

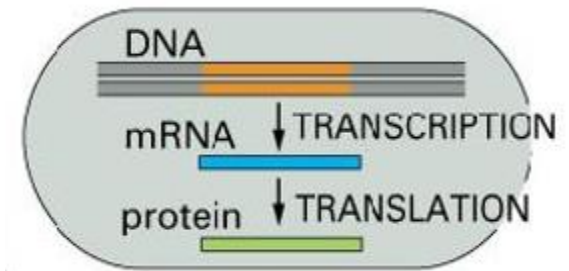
Tradução: decodificação da linguagem de ácido nucleico para polipeptídeo

Deise Schroder Sarzi

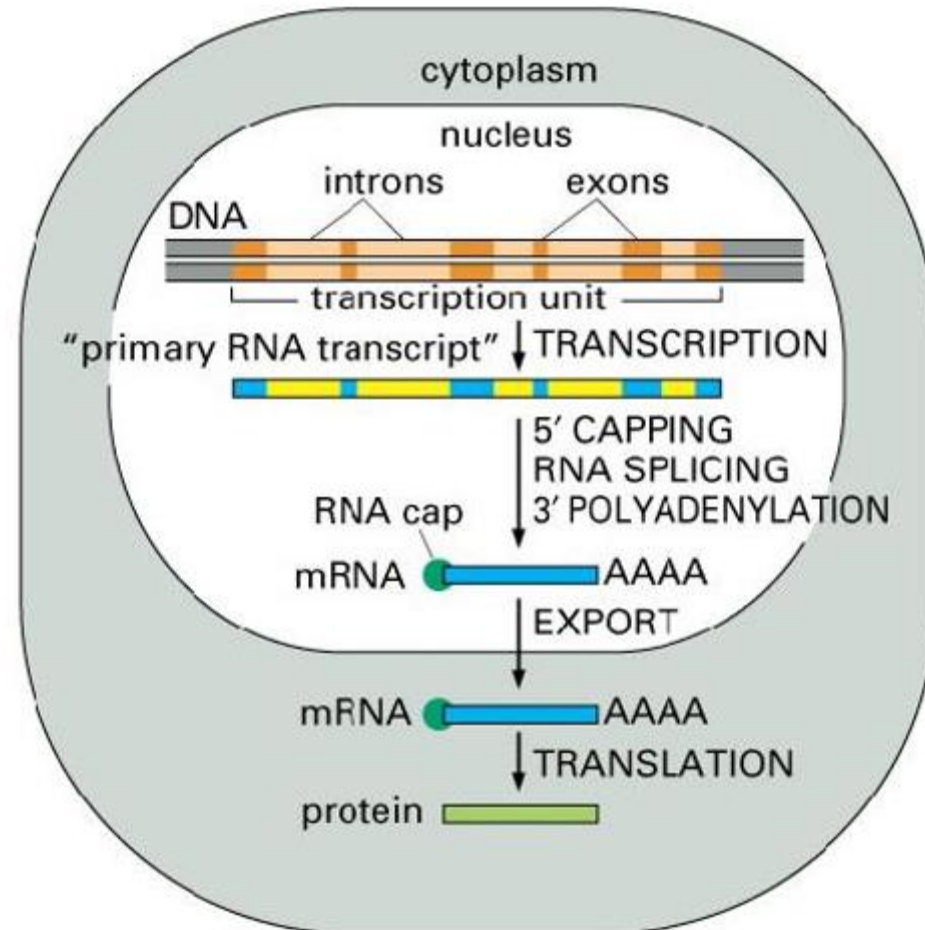
Tradução

- Proteínas são os produtos finais da maioria das vias de informação
- São necessárias para o funcionamento da célula
- Síntese protéica chega a consumir 90% do total de energia utilizada por uma célula para reações biossintéticas

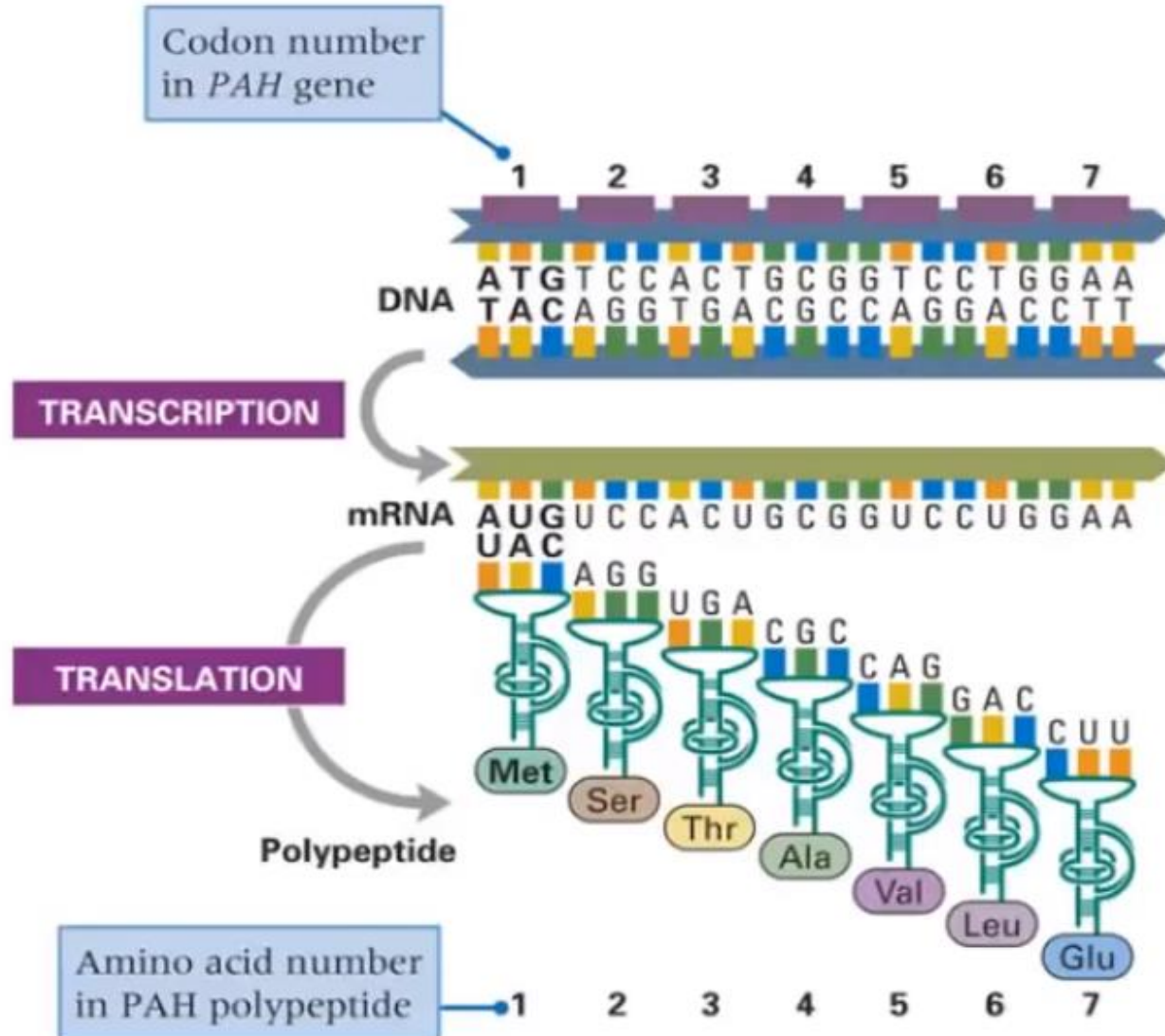
Procariotos:



Eucariotos:

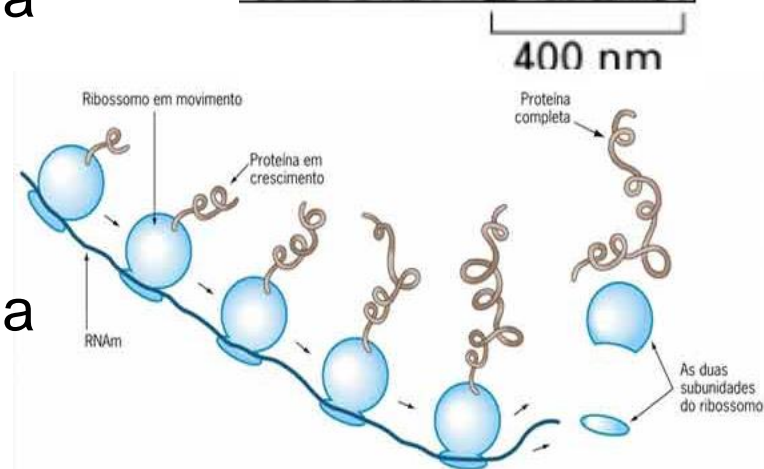
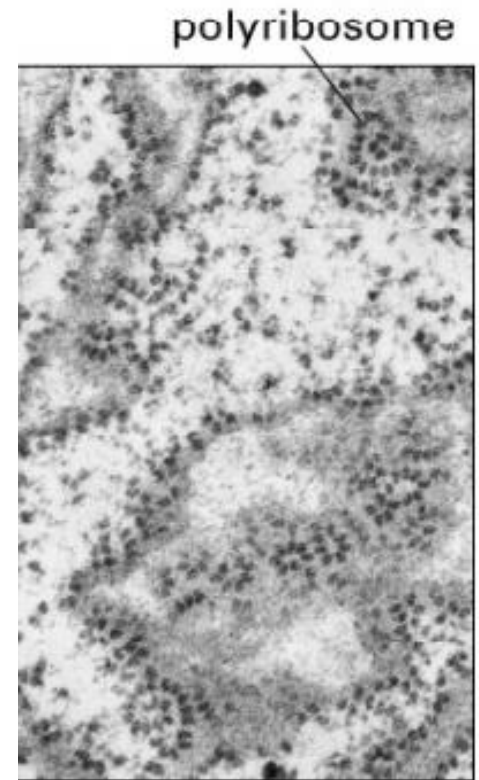


Dogma Central



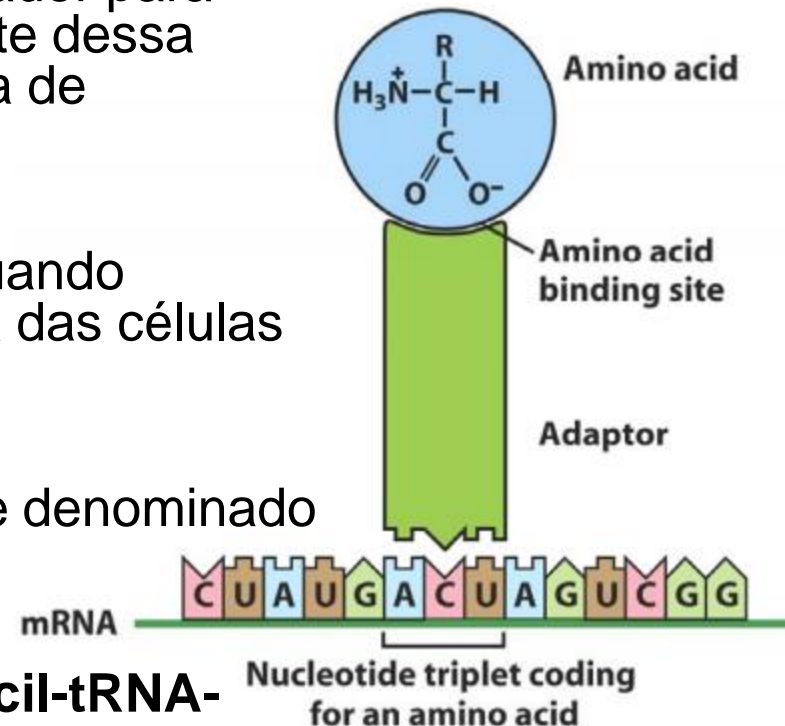
Onde as proteínas são sintetizadas na célula?

- Paul Zamecnik, em 1950
- Injeção de aa radioativos em ratos e acompanharam a síntese em diferentes tempos a partir de homogeneizados do fígado
- Após 2h todas as células continham proteínas marcadas
- Após alguns minutos, porém, apenas uma **fração citosólica** apresentava proteínas marcadas, e era composta por ribonucleoproteínas: o **ribossomo**
- Puderam ser visualizados em microscopia eletrônica

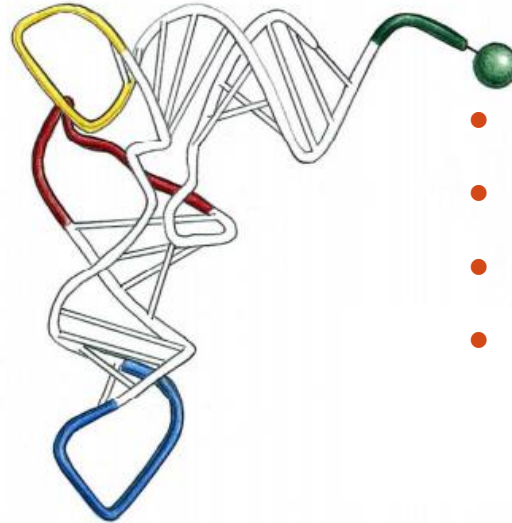
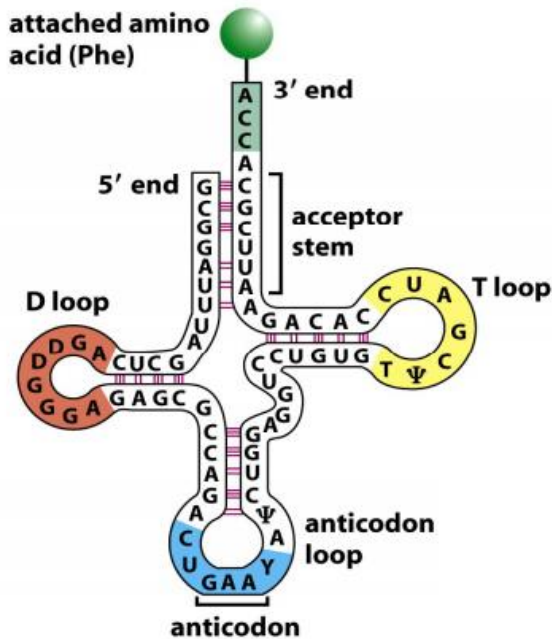


tRNA funciona como adaptador

- Francis Crick: como **4 letras** de DNA codificam **20aa**?
- Uma molécula (RNA?) atuando como adaptador para ligar um aa específico, enquanto a outra parte dessa pequena molécula reconheceria a sequência de nucleotídeos que codifica para aquele aa
- Zamecnik e Hoagland: **aa eram ativados** quando incubados com **ATP** e com a parte citosólica das células hepáticas
- Os aa se ligavam a um RNA (posteriormente denominado tRNA) para formar um **aminoacil-tRNA**
- Esse processo era catalisado pelas **aminoacil-tRNA-sintases**
- O tRNA adaptador traduz a sequência nucleotídica de um mRNA = **TRADUÇÃO!**

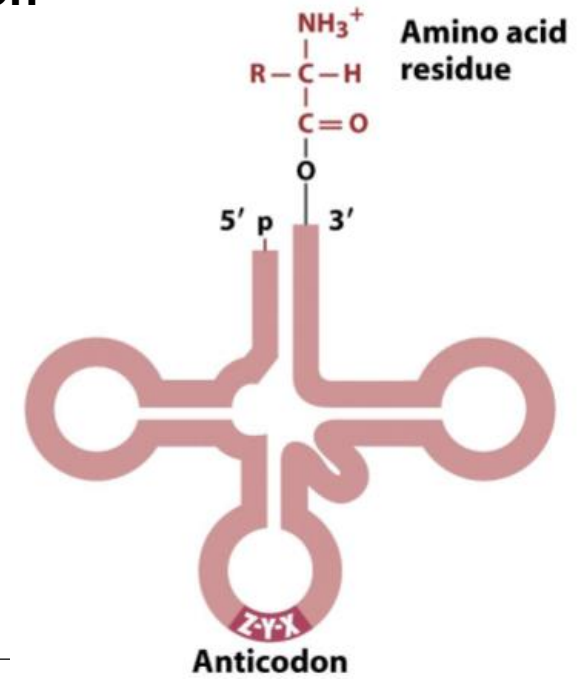


tRNA é o adaptador de Crick



- 2D- estrutura em **trevo de quatro folhas**
- 3D- estrutura em forma de **L torcido**
- Todos têm a sequência **CCA3'**
- Braço do aa: carrega o aa específico
- Braço do anticódon: contém o **anticódon**

- Consistem em uma fita de RNA dobrada em uma estrutura 3D precisa
- Contém entre 73 e 93 nucleotídeos
- Pelo menos 32 tRNAs são necessários para reconhecer todos os códons de aa



Decifrando o código genético

- Quatro letras do DNA e 20 aminoácidos
 - $4^2 = 16$ aa possíveis
 - $4^3 = 64$ aa possíveis
- **Códon:** trinca de nucleotídeos que codifica um aa específico
- Trincas são lidas de forma sucessiva e sem interrupção e sobreposição
- Primeiro códon estabelece a fase de leitura (3 fases de leitura possíveis)
- Cada fase apresenta uma sequência diferente de códons

Reading frame 1 5' ---

U	U	C
---	---	---

U	C	G
---	---	---

G	A	C
---	---	---

C	U	G
---	---	---

G	A	G
---	---	---

A	U	U
---	---	---

C	A	C
---	---	---

A	G	U
---	---	---

 --- 3'

Reading frame 2 ---

U

U	C	U
---	---	---

C	G	G
---	---	---

A	C	C
---	---	---

U	G	G
---	---	---

A	G	A
---	---	---

U	U	C
---	---	---

A	C	A
---	---	---

G	U
---	---

Reading frame 3 ---

U	U
---	---

C	U	C
---	---	---

G	G	A
---	---	---

C	C	U
---	---	---

G	G	A
---	---	---

G	A	U
---	---	---

U	C	A
---	---	---

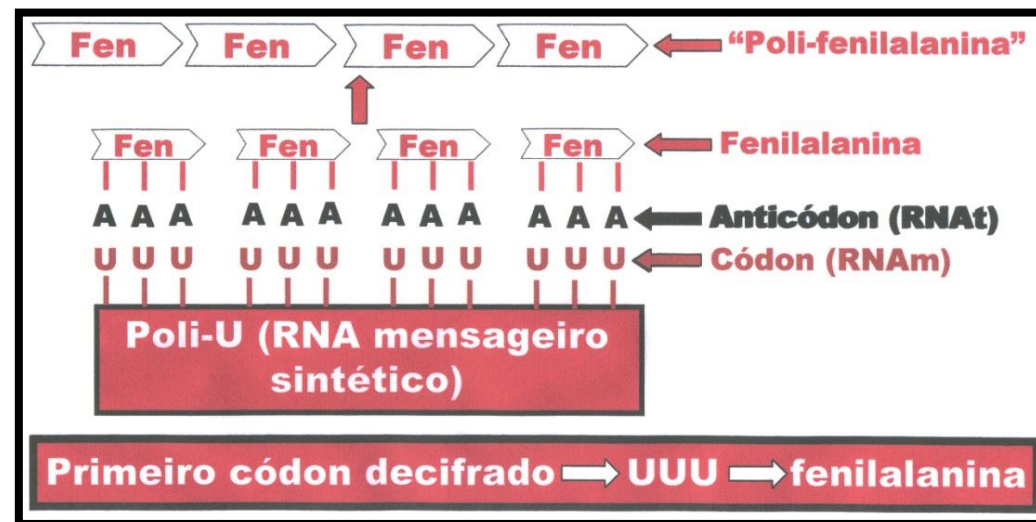
C	A	G
---	---	---

U

- Ficava a dúvida: quais eram as 3 letras em código para cada aa?

O código genético foi decifrado usando moldes artificiais de mRNA

- Marshall Nierenber e Heinrich Matthaei, 1961
- Incubaram poliU sintético em 20 tubos diferentes cada um com um dos aa marcados radioativamente em *E. coli*
- Polipeptideo radioativo foi formado apenas no tubo que continha fenilalanina radioativa
- Adotou a mesma abordagem para poliC (prolina) e poliA (lisina)



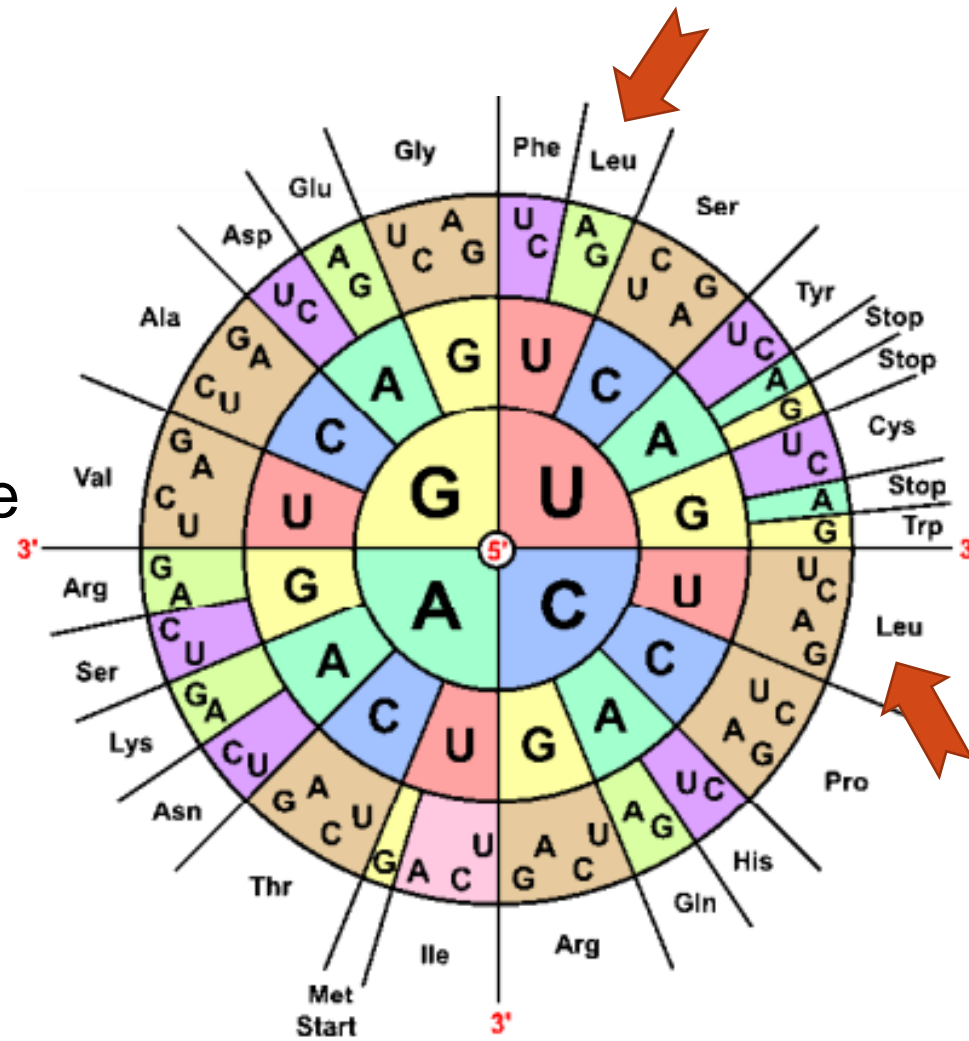
Decifrando o código

- Neierenberg e Leder, 1964: são os trinucleotídeos que promovem a ligação específica de tRNAs apropriados
- Os experimentos poderiam ser realizados com oligonucleotídeos sintetizados artificialmente!
- Khorana desenvolveu métodos químicos para sintetizar polipeptídeos com sequências repetidas de 2 ou 4 nucleotídeos.
- Ex: (AC)_x
- ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA
- Quantidades iguais de histidina e treonina
- Ex: Se já se sabia o códon para histidina (CAC), então treonina só pode ser o outro (ACA)

código genético decifrado (61 codons + 3 terminação)

O código genético: RNAm

- Degenerado : $4 \times 4 \times 4 = 64$
 - 61 (aminoácidos) 3 (stop códons)
- Universal (quase)
 - Variações são raras
 - AUG: geralmente códon de iniciação (metionina)
 - exceções: GUG (algumas bact) CUG (eucariotos)



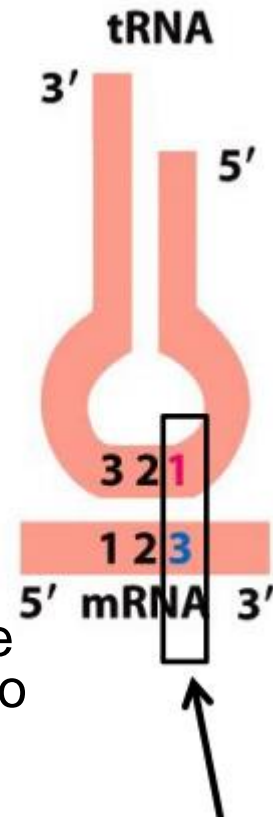
Código genético é degenerado

- **Especificidade:** um códon codifica sempre um aa específico
- **Redundância/degeneração:** um aa pode ser codificado por mais de um códon
- **Contínuo:** sempre lido de 3 em 3 bases
- **Universal**

		Segunda Base				
		U	G	A	G	
5' Primeira Base	U	UUU } Fenil-alanina UUC } UUA } Leucina UUG }	UCU } UCC } Serina UCA } UCG }	UAU } Tirosina UAC } UAA } Stop codon UAG } Stop codon	UGU } Cysteine UGC } UGA } Stop codon UGG } Tryptophan	3' Terceira Base U C A G U C A G U C A G U C A G
	C	CUU } Leucina CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Prolina CCA } CCG }	CAU } Histidina CAC } CAA } Glutamina CAG }	CGU } CGC } Arginina CGA } CGG }	
	A	AUU } Isoleucina AUC } AUA } AUG } Metionina start codon	ACU } ACC } Treonina ACA } ACG }	AAU } Asparagina AAC } AAA } Lisina AAG }	AGU } Serina AGC } AGA } Arginina AGG }	
	G	GUU } Valina GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Alanina GCA } GCG }	GAU } Ácido GAC } Aspártico GAA } Ácido GAG } Glutâmico	GGU } GGC } Glicina GGA } GGG }	

Oscilação permite que alguns tRNAs reconheçam mais de um códon

- tRNAs pareiam a sequência de 3 bases com o **anticódon**
- Precisaríamos de um tRNA para cada códon de aa
- Não é isso que ocorre.
- Crick criou a hipótese da oscilação: **3º base “oscila”**, se pareia de maneira mais frouxa
- Quando uma mutação ocorre na 3ª base do códon, que é a base oscilante, isso acarretará em uma mudança no aa codificado em apenas 25% dos casos
- **Mutações silenciosas:** o nucleotídeo é diferente mas o aa permanece o mesmo



**Posição wobble
(pendular)**

Códon de iniciação e de parada

- Iniciação: **AUG** (metionina) – sinal para o início para a síntese de um polipeptídeo
- Códon de parada: (**UAA, UAG, UGA**) – não codificam aa
- Se a fase de leitura de alguma forma pular um nucleotídeo, todos os códons subsequentes estarão distorcidos
- **OBS:** os experimentos para identificar a função dos códons não deveriam ter funcionado sem os códons de iniciação: **Sorte no azar!**

Open Reading Frames (ORFs)

- Sequências aleatórias de nucleotídeos normalmente apresentam 1 códon de parada a cada 20 códons
- Quando não há códons de parada por mais de 50 códons contínuos, considera-se uma ORF.
- Longas fases de leitura sem stop códons normalmente correspondem a genes que codificam proteínas!

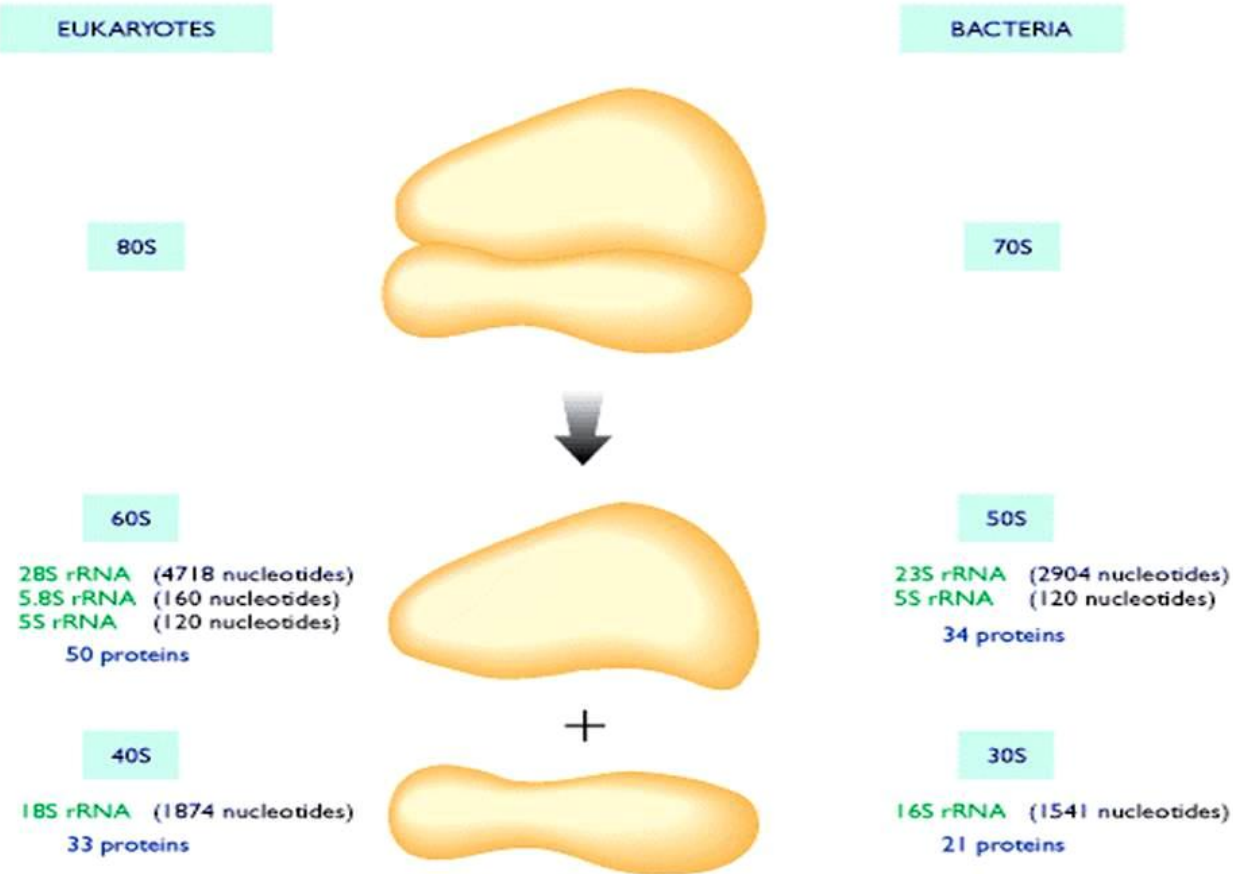


Síntese proteica – estágios

- **Ativação de aa:** ligação do aa ao tRNA – aminoacilação (ocorre no citosol), cada um dos 20 aa é ligado ao tRNA correspondente e essa ligação **requer ATP**
- **Iniciação:** o mRNA se liga a subunidade menor do ribossomo e ao tRNA iniciador carregado. Após, a subunidade maior do ribossomo se liga para formar o complexo
- **Alongamento:** o tRNA carregado entra no ribossomo e ocorre a adição de unidades sucessivas de aa à medida que o ribossomo se movimenta
- **Término:** reconhecimento de códon de parada no mRNA
- **Enovelamento:** dobramento tridimensional do polipeptídeo gerado, que pode ser auxiliado por enzimas ou outros processos

Ribossomos

- Constituem quase $\frac{1}{4}$ do peso seco da célula
- São compostos por duas subunidades
- Duas subunidades se encaixam de modo a formar uma fenda para o mRNA



S: Svedberg units

Estrutura do ribossomo

- Ribossomos têm 3 sítios de ligação de tRNA:
 - Sítio aminoacil (A)
 - Sítio peptidil (P)
 - Sítio de saída (E)

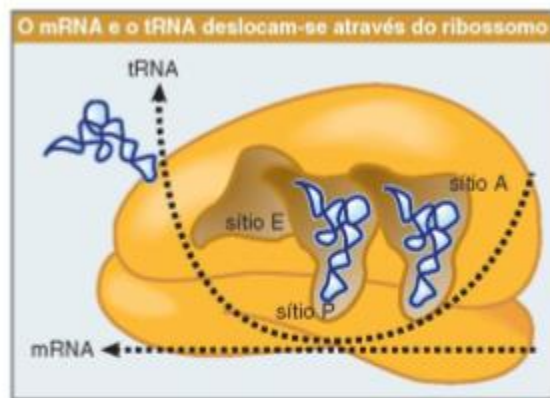
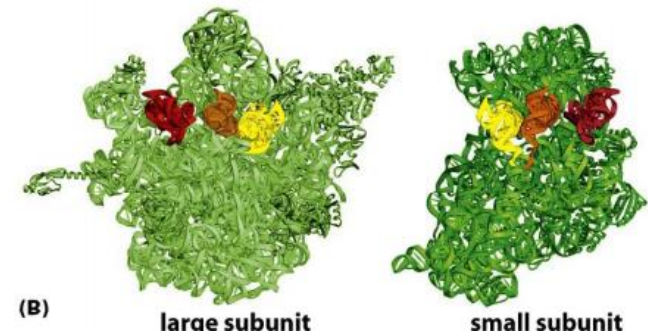
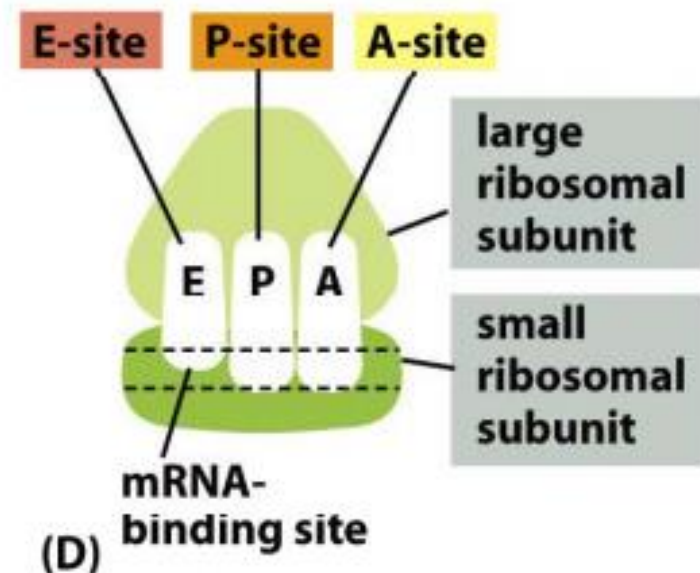


FIGURA 8.6 O tRNA e o mRNA deslocam-se através do ribossomo, na mesma direção.



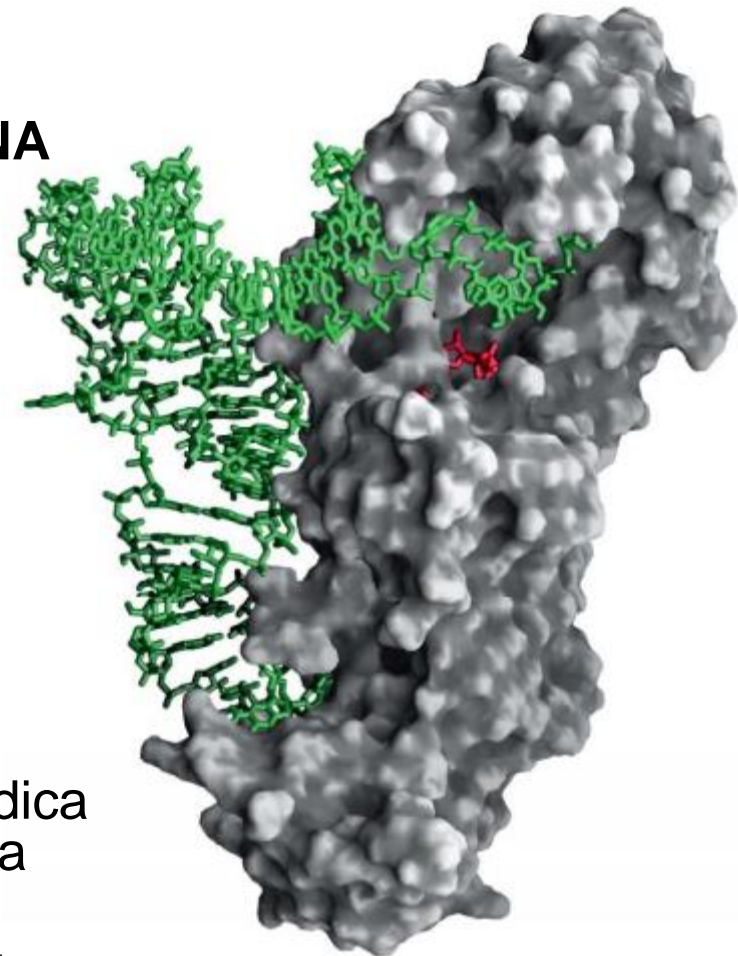
Ribossomos de eucariotos não tem sítio E*

- A e P ligam aminoacil tRNAs, enquanto E liga tRNAs não carregados

Reconhecimento de tRNAs por suas aminoacil-tRNA-sintetase

Segundo código genético

- Na primeira etapa da síntese, no citosol, **esterificam os 20 aa aos seus tRNAs**
- Cada enzima é **específica para um aa ou tRNA** correspondente
- Para aa com dois ou mais tRNAs correspondentes a mesma enzima pode aminoacilar
- Para cada molécula de aa ativada **são gastos duas ligações de fosfato** de alta energia (**2ATPs**)
- Tem função de ativar o aa para a ligação peptídica e de garantir o posicionamento adequado do aa no polipeptídeo nascente

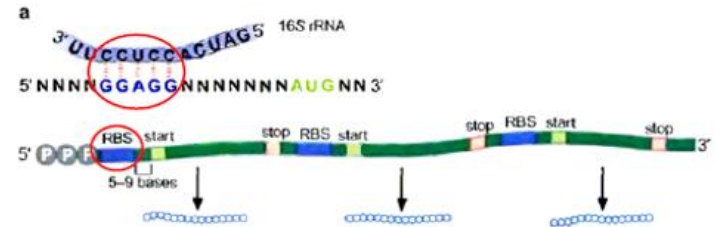


Início da síntese

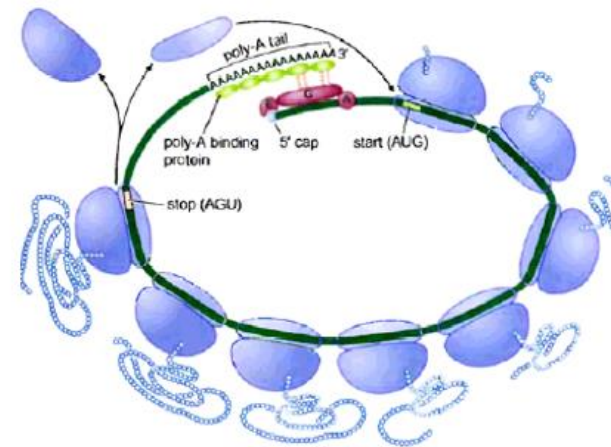
- Síntese começa na **extremidade aminoterminal** (AUG – metionina aminoterminal) e segue na direção carboxiterminal
- Todos os organismos tem dois tRNAs para metionina – um para posições internas e um para o códon de início

Prokarya X Eukarya

RNA policistrônico
Operon



RNA monocistrônico
interação entre proteínas
que se ligam a cauda
poliA e proteínas do
Complexo de Iniciação

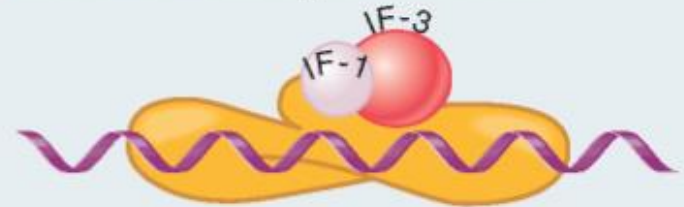


Início em bactérias

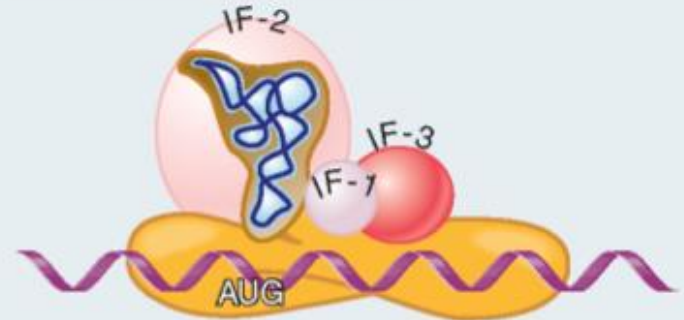
- Subunidade **30S** do ribossomo se liga a dois fatores de iniciação (**IF-1 e IF-3**).
- **IF-3** impede que a subunidade **50S** e 30S se combinem **prematuramente**
- mRNA se liga ao 30S
- O 5'AUG iniciador é guiado até sua posição correta pela **sequência de Shine-Dalgarno** (consenso com 8-13 bases de purina) presente no mRNA
- O AUG de início é distinguido dos demais AUGs pela sua proximidade com a sequência Shine-Dalgarno
- Os 3 IFs saem do ribossomo
- Ao final, ribossomo funcional **70S**

A iniciação requer fatores e subunidades livres

1 A subunidade 30S liga-se ao mRNA



2 IF-2 conduz o tRNA ao sítio P



3 IFs são liberados e a subunidade 50S associa-se

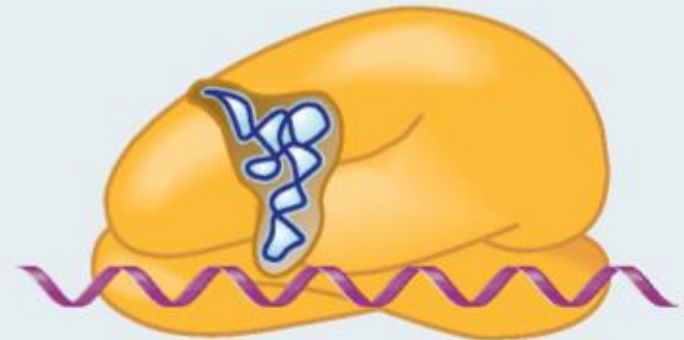
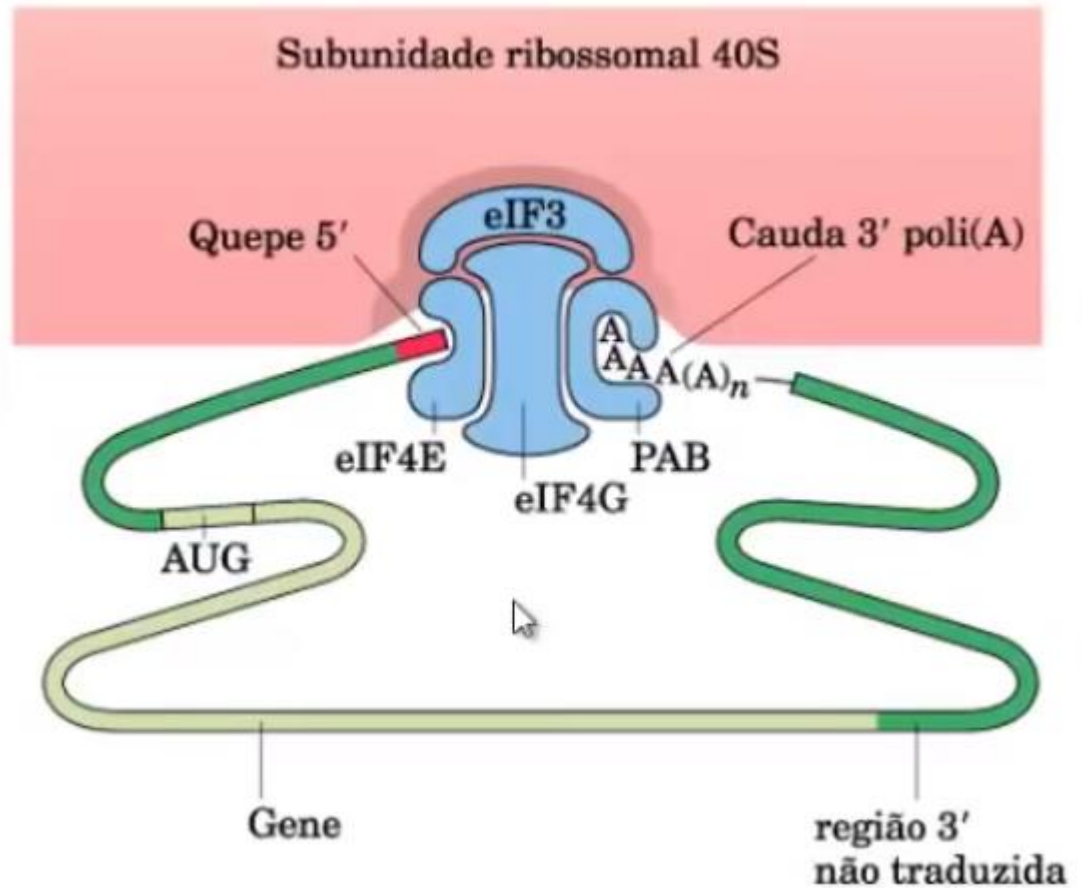


FIGURA 8.10 Os fatores de iniciação estabilizam as subunidades 30S livres e ligam o tRNA iniciador ao complexo 30S-mRNA.

Início eucariotos

- Não possuem sequência consenso de Shine-Dalgarno
- Apresentam CAP 5' e cauda poliA que vão ser reconhecidas por sequências ribossomais e vão posicionar o códon de iniciação no sítio P



Alongamento – ligações peptídicas

- Requer:
- Complexo de iniciação
- Aminoacil-tRNA
- Fatores de alongamento:
3 proteínas citosólicas
(EF-Tu, EF-Ts, EF-G)
- GTP

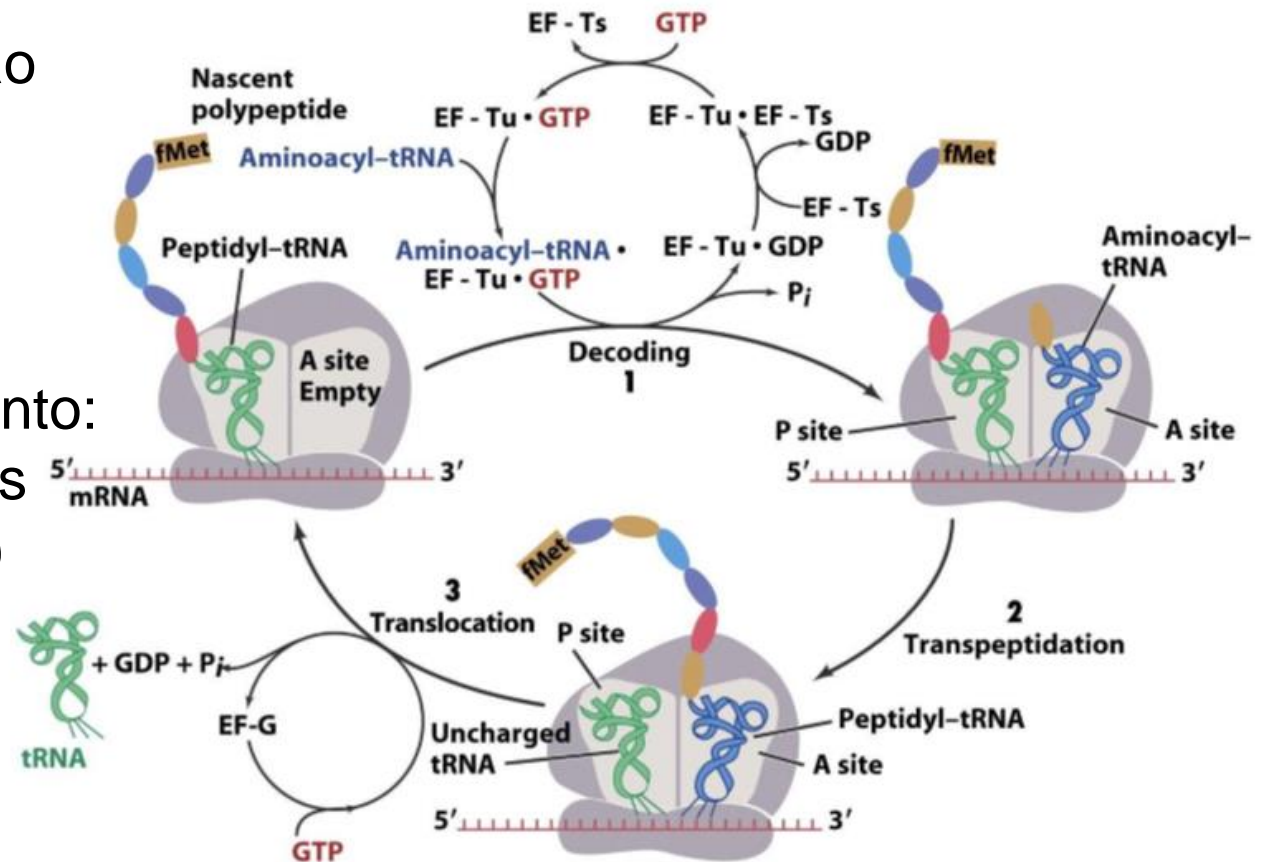
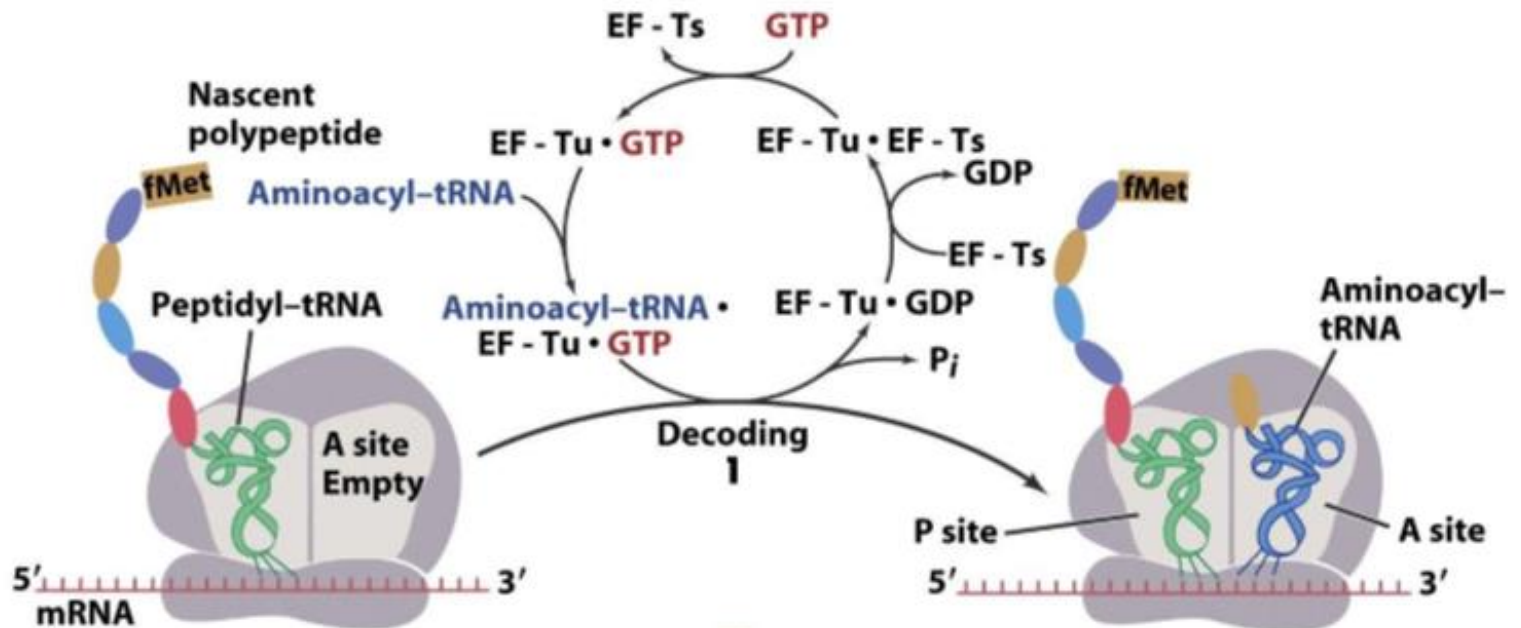


Figure 26-29 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

O processo

- Ligação de um **aminoacil-tRNA** apropriado à um complexo **EF-Tu+GTP**
- Esse complexo se liga ao **sítio A** do ribossomo e o **GTP** é **hidrolisado**
- Complexo **EF-Tu-GDP** é **liberado** do ribossomo



Ligação peptídica

- Uma ligação peptídica é formada entre os dois aa ligados por seus tRNAs, aos sítios A e P
- **Dipeptídeo no sítio A** e o sítio P não está mais com o tRNA carregado
- A ligação peptídica é catalisada pelo **rRNA 23S (peptidil transferase)**

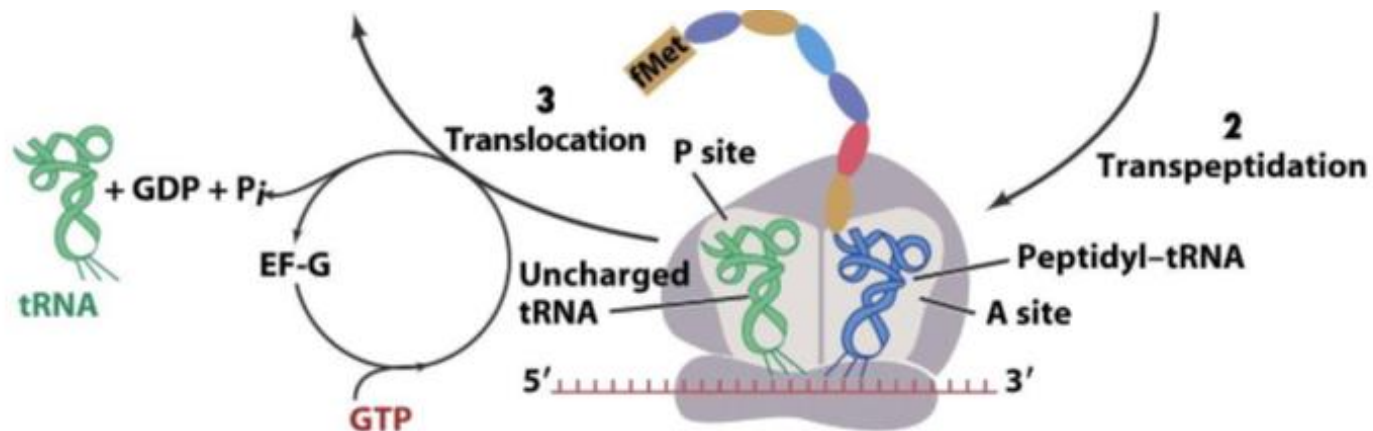


Figure 26-29 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

Translocação

- Ribossomo se move em direção à extremidade 3' do mRNA
- Isso move o dipepdil-tRNA do sítio A para o sítio P e move o o **tRNA descarregado do sítio P para o E**, o qual é então liberado para o citosol
- O movimento do ribossomo ao longo do mRNA requer **uma translocase (EF-G)** e a energia fornecida pela **hidrólise de GTP**
- O polipeptídeo permanece ligado ao tRNA do último aa inserido

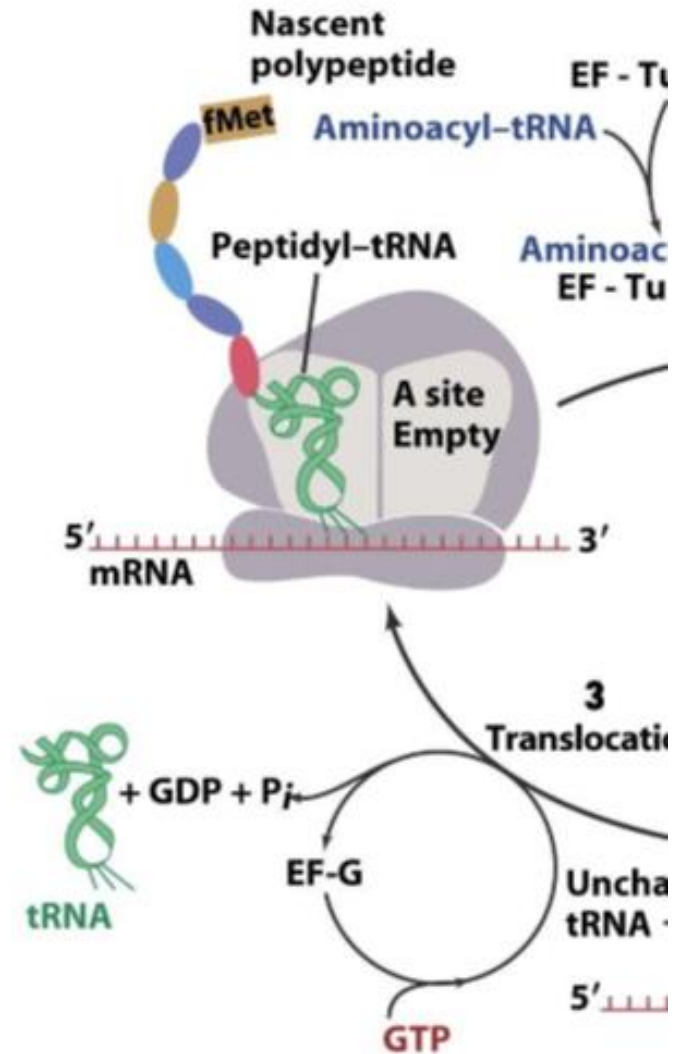
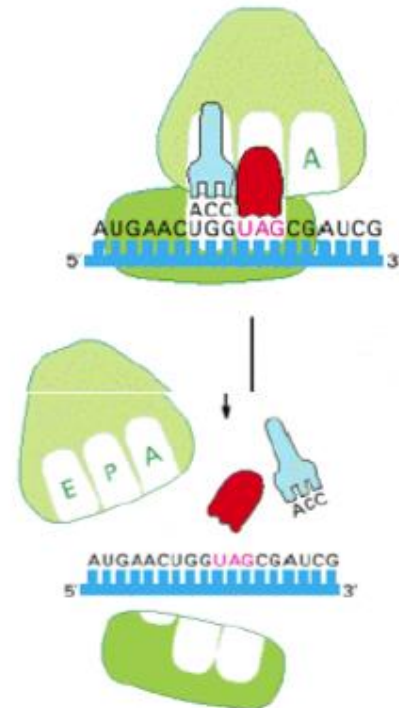
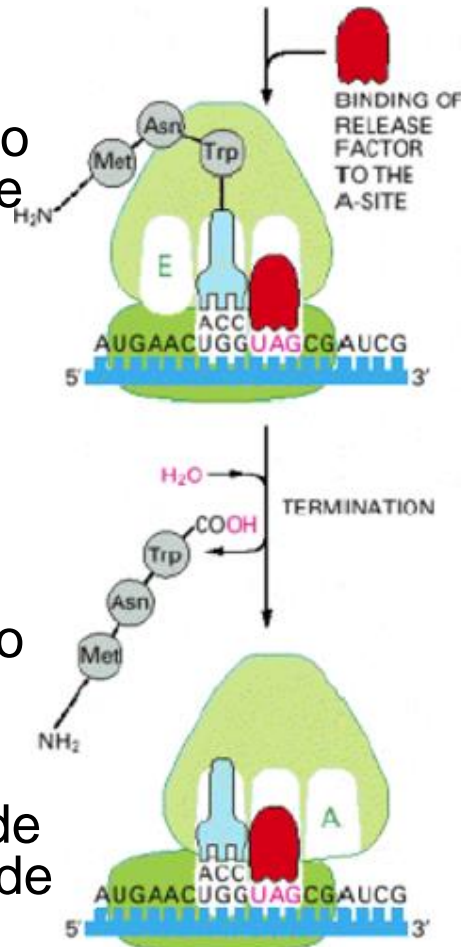


Figure 26-29 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

Término

- O alongamento continua até atingir um dos códons de parada no mRNA:
 - UAA, UAG, UGA
- Quando um desses códons ocupa o sítio A do ribossomo há 3 fatores de término:
 - **RF1** reconhece UAG e UAA
 - **RF2** reconhece UGA e UAA
- Ligam-se ao códon de parada e induzem a **peptidil-transferase** a transferir o polipeptídeo nascente para uma molécula de água e não para outro aa
- Em **eucariotos** há um único fator de término que reconhece os códons de parada: **eRF**



Reciclagem do ribossomo

- Fatores de término se dissociam do complexo
- São substituídos pelo **EF-G** e pela proteína **RRF** (fator de reciclagem do ribossomo)
- **Hidrólise de GTP** pelo EF-G faz a subunidade 50S dissociar do complexo 30S-tRNA-mRNA
- EFG e RRF são substituídos por **IF3**, que promove a **dissociação do tRNA e mRNA**
- Complexo IF-3+30S está pronta para iniciar outro ciclo de síntese protéica

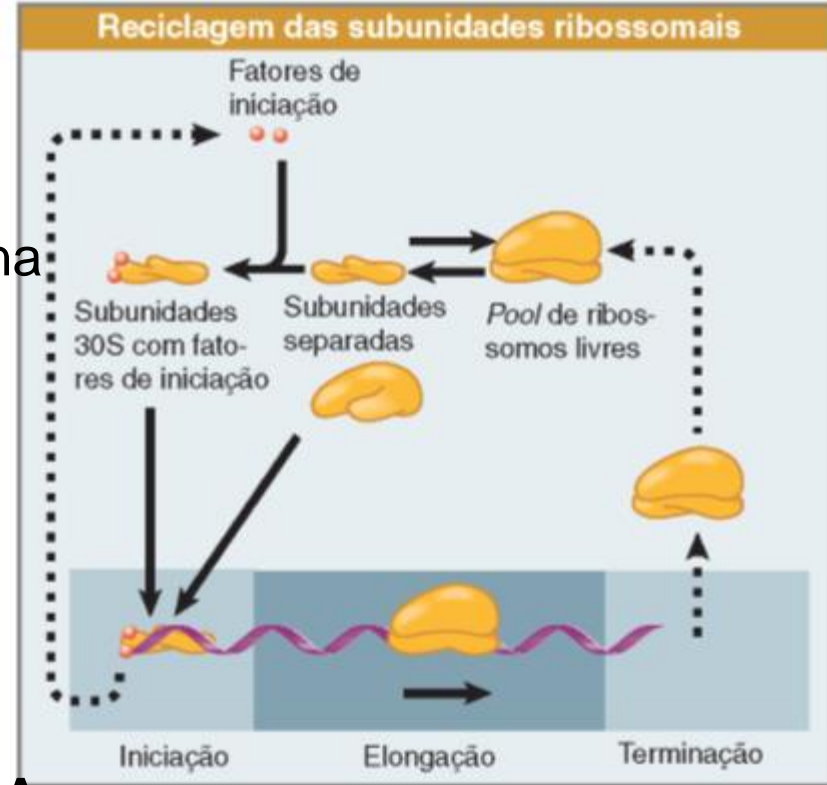
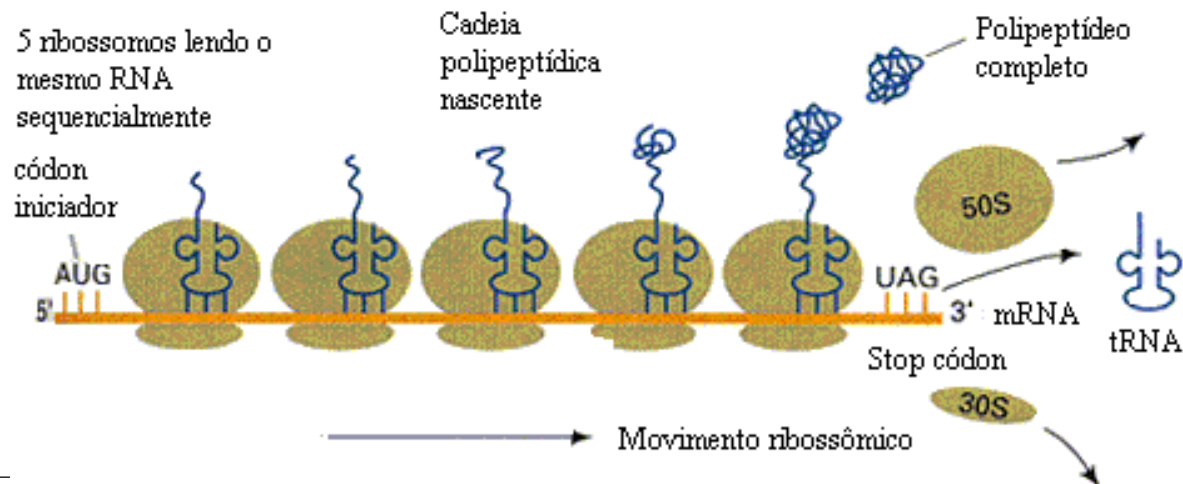
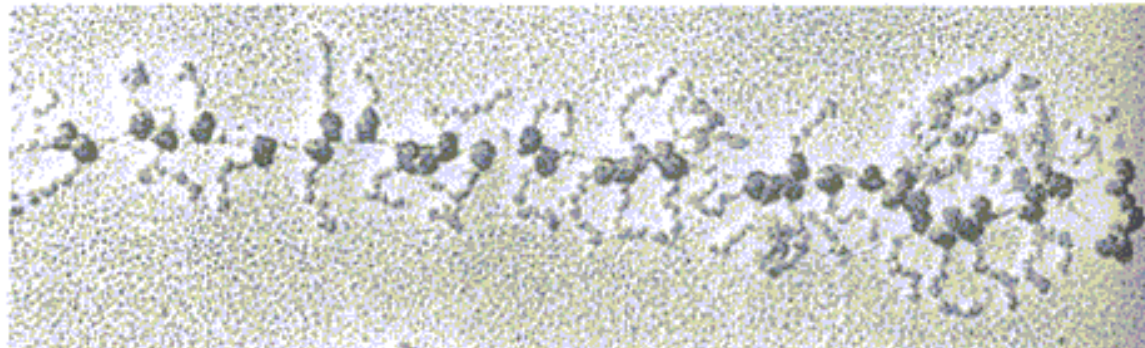


FIGURA 8.9 A iniciação requer subunidades ribossomais livres. Quando os ribossomos são liberados na terminação, as subunidades 30S ligam-se a fatores de iniciação e dissociam-se, gerando subunidades livres. Quando as subunidades se reassociam na iniciação, originando um ribossomo funcional, os fatores são liberados.

Polissomos

- Conjuntos de 10 a 100 ribossomos atuando simultaneamente na síntese proteica de um mRNA, permitindo o uso altamente eficiente desse mRNA
- Tradução é feita no sentido 5'→3'



Custo energético da síntese protéica

Formação de aminoacil-tRNA: 2 ATPs

Atividade hidrolase da aminoacil-t-RNA sintetase com tRNA incorreto: 1 ATP

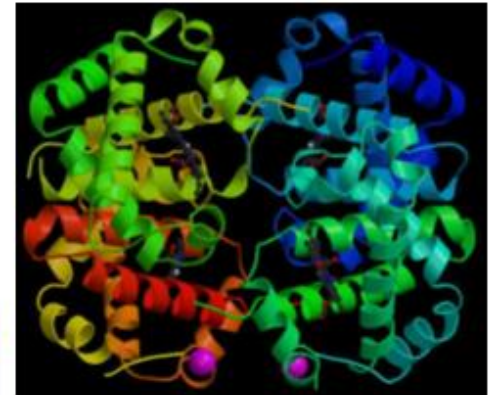
Primeira etapa de alongamento: 1 GTP

Translocação: 1 GTP

Para cada ligação peptídica são necessários: 4 NTPs (122 Kj/mol) → a hidrólise de uma ligação peptídica gera 21 Kj/mol

Proteínas são importantes para uma infinidade de funções!

Chaperonas I



Proteínas desenoveladas ligam-se a chaperonas



FIGURA 10.10 As proteínas emergem do ribossomo, ou da passagem através da membrana, em um estado desenovelado que atrai chaperonas que se ligam e protegem as proteínas do enovelamento incorreto.

Chaperoninas enovelam seus substratos internamente



As chaperonas controlam as interações no enovelamento de proteínas

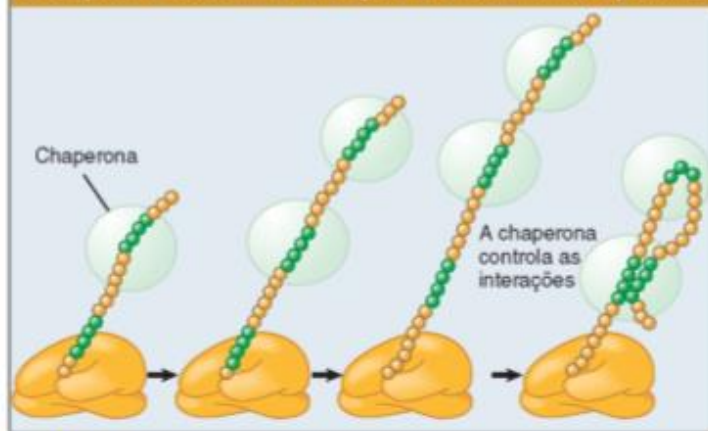
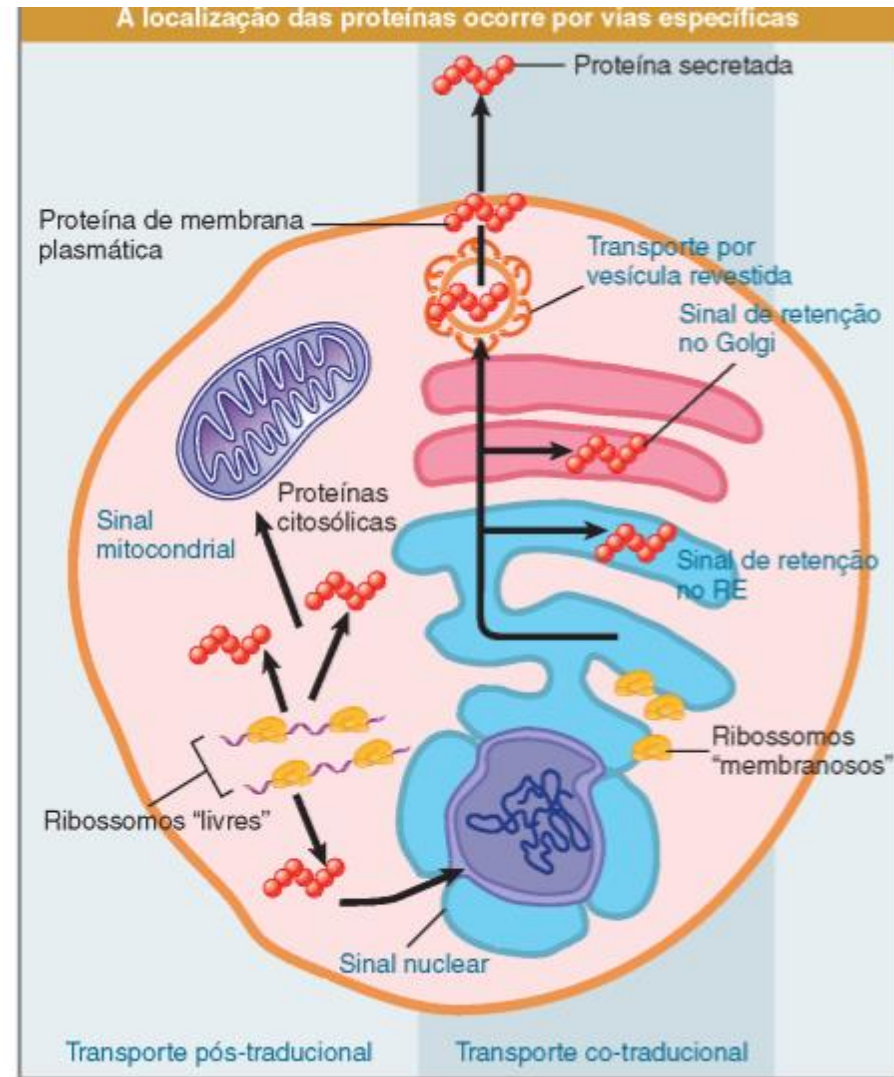
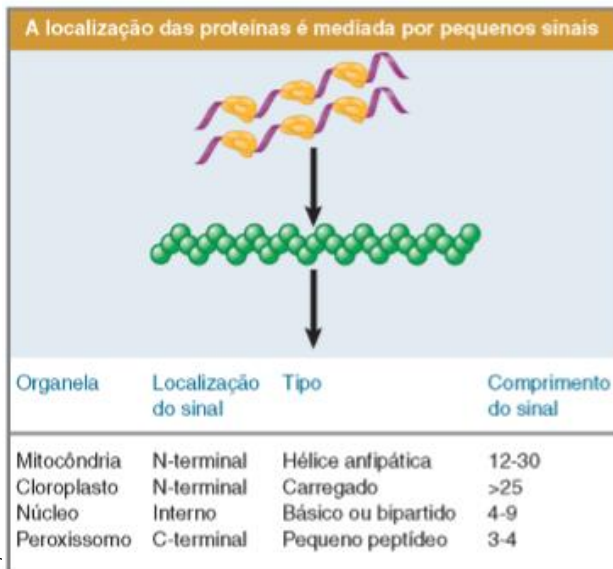


FIGURA 10.8 As chaperonas ligam-se a regiões interativas das proteínas à medida que estas são sintetizadas, impedindo a agregação aleatória. Regiões da proteína são liberadas para interagir de forma ordenada, resultando na conformação adequada.

- Complexo protéico que auxilia na montagem da estrutura 3D de uma proteína

Modificações pós traducionais

- Formação de ligações dissulfeto/dobramento
- Clivagem da cadeia
- Fosforilação
- Glicosilação
- Metilação/Acetilação
- Adição de grupos prostéticos

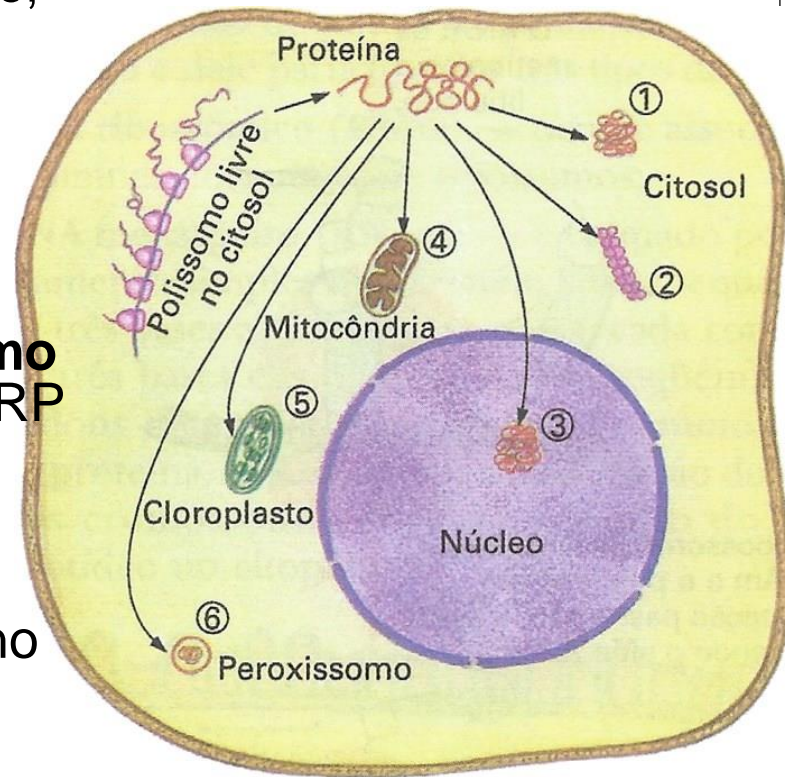


Proteína pronta: e agora??

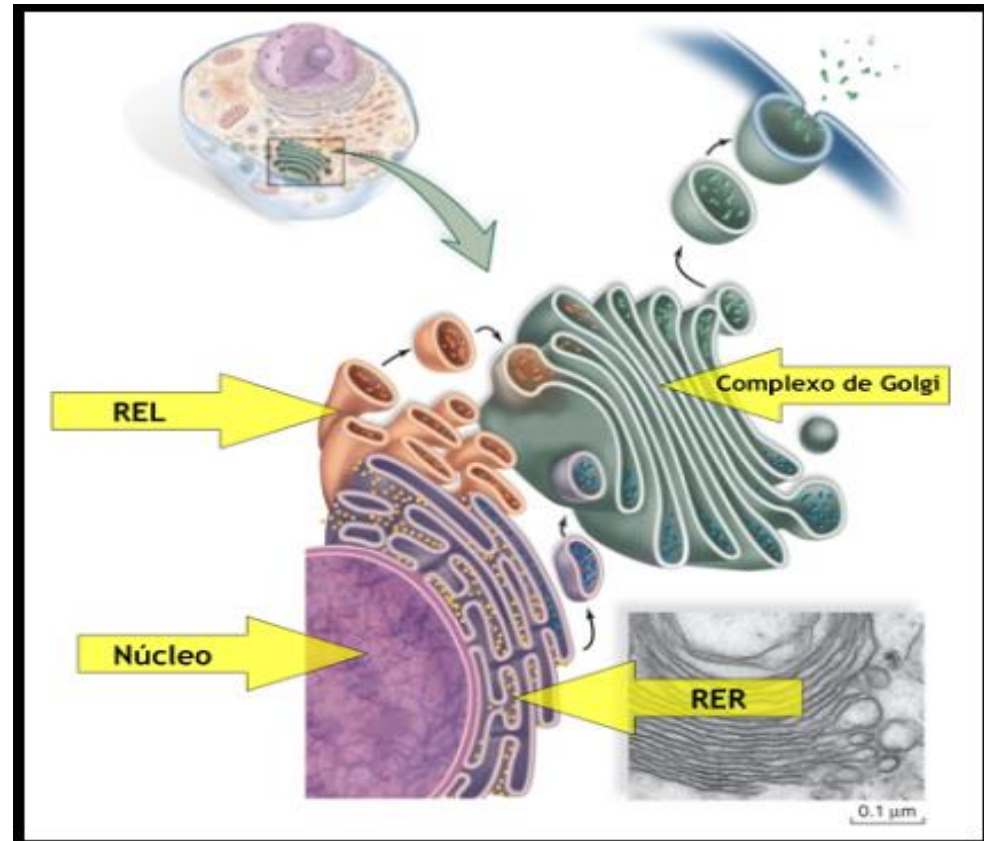
Endereçamento e degradação de proteínas

- Célula tem muitos compartimentos com funções específicas que necessitam de proteínas específicas
- Proteínas destinadas ao citosol permanecem onde são sintetizadas
- Muitas modificações pós traducionais tem início no retículo endoplasmático (RE):
 - proteínas de membrana, lisossomais e secretadas
- Em geral tem uma **sequência sinal N-terminal de 16-36 nt** que marca para o **transporte para o RE**
- Lado **carboxil** tem um **sítio de clivagem** que remove essa sequência após sua importação para o RE

- Sequência sinal direciona o ribossomo para o RE
 - (sequência sinal aparece no início da síntese, pois está na porção N-terminal)
- Sequência sinal e o ribossomo se ligam a **partícula de reconhecimento sinal (SRP)**
- SRP se liga ao GTP e **direciona o ribossomo** ainda ligado ao mRNA para os receptores SRP presentes **no lado citosólico do RE**
- O polipeptídeo nascente é levado para o **complexo de translocação de peptídeos** no RE
- O alongamento do polipeptídeo continua associado à esse complexo, levando o peptídeo para dentro do lúmen do RE até que toda a proteína tenha sido sintetizada
- A **sequência sinal é removida**, o ribossomo dissocia-se e é reciclado



- Proteínas vão do RE para o **complexo de golgi** para serem transportadas dentro de **vesículas** para seus destinos adequados
- Distinção do destino das proteínas é com base em **características estruturais** já que a sequência sinal já se dissociou



Sequências sinal para transporte **nuclear** não são clivadas

- Envelope nuclear é rompido a cada divisão celular e depois reestabelecido
- Nesse processo, proteínas nucleares dispersam e precisam ser importadas novamente para o núcleo
- **Sequência de localização nuclear (NLS)** não é removida depois que a proteína atinge seu destino e isso permite a importação repetidas vezes

Síntese proteica é inibida por antibióticos e toxinas

- Tetraciclinas bloqueiam o sítio A do ribossomo
- Estreptomicina causa leitura errada do código genético
- Cloranfenicol bloqueia a peptidil-transferase
- Ricina – proteína tóxica presente na mamona: inativa a subunidade 60S dos ribossomos de eucariotos

