

Tradução (síntese de proteínas)

Rafael H.F. Valverde

valverde@biof.ufrj.br

Lab. de Biomembranas G-37

Biologia Celular para Nanotecnologia
IBCCF^o UFRJ

Abril - 2022



O Código Genético

sequencia de **nucleotídeos** do **mRNA** é lida em **códons**

GCA GCC GCG GCU	AGA AGG CGA CGC CGG CGU	GAC GAU	AAC AAU	UGC UGU	GAA GAG	CAA CAG	GGA GGC GGG GGU	CAC CAU	AUA AUC AUU	UUA UUG CUA CUC CUG CUU	AAA AAG	AUG	UUC UUU	CCA CCC CCG CCU	AGC AGU UCA UCC UCG UCU	ACA ACC ACG ACU	UGG	UAC UAU	GUA GUC GUG GUU	UAA UAG UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

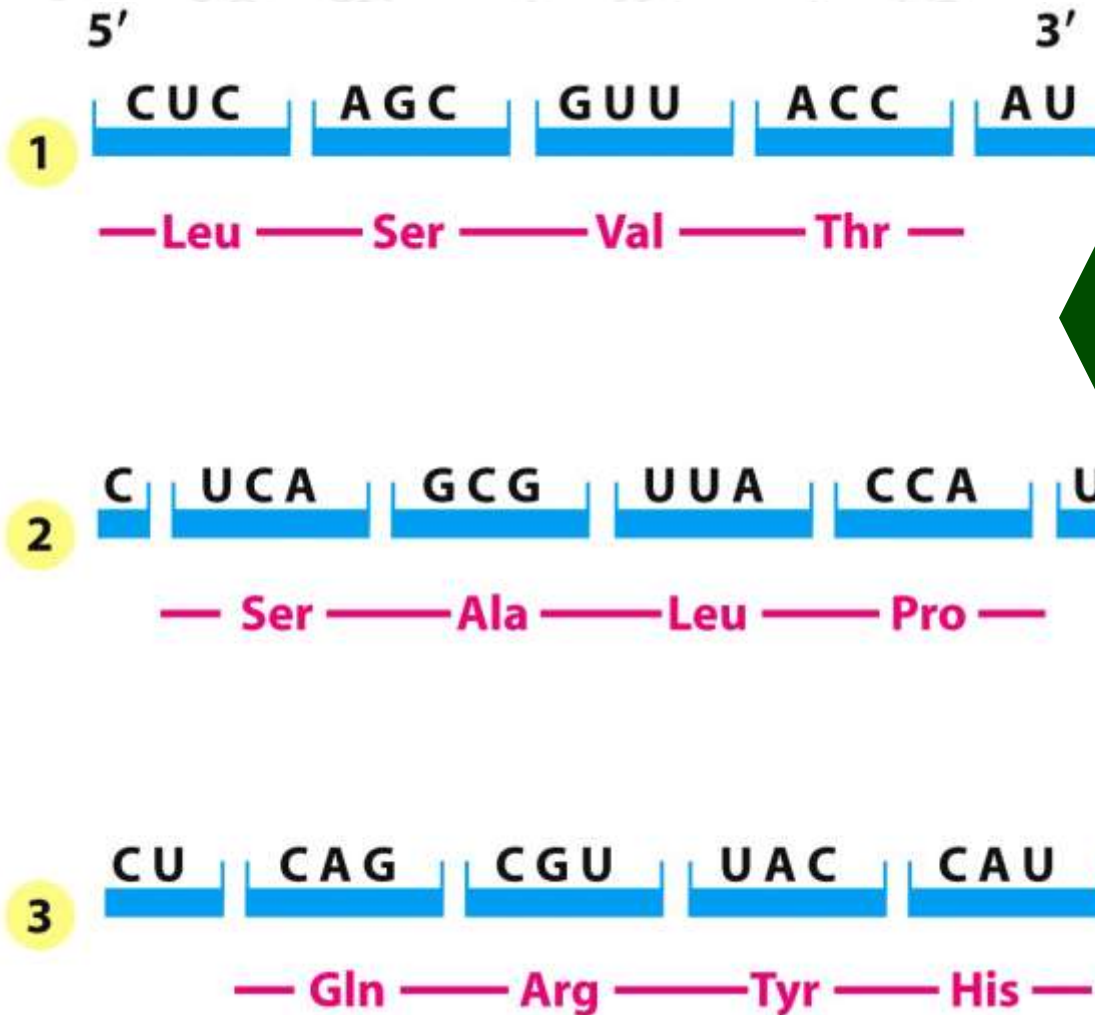
$4 \times 4 \times 4 = 64$ combinações possíveis

mas apenas 20 **aminoácidos** encontrados em **proteínas!**

aas codificados por mais de um triplete!

código universal (com algumas alterações em casos específicos)

Os três Possíveis Frames de Leitura na Síntese Proteica



RNA pode ser traduzido em um de três frames (quadros) de leitura possíveis

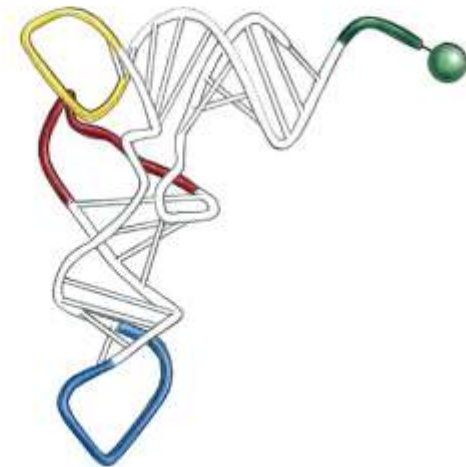
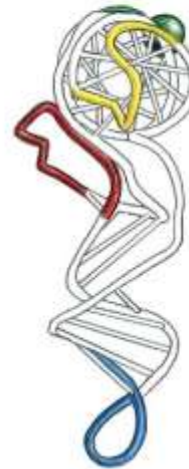
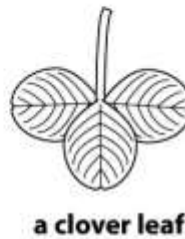
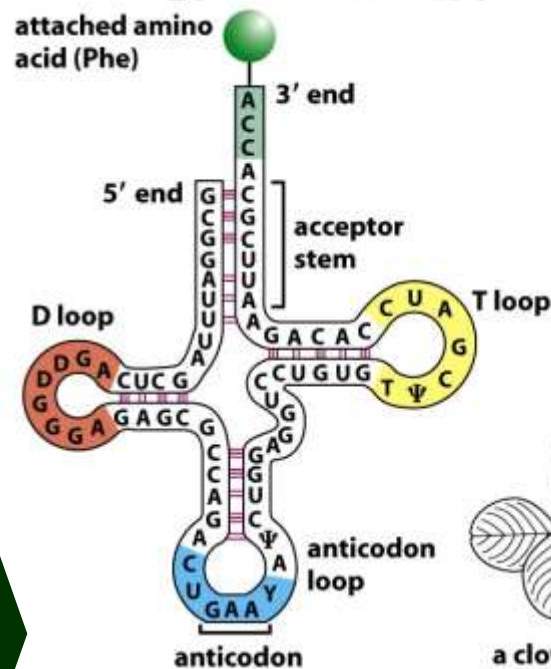
frame de leitura depende de onde começa a tradução

apenas um dos frames codifica a proteína funcional de interesse!

tRNA Emparelham Aminoácidos a Códons no mRNA

códons não reconhecem aminoácidos diretamente

tRNAs: RNAs adaptadores reconhecem **códons** e recrutam aminoácidos



anticódon **pareia** com o **códon** no mRNA

extremidade 3' se **liga** ao **aminoácido**

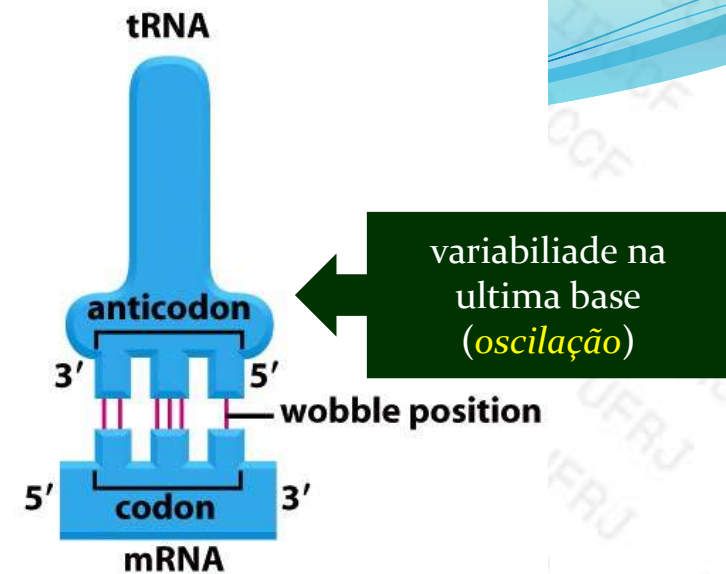
Pareamento de bases (oscilante) entre tRNA e mRNA

redundância do código: mais de um **tRNA** pra cada **aminoácido** ou **tRNAs** podem parear com mais de um **códon**?

alguns **tRNAs** requerem precisão apenas nas duas primeiras bases!!

em bactérias 61 **códons** diferentes reconhecidos por 31 **tRNAs** diferentes

Em humanos: 48 **anticodons** diferentes!



bacteria

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U or I
G	C or U

eucaryotes

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U
G	C

tRNAs são Modificados antes de Deixar o Núcleo



tRNAs sofrem *splicing* diferenciado catalisado por proteínas

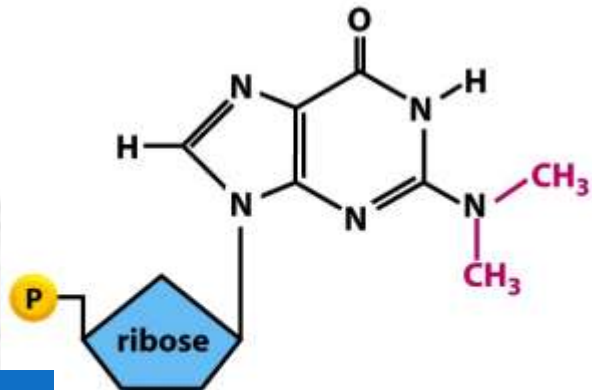
o “trevo” formado pelo tRNA é “podado” já em sua estrutura 3D

estrutura de uma endonuclease removendo um intron (azul) de um tRNA

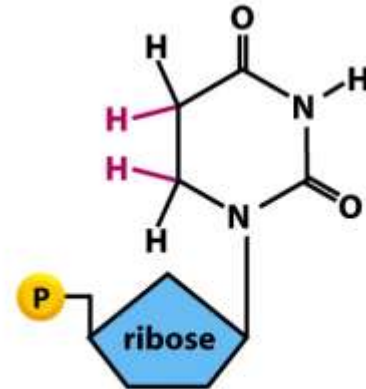
Alguns Nucleotídeos Pouco Comuns Encontrados em tRNAs

tRNAs são modificados quimicamente (1 em cada 10 nucleotídeos)

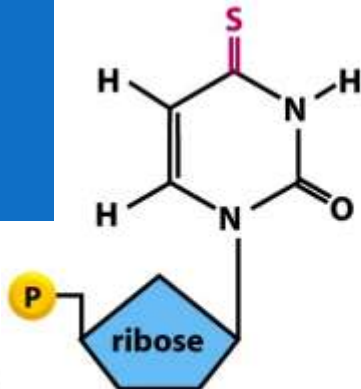
afetam conformação do tRNA, o pareamento no anticódon e com o aminoácido



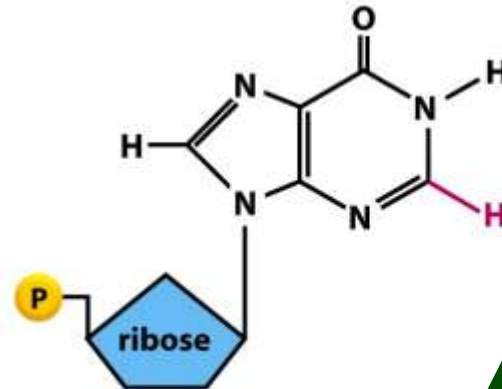
two methyl groups added to G
(*N,N*-dimethyl G)



two hydrogens added to U
(dihydro U)



sulfur replaces oxygen in U
(4-thiouridine)



deamination of A
(inosine)

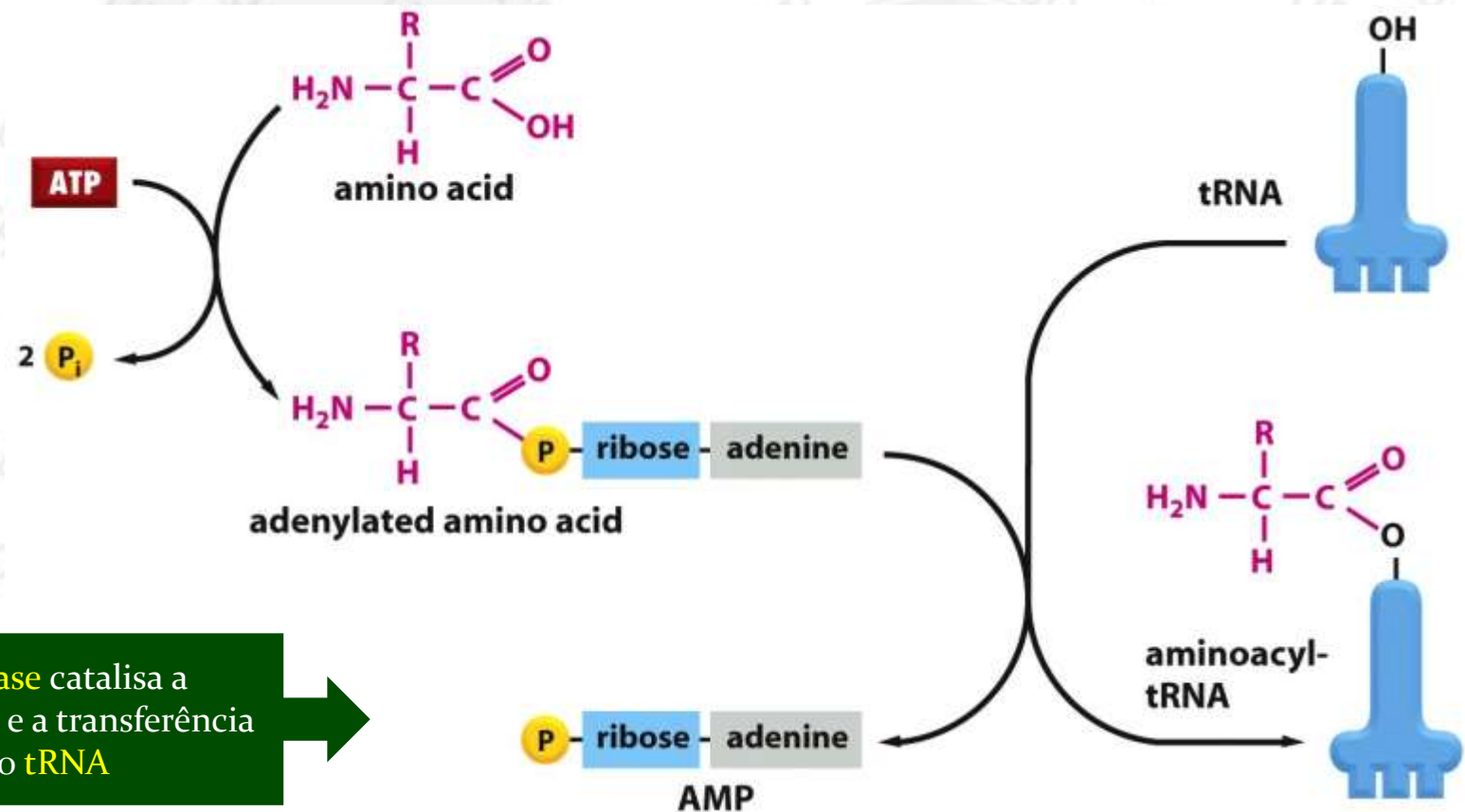
Inosina é gerada pela desaminação da adenina (reconhecimento de novos códons!)

Ativação dos Aminoácidos

como cada tRNA é associado ao aa apropriado?

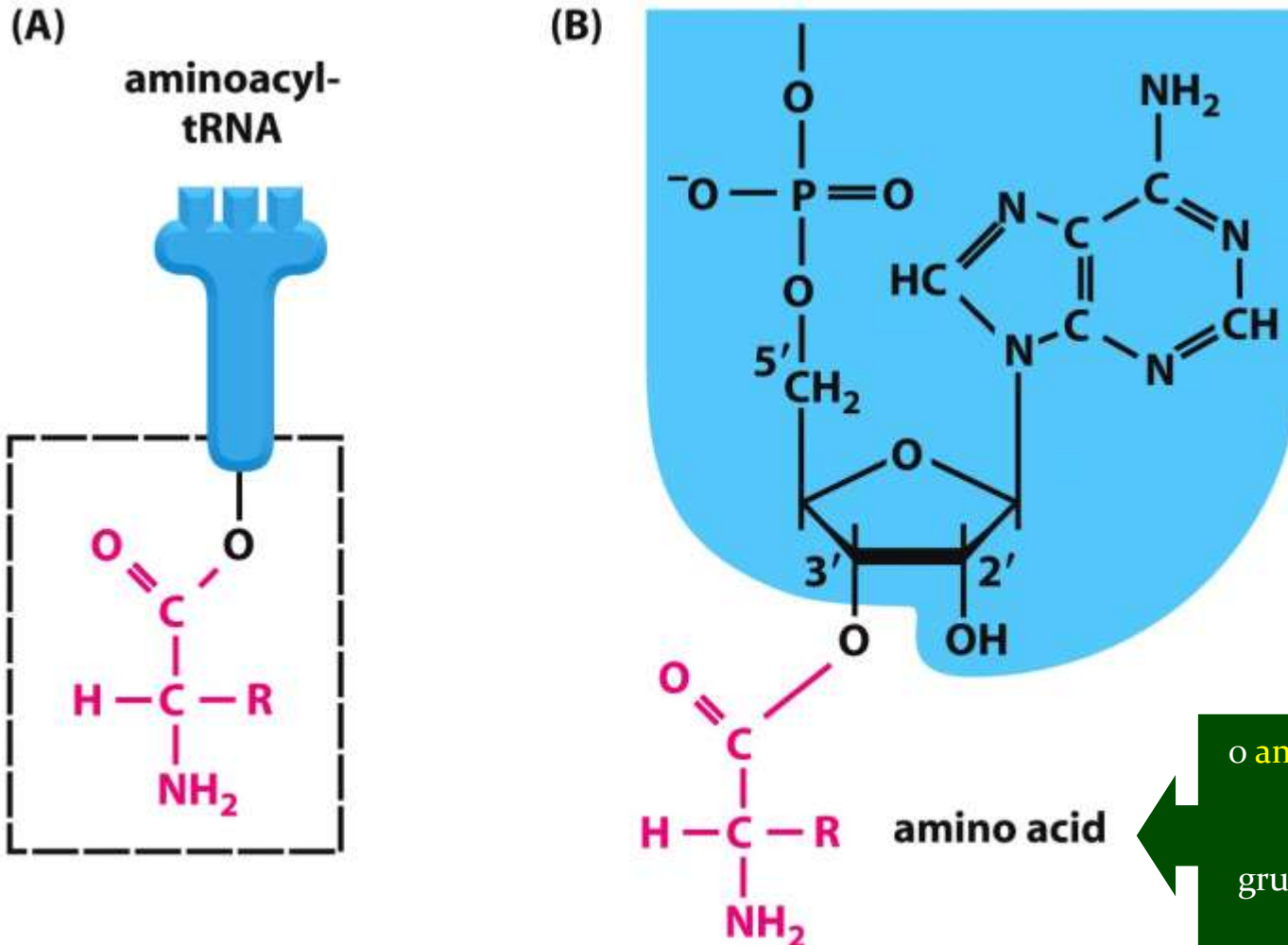
aminoacil-tRNA-sintetases ligam aminoácidos aos tRNA específicos

uma tRNA-sintetase para cada aminoácido!



tRNA sintetase catalisa a adenilação do aa e a transferência deste ao tRNA

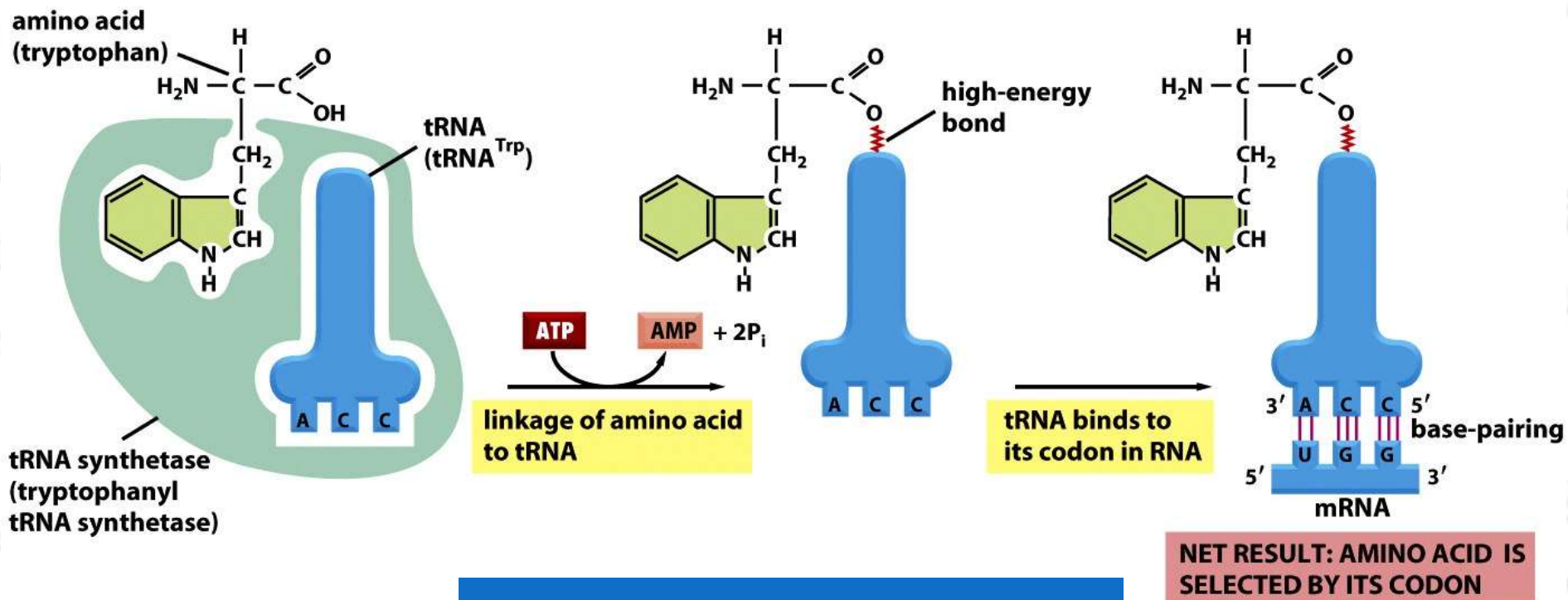
A Estrutura da Ligação aminoacil-tRNA



o **aminoácido** se liga ao terminal 3' do tRNA

grupo **R** indica a cadeia lateral do **aminoácido**

O Código Genético é Traduzido por Dois Adaptadores em Sequência



aminoacil-tRNA-sintetases e tRNA são ambos importantes na decodificação

experimento de conversão do aa após sua ligação ao tRNA

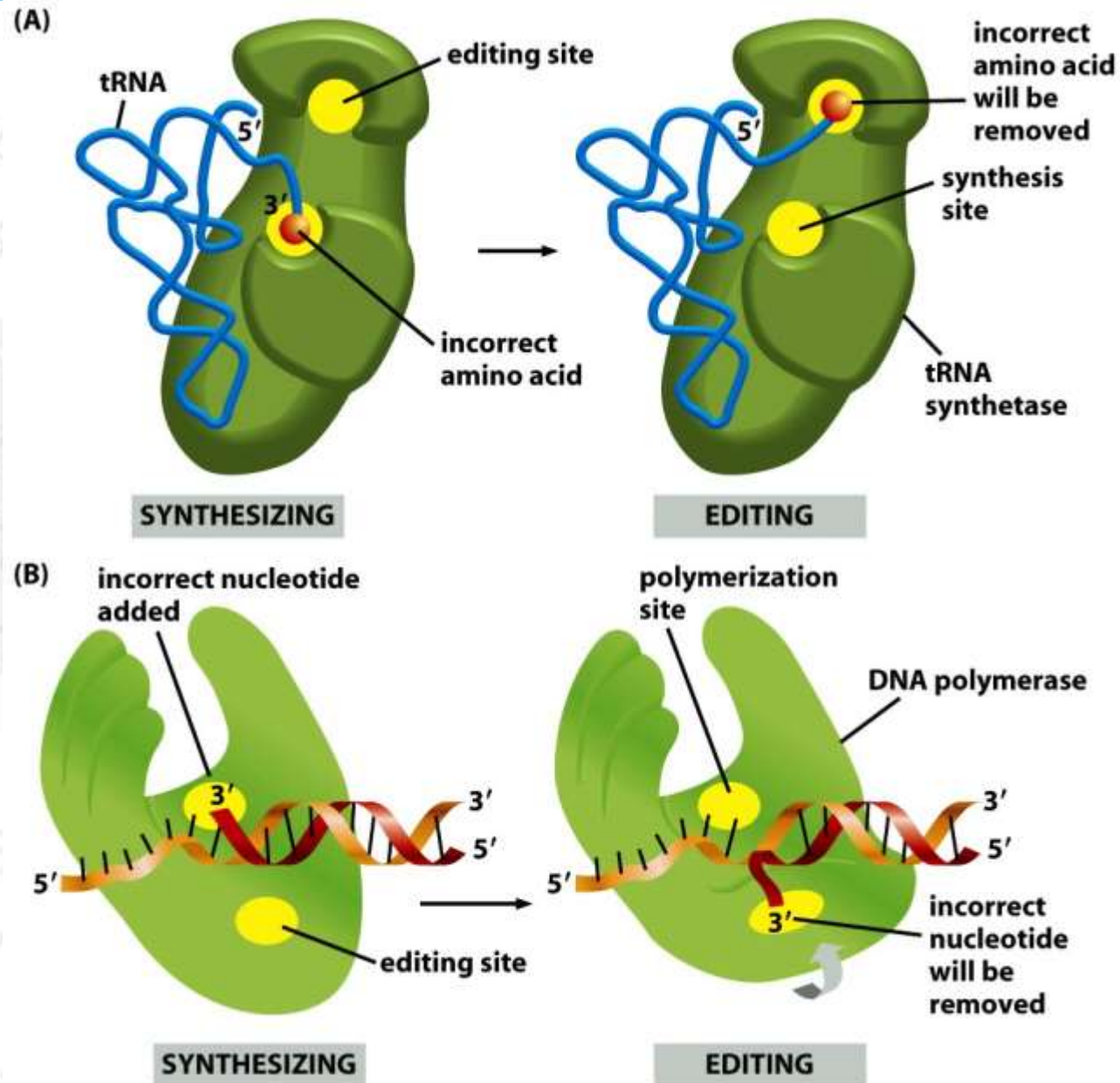
A Edição Hidrolítica

duas etapas asseguram que a **aminoacil-tRNA-sintetase** ligue o **aa** correto

01. **aa** correto tem maior afinidade pelo sítio ativo da **sintetase**

02. após ligação do **AMP** no **aa** o **tRNA** força este em um sítio de síntese

pareamento incorreto não encaixa e é processado no **sítio de edição** (hidrólise)

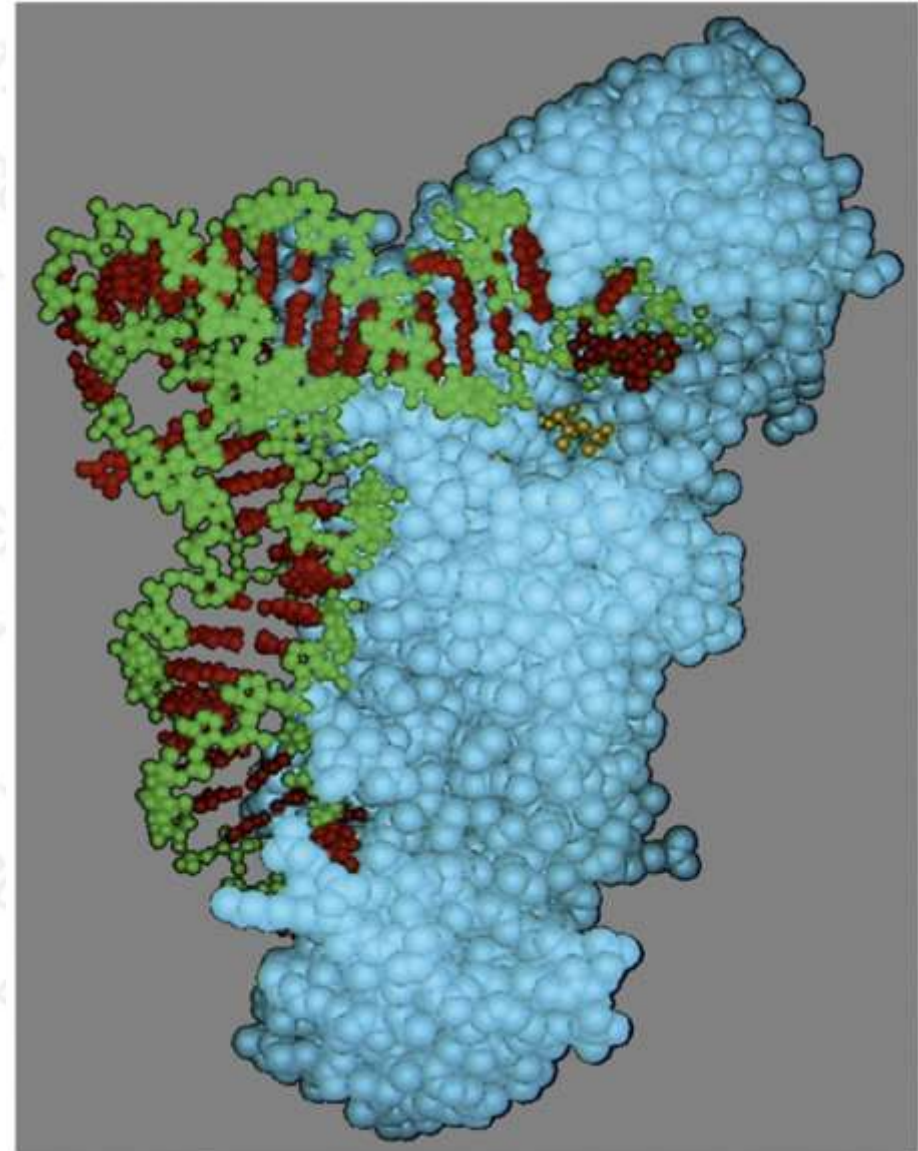


O Reconhecimento da Molécula de tRNA pela sua Aminoacil-tRNA-sintetase

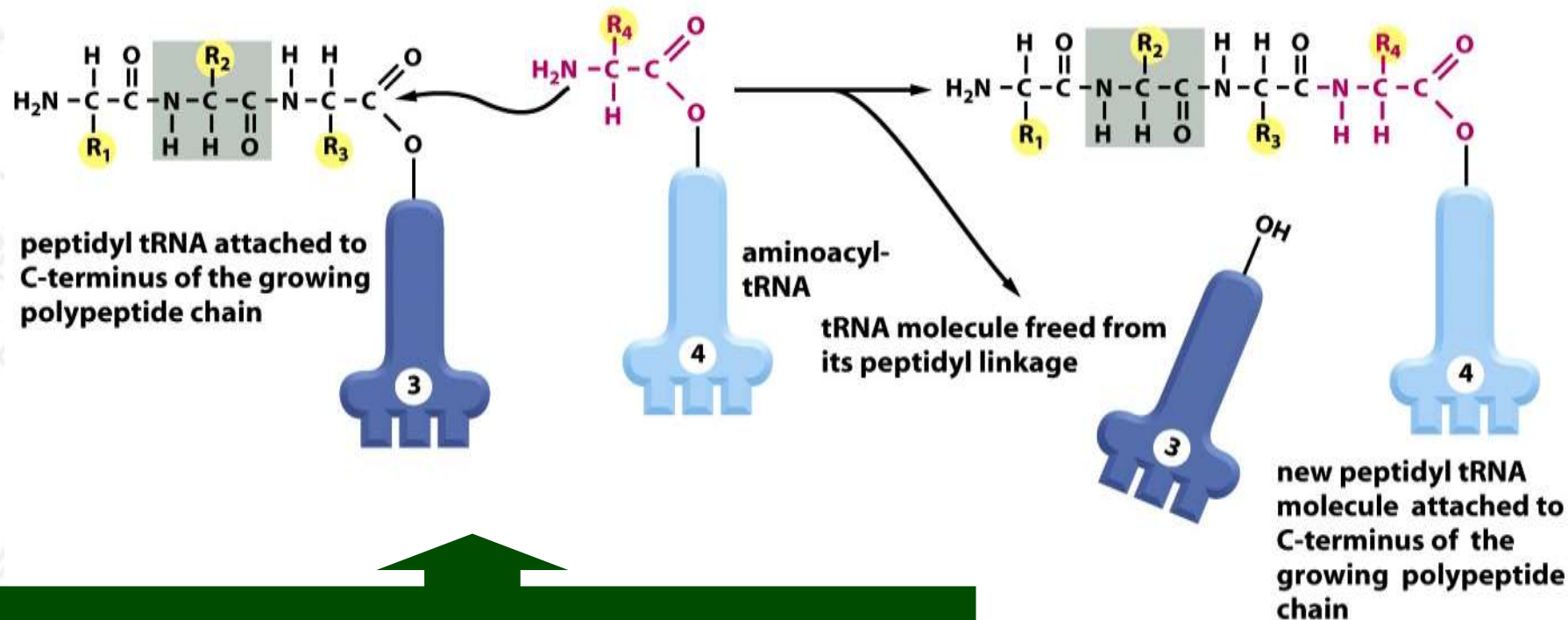
aminoacil-tRNA-sintetase precisa reconhecer o tRNA

reconhece as sequências do anticódon (complementariedade de forma e carga)

encaixe também depende da interação com a extremidade 3' do tRNA



Aminoácidos são Adicionados ao C-Terminal de uma Cadeia Polipeptídica Crescente

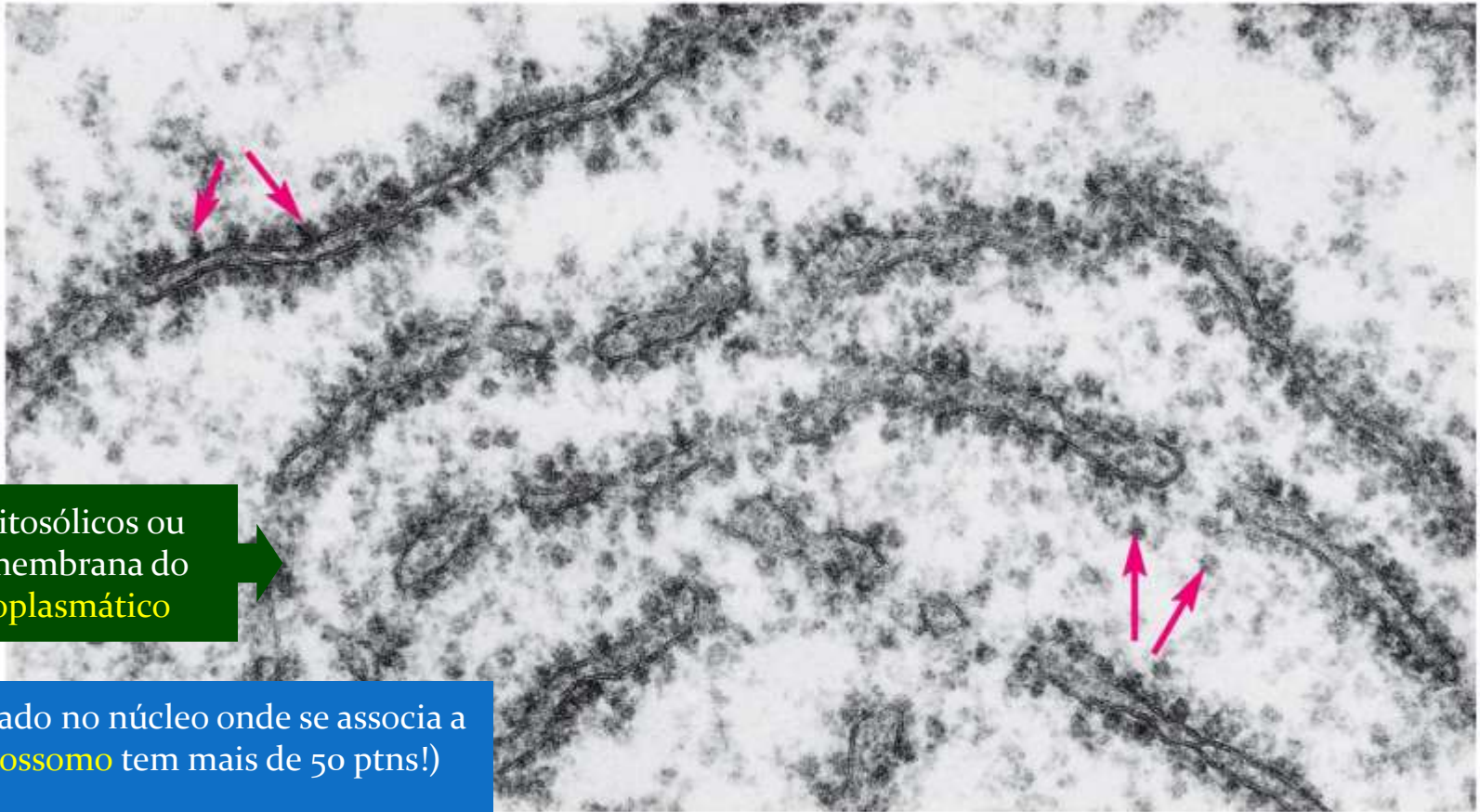


síntese: **ligação peptídica** entre grupamento **carboxila** (na cadeia em crescimento) e um **amino** livre

sentido do crescimento: **N-terminal** → **C-terminal**

C-term se liga ao **tRNA** e a cada **aa** adicionado essa ligação é quebrada e substituída por outra idêntica

A Mensagem do RNA é Decodificada nos Ribossomos



ribossomos: citosólicos ou associados a membrana do retículo endoplasmático

rRNA é sintetizado no núcleo onde se associa a proteínas (**ribossomo** tem mais de 50 ptns!)

subunidades são exportadas e montadas em um **ribossomo** no citosol

400 nm

Comparação dos Ribossomos de Procariotos e Eucariotos

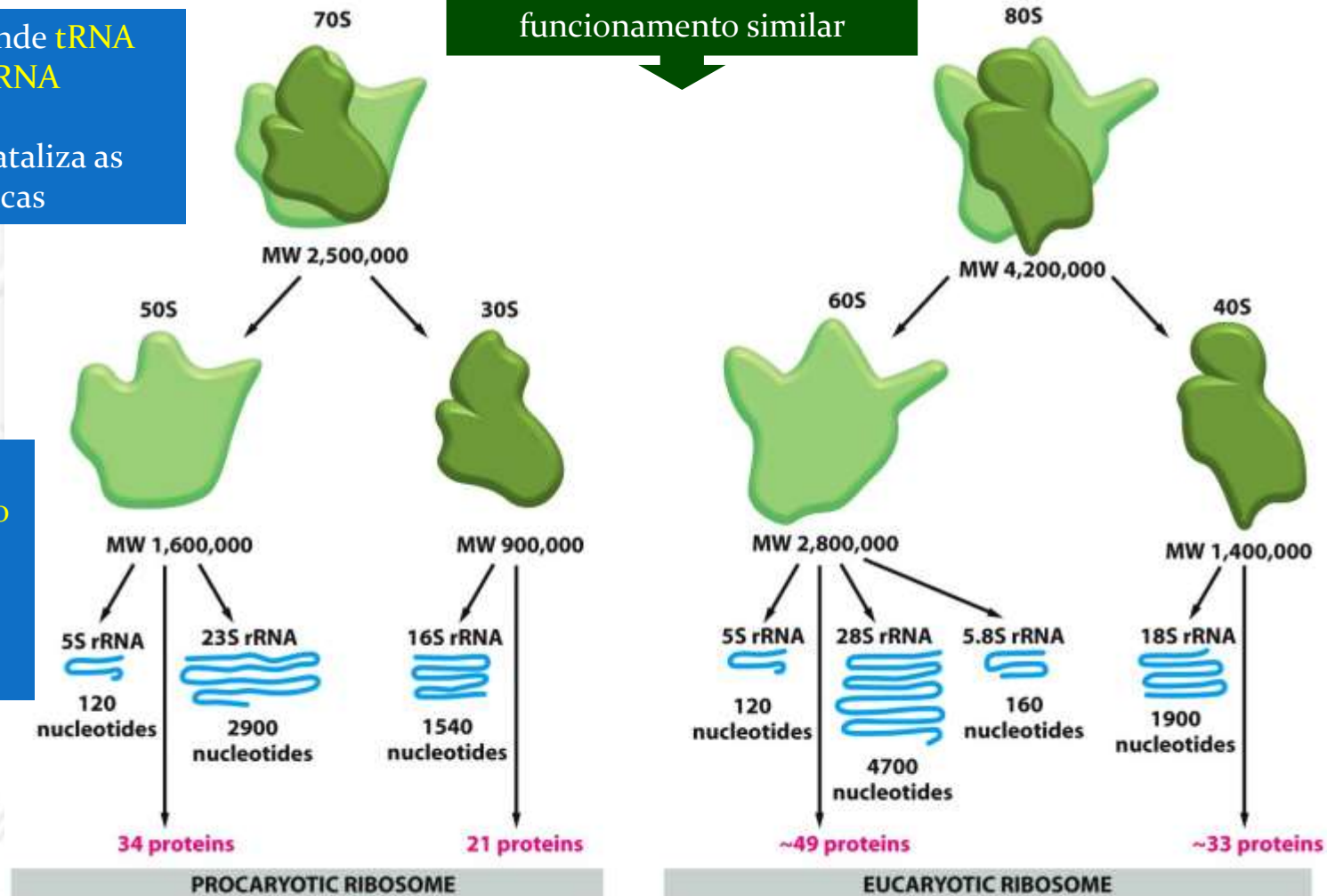
subunidade menor: onde tRNA
emparelha ao mRNA

subunidade maior: cataliza as
ligações peptídicas

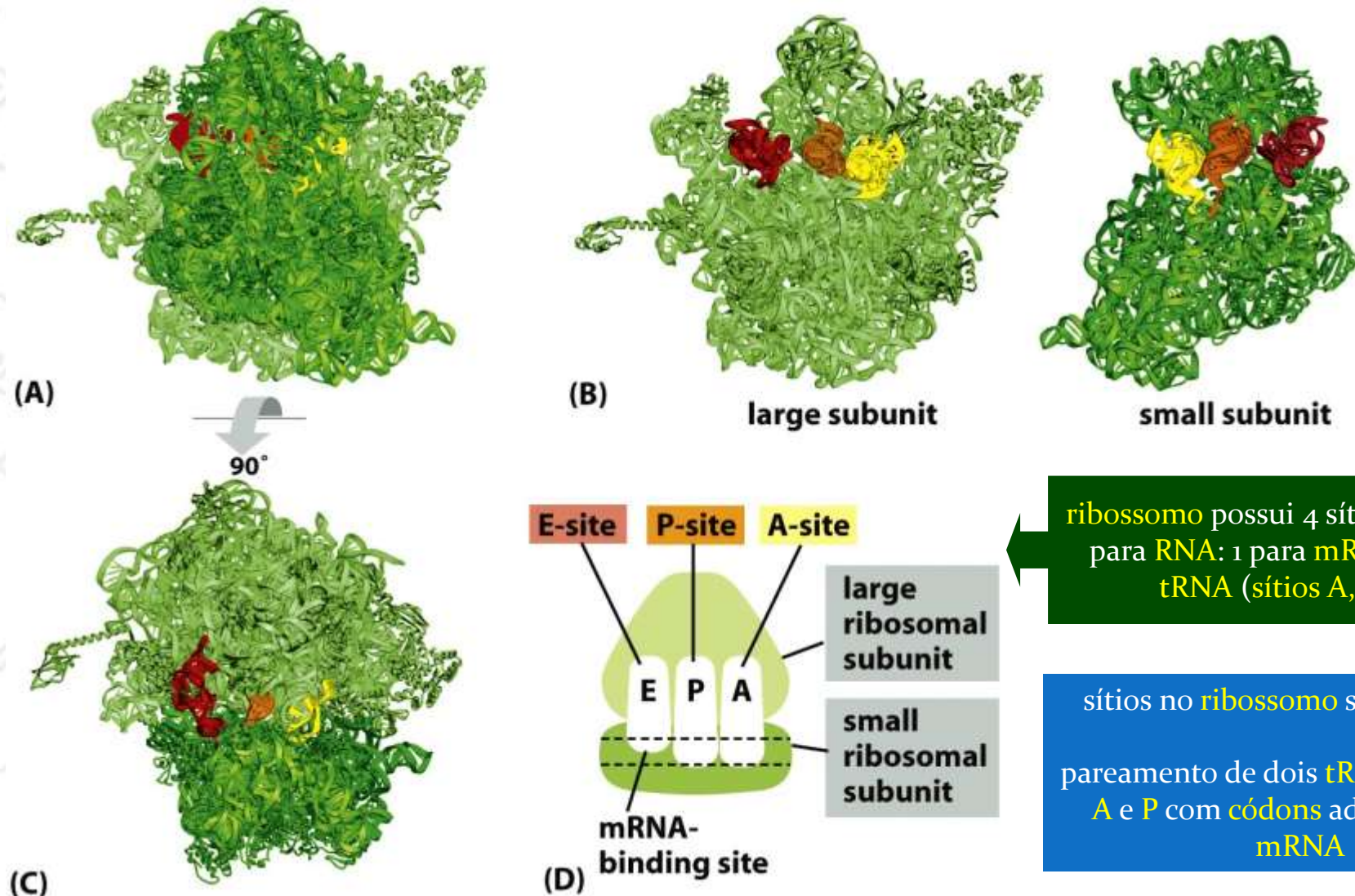
os ribossomos de pro e
eucariotos tem estrutura e
funcionamento similar

subunidades separadas
quando não há tradução

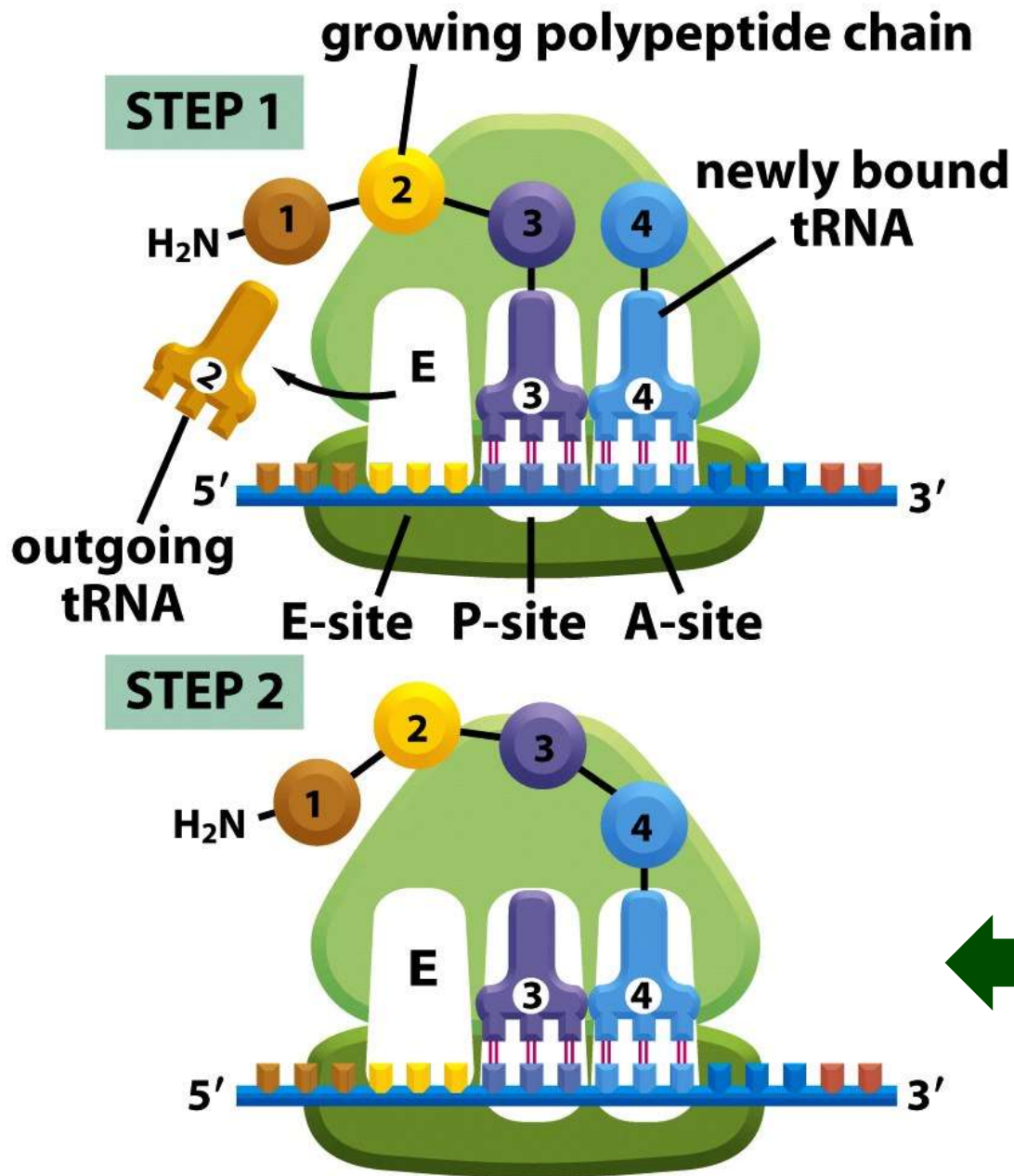
se associam em um
mRNA perto da
extremidade 5'



Os Sítios de Ligação ao RNA no Ribossomo



Traduzindo uma Molécula de mRNA



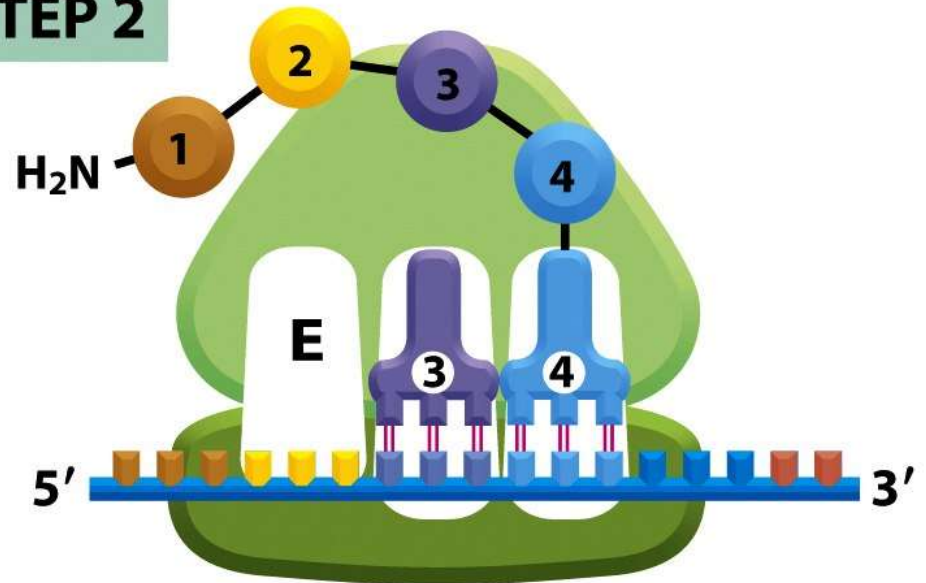
aminoácidos são adicionados em 4 etapas:

1. ligação do tRNA
2. formação da **ligação peptídica**
3. translocação da subunidade maior
4. translocação da subunidade menor

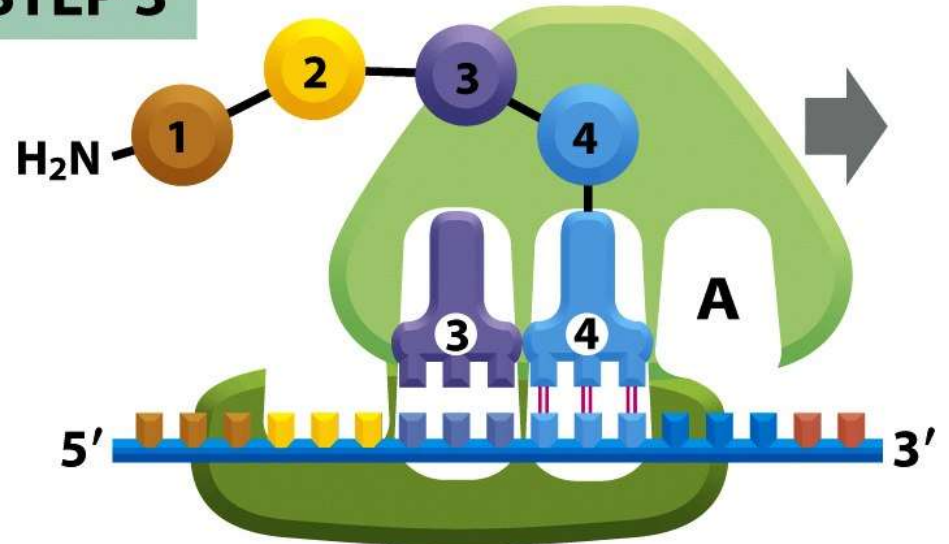
(se move 3 **nucleotídeos** a frente!)

quebra na ligação entre o tRNA e o aa. no **sítio P** e ligação ao grupamento amina do aa ligado ao tRNA no **sítio A**

STEP 2

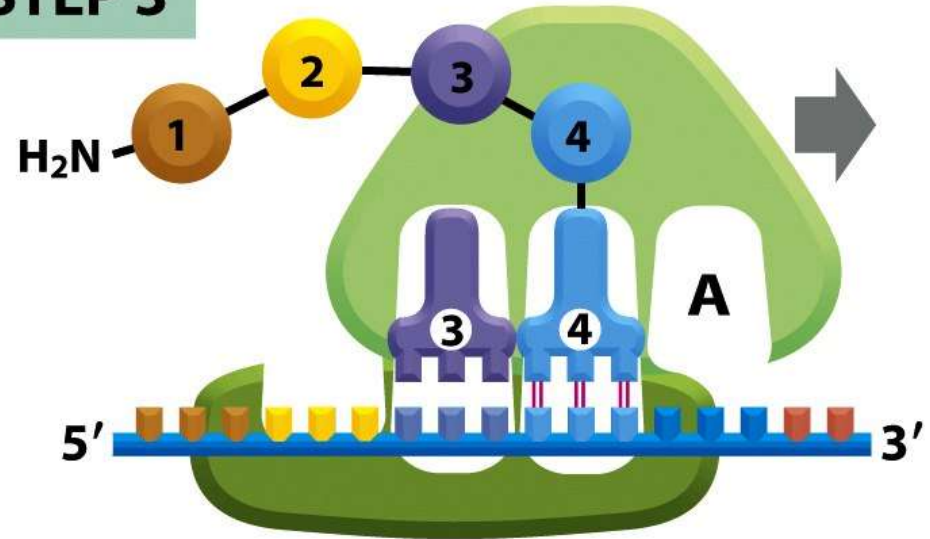


STEP 3

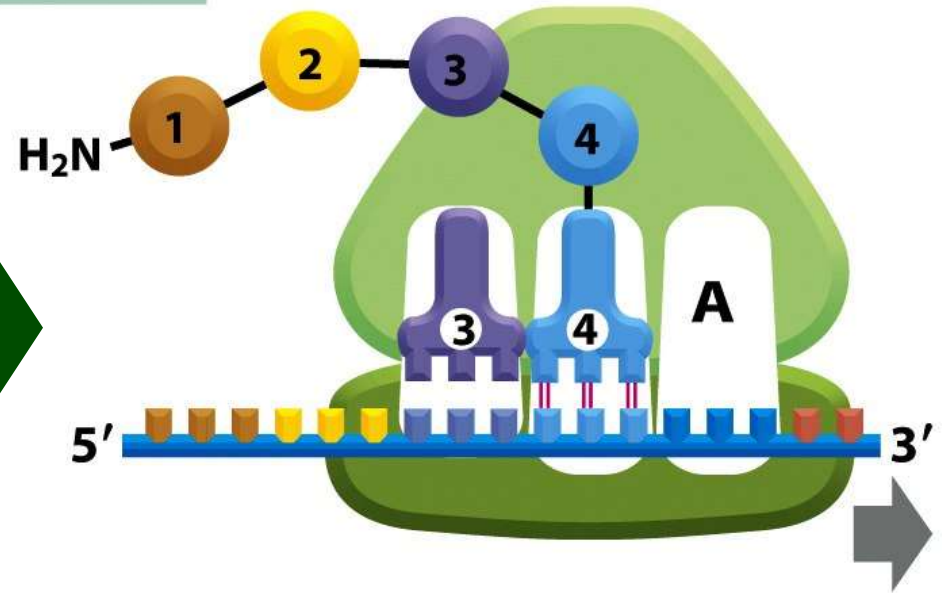


subunidade maior se move em
relação a menor
(sítios híbridos temporários)

STEP 3



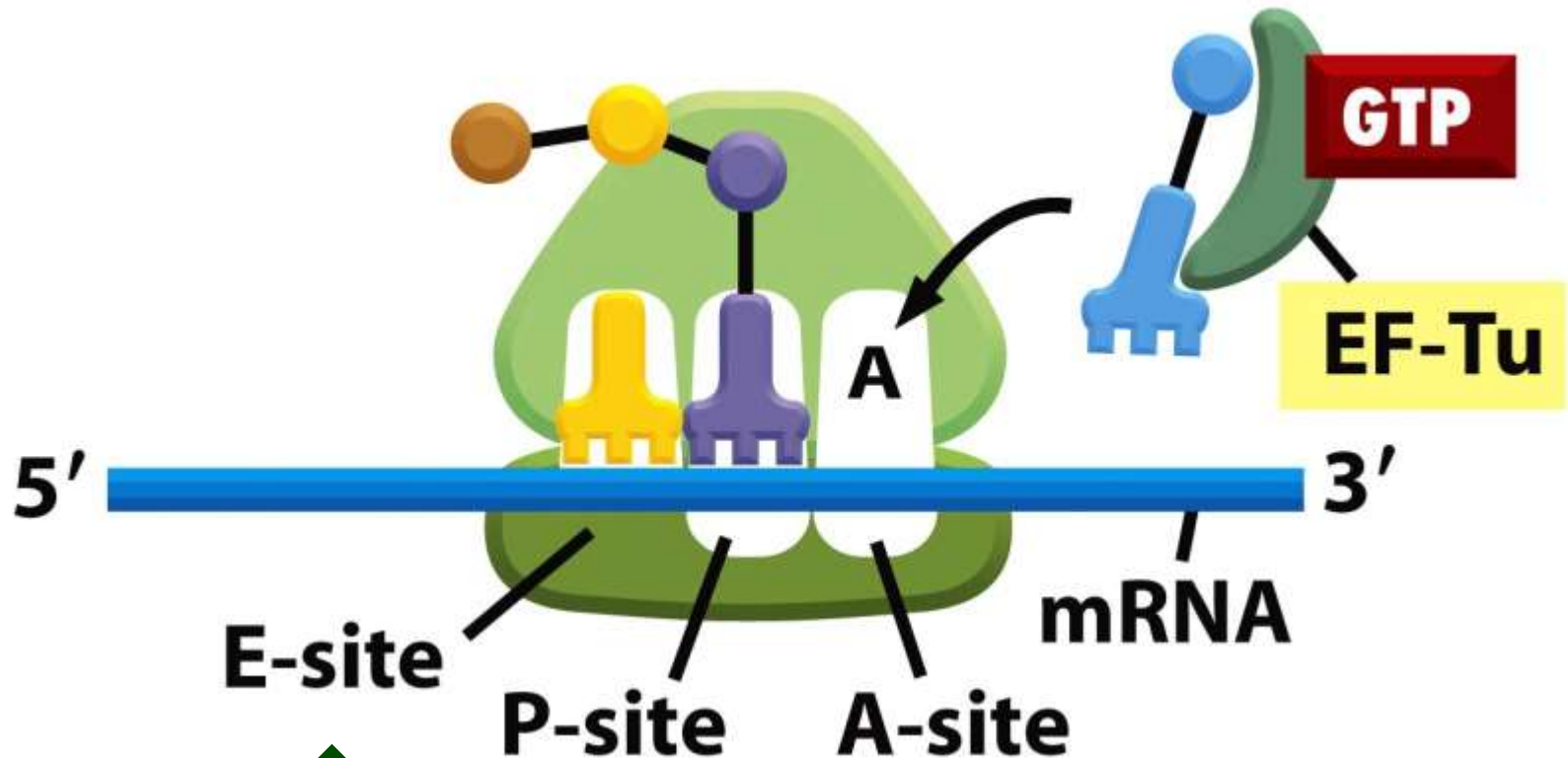
STEP 4



mudanças conformacionais adicionais movem a subunidade menor avançando 3 nucleotídeos adiante no mRNA

ribossomo pronto a receber um novo aminoacil-tRNA

Fatores de alongamento Controlam a Tradução e Aumentam sua Precisão



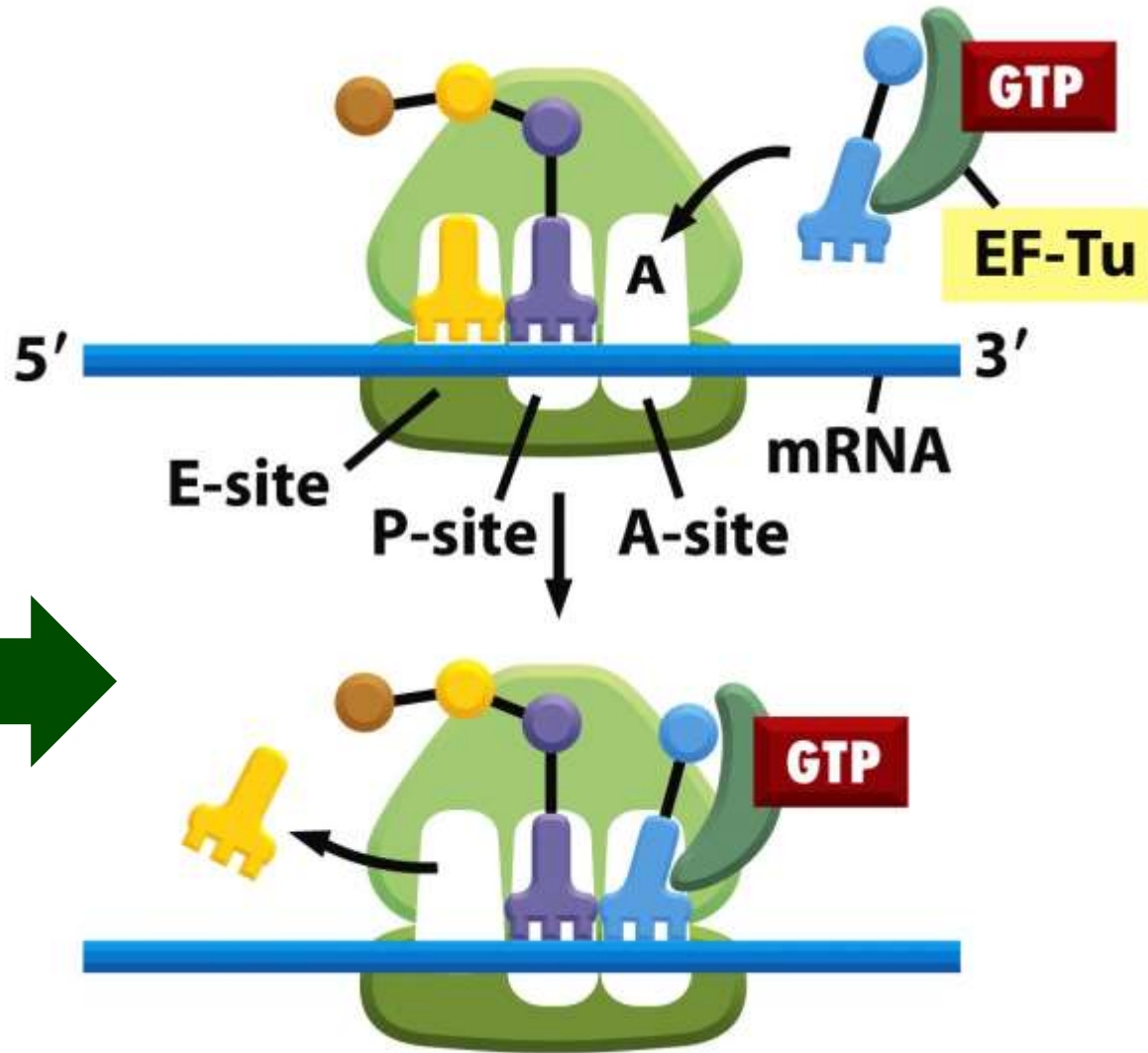
EF-Tu e EF-G (bactérias)/ EF₁ e EF₂ (eucariotos) entram e deixam o ribossomo na tradução (mudanças conformacionais GTP-dependentes)

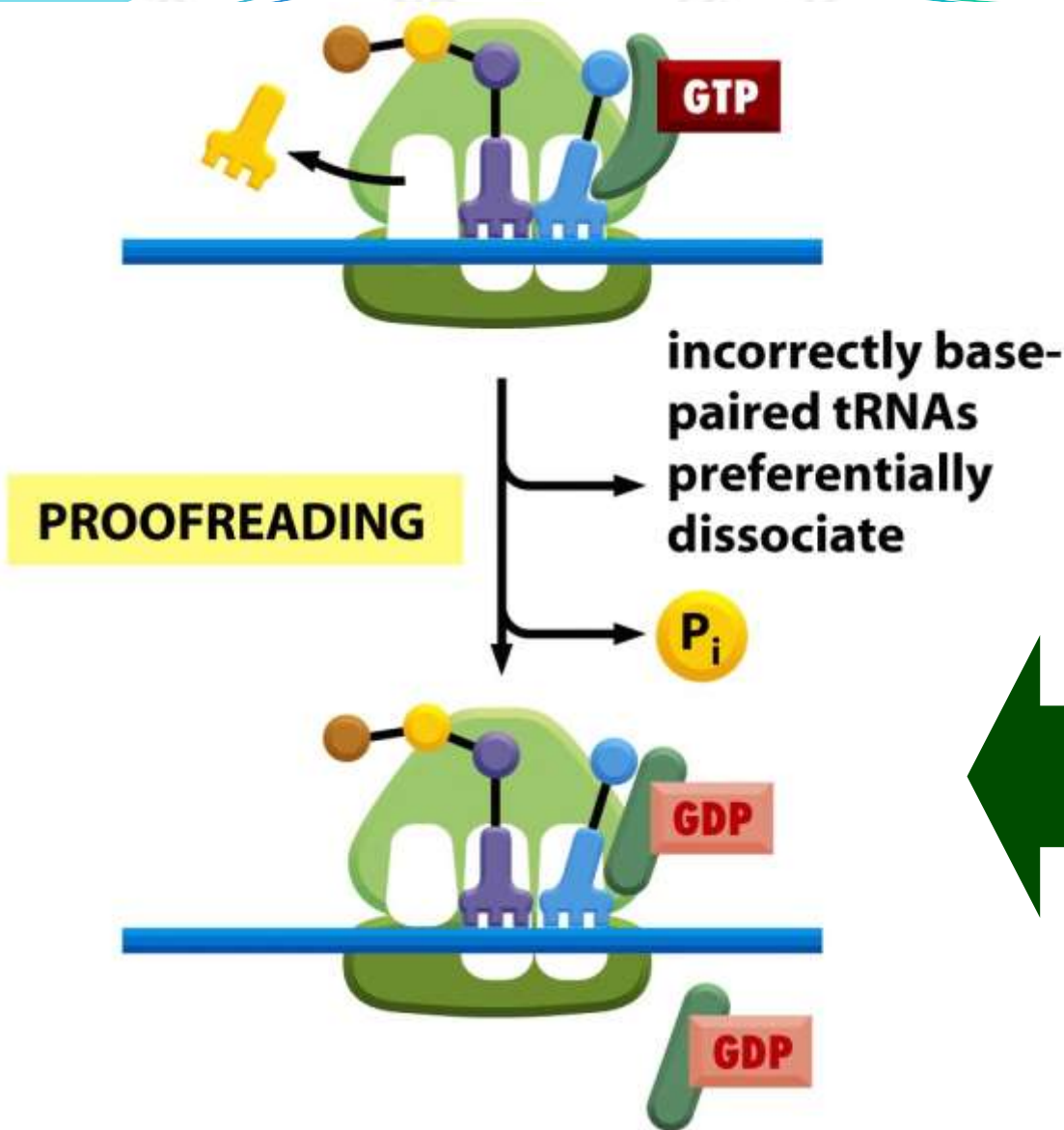
ciclos de associação dos **fatores de alongamento**, hidrólise de **GTP**, e dissociação (direcionamento correto/ maior velocidade)

fenômeno ainda obscuro

EF-Tu (EF-1) aumenta a precisão da tradução:

1. checka a especificidade do complexo tRNA-aa (complexo correto tem maior afinidade por EF-Tu!!)





2. monitora a interação do **anticodon** do **tRNA-aa** com o **códon** do **mRNA** no **sítio A**

complexo **tRNA-aa** é entortado enquanto interage com **EF-Tu** **GTP** -ligado

permite pareamento mas impede incorporação do **aa** na cadeia

pareamento correto leva a hidrólise do **GTP** e liberação de **EF-Tu**

como ocorre essa verificação da especificidade do pareamento **codón-anticodon**?

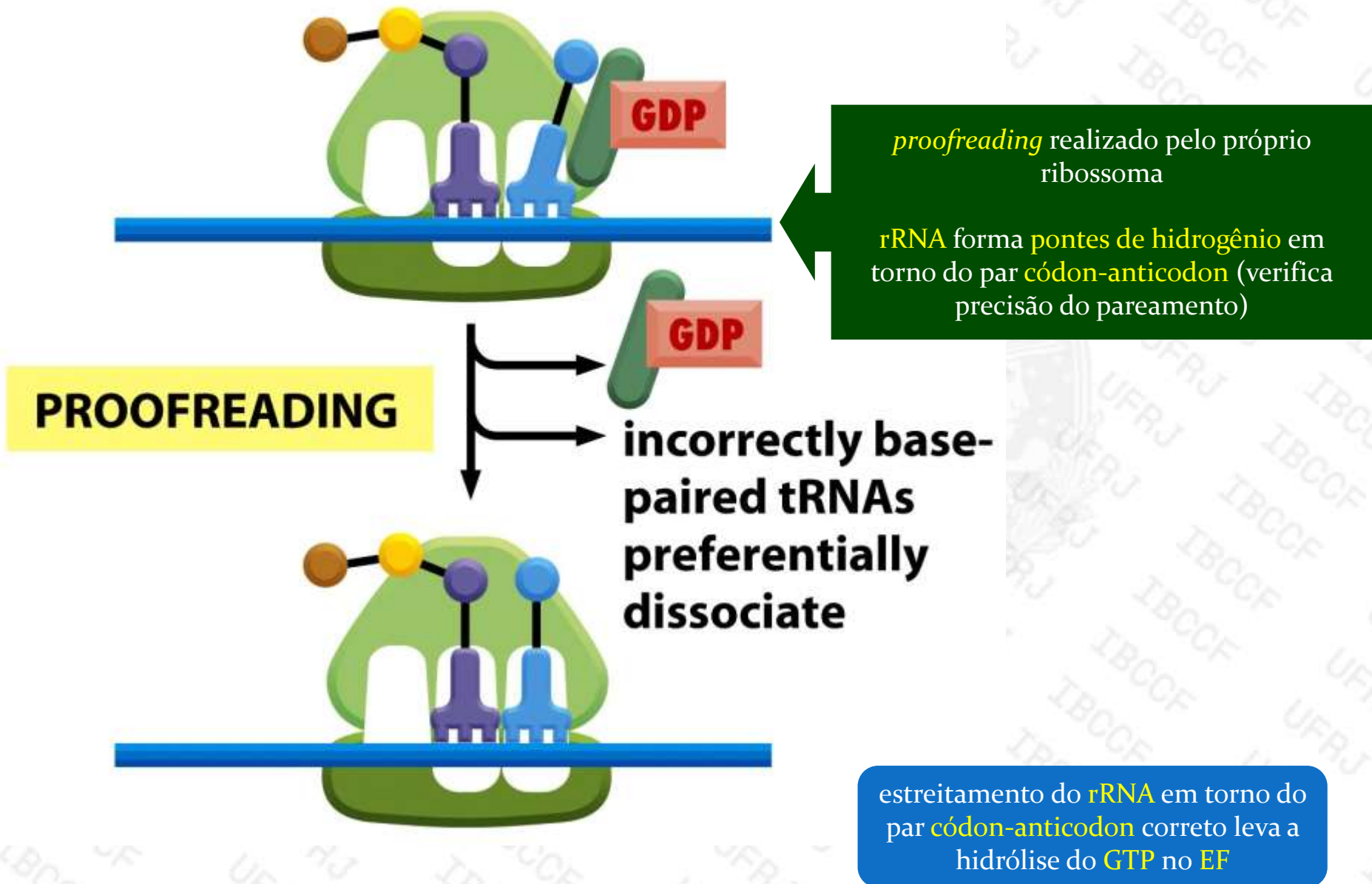
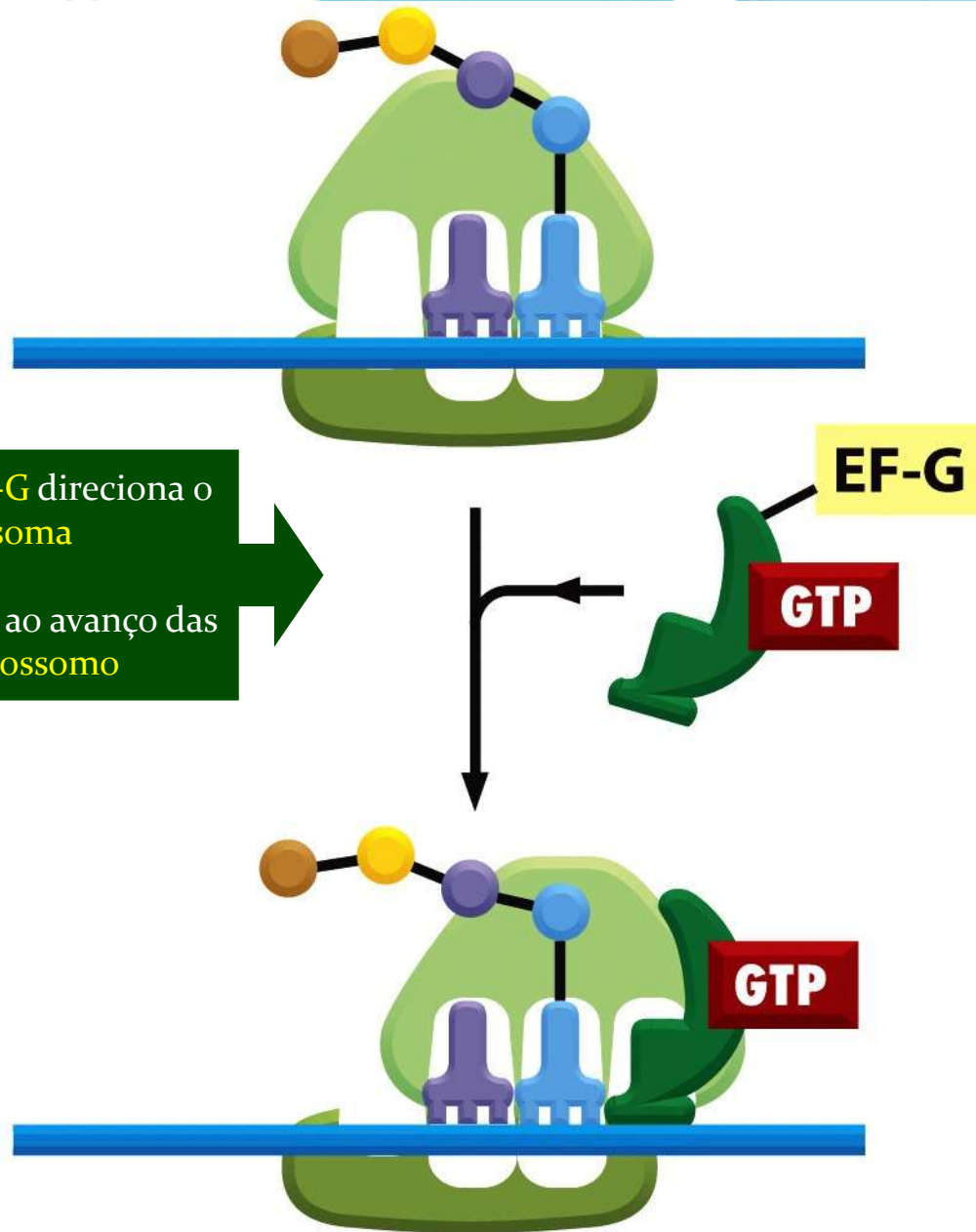


Figure 6-67 (part 4 of 7) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

fator de alongamento EF-G direciona o avanço do ribossoma
acopla a hidrólise de GTP ao avanço das subunidades do ribossomo



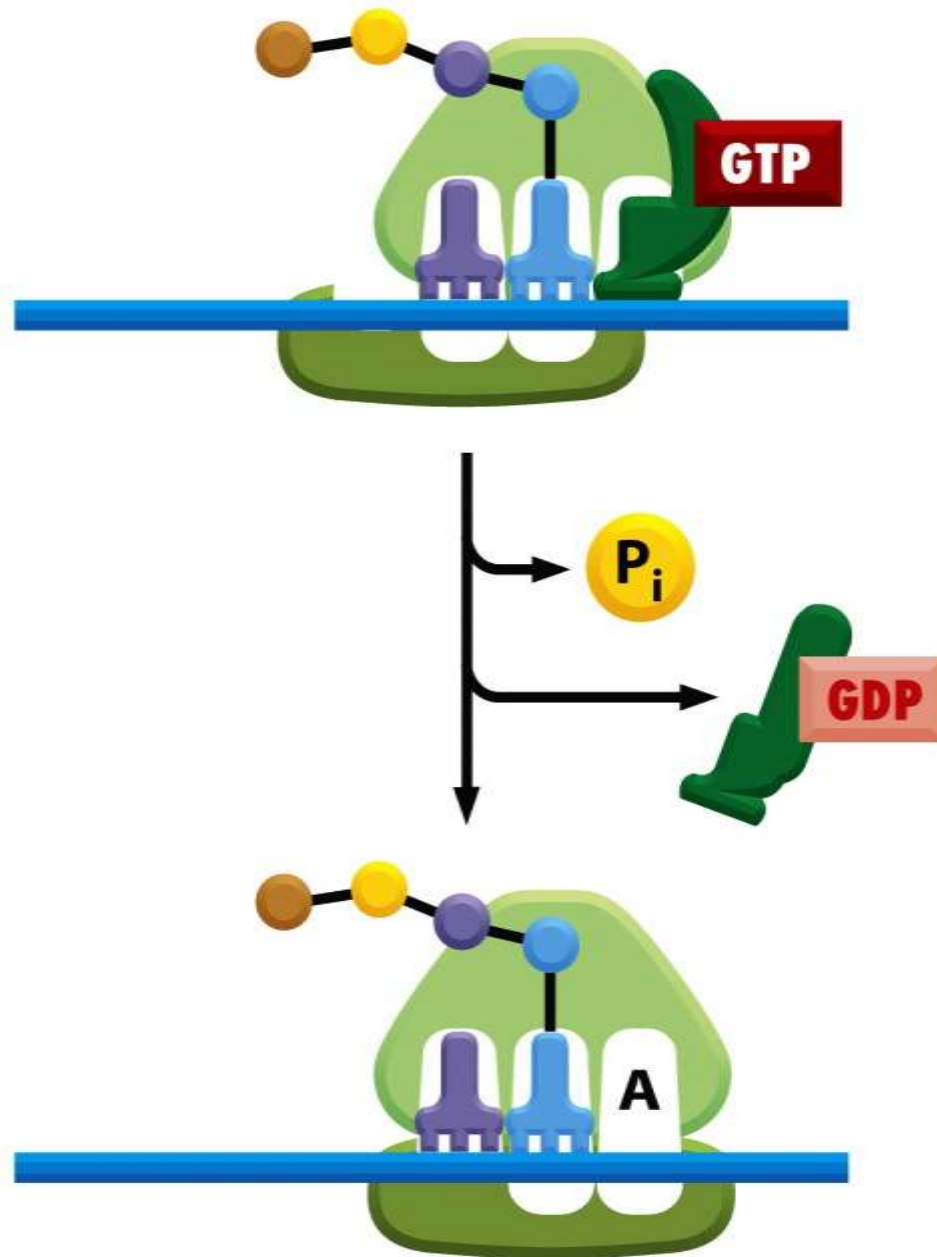
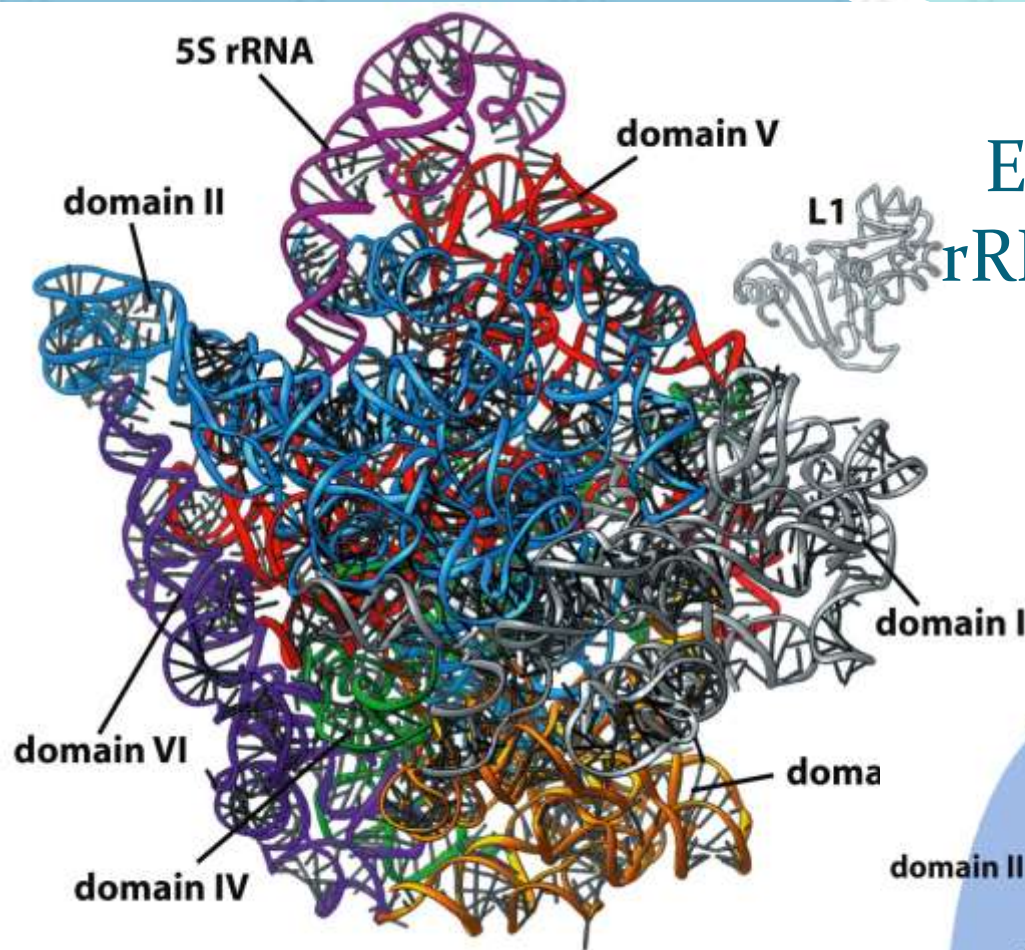
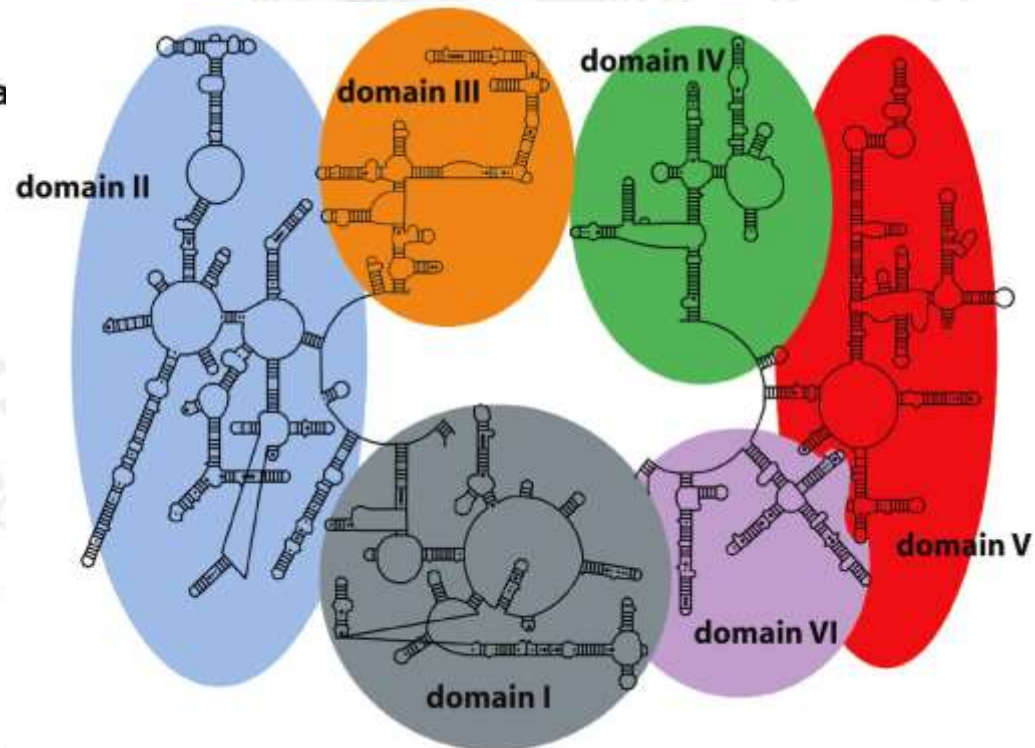


Figure 6-67 (part 7 of 7) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



Estrutura Cristalográfica dos rRNAs da Grande Subunidade do Ribossomo Bacteriano

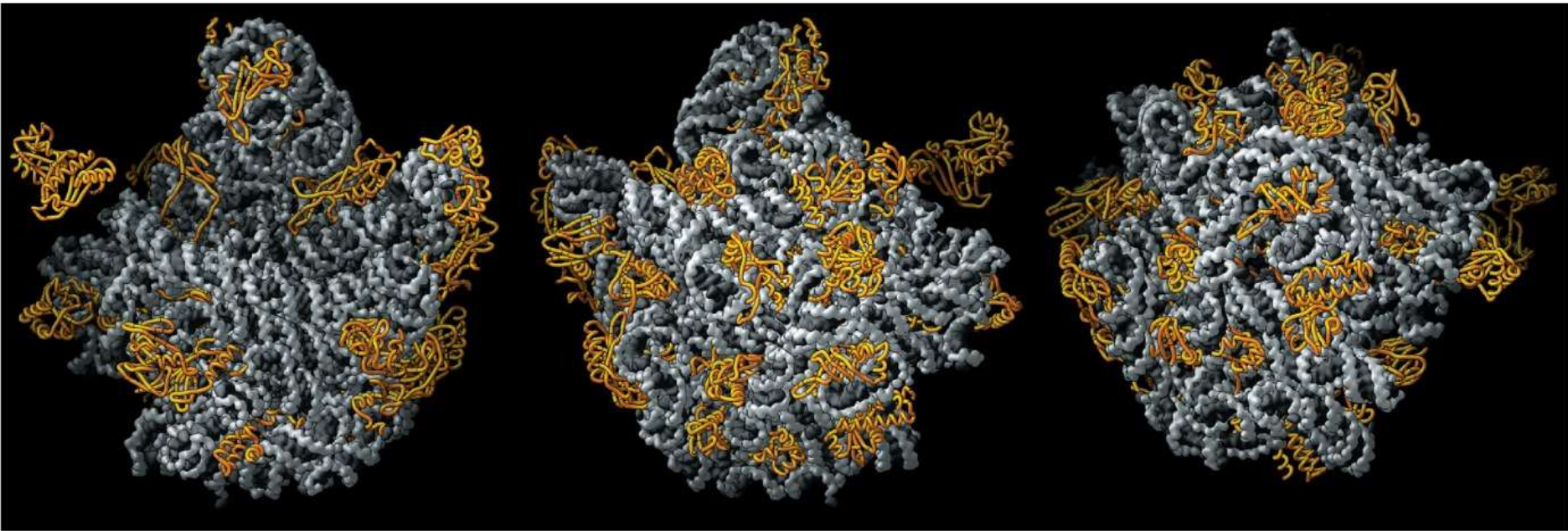
diversos rRNAs com estrutura 3D formando uma estrutura quaternária



ribossomo: 2/3 RNA e 1/3 proteína

rRNA é responsável pela estrutura, posicionamento dos **tRNAs** no **mRNA** e atividade catalítica

Componentes Proteicos do rRNA da Grande Subunidade Ribossomal

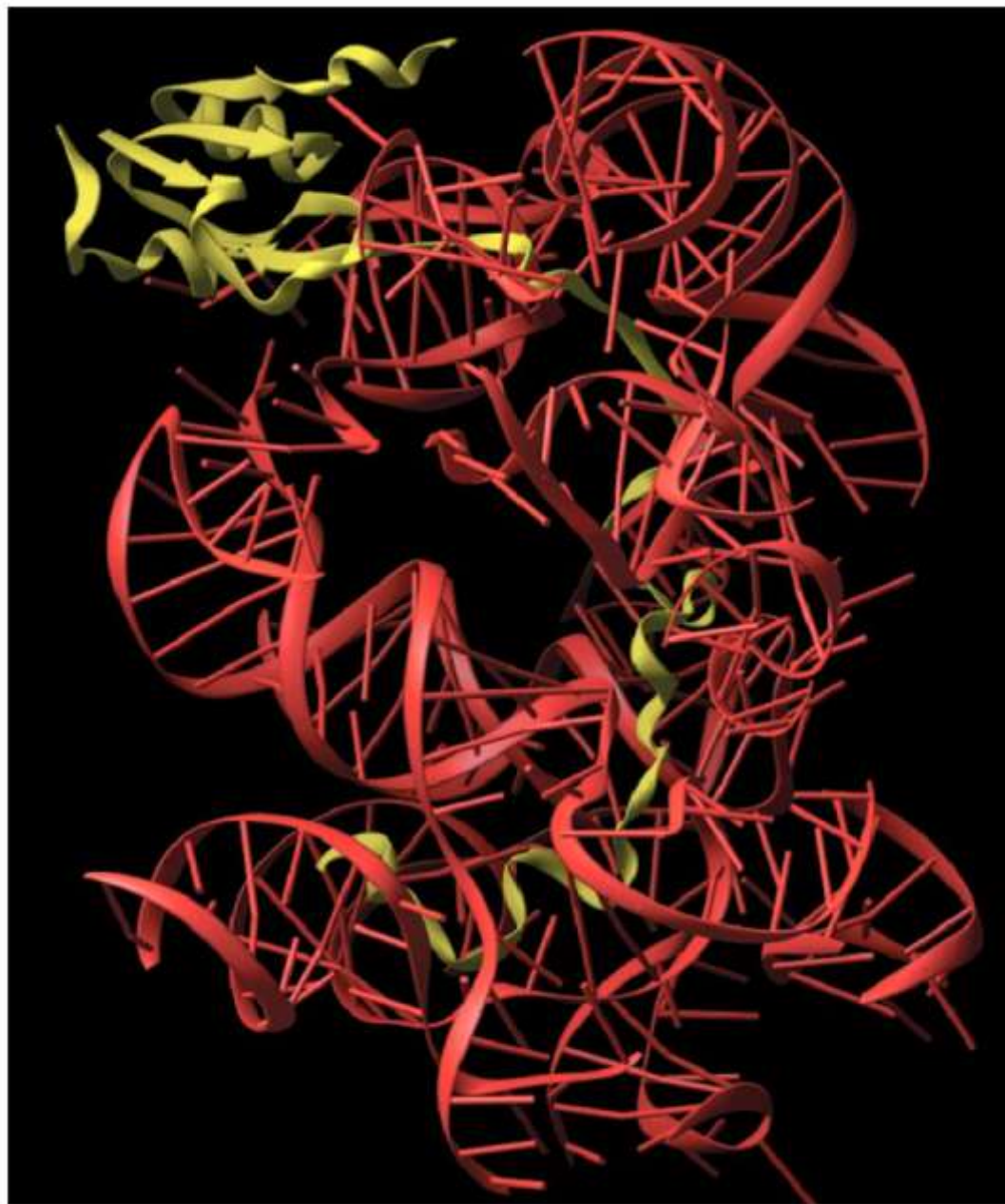


(A)

(B)

(C)

proteínas ribossomais se localizam na
superfície do **ribossoma** e preenchendo
espaços e fendas



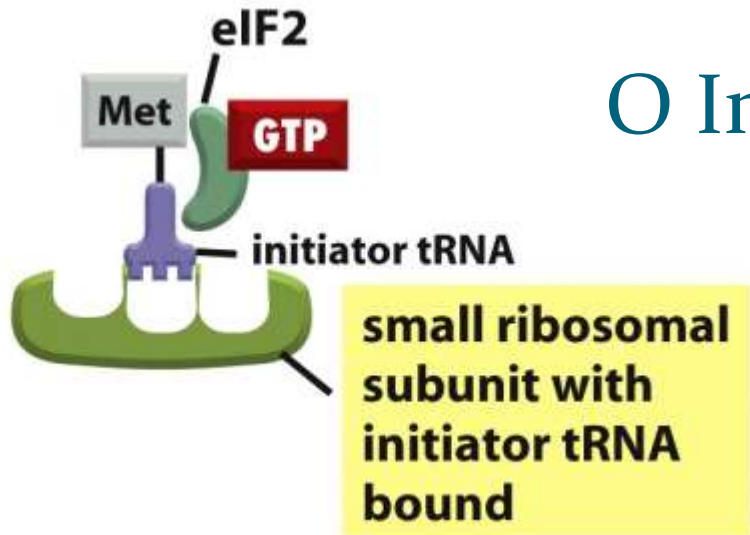
algumas proteínas se estendem em
pequenas cavidades do **rRNA**

estabilização durante a tradução e na
formação do **ribossomo**

sítios de ligação aos **tRNAs** A, P e E e sítio de
ligação peptídica são formados por **rRNA**

ribozimas: relíquias!!

O Início da Tradução do mRNA



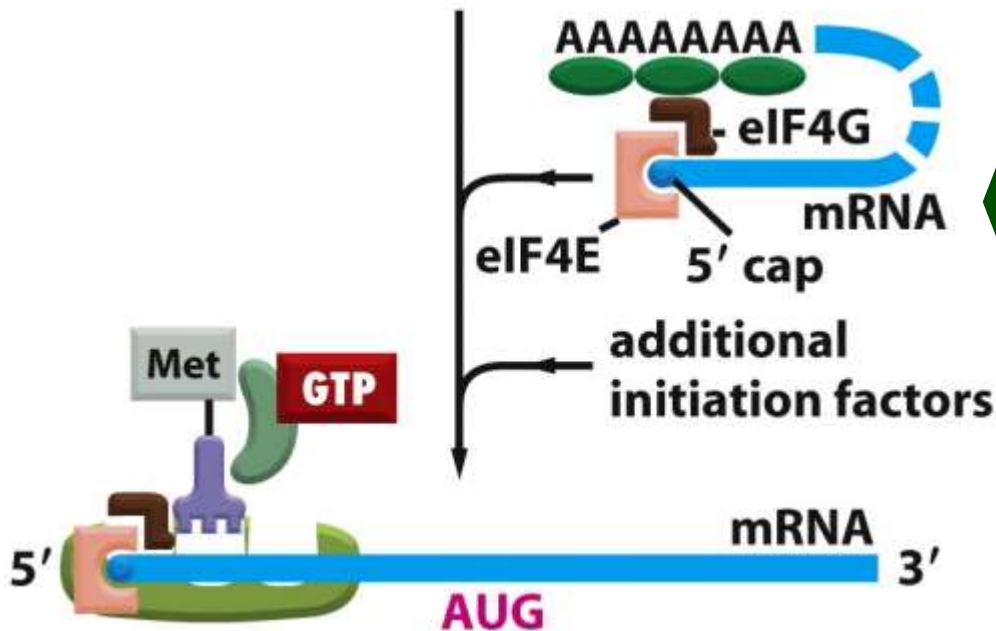
o ponto de início da **tradução** determina o **frame de leitura** (risco de tradução de uma proteína não-funcional!)

último ponto de decisão quanto a tradução da mensagem (regulação!)

tradução começa no **códon AUG**

tRNA iniciador carregando o aa **metionina** é reconhecido por **fator de iniciação eIF2**

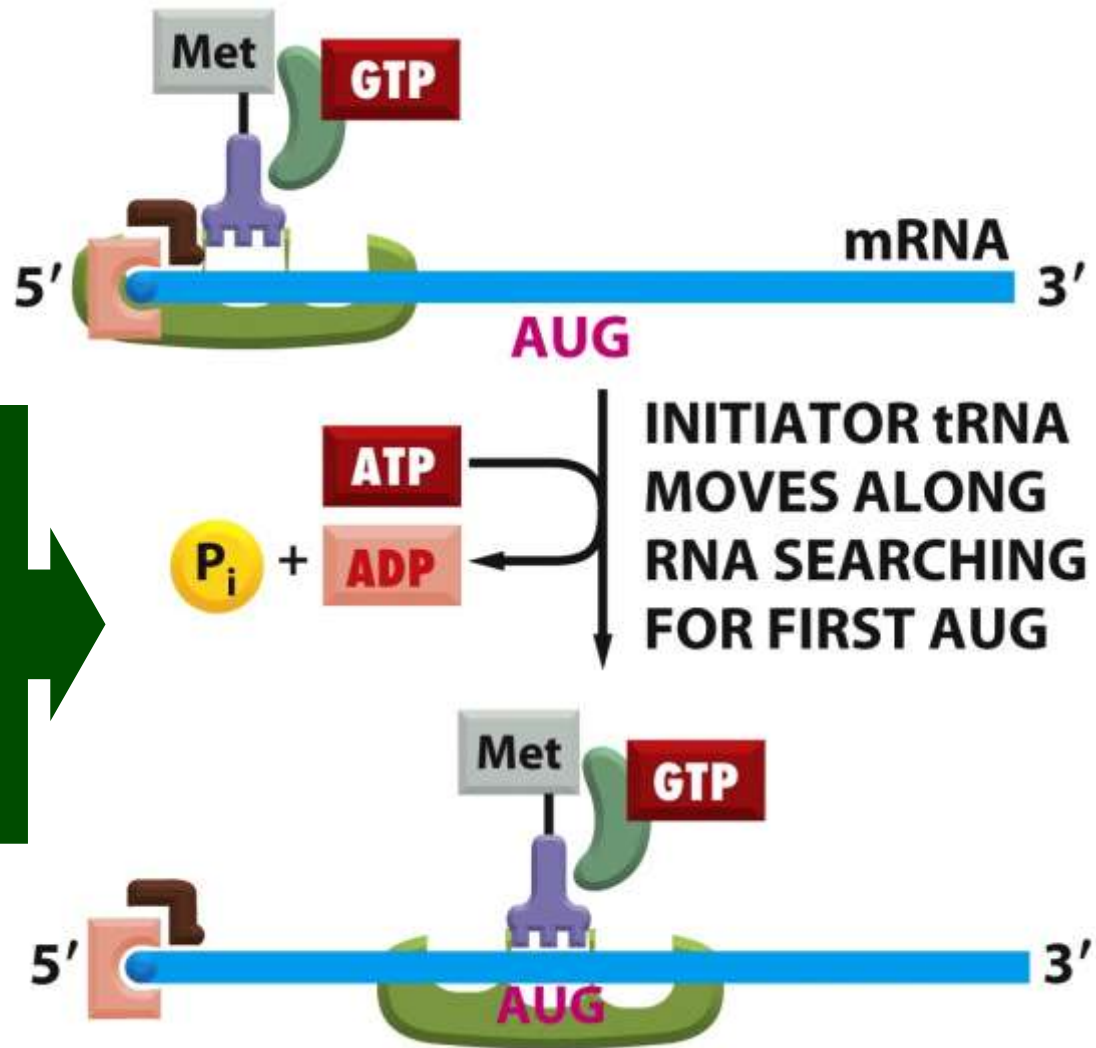
tRNA iniciador se liga diretamente no **sítio P** na **menor subunidade ribossomal** livre (único que é capaz!)

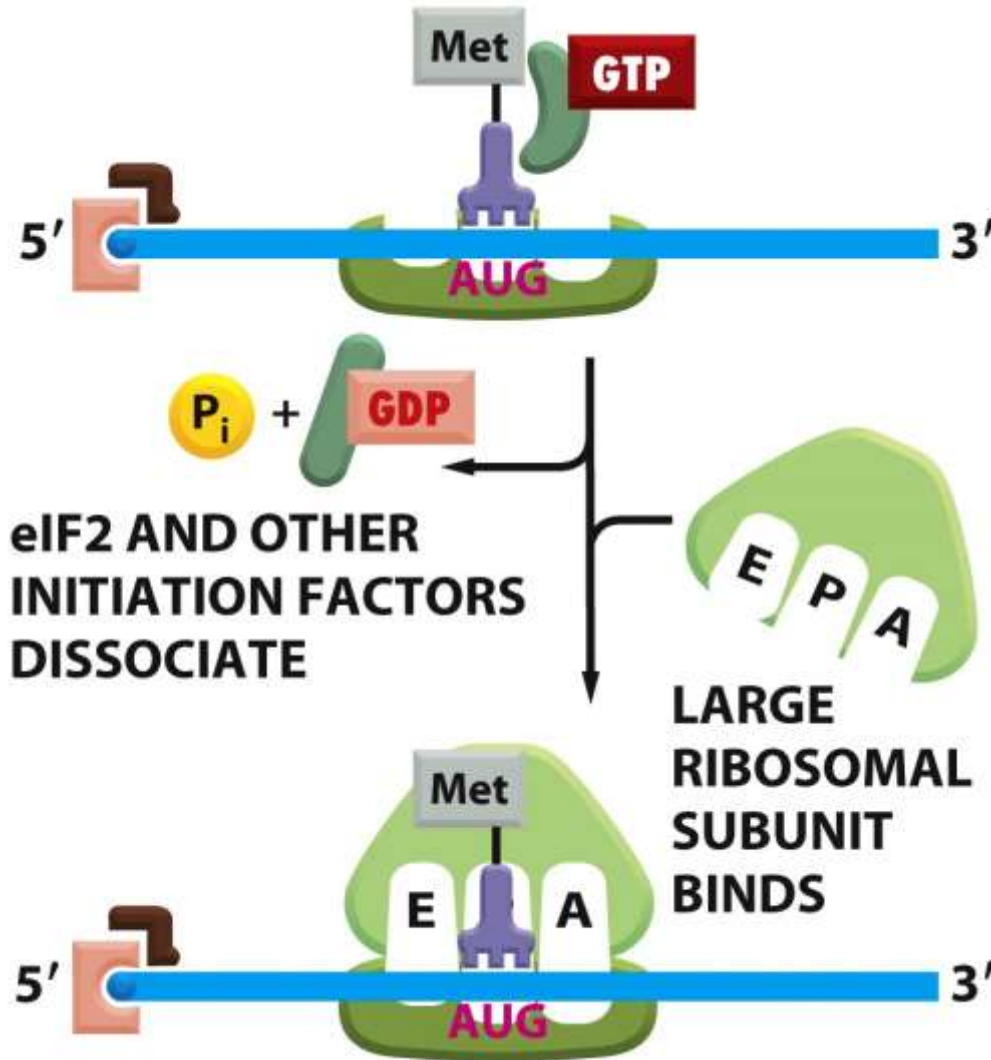


outros fatores de iniciação (eIF4E e eIF4G) reconhecem o CAP 5' do mRNA e acolhem a menor subunidade do ribossomo

complexo *scanneia* o mRNA buscando o primeiro códon AUG

fatores de iniciação com atividade helicase desfazem eventuais grampos

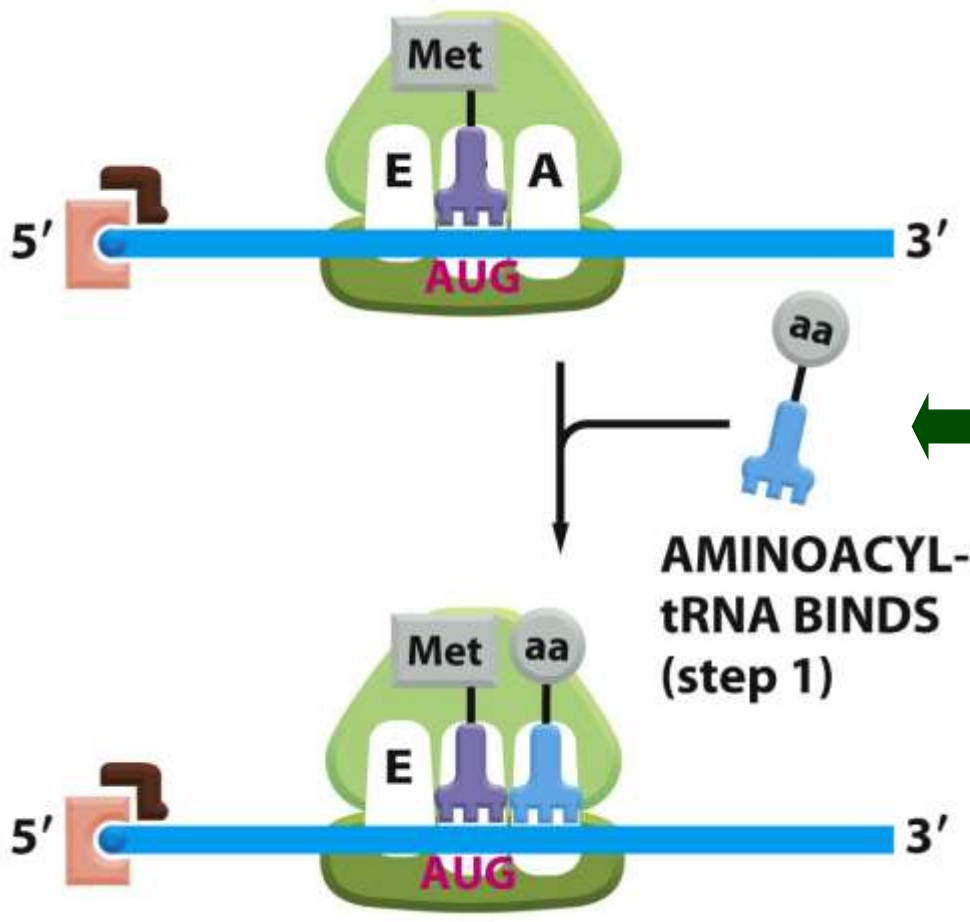




no **primeiro AUG** os fatores de iniciação se dissociam permitindo a associação da **maior subunidade ribossomal**

sequências nucleotídicas em torno do **AUG** (5'-ACCAUGG-3') influenciam o reconhecimento do **ponto de início de tradução** ("leaky scanning")

leaky scanning gera proteínas com **n-terminal** diferente!!



processo de alongamento da cadeia polipeptídica segue como previamente descrito

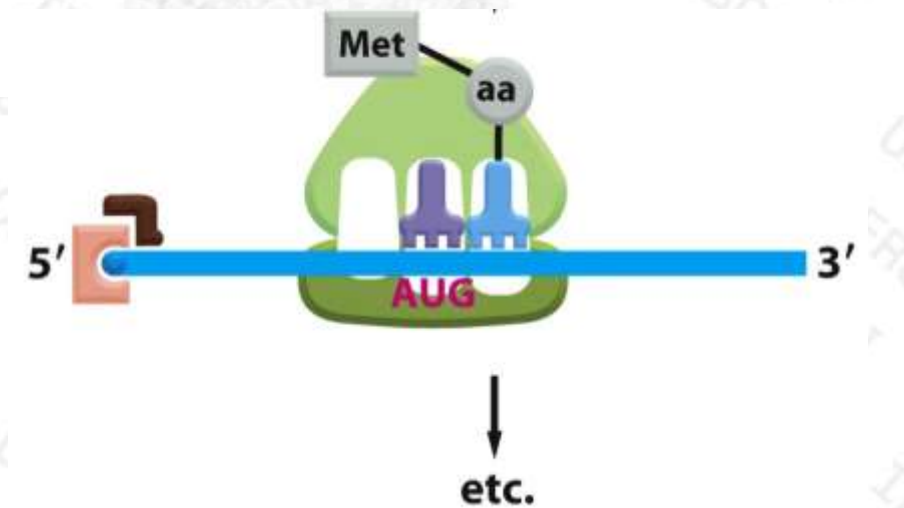
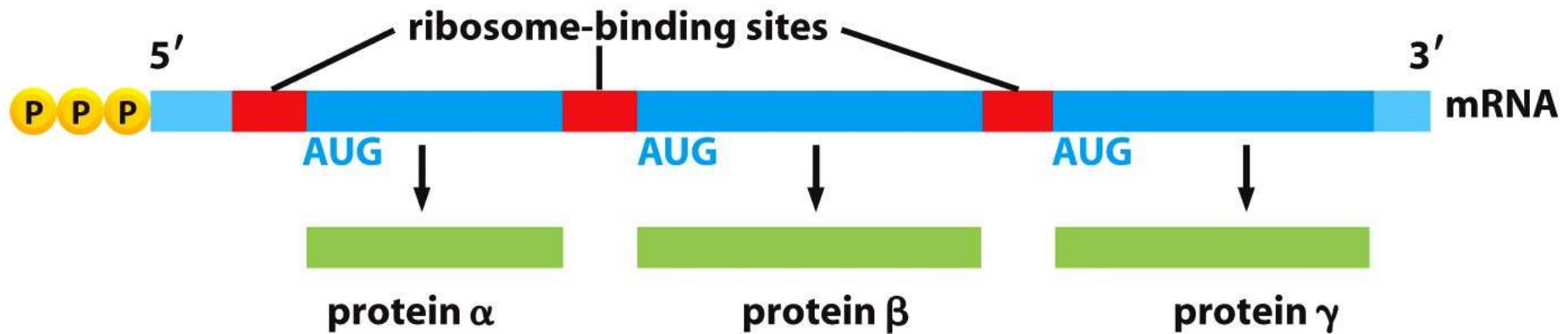


Figure 6-72 (part 4 of 5) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Estrutura de uma Molécula de mRNA Bacteriana



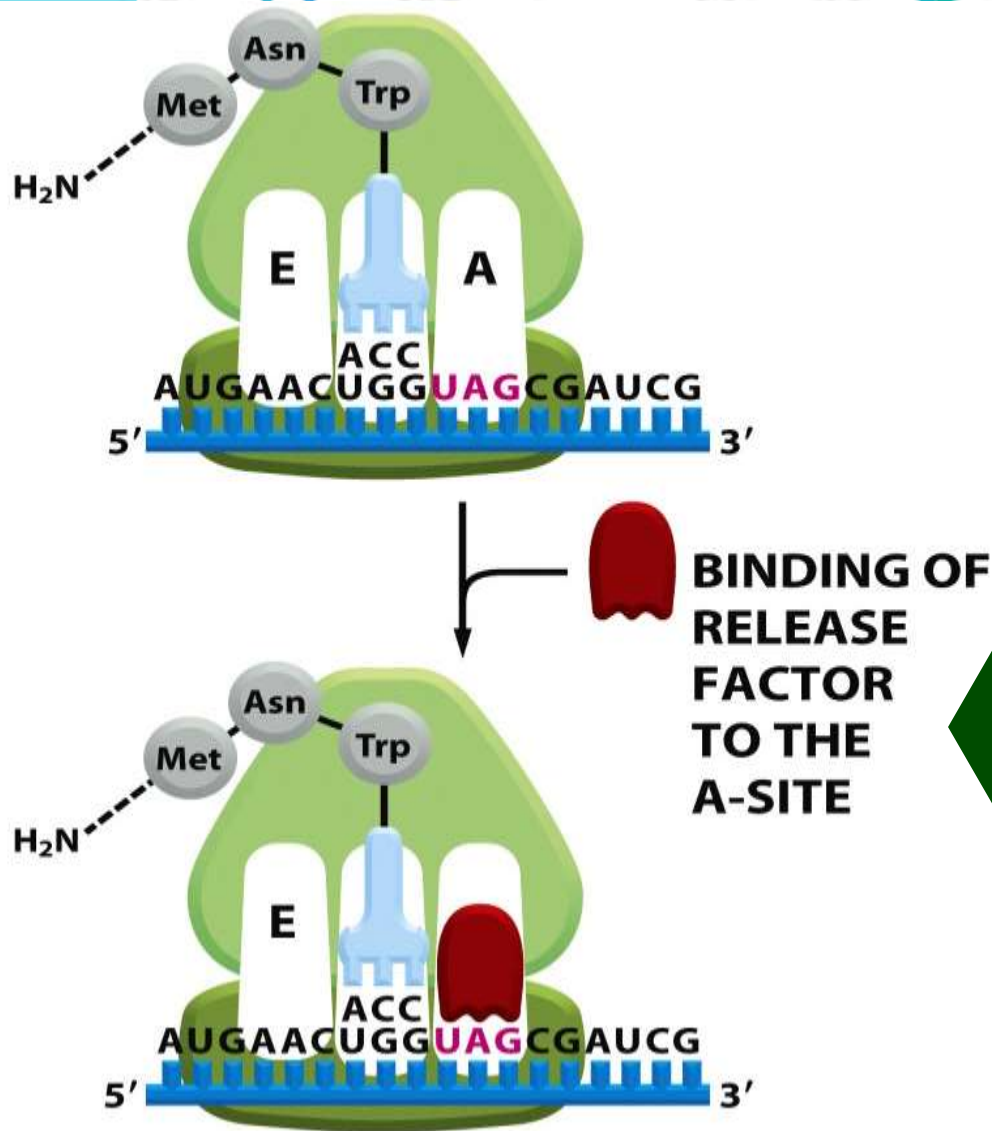
bactérias não possuem CAP 5' como origem de busca por AUG

sequência “*Shine Delgarno*”
pareia com a subunidade menor do ribossomo

ribossomo bacteriano pode ser montado diretamente no códon de início no interior da molécula de mRNA

mRNA policistrônico (varias proteínas codificadas pelo mesmo mRNA)

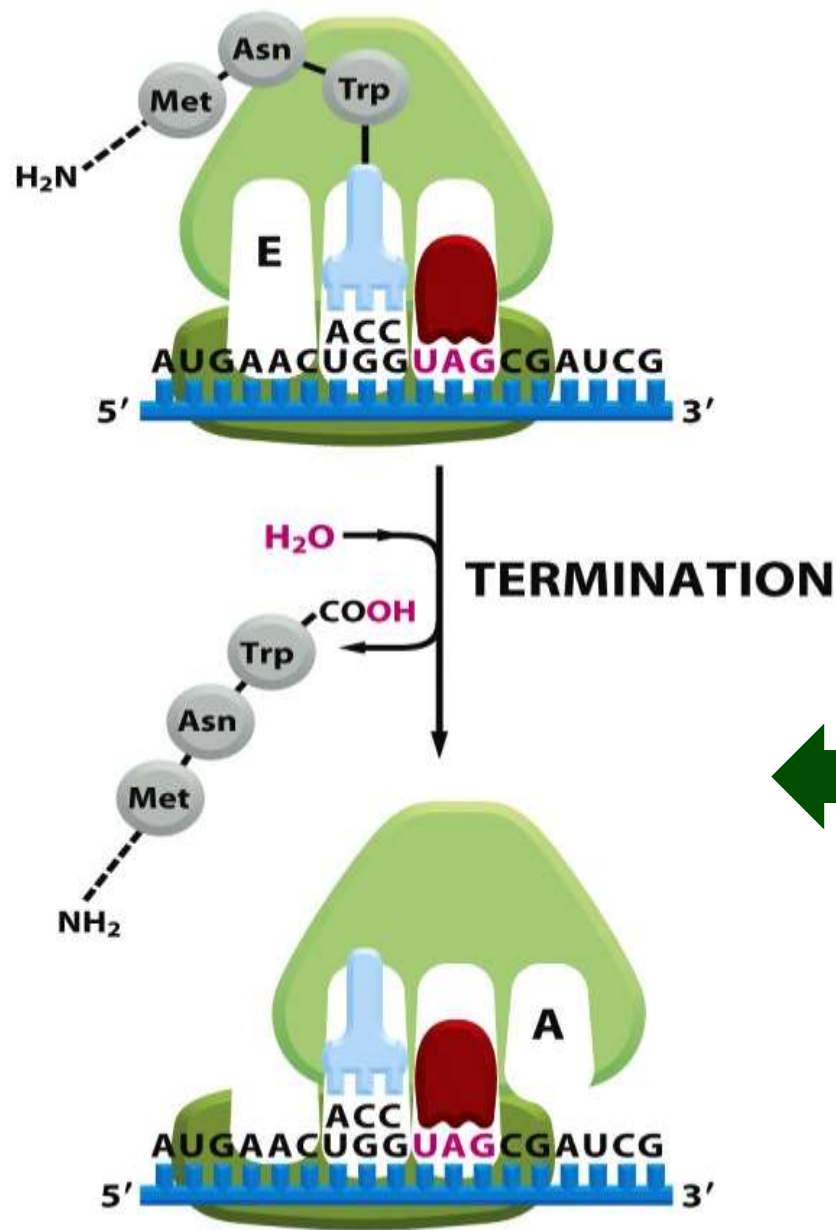
Códons STOP Marcam o Término da Tradução



final da **tradução** é assinalado pelo **códon STOP**
(não codificam qualquer **aa**)

fator de liberação se liga no **sítio A!**

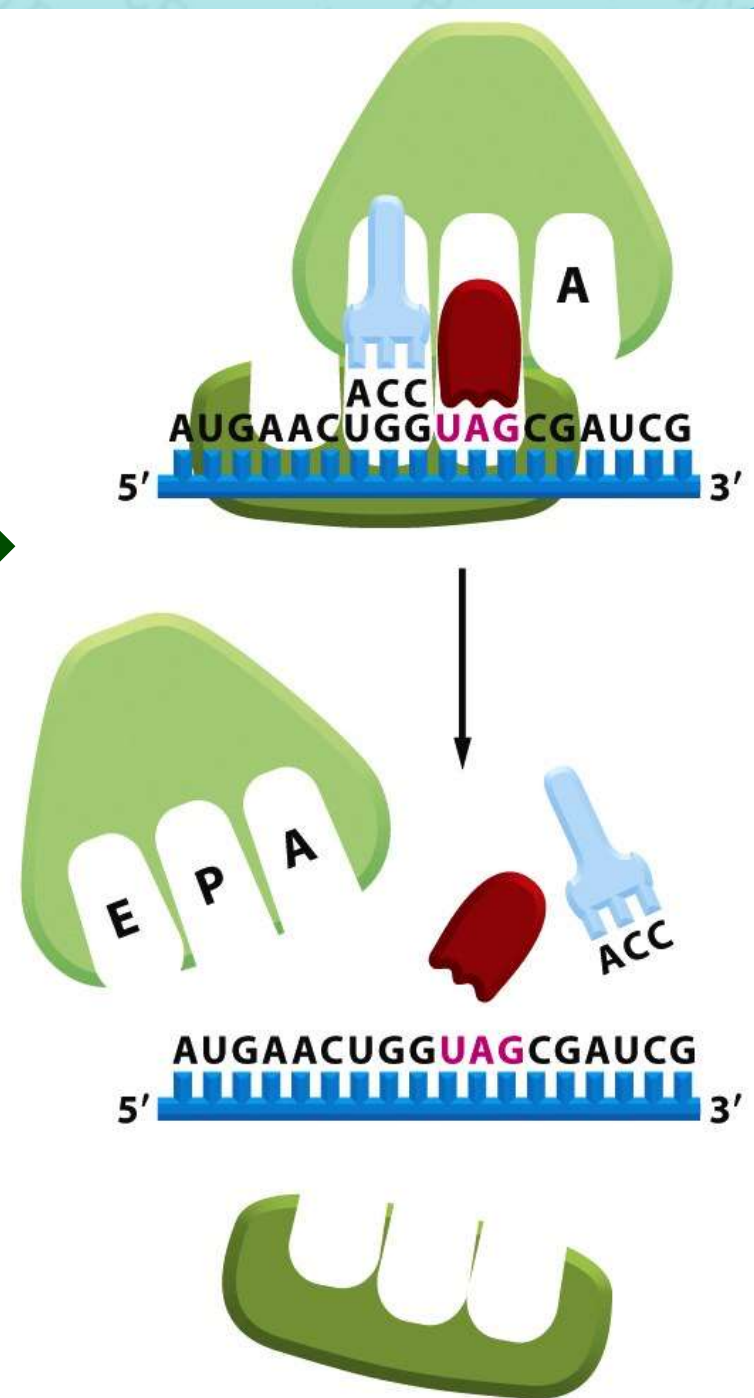
adição de uma molécula de **água** ao invés de um **aa**



adição de uma molécula de **água** ao invés de um **aa**
(hidrólise da ligação com o **tRNA**)

liberação da **cadeia polipeptídica** no **ribossomo**

ribossomo libera o mRNA e separa-se em suas subunidades pequena e grande que podem re-iniciar o ciclo



Estrutura do Fator de Liberação (eRF1)



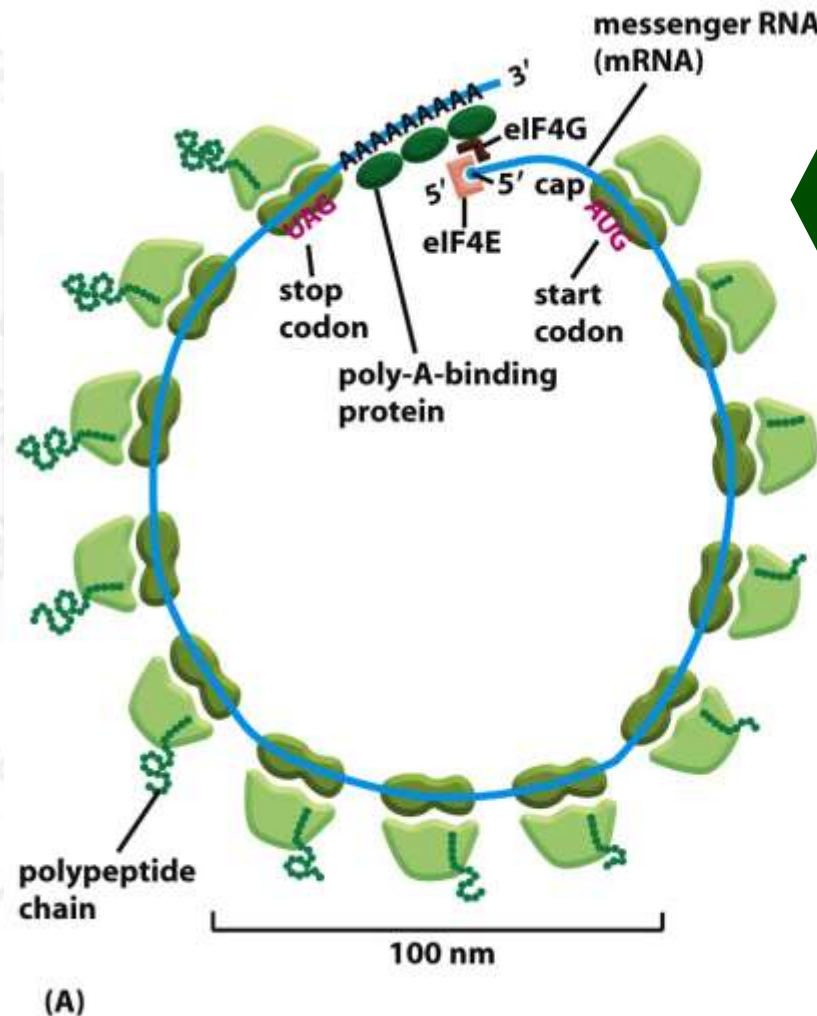
fator de liberação é exemplo de
mimetismo molecular

semelhança de forma e carga
permitem encaixe no **sítio A**

via de passagem da cadeia
polipeptídica no **ribossoma**: não
adere

estruturação mínima (alguma
estrutura 2ª)

Proteínas são Feitas em Poliribossomos



poliribossomos ou
polissomos (ribossomos
a cerca de 80
nucleotídeos de
distância no mesmo
mRNA)

síntese proteica dura entre
20s e vários minutos

múltiplos processos de **início**
de tradução simultâneos

bactérias : tradução antes do
fim da **transcrição!!**

eucariotos: interação entre 5'
e 3' do mRNA (re-início
facilitado!!)

Inibidores da Síntese Proteica são Úteis como Antibióticos

vários antibióticos inibem a **síntese proteica** bacteriana

interferência no funcionamento do **rRNA**

milhões de anos de competição

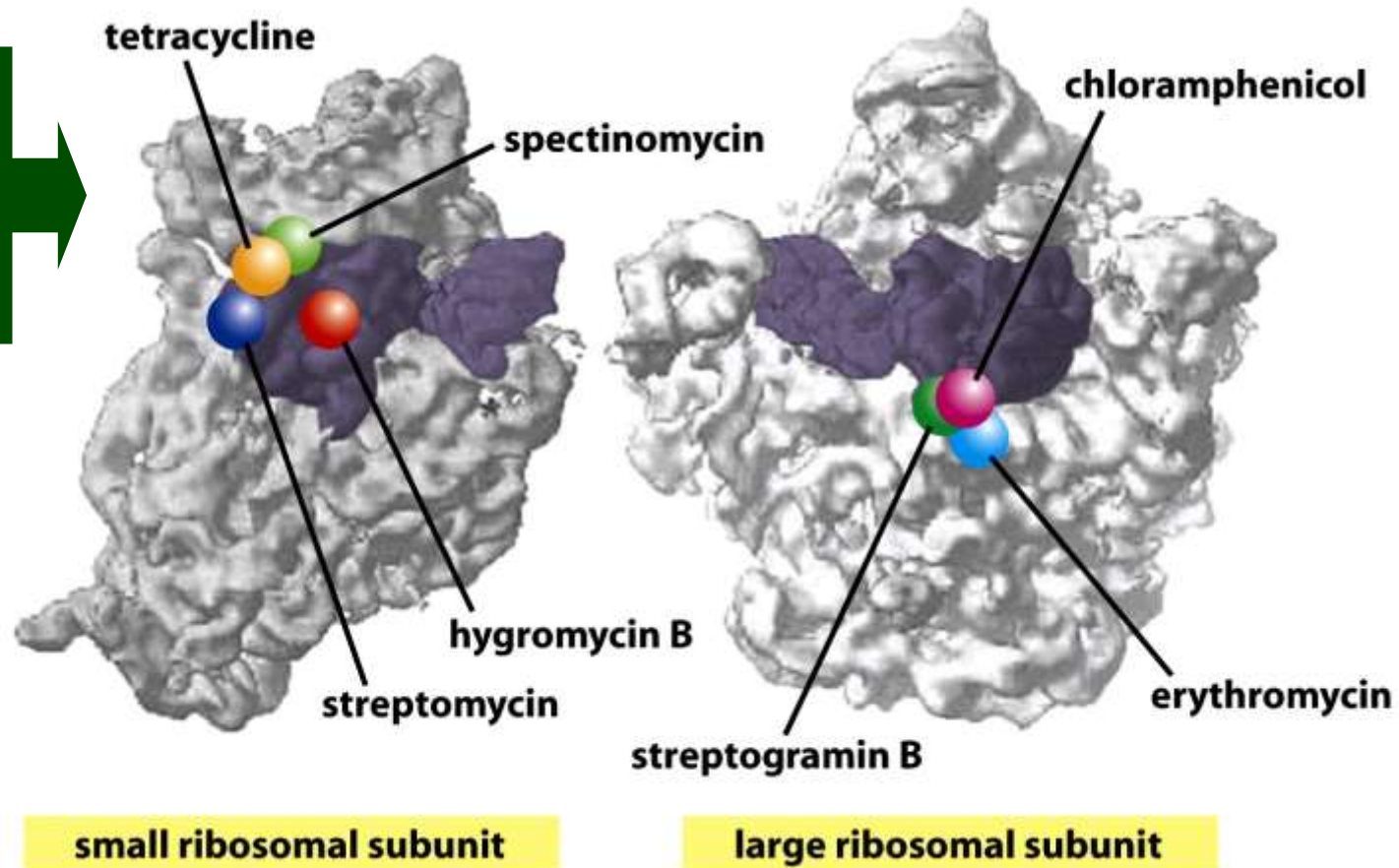


Table 6–4 Inhibitors of Protein or RNA Synthesis

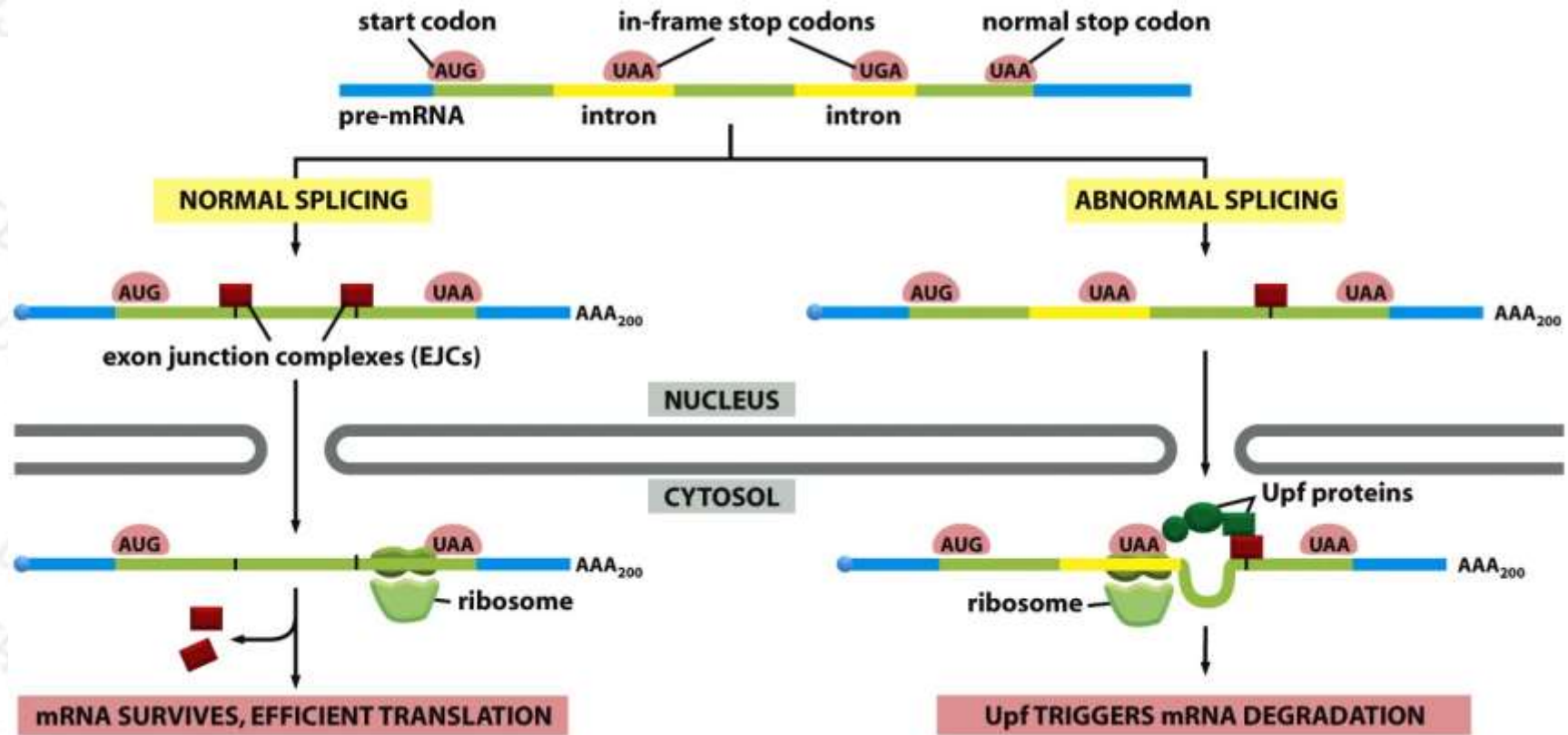
INHIBITOR	SPECIFIC EFFECT
<i>Acting only on bacteria</i>	
Tetracycline	blocks binding of aminoacyl-tRNA to A-site of ribosome
Streptomycin	prevents the transition from translation initiation to chain elongation and also causes miscoding
Chloramphenicol	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6–66)
Erythromycin	binds in the exit channel of the ribosome and thereby inhibits elongation of the peptide chain
Rifamycin	blocks initiation of RNA chains by binding to RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on bacteria and eucaryotes</i>	
Puromycin	causes the premature release of nascent polypeptide chains by its addition to the growing chain end
Actinomycin D	binds to DNA and blocks the movement of RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on eucaryotes but not bacteria</i>	
Cycloheximide	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6–66)
Anisomycin	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6–66)
α -Amanitin	blocks mRNA synthesis by binding preferentially to RNA polymerase II

The ribosomes of eucaryotic mitochondria (and chloroplasts) often resemble those of bacteria in their sensitivity to inhibitors. Therefore, some of these antibiotics can have a deleterious effect on human mitochondria.

cloranfenicol, ciclohexamida, puromicina
inibem a síntese proteica!

puromicina mimetiza tRNA-aa!!

Mecanismos de Controle Atuam Prevenindo a Tradução de mRNAs Danificados



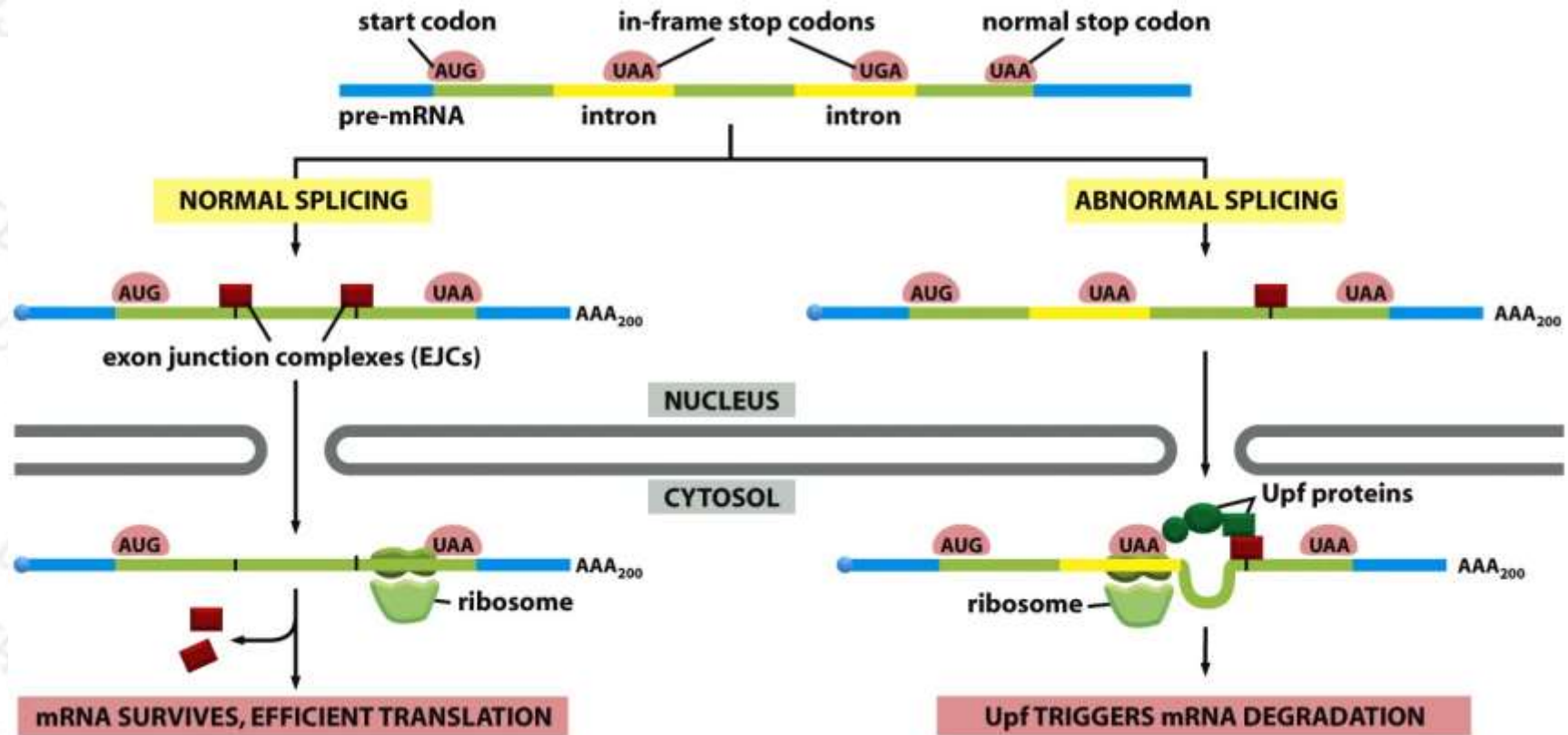
se o **ribossomo** atinge um **STOP** prematuro e restam **EJCs**: degradação

proteínas **Upf** marcam **EJCs** e interagem com o **ribossomo**

Nonsense-mediated RNA Decay (NMRD): mecanismo de monitoramento poderoso

acionado quando um **códon nonsense (STOP)** é encontrado prematuramente

Mecanismos de Controle Atuam Prevenindo a Tradução de mRNAs Danificados



CAP 5', cauda poli-A e complexos de junções de exons (EJC) são reconhecidos pela maquinaria de tradução

durante a tradução os EJCs são deslocados pelo avanço do ribossomo

STOP deve estar no ultimo exon (nenhum EJC deve restar quando o ribossomo encontra STOP)