

Tradução e sua regulação

Informação contida na molécula de DNA/RNA (ac. nucléicos)
é traduzida para Proteínas

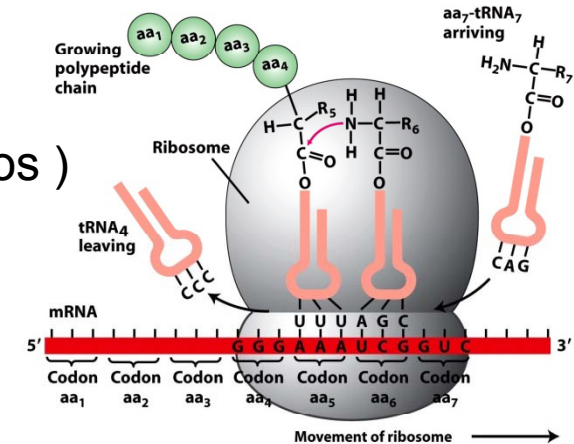
Envolve reações bioquímicas de alta complexidade

Em eucariotos envolve mais de 300 diferentes macromoléculas

- **proteínas ribossomais** (mais de 70)
- **enzimas ativadoras de aminoácidos** (aminoacil-tRNA sintetases) (≥ 20)
- **enzimas auxiliares** (GTPases) e outros **fatores proteicos** envolvidos nas diferentes fases da tradução
- **tRNAs e rRNAs** (mais de 40 tipos)

Alto investimento de energia pela célula
90% da energia gasta com reações biosintéticas

Erro 1 em 10^4



Tradução e sua regulação

Parte 1: Princípio e mecanismo geral da tradução

Tradução e sua regulação

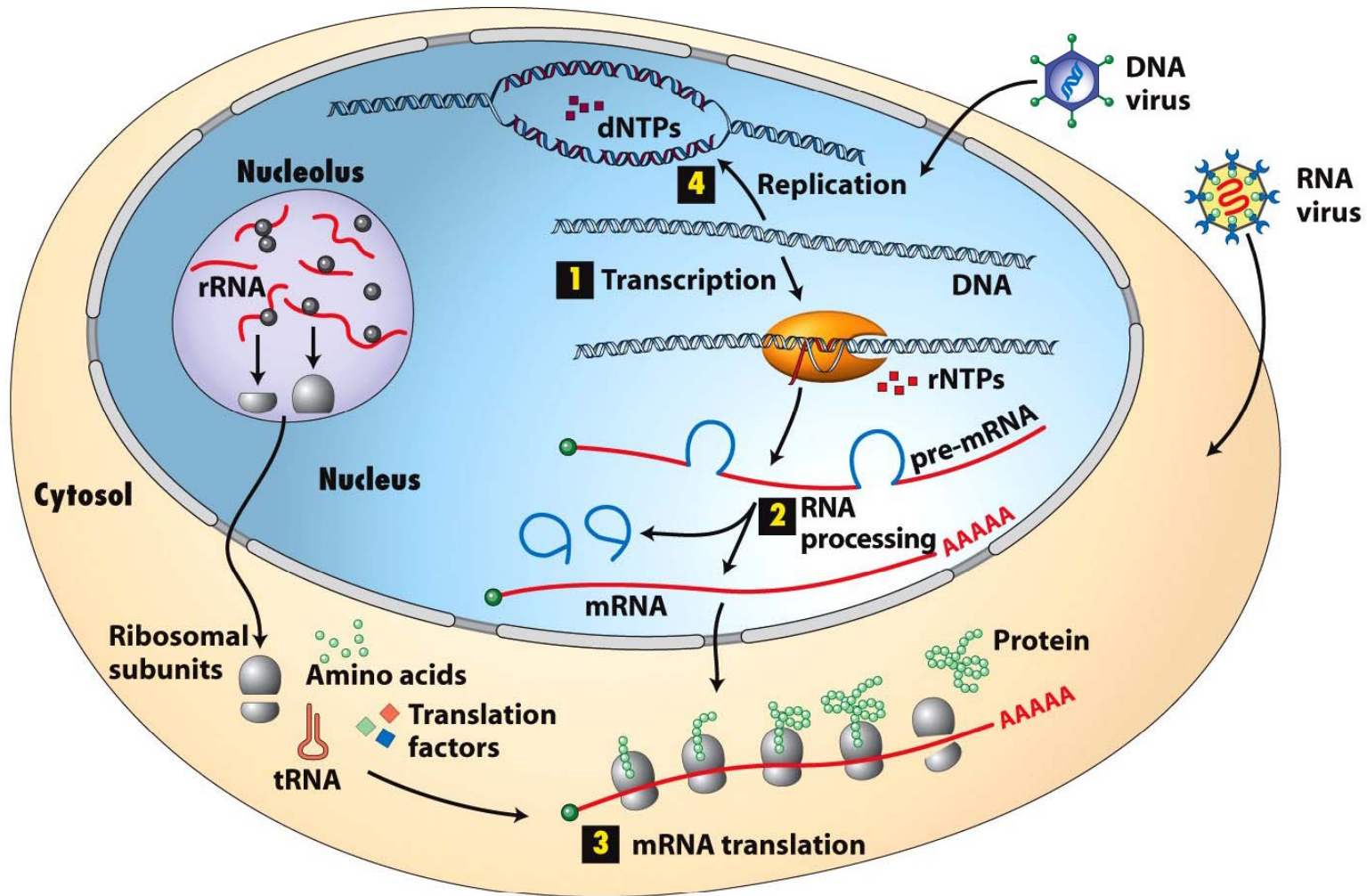


Figure 4-1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Síntese protéica ocorre em “pequenas partículas de ribonucleoproteína” **RIBOSSOMOS**

Paul Zamecnik (fracionamento subcelular) - local da síntese protéica

Observação da presença abundante dessas “partículas” em células especializadas em secreção protéica por microscopia eletrônica

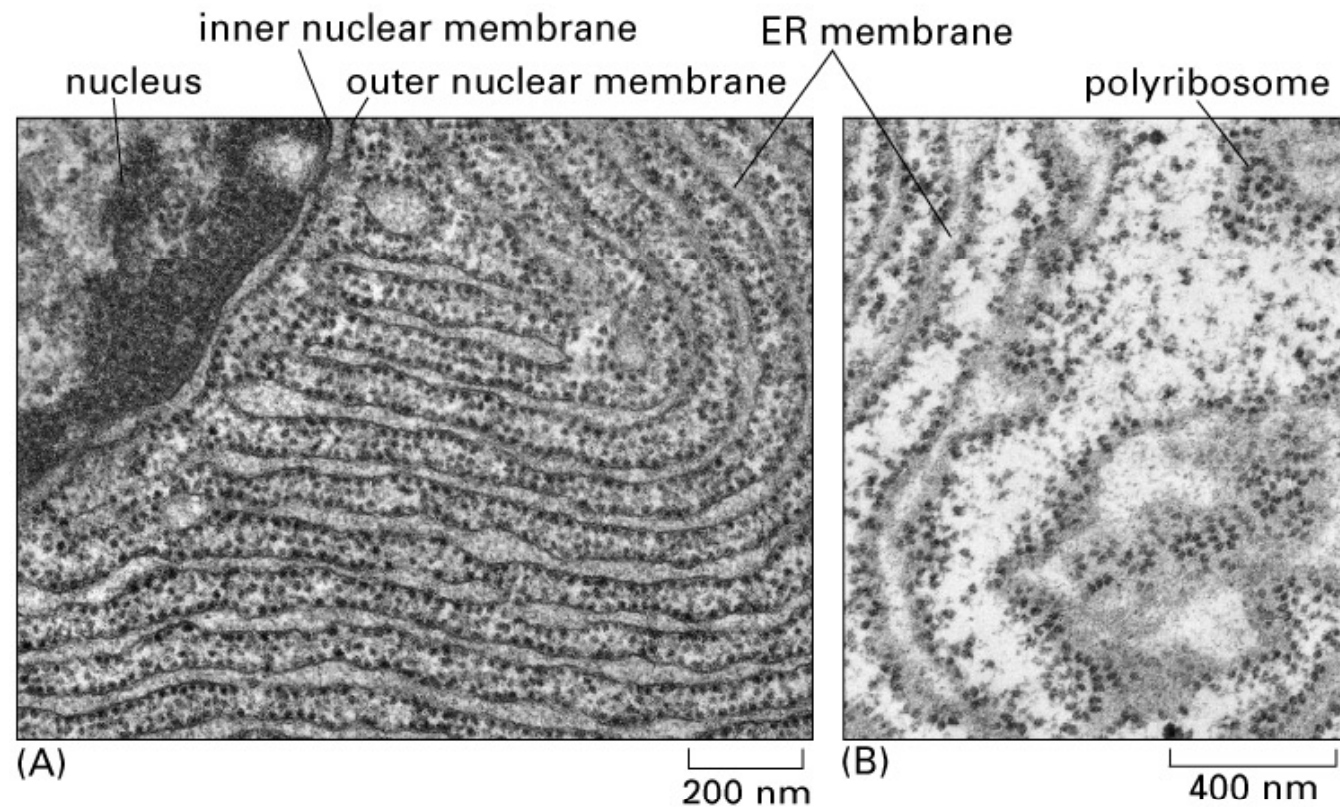


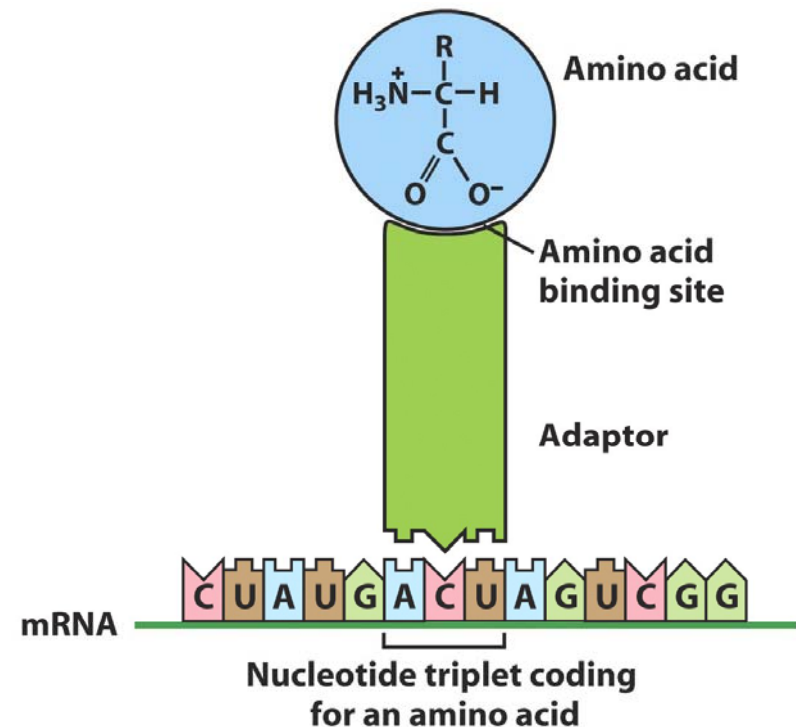
Figure 12-36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

tRNA funciona como adaptador

Zamecnik e Hoagland: aminoácidos ficam “ativados” quando incubados com ATP e citosol : associam-se a RNA estável e solúvel: aminoacil-tRNA

F. Click: existência de uma molécula adaptadora (RNA?) pelo menos 3 nucleotídeos são necessários para codificar cada aminoácido ($4 \times 4 \times 4 = 64$ codons)

R. Holley: Estrutura do tRNA



O Código Genético

- Codon é uma trinca de nucleotídeos que codifica um aminoácido
- Essas trincas são lidas de forma sucessiva e sem interrupção ou sobreposição
- Um primeiro codon determina a fase de leitura (3 são possíveis)

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

Quais trincas codificam cada aminoácido?

Decifrando o código

1961 - Nirenberg e Matthaei: poli(U) sintético codifica um polipeptídeo constituído de Phe

UUUUUUUUUU
P P P

CCCCCCCCC
F F F

Poliribonucleotídeos obtidos por misturas de dois nucleosídeos 5' diphosfato em proporções definidas
Ex. ADP e CDP (5:1)
AAA > A₂C > AC₂ > CCC

Constituição da trinca mas não a ordem.

TABLE 27-1 Incorporation of Amino Acids into Polypeptides in Response to Random Polymers of RNA

<i>Amino acid</i>	<i>Observed frequency of incorporation (Lys = 100)</i>	<i>Tentative assignment for nucleotide composition* of corresponding codon</i>	<i>Expected frequency of incorporation based on assignment (Lys = 100)</i>
Asparagine	24	A ₂ C	20
Glutamine	24	A ₂ C	20
Histidine	6	AC ₂	4
Lysine	100	AAA	100
Proline	7	AC ₂ , CCC	4.8
Threonine	26	A ₂ C, AC ₂	24

Decifrando o código

Khorana: obtenção de poliribonucleotídeos com seqüências definidas (repetições de 2 a 4 bases)

ACACACACACACAC = (ACA e CAC codons) = polip. quantidades iguais de Thr e His

His codon (AC2) = CAC

código genético decifrado (61 codons + 3 terminação)

1964 Nirenberg e Leder: ribossomos isolados ligam-se a aminoacil-tRNA específicos na presença de um dado polinucleotídeo

Ex. ribossomos + poli(U) se liga apenas a Phe-tRNA^{Phe}

O Código genético: RNAm

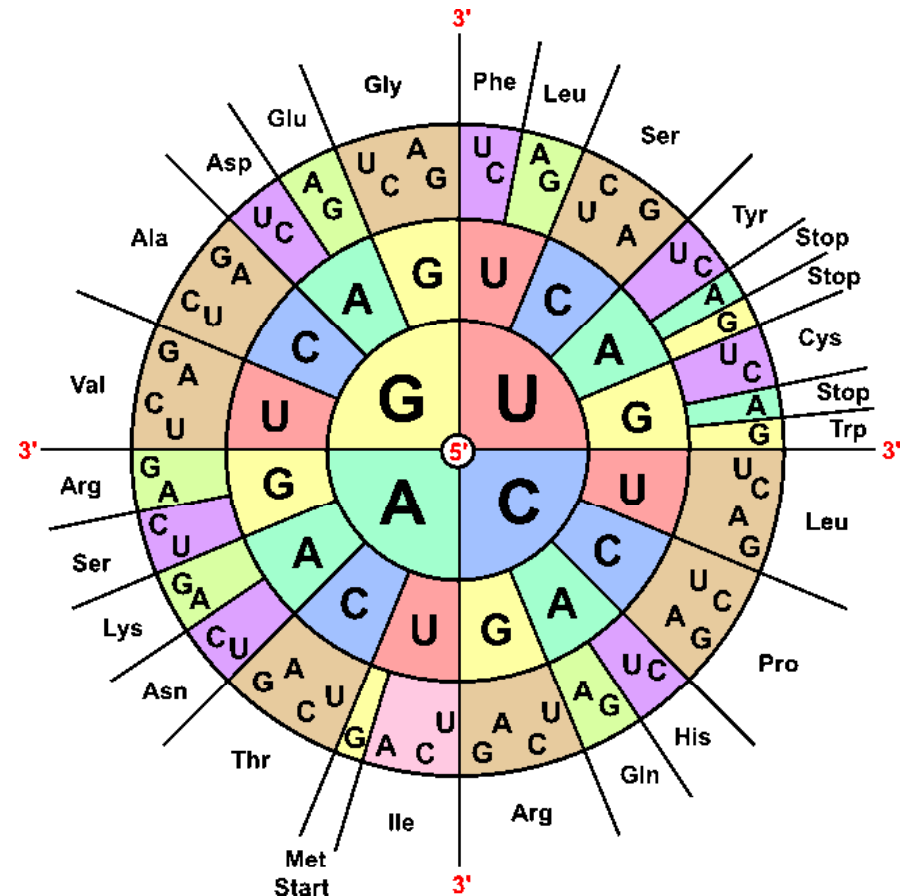
Degenerado : $4 \times 4 \times 4 = 64$
61 (aminoácidos) 3 (stop codons)

Universal (quase)

Variações são raras

AUG: geralmente codon de iniciação
exceções: GUG (algumas bact)
CUG (eucariotos)

Stop codons: podem codificar aa



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	

3 Fases de leitura são possíveis por molécula de mRNA

A D P L P A G K G V A R R P S W R C R R A S S R K W
G * P S A C G E G S R Q A A V M A V S E S Q L K K M
R L T L C L R G R E S P G G R H G G V G E P A Q E N G
CGGCUGA CCCUCUGCCUGCGGGGAAGGGAGUCGCCAGGCGCCGUCAUGGCGGUGUCGGAGAGCCAGCUCAAGAAAAUGG

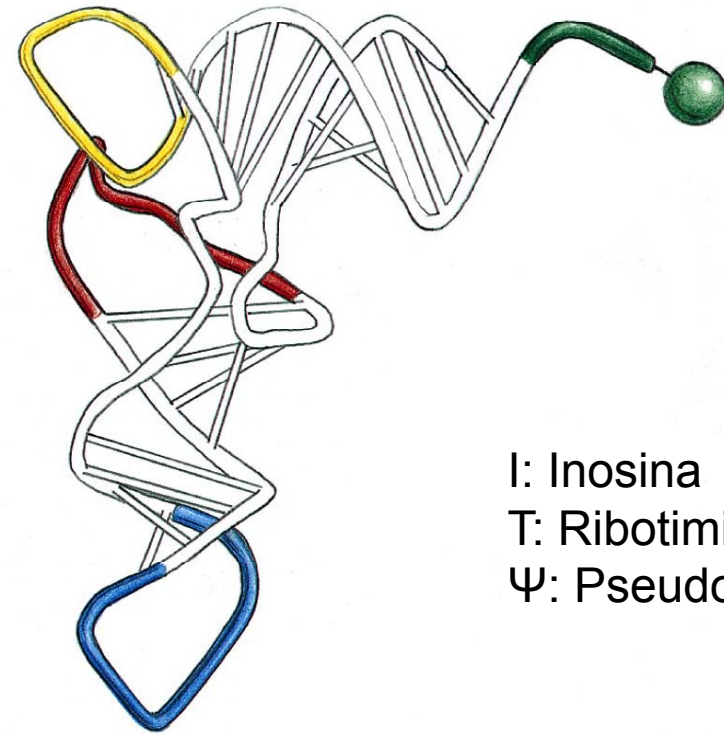
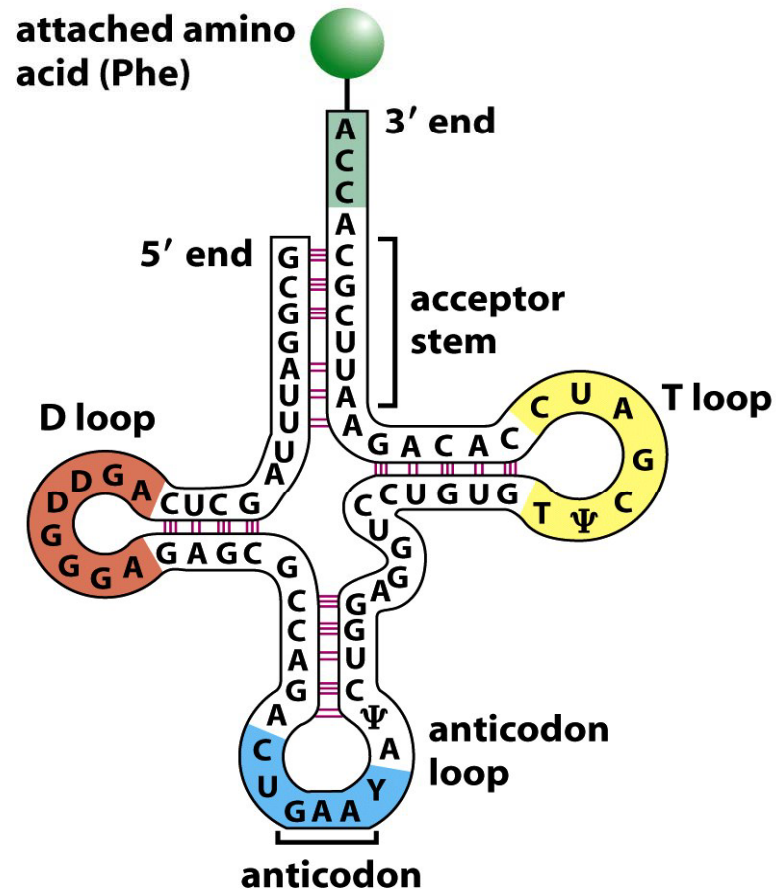
C P S T N T E T * L Y V K L S M L L L Y T K I S N L F
V S K Y K Y R D L T V R E T V N V I T L Y K D L K P V
V Q V Q I Q R P N C T * N C Q C Y Y S I Q R S Q T C
UGUCCAAGUACAAAUACAGAGACC UAA CUGUACG UGA AACUGUCA AUGUUAUACUCUAUACAAAGAUCUCAAACCUGUU

W I H M F L T M A V P G N * * T S L E Q S L C L I E
L D S Y V F N D G S S R E L M N L T G T I P V P Y R
F G F I C F * R W Q F Q G T N E P H W N N P C A L * R
UUGGAUUCUAUGUUUUUAACGAUGGCAGUUC CAGGGAAC UAAUGA ACCUCACUGGAACAAUCCUGUGCCUUA UAG AGG

Ao acaso 1 cada 20 codons
seria um stop codon

Frame shifting: Ex: HIV (gag-pol)

tRNA: uma molécula adaptadora



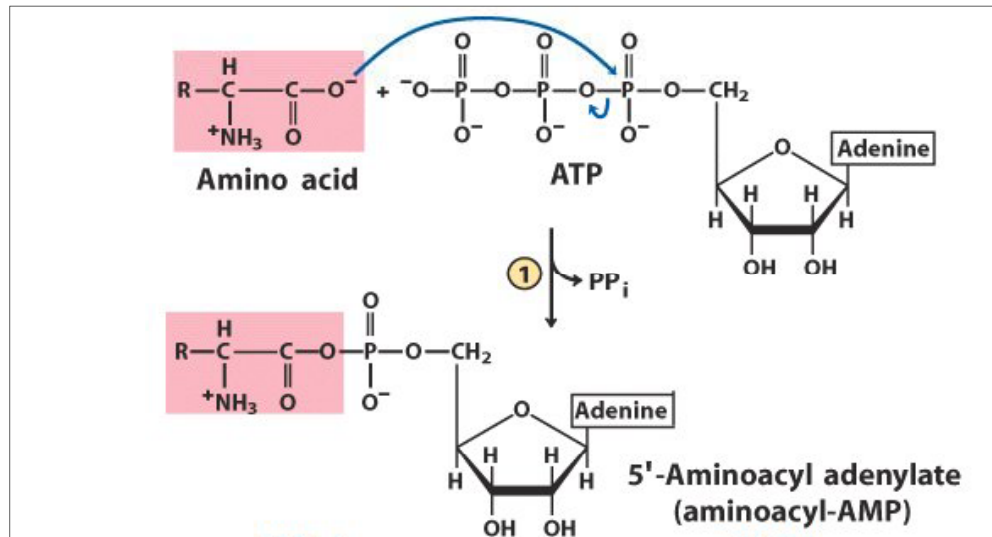
I: Inosina
T: Ribotimidina
Ψ: Pseudouridina

5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAYAYΨCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3'

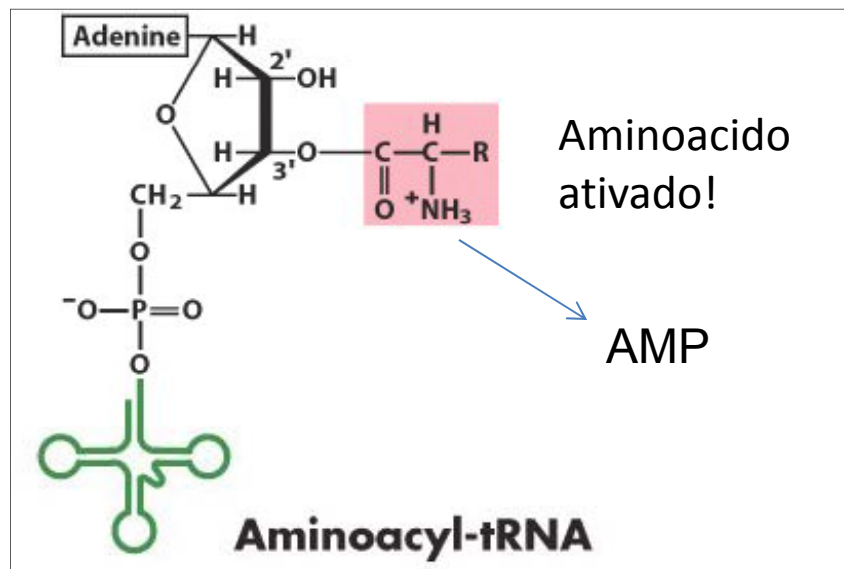
anticodon

Acoplamento de aminoácidos ao tRNA apropriado

Aminoacil- tRNA sintetases



1) Formação **aminoacil-AMP**:
ligação do grupo carboxila do aa à
uma molécula de AMP



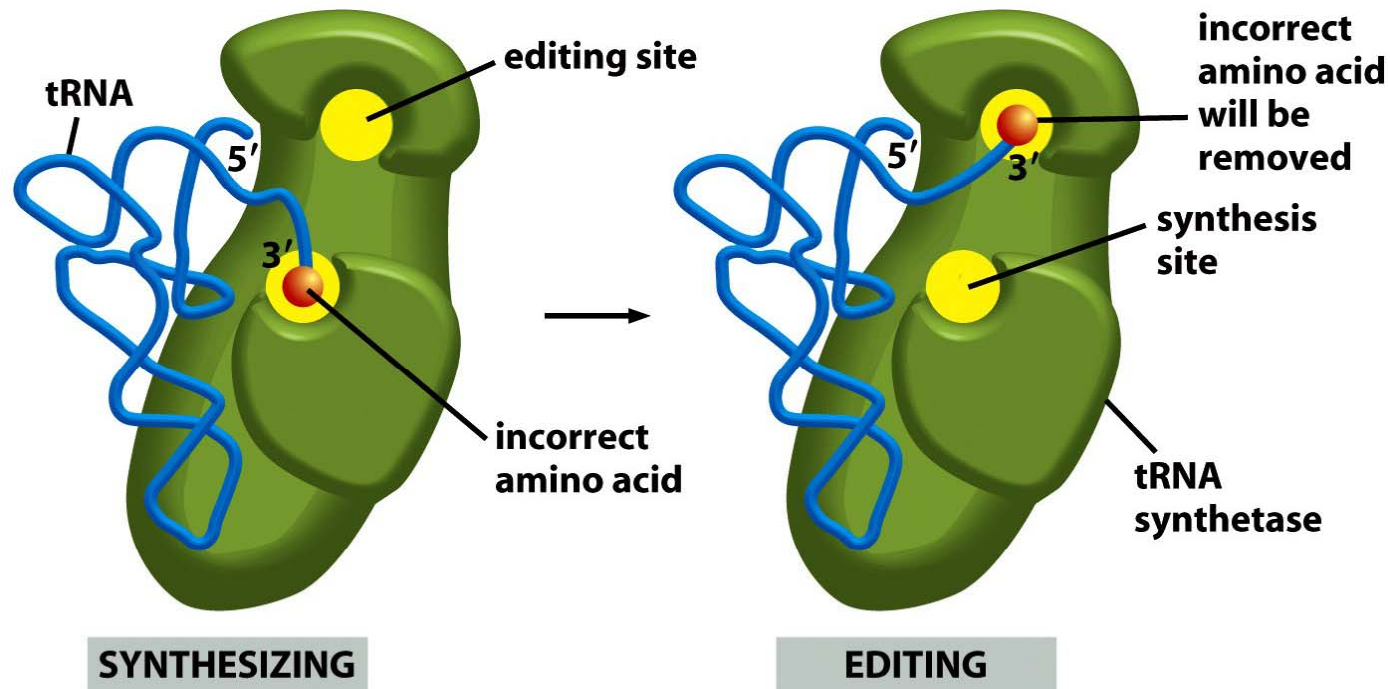
2) Transferência do grupo aminoacil-
para o tRNA: O grupo carboxila é
transferido para o grupo hidroxila da
ribose na extremidade 3' do tRNA

Existem duas classes dessas sintetases

Acoplamento de aminoácidos ao tRNA apropriado

Aminoacil- tRNA sintetases

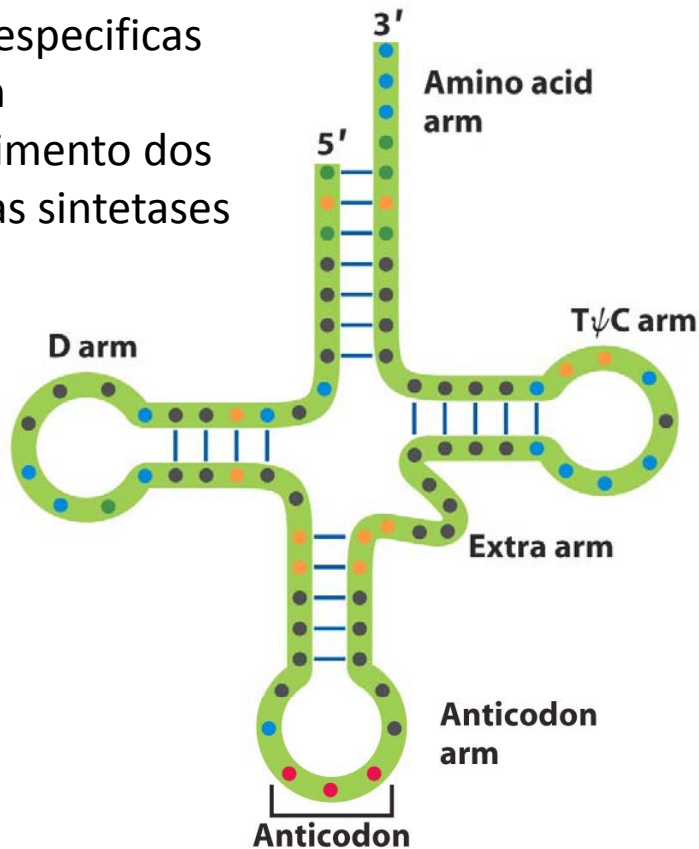
Edição (proofreading)



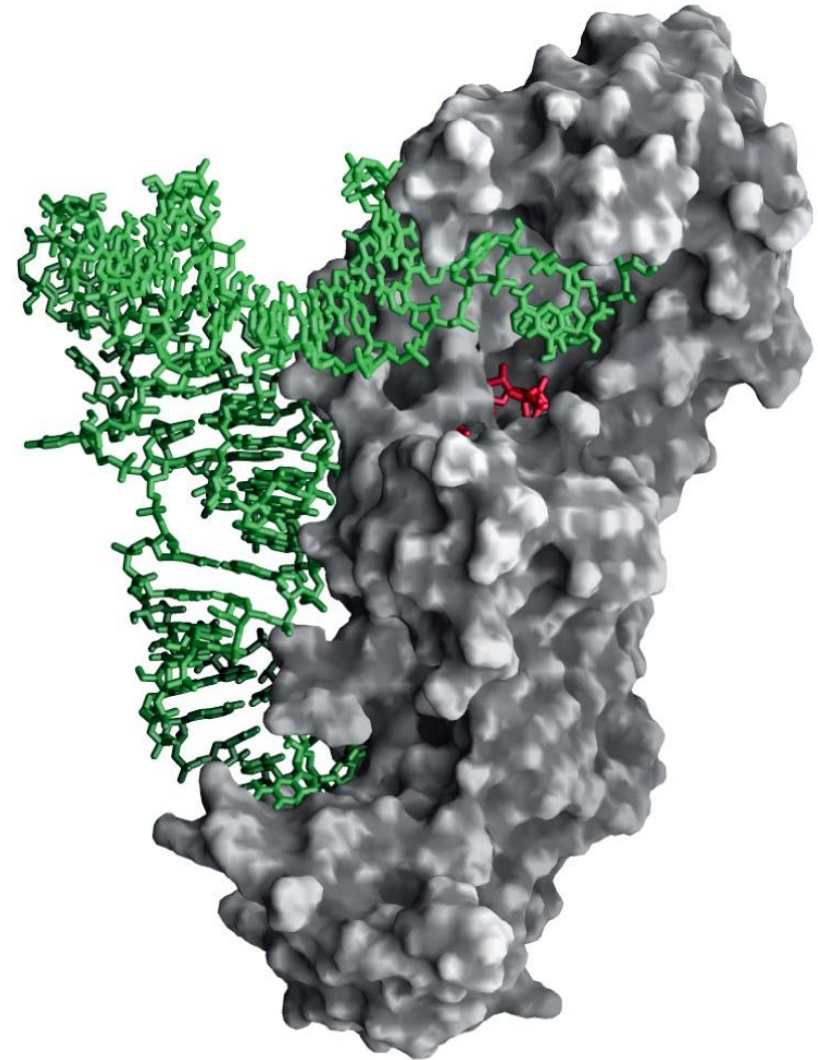
Reconhecimento de tRNAs por suas aminoacil-tRNA-sintetase

Segundo código genético

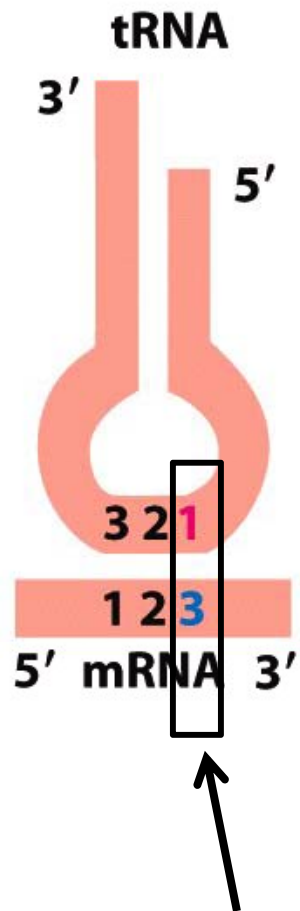
Nucleotídeos em posições específicas permitem reconhecimento dos tRNA pelas sintetases



Pontos comuns a todos tRNAs (em azul)



tRNA: uma molécula adaptadora



If these bases are in **first**, or wobble, position of anticodon

C	A	G	U	I	then the tRNA may recognize codons in mRNA having these bases in third position
G	U	C	A	C	
		U	G	A	
				U	

Posição Wobble
(pendular)

Uma mesma molécula de tRNA pode reconhecer mais de um códon para um determinado aminoácido

Ex. 5'-UUU-3' e 5'-UUC-3' (codon)
3'-AAG-5' (anti-codon)

A decodificação é feita nos ribossomos

(ribossomos de eucariotos e procariotos apresentam grande semelhança estrutural e funcional)

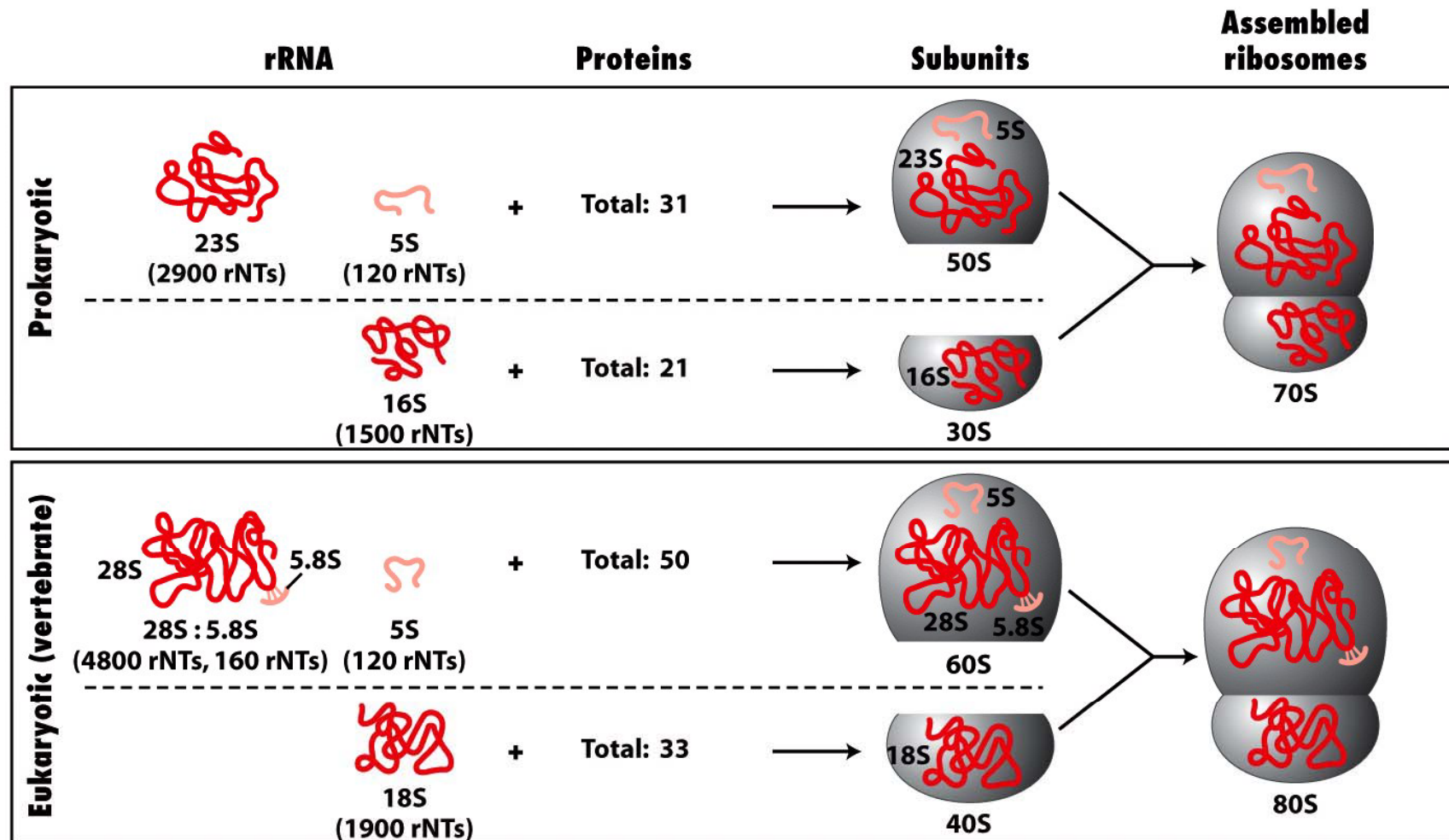
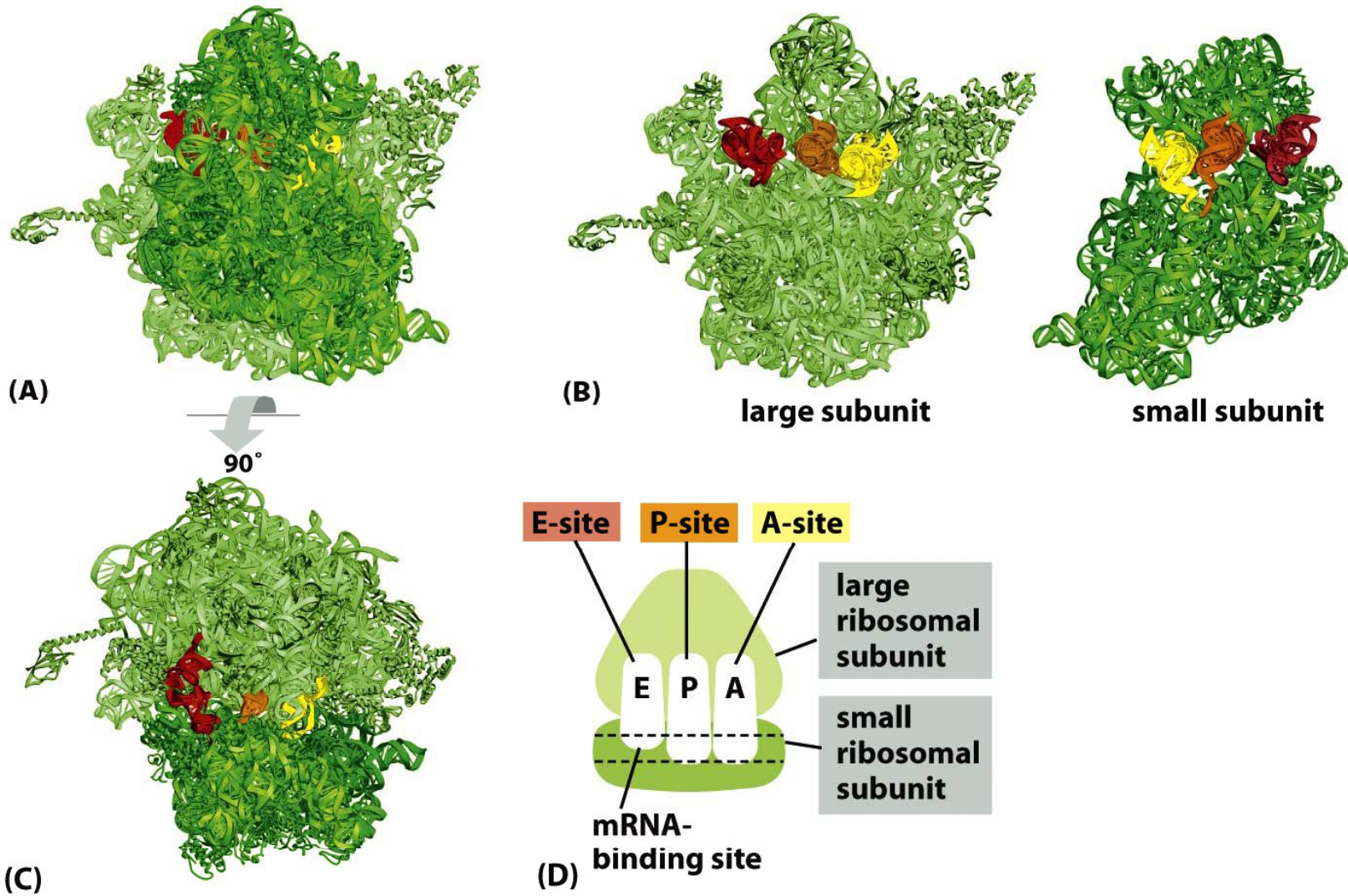


Figure 4-22
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

S: Svedberg units

Estrutura do Ribossomo 70S



Síntese Protéica

Ativação dos aminoácidos: - ligação do aminoácido na molécula adaptadora correta, ocorre no citosol, requer ATP

Iniciação: recrutamento do RNAm e formação dos complexos de pre-iniciação 48S e de iniciação 80S, requer GTP, fatores de iniciação

Elongação: síntese da cadeia polipeptídica, movimento do ribossomo ao longo da molécula de mRNA, requer GTP, fatores de elongação

Terminação e liberação: reconhecimento do stop codon no mRNA, fatores de liberação, requer GTP

Síntese Protéica

(proteínas efetoras principais)

Table 1

Translation factors in the three kingdoms of life.

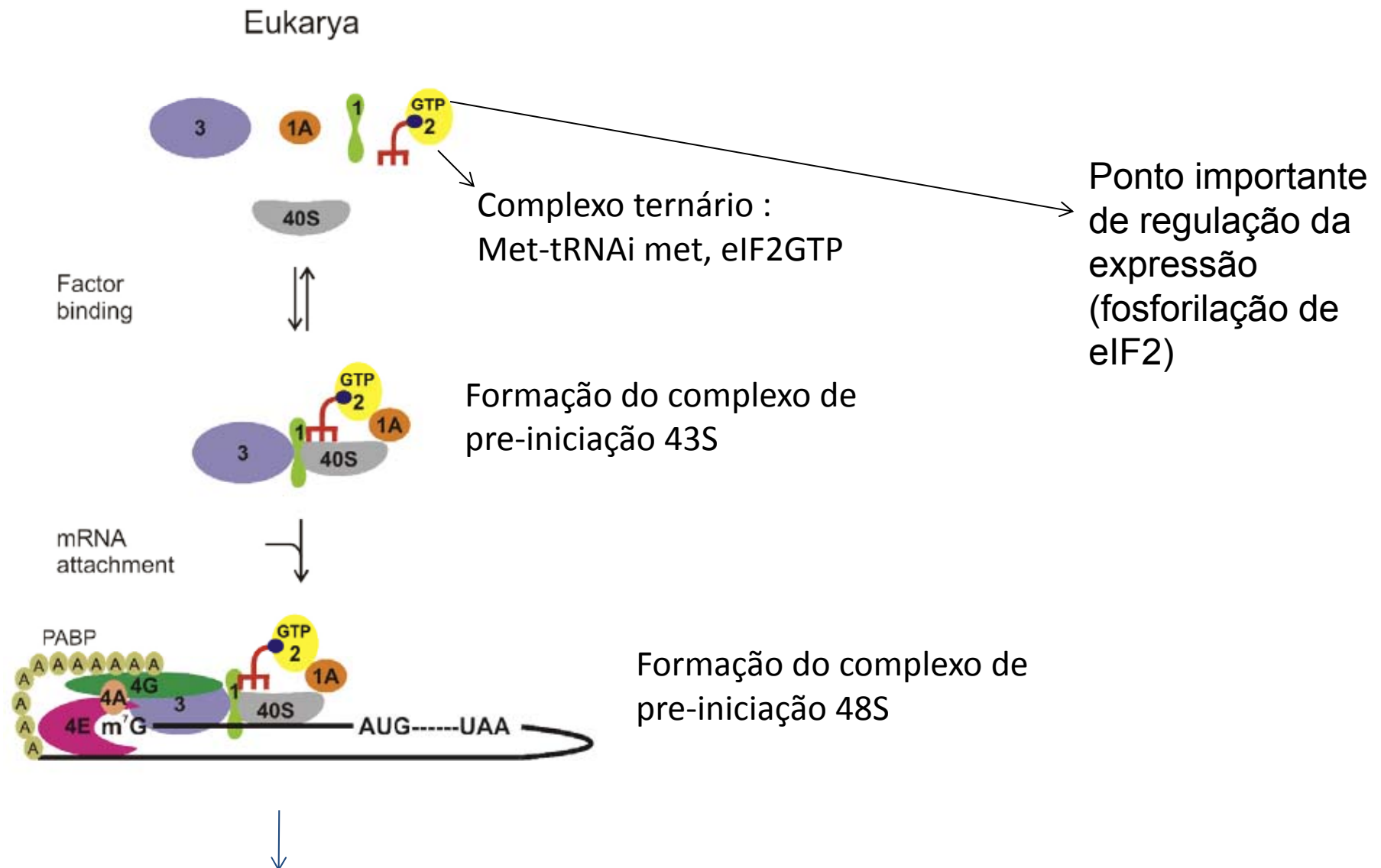
Translation step	Bacteria	Archaea	Eukarya
Initiation 20 proteínas + (13 eIF3)	IF1	aIF1A	eIF1A
	IF2	aIF5B	eIF5B
	IF3	aIF1	eIF1
		aIF2 α	eIF2 α
		aIF2 β	eIF2 β
		aIF2 γ	eIF2 γ
		aIF2B α	eIF2B α
			eIF2B β
			eIF2B γ
		aIF2B δ	eIF2B δ
			eIF2B ϵ
			eIF3 (13 subunits)
		aIF4A	eIF4A
			eIF4B
			eIF4E
			eIF4G
			eIF4H
		aIF5	eIF5
		aIF6	eIF6
			PABP

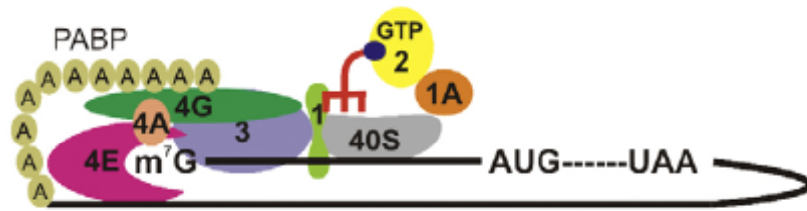
Elongation 5 proteínas	EF-Tu	aEF1 α	eEF1A
	EF-Ts	aEF1B	eEF1B (2 or 3 subunits)
		SeIB	eEFSec
			SBP2
	EF-G	aEF2	eEF2
Termination 2 proteínas	RF1	aRF1	eRF1
	RF2		
	RF3		eRF3
Recycling 4 proteínas	RRF		
	EFG		
			eIF3
			eIF3j
			eIF1A
			eIF1

Orthologous or functionally homologous factors are aligned.

Vários desses fatores são GTPases = edição

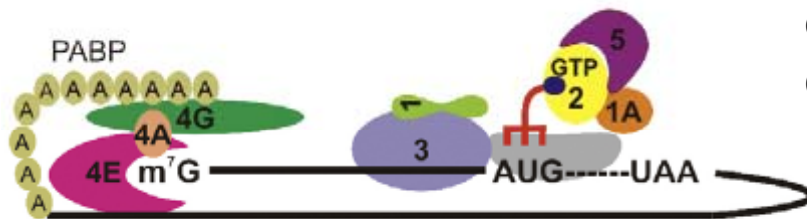
Iniciação da tradução em eucariotos





Identificação do codon de iniciação envolve a Sequência Kozak 5'-(AG)CCAUGG3'-'

Scanning



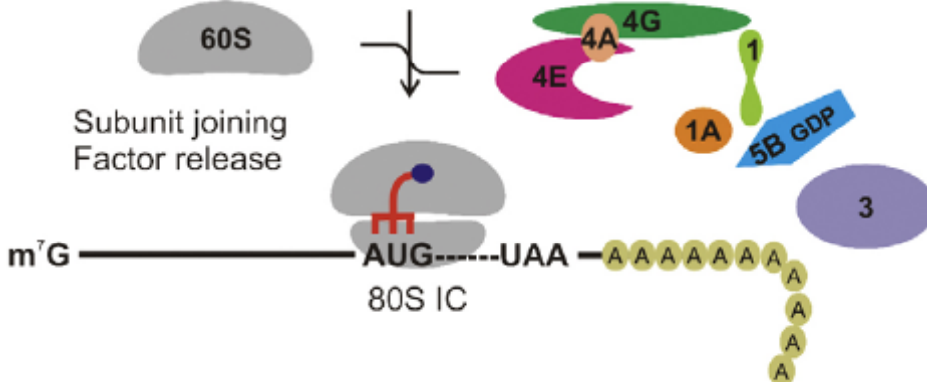
eIF5 é recrutado e estimula hidrólise de GTP ligado a eIF2.

AUG recognition



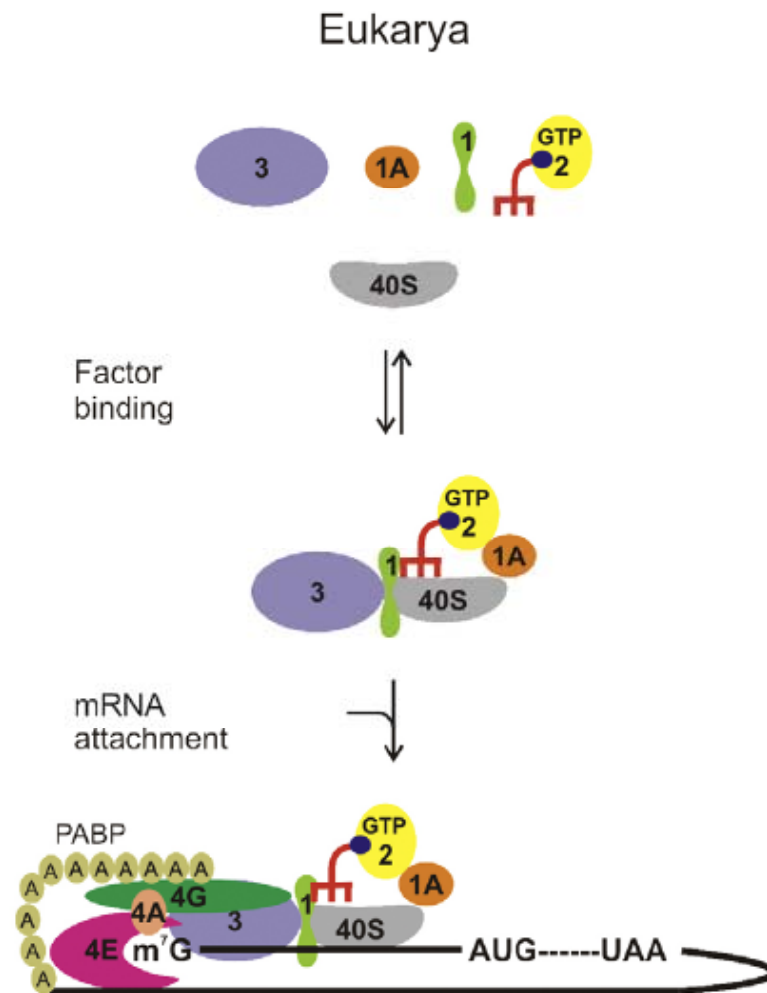
eIF1A recruta eIF5B-GTP permitindo o recrutamento da subunidade maior

Subunit joining
Factor release

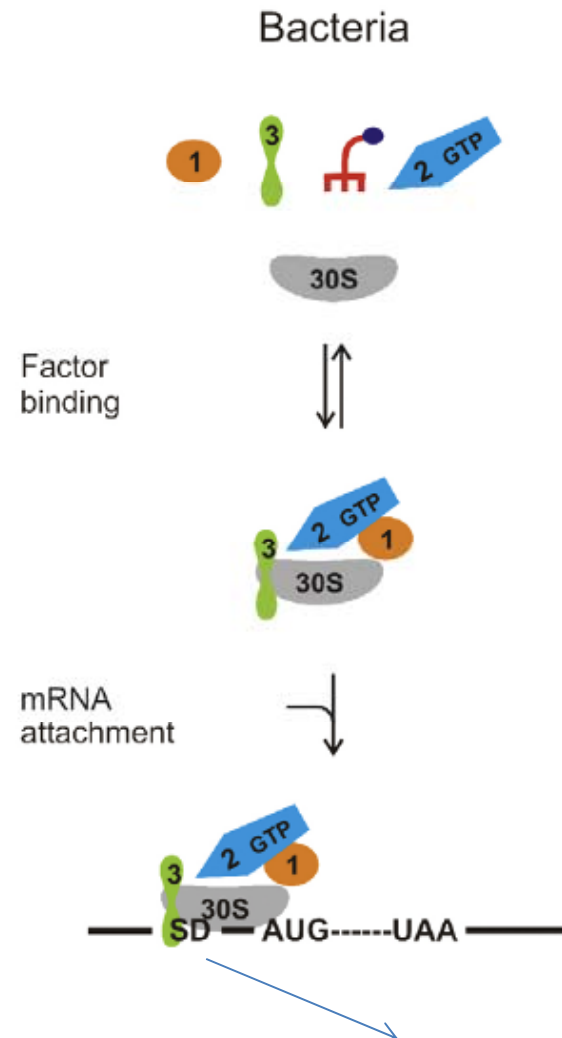


Hidrólise de GTP associado a eIF5B, formação do complexo de iniciação Met tRNAi posicionada no sitio P

Comparação com o equivalente em Procariotos



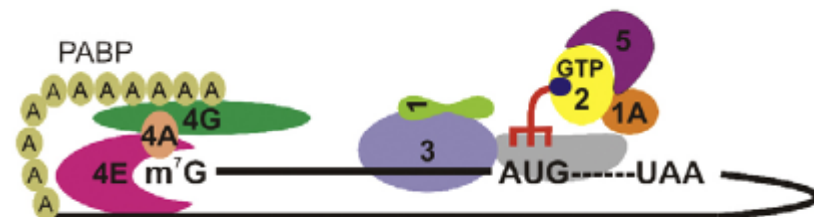
Homólogos funcionais: eIF1A – IF1,
eIF1 – IF3,
eIF5B – IF2



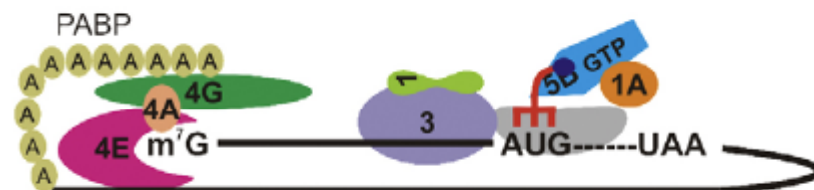
5' AGGAGGU3'
Distant 8 a 13
bases do AUG



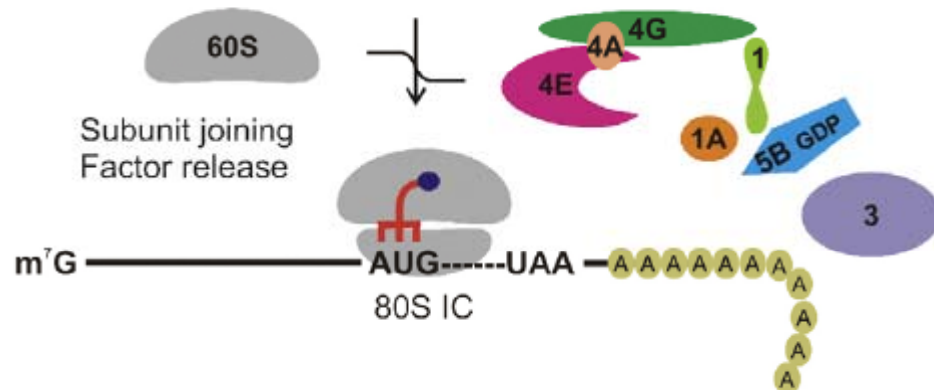
Scanning



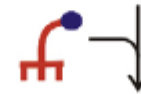
AUG recognition



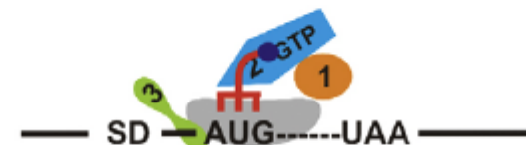
Subunit joining
Factor release



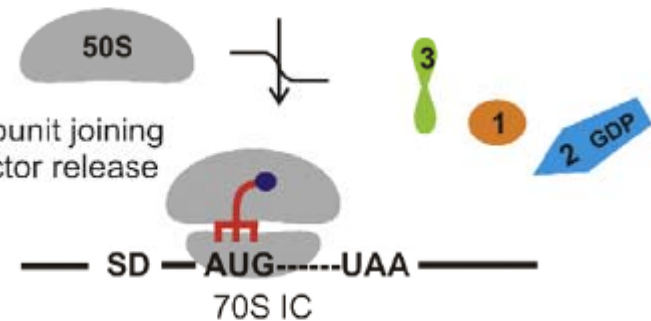
fMet-tRNA
binding



AUG recognition



Subunit joining
Factor release

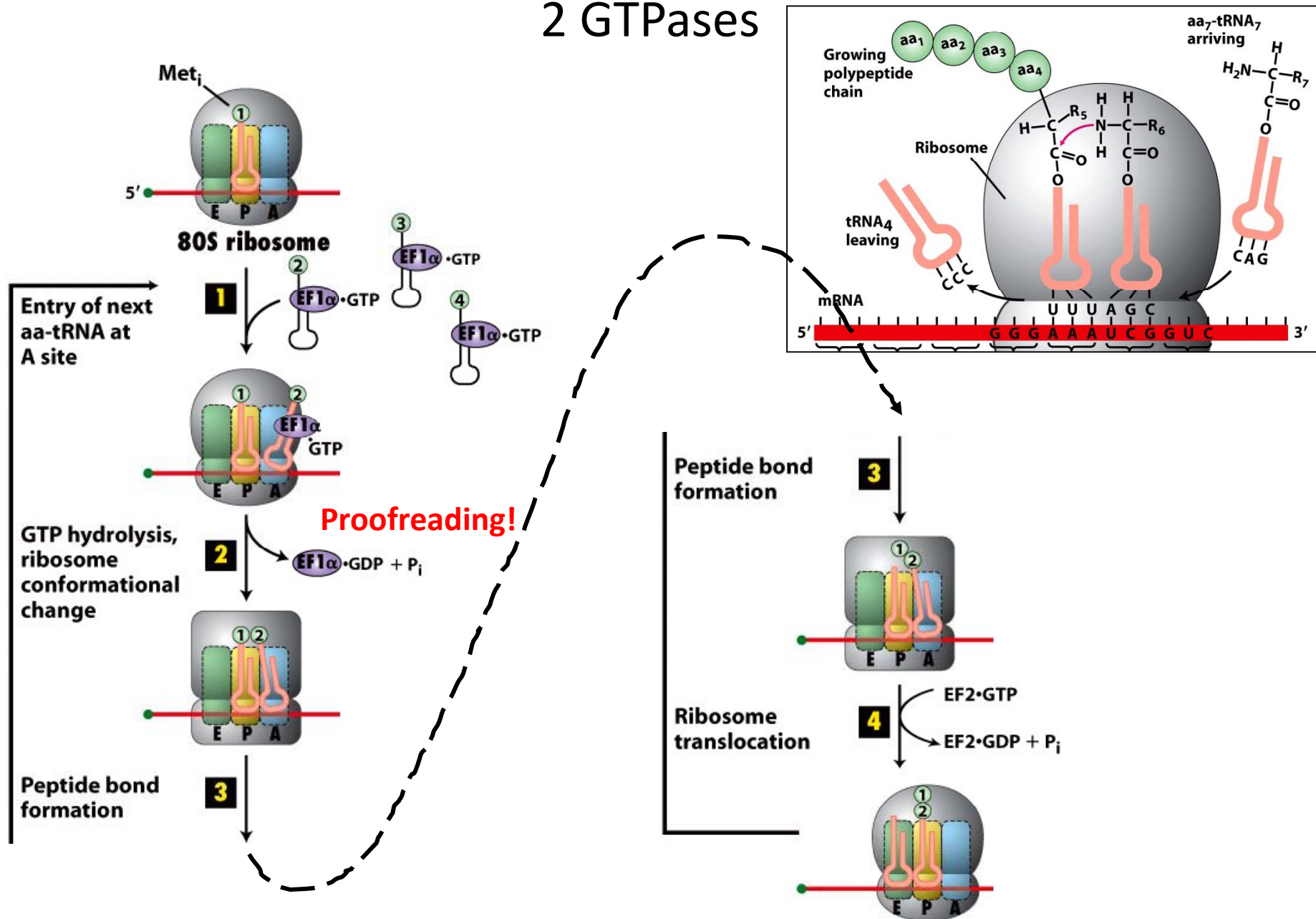


Elongação da tradução

- 1- Decodificação do códon em um mRNA por um anticodon no aminoacil-tRNA
- 2- Formação da ligação peptídica
- 3- Translocação do complexo tRNA-mRNA, movendo peptidil-tRNA do sitio A para o sitio P e apresentação um novo códon no sitio A.

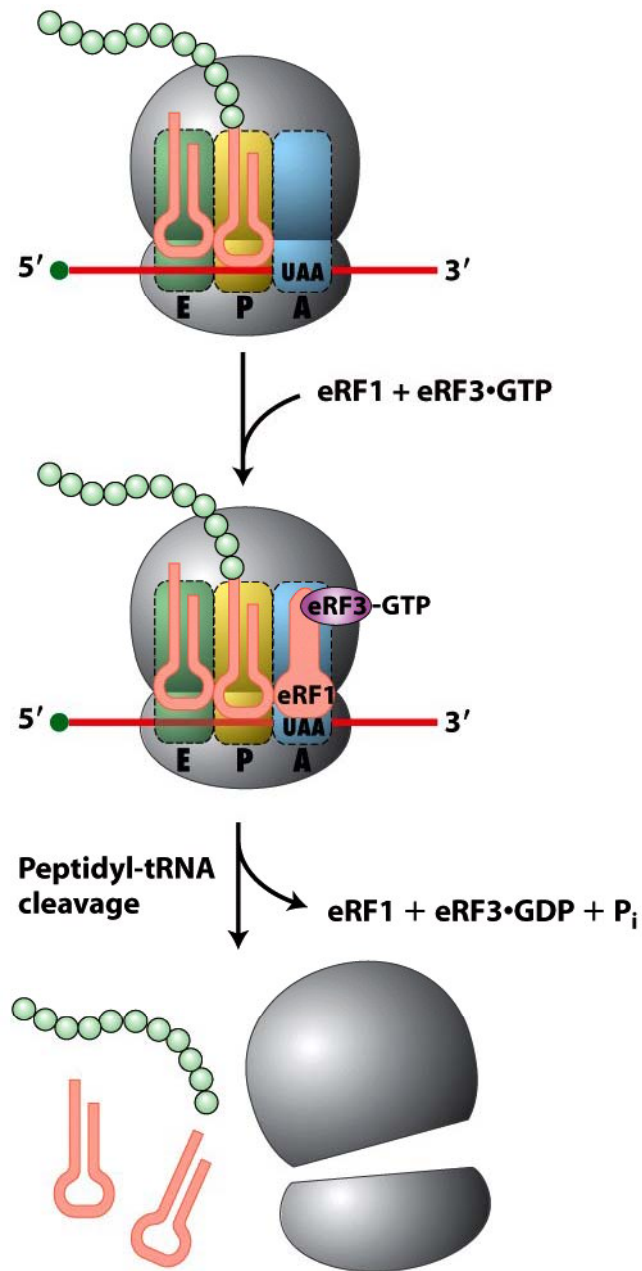
Etapas 1 e 2 são aceleradas por fatores de Elongação

Elongação (Extensão) da tradução 2 GTPases



Terminação da tradução

Fatores de liberação



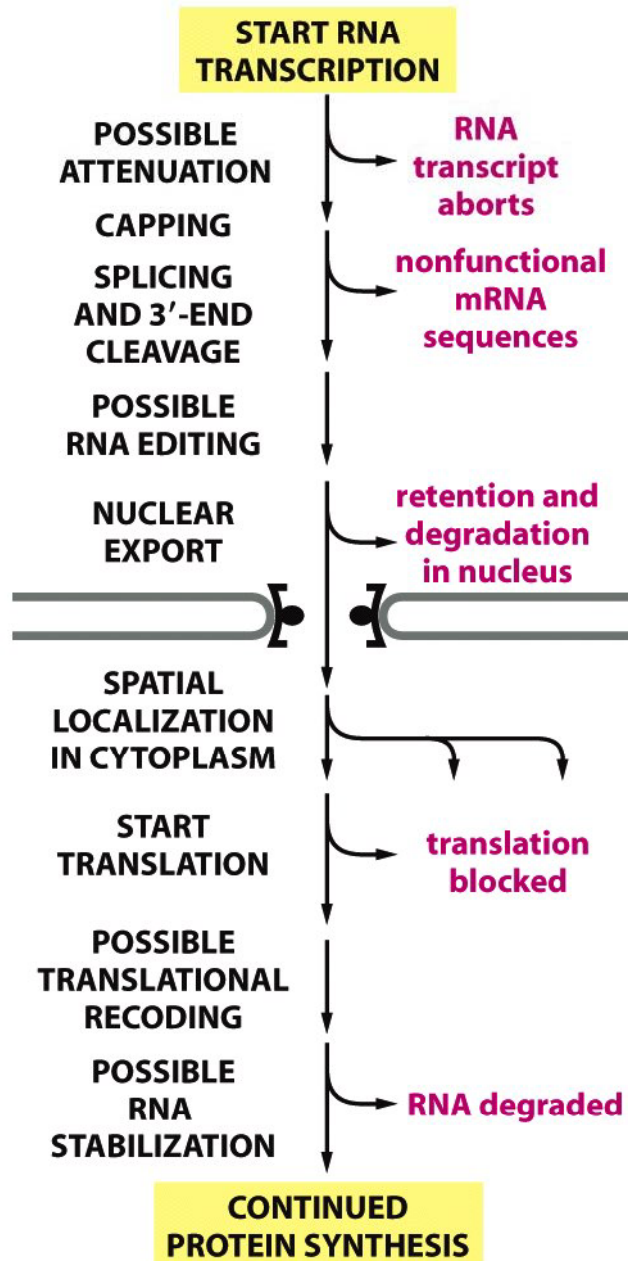
eRF1: reconhece os 3 stop codons
RF1 (UAG, UAA) e RF2 (UAA, UGA)
(em bacterias)

eRF3: GTPase
RF3 (em bacterias)

Tradução e sua regulação

Parte 2: Exemplos de mecanismos de controle da tradução

Controles pré-transcrionais (mais importantes)



- Detenção de mRNP aberrantes no citoplasma (EJC)

- Non-sense mediated decay
- Non-stop decay

- Síntese localizada de proteínas

- Inibição da tradução:

Mecanismos Globais:

- Atividade de fatores de iniciação
(ex. Fosforilação eIF2, mTOR)
- Proteínas ligantes de RNA
(ex. CPEB, IRE)

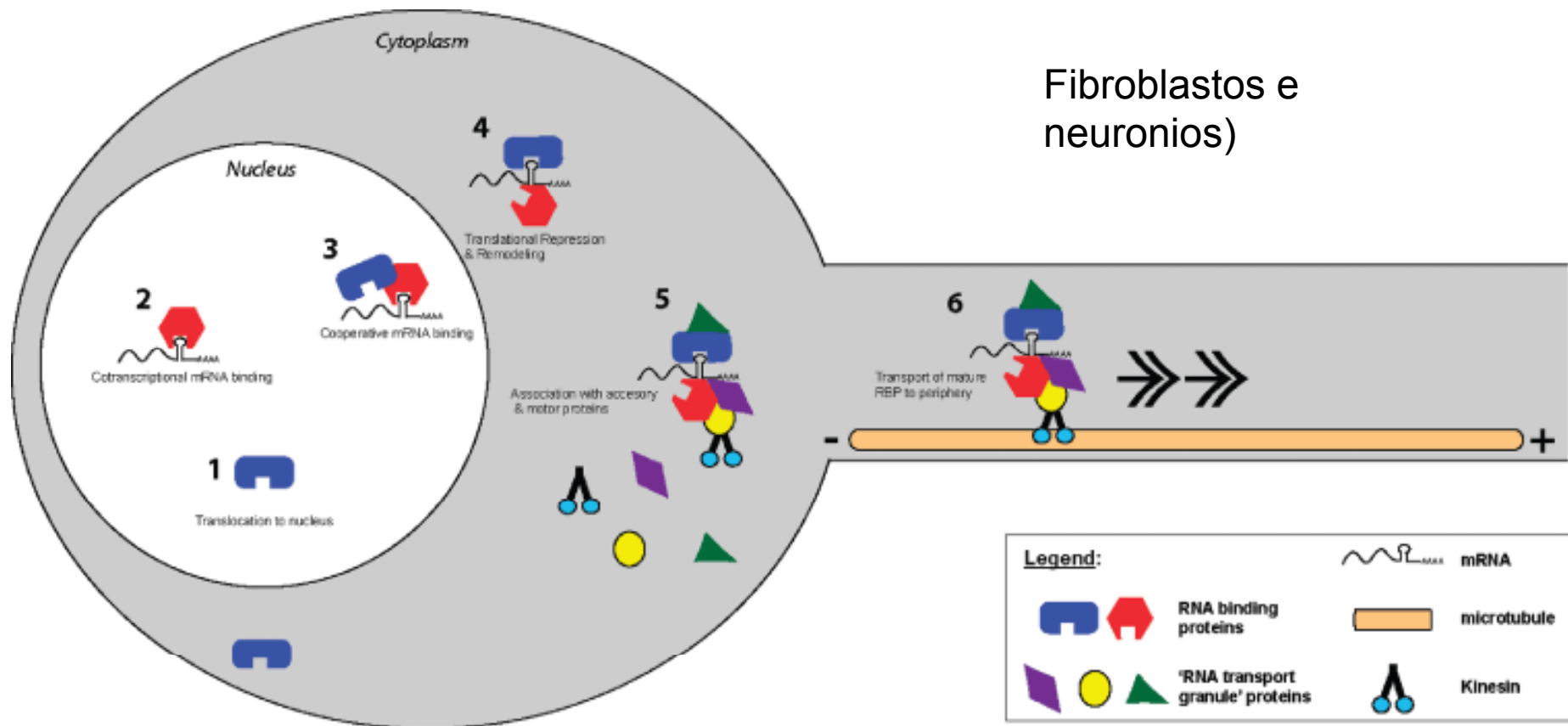
Mecanismos específicos

miRNA
siRNA

Localização de mRNA em regiões específicas do citoplasma

- Proteínas podem possuir sinais de direcionamento (acoplamento do ribossomos na membrana do RE)
- Seqüência de direcionamento no próprio mRNA, geralmente na região 3'UTR, (particularmente importante em cel. grandes, polarizadas – neuronios)
- Sistema de transporte muitas vezes acoplado ao controle da tradução (RNA fica quiescente até que seja colocado a disposição).
- mRNA complexado com proteínas (RNP complex) interage com motores moleculares (transporte dependente do citoesqueleto)

Montagem e transporte de RNP: exemplo direcionamento do mRNA de beta-actina



Traffic 2010

Controle da tradução: mecanismos globais

Fatores protéicos (muitos são ligantes de eIF4)

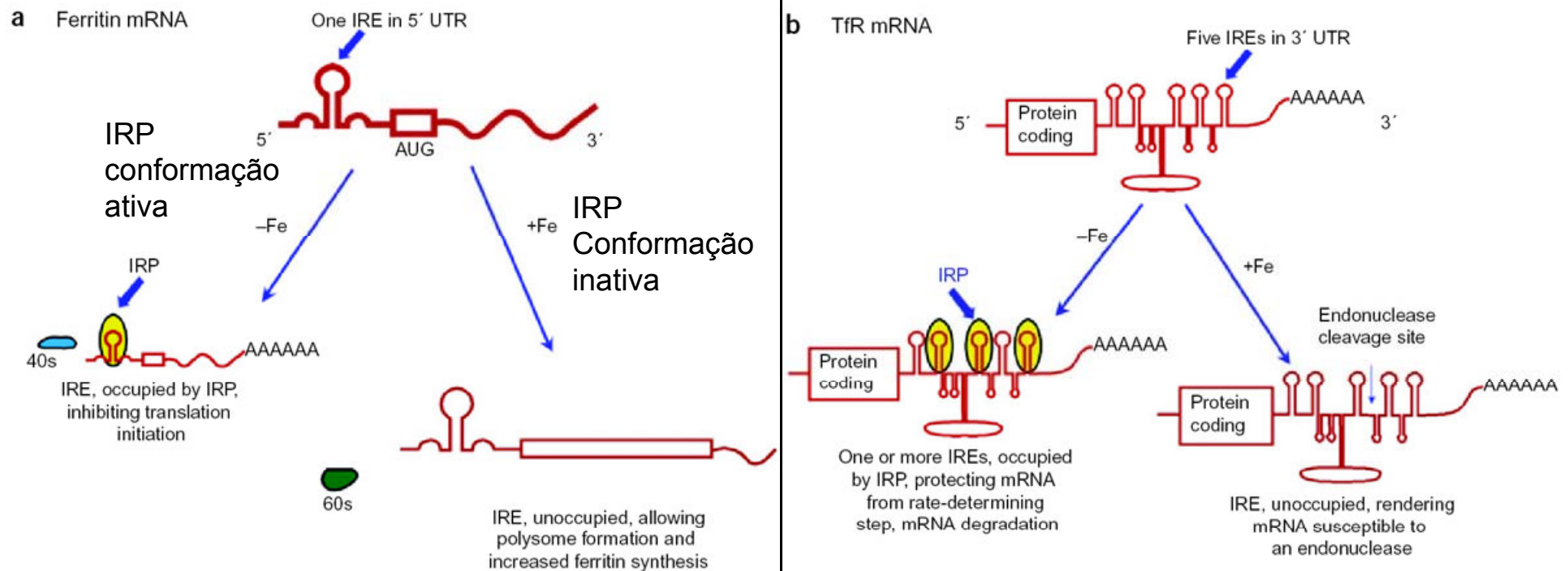
- Reguladores negativos: ex. associação IRP (iron responsive element), maskin
- Reguladores positivos: ex: PABP

Determinantes intrínsecos da molécula de mRNA:

- Tamanho complexidade estrutural do 5' UTR
- 3' UTR (mais importante) ex. poliadenilação citoplasmática (tamanho da cauda), associação sequencia-específica com proteínas regulatórias, miRNA, etc...

Controle da tradução

Efeito de proteínas ligantes de mRNA (5' UTR e 3' UTR)

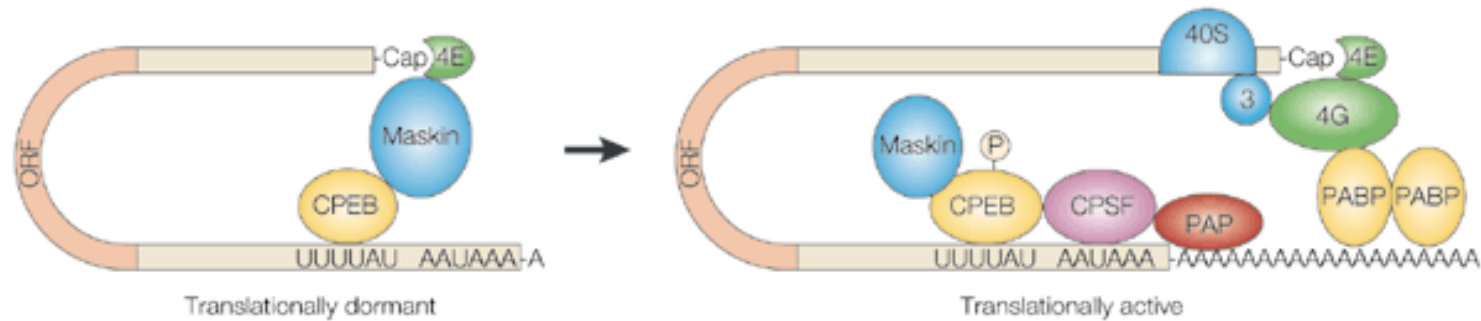


Controle da tradução: mecanismos globais

Efeito de proteínas ligantes de mRNA (ligação ao 3'UTR)

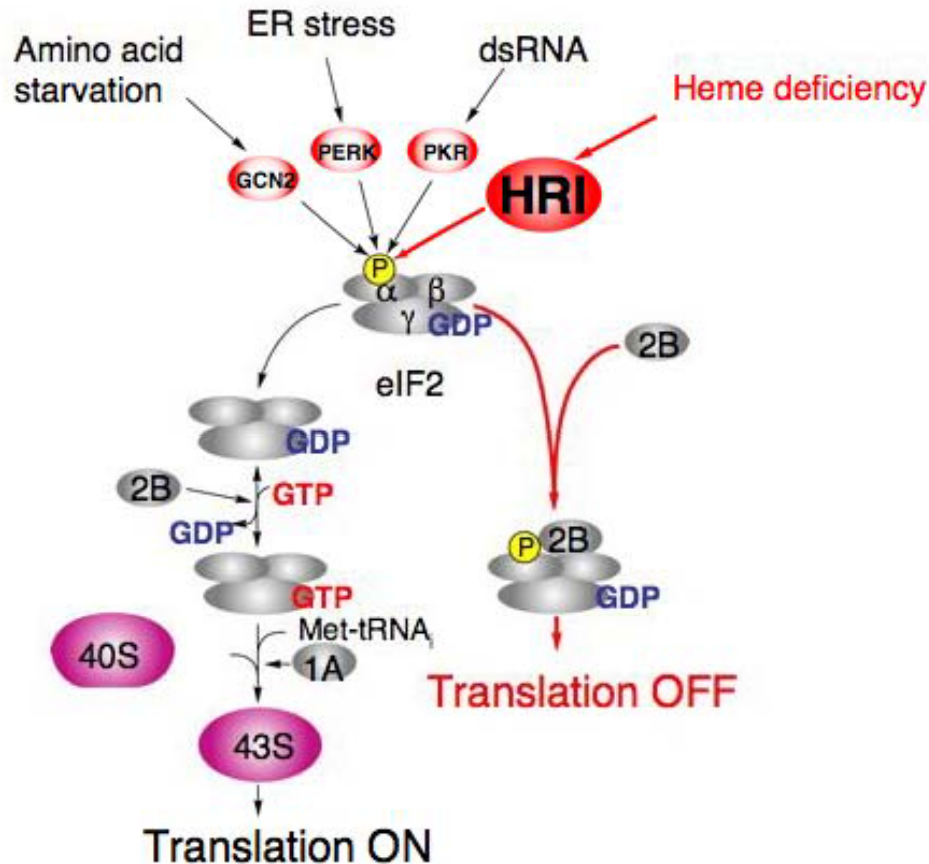
Controle traducional mediado pela “Cytoplasmic polyadenylation element BP” (CPEBP)

CPE: seq
variavel
consenso
UUUUUUAU



Controle da tradução: mecanismos globais

-Atividade de fatores de iniciação: Fosforilação eIF2



GCN2: ativada ao ligar-se com tRNA não carregado (deficiência aa)

PERK: ER stress

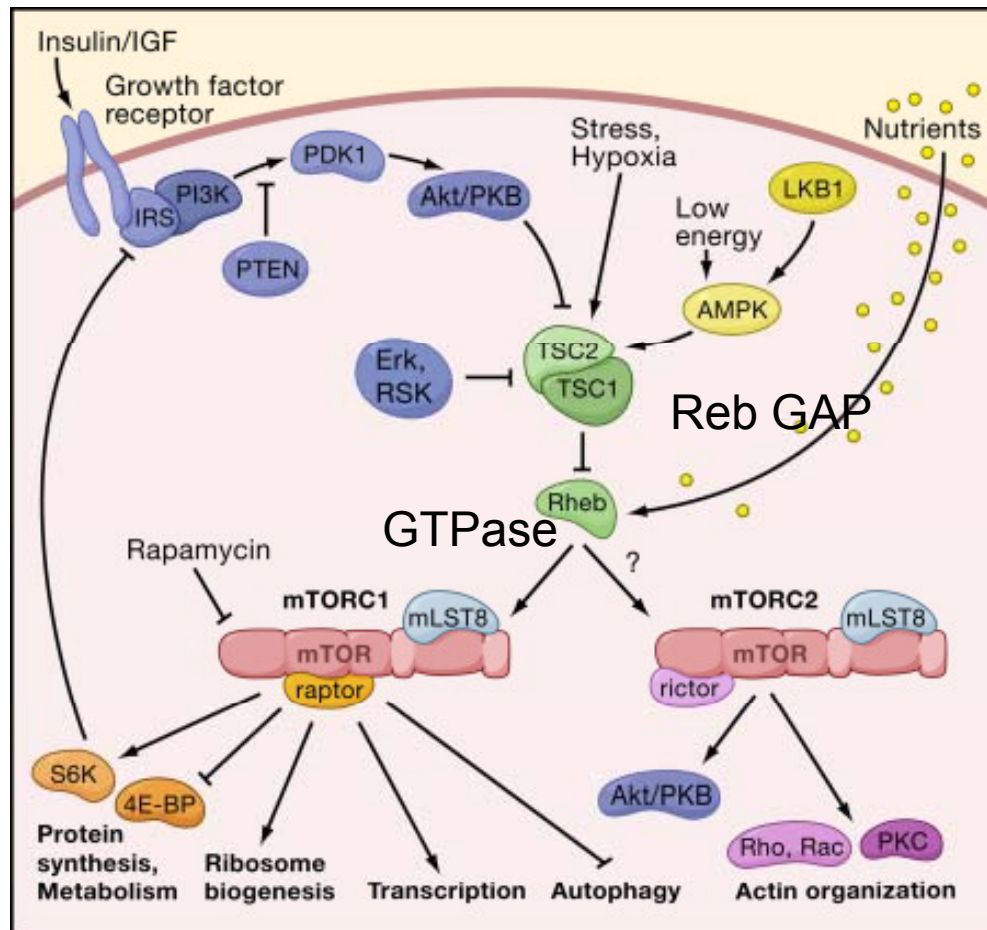
HRI: reticulocitos - baixos níveis de heme ferro (para que a síntese de globina também seja reduzida)

PKR: ativado por RNA fita dupla maiores que 30 pb (infecção viral)

Diversas outras proteínas efetoras da tradução podem ter a atividade regulada direta ou indiretamente pela ação de quinases, p. ex: eIF4E, eIF4G, eIF5, subun.eIF3...

Controle da tradução: mecanismos globais

-Atividade de fatores de iniciação: via de mTOR



4E-BP (eIF4E binding protein) quando fosforilada libera eIF4E para ligar-se a eIF4G.

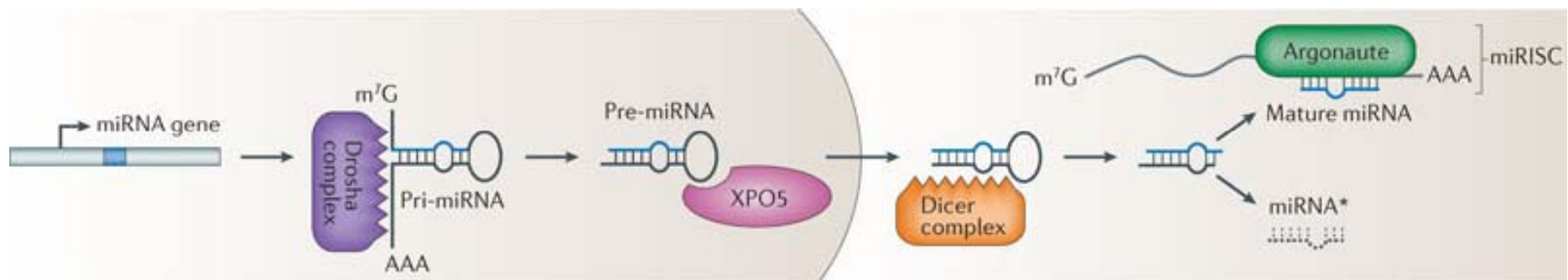
S6K (quinase) fosforila 6S RP Favorece tradução de 5'TOP mRNA ? ?

Controle da tradução: mecanismos específicos

miRNA

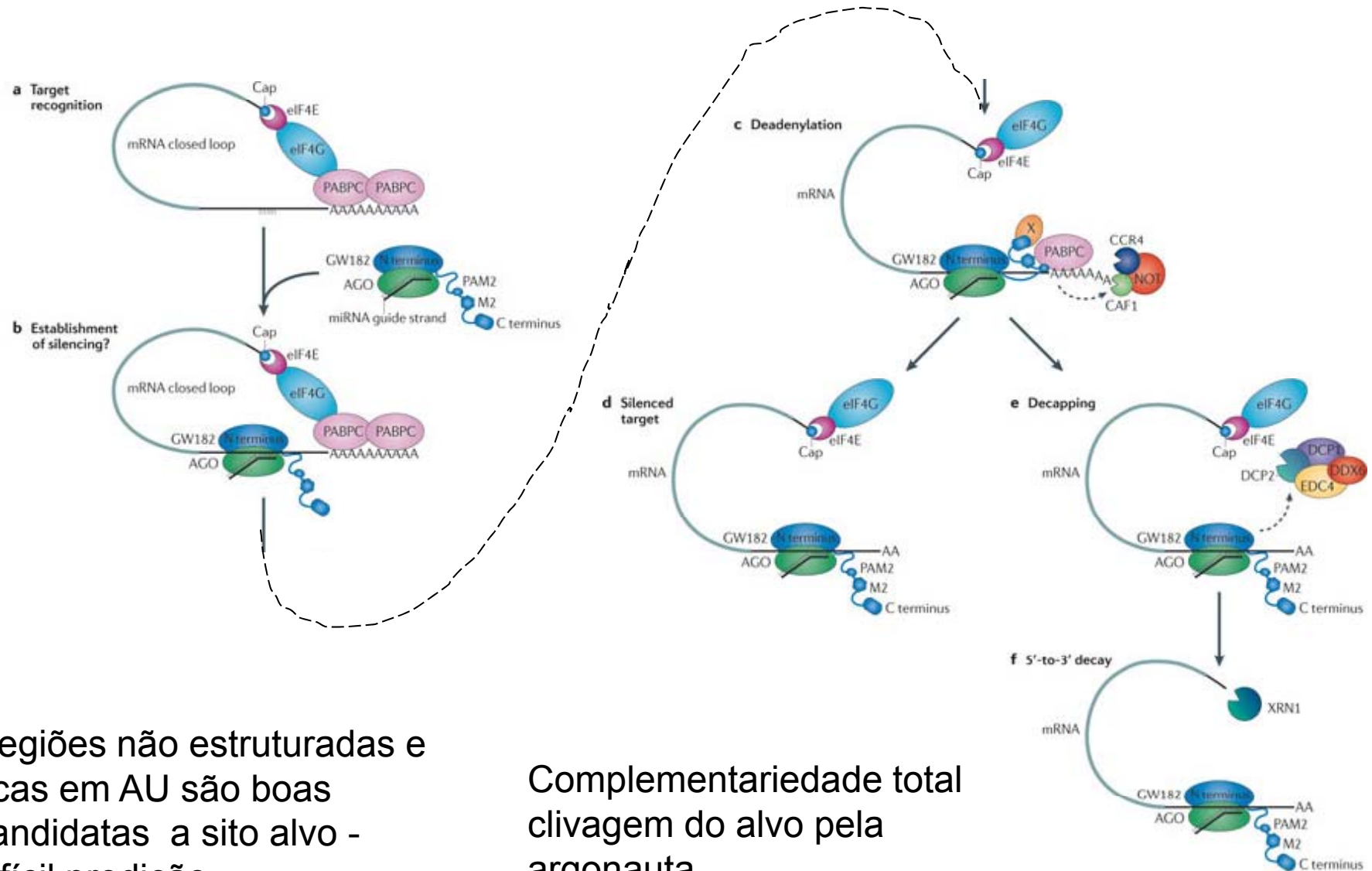
- 21-24 nt que regulam expressão de RNAm com seq complementar
- Regula mais de um terço do transcriptoma humano
- Vários mecanismos envolvidos:
 - * aceleração da taxa de degradação de mRNA
 - * Repressão da tradução (controverso)

Biogenese de miRNA



Controle da tradução: mecanismos específicos

miRNA: adaptadores que conferem especificidade na associação de Agonauta ao mRNA alvo



Regiões não estruturadas e ricas em AU são boas candidatas a sítio alvo - difícil predição

Complementariedade total clivagem do alvo pela argonauta