

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Tradução

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

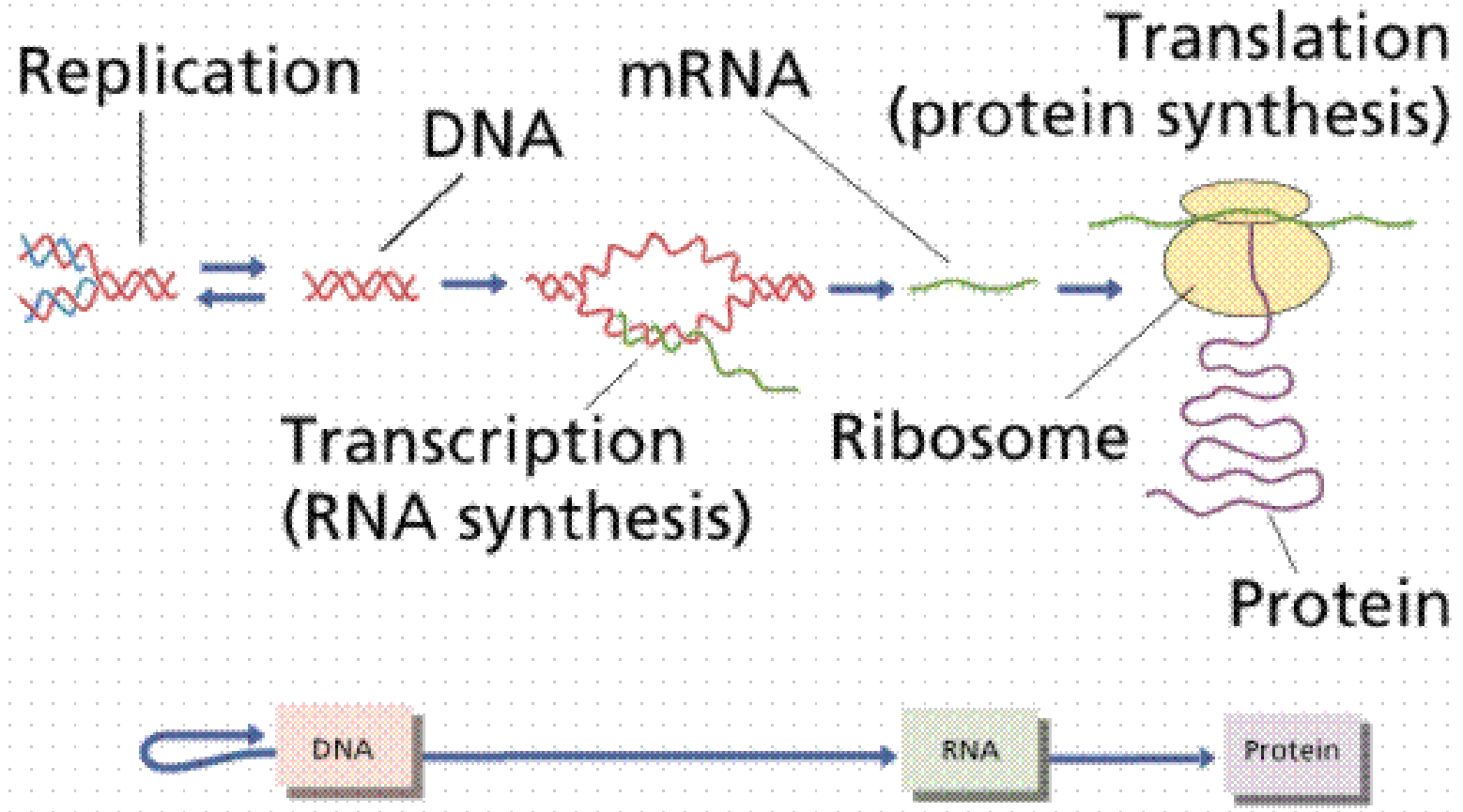
(NHZ6006-18)



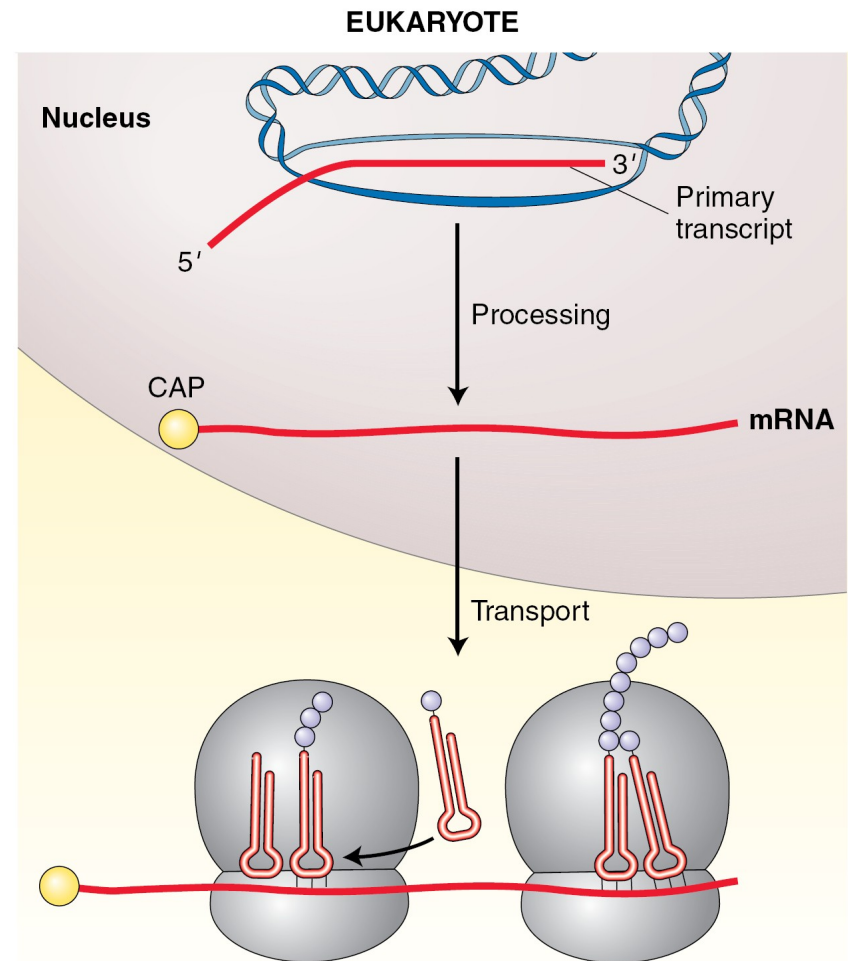
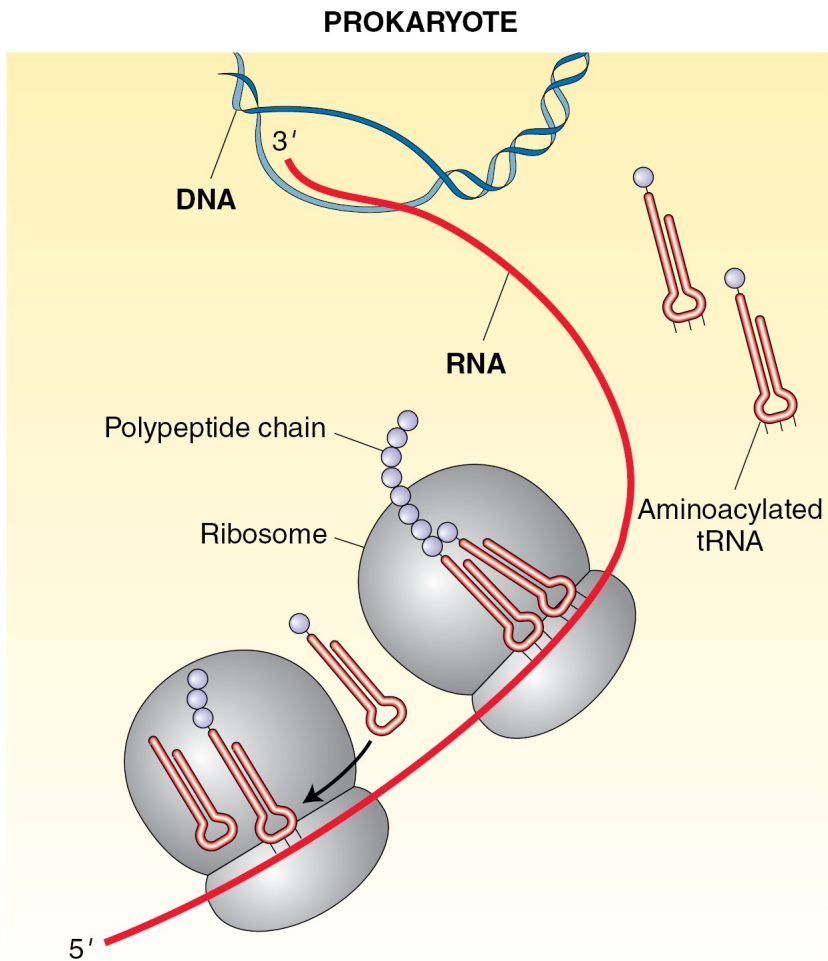
Universidade Federal do ABC

Tradução

Via de armazenamento e da transmissão da informação genética



Tradução



Tradução

		Segunda base do códon					
		U	C	A	G		
Primeira base do códon	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	Terceira base do códon
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA stop	UGA stop	A	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG stop	UGG Trp	G	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C	
		AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	

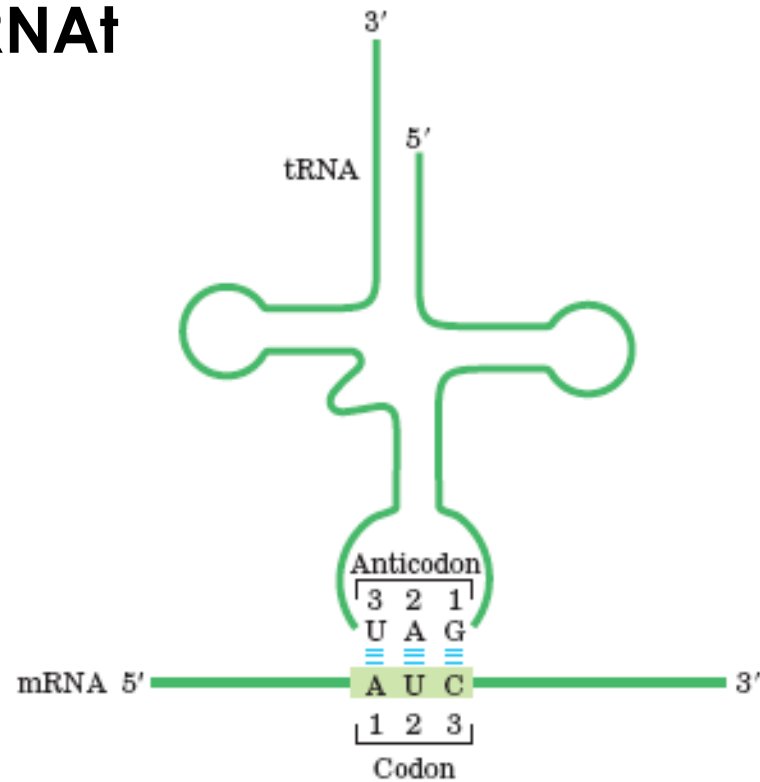
Arg – Arginina
 Asn – Asparagina
 Asp – Ácido aspártico
 Cys – Cisteína
 Gln – Glutamina
 Glu – Ácido glutâmico
 Gly – Glicina
 His – Histidina
 Ile – Isoleucina
 Leu – Leucina
 Lys – Lisina
 Met – Metionina (códon de início)
 Phe – Fenilalanina
 Pro – Prolina
 Ser – Serina
 Stop – Códon de parada
 Thr – Treonina
 Tyr – Tirosina
 Val – Valina

TABLE 27–3 Degeneracy of the Genetic Code

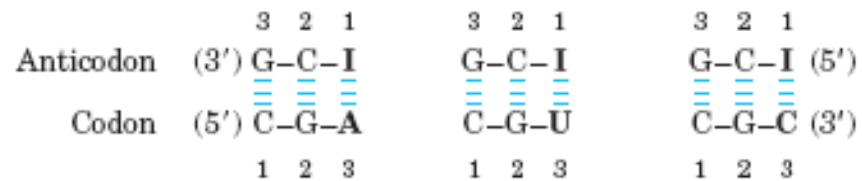
<i>Amino acid</i>	<i>Number of codons</i>	<i>Amino acid</i>	<i>Number of codons</i>
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

Tradução

Pareamento RNAm-RNAt



(a)



(b)

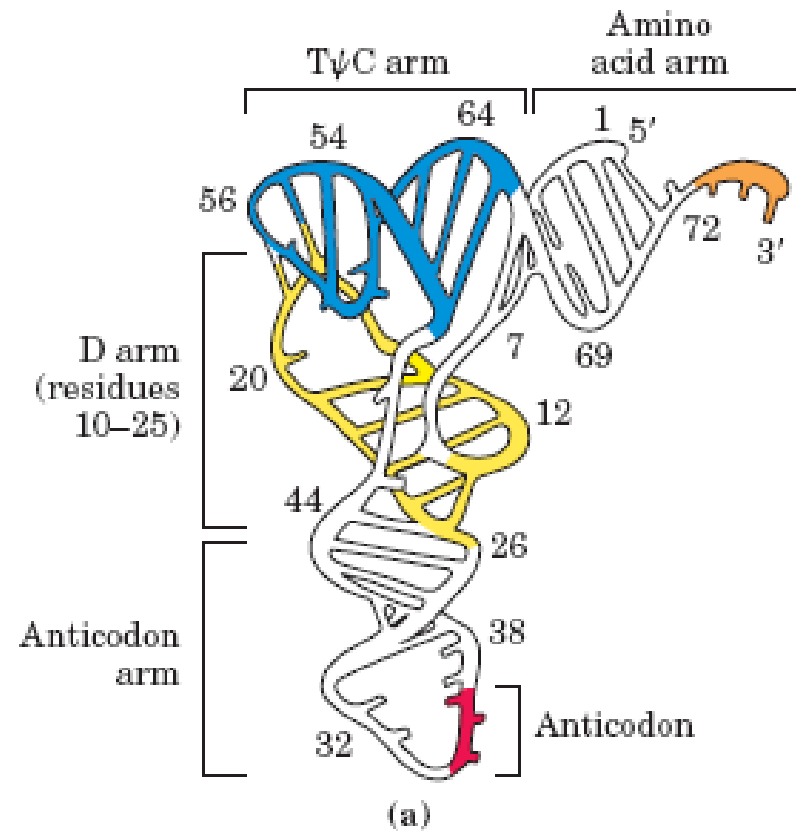
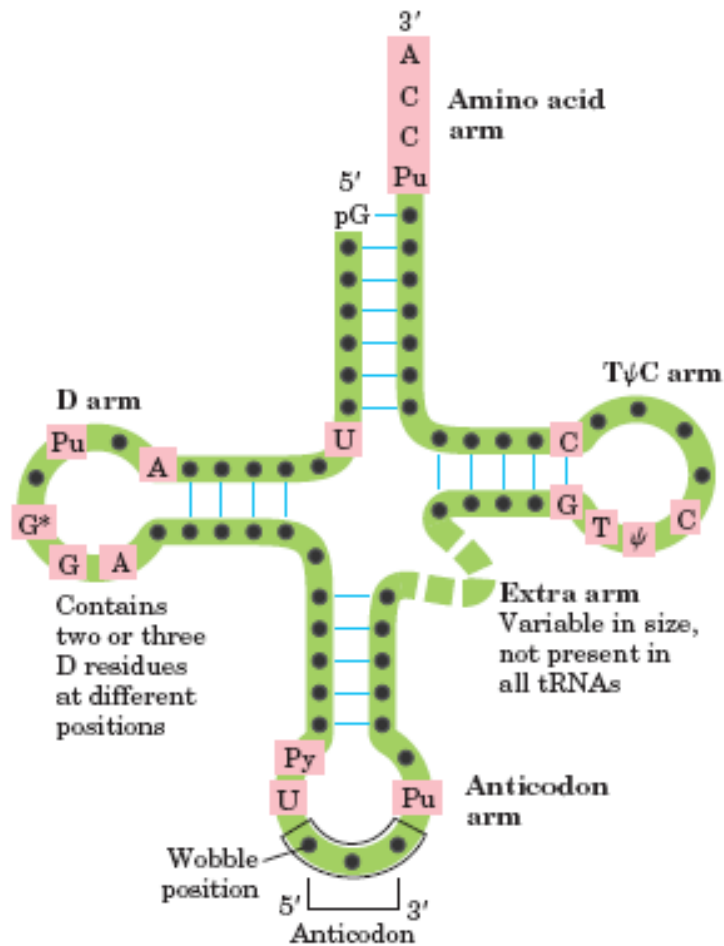
Tradução

Tabela 27-6 – Componentes requeridos para as cinco principais etapas na síntese de proteínas na *E. coli*

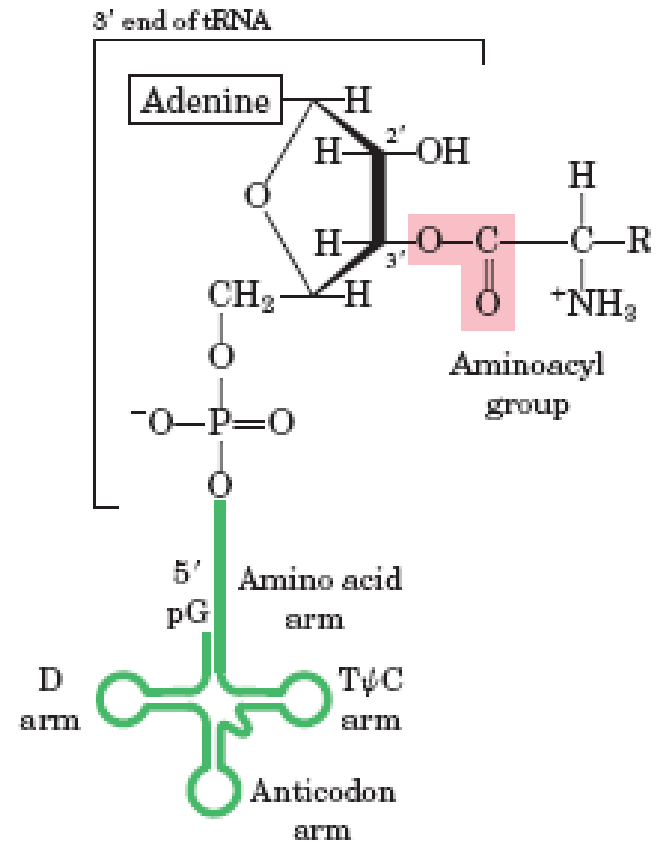
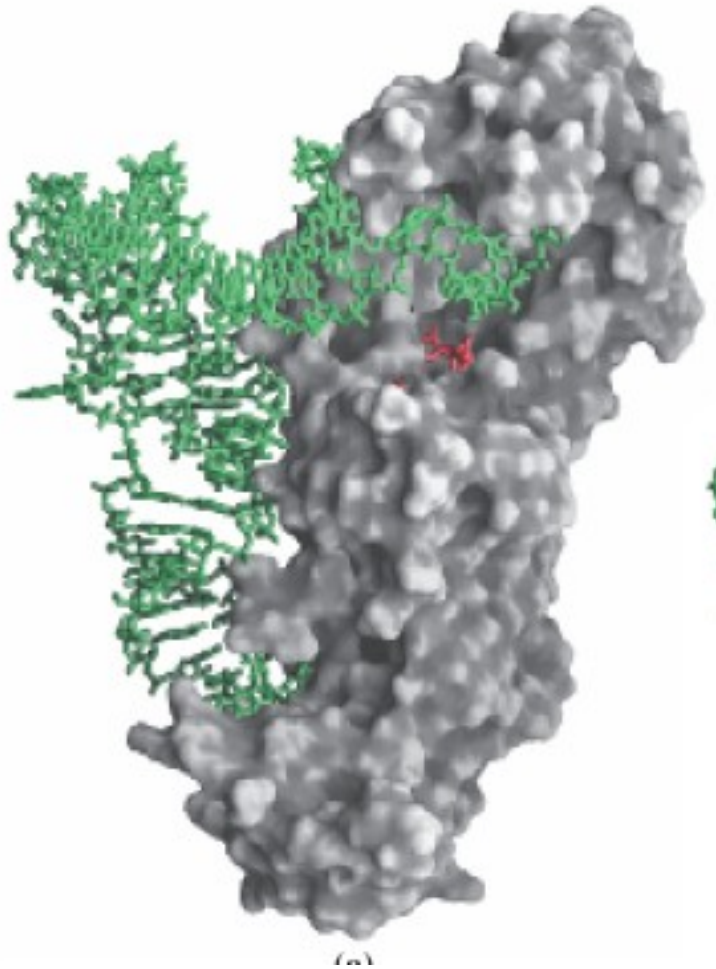
Etapa	Componentes necessários
1. Ativação dos aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA sintetases 20 ou mais tRNAs ATP Mg^{2+}
2. Iniciação	mRNA N-Formilmetionil-tRNA Códon de iniciação no mRNA (AUG) Subunidade ribossômica 30S Subunidade ribossômica 50S Fatores de iniciação (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg^{2+}
3. Alongamento	Ribossomo 70S funcional (complexo de iniciação) Aminoacil-tRNAs especificados pelos códons Fatores de alongamento (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg^{2+}
4. Terminação e liberação	Códon de terminação no mRNA Fatores de liberação de polipeptídeos (RF_1 , RF_2 , RF_3) ATP
5. Enovelamento e processamento pós-traducional	Enzimas, co-fatores e outros componentes específicos para a remoção de resíduos iniciais e seqüências sinalizadoras, processamento proteolítico adicional, modificação dos resíduos terminais e ligação dos grupos fosfato, metila, carboxila, carboidrato ou prostético

Tradução

RNA†



Aminoacil-RNA^t Sintetases (uma para cada aminoácido)

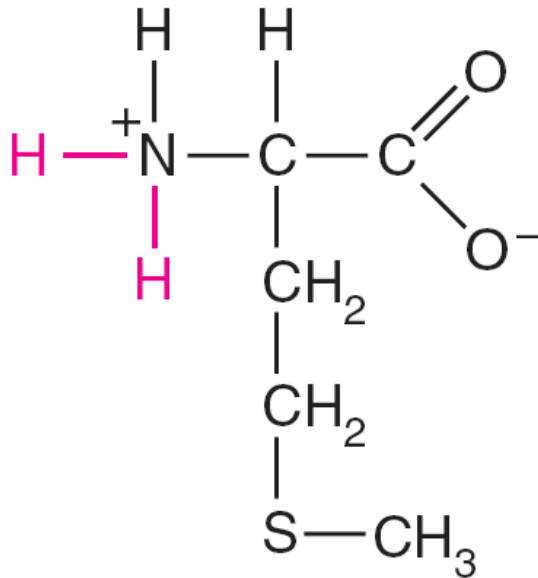


Erro ~ 1/10.000 - Funções catalítica e revisora (hidrolítica)

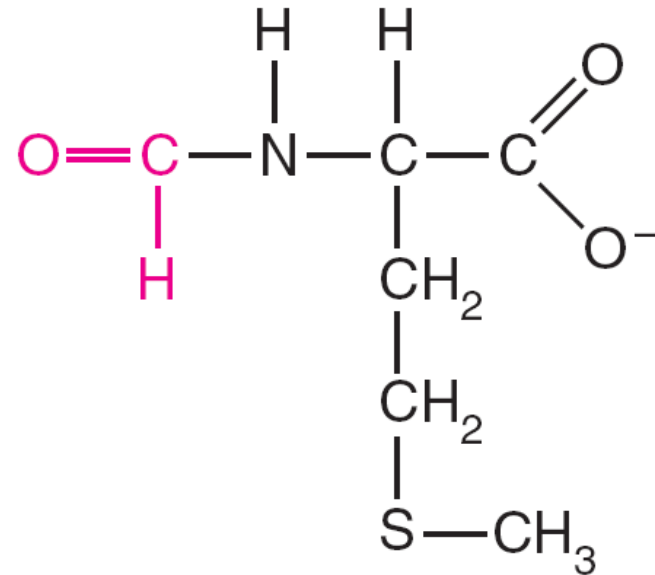
Tradução

Códon AUG

Metionina Inicial da síntese procariotos, mitocôndria, cloroplasto



Methionine



N-formyl methionine

Dois RNAs diferentes em procariotos e eucariotos

Ribossomos

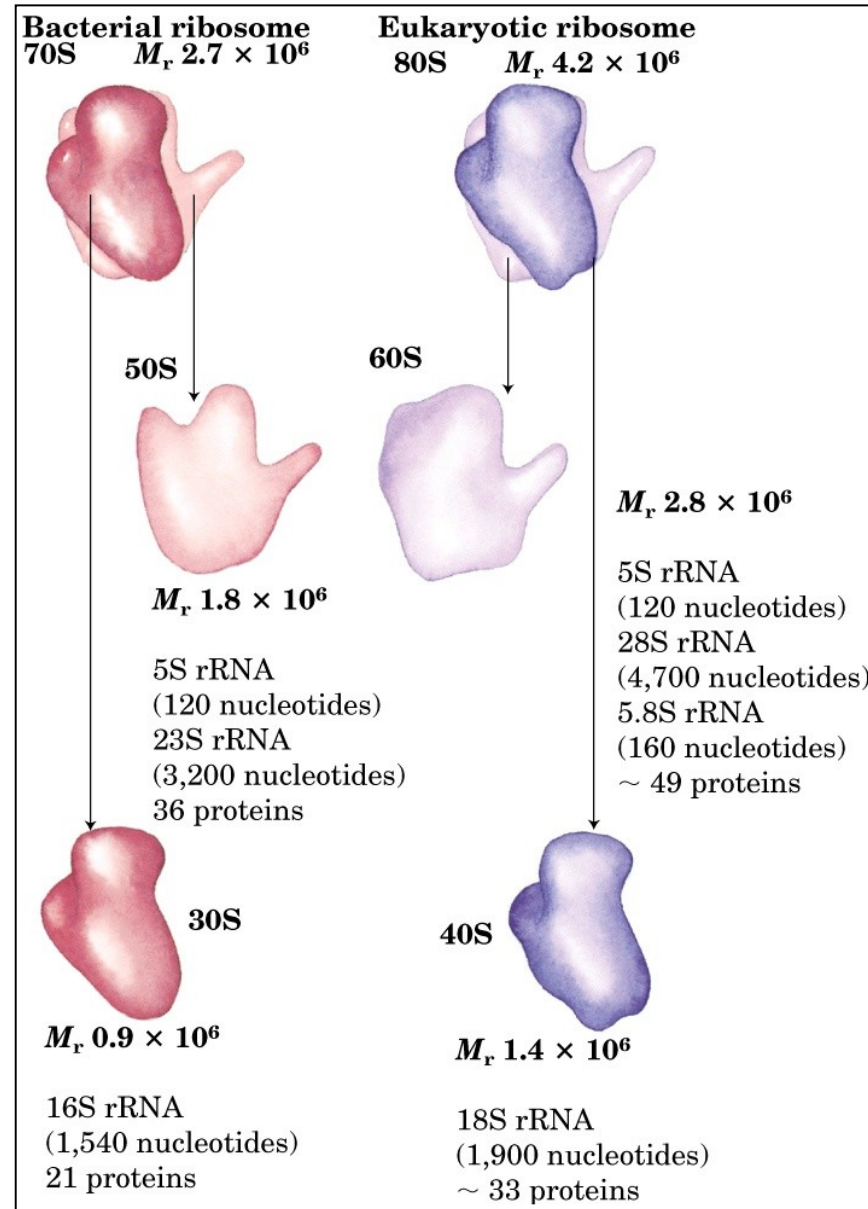
TABLE 27-6 RNA and Protein Components of the *E. coli* Ribosome

<i>Subunit</i>	<i>Number of different proteins</i>	<i>Total number of proteins</i>	<i>Protein designations</i>	<i>Number and type of rRNAs</i>
30S	21	21	S1-S21	1 (16S rRNA)
50S	33	36	L1-L36*	2 (5S and 23S rRNAs)

Mais de 15.000 em *E. coli*

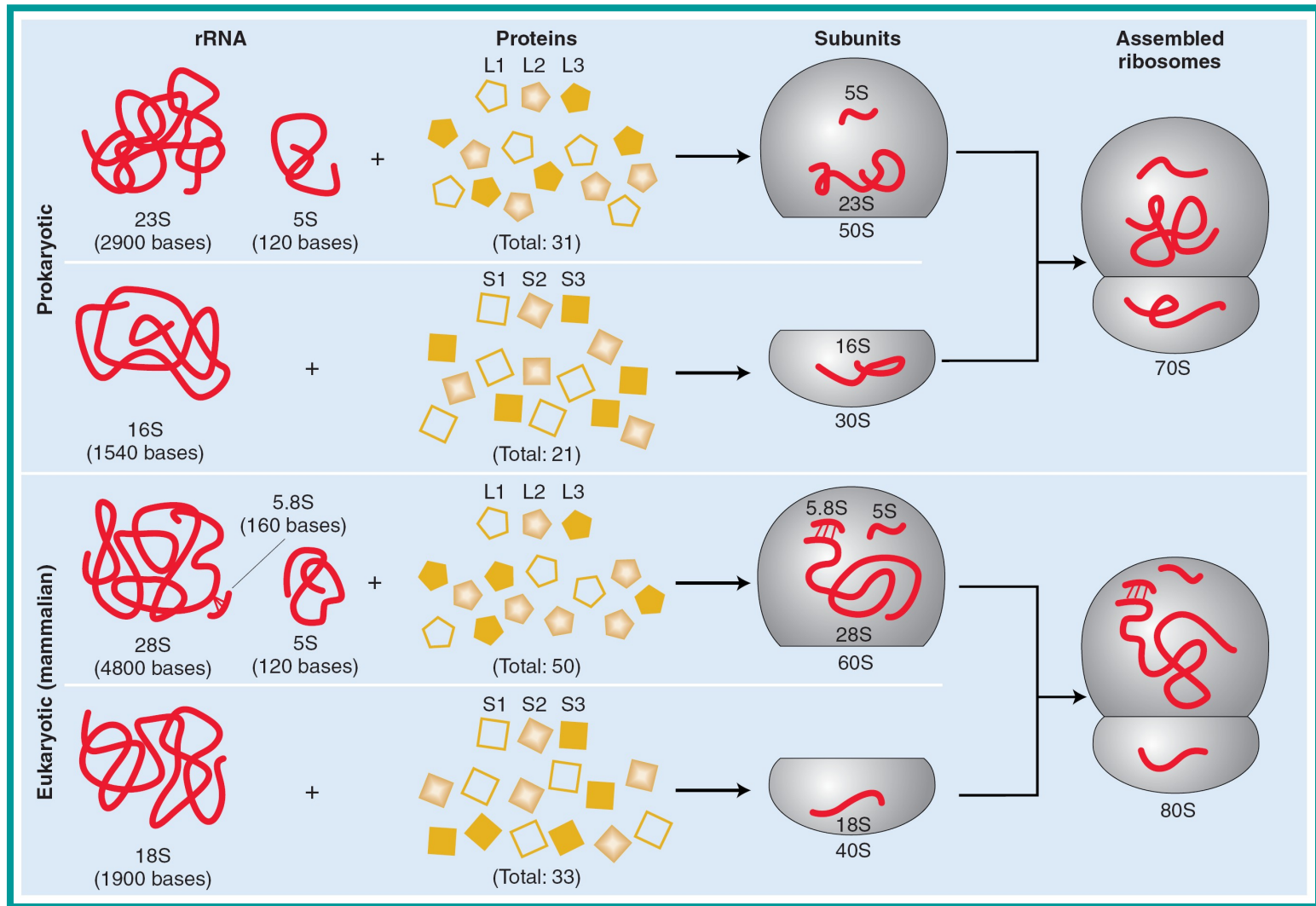
65% RNAr, 35% proteínas

Tradução



A taxa ou unidade Svedberg (símbolo S) é determinada através de técnicas de ultracentrifugação analítica, medindo a velocidade com que partículas (como ribossomos, proteínas ou organelas) sedimentam em um meio líquido sob a influência de uma força centrífuga de alta intensidade.

Tradução

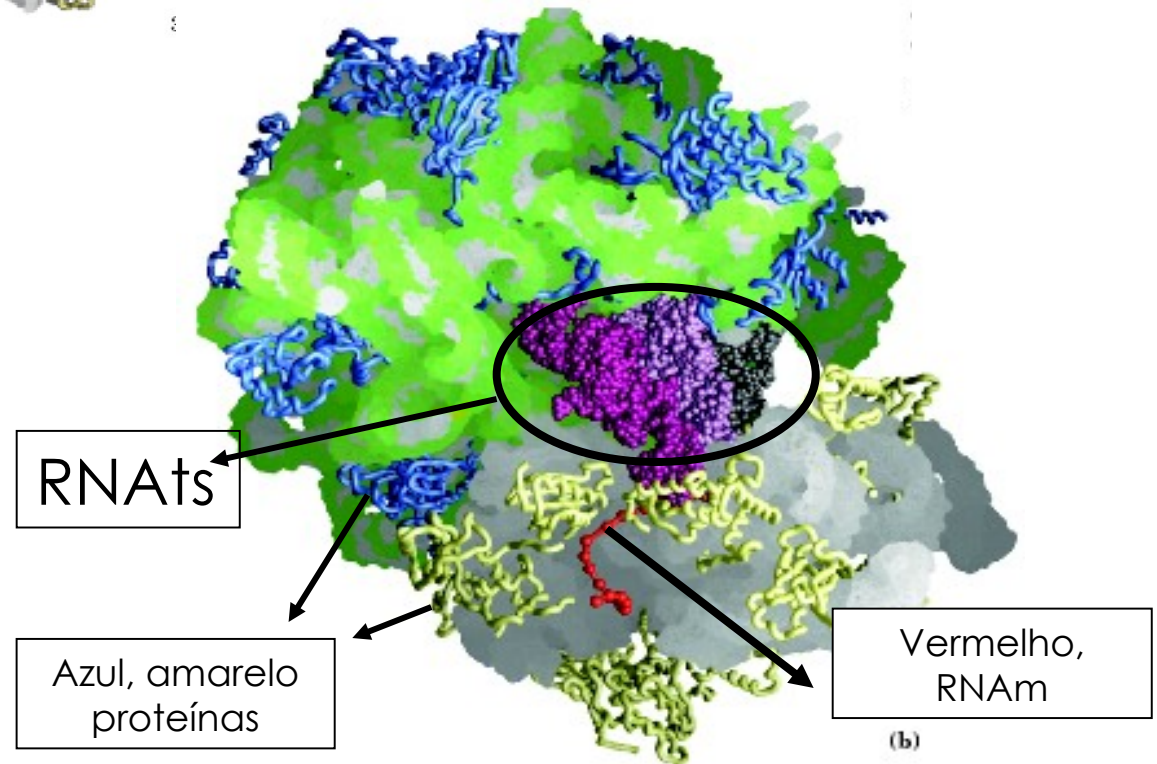
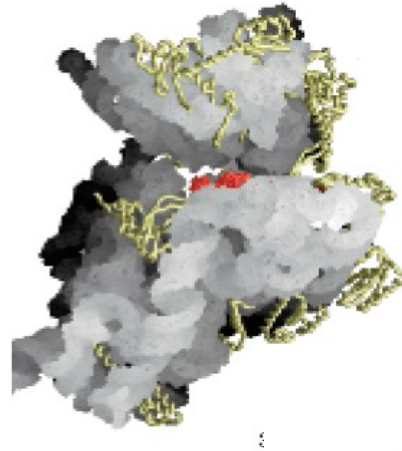
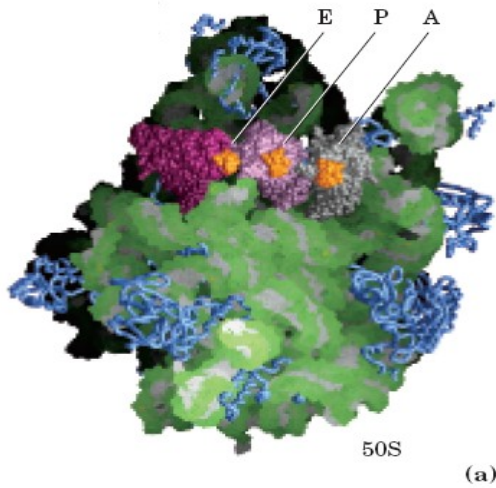


Ribossomos

- Sítio de ligação do mRNA (decodificador)
 - Presente na subunidade menor
- Sítio aminoacil (A)
 - Ligação do aminoacil-tRNA carregado
- Sítio peptidil (P) (peptidil transferase)
 - Contém o tRNA com a cadeia polipeptídica a crescer
 - Catalisa as ligações peptídicas (rRNA 23S da sub maior)
- Sítio de saída (E) **procariotos**
 - Contém o tRNAs descarregado pronto para ser liberado

Tradução *E. coli*

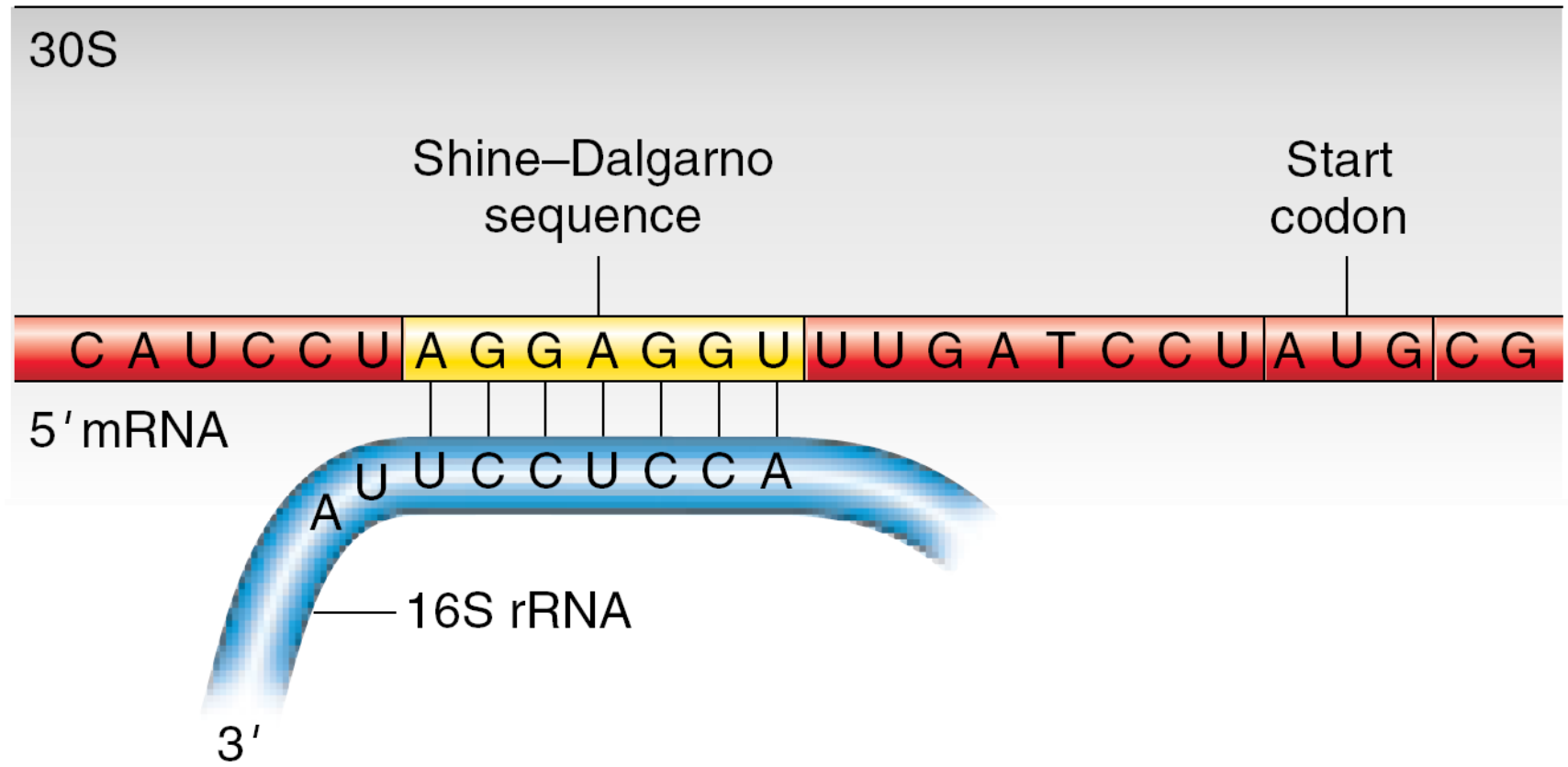
Subunidades do Ribossomo



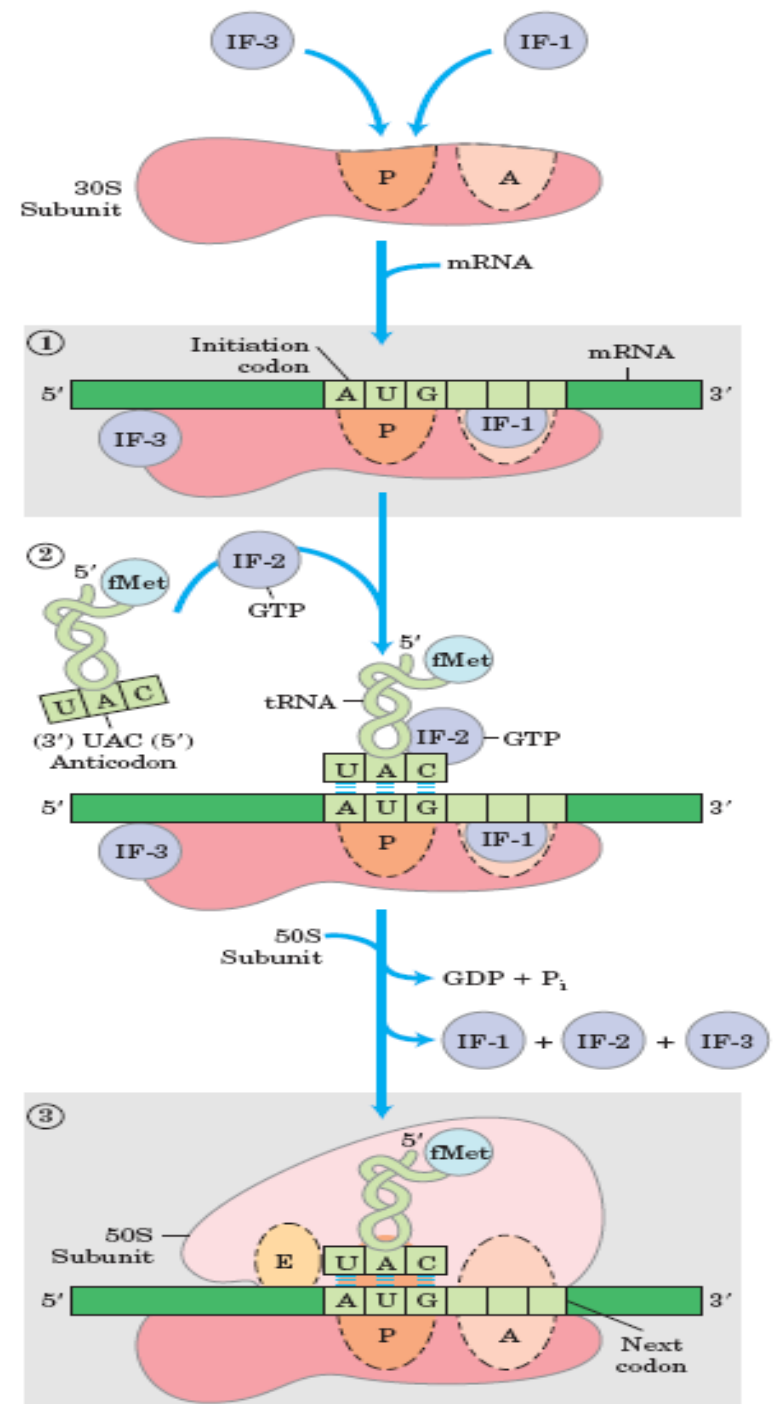
Tradução *E. coli*

Sítio de Interação Inicial : mRNA-Ribossomo

PROCARIOTOS



Formação do complexo de iniciação **PROCARIOTOS**

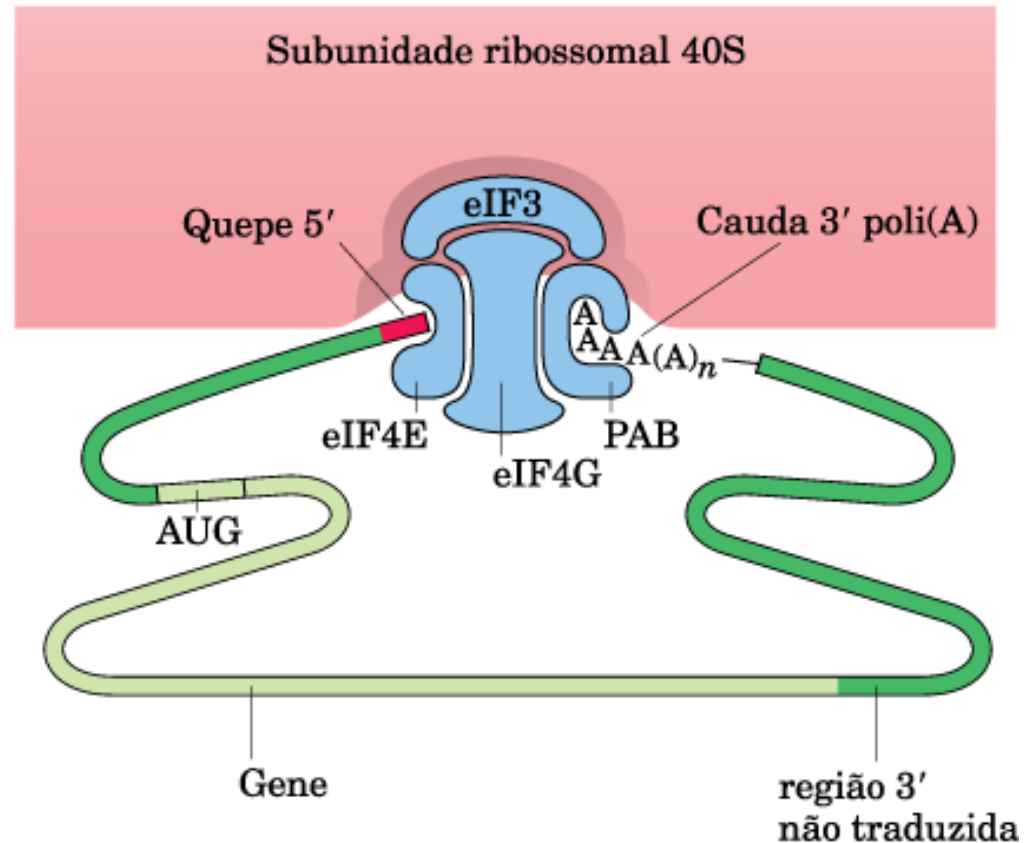


INICIAÇÃO EM EUCARIOTOS

Seqüência de Kozak:
5'-A/GCCAUGG-3'

Cerca de 10 fatores de iniciação envolvidos no processo:

- Alguns se ligam à extremidade 5' CAP
- Outros se ligam ao ribossomo
- Outros se ligam na cauda poli A (PAB)



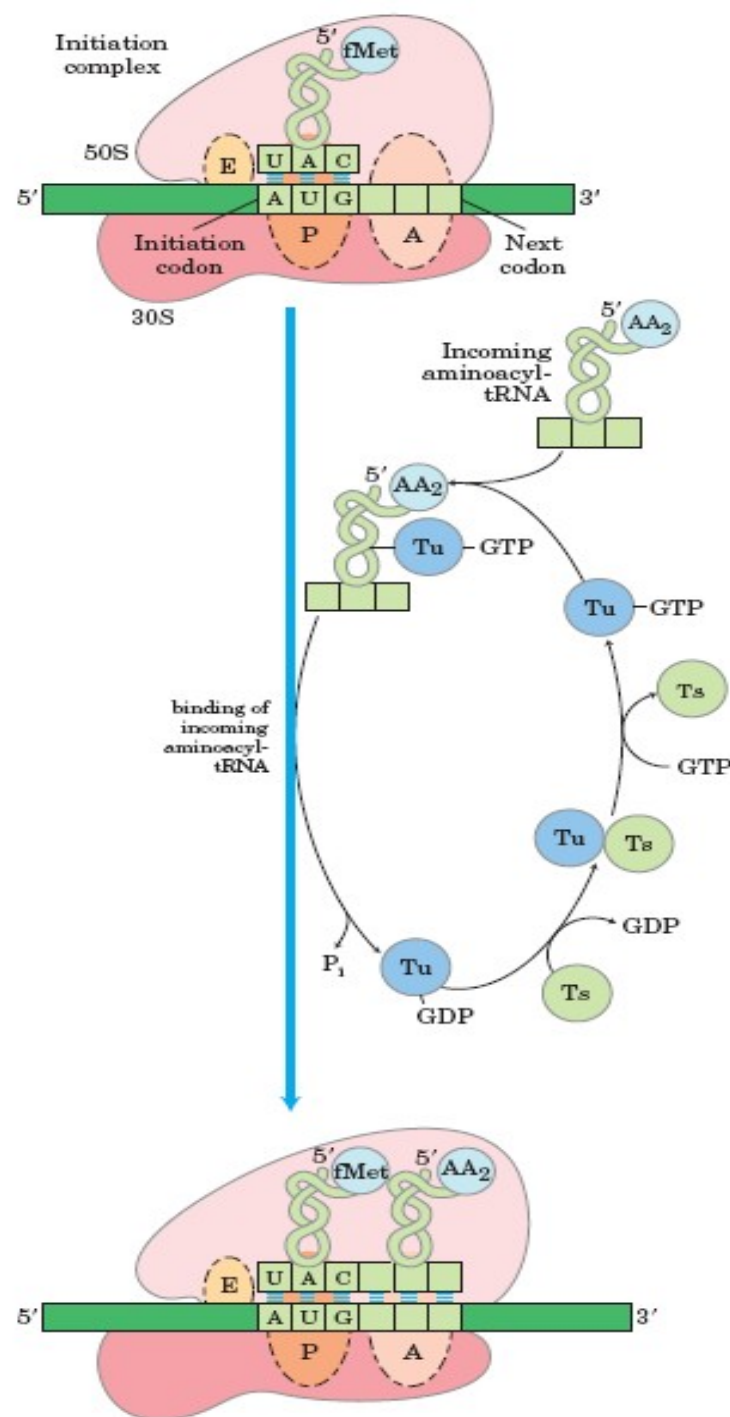
Tradução

Tabela 27-9 – Fatores protéicos requeridos para a iniciação da tradução em células bacterianas e eucarióticas

Bacteriana	
Fator	Função
IF-1	Impede a ligação prematura de tRNAs ao sítio A
IF-2	Facilita a ligação do fMet-tRNA ^{fMet} à subunidade ribossômica 30S
IF-3	Liga-se à subunidade 30S; impede a associação prematura da subunidade 50S; aumenta a especificidade do sítio P para o fMet-tRNA ^{fMet}
Eucariótica	
Fator*	Função
eIF2	Facilita a ligação do Met-tRNA ^{Met} de iniciação à subunidade ribossômica 40S
eIF2B, eIF3	Primeiros fatores a se ligarem à subunidade 40S; facilitam as etapas subsequentes
eIF4A	A atividade RNA helicase remove a estrutura secundária do RNA no mRNA para permitir a ligação à subunidade 40S; parte do complexo eIF4F
eIF4B	Liga-se ao mRNA; facilita o rastreamento do mRNA para localizar o primeiro AUG
eIF4E	Liga-se ao capacete 5' do mRNA; parte do complexo eIF4F
eIF4G	Liga-se ao eIF4E e à proteína de ligação poli(A) (PAB); parte do complexo eIF4F
eIF5	Promove a dissociação de vários outros fatores de iniciação da subunidade 40S como preliminar à associação da subunidade 60S, para formar o complexo de iniciação 80S
eIF6	Facilita a dissociação do ribossomo 80S inativo nas subunidades 40S e 60S

*O prefixo "e" identifica os fatores eucarióticos.

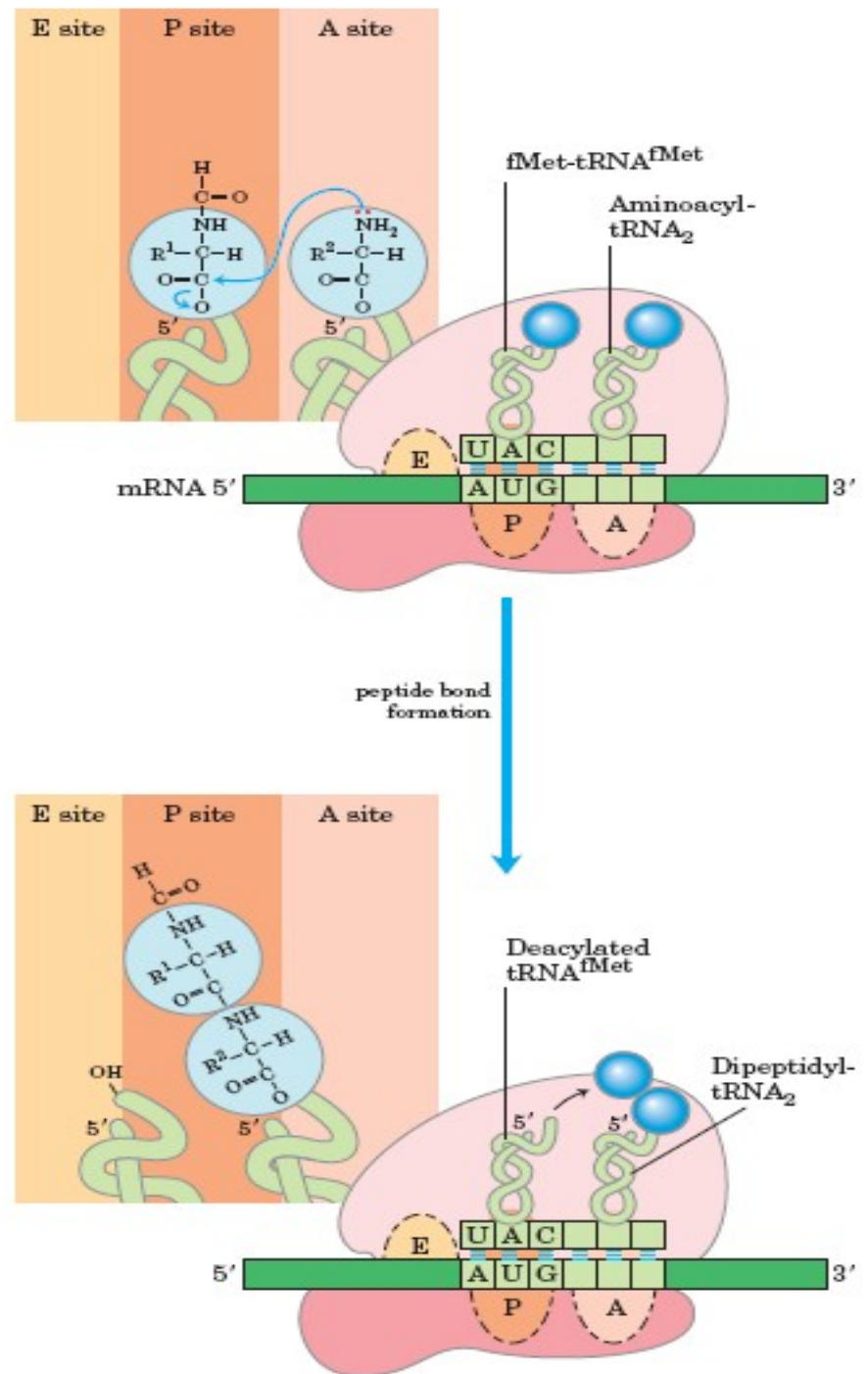
Etapa 1 do ALONGAMENTO



Tradução *E. coli*

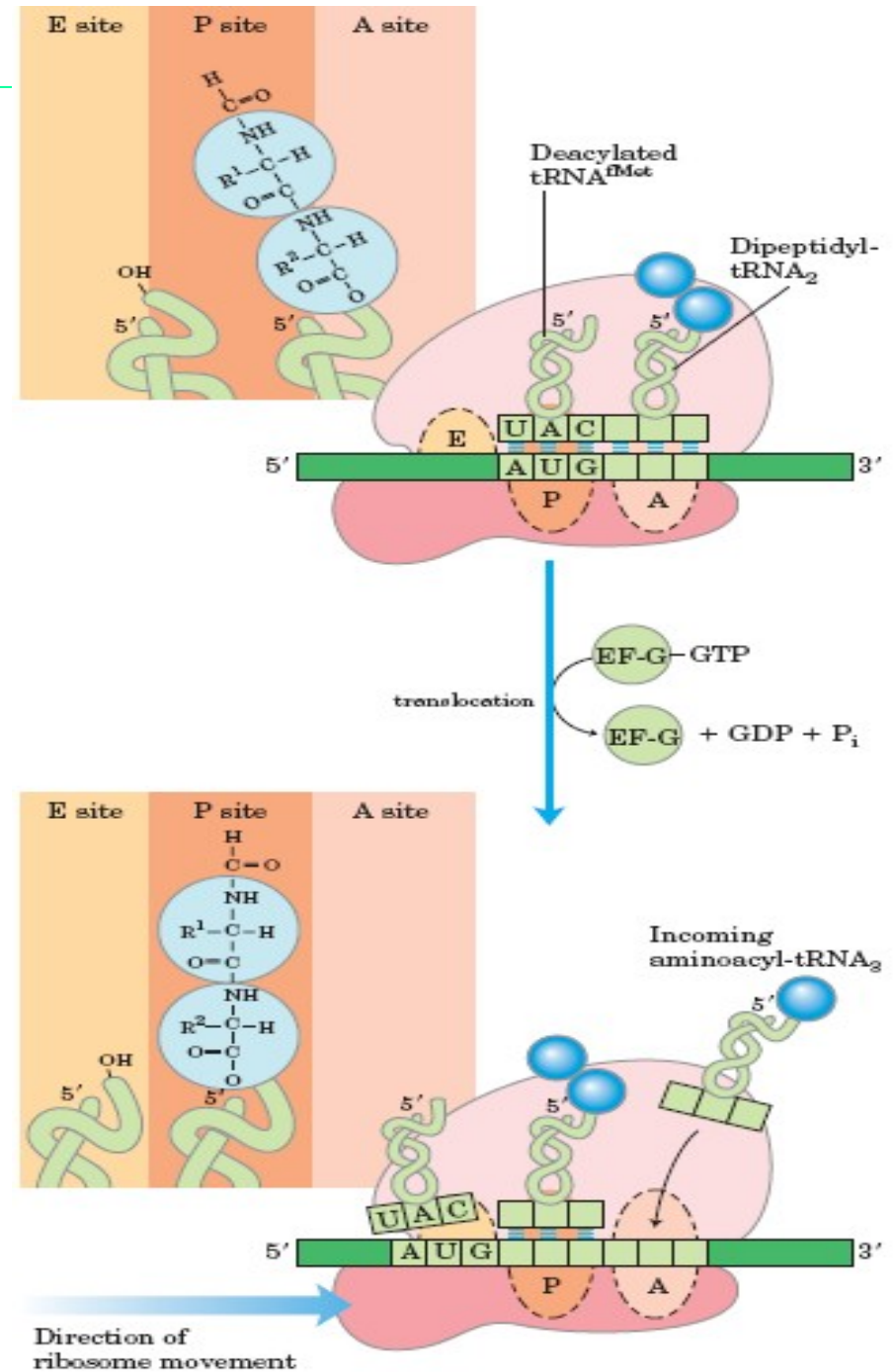
Etapa 2 de Alongamento

Atividade Peptidil-transferase da rRNA23S



Tradução *E. coli*

Etapa 3 : Translocação

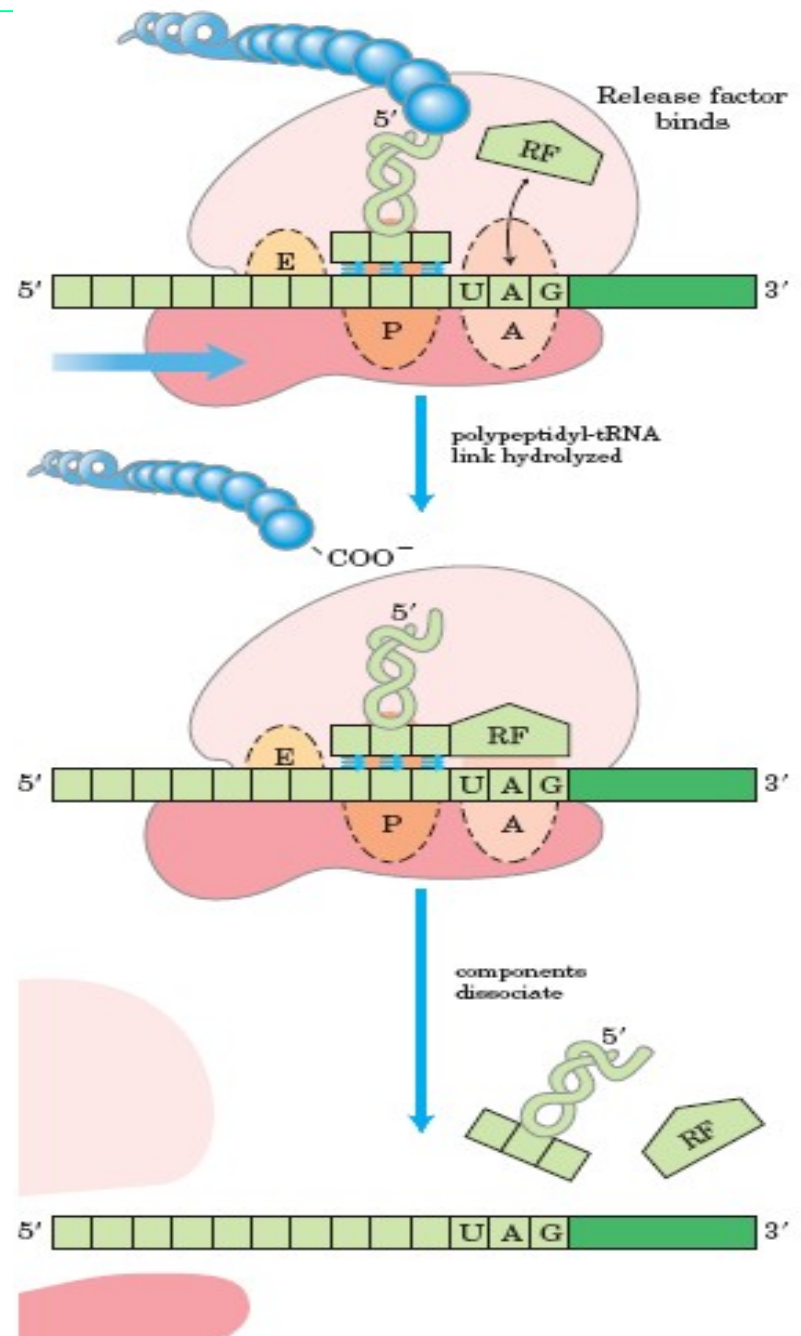


Tradução *E. coli*

Etapa 4 : Terminação

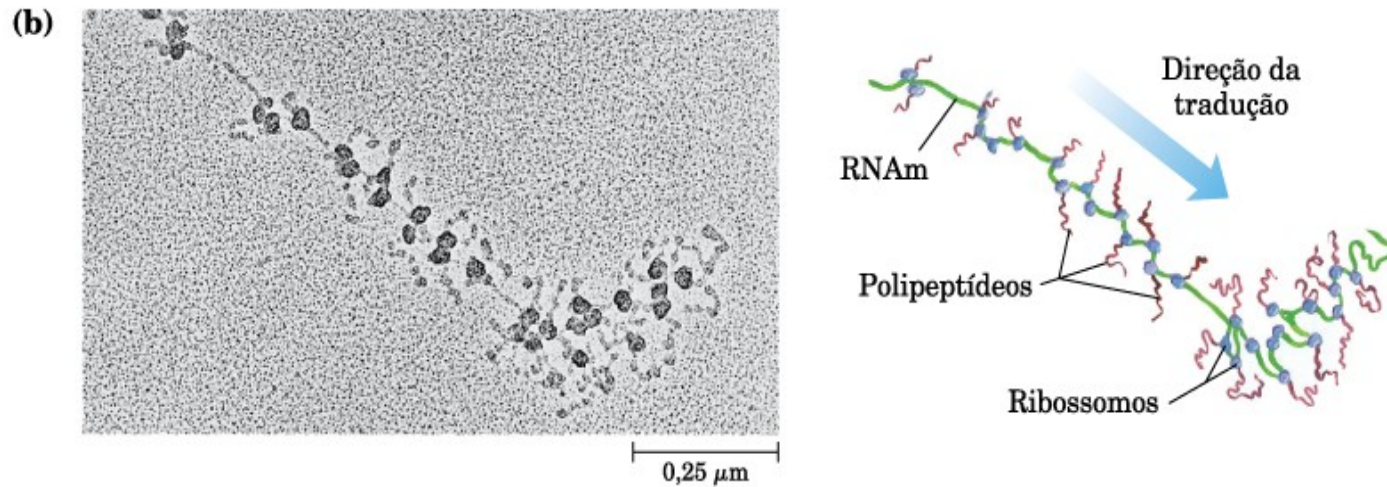
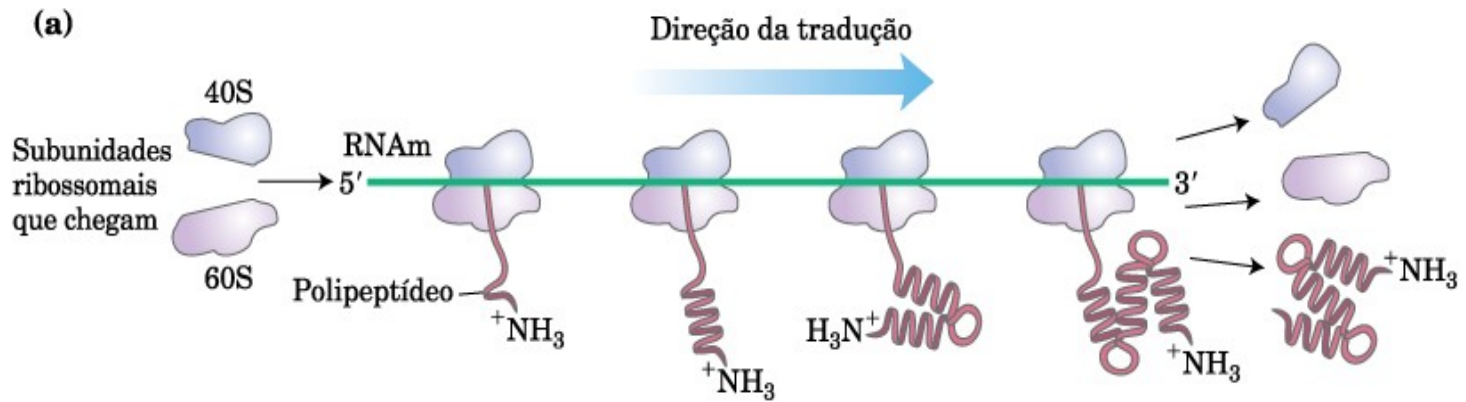
Codons de parada:
“stop codons”

UAA, UAG UGA



Tradução

POLISSOMOS



Modificações pós-traducionais - eucariotos

1. Glicosilação
2. Lipidação
3. Fosforilação
4. Hidroxilação
5. Metilação
6. Acetilação
7. Processamento proteolítico

Componentes macromoleculares da *E. coli*

~30% do peso seco bacteriano é associado à expressão gênica				
Componente	Massa da célula seca (%)	Moléculas/célula	Tipos diferentes	Cópias de cada tipo
Parede	10	1	1	1
Membrana	10	2	2	1
DNA	1,5	1	1	1
mRNA	1	1.500	600	2-3
tRNA	3	200.000	60	>3.000
rRNA	16	38.000	2	19.000
Proteínas ribossomais	9	10^6	52	19.000
Proteínas solúveis	46	$2,0 \times 10^6$	1.850	>1.000
Moléculas pequenas	3	$7,5 \times 10^6$	800	

Antibióticos no Ribossomo

- **Tetraciclina / Puromicina**

- Se liga ao sítio A e bloqueia a entrada de tRNAs carregados

- **Neomicina**

- Se liga próximo ao sítio A e induz erros traducionais

- **Cloranfenicol (procariotos) cicloeximida (eucariotos)**

- Se liga à subunidade maior e bloqueia a formação de ligações peptídicas

- **Streptomicina**

- Se liga à subunidade menor e inibe o início da síntese

- **Eritromicina**

- Bloqueia a translocação do ribossomo

Antibióticos no Ribossomo

- 1. Tetraciclinas (Bloqueio da Entrada)
 - Alvo: Subunidade 30S.
 - Ação: Elas se ligam fisicamente ao Sítio A.
 - Resultado: Quando o complexo EF-Tu-tRNA tenta entrar, ele encontra o caminho bloqueado. Sem novos aminoácidos, a síntese para imediatamente.
- 2. Cloranfenicol (Bloqueio da Ligação)
 - Alvo: Subunidade 50S.
 - Ação: Inibe a enzima peptidil transferase (o rRNA 23S).
 - Resultado: O tRNA está no Sítio A, mas a "cola" (ligação peptídica) não funciona. O aminoácido não consegue se unir à cadeia em crescimento.
- 3. Aminoglicosídeos (ex: Estreptomicina - Erro de Leitura)
 - Alvo: Subunidade 30S.
 - Ação: Eles alteram a forma do sítio onde ocorre o pareamento códon-anticódon.
 - Resultado: O ribossomo começa a aceitar tRNAs errados. A bactéria produz "proteínas lixo" defeituosas que acabam por matá-la.
- 4. Macrolídeos (ex: Azitromicina - Bloqueio da Translocação)
 - Alvo: Subunidade 50S (perto do túnel de saída).
 - Ação: Eles entopem o canal por onde a proteína deveria sair.
 - Resultado: O fator EF-G não consegue mover o ribossomo porque a cadeia de proteína está "entalada". A translocação é interrompida.