

BIOLOGIA MOLECULAR

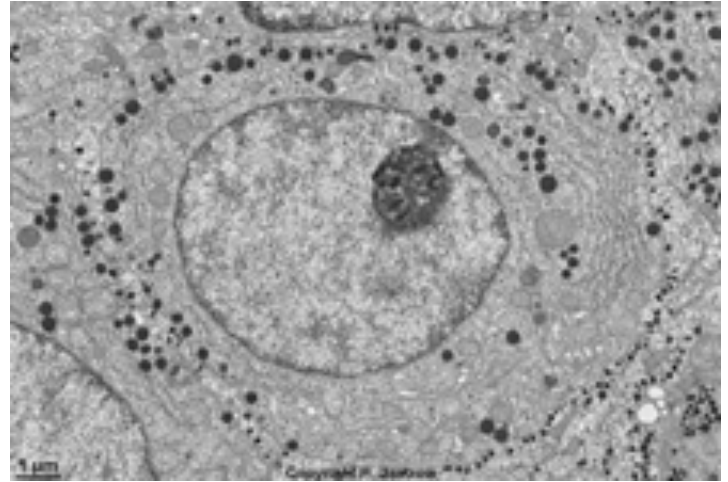
Aula 4

Prof^a Inês Rodrigues

2015/16
2^o Semestre

Transporte nuclear

Núcleo



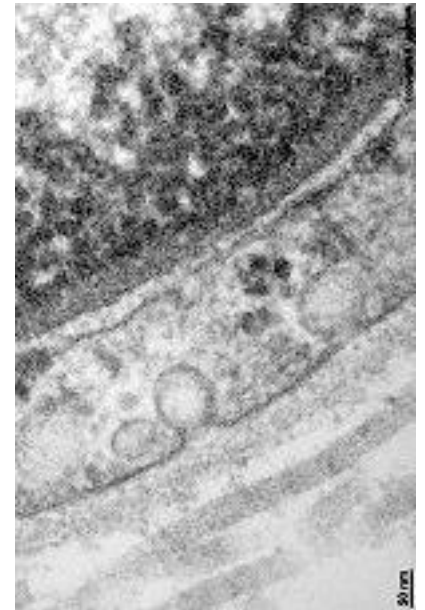
- ✓ **Contém o material genético**
- ✓ **Mantém e replica o genoma**
- ✓ **Participa na regulação da transcrição dos genes**
- ✓ **Controla o processamento dos RNAs resultantes**

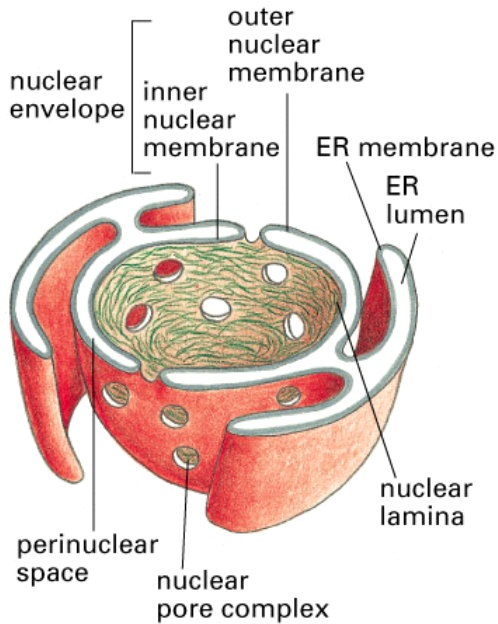
- ✓ **Tem uma estrutura complexa com formação de domínios onde se concentram grupos de moléculas com função relacionada**
- ✓ **Está separado do citoplasma pelo invólucro nuclear**

Invólucro nuclear

- ✓ Organização estrutural complexa que varia ao longo do ciclo celular
- ✓ Transporte nucleo-citoplásmico
- ✓ Organização espacial da cromatina
- ✓ Replicação do DNA

Invólucro nuclear {
Membranas nucleares
Poros nucleares
Lâmina

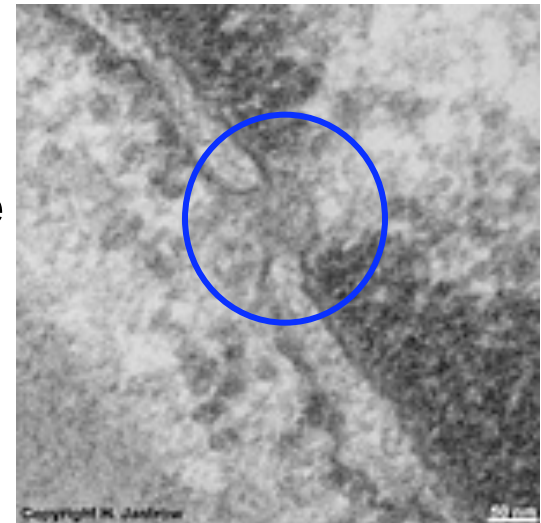




As duas membranas (interna e externa) delimitam um espaço - cisterna perinuclear

A membrana externa está em continuidade com o retículo endoplasmático

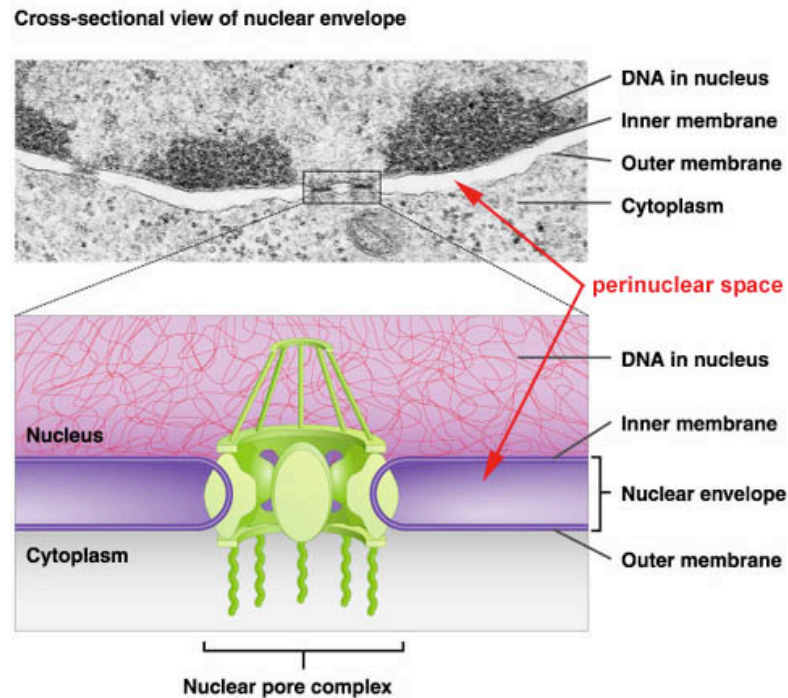
As duas membranas estão em continuidade nos locais em que se encontram os poros nucleares podendo considerar-se uma 3ª membrana (com composição proteica específica)

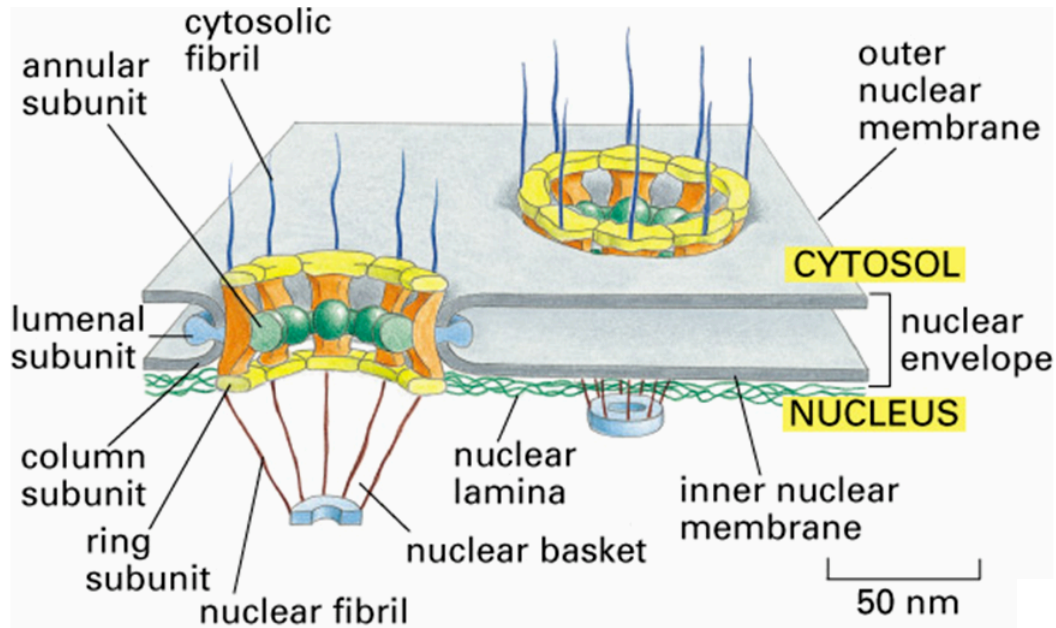


A lâmina constitui uma interface entre a membrana interna e a cromatina

Poros nucleares

- ✓ Transporte de metabolitos diversos; proteínas e complexos ribonucleoproteicos de tamanho e composição muito variada
- ✓ Estrutura supramolecular (125 MDa; >100 polipéptidos diferentes)



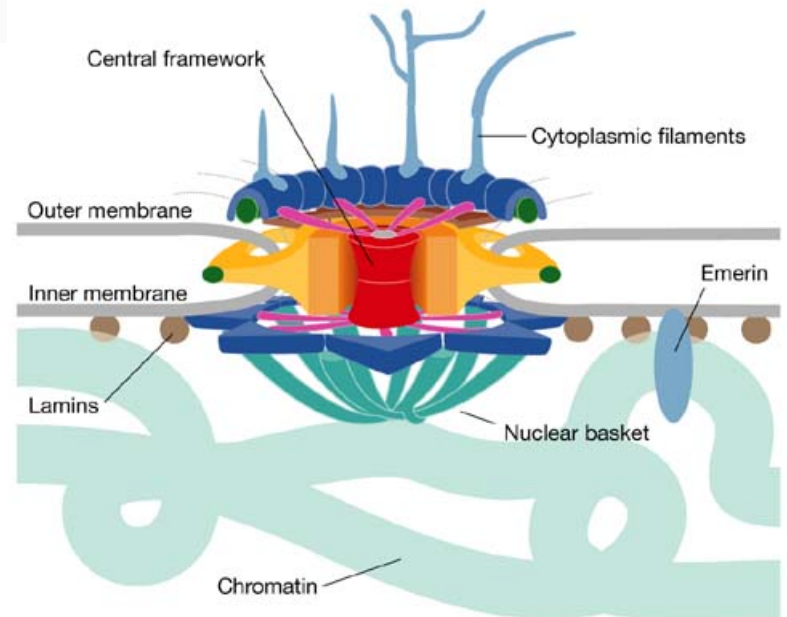


Grânulo central

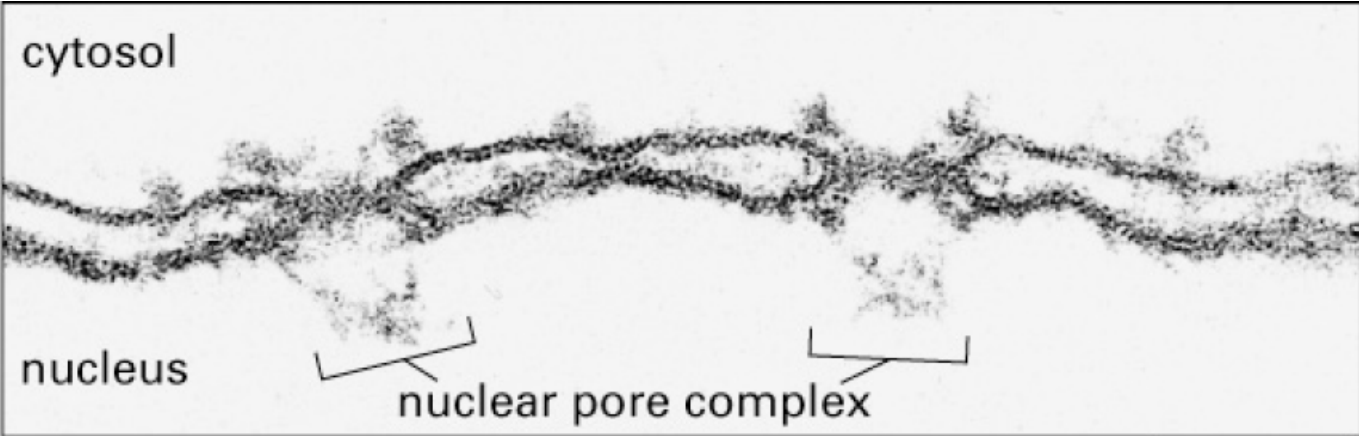
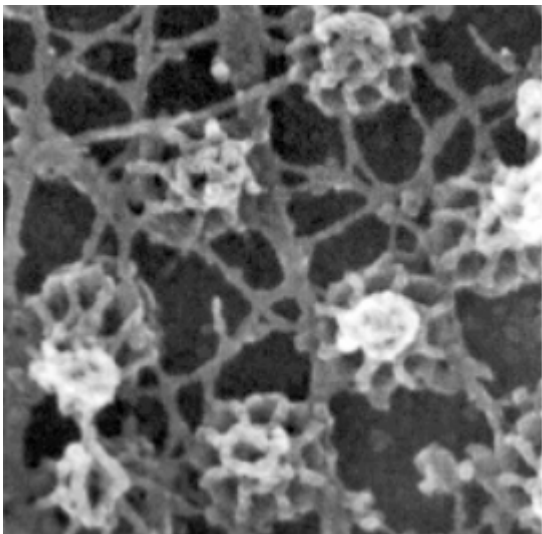
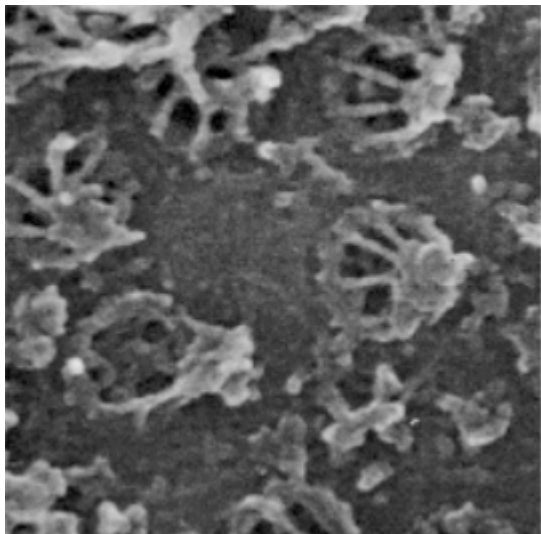
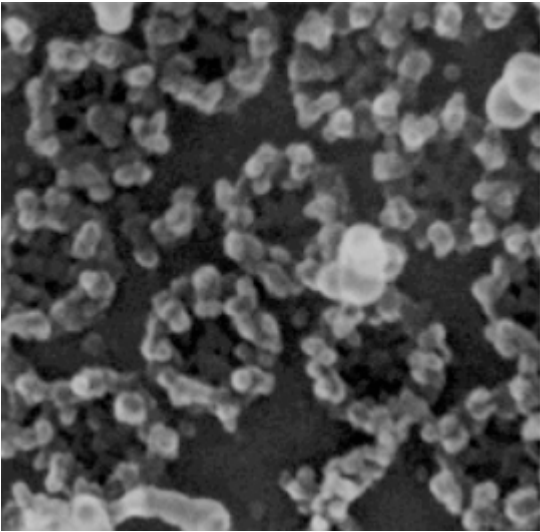
Anel e Filamentos citoplasmáticos

{ Anel e Filamentos nucleoplasmáticos

{ Anel menor – “cesto nuclear”



Poros nucleares



0.1 μm

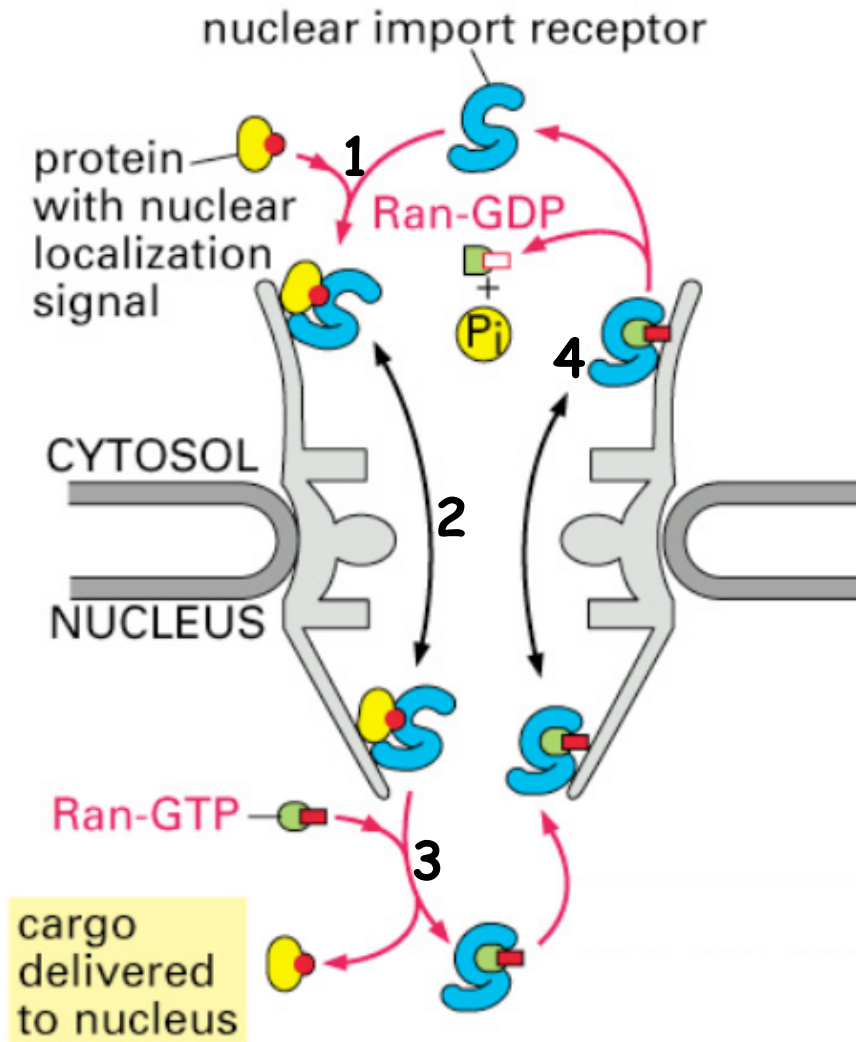
Transporte – importação de proteínas

Transporte ativo de proteínas para o núcleo

Sinais de localização nuclear (NLS: nuclear localization signal):
Sequências curtas de aminoácidos, ricas em arginina e/ou lisina, em qualquer zona da estrutura primária das proteínas

- **Recetores de NLS:** Importinas
- **Ran-GTP:** molécula que fornece a energia necessária; converte-se a Ran-GDP
- **Ran-GAP** (GTPase activating protein, citosol): promove a hidrólise do GTP
- **Ran-GEF** (Guanine exchange factor, núcleo): promove a libertação do GDP, permitindo a ligação de nova molécula de GTP

Transporte ativo de proteínas para o núcleo



1 – A proteína com NLS liga-se ao respectivo recetor; o recetor também se liga ao poro nuclear

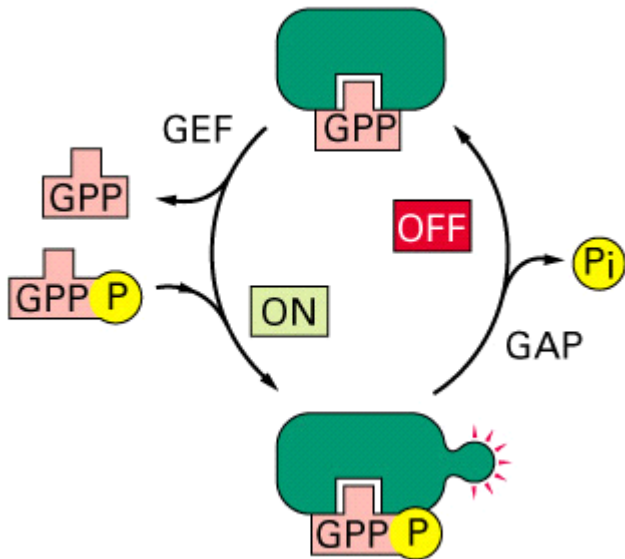
2 – O complexo proteína-recetor desloca-se através do poro

3 – No núcleo, uma proteína chamada Ran-GTP desloca a proteína que está a ser transportada

4 – O recetor é reciclado. Desloca-se ligado a Ran-GTP para o citoplasma

GTPases monoméricas

Proteínas que existem em dois estados: ligadas a GDP e a GTP, com diferentes atividades



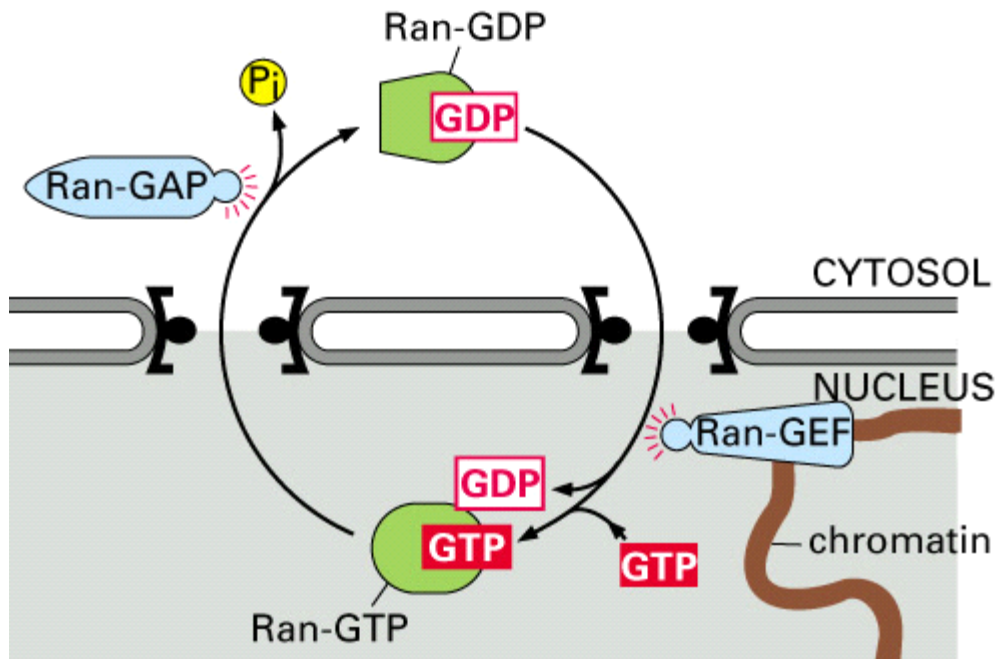
A transição de “ligado a GTP” para “ligado a GDP” requer a hidrólise da GTP

A taxa de hidrólise da **GTP** é acelerada por **GAP** (GTPase activating protein)

A transição de “ligado a GDP” para “ligado a **GTP**” é acelerada por **GEF** (Guanine nucleotide exchange factor)

A hidrólise de GTP é utilizada para fornecer energia a processos celulares

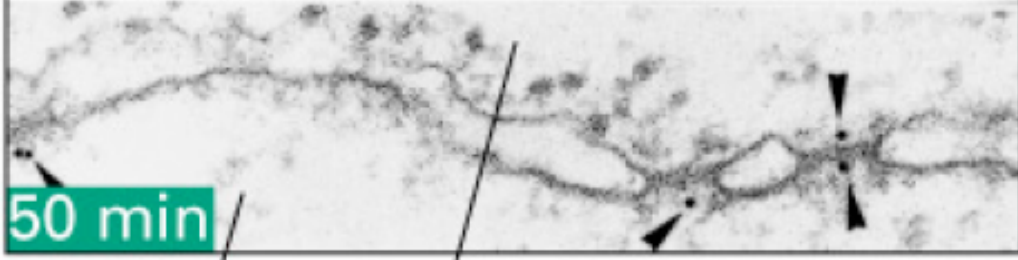
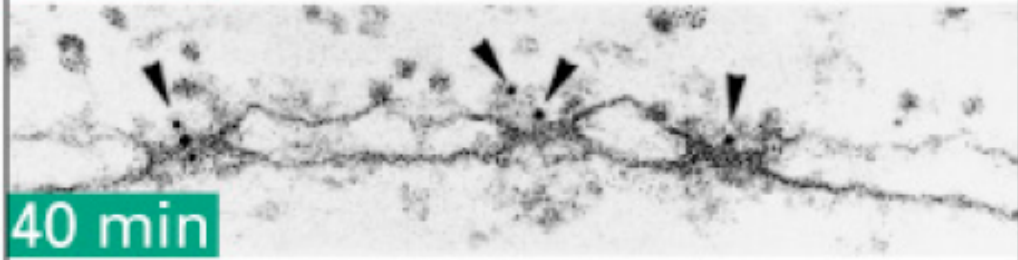
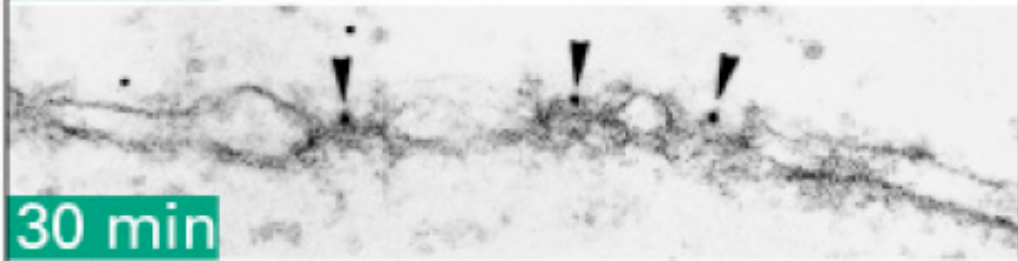
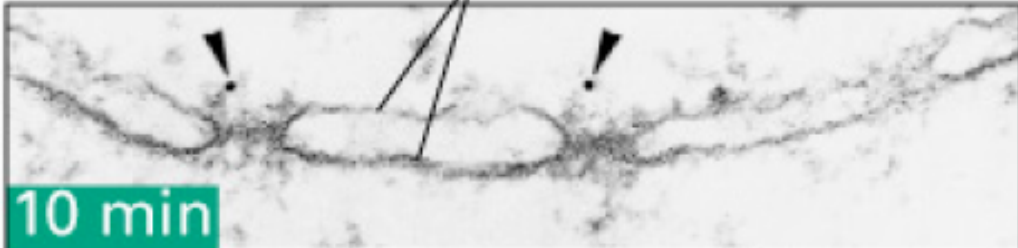
A distribuição assimétrica de **Ran-GAP** e **Ran-GEF** controla a proteína Ran e o transporte no poro nuclear



Ran-GAP no citoplasma faz predominar Ran-GDP

Ran-GEF no núcleo faz predominar Ran-GTP

nuclear envelope



nucleus cytosol

100 nm

Transporte - exportação

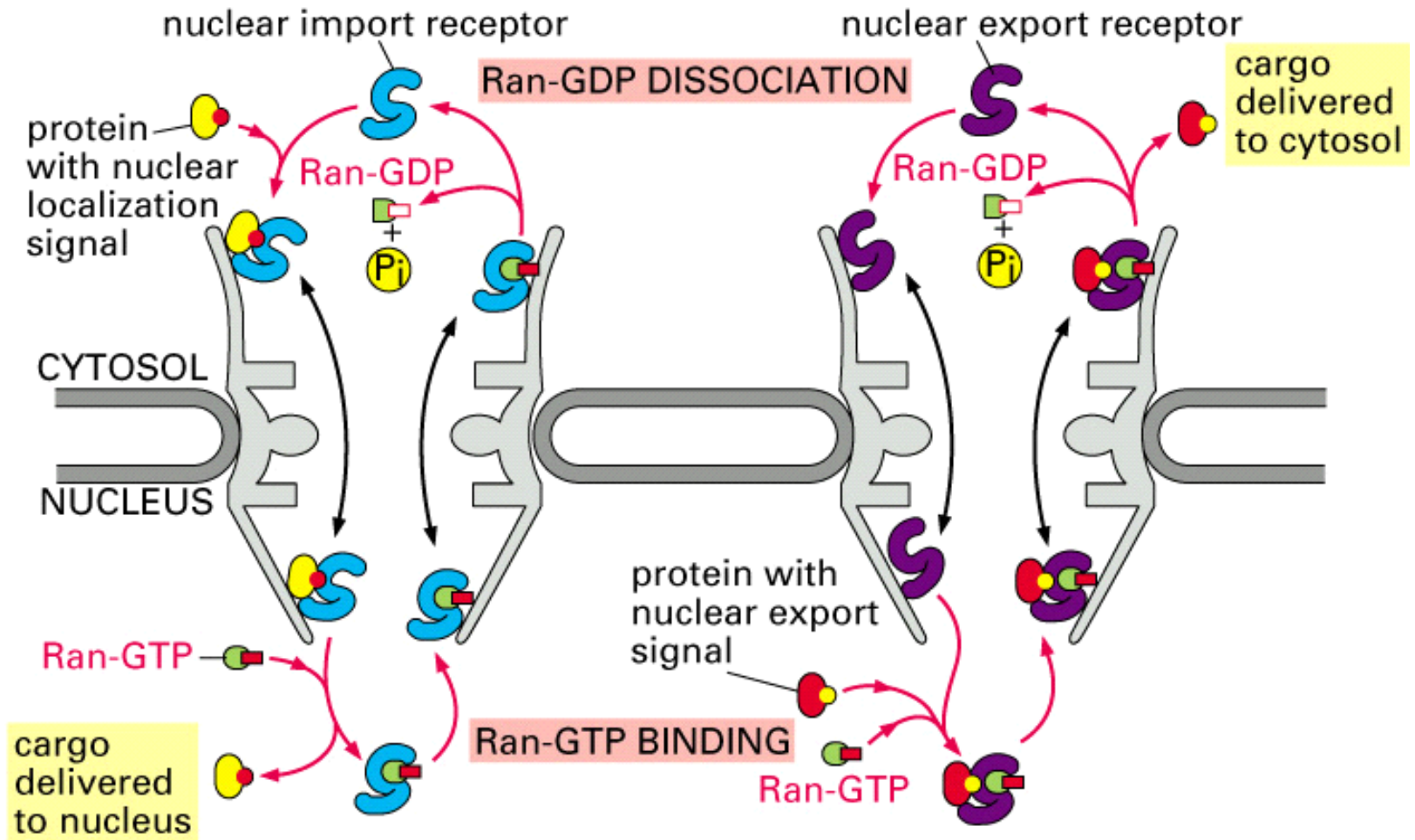
Transporte ativo de RNAs e de subunidades dos ribossomas para o citoplasma

Diferentes RNAs → Diferentes formas de transporte

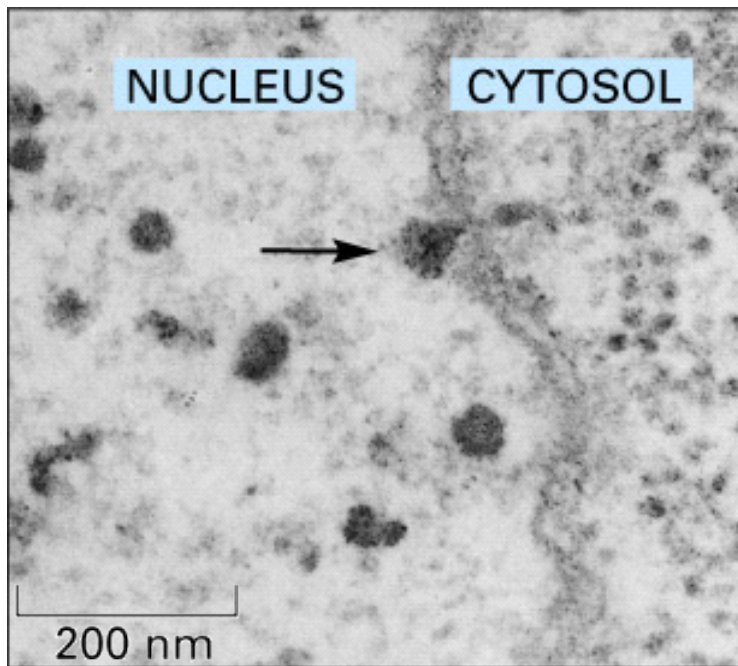
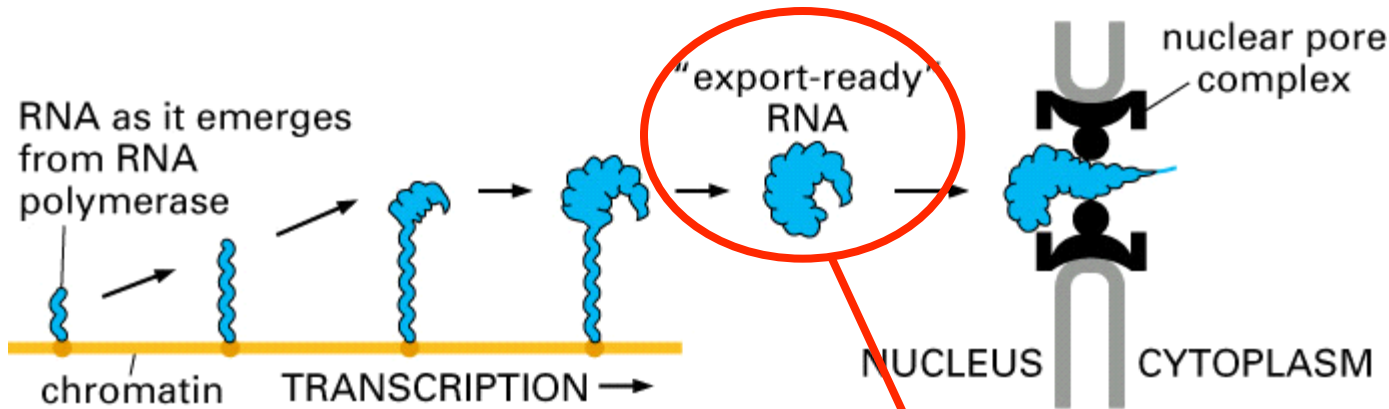
Sinais de exportação nuclear (NES: nuclear export signals): presentes nas proteínas e nas proteínas ligadas ao RNA

- ✓ **Recetores dos sinais de exportação:** “exportinas”; semelhantes aos recetores de importação
- ✓ **Ran:** regula a interação entre os NES e os recetores de exportação
- ✓ **Ran-GTP:** promove a associação do complexo proteína-recetor com o poro nuclear; a hidrólise do GTP ocorre no citoplasma

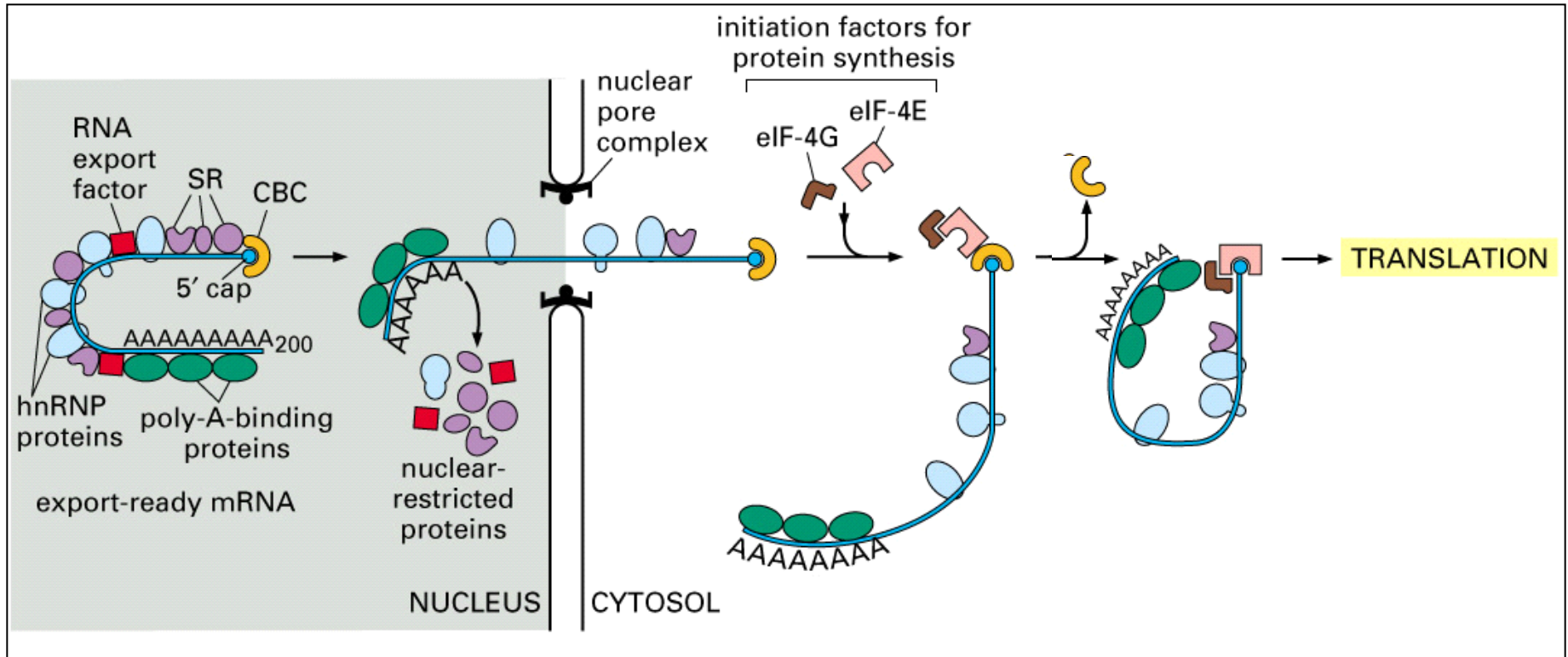
Importação - exportação



mRNA



- Deve estar ligado ao conjunto de proteínas adequado que atuam como fatores de exportação
- Proteínas ligadas durante o *splicing* para marcar acontecimentos completos são particularmente importantes
- As mais abundantes são as hnRNP (heterogenous nuclear ribonuclear proteins)



***SR proteins* – domínio rico em serinas e argininas, ligam aos exões, componentes do spliceossoma**

Tradução

O código genético

First letter of codon (5' end)

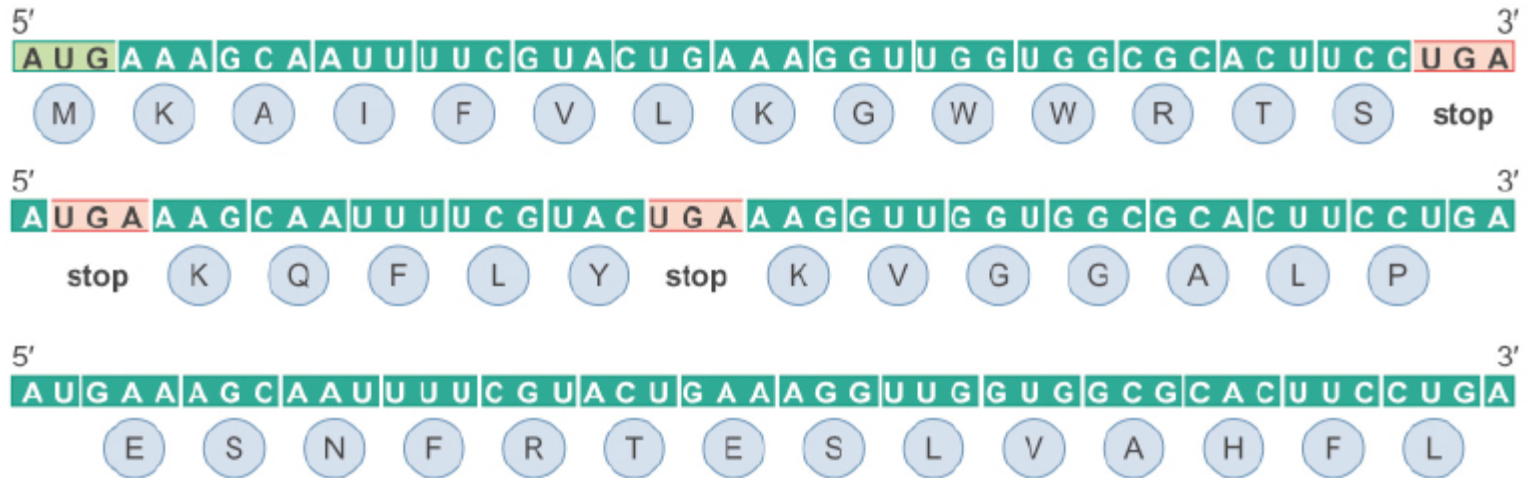
Second letter of codon

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

Diferença quase sempre no 3º nt

Figure 27-7
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

mRNA



Codão iniciador:

AUG (por vezes, GUG ou UUG) – Procariótas

AUG - Eucariótas

Codões de terminação (stop):

UGA; UAG; UAA

Em procariotas:

A molécula de mRNA pode ser lida de 3 modos (frames)

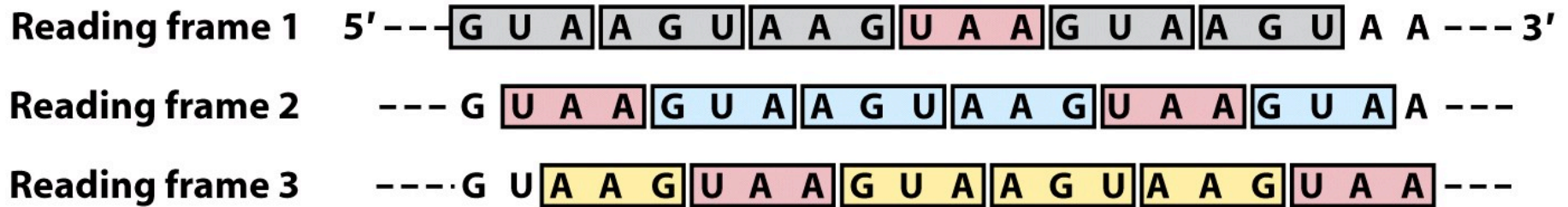


Figure 27-6

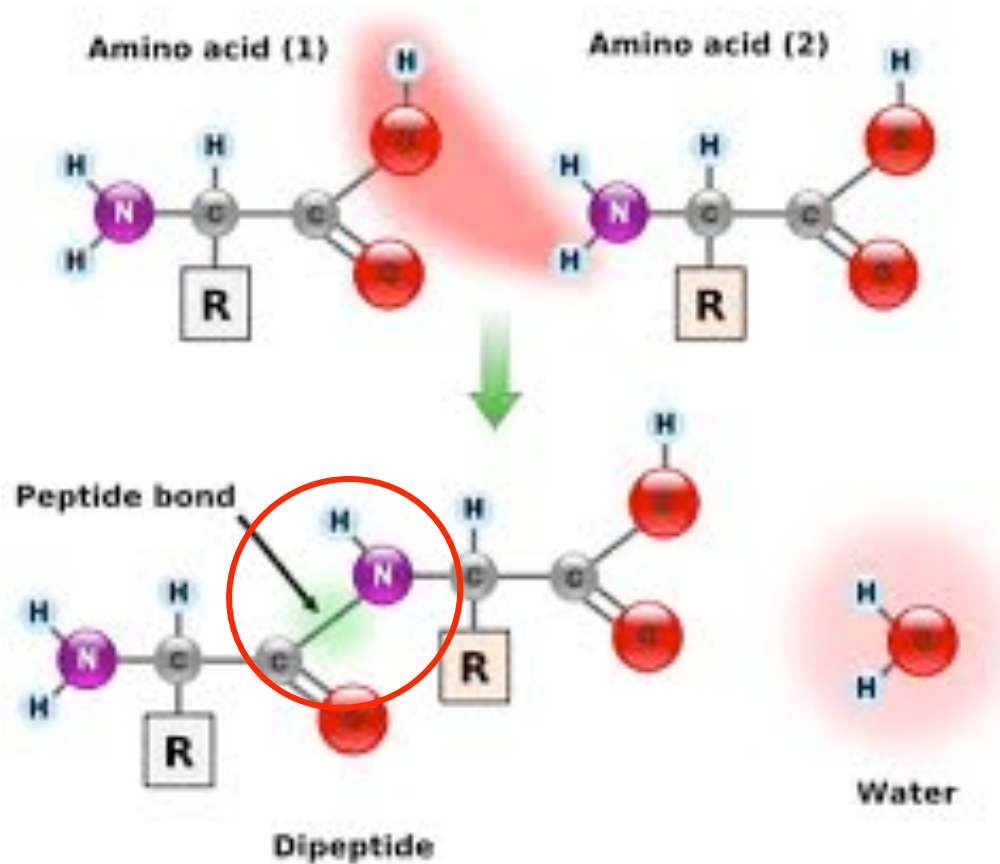
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

Código genético – principais características

- ✓ **Sem interrupções**
- ✓ **Sem sobreposições**
- ✓ **Redundante – só um codão para Met e Trp
outros aminoácidos têm 2-6 tripletos**
- ✓ **Degenerado – a 3^a posição do codão pode variar**
- ✓ **Não é ambíguo – cada tripleto codifica sempre o
mesmo aa**
- ✓ **Universal – com algumas exceções
(ex.: mitocôndria e alguns protozoários têm
codões diferentes)**
- ✓ **Tem 3 “reading frames”**

Síntese proteica: formação de ligações peptídicas



Para a síntese proteica (TRADUÇÃO) é necessário:

- ✓ mRNA (proveniente da transcrição)
- ✓ Aminoacil tRNA sintetases
- ✓ tRNAs (aminoacilados)
- ✓ Ribossomas

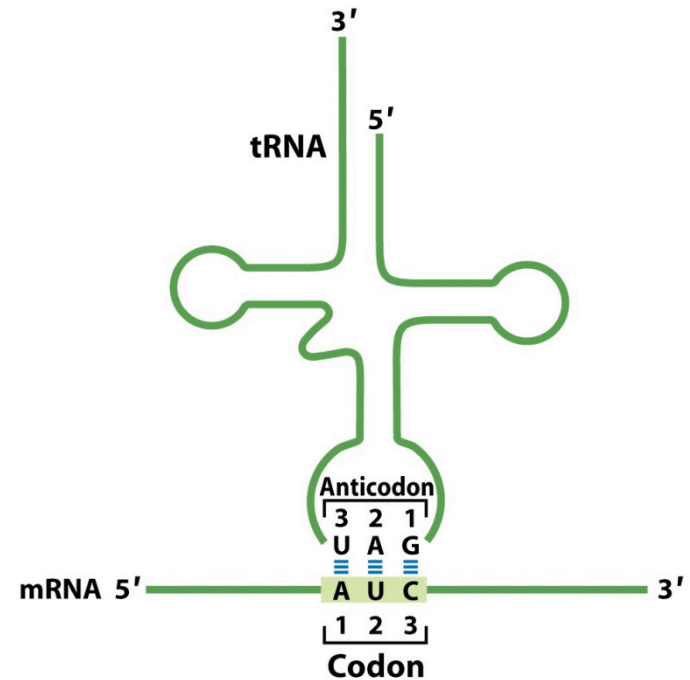


Figure 27-8a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

E também:

- ✓ Fatores de tradução
- ✓ tRNA especial para a iniciação

tRNAs

A hipótese do adaptador (Francis Crick)

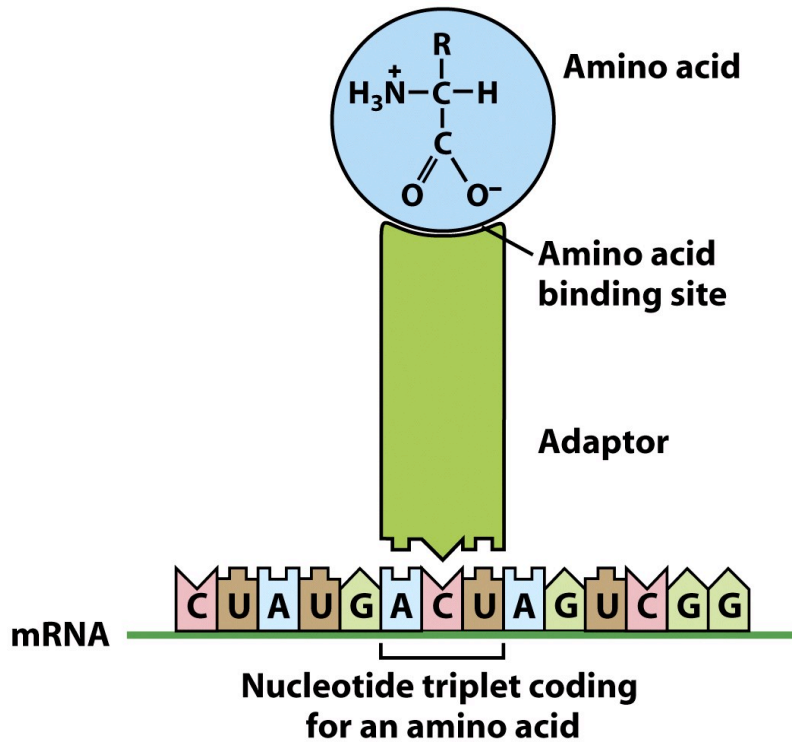
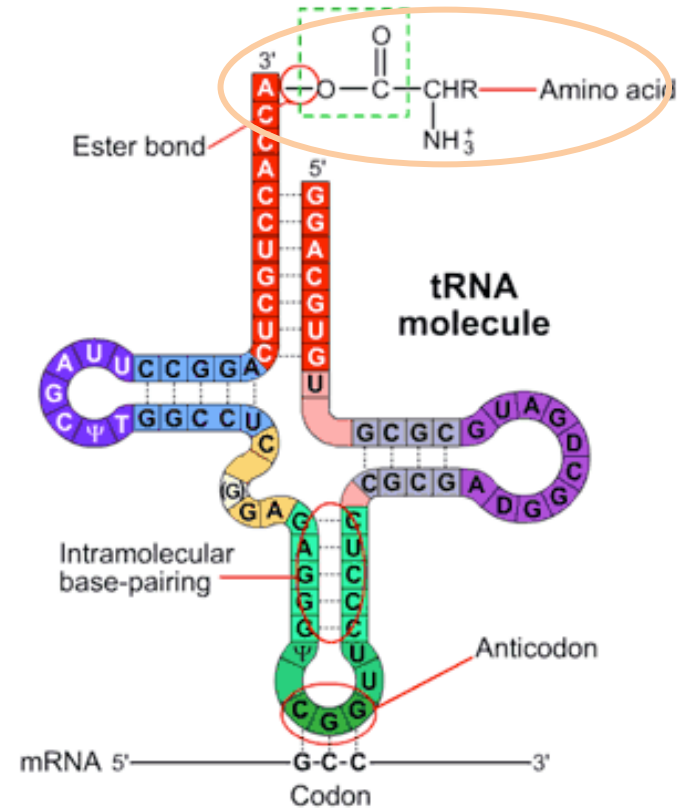
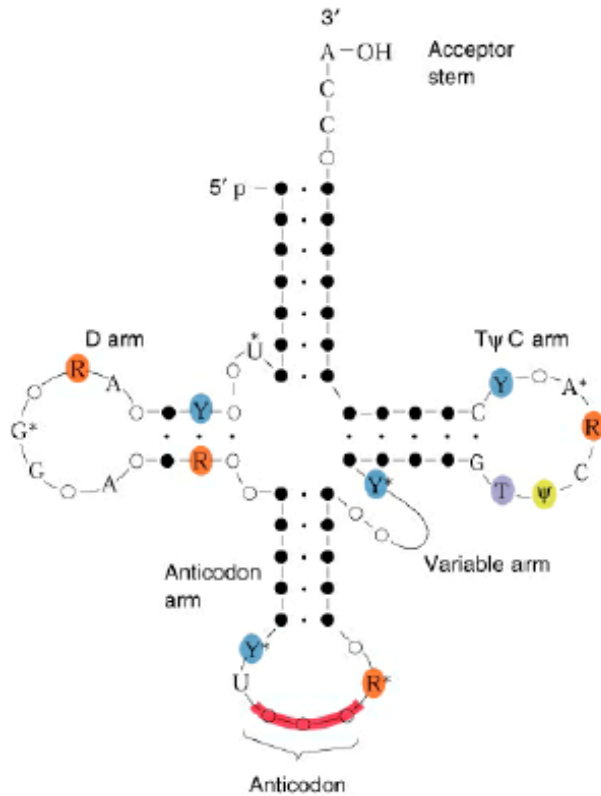


Figure 27-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

"The main idea was that it was very difficult to consider how DNA or RNA, in any conceivable form, could provide a direct template for the side-chains of the twenty standard amino acids. What any structure was likely to have was a specific pattern of atomic groups that could form hydrogen bonds. I therefore proposed a theory in which there were twenty adaptors (one for each amino acid), together with twenty special enzymes. **Each enzyme would join one particular amino acid to its own special adaptor.** This combination would then diffuse to the RNA template. An adaptor molecule could fit in only those places on the nucleic acid template where it could form the necessary hydrogen bonds to hold it in place. Sitting there, it would have carried its amino acid to just the right place where it was needed."

“Adaptador”: tRNA

(P. Zamecnik, M. Hoagland)

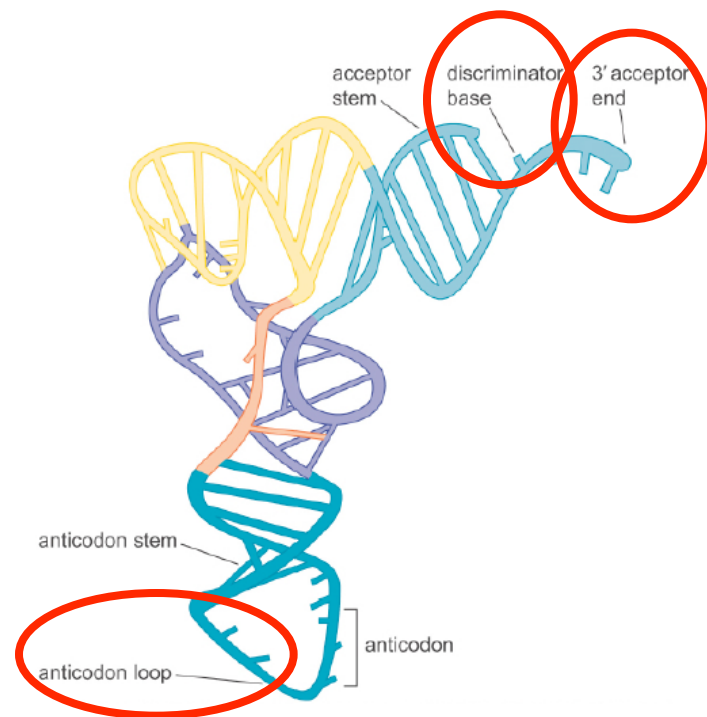


Aminoacil-tRNA sintetases

- ✓ Reação de adição
- ✓ Reconhecimento do tRNA correto pela enzima
- ✓ Reconhecimento do aminoácido correto pela enzima

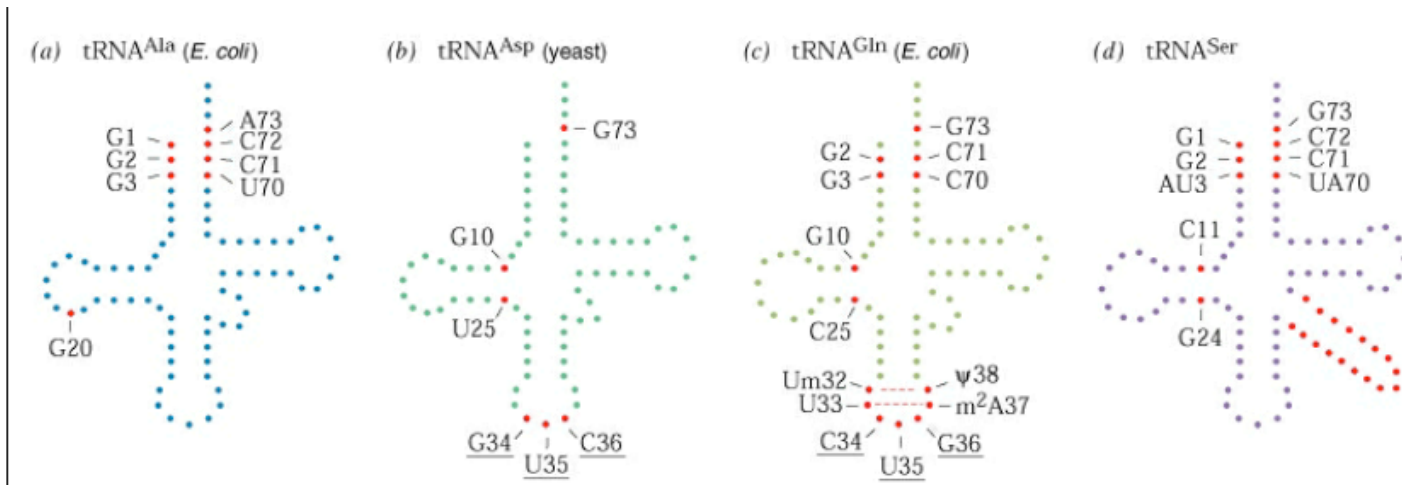
A enzima reconhece características do tRNA:

- Na extremidade 3' (aceitadora do aa)
- Na “laçada” do anticodão
- Uma base discriminatória

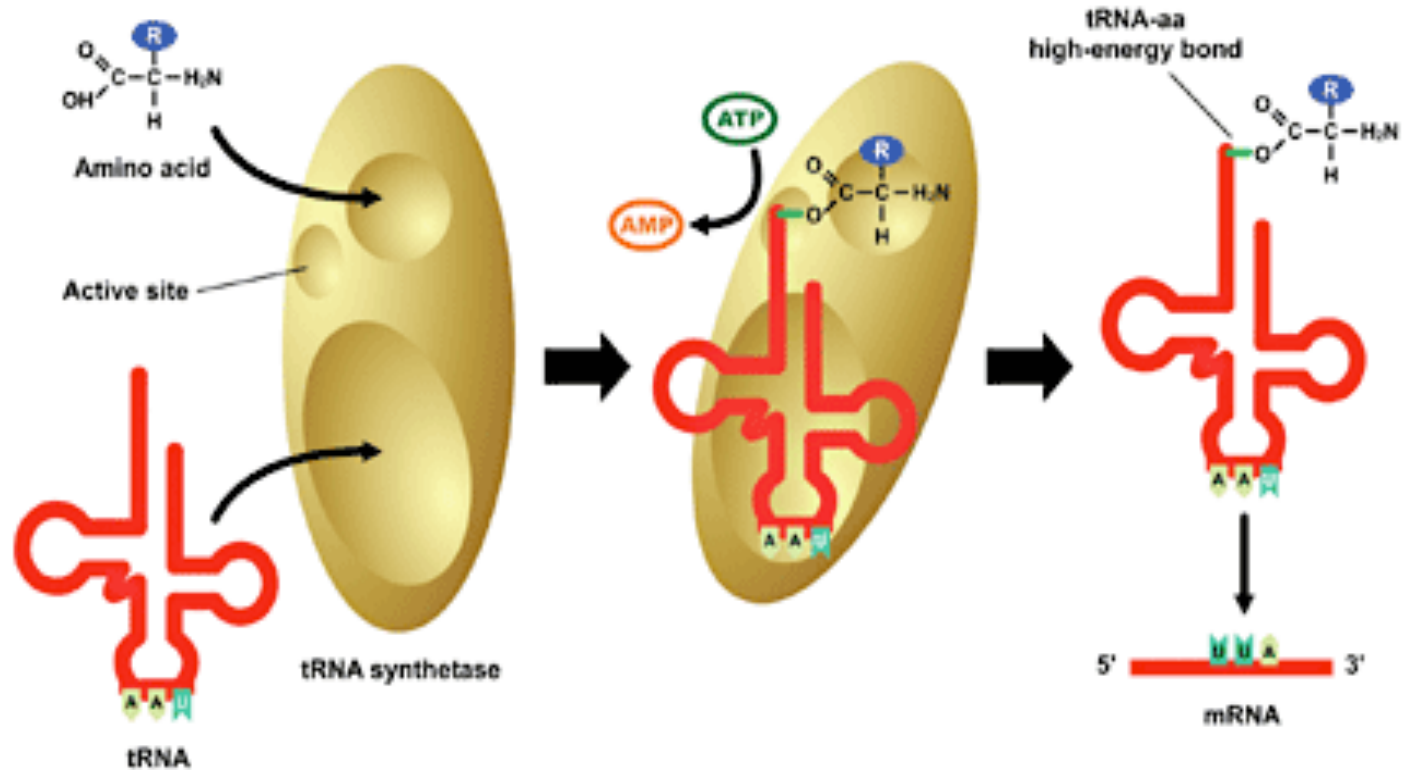


O reconhecimento pode ocorrer através:

- Da extremidade 3' (aceitadora do aa)
- Da “laçada” do anticodão
- Da extremidade 3' e da “laçada” do anticodão em simultâneo
- De combinação entre características da sequência e estruturais do tRNA



Aminoacyl-tRNA synthetases



journals.prous.com

Nomenclatura:

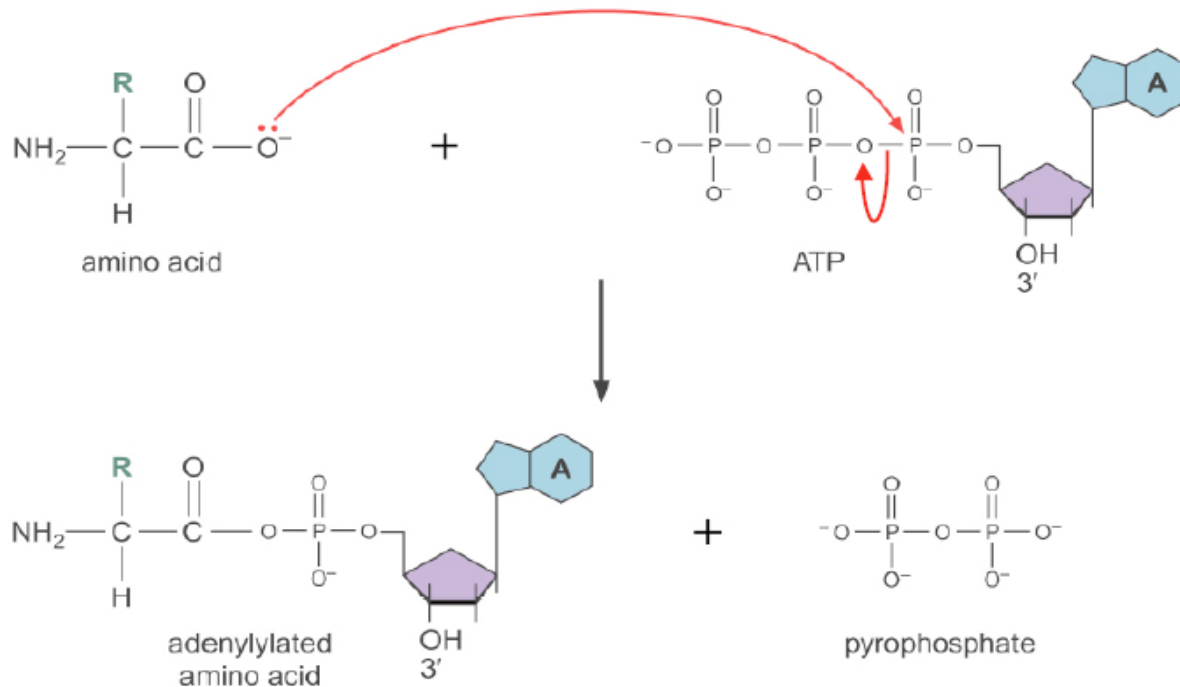
aa-tRNA^{NNN}

i.e. Phe-tRNA^{GAA}

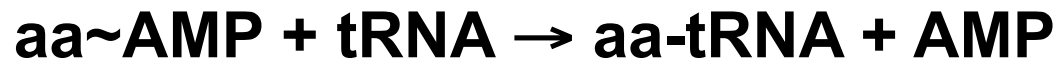
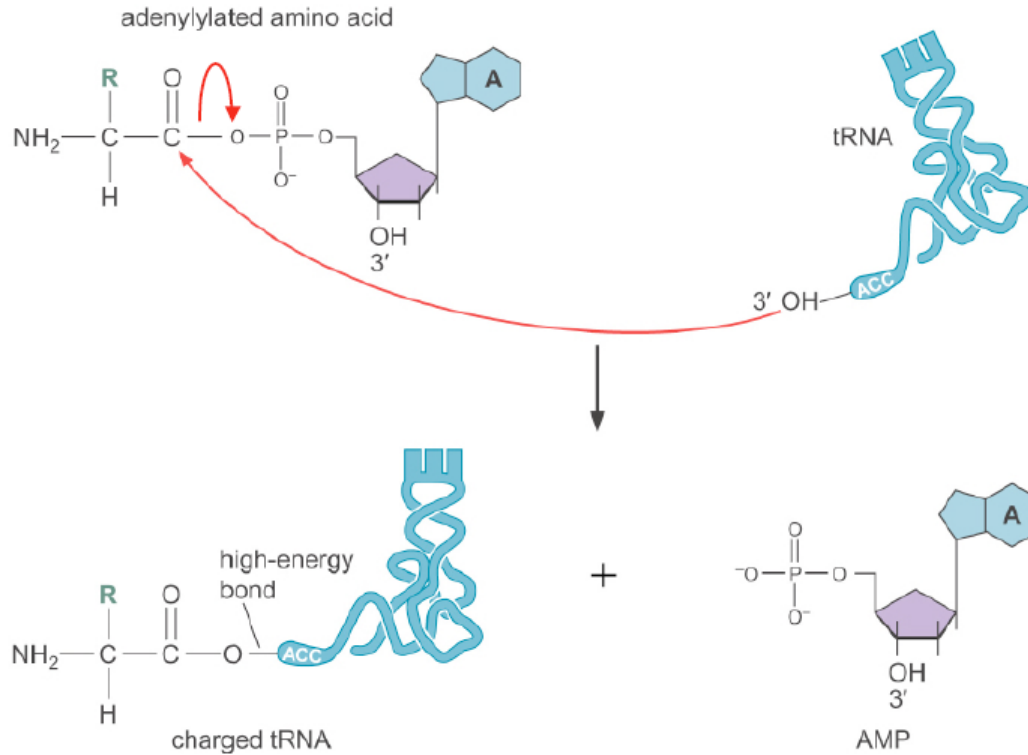
Formação de aminoacil-tRNAs

Mecanismo de aminoacilação direta

1ª ETAPA – ativação do aminoácido



2ª ETAPA – transferência do grupo aminoacil para o tRNA

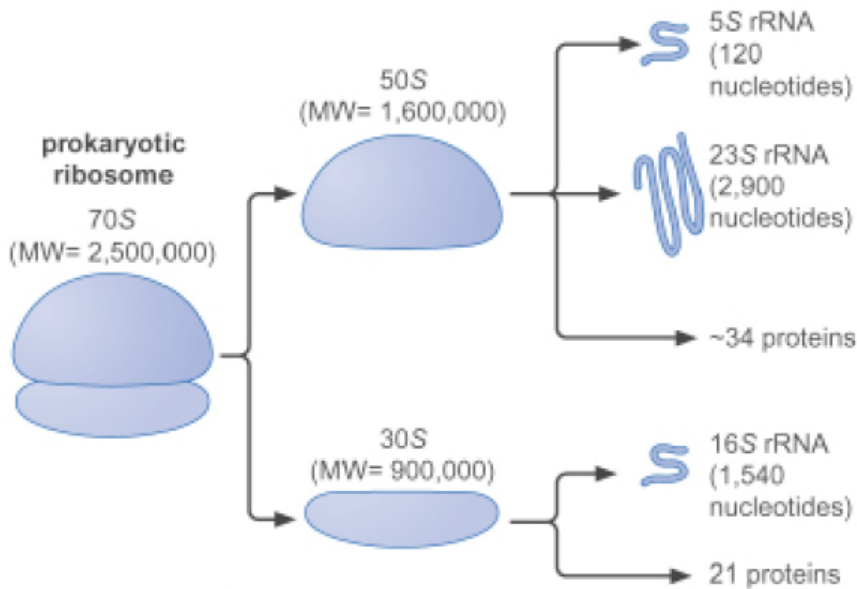


Porque motivo é tão importante a fidelidade nas aminoacil-tRNA sintetases ?

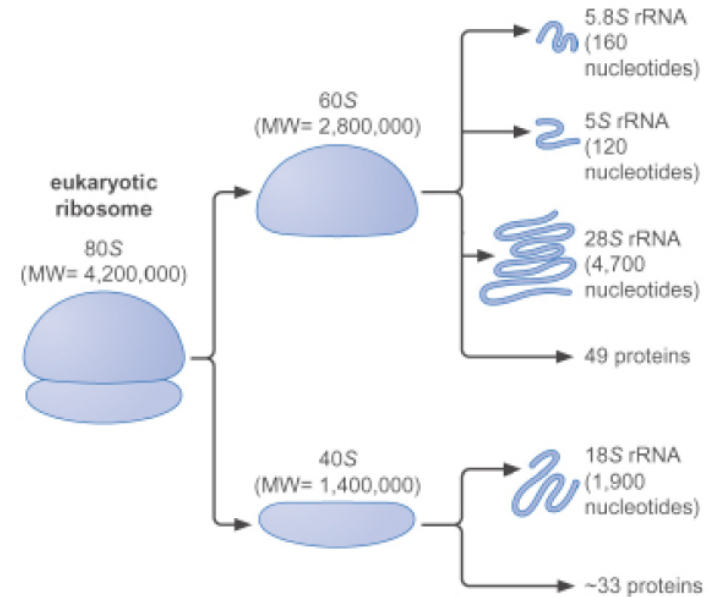
Porque o ribossoma não verifica a ordem de ligação dos aminoácidos !

Ribossomas

Procariotas



Eucariotas



Duas subunidades ribonucleoproteicas:

Pequena (30S/40S) – centro descodificante

Grande (50S/60S) – centro peptidiltransferase

Subunidade pequena

prokaryotes	eukaryotes
30S	40S
16S rRNA	18S rRNA
21 proteins	~33 proteins

Reconhecimento
do mRNA

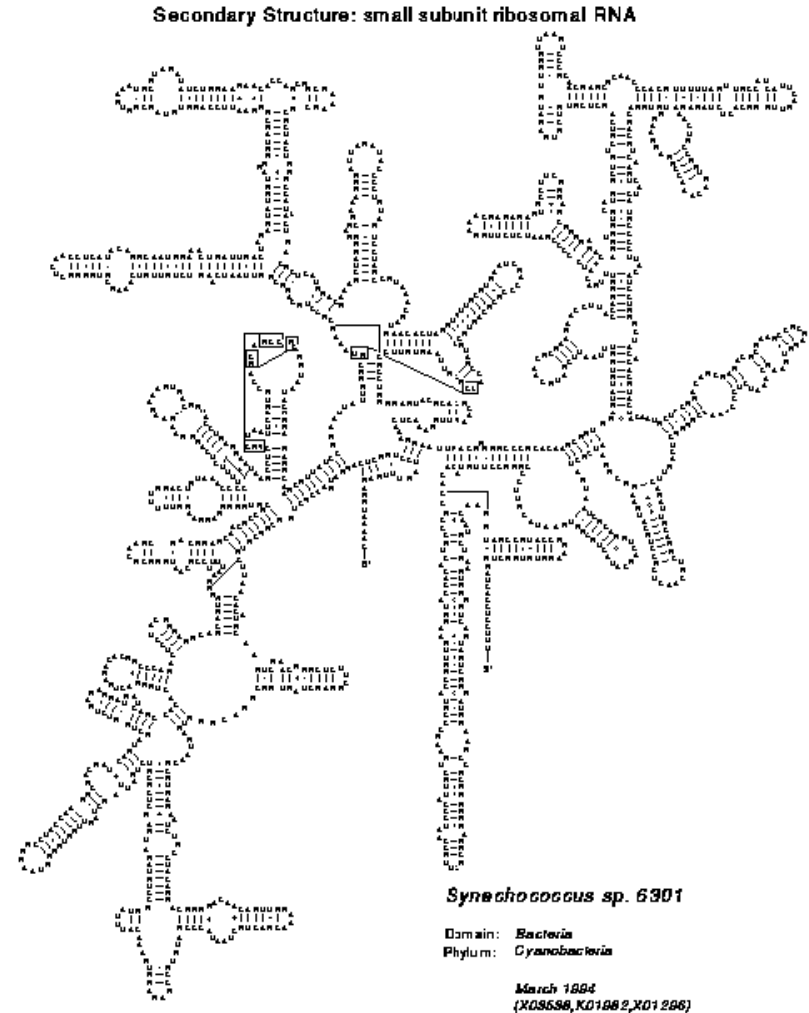
Subunidade grande

prokaryotes	eukaryotes
50S	60S
5S rRNA	5S rRNA
23S rRNA	5.8S rRNA
34 proteins L26 = S20 L7 = L12 (4 copies)	28S rRNA
	~50 proteins

Atividade
catalítica

16S rRNA

- Reconhece a extremidade 5' do mRNA
- Posiciona corretamente o mRNA no ribossoma
- Tem uma estrutura secundária característica em que metade dos nucleótidos está emparelhada
- Tem uma estrutura/sequência altamente conservada



16S rRNA from *Synechococcus* sp. PCC 6301

Tradução – síntese proteica

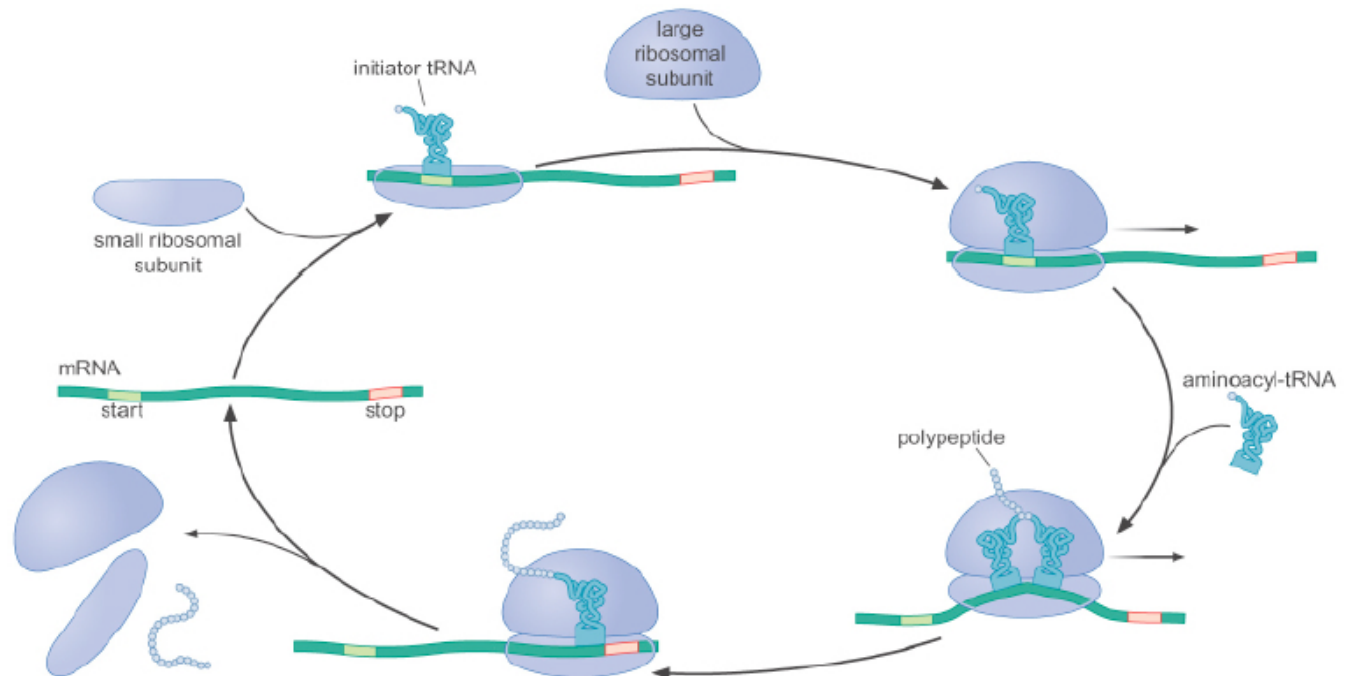
4 Etapas

Iniciação

Elongação

Terminação

“Desmontagem”



O que acontece no ribossoma?

Forma-se uma ligação peptídica

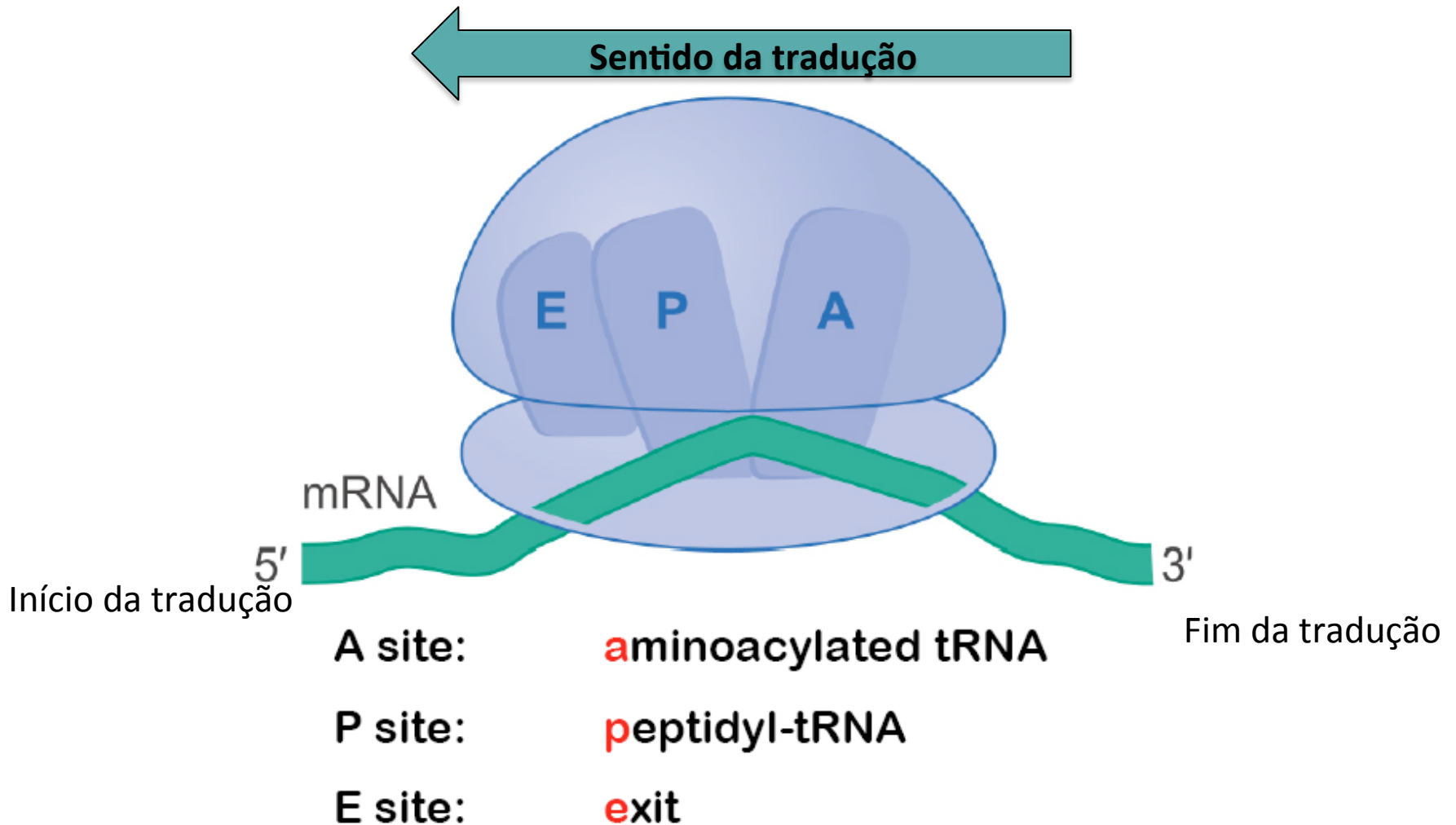
tRNA move-se ao longo do ribossoma

aa-tRNA → peptidil-tRNA → tRNA vazio

mRNA move-se ao longo do ribossoma

Polipéptido formado sai do ribossoma

Diferentes locais no ribossoma

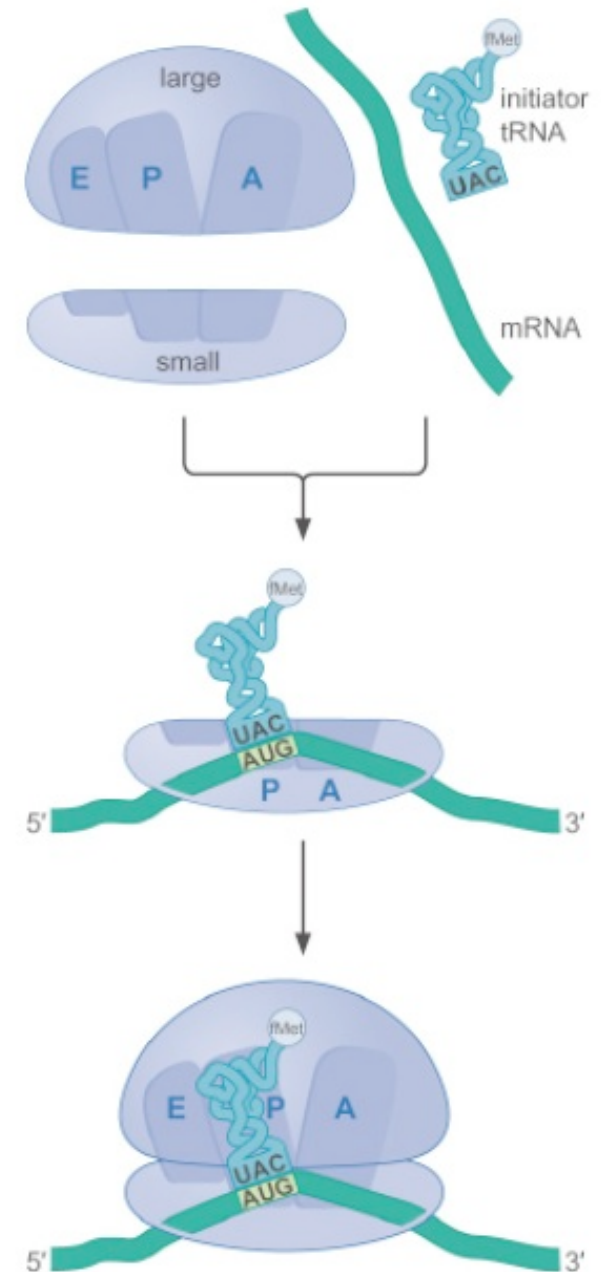


Iniciação

(**procariotas**)

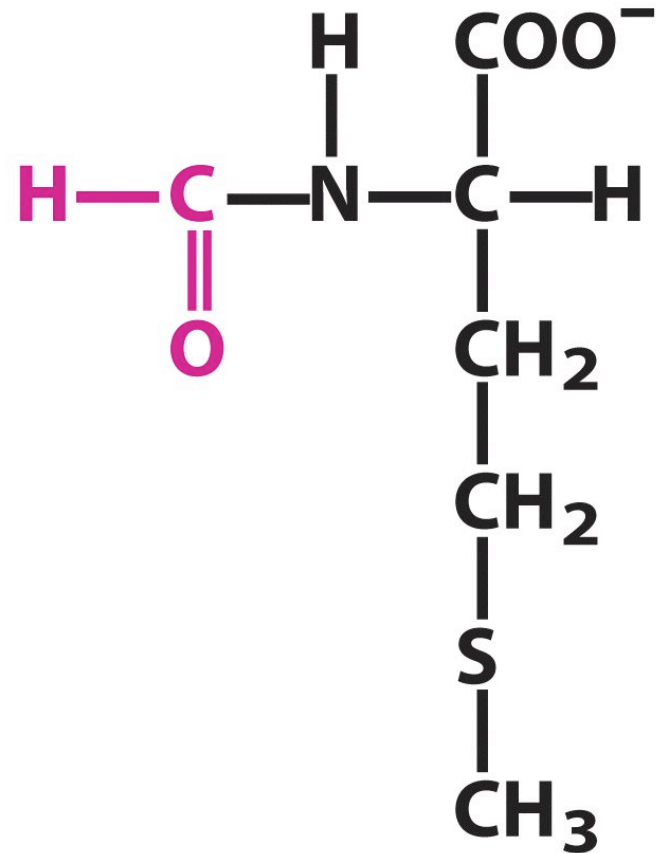
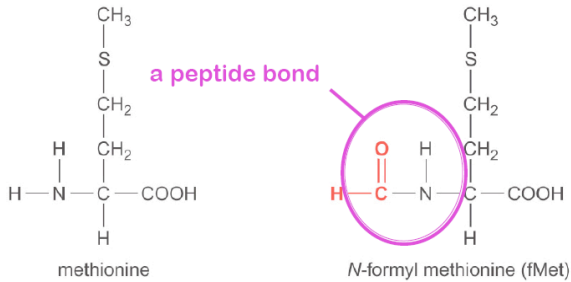
É necessário:

- ✓ 2 subunidades do ribossoma (30S e 50S =procariotas!)
- ✓ mRNA
- ✓ Iniciador: **fmet-tRNA_i^{Met}**
- ✓ 3 Fatores de iniciação: IF1, IF2 (GTP) e IF3



fmet-tRNA_i^{Met}

(procarionotas)



Único tRNA carregado a posicionar-se no local P do ribossoma

N-Formylmethionine

Unnumbered 27 p1088

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Iniciação

(procariotas)

Acontecimentos:

- ✓ Recrutamento do ribossoma para o mRNA (subunidade menor)
- ✓ Ligação do tRNA iniciador à posição P
- ✓ Posicionamento do ribossoma sobre o codão iniciador

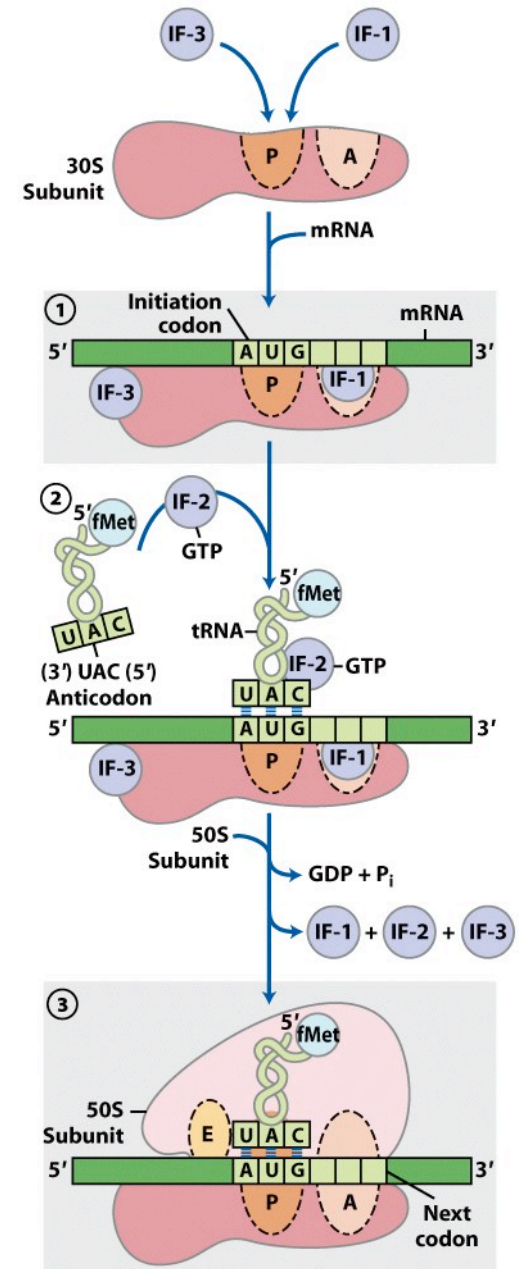
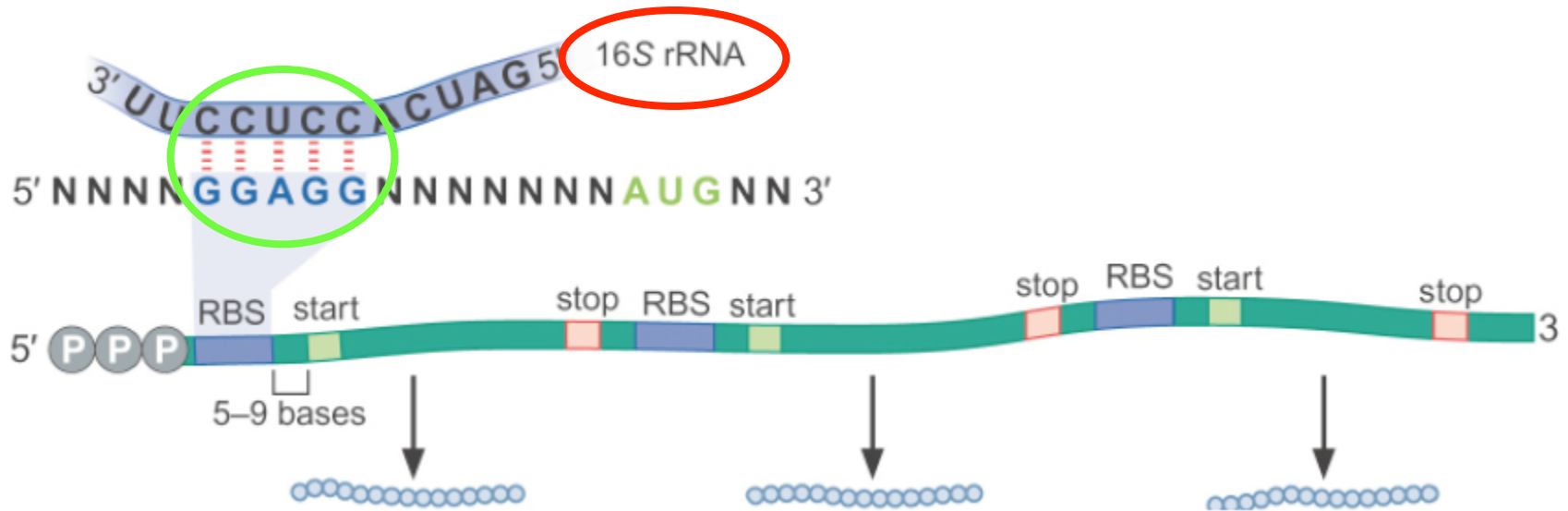


Figure 27-25

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Recrutamento do ribossoma para o mRNA (procariotas)

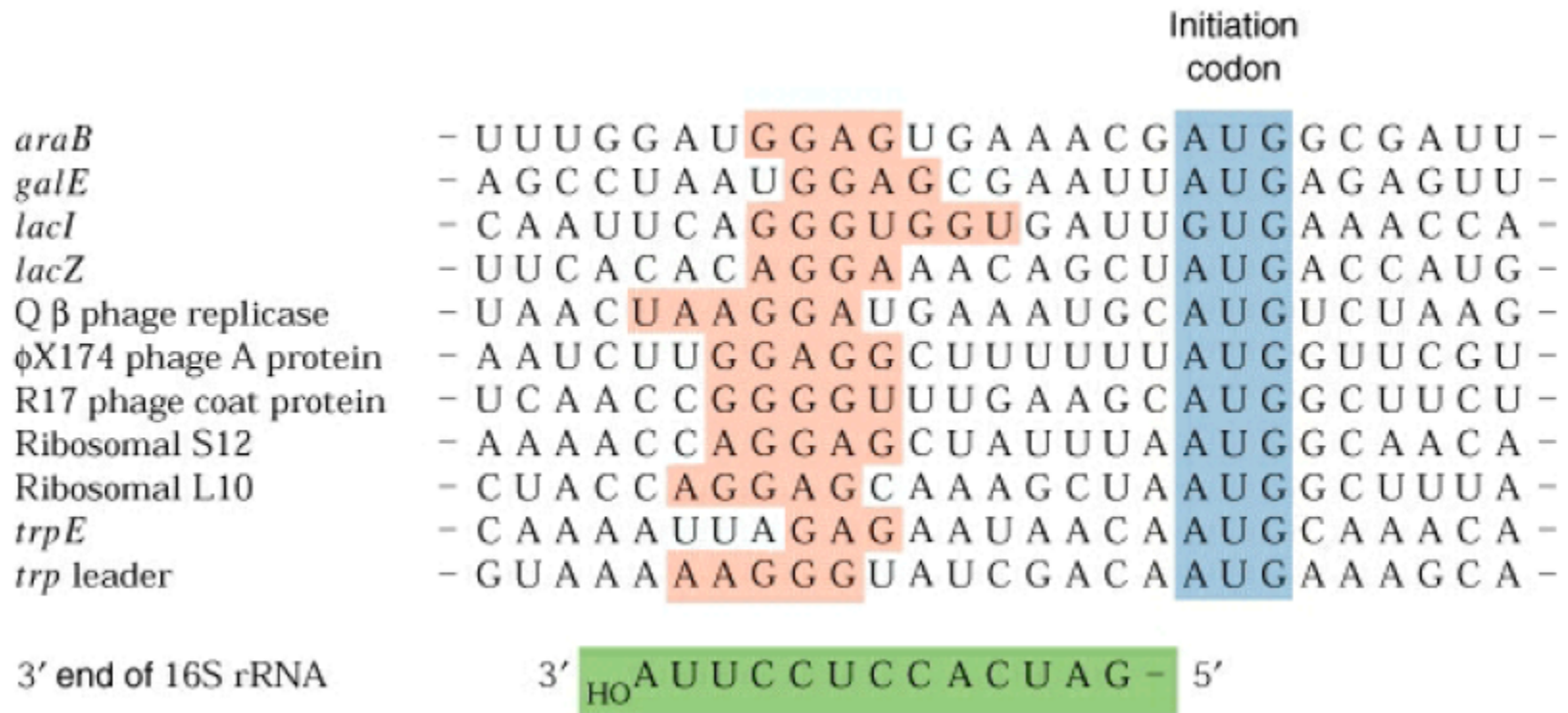


Local de ligação ao ribossoma (Ribosome binding site, **RBS**)
ou **Sequência de Shine-Dalgarno**

Localizada a 5-9 nt a montante do codão iniciador

Complementar à região 3' do 16S rRNA (ribossoma)

Sequência de Shine-Dalgarno (1974)

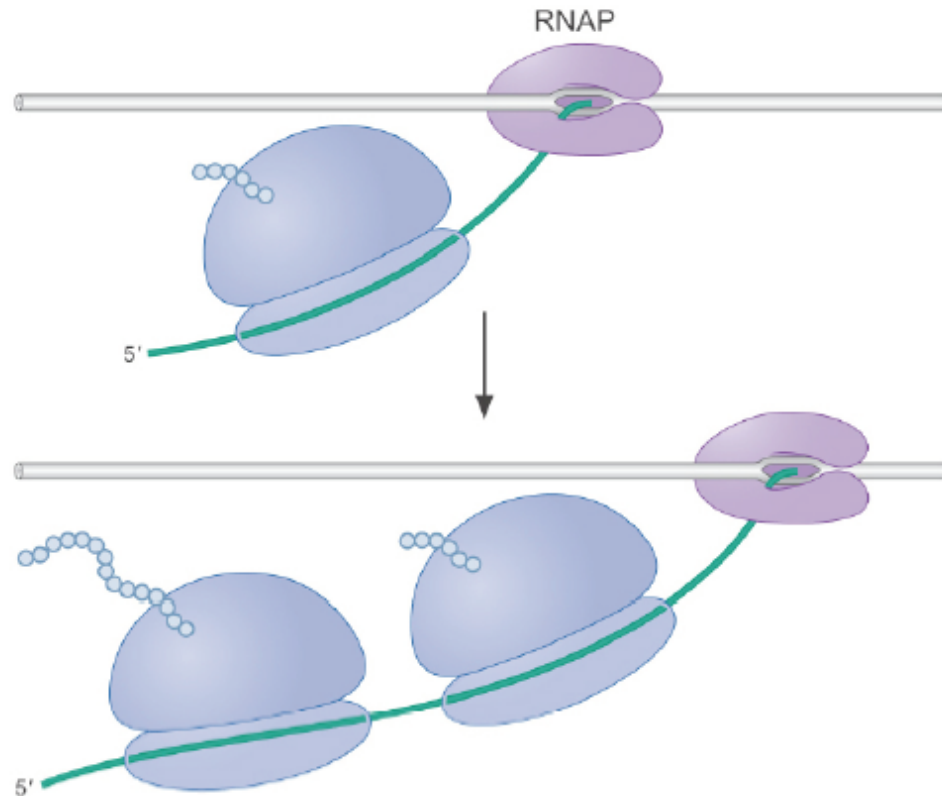


Exemplos de sequências de iniciação reconhecidas por ribossomas de *E. coli*

Algumas ORF de procariotas não contêm a sequência de Shine-Dalgarno

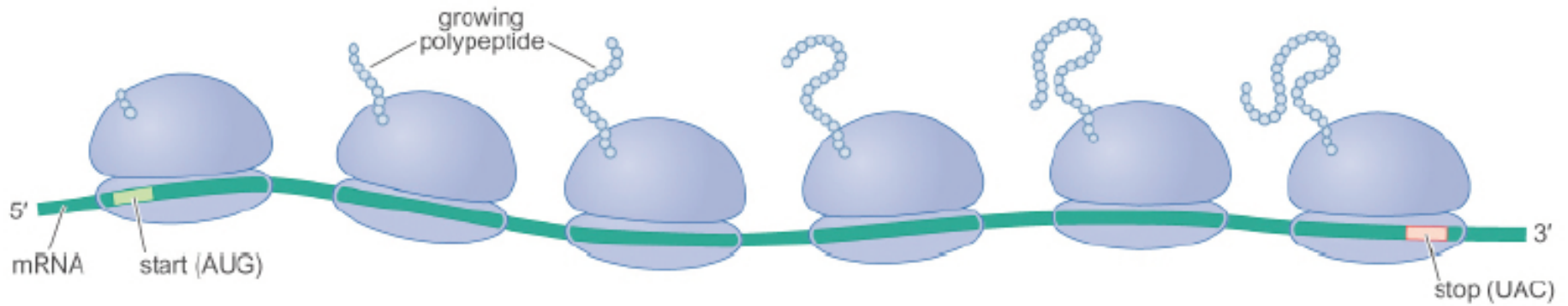
Procariotas

A tradução inicia-se enquanto ainda está a decorrer a transcrição



2-20 aa/segundo

Polissomas



Tradução de um único mRNA por vários ribossomas

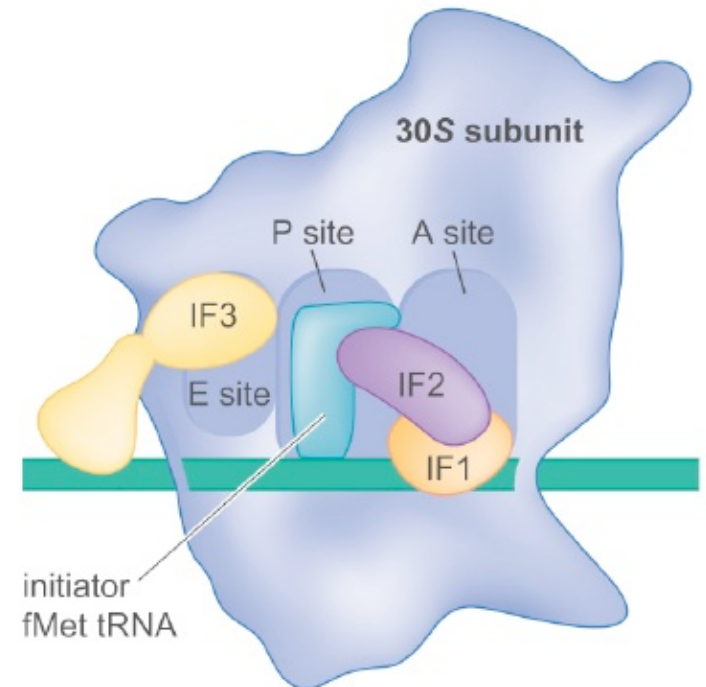
Procariotas

Fatores de iniciação

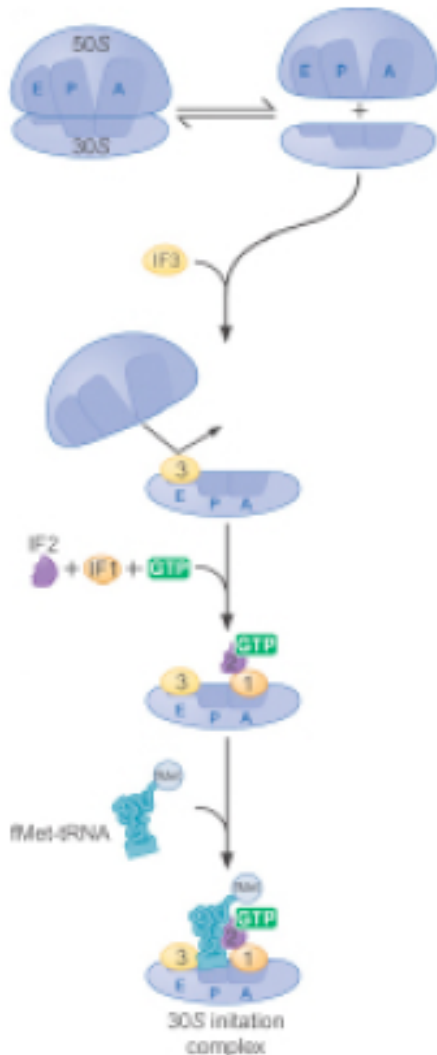
IF1 – Evita que o tRNA iniciador se ligue na posição A

IF2 – É uma GTPase; interatua com IF1 e liga ao fmet-tRNA_i^{Met}

IF3 – Liga à subunidade 30S e evita a associação precoce da subunidade 50S



Procariotas

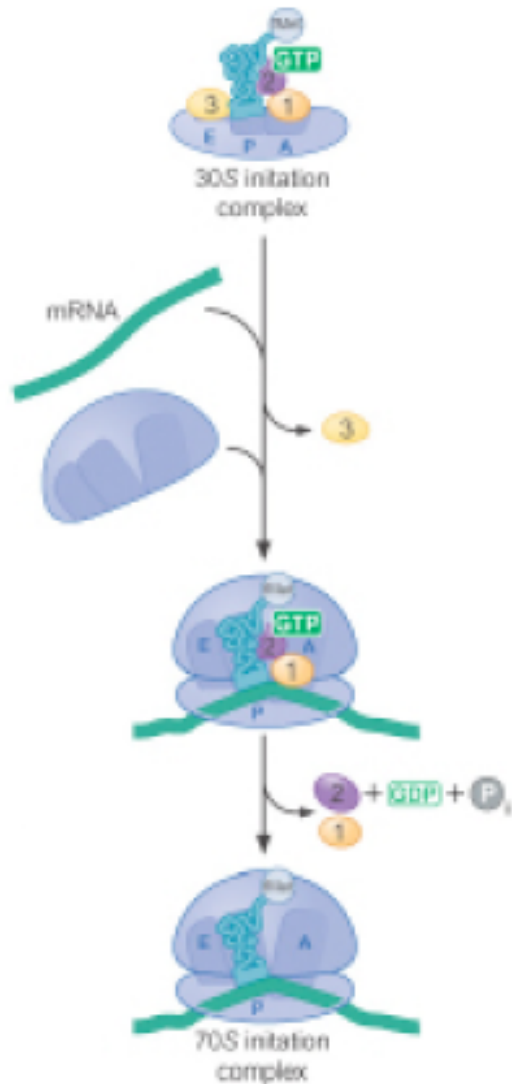


1. IF3 evita a associação das 2 subunidades

2. IF1 liga perto do local A e bloqueia-o

3. IF2 ajuda a ligação do **fmet-tRNA_i^{Met}** ao local P e forma-se o complexo 30S de pré-iniciação

Procariotas



4. Liga-se o mRNA e posiciona o codão iniciador

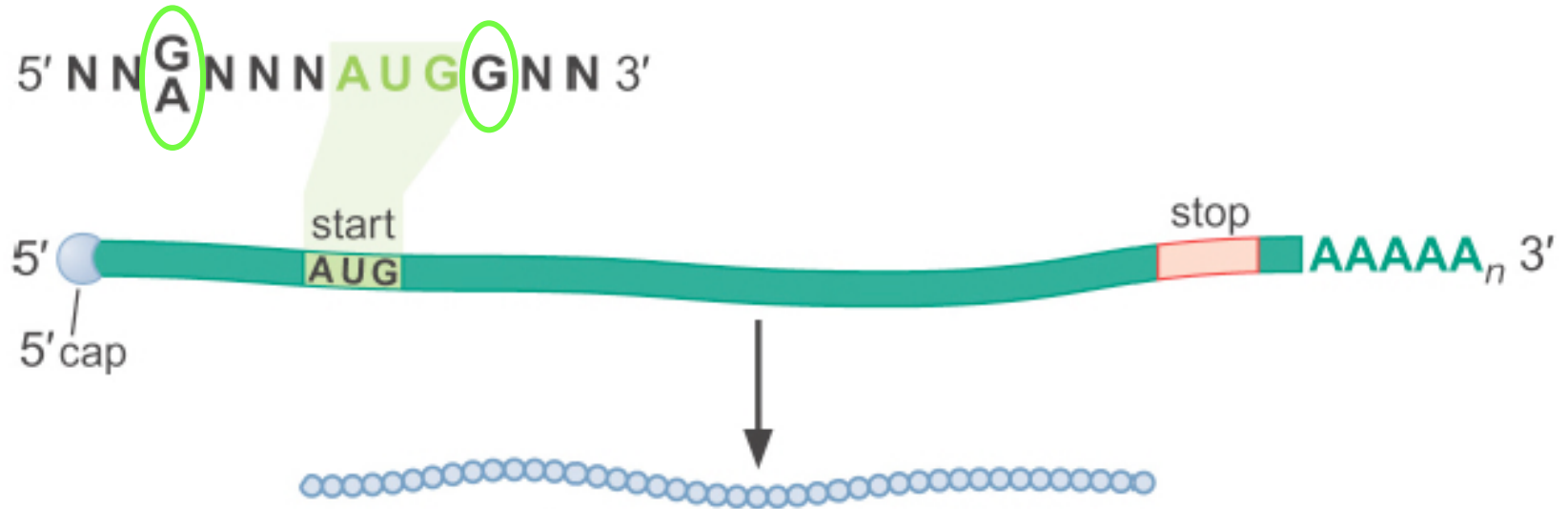
5. Alterações na conformação da subunidade 30S promovem a libertação do IF3

6. Liga-se a subunidade 50S que promove a atividade GTPase do IF2; libertam-se IF1 e IF2-GDP

Está formado o complexo 70S de iniciação

Eucariotas

Recrutamento do ribossoma para o mRNA (eucariotas)



Ribossoma é recrutado pelo 5' cap

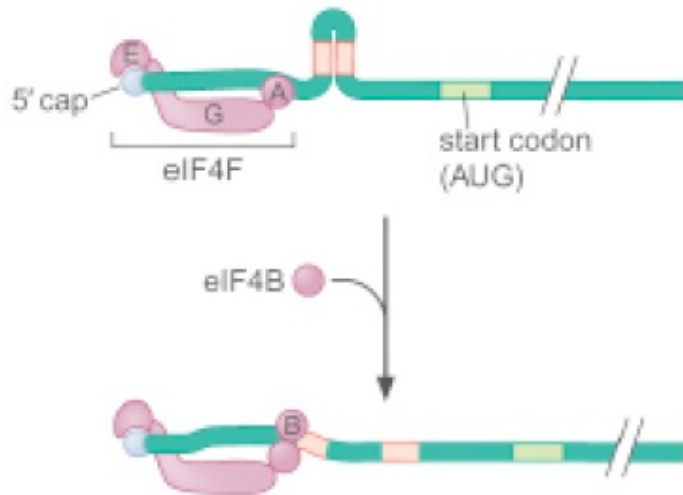
Percorre o mRNA até encontrar o codão iniciador

2 características da sequência estimulam a tradução:

- ✓ Purinas a montante
- ✓ Guanina após o codão iniciador

Eucariotas

Requer mais de 10 fatores de iniciação (eIFs)

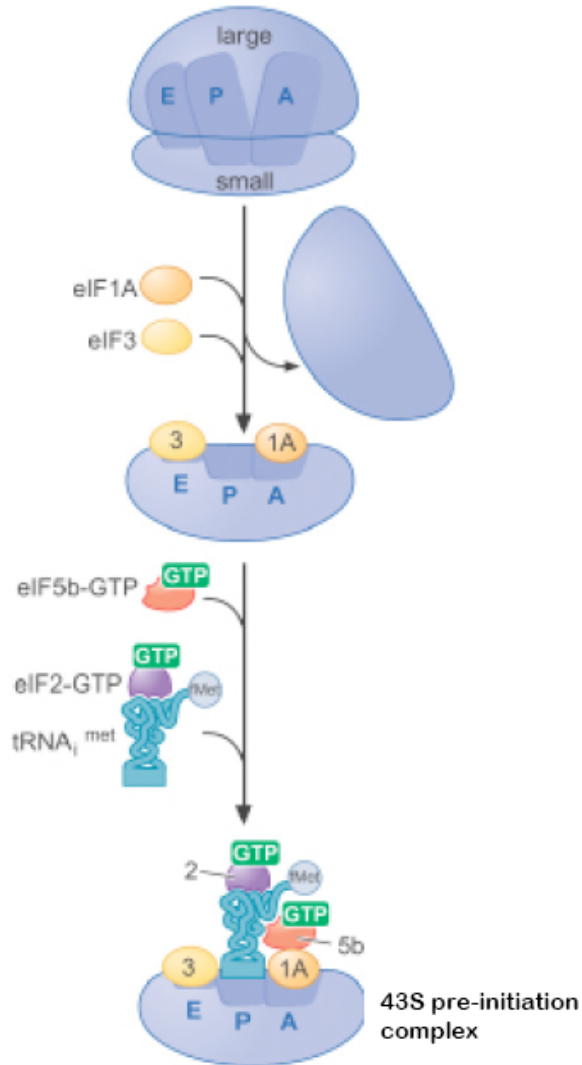


eIF4F – formado por 3 subunidades (A, G e E), reconhece o mRNA 5' cap

eIF4B – liga-se a subunidade B e ativa a helicase do eIF4F

Deste modo garante-se que o mRNA não tem estruturas secundárias

Eucariotas

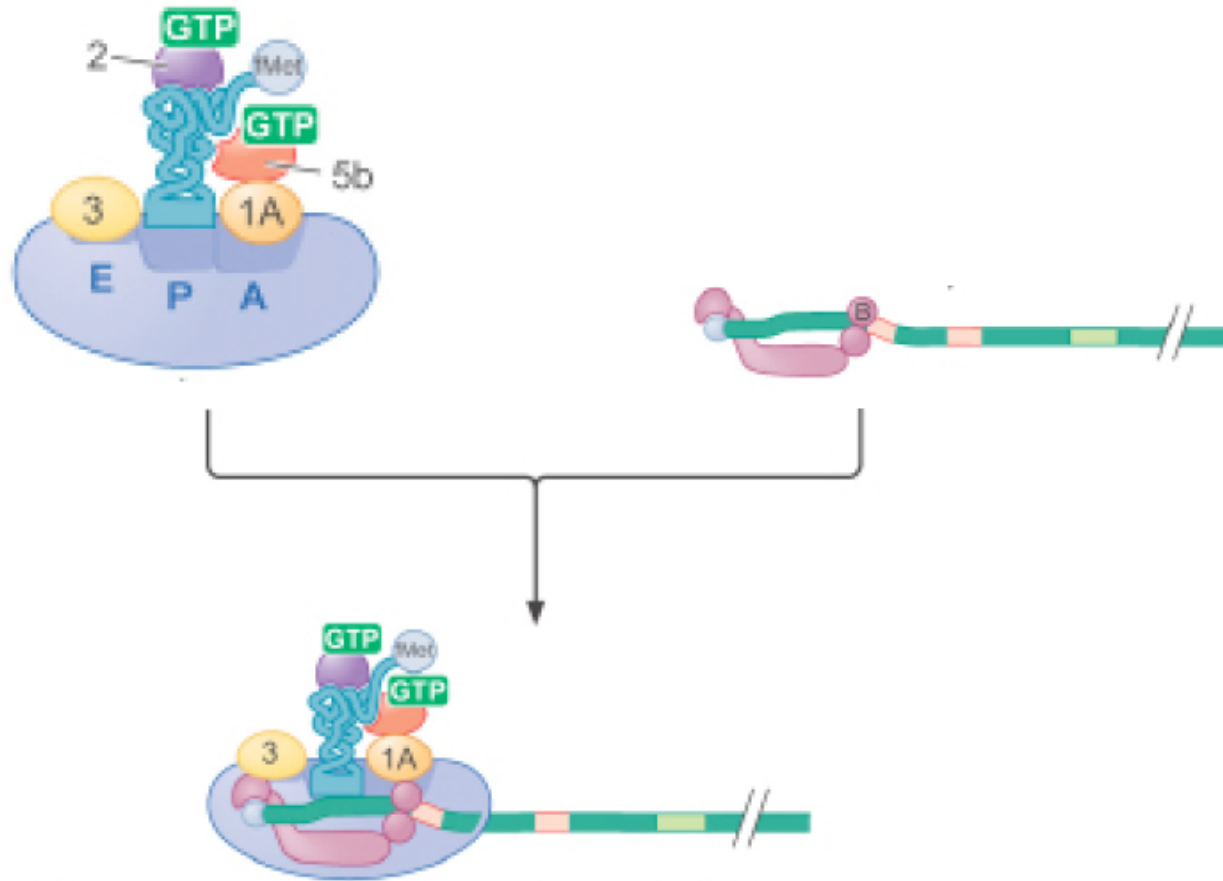


1. eIF1A e eIF3 dissociam o ribossoma

2. eIF5B(GTP) associa-se à subunidade pequena e atrai um complexo eIF2(GTP). **Met-tRNA_i^{met}**

Forma-se o complexo 43S de pré-iniciação

Eucariotas



3. O mRNA associa-se à subunidade pequena do ribossoma

Eucariotas

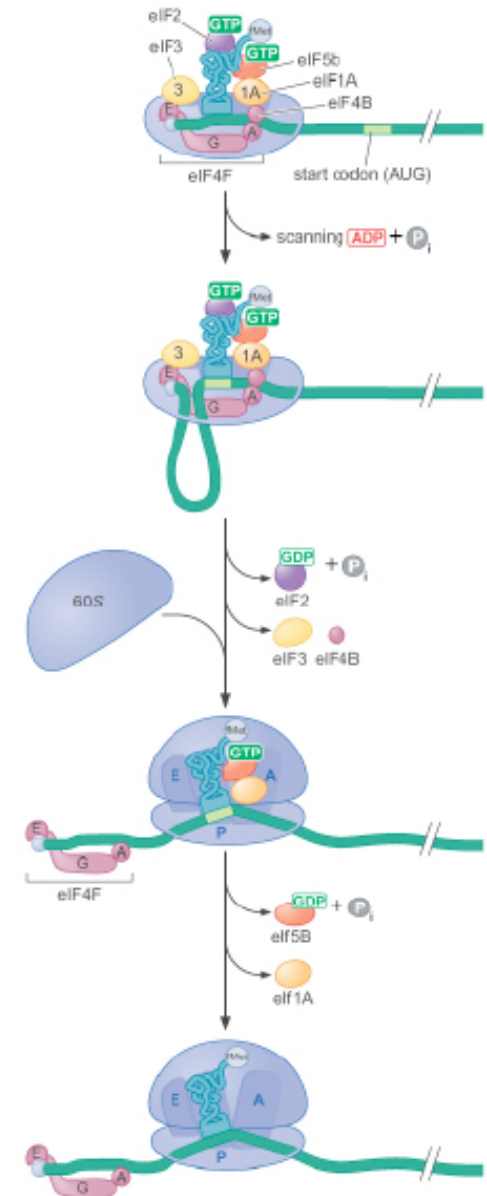
4. O codão iniciador é encontrado por procura. O processo requer ATP e requer a atividade helicase do eIF4F

5. Quando encontrado, eIF3 e eIF2 são libertados

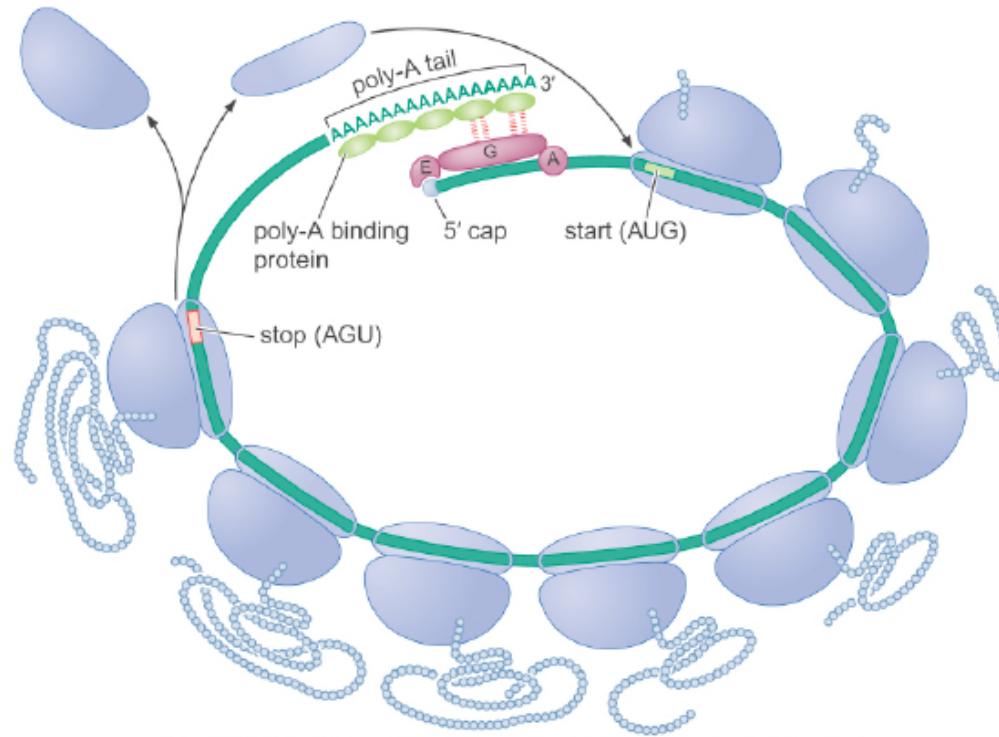
6. Liga-se a subunidade maior que promove a atividade GTPase do eIF5B

7. eIF5B.GDP e eIF1A são libertados.

Está formado o complexo 80S de iniciação



Eucariotas



eIF4G liga a outros factores e liga à PABP (poly A binding protein)

Garante-se que só mRNAs completos são traduzidos

Arranjo cíclico – permite que o processo se reinicie

Elongação

Fatores de alongação

Procarionotas		Eucariotas
EF-Tu (GTP)	----->	eEF-1a
EF-Ts	----->	eEF-1bg
EF-G (GTP)	----->	eEF-2

A alongação em procarionotas e eucariotas é muito semelhante

Elongação

É um processo cíclico

Um aminoacil-tRNA liga ao local A do ribossoma

Forma-se uma ligação peptídica (peptidiltransferase)

O peptidil-tRNA.mRNA é translocado no ribossoma

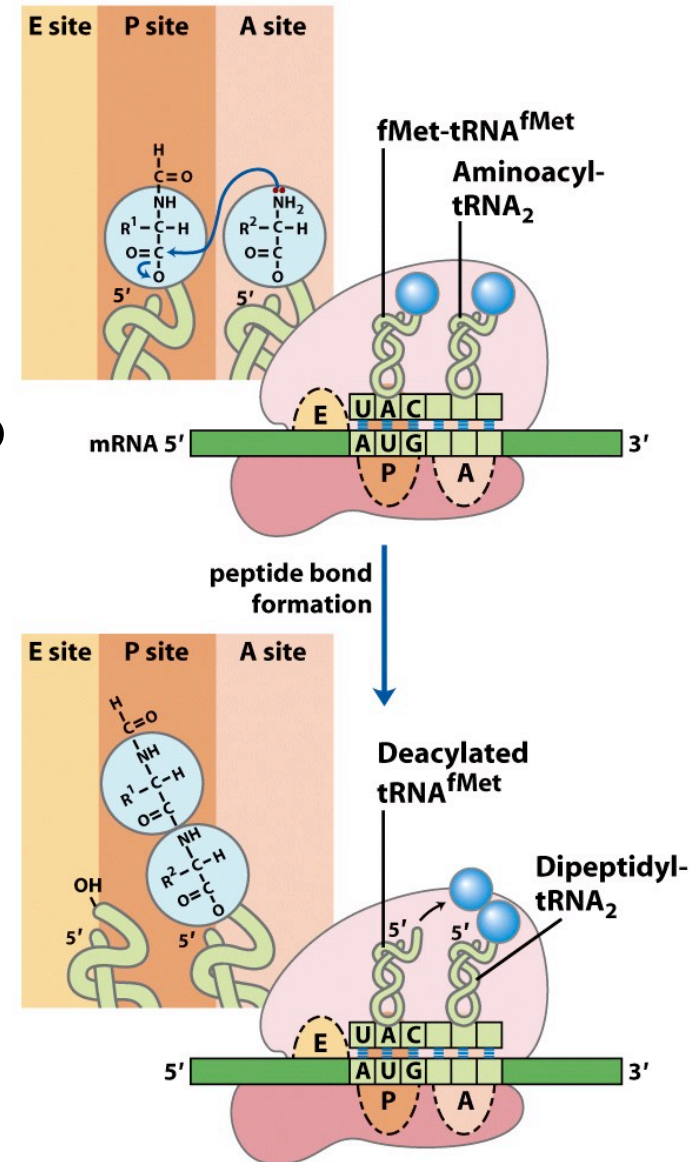
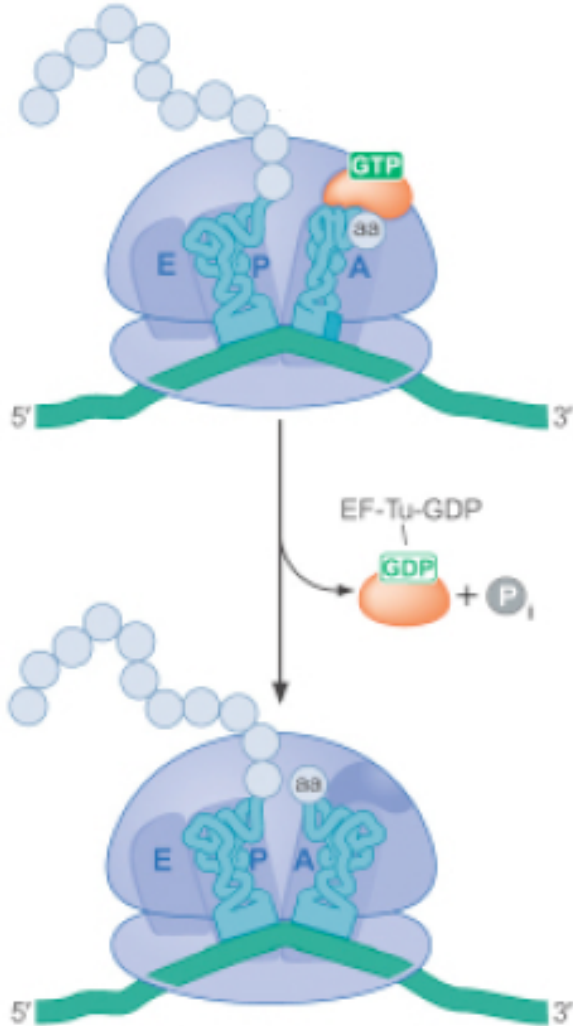


Figure 27-29
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Ligação do aminoacil-tRNA ao local A do ribossoma



Só o EF-Tu(GTP) consegue ligar-se a um tRNA-aa

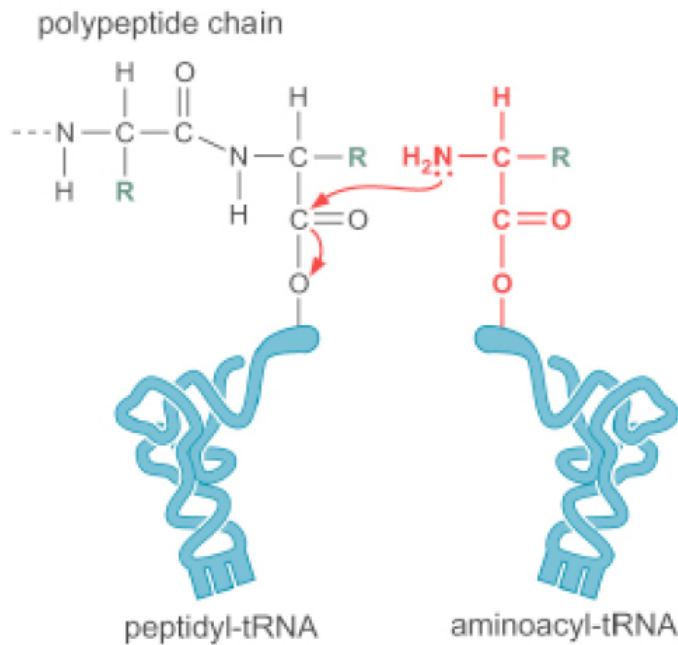
Impede a entrada prematura do tRNA carregado no local ativo da peptidil-transferase

O emparelhamento codão-anticodão é verificado

GTPase é ativada

EF-Tu(GDP) é libertado

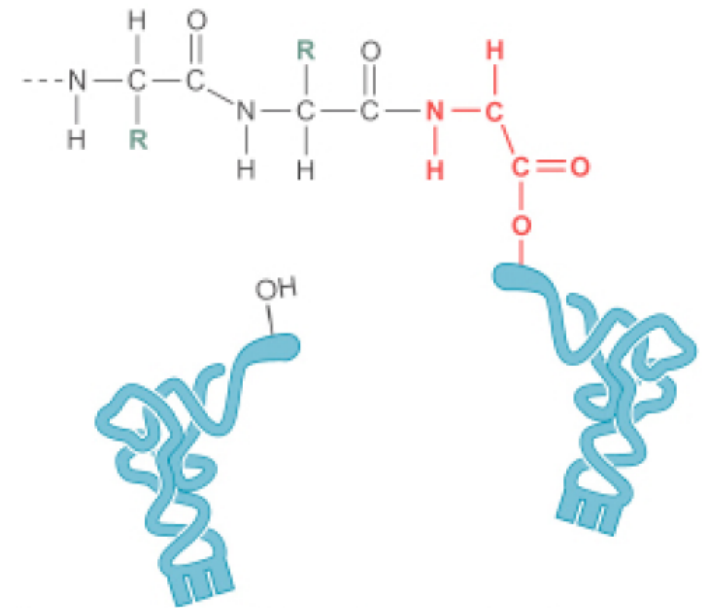
Formação da ligação peptídica

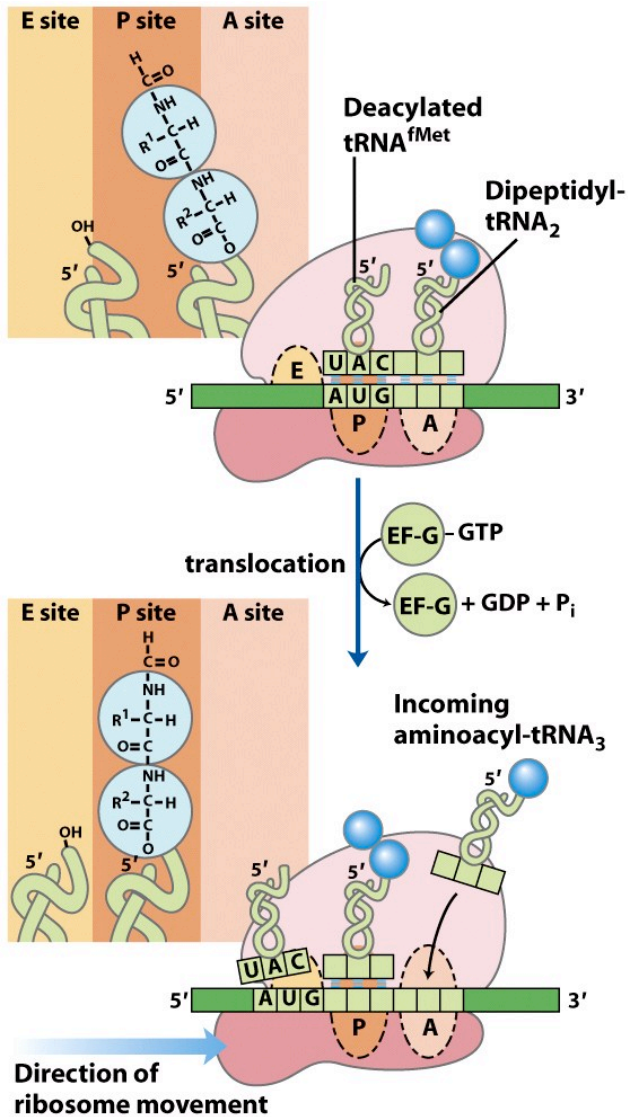


Transpeptidação Peptidil transferase

Síntese na direção N → C

Peptidil transferase
(atividade no rRNA 23S):
Ribozima





O tRNA do local P deve deslocar-se para o local E

O peptidil-tRNA do local A deve deslocar-se para o local P

O mRNA deve mover-se ao longo de 3 nt para expor o próximo codão

Direction of ribosome movement

Figure 27-30a

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Terminação

Acontece quando se chega a um codão STOP e não há nenhum aa para ser incorporado; o polipéptido formado é libertado do ribossoma

Fatores de terminação (releasing factors –RF)

Procariotas

RF1

RF2

RF3 (GTP)

Eucariotas

eRF

eRF3

Fatores de terminação

Classe I: reconhecem os codões stop e desencadeiam a hidrólise da cadeia peptídica do tRNA

RF1 – UAG e UAA

RF2 – UGA e UAA

eRF – todos os 3 codões stop

Classe II: estimulam a dissociação dos fatores classe I

RF3 e eRF3 – regulados por GTP

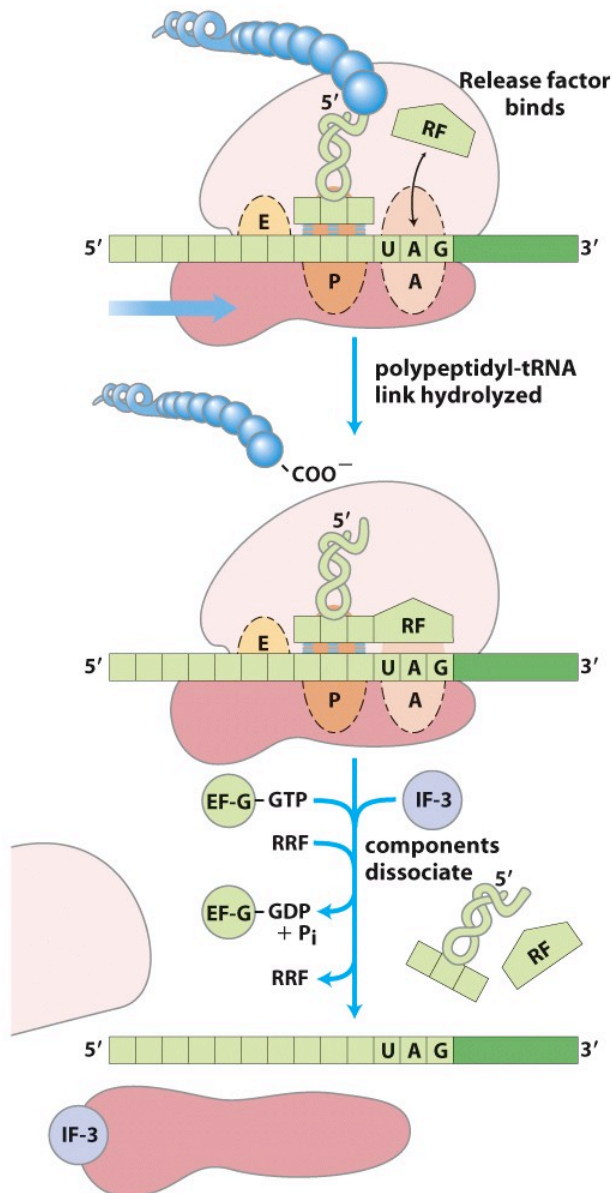


Figure 27-31

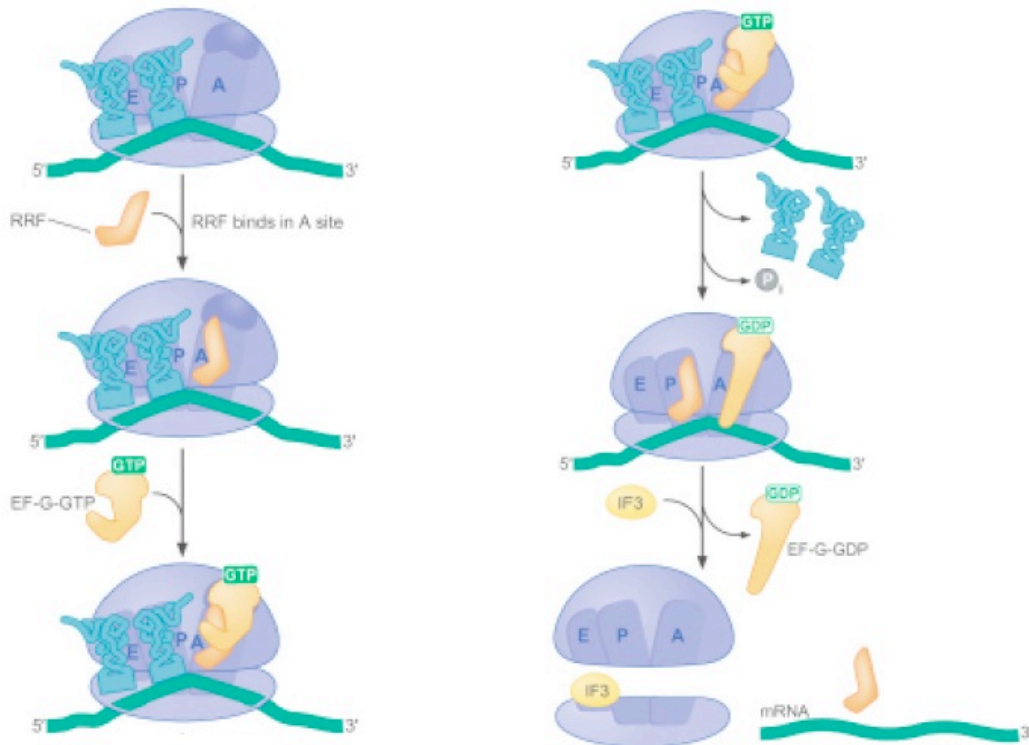
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

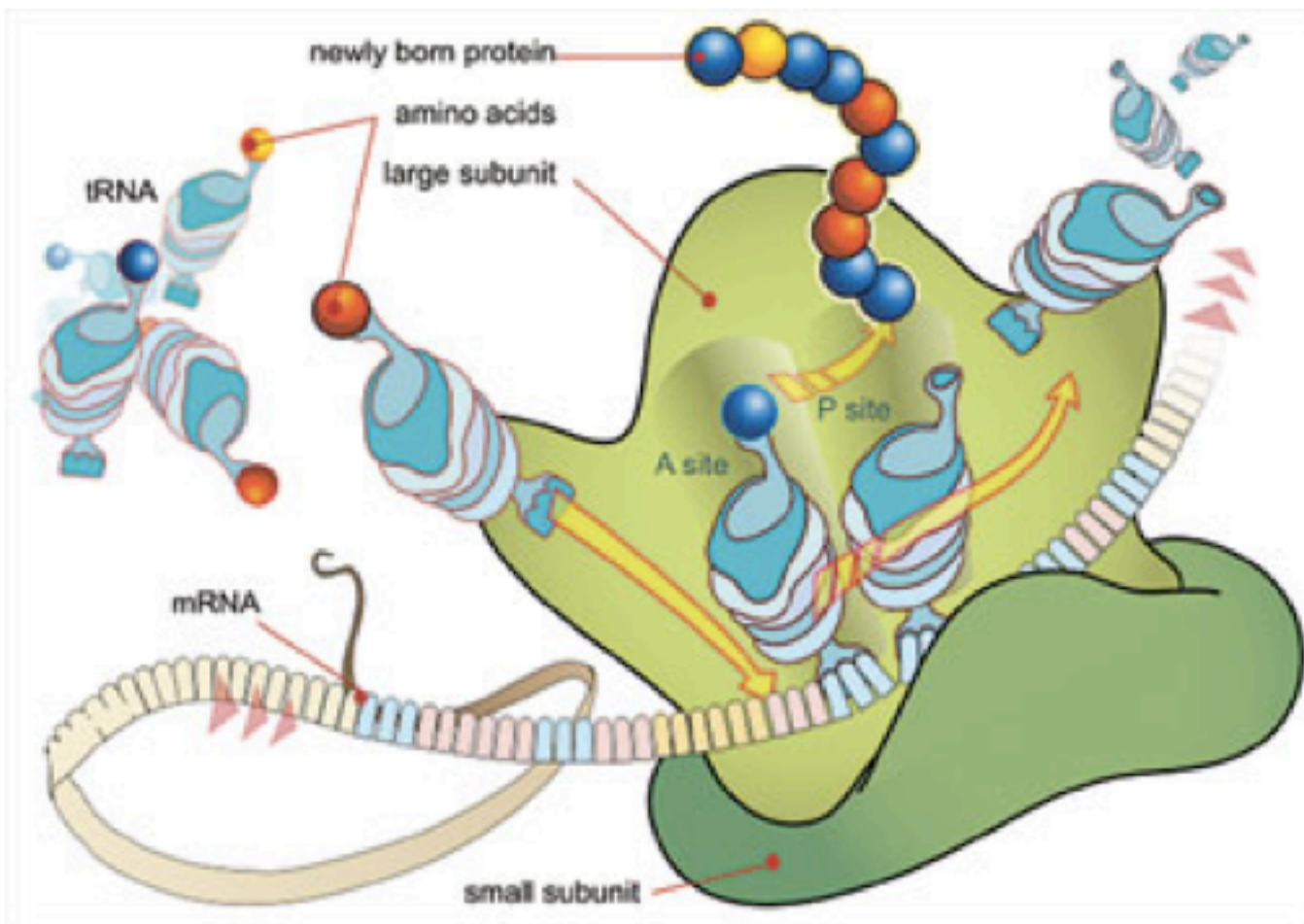
“Desmontagem” (disassembly)

Acontece quando um fator especial se liga ao ribossoma e liberta o mRNA e o tRNA que ainda estão ligados.

O ribossoma pode ser reciclado para novo processo de síntese proteica



Em procarionotas, o fator é o RRF (ribosome recycling factor)



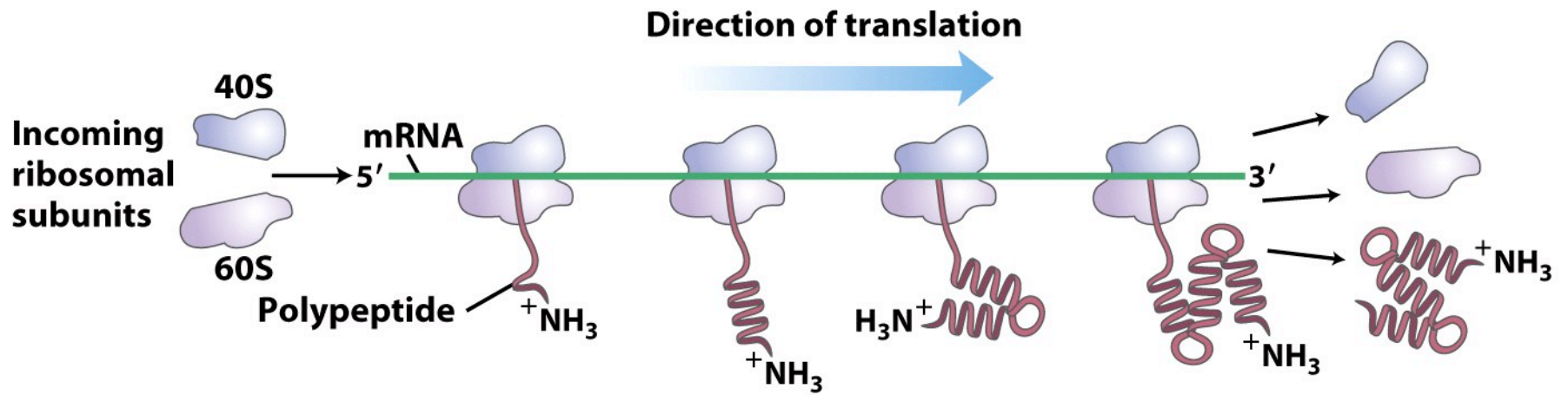


Figure 27-32a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

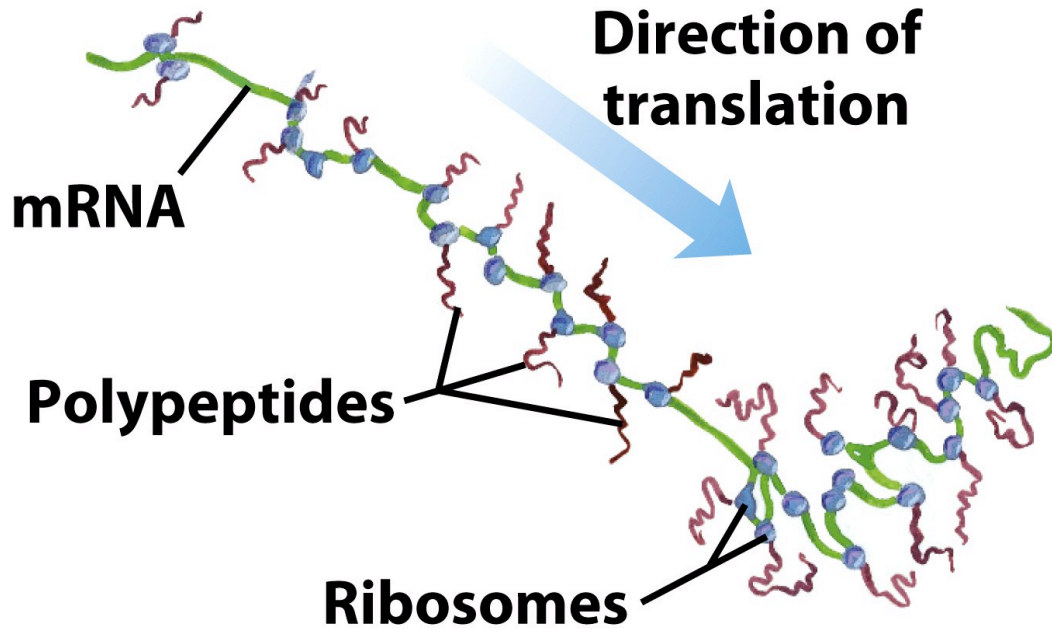
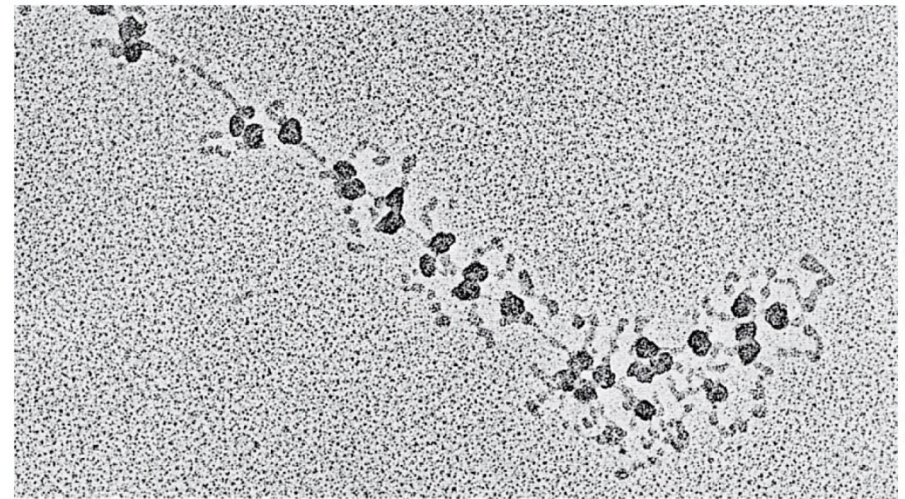


Figure 27-32b part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



0.25 μm

Figure 27-32b part 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

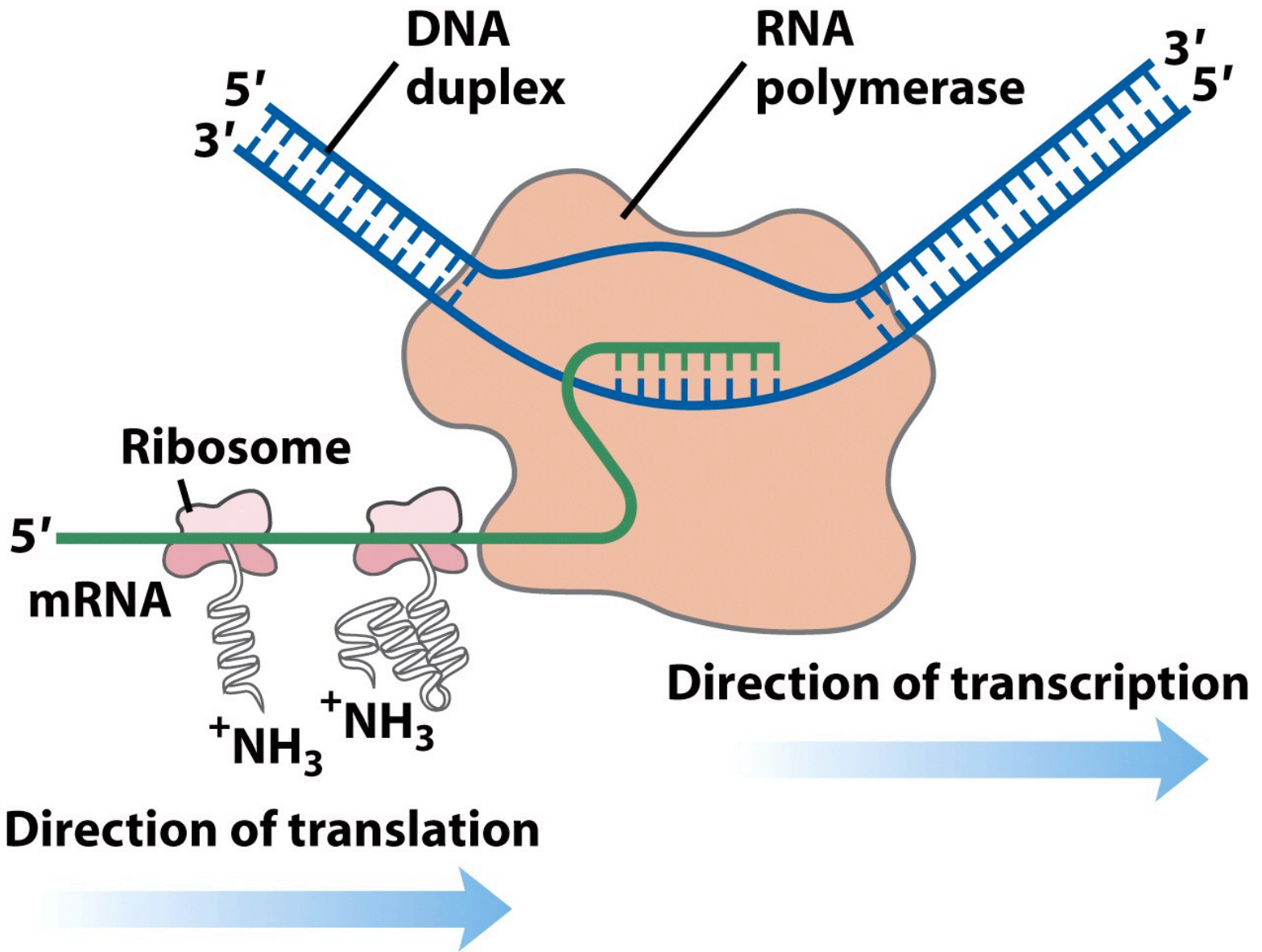
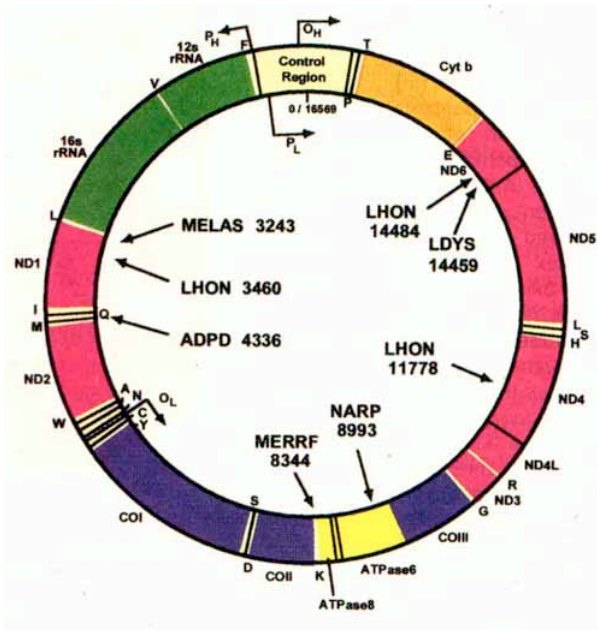


Figure 27-33
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Síntese proteica nas mitocôndrias

- ✓ Ribossomas semelhantes aos procariotas
- ✓ Usa fMet-tRNA na iniciação
- ✓ Tem um código genético com algumas particularidades



<http://course1.winona.edu>

Inibidores da síntese proteica - exemplos

Antibiótico	Efeito
Tetraciclina	Bloqueia o local A do ribossoma
Aminoglicósidos Estreptomicina Gentamicina Canamicina	Impedem a transição do complexo de iniciação para a fase de alongação e causam erros de leitura dos codões
Cloranfenicol	Bloqueia a reação da peptidiltransferase
Eritromicina	Bloqueia a reação de translocação nos ribossomas
Rifamicina	Liga à RNA polimerase e evita a síntese de RNA

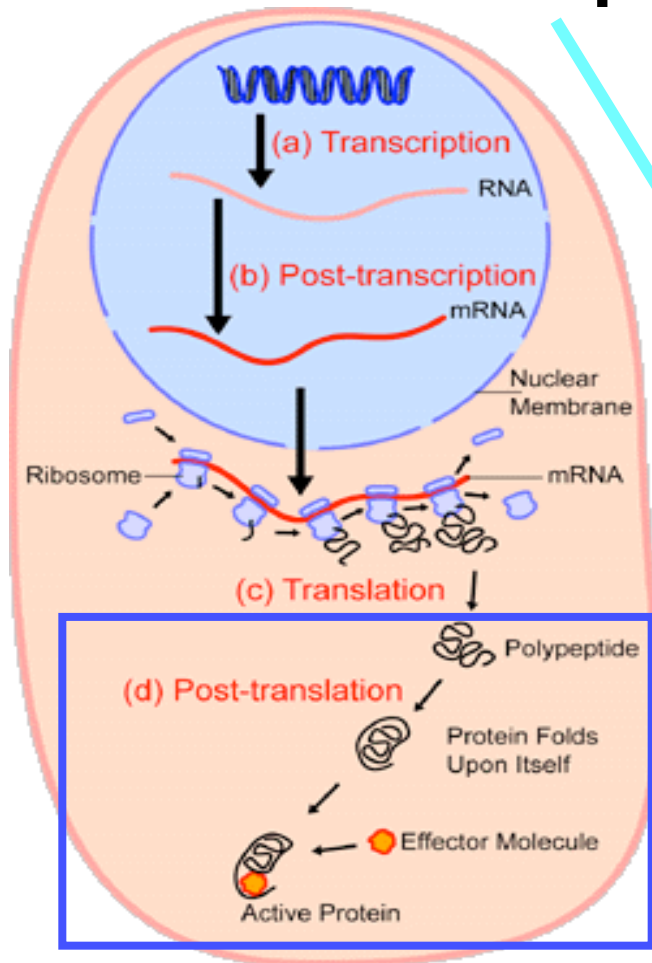
Antibiótico	Efeito
Cicloheximida	Bloqueia a reação de translocação nos ribossomas
Anisomicina	Bloqueia a reação da peptidiltransferase
a-Amanitina	Bloqueia a síntese de RNA (liga-se à RNA polimerase II)
Toxina da difteria	Inativa o eEF2 impedindo a tradução
Rícino	Remove uma adenina de um dos rRNAs e inativa a subunidade maior

Antibiótico	Efeito
Puromicina	Liga à cadeia polipeptídica nascente e causa a sua libertação prematura
Actinomicina D	Liga ao DNA e bloqueia o movimento da RNA polimerase

Modificações peptídicas pós tradução

Modificações pós tradução

Cadeia polipeptídica recém-formada



Enrolamento

Modificação covalente

Remoção de sequências peptídicas

Ligação a outras subunidades

Ligação a cofatores

Proteína funcional (3D)

Enrolamento

- ✓ Localização de resíduos hidrofóbicos no interior
- ✓ Formação de interações não covalentes estabilizantes
- ✓ Obtenção de conformação de menor energia
- ✓ Participação de “**chaperones**” moleculares que tornam o processo mais eficiente
- ✓ Ocorre predominantemente no RE

Chaperones moleculares

Classes principais:

hsp 70 (heat shock proteins)

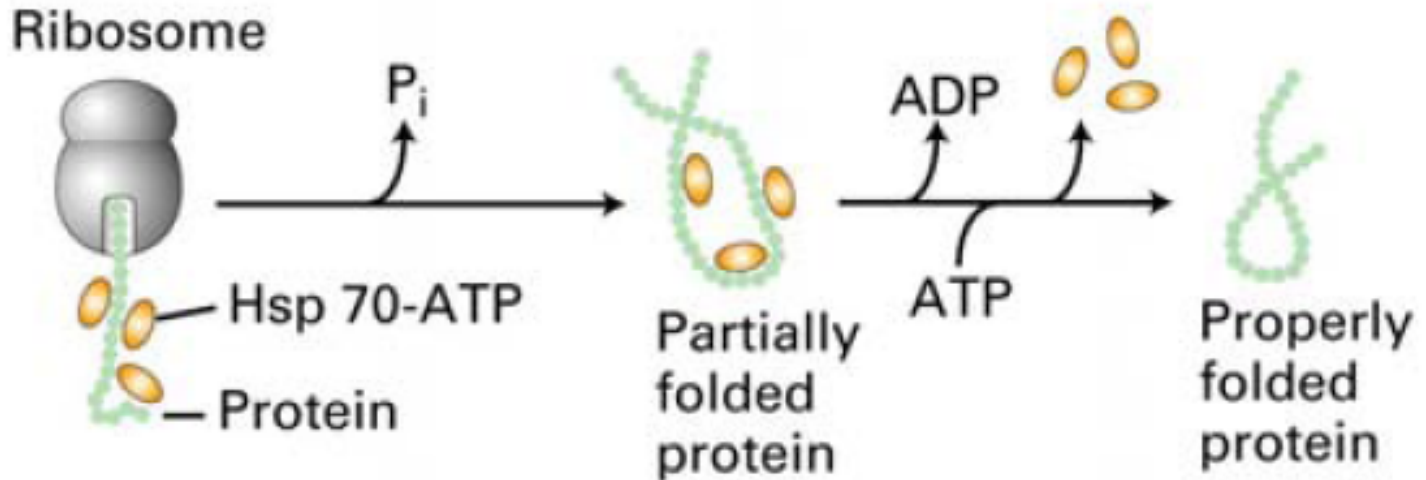
hsp 60 (chaperoninas, ou, em bactérias, **GroEL**)

- ✓ Têm afinidade por aa hidrofóbicos
- ✓ Hidrolisam ATP
- ✓ Repetem ciclos de hidrólise de ATP seguida de libertação temporária da proteína a enrolar
- ✓ Impedem a agregação de proteínas mal enroladas
- ✓ ^A sua transcrição é regulada pela temperatura

hsp 70

Actuam no início do processo

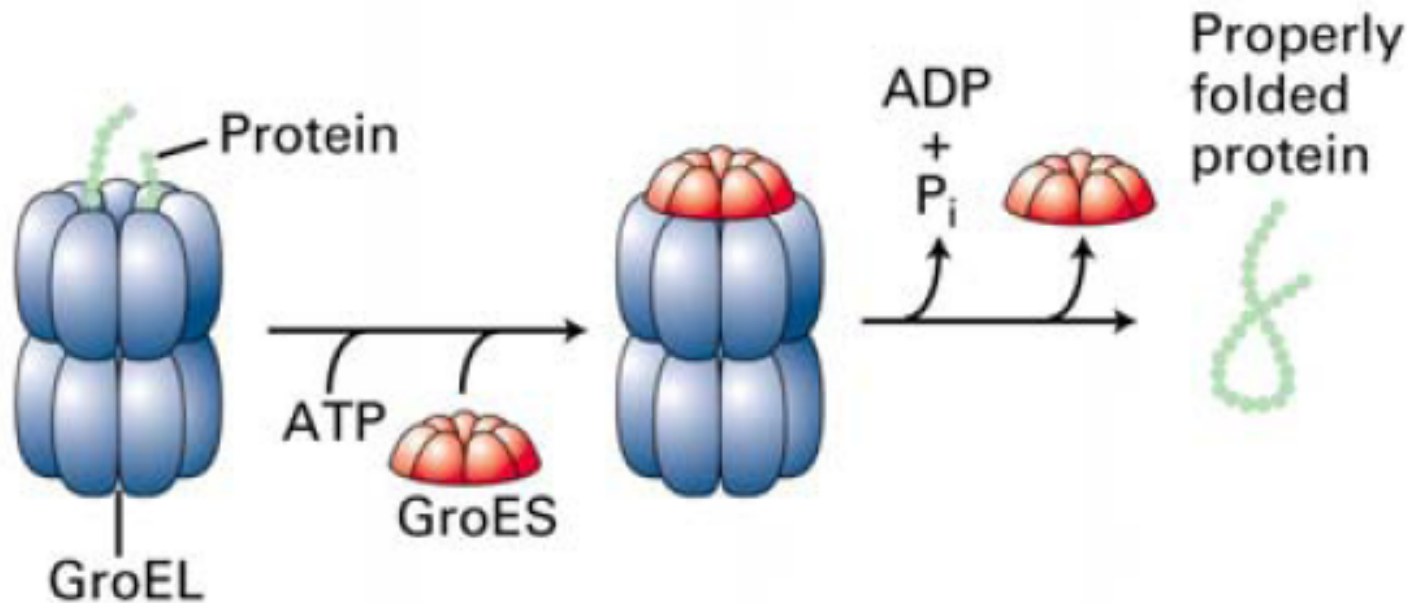
Ligam-se a cadeias de 7 aa hidrofóbicos, antes da proteína ser libertada do ribossoma



hsp 60

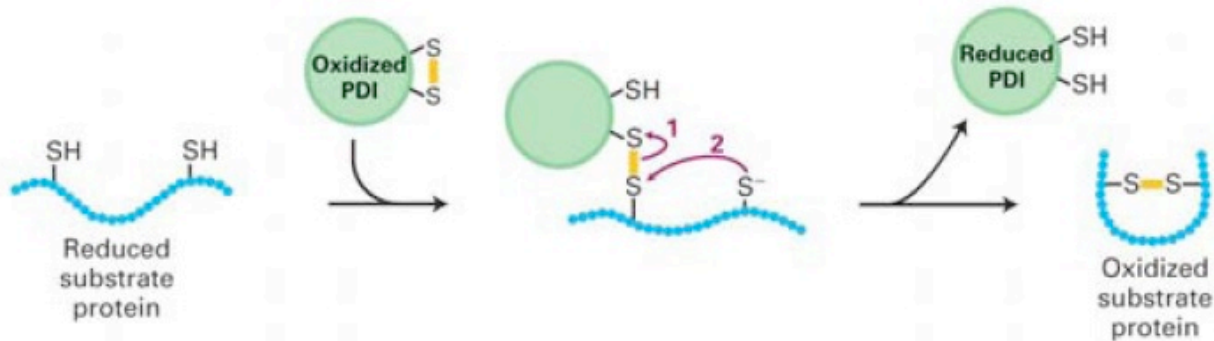
Atuam mais tarde

Formam uma “câmara” isolada onde as proteínas tentam corrigir erros de enrolamento

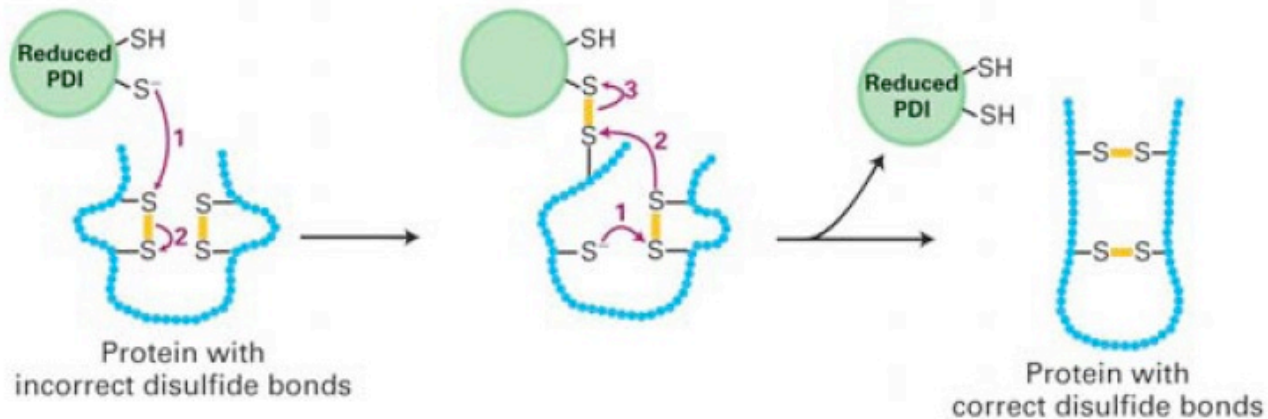


Formação/correção de pontes dissulfeto (no retículo endoplasmático)

(a) Formation of a disulfide bond

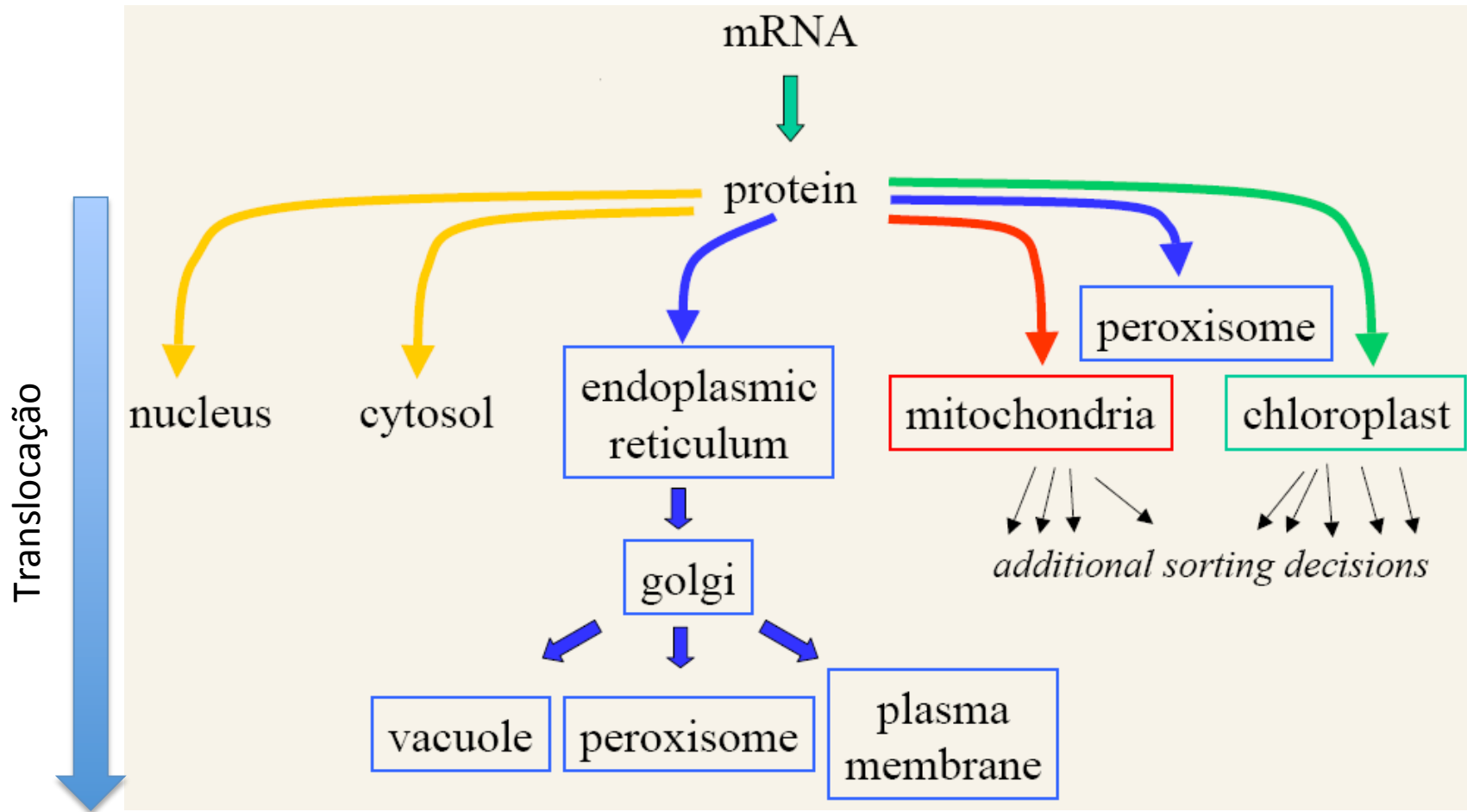


(b) Rearrangement of disulfide bonds



PDI – protein disulfide isomerase, dissulfeto isomerase, proteína dissulfeto isomerase

Tráfego (direcionamento) das proteínas



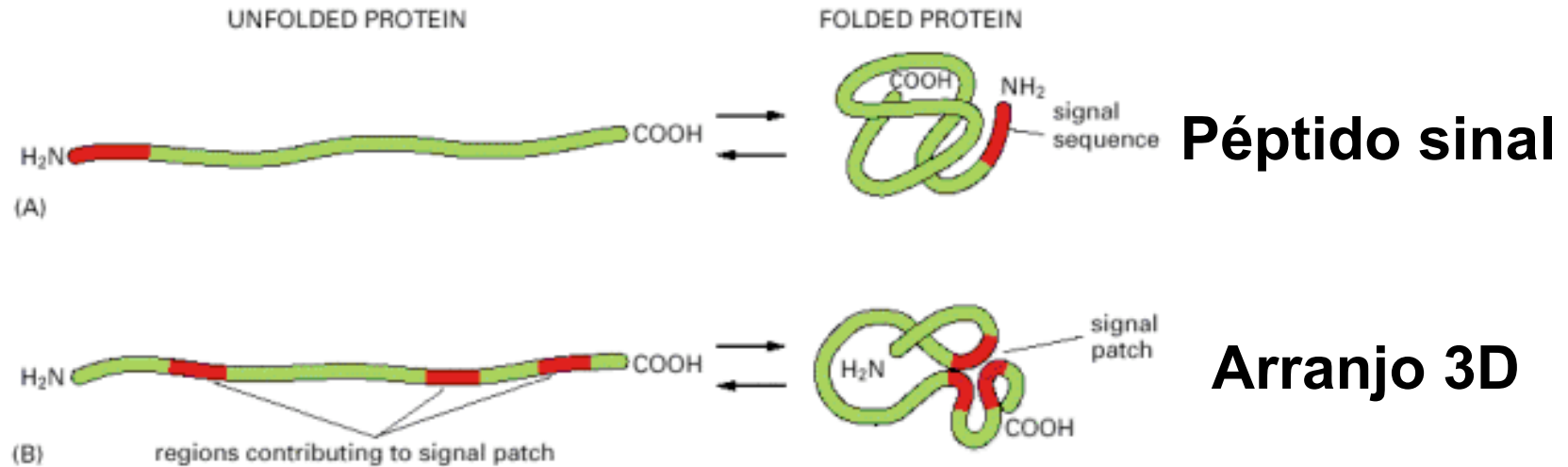
Direcionamento e translocação das proteínas

Todas as proteínas não citoplasmáticas têm que ser translocadas

O que é necessário?

- 1. Um sinal – intrínseco à proteína**
- 2. Um partícula de reconhecimento do sinal (SRP)**
reconhece o sinal e dirige-o à membrana correta
- 3. Um recetor na membrana a que se destina a proteína**
- 4. Um complexo de translocação**
- 5. Energia**

Sinais de reconhecimento



Péptido sinal – sequência contínua de aa, removida por peptidases no destino final da proteína

Arranjo 3D – sinal que resulta do enrolamento; não é removido

Sinal de reconhecimento = péptido sinal = Sequência sinal = Sequência “líder” (leader)

Proteína nascente / Precursora/ Pré-proteína



Local de clivagem para peptidase específica

← 13 – 36 resíduos → cleavage site

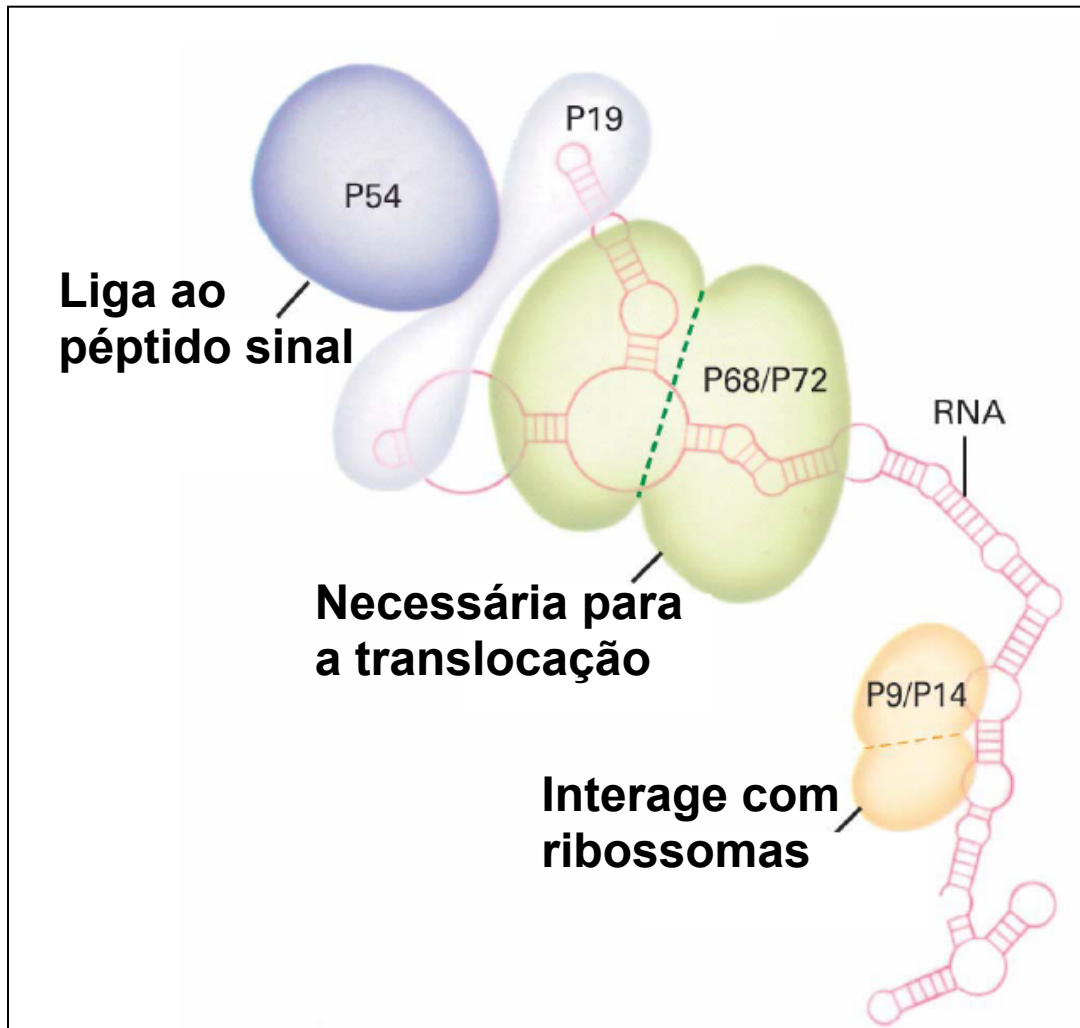
Human influenza virus A	Met	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Val	Ala	Gly	Asp	Gln	--											
Human preproinsulin	Met	Ala	Leu	Trp	Met	Arg	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	--		
Bovine growth hormone	Met	Met	Ala	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Pro	Trp	Thr	Gln	Val	Val	Gly	Ala	Phe	--
Bee promellitin	Met	Lys	Phe	Leu	Val	Asn	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Met	Val	Val	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Ala	Pro	--					
Drosophila glue protein	Met	Lys	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Val	Ile	Ala	Cys	Met	Leu	Ile	Gly	Phe	Ala	Asp	Pro	Ala	Ser	Gly	Cys	Lys	--				

Resíduos hidrofóbicos

Resíduos carregados positivamente

Resíduos polares

Partícula de reconhecimento de sinal (SRP)

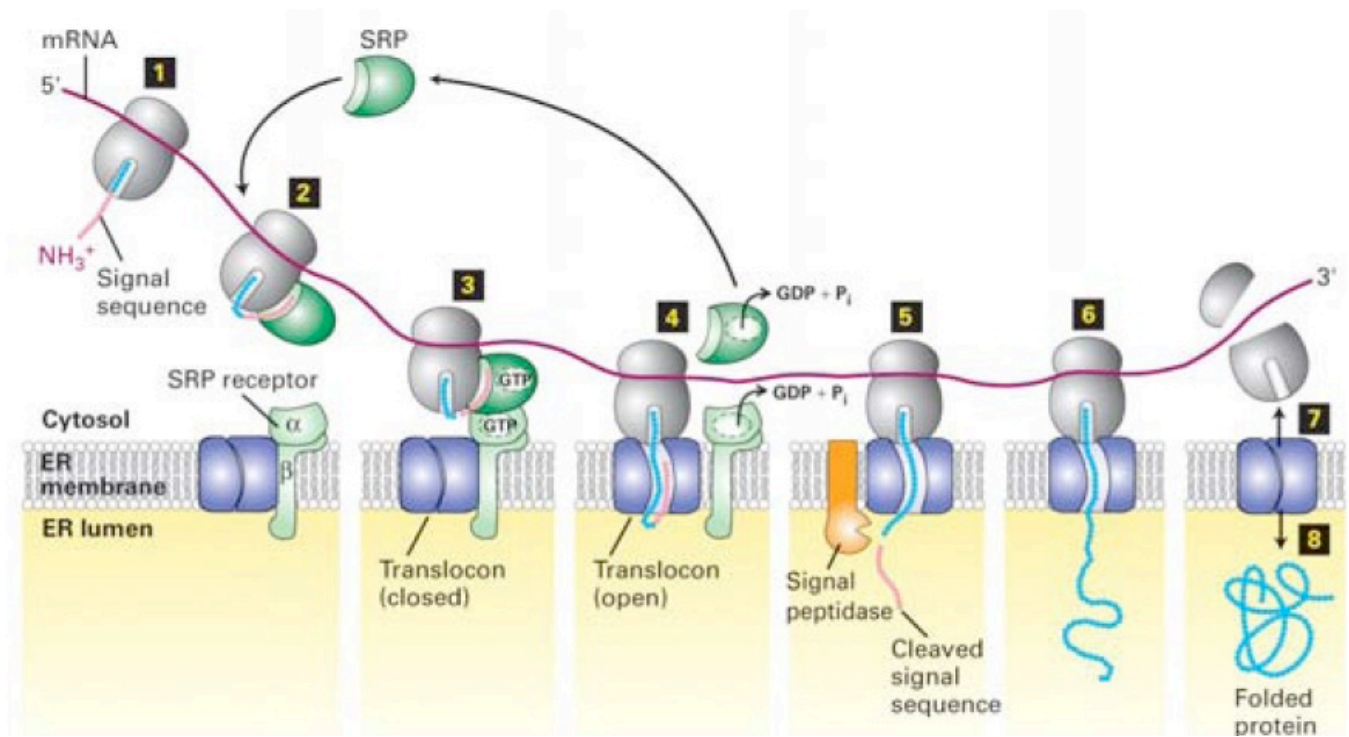


Seis subunidades

Todas (exceto a P54) ligam a uma molécula de RNA com 300 nt)

P54 liga ao péptido sinal e tem um sulco hidrofóbico de ligação

Translocação através da membrana do RE (proteínas extracelulares)



Proteína

Péptido sinal

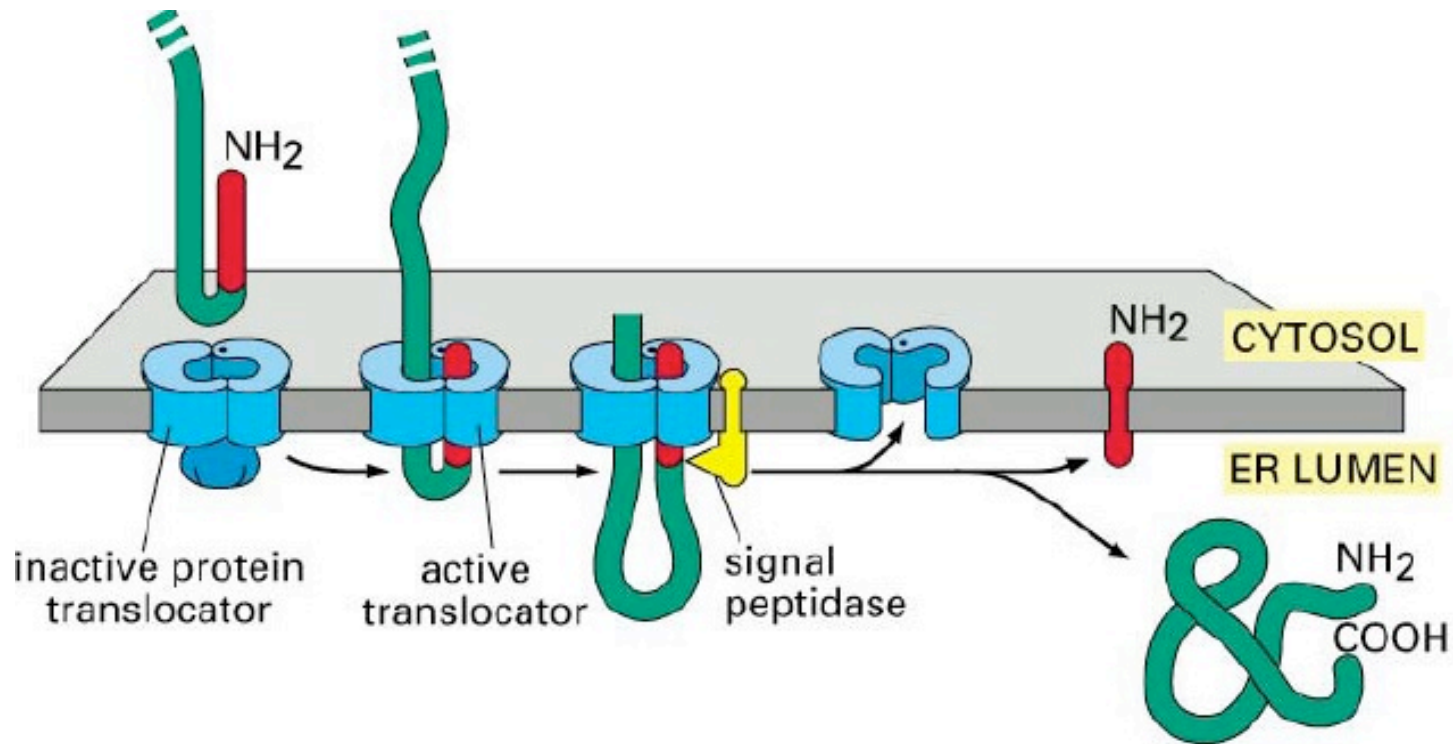
Partícula de reconhecimento do sinal (SRP)

Recetor de SRP

Complexo de translocação (“translocão”)

Peptidase do sinal

Translocção



As diferentes estruturas das seqüências determinam qual o recetor de translocação que se liga e o local para onde vai a proteína

Processamento das proteínas

Modificações covalentes

- **Metilação** (adição de $-CH_3$)
- **Fosforilação** (adição de fosfato)
- **Hidroxilação** (adição de $-OH$)
- **Glicosilação** (adição de hidratos de carbono)
- **Adição de lípidos** (adição de cadeias carbonadas)

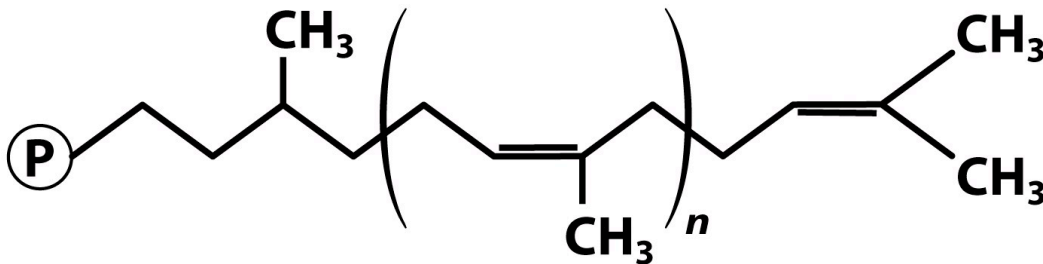
Glicosilação

(no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi)

- ✓ Aumenta a solubilidade
- ✓ Permite o reconhecimento molecular por outras moléculas

Ligação tipo N – adição à Asparagina (mais vulgar)

Ligação tipo O – adição à Serina ou Treonina



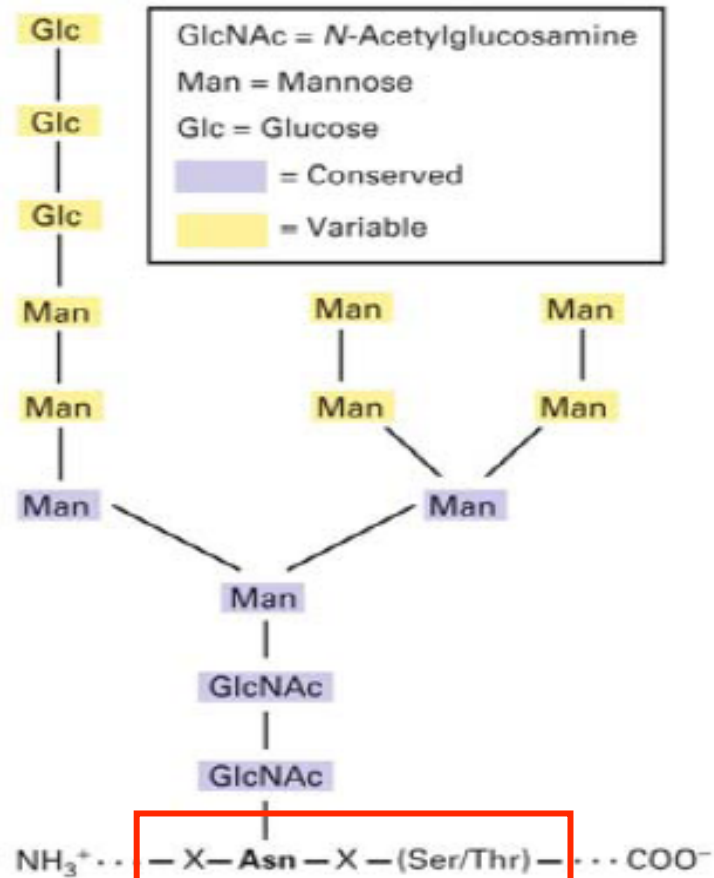
Dolichol phosphate
($n = 9-22$)



Transportador de complexos
de oses

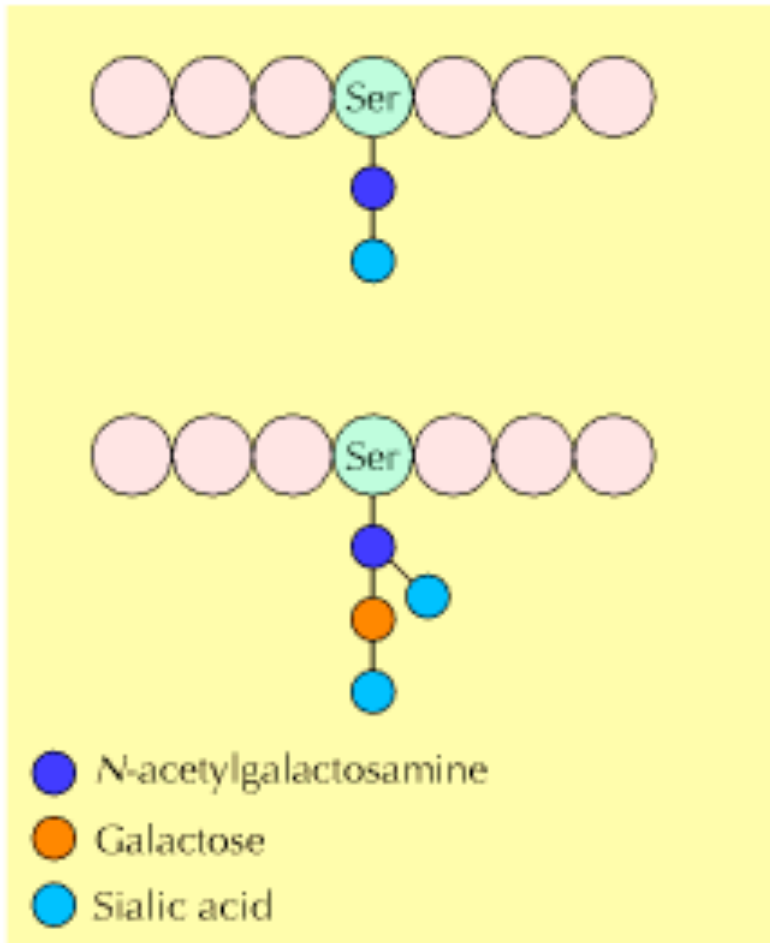
A adição dos hidratos de
carbono inicia-se no RER

O grupo de açúcares mais próximo da proteína é conservado mas os mais afastados podem variar



Sinal topogénico de glicosilação (Asn, Sr/Thr)

O-Glicosilação



Também ocorre no complexo de Golgi

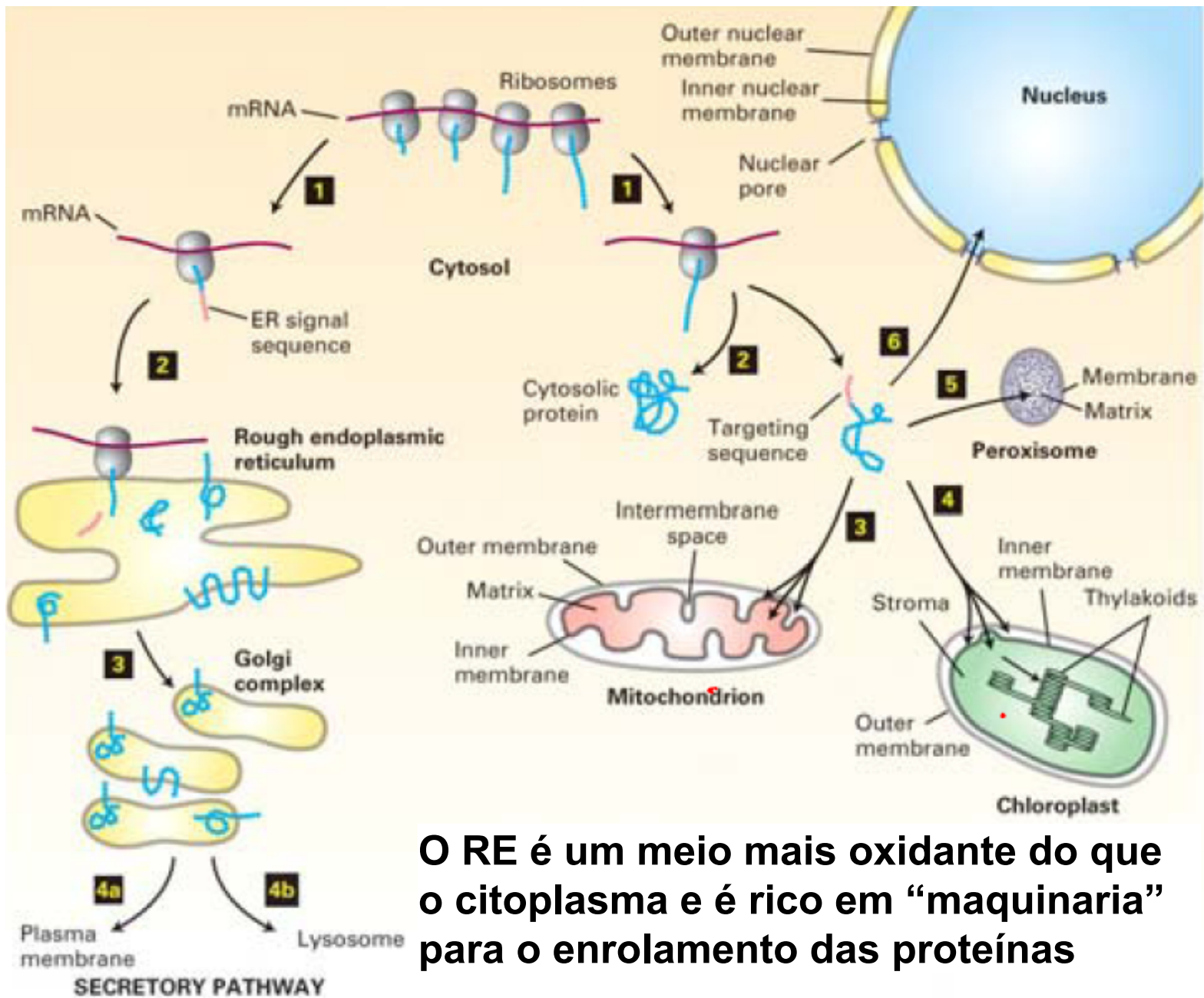
Os açúcares são adicionados um de cada vez aos resíduos de serina (ou treonina)

Os oligossacáridos são normalmente formados por poucos resíduos de açúcares

Clivagem proteolítica

- ✓ Cria diversidade – remoção da metionina inicial evita que todas as proteínas comecem com Met
- ✓ Ativação – por exemplo em enzimas, que existem na forma de pró-proteínas ou zimogénios
- ✓ Direcionamento da proteína (organelos)

As enzimas proteolíticas atuam principalmente em pares de aa básicos. Ex.: Arg-Arg



O RE é um meio mais oxidante do que o citoplasma e é rico em “maquinaria” para o enrolamento das proteínas

Controlo da qualidade

Proteína com aminoácidos hidrofóbicos à superfície não é normal:

- ✓ **enrolamento incorreto**
- ✓ **“acidente” que provocou desenrolamento**
- ✓ **desligada de restantes subunidades de algum complexo proteico**

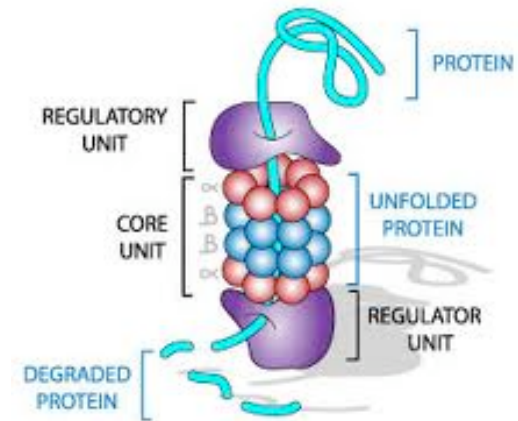


Inútil e potencialmente perigosa

Se não for corrigido o erro (pelos chaperones) a proteína deve ser DESTRUÍDA

Proteossoma

- ✓ **Complexo proteico com atividade proteolítica**
- ✓ **Atua em cerca de 1/3 dos polipéptidos recém-formados**
- ✓ **Dependente de ATP**
- ✓ **Constitui cerca de 1% da proteína celular**
- ✓ **Atua em proteínas marcadas para destruição (UBIQUITINA)**

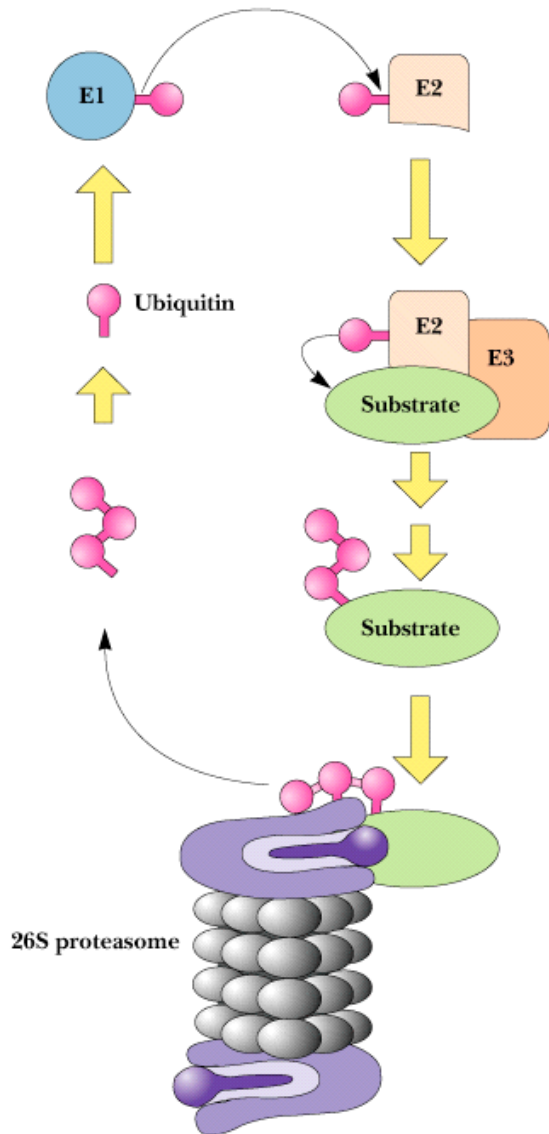


Adição de ubiquitina (eucariotas)

E1 = enzima ativadora da ubiquitina
E2 = enzima conjugadora da ubiquitina
E3 = ubiquitina ligase

O complexo E2-E3 liga-se à proteína alvo, transferindo as moléculas de ubiquitina

A enzima E3 reconhece os diferentes sinais de destruição que poderão existir na proteína

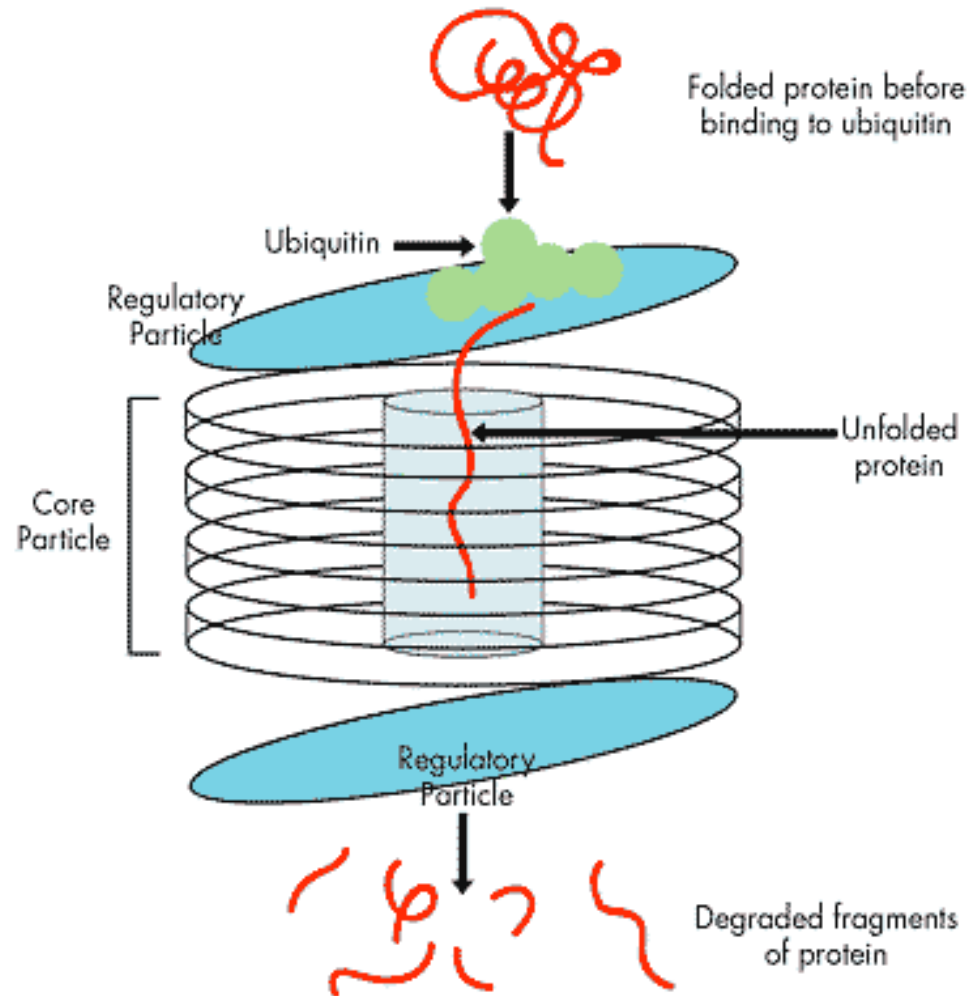


Criação de sinais de destruição

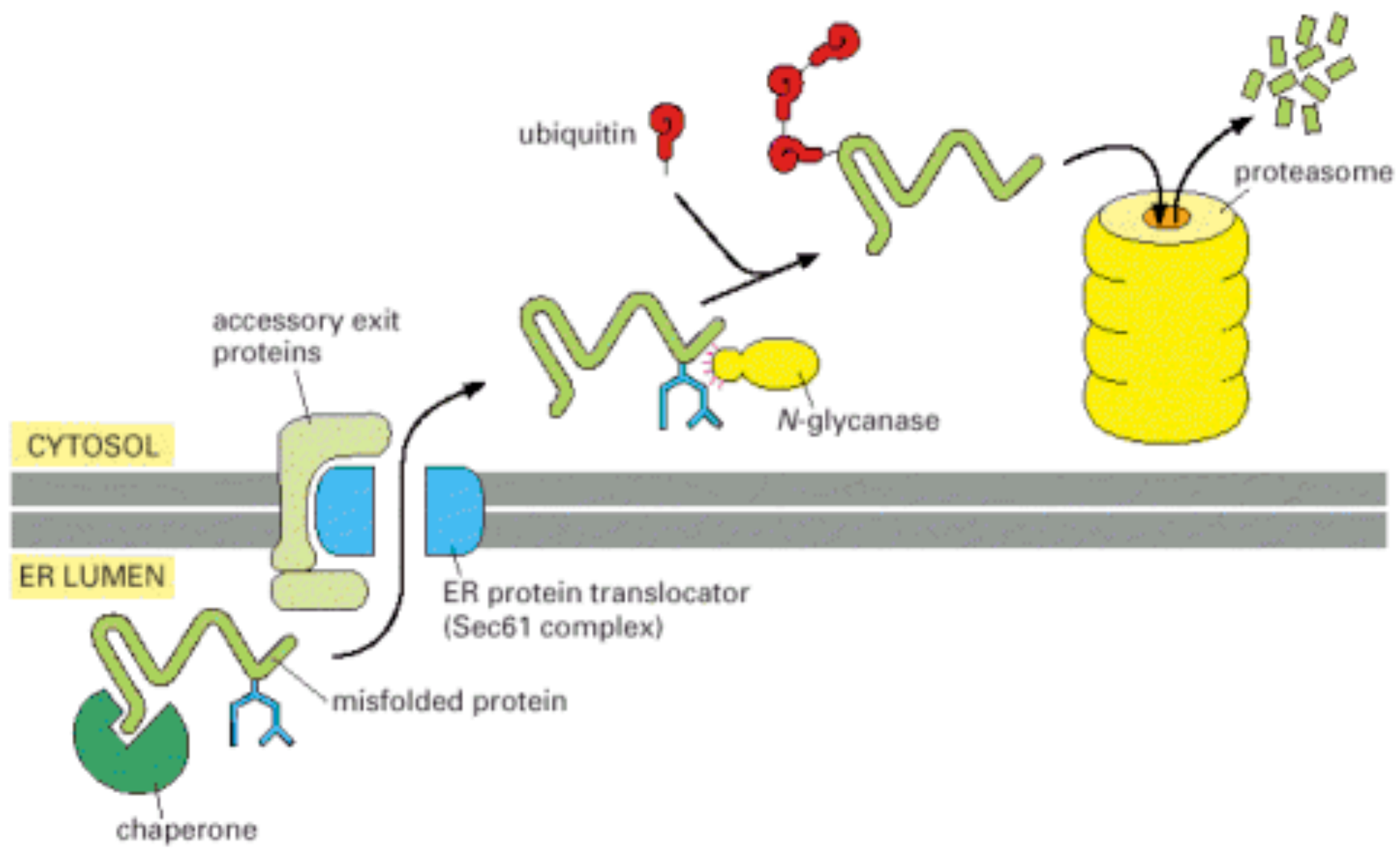
- ✓ **Alterações conformacionais (ligandos)**
- ✓ **Fosforilação**
- ✓ **Dissociação de 1 subunidade**
- ✓ **Clivagem de ligações peptídicas**

É criado um novo N-terminal na molécula reconhecido por enzimas E3 específicas

Ação do proteossoma



Ocorre no citoplasma



Consequências da agregação de proteínas

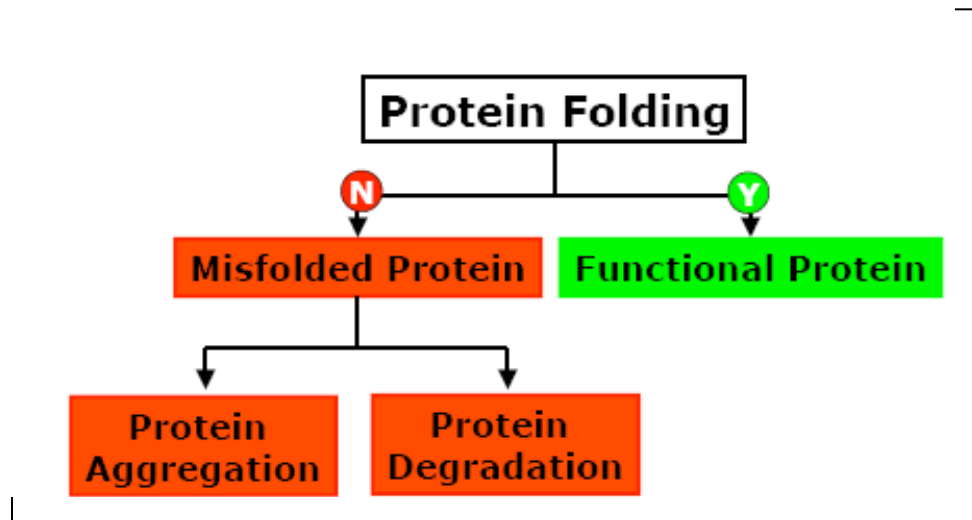
Proteínas mal enroladas tendem a agregar e precipitar causando danos nos tecidos



Desenvolvimento de doenças:

Perda de função das proteínas

Acumulação de proteínas mal enroladas



Consequências da agregação de proteínas

Exemplos

Doenças devidas à degradação de proteínas mal enroladas

Disease	Protein involved
Cystic fibrosis	CFTR
Retinitis Pigmentosa 3	Rhodopsin
α -1 antitrypsin deficiency	α -1 anti trypsin
Cancer	P53
Fabry Disease	α -galactosidase A
Gaucher's disease	β -glucocerebrosidase
Osteogenesis imperfecta	Type 1 procollagen pro a
Marfan syndrome	Fibrillin

Doenças devidas à acumulação de proteínas mal enroladas

Disease	Protein involved
Alzheimer's Disease	Amyloid β -peptide, Tau
Parkinson's Disease	α Synuclein
Creutzfeldt Jakob Disease	Prion protein
Type II Diabetes	Amylin
Primary Systemic Amyloidosis	Immunoglobulin light chains
Haemodialysis-related amyloidosis	β -2-Microglobulin