

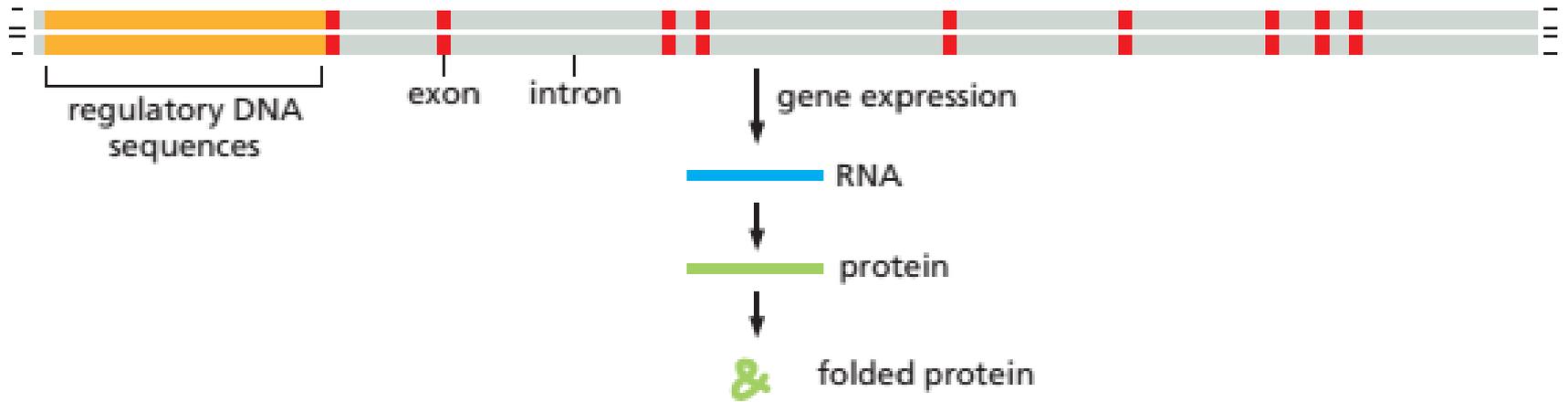
Síntese proteica e patogénese

Ana Ramos Coelho, Ph.D.

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, ESTeSL, Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01, 1990-096 Lisboa, Portugal, ana.ramos@estesl.ipl.pt
H&TRC - Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia

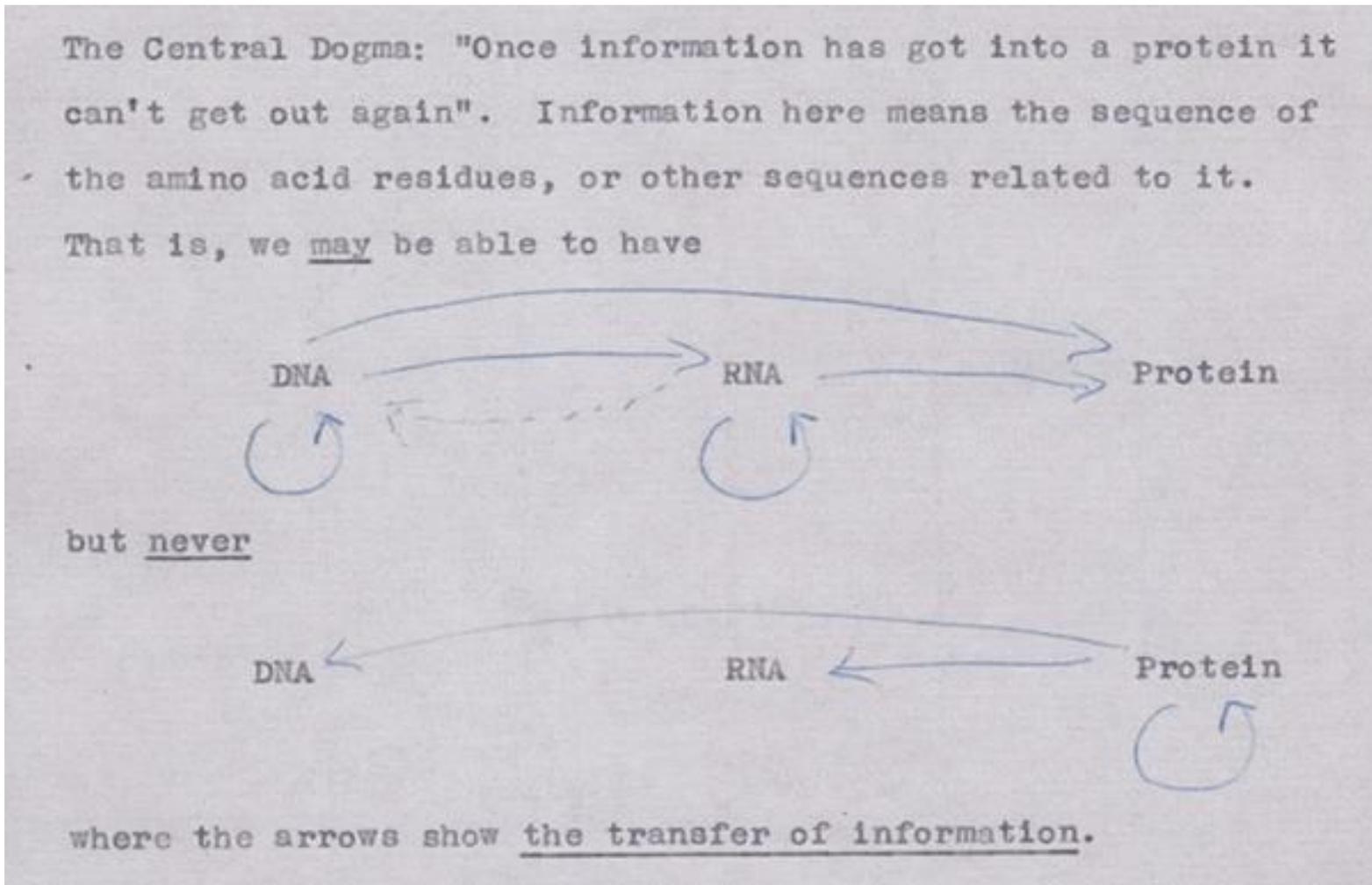
11 e 18 de maio de 2019

Gene



Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell*

Fig 1. Crick's first outline of the central dogma, from an unpublished note made in 1956.



Cobb M (2017) 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. PLOS Biology 15(9): e2003243.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>

<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003243>

ON PROTEIN SYNTHESIS

by

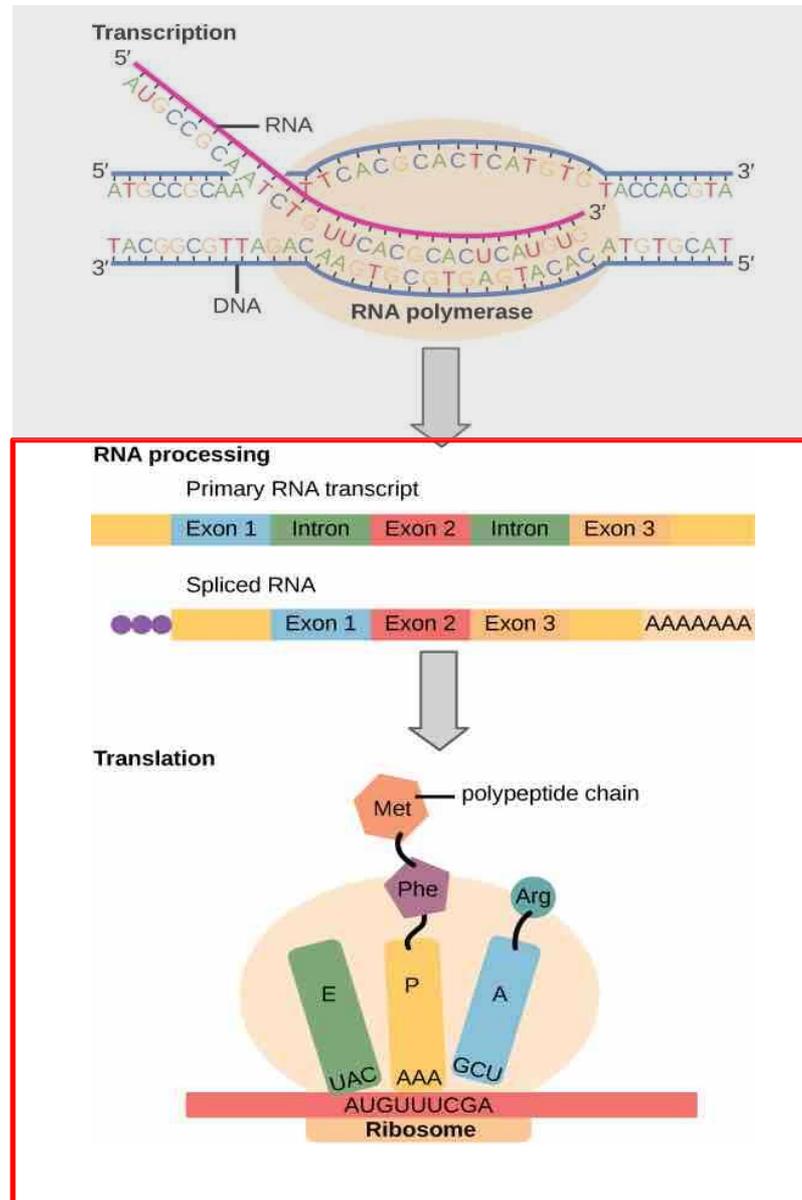
F.H.C. CRICK

*Framin Crick.
Oct '57*

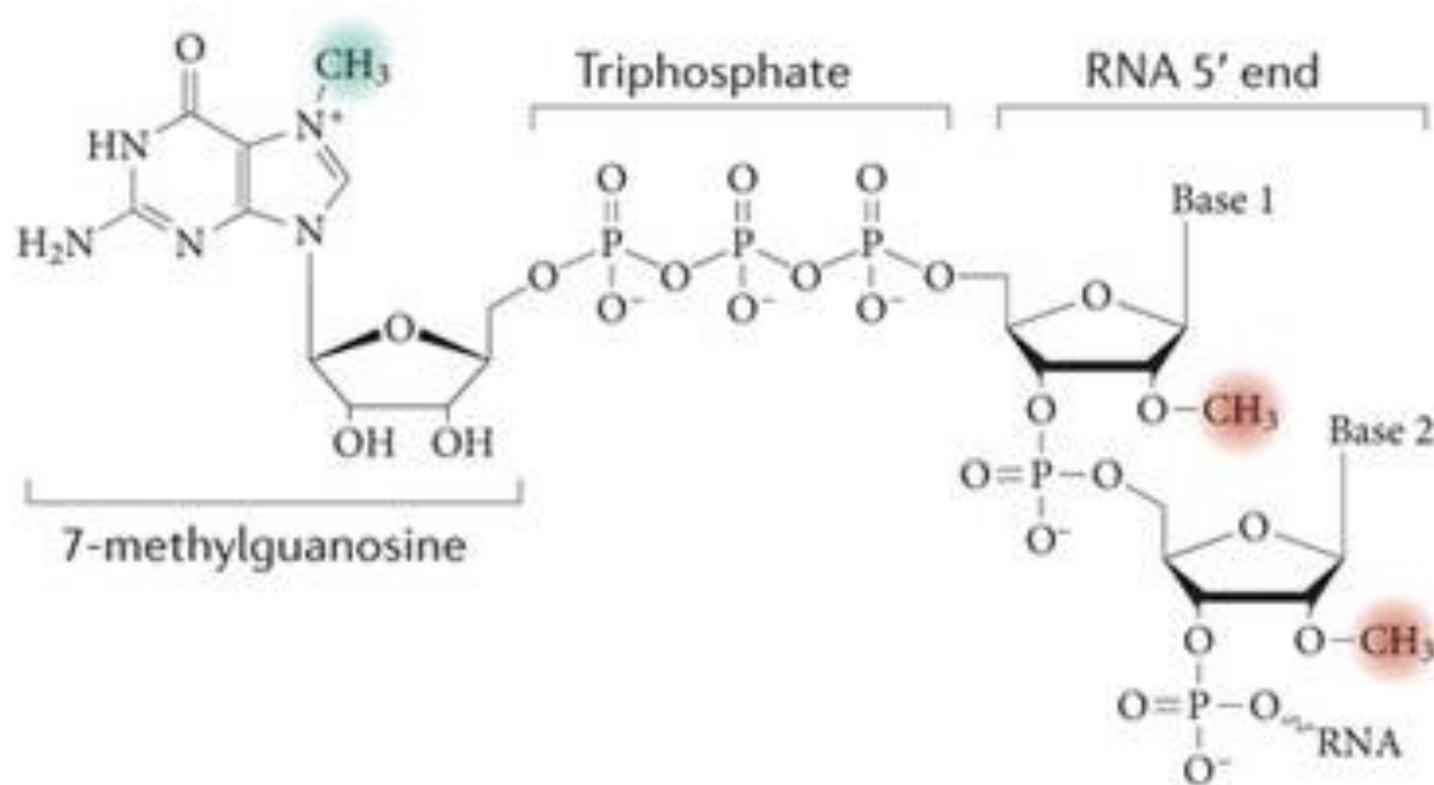
Medical Research Council Unit for the Study of the
Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish
Laboratory, Cambridge.

For an S.E.B. Symposium, London, September 1957.

Qual o dogma actualmente aceite?



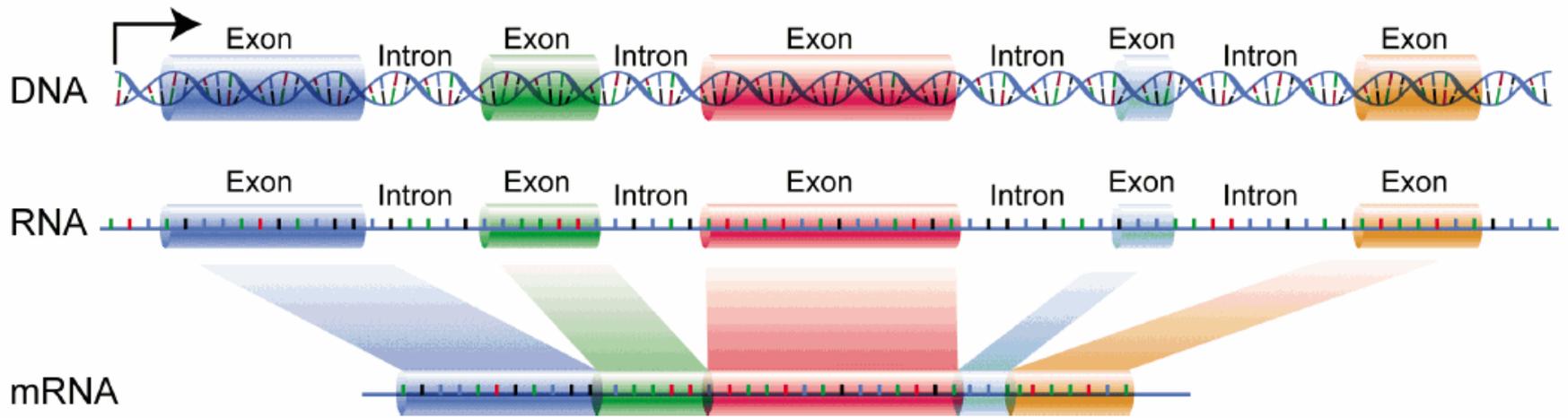
Cap 7-Metilguanossina



Decroly et al, 2012 Nature Reviews Microbiology

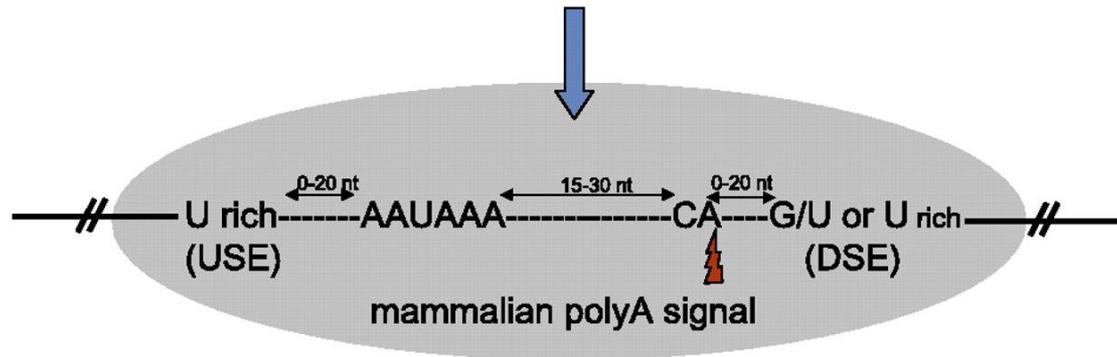
$m^7GpppNp$

Splicing



Adição cauda poly(A)

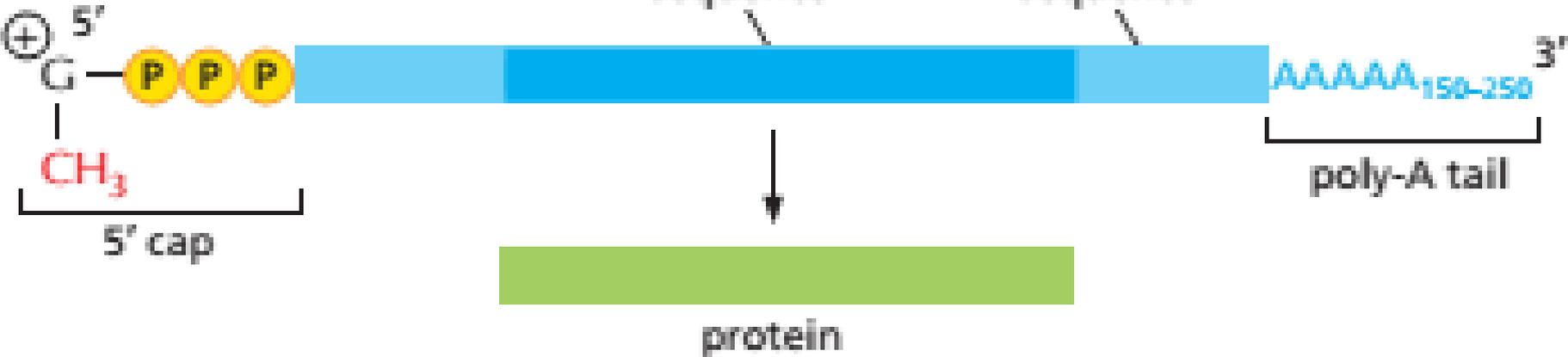
Cauda poly(A) a 3': conjunto de resíduos de A a pré-mRNA previamente clivado



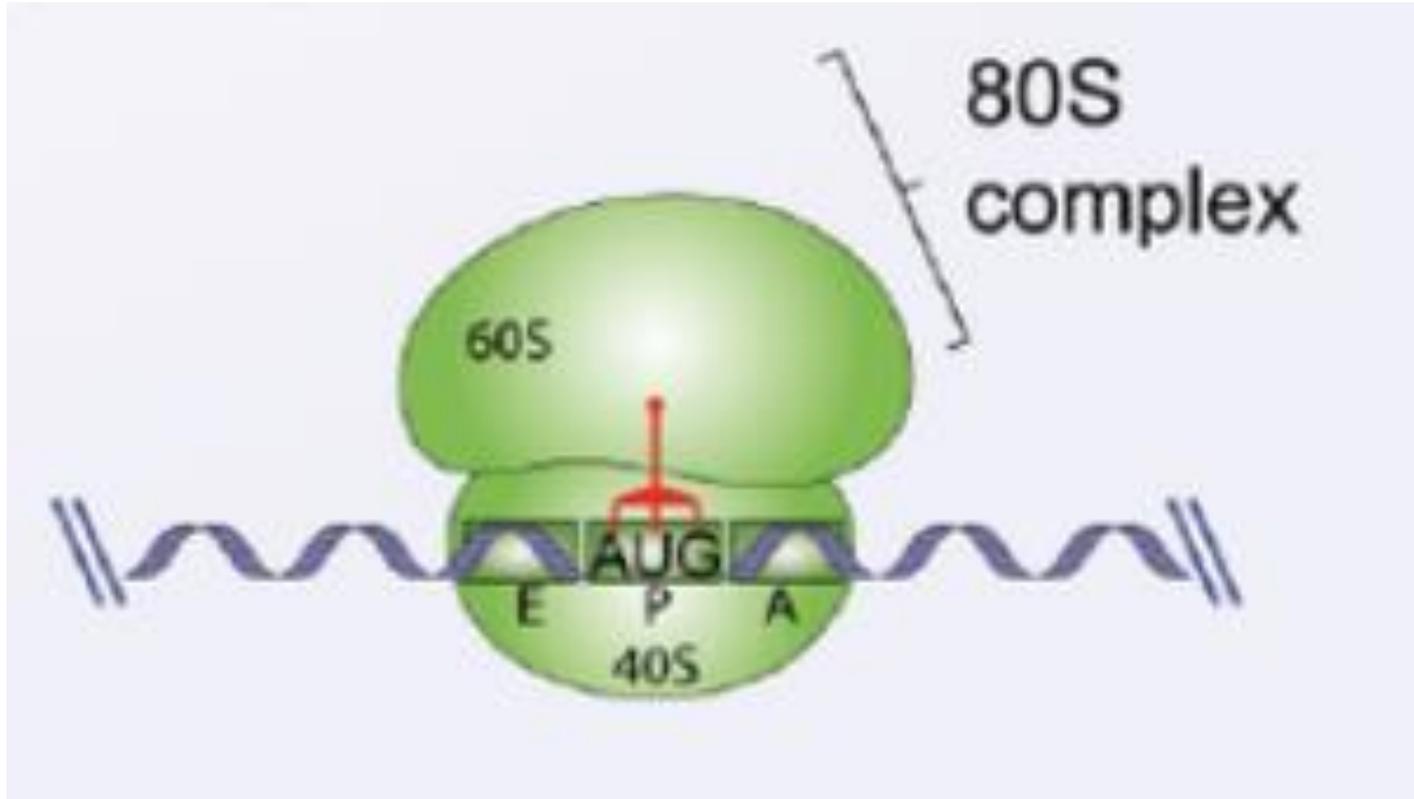
Nick J. Proudfoot *Genes Dev.* 2011;25:1770-1782

mRNA

eukaryotic mRNA

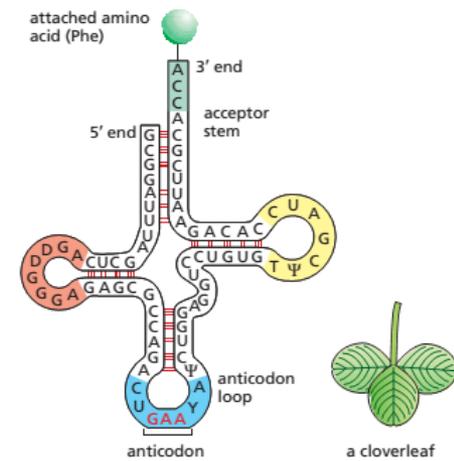


Tradução



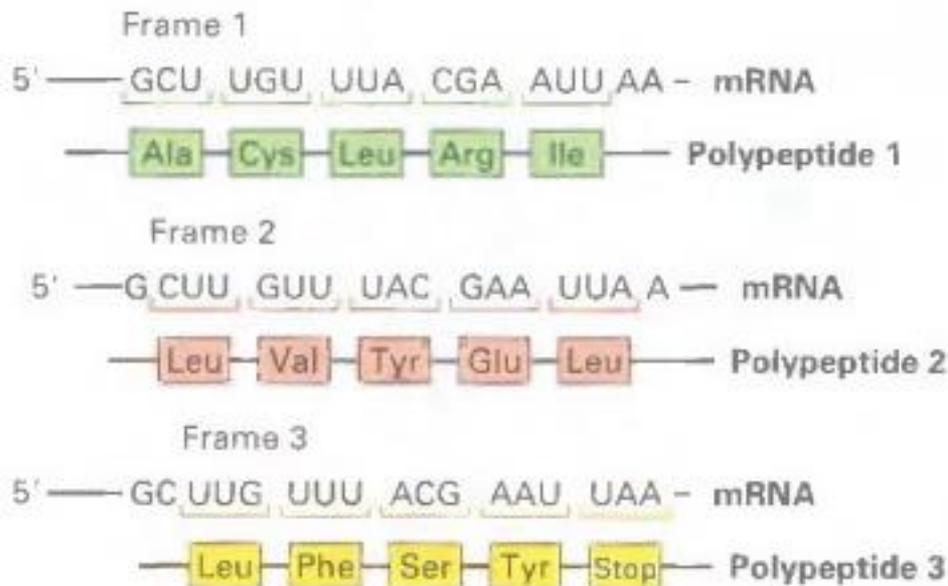
Tradução

- Ribossoma
- tRNA
- Factores de iniciação
- Factores de alongação
- Factores de terminação



Grelha de leitura

Sequência ininterrupta de codões desde um codão de iniciação ao codão stop (determina a sequência de aa)

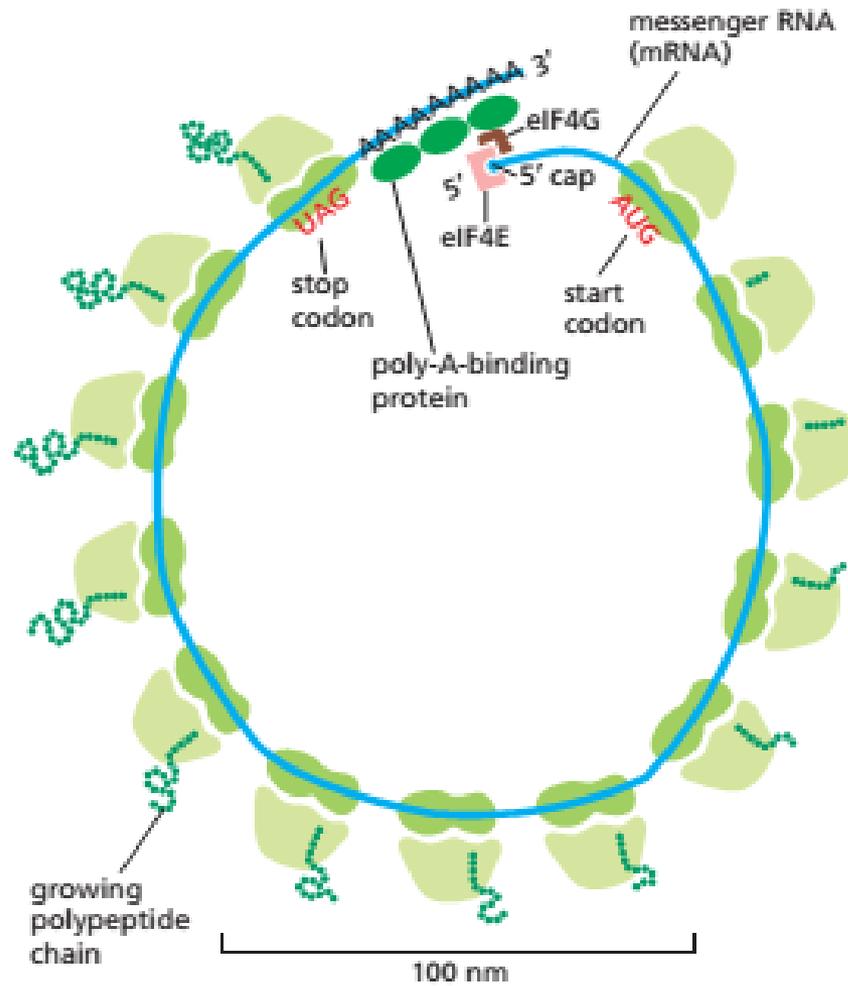


Lodish, H. (2011). *Molecular cell biology*

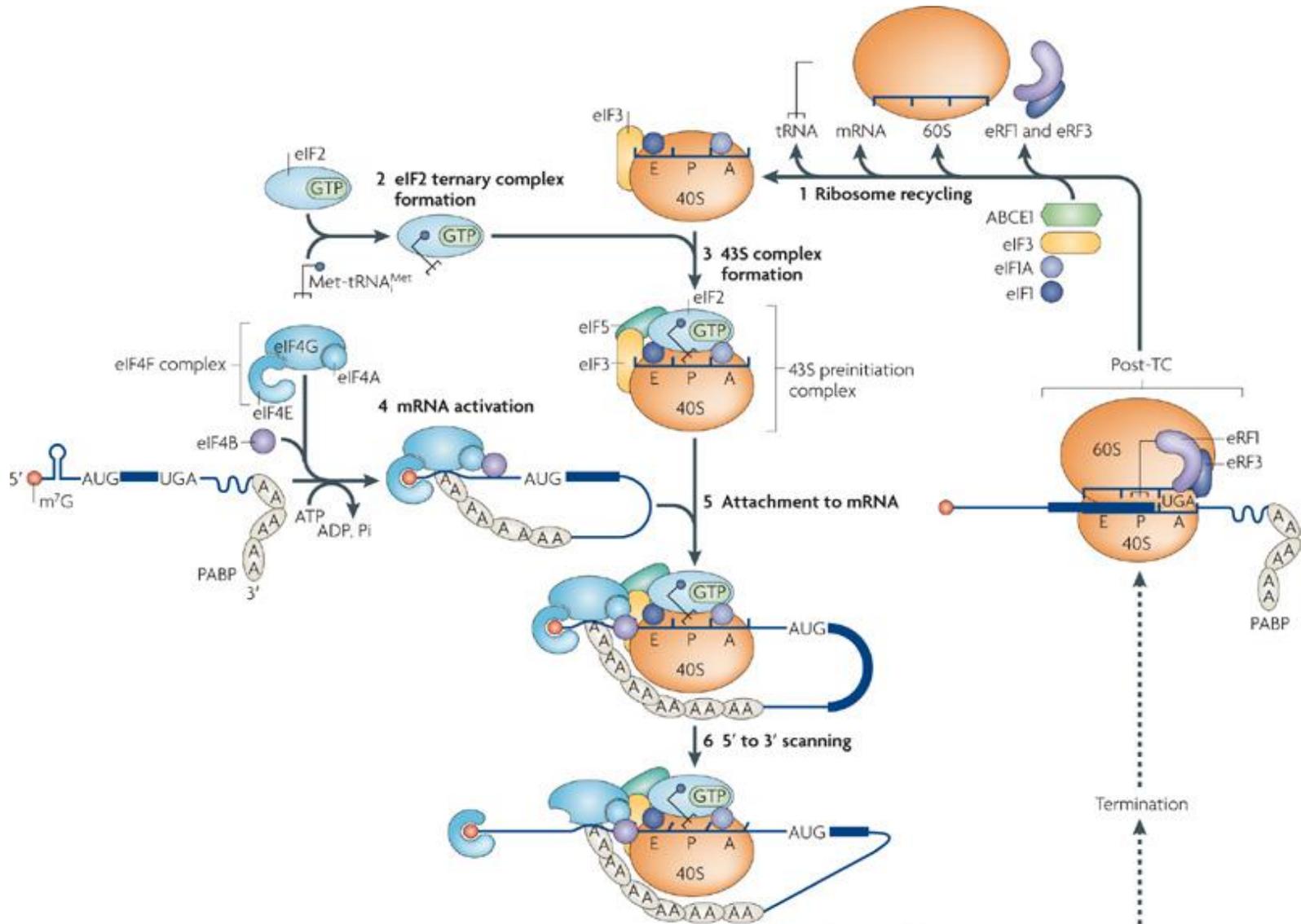
A grelha de leitura utilizada depende do início da tradução

Tradução

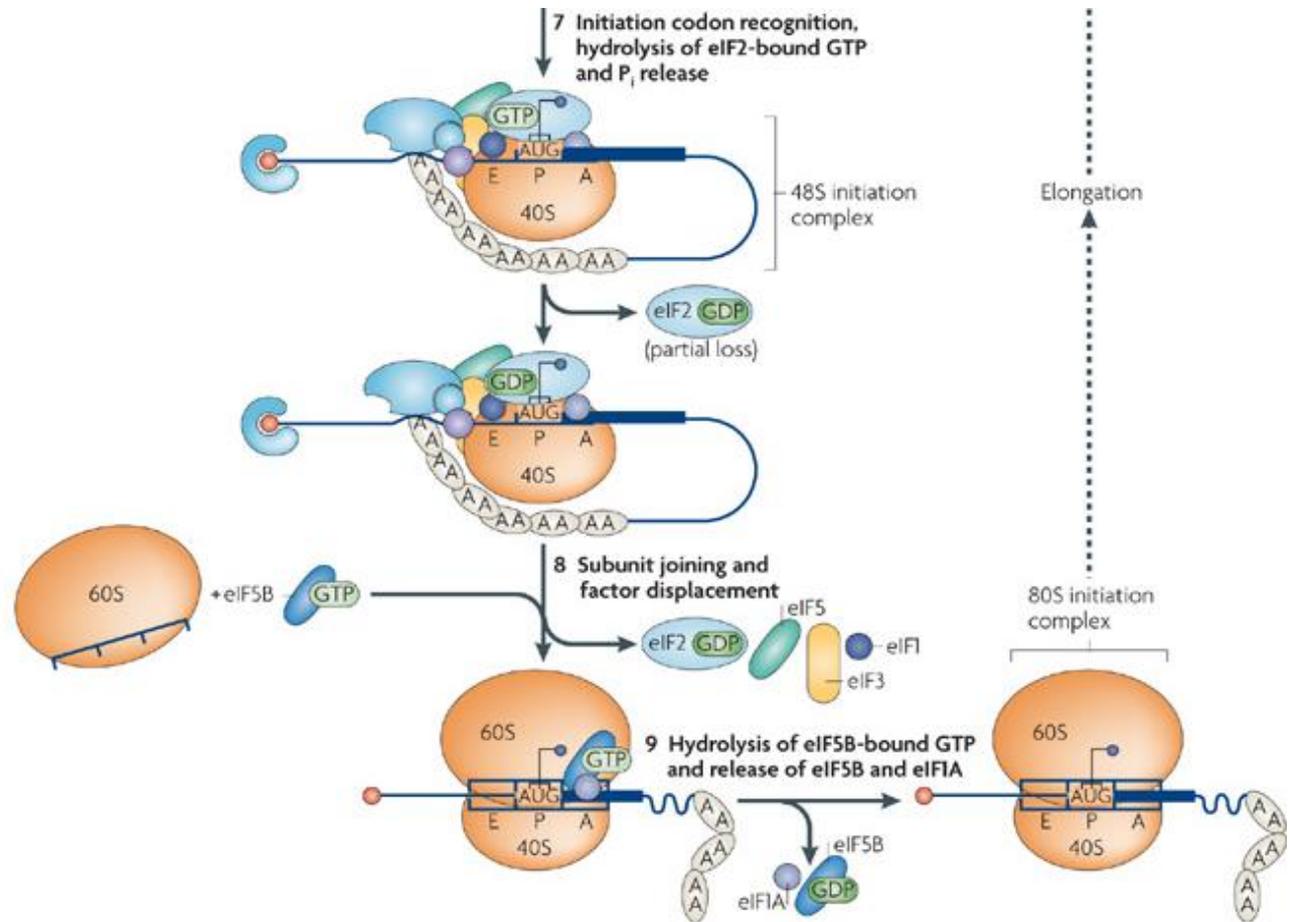
- Iniciação
- Elongação
- Terminação
- Reciclagem do ribossoma



Modelo de Iniciação da Tradução Eucariotas



Modelo de Iniciação da Tradução Eucariotas



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Seleção codão de iniciação

Feita pelo tRNA (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 e eIF5)

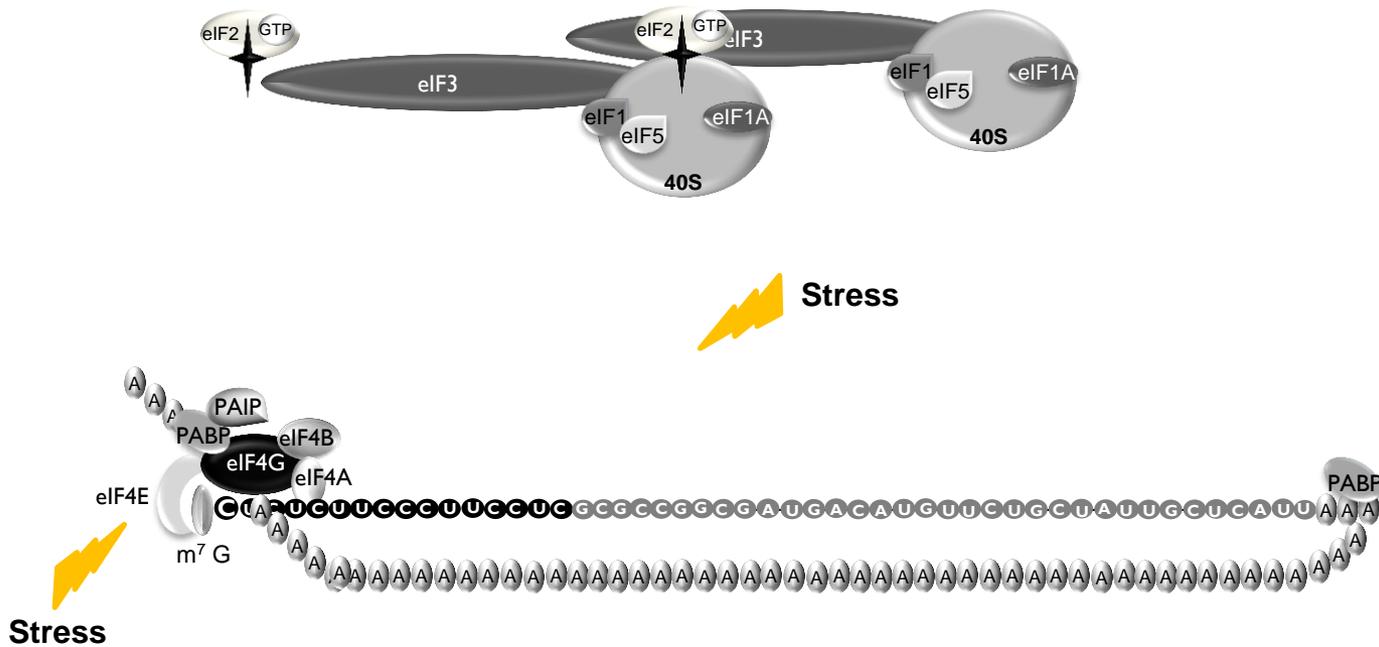
Posição na 5'UTR

Sequência Kozak: (5') **RCCAAUGG** (3'), R - purina

Codões de iniciação não-AUG

- Fortemente dependente da sequência Kozak
- Maior quantidade de eIF1 – maior selectividade para AUGs
- Selecção alterada por resposta a stress

Regulação da iniciação da tradução



Regulação da iniciação da tradução

Stress celular: apoptose, stress oxidativo, privação de nutrientes, hipóxia, stress do retículo endoplasmático, diminuição de nutrientes, stress genotóxico

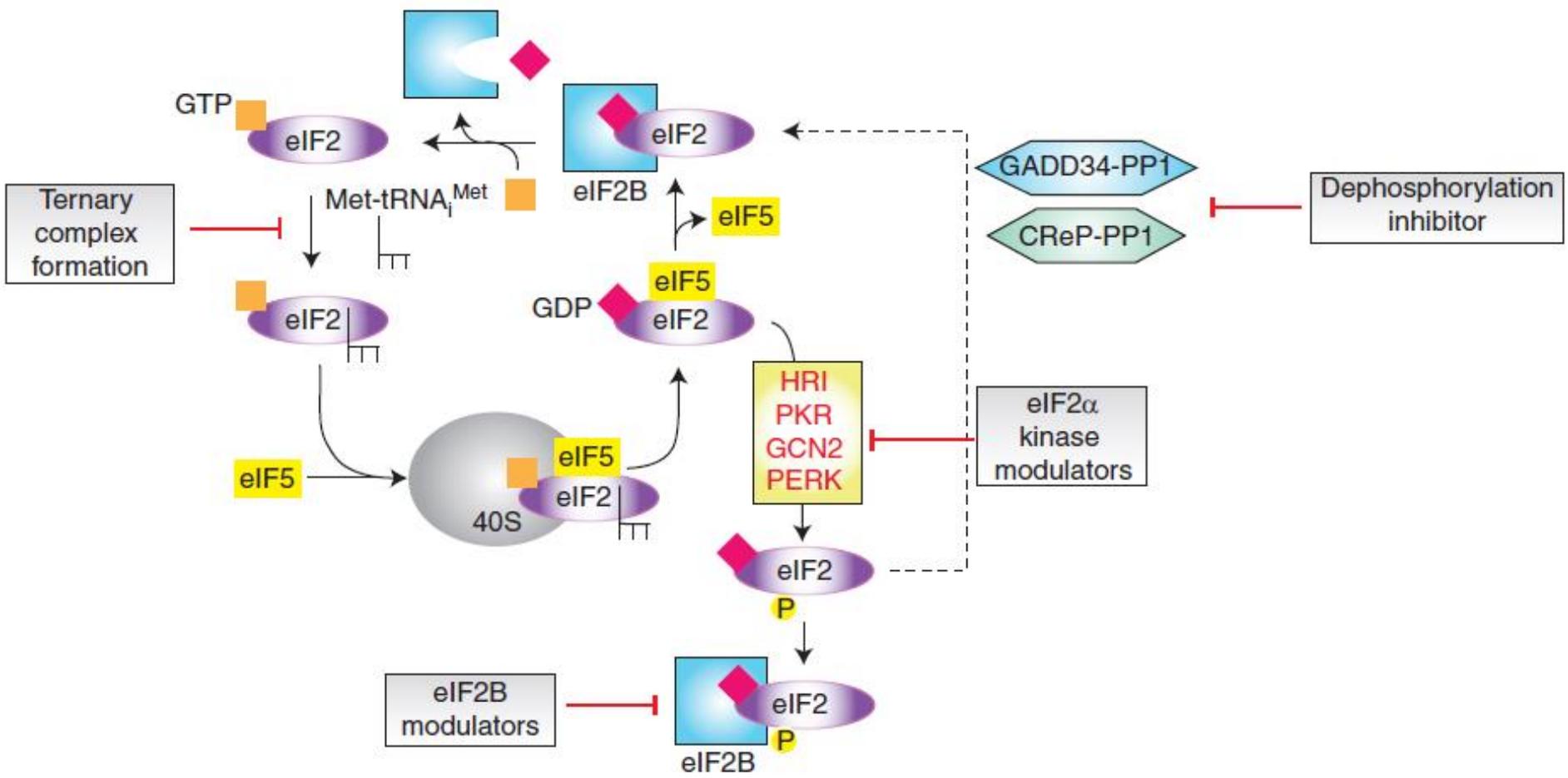
Mitose, diferenciação celular

Infecção viral

Regulação da iniciação da tradução

Regulação do complexo ternário

- eIF2 α fosforilado liga-se fortemente a eIF2B
- Fosforilação inibe reciclagem GDP-GTP



Regulação da iniciação da tradução

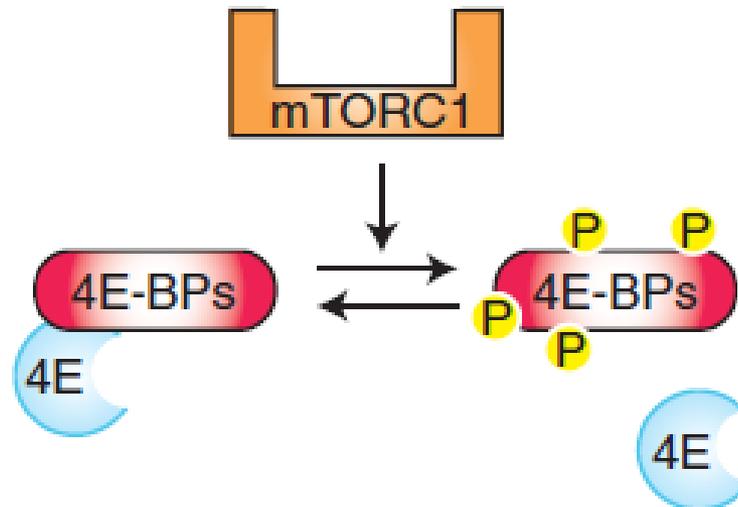
Regulação do complexo ternário

- Privação de aminoácidos, stress RE, hipóxia, infecção viral, dsRNA
- GCN, PERK, HRI, PEK, PKR

Regulação da iniciação da tradução

Regulação do complexo eIF4F

- eIF4E regulado por 4E-BP
- 4E-BP não fosforilado liga-se a eIF4E no mesmo local de ligação de eIF4G – ligação reduz tradução

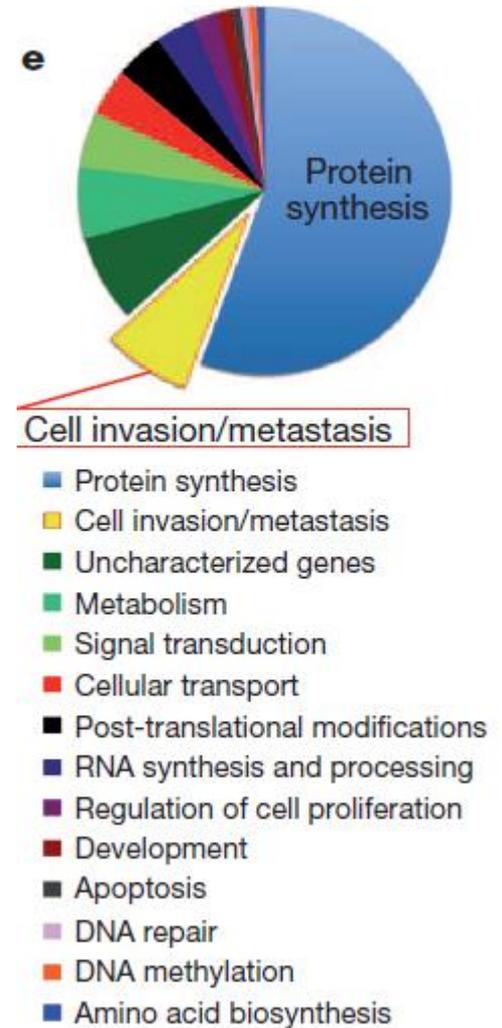


Inativação da via de sinalização do mTOR

- Privação de aminoácidos
- Baixa quantidade de ATP
- Ausência de factores de crescimento
- Privação de nutrientes
- Hipóxia
- *Unfolded protein response*

Inactivação da via de sinalização do mTOR

- 5' TOP ou PRTE
(pyrimidine-rich translational element)
- eIF4G assiste interacção eIF4E-cap
- mTOR disrompe eIF4E-eIF4G

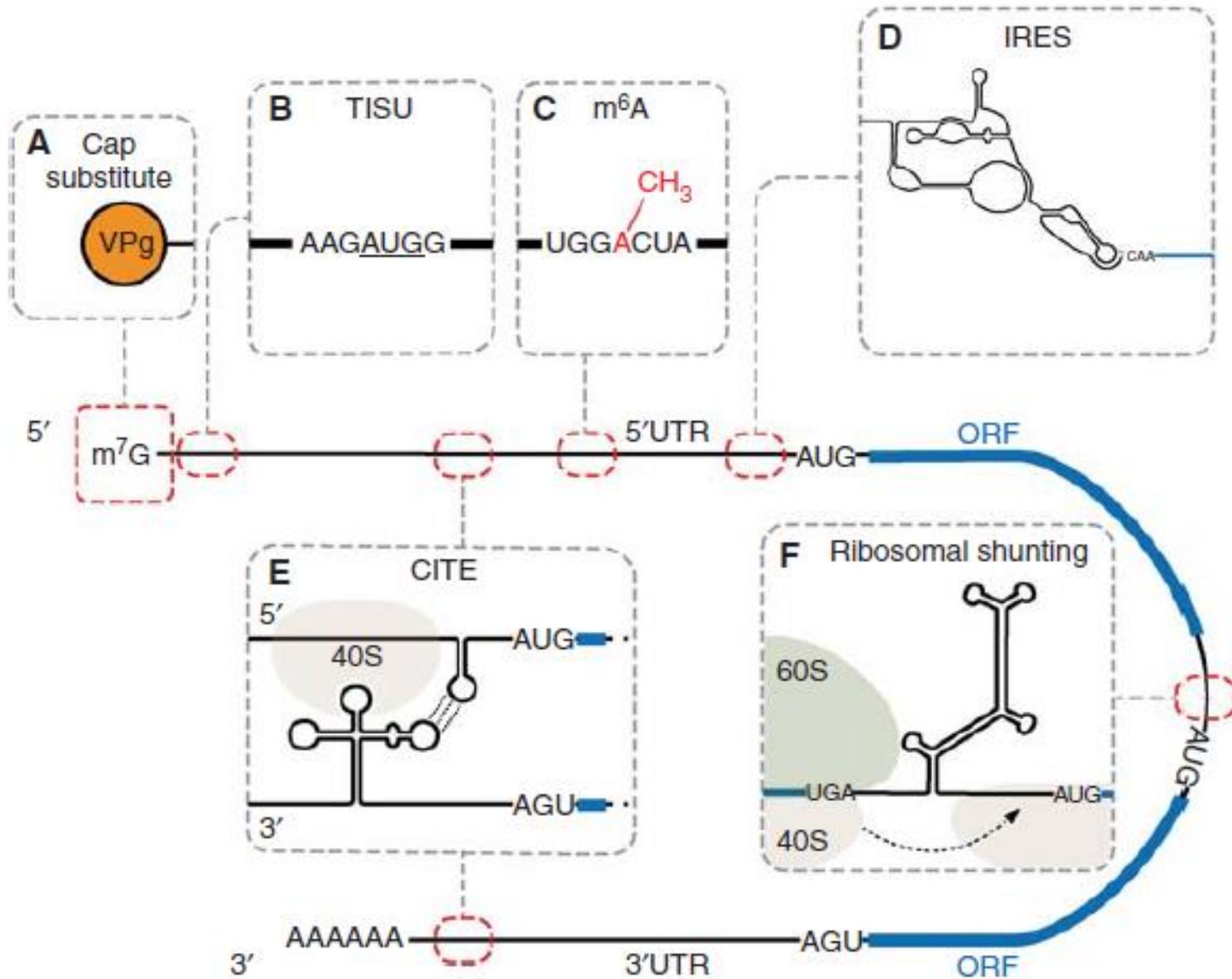


Regulação da iniciação da tradução

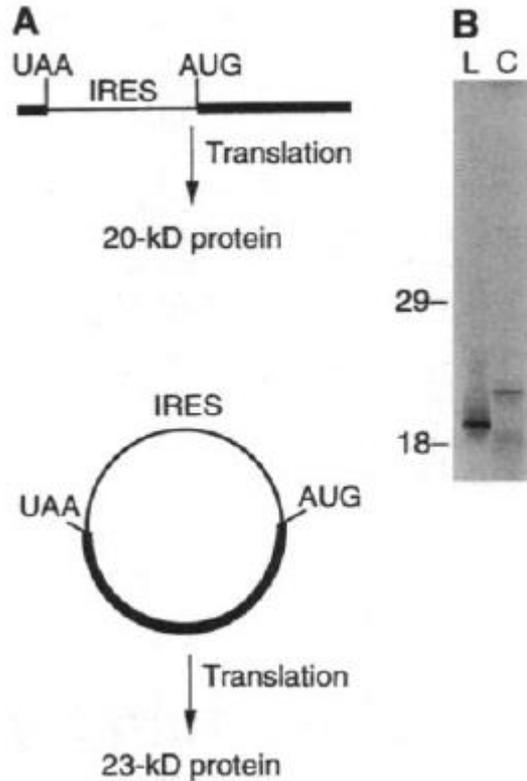
Regulação do complexo eIF4F

- 4ET : P-bodies
- 4EHP – ligação à cap
- Fosforilação de eIF4G
- Clivagem de eIF4G
- Ligação PDCD4-eIF4A

Mecanismos alternativos



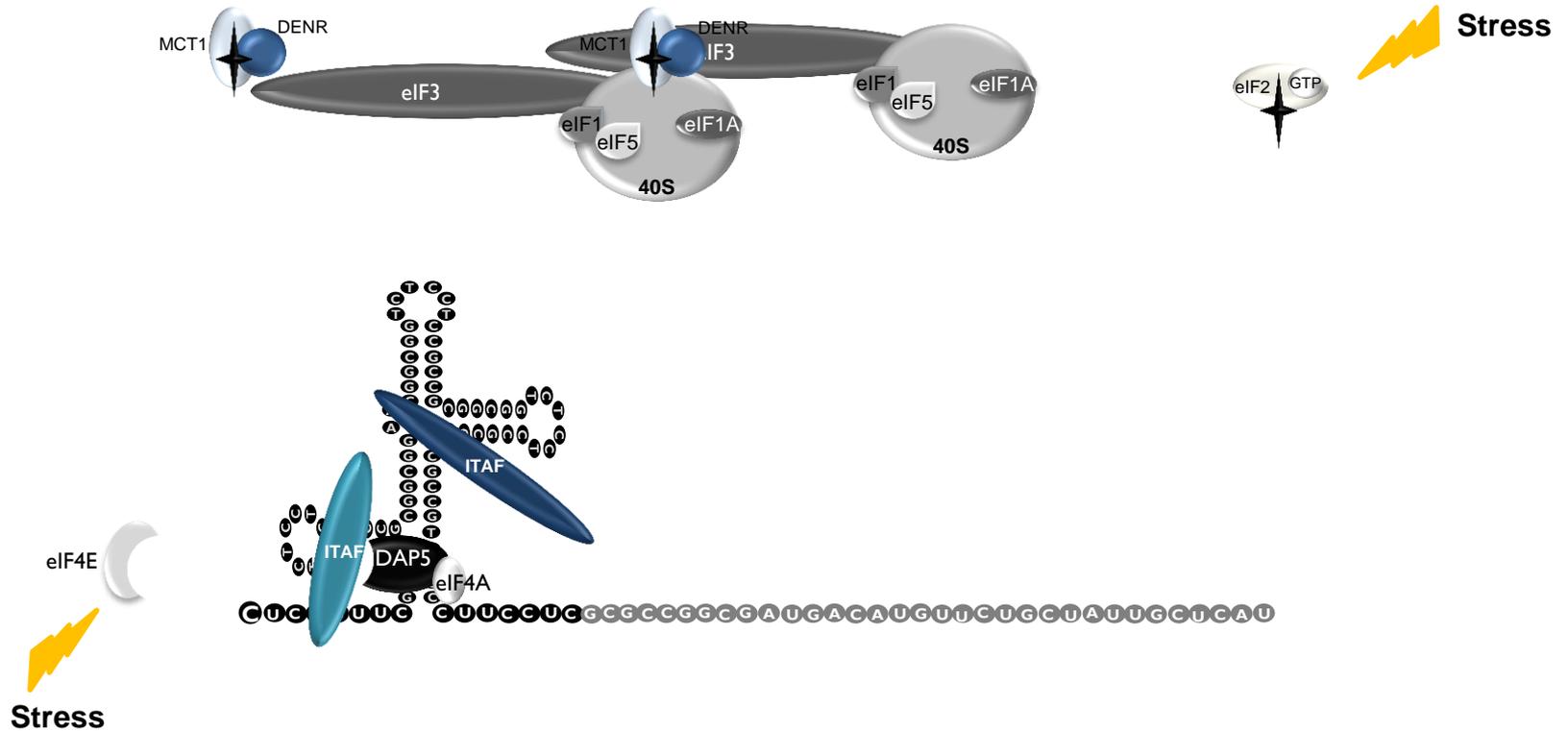
Tradução mediada por IRES



Chen and Sarnow, 1995

- Elementos de RNA que recrutam o ribossoma internamente, sem cap e sem terminal 5'

Tradução mediada por IRES



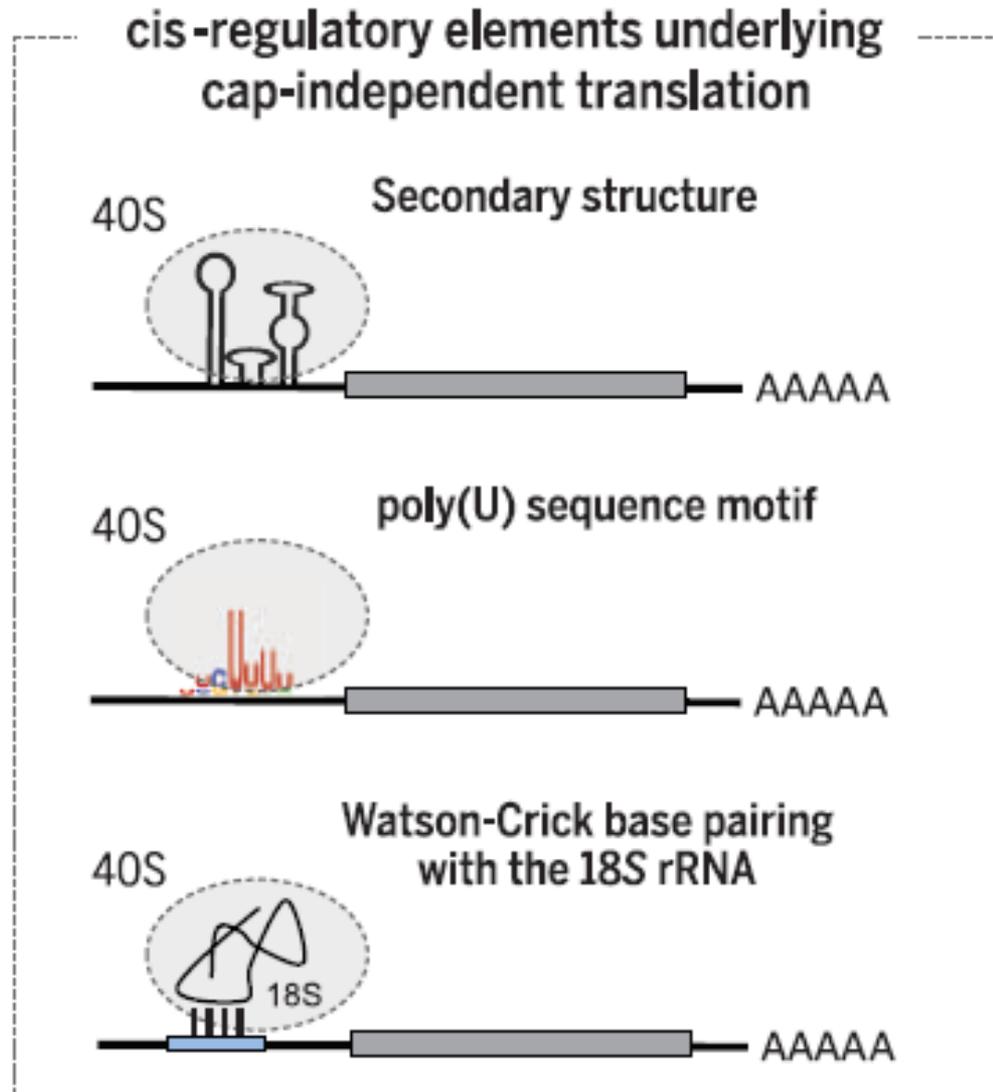
Tradução mediada por IRES

- Inicialmente descrita em virus (EMCV e PV – 1988)
- Primeiro IRES em mRNA celular: Bip
- Tamanho e estrutura variável
- 10% mRNAs possuem IRESs

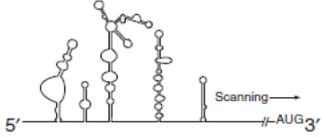
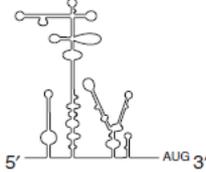
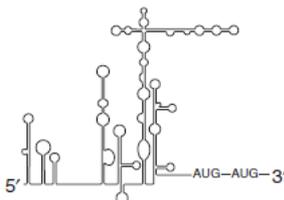
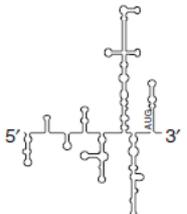
Tradução mediada por IRES

- Com ou sem scanning
- Com ou sem factores de iniciação canónicos
- Com ou sem *IRES trans-acting factors* (ITAF)

Tradução mediada por IRES



IRES virais

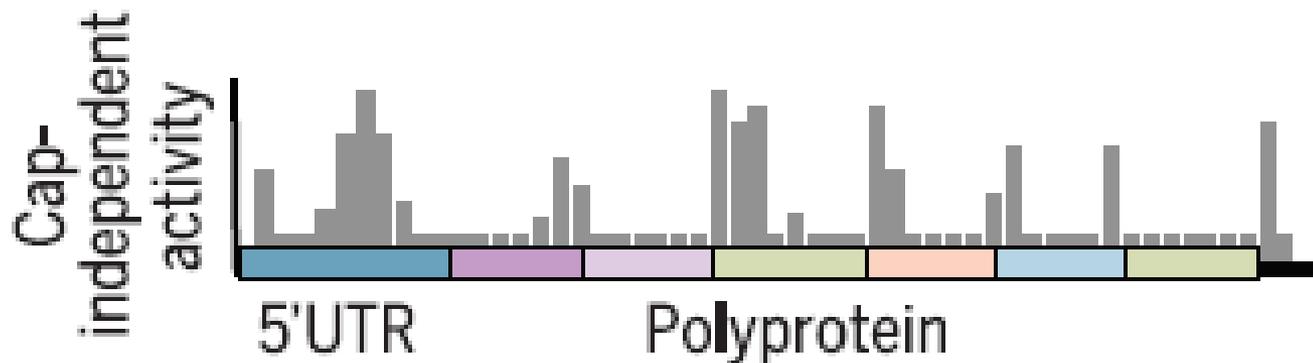
	Requirements		Examples	Notable features
	eIFs	ITAFs		
Type I (entero-/rhinovirus) 	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4Gm	PTB PCBP1 PCBP2	Poliovirus EV71 BEV Coxsackievirus B3 HRV2	Ribosomal scanning downstream of ribosome binding to the AUG
Type II (cardio-/aphthovirus) 	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4B eIF4Gm	PTB ITAF ₄₅	EMCV FMDV TMEV	Initiates translation at the site of 40S recruitment, 40S does not scan
Type IV (HAV-like) 	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4B eIF4E eIF4G	PTB PCBP2 La	HAV	Requires eIF4E but not binding to the 5' cap
Type V (Aichivirus) 	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4B eIF4Gm	PTB DHX29	Aichivirus	Does not require eIF1 and eIF1A

IRES virais

	Requirements		Examples	Notable features
	eIFs	ITAFs		
Type III (HCV-like)	eIF2 eIF3	None	AEV PTV-1 SPV-9	
HCV-like	eIF2 eIF3	None	HCV CSFV	Direct binding to 40S ribosomal subunit; translates under conditions with low ternary complex
Dicistrovirus	None	None	CrPV DCV IAV PSIV	Initiates translation in the absence of any eIFs in the A-site at a non-AUG codon Can translate in a +1 reading frame (ORF _x)
Retrovirus	eIF4A eIF4G eIF5A	hnRNPA1 hRIP DDX3	HIV-1 HTLV-1 SIV FIV	
Herpesvirus	eIF4F	PTB PCBP1 KSHV-ORF57	KSHV-vFLIP MDV	vFLIP IRES located in ORF of vCyclin

IRES virais

Landscape of translational regulatory elements in positive-strand RNA viruses



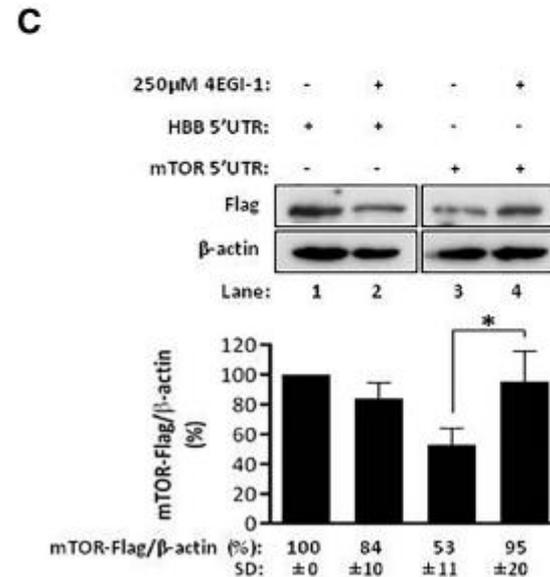
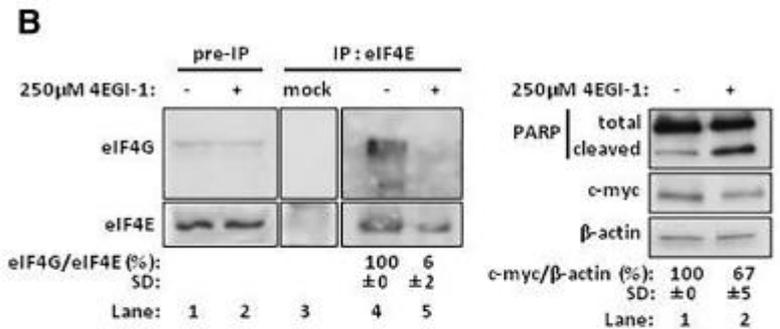
Weingarten-Gabbay, 2016

IRES em mRNAs de mamífero

Cellular pathway	Name	References
Amino acid starvation	Cationic amino acid transporter 1 (CAT-1)	Fernandez et al. 2001
	Sodium-coupled amino acid transporter (SNAT2)	Gaccioli et al. 2006
Nutrient signaling hypoxia	Human insulin receptor (HIR)	Spriggs et al. 2009
	Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)	Schepens et al. 2005
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Morris et al. 2010
	Fibroblast growth factor 2 (FGF2)	Bonnal et al. 2003
Apoptosis survival	Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)	Sella et al. 1999
	B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Marash et al. 2008
	BAG family molecular chaperone regulator 1 (Bag1)	Pickering et al. 2004
	Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1)	Graber et al. 2010
	X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)	Riley et al. 2010
Oncogene	c-myc	Le Quesne et al. 2001
	c-Jun	Blau et al. 2012
Mitosis	p58 PITSLRE	Cornelis et al. 2000
	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	Marash et al. 2008
	p120 catenin (p120)	Silvera et al. 2009
DNA damage response	p53	Yang et al. 2006
	Serine hydroxymethyltransferase 1 (SHMT1)	Fox et al. 2009
	Replication protein A2 (RPA2)	Yin et al. 2013
	Homeobox transcription factor (Hox)	Xue et al. 2015
Differentiation	Platelet-derived growth factor 2 (PDGF2)	Sella et al. 1999
	Runt-related transcription factor 1 (Runx1)	Pozner et al. 1999
	Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1)	Jimenez et al. 2005
	Cold shock	Cold inducible RNA-binding protein (CIRP)

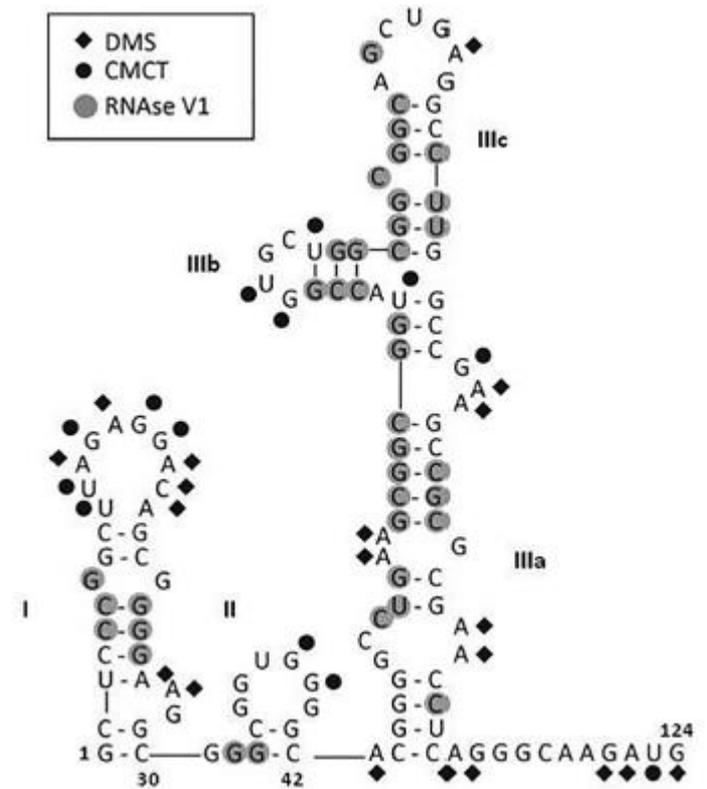
IRES em mRNAs de mamífero

mRNAs podem ser traduzidos pelo mecanismo canônico ou de forma dependente de IRES



IRES em mRNAs de mamífero

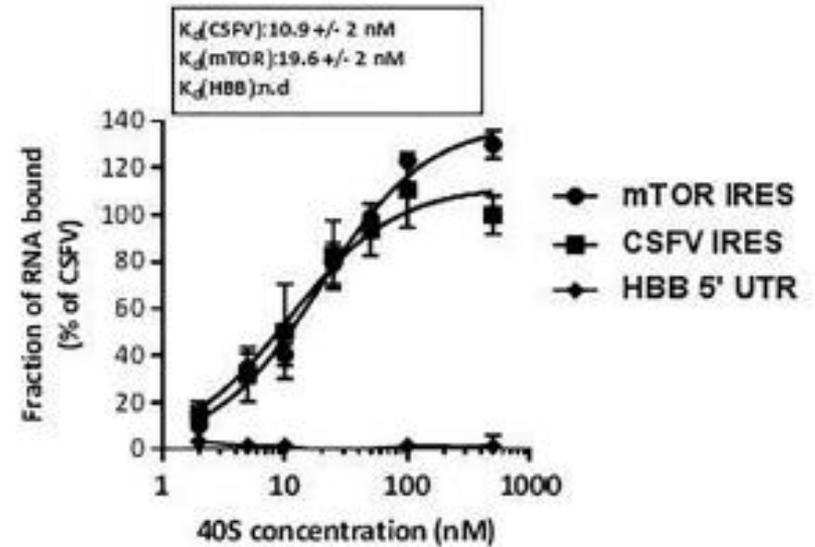
Menos estruturados do que os virais



Marques-Ramos, 2017

IRES em mRNAs de mamífero

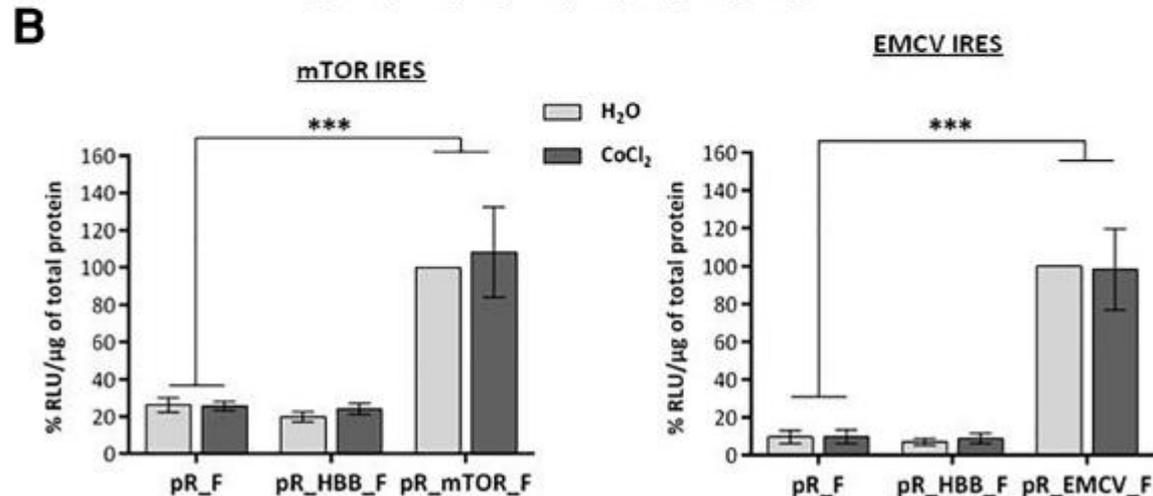
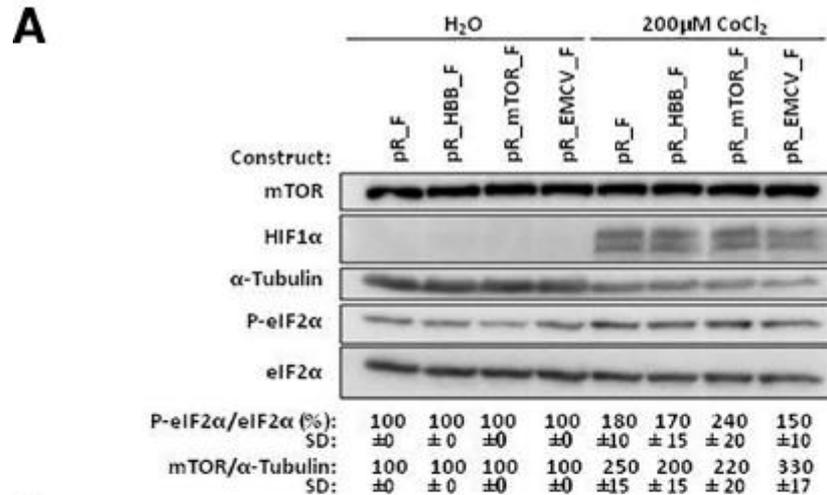
Podem-se ligar directamente à subunidade ribossomal 40S



Marques-Ramos, 2017

IRES em mRNAs de mamífero

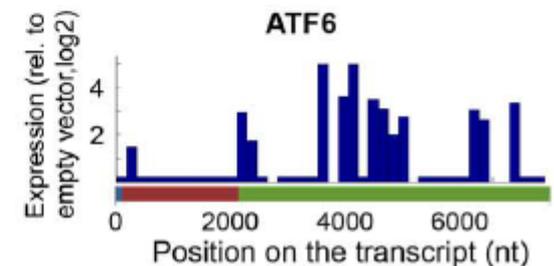
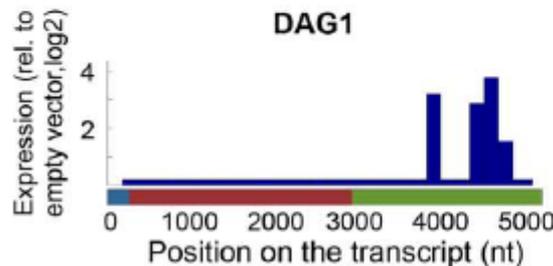
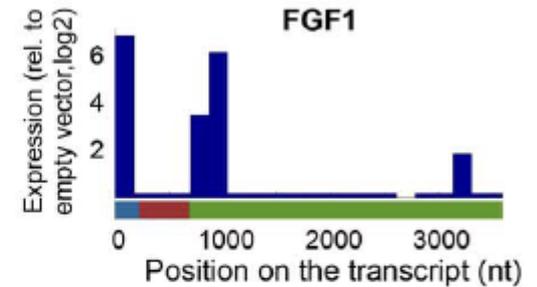
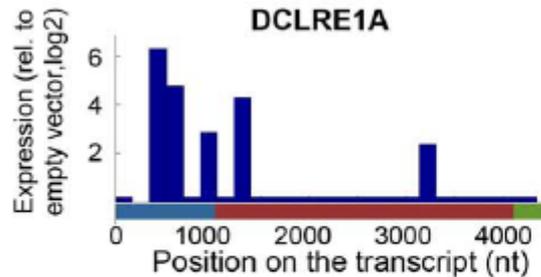
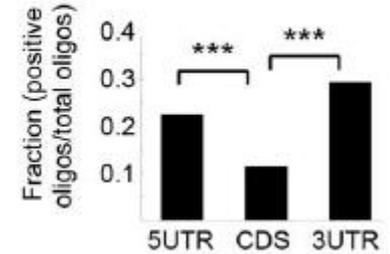
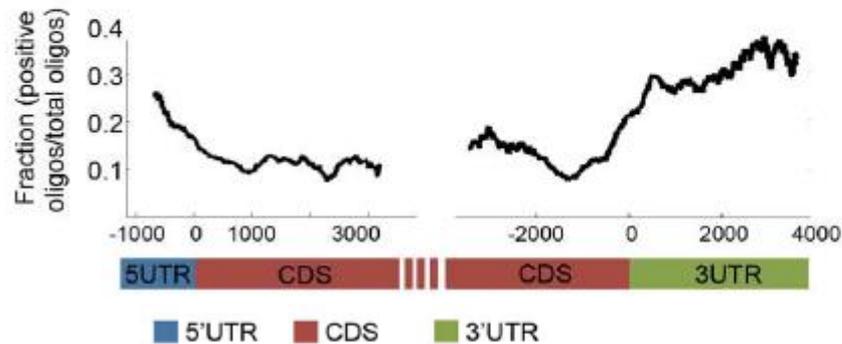
Podem funcionar de forma independente de eIF2



IRES em mRNAs de mamífero

Podem localizar-se
na 3'UTR

B Cap-independent translation



Significado biológico dos IRES

1. Permitir produção de proteínas de resposta a stress (stress transiente)

- Stress RE: p86 – tradução de HIAP2.
- Stress genotóxico – tradução de p53, relocalização de PTBP1 no citoplasma.
- Hipóxia – HIF1 α
- Choque térmico – HSPA1A

2. Permitir apoptose (stress crónico)

Perspectiva evolutiva tradução IRES

- Menor eficiência tradução
- Envolvimento de menos factores de iniciação
- Alguns funcionam por interacções mRNA-rRNA
- Forma ancestral de iniciação da tradução eucariota?

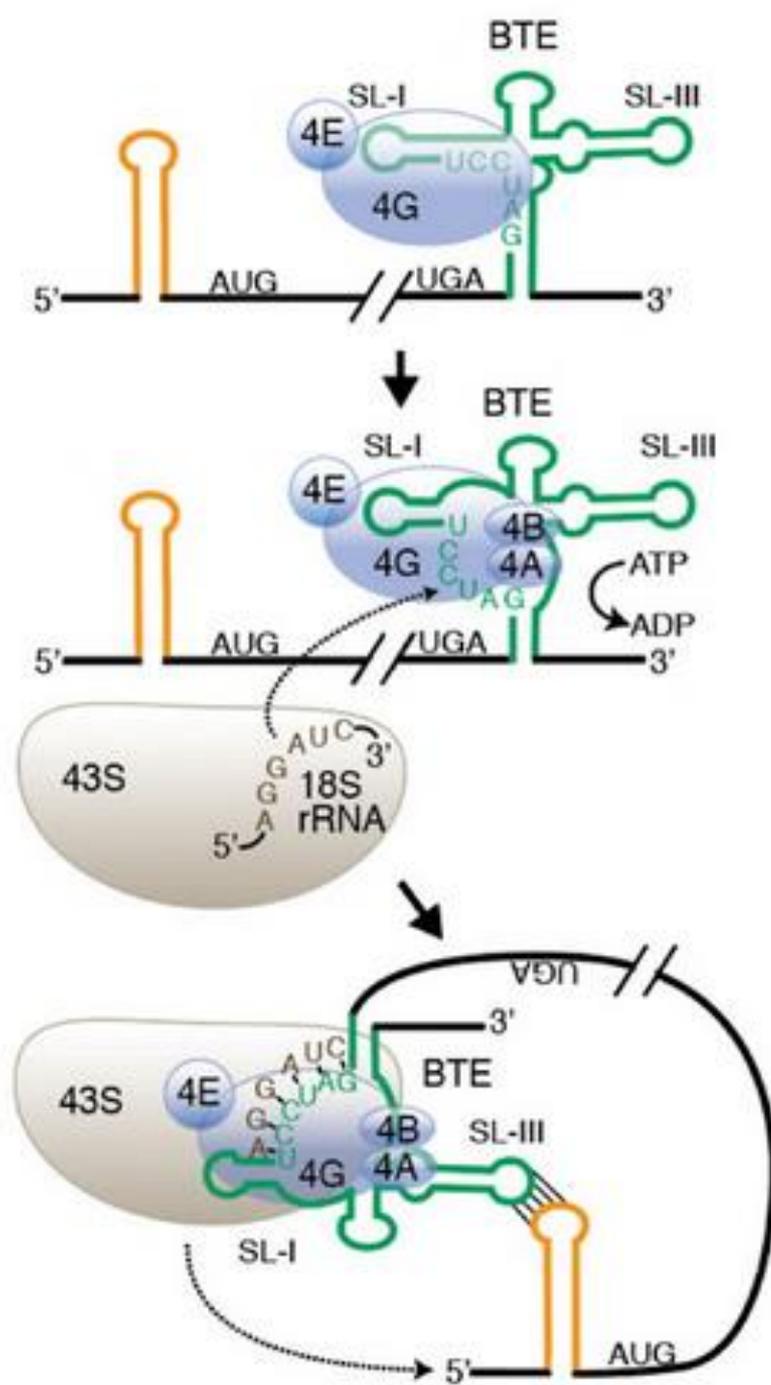
Tradução mediada por Cap-independent translation elements (CITEs)

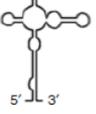
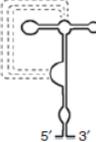
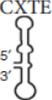
- Descoberto no *satellite tobacco necrosis virus* (STNV)
- Independente de cap, com scanning
- Requer terminal 5'
- Presentes na 3'UTR: Ligam-se à maquinaria de tradução e estabelecem interações com 5' UTR

Tradução mediada por Cap-independent translation elements (CITEs)

Vários mecanismos de actuação:

- Interação com componentes de eIF4F
- Interação com ribossoma (60S)
- PIC formado no terminal 3':
 - Interações 5' UTR-3'UTR
 - Interação ribossoma com 3'UTR e 5'UTR

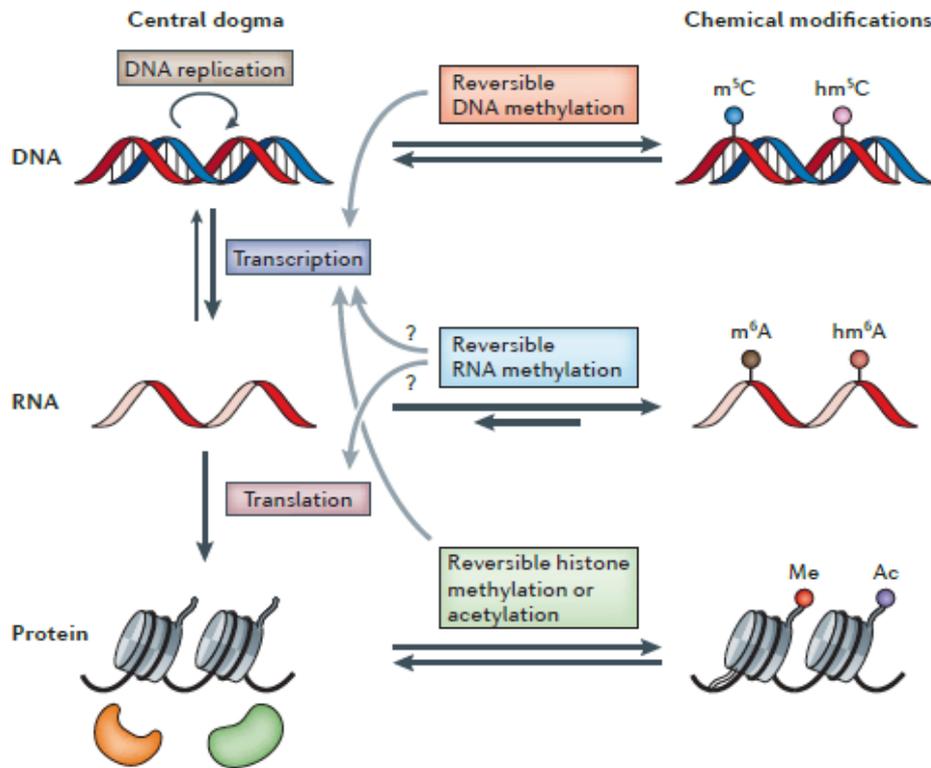


Type	Examples	Notable features
TED (STNV) 	STNV PLPV PCLPV	Binds eIF4F Apical loop interacts with hairpin in 5'UTR
BTE (BYDV) 	<i>Alphanecrovirus</i> <i>Betanecrovirus</i> <i>Dianthovirus</i> <i>Luteovirus</i> <i>Umbravirus</i>	Binds eIF4G, eIF4E-independent Up to six stem loops can radiate from central hub
PTE (PMV) 	PMV PEMV2 SCV	Binds eIF4E Base-pairing interactions (dotted lines) form pseudoknot
ISS (MNSV) 	MNSV MNeSV	Binds intact eIF4F Apical loop interacts with hairpin in 5'UTR
YSS (TBSV) 	TBSV CIRV	Requires eIF4F/eIFis04F 5' hairpin interacts with hairpin in 5'UTR
TSS (TCV) 	TCV PEMV2	TCV TSS competes with tRNA for P-site binding in 60S
CXTE (MNSV) 	MNSV	eIF4E independent

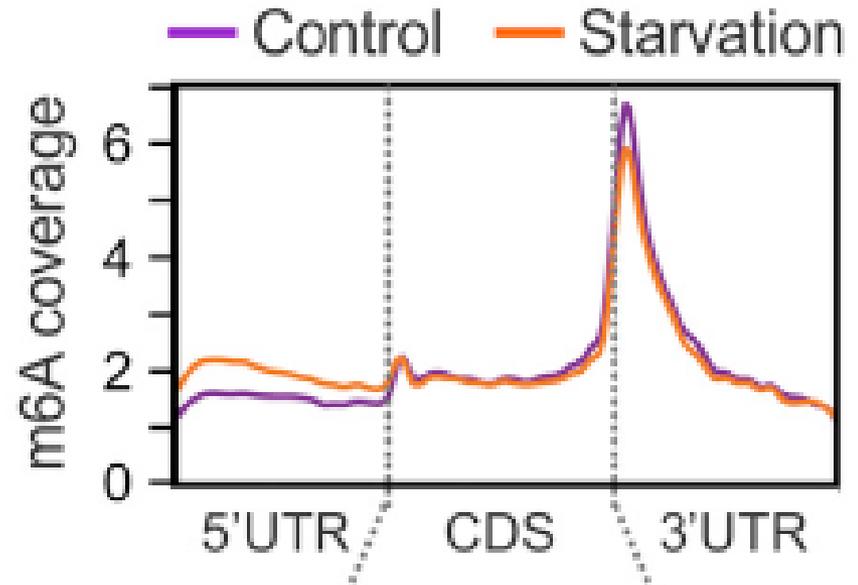
PLPV, Pelargonium line pattern virus; PCLPV, pelargonium chlorotic ring pattern virus; BYDV, barley yellow dwarf virus; PMV, panicum mosaic virus; SCV, strawberry crinkle virus; MNSV, melon necrotic spot virus; MNeSV, maize necrotic streak virus; TBSV, tomato bushy stunt virus; CIRV, carnation Italian ringspot virus; TCV, turnip crinkle virus.

Tradução mediada por m⁶A

- Resíduos N⁶-metiladenosina (m⁶A)



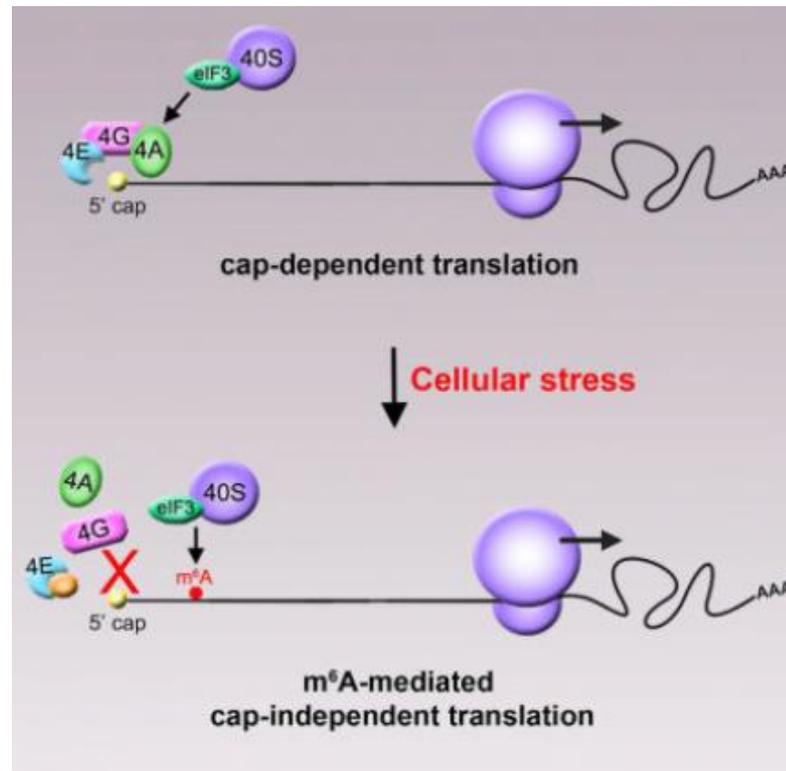
Fu, 2014



Zhou, 2018

Tradução mediada por m⁶A

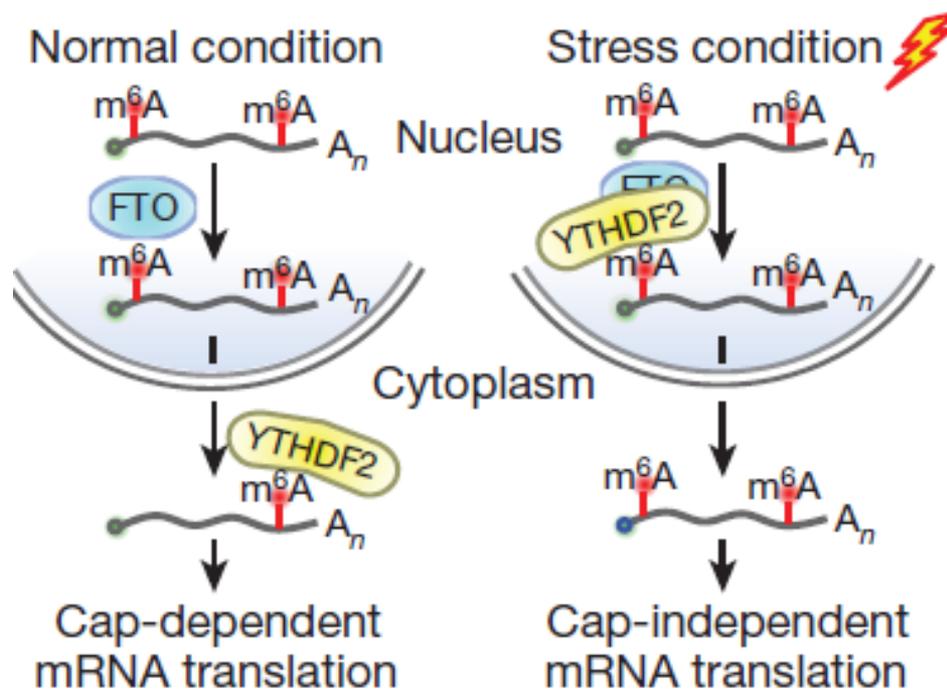
- Liga-se a eIF3 permitindo o recrutamento do ribossoma
- Requer o terminal 5'
- Envolve *scanning*



Meyer, 2015

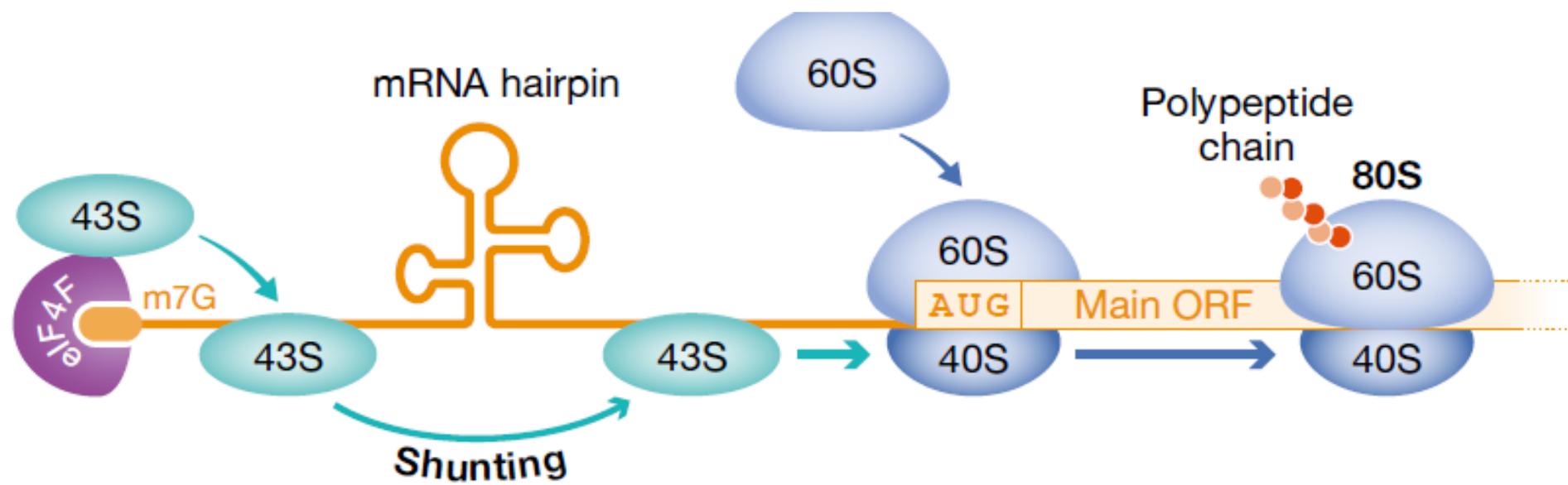
Tradução mediada por m⁶A

- Resposta a stress (choque térmico)



Ribosome shunting

- Translocação do ribossoma de um local dador para o codão de iniciação
- Requer cap, eIFs e scanning até local dador
 - Virus: CaMV, adenovirus, ...
 - mRNAs celulares: BACE1, cIAP2, HSP70
 - Tradução de sORF com translocação para tradução de ORF a 3'



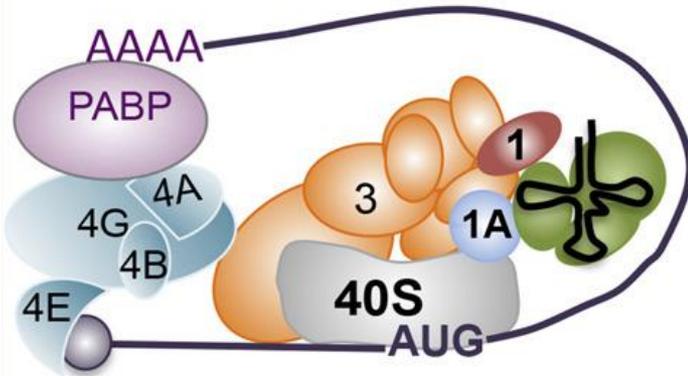
Sriram, 2018

Translation Initiator of Short 5'UTR (TISU)

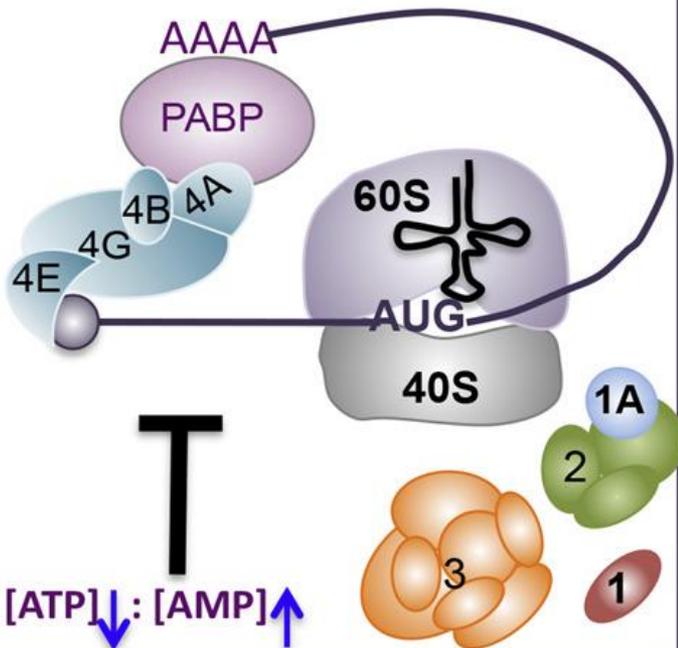
- Ocorre em 5'UTRs pequenas
- Localizado a 5-30 nts da cap
- Estruturas de 12nts (SAASAAUGGCGGC, S=C/G)
- Dependente de cap, sem *scanning*
- Metabolismo energético, mitocondrial, síntese proteica

Canonical translation initiation

48S recruitment

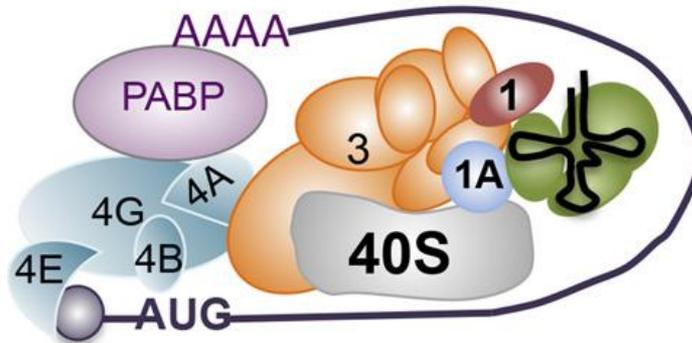


80S formation

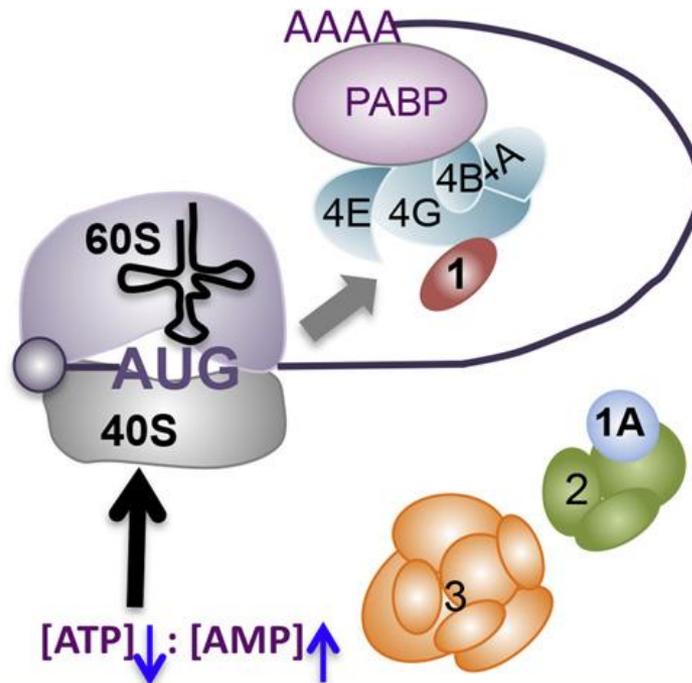


Translation initiation via TISU mitochondrial genes

48S recruitment



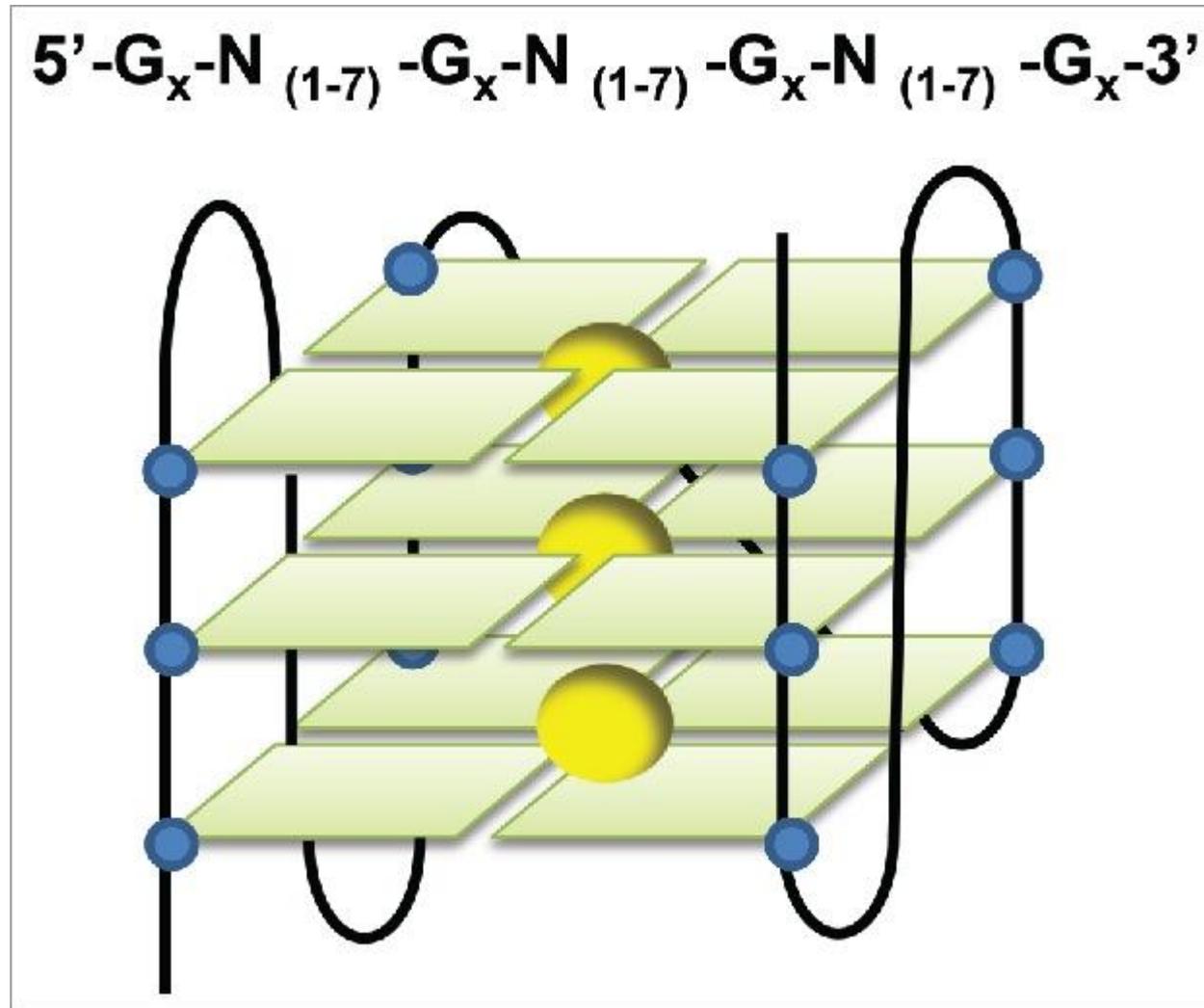
80S formation



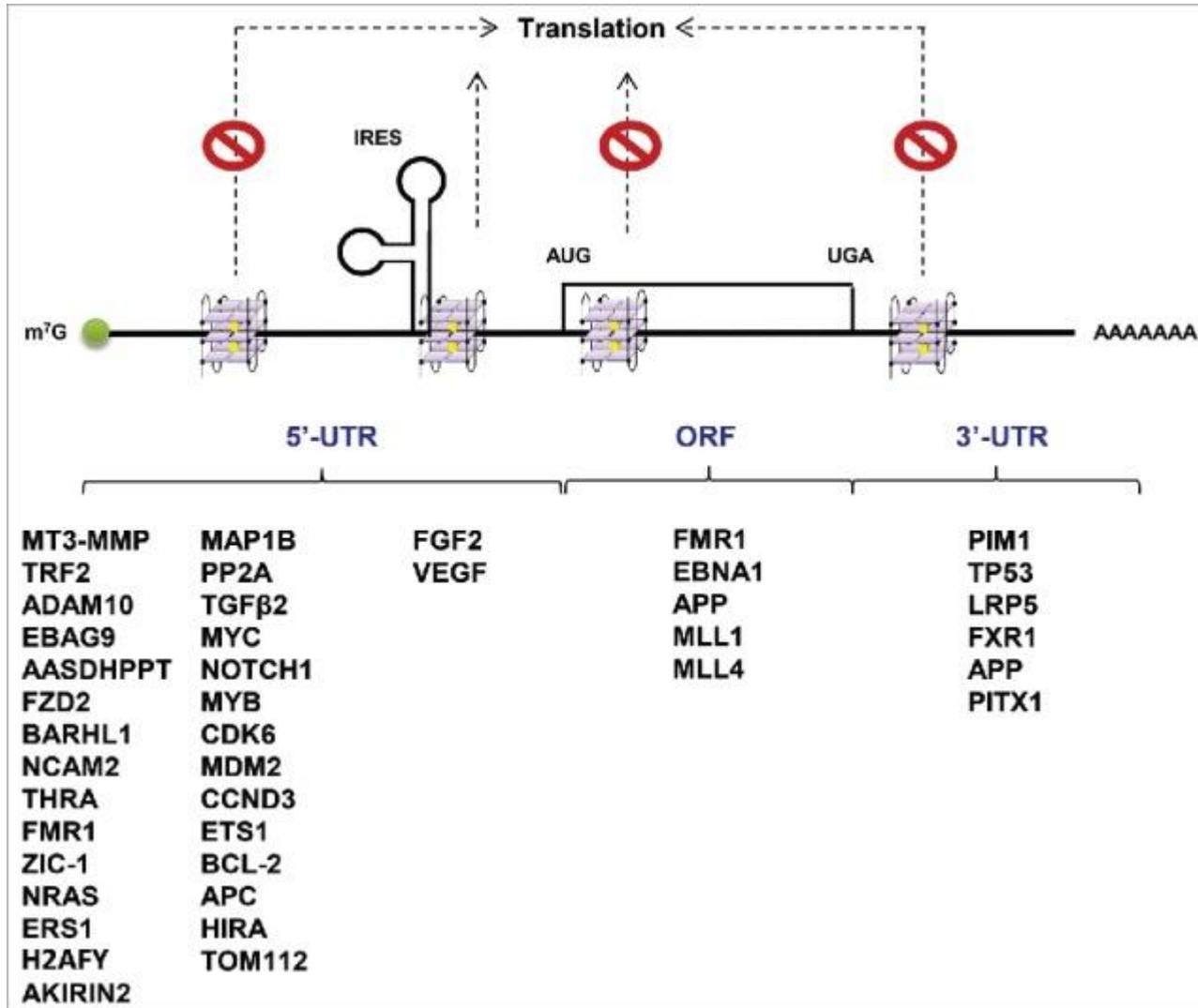
G-quadruplexes

- Estruturas secundárias formadas por regiões ricas em G
- Redução tradução mediada por cap
- Aumenta tradução por IRES

G-quadruplexes



G-quadruplexes



Proteínas de ligação ao RNA

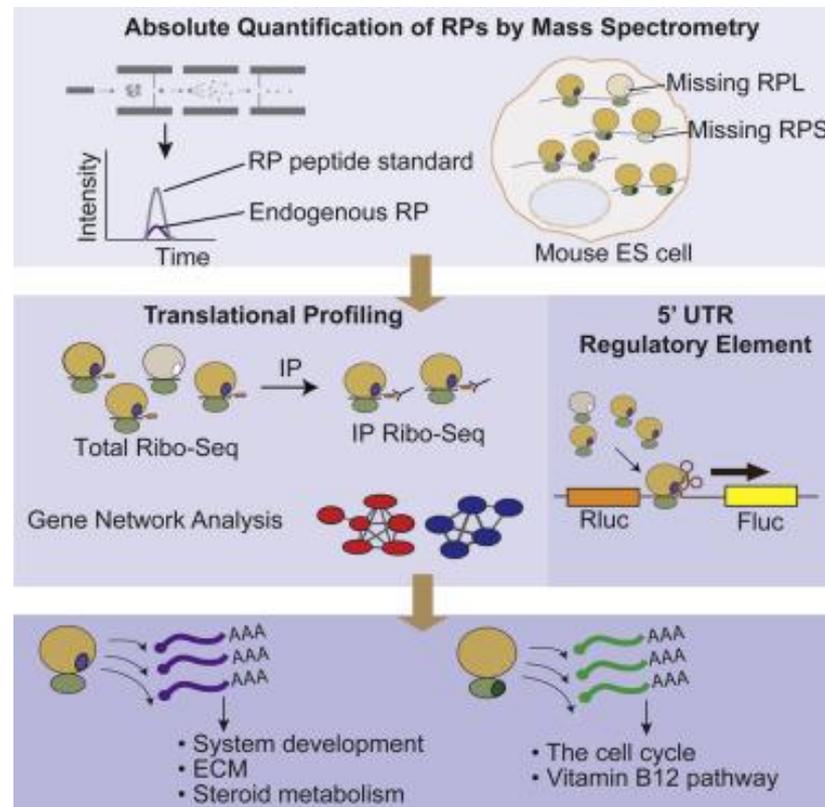
- *IRES* trans-acting factors (ITAFs)
 - IMP1 (cIAP1, IGF2)
 - PTB (virus – alteração estrutura)

ITAF	References	Organism
PTB/hnRNP1	[112–115]	Viral, eukaryotic
hnRNPA1	[116–118]	Eukaryotic
ITAF(45)	[112]	Viral
La autoantigen	[119]	Viral, eukaryotic
UNR	[120,121]	Viral, eukaryotic

- Recrutamento de 40S
- Proteínas nucleares, núcleo-citoplasma

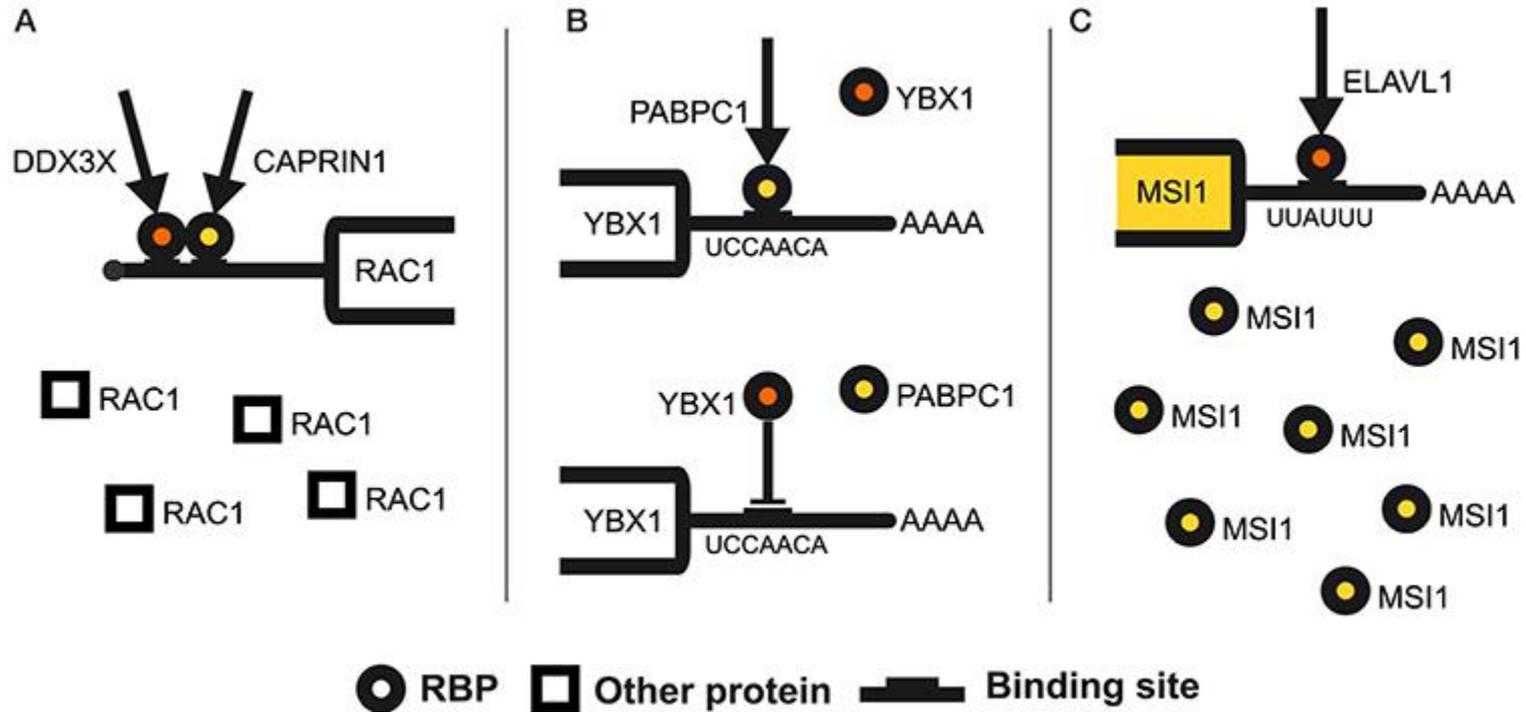
Proteínas de ligação ao RNA

- Proteínas ribossomais – especialização dos ribossomas

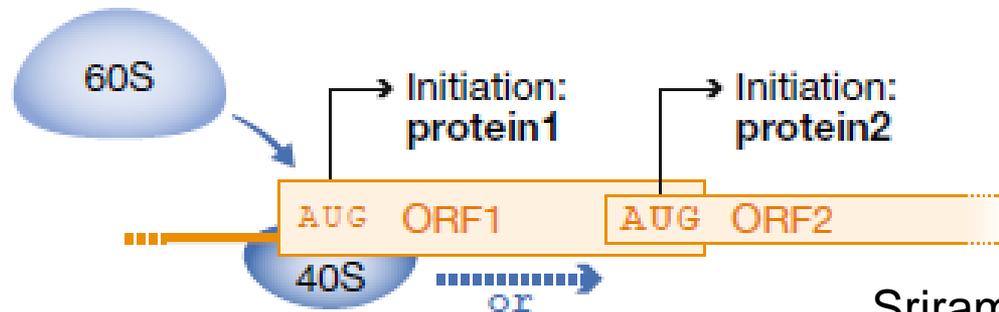
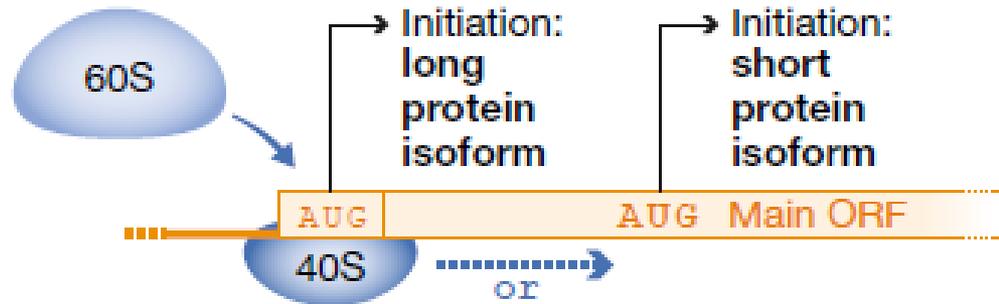
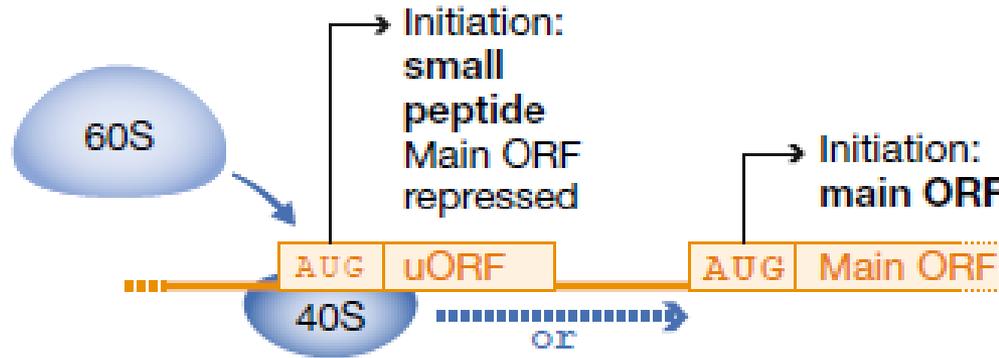


Shi, 2017

Proteínas de ligação ao RNA



uORFs



Leaky scanning

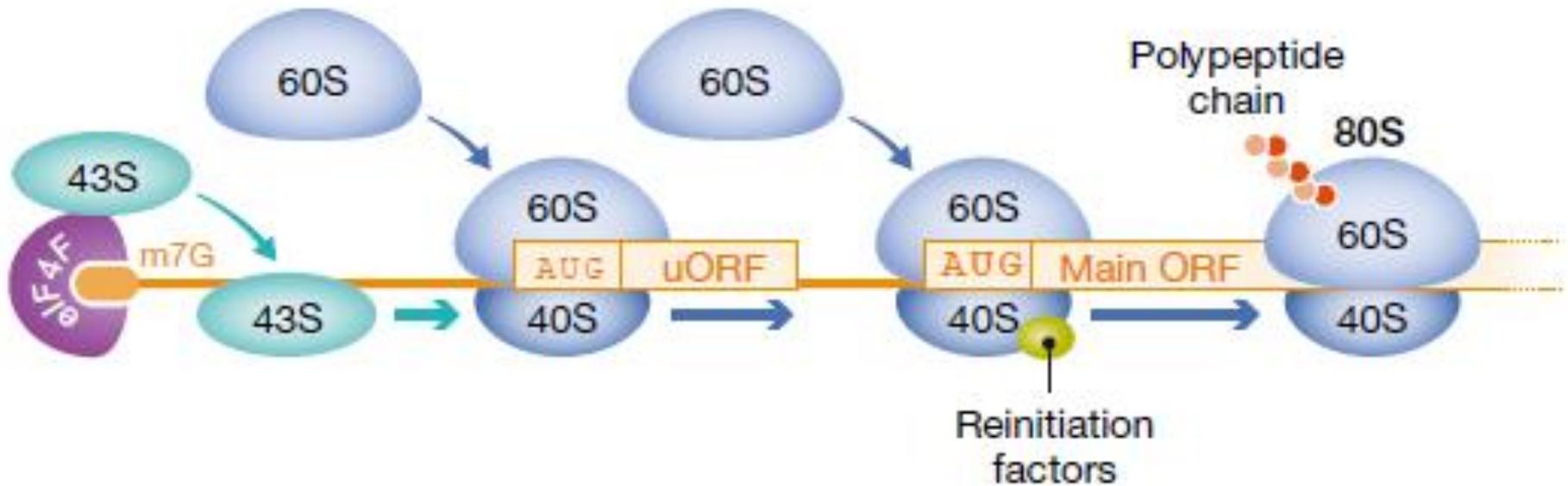
- uORF
- 2 AUGs na mesma grelha de leitura: 2 isoformas proteicas
- 2 AUGs em grelhas de leitura diferentes: 2 proteínas diferentes
- Frequência depende de eIF1 e eIF5

uORFs

- Efeito na main ORF é determinado
 - contexto Kozak do uAUG
 - Reiniciação
 - » Tamanho e complexidade
 - » Distância entre codão stop da uORF e codão de iniciação da main ORF
 - » Disponibilidade de CT
 - » Abrandamento do ribossoma pelo peptido

Reiniciação da tradução

- uAUG num contexto forte



Sriram, 2018

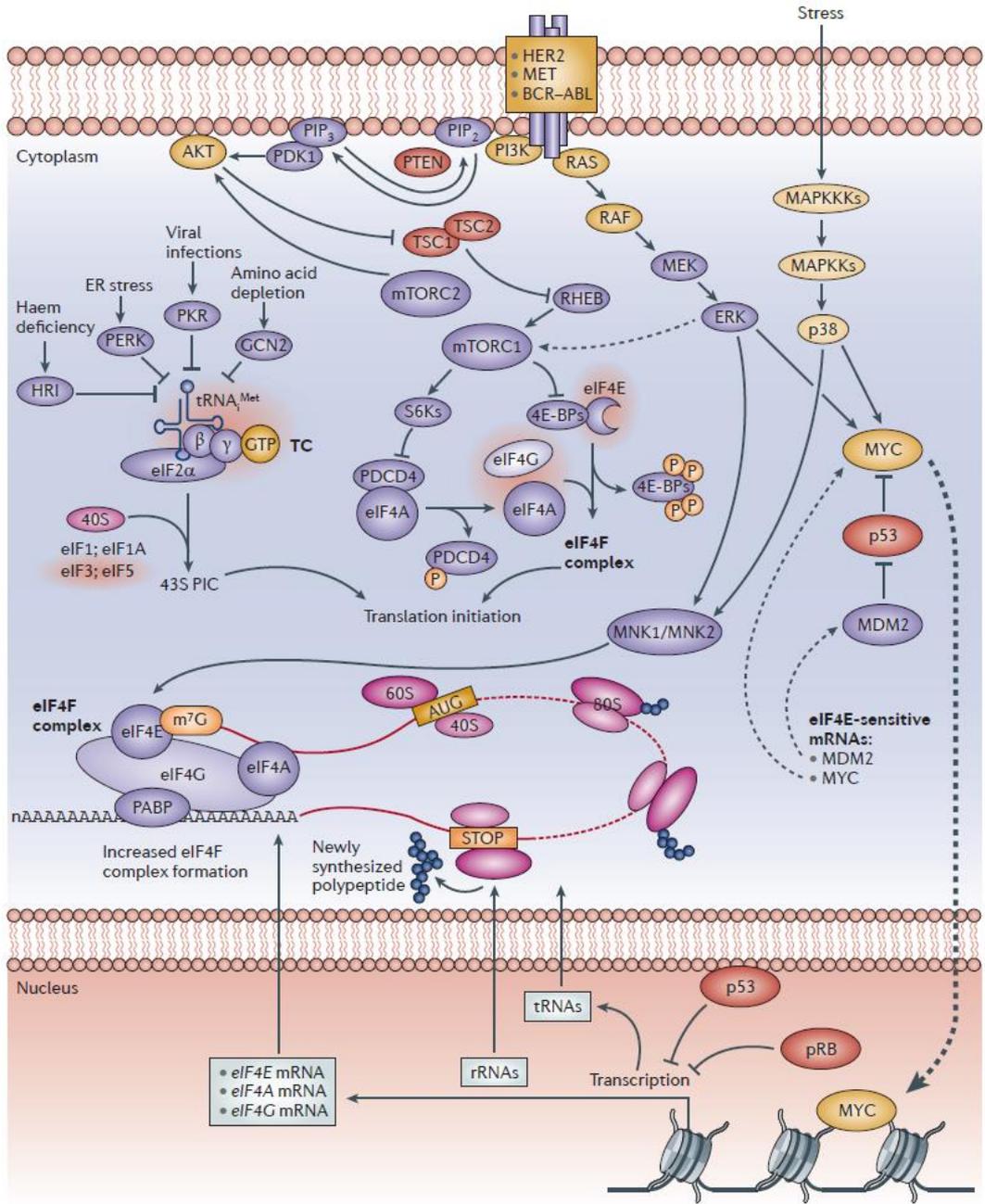
Tradução e carcinogénese

- Desregulação da tradução induz proliferação, sobrevivência, angiogénese, alterações na resposta imune, resistência à terapia

Mutações em cancro afectam tradução:

1. Aumentam tradução por cap
2. Activam vias alternativas

Aumento tradução de oncogenes, diminuição tradução genes supressores tumor



Bhat, 2015

Factor	Dysregulation	Clinical correlates in cancers
eIF4E	Overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased survival in breast, head and neck, liver, prostate, bladder and stomach cancers • Correlates with disease progression and aggressive subtypes in many cancers, and with resistance to chemotherapy
eIF4E	Phosphorylation	<ul style="list-style-type: none"> • Elevated in early stages of development of breast, colon, gastric and lung cancers • Increased in prostate cancer and correlates with androgen independence • Poor-prognosis marker in non-small-cell lung cancer
4E-BP1	Overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Inversely correlates with tumour grade • Correlates with better survival in lung and prostate cancers • Correlates with absence of lymph node and distant metastases in gastric cancer
4E-BP1	Loss	Possibly responsible for loss of translational control in 50% of pancreatic tumours
4E-BP1	Phosphorylation	Correlates with tumour grade and poor prognosis in breast, lung, ovarian and prostate cancers
eIF4G	Increased expression	<ul style="list-style-type: none"> • Amplification correlates with aggressive stages in lung cancer • Overexpressed in inflammatory breast cancer and cervical cancer • Correlates with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma
eIF4A	Increased expression	Overexpressed in lung and cervical cancer; lowered expression after radiation predicts better survival in cervical cancer
PDCD4	Decreased expression	<ul style="list-style-type: none"> • Associated with poor prognosis in breast, lung, colon and ovarian cancers and gliomas • Inversely correlated with advanced tumour stage in renal cell carcinoma
eIF2 α	Increased expression	Correlates with aggressive lymphoma subtypes
eIF5A	Increased expression and hypusination	Correlates with poor prognosis in early-onset colorectal cancer. Overexpression of eIF5A2 correlates with local invasion in non-small-cell lung cancer and hepatocellular carcinoma
eIF6	Altered expression and function	<ul style="list-style-type: none"> • Regulates ribosome biogenesis and 40S–60S joining. Promotes transformation and lymphomagenesis • Elevated in colorectal cancer, head and neck carcinomas and ovarian serous carcinoma; low expression correlates with reduced disease-free survival in ovarian serous carcinoma; mediates lymphomagenesis in Shwachman–Diamond syndrome
eIF3a	Increased expression	Associated with breast, cervical, oesophageal, lung and stomach cancers
eIF3b	Increased expression	Associated with bladder, breast and prostate cancers
eIF3c	Increased expression	Associated with meningioma and testicular seminoma
eIF3h	Increased expression	Associated with breast, colon, liver and prostate cancers
eIF3i	Increased expression	Associated with breast, head and neck, and liver cancers, as well as melanoma and neuroblastoma
eIF3m	Increased expression	Associated with colon cancer
eIF3e	Decreased expression	Associated with breast, lung and prostate cancers
eIF3f	Decreased expression	Associated with breast, colon, small intestine, ovarian, pancreatic and vulval cancers and melanoma

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

1. Disrupção eIF4F

- Inibição eIF4E

Ratinhos – redução do crescimento tumoral

Ensaio clínico (LY2275796)

1. Estabilização (vários tipos de cânceres)
2. Muita toxicidade (junção com irinotecan)

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

1. Disrupção eIF4F

- Impedimento da interação eIF4E-cap

Análogos de cap:

- Cmpdh#33
- 4Ei-1 (torna células cancerígenas pulmão sensíveis a gemcitabina e células de mesotelioma a pemetrexed).

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

1. Disrupção eIF4F

- Impedimento da interacção eIF4E-eIF4G
 - 4EGI-1
 - 4E1RCat
 - 4E2RCat

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

1. Disrupção eIF4F

- Inibição de eIF4A
- Pateamina A: remoção de eIF4A do complexo eIF4F
- Hipuristanol: impedimento interação eIF4A com RNA
- Rocaglate: liga-se a eIF4A, reduz quantidade de eIF4A em eIF4F.

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

1. Disrupção eIF4F

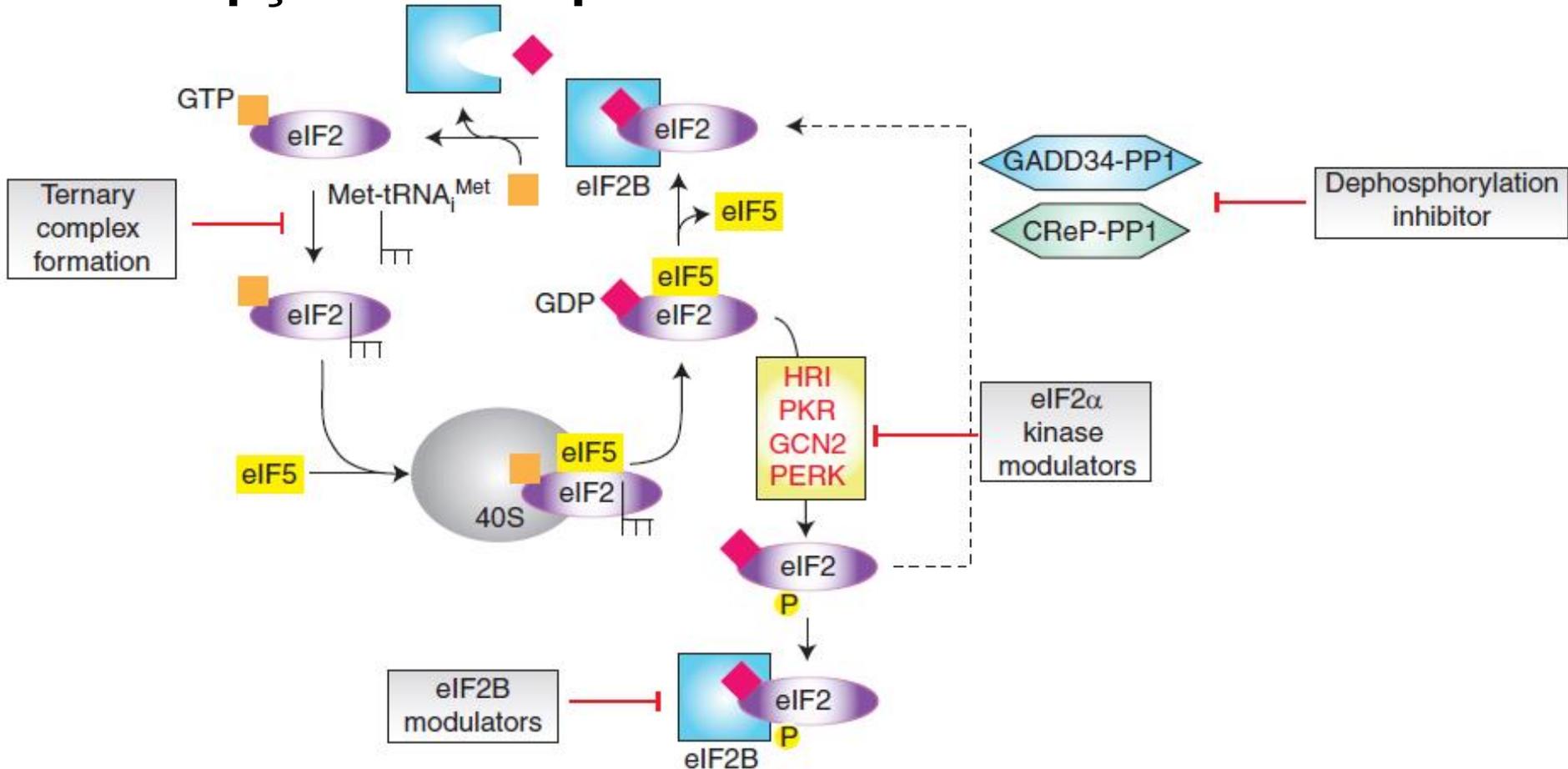
- Inibição de eIF4G

- BI-69A11

- SBI-756

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

2. Disrupção do complexo ternário



Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

2. Disrupção do complexo ternário

- GADD34 e CReP defosforilam eIF2 α
- Salubrinal (doenças neurodegenerativas)
- Guanabenz (cancro da mama – diminuição proliferação, sobrevivência, invasão)

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

2. Disrupção do complexo ternário

Compostos que aumentam fosforilação de eIF2 α

- Flavonoides
- Genisten
- Quercetin

Efeitos citotóxicos em células tumorais *in vitro*

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

2. Disrupção do complexo ternário

Prevenção ligação Met-tRNAⁱ a eIF2

- NSC119889
- NSC119893

Potencial terapêutico de elementos reguladores da tradução

- Direcções futuras
 - eIF4A-eIF4G
 - eIF3
 - eIF4B



That's all Folks!