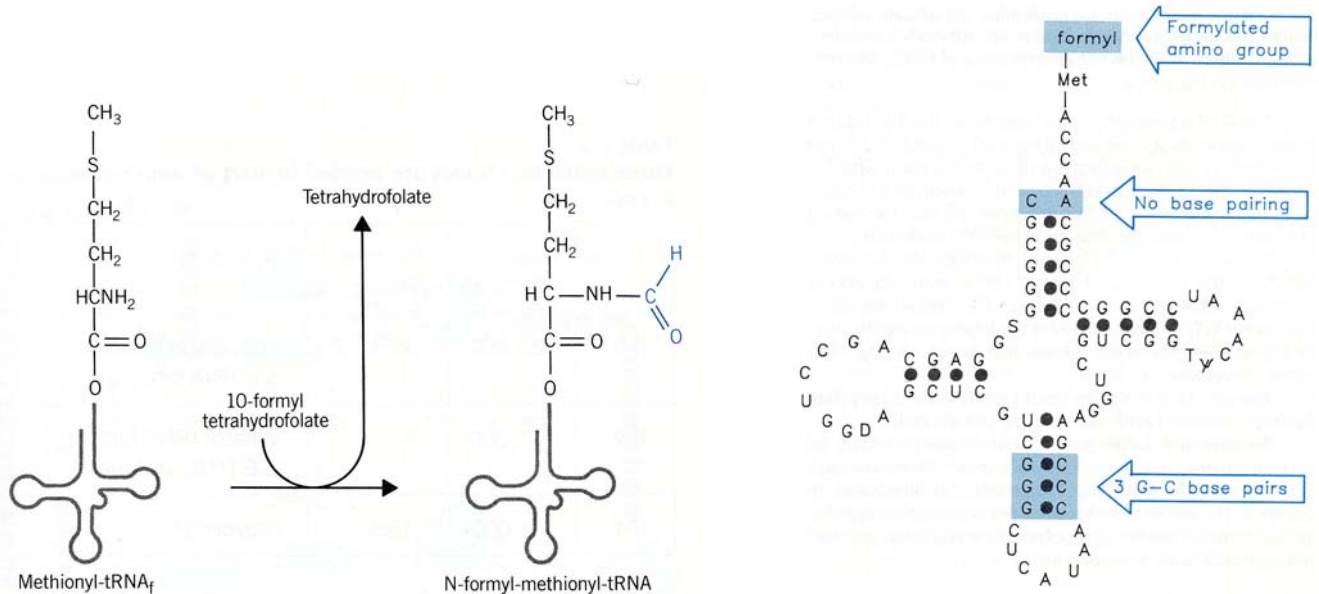
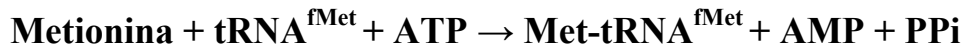
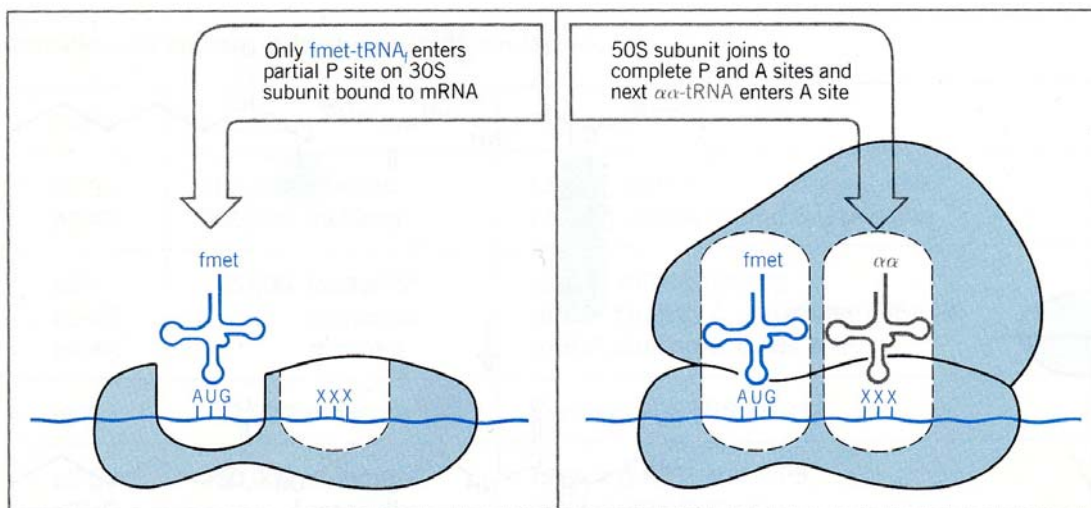


En bacterias, la síntesis de proteínas comienza con el fMet-tRNA^{fMet}

The initiator N-formyl-methionyl-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) is generated by formylation of methionyl-tRNA, using formyl-tetrahydrofolate as cofactor.



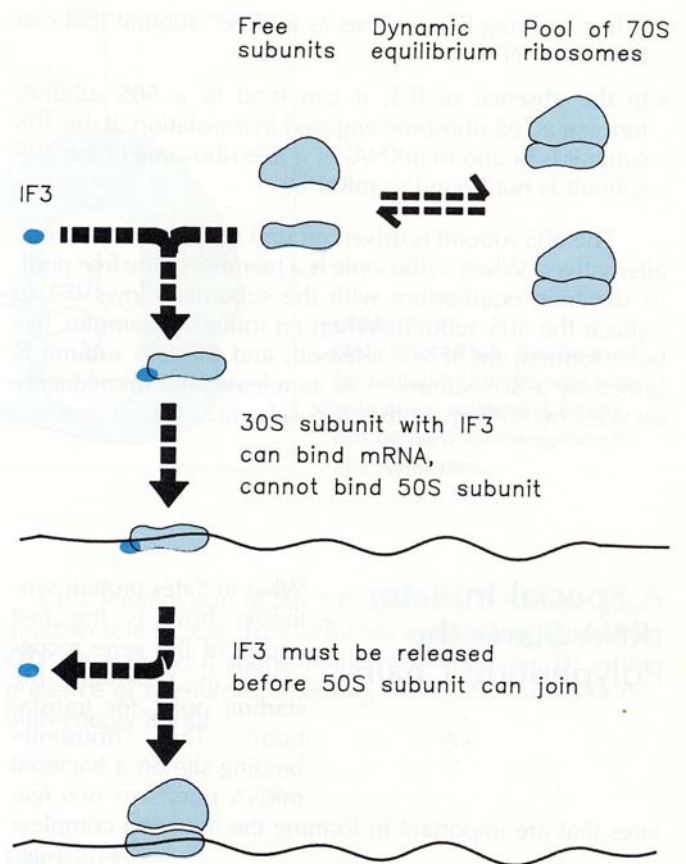
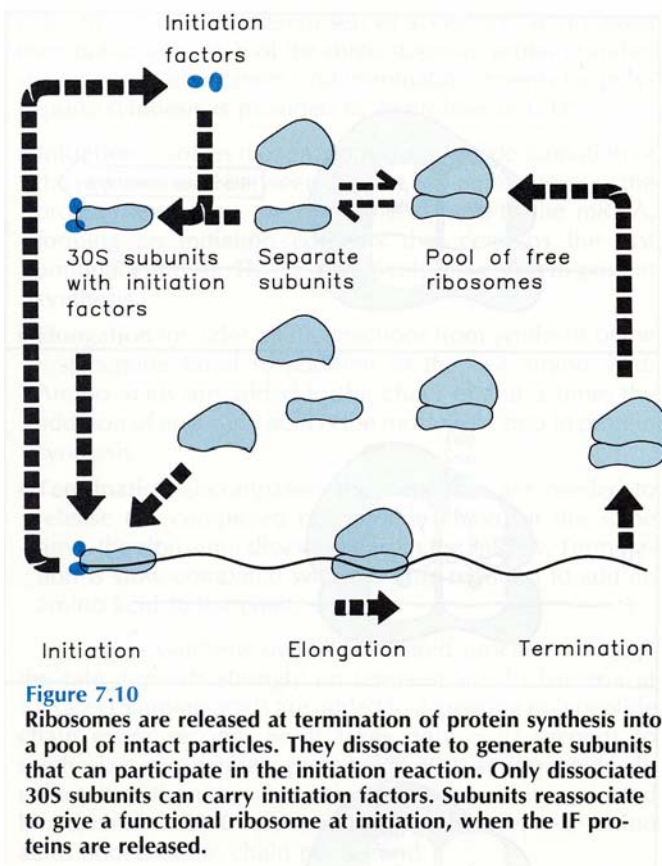
fMet-tRNA^{fMet} has unique features that are required to distinguish it as the initiator tRNA



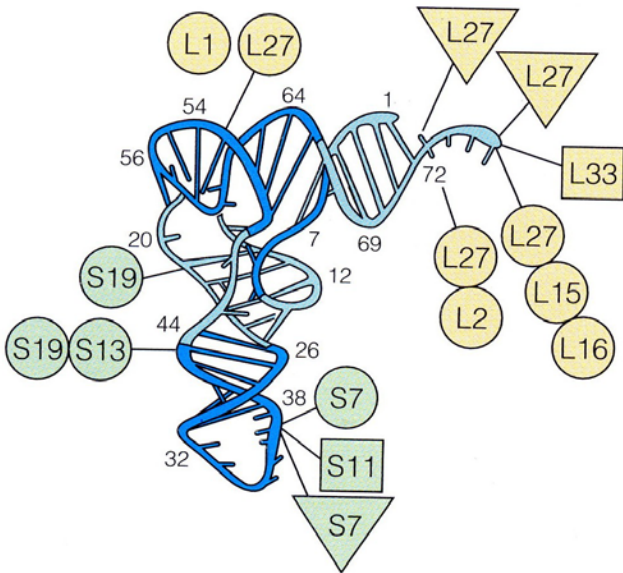
Only fMet-tRNA^{fMet}, can be used for initiation by 30S subunits; only other aminoacyl-tRNAs can be used for elongation by 70S ribosomes

Factores proteicos requeridos para el inicio de la traducción en bacterias

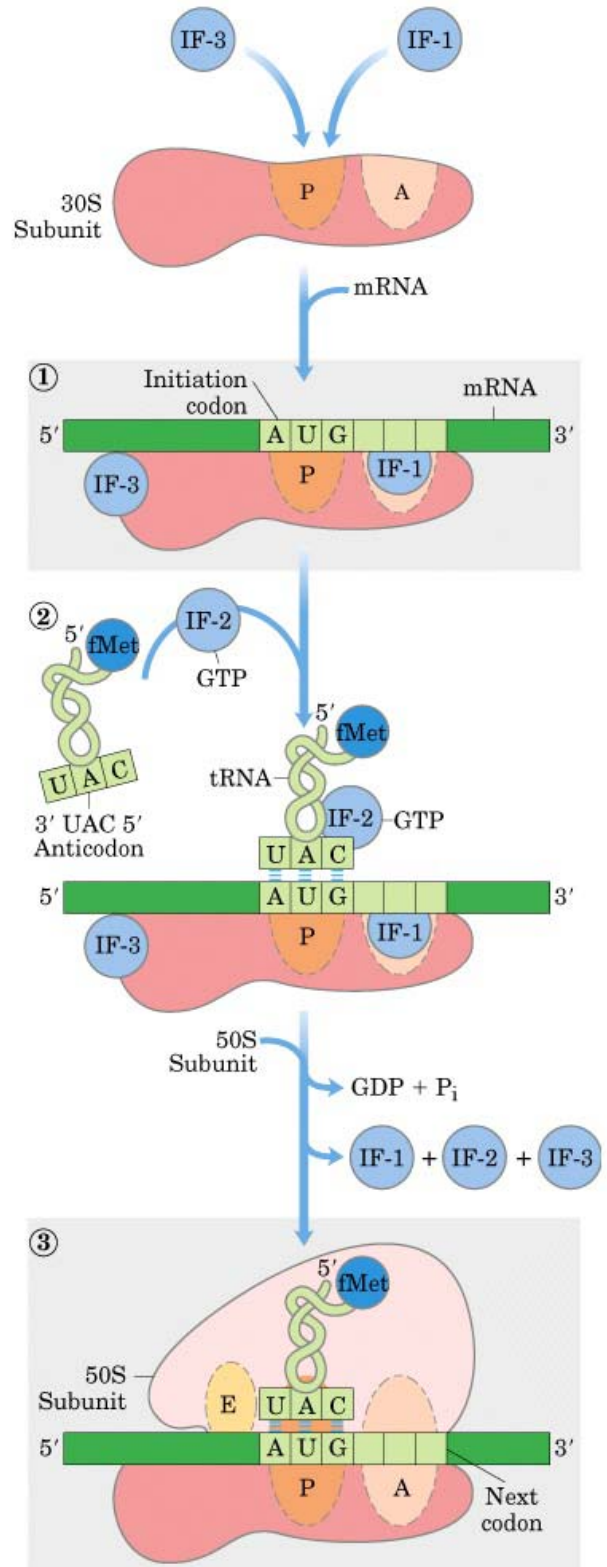
Factor	Función
IF-1	Evita la unión prematura del tRNA al sitio A
IF-2	Facilita la unión de fMet-tRNA ^{fMet} a la subunidad ribosómica 30S
IF-3	Se une a la subunidad ribosómica 30S; impide la asociación prematura de la subunidad 50S; mejora la especificidad del sitio P hacia fMet-tRNA ^{fMet}



Fase de iniciación



Ambiente de los tRNA en el ribosoma tal como se determina por entrecruzamiento. Se muestran los entrecruzamientos desde las posiciones definidas de nucleótidos en el tRNA hacia las proteínas. Las proteínas se entrecruzaron diferencialmente dependiendo de la situación del tRNA (triángulos, sitio A; círculos sitio P; cuadrados sitio E; S = subunidad pequeña; L = subunidad grande)



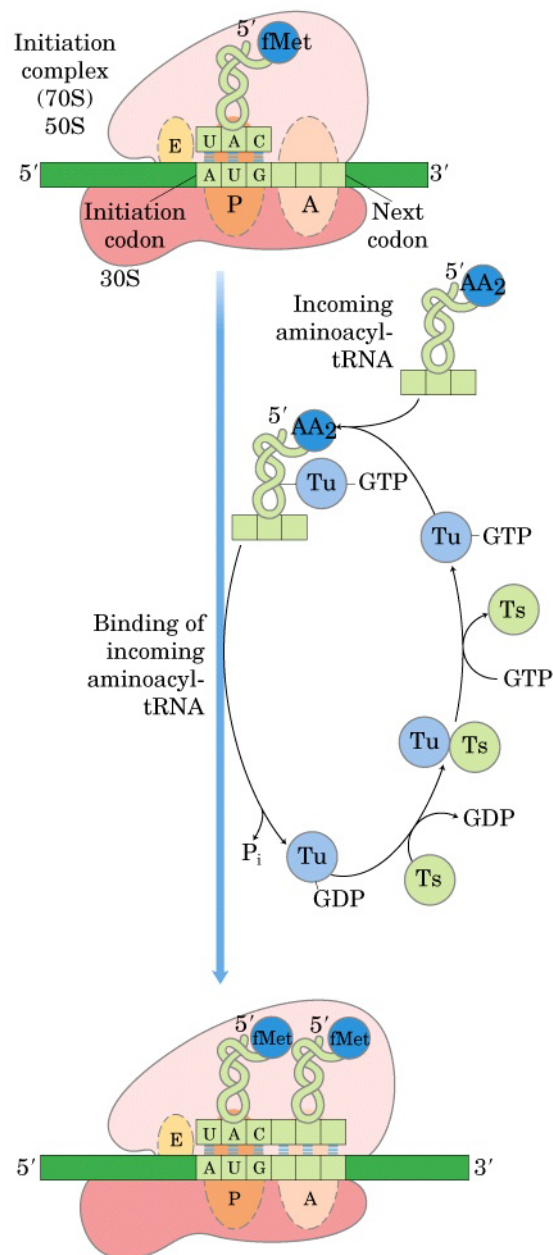
Elongación

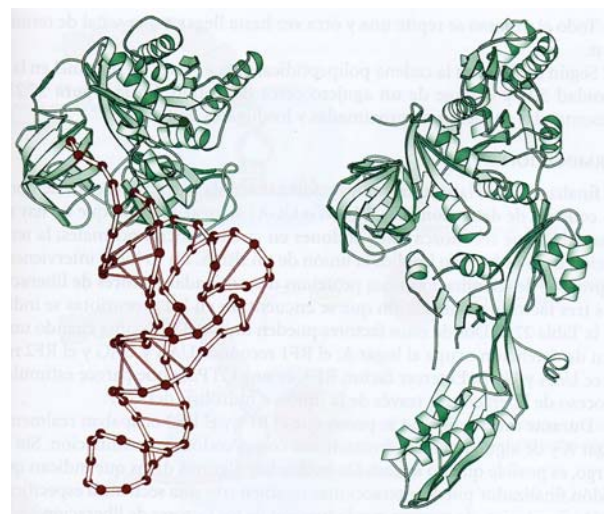
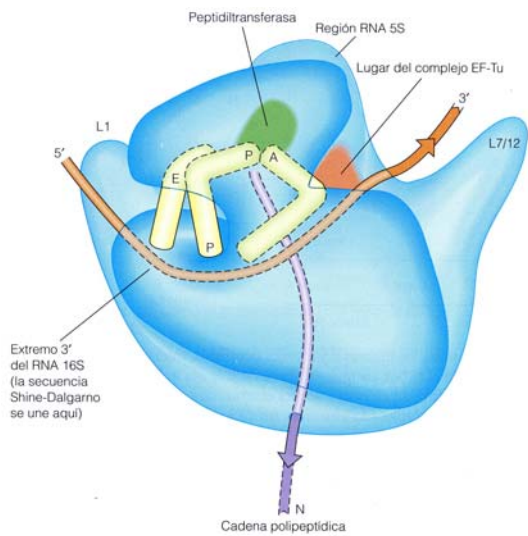
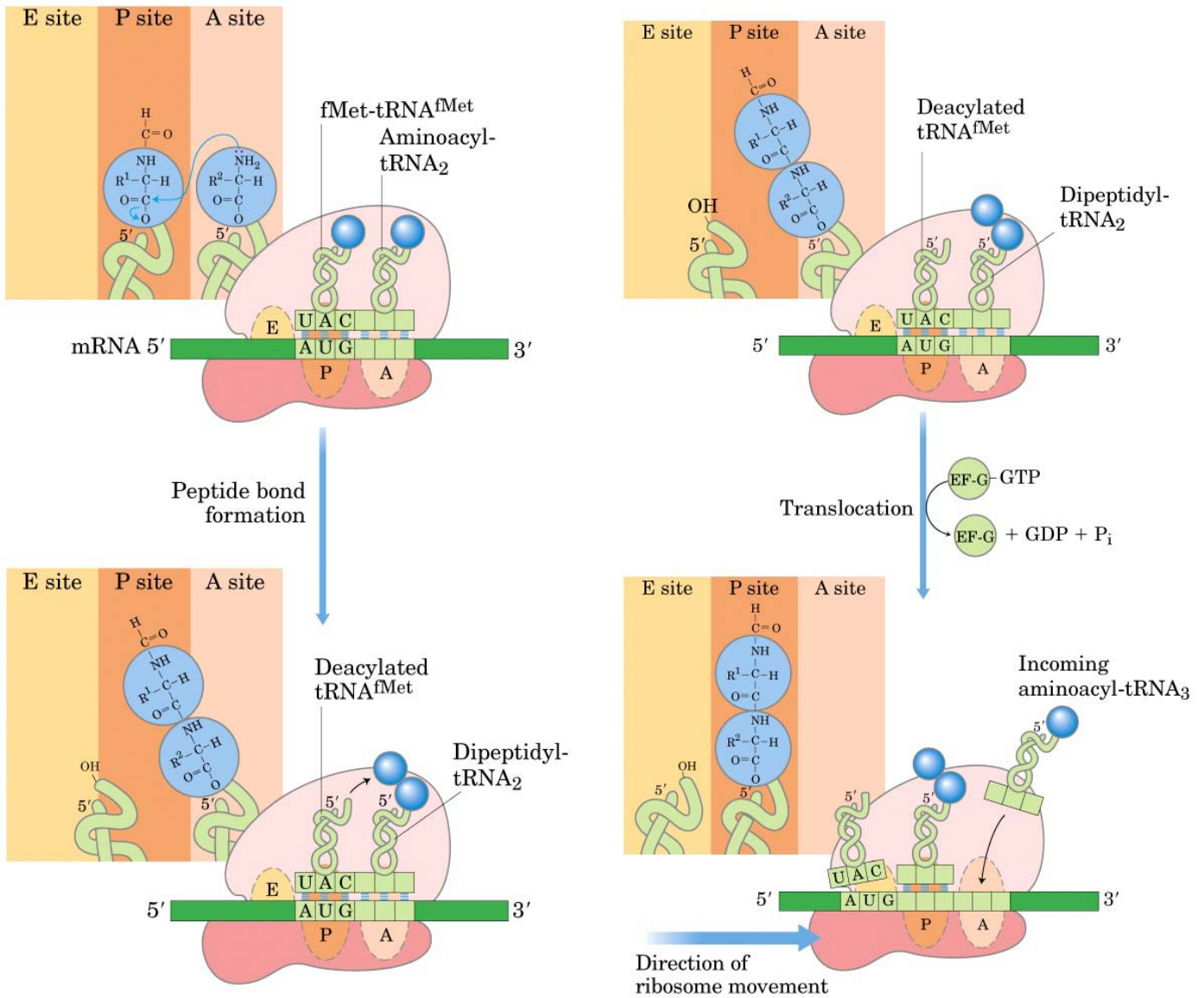
Aminoacyl-tRNA utilization requires two protein factors.

Factor	Coded by	Mass	Molecules /Cell	Function	Inhibitor
EF-Tu	<i>tufA, tufB</i>	43,225	70,000	binds aminoacyl-tRNA & GTP	kirromycin
EF-Ts	<i>tsr</i>	74,000	10,000	binds EF-Tu by displacing GDP	

translocation requires an elongation factor.

Factor	Coded by	Mass	Molecules /Cell	Function	Inhibitor
EF-G	<i>fus</i>	77,444	20,000	binds ribosome & GTP	fusidic acid

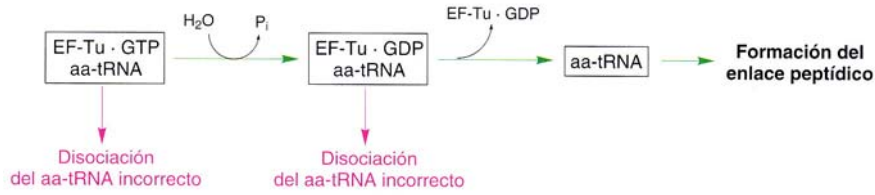




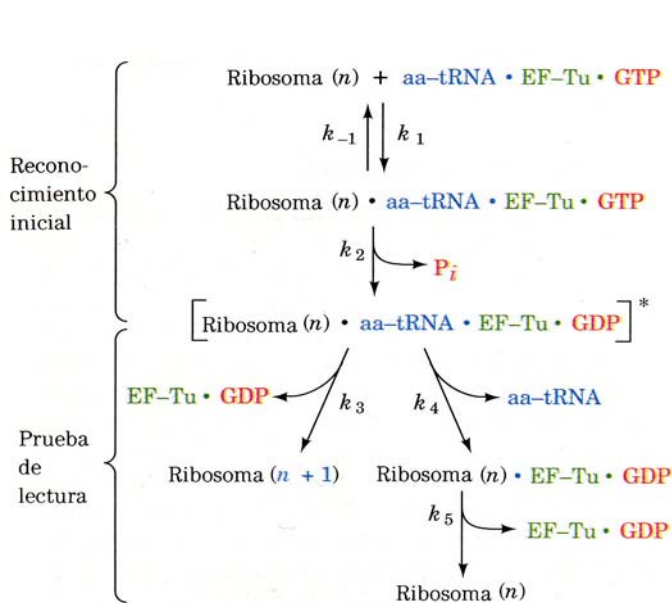
Presentación esquemática de las regiones funcionales del ribosoma. Para dibujar la situación de los sitios del tRNA se muestran ocupados los tres lugares, aunque esto no se produce nunca durante la síntesis de proteínas. Esta imagen tiene de frente la subunidad 30S y detrás la 50S.

Semejanza estructural sorprendente entre el factor de translocación EF-G (derecha) y el complejo ternario aa-tRNA-EF-Tu-GTP (izquierda). La proteína se presenta de color verde y el RNA de color marrón.

La velocidad GTPasa del factor EF-Tu establece el ritmo de la síntesis proteica y determina su fidelidad

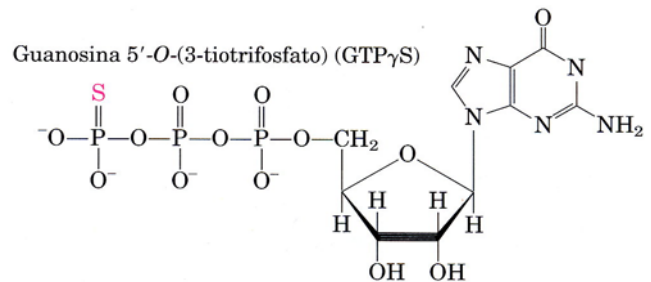


La comprobación del aminoacil-tRNA que ocupa el lugar A del ribosoma tiene lugar antes y después de la hidrólisis del GTP unido a EF-Tu. Los aminoacil-tRNAs incorrectos se disocian del lugar A (etapas representadas en rojo), mientras que el aminoacil-tRNA correcto permanece unido y se forma el enlace peptídico (flechas en verde).



$$f = \frac{K_1}{K_2} = \frac{e^{-\Delta G_1^{\circ'}/RT}}{e^{-\Delta G_2^{\circ'}/RT}} = e^{-\Delta\Delta G^{\circ'}/RT}$$

En donde $-\Delta\Delta G^{\circ'} = \Delta G_1^{\circ'} - \Delta G_2^{\circ'}$ es la diferencia entre las energías libres de unión de las dos sustancias. Por tanto; para una diferencia de $\approx 12 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $f \approx 100$. Sin embargo, el factor observado experimentalmente es de 10^4



¿ Con qué precisión deben seleccionarse los aminoacil-tRNAs?. En el transcurso de la evolución, se ha seleccionado una frecuencia de error de unos 10^{-4} por residuo de aminoácido para producir el mayor número de proteínas funcionales en el menor tiempo posible.

$$p = (1 - \epsilon)^n$$

p = probabilidad de formar una proteína sin errores

n = número de residuos de aminoácidos

ϵ = frecuencia de inserción de un aminoácido erróneo

Precisión de la síntesis proteica			
Frecuencia de inserción de un aminoácido incorrecto	Probabilidad de síntesis de una proteína sin error		
	Número de residuos de aminoácido		
	100	300	1000
10^{-2}	0,366	0,049	0,000
10^{-3}	0,905	0,741	0,368
10^{-4}	0,990	0,970	0,905
10^{-5}	0,999	0,997	0,990

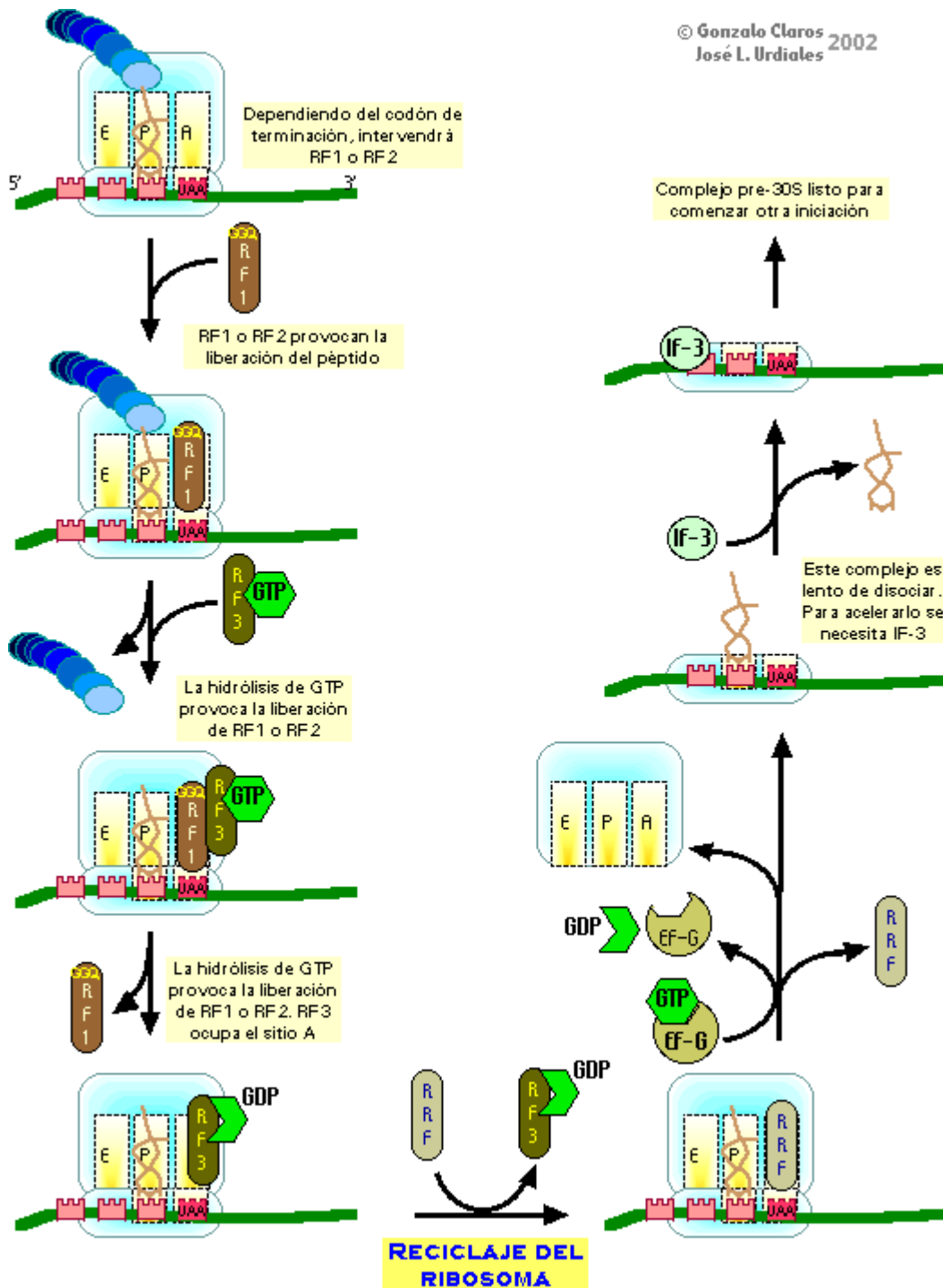
La síntesis de proteínas se termina por medio de factores de liberación que leen los codones STOP.

En bacterias cuando un codón de terminación ocupa el sitio A, tres factores de liberación; RF1, RF2 y RF3 contribuyen a: 1) Hidrólisis del enlace peptidil-tRNA terminal. 2) Liberación del polipéptido y 3) Disociación del ribosoma 70S.

-RF1 reconoce los codones UAG y UAA y RF2 reconoce los codones UGA y UAA

-RF3 es una GTPasa y no está bien caracterizado

Terminación y reciclaje del ribosoma



Mimetismo molecular

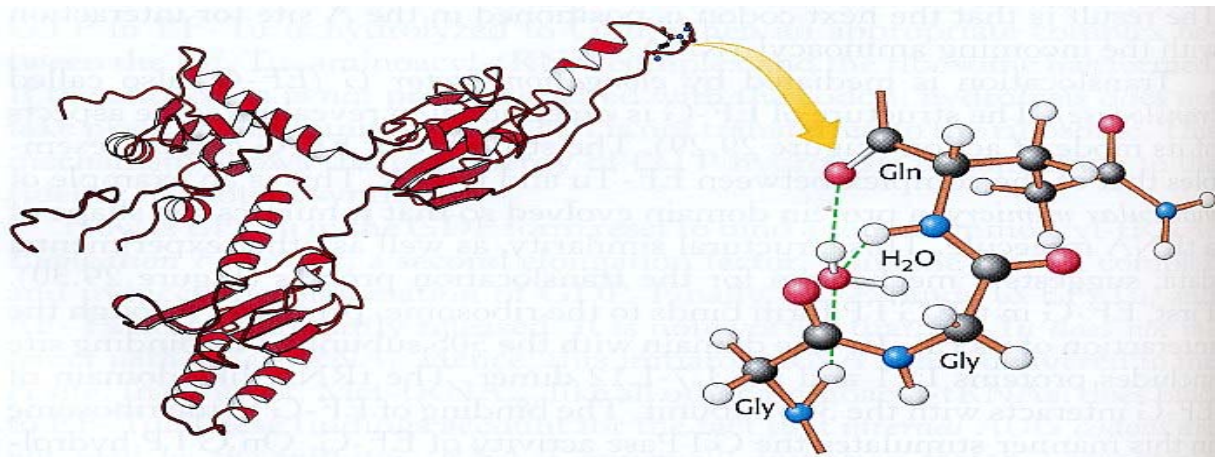
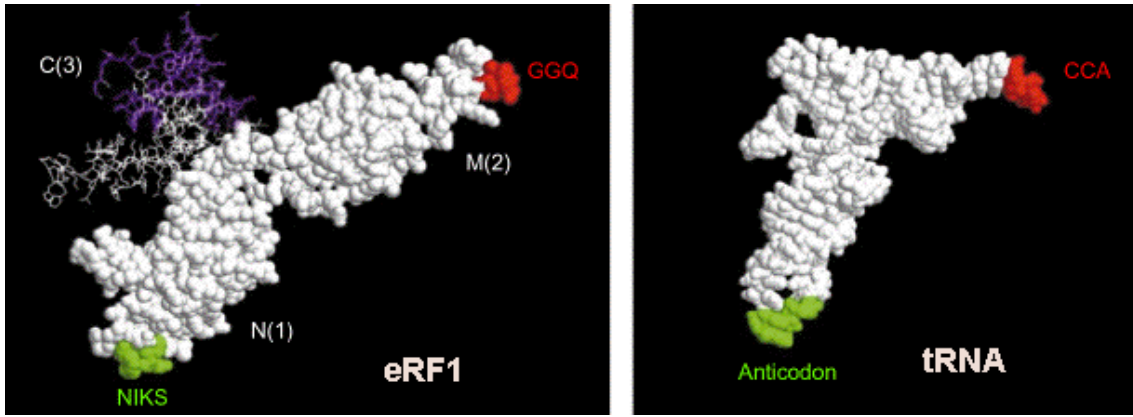


FIGURE 29.31 Structure of a release factor. The structure of a eukaryotic release factor reveals a tRNA-like fold. The acceptor-stem mimic includes the sequence Gly-Gly-Gln at its tip. This region appears to bind a water molecule, which may be brought into the peptidyl transferase center. There it can participate in the cleavage of the peptidyl-tRNA ester bond, with the aid of the glutamine residue and the ribosomal catalytic apparatus.

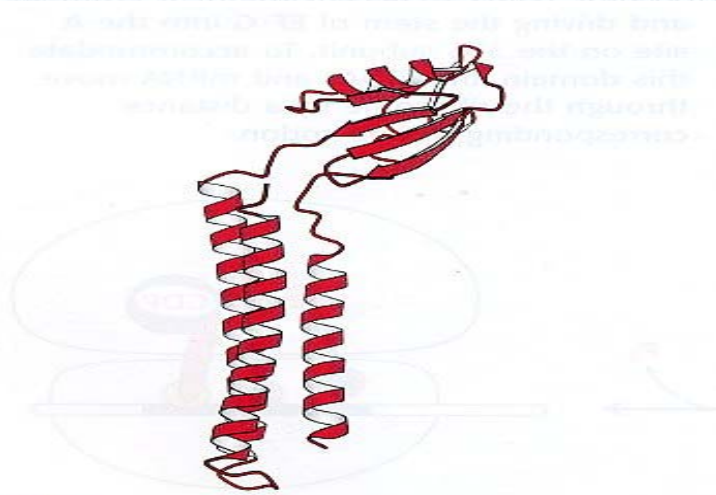


FIGURE 29.32 Structure of ribosome release factor (RRF). RRF is another protein that resembles tRNA. The α helices of this protein mimic the tRNA structure. In contrast, in EF-G, β strands are the mimics, revealing an independent evolutionary origin.

Rates and energetics of translation

At 37° C, the rate of translation in *E. coli* is about 15 amino acids per second.

The translational rate is equivalent to the transcriptional rate which is ~45 nucleotides per second.

Energy cost for synthesis of a protein with N amino acids:

2N	<u>ATPs to charge tRNA (ATP → AMP + PP_i → AMP + 2P_i)</u>
1	<u>GTP for initiation (IF2)</u>
N-1	<u>GTPs to position tRNA for N-1 peptide bonds (EF-Tu)</u>
N-1	<u>GTPs for N-1 translocation steps (EF-G)</u>
1	<u>GTP for termination (RF-3)</u>
<hr/>	
4N	

Total of 4 high-energy phosphate bonds cleaved per amino acid

Each ATP or GTP cleavage generates ~40 kJ/mol

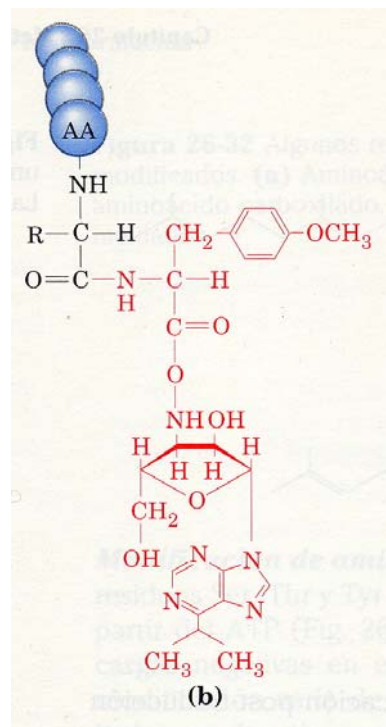
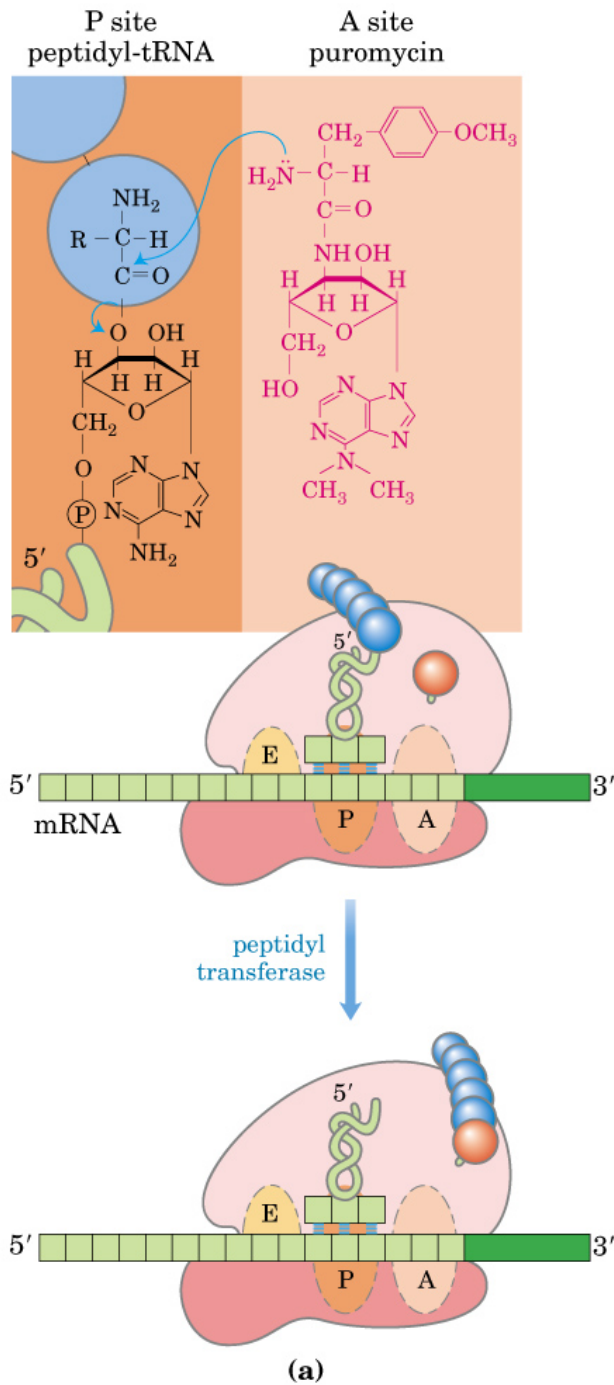
Each peptide bond costs ~160 kJ/mol in the cell, yet an uncatalyzed chemical reaction to form a peptide bond costs only ~20 kJ/mol.

Why is it so costly to make a peptide bond on a ribosome?

The excess energy is used for generating an accurate, defined polypeptide sequence, not a random one or a combination of multiple possibilities.

Two sources of errors during translation:

- Attachment of an incorrect amino acid to a tRNA
- Mispairing of the tRNA anticodon with the mRNA codon



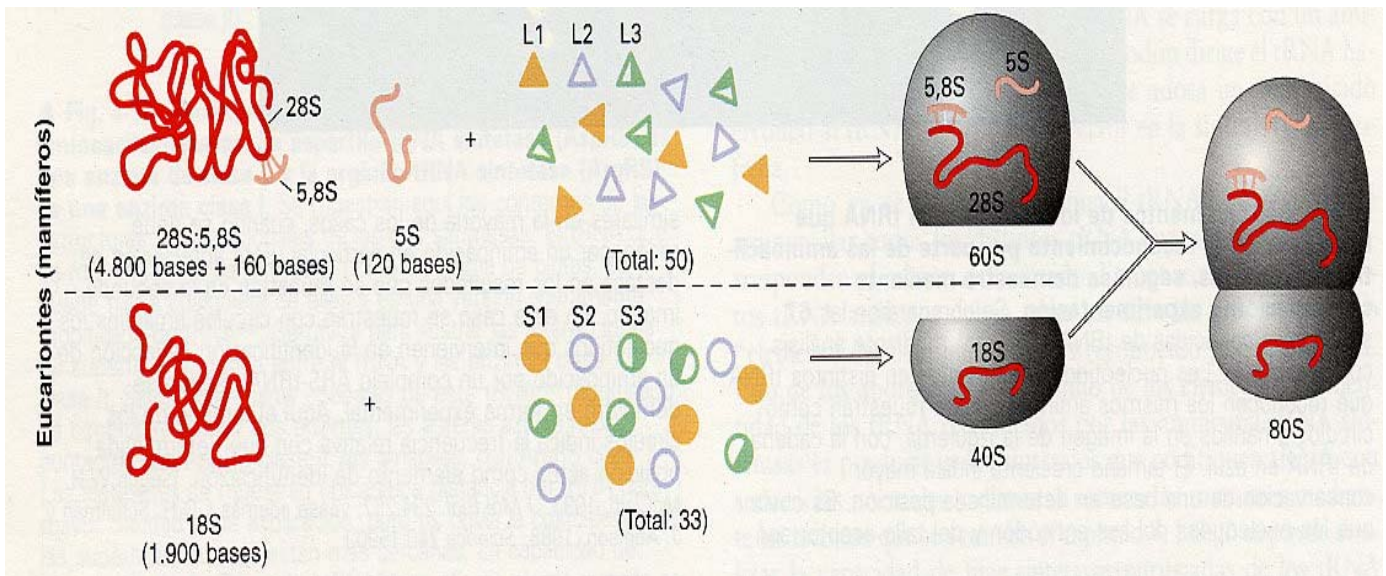
Formación de un enlace peptídico por la puromicina. **(a)** El antibiótico puromicina se parece al extremo aminoacilo de un tRNA cargado, pudiendo fijarse al sitio A del ribosoma y participar en la formación de un enlace peptídico. El producto de esta reacción, en lugar de ser translocado al sitio P, se disocia del ribosoma, provocando la terminación prematura de la cadena. **(b)** peptidil puromicina.

Algunos inhibidores de los ribosomas

Inhibidor	Acción
Cloranfenicol	Inhibe la peptidil transferasa de la subunidad grande procariótica
Cicloheximida	Inhibe la peptidil transferasa de la subunidad grande eucariótica
Eritromicina	Inhibe la translocación de la subunidad grande procariótica
Ácido fusídico	Inhibe la elongación en los procariotas al impedir la disociación de EF-G·GDP de la subunidad grande
Puromicina	Un análogo de aminoacil-tRNA que provoca la terminación prematura de cadenas tanto en procariotas como en eucariotas
Estreptomicina	Provoca la lectura equivocada del mRNA e inhibe la iniciación de cadenas en procariotas
Tetraciclina	Inhibe la unión de aminoacil-tRNAs a la subunidad pequeña de los procariotas
Toxina diftérica	Inactiva catalíticamente eEF-2 por ADP-ribosilación
Ricina/abrina	Proteínas vegetales venenosas, que inactivan catalíticamente la subunidad grande eucariótica

Síntesis de proteínas en eucariotas

Ribosomas



Componentes de los ribosomas citoplasmáticos del hígado de rata

	Ribosoma	Subunidad pequeña	Subunidad grande
Coefficiente de sedimentación	80S	40S	60S
Masa (kD)	4220	1400	2820
RNA			
Mayor		18S, 1874 nucleótidos	28S, 4718 nucleótidos
Menor			5,8S, 160 nucleótidos 5S, 120 nucleótidos
Masa del RNA (kD)	2520	700	1820
Proporción de la masa	60 %	50 %	65 %
Proteínas		33 polipéptidos	49 polipéptidos
Masa de las proteínas (kD)	1700	700	1000
Proporción de la masa	40 %	50 %	35 %

Fuente: Lewin, B., *Genes* (3.^a ed.), p. 146, Wiley (1987).

Initiation factors

Initiation factors

- first isolated in the early 1970's from mammalian cells by Schreier and Staehelin
- Assay: cell-free system containing salt-washed rat ribosomal subunits, rabbit globin mRNA, aminoacyl-tRNAs, ATP, GTP and purified translation elongation factors.
- Proteins from a rabbit ribosomal salt wash fraction, which were required to promote globin synthesis *in vitro* were isolated.
- These proteins were purified to homogeneity and shown to be responsible for the binding of initiator Met-tRNA_i and mRNA to ribosomes (Schreier et al., 1977; Trachsel et al., 1977).
- These and further factors isolated in other laboratories and some of their properties are listed in the following table:

Eukaryotic translation initiation factors				
Factor	Earlier name(s)	Function(s)	Mass (kD)	Subunits (kD)
eIF1		Stimulation of Met-tRNA _i and mRNA binding to 40S ribosomes	15	
eIF1A	eIF4C	Stimulation of Met-tRNA _i and mRNA binding to 40S ribosomes	17	
eIF2		Met-tRNA _i binding to 40S ribosomes	130	α (36) β (36) γ (55)
eIF2B	GEF	GDP-GTP exchange on eIF2	270	α (26) β (39) γ (58) δ (67) ε (82)
eIF2C	Co-eIF2A	Stabilization of ternary complex	94	
eIF3		Ribosome dissociation. Stabilization of ternary complex. Stimulation of mRNA binding.	737	a (170) b(116) c (110) d (66) e (48) f (47) g (44) h (40) i (36) j (35) k (25)
eIF3A	eIF6	Ribosome dissociation	25	
eIF4A		mRNA binding.RNA helicase	44	
Ded1		mRNA binding.RNA helicase	65	
eIF4B		mRNA binding.RNA helicase	70	
eIF4E		mRNA binding.Cap recognition	25	
eIF4F	CBP11	mRNA binding. Cap recognition.RNA helicase	270	eIF4E eIF4A eIF4G
eIF4G		mRNA binding. Anchor protein	154	
eIF4H		mRNA binding		
eIF5		Ribosomal subunit joining. Initiation factors dissociation	48	
eIF5B	eIF4D	Ribosomal subunit joining. Initiation factors dissociation	112	
Additional proteins were earlier included in the above list, but their classification as translation initiation factors is questionable				
eIF2A		AUG-dependent Met-tRNA _i binding to 40S ribosomes	65	
eIF3A	eIF6	Ribosome dissociation	25	
eIF5A		Ribosomal subunit joining. Formation of the first peptide bond		

Fase de iniciación en eucariotas

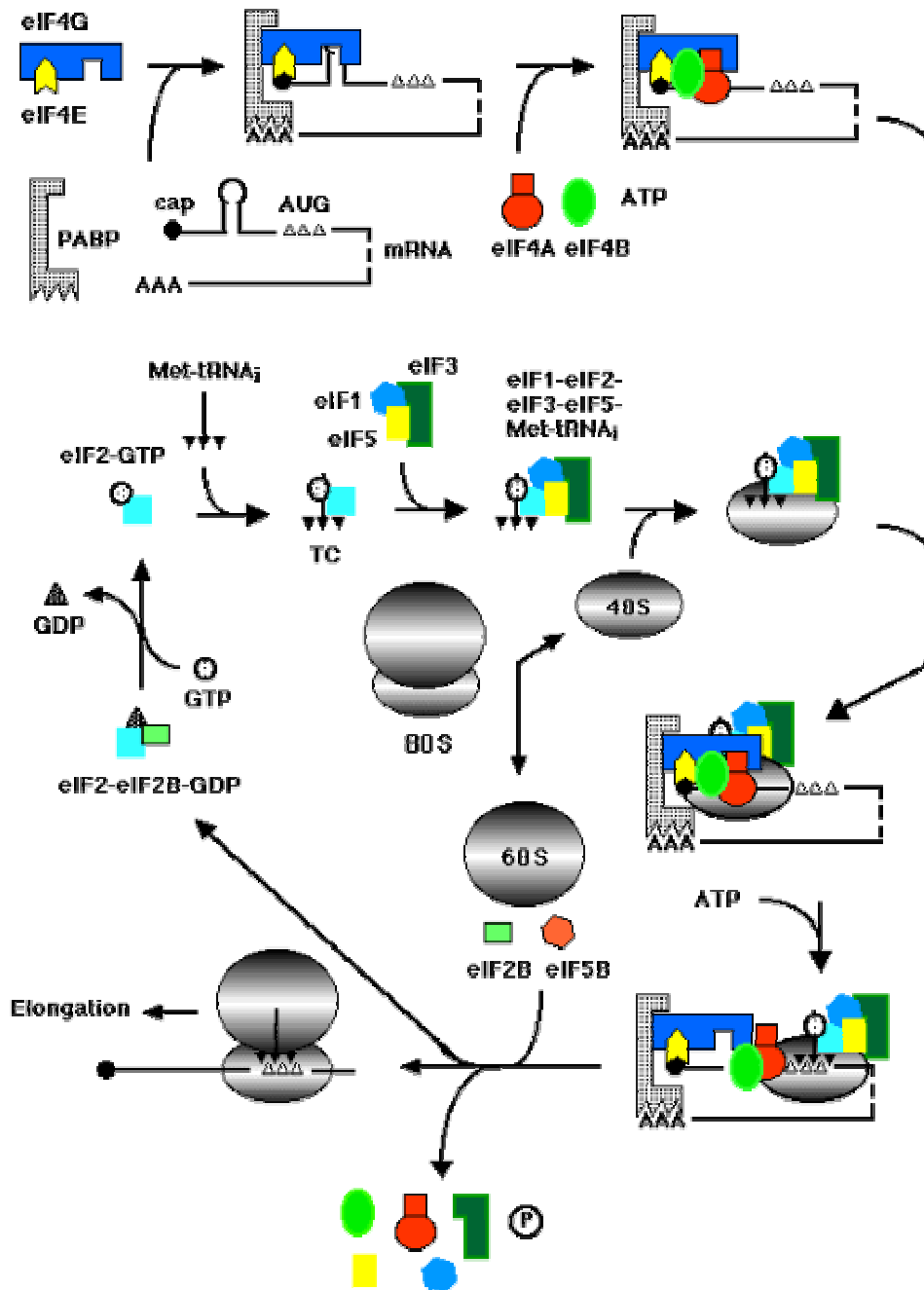
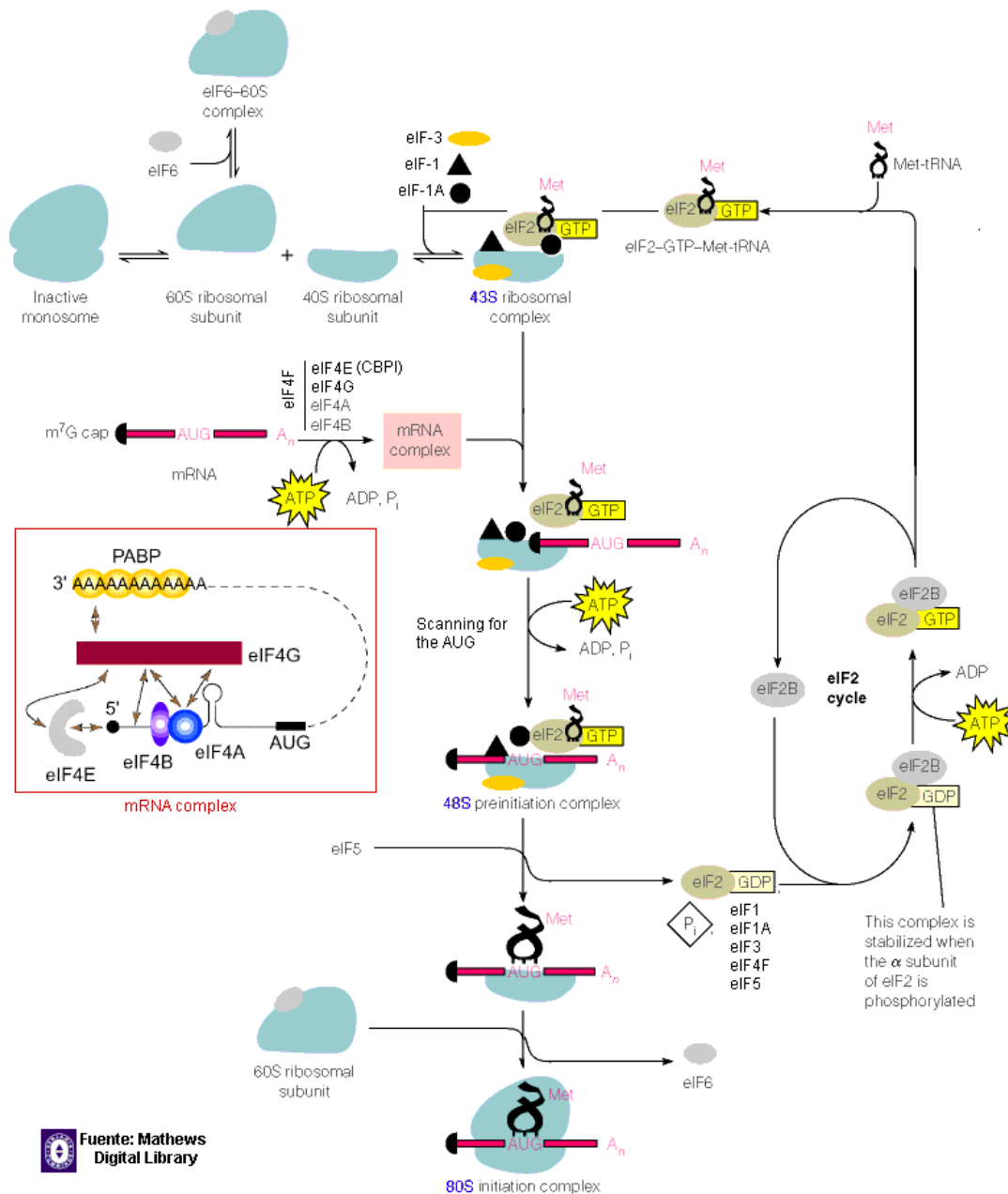


Fig.: Model of cap-dependent translation initiation

The initiation factor eIF4G binds eIF4E and associates with the cap structure and poly(A)-binding protein (PABP) which is itself bound to the poly (A) tail leading to circularization of the mRNA. Recruitment of eIF4A and eIF4B prepares the 5' end of the mRNA for ribosome binding through ATP-dependent local mRNA unwinding (hairpin in the figure). 80S ribosomes dissociate into 40S and 60S subunits, 40S subunits bind a protein complex containing eIF1, eIF3, eIF5 and the ternary complex eIF2-GTP-Met-tRNA_i (TC). The resulting 40S preinitiation complex then associates with the mRNA through interaction of eIF3 with eIF4G at the cap structure. From there the initiation complex moves in the 5' to 3' direction (scanning) and recognizes the AUG initiator codon through AUG-Met-tRNA_i base-pairing. The factors eIF5 and eIF5B then trigger GTP hydrolysis, eIF2-GDP release, ejection of bound factors and joining of the 60S subunit to the 40S initiation complex to form an 80S ribosome competent for polypeptide elongation. GDP/GTP exchange on factor eIF2 is catalyzed by eIF2B.

Inicio en los eucariotas

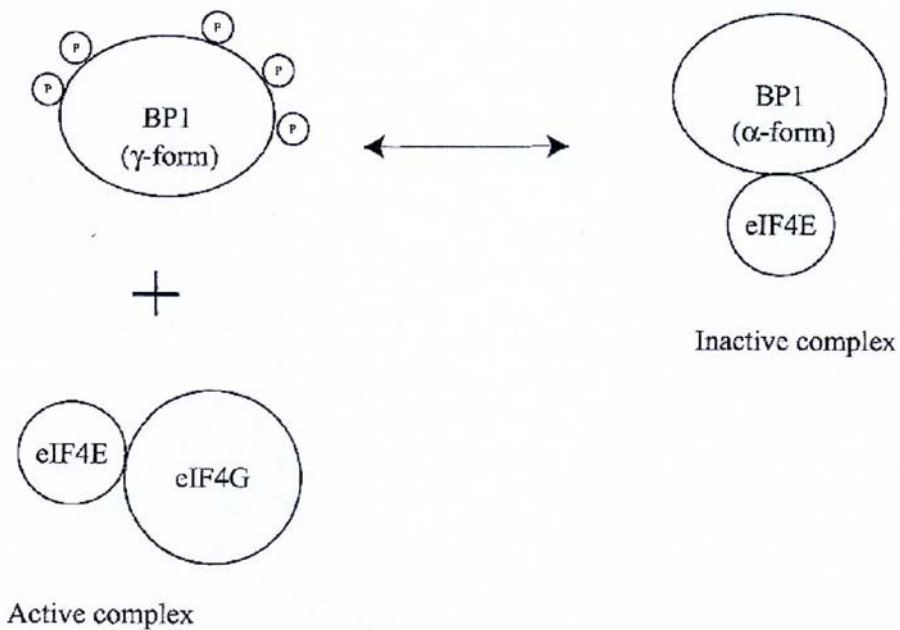


eIF-6 estabiliza la subunidad 60S del ribosoma. eIF-3, eIF-1 y eIF-1A se unen a la subunidad menor. Junto con el aa-tRNA unido a eIF-2, van a formar el **complejo 43S**. Como en procariontes, los aa-tRNA llegan acompañados de un factor (eIF-2) que se reciclará mediante el factor eIF-2B. Gracias a eIF-5B, el Met-tRNAi se coloca correctamente. El mRNA es reconocido por eIF-4E (formado a su vez por los factores 4G, 4A, 4B, 4E) a través de la caperuza. El complejo 43S se une al mRNA/eIF-4F y comienza a rastrear el mRNA desde su extremo 5' en busca del AUG iniciador (normalmente el primero). Este rastreo es necesario para deshacer las estructuras secundarias que se han producido en el traslado del mRNA desde el núcleo hasta el citoplasma. Una vez que lo encuentra se forma el **complejo de iniciación 48S**. eIF-1 y eIF-1A estabilizan este complejo además de catalizar su disociación si este complejo fuera artefactual. eIF-4G sirve de punto de anclaje de formación de todos los factores que componen eIF-4F, además de interactuar con eIF-3 y PABP. eIF-4E reconoce la caperuza. eIF-4A es una ATPasa dependiente de RNA con actividad RNA helicasa cuya misión es relajar los 15 primeros nucleótidos del mRNA, así como ayudar en la migración del ribosoma para buscar el AUG iniciador. En la migración le asiste eIF-4B. eIF-3 podría ser una especie de pinza que, mediante interacciones con eIF-1 y complementariedad con los rRNA, estabiliza el complejo 48S e interacciona con eIF-4G. El mRNA no está unido linealmente al ribosoma, sino formando una estructura circular por la interacción de PABP con eIF-4G. Esta estructura permite una reiniciación de la traducción del mRNA muy eficiente, incluso reciclando el mismo ribosoma. De hecho, la eficiencia de la traducción está estrechamente ligada a la longitud del poli-A. eIF-5 activa la actividad GTPasa de eIF-2 para indicar que el rastreo del AUG ha concluido y liberar todos los factores. Cuando la subunidad mayor se une, se libera eIF-6 y se forma el **complejo de iniciación 80S**, con el Met-tRNAi en el sitio P. El Met-tRNAi, como en procariontes, no se usará luego en la elongación. El Met-tRNAi que ha entrado con eIF-2, como en procariontes, no se usará luego en la elongación a pesar de llevar una Met sin formilar. El GTP unido a eIF-2 se hidroliza por la intervención de eIF-5, y es la señal que indica que se ha encontrado el AUG iniciador, provocando la liberación de todos los factores, incluido los propios eIF-2 y eIF-5. El factor eIF-2 se reciclará mediante el factor eIF-2B con consumo de ATP y es un punto de regulación estrecha. La subunidad mayor 50S unida a eIF-6 —que sirve para mantenerla separada de la subunidad 30S— se asocia a la menor, se desprende eIF-6 y se forma el **complejo de iniciación 80S**, con el Met-tRNAi en el sitio P.

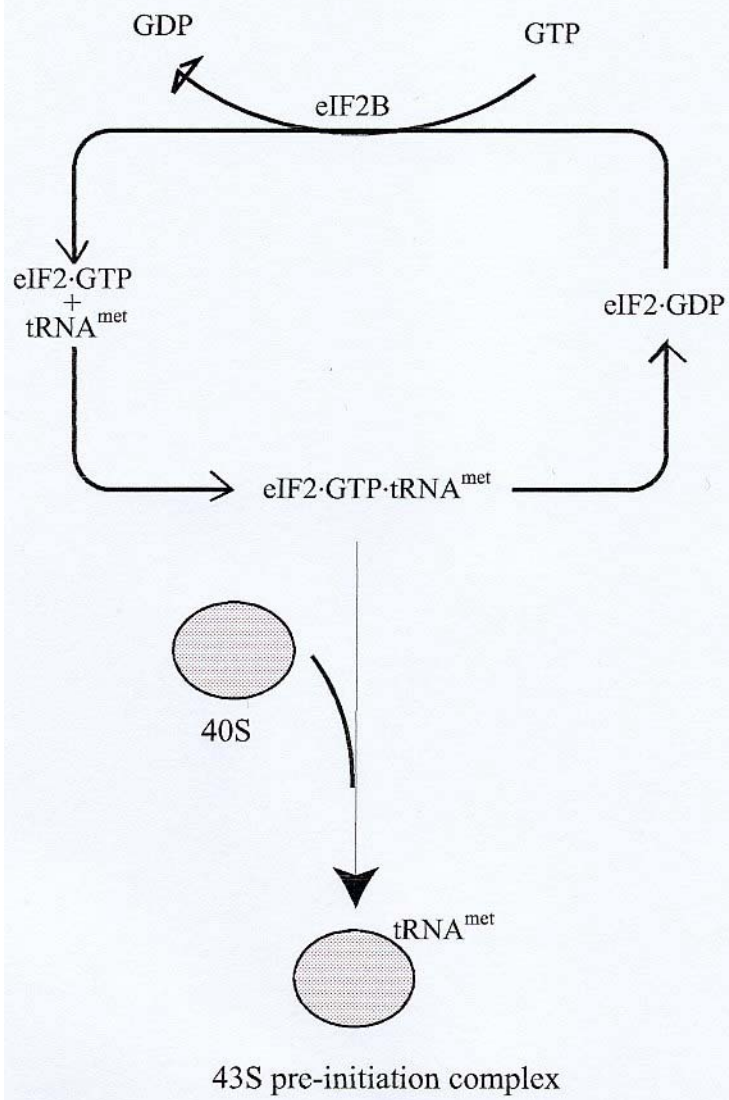
eIF4 regulation

- eIF4F Recognize, unfold and guide the mRNA to the 43S pre-initiation complex
- eIF4A } unwind secondary structures in the 5'-UTR of the mRNA
eIF4B }
- eIF4E cap-binding; the phosphorylated form have increase binding to eIF4G and/or to the 5'-cap
- eIF4G functions as a scaffold for eIF4E, eIF4A and mRNA

- eIF4F-BP1 competes with eIF4G to bind eIF4E, depending on its degree of phosphorylation
- its γ -form, the most phosphorylated, have less affinity for eIF4E
- its α -form, the least phosphorylated, have the highest affinity for eIF4E to form the inactive eIF4E.eIF4E-BP1 complex



eIF2B catalytic cycle

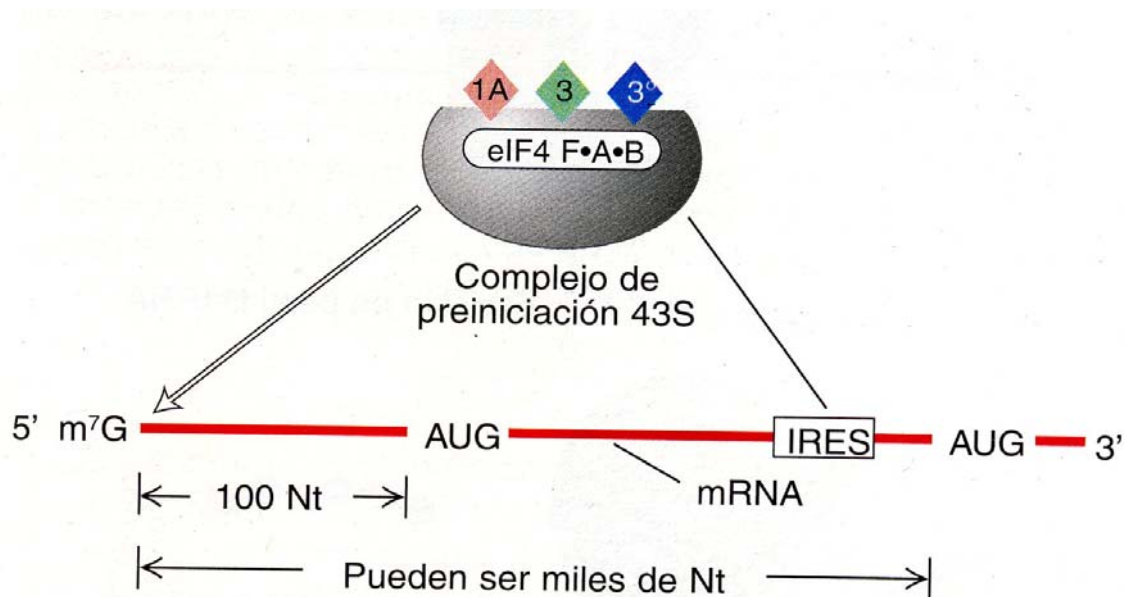


La selección del AUG de inicio se facilita por la acción de secuencias circundantes específicas, denominadas secuencias de **KOZAK**



Las posiciones resaltadas que preceden y que siguen al AUG parece ser las más importantes que afecta la eficiencia de la iniciación, máxima eficacia se consigue cuando ambas posiciones son ocupadas por purinas.

Algunos mRNA virales que son traducidos por los ribosomas de la célula huésped eucarionte carecen del casquete 5', la traducción de estos mRNAs se inicia en **sitios de entrada ribosómicos internos (IRES)**. Actualmente se sabe que algunos mRNAs celulares también se pueden traducir a partir de estos **IRES**.



La iniciación de la síntesis proteica eucarionte puede tener lugar cerca del extremo con casquete 5' y sobre sitios de entrada internos del ribosoma (IRES) de un mRNA. En el primer caso, el complejo de preiniciación 43S se une a la estructura de casquete 5' (m^7G) y luego se desliza a lo largo del mRNA hasta alcanzar un codón de inicio AUG aceptable, por lo general dentro de unos 100 nucleótidos. Con mucho menor frecuencia el complejo de preiniciación se une a un IRES dentro de la secuencia del mRNA, bastante más abajo del extremo 5', y luego lee en dirección de la corriente hasta hallar un codón de inicio AUG. (Nt = nucleótidos)

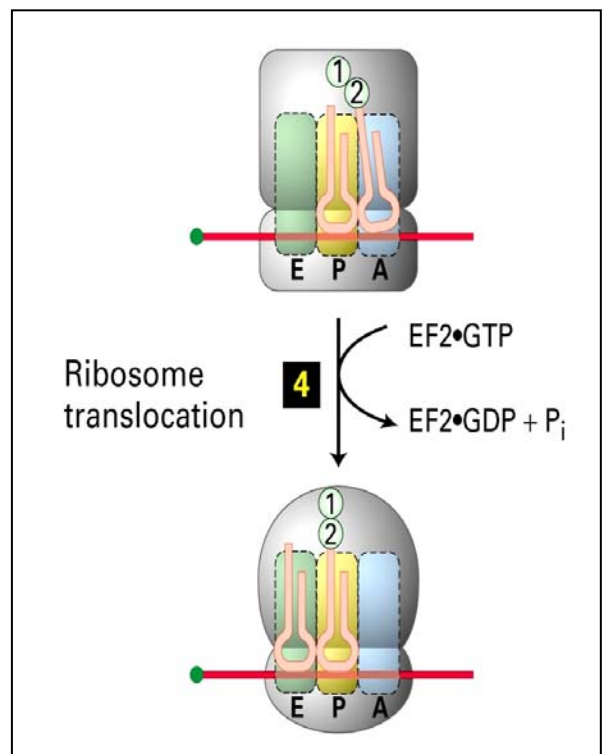
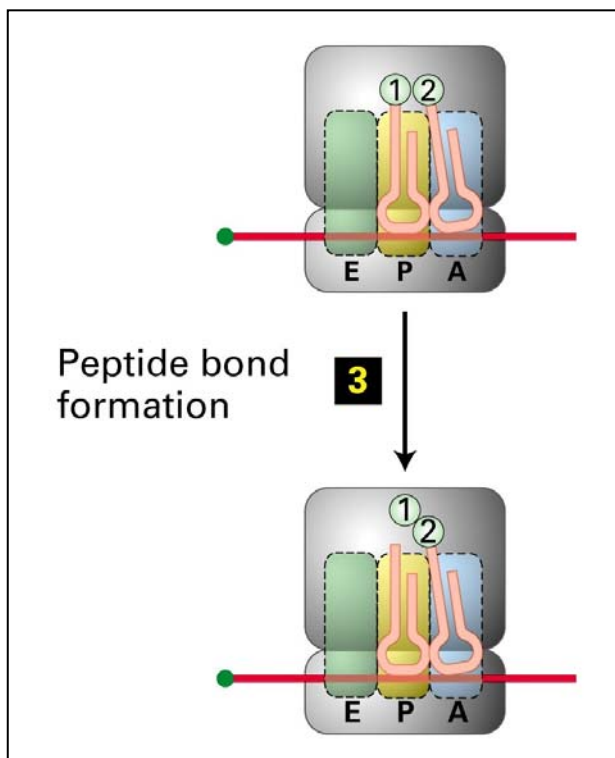
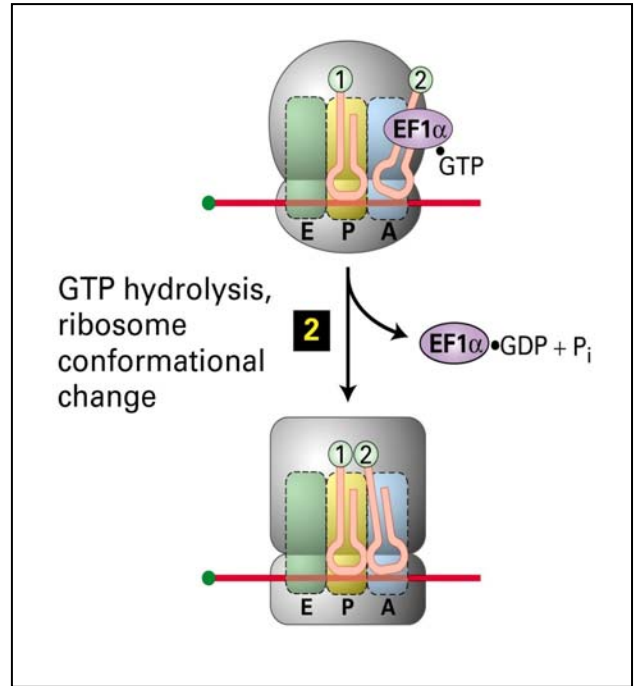
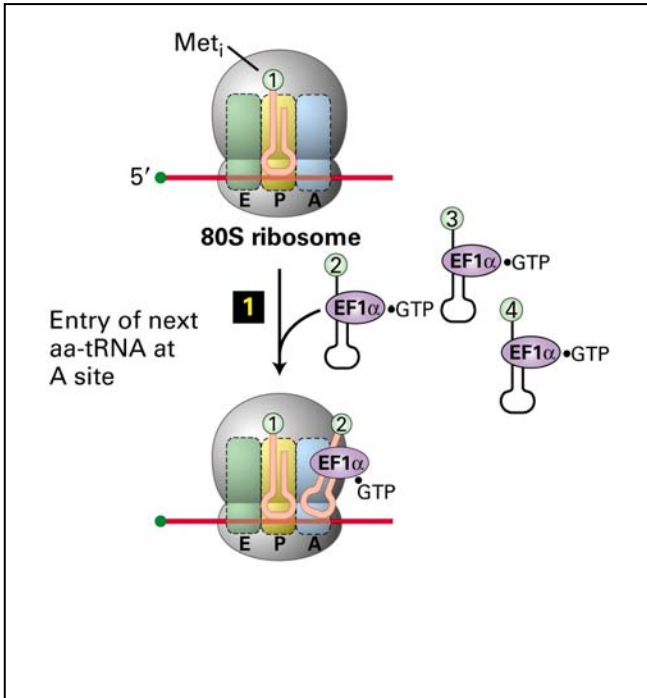
Fase de elongación

Factores de elongación:

eF1 α \rightarrow EF- Tu

eF1 $\beta\gamma$ \rightarrow EF- Ts

eF2 \rightarrow EF- G

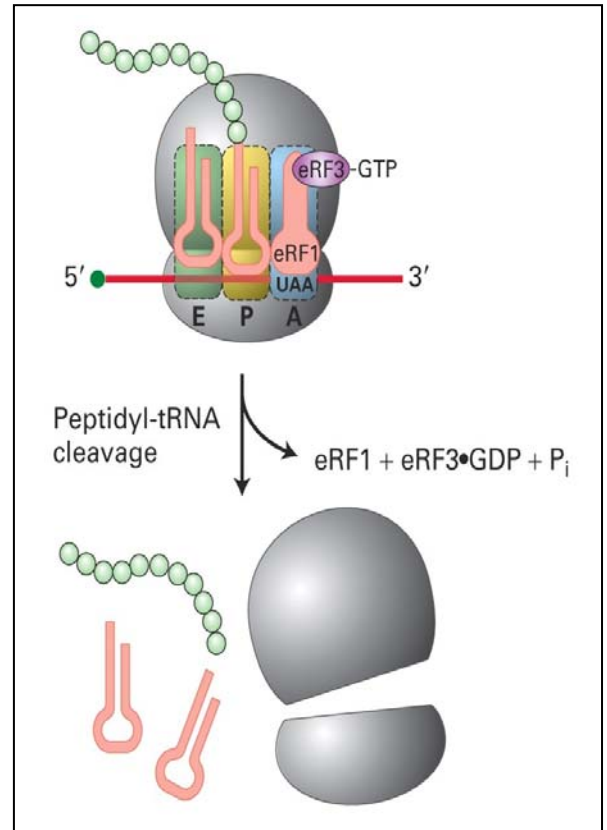
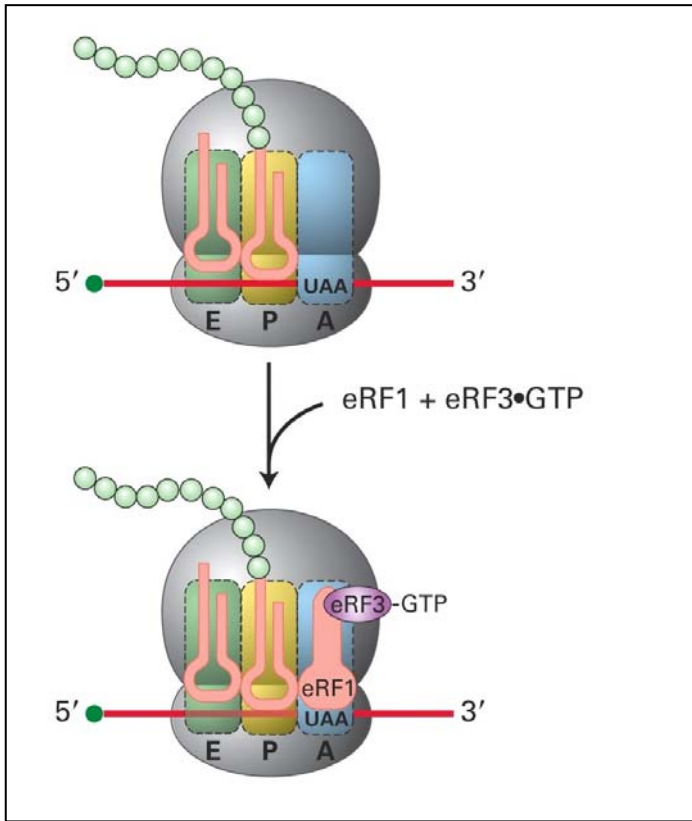


Terminacion

Factores de terminación.

eRF1 → RF1 y RF2

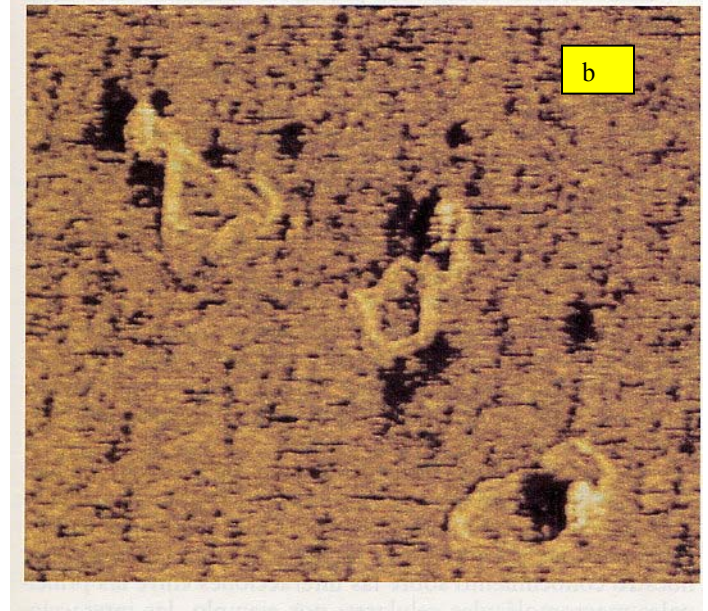
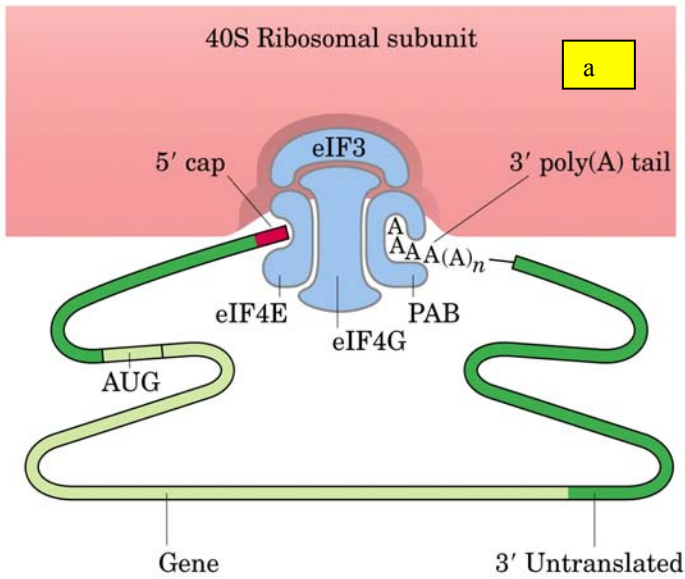
eRF3 → RF3



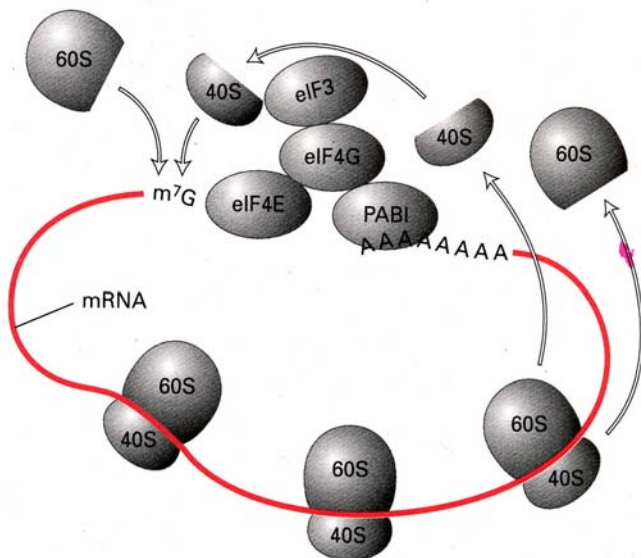
Factores que incrementan la velocidad global de la síntesis proteica

-La traducción simultánea de una única molécula de mRNA por múltiples ribosomas

-El reciclaje rápido de las subunidades ribosómicas después de que se separen del extremo 3' del mRNA



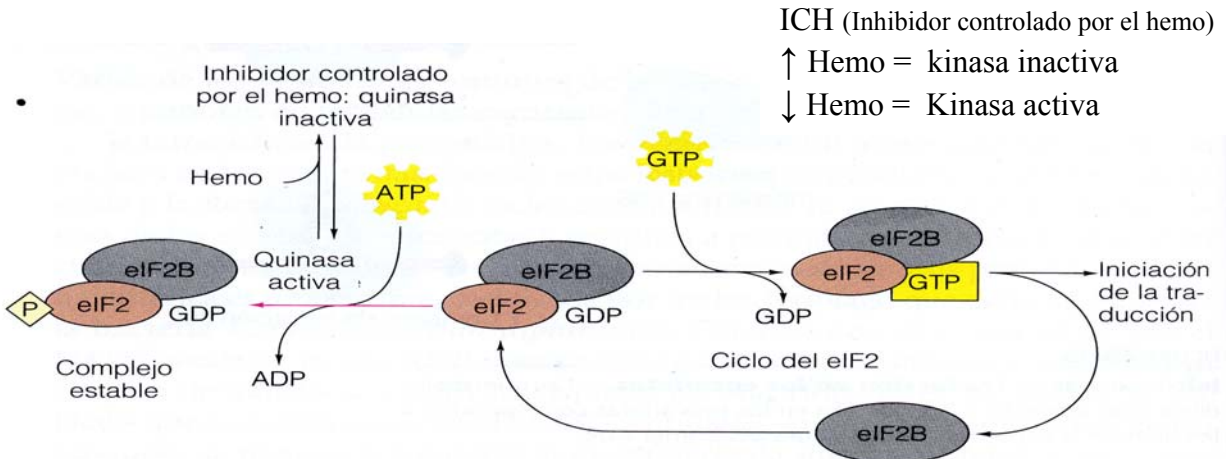
Formación de mRNA circular mediante integraciones entre proteínas que forman un puente entre los extremos 5' y 3'. (a) la proteína fijadora de poli(A) I (PABI) se une a la cola poli(A) 3' sobre un mRNA eucarionte y a las subunidades del factor iniciador eIF4, unidas a la cápsula m^7G del extremo 5' del mRNA. (b) Microfotografías electrónica de campos de fuerza de círculos de mRNA que se mantienen unidos mediante interacciones entre las tres proteínas purificadas descritas en la parte (a).



Modelo de síntesis proteica sobre polisomas circulares y reciclaje de subunidades de ribosoma. Múltiples ribosomas aislados pueden traducir en forma simultánea un mRNA eucarionte, como se muestra aquí en una forma circular estabilizada por interacciones entre proteínas unidas por los extremos 3' y 5'. Cuando un ribosoma completa la traducción y se disocia del extremo 3', las subunidades separadas hallan fácilmente el casquete 5' cercano (m^7G) e inician otra ronda de síntesis. Este rápido reciclaje de subunidades sobre el mismo mRNA contribuye a la formación de polisomas e incrementa la eficiencia de la traducción.

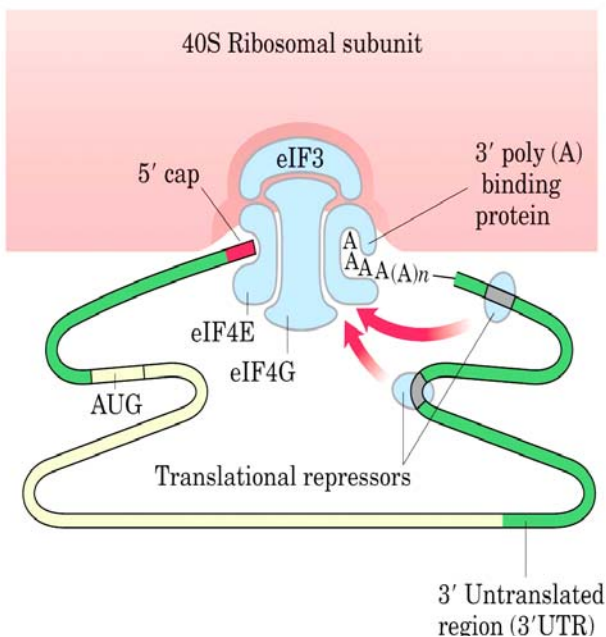
Regulación a nivel de la traducción

1- Los factores de iniciación están sujetos a fosforilación por diversas kinasas. Ejemplo:



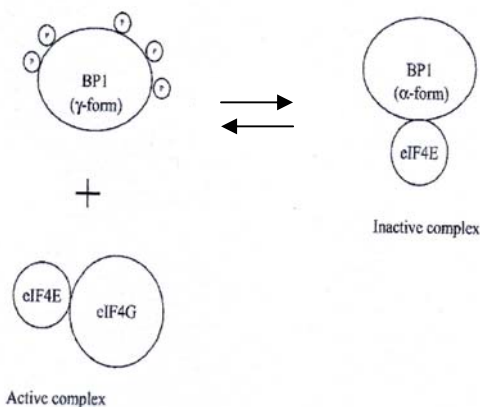
Regulación de la traducción en las células eritropoyéticas por las concentraciones de hemo. Si las concentraciones de hemo caen, la quinasa controlada por el hemo se activa y fosforila el eIF2 (flecha roja). Esto bloquea la traducción mediante la captura de este factor en un complejo estable con el eIF2B. Cuando las concentraciones de hemo son suficientes, la quinasa se inhibe, y se dispone de eIF2 para la iniciación de la traducción.

2- **Represores traduccionales.** Algunas proteínas interaccionan directamente con el mRNA (3' UTR) e interfieren con los factores de iniciación o con la subunidad 40 S



Regulación traduccional de mRNA eucarióticos. Un mecanismo principal para la regulación traduccional en eucariotas implica la unión de represores traduccionales (proteínas de unión al RNA) en sitios específicos de la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA. Estas proteínas interaccionan con factores de iniciación eucarióticos o con el ribosoma para impedir o aminorar la traducción.

3- Algunas proteínas (4E-BP, abreviatura de proteínas de unión a eIF4E) interrumpen las interacciones entre eIF4E y eIF4G



eIF4E-BP1 competes with eIF4G to bind eIF4E, depending on its degree of phosphorylation. Its γ -form the most phosphorylated, have less affinity for eIF4E, its α -form, the least phosphorylated, have the highest affinity for eIF4E to form the inactive eIF4E-eIF4E-BP complex.

Energy Costs of Translation

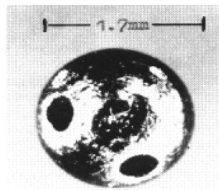
- **Protein synthesis is very expensive**
- **Growing *E. coli*: 90% of ATP**
- **Mammalian cells: variable, but up to 85%**
- **Scoresheet**
- **Two ATPs for charging each tRNA**
- **One GTP for the EF-Tu step**
- **One GTP for the EF-G step**
- **Sum: four high energy phosphates per peptide bond**
- **Initiation costs one GTP**
 - **Initiation in eukaryotes costs a variable number of ATPs (depending on secondary structure of the mRNA)**
- **Termination costs one GTP**

Protein Synthesis, USSR and Terrorists

Ricin is one of the most powerful toxins known. The protein is isolated from Castor bean seeds and depurinates a specific adenine of the 18S rRNA permanently inactivating that ribosome.



Georgi Markov, a Bulgarian dissident, killed by a KGB agent using a ricin filled pellet delivered from the tip of an umbrella. After a few hours Markov developed a high fever, the next day he went into shock and died three days later.



The ricin filled pellet recovered from Georgi Markov's thigh. It is about the size of the head of a pen.