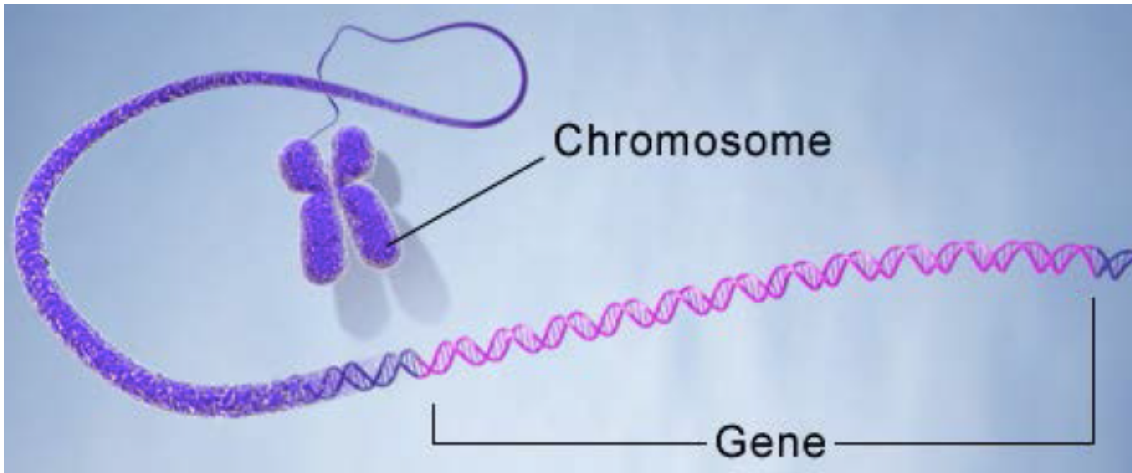


Conceitos de Biologia Molecular

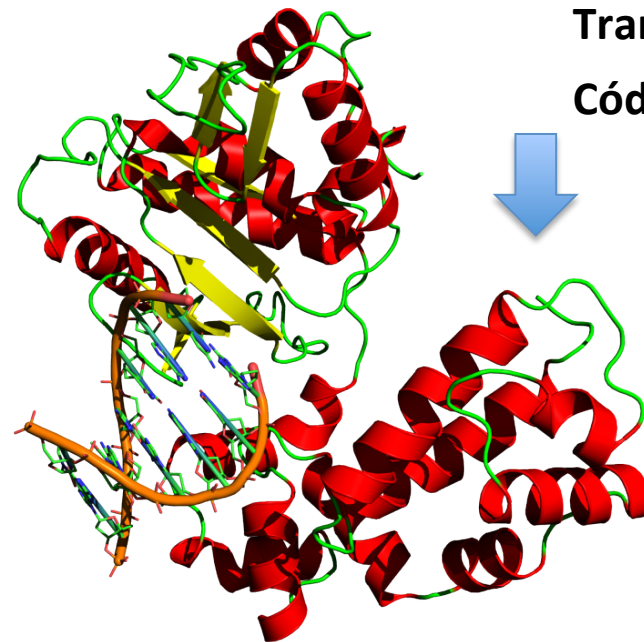
Aula 8- Transcrição

2022



Transcrição
Código Genético

RNA



PROTEÍNA

Células eucarióticas tem muito mais DNA que células procarióticas

Drosófila – 25 x mais que *E.coli*

Célula humana – 600 x mais que *E.coli*. 3×10^9 pares de bases

Genoma eucariótico tem alta proporção de DNA não codificador

~ 2500 genes/mm DNA de *E.coli*

~ 50 genes/mm DNA humano

Introns

Sequências intergênicas

DNA repetitivo

Gene

- **sequência de DNA que inclui todas as sequências de nucleotídios que levam à síntese de um produto (mRNA tRNAs, etc)**
- **É constituído pelas regiões codificantes e as reguladoras.**

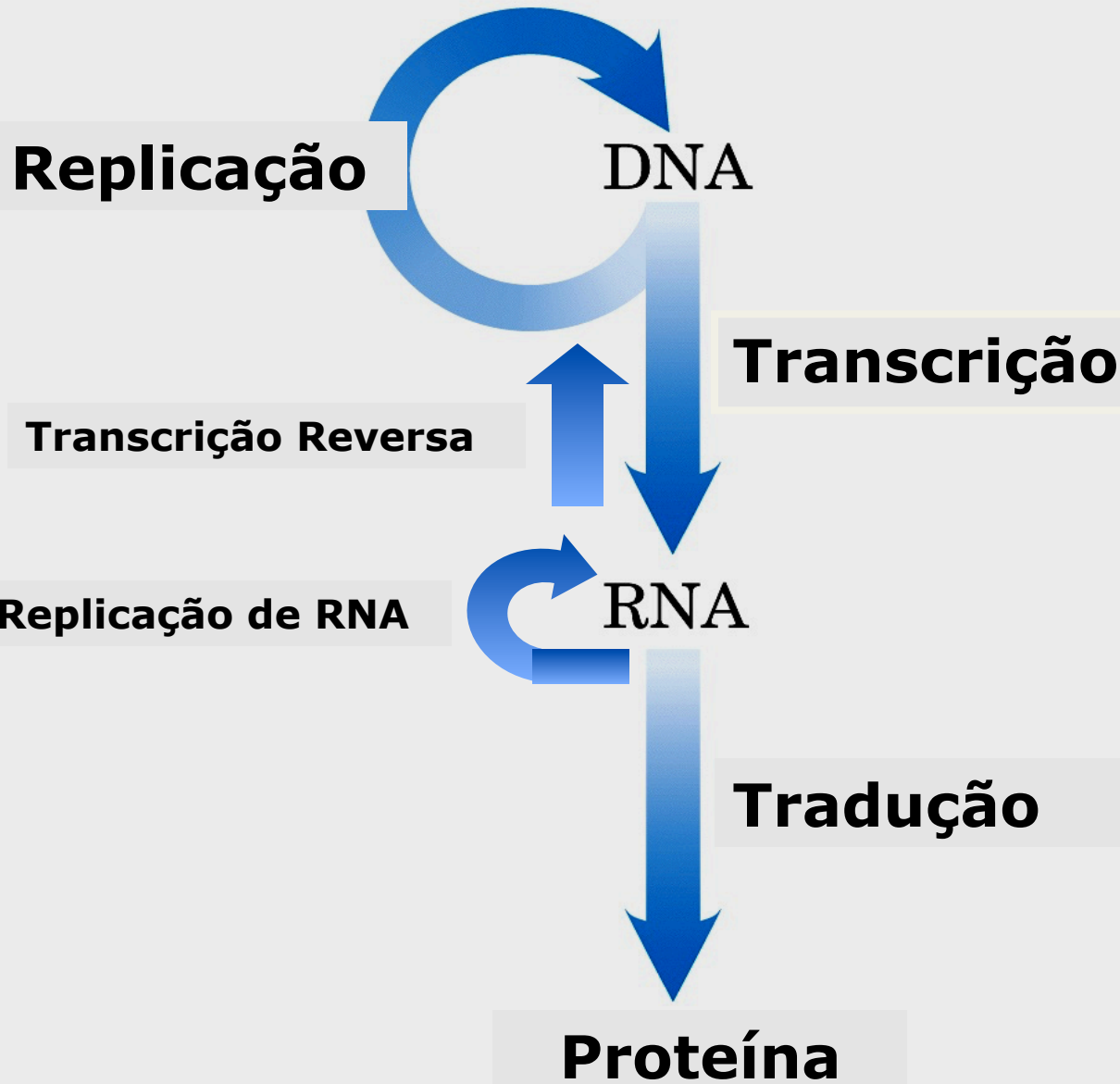
Gene- eucariotos

- Sequências codificantes podem estar interrompidas por sequências sem função de codificadora.
- **Exons**- codificantes- **expressed sequences**
- **Introns**- não codificantes- **intervening sequences**.
- Alguns organismos não apresentam introns (incluindo alguns eucariotos)

Gene

-Genes estão orientados de 5' para 3' (fita codificadora). Esta sequência estará representada no RNA.

-O RNA sintetizado tem a mesma orientação e sequência da fita de DNA codificadora



- Processo para síntese de todos os RNAs da célula

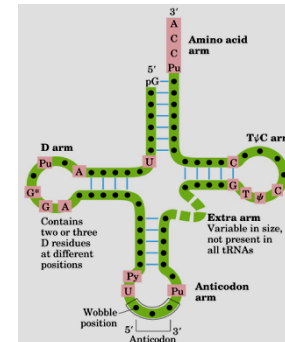
- Reflete o estado fisiológico da célula

- O conjunto de genes expressos em uma dada situação é variável

- Processo catalisado pelas RNAs polimerases

Metabolismo de RNA

- RNA- macromolécula que pode conter a informação genética (virus de RNA), transmitir a informação genética ou ter atividade catalítica (ribozima)
- DNA transmite sua informação através do RNA
- Transcrição- um sistema enzimático converte a informação genética do DNA (dupla fita) para RNA (fita simples).
- Informação – base complementar
- Bases modificadas



RNAs

Tipo	Tamanho	Função
tRNA	Pequeno	Transporte de aa para o local de síntese
rRNA	Diversos	Forma os ribossomos, juntamente com proteínas
mRNA	Diversos	Determina a sequência de aa na proteína
snRNA	Pequeno	Processa o mRNA inicial nos eucariotos
miRNA	Pequeno	Afeta a expressão gênica (crescimento, desenvolvimento)
siRNA	pequeno	Afeta a expressão gênica. Cientistas utilizam para bloquear a expressão do gene de interesse

Principais Tipos de RNA

RNA mensageiro (mRNA): contém a informação genética para a sequência de aminoácidos das proteínas

RNA transportador (tRNA): identifica e transporta os aminoácidos até o ribossomo

RNA ribossômico (rRNA): constituinte dos ribossomos

Transcrição

- **Unidade de transcrição:** promotor, região de iniciação da transcrição, até a sequência chamada de terminador
- Pode haver um ou mais do que um gene sob um único promotor (**monocistrônico** e **policistrônico**, respectivamente).
- Bactérias: mono e policistrônico
- **Operon:** quando mais do que um gene é transcrito no mesmo RNA

Transcrição

Síntese de RNA:

-molde (fita de DNA).

- substratos (ribonucleotídios trifosfato-ATP, GTP, CTP, UTP).

-enzima: RNA polimerase crescimento 5' - 3'.

-RNA polimerase reconhece o promotor, abre as fitas e inicia a síntese do RNA

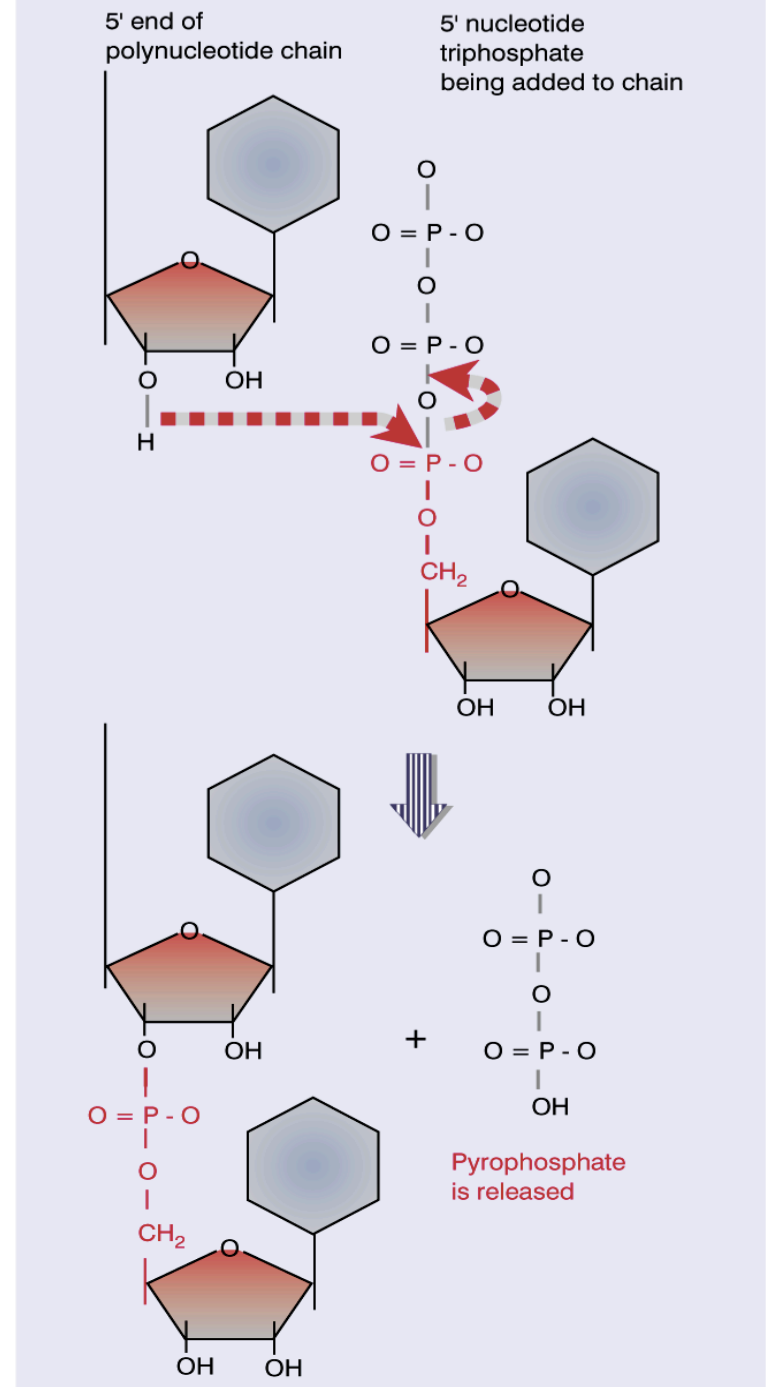
Síntese de RNA: formação da ligação fosfodiéster envolve o ataque nucleofílico do 3' OH da cadeia crescente no fosfato do carbono 5' do ribonucleosídeo trifosfatado que será incorporado

Nucleotídios trifosfato como substratos (UTP, UGC, ATP, CTP)

A RNA polimerase não requer um iniciador (primer) para iniciar a síntese do RNA

A RNA polimerase não tem mecanismo de reparo

RNA polimerase: 1 em bactérias; 3 em mamíferos



Transcrição: DNA- RNA

- O QUE COPIAR
- QUANDO COPIAR?

(5') CGCTATAGCGTTT(3')

DNA nontemplate (coding) strand

(3') GCGATATCGCAA(5')

DNA template strand

(5') CGCUAUAGCGUUU(3')

RNA transcript

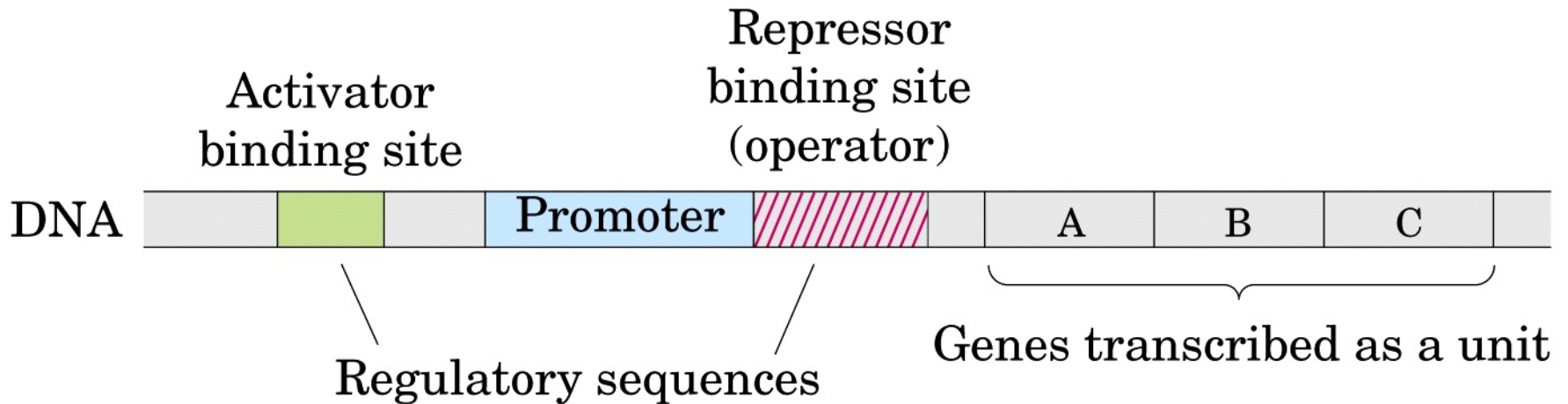
→ **Fita codificante** → 5' → 3'

Ambas as fitas do DNA podem ser “codificantes”

Síntese do RNA dirigida pela complementaridade de base com o DNA

Operon

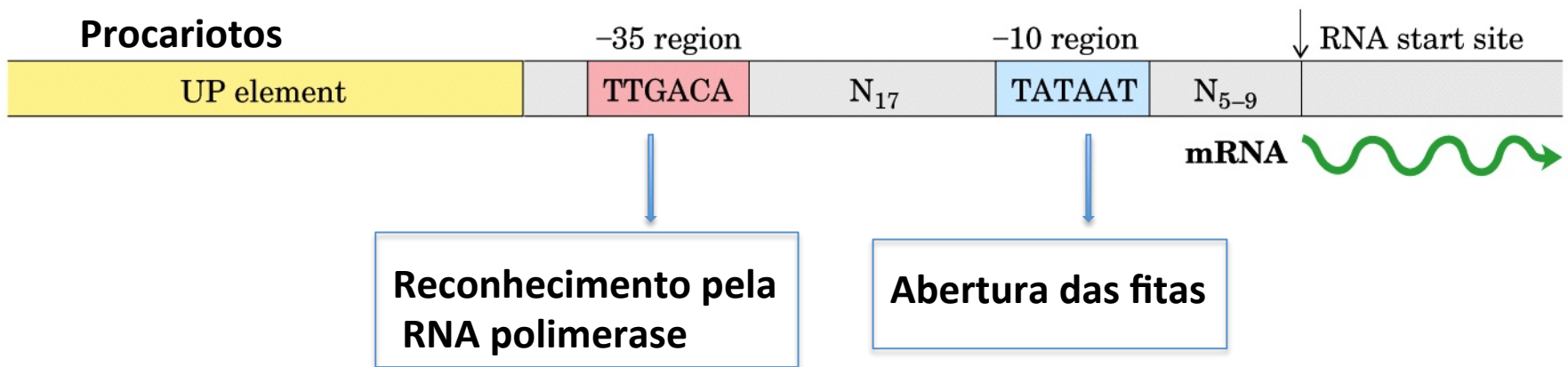
Grupo de genes sob o controle de um único operador:
genes estruturais, operador e promotor



- **Promotor-** região de ligação da RNA polimerase; abertura da fita de DNA (bolha de transcrição).
- **Elongação**
- **Término-** sinais de terminação.

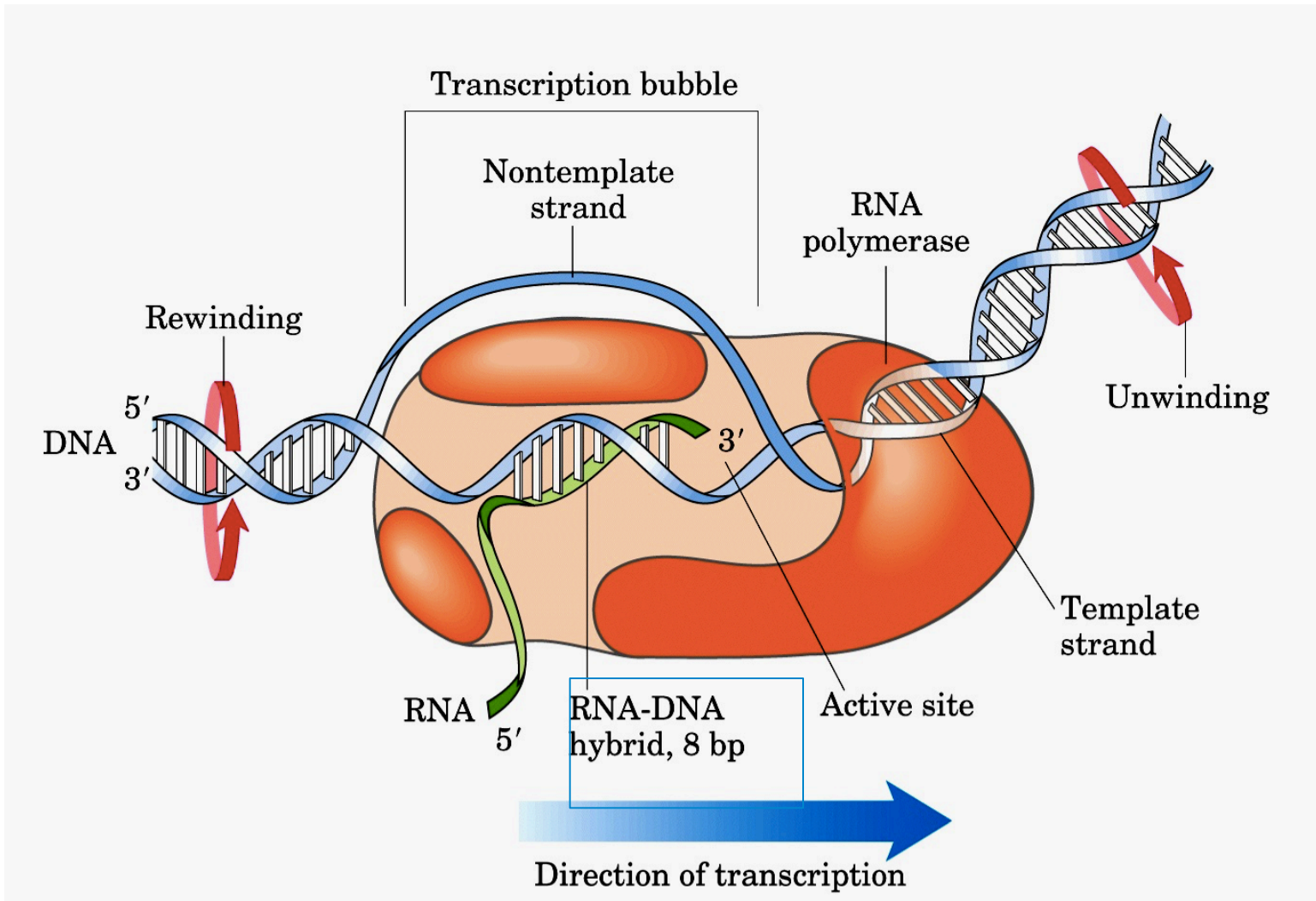
Etapas da transcrição

- **Iniciação** - ligação da RNA polimerase ao promotor; abertura da fita de DNA (bolha de transcrição).
- **Elongação**- bolha de transcrição (topoisomerase de DNA).
- **Término**- sinais de terminação.

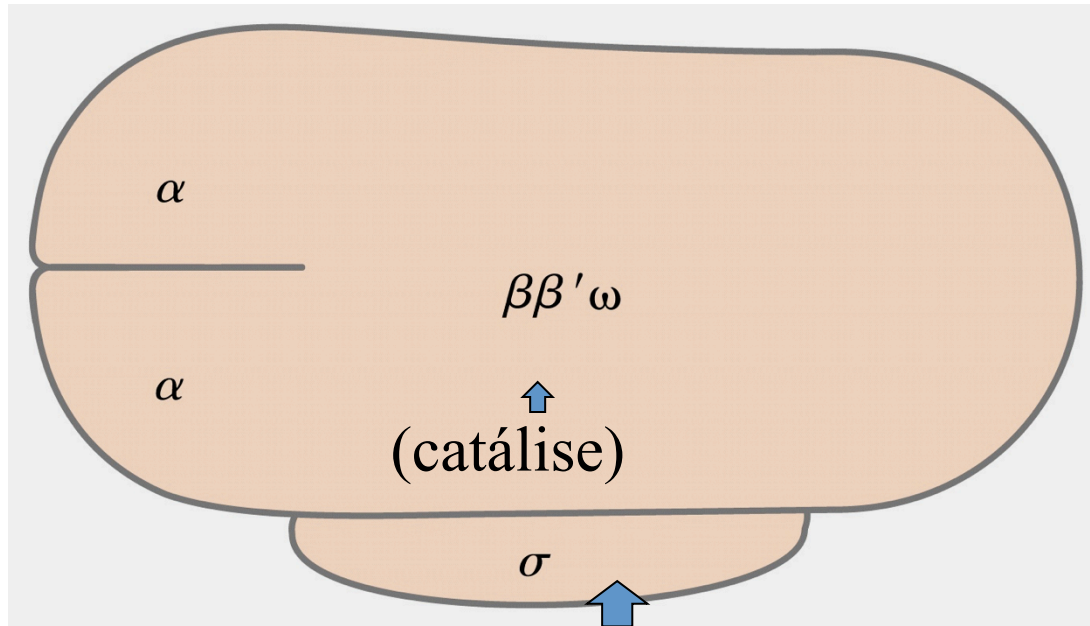


Eucariotos- TATA box: -30

Bolha de transcrição- ~17 pares de bases



RNA polimerase de *E.coli*



50-90 nucleotídios/seg
1 erro a cada $10^4 - 10^5$

Reconhecimento de promotor
Diferentes Sigmas
Ausente no alongamento

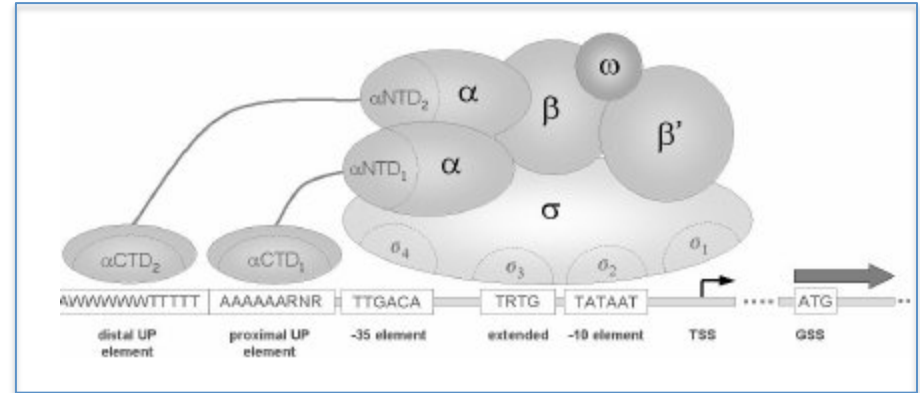
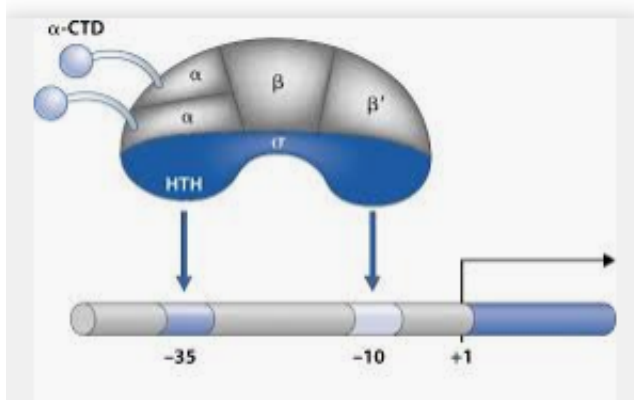
Duplicação- 1 erro a cada $10^9 - 10^{10}$

Sigma (σ)- bactérias

- **Subunidade da holoenzima**
- **Necessária para a RNA polimerase se ligar nas regiões do promotor.**
- **Diferentes tipos expressos em diferentes condições -regulam diferentes genes, ligam-se a diferentes promotores.**

- **Após a etapa de iniciação, a síntese de RNA ocorre sem a presença do fator Sigma**

Uma única RNA polimerase em bactérias



Composição da RNA polimerase
2 subunidades alfa
1 subunidade beta
1 subunidade beta'
1 subunidade omega

Catálise

Fator Sigma- reconhecimento do promotor

Quando a RNA polimerase está alongando o RNA, outra RNA polimerase pode iniciar nova síntese

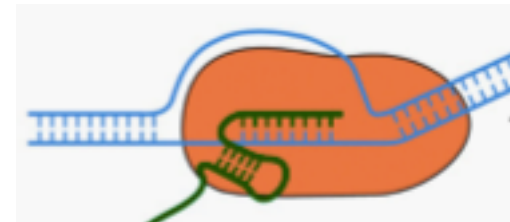
Terminação da Transcrição em bactérias

1. Dependente de proteína- proteína Rho

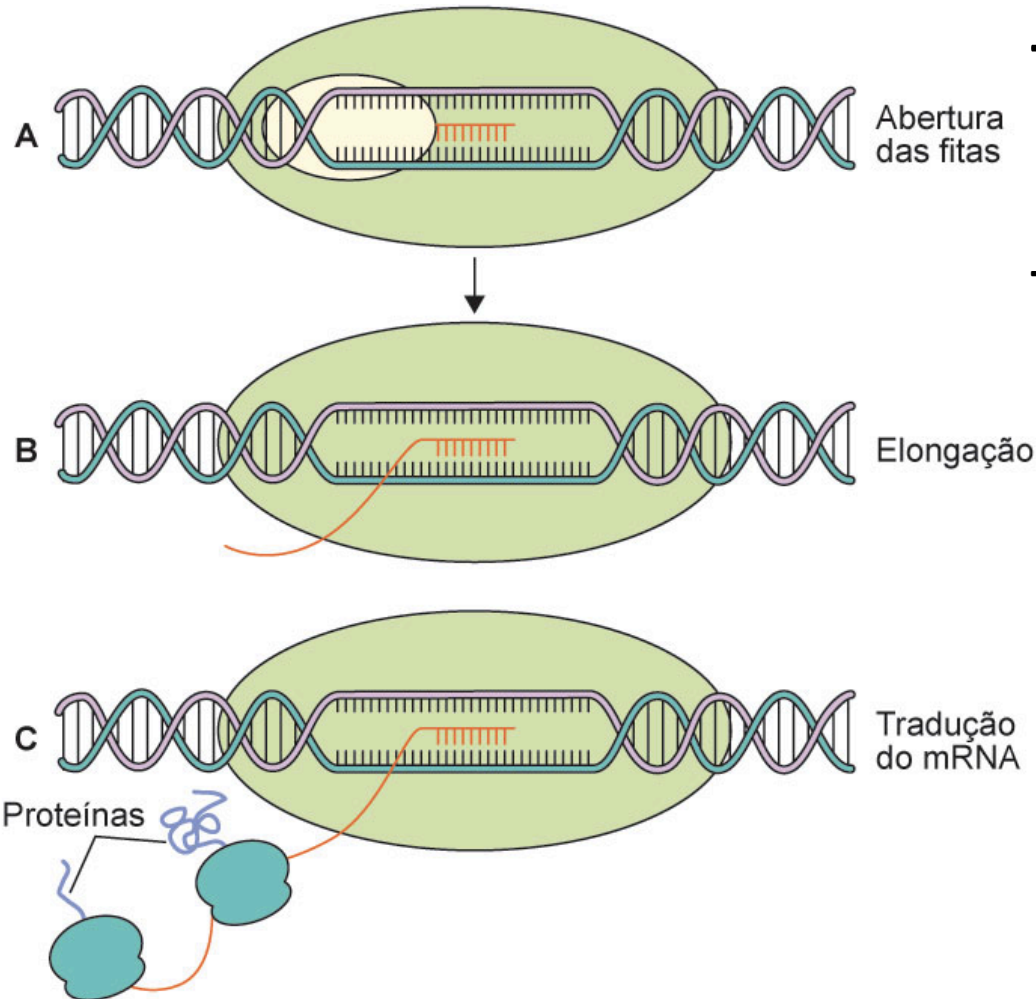
- Rho reconhece um sítio no RNA, situado próximo ao local de parada da transcrição.
- Rho hidroliza ATP e se desloca até a RNA polimerase no sítio de terminação, causando a dissociação do complexo de transcrição.

2. Independente de proteína

- a sinalização está no próprio RNA (estrutura de grampo; e sequências de uracila, diminuindo a afinidade da polimerase pelo DNA)



Transcrição bacteriana



Transcrição e síntese proteica concomitantes

Figura 6.5 Elongação da transcrição e acoplamento com a tradução. Após a adição de alguns ribonucleotídeos (A), a RNA polimerase pode liberar a subunidade sigma (B) e realizar a elongação da transcrição somente com o cerne da enzima. Em bactérias, a transcrição da mensagem e sua leitura pelos ribossomos ocorrem simultaneamente, pela ausência de uma membrana nuclear (C).

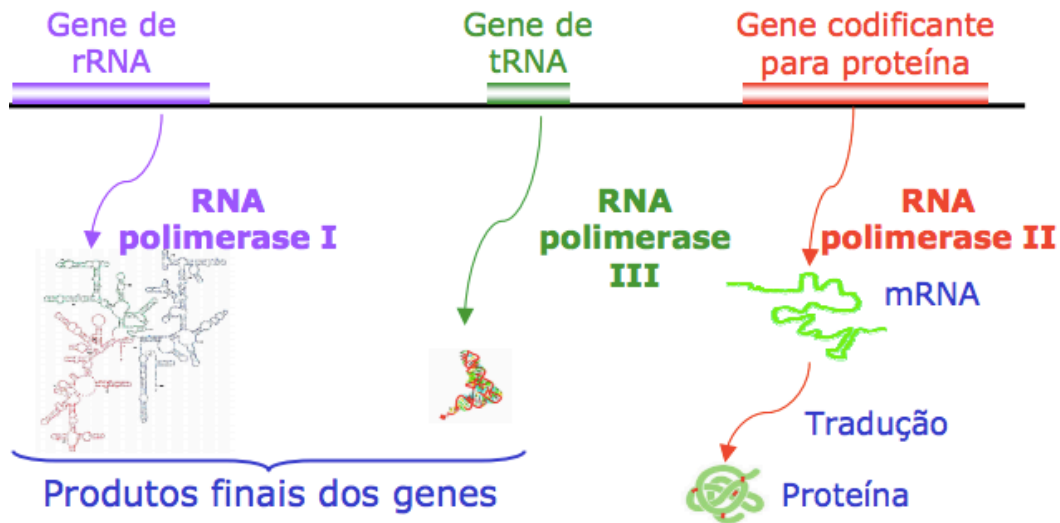
Transcrição em eucariontes

Transcrição em eucariotos (núcleo)

Basicamente o mesmo processo dos procaríotos, mas muito mais complexo

3 RNA polimerases (transcrição de diferentes RNAs):

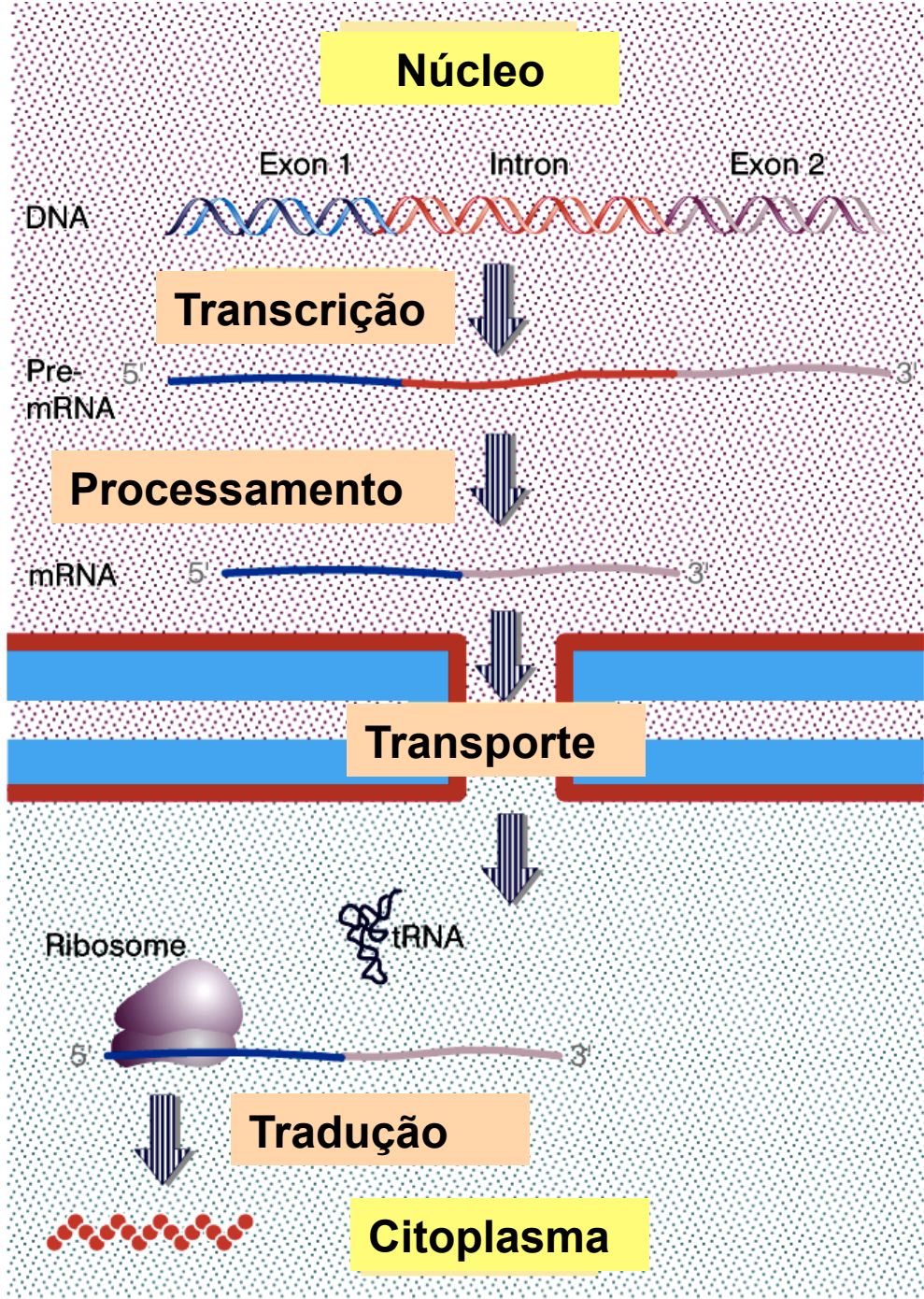
- **RNA Pol I e II**- muitos tRNAs, rRNAs, snRNAs;
- **RNA Pol III**- muitos genes codificadores de proteínas



Transcrição em eucariontes (núcleo)

Basicamente o o mesmo processo dos procariontes, mas muito mais complexo

- **TATA box** (TATAAA) na região -30 do promotor é a principal sequência consenso da RNA Pol II; ativadores e repressores- sequências bem mais distantes do promotor.
- **Transcrição:** Complexos proteicos que reconhecem o início de transcrição. Vários fatores de transcrição para iniciação e alongação. 3 RNA polimerases
- **Regulação** de transcrição por vários mecanismos (metabólitos, hormonal)
- **Processamento do RNA rRNA, tRNA, mRNA**



Núcleo

Exon 1 Intron Exon 2

DNA

Transcrição

Pre-mRNA

Processamento

mRNA

Transporte

Ribosome

tRNA

Tradução

Citoplasma

Etapas envolvidas na expressão de genes em eucariotos

Eucariotos

- Há processamento de:
 - mRNA
 - tRNA
 - rRNA

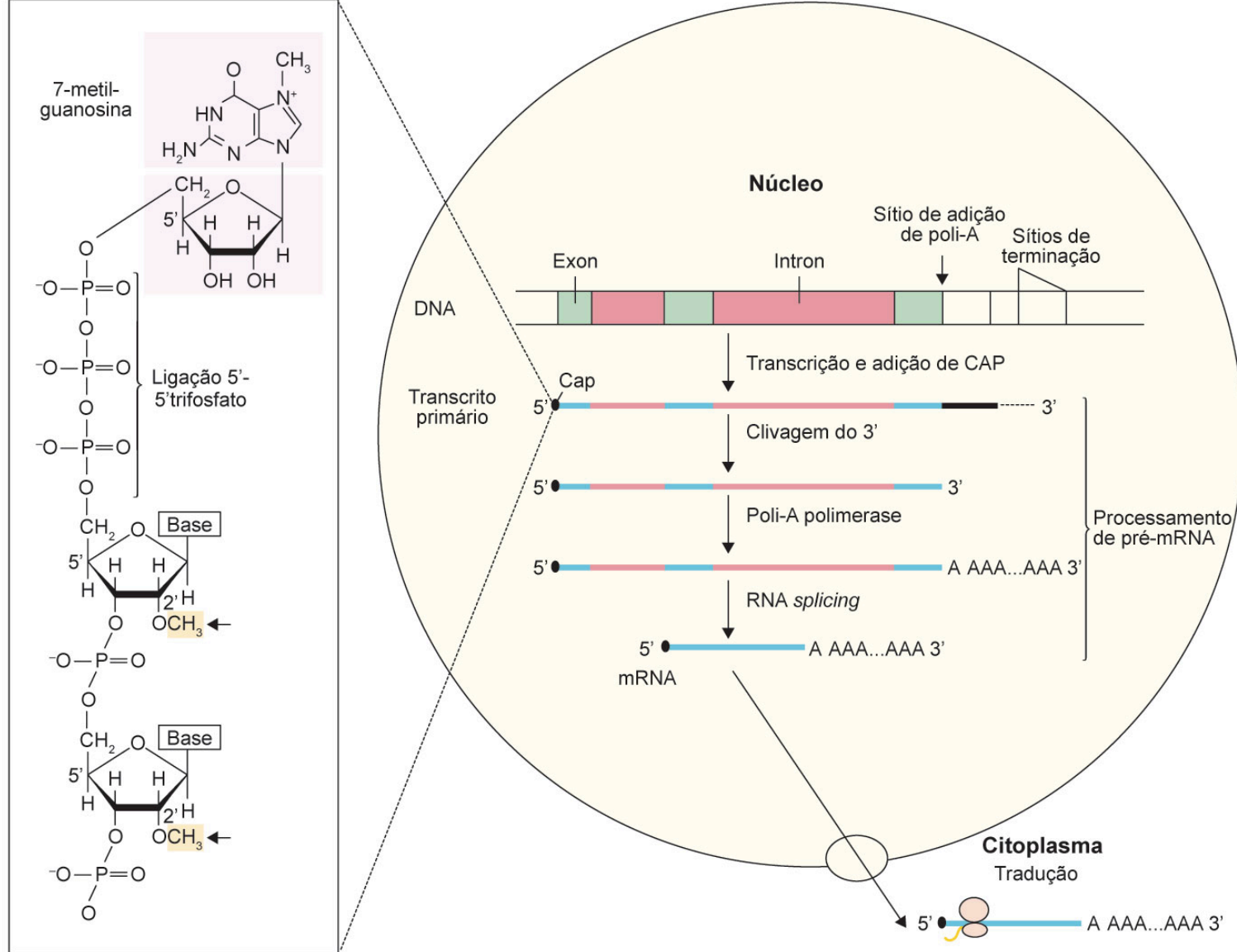
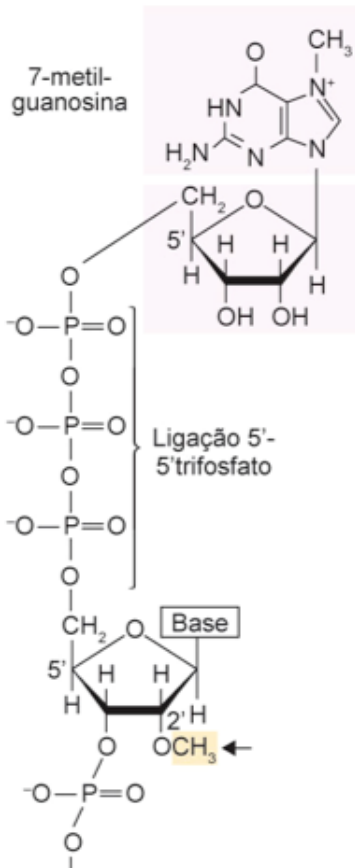
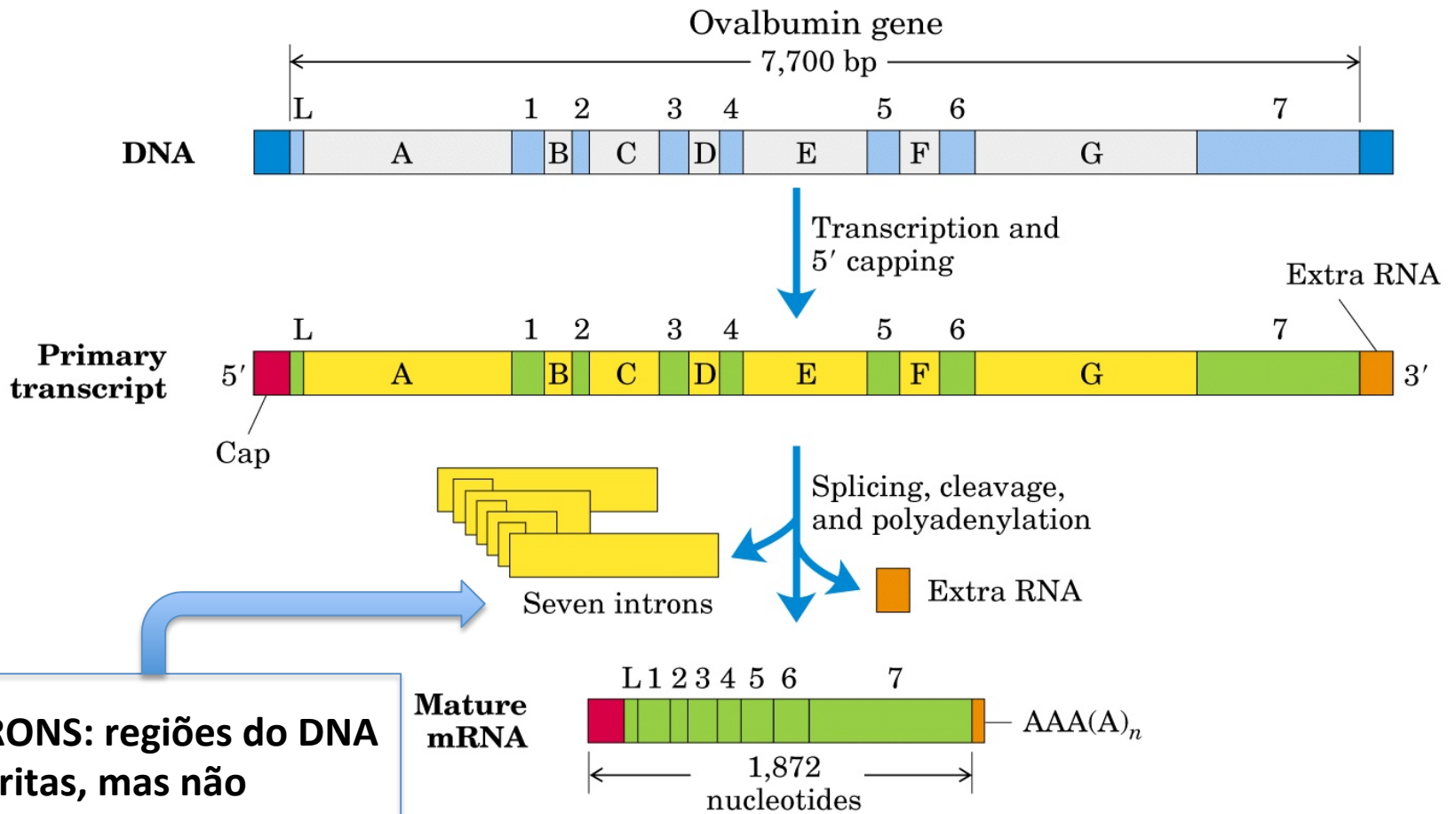


Figura 6.17 Etapas de processamento do RNA. Os genes transcritos a partir do DNA contêm seqüências que codificam aminoácidos no produto final (introns) e seqüências que devem ser removidas antes da tradução (exons). Após a transcrição e ainda no núcleo, o RNA sofre modificação nas extremidades, com adição do CAP e da cauda poli-A e a retirada dos introns (*splicing*). Apesar de a figura mostrar a etapa de adição da cauda poli-A como anterior a *splicing*, ela pode ocorrer posteriormente a este, pois o sítio de adição de poli-A pode não ter sido transcrito ainda por ocasião do *splicing* (detalhes no texto). O mRNA maduro será, então, transportado para o citoplasma, no qual será traduzido nos ribossomos. No destaque, a estrutura do CAP, em que um nucleotídeo de 7-metil-guanosina é adicionado no 1º nucleotídeo do transcrito, em uma ligação 5'-5'fosfodiéster. As duas primeiras bases do RNA podem também ser metiladas na posição 2', conforme mostrado na figura (*setas*). Adaptada de Lodish, 2008.

Processamento de mRNA de eucariotos



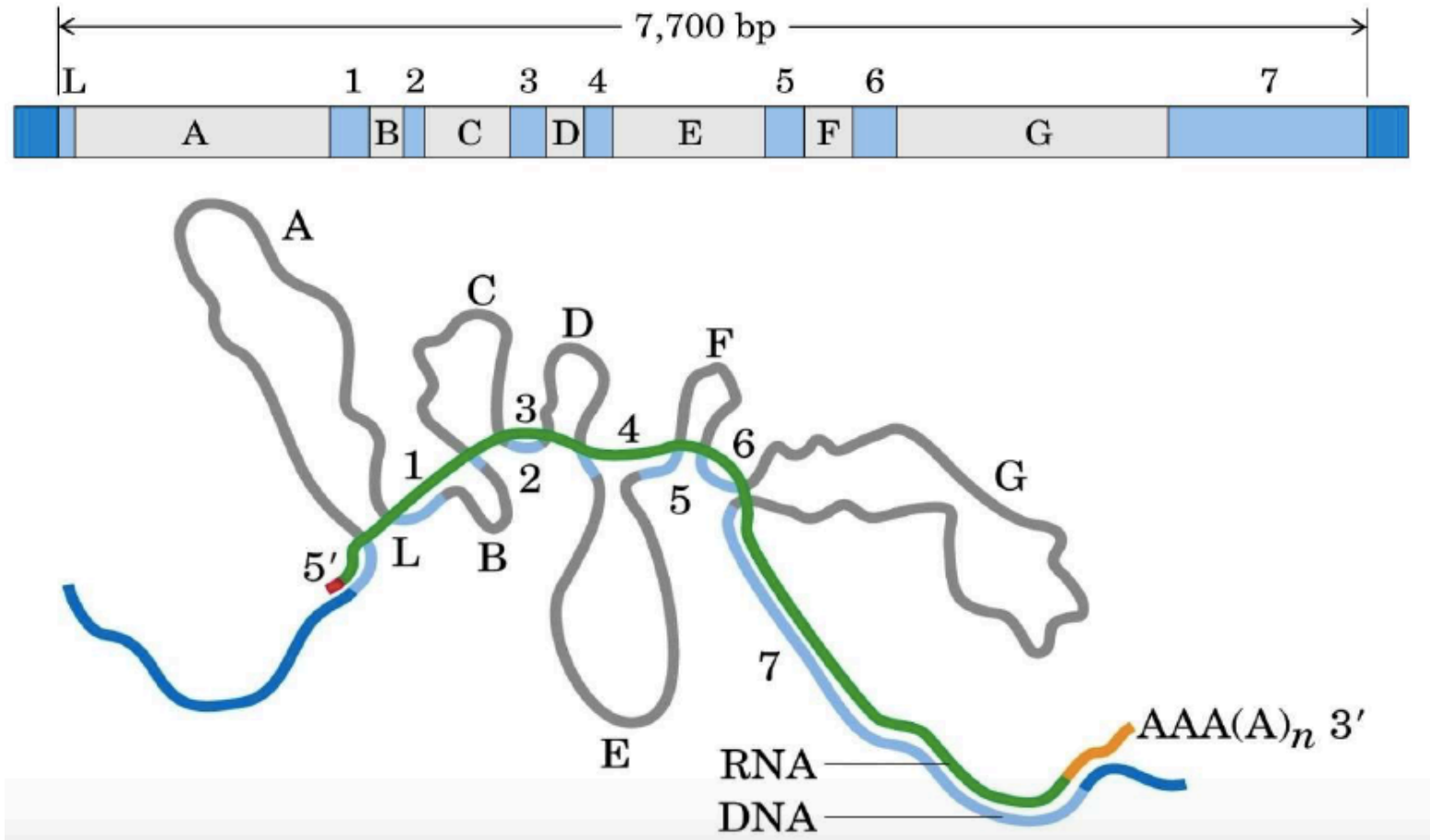
- **Adição de CAP (7-metilguanossina) na extremidade 5' ; metilação da ribose (C2) -proteção a exonucleases e ligação a ribossomo.**
- **Adição de cauda de poli A na extremidade 3' - (80- 100 resíduos de adenina)**
- **Remoção de regiões não codificantes- “*splicing*” (spliceossomo- ribonucleoproteínas) -Introns (50- 20000 nucleotídios). -SnRNAs identificam, alinham no local de corte e quebra das ligações.**



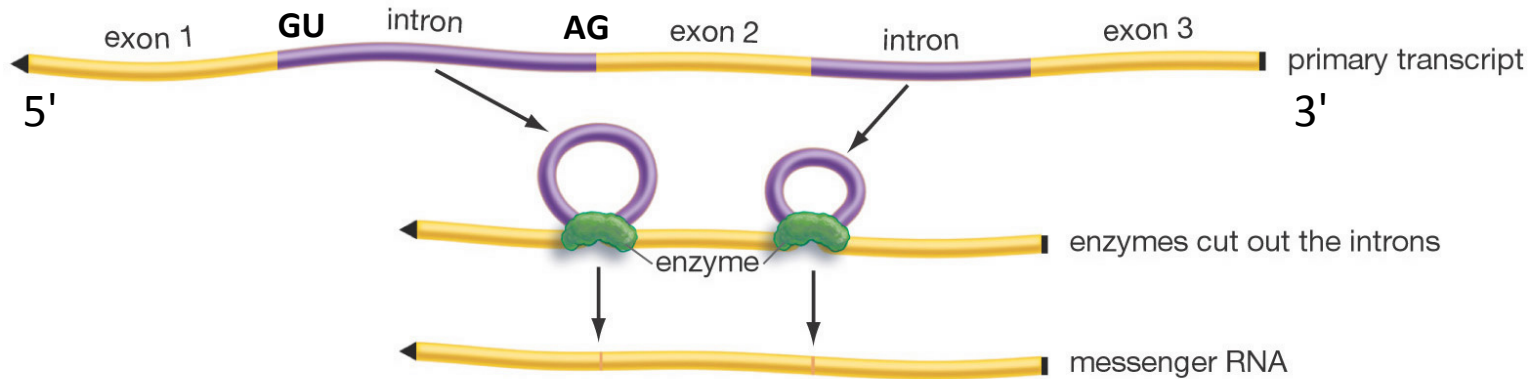
7 INTRONS: regiões do DNA transcritas, mas não traduzidos. Removidos no processamento do mRNA

Nota: alguns mRNA de procaríotos também possuem cauda de poli A, mas a função não é de proteção à degradação do RNA

Hibridação: Sequência gênica e mRNA maduro



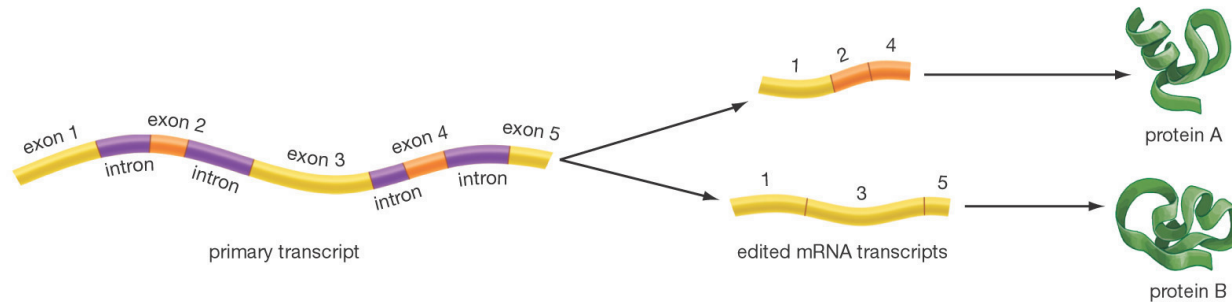
splicing



98% das junções de slides no genoma humano- GU/AG

- primeiro intron é retirado antes que os demais sejam sequer transcritos
- Remoção ou não de determinados introns: diferentes proteínas

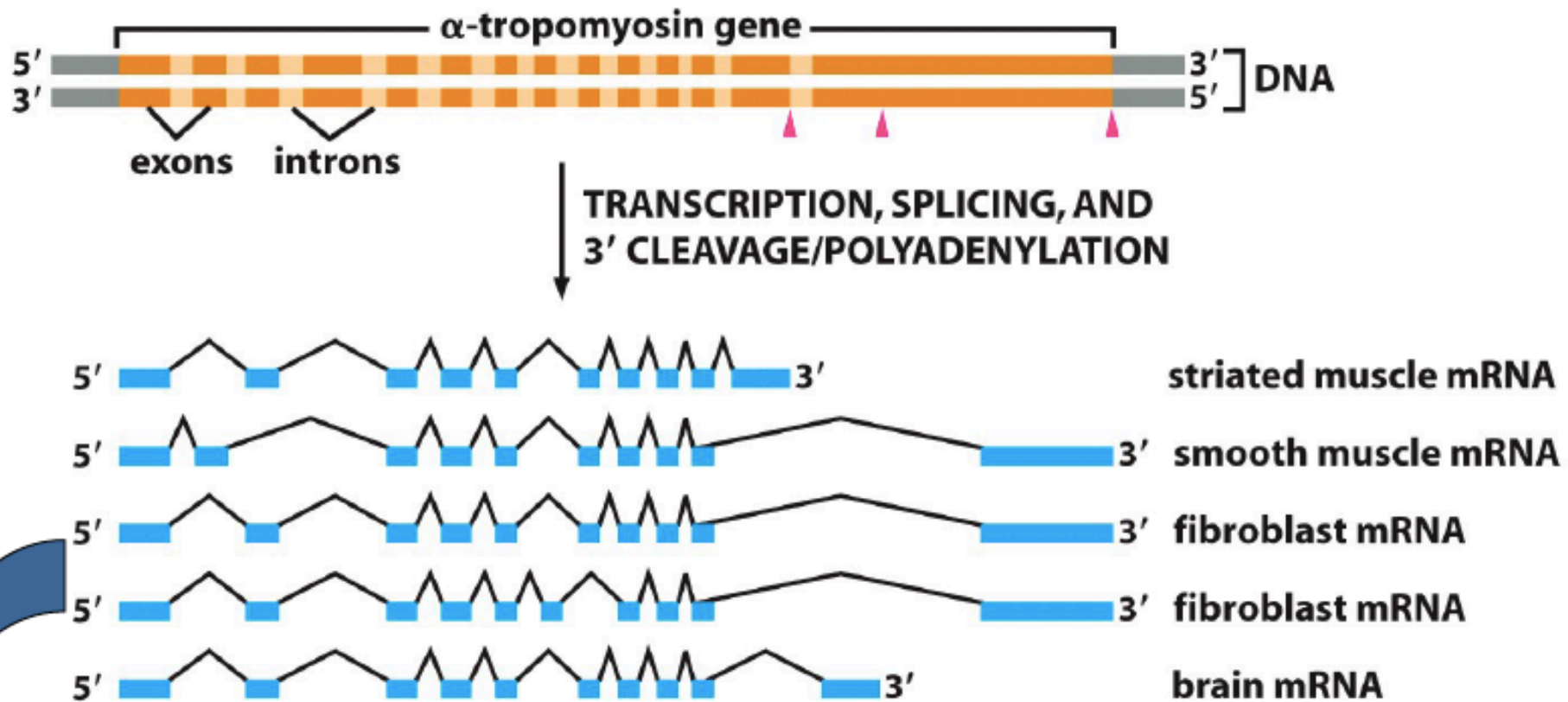
Splicing alternativo



Vantagens do Intron- splicing alternativo

- **Origem a diferentes proteínas a partir do mesmo gene**
- **Remoção ou não de determinados introns**
- **Maioria dos genes tem splicing alternativo**
- **~ 1 milhão de proteínas diferentes devido ao splicing alternativo**

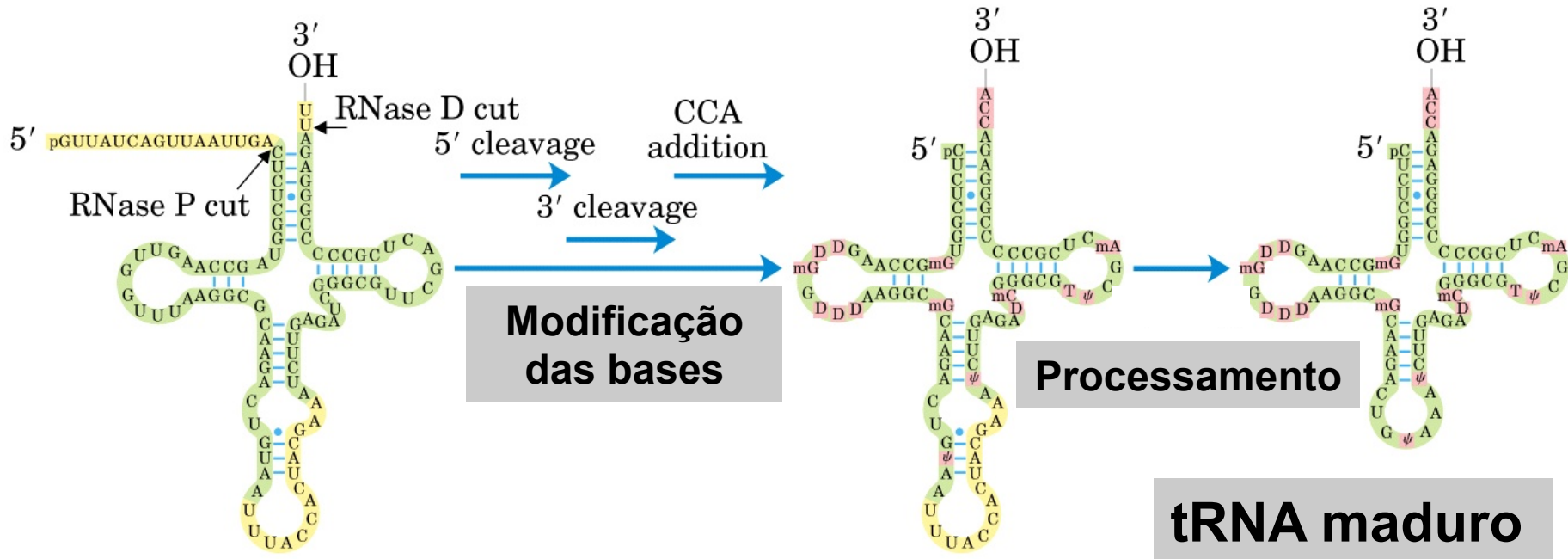
Splicing Alternativo



Isoformas/variantes de splicing

A maioria dos genes humanos apresentam splicing alternativo

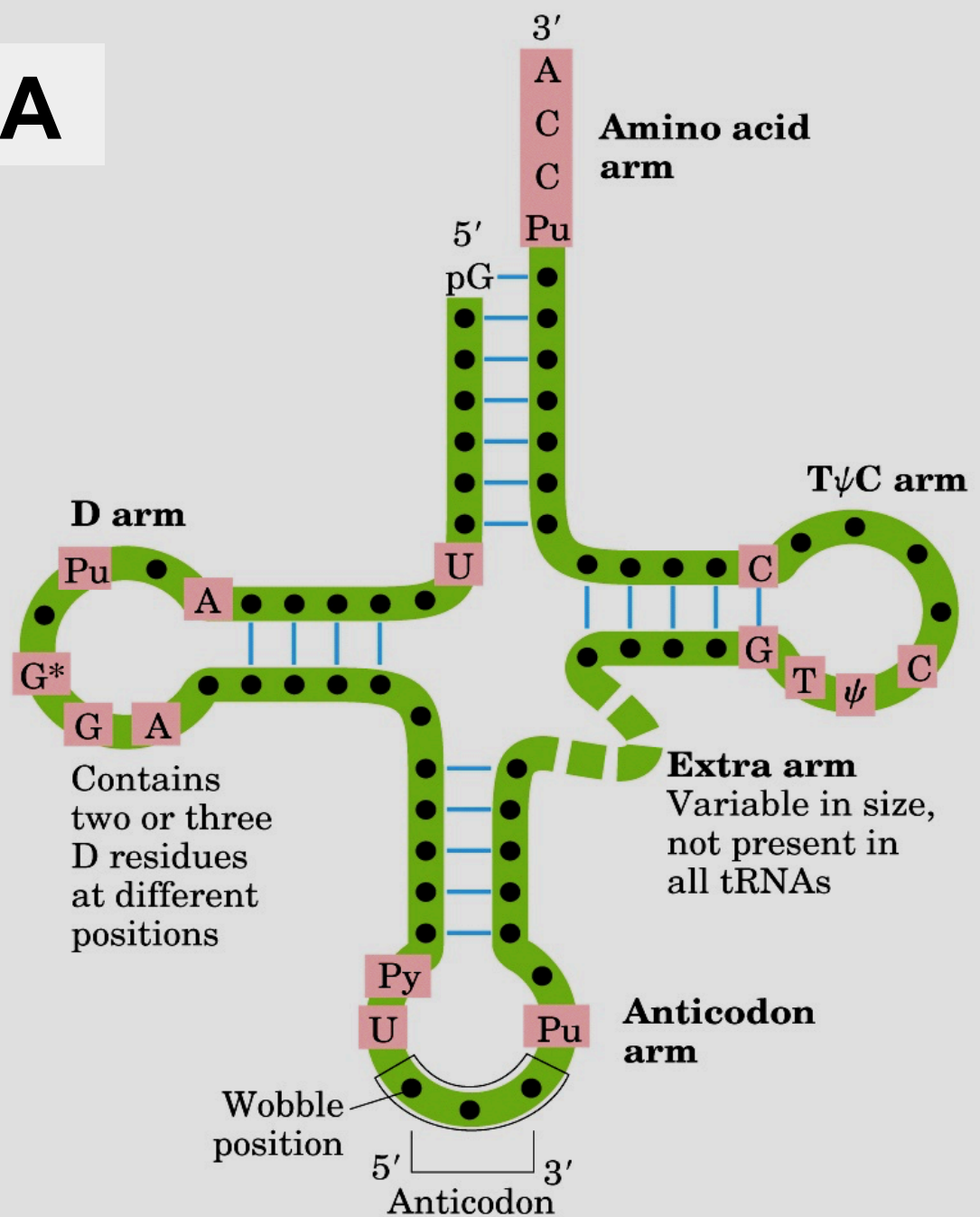
Processamento do precursor do tRNA



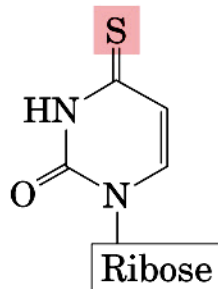
tRNA

-Estrutura secundária com grampos e alças formando um trevo

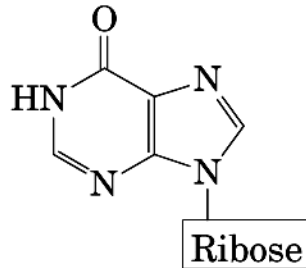
-Alto número de bases modificadas depois da sua transcrição



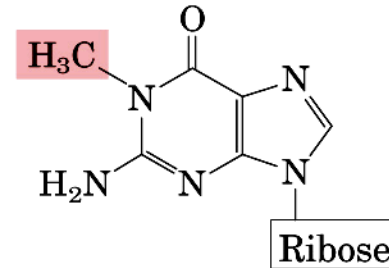
Bases modificadas nos tRNAs



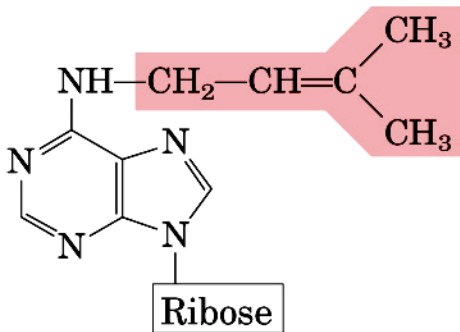
4-Thiouridine (S⁴U)



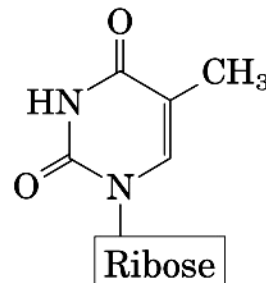
Inosine (I)



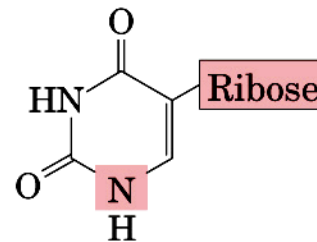
1-Methylguanosine (m¹G)



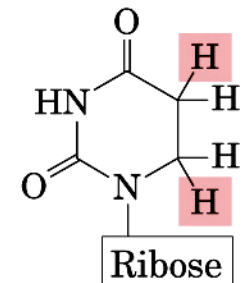
N⁶-Isopentenyladenosine (i⁶A)



Ribothymidine (T)



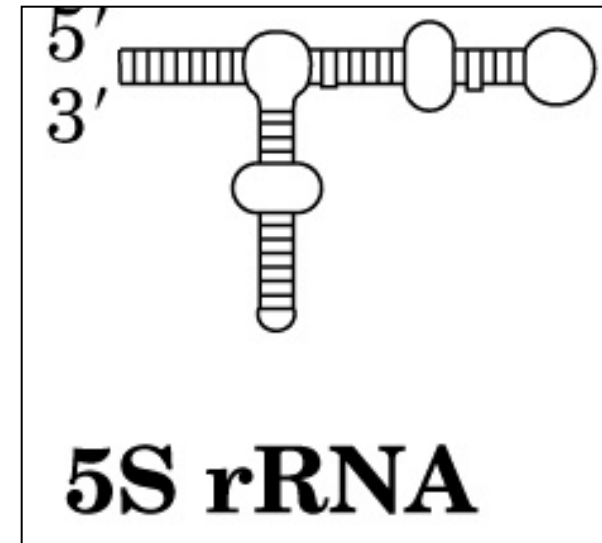
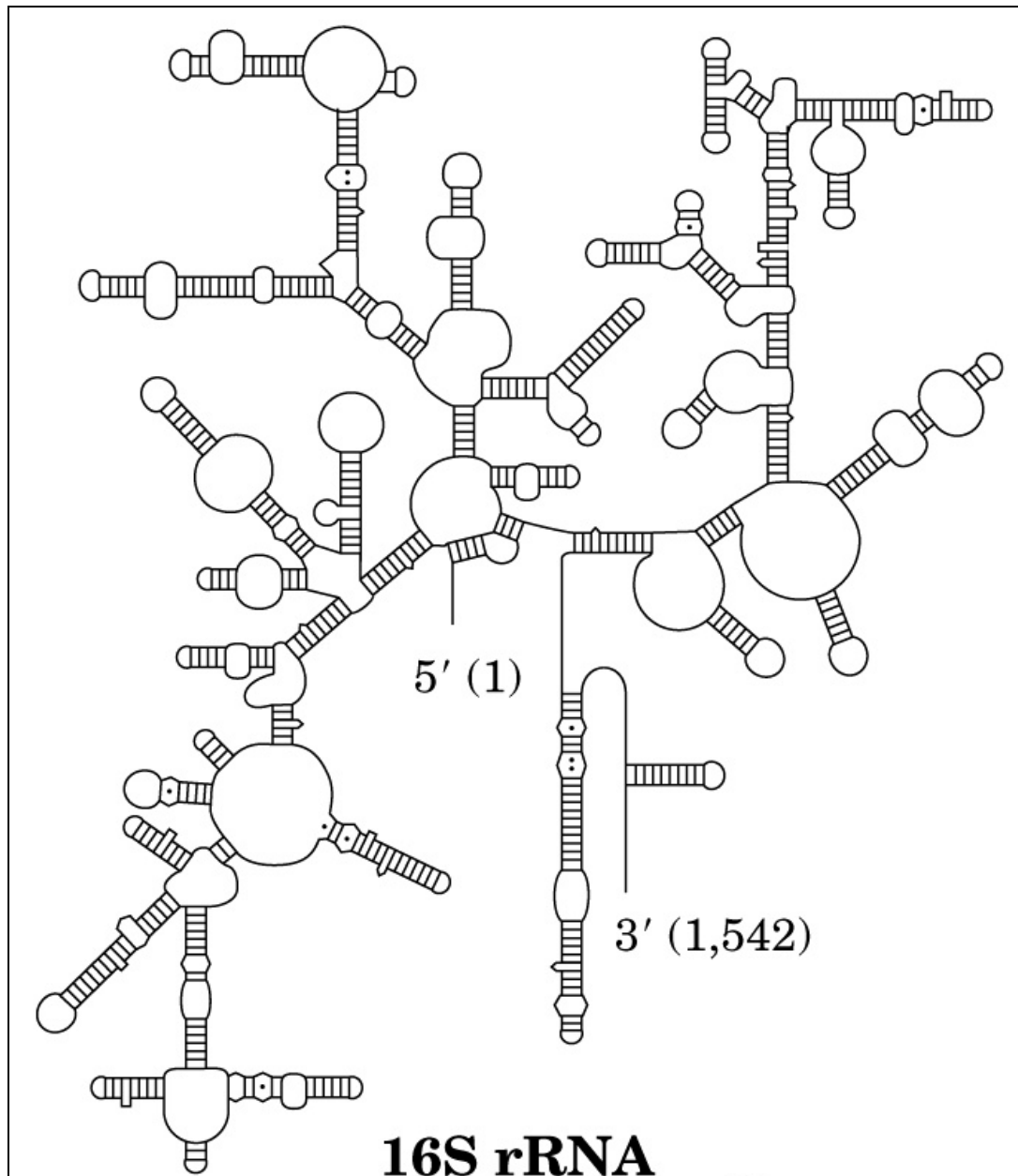
Pseudouridine (ψ)



Dihydrouridine (D)

Exemplos de rRNAs:

- Estrutura secundária com grampos e alças
- Bases metiladas

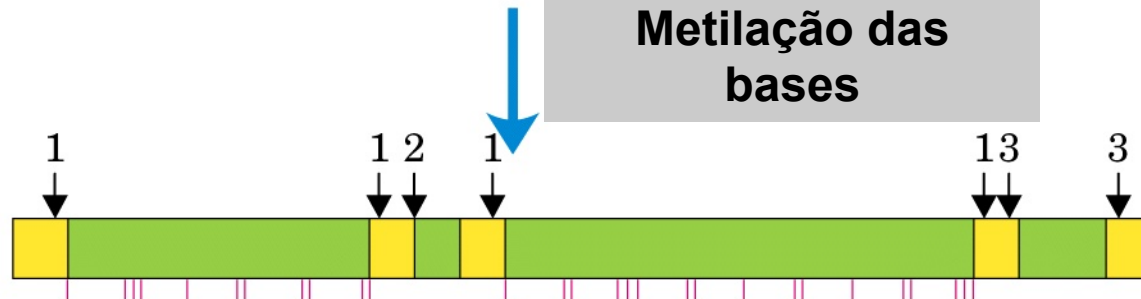


Processamento do precursor do rRNA

RNA precursor
30S



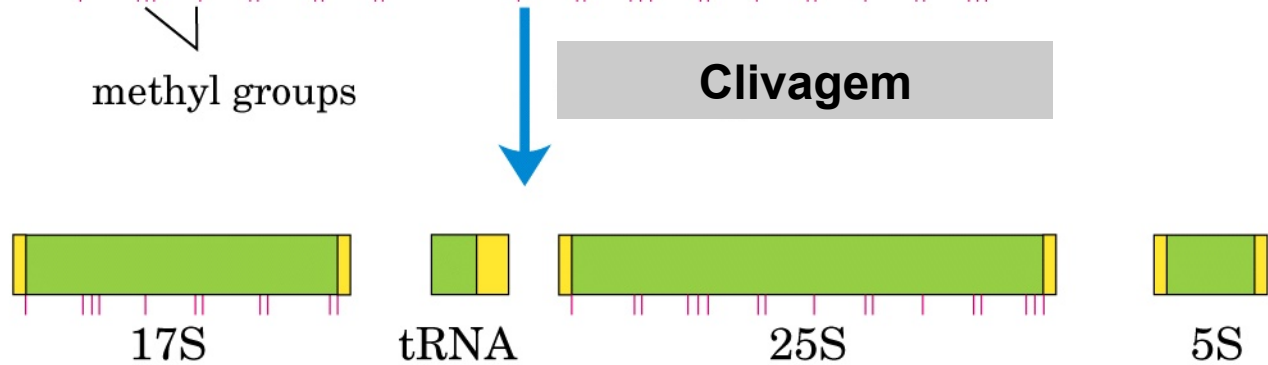
(a)



(b)

methyl groups

Clivagem

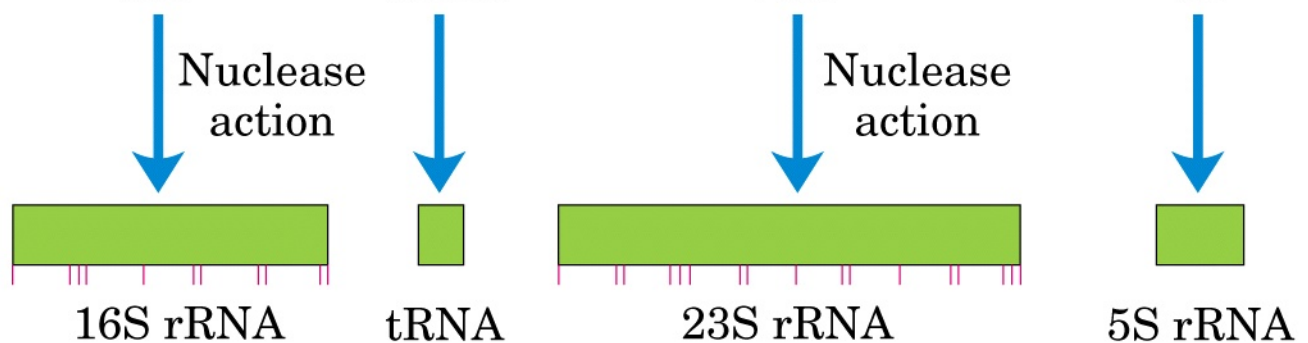


(c)

Nuclease
action

Nuclease
action

RNAs maduros



Expressão Gênica

- **Somente uma fração dos genes é expressa em um determinado tempo**
- **Alguns produtos gênicos são mais (fatores de alongação de proteínas em bactéria) ou menos (enzimas de reparo) abundantes**
- **Necessidade de determinados produtos varia com a condição fisiológica da célula**
- **Algumas proteínas são órgão específicas**
- **Genes constantemente expressos- constitutivos (housekeeping genes- enzimas do metabolismo central)**
- **Genes que respondem a sinais moleculares- indução ou repressão**
- **Regulação- feita por interação de ácidos nucleicos- proteína**

Regulação da Expressão Gênica

Procaríotos:

- Resposta direta a variações nas condições nutricionais (genes ativados e reprimidos)
- Transcrição pode ser acoplada com a tradução (simultânea)

Eucariotos multicelulares:

- Limitação na resposta direta às variações nas condições externas (células estão organizadas em tecidos e órgãos)
- Transcrição ocorre em compartimento distinto da tradução eliminando a possibilidade de acoplamento
- Regulação dependente de desenvolvimento e tecido

Regulação gênica

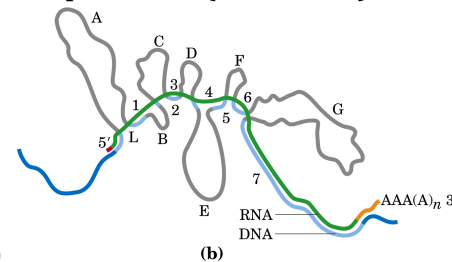
Diversos mecanismos

- **Metabólitos**
- **Hormônios**

**(hormônios esteróides- receptor citoplasmático)-
translocação para o núcleo- ligação em sequências
específicas do DNA – HRE- hormone responsive
elements- transcrição específica**

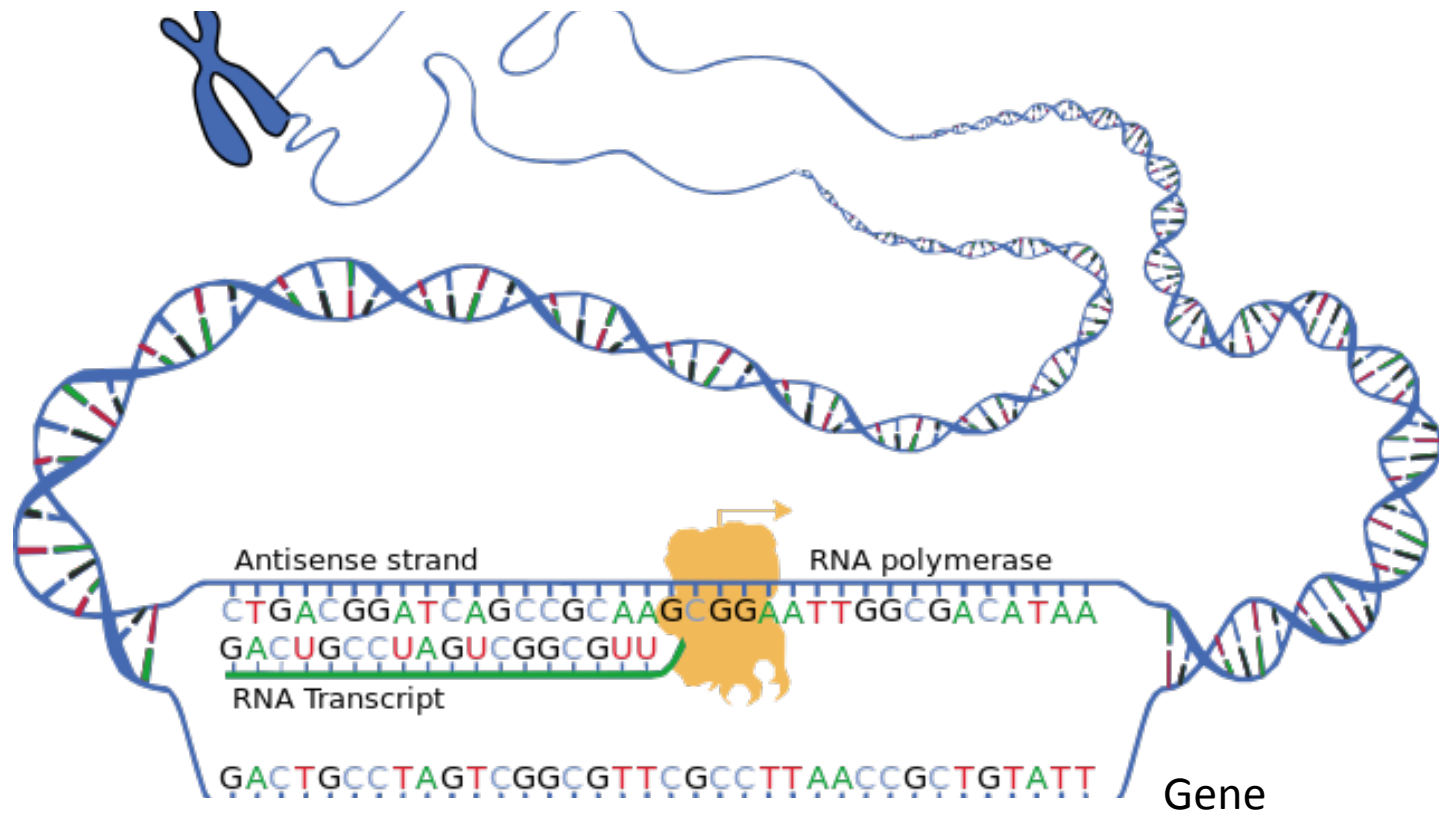
- **Regulação dos fatores de transcrição por
fosforilação (transdução de sinal)**

1. O que se entende por transcrição?
2. Comente a afirmação: na transcrição forma-se um híbrido RNA-DNA ligado por pontes de hidrogênio e baseado na complementaridade de bases.
3. Quais os principais tipos de RNA existentes, quais suas características estruturais e função?
4. Quais as modificações (processamento) que ocorrem nos mRNA de eucariotos? Qual sua função?
5. O DNA isolado de uma célula de mamífero (em cinza) foi incubado com o mRNA que codificava para uma determinada proteína (em verde), obtendo-



se a imagem abaixo. Explique o resultado

6. Quais as modificações que ocorrem nos tRNA?
7. Quais as modificações que ocorrem no RNA ribossômico?
8. O que é um promotor? Exemplifique com um promotor de procarionto
9. Quais as subunidades da RNA polimerase de procariontos? Qual sua função?
10. Em procariontos, como se dá a fase de iniciação, alongação e terminação de transcrição? Compare com eucariotos.
11. Procure na literatura 2 exemplos de moléculas que afetam a transcrição.



Fita antisense- fita molde

RNA polimerases de eucariotos

RNA pol I	Nucleólo	rRNA	Várias subunidades
RNA pol II	Nucleoplasma	hnRNA (transcrito primário) snRNA	Várias subunidades
RNA pol III	Nucleoplasma	rRNA 5S tRNAs	Várias subunidades
RNA pol Mitochondrial	Mitocondria		01 subunidade
RNA pol de Cloroplastos	Cloroplasto		Similar as bacterianas

Requerem proteínas auxiliares: fatores de transcrição