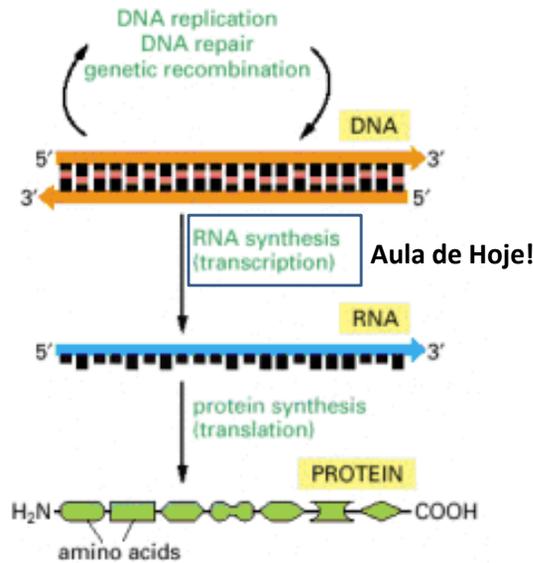
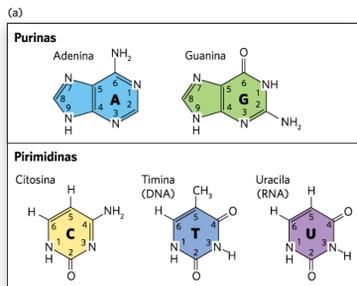


O Fluxo da informação gênica (Dogma central da Biologia)



1

Recordando...



As bases nitrogenadas presentes no RNA podem formar pares de base com outra molécula de RNA ou com o DNA!

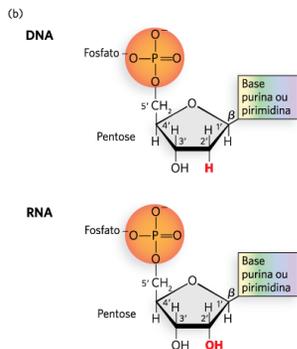
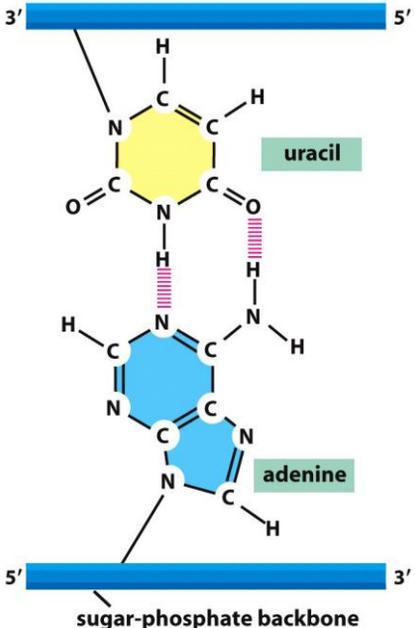


FIGURA 6-2 Composição química dos nucleotídeos. (a) As bases são purinas, com anéis de nove membros, ou pirimidinas, com anéis de seis membros, com a indicação do sistema de numeração. No DNA e no RNA, as purinas são adenina e guanina; no DNA, as pirimidinas são citosina e timina; no RNA, as pirimidinas são citosina e uracila. (b) Os nucleotídeos consistem em um fosfato, uma pentose (açúcar) e uma base heterocíclica; os carbonos no anel da pentose são numerados como mostrado, com os números seguidos por um apóstrofo (') para diferenciá-los dos átomos numerados das bases. No DNA, a pentose é a 2'-desoxirribose, que não possui o grupo hidroxila no carbono 2' (em vermelho); no RNA, o açúcar é a ribose, que inclui a 2'-hidroxila. Uma ligação glicosídica liga o carbono 1' da ribose ou desoxirribose à base; o β indica a direção da base em relação ao anel da pentose.

2

Uracila pode emparelhar com adenina!



3

Recordando...

(a) Desoxirribonucleotídeos

Nucleosídeo:	Desoxiadenosina	Desoxiguanosina	Desoxitimidina	Desoxicitidina
Nucleotídeo:	Desoxiadenilato (desoxiadenilato 5'-monofosfato)	Desoxiguanilato (desoxiguanosina 5'-monofosfato)	Desoxitimidilato (desoxitimidina 5'-monofosfato)	Desoxicitidilato (desoxicitidina 5'-monofosfato)
Símbolos	A, dA, dAMP	G, dG, dGMP	T, dT, dTMP	C, dC, dCMP

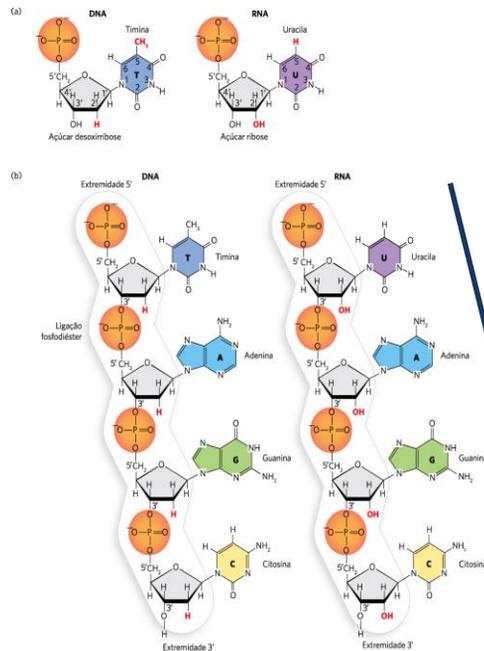
(b) Ribonucleotídeos

Nucleosídeo:	Adenosina	Guanosina	Uridina	Citidina
Nucleotídeo:	Adenilato (adenosina 5'-monofosfato)	Guanilato (guanosina 5'-monofosfato)	Uridilato (uridina 5'-monofosfato)	Citidilato (citidina 5'-monofosfato)
Símbolos	A, AMP	G, GMP	U, UMP	C, CMP

FIGURA 6-4 Desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos dos ácidos nucleicos. Todos os nucleotídeos estão ilustrados nas suas formas predominantes em pH neutro. (a) Desoxirribonucleotídeos do DNA. (b) Ribonucleotídeos do RNA.

4

Logo, o RNA também tem polaridade!



5

Mecanismo de ação da RNA polimerase

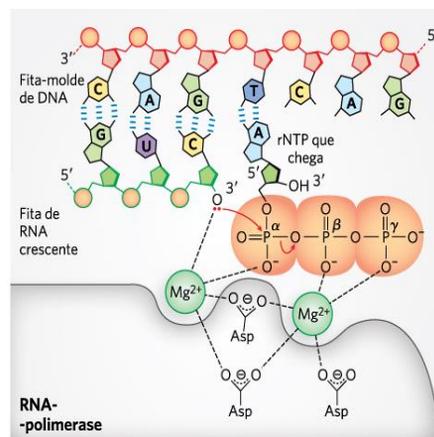


FIGURA 15-3 Mecanismo químico da síntese de RNA. A adição de um rNTP a um transcrito crescente é uma reação dependente de Mg^{2+} que produz uma ligação fosfodiéster 5'→3'.

A RNA polimerase precisa de primer?

NÃO!!!!!!!

6

Qual é a estrutura de um gene que codifica proteínas?



7

A síntese de RNA ocorre usando uma das fitas do DNA como molde, e formando um híbrido RNA-DNA transiente

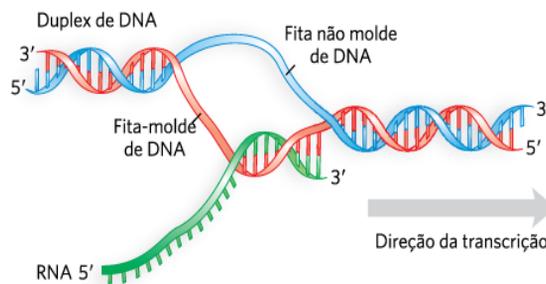
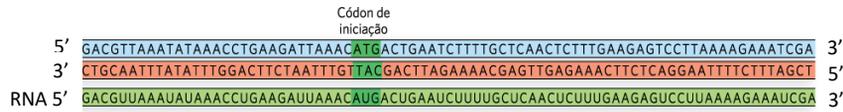


FIGURA 15-1 Transcrição do DNA em RNA. O duplex de DNA se abre, permitindo que uma cópia de RNA complementar seja produzida a partir de uma fita (molde). A síntese ocorre na direção 5'→3' na fita de mRNA.

8

Qual fita é copiada?



Qual destas fitas a RNA polimerase “lê” durante a síntese de RNA?

R: A fita de baixo (vermelha)

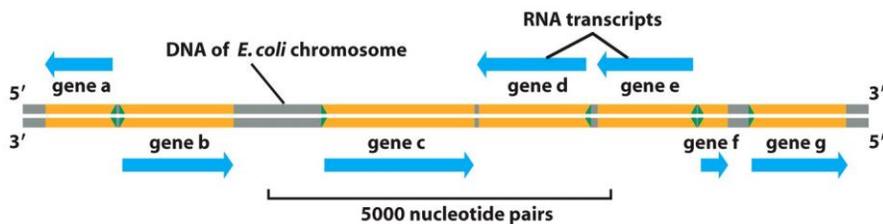
Em qual sentido a RNA polimerase “lê” esta fita?

R: 3' → 5'

Por definição, sempre que se apresenta a sequência de um gene, é mostrada apenas a fita codificadora, a não ser que explicitamente detalhado no texto.

9

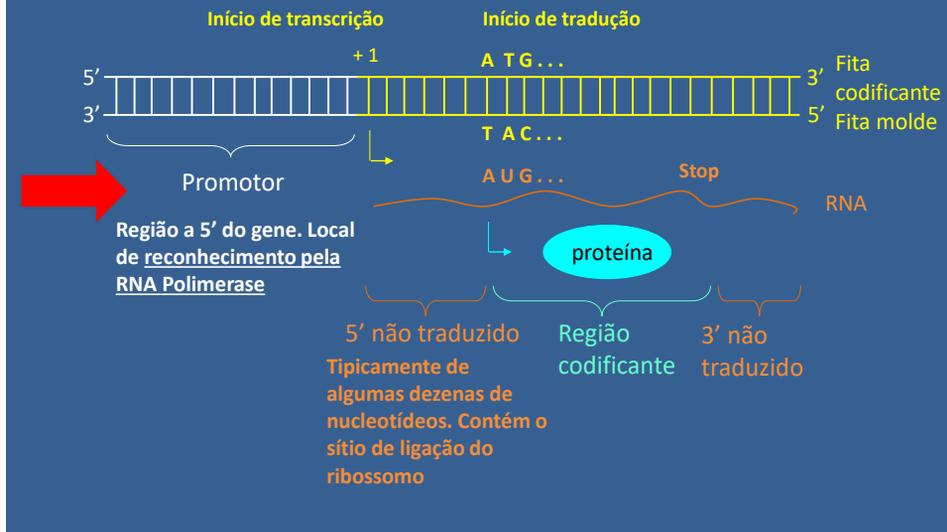
Os genes (fitas codificadoras) podem estar presentes em qualquer uma das duas fitas do genoma



10

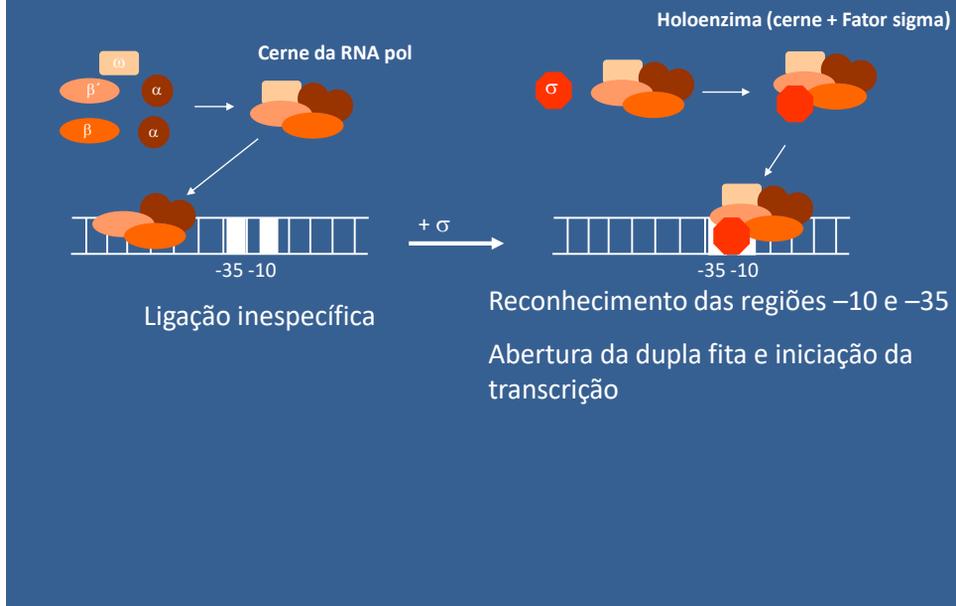
O gene bacteriano

Como encontrar um gene em meio a um mar de DNA?



11

Fatores Sigma e o reconhecimento de promotores em bactérias

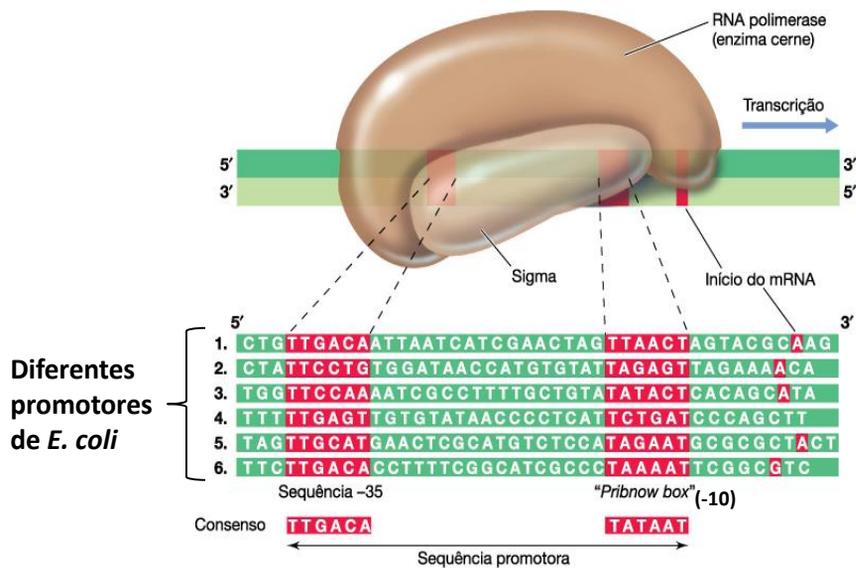


12

Em bactérias, existem diferentes fatores sigma, mas apenas uma RNA polimerase, que é responsável por transcrever todos os genes (todos os mRNAs, tRNAs, rRNAs, pequenos RNAs)

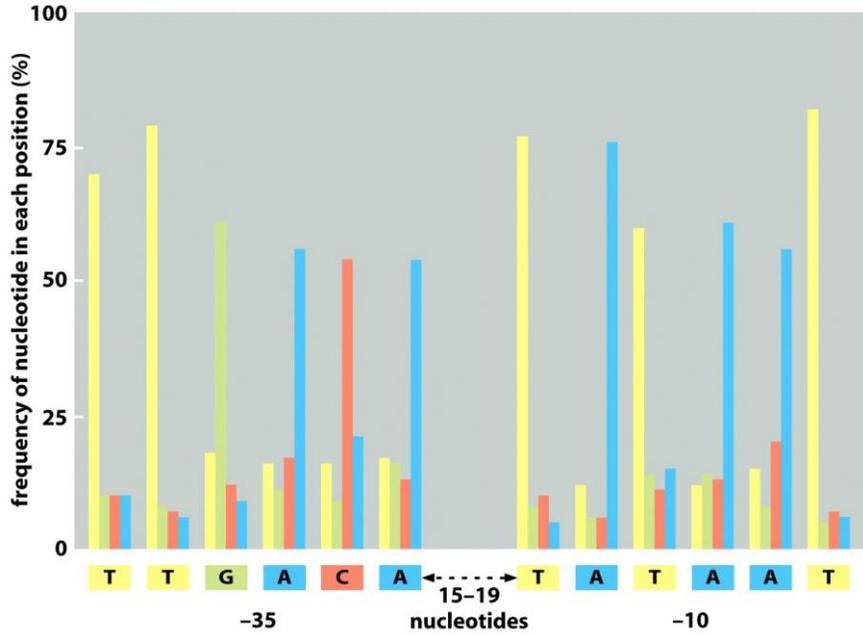
13

Fatores sigma reconhecem sequências nas regiões -35 e -10, e promovem uma ligação específica da RNA polimerase, posicionando-a para o início de transcrição



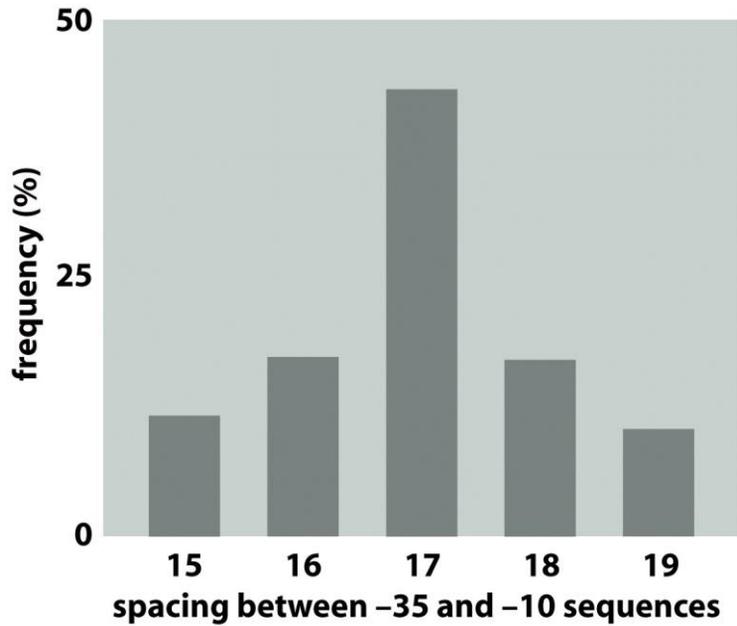
14

Frequência das bases em cada posição das regiões -10 e -35



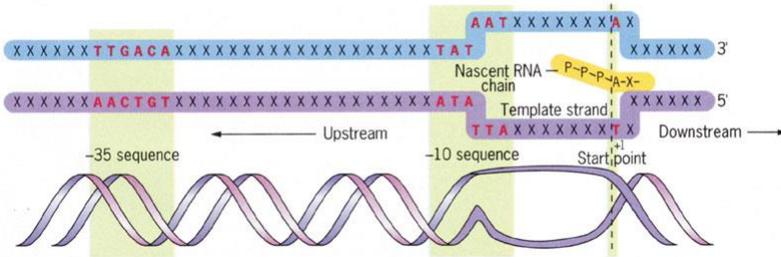
15

Espaçamento das bases entre as regiões -10 e -35



16

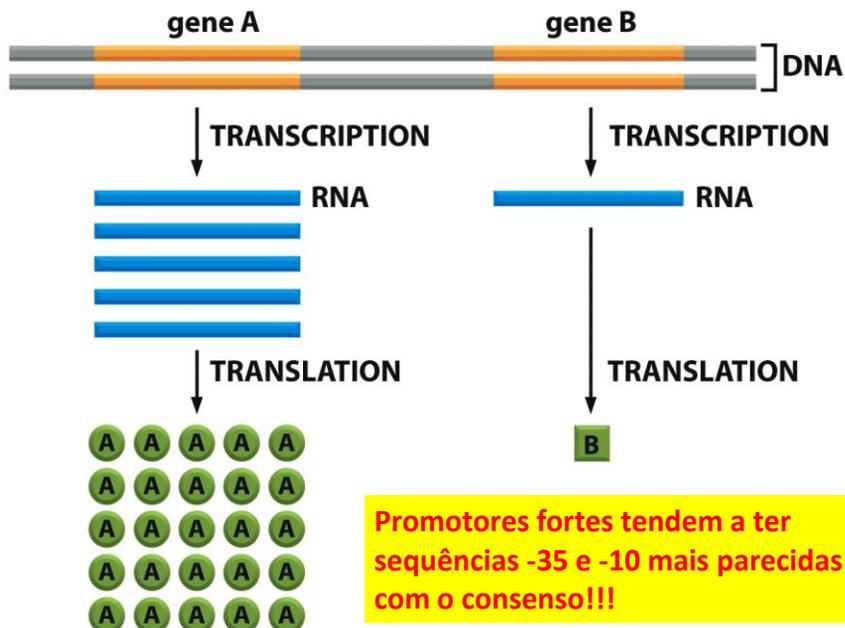
A dupla fita de DNA se abre em torno da região -10, permitindo o início da transcrição



A sequência da região -10 é rica em A/T!!

17

Diferentes genes são expressos em níveis variados



18

A “bolha” de transcrição

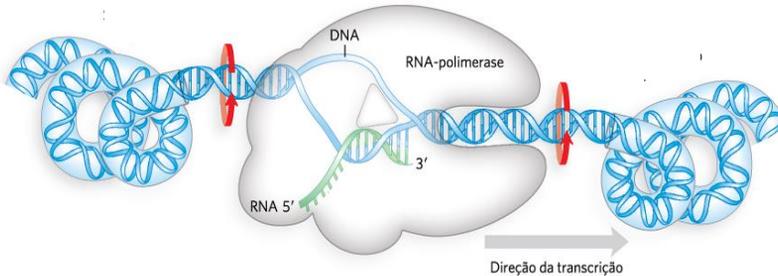


FIGURA 15-6 A “bolha” de transcrição. O duplex de DNA é desenrolado por cerca de 17 pb, formando uma bolha e permitindo que a RNA-polimerase acesse a fita-molde. A supertorção do DNA ocorre à frente e após a bolha de transcrição.

- A RNA polimerase cobre aproximadamente 35 pares de bases do DNA
- Em torno de 17 pares de bases separados
- O híbrido de DNA-RNA ocupa cerca de 9 pares de base

19

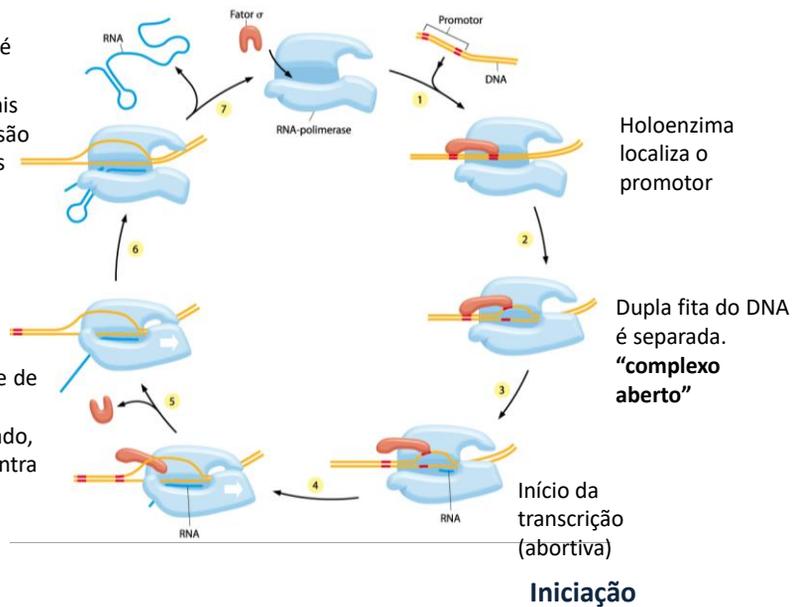
Uma visão geral da transcrição – 3 etapas

Término

Transcrição é terminada quando sinais específicos são encontrados

Elongação

Após a síntese de ~10 bases, o sigma é liberado, e a RNA Pol entra no modo de extensão



20

Acoplamento da transcrição e tradução em bactérias

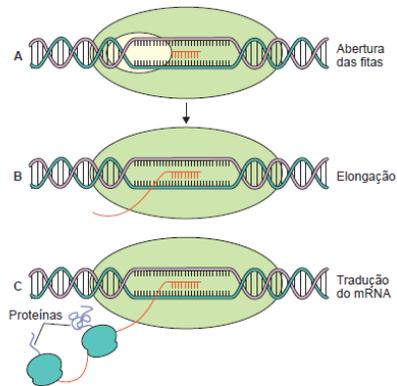
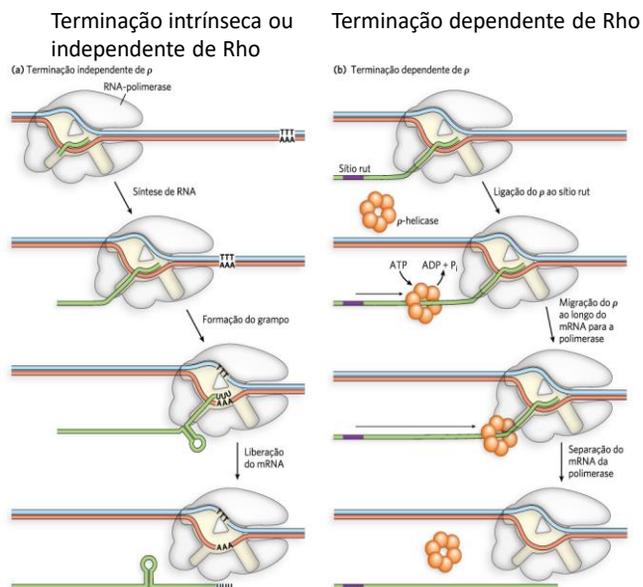


Figura 6.5 Elongação da transcrição e acoplamento com a tradução. Após a adição de alguns ribonucleotídeos (A), a RNA polimerase pode liberar a subunidade sigma (B) e realizar a elongação da transcrição somente com o cerne da enzima. Em bactérias, a transcrição da mensagem e sua leitura pelos ribossomos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

RNAs já são traduzidos pelos ribossomos antes do término de sua transcrição!

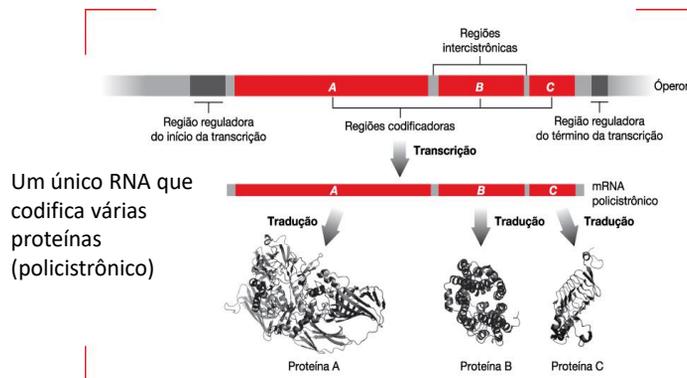
21

Como a transcrição termina?



22

Genes bacterianos estão tipicamente arranjados em **operons**



Qual é a vantagem?

23

A regulação da expressão gênica pode ser feita tanto por **ativadores** como por **repressores**

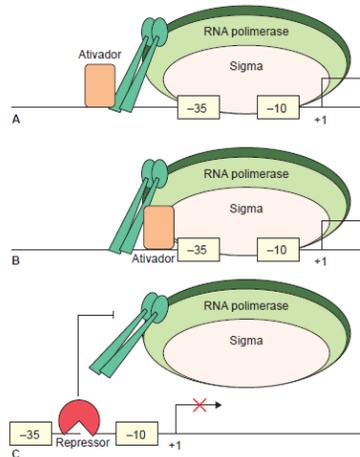


Figura 6.7 Posicionamento de fatores regulatórios da transcrição. Os ativadores de transcrição posicionam-se contactando a RNA polimerase, seja a subunidade alfa (A) ou sigma (B), e auxiliando a estabilização da RNA polimerase no promotor. Os repressores de transcrição, em sua maioria, reconhecem seqüências (operador) sobrepostas ao promotor (C) e, ao se ligarem, impedem a ligação da RNA polimerase.

Ativadores: interagem com a RNA pol e promovem a interação com o promotor-alvo

Repressores: Impedem o reconhecimento do promotor pela RNA pol

24

RNA polimerases Eucarióticas: uma para cada um dos tipos majoritários de RNA

Table 6–2 The Three RNA Polymerases in Eucaryotic Cells

TYPE OF POLYMERASE	GENES TRANSCRIBED
RNA polymerase I	5.8S, 18S, and 28S rRNA genes
RNA polymerase II	all protein-coding genes, plus snoRNA genes, miRNA genes, siRNA genes, and most snRNA genes
RNA polymerase III	tRNA genes, 5S rRNA genes, some snRNA genes and genes for other small RNAs

The rRNAs are named according to their “S” values, which refer to their rate of sedimentation in an ultracentrifuge. The larger the S value, the larger the rRNA.

25

A célula eucariótica produz diferentes tipos de RNA:

Tabela 6-1 Principais tipos de RNA produzidos nas células

Tipo de RNA	Função
mRNAs	RNAs mensageiros, codificam proteínas.
rRNAs	RNAs ribossomais, formam a estrutura básica do ribossomo e catalisam a síntese proteica.
tRNAs	RNAs transportadores, elementos essenciais para a síntese proteica, funcionando como adaptadores entre o mRNA e os aminoácidos.
snRNAs	pequenos RNAs nucleares, atuam em uma série de processos nucleares, incluindo o <i>splicing</i> do pré-mRNA.
snoRNAs	Pequenos RNAs nucleolares, utilizados para processar e modificar quimicamente os rRNAs.
scaRNAs	Pequenos RNAs de Cajal, usados para modificar snoRNAs e snRNAs.
miRNAs	microRNAs, regulam a expressão gênica tipicamente pelo bloqueio da tradução de mRNAs selecionados.
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência, desligam a expressão de genes pela degradação direta de mRNAs selecionados e pelo estabelecimento de estruturas de cromatina compacta.
Outros RNAs não-codificantes	Atuam em diversos processos celulares, incluindo a síntese de telômeros, a inativação do cromossomo X e o transporte de proteínas para o retículo endoplasmático.

26

RNA Polimerase II de eucariotos X RNA Polimerase bacteriana

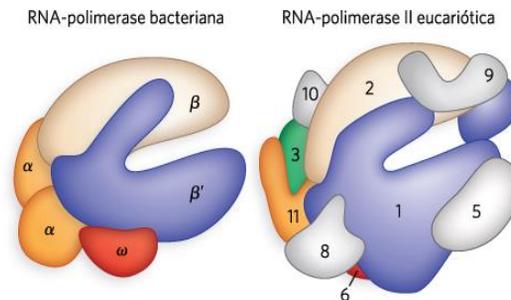


FIGURA 15-21 Elementos estruturais da RNA-polimerase bacteriana e Pol II eucariótica. Embora a Pol II tenha mais subunidades com componentes adicionais, ela possui similaridades estruturais óbvias com a RNA-polimerase bacteriana. Os números nas subunidades da Pol II indicam RBP1, RBP2 e assim por diante.

27

Promotores da Pol II eucariótica também possuem sequências típicas que são reconhecidas pelo aparato de transcrição

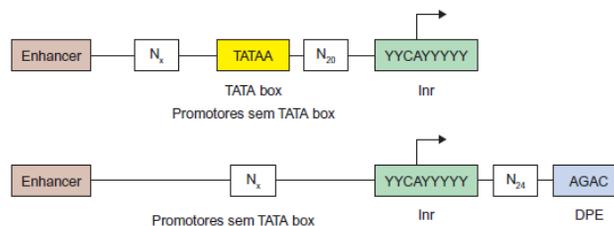


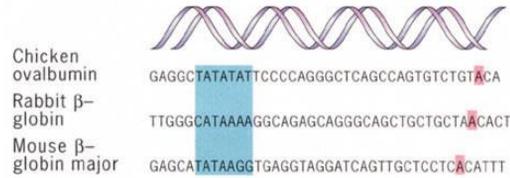
Figura 6.15 Elementos básicos de promotores de RNA polimerase II. Os promotores de RNA polimerase II contêm o elemento Inr, no qual efetivamente se inicia a transcrição e pode ou não conter uma TATA-box a montante do início e/ou um elemento DPE dentro da região transcrita. Os sítios de ligação de ativadores de transcrição, sequências denominadas *enhancers*, variam em número, sequência e localização.

Promotores sem TATA box possuem elementos “downstream” (DPE) que auxiliam no seu reconhecimento

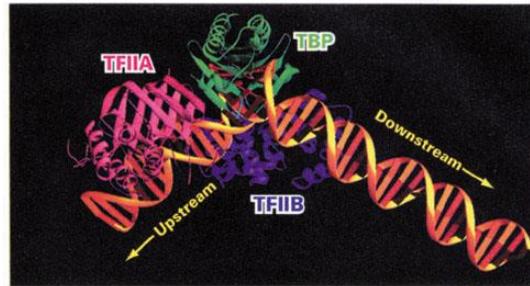
28

Promotores eucarióticos também possuem sequências típicas que são reconhecidas pelo aparato de transcrição

TATA Box: reconhecido pela proteína TBP



(a)



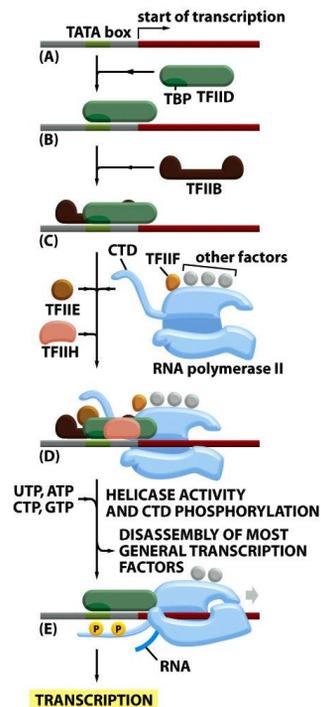
(b)

29

O reconhecimento de promotores eucarióticos requer o auxílio de vários **FATORES DE TRANSCRIÇÃO GERAIS**

(TFIIA, TFIIB, etc...)
Cada um composto por diversas proteínas!

O complexo TFIIF possui as atividades de quinase e helicase



30

Vários outros elementos estão presentes nos promotores eucarióticos, auxiliando no seu reconhecimento pelo aparato de transcrição

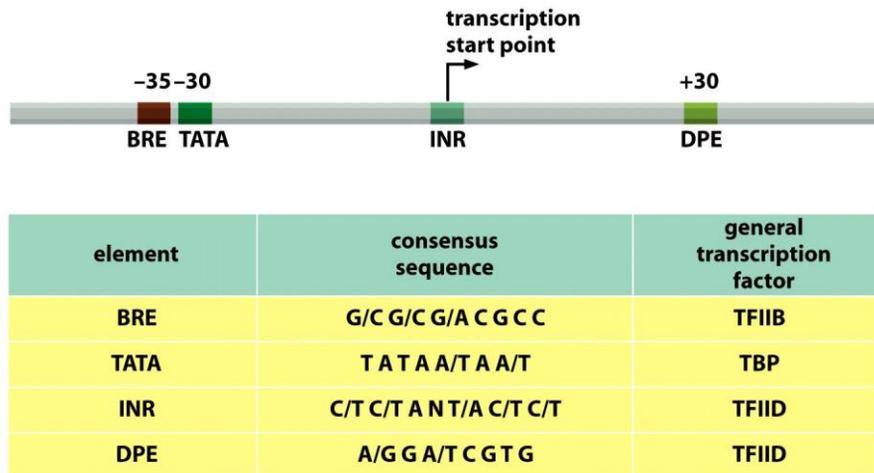
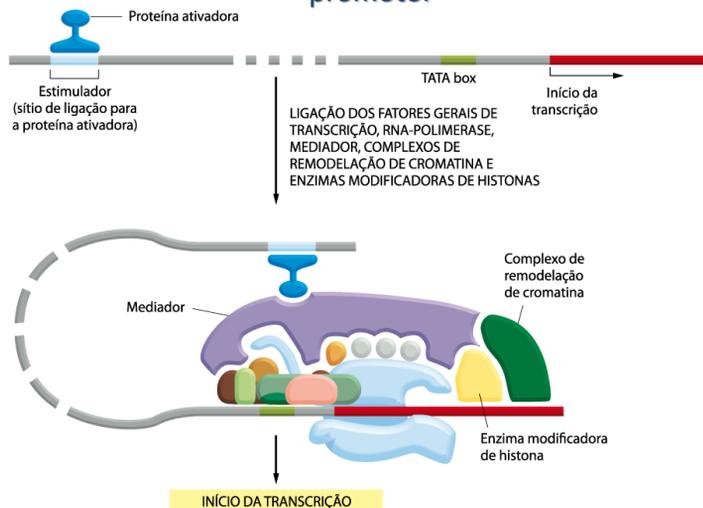


Figure 6-17 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

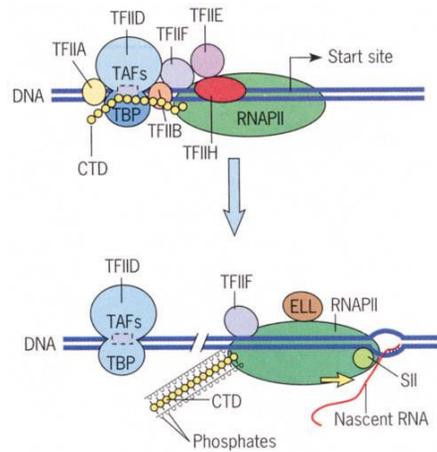
31

Elementos reguladores da transcrição, como enhancers, podem estar presentes em regiões à montante do promotor



32

A RNA Polimerase é fosforilada em seu Domínio C-terminal (CTD)



Esta fosforilação é mediada pelo fator TFIIH, e converte a RNA polimerase em uma enzima altamente processiva, que deixa os fatores de transcrição para trás e começa a fase de elongação. A fosforilação de CTD também desempenha outros papéis.

33

Visão geral da transcrição mediada pela RNA Pol II

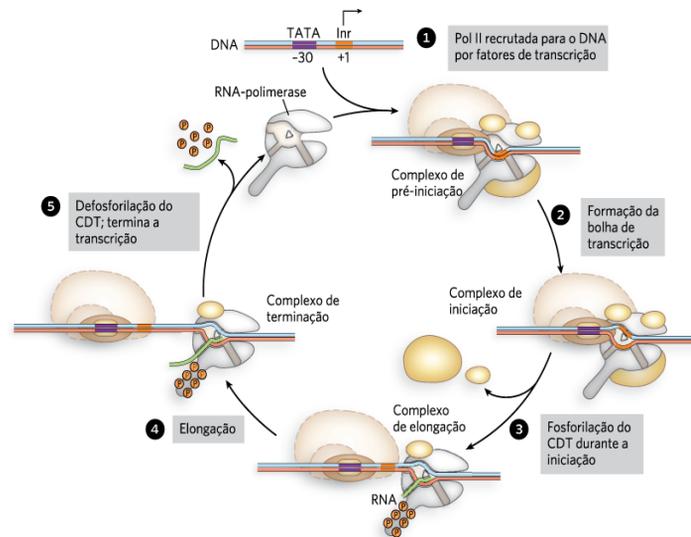
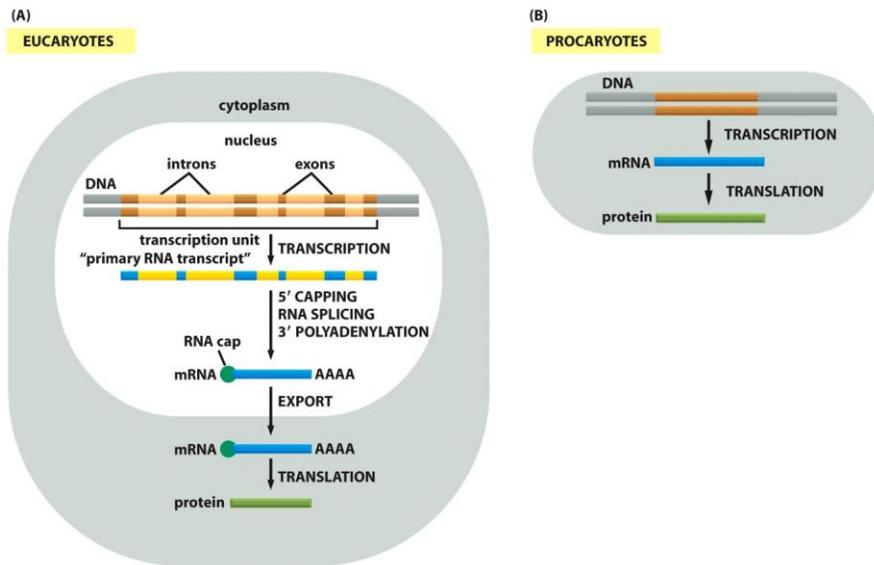


FIGURA 15-22 Transcrição nos promotores da Pol II. As fases da transcrição pela Pol II — montagem, iniciação, elongação e terminação — estão associadas a proteínas características, conforme descrito no texto. A montagem organizada e a dissociação dos fatores conduzem o processo adiante.

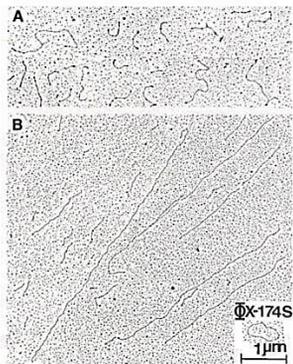
34

O gene foi transcrito até o final. Acaba por aí? Depende...



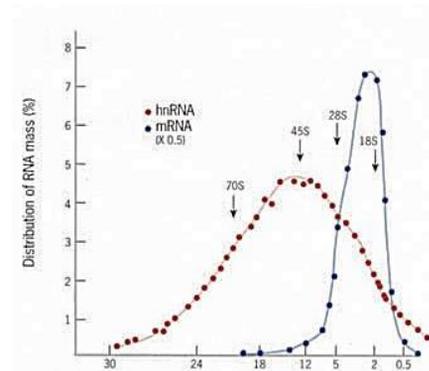
35

RNAs são processados em fragmentos menores após a sua síntese



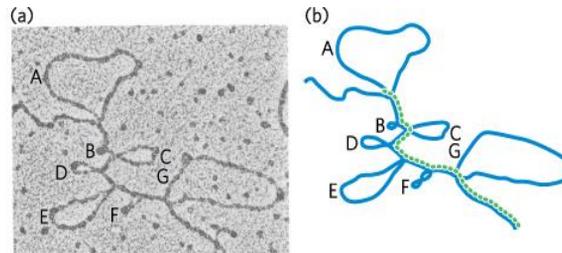
mRNAs maduros presentes no citoplasma

hnRNAs do presentes no núcleo
(heterogenous nuclear RNAs)



36

Mais evidências de processamento! Análise de hibridação de RNA-DNA por microscopia eletrônica



Evidência de que os genes são interrompidos por regiões não codificantes: nem todas partes do gene (DNA) estão representadas no mRNA

37

Os genes eucarióticos são interrompidos por **introns**

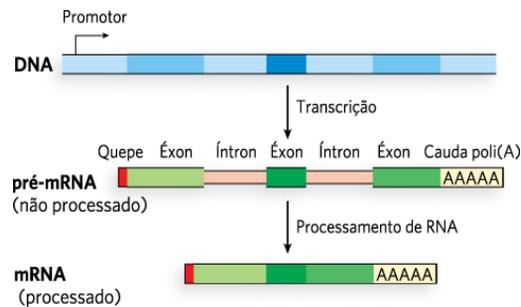
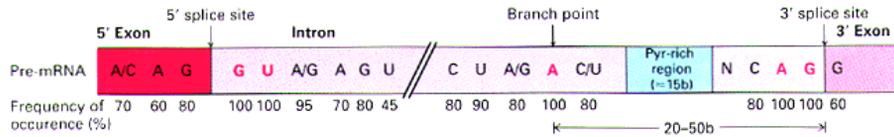


FIGURA 16-7 Genes interrompidos. Introns são sequências que não codificam proteínas no DNA e no mRNA transcrito que são removidas do RNA durante o processamento para formar um mRNA proteína-codificante contínuo, formado somente por éxons.

38

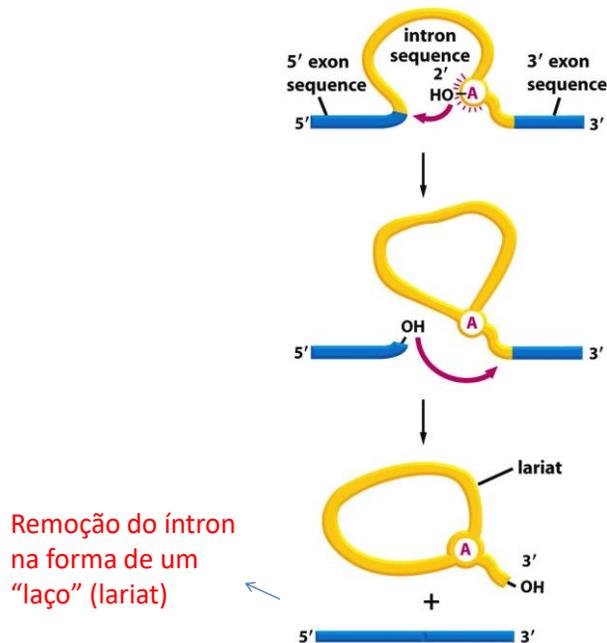
Juntando os éxons: como os íntrons são reconhecidos e removidos?



- O processo de remoção dos íntrons é conhecido como **splicing**
- O splicing é mediado por pequenos RNAs chamados **snRNAs** e proteínas a eles associadas. Estes complexos são chamados de **SNRPs**
- O conjunto de snRNPs e outras proteínas envolvidas no splicing é chamado de **spliceossomo**

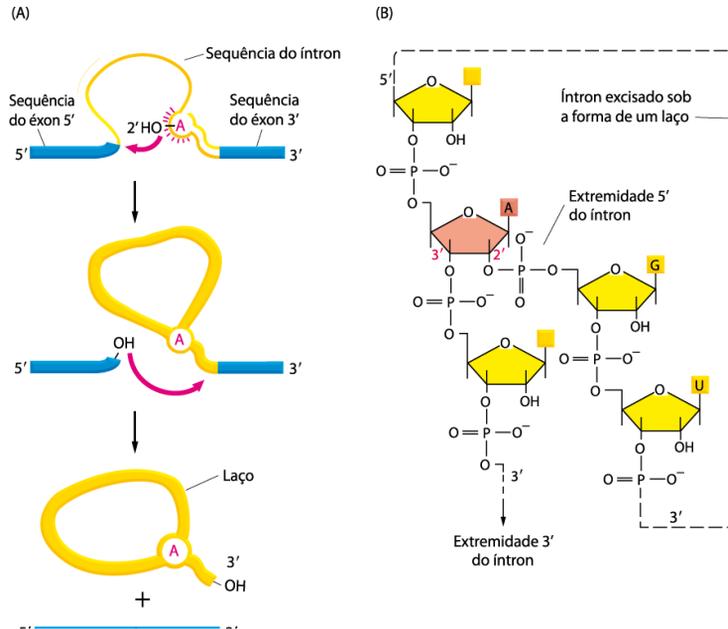
39

Mecanismo de splicing

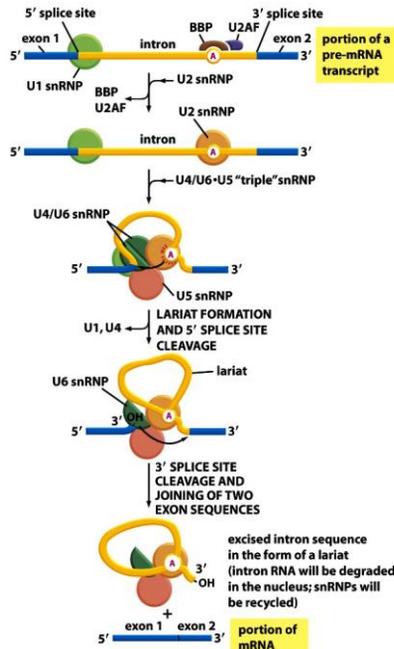


40

A formação do laço envolve uma ligação 5' P - 2' OH atípica



41



The U1 snRNP forms base pairs with the 5' splice junction (see Figure 6-30A) and the BBP (branch-point binding protein) and U2AF (U2 auxiliary factor) recognize the branch-point site.

The U2 snRNP displaces BBP and U2AF and forms base pairs with the branch-point site consensus sequence (see Figure 6-30B).

The U4/U6-U5 "triple" snRNP enters the reaction. In this triple snRNP, the U4 and U6 snRNAs are held firmly together by base-pair interactions. Subsequent rearrangements create the active site of the spliceosome and position the appropriate portions of the pre-mRNA substrate for the first phosphoryl-transfer reaction.

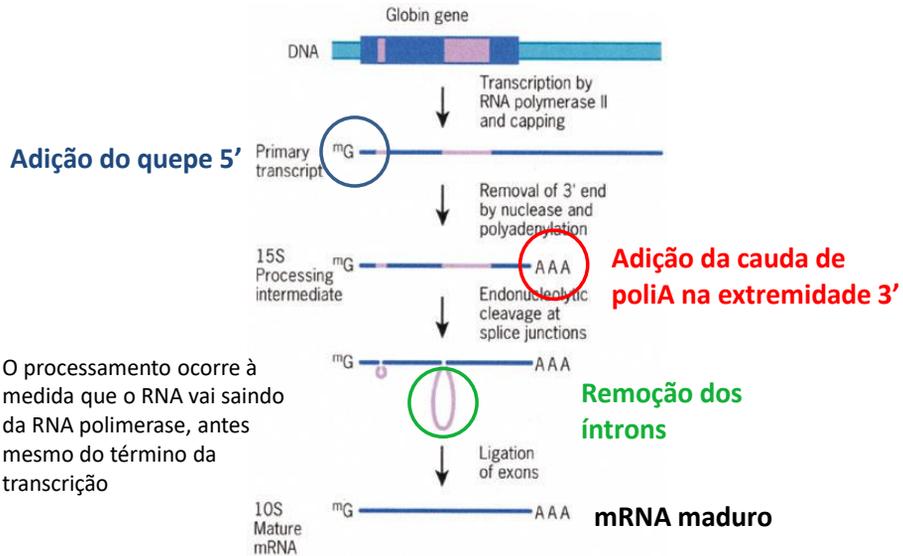
Several more RNA-RNA rearrangements occur that break apart the U4/U6 base pairs and allow the U6 snRNP to displace U1 at the 5' splice junction (see Figure 6-30A) to form the active site for the second phosphoryl-transfer reaction, which completes the splice.

Não precisa saber!!!

Figure 6-29 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

42

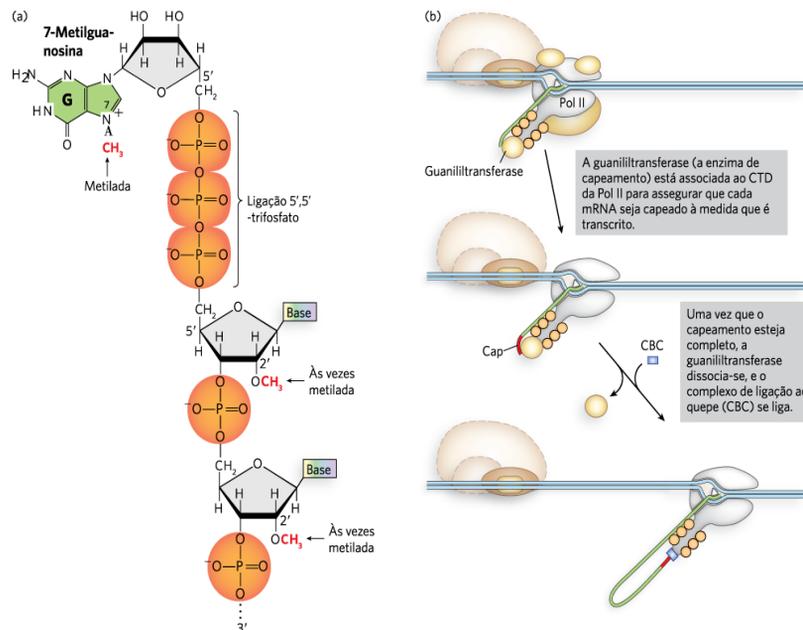
Os RNAs transcritos pela RNA Pol II devem ser processados para se tornarem mRNAs maduros



O processamento ocorre à medida que o RNA vai saindo da RNA polimerase, antes mesmo do término da transcrição

43

Adição do quepe (cap) de 5-metilguanossina na extremidade 5' do mRNA



44

Adição do quepe (cap) de 5-metilguanosina na extremidade 5' do mRNA

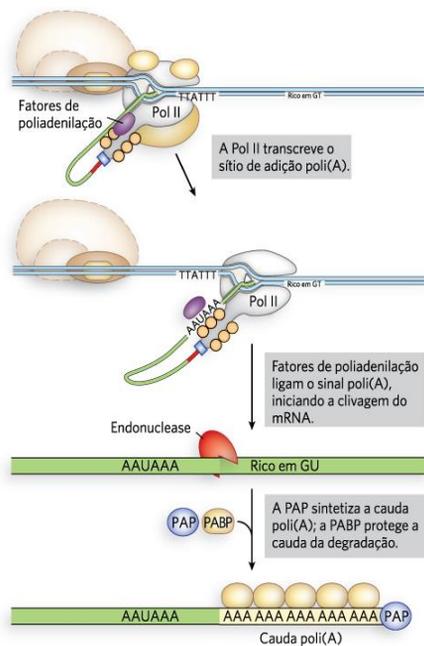
Adicionado por uma ligação não usual 5' – 5'

Funções do quepe:

- Proteção contra exonucleases
- Auxilia no transporte para fora do núcleo
- Papel no início da tradução

45

Adição do cauda poli(A) na extremidade 3' do RNA



46

Adição do cauda poli(A) na extremidade 3' do RNA

- Endonuclease cliva o RNA após a sequência AAUAAA
- **Poli(A) Polimerase** adiciona em torno de 250 adenosinas sem a necessidade de molde
- Proteínas que se ligam à cauda poli(A) protegem o RNA da degradação

Considerando que 80% do RNA celular é composto pelos rRNAs, como a presença da cauda poli(A) facilita o estudo de RNAs mensageiros?

47

Coordenação dos eventos de processamento com a transcrição

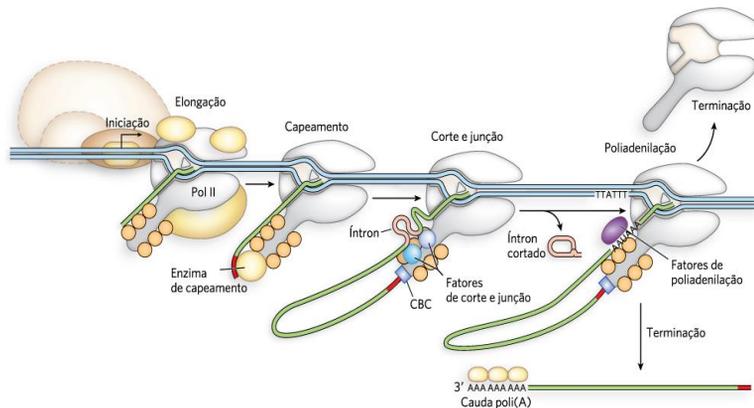


FIGURA 16-5 Coordenação da transcrição e processamento do pré-mRNA. As proteínas de processamento do mRNA associam-se ao domínio C-terminal da Pol II. Conforme o mRNA é sintetizado, a enzima de capeamento (guanililtransferase), fatores de corte e junção e fatores de poliadenilação transferem-se do CTD da Pol II para o mRNA e processam o mRNA à medida que ele é transcrito. O transcrito maduro é utilizado para múltiplas rodadas de síntese proteica e então degradado.

48

Processamento (splicing) alternativo: combinando diferentes exons para formar proteínas diferentes

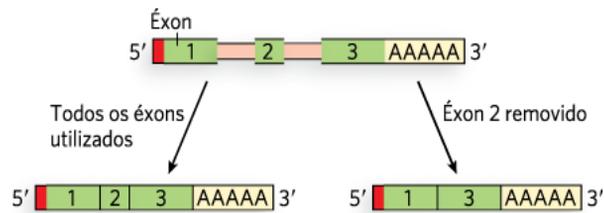
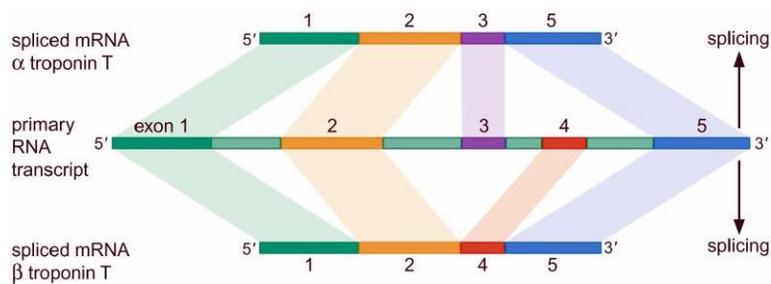


FIGURA 16-8 Diferentes modos de combinar os éxons. O processamento alternativo pode gerar produtos múltiplos a partir de um único gene.

49

Exemplo: Formação de duas proteínas diferentes a partir de um mesmo gene



50

Tá complicado? Olha esse aqui:

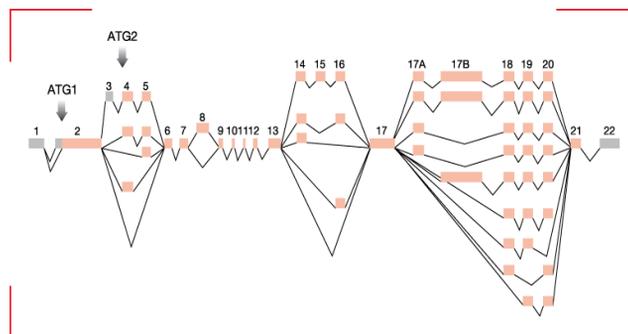


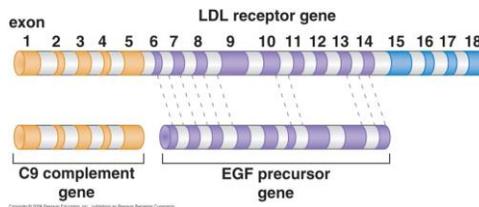
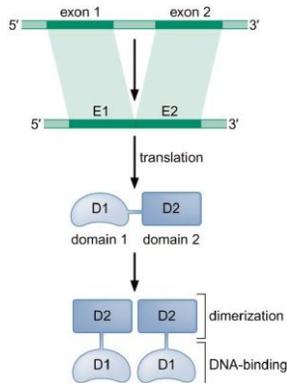
Figura 5.5

Geração de múltiplos mRNAs a partir do gene humano EPB41, que codifica a proteína 4.1R. O gene, com mais de 90 kb de extensão, é transcrito em um único pré-mRNA, que gera pelo menos 18 isoformas diferentes da proteína. Isso é possível a partir da utilização de dois códons de início de tradução alternativos (ATG1 e ATG2, indicados por setas) e do *splicing* alternativo de 12 dos 23 éxons (representados por barras e numerados) do gene. As regiões codificadoras dos éxons estão representadas em cor-de-rosa, e as não codificadoras, em cinza; as sequências dos introns não estão representadas. As linhas ligam os éxons unidos por *splicing*; os eventos de *splicing* alternativo estão representados em paralelo.

51

Por que os genes eucarióticos possuem íntrons?

- Splicing pode ser alvo de regulação e de processamento alternativo, modulando a expressão do gene e aumentando a capacidade de codificação de um gene.
- Os éxons podem **facilitar a evolução!**

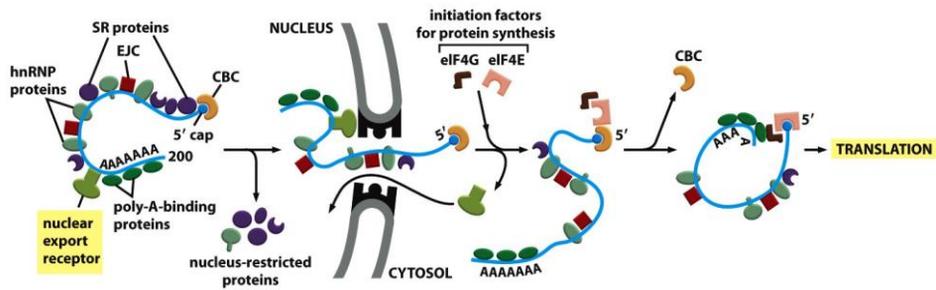


Combinando diferentes éxons por rearranjos gênicos, genes codificando novas proteínas podem surgir.

Éxons muitas vezes correspondem a domínios funcionais das proteínas.

52

Os RNAs maduros (“export-ready”) devem ser exportados através da membrana nuclear para o citoplasma, onde serão traduzidos



Como a célula sabe que um RNA está “pronto”?

O RNA está coberto por proteínas ligadas ao CAP e cauda poliA, e também alguns fatores do spliceossomo

Figure 6-40 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)