

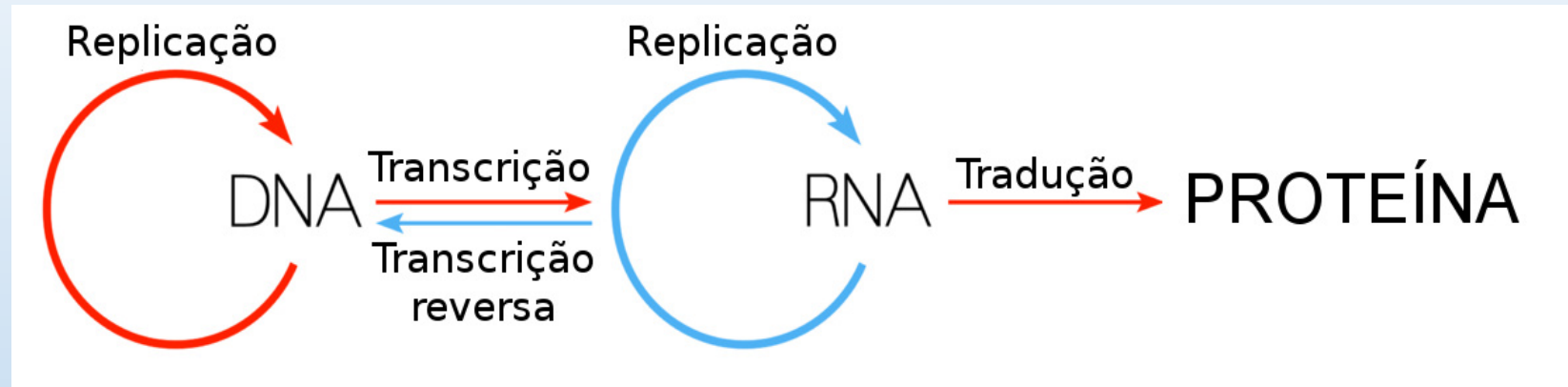
Replicação, transcrição e tradução da informação genética

Disciplina de Graduação da Faculdade de Saúde Pública - IMT2003

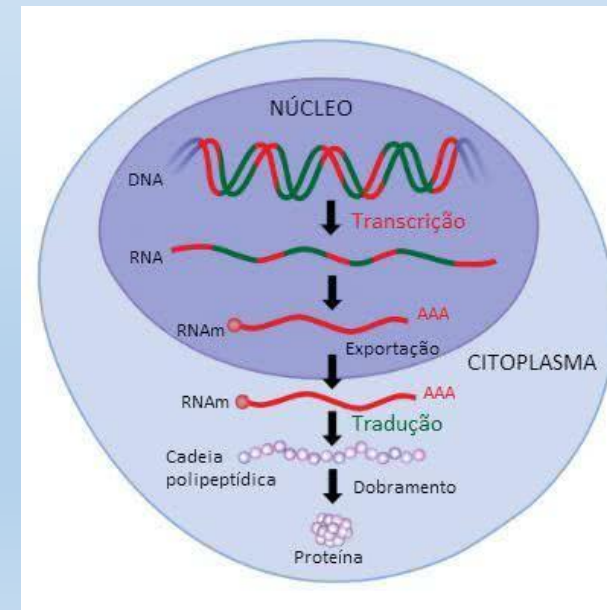
Thelma S. Okay – Profa. Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP)

thelma.okay@usp.br

Dogma central da biologia molecular



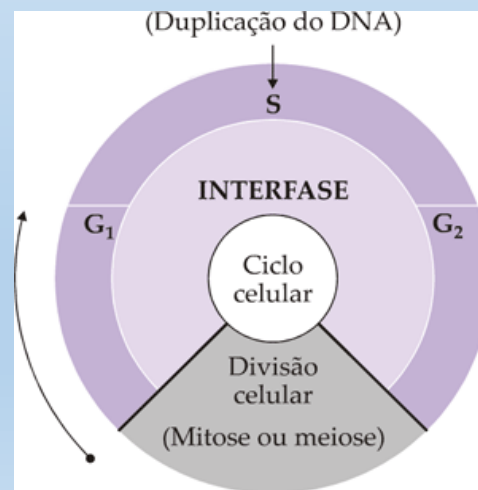
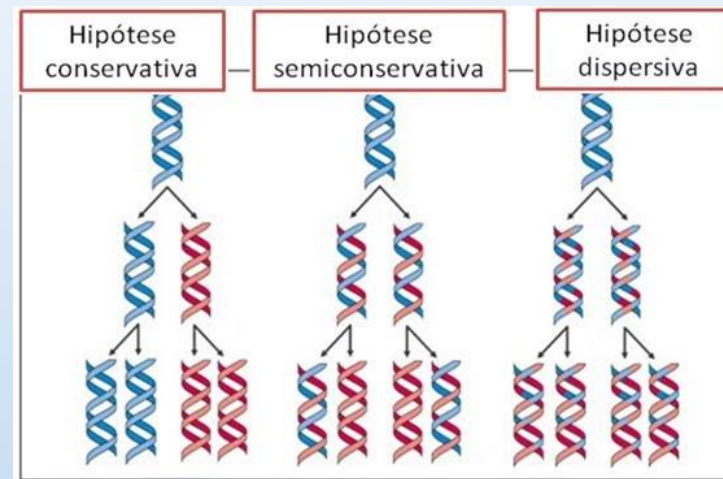
- O Dogma Central da Biologia Molecular explica como ocorre o fluxo de informações genéticas
- Foi postulado por Francis Crick em 1958



Replicação do DNA

Replicação do DNA

- A replicação ou duplicação do DNA é um processo semiconservativo, pois cada uma das moléculas recém-formadas é igual à molécula que a originou e forma uma nova fita, complementar ao DNA que serviu de molde
- A replicação do DNA ocorre na intérfase da divisão celular



INTÉRFASE

Intérfase
Período que decorre entre o fim de uma divisão celular e o início da divisão seguinte.

Centrosomas (pares de centríolos) Só nas células animais!
Cromatina
Núcleo
Membrana citoplasmática
Membrana nuclear

Período G₁: formação de organelos celulares; intensa actividade de biossíntese (RNA, proteínas, lípidos e glicídios) ⇒ crescimento celular.

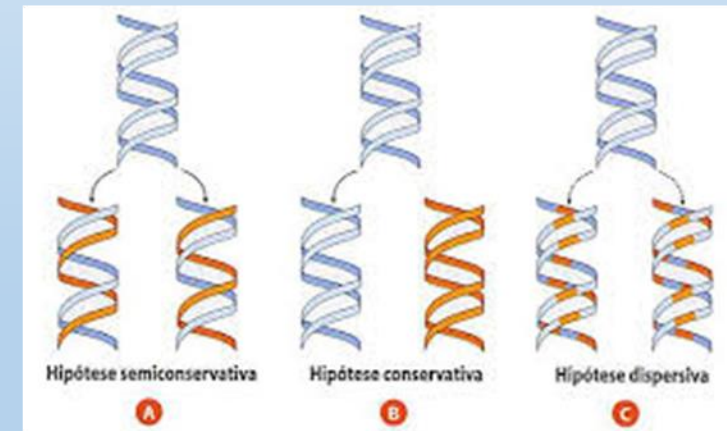
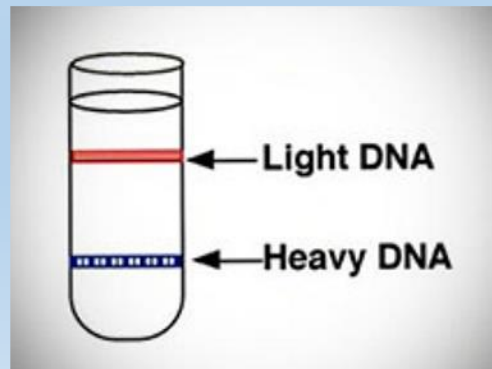
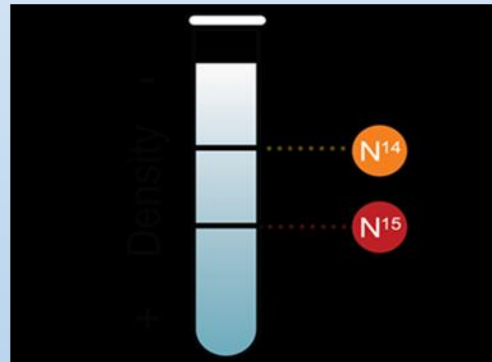
Período S: replicação do DNA e síntese de histonas.

Período G₂: preparação para a divisão celular: mais biossíntese de proteínas e estruturas membranares.

J.R.

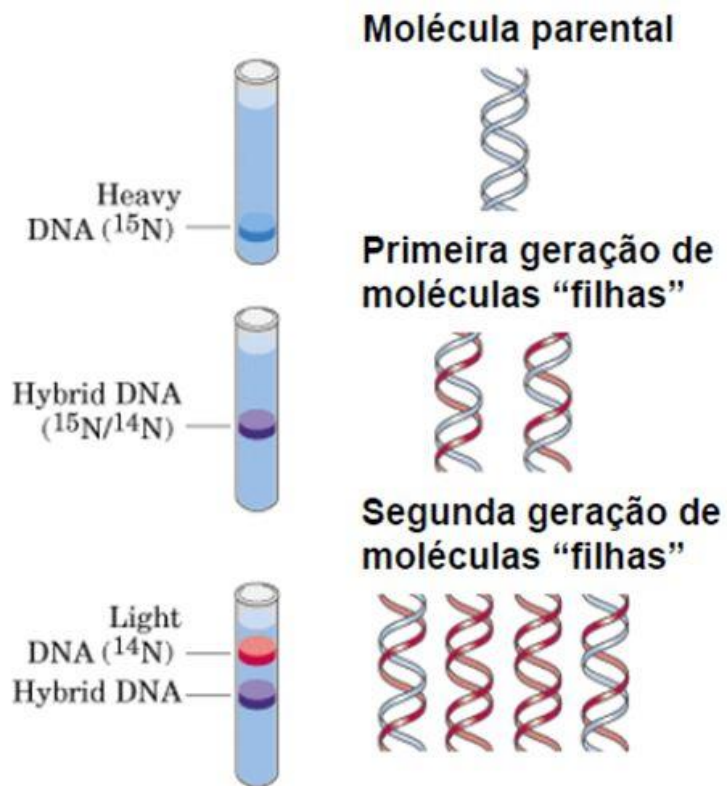
Replicação do DNA

- 1957: Matthew Stanley Meselson e Franklin Stahl descreveram a replicação semi-conservativa do DNA da bactéria *E. coli*
- Na replicação, as duas fitas de DNA se desconectam e cada uma serve de modelo para a síntese de uma fita complementar nova



Replicação do DNA

Experimentos de Meselson e Stahl (1958):



Cultivo bacteriano em meio contendo o isótopo ^{15}N

Células transferidas para meio com ^{14}N

Extração e Purificação de DNA

Replicação de DNA: sítio de origem



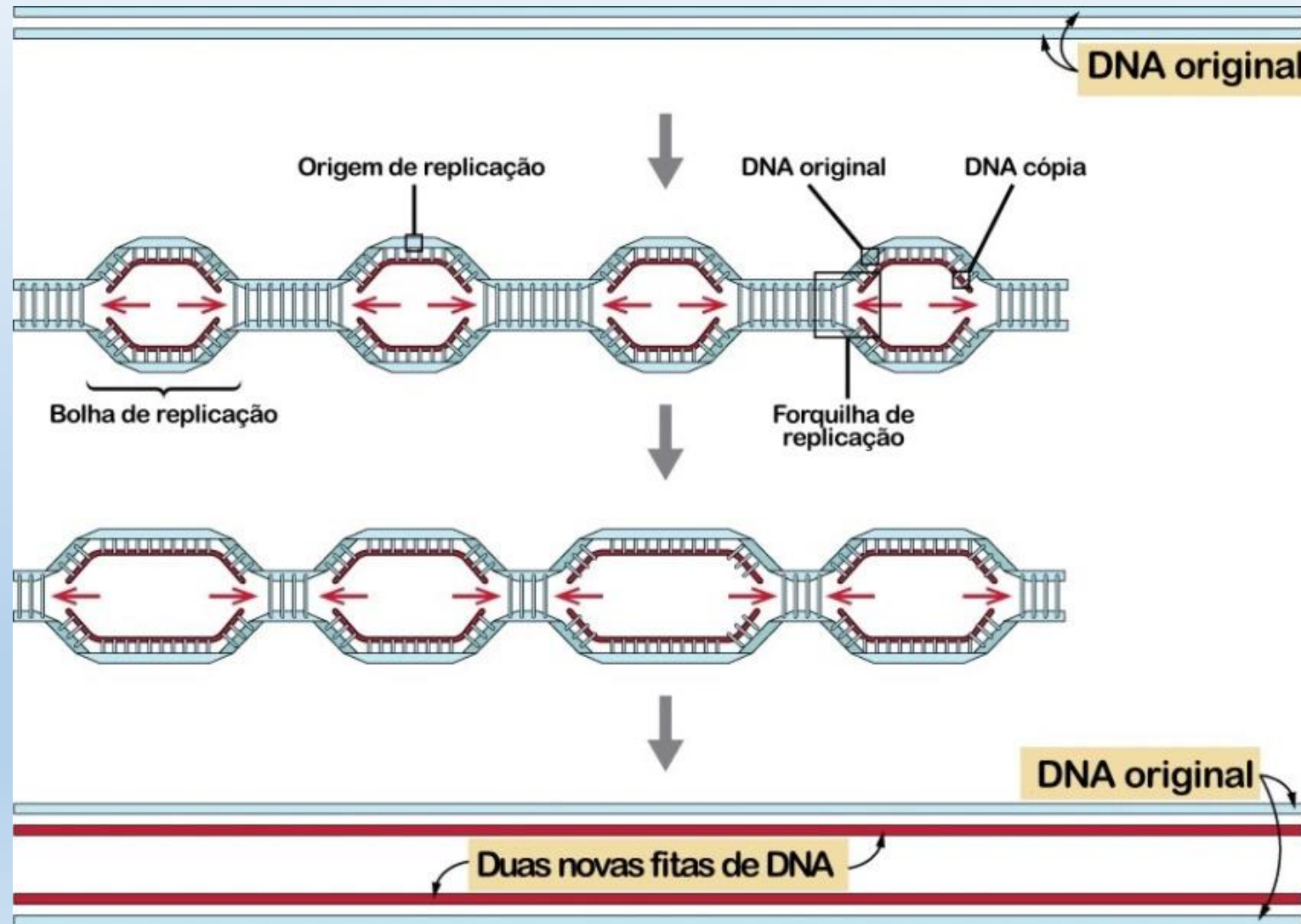
INÍCIO DA REPLICAÇÃO - ORIGEM

- Região do DNA onde a replicação começa
- Origens de procariotos e eucariotos – ricas em AT
- Procariotos, plasmídeos e vírus - uma origem
- Eucariotos – várias origens
- *E. coli* – região de 245 pb essencial à replicação

4 seqüências de 9 pb - TTAT(C/A)CA(C/A)A

3 seqüências de 13 pb ricas em AT

Replicação de DNA: sítio de origem



Replicon

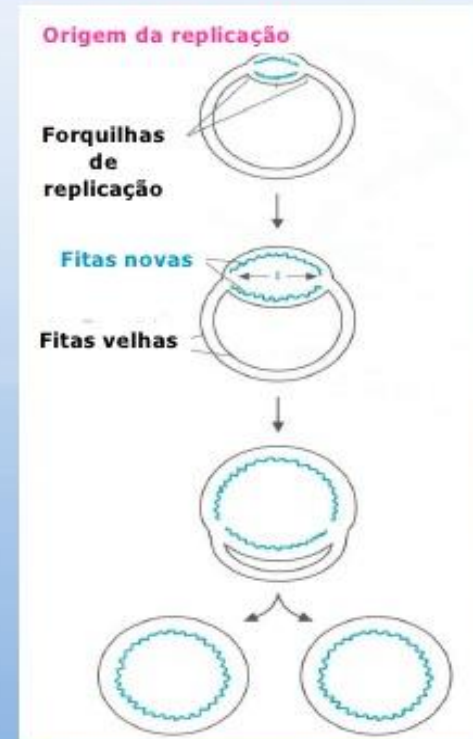
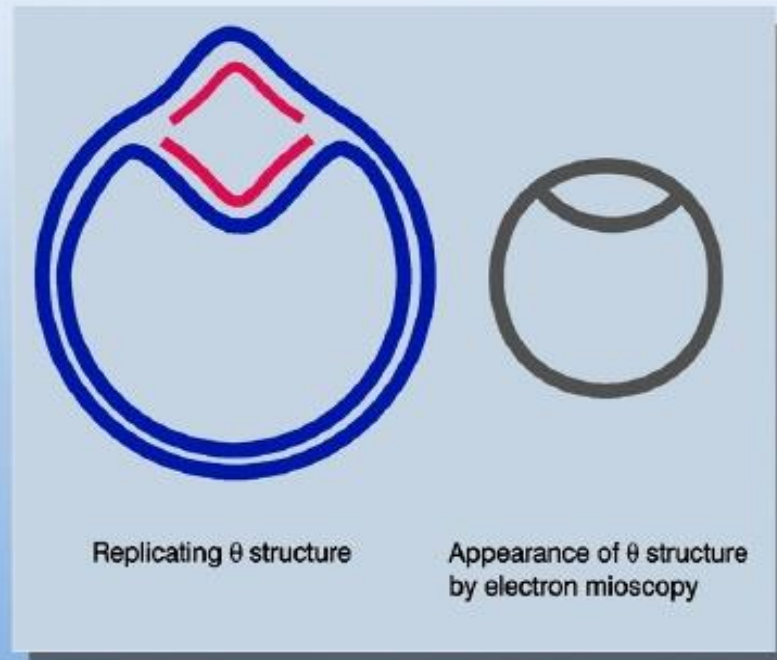
Replicon: Unidade do DNA onde está ocorrendo um evento de replicação

Replicon:

1. Origem + Término
2. Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular
3. O genoma de uma célula procariótica constitui um único replicon
4. Cada cromossomo eucariótico constitui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente

Replicon: procariotos

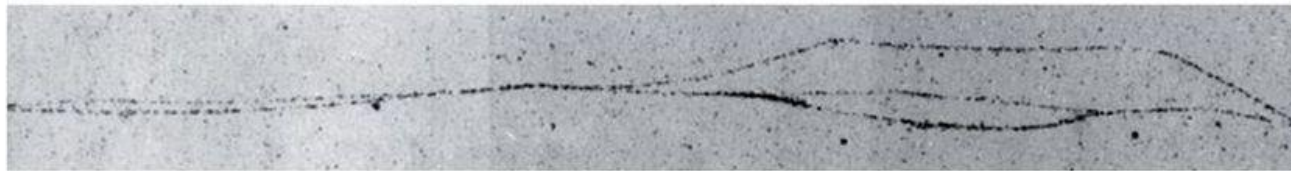
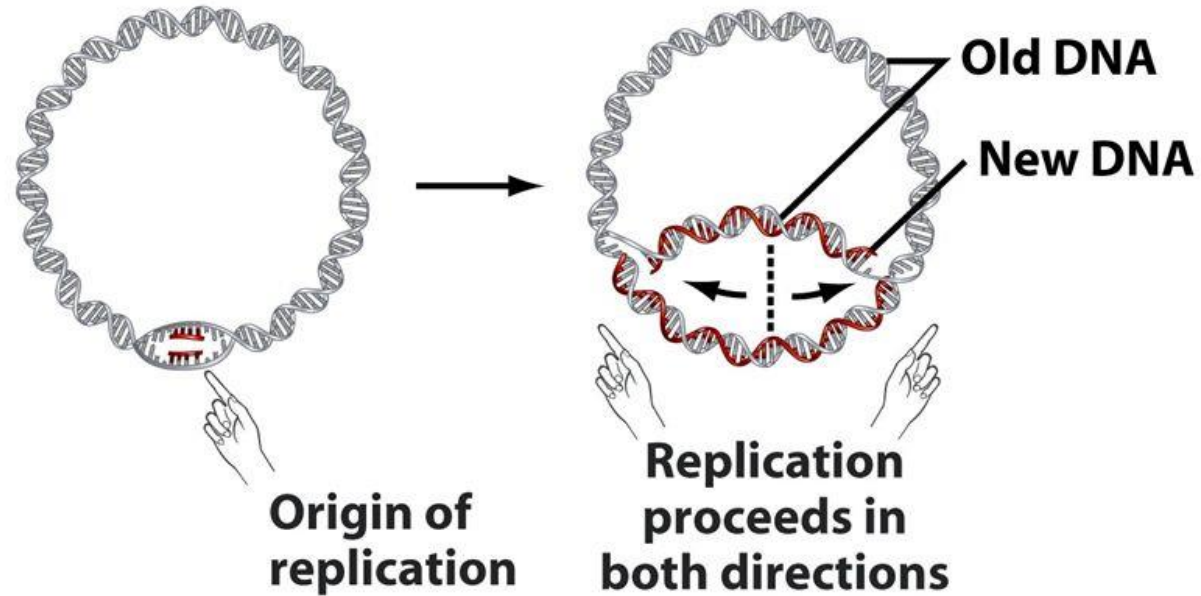
O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



- A velocidade da forquilha de replicação bacteriana é 50000pb/min
- Um única origem de replicação em *E.coli* (OriC, 245 pb)

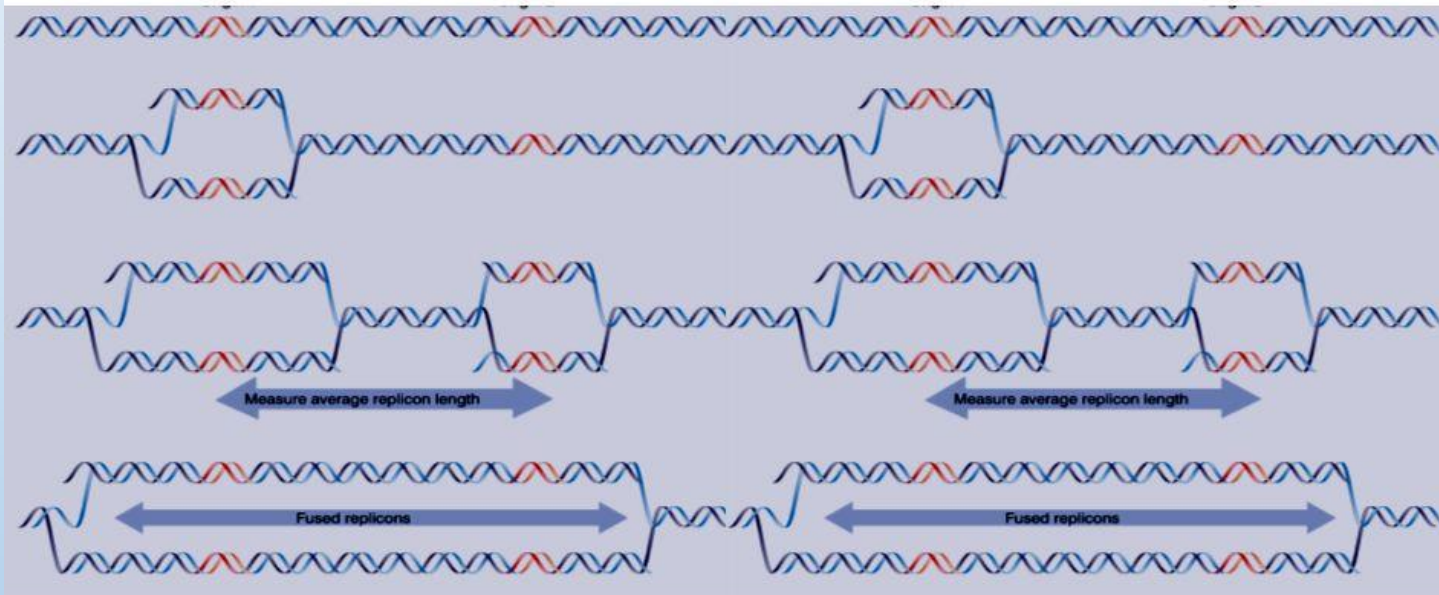
Replicon: procariotos

Origem de replicação em bactérias



Replicons: eucariotos

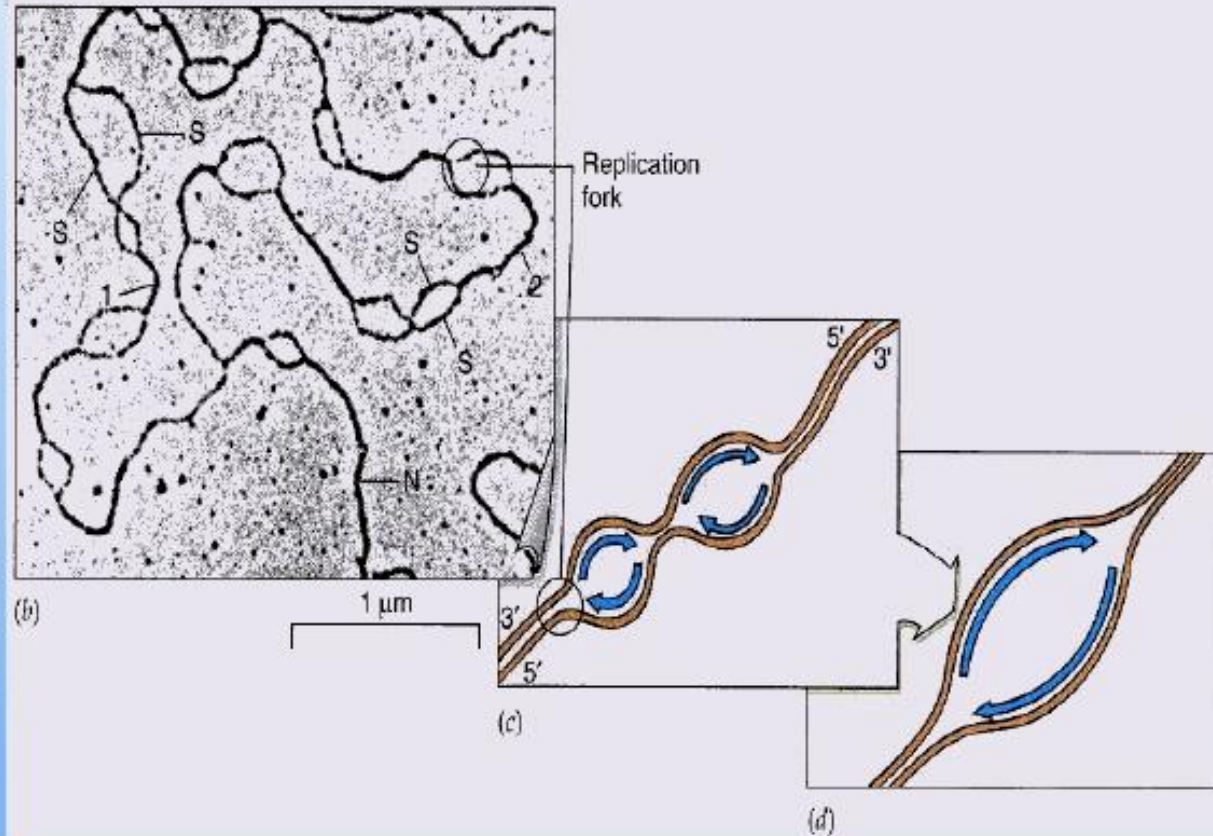
O genoma eucariótico constitui vários replicons



- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2000pb/min
- Os replicons eucarióticos tem 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes
- Fase S demora ~ 6hrs em uma célula somática

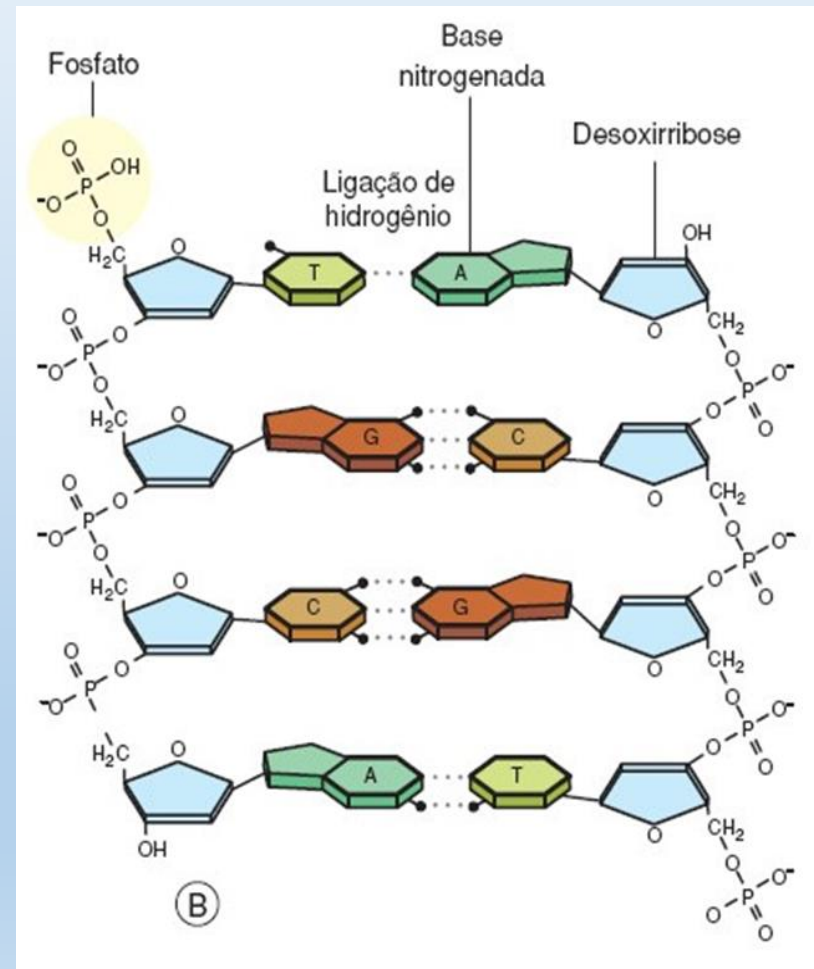
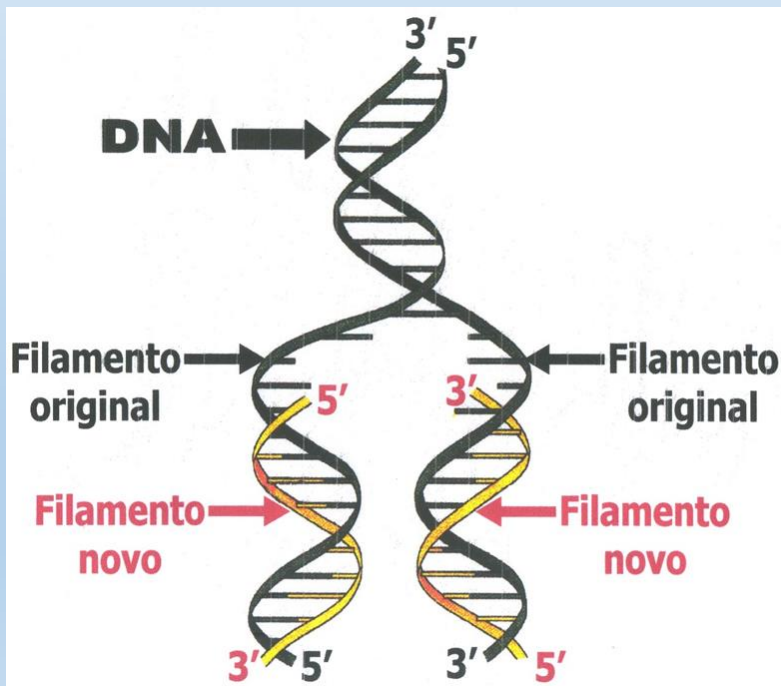
Replicons: eucariotos

Nos eucariotos são abertos várias "bolhas de replicação" ou replicons



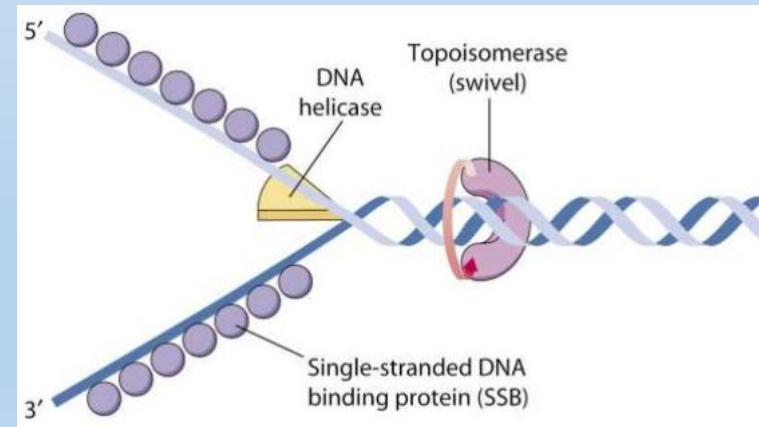
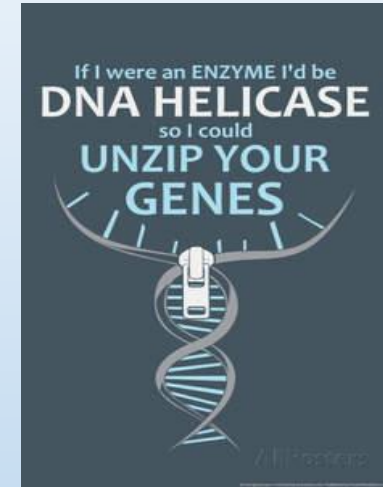
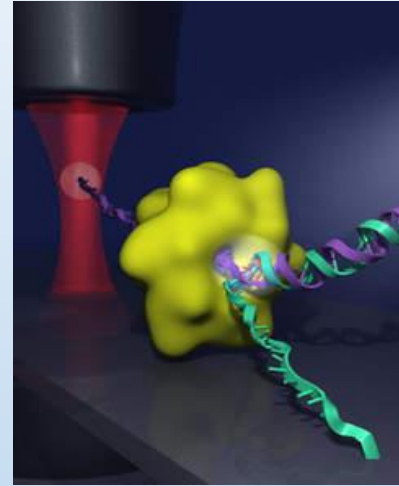
Replicação do DNA

- O primeiro passo é a separação da dupla fita
- Ocorre quebra das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e as fitas são separadas, formando a forquilha de replicação



Replicação do DNA

- A **DNA helicase** é uma enzima que promove a abertura da hélice de DNA, separando-a em duas fitas simples para que possa sofrer replicação
- A helicase quebra as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) de ambas as fitas de DNA fazendo com que estas se separem
- A helicase se move ao longo da dupla fita de DNA utilizando energia proveniente da hidrólise do ATP para separá-las

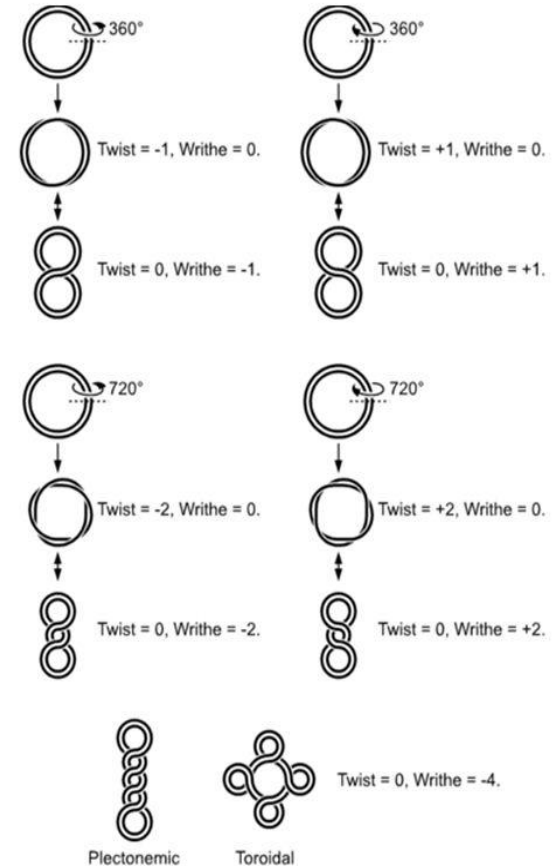


Replicação do DNA

- As helicases recebem ajuda da enzima DNA girase (topoisomerase), que desenrola a cadeia, diminuindo a tensão do DNA antes da ação das helicases
- Depois de aberta, a dupla fita de DNA não volta a se ligar devido à ação das proteínas ligadoras de fita simples (proteínas SSB- Single Strand Binding proteins)

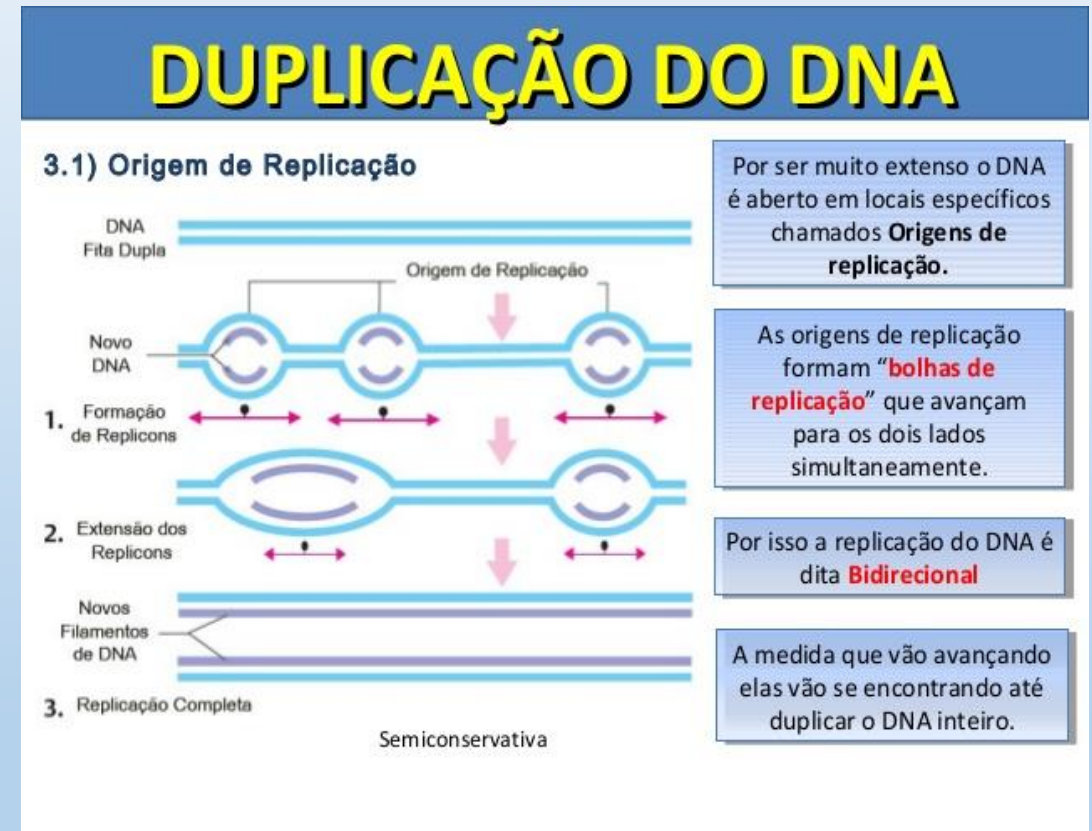
Girase/ Topoisomerase

- As enzimas topoisomerases aliviam a tensão no DNA que fica enrolado por causa das helicases
- O superenrolamento pode causar a inativação do DNA



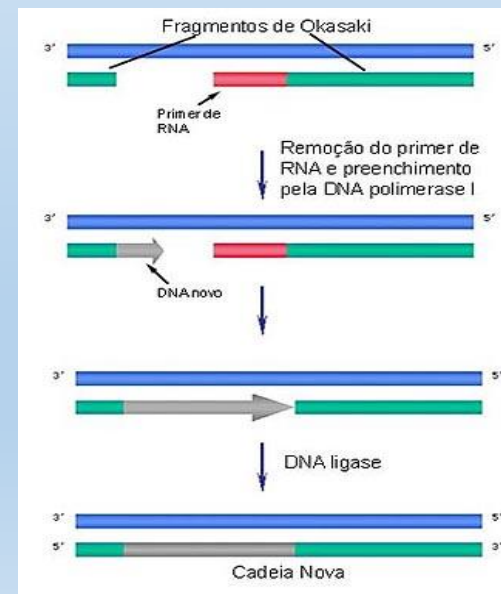
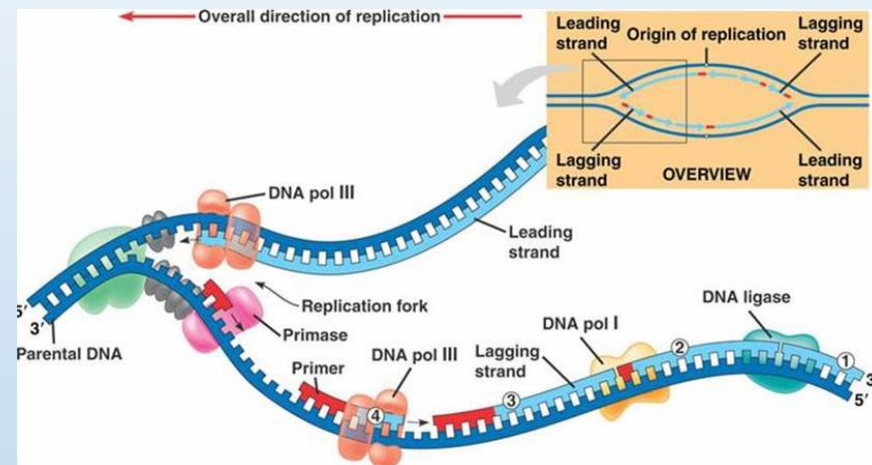
Replicação do DNA

- A replicação de DNA sempre começa em locais específicos chamados de **origens de replicação** e são reconhecidos pela sua sequência
- As helicases reconhecem esse sítio (origem) ligam-se a ele e abrem as duas fitas de DNA formando a forquilha de replicação
- DNA polimerases só conseguem sintetizar DNA na direção 5' para 3', e isto é um problema durante a replicação
- Uma dupla hélice de DNA é sempre antiparalela; em outras palavras, uma fita vai na direção 5' para 3', enquanto a outra vai na direção 3' para 5', fazendo com que seja necessário que as duas novas fitas, que também são antiparalelas aos seus moldes, sejam sintetizadas de maneiras ligeiramente diferentes



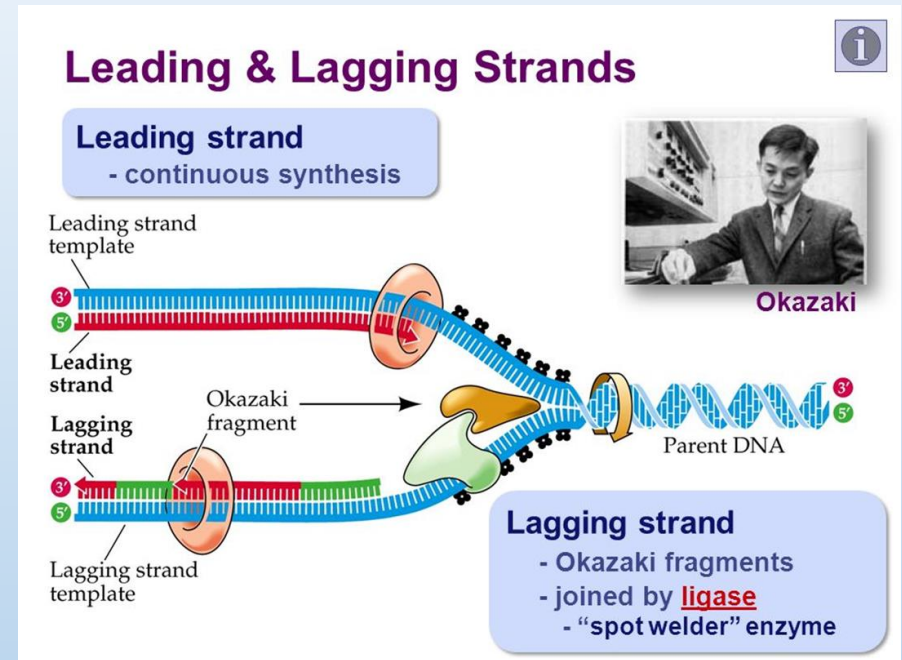
Replicação do DNA

- Na fita líder (leading strand) a nova cadeia de DNA será sintetizada de 3'=> 5' de forma contínua pela DNA polimerase III
- Primase é uma enzima que sintetiza um segmento curto de RNA (portanto existirá **Uracila** em lugar de **Timina**), com cerca de 10 nucleotídeos, complementar a uma fita de DNA
- Essa sequência de RNA, também conhecida como *primer*, é importante porque a DNA polimerase só pode sintetizar uma fita de DNA a partir de uma sequência pré-existente de nucleotídeos
- Após o alongamento da fita de DNA atrasada ou tardia (lagging strand) pela DNA polimerase III formando os fragmentos de Okazaki, o primer de RNA é removido pela DNA polimerase I (ação exonuclease da enzima) e é sintetizada uma nova fita de DNA no lugar do primer (ação de síntese e reparo da polimerase I) preenchendo os espaços entre fragmentos de Okazaki
- Os diferentes fragmentos são posteriormente ligados pela **DNA ligase**



Replicação do DNA

- DNA polimerases só podem agir na direção 5' para 3' e isto cria um problema durante a replicação
- Uma dupla hélice de DNA é sempre antiparalela; uma fita vai na direção 5' para 3', enquanto a outra vai na direção 3' para 5' fazendo com que seja necessário que as duas novas fitas sejam sintetizadas de maneiras diferentes
- Uma das novas fitas, a que se desloca de 5' para 3' em direção à forquilha de replicação, é a fácil. Esta fita é feita continuamente, porque a DNA polimerase III está se movendo na mesma direção que a forquilha de replicação. Esta fita sintetizada continuamente é chamada **fita líder (leading strand)**
- A outra fita nova, que se desloca de 5' para 3' distanciando-se da forquilha, é a fita atrasada que é sintetizada de forma mais complexa
- A **fita tardia ou atrasada (lagging strand)** é feita em fragmentos porque, conforme a forquilha avança, a DNA polimerase III se separa e se religa ao próximo primer de RNA formando “gaps” na fita que está sendo sintetizada
- Os pequenos fragmentos sintetizados são chamados de **fragmentos de Okazaki**, em homenagem ao cientista japonês que os descobriu
- Portanto, um **fragmento de Okazaki** é um pequeno fragmento de DNA com um primer de RNA na extremidade 5', criado na fita atrasada durante o processo de replicação

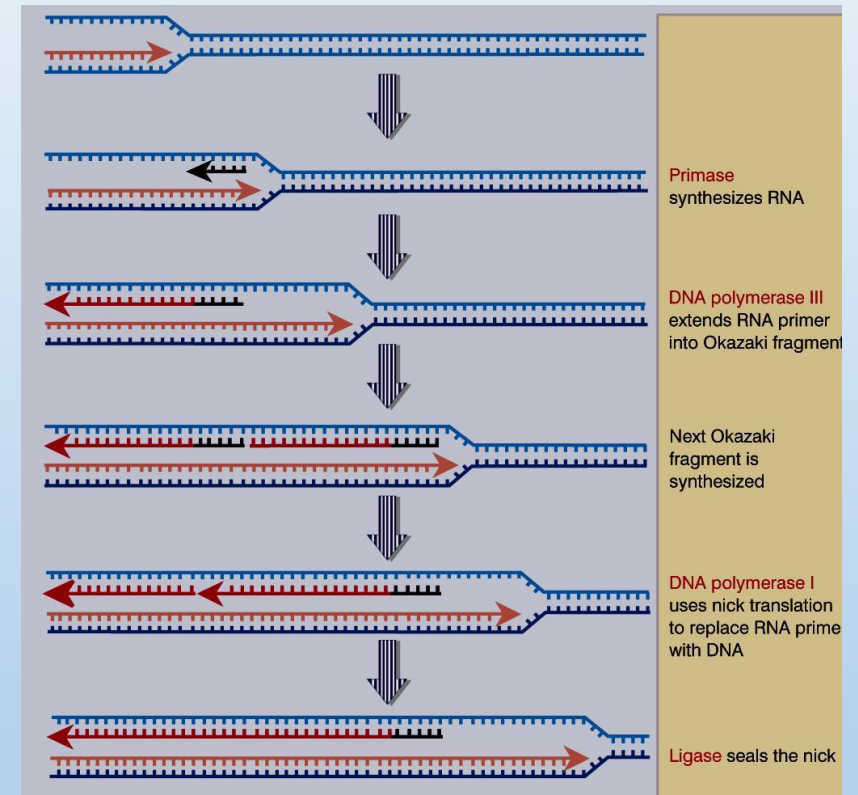


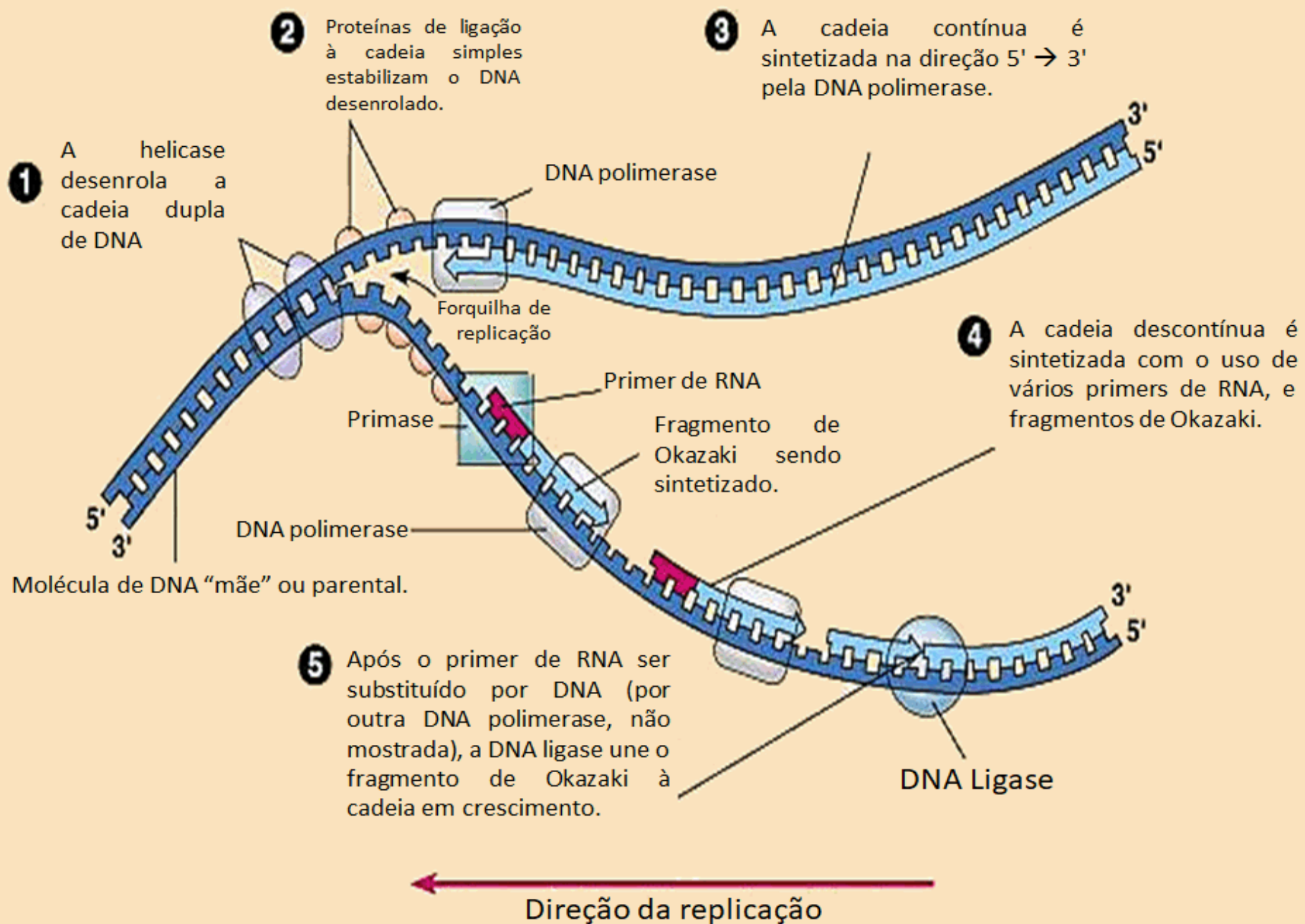
1.000 a 2.000 pares de base nos procariontes

150 a 200 pares de base nos eucariontes

Replicação do DNA

- Graças a sua capacidade de sintetizar novas fitas de DNA, a polimerase I é capaz de substituir os *primers* de RNA por segmentos de DNA usando o processo de *Nick Translation* (reação de deslocamento do corte)
- A polimerase I reconhece um corte (*nick*) na cadeia do DNA, isto é, a ausência de ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' de um nucleotídeo e a extremidade 5' do nucleotídeo vizinho, que, nesse caso, é o início do *primer* de RNA
- A polimerase I se liga à extremidade 3' OH livre e usando sua atividade exonucleotídica 5' => 3', remove por hidrólise os ribonucleotídeos do *primer* do início do fragmento de Okazaki
- Ao mesmo tempo, usando sua atividade de síntese e reparo de DNA, a polimerase I adiciona desoxirribonucleotídeos no lugar dos ribonucleotídeos do primer do fragmento de Okazaki ao qual ela está ligada, preenchendo os "gaps" entre os fragmentos
- O *nick* se desloca um nucleotídeo no sentido 5' => 3' de cada vez, e o processo se repete cerca de 10 a 12 vezes antes da polimerase I se dissociar do DNA e outra polimerase I reiniciar o processo em outro *primer* até que todos os *primers* de RNA tenham sido substituídos por fitas de DNA





Resumo da replicação de DNA

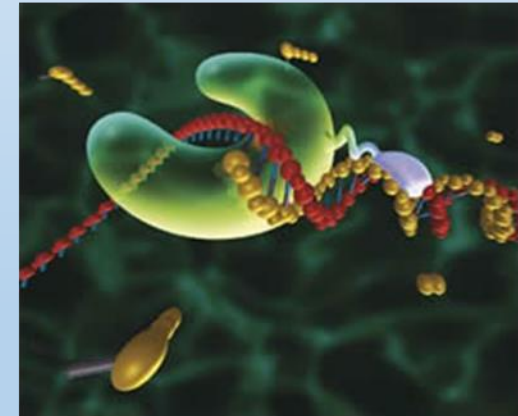
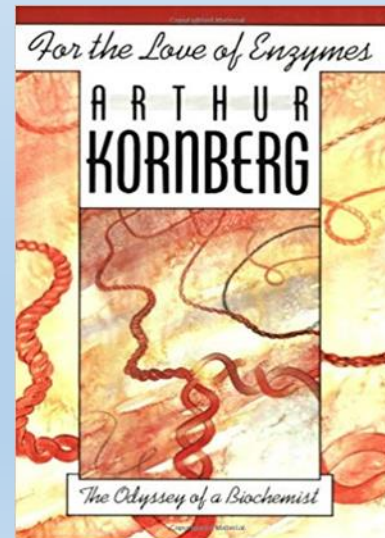
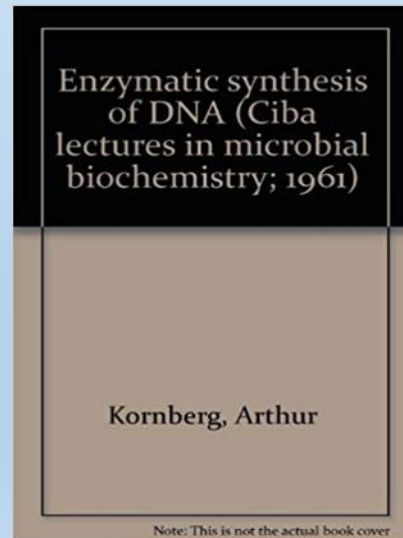
- Helicase abre o DNA formando a forquilha de replicação
- Proteínas ligadoras de fita simples (SSB) recobrem o DNA ao redor da forquilha de replicação para evitar que ele volte a formar dupla fita
- DNA girase (topoisomerase) trabalha na região à frente da forquilha de replicação para evitar enrolamento excessivo do DNA
- Na fita líder a síntese de DNA será contínua e realizada pela DNA polimerase III
- Primase sintetiza *primers* de RNA complementares à fita de DNA na fita atrasada
- DNA polymerase III polimeriza uma nova fita de DNA partindo dos *primers*, adicionando nucleotídeos à extremidade 3'
- *Primers* de RNA são removidos e substituídos por DNA pela ação exonucleotídica da enzima DNA polimerase I
- As lacunas (gaps) entre fragmentos de DNA são preenchidos pela ação de reparo da DNA polimerase I
- A ligação entre fragmentos de Okazaki é feita pela DNA ligase tornando a fita atrasada única

Descoberta da DNA polimerase

- 1956: a primeira DNA Polimerase descoberta foi a da bactéria *Escherichia coli* (E. Coli), caracterizada por Arthur Kornberg (bioquímico) e colegas em 1956. Descreveram o processo de replicação do DNA pelo qual a **DNA polimerase** copia a sequência de bases de uma fita-molde de DNA. Kornberg e colegas receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1959



(1918-2007)



DNA polimerase

Resumo: ação das enzimas

Proteínas presentes na forquilha de Replicação de *E.coli*

SSB	Liga a fita simples de DNA
DnaB (helicase)	Desenrola o DNA
Primase (DnaG)	Sintetiza os primers de RNA
DNA Polimerase III	Síntese da fita nova
DNA Polimerase I	Preenche as lacunas e excisa os primers
DNA Ligase	Liga os fragmentos
DNA girase	Superenrolamento

Diferenças entre replicação de procariontes e eucariontes

- O básico da replicação de DNA é similar entre procariontes e eucariontes tais como seres humanos, mas existem algumas diferenças
- Eucariontes possuem múltiplos cromossomos lineares, cada um com múltiplas origens de replicação (seres humanos podem ter até 100.000 origens de replicação) enquanto o genoma nuclear bacteriano possui apenas 1 origem de replicação
- *E. coli* possui 5 tipos de enzima DNA polimerase, enquanto os mamíferos possuem pelo menos 20 tipos
- A maioria dos cromossomos eucarióticos é linear. Devido a maneira pela qual a fita tardia é sintetizada, fragmentos de DNA são perdidos nas extremidades dos cromossomos lineares (telômeros) em cada rodada de replicação

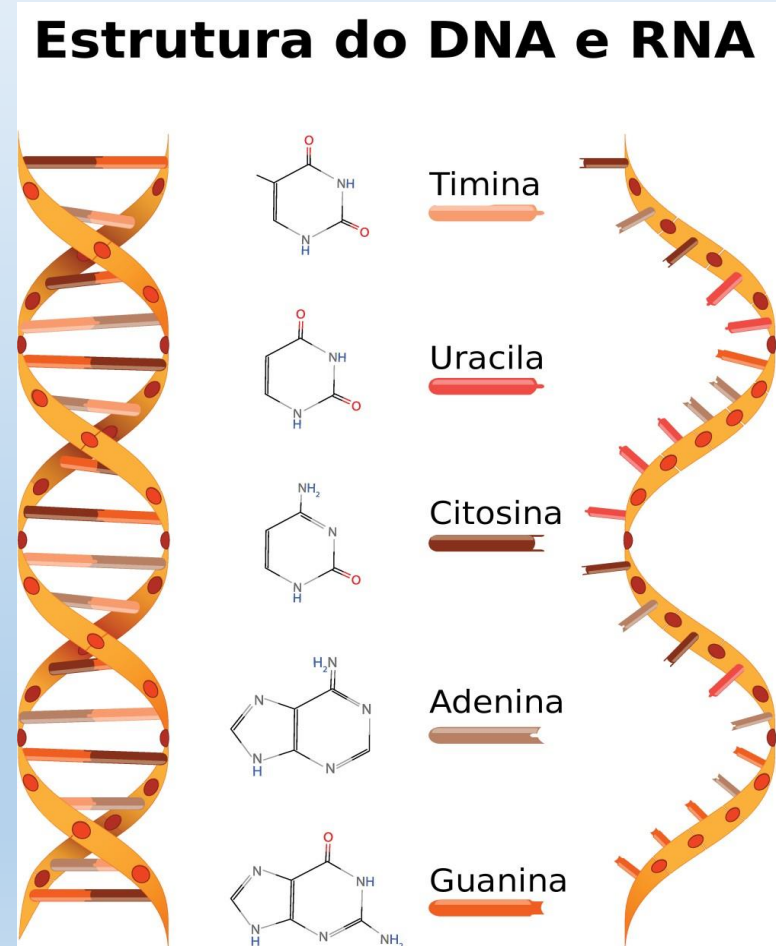
Vídeos de replicação do DNA

- https://www.youtube.com/watch?v=J3SV_2f1XBQ
- <https://www.youtube.com/watch?v=tBkhK3t6Aw0>
- <https://www.youtube.com/watch?v=G40701DeCc4> Português
- <https://www.youtube.com/watch?v=T3RK7w0nfOc> Português

Transcrição

RNA e DNA

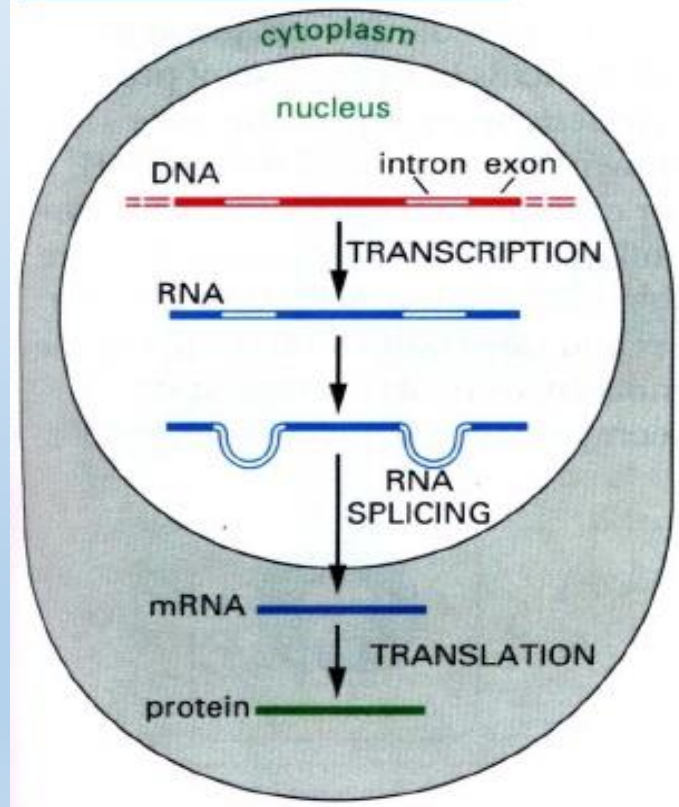
- O **ácido ribonucleico (RNA)** tem muitas semelhanças com o **DNA**, porém apresenta diferenças fundamentais: é formado por uma fita simples que pode dobrar-se sobre si mesma (produzindo formas tridimensionais complexas através da ligação intramolecular de pares de bases nitrogenadas), possui o açúcar ribose em vez da desoxirribose e a base nitrogenada uracila em vez da timina



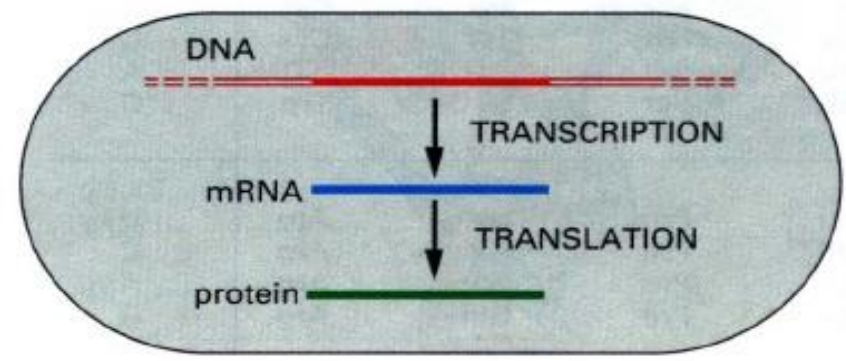
Transcrição

TRANSCRIÇÃO : EUCARIOTO X PROCARIOTO

EUCARIOTOS

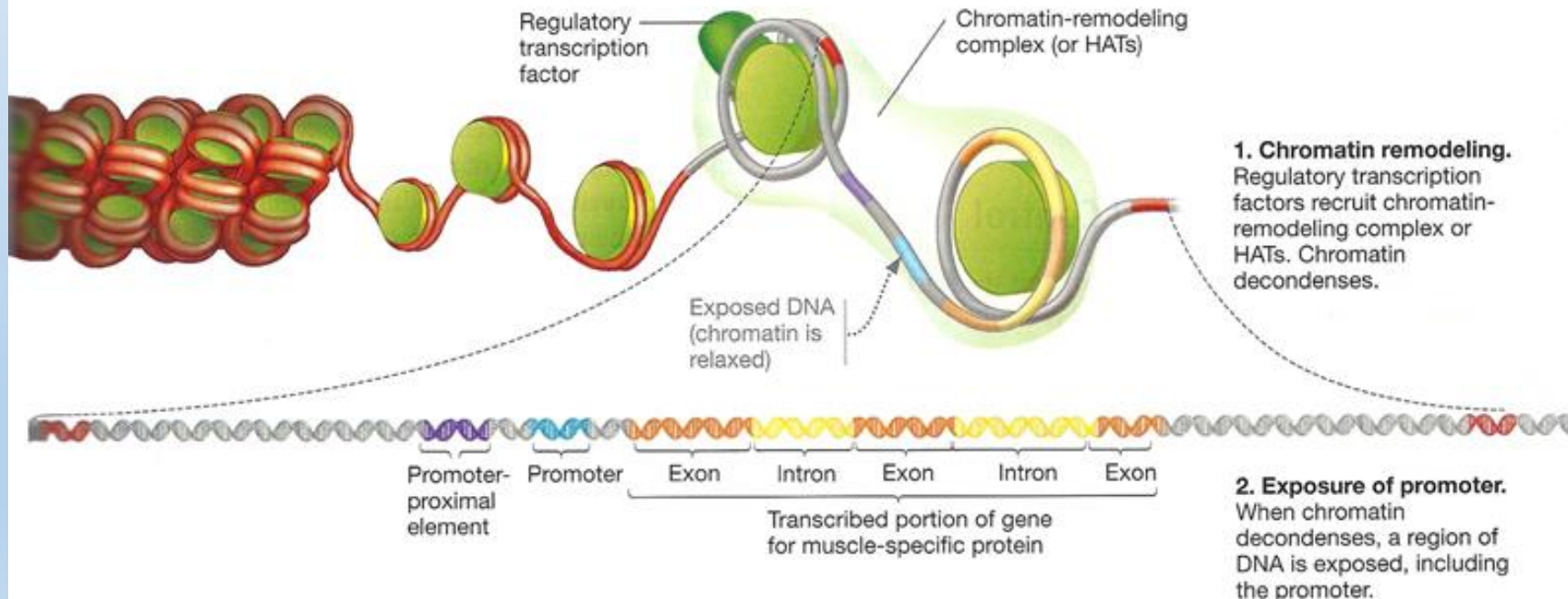


PROCARIOTOS



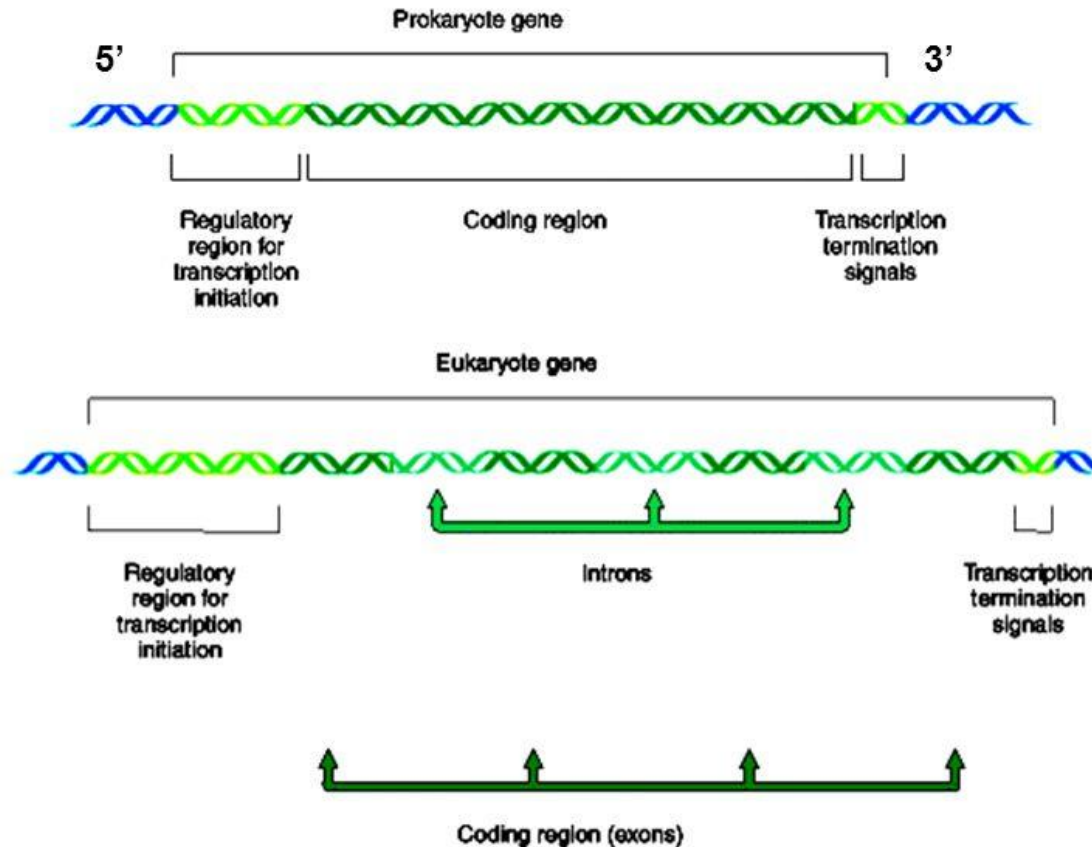
Controle da transcrição: histonas

Chromatin remodeling exposes the promoter



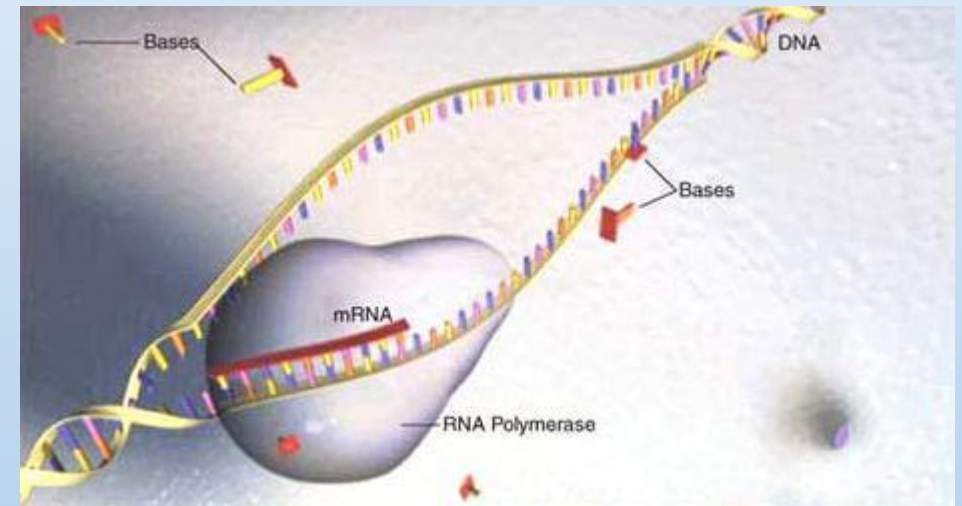
Genes de procariotos e eucariotos

GENES → EUCARIOTO X PROCARIOTO



Transcrição em procariotos

- **Transcrição:** processo de síntese de RNA a partir de uma fita molde de DNA
- O processo é realizado por um complexo enzimático cuja enzima chave é a RNA polimerase, composta de várias subunidades
- A RNA polimerase nos **procariotos** é única, enquanto nos **eucariotos** são três (I, II e III)
- RNA polimerases são grandes enzimas com múltiplas subunidades, mesmo em organismos simples como bactérias
- Os RNAs formados durante a transcrição podem ser de três tipos: o mRNA (mensageiro), o tRNA (transporte ou transferência) e o rRNA (ribossomal)



Transcrição em procariotos: etapas

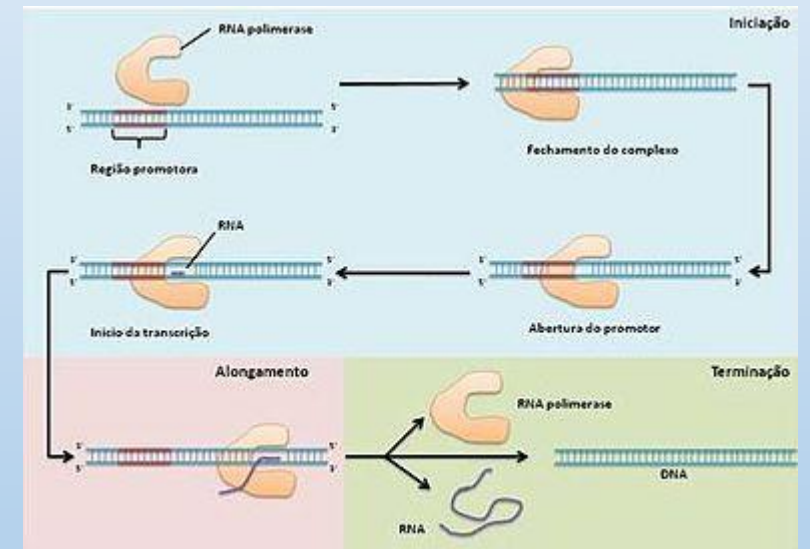
- **A transcrição em procariotos ocorre em quatro etapas:**

- **Reconhecimento:** quando ocorre o reconhecimento de sequências específicas no DNA chamadas de promotoras ou promotores localizadas próximas ao início de um gene

- **Iniciação:** nessa etapa ocorre a formação do complexo de iniciação, que é quando a dupla hélice do DNA é aberta devido à ruptura das pontes de hidrogênio

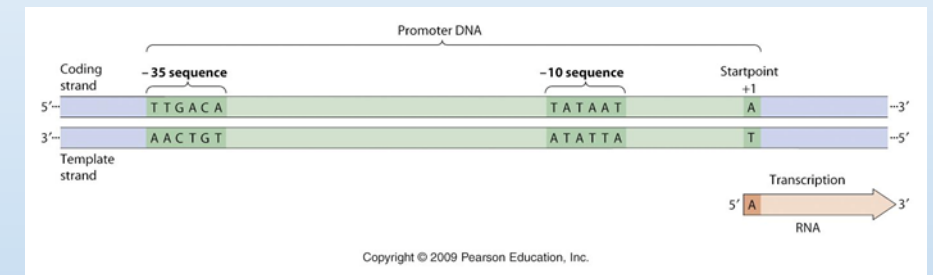
- **Alongamento:** o alongamento da cadeia de RNA ocorre quando os ribonucleotídeos são incorporados sucessivamente, originando a cadeia nascente de RNA

- **Terminação:** o término da transcrição ocorre quando sequências no DNA são reconhecidas (terminador) e a síntese de RNA é cessada, liberando o complexo RNAP, a molécula sintetizada de RNA e a molécula de DNA que serviu de molde



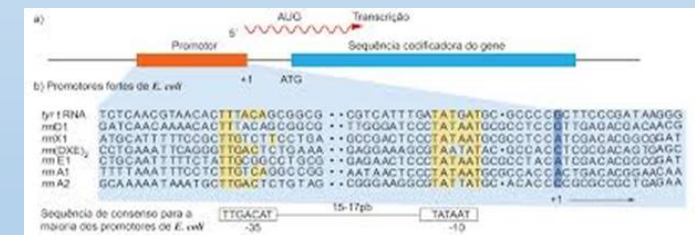
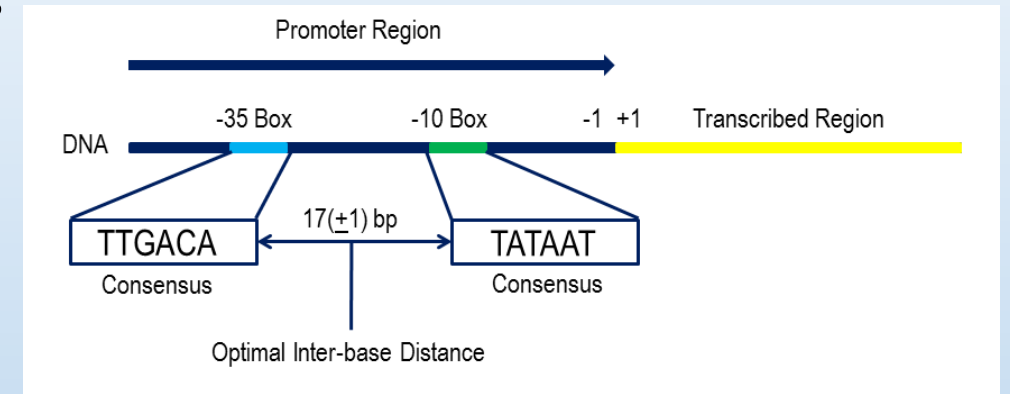
Reconhecimento

- Um **promotor** é uma região do DNA que inicia a transcrição de um determinado gene
- Os promotores estão localizados perto do sítio de início da transcrição de genes, na mesma fita e a montante no DNA
- Os promotores podem ter por volta de 100-1000 pares de base de comprimento
- Posições no promotor são designadas em relação ao local onde a transcrição do DNA, por exemplo, posições a montante são números negativos contando a partir de -1. Por exemplo, -100 é uma posição 100 pares de bases a montante do início da transcrição



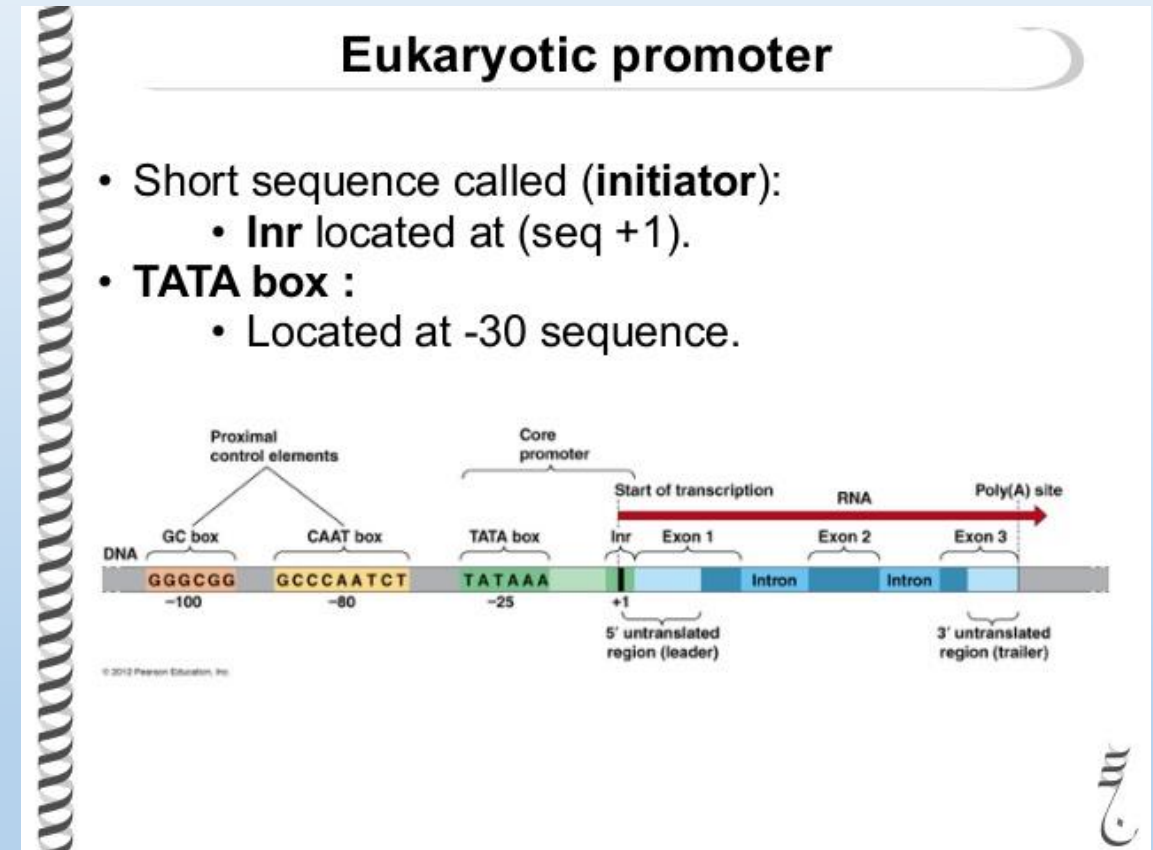
Reconhecimento

- Em bactérias, o promotor contém dois elementos curtos de aproximadamente 10 e 35 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição
- A sequência a -10 (o elemento -10) tem a sequência consenso TATAAT
- A sequência a -35 (elemento -35) tem a sequência consenso TTGACA
- Em média, apenas 3 a 4 dos 6 pares de bases em cada sequência consenso são encontrados em qualquer promotor
- Poucos promotores naturais foram identificados até hoje que possuam sequências consenso intactas de ambos os elementos -10 e -35
- O melhor espaçamento entre as sequências -35 e -10 é de 17 bp
- Alguns promotores contêm um ou mais subsítios de elementos promotores a montante (elemento UP)



Promotores em humanos

- Em eucariontes como humanos, a principal RNA polimerase em suas células não se liga diretamente aos promotores como a RNA polimerase bacteriana. Ao invés disso, proteínas acessórias chamadas **fatores de transcrição basais (gerais)** se ligam primeiramente ao promotor, auxiliando a RNA polimerase a obter um ponto de apoio no DNA
- Muitos promotores eucarióticos possuem uma sequência chamada de **TATA box**. O "TATA box" tem um papel muito similar ao elemento -10 em bactérias. Ele é reconhecido por um dos fatores gerais de transcrição, permitindo que outros fatores de transcrição e eventualmente a RNA polimerase se liguem. Ele também contém muitos As e Ts, o que torna a separação das fitas de DNA mais fácil



Regiões promotoras de genes de eucariontes

Promoter Regions of Several Representative Eukaryotic Genes

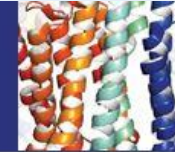


TABLE 29.3 A Selection of Consensus Sequences That Define Various RNA Polymerase II Promoter Modules and the Transcription Factors That Bind to Them

Sequence Module	Consensus Sequence	DNA Bound	Factor
TATA box	TATAAAA	~10 bp	TBP
CAAT box	GGCCAATCT	~22 bp	CTF/NF1
GC box	GGGCGG	~20 bp	SP1
Octamer	ATTTGCAT	~20 bp	Oct-1 or Oct-2
κ B	GGGACTTCC	~10 bp	NF κ B or H2 TF1
ATF	GTGACGT	~20 bp	ATF

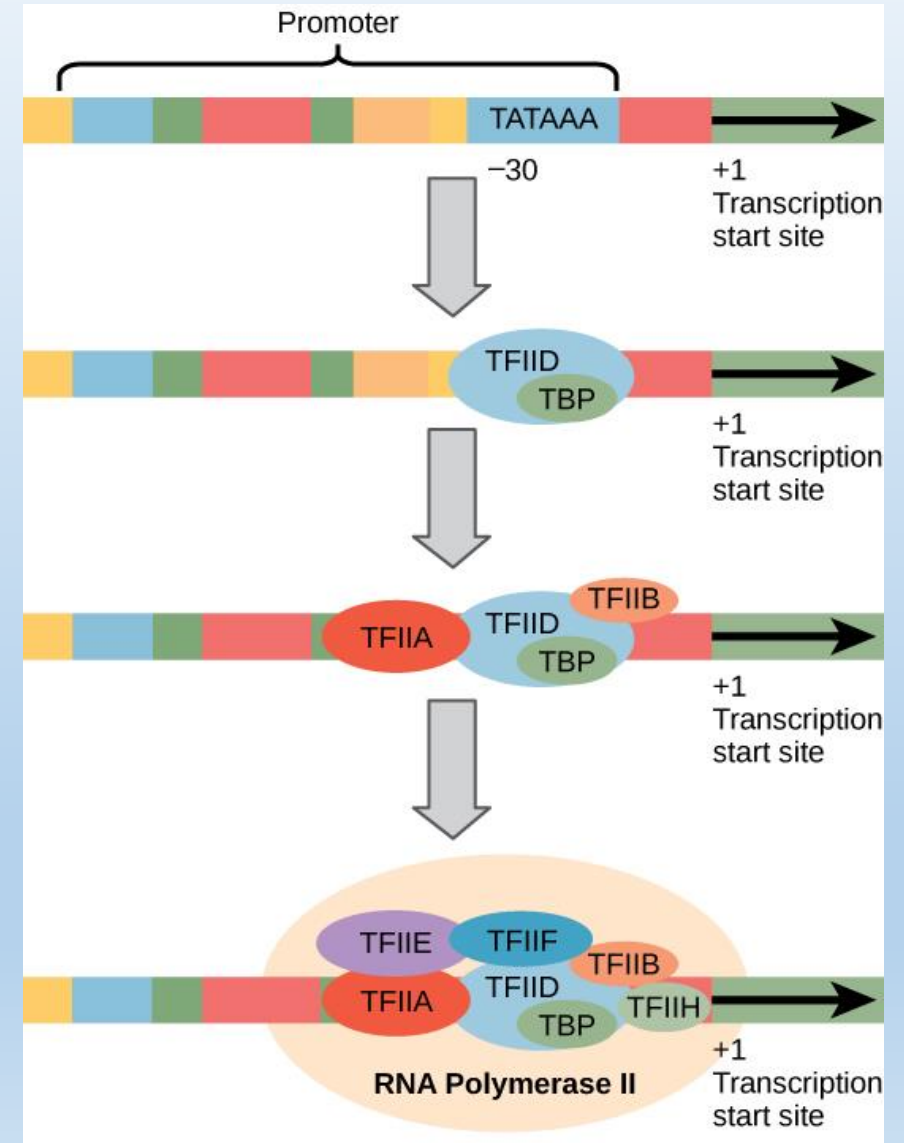
DNA looping permits multiple proteins to bind to DNA sequences.

Iniciação: procariotos

- As sequências promotoras são reconhecidas apenas pela RNA polimerase contendo o fator sigma -70 e este reconhecimento vai direcionar a transcrição do gene
- A RNA polimerase sempre constrói uma nova fita de RNA na direção **5' para 3'**. Isto é, ela só pode adicionar nucleotídeos de RNA (A, U, C ou G) à extremidade 3' da cadeia
- O reconhecimento dos promotores pela RNA polimerase se dá graças ao **fator sigma (proteína móvel)** que faz com que os promotores tenham maior afinidade pelas sequências consenso localizadas antes do início da transcrição, a distâncias específicas
- Holoenzimas de RNA polimerase contendo outros fatores sigma reconhecem diferentes promotores
- Os promotores procarióticos localizam-se geralmente na região -10 e -35 do início da transcrição e as sequências consenso mais conhecidas são a TATA box na região -10 (TATAAT) e a sequência TTGACA na região -35
- Existem vários tipos de promotores e fatores sigma e esta variedade permite que as funções celulares possam ser reguladas mantendo o equilíbrio de todas as funções celulares

Iniciação: eucariotos

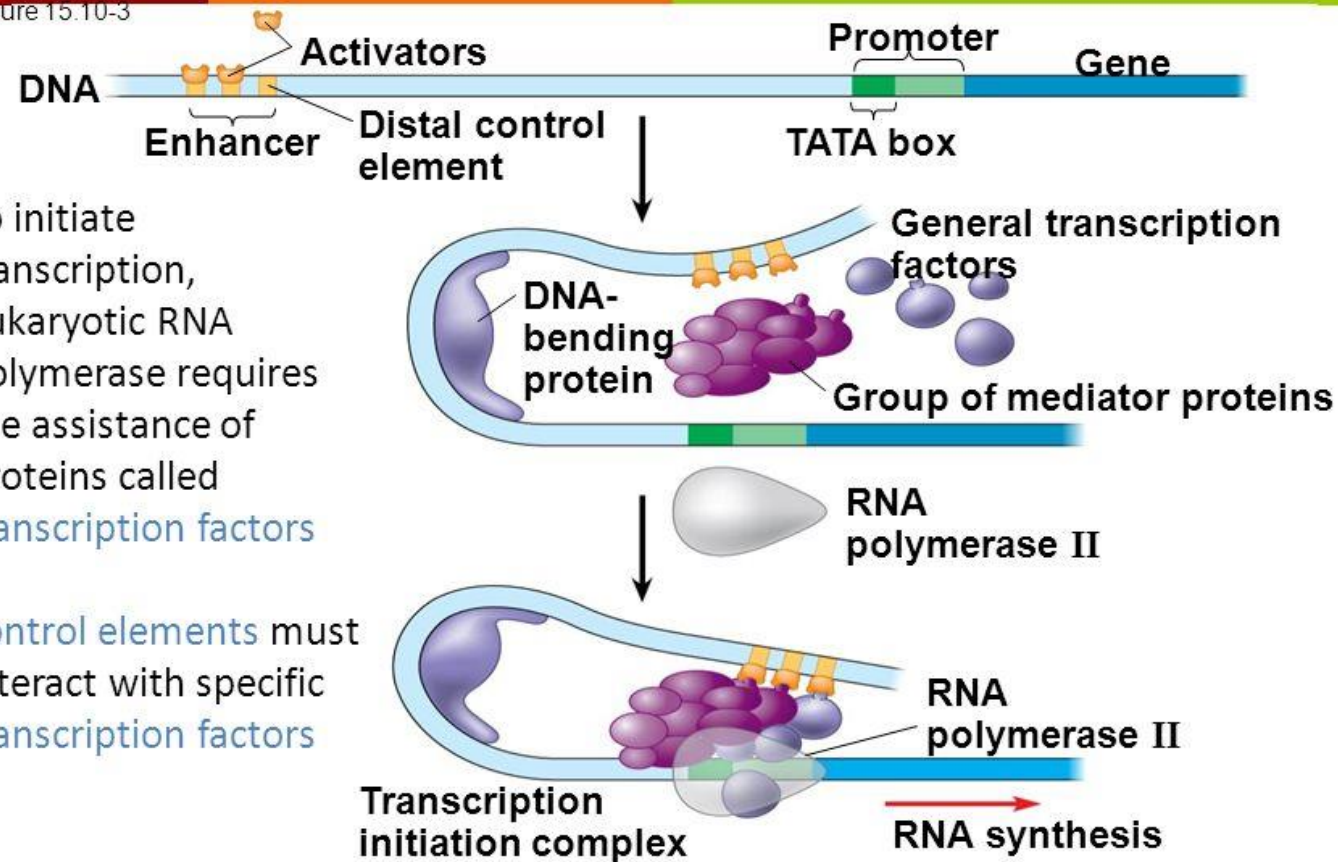
- Nos eucariotos, o processo de iniciação e regulação da transcrição é muito mais complexo, envolvendo um número e uma diversidade maior de sequências promotoras e de fatores de transcrição (análogos ao fator sigma dos procariotos)
- Uma importante etapa na iniciação da transcrição é a abertura da dupla fita de DNA (desenovelamento), que é feito rompendo-se as pontes de hidrogênio entre as bases das duas fitas
- É necessário que os nucleotídeos de um dos filamentos estejam disponíveis para novos emparelhamentos
- A RNA polimerase deve desenrolar o DNA dupla hélice, formando uma bolha de transcrição, com cerca de 17 pares de bases desenrolados



Fatores de transcrição

Transcription Factors

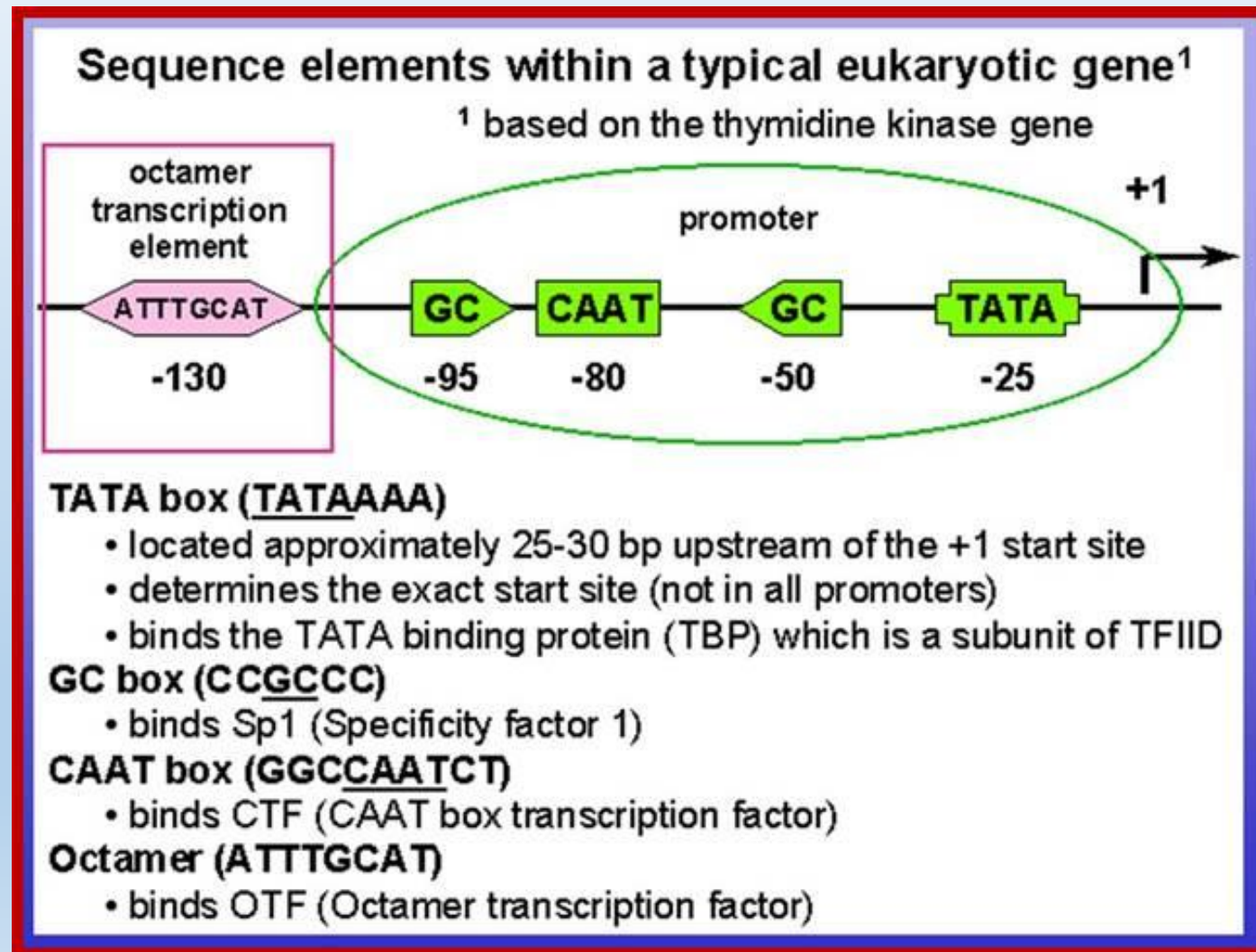
Figure 15.10-3



- To initiate transcription, eukaryotic RNA polymerase requires the assistance of proteins called transcription factors

- control elements must interact with specific transcription factors

Elementos na transcrição de eucariotos



Fatores de transcrição

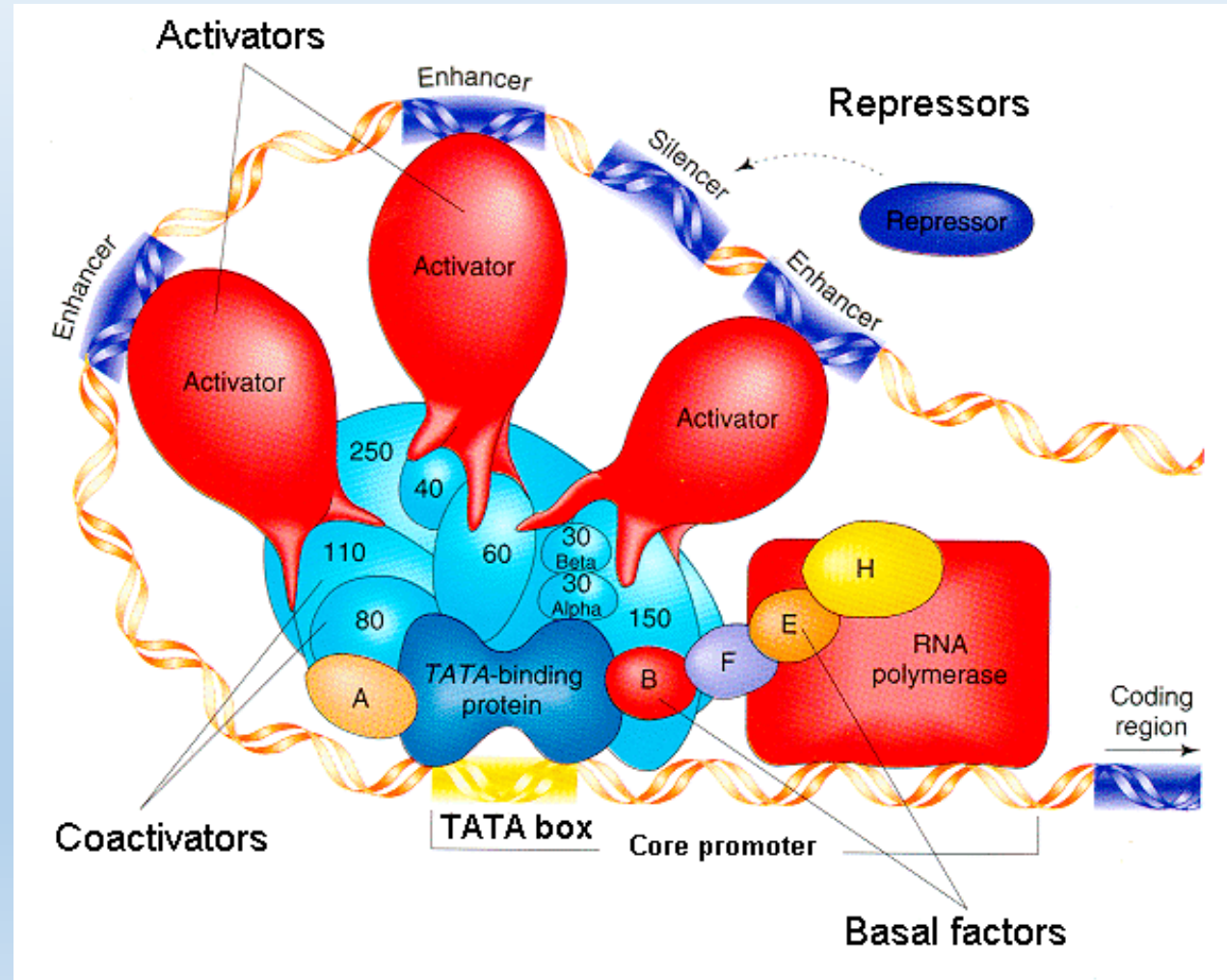
Promotores reconhecidos pela RNA polimerase II:

- TATA box: é o primeiro elemento conservado mais próximo do sítio de transcrição. Sua sequência é TATAAAA na posição – 30
- CAAT box: é o segundo elemento conservado. Sua sequência é GGCCAATCT na posição –80

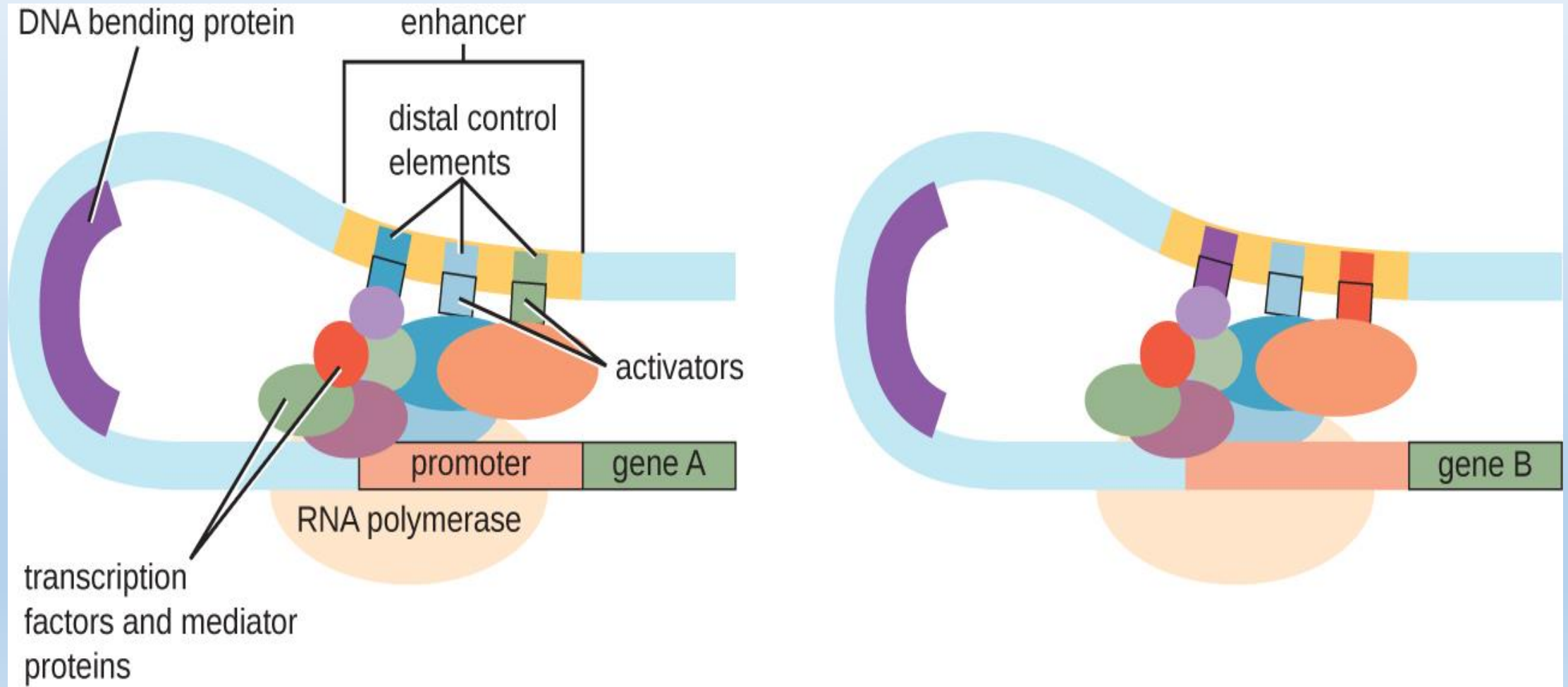
Cada fator de transcrição que ajuda a RNA polimerase II a iniciar a transcrição é chamado TFII X (X é a letra que identifica o fator individual):

- TFIID – reconhece a TATA box e assegura que o local de início correto seja usado
- TFIIA e TFIIB; TFIIF se liga à RNA polimerase II e depois ao complexo de iniciação promovendo o desenrolamento do DNA
- TFIIE se junta ao complexo de iniciação ligando-se ao DNA e em seguida ao ponto de iniciação da transcrição
- TFIIH e TFIIJ se juntam ao complexo após TFIIE

Transcrição em eucariotos é mais complexa



Diferentes genes: diferentes transcrições



Alongamento e terminação

- **Alongamento**

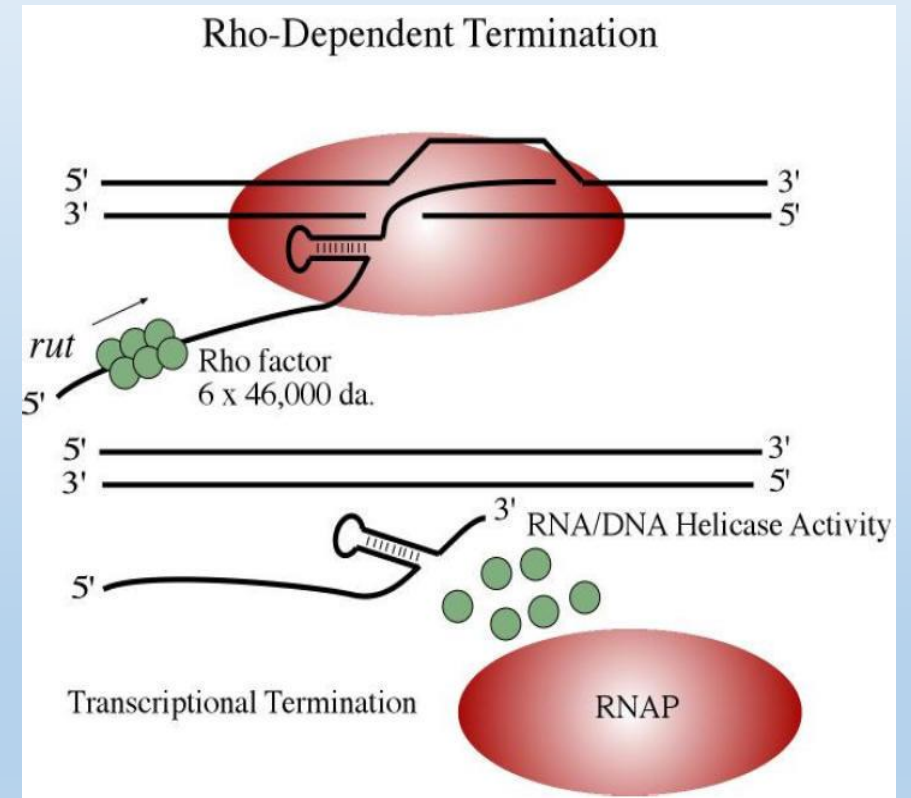
O RNA recém-sintetizado fica temporariamente emparelhado à fita molde de DNA, formando um híbrido curto RNA-DNA. Uma vez iniciada, a transcrição segue numa velocidade de aproximadamente 50 nucleotídeos por segundo, estando a RNA polimerase ligada à fita molde de DNA até encontrar o sinal de término da transcrição. O transcrito de RNA é quase idêntico à fita de DNA não molde (codificante), porém as fitas de RNA têm a base uracila (U) em vez de timina (T), assim como um açúcar ligeiramente diferente (ribose em lugar de desoxirribose)

- **Término ou terminação**

O final da transcrição é um processo bem controlado, determinado pelo surgimento dos códons de parada ou de terminação, finalizando a síntese dessa molécula. Este processo é diferente em procariotos e eucariotos

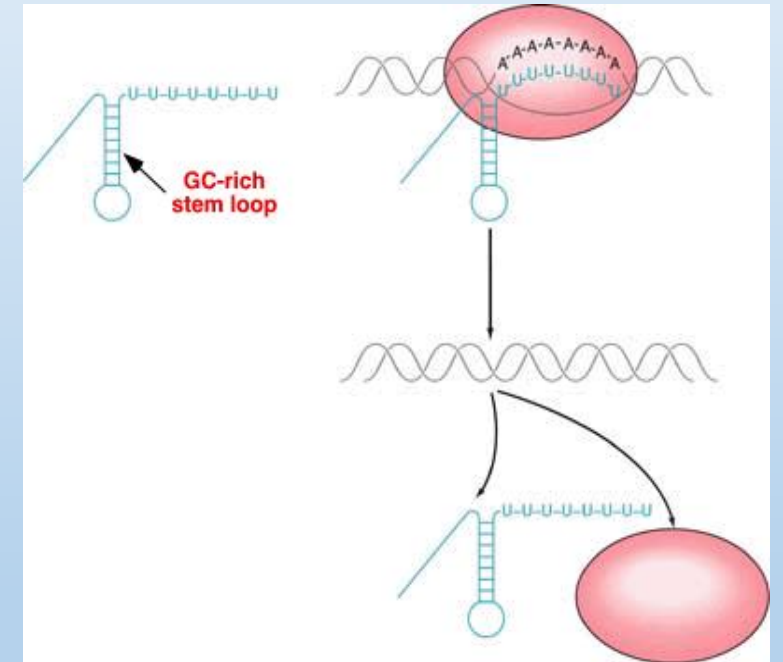
Término em procariotos

- Existem duas estratégias de terminação principais encontradas em bactérias: Rho-dependente e Rho-independente
- Em **terminações Rho-dependente**, o RNA contém um sítio de ligação para uma proteína chamada fator Rho. O fator Rho se liga a essa sequência e começa a "subir" o transcrito em direção à RNA polimerase
- Quando ele alcança a polimerase na bolha de transcrição, o Rho puxa o transcrito de RNA e o molde de DNA se separa, liberando a molécula de RNA e terminando a transcrição
- Outra sequência, encontrada mais tarde no DNA, chamada de **ponto de parada da transcrição**, faz com que a RNA polimerase pause e portanto ela ajuda o fator Rho a alcançar o transcrito



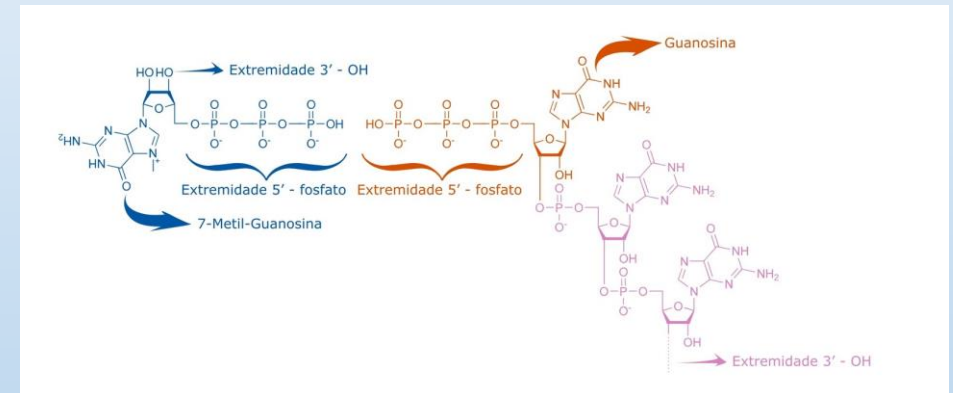
Término em procariotos

- **Terminações Rho-independentes** dependem das sequências específicas do modelo do DNA que serviu de molde
- Enquanto a RNA polimerase se aproxima do final do gene que está sendo transcrito, ela atinge uma região rica em nucleotídeos C e G
- O RNA transcrito desta região se dobra sobre si mesmo e os nucleotídeos complementares C e G se ligam
- O resultado é uma estrutura semelhante a um “grampo de cabelo” que é estável e faz com que a RNA polimerase fique presa
- Em uma terminação, o grampo de cabelo é seguido de trechos de Us no RNA, que se emparelham com nucleotídeos A no modelo de DNA
- A região complementar U-A da transcrição do RNA forma somente uma fraca interação com o modelo de DNA produzindo instabilidade suficiente para a enzima “cair” e liberar o novo RNA que foi transcrito



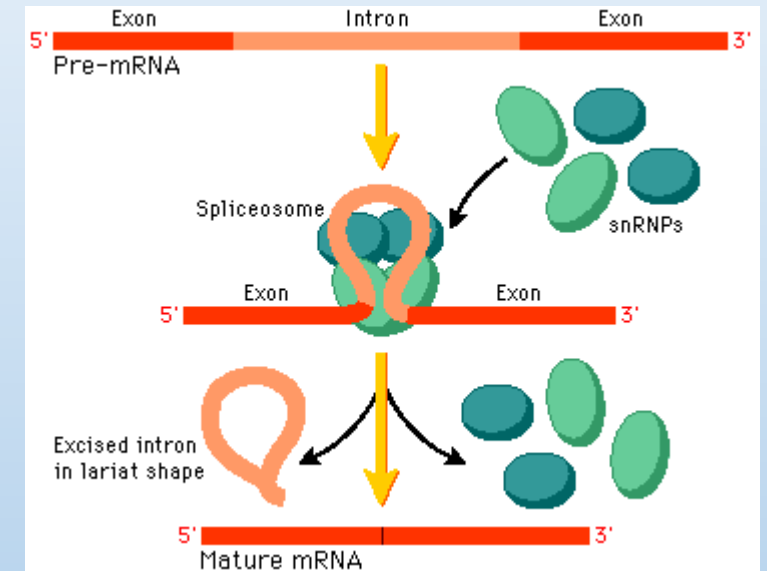
Término nos eucariotos

- No início do alongamento da cadeia ocorre a adição da 7-metil guanosina (7-MG), acionada quando cerca de 30 nucleotídeos do RNA já foram transcritos
- Os 7-MG possuem a função de proteger as cadeias nascentes de RNA da degradação por exonucleases e facilitar o transporte e o splicing (maturação do RNA)
- Os processos de término da transcrição são variados e dependem da RNA polimerase que está sendo utilizada
- A transcrição de genes por RNA polimerases II pode continuar por centenas ou mesmo milhares de nucleotídeos após o final de uma sequência não codificante
- A cadeia de RNA é então clivada por um complexo que se associa às polimerases
- A clivagem é acoplada à terminação da transcrição e ocorre em uma sequência consenso
- mRNAs sintetizados pela RNA pol II são poliadenilados na extremidade 3', resultando em uma cauda poli-A que possui a função de proteger o RNA de degradação por nucleases e dar estabilidade à molécula



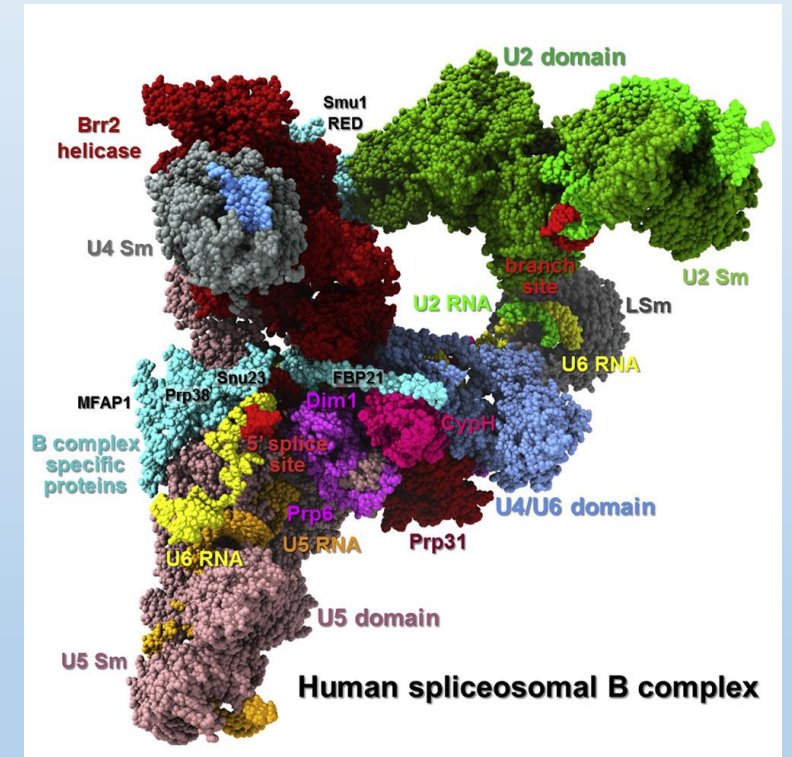
Splicing (maturação do mRNA)

- O **Splicing** é um processo que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA
- Ele consiste na retirada dos *íntrons* de um mRNA precursor, sendo um dos processos necessários para formar um mRNA maduro funcional
- O splicing só ocorre em eucariotos já que o DNA dos procariotos não possui íntrons
- A estrutura fundamental para clivar essas ligações entre os nucleotídeos é o **spliceossomo**
- Essa excisão dos *íntrons* do mRNA é um evento muito importante e requer uma extrema precisão das moléculas envolvidas no processo. A exclusão ou o acréscimo de um único nucleotídeo em um *éxon* pode levar a uma alteração da fase de leitura (ORF- Open Reading Frame) e à produção de uma proteína completamente diferente da original ou defeituosa
- A análise das sequências de milhares de uniões íntron-éxon de eucariotos permitiu a definição de sequências consenso apresentadas dentro dessa região de corte



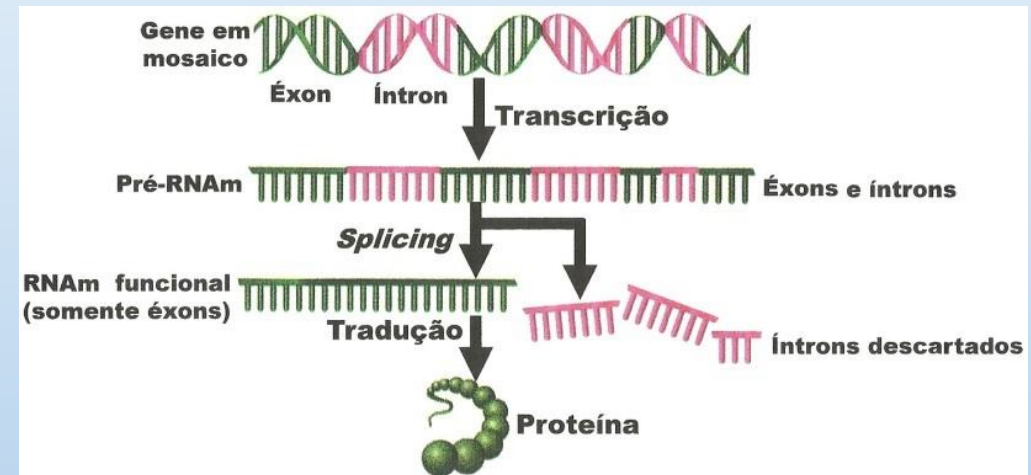
Splicing (só ocorre em eucariotos)

- Esses dados mostraram que a grande maioria dos íntrons começa com uma sequência "GU" e termina com "AG"
- A sequência de consenso no ponto de corte 5' dos vertebrados é "AGGUAAGU" e na extremidade 3' dos RNA de mamíferos, o consenso é um trecho contendo dez pirimidinas ("C" ou "U"), seguidas por uma base qualquer, um "C" e uma sequência final "AG"
- Além disso, os íntrons possuem ainda, um importante ponto interno, uma **adenina** chamada de **ponto de ramificação**, situada entre 20 e 50 nucleotídeos antes do ponto de corte 3' e que não é muito conservado nos mamíferos
- O restante do íntron é extremamente variável e não tem muita importância no processo de splicing
- O spliceossomo é uma estrutura com atividade catalítica responsável pela execução do splicing
- É um complexo formado por 5 espécies de RNA e mais 50 proteínas (ribonucleoproteínas) ligadas a moléculas de RNA do tipo snRNA (pequeno RNA nuclear) = máquina de excisão



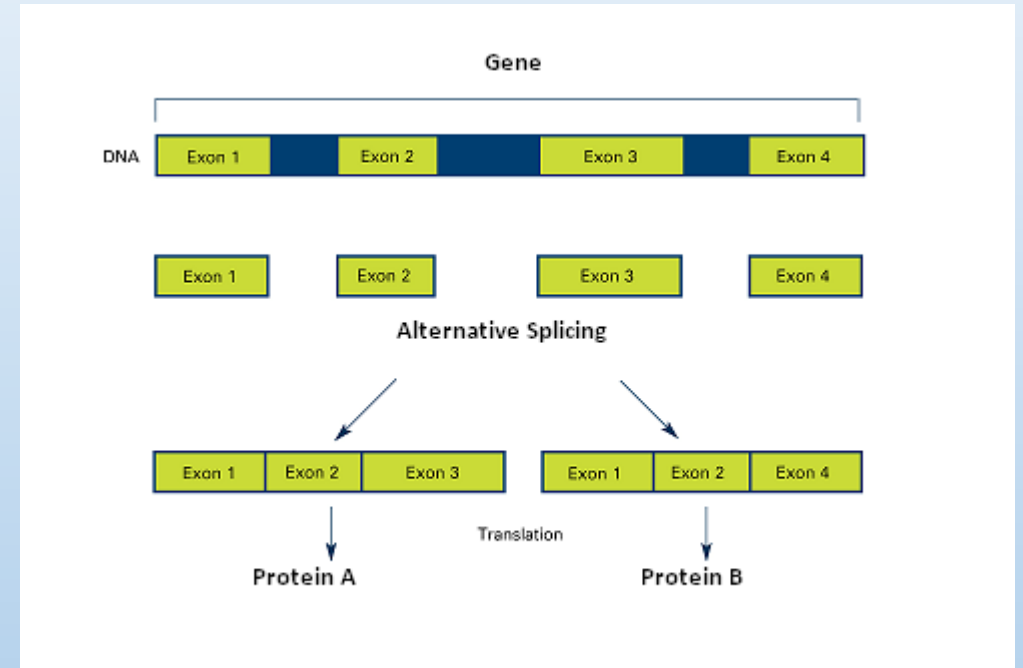
Splicing

- O spliceossomo reconhece o início e o fim dos íntrons, depois os unem, formando uma alça que então é cortada
- Há dois tipos de splicing: o que utiliza o spliceossomo e o *self-splicing*
- *Self-splicing* acontece quando um tipo específico de RNA pode fazer *splicing* ele mesmo, sem a ajuda de um spliceossomo
- Ambos ocorrem em duas etapas: duas transesterificações (transferência da ligação fosfodiéster) entre dois nucleotídeos de RNA.
- O *splicing* de tRNA é uma exceção, e não ocorre por transesterificação
- A primeira reação ocorre pelo ataque nucleofílico do 2'OH de uma adenina do sítio de ramificação à guanina no sítio de splice 5'. Com a transferência da ligação fosfodiéster, é formada uma estrutura intermediária de alça. A segunda reação se dá pela ligação do 3'OH do 5' sítio do éxon com o 3' sítio do outro éxon, soltando assim o íntron que será degradado e reciclado na célula



Splicing alternativo

- Em muitos casos, o processo de splicing pode criar muitas proteínas diferentes, só por variar o composição dos éxons do RNA. Essa ocorrência é chamada Splicing Alternativo
- Splicing alternativo pode acontecer de várias maneiras. Éxons podem ser estendidos ou passados, ou íntrons podem ser retidos. É estimado que até 95% das fitas de RNA dos genes com múltiplos éxons podem passar por splicing alternativo, às vezes por causa de uma condição específica do tecido
- Com esta complexidade, o splicing alternativo de uma transcrição pré-mRNA é regulado por uma sistema de proteínas (ativadoras e repressoras) que se ligam a elementos (potencializadores e silenciadores) na mesma transcrição de pré-mRNA



Transcrição de procariotos e eucariotos: semelhanças

- DNA é o molde para a síntese da fita de RNA
- Apenas uma das fitas do DNA vai servir como molde para a síntese de RNA
- Nos dois grupos a transcrição produz moléculas de RNA
- A composição química dos transcritos de RNA é semelhante nos dois grupos
- A transcrição é facilitada pela enzima RNA polimerase nos dois grupos

Transcrição de procariotos e eucariotos: diferenças

Procariotos	Eucariotos
A transcrição e a tradução são processos contínuos que ocorrem simultaneamente no citoplasma	São dois processos separados, ocorrendo a transcrição no núcleo e a tradução no citoplasma
A etapa de iniciação é simples pelo fato do DNA não estar associado a proteínas histonas	Etapa de iniciação é mais complexa pois o DNA está associado a proteínas histonas
Existência de apenas 1 RNA polimerase que sintetiza todos os tipos de RNA da célula (mRNA, tRNA, rRNA)	3 tipos de RNA: RNA pol I para a síntese de rRNA; RNA pol II para a síntese de mRNA e RNA pol III para a síntese de tRNA e 5S rRNA
RNA polimerase possui 5 subunidades: 2 alpha, 1 beta, 1 beta' e 1 ômega	RNA pol I tem 14 subunidades, RNA pol II 10-12 subunidades e RNA pol III 10 subunidades
Presença obrigatória do fator sigma para o início da transcrição	Fator sigma não é essencial pois existem inúmeros outros fatores de transcrição
RNA polimerase reconhece a região promotora com a ajuda do fator sigma	A RNA polimerase não consegue reconhecer a região promotora a não ser que já esteja ocupada pelos fatores de transcrição (iniciação)
Região promotora localizada sempre à montante do sítio de iniciação (start site)	Região promotora geralmente localizada à montante do sítio de iniciação (start site), com exceção do sítio de ligação da RNA pol III
Região promotora contém Pribnow box na posição -10, não existindo TATA box e CAT box	Não existe Pribnow box mas a região promotora contém: TATA box (35-25) upstream; CAT box ~70 upstream; GC box ~110 upstream

Transcrição de procariotos e eucariotos: diferenças

Procariotos	Eucariotos
Término da transcrição comandado por mecanismos dependentes ou independentes de rho	O mecanismo de término não é totalmente conhecido podendo ser realizado por um sinal emitido por uma polimerase A ou por uma sequência específica de parada no DNA
Em geral não existem modificações pós-transcricionais do RNA transcrito	O RNA sintetizado (transcrito) passará por etapas de modificação (RNA editing)
RNA capping é ausente. O mRNA é desprovido de capping de guanosina	RNA capping presente. O mRNA possui capping de guanosina
Não existe cauda poli-A no mRNA	Existe cauda poli-A no mRNA que é adicionada enzimaticamente, sem a presença da fita complementar
Íntrons ausentes no mRNA	Íntrons presentes no mRNA imaturo
Não existe splicing de mRNA pois não existem íntrons	Íntrons são removidos do transcrito primário por meio de vários mecanismos de splicing e as partes do mRNA maduro são unidas
Genes geralmente policistrônicos portanto um único transcrito pode conter sequências para inúmeros polipeptídeos	Genes são monocistrônicos portanto o transcrito codifica apenas um polipeptídeo
Sequência SD (Shine-Dalgarno) localizada 8 nucleotídeos upstream em relação ao start códon no RNA (SD local de ligação do ribossomo)	SD ausente pois a transcrição e a tradução são fenômenos distintos nos eucariotos

Vídeo de transcrição de DNA e splicing

- <https://www.youtube.com/watch?v=slOneovpOEk> transcription
- https://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw_pQ splicing
- https://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw_pQ splicing

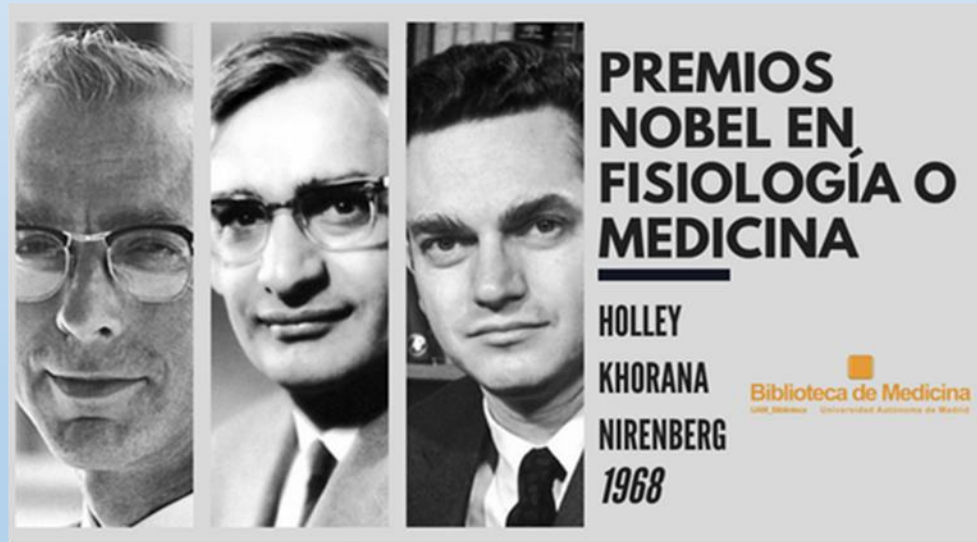
Tradução

Tradução

- A **tradução** envolve "decodificar" um RNA mensageiro (mRNA) e usar sua informação para produzir uma cadeia de aminoácidos que vai gerar um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína
- Em um mRNA, as instruções para a produção de um polipeptídeo vêm em grupos de três nucleotídeos chamados **códons**
- Existem 61 códons diferentes para a produção de aminoácidos
- Três códons de "parada" ou STOP códons sinalizam que o polipeptídeo deve ser terminado
- Um códon AUG é um sinal de "início" para começar a tradução (também especifica o aminoácido metionina)
- Essas relações entre os códons do mRNA e os aminoácidos são conhecidas como **código genético**

Código genético

- 1964: Marshall Warren Nirenberg, bioquímico; Har Gobind Khorana, biólogo molecular indiano e Robert William Holley, bioquímico, receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1968 pela descoberta do código genético



(1922-1993) (1922-2011) (1927-2010)

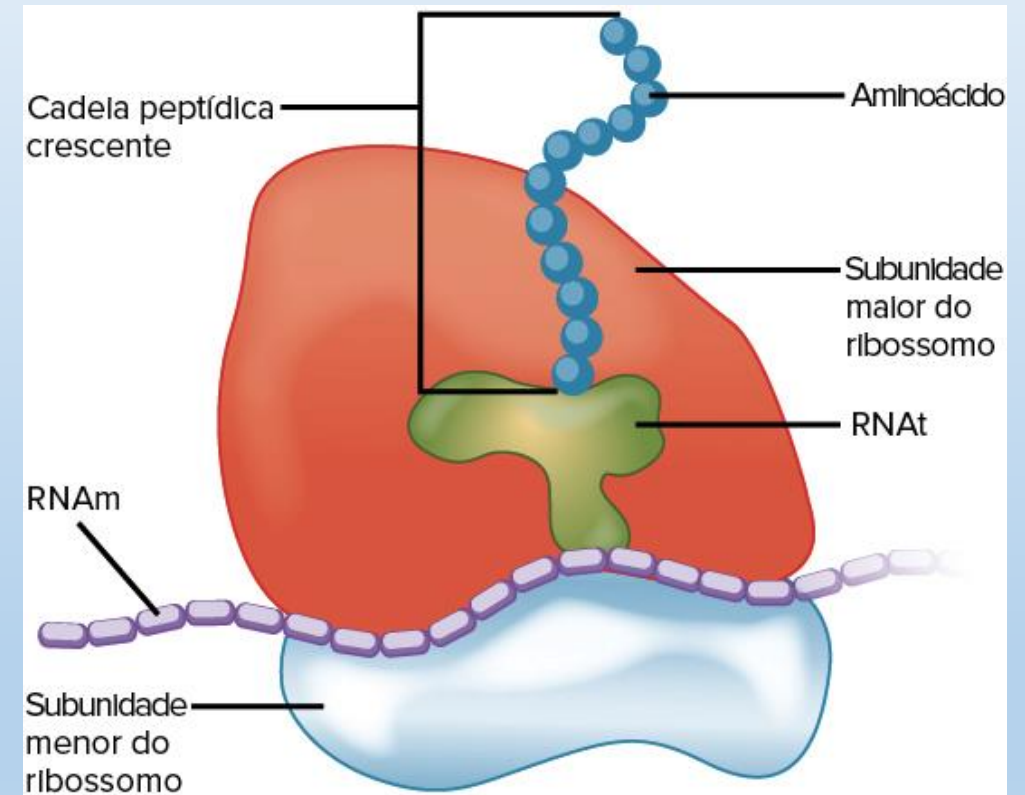
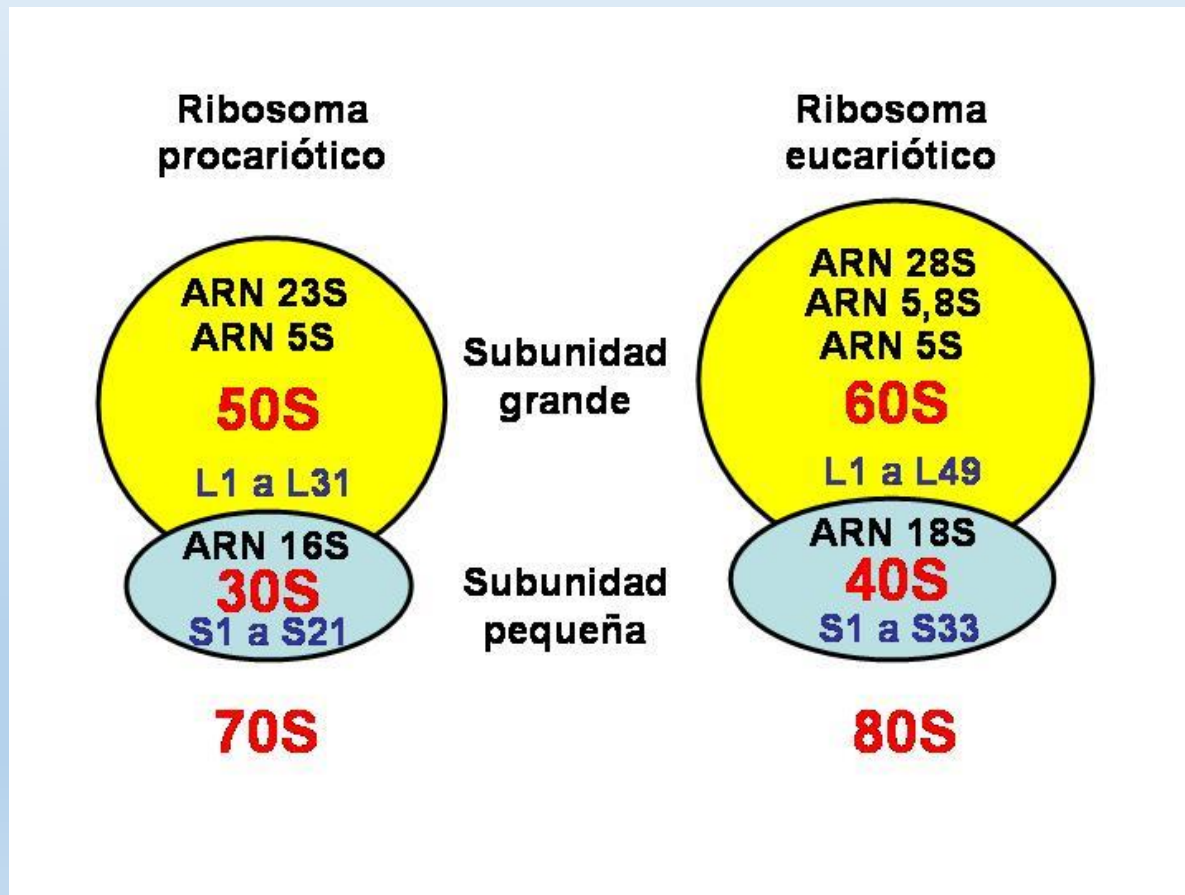
O código genético

- **Código genético** é a relação entre a sequência de bases nucleotídicas e a sequência correspondente de aminoácidos na proteína
- Um códon é formado de três bases nucleotídicas

		Segunda Base					
		U	C	A	G		
Primeira Base 5'	U	UUU } Fenil- alanina UUC } UUA } Leucina UUG }	UCU } UCC } Serina UCA } UCG }	UAU } Tirosina UAC } UAA } Stop codon UAG } Stop codon	UGU } Cysteine UGC } UGA } Stop codon UGG } Tryptophan	U	A
	C	CUU } CUC } Leucina CUA } CUG }	CCU } CCC } Prolina CCA } CCG }	CAU } Histidina CAC } CAA } Glutamina CAG }	CGU } CGC } Arginina CGA } CGG }	C	G
	A	AUU } Isoleucina AUC } AUA } Metionina AUG } start codon	ACU } ACC } Treonina ACA } ACG }	AAU } Asparagina AAC } AAA } Lisina AAG }	AGU } Serina AGC } AGA } Arginina AGG }	A	U
	G	GUU } GUC } Valina GUA } GUG }	GCU } GCC } Alanina GCA } GCG }	GAU } Ácido GAC } Aspártico GAA } Acido GAG } Glutâmico	GGU } GGC } Glicina GGA } GGG }	G	C
						3'	

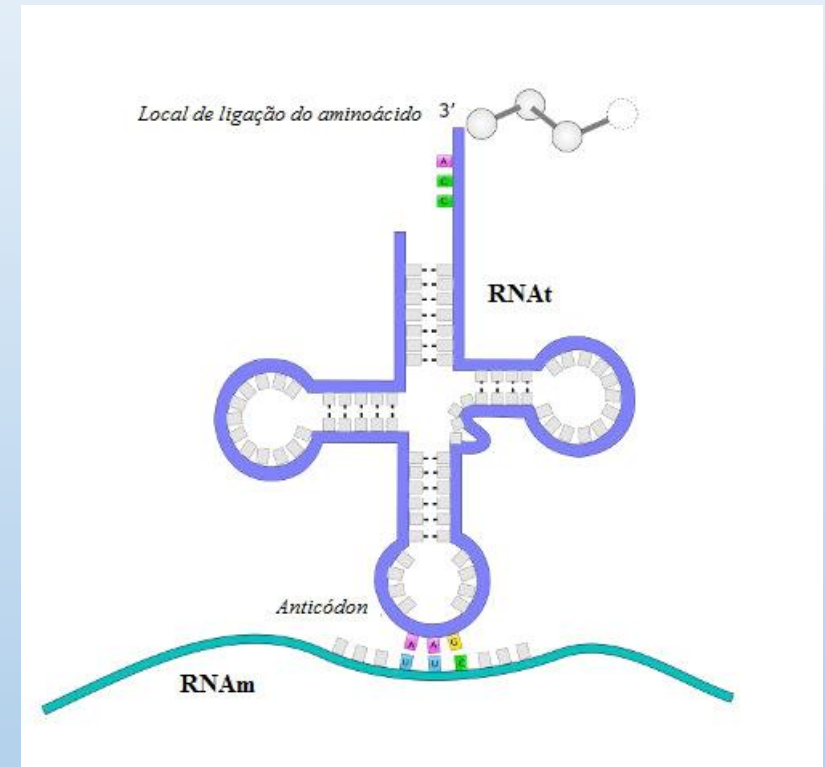
- O código é degenerado (aminoácidos são produzidos por mais de 1 códon), exceto triptofano
- AUG (metionina) é o start codon e existem 3 stop codons (UAA, UAG, UGA)

Tradução: participação de ribossomos



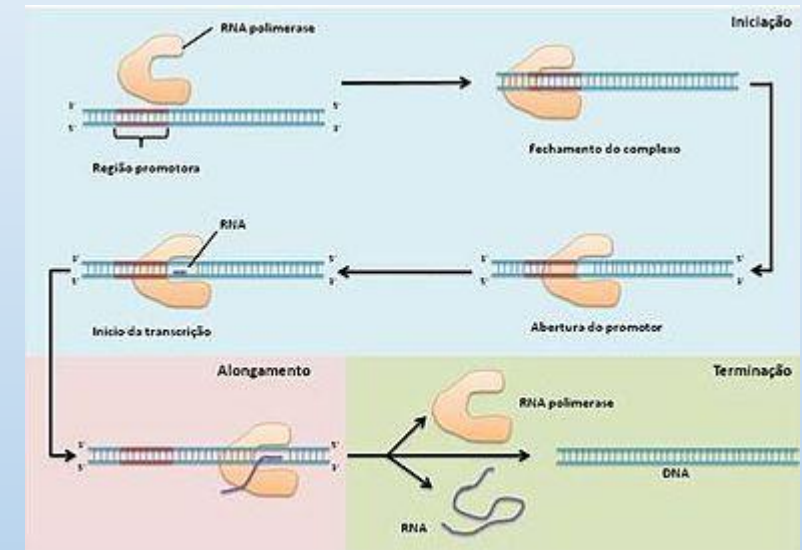
Tradução

- Na tradução, os códons de um mRNA são lidos por ordem (da extremidade 5' para a extremidade 3') por moléculas chamadas de RNA de transporte ou transferência (tRNA)
- Cada tRNA possui um **anticódon**, ou seja, um conjunto de três nucleotídeos complementares e que se ligam ao códon correspondente no mRNA através do emparelhamento de bases
- A outra extremidade do tRNA traz o aminoácido especificado pelo códon para formar uma cadeia polipeptídica
- Os tRNA se ligam aos mRNA dentro de uma estrutura de RNA e proteína chamada **ribossomo**
- À medida que os tRNA preenchem os compartimentos do ribossomo e se ligam aos códons, seus aminoácidos são adicionados à cadeia crescente de peptídeos em uma reação química
- O produto final é um polipeptídeo cuja sequência de aminoácidos reflete a sequência de códons do mRNA



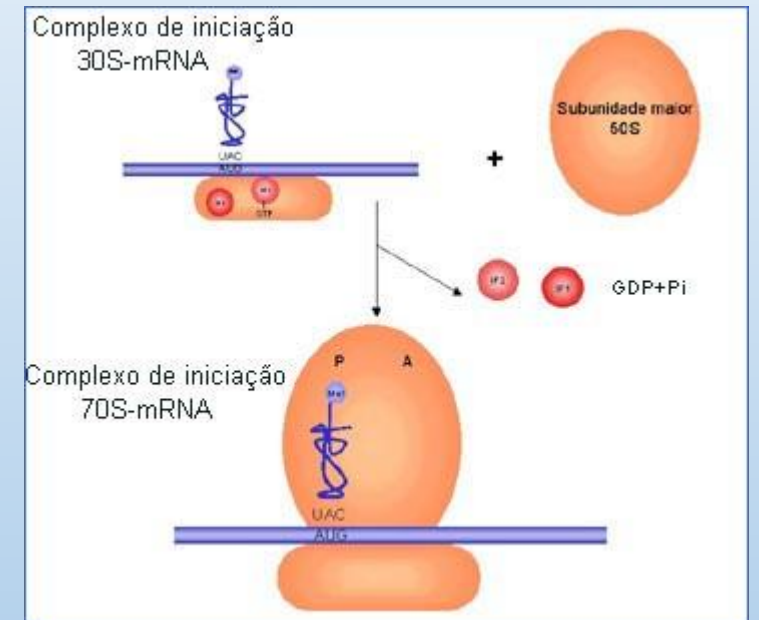
Etapas da tradução

- **Iniciação** ("começo"): nesta etapa, o ribossomo se junta ao mRNA e ao primeiro tRNA para que a tradução possa ter início
- **Alongamento** ("meio"): nesta etapa, os aminoácidos são trazidos ao ribossomo pelos tRNA e são ligados entre si para formar uma cadeia polipeptídica
- **Terminação** ("fim"): na última etapa, o polipeptídeo final é liberado para que possa cumprir sua função na célula. Sendo assim, o polipeptídeo pode entrar no núcleo, ficar no citoplasma ou ser exportado para o meio extracelular dependendo de sua função



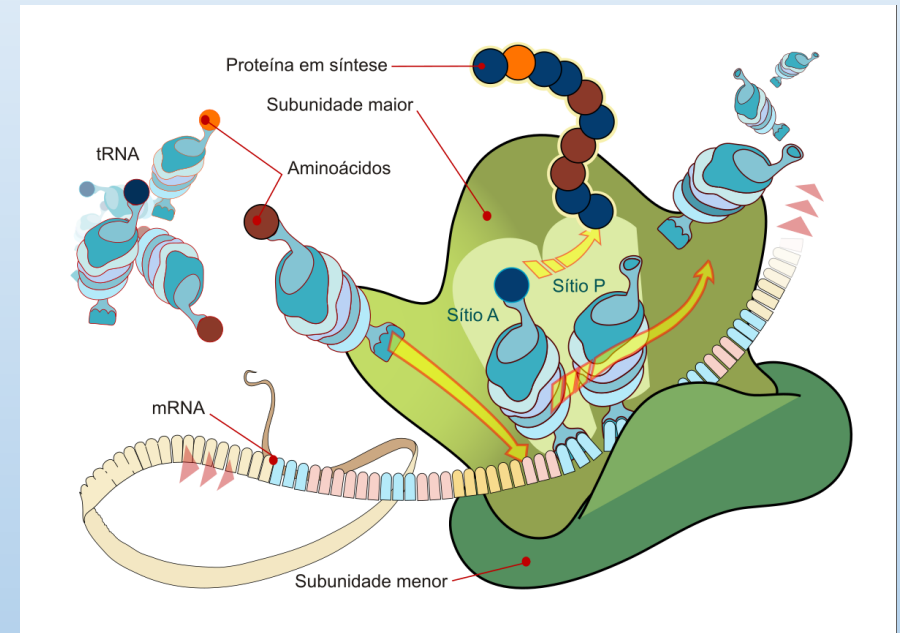
Tradução: iniciação

- Para que a tradução possa começar, alguns elementos são necessários:
 - Um ribossomo (o qual tem duas partes, uma pequena e uma grande)
 - Um mRNA com as instruções para a proteína que será sintetizada
 - Um tRNA "iniciador" transportando o primeiro aminoácido da proteína, que quase sempre é a metionina (Met)
- Durante a iniciação, essas peças devem se unir de maneira correta. Juntas, elas formam o **complexo de iniciação**, a configuração molecular necessária para começar a síntese de uma nova proteína



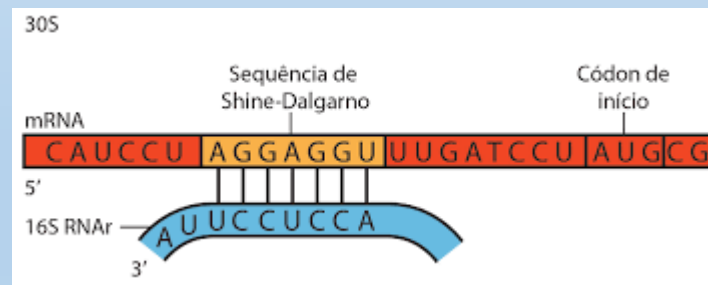
Iniciação

- Na subunidade maior do ribossomo há dois sítios: P e A
- O primeiro tRNA que se ligou ao mRNA ocupa o primeiro sítio (P) e, seguindo a sequência do mRNA, um novo tRNA transportando outro aminoácido irá se ligar ao complexo, ocupando o segundo sítio (A)
- Assim, quando ambos os sítios do ribossomo estiverem ocupados, ocorrerá uma ligação peptídica entre os aminoácidos ali localizados
- Após a formação da ligação peptídica, o tRNA que ocupava o sítio P é desligado e o ribossomo segue para o próximo códon do mRNA
- Desta forma o tRNA que antes ocupava o sítio A passa a ocupar o sítio P e, seguindo a sequência do RNA mensageiro, um novo tRNA vai se ligar ocupando o sítio A



Iniciação em procariotos

- Nas bactérias, a iniciação da tradução é um pouco diferente
- A subunidade ribossômica pequena não começa pela extremidade 5' e caminha em direção a 3'
- Em vez disso, a subunidade ribossômica pequena se associa diretamente a determinadas sequências no mRNA chamadas sequências **Shine-Dalgarno**, que antecedem os códons e "os apontam" para o ribossomo

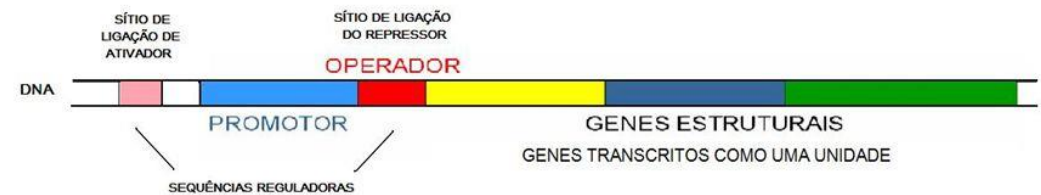


Iniciação: procariotos

- Por que usar sequências Shine-Dalgarno?
- Os genes bacterianos são frequentemente traduzidos em grupos chamados **operons**, portanto um mRNA bacteriano pode conter sequências codificadoras de muitos genes
- Uma sequência de Shine-Dalgarno marca o início de cada sequência codificadora, o que permite que o ribossomo encontre o códon de iniciação certo para cada gene que vai ser traduzido

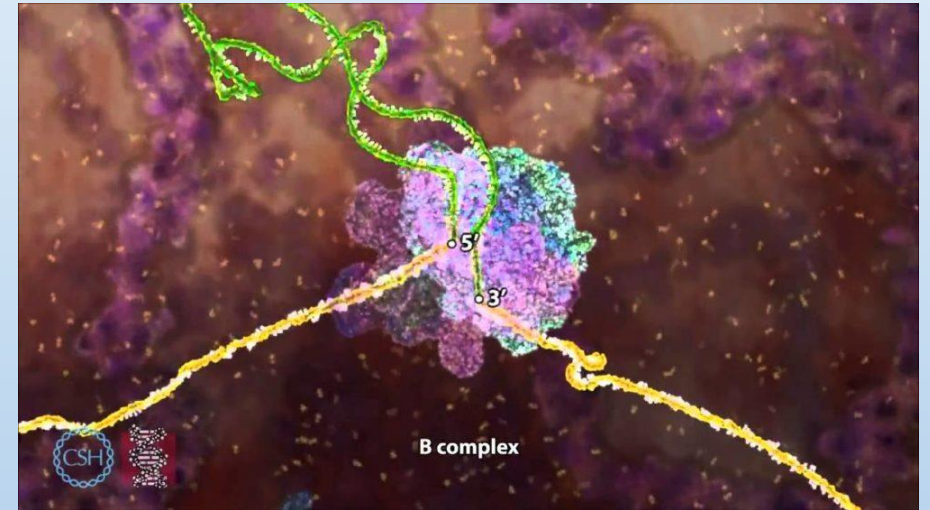
O MODELO DO OPERON

- **Operon:** grupo de genes que codificam para produtos com funções relacionadas e são transcritos juntos sob o controle de um único promotor.
- É formado pelos **genes estruturais**, um **promotor** e um **operador**



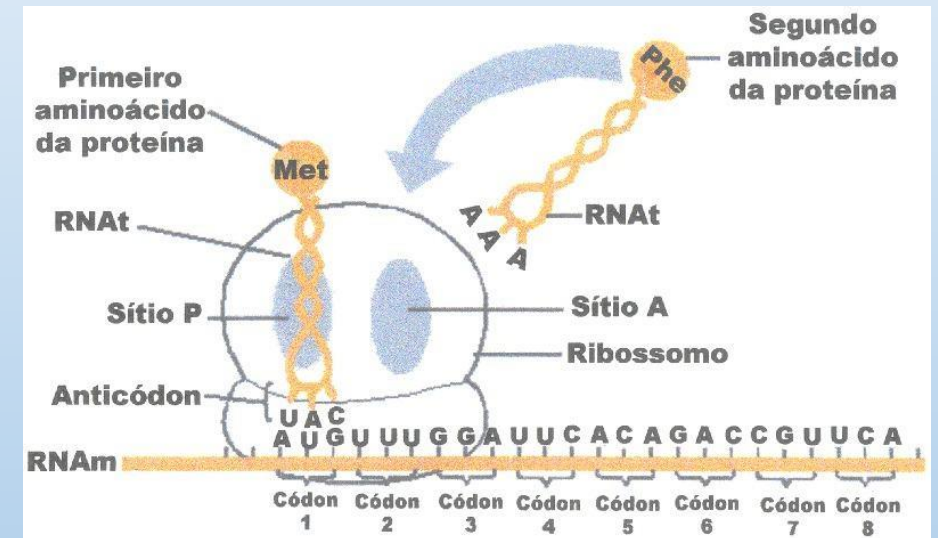
Iniciação em eucariotos

- O tRNA transportando a metionina (códon AUG) se liga à subunidade ribossomal pequena
- Em seguida, tRNA + subunidade ribossomal pequena irão se ligar à extremidade 5' do mRNA através do reconhecimento do cap 5' GTP (adicionado durante o processamento no núcleo)
- O processo continua com tRNA + subunidade ribossomal pequena "caminhando" ao longo do mRNA na direção 3'. Só vão parar quando alcançarem o códon de iniciação (com frequência, mas nem sempre, o primeiro AUG)



Alongamento

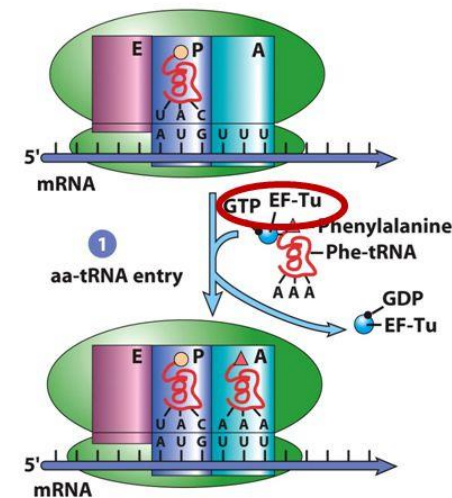
- **Alongamento** é quando o polipeptídeo se torna mais **longo**
- O primeiro tRNA transportador de metionina começa no compartimento do meio no ribossomo, chamado de sítio P
- Ao lado, um novo códon é exposto em outro compartimento, chamado de sítio A
- O sítio A será o local de "desembarque" para o próximo tRNA, aquele cujo anticódon é o correspondente perfeito (complementar) do códon em exposição
- Uma vez que o tRNA correspondente desembarca no sítio A ocorre a formação de uma **ligação peptídica** que conecta um aminoácido a outro (o do sítio P com o do sítio A)
- Esta etapa transfere a metionina do primeiro tRNA para o aminoácido do segundo tRNA no sítio A
- Temos agora 2 aminoácidos, um (minúsculo) polipeptídeo, com a metionina na extremidade **N-terminal** (amino terminal) do polipeptídeo, e o outro aminoácido na extremidade **C-terminal (carboxi terminal)**



Alongamento continua...

- Depois que a ligação peptídica é formada, o mRNA é puxado para frente no ribossomo (deslocamento correspondendo ao espaço exato de um códon)
- Esse deslocamento permite que o primeiro tRNA, agora vazio, saia através do sítio E (do inglês "Exit")
- Isso também faz com que um novo códon fique exposto no sítio A, para que todo o ciclo se repita
- E se repete, variando de alguma vezes até espantosas 33.000 vezes
- A proteína titina, encontrada em nossos músculos, é o mais longo polipeptídeo conhecido, pode ter mais de 33.000 aminoácidos

Alongamento da tradução (2ª fase)



Seleção do aa-tRNA

Figure 11-49a part 1 Cell and Molecular Biology, 5/e (© 2008 John Wiley & Sons)

Terminação

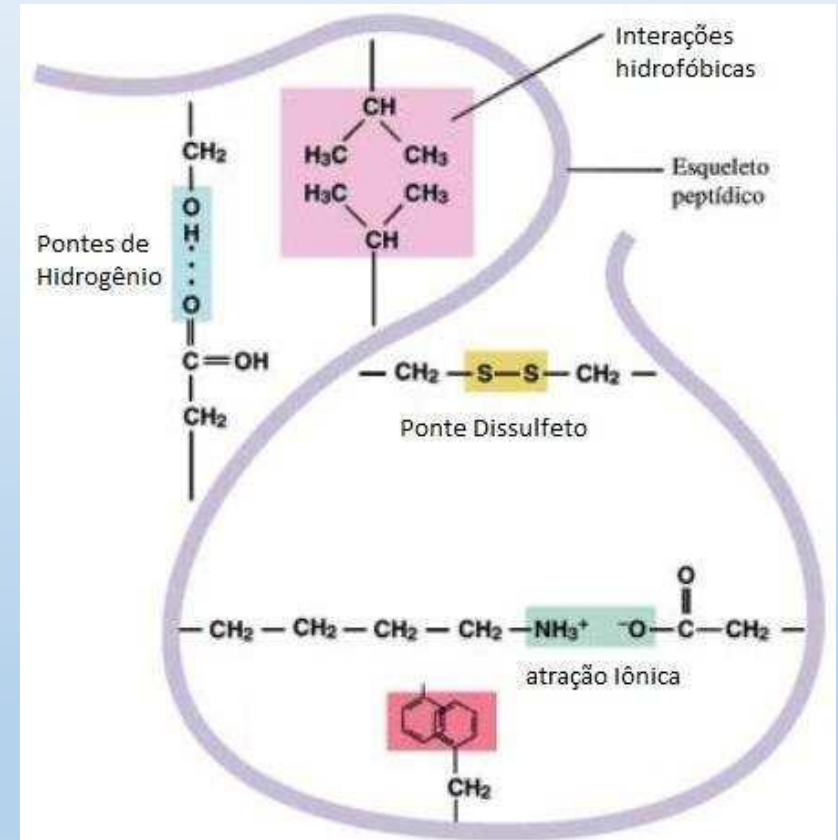
- A tradução acaba em um processo chamado terminação
- A terminação acontece quando um dos três códons de parada (STOP) no mRNA (UAA, UAG ou UGA) entra no sítio A
- Códons de parada (STOP) são reconhecidos por proteínas chamadas de **fatores de liberação**, os quais se adaptam perfeitamente ao sítio P (embora não sejam tRNA)
- Fatores de liberação confundem a enzima que normalmente forma as ligações peptídicas, fazendo-as adicionar uma molécula de água ao último aminoácido da cadeia
- Essa reação separa a cadeia do tRNA, assim a proteína recém-produzida é liberada

Terminação da Tradução

- Fator de terminação liga-se ao stop codon
– UAA, UGA, UAG
- Proteína é liberada
- Complexo é desfeito

Após a terminação: processamento

- O “maquinário” de tradução é bastante reutilizável
- Depois que as unidades ribossômicas se separam do mRNA e entre si (a subunidade grande se separa da pequena), cada elemento pode, e normalmente fazem isso rapidamente, participar de um novo ciclo de tradução
- Muitos polipeptídeos precisam de algumas “edições” para ficarem aptos a cumprir suas funções nas células
- Durante e após a tradução, aminoácidos podem ser quimicamente alterados ou removidos
- O novo polipeptídeo também vai se dobrar em uma estrutura em 3D distinta e pode se associar a outros polipeptídeos para formar uma proteína com múltiplas partes (proteína multimérica)



Epílogo: modificações pós-traducionais

- Ocorrem apenas nos eucariotos
- Muitas proteínas conseguem se dobrar sozinhas, mas algumas precisam de auxiliares, as **chaperonas**, para evitar que se unam incorretamente durante o processo complexo que é o dobramento
- Algumas proteínas também contêm sequências especiais de aminoácidos que as direcionam para determinadas partes das células, orientando o dobramento
- Estas sequências, muitas vezes encontradas próximas às extremidades terminais N e C, podem ser entendidas como as "passagens de trem" das proteínas para suas destinações finais (órgãos e tecidos onde irão atuar)

Síntese Protéica



As chaperonas controlam as interações no enrolamento de proteínas.

Chaperona

A chaperona controla as interações.

FIGURA 10.9 As chaperonas ligam-se a regiões indesejadas das proteínas à medida que estas são sintetizadas, impedindo a agregação aborrecida. Regiões da proteína são liberadas para interação de forma ordenada, resultando na conformação adequada.

Proteínas desenoveladas ligam-se a chaperonas

FIGURA 10.10 As proteínas emergem do ribossomo, ou da passagem através da membrana, em um estado desenovelado que atrai chaperonas que se ligam e protegem as proteínas do enrolamento incorreto.

Chaperoninas envolvem seus substratos internamente

A proteína é inserida em uma câmara fechada

A proteína emerge após o dobramento

FIGURA 10.11 Uma chaperonina forma um grande complexo oligomérico e envolve uma proteína substrato em seu interior.

Vídeos de tradução

- <https://www.youtube.com/watch?v=DcCnmPeutP4> trad
- <https://www.youtube.com/watch?v=gG7uCskUOrA> todo o processo

Expressão gênica

- O termo **expressão gênica** refere-se ao processo durante o qual a informação codificada por um determinado gene é decodificada e dá origem a uma proteína (polipeptídeo)
- Teoricamente, a regulação em qualquer uma das etapas desse processo (transcrição- tradução) pode levar a uma **expressão gênica diferencial** que vai atender as necessidades de cada tecido, órgão ou sistema (respiratório, cardíaco, nervoso etc)
- A expressão gênica diferencial também pode ser útil, por exemplo, para o nosso organismo combater uma infecção por intermédio da expressão de diferentes genes, ou de diferentes éxons de um mesmo gene, que serão selecionados para comporem o polipeptídeo, de acordo com a fase da infecção

Resumo das informações

- O DNA é dividido em unidades funcionais chamadas **genes**, que podem codificar polipeptídeos (proteínas e subunidades de proteínas) ou RNAs funcionais (como tRNA e rRNA)
- A informação genética contida em um gene é usada para construir um produto funcional em um processo chamado **expressão gênica que envolve os processos de transcrição e tradução**
- Um gene que codifica um polipeptídeo é expresso em duas etapas. Nesse processo, a informação flui do DNA => RNA => proteína, uma relação direcional conhecida como **dogma central** da biologia molecular
 - **Transcrição:** uma fita do DNA (do gene) é copiada dando origem ao RNA. Nos eucariontes, o transcrito de RNA deve passar por etapas adicionais de processamento para se tornar um RNA mensageiro (mRNA) maduro
 - **Tradução:** A sequência de nucleotídeos do mRNA é decodificada dando origem a uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo. Este processo ocorre dentro de um ribossomo e requer moléculas adaptadoras chamadas de tRNA
- Durante a tradução, os nucleotídeos do RNA são lidos em grupos de três, chamados códon. Cada códon especifica um aminoácido em particular ou um sinal de parada (STOP códon). Esse conjunto de relações é conhecido como o **código genético**