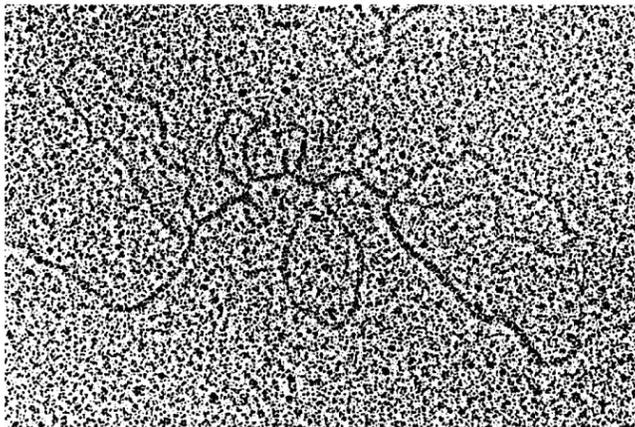




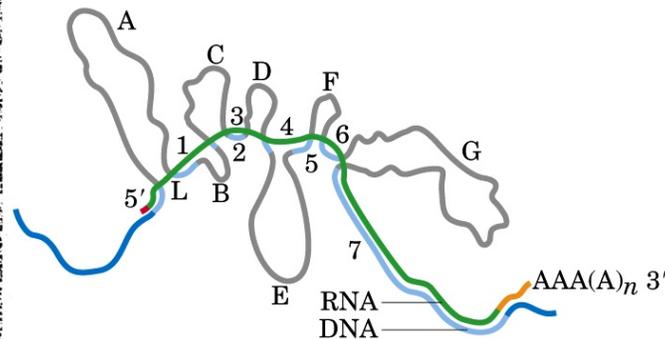
# QBQ0317 - 2020

## Aula 11

### Processamento de RNA



(a)



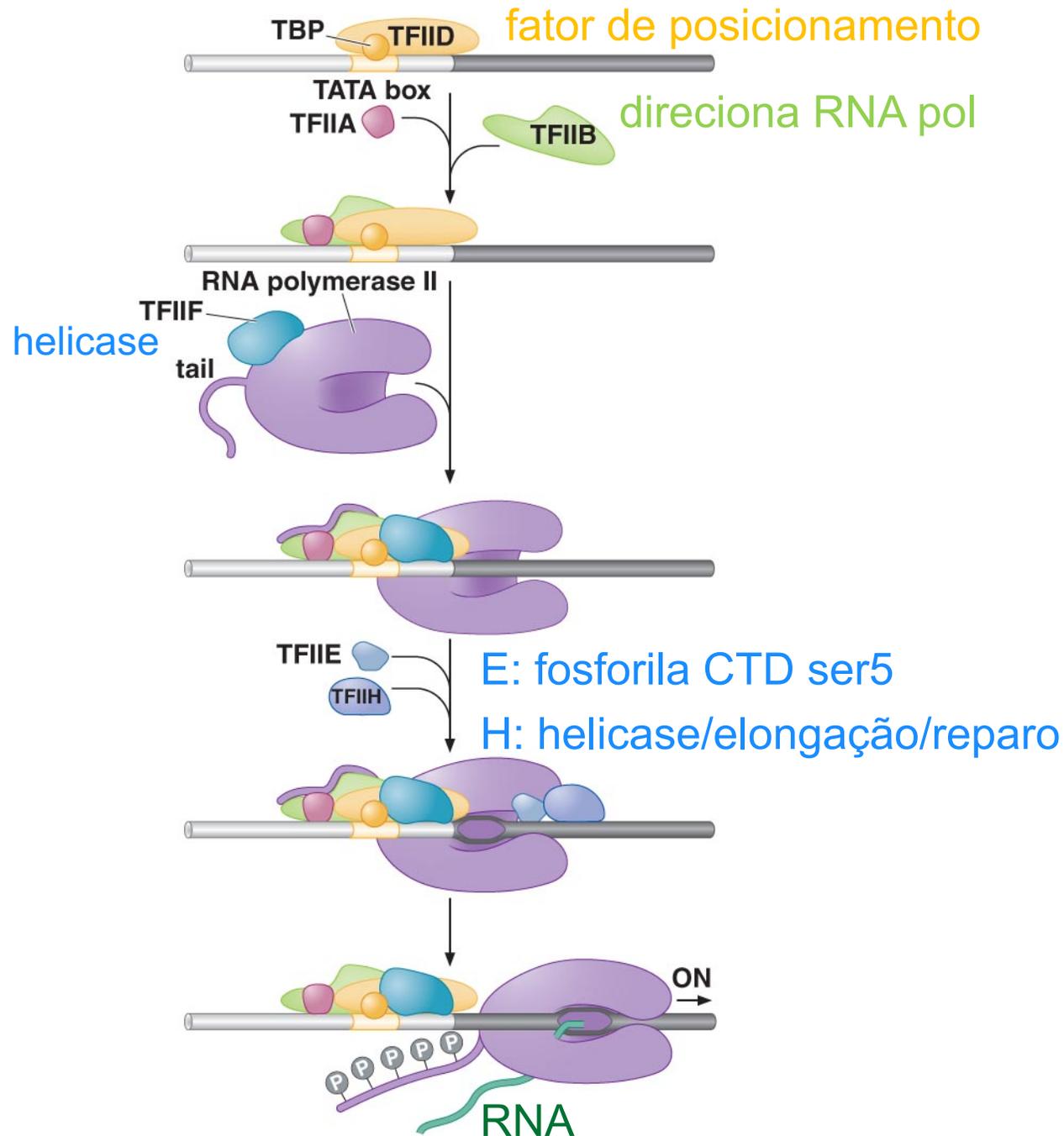
(b)

# Transcrição pela RNAPII

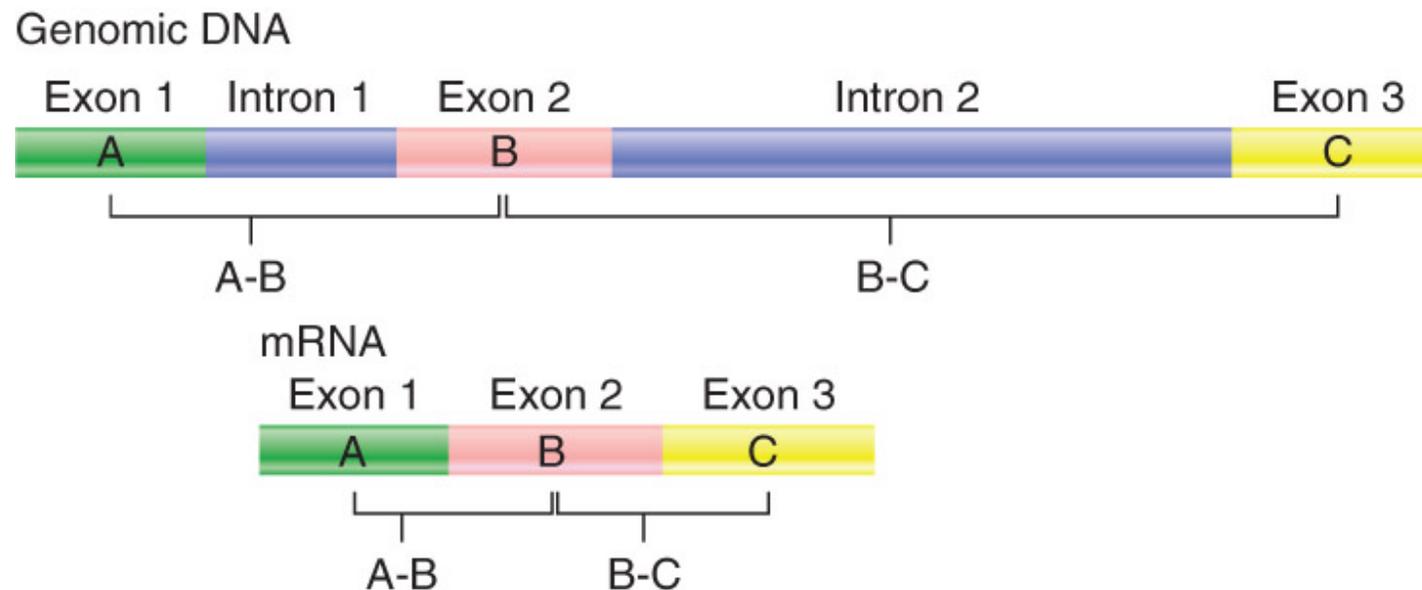
Formação do complexo basal (ou de pré-início)

Fosforilação (P) do domínio carboxiterminal (CTD) da RNAP

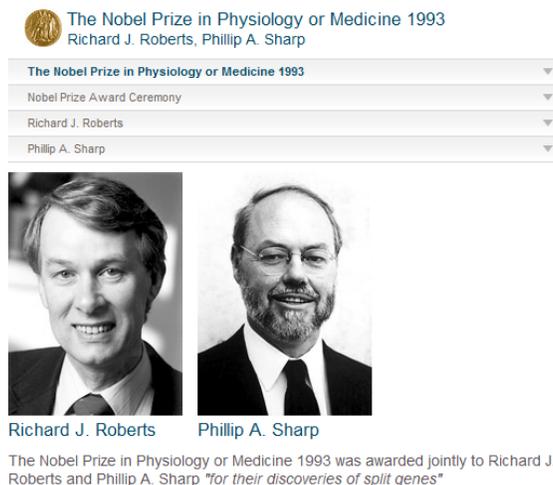
Escape do promotor e síntese do RNA



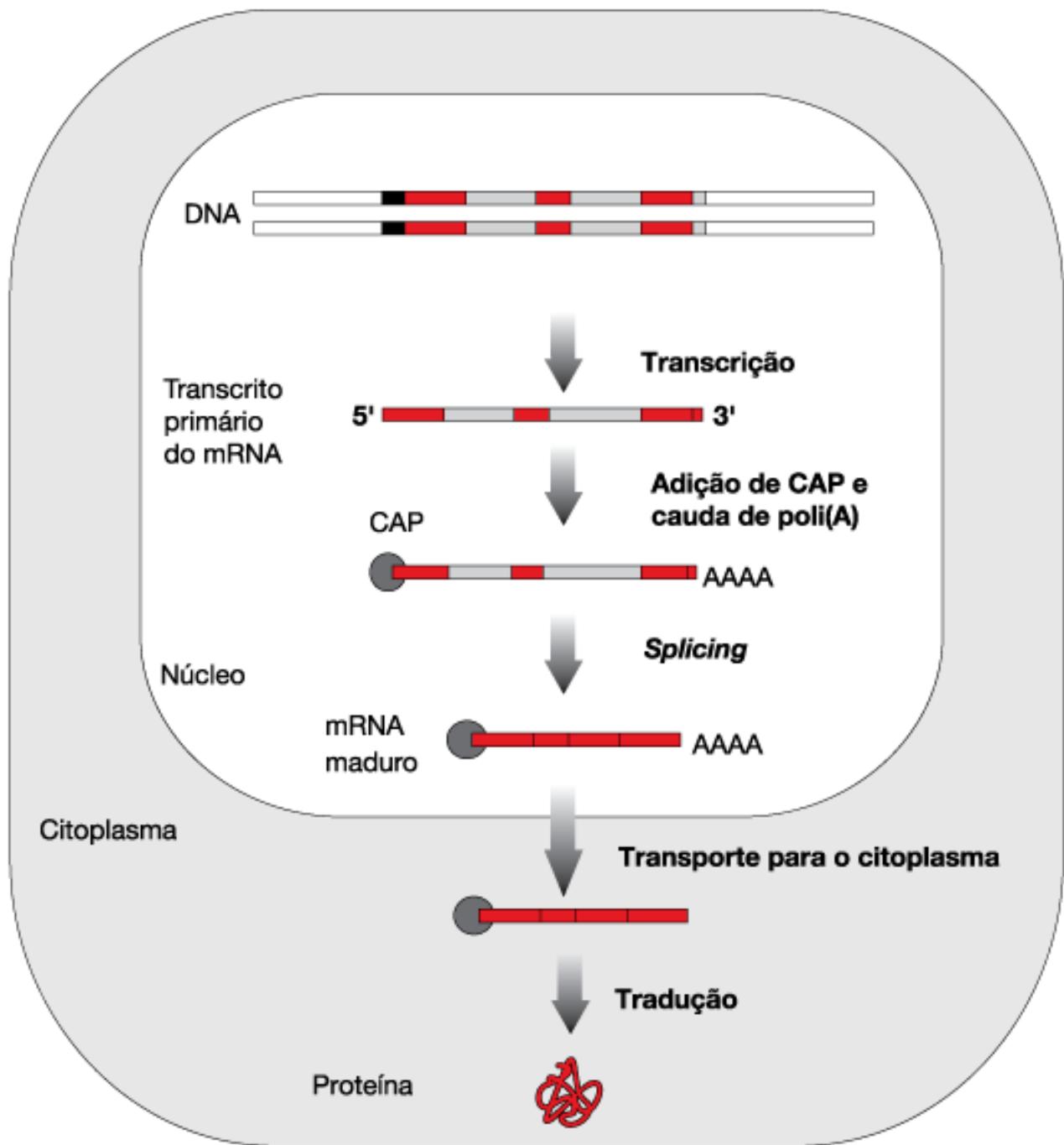
# Genes eucarióticos são interrompidos por introns



- **Exons**: regiões codificadoras
- **Introns** (intragenic regions)
  - presentes no DNA, mas não no mRNA
  - removidos do RNA precursor (*splicing*)



# Processamento do RNA



- Adição do 5' - CAP
- *Splicing* – remoção dos introns
- Adição da cauda poli-A (poliadenilação)

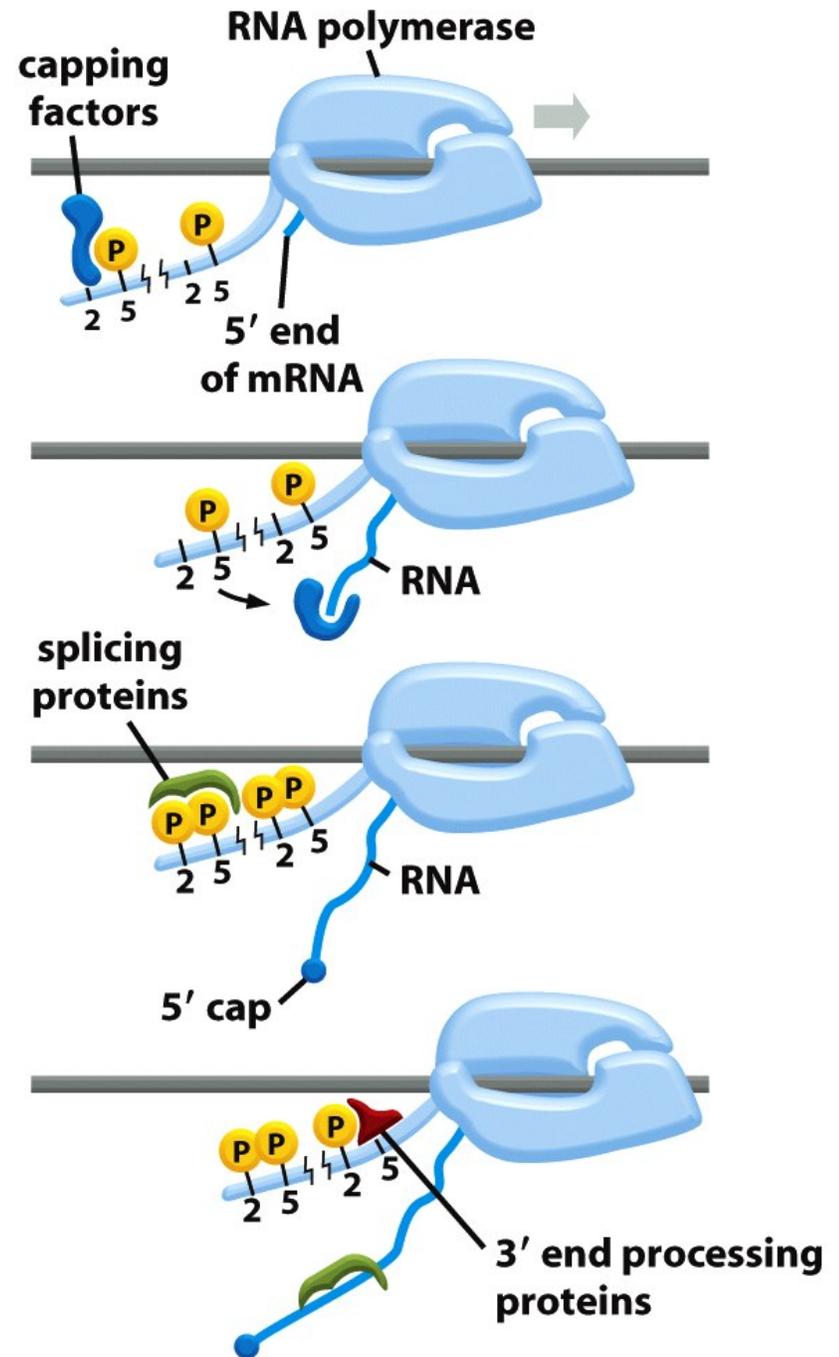
# Três eventos de processamento do RNA

- **Adição do 5' CAP**
  - proteção contra nucleases
  - sinalização
- **Splicing**
  - remoção dos introns
  - pode gerar mRNAs maduros diferentes
- **Adição da cauda poli-A no 3'**
  - proteção contra nucleases
  - sinalização

Ocorrem simultaneamente à transcrição

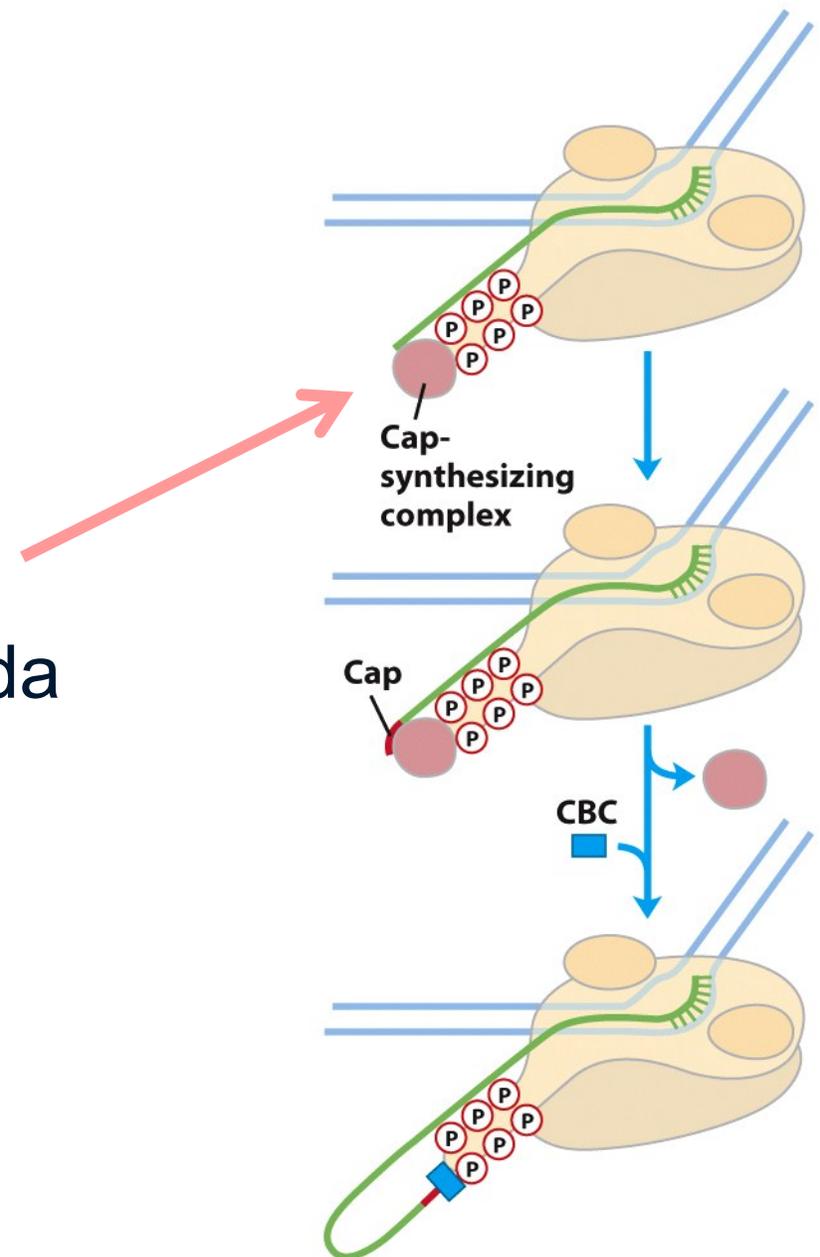
Enzimas envolvidas no processamento do RNA são recrutadas pelo CTD da RNAP II

Diferentes estados de fosforilação do CTD



# Síntese do CAP

- Enzimas associadas ao CTD fosforilado, durante pausa no início da transcrição
- Adição do CAP promove alongação do transcrito



**Figure 26-13c**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# CAP na extremidade 5' do mRNA

- Ligação fosfodiéster 5' → 5' de uma guanosina ao pré-mRNA
  - Metilação na posição 7
- Protege mRNA da degradação
- Sinal para a tradução

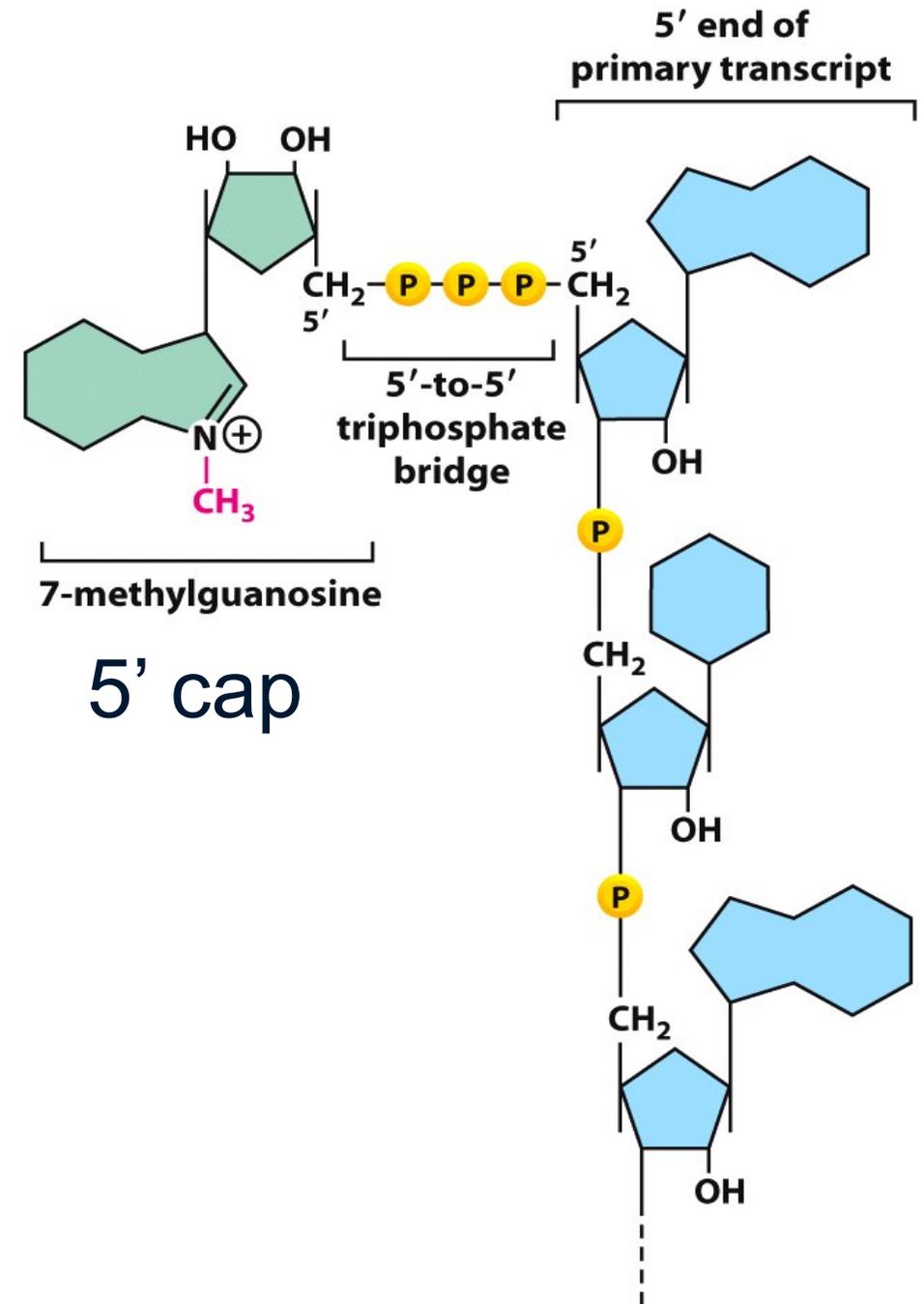
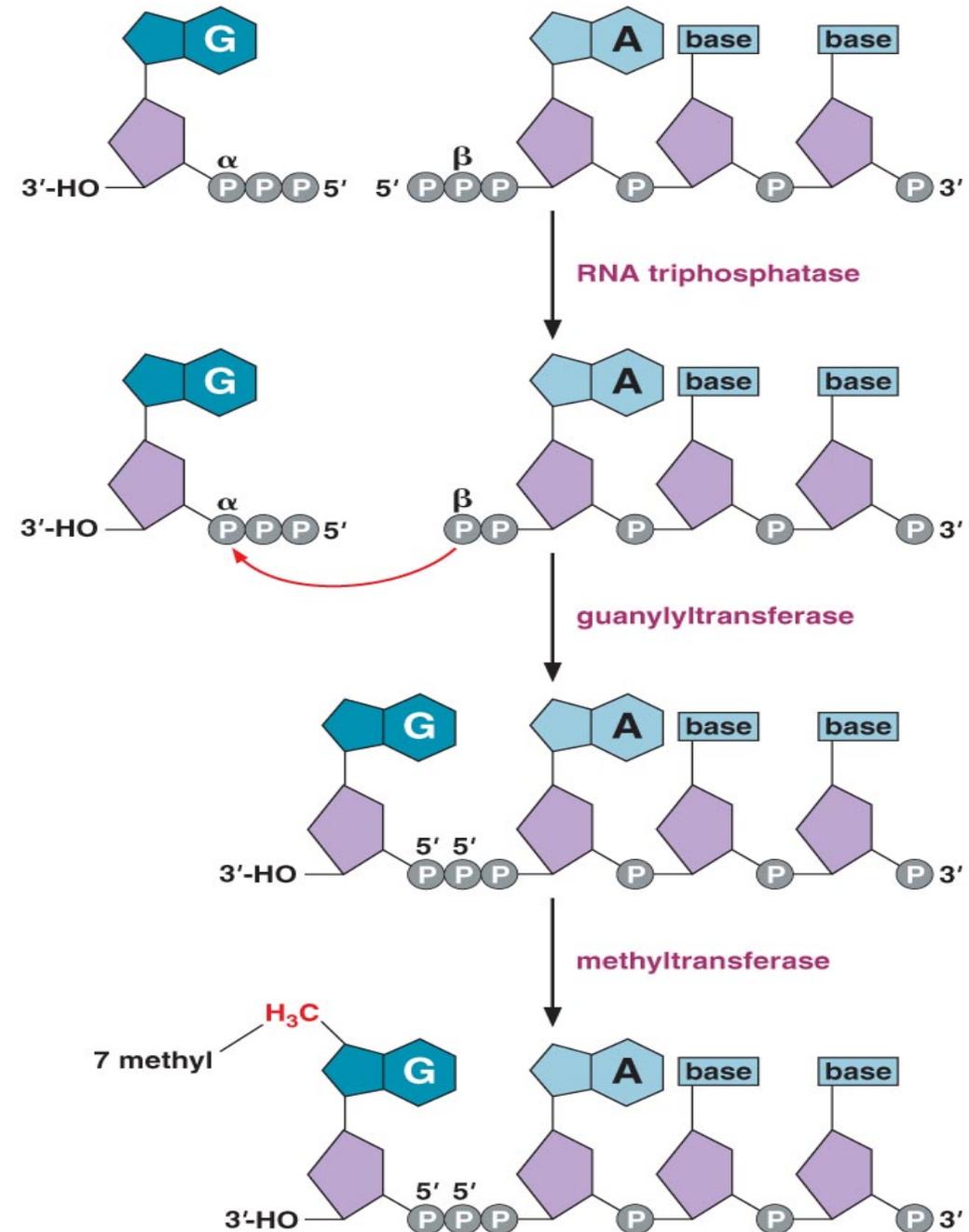
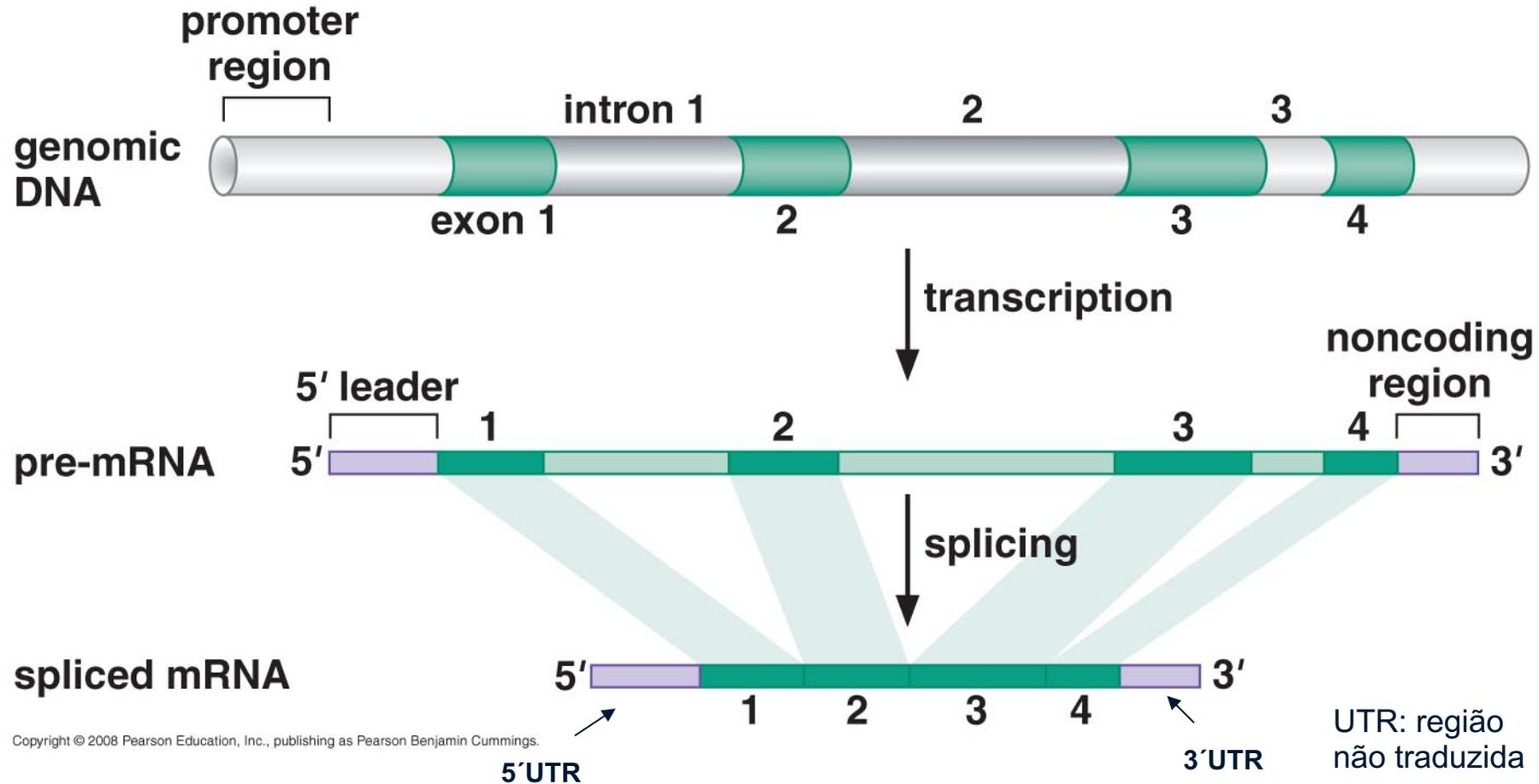


Figure 7-16b Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

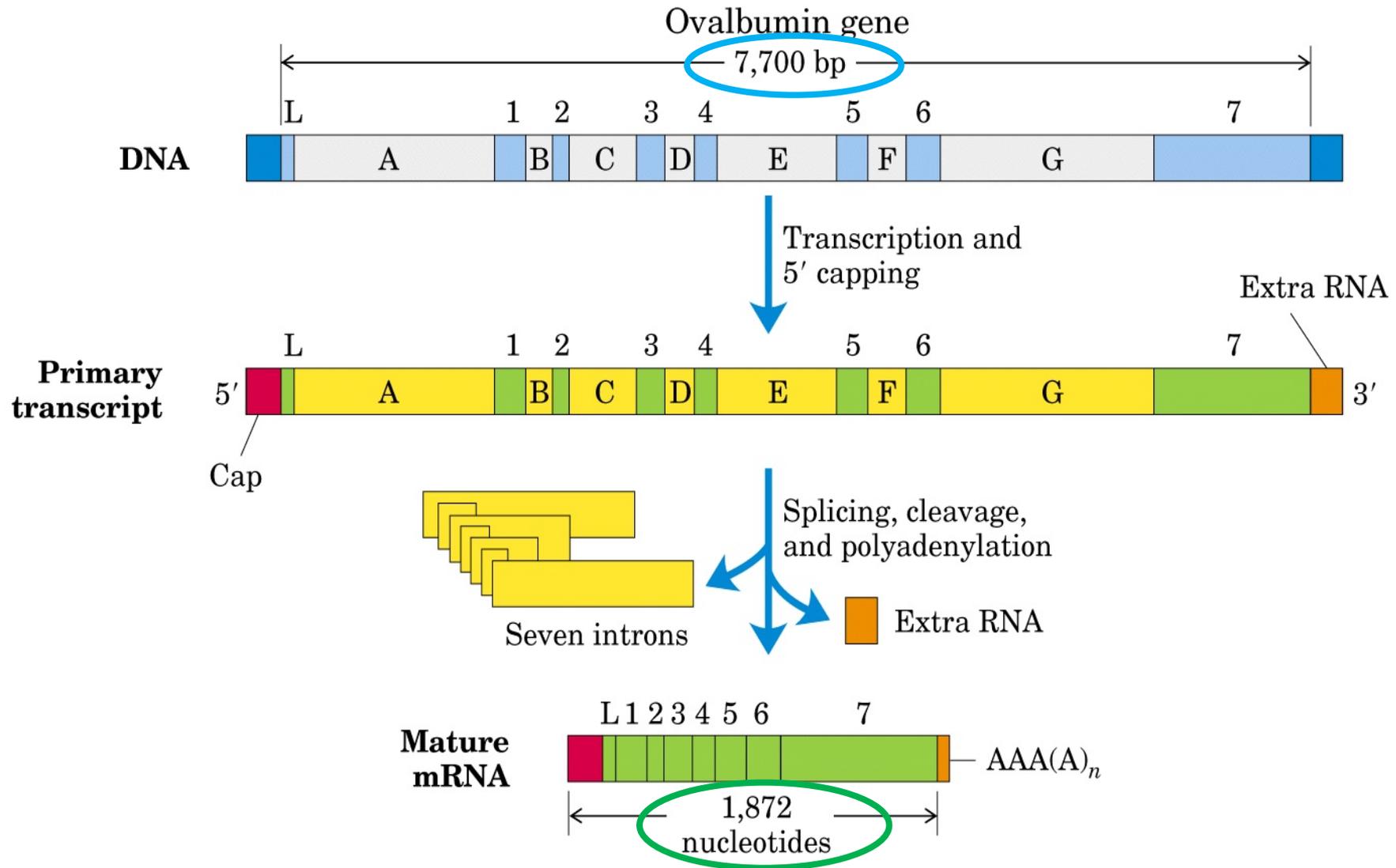
# Mecanismo de adição de 5' cap

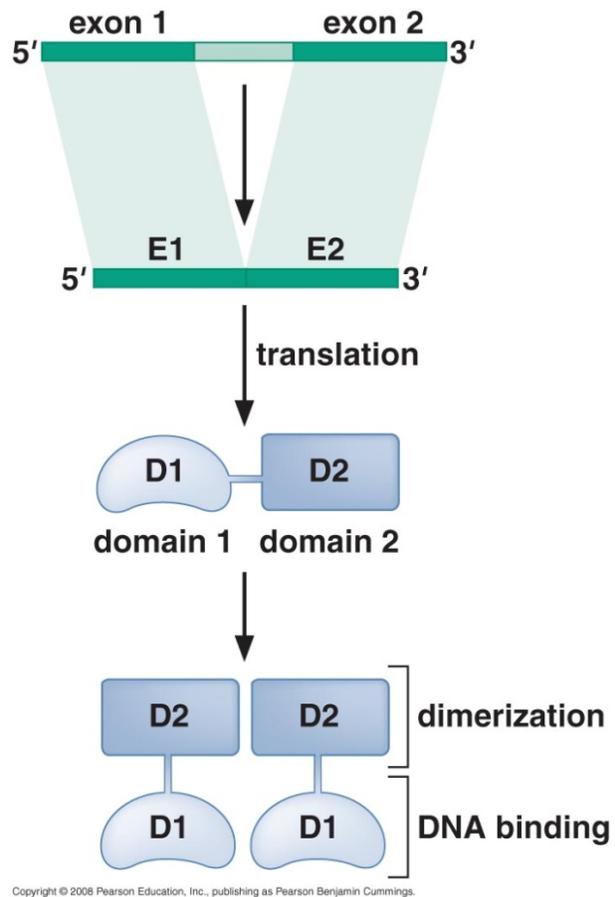


# Genes eucarióticos são interrompidos por introns (*interrupting sequences*)

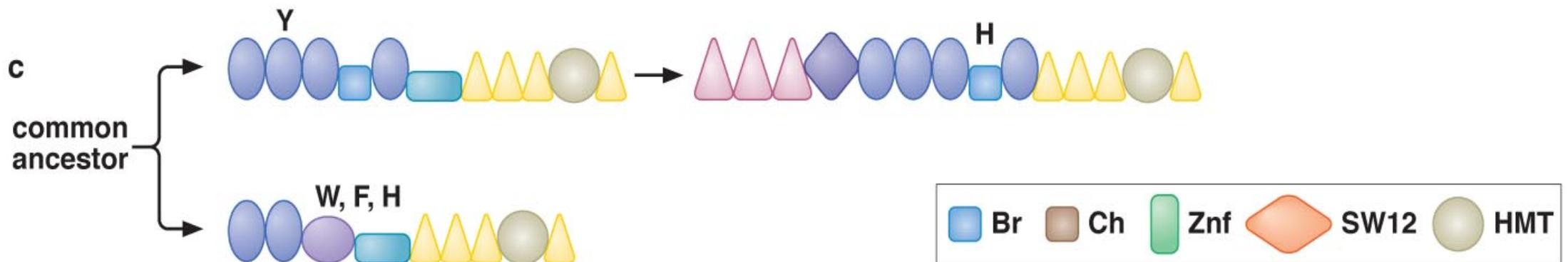


# Introns podem corresponder à maior parte do gene

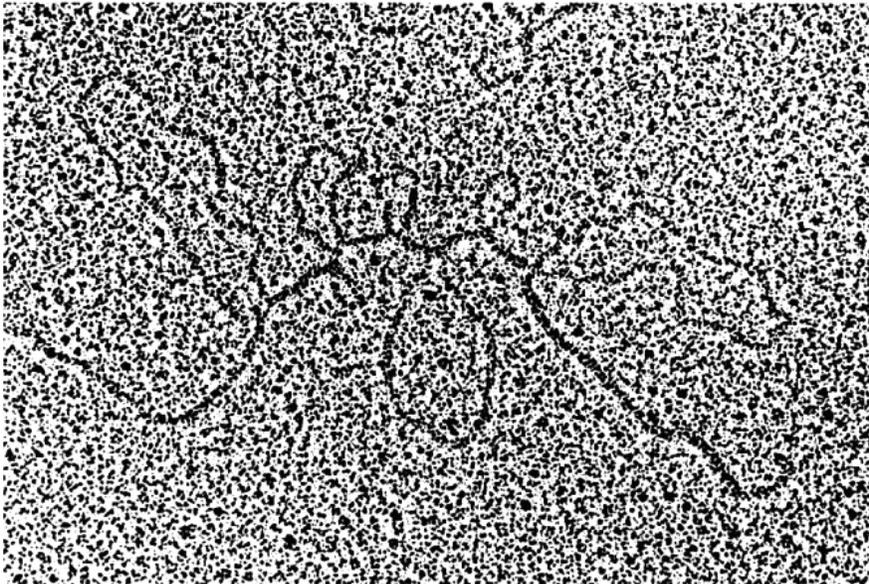
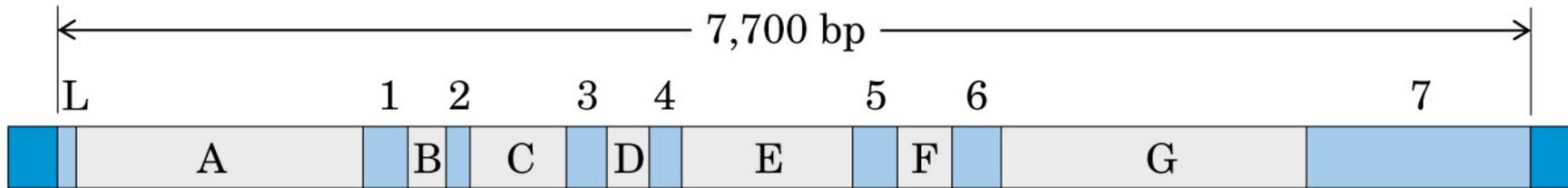




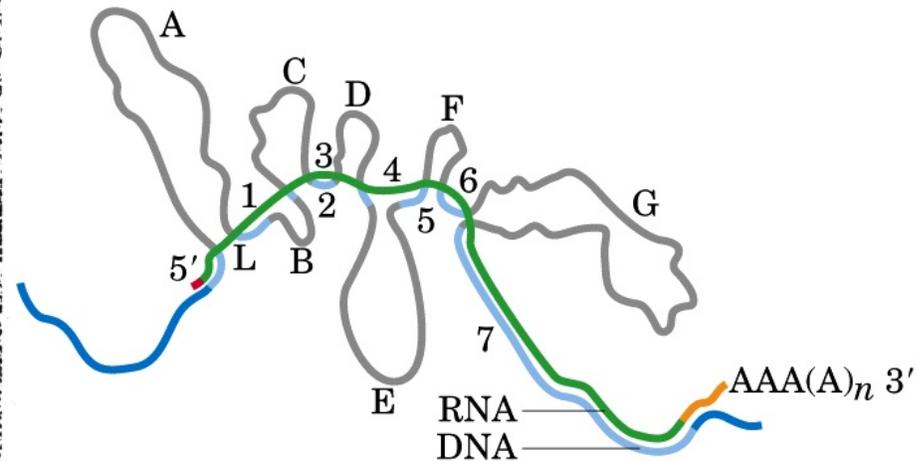
Exons codificam domínios proteicos e foram misturados por recombinação para produzir novos genes/proteínas ao longo da evolução



# “A beautiful case of seeing is believing”



(a)



(b)

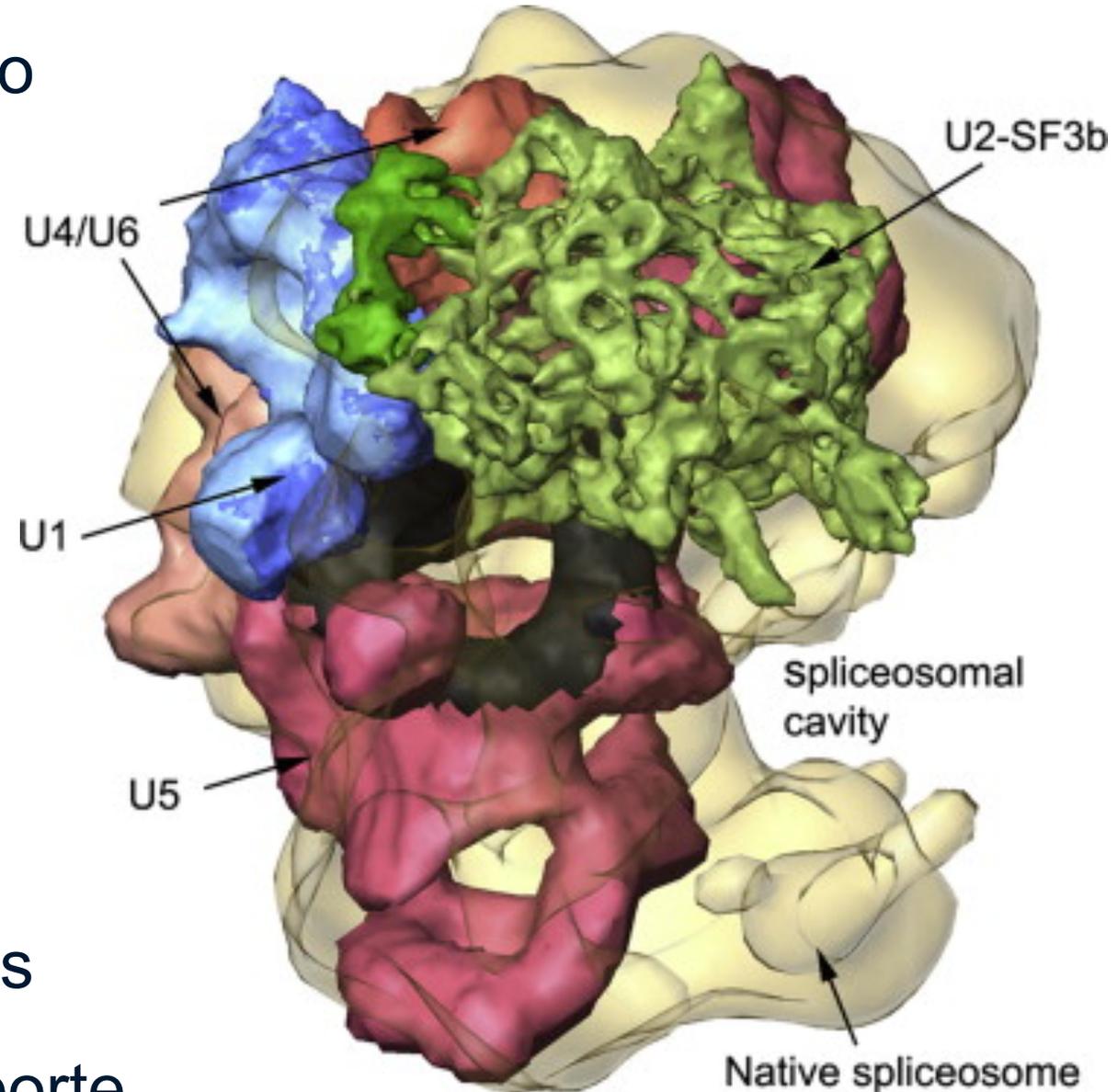
Hibridização do segmento de DNA do gene com mRNA maduro:  
Há segmentos que não hibridizam (não anelam) – os introns!

# Como os introns são removidos do pré-mRNA?

- Dois mecanismos
  - **Spliceossomo** – núcleo
  - self-splicing – mitocôndrias e cloroplastos  
– (não vamos tratar na disciplina)

# O spliceossomo é uma máquina molecular

- Complexo maior que o ribossomo
  - 12 MDa
- 5 snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*):
  - U1, U2, U4, U5 e U6
  - snRNAs pareiam com pré-mRNA
- fatores de *splicing*
- Proteínas com funções em outras etapas do processamento/transporte



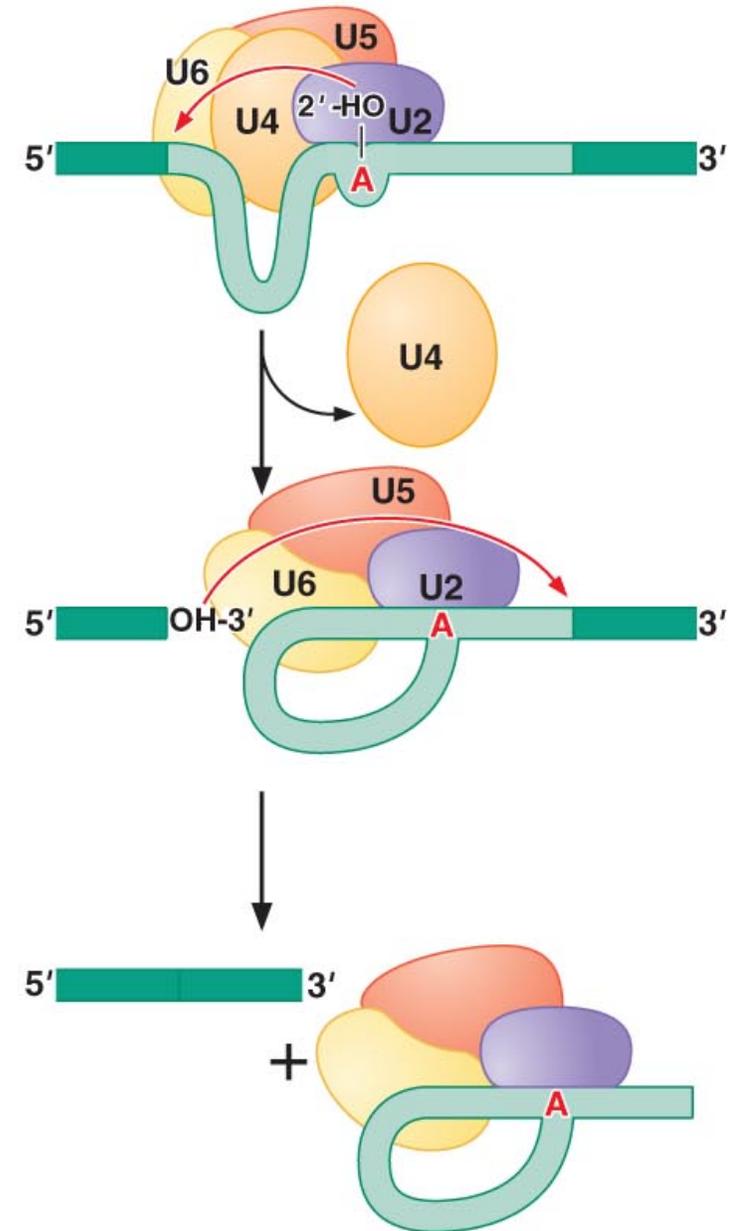
Como os introns são removidos do pré-mRNA pelo mecanismo do spliceossomo?



# Spliceossomo

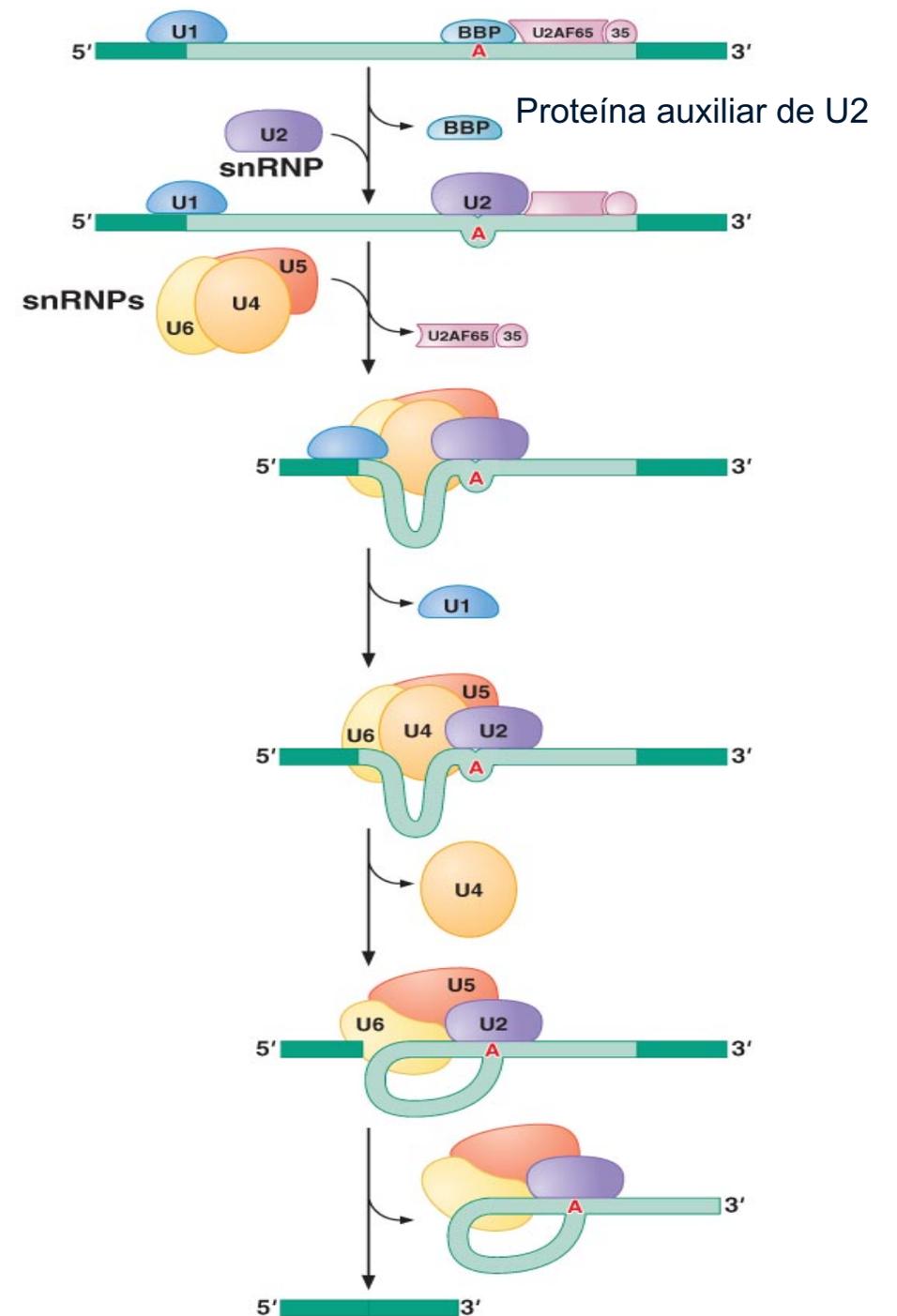
- Formado por cinco ribonucleoproteínas pequenas nucleares (snRNP ou *snurps*)
  - U1, U2, U4, U5 e U6
- Cada snurp é composta por
  - 6-10 polipeptídeos
  - 1 pequeno RNA nuclear (snRNA)

a pre-mRNA spliceosome



# Spliceossomo

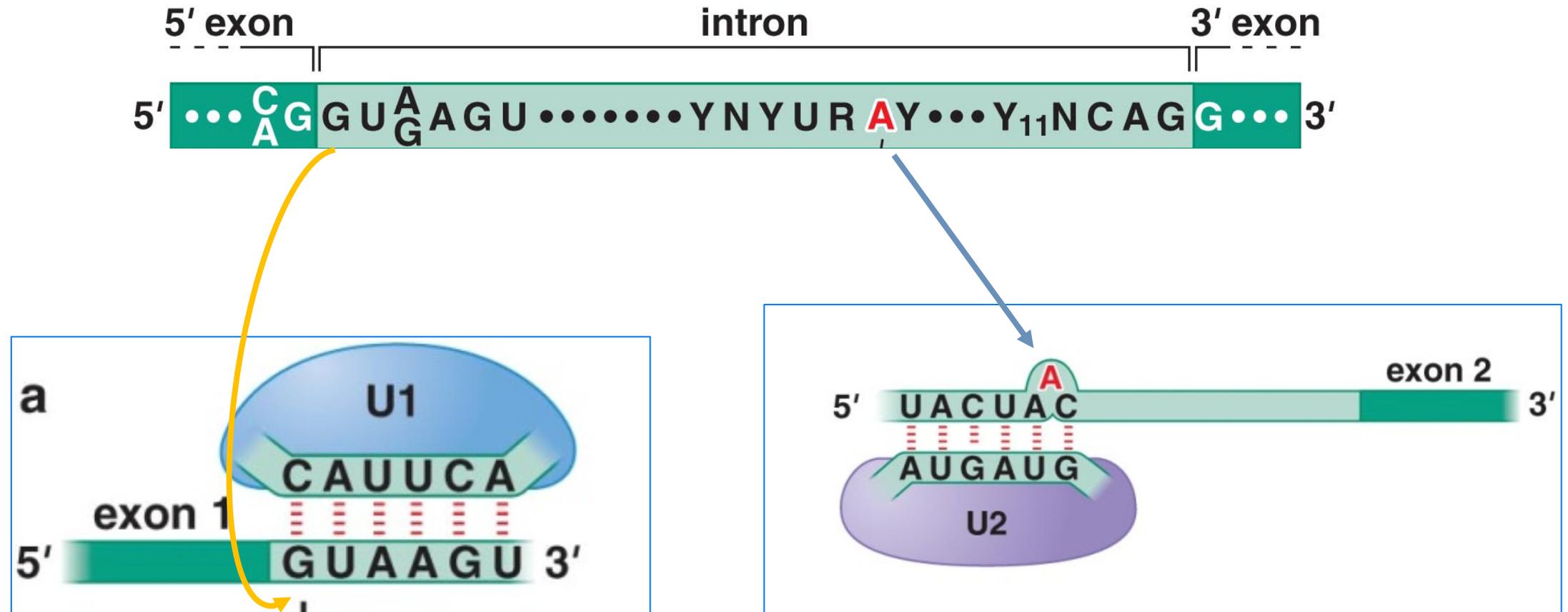
- Reconhece o sítio 5' de splicing e o sítio de ramificação
- Aproxima esses sítios no momento correto
- Catalisa a quebra e ligação do RNA
- O sítio catalítico (U6+U2) se forma durante o processo



# Como o spliceossomo reconhece os sítios de splicing?

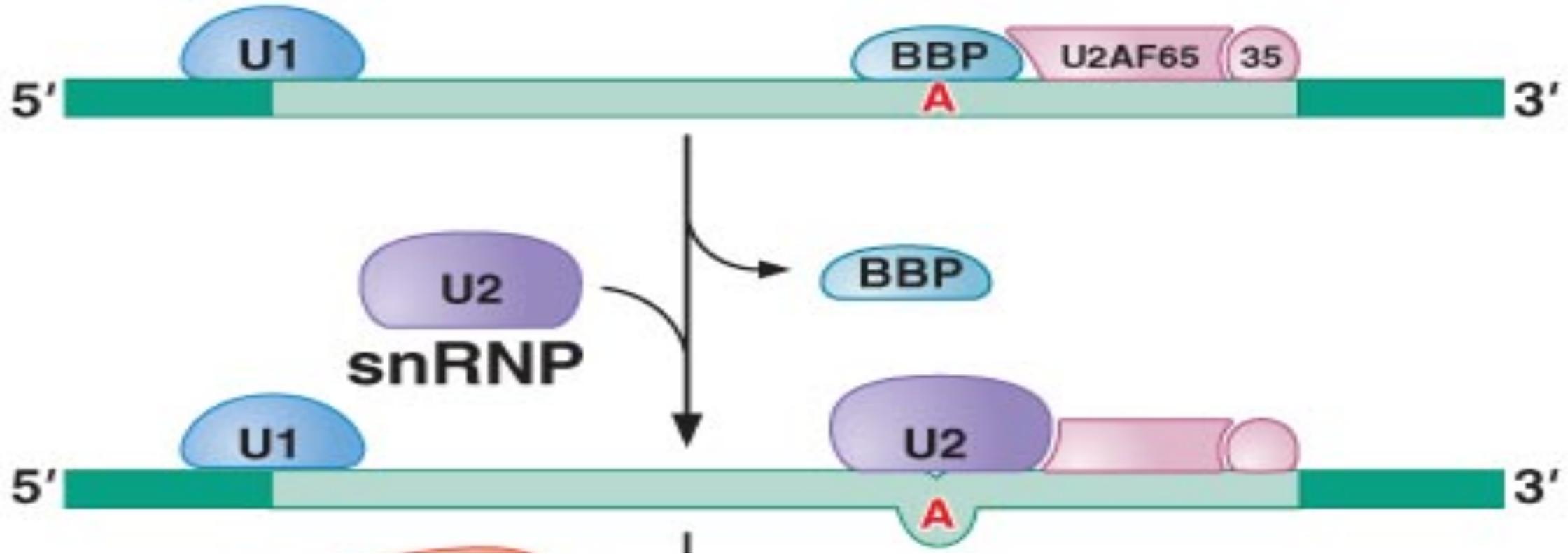
- Pareamento dos snRNAs com o pré-mRNA
  - sítios de splicing
  - sítio de ramificação

# Complementariedade entre RNAs das snRNPs e sequências nos introns garantem a precisão do *splicing*



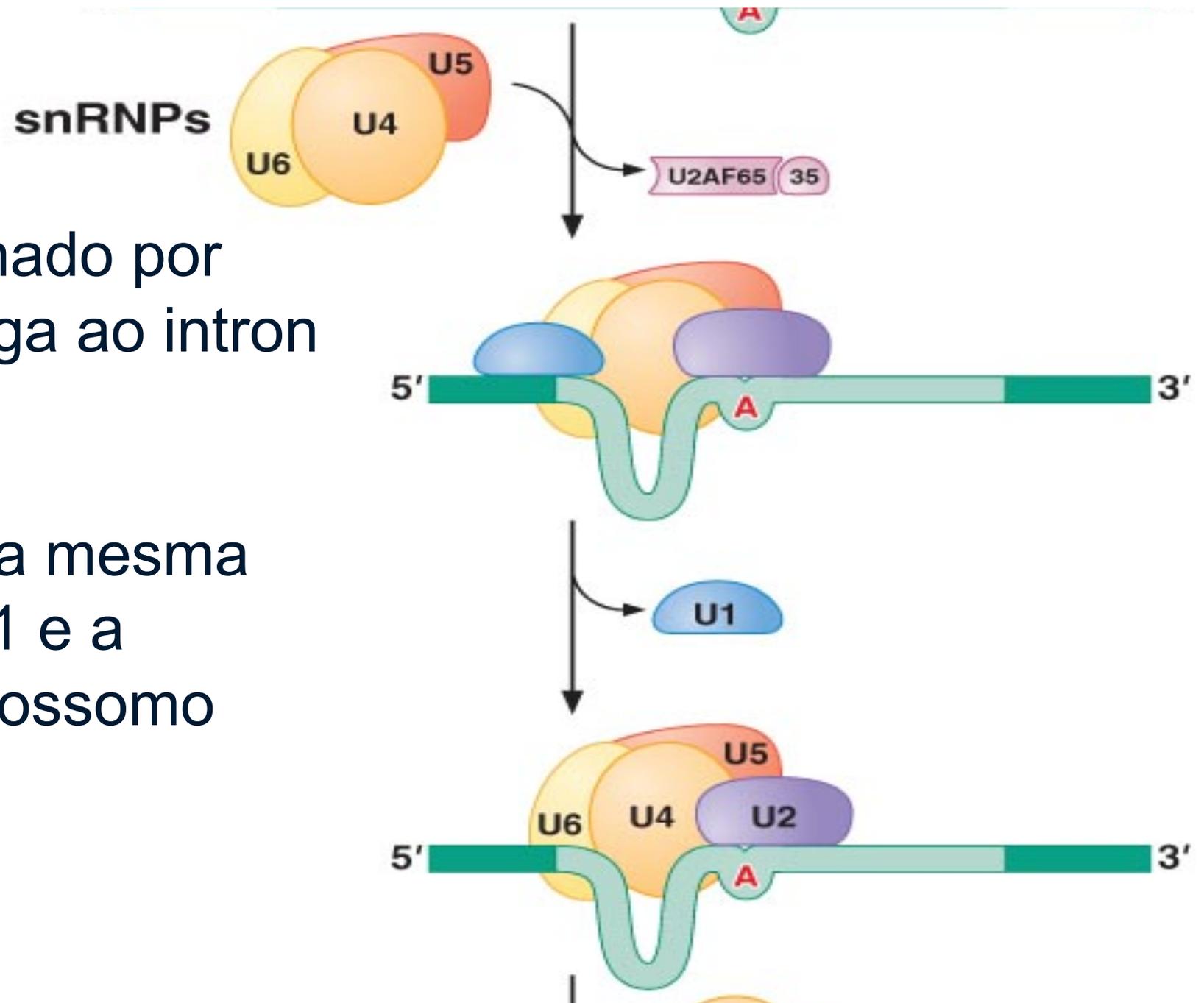
# Sequência de eventos do splicing

# 1. Reconhecimento dos sítios 5' por U1 e de ramificação por U2



2. Complexo formado por U6, U4 e U5 se liga ao intron

3. U6 reconhece a mesma sequência que U1 e a desloca do spliceossomo



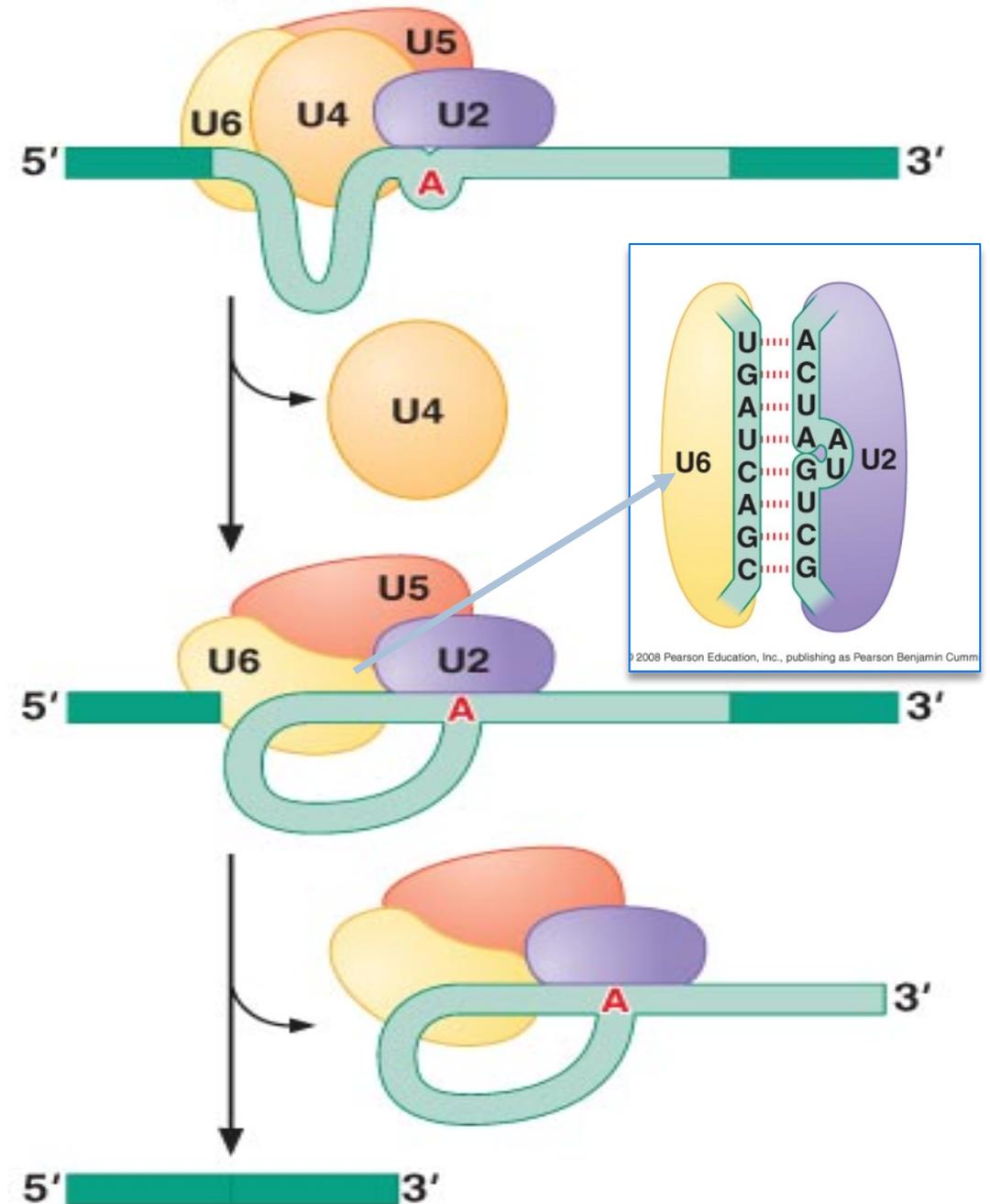
## 4. Reorganização do spliceossomo

- U4 se desliga

## 5. U6 e U2 se aproximam e snRNAs interagem

- formação do sítio ativo para transesterificação

## 6. Catálise mediada por RNA

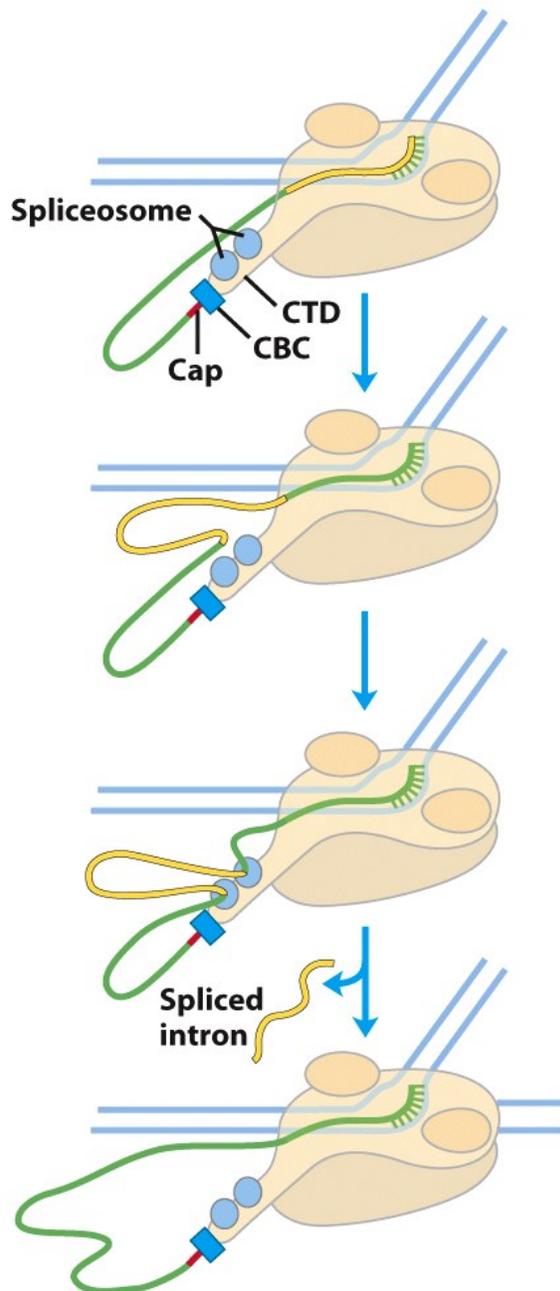


# Mutações podem alterar sítios de splicing e causar doenças genéticas

mRNA $\beta$ -globina	GUU GGU GGU GAG GCC CUG GGC <b>AG</b>	<u>GUUGGU.....UUAG</u>	<b>G</b> CUG CUG GUG
	Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg	Intron	Leu Leu Val
	Val Gly Gly		Cys Trp Ser
mRNA Talassemia $\beta^+$	GUU GG <b>A</b> G	<u>GUGAGGCCUGGGCAGGUUGGU.....UUAG</u>	<b>GC</b> UGC UGG UGG
		Intron	

- Talassemia
  - Gene da subunidade  $\beta$  da hemoglobina

# Coordenação do splicing com a transcrição

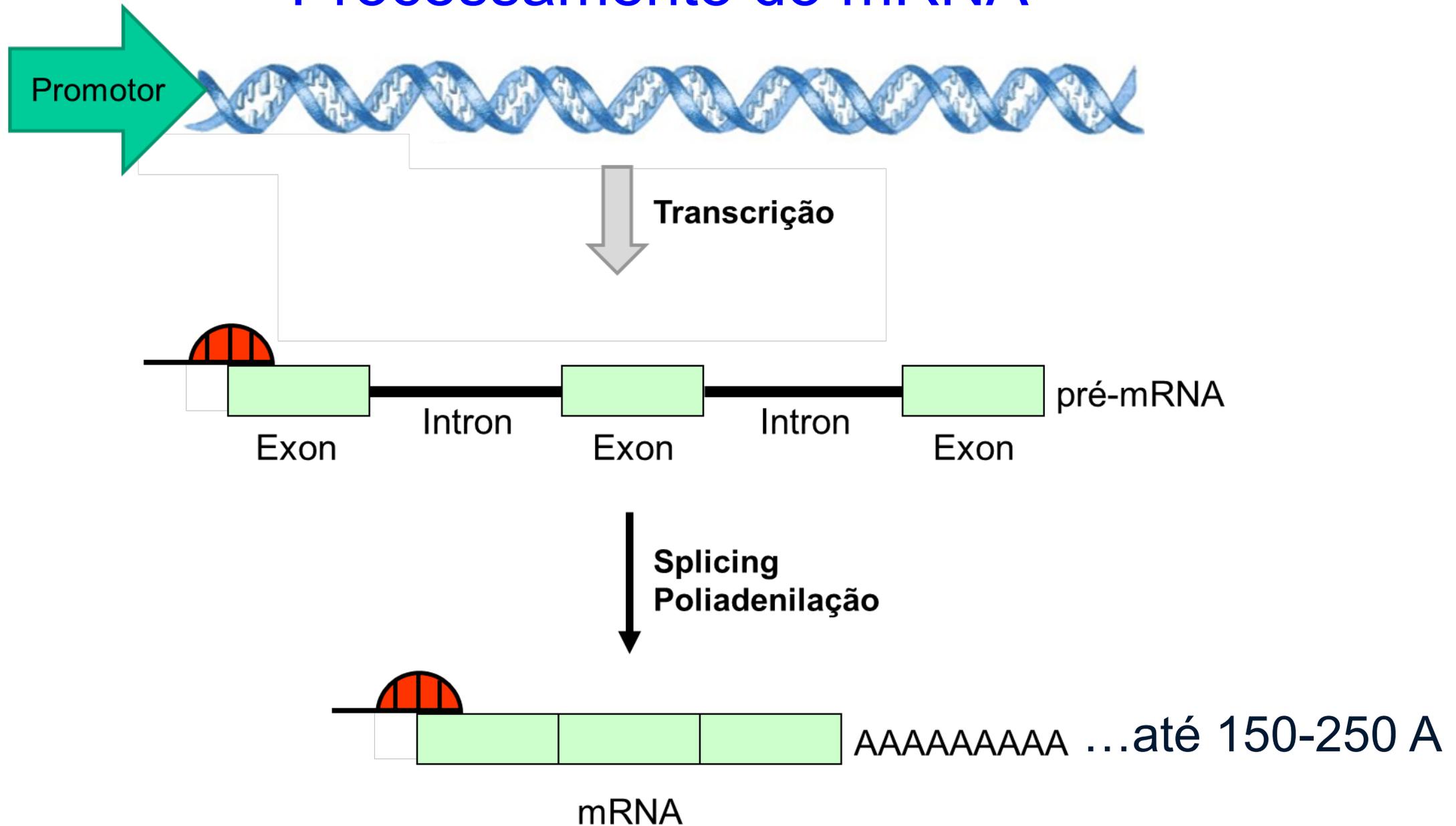


**Figure 26-17c**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Spliceossomo também interage com CTD da RNA polimerase II
- Aumenta especificidade do splicing com as extremidades corretas
- Animação:

<http://www.dnalc.org/resources/3d/rna-splicing.html>

# Processamento do mRNA



# Adição da cauda de poli-A (poliadenilação do RNA)

- Acoplada com a terminação da transcrição
- Cauda poli-A afeta estabilidade do mRNA e início da tradução
- A poli-A polimerase não precisa de molde: cauda poli-A não é codificada no DNA

Sequência sinal para poliadenilação

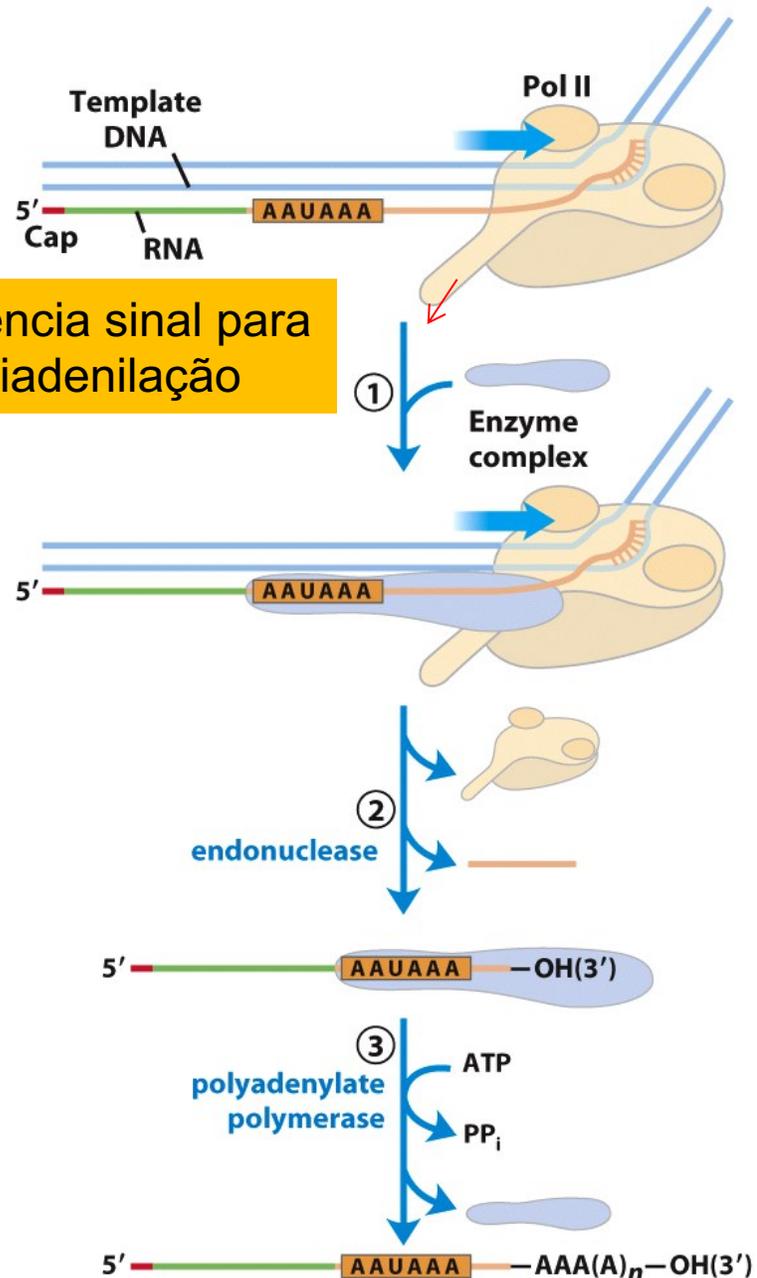
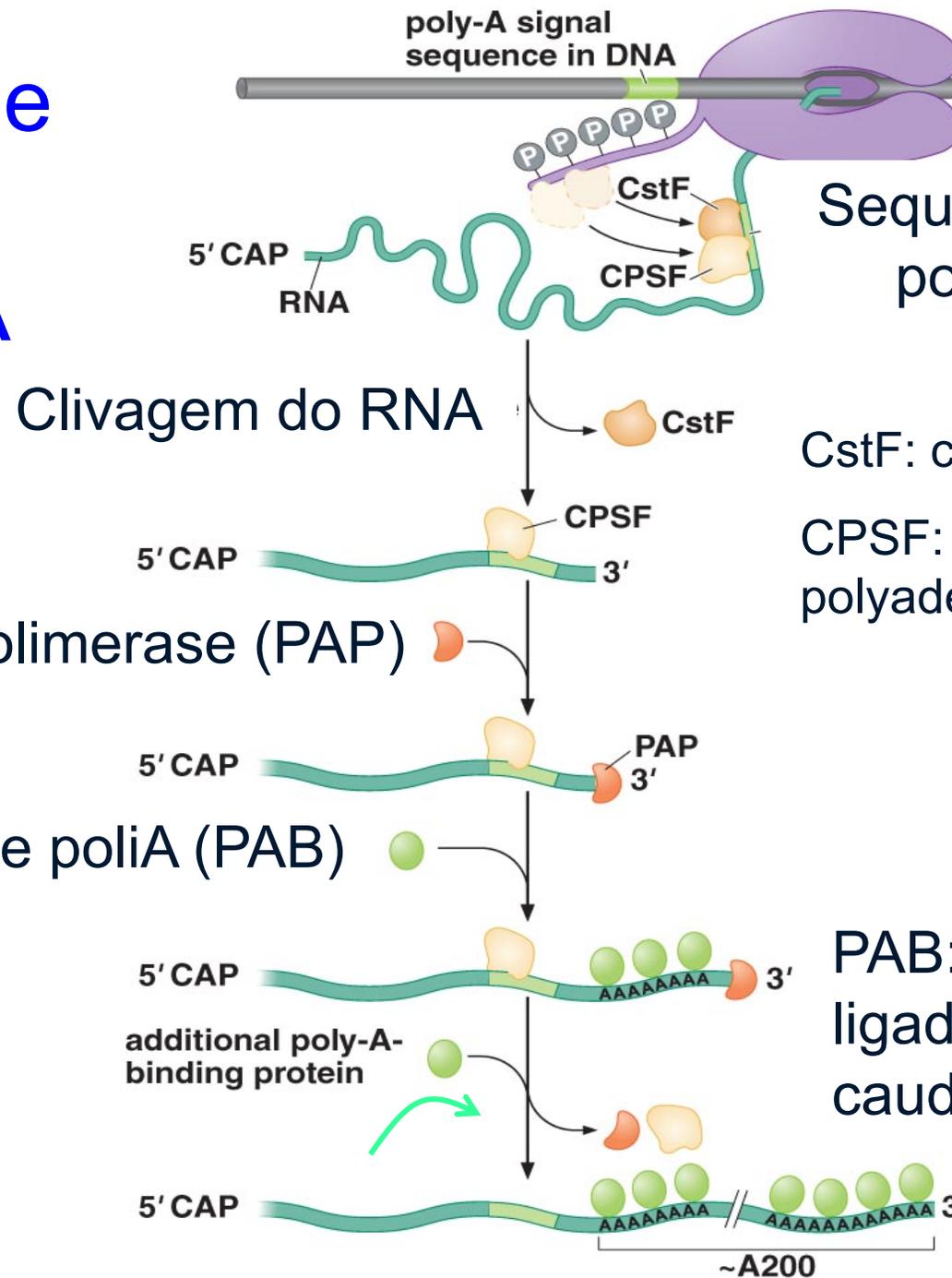


Figure 26-18

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

# Mecanismo de adição da cauda poli-A



Sequência sinal para  
poliadenilação:

**AAUAAA**

CstF: cleavage stimulating factor

CPSF: cleavage and  
polyadenylation specificity factor

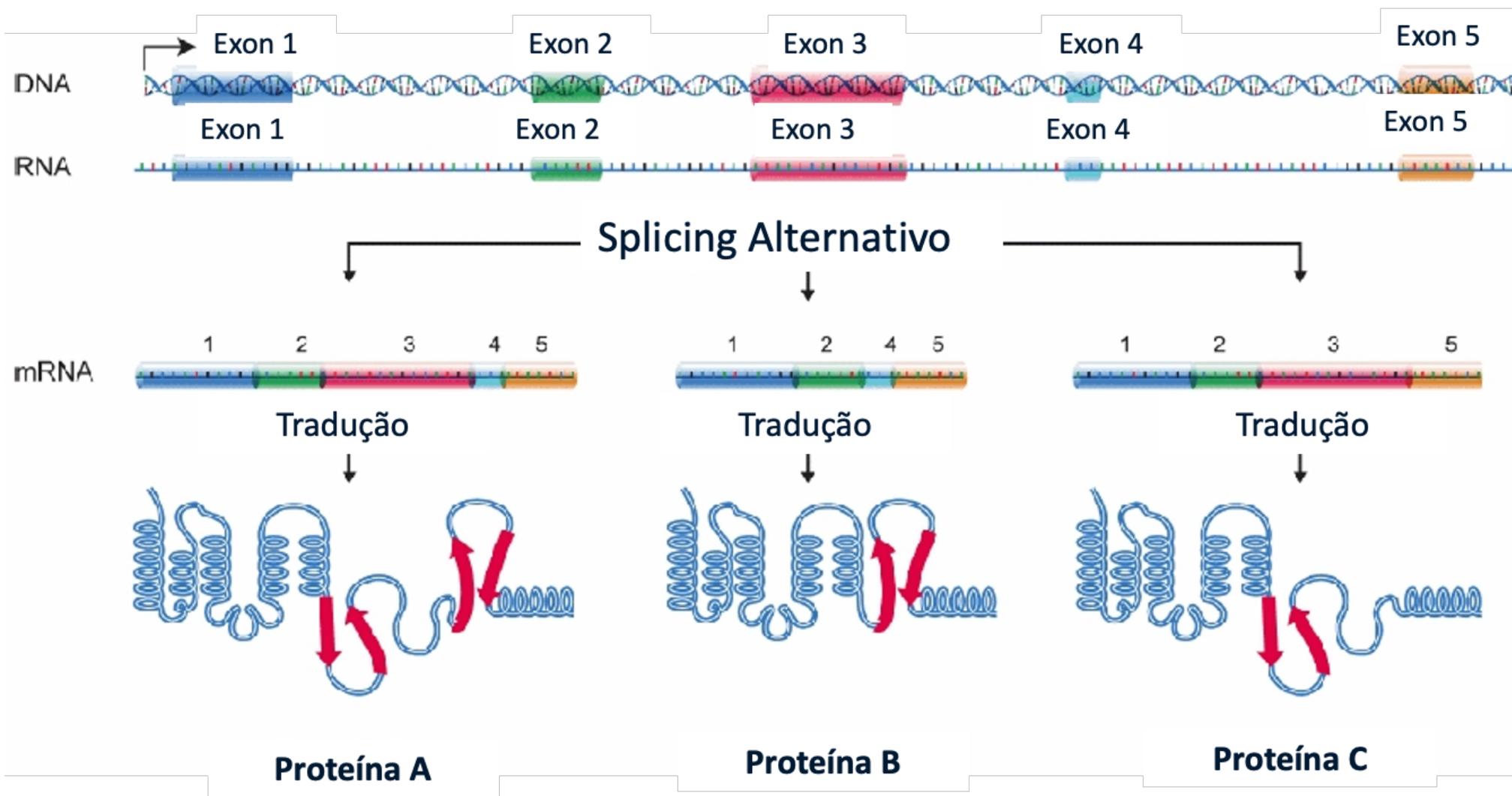
PAB: monômero de 70 kDa  
ligado a cada 10-20 nt da  
cauda de poli-A

O splicing e a poliadenilação podem apresentar variantes alternativas, dependendo do tipo celular e das condições

# Um gene, um transcrito?

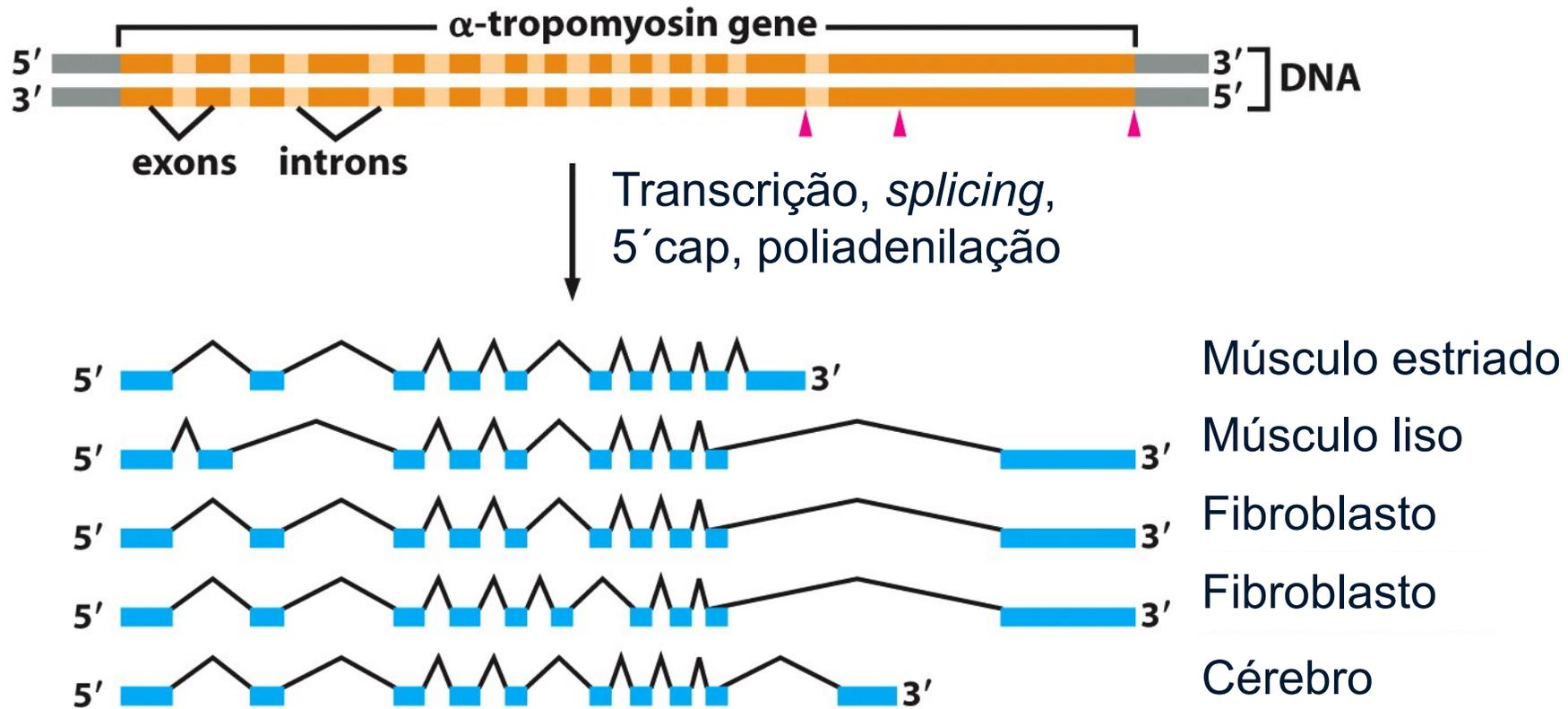
- Um gene → múltiplas variantes de splicing e de sítios de poliadenilação!!
- > 90% dos genes de mamíferos têm splicing alternativo
- Geração de variantes ou isoformas de proteínas

# Splicing Alternativo



Gera combinações variáveis de éxons

# Splicing Alternativo



Isoformas de mRNAs ou variantes de *splicing*

Depende de proteínas acessórias

# Splicing Alternativo

Table 1 Comparative genomics of splicing levels in several well-studied metazoans<sup>a</sup>

	Human <sup>b</sup>	Mouse <sup>b</sup>	Fly <sup>c</sup>	Worm <sup>c</sup>
Genome size	3,300 MB	3,300 MB	165 MB	100 MB
Protein-coding genes	22,180	22,740	13,937	20,541
Multiexonic genes (percentage with 2+ isoforms)	21,144 (88%)	19,654 (63%)	11,767 (45%)	20,008 (25%)
Isoforms (average number per gene)	215,170 (3.4)	94,929 (2.4)	29,173 (1.9)	56,820 (1.2)
Average number of unique exons per gene (median)	33 (26)	22 (15)	7.5 (4)	8.6 (6)
Average number of unique introns per multiexonic gene (median)	28 (21)	19 (12)	8.7 (5)	7.2 (5)
Average exon length (median length)	320 bp (145 bp)	323 bp (141 bp)	494 bp (272 bp)	222 bp (157 bp)
Average intron length (median length)	7,563 bp (1,964 bp)	6,063 bp (1,693 bp)	2,068 bp (642 bp)	561 bp (354 bp)
Genes (all)	63,677	39,179	15,682	46,726
Isoforms (all) (average number per gene)	215,170 (3.4)	94,929 (2.4)	29,173 (1.9)	56,820 (1.2)

# Poliadenilação alternativa também pode originar mRNAs diferentes

Sítios alternativos de poliadenilação



Proteínas diferentes

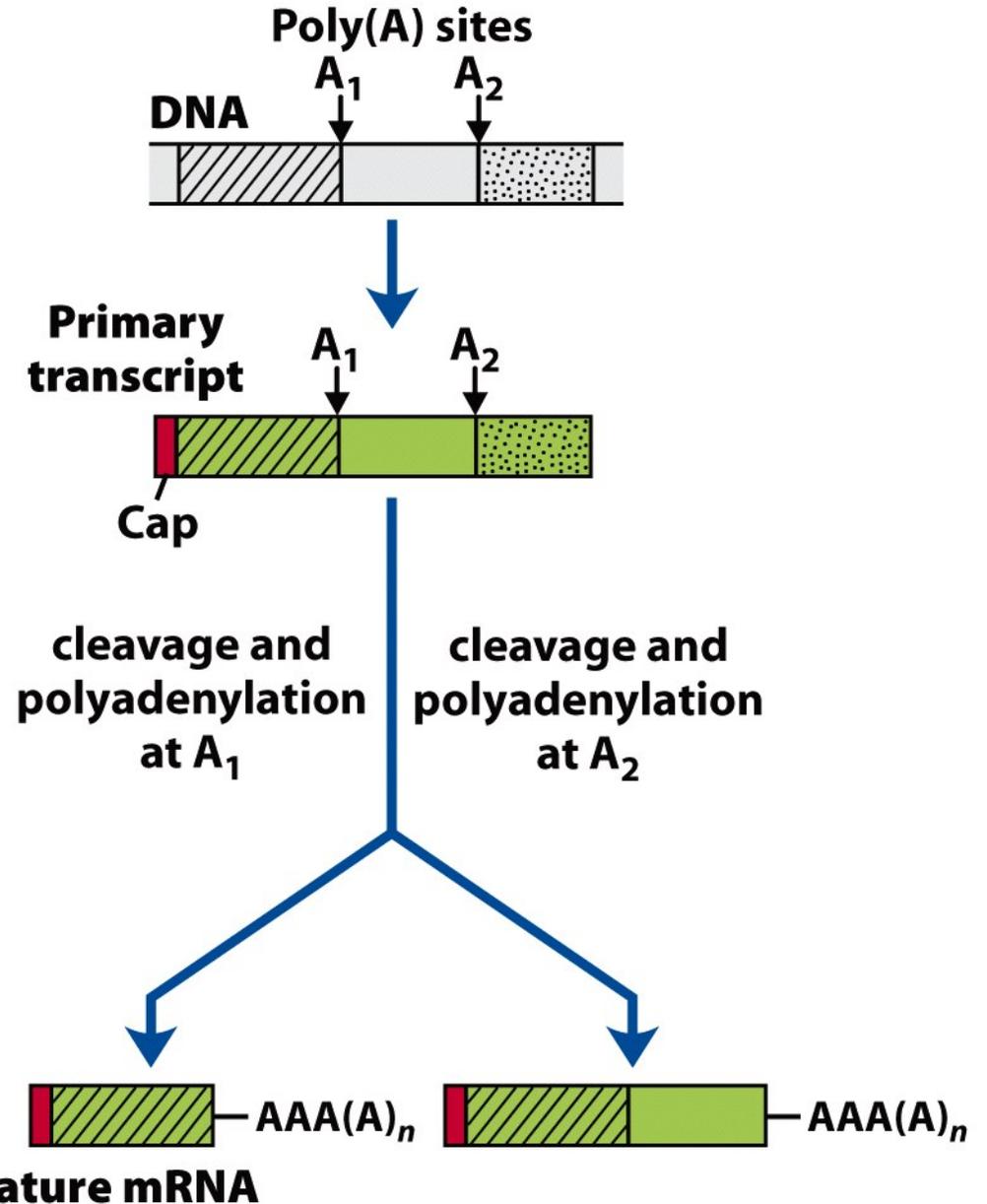
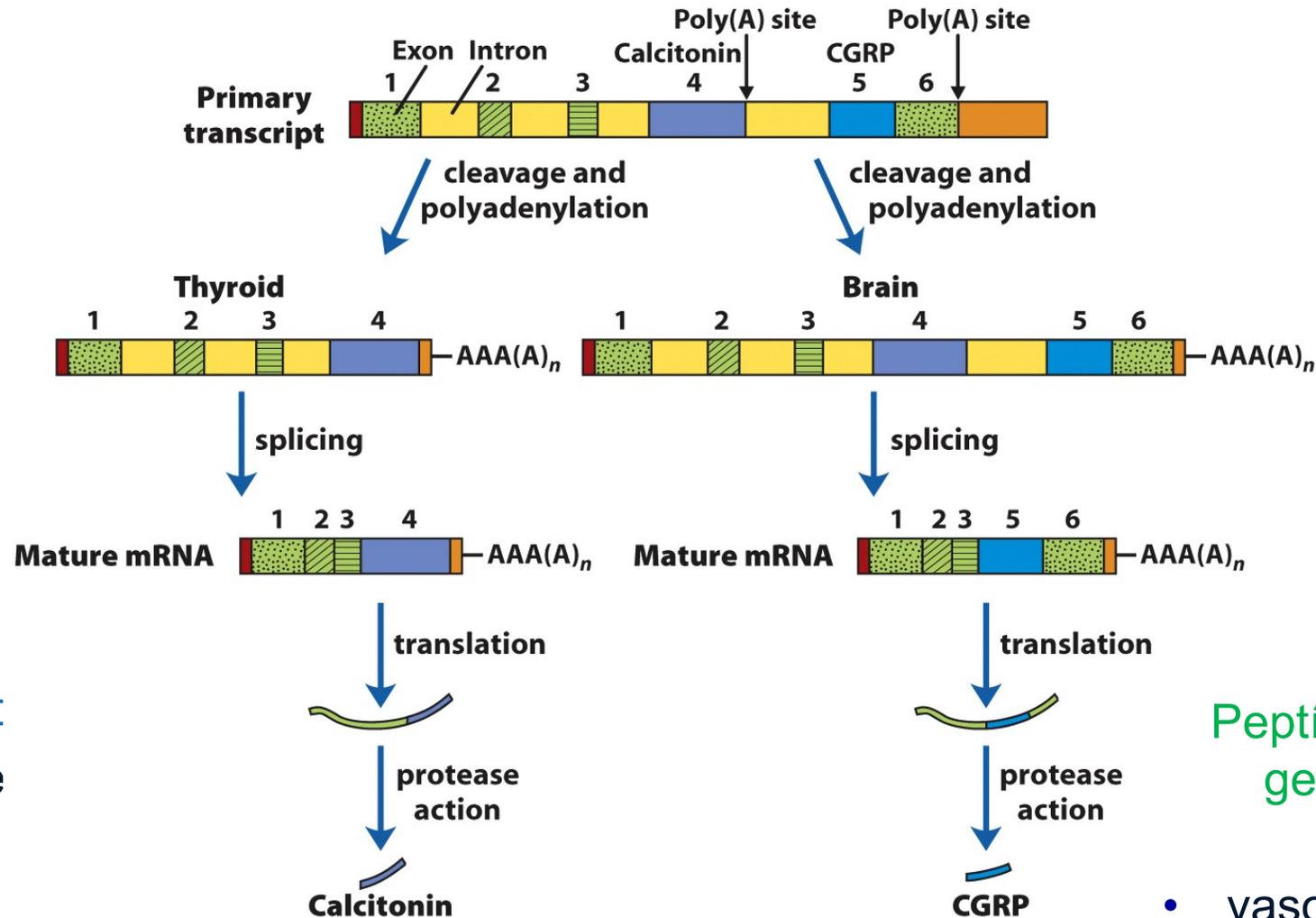


Figure 26-20a  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# Processamento (poli-A) alternativo



## Tireóide

### Calciton

- Hormônio que concentração sangue
- Inibe a ação dos osteoclastos

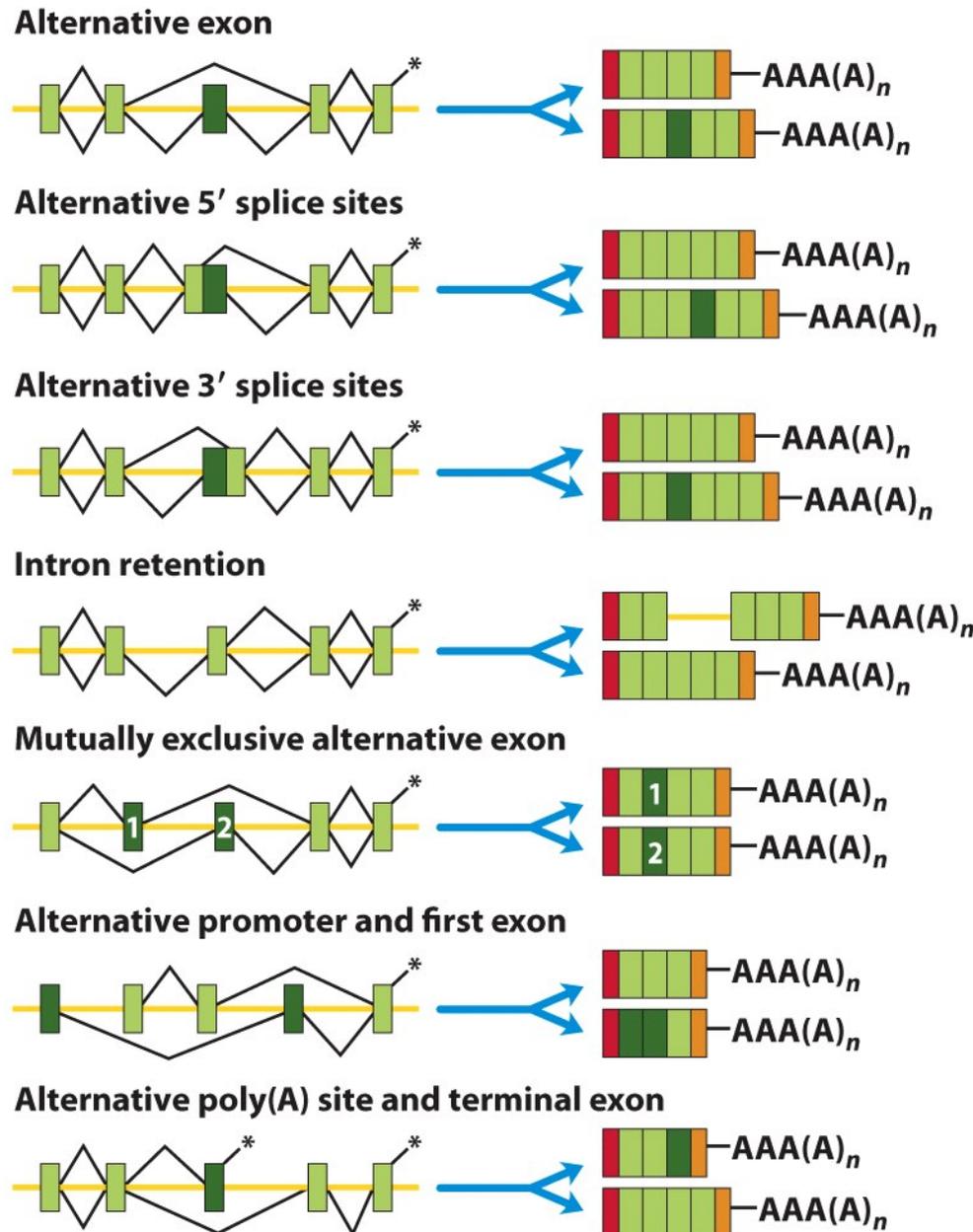
Figure 26-21  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Neurônios

### Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

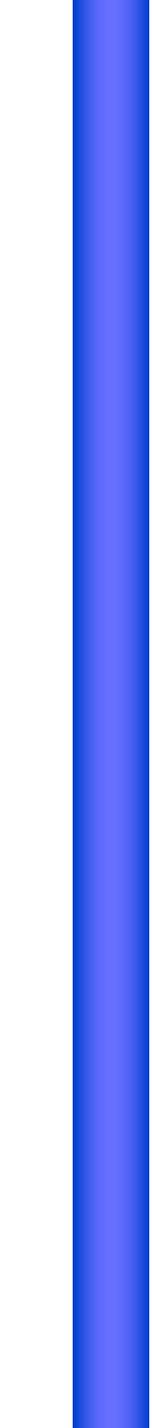
- vasodilatador
- Papel na transmissão da dor

# Múltiplas alternativas para processamento!

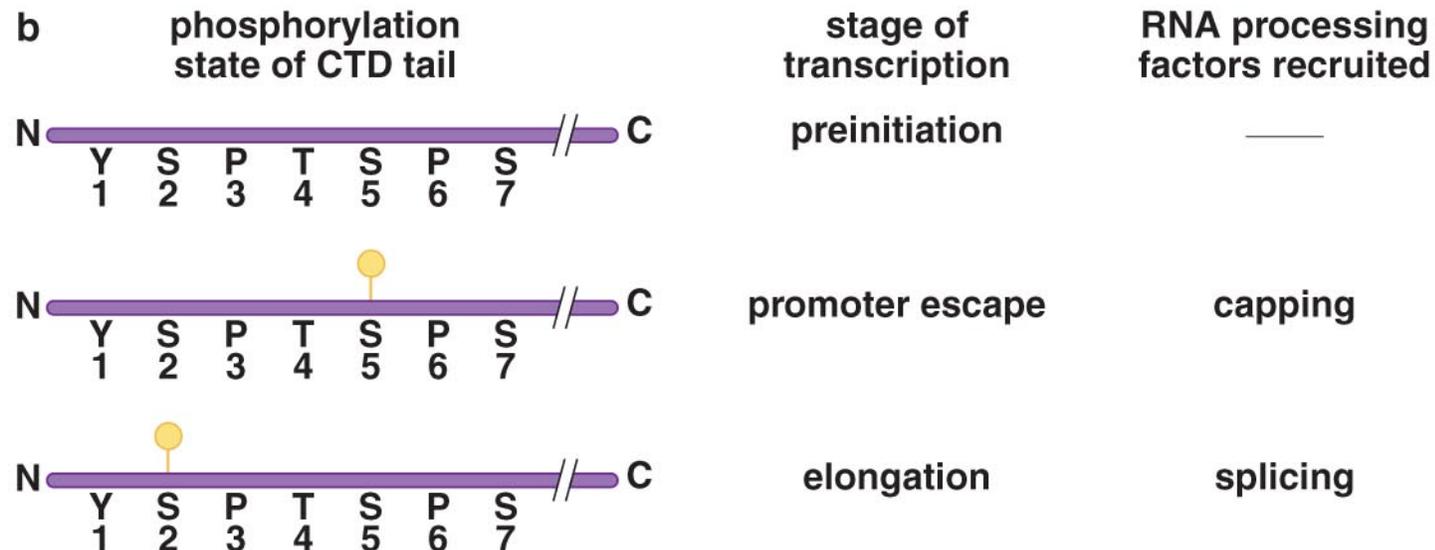
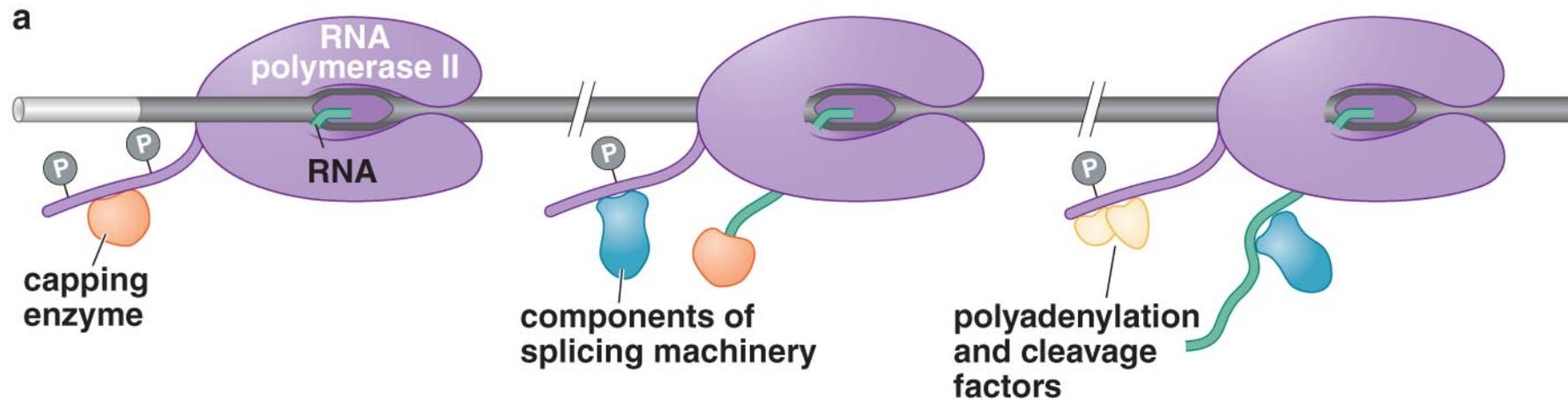


**Figure 26-22**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Regulação tecido-específica
  - Diversidade estrutural
  - Proteínas diferentes com funções diversas
- Altera propriedade dos mRNAs
  - Abundância
  - degradação



Slides extras



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

CTD = domínio carboxiterminal da subunidade Rpb1 da RNAPII

# Sítios conservados nos introns

- Junções **GU-AG**  
(~98% dos introns em humanos)

- Região interna UACUA**AC**
  - Sítio de ramificação

bases envolvidas na formação do laço

- Sítios de ligação dos snRNAs dos spliceossomos, por complementaridade de sequência

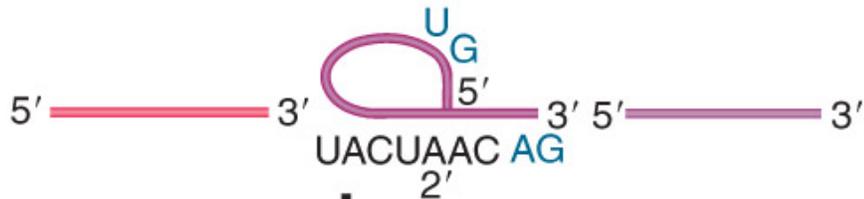


Py<sub>80</sub> N Py<sub>80</sub> Py<sub>87</sub> Pu<sub>75</sub> A Py<sub>95</sub>  
Animal consensus

Cut at 5' site and form lariat by 5'–2' bond connecting the intron 5'-G to the 2' of A at the branch site



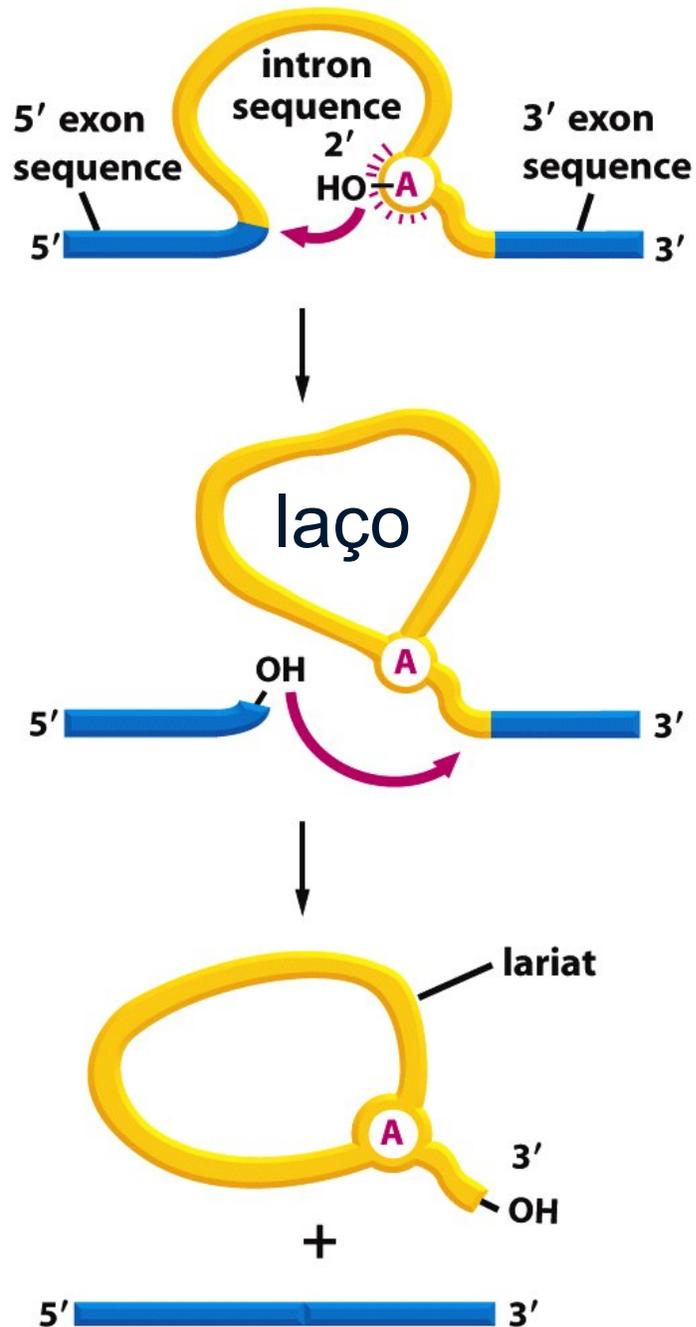
Cut at 3' site and join exons; intron released as lariat



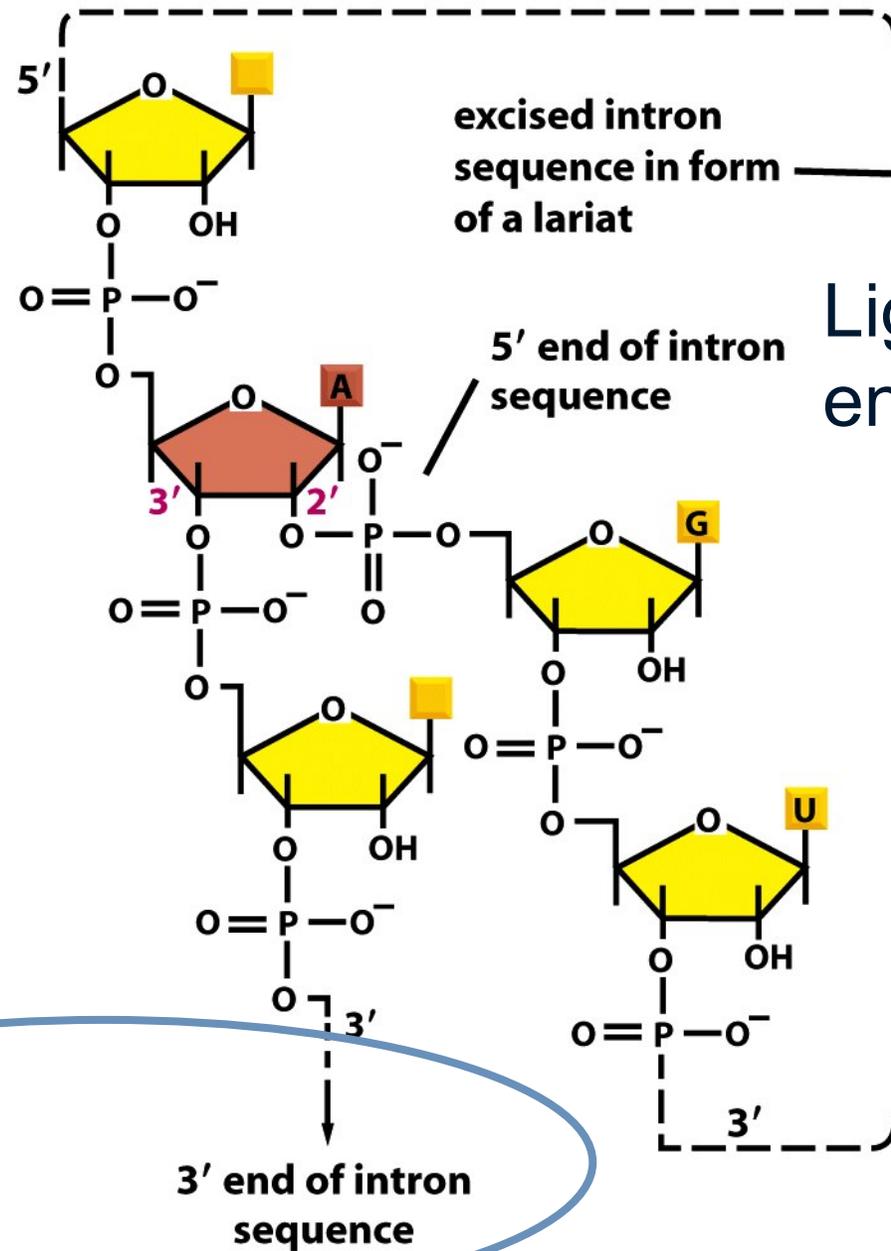
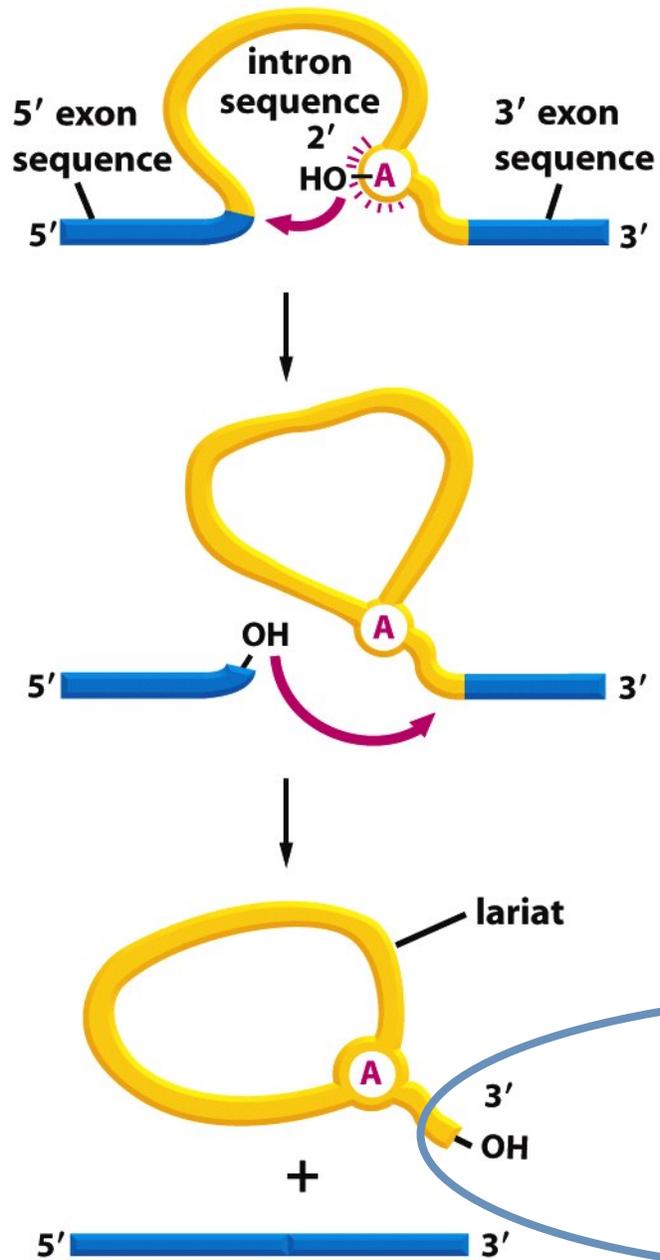
Debranch intron



# Reações de transesterificação

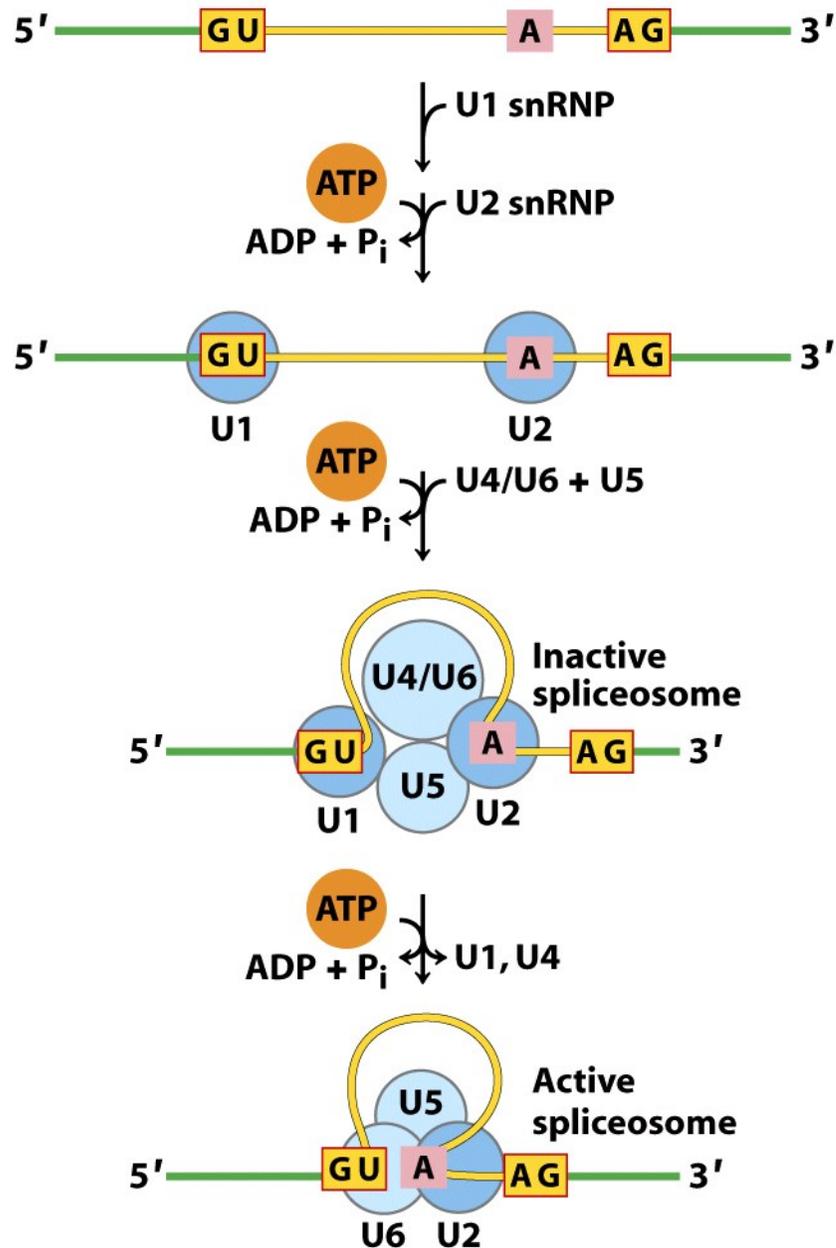


- Ligações fosfodiéster são desfeitas e refeitas em outra posição
- Removem intron e ligam as pontas dos exons



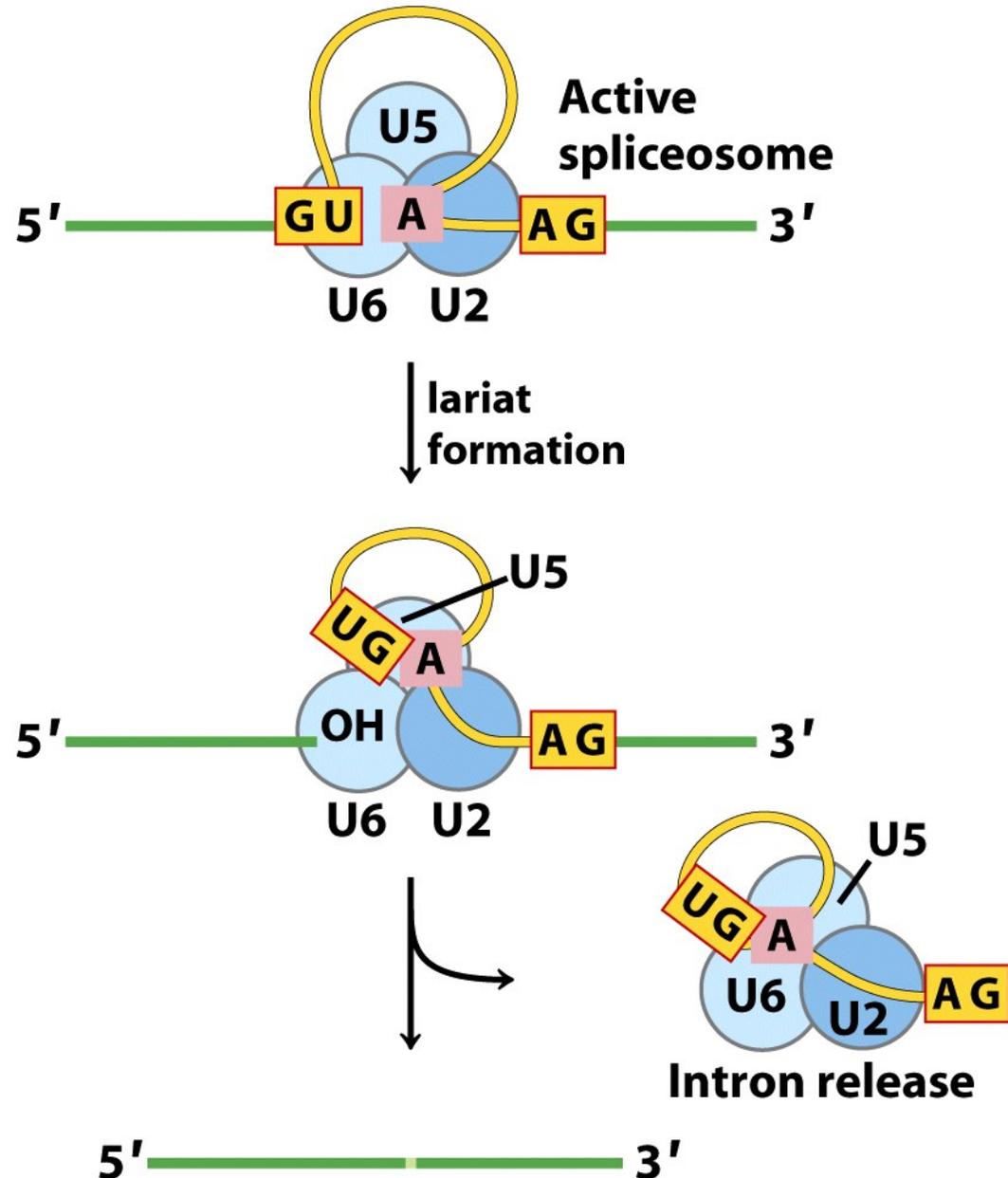
Ligação 2', 5' entre A e G

# Montagem do spliceossomo -1



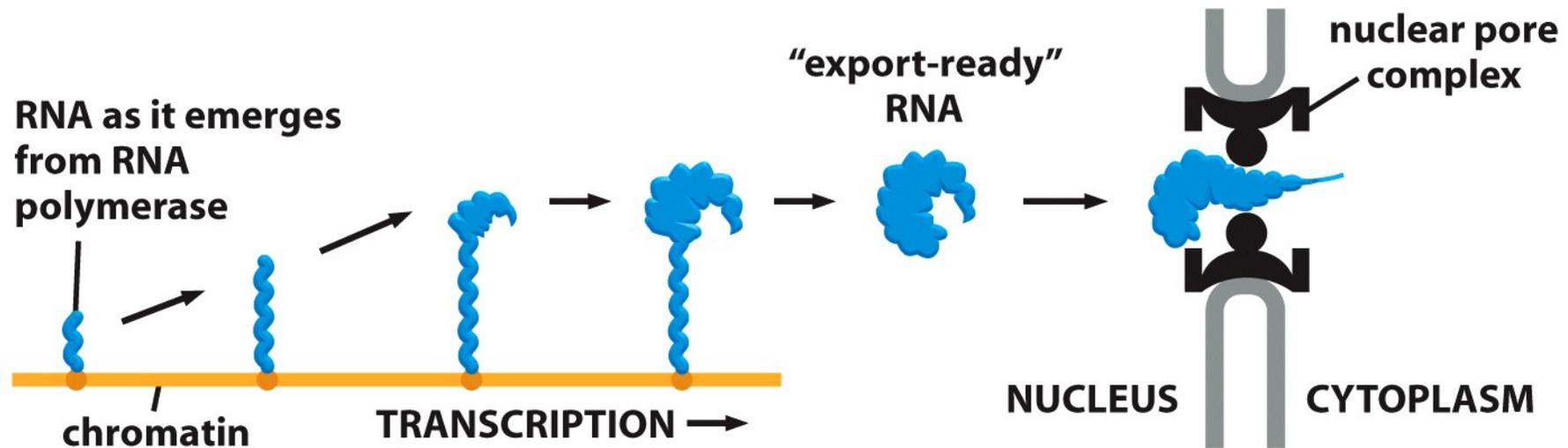
- Regiões de transesterificação ficam próximas
- Interações
  - RNA-RNA
  - Proteína-RNA
  - Proteína-proteína
- Requer ATP para mudanças conformacionais, mas não para catálise

# Montagem do spliceossomo -2



- Primeira reação de transesterificação
  - Formação do laço
- Segunda transesterificação
  - liberação do intron
  - ligação dos exons

Figure 26-17b part 2  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company



- Complexos proteicos nos poros nucleares reconhecem mRNAs
- corretamente processados (e associados a proteínas). Esta é uma etapa de "controle de qualidade": mRNAs que não foram processados corretamente e nunca chegam ao citoplasma

Splicing alternativo pode  
originar mRNAs  
diferentes

Sítios alternativos  
de splicing



Proteínas diferentes

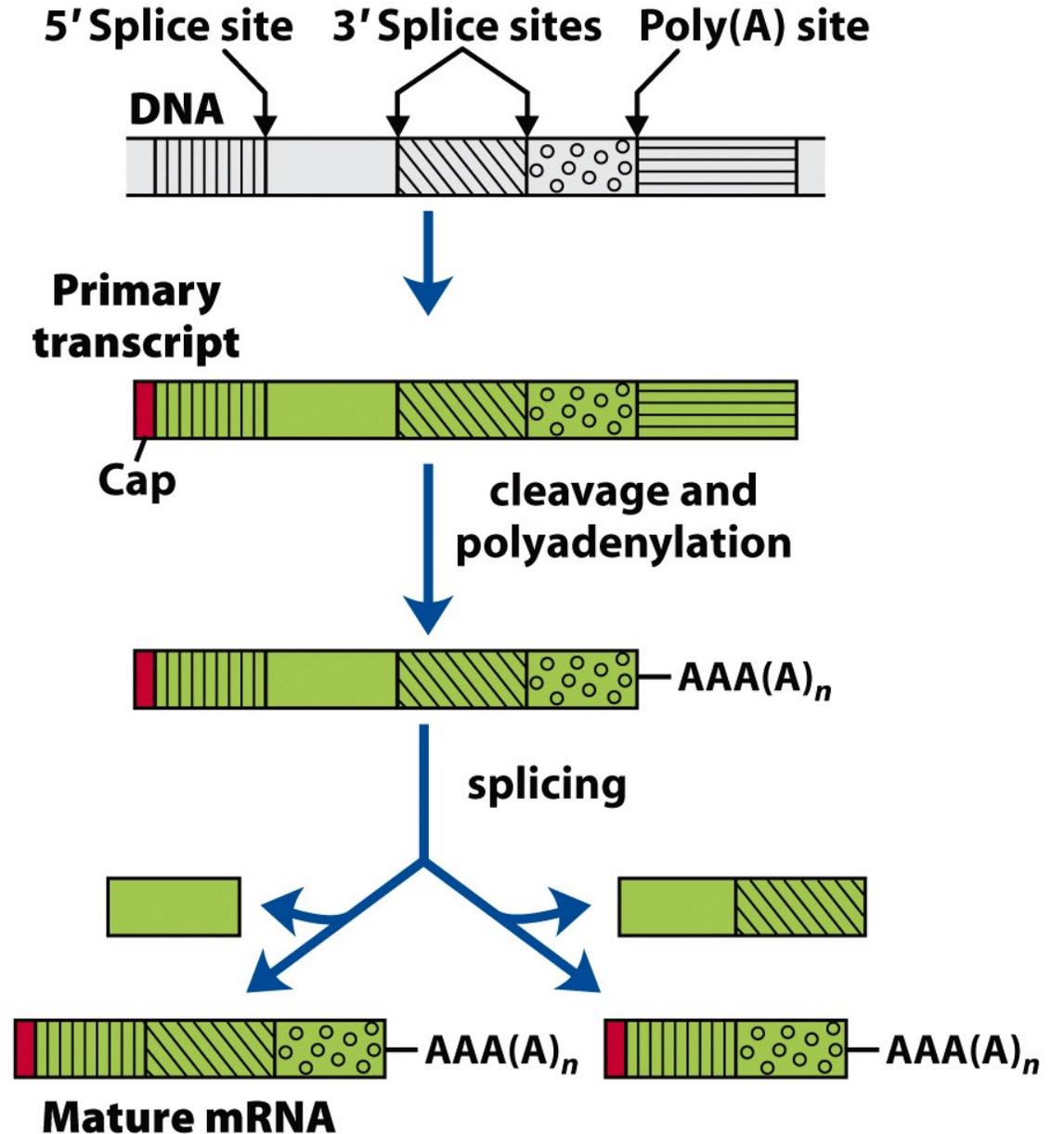
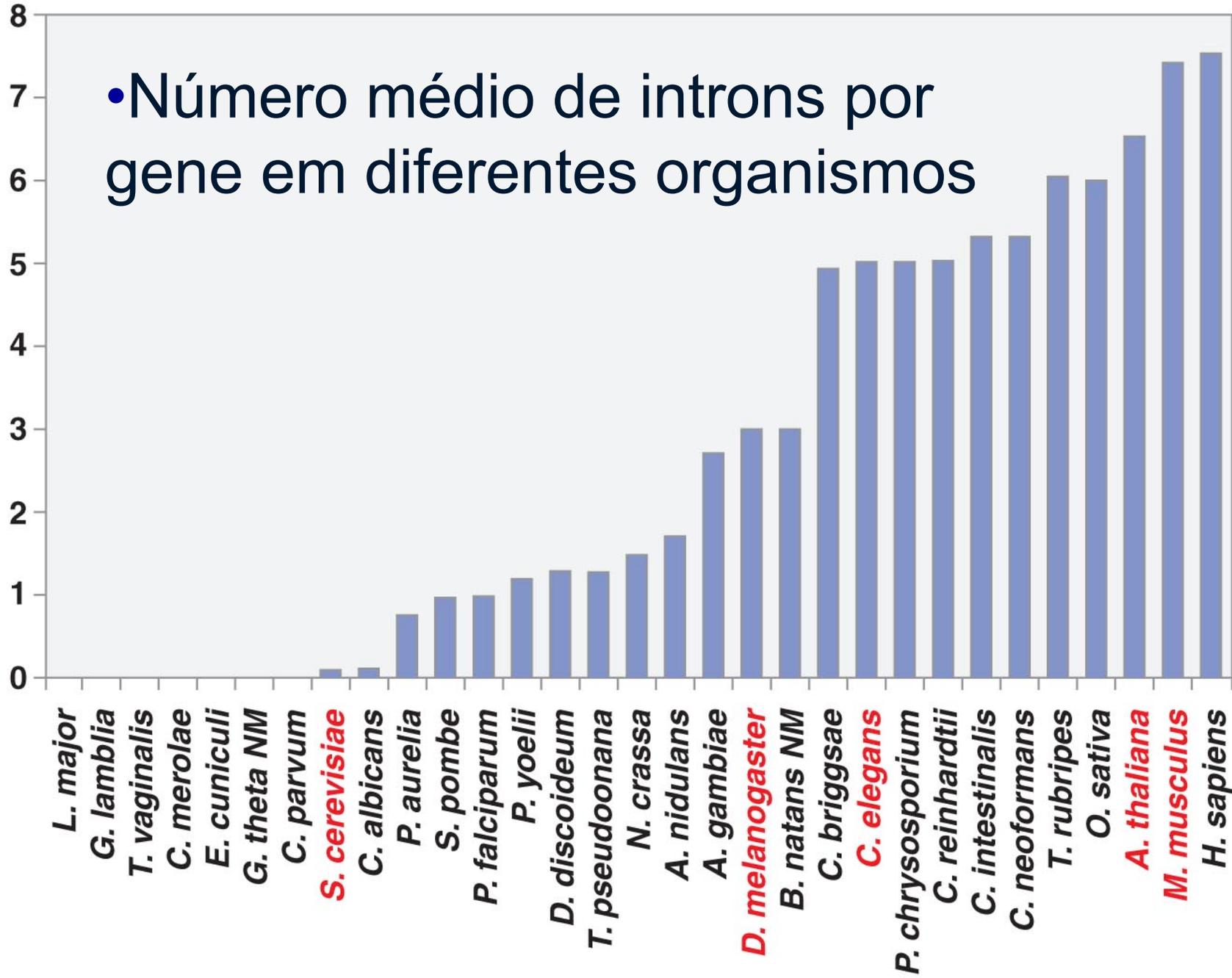


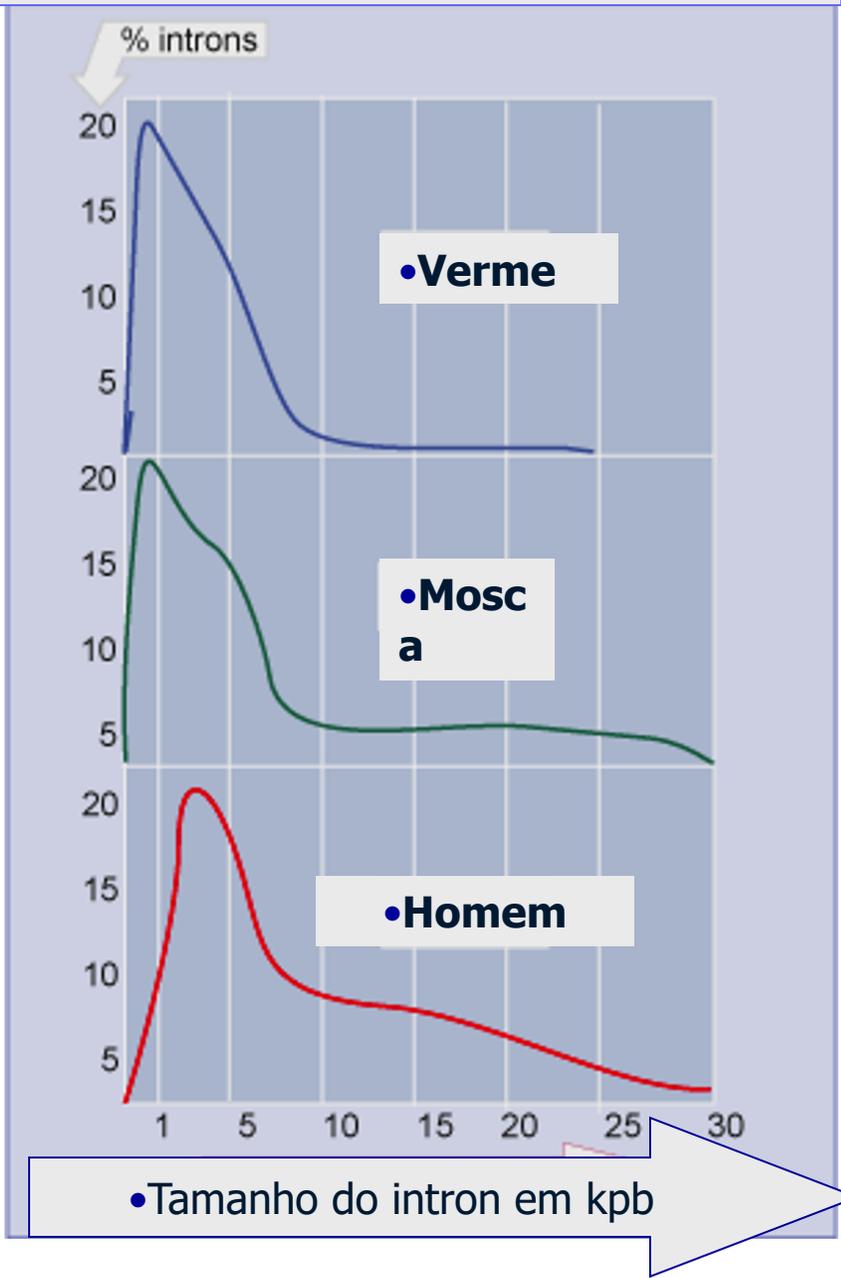
Figure 26-20b  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Average number of introns per gene

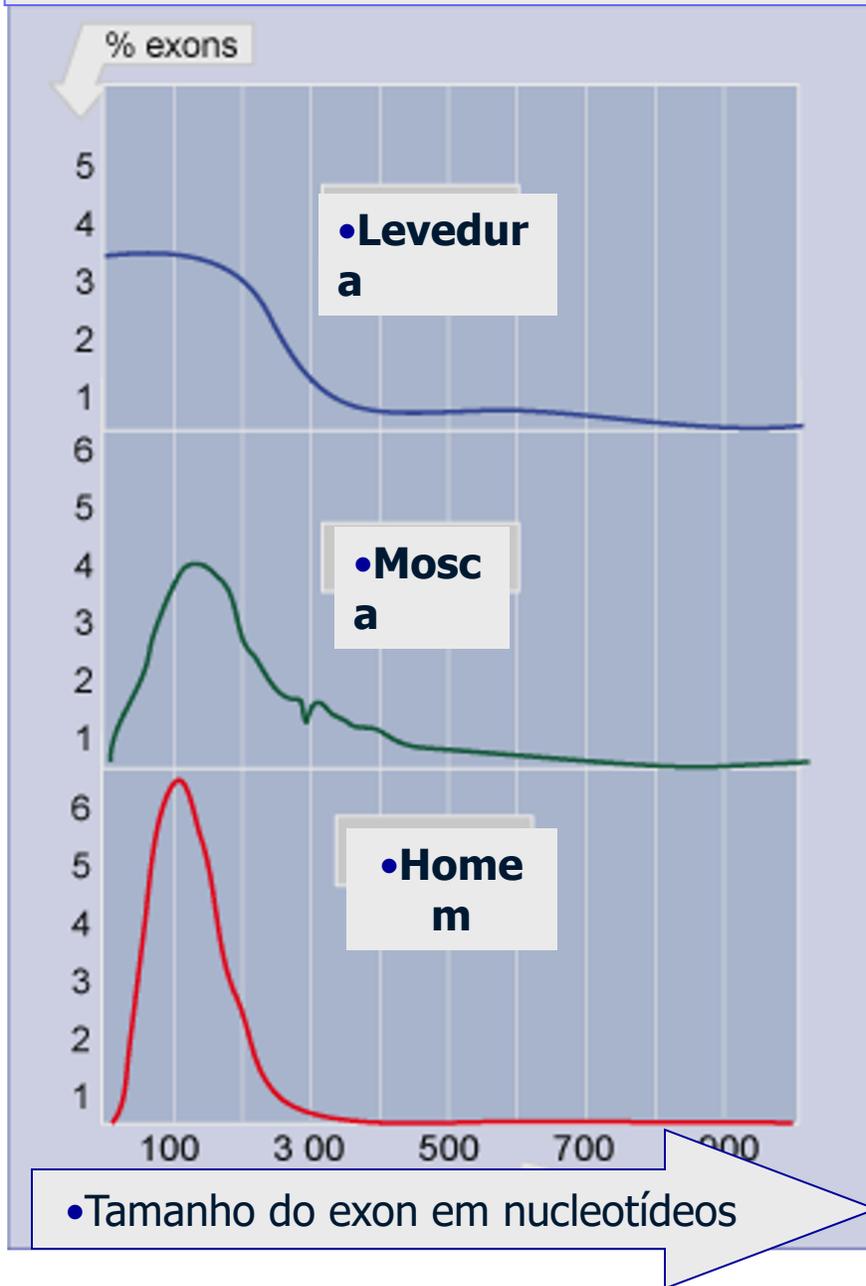
- Número médio de introns por gene em diferentes organismos



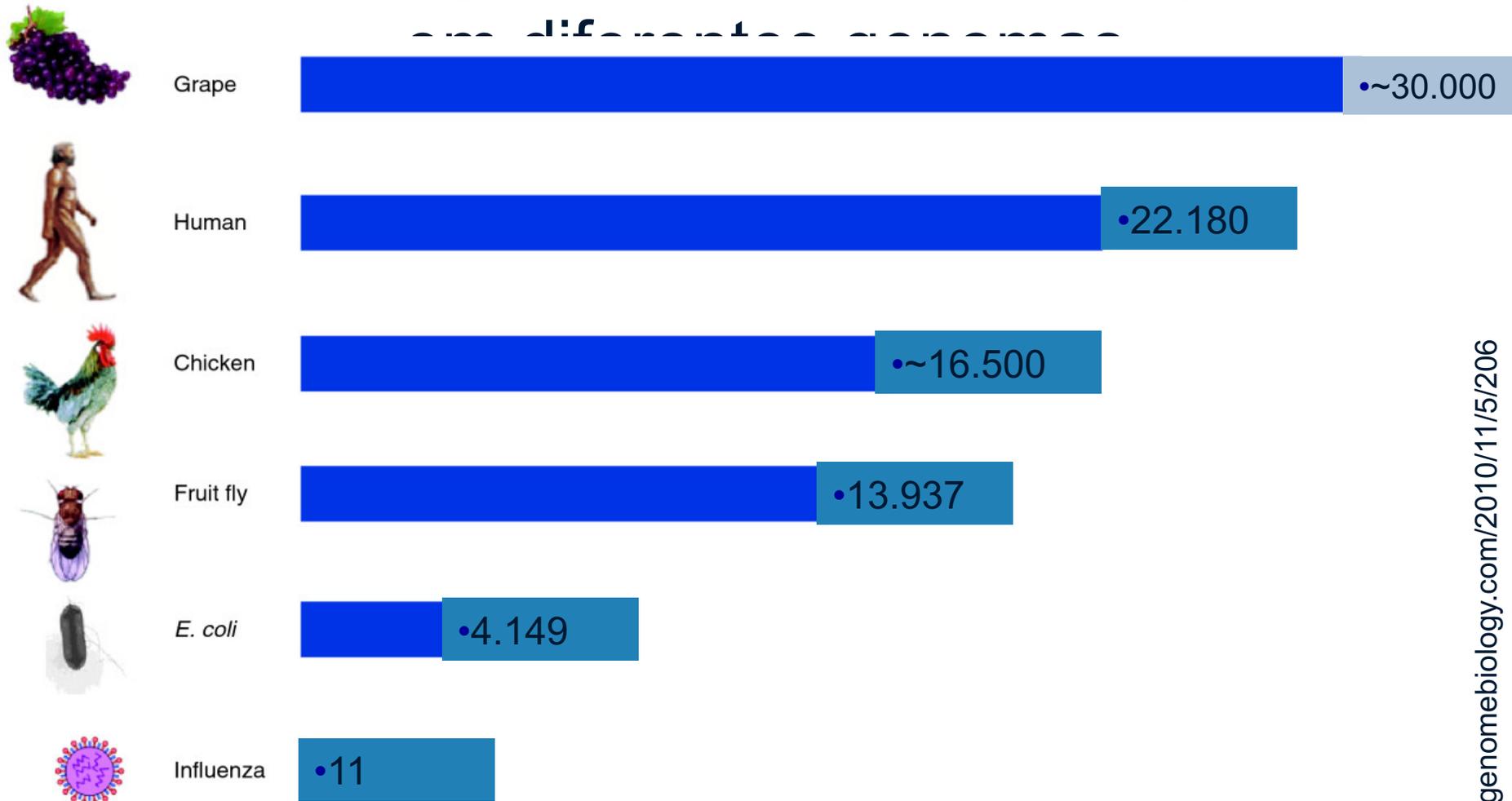
• Introns tem tamanho muito variável



• Exons tem tipicamente 100-200 pb



# •Número de genes codificadores de proteínas



• *Splicing* alternativo seria a solução para explicar

- Alguns fatos...
- Tecido nervoso é caracterizado pela maior diversidade de eventos de AS (splicing alternativo)
- AS contribui para características específicas da função do cérebro humano
- AS está associado com diversas doenças genéticas hereditárias