

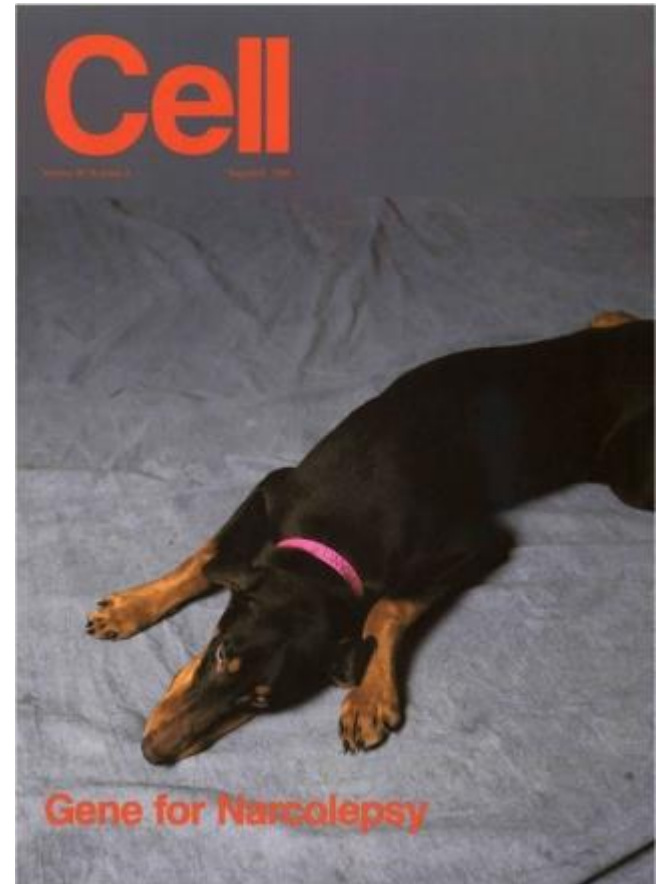
# QBBQ 136 Transcrição e Processamento de RNA

## Narcolepsia

distúrbio do sono caracterizado por sonolência excessiva

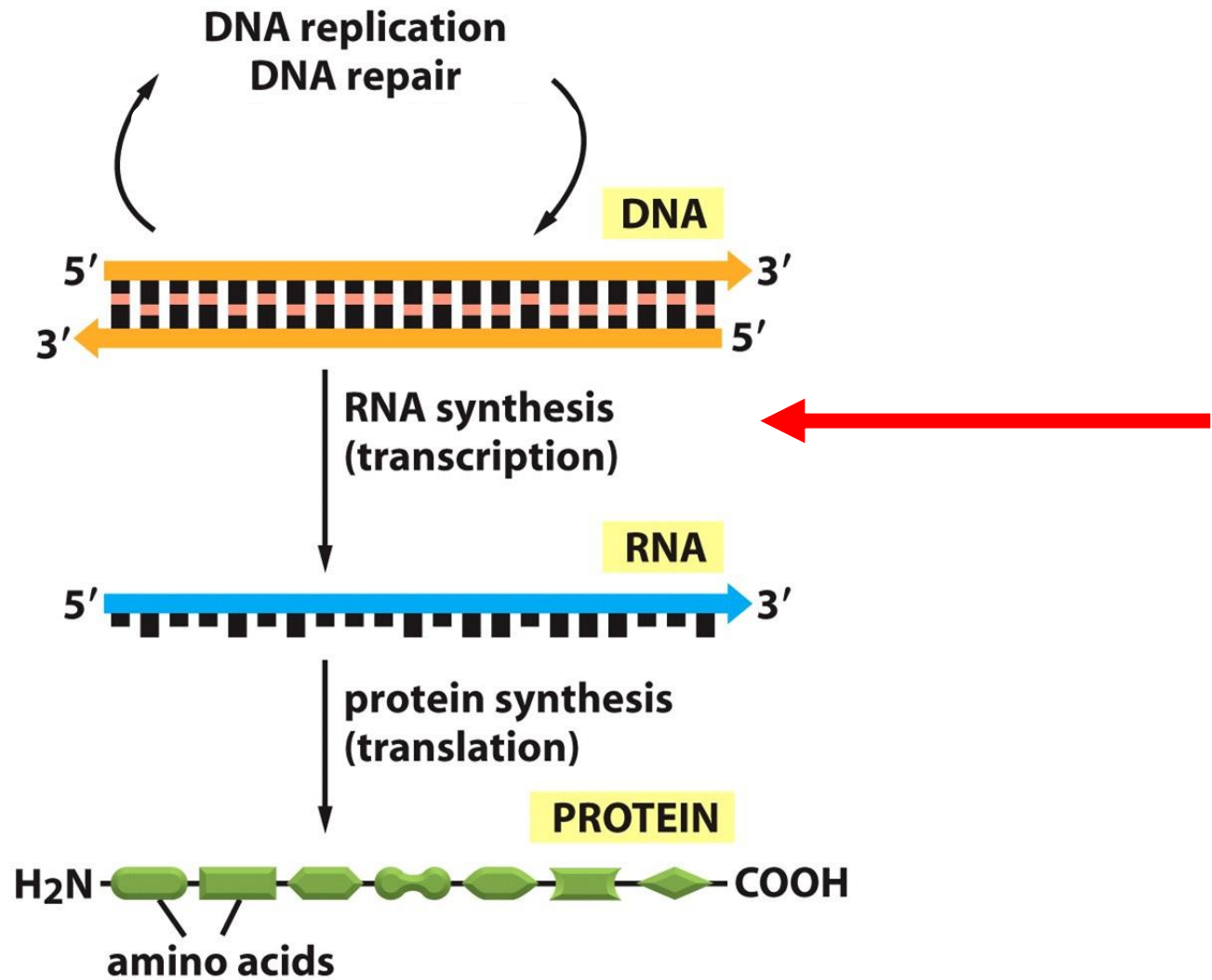


Orexina é um neuropeptídeo que regula o sono, apetite.



Mutação no gene do receptor para orexina (ou hipocretina) que afeta o processamento do mRNA foi identificada em cães com narcolepsia

**Como é esta mutação?**



# TRANSCRIÇÃO:

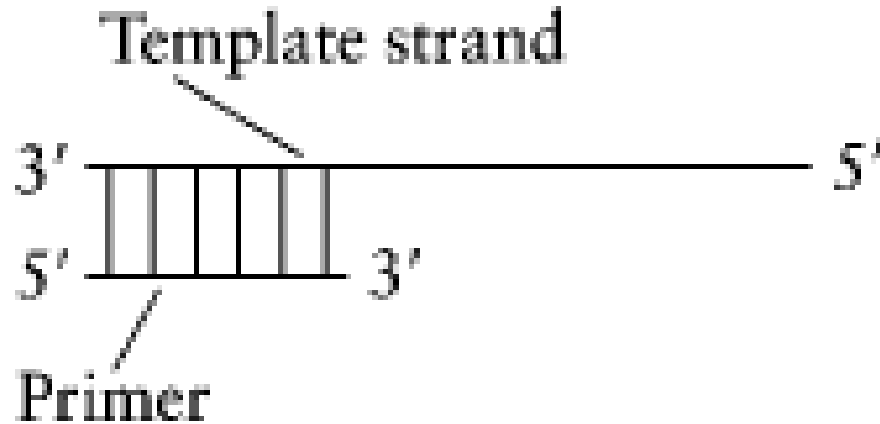


- Processo através do qual RNA é sintetizado a partir de um DNA molde pela RNA polimerase;
- RNA polimerase transcreve os genes;
- RNA polimerase inicia a transcrição nos **promotores** e finaliza nos **terminadores**;
- O RNA é sintetizado no sentido 5' → 3'

# Diferenças entre RNA polimerase e DNA polimerase

DNA polimerase

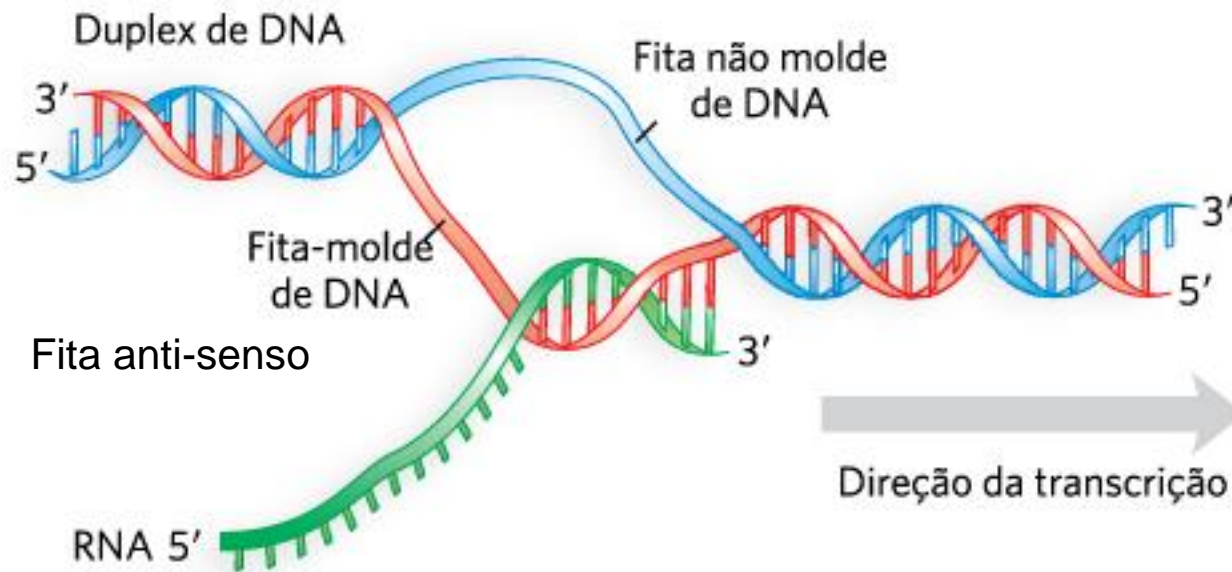
requer *primer*



RNA polimerase

não requer *primer*





Síntese 5' -> 3', como no caso do DNA

Só uma das fitas é transcrita de cada vez

Produto não se mantém pareado com a fita molde

RNA polimerase não necessita de "primer"

Utiliza ribonucleotídeos, uracila no lugar de timina

Só partes do genoma são transcritas

(5') CGCTATAGCGTTT (3')

fita codificadora

(3') GCGATATCGCAA (5')

fita molde

(5') CGCUAUAGCGUUU (3')

RNA transcrito

Síntese 5' → 3'

# RNA polimerase

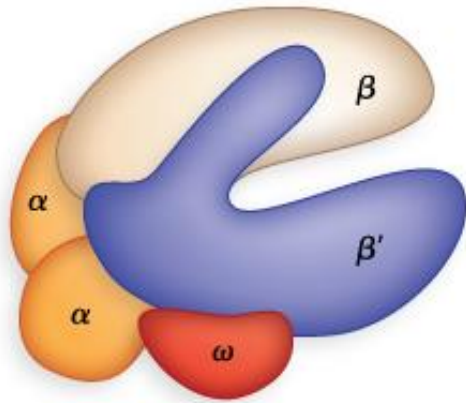
Etapas na síntese de RNA:

1- Início da transcrição: **promotores**

2- Alongamento da cadeia de RNA

3- Terminação da transcrição: **terminadores**

# RNA polimerase de *E. coli*

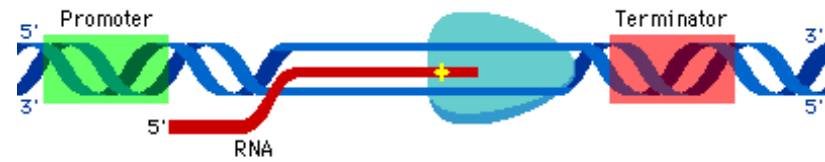


- Enzima composta por 6 subunidades ( $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ )
- Porção catalítica é  $\alpha_2\beta\beta'\omega$ , também chamada cerne (“core”)
- Subunidade sigma (fator  $\sigma$ ) confere especificidade: reconhece regiões no DNA que “marcam” o início da transcrição (promotor)
- Cerne + sigma = holoenzima

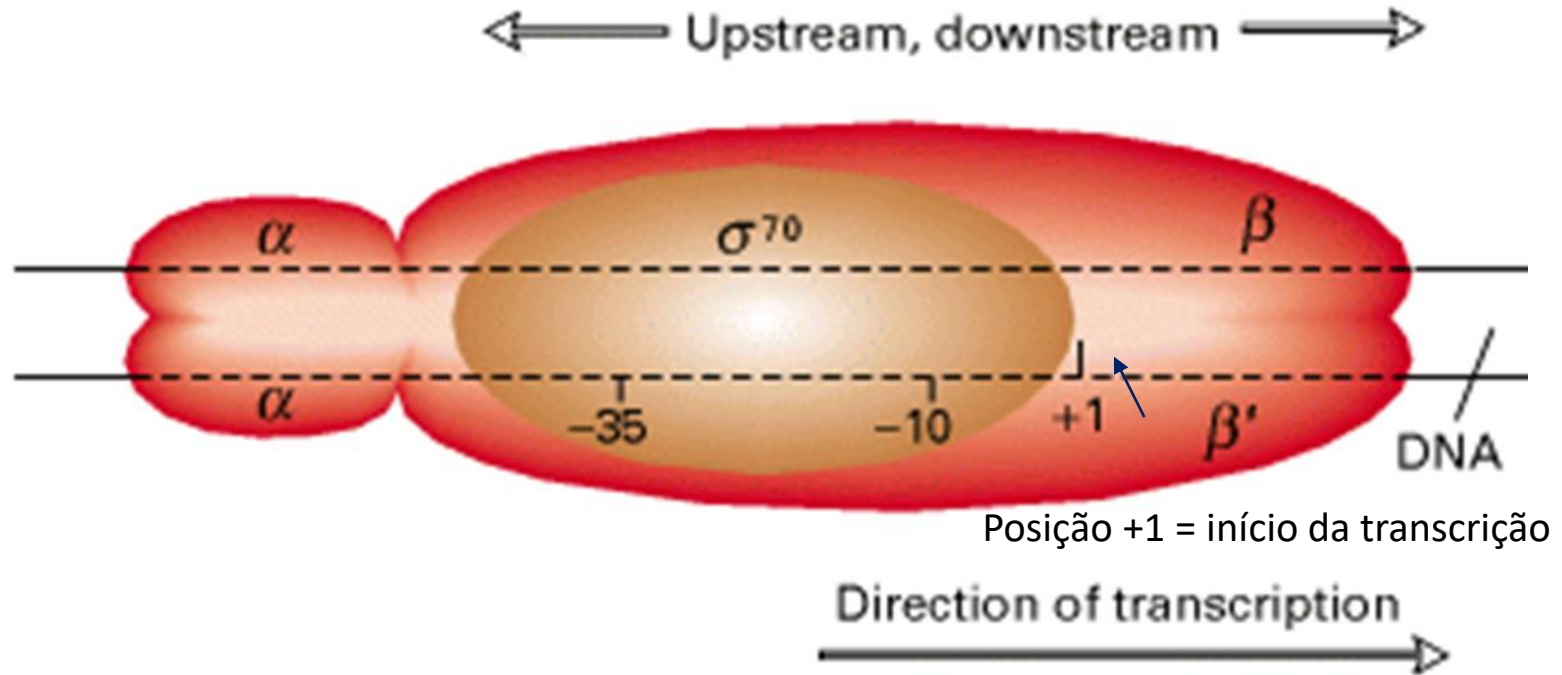
Gene	product	Functions
<i>rpoA</i>	2 $\alpha$ subunits (37 kD each)	enzyme assembly promoter recognition binds some activators
<i>rpoB</i>	$\beta$ subunit (151 kD)	catalytic center
<i>rpoC</i>	$\beta'$ subunit (155 kD)	
<i>rpoD</i>	$\sigma$ subunit (18–70 kD)	promoter specificity
<i>rpoZ</i>	$\omega$ subunit (10 kD)	
<i>E. coli</i> enzyme = 460 kD		



# 1-Início da transcrição

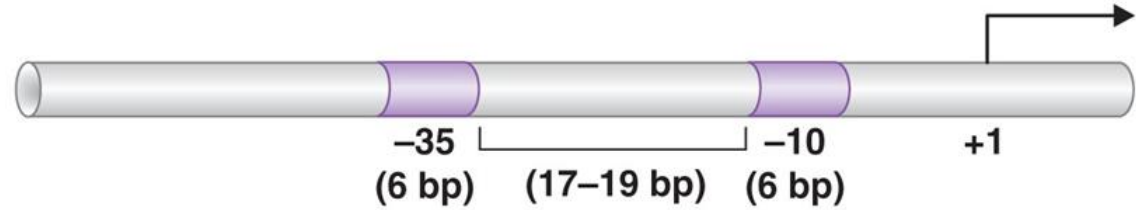


Reconhecimento do promotor pela RNA polimerase de *E. coli*

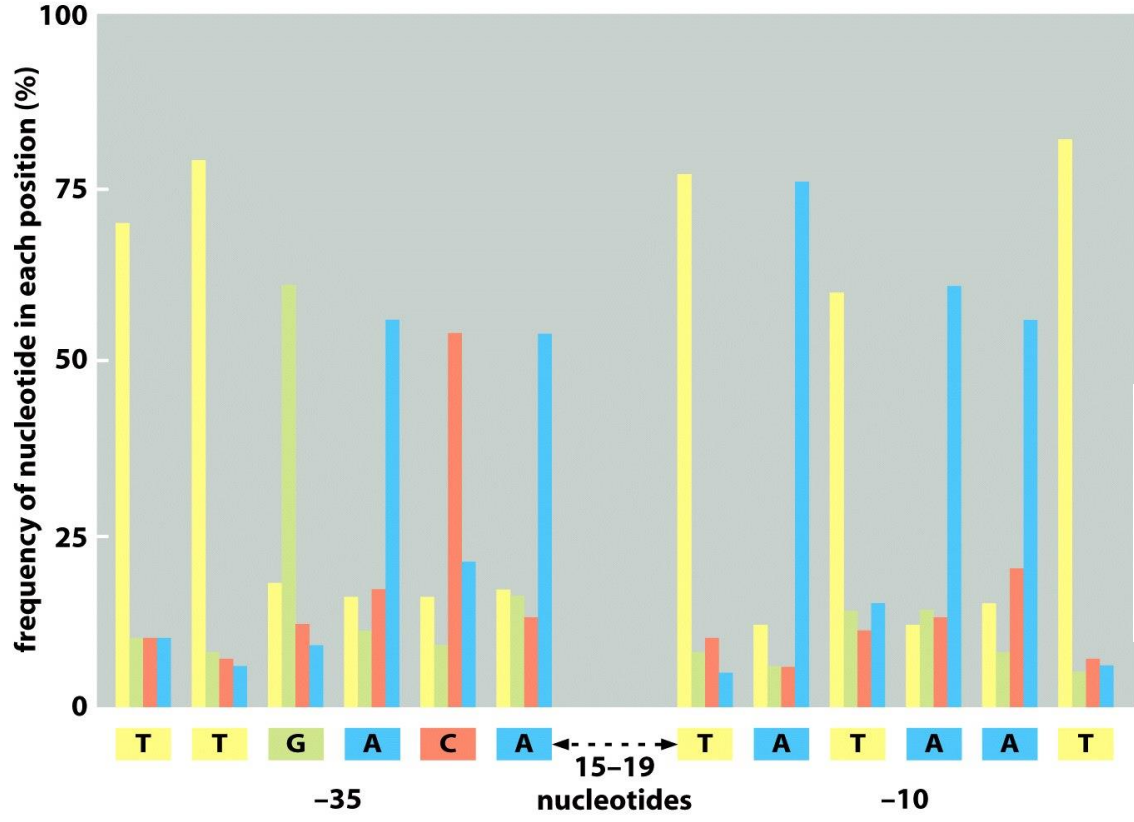


RNA polimerase de *E.coli*

# Promotores



Sequência consenso para 300 promotores de *E. coli* (reconhecidas pelo fator  $\sigma 70$ )



### Strong *E. coli* promoters

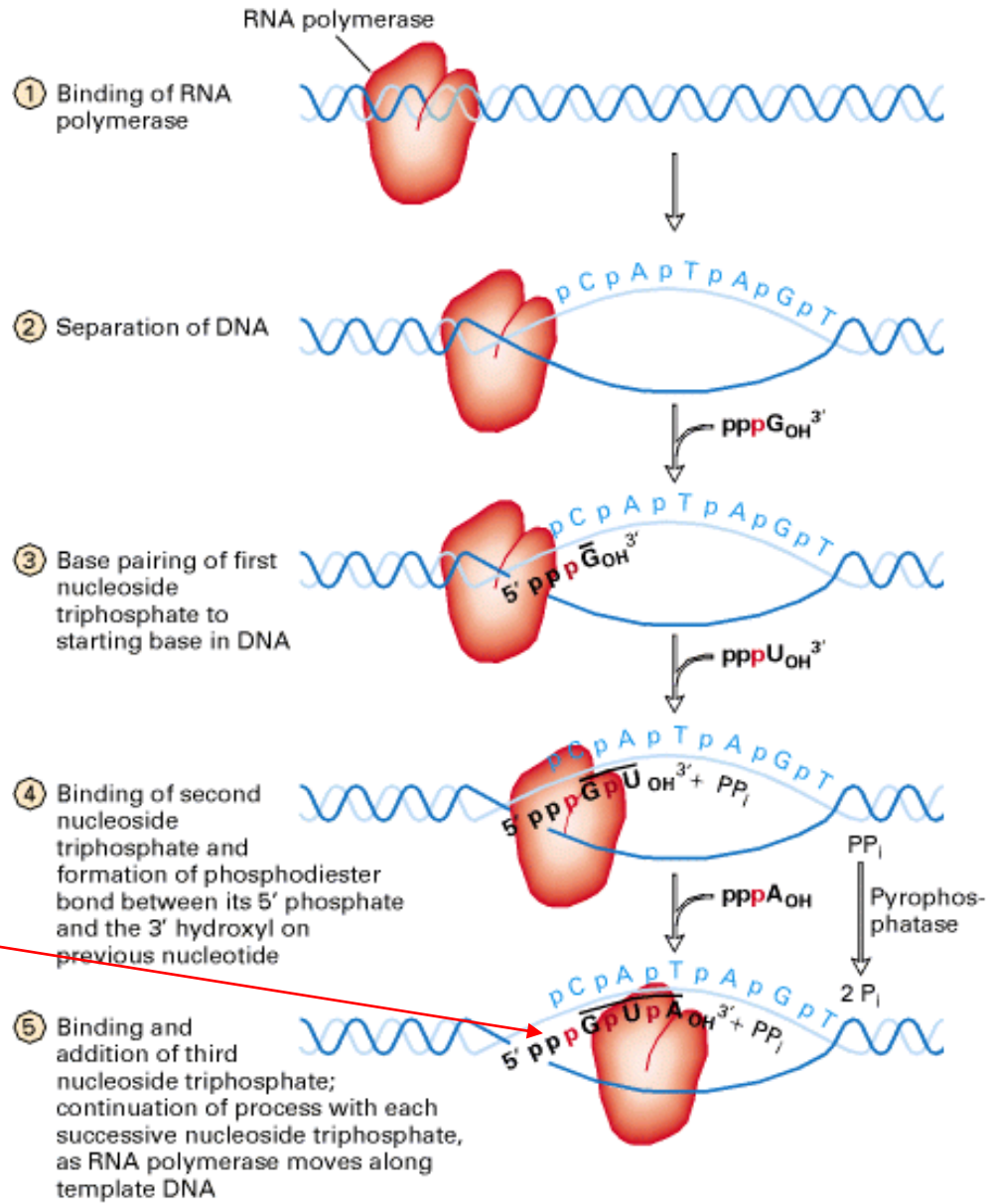
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC	TTTACAGCGGCG	•CGTCATTGAT	TATGATGC	•GCCCCGTTCC
rrn D1	GATCAAAAAATAC	TTGTGCAAAAAA	•TTGGGATCCC	TATAATGCGCCTCCG	TTGAG
rrn X1	ATGCATTTTCCGC	TTGCTTCCTGA	•GCCGACTCCC	TATAATGCGCCTCCAT	TCGAA
rrn (DXE) <sub>2</sub>	CCTGAAATTCAGGG	TTGACTCTGAAA	•GAGGAAAGCG	TAAATAC	•GCCACCTCGC
rrn E1	CTGCAATTTTCTA	TTGCGGCCTGCG	•GAGAACTCCC	TATAATGCGCCTCCAT	TCGAA
rrn A1	TTTTAAATTTCTC	TTGCAAGGCCGG	•AATAACTCCC	TATAATGCGCCACCA	CTGAA
rrn A2	GCAAAAAATAATGC	TTGACTCTGTAG	•CGGGAAGCGG	TATTATGC	•ACACC
λ P <sub>R</sub>	TAAACCCGTGCGTG	TTGACTATTTTA	•CCTCTGGCGGTGATA	ATGG	•TTGCATGTAG
λ P <sub>L</sub>	TATCTCTGGCGGTG	TTGACATAAATA	•CCACTGGCGGTGATA	CTGA	•GCACATCAG
T7 A3	GTGAAACAAAACGG	TTGACACATGA	•AGTAAACACGG	TACGATGT	•ACCACATGAA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA	TTGACTTAAAGT	•CTAACCTATAGG	AATACTTA	•CAGCCATCGAA
T7 A2	ACGAAAAACAGGTA	TTGACAACATGAAGT	AACATGCAG	TAGATAC	•AAATCGTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCG	TTGTACTTTGTT	•TCGCGCTTGG	TATAATCG	•CTGGGGTCA

-35
-10
+1

(Uma fita está representada, mas a RNA polimerase se liga a DNA dupla fita)

Além do fator  $\sigma 70$ , existem Outros fatores sigma que reconhecem promotores diferentes!

# 2- Alongamento

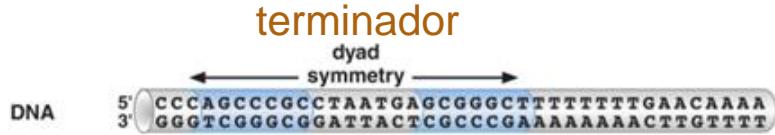


O nucleotídeo da extremidade 5' retém os 3 grupos fosfato

# 3- Terminação da transcrição em *E.coli*



independente da proteína Rho



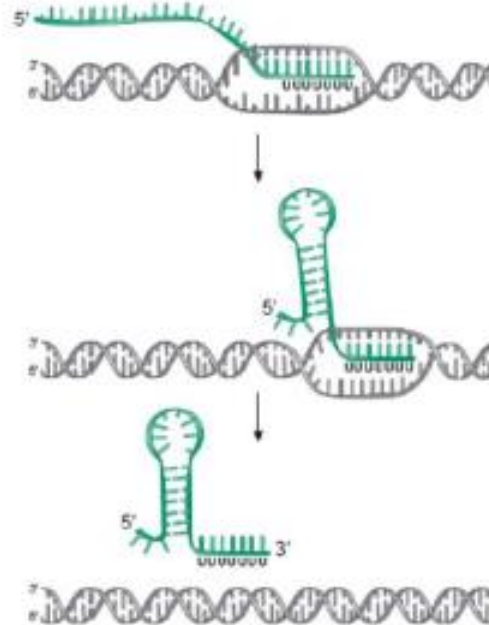
transcript folded to form termination hairpin



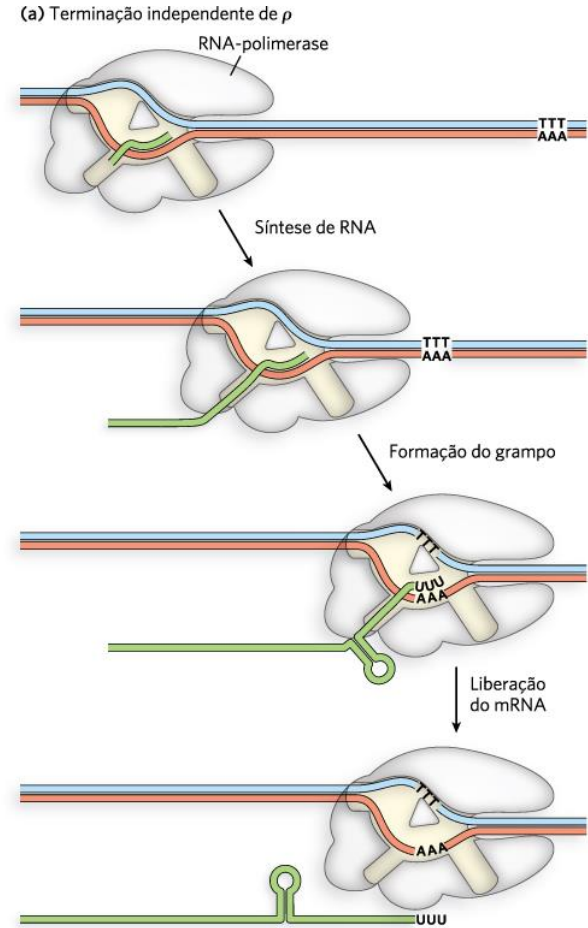
grupo de terminação ou *hairpin*

Seguido de seq. de Us

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



Formação do grampo de terminação → longa pausa → desestabilização do complexo de transcrição



# Transcrição em eucariotos

- 3 RNA polimerases (I, II, III) com funções especializadas
- Maquinaria muito mais complexa: holoenzima tem > 60 polipeptídeos
- Promotor tem elementos diferentes do procariótico
- Reconhecimento do promotor é executado pelos fatores gerais de transcrição (GTFs)
- Transcrição precisa lidar com o fato que o DNA está empacotado em nucleossomos



**Table 6–1 Principal Types of RNAs Produced in Cells**

<b>TYPE OF RNA</b>	<b>FUNCTION</b>
→ mRNAs	messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids
→ snRNAs	small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA
snoRNAs	small nucleolar RNAs, used to process and chemically modify rRNAs
scaRNAs	small cajal RNAs, used to modify snoRNAs and snRNAs
miRNAs	microRNAs, regulate gene expression typically by blocking translation of selective mRNAs
siRNAs	small interfering RNAs, turn off gene expression by directing degradation of selective mRNAs and the establishment of compact chromatin structures
Other noncoding RNAs	function in diverse cell processes, including telomere synthesis, X-chromosome inactivation, and the transport of proteins into the ER

# RNA polymerases eucarióticas

Eucariotos possuem mais de uma RNA polimerase

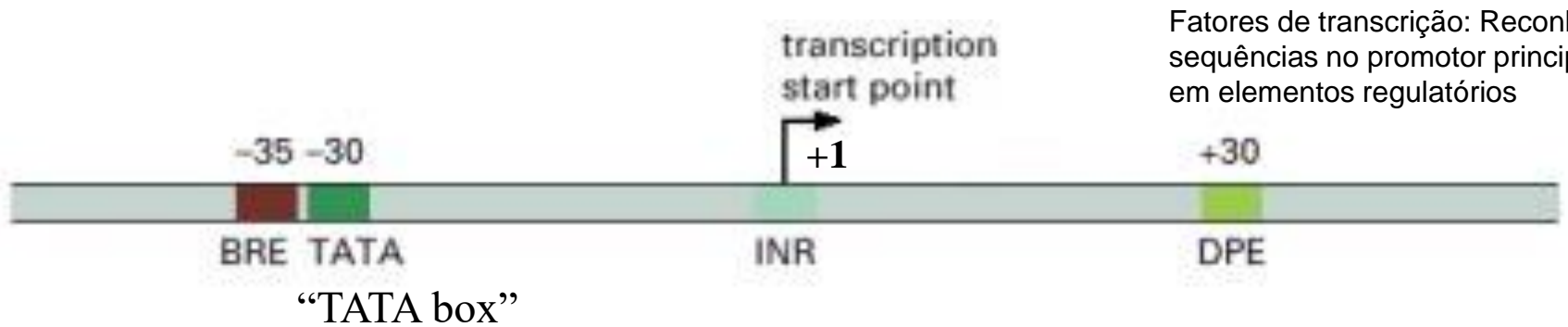
**Table 6–2 The Three RNA Polymerases in Eucaryotic Cells**

TYPE OF POLYMERASE	GENES TRANSCRIBED
RNA polymerase I	5.8S, 18S, and 28S rRNA genes
RNA polymerase II	<u>all protein-coding genes</u> , 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.

# Sequências consenso no promotor eucariótico

## Reconhecidas pelos fatores gerais de transcrição (GTFs)



Fatores de transcrição: Reconhecem sequências no promotor principal e em elementos regulatórios

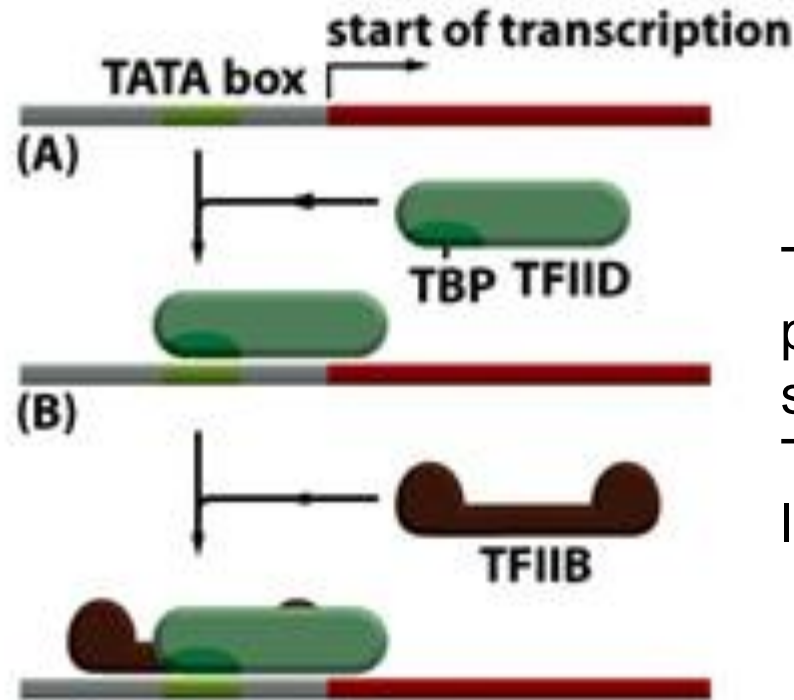
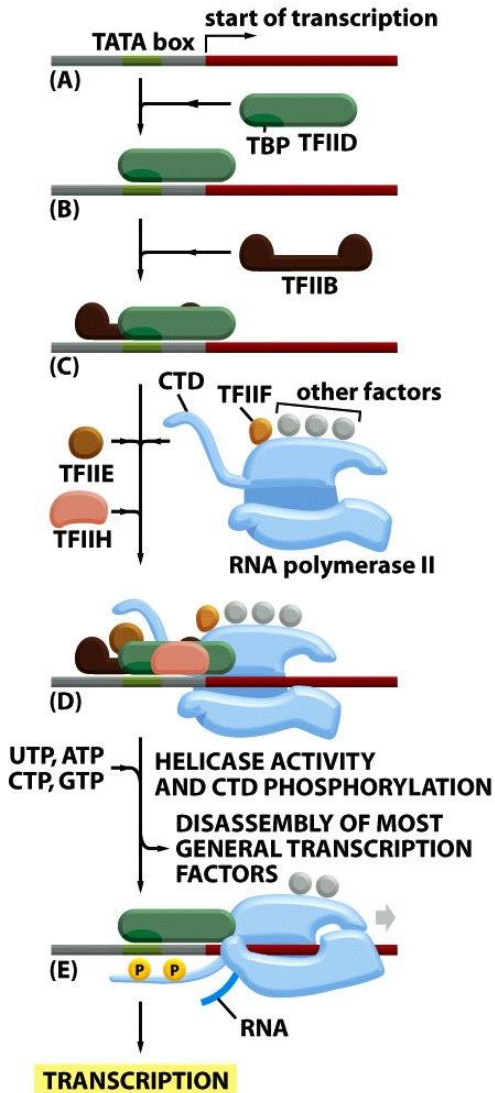
element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

Principal elemento dos promotores eucarióticos de genes transcritos pela RNAPII é o “TATA Box”

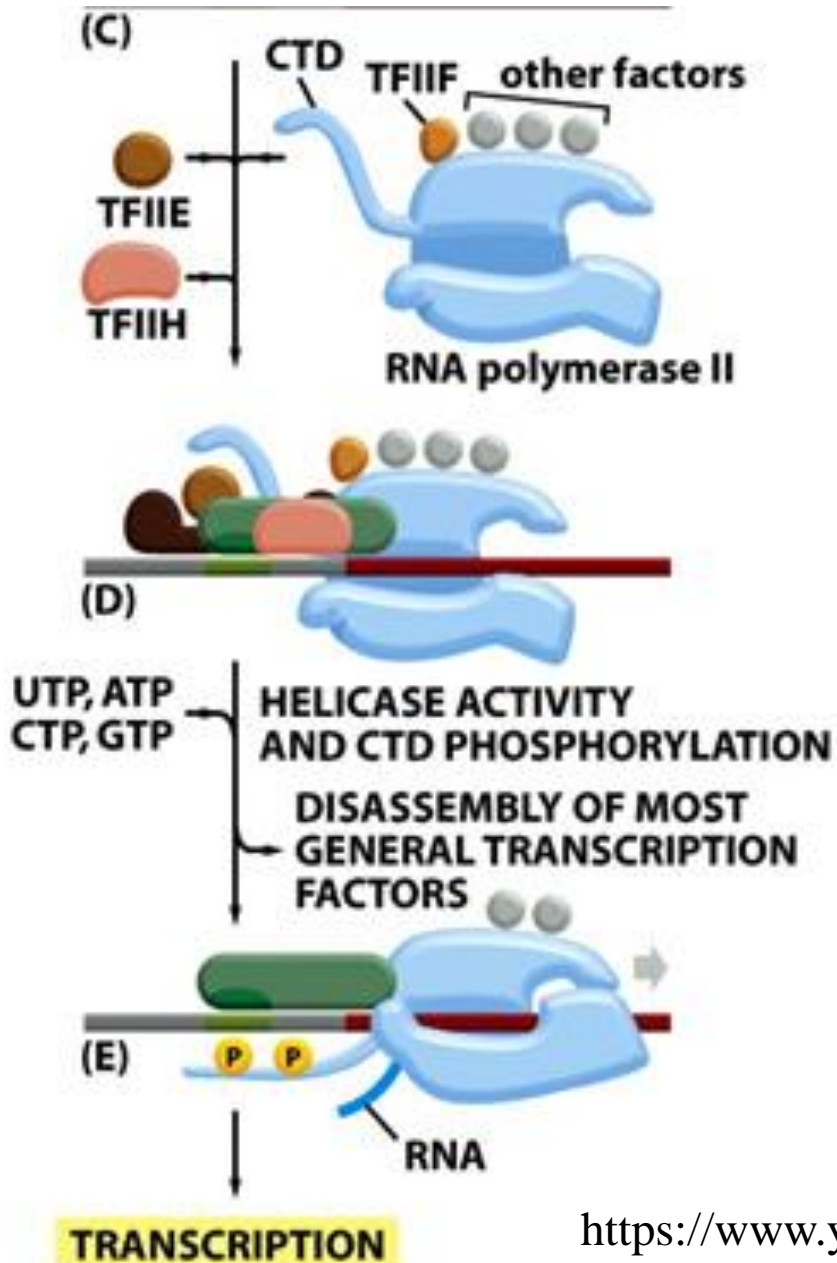
**TBP** (TATA-binding protein)  
Faz parte do TFIID



# Início da transcrição de um gene eucariótico pela RNA polimerase II



TFIID se liga ao promotor através de sua subunidade TBP. Isto permite a ligação de TFIIB



RNA pol II é recrutada por contatos com TFIID e TFIIB, com ajuda de TFIIF.

TFIIH apresenta atividade de helicase: separa as fitas.

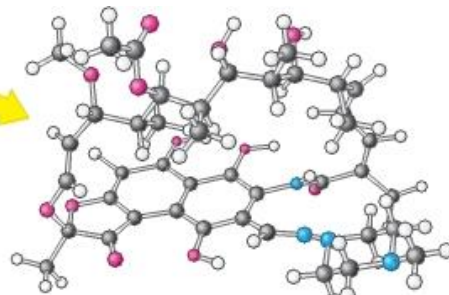
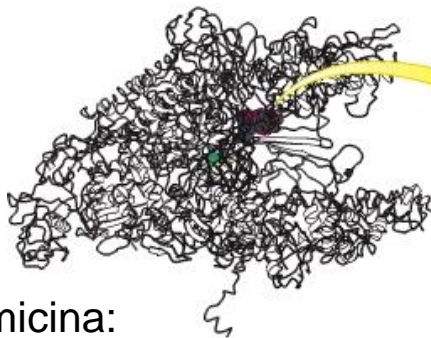
Escape do promotor e alongamento dependem de fosforilação da cauda CTD da polimerase por TFIIH

<https://www.youtube.com/watch?v=5MfSYnItYvg>

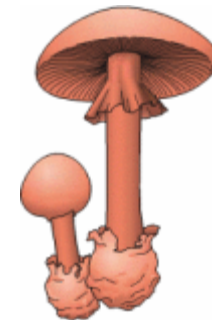
**Table 6–4 Inhibitors of Protein or RNA Synthesis**

INHIBITOR	SPECIFIC EFFECT
<i>Acting only on bacteria</i>	
Tetracycline	blocks binding of aminoacyl-tRNA to A-site of ribosome
Streptomycin	prevents the transition from translation initiation to chain elongation and also causes miscoding
Chloramphenicol	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6–66)
Erythromycin	binds in the exit channel of the ribosome and thereby inhibits elongation of the peptide chain
Rifamycin	blocks initiation of RNA chains by binding to RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on bacteria and eucaryotes</i>	
Puromycin	causes the premature release of nascent polypeptide chains by its addition to the growing chain end
Actinomycin D	binds to DNA and blocks the movement of RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
<i>Acting on eucaryotes but not bacteria</i>	
Cycloheximide	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6–66)
Anisomycin	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6–66)
$\alpha$ -Amanitin	blocks mRNA synthesis by binding preferentially to RNA polymerase II

The ribosomes of eucaryotic mitochondria (and chloroplasts) often resemble those of bacteria in their sensitivity to inhibitors. Therefore, some of these antibiotics can have a deleterious effect on human mitochondria.



Rifampicin



$\alpha$ -amanitina:

Isolado do cogumelo *Amanita phalloides*

Altamente tóxico

Bloqueia a etapa de elongação

Rifamicina:

(liga a subunidade  $\beta$ )

O antibiótico previne o início da síntese da cadeia de RNA (liga-se no local do híbrido DNA/RNA)

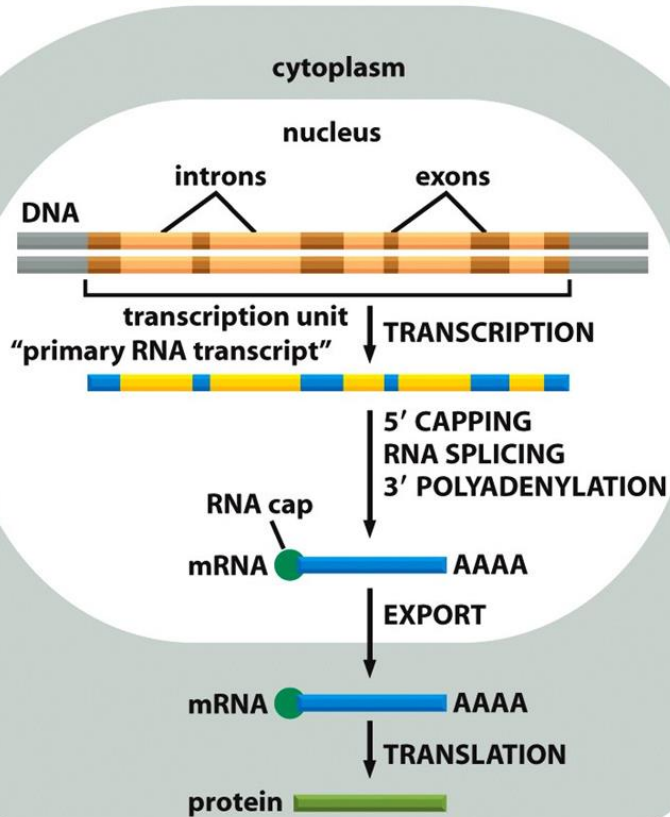
## PROCESSAMENTO DO RNA (ocorre apenas em eucariotos)

Transcrição do DNA em eucariotos resulta na produção de um pré-RNA mensageiro ou RNA primário, que deve ser processado antes de poder ser traduzido.

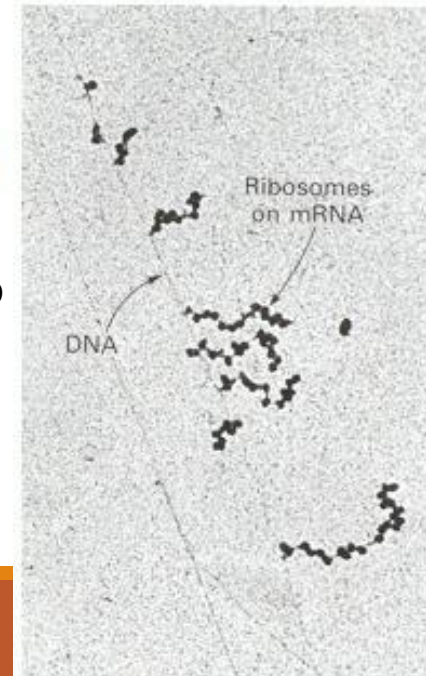
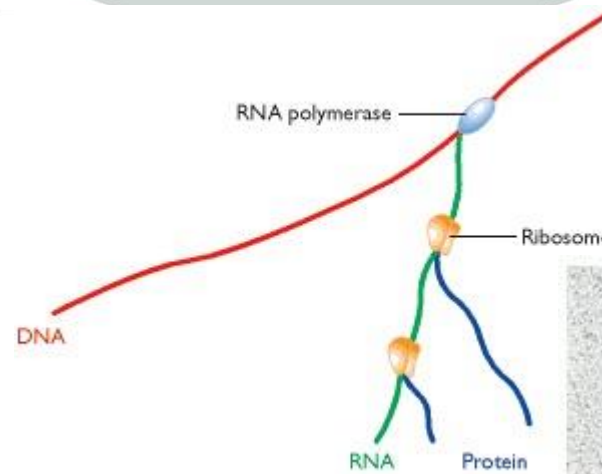
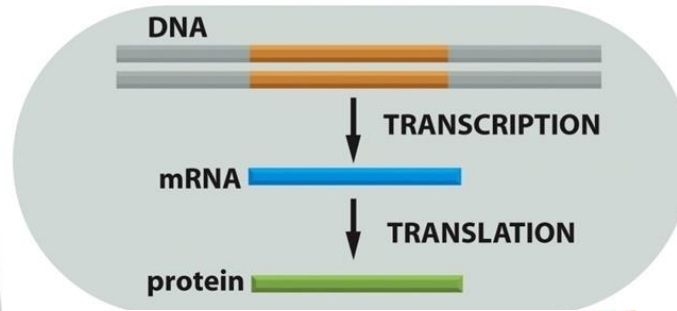


# PROCESSAMENTO DO RNA (ocorre apenas em eucariotos)

## EUCARYOTES



## PROCARYOTES



Transcrição e tradução são acopladas em procariotos

## PROCESSAMENTO DO pré-RNAm produzido pela RNA pol II:

- 1- Adição de 'CAP' (quepe) na extremidade 5' do RNAm;
- 2- Poliadenilação da extremidade 3' do RNAm;
- 3- Remoção dos íntrons e junção dos exons (*splicing*).

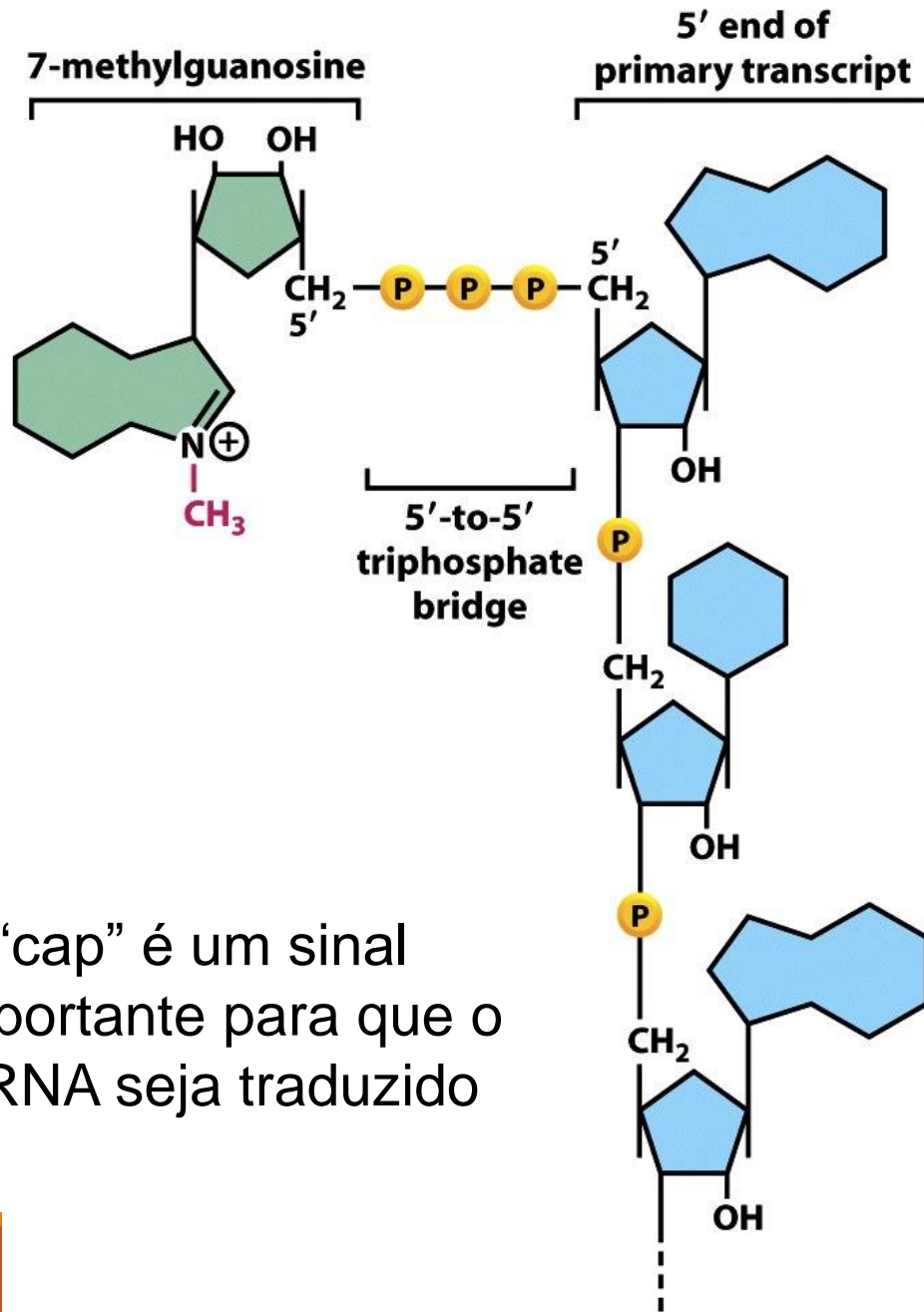
Estabilidade (protege de degradação)

Tradução eficiente

Transporte para citoplasma

pré-RNAm também é chamado de transcrito primário ou não processado

# 1- Adição de 'CAP' na extremidade 5' do RNAm



mRNA guanylyltransferase

O "cap" é um sinal importante para que o mRNA seja traduzido

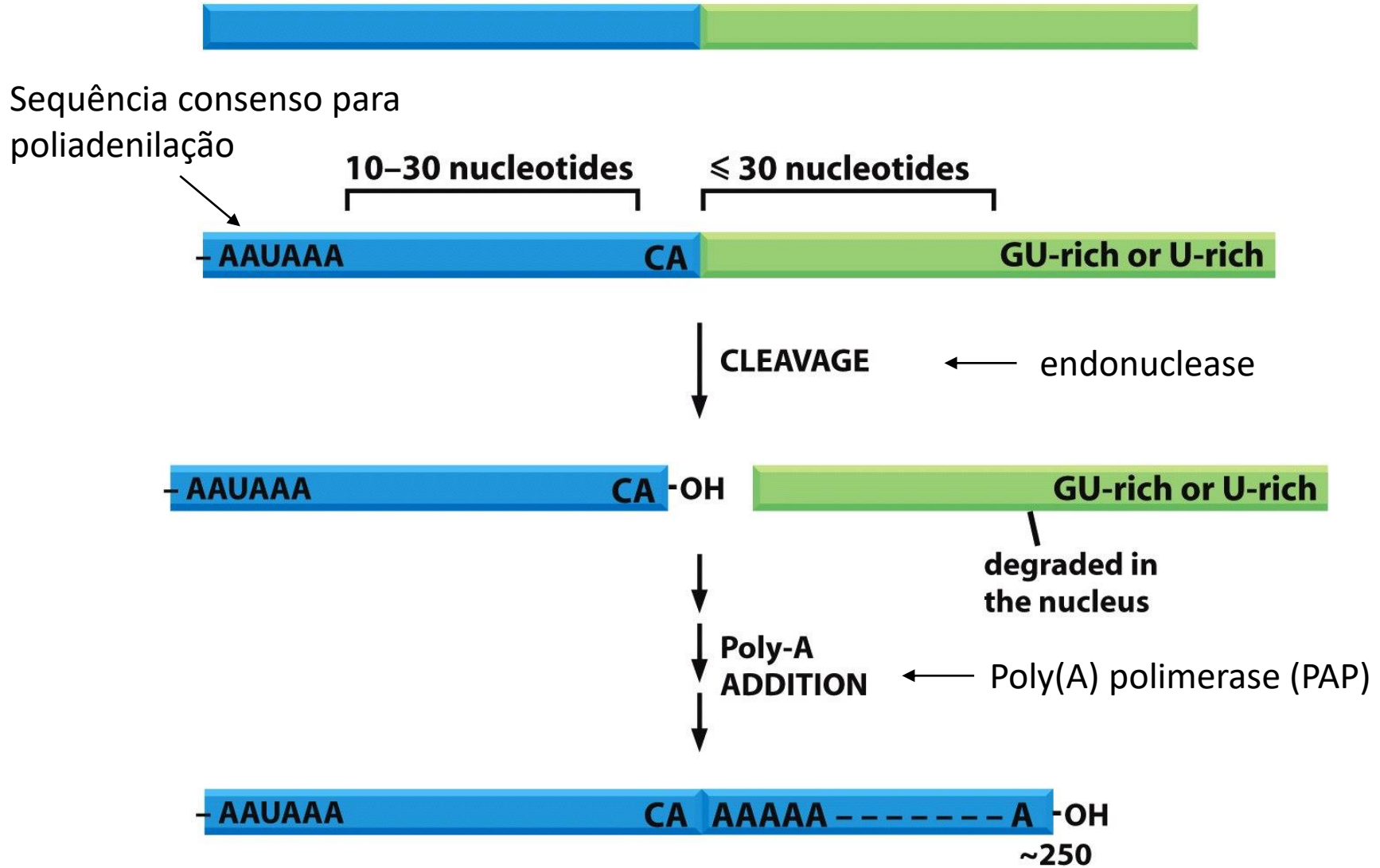
Além do 5' cap, mRNAs eucarióticos possuem uma cauda de As (cauda poli A) na extremidade 3'



A poliadenilação controla a estabilidade do mRNA e também é importante na tradução



## 2- Clivagem e poliadenilação da extremidade 3' do RNAm

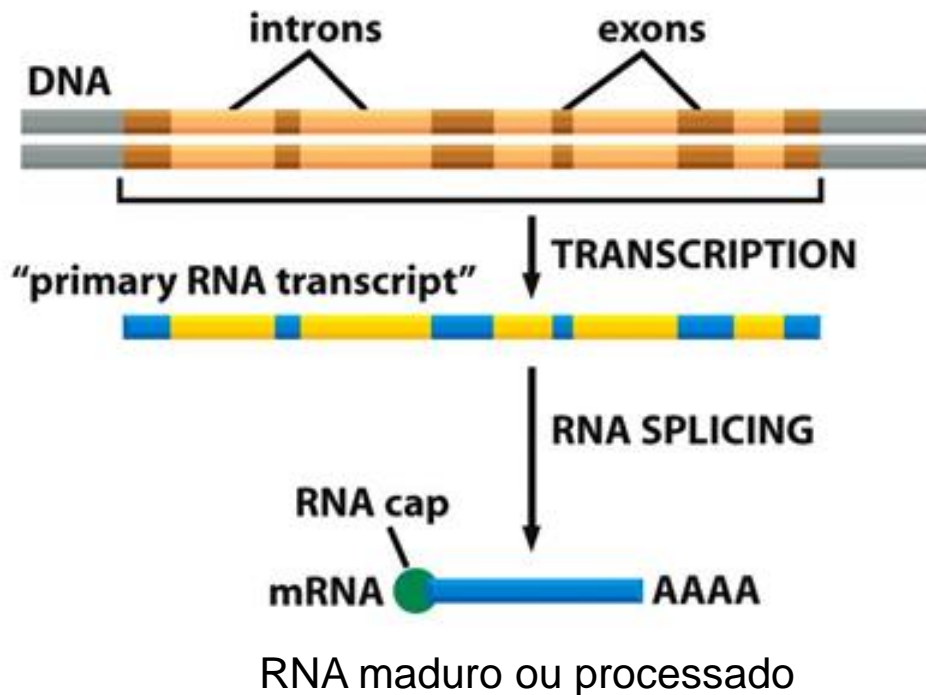


### 3- Splicing

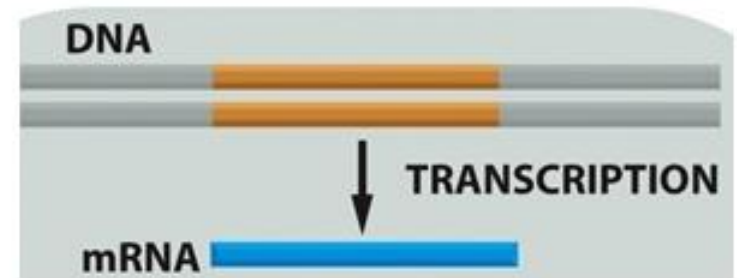
A maioria dos genes eucarióticos possuem segmentos de sequências codificadoras (exons) separadas por sequências não codificadoras (íntrons)

introns= *interrupting sequences*

#### EUCARYOTES



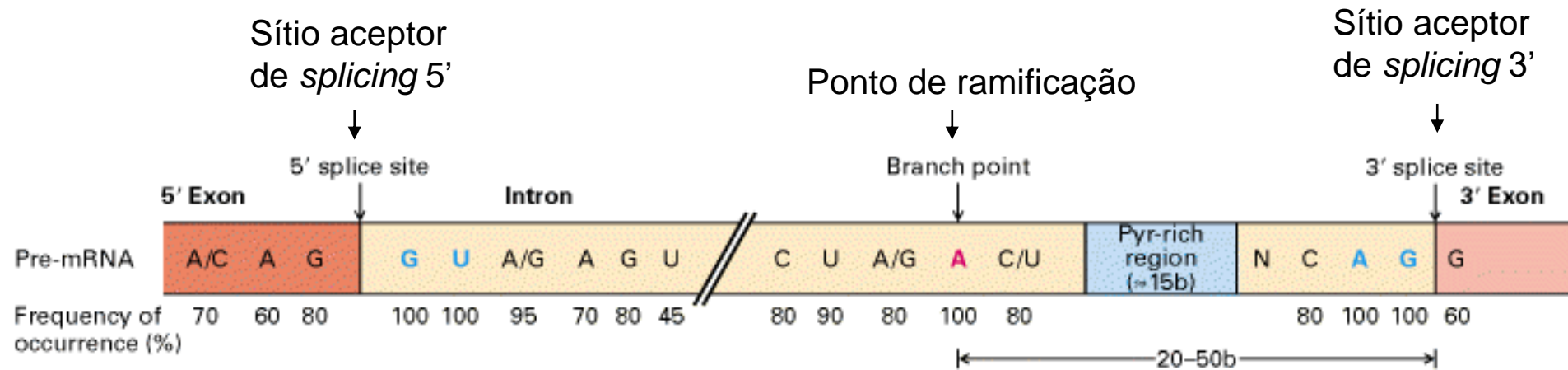
#### PROCARYOTES



Genes de procaríotos não têm íntrons  
Não ocorre *splicing* em procaríotos

# As bordas exon-intron exibem sequências conservadas

Sequências consenso no pre-RNAm que sinalizam o início e final dos íntrons



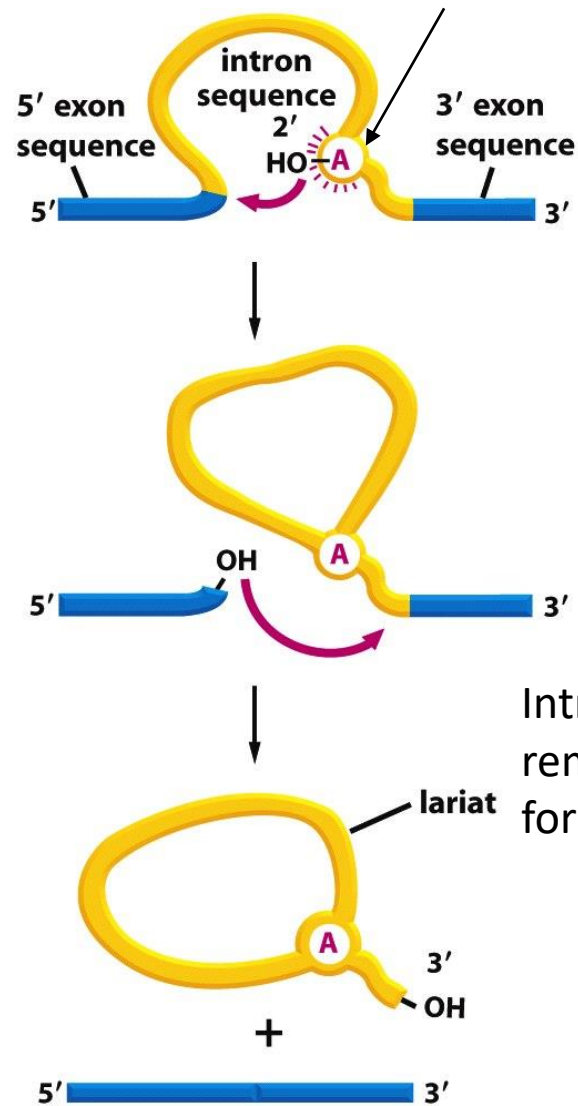
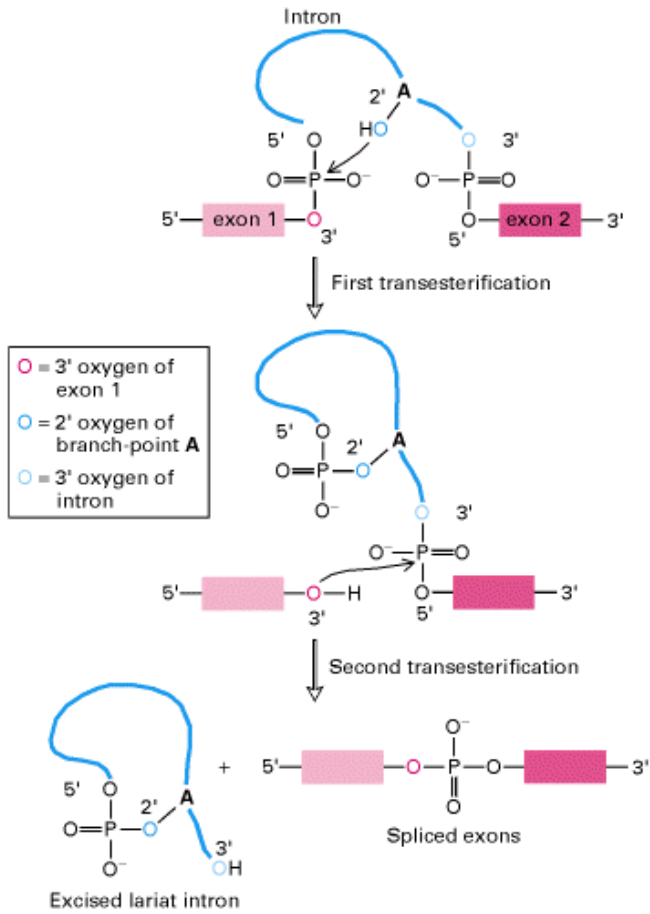
Bases conservadas dirigem a maquinaria de splicing.

A maioria das bases conservadas fica dentro do intron.

Sinais mais importantes:

- GU no sítio 5'
- AG no sítio 3'
- A no sítio de ramificação

# Ponto de ramificação

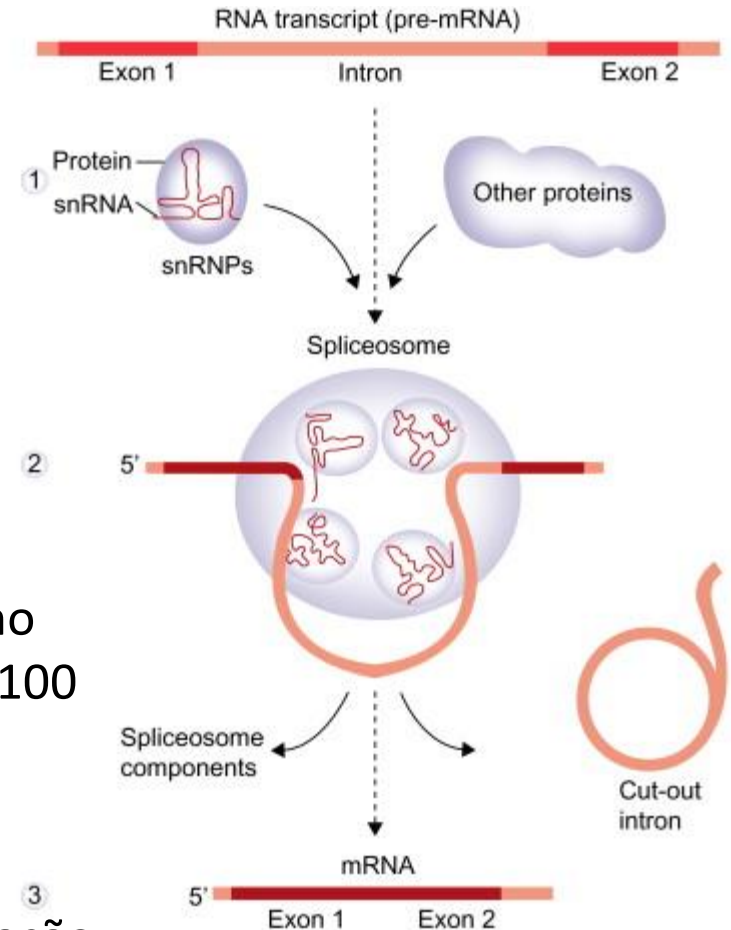


# A maquinaria molecular que executa o splicing é o spliceossomo:

Grande complexo ribonucleoproteico formado por 5 snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) que catalisa o *splicing* do pre-RNA

Características do Spliceossomo:

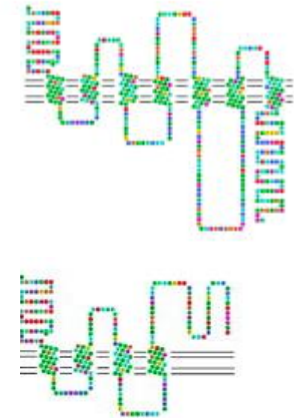
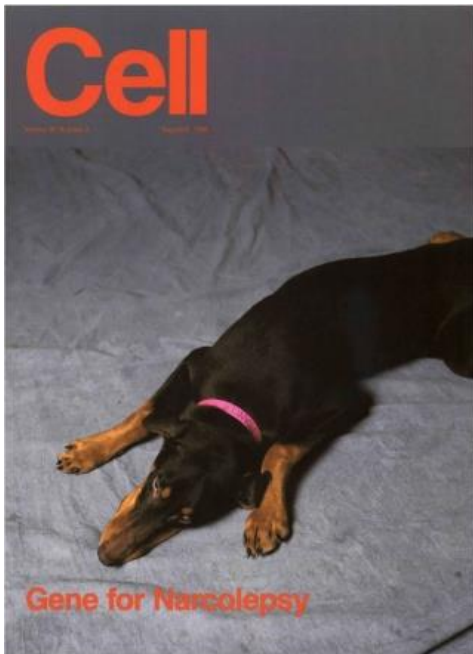
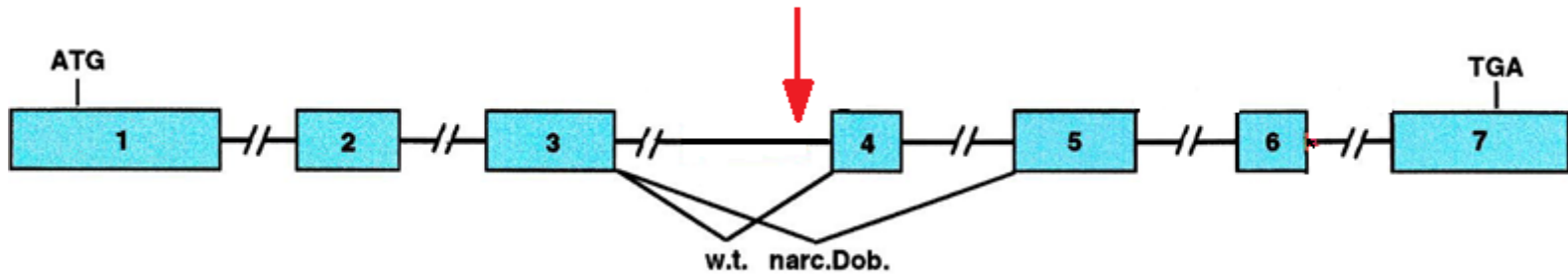
- É composto por “ribonucleoproteínas pequenas nucleares” - **snRNPs** (“snurps”)
- Cada snRNP consiste de 6-10 proteínas e 1 pequeno RNA nuclear (**snRNA**), que varia de tamanho entre ~100 e ~200 nt.
- Os 5 snRNAs são: U1, U2, U4, U5, e U6.
- O spliceossomo é capaz de:
  - reconhecer o sítio 5' de splicing e o sítio de ramificação,
  - aproximar estes sítios no momento correto,
  - catalizar as reações de quebra e ligação do RNA.



snRNP = snRNA + proteins

# Narcolepsia canina causada por mutações no gene *Hcrtr2*

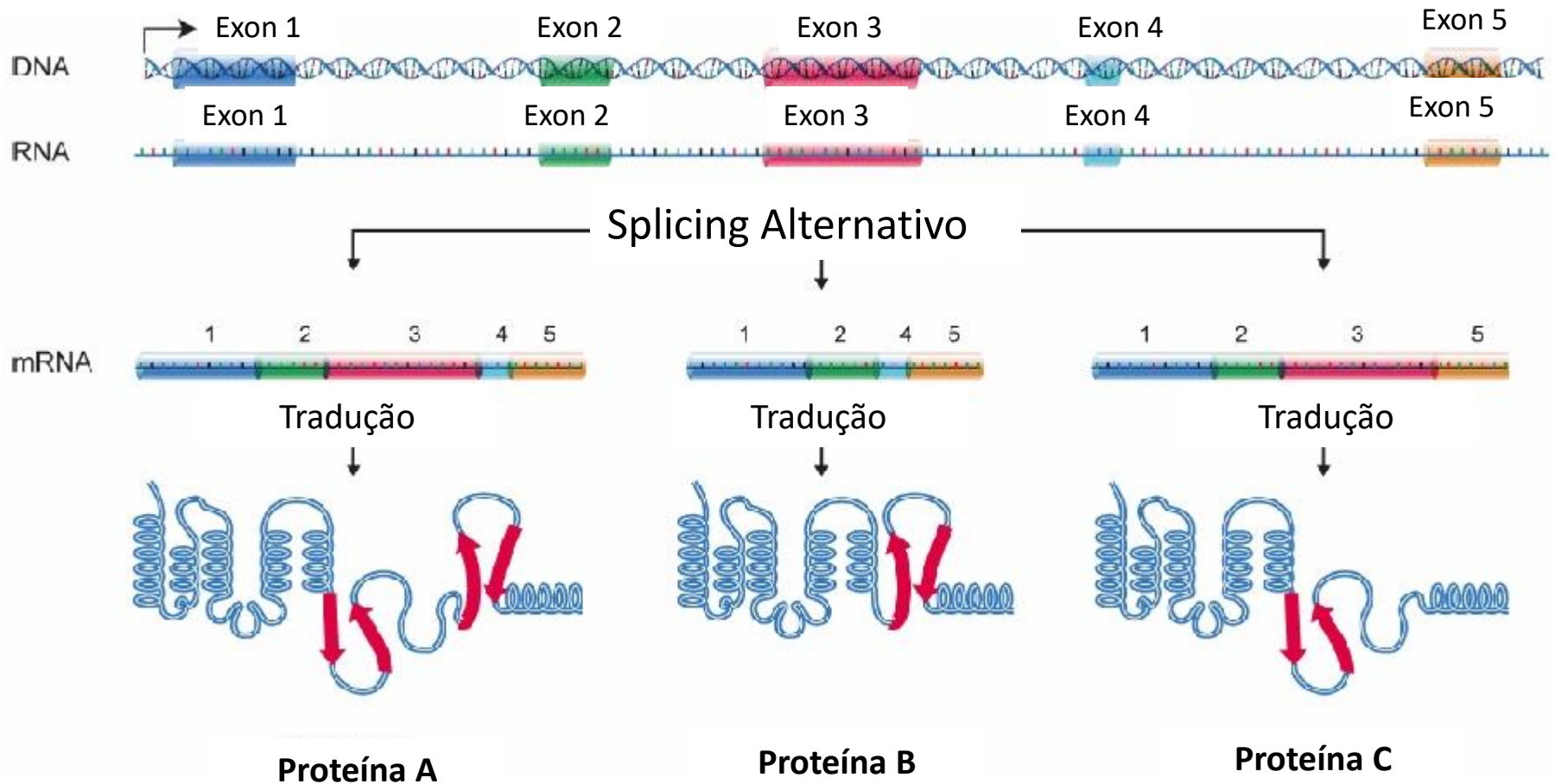
Mutação que altera o ponto de ramificação





# Splicing Alternativo

Os transcritos primários de mRNAs podem sofrer *splicing* de mais de uma maneira, gerando combinações diferentes de exons



~~Um gene → um transcrito~~

*Splicing alternativo*



Um gene → múltiplos transcritos (isoformas  
ou variantes)