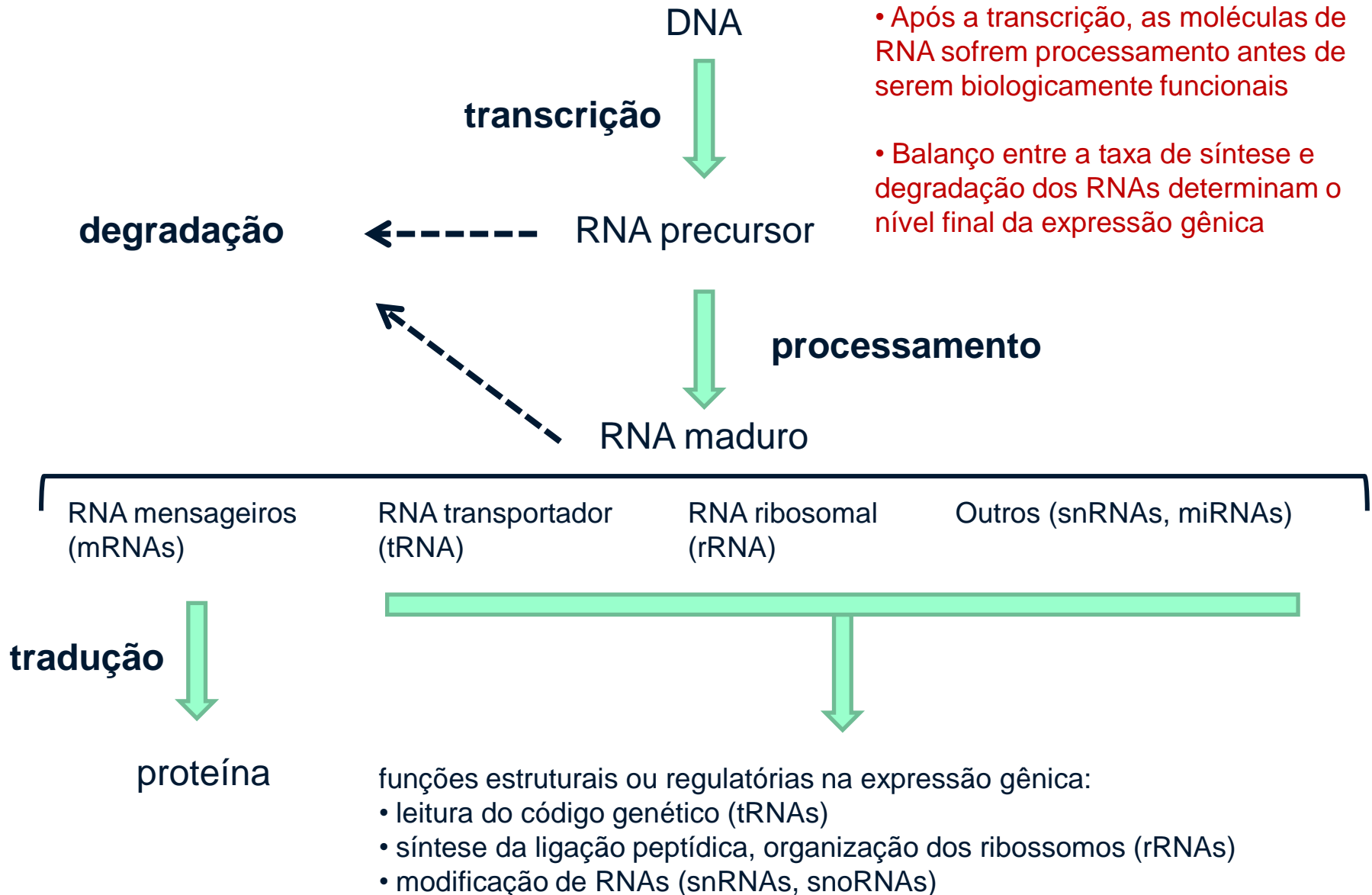


QBQ1354 – Biologia Molecular

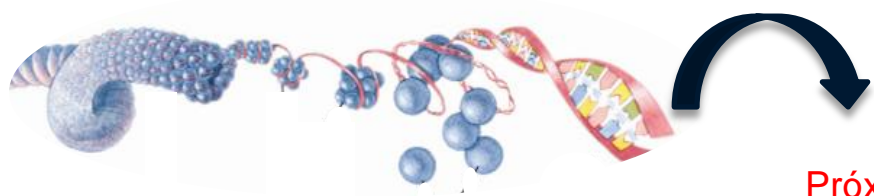
**Processamento de RNAs em
eucariotos**

Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química - USP

O que acontece após a transcrição do DNA?



Níveis de Controle da Expressão Gênica em Eucariotos



Modificação e Remodelamento da cromatina

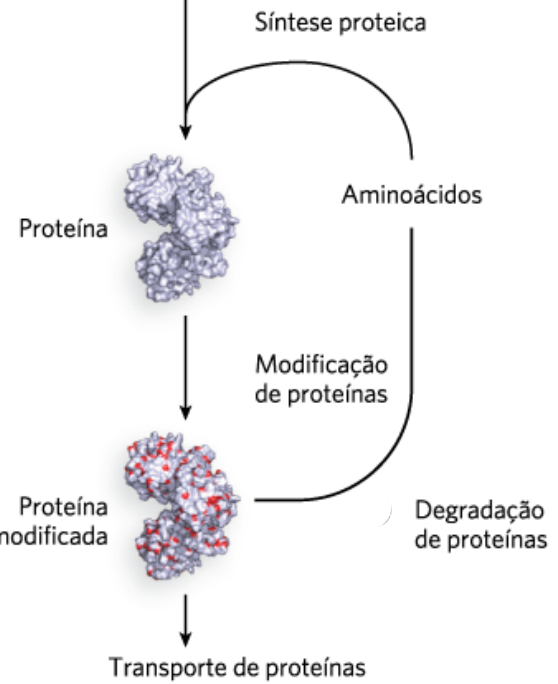
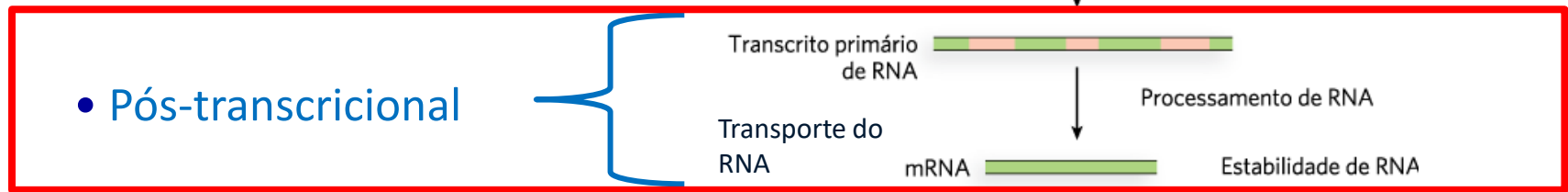
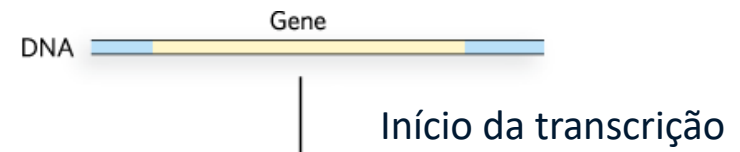
Próxima aula

- Transcricional

- Pós-transcricional

- Traducional

- Pós-traducional

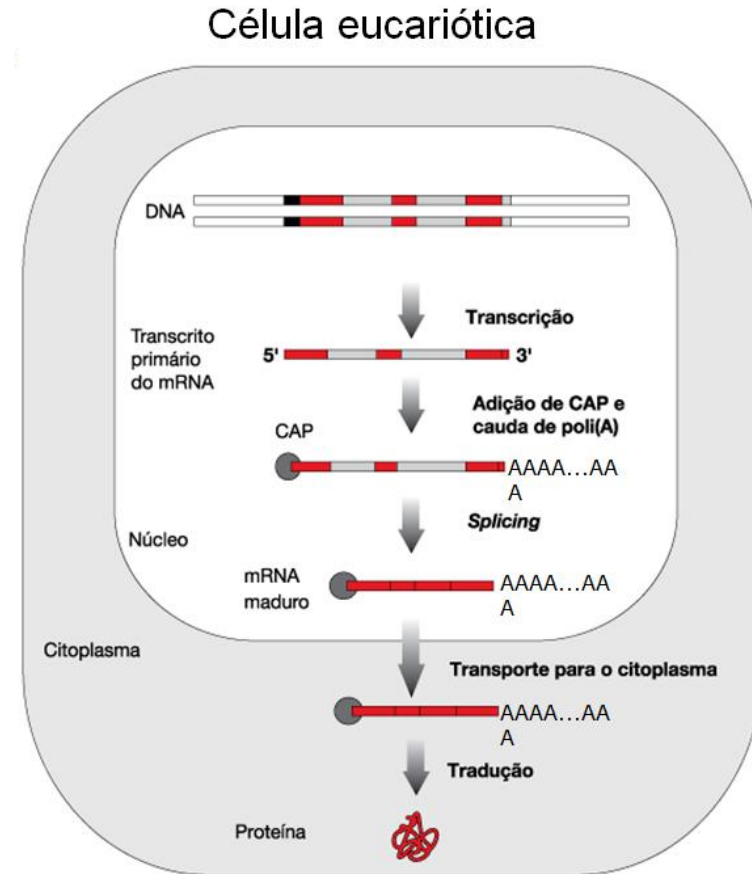


RNAs transcritos pela RNAP II são alvo de 3 tipos principais de processamento que regulam a expressão gênica:

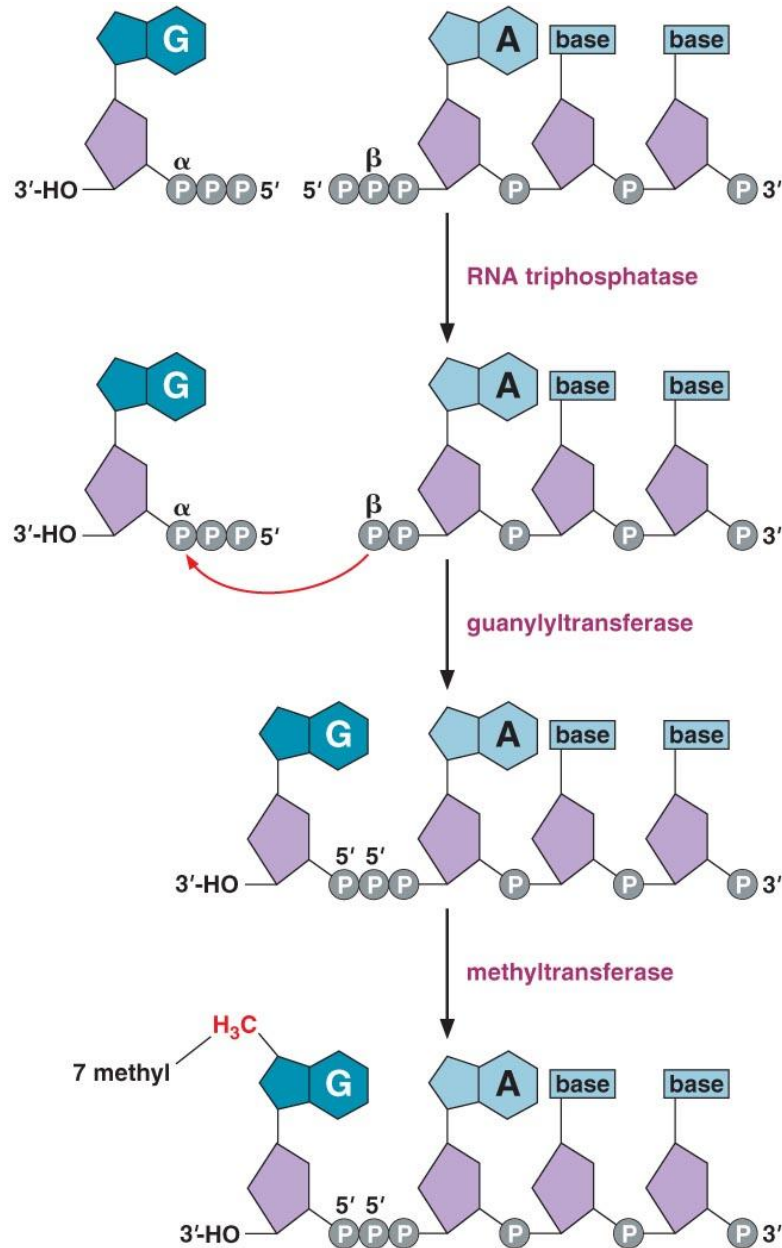
1. Adição de "cap" no 5'
2. Poliadenilação do 3'
3. Remoção dos introns (*splicing*)

Consequências:

alteração da estrutura/função do RNA ou da sequência da proteína codificada (modificam a informação codificada no código genético)



Mecanismo de adição de 5' cap

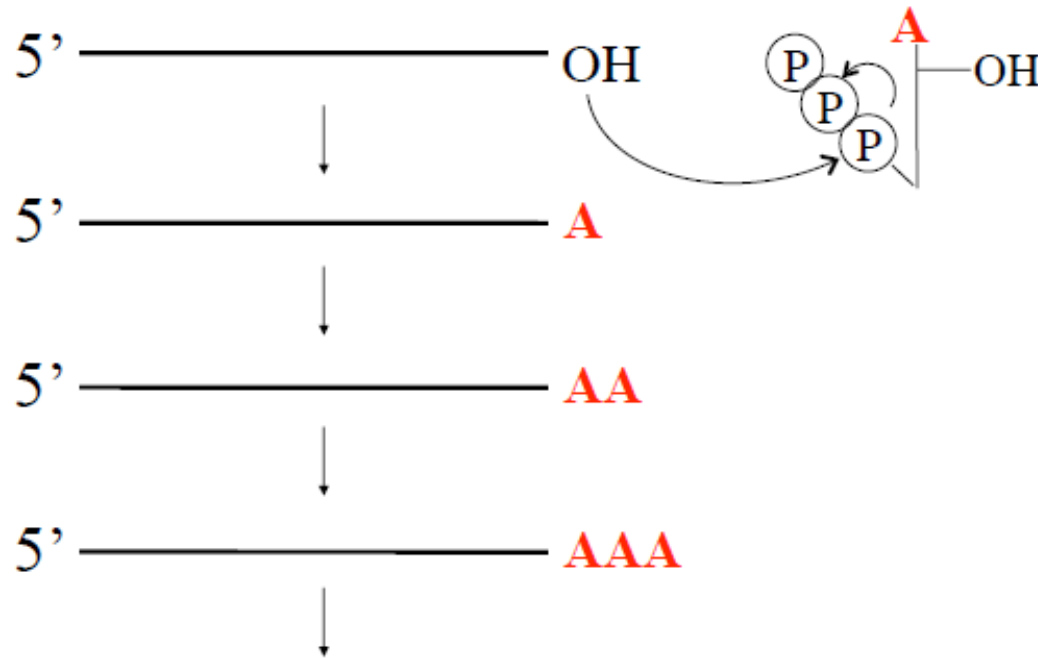


Além do 5' cap, mRNAs eucarióticos possuem uma cauda de As (cauda poli A) na extremidade 3'



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

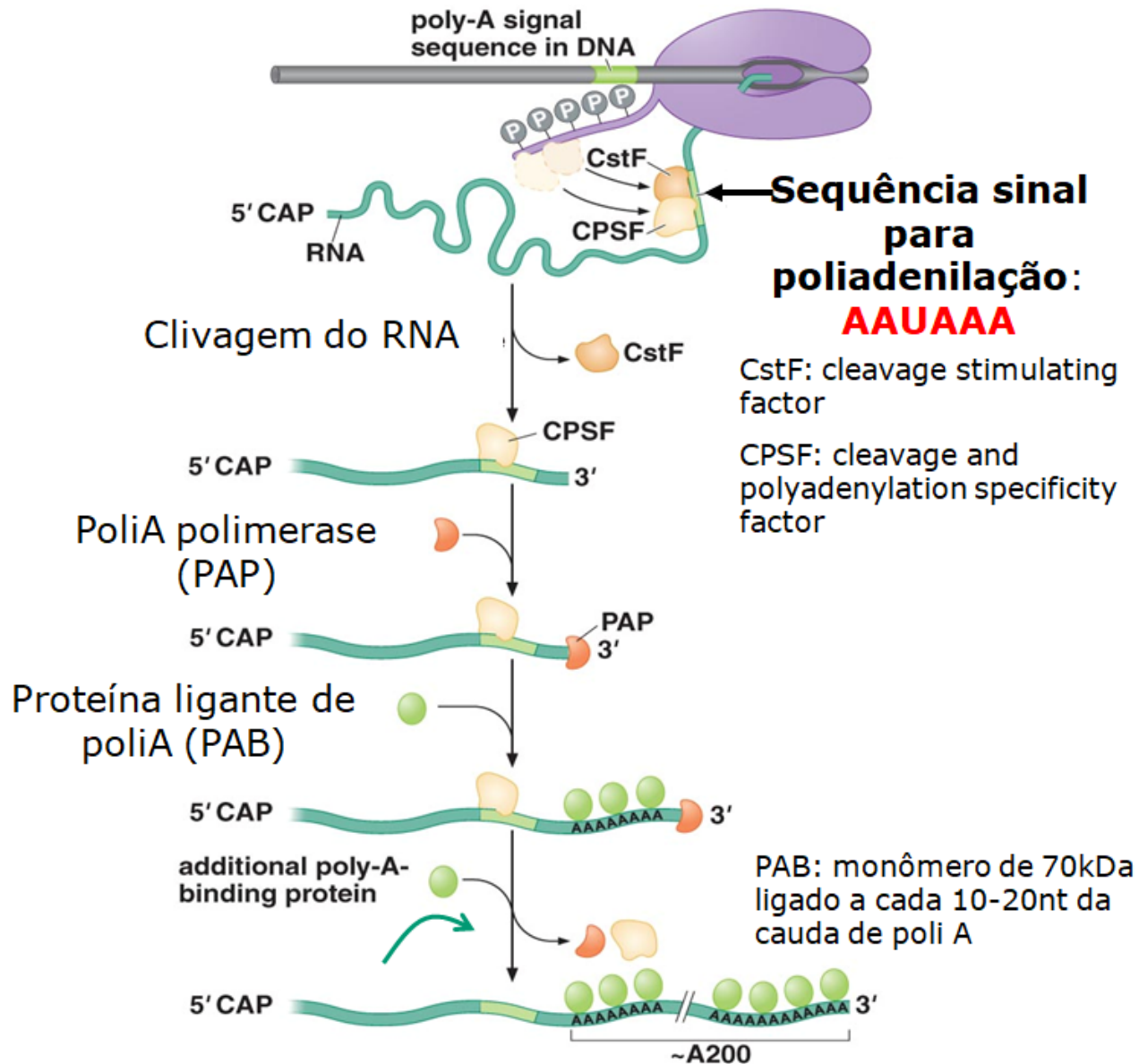
Adição de poli-A é feita pela poli-A polimerase



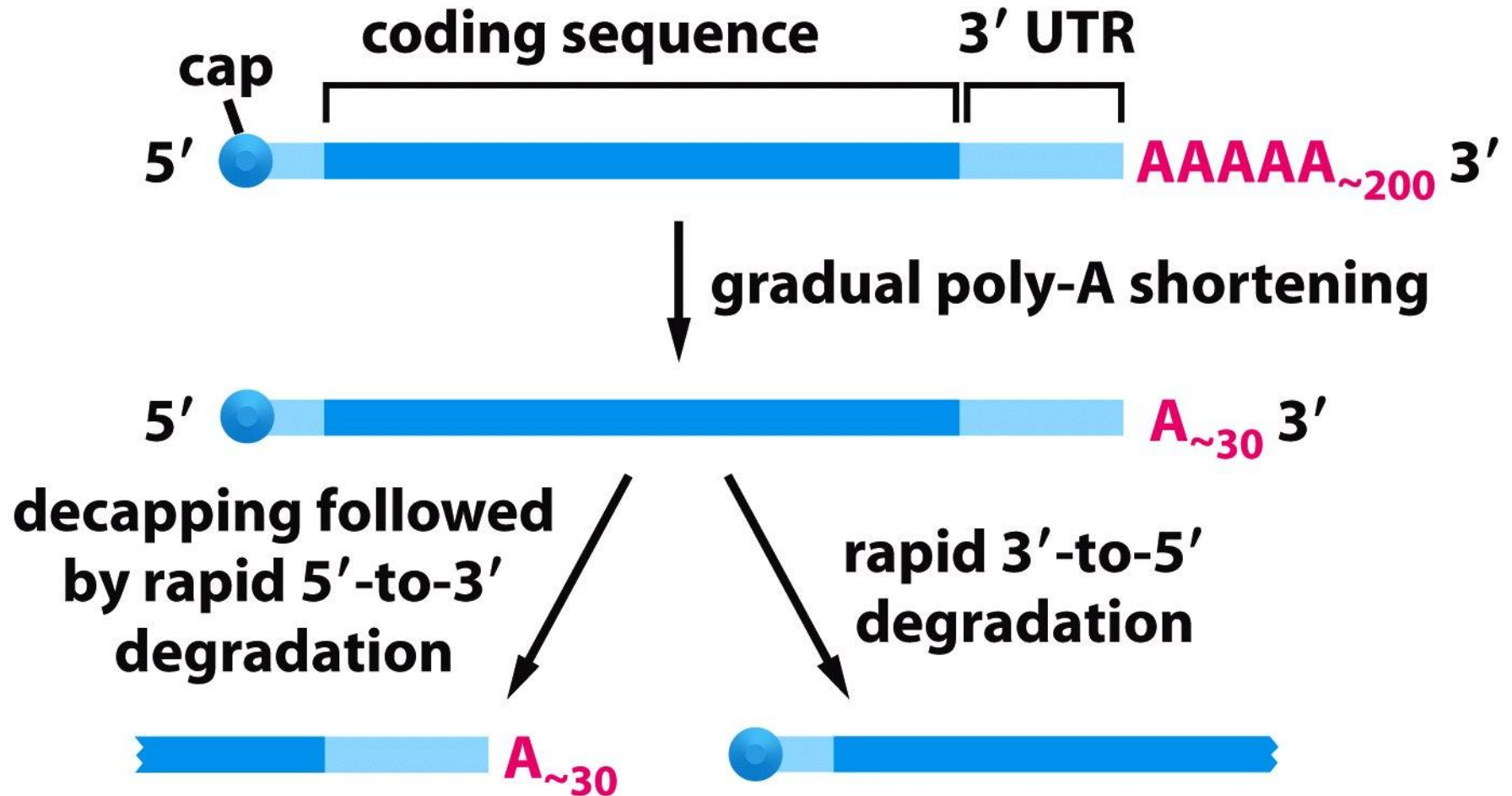
Etc....Até ~150-250 **As**

Enzima funciona **sem** molde – a cauda poli-A **não** está codificada no DNA

Mecanismo de adição da cauda poliA



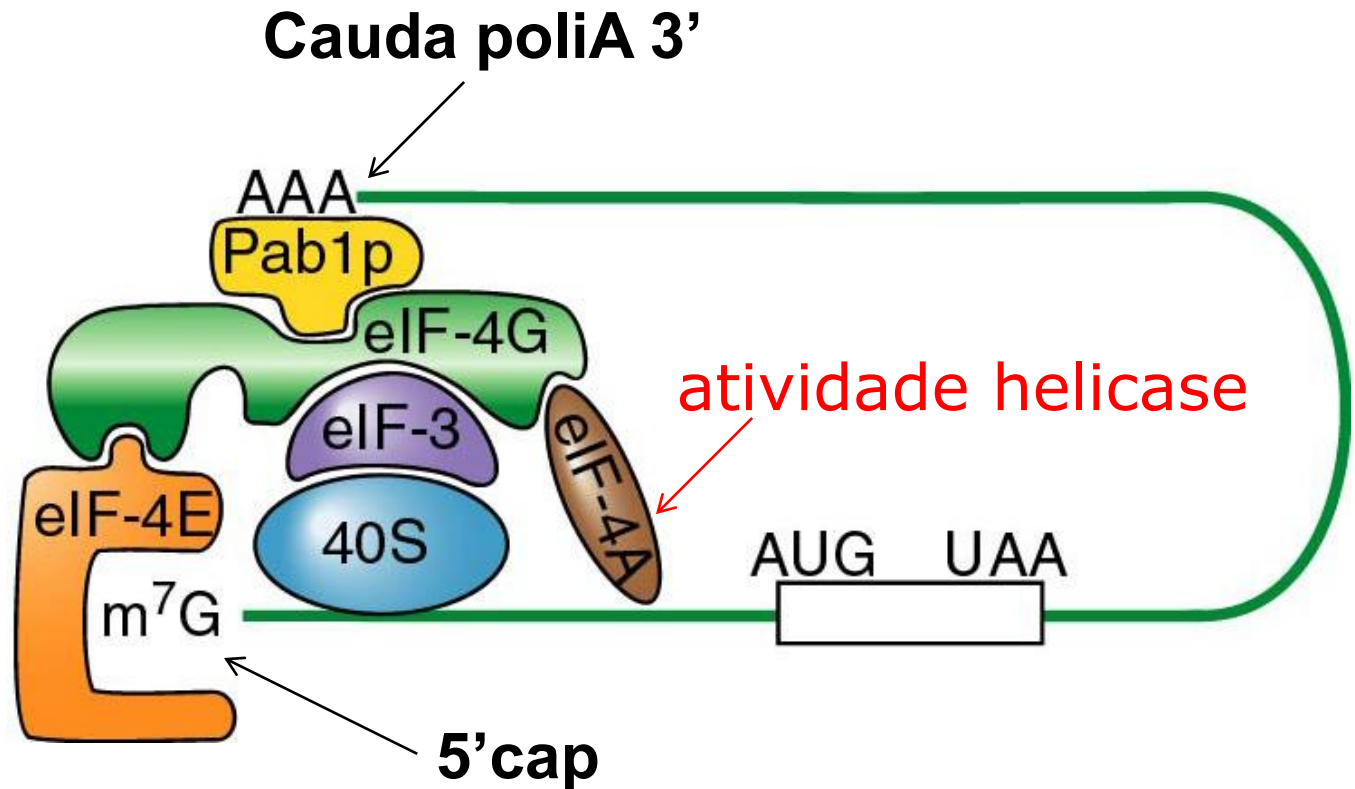
Cauda poli A e 5' Cap regulam a estabilidade do mRNA (no citoplasma)



Presença de 5'cap e cauda poliA 3' promovem a circularização do mRNA e a sua tradução

Fatores de iniciação da tradução:

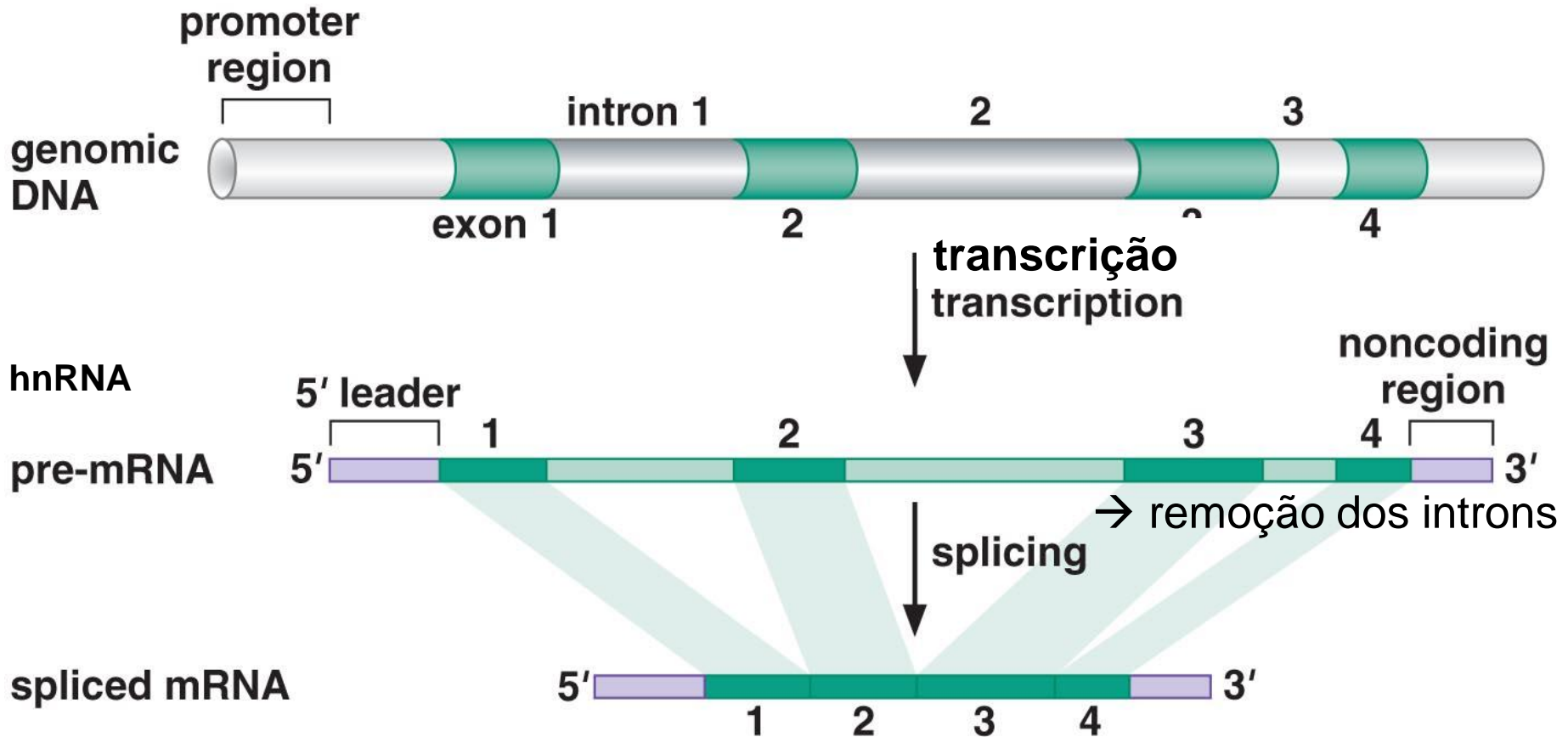
- eIF-4E
- eIF-4G
- eIF-4A
- eIF-3



Circularização do mRNA aumenta a eficiência da tradução

Além do **5' cap** e da adição da **cauda poli A** na extremidade 3', os transcritos primários tem os introns removidos. Este processamento é denominado ***splicing*** de RNA

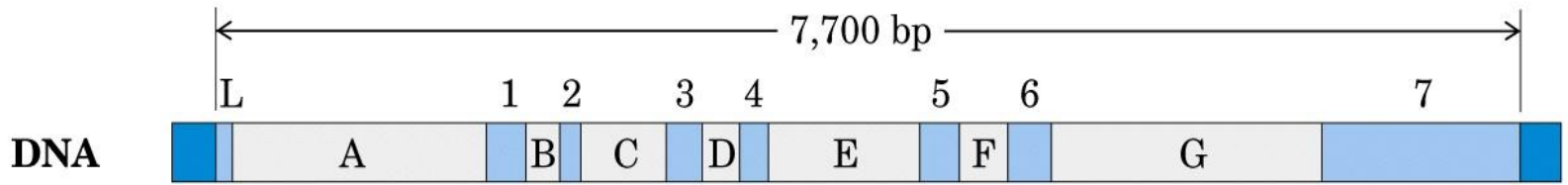
Genes eucarióticos são (em sua maioria) constituídos por exons interrompidos por introns



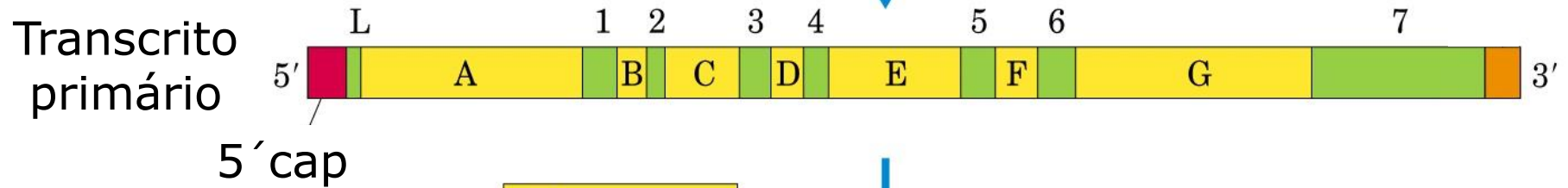
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Intron: *interrupting sequences*

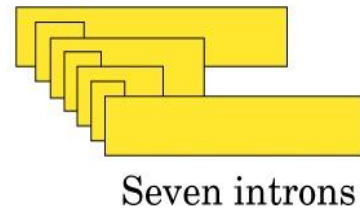
Gene X



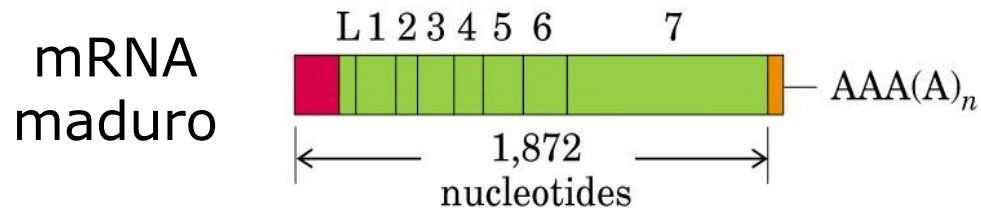
Transcrição



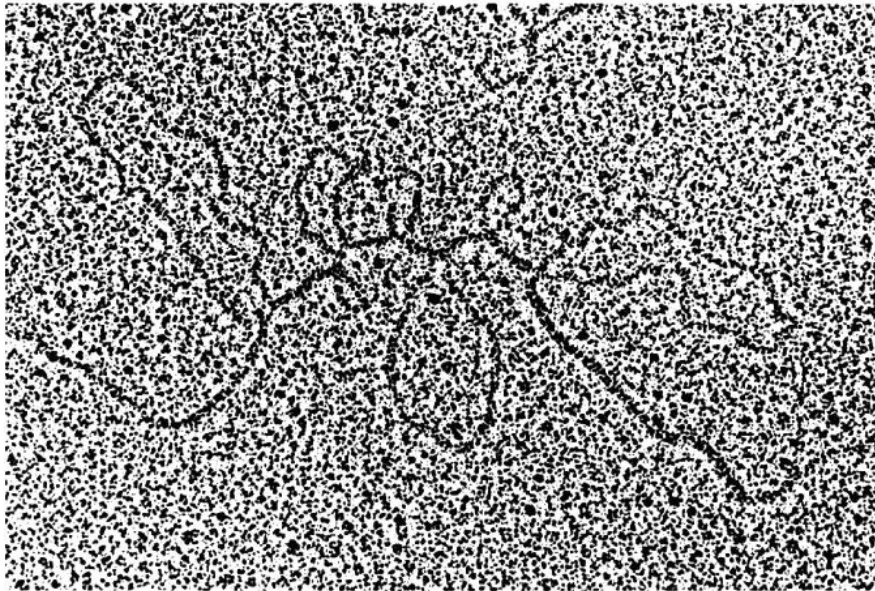
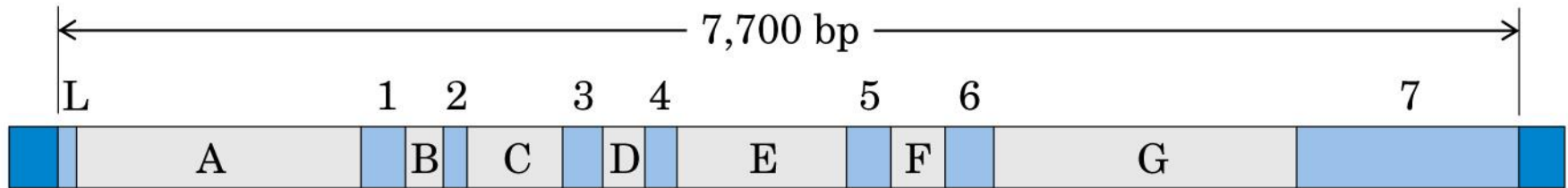
Splicing



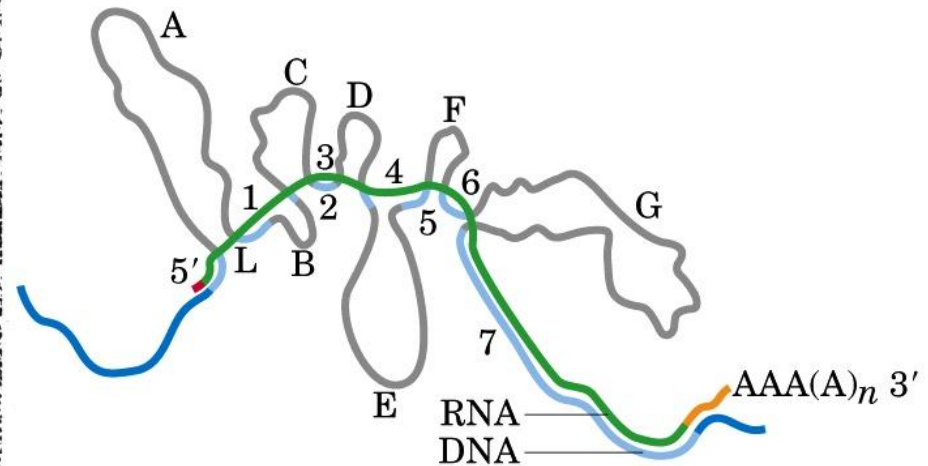
Poliadenilação



“A beautiful case of seeing is believing”



(a)



(b)

Hibridização do segmento de DNA do gene com mRNA maduro:
Observe que há segmentos que não hibridizam (não anelam)!



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993

Richard J. Roberts, Phillip A. Sharp

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993

Nobel Prize Award Ceremony

Richard J. Roberts

Phillip A. Sharp



Richard J. Roberts



Phillip A. Sharp

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993 was awarded jointly to Richard J. Roberts and Phillip A. Sharp *"for their discoveries of split genes"*

O número e o tamanho dos introns nos genes humanos é bastante variável (100pb até >30kpb)

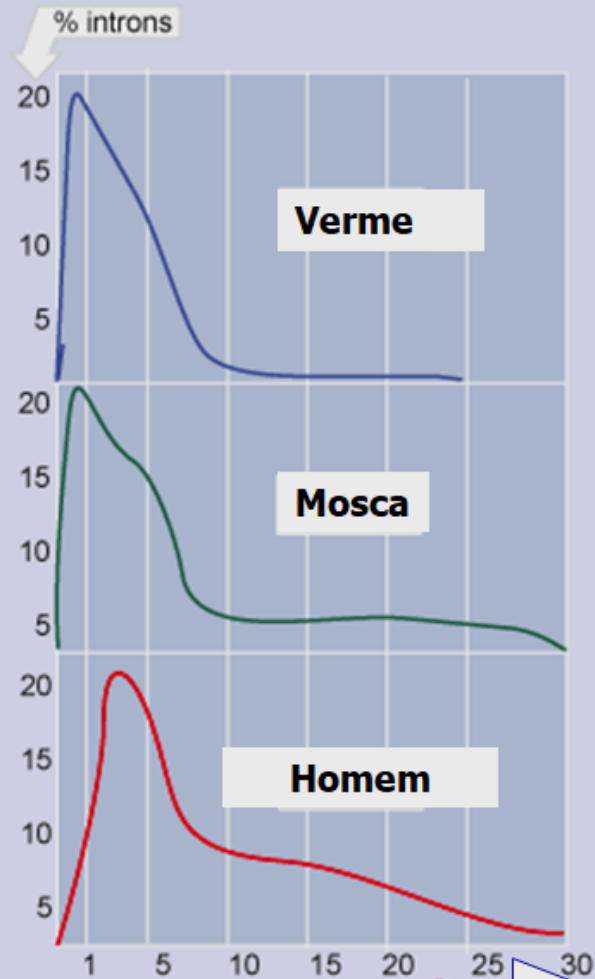
Gene da diidrofolato-redutase: 31 kpb

- 5 introns, que compreendem 29 dos 31 kb do gene
- sequência codificante representa apenas $\sim 7\%$ do gene

Gene da titina: 363 introns

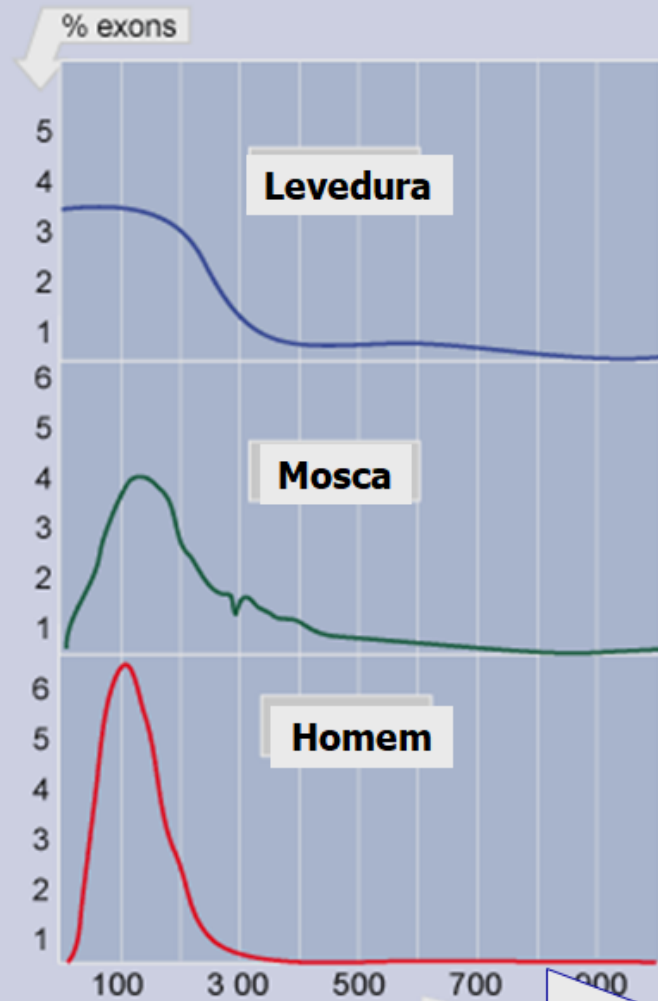
Exon típico tem $\sim 150-200$ pb

Introns tem tamanho muito variável



Tamanho do intron em kpb

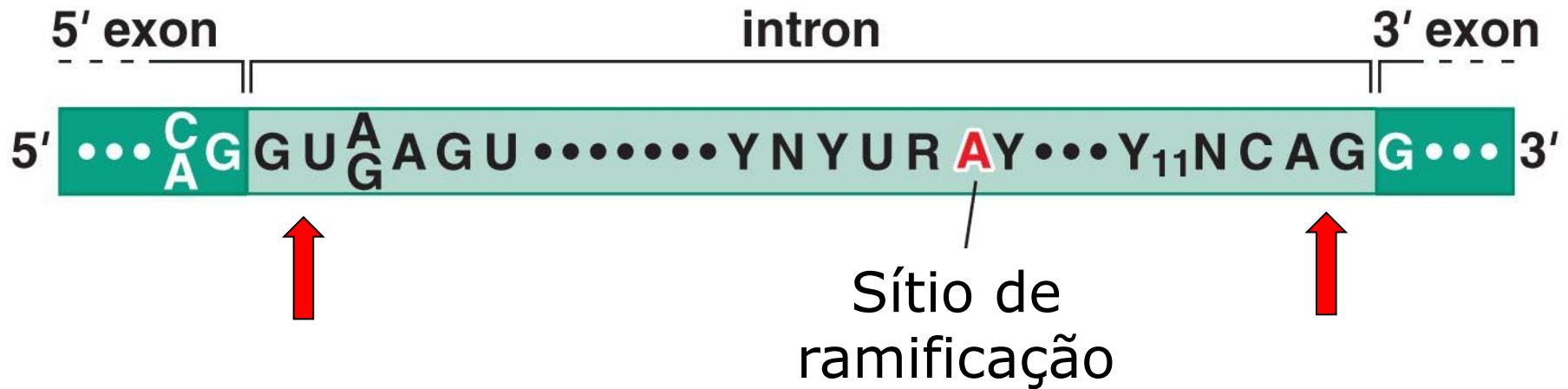
Exons tem tipicamente 100-200 pb



Tamanho do exon em nucleotídeos

Mecanismo de *splicing*

As bordas exon-intron exibem sequências conservadas



Bases conservadas dirigem a maquinaria de splicing.
A maioria das bases conservadas fica dentro do intron.
Sinais mais importantes:

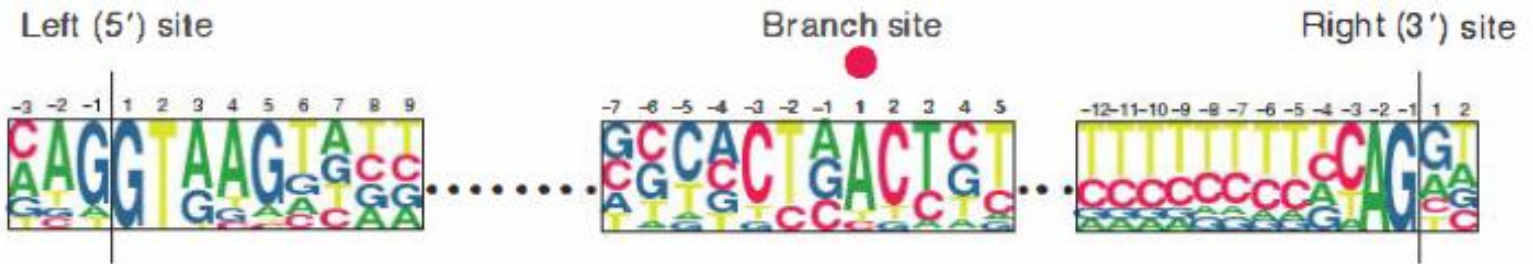
- GU no sítio 5'
- AG no sítio 3'
- A no sítio de ramificação

98% das junções de splicing seguem a regra GU/AG

Maior parte dos genes possui sinais de *splicing* conservados

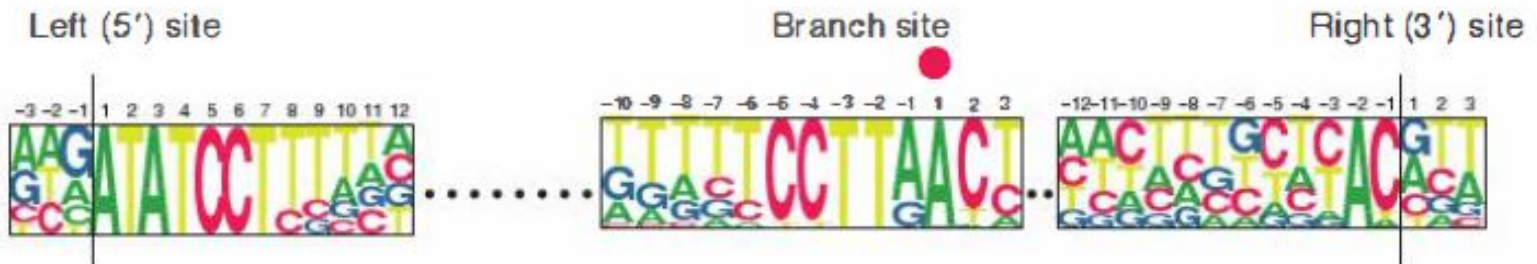
> 97% dos introns

Splicing signals for major (U2-type or GU-AG) introns



< 3%

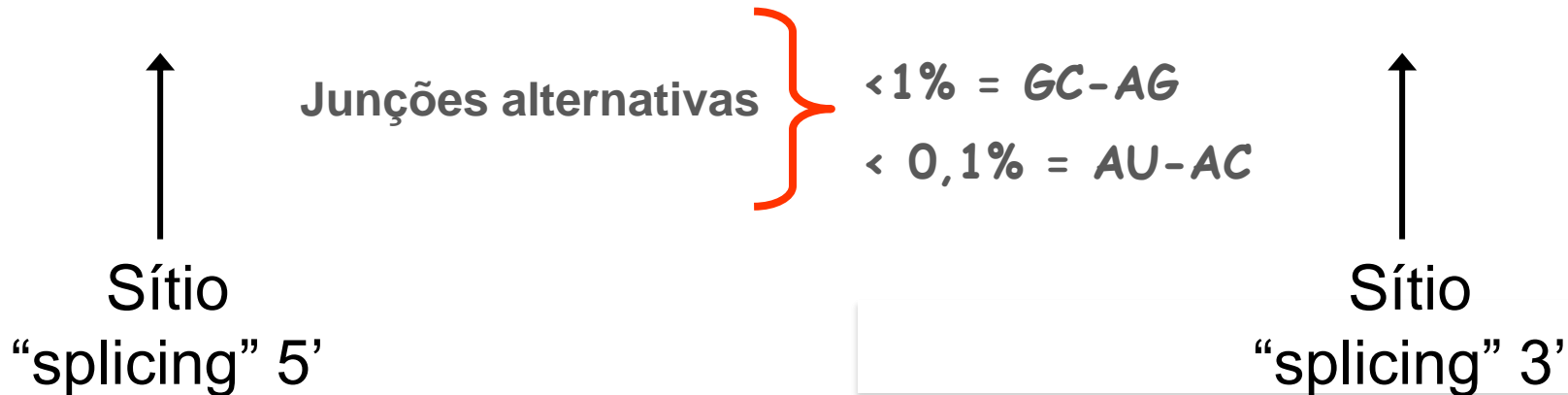
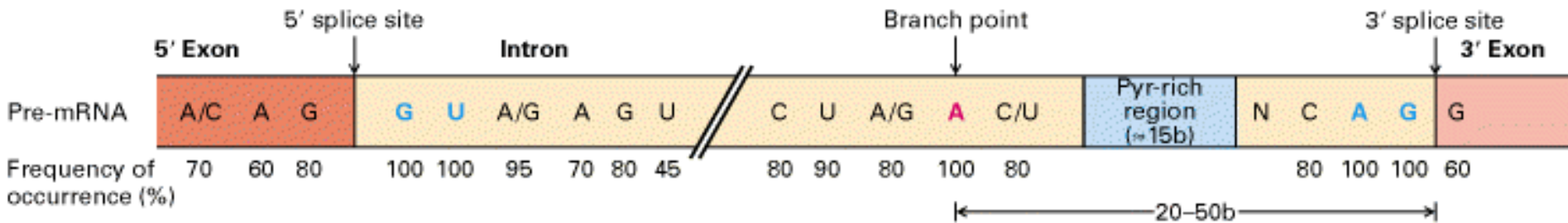
Splicing signals for minor (U12-type or AU-AC) introns



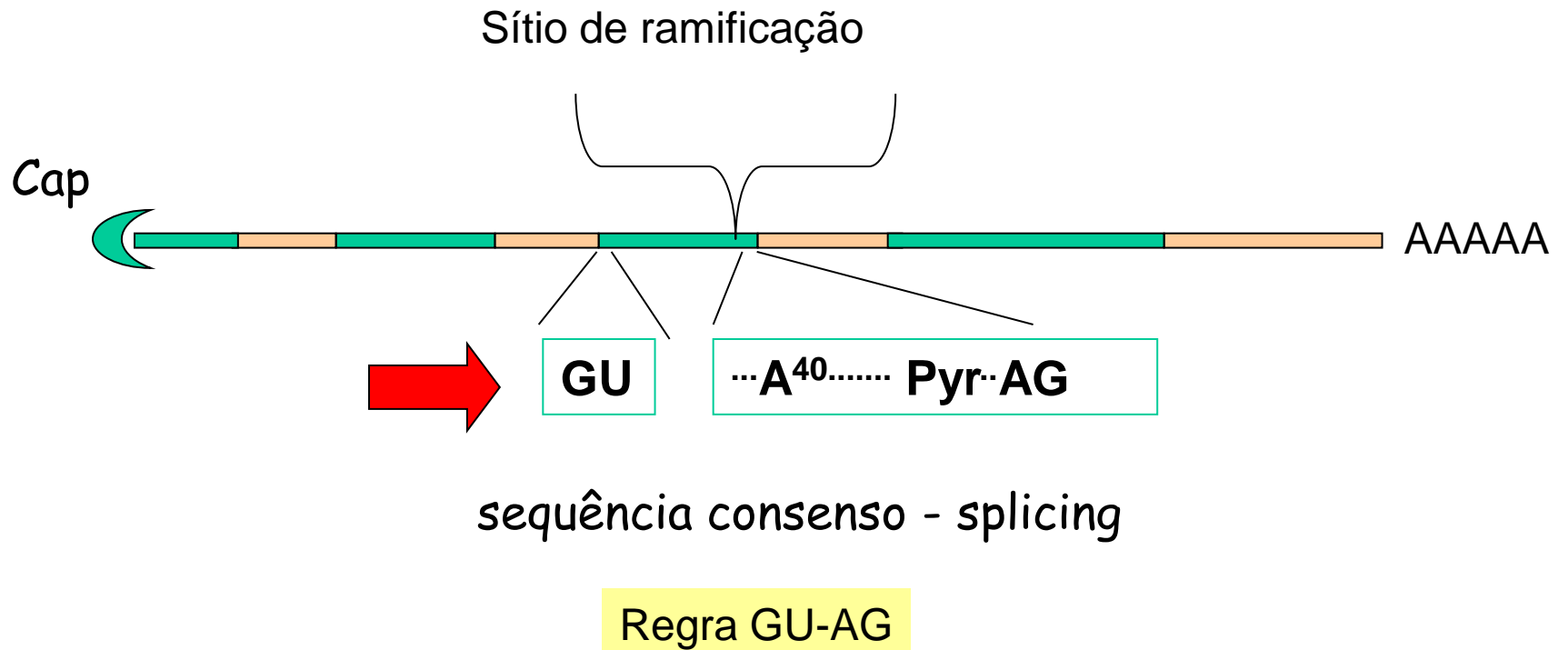
Estrutura típica de bordas exon-intron em um gene eucarioto

Existem sequências consenso em uma molécula de RNA que sinalizam o começo e o final da maioria dos introns

Regra GU-AG - 98% das junções de splicing no genoma humano



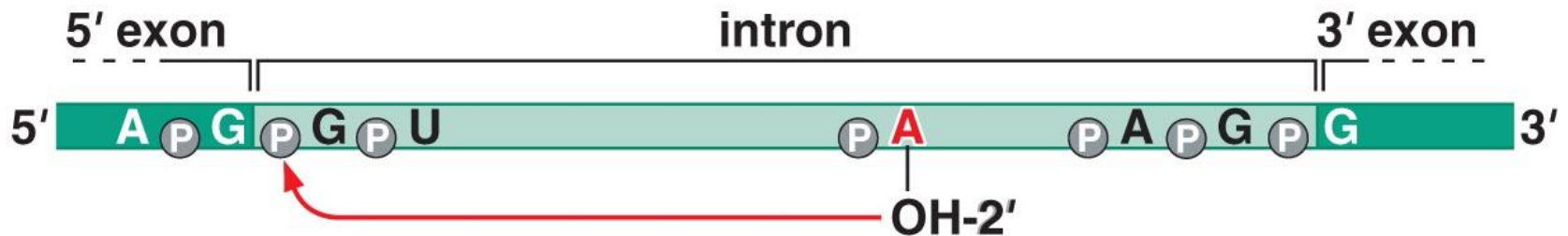
Estrutura típica de bordas exon-intron em um gene eucarioto



O processo de *splicing* envolve 2 reações de transesterificação:

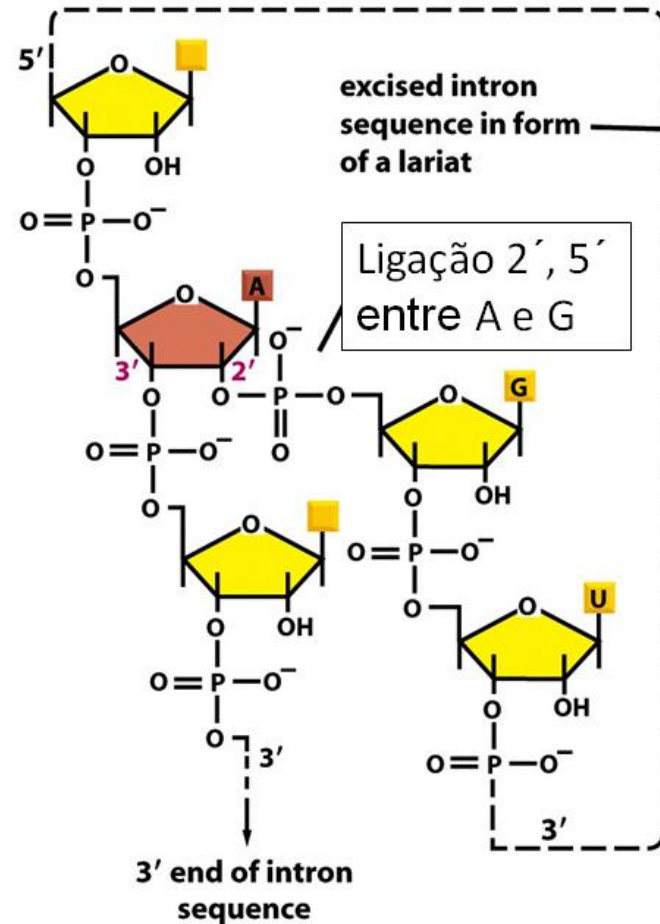
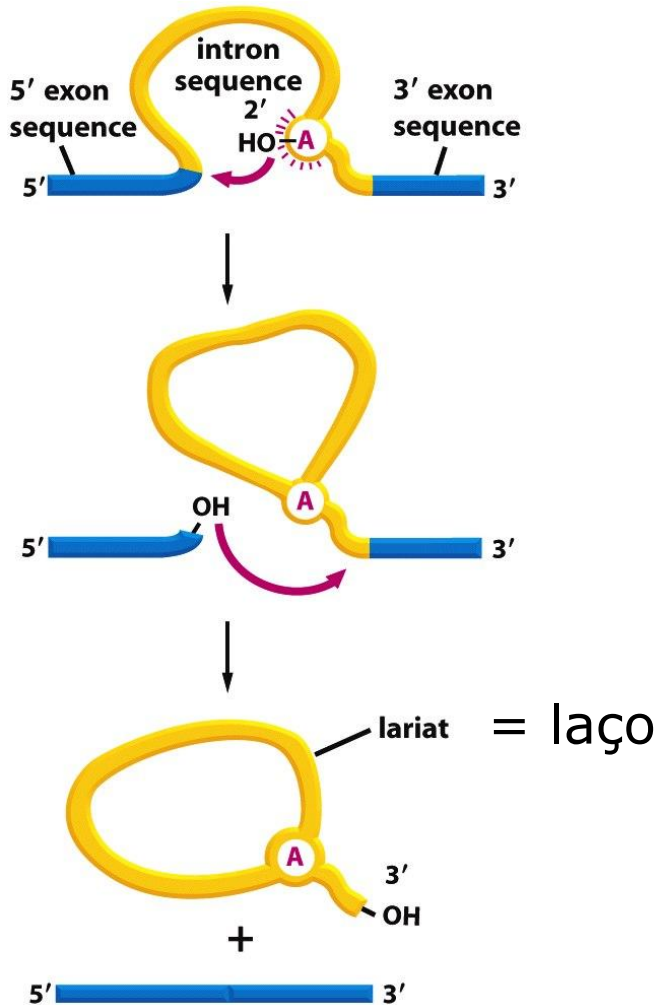
1ª reação:

O 2' OH da A do ponto de ramificação ataca o grupo fosforil da G no sítio 5' de splicing.



A ligação covalente 2', 5' entre o G do sítio de splicing e o A do ponto de ramificação faz com que o intron adote uma estrutura em alça característica chamada "lariat" ou laço.

O processo de *splicing* envolve 2 reações de transesterificação na remoção do intron e junção dos exons



Introns podem ser removidos através de diferentes mecanismos de “splicing”

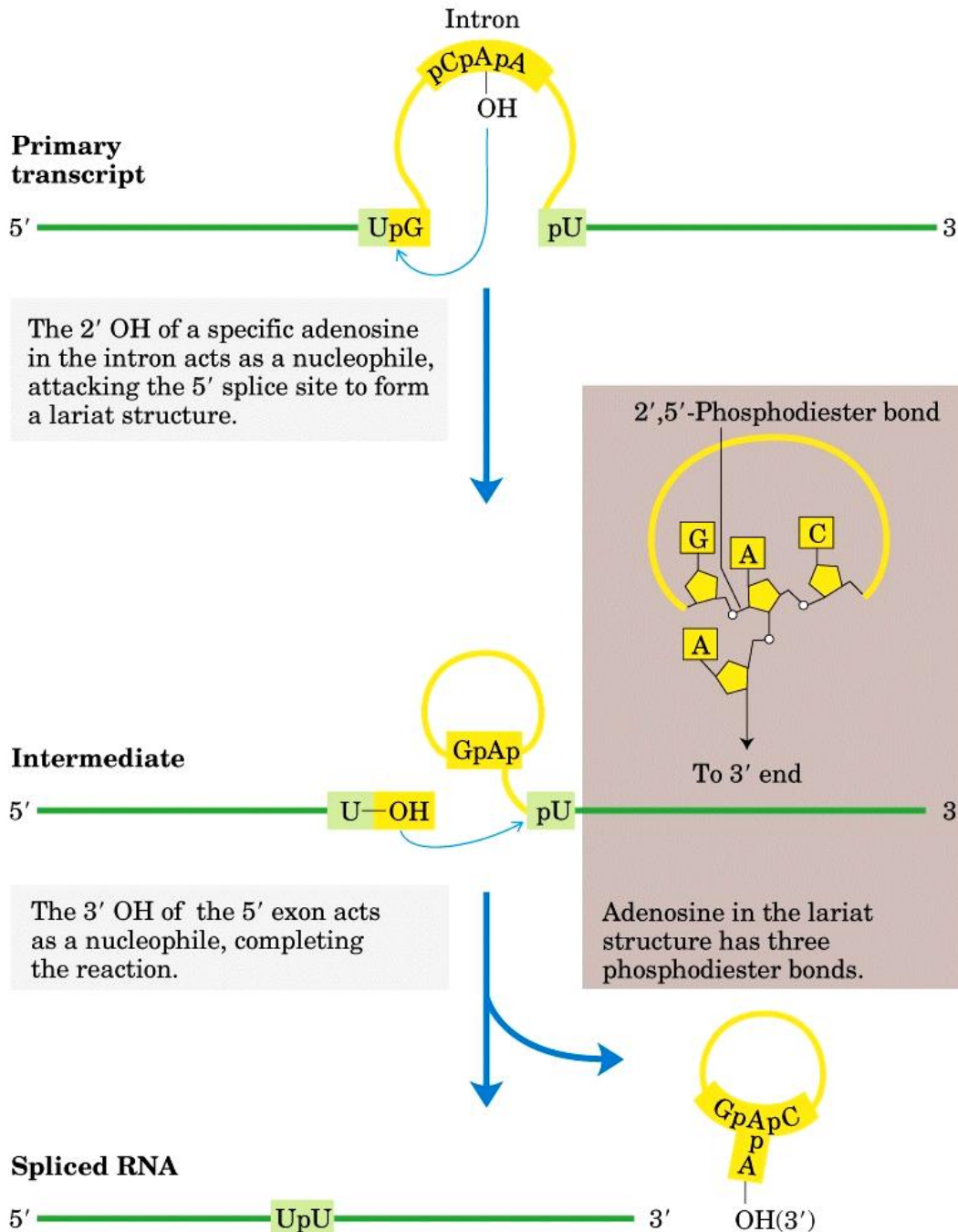
- **“Splicing” auto-catalizado:**

Introns grupo I e II (procariotos e eucariotos)

- **“Splicing” assistido por complexo ribonucleoprotéico (spliceossomo) = “splicing” nuclear**

Introns nucleares ou spliceossomais (exclusivamente em eucariotos)

Auto-splicing: introns do grupo II

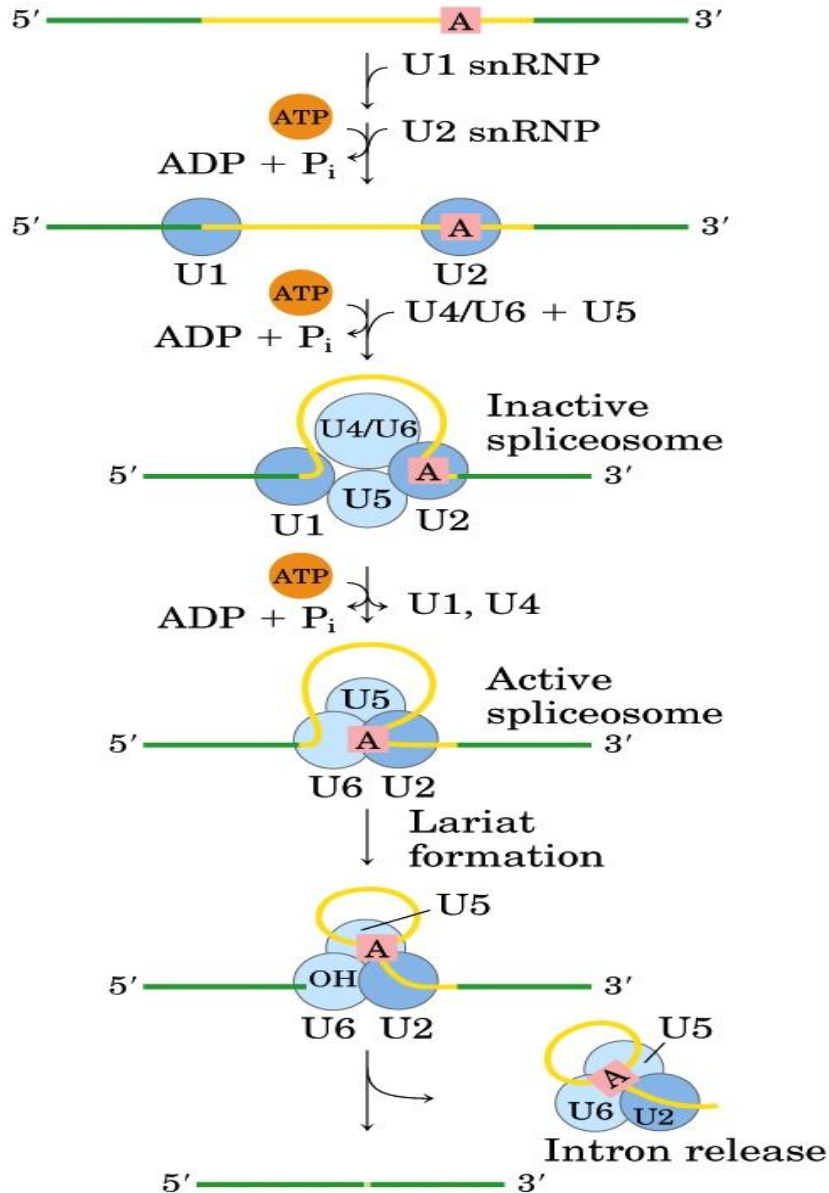


Presentes em mRNAs de bactérias e vírus.
Em eucariotos presente em mRNAs de organelas (mitocôndria e cloroplasto).

Adenosina presente no intron atua como agente nucleofílico na 1ª reação de transesterificação

Resulta na formação do RNA maduro e uma estrutura circularizada contendo os introns (lariats)

Introns sem auto-splicing

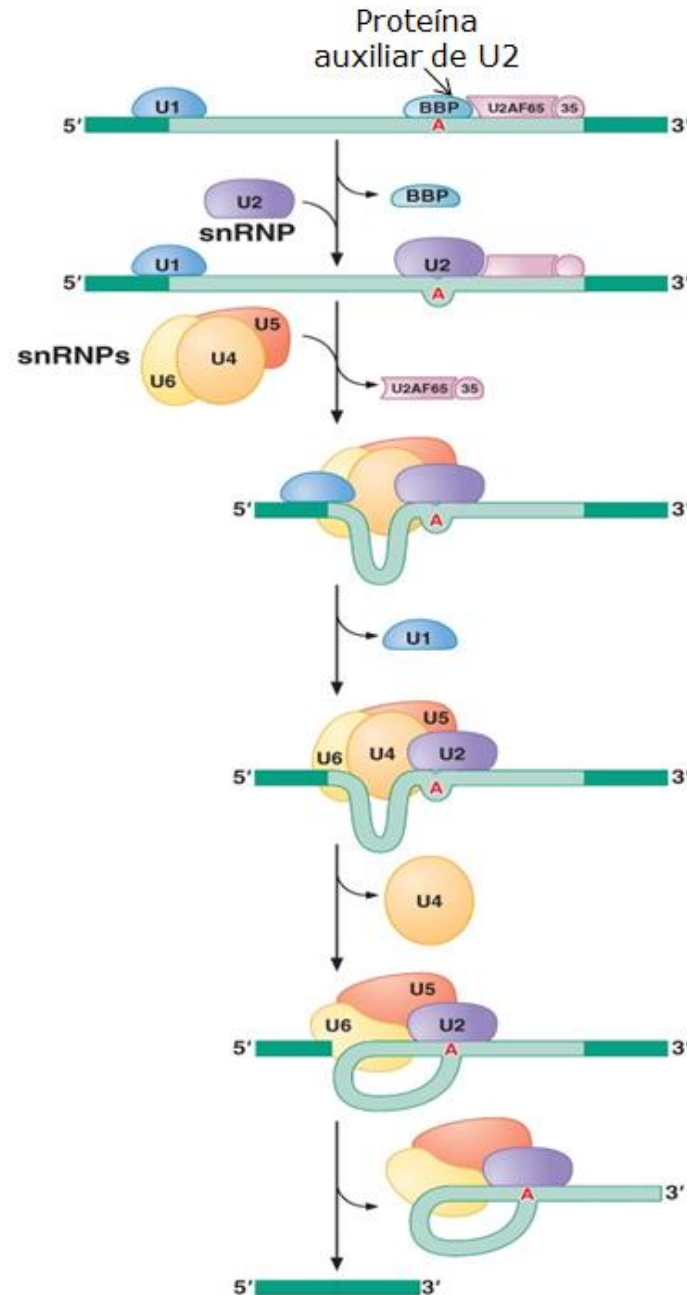


- Classe mais numerosa de introns
- **Presentes em mRNAs de eucariotos**
- Remoção de introns realizada por “**spliceossomos**”.
- Spliceossomos são complexos supra-moleculares formados pela associação de pequenas ribonucleoproteínas (snRNPs – “small nuclear ribonucleoproteins”))
- Processo que consome energia (ATP)

snRNPs: U1, U2, U4, U5 e U6

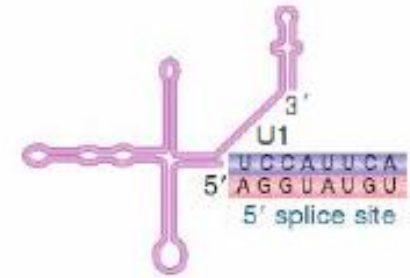
O spliceossomo é capaz de:

- Reconhecer o sítio 5' de splicing e o sítio de ramificação
- Aproximar estes sítios no momento correto
- Catalisar as reações de quebra e ligação do RNA
- O sítio catalítico (U6+U2) só é formado durante a montagem do spliceossomo

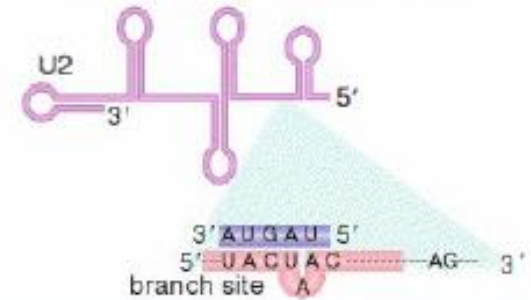


Complementaridade entre sequencias primárias de snRNAs são críticas para o posicionamento correto do spliceosomo e mudanças conformacionais que acontecem ao longo do *splicing*

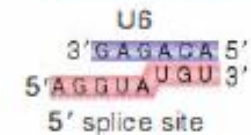
U1 pairs with the 5' splice site



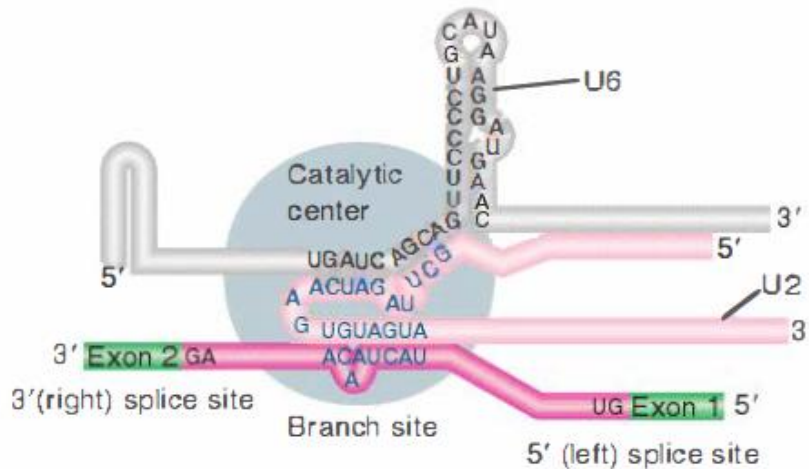
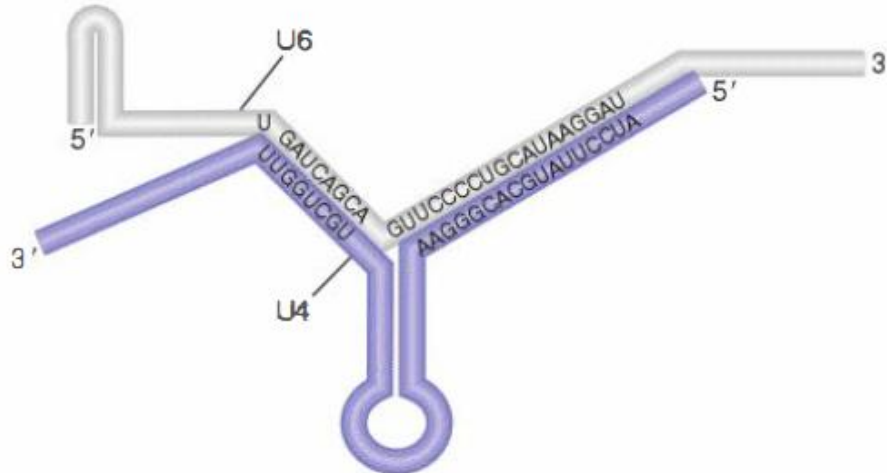
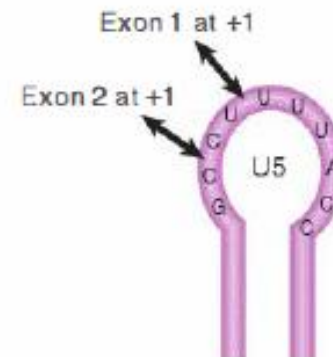
U2 pairs with the branch site



U6 pairs with the 5' splice site

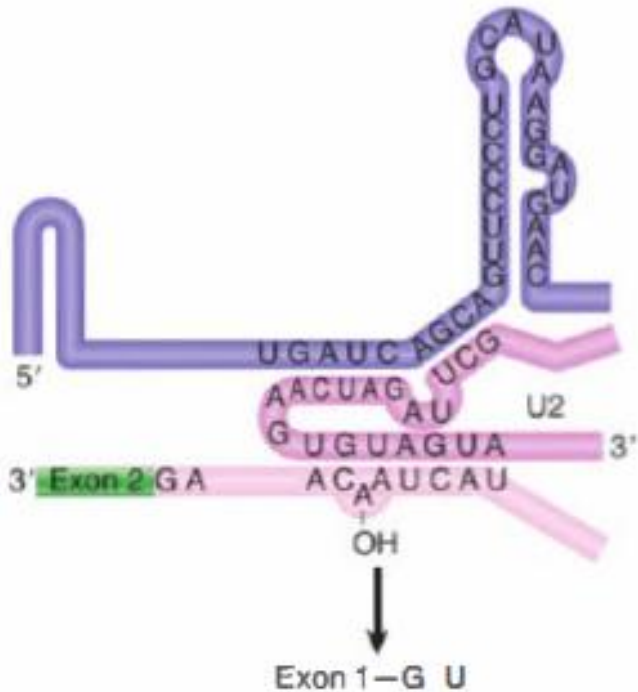


U5 is close to both exons

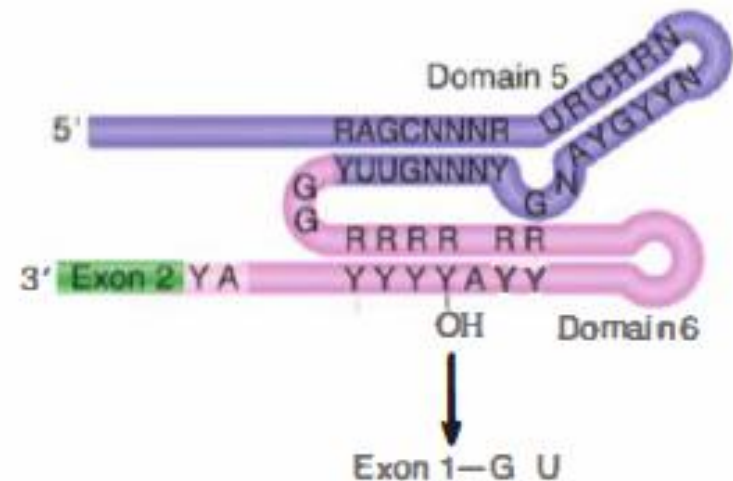


Splicing catalizado pelo spliceosoma e splicing autocatalizado (Tipo II) envolvem a formação de estruturas secundárias semelhantes

Nuclear splicing constructs an active site from pairing between U6-U2 and U2 intron



Group II splicing constructs an active center from the base-paired regions of domains 5 and 6

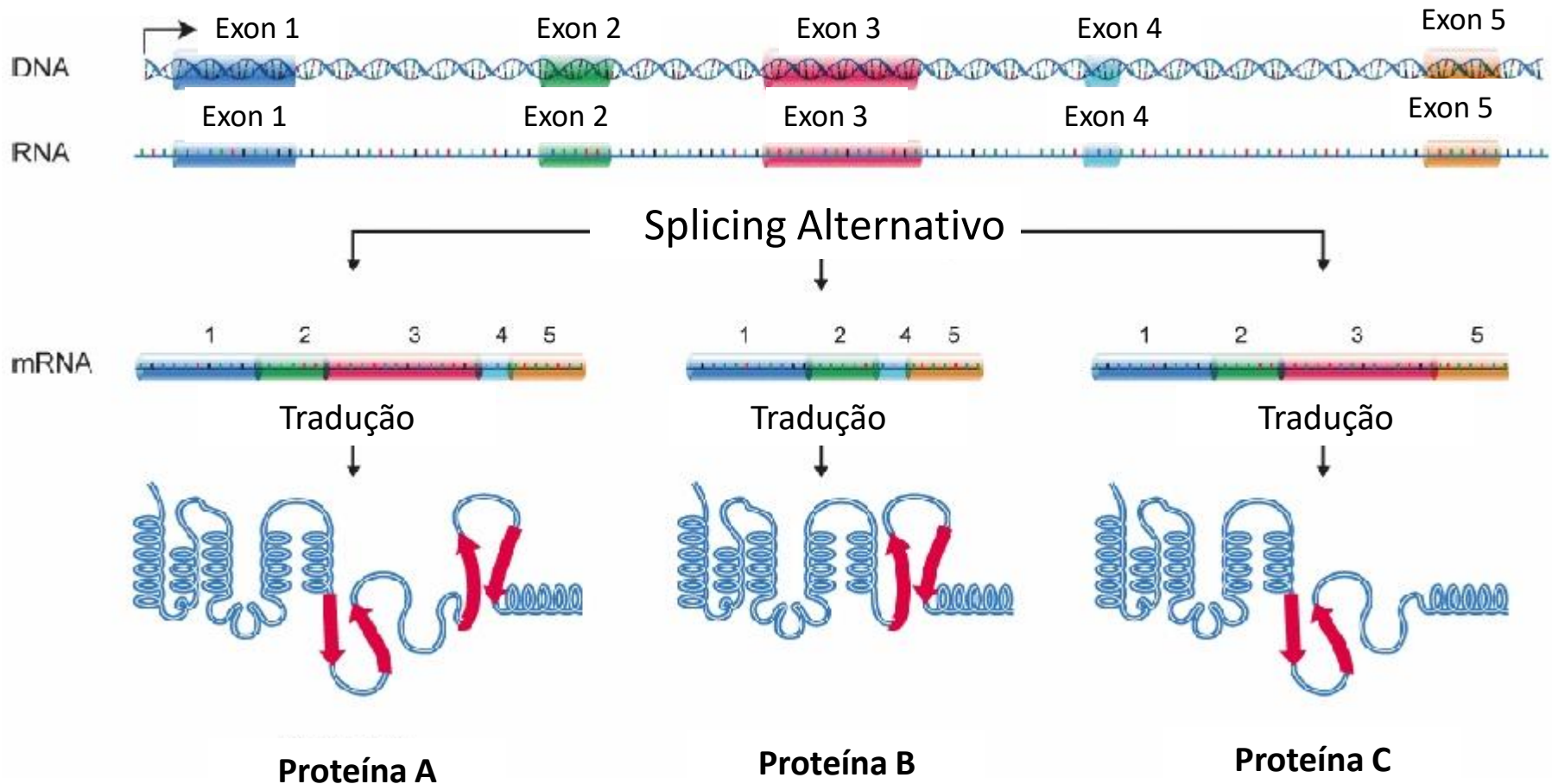


Y = pirimidina (C ou T)

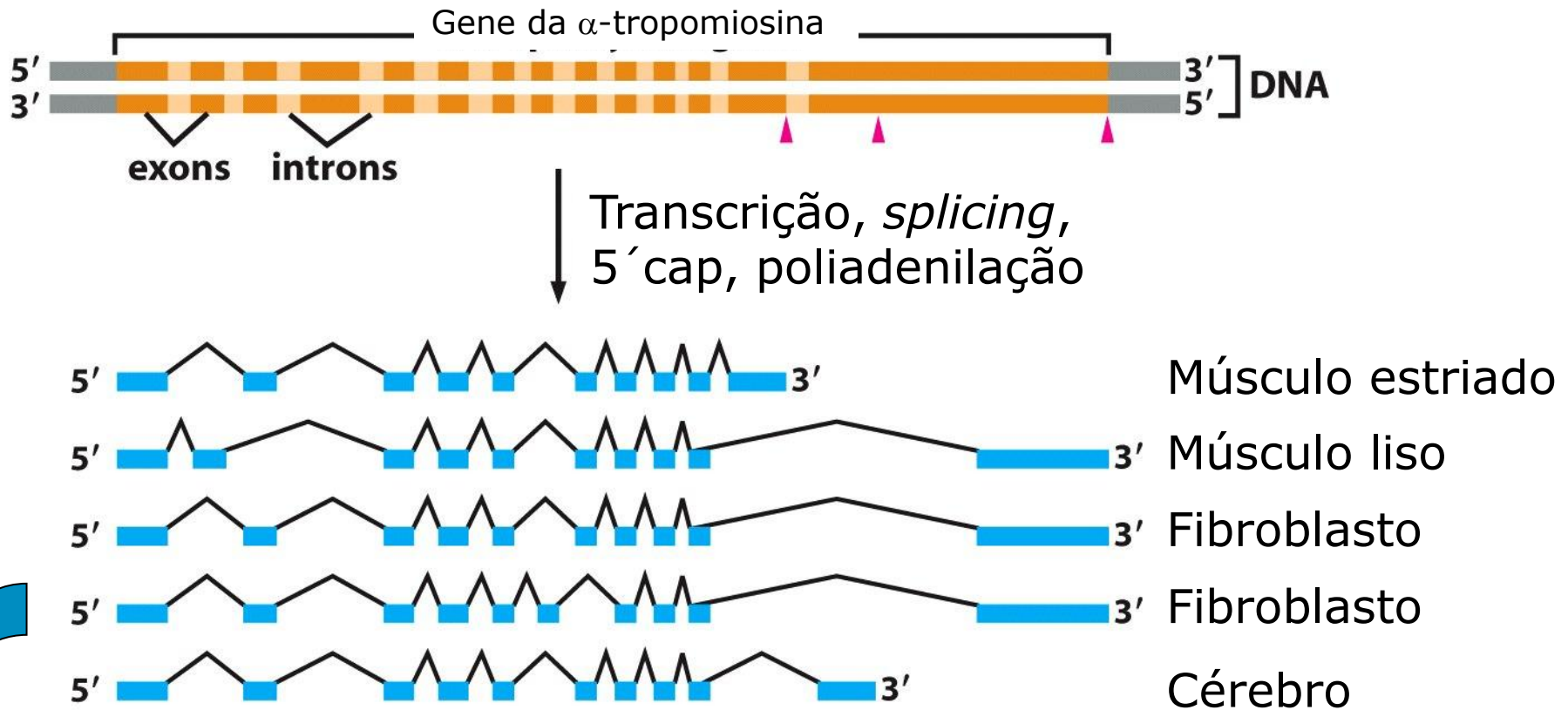
Coorobora a hipótese de que o spliceosoma tenha evoluído nos eucariotos a partir de introns auto-catalíticos

Splicing Alternativo

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



Splicing Alternativo causa variabilidade na sequencia do RNA



Isoformas de mRNAs ou variantes de *splicing*

A maioria (92-94%) dos genes humanos apresentam *splicing* alternativo!!!

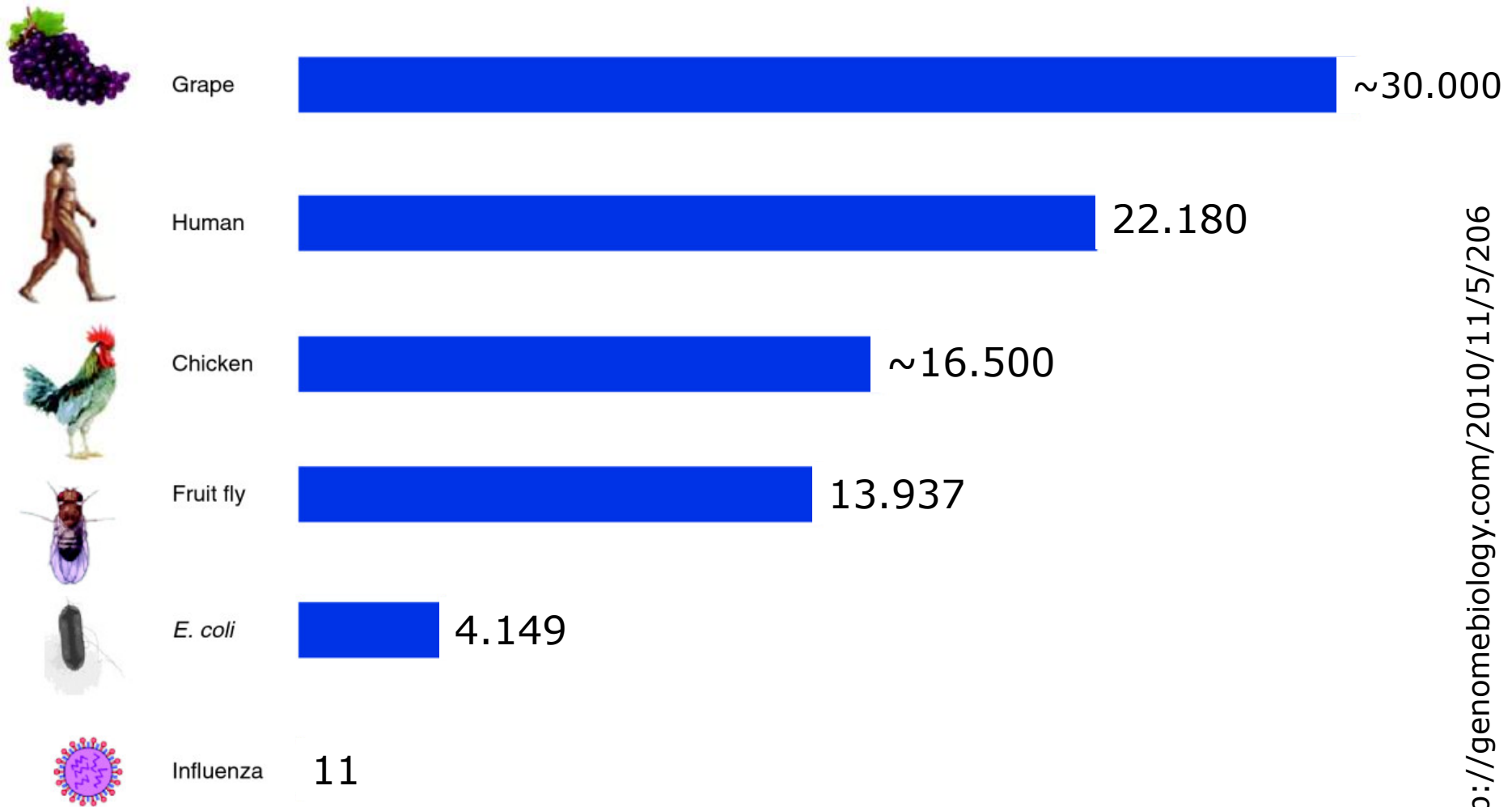
~~Um gene → um transcrito~~

Splicing alternativo



Um gene → múltiplos transcritos
(isoformas ou variantes)

Número de genes codificadores de proteínas em diferentes genomas



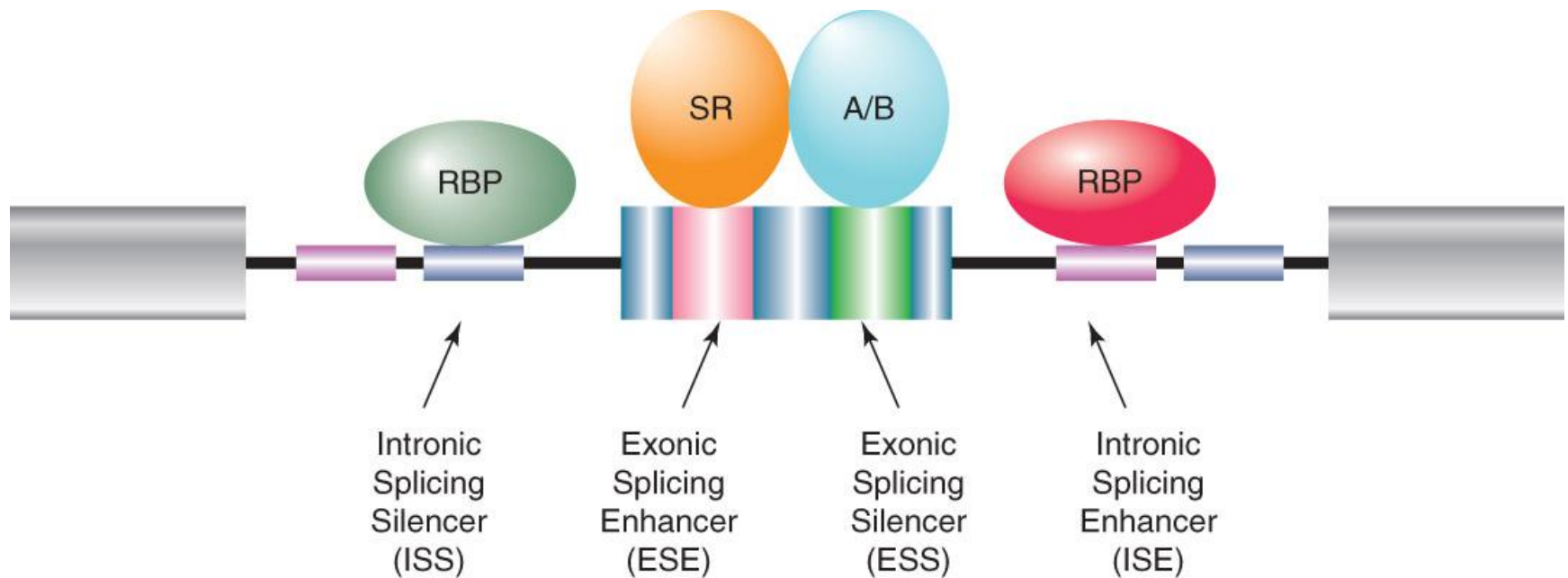
Splicing alternativo seria a solução para explicar maior complexidade dos seres humanos?

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

Como é feita a escolha dos sítios de splicing?

Sequências exônicas e intrônicas no RNA são alvos de fatores protéicos que modulam a seleção dos sítios de *splicing*.



Exemplo 1: Silenciador de *splicing* exônico

Tipo celular 1

Tipo celular 2

primary RNA transcript

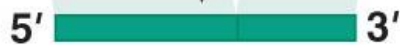


splicing machinery



primary RNA transcript

spliced mRNA



repressor

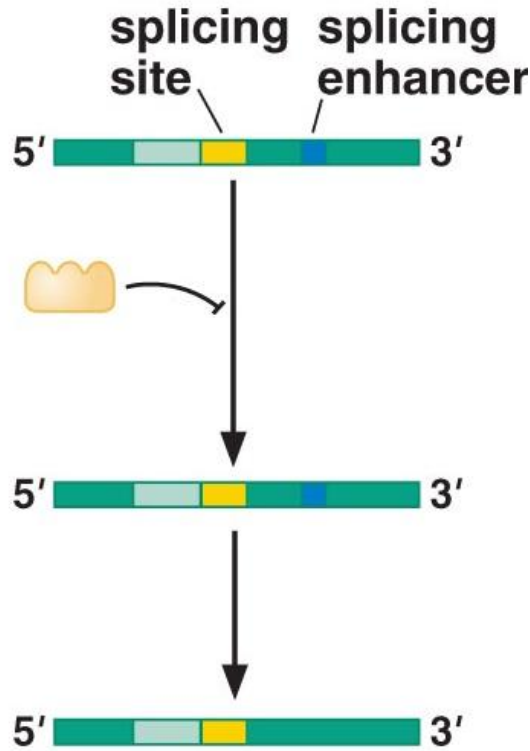


5' 3' unspliced

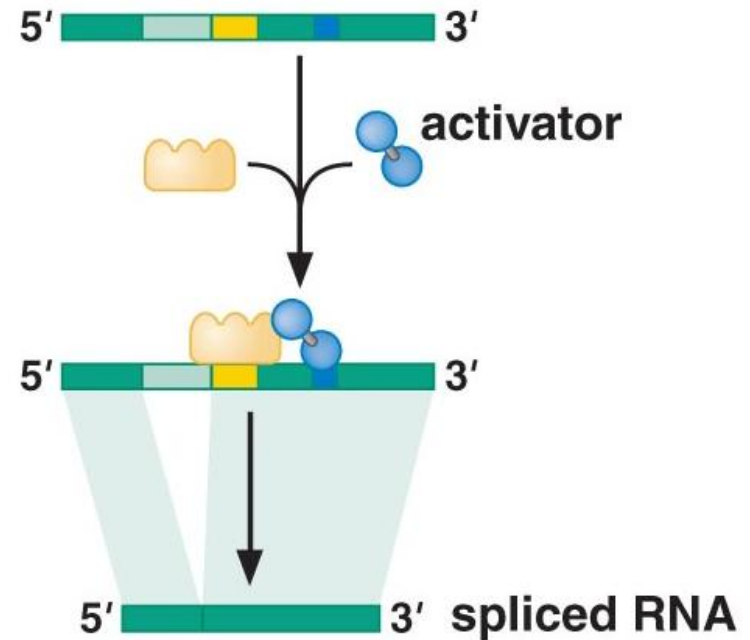


Exemplo 1: Ativador de splicing exônico

Tipo celular 1



Tipo celular 2



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

Muitos dos sítios de splicing alternativos são "fracos" (sítios cripticos) e precisam ser reconhecidos por proteínas que ativem a sua utilização no splicing.