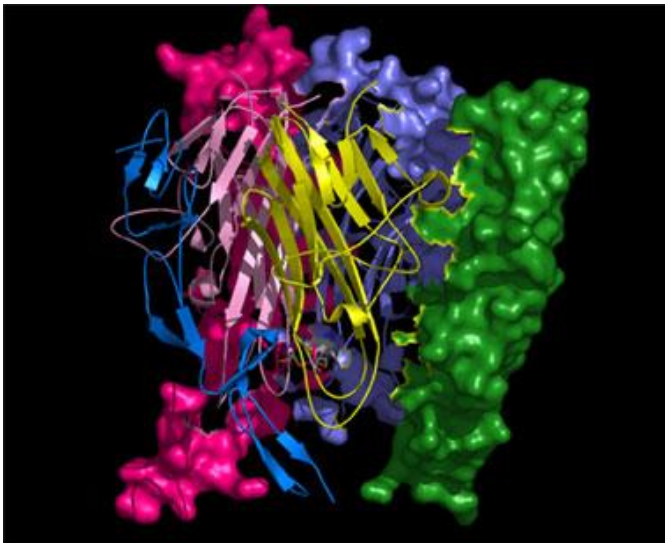


Expressão Gênica – Transcrição 2

Wellington Luiz de Araújo

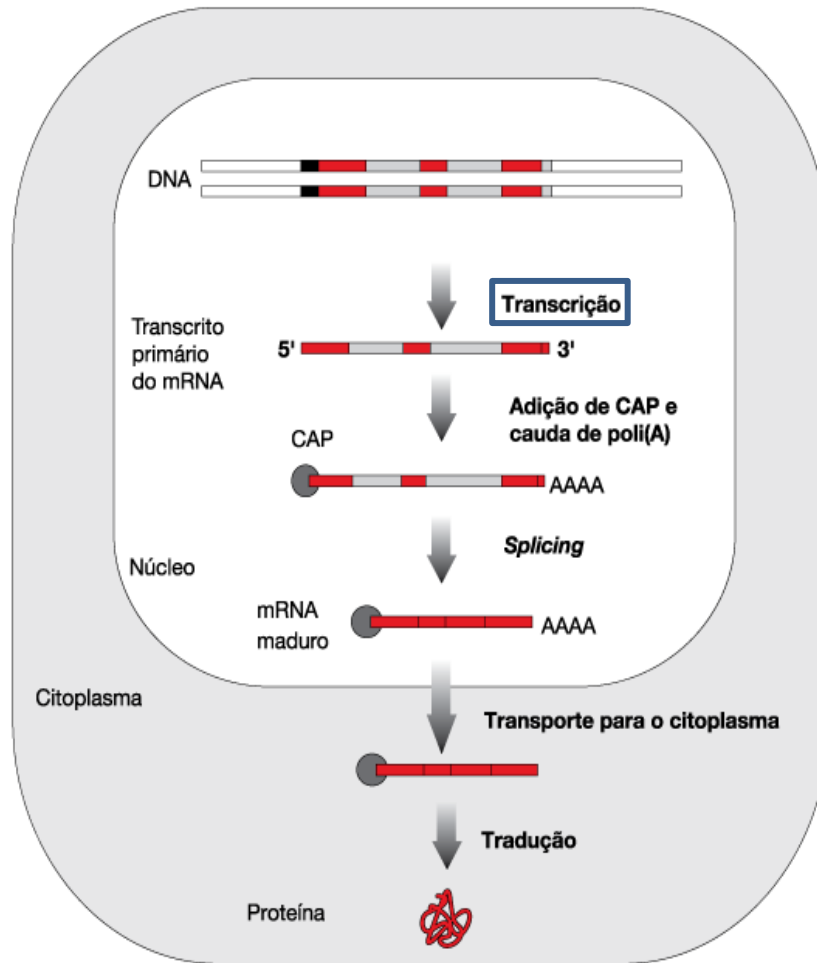
wlaraujo@usp.br



O que é a transcrição, quando se está falando em expressão de genes?

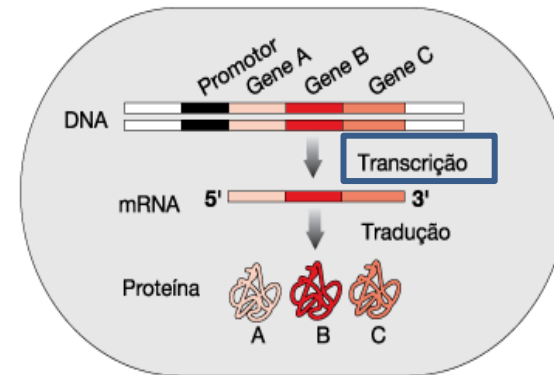
O fluxo da informação em sistemas biológicos

Eucariotos

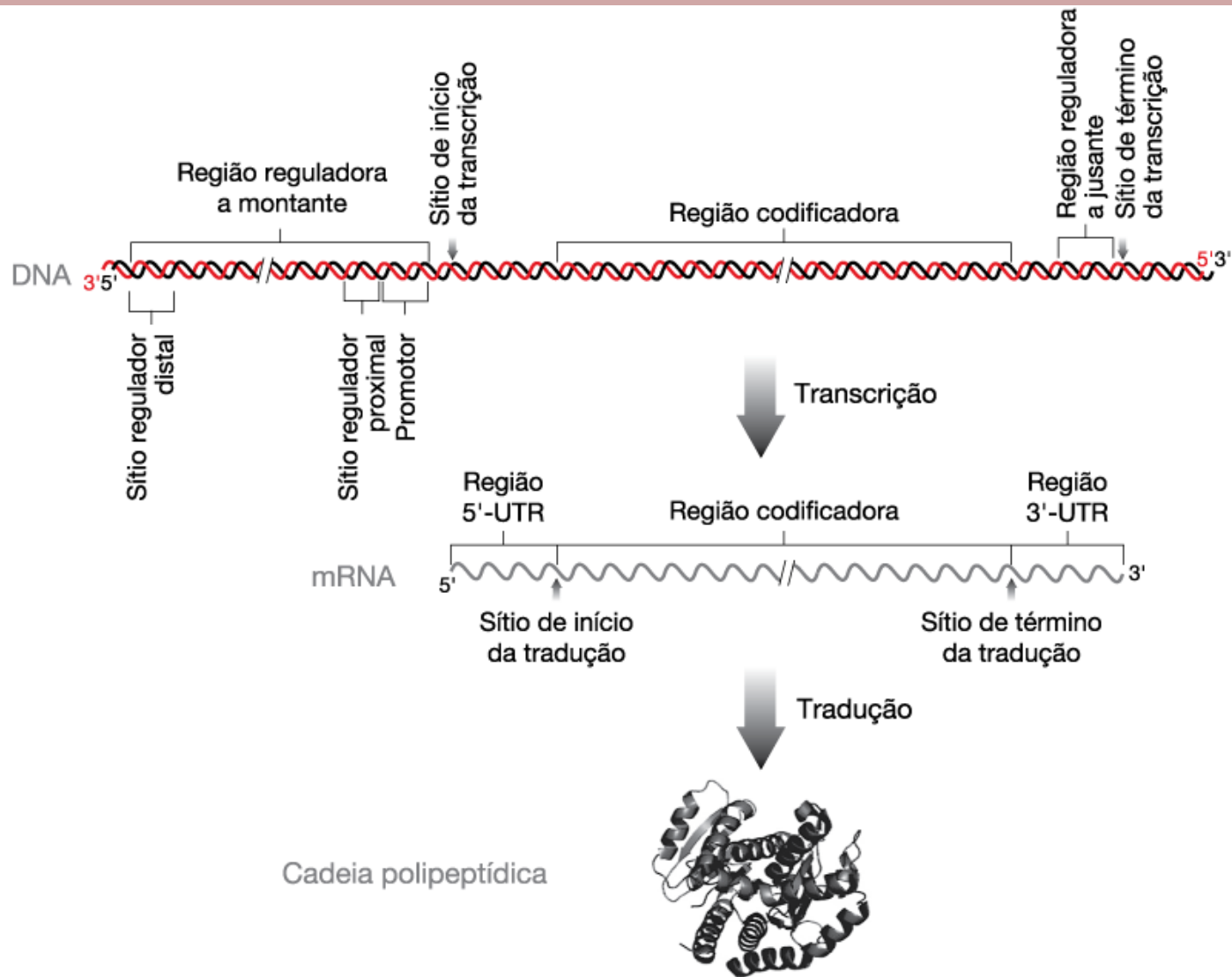


- Promotor
- Éxon
- Íntron

Procaríotos



Qual a estrutura de um gene que codifica proteínas

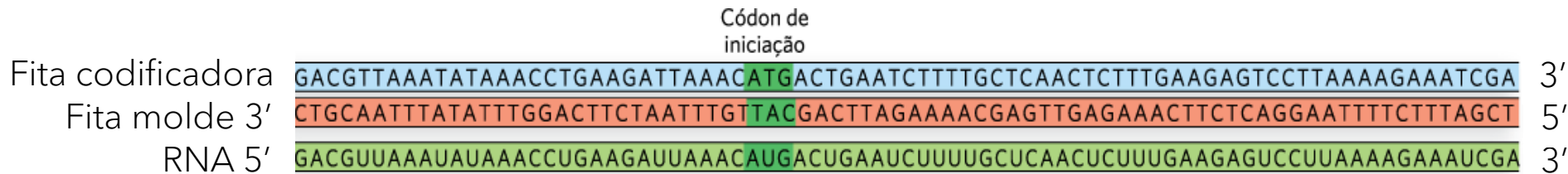


Funcionalmente, um gene é maior do que a região que codifica a proteína

Qual é a fita a ser lida pela RNA polimerase??

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

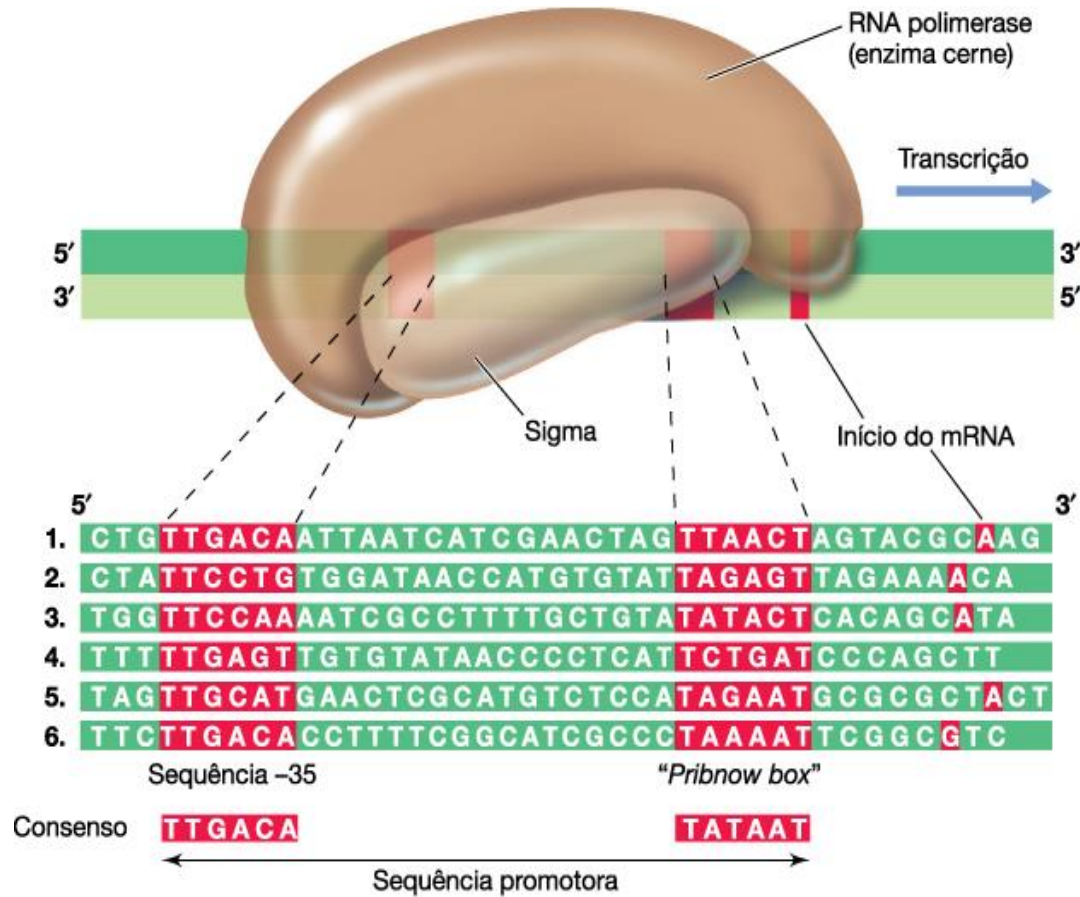
Em qual sentido a RNA polimerase “lê” esta fita?



Por definição, sempre que se apresenta a sequência de um gene, é mostrada apenas a **fita codificadora** (aquela que é semelhante ao RNA), a não ser que explicitamente detalhado no texto.

Fita molde é aquela lida pela RNA polimerase

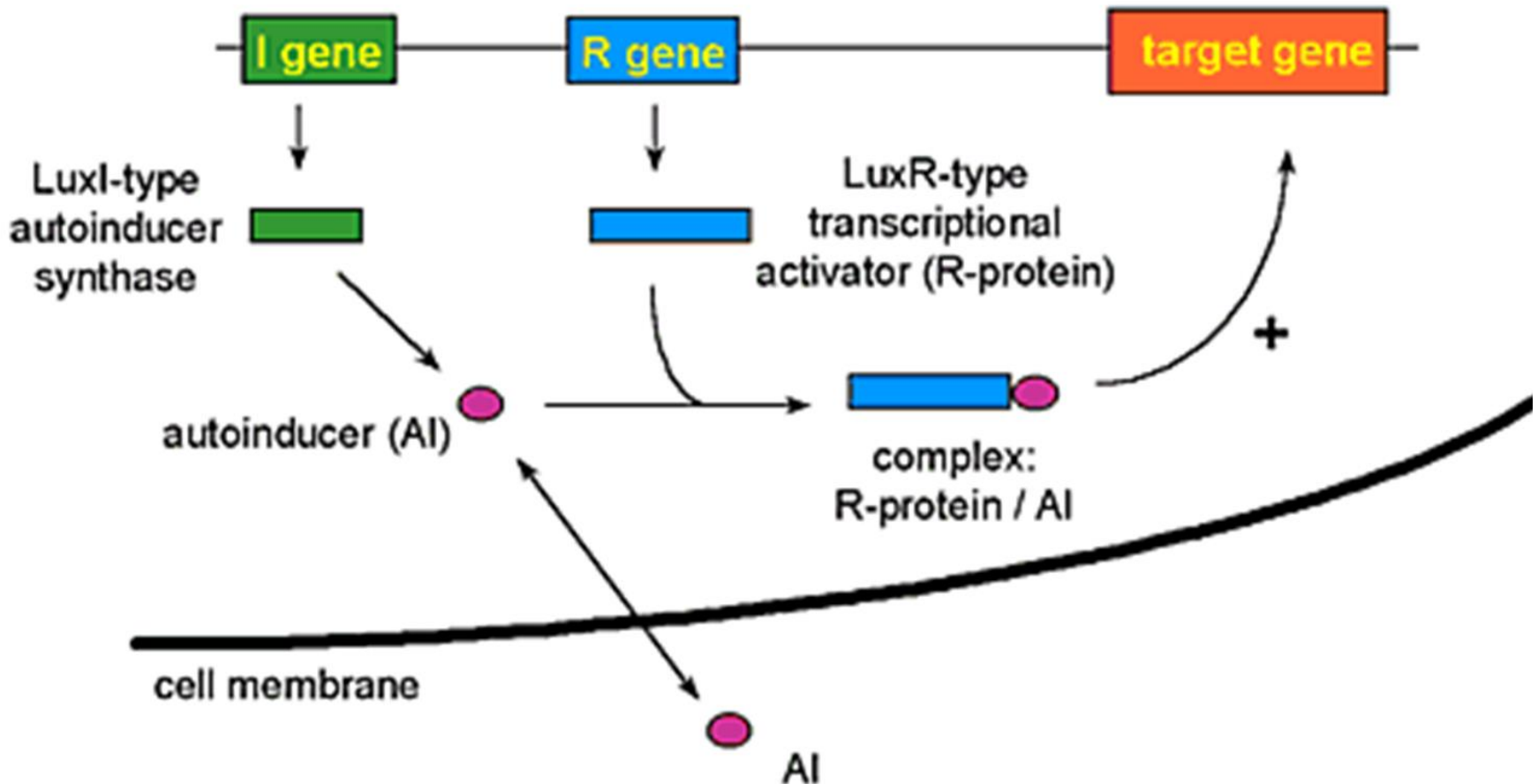
Fatores Sigma



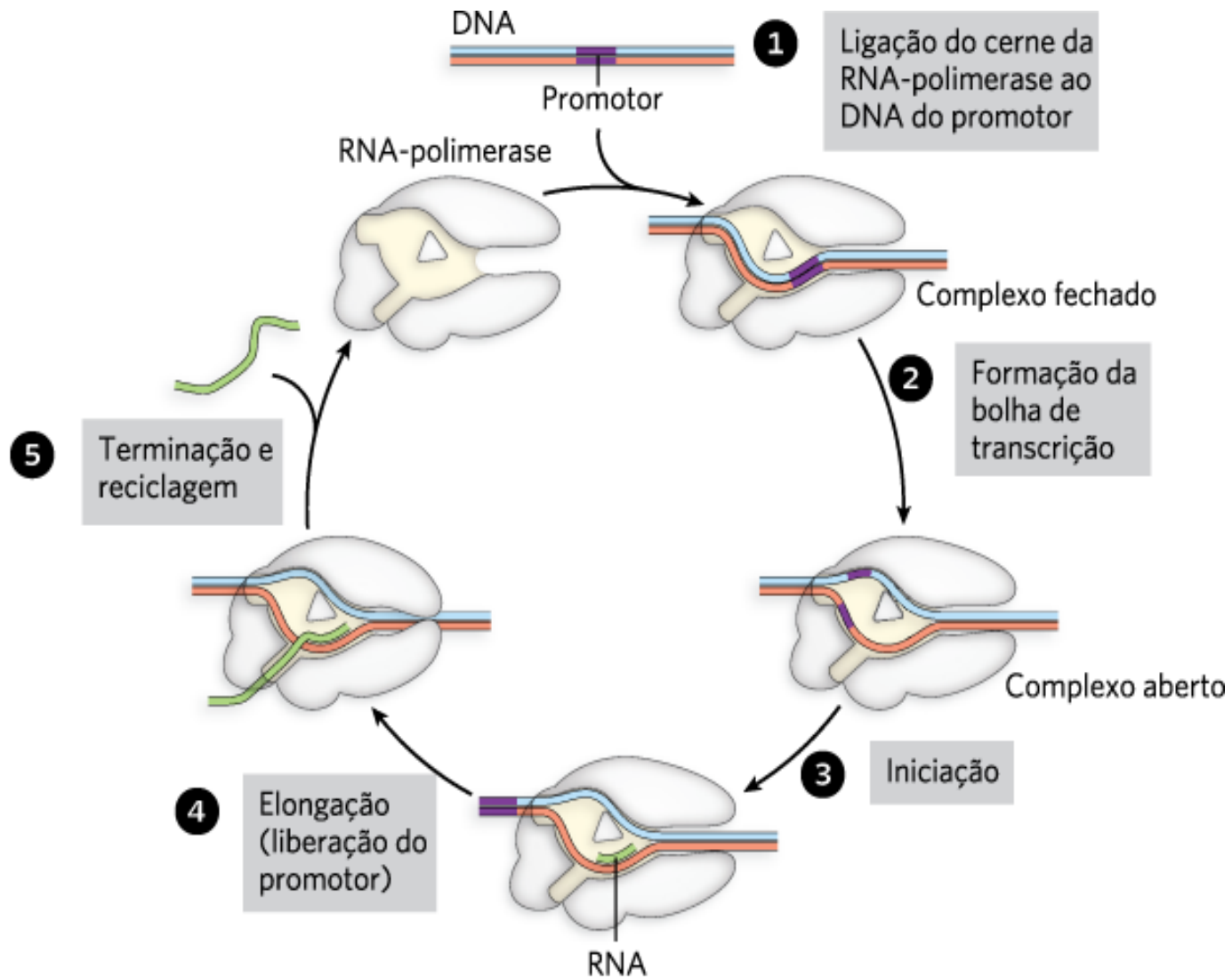
Fatores sigma reconhecem sequências nas regiões -35 e -10, e promovem uma ligação específica da RNA polimerase, posicionando-a para o início de transcrição

Curiosidade

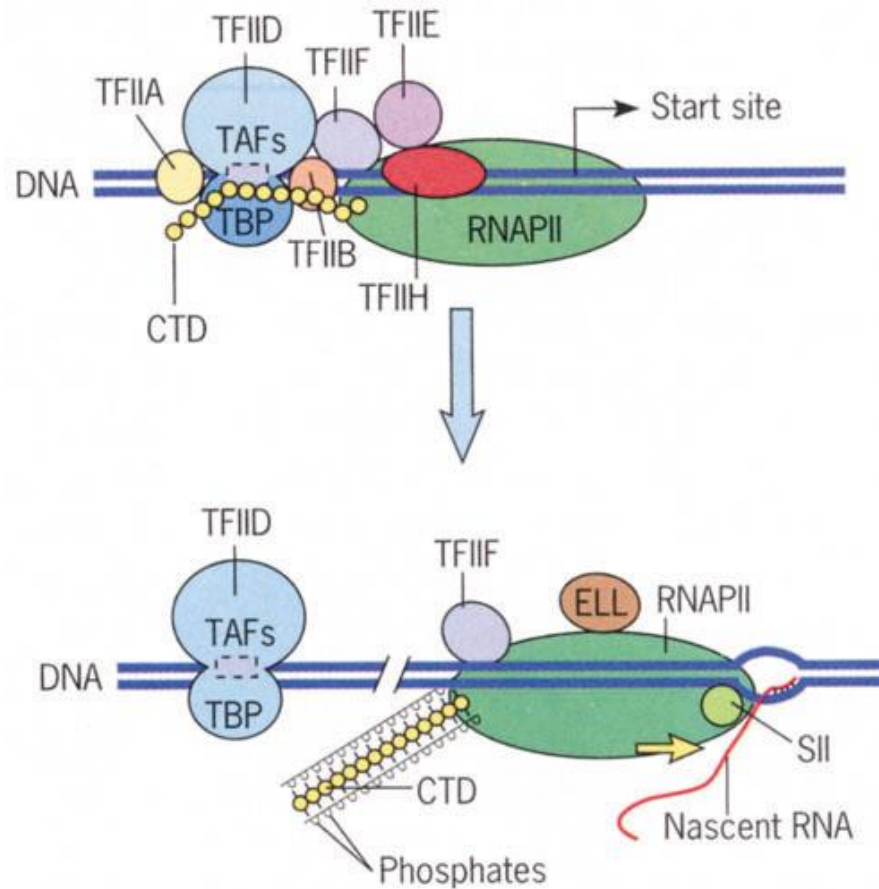
Regulação de genes por *quorum sensing*



A transcrição - Procariotos



Em Eucariotos a RNA Polimerase é fosforilada em seu Domínio C-terminal (CTD)



Esta fosforilação é mediada pelo fator TFIIH, e converte a RNA polimerase em uma enzima altamente processiva, que deixa os fatores de transcrição para trás e começa a fase de alongação.

Visão geral da transcrição mediada pela RNA Pol II

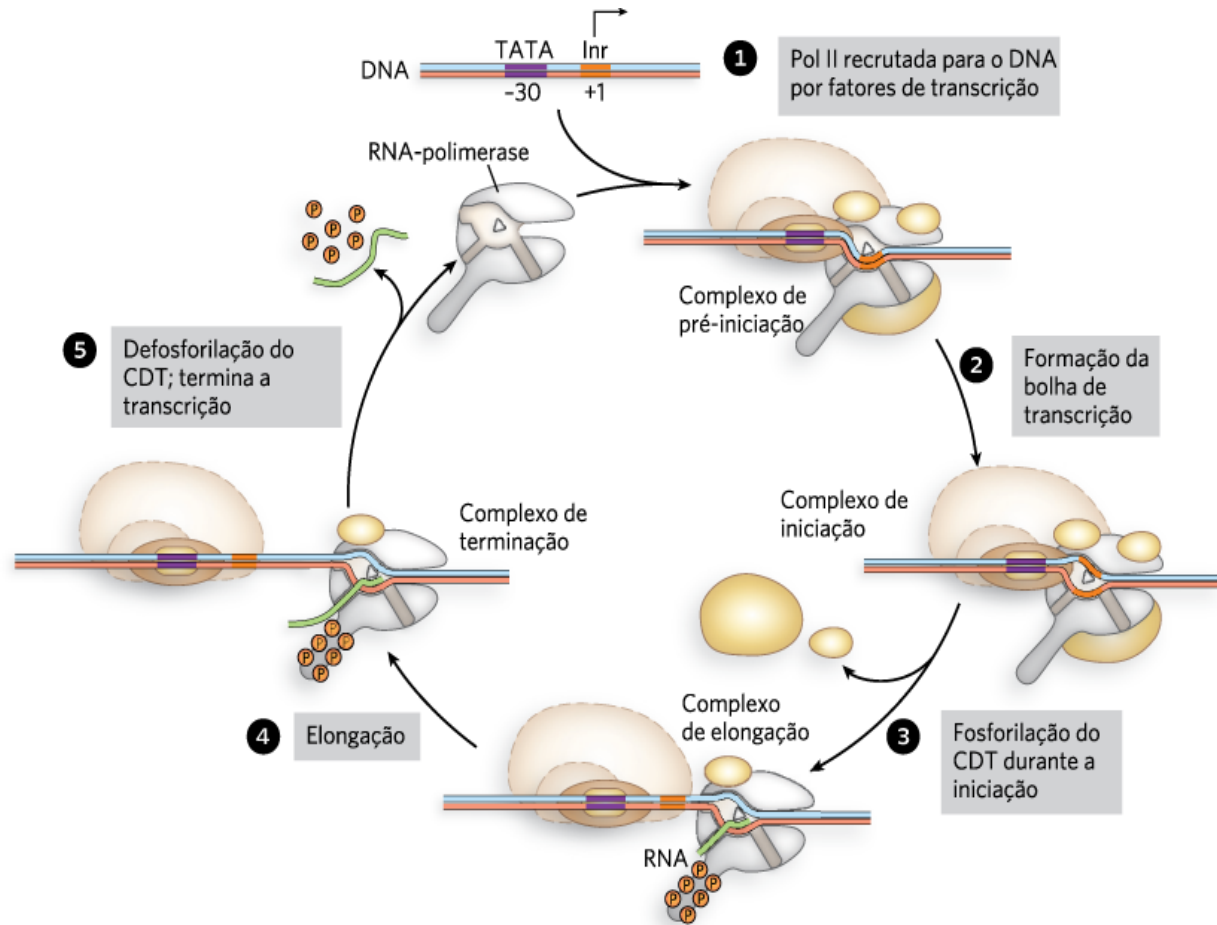


FIGURA 15-22 Transcrição nos promotores da Pol II. As fases da transcrição pela Pol II — montagem, iniciação, elongação e terminação — estão associadas a proteínas características, conforme descrito no texto. A montagem organizada e a dissociação dos fatores conduzem o processo adiante.

Exercício 1

- A figura 1 representa o processo de transcrição de dois genes de RNA ribossômicos adjacentes, em uma foto de microscopia eletrônica. Interpretando a figura, qual o movimento da RNA polimerase: da esquerda para a direita ou da direita para a esquerda? Por que? Por que as moléculas de RNA parecem menores do que o DNA que as codifica?

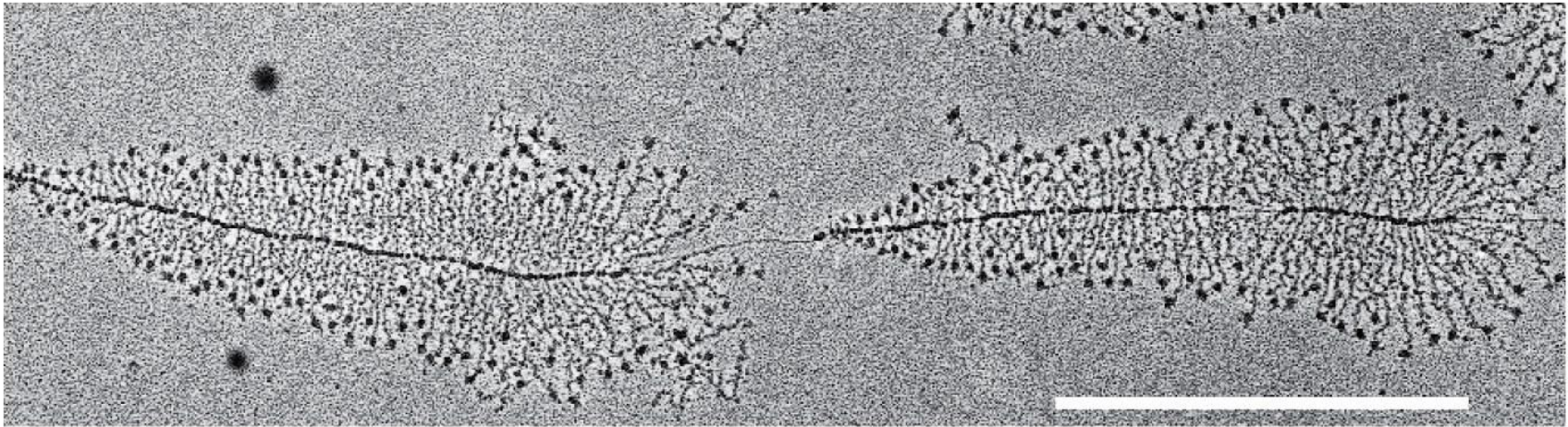


Figure 6-1 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

Figura 1. Microfotografia de genes de RNA ribossômico .

Exercício 1

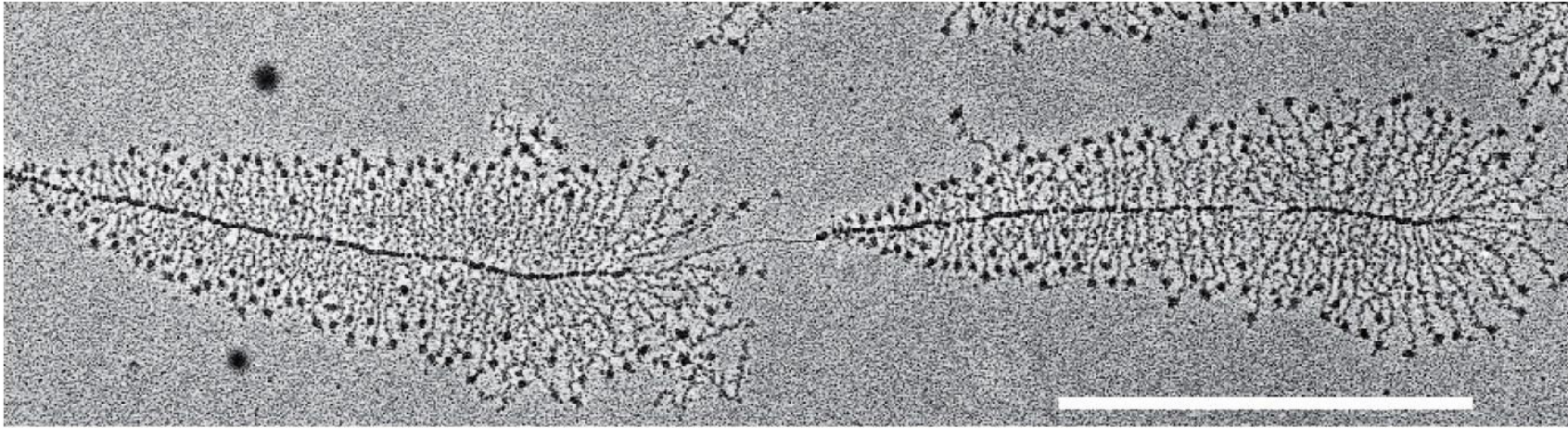
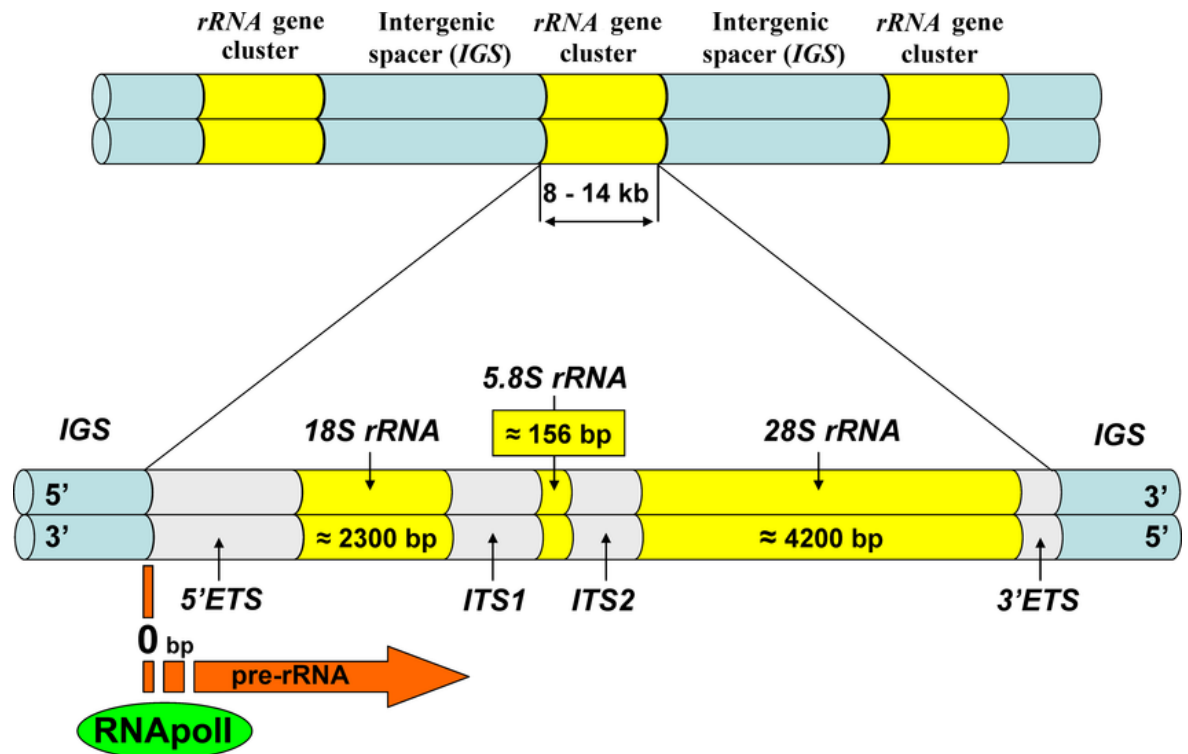


Figure 6-1 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)



Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. Qual seria a sequência da molécula de RNA? E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. Qual seria a sequência da molécula de RNA? E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

5'- GTAACGGATCCTGACTAG-3' → 5'-CUAGUCAGGAUCCGUUAC-3'

3'- CATTGCCTAGGACTGATC-5' → 5'-GUAACGGAUCCUGACUAG-3'

Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTAACGGATCCTGACTAG-3'

3'- CATTGCCTAGGACTGATC-5'

5'- **GTAACGGATCCTGACTAG-3'** → 5'-CUAGUCAGGA-3'

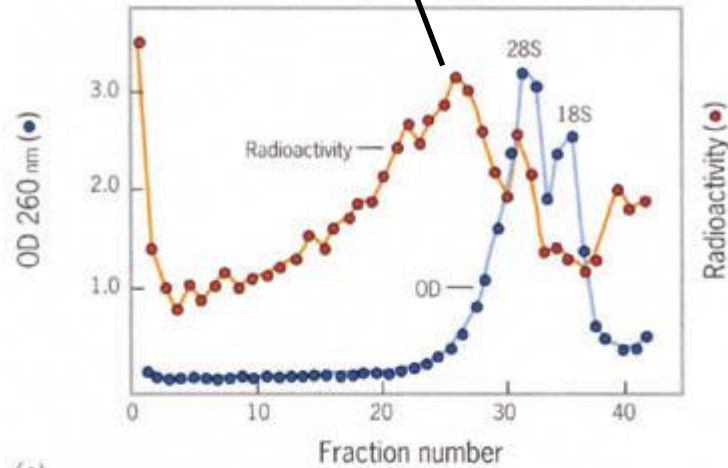
3'- **CATTGCCTAGGACTGATC-5'** → 5'-GUAACGGA-3'

RNAs são processados em fragmentos menores após a sua síntese

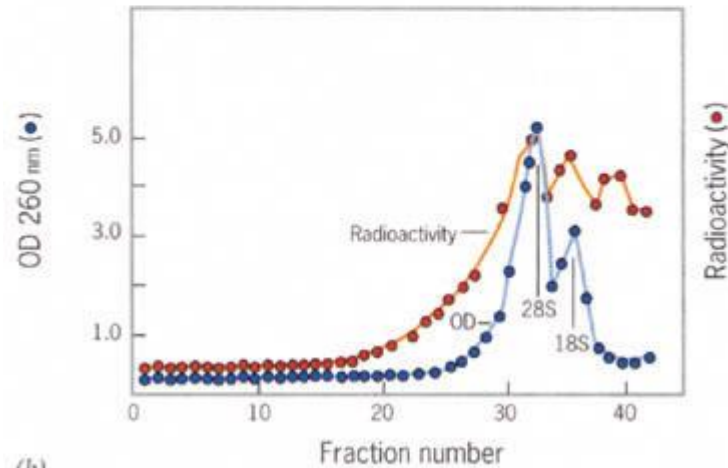
Heterogeneous Nuclear RNAs (hnRNAs)

Marcação radioativa de RNAs

Marcação radioativa que permanece após 3 horas em condições onde a síntese de RNA é inibida

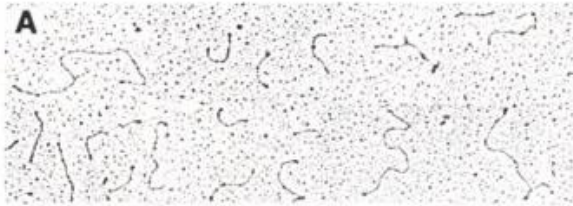


(a)

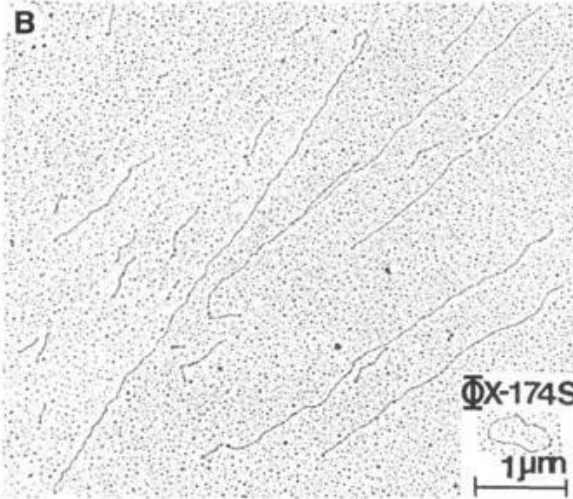


(b)

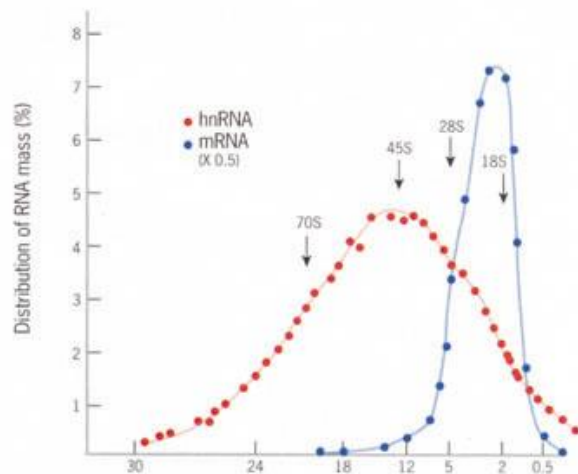
Tamanho dos RNAs após processamento



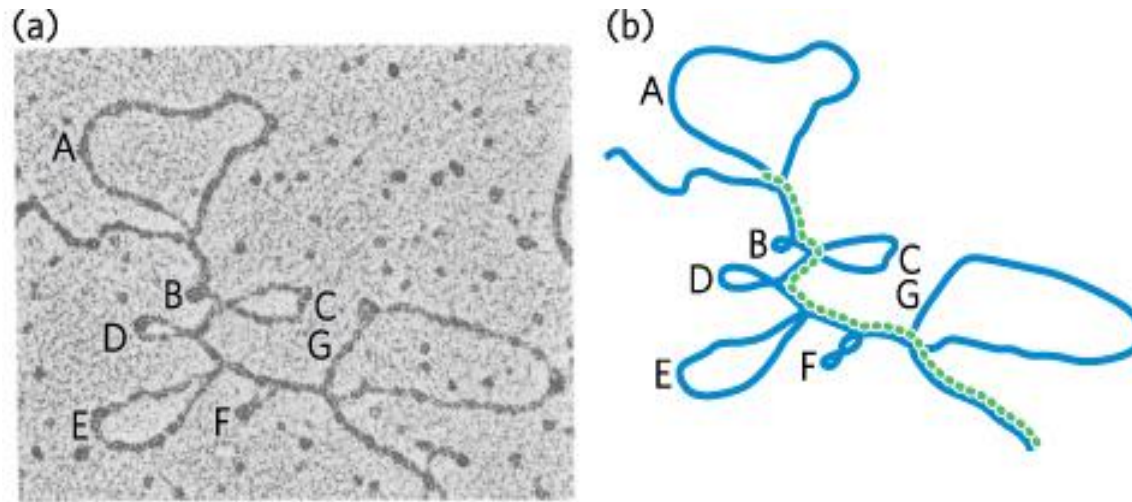
mRNAs maduros presentes no citoplasma



hnRNAs presentes no núcleo



Análise de hibridação de RNA-DNA por microscopia eletrônica



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

Estrutura dos genes eucarióticos: introns

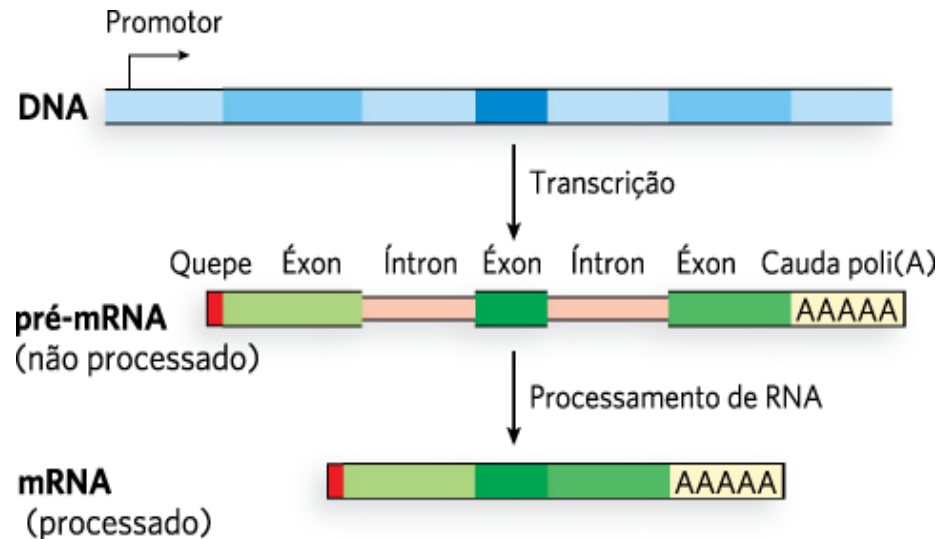
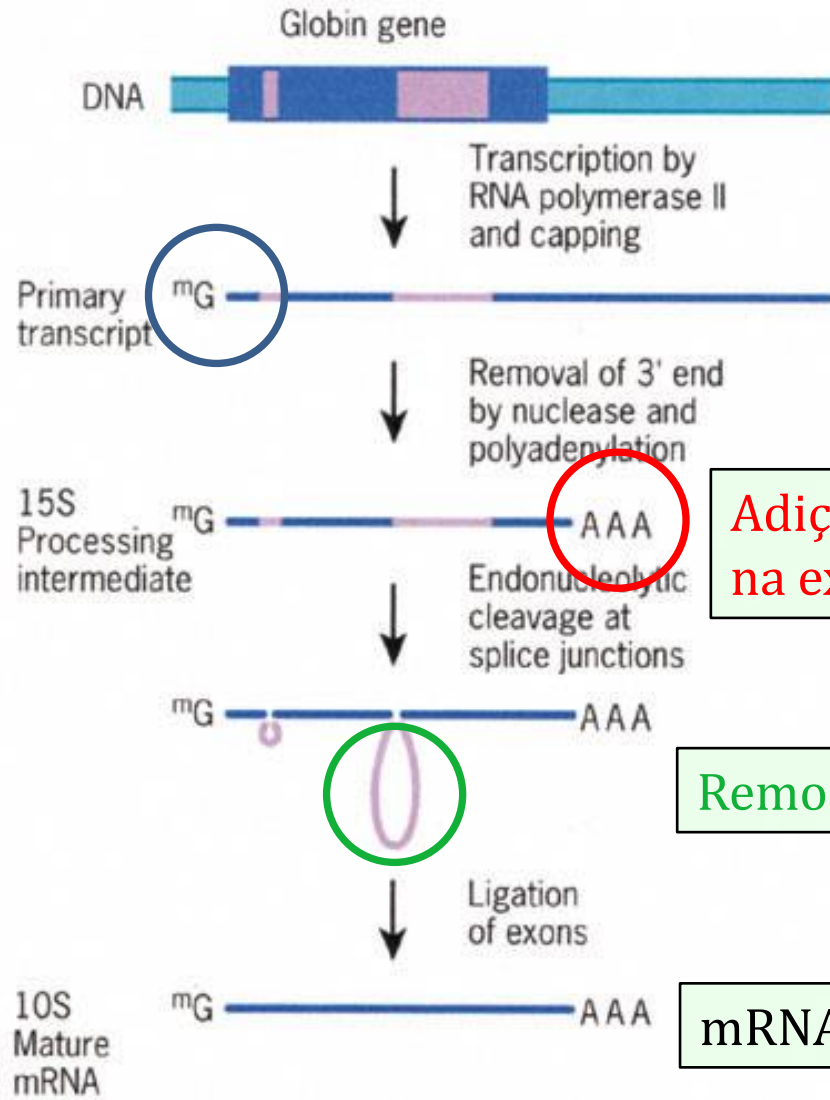


FIGURA 16-7 Genes interrompidos. Íntrons são sequências que não codificam proteínas no DNA e no mRNA transcrito que são removidas do RNA durante o processamento para formar um mRNA proteína-codificante contínuo, formado somente por éxons.

Os genes são interrompidos por **íntrons**

Pós - transcrição - processamento

Adição do quepe 5'



Adição da cauda de poli-A na extremidade 3'

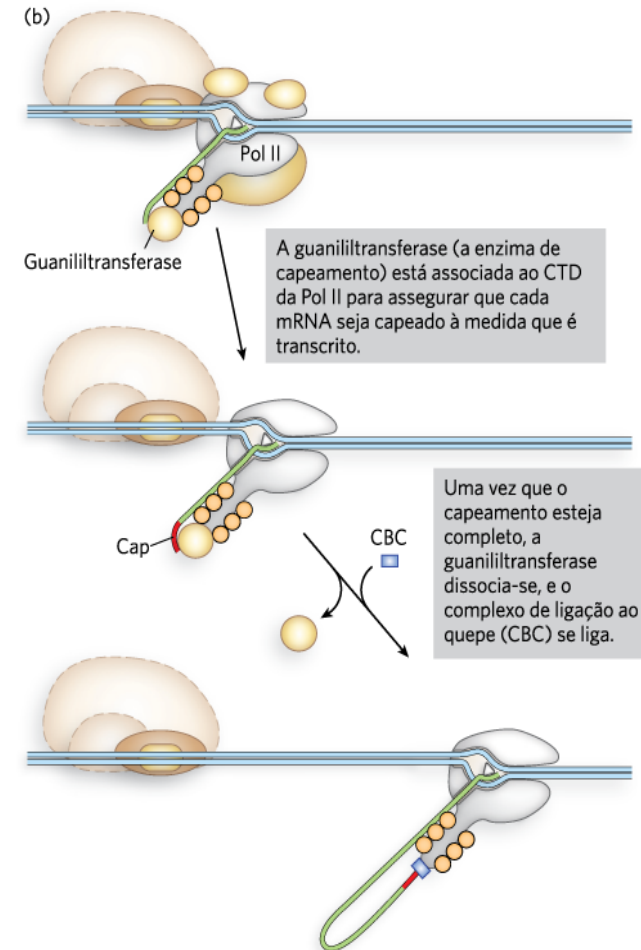
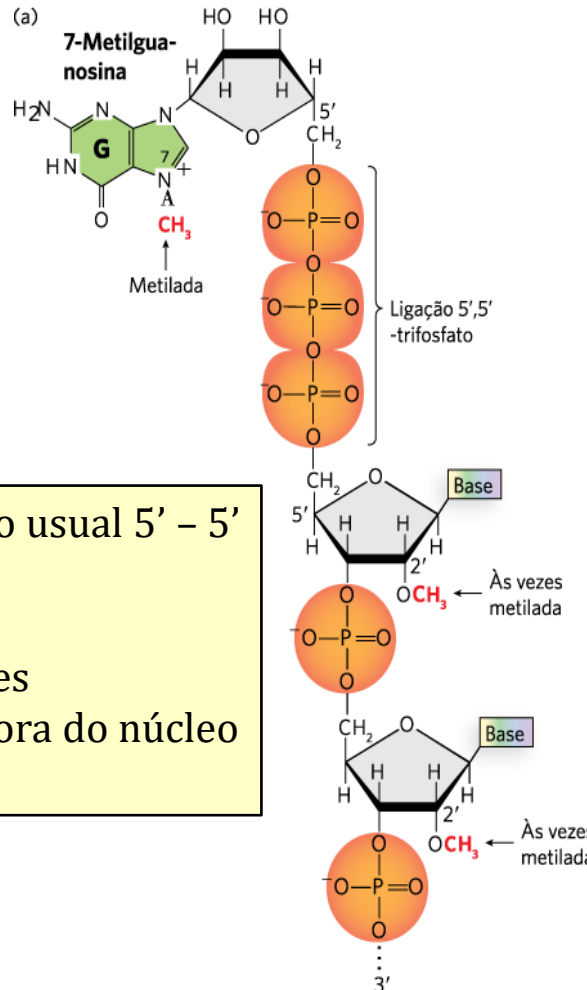
Remoção dos íntrons

mRNA maduro

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

Pós - transcrição - processamento

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



Adicionado por uma ligação não usual 5' - 5'

Funções do quepe:

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

Pós - transcrição - processamento

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

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

Funções da cauda de poli-A:

- Aumenta estabilidade no citoplasma: Poly(A) polimerase continua adicionando A.
- Aumenta eficiência na tradução: se liga a proteínas no início do processo.
- Participa do splicing do último intron

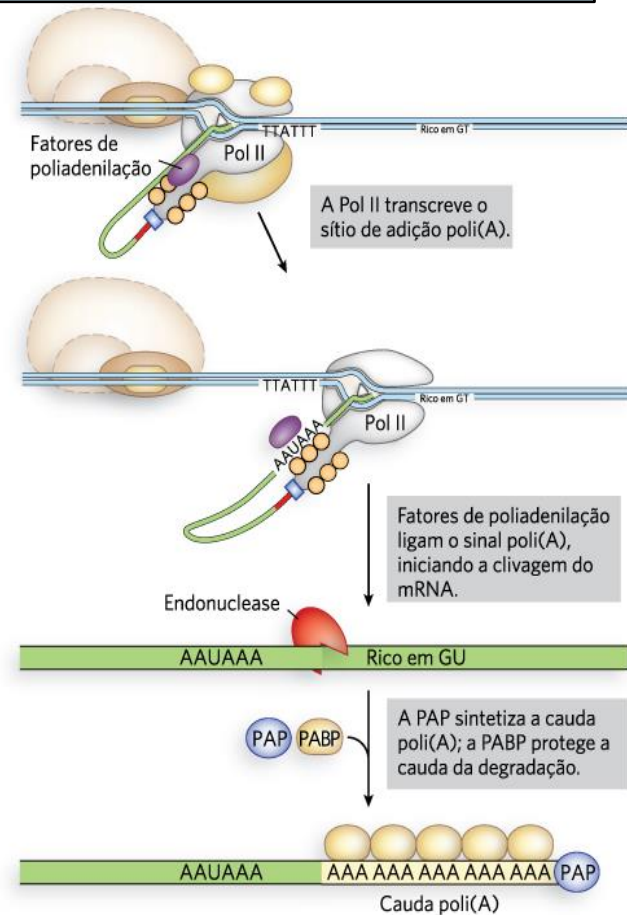


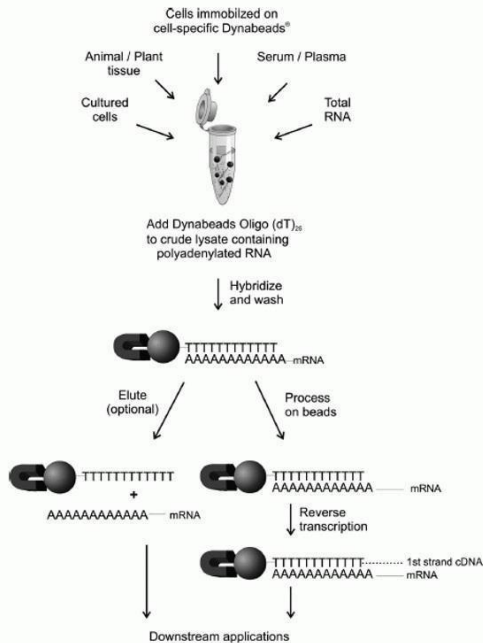
FIGURA 16-4 Adição da cauda poli(A) 3' ao transcrito. Fatores de poliadenilação estão associados à Pol II durante a transcrição. Após a transcrição da sequência 5'-AAUAAA, essas proteínas transferem-se para o transcrito e ajudam a recrutar fatores de clivagem e proteína de ligação poli(A) (PABP) antes de se dissociarem. A cauda poli(A) é sintetizada pela poliadenilato polimerase (PAP).

Pós - transcrição - processamento

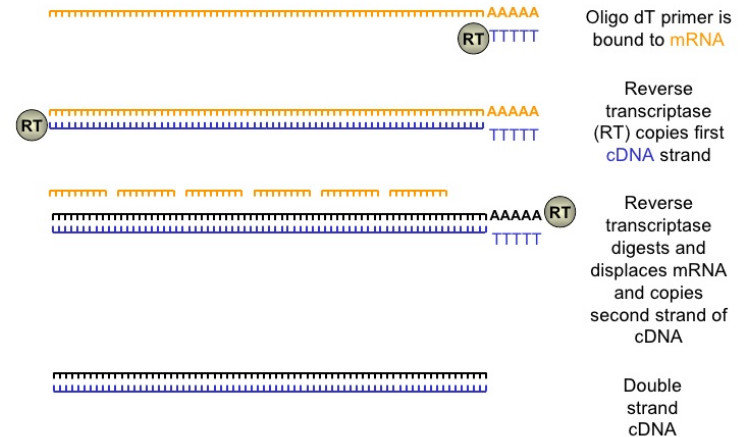
Adição do cauda poli(A) na extremidade 3' do RNA

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

Para purificar o mRNA



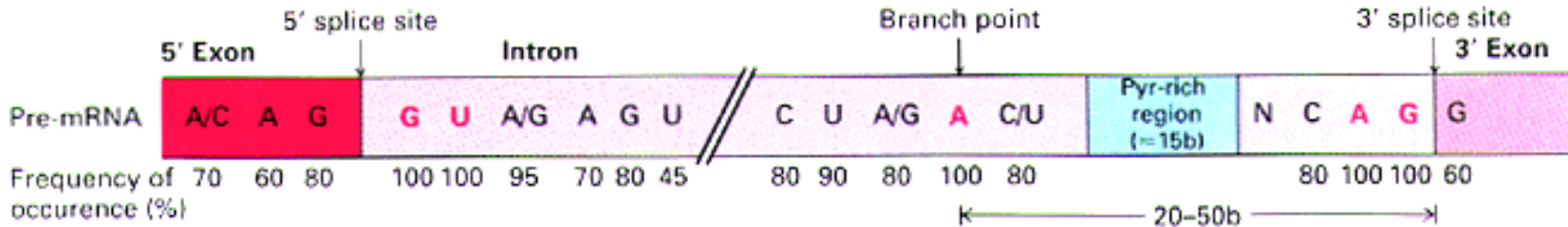
Para gerar o cDNA - clonagem



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription

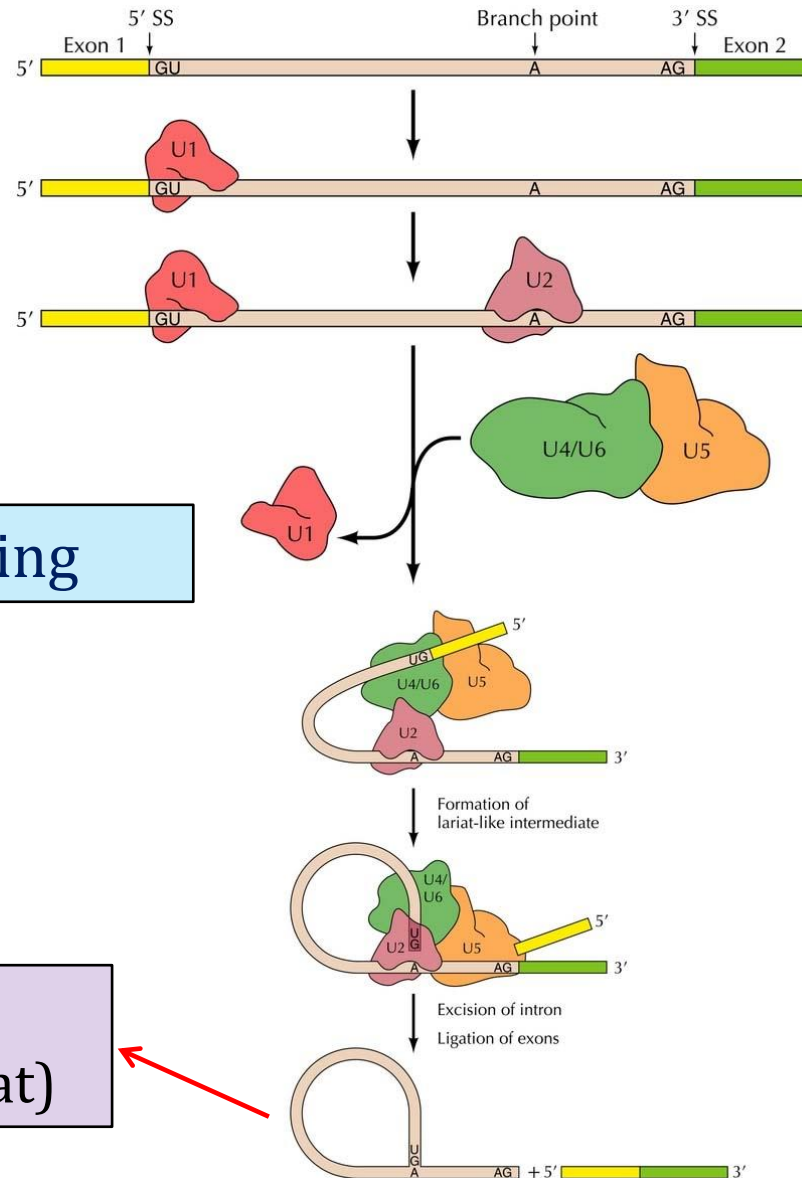
Pós - transcrição - processamento

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



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

Pós - transcrição - processamento

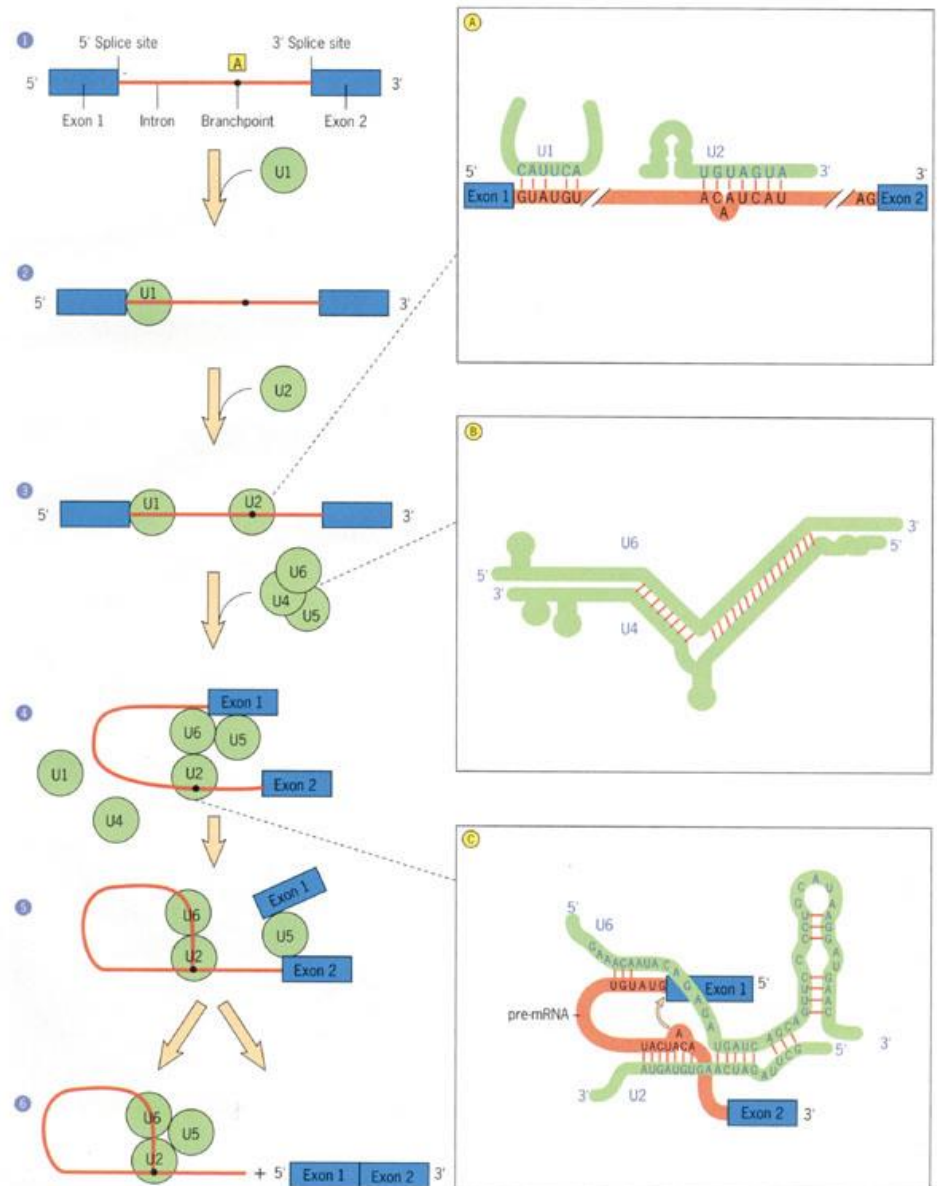


Mecanismo de splicing

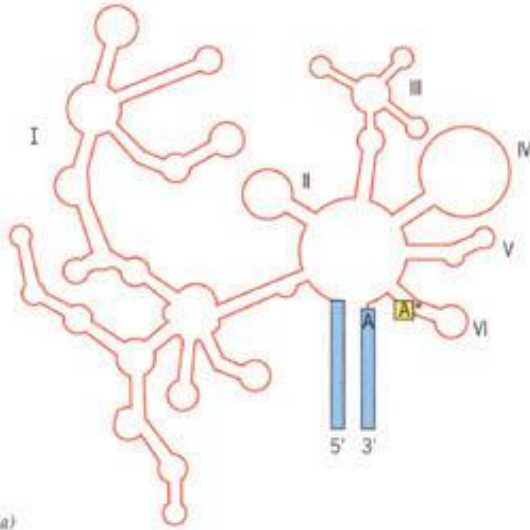
Remoção do íntron na forma de um “laço” (lariat)

Pós - transcrição - processamento

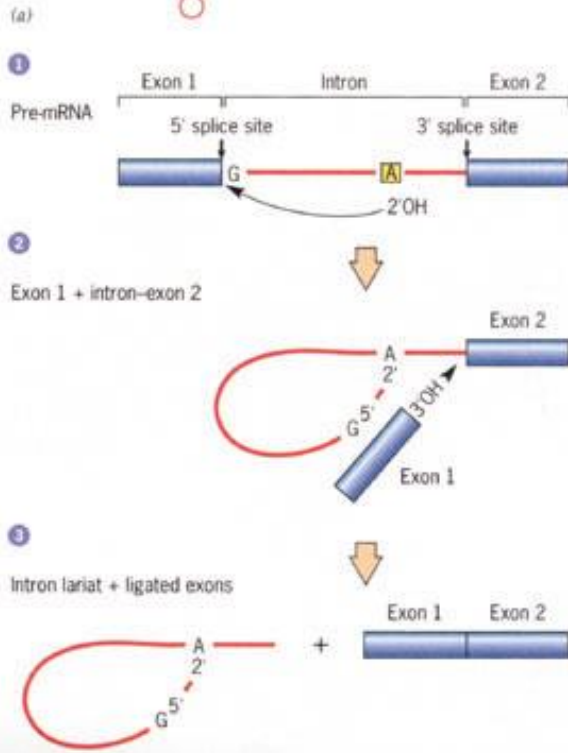
- RNAs presentes nos SNRPs formam pares de bases com as sequências dos íntrons durante o splicing
- Os RNAs podem ter também um papel catalítico?



Pós - transcrição - processamento - bactéria



Ítrons do grupo 2: presentes em bactérias, mecanismo de *splicing* muito semelhante ao dos ítrons eucarióticos.



Quem catalisa este splicing?
R: O próprio intron!

RNAs podem funcionar como enzimas (ribozimas): evidência a favor do mundo de RNA!!

Pós - transcrição - processamento

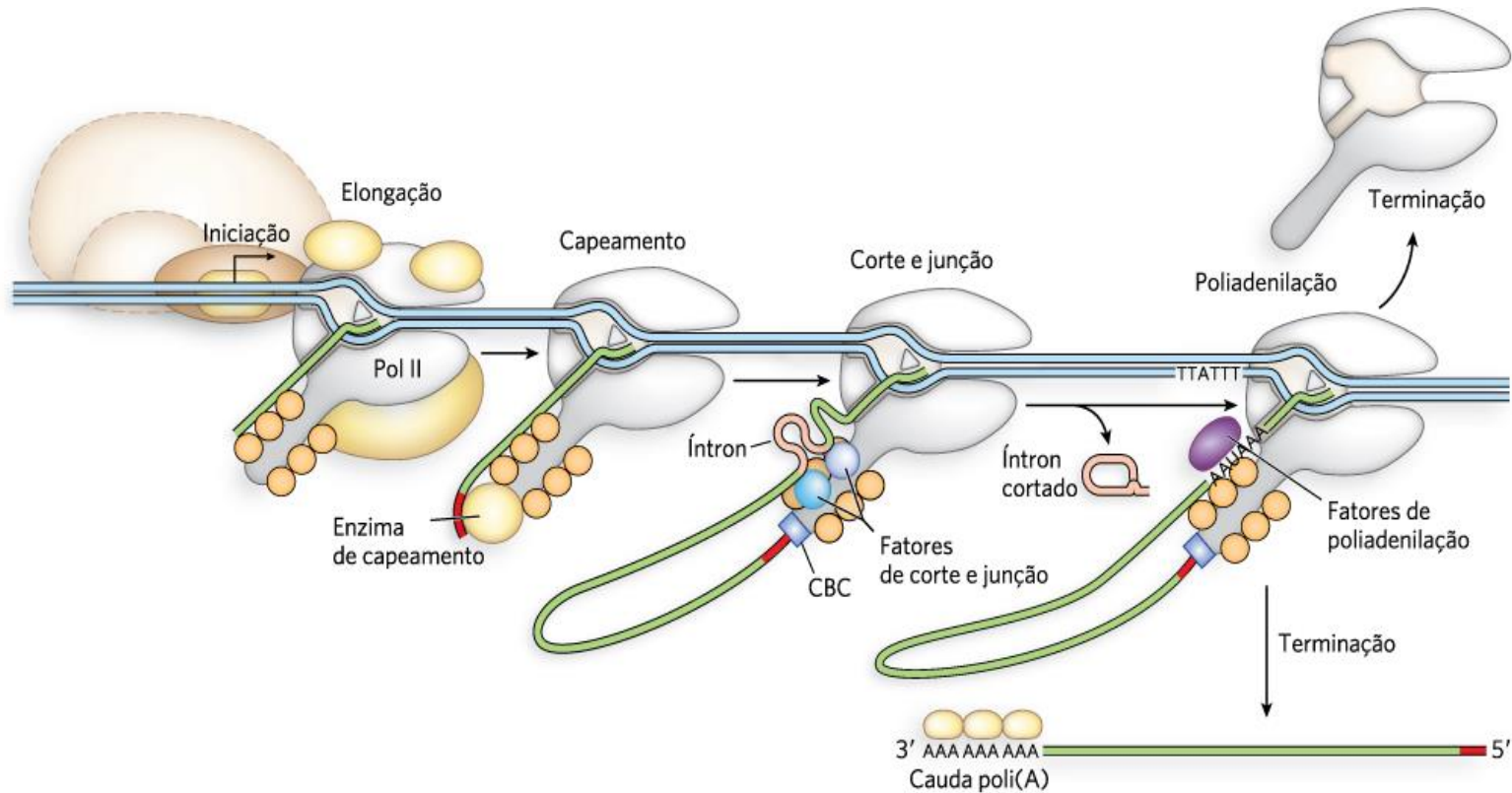


FIGURA 16-5 Coordenação da transcrição e processamento do pré-mRNA. As proteínas de processamento do mRNA associam-se ao domínio C-terminal da Pol II. Conforme o mRNA é sintetizado, a enzima de capeamento (guanililtransferase), fatores de corte e junção e fatores de poliadenilação transferem-se do CTD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

Coordenação dos eventos de processamento com a transcrição

Pós - transcrição – processamento

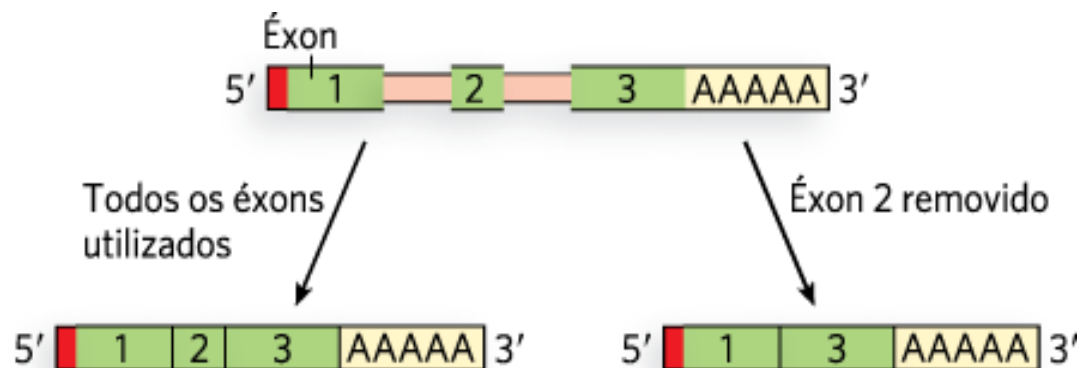
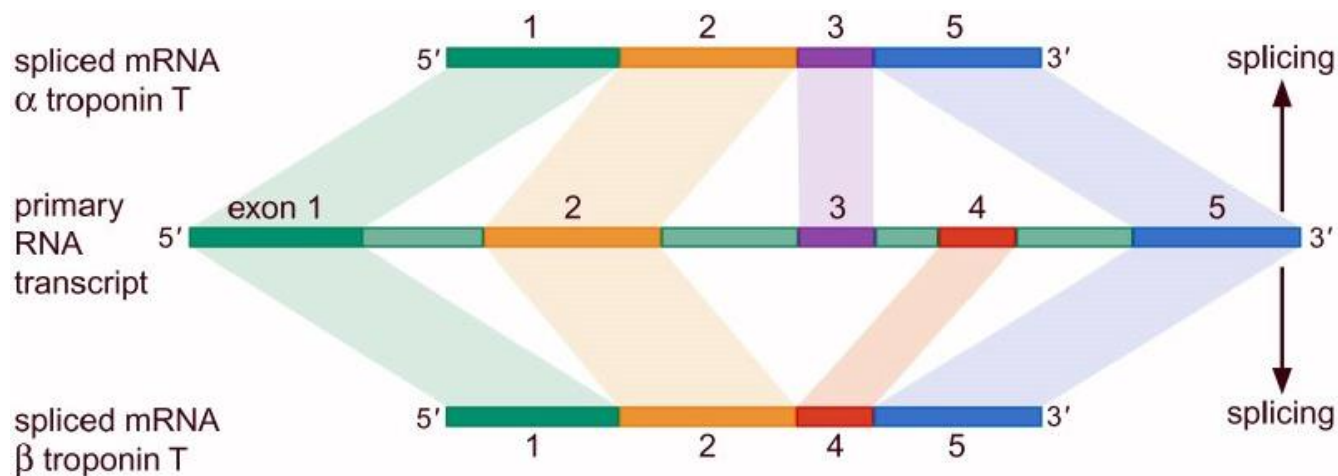


FIGURA 16-8 Diferentes modos de combinar os éxons. O processamento alternativo pode gerar produtos múltiplos a partir de um único gene.

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

Pós - transcrição - processamento



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

Pós - transcrição – processamento

Tá complicado? Olha esse aqui:

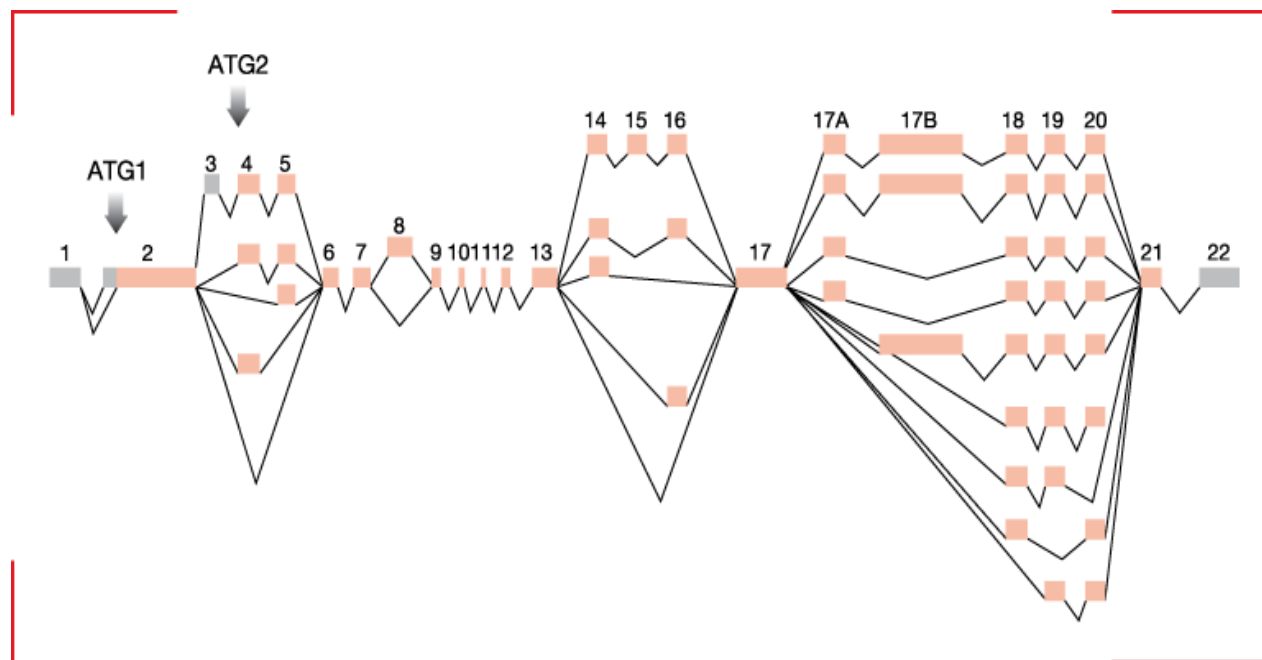
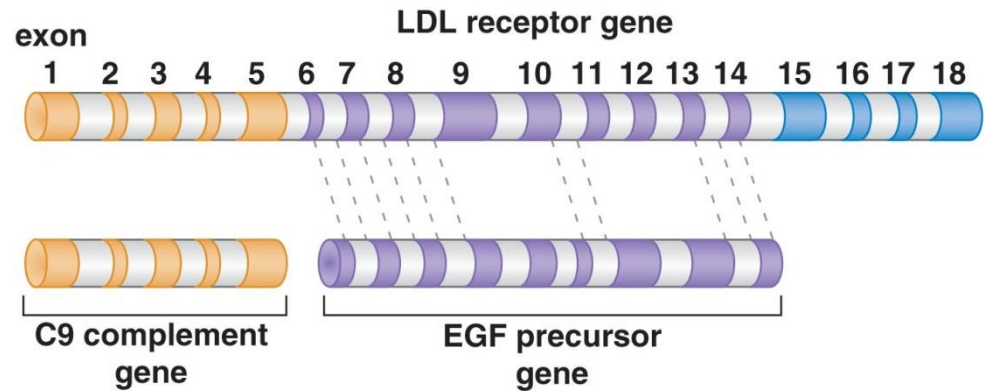
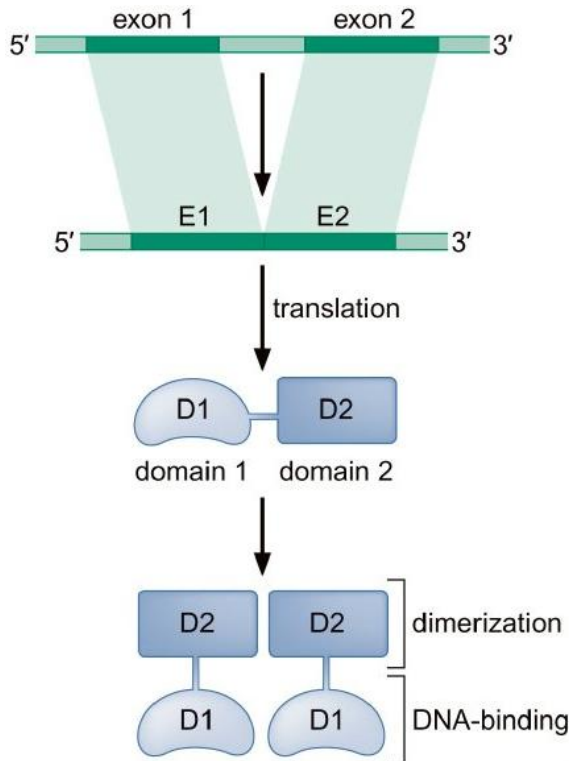


Figura 5.5

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

Porque os genes eucarióticos possuem íntrons?

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



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

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

Éxons muitas vezes correspondem a domínios funcionais das proteínas.

Expressão Gênica - Tradução



O que é a tradução, quando se está falando em expressão de genes?

Exercício 3

- A) Quais das mutações abaixo você diria que pode ser mais deletéria para a função gênica. Explique porque:
1. Inserção de um único nucleotídeo próximo do final da sequência codificadora.
 2. Remoção de um único nucleotídeo do início da sequência codificadora.
 3. Deleção de 3 nucleotídeos no meio da sequência codificadora..
 4. Substituição de um único nucleotídeo por outro no meio da sequência codificadora.
 5. Deleção de 4 nucleotídeos no meio da sequência codificadora.

Boa Tarde.....



Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. Qual seria a sequência da molécula de RNA? E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. Qual seria a sequência da molécula de RNA? E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

5'- GTACATGCGGATCCGGACTGGACCTAG-3'

3'- CATGTACGCCTAGGCCTGACCTGGATC-5'

5'- GTAACGGATCCTGACTAG-3' → 5'-CUAGUCAGGAUCCGUUAC-3'

3'- CATTGCCTAGGACTGATC-5' → 5'-GUAACGGAUCCUGACUAG-3'

Exercício 2

- A sequência de DNA abaixo pode ser utilizada para transcrição de RNA. E se a RNA polimerase interrompesse a transcrição na sequência CCT, qual seria a sequência do RNA transcrito? Indique a orientação da fita.

5'- GTAACGGATCCTGACTAG-3'

3'- CATTGCCTAGGACTGATC-5'

5'- **GTAACGGATCCTGACTAG-3'** → 5'-CUAGUCAGGA-3'

3'- **CATTGCCTAGGACTGATC-5'** → 5'-GUAACGGA-3'

Exercício 1

- A figura 1 representa o processo de transcrição de dois genes de RNA ribossômicos adjacentes, em uma foto de microscopia eletrônica. Interpretando a figura, qual o movimento da RNA polimerase: da esquerda para a direita ou da direita para a esquerda? Por que? Por que as moléculas de RNA parecem menores do que o DNA que as codifica?

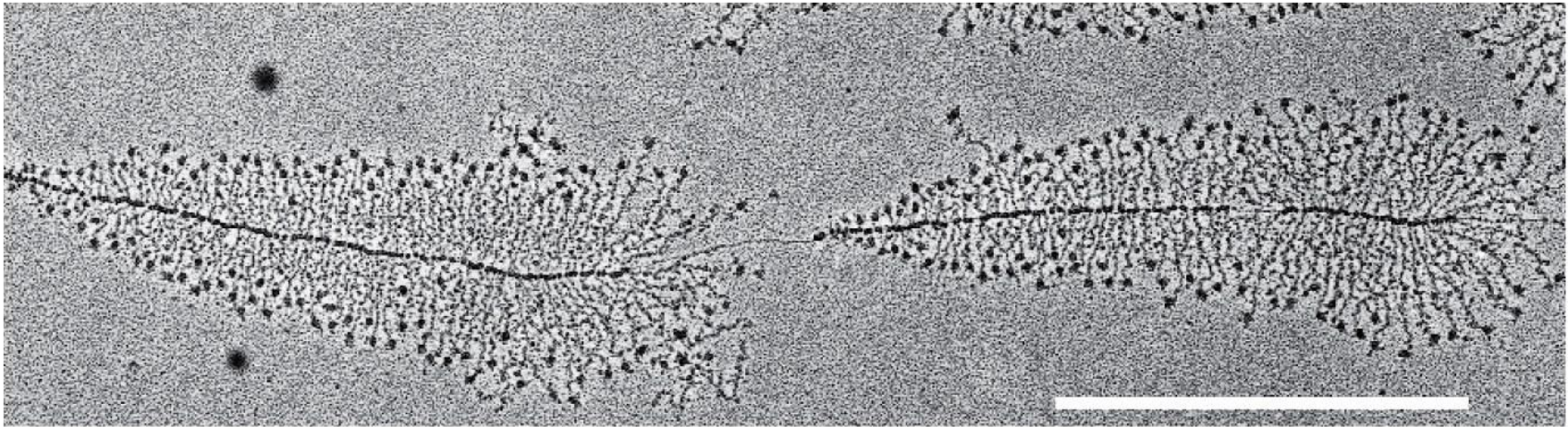


Figure 6-1 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

Figura 1. Microfotografia de genes de RNA ribossômico .

Exercício 1

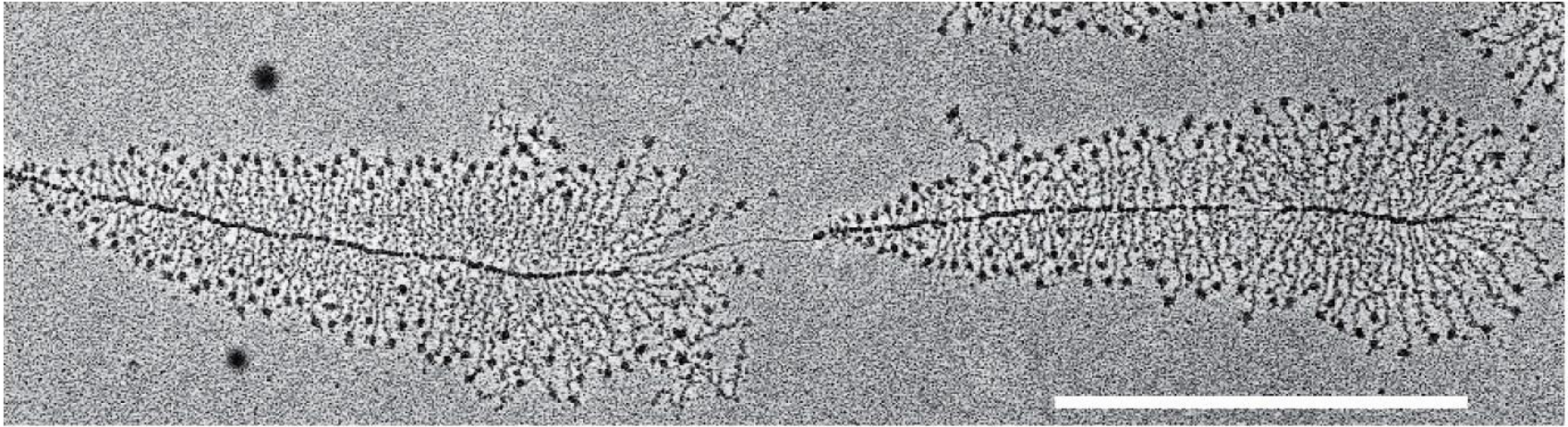


Figure 6-1 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

