

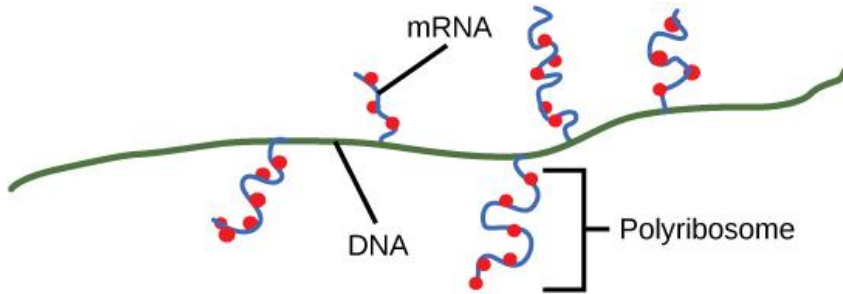
Processamento de RNA

CCM0121 – Biologia II

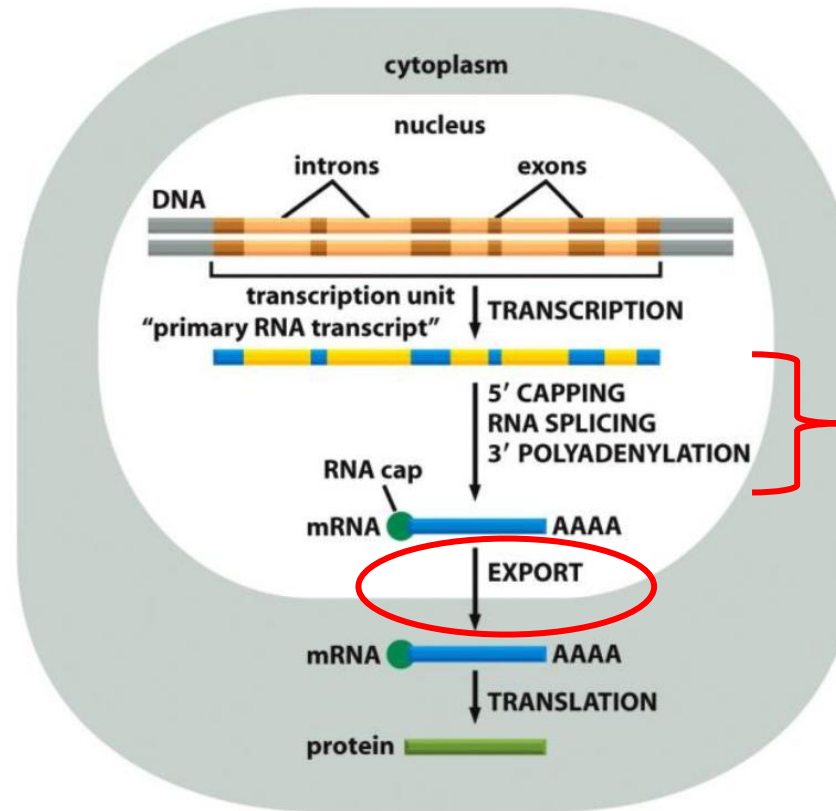
Evandro de Souza

Relembrando transcrição

Procariotos



Eucariotos



Processamento

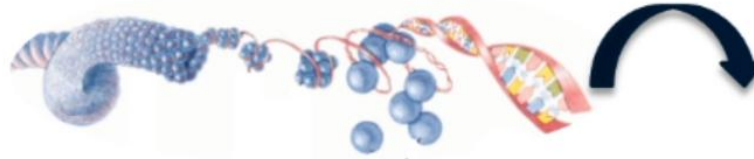
funções:

- *Estabilidade/proteção
- *Auxilia na tradução (reconhecimento)
- *Diversidade genética

PS: Existem outras modificações de RNA que não vamos cobrir. EX: Edição de RNA

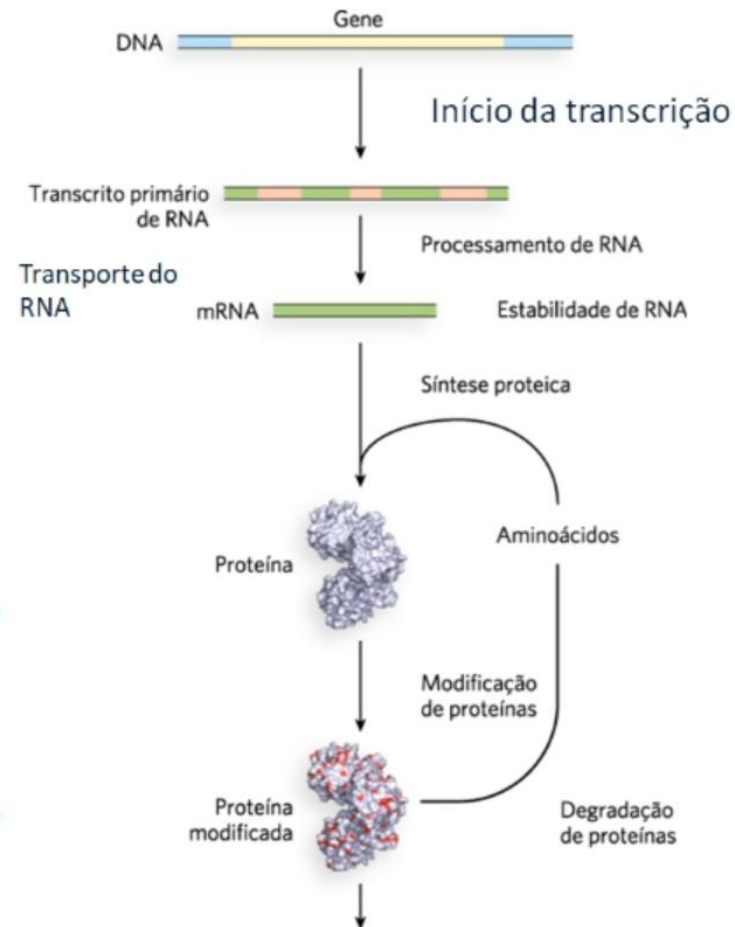
Processamento e controle da expressão gênica

Níveis de Controle da Expressão Gênica em Eucariotos



Modificação e Remodelamento da cromatina

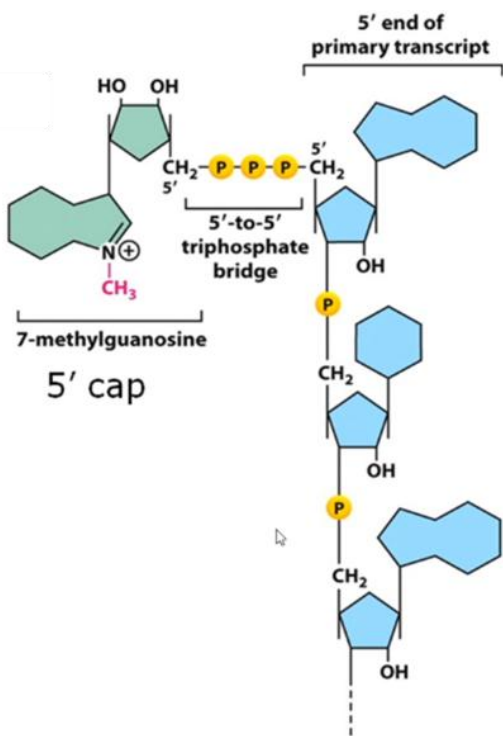
- Transcricional
- Pós-transcricional
- Traducional
- Pós-traducional



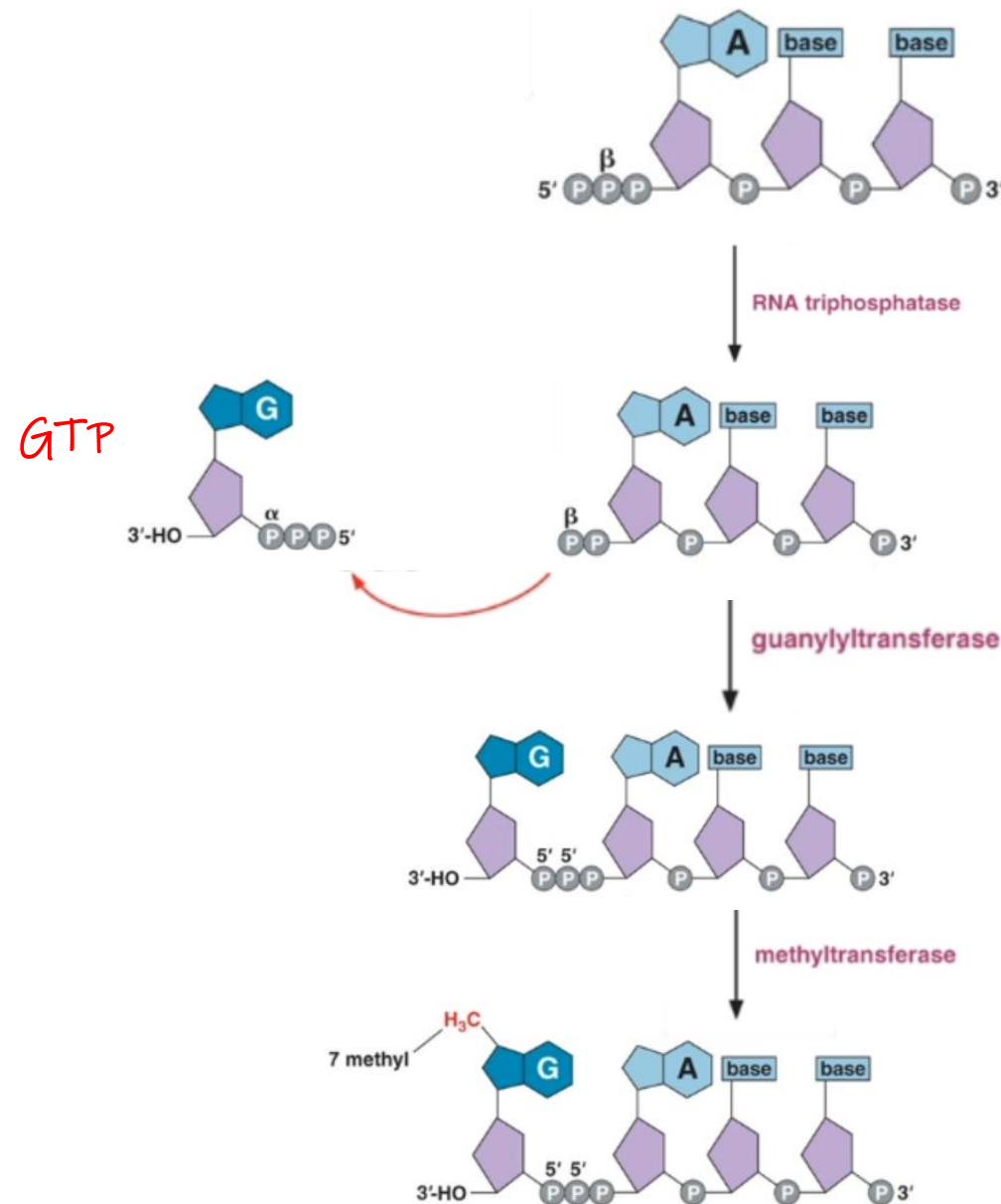
mRNA eucariótico – 5' cap



Mecanismo de
adição de 5' cap



Muitas exonucleases que degradam RNA (como 5'-3' exonucleases) precisam de uma extremidade 5' livre para iniciar a degradação.

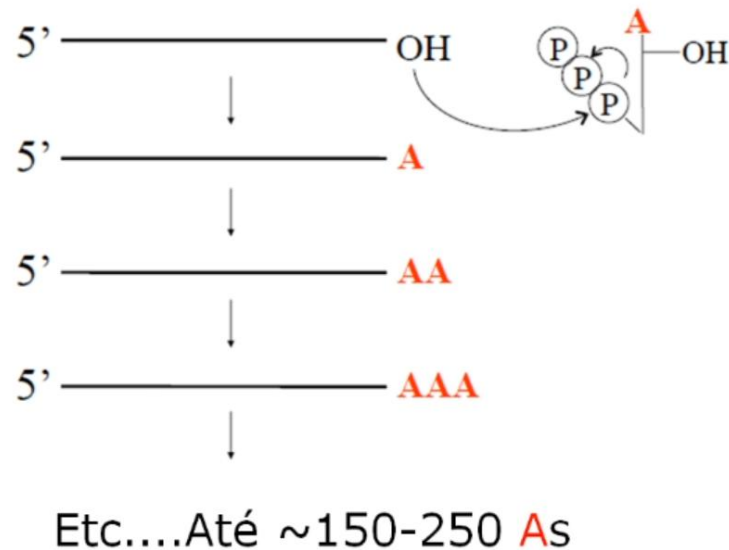


mRNA eucariótico – poli A na extremidade 3'

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

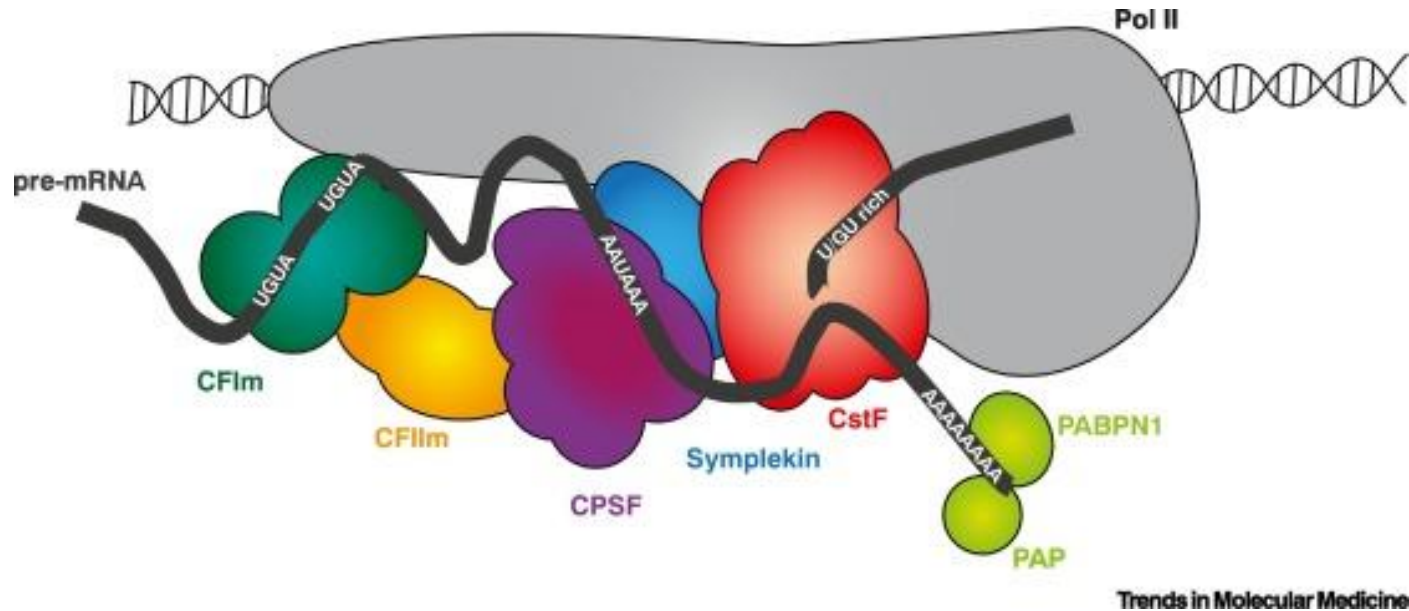


poli-A polimerase



Importante: É um mecanismo de adição pós-transcricional. Não há um molde de DNA para a ação da poli-A polimerase.

mRNA eucariótico – poli A na extremidade 3'



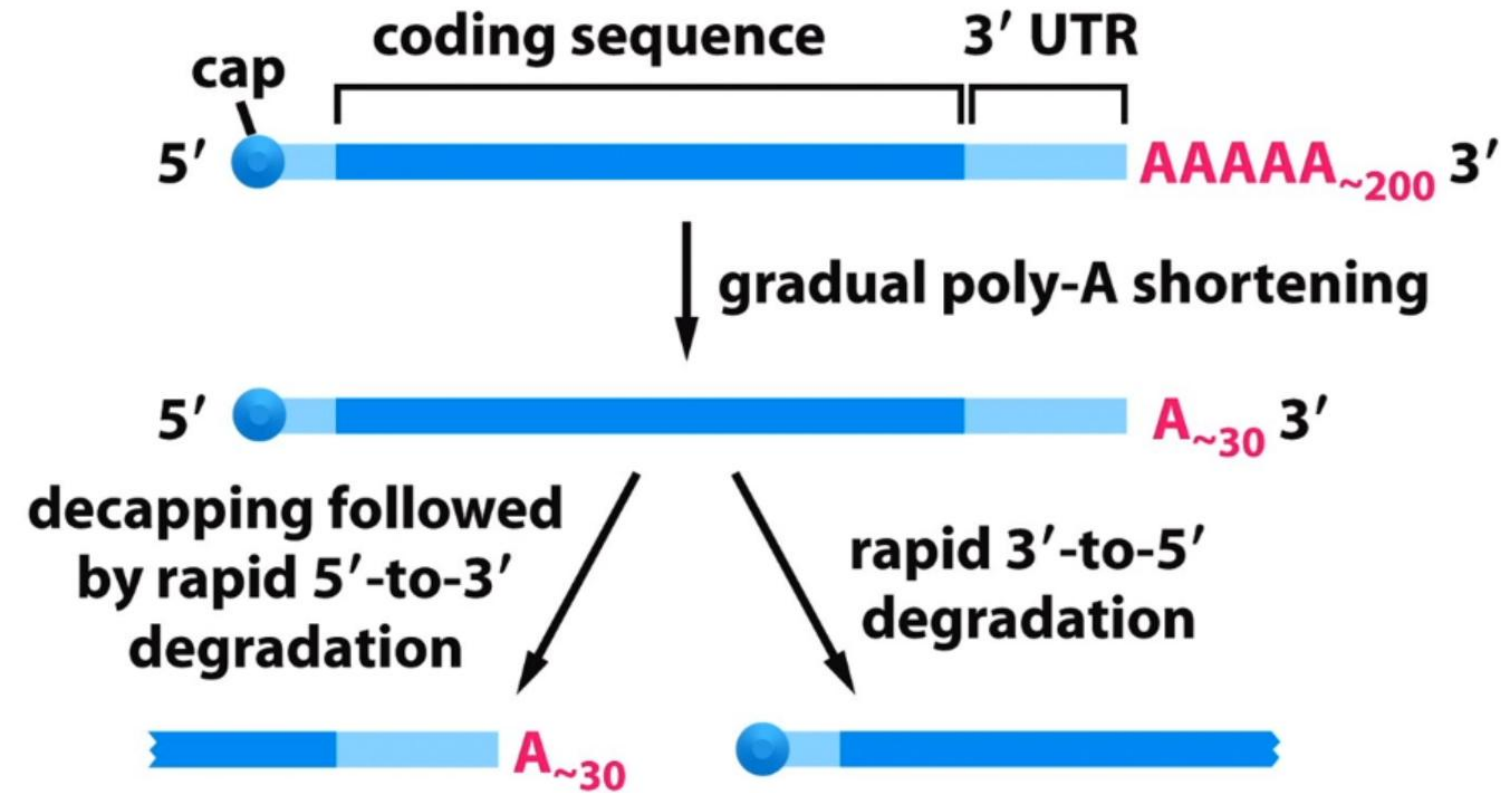
Em eucariotos, o complexo de processamento do pré-mRNA que reconhece o sinal de poliadenilação também participa da terminação da transcrição, coordenando o corte do RNA e o recrutamento da poli-A polimerase para a adição da cauda poli-A

CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor): Reconhece a sequência AAUAAA

PAP (Poly(A) Polymerase): Adiciona a cauda poli(A) após a clivagem

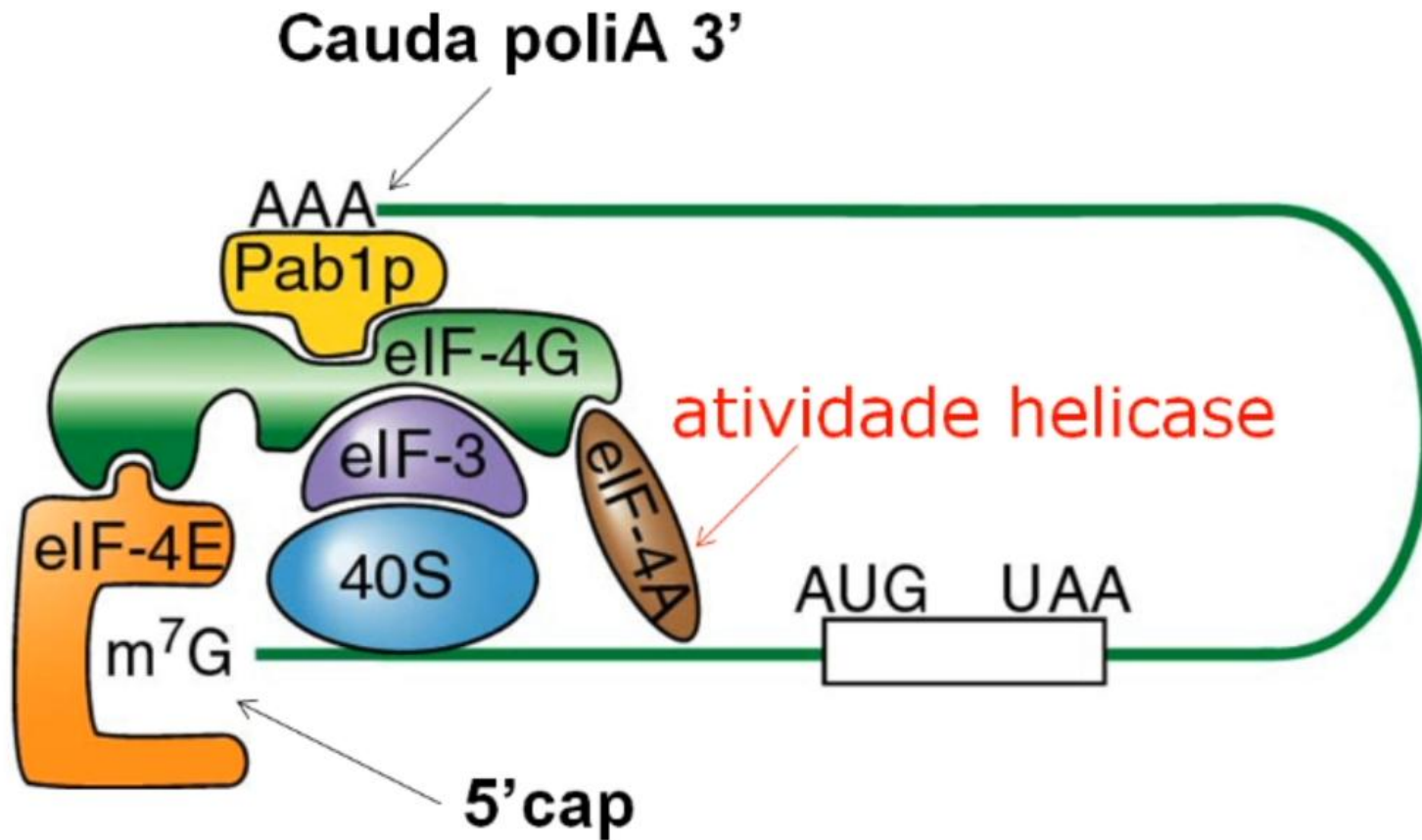
PABPN1 (Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1): Liga-se à cauda poli(A) nascente e regula seu comprimento.

5' cap e poli A (3') regulam a estabilidade do RNAm no citoplasma



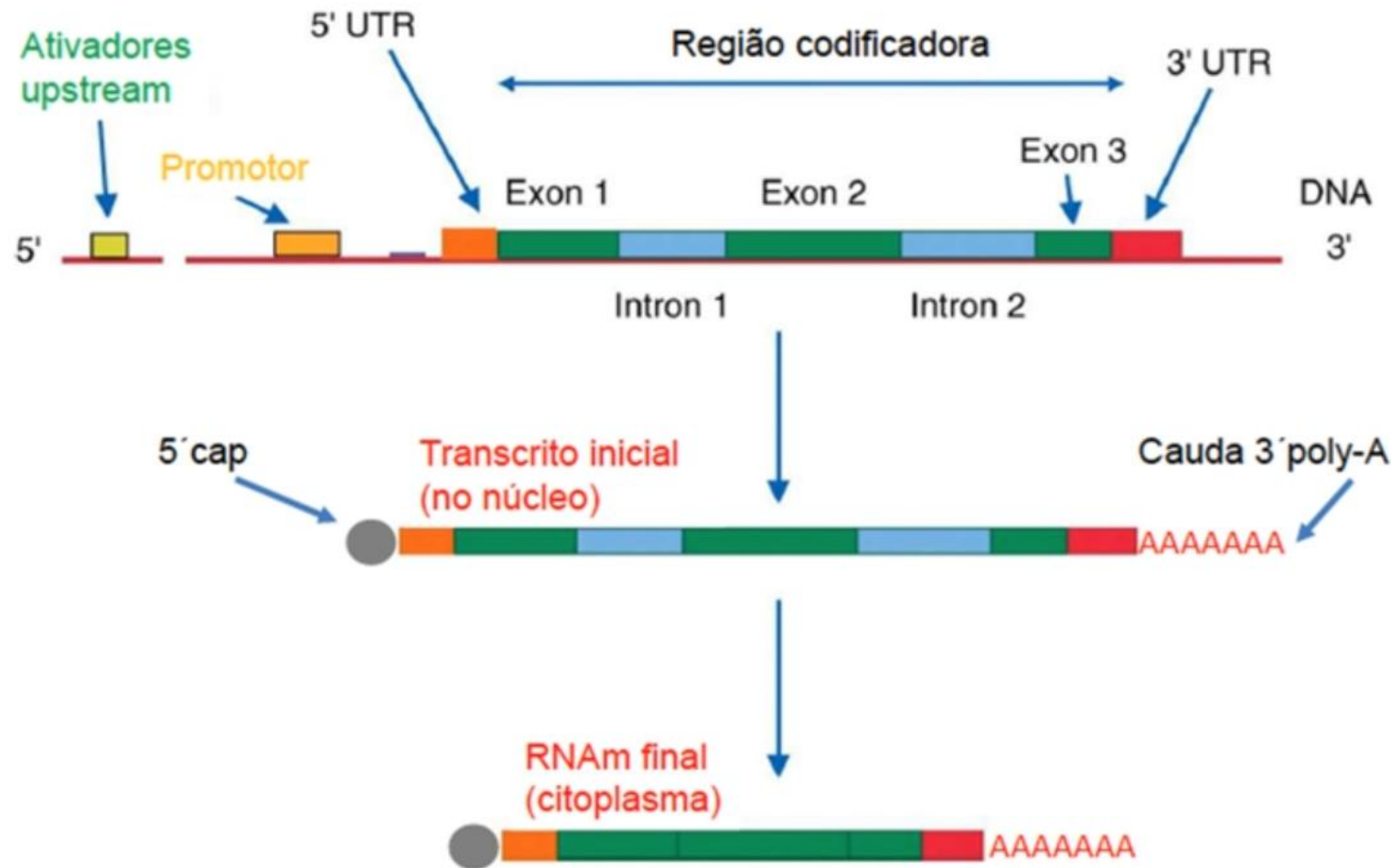
Com o tempo, ocorre o encurtamento gradual da cauda poli-A. Quando a cauda é suficientemente reduzida (~30 adeninas), o mRNA é direcionado para a degradação.

5'cap e poli A (3') são importantes para a tradução



A extremidade 5' do mRNA é reconhecida pela proteína eIF-4E ligada ao cap (m⁷G). O fator eIF-4A, com atividade helicase, ajuda a desenrolar estruturas secundárias do mRNA, facilitando a varredura para o códon de iniciação (AUG).

A anatomia de um mRNA eucariótico



Regiões UTRs (Untranslated Regions):

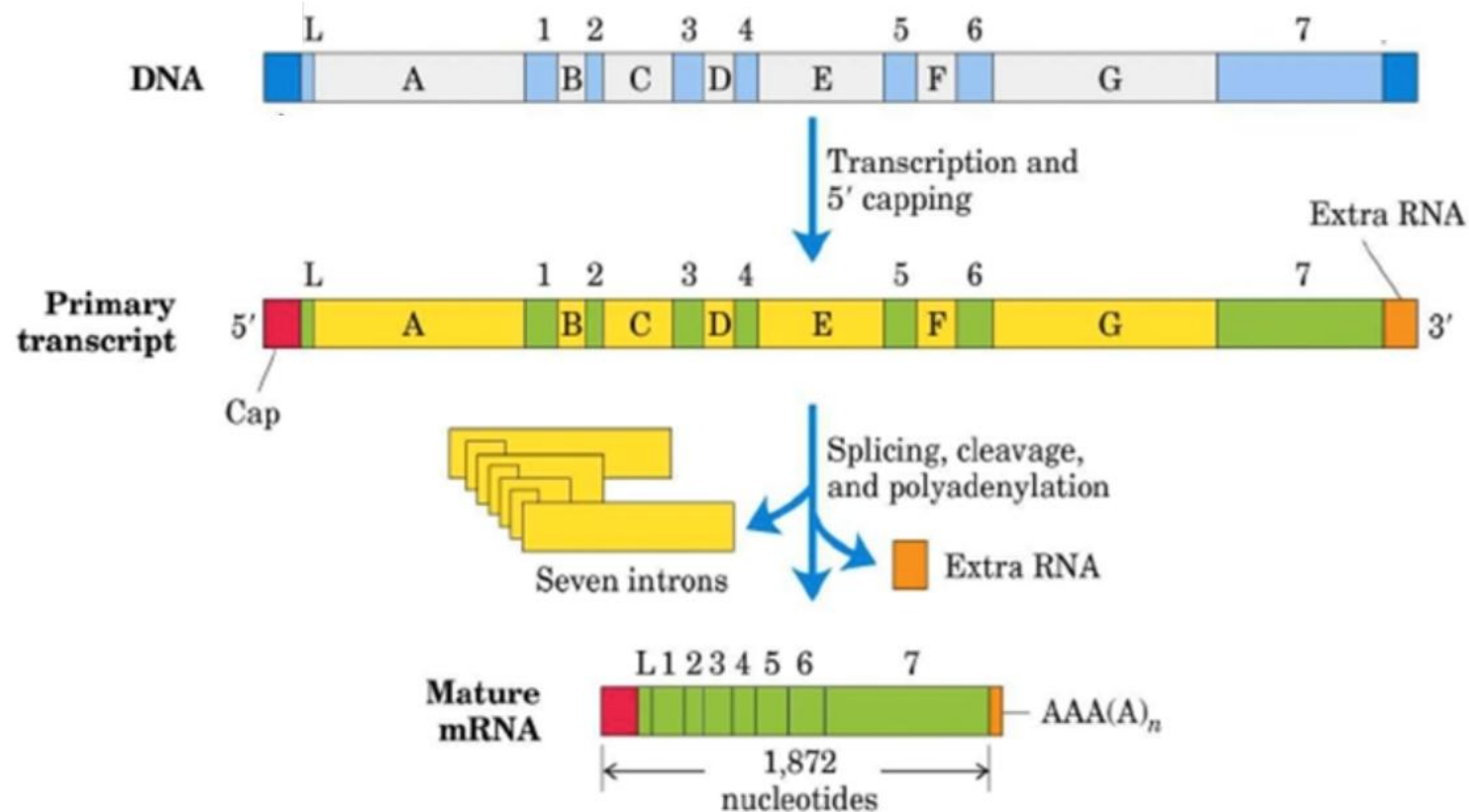
Regiões do mRNA que não codificam proteínas, localizadas antes (5'UTR) e depois (3'UTR) da sequência codificante.

5'UTR: Regula a iniciação da tradução e a estabilidade do mRNA;

3'UTR: Controla a estabilidade, localização e eficiência da tradução do mRNA; contém sinais para adição da cauda poli-A e sítios de ligação para microRNAs.

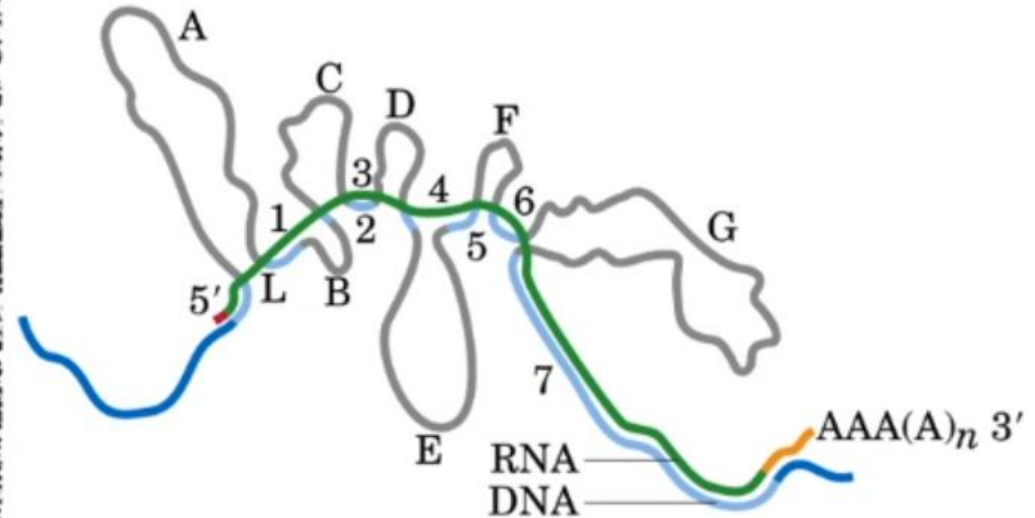
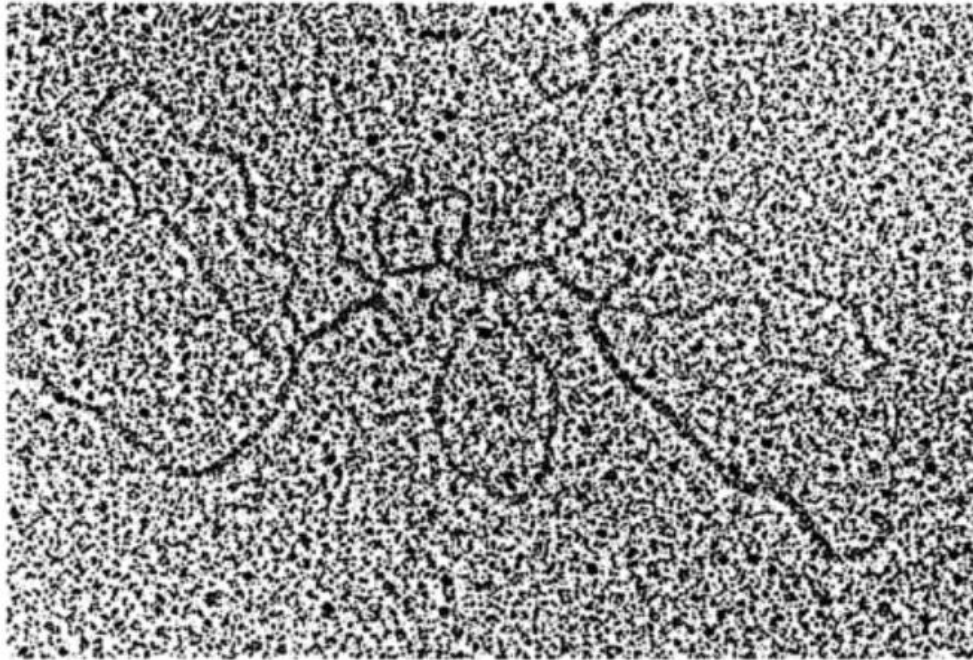
Splicing

Em eucariotos, além do 5' cap e da adição da cauda poli A na extremidade 3', os transcritos primários tem os íntrons removidos. Este processamento é denominado splicing de RNA



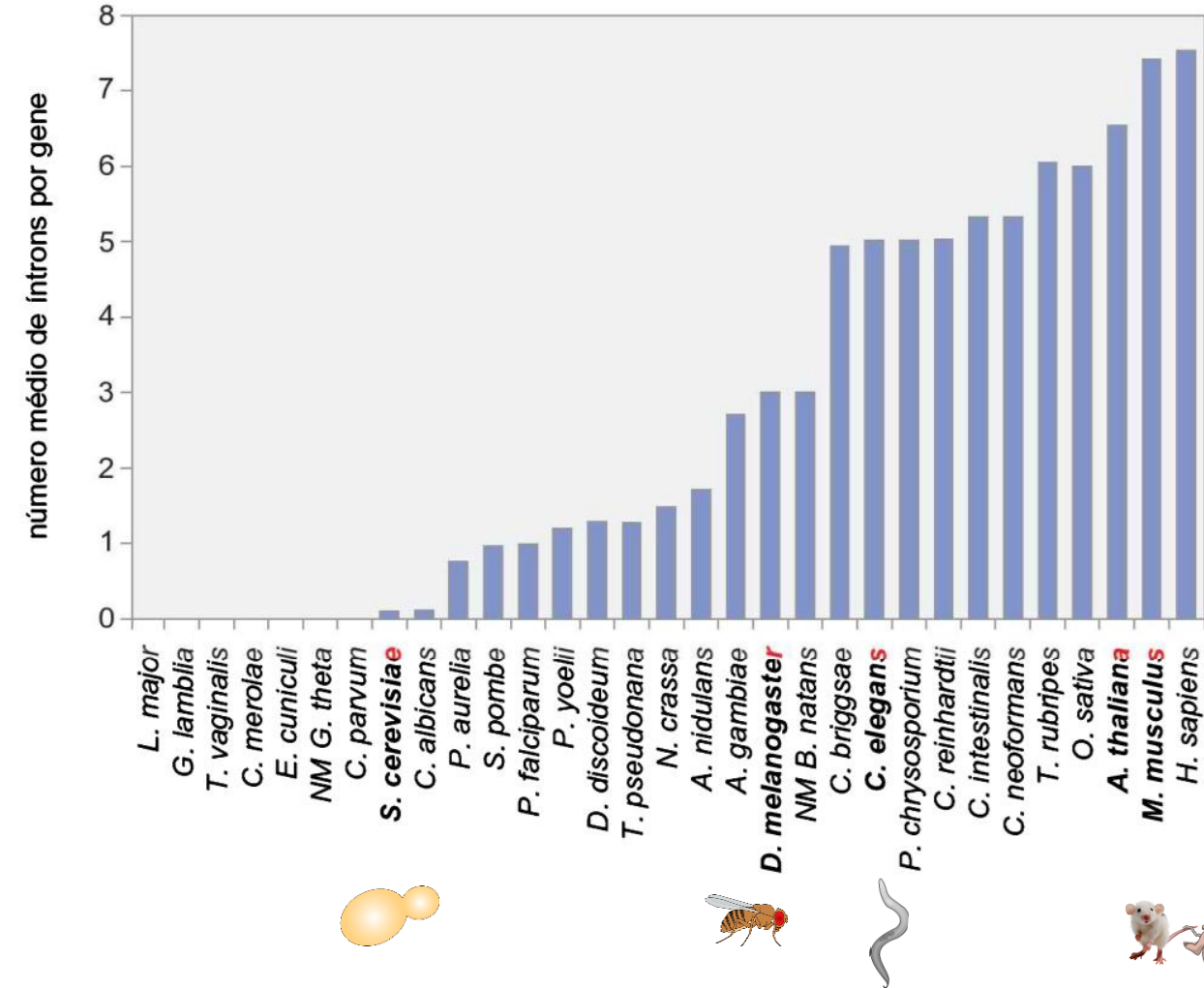
Consiste no rearranjo do mRNA, eliminando as sequências que não serão traduzidas (introns)

Mapeamento de mRNA com DNA



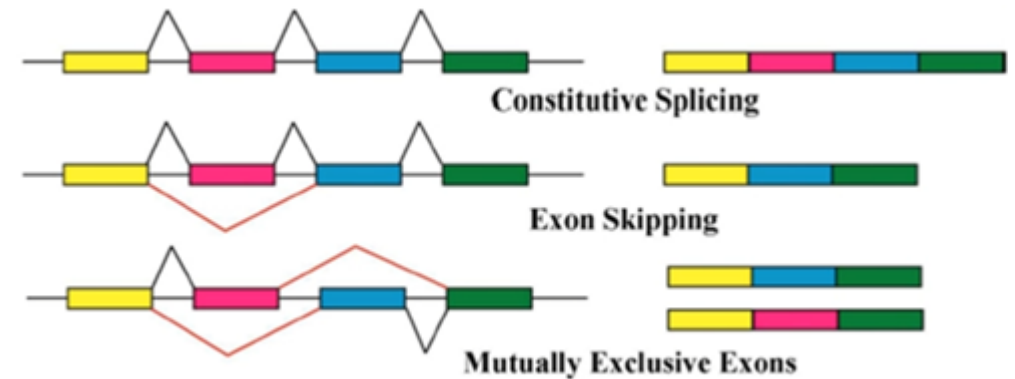
Hibridização do segmento de DNA do gene com mRNA maduro:
Observe que há segmentos que não hibridizam (não anelam)!

Número médio de íntrons por gene



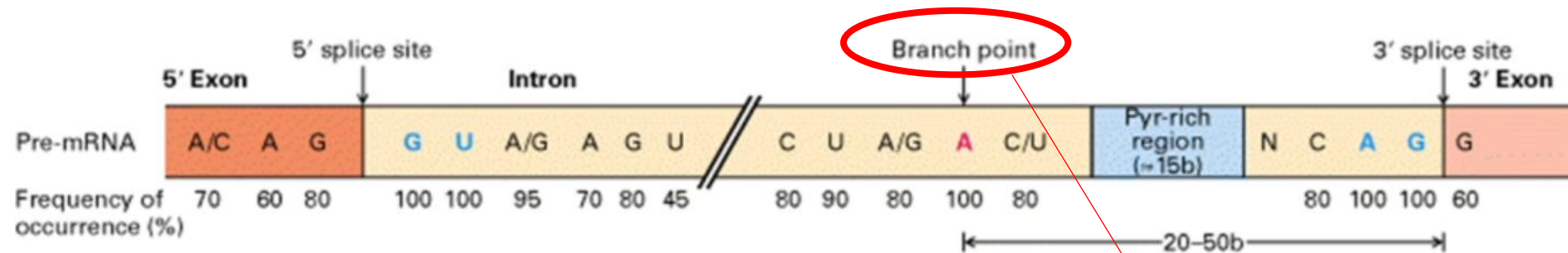
Splicing em procariotos é raro, mas existe

Gene típico de levedura: 1 intron. O gene humano da Titina possui 363 introns.

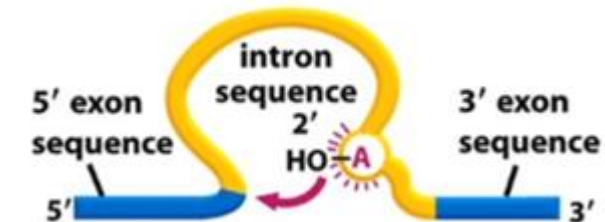


Estrutura típica de bordas exon-intron

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

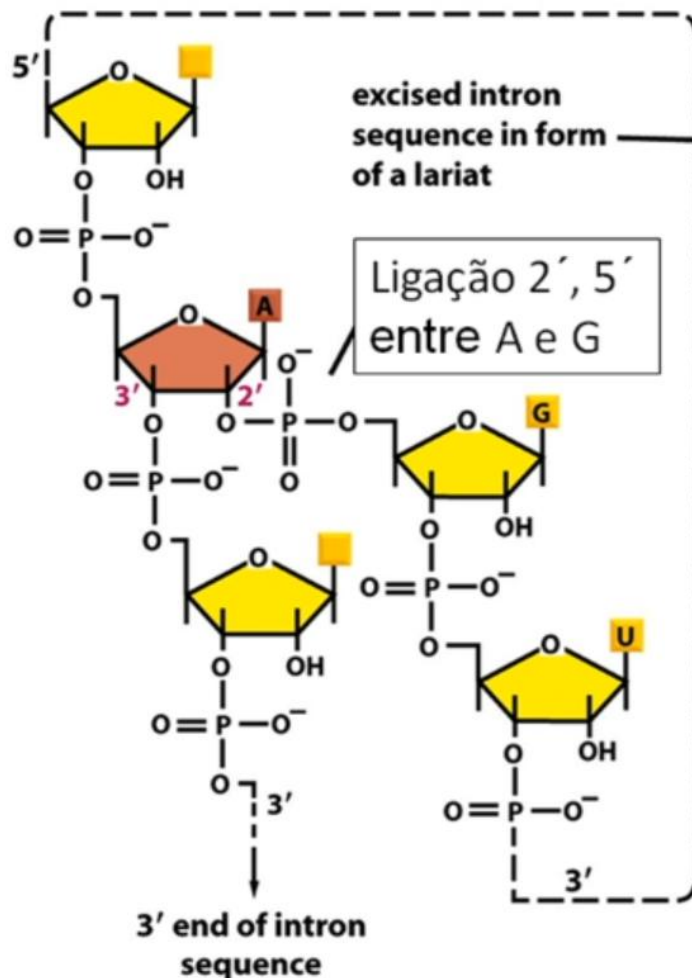


O sítio de ramificação contém uma adenina (A) que, após o corte no início do intron, se liga de forma covalente ao 5' do éxon anterior, criando uma estrutura em forma de laço ou "ramificação"



Reações de splicing

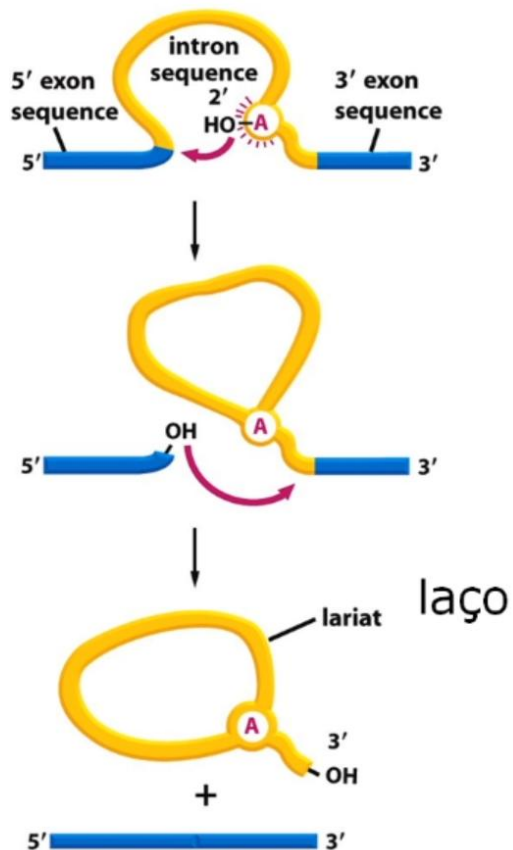
O processo de *splicing* envolve 2 reações de transesterificação na remoção do intron e junção dos exons



O sítio de ramificação contém uma adenina (A)

A hidroxila 2' da adenina ataca a junção 5' do intron, formando uma ligação especial (2'-5' fosfodiéster) e criando uma estrutura de laço

Em seguida, a extremidade livre 3' do primeiro éxon ataca o início do segundo éxon, unindo os dois éxons e liberando o intron em forma de laço.



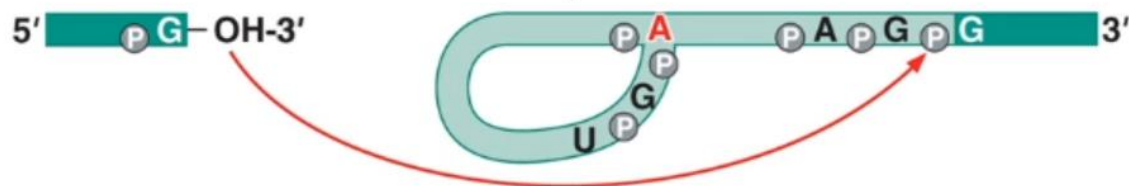
Reações de splicing

1ª reação:

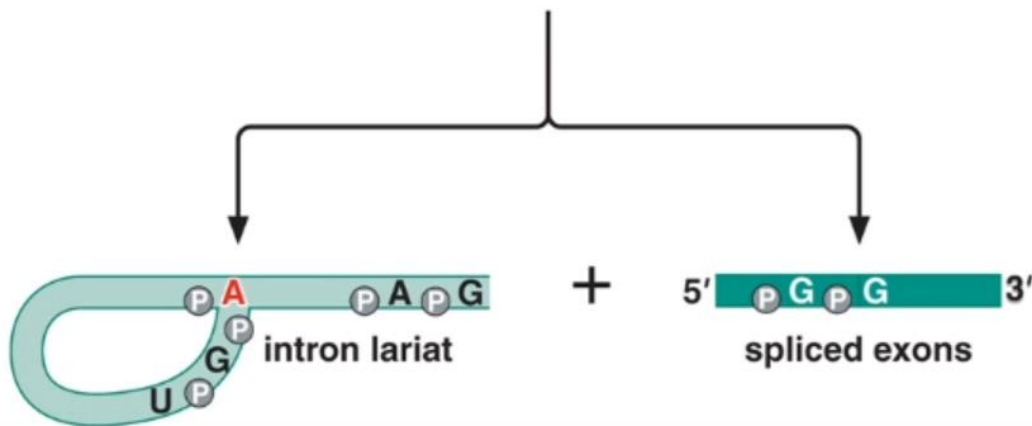


O sítio de ramificação contém uma adenina (A)

2ª reação:



A hidroxila 2' da adenina ataca a junção 5' do intron, formando uma ligação especial (2'-5' fosfodiéster) e criando uma estrutura de laço



Em seguida, a extremidade livre 3' do primeiro éxon ataca o início do segundo éxon, unindo os dois éxons e liberando o intron em forma de laço.

Tipos de íntrons

Introns do tipo I

- fazem self-splicing (ribozimas)
- encontrados em alguns genes bacterianos

Introns do tipo II

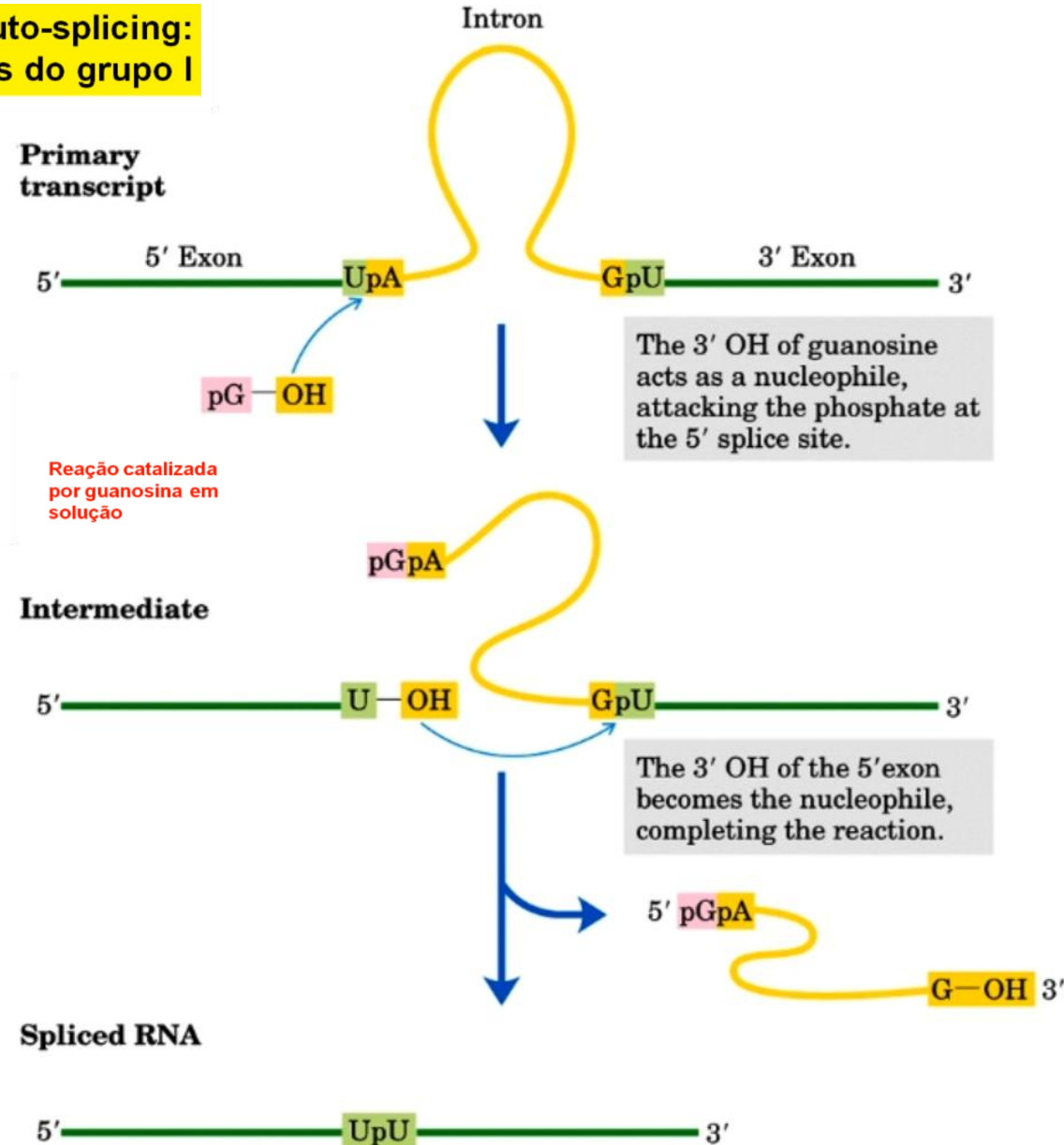
- fazem self-splicing (ribozimas) mas também usam proteínas quando *in vivo*
- encontrados em alguns genes de mitocôndria e cloroplastos

Introns do tipo III

- são os introns mais comuns e os mais estudados
- são retirados por um complexo de proteínas e RNAs (spliceossomo)
- são encontrados na maioria dos genes eucarióticos

Auto-catalizado. Tipo I

Auto-splicing:
introns do grupo I



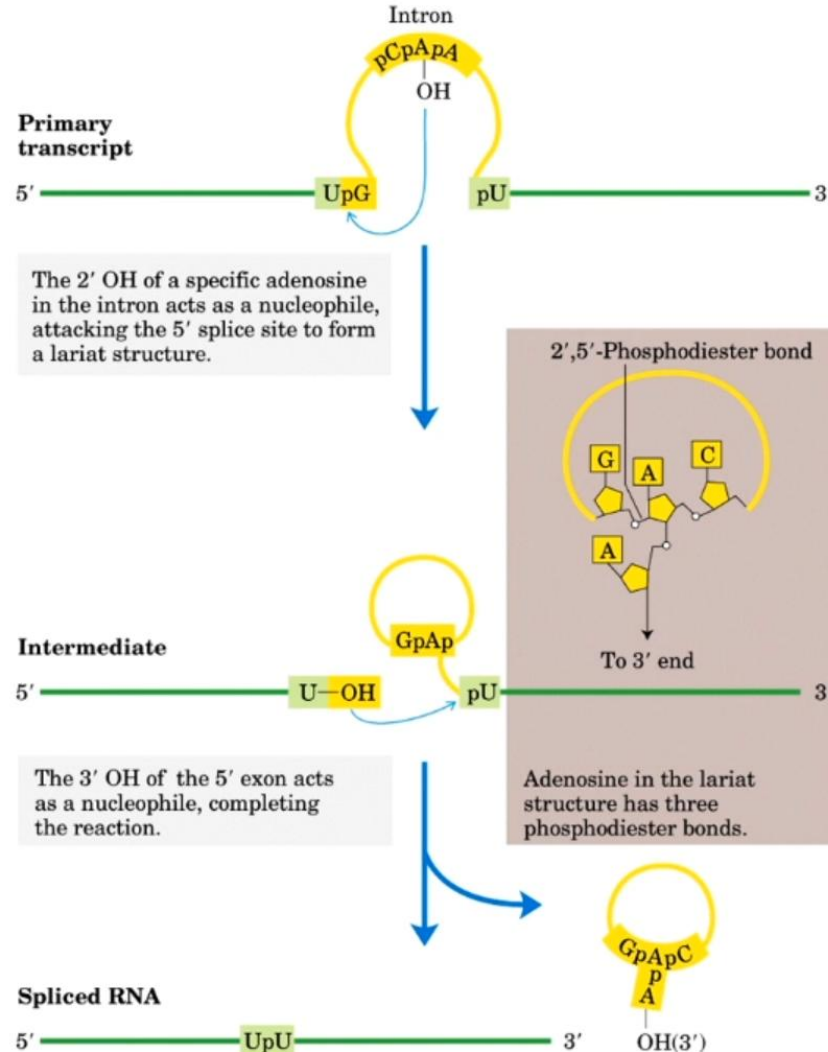
Um nucleotídeo de guanosina livre (pG-OH) ataca o sítio de splicing 5', clivando a ligação fosfodiéster.

O intron se liga covalentemente à guanosina (pGpA), e o 3' OH do éxon 5' se torna exposto, pronto para atacar o sítio de splicing 3'

O 3' OH do éxon 5' ataca a ligação no sítio 3', liberando o intron em forma linear e ligando os éxons

Auto-catalizado. Tipo II

Auto-splicing: introns do grupo II



O 2' OH de uma adenosina interna no intron inicia a reação.

Forma-se uma estrutura de "laço" (lariat) com ligação 2',5'-fosfodiéster.

O 3' OH do éxon 5' ataca o sítio 3', unindo os éxons.

O intron é liberado em forma de laço.

Grupo I: Requer guanosina livre; intron linear.

Grupo II: Usa adenosina interna; intron em laço (lariat).

Ambos são autocatalíticos, mas o mecanismo de ataque nucleofílico e a estrutura do intron liberado são distintos.

Introns sem auto-splicing

mRNAs de eucariotos

Remoção de íntrons realizadas por **spliceossomos**



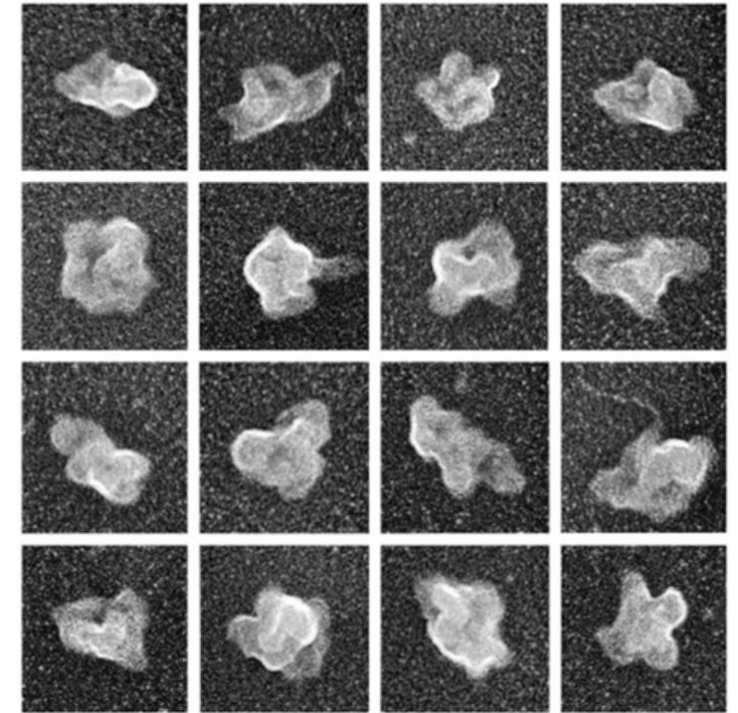
*Complexo proteico enorme composto por 5 ribonucleoproteicos (snRNPs)
PS: Tem outras proteínas adicionais*

Os RNAs dos snRNPs podem interagir com o mRNA

snRNPs: U1, U2, U4, U5 e U6

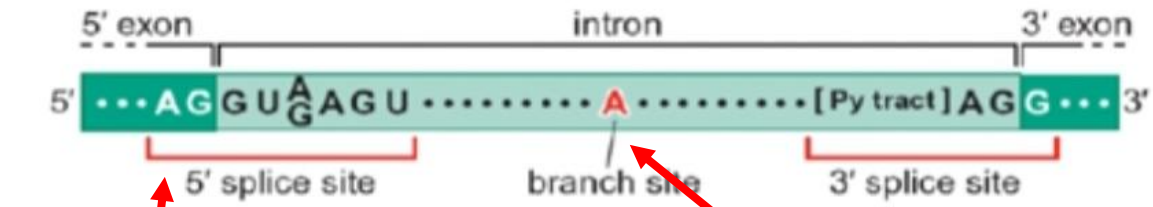
- Spliceossomos são complexos supra-moleculares formados pela associação de pequenas ribonucleoproteínas (snRNPs – “small nuclear ribonucleoproteins”)

U3 → Atua no processamento do pré-rRNA (envolvido na montagem dos ribossomos, não na maturação de mRNA).

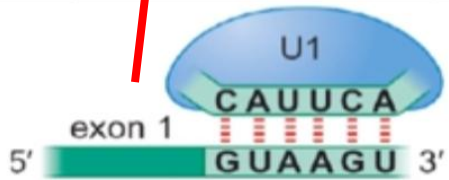


O nome "U" vem do fato de que esses RNAs foram originalmente identificados como sendo ricos em uridina

Pareamento dos snRNAs com regiões do pré-mRNA



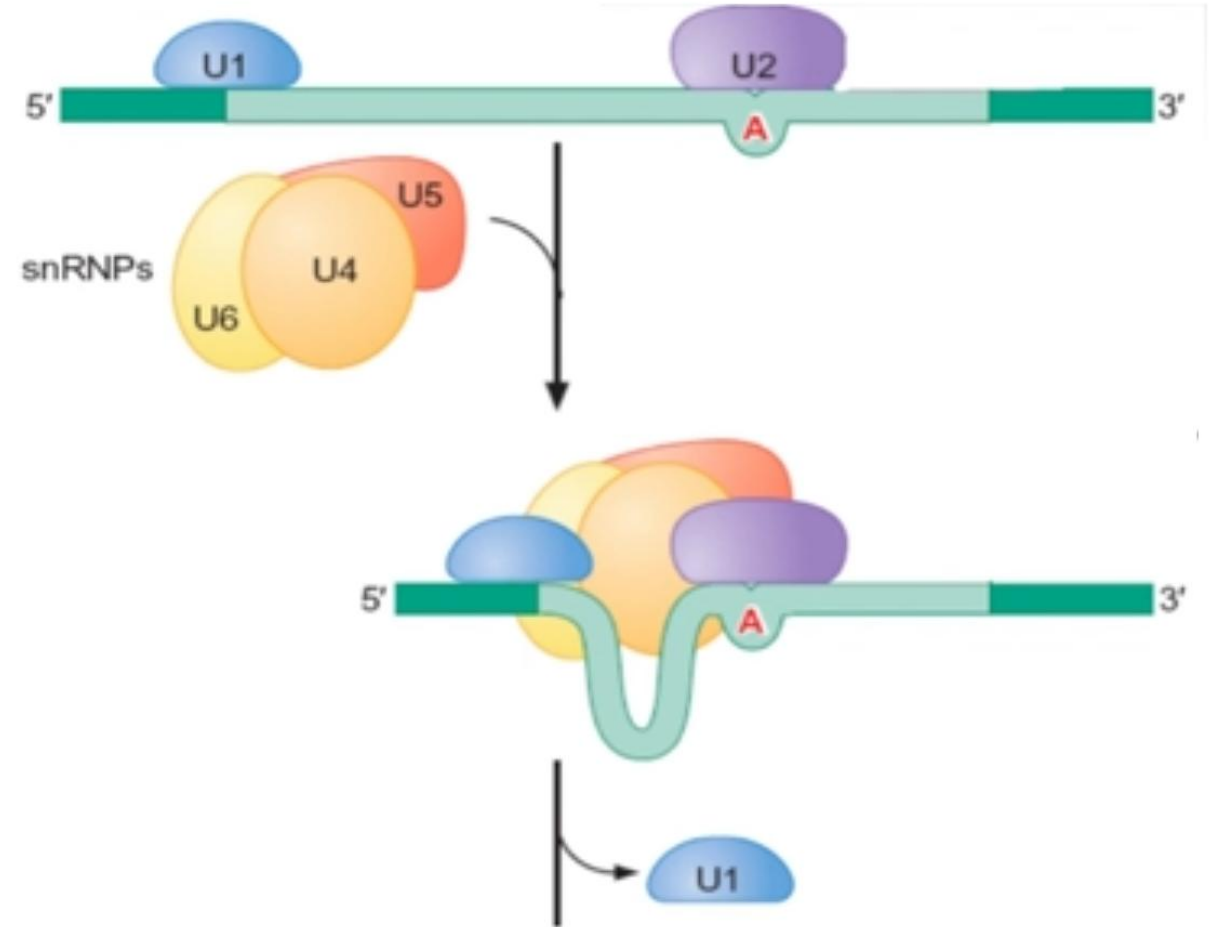
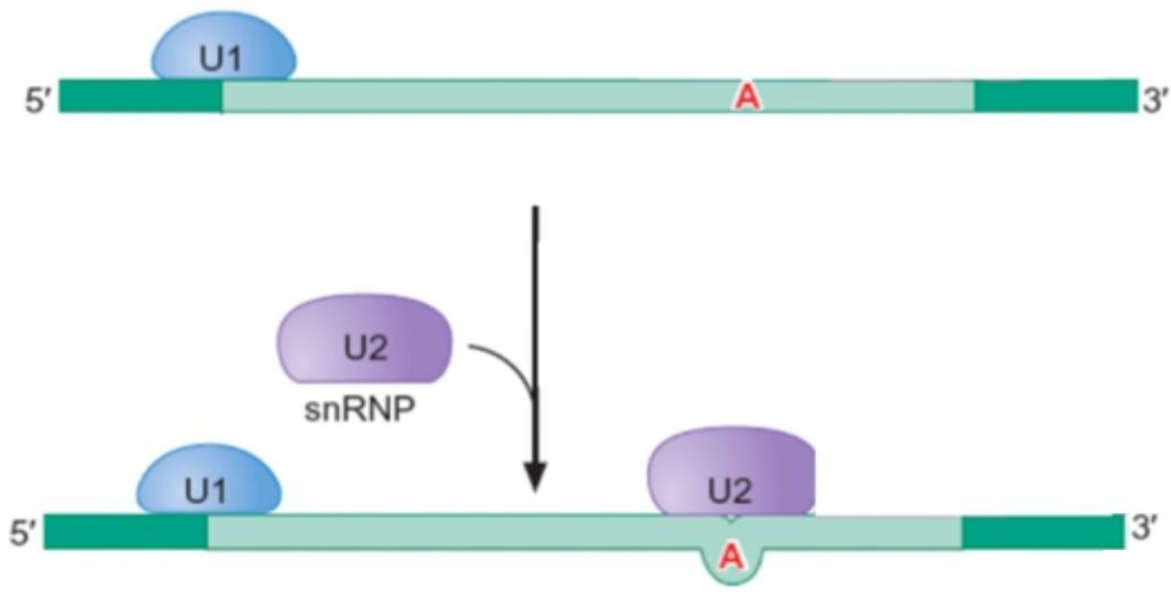
U1 é complementar ao sítio de splicing 5'



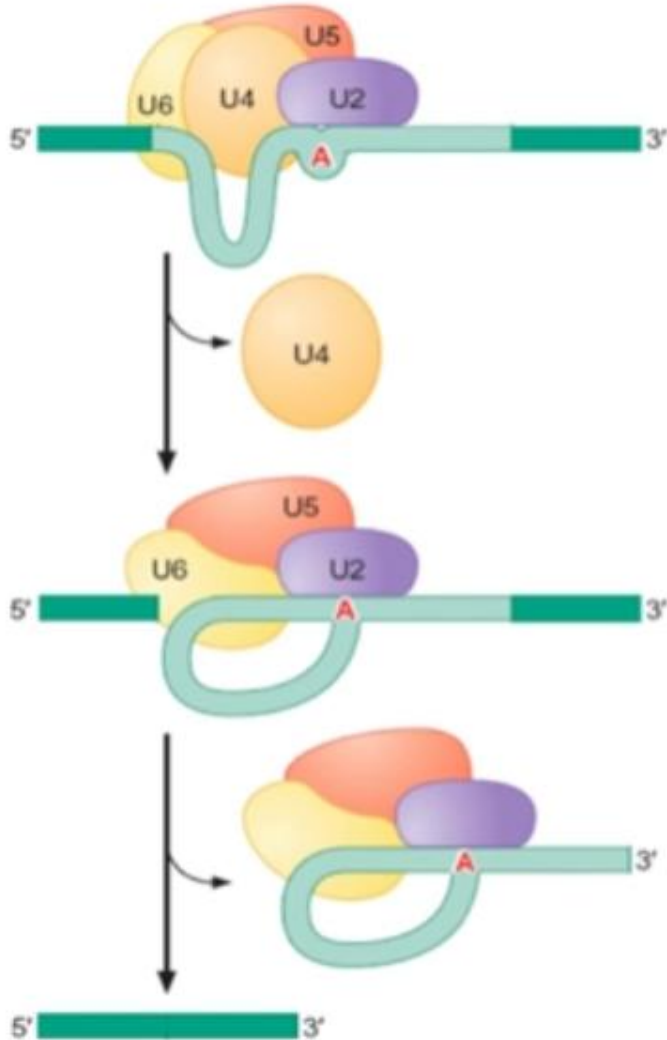
U2 é complementar ao sítio de que flanqueia o ponto de ramificação causando a exposição do mesmo



Ação do spliceossomo



Ação do spliceossomo



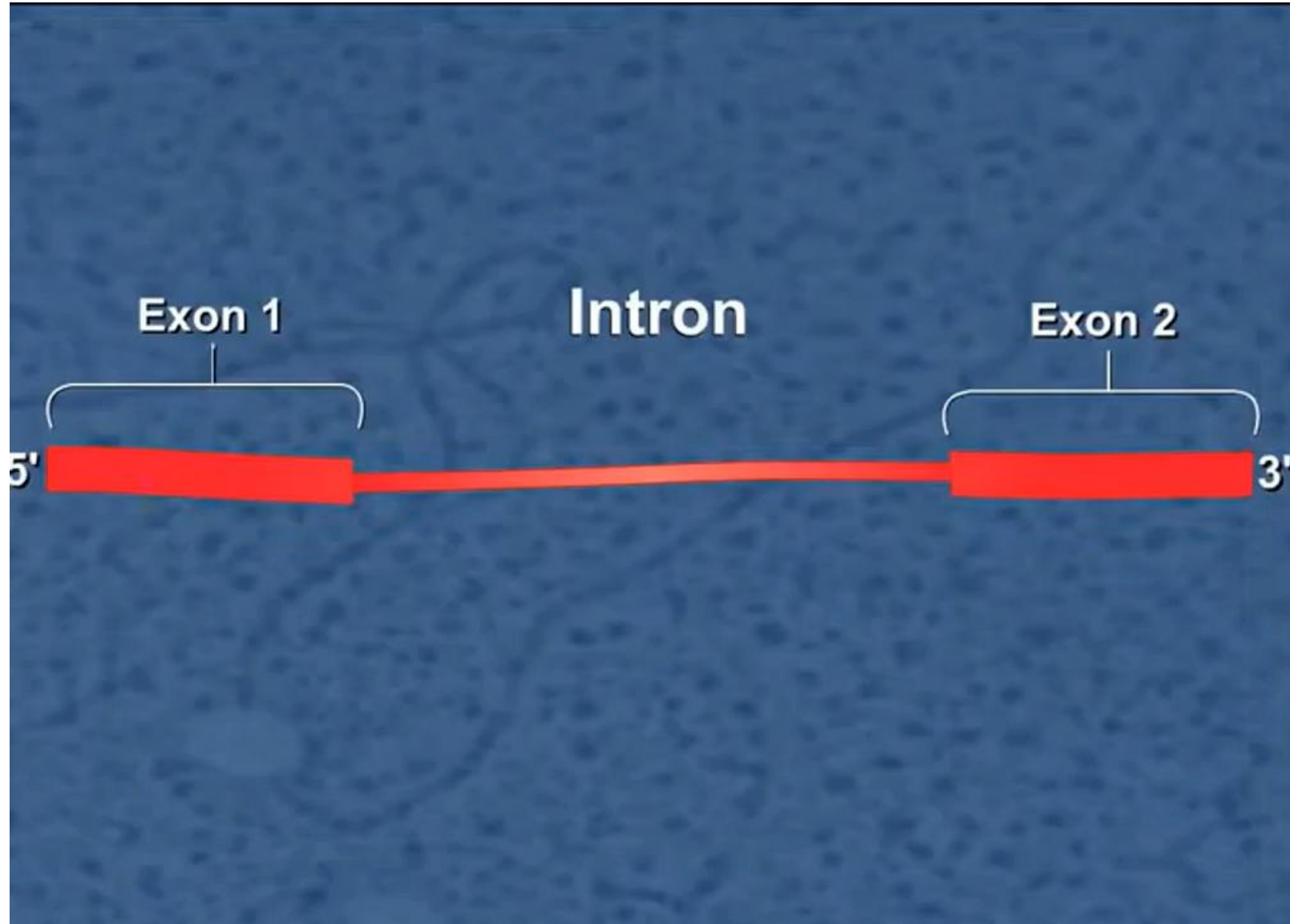
U4 atua como inibidor temporário de U6. Quando o spliceossoma está corretamente montado e pronto para catalisar o corte e a junção dos exons, U4 se desprende

U6 organiza o ambiente catalítico para o ataque nucleofílico da adenosina

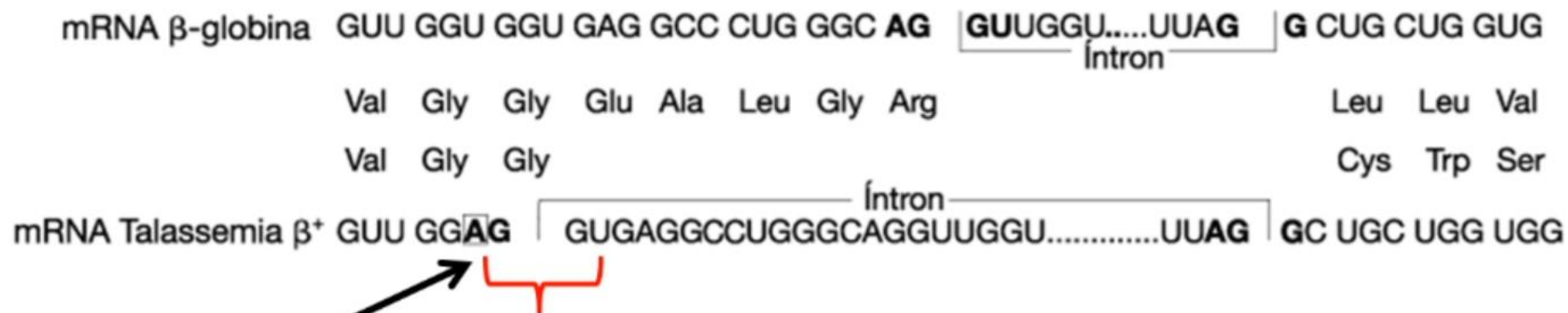
U5 alinha os exons para que sejam unidos após o corte do intron

Há um grande consumo de ATP nessas deslocções das snRNPs

Ação do spliceossomo

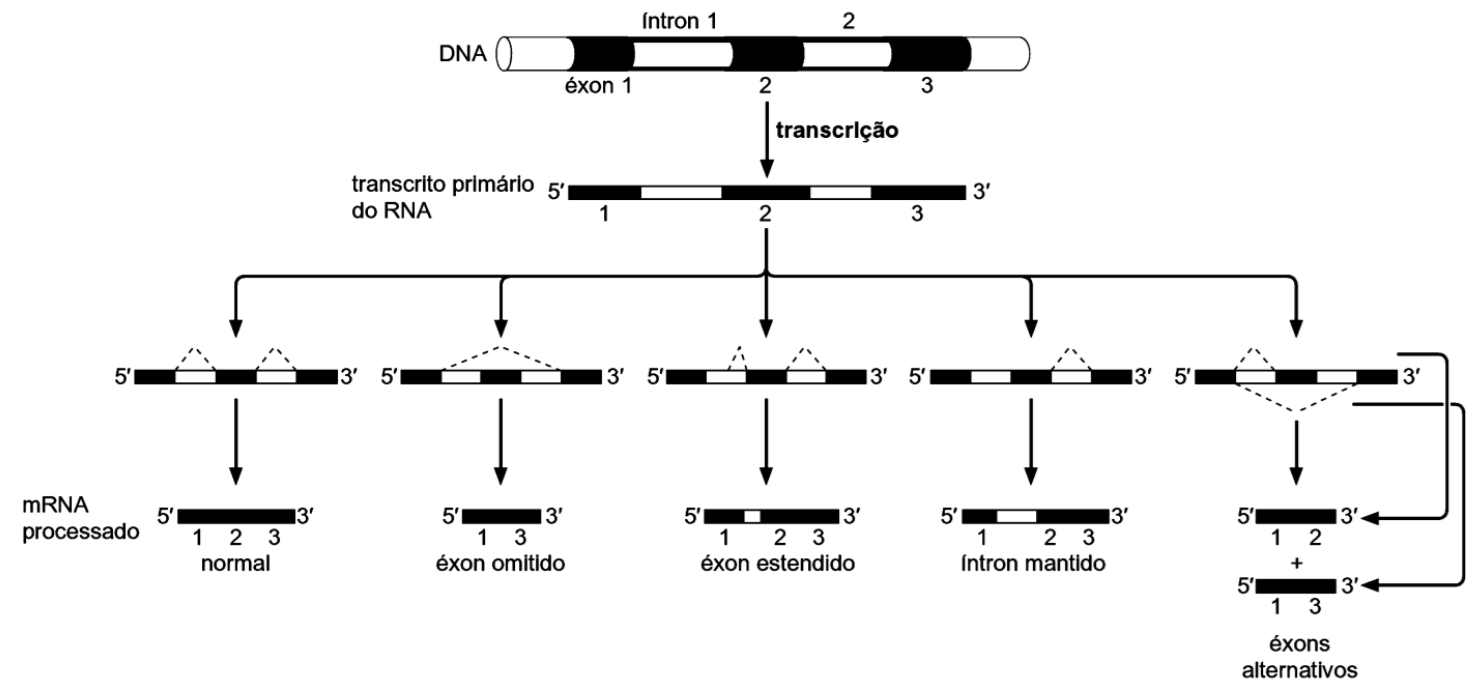
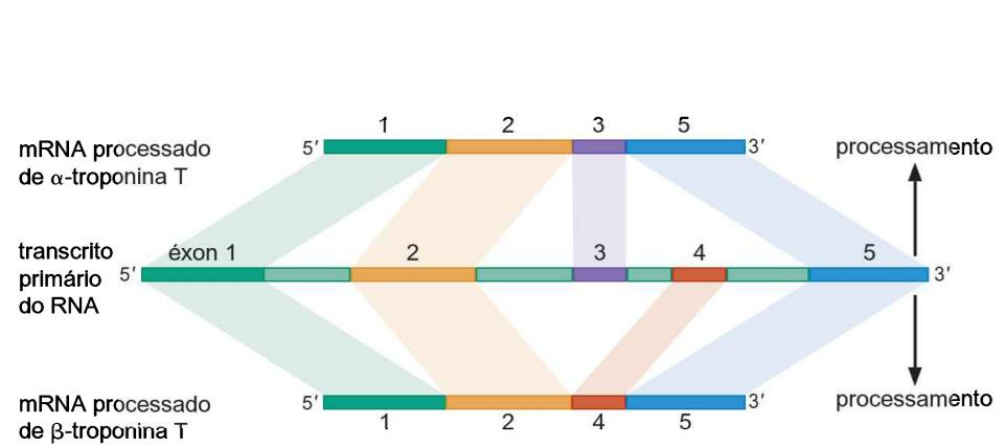


Splicing & doenças humanas



Mutação criou um sítio
de *splicing* distinto

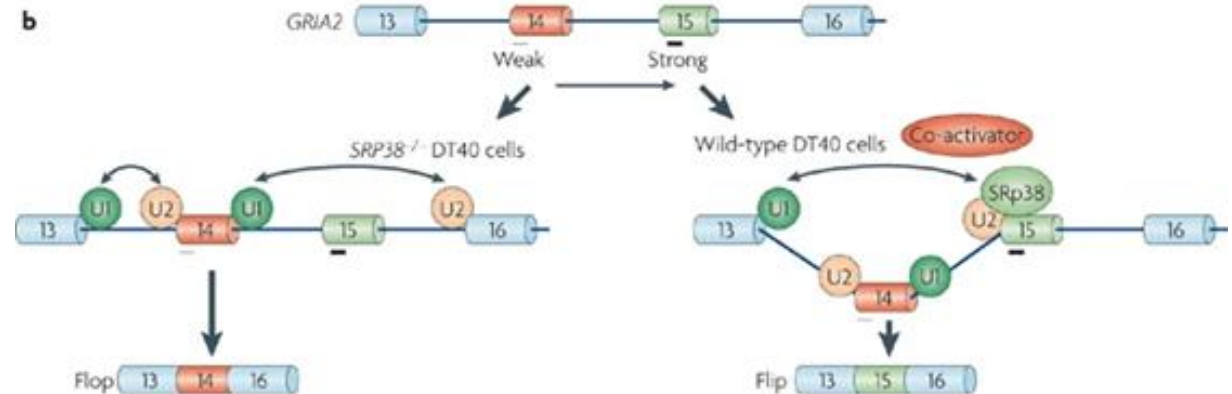
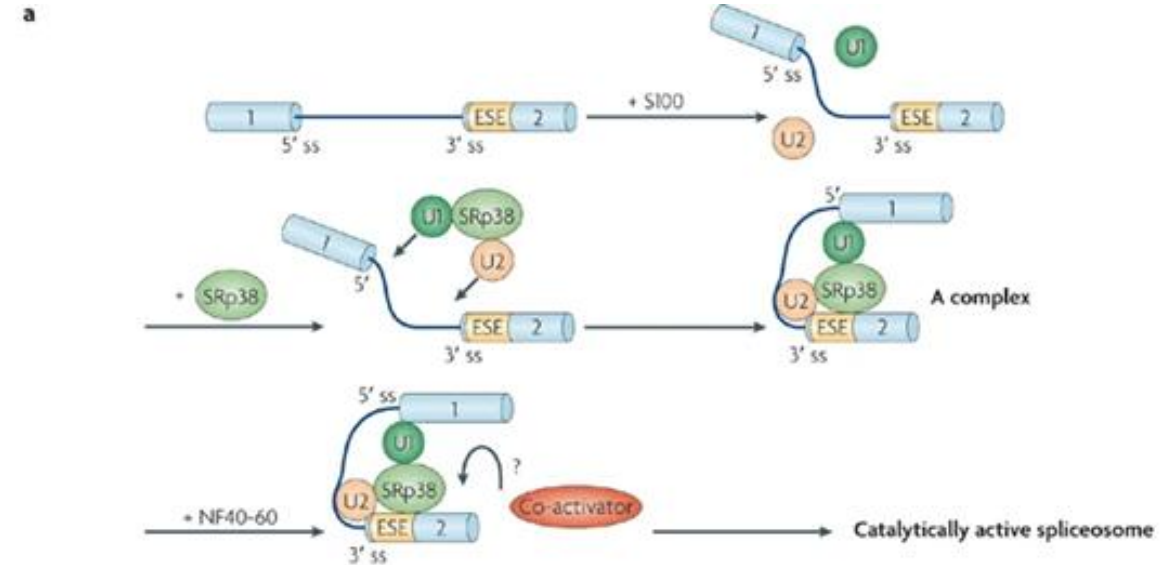
Processamento alternativo e isoformas



Como ocorre o splicing alternativo?

Ainda é uma área em desenvolvimento

O splicing alternativo pode ser controlado por reguladores de splicing diferencialmente expressos e/ou modificações pós-traducionais (e.g., fosforilação).

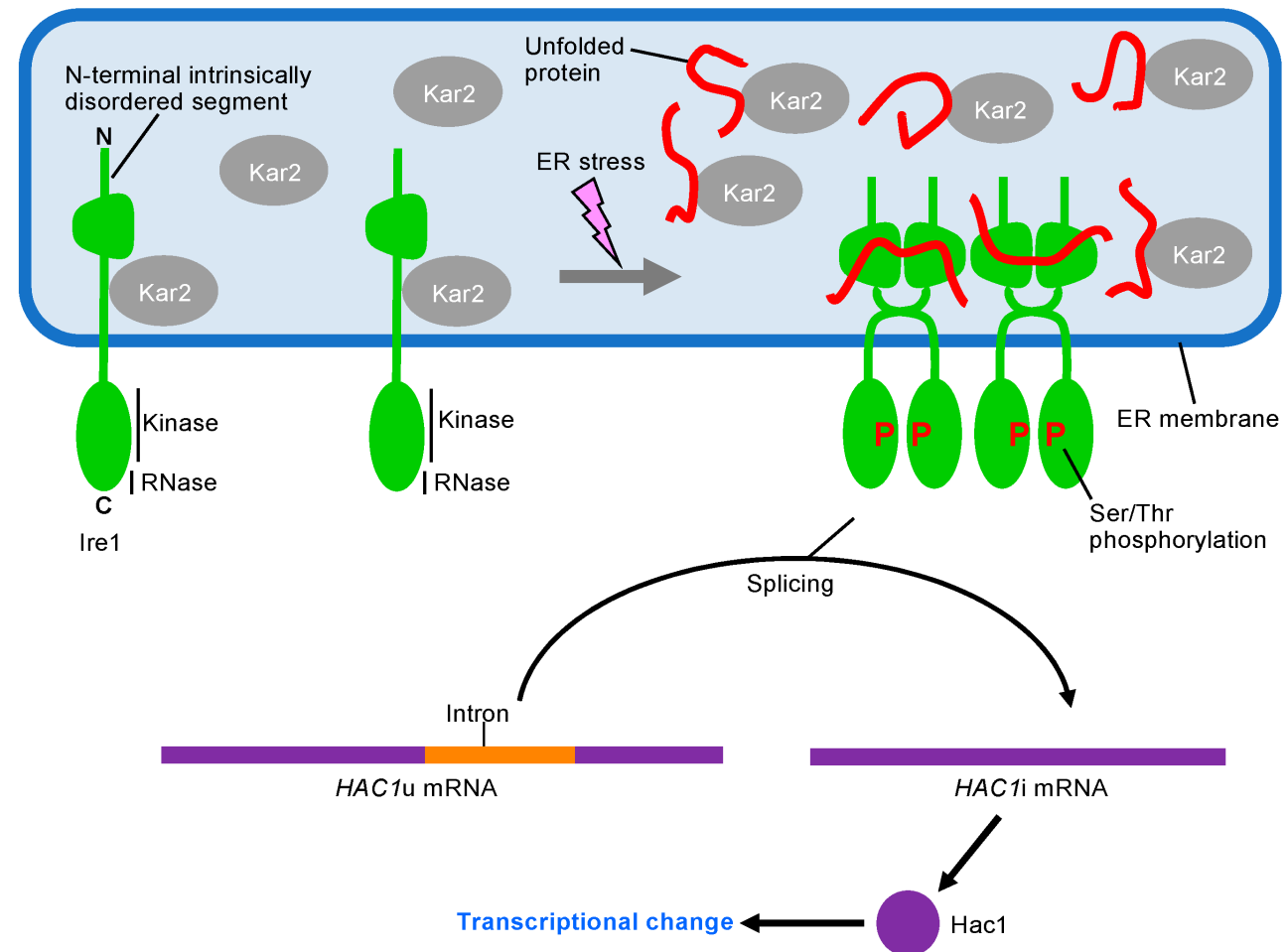


Um caso de splicing não-canônico citosólico

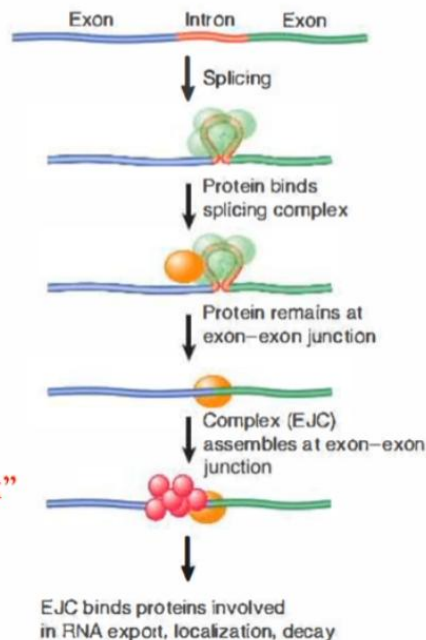
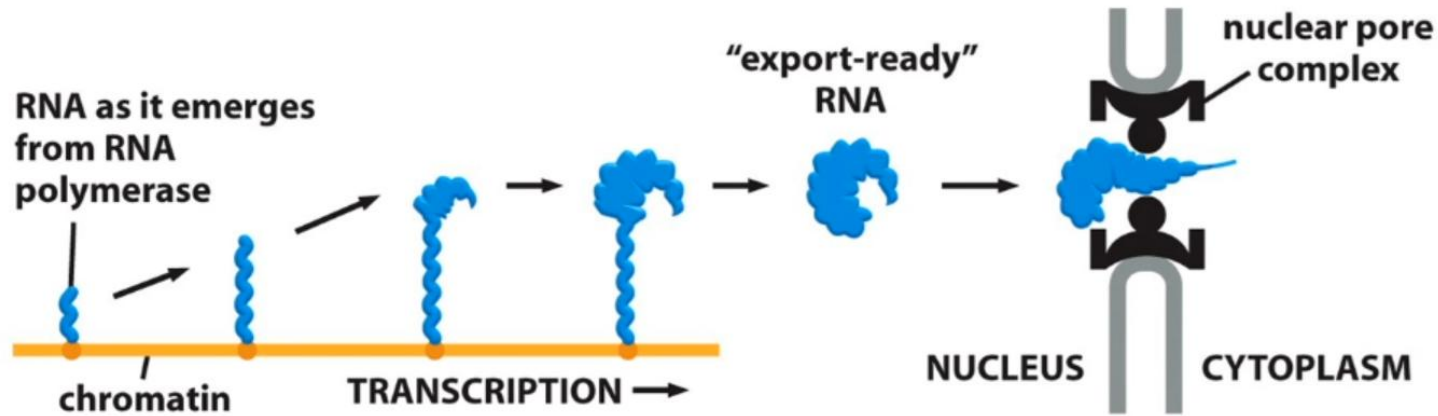
Unfolded Protein Response / Resposta a Proteínas Mal-Enoveladas



Breakthrough Prize in Life Sciences
Albert Lasker Award



Transporte de RNA



**“Exon Junction complex”
EJC**

Só os mRNAs com processamento completo são reconhecidos por proteínas exportadoras (como o complexo TREX), que os direcionam através dos poros nucleares para o citoplasma.

Leitura adicional (opcional)



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993

"for their discoveries of split genes "



Richard J. Roberts



Phillip A. Sharp

Nobel lectures:

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1993/roberts/lecture/>

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1993/sharp/lecture/>