

Estrutura Gênica e Transcrição

Prof. Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química – USP

QBQ1354
Química

O que são genes ?

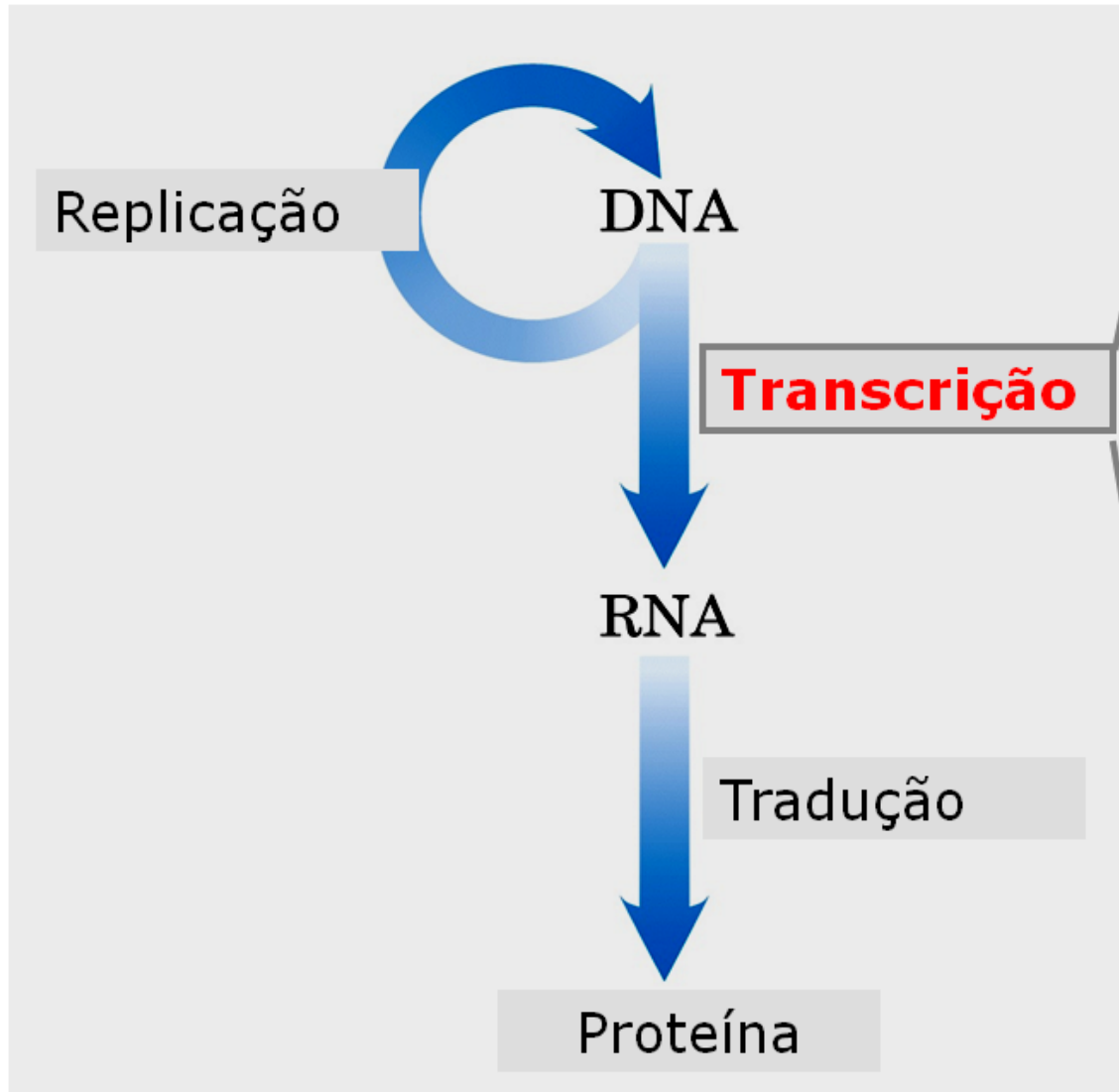
Qual a diferença entre genoma e transcrito ?

Como os genes são ativados ?

Quais as características estruturais e elementos regulatórios dos genes de procariotos? E de eucariotos ?

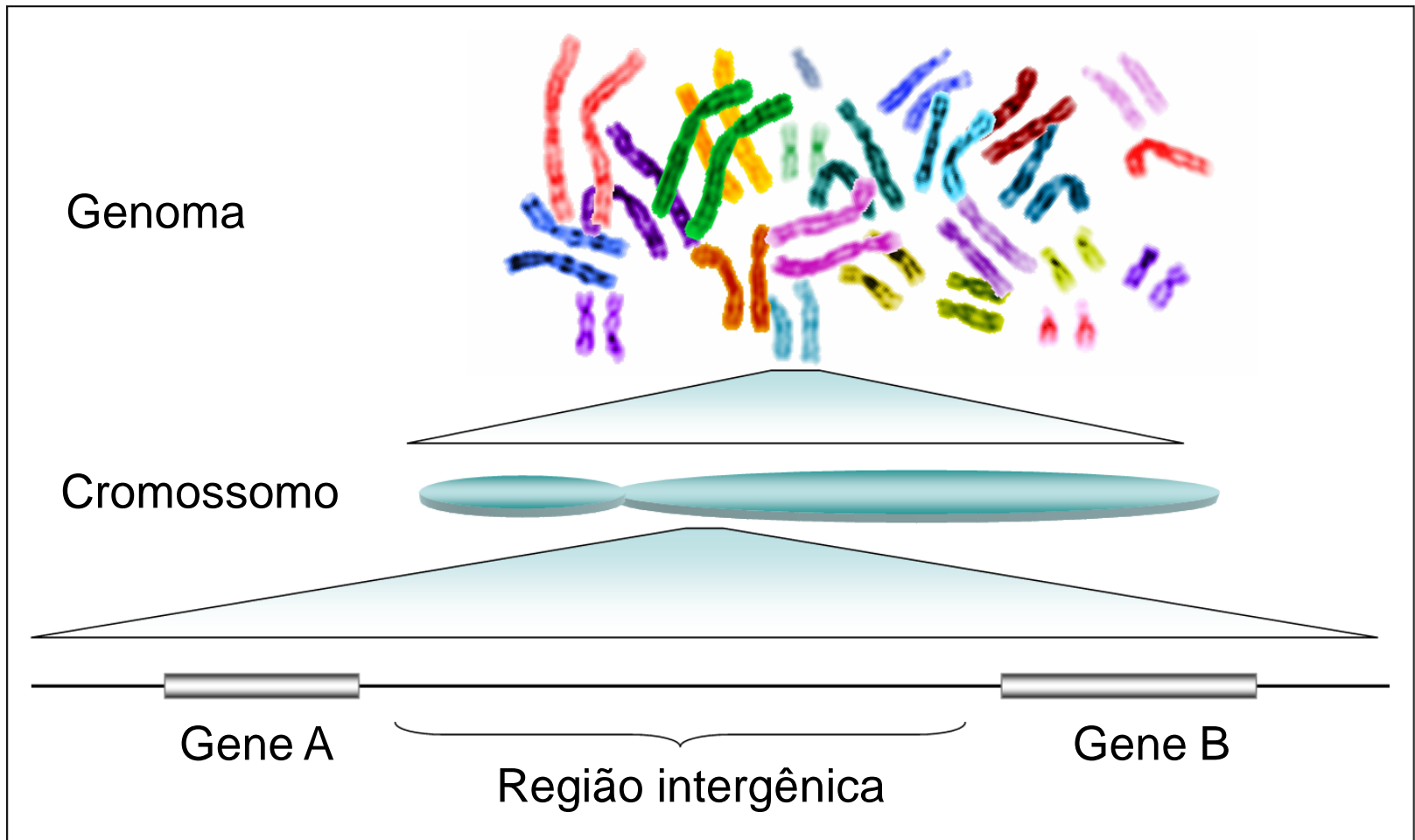
Qual a maquinaria celular envolvida na transcrição ?

Genes ativos geram cópias de RNA no processo de transcrição



- Processo para síntese de todos os RNAs da célula
- Reflete o estado fisiológico da célula
- O conjunto de genes expressos em uma dada situação é variável
- Processo catalisado pelas **RNAs polimerases**

O que são genes?

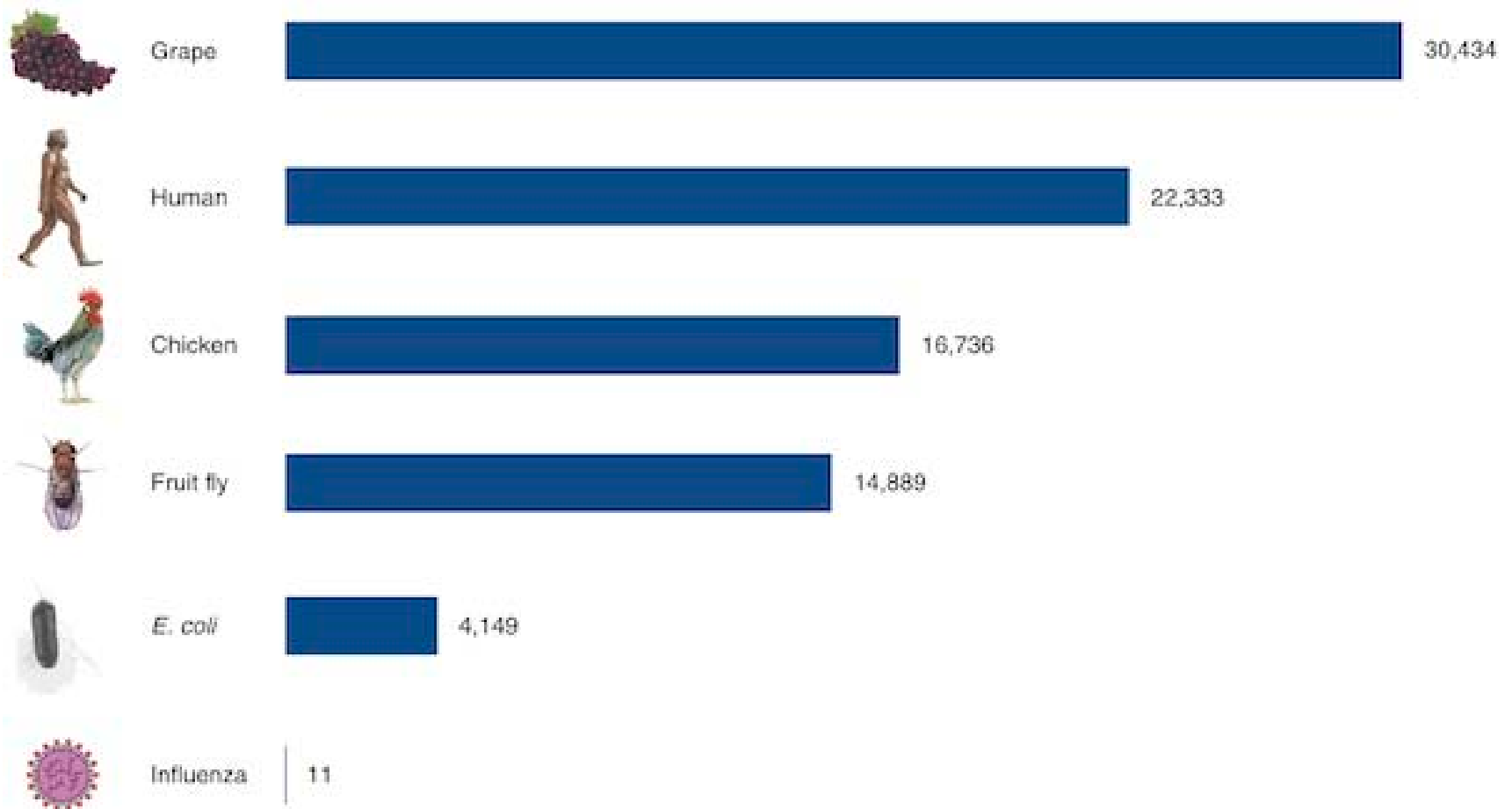


O que são genes?

- **Trechos funcionais do genoma** (DNA nas células, RNA em alguns virus) que são transmitidos como uma **unidade hereditária**.
- Frequentemente estão associados a **características mensuráveis (fenótipos)**. Ex. cor dos olhos ou cabelo, tipo sanguíneo, etc.
- Podem estar presentes em mais de uma cópia e apresentar variações entre indivíduos, onde os variantes são denominados **alelos** (organismos diplóides possuem 2 alelos distintos).

Número de genes em diferentes organismos

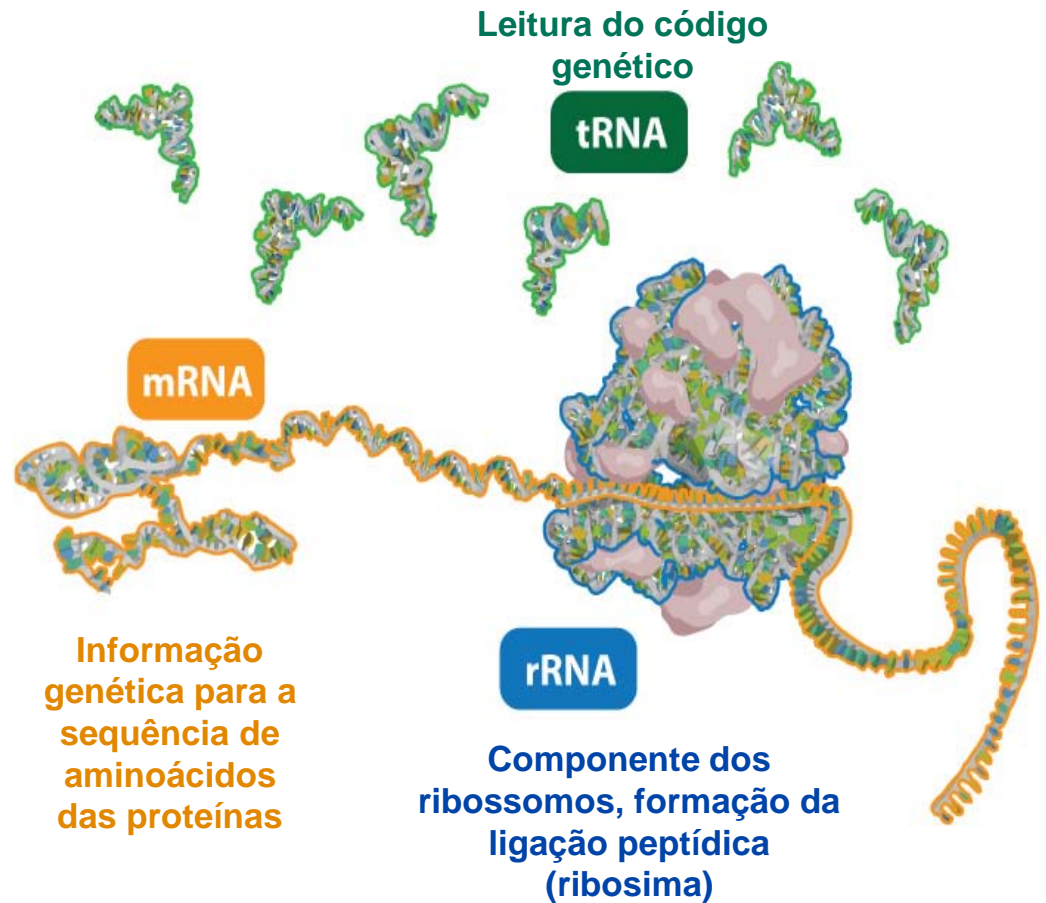
Em geral há uma correlação positiva com o grau de complexidade dos organismos (há exceções!!)



A definição de genes foi mudando a medida que o conhecimento da biologia molecular avançou

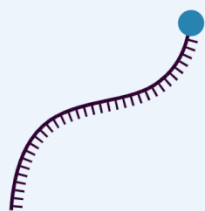
Conceito clássico:

regiões do genoma que codificam proteínas (RNAs mensageiros) e RNAs diretamente envolvidos na síntese proteica (rRNAs ribossomais, RNAs transportadores)



Tipos de RNA codificados no genoma eucariótico

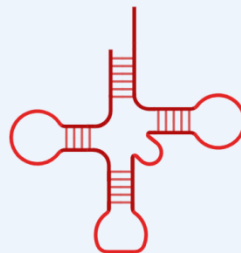
mRNA



1-5%

codifica proteínas

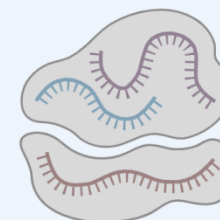
tRNA



5-10%

Atua como adaptador na leitura do código genético

rRNA



80-90%

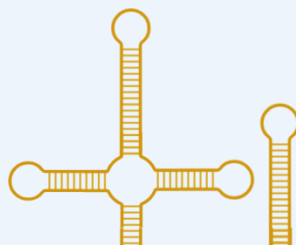
componente estrutural e catalítico dos ribossomos

snoRNA



1-2%

snRNA



microRNA

< 1%

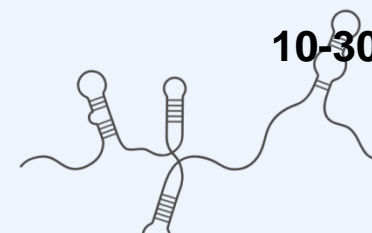


RNAs não codificadores longos (lncRNAs)

1-2%



10-30%



Conceito moderno de gene:

regiões do genoma que codificam proteínas ou RNAs com funções regulatórias, catalíticas e estruturais (RNAs não codificadores de proteínas, ncRNAs)

Quantidade relativa de diferentes RNAs na bactéria E.coli

Component	Dry Cell Mass (%)	Molecules /Cell	Different types	Copies of each type
Wall	10	1	1	1
Membrane	10	2	2	1
DNA	1.5	1	1	1
mRNA	1	1,500	600	2-3
tRNA	3	200,000	60	>3000
rRNA	16	38,000	2	19,000
Ribosomal protein	9	10^6	52	19,000
Soluble protein	46	2.0×10^6	1850	>1000
Small molecules	3	7.5×10^6	800	

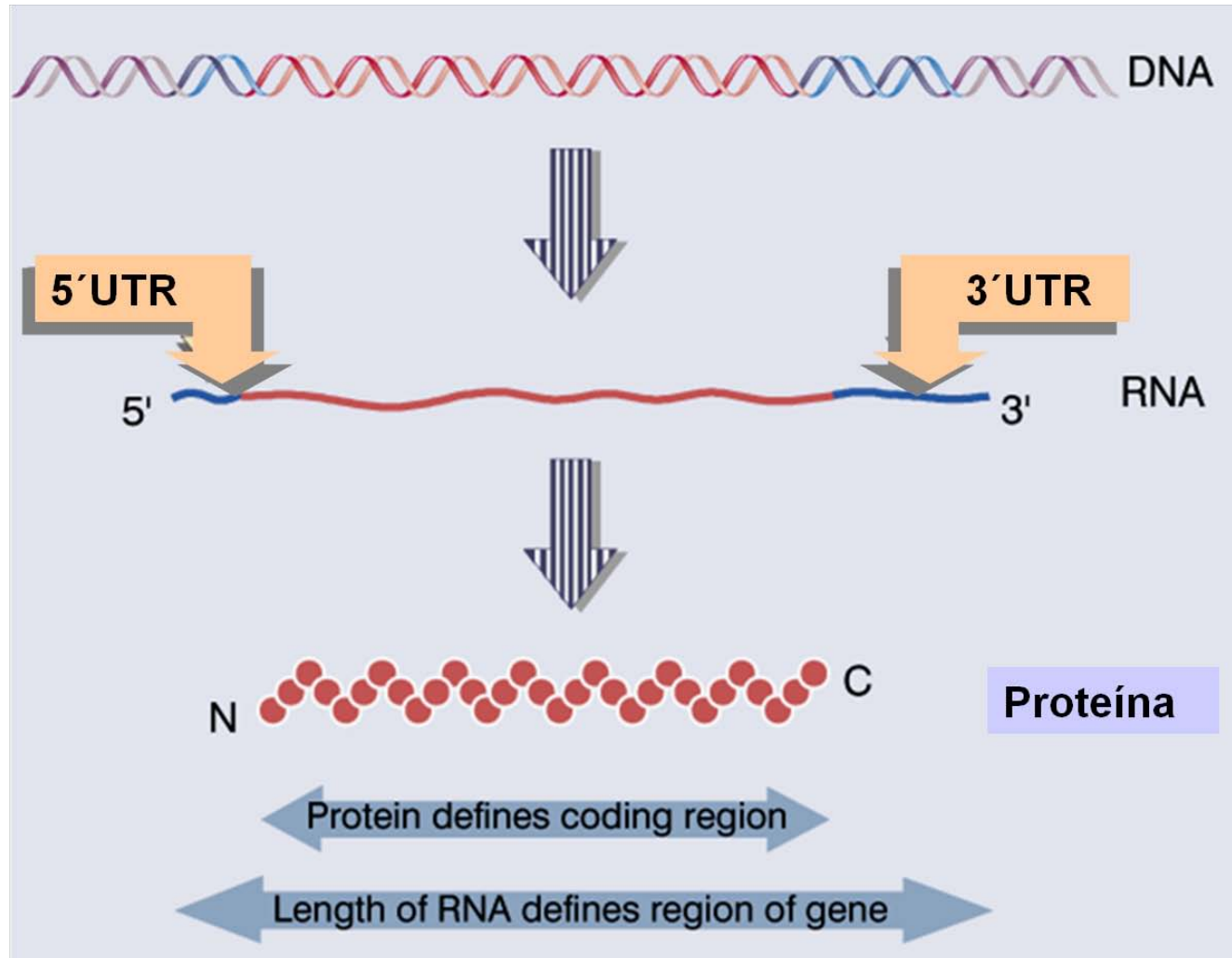
O que é o transcritoma ?

= Coleção de RNAs (transcritos) presentes em uma célula/tecido em um dado momento.

Fração do código genético (DNA) que é **transcrita** pela RNA polimerase em moléculas de RNA em uma célula

Inclui todos os tipos de RNA codificados no genoma

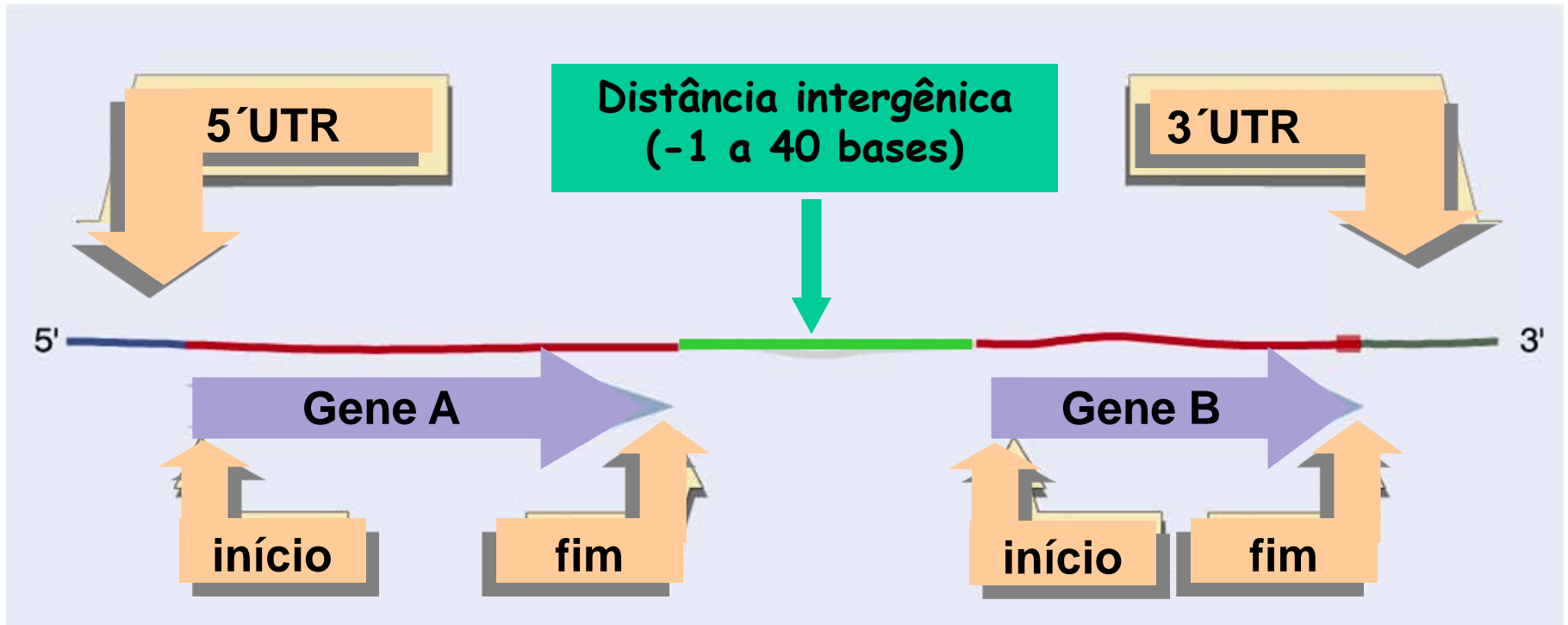
O gene geralmente é maior do que a sequência codificadora para a proteína



UTR: Região não traduzida (“Untranslated region”)

Anatomia dos genes em procariotos

O mRNA bacteriano em geral é **policistrônico** (poligênico)

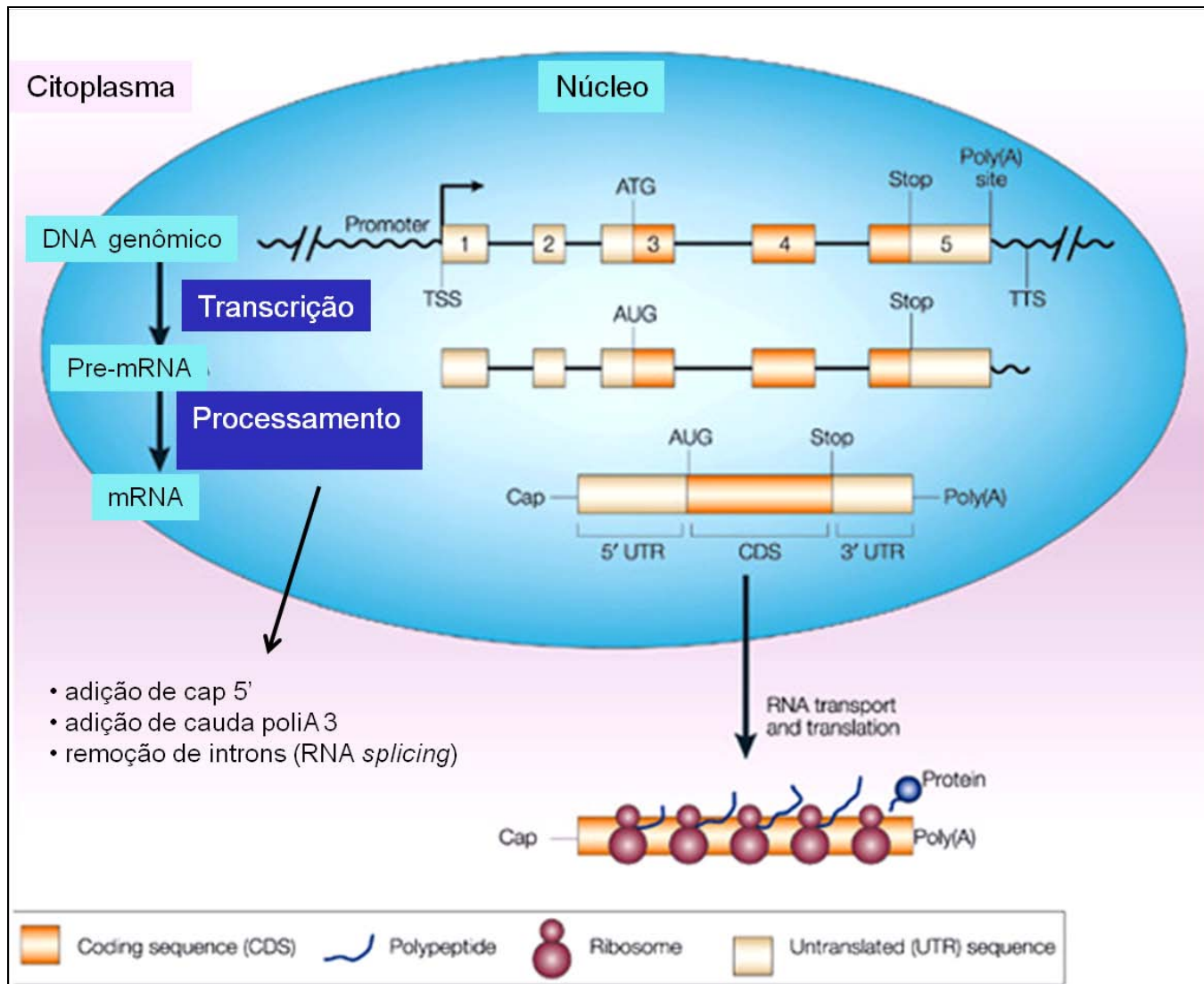


mRNAs eucarióticos são **sempre monocistrônicos**
(codificam um único gene)

Estrutura de um gene eucariótico

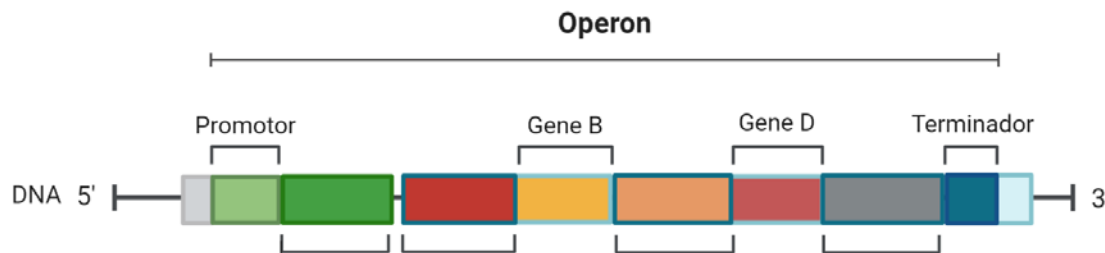
Genes eucarióticos são interrompidos:

- RNAs precursores (pre-mRNAs) contêm trechos codificadores e UTRs (“exons”) intercalados por trechos não-codificadores (“introns”).
- Introns são removidos após a transcrição (“splicing”)

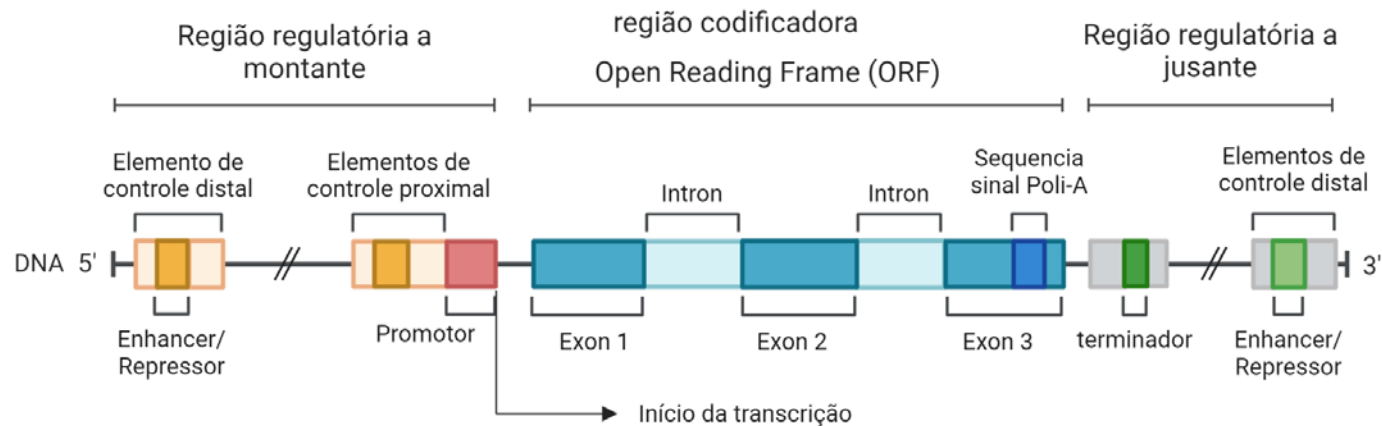


Quais as semelhanças e diferenças na arquitetura e componentes de genes de procariotos e eucariotos?

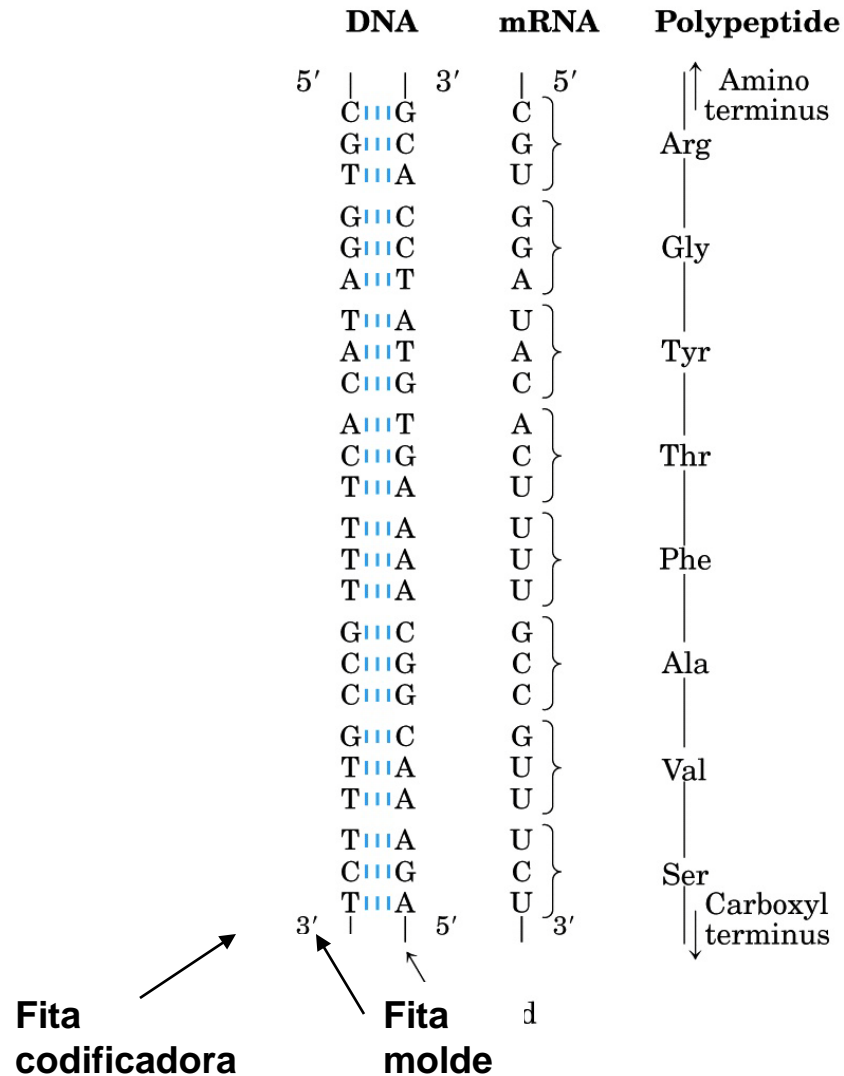
Estrutura de gene procariótico



Estrutura de gene eucariótico



Co-linearidade entre a sequência do gene e a sequência da proteína



Demonstração experimental da co-linearidade entre a sequência do gene e a sequência da proteína

Charles Yanofsky, 1960

Experimento onde foi verificado que a ordem de mutações pontuais introduzidas no gene da enzima triptofano sintetase de *E.coli* correspondem a mesma ordem das troca de aminoácidos na sequência polipeptídica

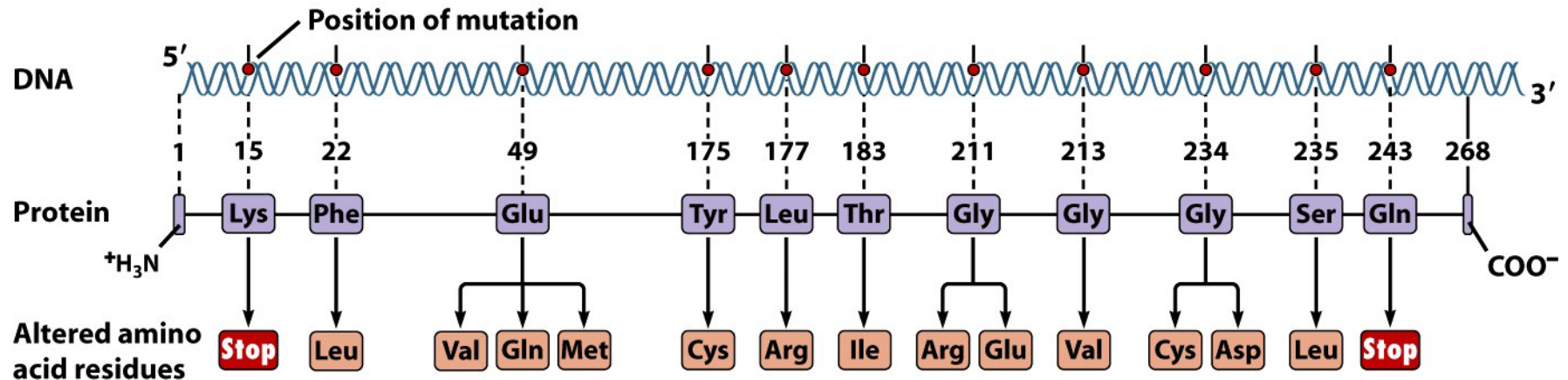


Figure 2-4
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W.H. Freeman and Company

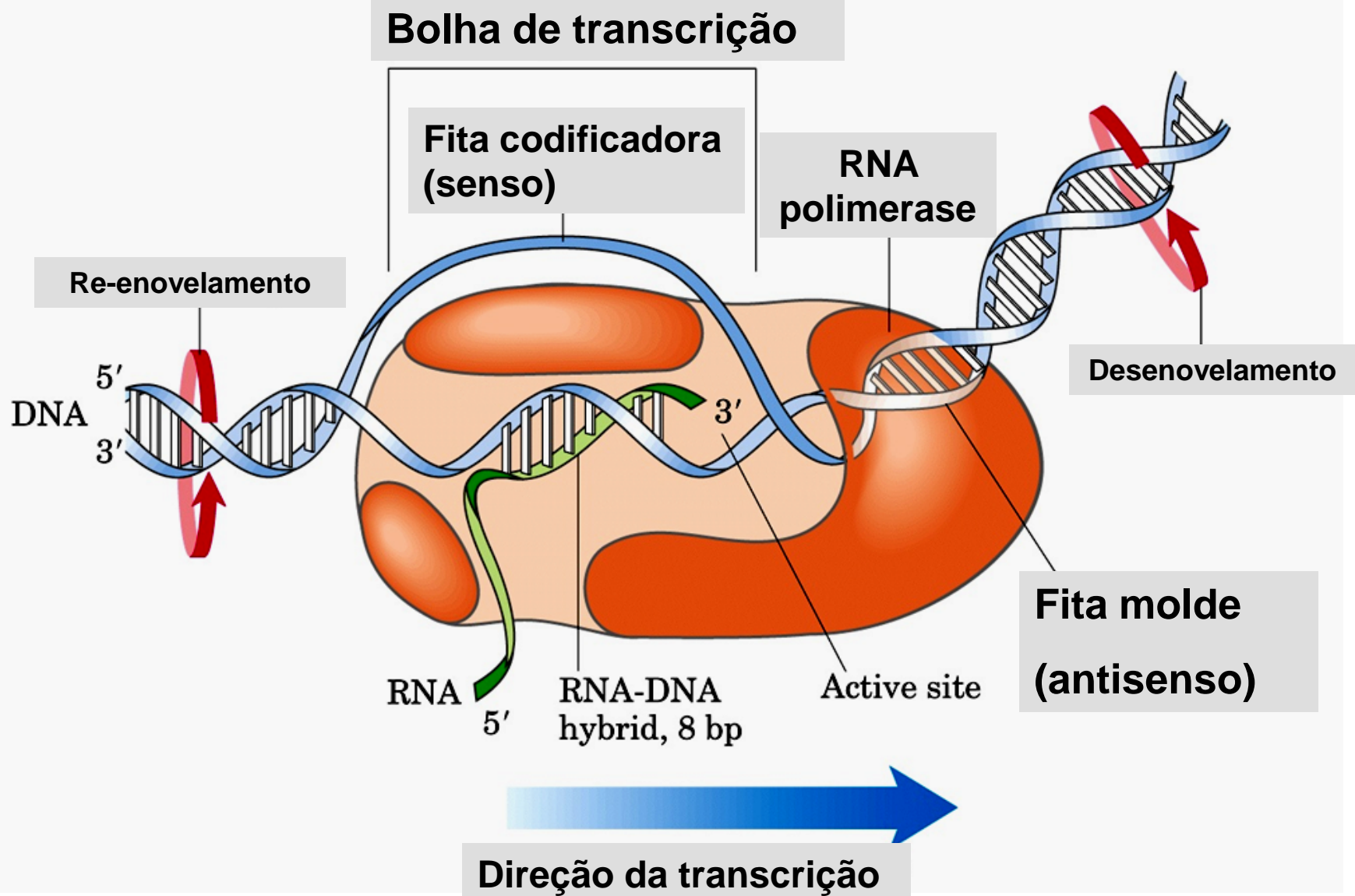
Moléculas de ácido nucléico envolvidas na transcrição

(5') CGCTATAGCGTTT(3') **DNA fita codificadora**

(3') GCGATATCGCAAA(5') **DNA fita molde**

(5') CGCUAUAGCGUUU(3') **RNA transcrito**

A transcrição do DNA pela RNA Polimerase

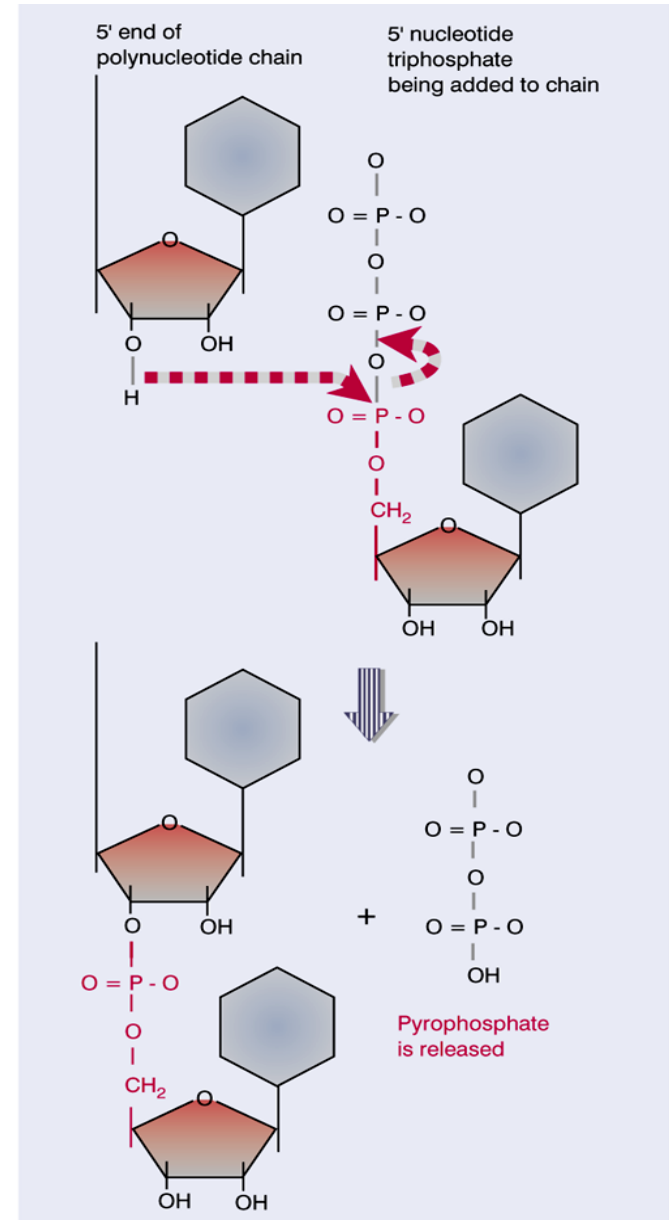


Propriedades da transcrição pela RNA Polimerase

Síntese de RNA:

- Direção 5' → 3'
- formação da ligação fosfodiéster envolve o ataque nucleofílico do 3' OH da cadeia crescente no fosfato do carbono 5' (alfa) do ribonucleosídeo trifosfatado que será incorporado.

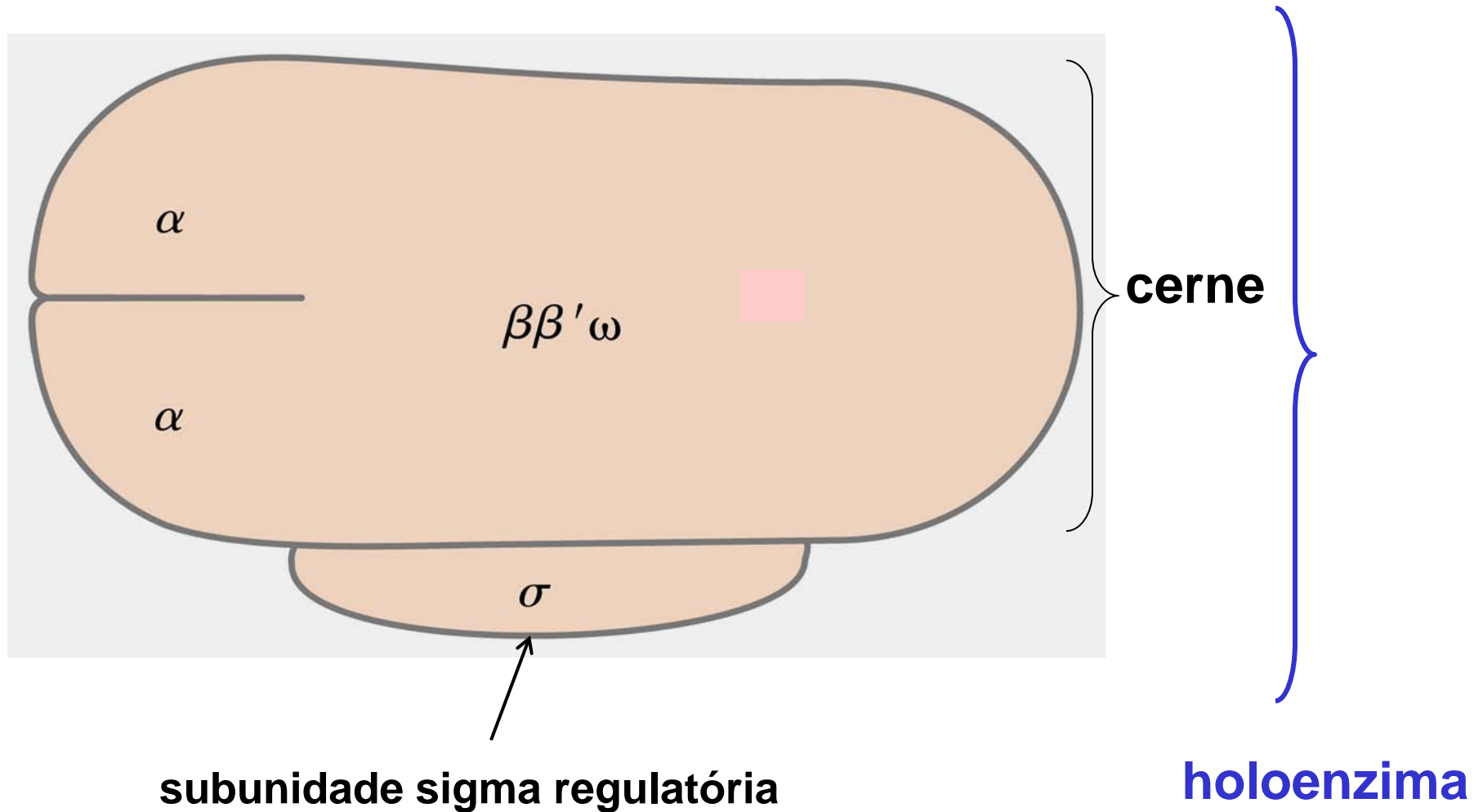
A RNA polimerase não requer um iniciador (primer) para iniciar a síntese do RNA



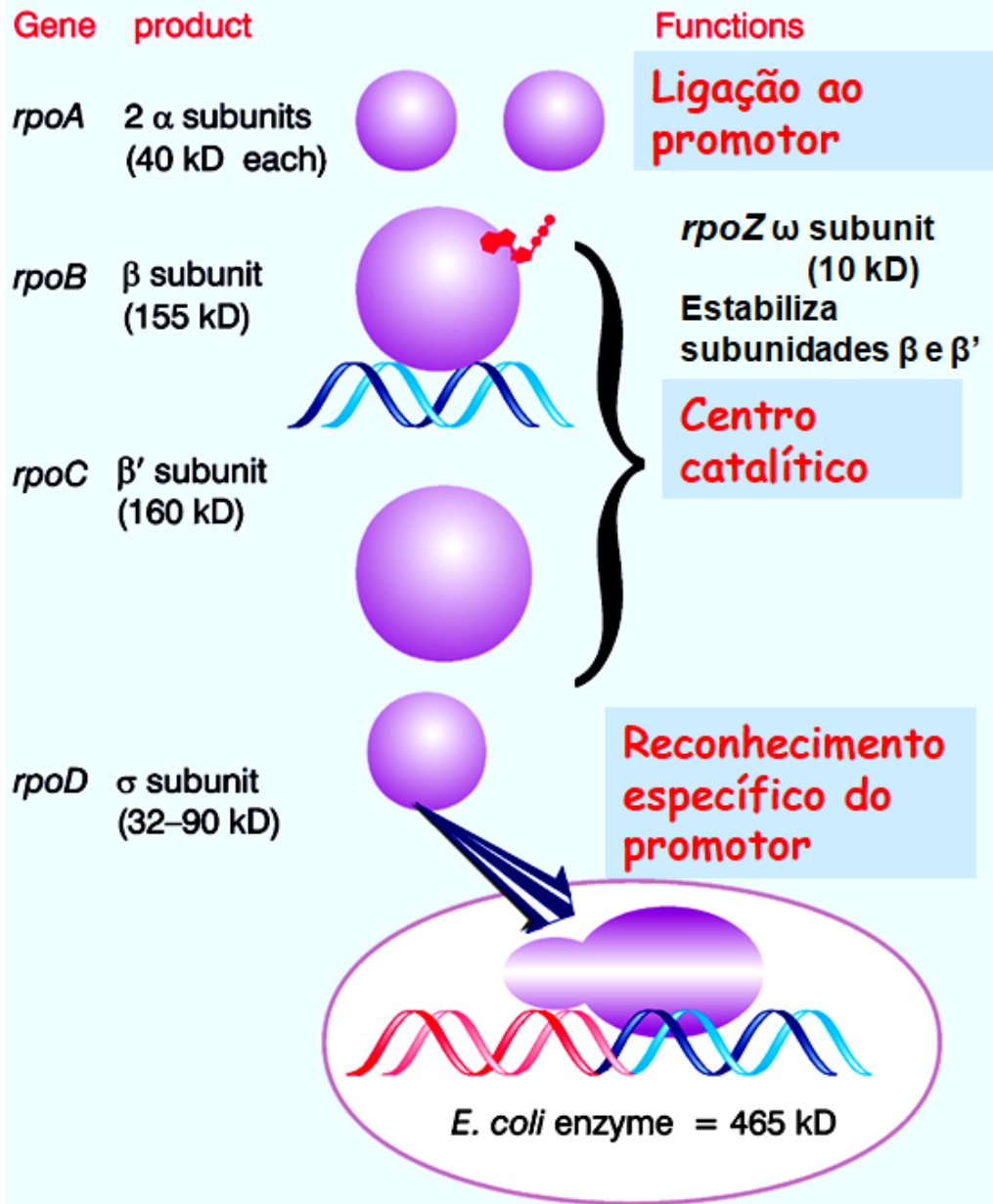
RNA polimerase bacteriana

Complexo composto por várias proteínas:

~ 465 kD em E. coli



Componentes da RNA polimerase de *E.coli*



RNA polimerases
Também possuem **mecanismos que garantem a fidelidade da transcrição** e uma baixa taxa de erro de incorporação de bases nas moléculas de RNA (10^{-5})



Taxa de erro é 2 ordens de grandeza maior que a das DNA polimerases (taxa de erro 10^{-7})

Estrutura cristalina da RNA Polimerase bacteriana a 2.6Å



Fig. 1. Holoenzyme crystal structure. The subunits colors are: β , sage; β' , white (β' 163-452, cyan; β' Zn-finger, green); α I, blue; α II, light orange; σ , magenta; and ω , red. Two catalytic Mg^{2+} (red) and two Zn^{2+} ions (blue) are shown as spheres.

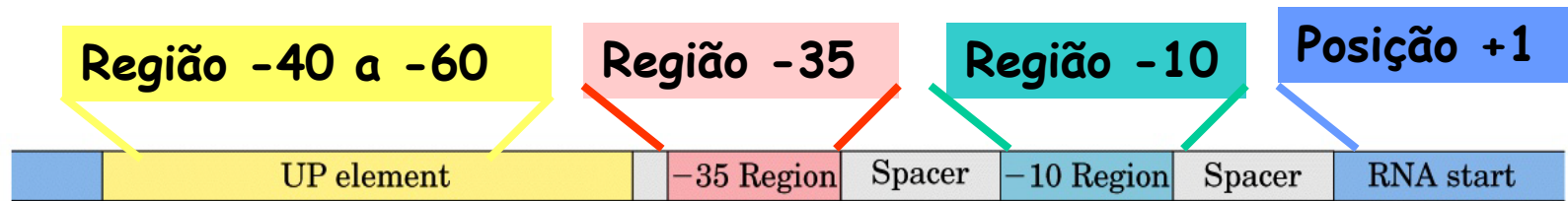
Etapas da Transcrição do DNA

1. Iniciação
2. Elongamento
3. Terminação

A transcrição do RNA se inicia em **Regiões Promotoras (elementos regulatórios *cis*)** localizadas na vizinhança do local de início da transcrição, que contem sítios de ligação da RNA polimerase

Promotores de genes bacterianos

A numeração é relativa a posição do 1º nucleotídeo transcrito



Consensus sequence



rrnB P1



trp



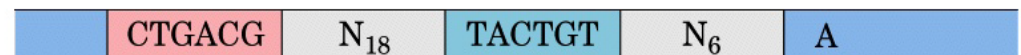
lac



recA



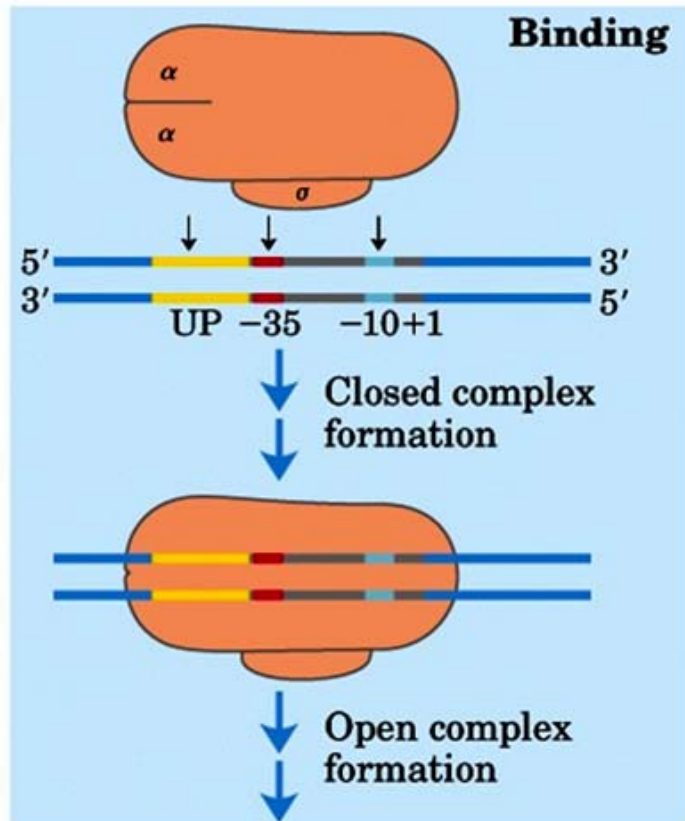
araBAD



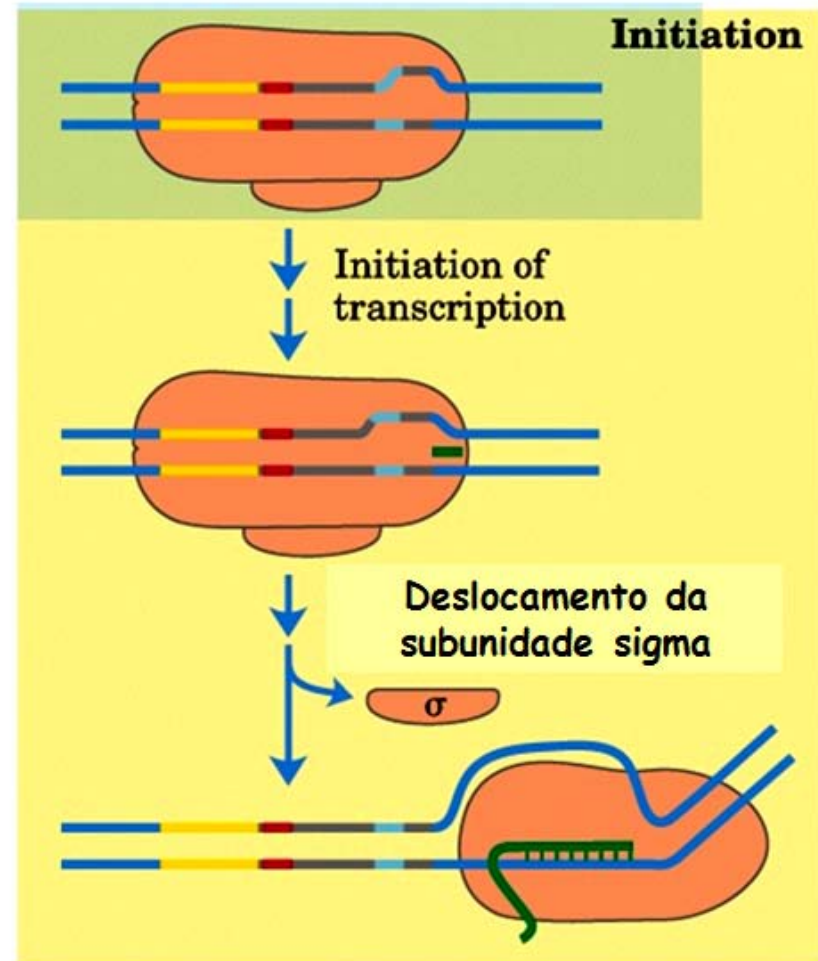
Genes codificantes para RNA ribossomal possuem elementos UP

Passo 1: Iniciação da transcrição

Reconhecimento e
Ligação ao promotor



Início da Transcrição

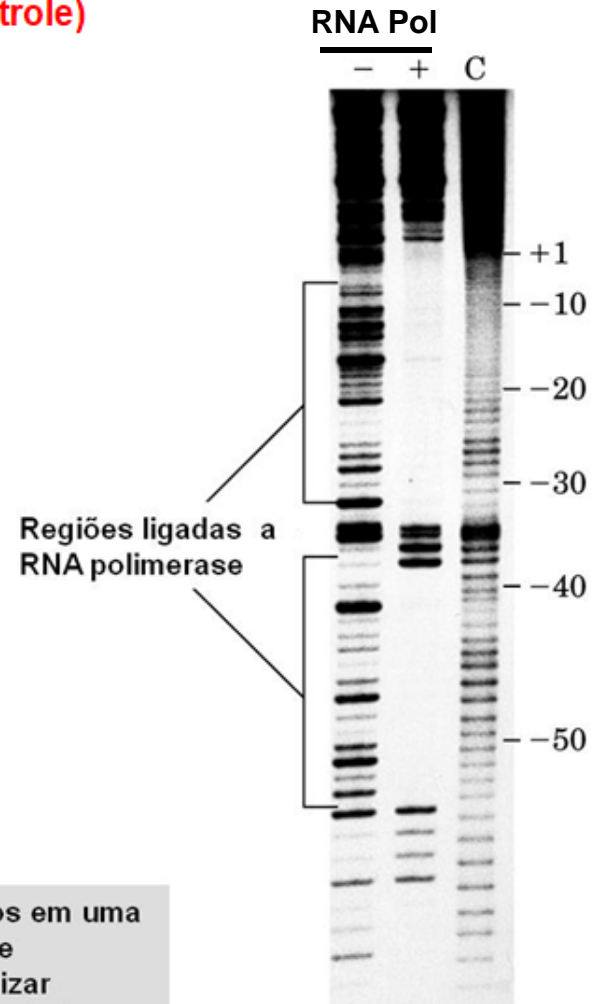
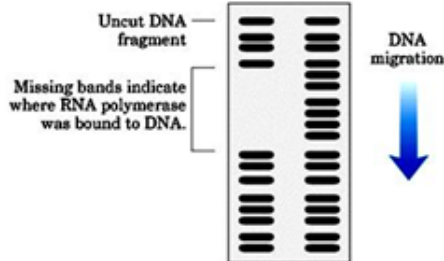
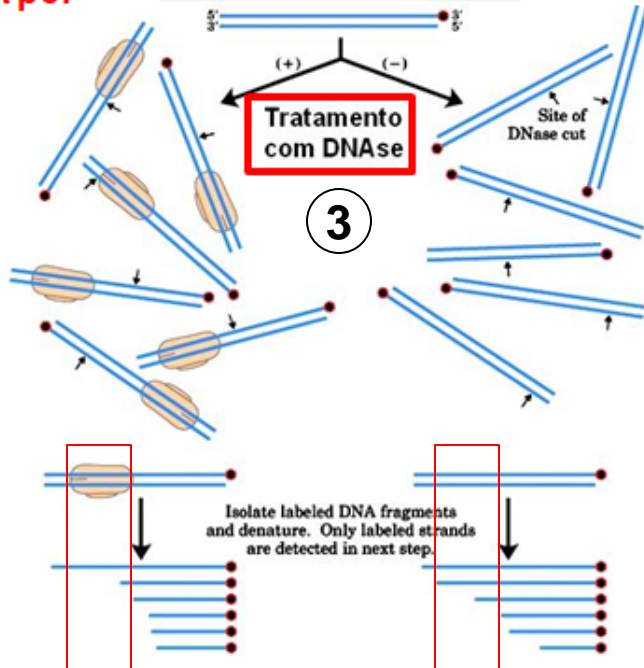


Como determinar no laboratório os locais de início de transcrição no DNA?

“Footprinting” de DNA: a ligação da RNA Polimerase em regiões promotoras protege o DNA da digestão enzimática

1 - Marcação do DNA com ^{32}P

2 + RNA pol - RNA pol (controle)

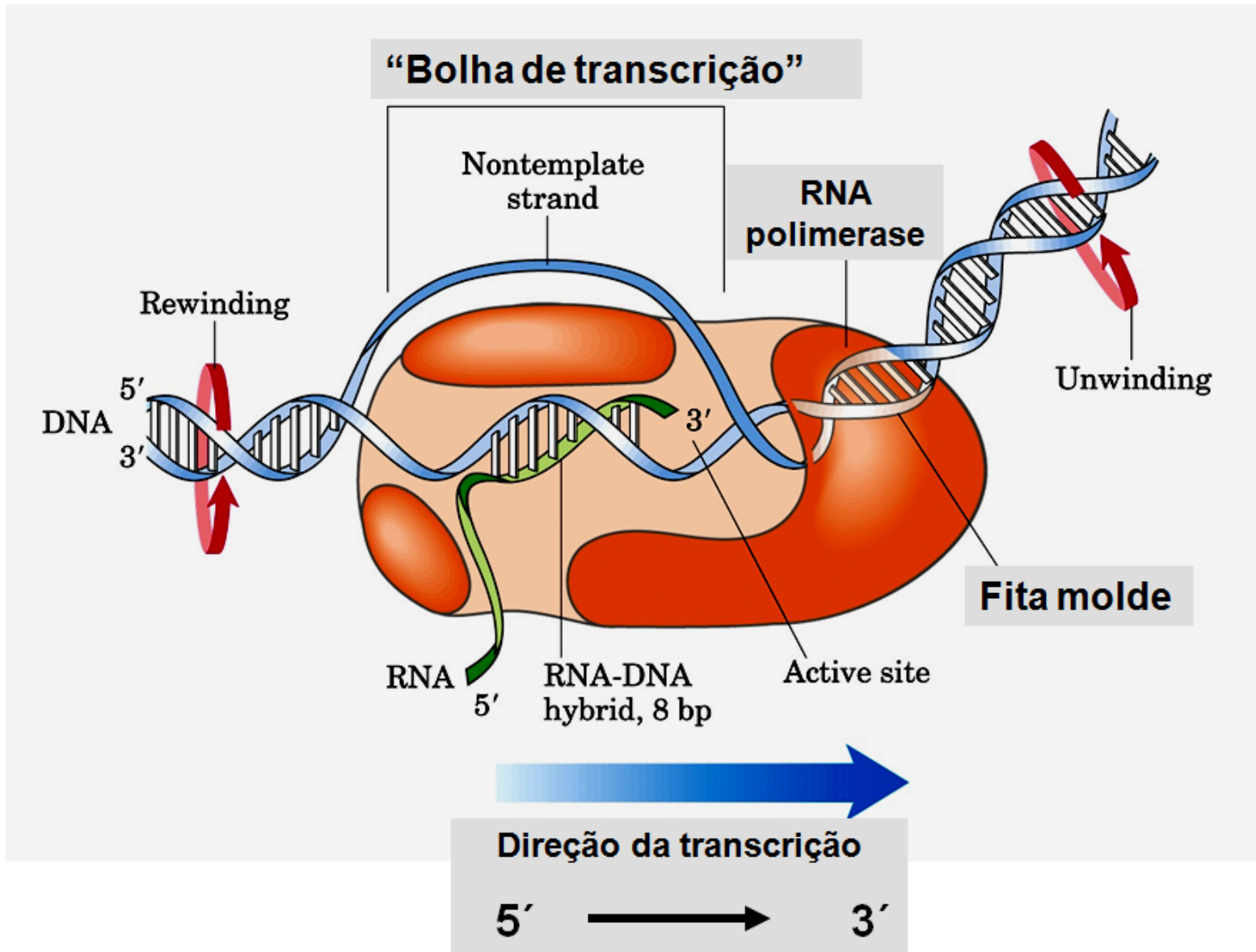


Substituição do fator sigma ligado a RNA polimerase controla a iniciação da transcrição de genes de acordo com as necessidades da célula

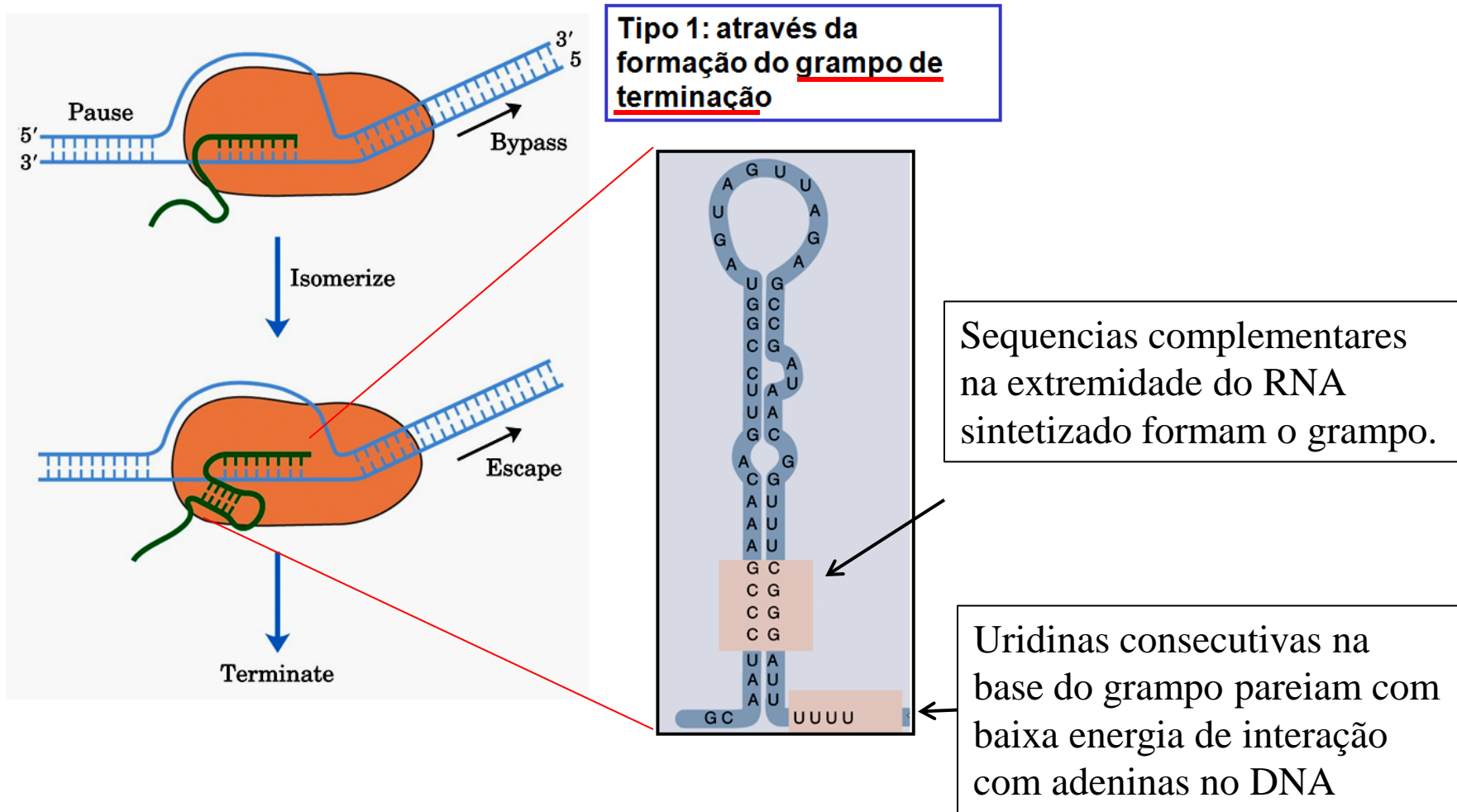
Fatores sigma σ distintos reconhecem sequencias promotoras diferentes e ativam conjuntos distintos de genes

Gene	Factor	Use	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
<i>rpoD</i>	σ^{70}	general	TTGACA	16–18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	σ^{32}	heat shock	CCCTTGAA	13–15 bp	CCCGATNT
<i>rpoE</i>	σ^E	heat shock	not known	not known	not known
<i>rpoN</i>	σ^{54}	nitrogen	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	σ^F	flagellar	CTAAA	15 bp	GCCGATAA

Passo 2: alongação da transcrição

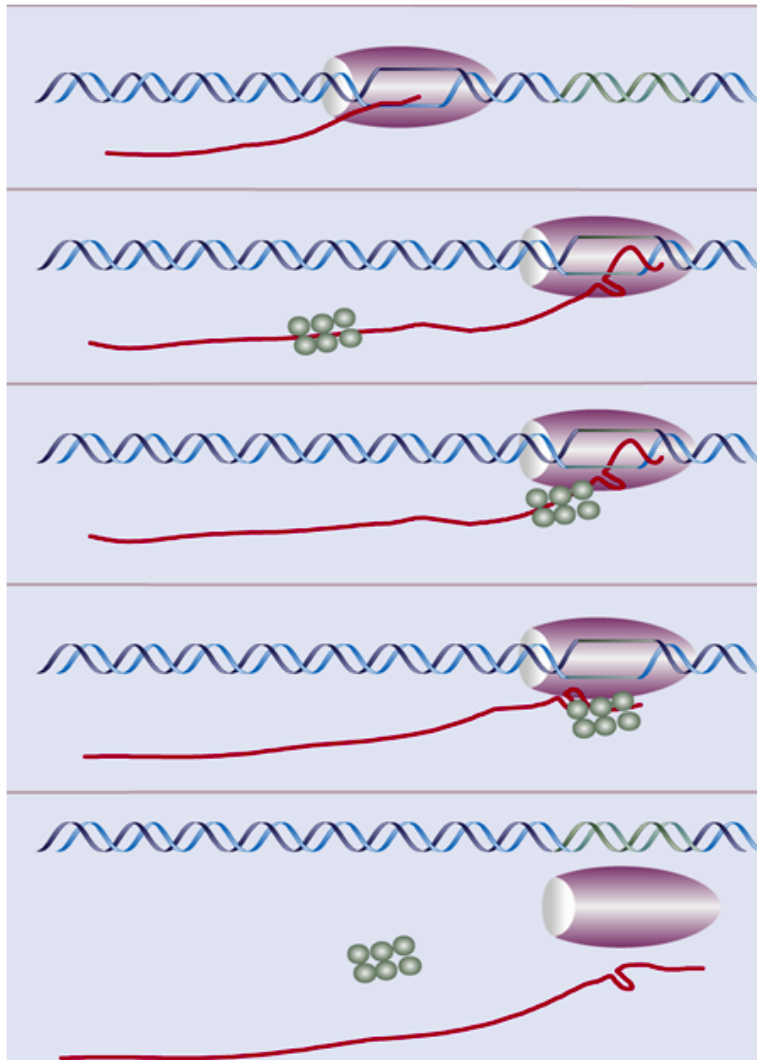


Passo 3: terminação da transcrição



Grampo de terminação causa a pausa no avanço da RNA polimerase e a sua dissociação do DNA

Passo 3: terminação da transcrição



Tipo 2: terminação dependente da proteína Rho

Rho (46kDa, ativa como hexâmero) move-se ao longo do RNA acompanhando a RNA polimerase

Com a pausa da RNA polimerase na sequência de terminação, Rho alcança a enzima

Rho desenrola o híbrido RNA-DNA

Sequência de Terminação dependente de Rho: rica em C

AUCGCUACCUCAUAUCCGCACCUCUCAAAACGCUACCUCGACCAGAAAGGCGUCUCUU

RNA polimerases de eucariotos

RNA pol I	Nucleólo	rRNA	Várias subunidades
RNA pol II	Nucleoplasma	mRNA snRNA	Várias subunidades
RNA pol III	Nucleoplasma	rRNA 5S tRNAs	Várias subunidades
RNA pol Mitochondrial	Mitocondria		01 subunidade
RNA pol de Cloroplastos	Cloroplasto		Similar as bacterianas

Requerem proteínas auxiliares para sua atividade: **fatores de transcrição** (elementos regulatórios em *trans*)

Estrutura de promotores eucarióticos reconhecidos pela RNA Pol II

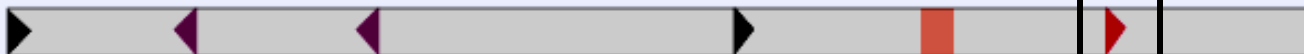
SV40 early



Thymidine kinase



Histone H2B



Sítio de início da transcrição

-140 -120 -100 -80 -60 -40 -20

Startpoint

Types of module

▶
Octamer

◀
CAAT

■
GC

■
TATA

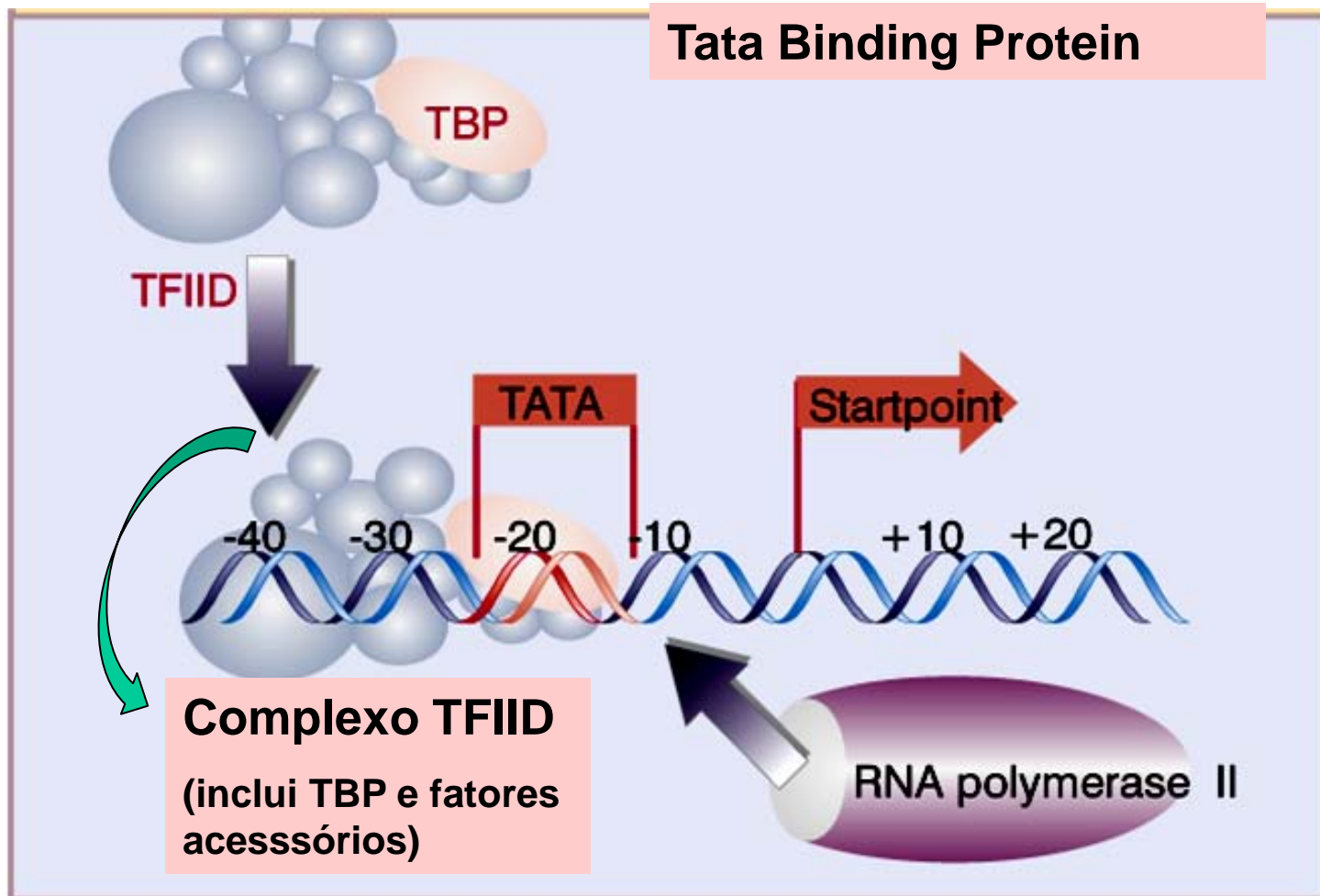
Diferentes proteínas são necessárias para o recrutamento da RNA Pol II para a região promotora e iniciação/elongação da transcrição do DNA

Fatores gerais de transcrição

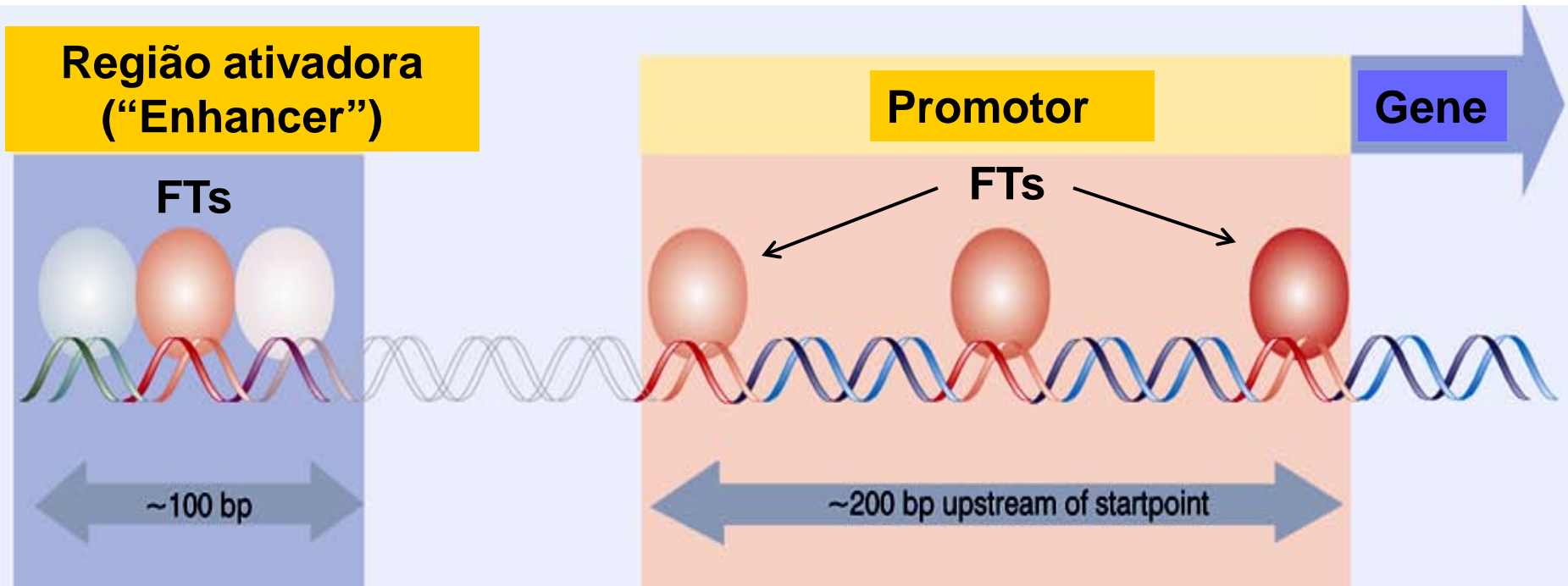
Transcription factor	Number of subunits	Subunit M_r	Functions
Initiation			
RNA polymerase II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIIB and TBP to the promoter
TFIIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits RNA polymerase–TFIIF complex
TFIID	12	15,000–250,000	Interacts with positive and negative regulatory proteins
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to RNA polymerase II; binds to TFIIIB and prevents binding of RNA polymerase to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter; phosphorylates RNA polymerase; recruits nucleotide-excision repair complex
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
P-TEFb	2	43,000, 124,000	
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	

Formação do **complexo basal de transcrição** em promotores de genes transcritos pela RNA pol II

Fatores gerais de transcrição + RNA Polimerase = **Complexo Basal de Transcrição**

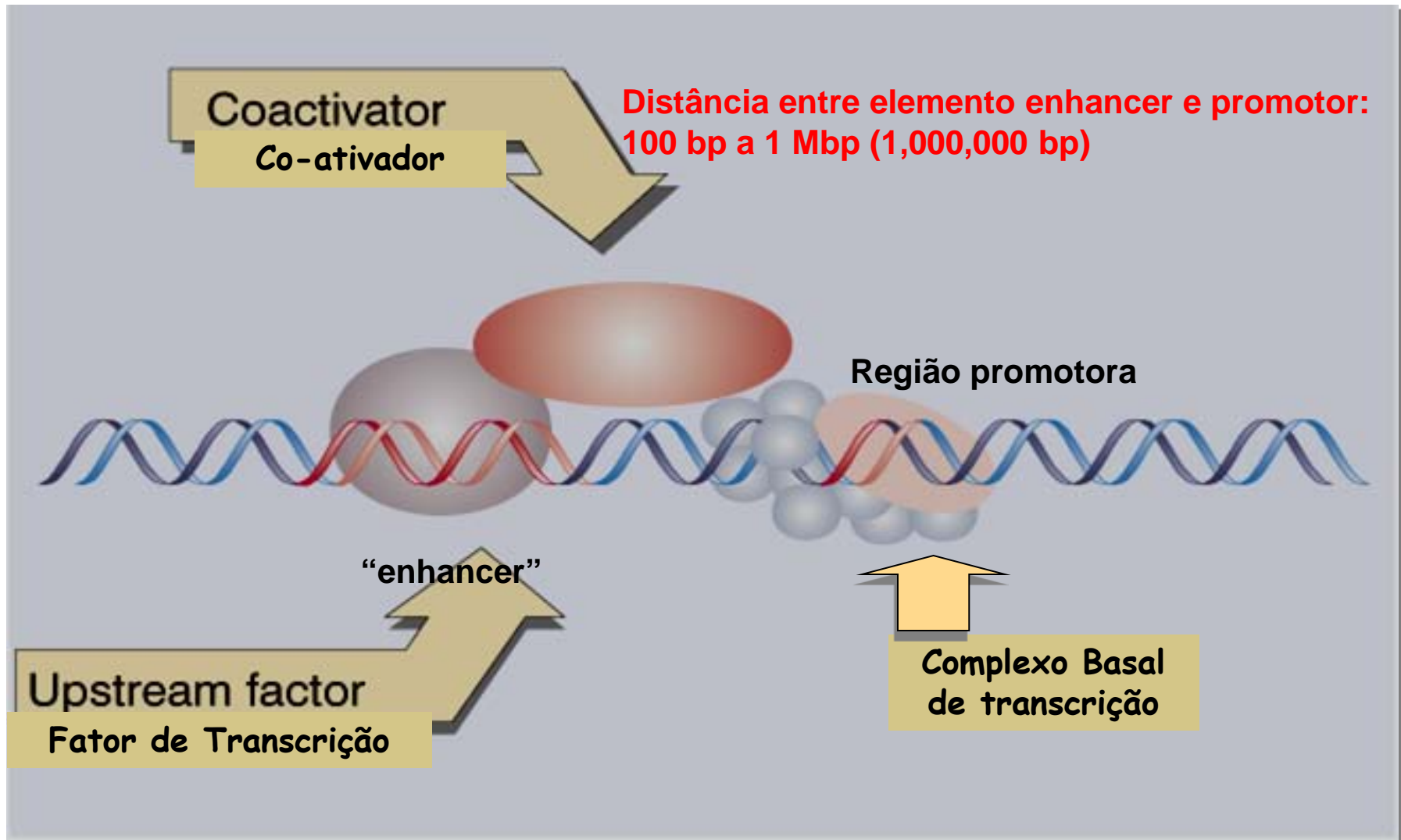


Genes eucarióticos contêm regiões regulatórias adicionais, distantes das regiões promotoras vizinhas ao sítio de início da transcrição



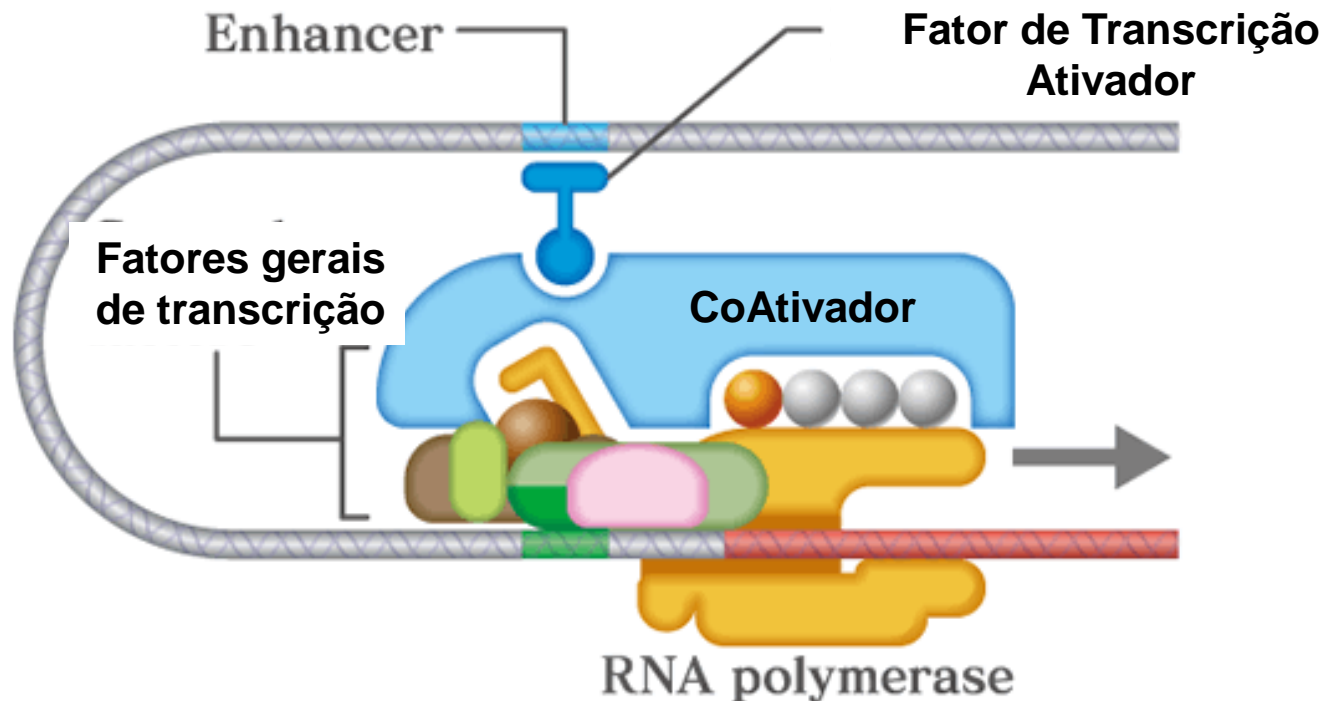
- “Enhancers” podem estar fisicamente separados do promotor por centenas ou milhares de nucleotídeos.
- Assim como promotores, os “Enhancers” também contêm elementos na sequência do DNA que ligam fatores de transcrição específicos e acentuam a transcrição do DNA

O **complexo basal de transcrição** sofre regulação de **fatores de transcrição** específicos que se ligam a regiões ativadoras (“enhancers”) e interagem através de **proteínas co-ativadoras**

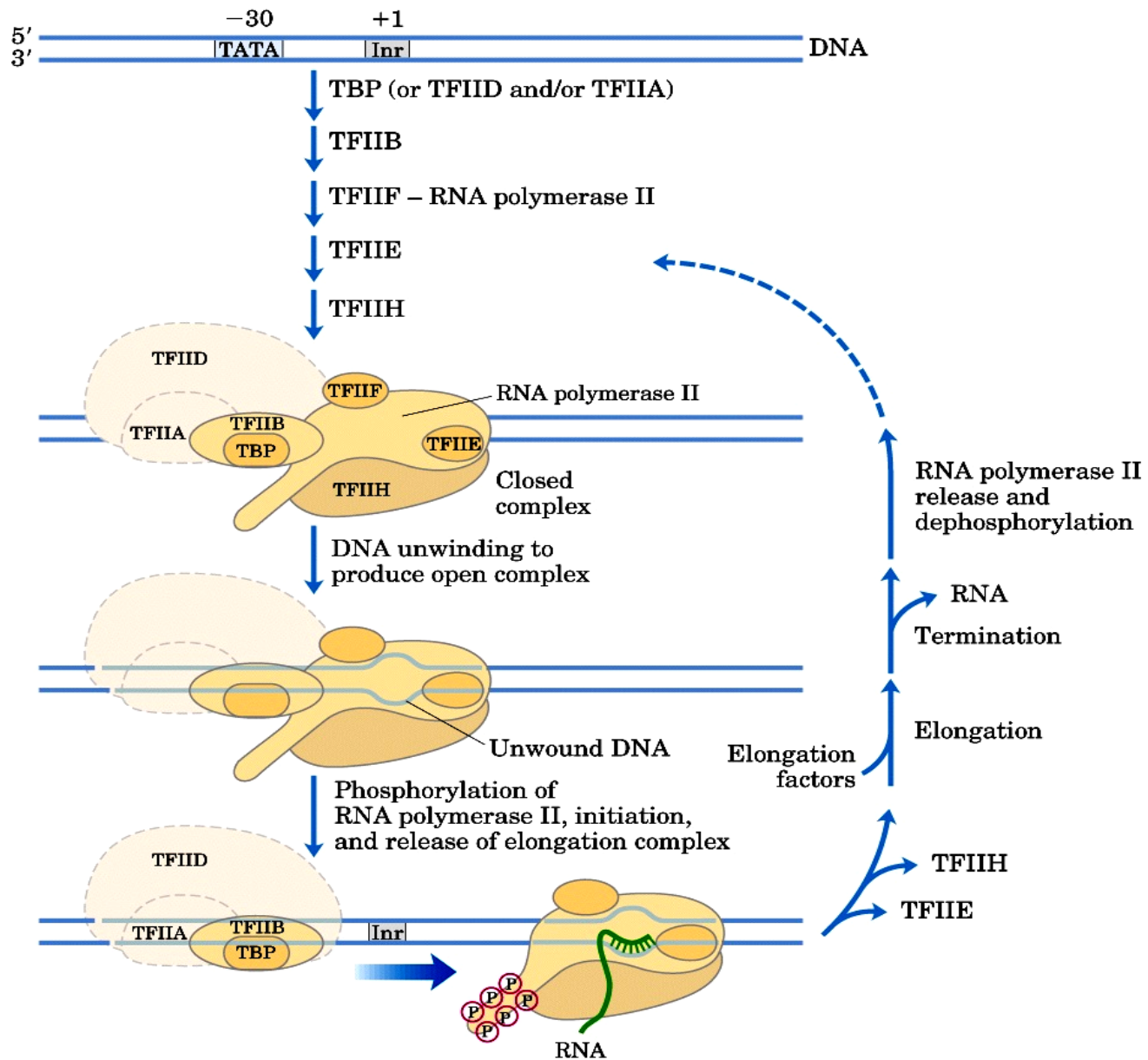


Como os “enhancers” localizados a até milhares de bases de distância dos promotores conseguem modular a expressão gênica?

Ativação do complexo basal de transcrição por fatores de transcrição envolve a formação de voltas no DNA (“loops”) que aproximam regiões ativadoras (“enhancers”) da região promotora



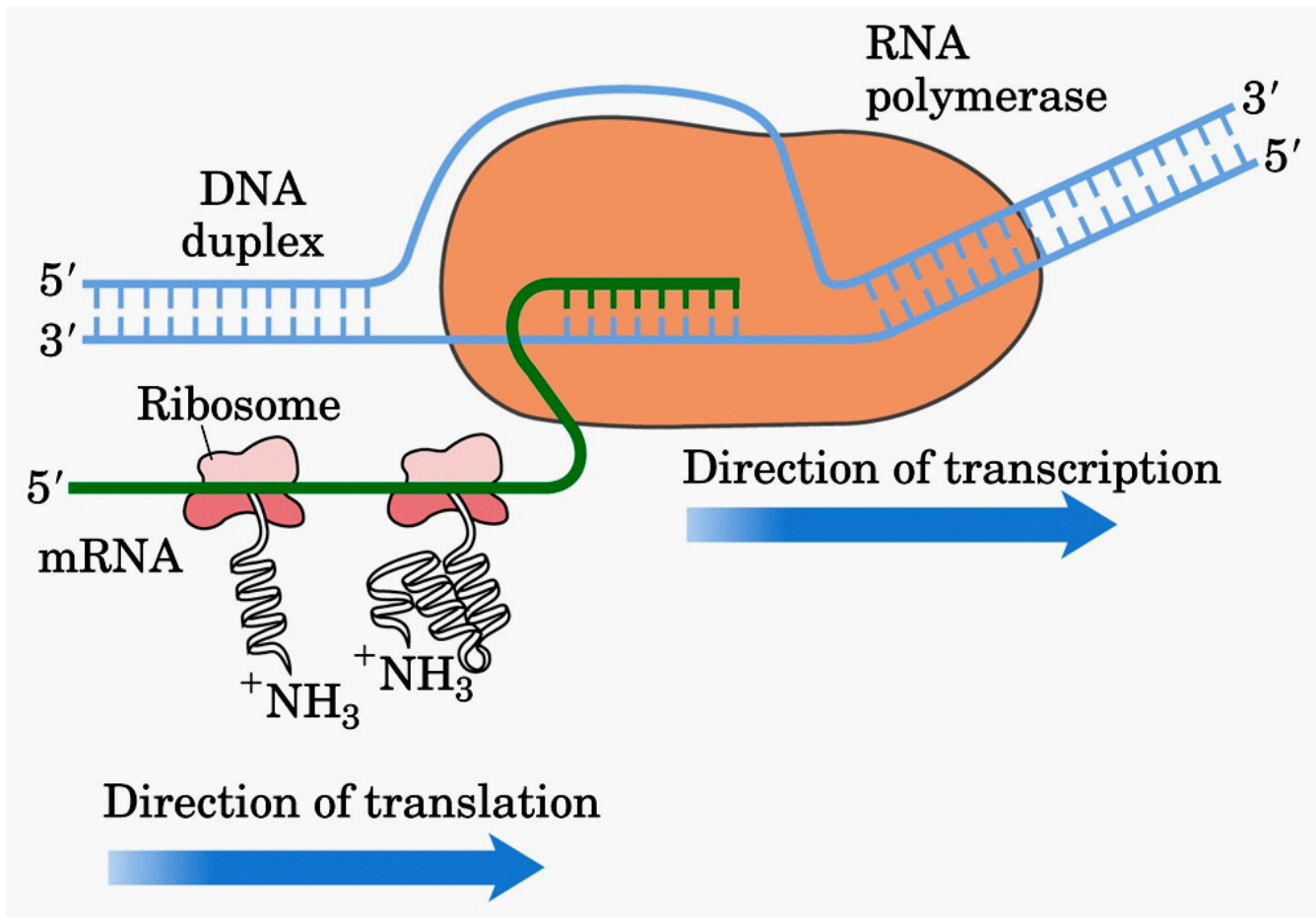
Transcrição em eucariotos



A **fosforilação** da extremidade C-terminal da RNA polimerase é necessária para a iniciação e alongação da transcrição

Comparação da transcrição em procariotos e eucariotos

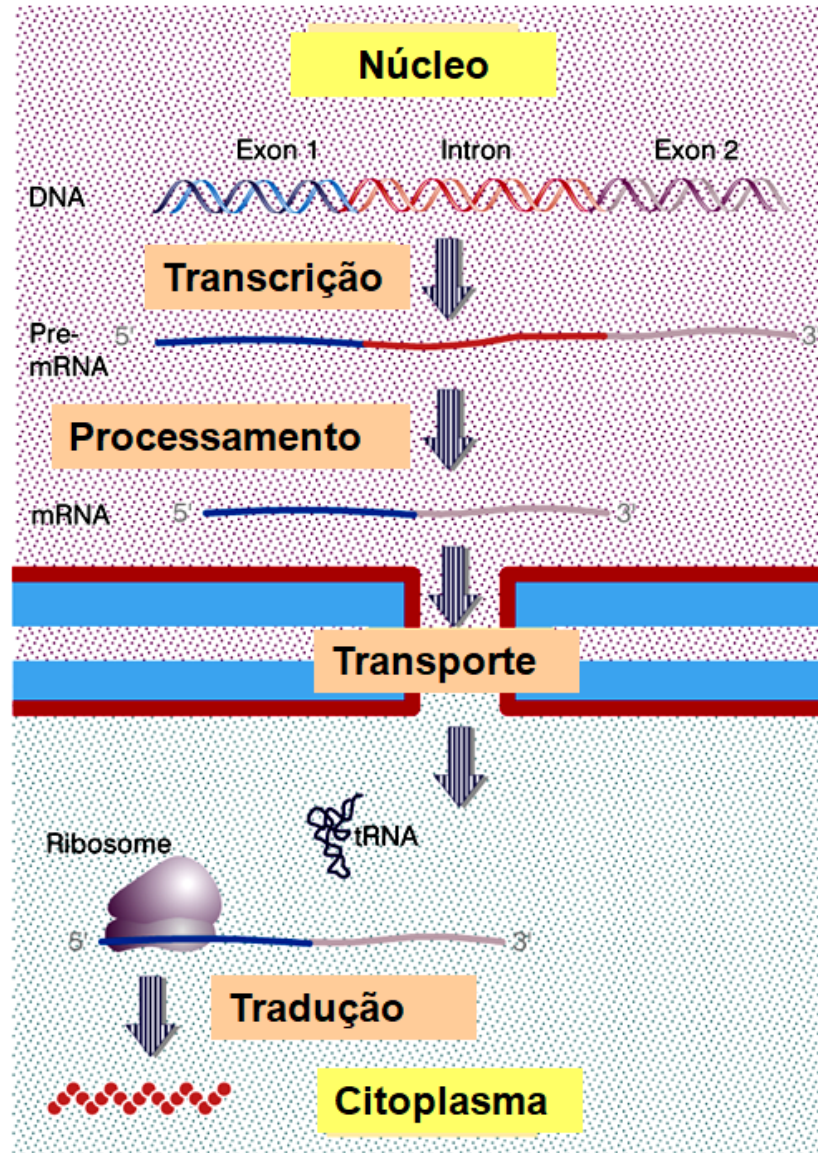
Nos procariotos a transcrição e tradução são processos acoplados que ocorrem simultaneamente



Procariotos não possuem compartimentalização do genoma no núcleo

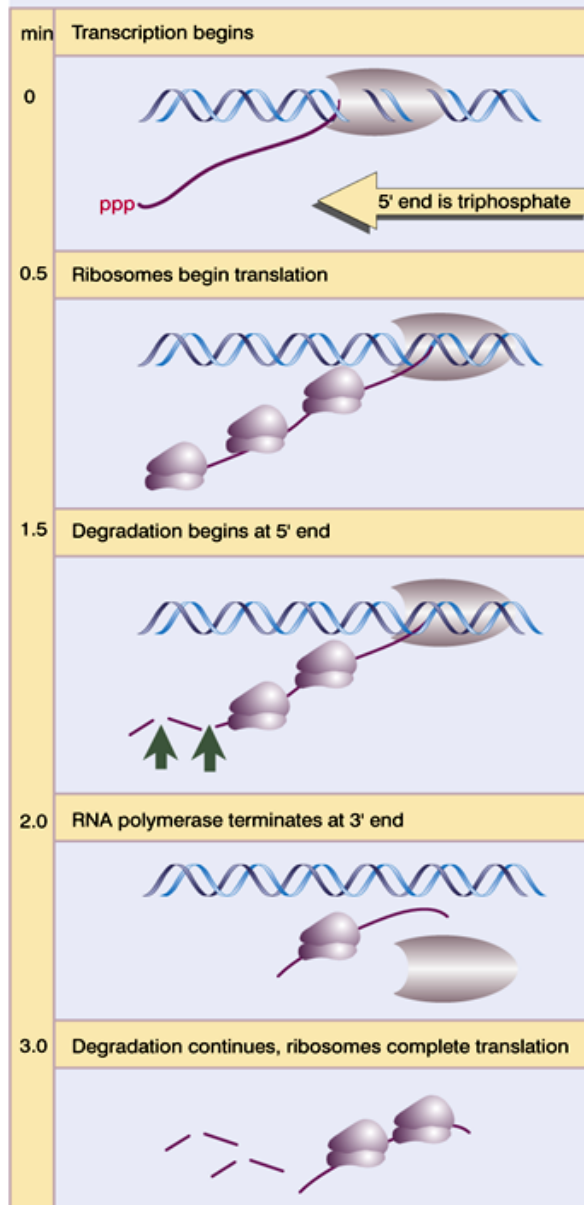
Nos eucariotos, a transcrição acontece no núcleo e a tradução no citoplasma

A compartimentalização da transcrição no núcleo possibilita que o RNA sofra diferentes tipos de processamento até ser transportado para o citoplasma

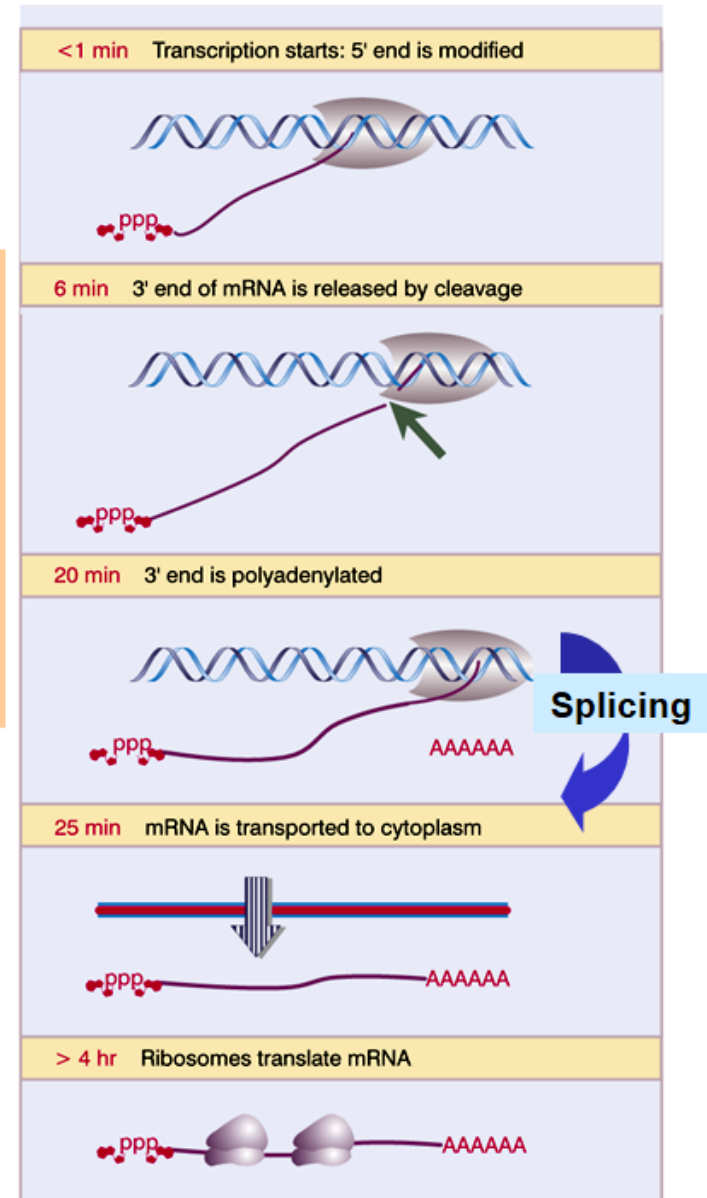


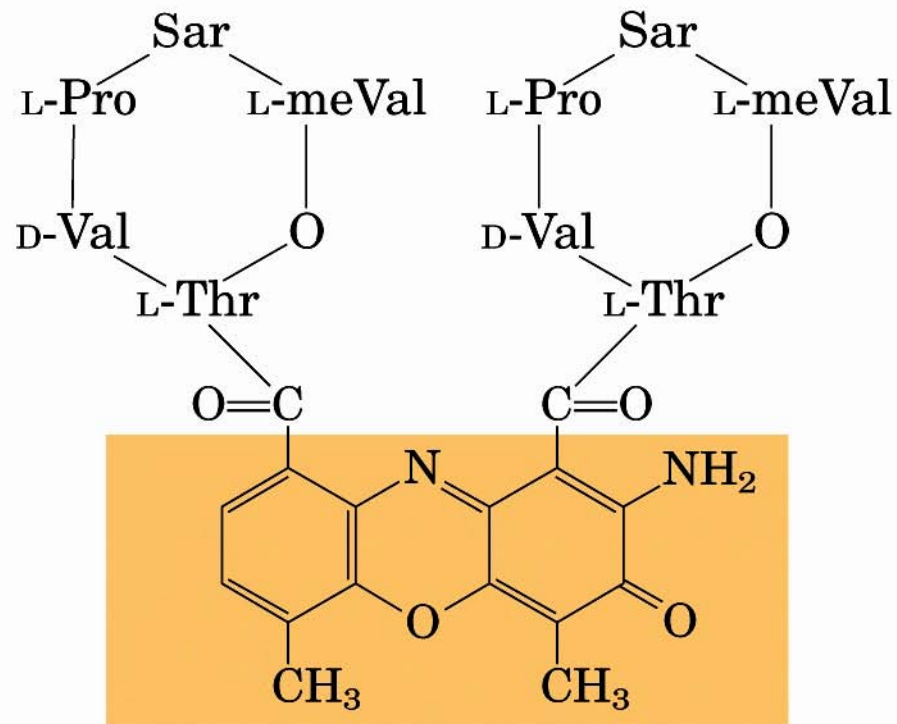
Etapas da transcrição em procariotos e eucariotos tem tempos de duração distintos

Procariotos

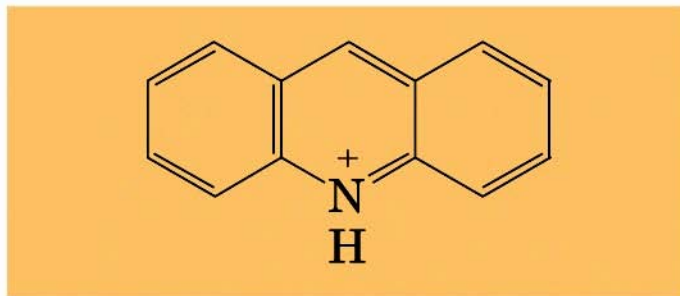


Eucariotos





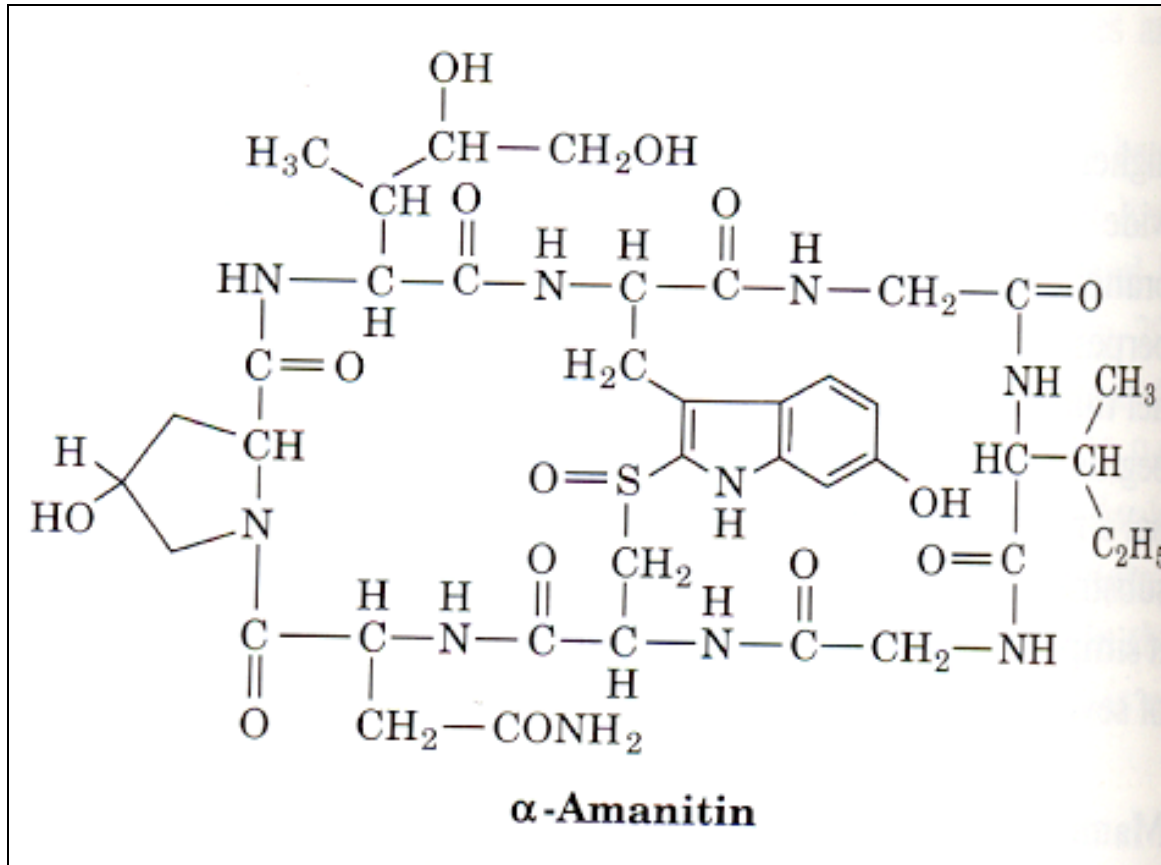
Actinomicina D



Acridina

Agentes intercalantes de ácidos nucléicos inibem tanto a transcrição como a replicação, em procariotos e eucariotos

A RNA polimerase II de eucariotos é inibida especificamente por α -amanitina



- Isolado do cogumelo *Amanita phalloides*
- Altamente tóxico
- Bloqueia a etapa de alongação da transcrição