

Transcrição

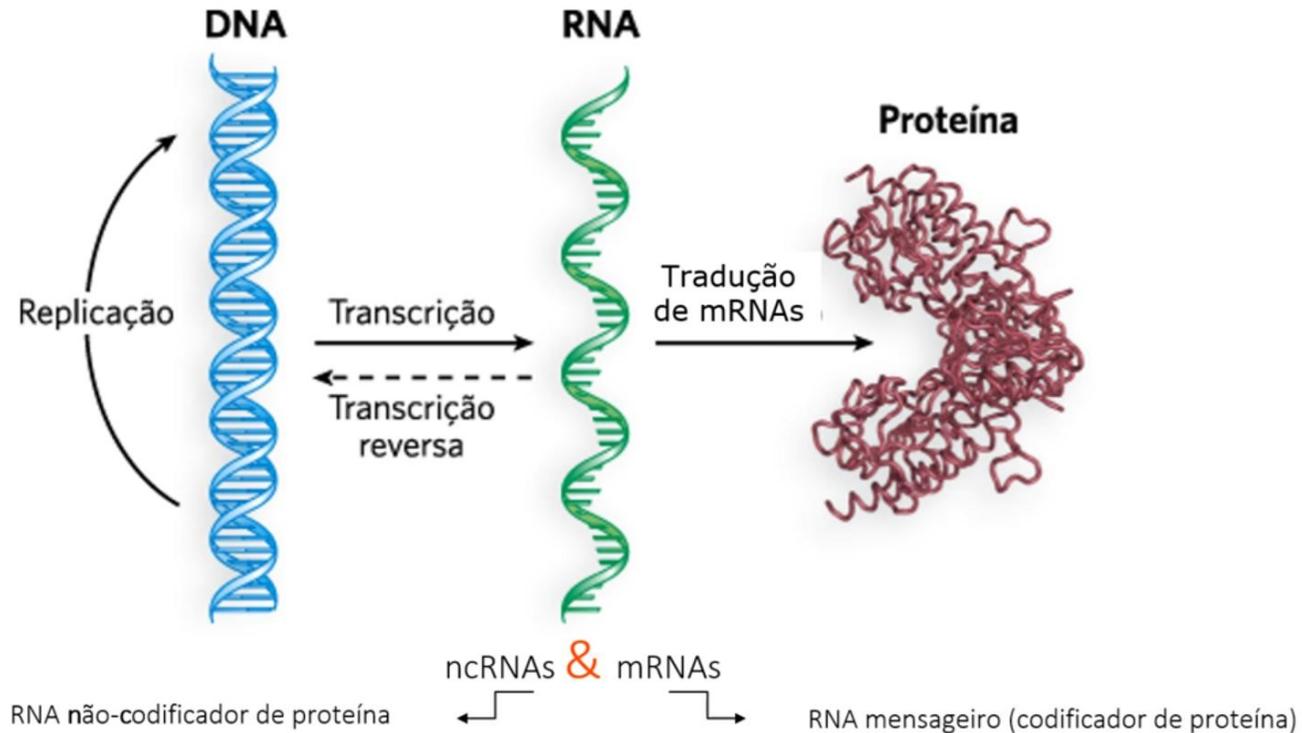
CCM0121 – Biologia II

Evandro de Souza

evandro@iq.usp.br

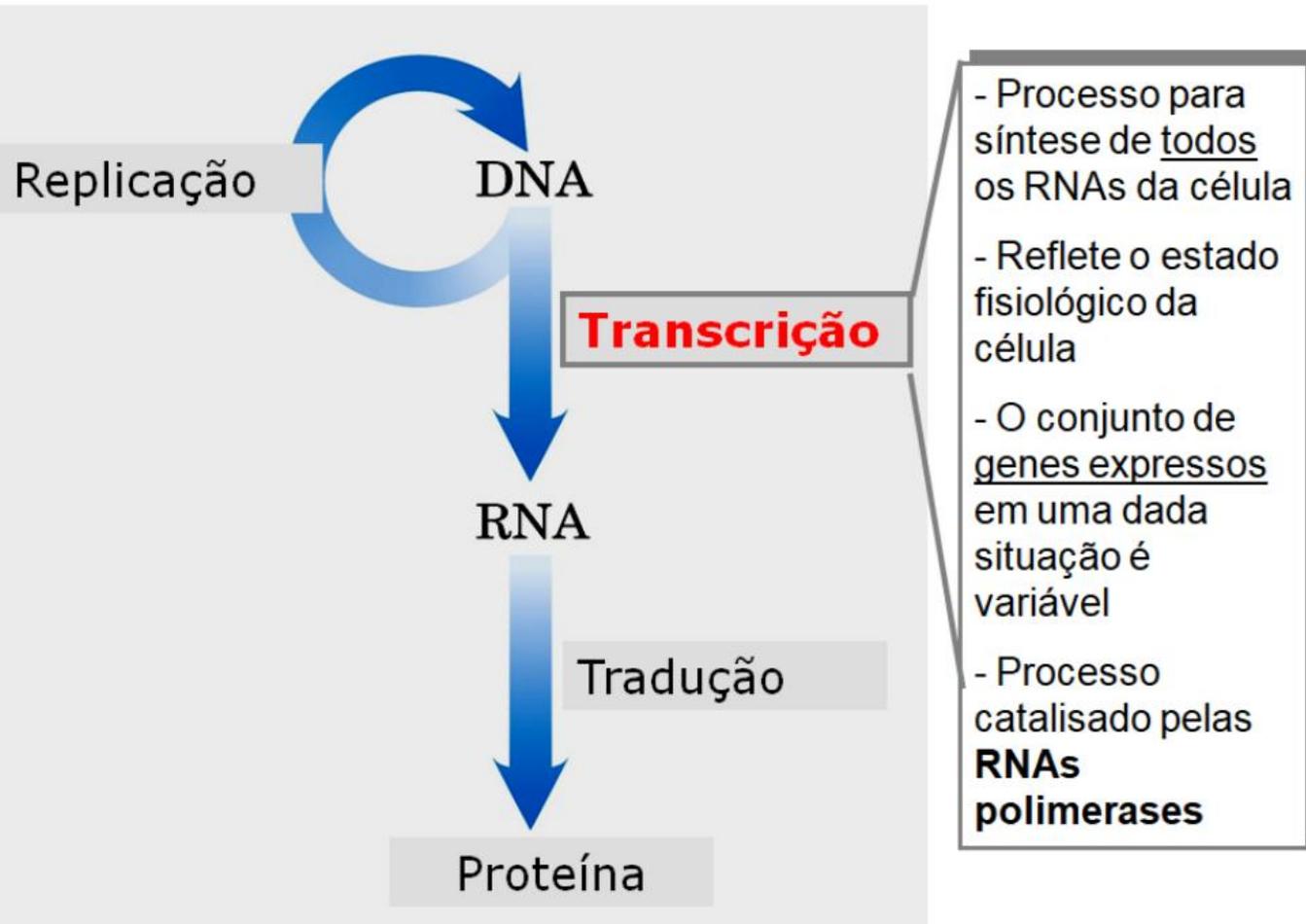
Fluxo da informação

Transcrição: Síntese de RNA dependente de DNA



A expressão da informação de um gene envolve a produção de uma molécula de RNA transcrita a partir de um molde de DNA

Genes ativos geram cópias de RNA no processo de transcrição



Gene:

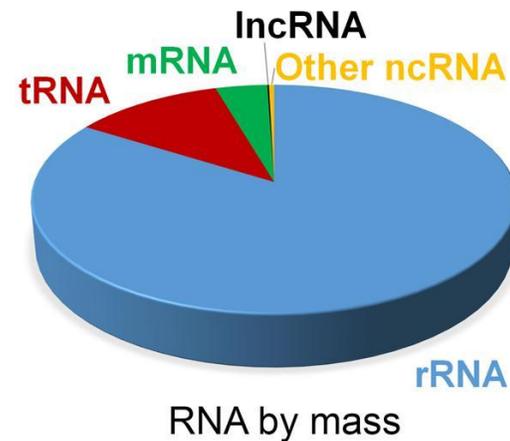
Trechos funcionais do genoma (DNA nas células, RNA em alguns vírus) que são transmitidos como uma unidade hereditária

Tipos de RNAs

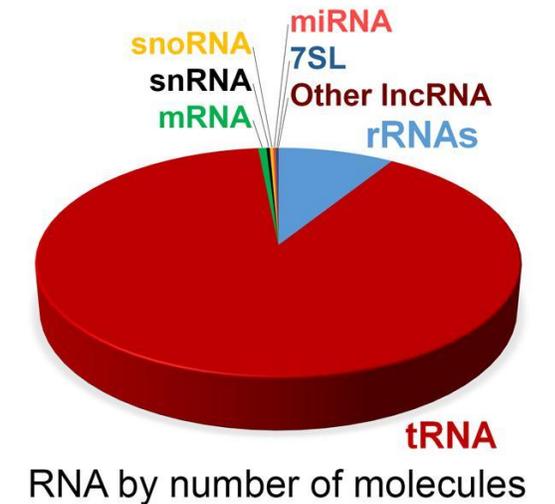
Tipo	Abundância no estado estacionário
rRNA (RNA ribossômico)	83%
tRNA (RNA transportador)	14%
mRNA (RNA mensageiro)	3%
sRNA (RNAs pequeno não-codificador)	~1%

Informação de *E. coli* (Bremer, H. e Dennis, P. P. (1987))

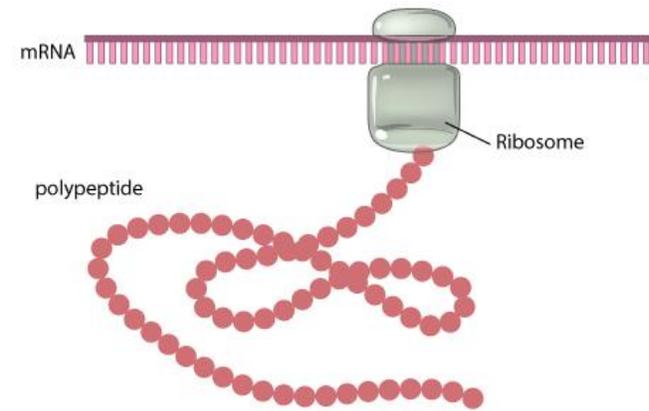
A



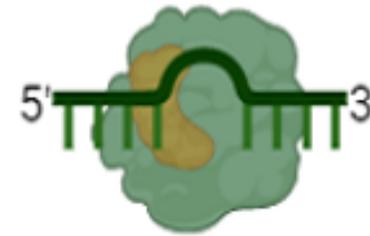
B



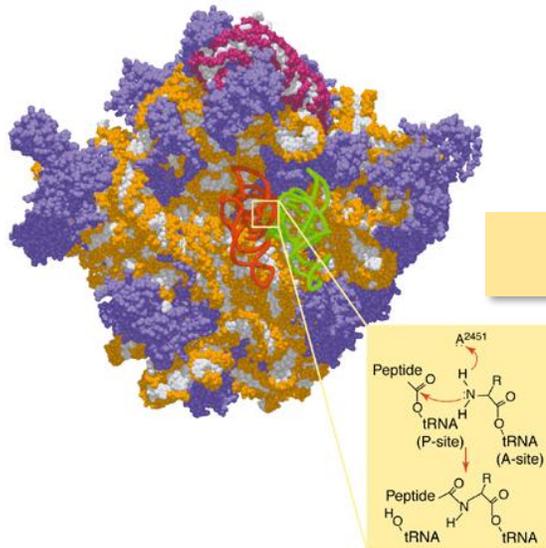
Funções de RNAs



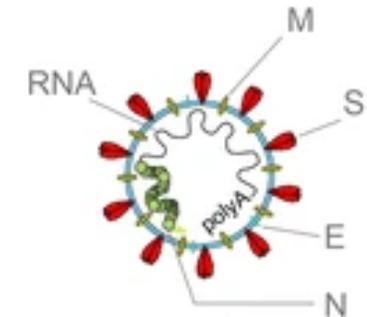
Tradução



Regulatório



Catalítica



Armazenamento de
informação

Mundo do RNA

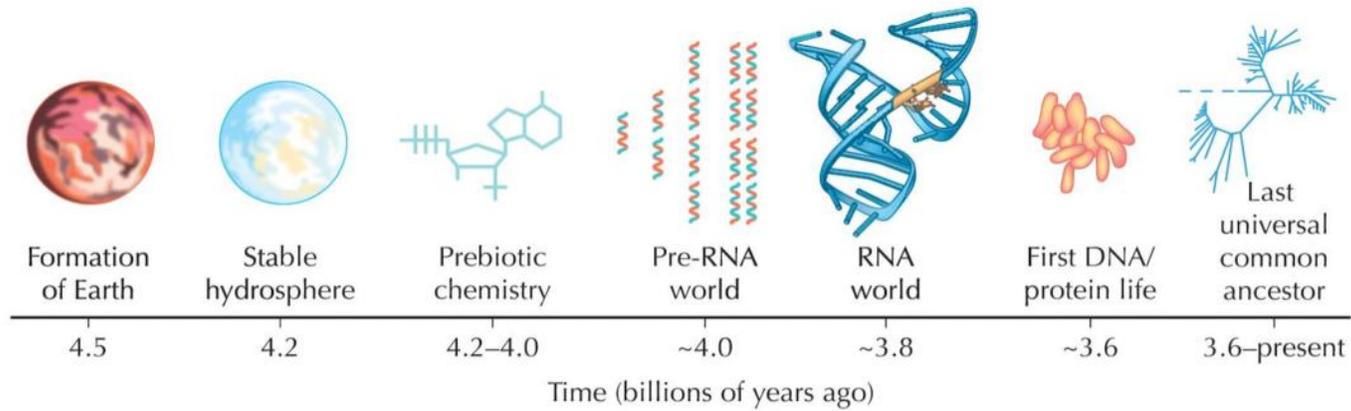
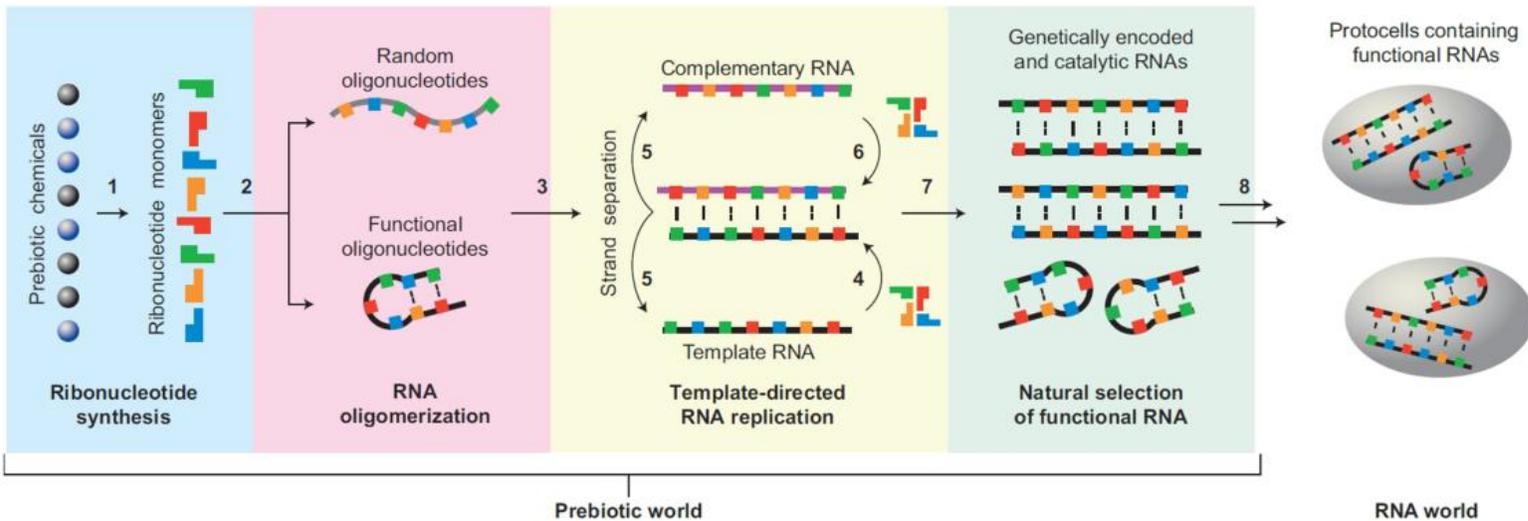
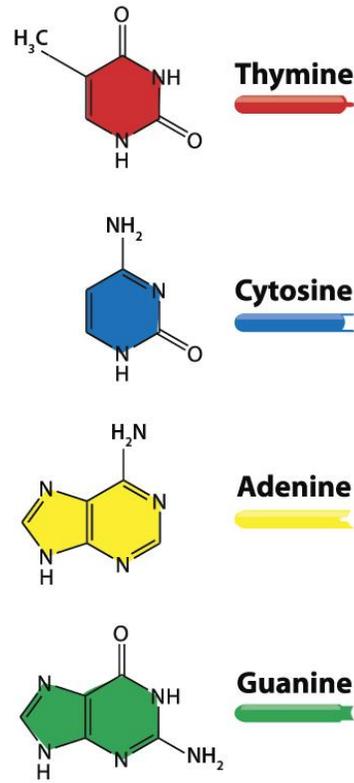


FIGURE 4.4. Steps in the origin of life.

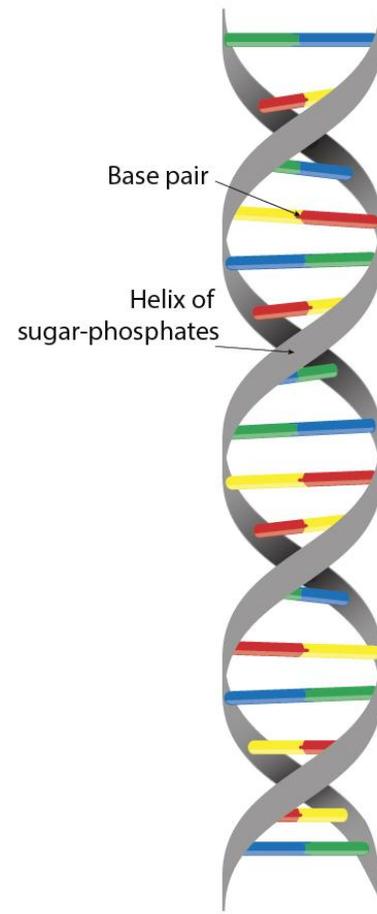


RNA vs DNA

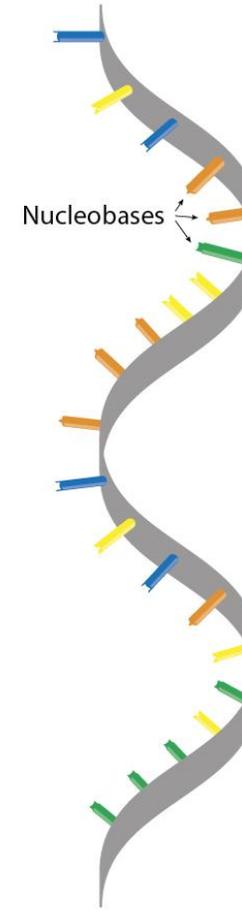
Açúcar é ribose (2' OH)
Uracila (em lugar de Timina)
Fita simples, mas assume estruturas secundárias e terciárias pelo pareamento intra-cadeia



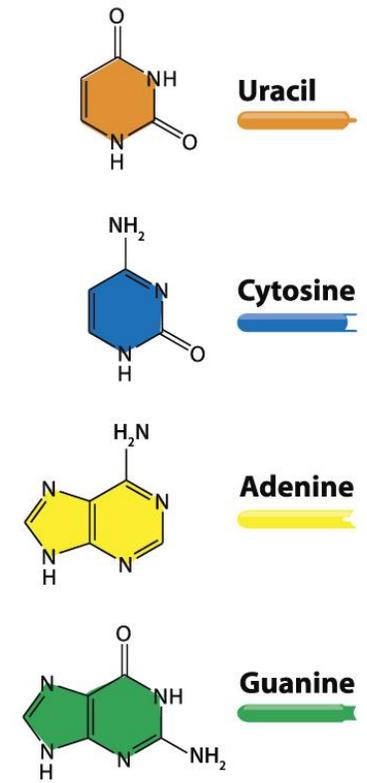
Nucleobases of DNA



DNA
Deoxyribonucleic acid

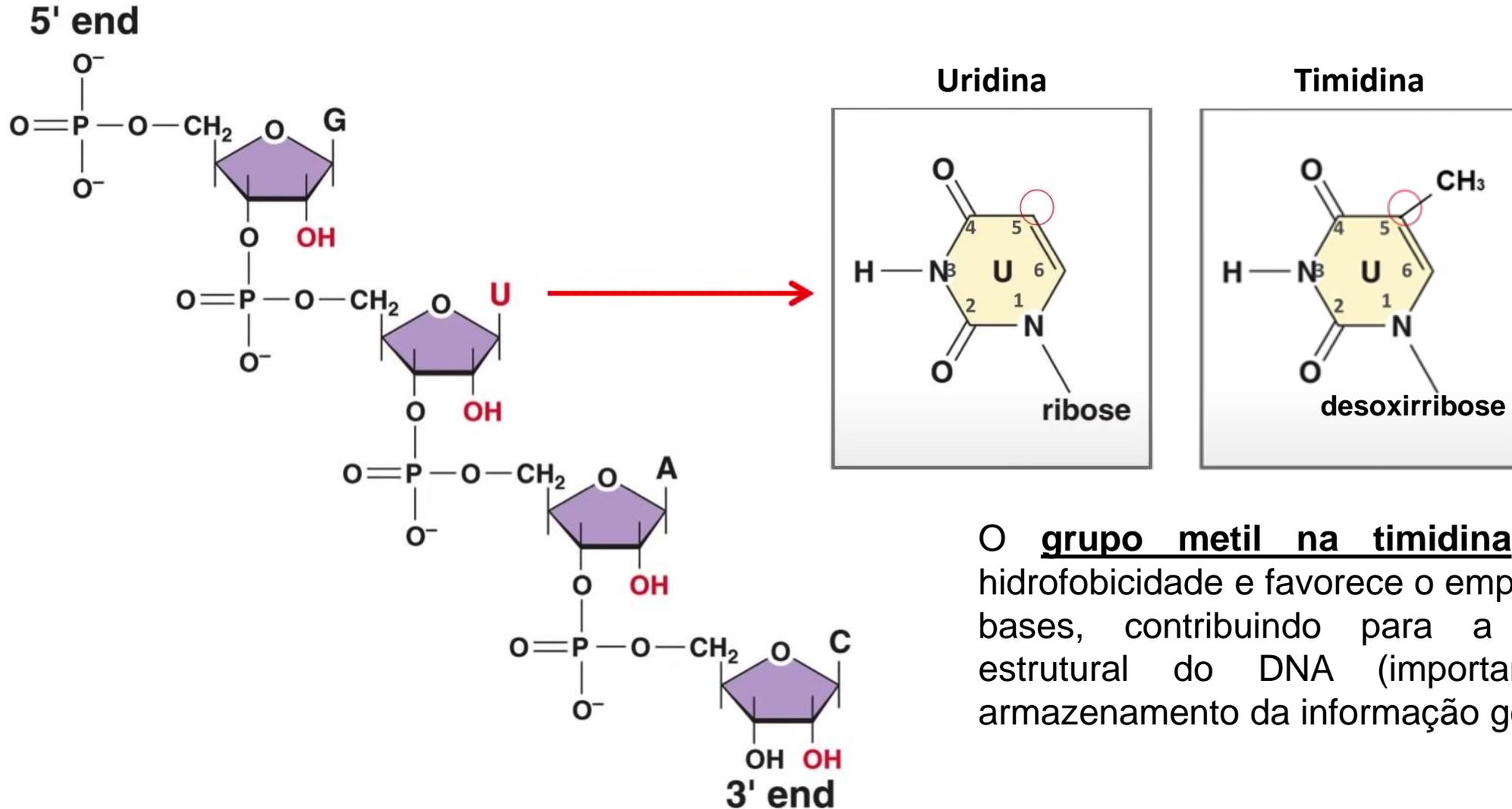


RNA
Ribonucleic Acid

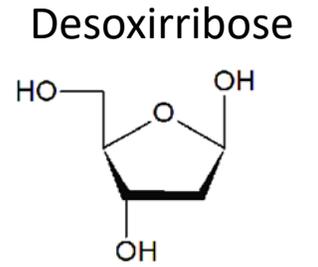
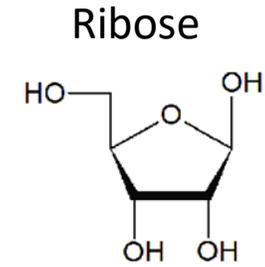
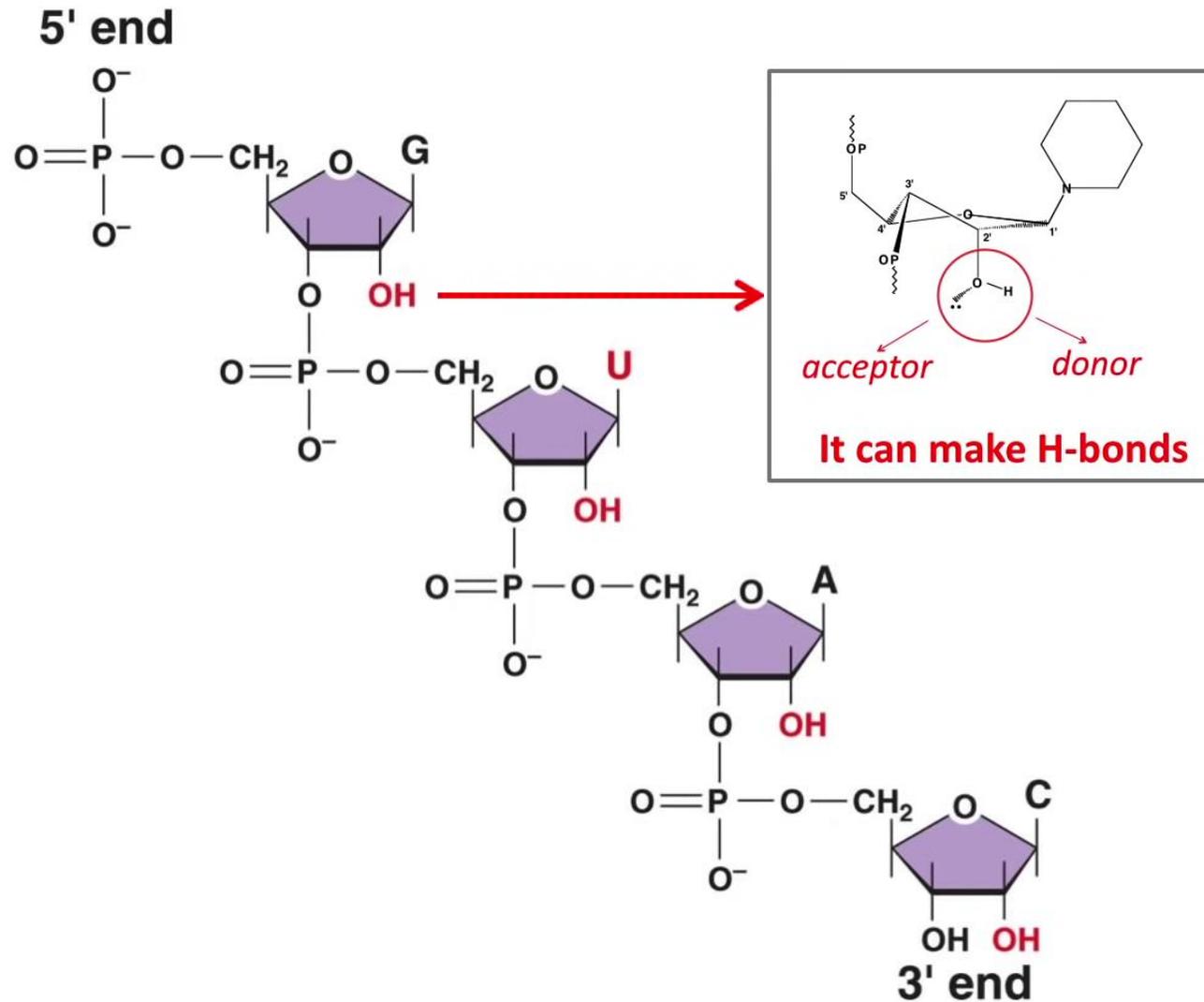


Nucleobases of RNA

RNA vs DNA



RNA vs DNA



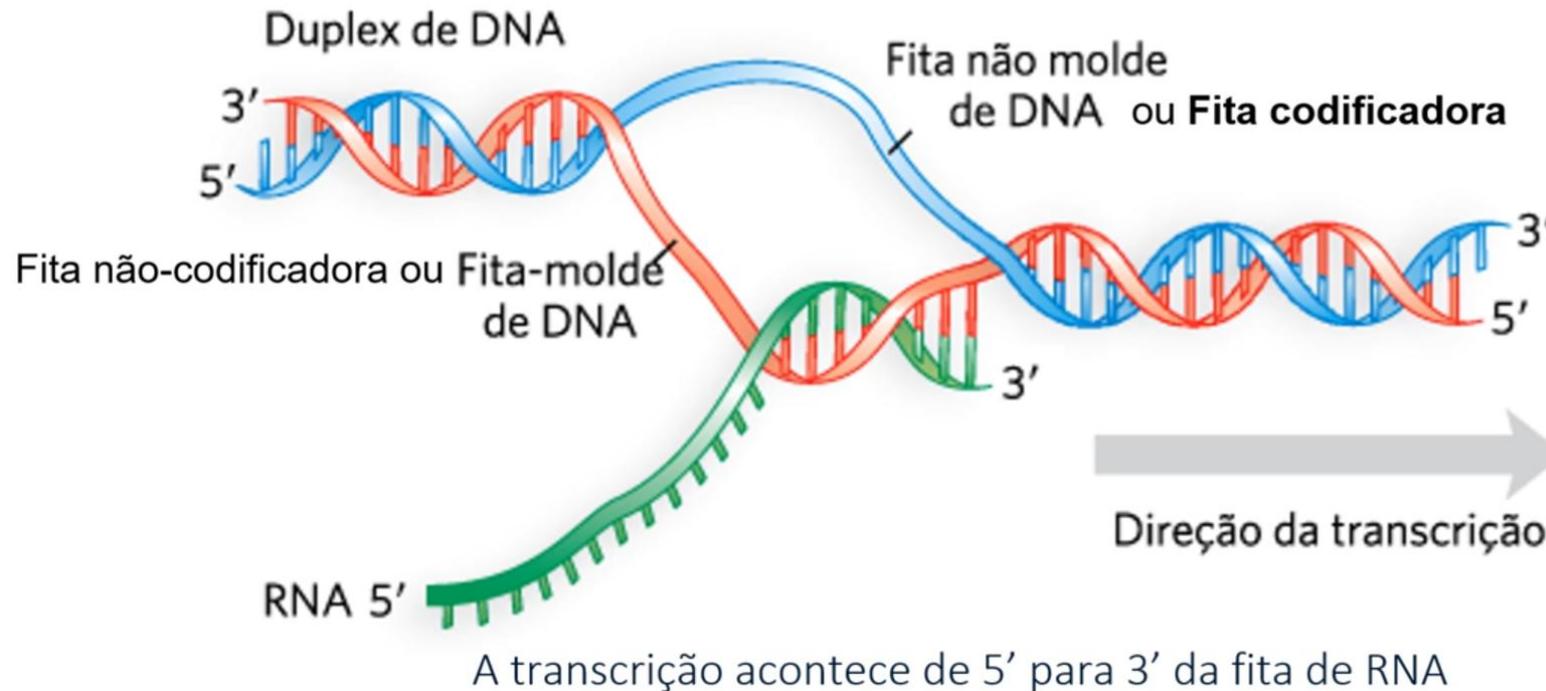
No caso do DNA/Desoxirribose:

Não possui o grupo -OH no carbono 2', o que reduz o estresse estérico e permite um empilhamento mais eficiente das bases.

No caso do RNA/Ribose:

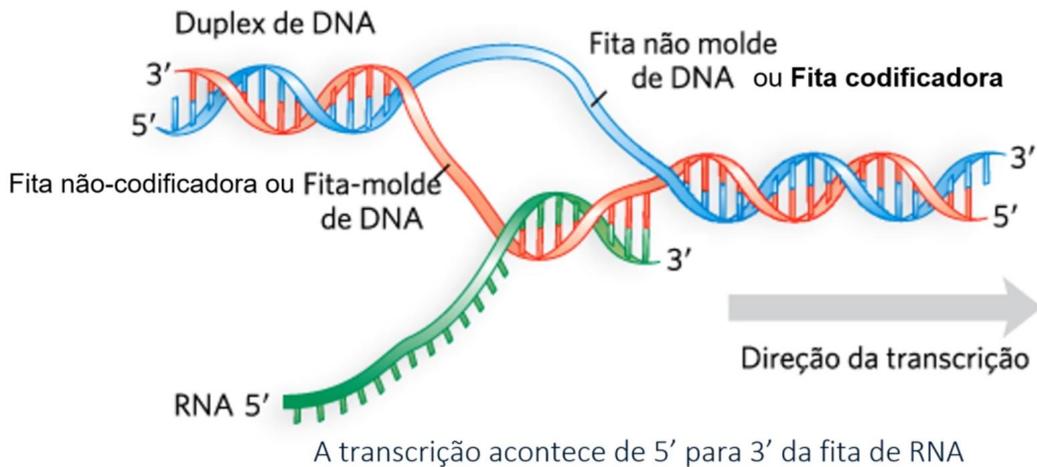
Aumenta a reatividade, menos estável, mas permite outras interações

Transcrição: Síntese do RNA



Quais semelhanças e quais diferenças vocês conseguem notar em relação a replicação?

Transcrição: Síntese do RNA



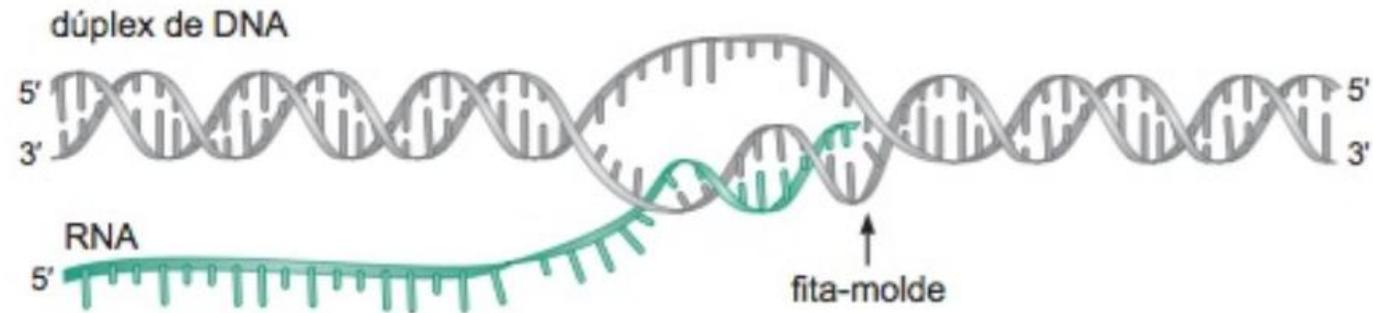
Semelhanças com a replicação:

Gera uma fita de polinucleotídeos complementar a uma fita de DNA molde

Nucleotídeos trifosforilados como precursores
(porém NTPs vs dNTPs)

Ocorre no sentido 5'-3'

Transcrição: Síntese do RNA



Diferenças:

Não requer um iniciador (primer)

Transcrição ocorre em uma bolha

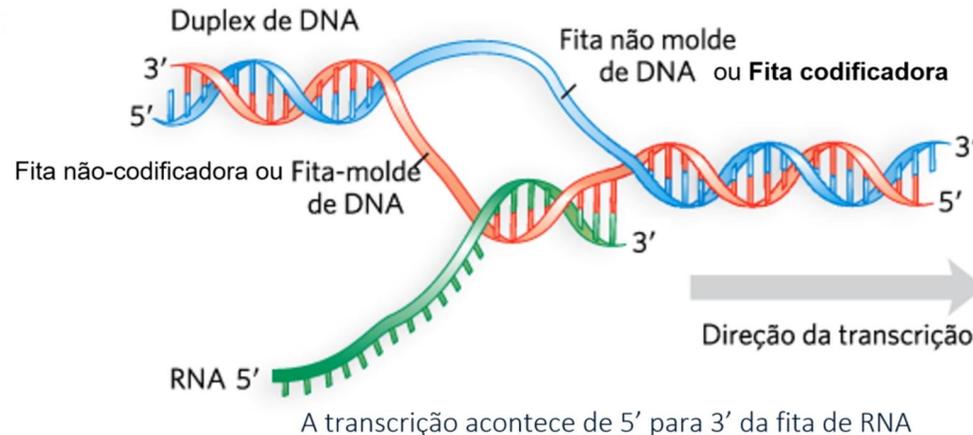
Produto de RNA não permanece pareado com DNA

Taxa de erro: 1 em 10,000

Transcrição: Síntese do RNA



Transcription

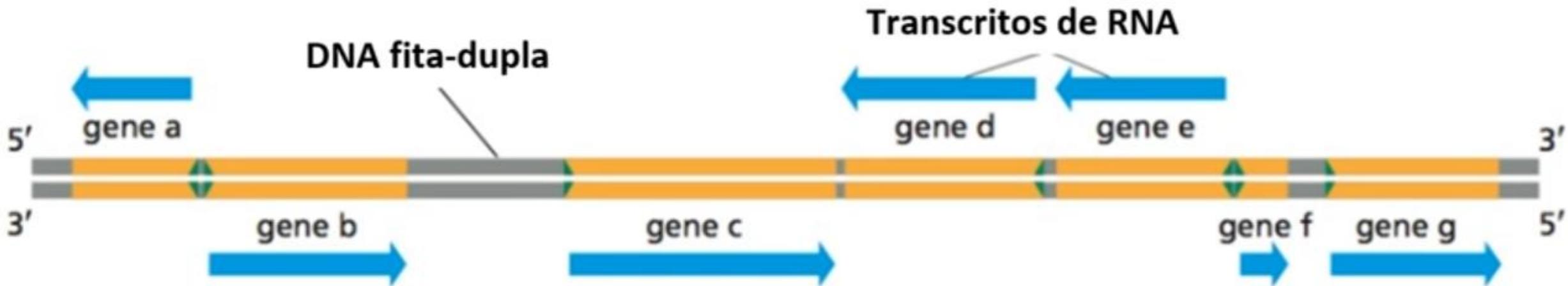


O DNA é uma dupla fita, ao passo que o RNA mensageiro é uma fita simples.

Logo, a informação daquele RNAm veio de alguma das fitas

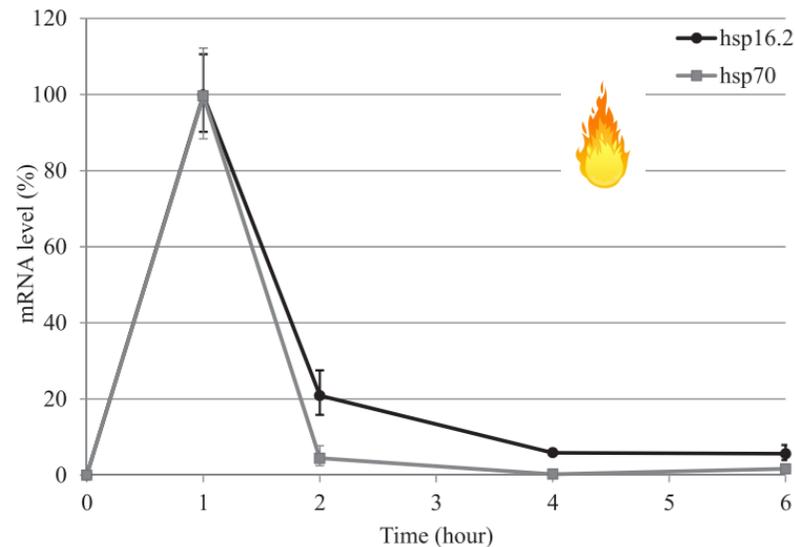
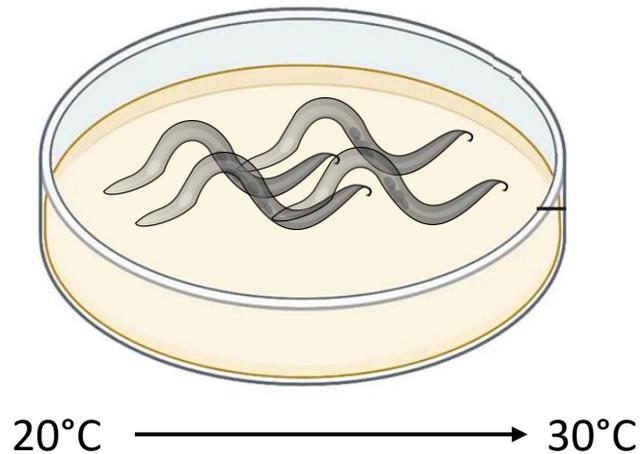
Ambas fitas do DNA podem ser transcritas em produtos diferentes

A fita de DNA transcrita não é sempre a mesma



Alguns genes são transcritos de uma das fitas do DNA e outros da outra fita. Mas, a transcrição é sempre de 5' -> 3'

Transcrição: Síntese do RNA



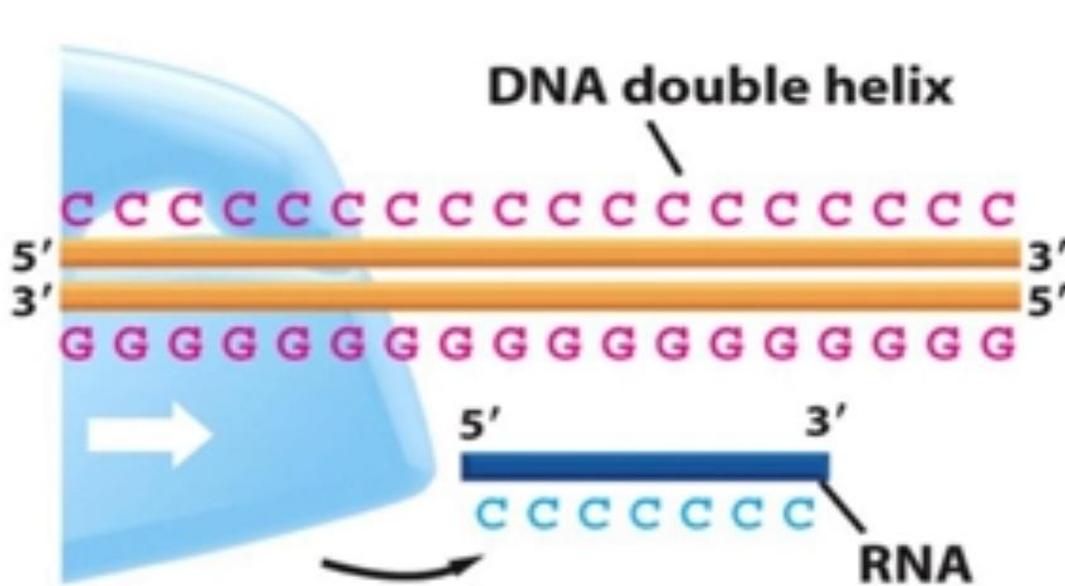
doi: 10.1016/j.mex.2015.02.002

hsp – *heat shock protein* (chaperonas, proteínas auxiliam enovelamento proteico)

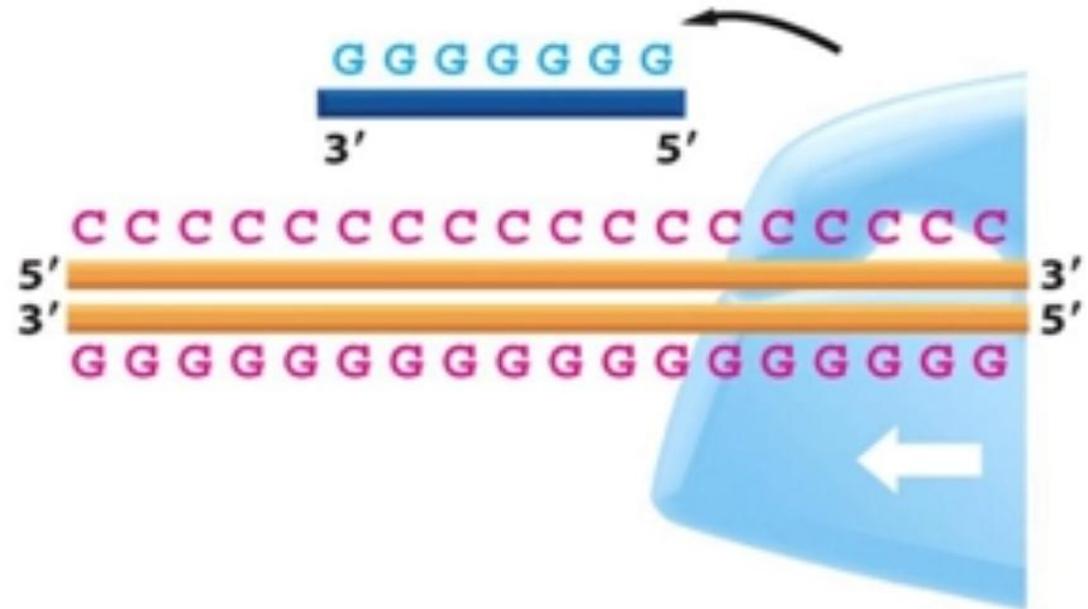
Alguns genes são transcritos de forma constante e essencial, como os **housekeeping genes**. Já outros são ativados ou têm sua transcrição aumentada apenas em momentos ou condições específicas. Ou seja, a escolha da região a ser transcrita não é aleatória, mas sim regulada de maneira regulável.

Como a direção é definida?

Depende da orientação pela qual a RNA polimerase vai se associar ao DNA!

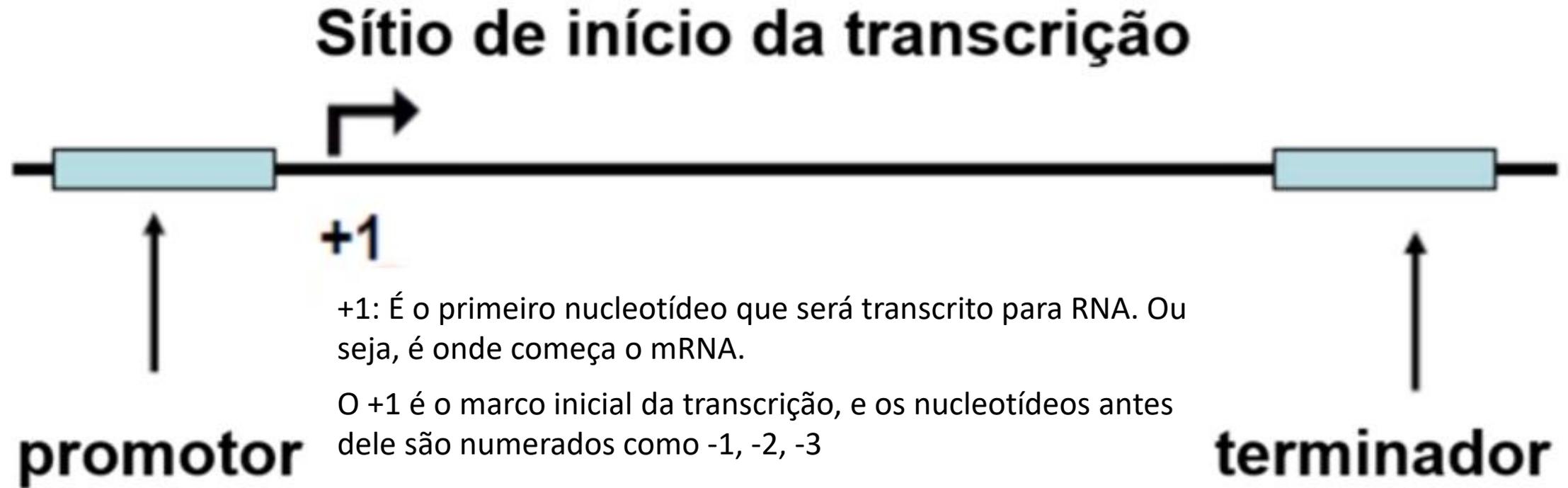


an RNA polymerase that moves from left to right makes RNA by using the bottom strand as a template



an RNA polymerase that moves from right to left makes RNA by using the top strand as a template

A transcrição tem início e fim



Unidade de transcrição: Promotor + Gene (ou genes) + Terminador

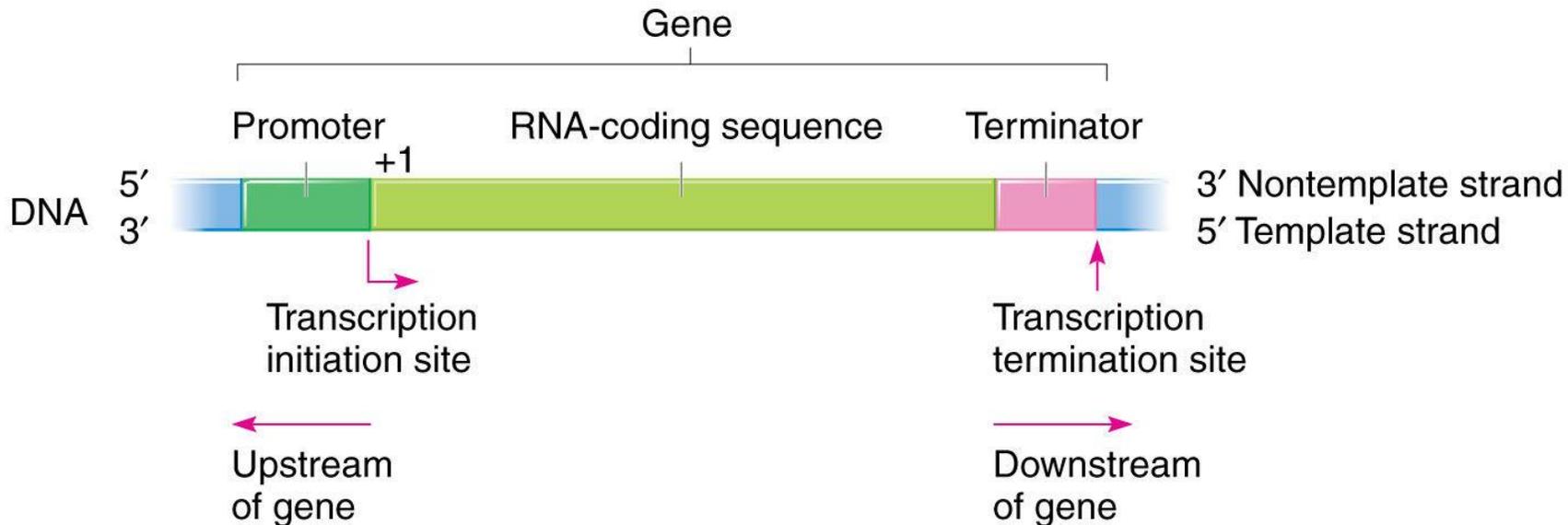
Algumas definições

Promotor: Uma região do DNA aonde se liga a RNA polimerase para iniciar a transcrição

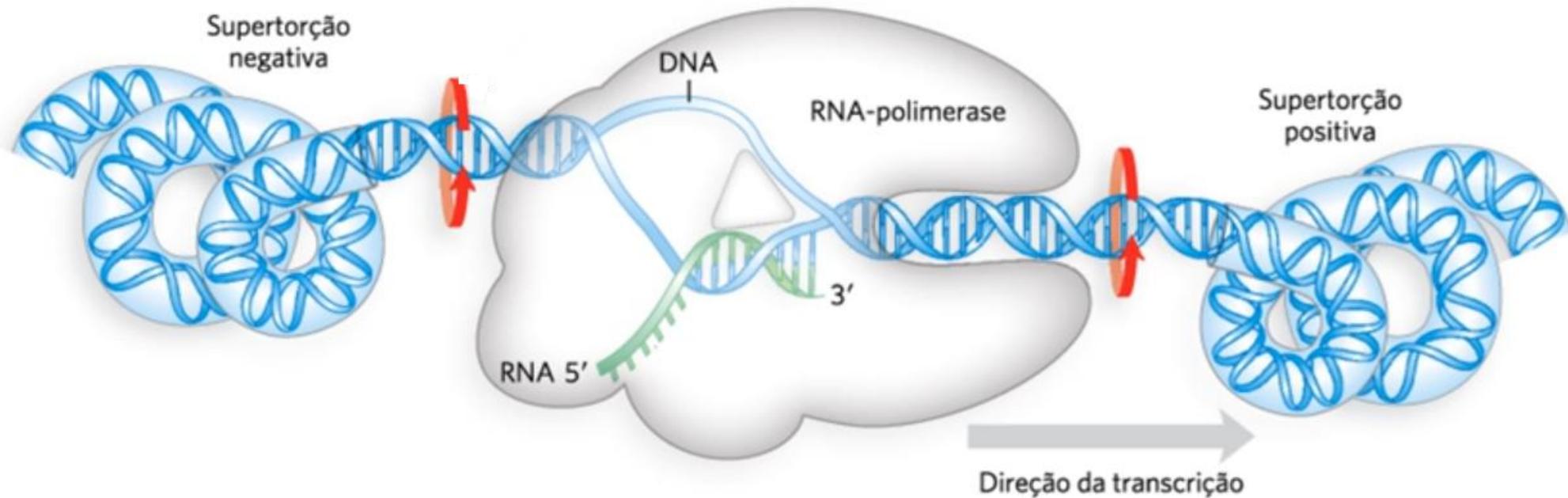
Ponto de início de transcrição: A posição no DNA correspondendo à primeira base incorporada no RNA.

Terminador: Uma sequência de DNA que induz a terminação da transcrição pela RNA polimerase

Unidade de transcrição: A sequência entre os sítios de iniciação e terminação pela RNA polimerase;
Em bactérias, pode incluir mais de um gene.



Os RNAs são sintetizados por RNA polimerases (RNAP)



Um trecho de ~ 17 pares de bases do DNA é desenrolado para a síntese da molécula de RNA (**bolha de transcrição**)

Os RNAs são sintetizados por RNA polimerases (RNAP)

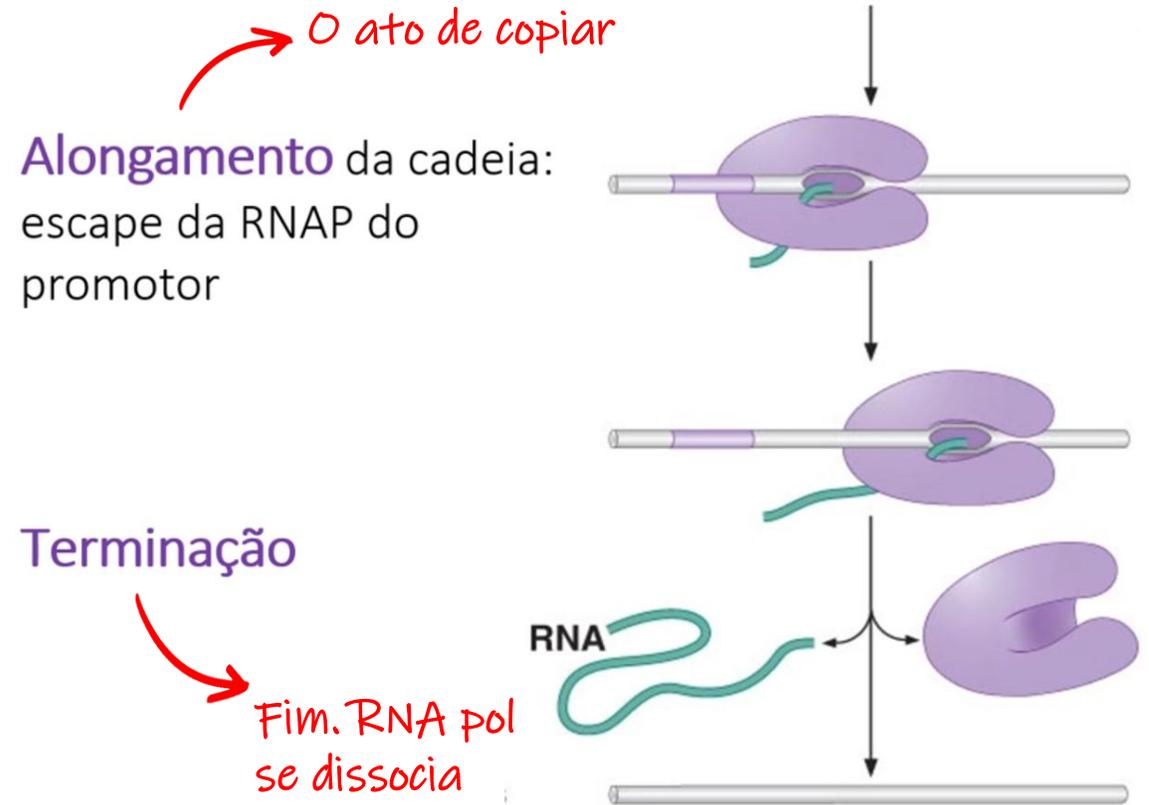
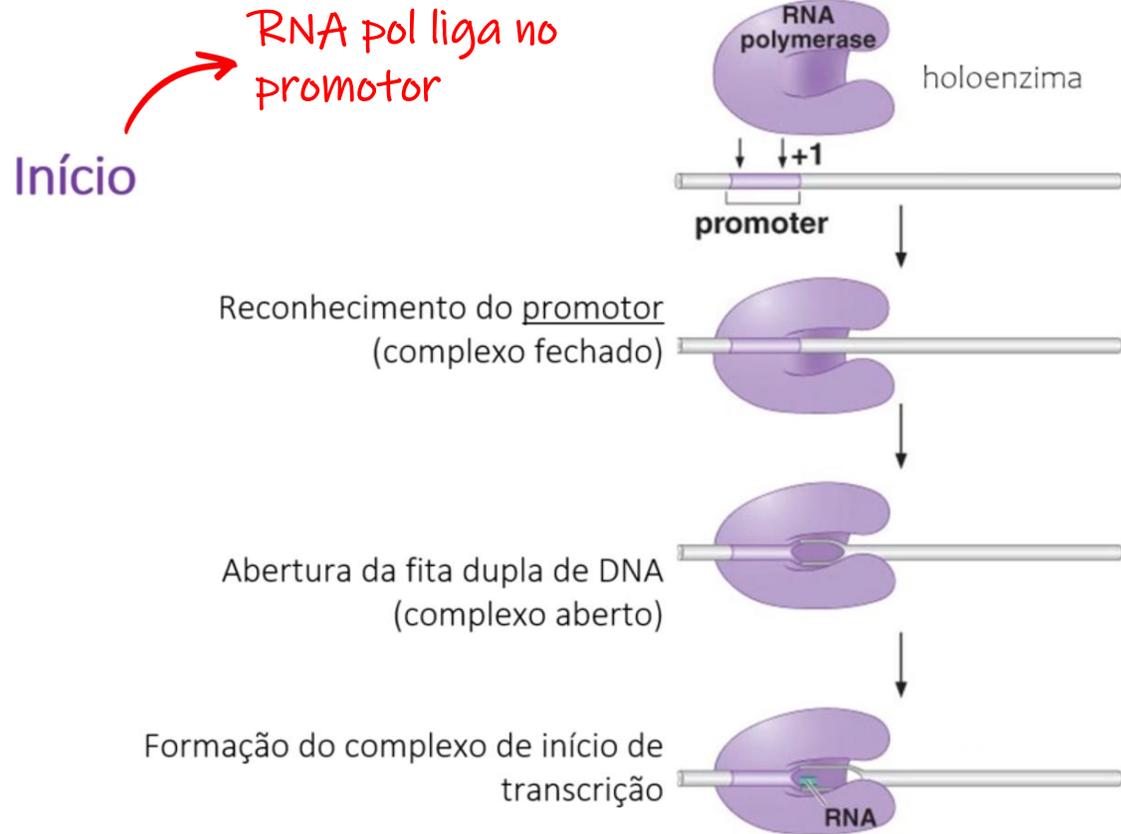
-Vamos agora estudar como este processo ocorre em bactérias e depois em eucariotos

-Porém, há algumas semelhanças:

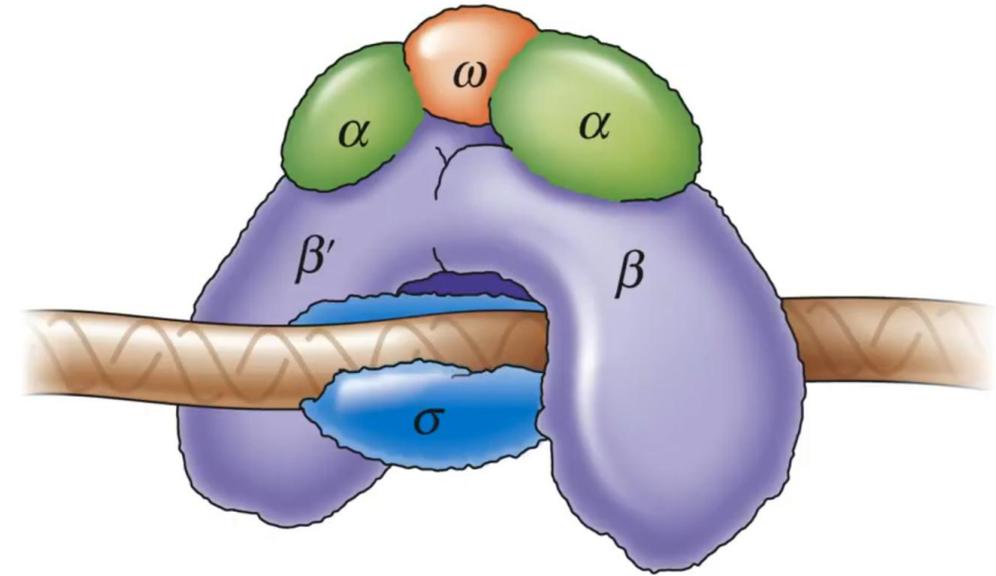
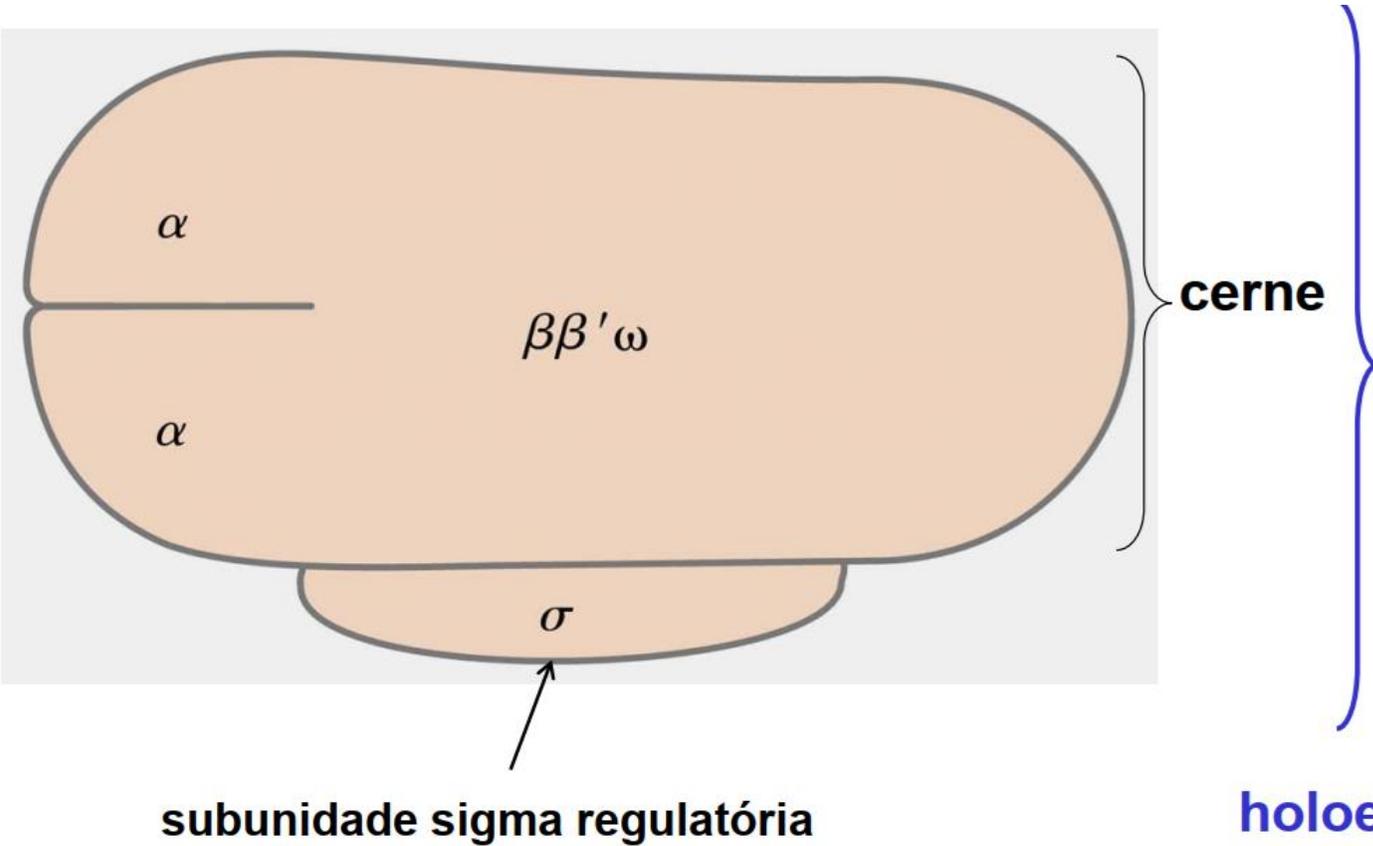
*Em ambos, a transcrição será feita pela RNA polimerase e o processo de transcrição pode ser dividido em 3 etapas:

- (i) Início
- (ii) Alongamento
- (iii) Terminação

Ciclo da transcrição



RNA polimerase bacteriana



holoenzima

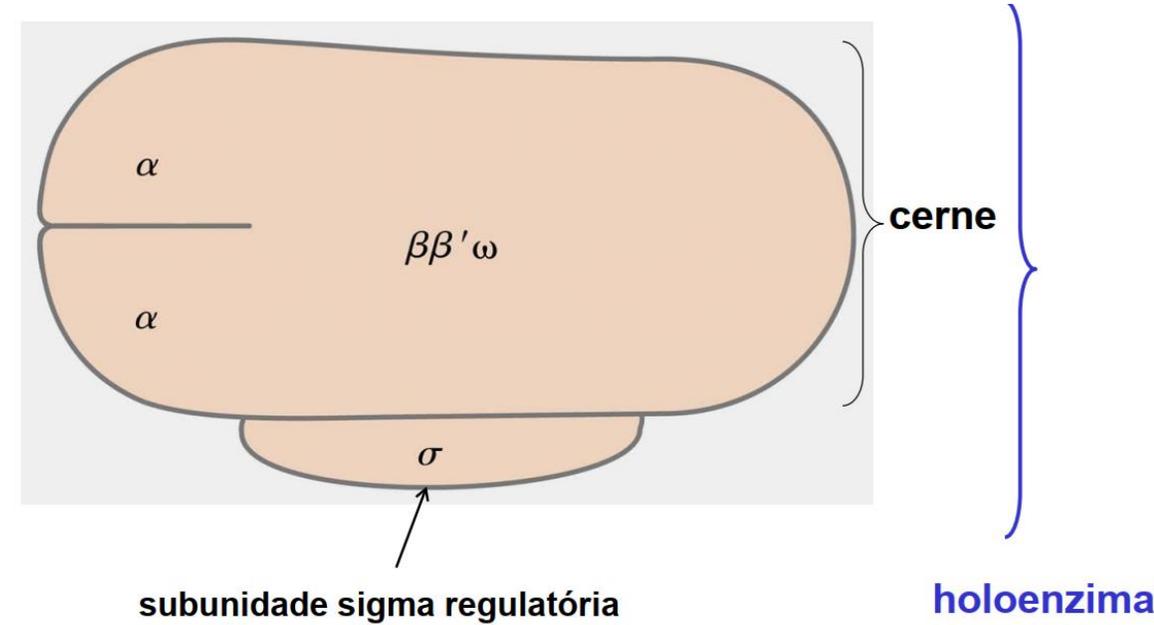
Transcrição bacteriana

A RNA polimerase bacteriana é composta por múltiplas subunidades

Gene	Produto proteico	Funções
	2 α subunits (37 kD each)	Montagem da enzima Interage com a região do promotor
	β subunit (151 kD)	Formam o centro catalítico da RNAP
	β' subunit (155 kD)	
	σ subunit (18–70 kD)	Reconhecimento específico do promotor
	ω subunit (10 kD)	

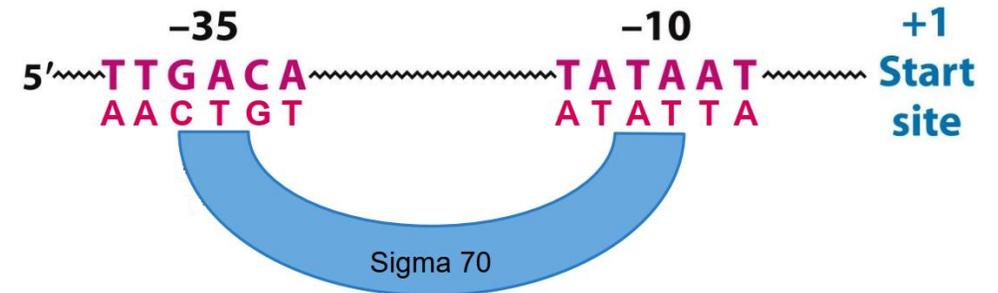
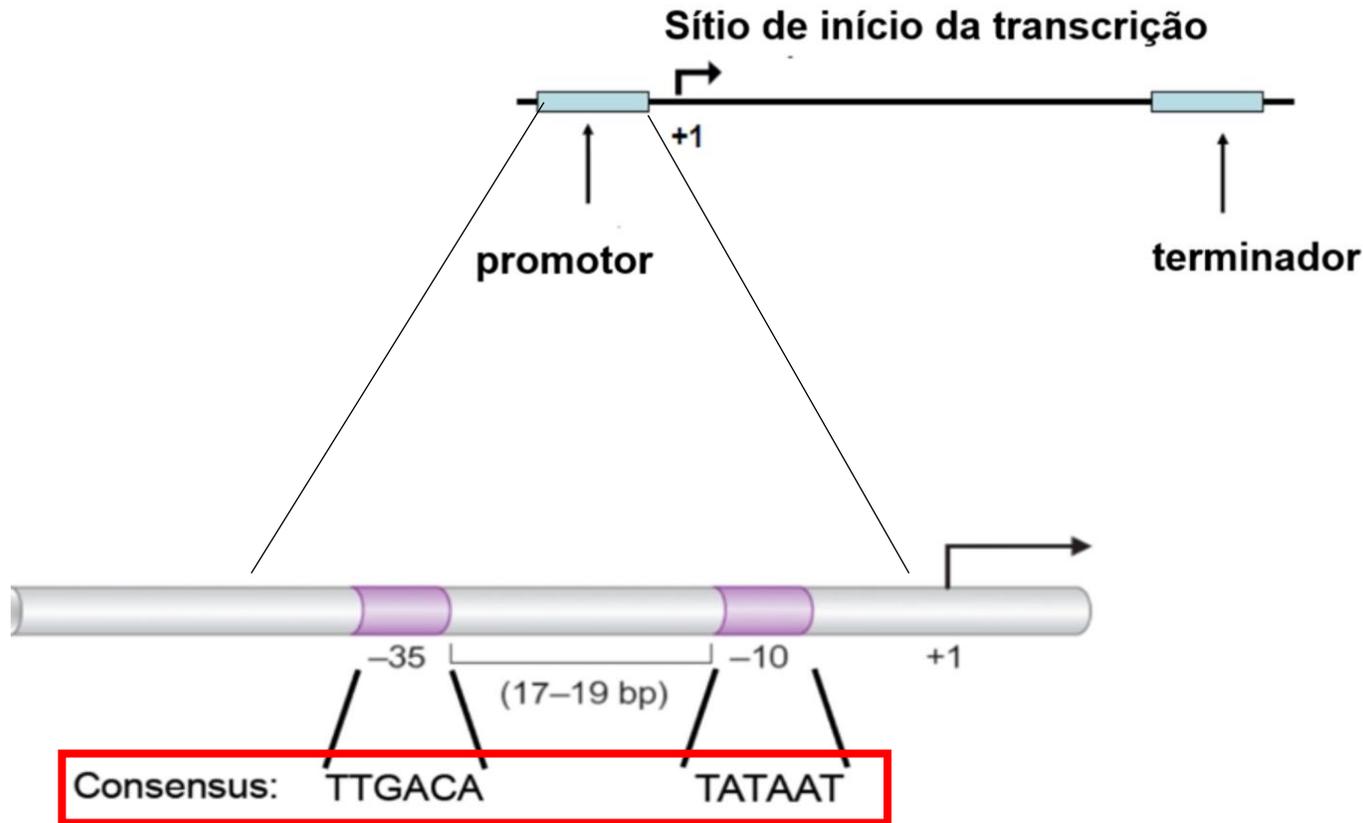
E. coli enzyme = 460 kD

σ subunit
σ_{70}
σ_{54}
σ_{38}
σ_{32}
σ_{28}
σ_{24}
σ_{18}



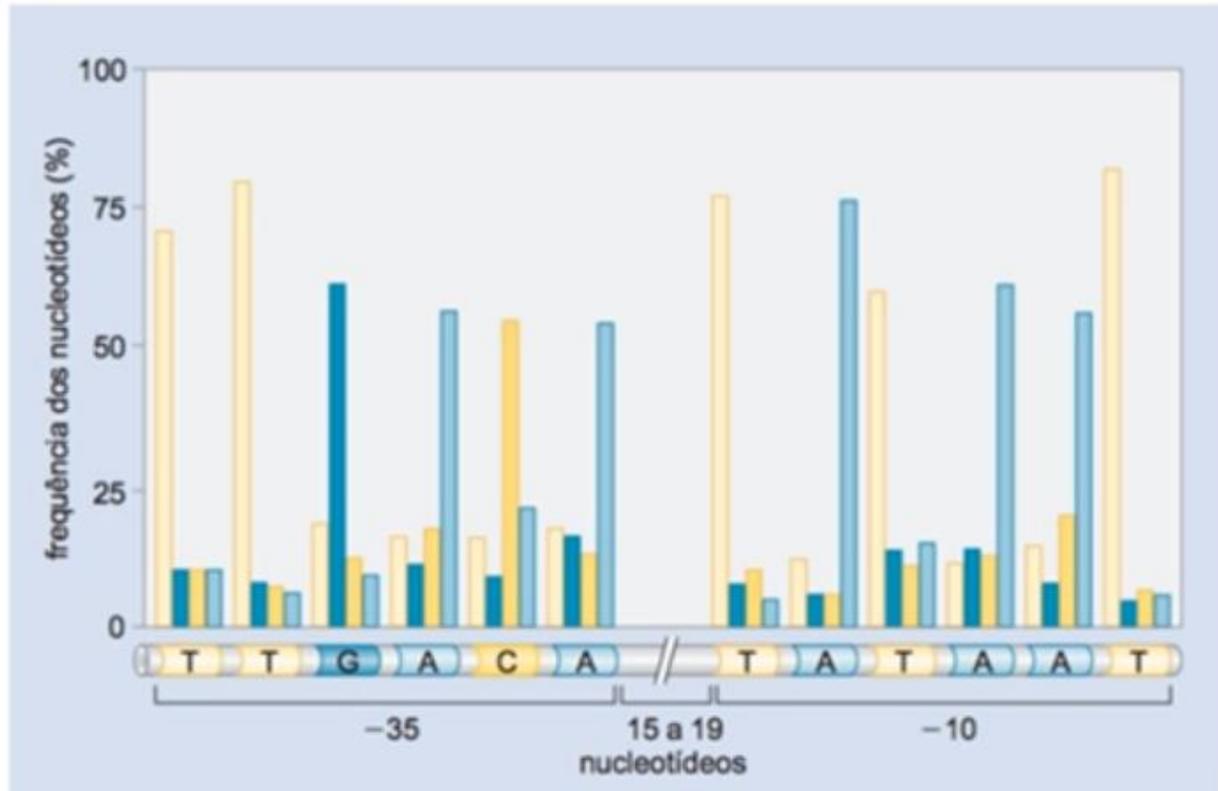
Promotor bacteriano

Os promotores bacterianos são compostos de elementos de sequência conservada localizados upstream (antes) do sítio de iniciação da transcrição. Os elementos mais importantes são as regiões a -10 e a -35. Essas regiões são separadas por ~17 pares de bases.



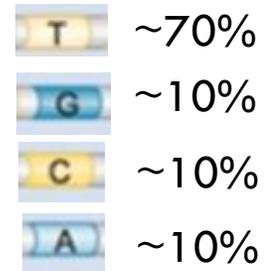
O que é uma sequência consenso

Representação da região promotora de n genes:



Frequência esperada? 25%

Primeiro nucleotídeo



Sequências representativas de promotores em *E. coli*

–35 region

–10 region

Initiation site (+1)

```

lac      ACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
lacI    CCATCGAATGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTC
galP2   ATTTATTCCATGTCACACTTTTTCGCATCTTTGTTATGCTATGGTTATTTTCATACCAT
araBAD  GGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATAACCGTTTTT
araC    GCCGTGATTATAGACACTTTTGTACGCGTTTTTGTTCATGGCTTTGGTCCCCTTTG
trp     AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAAGTTCACGTA
bioA    TTCCAAAACGTGTTTTTTGTTGTTAATTTCGGTGTAGACTTGTAACCTAAATCTTTT
bioB    CATAATCGACTTGTA AACCAAATTGAAAAGATTTAGGTTTACAAGTCTACACCGAAT
tRNATyr CAACGTAACACTTTACAGCGGCGCGTCATTTGATATGATGCGCCCCGCTTCCCGATA
rrnD1   CAAAAAATACTTGTGCAAAAAATTGGGATCCCTATAAATGCGCCTCCGTTGAGACGA
rrnE1   CAATTTTTCTATTGCGGCCTGCGGAGAACTCCCTATAAATGCGCCTCCATCGACACGG
rrnA1   AAAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTATGCACACCCC GCGCCGCTG
  
```

Quanto mais similar, maior a força do promotor

Consenso é a sequência ideal em que a subunidade sigma se liga com maior afinidade

Raramente um promotor obedece perfeitamente ao consenso

–35 region

–10 region

Initiation site

Consensus sequence:

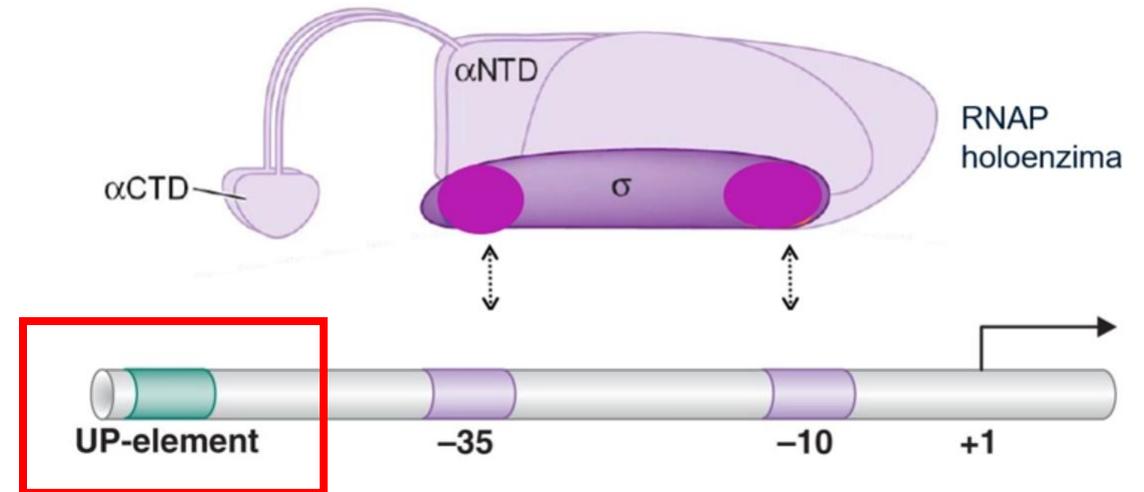
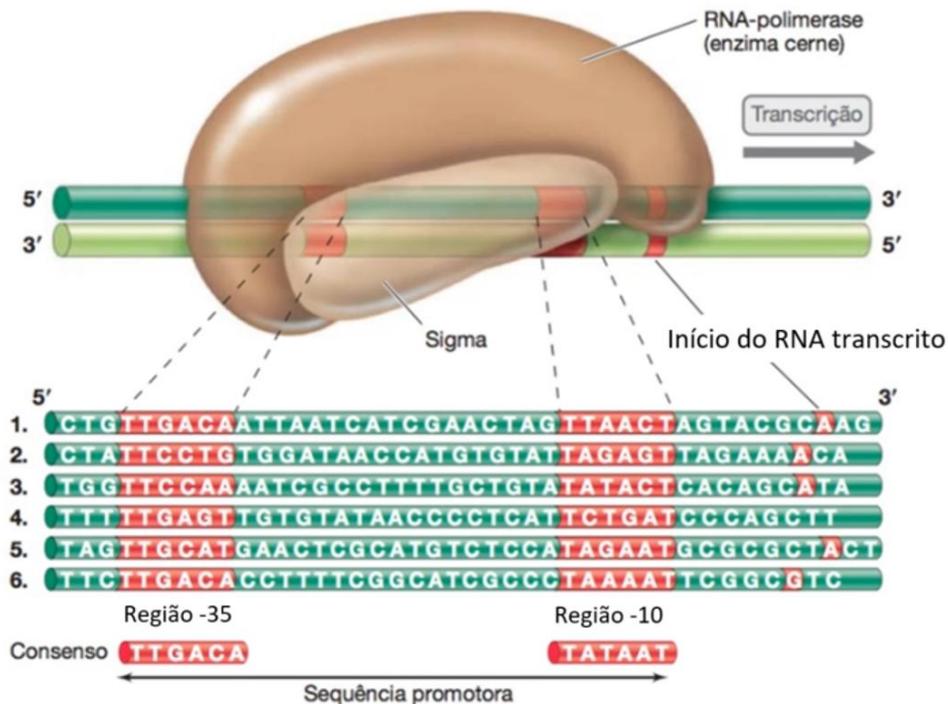
T T G A C A ... 16–19 bp ...

T A T A A T ... 5–8 bp ...

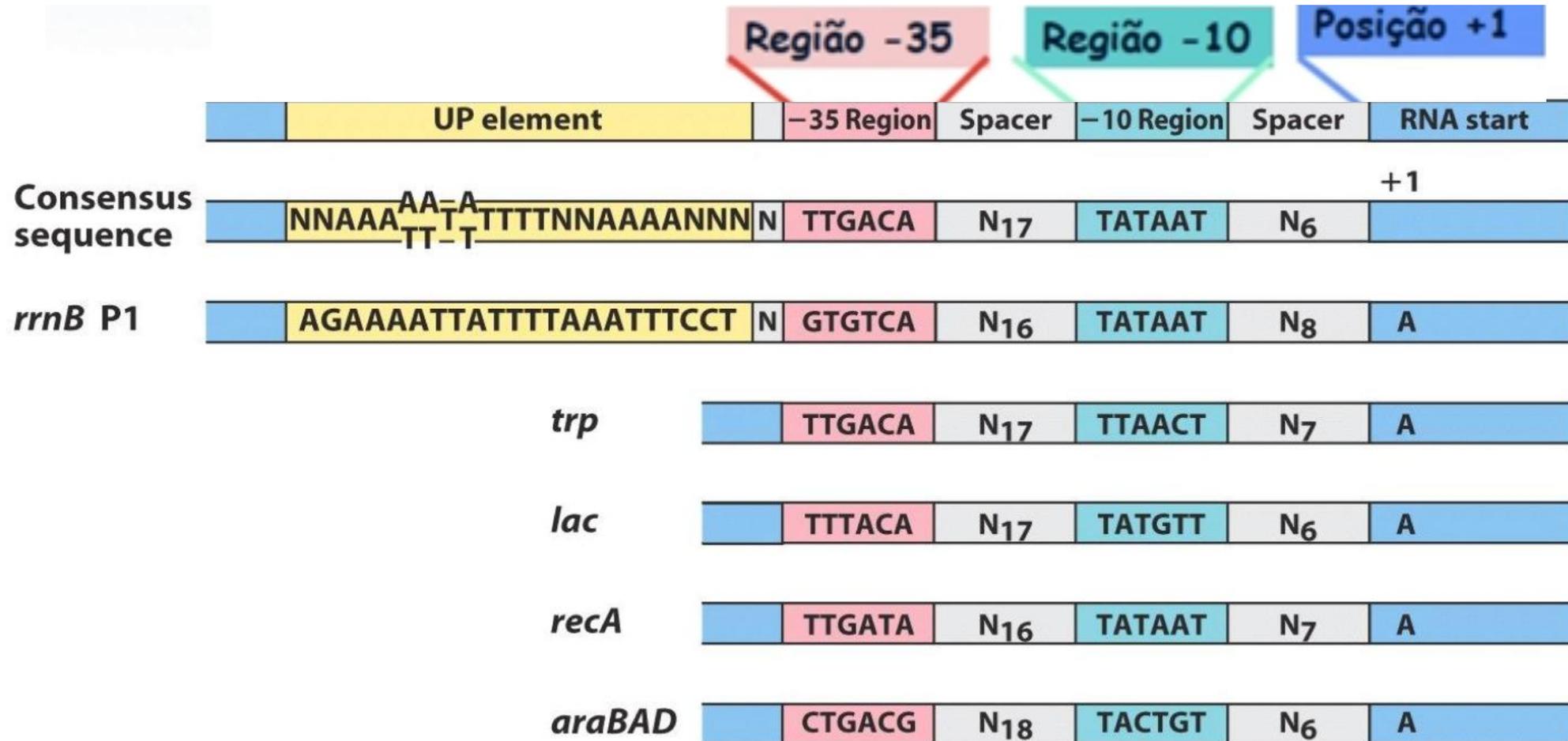
A
51
C T
55 G 48
42

Como a RNA polimerase bacteriana reconhece o promotor?

A subunidade sigma da RNA polimerase se liga às regiões -35 e -10 do promotor



Como a RNA polimerase bacteriana reconhece o promotor?

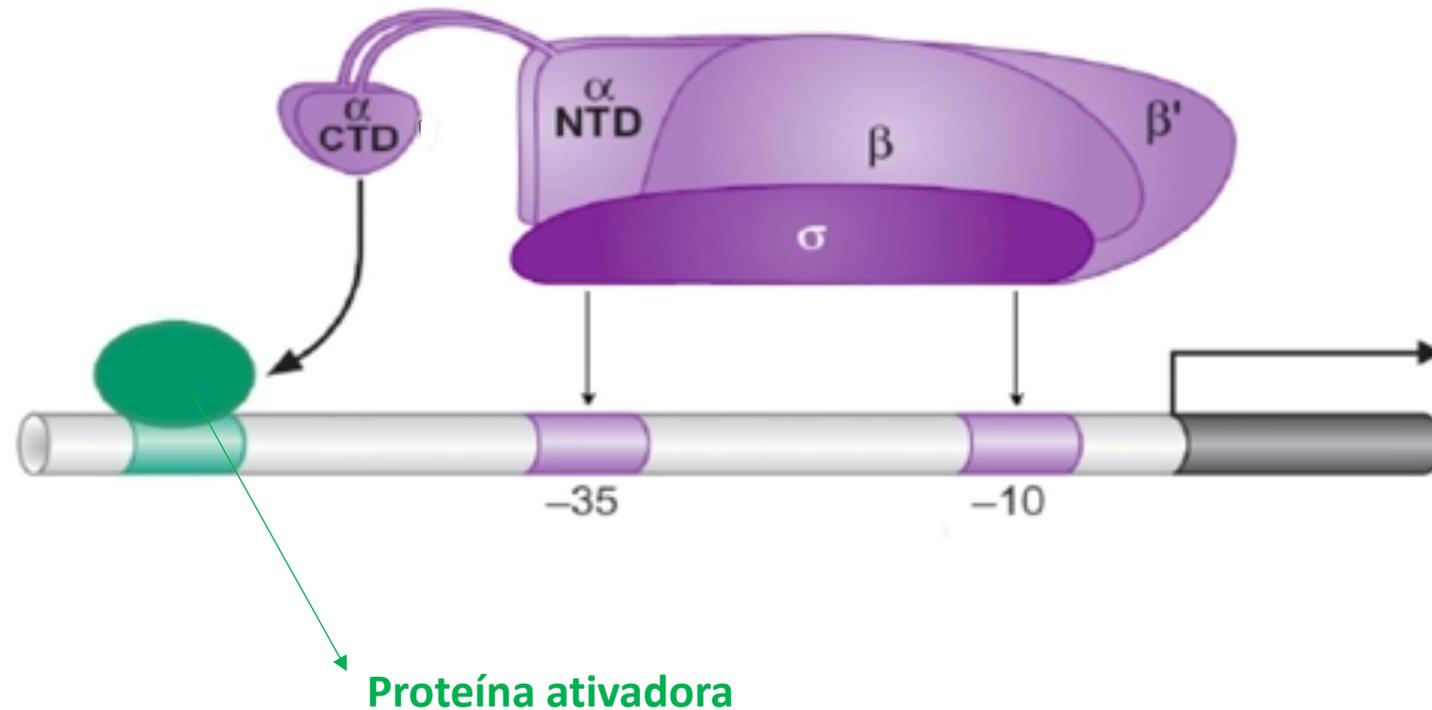


A ausência de conformidade com o consenso é a base para o controle da expressão gênica

As proteínas ativadoras se ligam ao DNA e aumentam a taxa de transcrição de determinados genes.

Elas reconhecem e se ligam a sequências *upstream* na região promotora.

Depois de ligadas, ajudam a recrutar a RNA polimerase (ou estabilizá-la no promotor), facilitando o início da transcrição.



Tipos de proteínas sigma

TABLE 26-1 The Seven σ Subunits of *Escherichia coli*

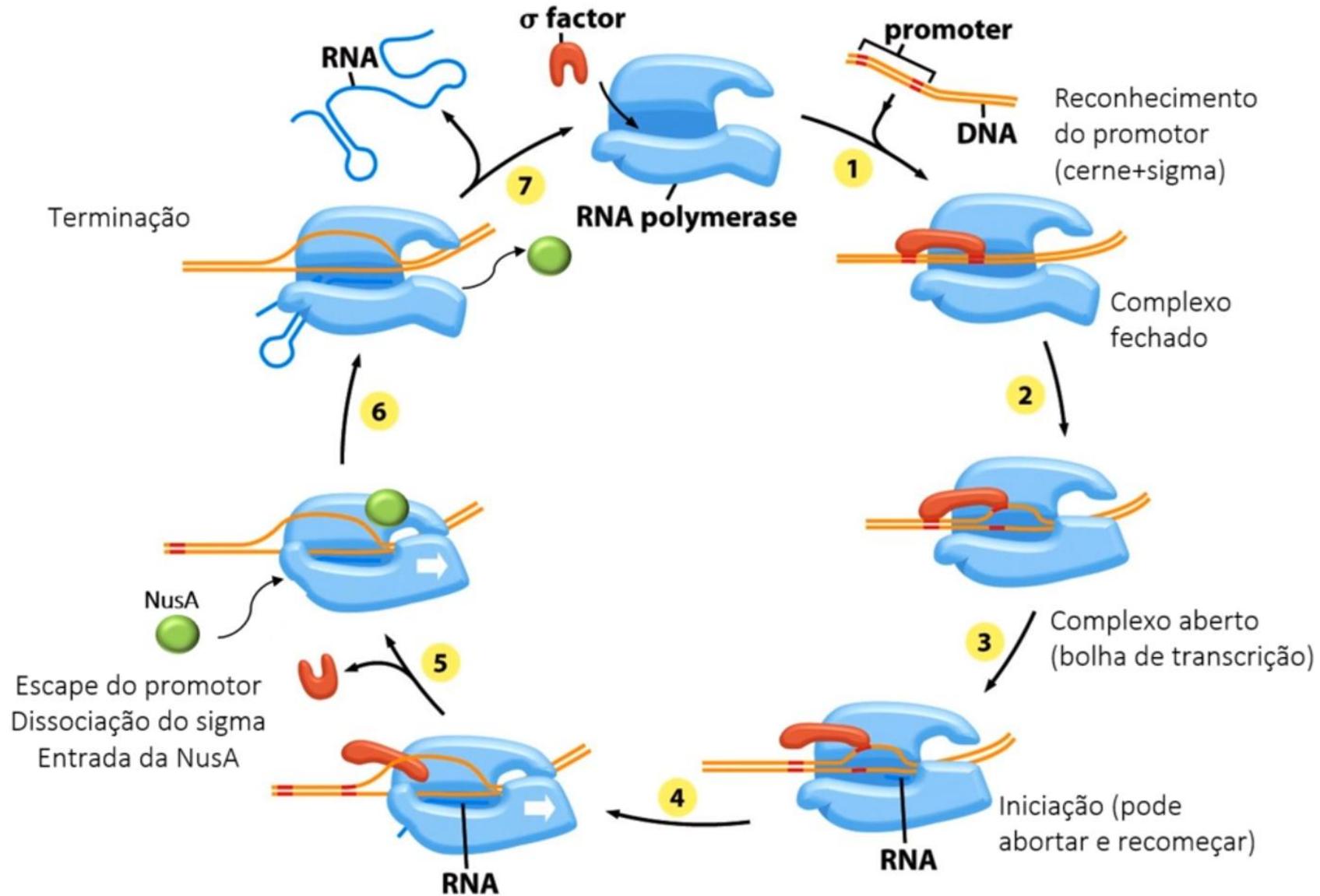
σ subunit	K_d (nM)	Molecules/cell*	Holoenzyme ratio (%)*	Function
σ^{70}	0.26	700	78	Housekeeping
σ^{54}	0.30	110	8	Modulation of cellular nitrogen levels
σ^{38}	4.26	<1	0	Stationary phase genes
σ^{32}	1.24	<10	0	Heat shock genes
σ^{28}	0.74	370	14	Flagella and chemotaxis genes
σ^{24}	2.43	<10	0	Extracytoplasmic functions; some heat shock functions
σ^{18}	1.73	<1	0	Extracytoplasmic functions, including ferric citrate transport

Source: Adapted from Maeda, H., Fujita, N., & Ishihama, A. (2000) *Nucleic. Acids Res.* 28, 3500.

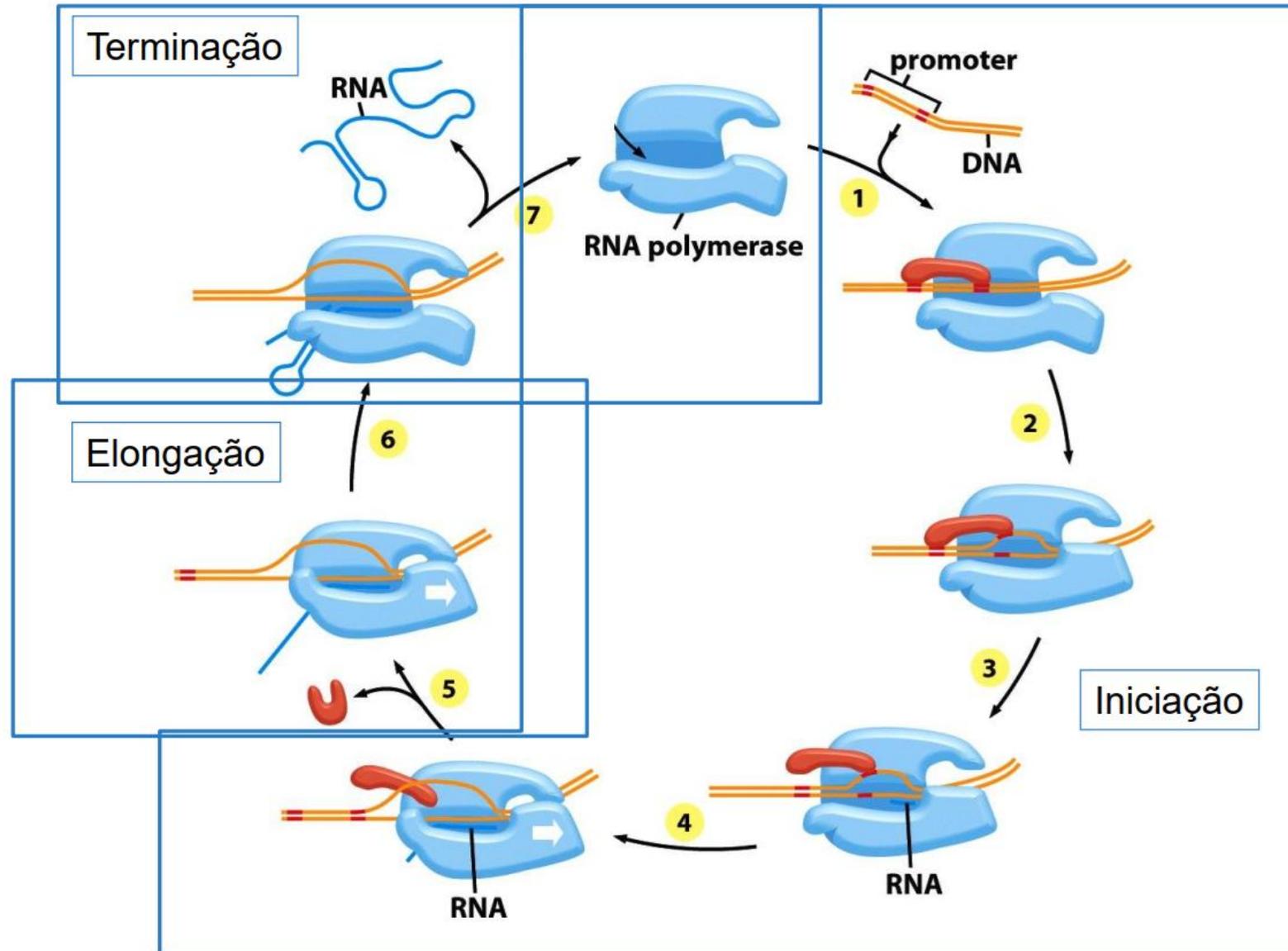
Factor	Use	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
σ^{70}	general	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
σ^{32}	heat shock	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
σ^E	heat shock	not known	not known	not known
σ^{54}	nitrogen	CTGGNA	6 bp	TTGCA
σ^F	flagellar	CTAAA	15 bp	GCCGATAA

As sequências -10 e -35 mudam dependendo do sigma

O ciclo da transcrição em bactérias

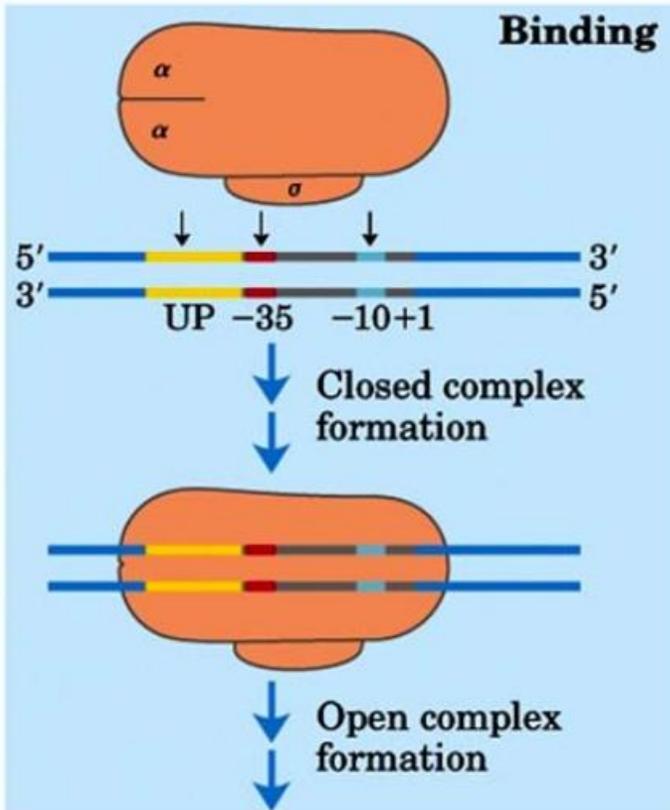


O ciclo da transcrição em bactérias

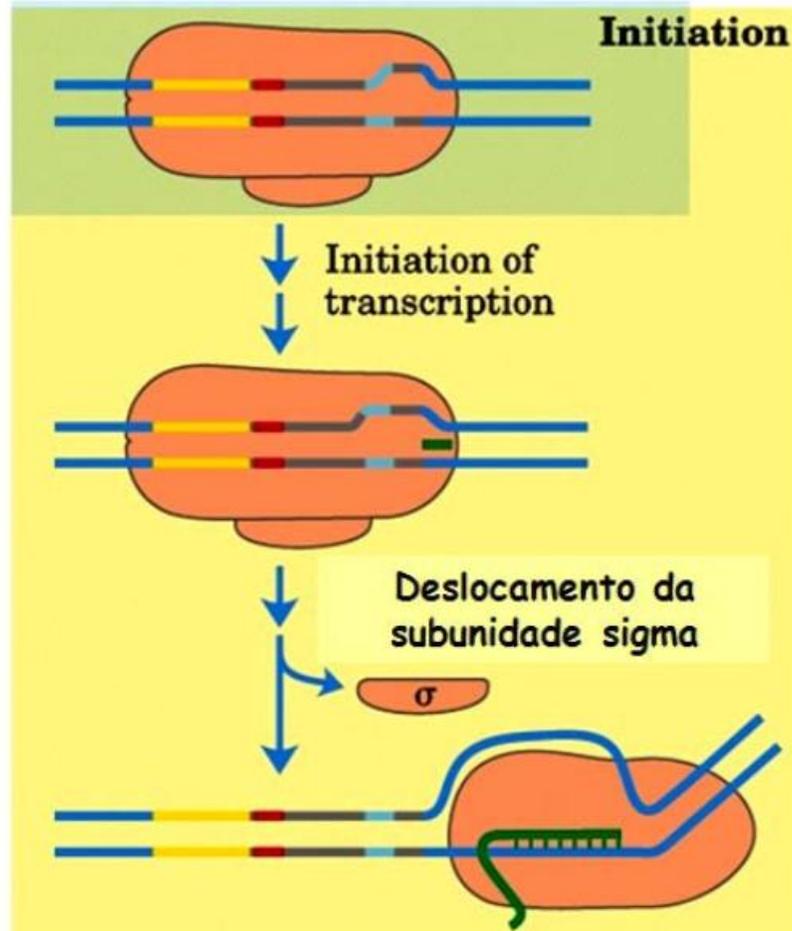


Passo 1: Iniciação da transcrição

Reconhecimento e Ligação ao promotor



Início da Transcrição

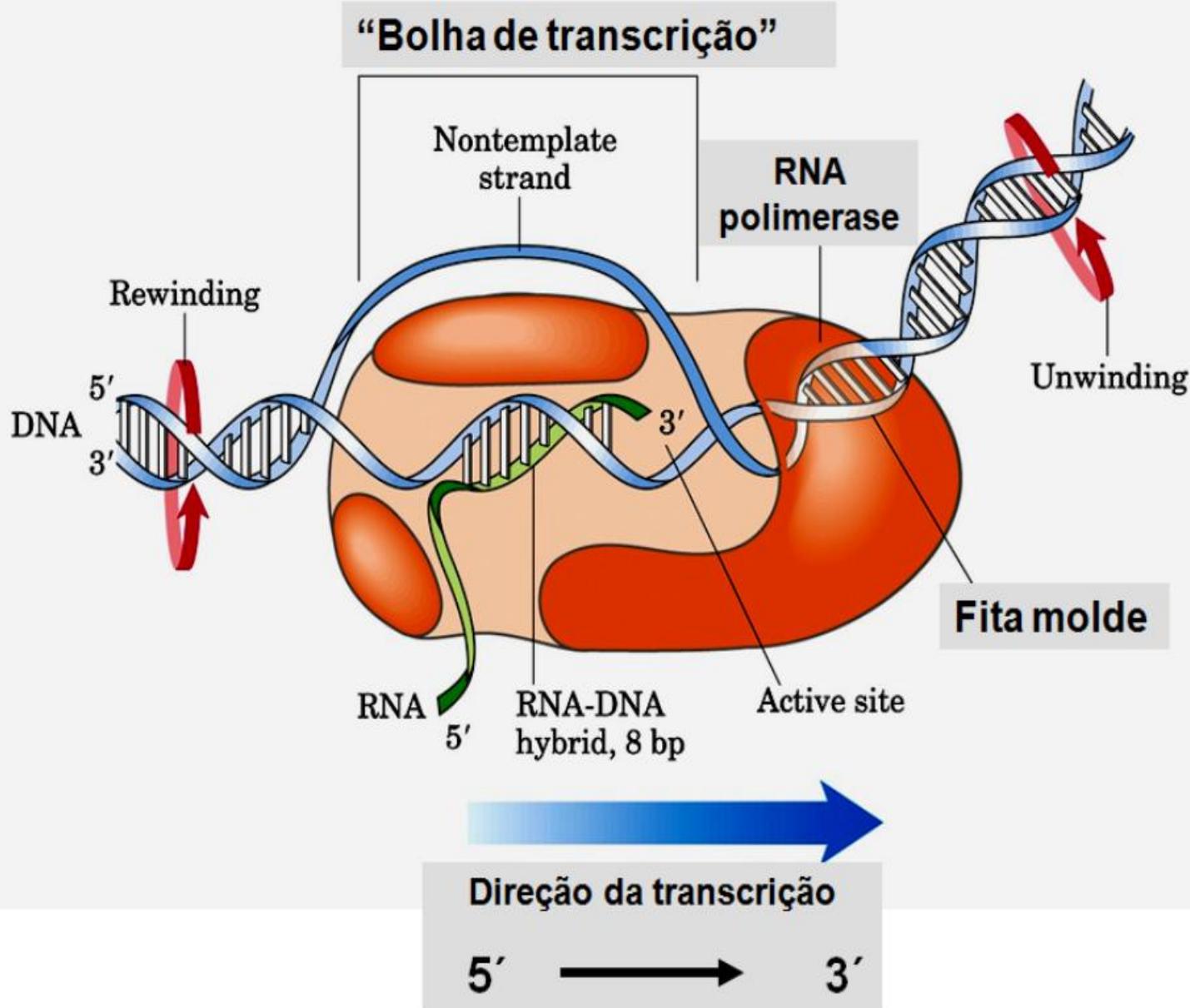


A transcrição começa com o reconhecimento e ligação da RNA polimerase ao promotor, auxiliada pela subunidade sigma (σ).

Essa ligação forma inicialmente o "complexo fechado". Em seguida, ocorre a abertura da dupla hélice, formando o "complexo aberto". Com isso, inicia-se a síntese do RNA.

Após os primeiros nucleotídeos serem adicionados, a subunidade sigma é liberada, permitindo a continuidade da transcrição.

Passo 2: alongação da transcrição

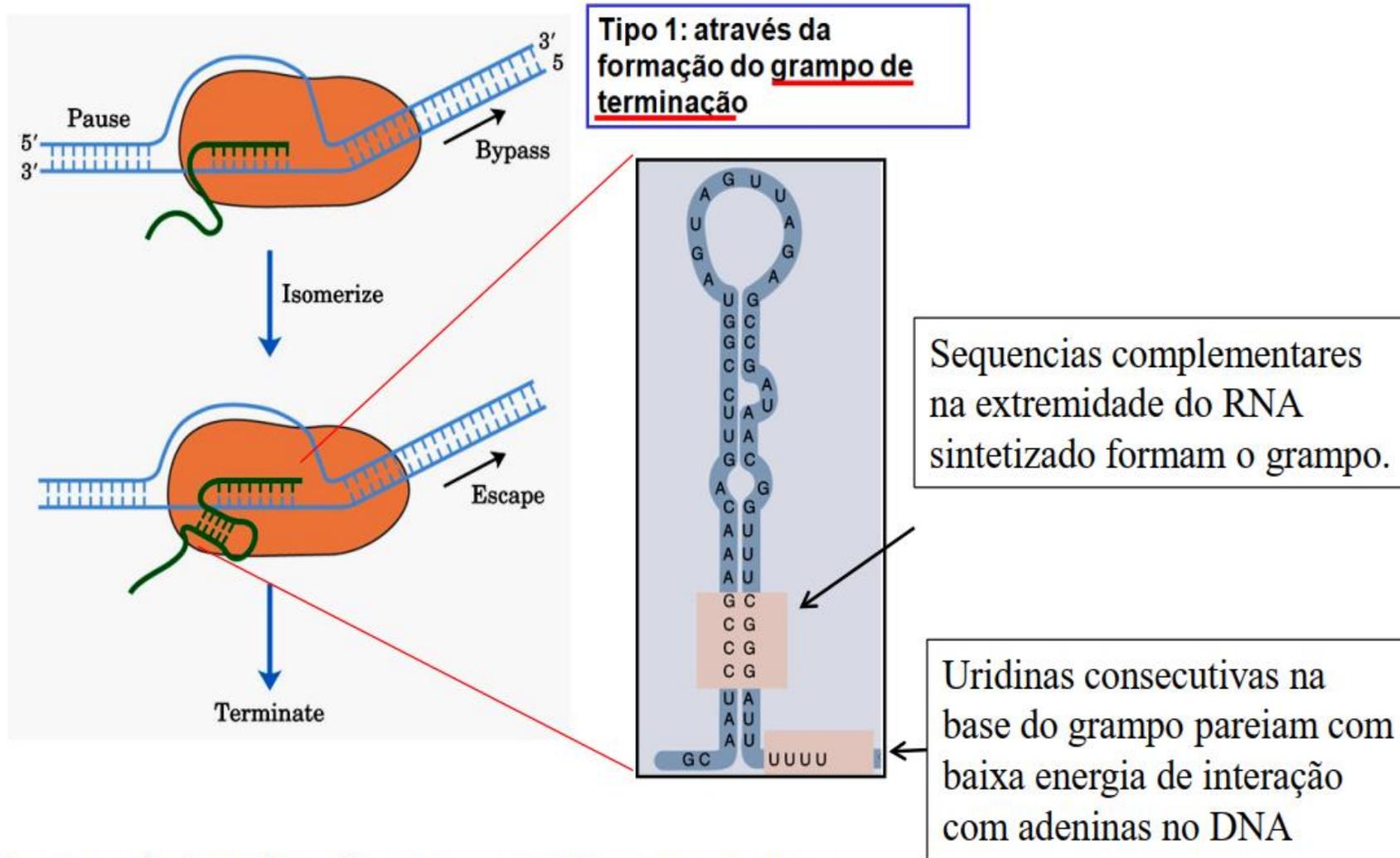


Durante a alongação, a RNA polimerase percorre a fita molde do DNA no sentido 3' → 5', sintetizando uma molécula de RNA complementar no sentido 5' → 3'.

A "bolha de transcrição" é mantida aberta pela enzima, permitindo a leitura do DNA e a formação temporária de um híbrido RNA-DNA.

À medida que a enzima avança, o DNA atrás dela se reassocia (rewinding), enquanto a frente continua a ser desenrolada (unwinding).

Passo 3: terminação da transcrição



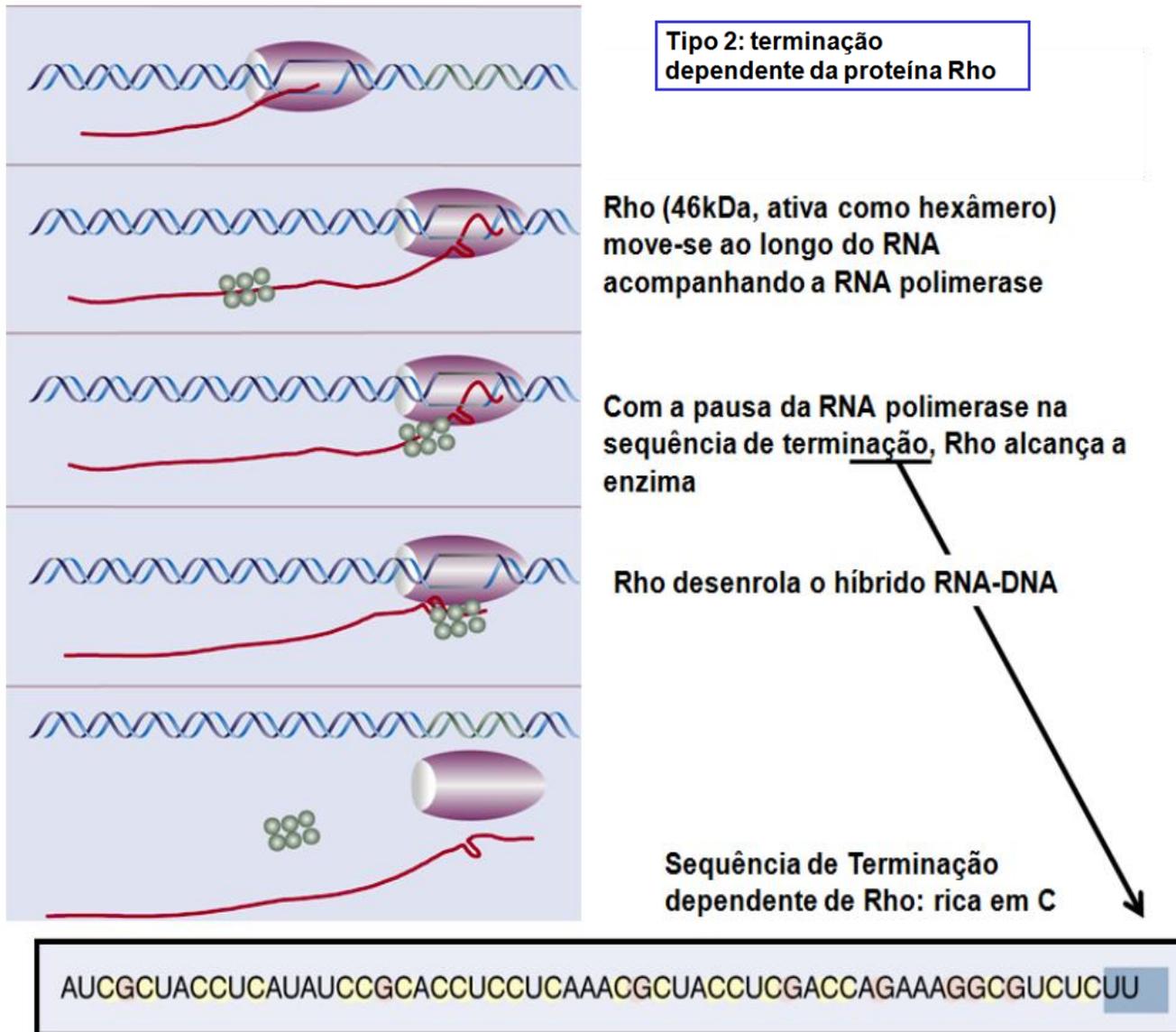
Na terminação intrínseca, a formação de um grampo de RNA, provoca uma pausa na RNA polimerase.

Logo após o grampo, uma sequência rica em Us forma uma região fraca de pareamento com o DNA, favorecendo a dissociação do complexo de transcrição.

Esse mecanismo permite que a RNA polimerase se desligue do DNA, finalizando a síntese do RNA.

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

Passo 3: terminação da transcrição

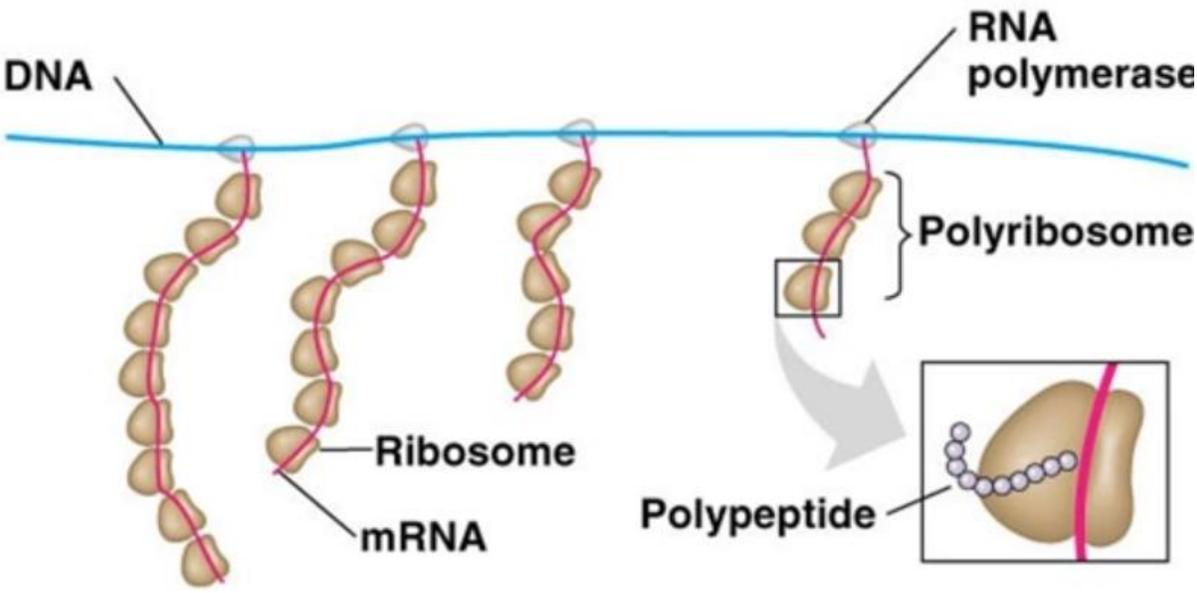
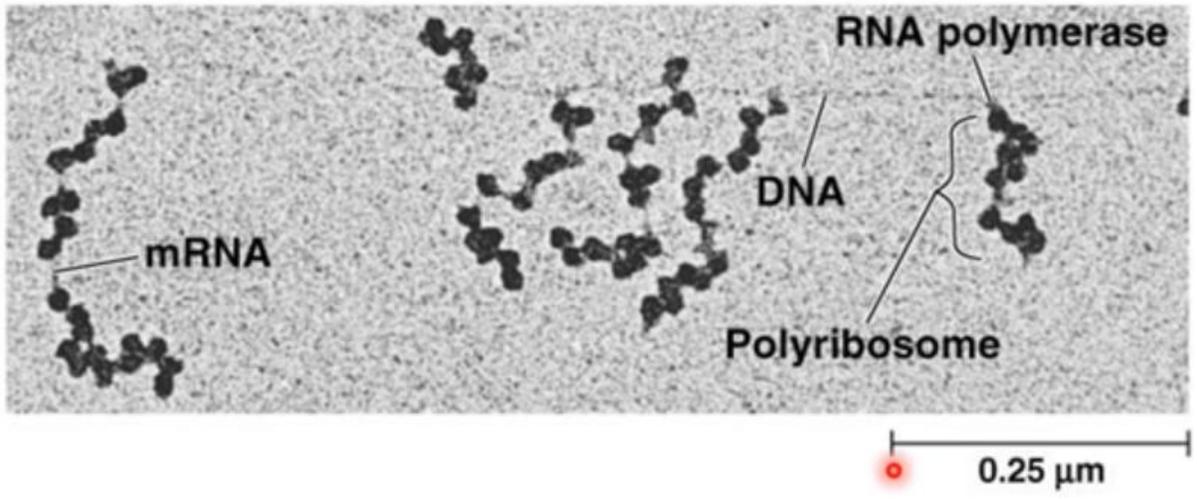


Na terminação dependente de Rho, a proteína Rho se liga ao RNA recém-transcrito e se desloca em direção à RNA polimerase.

Quando a enzima pausa em uma sequência de terminação **rica em C**, Rho alcança o complexo e desenrola o híbrido RNA-DNA, promovendo a liberação do RNA.

A ligação entre C e G (3 pontes de hidrogênio) forma um híbrido muito estável, dificultando a separação do RNA da fita molde. Essa estabilidade pode prender temporariamente a RNA polimerase, contribuindo para a pausa.

Em bactérias, transcrição e tradução estão acoplados



Ribossomos se ligam ao mRNA nascente e iniciam a tradução da proteína

Transcrição em eucariotos

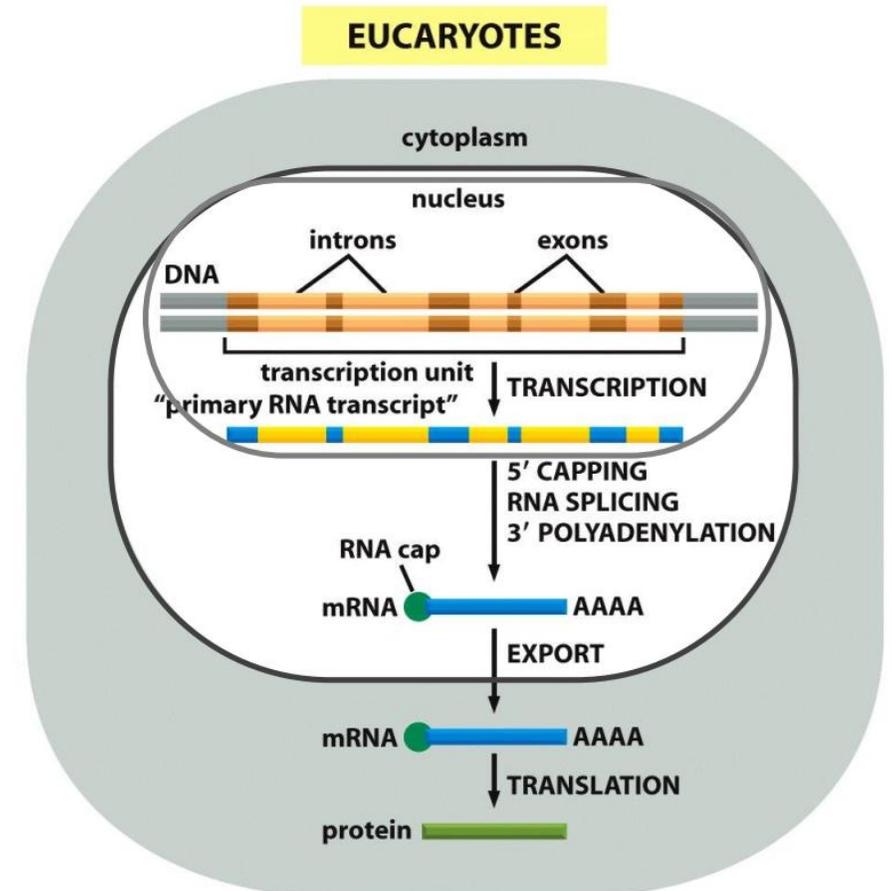
Há algumas diferenças quando comparado a bactérias:

Existe mais de uma RNA polimerase

A sequência dos promotores é diferentes

Existem vários fatores de transcrição diferentes do fator sigma

Processo de terminação da transcrição é diferente



Transcrição em eucariotos

Procarióticas	Eucarióticas		
Parte central em bactérias	RNAP I (Pol I)	RNAP II (Pol II)	RNAP III (Pol III)
β'	RPA1	RPB1	RPC1
β	RPA2	RPB2	RPC2
α'	RPC5	RPB3	RPC5
α''	RPC9	RPB11	RPC9
ω	RPB6	RPB6	RPB6
	[+ outras 9]	[+ outras 7]	[+ outras 11]

Não há fator sigma!

Existem 3 RNA polimerases em eucariotos:

RNA pol I	→	rRNAs	rRNAs 18S, 25S/28S e 5.8S
RNA pol II	→	mRNAs	Alguns snRNAs e snoRNAs
RNA pol III	→	tRNAs	rRNAs 5S, snRNAs, snoRNAs

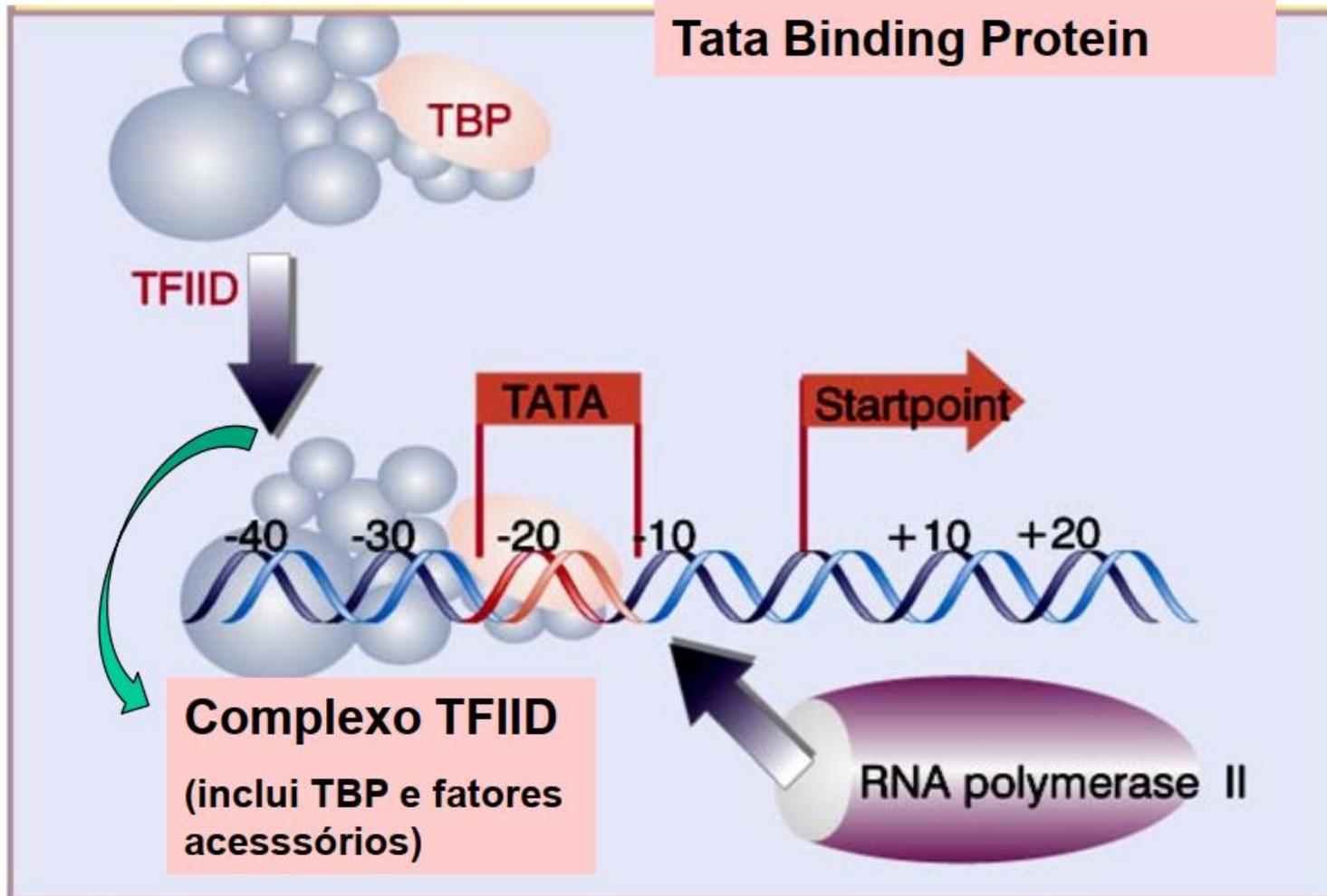
Como promotores são reconhecidos pela RNA pol II?

Ao contrário da RNA polimerase bacteriana, a RNA pol II não consegue reconhecer promotores sozinha. Ela requer proteínas adicionadas chamadas de fatores de transcrição geral

Proteína de transcrição	Número de subunidades	Subunidade(s) M_r	Função(ões)
Iniciação			
Pol II	12	10.000 – 220.000	Catalisa a síntese de RNA
TBP (proteína ligadora do TATA)	1	38.000	Reconhece especificamente a TATA <i>box</i>
TFIIA	3	12.000, 19.000, 35.000	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor
TFIIB	1	35.000	Liga-se ao TBP; recruta o complexo Pol II-TFIIF
TFIIE	2	34.000, 57.000	Recruta o TFIIH; tem atividades de ATPase e helicase
TFIIF	2	30.000, 74.000	Se liga fortemente à Pol II; se liga à TFIIB e impede a ligação da Pol II às sequências de DNA não específicas
TFIIH	12	35.000 – 89.000	Desenrola o DNA no promotor (atividade de helicase); fosforila a Pol II (no interior do CTD); recruta proteínas de reparo de excisão de nucleotídeos

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

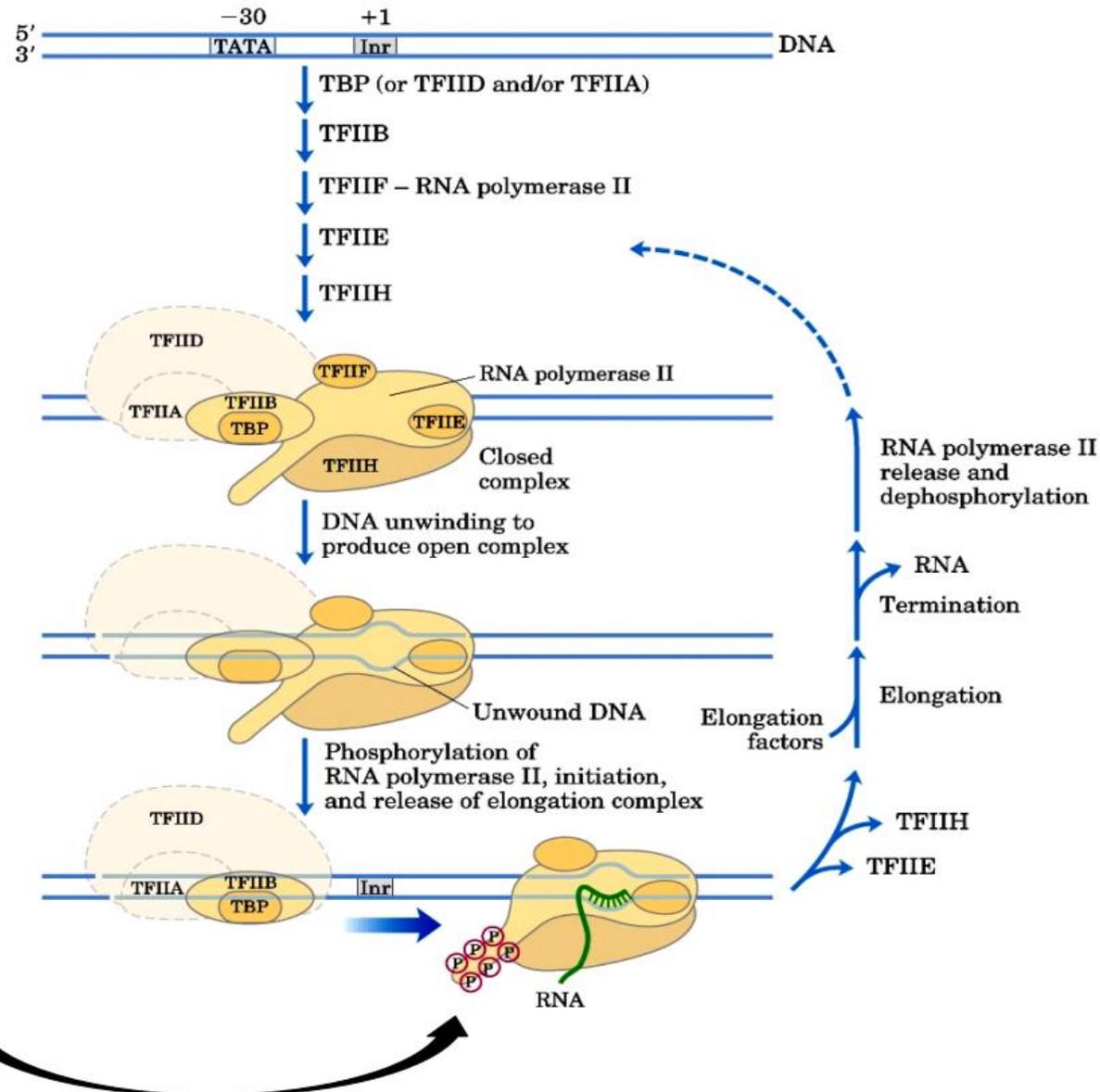
Fatores gerais de transcrição + RNA Polimerase = **Complexo Basal de Transcrição**



Nos eucariotos, a iniciação da transcrição pela RNAPol II começa com a ligação do complexo TFIID ao promotor. Esse complexo inclui a proteína TBP (TATA Binding Protein), que reconhece e se liga à região TATA, localizada cerca de 25-30 nucleotídeos antes do ponto de início da transcrição.

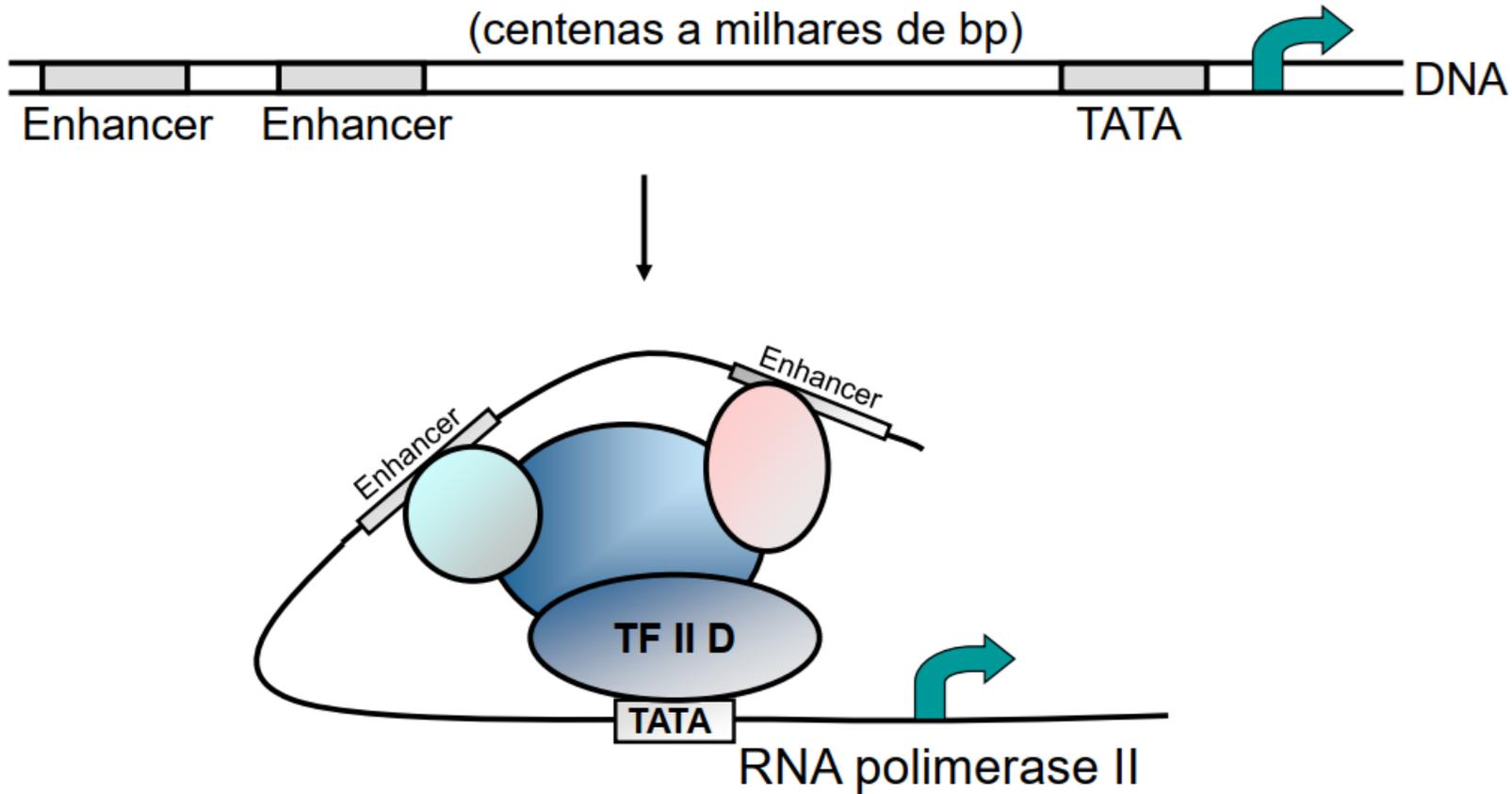
A ligação do TBP facilita a montagem do complexo de pré-iniciação, que inclui outros fatores gerais de transcrição e, por fim, a RNA polimerase II.

Transcrição em eucariotos



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

Enhancers



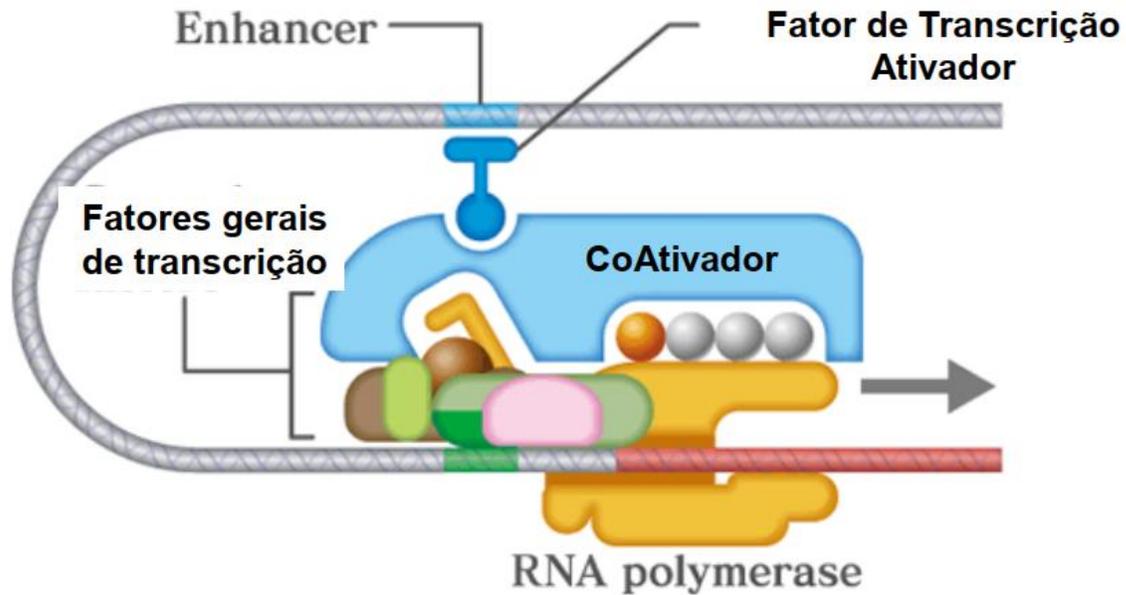
Enhancers” podem estar fisicamente separados do promotor por centenas ou milhares de nucleotídeos.

Assim como promotores, os “Enhancers” também contem elementos na sequencia do DNA que ligam fatores de transcrição específicos e acentuam a transcrição do DNA

Enhancers

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

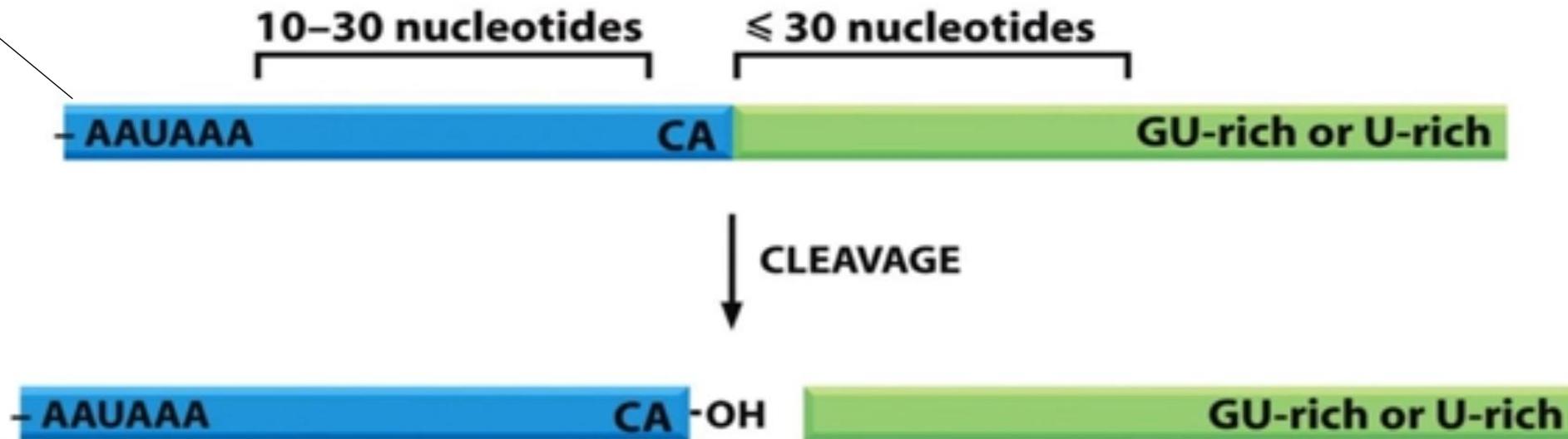


Terminação da transcrição em eucariotos

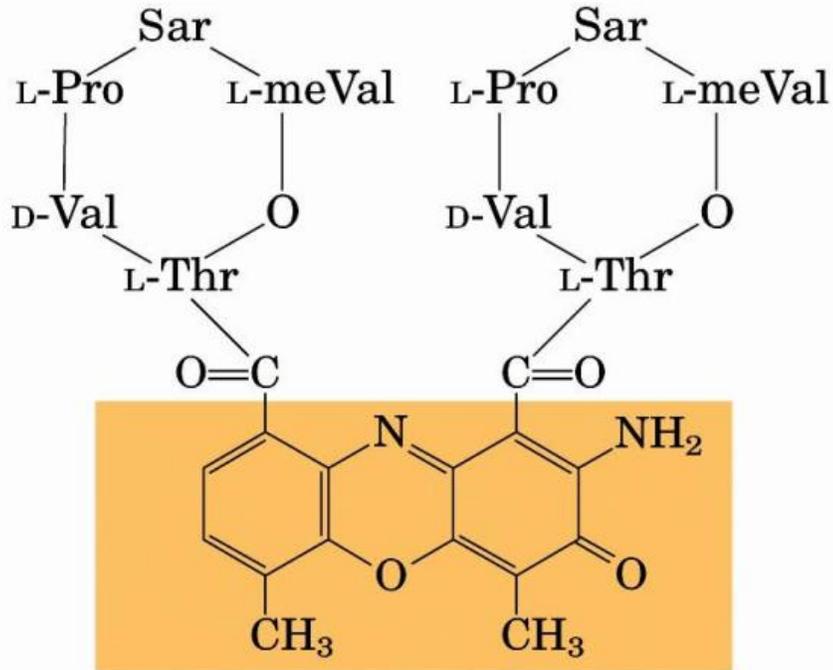
O processo não é tão bem compreendido como em procariotos.

O sinal de poliadenilação leva à clivagem do mRNA sendo transcrito (assunto da próxima aula!)

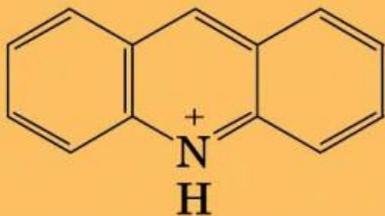
Sequência consenso no final do RNAm



Inibidores farmacológicos da transcrição



Actinomicina D

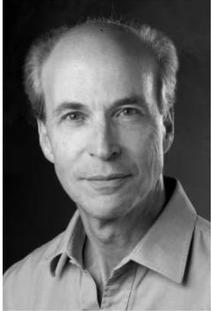


Acridina

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

Intercala-se na dupla-fita de DNA, inibindo tanto transcrição como replicação de DNA, tanto de procariotos como de eucariotos.

Leitura extra (opcional)



The Nobel Prize in Chemistry 2006 was awarded to Roger D. Kornberg "for his studies of the molecular basis of eukaryotic transcription"

(Filho do Arthur Kornberg!)



<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2006/kornberg/lecture/>
https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/kornberg_lecture.pdf