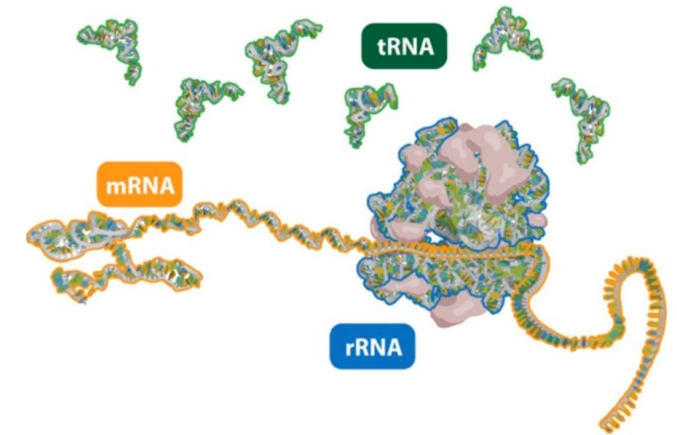
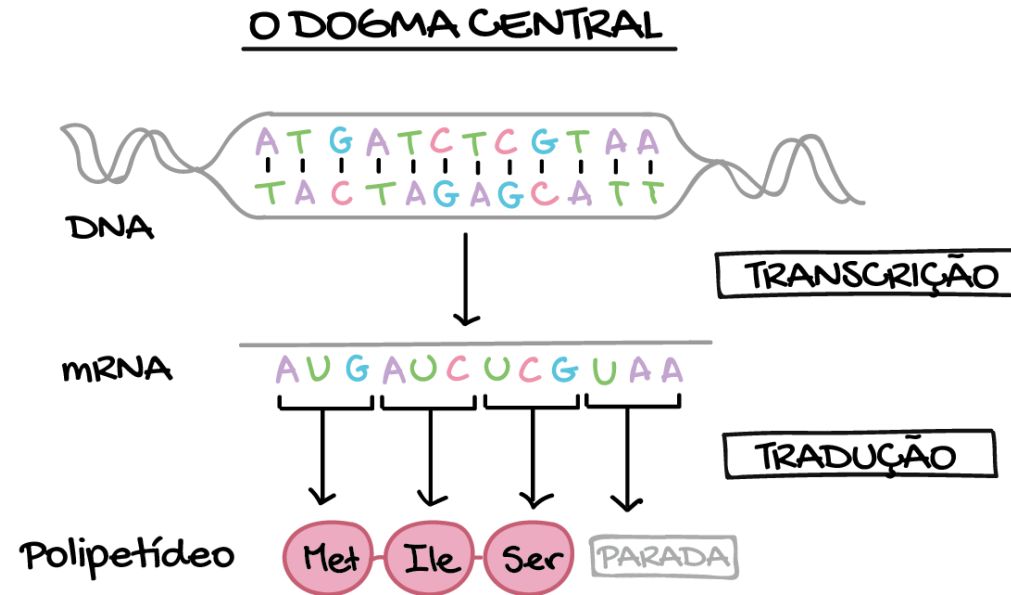


Silenciamento gênico:

RNA interferente (RNAi)

Papéis dos RNAs

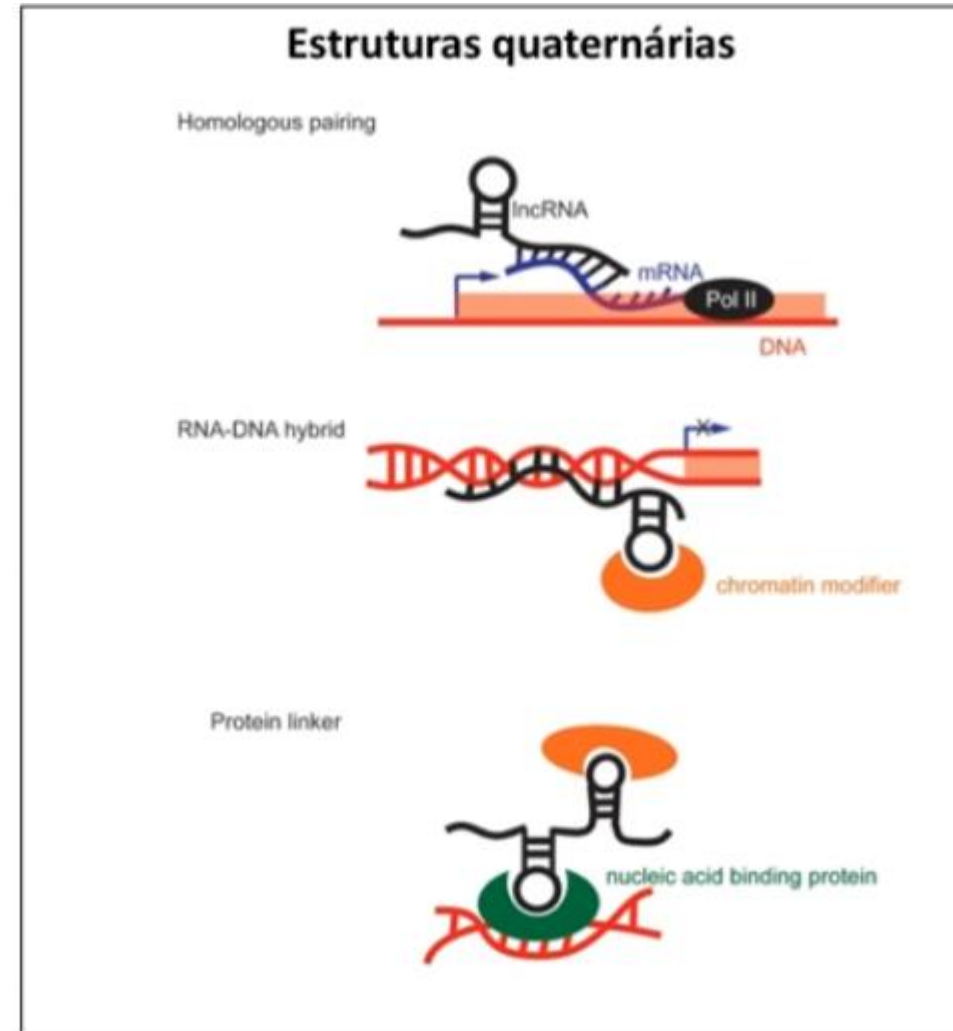
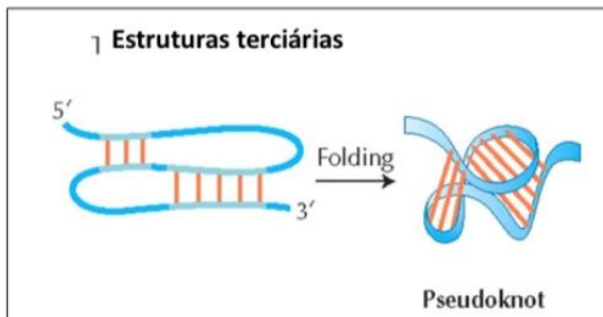
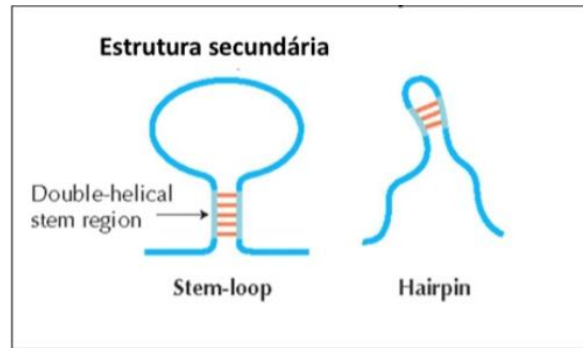
Dogma central da
biologia molecular



RNAs regulatórios

- *CRISPR RNAs (crRNAs)
- *microRNAs
- *siRNAs
- *long non-coding RNAs

RNAs são estabilizados por pareamentos de bases não canônicos



Plasticidade e complexidade estrutural permitiu o surgimento de RNAs catalíticos

Ribozimas

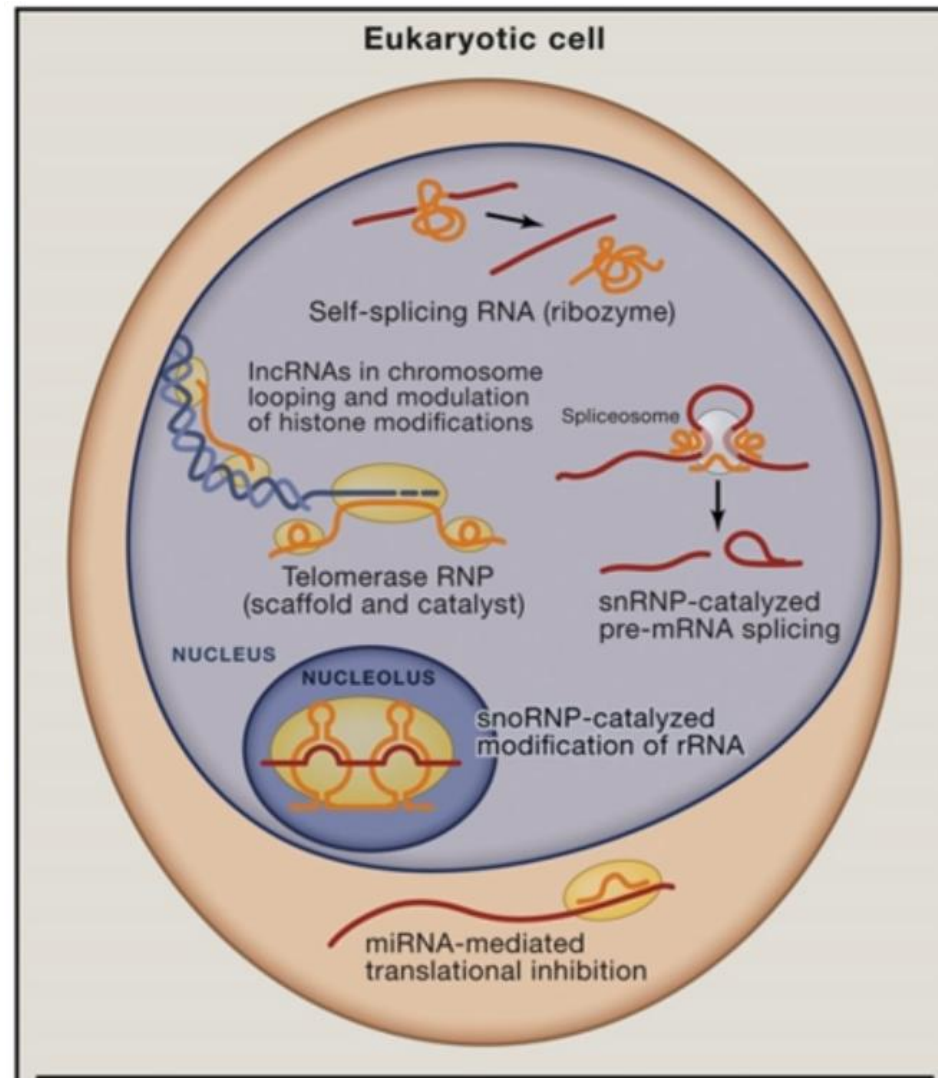
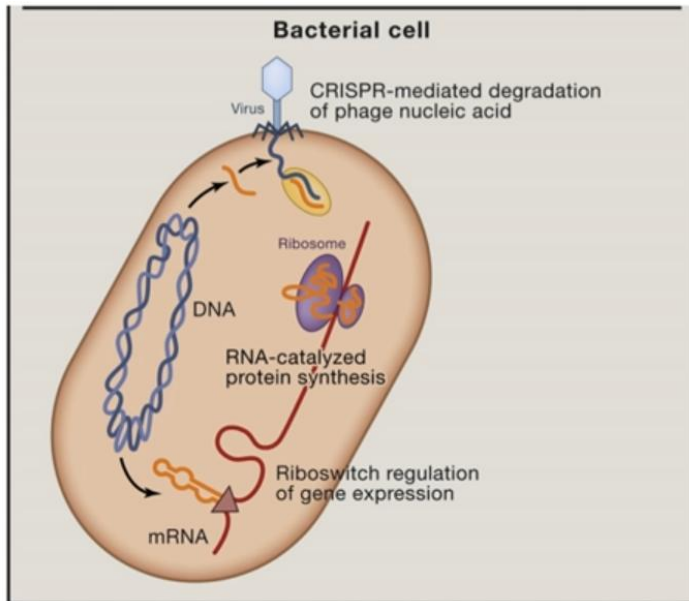
23S rRNA peptidil transferase

Introns auto-catalíticos

TABLE 4.3. Examples of modern RNA roles

Function	Type of RNA	Role of RNA
Translation	mRNA	Product of DNA transcription
	tRNA	Involved in translation of the genetic code
	rRNA	Serves as part of a ribosomal subunit
DNA replication	RNA primers	Replication of the lagging DNA strand initiates with an RNA primer
	Telomerase RNA	Needed at the ends of linear chromosomes
Splicing and RNA processing	Small nuclear RNA (snRNA)	Involved in splicing
	Small nucleolar RNA (snoRNA)	Required for posttranscriptional processing of rRNA
	RNase P	Essential for tRNA processing
Translation quality control	tmRNA	Targeting aberrant protein products for degradation in bacteria
Protein translocation	Signal recognition particle (srpRNA)	A component of the signal recognition particle (SRP)
RNA interference (RNAi)	Many types	Involved in regulating RNA stability and translation in eukaryotes
Transcription regulation	6S	Regulates the function of bacterial RNA polymerase

RNAs tem papéis regulatórios no controle da expressão gênica e na organização da estabilidade do genoma



Em eucariotos

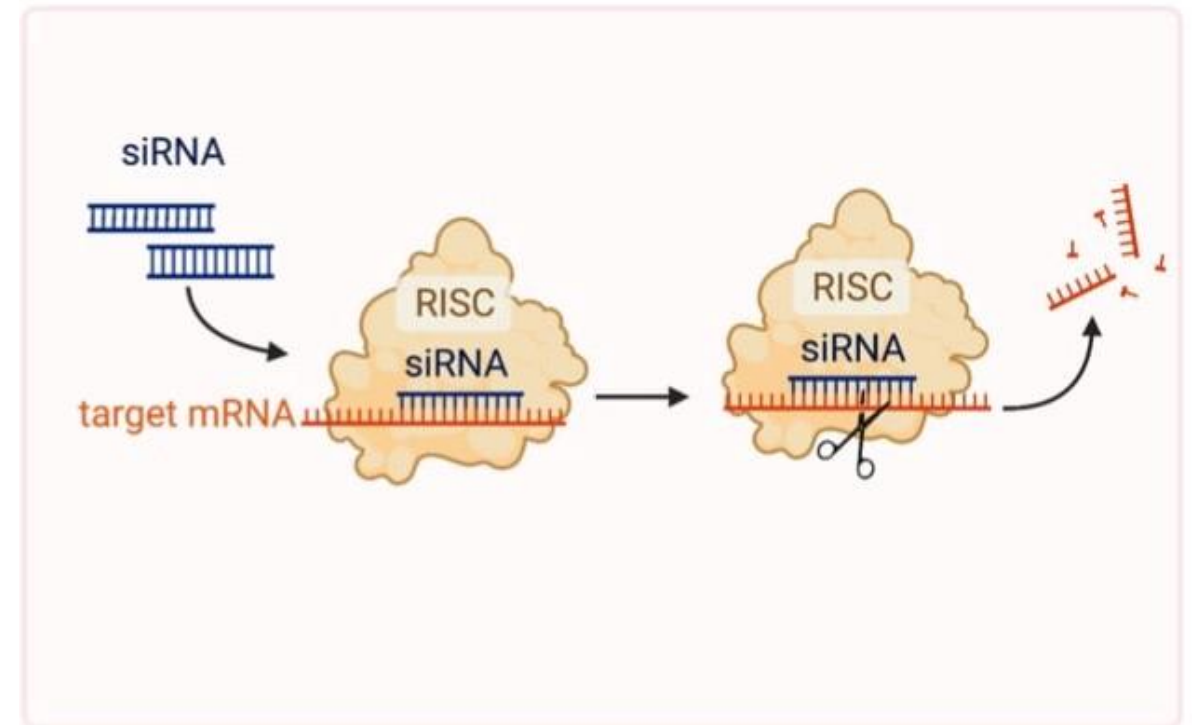
siRNAs e miRNAs

RNAs não-codificantes longos

Interferência de RNA (RNAi)

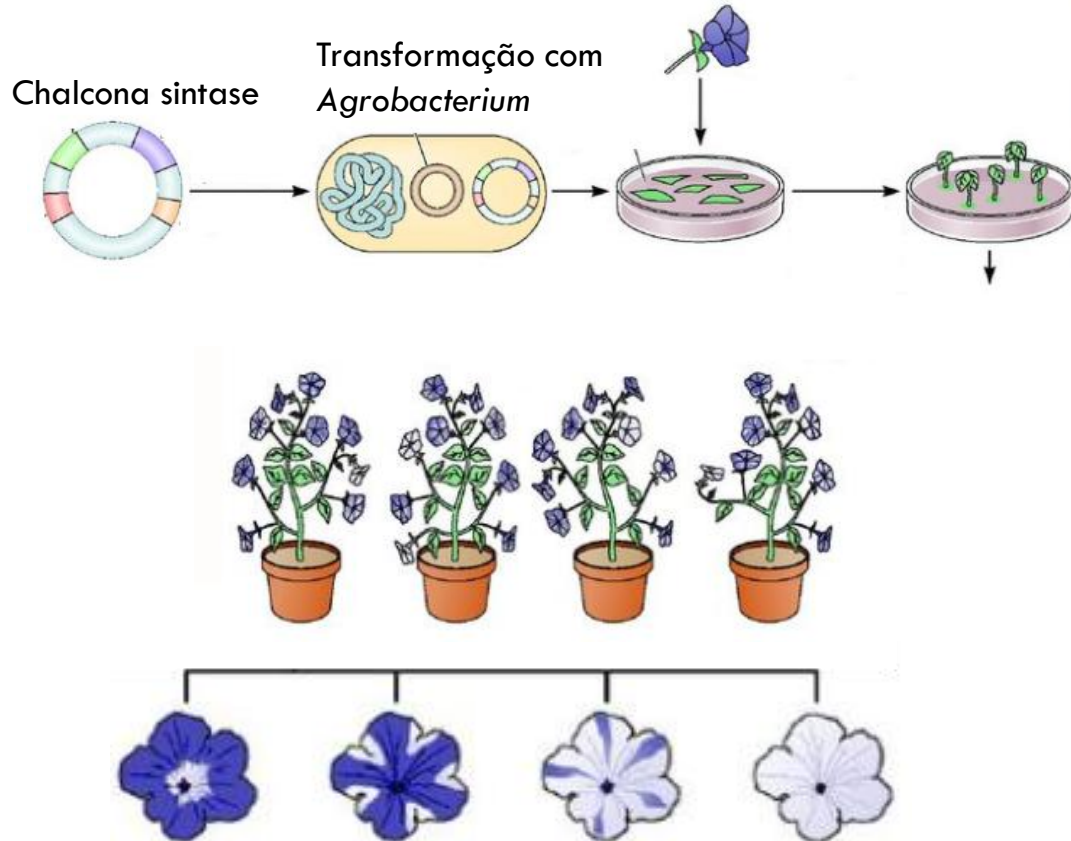
É o mecanismo de silenciamento da expressão gênica mediado por moléculas de pequenos RNAs dupla-fita (dsRNA)

Presente em plantas e animais



Primeira observação

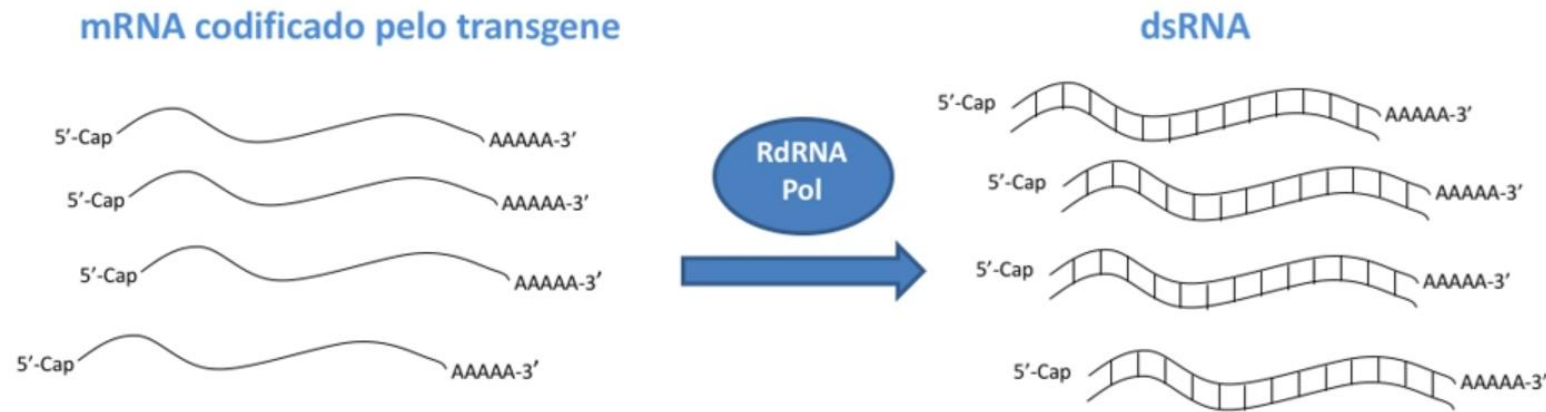
- Enzima chalcona sintase responsável pelo pigmento roxo da petúnia.



Plantas de petúnia foram transformadas com o gene da chalcona sintase visando intensificar a coloração roxa das flores.

No entanto, algumas plantas transgênicas apresentaram flores brancas, ou seja, o oposto do efeito esperado!

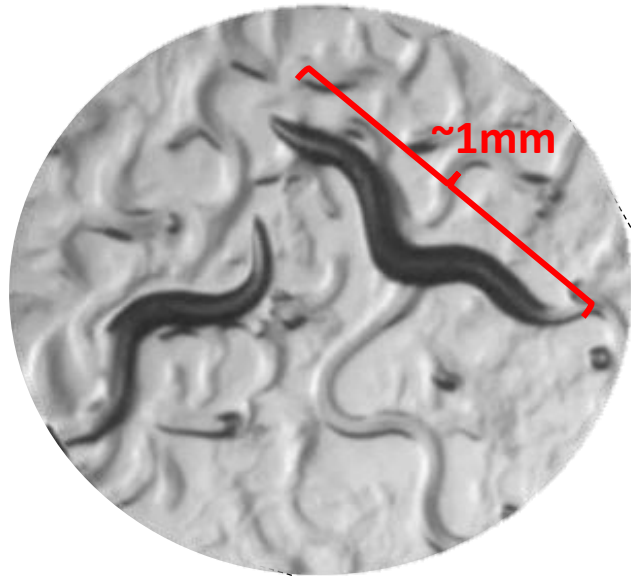
Fenômeno observado em plantas depende da formação de RNAs dupla-fita (dsRNA)



Excesso de mRNA produzido pelo transgene em plantas pode ser reconhecido pela RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP), que converte o RNA fita simples em RNA de fita dupla (dsRNA).

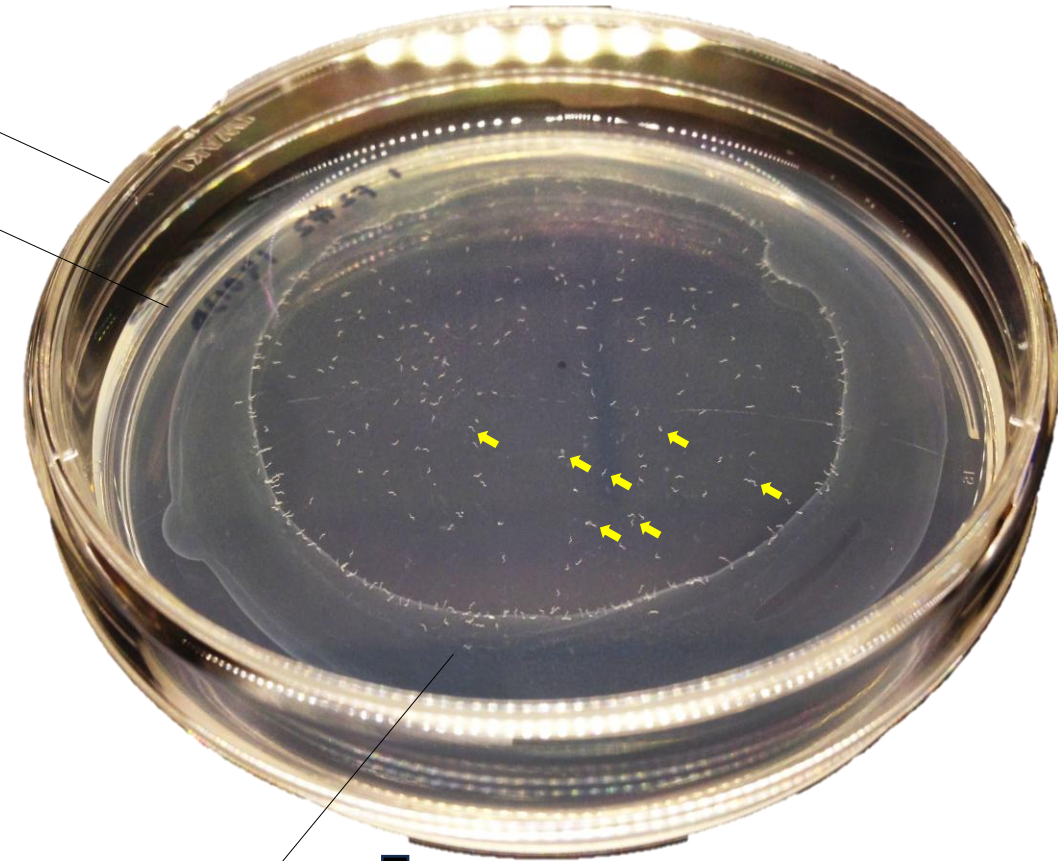
Por que o RNA fita dupla (dsRNA) causa silenciamento gênico?

Compreensão do mecanismo foi feito em estudos com *Caenorhabditis elegans*



Placa de Petri

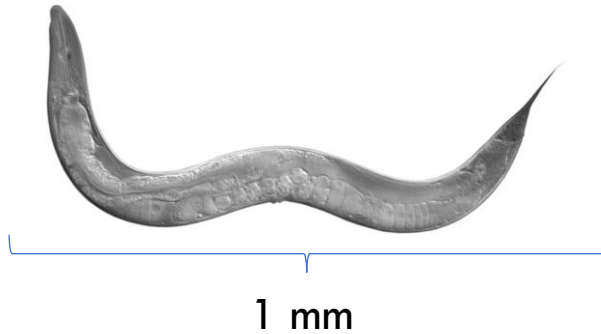
Meio sólido
(NGM)



Comida (*E. coli*)

Mantidos a 20°C
em BODs

Compreensão do mecanismo foi feito em estudos com *Caenorhabditis elegans*



~1000 células somáticas, 302 neurônios

Hermafroditas (auto-fecundam), mas presença de machos (0.01%)

Transparentes



2002 (Medicina): Morte celular programada

2006 (Medicina): RNAi

2008 (Química): Aplicação do uso do GFP

2024 (Medicina): Descoberta dos microRNAs

Compreensão do mecanismo foi feito em estudos com *Caenorhabditis elegans*

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

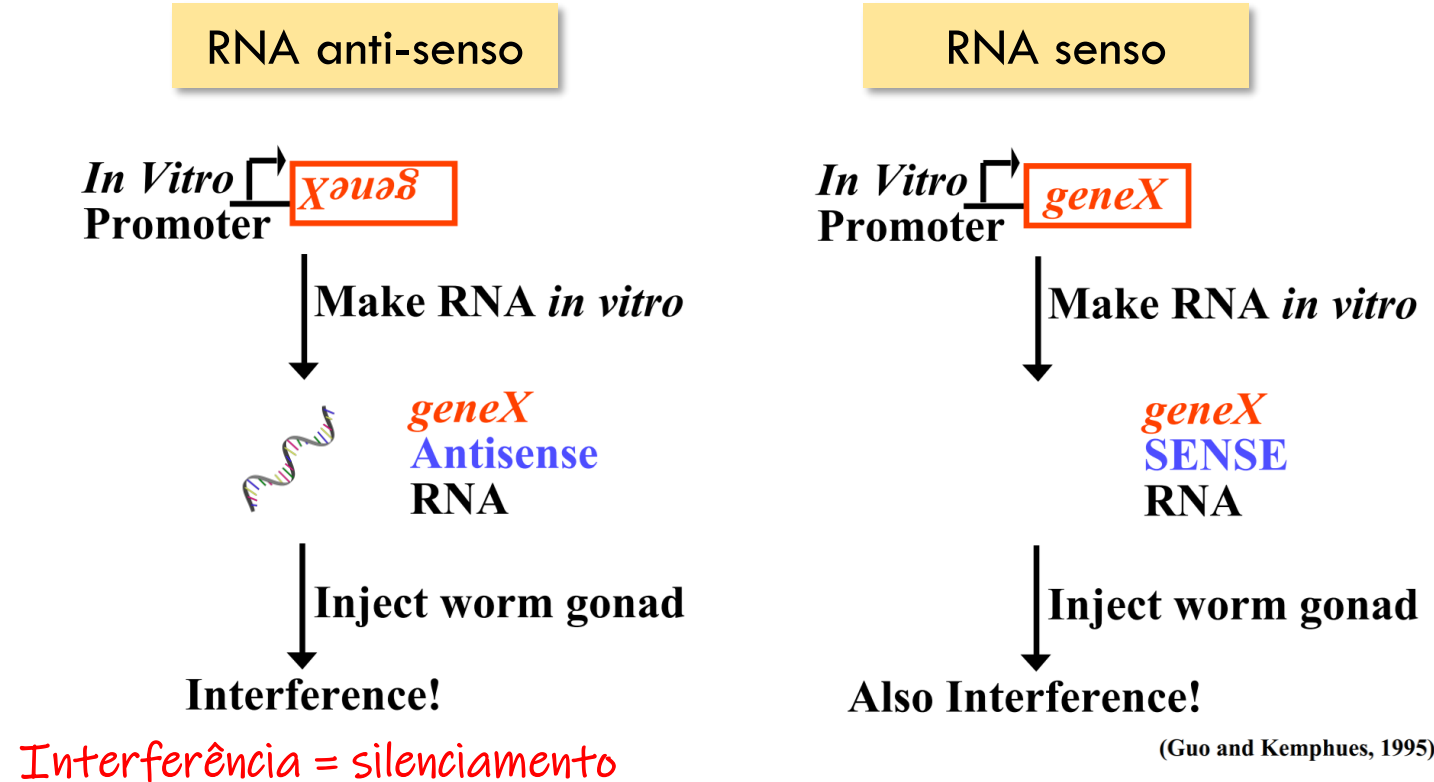


Photo: L. Cicero
Andrew Z. Fire



Photo: J. Mottern
Craig C. Mello

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

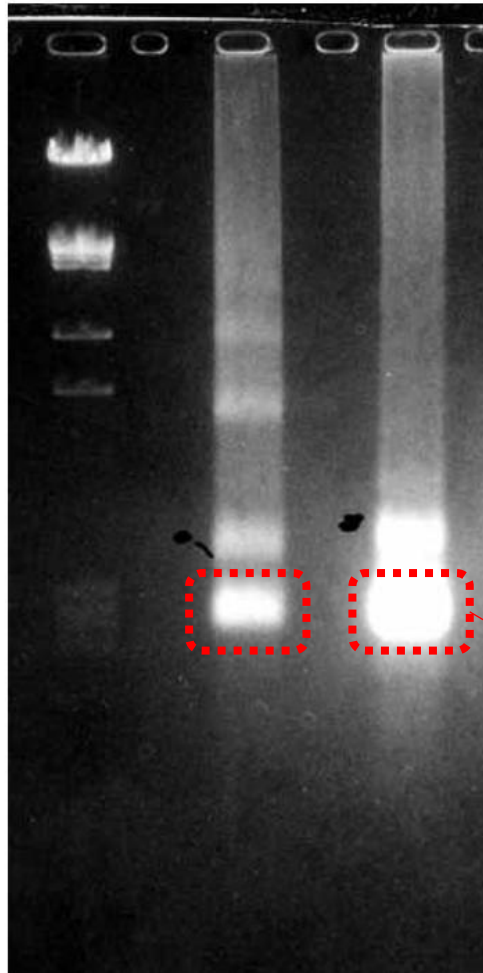


- How could both "Sense" and "Antisense" RNA produce interference?
- Is the interfering RNA a "contaminant" with stable structure?

Compreensão do mecanismo foi feito em estudos com *Caenorhabditis elegans*

Gel (agarose) de RNA

MW sense Anti-sense



MW: molecular weight

“Contaminante” era o responsável. Eventualmente, descobriram que era um dsRNA formado

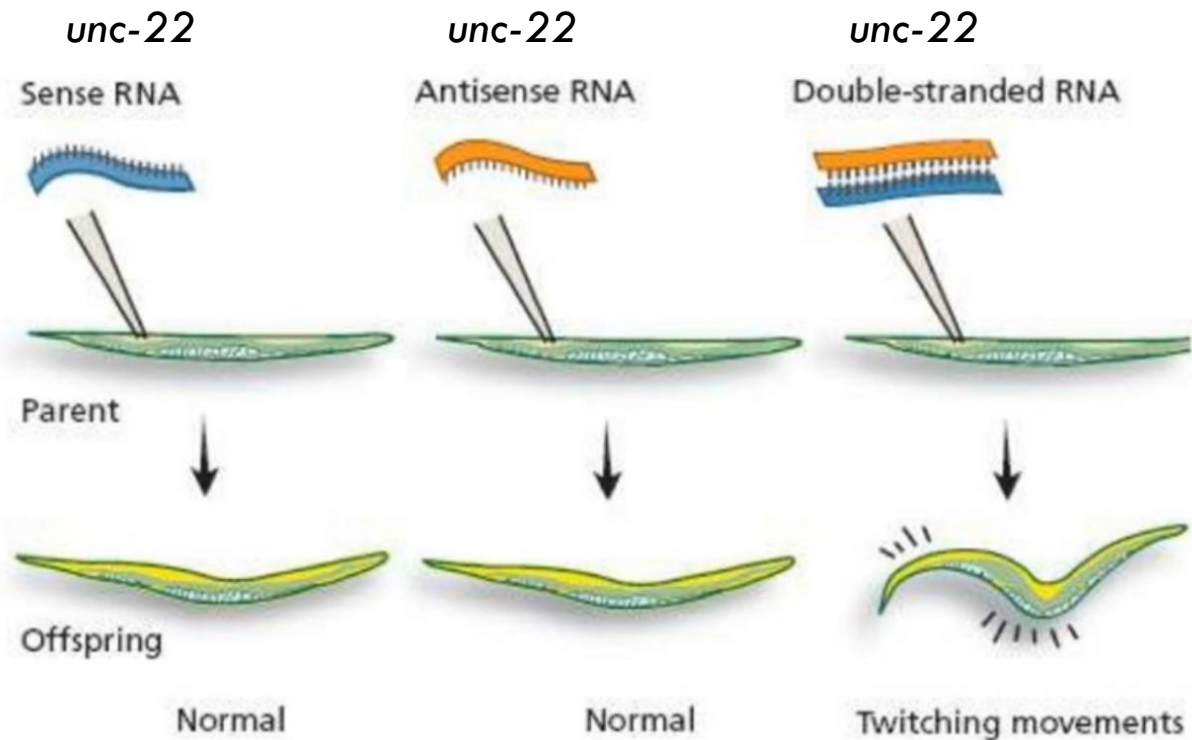
Possível razão da formação de dsRNA: Se durante a transcrição do RNA sense houver resquícios de molde DNA com promotor inverso (por exemplo, T7 em uma direção e SP6 na outra), a RNA polimerase pode sintetizar acidentalmente o RNA da fita oposta também. Isso gera sense e antisense na mesma reação, que podem se parear espontaneamente → formando dsRNA.

Tamanho esperado dos RNAs sense ou anti-sense

Isolaram esse RNA e repetiram experimento: não observavam silenciamento!

Compreensão do mecanismo foi feito em estudos com *Caenorhabditis elegans*

Silenciamento de *unc-22* causa fenótipos de alteração de movimento (twitching)



Técnica de RNAi é amplamente utilizada na biologia

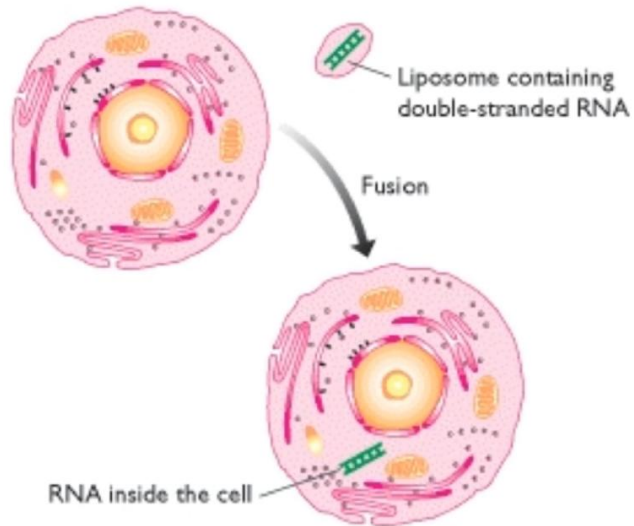
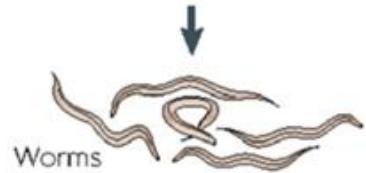
C. elegans



DNAFORM

C. elegans RNAi Clones

Whole RNAi library which consists of 19,960 clones is available, as well as individual clones.



Media reports: First RNAi drug, based on Craig Mello discovery, nearing market

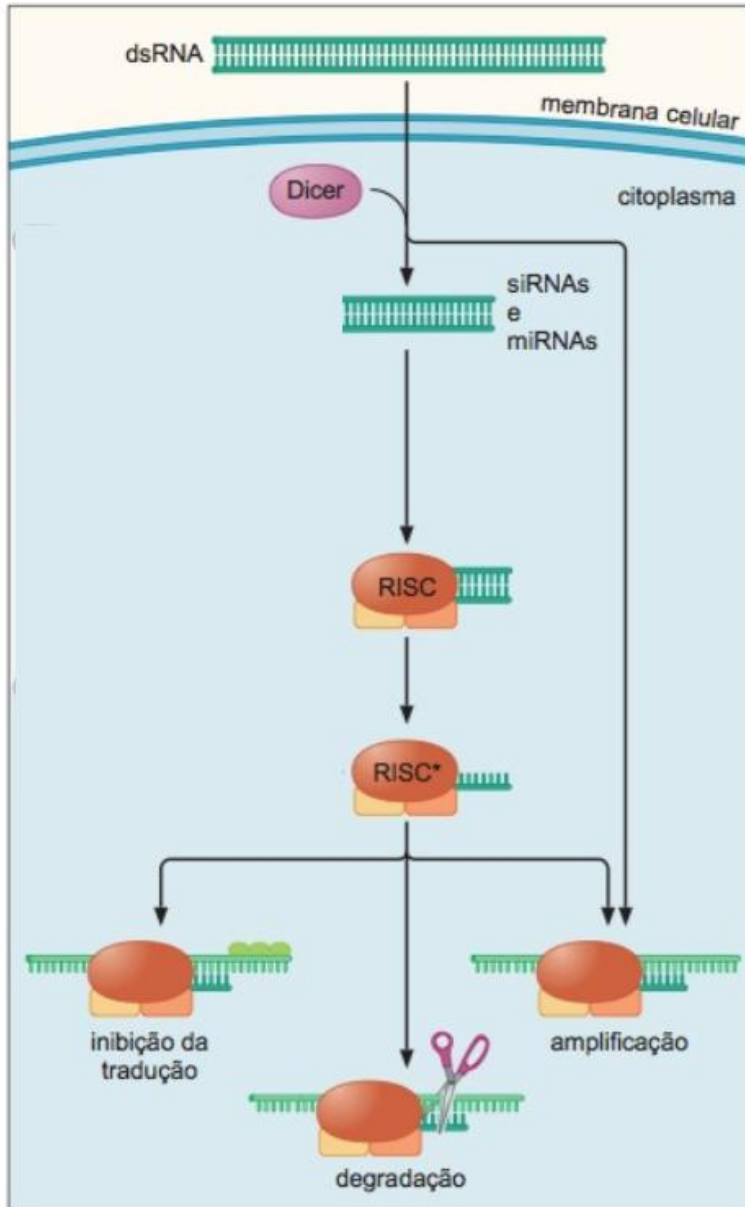
Alnylam to seek U.S. approval of patisiran to treat rare nerve disorder

September 22, 2017



Craig C. Mello, PhD

Mecanismo de silenciamento



Após a entrada do dsRNA, no citoplasma, a enzima **Dicer cliva o dsRNA em pequenos fragmentos chamados siRNAs** (small interfering RNAs).

Esses pequenos RNAs são incorporados ao complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex), que desemparelha as fitas de RNA, mantendo uma fita.

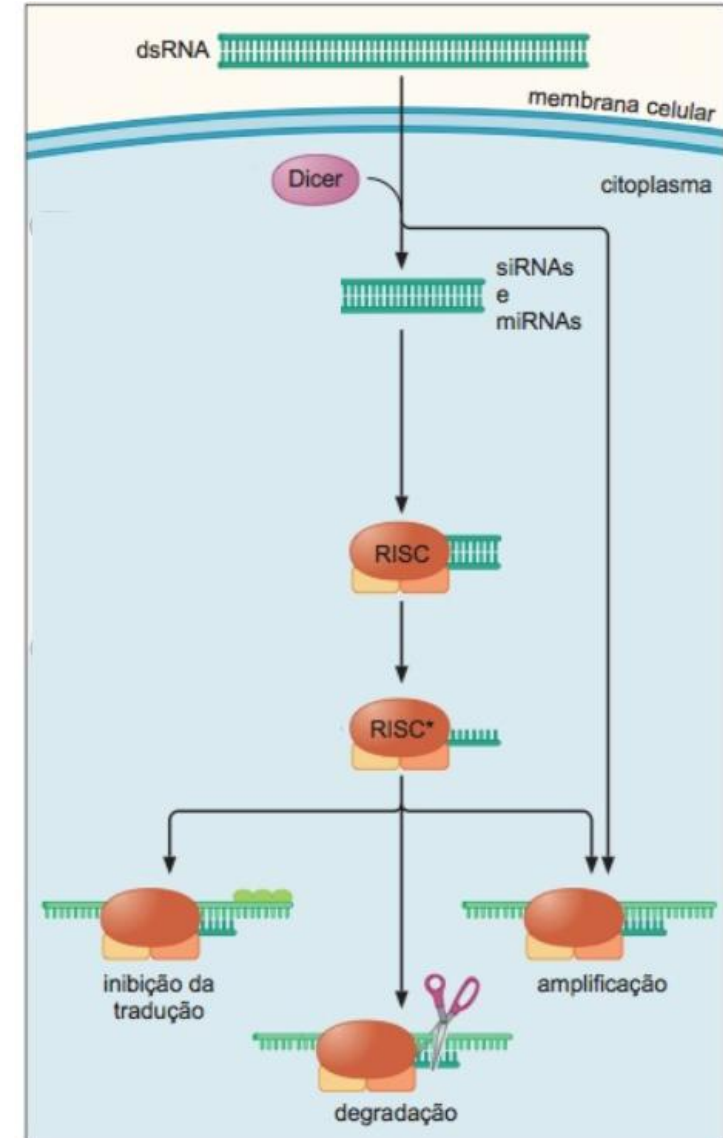
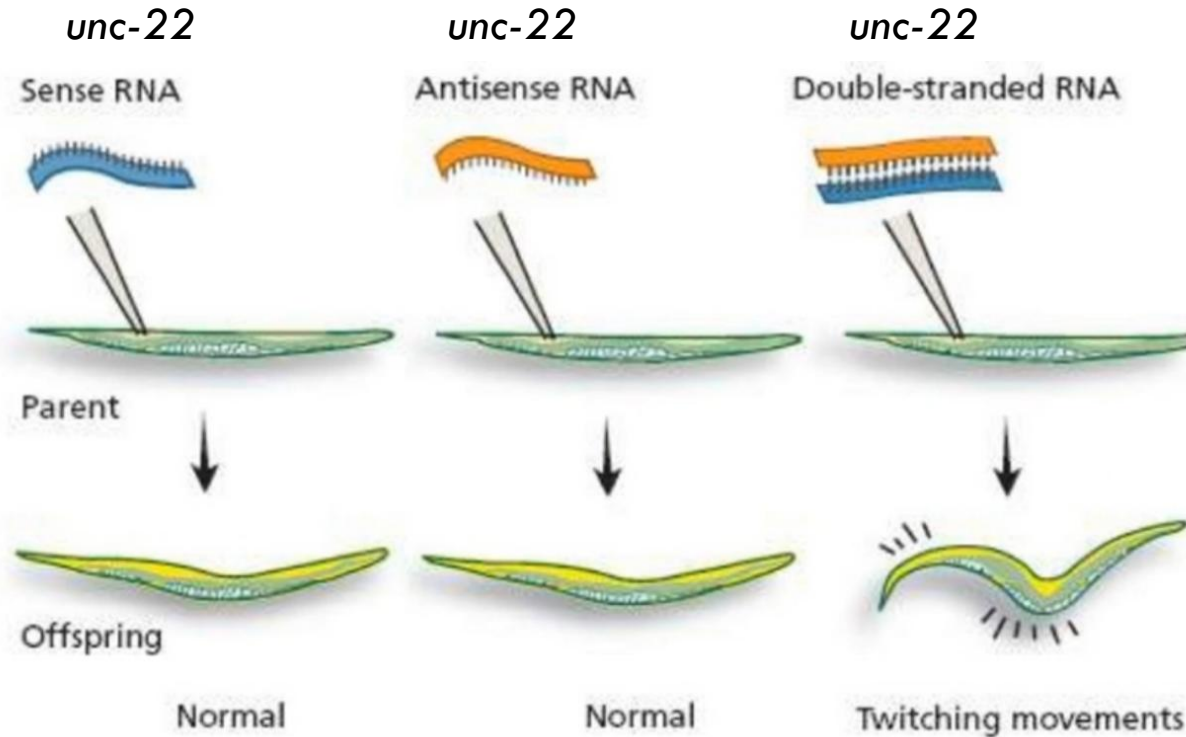
O complexo RISC atua de 3 maneiras principais:

-Inibição da tradução: bloqueando a síntese da proteína sem degradar o mRNA.

-Degradação do mRNA: impedindo que ele seja traduzido em proteína.

-Amplificação da resposta: gera novas moléculas de RNA interferente para potencializar o silenciamento.

Por que existiria uma maquinaria dessas nas nossas células?



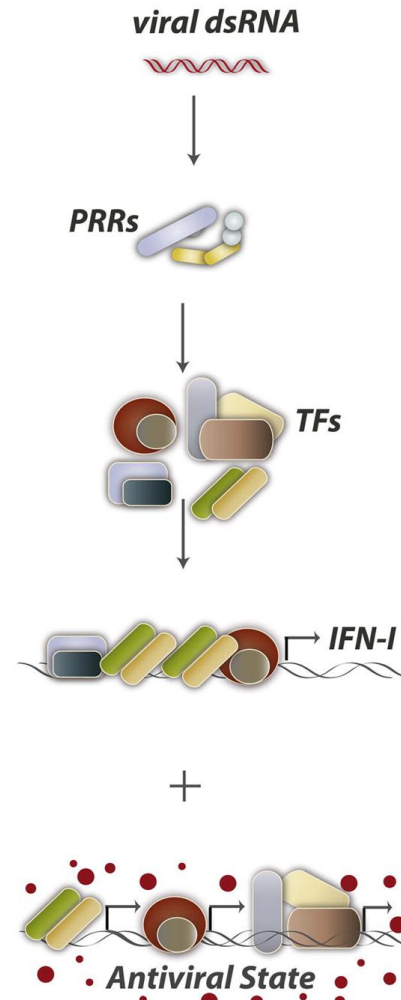
Por que existiria uma maquinaria dessas nas nossas células?

Duas razões:

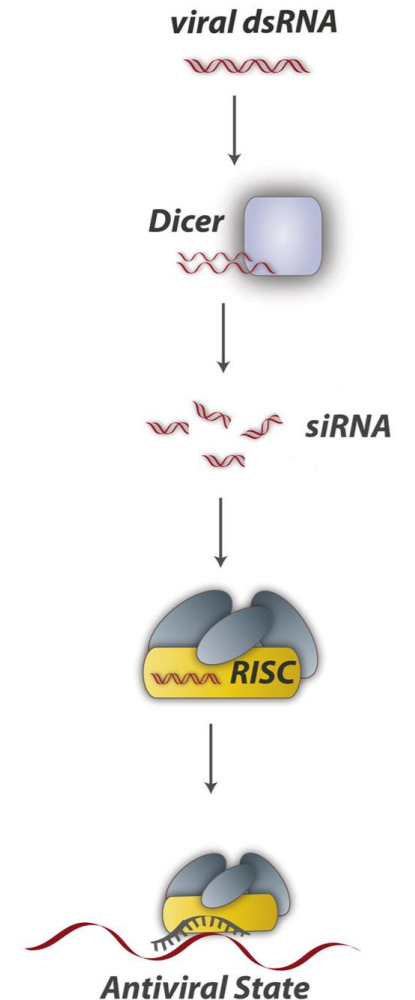
1) Defesa contra RNAs exógenos (vírus!)

Outros mecanismos surgiram para reconhecer e responder a presença de dsRNAs (e.g., Interferon)

Type I IFN System



RNAi System

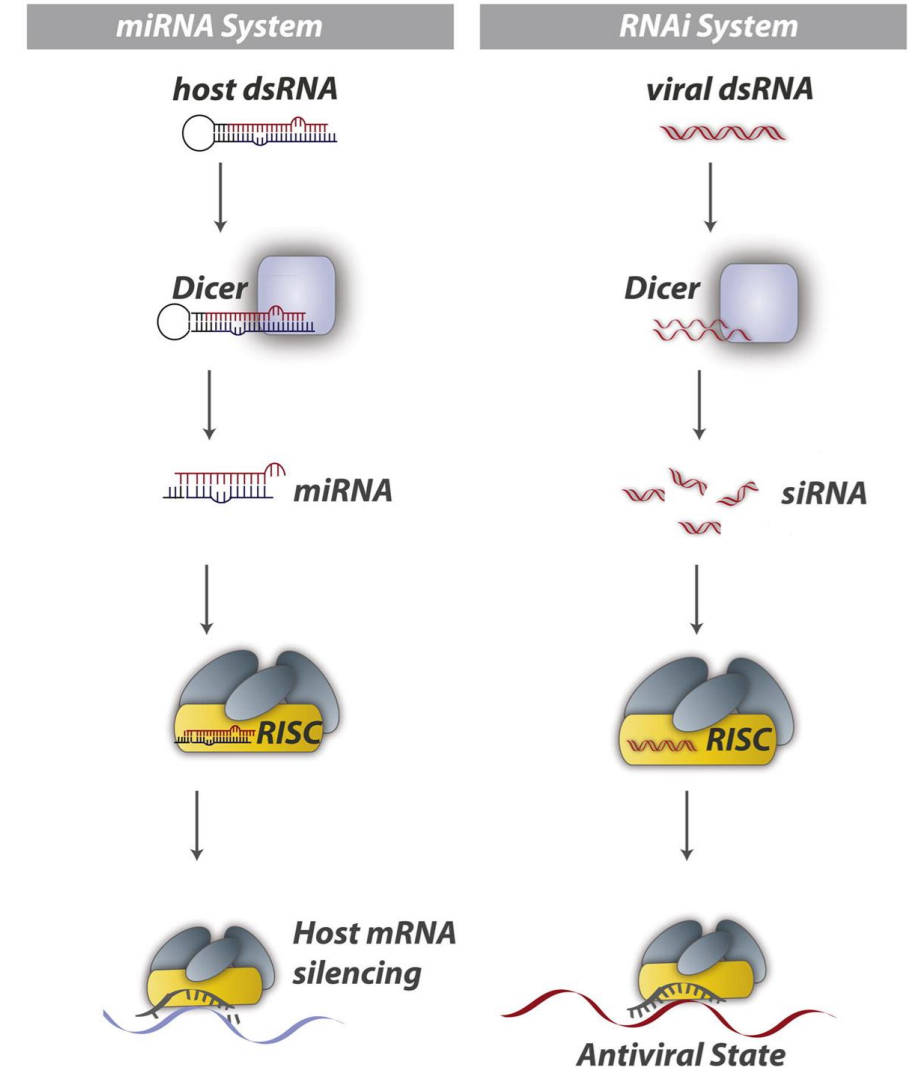
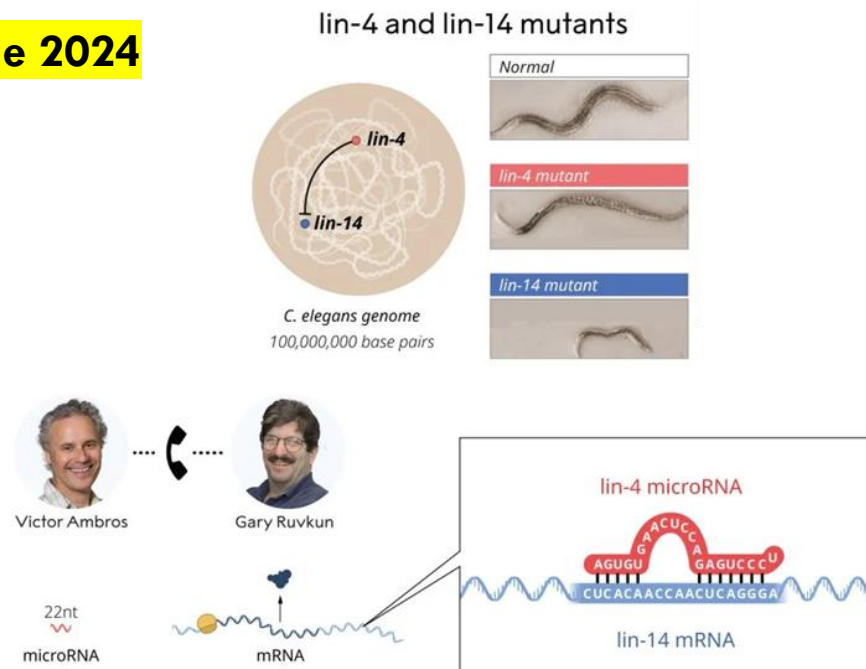


Por que existiria uma maquinaria dessas nas nossas células?

Duas razões:

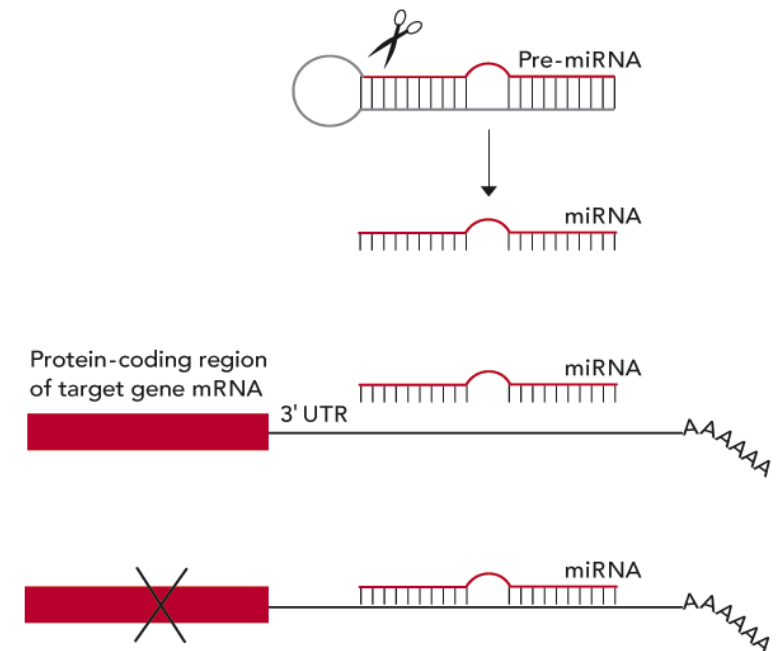
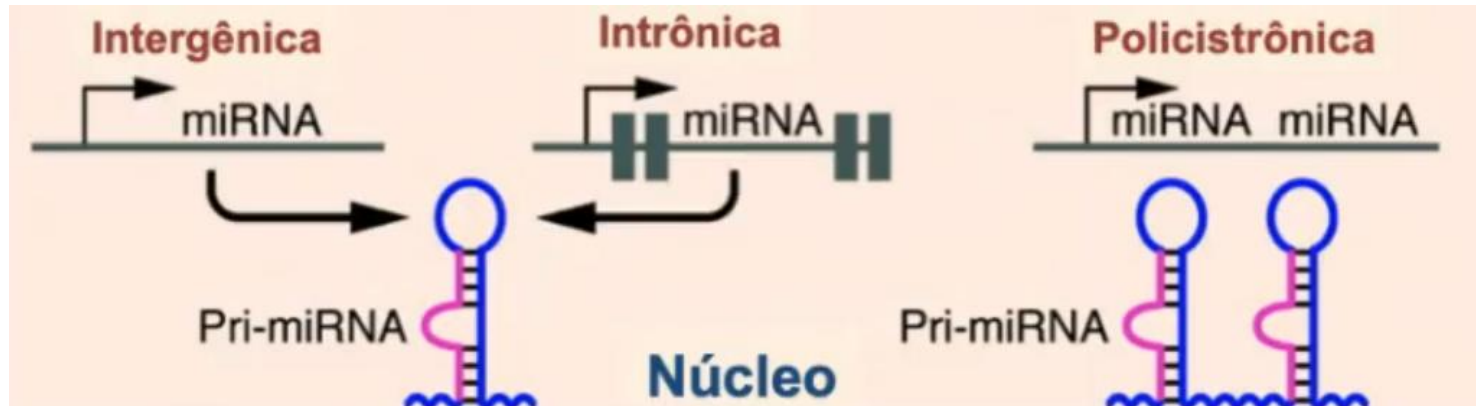
2) RNAs regulatórios (microRNAs) endógenos agem por uma maquinaria similar

Prêmio Nobel (Medicina) de 2024

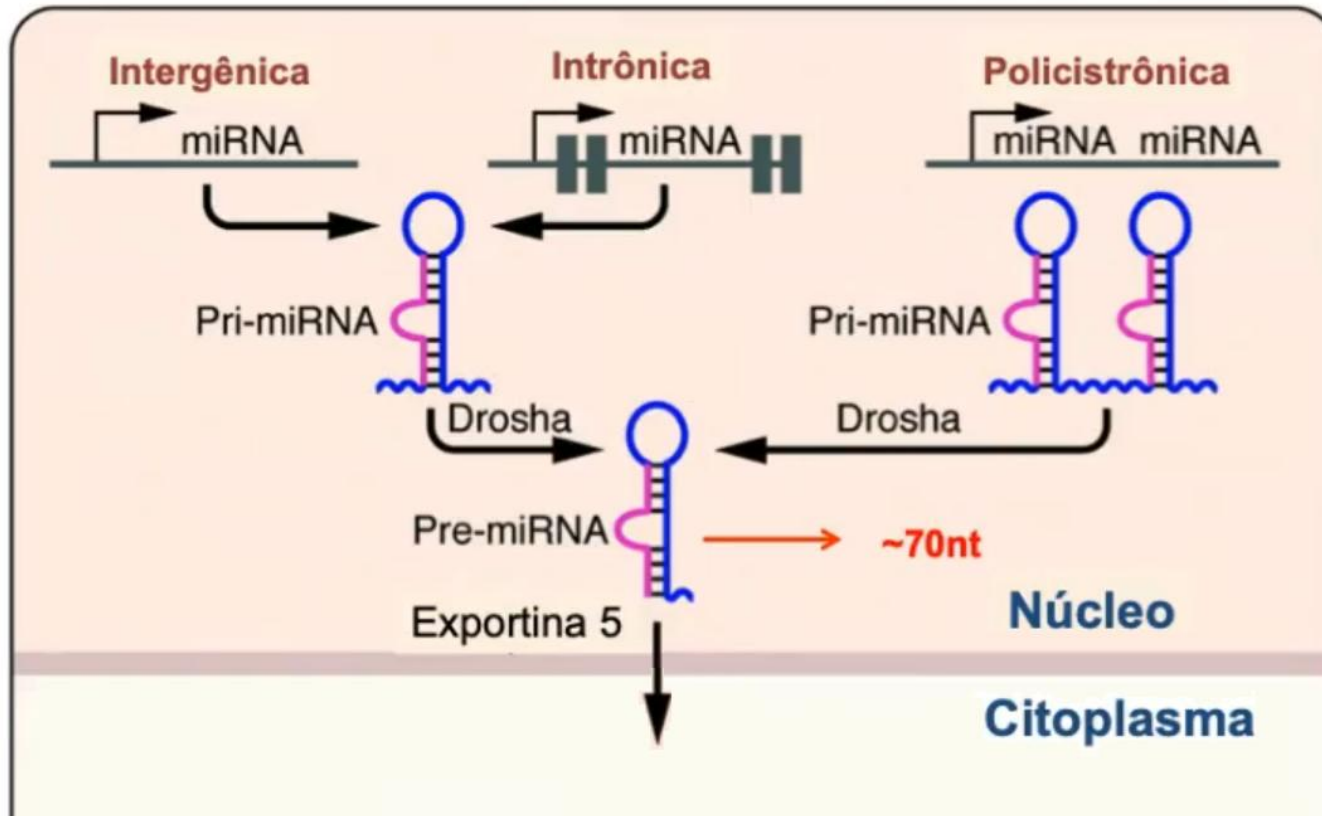


microRNAs

- Pequenos RNAs (18-22nt) codificados no genoma
- Genoma humano possui cerca de 2.600 miRNAs
- Eles tem complementariedade com região 3'UTR de mRNAs levando à sua degradação
- Um único microRNA pode ter vários mRNAs como alvos



microRNAs

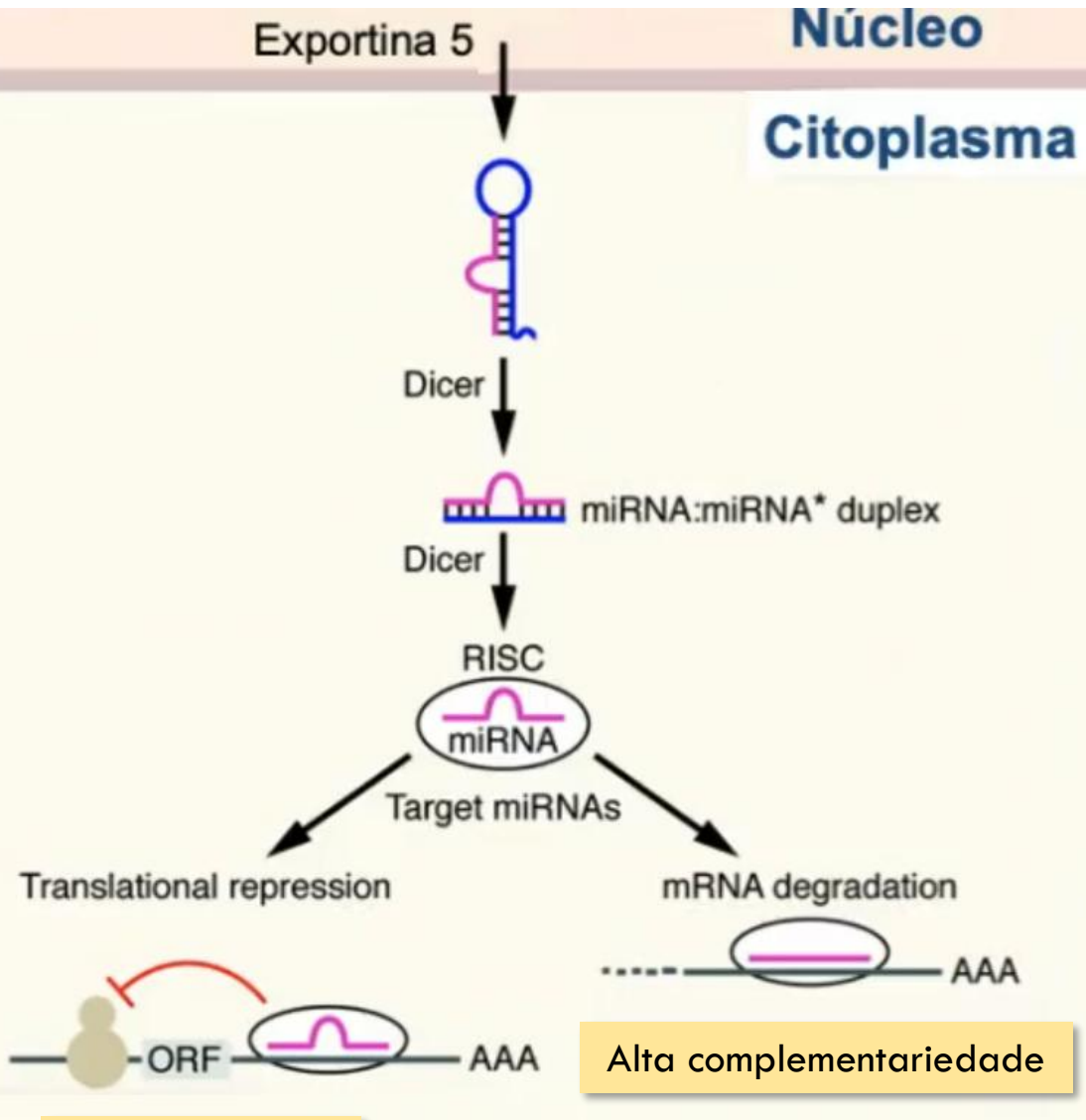


Genes codificadores de miRNA estão espalhados pelo genoma em regiões intergênicas ou intrônicas

O primeiro produto transcrito é o pri-miRNA que pode ter milhares de nucleotídeos que é cortado, gerando o pré-miRNA - molécula de 60-70 nucleotídeos em forma de hairpin

O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma por uma proteína chamada Exportina-5

microRNAs



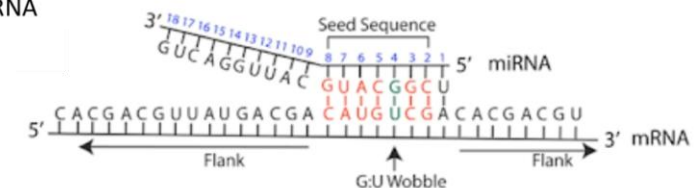
No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela Dicer, produzindo um duplex de miRNA com duas fitas complementares de cerca de 22 nucleotídeos cada.

Uma das fitas do duplex (a fita guia) é incorporada ao RISC. O miRNA age por complementaridade de sequência, geralmente na região 3' UTR (Untranslated Region) do mRNA.

O RISC pode bloquear a tradução ou degradar o mRNA diretamente.

A interação entre o microRNA e o mRNA – alvo depende de pequenas regiões de complementaridade (6 a 8 bases) na extremidade 5' do microRNA

Sequências “seed”



Como os “seeds” são curtos, microRNAs frequentemente pareiam com múltiplos RNAs mensageiros alvo.