

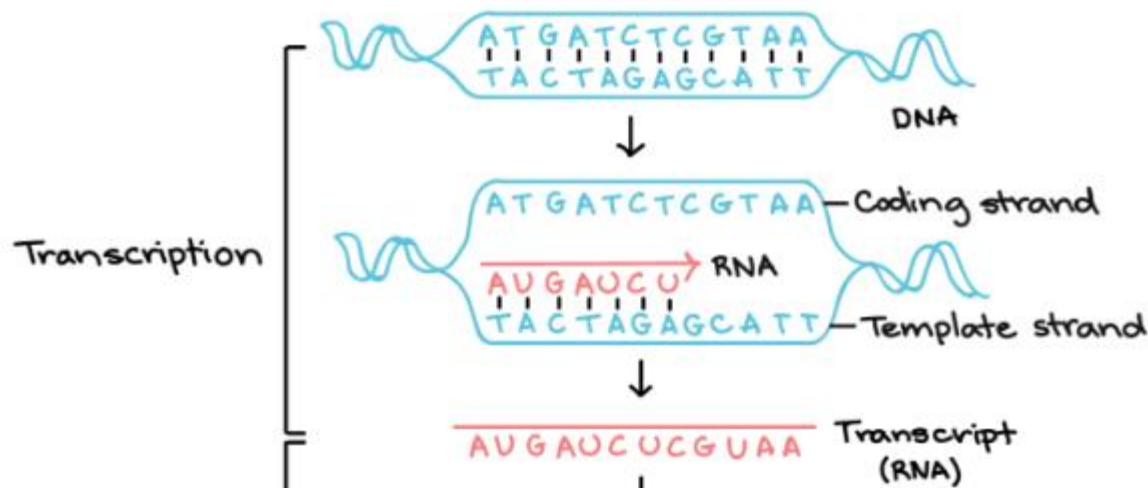
# Transcrição

Deise Schröder Sarzi

deise.sarzi@bioqmed.ufrj.br

# O que é? Para que serve?

- Produção de uma molécula de RNA transcrita a partir de um molde de DNA
- Para ativação e desativação diferencial de genes
- Define o repertório de genes ativos a cada instante, o **transcriptoma**
- Muda de acordo com o tecido, alimentação, estímulos ambientais



# Transcrição ocorre em genes

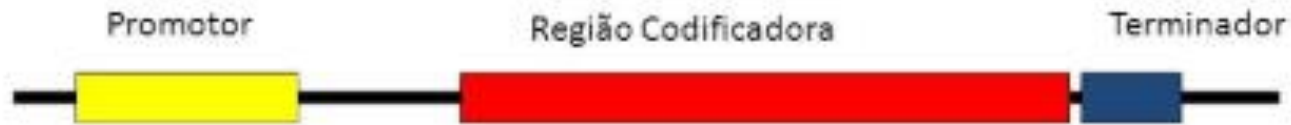
- Na replicação o cromossomo inteiro é copiado
- Na transcrição apenas genes ou grupos de genes particulares são transcritos
- Somente produtos necessários em momentos particulares
- A soma de todas as moléculas de RNA produzidas em uma célula sob um determinado conjunto de condições constitui o **transcriptoma**

# O que é um gene?

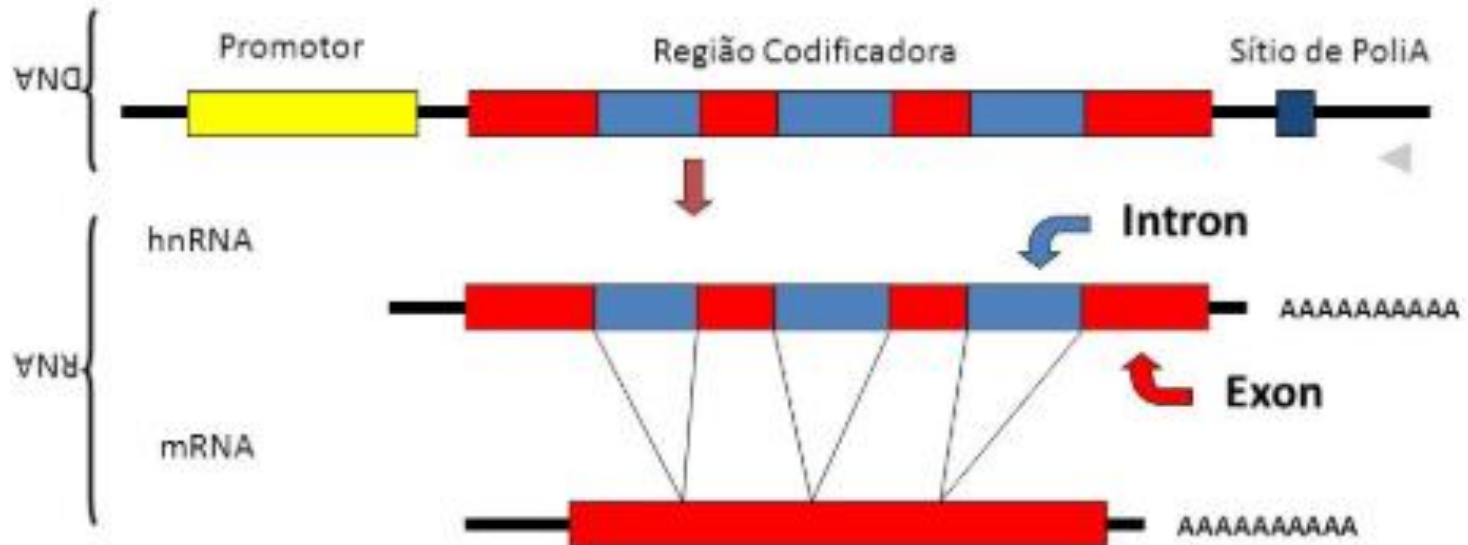
- 1ª definição: região do cromossomo que determina 1 fenótipo
- 2ª definição: região que codifica uma enzima
- 3ª definição: 1 gene codifica um polipeptídeo
- Definição atual: DNA que codifica a sequência primária de algum produto gênico (polipeptídeo ou RNA)
  - Pode conter sequências regulatórias (íntrons e éxons)
  - Sequências de início e de término, promotores, enhancers

# Estrutura do gene (eucarioto x procarioto)

## Estrutura de um Gene de Procaríoto

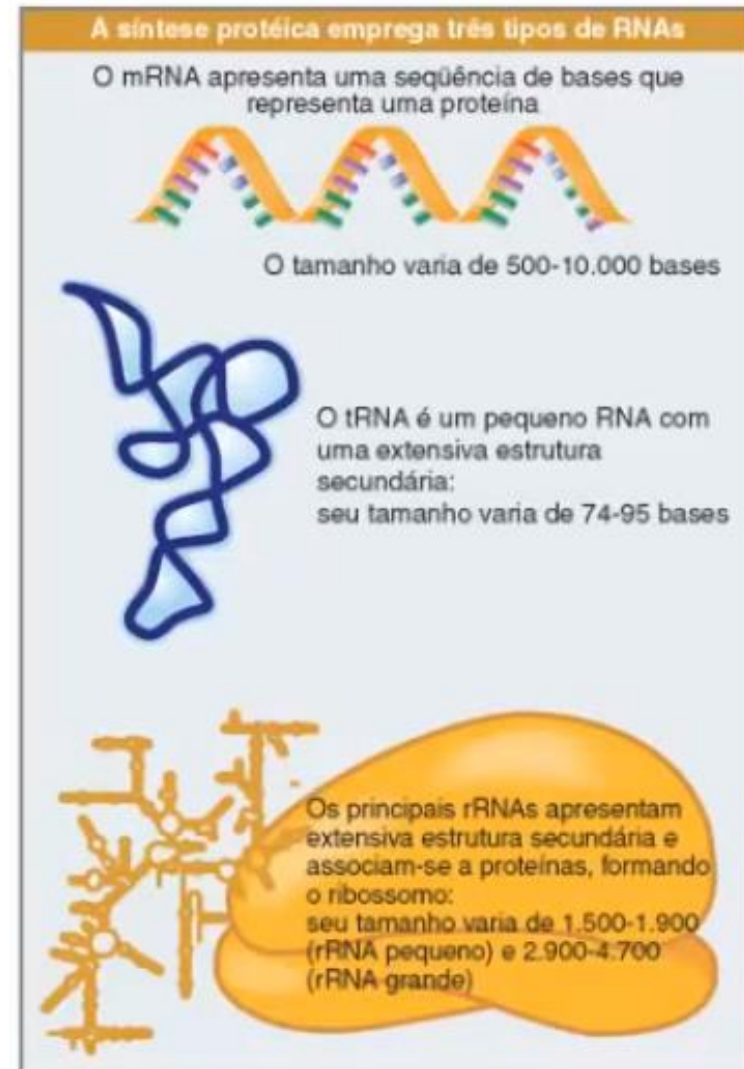


## Estrutura de um Gene de Eucarioto



# Tipos de RNA

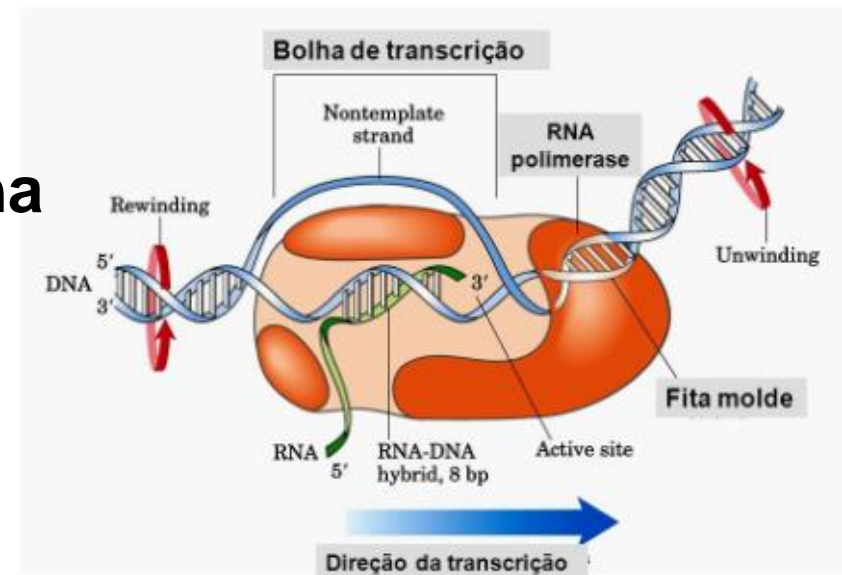
- Existem três tipos principais de RNA:
  - RNA mensageiro (**mRNA**): codificam a sequência de aa de um ou mais polipeptídeos especificados por um gene ou um conjunto de genes
  - RNA transportador (**tRNA**): leem a informação codificada do mRNA e transferem o aa adequado para uma cadeia polipeptídica em crescimento durante a síntese de proteínas
  - RNAs ribossomais (**rRNAs**): são constituintes dos ribossomos, as máquinas celulares que sintetizam proteínas



**FIGURA 7.1** Os três tipos de RNAs universalmente necessários à expressão gênica são mRNA (que carrega a sequência codificadora), tRNA (que fornece o aminoácido correspondente a cada códon) e rRNA (o principal componente do ribossomo, que fornece o ambiente para a síntese protéica).

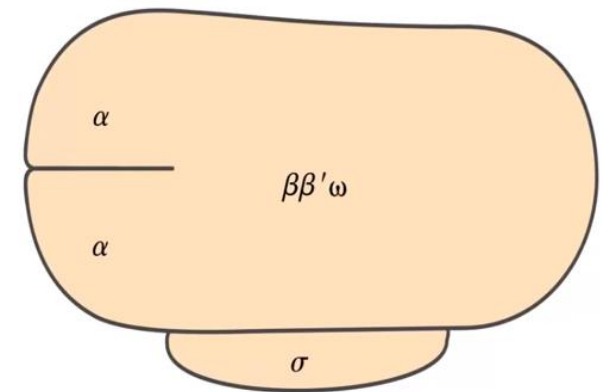
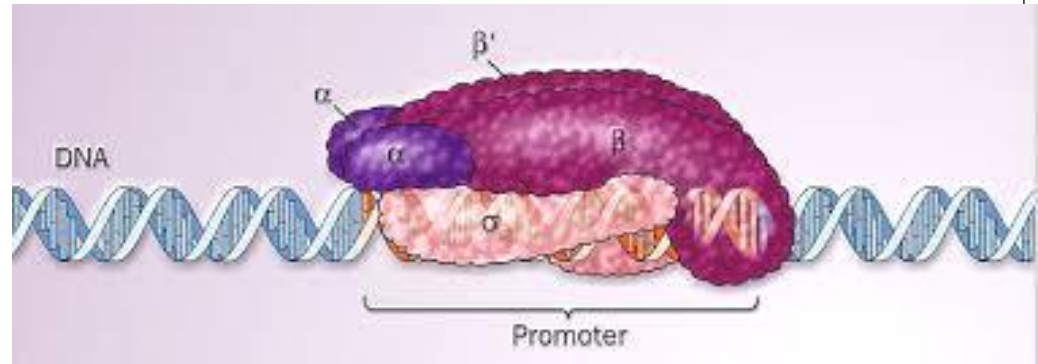
# Síntese de RNA depende de DNA

- A fita de RNA é copiada da mesma forma que na replicação
- RNA polimerase **não precisa de um iniciador** (primer) para a síntese
- A iniciação ocorre quando a RNA polimerase se liga a sequências de DNA específica, chamadas de **promotores**
- Para que a RNA pol sintetize, o duplex de DNA deve se desenrolar, formando uma **bolha de transcrição**
- Os problemas causados por essa bolha são aliviados pelas **topoisomerases!**



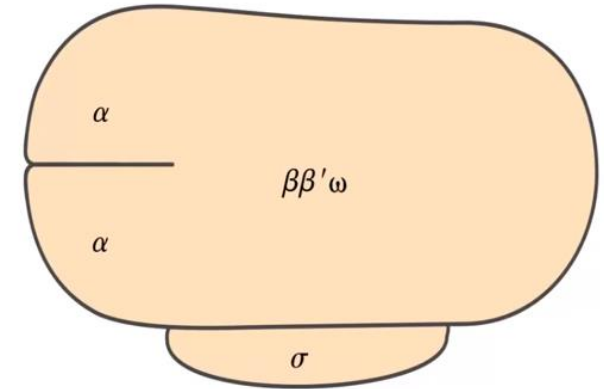
# RNA polimerase

- São enzimas grandes
- Em *E.coli* tem 6 subunidades
- Sexta subunidade (**sigma -  $\sigma$** ) é variável e liga transitoriamente ao centro e direciona a enzima para sítios de ligação específicos do DNA



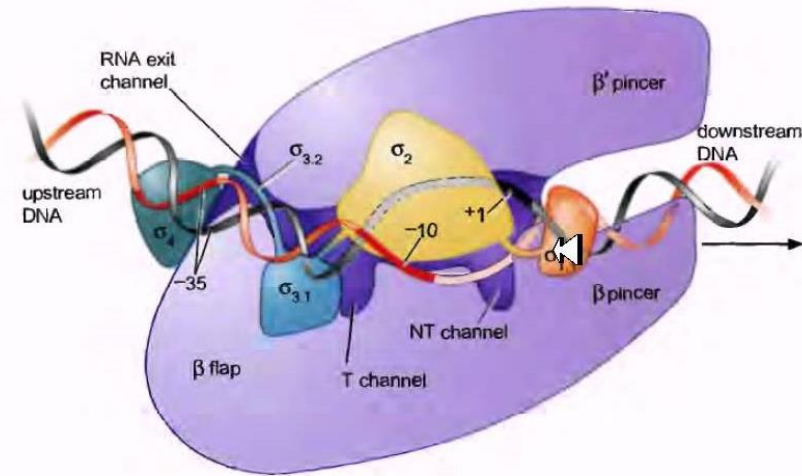


# Função das subunidades



Subunidade	Gene	Número	Papel
a	rpoA	2	Participa da iniciação, liga-se a seqüências reguladoras
b	rpoB	1	Participa da iniciação e alongamento, forma ligações fosfodiéster
b'	rpoC	1	Liga-se ao molde de DNA
s	rpoD	1	Reconhece promotor, inicia síntese (dissociando-se logo após)
w	-	1	Desconhecido

# Tipos de RNA pol

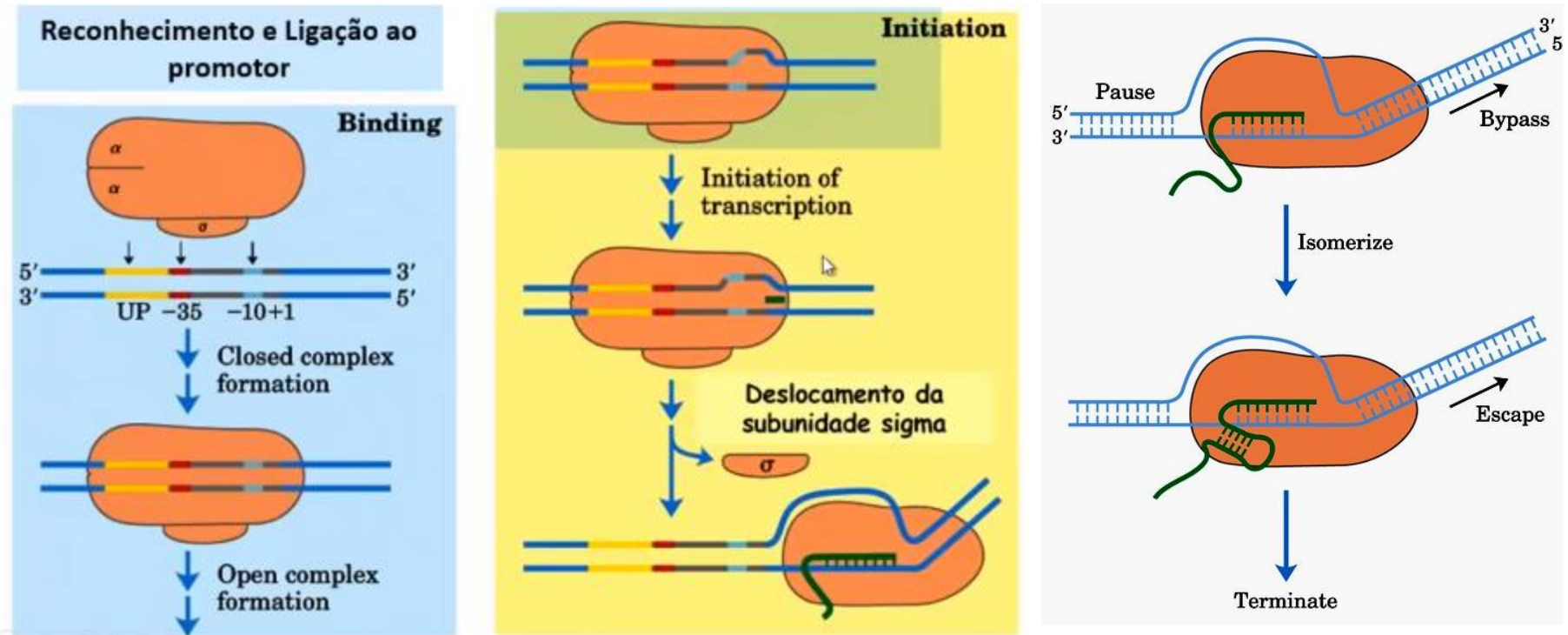


- Procariontes: apenas uma isoforma
- Eucariontes tem três isoformas:
  - **RNA polimerase I:** responsável pela síntese de pré-rRNAs (precursor do 18S, 5.8S e 28S)
  - **RNA polimerase II:** síntese de mRNA e de alguns RNAs especializados
  - **RNA polimerase III:** produz tRNA, rRNA 5S e alguns outros RNAs pequenos

• OBS: RNA pol não apresenta atividade de exonuclease (correção) = mais erros que na replicação – taxa de  $\sim 10^4$  erros por ribonucleotídeo incorporado

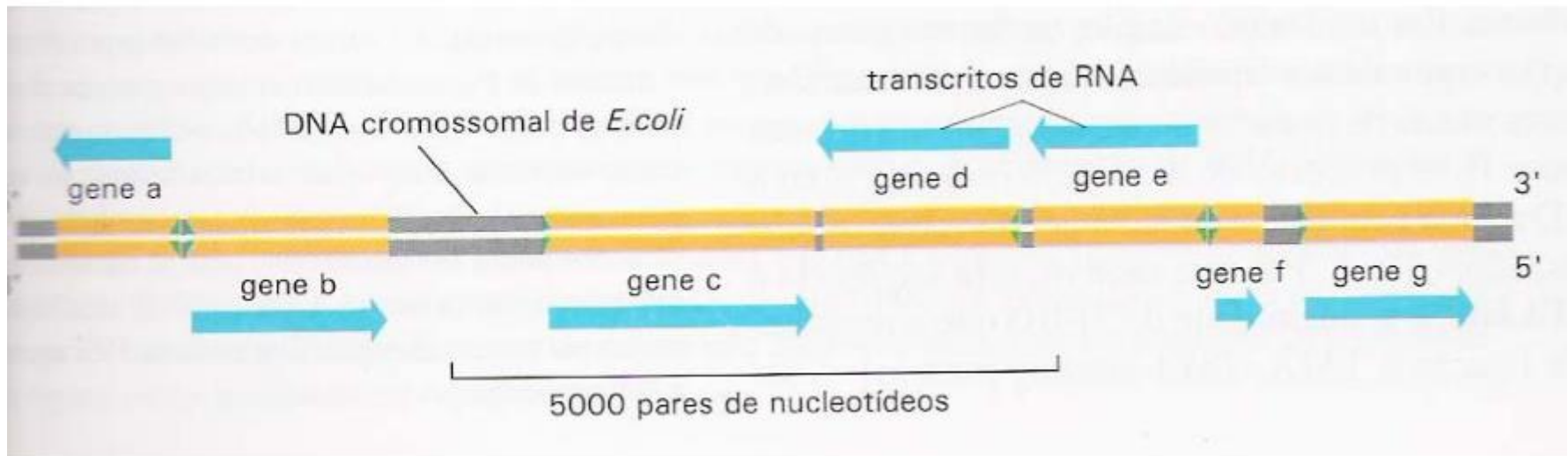
# Fases da transcrição

- **Início:** reconhecimento do promotor
- **Alongamento:** adição de ribonucleotídeos
- **Término:** reconhecimento das sequências de término da síntese.



# Qual fita transcrever?

- Os genes podem estar tanto em uma ou em outra fita
- A escolha da fita molde **depende da localização do promotor**
- Sempre no sentido da vida!



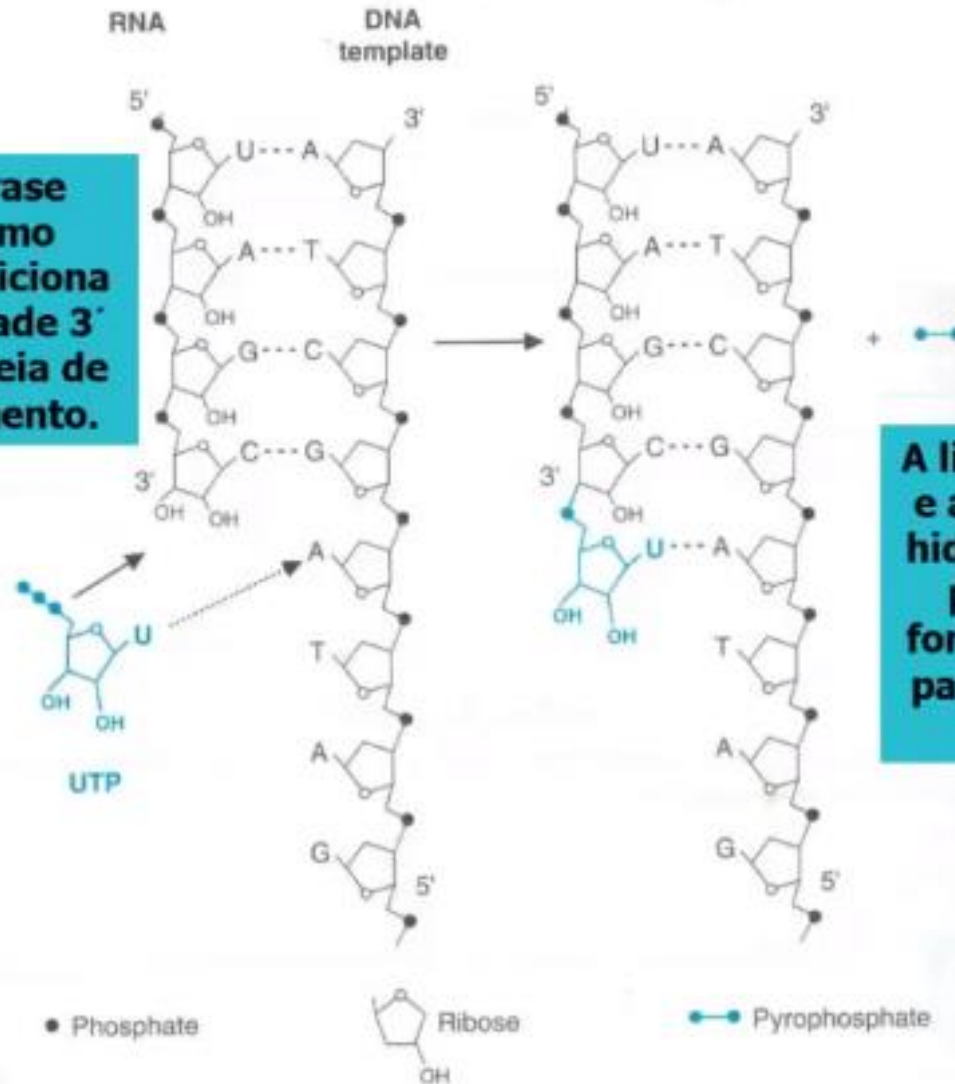
O RNA sintetizado possui a mesma direção que a fita codificadora!



Não se transforma em RNA.  
É usado como molde!

# Ação da RNA Polimerase

A RNA polimerase utiliza NTP como precursores e adiciona NMP à extremidade 3' da ribose da cadeia de RNA em crescimento.

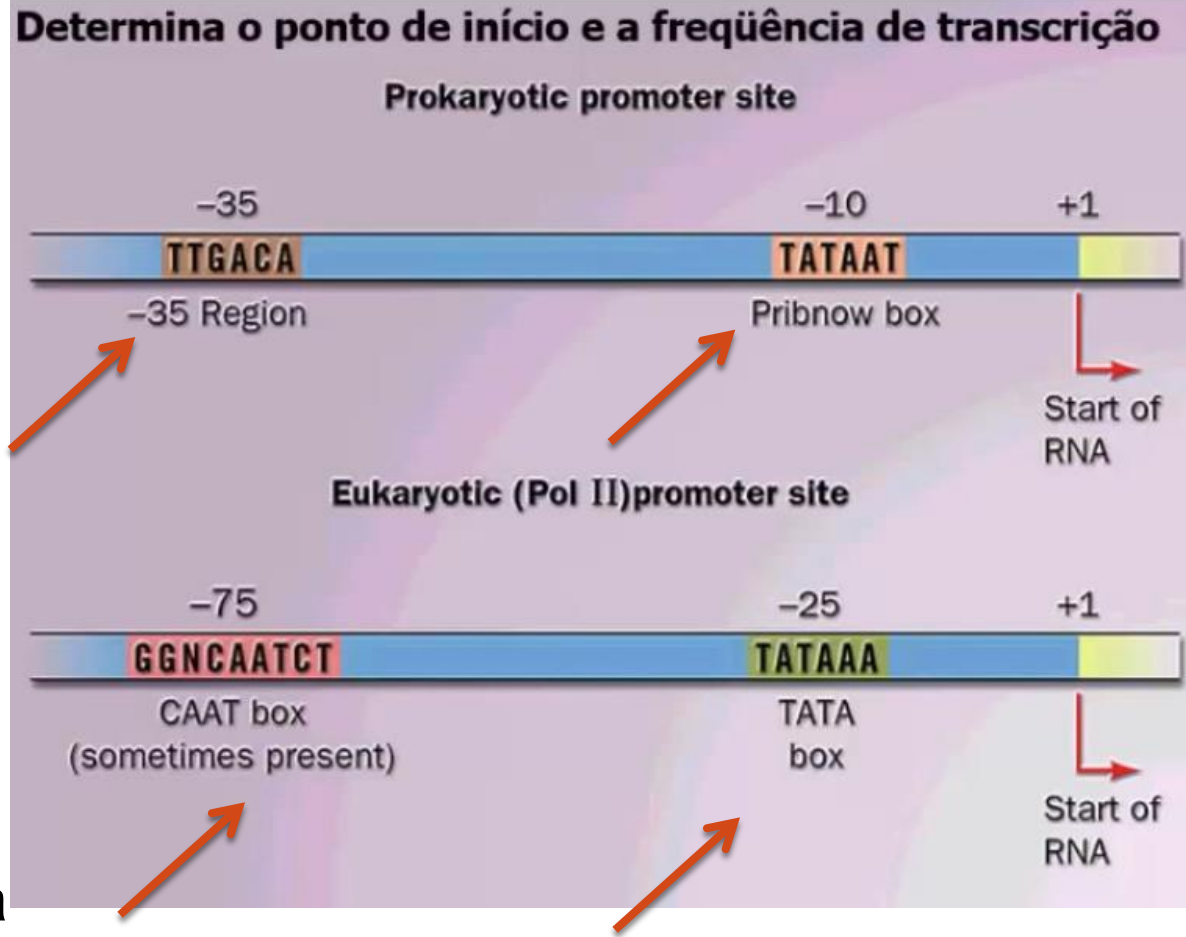


A liberação do PPi e a sua posterior hidrólise por uma pirofosfatase fornece a energia para a síntese de RNA



# Como a RNA pol sabe onde iniciar? Promotores!

- Promotores dirigem a síntese de genes
- Iniciar em pontos aleatórios seria um desperdício
- Existem algumas **seqüências consenso**
- A eficiência da RNA pol muitas vezes depende dessas seqüências
- É a **subunidade sigma** que reconhece o promotor



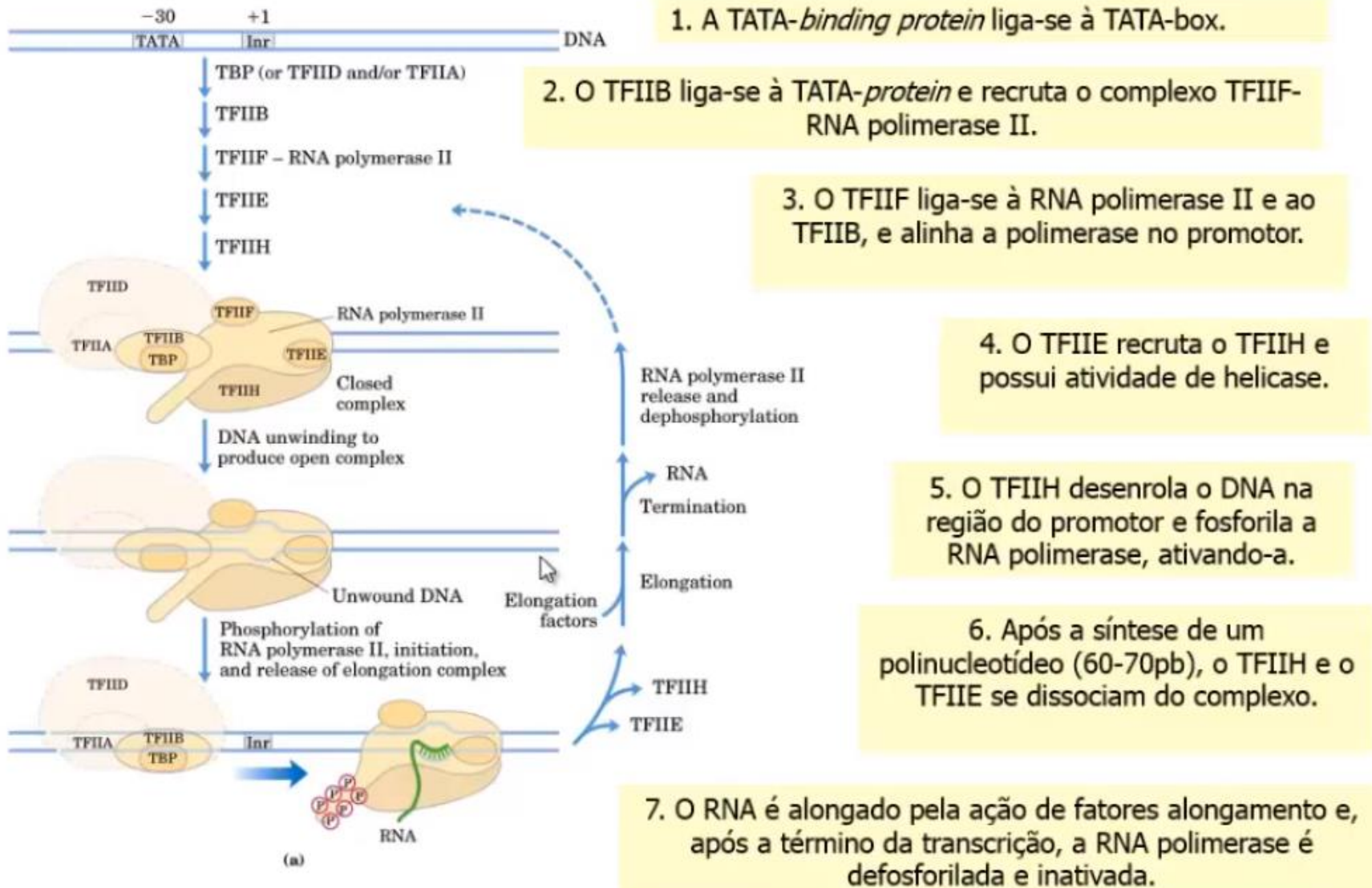
# Subunidade Sigma -- $\sigma$

- A subunidade sigma ( $\sigma$ ) da RNA polimerase é fundamental para o reconhecimento específico da região promotora. Ela, juntamente ao cerne da enzima, desliza ao longo do DNA à procura do promotor
- A subunidade sigma dissocia estocasticamente
- Célula pode expressar genes diferentes apenas trocando essa subunidade, permitindo alterações importantes na fisiologia celular
- Cada subunidade tem afinidade diferente por promotores diferentes.

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

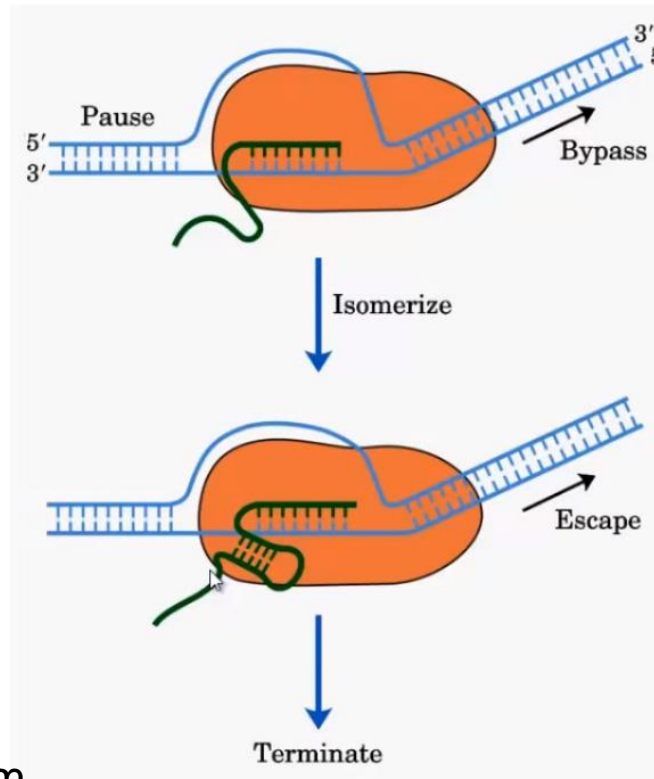


# RNA polimerase requer outras proteínas para transcrever

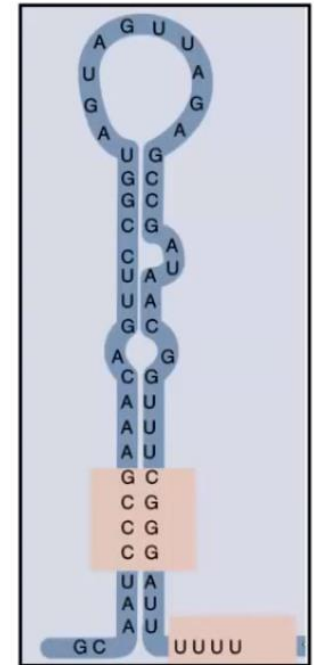


# Sequências específicas sinalizam a terminação da síntese de RNA

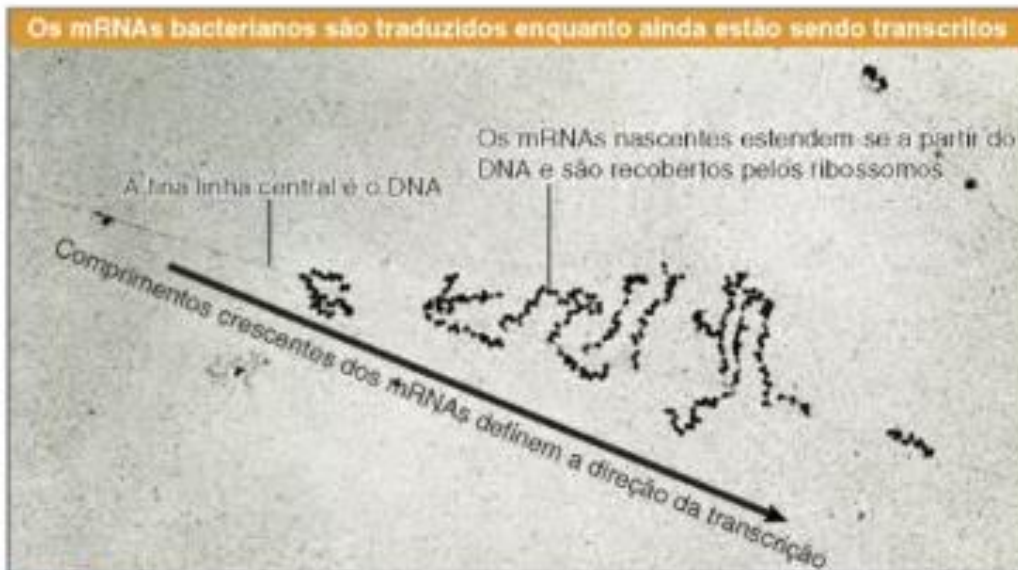
- Duas classes de sinais de terminação (procariotos):
  - Dependente de fator protéico rho
    - Geralmente incluem uma região rica em CA
  - Independente de rho
    - Uma região que produz um transcrito de RNA com sequências autocomplementares, permitindo a formação de uma estrutura de grampo com 15 – 20 nucleotídeos no centro antes da extremidade projetada da fita de RNA



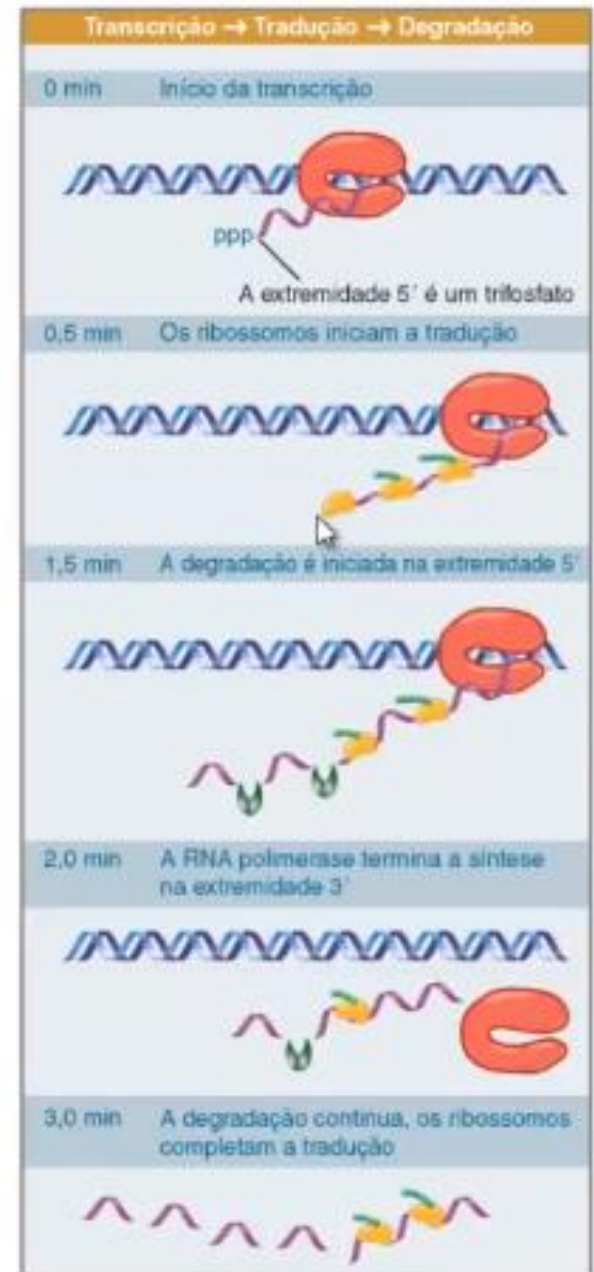
Terminação da transcrição através da formação do grampo de terminação



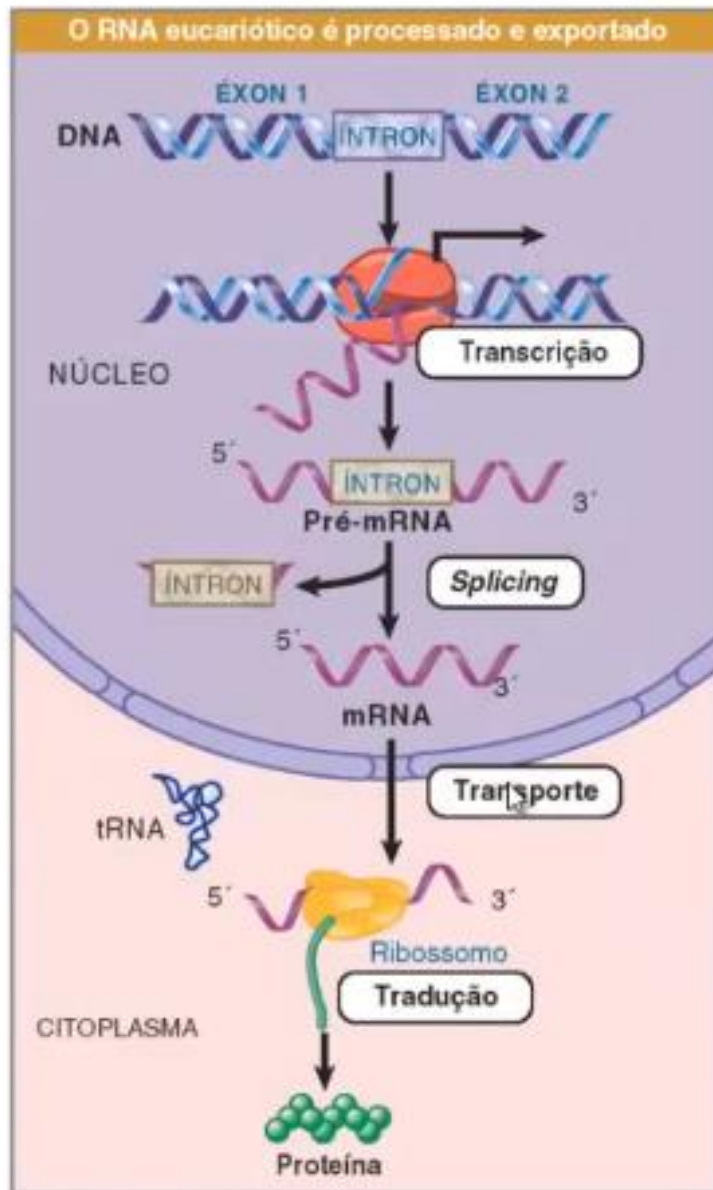
# Procaríotos: O acoplamento transcrição-tradução



**FIGURA 7.14** Unidades de transcrição podem ser visualizadas em bactérias. Foto cortesia de Oscar Miller.



**FIGURA 7.13** Visão geral: o mRNA é transcrito, traduzido e degradado, simultaneamente, em bactérias.



**FIGURA 2.15** A expressão gênica é um processo de múltiplos estágios.

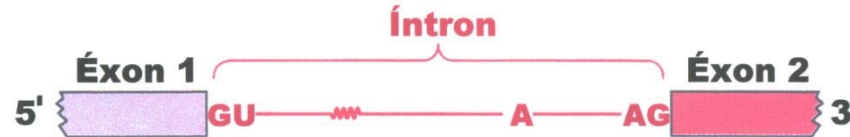
Eucariotos

**O RNA vai  
para o  
citoplasma**



# Tanto íntrons quanto éxons são transcritos de DNA para RNA

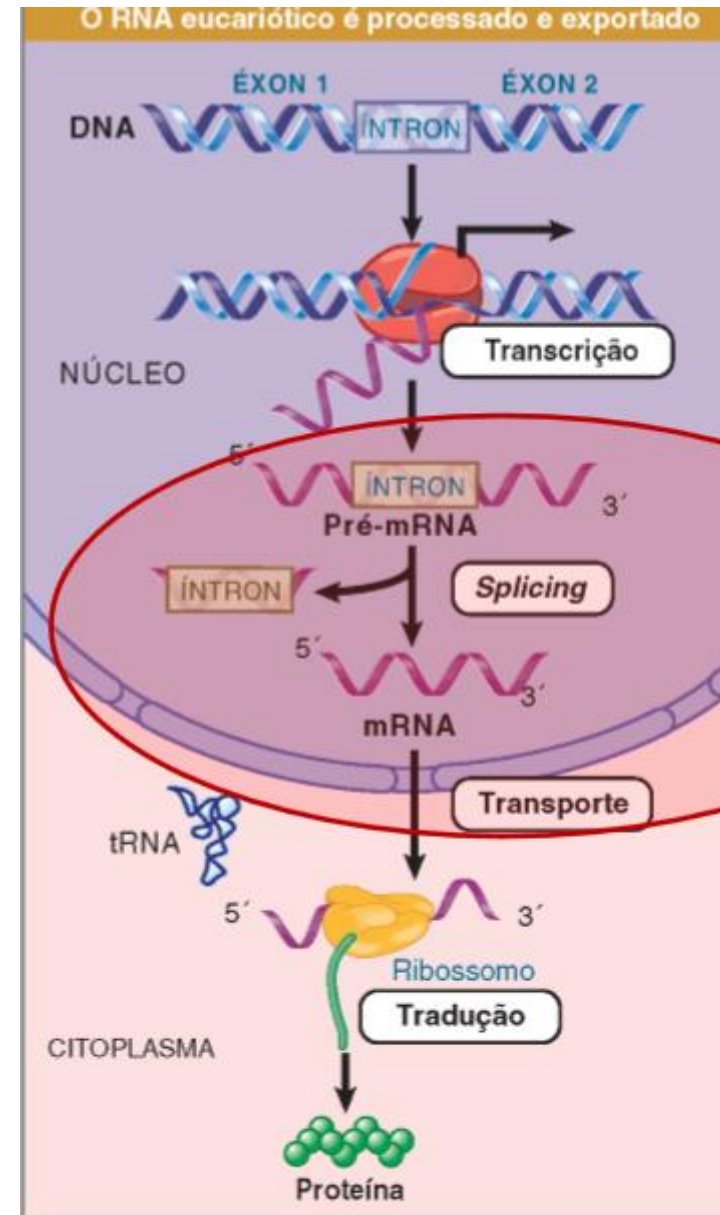
- 1977, Phillip Sharp e Richard Roberts descobriram independentemente que muitos genes em eucariontes são interrompidos por sequências não codificadoras (íntrons)
- A grande maioria dos vertebrados tem íntrons



- Os íntrons do DNA são transcritos junto com o resto do gene pelas RNA polimerases
- Os íntrons desse transcrito primário sofrem splicing e os éxons são então ligados para formar um RNA maduro e funcional
- Genes humanos tem muito mais DNA na forma de íntron do que de éxons

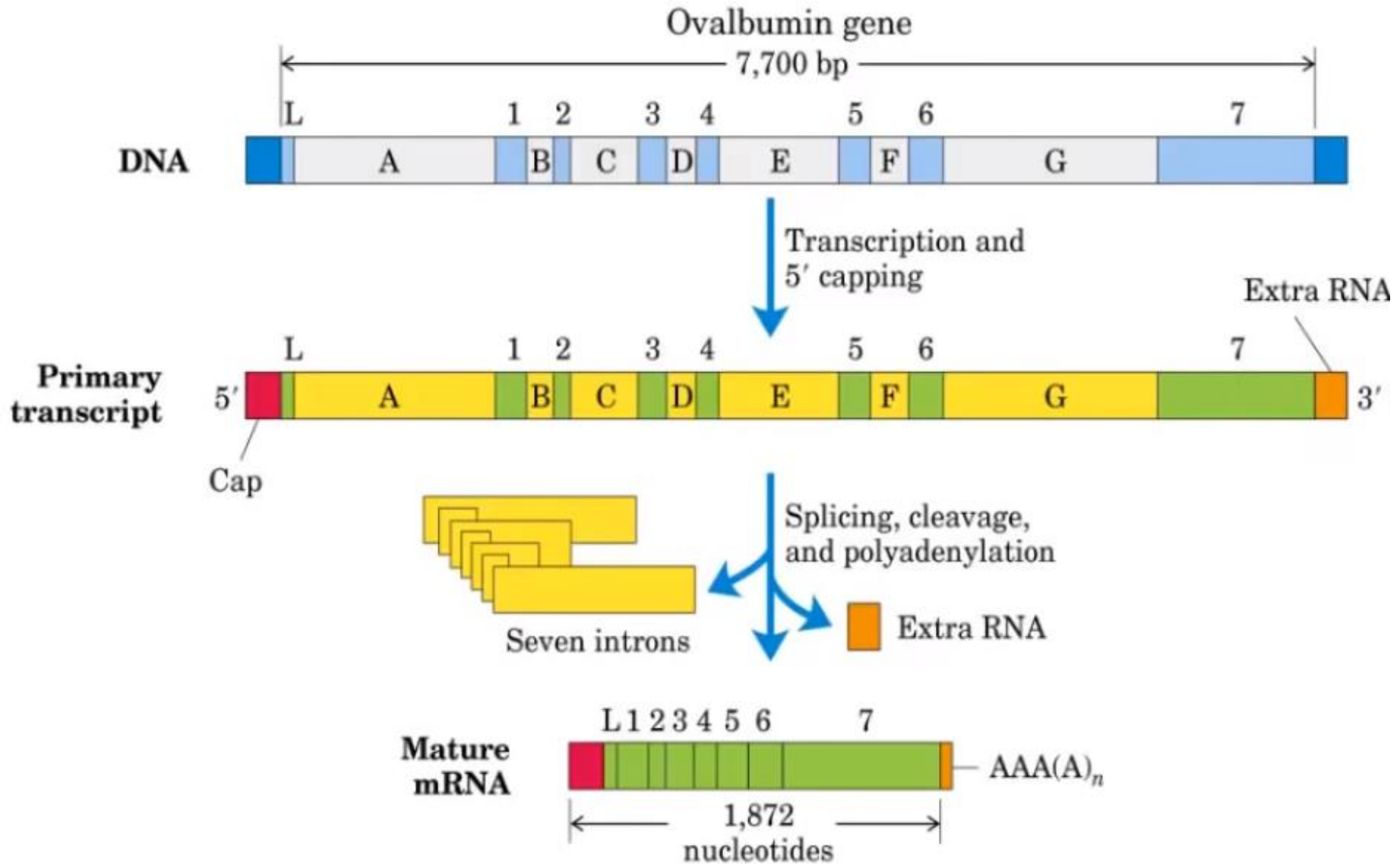
# O processamento de RNA

- Uma molécula de RNA recém sintetizada é chamada de **transcrito primário**, que ainda apresenta **íntrons** e **éxons**
- Os íntrons são removidos em um processo chamado de **splicing de RNA**, onde os éxons são ligados para formar uma sequência contínua que especifica um polipeptídeo funcional



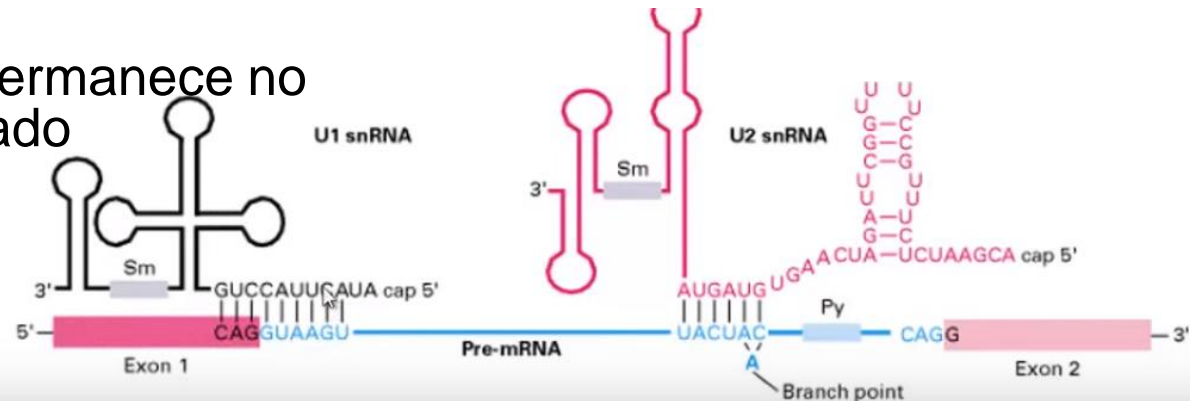
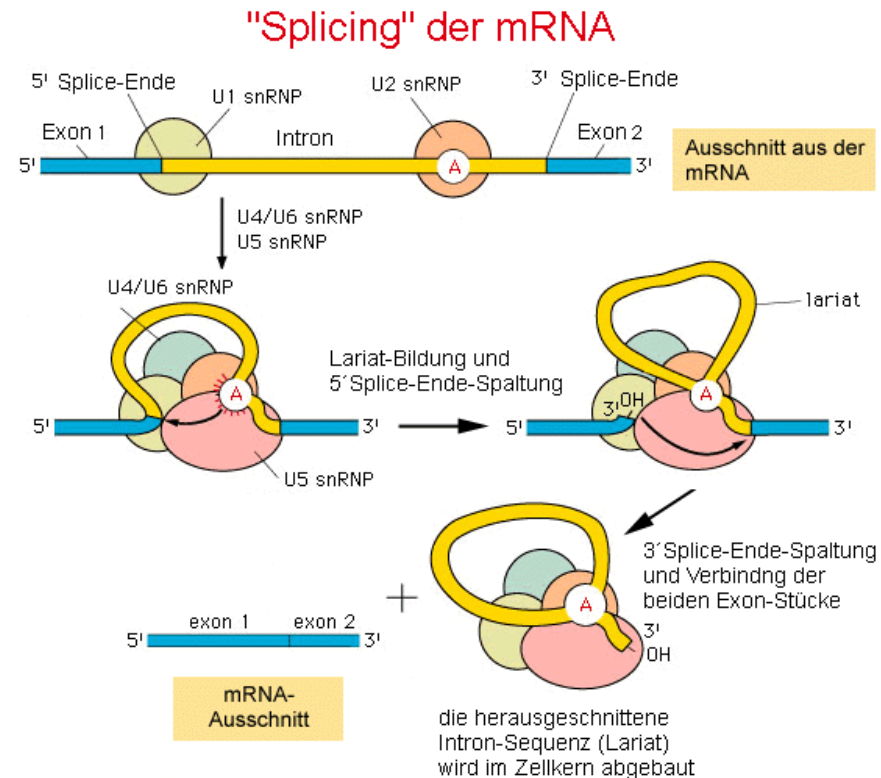
**FIGURA 2.15** A expressão gênica é um processo de múltiplos estágios.

# Processamento do mRNA



# Spliceossomo

- É composto por complexos de RNA e proteínas especializadas: as ribonucleínas nucleares (**snRNA**)
- Íntrons normalmente têm sequências que marcam os sítios em que o splicing ocorre de dinucleotídeos:
  - GU** na 5'
  - AG** na 3'
- ATP é necessário para a montagem do spliceossomo, mas não para as reações de clivagem do RNA
- Após o splicing, o íntron permanece no núcleo e é depois degradado

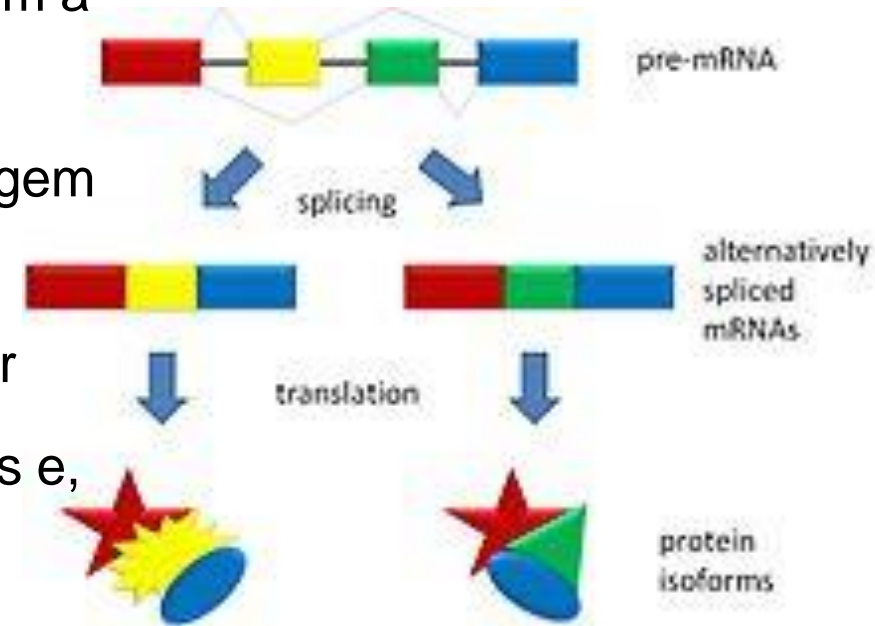




# Splicing alternativo

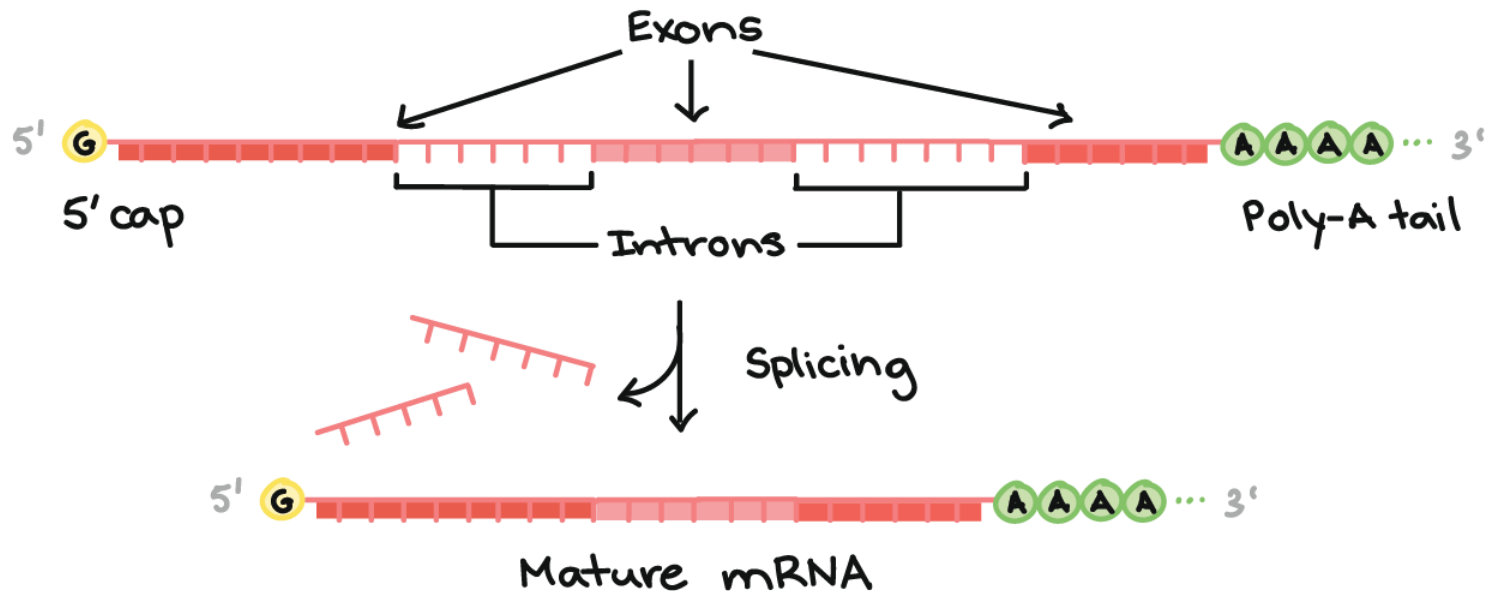
Humanos ~23 mil genes e produzem ~100 mil proteínas

- Acreditava-se que um gene daria origem a um polipeptídeo
- A verdade é que um gene pode dar origem a mais de um produto!
- Alguns transcritos de mRNA podem ser processados de mais de uma maneira, para produzir diferentes RNAs maduros e, portanto, diferentes polipeptídeos.
- Proteínas ligadas ao mRNA promovem uma via em detrimento de outra
- Transcrição ocorre no núcleo e tradução no citoplasma: tempo para modificar o mRNA antes da tradução!



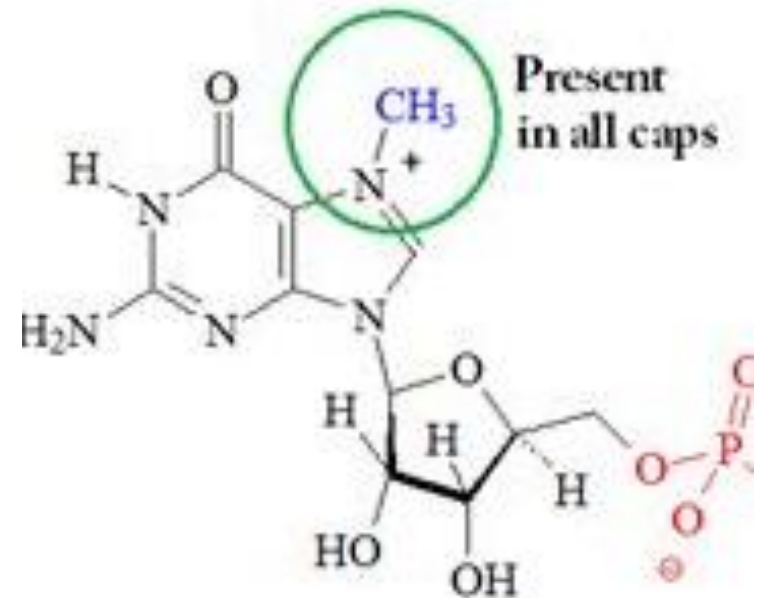
# Cap 5' e cauda PoliA

- Os mRNAs de eucariontes são modificados em cada extremidade (proteção contra degradação).
- Um resíduo modificado chamado de **cap 5'** é adicionado à extremidade 5'
- A extremidade 3' é clivada e 80 a 250 resíduos A são adicionados para criar uma **cauda poli A**



# Cap 5'

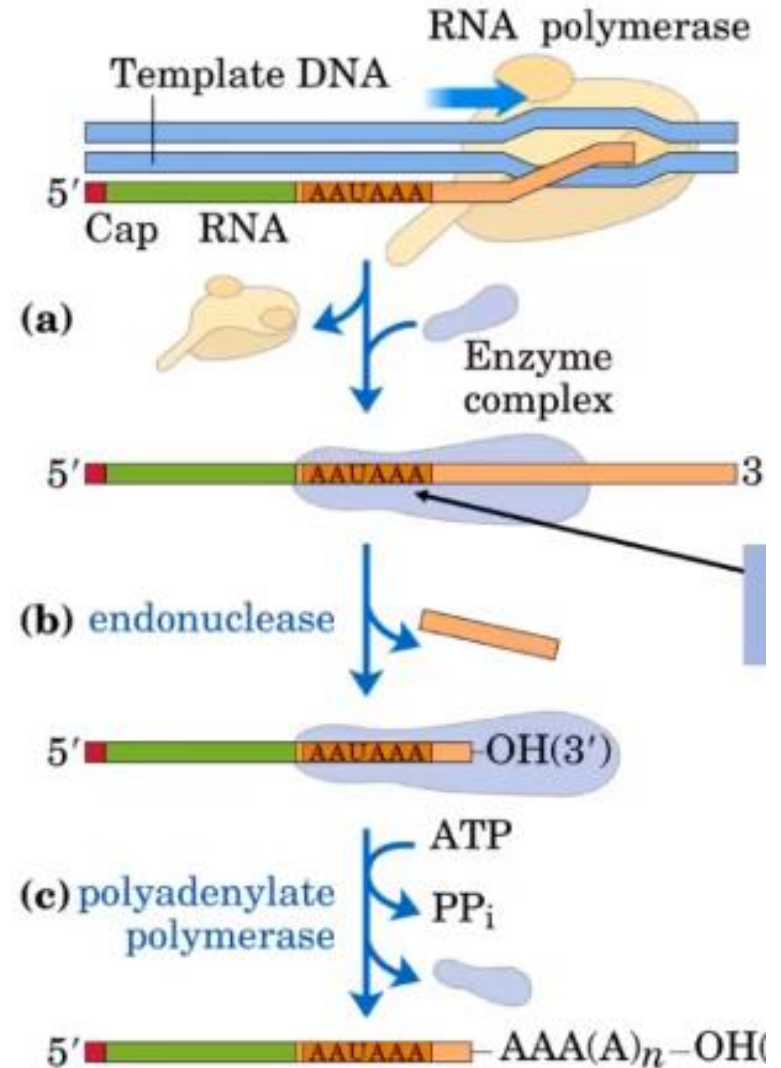
- Uma guanina metilada na posição N-7 é ligada a região 5' do mRNA
- Ocorre no início da transcrição
- O cap 5' ajuda a proteger o mRNA das ribonucleases
- Também se liga ao mRNA do ribossomo para iniciar a tradução



G added by 5'-5' linkage

# Cauda poli A

- Filamento de 80 – 250 resíduos de A
- Conjunto das proteínas + cauda poliA ajudam a proteger o mRNA da destruição enzimática
- Quando a clivagem é feita (reconhecimento de uma região conservada **5' AAUAAA 3'**), a **polimerase poliadenilato** adiciona os resíduos de A
- Essa enzima não precisa de um molde



# A transcrição é regulada em vários níveis

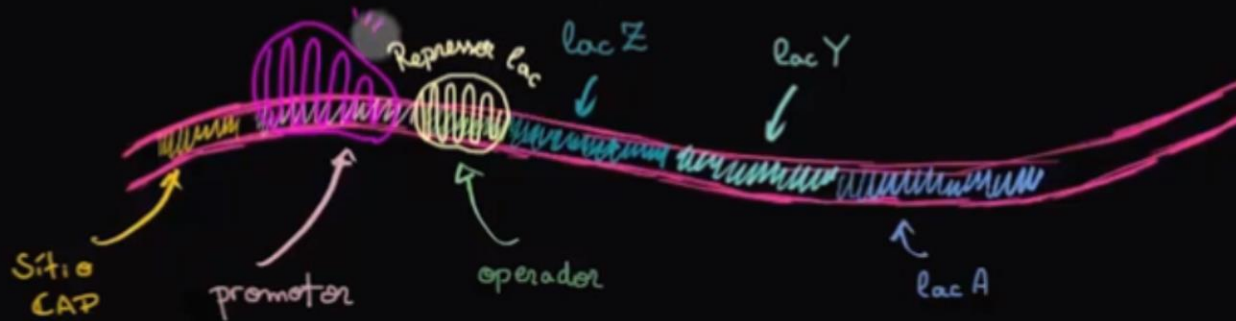
- A transcrição de cada gene é cuidadosamente regulada para formar produtos gênicos apenas nas proporções necessárias
- A ligação de proteínas tanto próximas quanto distantes do promotor podem afetar os níveis de expressão gênica
- A ligação das proteínas pode ativar a transcrição ao facilitar a ligação da RNA pol ou reprimir a transcrição ao bloquear a atividade da polimerase
- Repressores bloqueiam a síntese do RNA em genes específicos

# Operon Lac

**OPERON** = Conjunto de genes que se encontram funcionalmente relacionados, contíguos e controlados coordenadamente, sendo todos expressos em apenas um RNA mensageiro.

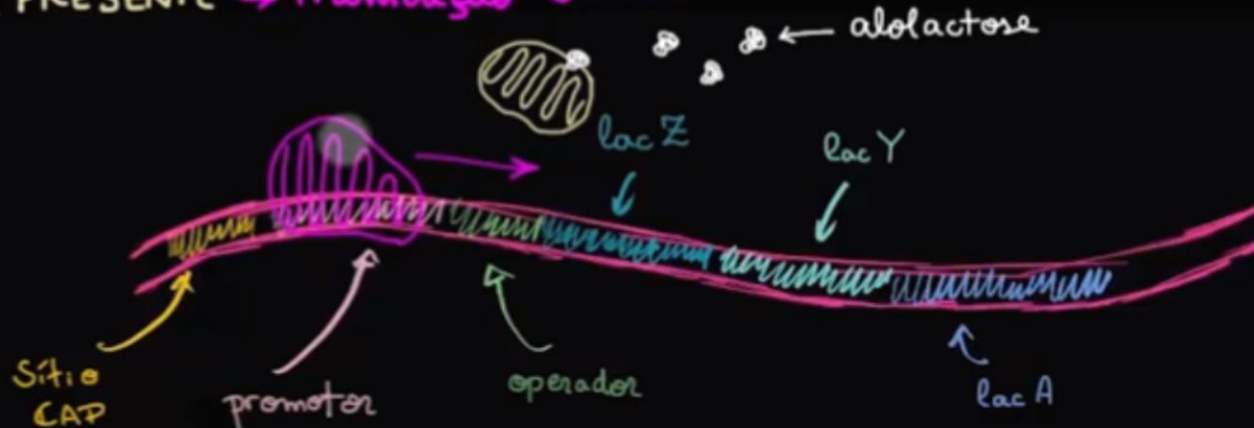
*E. Coli* –  
degradação de  
lactose

\*Lactose AUSENTE → Transcrição NÃO ocorre

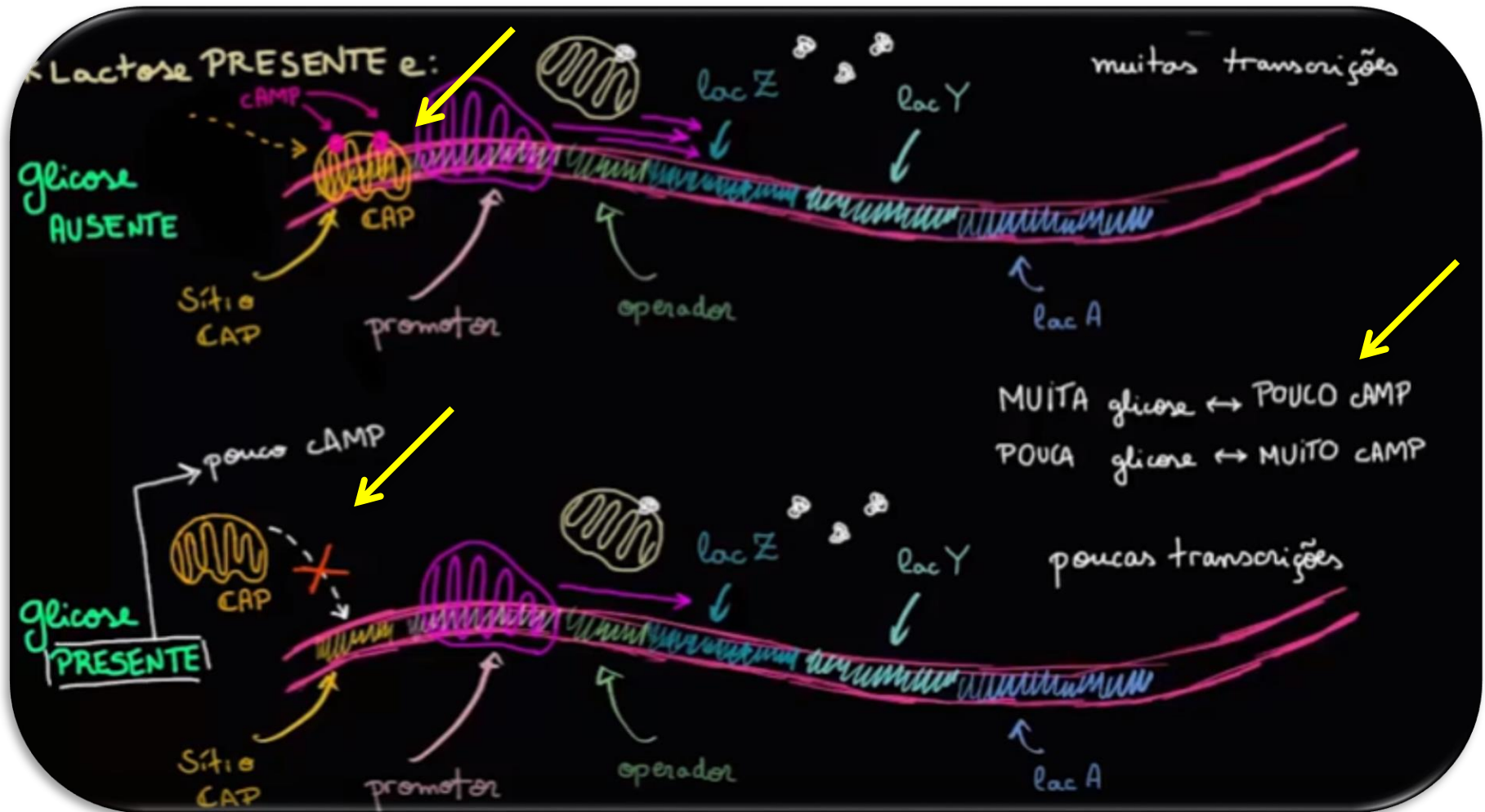


Proteína Ativadora Catabólica

\*Lactose PRESENTE → Transcrição OCORRE



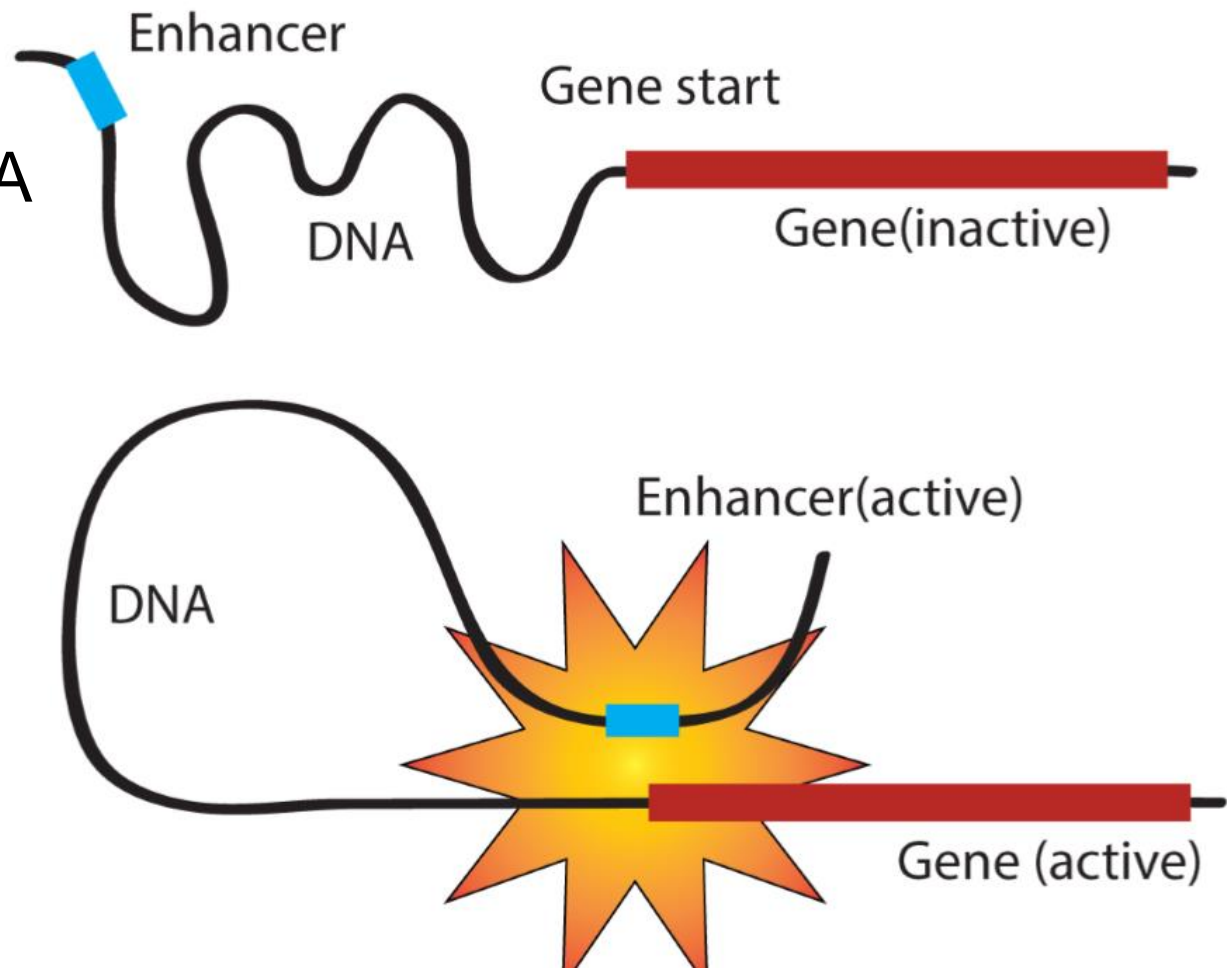
# Operon Lac: Lactose presente





# Enhancers

- Os enhancers ou acentuadores são seqüências de DNA que aumentam a afinidade da maquinaria de transcrição por um certo promotor





# Human-Specific Gain of Function in a Developmental Enhancer

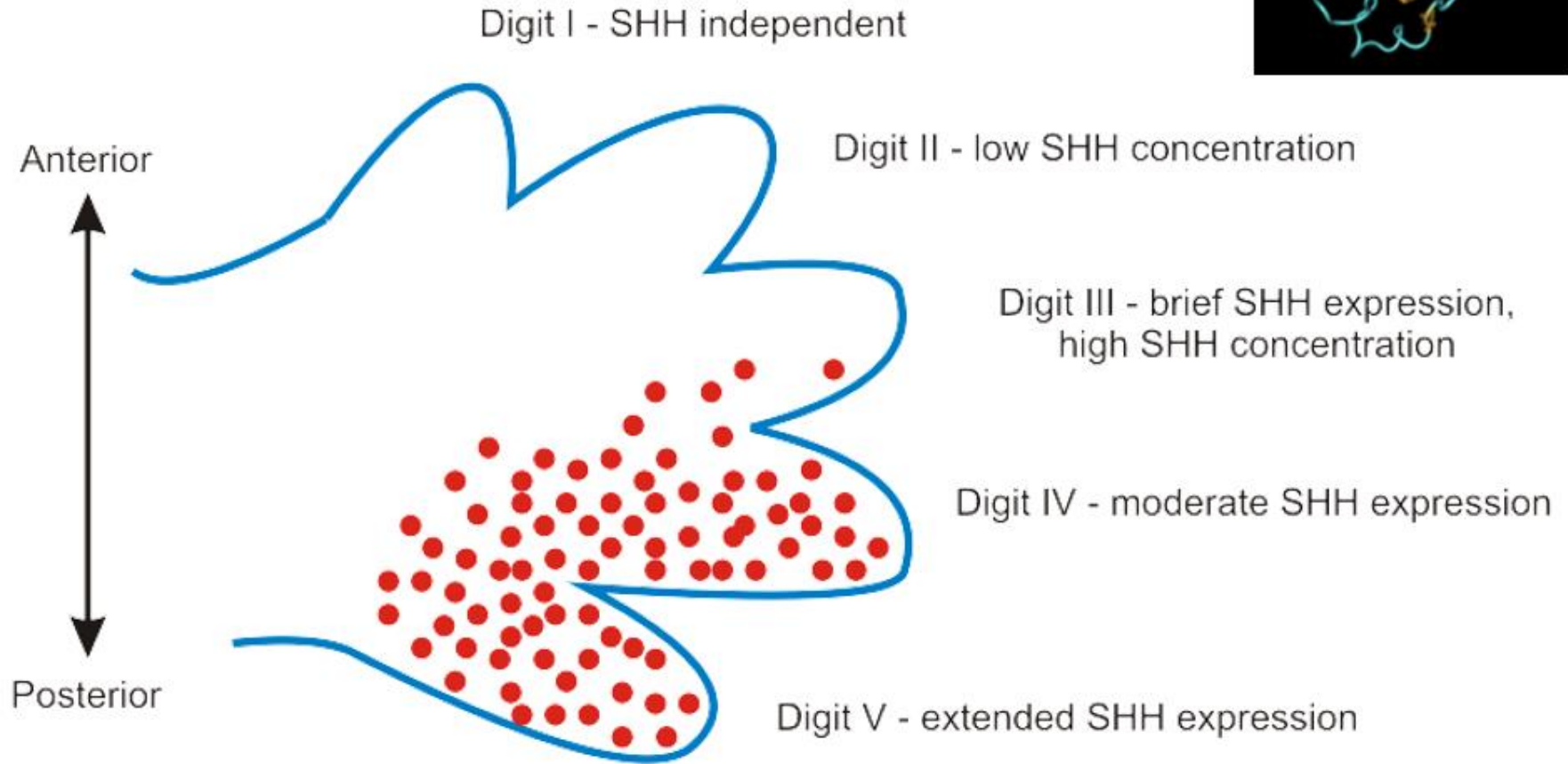
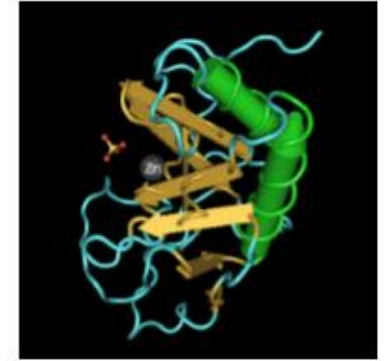
Shyam Prabhakar,<sup>1\*</sup> Axel Visel,<sup>1</sup> Jennifer A. Akiyama,<sup>1</sup> Malak Shoukry,<sup>1</sup> Keith D. Lewis,<sup>1†</sup> Amy Holt,<sup>1</sup> Ingrid Plajzer-Frick,<sup>1</sup> Harris Morrison,<sup>2</sup> David R. FitzPatrick,<sup>2</sup> Veena Afzal,<sup>1</sup> Len A. Pennacchio,<sup>1,3</sup> Edward M. Rubin,<sup>1,3‡</sup> James P. Noonan<sup>1‡§</sup>

Changes in gene regulation are thought to have contributed to the evolution of human development. However, in vivo evidence for uniquely human developmental regulatory function has remained elusive. In transgenic mice, a conserved noncoding sequence (HACNS1) that evolved extremely rapidly in humans acted as an enhancer of gene expression that has gained a strong limb expression domain relative to the orthologous elements from chimpanzee and rhesus macaque. This gain of function was consistent across two developmental stages in the mouse and included the presumptive anterior wrist and proximal thumb. In vivo analyses with synthetic enhancers, in which human-specific substitutions were introduced into the chimpanzee enhancer sequence or reverted in the human enhancer to the ancestral state, indicated that 13 substitutions clustered in an 81-base pair module otherwise highly constrained among terrestrial vertebrates were sufficient to confer the human-specific limb expression domain.

Sequência não codificante (HACNS1), com 13 substituições, atua como enhancer em humanos

# Human Limb Bud Formation

## SHH - Sonic hedgehog



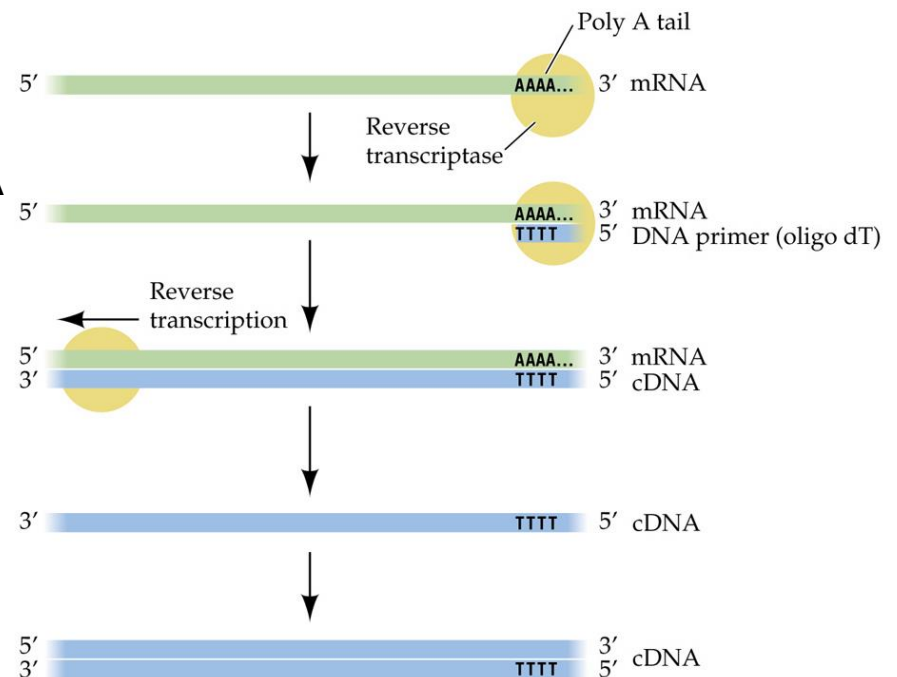
# RNA polimerase sofre inibição seletiva

- Antibiótico: **Rifamicina** inibe a síntese bacteriana ao se ligar à subunidade beta das RNA-polimerases bacterianas, impedindo o distanciamento do promotor
- O cogumelo *Amanita phalloides* produz alfa-amanitina que interrompe a formação de mRNA nas células animais ao **bloquear ao Pol II**.
- Responsável por 90% dos envenenamentos por cogumelo anuais!



# Transcriptase reversa, a DNA polimerase dependente de RNA

- 1. síntese de DNA dependente de RNA
- 2. degradação de RNA
- 3. Síntese de DNA dependente de DNA
- A transcriptase reversa, assim como as RNA polimerases, não tem exonucleases revisoras.
- Maior número de erros (1 a cada 20 mil nucleotídeos)!
- O novo duplex de DNA frequentemente é incorporado ao genoma do hospedeiro, podendo ser transcrito





# Retrovírus

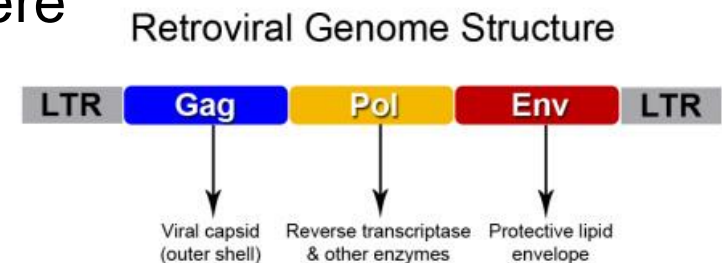
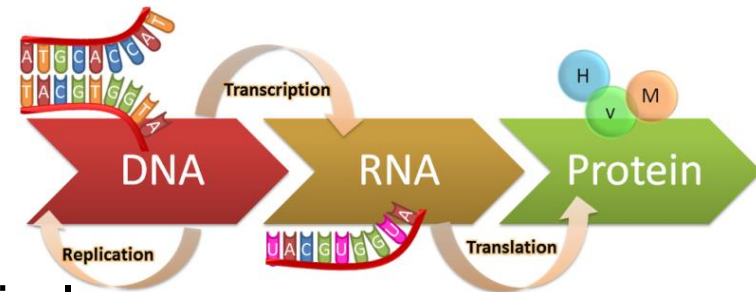


David Baltimore  
Nobel em 1975 – vírus e tumores



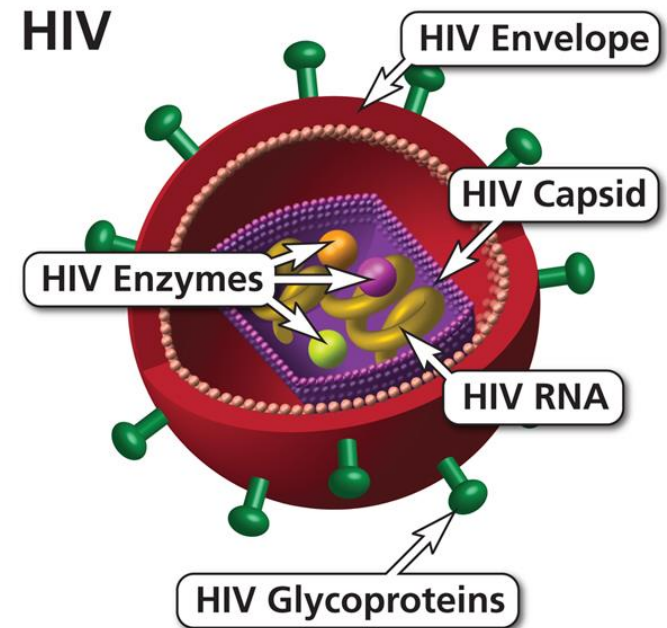
Temin

- Essa estrutura foi prevista por Temin (1962) e Baltimore (1970)
- Abalou o dogma central da biologia!
- Geralmente três genes:
  - **Gag**- codifica o núcleo da partícula viral
  - **Pol** – codifica uma integrase que insere o DNA viral no cromossomo do hospedeiro e a própria transcriptase reversa
  - **Env** – codifica as proteínas do envelope viral



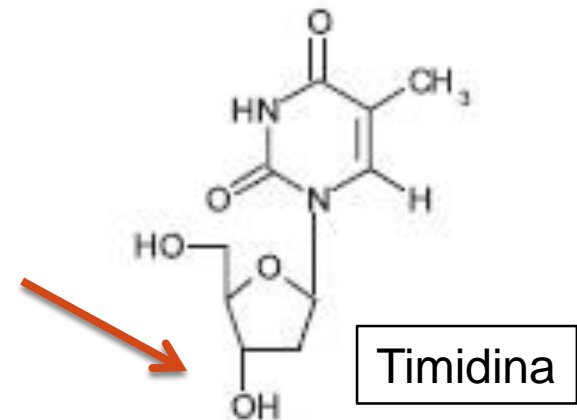
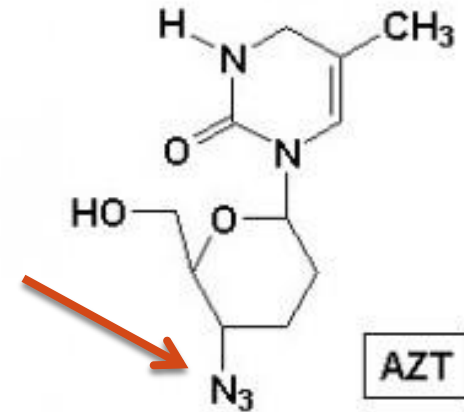
# HIV: retrovírus causador da AIDS

- Genoma de RNA
- Diferente de outros vírus, HIV mata muitas das células que infecta
  - principalmente **linfócitos T**
- Transcriptase reversa de HIV é cerca de 10x mais propensa a erros do que outras transcriptases conhecidas
- Alta taxa de mutação: difícil desenvolver fármacos efetivos!



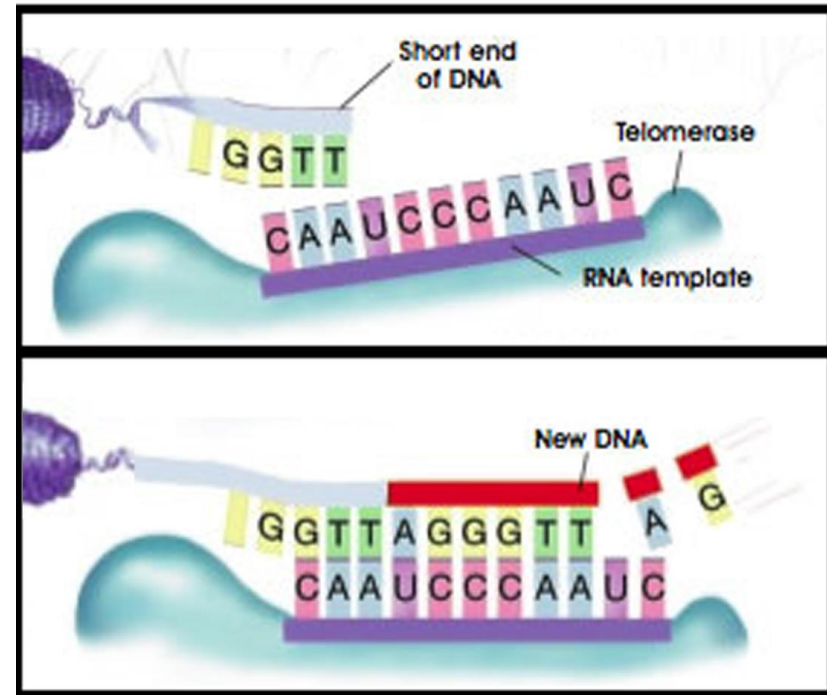
# Azido didezoxitimidina (AZT)

- Primeiro fármaco – inicialmente desenvolvido para câncer (1964), só em 1985 usado para tratamento de AIDS
- Transcriptase reversa do HIV tem uma afinidade maior pelo AZT do que pela timina
- Tem N onde deveria estar a extremidade 3'OH e isso interrompe a síntese
- Não é tão tóxico para as demais células, pois as polimerases celulares tem preferência pela timina
- Tóxico para células da medula óssea progenitoras de eritrócitos, causando anemia



# Telomerase: transcriptase reversa especializada

- Telomerase adiciona sequência repetitiva de T(x)G(y) nas extremidades dos cromossomos
- Ela contém um componente de RNA de ~150 nucleotídeos de comprimento que atua como molde para a síntese da fita T(x)G(y)



After - long telomere