

# Transcrição do RNA

*Rafael H.F. Valverde*

*[valverde@nano.ufrj.br](mailto:valverde@nano.ufrj.br)*

*Laboratório de Biomembranas G-37*

Biologia Celular para Nanotecnologia  
IBCCFº UFRJ

Abril 2022

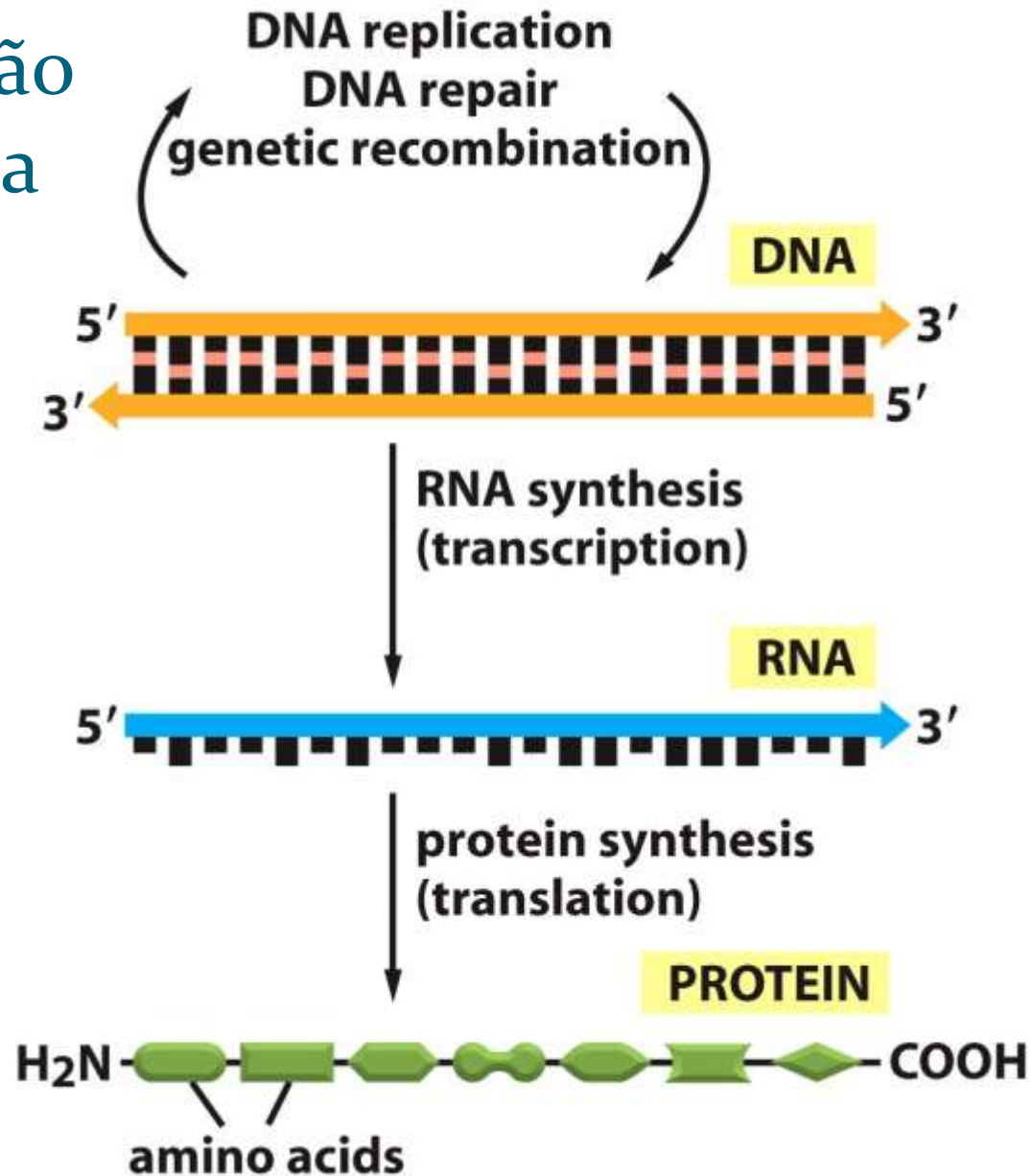


# O Fluxo da Informação entre DNA e Proteína

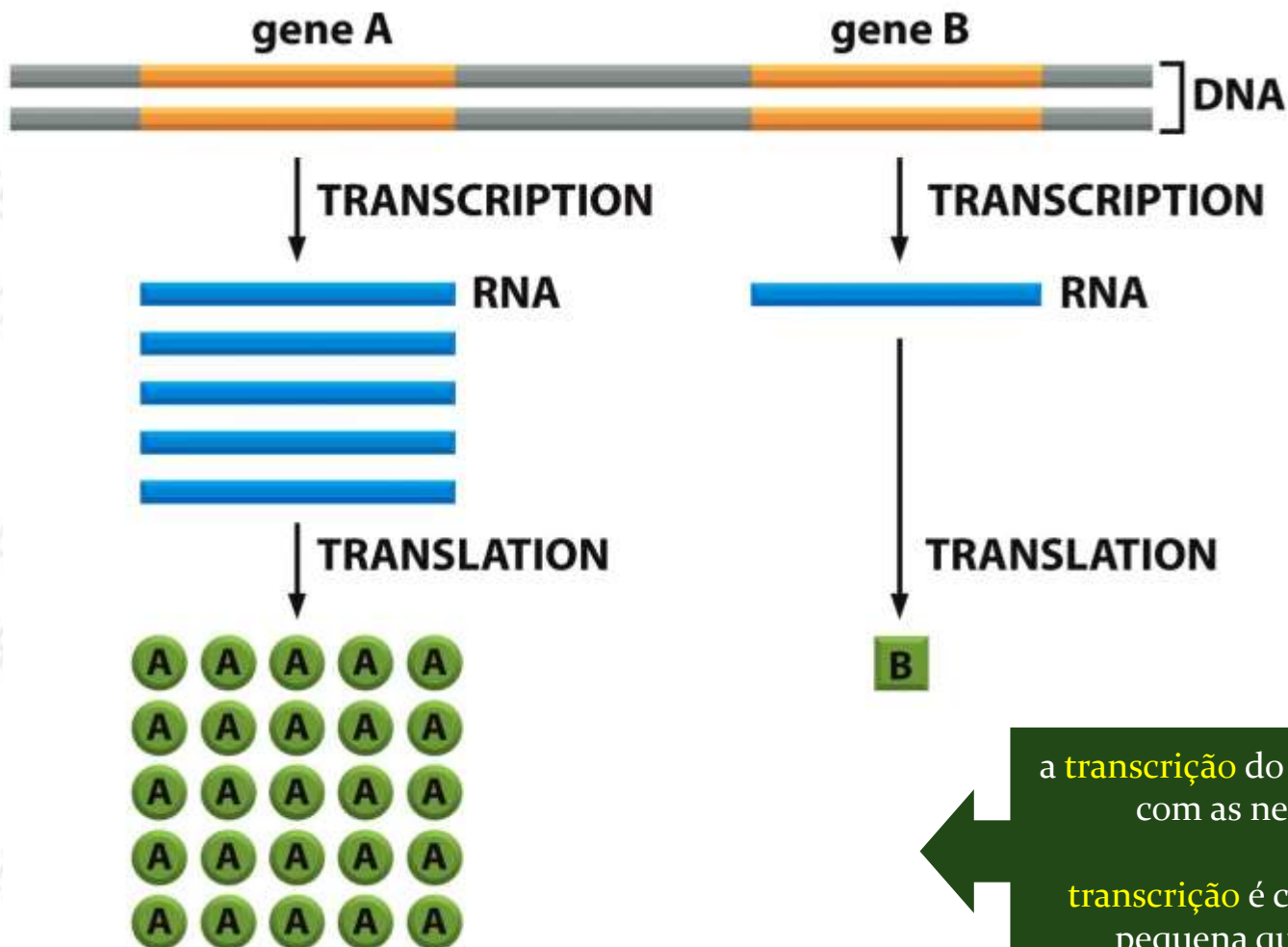
fluxo da informação  
genética: dogma  
primordial da biologia

diferenças: **processamento**  
em eucariotos

proteínas nem sempre são o  
produto final



# Genes Podem ser Expressos com Diferentes Eficiências



a **transcrição** do **RNA** é regulada de acordo com as necessidades da célula

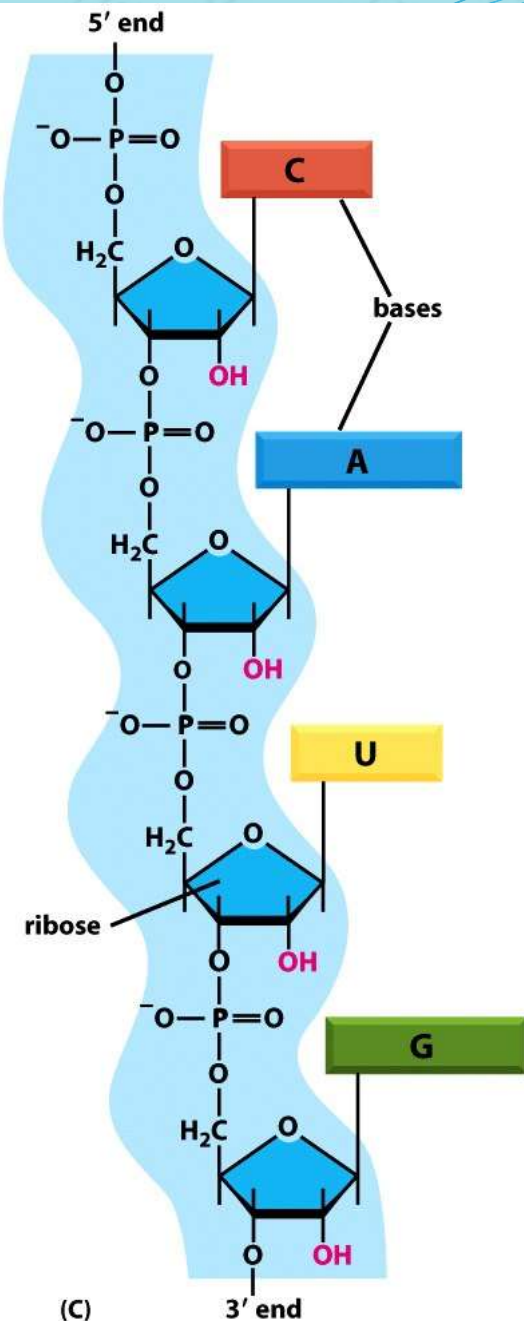
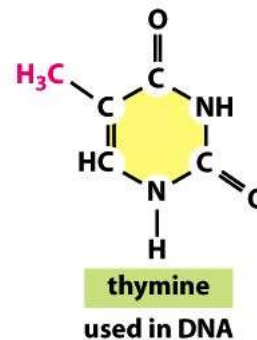
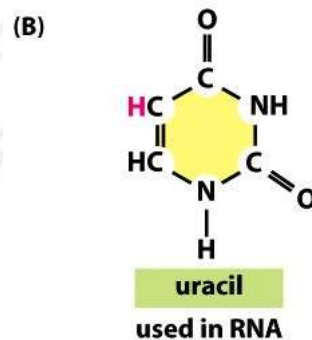
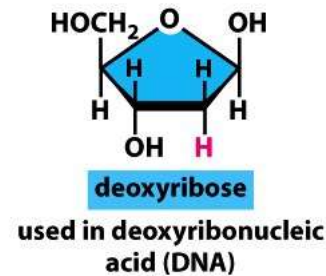
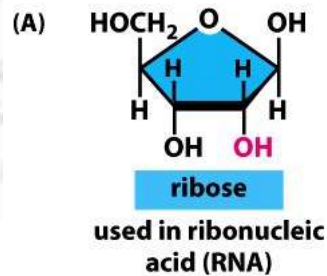
**transcrição** é circunstancial: grande ou pequena quantidade de proteína

# A Estrutura Química do RNA

RNA contém **ribonucleotídeos**  
(açúcar ribose ao invés de  
desoxirribose)

**uracila** no lugar de **timina**

pareamento de **U** com **A**:  
duas pontes de hidrogênio



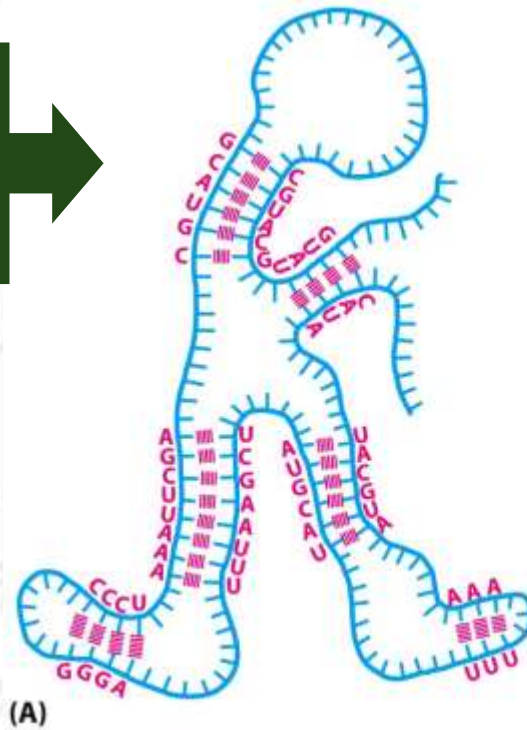


# RNA se Enovela Formando Estruturas 3D

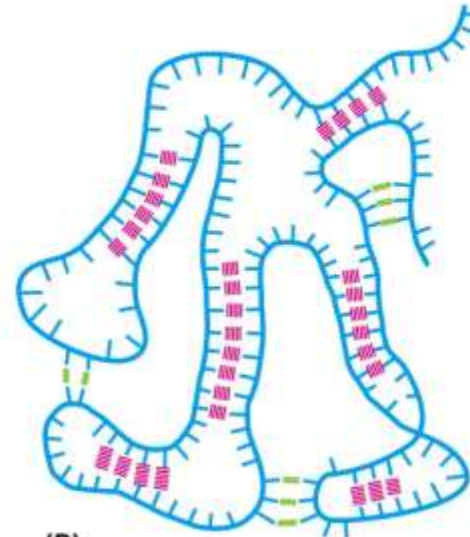
DNA: fita dupla em hélice

≠

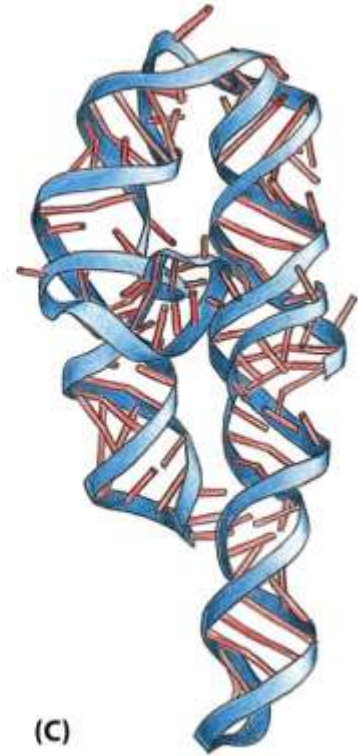
RNA: fita simples e formas múltiplas



(A)



(B)



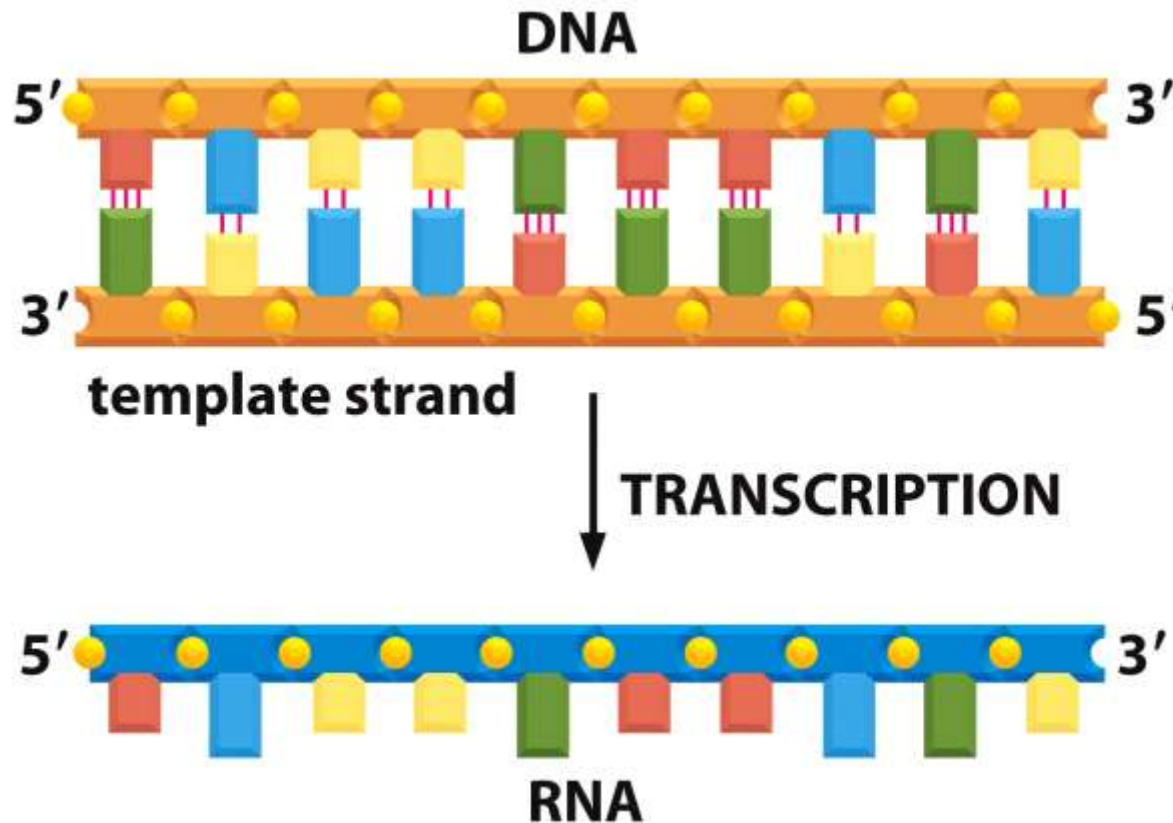
(C)

RNA pode assumir conformações 3D:  
funções estruturais e catalíticas!!

↑  
pareamentos não usuais!

↑  
intron

# A Transcrição do DNA Produz um RNA Complementar a uma Fita de DNA

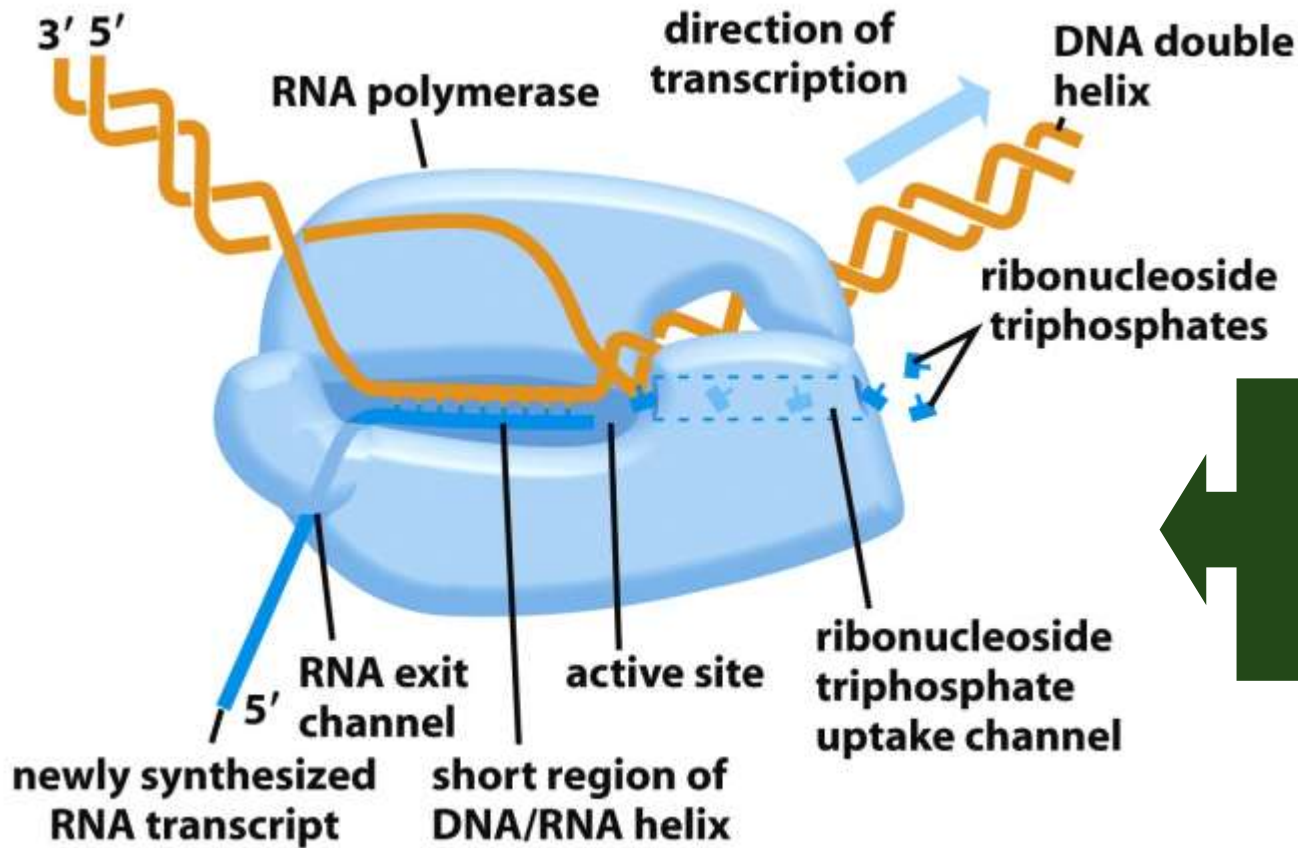


RNA não permanece ligado covalentemente ao DNA

menor do que o DNA (apenas uma região deste)

← síntese do RNA requer abertura do DNA molde

# O DNA é Transcrito pela RNA Polimerase

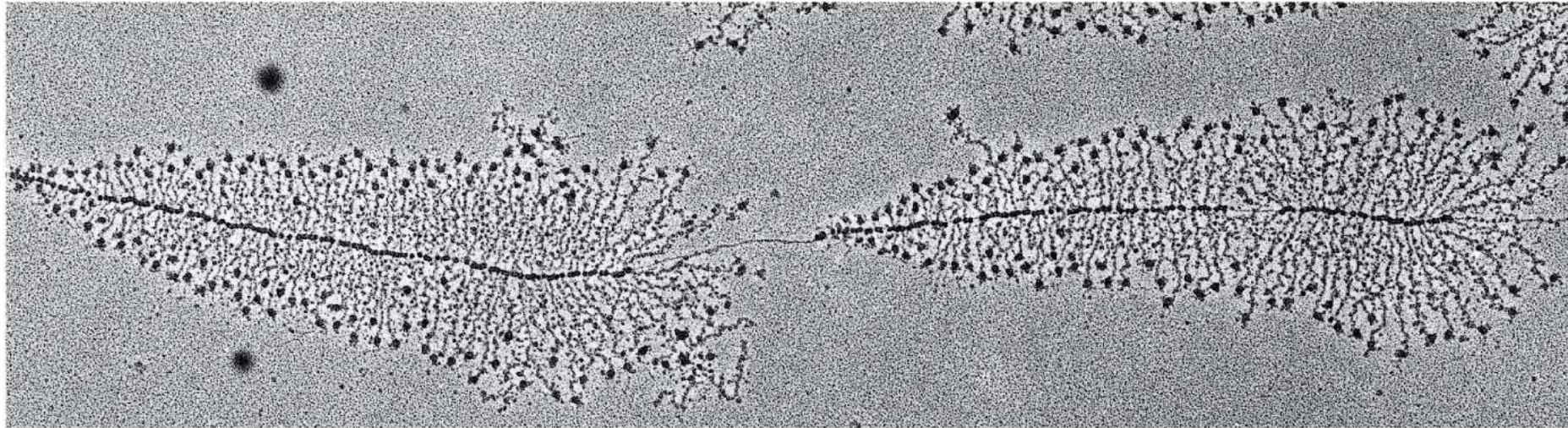


RNA polimerase catalisa a transcrição

ligações **fosfodiéster** entre ribonucleosídeos trifosfatos no sentido 5' → 3'



# Transcrição de Dois Genes Observada em Microscópio Eletrônico.



1  $\mu\text{m}$

diversas cópias de RNA são feitas  
a partir do mesmo gene

síntese de novo RNA se inicia antes da primeira fita de  
RNA ser terminada ( $>10^3$  transcritos/h)

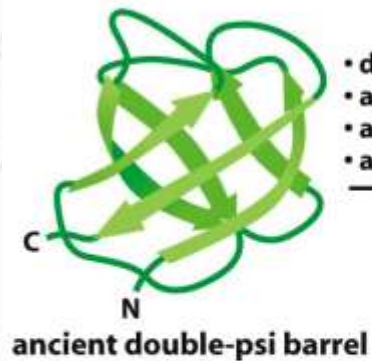
RNA polimerase não precisa de um primer

menor necessidade de precisão

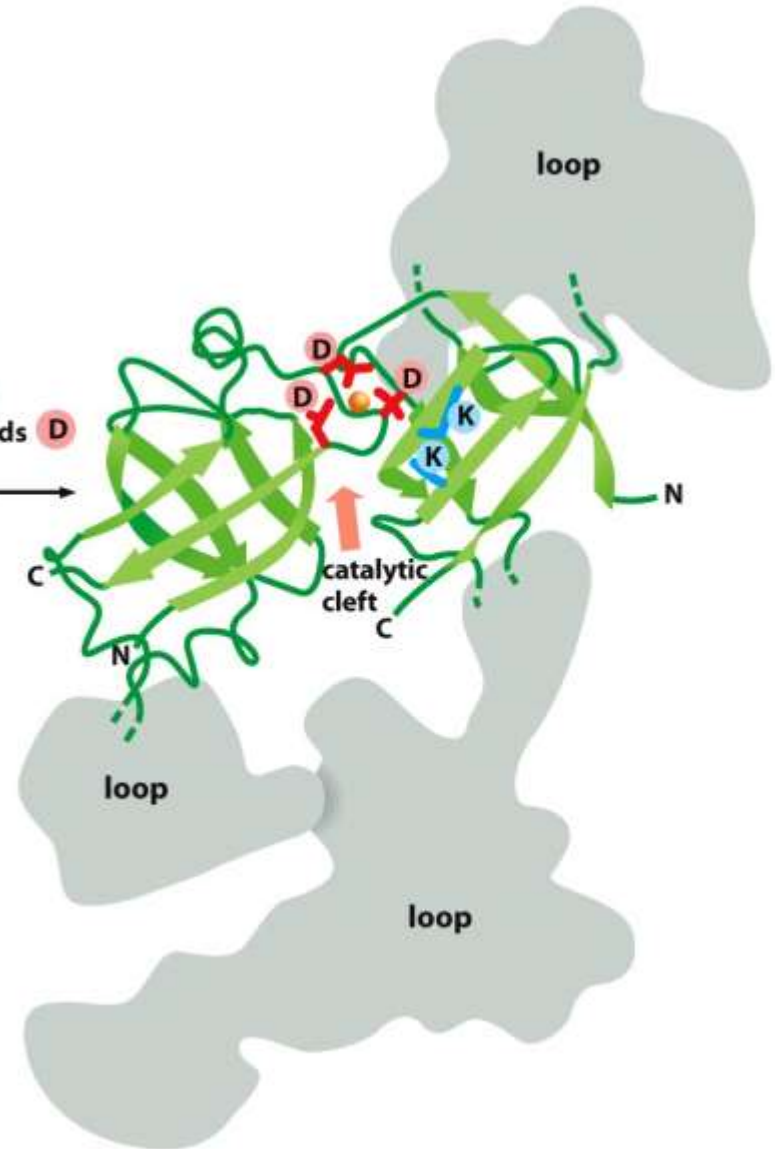


# A Evolução das RNA Polimerases Modernas

RNA polimerase tem um mecanismo de correção de erros: escisão reversa



- dimerization
- acquisition of lysines K
- acquisition of aspartic acids D
- acquisition of loops



RNA polimerases e DNA polimerases surgiram independentemente durante a evolução

# Células Produzem Diversos Tipos de RNA

**Table 6–1 Principal Types of RNAs Produced in Cells**

TYPE OF RNA	FUNCTION
mRNAs	messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids
snRNAs	small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA

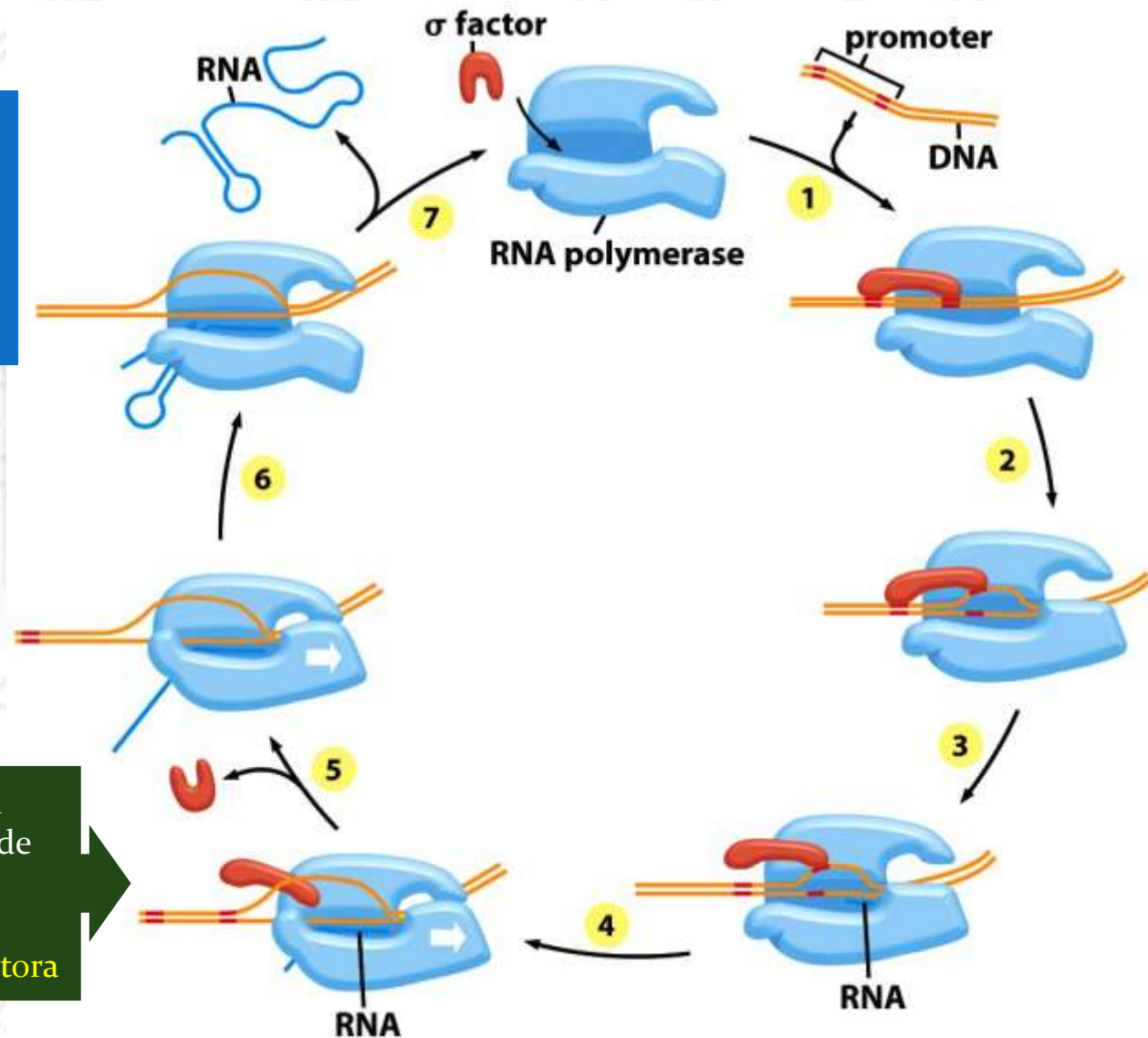
RNA que codifica proteínas: mRNA

grande parcela dos RNAs transcritos tem o próprio RNA como produto final:  
rRNA, tRNA, snRNA

# O Ciclo de Transcrição da RNA Polimerase

RNA polimerase deve saber onde começar e terminar uma transcrição

mecanismo  $\neq$  em bactérias e eucariotos

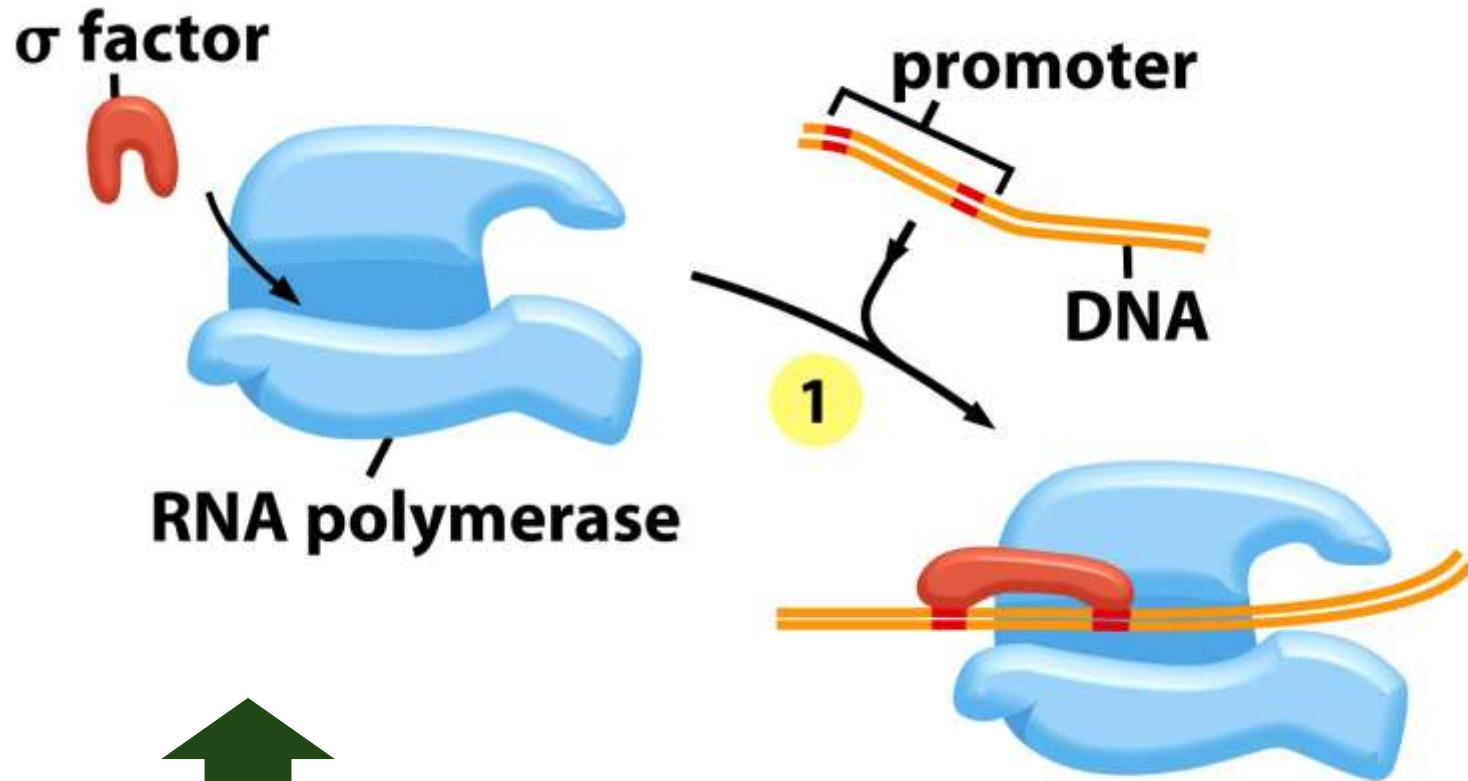


RNA polimerase bacteriana é um complexo contendo uma subunidade destacável fator sigma ( $\sigma$ )

fator  $\sigma$  reconhece a sequência promotora



# O Reconhecimento da Sequencia Promotora



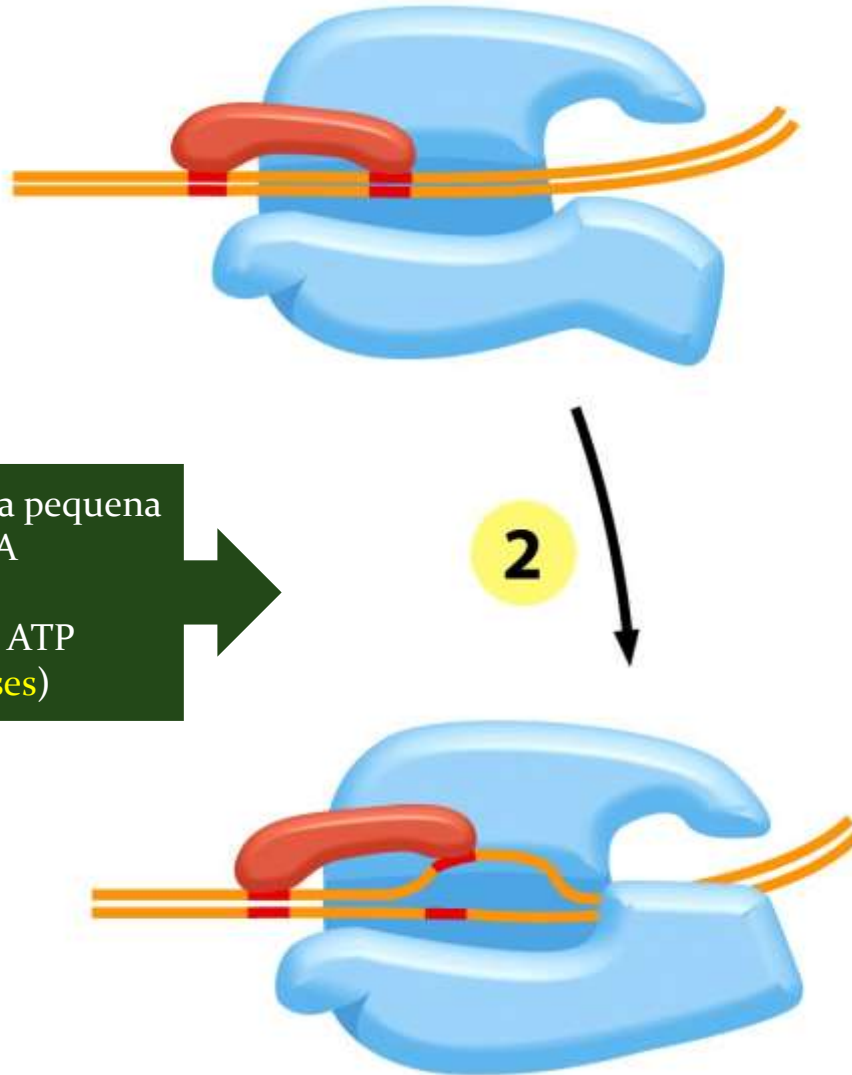
complexo entre **core da polimerase** e o **fator  $\sigma$**  se associa fracamente ao DNA quando colidem

ao encontrar uma **sequencia promotora**: **RNA polimerase** se liga fortemente através do **fator  $\sigma$**

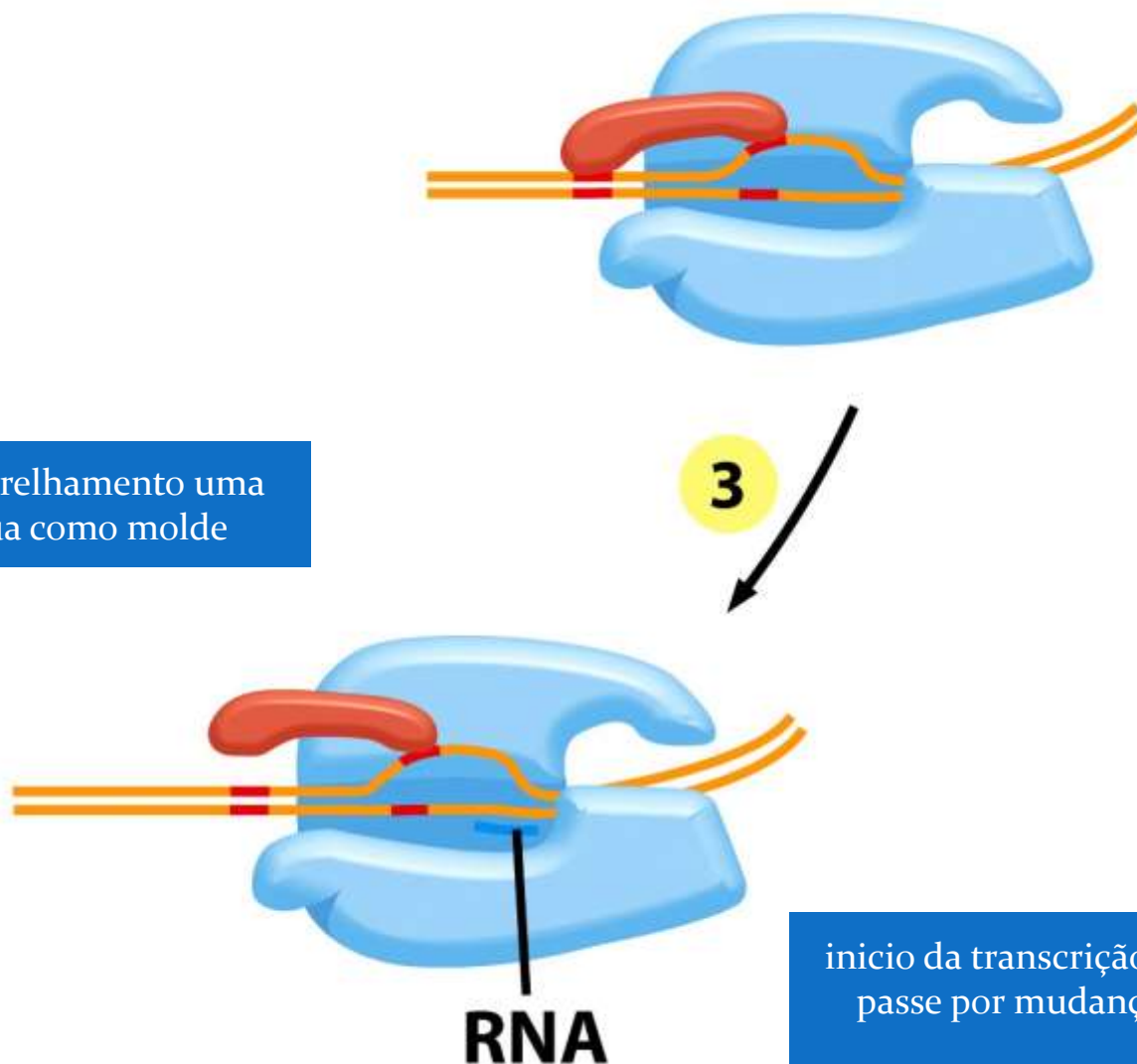
RNA polimerase abre uma pequena extensão do DNA

abertura não requer ATP  
( $\neq$  de DNA Helicases)

2



após desemparelhamento uma das fitas atua como molde

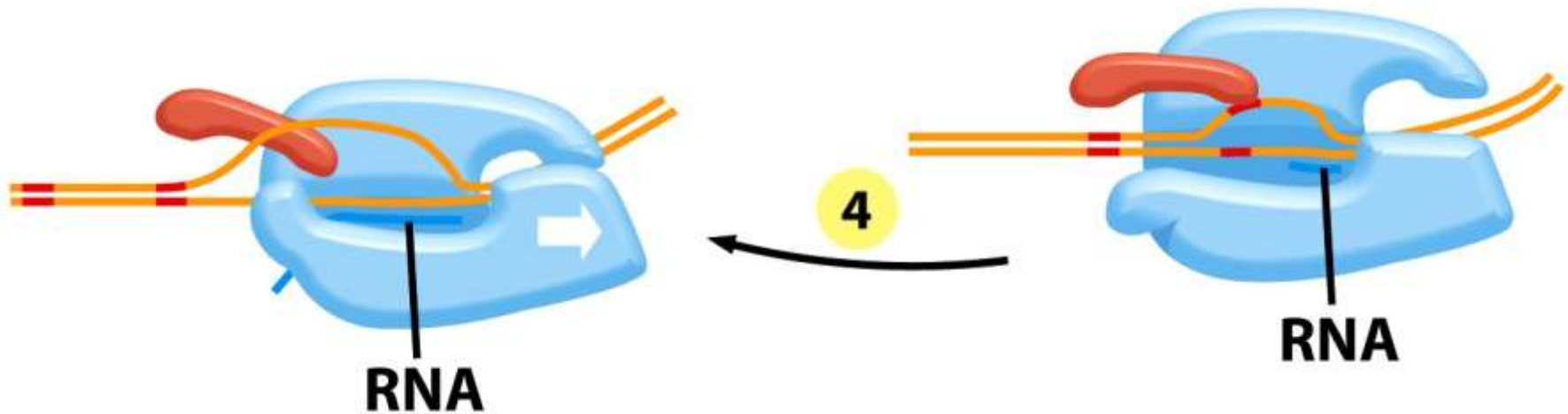


início da transcrição requer que **RNA pol.** passe por mudanças conformacionais

estritamento da enzima em torno do complexo **RNA/DNA**



após **transcrição** dos primeiros 10 nucleotídeos as ligações do **fator  $\sigma$**  com o **promotor** se enfraquecem



**RNA polimerase** começa a se mover

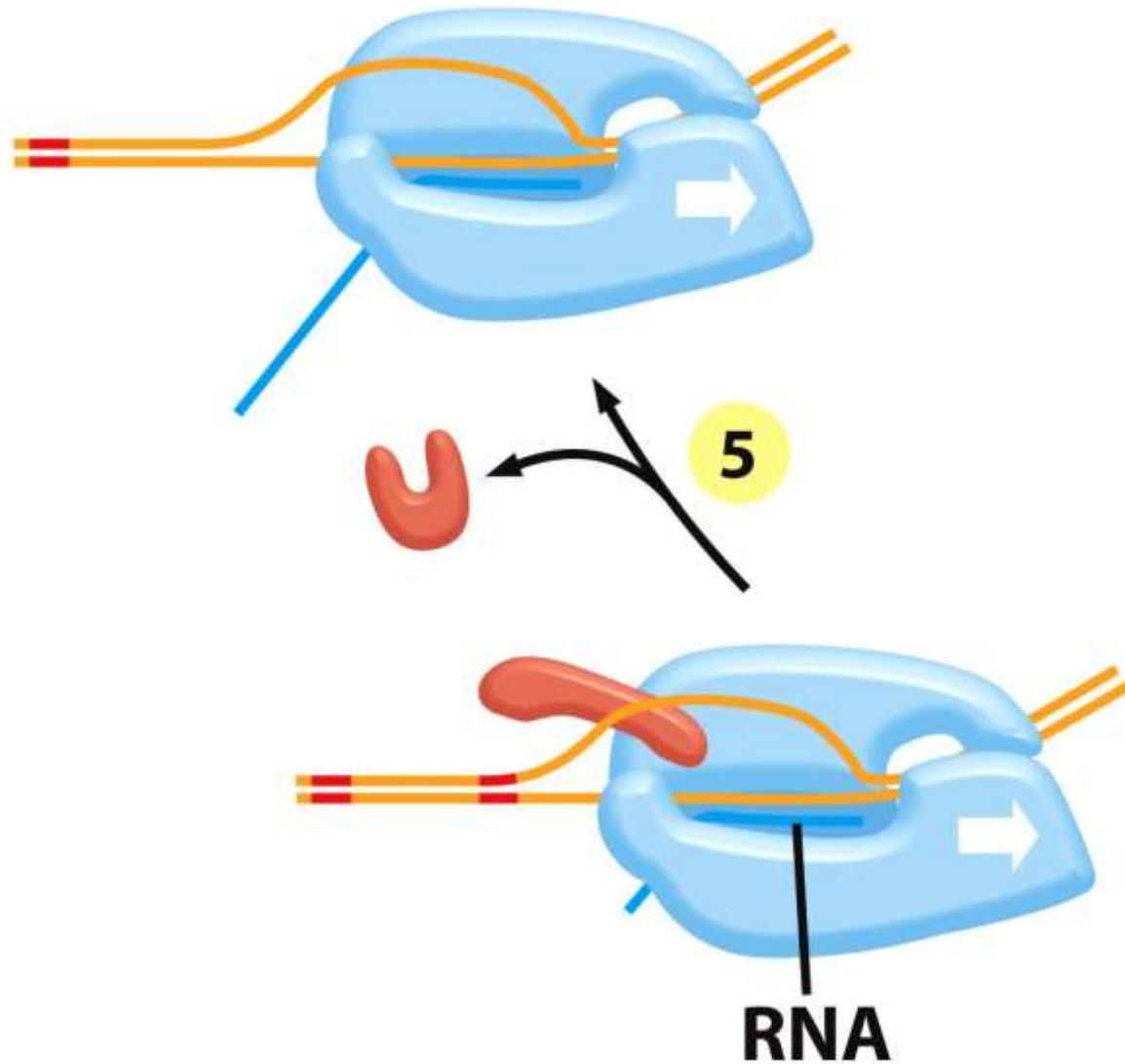
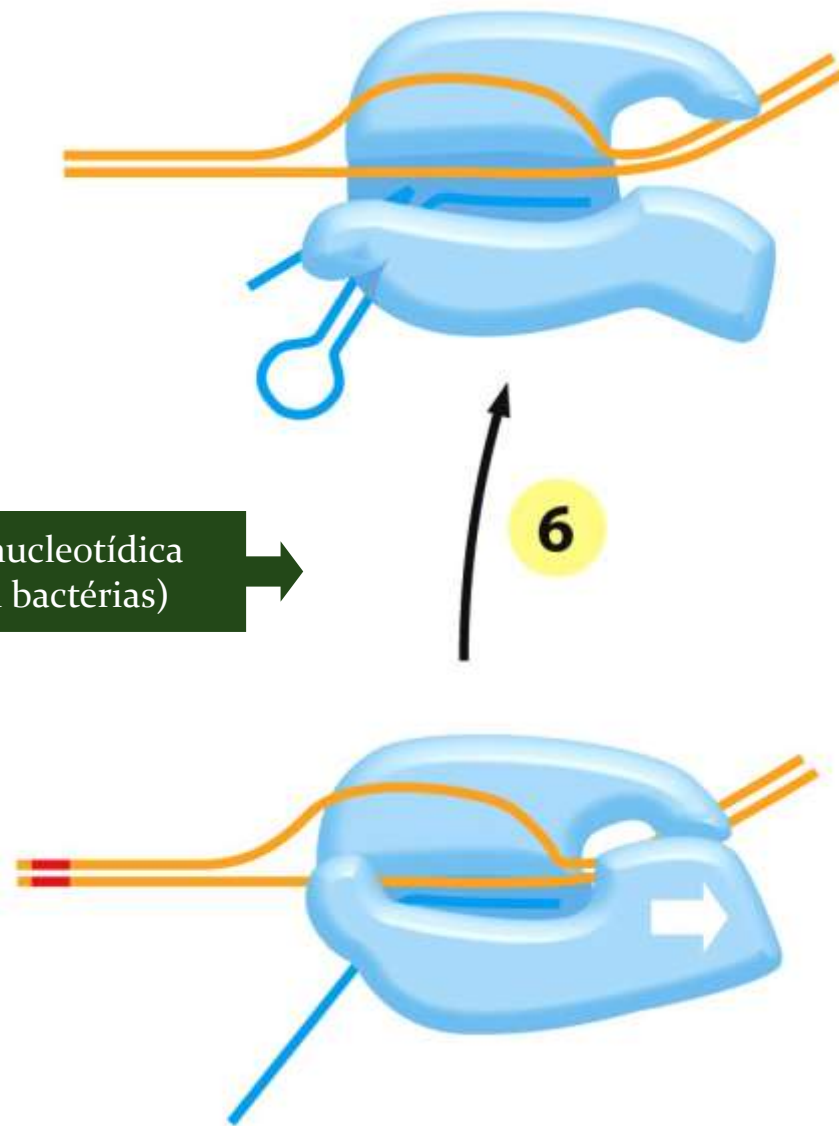


Figure 6-11 (part 5 of 7) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

o **elongamento** da cadeia nucleotídica ocorre a 50 bases/seg (em bactérias)

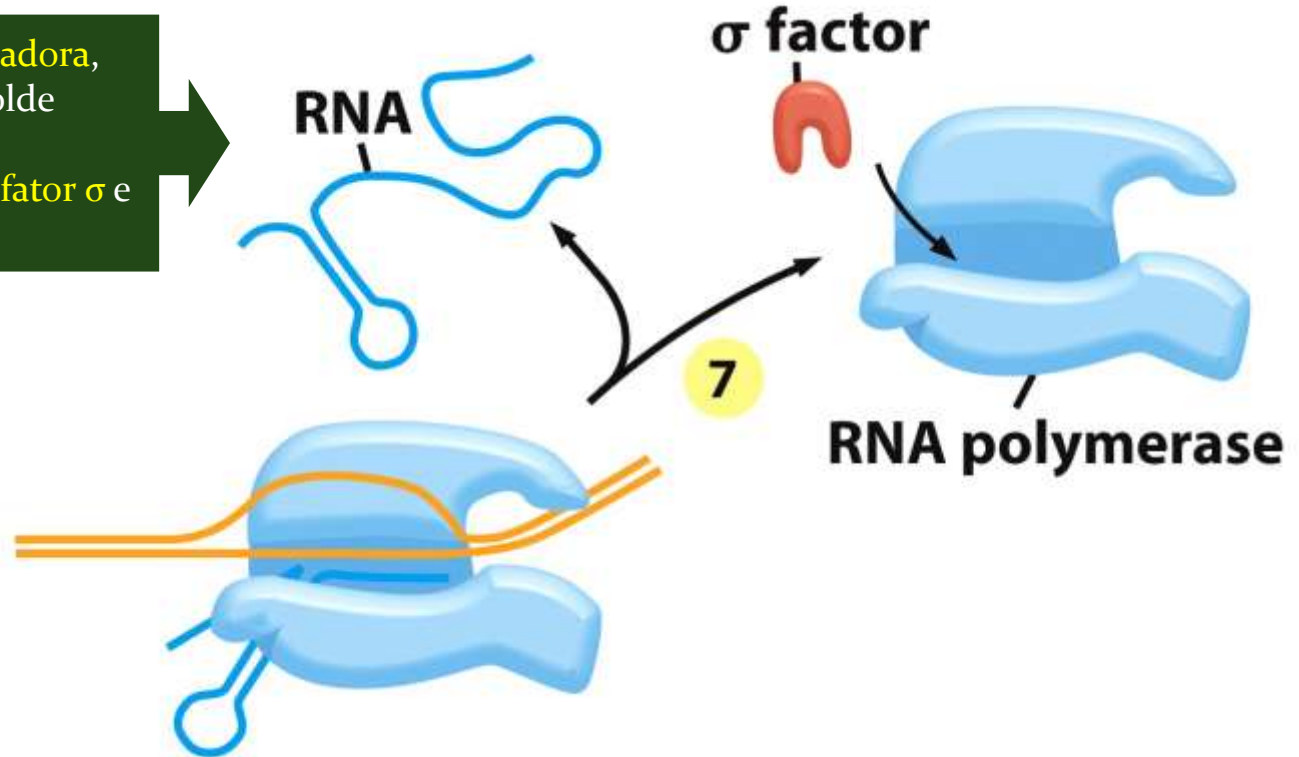




# O Reconhecimento da Sequencia Terminadora

RNA pol. encontra a seq. terminadora,  
liberando o RNA e o DNA molde

core livre se reassocia a um a um fator  $\sigma$  e  
reinicia a transcrição

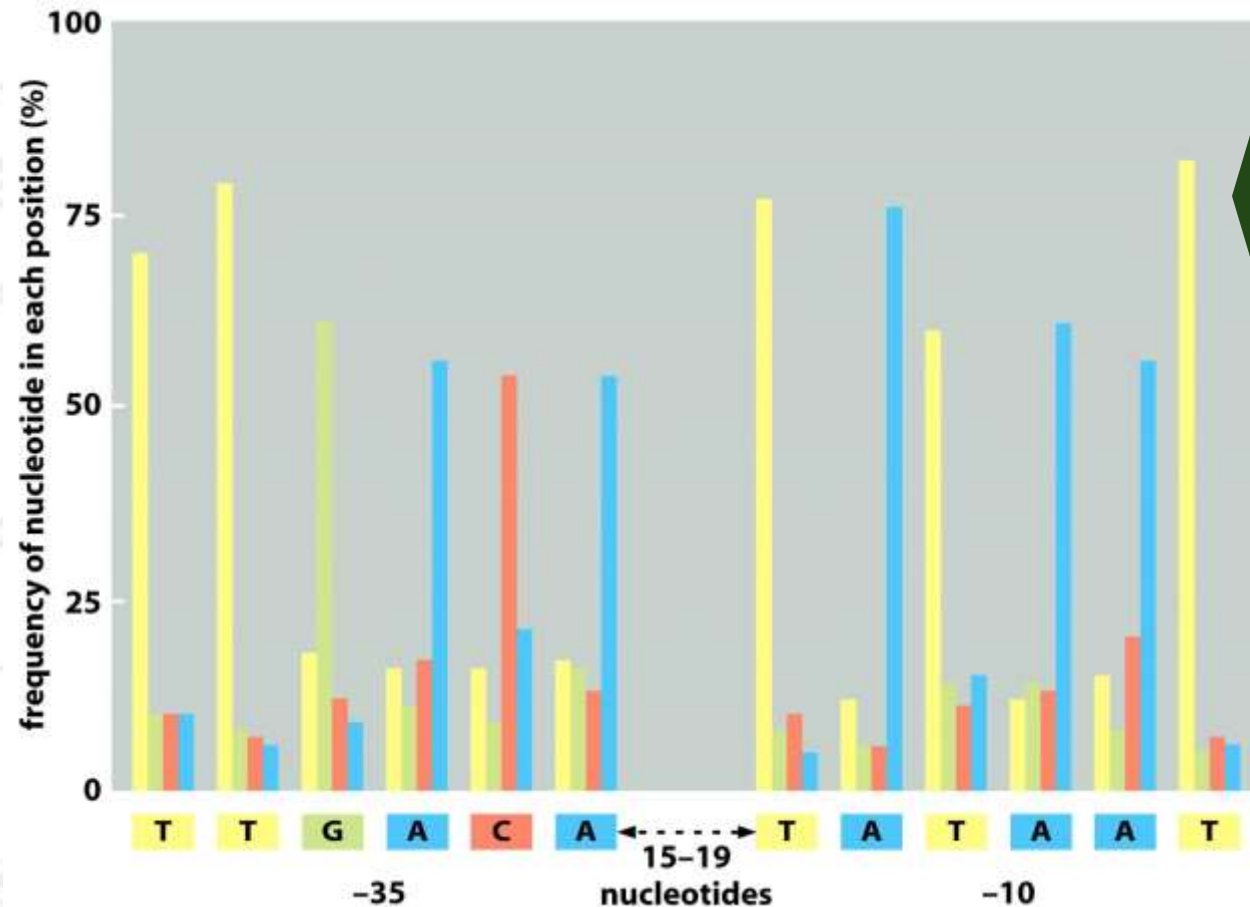


sequência de A-T precedida de seq duas vezes  
simétrica: sinal de terminação!

formação de grampo alavanca o RNA do sítio  
ativo

# Sequências Promotoras são Heterogêneas

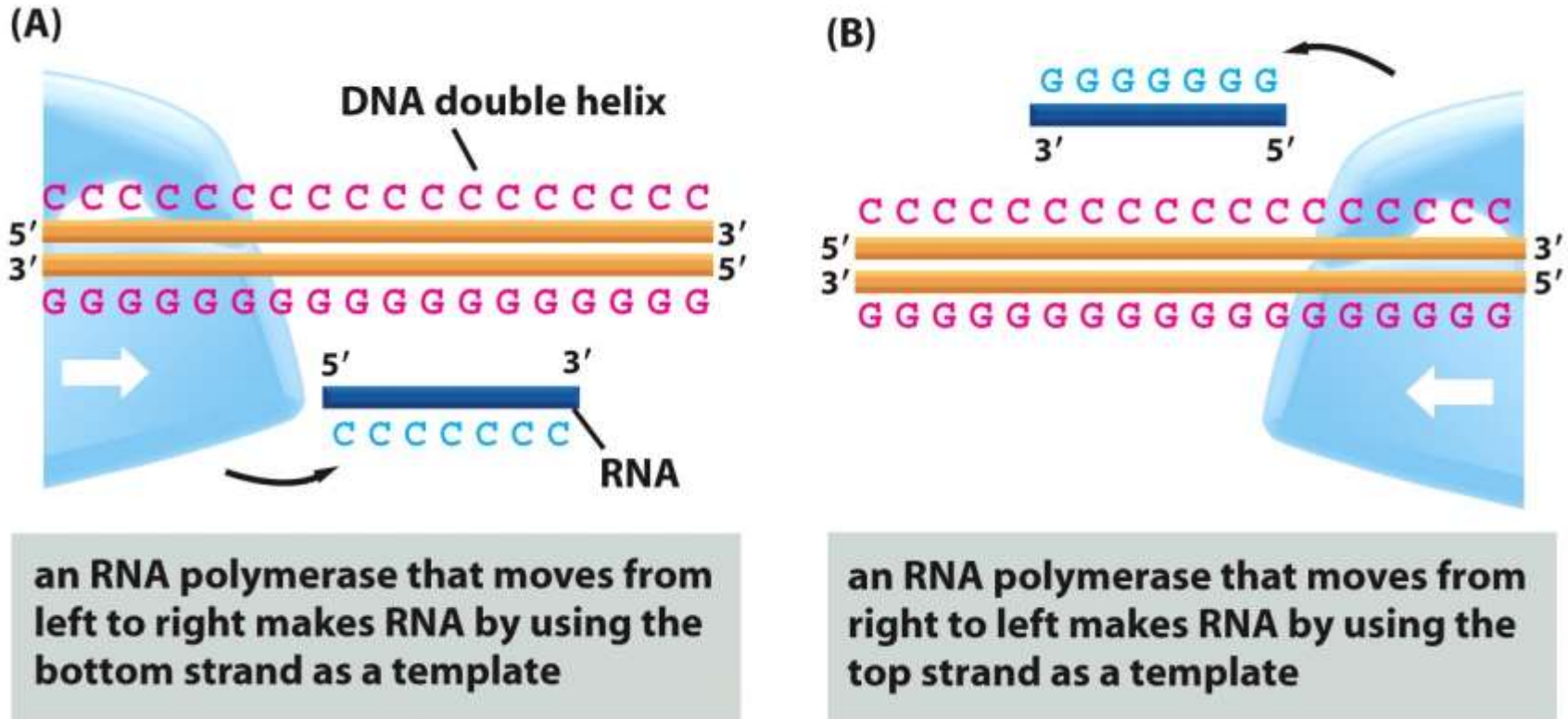
**promotores:** duas sequências hexaméricas flanqueando o início da **transcrição** (designada +1)



**sequências consenso** reconhecidas pelo fator  $\sigma$

variabilidade da **sequência consenso** determina a força do **promotor** (início de **transcrição**/intervalo de tempo)

# A Importância da Orientação

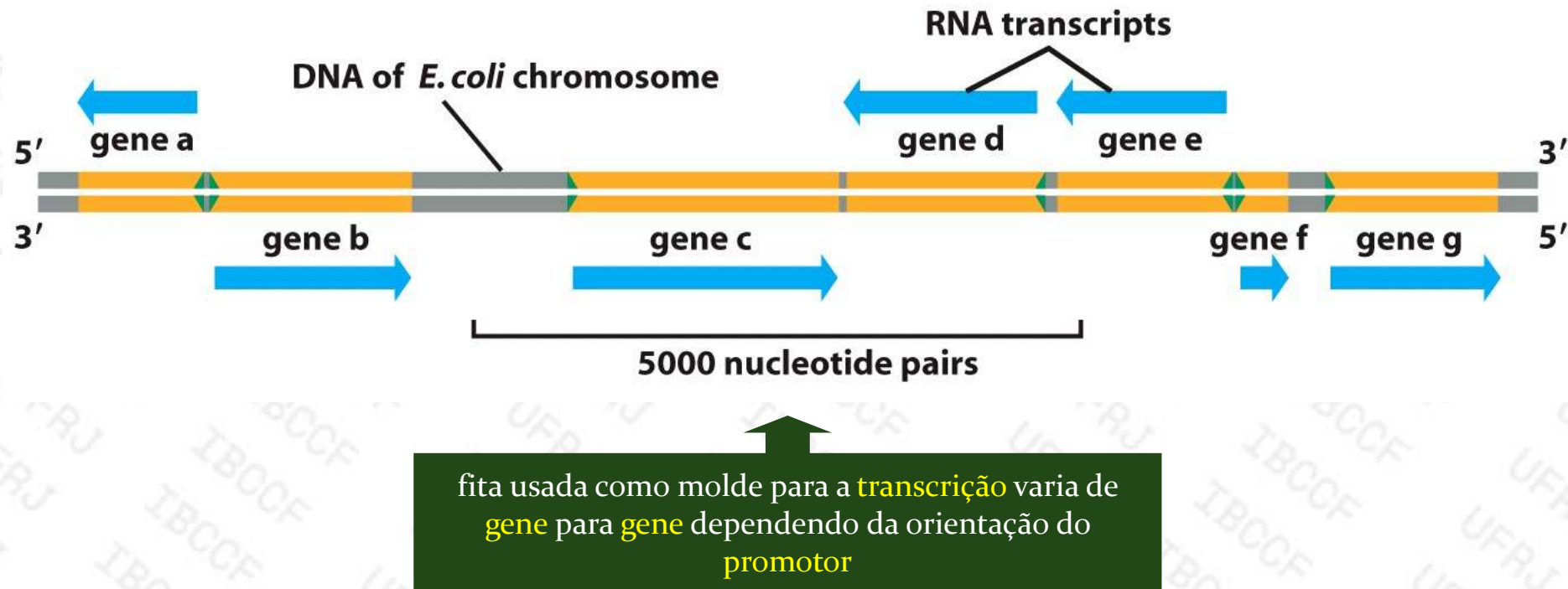


genes tem apenas um **promotor** assimétrico e a **transcrição** ocorre no sentido 5' → 3'

**transcrição** de um **gene** ocorre em apenas uma das duas fitas do DNA



# Direção da Transcrição em uma Pequena Porção do DNA Bacteriano



**Table 6–2 The Three RNA Polymerases in Eucaryotic Cells**

TYPE OF POLYMERASE	GENES TRANSCRIBED
RNA polymerase I	5.8S, 18S, and 28S rRNA genes
RNA polymerase II	all protein-coding genes, plus snoRNA genes, miRNA genes, siRNA genes, and most snRNA genes
RNA polymerase III	tRNA genes, 5S rRNA genes, some snRNA genes and genes for other small RNAs

The rRNAs are named according to their “S” values, which refer to their rate of sedimentation in an ultracentrifuge. The larger the S value, the larger the rRNA.

células eucarióticas possuem 3 RNA pol.: I, II e III

RNA pol II transcreve genes codificando para proteínas

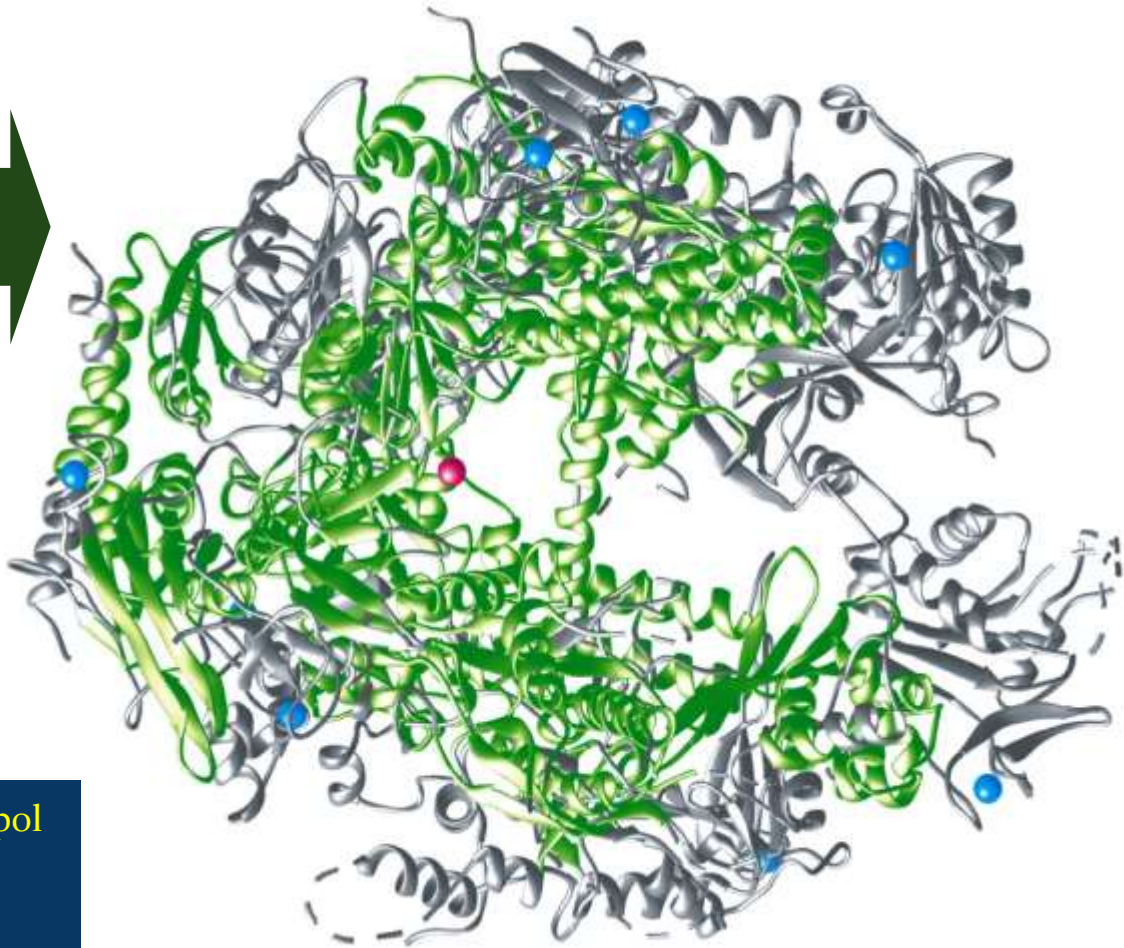
# Similaridade Estrutural Entre RNA Polimerase Bacteriana e Eucariótica

verde: regiões com estruturas similares

cinza: região extra da **polimerase** eucariótica

azul: Zn que serve como componentes estruturais da **polimerase**

vermelho: Mg presente no sitio ativo onde ocorre a polimerização



RNA pol bacteriana requer **fator  $\sigma$**  e a RNA pol eucariótica requer **fatores de transcrição**

**transcrição** em eucariotos deve lidar com o empacotamento **nucleossomal!**



# A Iniciação da Transcrição de um Gene pela RNA Polimerase II em Eucariotos

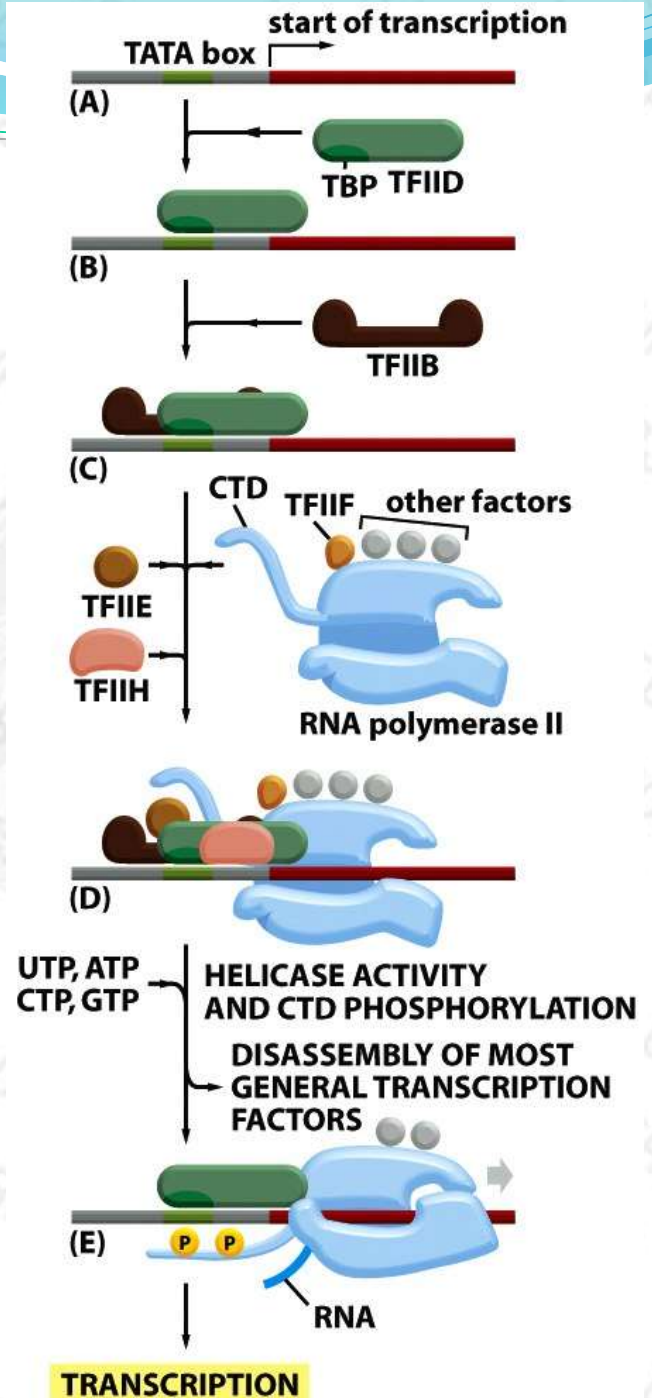
## FATORES DE TRANSCRIÇÃO:

1. posicionam a **polimerase** no **promotor**
2. ajudam a afastar as fitas de **DNA**
3. ajudam a liberar a **RNA pol.** na fase de **elongamento**

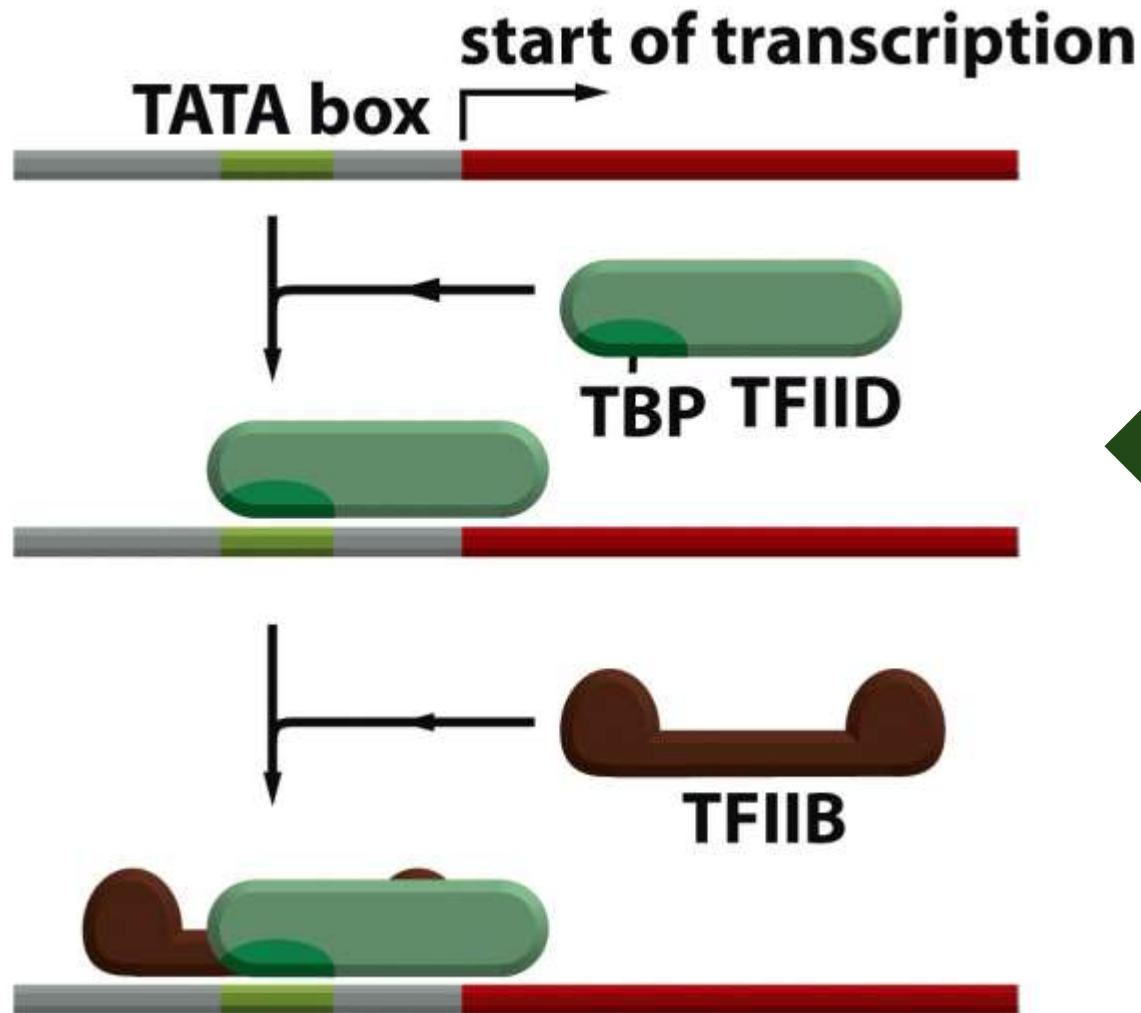
agem em todos os **promotores** usados pela **RNA pol. II**

set de proteínas designadas como **TFII\_**

função semelhante a do **fator  $\sigma$**





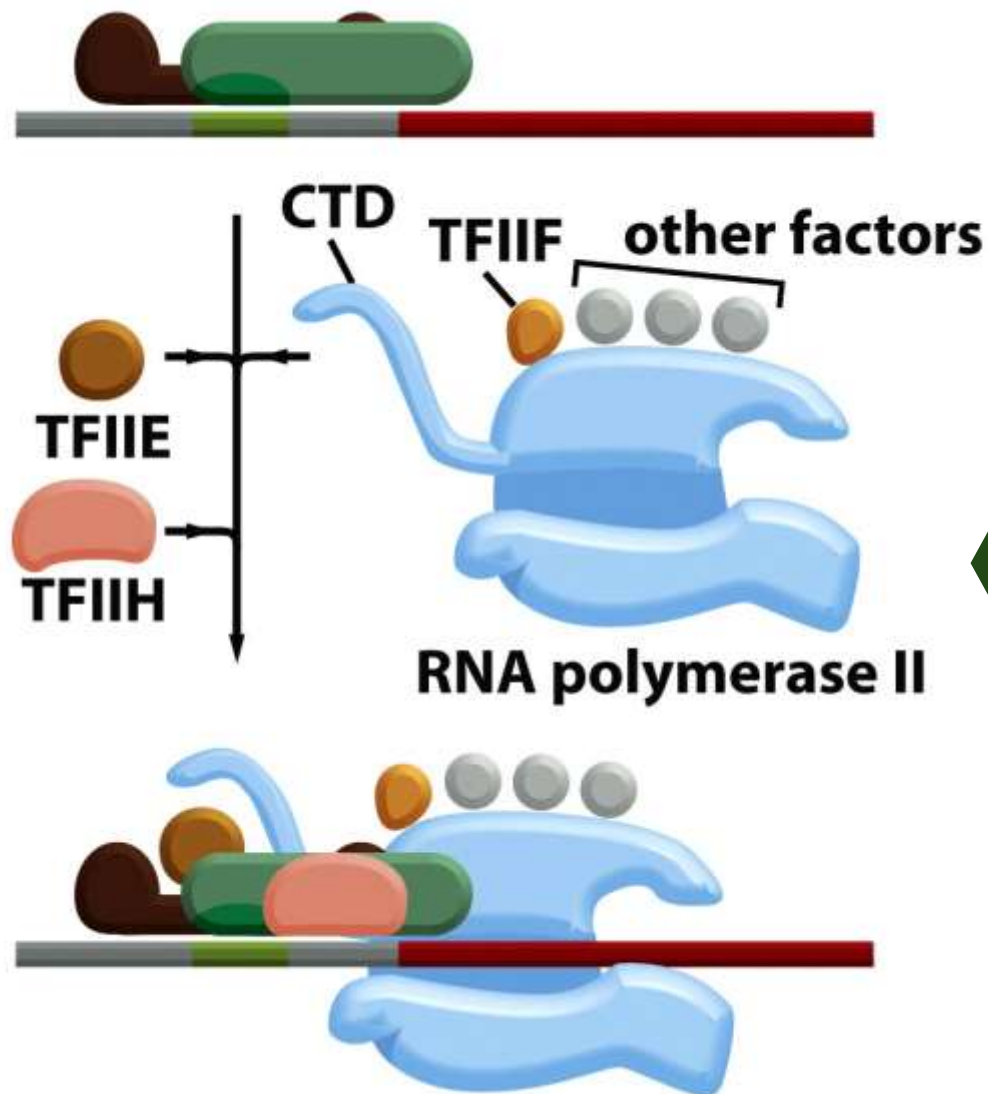


TFIID se liga ao **TATA Box** (rica em T-A!!)

**TATA Box** a 25 bases do início da transcrição

**TBP:** *TATA binding protein*

ligação leva a distorção no DNA do **TATA box** (sinal físico de **promotor** ativo!)



outros fatores se complexam

TFIIH possui nove subunidades (tão grande quanto a polimerase!)

TFIIH possui papel chave

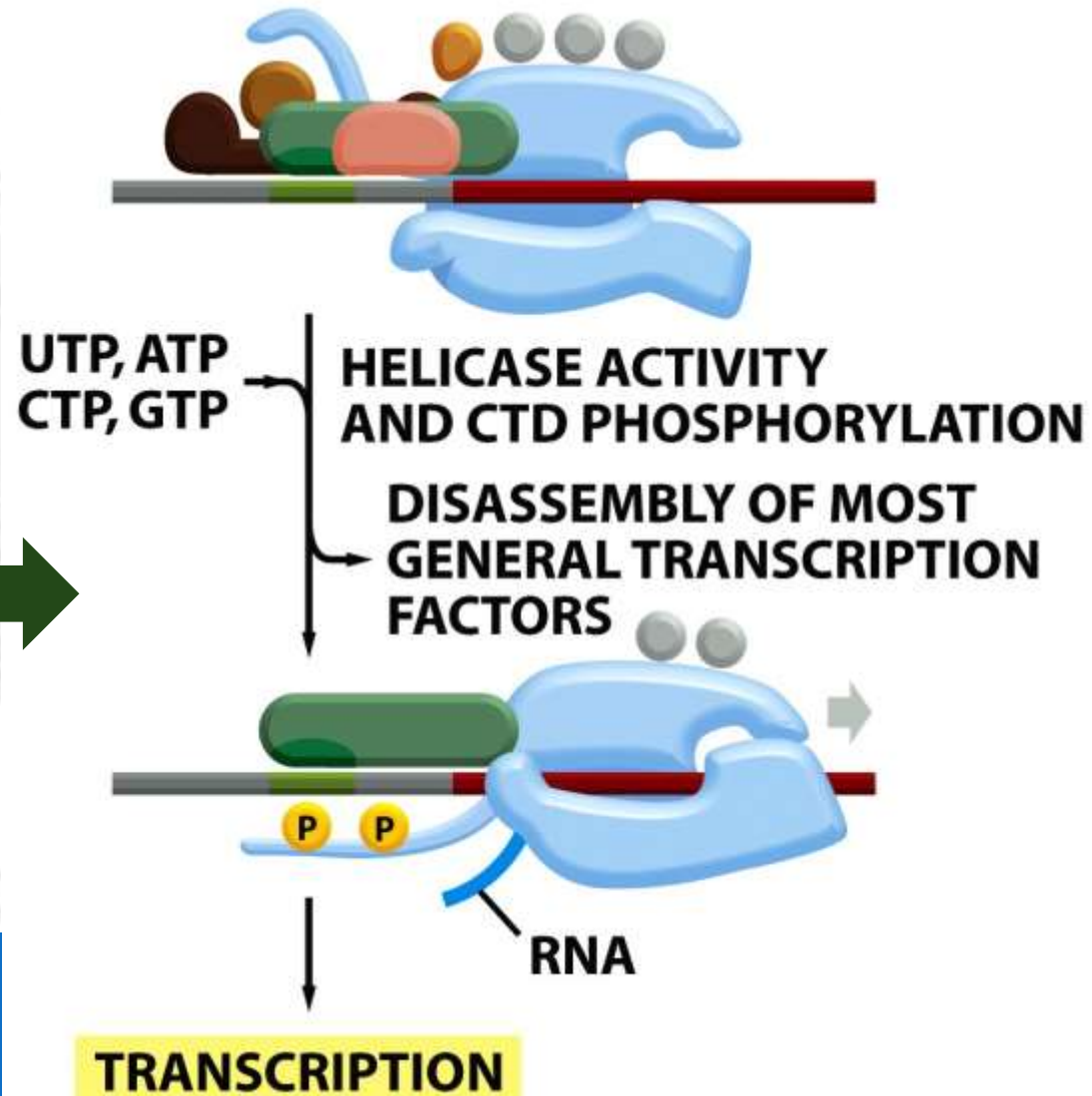
Complexo de Iniciação da Transcrição

# Início da Transcrição Depende de Mudanças Conformacionais da RNA Polimerase II

TFIIH: papel de **helicase** e **cinase**

fosforilação de serinas específicas no  
**CTD**

modificações estruturais na **RNA pol. II**  
permitem a liberação dos **fatores**



# Fatores Gerais de Transcrição Requeridos para Início da Transcrição pela RNA Polimerase II Eucariotica

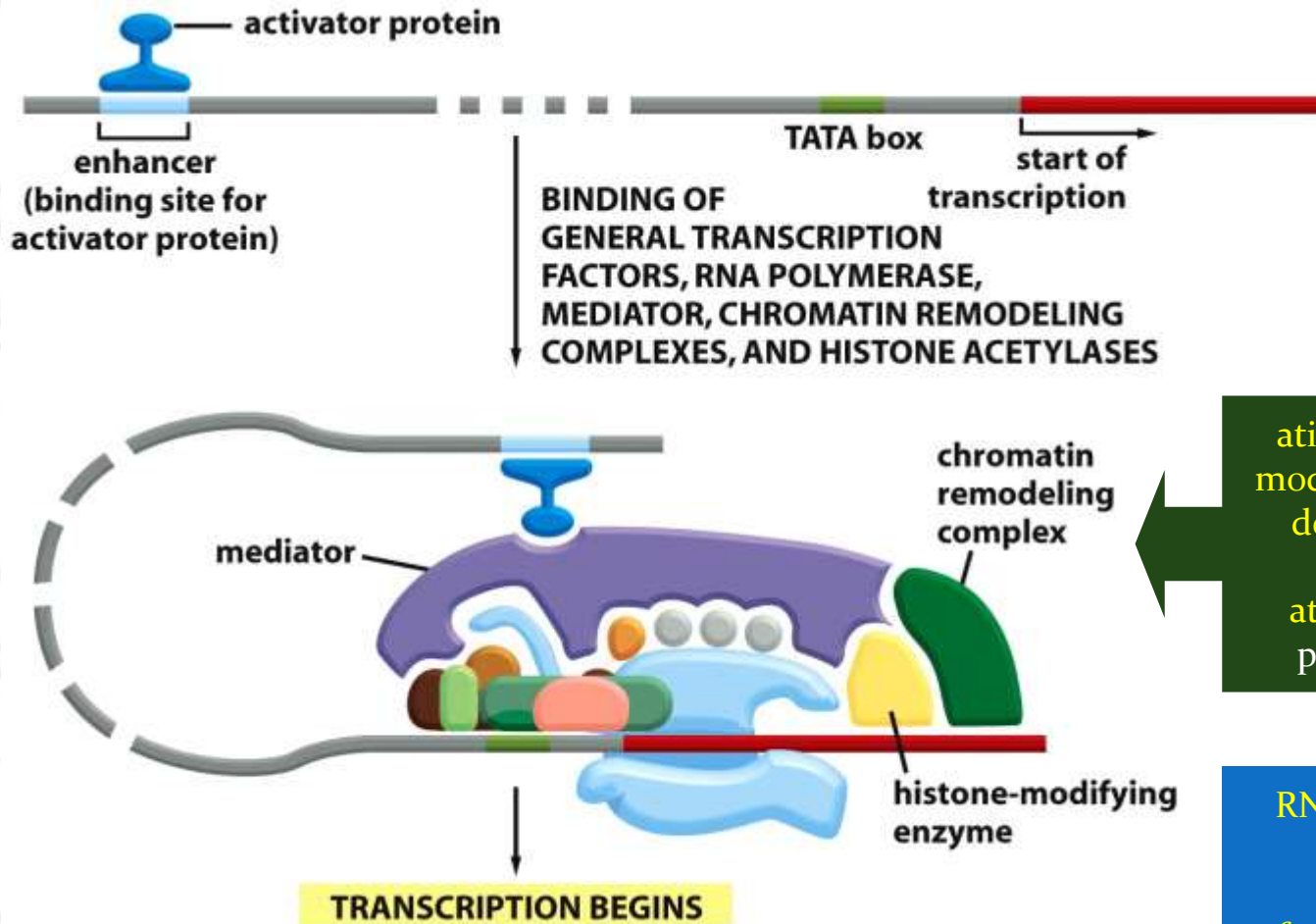
**Table 6–3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eucaryotic RNA Polymerase II**

NAME	NUMBER OF SUBUNITS	ROLES IN TRANSITION INITIATION
<b>TFIID</b> TBP subunit	1	recognizes TATA box
TAF subunits	~11	recognizes other DNA sequences near the transcription start point; regulates DNA-binding by TBP
<b>TFIIB</b>	1	recognizes BRE element in promoters; accurately positions RNA polymerase at the start site of transcription
<b>TFIIF</b>	3	stabilizes RNA polymerase interaction with TBP and TFIIB; helps attract TFIIE and TFIIH
<b>TFIIE</b>	2	attracts and regulates TFIIH
<b>TFIIH</b>	9	unwinds DNA at the transcription start point, phosphorylates Ser5 of the RNA polymerase CTD; releases RNA polymerase from the promoter

TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.



# Polimerase II Também Requer Ativador, Mediador, e Proteínas de Modelação da Cromatina



ativador, mediador, proteínas de modificação de histonas, complexo de remodelagem da cromatina

ativador atrai a RNA pol para o ponto de início da transcrição

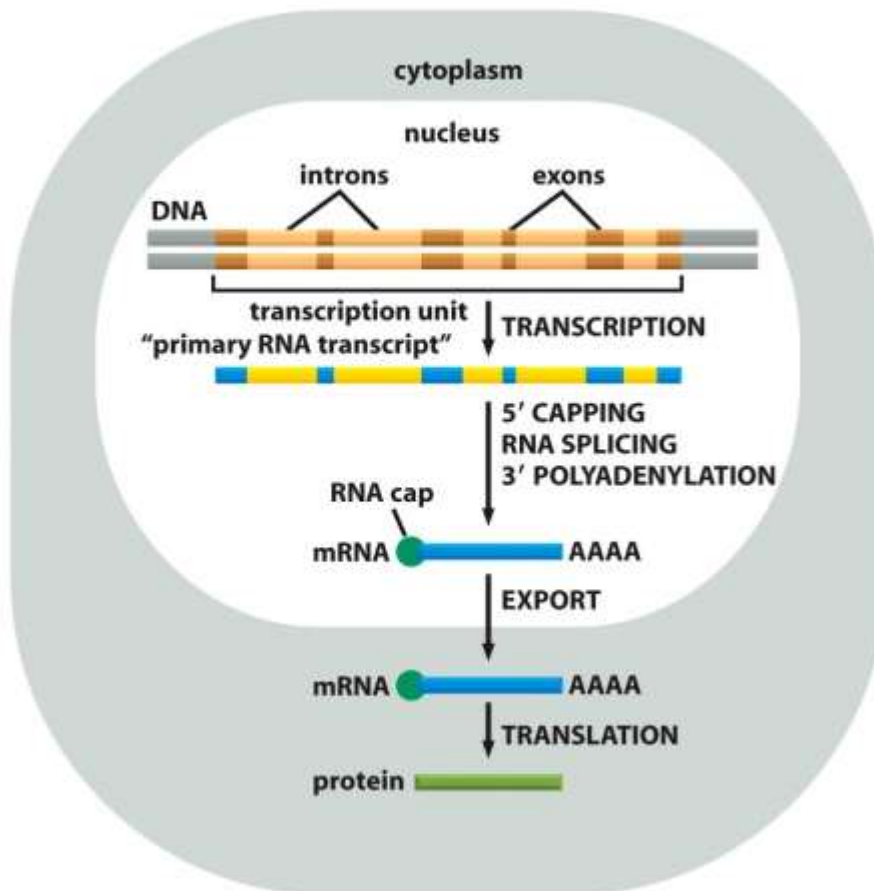
RNA pol na fase de alongamento avança de forma irregular

fatores de alongamento evitam a dissociação

# Passos que levam do Gene a Proteína em Eucariotos e Bactérias

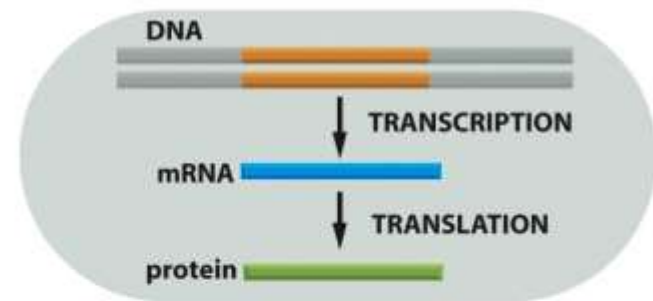
(A)

## EUCARYOTES



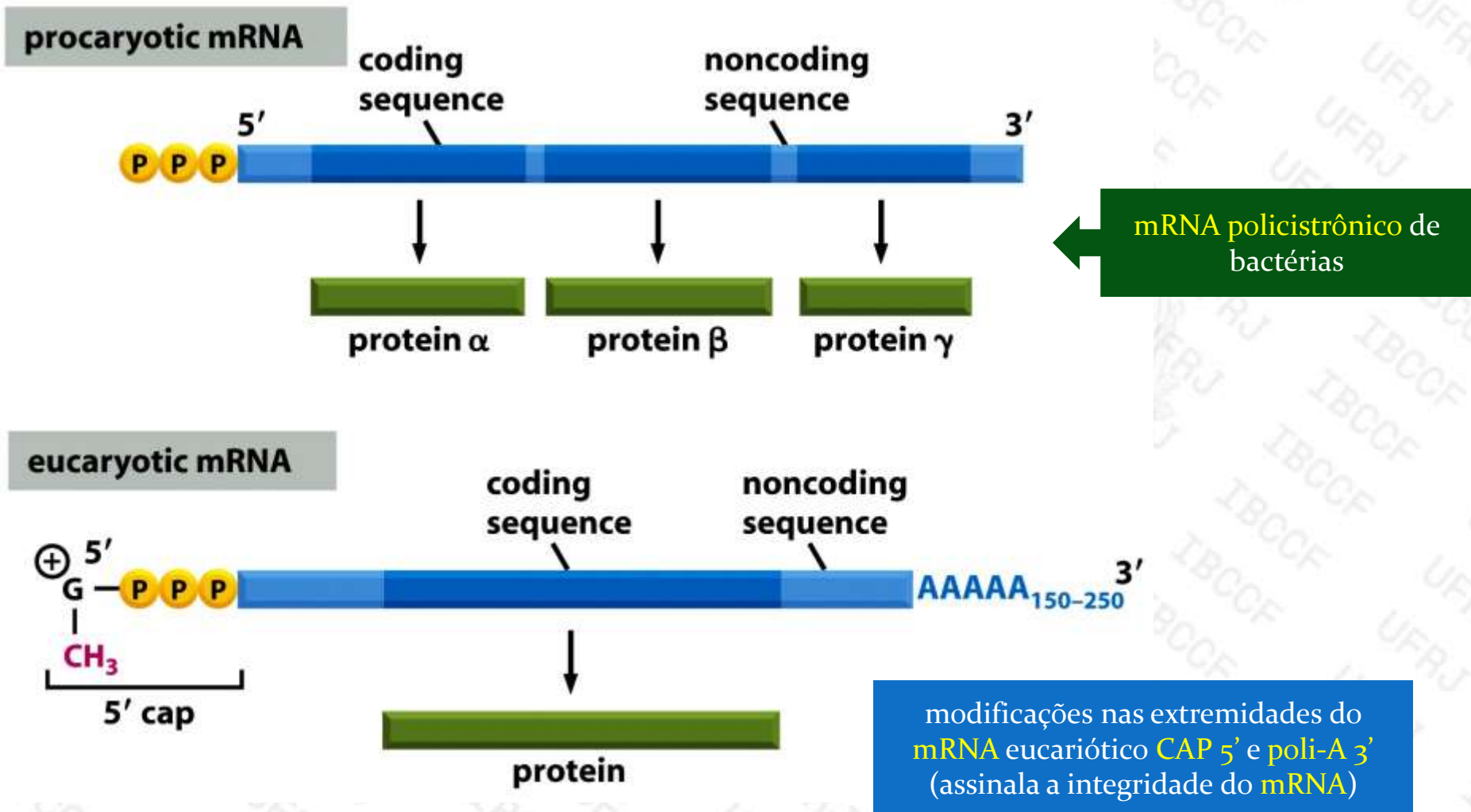
(B)

## PROCARYOTES



em eucariotos a **transcrição** é apenas o primeiro passo na produção do **mRNA**  
**splicing** + **modificação das extremidades**

# Comparação das Estruturas do mRNA de Procariotos e Eucariotos



# RNA Polimerase II como uma Fábrica de RNA em Eucariotos

processamento paralelo ao alongamento

**CTD**: sequências repetidas de 7 aminoácidos com 2 serinas em cada

serinas 5 fosforiladas por **TFIIH** atraem proteínas do “**Capping**”

fosforilação nas serinas 2 atraem proteínas de processamento do 3' do **RNA** e de **splicing**

algumas destas proteínas são transferidas ao **pré-mRNA** nascente

ao fim da transcrição a **RNA polimerase** é defosforilada

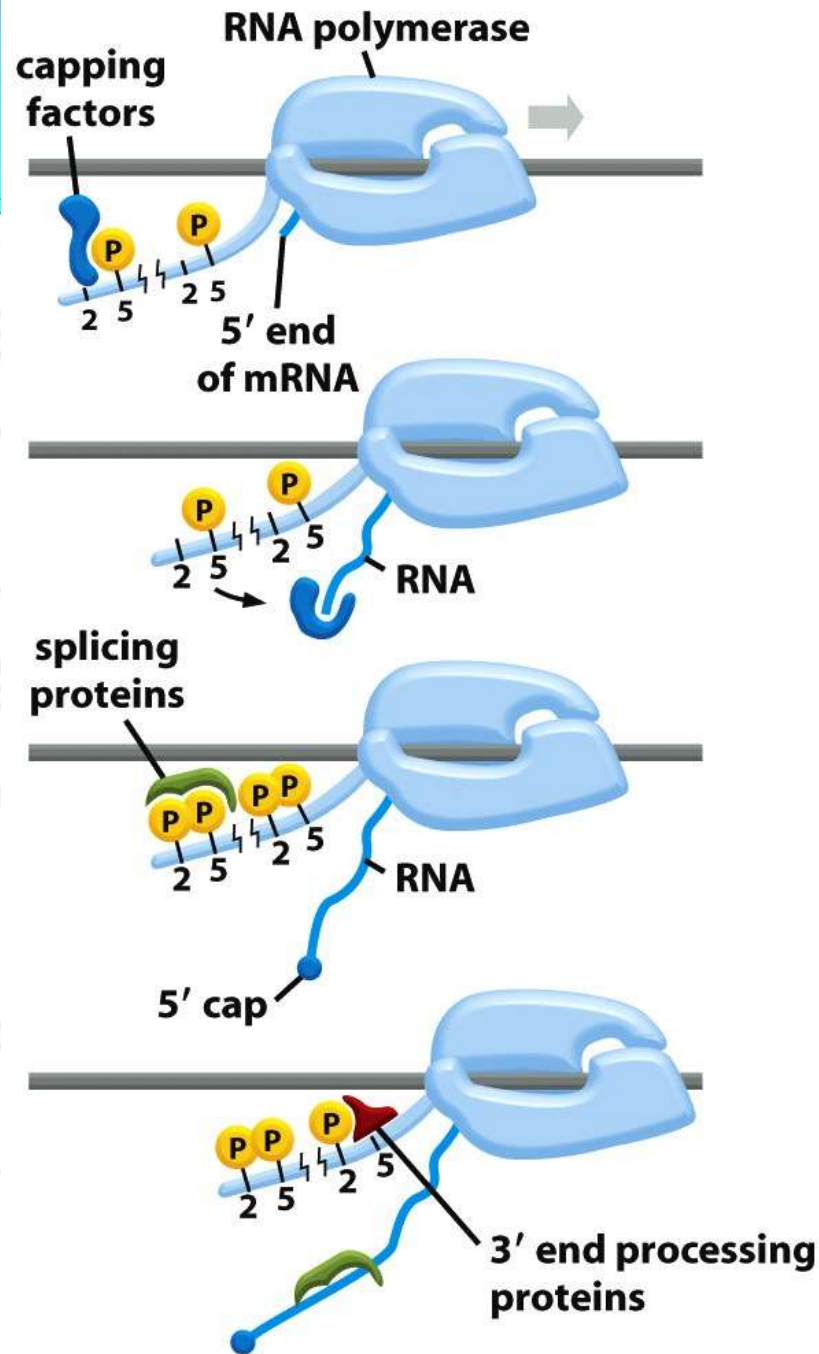


Figure 6-23 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Capping do RNA é a Primeira Modificação do Pré-mRNA Eucariotico

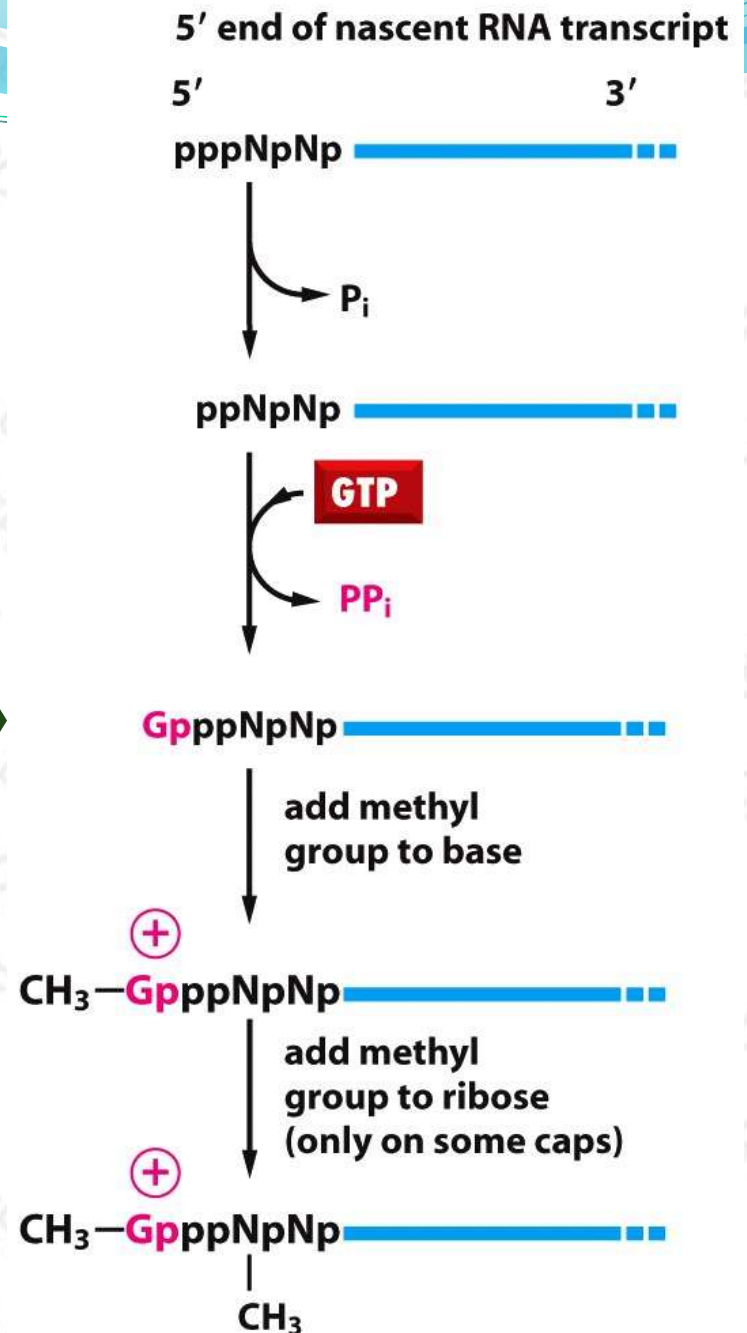
três enzimas participam na adição do **CAP** (nucleotideo guanina modificado)

01. **fosfatase** defosforila o 5' do **RNA** nascente
02. **guanilil-transferase** adiciona GMP
03. **metil-transferase** adiciona um metil a guanosina

se associam a cauda da **RNA pol. II**

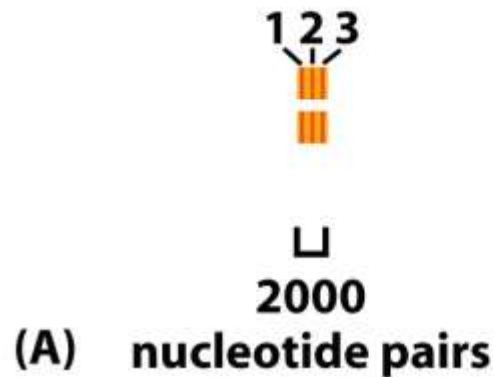
as três enzimas se ligam ao **CTD** quando **Ser5** esta fosforilada!

**CAP** marca a extremidade 5' de um **mRNA**



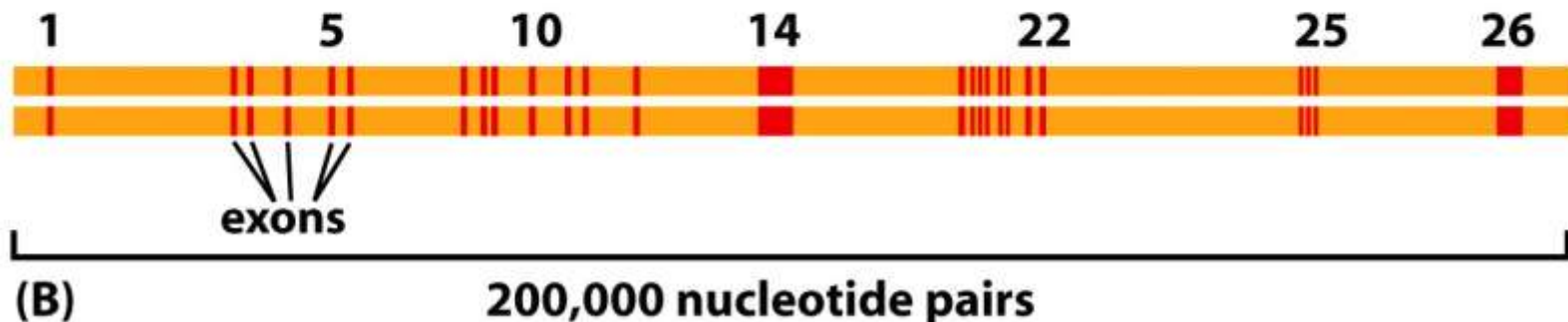
# o Splicing do RNA Remove *Introns* dos Pré-mRNAs Recém Transcritos

## human $\beta$ -globin gene



genes eucariotos são fragmentados  
grandes sequências não-codificantes (*Introns*)  
sequências codificantes (*Exons*)  
ambos são transcritos em um pré-RNA  
remoção por *splicing*

## human Factor VIII gene



# A Reação de *Splicing* do Pré RNA

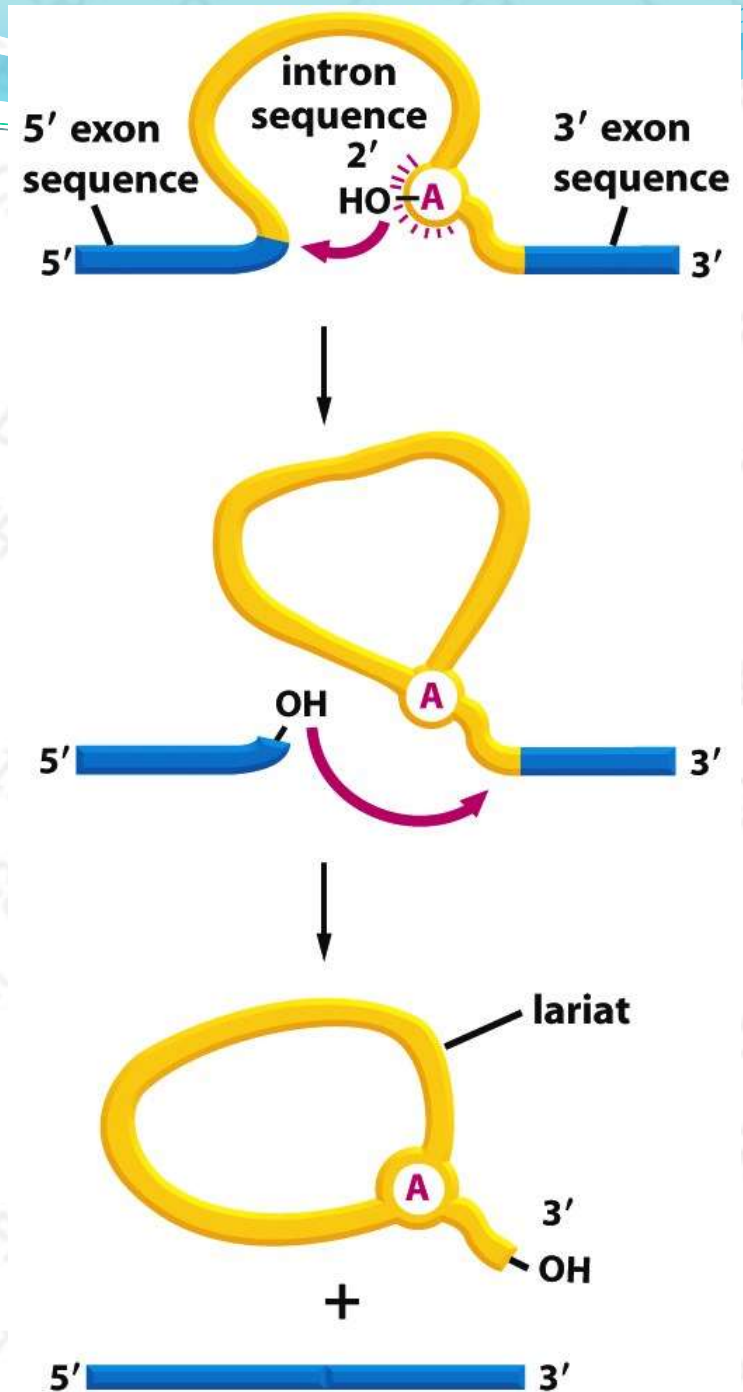
cada *splicing* remove um **intron** em duas reações de transferência de fosforila (**transesterificações**)

**Intron** é removido com um **laço** juntando dois **exons**

maquinaria de *splicing* consiste de 5 moléculas de **RNA**, mais de 200 proteínas e requer **ATP**

precisão e maleabilidade

arranjo **exon-intron** tem importância evolutiva (novas proteínas!)



# O Splicing Alternativo e a Ampliação do Repertório Proteico

transcritos primários podem ser processados por *splicing* de diferentes formas

proteínas diferentes!

processamento diferente do mesmo **gene** em células diferentes!

ex: isoformas de **tropomiosina**

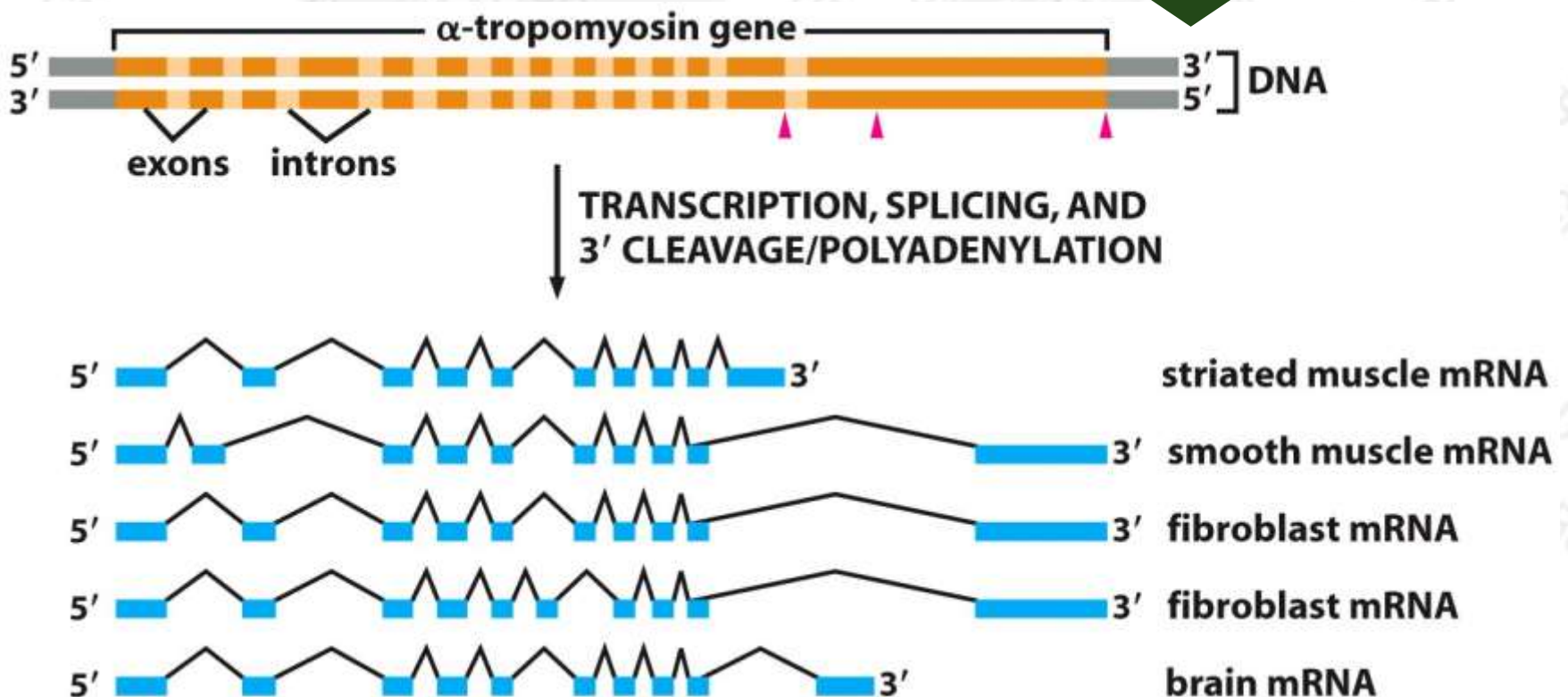
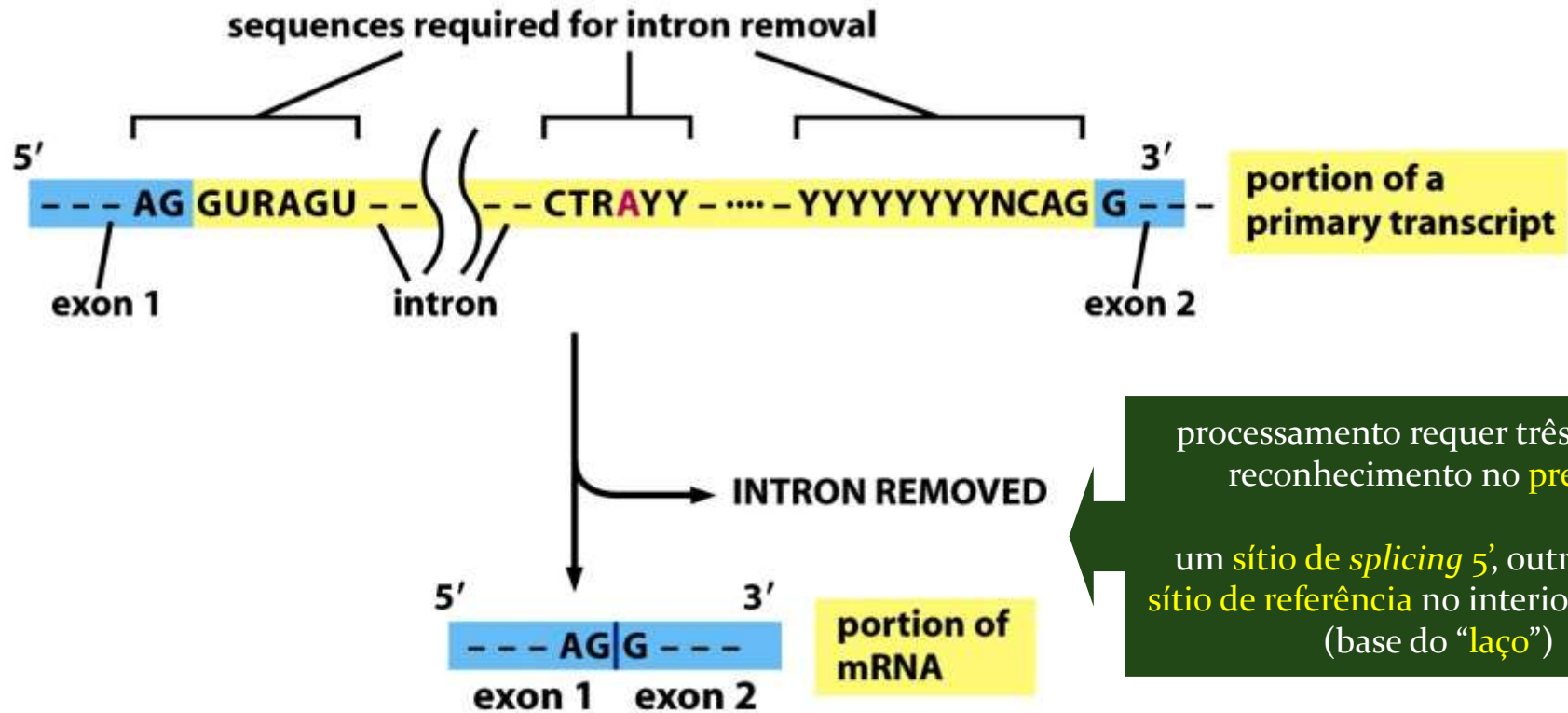


Figure 6-27 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Sequências Nucleotídicas Marcam Onde Ocorre o *Splicing*



alta variabilidade das sequências  
consenso de *splicing* (desafio a  
genômica)

# Dois Tipos de Erro de *Splicing*

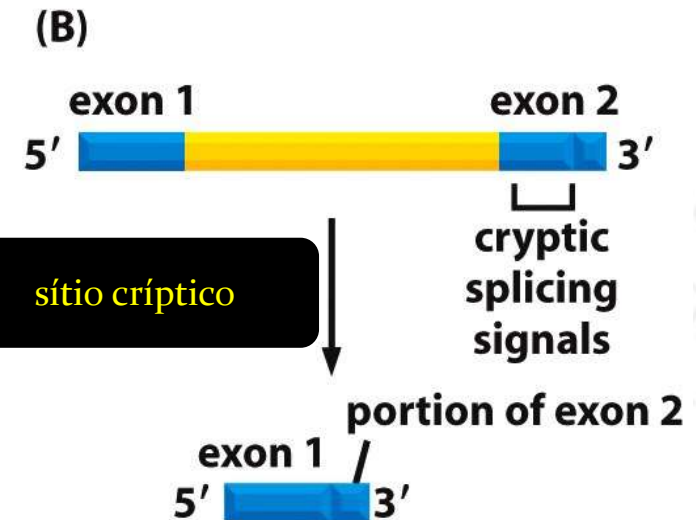
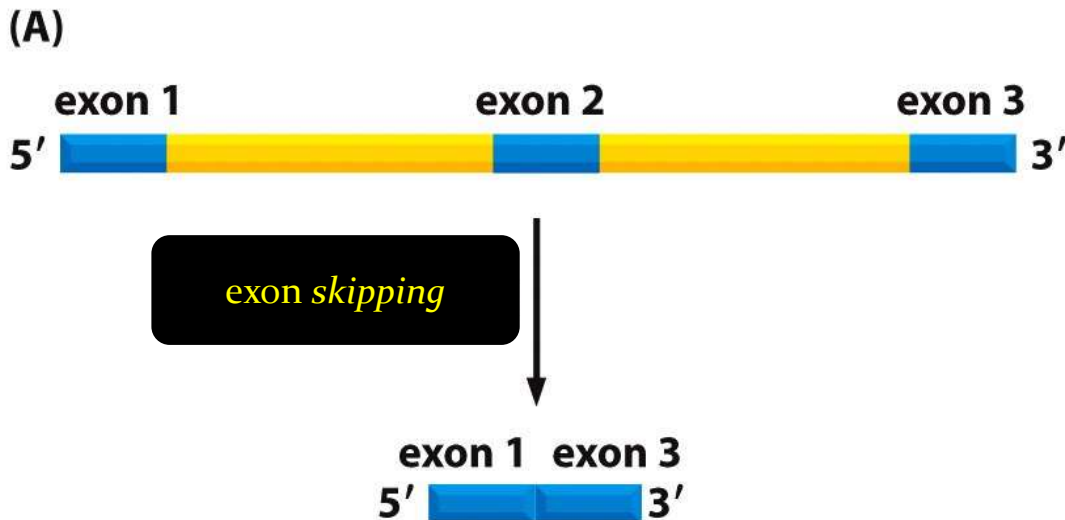
*Introns* variam muito de tamanho

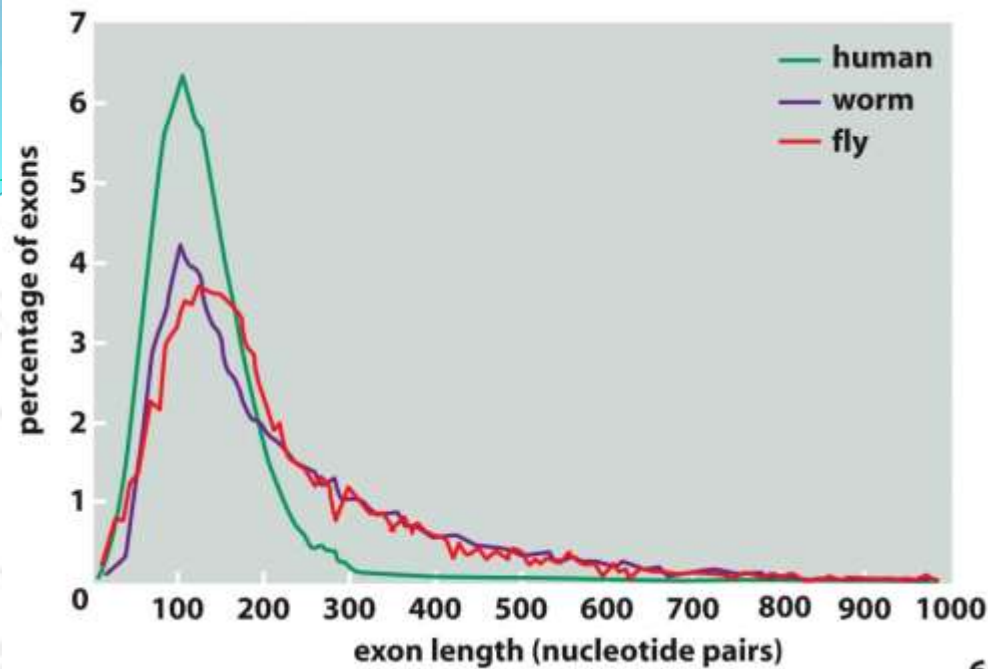
se os sítios reconhecidos por *snRNPs* fossem determinados após a *transcrição* a chance de erros seria maior (*skipping* e sítio *críptico*)

fidelidade no *splicing* é garantida por duas estratégias

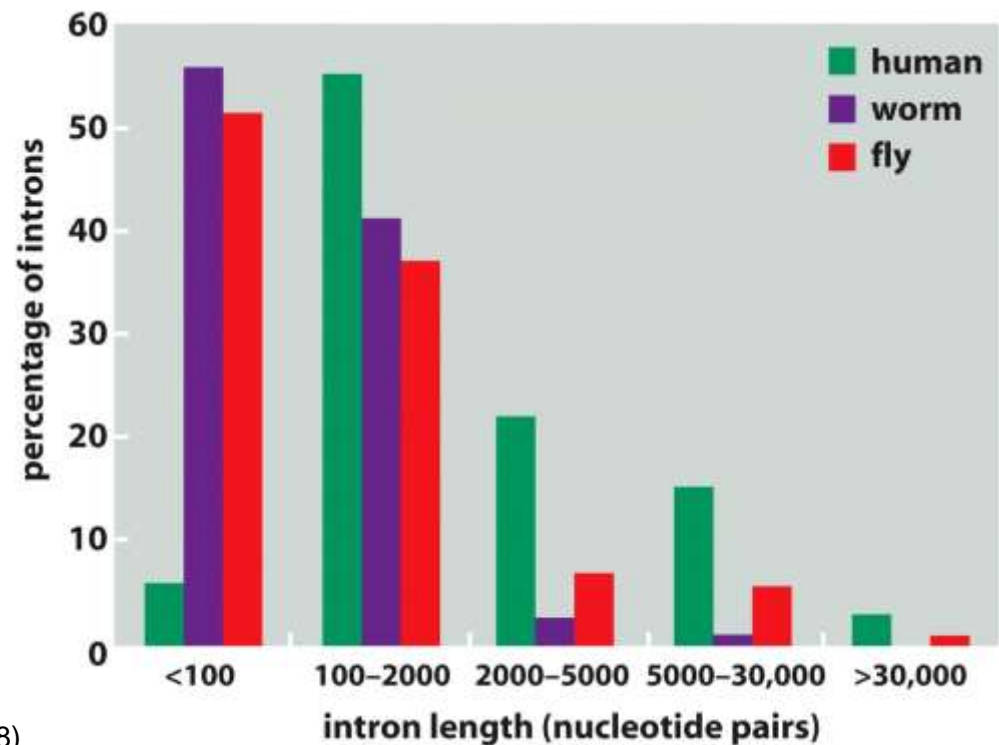
01. componentes do *splicing* são transferidos do *CTD* para o *pré-RNA* enquanto este é sintetizado (evita *skipping*)

02. *Exon Definition*





tamanho dos **exons** tende a ser muito mais uniforme que o de **introns**

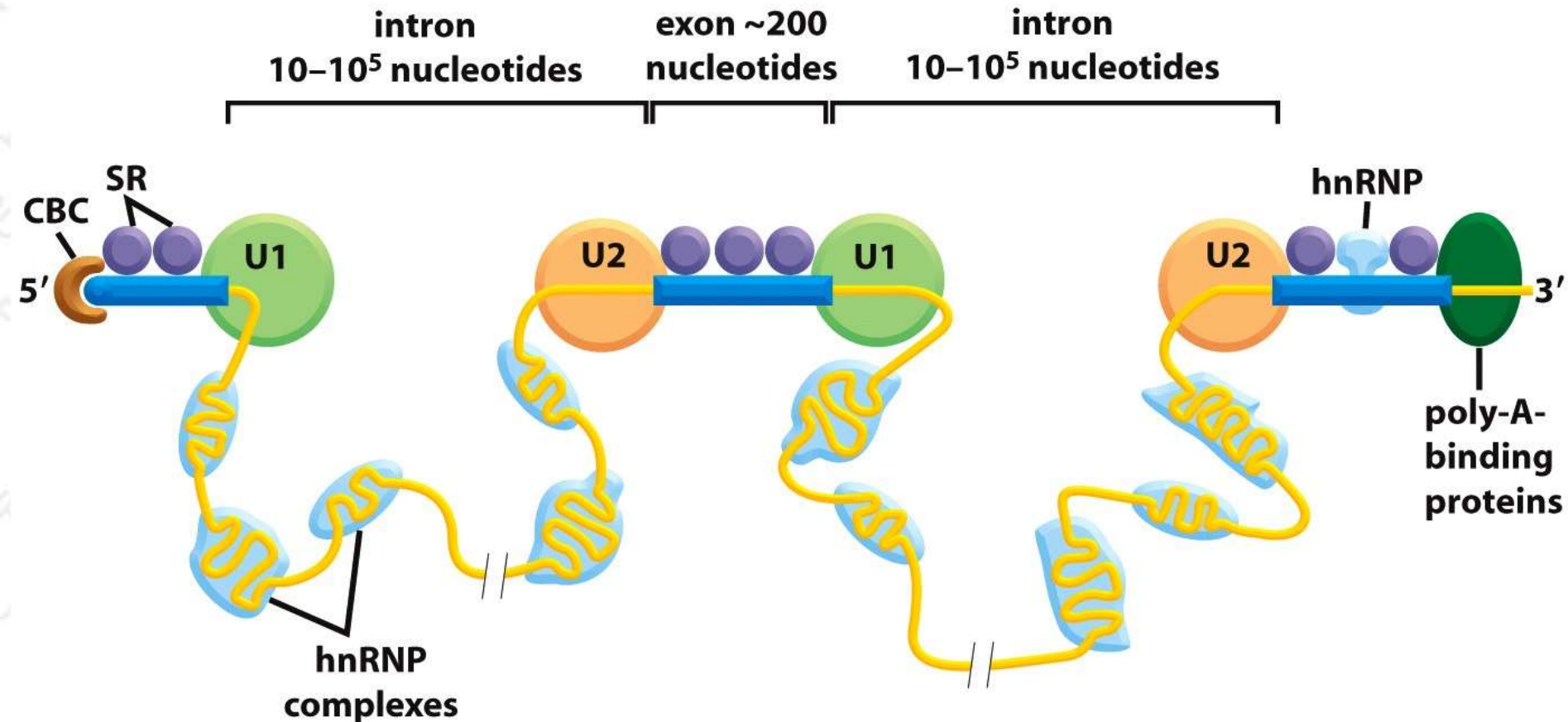


# A Definição dos Exons

proteínas **SR** marcam os exons delimitando **sítios de splicing 5' e 3'**

**SR** recrutam **snRNAs U1** (sítio 5') e **U2** (sítio 3')

aumento da precisão!! (evita **sítios crípticos**)



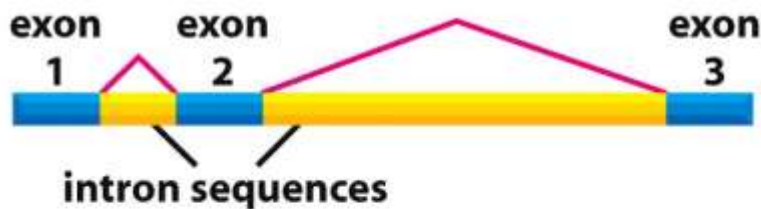


# A Plasticidade do *Splicing* do RNA

mutações na sequência nucleotídica de um sítio de *splicing* criam novos padrões de processamento (ex: *exon skipping*)

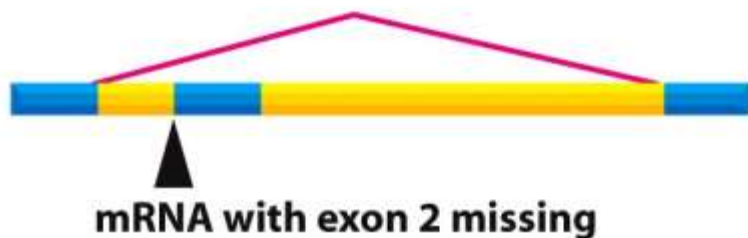
mutações foram importantes na evolução dos organismos hoje conhecidos

## (A) NORMAL ADULT $\beta$ -GLOBIN PRIMARY RNA TRANSCRIPT

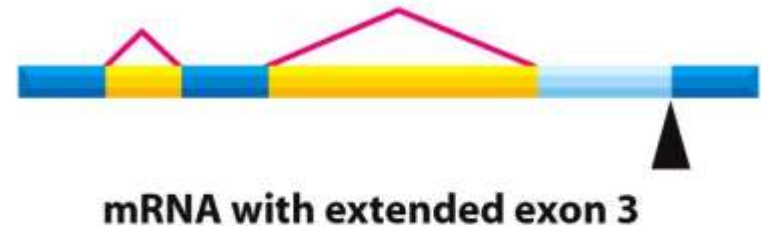


normal mRNA is formed from three exons

## (B) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT DESTROY A NORMAL SPLICE SITE CAUSE EXON SKIPPING



## (C) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT DESTROY NORMAL SPLICE SITES ACTIVATE CRYPTIC SPLICE SITES



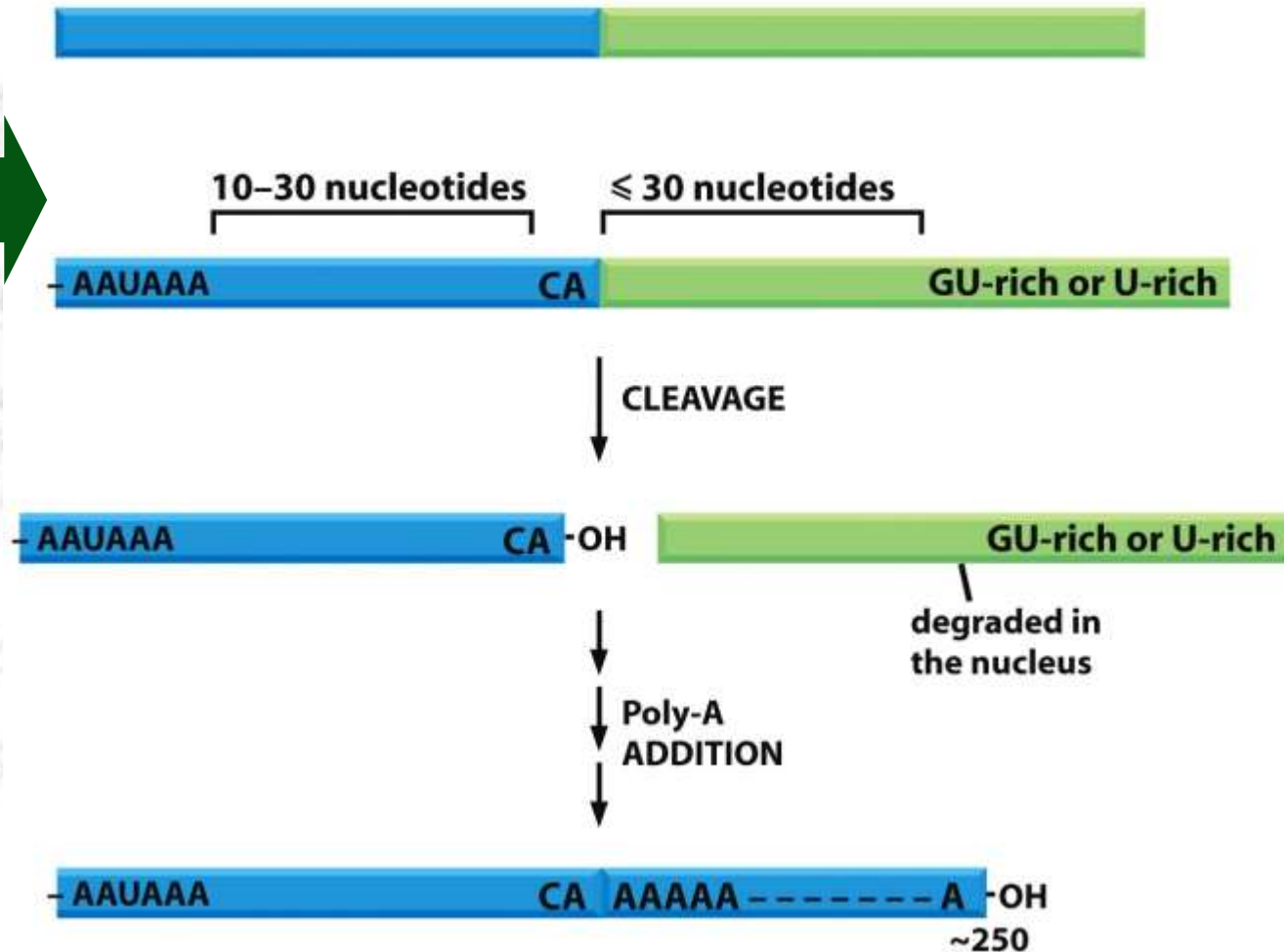
## (D) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT CREATE NEW SPLICE SITES CAUSE NEW EXONS TO BE INCORPORATED



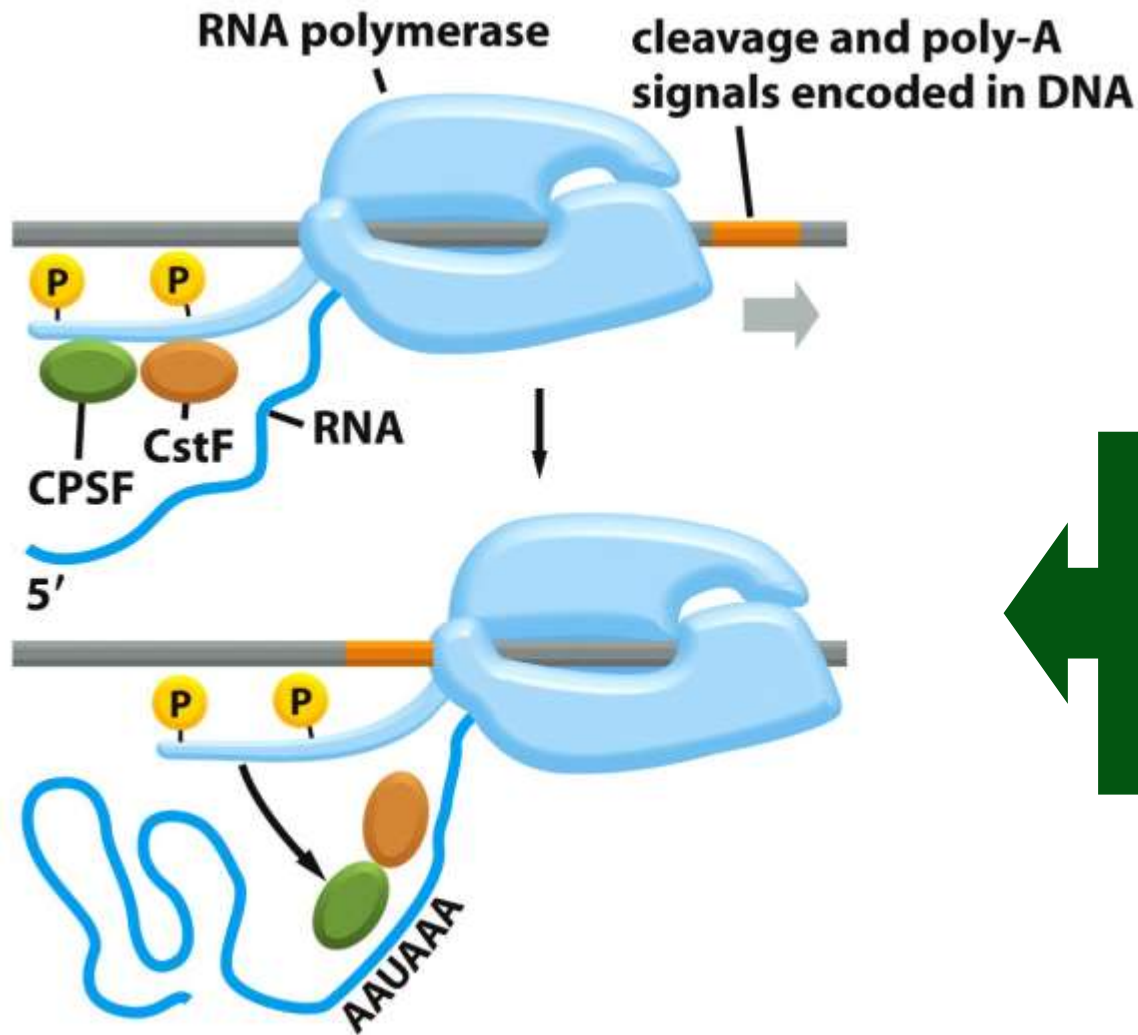
# Enzimas de Processamento do RNA Geram a Terminação 3' dos mRNAs Eucarioticos

extremidade 3' do mRNA é especificada por uma sequência sinal **AAUAAA**, ligada por **CPSF**

a região rica em GU é ligada por **CstF**



# Passos Importantes na Geração da Extremidade 3' do mRNA Eucariotico



CstF (cleavage stimulation factor)

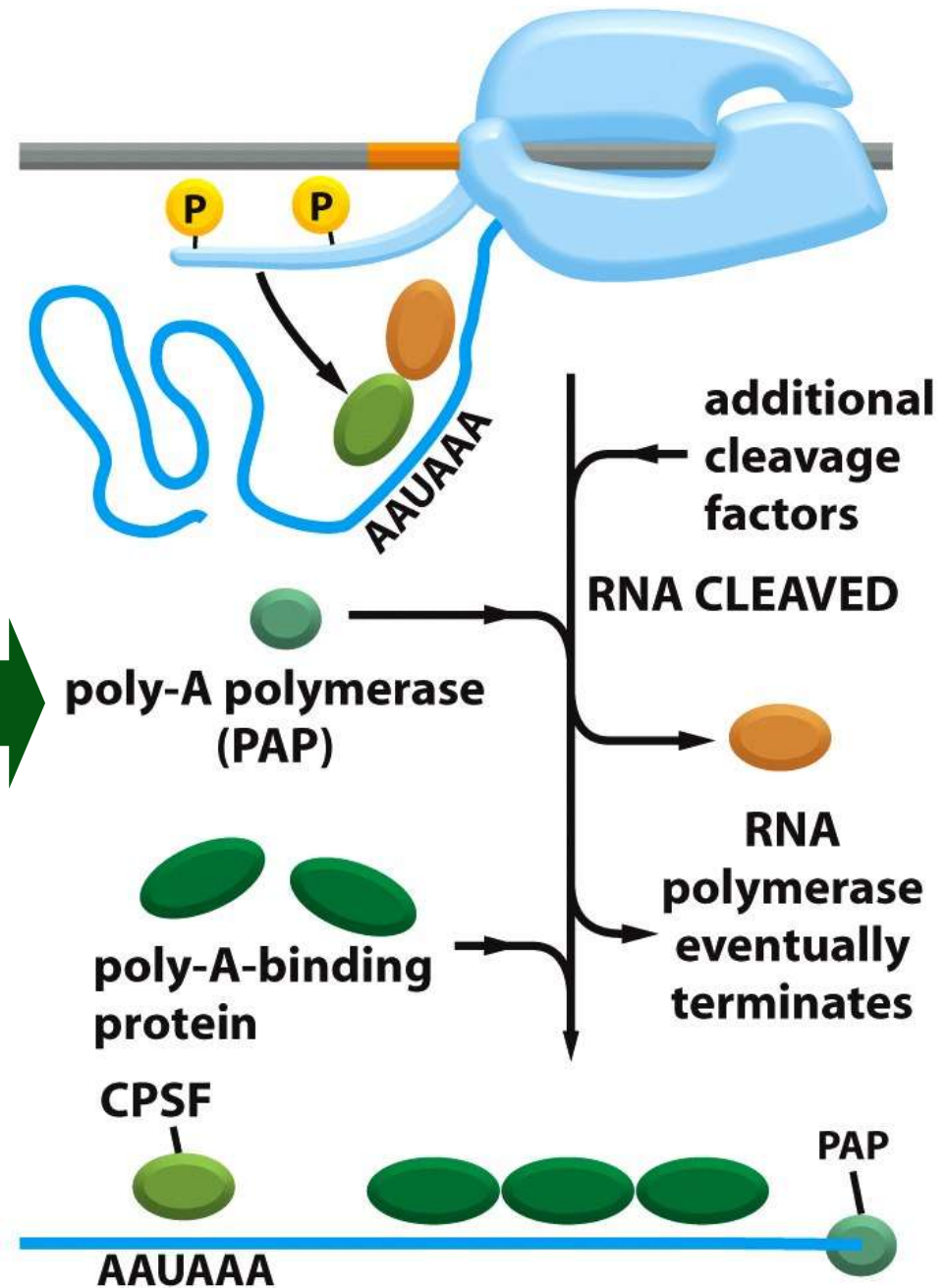
CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor)

transferidas do CTD para o RNA quando sequência sinal 3' surge

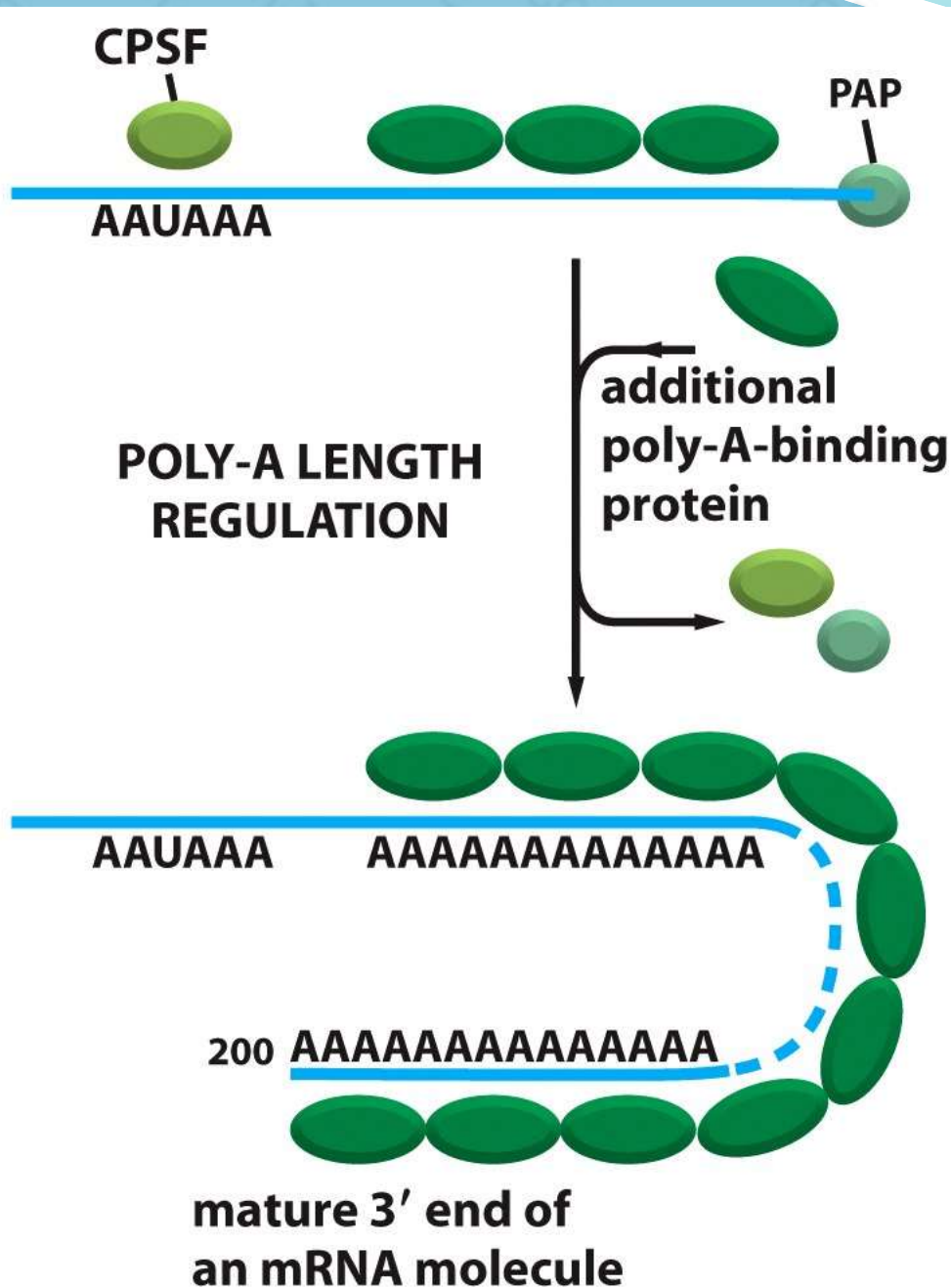
após ligação de CPSF e CstF outras proteínas são montadas para criar a extremidade 3'

após a clivagem da extremidade, poly-A polymerase (PAP) adiciona 200 nucleotídeos A

poly-A-binding proteins se montam nela



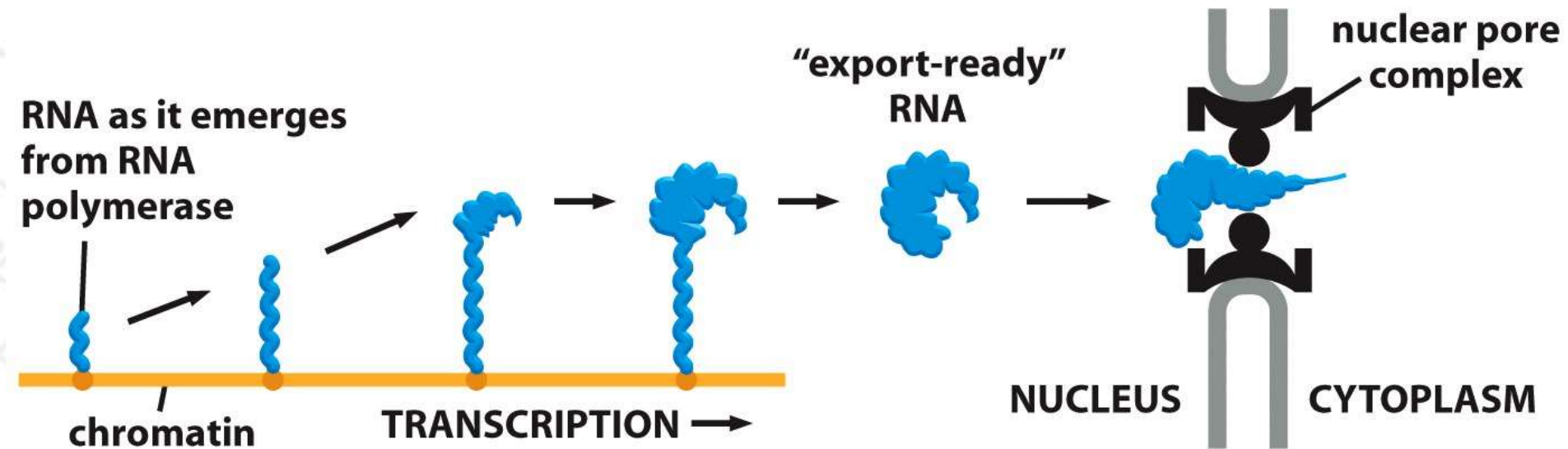




*poly-A-binding proteins* permanecem montadas na **cauda poly-A**

ajudam na tradução deste RNA a proteína

# mRNAs Eucarióticos Maduros são Seletivamente Exportados do Núcleo



pequena fração dos **préRNAs** é útil para a célula (**introns**, **RNA** processados erroneamente etc são degradados)

**mRNA** pronto contém sinais moleculares dos processos de **capping**, **splicing**, **poliadenilação**

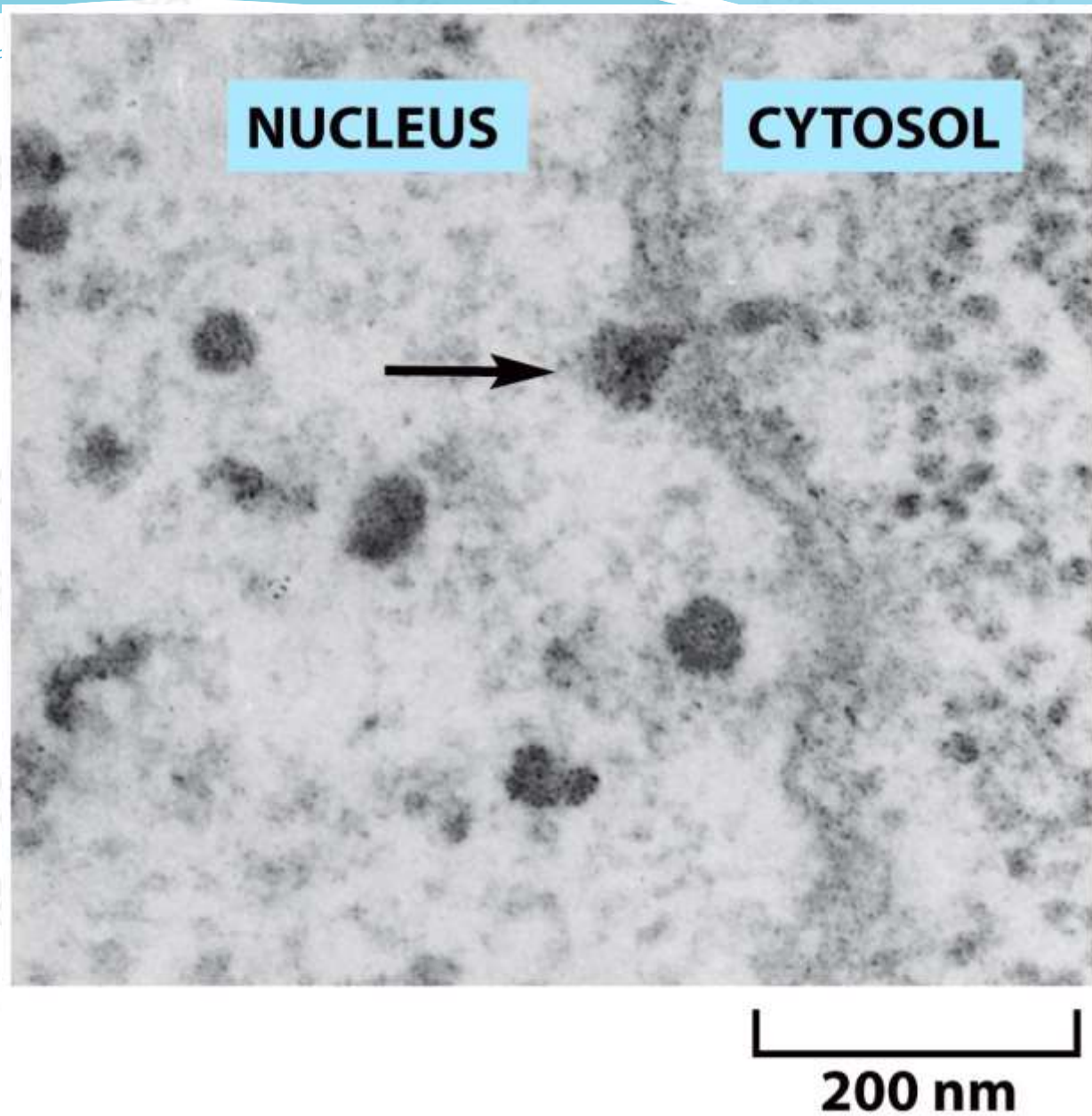
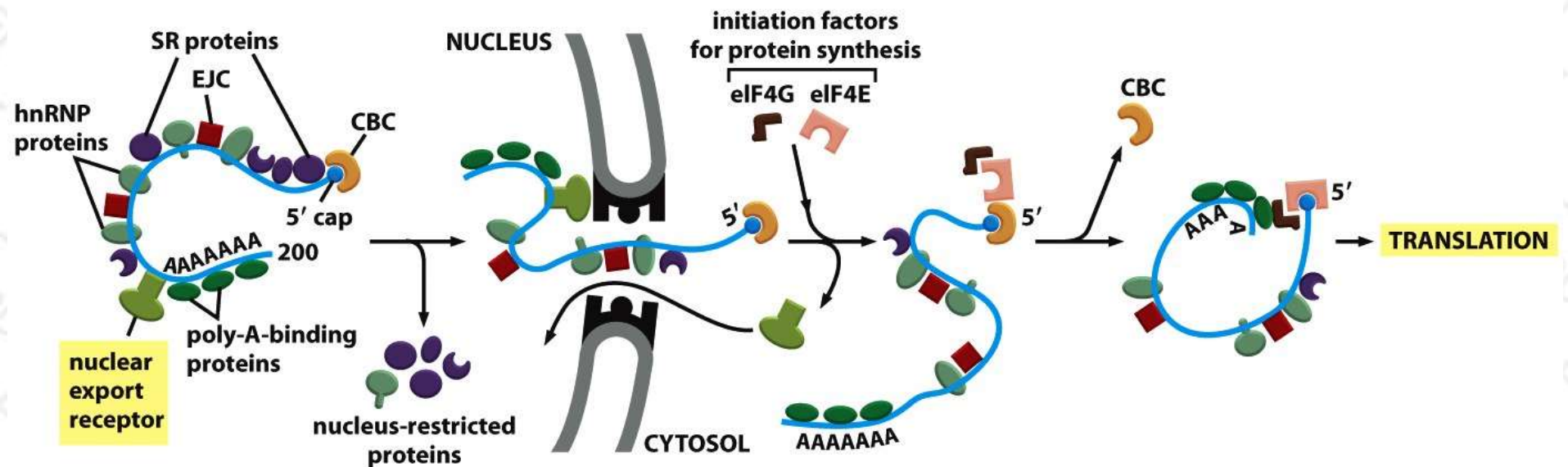


Figure 6-39b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



mRNAs maduros possuem CAP 5', EJC, cauda Poly-A

outras modificações indicam RNAs não prontos a deixar o núcleo (ex: snRNPs ainda montados)