

# DBG0061 - Portfólio

João Vitor Ferreira Cavalcante

2020-06-23



# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Prefácio</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>mRNA, tRNA e rRNA</b>	<b>7</b>
2.1	Identifique as funções de cada um . . . . .	7
2.2	Nomeie as regiões de um RNA mensageiro . . . . .	8
2.3	Geração e modificações pós-transcricionais . . . . .	8
2.4	Edição de RNA . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Primers de RNA</b>	<b>11</b>
3.1	O que são? . . . . .	11
3.2	Como são gerados? . . . . .	11
3.3	Onde são usados? . . . . .	11
3.4	Qual a importância deles pros retrovírus? . . . . .	12
<b>4</b>	<b>snRNA e snoRNA</b>	<b>13</b>
4.1	O que são ribonucleoproteínas? . . . . .	13
4.2	Descrições desses dois ncRNAs . . . . .	13
4.3	Onde eles atuam? . . . . .	14
4.4	A quais doenças estão relacionados? . . . . .	15
<b>5</b>	<b>Histórico dos miRNAs</b>	<b>17</b>
5.1	Qual foi o primeiro miRNA e como ele foi identificado? . . . . .	17
5.2	Que alvos ele controla? . . . . .	17
5.3	Qual seu mecanismo de ação; . . . . .	17
5.4	Identificar e comentar as 3 outras descobertas importantes sobre os miRNAs . . . . .	19
5.5	Ideias gerais de 3 artigos seminais . . . . .	19
<b>6</b>	<b>Referências</b>	<b>21</b>



# Capítulo 1

## Prefácio

Esse é o meu portfólio para a disciplina DBG0061 - RNAs Não Codantes, cursada no semestre suplementar 2020.5.

Aqui estarão contidas respostas para os exercícios de cada dia, dúvidas e reflexões sobre os seminários.

As duas principais referências usadas foram os encontros de cada aula e o livro “Introdução ao universo dos non-coding RNAs” de Tiago Campos Pereira. Fontes alternativas, se utilizadas, são citadas em cada capítulo.



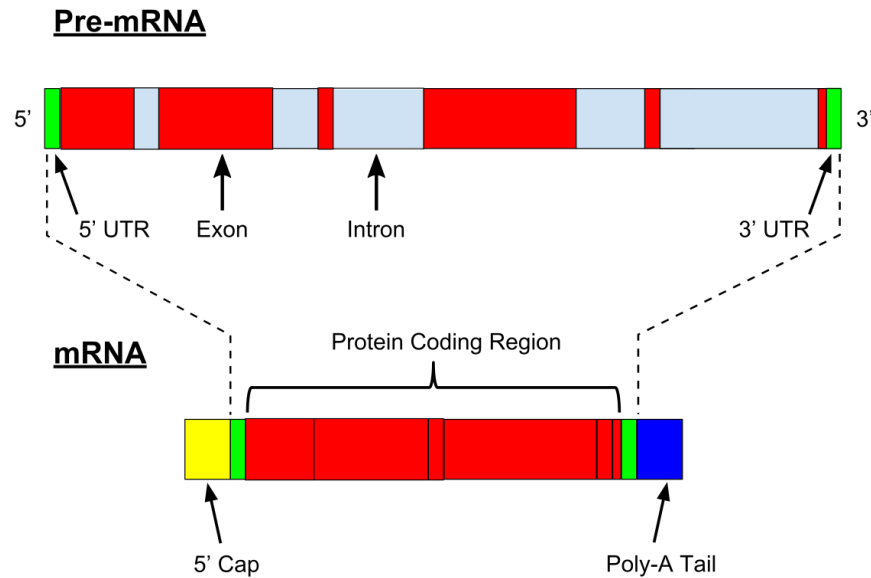
## Capítulo 2

# mRNA, tRNA e rRNA

### 2.1 Identifique as funções de cada um

- O mRNA é o responsável por carregar a informação codante do genoma, gerado no processo de transcrição, ele é o passo inicial para a produção de proteínas.
- O tRNA é aquele que irá interpretar a informação contida no mRNA processado, se ligando aos seus códons e trazendo consigo o respectivo aminoácido.
- O rRNA, por fim, será aquele responsável pela consolidação final da formação proteica, ao trafegar pelo mRNA, indica quais tRNAs devem se ligar e une os seus respectivos aminoácidos para a formação da proteína.

## 2.2 Nomeie as regiões de um RNA mensageiro



Inicialmente, o mRNA possui 3 principais componentes: Os íntrons, que não codificam a informação proteica final, os éxons, a porção codante, e as UTRs em cada ponta, que são, também, regiões não traduzidas. Após o processamento, observa-se a adição de um “capacete” na extremidade 5’ e uma sequência poli-A na extremidade 3’, ambas estruturas que auxiliam na proteção do mRNA de exonucleases.

## 2.3 Geração e modificações pós-transcricionais

### 2.3.1 mRNA

A **transcrição**, em eucariotos, ocorre por meio da RNA Polimerase II, que junto a um ou mais fatores de transcrição, se liga ao promotor, formando a bolha de transcrição, posteriormente, à medida que as ligações de hidrogênio vão sendo quebradas pela forquilha, vai se formando a fita, com a adição de nucleotídeos de RNA complementares. Ao fim deste processo teremos o pre-mRNA, que passará pelo processamento mencionado em 2.2

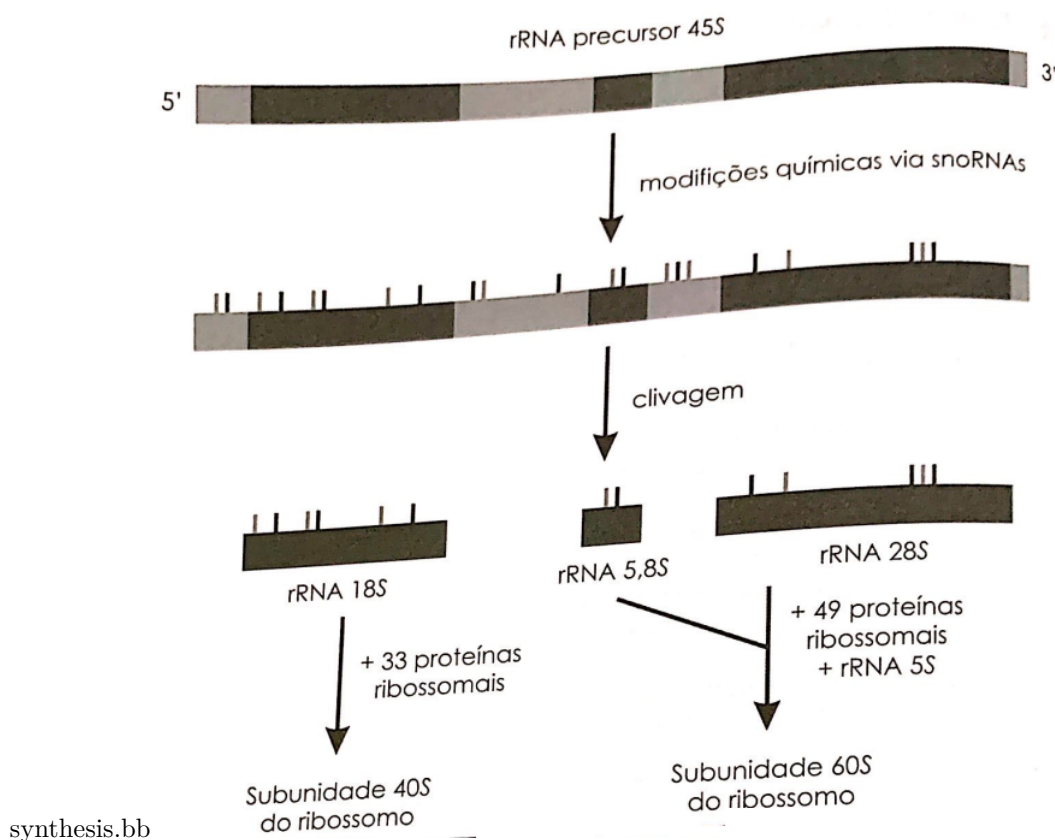


### 2.3.2 tRNA

Seus genes, localizados no nucléolo, são transcritos pela RNA Polimerase III. Em seguida ocorre o processamento do pre-tRNA formado, iniciando com a remoção de certas sequências, tanto na ponta 3' quanto na 5'. Vale destacar que inicialmente alguns tRNAs possuem íntrons, que em procariotos se auto-removem, mas em eucariotos e arqueas são removidos por endonucleases, que reconhecem sua região BHB. Por fim, há a adição de CCA na sua extremidade 3', posteriormente a isso o tRNA ainda pode passar por diversos processamentos, a depender do aminoácido ao qual se relaciona.

E, ultimamente, é claro, há a reação de aminoacilação quando o tRNA for executar sua função na célula.

### 2.3.3 rRNA



Em eucariotos, ocorre no nucléolo, com a síntese do 45S pela RNA Polimerase I, este possuindo de regiões interespçadas transcritas que assemelham íntrons,

e no núcleo, com a síntese do 5S pela RNA Polimerase III. O 45S, após passar por modificações realizadas por snoRNAs, como metilação e pseudouridilação, tem seus espaçadores clivados. Os fragmentos resultantes se unem a proteínas ribossomais, formando as duas subunidades conhecidas, a 40S e a 60S.

## 2.4 Edição de RNA

É o processo no qual ocorrem modificações no RNA que não refletem mutações na sequência genômica original. Essas modificações podem ser inserções, deleções e substituições. Algumas modificações de nota são:

- Edição do gene da ApoB - uma troca de C para U - reflete nas isoformas observadas da proteína no organismo, a ApoB-100 (hepática) e a ApoB-48 (intestinal), essa última que possui seu tamanho reduzido pois a troca gera um códon de parada.
- Conversão de A para Inosina pela **ADAR** em miRNAs, que pode impedir o processamento por DROSHA e DICER.

## Capítulo 3

# Primers de RNA

### 3.1 O que são?

São pequenas sequências nucleotídicas de fita única, responsáveis pela iniciação da síntese de uma sequência nucleotídica maior, como ocorre na síntese de DNA.

### 3.2 Como são gerados?

São gerados pela primase, que se acopla à fita de DNA quando ligada a uma molécula de ATP, formando inicialmente um dinucleotídeo pppApG ligado à sua ATP, em seguida organiza os nucleotídeos restantes do primer pela sua complementaridade com o DNA.

### 3.3 Onde são usados?

São usados na síntese de DNA, como falado anteriormente, visto que as DNAs polimerases não tem capacidade de iniciar o processo sozinhas. Mas também são usados na transcrição reversa, como é o caso da Telomerase em humanos, em que seu componente TERC é fundamental, auxiliando na manutenção da longevidade da molécula de DNA.

E, é claro, possuem inúmeras aplicações na biologia molecular, destacando-se as principais técnicas usadas nessa área, o PCR e o Sequenciamento, para as quais os primers são indispensáveis.

### 3.4 Qual a importância deles pros retrovírus?

Os primers de RNA são fundamentais para a replicação dos retrovírus, visto que, como o próprio nome diz, esses vírus utilizam um molde de RNA para sintetizar DNA, o início do processo se dá com um primer. Este primer, que muitas vezes é um tRNA de lisidina, se acopla à seção do genoma viral chamado de PBS, o que possibilita o início da polimerização pela Transcriptase Reversa, adicionando-se nucleotídeos na extremidade 3' do primer. Após a degradação de seções não codantes e repetitivas na extremidade 3' o primer de tRNA se desloca para a extremidade 5', extendendo a nova fita de DNA nesse sentido.

## Capítulo 4

# snRNA e snoRNA

### 4.1 O que são ribonucleoproteínas?

São complexos formados por ácidos ribonucleicos e RBPs ou proteínas de ligação a RNA, alguns exemplos são os ribossomos e os snRNPs, estes últimos formados pela associação de snRNAs a proteínas, preenchendo funções de extrema relevância para o processo de splicing.

### 4.2 Descrições desses dois ncRNAs

#### 4.2.1 snRNAs

São pequenos RNAs sintetizados no núcleo, especificamente nos corpos de Cajal, possuem um comprimento médio de 150nt e podem ser transcritos tanto pela RNAPol-II quanto pela RNAPol-III. Preenchem funções relevantes no processo de splicing. Se tem conhecimento de por volta de 10 snRNAs e estes são divididos em duas classes:

- Os Sm, transcritos pela RNAPol-II, são exportados para o citoplasma, onde sofrem clivagem na extremidade 3' resultando na formação de um loop. A estrutura em loop 3' é necessária para o reconhecimento pela proteína SMN, que proporcionará a hipermetilação de seu cap 5', originando um cap de tri-metilguanosina, que é necessário para seu endereçamento celular para os corpúsculos de Cajal, onde podem passar por pseudouridilações e mais metilações.
- Os Lsm, transcritos pela RNAPol-III, possuindo um cap 5' de monometilfosfato, nunca deixam o núcleo, se ligando a proteína La, o que proporciona a ligação do anel Lsm, o que indica seu endereçamento para o nucléolo,

onde por fim pode passar pelas pseudouridinilações e metilações que o farão funcional.

### 4.2.2 snoRNAs

São pequenos RNAs localizados no nucléolo, podendo se maturar nele mesmo ou nos corpúsculos de Cajal. Tem tamanho variando de 60 a 170nt. São, em sua grande parte, transcritos pela RNAPol-II. Se dividem, também, em duas classes, diferenciando-se pelos boxes, ou sequências curtas conservadas, que possuem:

- Os box H/ACA possuem duas estruturas secundárias interceptadas por um box H e um box ACA.
- Os box C/D possuem pareamentos nas suas extremidades, onde são localizados os dois boxes, C e D.

## 4.3 Onde eles atuam?

### 4.3.1 snRNAs

A grande maioria participa do spliceossomo (Abaixo descreve-se splicing U2):

- Inicialmente, há a ligação do complexo U1 ao sítio de splicing 5', mediada pela complementaridade do snRNA que possui.
- Logo em seguida, ocorre a ligação do complexo U2 ao ponto de ramificação do íntron.
- As reações de transesterificação subsequentes, propiciadas inicialmente pela hidroxila 2 do ponto de ramificação, irão resultar na ligação dos éxons adjacentes e a liberação do íntron na forma de laço.

### 4.3.2 snoRNAs

Formam os complexos de snoRNPs, com as porções ribonucleotídicas agindo como um “guia”, indicando seções nos rRNAs não processados e, com o pareamento destes, proporcionam reações de metilação e pseudouridinilação, estas necessárias para a clivagem e formação da estrutura final do ribossomo.

## 4.4 A quais doenças estão relacionados?

### 4.4.1 snRNAs

- **Atrofia muscular espinhal:** Mutações no SMN que podem resultar na perda da função das suas proteínas, com sua responsabilidade na síntese dos snRNAs Sm sendo prejudicada.
- **Medulloblastoma:** Alguns desses tumores possuem um U1 snRNA mutado, o que leva a alterações negativas no splicing.

### 4.4.2 snoRNAs

- **Síndrome de Prader-Willi:** Foi observado que perdas de cópias do SNORD116 está associado ao surgimento dessa síndrome (Sahoo et al., 2008).
- **Autismo:** Ganho de cópias do SNORD115 pode estar associado ao surgimento de algumas formas de autismo (Bolton et al., 2004)





## Capítulo 5

# Histórico dos miRNAs

### 5.1 Qual foi o primeiro miRNA e como ele foi identificado?

O lin-4 foi descoberto em um experimento que pretendia elucidar funções de genes heterocrônicos do *C. elegans*, inicialmente, se foi observado que na diferenciação dos estágios de vida L1 e L2, havia aumento do RNA lin-4 e diminuição da **proteína** lin-14, porém isso não se refletia numa diminuição dos transcritos de lin-14, o que indica uma regulação negativa pós-transcricional. Foi observado, posteriormente, que essa regulação estava associada com a região 3' UTR do lin-14.

### 5.2 Que alvos ele controla?

Regula negativamente a tradução da proteína lin-14, o que possibilita o desenvolvimento adequado do *C. elegans* em seus estágios larvais. Posteriormente também foi descoberto que ele regula negativamente o lin-28.

### 5.3 Qual seu mecanismo de ação;

Ele parecia com a região 3' UTR do lin-14, alterando o prosseguimento da tradução - impedindo a finalização ou prolongamento desta.

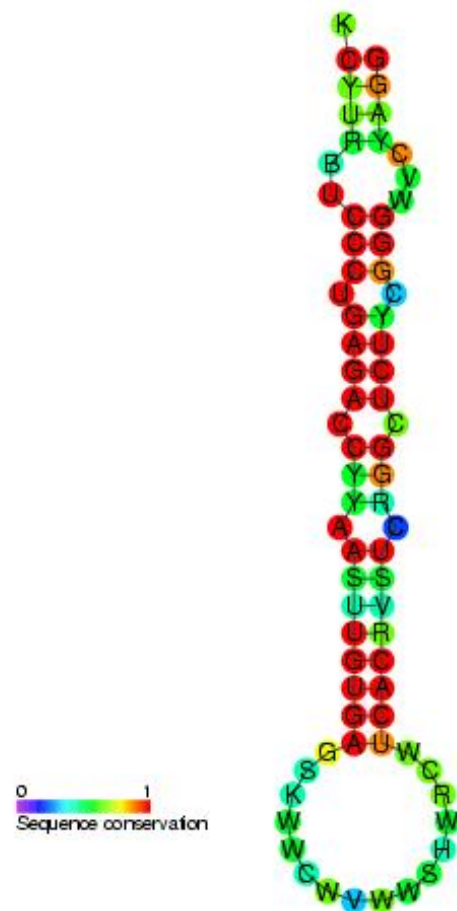


Figura 5.1: (Rfam database)

## 5.4 Identificar e comentar as 3 outras descobertas importantes sobre os miRNAs

- Descobertas anteriores sobre a capacidade de RNAs antisenso de afetarem a estabilidade e alterarem a tradução de RNAs mensageiros.
- A descoberta de que o lin-14 não atua impedindo o início da tradução, atuando posteriormente ao início, inclusive podendo atuar em mais de uma etapa diferente.
- A descoberta do segundo miRNA, o let-7, que regula negativamente o lin-41, também importante no desenvolvimento do *C. elegans*, porém agora na transição para o estágio L4.

## 5.5 Ideias gerais de 3 artigos seminais

- (Lau, 2001) miRNAs podem ser transcritos na forma de cluster. Também podendo ser co-expressos durante a embriogênese. Porém, talvez mais relevante, a existência de ortólogos potenciais dos genes de miRNA em humanos.
- (Lagos-Quintana, 2001) Isolamento de miRNAs em *Drosophila* e células HeLa. Identificando-se 21 miRNAs diferentes em humano.
- (Lee, 2001) Descoberta de vários novos miRNAs em *C. elegans* indicando também possíveis homólogos no ser humano.

# Bibliografia

- Bolton, P. F., Veltman, M. W. M., Weisblatt, E., Holmes, J. R., Thomas, N. S., Youngs, S. A., Thompson, R. J., Roberts, S. E., Dennis, N. R., Browne, C. E., Goodson, S., Moore, V., and Brown, J. (2004). Chromosome 15q11-13 abnormalities and other medical conditions in individuals with autism spectrum disorders. *Psychiatric Genetics*, 14(3):131–137.
- Lagos-Quintana, M. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853–858.
- Lau, N. C. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):858–862.
- Lee, R. C. (2001). An extensive class of small RNAs in *caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):862–864.
- Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J. R., Shinawi, M., Peters, S. U., Person, R. E., Garnica, A., Cheung, S. W., and Beaudet, A. L. (2008). Prader-willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 c/d box small nucleolar RNA cluster. *Nature Genetics*, 40(6):719–721.