

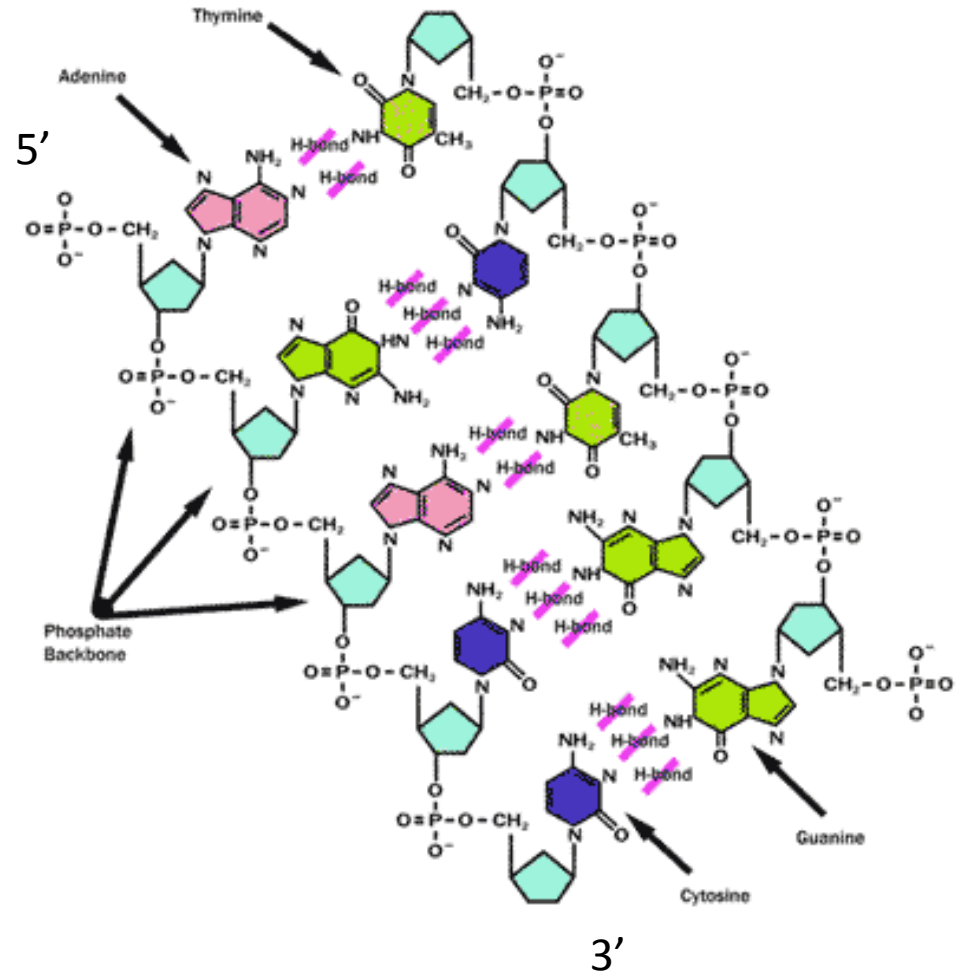
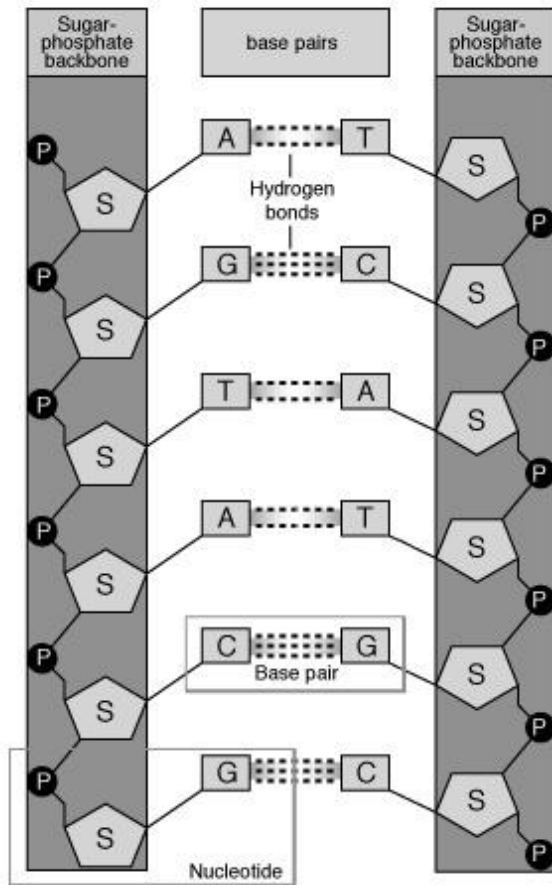


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
SETOR DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Fluxo da informação genética

Profa. Dra. Nívea Macedo

DNA



Do DNA ao RNA

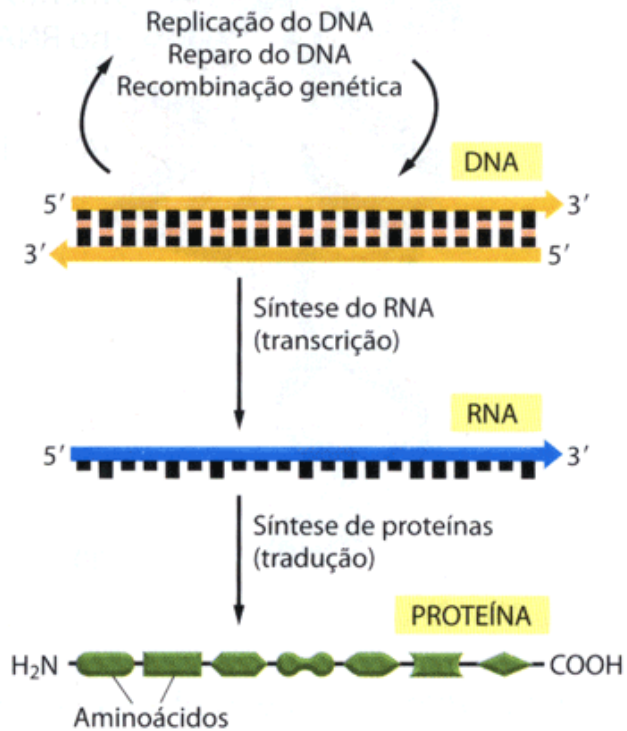
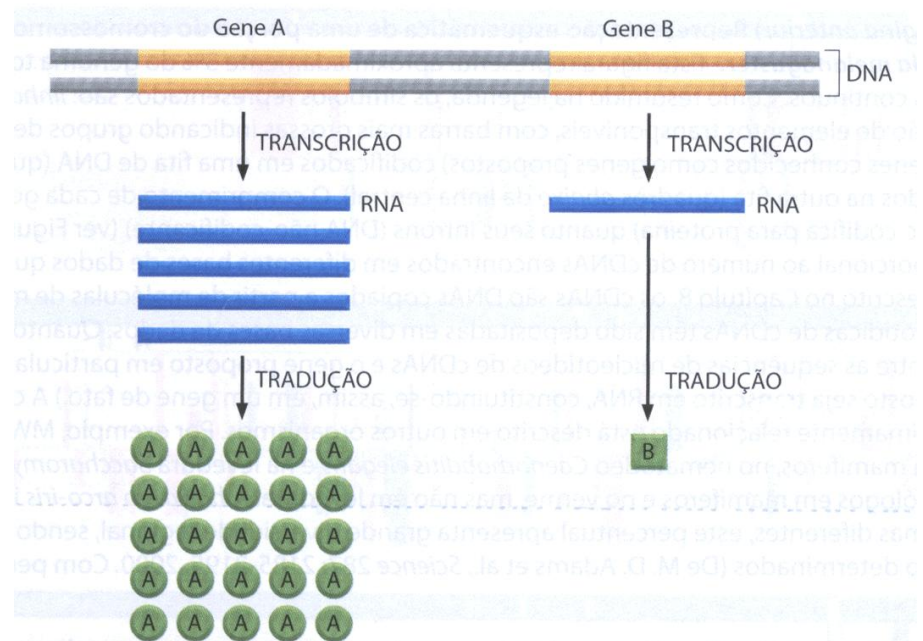
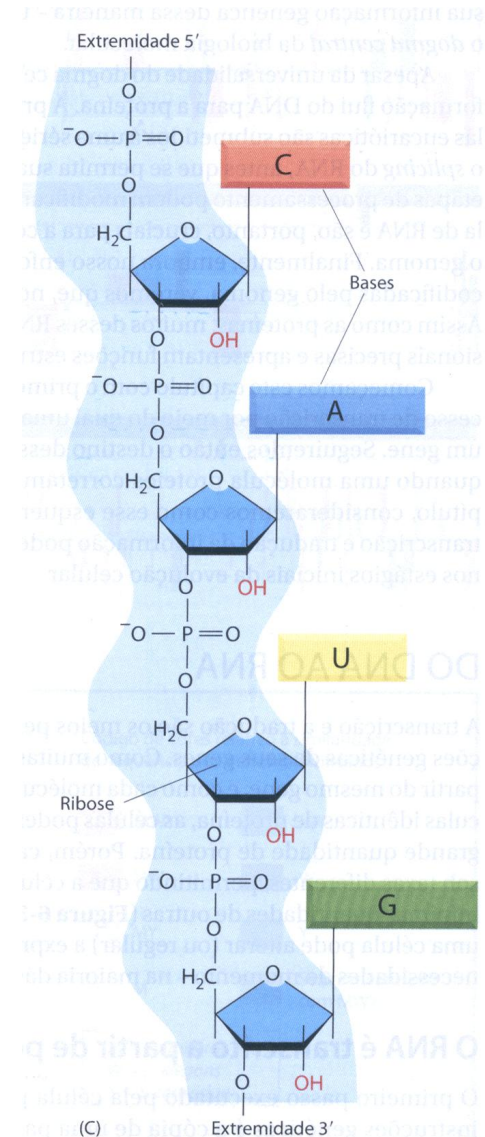
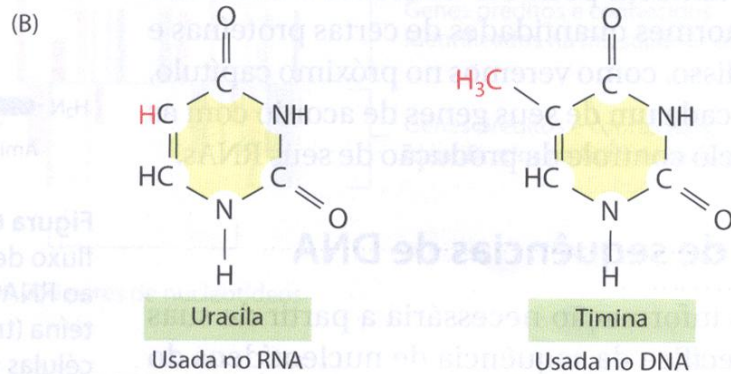
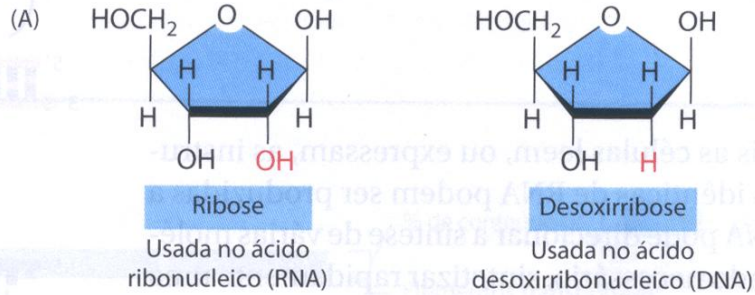


Figura 6-2 A via do DNA à proteína. O fluxo de informação genética do DNA ao RNA (transcrição) e do RNA à proteína (tradução) ocorre em todas as células vivas.

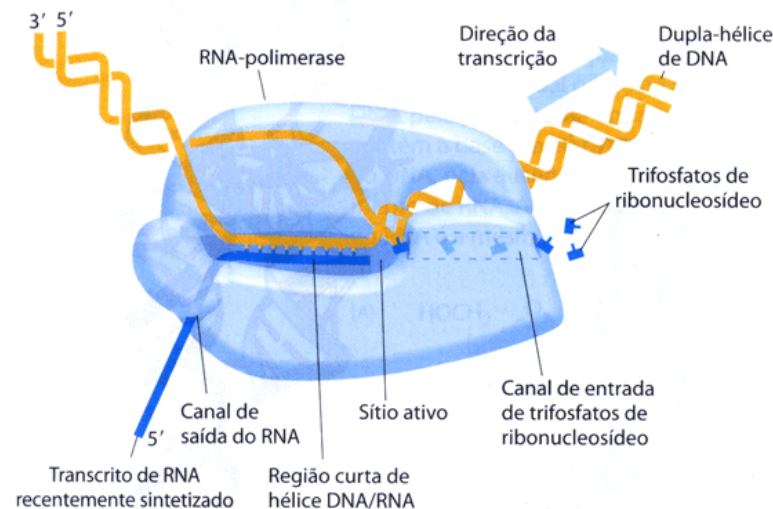


A estrutura química do RNA



O DNA é transcrito pela enzima RNA polimerase

- As RNA-polimerases catalisam a formação de ligações fosfodiéster que conectam os nucleotídeos entre si, formando uma cadeia linear na direção 5' para 3';
- Os substratos são os trifosfatos de nucleosídeos (ATP, CTP, GTP e UTP);
- Taxa de um erro a cada 10^4 nucleotídeos copiados;
- Possuem um pequeno mecanismo de correção;



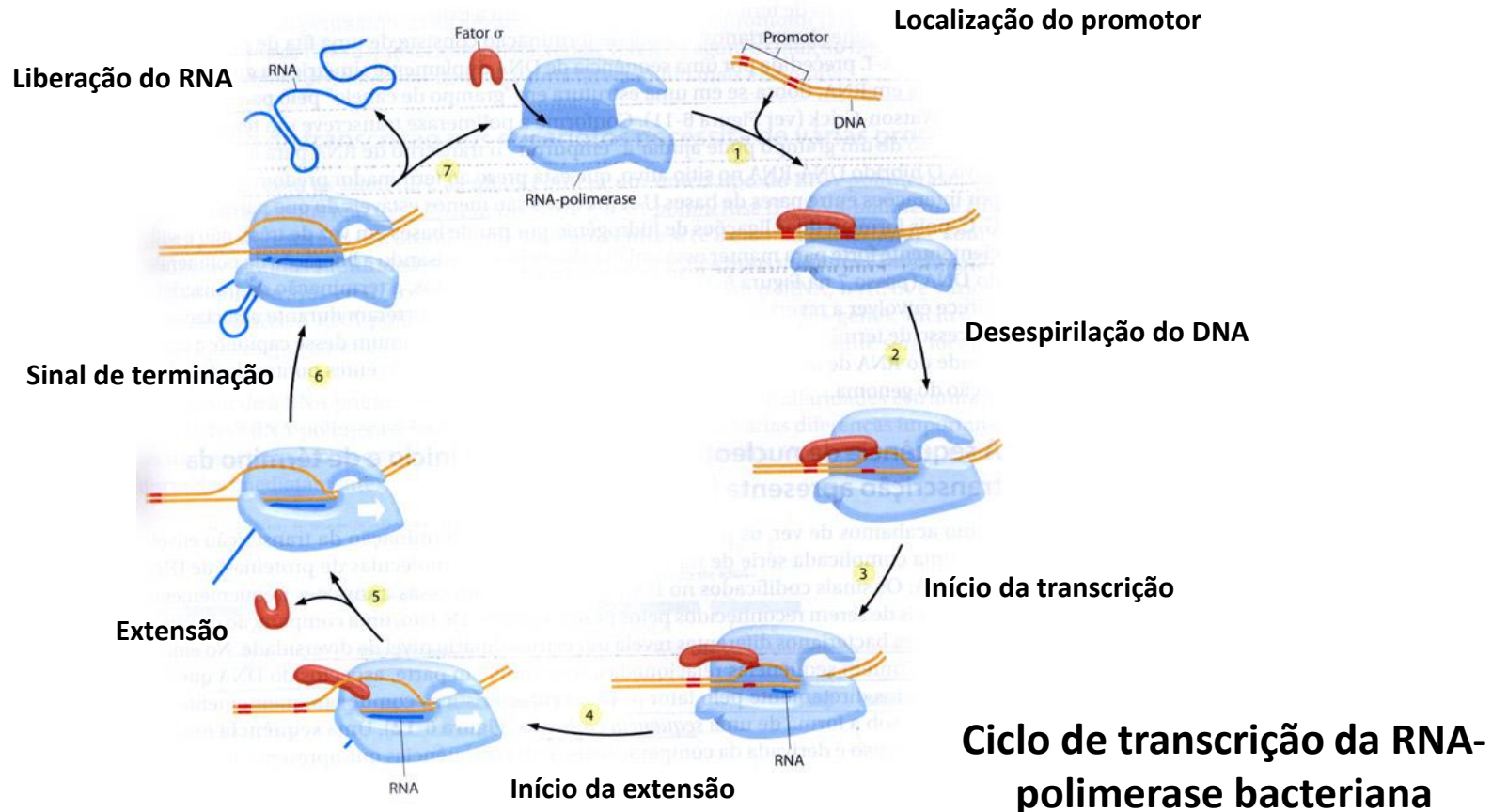
As células possuem diversos tipos de RNAs

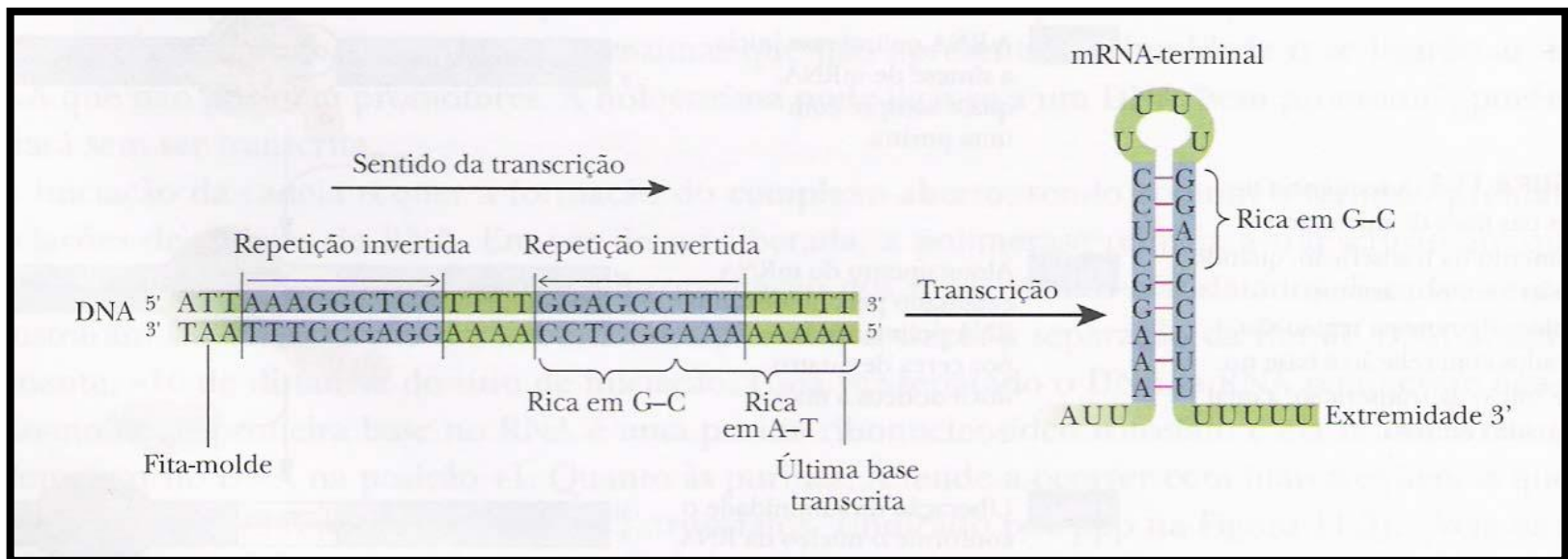
Tabela 6-1 Principais tipos de RNA produzidos nas células

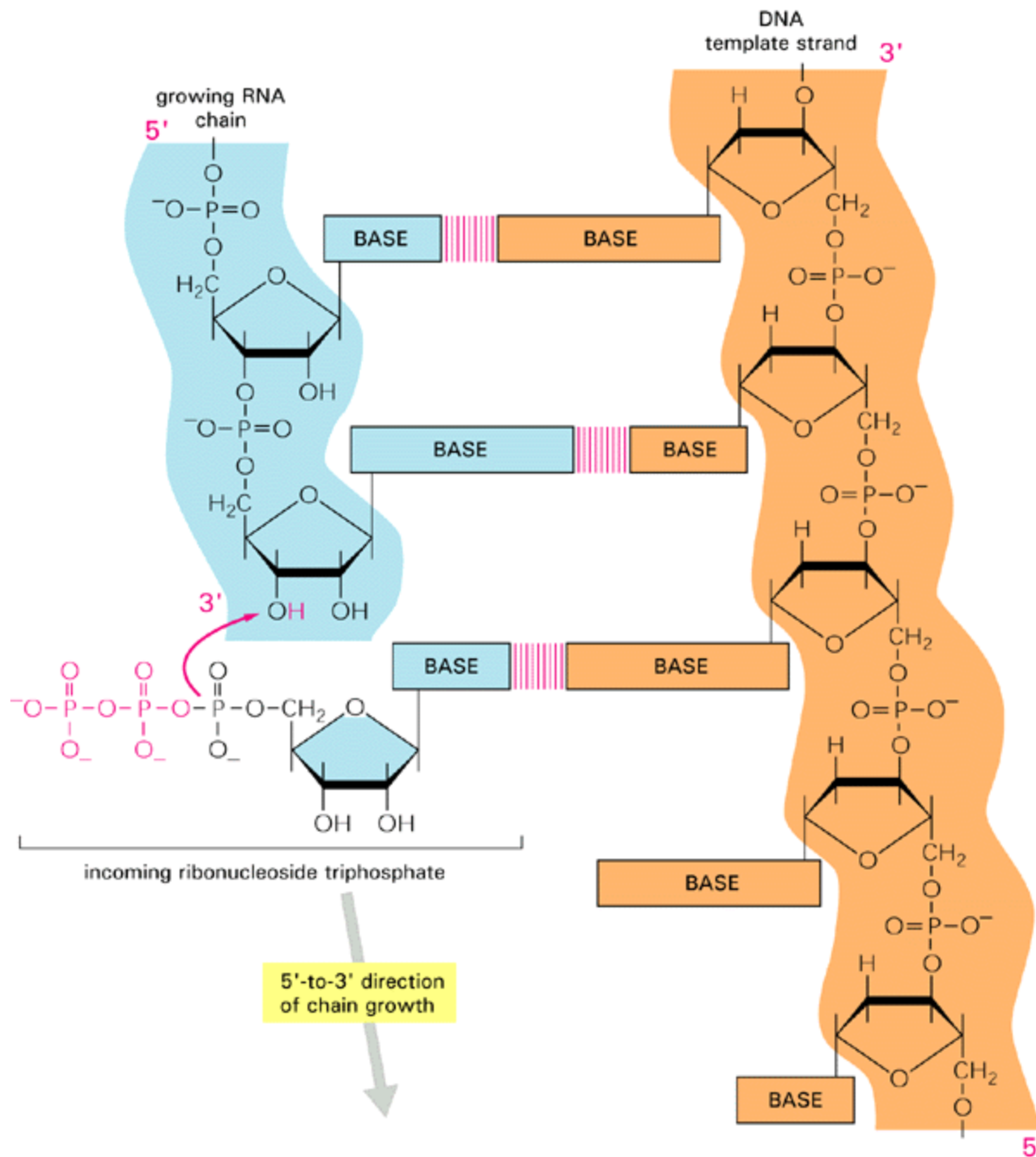
Tipo de RNA	Função
mRNAs	RNAs mensageiros, codificam proteínas.
rRNAs	RNAs ribossomais, formam a estrutura básica do ribossomo e catalisam a síntese proteica.
tRNAs	RNAs transportadores, elementos essenciais para a síntese proteica, funcionando como adaptadores entre o mRNA e os aminoácidos.
snRNAs	pequenos RNAs nucleares, atuam em uma série de processos nucleares, incluindo o <i>splicing</i> do pré-mRNA.
snoRNAs	Pequenos RNAs nucleolares, utilizados para processar e modificar quimicamente os rRNAs.
scaRNAs	Pequenos RNAs de Cajal, usados para modificar snoRNAs e snRNAs.
miRNAs	microRNAs, regulam a expressão gênica tipicamente pelo bloqueio da tradução de mRNAs selecionados.
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência, desligam a expressão de genes pela degradação direta de mRNAs selecionados e pelo estabelecimento de estruturas de cromatina compacta.
Outros RNAs não-codificantes	Atuam em diversos processos celulares, incluindo a síntese de telômeros, a inativação do cromossomo X e o transporte de proteínas para o retículo endoplasmático.

Os sinais codificados no DNA indicam à RNA-polimerase onde iniciar e onde terminar

- A RNA-polimerase bacteriana é um complexo de múltiplas subunidades;
- A subunidade chamada fator sigma (σ) indica onde iniciar a transcrição, pois reconhece o promotor;
- O sinal de terminação consiste de uma sequência de nucleotídeos A-T, precedida por uma sequência de DNA duplamente simétrica, a qual, quando transcrita dobra-se em uma estrutura em “grampo de cabelo”;







Não é que
parece com a
replicação?

A iniciação da transcrição em eucariotos necessita de várias proteínas

- Os eucariotos possuem 3 RNA-polimerases: RNA-polimerase I, RNA-polimerase II e RNA-polimerase III;

Tabela 6-2 As três RNA-polimerases de células eucarióticas

Tipo de polimerase	Genes transcritos
RNA-polimerase I	Genes do rRNA 5,8S, 18S e 28S.
RNA-polimerase II	
RNA-polimerase III	Genes de tRNA, rRNA 5S, alguns snRNA e genes de outros pequenos RNAs.

Os rRNAs são nomeados de acordo com seus valores "S", que se referem à taxa de sedimentação em ultracentrífuga. Quanto maior o valor S, maior o rRNA.

A iniciação da transcrição em eucariotos necessita de várias proteínas

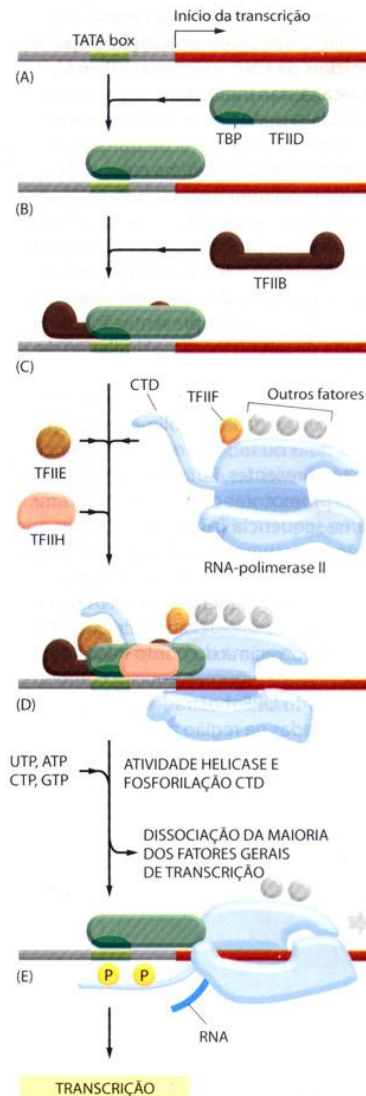
- As RNA-polimerases eucarióticas necessitam de diversas proteínas adicionais, coletivamente denominadas *fatores gerais de transcrição*;
- Ajudam a posicionar corretamente a RNA-polimerase no promotor e auxiliam na separação das duas fitas de DNA;
- São necessários em praticamente todos os promotores que utilizam a RNA-polimerase II;
- São designados TFII (fator de transcrição para a polimerase II) e recebem nomes arbitrários de TFIIB, TFIID etc;

Tabela 6-3 Os fatores gerais de transcrição necessários à iniciação da transcrição pela RNA-polimerase II eucariótica

Nome	Número de subunidades	Funções na iniciação da transcrição
TFIID		
Subunidade TBP	1	Reconhece o TATA box.
Subunidades TAF	~11	Reconhece outras sequências de DNA próximas ao ponto de início da transcrição; regula a ligação ao DNA pela TBP.
TFIIB	1	Reconhece o elemento BRE nos promotores; posiciona com exatidão a RNA-polimerase no sítio de início da transcrição.
TFIIF	3	Estabiliza a interação da RNA-polimerase com TBP e TFIIB; auxilia a atrair TFIIE e TFIIH.
TFIIE	2	Atrai e regula TFIIH.
TFIIH	9	Desespiraliza o DNA no sítio de início da transcrição, fosforila a Ser5 do CTD da RNA-polimerase; libera a RNA-polimerase do promotor.

TFIID é composto por TBP e ~11 subunidades adicionais denominadas TAFs (fatores associados à TBP); CTD, domínio C-terminal.

A iniciação da transcrição em eucariotos necessita de várias proteínas



Reconhecimento de TATA-box pelo TFIID

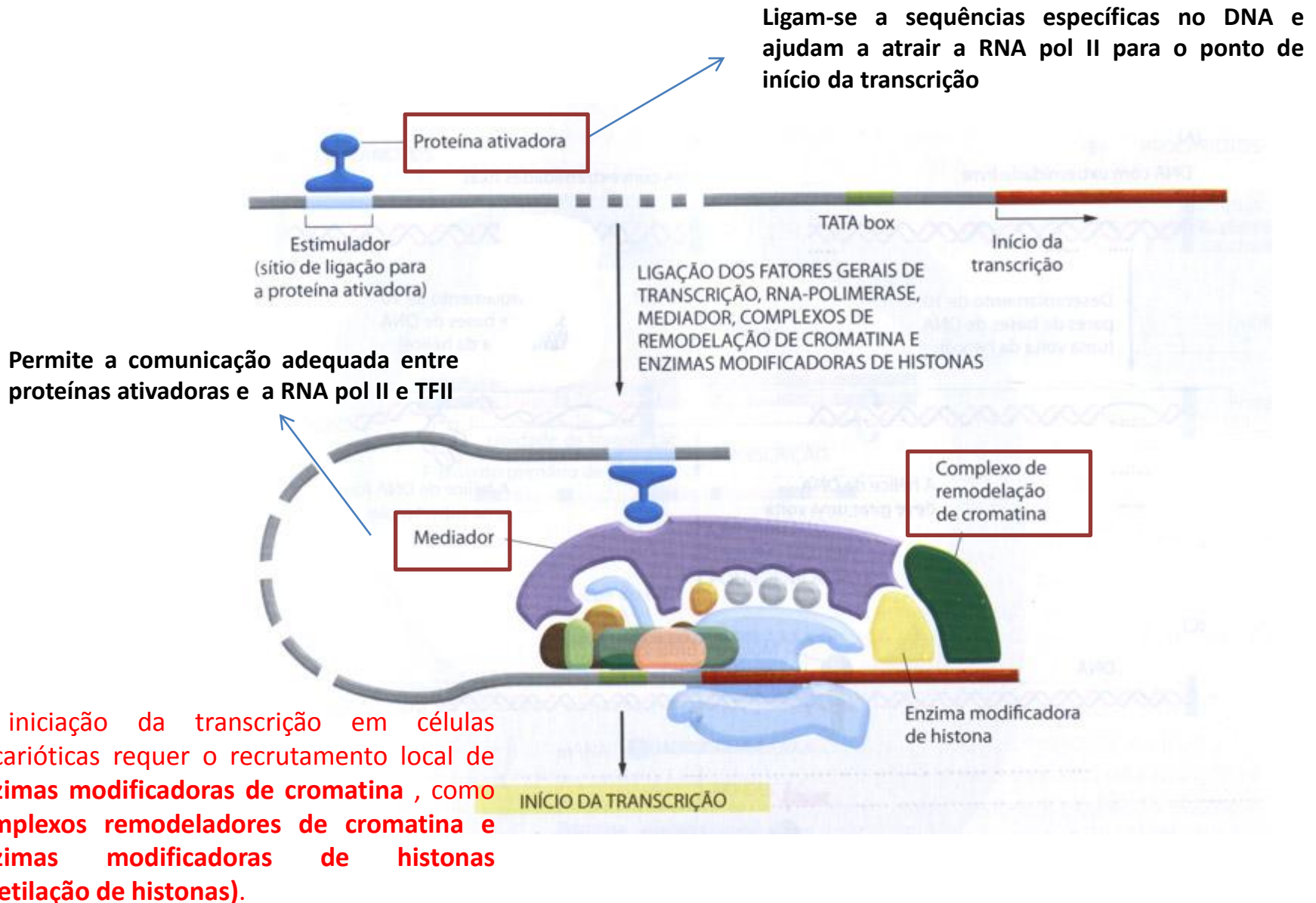
Distorção no DNA por meio da ligação de TFIID e ligação de TFIIB que permite o perfeito posicionamento da RNA pol II no sítio de transcrição

Associação de TFIIF estabiliza a interação da RNA-polimerase II com TBP e TFIIB e atrai TFIIE e TFIIH

TFIIE atrai e regula TFIIH

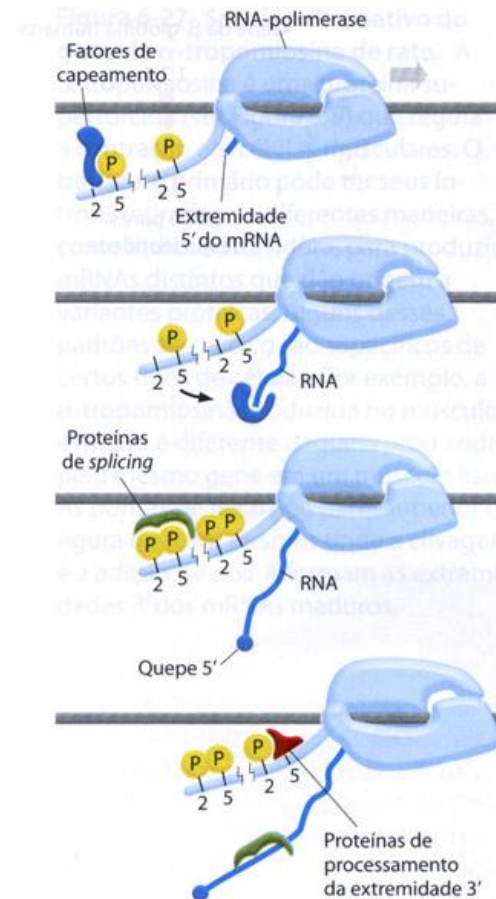
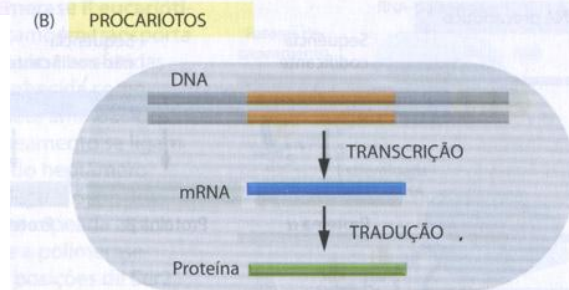
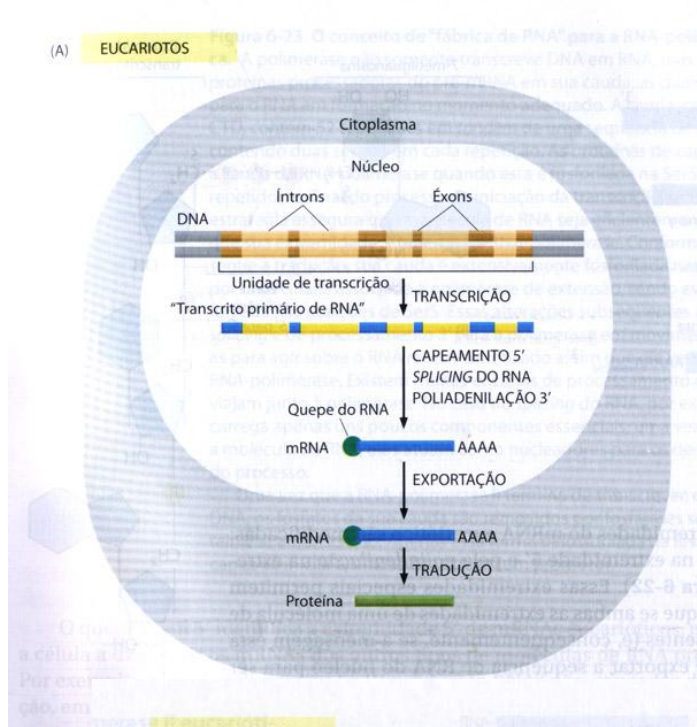
TFIIH usa ATP para separar a dupla-hélice e fosforila a RNA-pol II, que se separa dos TFI e iniciação a fase de extensão

A iniciação da transcrição em eucariotos necessita de várias proteínas



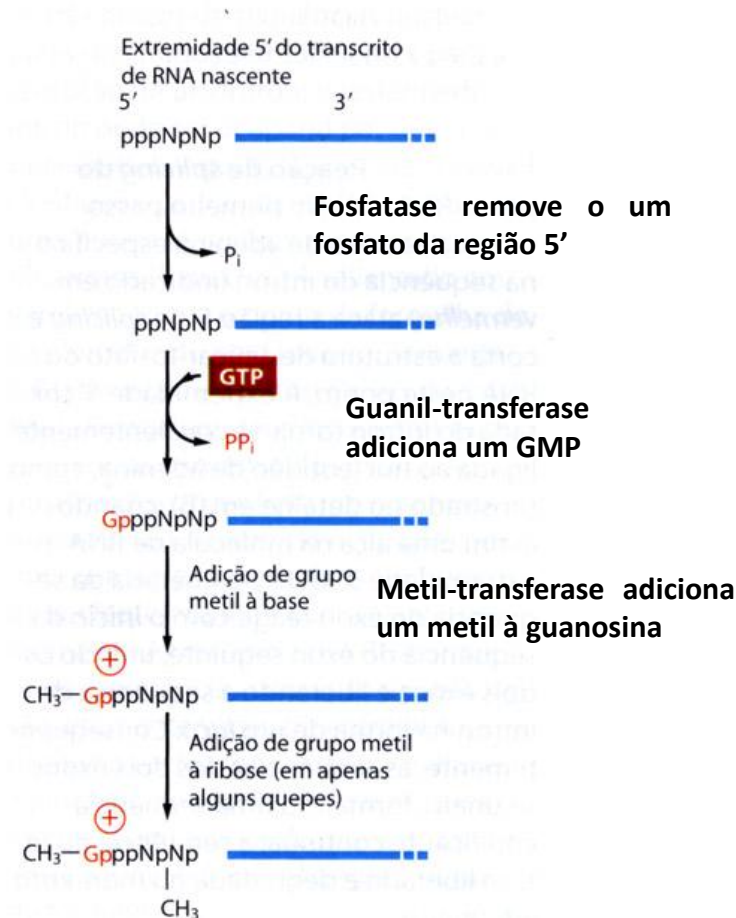
A extensão da transcrição em eucariotos está fortemente associada ao processamento de RNA

- As modificações nas extremidades permitem que a célula verifique se ambas as extremidades de uma molécula de mRNA estão presentes;



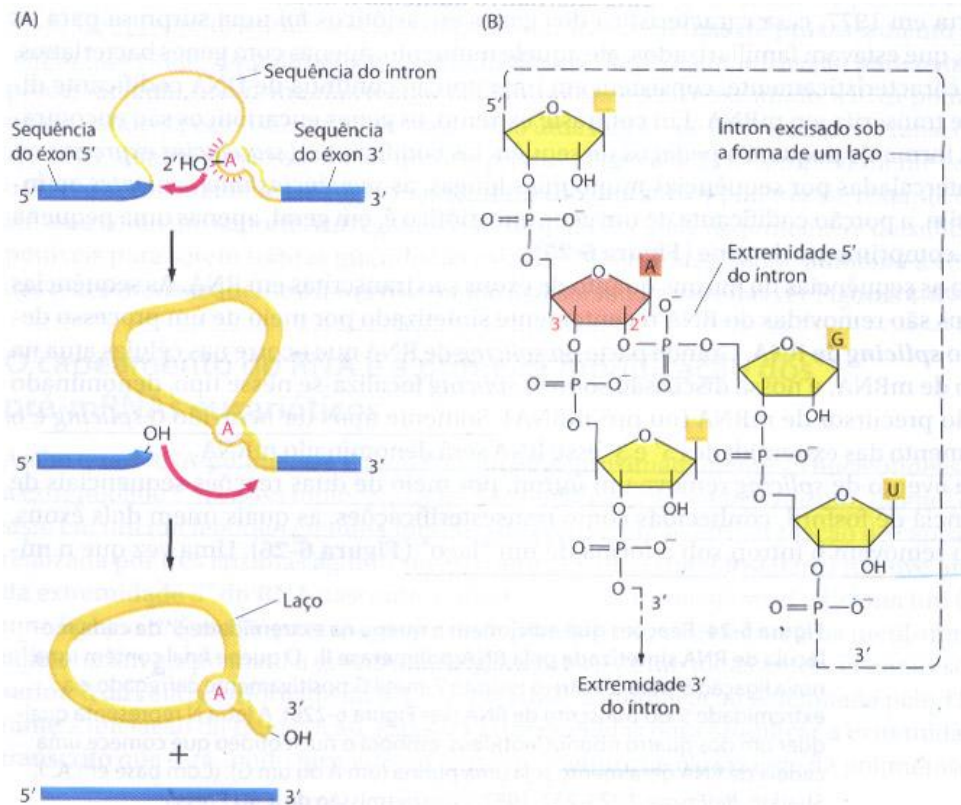
A extensão da transcrição em eucariotos está fortemente associada ao processamento de RNA

CAPEAMENTO



A extensão da transcrição em eucariotos está fortemente associada ao processamento de RNA

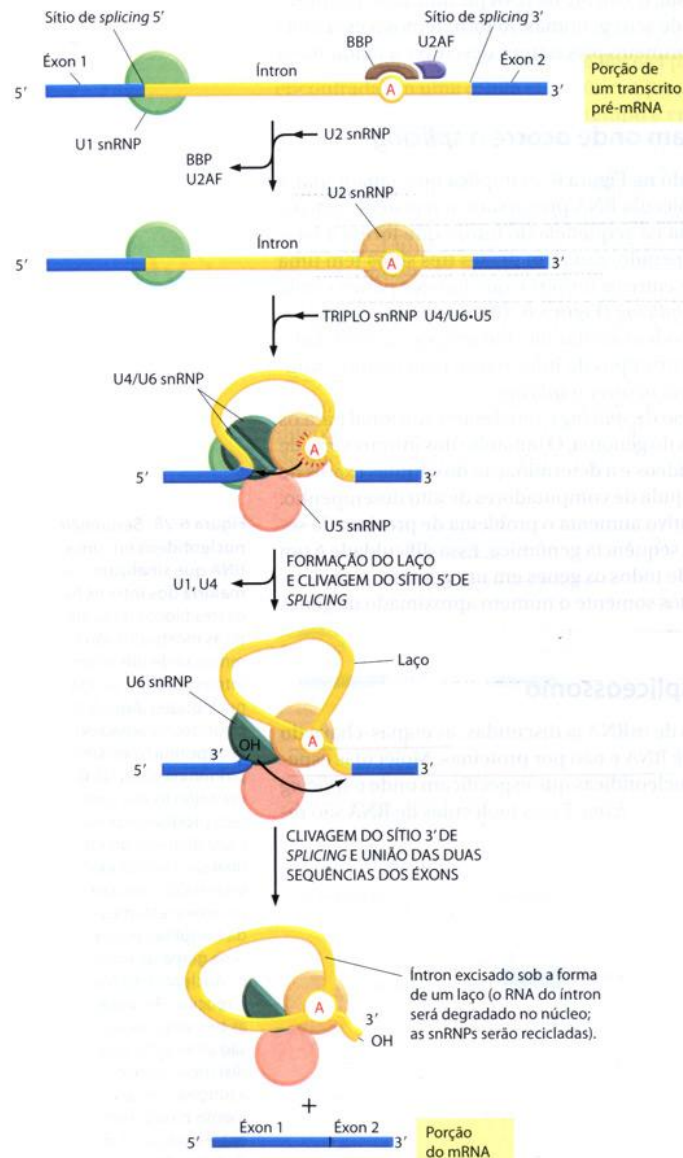
- A maquinaria de splicing do RNA é composta por 5 moléculas de RNA e cerca de 200 proteínas;
- Cada evento de splicing remove um íntron por meio de duas reações sequenciais de transferência de fosforil, conhecidas como transesterificações, as quais unem dois éxons, enquanto removem um íntron sob a forma de um “laço”;



O splicing do RNA é realizado pelo spliceossomo

- As etapas-chave do splicing do RNA são realizadas por moléculas de RNA e não proteínas;
- Pequenas moléculas especializadas de RNA (snRNAs – pequenos RNAs nucleares) reconhecem as sequências nucleotídicas que especificam onde o splicing deve ocorrer e também participam da química do splicing (U1, U2, U4, U5 e U6);
- Cada uma snRNA é complexado com pelo menos 7 subunidades protéicas para formar uma snRNP;
- As snRNPs formam o cerne do spliceossomo;

O splicing do RNA é realizado pelo spliceossomo



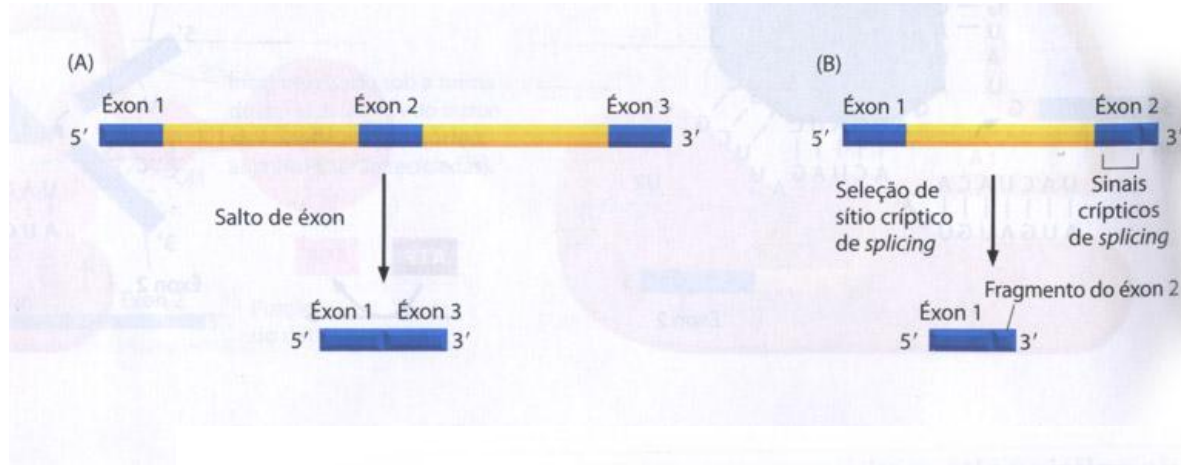
A snRNP U1 pareia com a junção 5' do *splicing* (ver Figura 6-30A) e a BBP (proteína de ligação ao ponto de forquilha) e o U2AF (fator auxiliar de U2) reconhecem o sítio do ponto de forquilha.

A snRNP U2 desloca BBP e U2AF e forma pares de base com a sequência consenso da região do ponto de forquilha (ver Figura 6-30B).

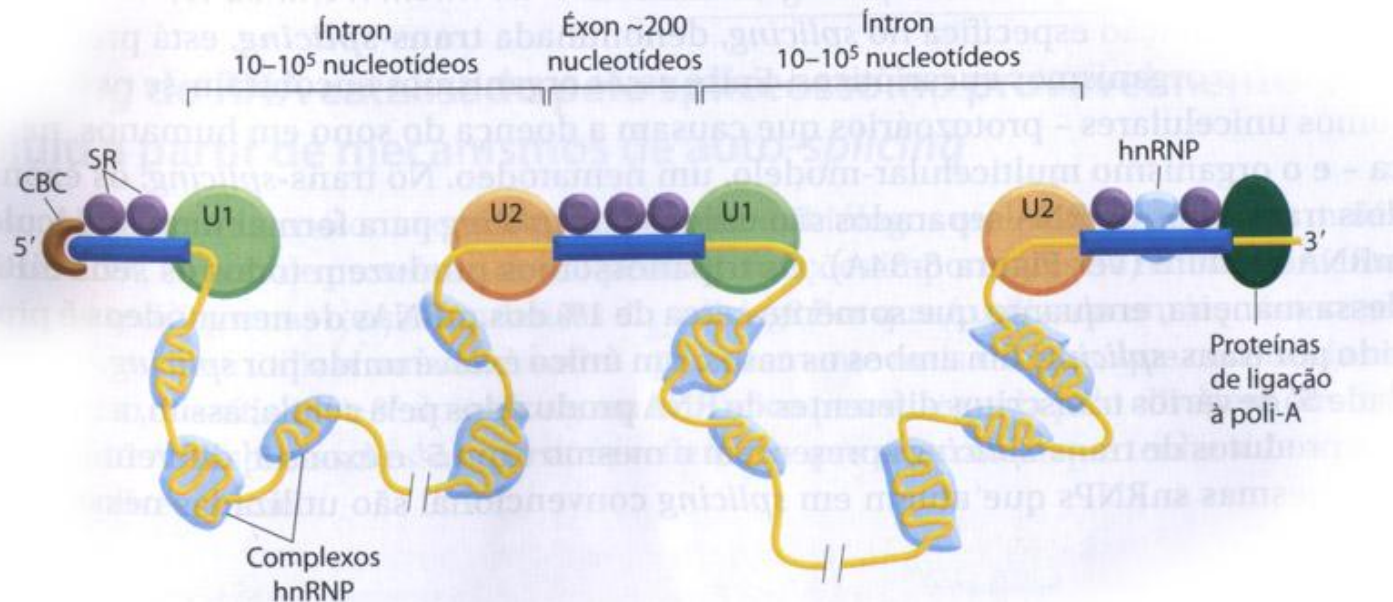
A tripla snRNP U4/U6-U5 entra na reação. Na tripla snRNP, os snRNAs U4 e U6 são mantidos firmemente em união pelas interações de pares de bases. Os rearranjos subsequentes criam o sítio ativo do spliceossomo e posicionam as porções apropriadas do substrato pré-mRNA para que ocorra a primeira reação fosforil-transferase.

Vários outros rearranjos RNA-RNA ocorrem e separam as bases pareadas de U4/U6, permitindo que a snRNP U6 desloque U1 na junção 5' do *splicing* (ver Figura 6-30A) para a formação do sítio ativo da segunda reação fosforil-transferase, a qual completa o *splicing*.

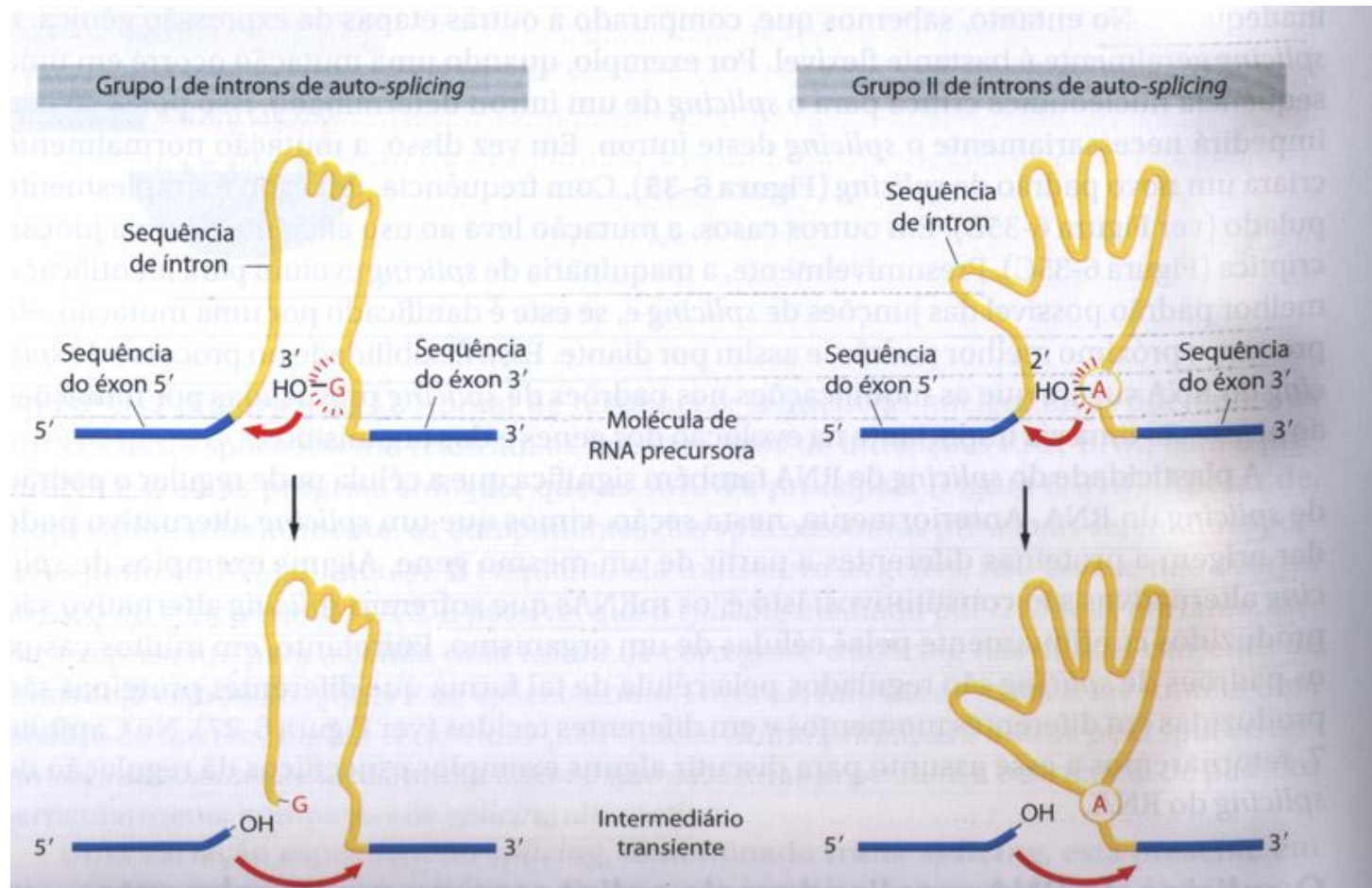
Outras propriedades do pré-RNA e sua síntese auxiliam a explicar a escolha dos sítios adequados de splicing



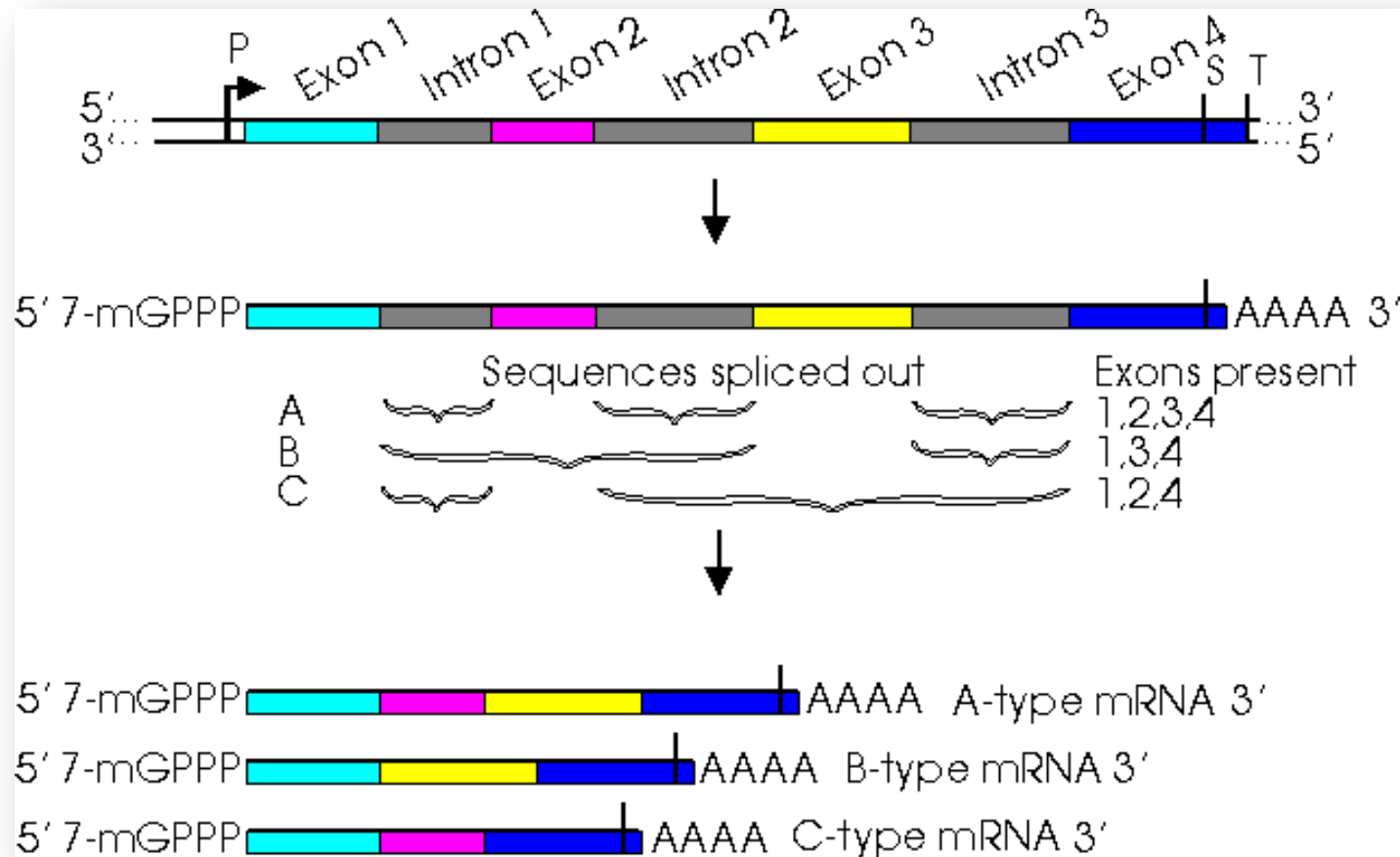
1. Os eventos iniciais do splicing são concomitantes com a transcrição;
2. Proteínas SR e hnRNPs;



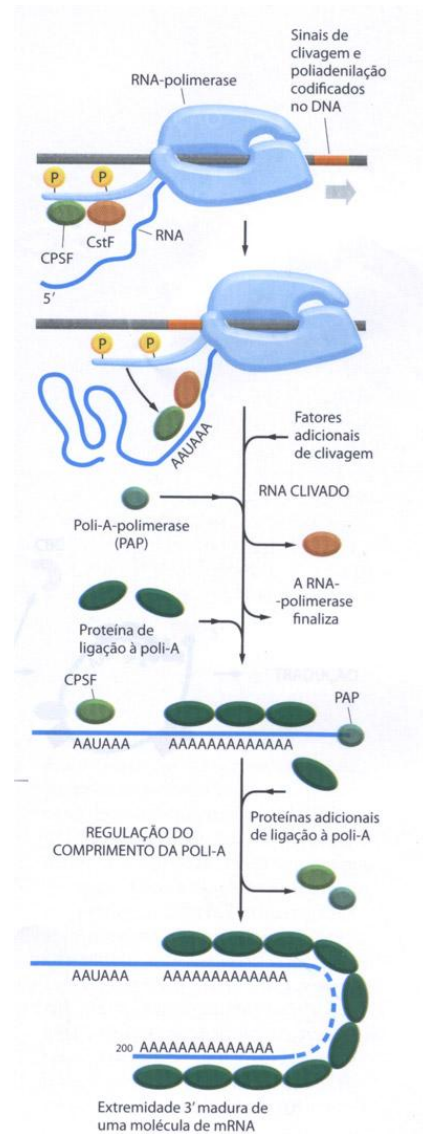
O splicing no RNA catalisado pelo spliceossomo provavelmente evoluiu a partir de mecanismos de auto-splicing



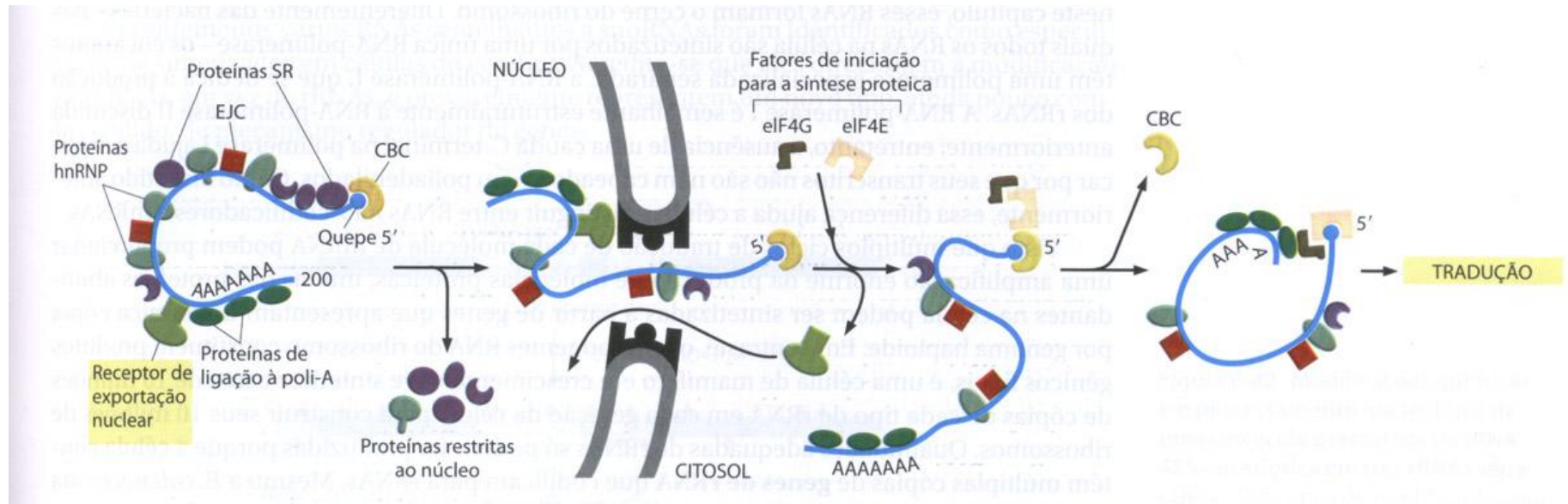
Splicing alternativo



As enzimas de processamento do RNA geram a extremidade 3' dos mRNAs de eucariotos

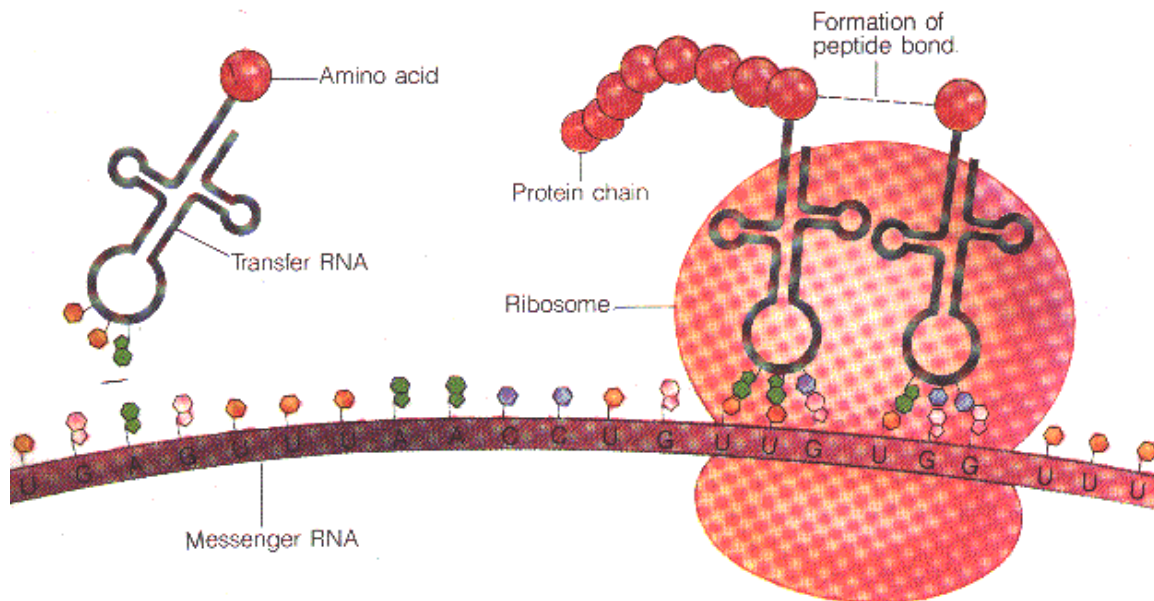


Os mRNA maduros são seletivamente exportados do núcleo



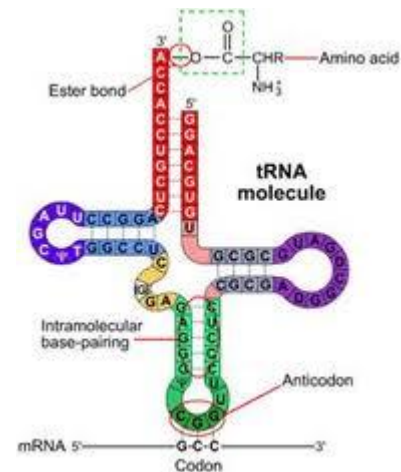
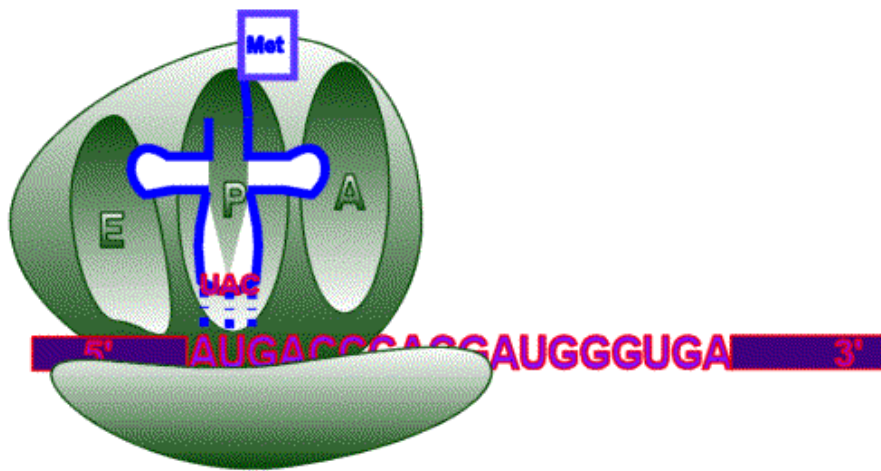
Síntese protéica

- As principais estruturas envolvidas na síntese protéica são: mRNA, tRNAs aminoacilados e ribossomos contendo rRNAs;
- O processo de tradução pode ser dividido em 3 estágios: iniciação, alongamento e terminação;
- Metionil-tRNA_i^{Met} reconhece o códon inicial AUG;
- O códon AUG para metionina funciona como códon inicial na grande maioria dos mRNAs;



Síntese protéica

- Procariotos e eucariotos contêm 2 diferentes metioninas tRNAs: $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ pode iniciar a síntese protéica, enquanto tRNA^{Met} somente pode incorporar metionina em uma cadeia protéica crescente.
- A mesma aminoacil-tRNA sintetase (MetRS) adiciona ambos tRNAs com metionina, mas somente $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ pode ligar-se ao sítio apropriado na subunidade ribossomal pequena, o sítio P, para iniciar a síntese de uma cadeia polipeptídica;
- O aminoacil-tRNA^{Met} e todos os outros tRNAs carregados são capazes de ligar-se somente ao outro sítio ribossomal, sítio A.
- O código genético é degenerado, pois mais de uma trinca de bases pode codificar o mesmo aminoácido: Ex. glicina (GLY) é codificada por GGG, GGC, GGA e GGU;



Síntese protéica

CÓDONS - m RNA

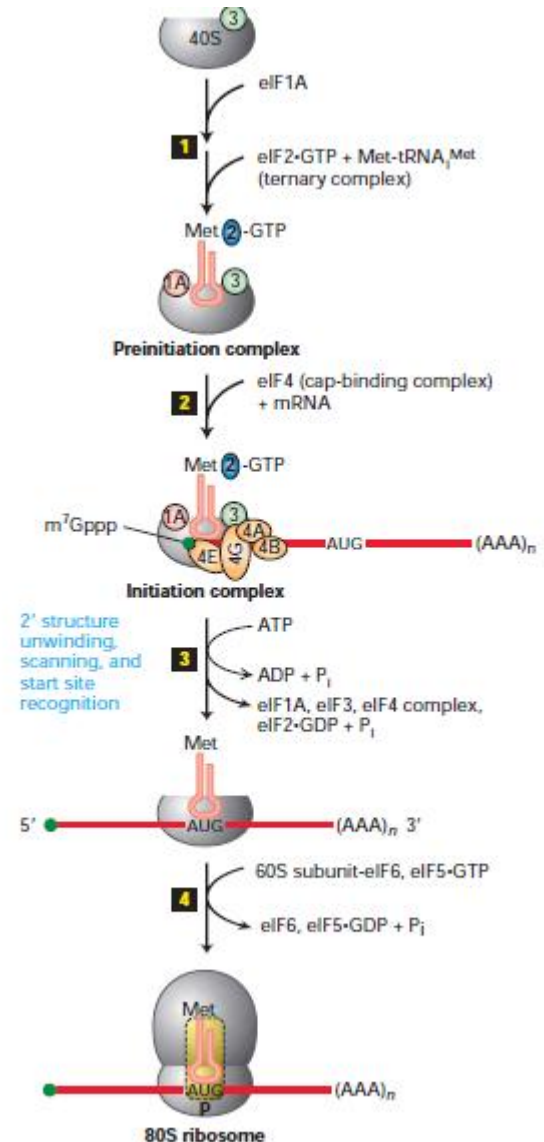
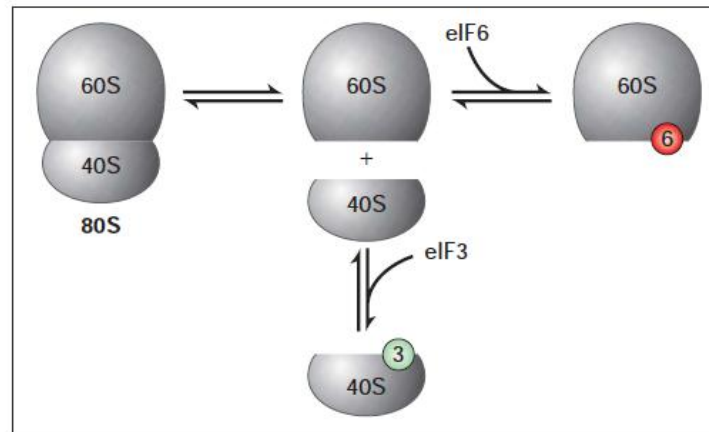
		Segunda Letra					
		U	C	A	G		
Primeira Letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Sem UAG } sentido	UGU } Cys UGC } UGA } Sem sentido UGG } Try	U C A G	Terceira Letra
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ileu AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Vai GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Síntese protéica

- O início da tradução ocorre no códon AUG mais próximo da região 5' de uma molécula de mRNA;
- No primeiro estágio da tradução ocorre a montagem do ribossomo complexado com uma molécula de mRNA e um tRNA iniciador ativado corretamente posicionado no códon de início.
- As subunidades ribossomais grande e pequena são mantidas separadas devido à ligação de 2 fatores de iniciação, chamados eIF3 e eIF6, em eucariotos;

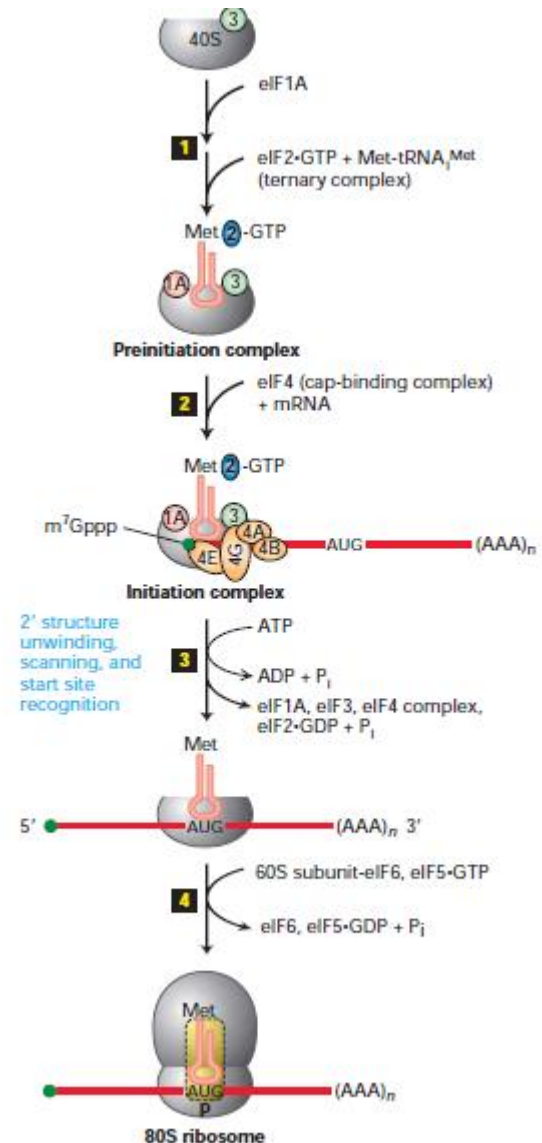
► **FIGURE 4-25 Initiation of translation in eukaryotes.**

(Inset) When a ribosome dissociates at the termination of translation, the 40S and 60S subunits associate with initiation factors eIF3 and eIF6, forming complexes that can initiate another round of translation. Steps 1 and 2: Sequential addition of the indicated components to the 40S subunit-eIF3 complex forms the initiation complex. Step 3: Scanning of the mRNA by the associated initiation complex leads to positioning of the small subunit and bound Met-tRNA^{Met} at the start codon. Step 4: Association of the large subunit (60S) forms an 80S ribosome ready to translate the mRNA. Two initiation factors, eIF2 (step 1) and eIF5 (step 4) are GTP-binding proteins, whose bound GTP is hydrolyzed during translation initiation. The precise time at which particular initiation factors are released is not yet well characterized. See the text for details. [Adapted from R. Mendez and J. D. Richter, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:521]



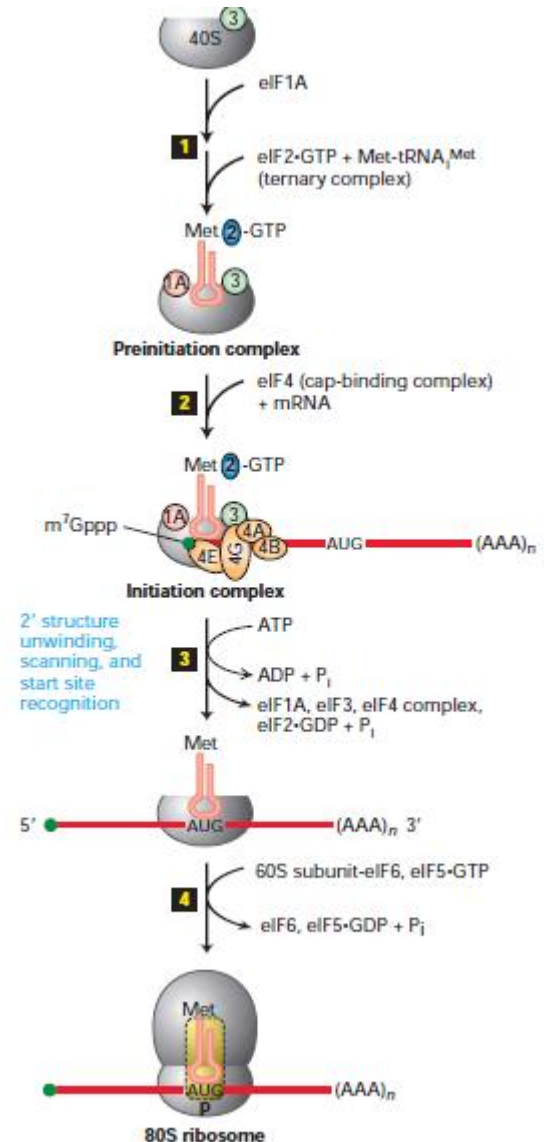
Síntese protéica

- O **complexo de pré-iniciação** da tradução é formado quando o complexo subunidade 40S – eIF3 liga-se por meio de eIF1A a um complexo ternário (aminoacil-tRNA_i^{Met}, eIF2 e GTP);
- As células podem regular a síntese de proteínas por meio da fosforilação de um resíduo de serina no eIF2 ligado ao GDP;
- O complexo fosforilado é incapaz de trocar o GDP por GTP e não pode ligar ao aminoacil-tRNA_i^{Met}, inibindo, assim, a síntese protéica;



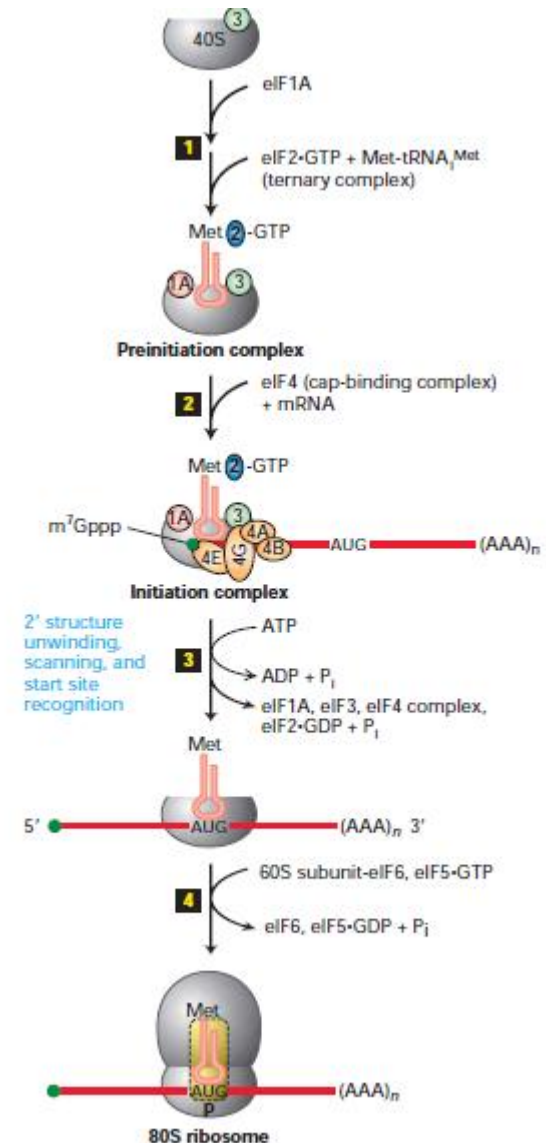
Síntese protéica

- Para a iniciação da tradução, o complexo mRNA-eIF4 associa-se com o complexo de pré-iniciação, formando, então o complexo de iniciação;
- O complexo de iniciação desliza ao longo do mRNA devido à atividade helicase do eIF4A, que usa a energia da hidrólise do ATP para desenrolar a estrutura secundária do RNA;
- O reconhecimento do códon de início conduz à hidrólise do GTP associado ao eIF2;



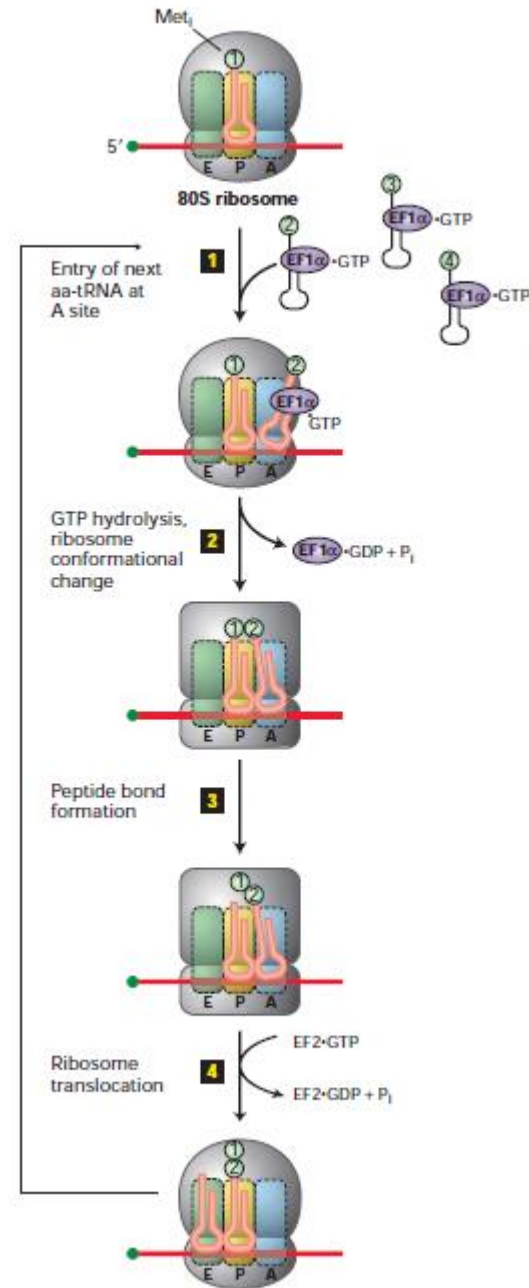
Síntese protéica

- A seleção do códon AUG de iniciação é facilitada por nucleotídeos específicos chamados de sequência de *kozak* (Marily Kozak): (5)**ACCAUGG** (3);
- Uma vez que a subunidade ribossomal pequena com seu aminoacil-tRNA_i^{Met} ligado esteja corretamente posicionada no códon de iniciação, a união com a subunidade ribossomal grande (60S) completa a formação do ribossomo 80S;
- **A formação do ribossomo 80S requer a ação de um outro fator (eIF5) e a hidrólise de um GTP associado a ele. Isso permite com que as subunidades ribossomais não se dissociem até que a molécula de mRNA inteira seja traduzida e a síntese protéica seja terminada;**
- Quando ocorre o correto posicionamento do complexo ribossomo 80S – Met-tRNA_i^{Met}, pode ser dado início a tradução do mRNA;



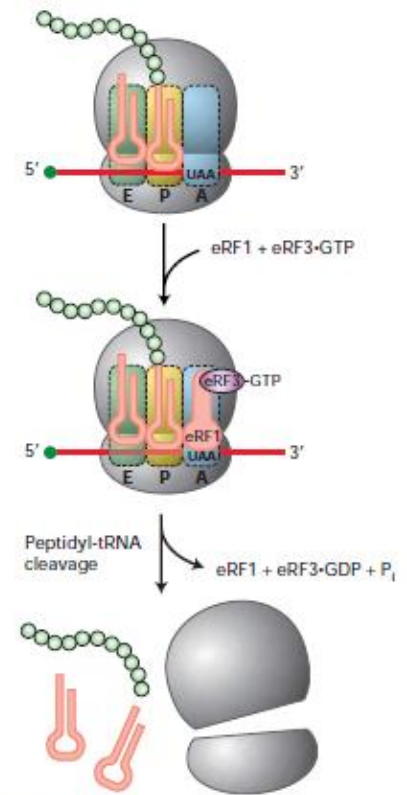
Síntese protéica

- Durante a etapa de alongamento, a cadeia polipeptídica permanece ligada ao tRNA no sítio P do ribossomo;
- Assim como no caso da iniciação, fatores de alongamento (EFs – EFtu e EFg em procariotos e EF1 e EF2 em eucariotos) são necessários para a alongamento das cadeias polipeptídicas;
- Os passos-chave do processo de alongamento são a **entrada de aminoacil-tRNAs sucessivos, formação de pontes peptídicas e o movimento (translocação) do ribossomo um códon a frente no mRNA**;
- O passo de translocação ao longo do mRNA é promovido pela hidrólise do GTP;



Síntese protéica

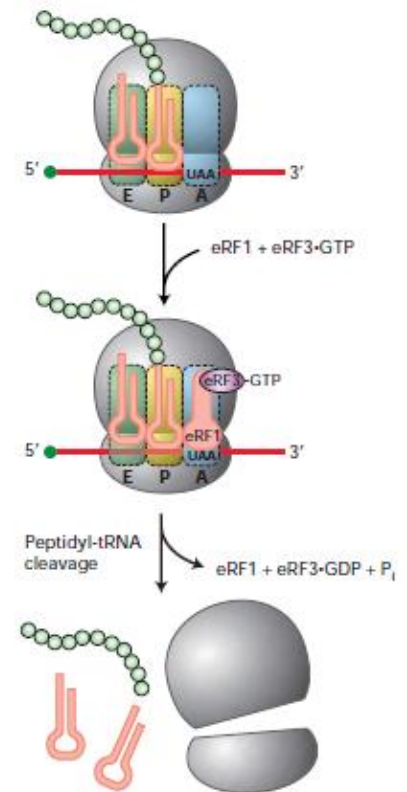
- O estágio final da tradução, assim como a iniciação e alongamento, requer sinais moleculares altamente específicos que decidem o destino do complexo **mRNA – ribossomo – peptidil-tRNA**;
- Em eucariotos, sabe-se que fatores de liberação atuam no final da tradução;
- O fator eRF1, cujo formato é similar ao de tRNAs, aparentemente age por meio da ligação ao sítio ribossomal A e reconhecimento do códon de parada;



▲ **FIGURE 4-29 Termination of translation in eukaryotes.** When a ribosome bearing a nascent protein chain reaches a stop codon (UAA, UGA, UAG), release factor eRF1 enters the ribosomal complex, probably at or near the A site together with eRF3-GTP. Hydrolysis of the bound GTP is accompanied by cleavage of the peptide chain from the tRNA in the P site and release of the tRNAs and the two ribosomal subunits.

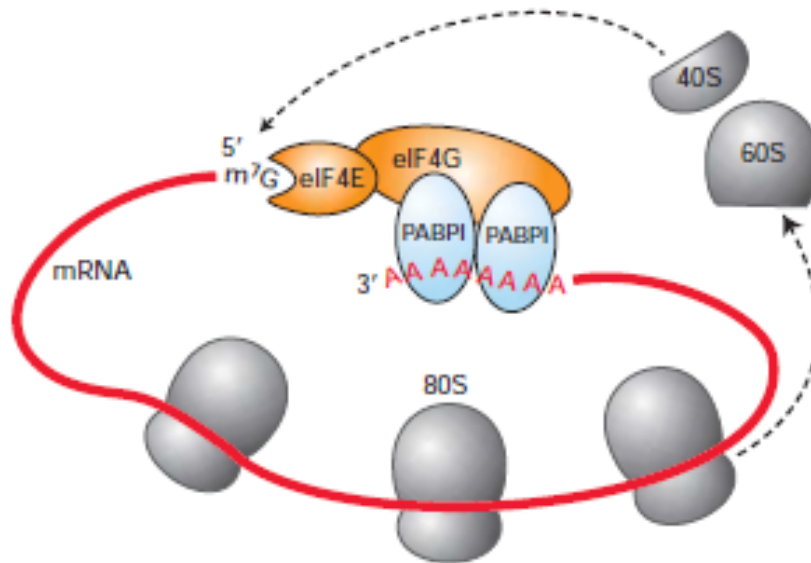
Síntese protéica

- O fator de liberação eRF3, que é uma proteína que se liga a GTP, age conjuntamente com eRF1 para promover a clivagem do peptidil-tRNA, liberando, assim, a cadeia polipeptídica;
- A proteína recém-sintetizada enovela-se na sua conformação tridimensional nativa por meio da ajuda de chaperonas.
- Fatores de liberação adicionais promovem a dissociação dos ribossomos, liberação das subunidades, do mRNA e do tRNA terminal;



▲ **FIGURE 4-29 Termination of translation in eukaryotes.** When a ribosome bearing a nascent protein chain reaches a stop codon (UAA, UGA, UAG), release factor eRF1 enters the ribosomal complex, probably at or near the A site together with eRF3-GTP. Hydrolysis of the bound GTP is accompanied by cleavage of the peptide chain from the tRNA in the P site and release of the tRNAs and the two ribosomal subunits.

Síntese protéica



◀ **FIGURE 4-31 Model of protein synthesis on circular polysomes and recycling of ribosomal subunits.** Multiple individual ribosomes can simultaneously translate a eukaryotic mRNA, shown here in circular form stabilized by interactions between proteins bound at the 3' and 5' ends. When a ribosome completes translation and dissociates from the 3' end, the separated subunits can rapidly find the nearby 5' cap (m^7G) and initiate another round of synthesis.