

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E GENÉTICA**

Março 2008

Texto Didático (revisado em agosto 2008)

Dr^a Judith Viégas, Prof^a Adjunta

BIOLOGIA MOLECULAR – Parte III

TRANSCRIÇÃO EM RNA

1. INTRODUÇÃO

Assim como o DNA e o RNA possuem estruturas análogas, também o processo de transcrição assemelha-se ao de replicação. A transcrição ou síntese de RNA é necessária para a formação de todos os tipos de RNA. **O RNA é o intermediário do DNA na síntese protéica**, sua atuação é essencial, pois soluciona alguns problemas que ocorreriam se o DNA agisse diretamente na síntese de proteínas, que seriam, por exemplo:

- **Envolvimento de toda molécula de DNA:** apesar de ser necessária apenas a síntese de uma determinada proteína (por exemplo, aquela codificada pelo gene α), o DNA ao envolver-se diretamente estaria envolvendo nesta síntese, também, todos os seus outros genes e não apenas o gene alfa;
- **Associação do DNA com histonas:** em eucariotes, o DNA está associado com várias moléculas, principalmente com as proteínas histônicas, compondo os cromossomos, o que dificulta sua ação direta na síntese protéica;
- **Localização nuclear do DNA:** também, em eucariotes, o DNA está confinado ao núcleo, enquanto que a síntese de proteínas ocorre em nível citoplasmático.

Desta maneira, o DNA transcreve-se em RNA, para que este aja como seu intermediário na formação do produto gênico.

A transcrição, apesar de análoga à replicação, difere em alguns pontos:

- a replicação envolve toda a molécula de DNA, enquanto que a **transcrição envolve apenas a parte da molécula de DNA que necessita ser transcrita, ou seja, aquela parte relativa a um ou poucos genes;**

- na replicação, ocorre a abertura de toda a molécula do DNA, enquanto que **na transcrição ocorre a abertura de parte da molécula de DNA, ou seja, aquela parte relativa a um ou poucos genes;**
- na replicação, ambos os filamentos da dupla hélice de DNA servem de modelo para a síntese dos filamentos novos, enquanto que **na transcrição apenas parte do filamento do DNA (o filamento modelo ou molde) serve de modelo para a síntese de um determinado RNA;** o filamento do DNA, que é complementar à porção do filamento modelo, não possui codificação genética para este determinado gene ou genes.

É importante ressaltar que **o RNA transcrito pode ser qualquer tipo de RNA**, desde um RNA mensageiro (mRNA), como um RNA funcional (tRNA, rRNA, snRNA, siRNA, etc.), pois todos tem sua codificação genética no DNA.

2. TRANSCRIÇÃO

A transcrição é a síntese de uma molécula de RNA a partir do molde de um dos filamentos de DNA.

Assim como na replicação do DNA, a transcrição em RNA é mediada por uma enzima, a **RNA polimerase**, que faz o alinhamento de nucleotídeos, só que neste caso, alinha os **ribonucleotídeos** trifosfatados (ATP, GTP, CTP e UTP) ao longo de um dos filamentos de DNA, também, sempre no sentido 5' → 3'.

Assim como os filamentos novos do DNA são complementares aos filamentos antigos, os transcritos de RNA são complementares ao seu modelo de DNA, ou seja, ao pedaço de filamento de DNA que lhe serviu de molde. Conseqüentemente, a seqüência de nucleotídeos no RNA será idêntica à do filamento não modelo do DNA, exceto pelos nucleotídeos de Timina, que serão trocados pelos de Uracila, conforme Figura 1.

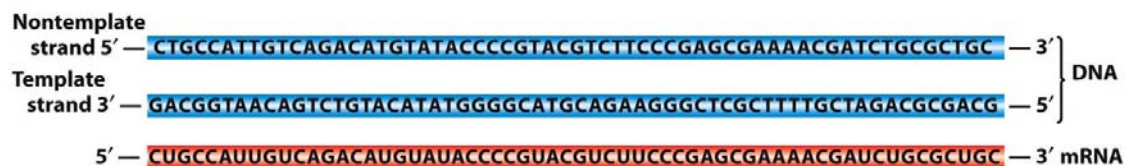


Figure 8-6
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Figura 1: Esquema mostrando pedaço de dupla cadeia do DNA, um gene, e seu mRNA transcrito. Neste caso o filamento modelo é o 3'-5', enquanto o filamento não modelo é o 5'-3'.

O fato da seqüência de nucleotídeos do RNA ser idêntica à do filamento não modelo do DNA (com exceção da Timina trocada por Uracila) faz com que o filamento não modelo do DNA seja chamado de **filamento ou fita codificadora**.

Os genes a serem transcritos não estão todos no mesmo filamento da cadeia de DNA. De acordo com a Figura 2, alguns genes podem estar um dos filamentos (3'-5') e outros no filamento oposto (5'-3').

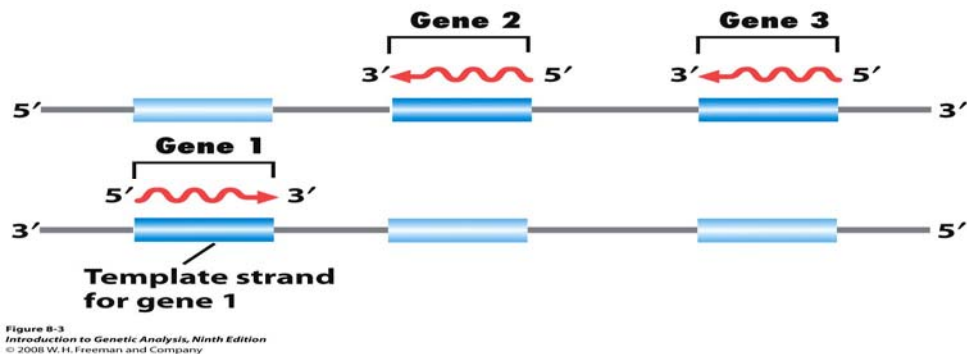


Figura 2: Dupla cadeia de DNA, mostrando três genes, dos quais dois são transcritos na cadeia 5'-3' e apenas um é transcrito na cadeia 3'-5', conforme Griffiths et al (2008). [cada reta cinza com blocos azuis=um filamento do DNA, vermelho ondeado com seta=RNA]

A transcrição necessita ser um processo muito preciso, deve ser bem sinalizado, pois o gene a ser transcrito é um pequeno pedaço de uma molécula muito longa de DNA. A transcrição tem três momentos essenciais que são denominados de iniciação, alongamento e finalização ou terminação, os quais apesar de serem basicamente semelhantes em procariotes e eucariotes têm diferenças importantes.

2.1. Processo de transcrição em procariotes

A RNA polimerase de procariotes é uma enzima complexa constituída de cinco cadeias polipeptídicas diferentes: α , β , β' , ω e σ . A subunidade **sigma** (σ) liga-se fracamente ao complexo enzimático, podendo desligar-se do mesmo, o qual tem função polimerase apenas com as outras quatro cadeias (α , β , β' e ω).

A subunidade σ faz o reconhecimento certo do ponto de início da transcrição e desliga-se da RNA polimerase, logo que esta inicia a transcrição. O fator sigma é de extrema importância: (1) a RNA polimerase pode transcrever mesmo sem o auxílio do fator sigma, mas ocorrerão erros em relação ao início da transcrição, e (2) se após o

início da transcrição, o fator σ não for desligado da RNA polimerase, a transcrição será abortiva.

Em procariotes, a RNA polimerase (RNAPol) liga-se ao promotor. **O promotor é uma seqüência específica do DNA, localizada próxima do início da região a ser transcrita.** A primeira base a ser transcrita está sempre na mesma localização, logo após o promotor, e é designada **sítio de iniciação**. Esta primeira base a ser transcrita é numerada como **+1**, por convenção (Figura 3).

Como a direção da transcrição é 5'→3', geralmente a extremidade 5' é “desenhada” na esquerda e a 3' é “desenhada” na direita (segundo a direção da escrita ocidental). Assim, pode-se “desenhar” o sítio de iniciação à direita do promotor. [Desenhar um ácido nucléico é ir colocando as suas bases nitrogenadas, sempre da extremidade 5' para a 3', para que ele seja sintetizado em laboratório, por exemplo. Assim, se for pedido um RNA com o seguinte desenho AACGUAGC, isto indica que ele tem direção 5' - AACGUAGC -3' e não a direção 3' - AACGUAGC -5']

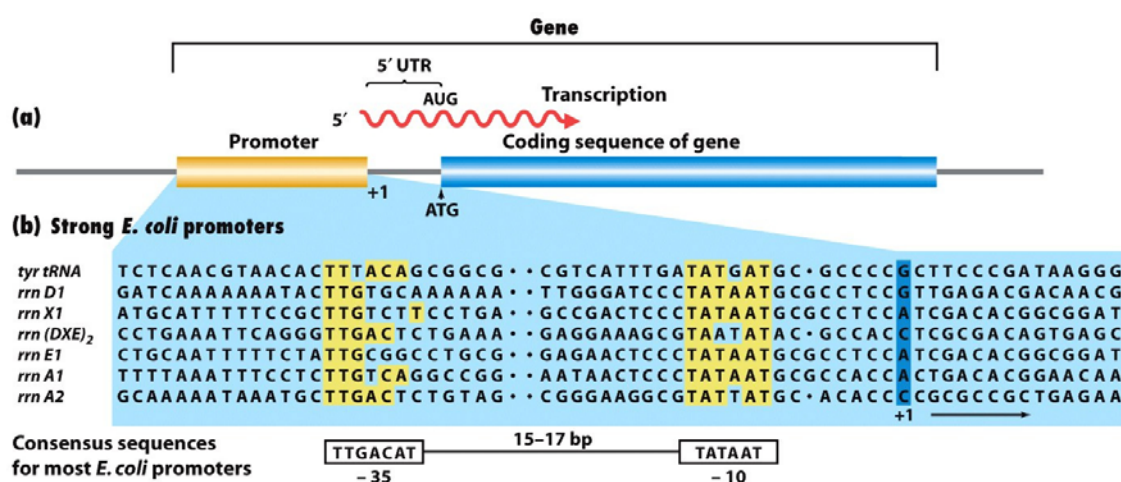


Figure 8-7
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Figura 3: (a) Filamento de DNA de procaríote mostrando processo de transcrição a partir do sítio de iniciação +1; (b) Bases nitrogenadas de fortes promotores de *Escherichia coli*, mostrando seqüências de consenso da maioria dos promotores desta bactéria (Griffiths et al, 2008).

Diz-se que o promotor está **upstream** do sítio de iniciação (+1), porque ele está localizado na frente do sítio de iniciação, na direção oposta da transcrição. [*upstream* = rio acima, contra a corrente]. Se estiver **downstream** do sítio de iniciação (+1), é porque está localizado depois do sítio de iniciação, na direção da transcrição. [*downstream* = a jusante, rio abaixo]. Nucleotídeos *upstream* do sítio de iniciação são indicados por um

sinal negativo (-) antes do seu número de ordem e aqueles *downstream*, por um sinal positivo (+).

Ao estudar, pela primeira vez, os promotores de diferentes genes isolados de *Escherichia coli*, os pesquisadores verificaram que, aproximadamente, nas localizações 10 e 35 pares de bases *upstream*, ou seja, na altura dos nucleotídeos -10 e -35, havia seis nucleotídeos que eram idênticos em todos os genes estudados, e que foram chamados de **seqüências de consenso**. As outras seqüências de nucleotídeos dos genes eram diferentes, as seqüências de nucleotídeos dos promotores também eram diferentes, mas as seqüências de consenso eram idênticas ou praticamente idênticas. Estas seqüências de consenso são muito importantes na transcrição e mostraram-se muito importantes nos processos de biotecnologia, de modo geral.

Iniciação da transcrição (Figura 4): A RNA polimerase liga-se, inespecificamente, ao DNA e desliza ao longo da dupla hélice até que a subunidade σ sinalize o início da transcrição, ligando-se às seqüências de consenso (-10 e -35) do promotor, formando um forte complexo RNAPol-promotor. Então, a RNAPol abre a dupla hélice de DNA, formando uma **bolha de transcrição**, e a transcrição é iniciada pela polimerização dos ribonucleotídeos livres, a partir sítio iniciador.

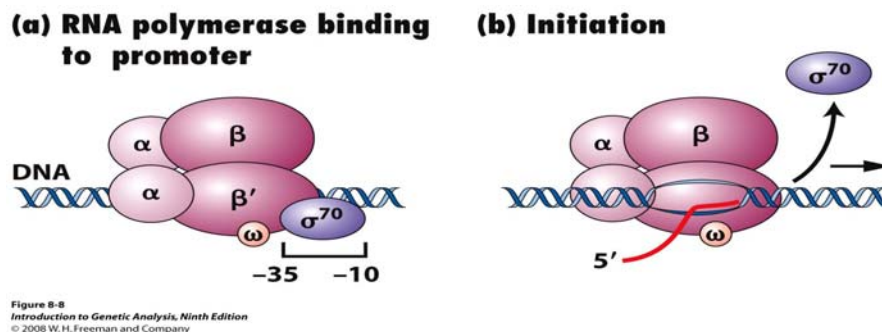


Figura 4: Ligação da RNA polimerase ao promotor, com a subunidade σ reconhecendo as seqüências de consenso (-10 e -35), ocorre a abertura da dupla hélice de DNA, formando uma **bolha de transcrição**, e a transcrição é iniciada pela polimerização dos ribonucleotídeos livres, a partir sítio iniciador, enquanto a subunidade σ se desliga da RNA pol (Griffiths et al, 2008).

Alongamento da transcrição (Figura 5a): A subunidade σ desliga-se do core da RNAPol. A RNAPol continua migrando ao longo do DNA, desnaturando-o, abrindo a dupla hélice, continuando a expor as seqüências de nucleotídeos a serem copiadas, alinhando os nucleotídeos livres em seus locais corretos (de acordo com o pareamento complementar de bases, formando um DNA-RNA híbrido) e, com isso, alongando a cadeia de RNA.

Conforme a cadeia de RNA vai sendo sintetizada e a RNAPol vai avançando sobre o filamento molde de DNA, o RNA nascente vai se soltando e a própria RNAPol vai renaturando o DNA, na região imediatamente posterior à da síntese, ou seja, a dupla hélice de DNA volta a fechar-se logo após a passagem da RNAPol e de ter ocorrido o desprendimento da cadeia de RNA nascente.

Término ou finalização da transcrição (Figura 5b): A transcrição terminará quando houver uma sinalização de término, que pode ser (1) a formação de uma alça (**grampo de terminação**) do próprio RNA nascente, o que irá desestabilizar, isto é, separar o DNA-RNA híbrido, ou (2) a presença do **fator rô**, proteína que se liga ao DNA, no ponto final da transcrição, e que barra a continuidade da RNA polimerase, a qual, então, se desliga do DNA e da cadeia de RNA.

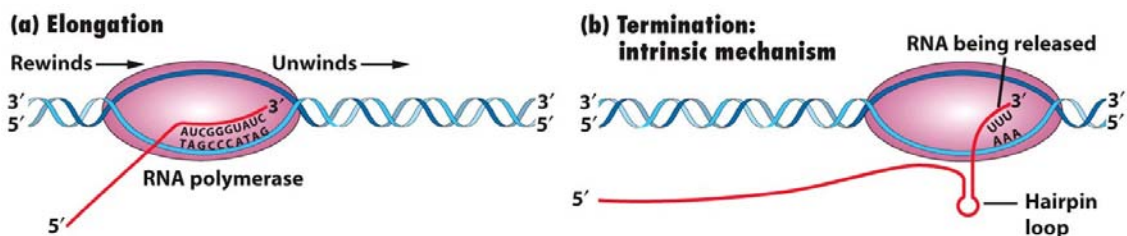


Figure 8-9
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Figura Figura 5: (a) Alongamento da transcrição mostrando a abertura e o fechamento da bolha de transcrição conforme ocorre o alongamento da cadeia de RNA; (b) Finalização da transcrição devido à formação de grampo de terminação na cadeia de RNA nascente (Griffiths et al, 2008)

A função da RNA polimerase, portanto, além de alinhar os ribonucleotídeos complementares à cadeia molde do DNA é de:

- encontrar o início correto da transcrição, através da subunidade sigma;
- abrir a dupla hélice de DNA;
- manter as fitas do DNA separadas na região de síntese;
- expor as seqüências de nucleotídeos a serem copiadas;
- alinhar os nucleotídeos livres;
- manter estável o DNA-RNA híbrido na região de síntese;
- renaturar o DNA na região imediatamente posterior à da síntese;
- sozinha ou com auxílio de proteína(s) específica(s), terminar a síntese do RNA.

A cadeia de RNA em crescimento vai se destacando da cadeia modelo e a molécula de DNA, na parte que já foi percorrida pela RNA polimerase, pode aceitar outra RNA polimerase formando novo complexo e iniciando outro ciclo de transcrição ou vai se

fechando caso a transcrição seja encerrada. Esta é uma maneira de controle gênico, pois serão produzidas tantas cadeias de RNA sobre o molde de um único gene, quantas forem necessárias, basta que os genes sejam percorridos pelo número necessário de RNA polimerases. No caso dos RNA ribossômicos (rRNA), que são necessários constantemente e em grandes quantidades por todas as células dos organismos, além deste controle, ainda os próprios genes estão duplicados várias vezes. No caso de genes como os para rRNAs, em que há uma grande demanda de síntese, formam-se figuras tipo folhas ou árvores de Natal, vistas ao microscópio eletrônico (Figura 6).

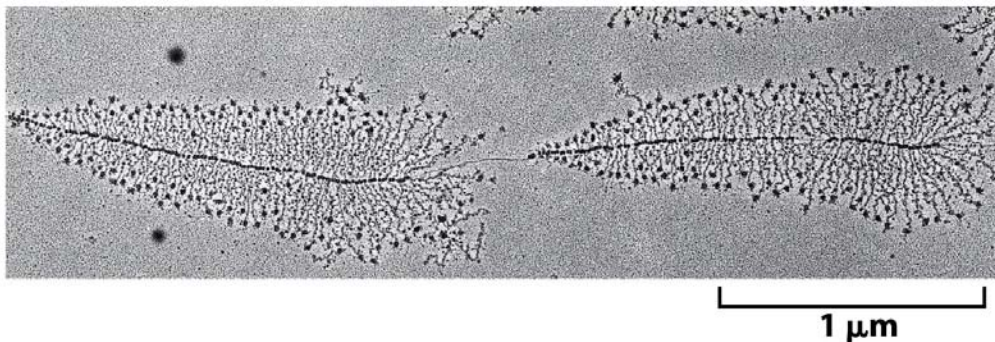


Figura 6: Dois genes idênticos de rRNA sendo transcritos: as partículas observadas nos finais 5' de cada rRNA nascente são, provavelmente, proteínas ribossômicas que já estão se complexando com estes rRNAs (Alberts et al., 2008).

2.2. Transcrição em eucariotes

O processo de transcrição descrito até aqui é o que ocorre em procariontes, geralmente é o de *E. coli*, que é melhor estudado e descrito em livros. A transcrição em eucariotes, apesar de seguir as mesmas regras básicas, é um processo bem mais complexo e será visto neste texto de maneira simplificada, pois a diversidade ocorrente, não só entre organismos, mas também entre células, aumenta a complexidade e dificulta o estudo. Isto se deve, principalmente, a três fatores:

1º) Os genomas eucariotos são maiores que os procariotos, mas ao mesmo tempo, os eucariotos têm muito mais material genético não codificante do que os procariotos. Uma bactéria tem 1 gene por 1.400 pares de bases (pb), uma drosófila tem 1 gene por 9.000 pb e um ser humano tem 1 gene por 100.000 pb. Observa-se que a densidade gênica é muito maior numa bactéria do que num ser humano (\approx em mamíferos). Esta baixa densidade gênica em mamíferos faz com que a transcrição, principalmente a **iniciação da transcrição**, seja uma etapa muito complicada, pois em organismos multicelulares, procurar um determinado gene, numa determinada célula, num determinado momento de vida do organismo, é semelhante a procurar uma agulha num palheiro (Griffiths et al,

2008). Devido a isto, em eucariotes existem, pelo menos, cinco RNA polimerases (RNAPol) diferentes, cada uma envolvida na síntese de RNAs específicos:

****RNAPol I** transcreve os genes dos RNA ribossômicos: rRNAs 18S, 28S e 5,8S;

****RNAPol II** transcreve os genes que codificam proteínas, os pré-mRNAs, que serão processados em um último transcrito que são os mRNAs, e mais alguns genes para snRNAs e snoRNAs (*small nuclear RNAs & small nucleolar RNAs*);

****RNAPol III** transcreve todos tRNAs, o rRNA 5S, alguns snRNAs e pequenos RNAs.

As RNA polimerases de eucariotes sempre necessitam de proteínas auxiliares, os **fatores de transcrição**, cuja função é reconhecer o promotor, ligar-se ao DNA, interagir com outros fatores formando um complexo ao qual se associa a RNA polimerase.

2º) Os eucariotes possuem núcleo, onde está situado o genoma, o que já não acontece com os procariotes. Em procariotes, a informação do RNA é quase que imediatamente traduzida em cadeia de aminoácidos (polipeptídeo), o que não ocorre com os eucariotos, em que a transcrição e a tradução estão espacialmente separadas. Nos eucariotos, a transcrição ocorre no núcleo e a tradução ocorre no citoplasma. Assim, antes que os RNAs transcritos saiam do núcleo, eles devem ser modificados de várias maneiras, dependendo de seu tipo, é o chamado **processamento do RNA**.

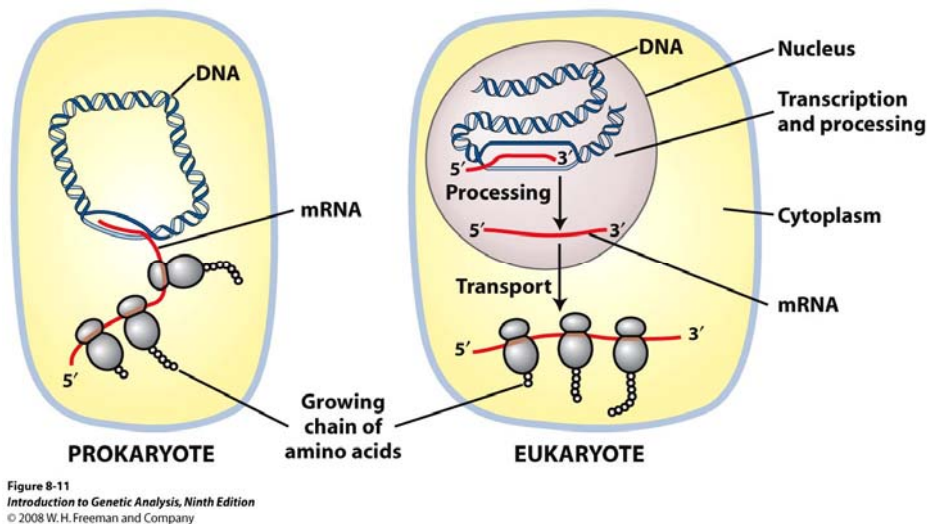


Figura 7: Diferenças entre o destino do RNA transcrito em procariotes e em eucariotes (Griffiths et al, 2008).

3º) O DNA dos eucariotos além de estar confinado ao núcleo, está complexado com diversas proteínas formando os cromossomos e, tanto para replicar, como para transcrever, necessita estar “desbloqueado”, isto é não pode estar muito compactado com as proteínas cromossômicas, como ocorre quando a célula está em divisão.

2.3. Processamento do RNA

Após a transcrição, é desfeito o complexo transcricional e o RNA sintetizado, após seu processamento, irá rumar para o local de sua atividade fisiológica: o mRNA e os tRNAs irão para o citoplasma, enquanto o rRNA permanecerá em nível de nucléolo para complexar-se com as proteínas ribossômicas e, então, já como parte integrante das subunidades ribossomais, migrará para o citoplasma, através dos poros do envelope nuclear, posicionando-se nos locais de síntese protéica.

Os rRNAs são clivados e ligam-se a proteínas ribossômicas específicas no nucléolo; os tRNAs sofrem metilação em algumas de suas bases e redução de comprimento através de clivagem e os mRNAs passam por um processamento mais complexo denominado de emenda/junção ou *splicing*.

Os rRNAs transcritos são denominados de **transcritos primários**, não representando a molécula de rRNA funcional, que só estará pronta após adição, deleção ou modificação de poucos ou vários nucleotídeos.

Os rRNAs e tRNAs são, normalmente, processados tanto em procaríotes como em eucariotes. Os mRNAs são processados apenas em eucariotes (Figura 8).

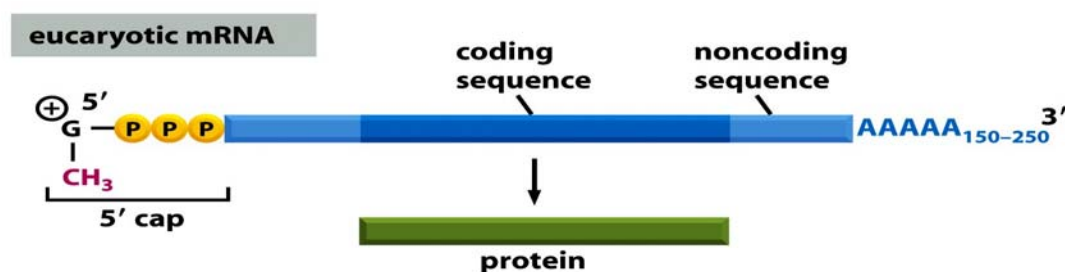


Figure 6-22a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 8: Adição do cap na extremidade 5' e da cauda poli-A na extremidade 3' do mRNA eucarioto, antes de seu processamento (*splicing* ou emenda), modificado de Alberts et al (2008).

O **transcrito primário** ou **precursor de mRNA** ou **pré-mRNA** (também chamado de **hnRNA=RNA heterogêneo nuclear**) possui seqüências que não são incluídas na forma final do mRNA, os íntrons, e seqüências que serão mantidas, após o processamento deste ácido nucléico, os éxons. Com algumas exceções, a presença de éxons e íntrons é característica de eucariotes. Além disso, o mRNA, antes mesmo de terminada sua transcrição, recebe a ligação de um nucleotídeo de guanina metilado (7-metilguanilato) na extremidade 5', que é chamado de **cap** (=capacete ou quepe) e cujas funções são a proteção contra a ação de exonucleases e o reconhecimento, pelo

ribossomo, do sítio de início de síntese protéica. Após o final da transcrição, é adicionada uma **cauda de poli-A** à extremidade 3' do mRNA, com cerca de 200 resíduos de adenina.

Após a adição do cap, da cauda poli-A e, às vezes, da metilação de adeninas, o pré-mRNA precisa sofrer o processo de excisão de íntrons e junção de éxons, chamado de **RNA splicing** (*splicing* = ação de emendar ou de unir; união; emenda), **emenda do RNA** ou **recomposição do mRNA**. Este processo é realizado, principalmente, por **pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs=small nuclear ribonucleoproteins** ou *snurps*). Conforme o mRNA vai sendo transcrito, os snRNPs ligam-se em cada extremidade do íntron com a finalidade de aproximar estas extremidades, formando uma alça com o íntron e aproximando os éxons separados pelo mesmo. Clivagens e ligações ocorrem, unindo os éxons e liberando íntrons em forma de laço (Figura 9).

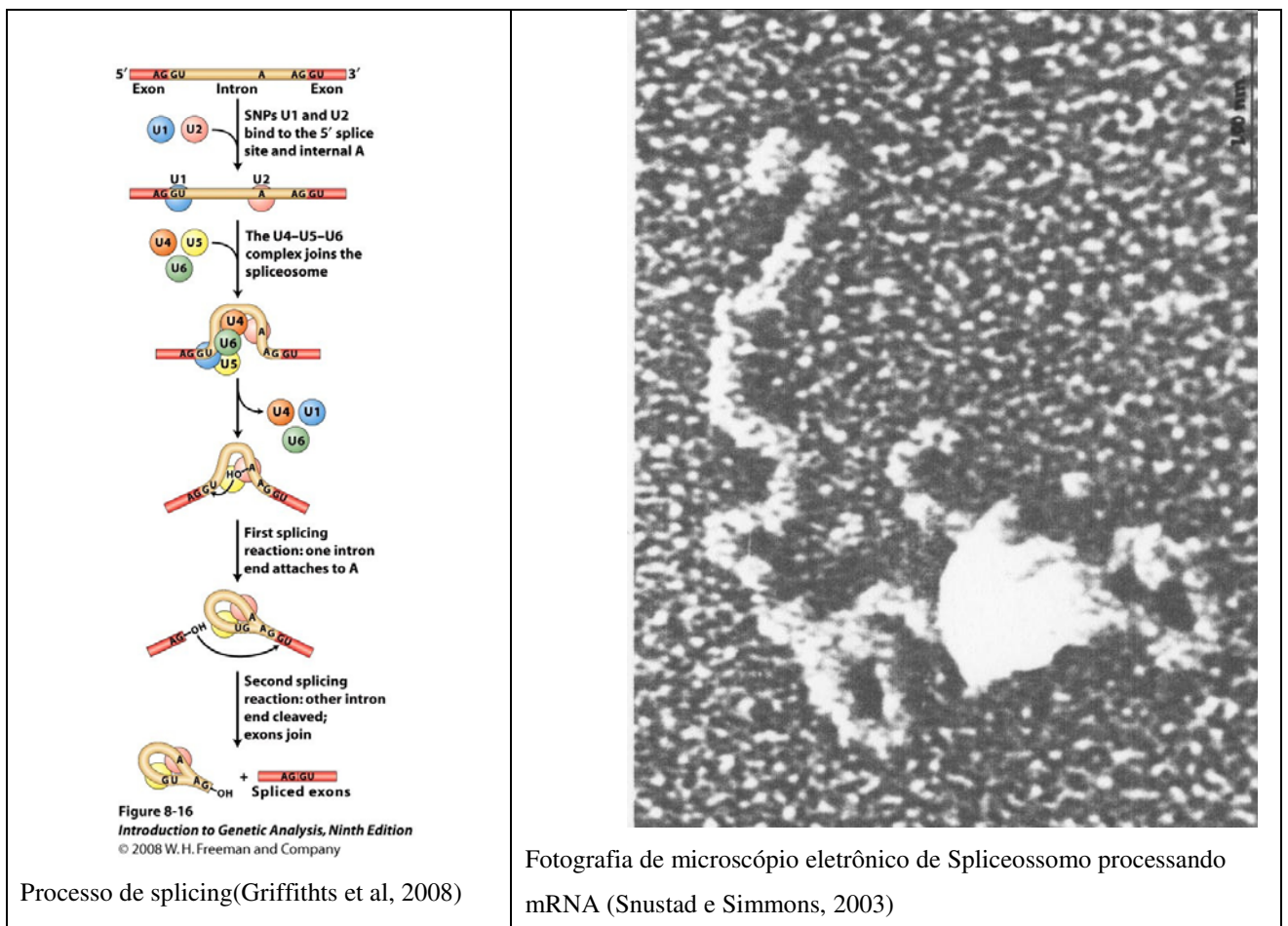


Figura 9: Esquema e fotografia do processamento do mRNA

Cada snRNP é formado por 6-10 proteínas associadas a pequenas moléculas de pequenos RNAs nucleares (**snRNAs**=*small nuclear RNAs*), com cerca de 100 a 300 nucleotídeos. A reunião de vários snRNPs com outras proteínas, durante o processamento do RNA forma o **spliceossomo**, complexo com tamanho semelhante ao de um ribossomo (3×10^3 KDa) e que não atravessa os poros nucleares (Figura 9). Após a ocorrência da emenda do RNA, proteínas receptoras, localizadas próximas aos poros nucleares, reconhecem o mRNA e o transportam ativamente para o citoplasma.

O processamento dos rRNAs e tRNAs é feito, geralmente, através da clivagem do precursor de RNA por enzimas tipo RNAases ou ribonucleases (Figura 10).

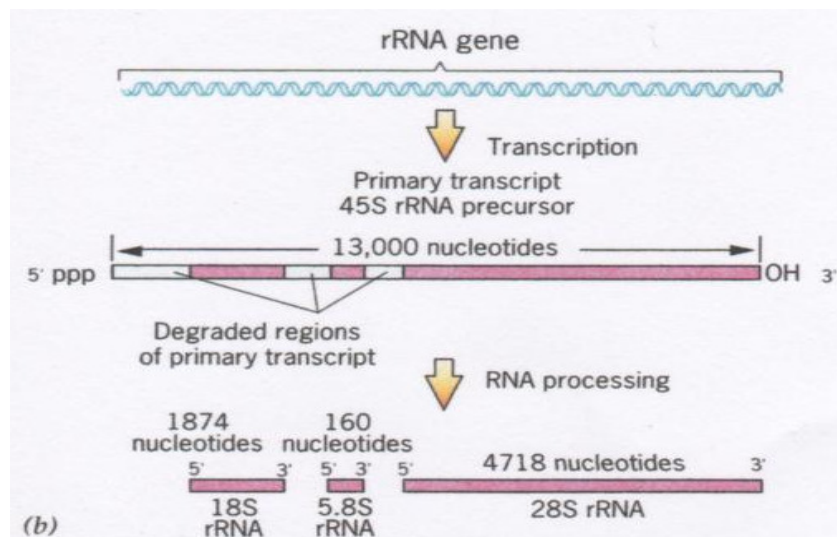


Figura 10: Esquema do processamento por clivagem do rRNA 45S em mamíferos

Outras RNA polimerases:

- **RNA polimerase de mitocôndria:** sintetiza os RNAs da mitocôndria, é codificada no núcleo e têm apenas uma subunidade, sendo similar às RNA polimerases de bacteriófagos;
- **RNA polimerase de cloroplasto:** sintetiza os RNAs do cloroplasto, é codificada pelo DNA do cloroplasto e é semelhante às RNA polimerases de bactéria.

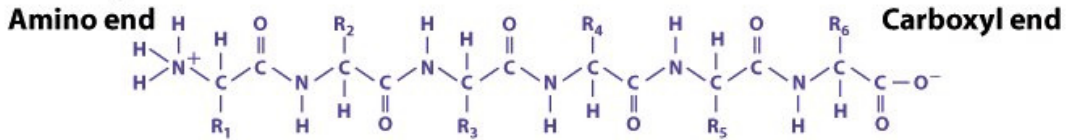
2.4. Proteínas (resumo resumido)

As proteínas são grandes moléculas que se constituem de seqüências lineares de aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas, formando assim as cadeias polipeptídicas ou, simplesmente, polipeptídios. Os tipos de aminoácidos normalmente encontrados nas proteínas, em número e seqüências diversas para cada tipo, são em número de 20. A **estrutura primária** (número e seqüência de aminoácidos) das proteínas contém toda a informação necessária para dirigir o enrolamento do polipeptídio numa conformação tri-dimensional para sua função. Existem vários tipos funcionais de polipeptídios, como, por exemplo, as enzimas, os anticorpos, os hormônios, os elementos estruturais e outras proteínas.

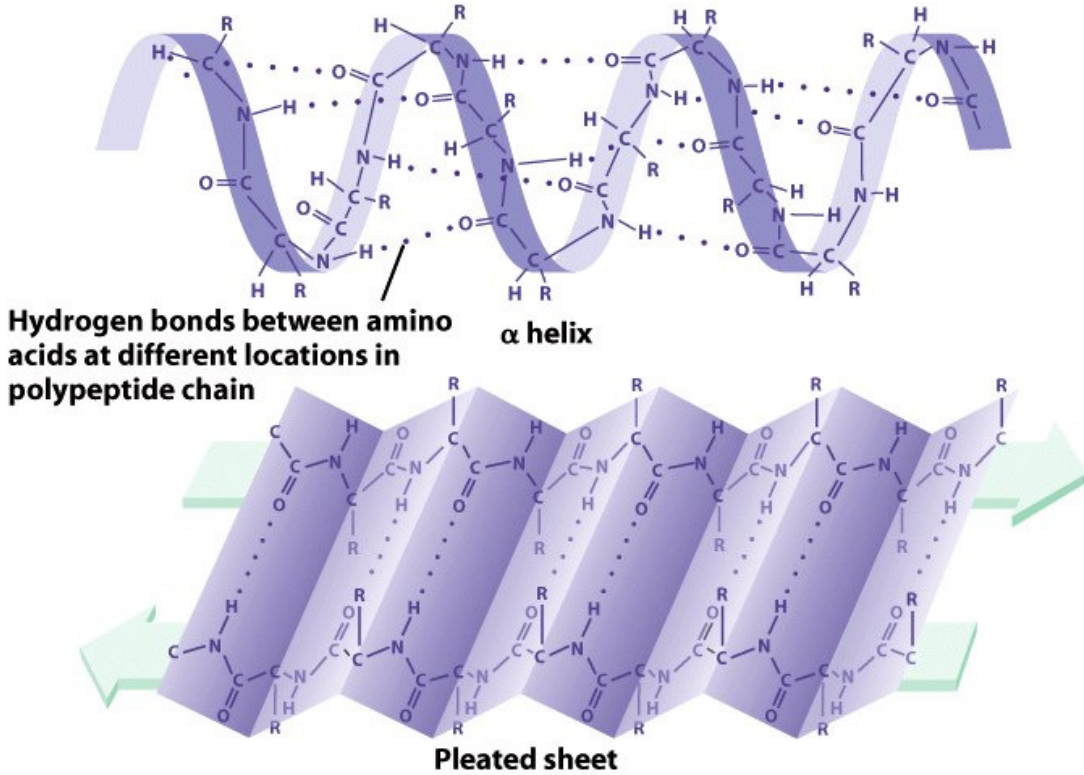
A **estrutura secundária** das proteínas um enrolamento helicoidal (geralmente alfa-hélice) e/ou uma lâmina dobrada. Estes apresentarão dobramento e enrolamento característicos, levando a uma conformação tri-dimensional chamada de **estrutura terciária**. Algumas proteínas como, por exemplo, a hemoglobina, são compostas de mais do que uma cadeia polipeptídica. Quando uma proteína, para ser funcional, necessita da união de duas ou mais cadeias polipeptídicas (iguais ou diferentes), diz-se que tem **estrutura quaternária**.

Após a síntese, as proteínas podem ser modificadas no sentido de ligar-se a grupos de lipídios ou carboidratos. Algumas vezes, os resíduos aminoácidos podem, também, ser modificados, como é o caso da hidroxilação da prolina e da lisina nas cadeias polipeptídicas do colágeno e a acetilação do grupamento amino terminal de muitas proteínas como, por exemplo, as cadeias de hemoglobina.

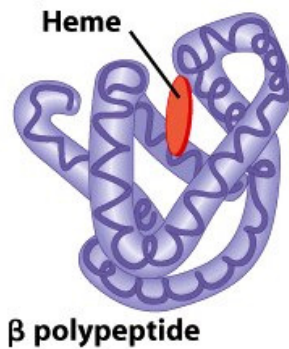
(a) Primary structure



(b) Secondary structure



(c) Tertiary structure



(d) Quaternary structure

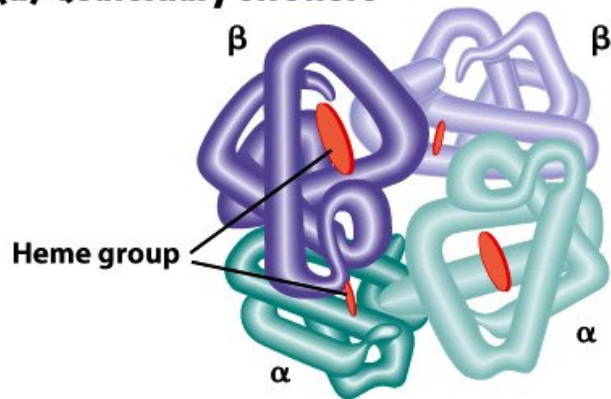


Figure 9-3
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Figura 11: Estrutura das proteínas, segundo Griffiths et al (2008).

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**, Garland Science, New York, 2008, 1.268 p.
- Borges-Osório, M.R., Robinson, W.M. **Genética Médica**, Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 2001, 459 p.
- Chaves, A.L.S. **Biologia Molecular para Iniciantes**, Editora e Gráfica Universitária, Pelotas, 2006, 160 p.
- Cooper, G.M.; Hausmann, R.E. **The Cell: A Molecular Approach**, ASM Press, Washington, 2004, 713 p.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B. **Introduction to Genetic Analysis**, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, 838 p.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. **Principles of Genetics**. John Wiley & Sons, Inc, Danvers, 2003, 840 p.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. **Biologia Molecular**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 287 p.