

Evolução do Gene,

Processamento de RNA

E RNA interferência

Para esta aula, parte pode ser encontrada nos **Capítulo 6 do livro**

Molecular Biology of the Cell, Alberts et al,

FALANDO DE EVOLUÇÃO:

Mutações aumentam a variabilidade genética:

Quais são os principais tipos de mutações?

Substituições de base,

Inserções e Deleções

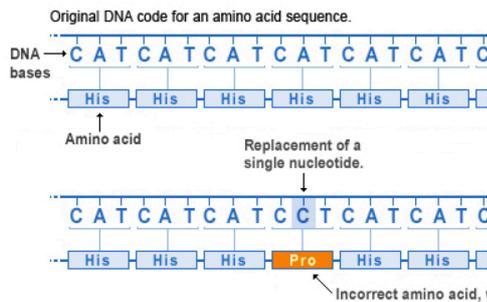
Alterações cromossômicas

Inversões cromossômicas

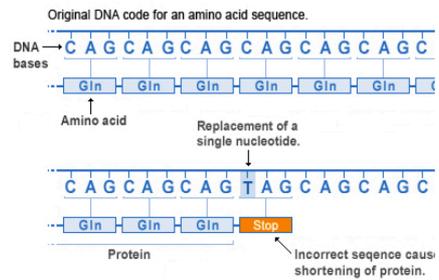
Alteração de número de cromossomos.

Substituições de base: MISSENSE e NONSENSE

Missense mutation



Nonsense mutation



Qual a gravidade de cada uma dessas mutações nas proteínas?

Uma troca de aminoácido pode afetar a proteína?

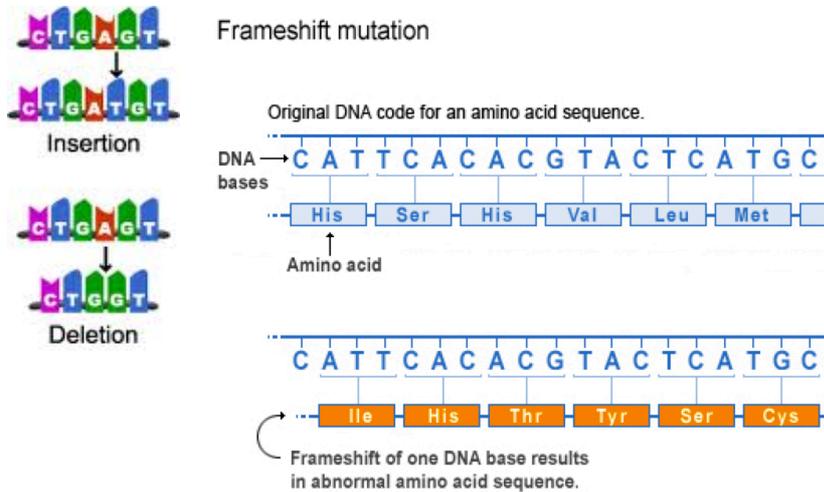
E o que pode ocorrer se a mutação estiver no terceiro Nucleotídeo de um códon?

Código genético é universal e degenerado.

	U	C	A	G	
Primeira Base 5'	UUU } Fenil-alanina	UCU } Serina	UAU } Tirosina	UGU } Cysteine	Terceira Base
	UUC } alanina	UCC } Serina	UAC } Tirosina	UGC } Cysteine	
	UUA } Leucina	UCA } Serina	UAA } Stop codon	UGA } Stop codon	
	UUG } Leucina	UCG } Serina	UAG } Stop codon	UGG } Tryptophan	
C	CUU } Leucina	CCU } Prolina	CAU } Histidina	CGU } Arginina	U C A G
	CUC } Leucina	CCC } Prolina	CAC } Histidina	CGC } Arginina	
	CUA } Leucina	CCA } Prolina	CAA } Glutamina	CGA } Arginina	
	CUG } Leucina	CCG } Prolina	CAG } Glutamina	CGG } Arginina	
A	AUU } Isoleucina	ACU } Treonina	AAU } Asparagina	AGU } Serina	U C A G
	AUC } Isoleucina	ACC } Treonina	AAC } Asparagina	AGC } Serina	
	AUA } Metionina	ACA } Treonina	AAA } Lisina	AGA } Arginina	
	AUG } Metionina start codon	ACG } Treonina	AAG } Lisina	AGG } Arginina	
G	GUU } Valina	GCU } Alanina	GAU } Ácido Aspártico	GGU } Glicina	U C A G
	GUC } Valina	GCC } Alanina	GAC } Ácido Aspártico	GGC } Glicina	
	GUA } Valina	GCA } Alanina	GAA } Ácido Glutâmico	GGA } Glicina	
	GUG } Valina	GCG } Alanina	GAG } Ácido Glutâmico	GGG } Glicina	

Mutação SILENCIOSA!! Por que?

Inserções e deleções de alguns nucleotídeos!



o que acontece se a inserção for de três nucleotídeos?

Inserções e deleções!

Mas o frameshift em geral leva a proteína truncada!

(a) Fase de leitura de códons em triplete com um códon de início ATG e um códon de parada TAG

ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC ATG CGAGCTTTT AGT TCC TAC GAGGTA AGT CCT CATAGG GAGGTA AGT CCC TAG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Met Arg Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Val Gly Pro His Arg Glu Val Ser Pro Parada

Sítio de deleções e inserções em (b)

(b)

-1 Deleção (-A) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC TGCGAGCTT TTA GTT CCT ACG AGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

-2 Deleção (-AT) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC GCGAGCTTT TAG TTC CTA CGAGGT AAGTCC TCA TAG GGAGGT AAGTCC CTA G
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Ala Ser Phe Parada

+1 Inserção (+C) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC CAT GCGAGCTTT TAG TTC CTA CGA GGT AAGTCC TCA TAG GGAGGT AAGTCC CTA G
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr His Ala Ser Phe Parada

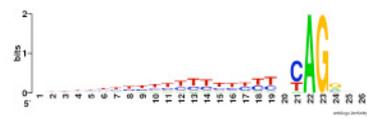
+2 Inserção (+CG) ATG TCC AGT AGG GTA AGT TAC CGA TGCGAGCTT TTA GTT CCT ACG AGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Arg Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

E mutações nos introns, podem afetar o gene?????

Sinais conservados nos introns:

A 3'do exon

a 5'do exon



E por que os introns são menos conservados?

Em uma população de Goiás encontramos duas mutações germinativas no gene XPV!!

↓ G-A no sinal de splicing

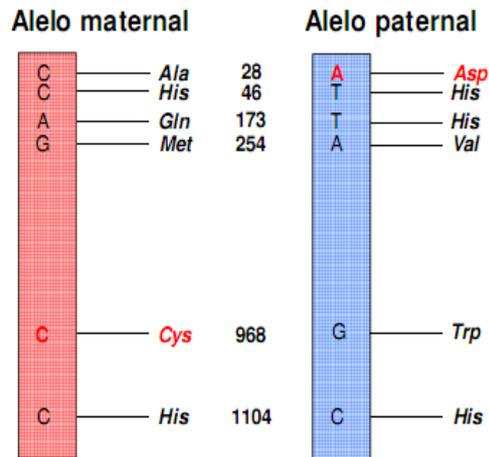
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

↑ C-T – nonsense mutation

Qual o efeito de mutações no sinal de splicing?

Pacientes xeroderma pigmentosum brasileiros-
E essas outras mutações no gene *XPG*.... O que são?



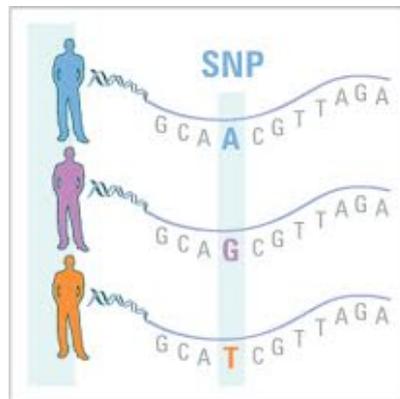
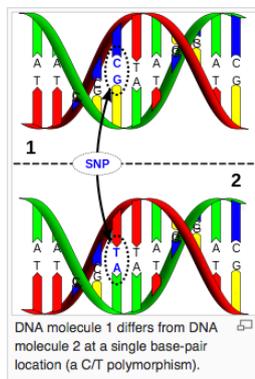
Mutações aumentam a variabilidade genética:

Single nucleotide polymorphism (SNP)-

São cerca de 3 milhões no genoma!!!! (qual o tamanho de nosso genoma?)

20-30.000 em um exoma...

(em um exoma brasileiro encontramos 3000 novos- não descritos!).

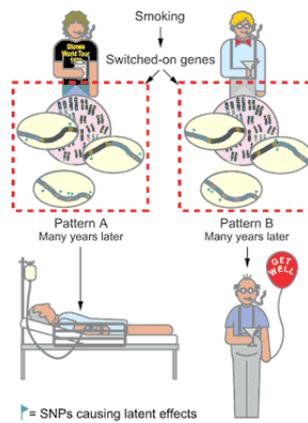


SNPs... o que eles podem nos dizer?

Representam nossa diversidade?

Nossas diferentes respostas em doenças???

Genetic Variations: Latent Effects

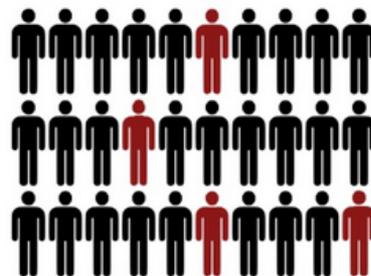
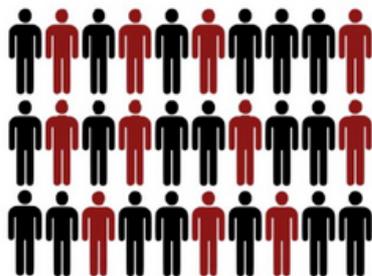


SNPs...e as associações de SNPs com doenças permitem entender melhor nossos riscos!

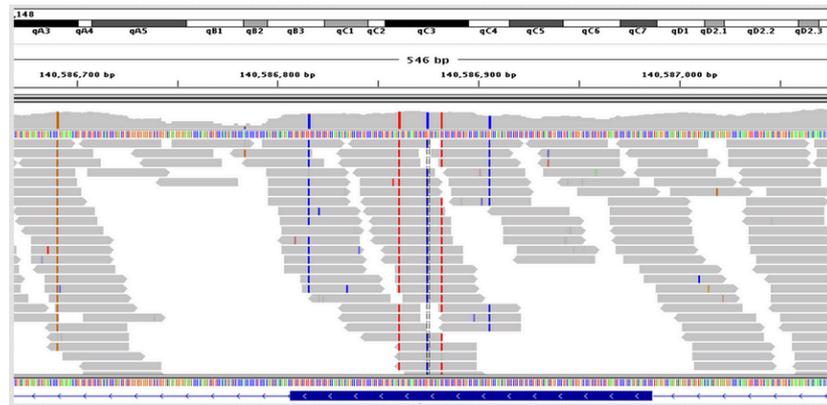
A

TTGGCCAGCTGGACGAGGGCGATGAC

TTGGCCAGCTGGATGAGGGCGATGAC



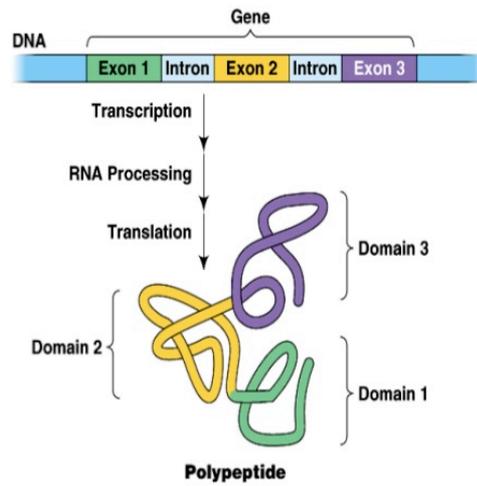
Detectando SNPs por NGS:



Construindo novas proteínas
durante a evolução por

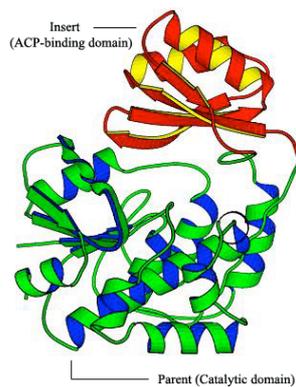
EXON SHUFFLING
(embaralhamento de exons)

Mas as proteínas são feitos de pedaços (domínios) e em geral codificadas por exons independentes!!!!

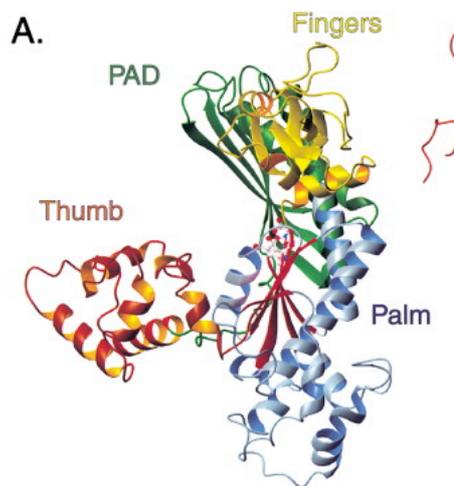


O Que isso significa em termos de evolução e criação de novos genes?

**Domínios proteicos... o que são?
e qual sua relação com a evolução das proteínas:**

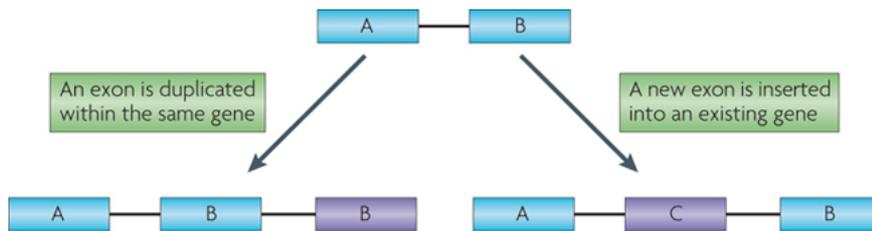


ESCHERICHIA COLI MALONYL-COA:ACYL CARRIER PROTEIN
TRANSACYLASE (PDB Code: 1MLA)

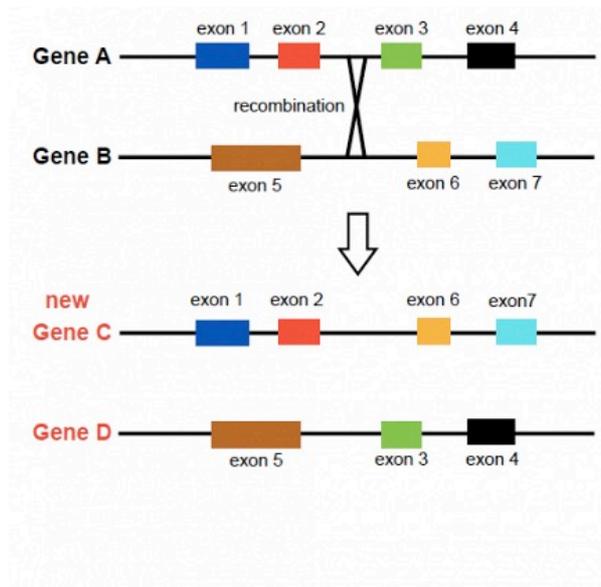


DNA polimerase

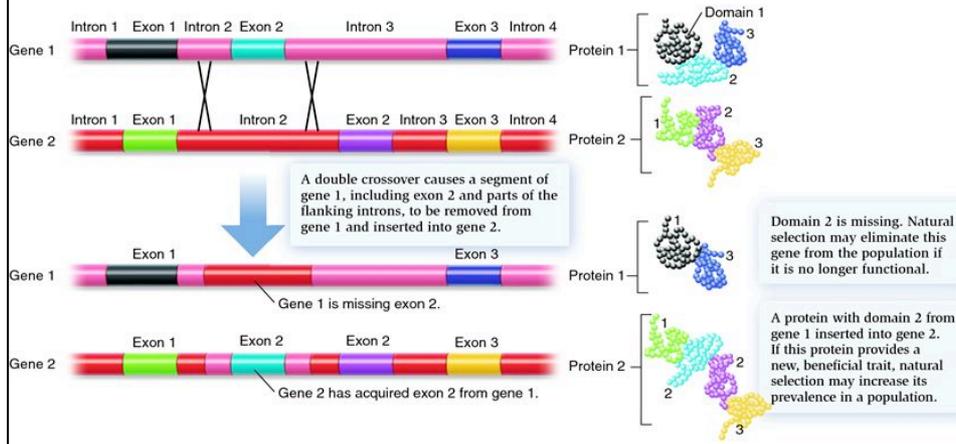
Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!



Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!



Recombinação meiótica entre os introns:

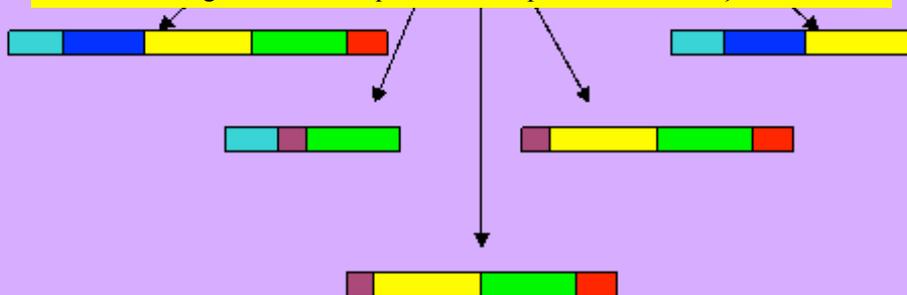


In this example, a segment of one gene containing an exon and the flanking introns has been inserted into another gene. A rare, abnormal crossing-over event called nonhomologous recombination can cause this to happen. This results in proteins that have new combinations of domains and possibly new combinations of functions.

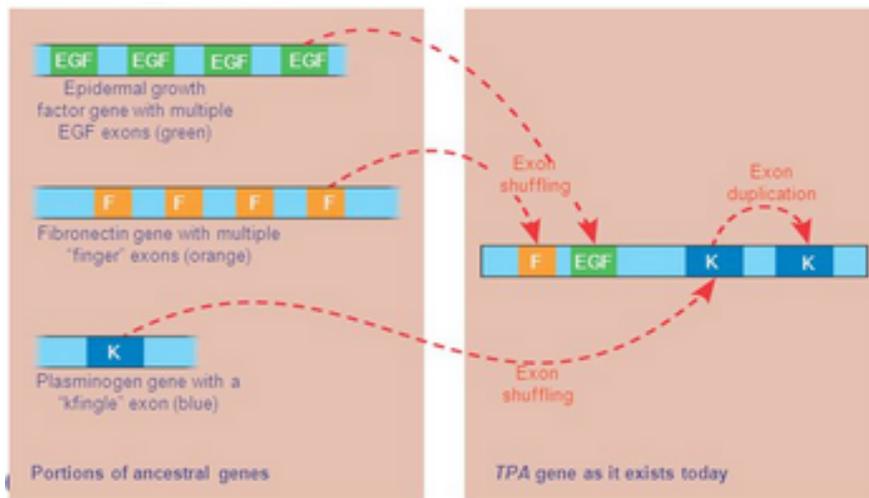
Pode formar novas proteínas...

Assim, os domínios proteicos podem funcionar como peças de LEGO e montar proteínas diferentes através de recombinações nos introns!!!!

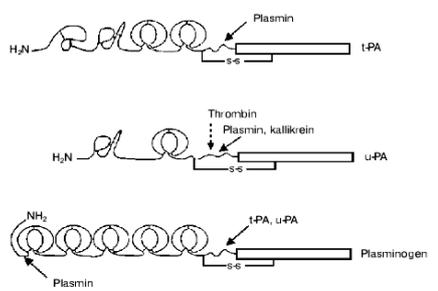
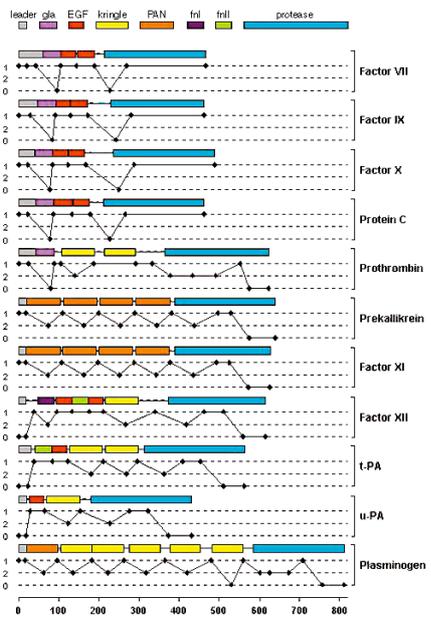
No exon shuffling um número pequeno de domínios funcionais podem ser embaralhados por recombinação e, no processo evolutivo, formar uma grande diversidade de genes distintos que codificam proteínas com funções distintas.



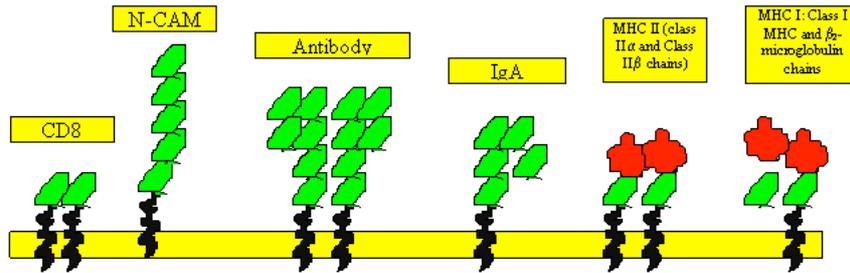
Assim, os domínios proteicos podem funcionar como peças de LEGO e montar proteínas diferentes através de recombinações nos introns!!!!



Domínios na montagem de proteínas: exemplos:

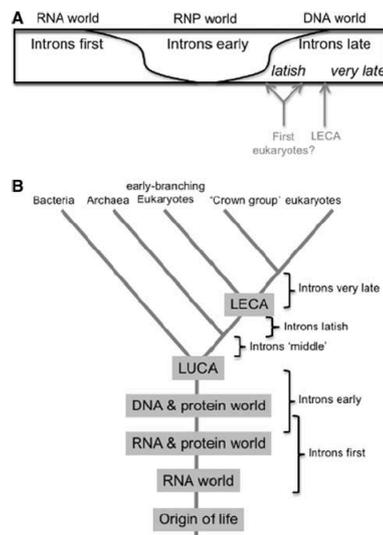


**Outros exemplos de proteínas com domínios homólogos!!!!
Genes do sistema imunológico!**



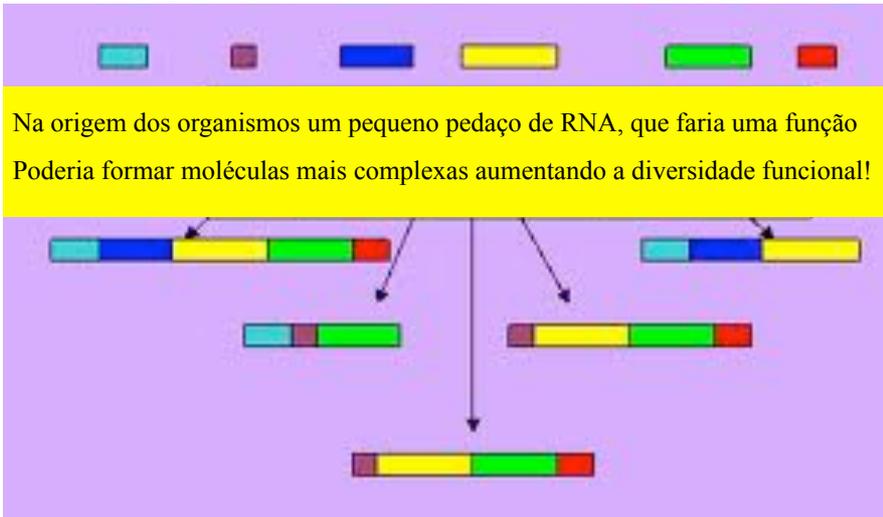
<https://www.youtube.com/watch?v=rMa3i8xz5nU>

**Se os exons/introns são tão importantes na formação de proteínas,
Certamente tem muito impacto na evolução?
Há quanto tempo os organismos vivos tem introns em seus genes!!!!**



Os introns são basicamente conservados onde existem em eucariontes..
teriam existido introns nos genes do progenota?

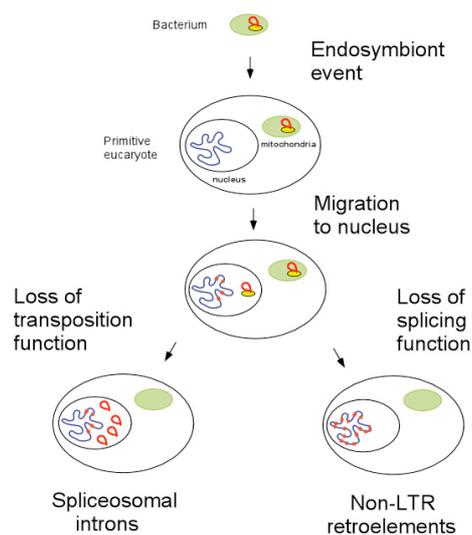
Ou no mundo de RNA? **-INTRON EARLY HYPOTHESIS**
(alguns autores defendem: Intron First hypothesis)



Ou os introns teriam surgido pela infestação de transposons depois que já existiam eucariontes???

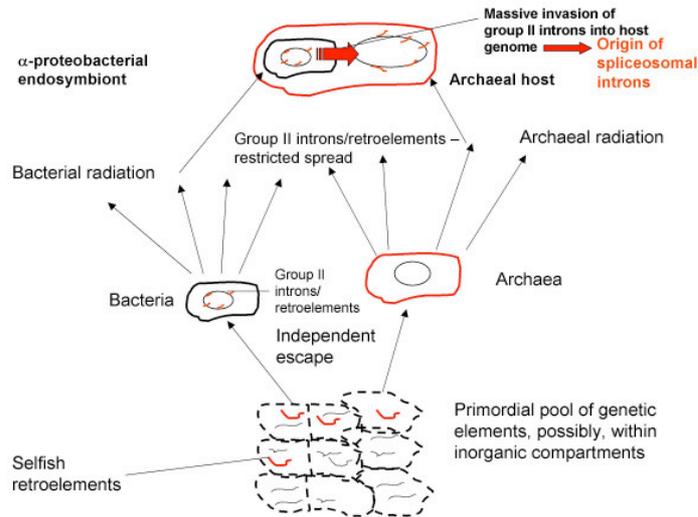
INTRON LATE HYPOTHESIS!

Proposed history of group II introns



Essa infestação pode ter surgido durante a formação de organelas,
pela teoria endossimbiontica.

INTRON LATE HYPOTHESIS!

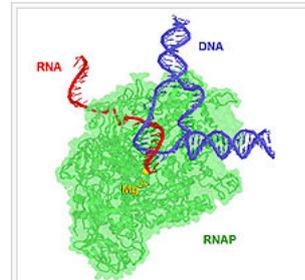
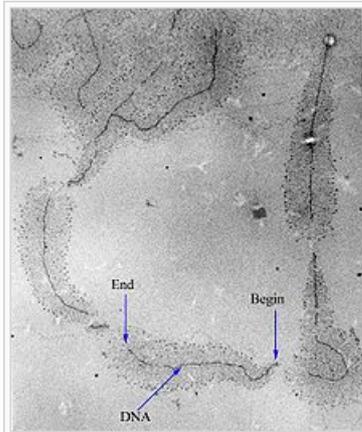


Objetivos da aula:

Como o RNA é processado em eucariontes e RNA não codificantes

- 1. Eucariontes tem 3 RNA polimerases.**
- 2. 5'CAP e poli-adenilação de mRNA.**
- 3. Introns "self splicing"- Ribozimas**
- 4. Spliceossomos e sua origem.**
- 5. Transporte do RNA ao Citoplasma.**
- 6. RNA não codificador.**
- 7. RNA interference e miRNA**
- 8. RNA editing**

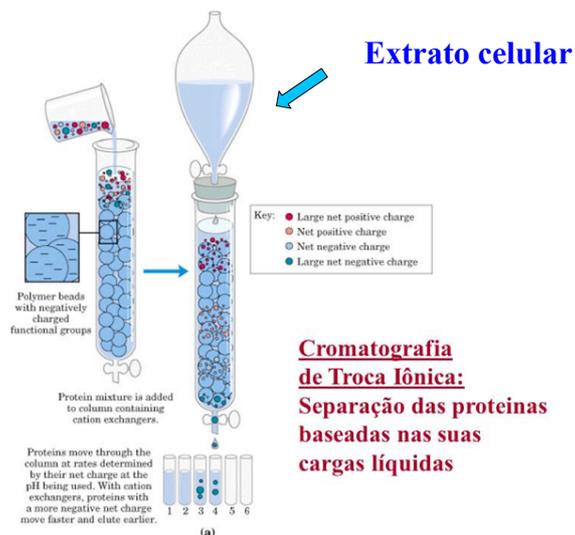
Quantas RNA polimerases existem em bactérias!



RNAP from *T. aquaticus* pictured during elongation. Portions of the enzyme were made transparent so as to make the path of RNA and DNA more clear. The magnesium ion (yellow) is located at the enzyme active site.

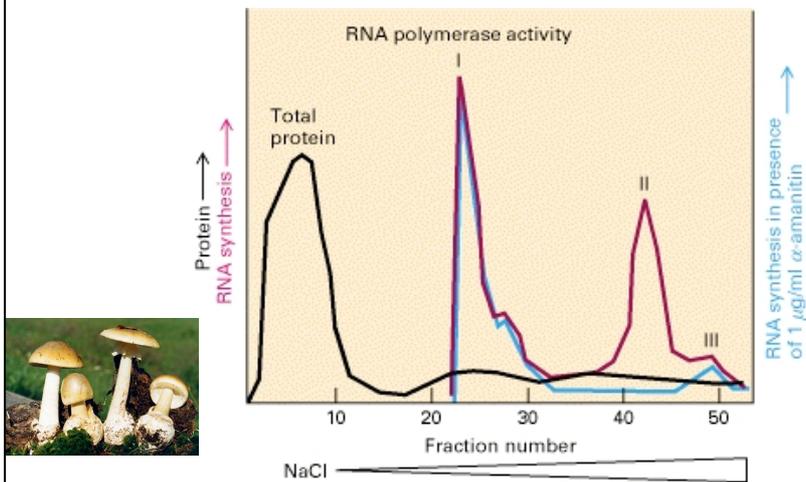
Apenas uma RNA polimerase! E em eucariontes?

Como purificar a RNA polimerase de eucarionte?



- O que é cromatografia de troca iônica?
- Como medir a atividade de RNA polimerase?

**Vejam os resultados da eluição:
QUANTAS RNAs Polimerases temos em Eucariontes?**



Alfa amanitina (azul) inibe síntese de RNAm! Que enzima sintetiza RNA mensageiro?

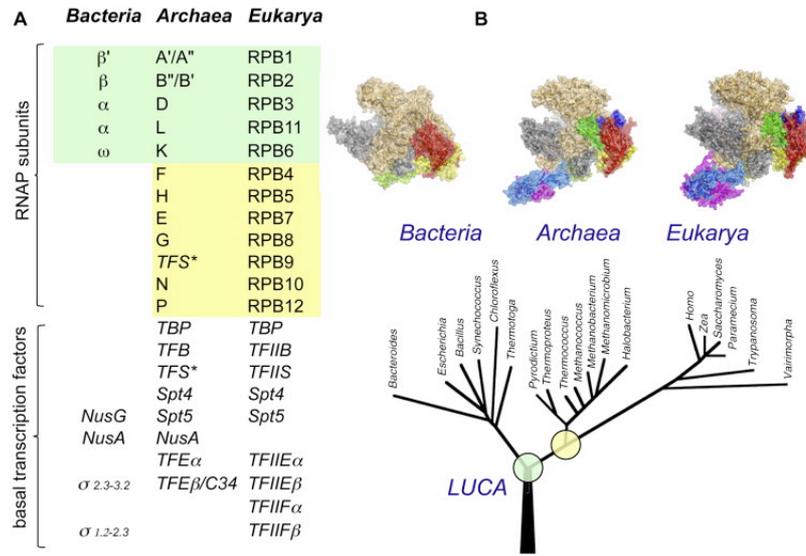
Três RNA polimerases transcrevem o RNA em eucariontes!

RNA polimerase I- RNA ribossômico- RNAr

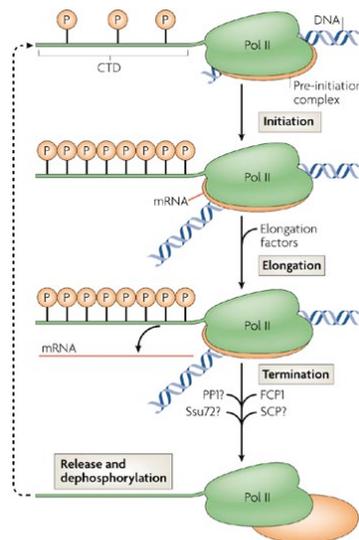
**RNA polimerase II- RNA mensageiro- RNAm
(microRNA também)**

**RNA polimerase III- RNA transportador e outros RNAs
pequenos (RNAr 5S, 7S RNA, etc).**

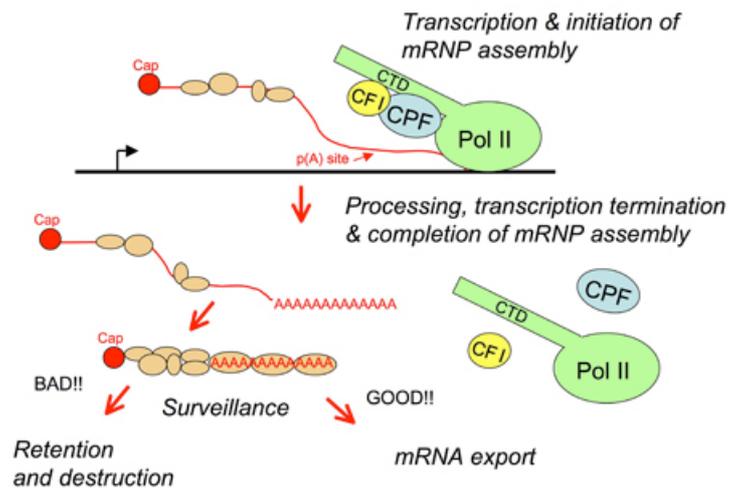
**As RNA polimerases são altamente conservadas!
Compare eucaria/arquéia e bactéria! Quem são as mais próximas?**



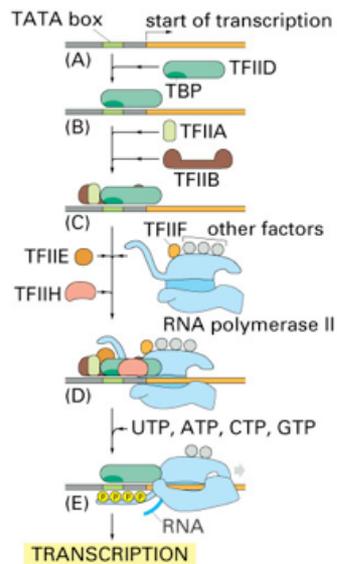
**A RNA polimerase II tem uma cauda (CTD- carboxy terminal domain)
que é fosforilada durante a transcrição!
52 repetições da sequência Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**



A CTD da RNA polimerase interage com o DNA e serve como uma espécie de plataforma para ancorar outras proteínas necessárias na transcrição!

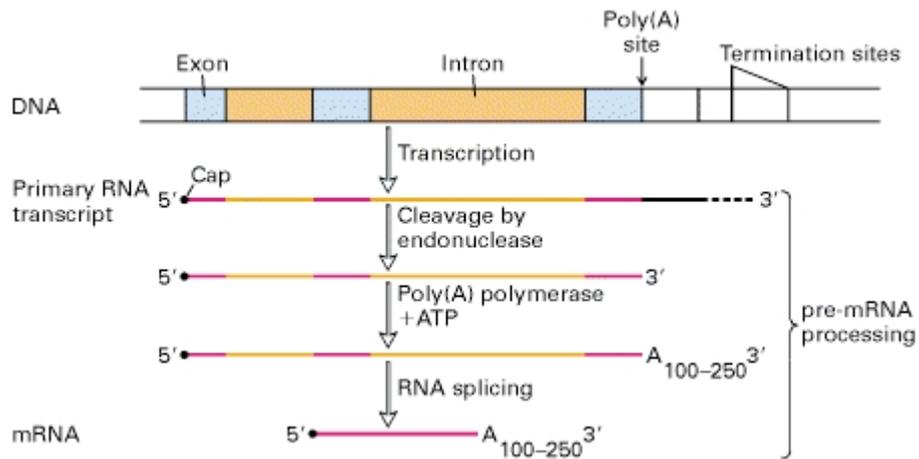


Vários são os peptídeos fatores de transcrição (TFII) que interagem com a RNA polimerase II! O que é TATA box? E o que é TBP?

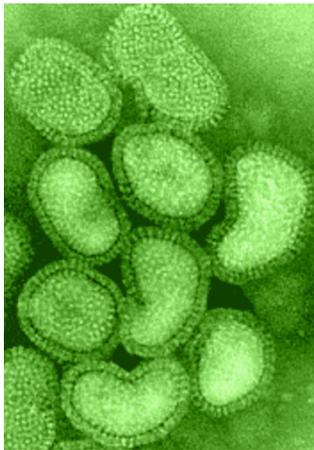


TBP= TATA binding protein!

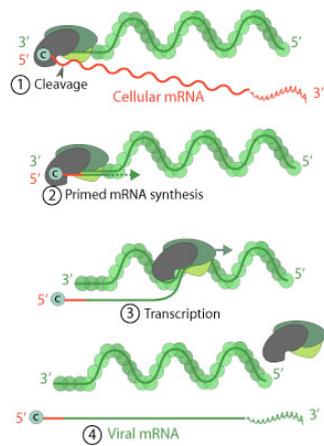
Modificações do RNA na célula (a CTD da RNA polimerase II participa de todos os processos)



Por que os vírus da gripe (genoma RNA negativo) tem replicação nuclear???

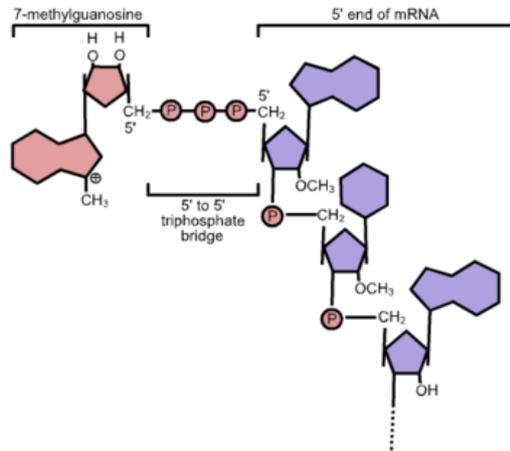


Cap snatching



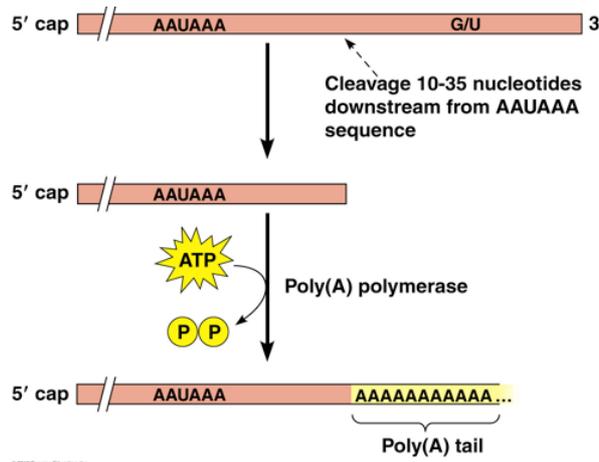
Rouba 5'cap do RNAm da célula hospedeira!

Estrutura do 5'CAP!



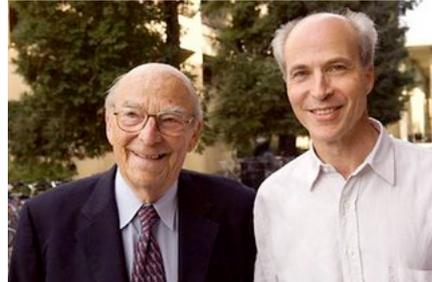
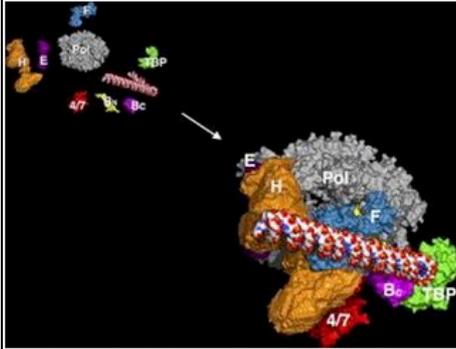
Após a clivagem do poliA, o RNA continua a ser transcrito, mas sem 5'CAP é degradado!

**RNAs virais e celulares (mensageiros) tem cauda de poli-A!
(exceto RNAm de histonas!!!! Por que? Qual a função de Poli-A?)**



Mutações na sequência sinal (AAUAAA) fazem com que o RNAm não seja poliadenilado e seja degradado!

Prêmio Nobel de Química 2006 Roger Kornberg (aqui com seu pai Arthur- prêmio Nobel em 1959!)



The high resolution of the RNA pol II structure and function!

Video:

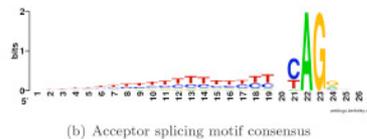
<https://www.youtube.com/watch?v=XzVXhemtwmA>

- **RNAm de eucariontes possui introns e exons.**
- **E existem sinais para o splicing!**

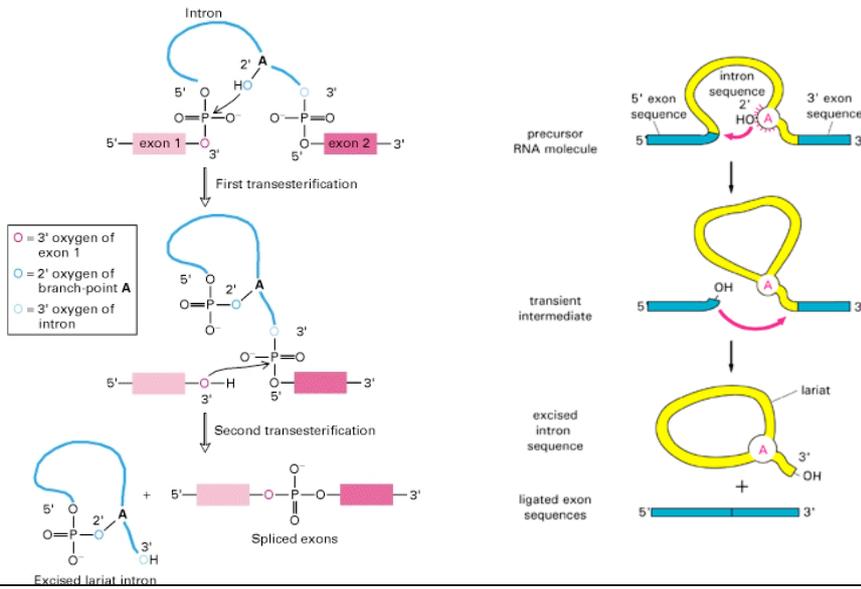
Sinais conservados nos introns:

A 3'do exon

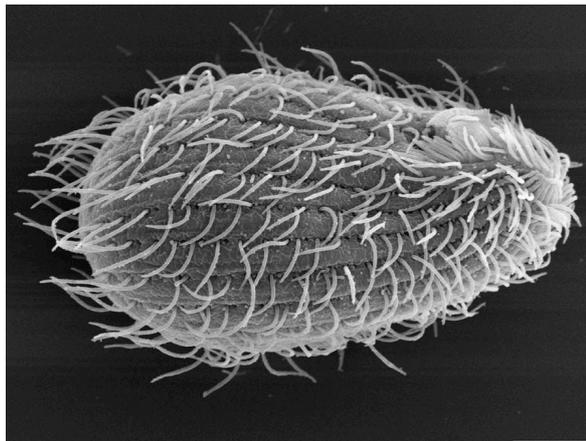
a 5'do exon



**Reações de trans-esterificações resultam na remoção de introns,
Na região da Adenina (branch point)- Formação do *lariat*- laço!**

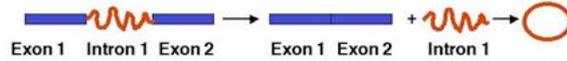


**Tom Cech: trabalhando com o mecanismo de
processamento de introns em *Tetrahymena*:**



- **controle, sem proteínas, teve splicing!!!!**
- **Self splicing RNA!!!!!!?**

Self-splicing in pre-rRNA in *Tetrahymena* :
T. Cech et al. 1981



• Products of splicing were resolved by gel electrophoresis:

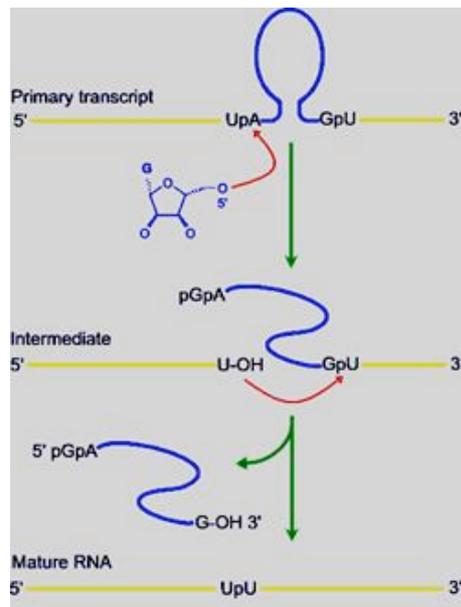
pre-rRNA	+	+	+	+
Nuclear extract	-	+	-	+
GTP	-	+	+	-
pre-rRNA	[band]			
Spliced exon	[band]			
Intron circle	[band]			
Intron linear	[band]			

Additional proteins are NOT needed for splicing of this pre-rRNA!

Do need a G nucleotide (GMP, GDP, GTP or Guanosine).

- **Ribozyme discovery 1 and 2**

**Self splicing de RNAr em Tetrahymena- grupo I:
RNAs catalíticos= ribozimas!**



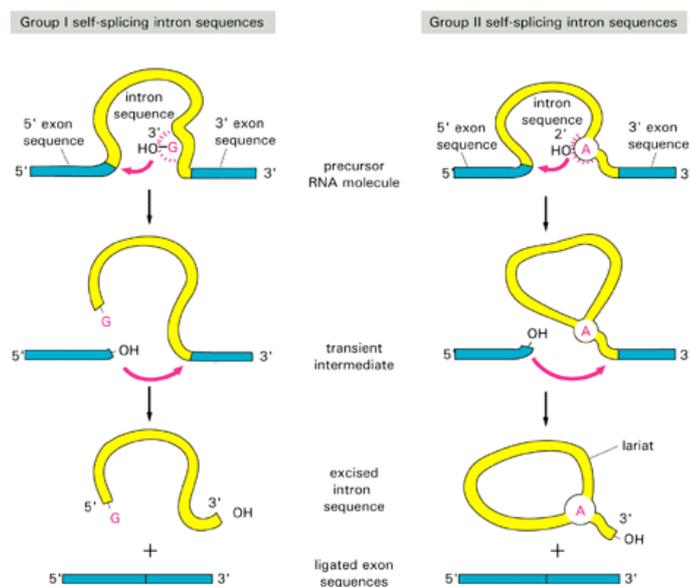
**Self splicing de RNAr em Tetrahymena- grupo I:
RNAs catalíticos= ribozimas!**

Tom Cechi video comments

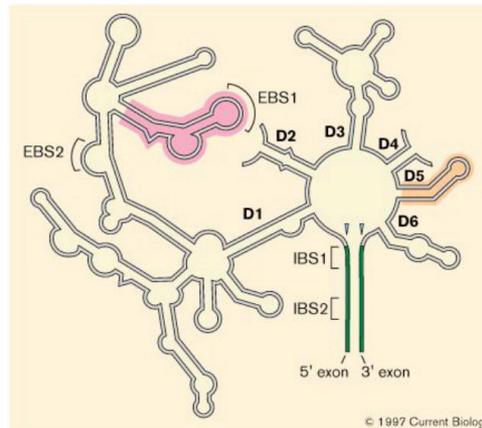
Ribozyme discovery 1 (a partir do minuto 6) and 2

<https://www.youtube.com/watch?v=HwEgcH1zsXw>

Self splicing grupo I e grupo II:

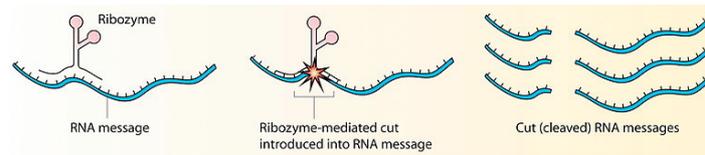


Os introns (self) têm estrutura que aproximam os exons!

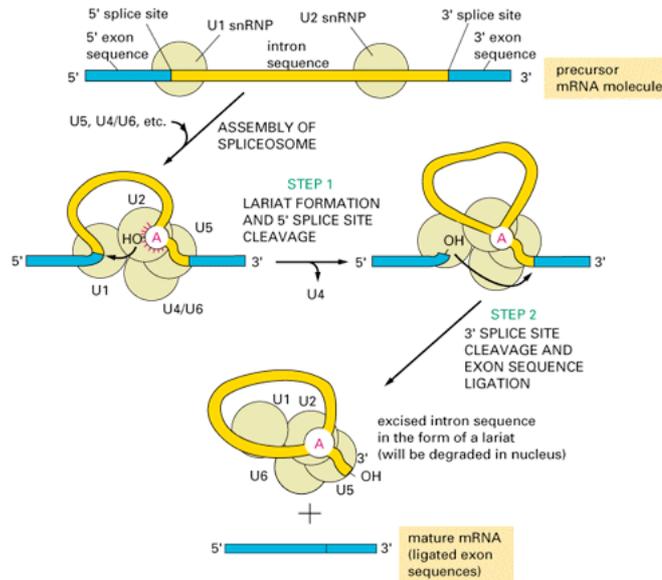


© 1997 Current Biology

Ribozimas!



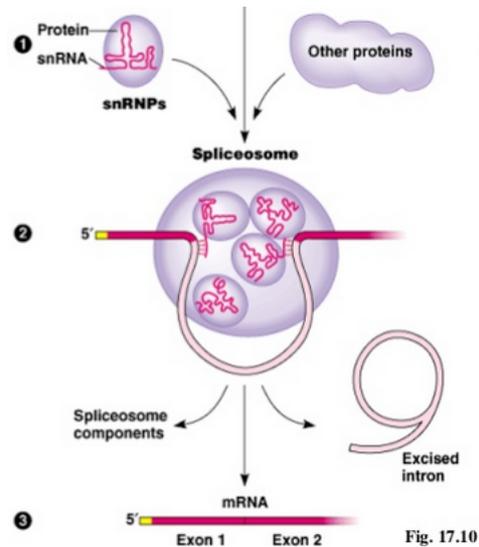
Mas em nosso núcleo o splicing ocorre através de spliceossomos!



O Que são snRNPs???? Qual sua composição?????

Os snRNPs são complexos RNA (ricos em U) e proteínas!

Os RNAs emparelham com o RNAm:



Qual a função dos RNAs nessas RNPs! Estrutural ou catálise?

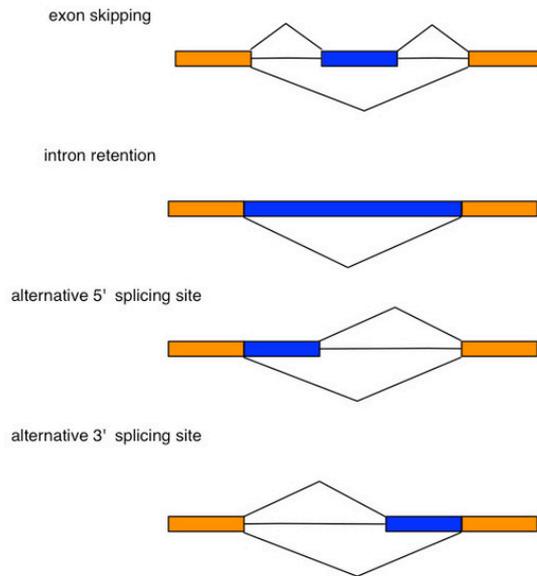
Por que isso é chamado de catálise *trans*?

Que relação existe entre os introns self splicing e aqueles para os spliceossomos?

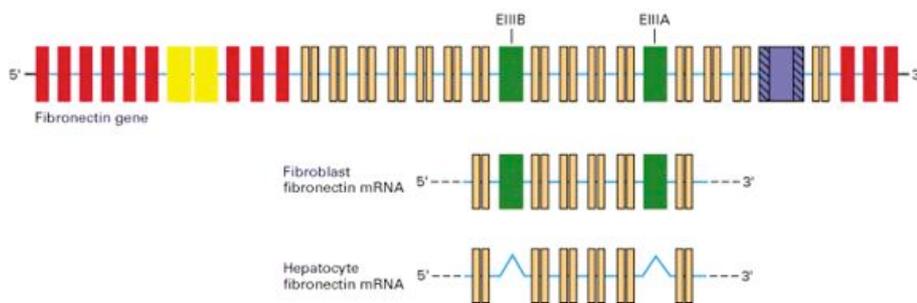
Vídeo snRNPs:

https://www.youtube.com/watch?v=Dp_b9elTxdc

Controle de RNAm Splicing: exon skipping e sítios críticos de splicing!

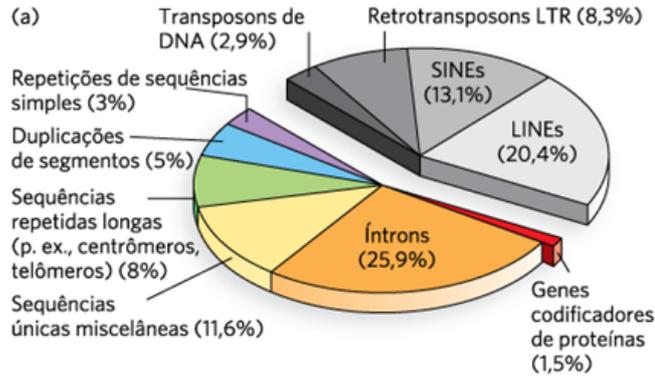


Controle de RNAm Splicing: exon skipping para splicing alternativo na fibronectina:



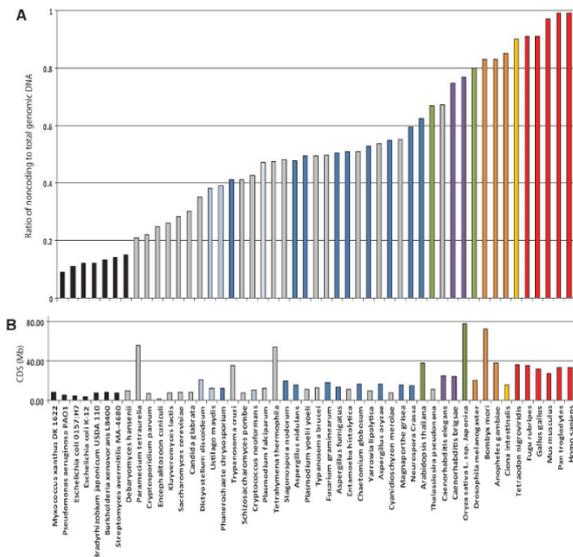
EIIIB e EIIIA são domínios de ligação na membrana plasmática- a produzida pelo hepatócito é uma proteína circulante no sangue....

Composição do genoma humano!



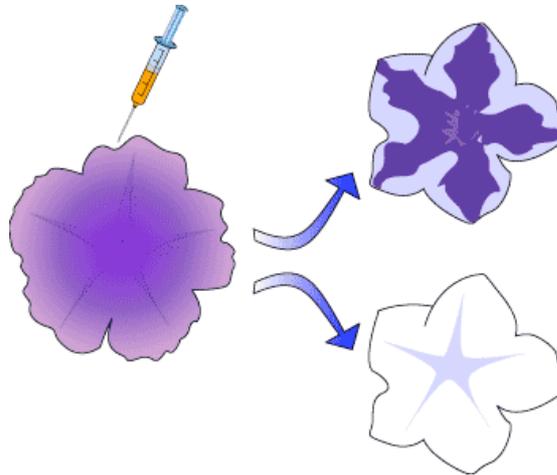
Só 1,5% do genoma codifica proteínas, mas 70% codifica RNA!!!!

RNA não codificante e complexidade de eucariontes!



Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS: The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* 2007, 29:288-99.

RNA interference: antes em cossupressão em petúnias



Superexpressão de gene de pigmento faz a flor ficar branca!!!

RNA interference- um novo paradigma *Caenorhabditis elegans*

Video: <https://www.youtube.com/watch?v=zjqLwPgLnV0>



***Caenorhabditis elegans* model for development- see at home:**

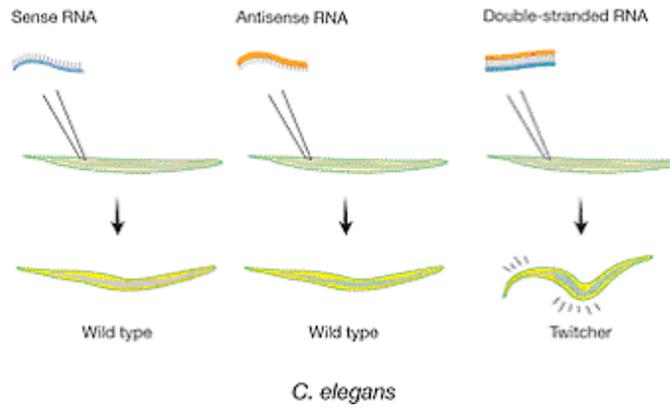
<https://www.youtube.com/watch?v=zc1P7IGSzdU>

RNA interference- O experimento (1998)



Craig Mello and Andrew Fire, Nobel- 2006

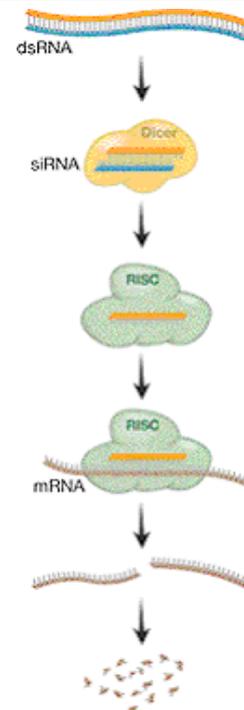
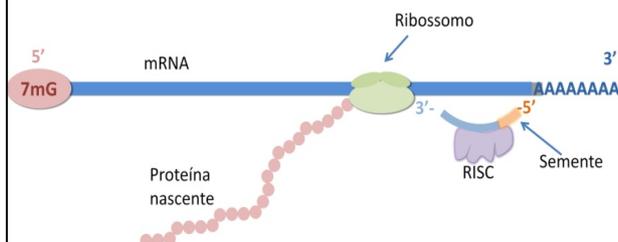
Silenciamento gênica por RNA dupla-fita.



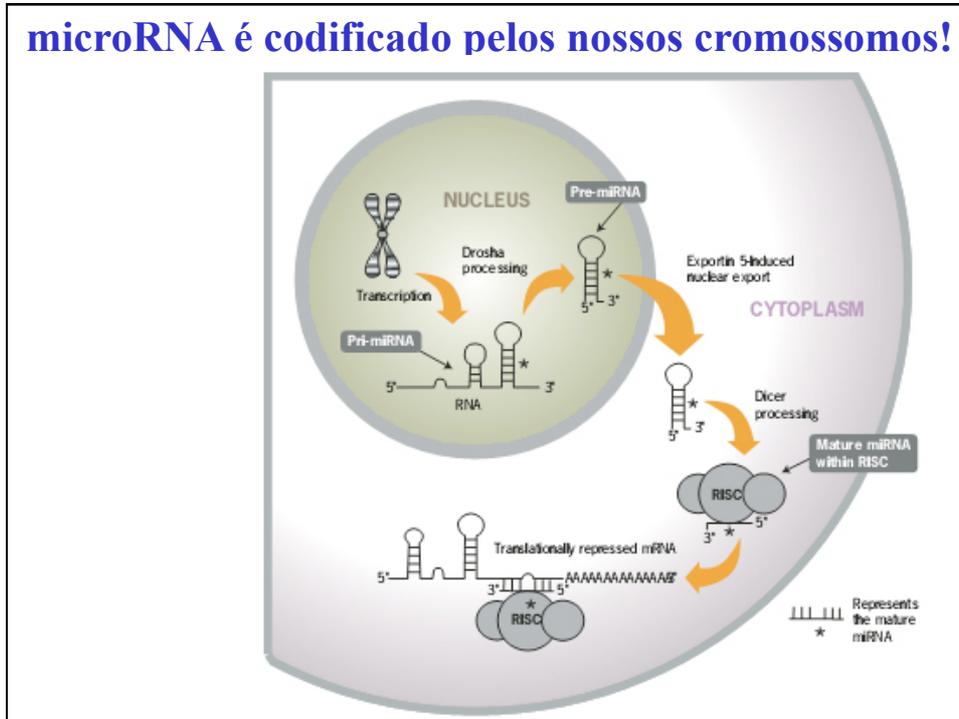
RNA interference

Silenciamento gênica por RNA dupla-fita- degradação do RNAm

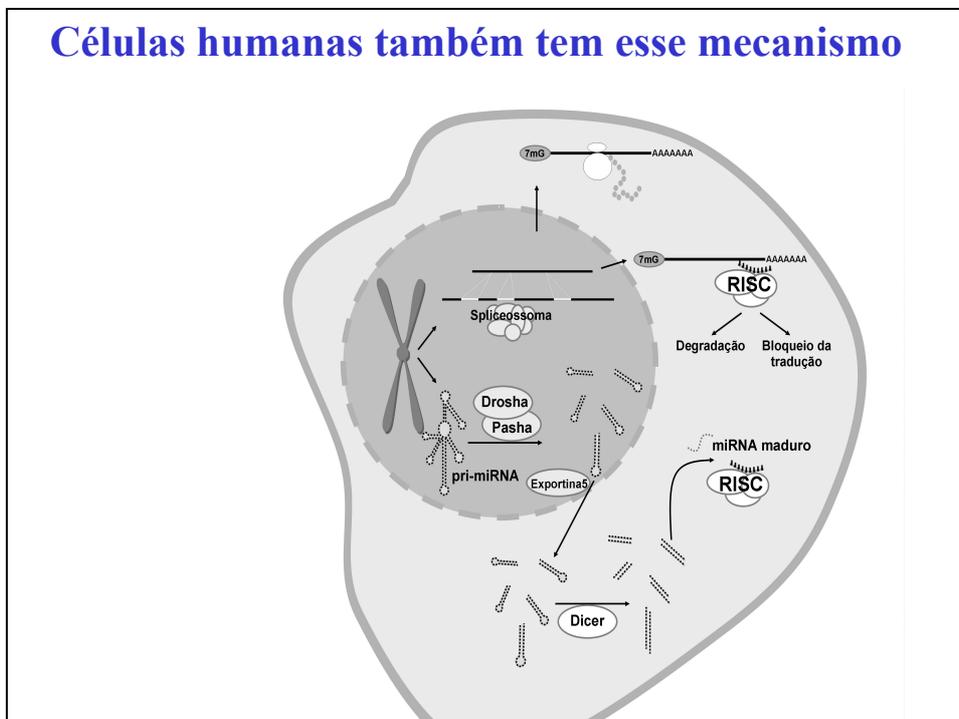
Ou bloqueio de tradução



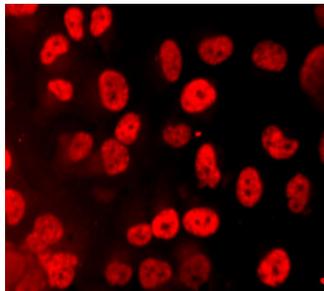
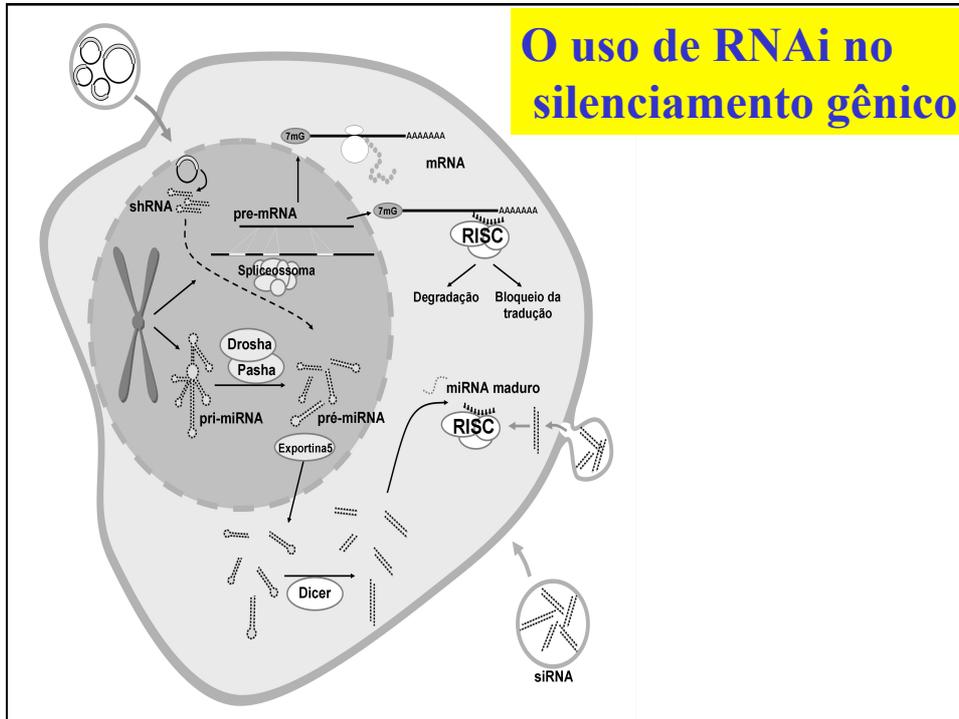
microRNA é codificado pelos nossos cromossomos!



Células humanas também tem esse mecanismo

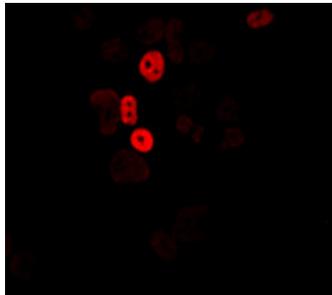


O uso de RNAi no silenciamento gênico



Si RNA – exemplo de inibição de proteína nuclear.

RNA controle



SiRNA silenciando esse gene.

RNA interference Nature video and neuronaute:

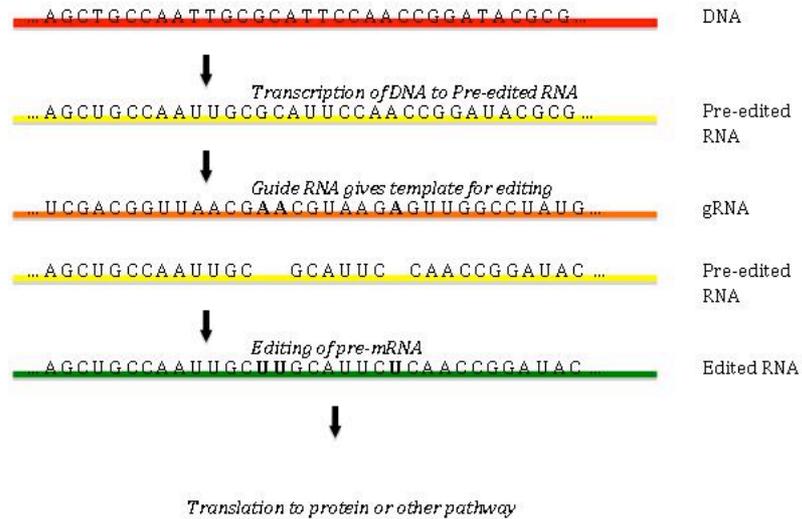
https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGBI_ELE

RNA interference para leigos:

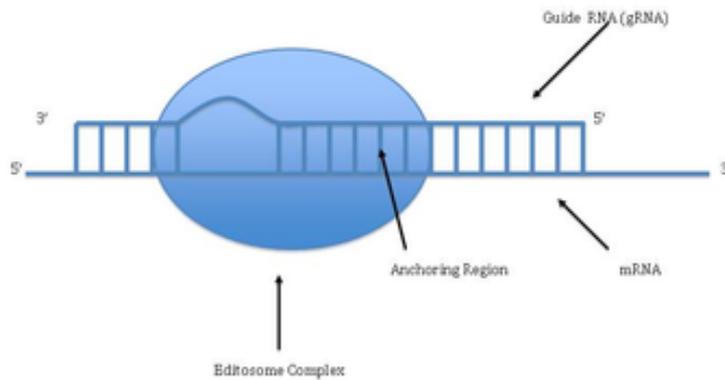
<http://ed.ted.com/lessons/rnai-slicing-dicing-and-serving-your-cells-alex-dainis>

- **Nem sempre a sequência do RNA é igual a de seu gene!!!!**
- **Edição do RNA!!!!**

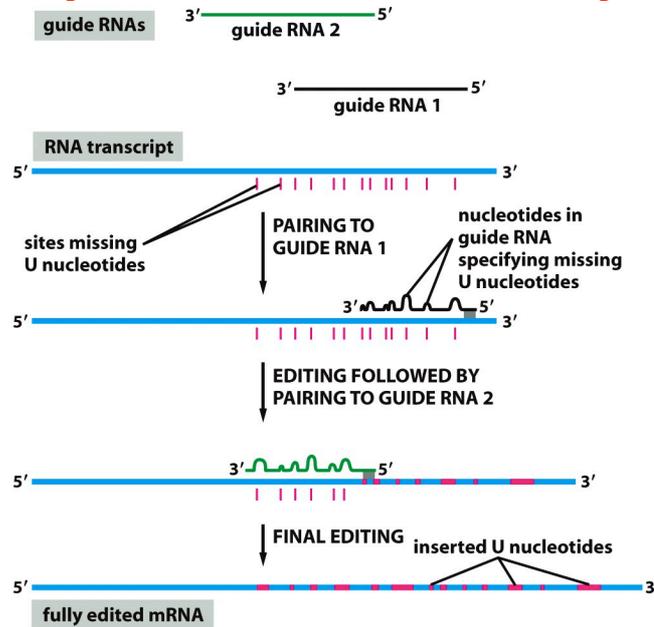
Addition of Uracil to RNA



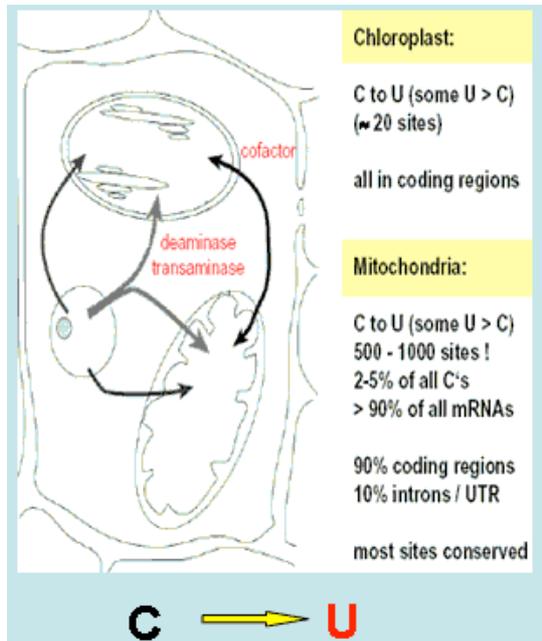
Os RNAs podem ser editados: RNA editing pelo RNA guide!



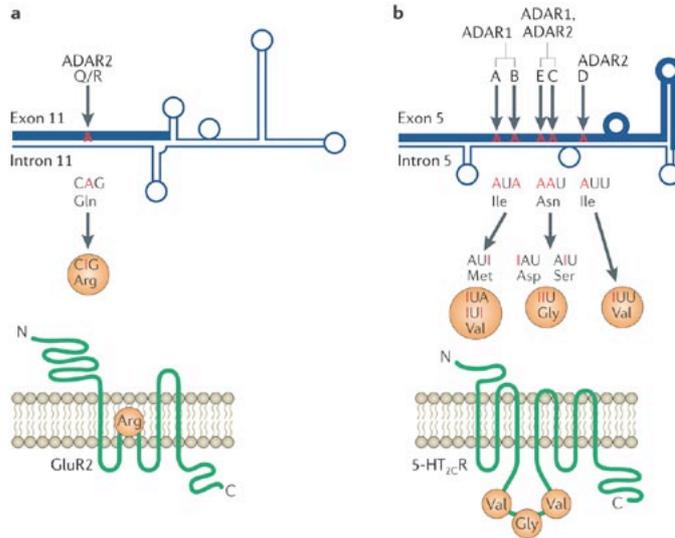
Os RNAs podem ser editados: mitocôndria de tripanossoma!



Os RNAs podem ser editados: organelas de plantas!



RNA editing em humanos! Proteína ADAR- A->I



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

RNA editing em humanos! Expressão diferente dependendo do tecido

