

# **Evolução do Gene- SNPs e exon shuffling**

## **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,**

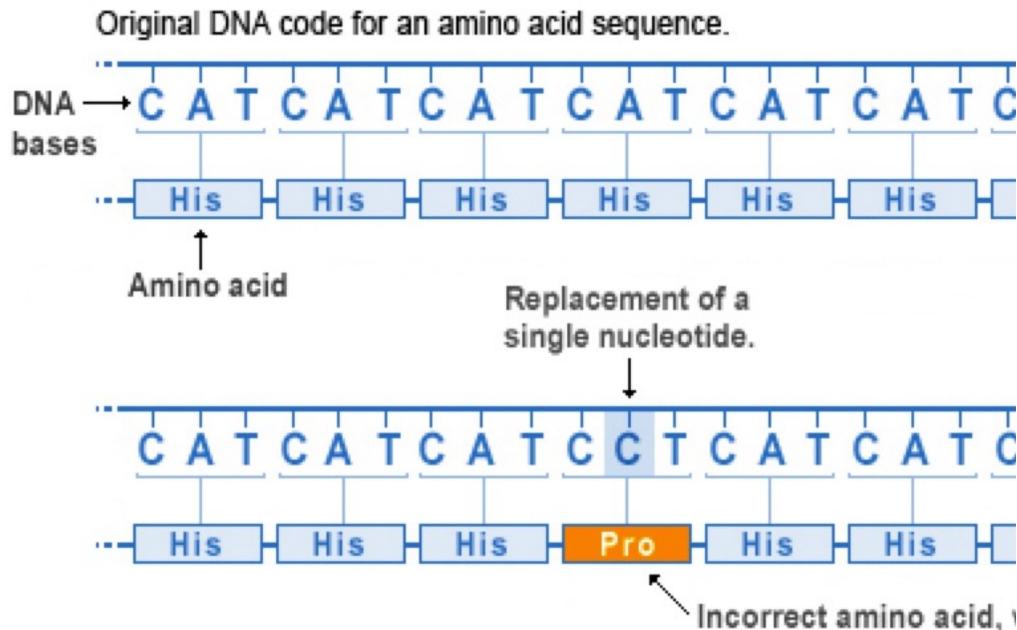
**<https://archive.org/details/MolecularBiologyOfTheCell5th/page/n23/mode/2up>**

**Exon shuffling page 257 chapter 4**

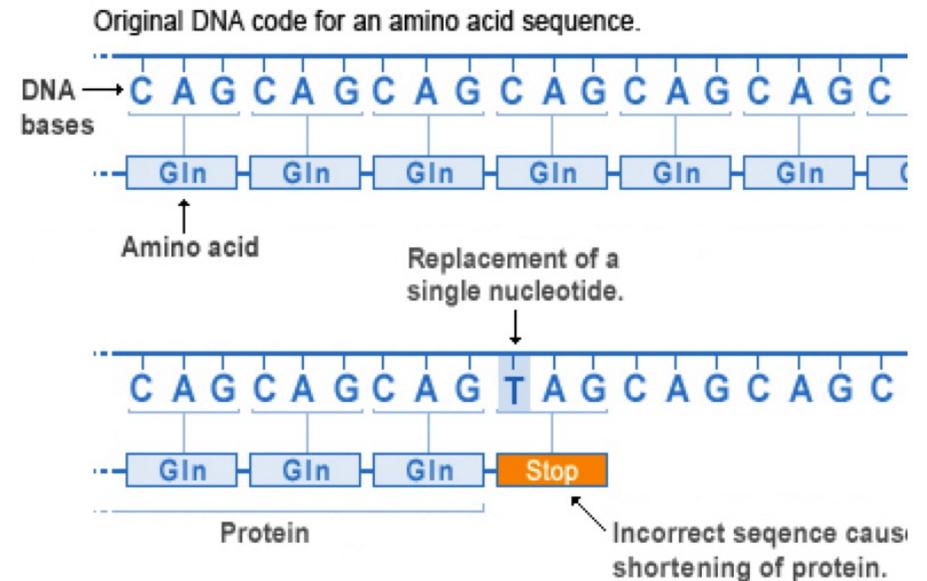
**siRNA e RNA editing pages 480-499- chapter 7**

# Mutações - 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?**

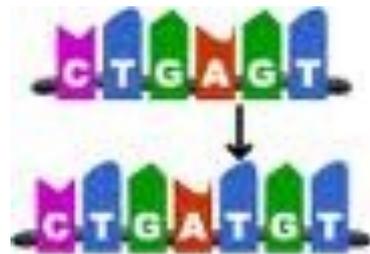
# E o que pode ocorrer se a mutação estiver no terceiro Nucleotídeo de um códon?

*Código genético é universal e degenerado.*

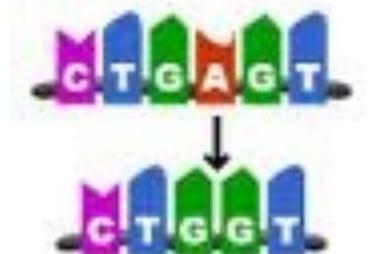
		U	C	A	G					
Primeira Base 5'	U	UUU } Fenil- UUC } alanina	UCU } UCC } Serina UCA } UCG }	UAU } Tirosina UAC }	UGU } Cysteine UGC }	Terceira Base 3'	U C A G			
		UUA } Leucina UUG }		UAA } Stop codon UAG }	UGA } Stop codon UGG } Tryptophan					
		G		C	CUU } CUC } Leucina CUA } CUG }		CCU } CCC } Prolina CCA } CCG }	CAU } Histidina CAC }	CGU } CGC } Arginina CGA } CGG }	U C A G
					A		U	AUU } AUC } Isoleucina AUA }	ACU } ACC } Treonina ACA } ACG }	AAU } Asparagina AAC }
AUG } Metionina start codon	AAA } Lisina AAG }		AGA } Arginina AGG }							
G	U		GUU } GUC } Valina GUA } GUG }			GCU } GCC } Alanina GCA } GCG }		GAU } Ácido GAC } Aspártico GAA } Acido GAG } Glutâmico		GGU } GGC } Glicina GGA } GGG }

**Mutação SILENCIOSA!! Por que?**

# Inserções e deleções de alguns nucleotídeos!



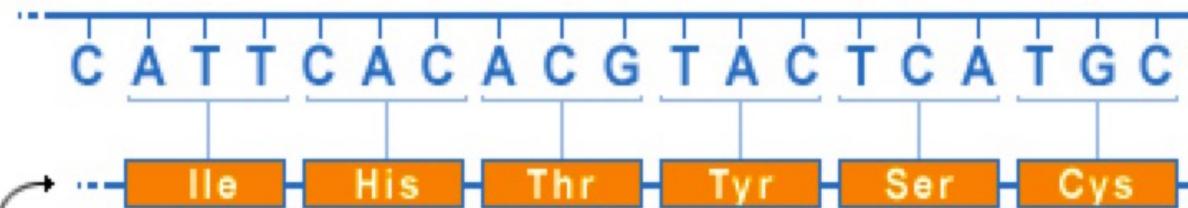
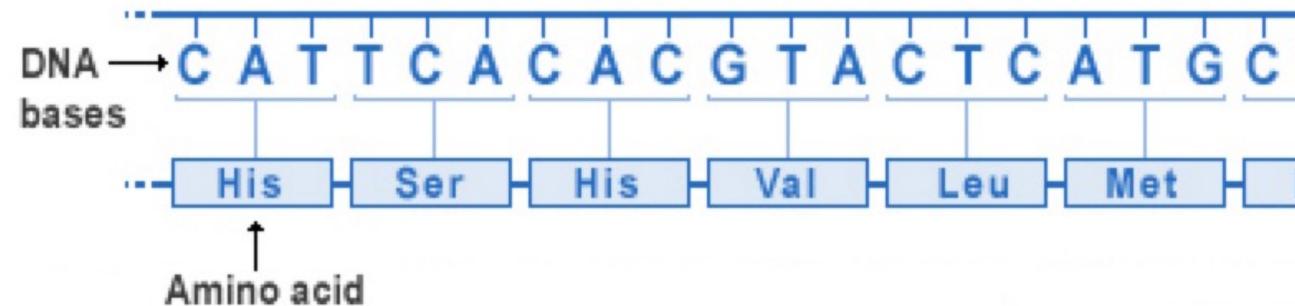
Insertion



Deletion

Frameshift mutation

Original DNA code for an amino acid sequence.



Frameshift of one DNA base results in abnormal amino acid sequence.

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 CGAGCTTT 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 ACGAGG TAA GTC CTC ATA GGGAGG TAA 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 CGAGGTAAGTCC 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 CATGCGAGCTTT TAG TTC CTA CGA GGT AAG TCC TCA TAG GGAGGT AAG TCC 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 ACGAGG TAA GTC CTC ATA GGGAGG TAA 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?????

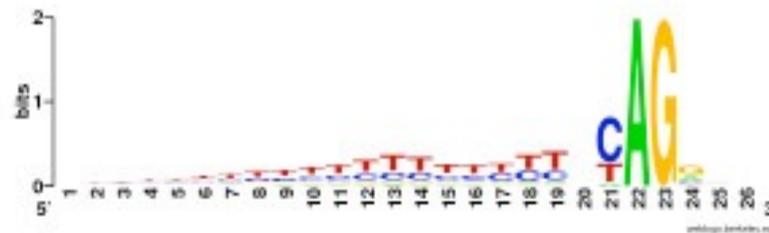
Sinais conservados nos introns:

A 3'do exon

a 5'do exon



(a) Donor splicing motif consensus



(b) Acceptor splicing motif consensus

E por que os introns são menos conservados?

### Alelo maternal

C	Ala	28
C	His	46
A	Gln	173
G	Met	254
C	Cys	968
C	His	1104

### Alelo paternal

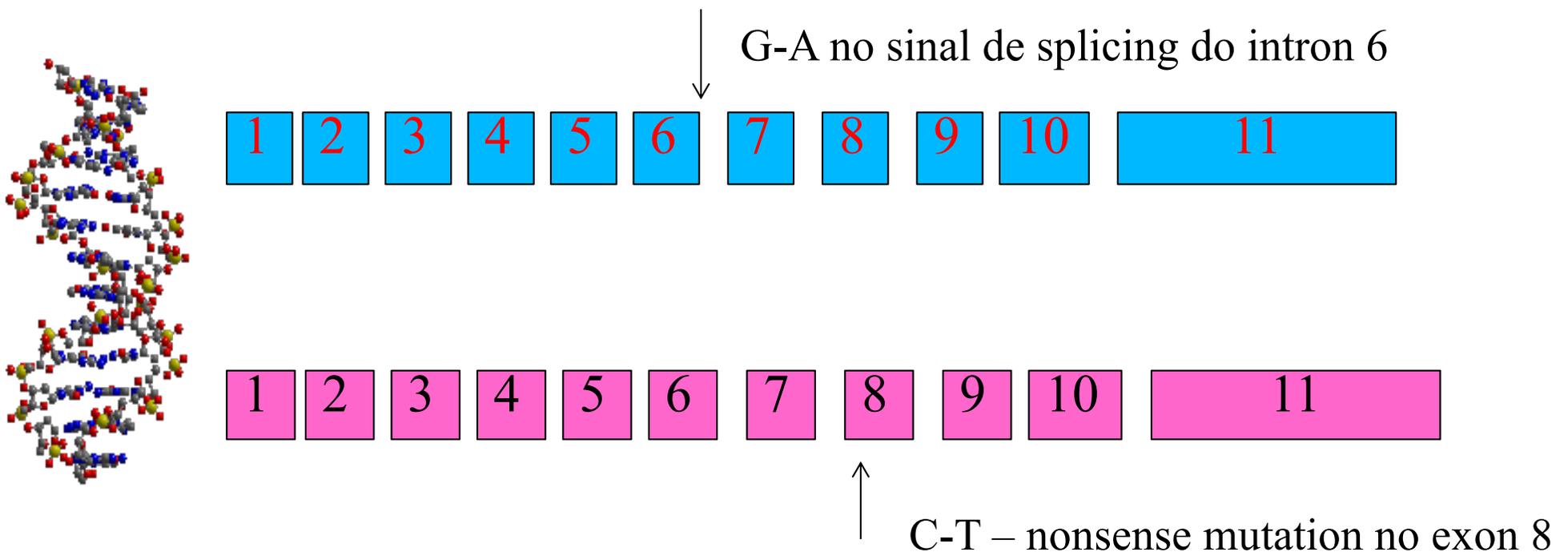
A	Asp	
T	His	
T	His	
A	Val	
G	Trp	
C	His	

**Pacientes xeroderma pigmentosum brasileiros-**

**E essas outras mutações no gene *XPG*... O que são?**

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

**(esses indivíduos têm uma doença genética- Não podem tomar Sol!)  
XERODERMA PIGMENTOSUM**



**Qual o efeito de mutações no sinal de splicing?**

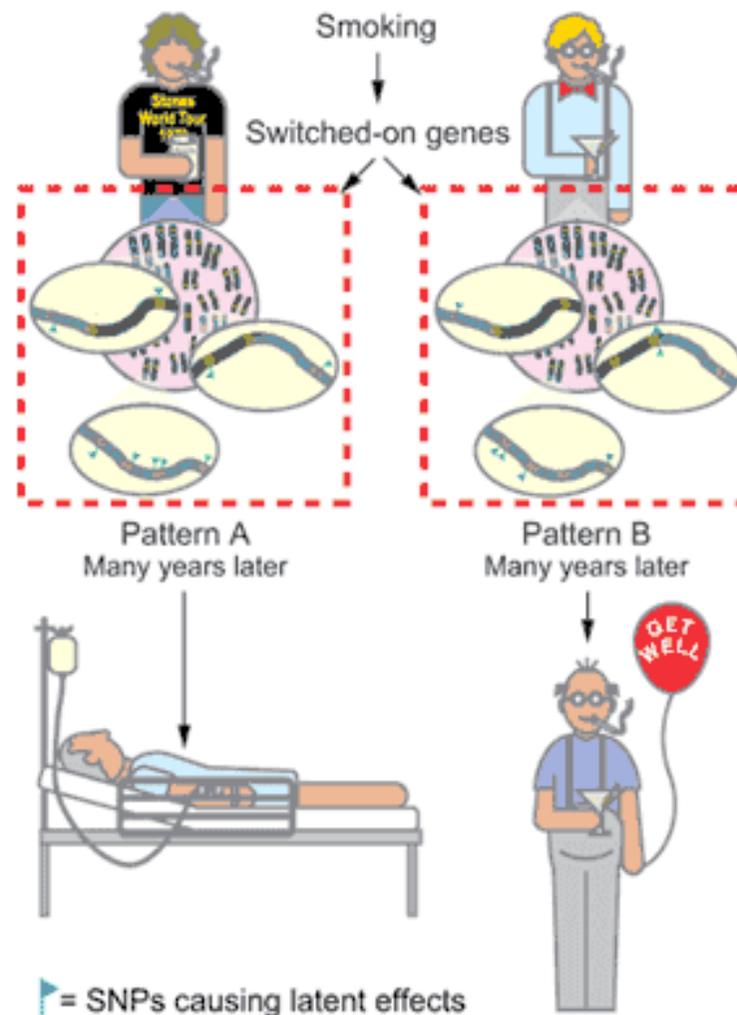


**SNPs... o que eles podem nos dizer?**

**Representam nossa diversidade?**

**Nossas diferentes respostas em doenças???**

## Genetic Variations: Latent Effects

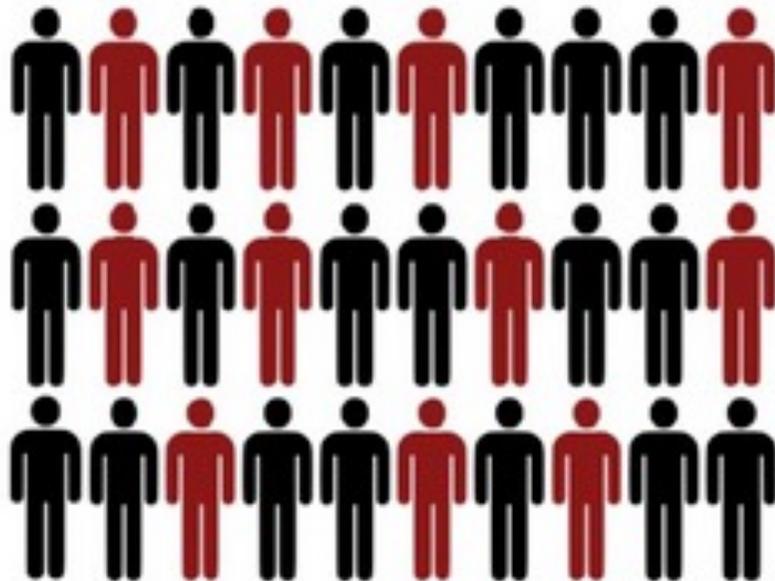


# SNPs...e as associações de SNPs com doenças permitem entender melhor nossos riscos!

A

TTGGCCAGCTGGACGAGGGGCGATGAC

TTGGCCAGCTGGATGAGGGGCGATGAC

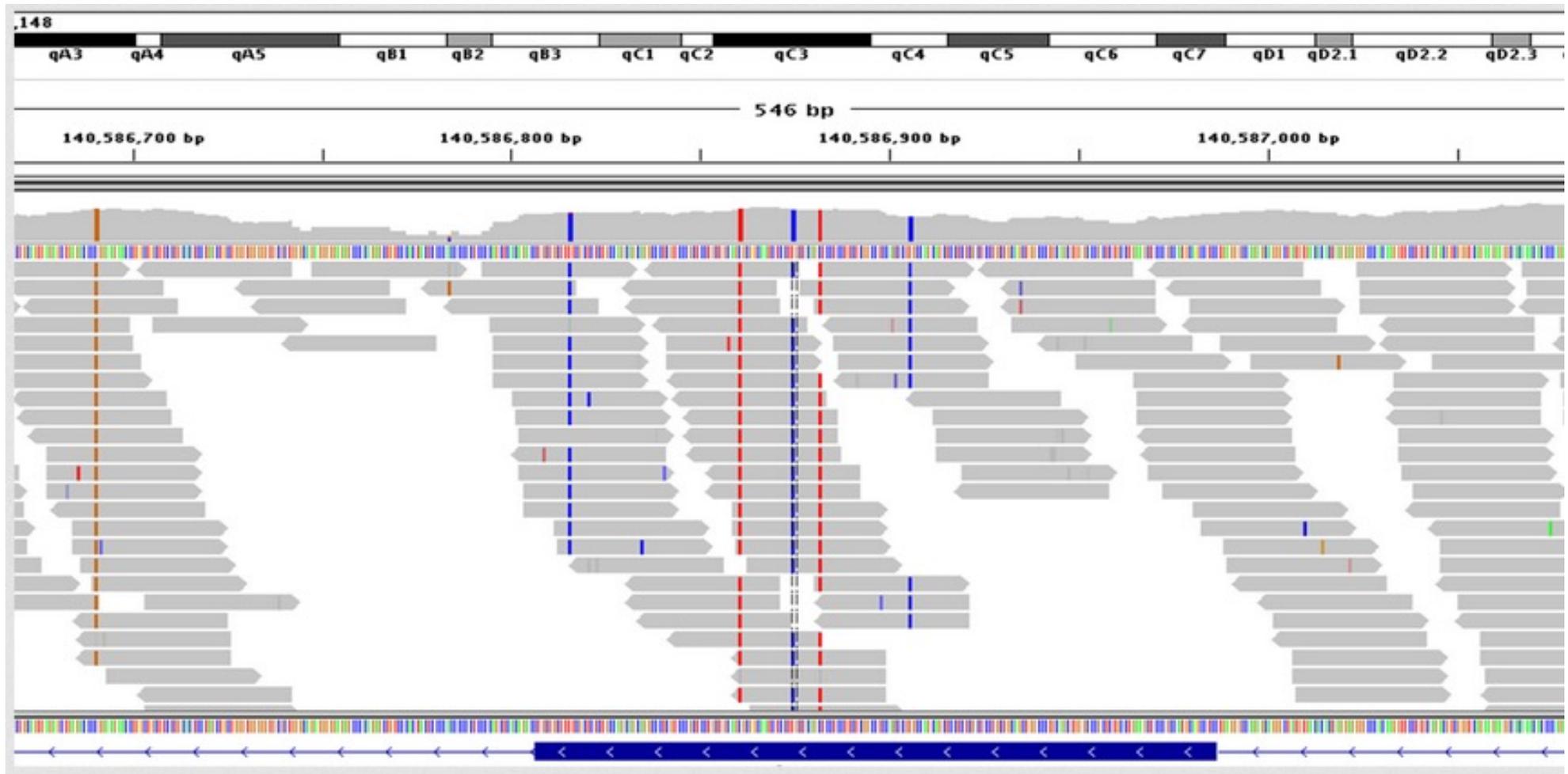


Cases



Controls

# Detectando SNPs por NGS:

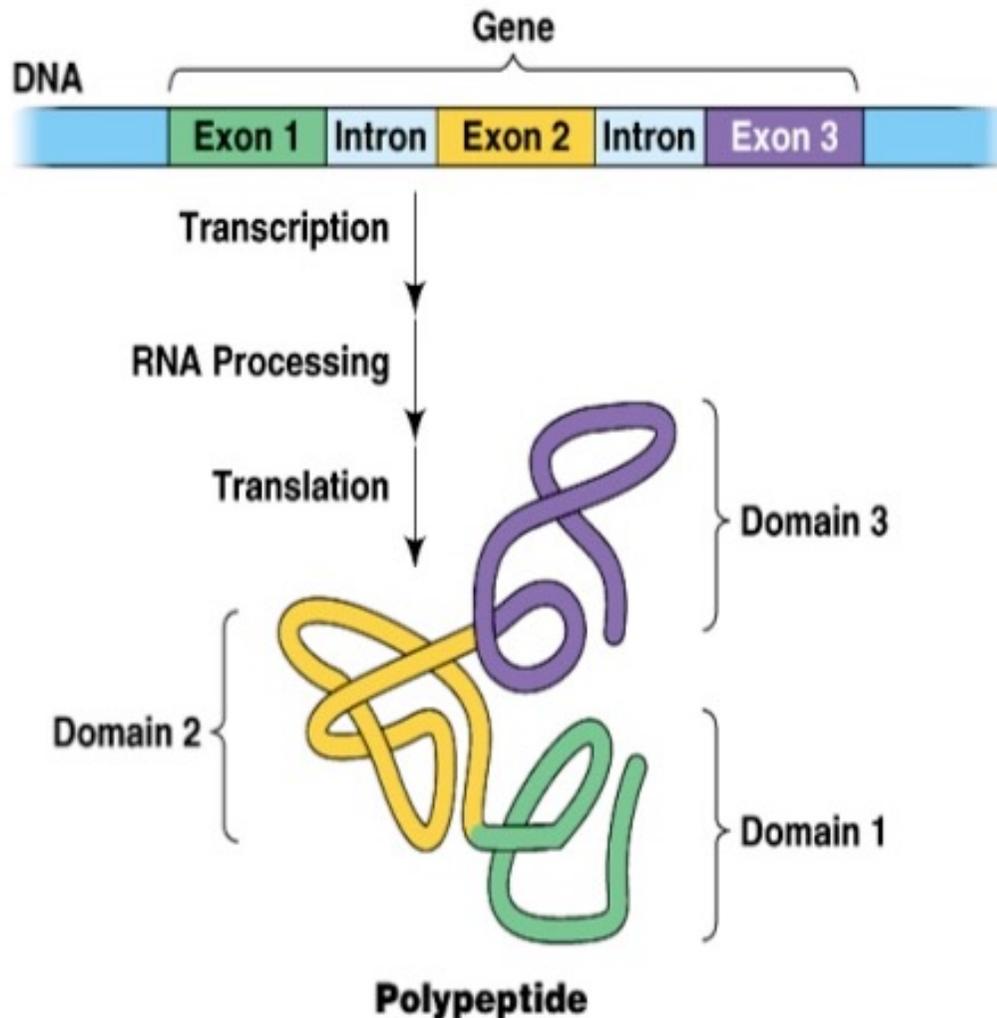


**Construindo novas proteínas  
durante a evolução por**

**EXON SHUFFLING**

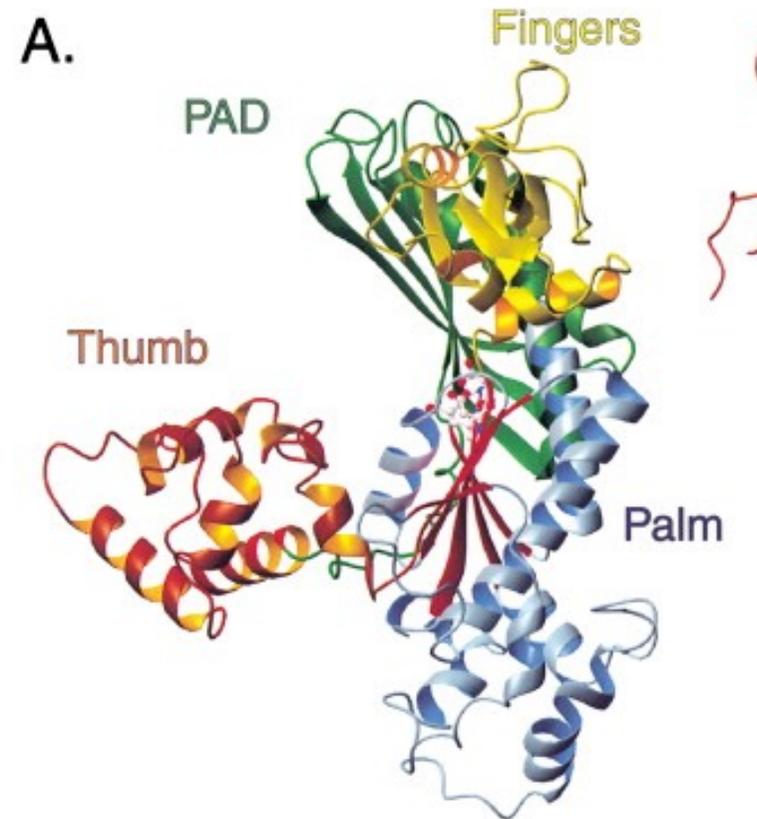
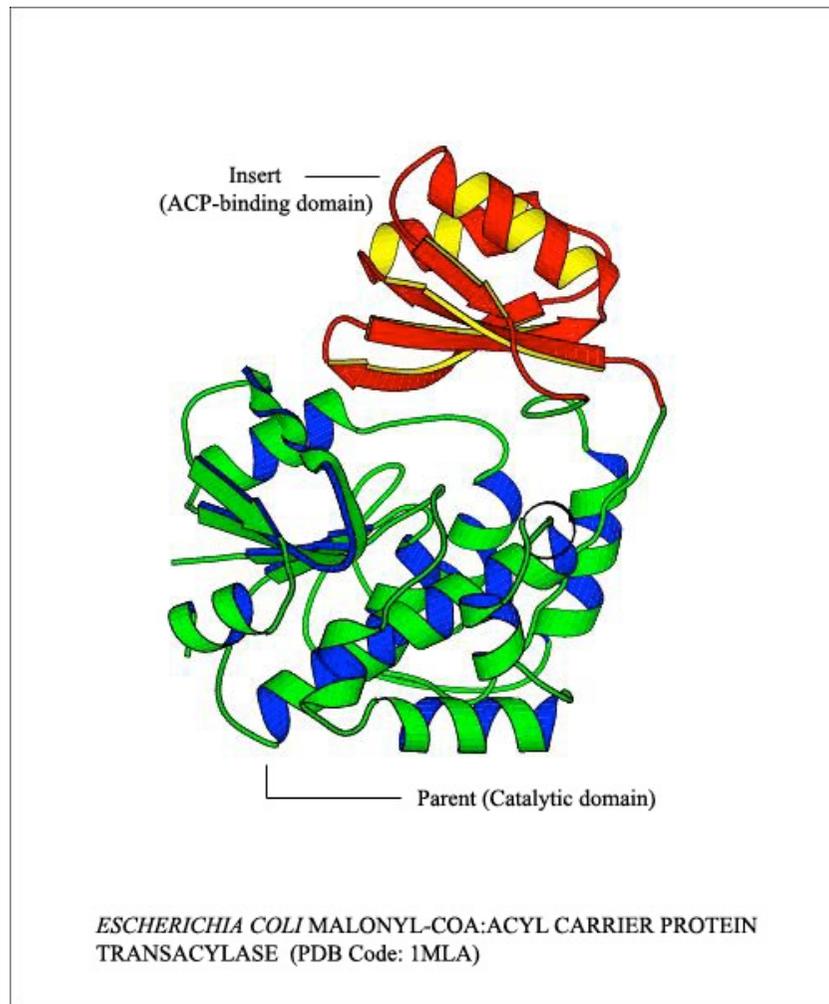
**(embaralhamento de exons)**

**TRATA-SE DE UM PROCESSO EVOLUTIVO  
PARA CRIAÇÃO DE NOVOS GENES!!!!  
DEVE PASSAR PARA NOVAS GERAÇÕES!**



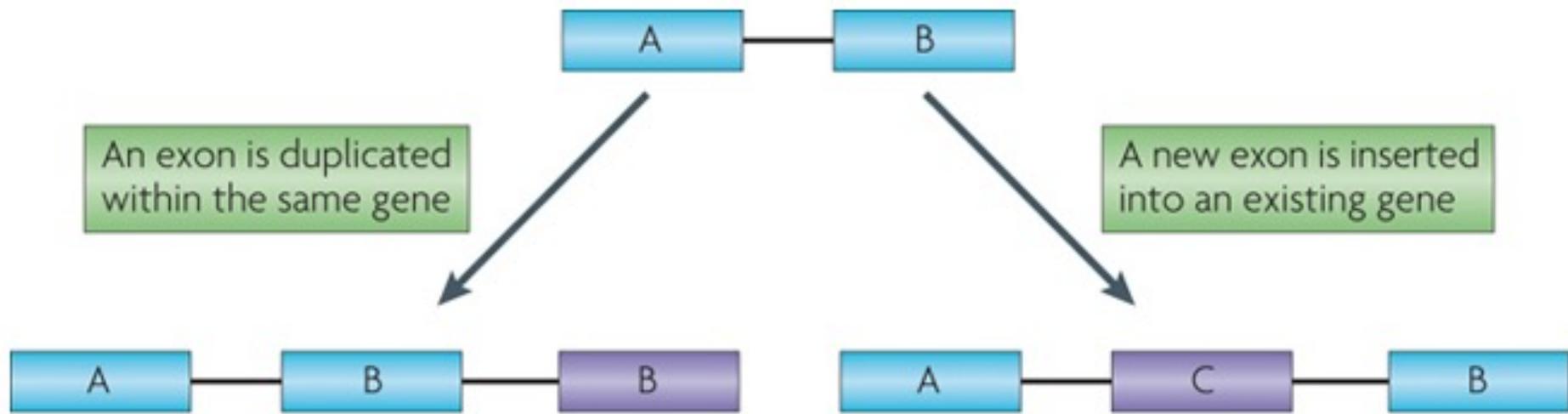
**Mas as proteínas são feitos de pedaços (domínios) e em geral codificadas por exons independentes!!!!  
O Que isso significa em termos e evolução e criação de novos genes?**

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



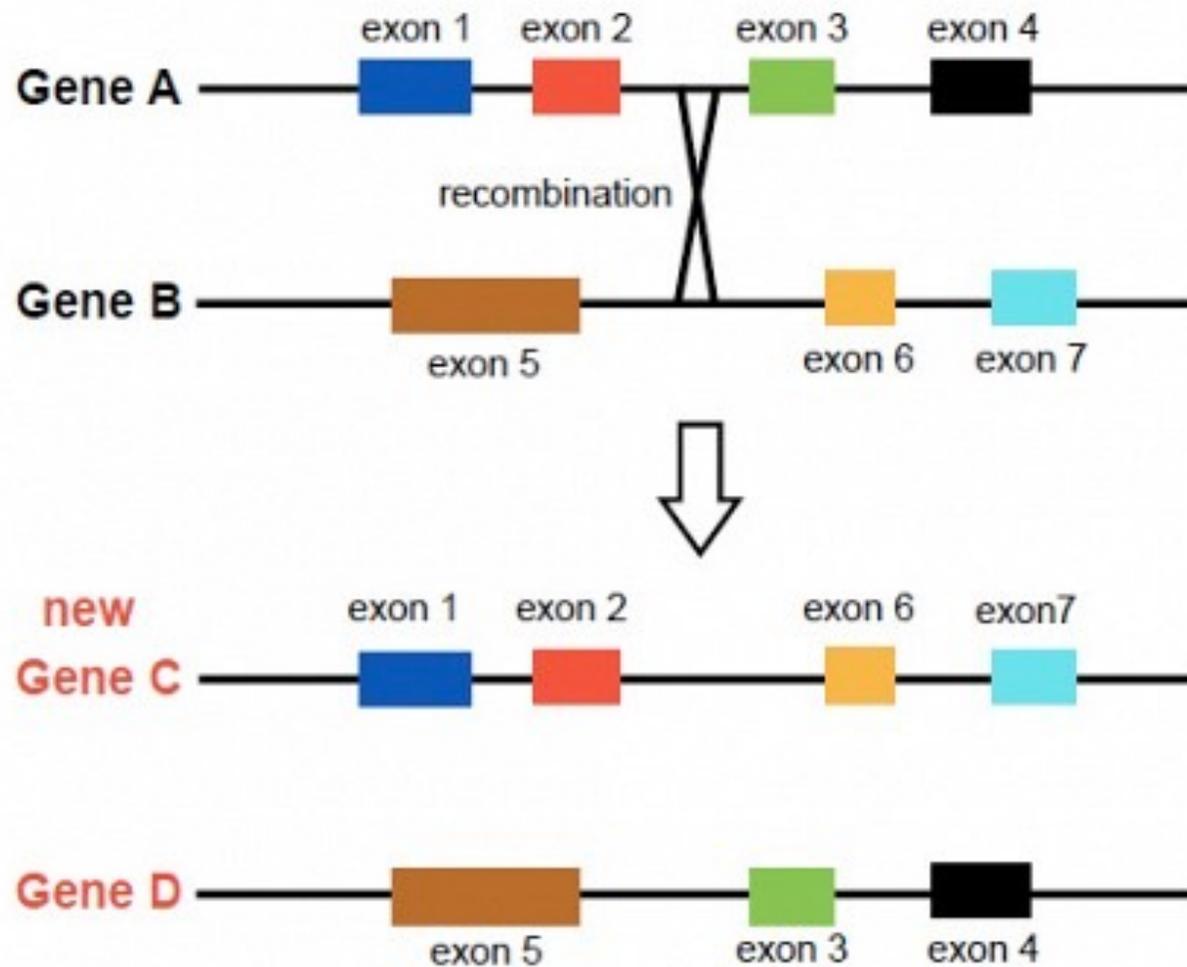
DNA polimerase

**Esses domínios podem ser codificados por exons!!**



**Durante a evolução os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!**

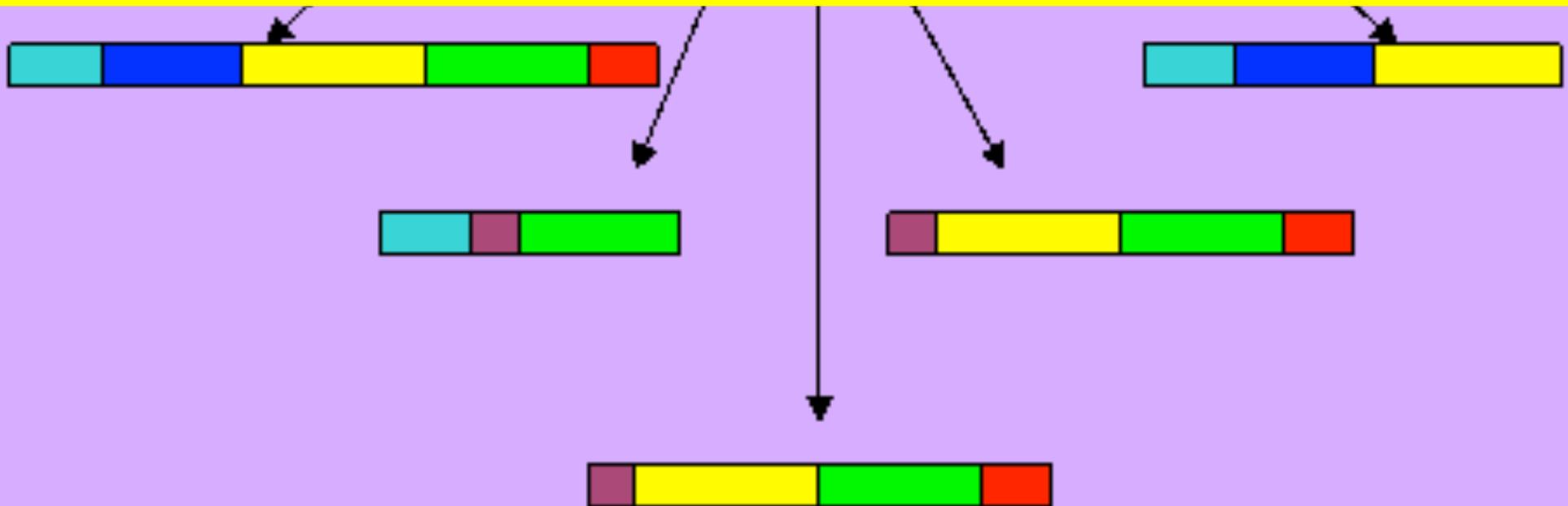




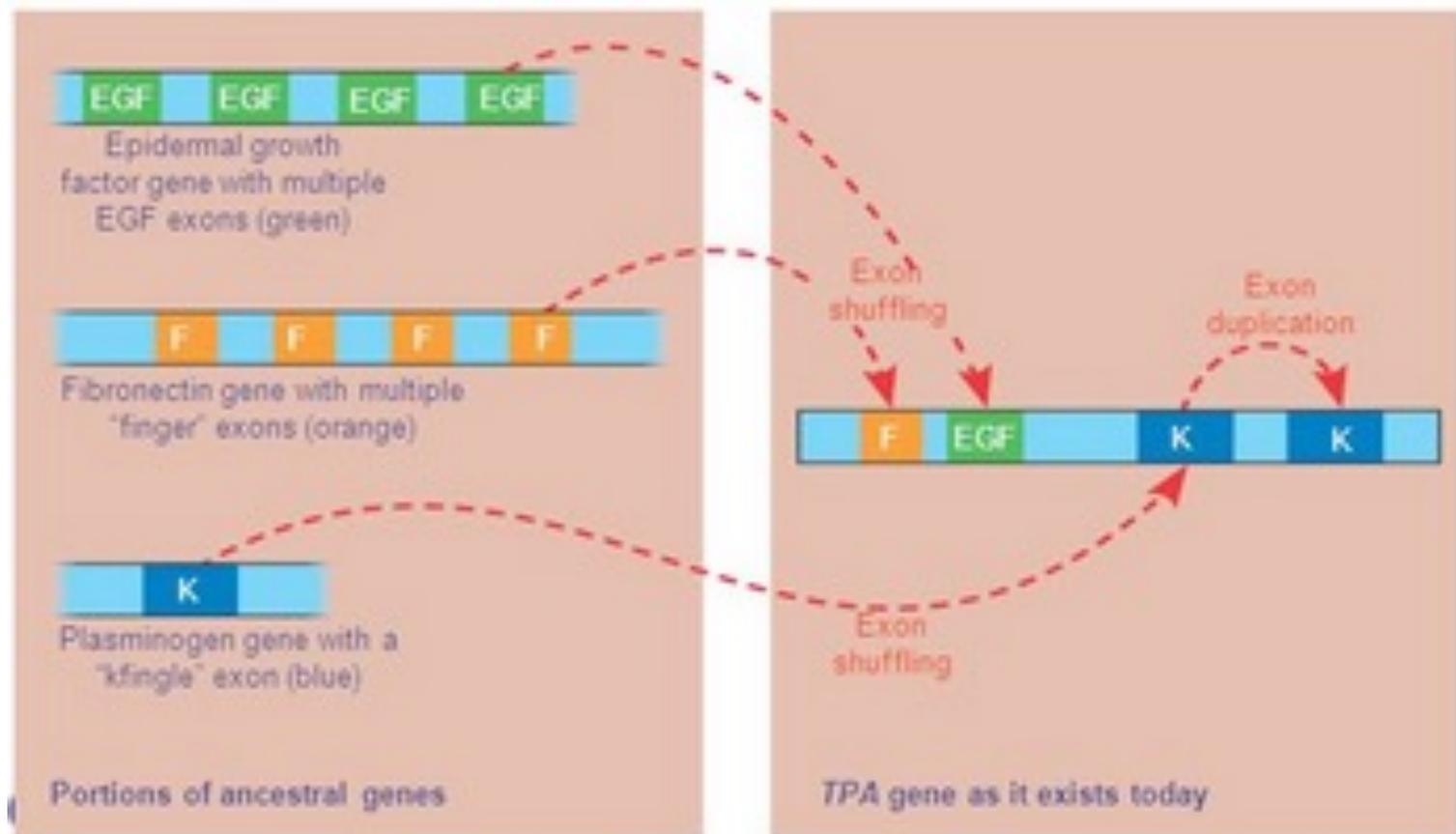
**Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!**



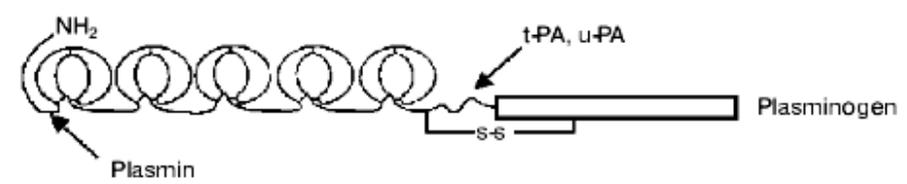
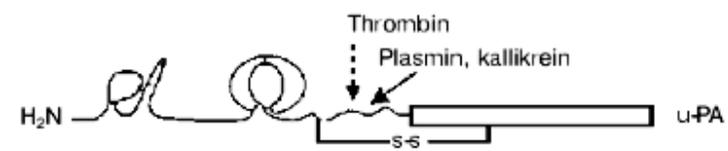
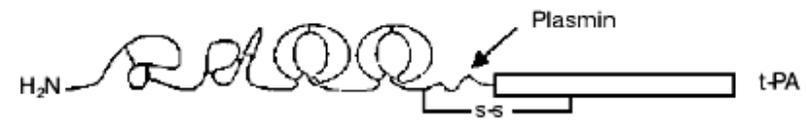
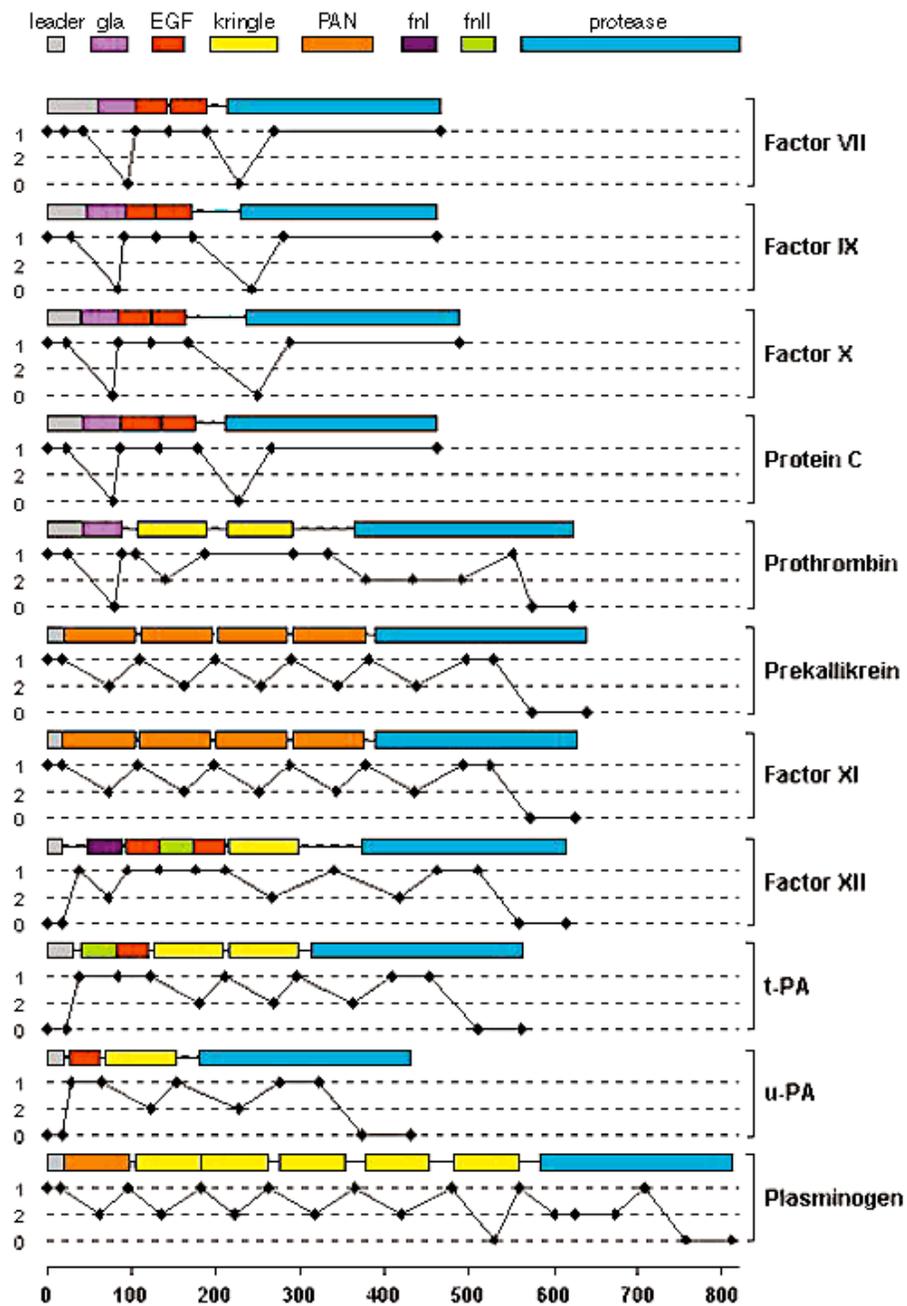
No exon shuffling um número pequeno de domínios funcionais podem ser embaralhados por recombinação e, no processo evolutivo, formar uma grande diversidade de genes distintos que codificam proteínas com funções distintas.



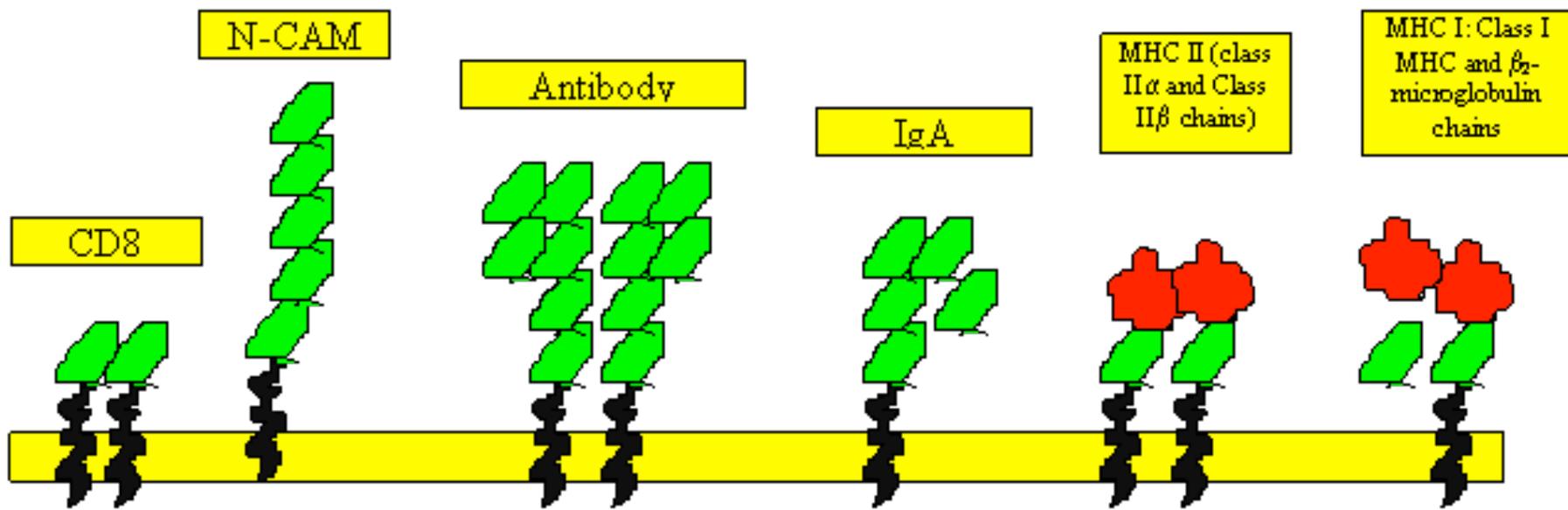
**Assim, os domínios proteicos podem funcionar como peças de LEGO e montar proteínas diferentes através de recombinações nos introns!!!!**



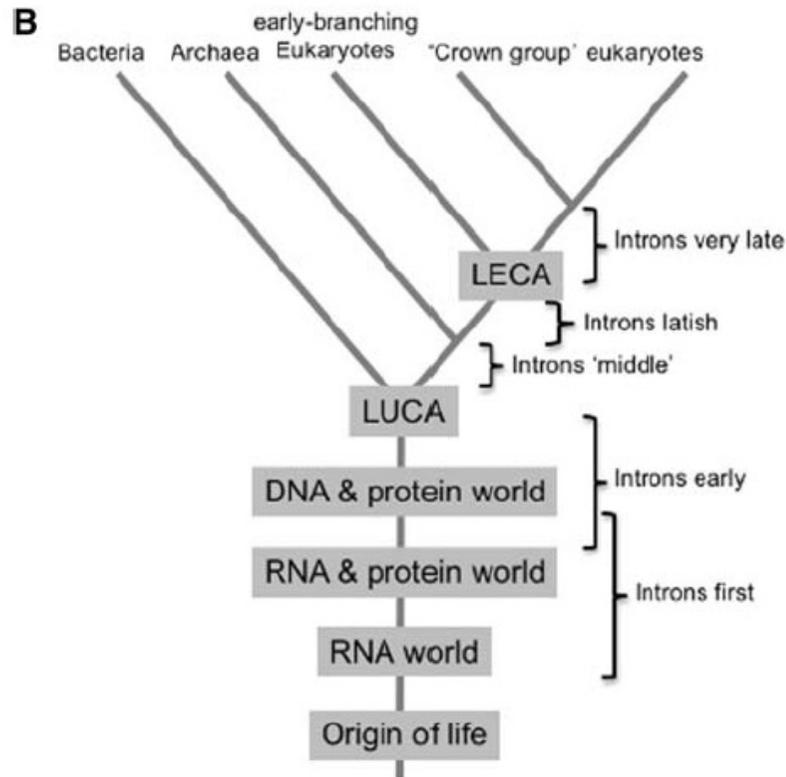
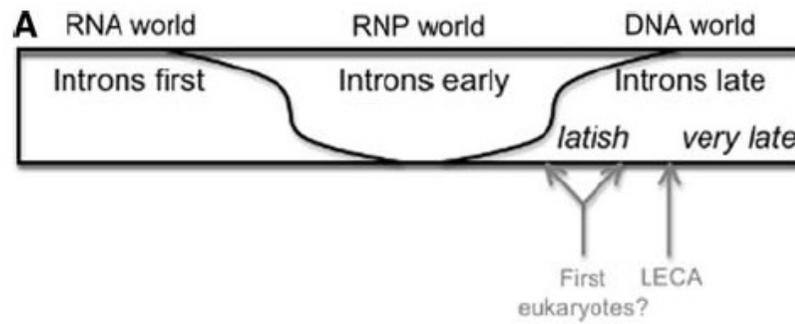
# Domínios na montagem de proteínas: exemplos:



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



<https://www.youtube.com/watch?v=Hy3RmzwYgaE>



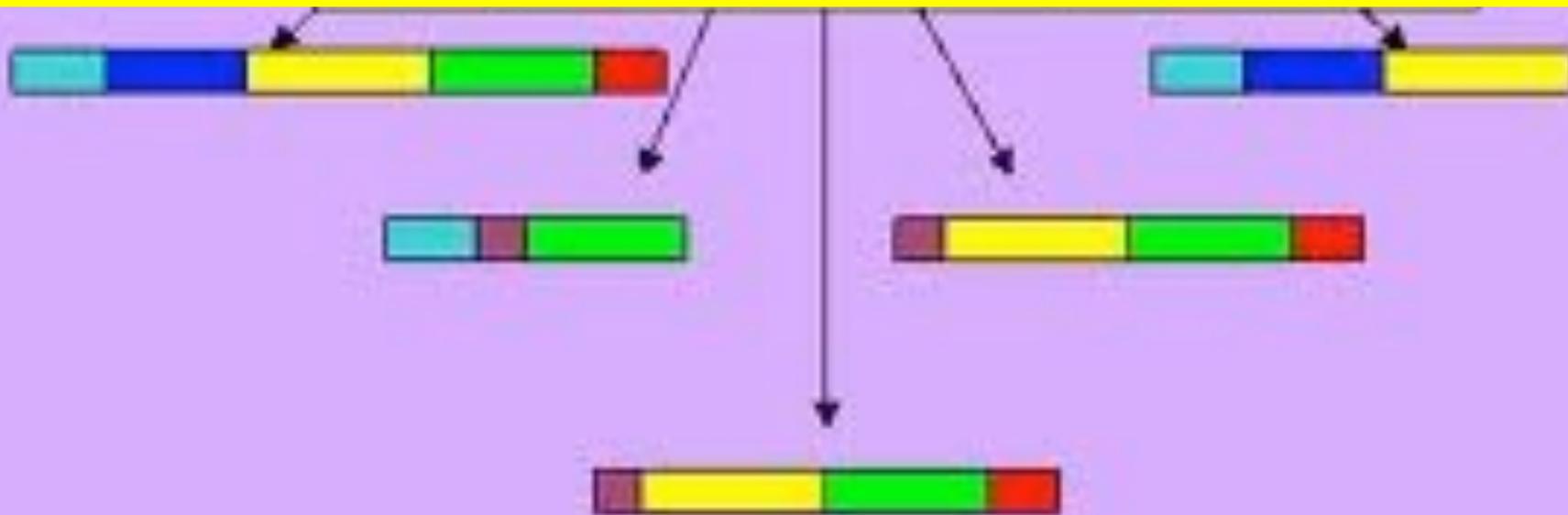
**Se os exons/introns são tão importantes na formação de proteínas,  
 Certamente tem muito impacto na evolução?  
 Há quanto tempo os organismos vivos tem introns em seus genes!!!!**

**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)**



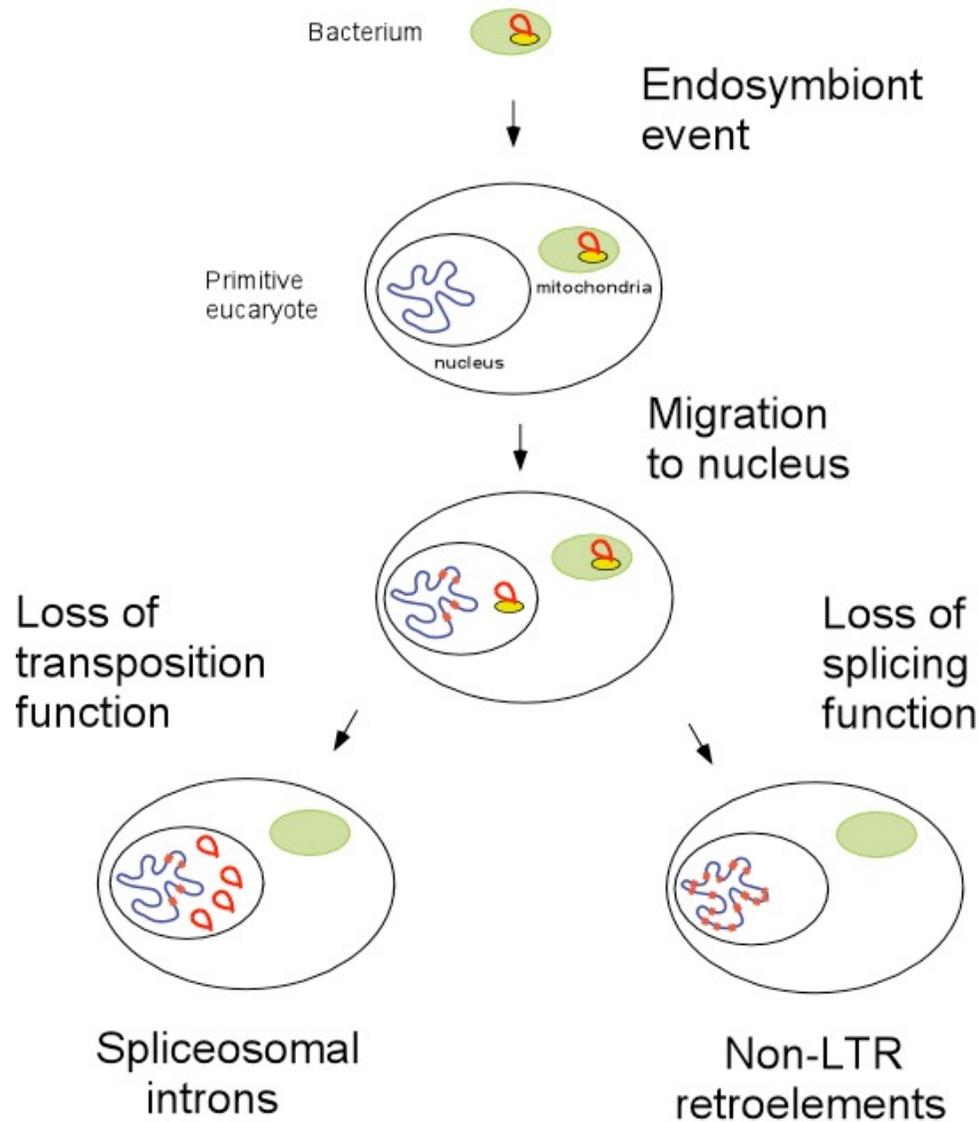
Na origem dos organismos um pequeno pedaço de RNA, que faria uma função  
Poderia formar moléculas mais complexas aumentando a diversidade funcional!



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

**INTRON LATE HYPOTHESIS!**

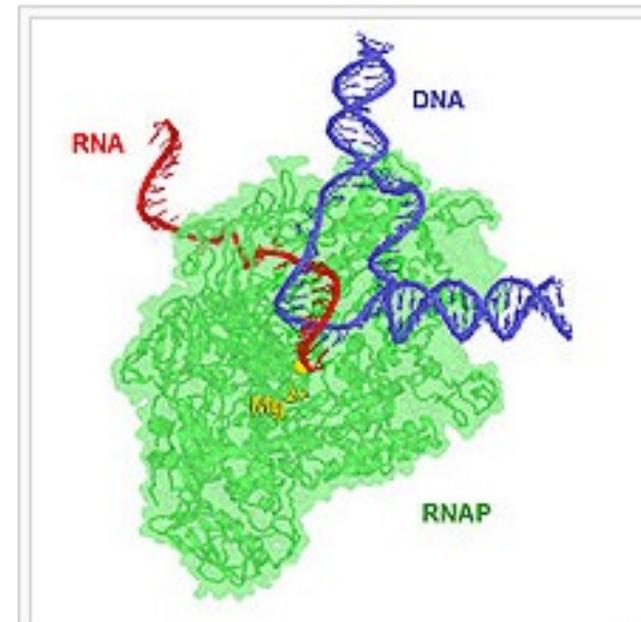
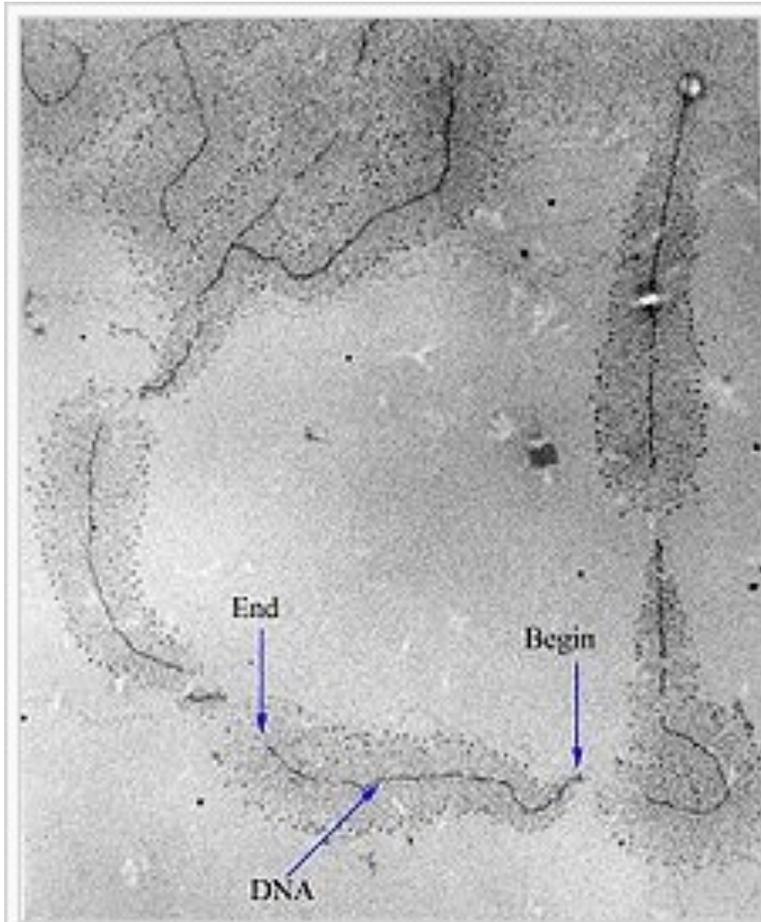
Proposed history of group II introns



## **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**

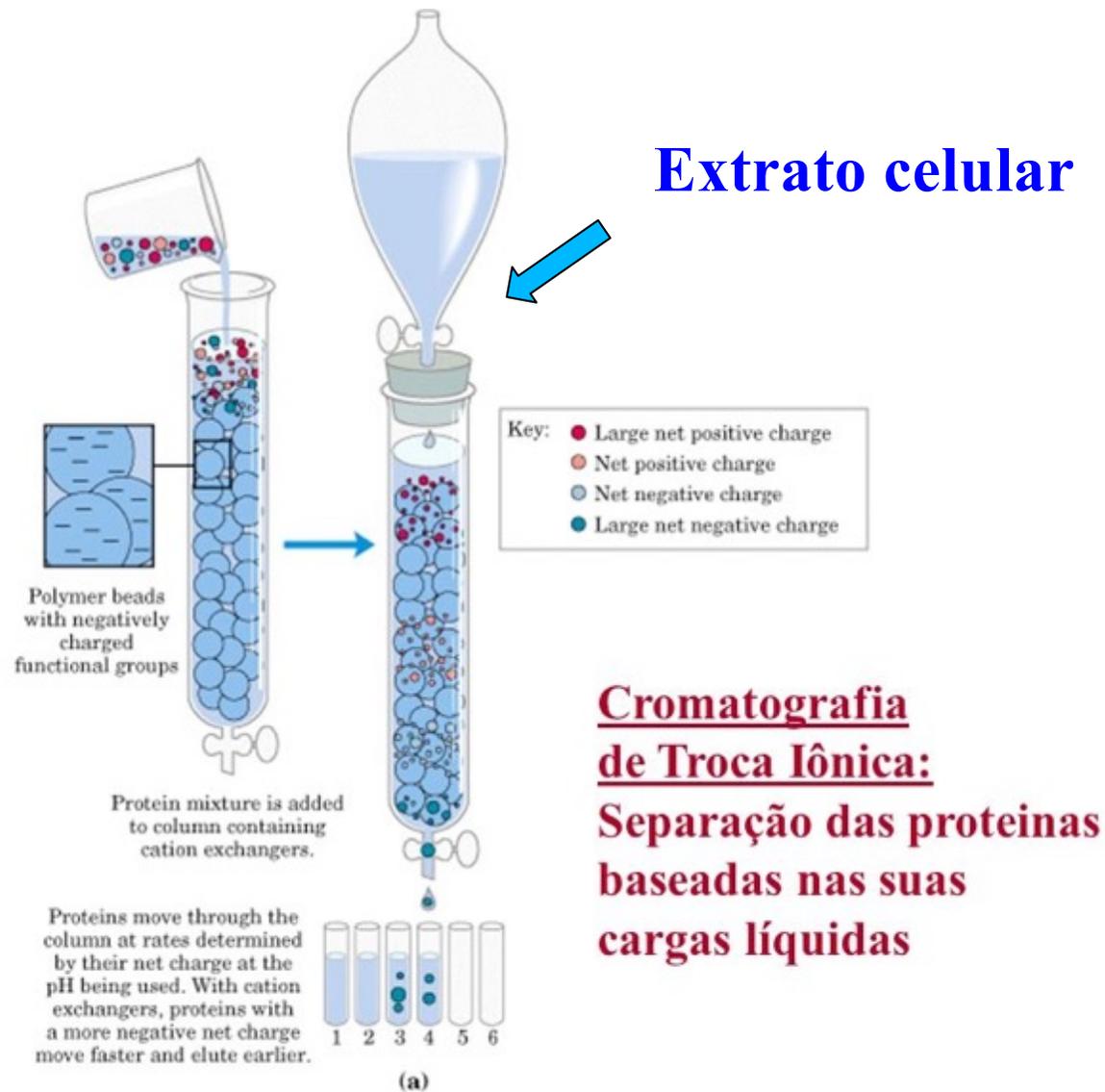
# Quantas RNA polimerases existem em bactérias!



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.

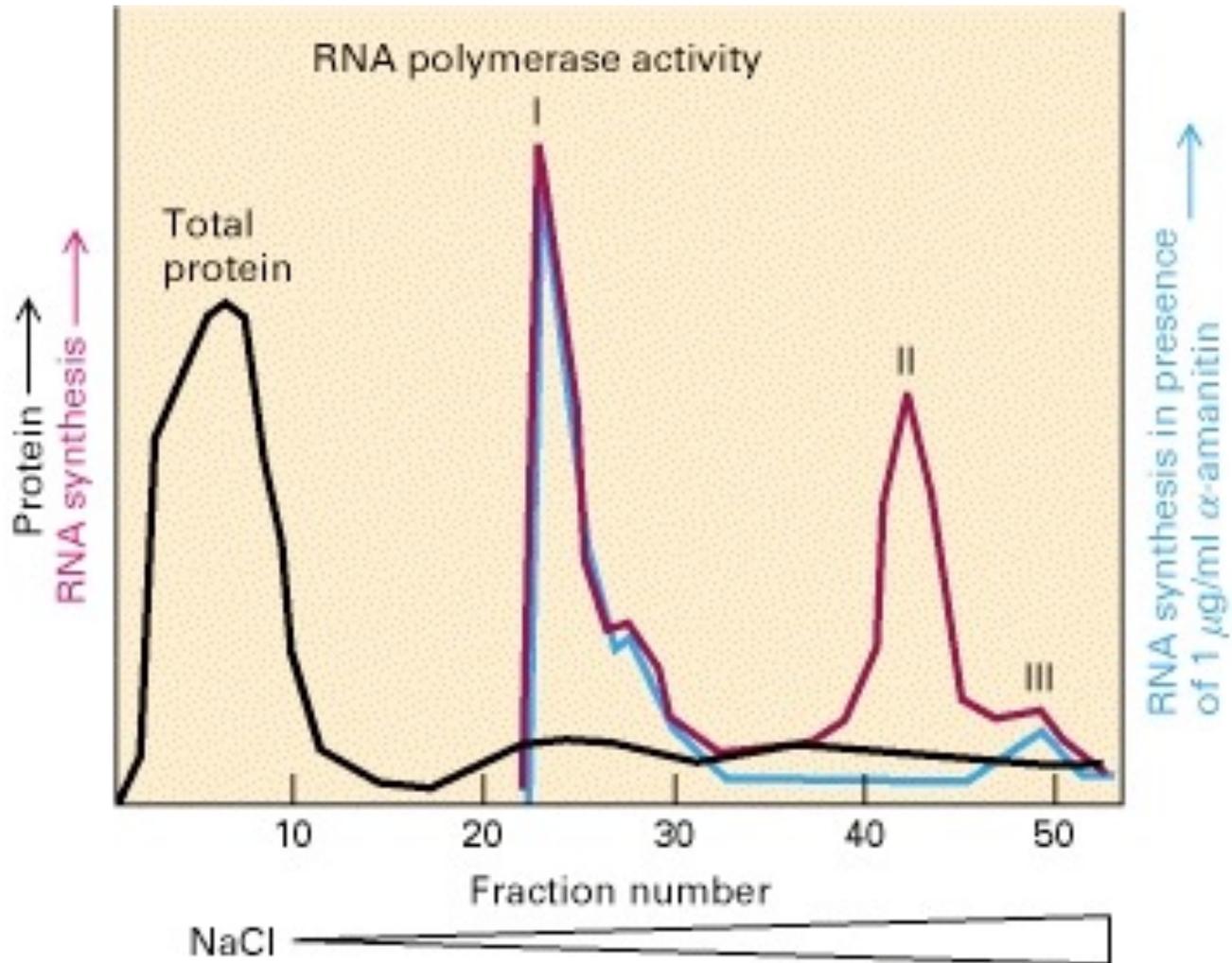
**Apenas uma RNA polimerase!**

# 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?**

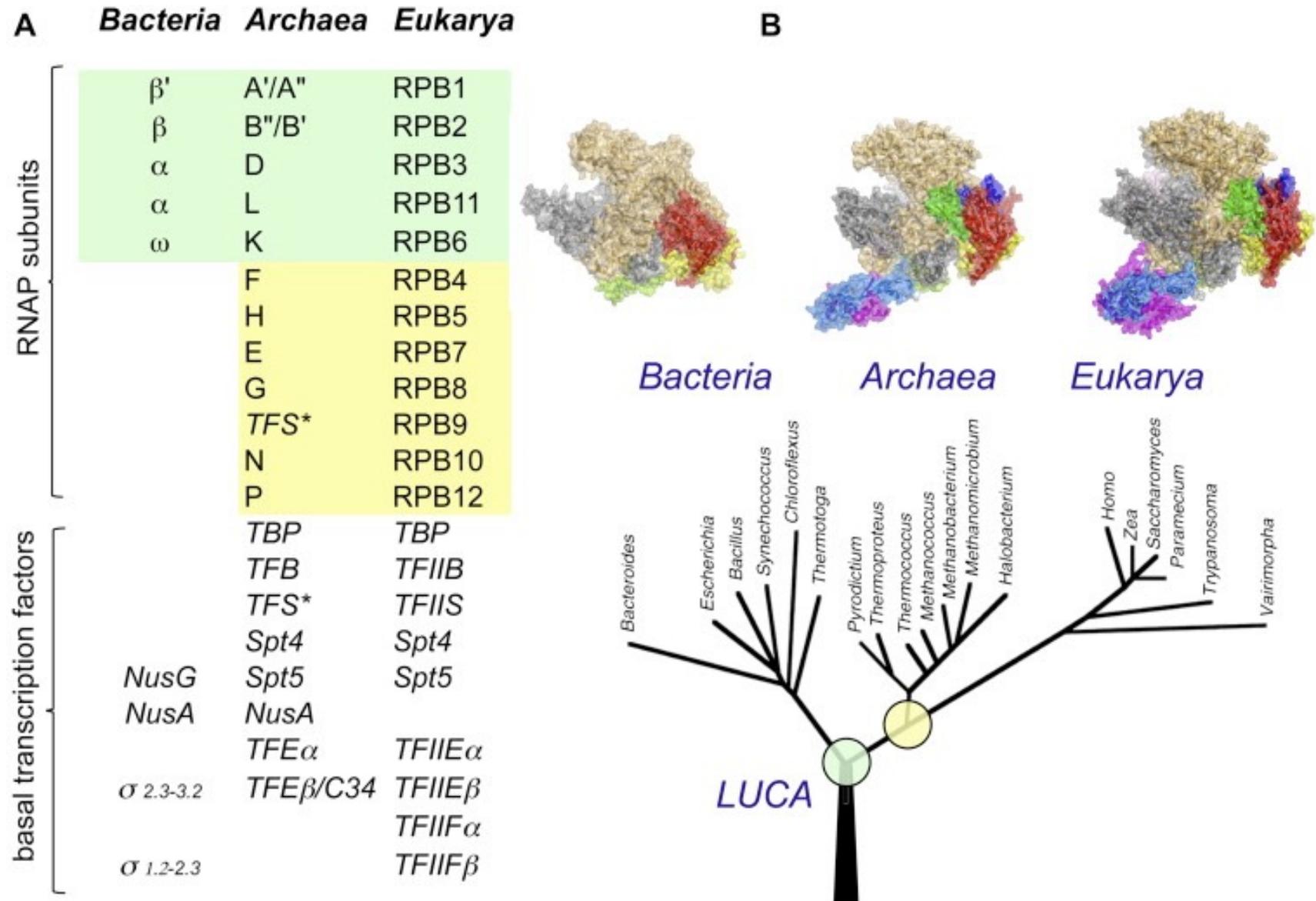
**Três RNA polimerases transcrevem  
o RNA em eucariontes!**

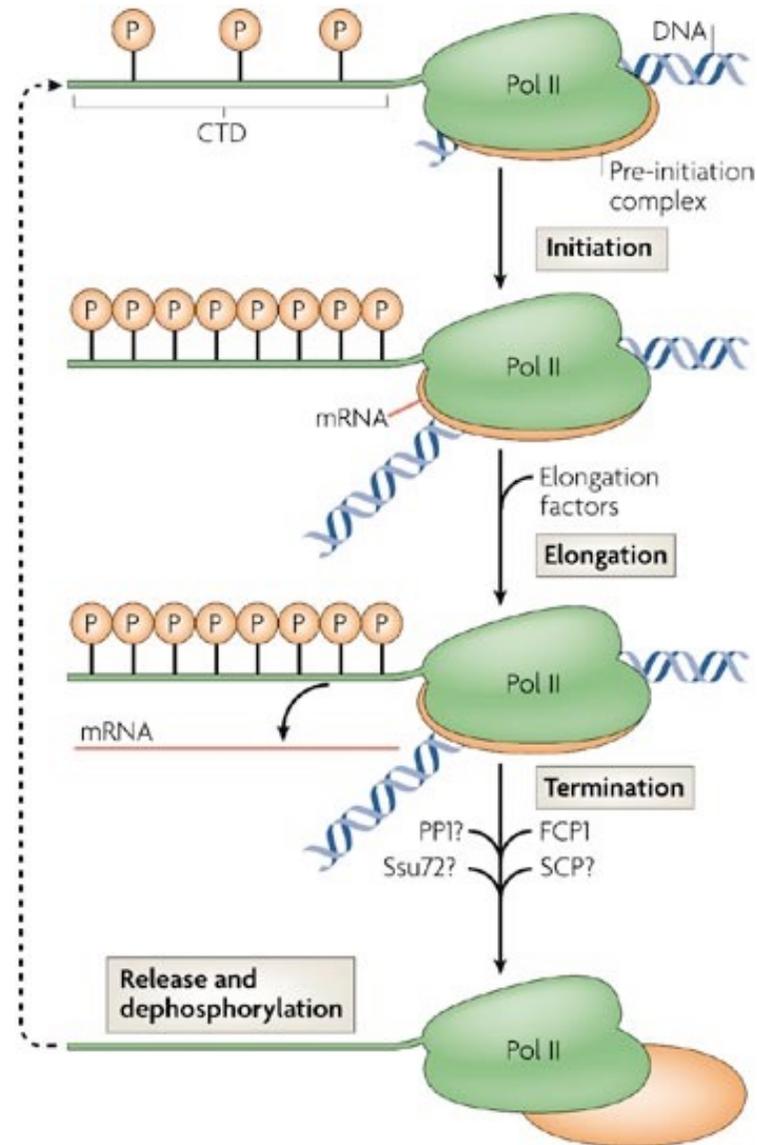
**RNA polimerase I- RNA ribossômico- RNAr**

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

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

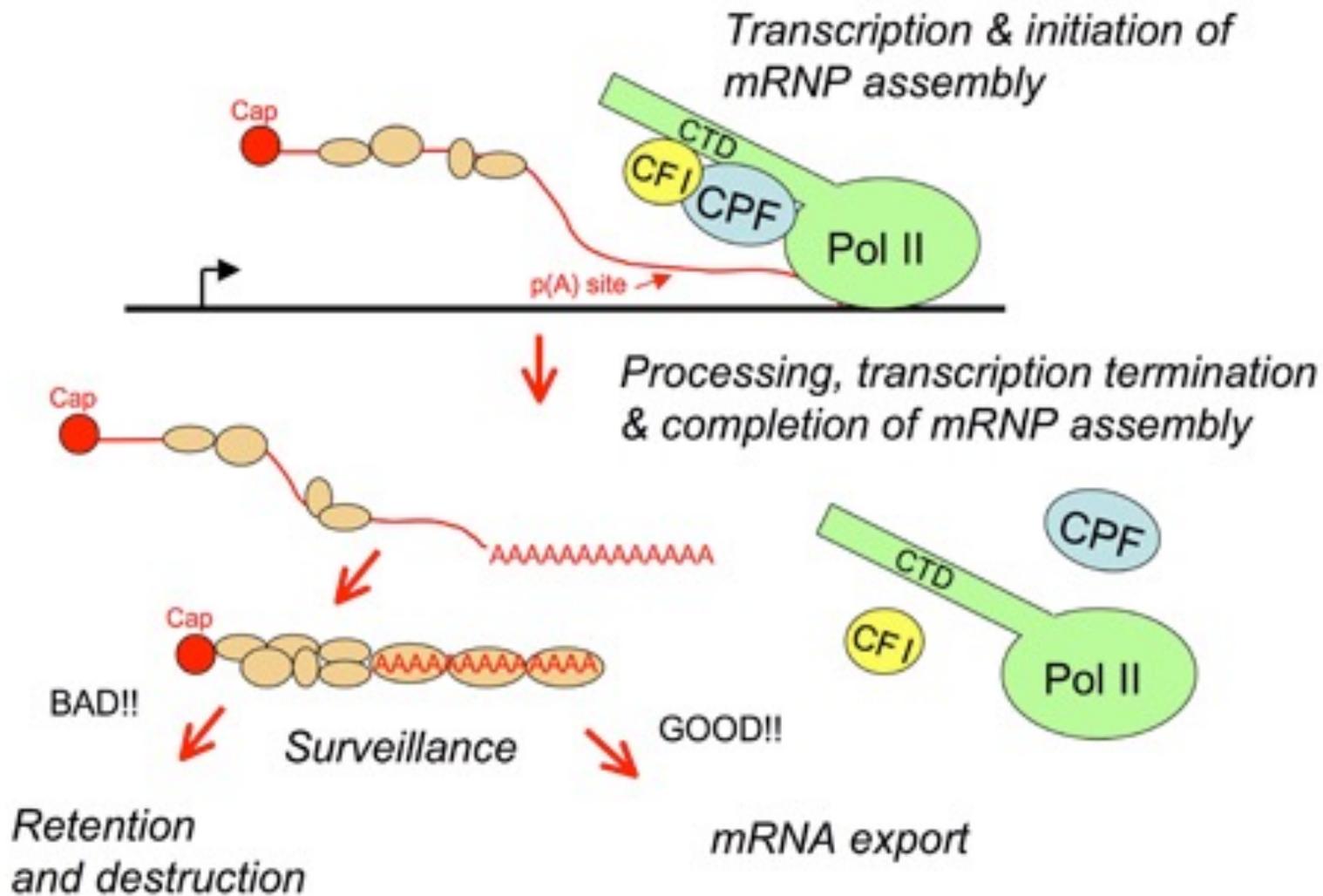
# As RNA polimerases são altamente conservadas! Compare eucaria/arquéia e bactéria! Quem são as mais próximas?



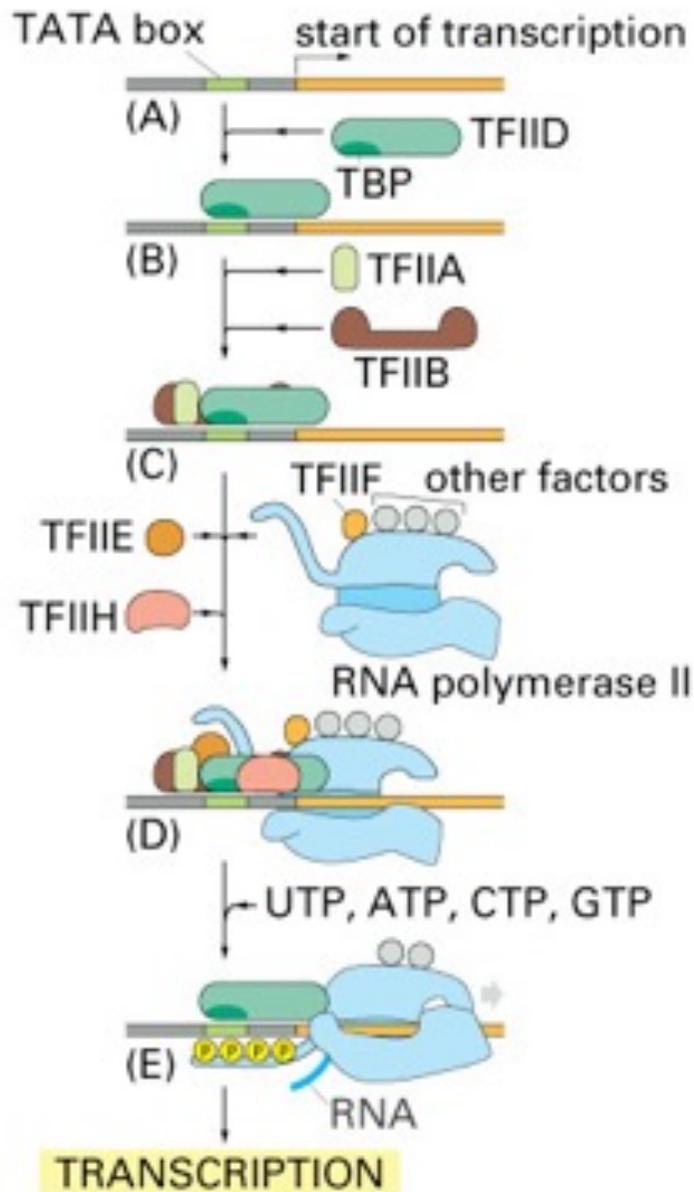


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**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!**

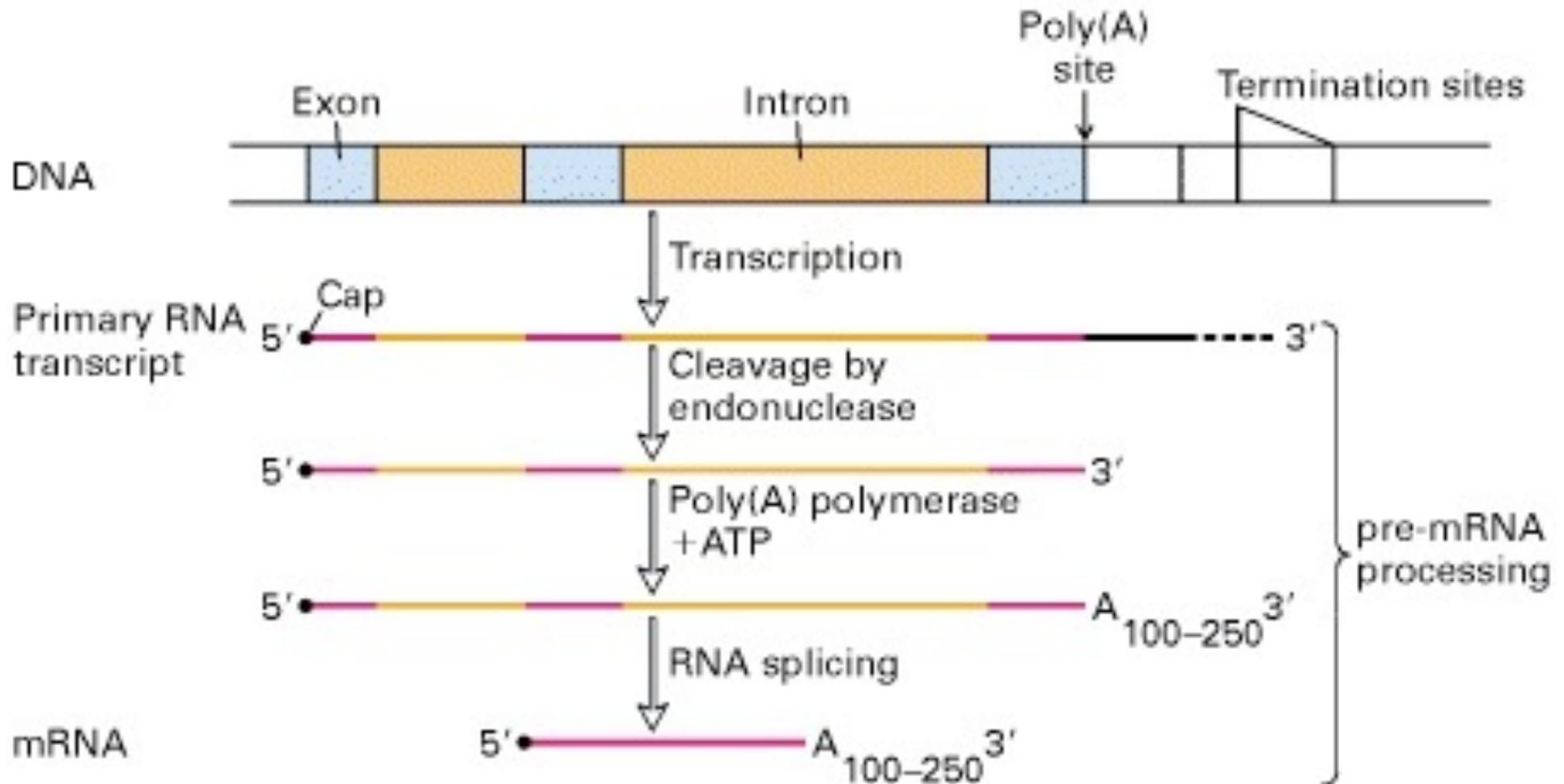


**TBP= TATA binding protein!**

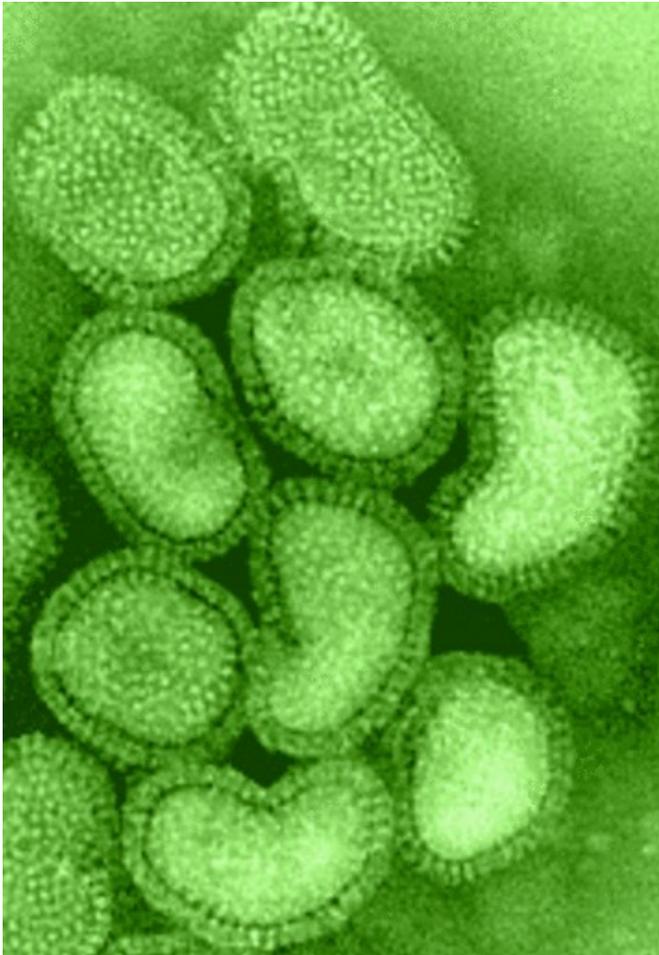
Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

**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?**

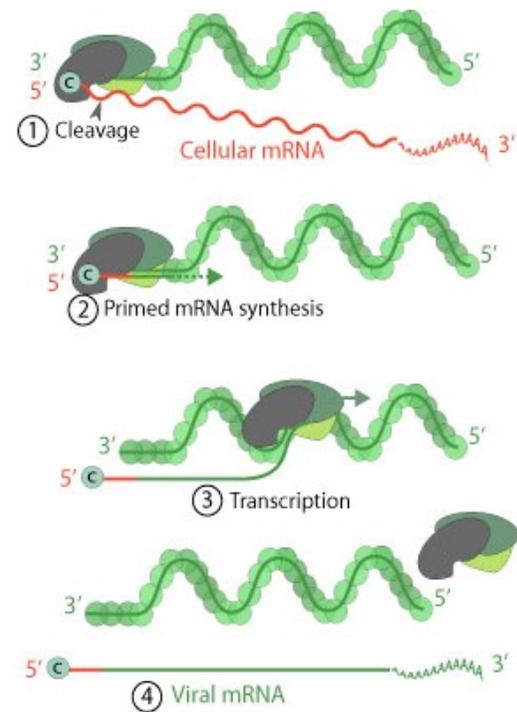
## Modificações do RNA na célula (a CTD da RNA polimerase II participa de todos os processos)



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

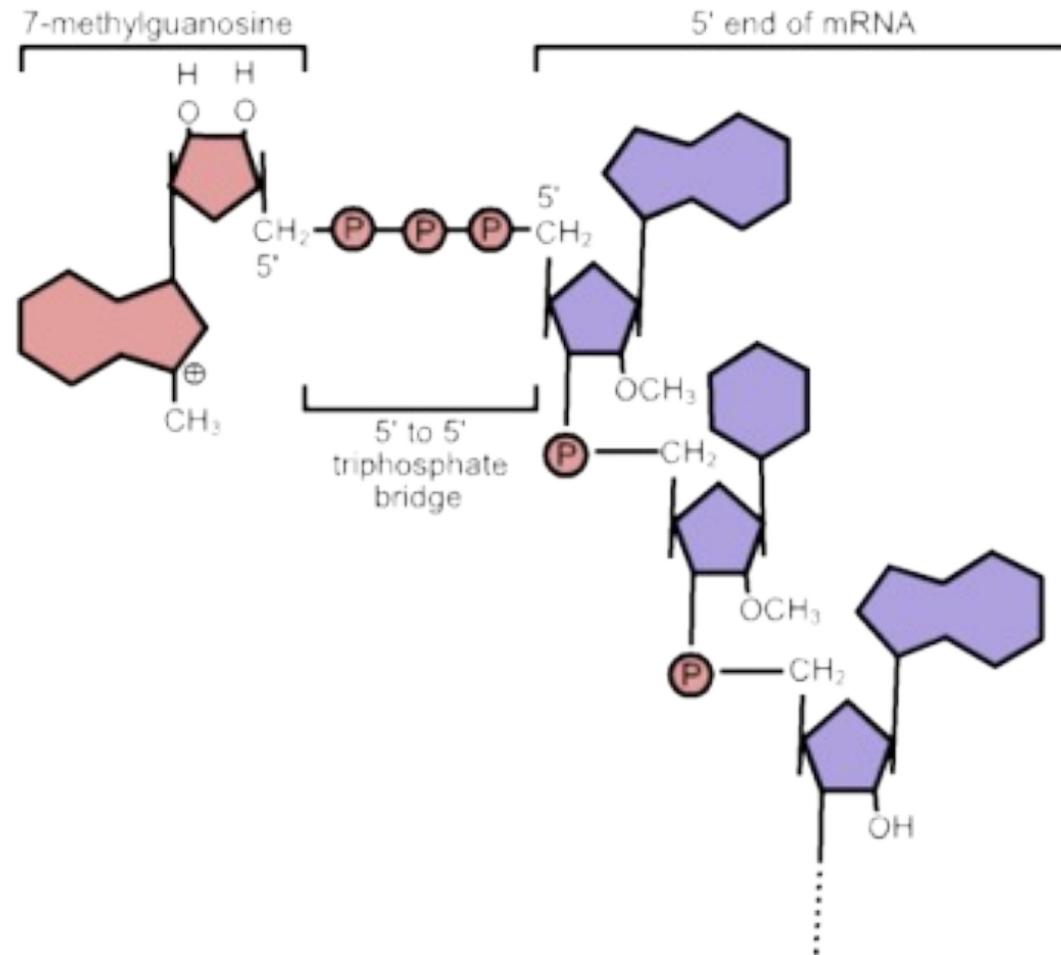


### Cap snatching

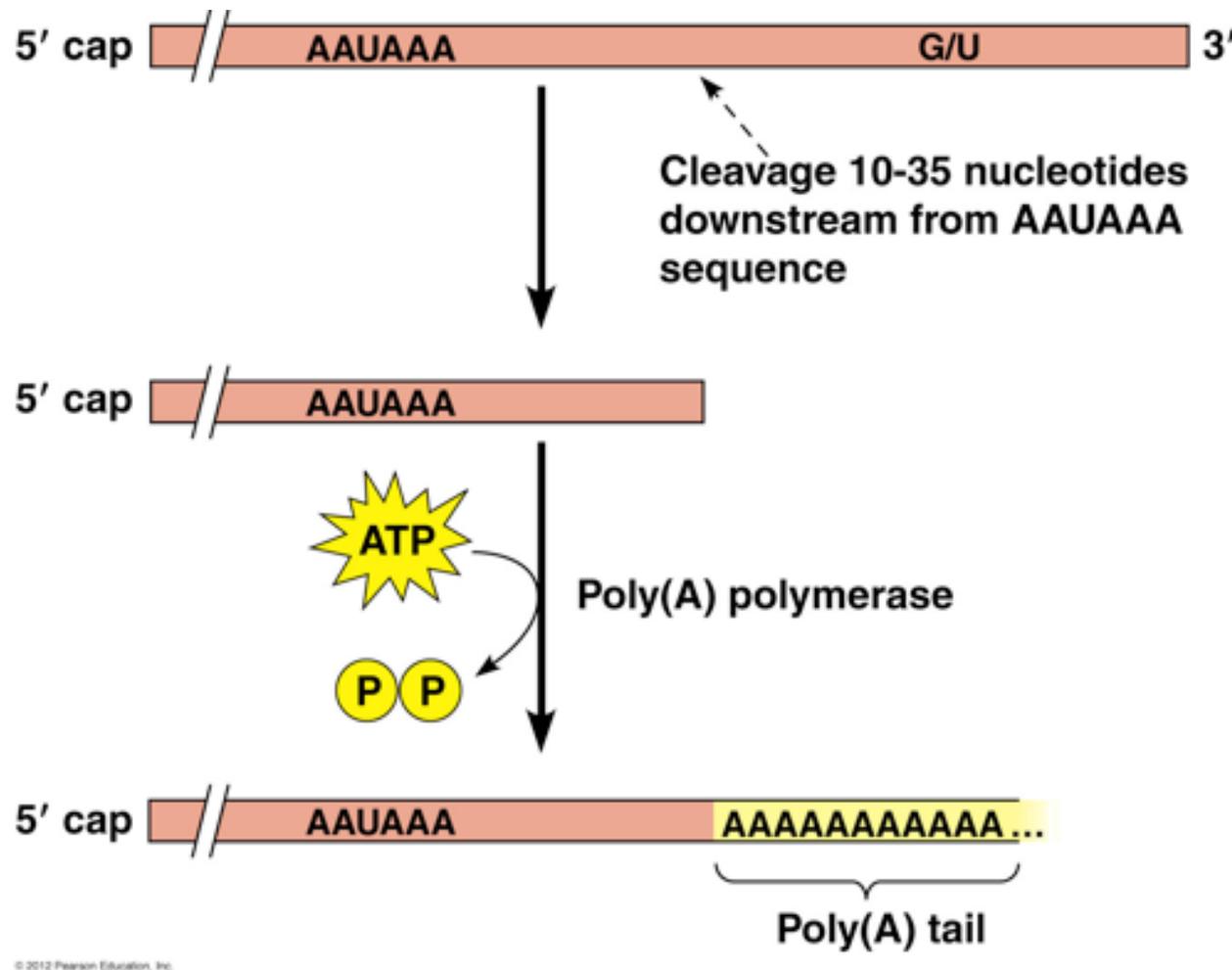


**Rouba 5'cap do RNAm da célula hospedeira!**

## Estrutura do 5'CAP!



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

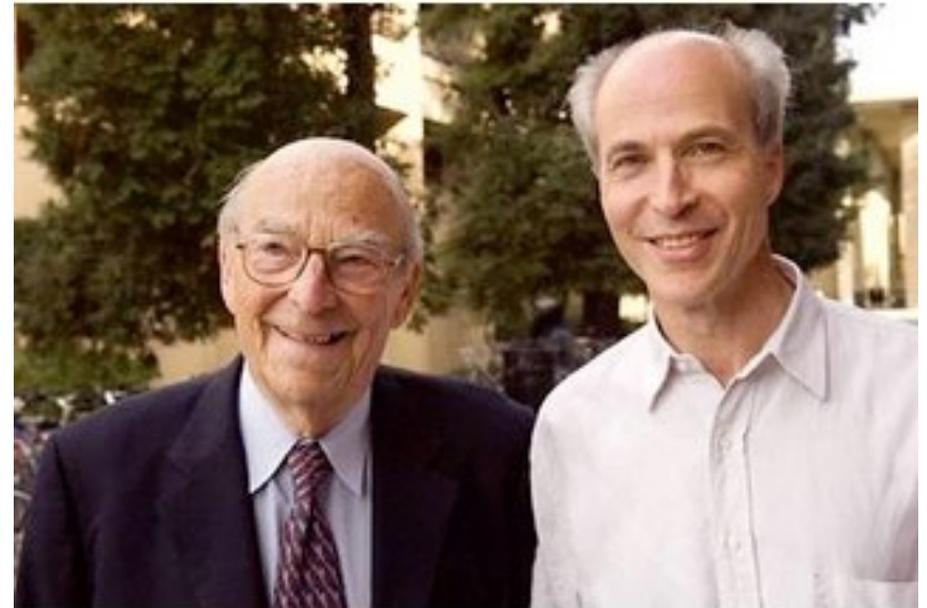
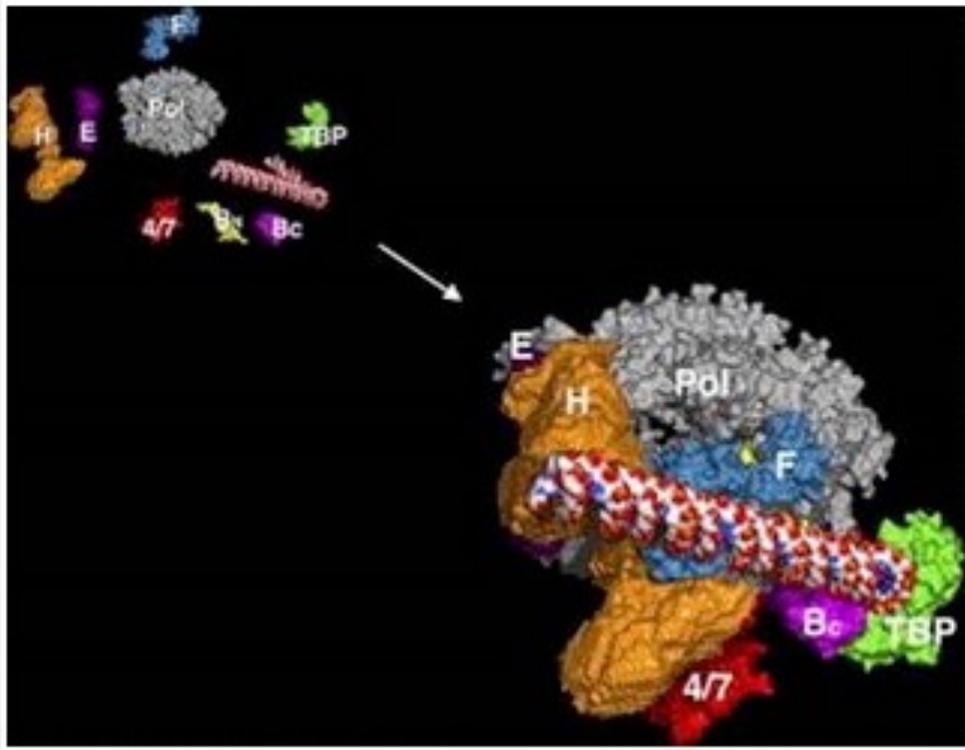


**RNAs virais e celulares (mensageiros) tem cauda de poli-A!  
(exceto RNAm de histonas!!!! Por que? Qual a função de Poli-A?)**

**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!
- Mas como acontece o splicing?

Sinais conservados nos introns:

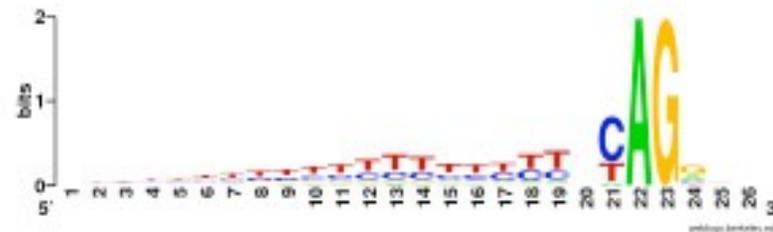
A 3'do exon

a 5'do exon

intron

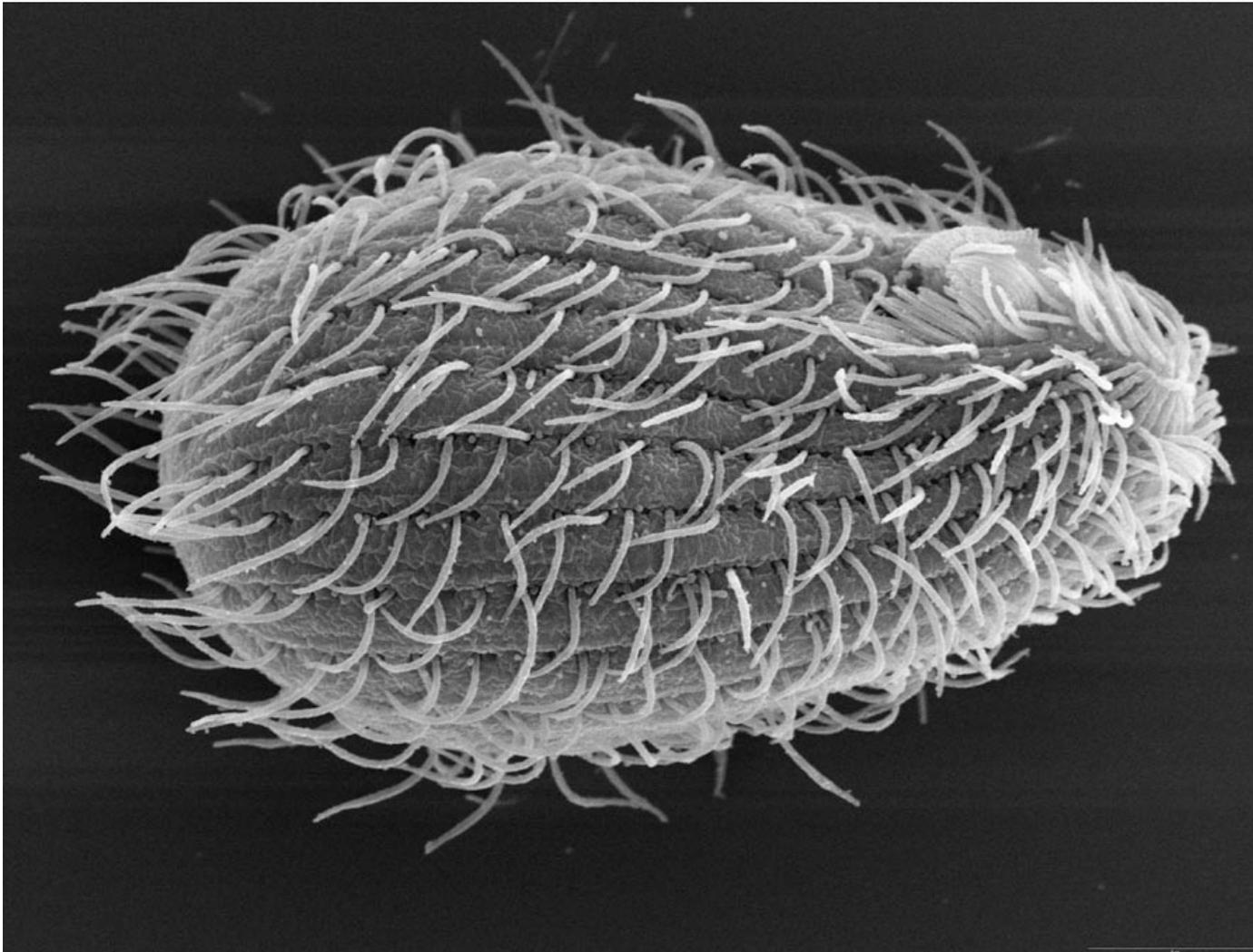


(a) Donor splicing motif consensus

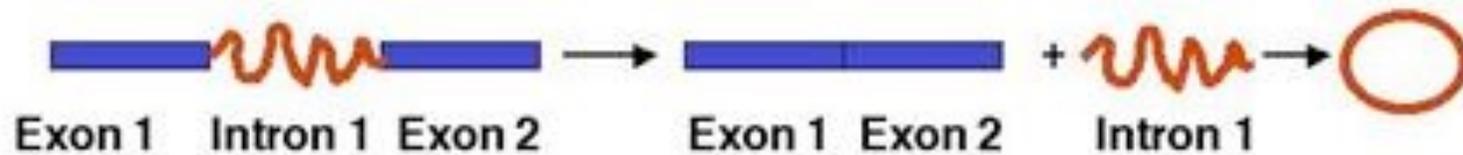


(b) Acceptor splicing motif consensus

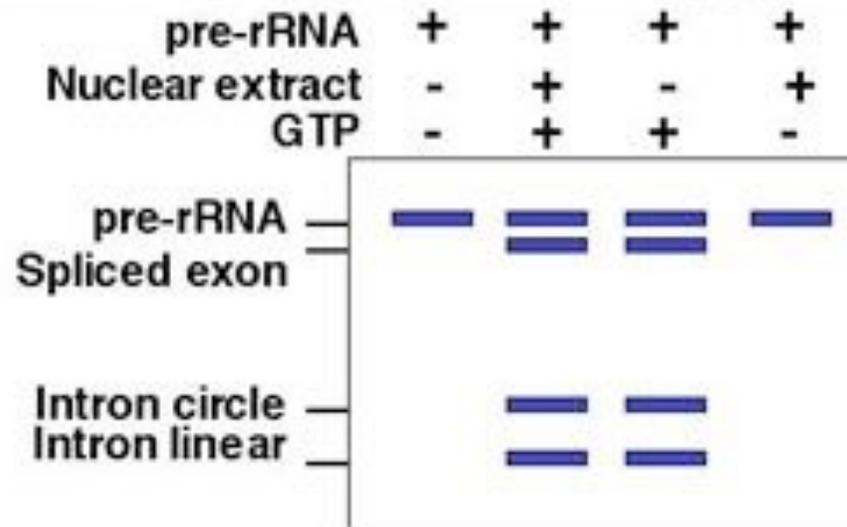
**Tom Cechi: trabalhando com o mecanismo de processamento de introns em Tetrahymena (protozoário):**



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



• Products of splicing were resolved by gel electrophoresis:

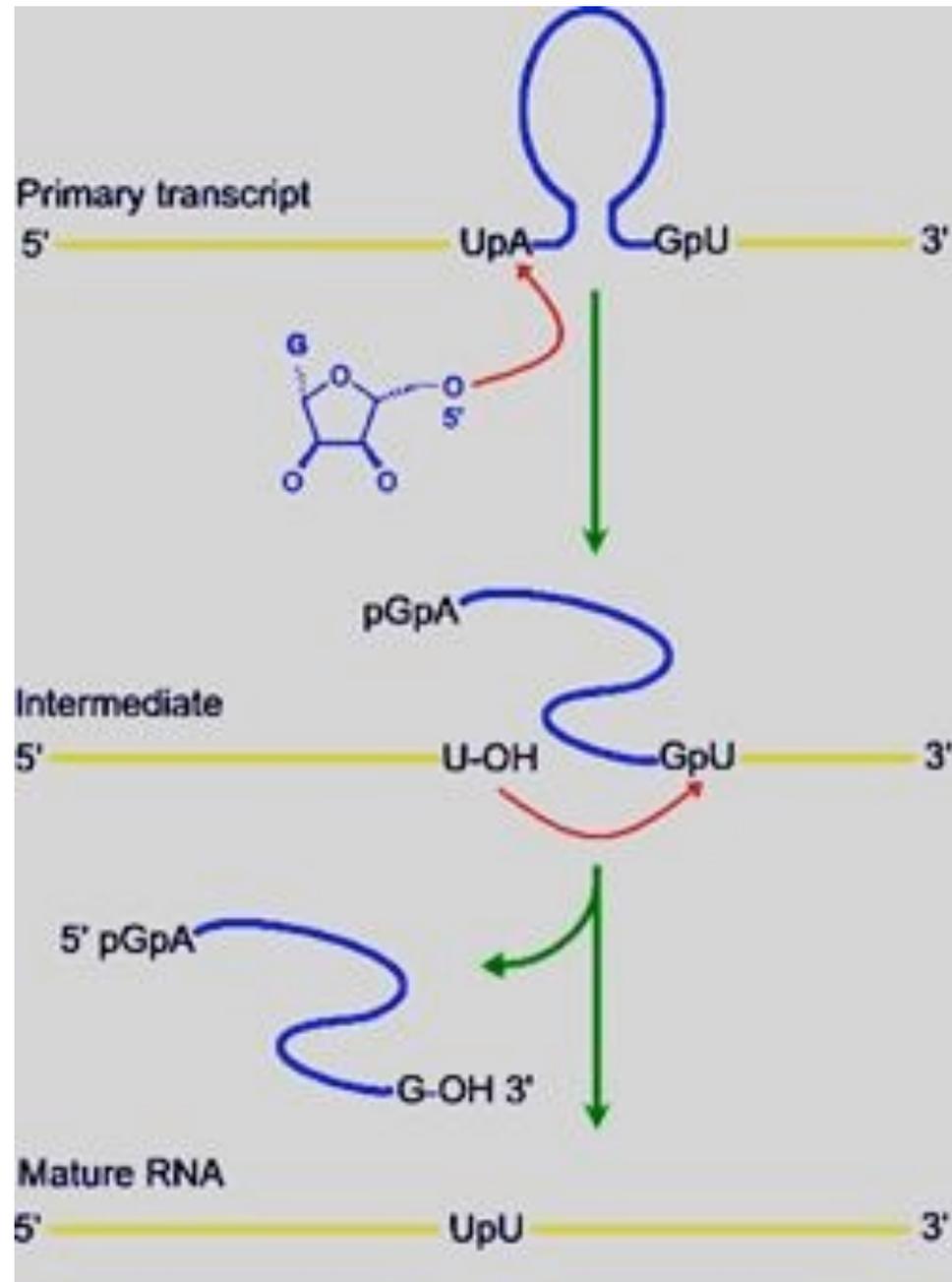


Additional proteins are NOT needed for splicing of this pre-rRNA!

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

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

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

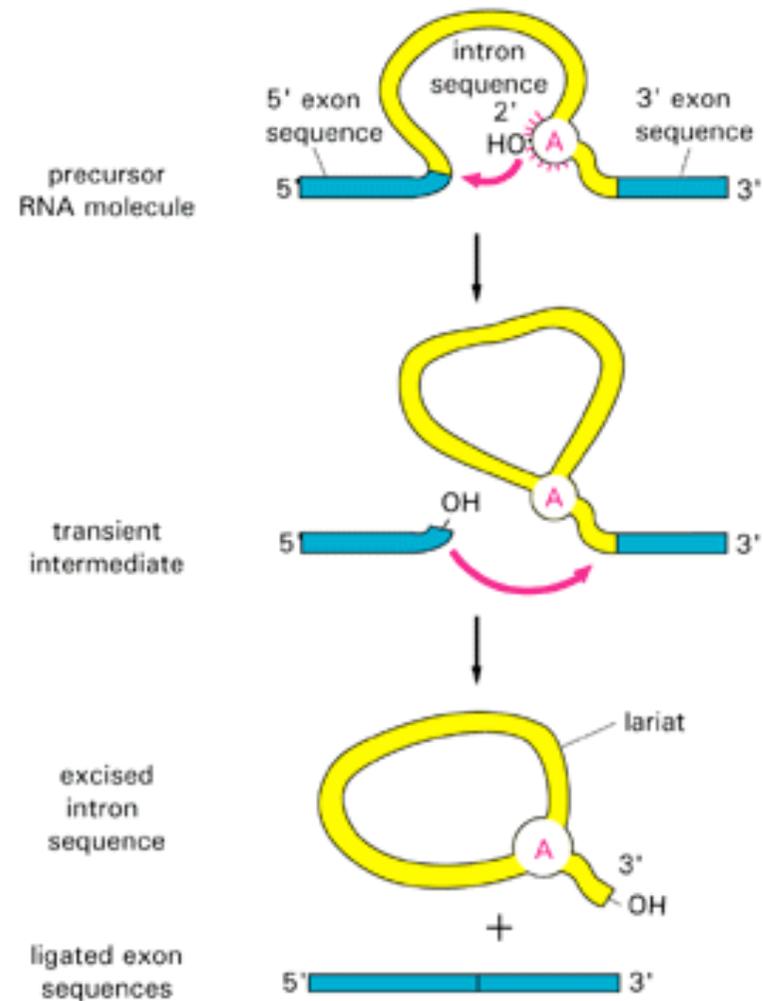
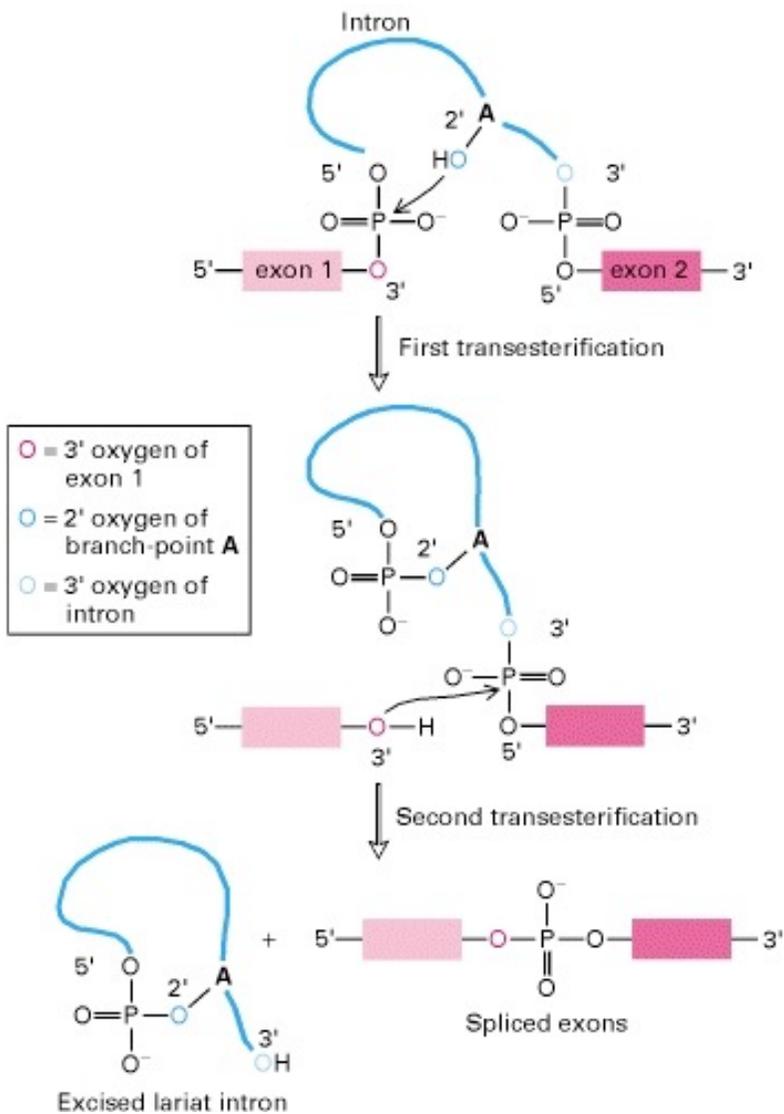


**Self splicing de RNAr em Tetrahymena- grupo I:  
RNAs catalíticos= ribozimas!**

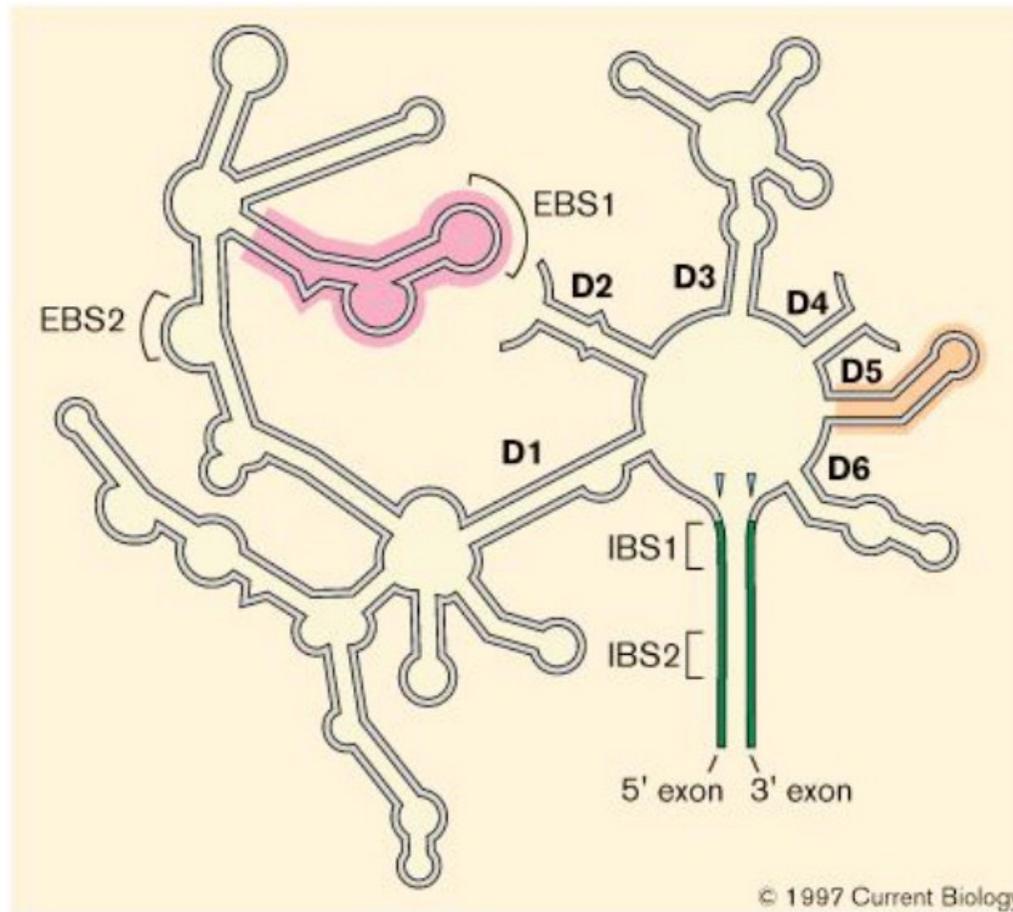
**Tom Cechi video**

<https://www.youtube.com/watch?v=WAChisSiW3o>

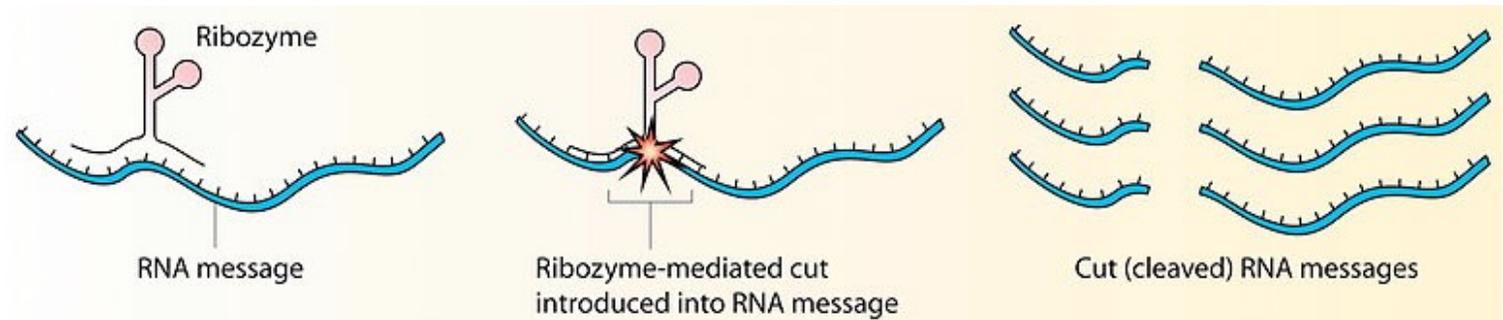
**Reações de trans-esterificações resultam na remoção de introns, Na região da Adenina (branch point)- Formação do *lariat*- laço!**

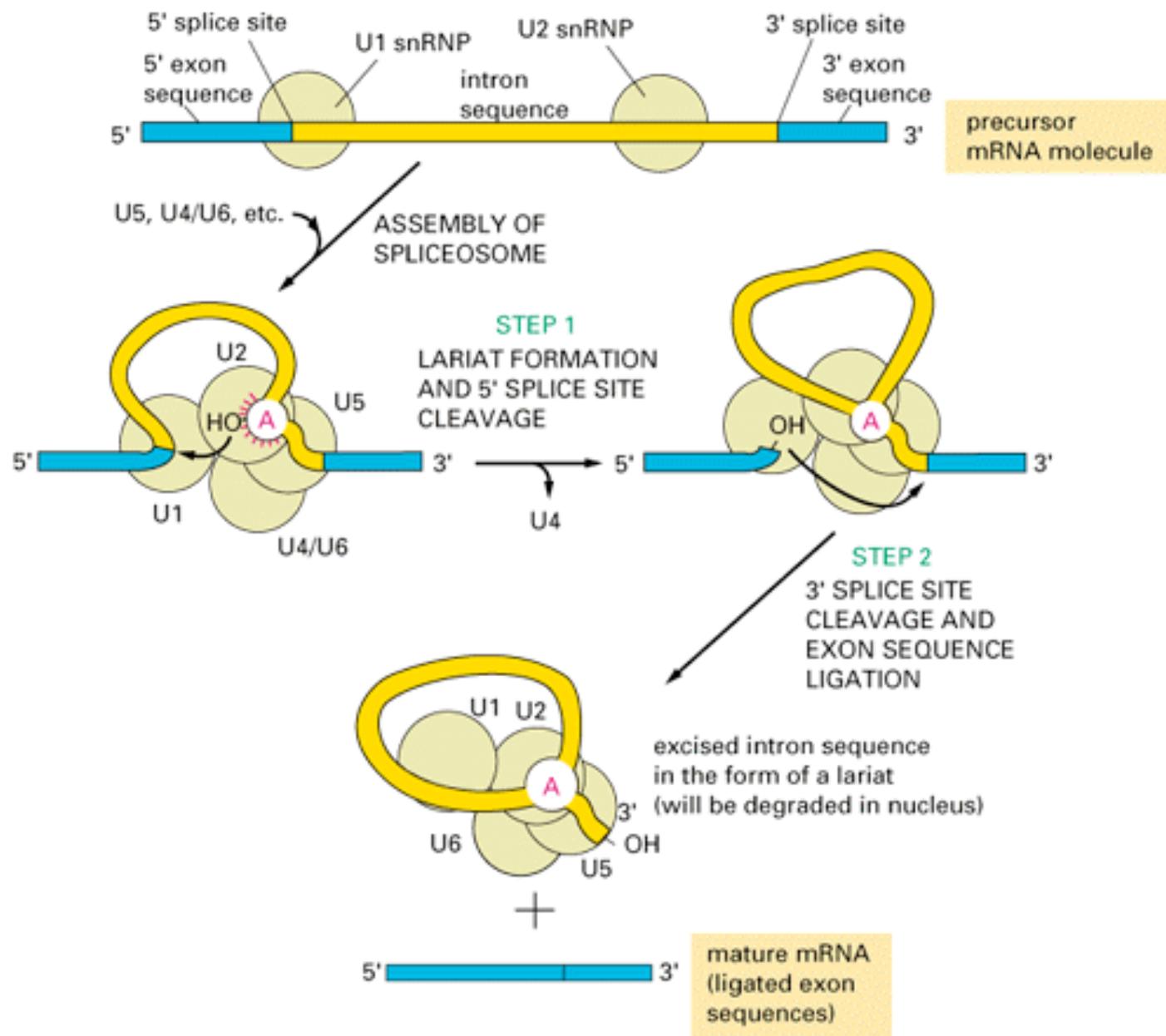


# Os introns (self) têm estrutura que aproximam os exons!



## Ribozimas!





**Mas em nosso núcleo o splicing ocorre através de spliceossomos!**

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

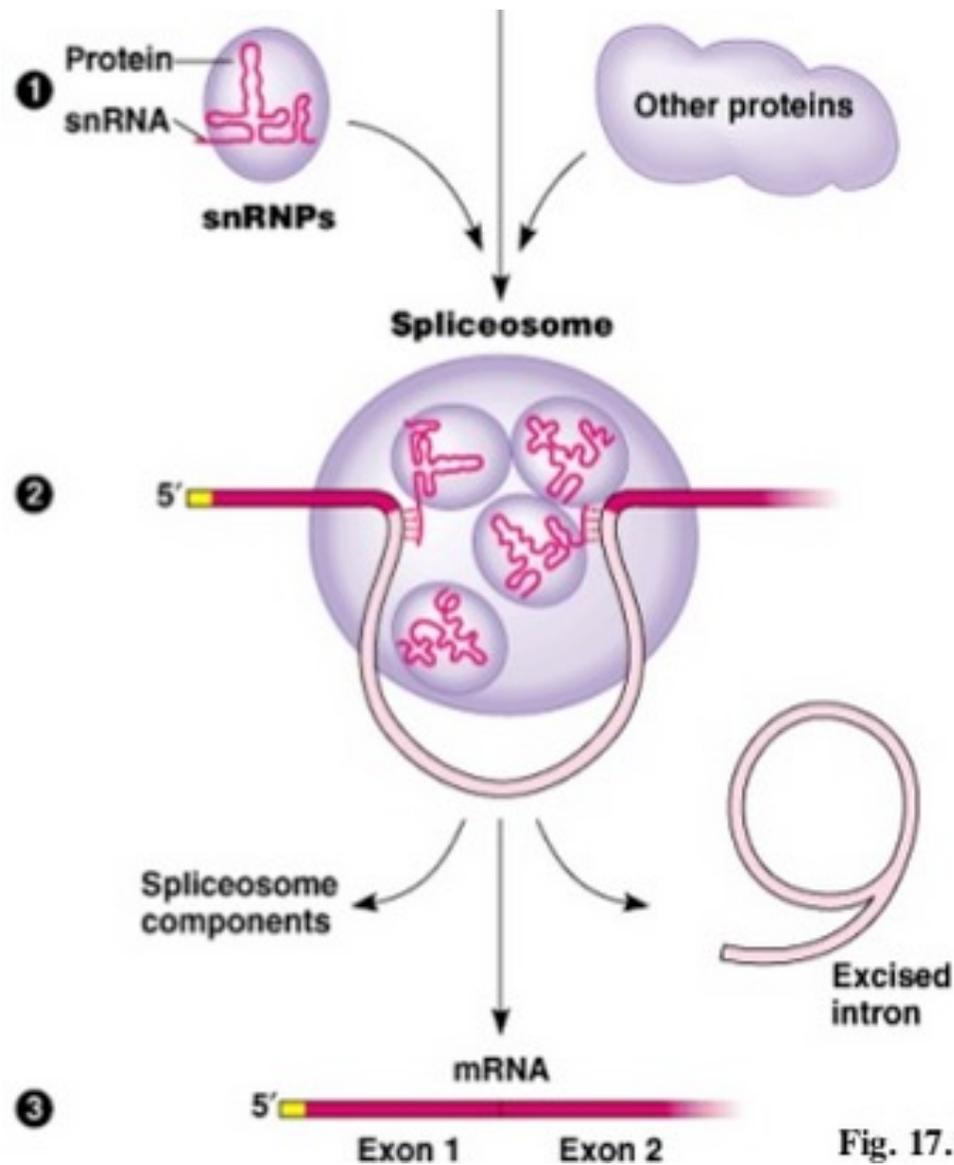


Fig. 17.10

**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?**

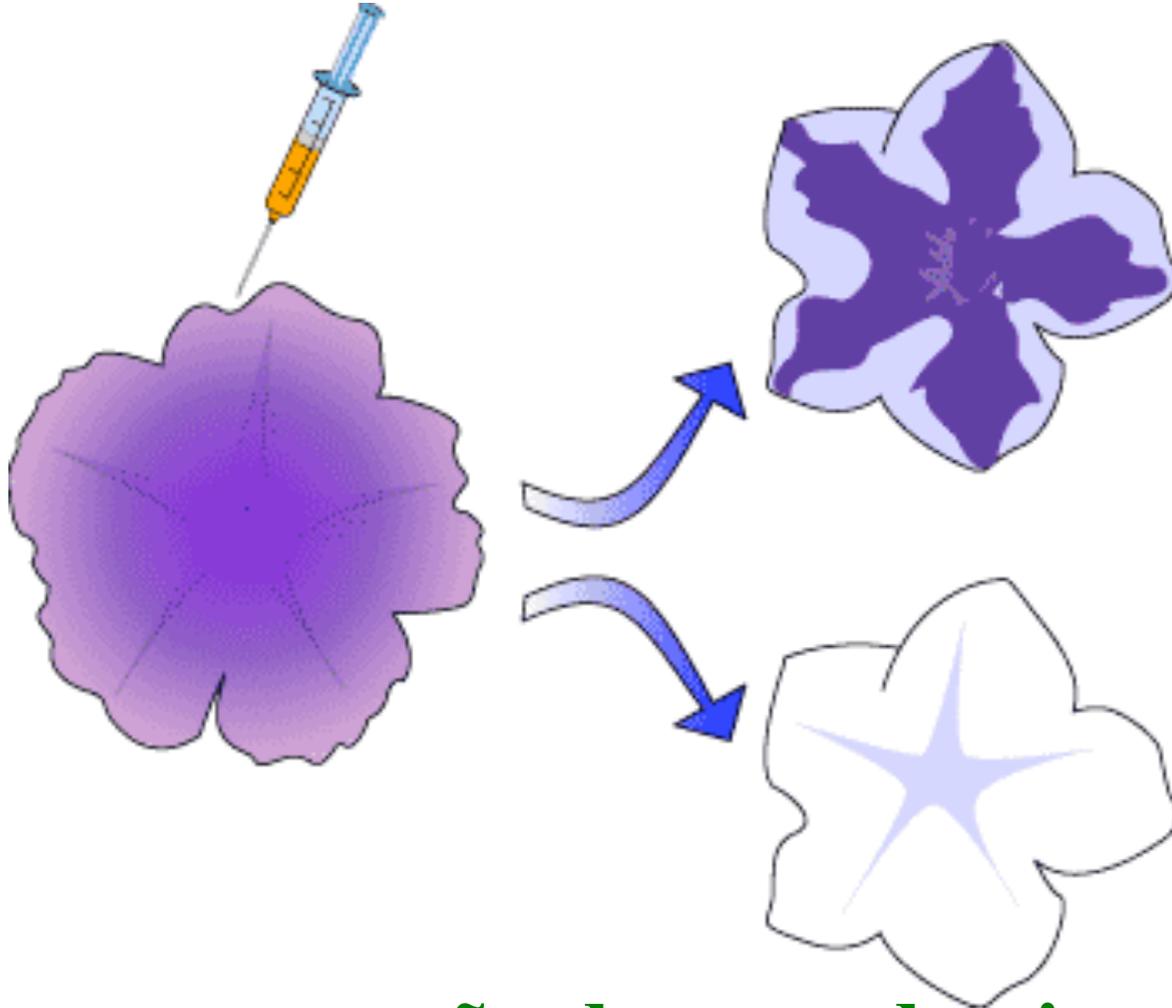
**Por que isso é chamado de catálise *trans*?**

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

Vídeo snRNPs:

[https://www.youtube.com/watch?v=Dp\\_b9elTxdc](https://www.youtube.com/watch?v=Dp_b9elTxdc)

# RNA interference: 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>



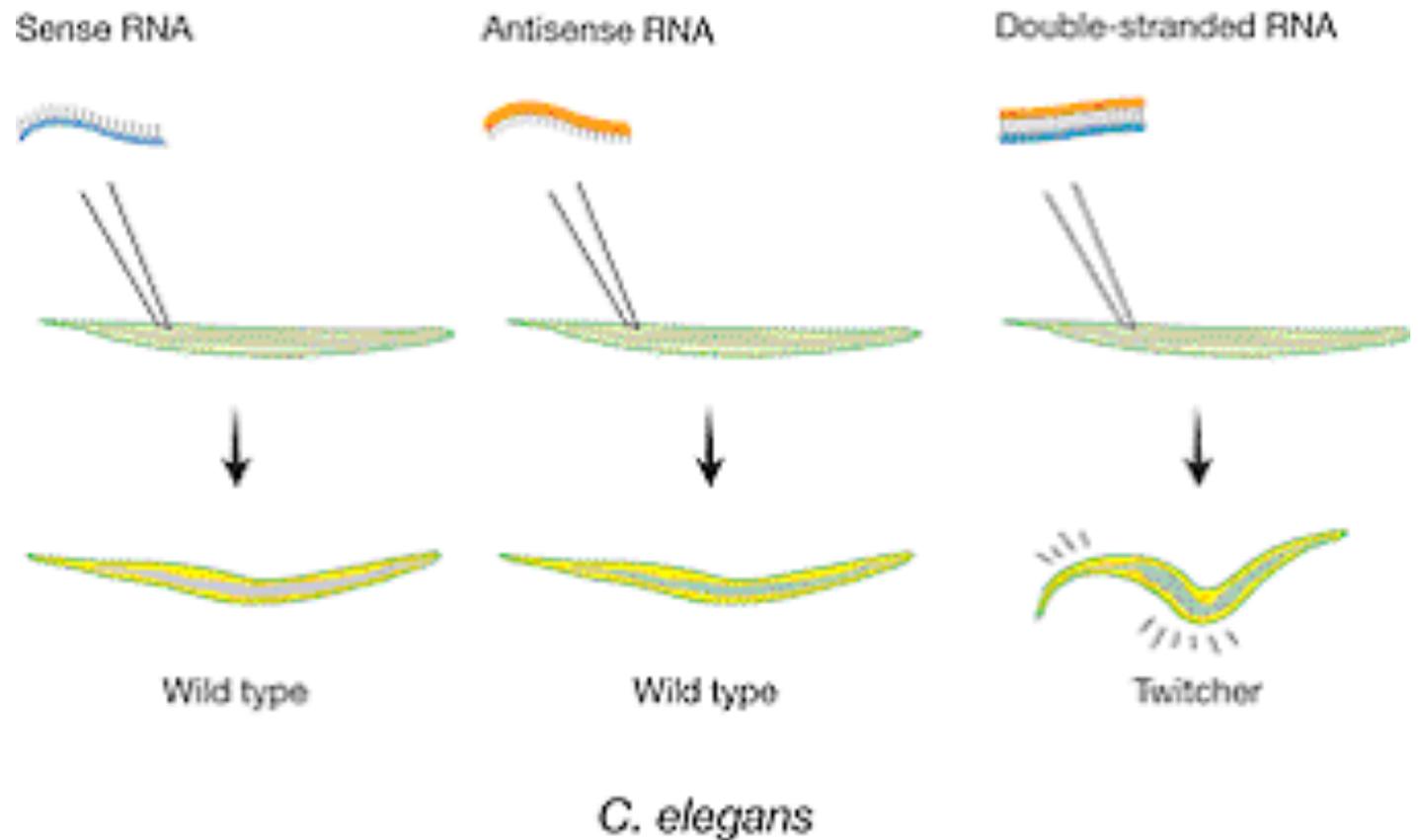
***Caenorhabditis elegans* modelo para desenvolvimento (longo):**

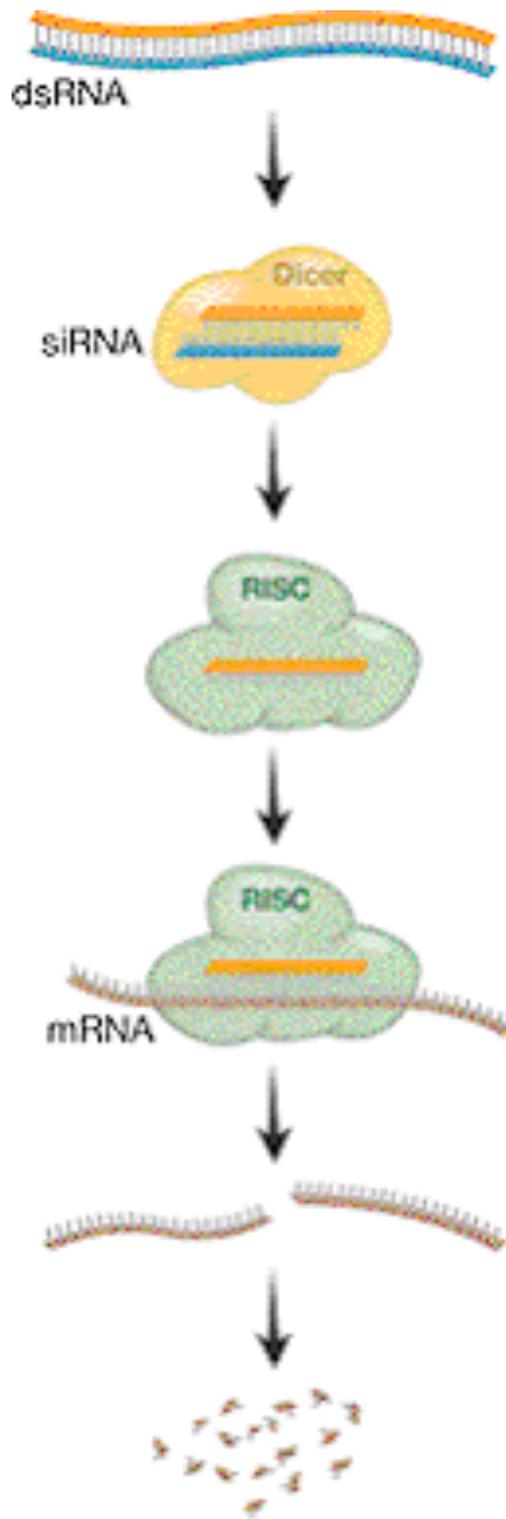
<https://www.youtube.com/watch?v=zc1P71GSzdU>

# RNA interference- O experimento (1998)

## Silenciamento gênica por RNA dupla-fita.

Craig Mello and Andrew  
Fire, Nobel- 2006

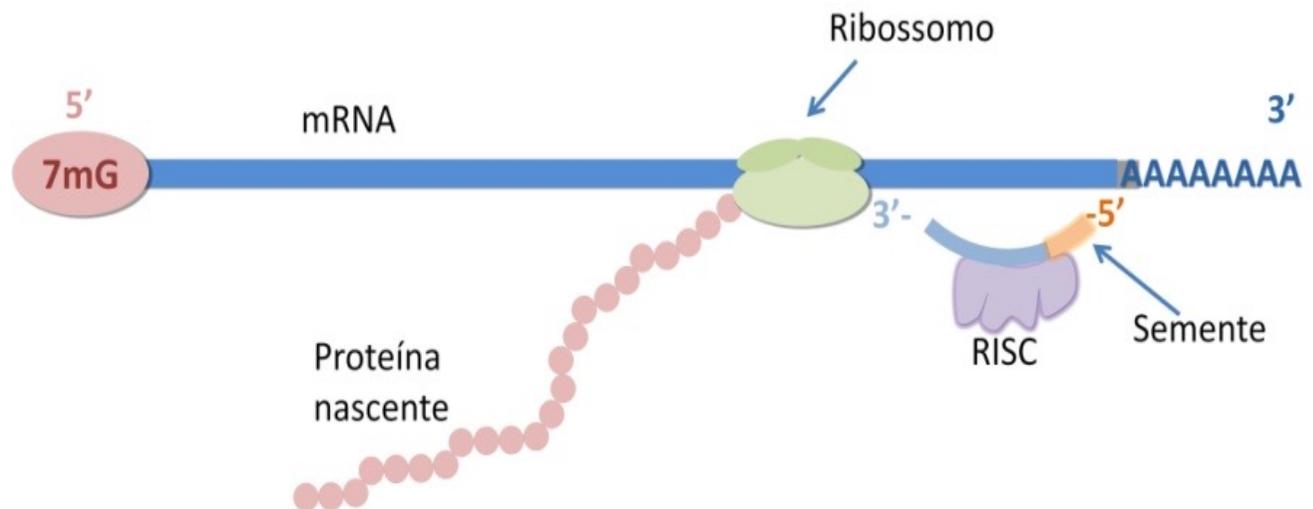


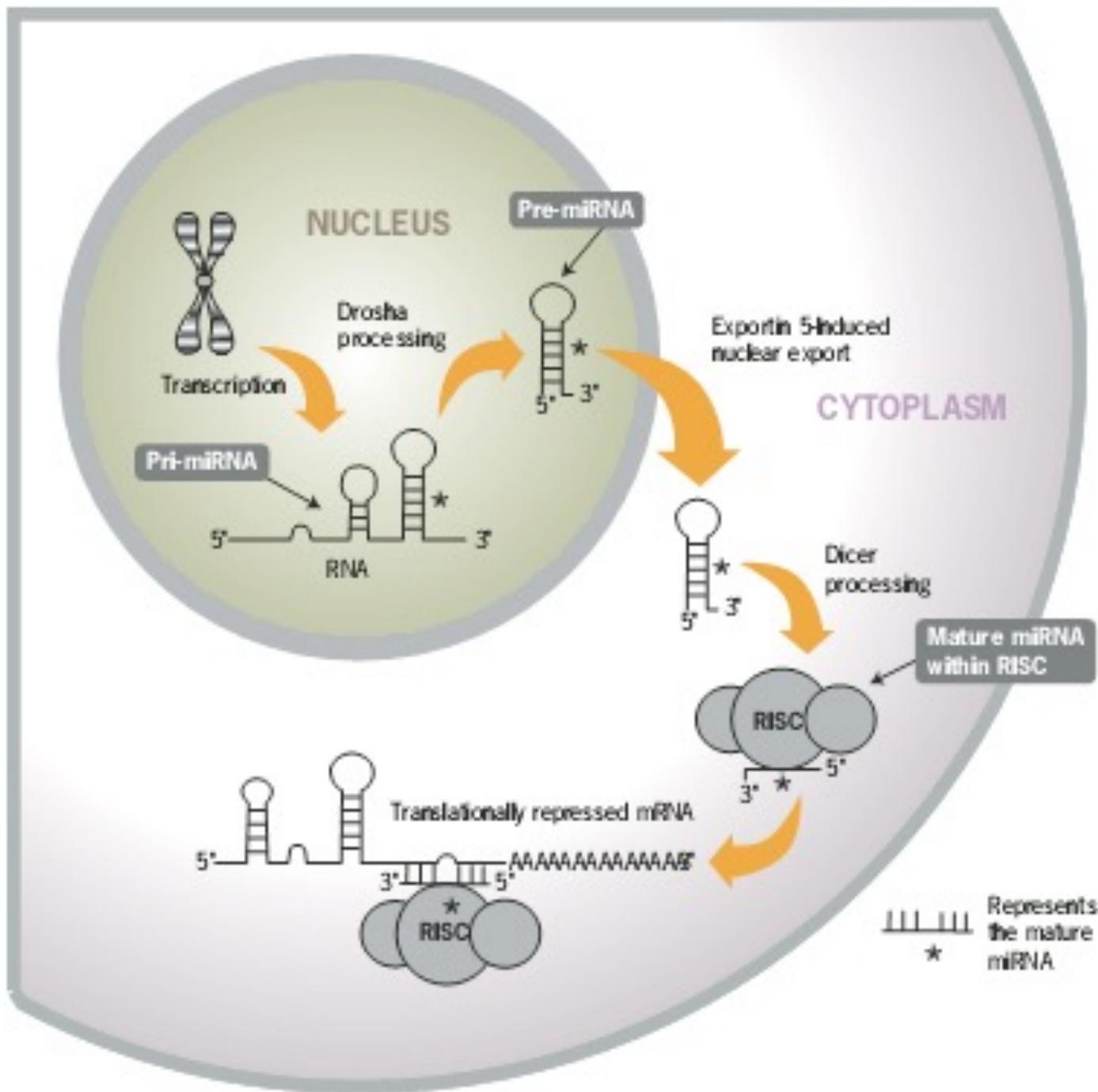


## RNA interference

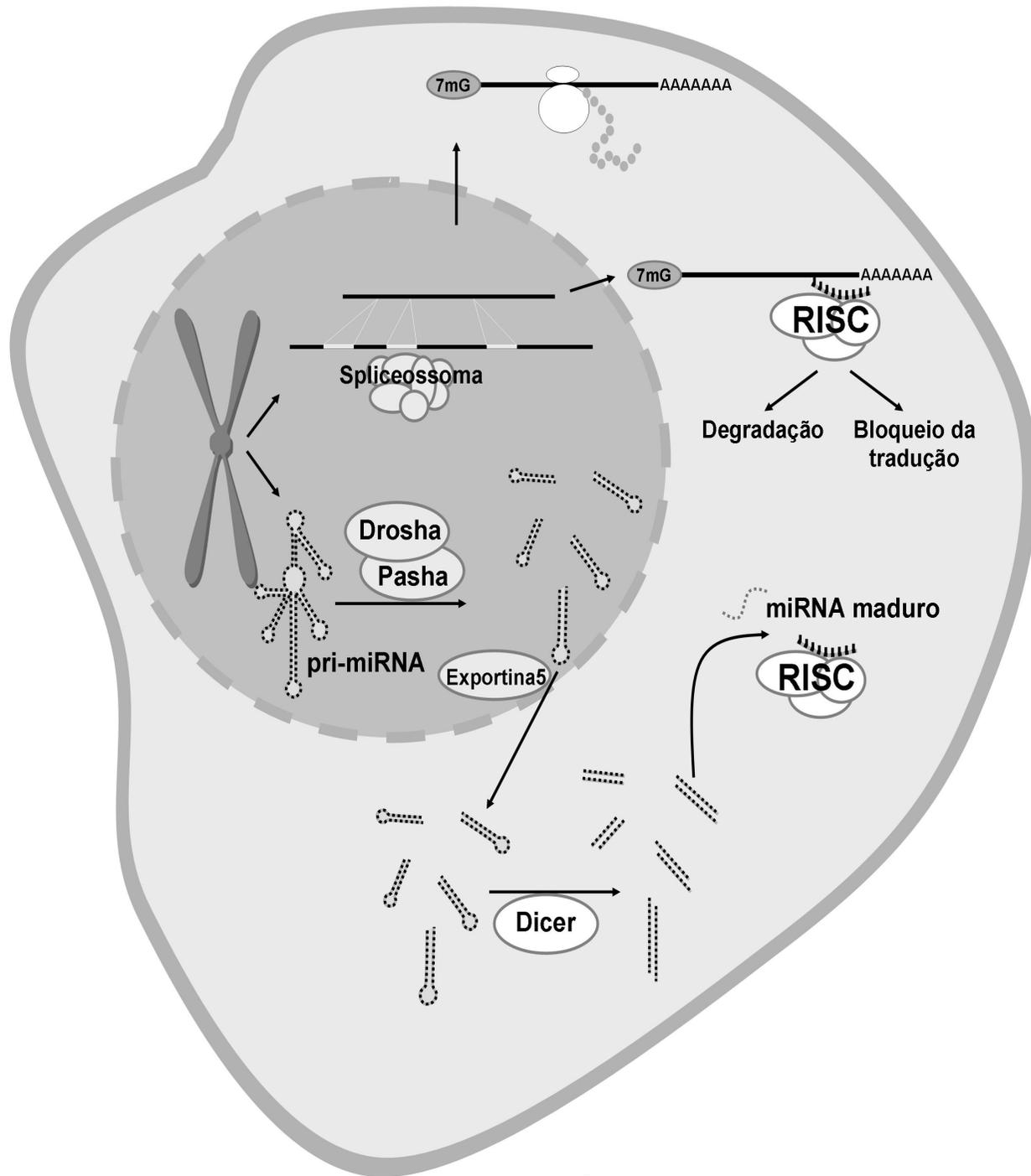
Silenciamento gênica por  
RNA dupla-fita- degradação do  
RNAm

Ou bloqueio de tradução



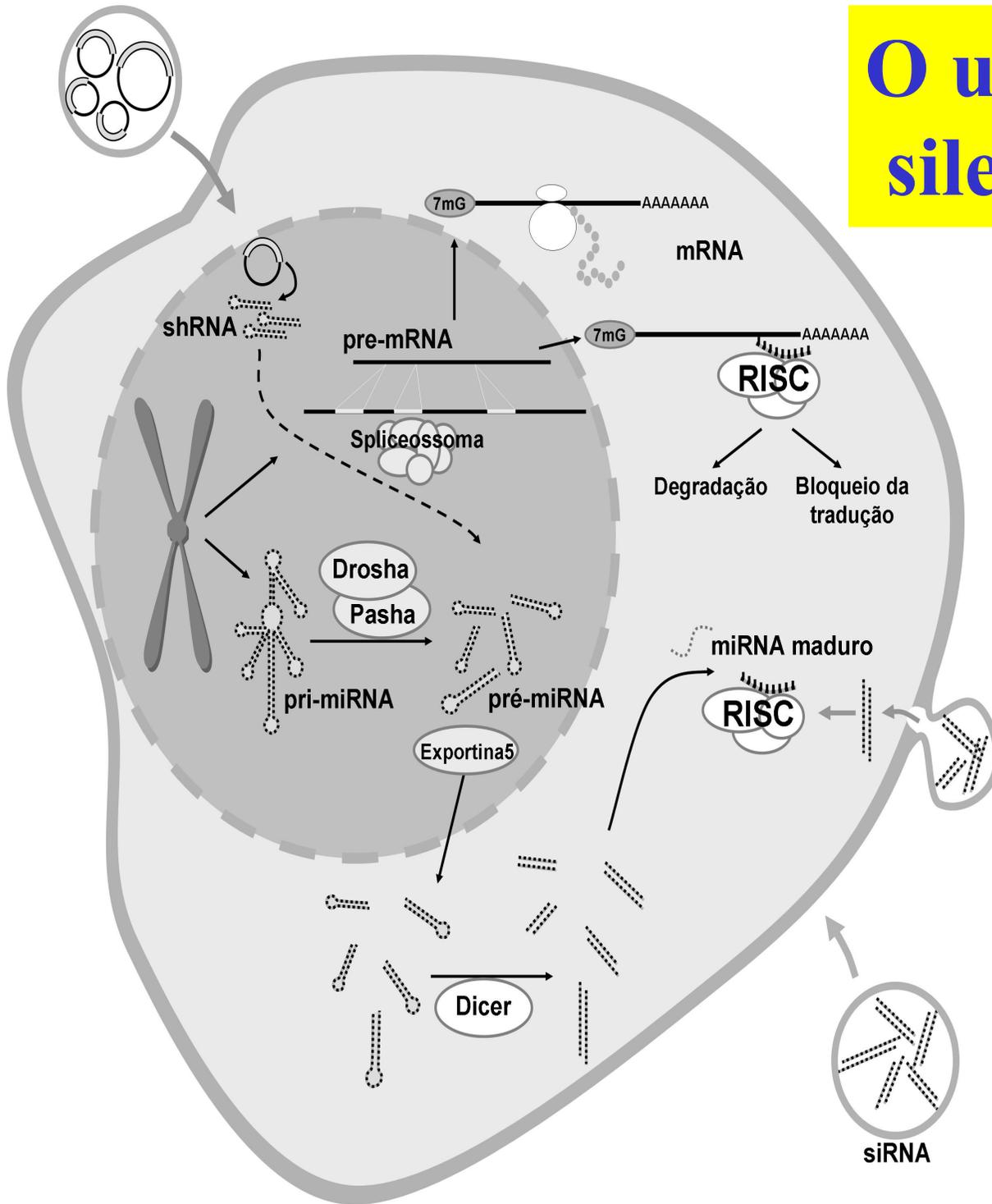


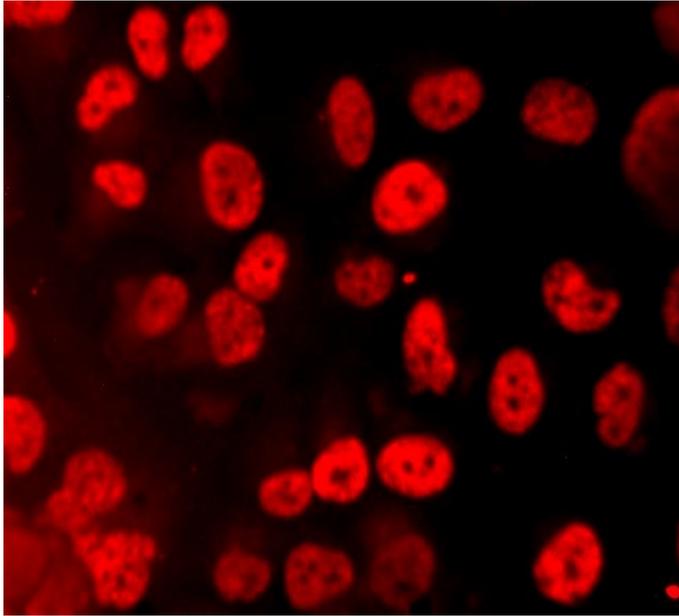
**microRNA é codificado pelos nossos cromossomos!**



**Células humanas também tem esse mecanismo**

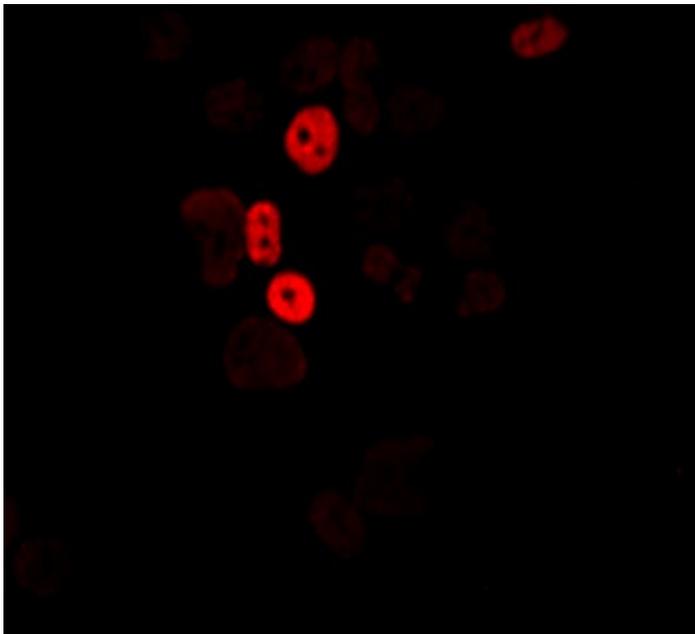
# O uso de RNAi no silenciamento gênico





**Si RNA –exemplo de inibição de proteína nuclear.**

**RNA controle**



**SiRNA silenciando esse gene.**

**RNA interference Nature video and neuronaute:**

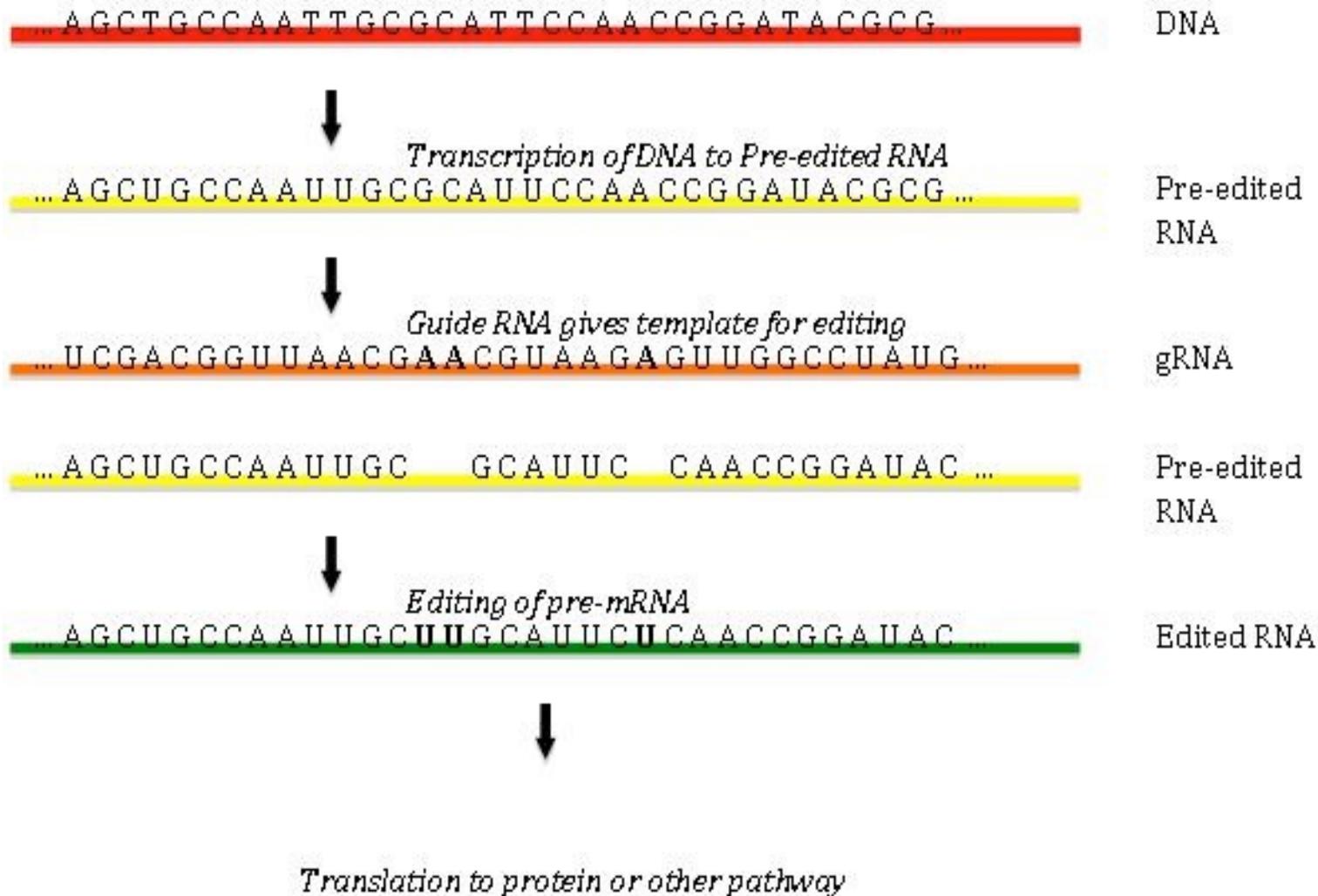
[https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1\\_ELE](https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE)

**RNA interference para leigos:**

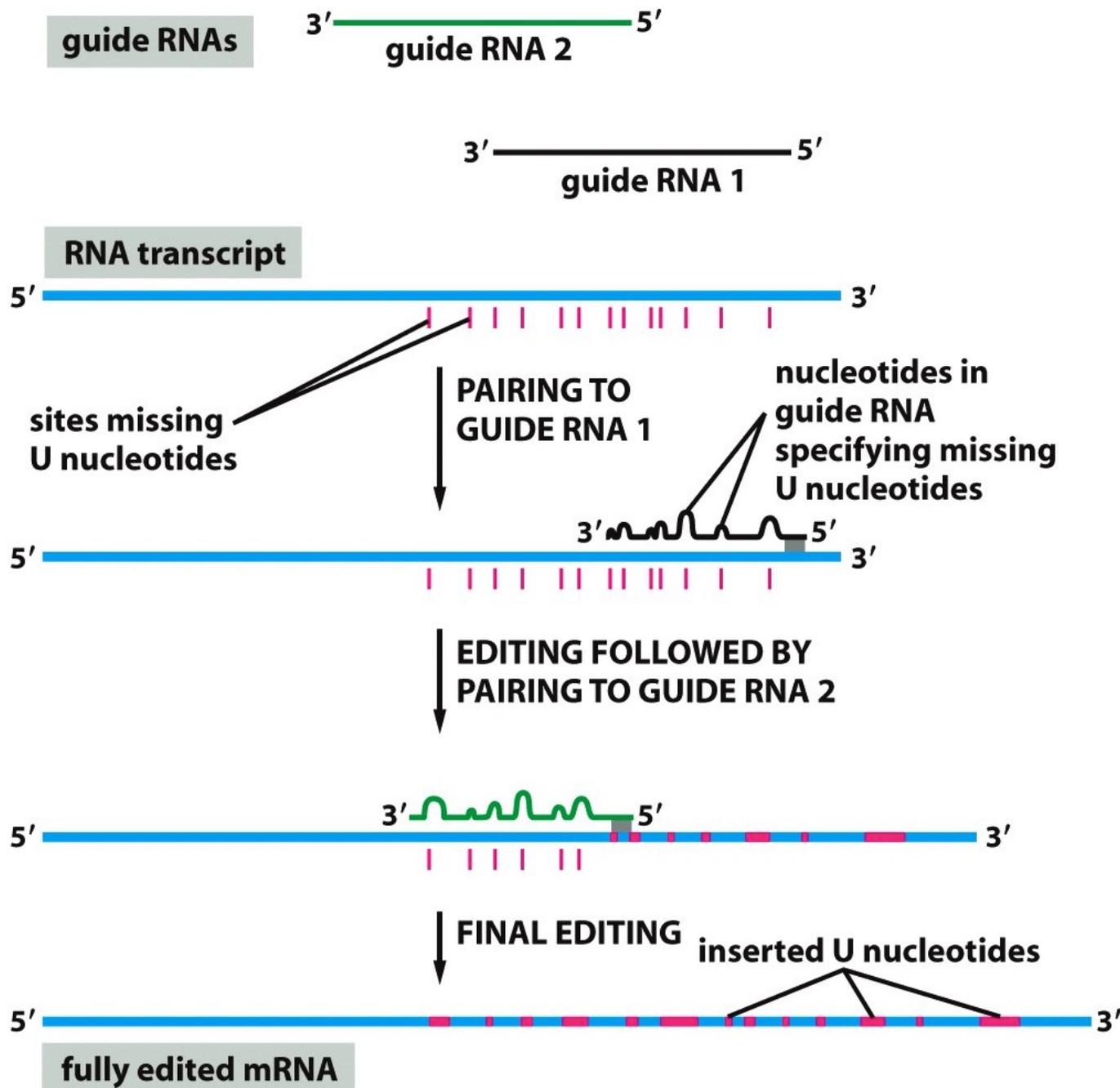
<http://ed.ted.com/lessons/rnai-slicing-dicing-and-serving-your-cells-alex-dainis>

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

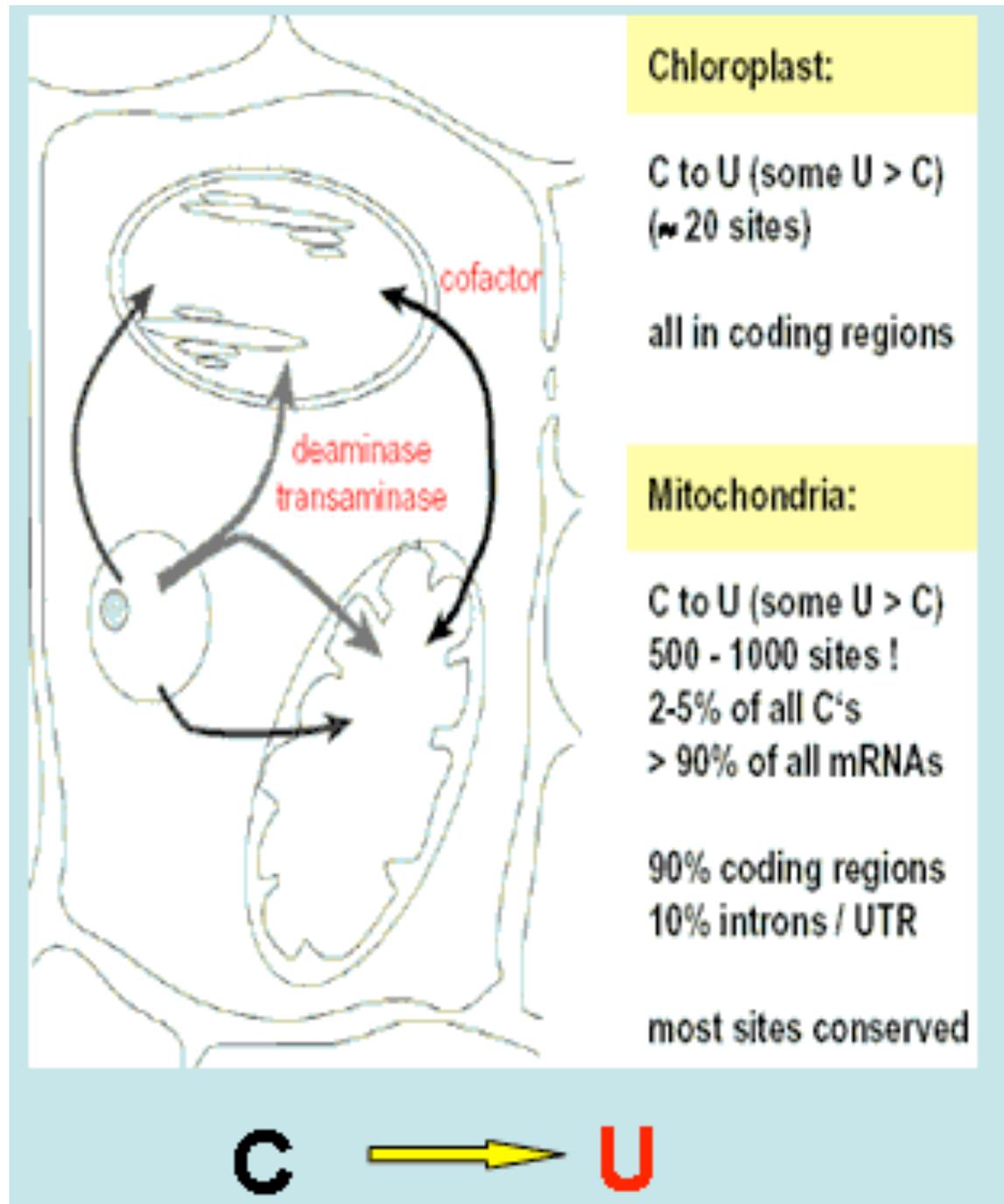
Addition of Uracil to RNA



# Os RNAs podem ser editados: mitocôndria de tripanossoma!

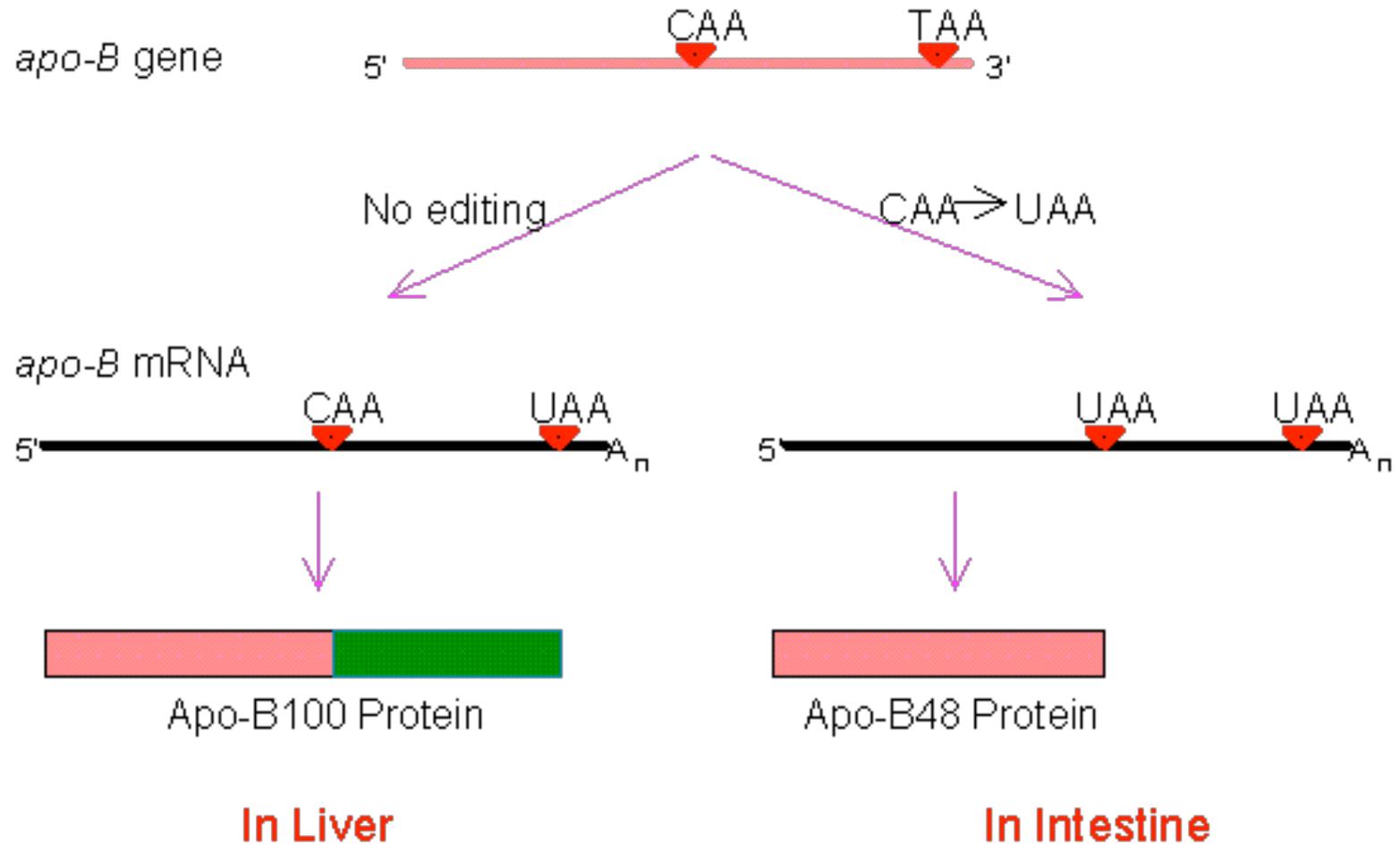


# Os RNAs podem ser editados: organelas de plantas!



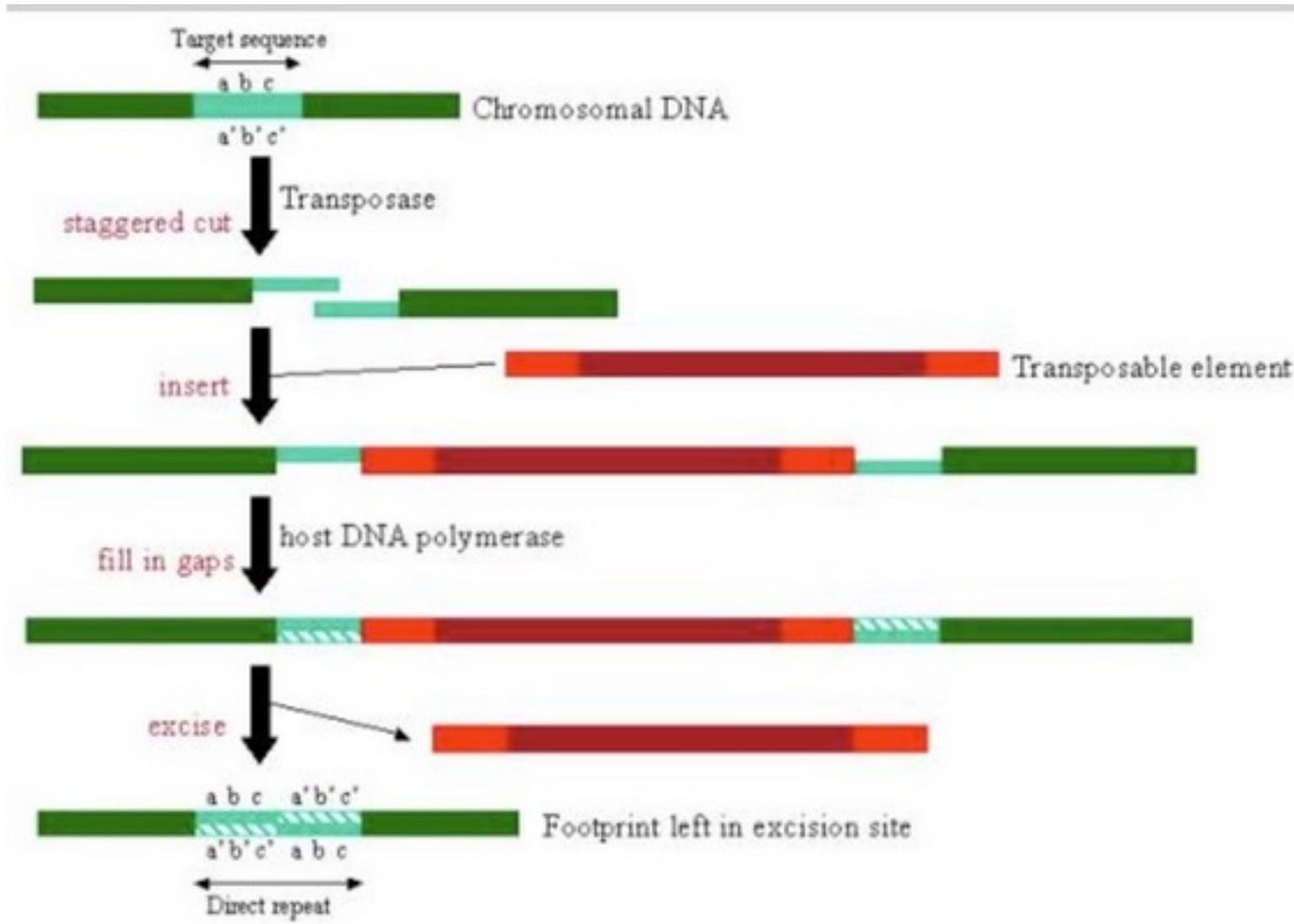
# RNA editing em humanos!

## Expressão diferente dependendo do tecido



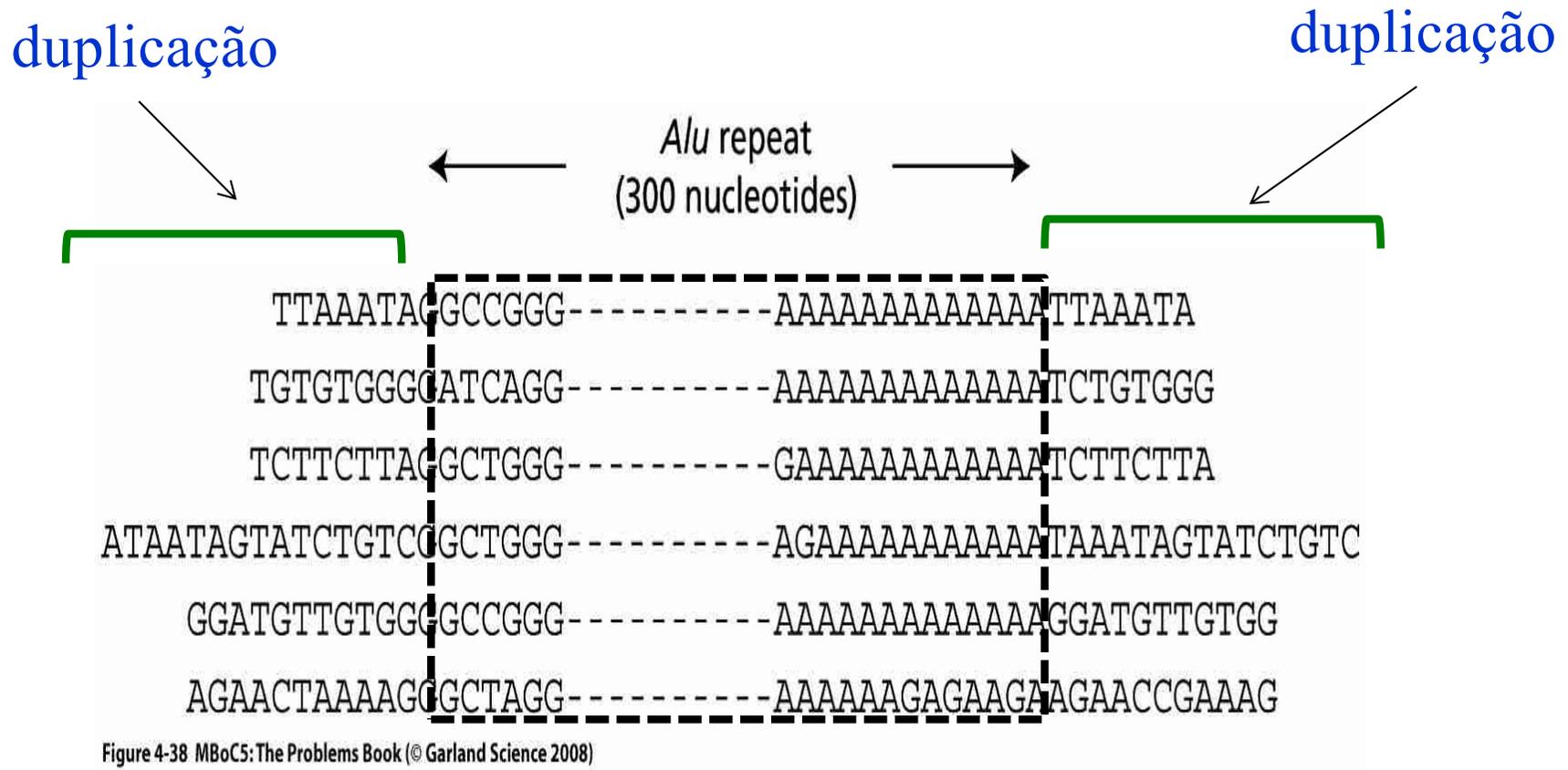


# Para os exercícios: o transposon provoca duplicação

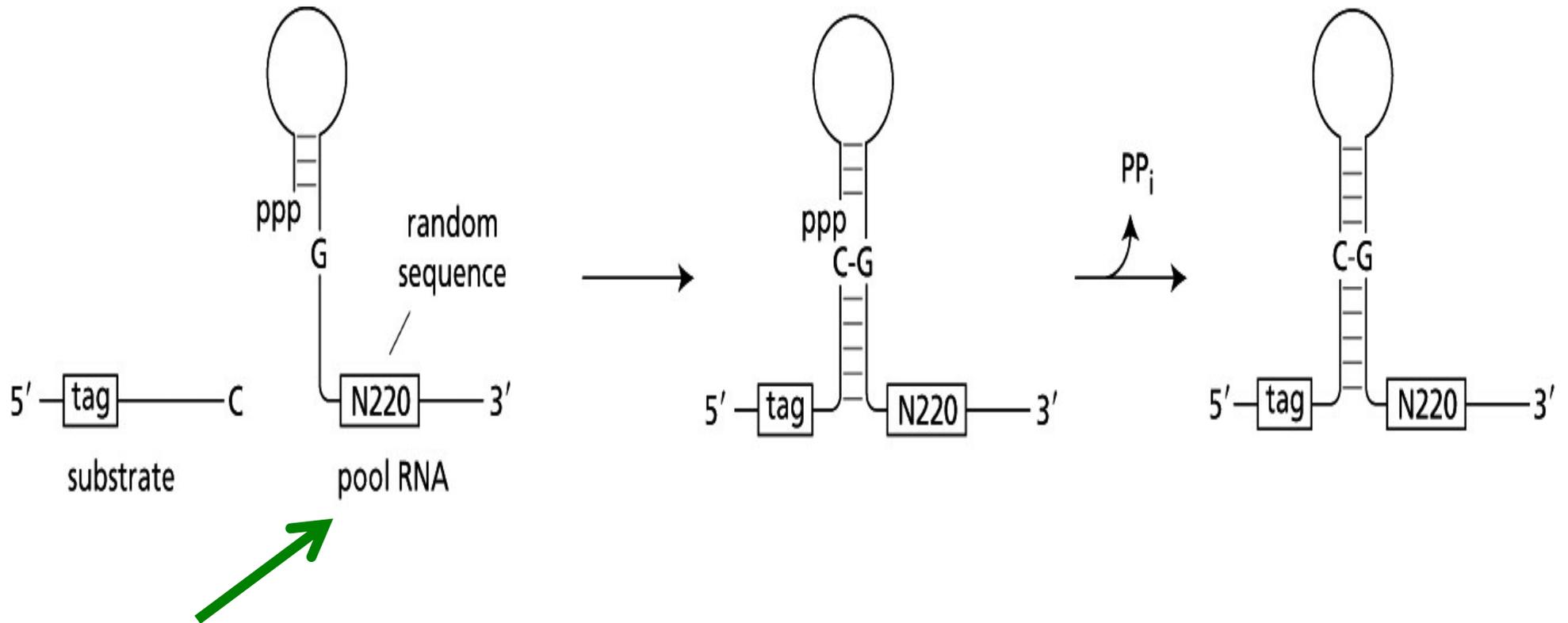


## Exercício 2: o transposon provoca duplicação

Contar as diferenças entre as duplicações!



## Exercício 3: como realizar uma seleção de uma molécula De RNA que faz atividade ligase!



Sequência de 220 nucleotídeos aleatórios!

Mas como selecionar as que fazem essa atividade?