

Biologia Molecular e Celular- 2024-1

Docentes: BM: Menck, Enrique Boccardo

BC: Nathalie Cella, Patrícia Coltri

Suporte: Veridiana Munford,

Karen Cristina Dalaqua da Silva, Raiane Silva de Moraes

Bibliografia:

Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas
(Organizado por Menck e Sluys), GRUPOGEN, 2017.

Biologia Celular e Molecular (10ª edição). Junqueira e Carneiro,
(organizado por CY Yan e N Cella), GEN, 2023.

Molecular Biology of The Cell (6th Edition) by Alberts et al Garland Science, 2014.

Molecular Cell Biology (7th Edition) , by Lodish et al, WH Freeman and Company, 2013.

Molecular Biology of the Gene (7th edition) By Watson et al, Pearson and Cold Spring Harbor Press, 2014.

Anatomia do Genoma Eucarionte!

Para esta aula, ler o Capítulo 06 do livro

Molecular Cell Biology, Lodish et al, 7a edição.

**E livro de Genética Molecular Básica,
Capítulos 09, 12 e 17**

Qual a relação do tamanho do genoma e a complexidade do organismo?

Como é nosso genoma? Qual o tamanho do genoma humano? Quanto dele codifica para RNA e para proteína?

Quem teria um genoma maior? O ser humano? O arroz? Uma bactéria? Ou uma ameba?

Qual a definição do gene? Um gene – uma proteína???

RNA não codificante

Qual o tamanho médio de um gene?

Pseudogenes/ genes egoístas!

O paradoxo do tamanho dos genomas!

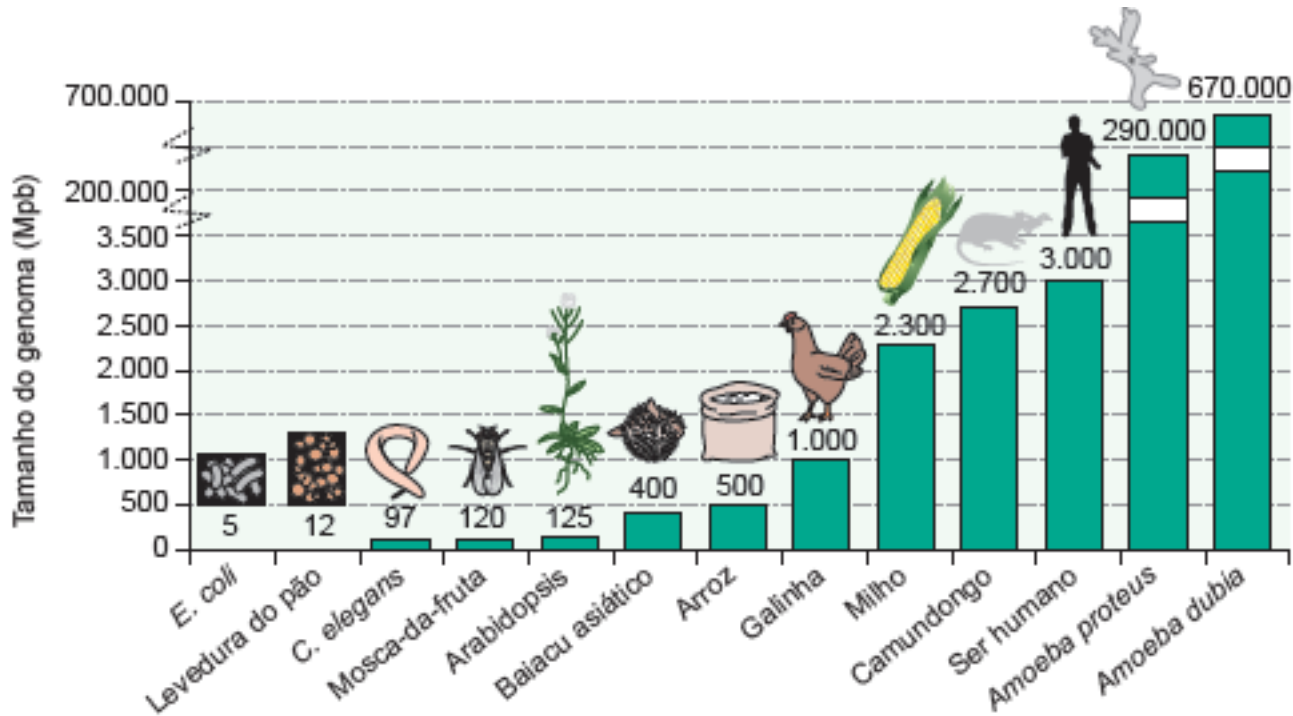


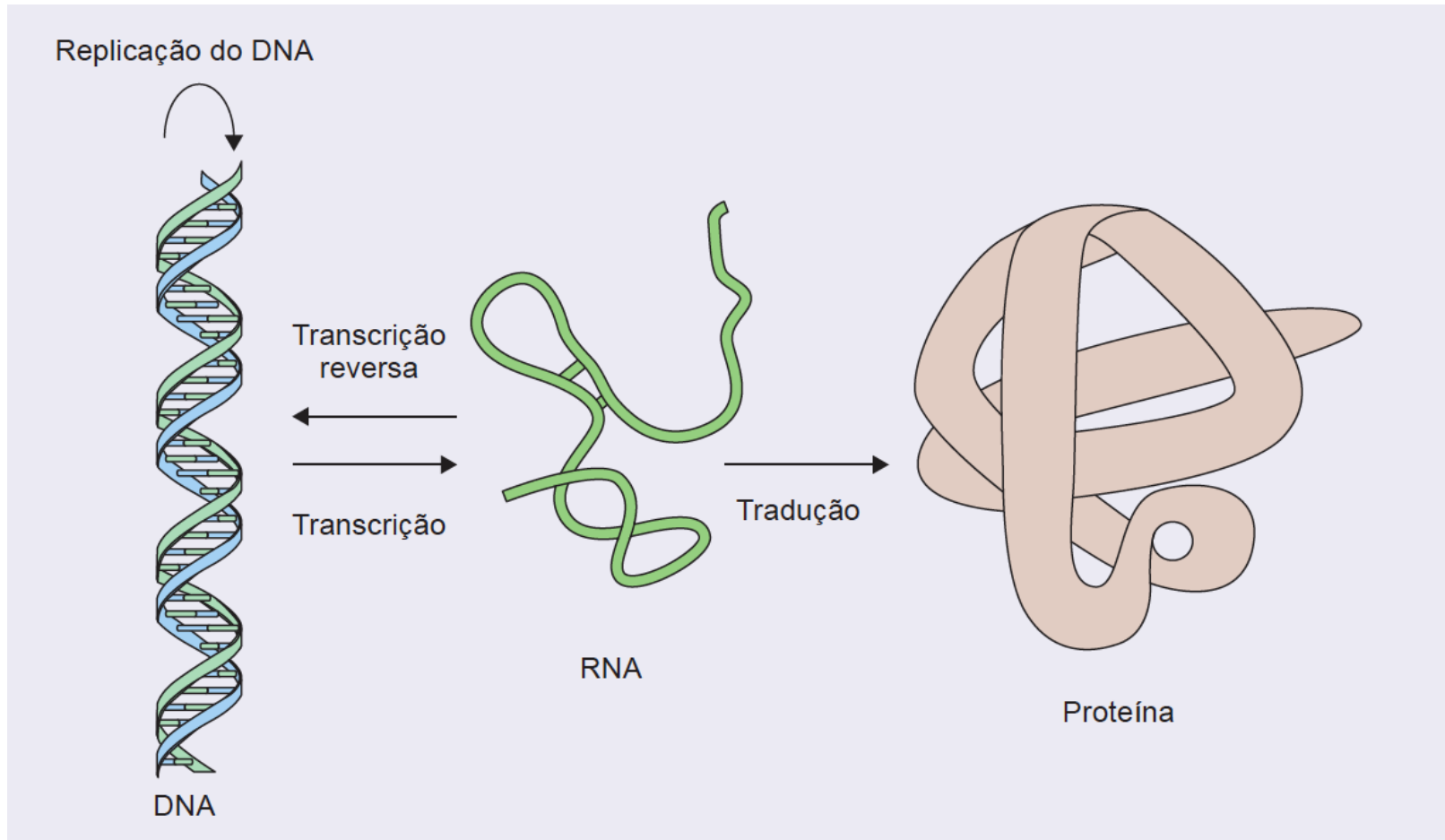
Figura 12.7 Comparação entre o tamanho dos genomas de algumas espécies.

Os organismos mais complexos não deveriam ter genomas maiores?

Quem é mais complexo: o ser humano ou as plantas? Ou anfíbios?
Ou amebas?

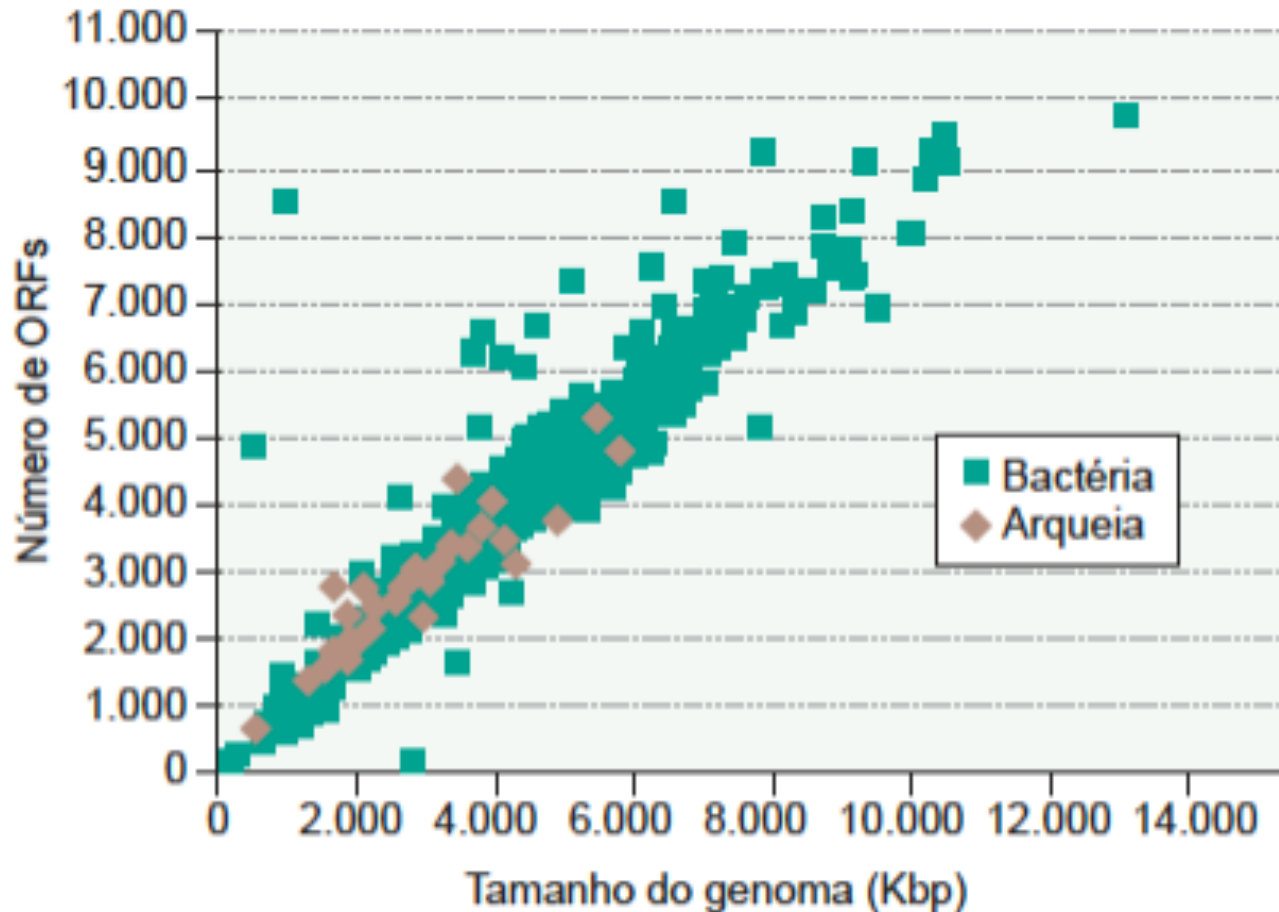
Figura GMB: dos genes aos genomas

Mas afinal o que é de fato um gene? Um gene -> uma proteína? DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA



Qual o tamanho de um gene?

Em procariontes, o número de genes correlaciona com o tamanho do genoma!

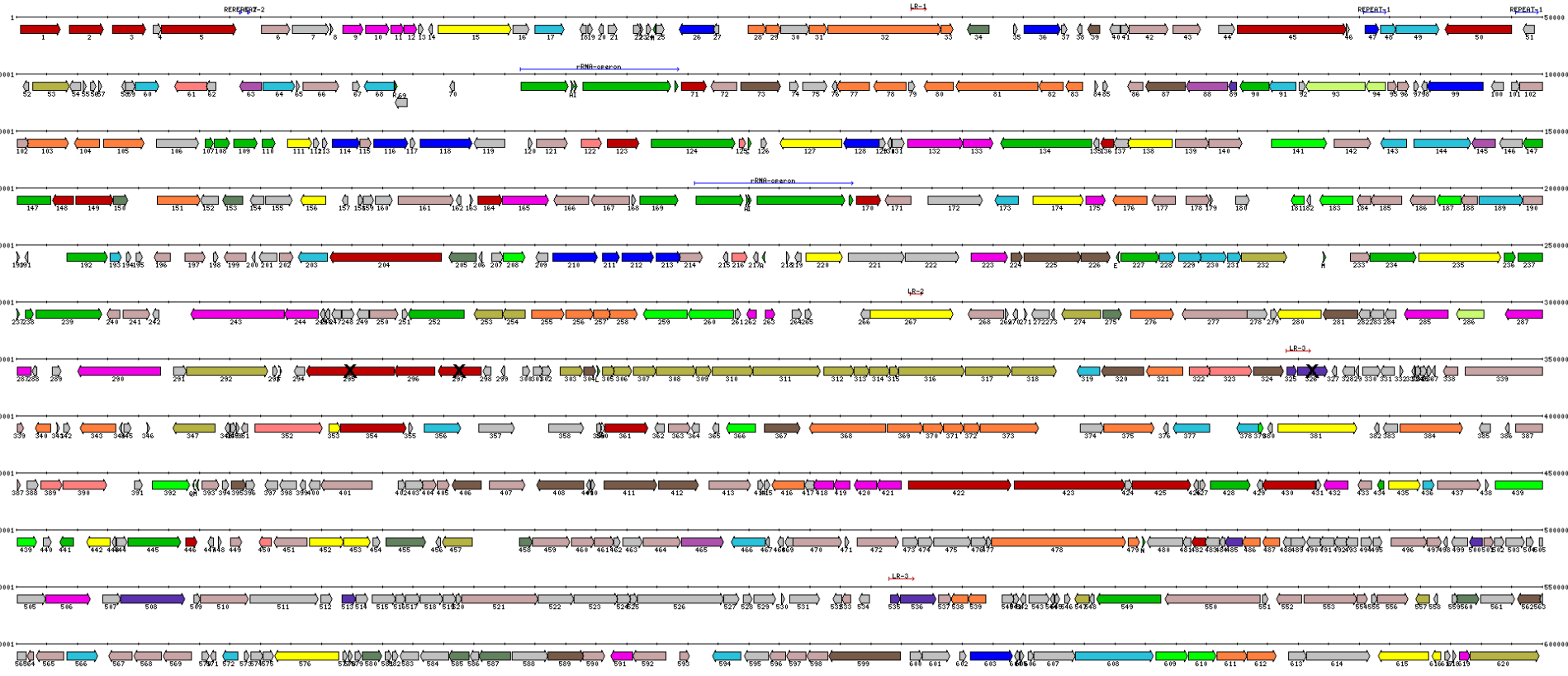


Essa correlação indica que cada gene tem ~ 1000 pares de bases!

Figura GMB: dos genes aos genomas

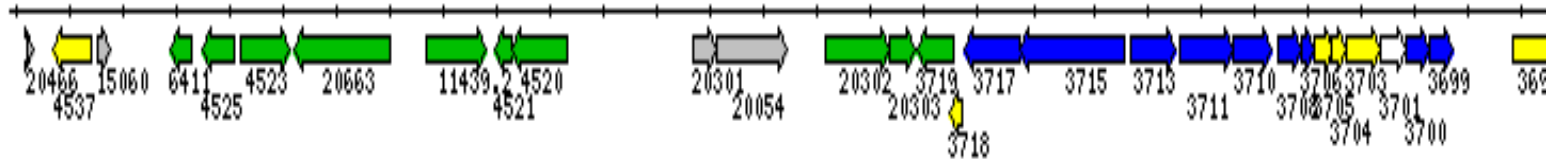
Esse é o mapa de um genoma de procarionte!

Main Chromosome Gene Map



genoma de procarionte!

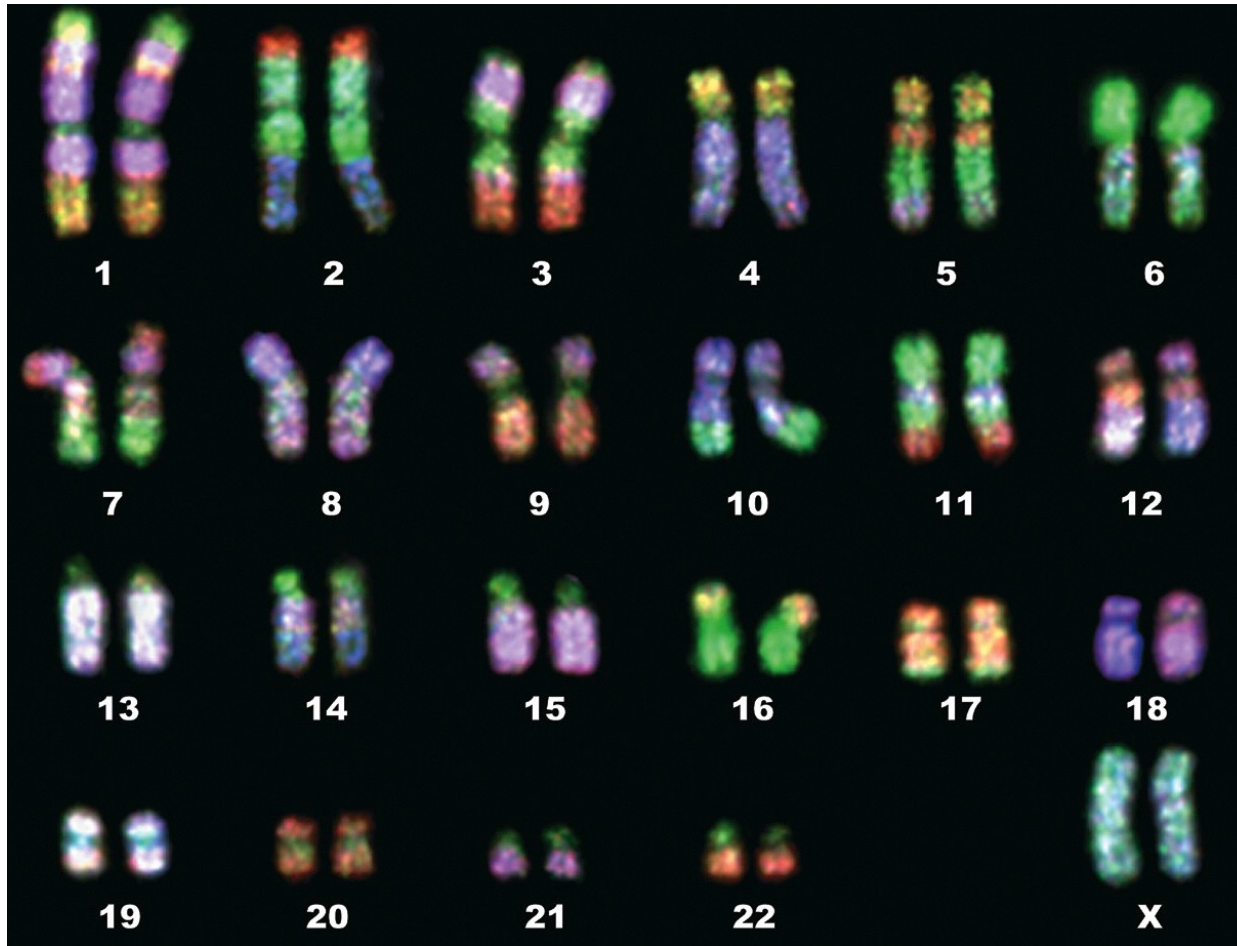
Há muito espaço entre os genes?



Definir monocistrônico e policistrônico!

- **O que é um operon? O que é sequência Shine Dalgarno?**

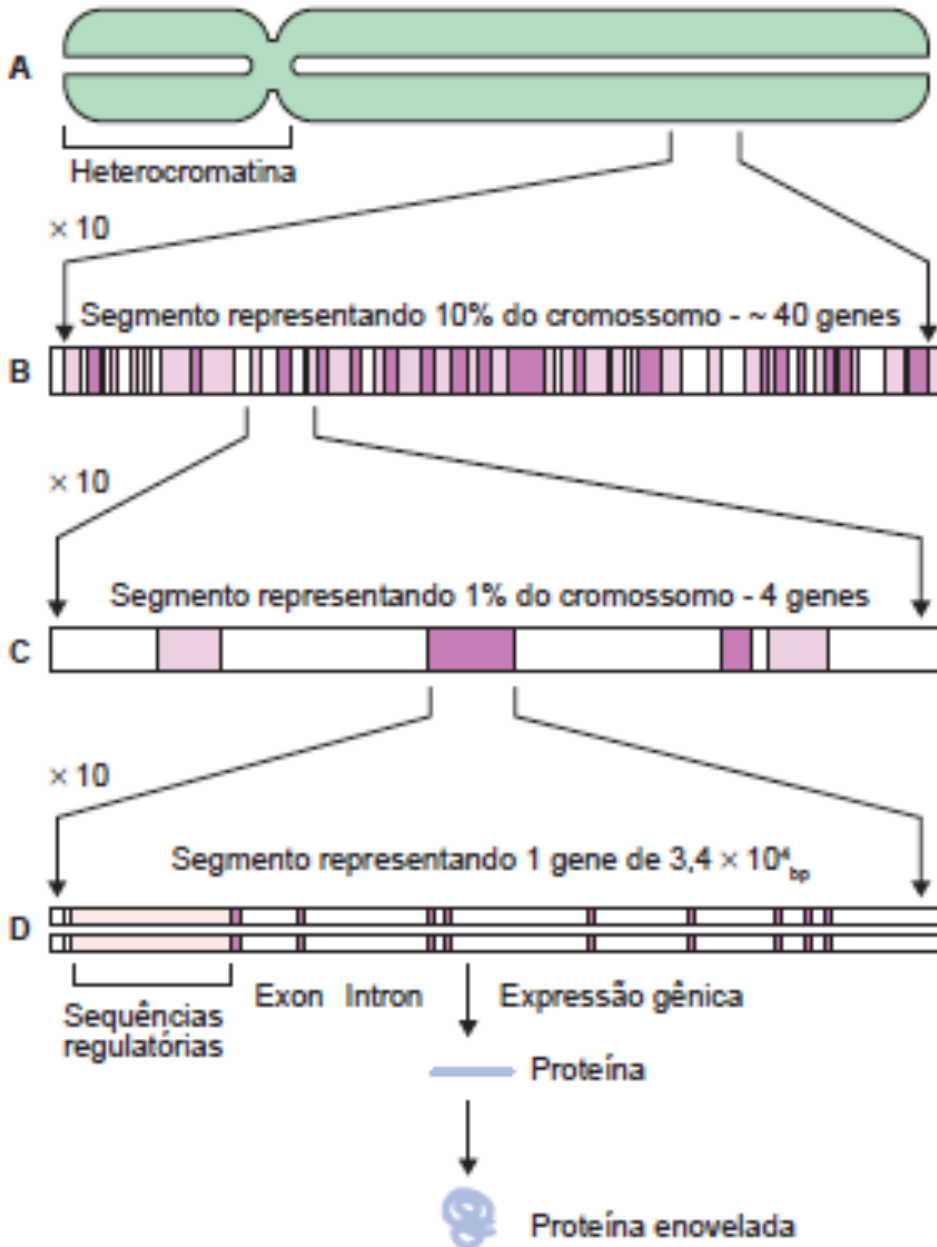
Esse é o cariótipo Humano. Como estão os genes nesse cariótipo?



No cariótipo humano, qual a razão da numeração dos cromossomos?

Se você tivesse que começar a sequenciar, qual cromossomo sequenciaria?

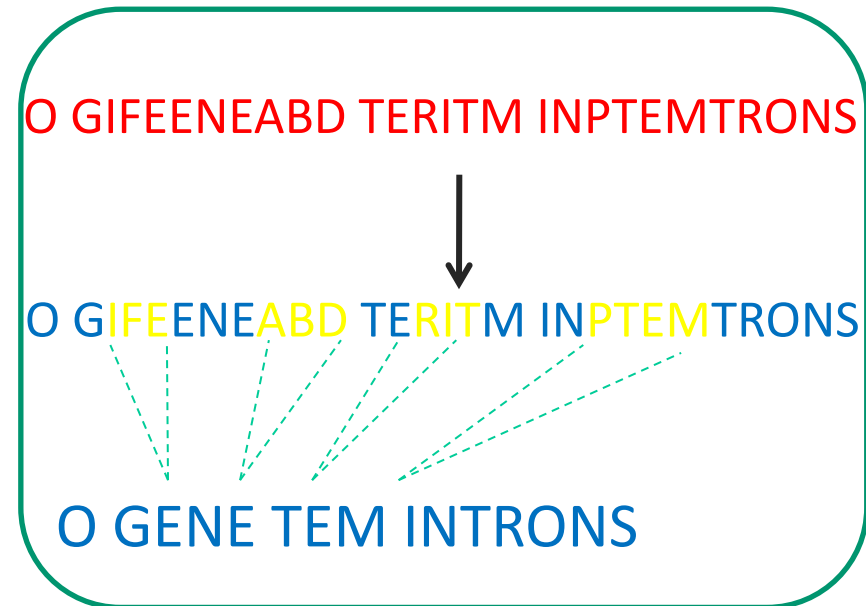
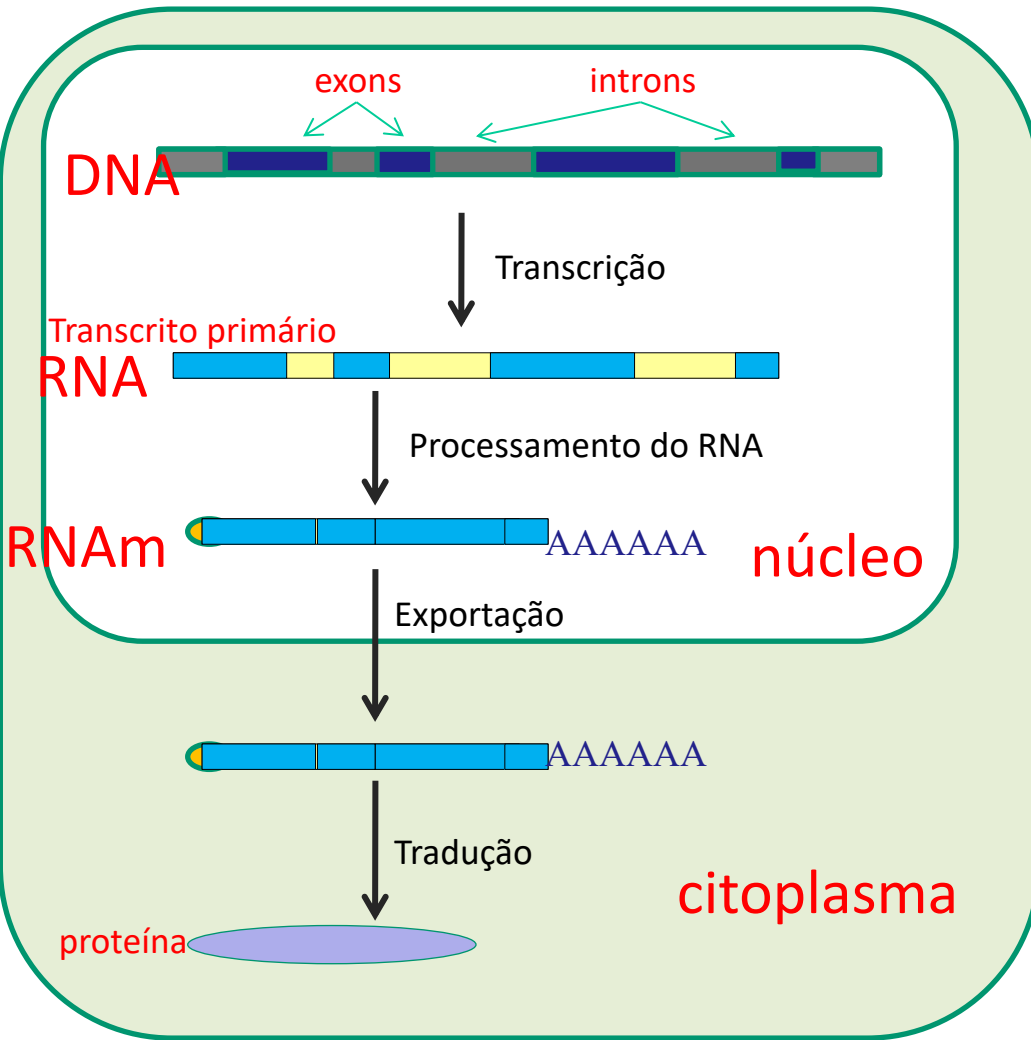
Cromossomo 22 humano na sua conformação mitótica composto por duas moléculas de DNA, cada uma com 48×10^8 pares de nucleotídeos



Como estão os genes no cromossomo 22 humano? (Primeiro cromossomo totalmente sequenciado)

Figura GMB:
dos genes aos genomas

Em eucariontes nosso RNA sofre processamento (splicing) E incorporação de 5'CAP e poli-adenilação



Em um mRNA o que são as regiões 5'UTR e 3'UTR?

Descoberta dos Introns

RNA Heterogêneo (1973) pelo Francês Klaus Scherrer

- RNA nuclear é maior que o do Citoplasma – já falava em processamento Para fazer o mRNA!

- E de tamanho heterogêneo

- (o RNA é processado – splicing- no Núcleo)

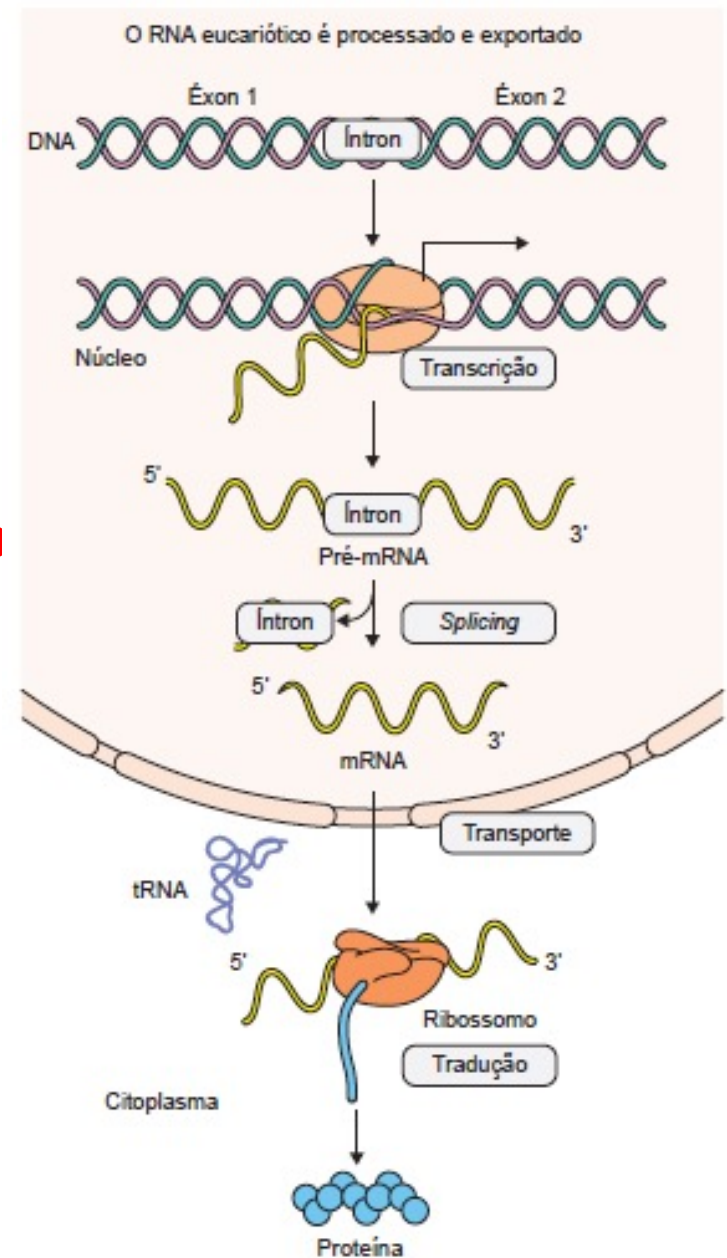


Figura 9.3 Genes codificadores de proteínas. Processo de transcrição ocorre no núcleo da célula. O RNA produzido sofre também no núcleo o processo de *splicing* com a excisão dos introns. O RNA mensageiro é exportado ao citoplasma, onde ocorre a tradução das proteínas.

Figura GMB: dos genes aos genomas

Premio Nobel de 1993 Fisiologia ou Medicina

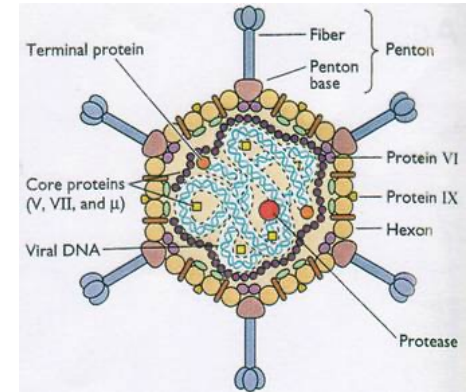
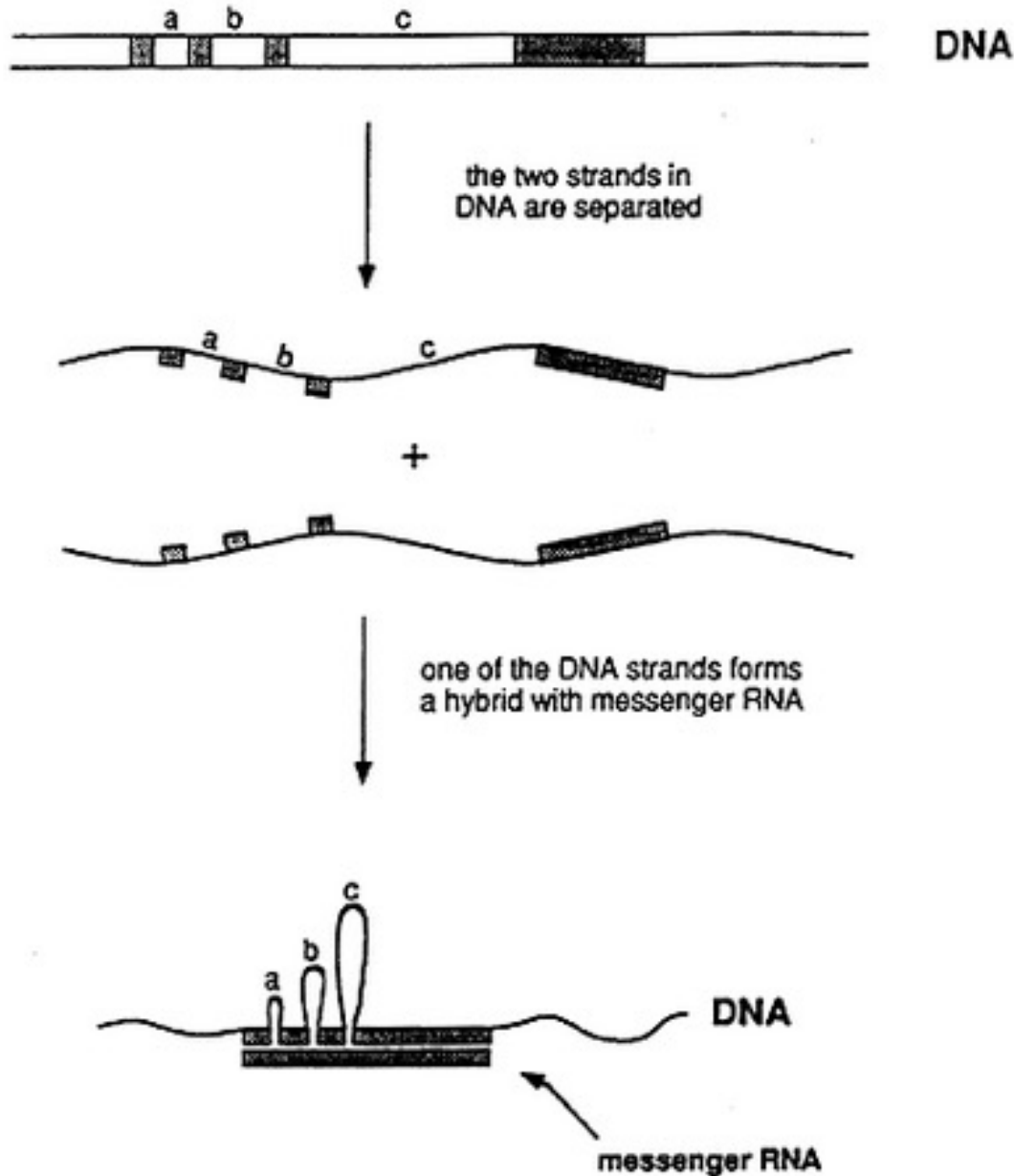
Richard J. Roberts and Philip A Sharp:

The Nobel Assembly at the Karolinska Institute in Stockholm, Sweden, has awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1993 jointly to Richard J. Roberts and Phillip A. Sharp for their discovery of split genes.



DESCOBERTA DOS INTRONS:

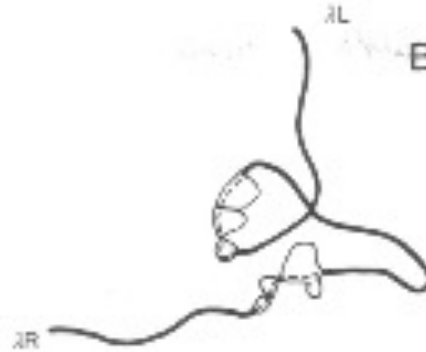
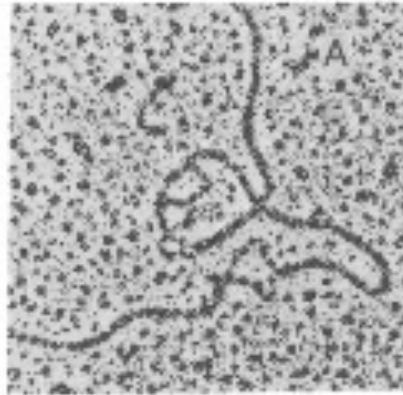
R-loops em cDNA de adenovirus (1977)



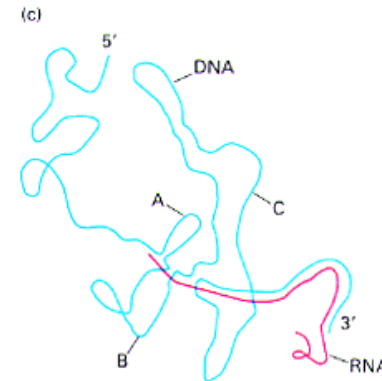
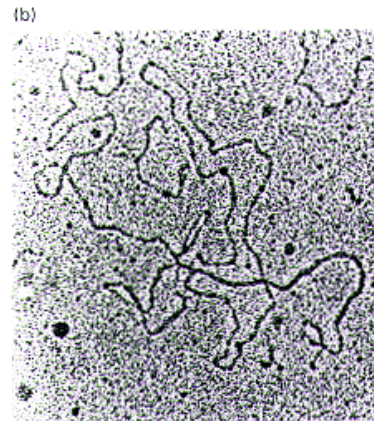
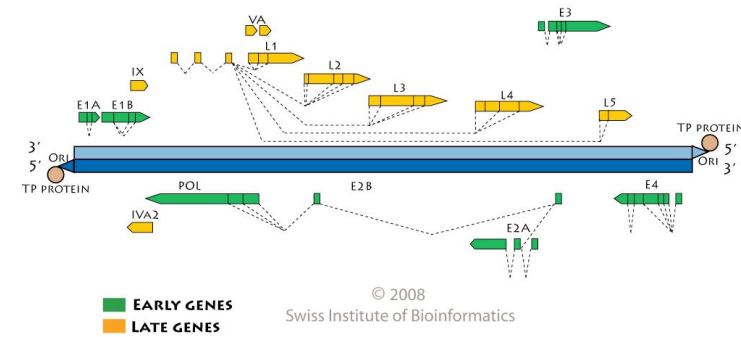
- que é cDNA?
- DNA cópia do mRNA!

DESCOBERTA DOS INTRONS :

**R-loops em cDNA de adenovirus
(microscopia eletrônica).**



HUMAN ADENOVIRUS TYPE 5 GENOME



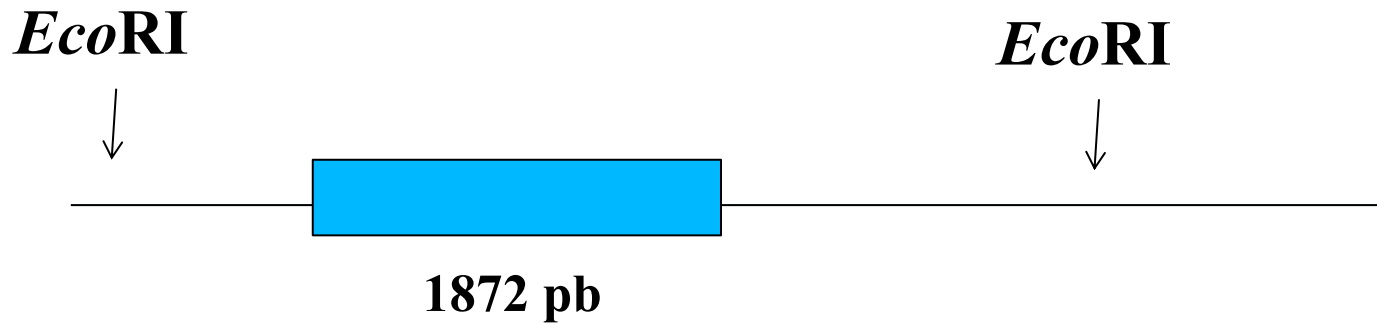
Qual o impacto inicial dessa descoberta?

Pequeno, porque era com vírus!!!!

O Experimento de Pierre Chambon (1981):

- cDNA da ovoalbumina (da galinha) já havia sido clonado (... por que?)-mRNA com 1872 bases, nenhum sítio de *EcoRI*....

No genoma seria algo assim:

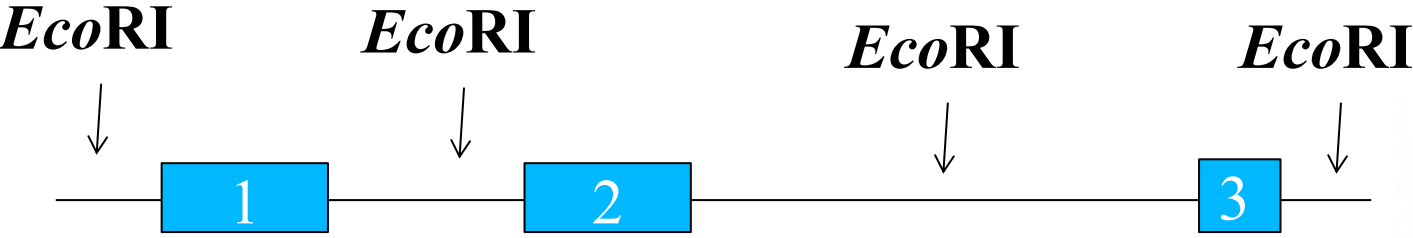


Em um gel de agarose qual seria o tamanho esperado para esse fragmento em um Southern blot?

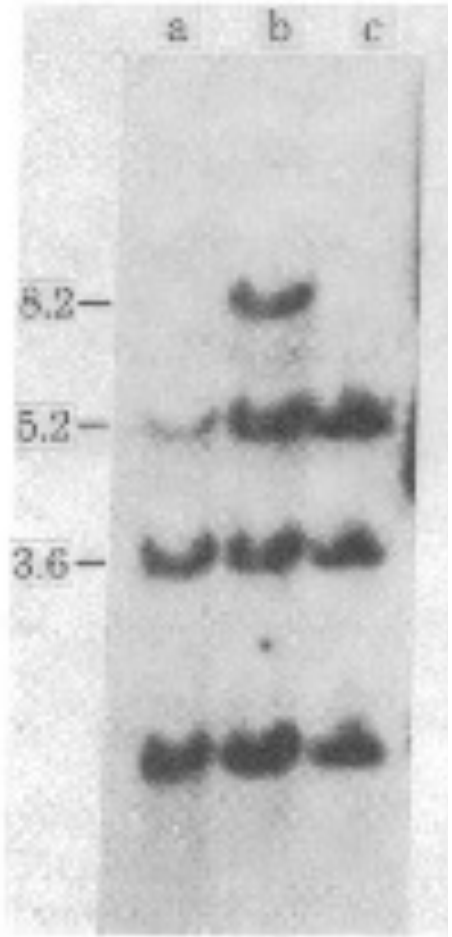
O Experimento de Pierre Chambon (1981) com cDNA de ovoalbumina – 1872 pb:

Southern Blot do DNA genômico:

No DNA genômico!



No mRNA!



Eles encontraram vários fragmentos maiores que 1872 pb, devido a
Descontinuidade do gene no genoma: o genoma da galinha tem introns!

Este é o gene eucarionte- fruto do splicing dos introns.

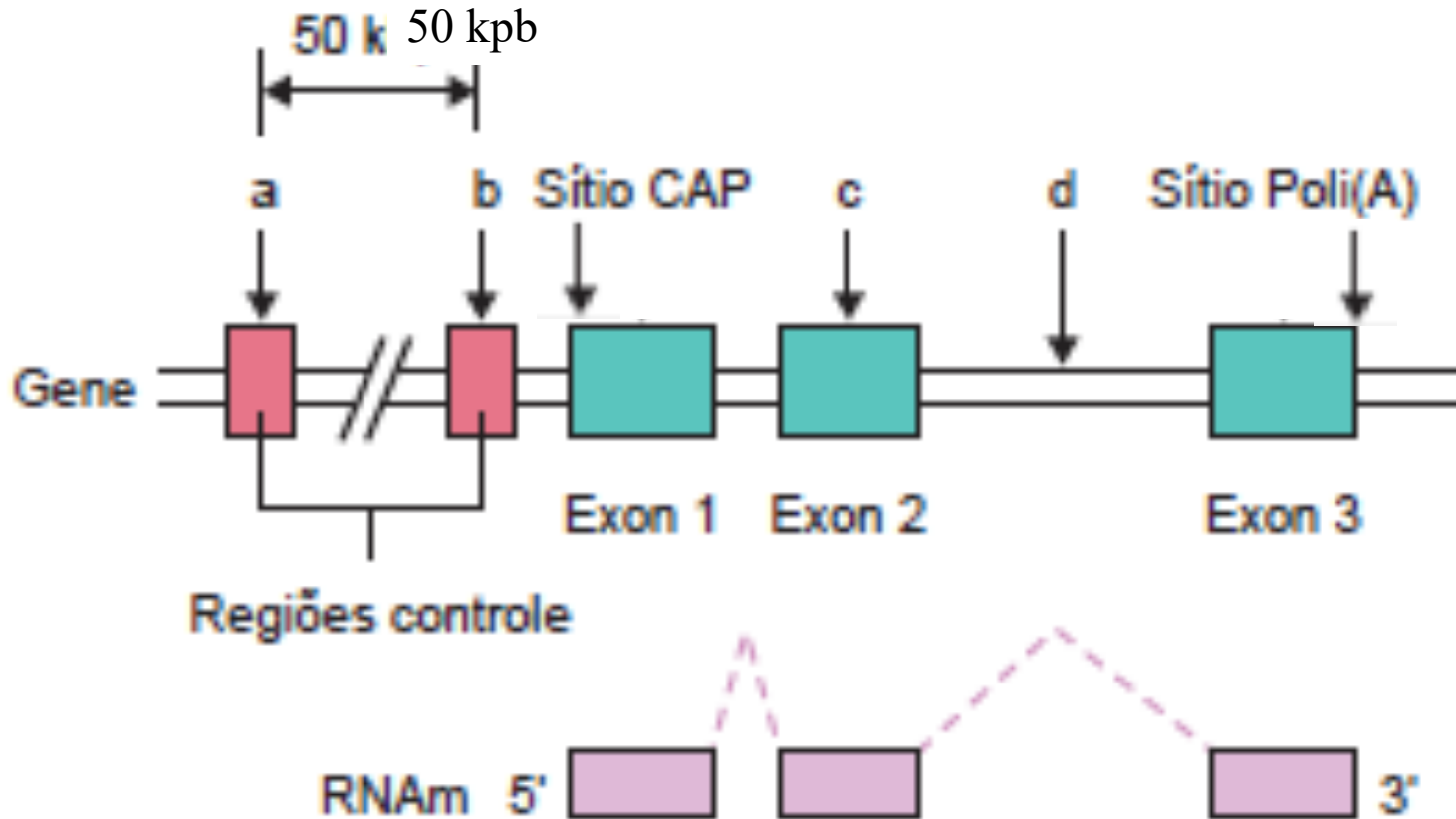


Figura 9.2 Modelo esquemático da estrutura de um gene em eucariotos. Observe a presença dos introns, os quais são excisados da molécula de RNA produzindo o RNA mensageiro (RNAm).

E há conservação da posição dos introns nos genomas de organismos próximos!

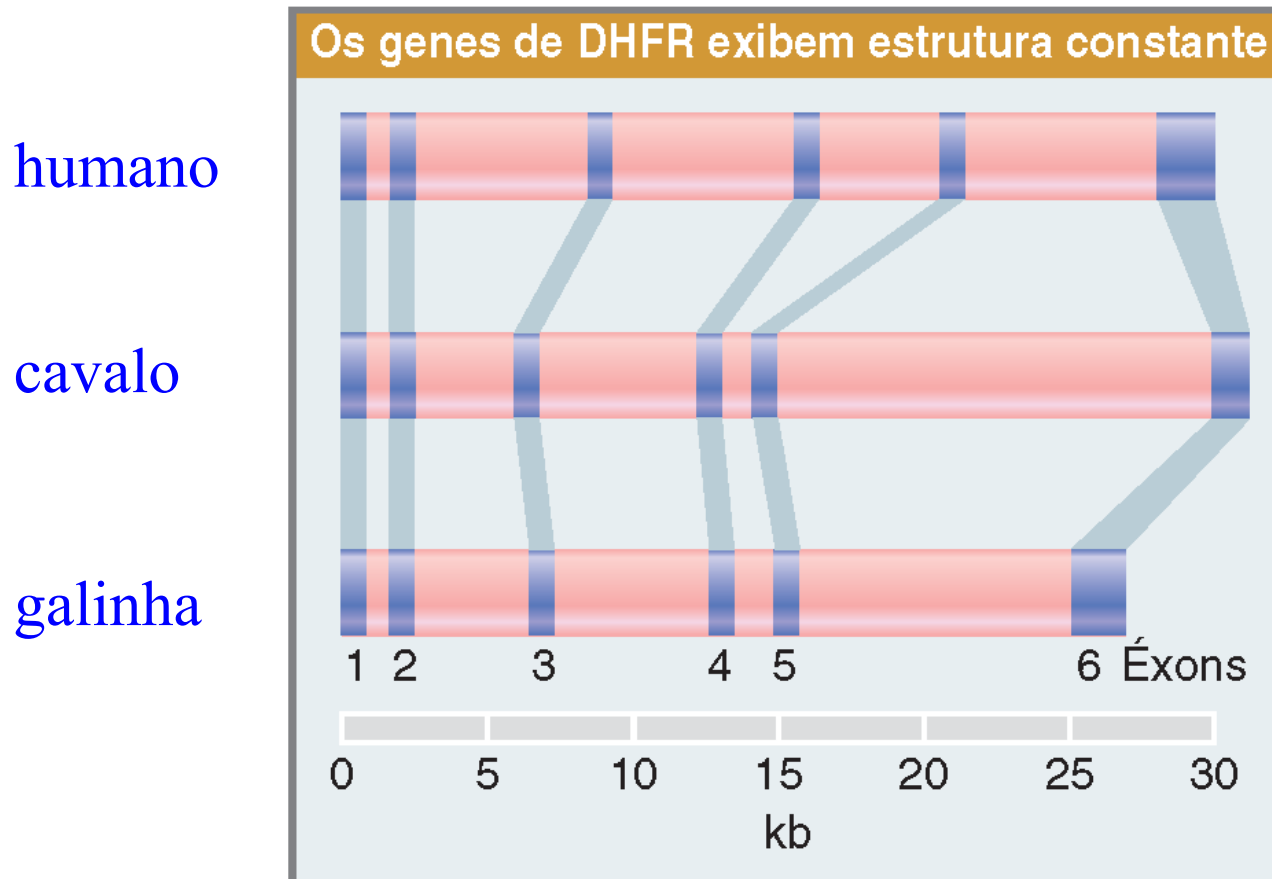
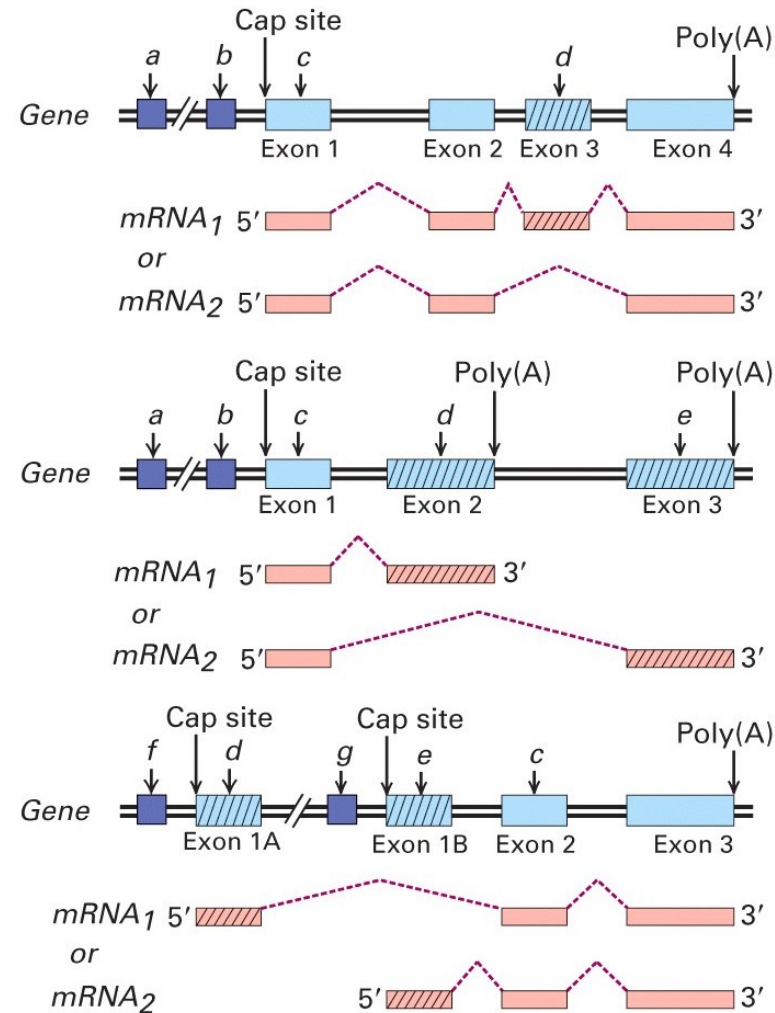


FIGURA 3.8 Os genes de DHFR de mamíferos apresentam a mesma organização relativa, com éxons mais curtos e íntrons muito longos, embora o tamanho dos íntrons seja muito variável.

Mas um gene- vários transcritos!!!! Por splicing alternativo.

(b) Complex transcription units



Diferentes tipos de eventos de splicing alternativo

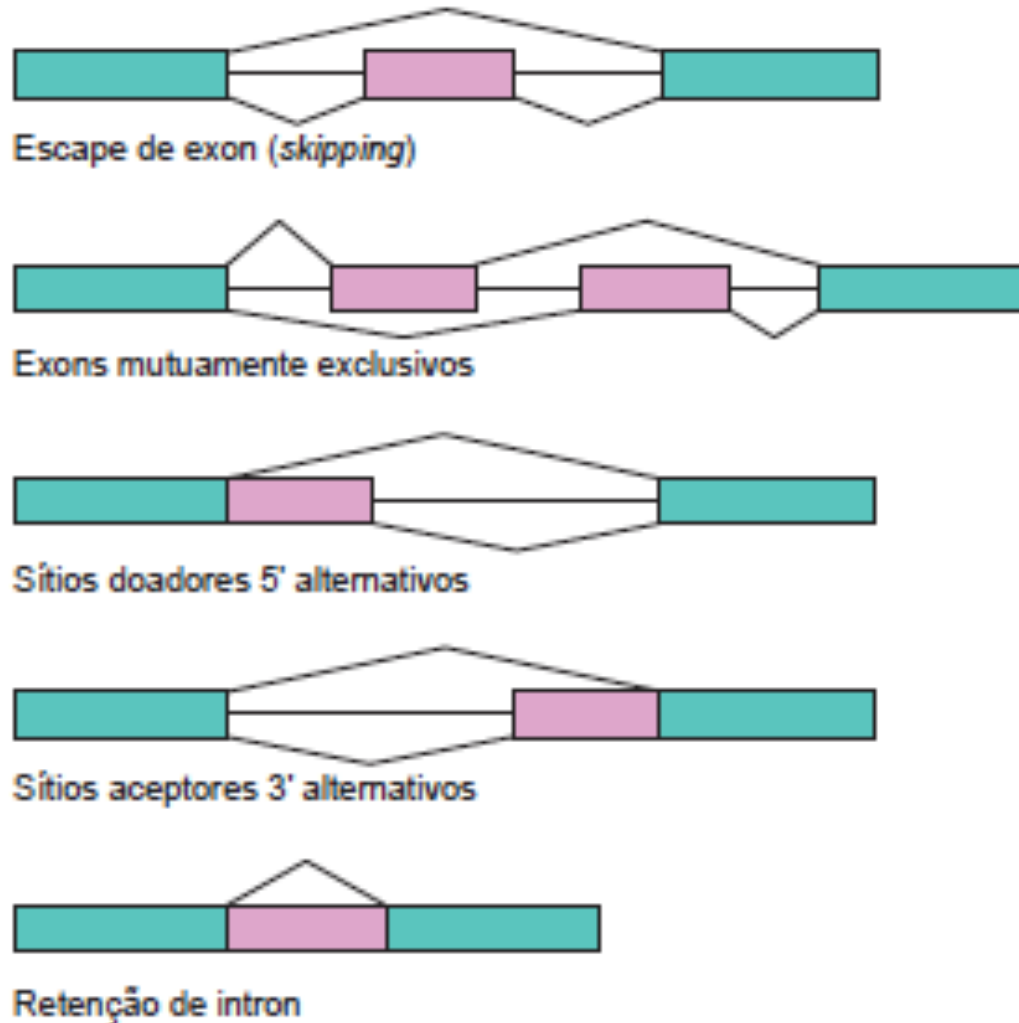
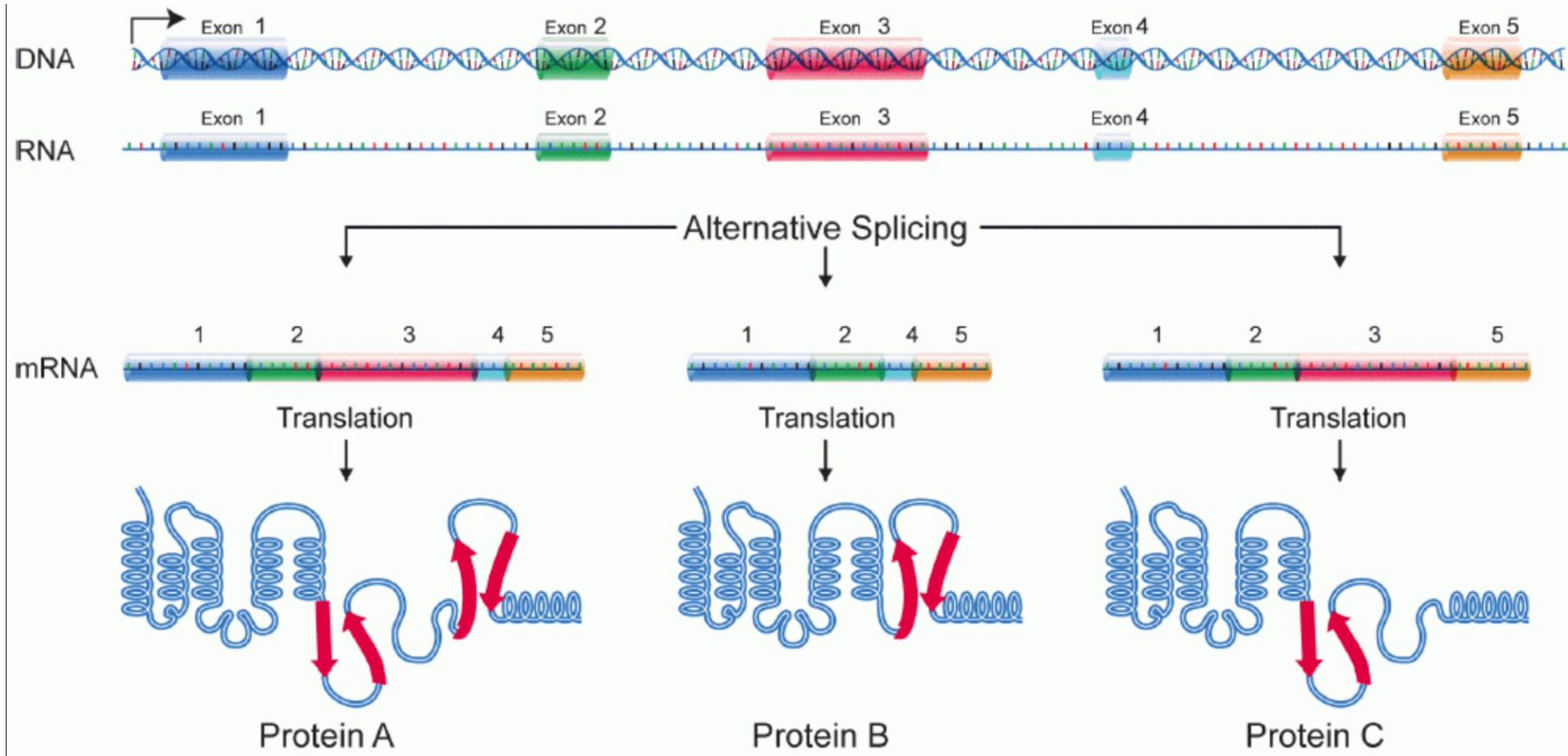


Figura 9.9 Diferentes tipos de eventos de *splicing* alternativo. A forma mais eficiente de detecção de eventos de *splicing* alternativo dá-se pelo mapeamento de sequências expressas no genoma.

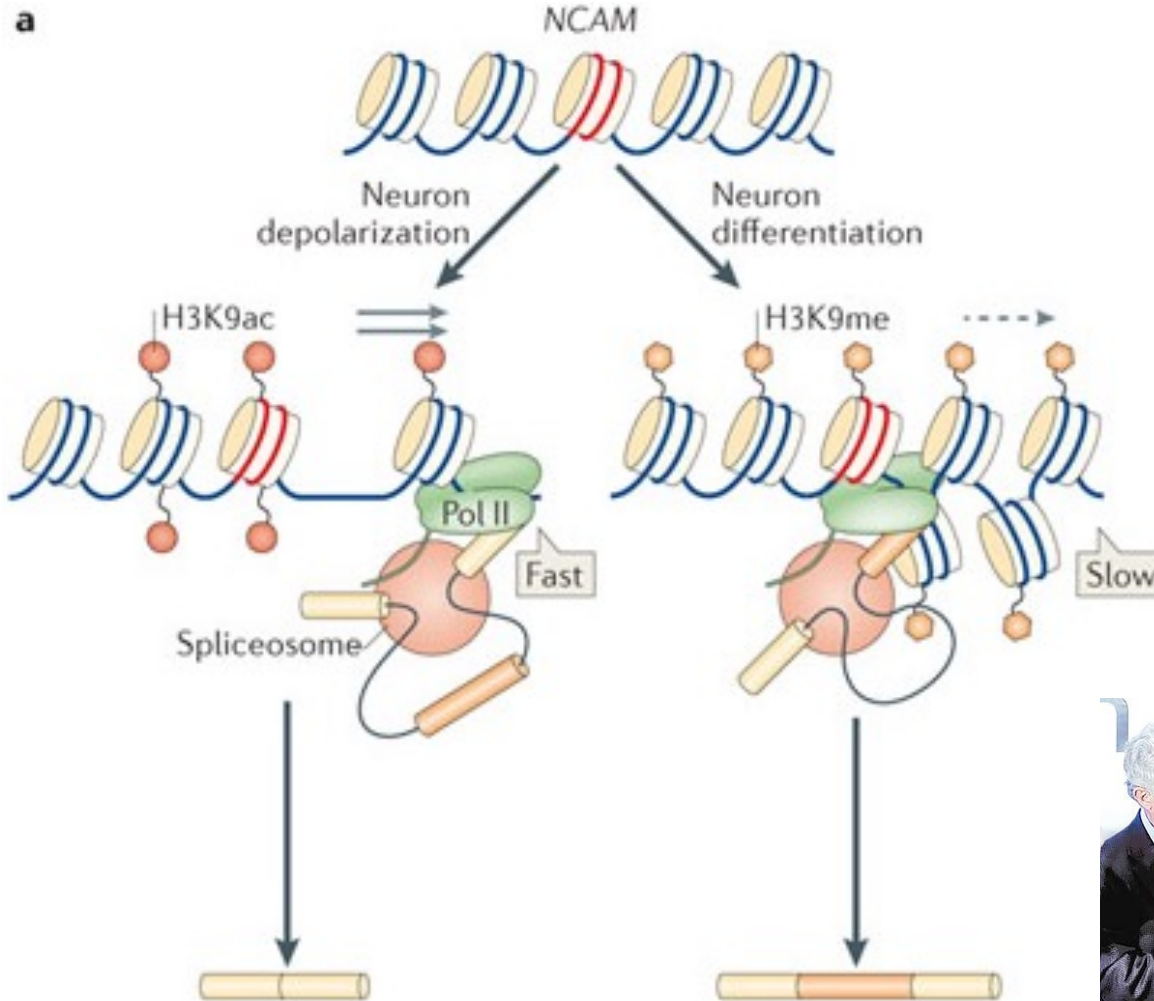
Como produto de splicing alternativo cada gene Pode codificar diferentes isoformas de proteínas!



**Diferentes isoformas podem ser expressas nos
Diferentes tecidos!**

Figura Wikipedia

Mecanismos de alternative splicing: Alberto Kornblihtt!!!!



Alguns aspectos do gene eucarionte: mas o número de introns e o tamanho dos genes é variável sobretudo em escalas maiores de evolução!

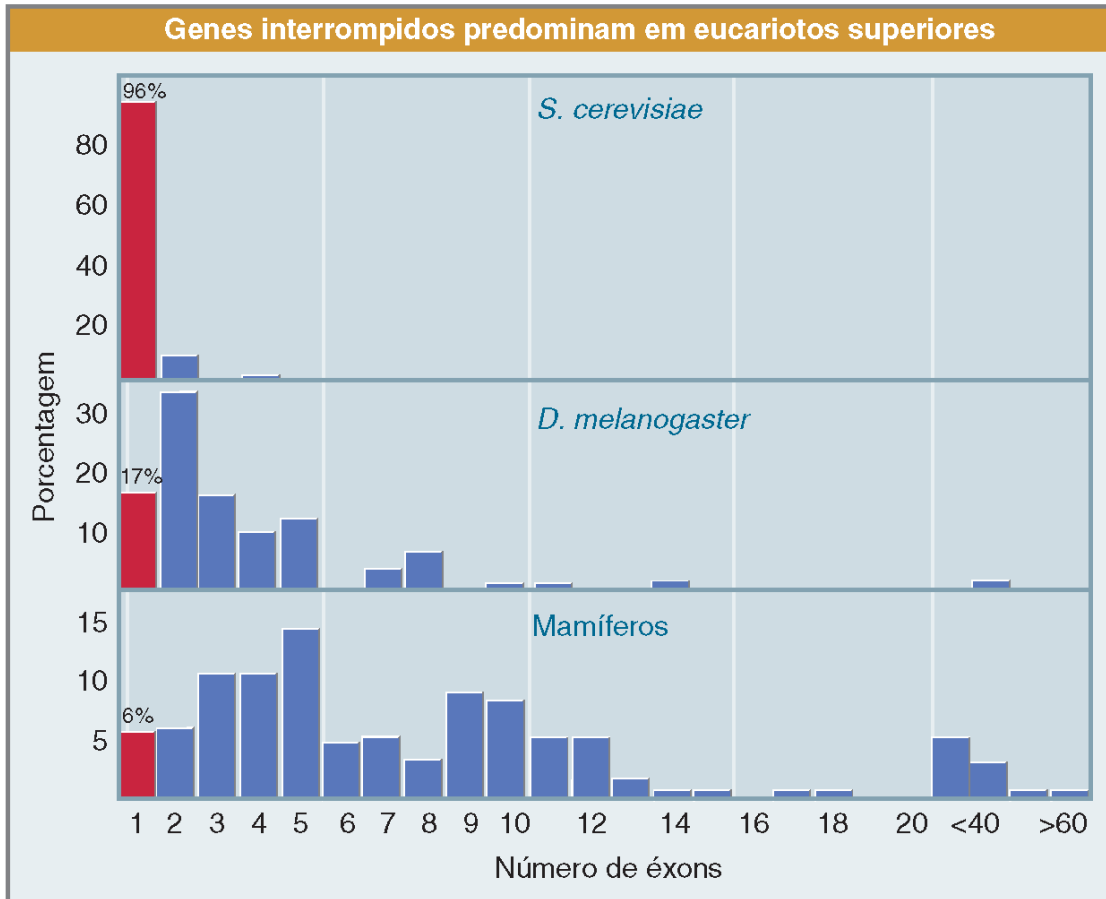


FIGURA 3.10 A maioria dos genes não é interrompida em leveduras; na mosca e nos mamíferos, a maioria é interrompida. (O total de genes não-interruptos, contendo apenas um éxon, é ilustrado na coluna à esquerda.)

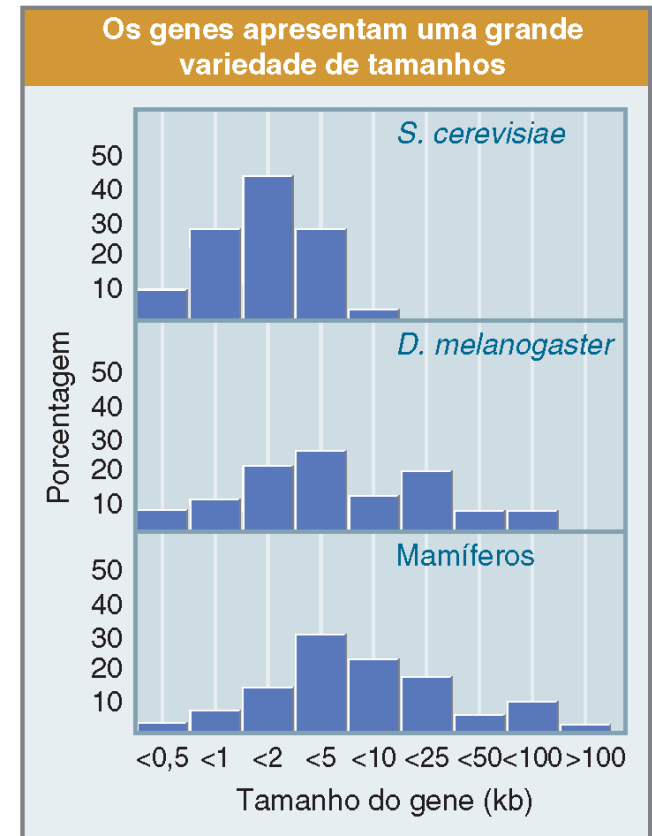
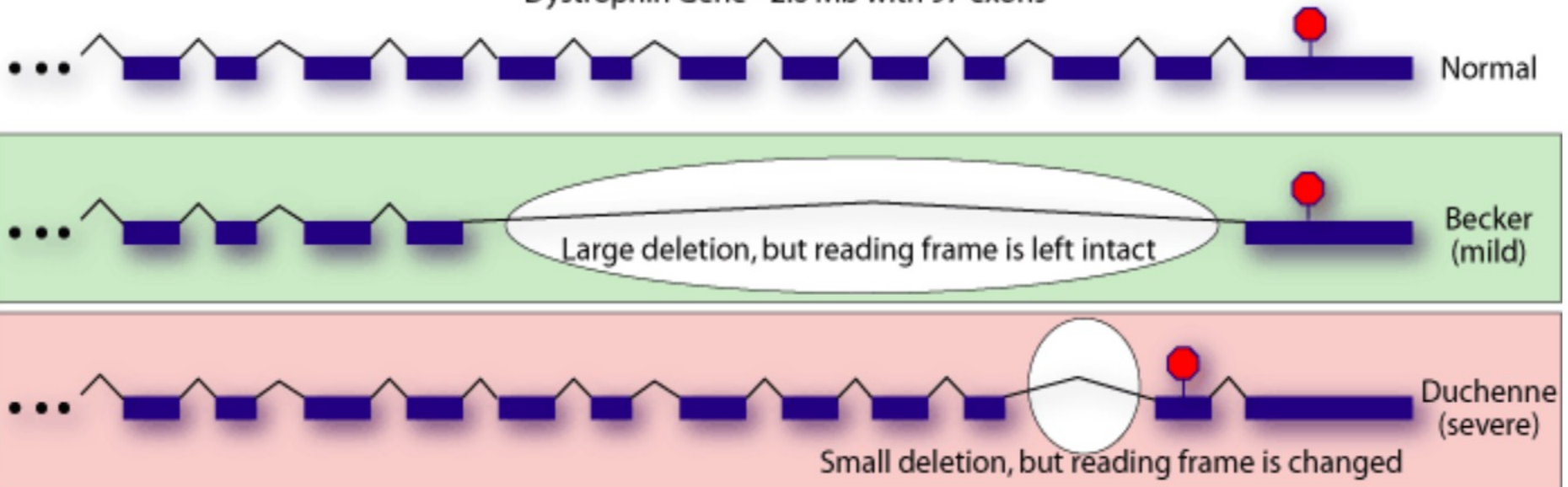


FIGURA 3.11 Os genes são pequenos em leveduras, ao passo que em moscas e em mamíferos exibem uma distribuição ampla, atingindo tamanhos muito grandes.

Tamanho de nossos genes: o maior gene humano

O Gene da distrofina

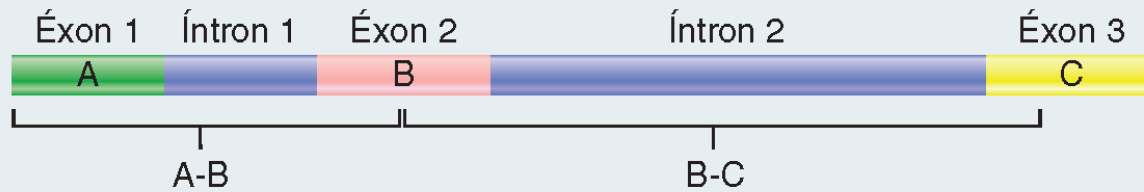
Dystrophin Gene - 2.6 Mb with 97 exons



Característica importante: a ordem dos exons é a mesma no DNA E no RNA... CIS-SPLICING!

A ordem dos éxons é a mesma no DNA e no RNA

DNA genômico



mRNA

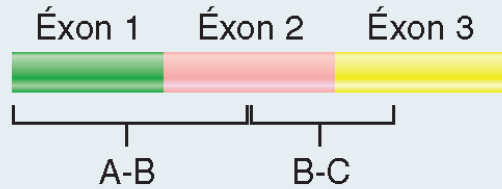
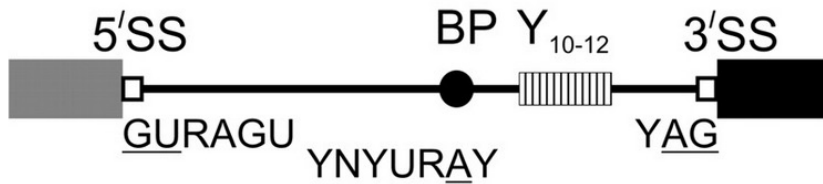


FIGURA 3.2 Os éxons encontram-se na mesma ordem no mRNA e no DNA, mas as distâncias ao longo do gene não correspondem às distâncias no mRNA ou na proteína. No gene, a distância de A para B é menor que de B para C; mas no mRNA (e na proteína), a distância de A para B é maior que de B para C.

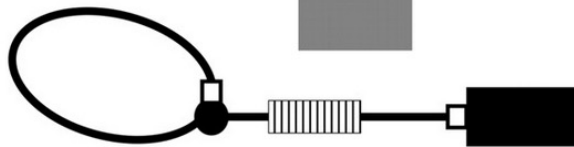
Mas em eucariontes existem exceções!

Em Tripanossomatídeos ocorre trans-splicing!

Mammalian *cis* splicing

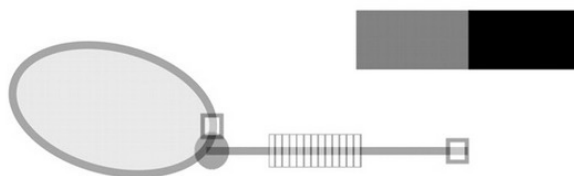


Lariat

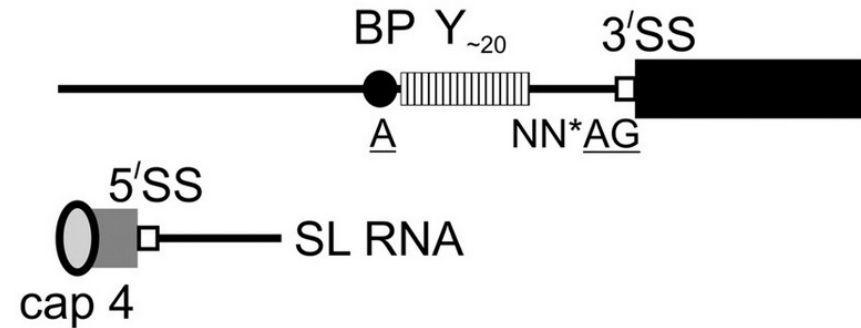


Transesterification 1

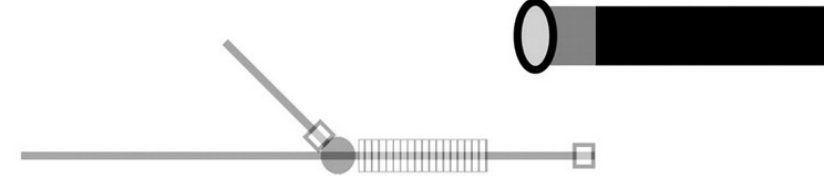
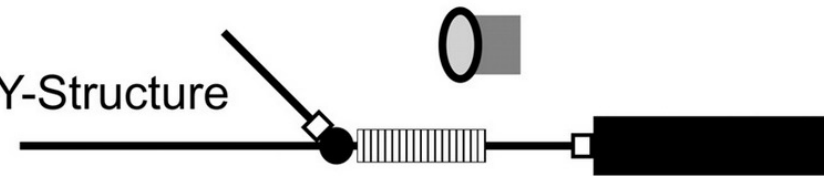
Transesterification 2



Trypanosome *trans* splicing



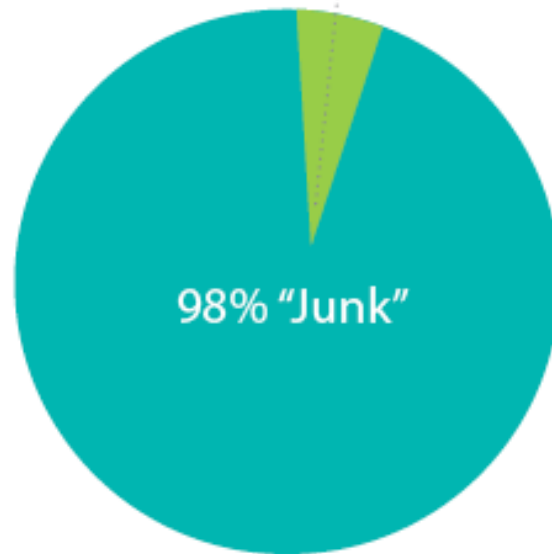
Y-Structure



No sequenciamento do genoma humano se verificou que apenas 1,5- 2,0% representam sequencias que codificam proteínas!!!!

There are only 20,887 protein-coding genes in the human genome

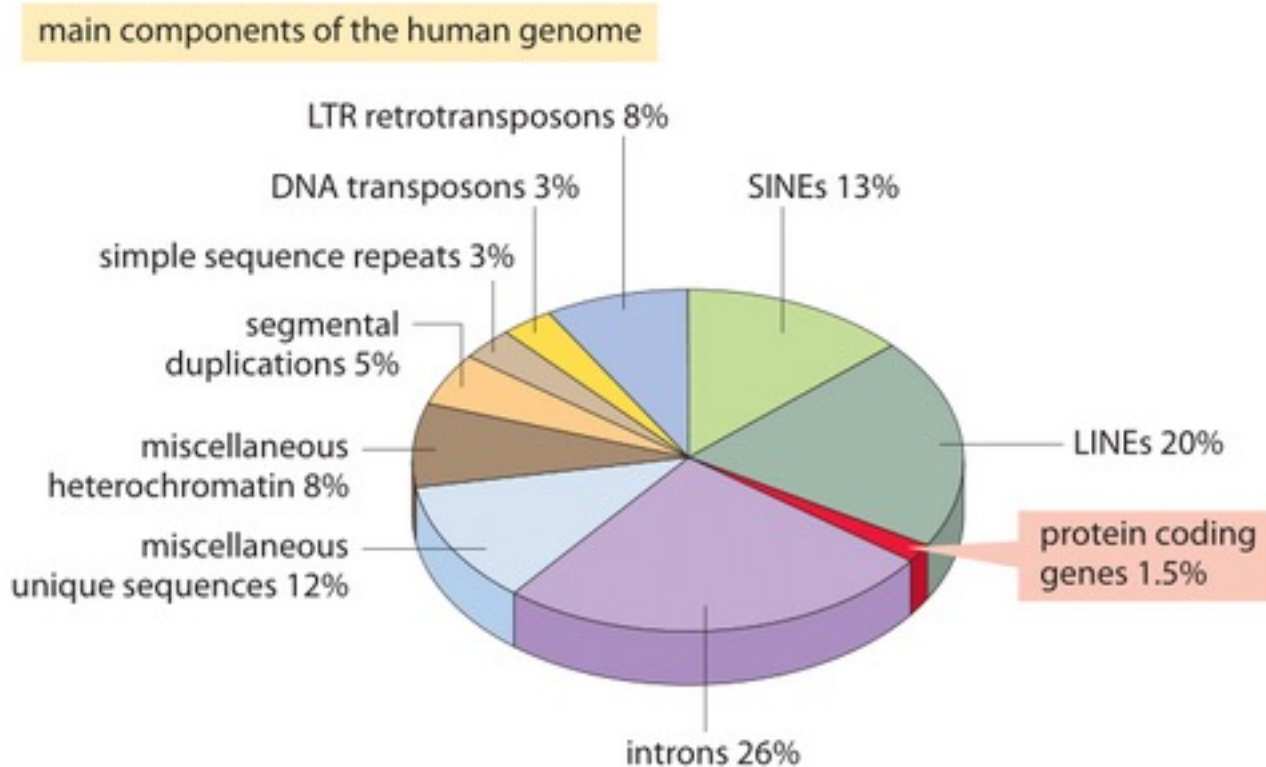
2% Genes



Será que o restante é realmente JUNK DNA?

(ou DNA lixo, ou **DNA Tralha**)

Introns correspondem a 26% do genoma humano:

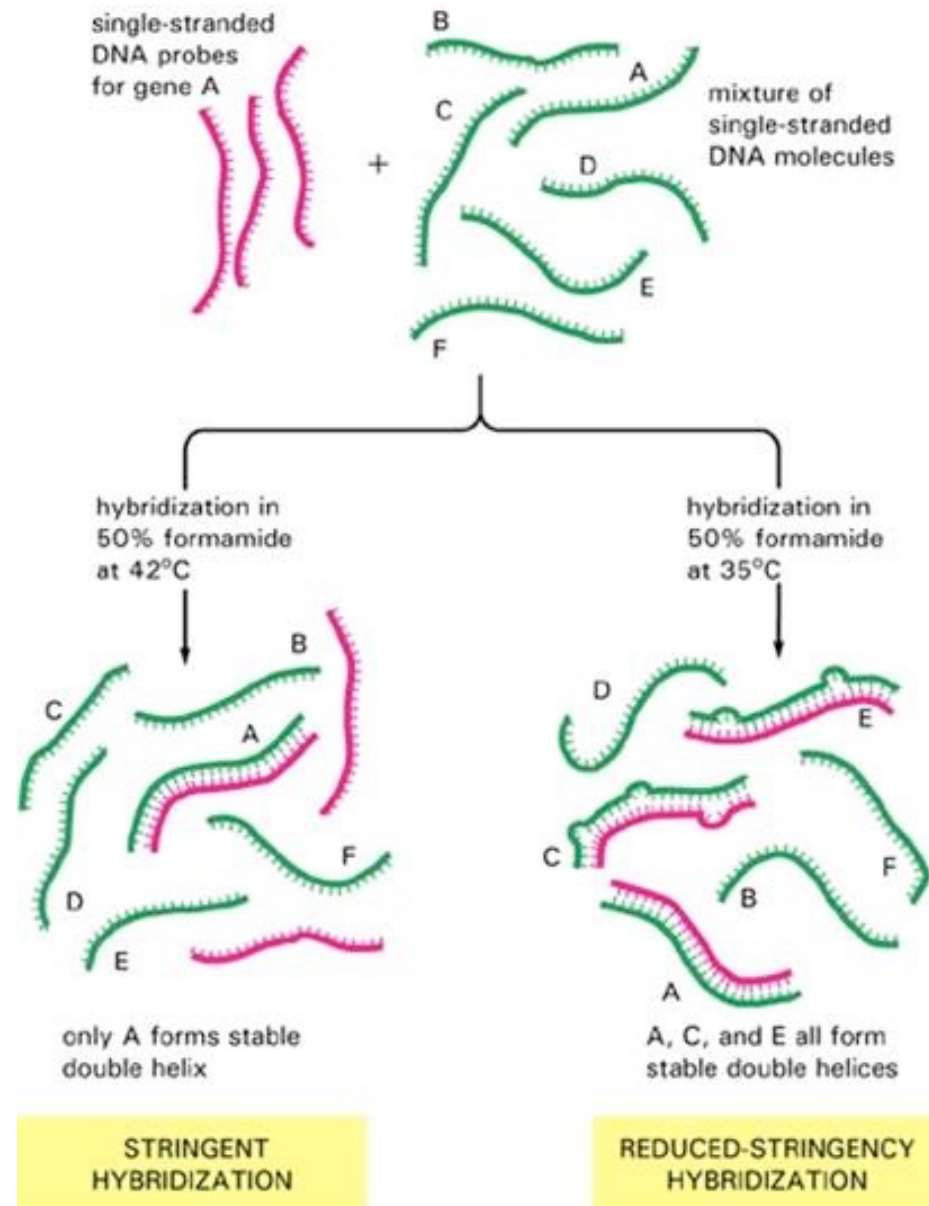


Mas e esse restante, do que se trata?

Temos sequencias únicas, famílias gênicas, repetições e transposons (em repetições)

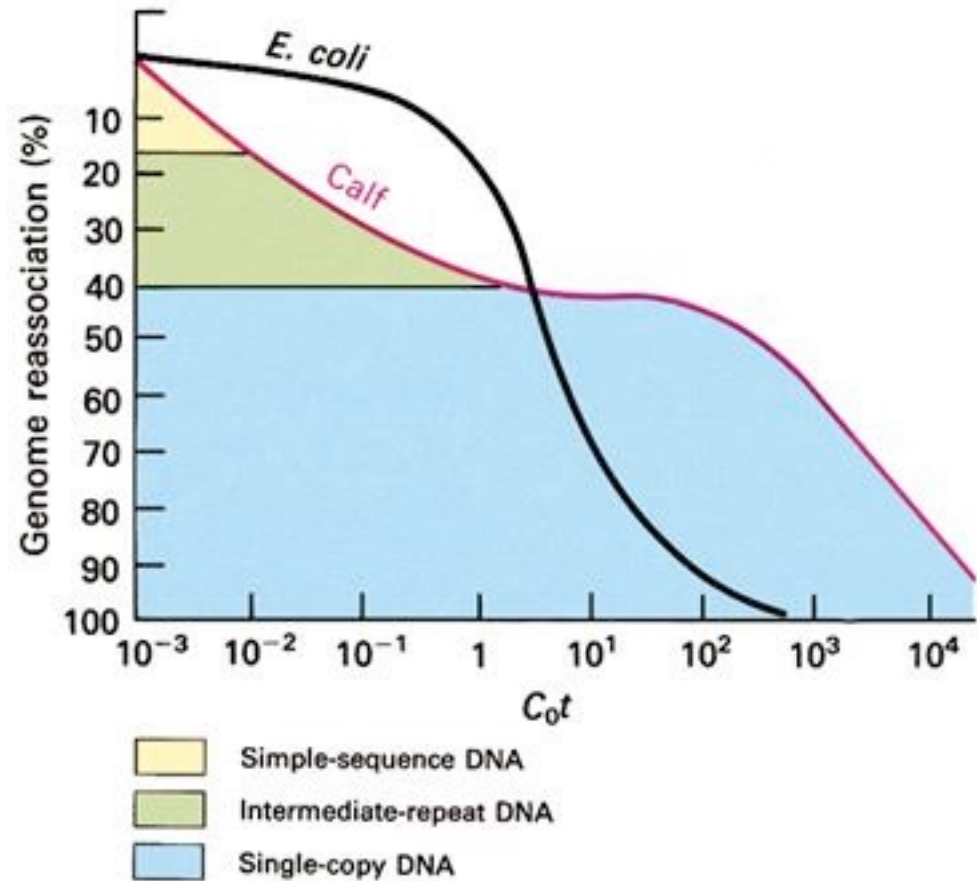
Descoberta de fração de DNA repetitiva:

Hibridação de DNA!



Descoberta de fração de DNA repetitiva:

Curvas de reassociação de DNA....



Em *E.coli* sequencias unicas

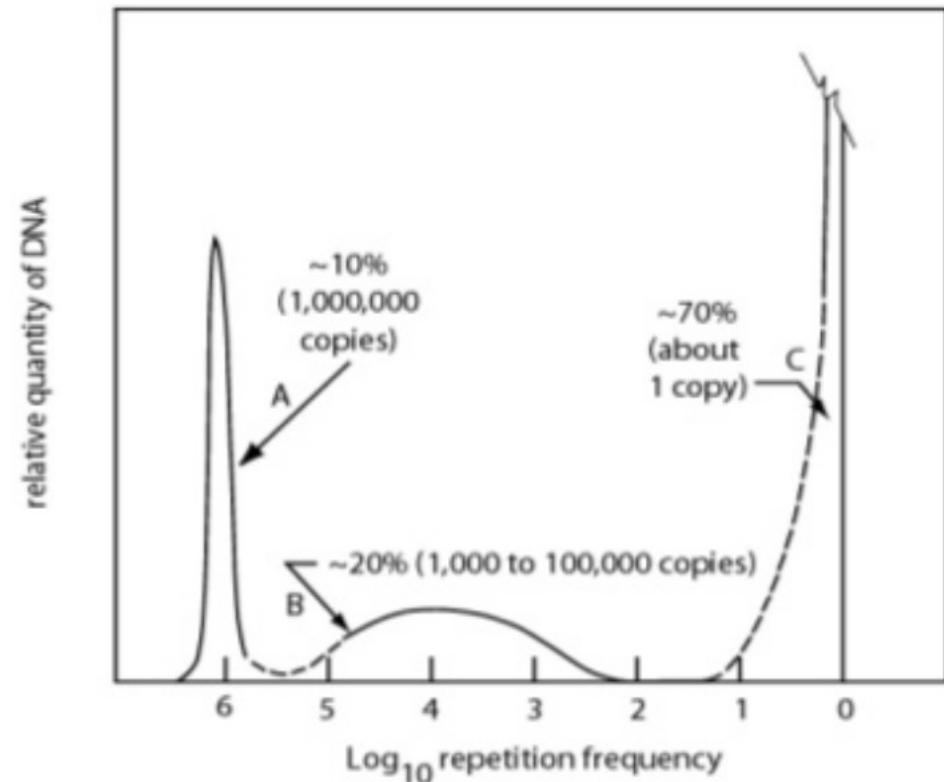
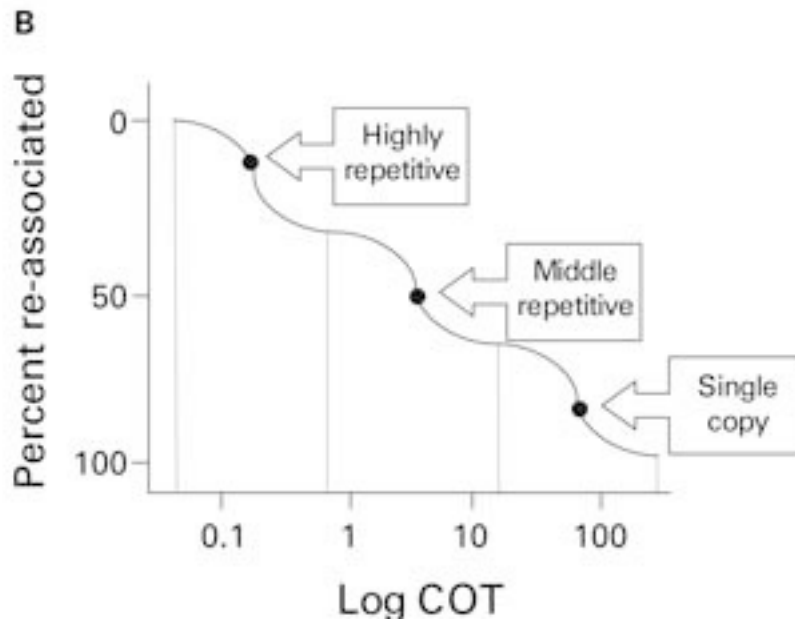
Em mamíferos pelo menos

3 inclinações na curva....

Os primeiros a se reassociar
estão repetidos!

Descoberta de fração de DNA repetitiva:

Curvas de reassociação de DNA....



Temos sequências únicas

Sequências em poucas cópias e sequências muito repetitivas!

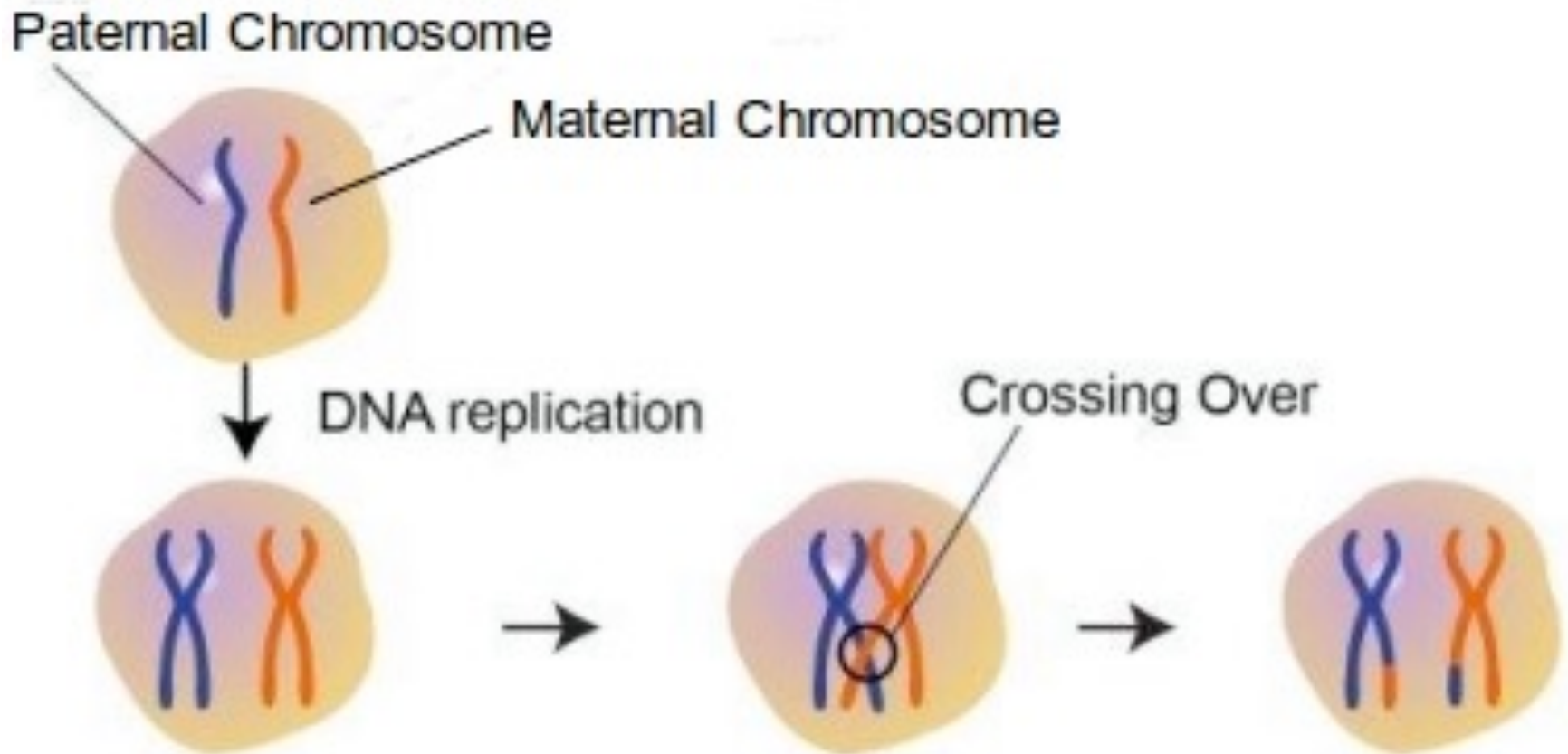
Vamos falar de cópias no genoma...

Como isso acontece? O gene pode duplicar?

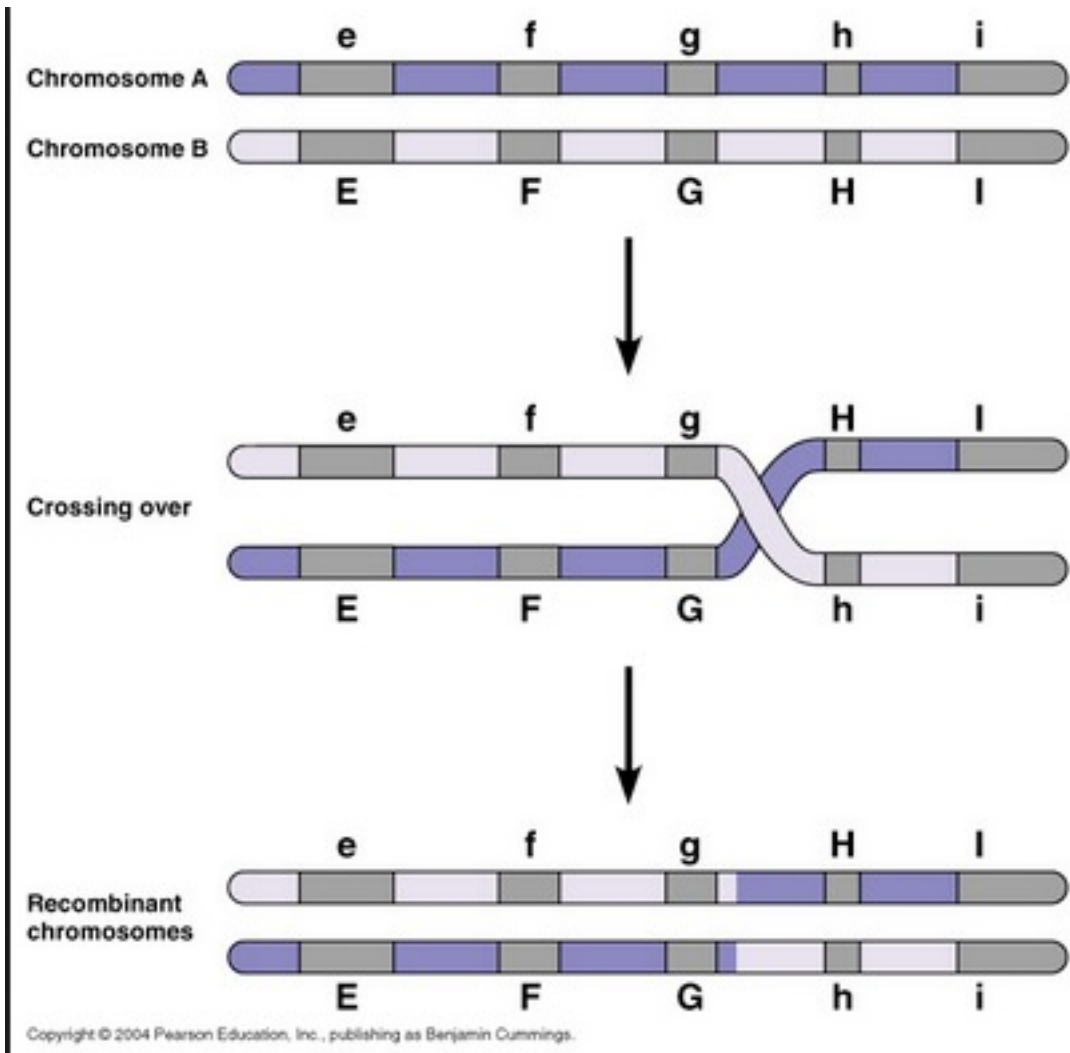
Como?

Duplicações gênicas são fundamentais na evolução do genoma E do organismo! Mas como ocorre?

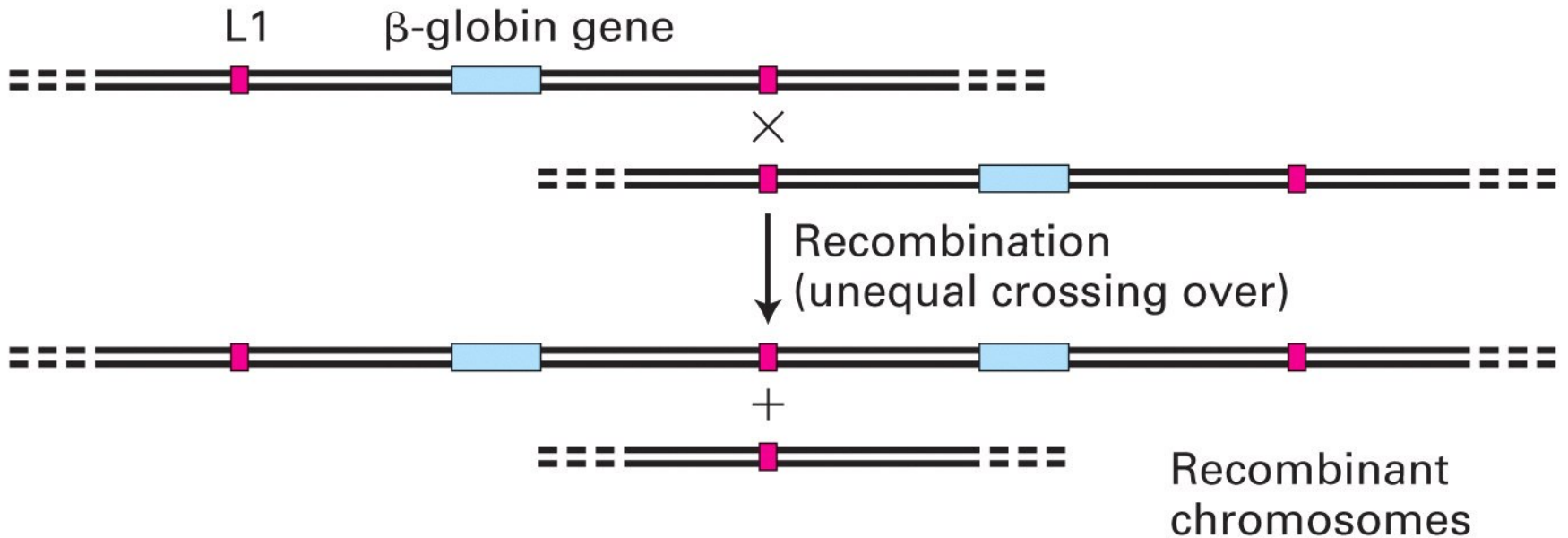
Processo de recombinação: crossing over! Parece simples não?



Processo de recombinação: crossing over! Parece simples não?

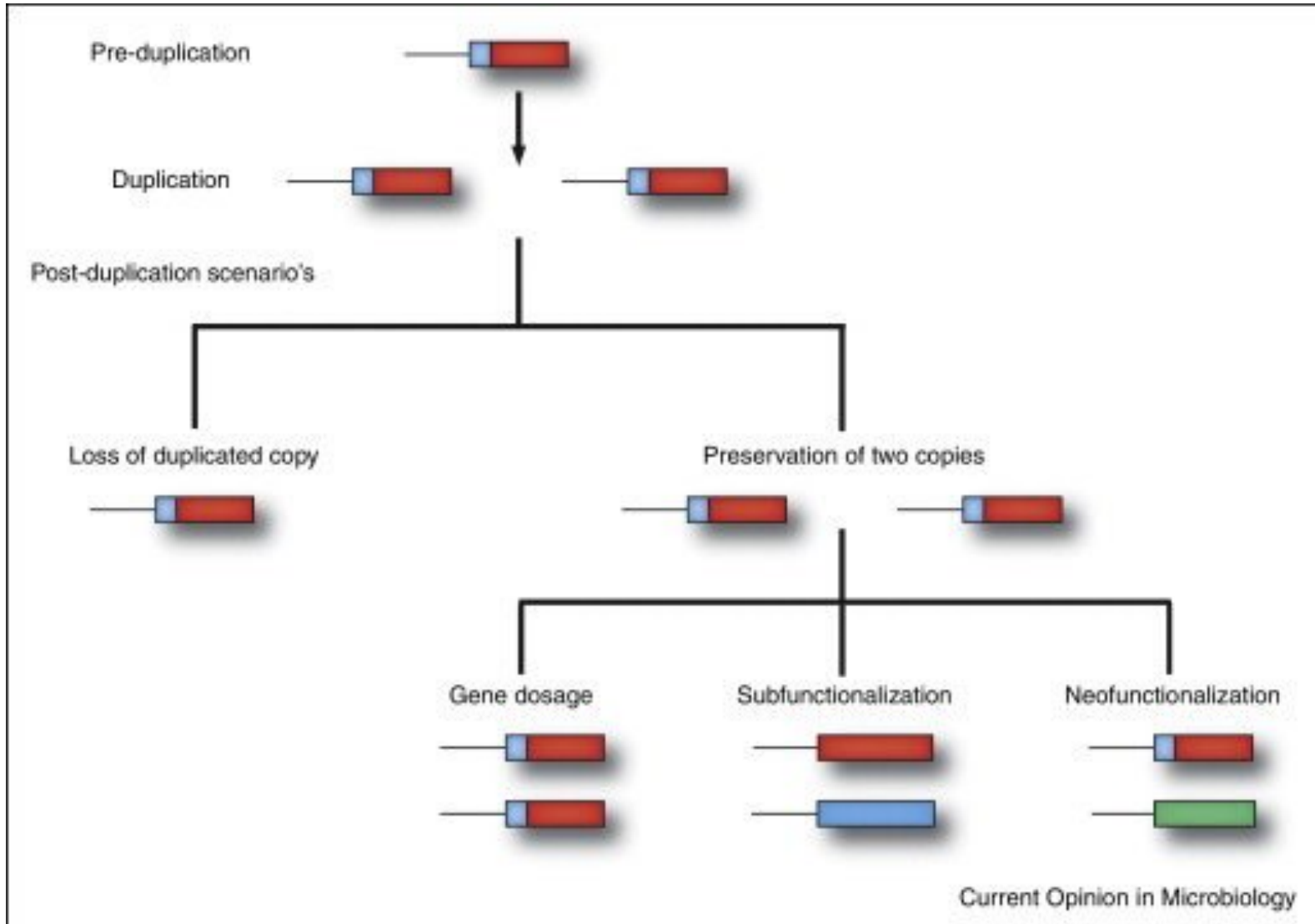


Processo de recombinação: mas e se a recombinação acontecer em pontos errados?! O que está acontecendo no gene abaixo?



Qual a vantagem de uma duplicação gênica?

A evolução de uma duplicação gênica?

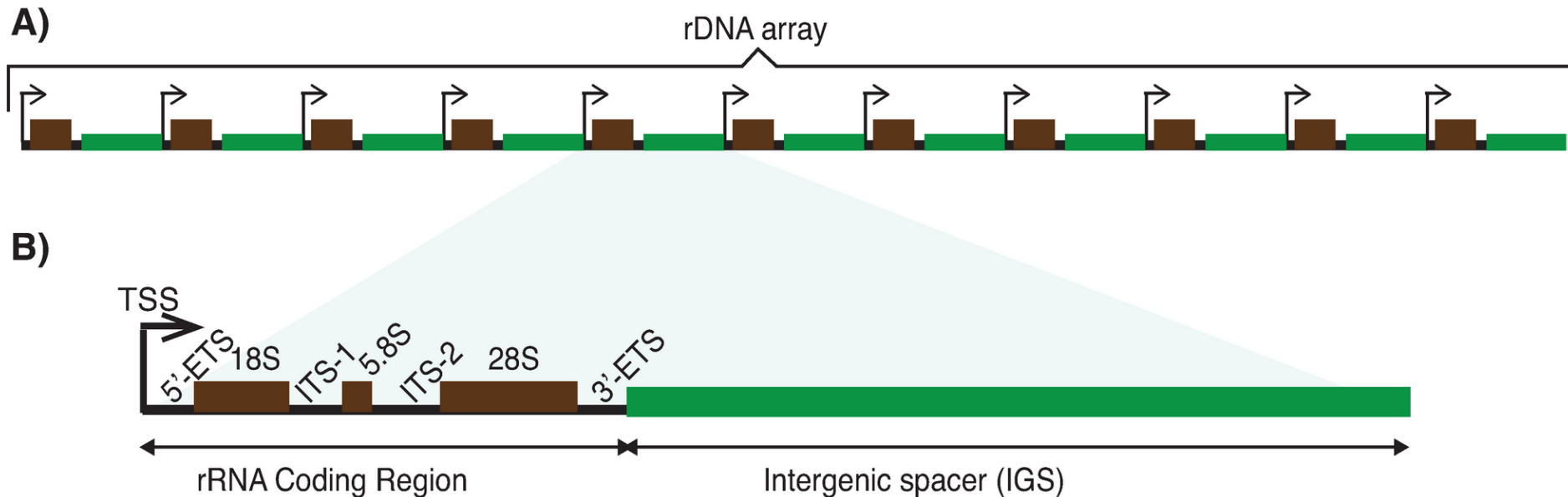


Voordeckers K, Verstrepen KJ. 2015 Curr Opin Microbiol
PMID: 26202939.

Existem cópias que são idênticas?- SIM!

Por que a evolução iria permitir cópias idênticas?

Genes que codificam RNA ribossômico (rRNA!)

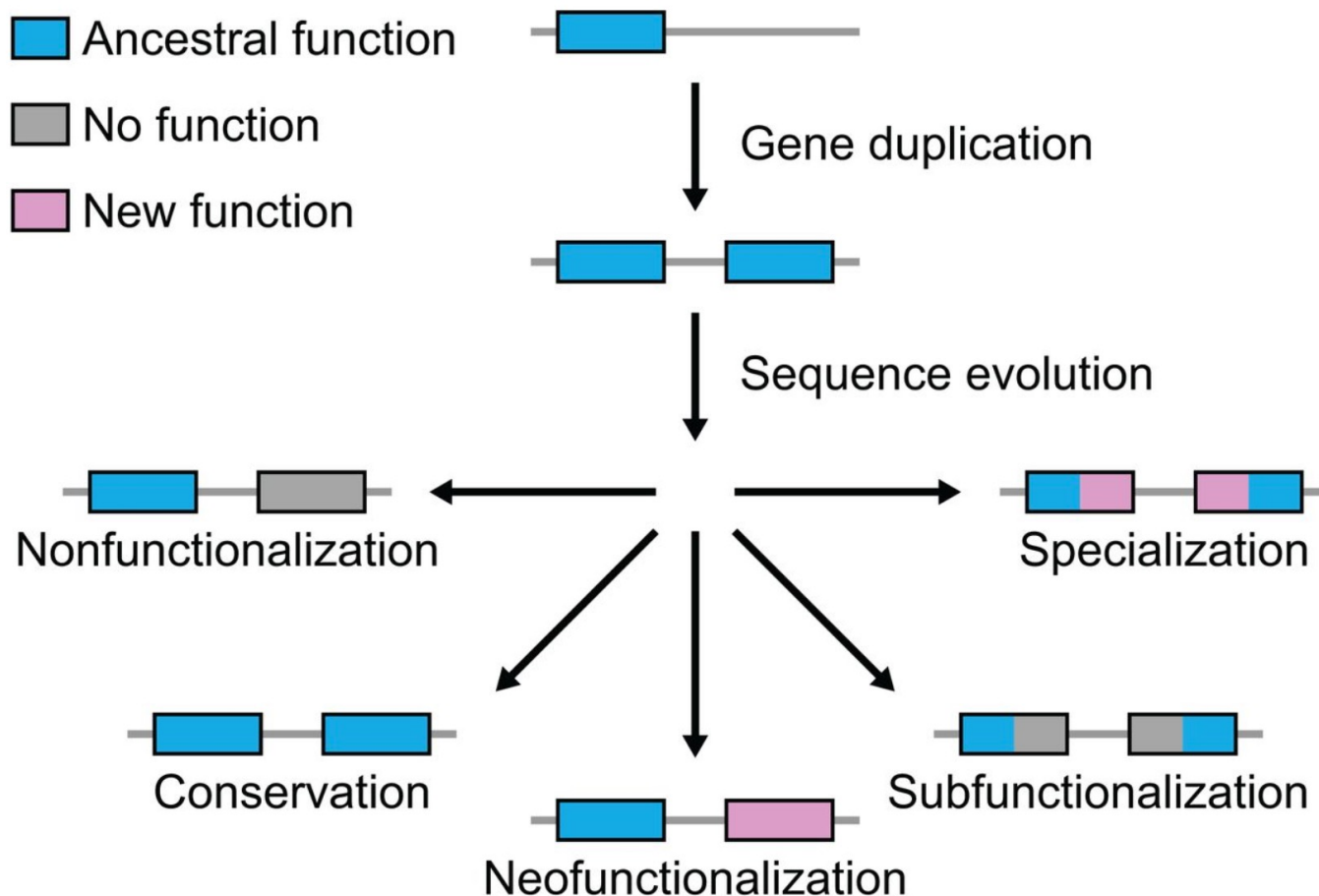


doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207531.g001>

Por que as células têm várias cópias de rRNA?

Agrawal and Ganley (2018) PLOS ONE

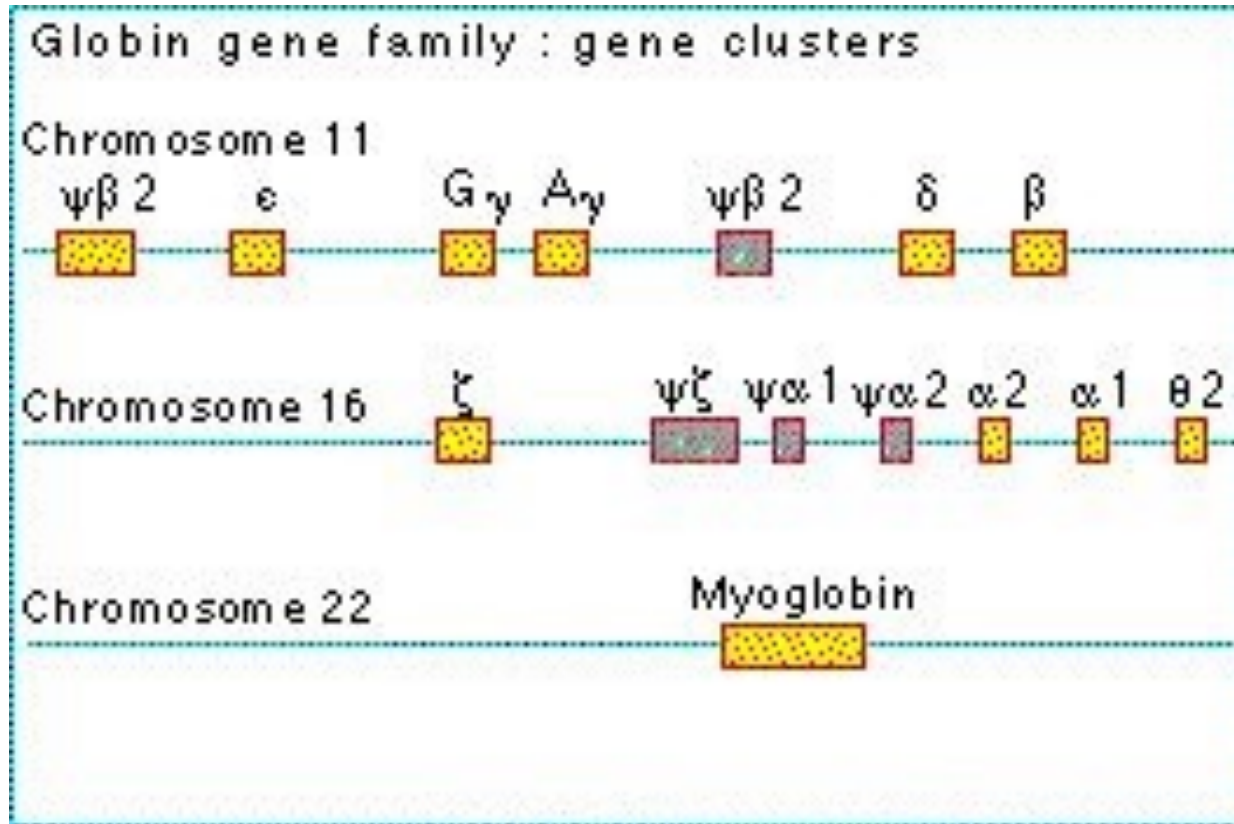
- **Gene duplicação pode evoluir independentemente!!!!**
 - **E de diferentes formas!**



- O que acontece quando o gene duplicado ganha uma nova função?

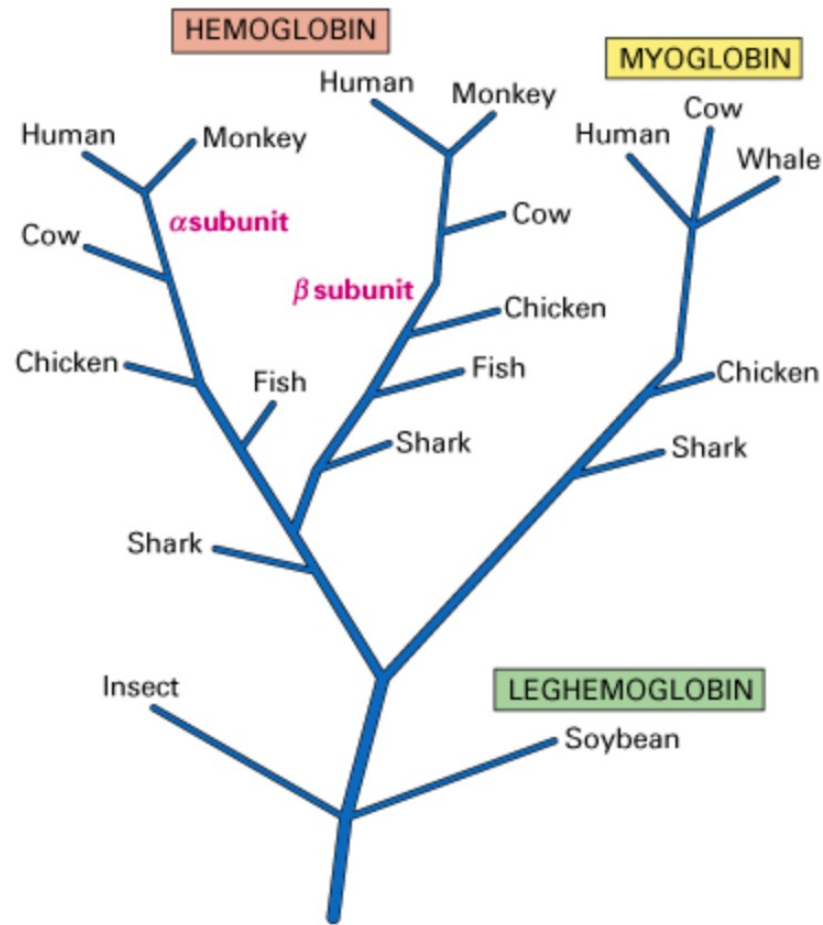
• E quando simplesmente perde a capacidade de gerar proteínas?

**Genes de origem, com funções eventualmente similar, formam as FAMÍLIAS GÊNICAS!
Como os genes das hemoglobinas!**



Mas nessa família também existem pseudogenes? O que são?

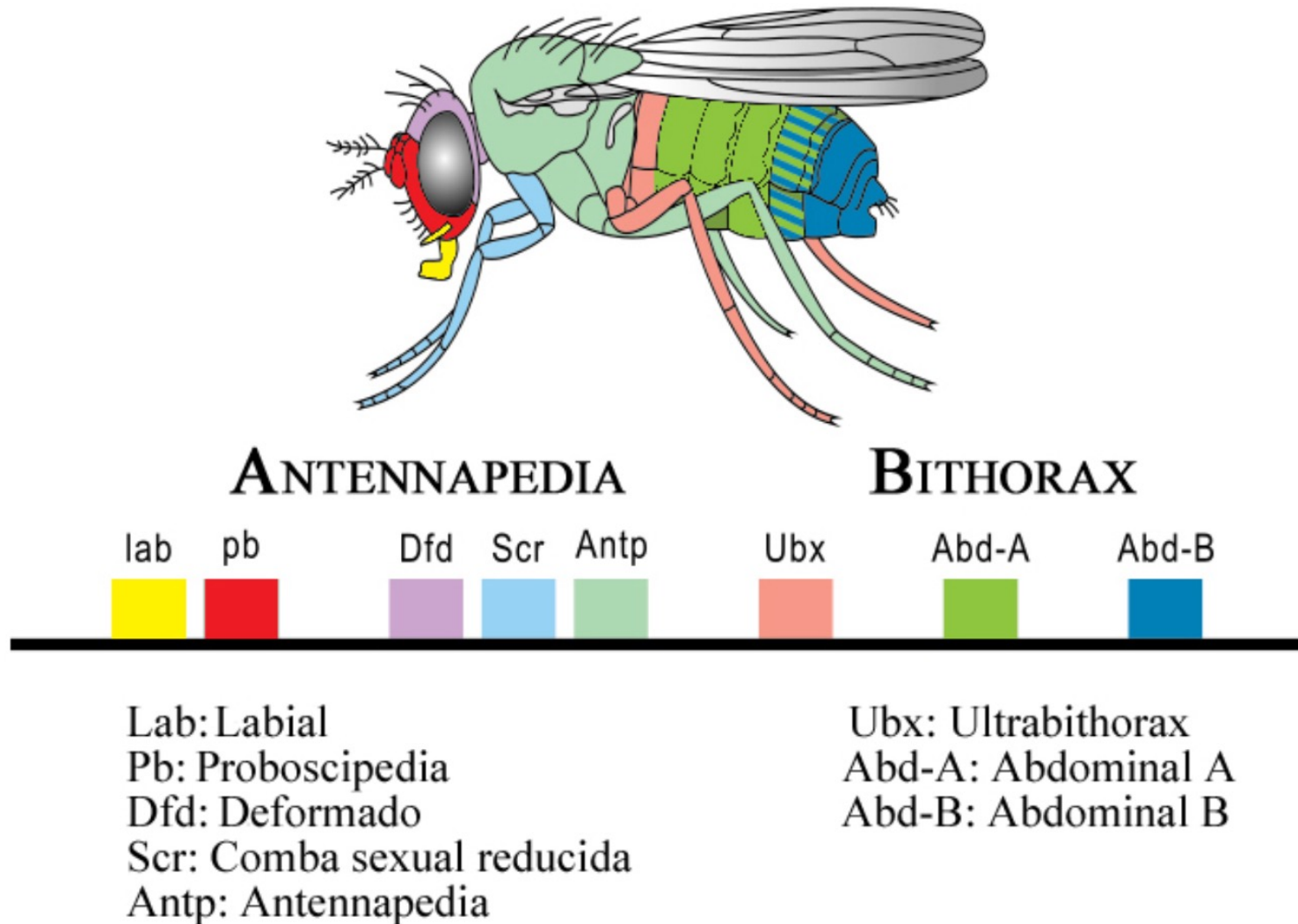
A evolução da família de genes de globinas!!!



- **Esses genes são homólogos! O que é homologia?**
- **Que são genes Parálogos? Na mesma espécie: hemoglobina e mioglobina.**
- **E genes ortólogos? Especiação: mioglobina humana e vaca!**

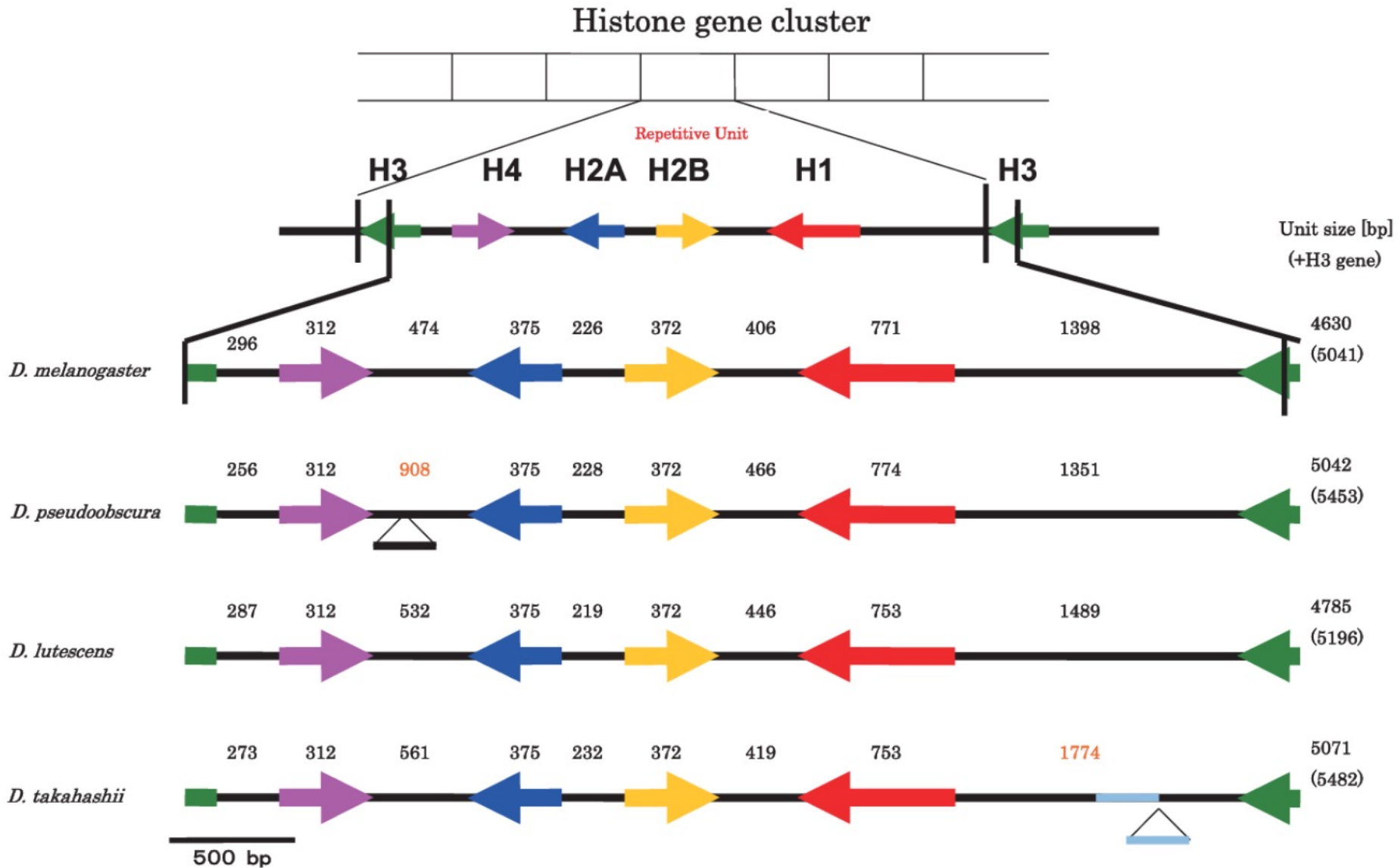
Outras famílias gênicas humanas:

Homeobox genes



Outras famílias gênicas:

Histonas



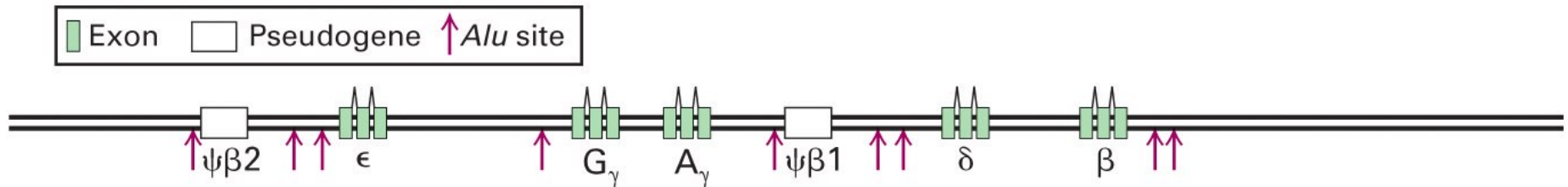
E se a duplicação não evoluir para novas funções?

- **Que é um pseudogene?**
- **Um gene pode ter função, mesmo se não codificar uma proteína?**
- **E o que é uma RETROCÓPIA?**
 - **O que é Transcriptase Reversa?**

Veja a família de globinas no cromossomo 11:

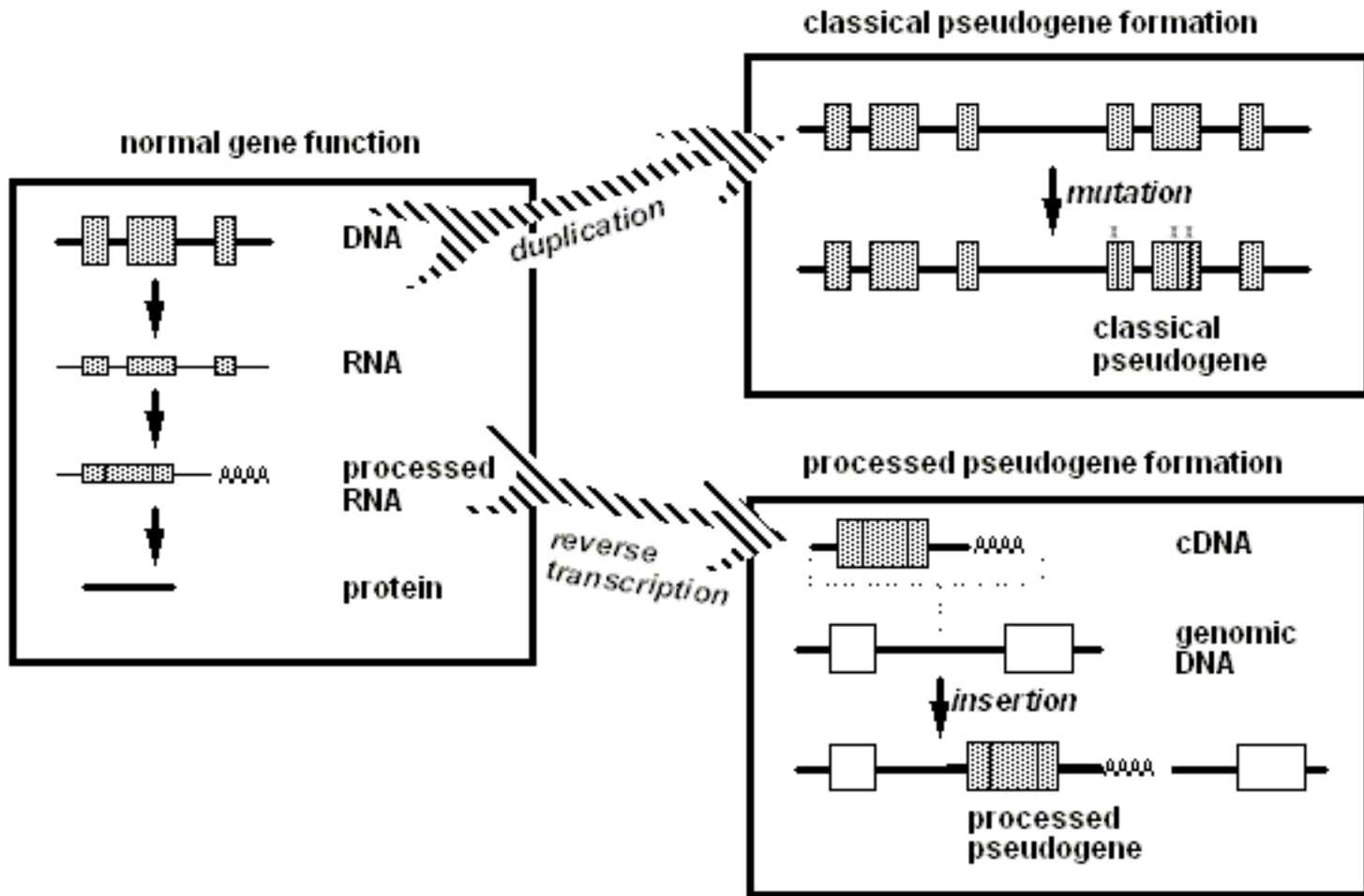
- Porque alguns pseudogenes não tem introns?
- Como eles podem ser eliminados?

(a) Human β -globin gene cluster (chromosome 11)



Famílias gênicas: E os pseudogenes?

Por que algum deles não têm introns? O que são retrocópias?



E genes solitários? O que são?

25-30% dos genes humanos são solitários....

O número de famílias gênicas corresponde ao tamanho do genoma

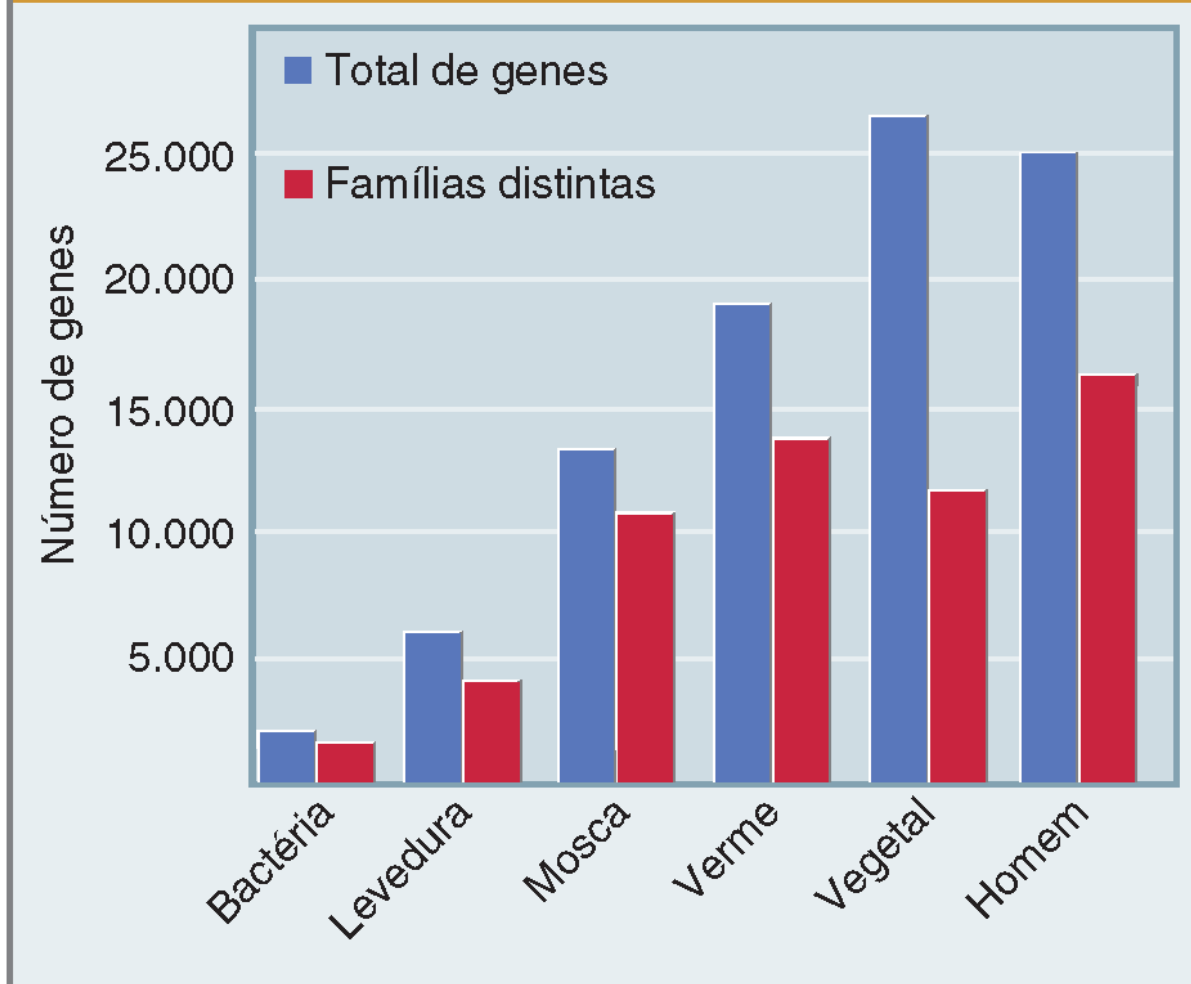
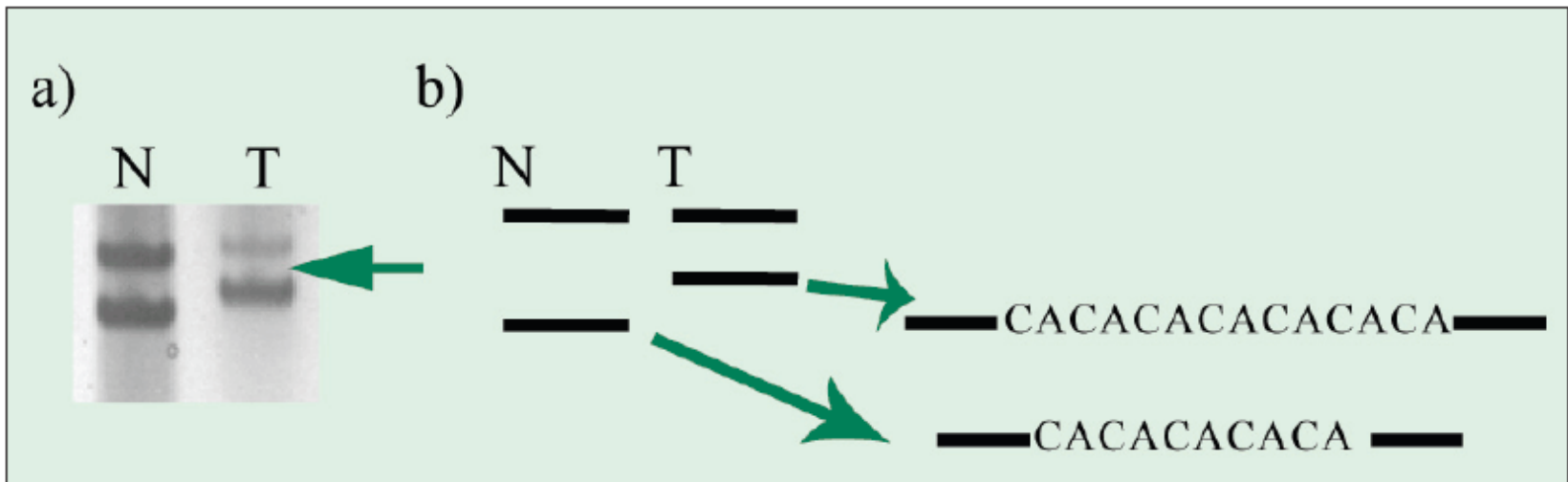
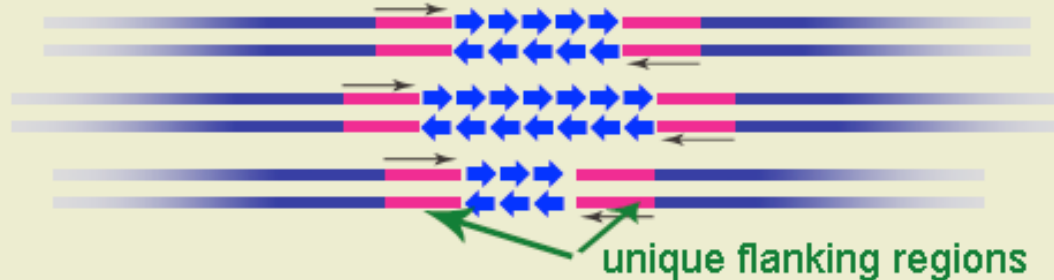


FIGURA 5.7 Muitos genes são duplicados e, por este motivo, o número de famílias de genes diferentes é muito menor que o número total de genes. O histograma compara o número total de genes com o número de famílias gênicas distintas.

Microssatélites em nosso DNA... o que são?

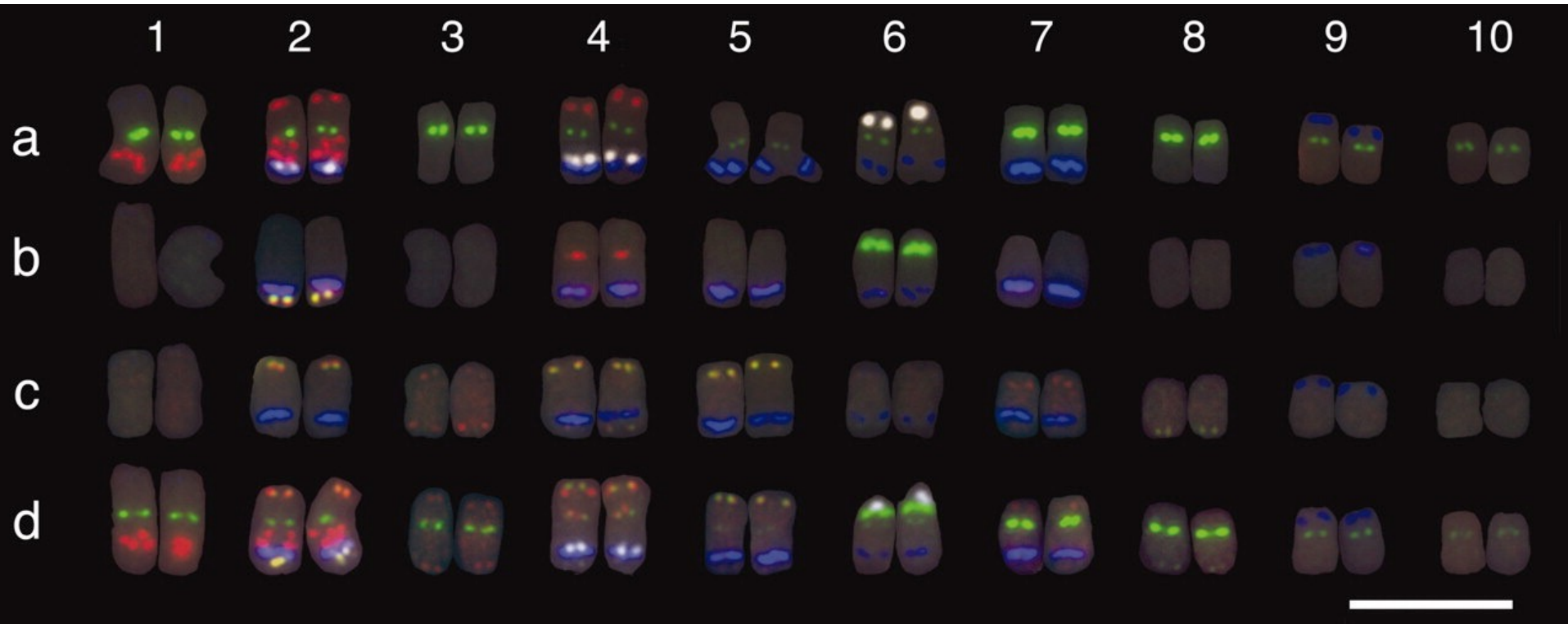


The number of SSRs is highly variable among individuals



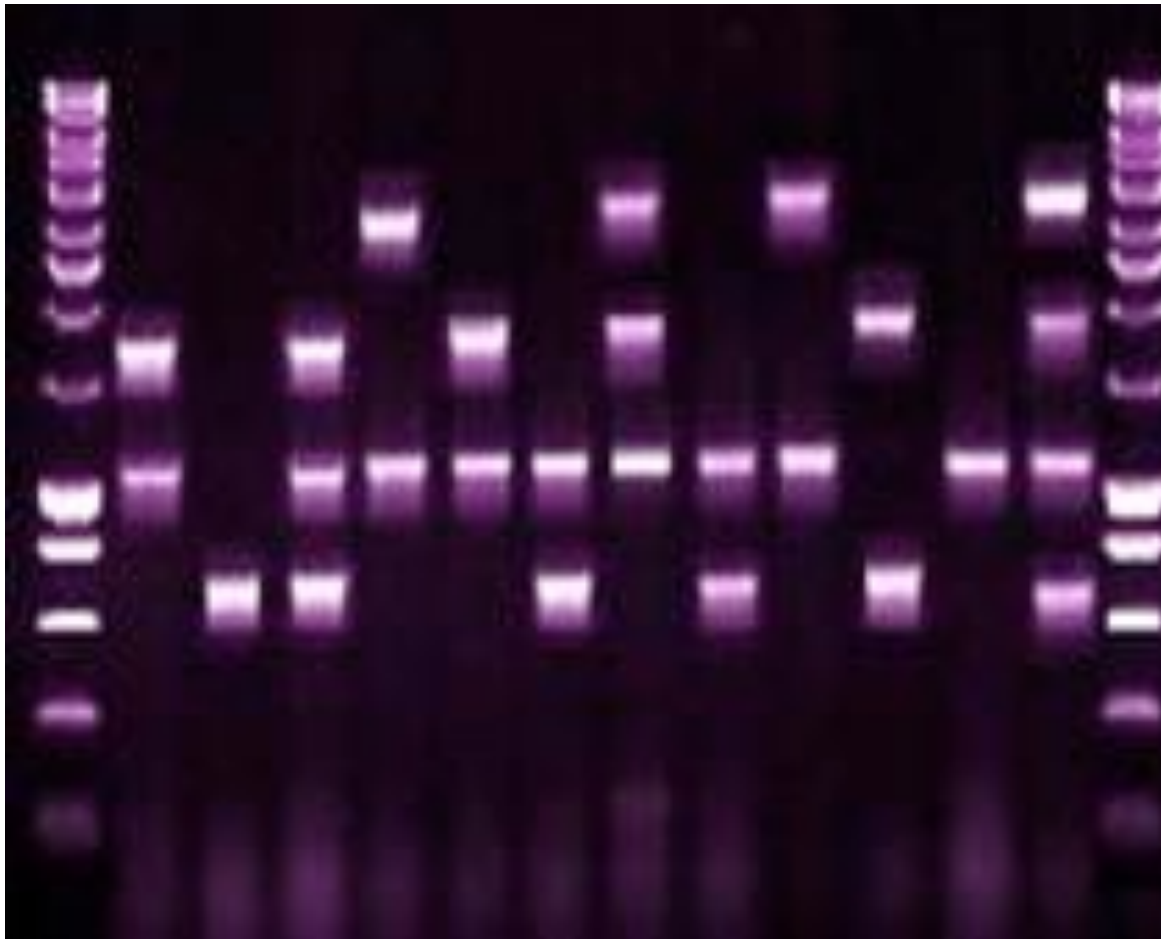
Por que essas sequencias pequenas (micro) têm tanta Variação? A DNA polimerase pode escorregar!!!!

Microssatélites em nosso DNA... E onde estão? (heterocromatina- telômeros, centrômeros, etc)

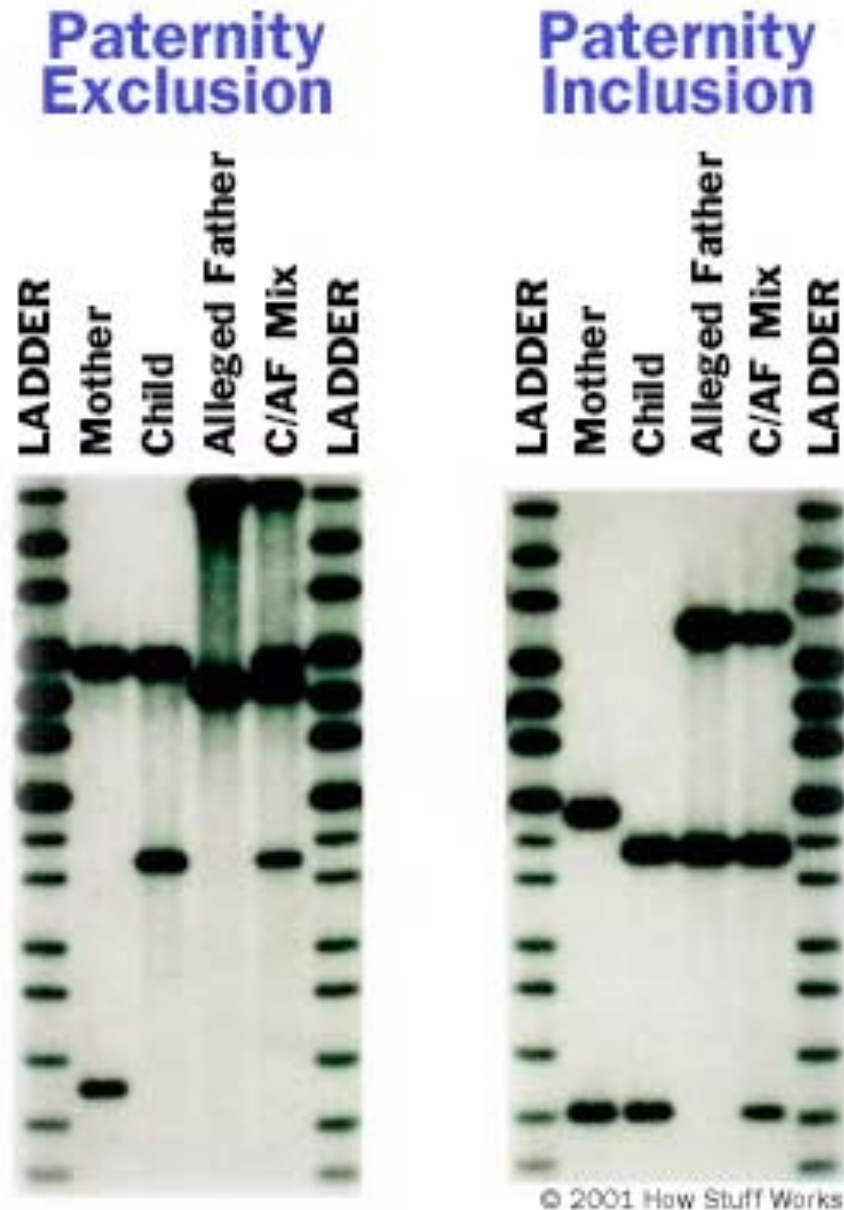


Microssatélites em nosso DNA... amplificação por PCR:

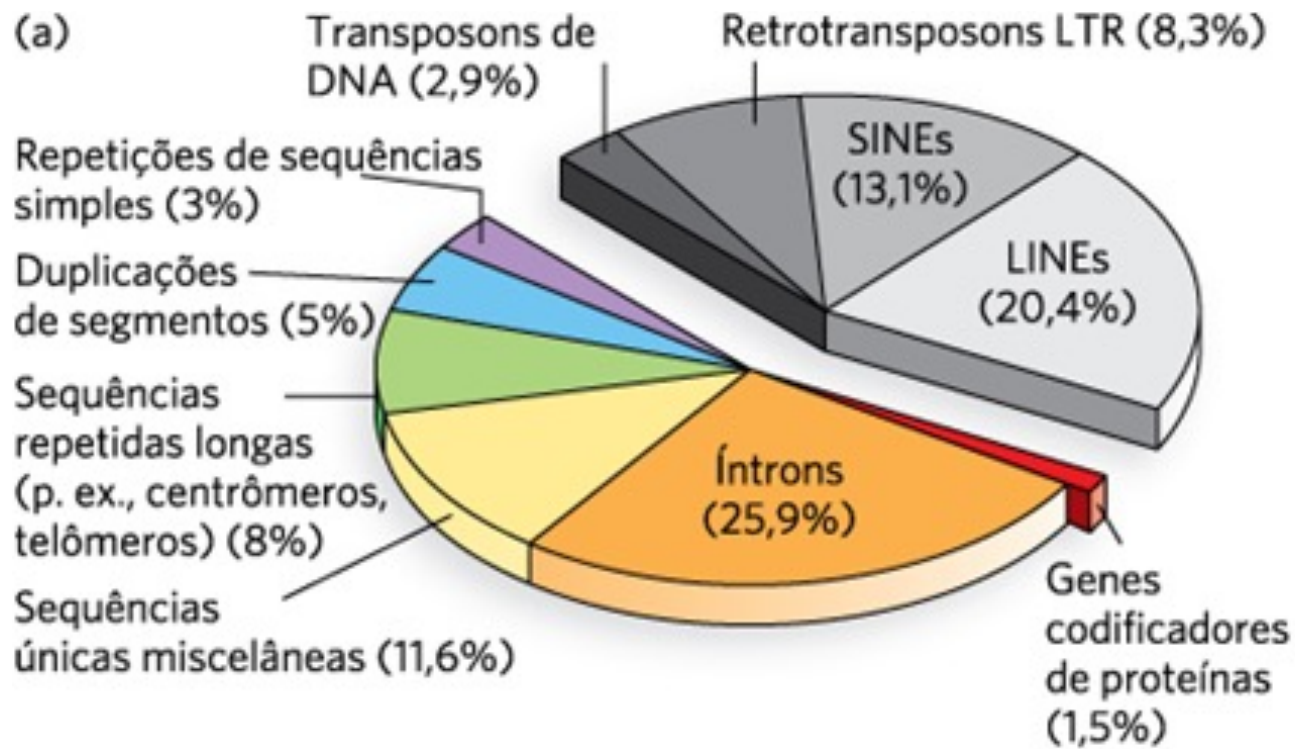
Cada indivíduo é diferente!!!! Fingerprinting!



Microsatélites em nosso DNA... uso em medicina forense:



Composição do genoma humano!



GENES EGOISTAS? PARASITAS? JUNK DNA (DNA tralha)?
Ou essas sequencias tem funções no genoma???

Mas nosso genoma é também composto de genes saltadores!

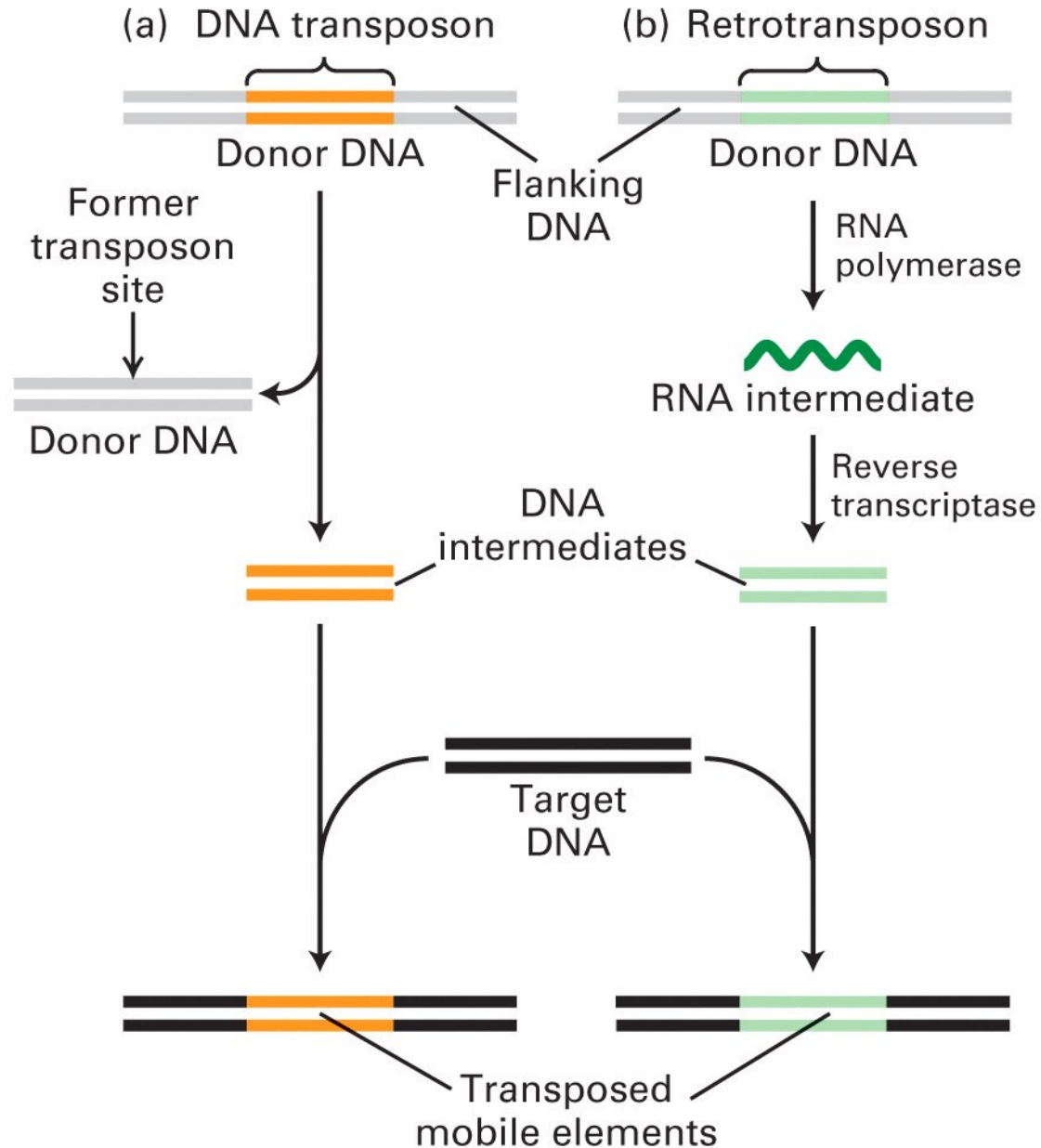


**Barbara McClintock
propôs que existem
elementos genéticos que
mudam sua posição no
genoma em 1944!
Prêmio Nobel em 1983!**

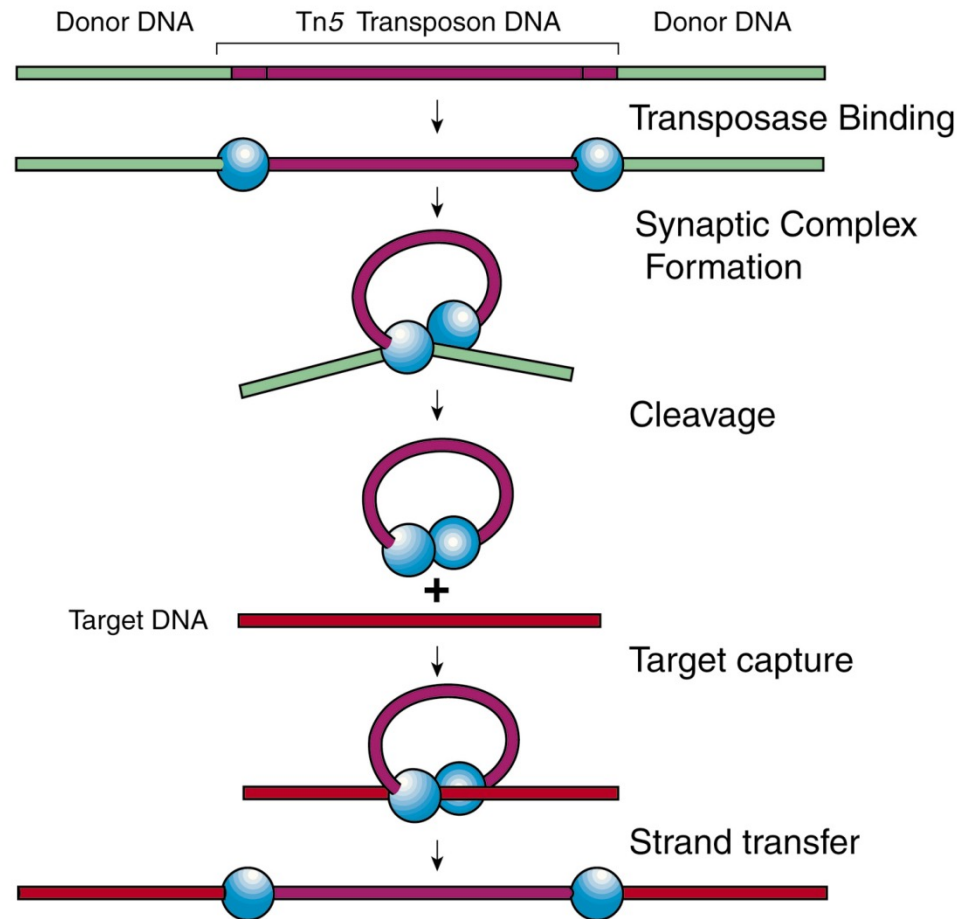


Ela chamou de elementos reguladores!

Os dois tipos de transposons:

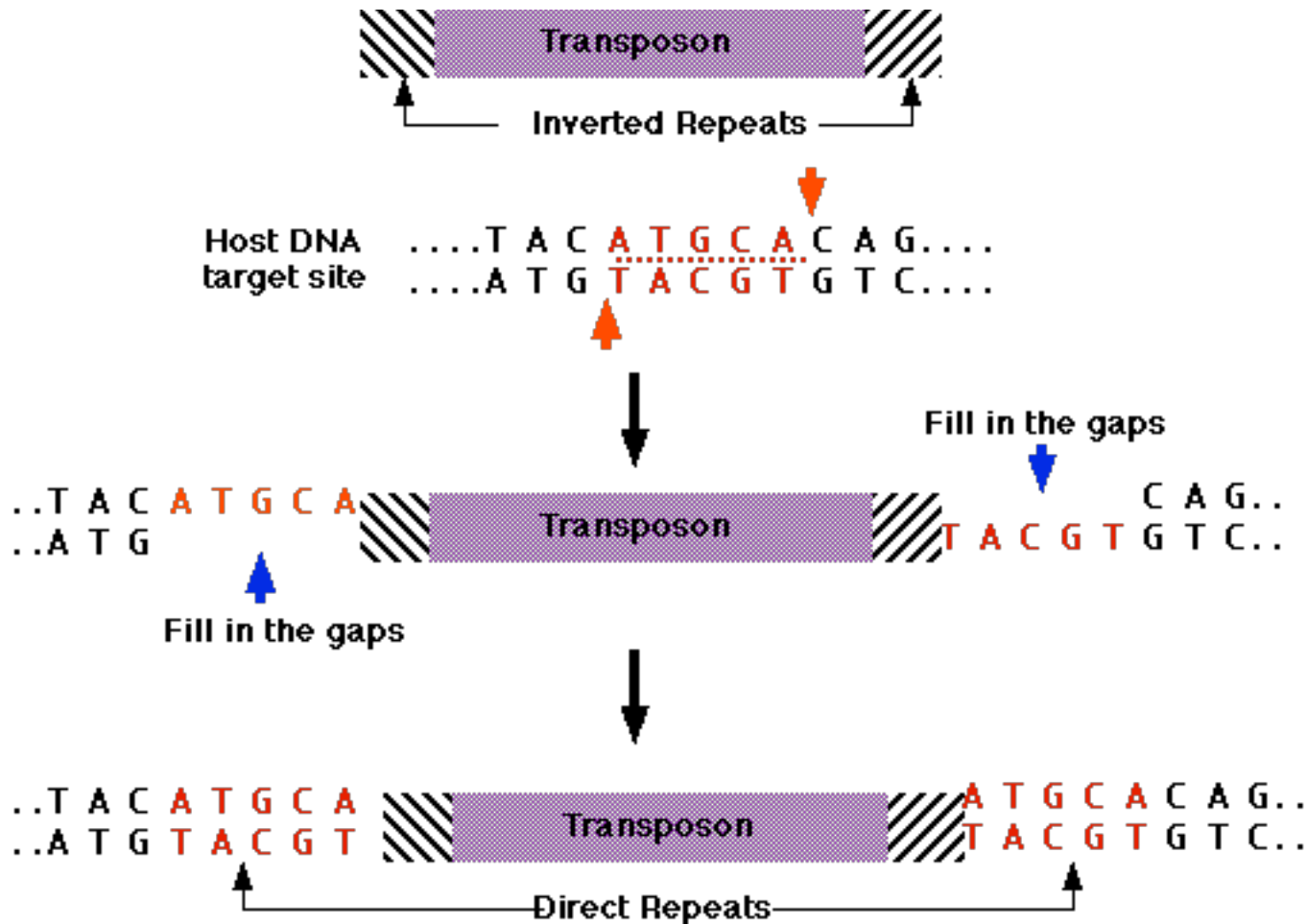


Os transposons podem ser de DNA.... (“cut and paste”)



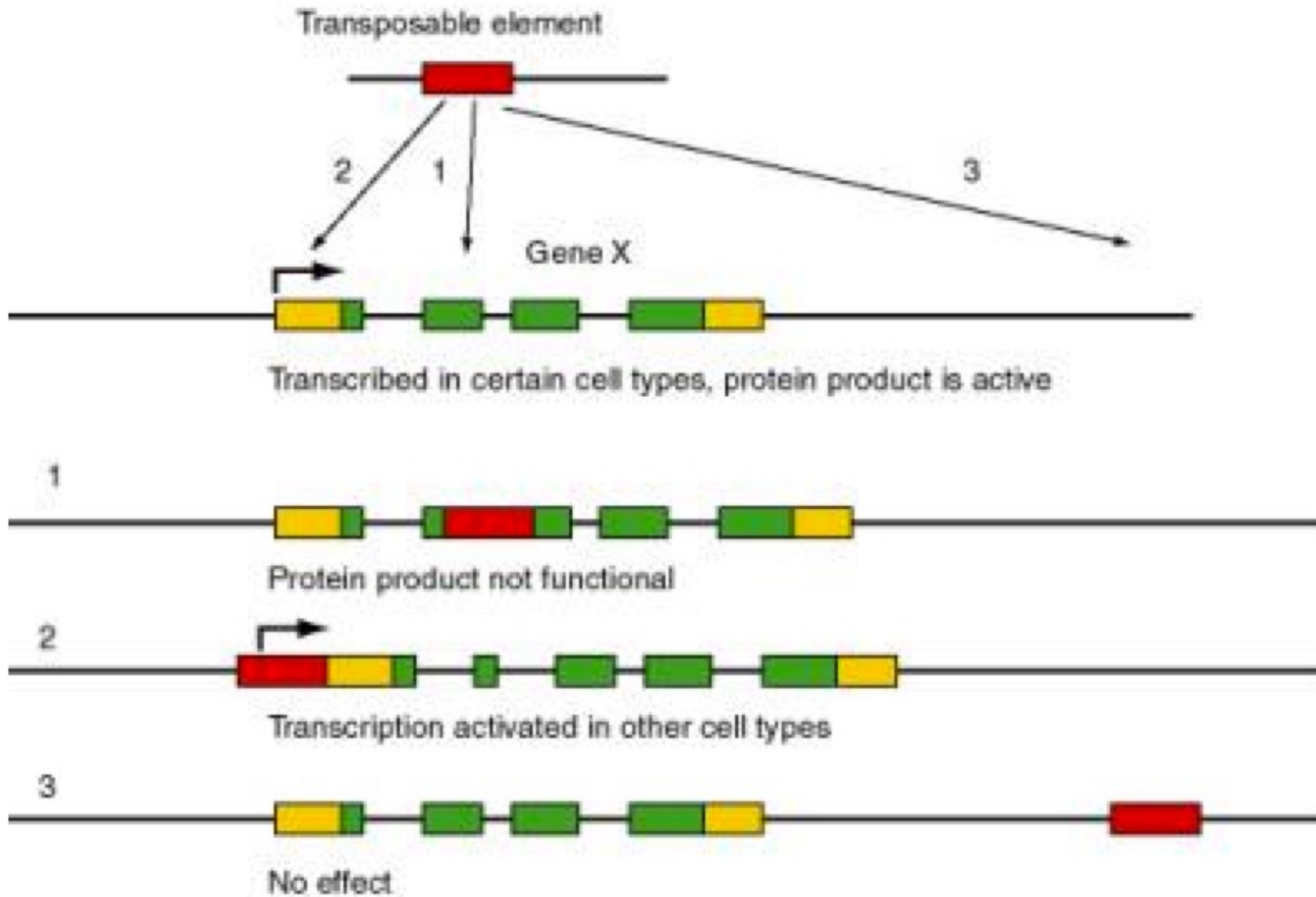
Por que em bactérias genes de resistência a antibióticos estão localizados em transposons???

Os transposons de DNA fazem pequenas duplicações ao entrarem no DNA celular.....

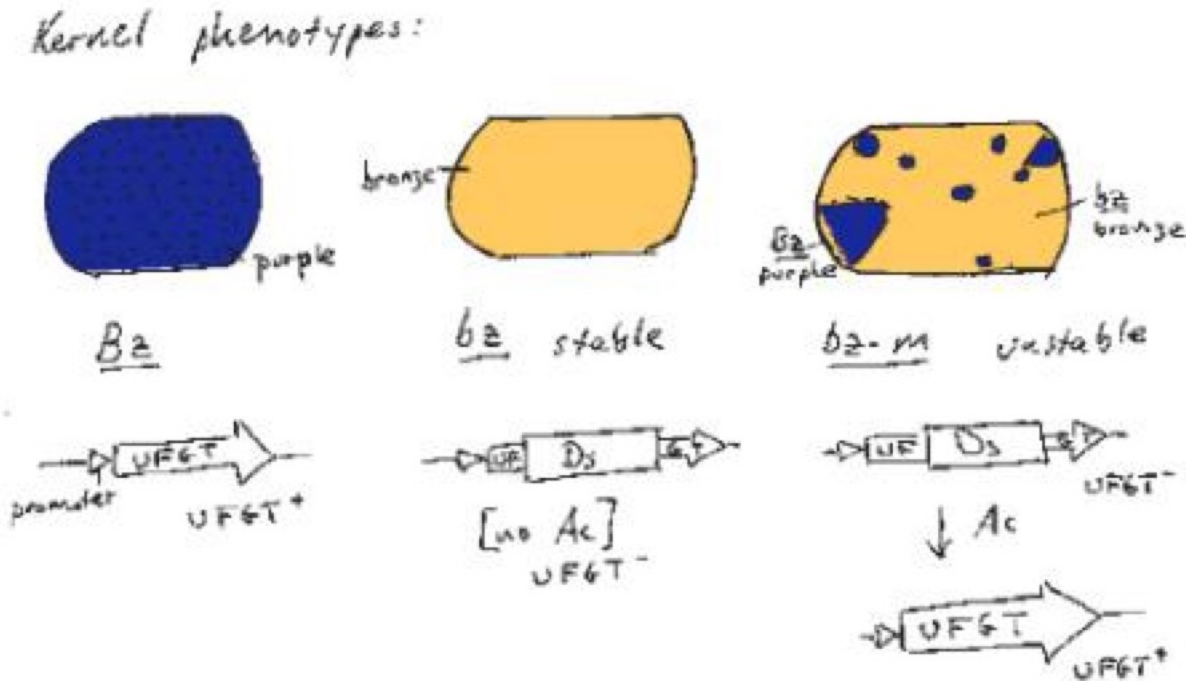


Ao sair o transposon deixa uma cicatriz !!!!
Que é justamente essa duplicação!

Transposons podem inativar genes ou mudar sua atividade.....



Também pode liberar um gene mutado, ao sair do gene.....



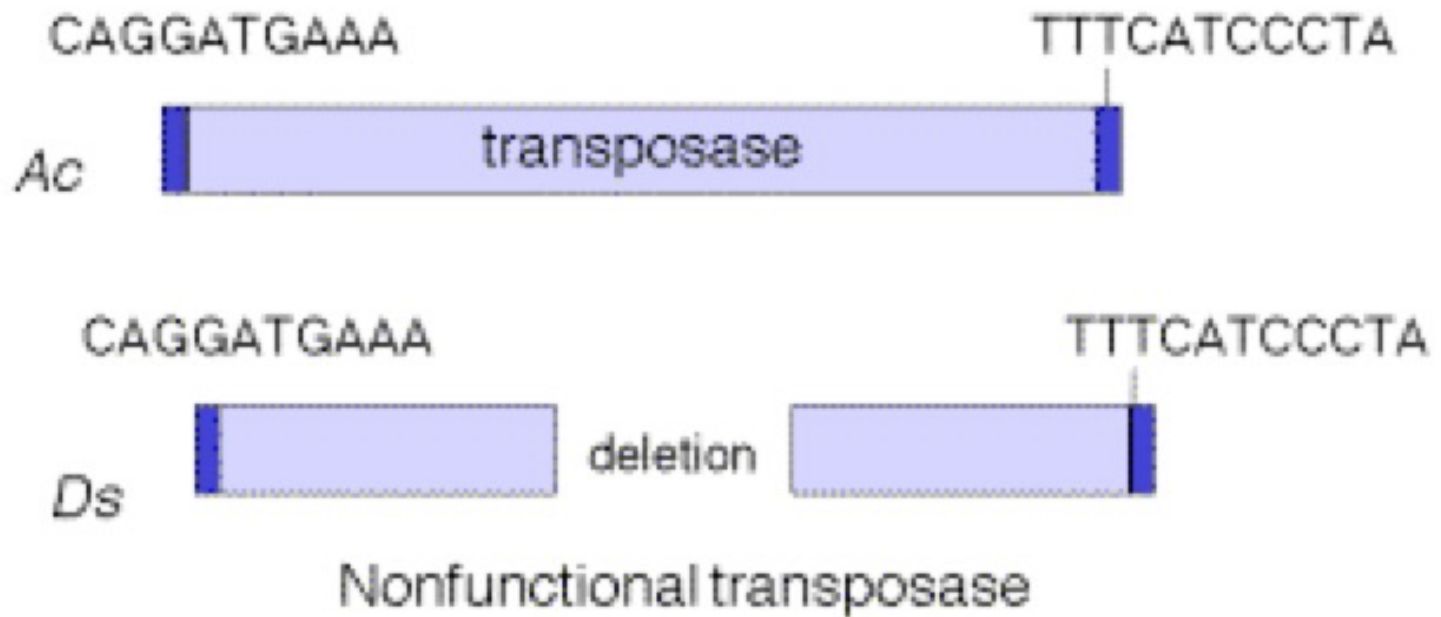
Flor com cores variegada pela ação de transposon..... Como?



Cães Merle

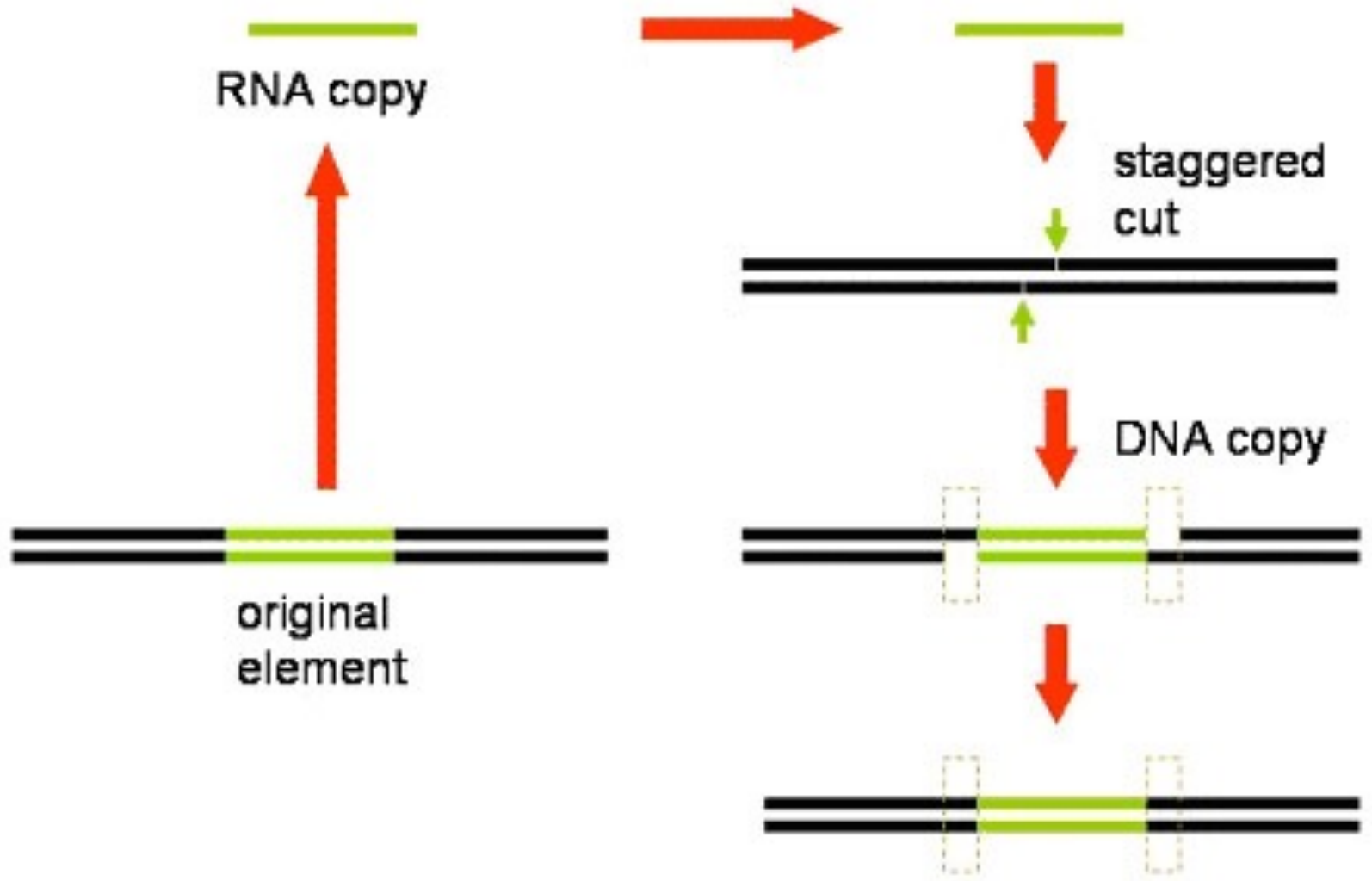


- Que faz a proteína transposase?.....
- Um transposon sem transposase pode transpor?



Ou de RNA - > retrotransposons.... “copy and paste”

How retrotransposons copy-and-paste

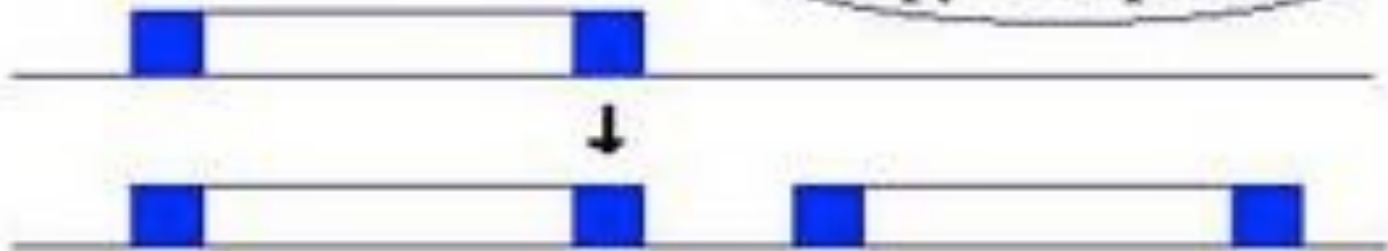


Diferença entre transposons de DNA ou retro

Two classes of transposable elements

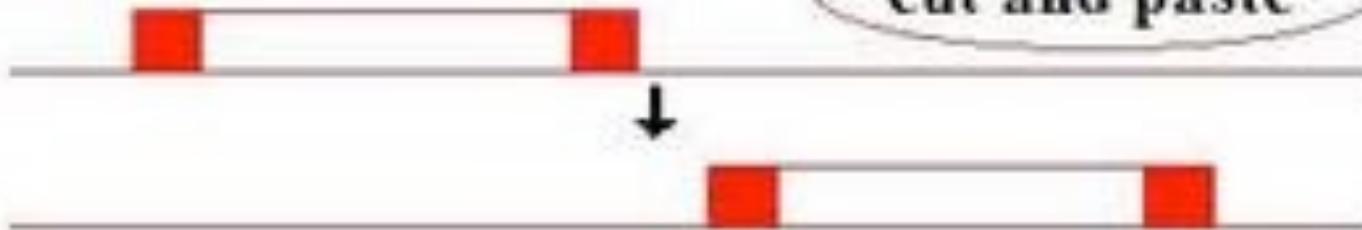
1. Retrotransposons

"copy and paste"

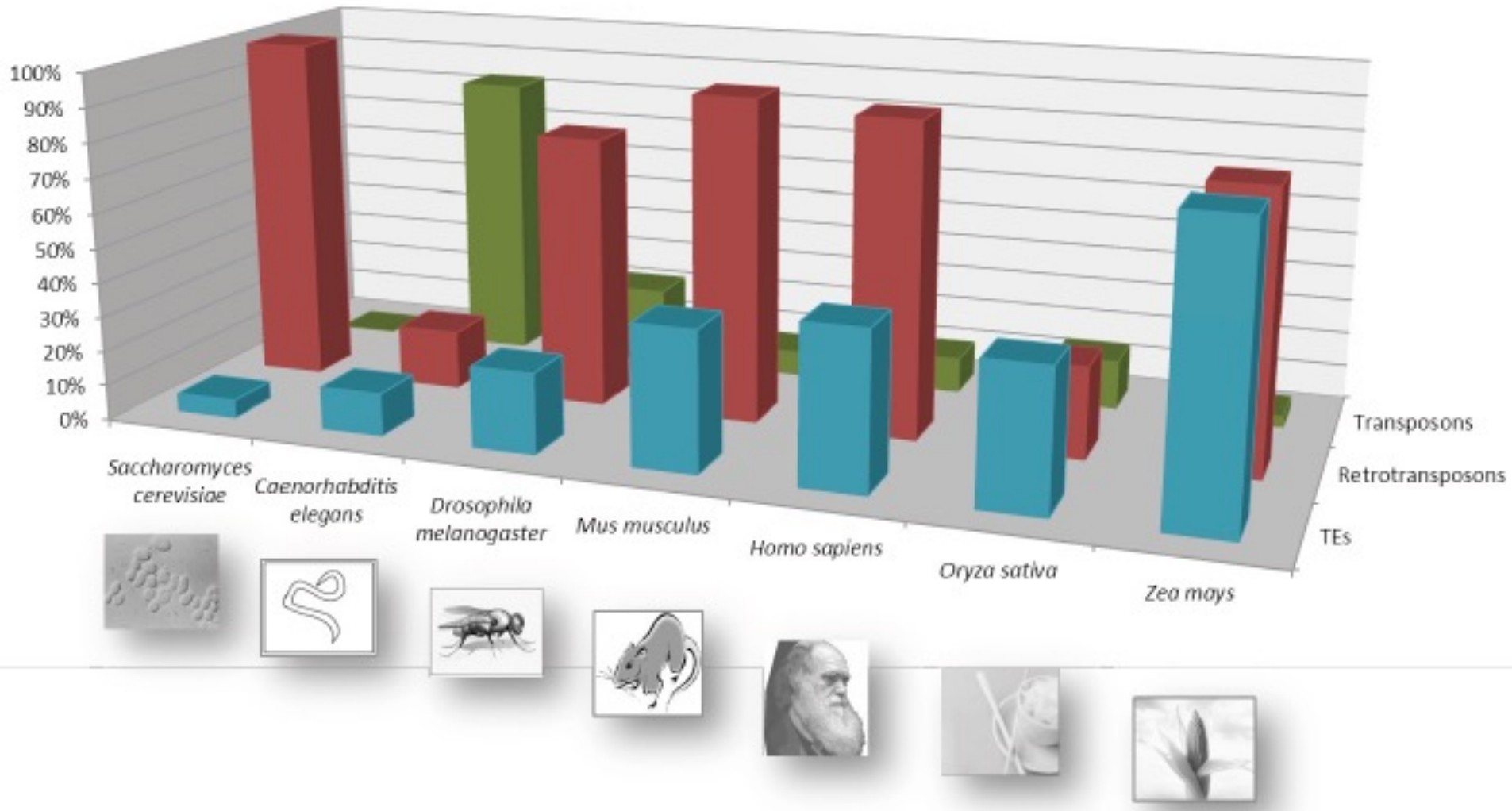


2. DNA transposons

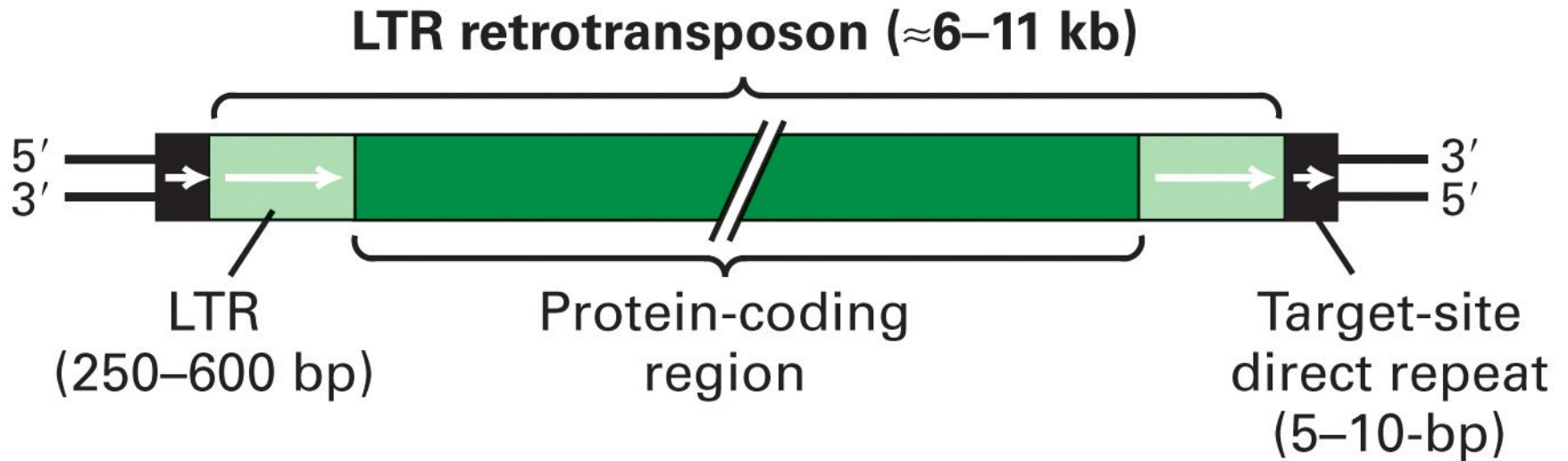
"cut and paste"



Grande parte de nosso genoma é composto por elementos Repetitivos: principalmente retrotransposons!

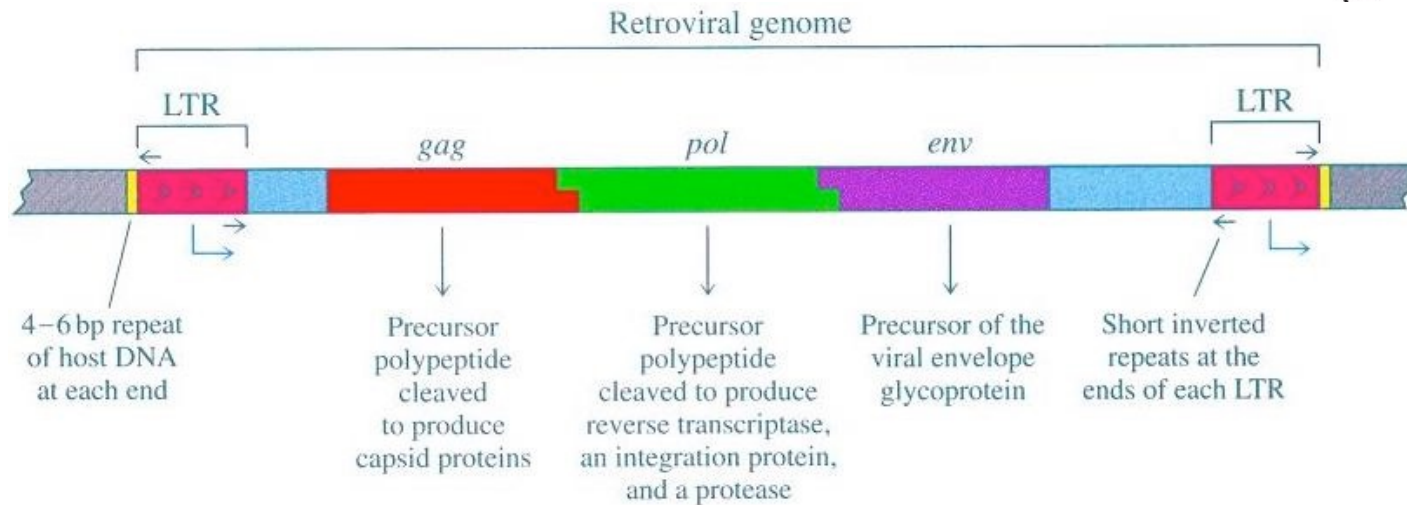
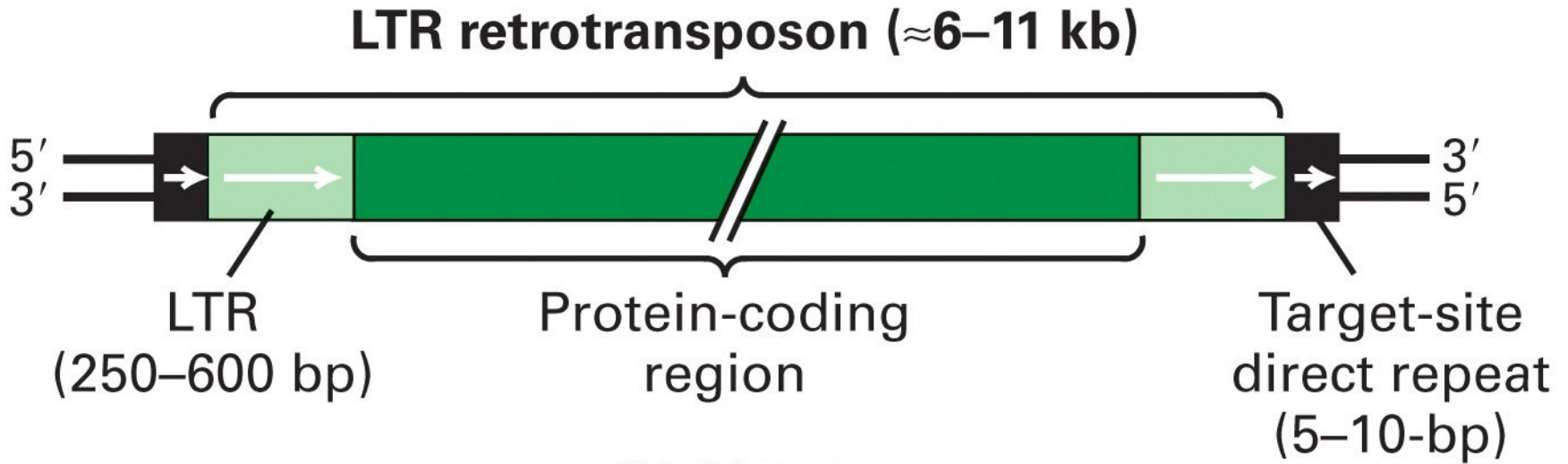


Alguns retrotransposons tem LTR (Long Terminal Repeats)

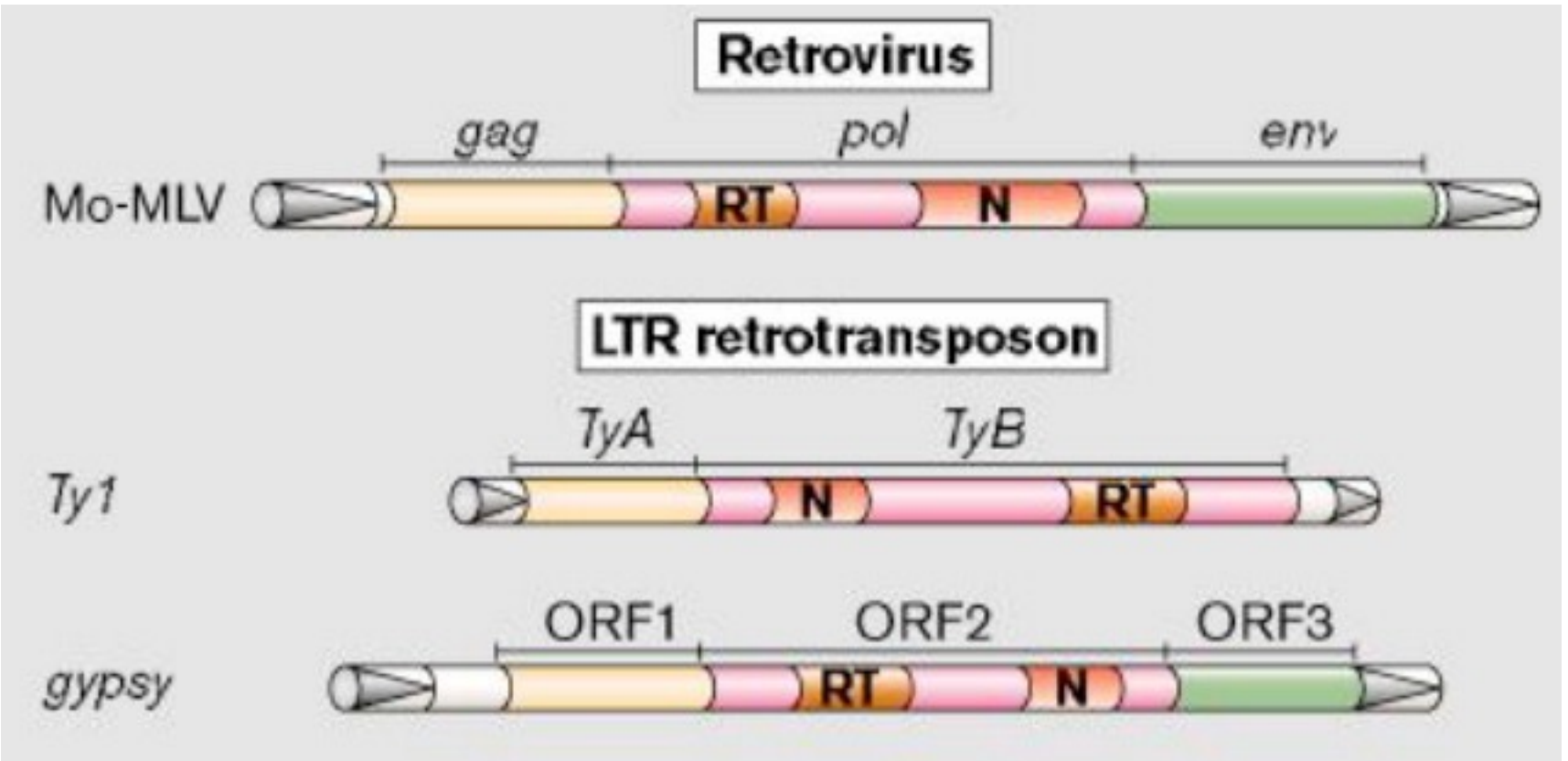


Qual a similaridade com retrovírus?

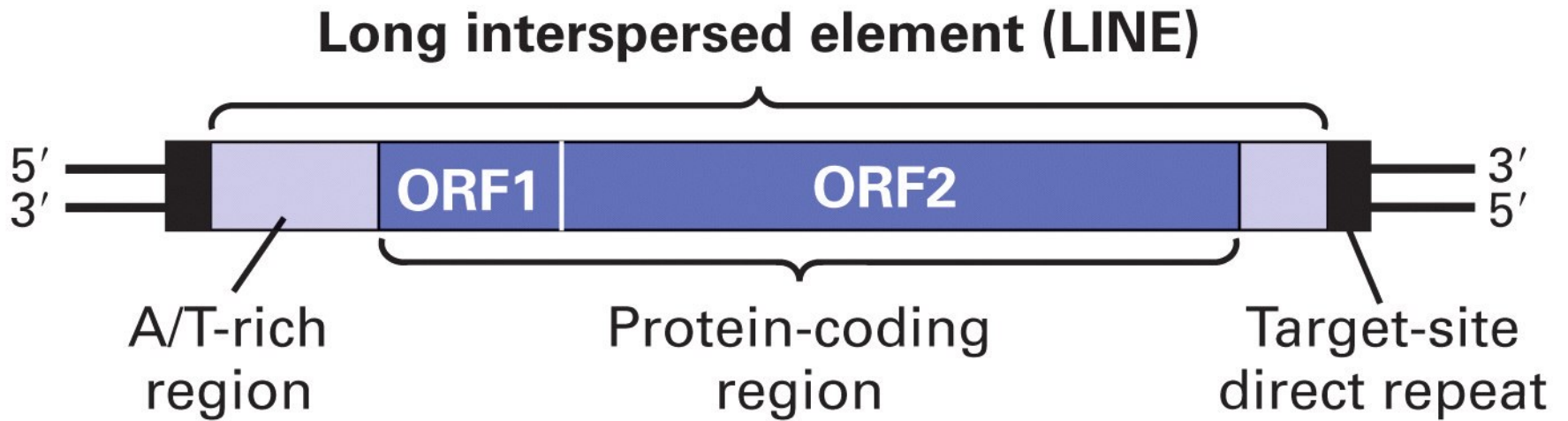
Muito similar a retrovírus!!!! São parentes?



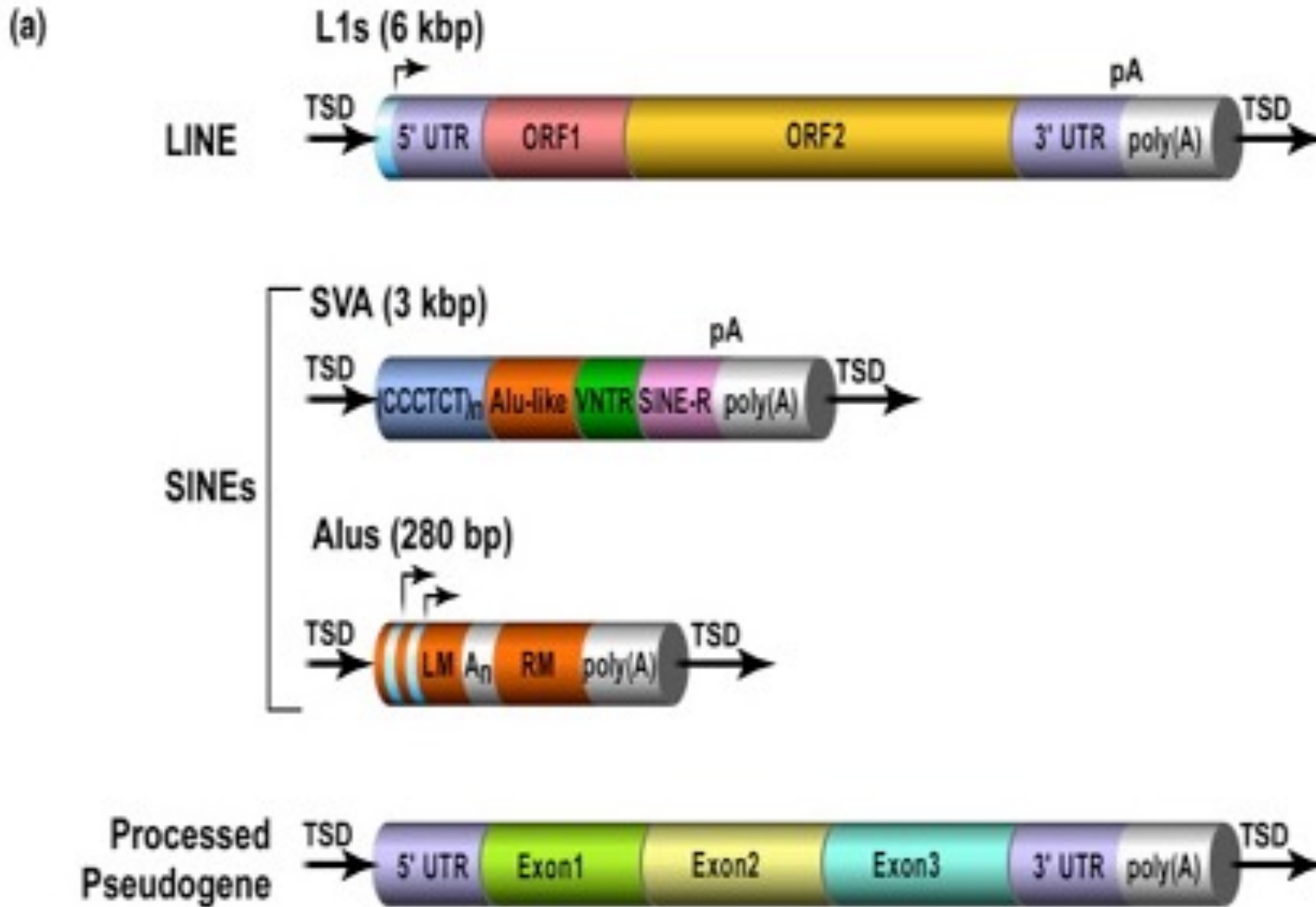
Exemples de retrotransposons LTR



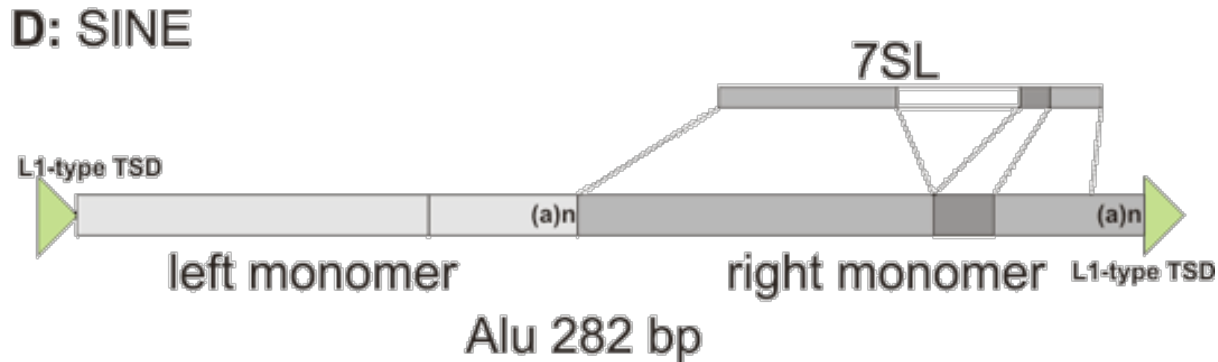
Retrotransposons podem ser Non-LTR!



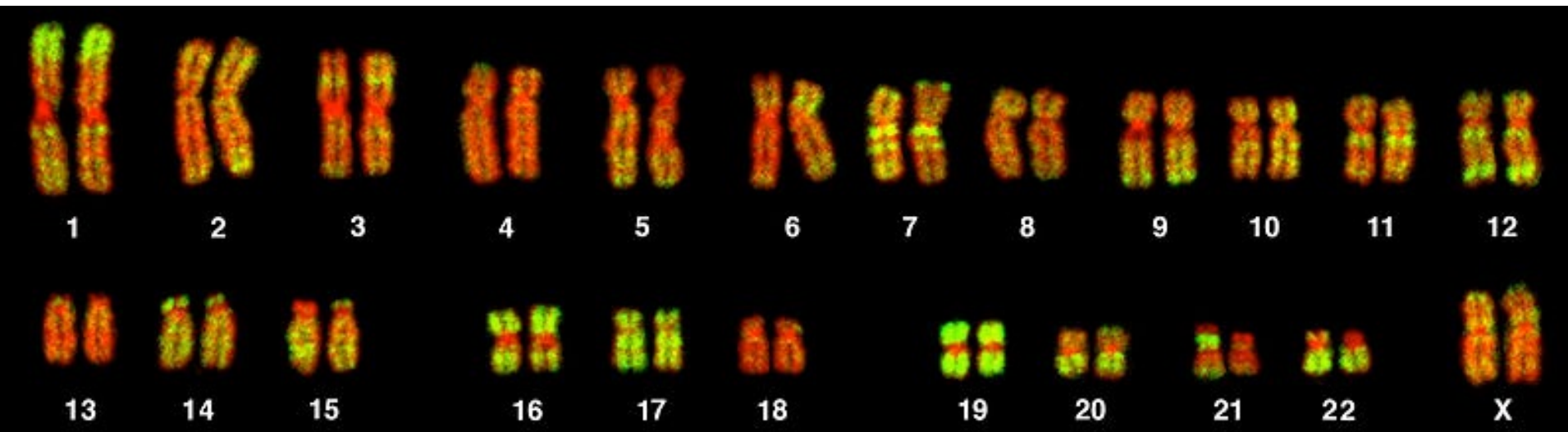
Esses non-LTR podem ser longos or curtos (SHORT)



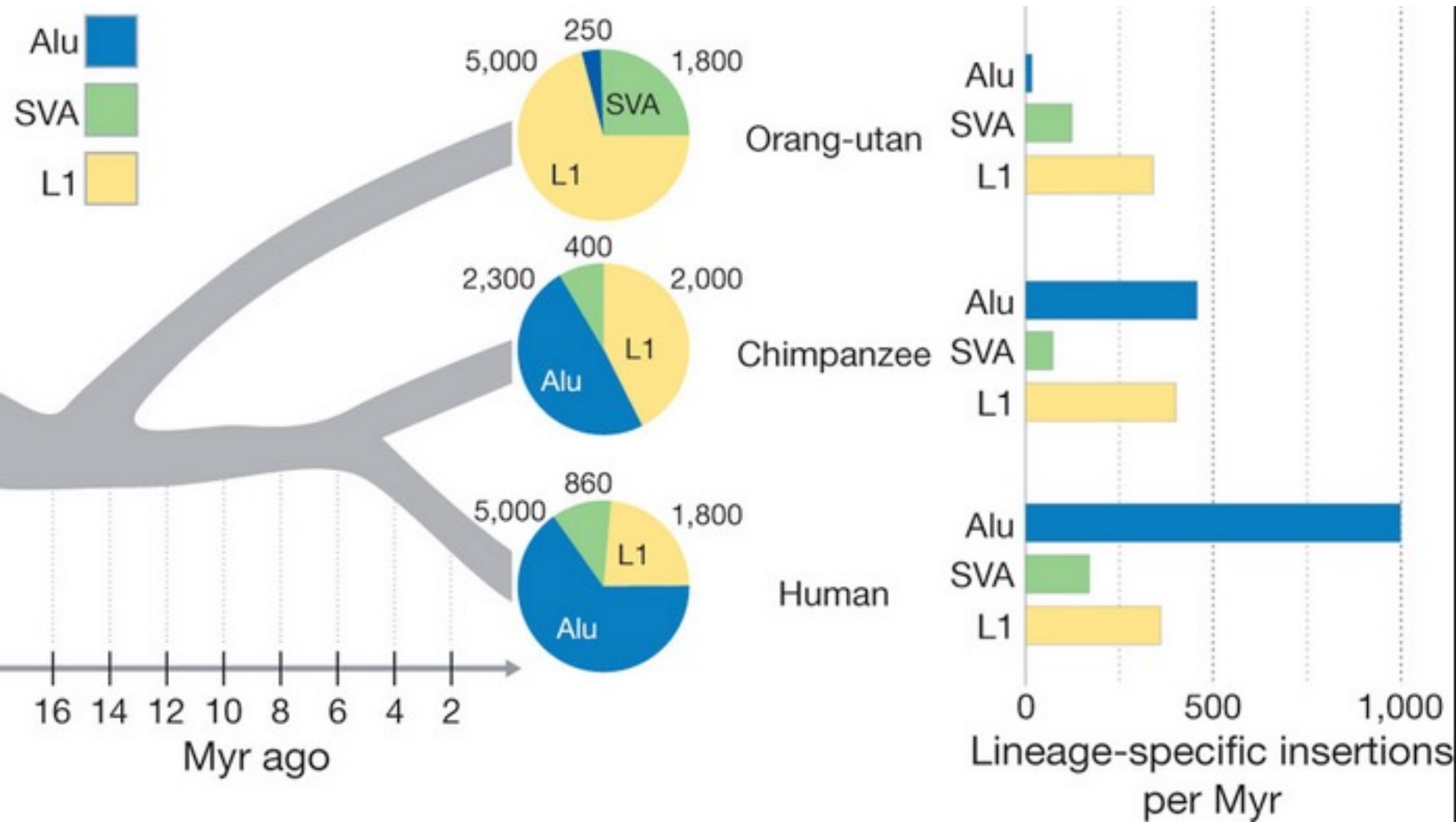
- **Elemento ALU- mais de um milhão de cópias no genoma humano**
- **10% de nosso genoma!!!!**
- **Porque esses SINES são chamados elementos ALU?**



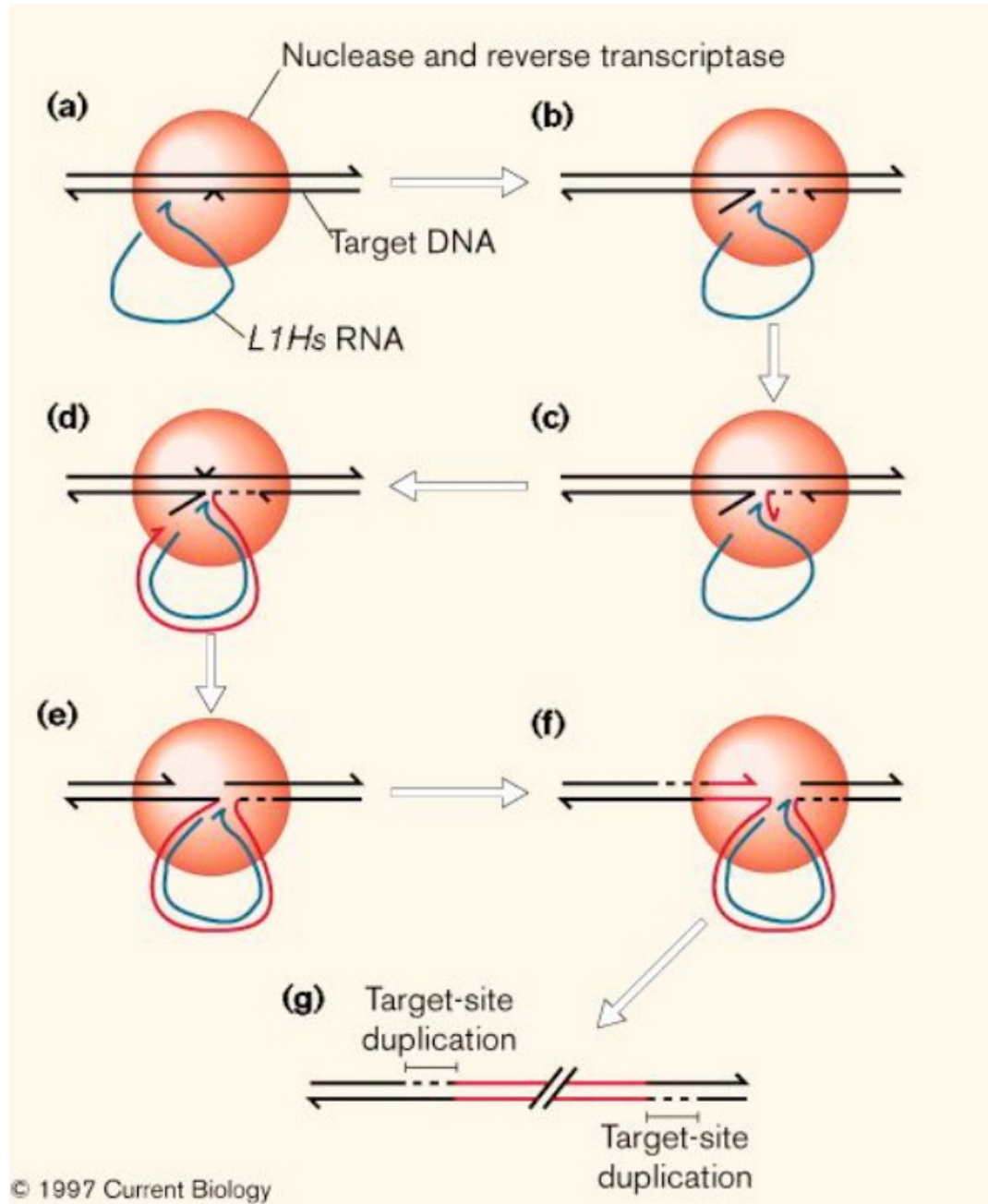
Similar ao RNA 7SL (transporte e secreção de proteínas)!



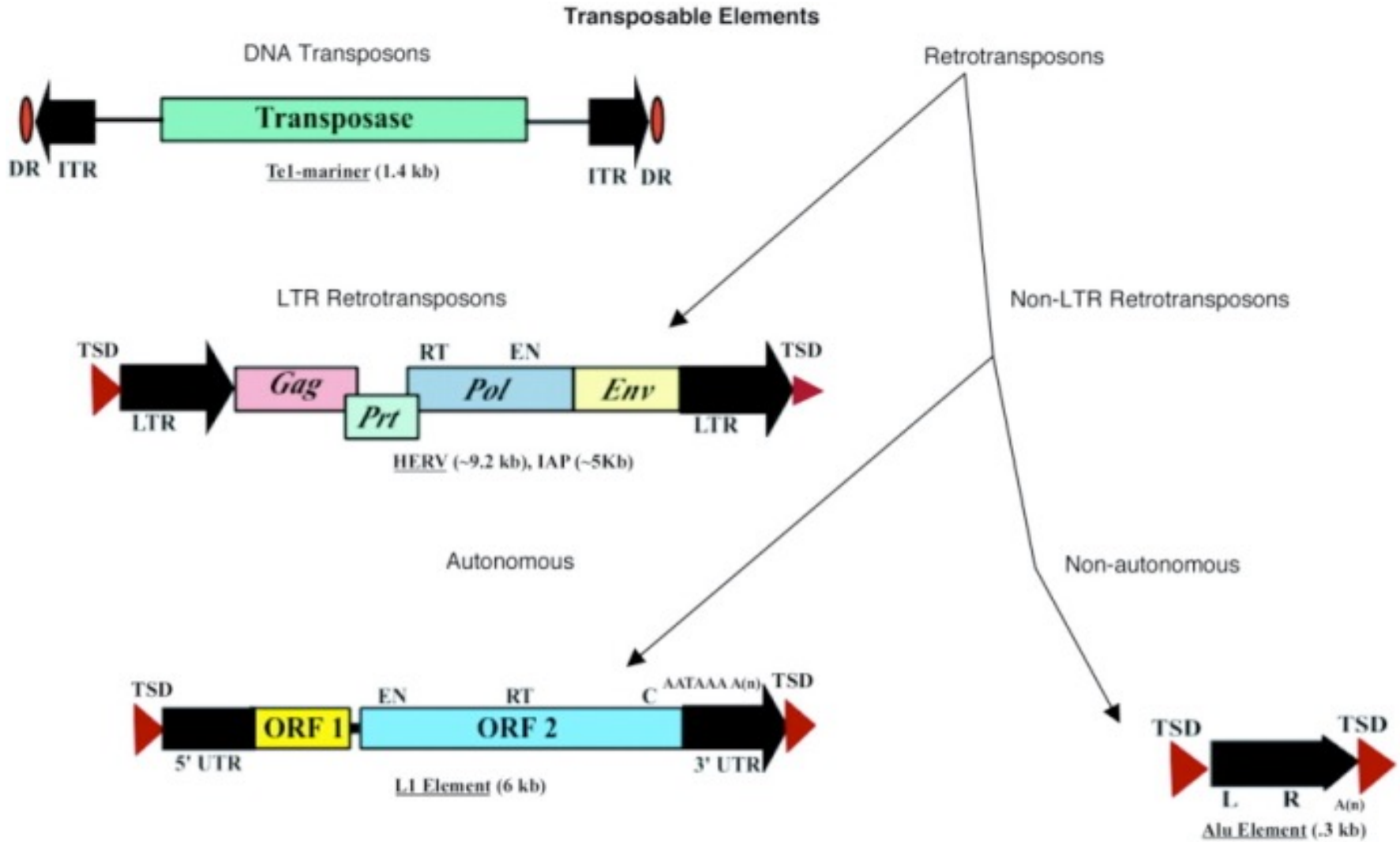
Evolução dos SINES –ALU nos primatas, Mas é mais presente no ser humano



E como os elementos non-LTR transpõem?



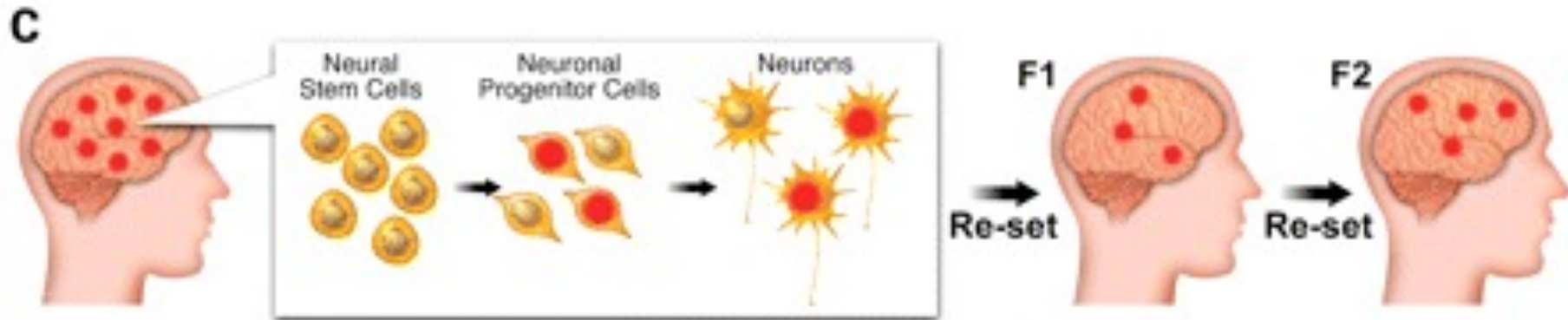
Classes de Transposons



Seriam eles o DNA egoista? O último parasita?

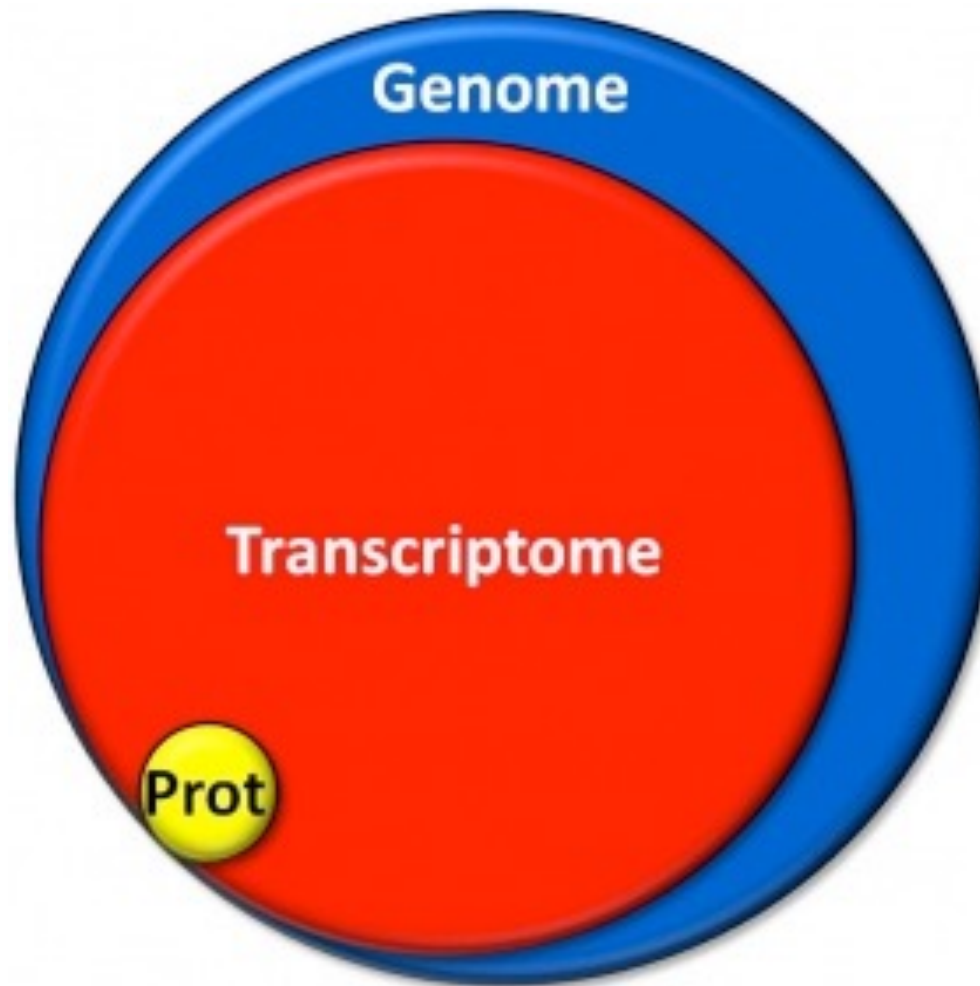
Line L1 retranspõe no desenvolvimento do cérebro!!

(Alysson Muotri- Univ. San Diego)



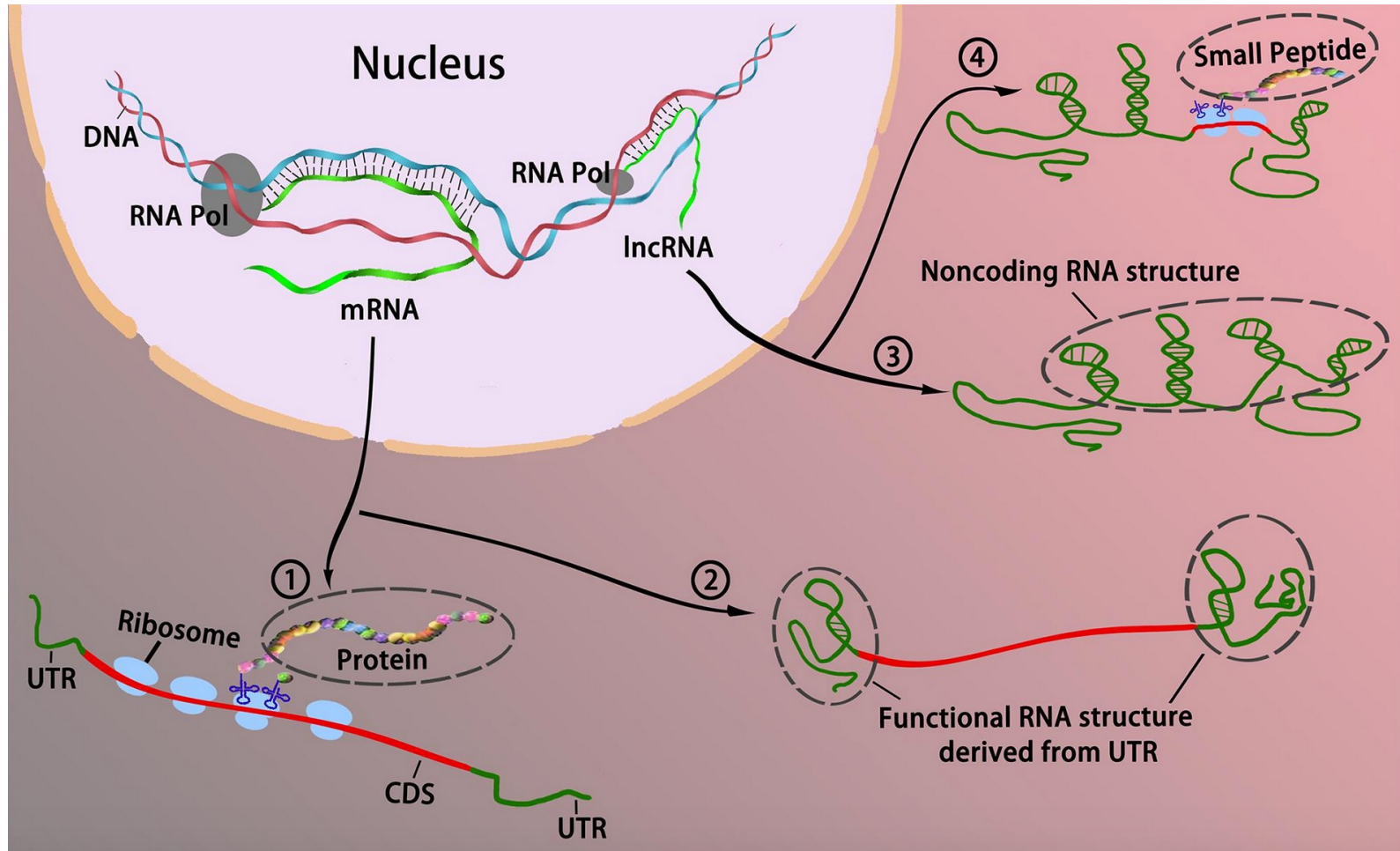
70% do genoma humano é transcrito!!!

Deve ser funcional!

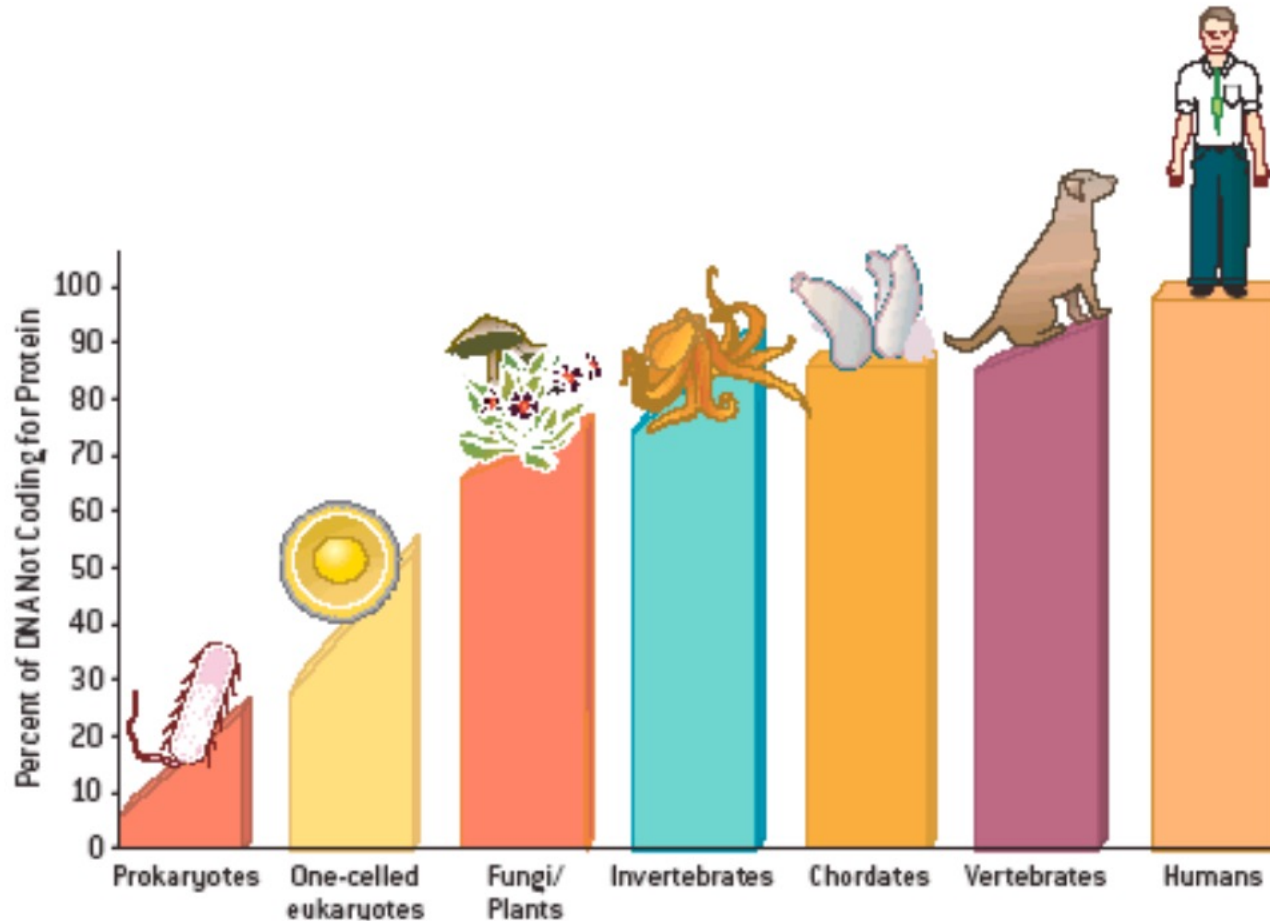


70% do genoma humano é transcrito!!!

Non-coding RNA!!!! Longos (lncRNA) e pequenos (miRNA)



The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity



Será que isso resolve o paradoxo do tamanho do genoma?

Mas qual a função dos ncRNA?

ENCODE: 80% do genoma é funcional!!



GOD... THE HUMAN GENOME CODE'S BEEN UNRAVELLED

DAMN HACKERS!!! NOW, I HAVE TO CHANGE THE PASSWORD

