

Evolução do Gene- SNPs e exon shuffling

Processamento de RNA

E RNA interferência

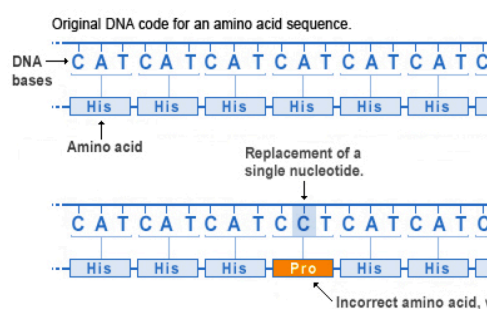
Para esta aula, parte pode ser encontrada nos Capítulo 6 do livro Molecular Biology of the Cell, Alberts et al, <https://archive.org/details/MolecularBiologyOfTheCell5th/page/n23/mode/2up>

Exon shuffling page 257 chapter 4

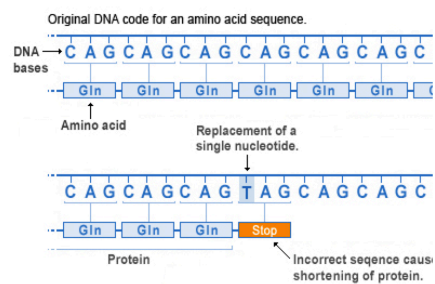
siRNA e RNA editing pages 480-499- chapter 7

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?

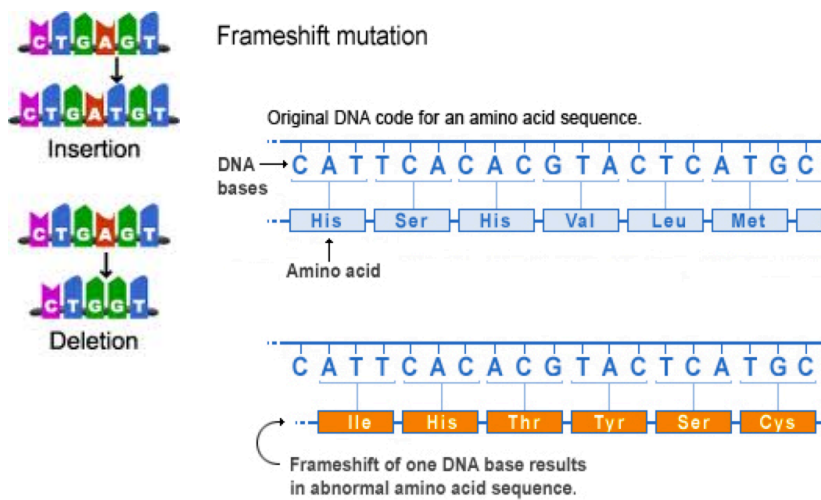
E o que pode ocorrer se a mutação estiver no terceiro Nucleotídeo de um códon?

Código genético é universal e degenerado.

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

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 AGTAGGGTAAGT 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 AGTAGGGTAAGT TAC TGCGAGCTTTT GTT CCTACGAGGTAA 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 AGTAGGGTAAGT 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 AGTAGGGTAAGT TAC CATGCGAGCTTT TAG TTC CTA CGA GGT AAGTCC TCA TAG GGAGGT AAGTCC CTA G
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr His Ala Ser Phe Parada

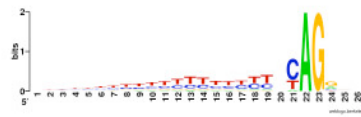
+2 Inserção (+CG) ATG TCC AGTAGGGTAAGT TAC CGATGCGAGCTTT TTA GTT CCTACGAGG TAA GTC CTC ATA GGGAGGTAA GTC CCT AG
Met Ser Ser Arg Pro Val Tyr Arg Cys Glu Leu Leu Val Pro Thr Arg Parada

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

Sinais conservados nos introns:

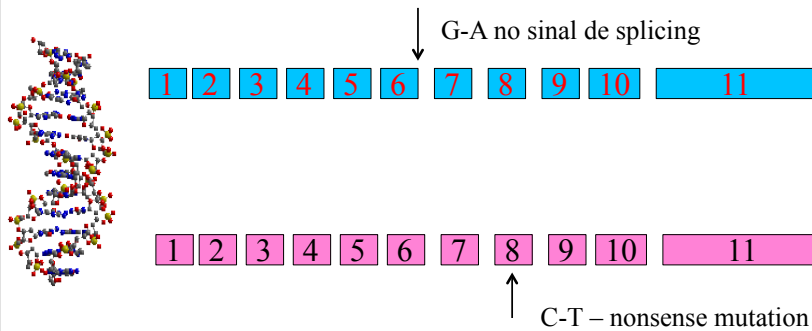
A 3' do exon

a 5' do exon

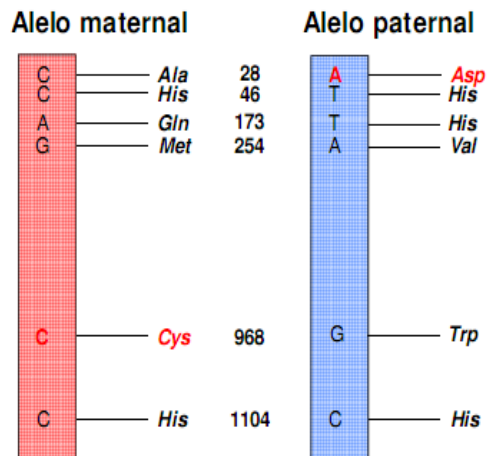


E por que os introns são menos conservados?

**Em uma população de Goiás encontramos duas
Mutações germinativas no gene XPV!!
(esses indivíduos têm uma doença genética- Não podem tomar Sol!)
XERODERMA PIGMENTOSUM**



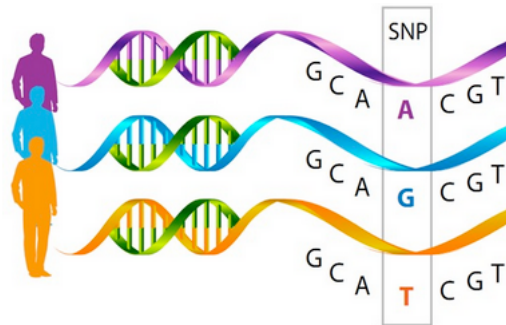
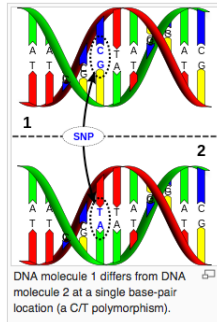
Qual o efeito de mutações no sinal de splicing?



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

Mutações aumentam a variabilidade genética:

Single nucleotide polymorphism (SNP)-



Diferença entre dois indivíduos:

São cerca de 3 milhões no genoma!!!!

(qual o tamanho de nosso genoma?)

20-30.000 em um exoma... (o que é exoma?)

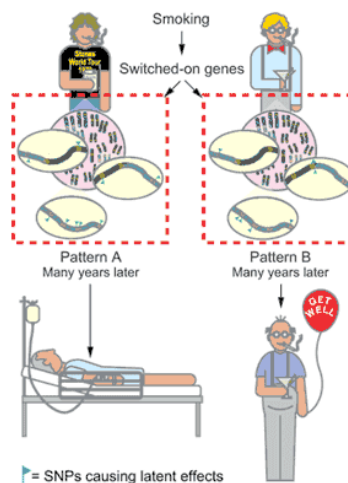
(em um exoma brasileiro encontramos 3000 novos- não descritos!).

SNPs... o que eles podem nos dizer?

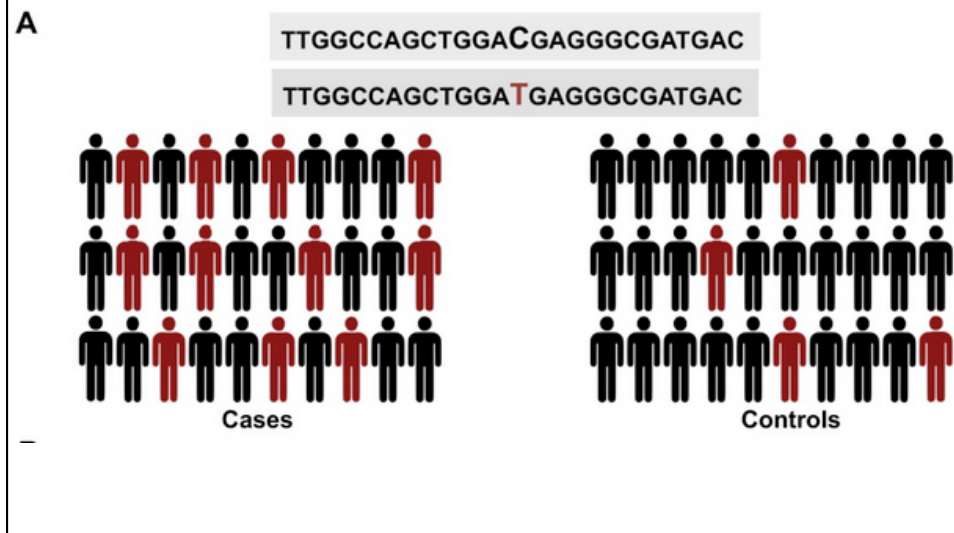
Representam nossa diversidade?

Nossas diferentes respostas em doenças???

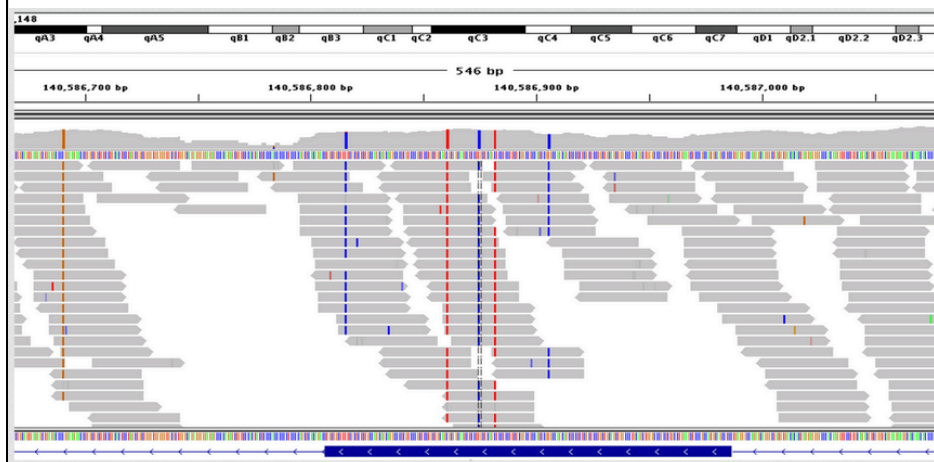
Genetic Variations: Latent Effects



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



Detectando SNPs por NGS:

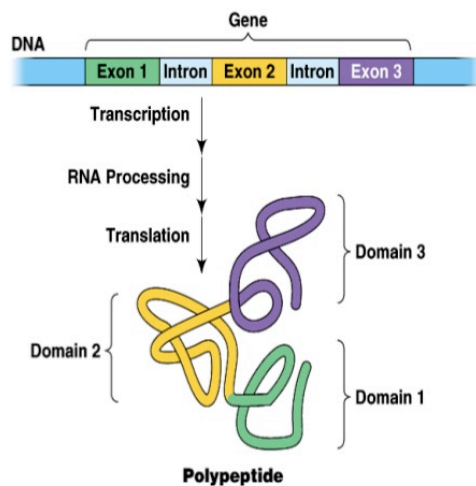


Construindo novas proteínas
durante a evolução por

EXON SHUFFLING

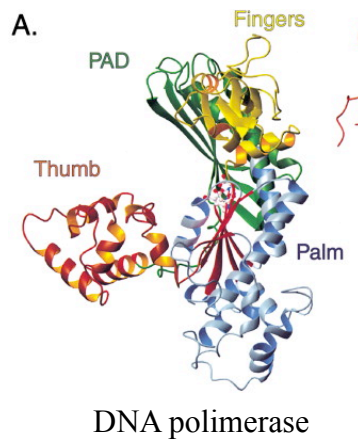
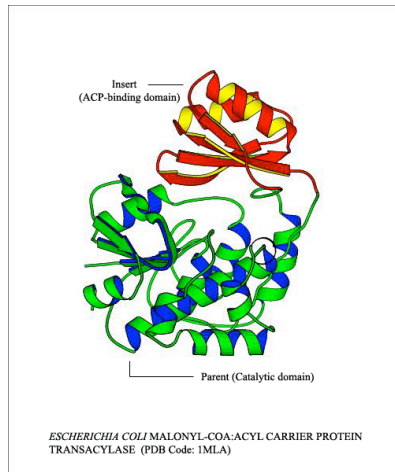
(embaralhamento de exons)

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

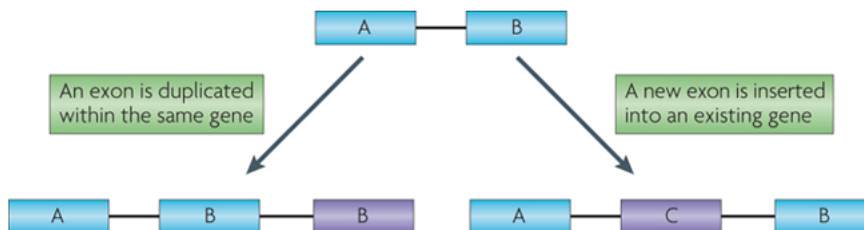


Mas as proteínas são feitas de pedaços (domínios) e em
geral codificadas por exons independentes!!!!
O Que isso significa em termos de evolução e criação de
novos genes?

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

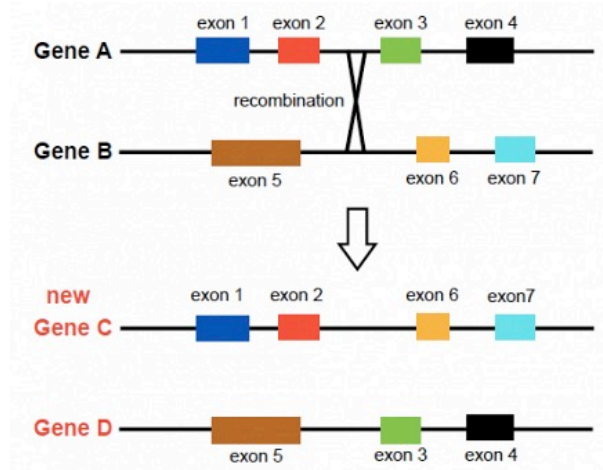


Esses domínios podem ser codificados por exons!!

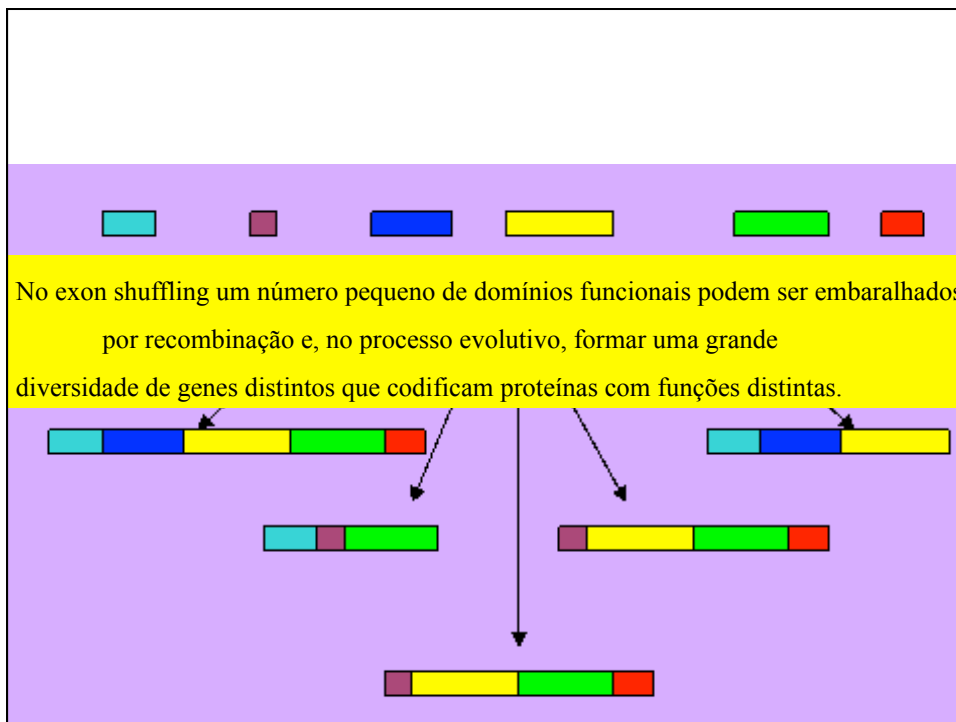


Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!



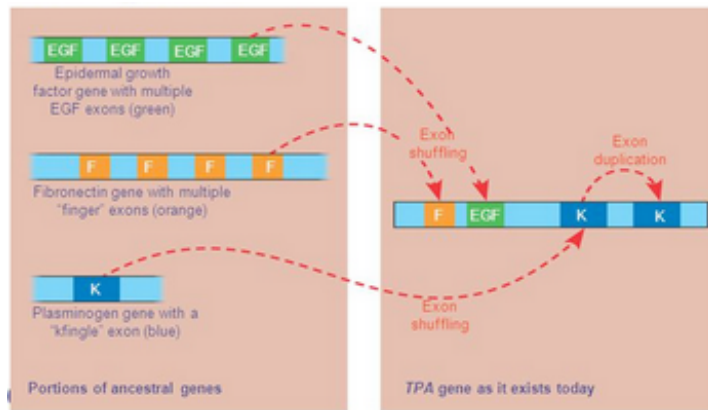


Os exons podem ser embaralhados (exon shuffling) e produzir novas proteínas!!!

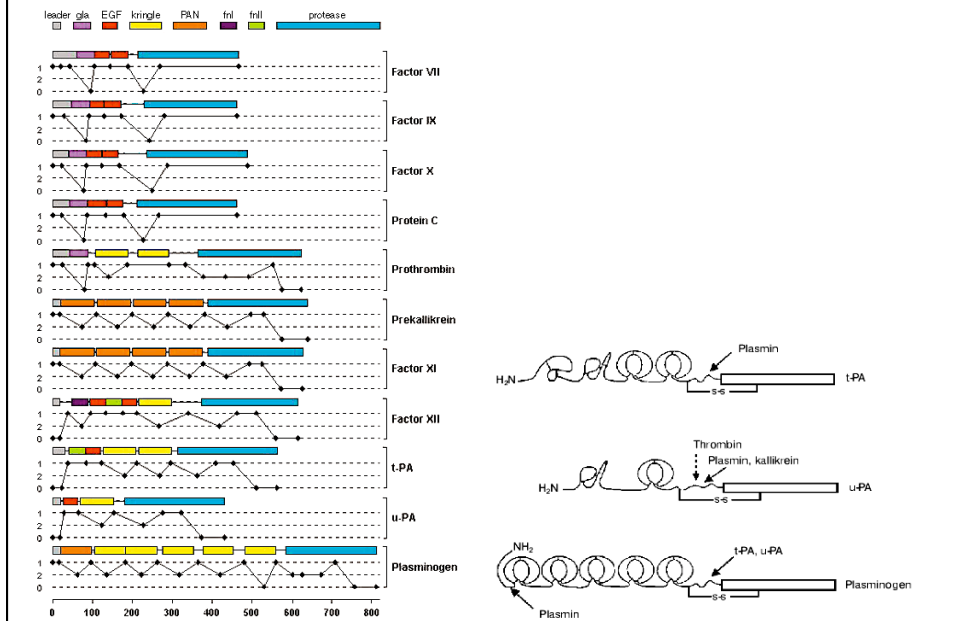


No exon shuffling um número pequeno de domínios funcionais podem ser embaralhados por recombinação e, no processo evolutivo, formar uma grande diversidade de genes distintos que codificam proteínas com funções distintas.

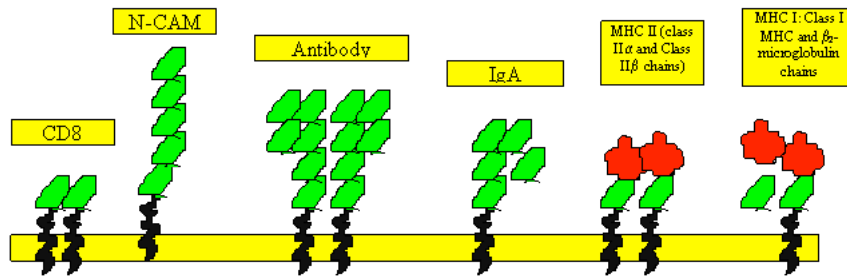
Assim, os domínios proteicos podem funcionar como peças de LEGO e montar proteínas diferentes através de recombinações nos introns!!!!



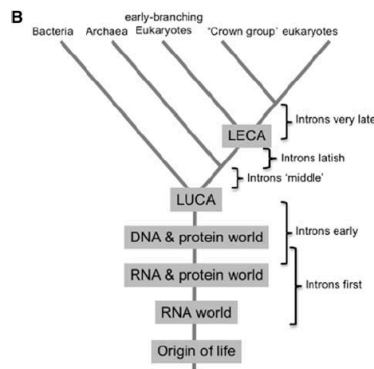
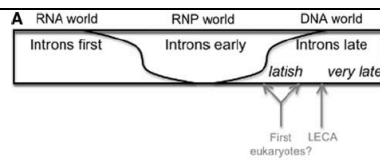
Domínios na montagem de proteínas: exemplos:



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



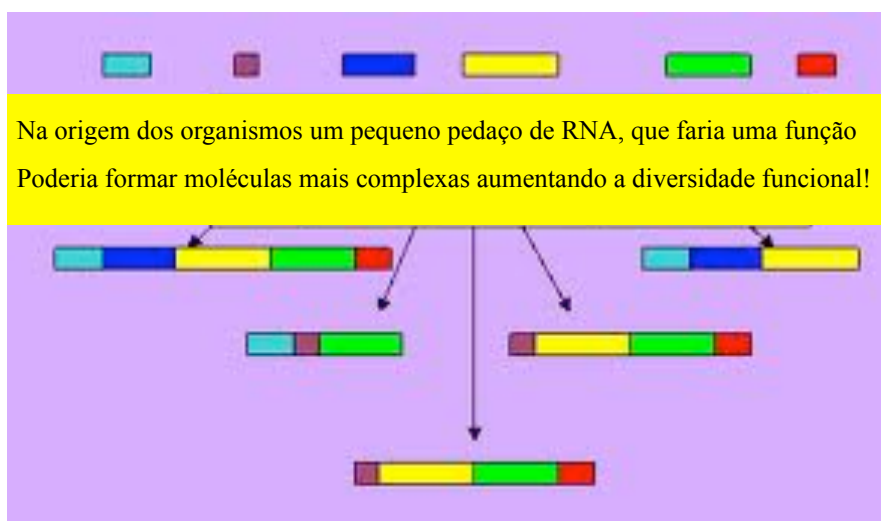
<https://www.youtube.com/watch?v=Hy3RmzwYgaE>



**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!!!!**

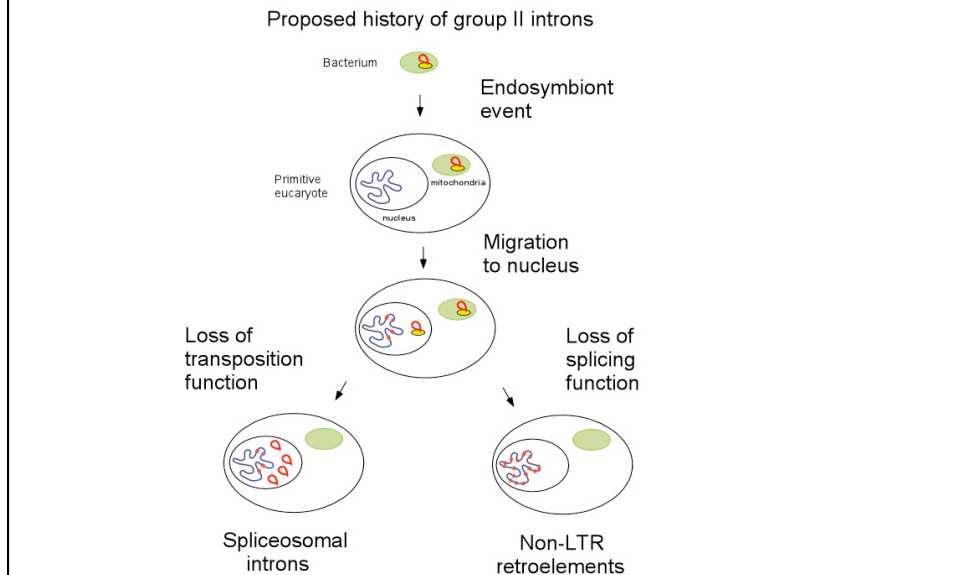
Os introns são basicamente conservados onde existem..
teriam existido introns nos genes do progenota?

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???

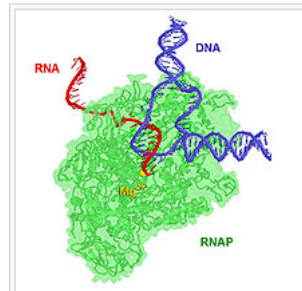
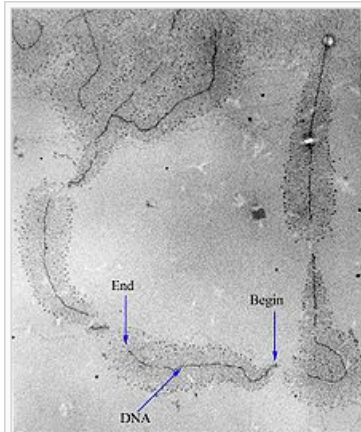
INTRON LATE HYPOTHESIS!



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**

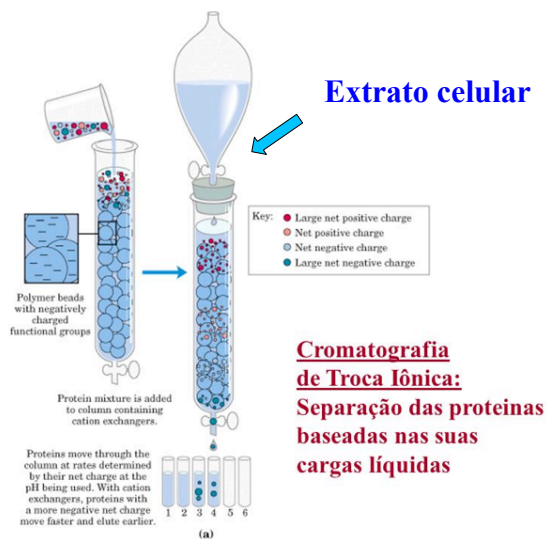
Quantas RNA polimerases existem em bactérias!



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.

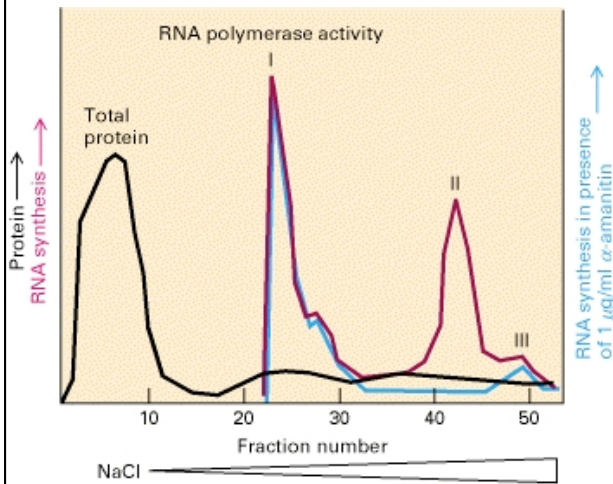
Apenas uma RNA polimerase!

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?**

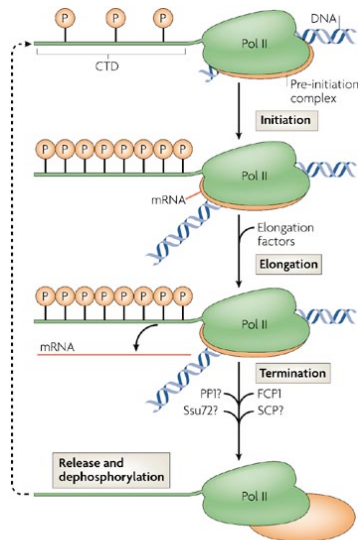
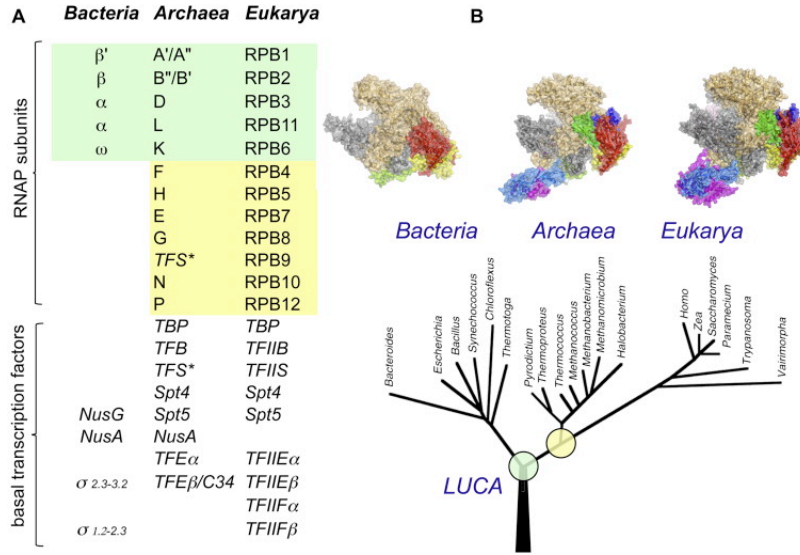
**Três RNA polimerases transcrevem
o RNA em eucariontes!**

RNA polimerase I- RNA ribossômico- RNAr

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

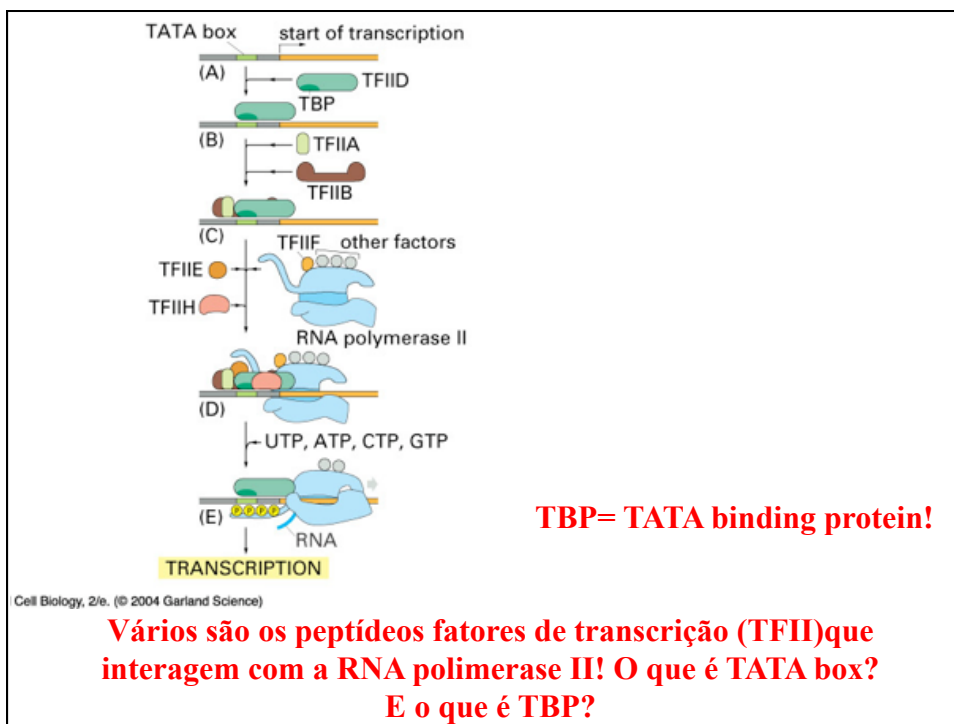
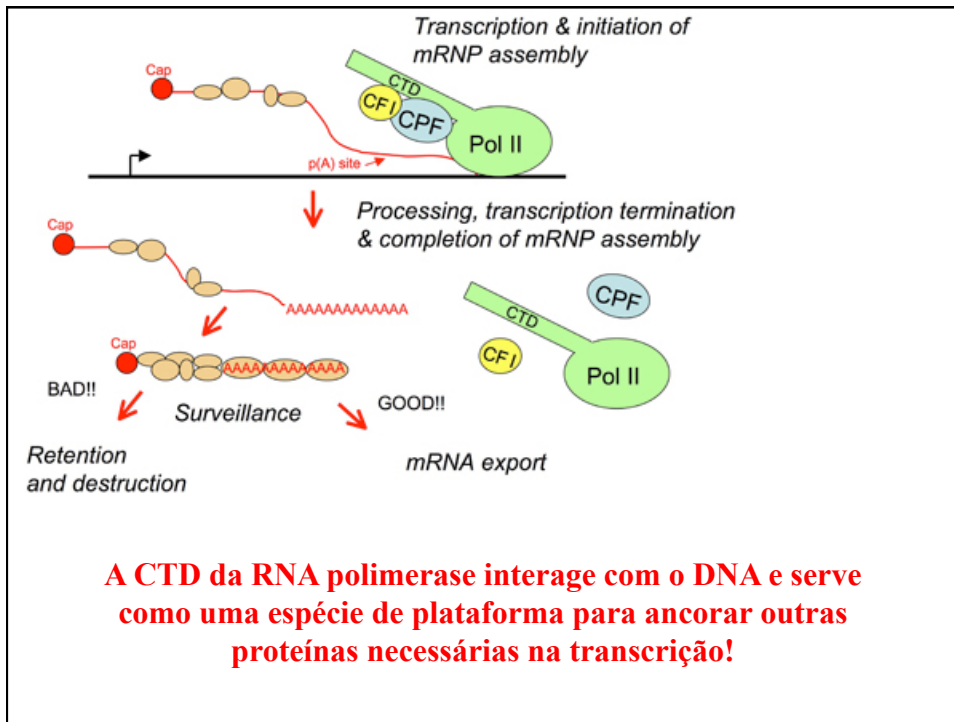
**RNA polimerase III- RNA transportador e outros RNAs
pequenos (RNAr 5S, 7S RNA, etc).**

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

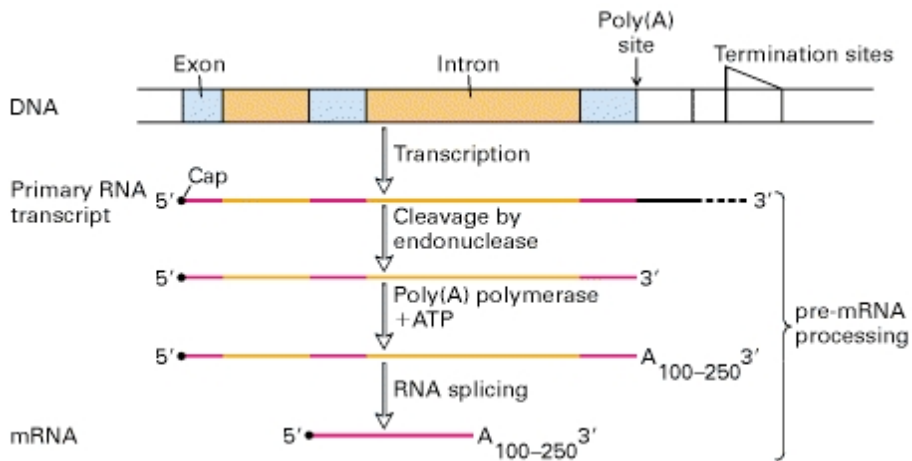


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

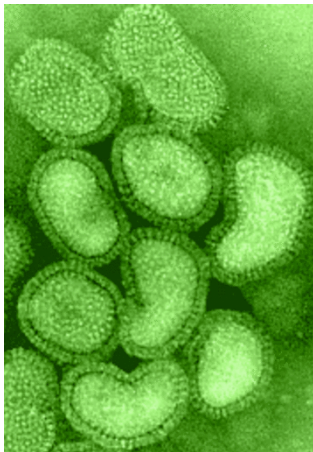
**A RNA polimerase II tem uma cauda (CTD- carboxy terminal domain)
que é fosforilada durante a transcrição!
52 repetições da sequência Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**



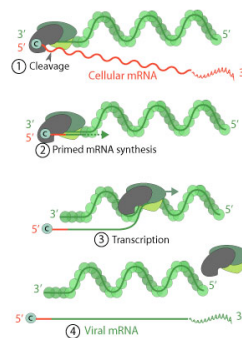
Modificações do RNA na célula (a CTD da RNA polimerase II participa de todos os processos)



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

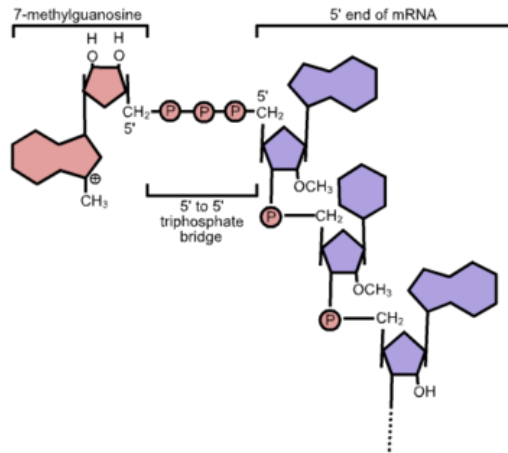


Cap snatching

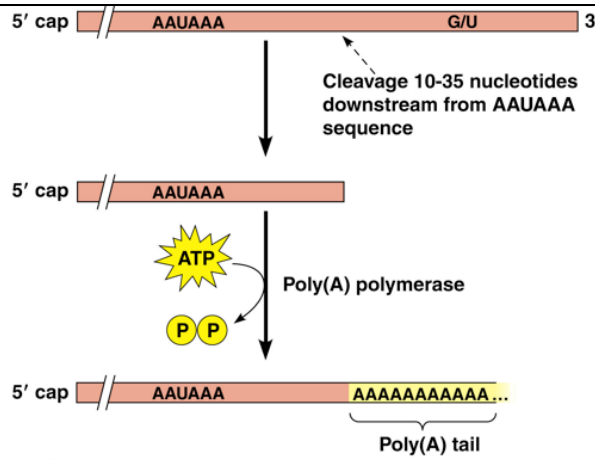


Rouba 5'cap do RNAm da célula hospedeira!

Estrutura do 5'CAP!



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

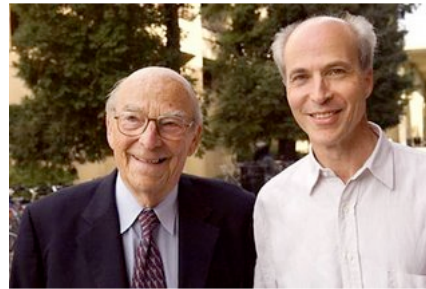
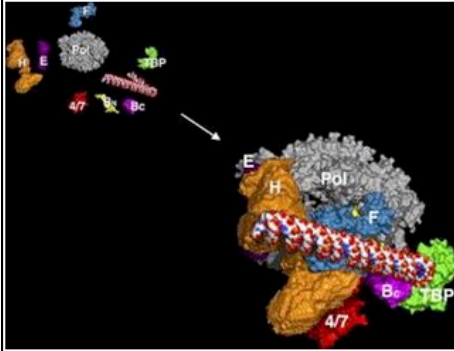


**RNAs virais e celulares (mensageiros) tem cauda de poli-A!
(exceto RNAm de histonas!!!! Por que? Qual a função de Poli-A?)**

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?**

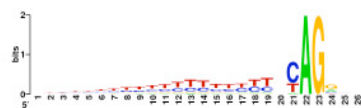
Sinais conservados nos introns:

A 3'do exon

a 5'do exon

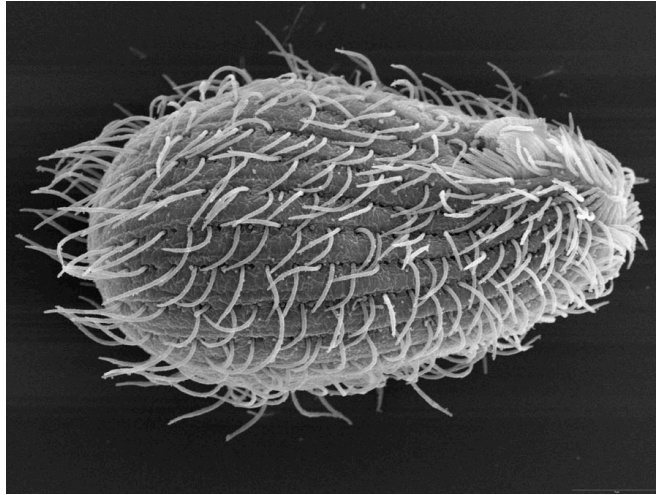


(a) Donor splicing motif consensus

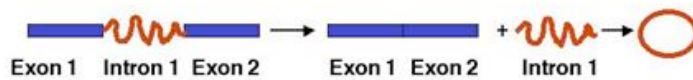


(b) Acceptor splicing motif consensus

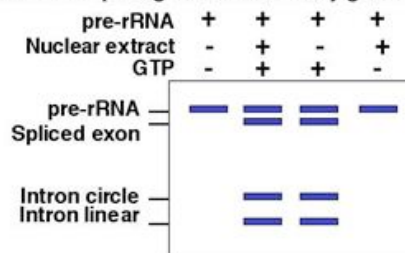
Tom Cech: trabalhando com o mecanismo de processamento de introns em *Tetrahymena* (protozoário):



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



• Products of splicing were resolved by gel electrophoresis:

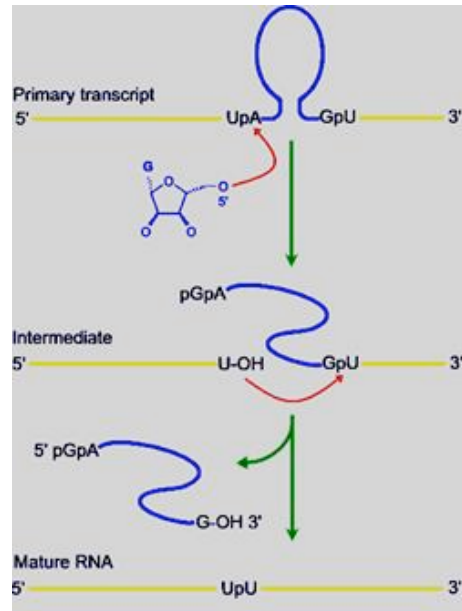


Additional proteins are NOT needed for splicing of this pre-rRNA!

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!**

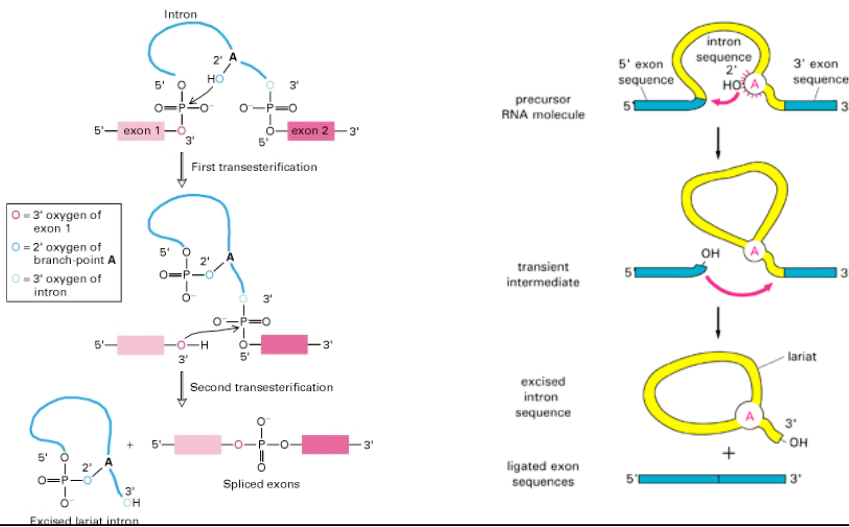


**Self splicing de RNAr em Tetrahymena- grupo I:
RNAs catalíticos= ribozimas!**

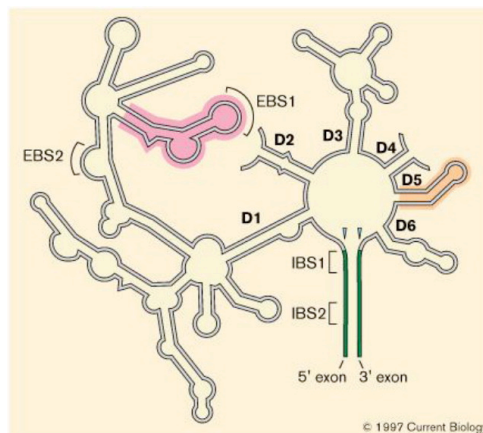
Tom Cechi video

<https://www.youtube.com/watch?v=WACHisSiW3o>

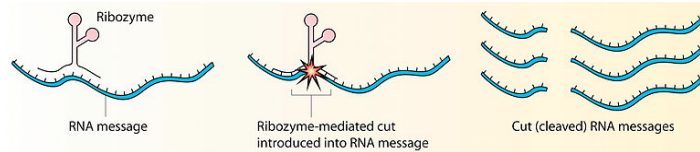
Reações de trans-esterificações resultam na remoção de introns, Na região da Adenina (branch point)- Formação do *lariat*- laço!

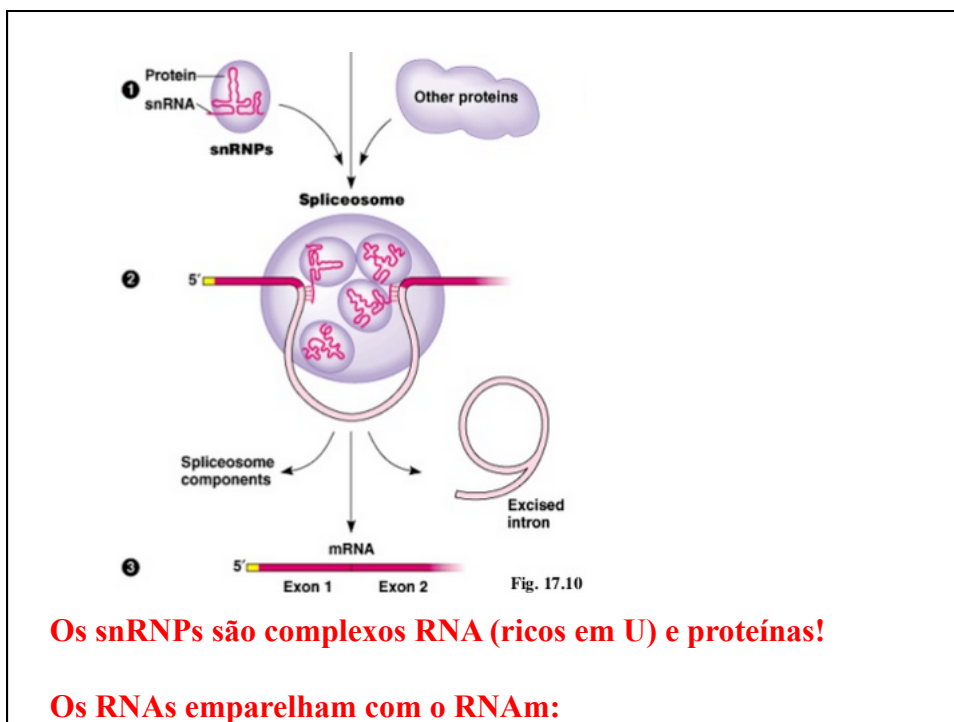
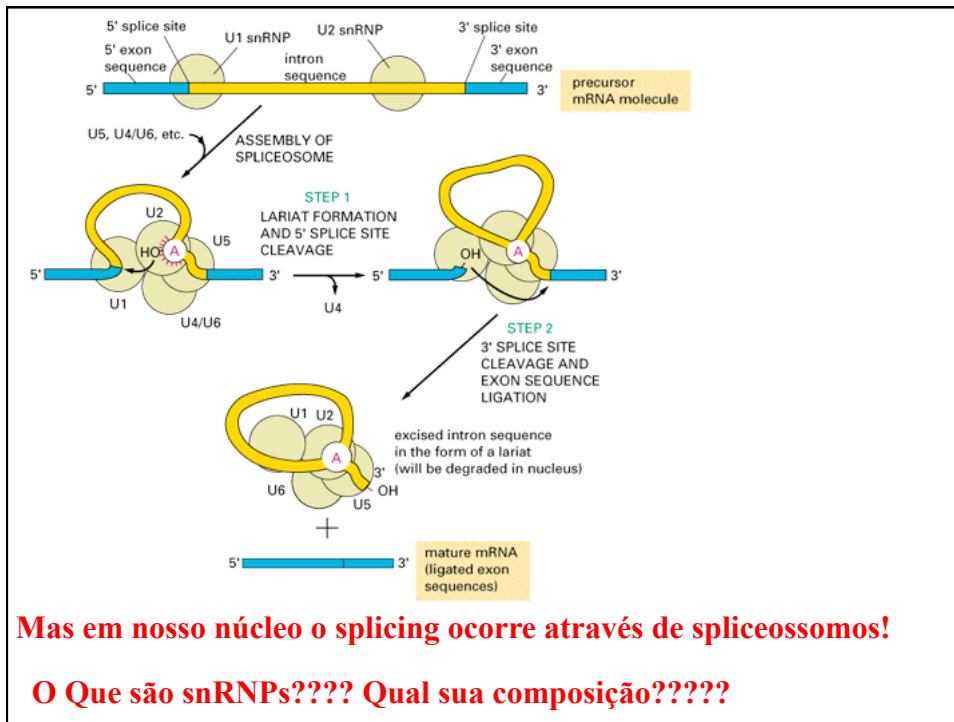


Os introns (self) têm estrutura que aproximam os exons!



Ribozimas!





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

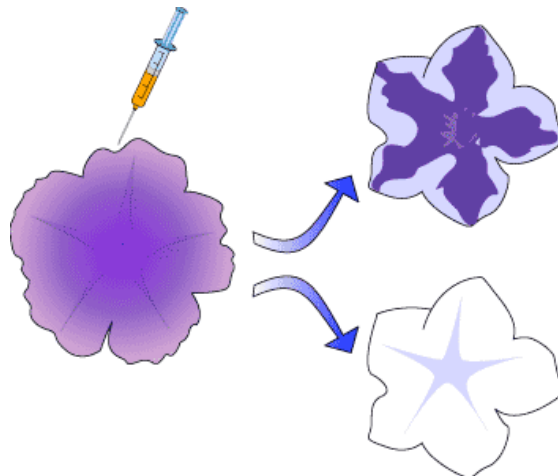
Por que isso é chamado de catálise *trans*?

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

Vídeo snNRPs:

https://www.youtube.com/watch?v=Dp_b9eITxdc

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>



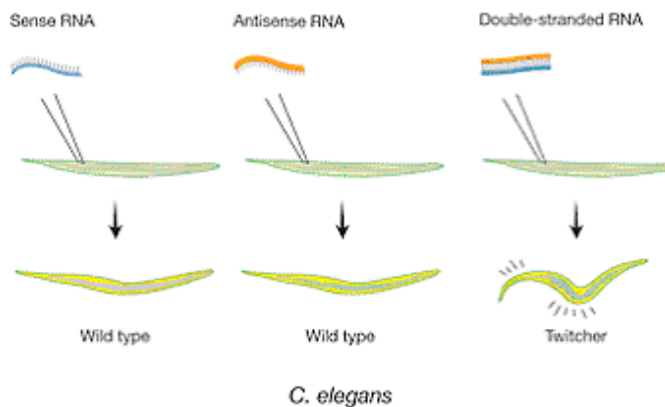
***Caenorhabditis elegans* modelo para desenvolvimento (longo):**

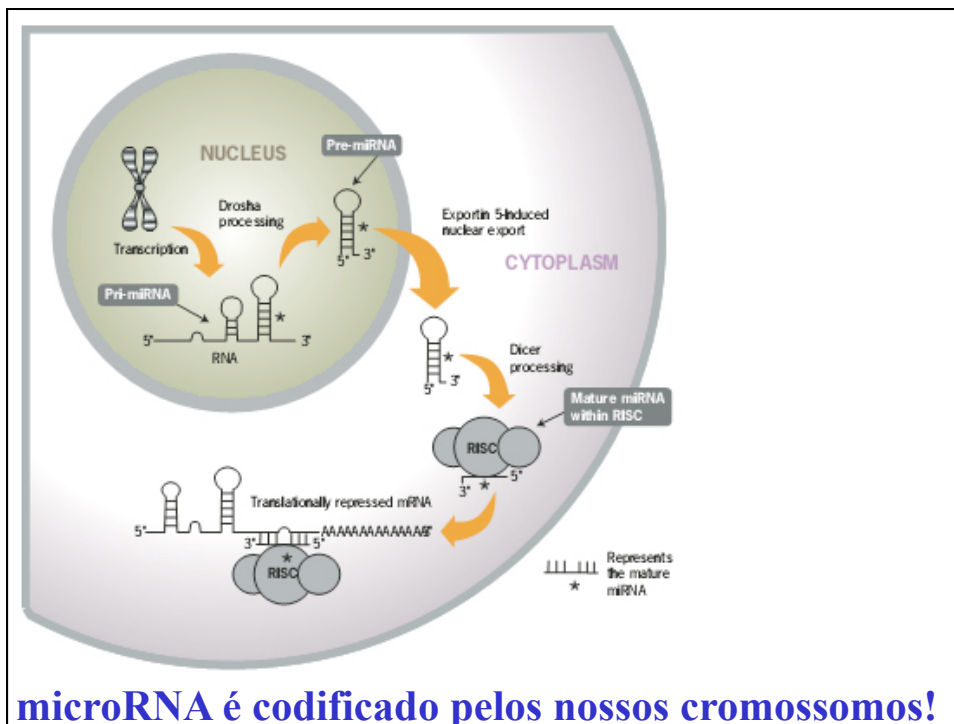
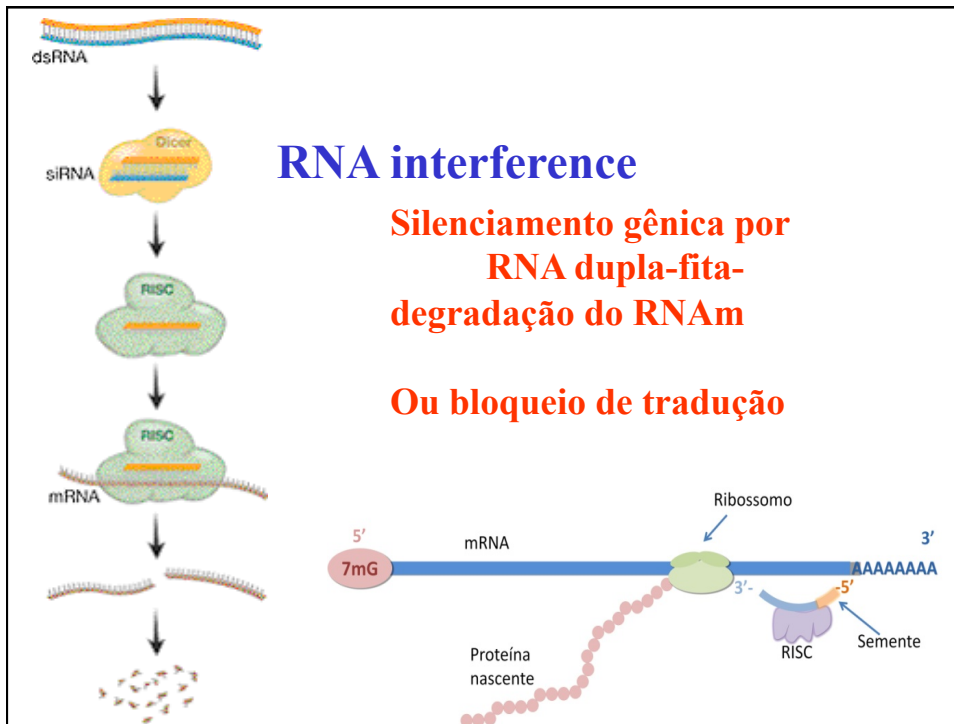
<https://www.youtube.com/watch?v=zc1P7lGSzdU>

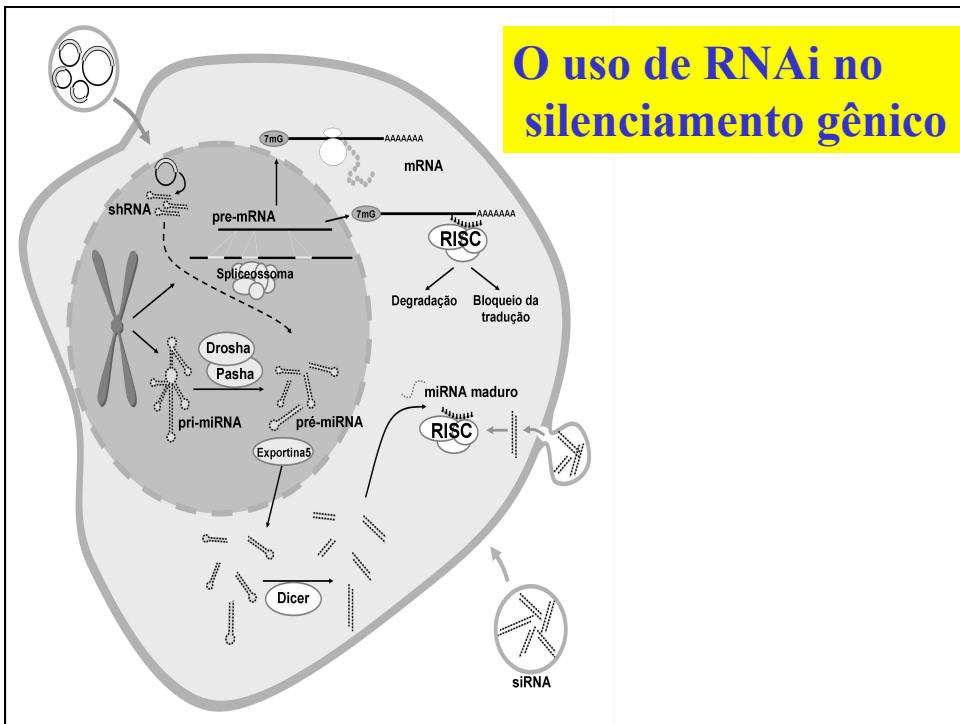
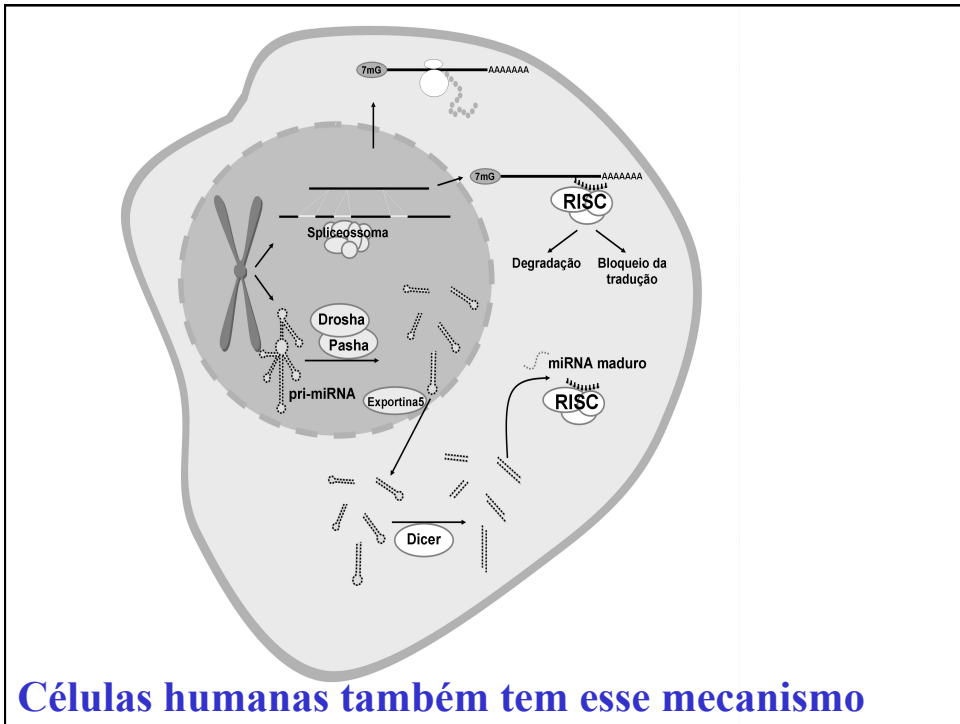
RNA interference- O experimento (1998)

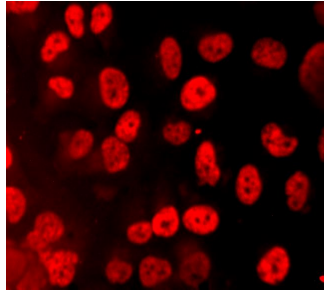
Silenciamento gênica por RNA dupla-fita.

Craig Mello and Andrew
Fire, Nobel- 2006



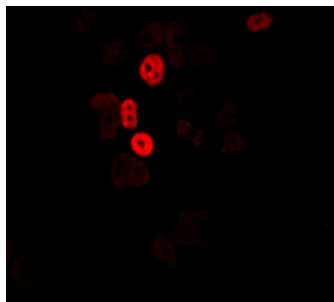






Si RNA –exemplo de inibição de proteína nuclear.

RNA controle



SiRNA silenciando esse gene.

RNA interference Nature video and neuronaute:

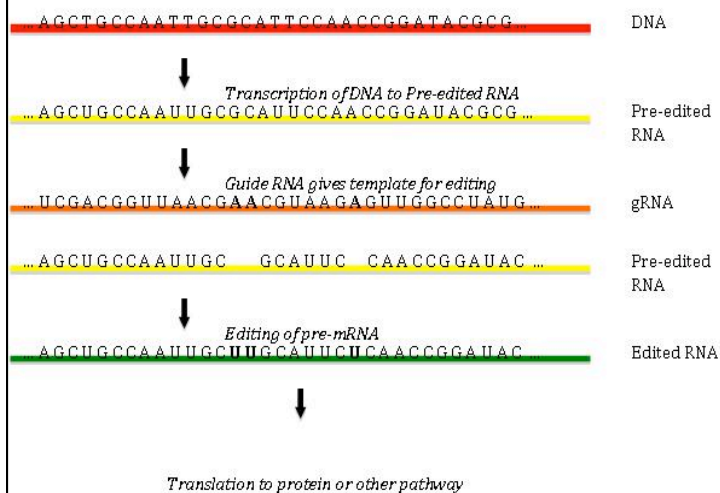
https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGBI_ELE

RNA interference para leigos:

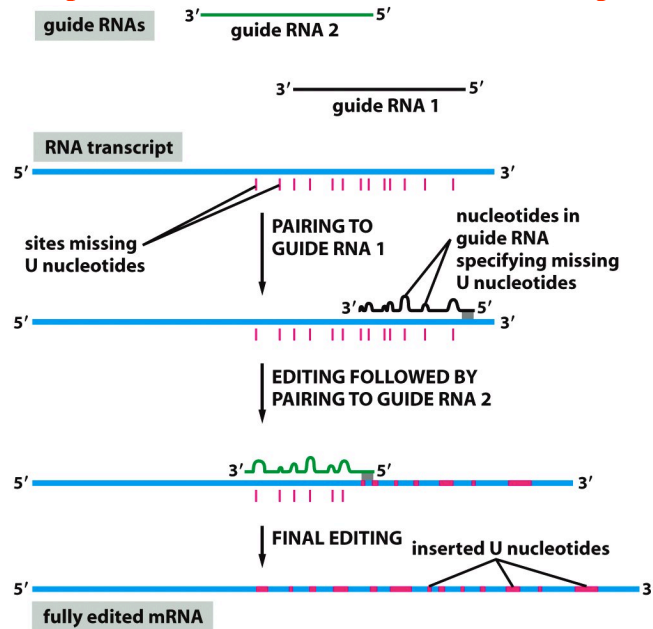
<http://ed.ted.com/lessons/rnai-slicing-dicing-and-serving-your-cells-alex-dainis>

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

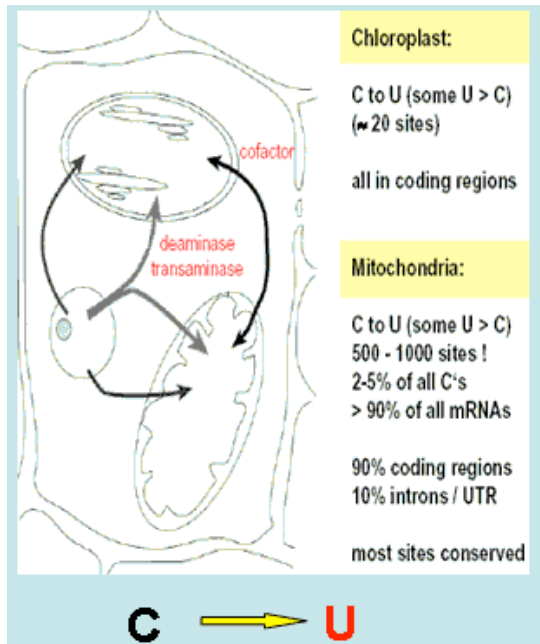
Addition of Uracil to RNA



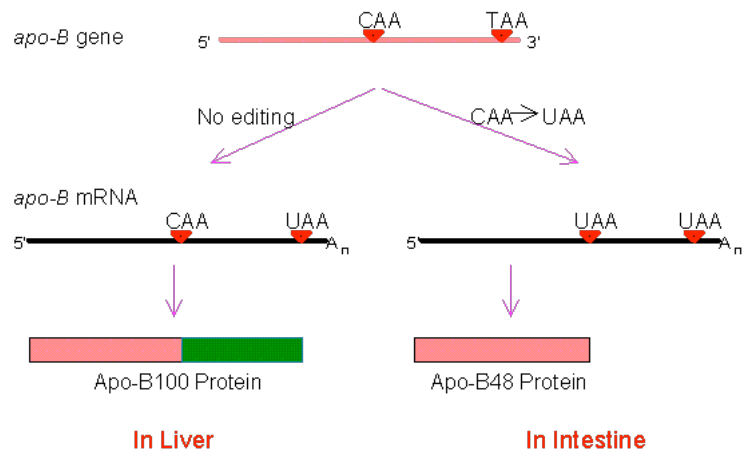
Os RNAs podem ser editados: mitocôndria de tripanossoma!



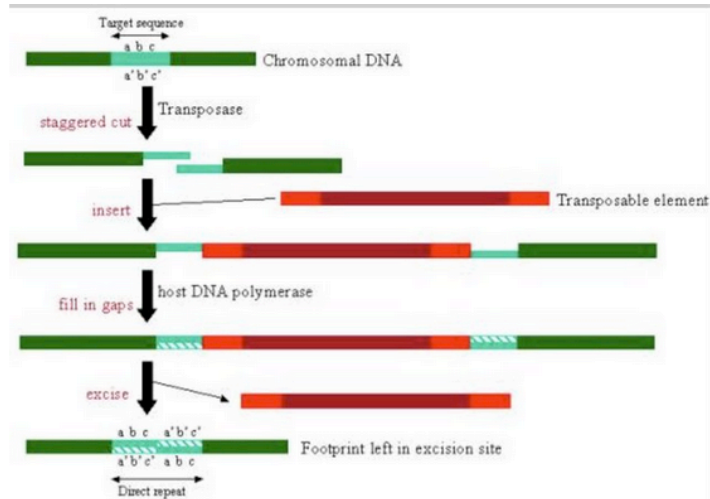
Os RNAs podem ser editados: organelas de plantas!



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!

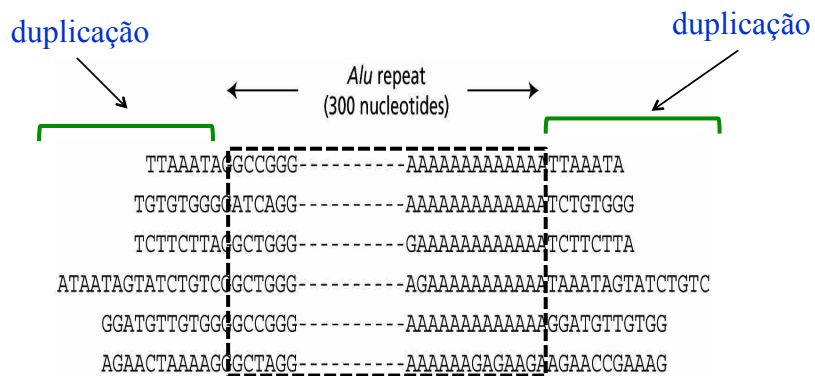
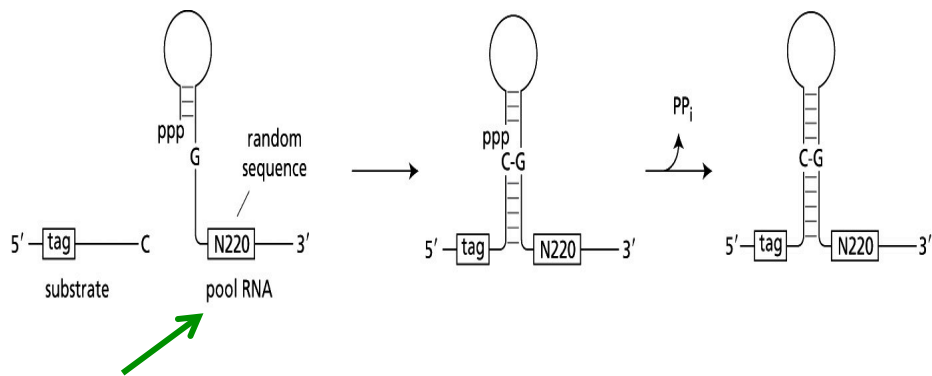


Figure 4-38 MB6C5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

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?