

Expresión de la información genética en eucariotas

► similitudes y diferencias con procariotas

► metodologías de estudio 1

Víctor Romanowski, 2013

¿Qué se transcribe?

Los **genes** son segmentos del genoma que se **transcriben** y sus secuencias regulatorias

Productos de transcripción = “transcriptos”

RNAs codificantes para proteínas (son traducidos) = mRNAs

Hay 35 000 genes codificantes para proteínas en un genoma de mamífero típico, incluyendo el genoma humano.
Este número es mucho menor que lo que se pensaba (> 100 000)

RNAs no codificantes = ncRNAs

rRNA: RNAs ribosomales: hay 150-200 copias de los 28S - 5.8S - 18S
+ 200-300 copias del 5S .

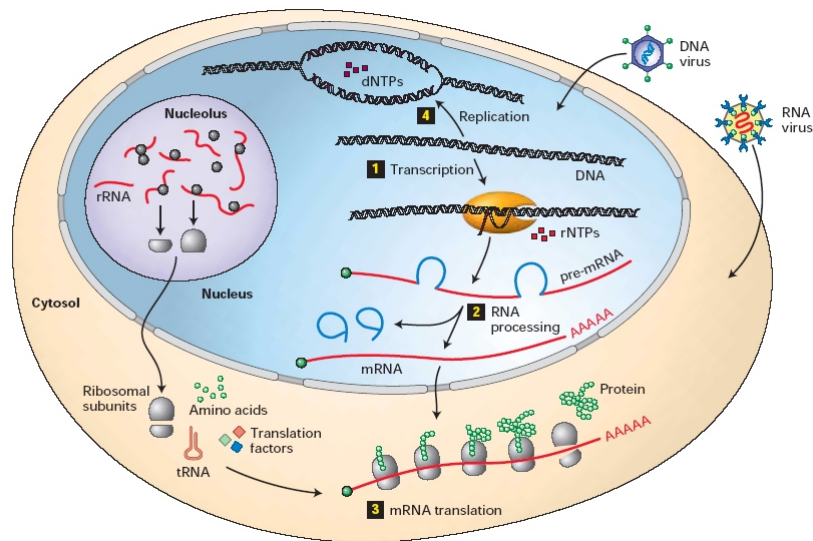
tRNA: RNAs de transferencia: >> 500 genes en el genoma humano.

snoRNA: small nucleolar RNAs; la mayor parte de los snoRNAs participan en modificación de rRNA

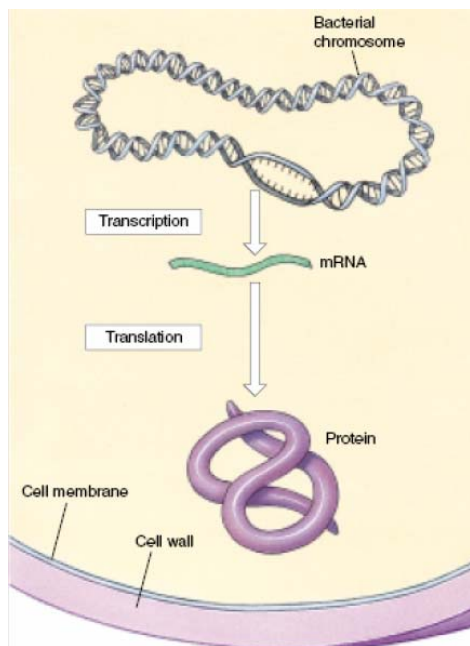
snRNAs: small nuclear RNAs: constituyen los RNA que forman el **spliceosoma**

Otros: incluyen microRNAs (**miRNAs**), pequeños de interferencia (**siRNAs**), RNA citoplasmáticos pequeños (**scRNA**), telomerasa, ribonucleasa P, SRP, etc.

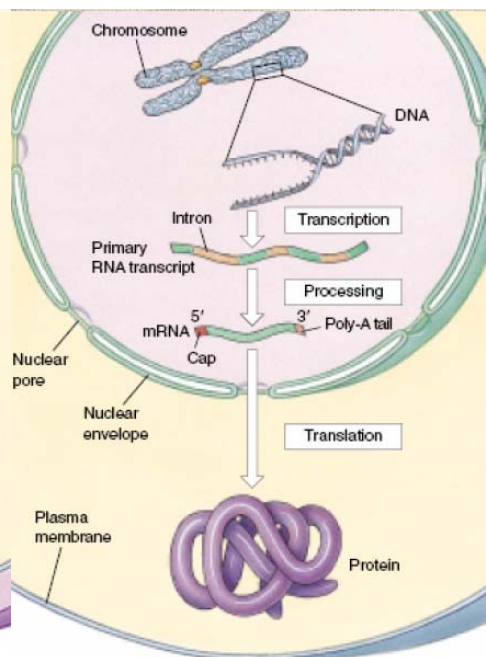
Célula eucariota



Procariotas



Eucariotas



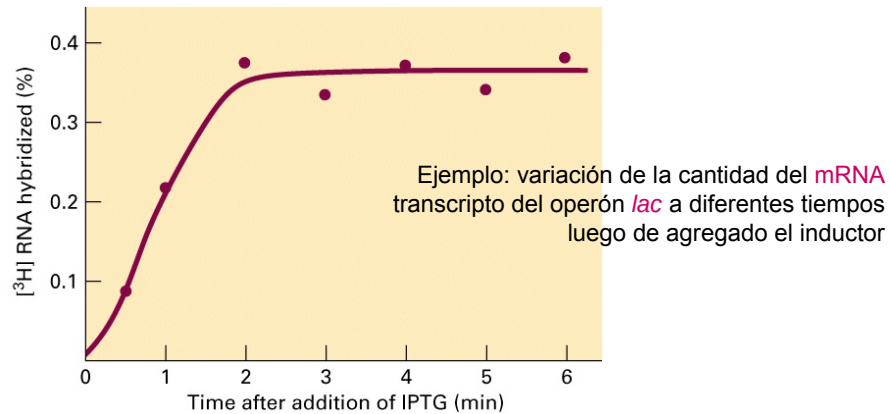
Técnicas relacionadas con la transcripción

- 1- Niveles estacionarios de RNA
- 2- Síntesis de RNA
- 3- Interacciones DNA-proteína
- 4- Actividad de promotores
- 5- Inicio de la transcripción

Técnicas para medir niveles estacionarios de RNA

- Base para **reconocer** el nivel de **un mRNA X particular** entre muchos otros RNAs:
hibridación (alternativas de “*probe-target*”)
(alternativas de sonda - secuencia que “atrapa” a la sonda)
 - Preparación de RNA total marcado (= mezcla de sondas; la correspondiente al gen X debe ser atrapada –por ejemplo– por DNA del gen X clonado anclado a un soporte sólido)
 - RNA no marcado >>> cDNAs marcados >>> sondas ...
 - RNA no marcado >>> una sonda de X (marcada) ...
 - ¿Qué se fija sobre el soporte sólido? ¿Qué se usa como sonda?

Biochemical experiments confirm that induction of the *lac* operon leads to an increased synthesis of *lac* mRNA



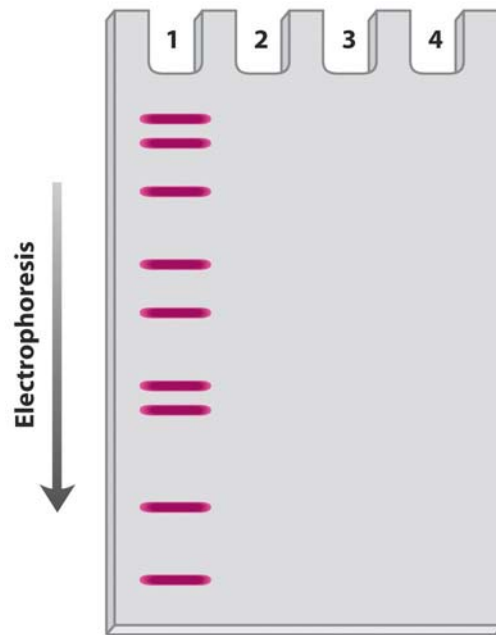
¿Por qué no se incrementa la cantidad de mRNA *lac* después de los 2 min?

Ver alternativas: sonda, *target* de hibridación (atrapa sonda).

Situaciones en las que puede incubarse el sistema con precursores radiactivos y otras en que esto no es posible

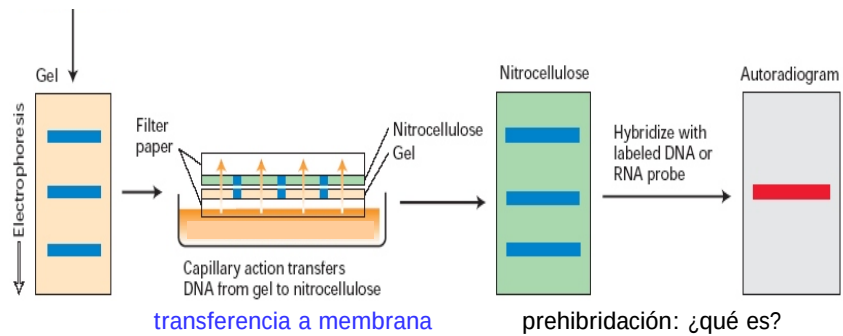
Técnicas para medir niveles estacionarios de RNA

- Northern blot
- Dot blot/Macroarray (macro-arreglo)
- Microarray (micro-arreglo)
- PCR en tiempo real (real time PCR)



Northern blot

RNA total



prehibridación: ¿para qué?

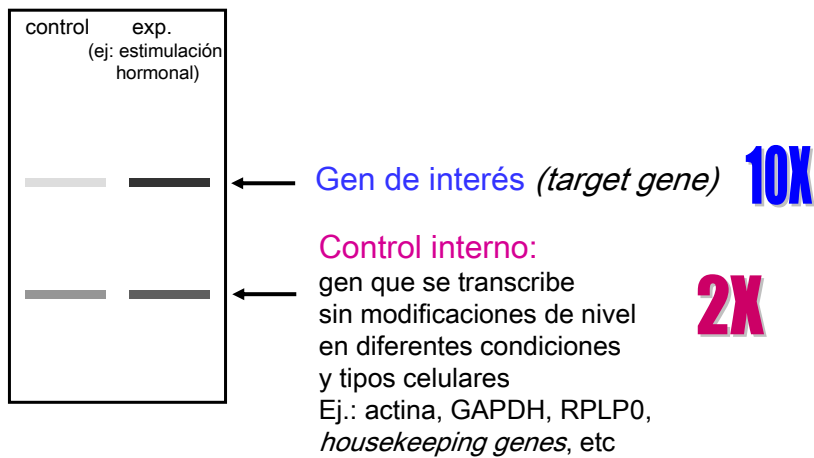
hibridación: ¿para qué?

lavado

exposición

revelado

NORTHERN blot



$$\text{Corrected fold increase} = 10/2 = 5$$

$$\text{Ratio target gene in experimental/control} = \frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$$

Standards

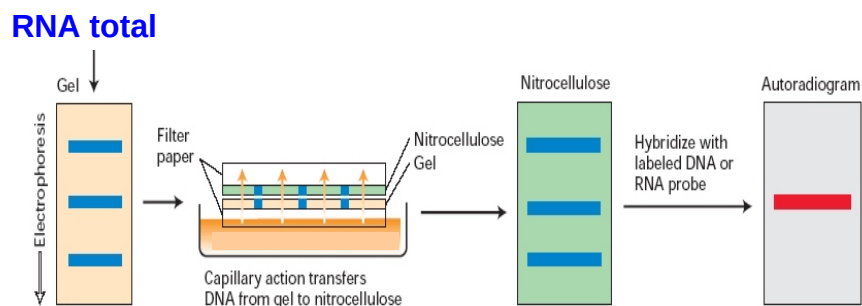
- same copy number in all cells
- expressed in all cells
- medium copy number advantageous
 - correction more accurate

Standards

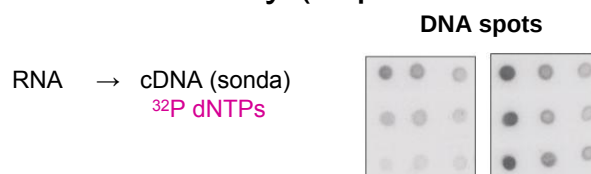
- **The perfect standard does not exist**

- Commonly used standards
 - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA
 - β -actin mRNA
 - MHC I (major histocompatibility complex I) mRNA
 - Cyclophilin mRNA
 - mRNAs for certain ribosomal proteins
 - e.g. RPLP0 (ribosomal protein, large, P0; also known as 36B4, P0, L10E, RPPO, PRLP0, 60S acidic ribosomal protein P0, ribosomal protein L10, Arbp or acidic ribosomal phosphoprotein P0)
 - 28S or 18S rRNA

Northern blot



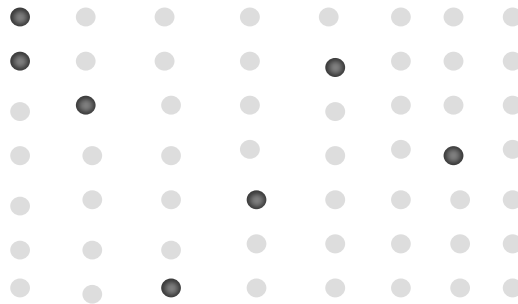
dot blot-macroarray (expresión de **varios genes**)



Dot blot

Alternativas:

1. Depositar en cada posición una muestra de RNA de células sometidas a diferentes estímulos e hibridar con una única sonda de DNA correspondiente al gen de interés (análisis de múltiples situaciones para un único gen).
2. Depositar en cada posición un exceso de DNA clonado con la secuencia de los genes de interés (uno diferente en cada posición) e hibridar con una sonda (mezcla de sondas) extraída de células incubadas en presencia de precursores radiactivos, o de cDNA (RNA extraído de células y usado para generar una sonda por transcripción reversa en presencia de precursores radiactivos)
3. otras



Specific RNAs can be quantitated and mapped on DNA by **nuclease protection**

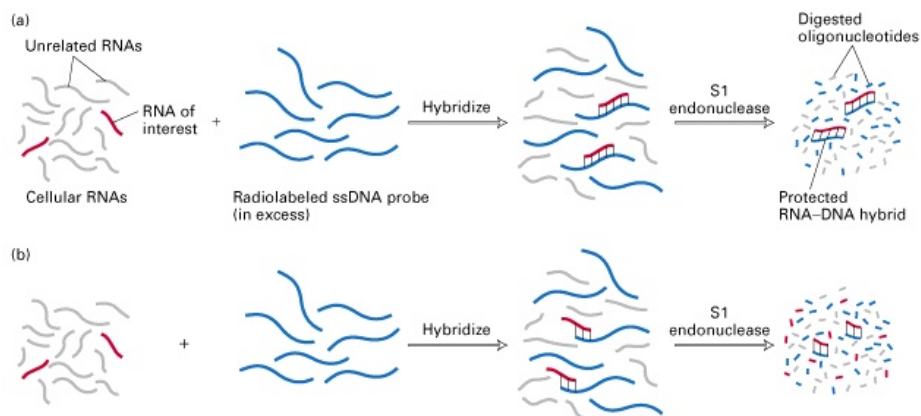


Figure 7-34a,b

S1 nuclease digests ssRNA / ssDNA ONLY [dsRNA / RNA:DNA hybrids are protected]

Transcriptoma

conjunto de RNAs transcritos en un tipo de célula

Las diferentes células de un organismo tienen el mismo genoma (DNA)

Las células son diferentes porque un conjunto distinto de genes se expresa en cada tipo celular

¿Qué genes se expresan en un tejido y cuáles en otro?

¿Qué genes se activan por estímulos hormonales?

¿Qué diferencias se observan a nivel de la expresión de genes en determinados estados patológicos?

DNA microarrays: analyzing genome-wide expression

- DNA microarrays consist of thousands of individual gene sequences bound to closely spaced regions on the surface of a glass microscope slide
- DNA microarrays allow the simultaneous analysis of the expression of thousands of genes
- The combination of DNA microarray technology with genome sequencing projects enables scientists to analyze the complete transcriptional program of an organism during specific physiological response or developmental processes

microarrays

6

Part I INTRODUCTION

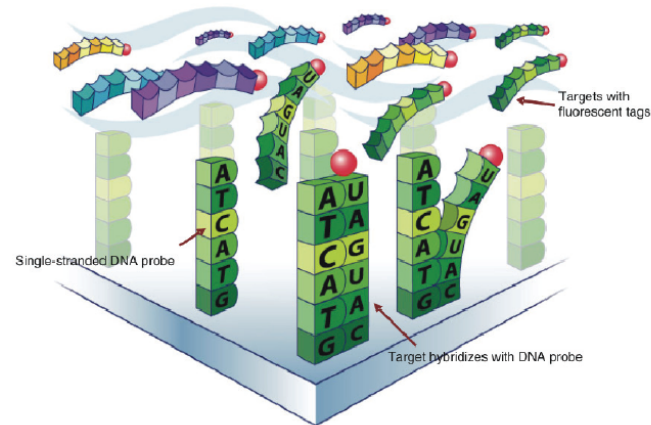
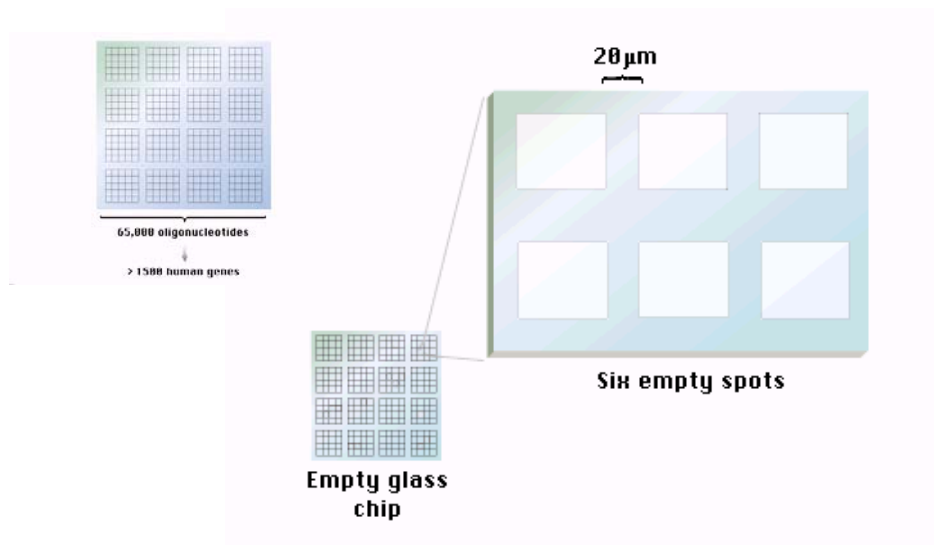


Figure 1-1. Cartoon illustration of DNA microarray probes and target hybridization (source: Wellcome Trust Centre for Human Genetics, <http://www.well.ox.ac.uk/>).

DNA chips

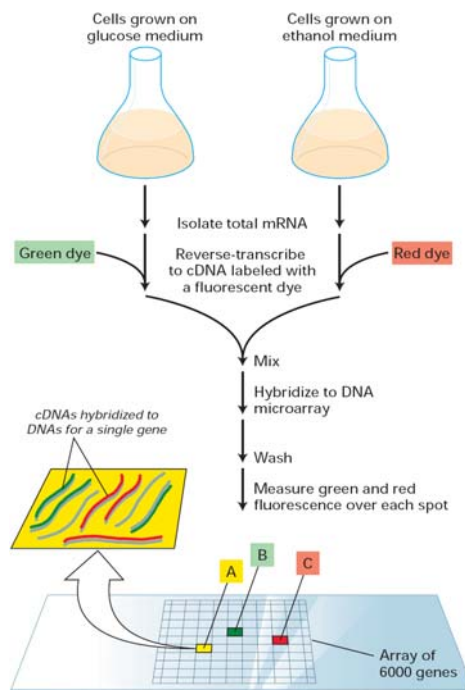
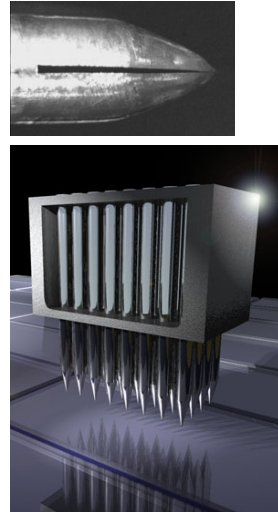
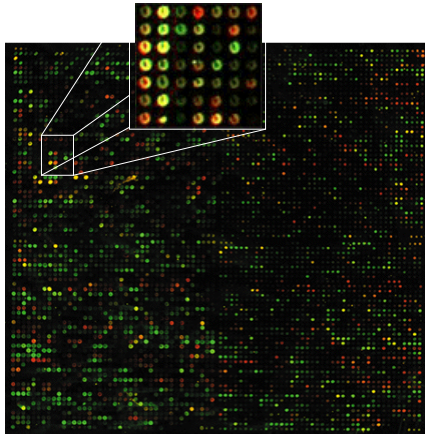




DNA chips



microarrays (spotter ~ ink jet printer)

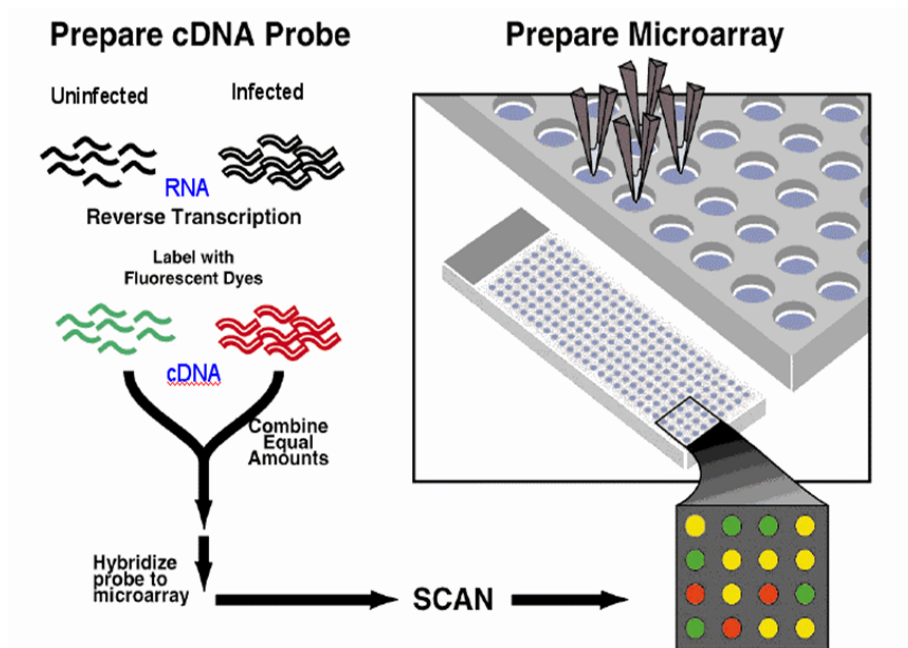


DNA microarrays can be used to evaluate the expression of many genes at one time

▲ EXPERIMENTAL FIGURE 9-35 DNA microarray analysis can reveal differences in gene expression in yeast cells under different experimental conditions. In this example, cDNA prepared from mRNA isolated from wild-type *Saccharomyces* cells grown on glucose or ethanol is labeled with different fluorescent dyes. A microarray composed of DNA spots representing each yeast gene is exposed to an equal mixture of the two cDNA preparations under hybridization conditions. The ratio of the intensities of red and green fluorescence over each spot, detected with a scanning confocal laser microscope, indicates the relative expression of each gene in cells grown on each of the carbon sources. Microarray analysis also is useful for detecting differences in gene expression between wild-type and mutant strains.

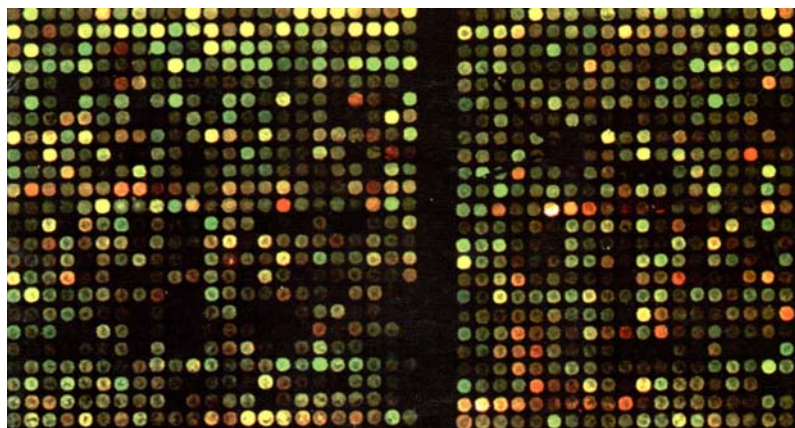
- A** If a spot is yellow, expression of that gene is the same in cells grown either on glucose or ethanol
- B** If a spot is green, expression of that gene is greater in cells grown in glucose
- C** If a spot is red, expression of that gene is greater in cells grown in ethanol

Lodish 5th ed.



TRANSCRIPTOMA

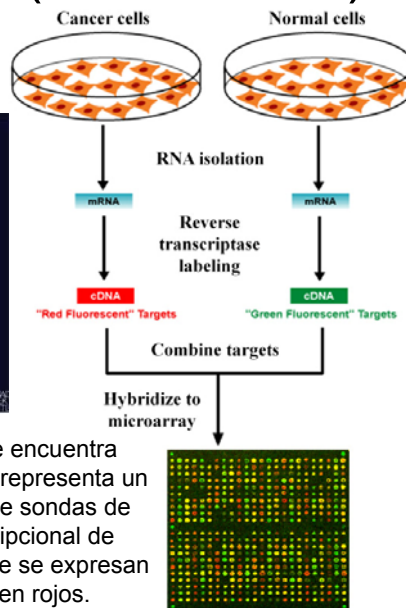
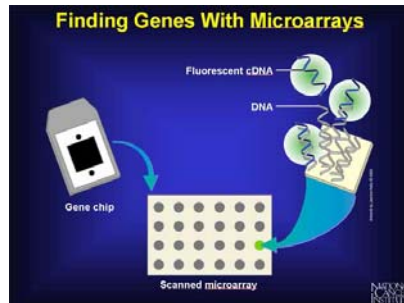
la expresión miles de genes a nivel de la transcripción de puede estudiarse mediante **microarrays** o **chips de DNA**



sonda roja: cDNA de hígado

sonda verde: cDNA de cerebro

Microarray (micromatriz)



En cada posición del *chip* de DNA se encuentra unida a la matriz una secuencia que representa un tramo del genoma (gen): la mezcla de sondas de cDNA representa la actividad transcripcional de cada gen. Por ejemplo: los genes que se expresan más en las células tumorales aparecen rojos.

