



Módulo 6: Empalme Alterno

Leocadia Paliulis

(traducido por Enrique Rodríguez-Borrero)

Objetivos

- Demostrar cómo el empalme alternativo de un gen puede conducir a diferentes mRNAs.
- Mostrar cómo el empalme alternativo puede conducir a la producción de diferentes polipéptidos y resultar en cambios drásticos en el fenotipo.

Prerrequisitos

- Completar los módulos titulados: Entendiendo genes eucariotas: <https://thegep.org/ueg/>

Instrucción en el aula

- Introducir tra-RB
- Discutir las diferencias entre tra-RB y tra-RA. Reforzar el concepto de isoforma.
- Investigación 1: ¿Cómo puede haber diferentes mRNAs codificados en el mismo gen?
- Investigación 2: Examine los polipéptidos *de tra* mirando los tres posibles marcos de lectura. Revise el concepto de marco de lectura e introduzca la fase si no se introdujo previamente. Los estudiantes construirán un modelo genético para tra-RB, utilizando información de secuencia, y datos de RNA-Seq como evidencia.
- Discusión sobre modelos genéticos/resumen

Videos Asociados

- Video de Genes e Isoformas: <https://youtu.be/ce6nVSiiV7I>
- Video de Empalme y fase: <https://youtu.be/9VWjyu3PUJ0>
- RNA-Seq and TopHat Video: <https://youtu.be/XD-egRcHYL4>

Índice de Contenido

Investigación 1:	2
Investigación 2. ¿Cuáles son las consecuencias del empalme alternativo en los polipéptidos producidos a partir de cada isoforma?	8
Puntos de discusión:	8

Investigación 1:

En esta investigación, nos centraremos en tra-RB, la segunda isoforma del gen *tra*, y exploraremos cómo múltiples mRNAs y polipéptidos diferentes pueden ser codificados por el mismo gen. ¡La historia de tra-RB es una emocionante historia de sexo, empalme alternativo y exones venenosos!

1. Para empezar, abre un navegador web.
2. Ve al sitio del espejo del navegador genómico de GEP UCSC en <https://gander.wustl.edu/> y sigue las instrucciones dadas en el Módulo 1 para abrir contig1 de *Drosophila melanogaster*, utilizando el ensamblaje de **July 2014 (Gene)** en lugar del ensamblaje de **Aug. 2014 (BDGP Release 6 + ISO1 MT/dm6)**. Una vez que estas en la página del Navegador genómico, pon "Base Position" (bajo la barra " Mapping and Sequencing Tracks ") en "**full**" para que puedas ver los tres posibles marcos de lectura (recuerda que no verás bases individuales o aminoácidos hasta que presiones Zoom in). También ajusta "FlyBase Genes" (bajo la barra "Genes and Gene Predictions") a "**full**". No olvides hacer clic en uno de los botones de "refresh" para ver tus cambios.
3. Introduce las siguientes coordenadas en el text box "**chromosome range or search terms**": **contig1:9,700-11,000** y presiona el botón de "**go**" para tener una mejor vista del gene *tra* (Figura 1).

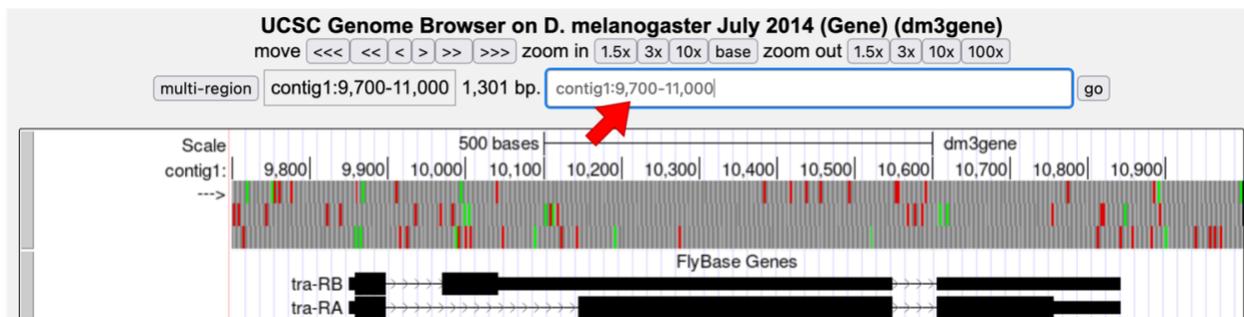


Figura 1 Centrar el navegador en el gen *tra*.

4. Consideremos lo que sabemos sobre tra-RA y aprendamos más sobre tra-RB.

Pregunta 1. Dado que los exones son mostrados por las cajas negras, y los intrones se muestran por líneas delgadas con puntas de flecha en el track de FlyBase Genes, ¿qué nos dice esto sobre el primer intrón de *tra-RB* en comparación con el de *tra-RA*?

5. Ahora echemos un vistazo a los patrones de transcripción. Desplázate hacia abajo hasta “**RNA Seq Tracks,**” haz clic en el enlace “RNA-Seq Coverage”. Cambia la configuración de visualización del “como lo hicimos en el módulo 2 (en “Display mode” use **full**; en “Data view scaling” ajústalo a “**use vertical viewing range setting**”; en “Vertical viewing range” busca el cuadro de valor máximo y ponga “**37**”), pero en esta ocasión en “List subtracks” marca la opción de “all” y escoge las opciones “Adult Females” y “Adult Males”. Luego presiona el botón de “Submit” (Figura 2). De vuelta en la página principal del navegador, busca “**RNA seq tracks**” → “**Exon Junctions**” y utilizando el menú desplegable selecciona “**full**”, y presiona “**refresh**”. Para repasar el uso de “RNA Seq data” presiona el siguiente enlace: [RNA-Seq and TopHat video](#).

RNA-Seq Coverage Track Settings

RNA-Seq Read Coverage (▲ [All RNA Seq Tracks](#))

Display mode: [Reset to defaults](#)

Type of graph:

Track height: pixels (range: 11 to 110)

Data view scaling: Always include zero:

Vertical viewing range: min: max: (range: 1 to 250)

Transform function: Transform data points by:

Windowing function: Smoothing window: pixels

Negate values:

Draw y indicator lines: at y = 0.0: at y =

[Graph configuration help](#)

List subtracks: only selected/visible all

[Configure](#) Adult Females modENCODE RNA-Seq from D. melanogaster Whole Adult Females [Schema](#)

[Configure](#) Adult Males modENCODE RNA-Seq from D. melanogaster Whole Adult Males [Schema](#)

Figura 2 Entrada de ajustes en RNA-Seq tracks.

Ahora podemos ver el “RNA-Seq data” para machos (rojos) y hembras (azul). Recuerda que los picos en “RNA-Seq Read Coverage tracks” generalmente corresponden a las regiones del genoma que se están transcribiendo. Estas dos muestras generalmente muestran “RNA-Seq read coverage” a lo largo de todo el tramo del gen *tra*. Sin embargo, la muestra femenina adulta muestra lecturas en el “RNA-Seq read coverage” alrededor de las posiciones 9,971-10,145 (caja roja en la Figura 3). También podemos ver el “RNA-Seq Exon Junctions track”, que muestra la ubicación de los sitios de empalme apoyados por el “RNA-Seq data” (como vistes en el Módulo 4). Recuerda que las cajas negras en el “FlyBase Genes track” son exones y las líneas delgadas con puntas de flecha muestran la ubicación de los intrones. Observa que los diagramas del primer y segundo “RNA-Seq Exon Junctions tracks” tienen el mismo sitio de empalme en el terminal 5’ pero diferentes en el sitio de empalme del terminal 3’. Veamos qué podemos averiguar sobre estos sitios de empalme. Primero, necesitamos establecer el marco de lectura para el primer exón. Acerca el extremo 5’ de la transcripción alrededor de la posición 9850-9860.

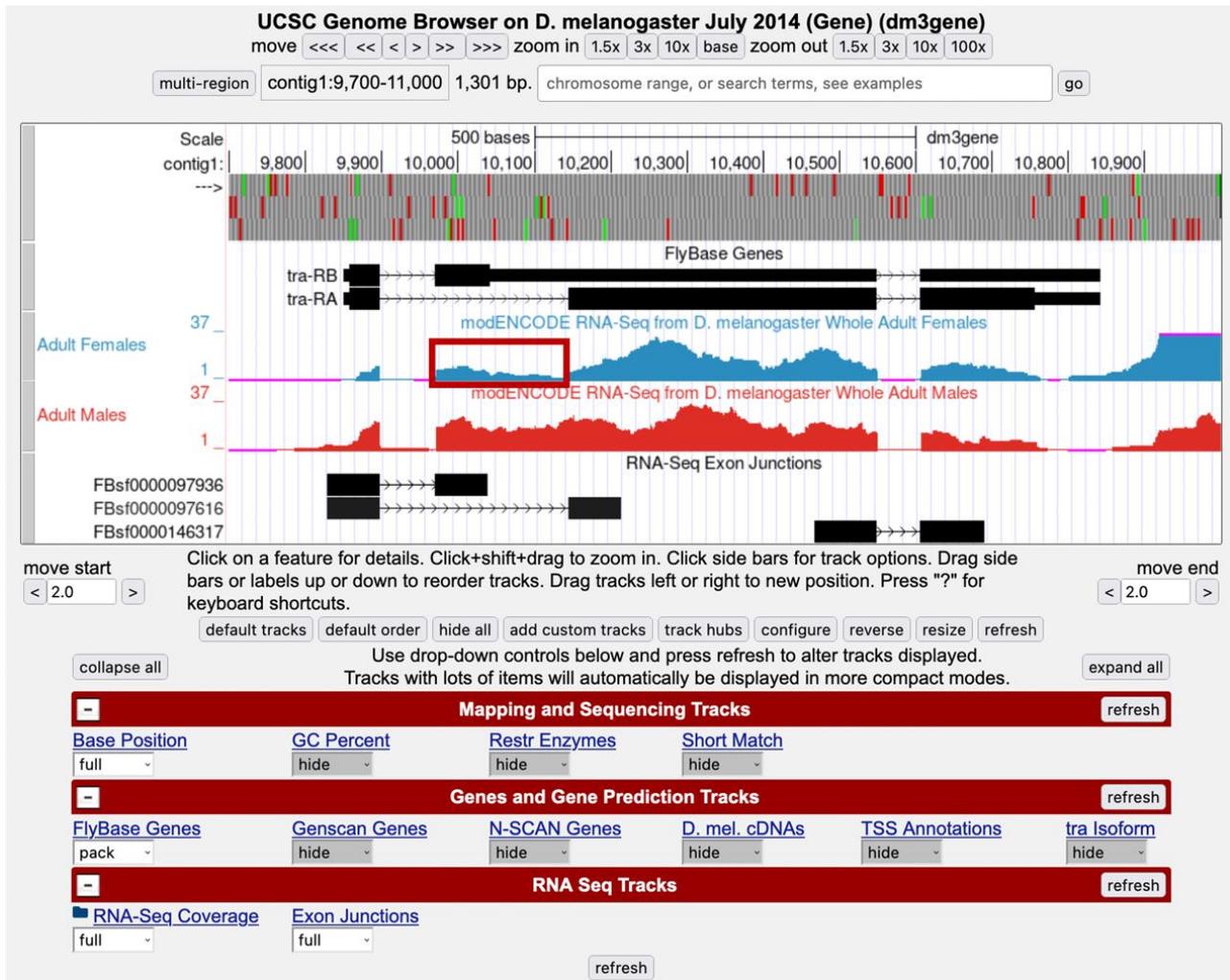


Figura 3 El navegador mostrando los predictores genéticos, “RNA-Seq tracks”, y “RNA-Seq exon junctions” machos y hembras de *Drosophila melanogaster*.

Pregunta 2. Dado lo que sabes sobre el inicio de la traducción, cuál de los 3 marcos de lectura posibles se utiliza tanto para los productos *tra-RA* y *tra-RB*?

Ahora acerca la ubicación del sitio del empalme de 5' al final del primer exón tanto en *tra-RA* como en *tra-RB* (Figura 4). También estaremos pensando en el concepto de fase aquí. Para revisar el empalme y la fase, presiona el siguiente enlace: [Splicing and Phase video](#).

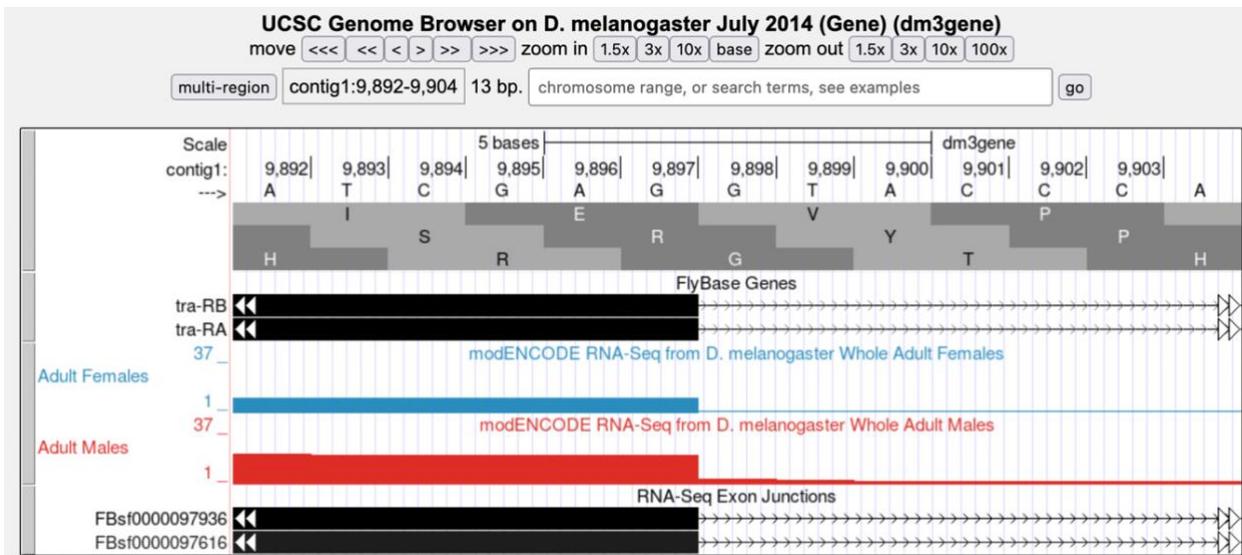


Figura 4 Magnificación el primer sitio de empalme de 5'.

- Pregunta 3. Da la coordenada para la última base del primer exón para tra-RA _____
- Pregunta 4. Da la coordenada para la última base del primer exón para tra-RB _____
- Pregunta 5. ¿Cuál es la secuencia de consenso para el sitio de empalme de 5' (sitio de donante)? _____
- Pregunta 6. ¿Cuáles son las coordenadas para el sitio de empalme de 5' en tra-RA? _____
- Pregunta 7. ¿Cuáles son las coordenadas para el sitio de empalme de 5' en tra-RB? _____
- Pregunta 8. ¿Cuál es la fase en este sitio de empalme? _____

6. Ahora acerca (zoom in) y aleja (zoom out) en el inicio del segundo exón en tra-RB, justo después del sitio del empalme de 3'. Podemos identificar el segundo exón por el “RNA-Seq data”, particularmente usando los datos del “RNA-Seq Exon Junctions” (Figura 5).

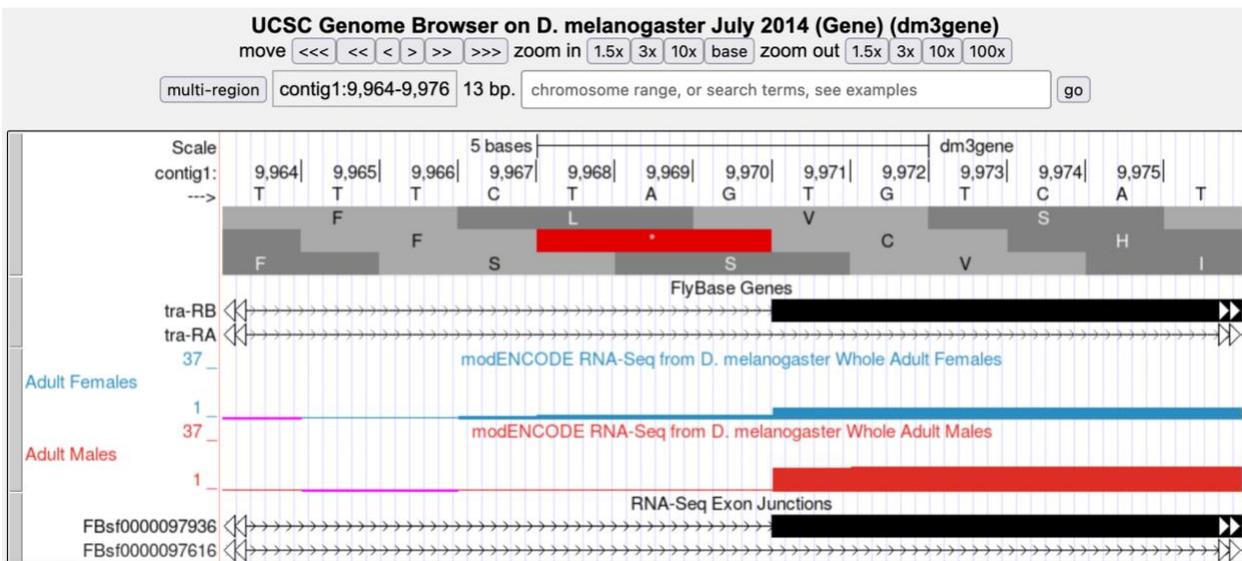


Figura 5 Magnificar al inicio del segundo exon en tra-RB.

- Pregunta 9.** ¿Cuáles son las coordenadas para la primera base del segundo exón en tra-RB? _____
- Pregunta 10.** ¿Cuál es la secuencia de consenso para el sitio de empalme de 3' ? _____
- Pregunta 11.** ¿Cuáles son las coordenadas del sitio de empalme de 3' en intrón 1 de tra-RB? _____
- Pregunta 12.** ¿Qué fase anticipamos? _____
- Pregunta 13.** Teniendo esto, ¿cuál es el marco de lectura para el exón 2 de tra-RB? _____
- Pregunta 14.** Dada la ubicación de los codones de terminación ¿Tiene sentido esto? _____

7. Ahora aleja y acerca el sitio de empalme de 3' para tra-RA. Este se puede identificar en el “RNA-Seq data”, particularmente en el “RNA-Seq Exon Junctions” (Figura 6).

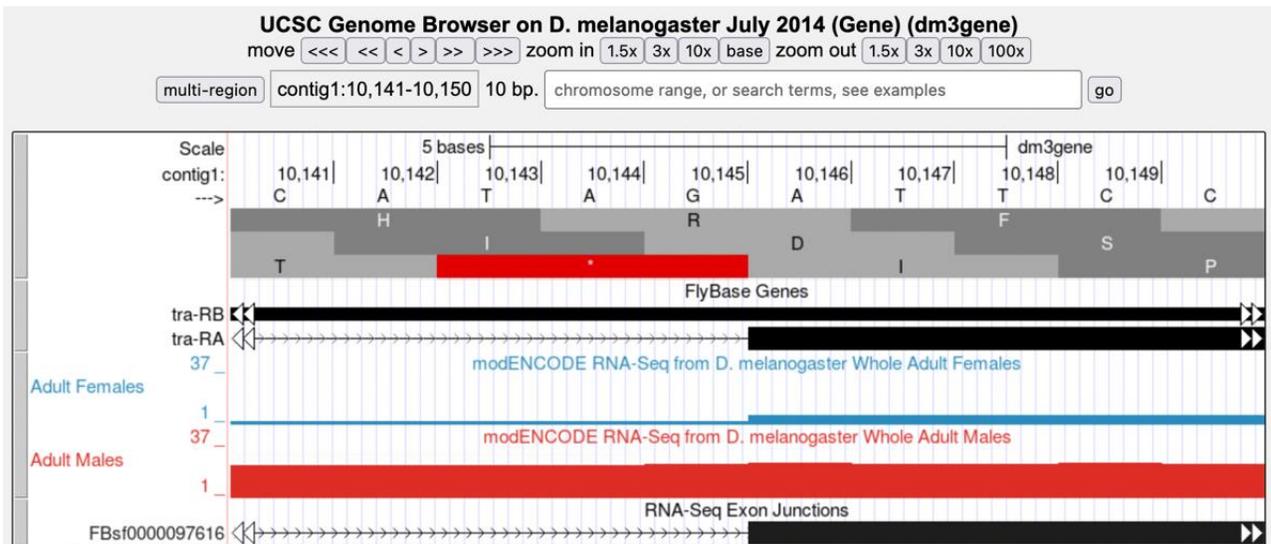


Figura 6 Acercar el inicio del segundo exón para tra-RA.

- Pregunta 15.** ¿Cuáles son las coordenadas de la primera base del segundo exón en tra-RA? _____
- Pregunta 16.** ¿Cuál es la secuencia de consenso para el sitio de empalme de 3' ? _____
- Pregunta 17.** ¿Cuáles son las coordenadas de esa secuencia en el intrón 1 de tra-RA? _____
- Pregunta 18.** Dada la fase en el sitio del donante, ¿qué fase estamos buscando aquí? _____
- Pregunta 19.** Teniendo esto, ¿cuál es el marco de lectura para el exón 2 de tra-RA? _____
- Pregunta 20.** Dada la ubicación de los codones de terminación, ¿Esto tiene sentido? _____

El sitio aceptador del 3' para el segundo intrón en tra-RA se encuentra dentro del segundo exón de tra-RB. Este intrón está *empalmado alternativamente*. El empalme alternativo es una forma en que los eucariotas producen diferentes proteínas de las mismas regiones codificantes del DNA. Aquí la decisión alterna se toma de una manera sexo-específica; las moscas fruteras masculinas han dirigido el empalmosoma a utilizar el primer sitio de aceptación de 3' identificado por el “RNA-Seq Exon Junction data”, mientras que las moscas fruteras hembra han dirigido al empalmosoma a utilizar el segundo sitio de aceptación de 3' identificado. Este cambio en el empalme tiene efectos profundos – de hecho,

impulsa la programación de características masculinas y femeninas en la mosca en desarrollo. Para repasar el empalme alternativo presione en el siguiente enlace: [Genes and Isoforms video](#).

8. Restablece tu navegador introduciendo "**contig1:9,700-11,000**" en el cuadrado marcado como "chromosome range or search terms" y pulse ir. Analicemos las consecuencias de este empalme alternativo en la producción de un producto proteico.

Pregunta 21. A partir de tu análisis de la isoforma RA de gen *tra* en el módulo 5, ¿Cuántos aminoácidos tiene el producto proteico tra-RA? _____

Ahora mira la isoforma tra-RB: _____

Pregunta 22. Anota las coordenadas de exón 1. _____

Pregunta 23. Dado el marco de lectura que usted estableció para tra-RB, la traducción continúa a través del exón 2, ¿o se termina por un codón de terminación? _____

Pregunta 24. Anota las coordenadas de la parte traducida de exón 2. _____

Pregunta 25. ¿Cuántos aminoácidos tiene la proteína traducida de la isoforma tra-RB? _____

Pregunta 26. ¿Es probable que la proteína traducida del gen tra-RB pueda desempeñar el mismo papel funcional desempeñado por la proteína traducida de tra-RA? _____

La proteína Tra tiene una función importante en las hembras de *Drosophila* y es en sí misma un factor de empalme que regula el empalme. La anotación cuidadosa de genes, como hemos hecho aquí, puede proporcionar muchos conocimientos sobre los mecanismos de control biológico.

Investigación 2. ¿Cuáles son las consecuencias del empalme alternativo en los polipéptidos producidos a partir de cada isoforma?

Ahora que sabemos que *el tra* está empalmado alternativamente para hacer dos isoformas, tra-RA y tra-RB, y que los machos expresan una isoforma mientras las hembras expresan la otra, tratemos de averiguar cómo el empalme alternativo afecta a los polipéptidos producidos por la traducción de estos mRNAs. Para ello, necesitamos producir un modelo genético para tra-RB y compararlo con el modelo genético para tra-RA que construiste en el Módulo 5, mostrando dónde aparecen los codones de iniciación y terminación en cada isoforma.

Utiliza lo que aprendiste en el módulo 5 para construir un modelo genético para tra-RB. Localiza el codón de iniciación, los sitios de empalme y el codón de terminación. Construye el modelo genético a continuación.

Pregunta 27. Coordinada para el inicio de la traducción: _____

Pregunta 28. Coordinación para la última base de exón 1: _____

Pregunta 29. Coordinación para la primera base de exón 2: _____

Pregunta 30. Coordinación para la última base de exón 2: _____

Pregunta 31. Coordinada para primera base de exón 3: _____

Pregunta 32. Detiene las coordenadas del codón: _____

Puntos de discusión:

¿En qué se diferencia el polipéptido traducido del isoformo tra-RB del polipéptido traducido del isoformo tra-RA? ¿Cuáles son las consecuencias de estas diferencias en la función proteica?

¡¡Discutir cómo el mRNA más grande conduce a la creación de un polipéptido más pequeño!!

Considera cómo el empalme alternativo podría permitir que muchas proteínas diferentes sean codificadas por el mismo gen.

Basado en la estructura genética de las dos isoformas de *tra* mostradas en el "FlyBase Gene track", proporciona una hipótesis que podría explicar esta diferencia en el "RNA-Seq Read Coverage" entre la muestra de machos adultos y la muestra de hembras adultas.