

Regulação da expressão gênica I

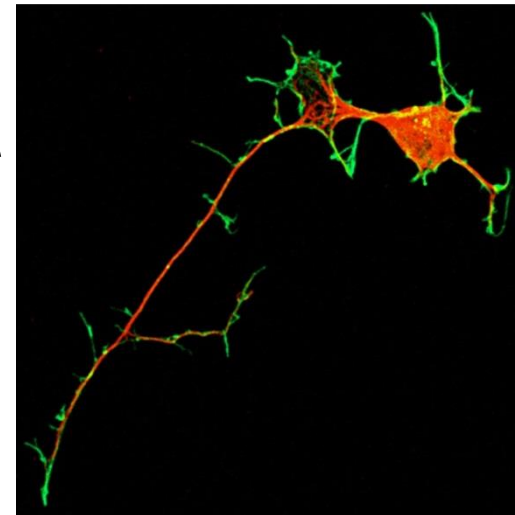
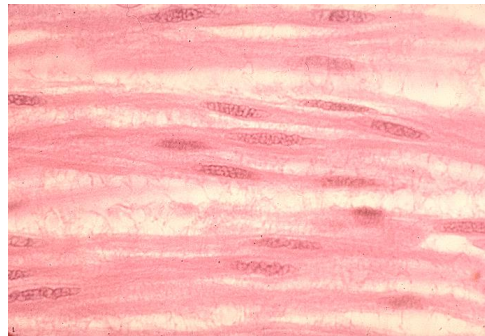
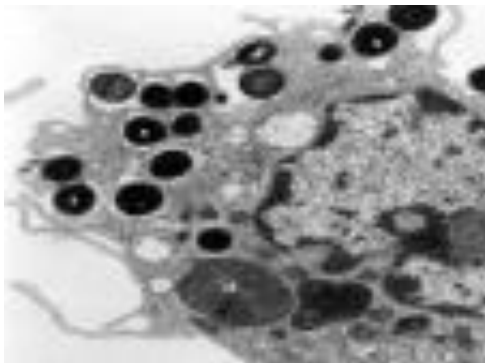
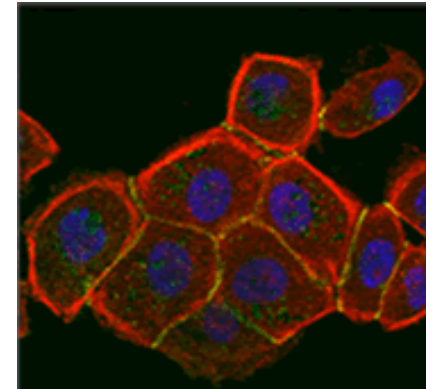
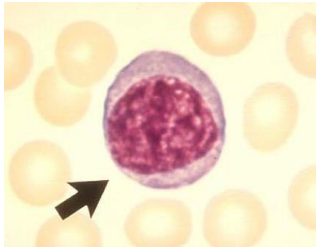
“Potência sem controle não é nada!”

Enrique Boccardo

eboccardo@usp.br

Regulação da expressão gênica

Como é possível?

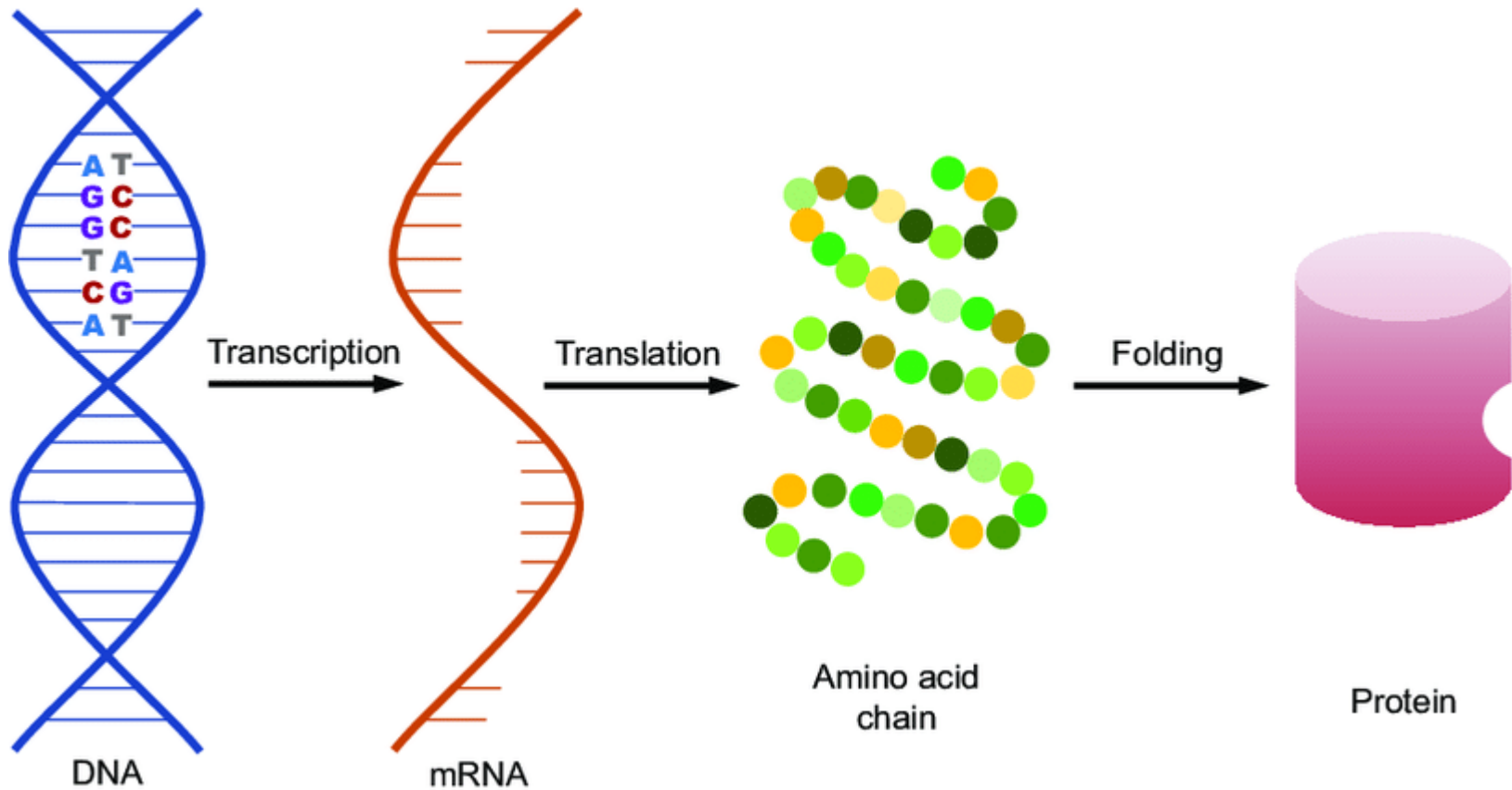


Regulação da expressão gênica

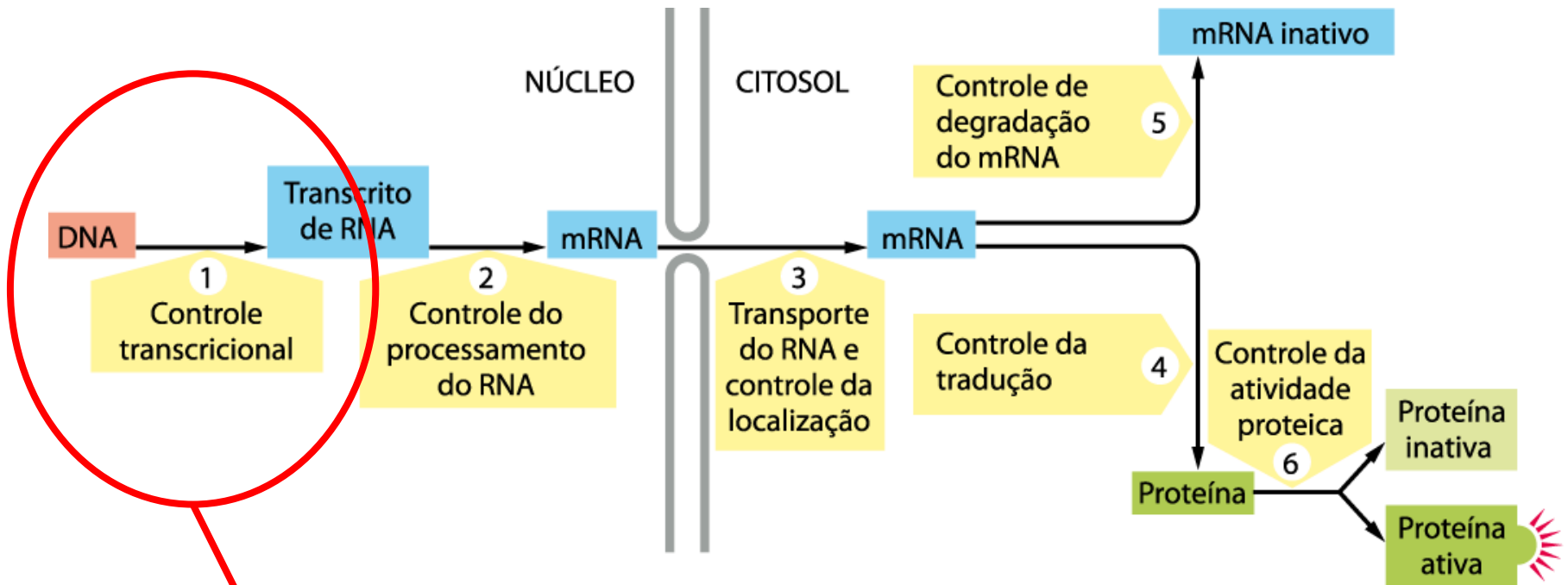
Tudo pode ser resumido a poucas questões simples...

- **QUEM?**
- **ONDE?**
- **QUANDO?**
- **QUANTO?**

Regulação da expressão gênica



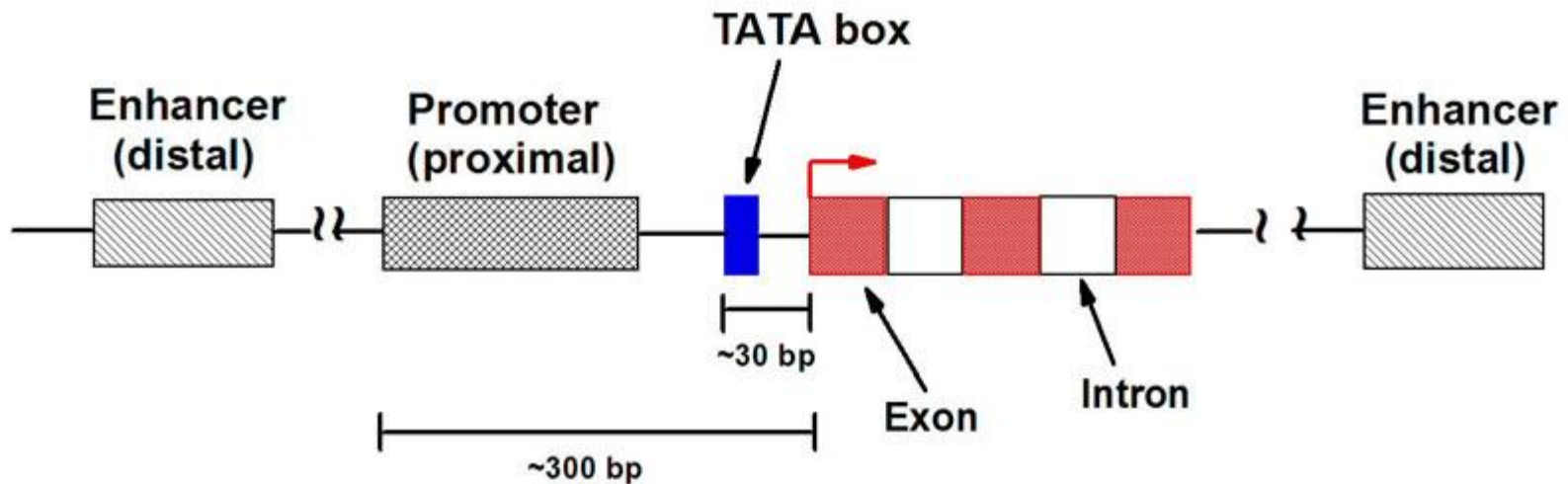
Regulação da expressão gênica



O controle do início do transcrição é o principal

Regulação da expressão gênica

Estrutura de um gene que codifica proteínas

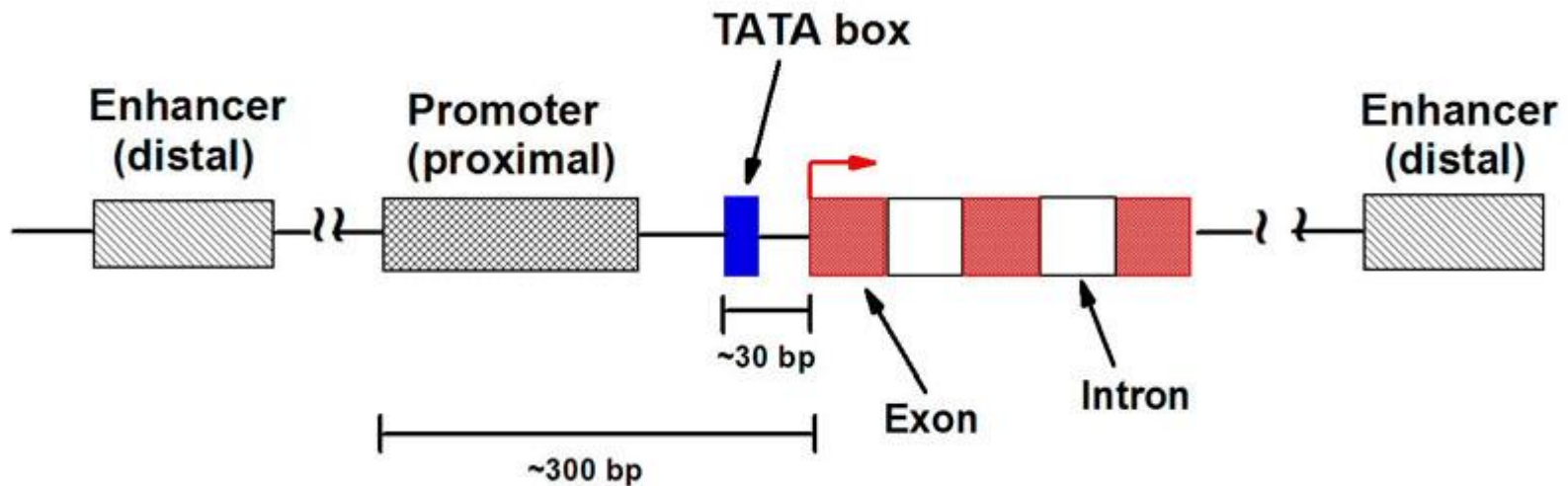


- Funcionalmente, um gene é maior do que a região que codifica a proteína ou o RNA funcional.

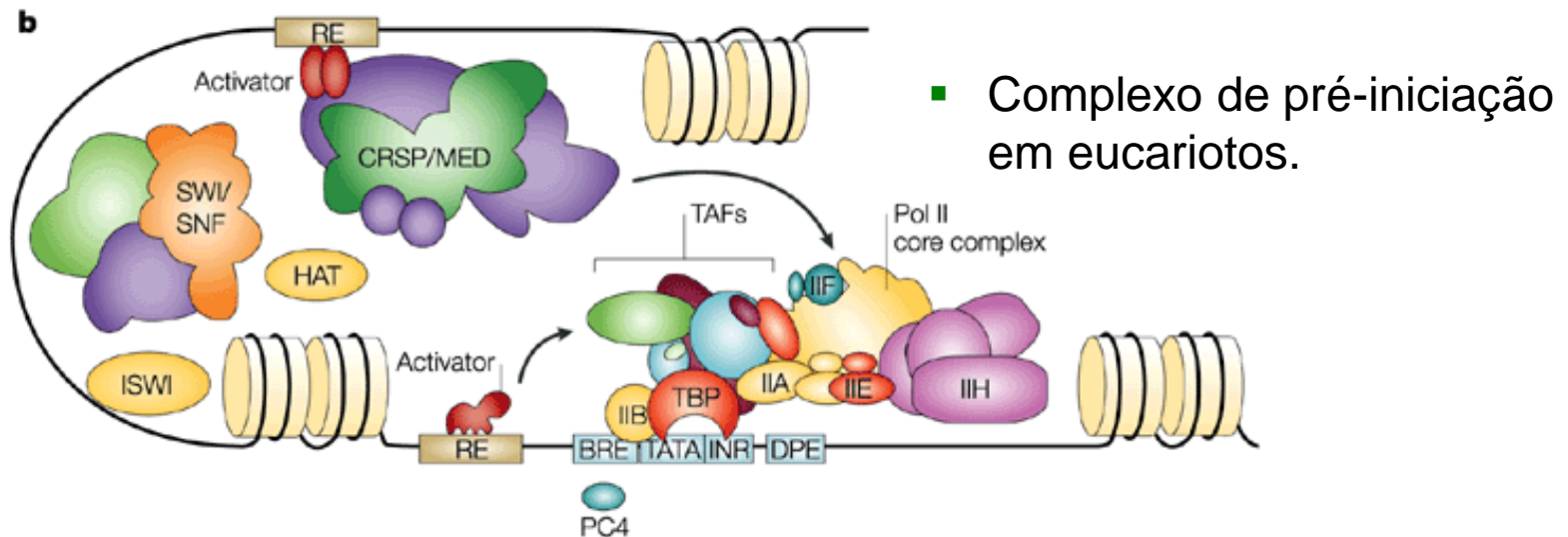
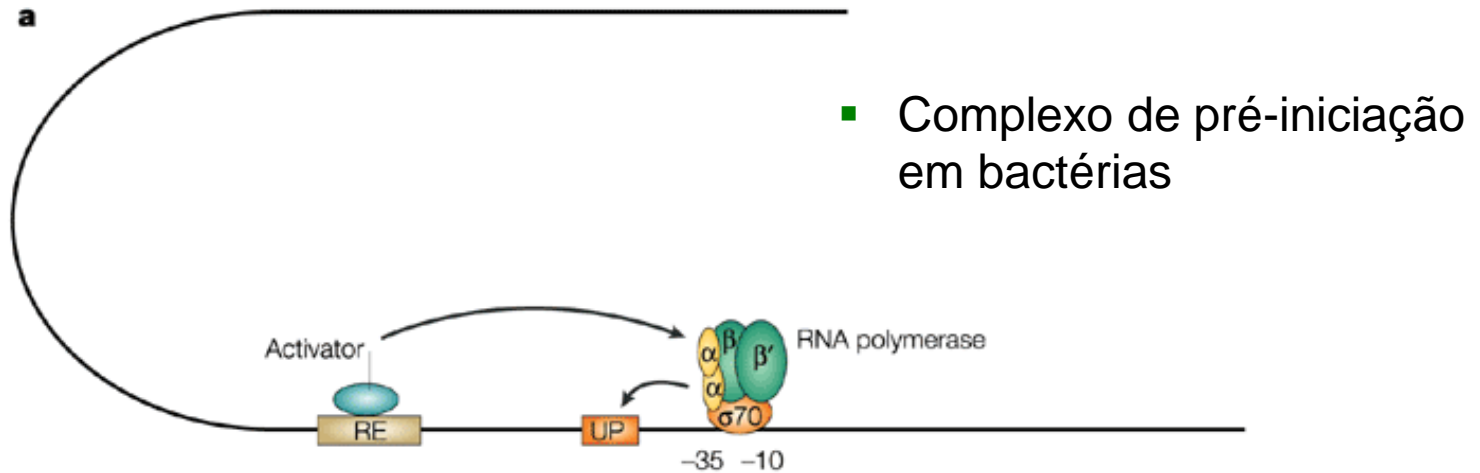
Regulação da expressão gênica

A expressão de um gene é regulada por uma combinação de:

- **Elementos *trans*** – proteínas codificadas por outra molécula de DNA ou por genes distantes que precisam se locomover para chegar ao promotor que será regulado.
- **Elementos *cis*** – sequências presentes na região regulatória (promotor e *enhancer*) do gene regulado.

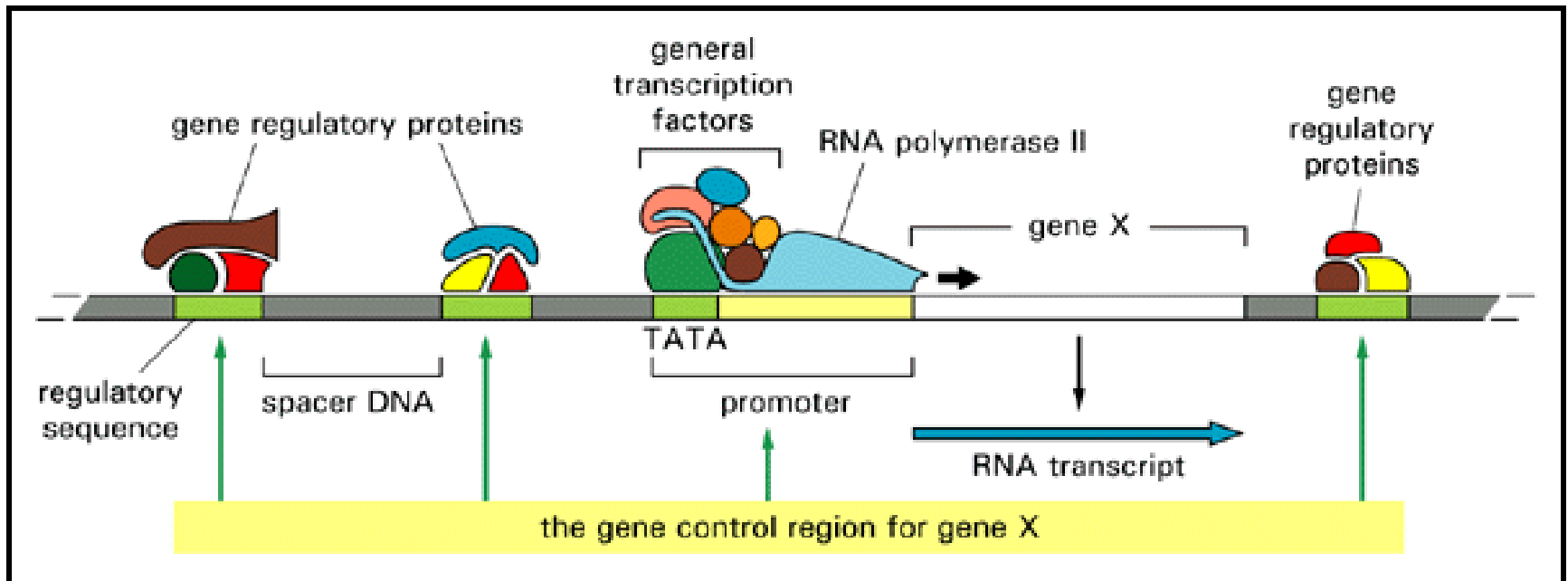


Regulação da expressão gênica

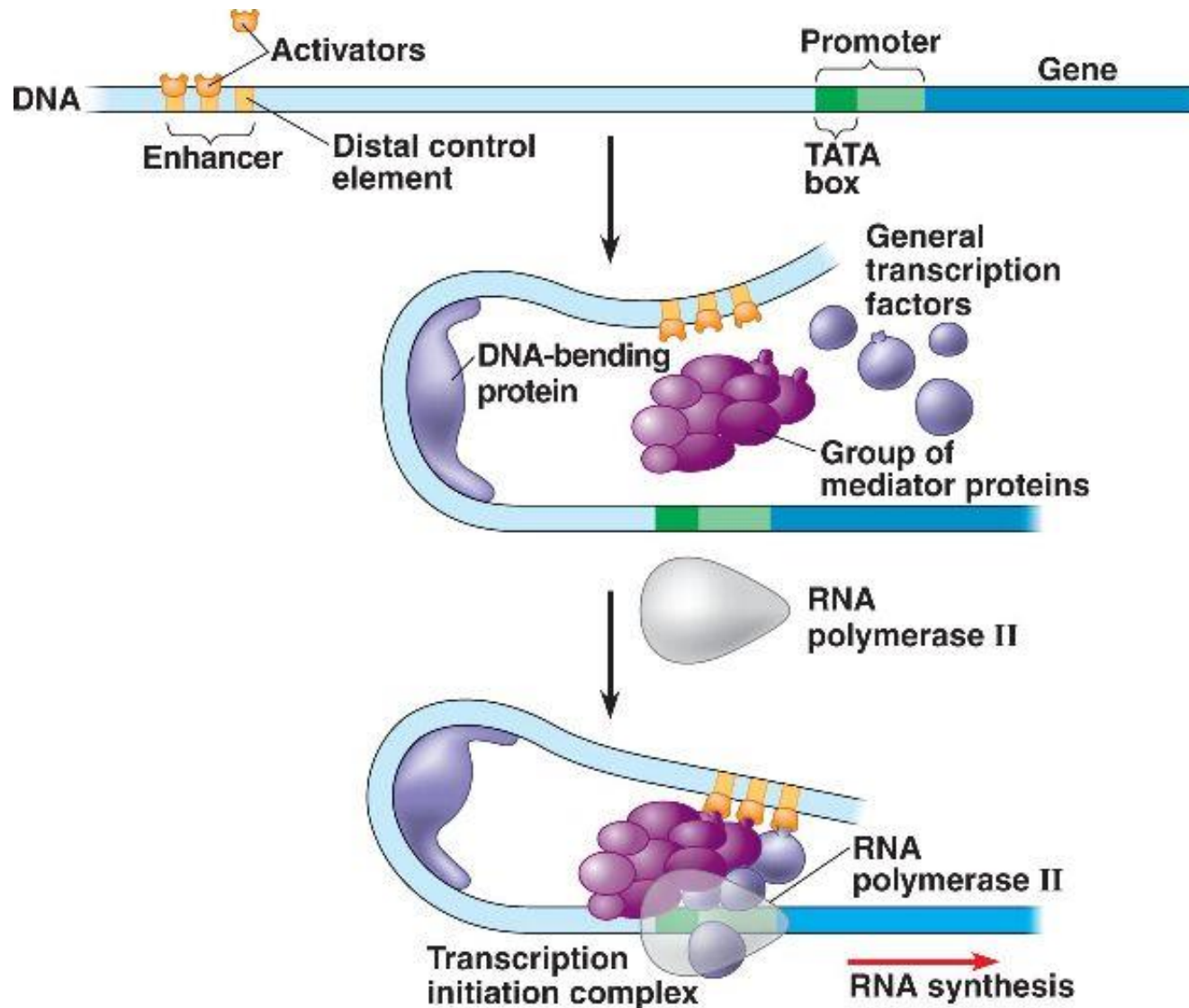


Regulação da expressão gênica

- A expressão de um gene é regulada por uma combinação de sequências regulatórias e fatores de transcrição.



Regulação da expressão gênica



Regulação da expressão gênica

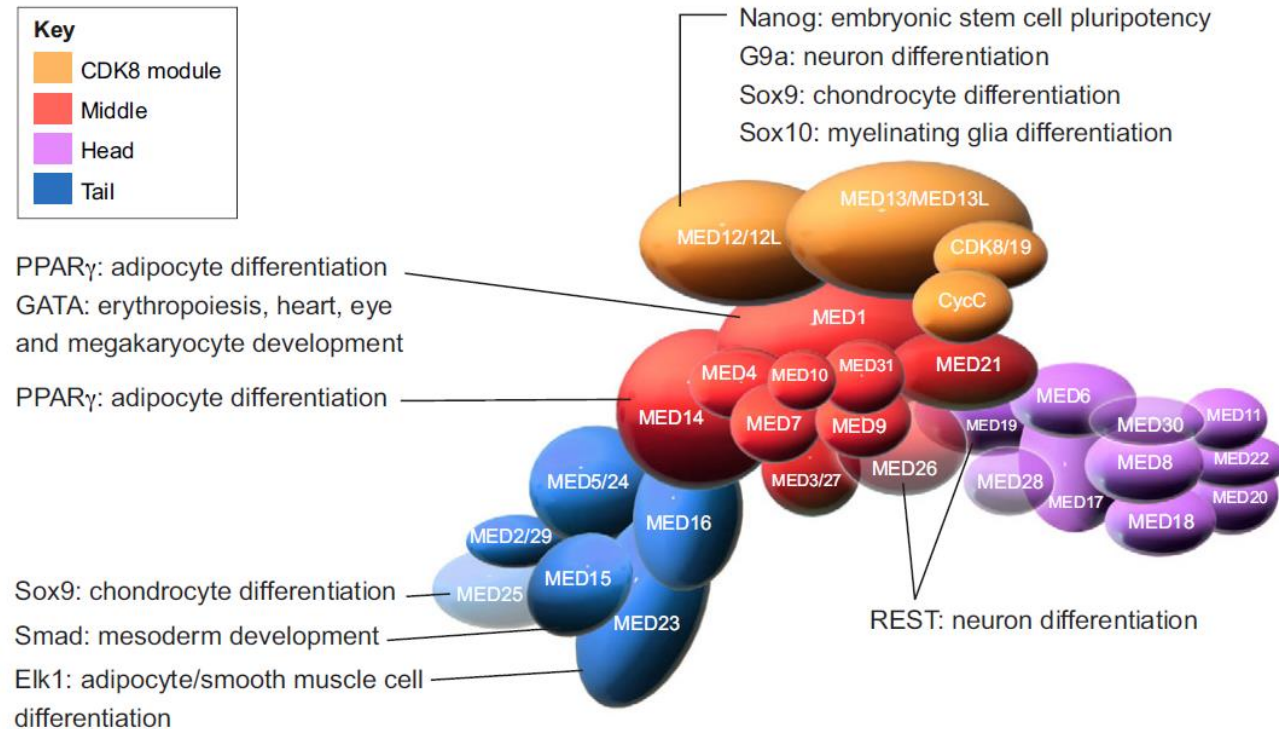


Fig. 1. Composition of the mammalian Mediator complex. The predicted composition of the complex and the relative sizes of individual subunits are based on the published literature. The positions of several subunits (e.g. MED25, MED26, MED28 and MED30) are postulated, as denoted by their transparency (see Larivière et al., 2012). Several representative transcription factor-Mediator subunit interactions and their involvement in developmental processes are indicated.

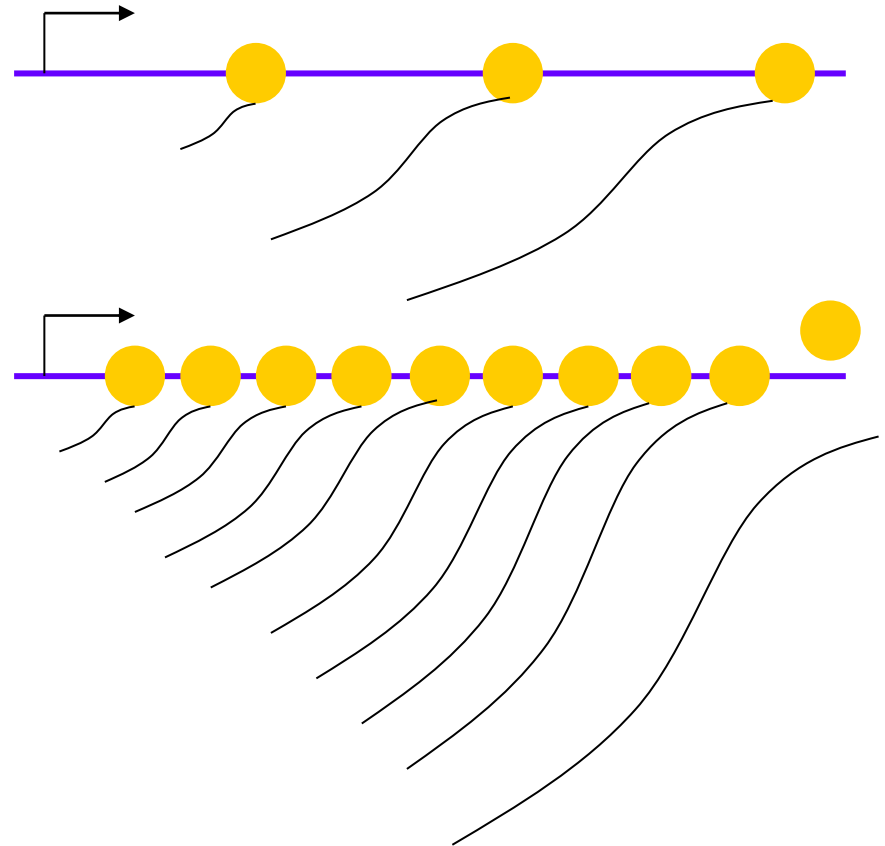
Regulação da expressão gênica

Fatores de Transcrição

Fatores que decodificam mensagens do exterior da célula para o núcleo



Alteram a taxa de início de transcrição gênica



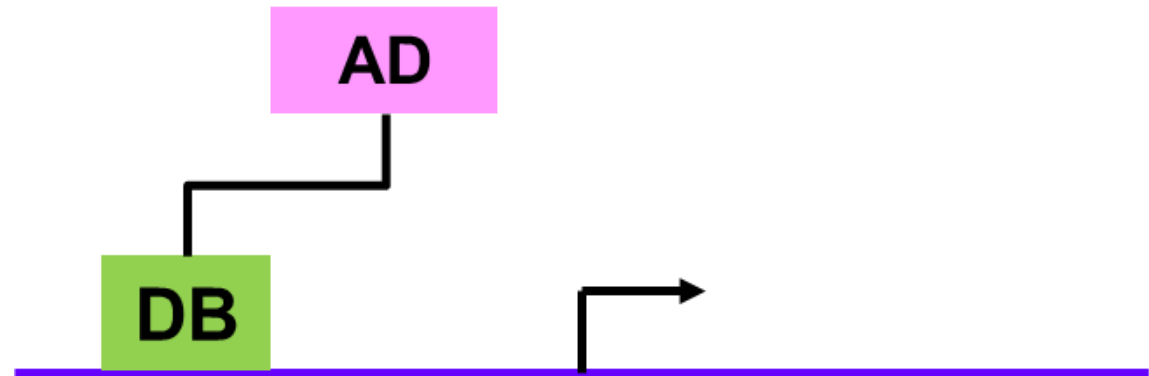
Regulação da expressão gênica

Fatores de Transcrição

Fatores que decodificam mensagens do exterior da célula para o núcleo



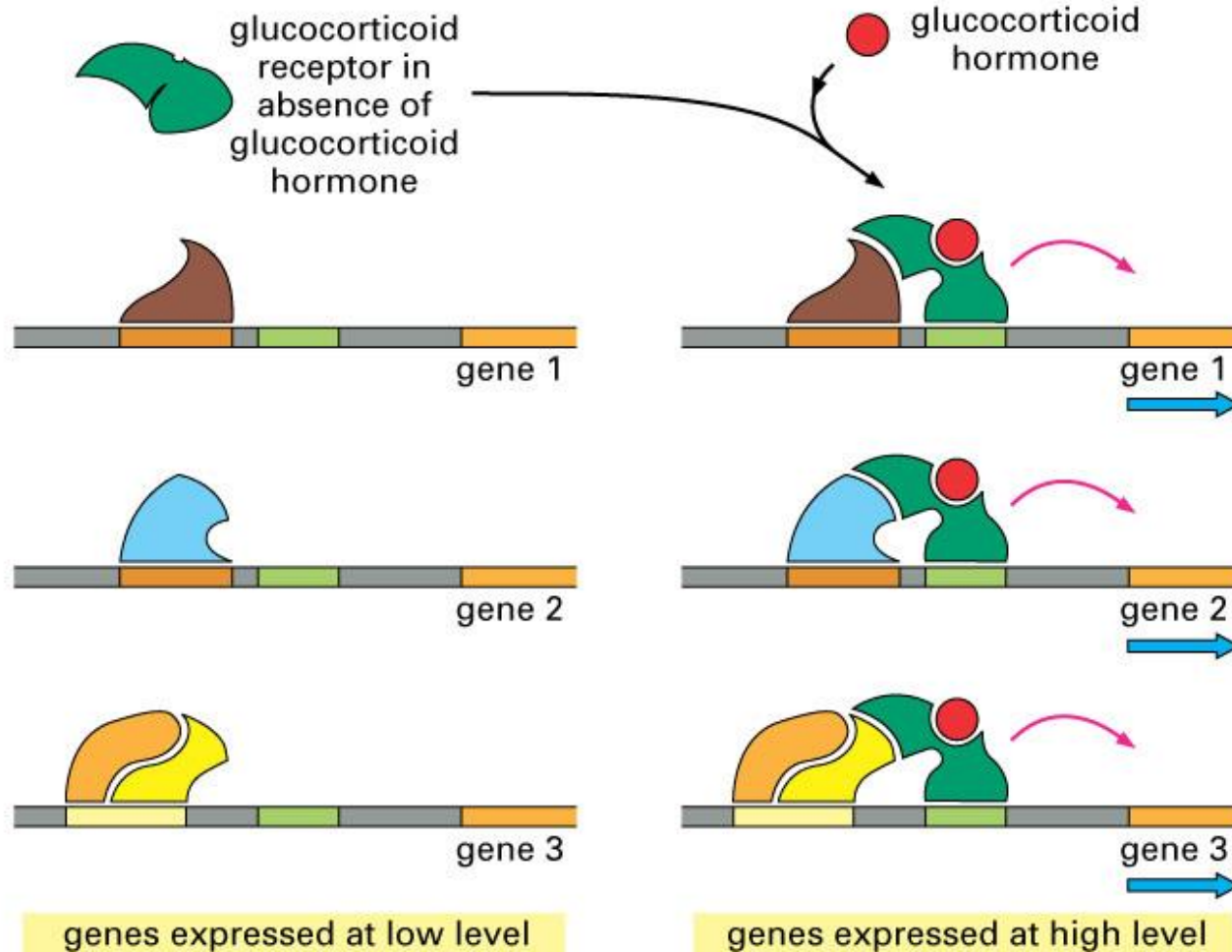
Alteram a taxa de início de transcrição gênica



Regulação da expressão gênica

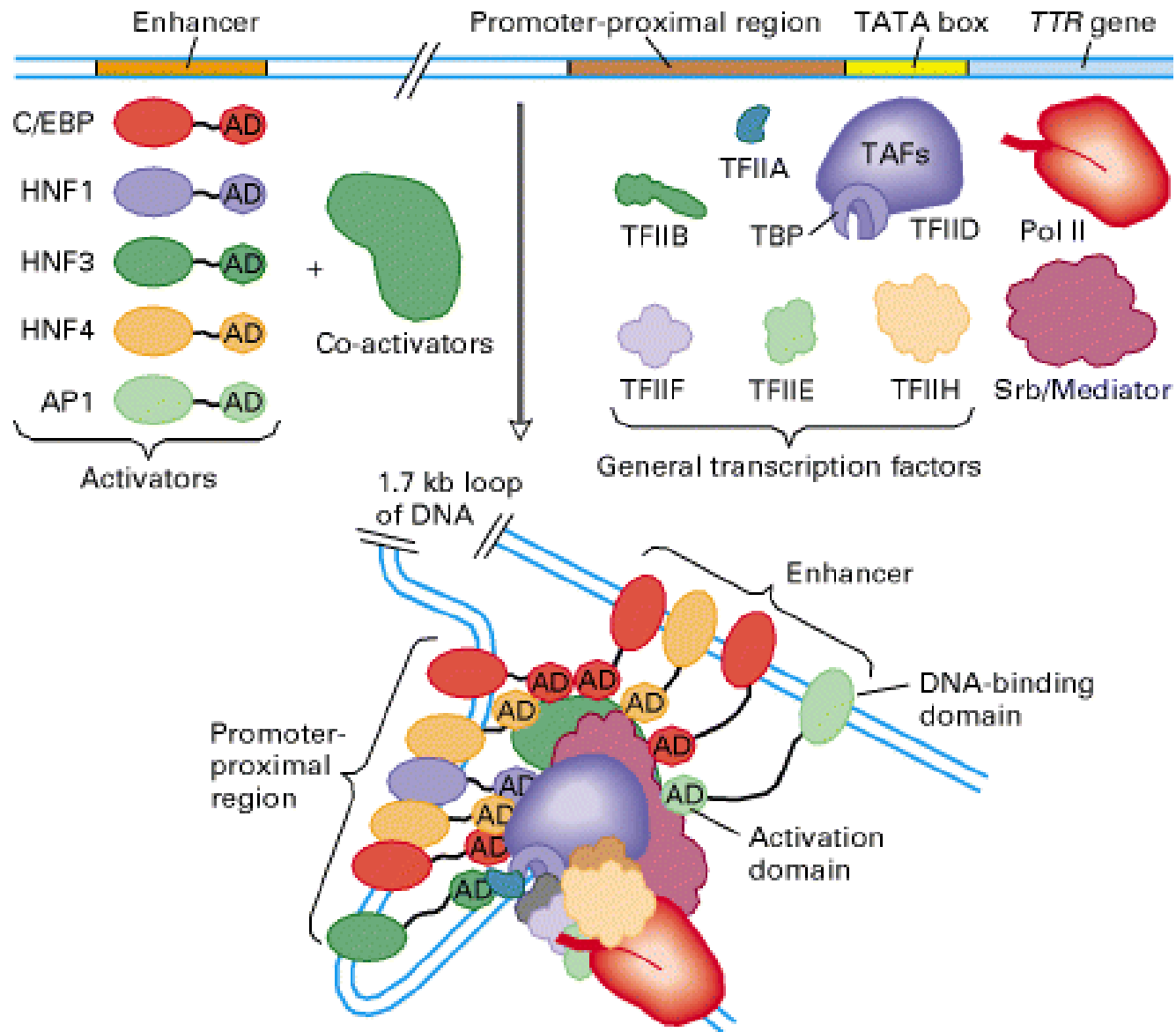
Fatores de Transcrição

- A combinação é importante.



Regulação da expressão gênica

Fatores de Transcrição



Regulação da expressão gênica

Fatores de Transcrição

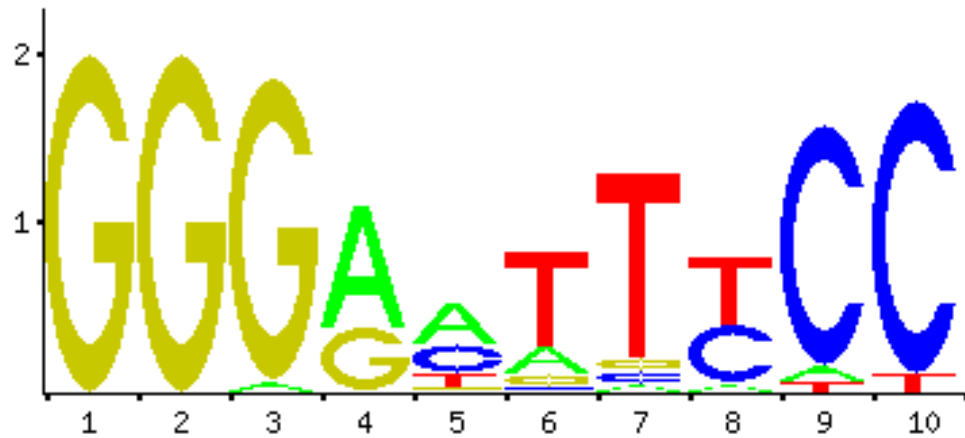
- Os fatores de transcrição atuam através de sua ligação à seqüências específicas.

Fator de Transcrição	Sítio de ligação consenso
Specificity protein 1 (Sp1)	GGGCGG
CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP)	CCAAT
Activator protein 1 (AP1)	TGACTCA
Octamer binding proteins (OCT-1 and OCT-2)	ATGCAAAT
E-box binding proteins (E12, E47, E2-2)	CANNTG

N = qualquer nucleotídeo

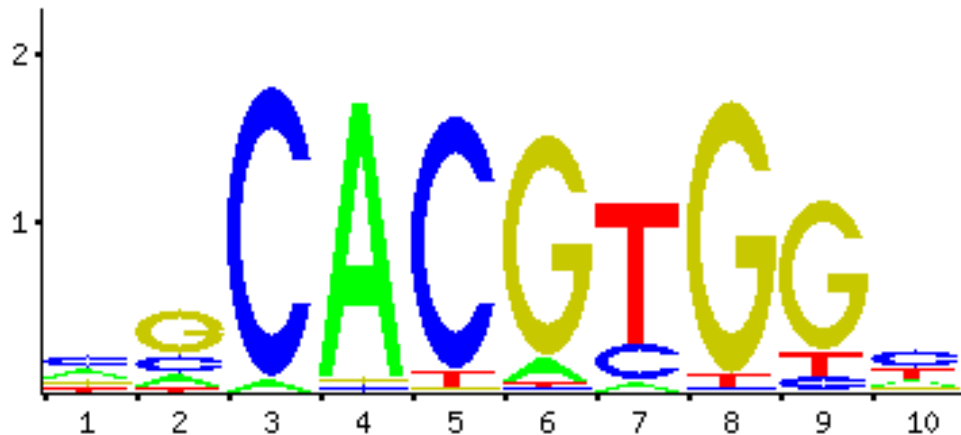
Regulação da expressão gênica

Fatores de Transcrição



NF κ B

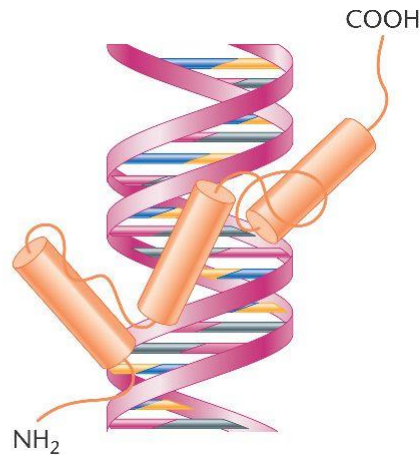
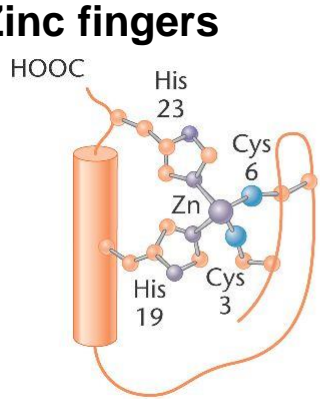
- Cada fator tem sua seqüência consenso.



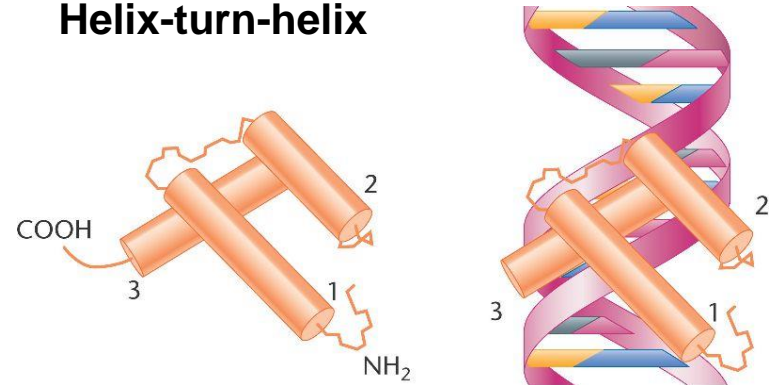
Myc

Fatores de Transcrição: estruturas específicas

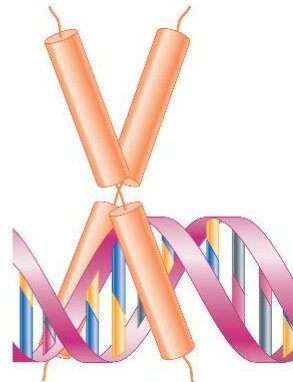
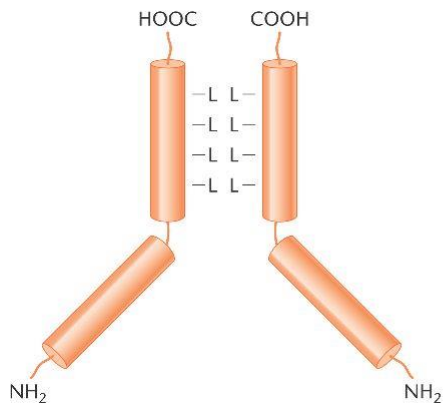
Zinc fingers



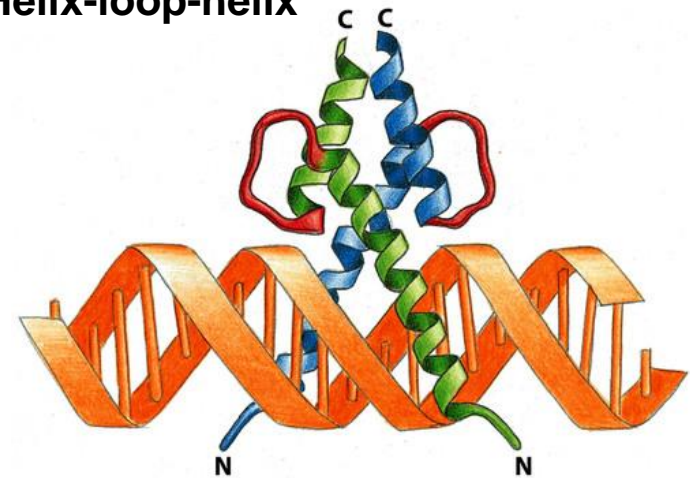
Helix-turn-helix



Leucine zipper

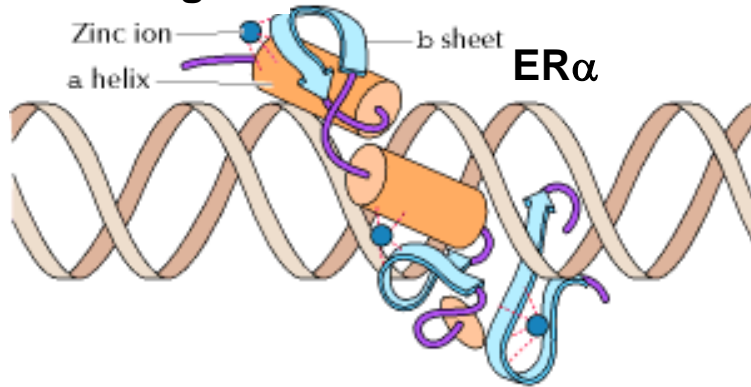


Helix-loop-helix

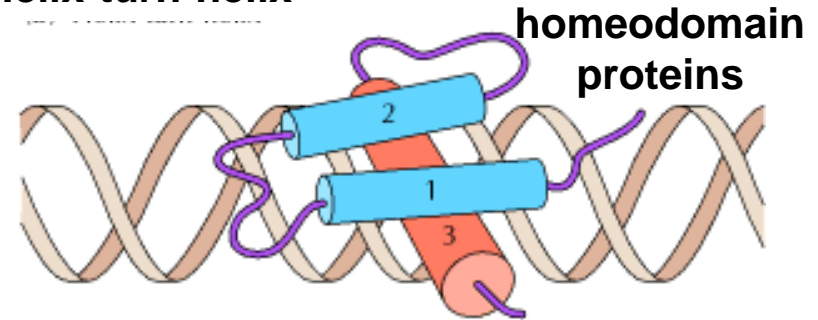


Fatores de Transcrição: estruturas específicas

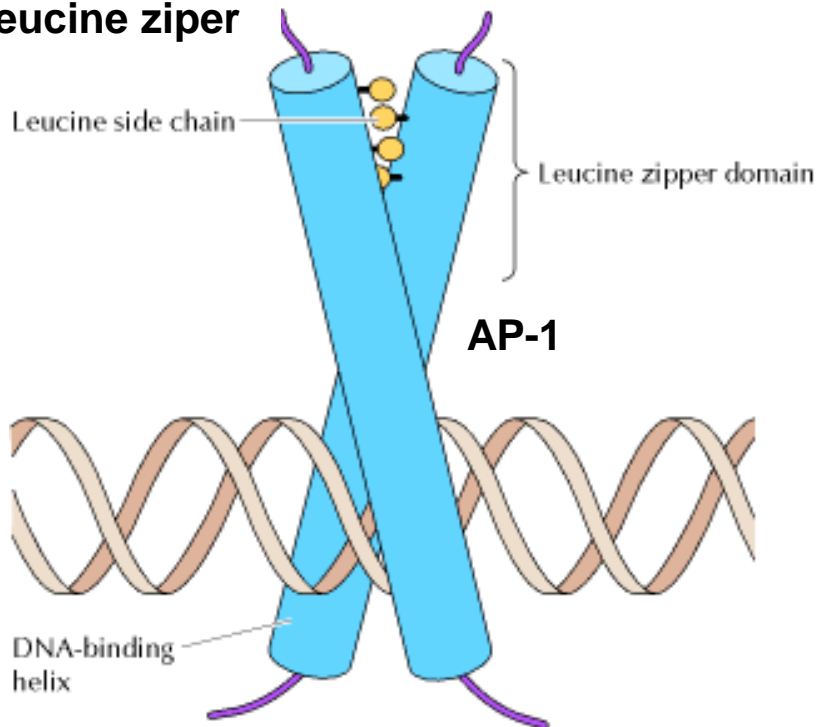
Zinc fingers



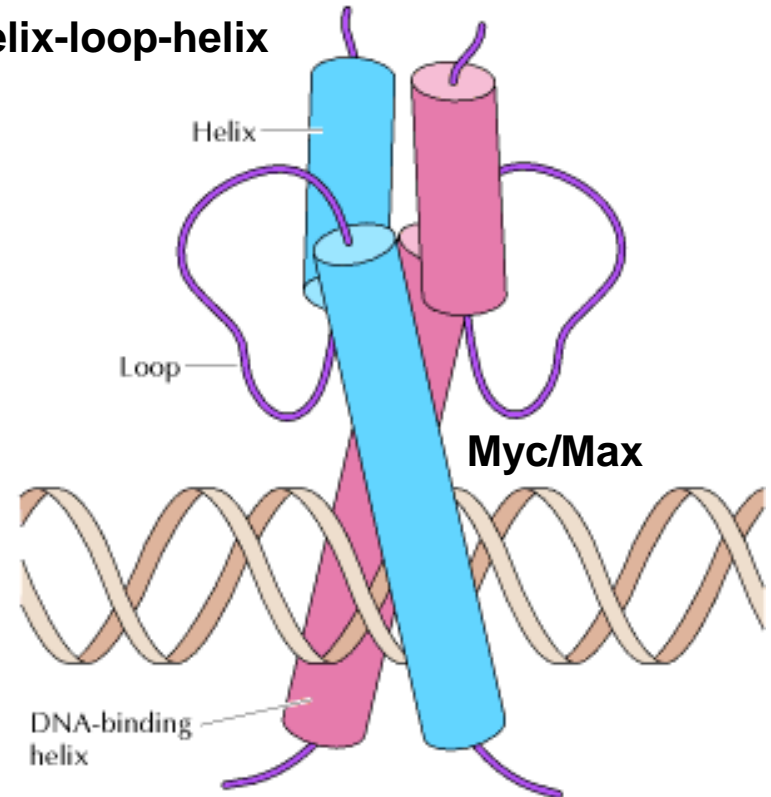
Helix-turn-helix



Leucine zipper



Helix-loop-helix



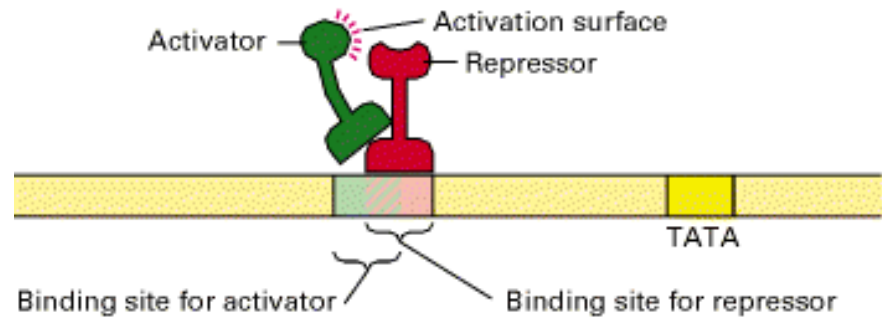
Fatores de Transcrição

Fatores de transcrição também podem reprimir expressão gênica.

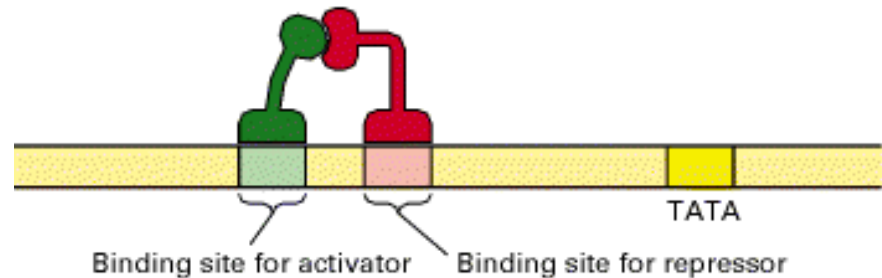
Interação direta com outros fatores de transcrição

Recrutamento de enzimas que alterem o status da cromatina eg., Mad/Max - HDAC

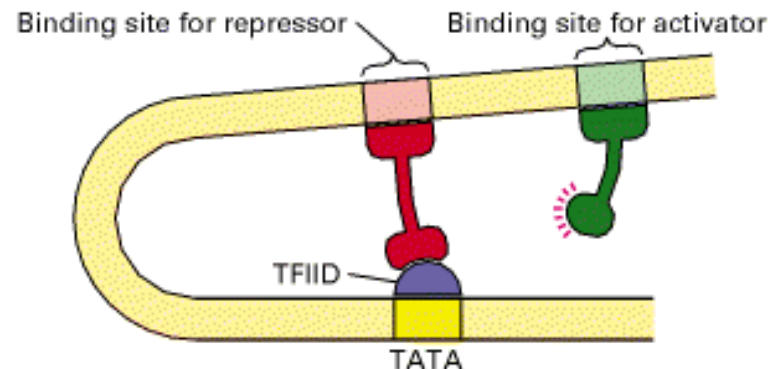
(a) Competitive binding with activator



(b) Interaction with activation domain of bound activator

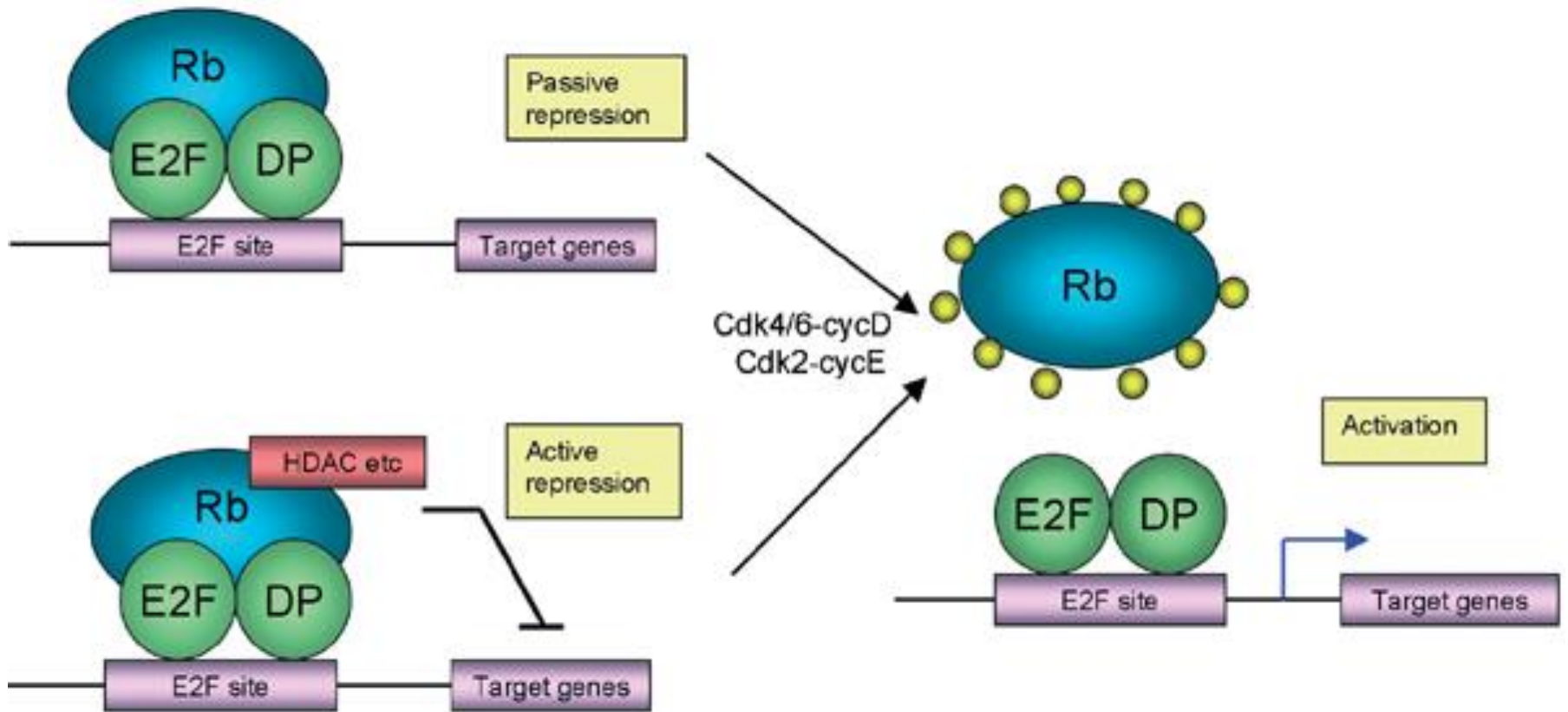


(c) Interaction with general transcription factors



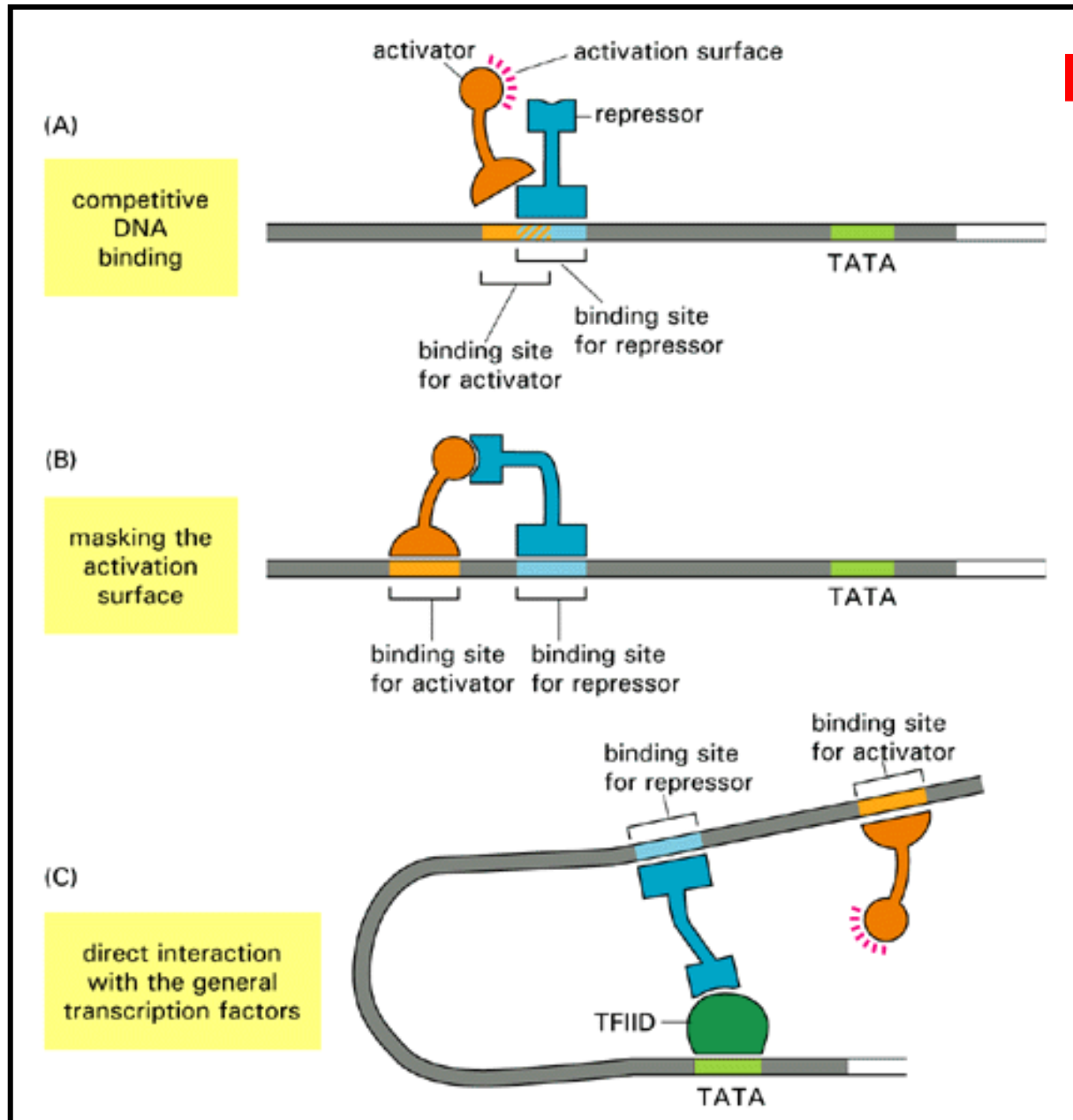
Regulação da expressão gênica

Positiva vs. Negativa



Regulação da expressão gênica

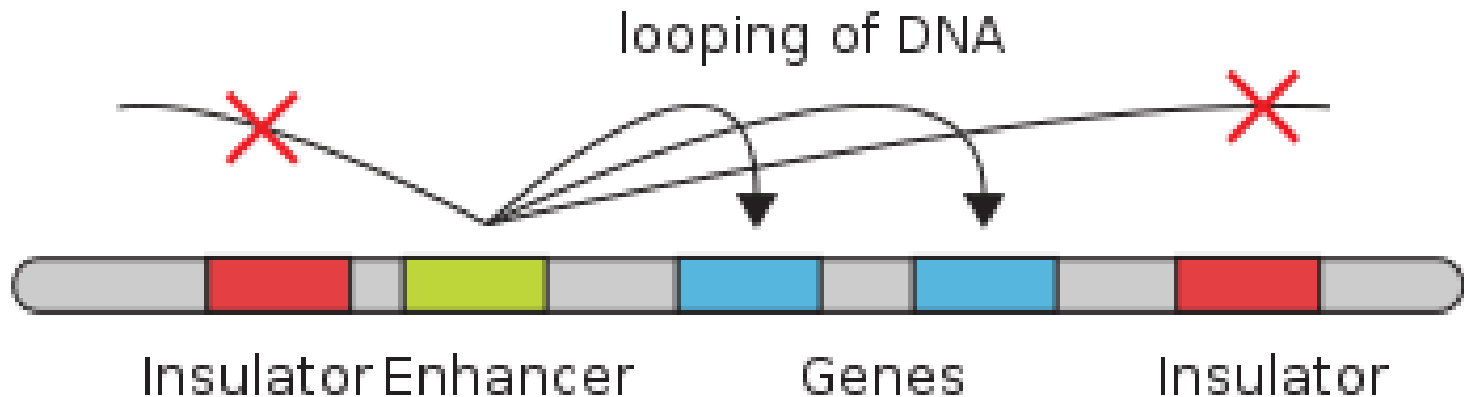
Negativa



Regulação da expressão gênica

Elementos regulatórios à distância: *Enhancers e insulators*

Podem regular a expressão de um gene distante independentemente da sua orientação ou posição.



Regulação da expressão gênica

Elementos regulatórios: *Enhancers*

ESTRUTURA

Promovem dobras ou alterações na estrutura do DNA facilitando a ligação da maquinaria basal

MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

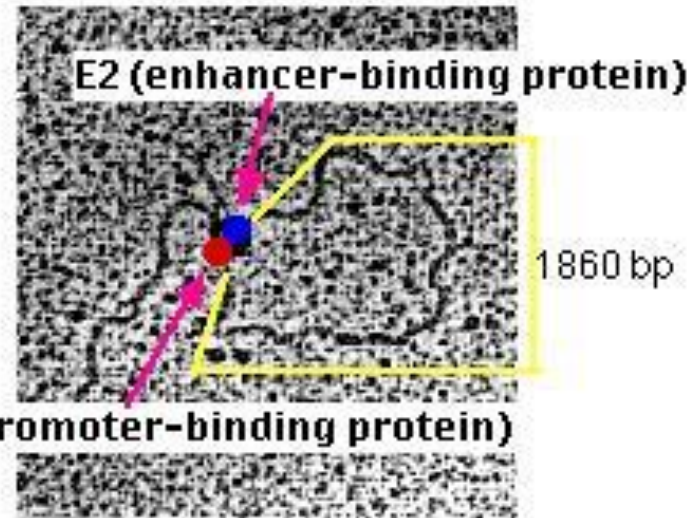
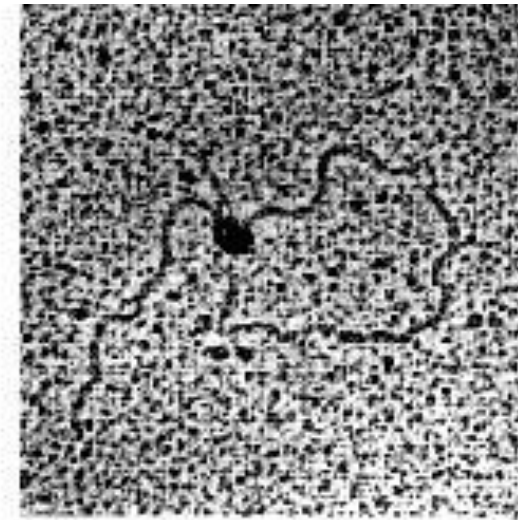
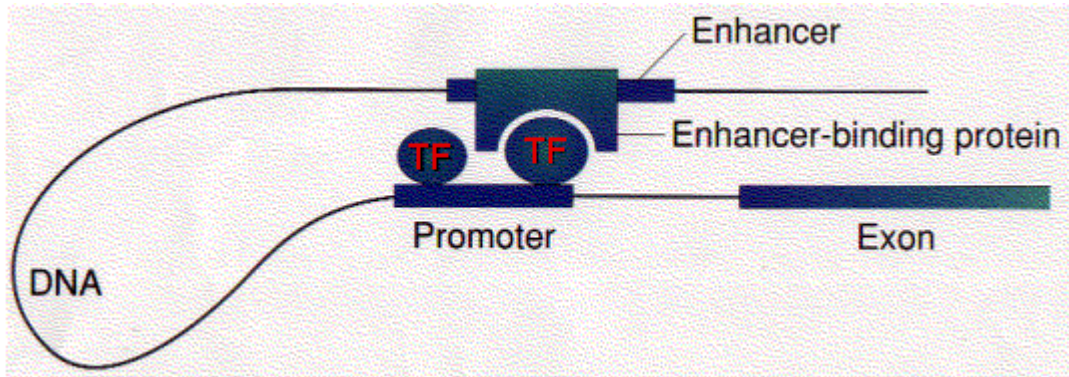
Recrutam enzimas que acetilam histonas para facilitar acesso de fatores de transcrição ou maquinaria basal ao DNA

TERMODINÂMICA

Recrutam fatores da maquinaria basal, alterando a concentração local destes fatores, portanto facilitando a ligação dos mesmos ao DNA.

Regulação da expressão gênica

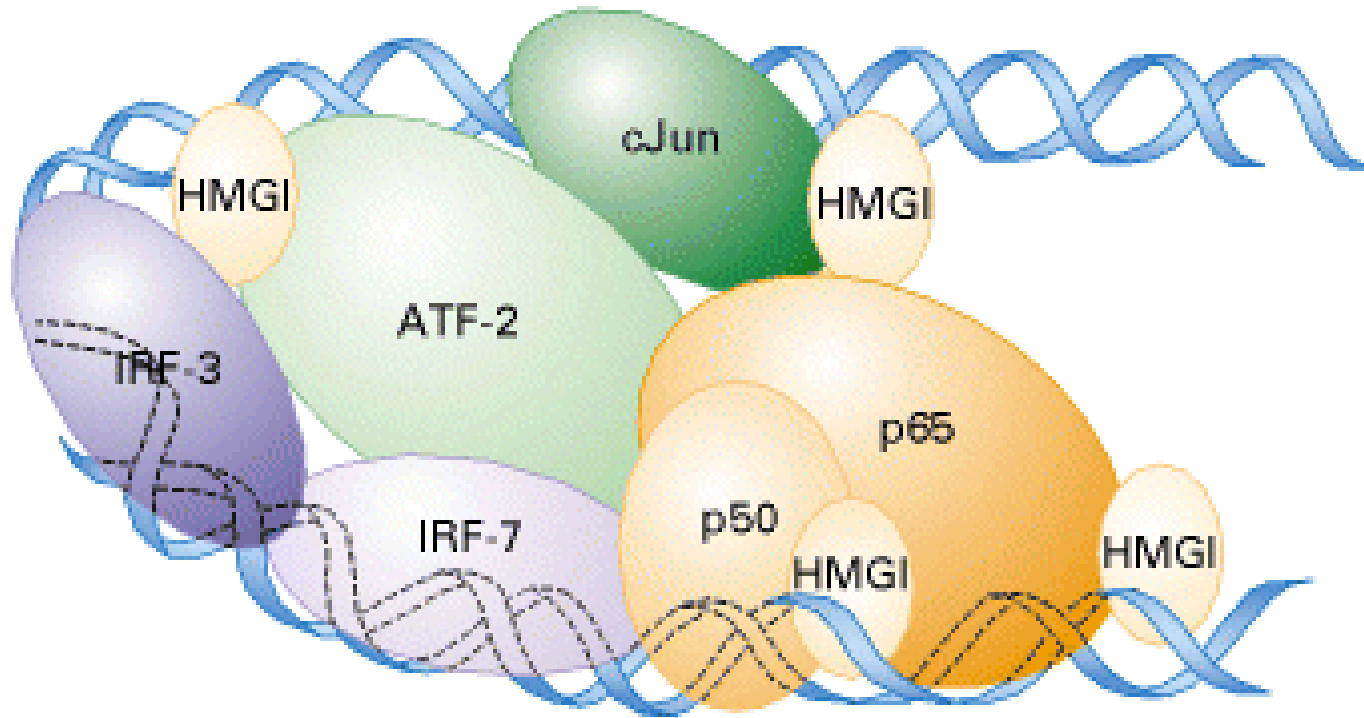
Elementos regulatórios: *Enhancers*



Sp1 (promoter-binding protein)

Regulação da expressão gênica

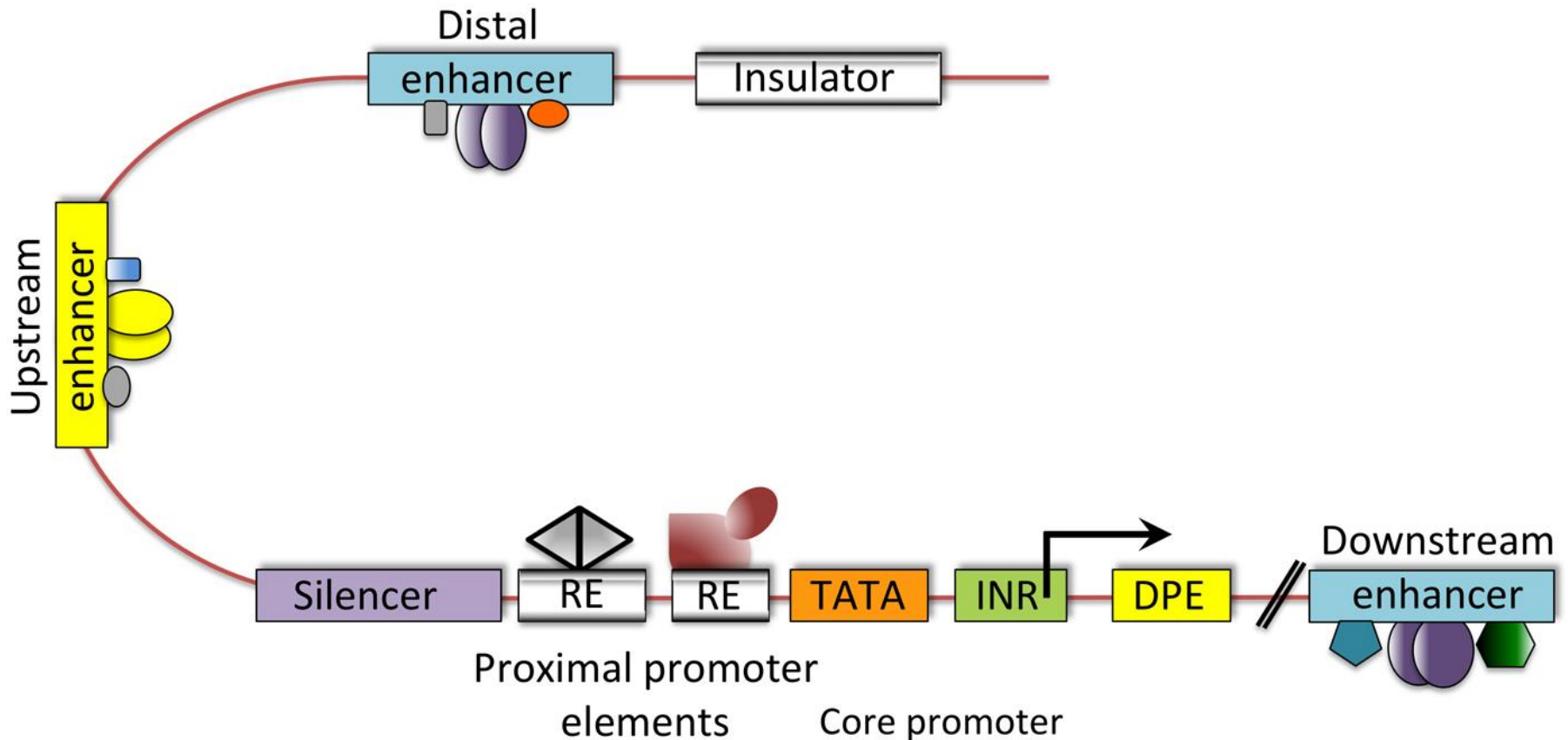
Elementos regulatórios: *Enhancers*



“**Enhanceossomo**” – complexo de fatores de transcrição que regulam a expressão de um determinado gene.

Regulação da expressão gênica

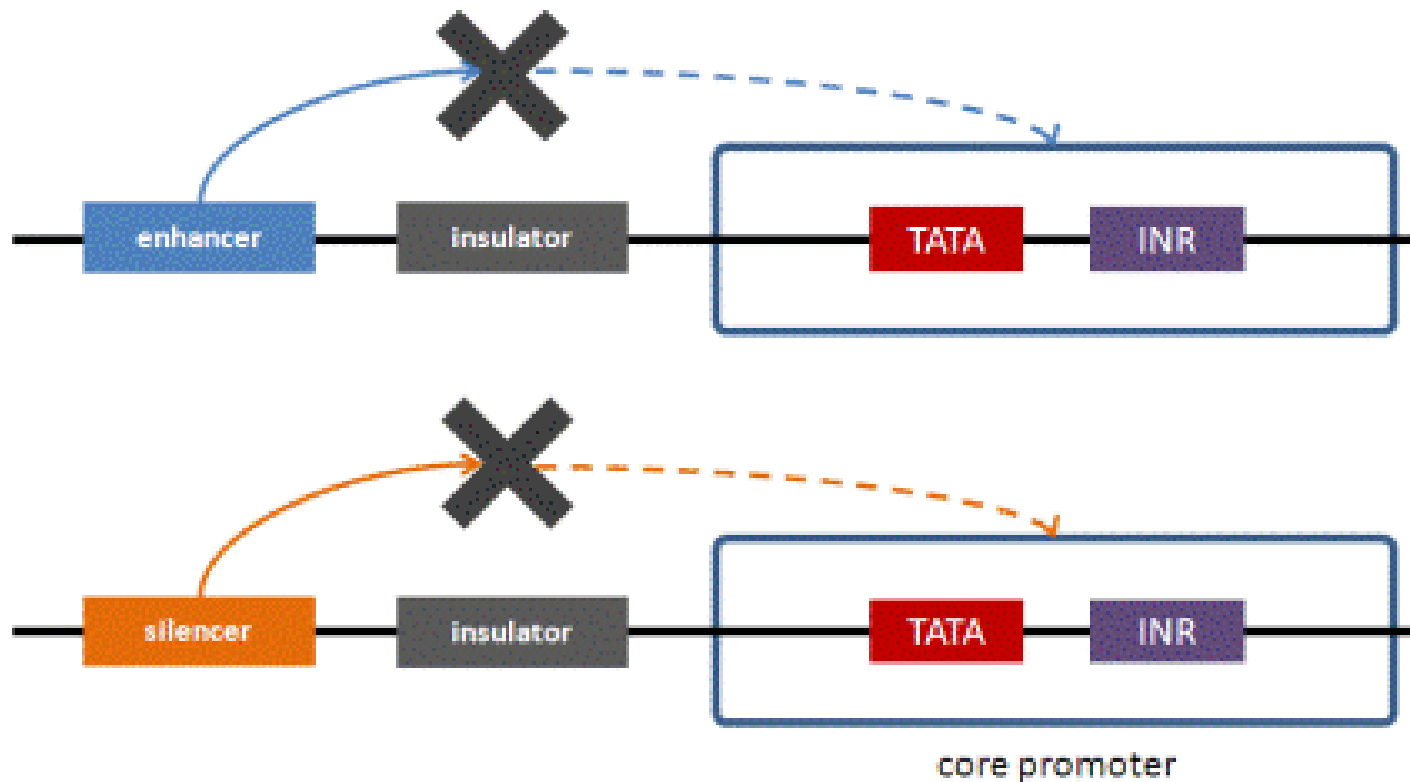
Elementos regulatórios à distância: *Enhancers e insulators*



Regulação da expressão gênica

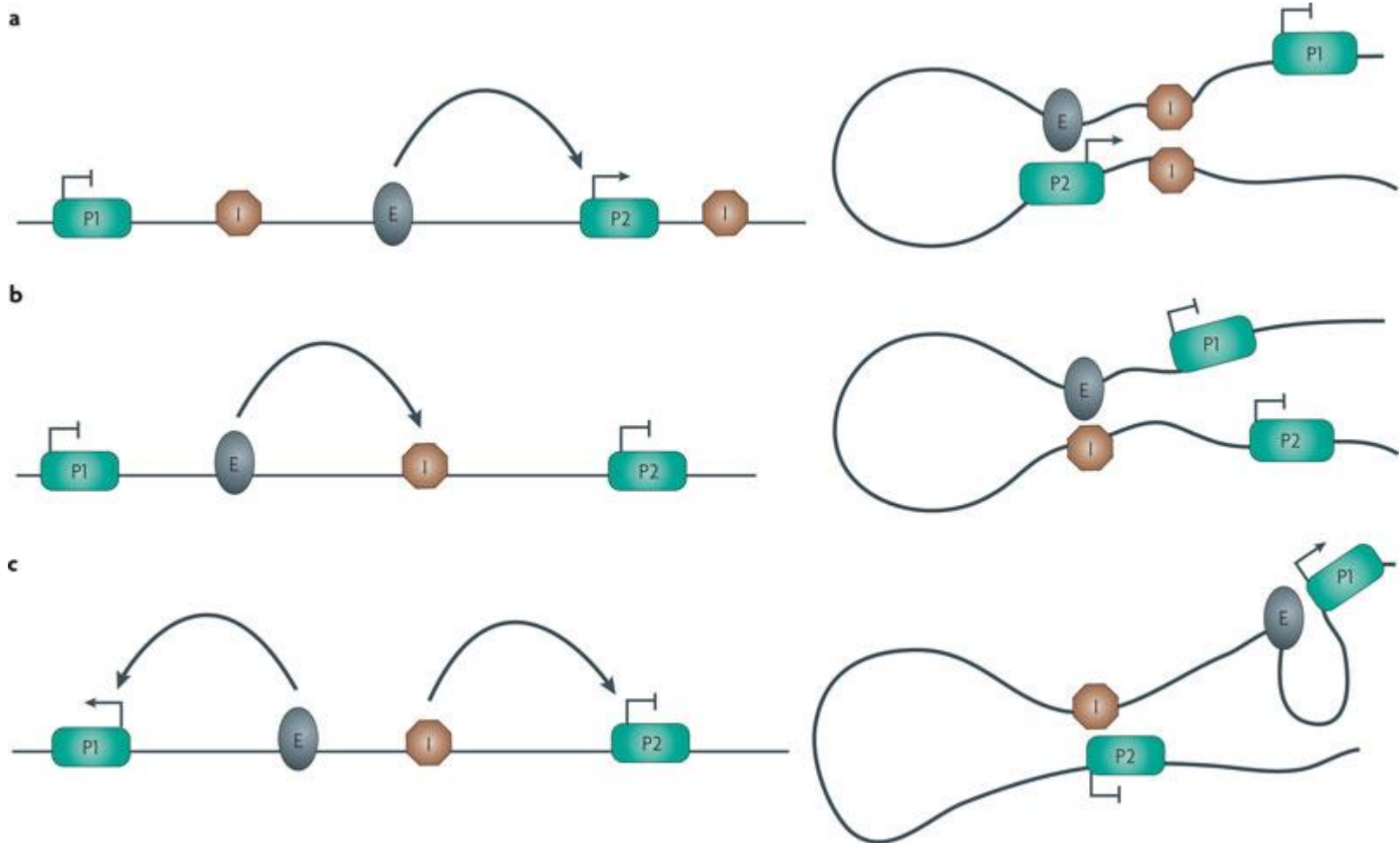
Elementos regulatórios: *Insulators*

Sequência de nucleotídeos que age como barreira entre um *enhancer* (ou silenciador) e um promotor.



Regulação da expressão gênica

Elementos regulatórios: *Insulators vs Enhancers*



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

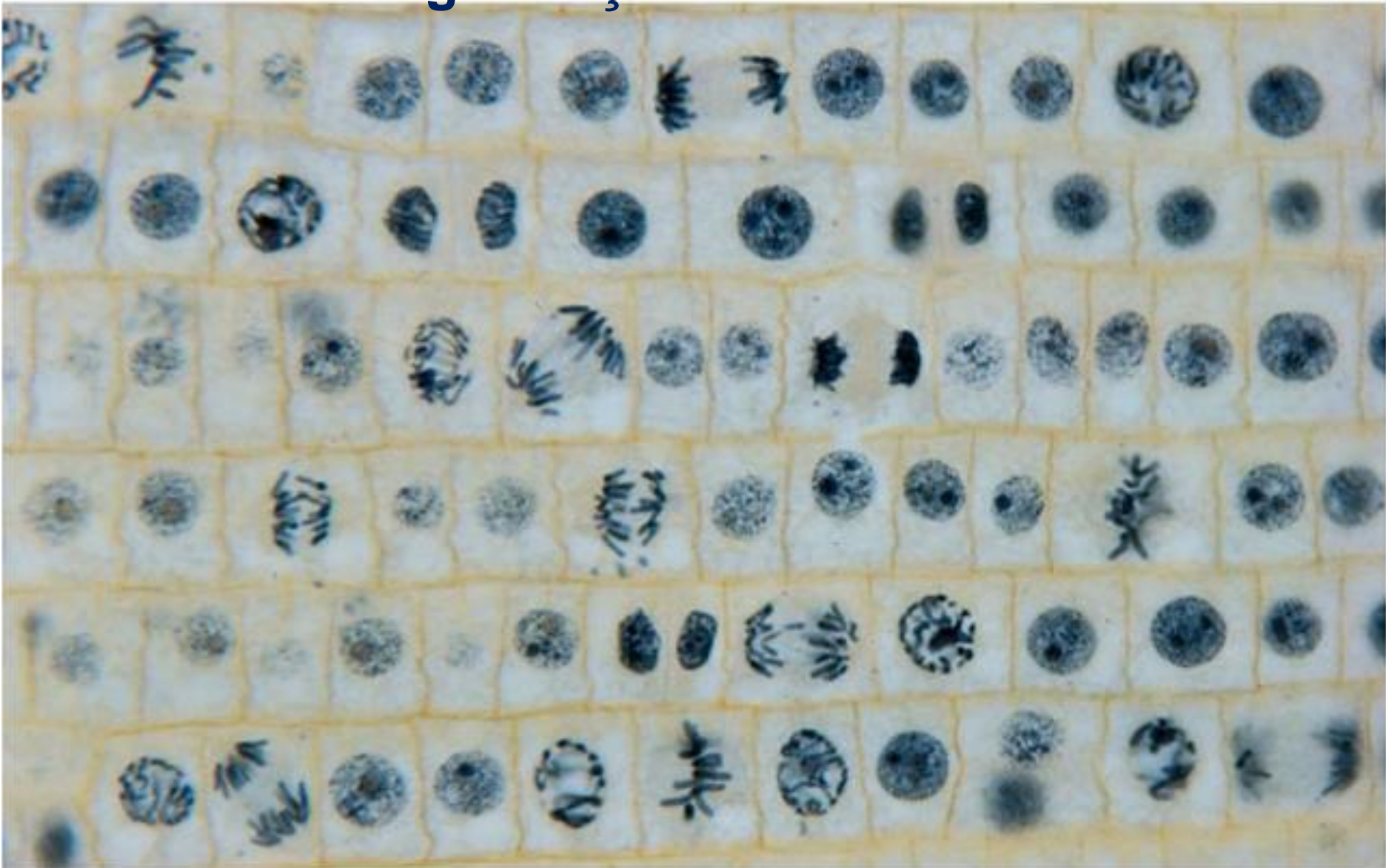
Um pouquinho de DNA e matemática...

- Nosso genoma haploide é composto por $\sim 3 \times 10^9$ pares de bases.
- Cada par de bases mede 0.34 nm (0.34×10^{-9} metros).
- Logo, nosso genoma mede $[0.34 \times 10^{-9} \text{ metros } (6 \times 10^9)] = 2,04$ metros
- O núcleo de uma célula humana mede $\sim 10 \mu\text{m}$ de diâmetro.

Temos um problema...

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

Cromatina

Eucromatina
+ transcrição

- transcrição

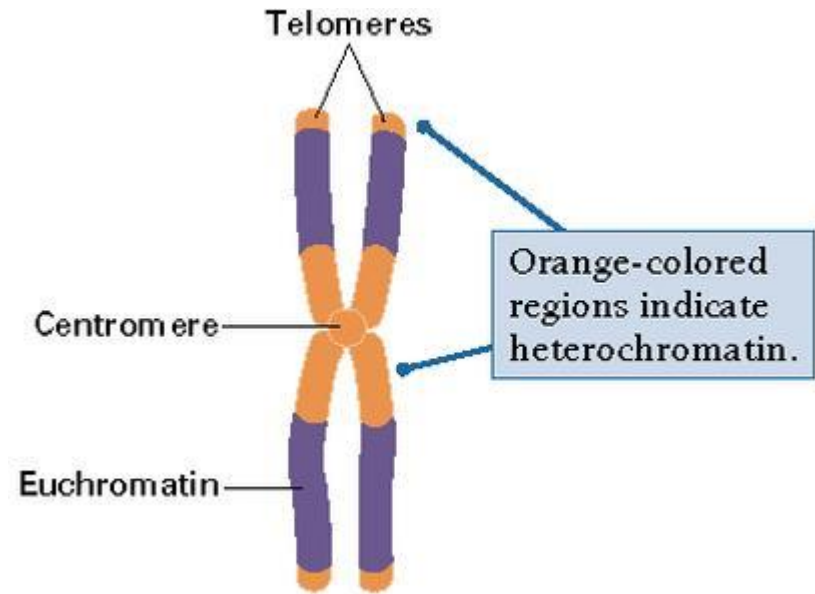
Heterocromatina

Facultativa

(cromossomo X)

Constitutiva

(Centrômero, telômero,
regiões do cromossomo Y)



- O grau de compactação de cromatina determina a acessibilidade da maquinaria de transcrição aos genes.

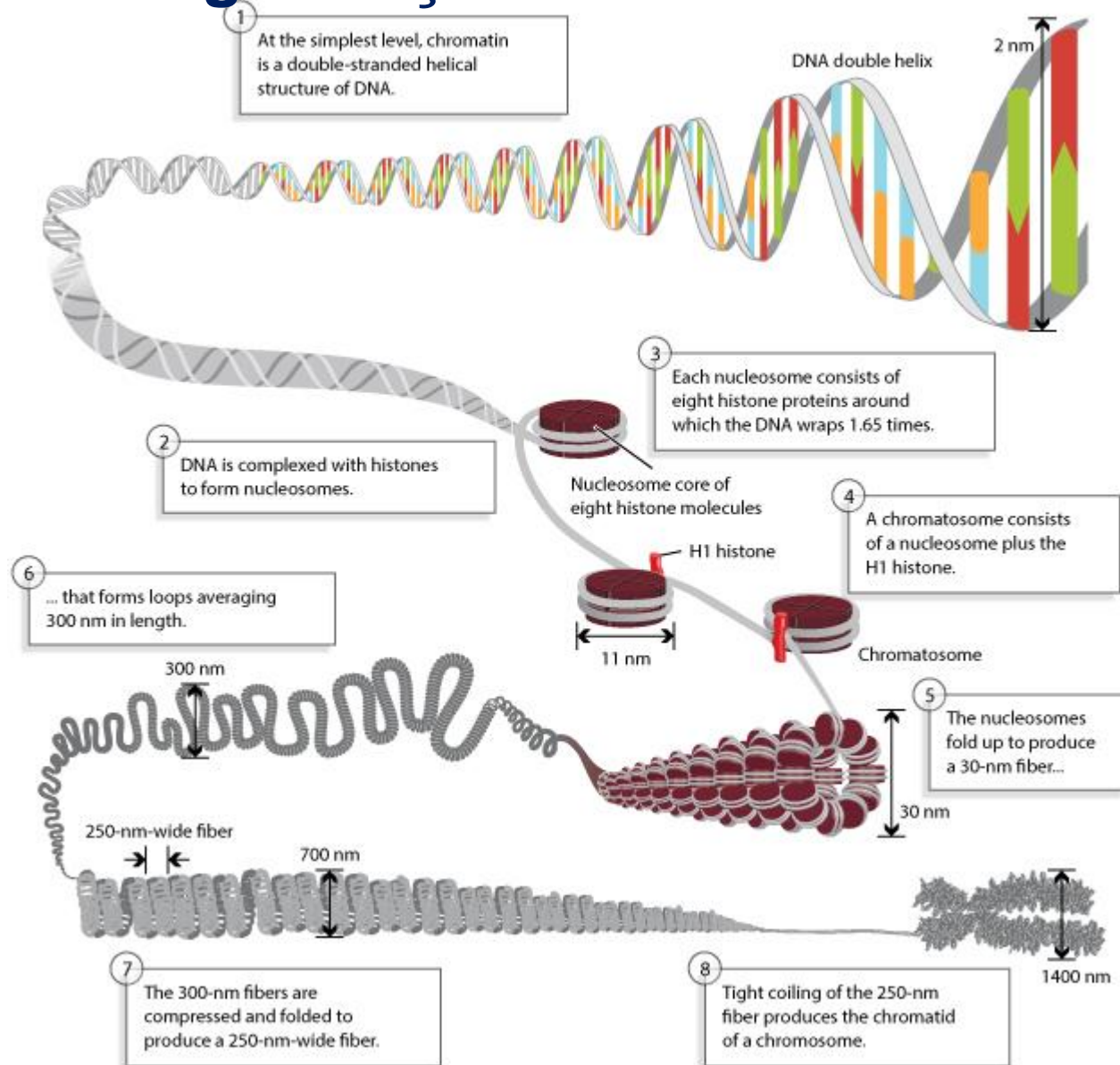
Regulação da expressão gênica

Nosso DNA está organizado em cromatina.

Cromatina: DNA + Histonas + outras proteínas

Regulação da expressão gênica

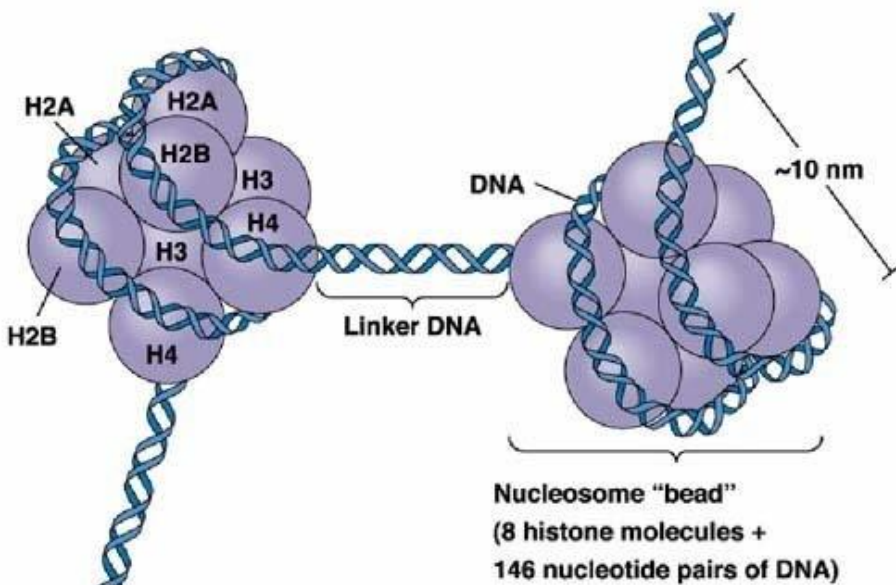
Organização da cromatina



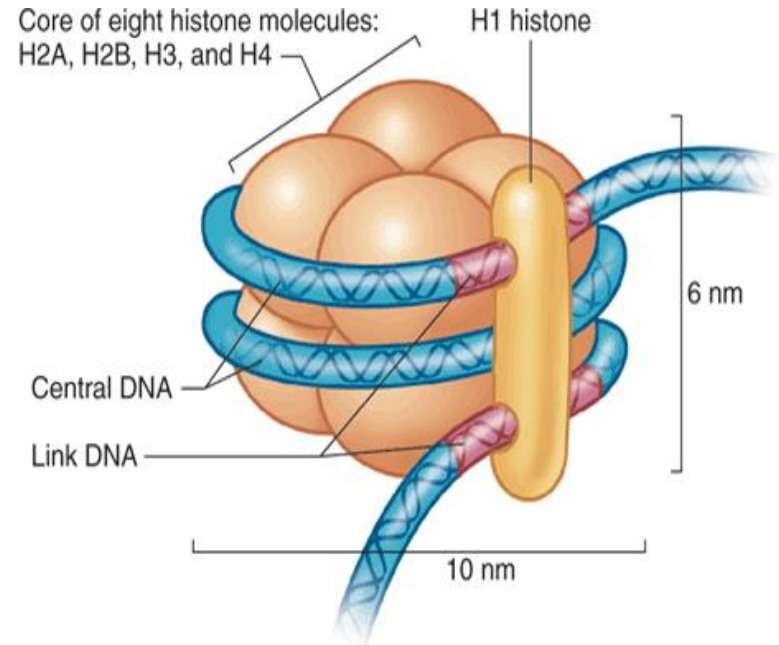
Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

- Os nucleossomos constituem o primeiro nível de compactação da cromatina



©Addison Wesley Longman, Inc.



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

- A histona H1 auxilia na compactação dos nucleossomos adjacentes.
- Com H1 o fragmento protegido da nuclease de micrococo é de 166 pb. Sem H1, apenas 146 pb estão protegidos.

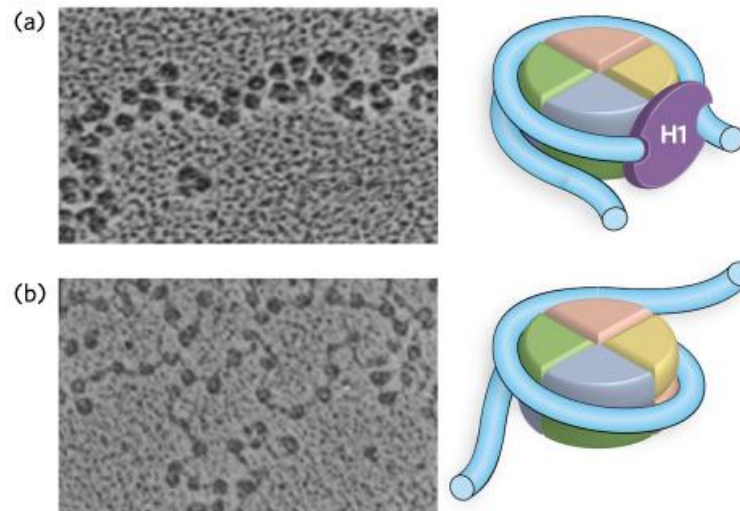
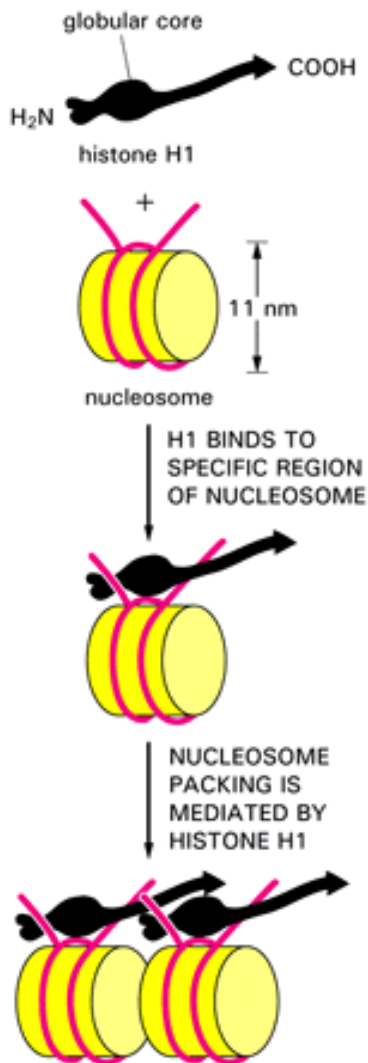
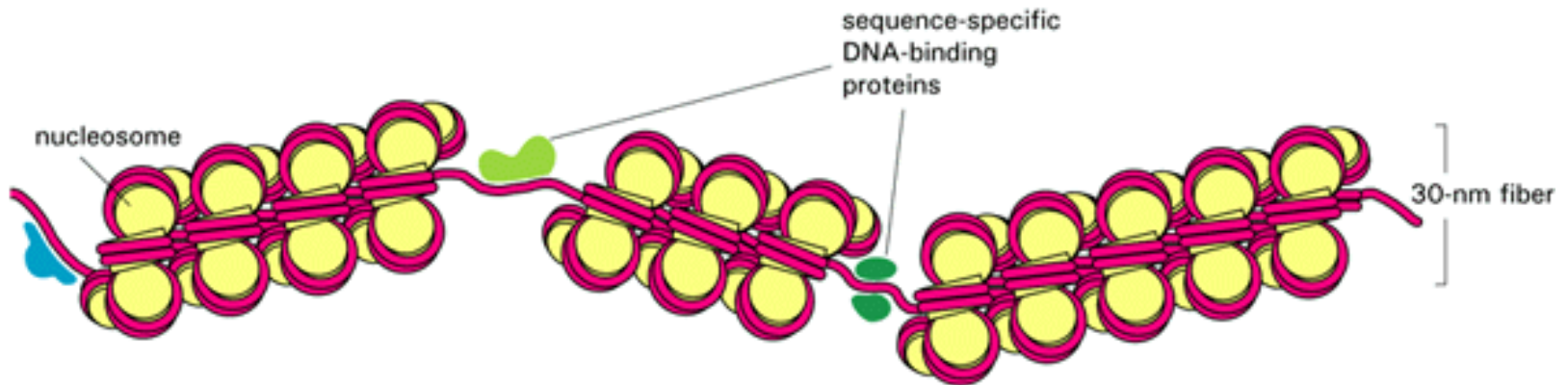
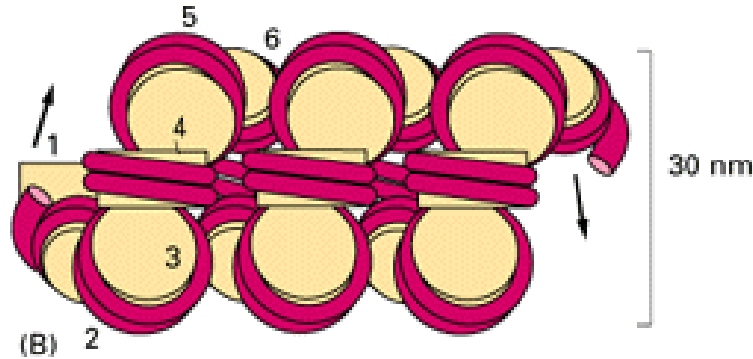
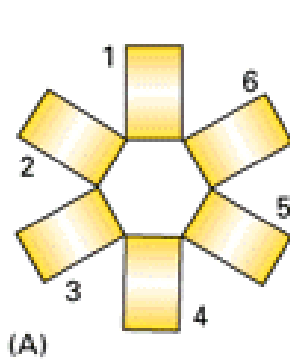


FIGURA 10-12 Aparência de zigue-zague dos nucleossomos na presença de H1. Micrografia eletrônica de nucleossomos (a) na presença de H1 e (b) na sua ausência. H1 aumenta a aparência de zigue-zague porque reduz os ângulos de entrada e saída do DNA, como mostram as ilustrações à direita das micrografias. Barra de escala = 1.000 Å. [Fonte: Fotos © F. Thoma et al., 1979. Originalmente publicadas em *The Journal of Cell Biology* 83:403-427.]

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

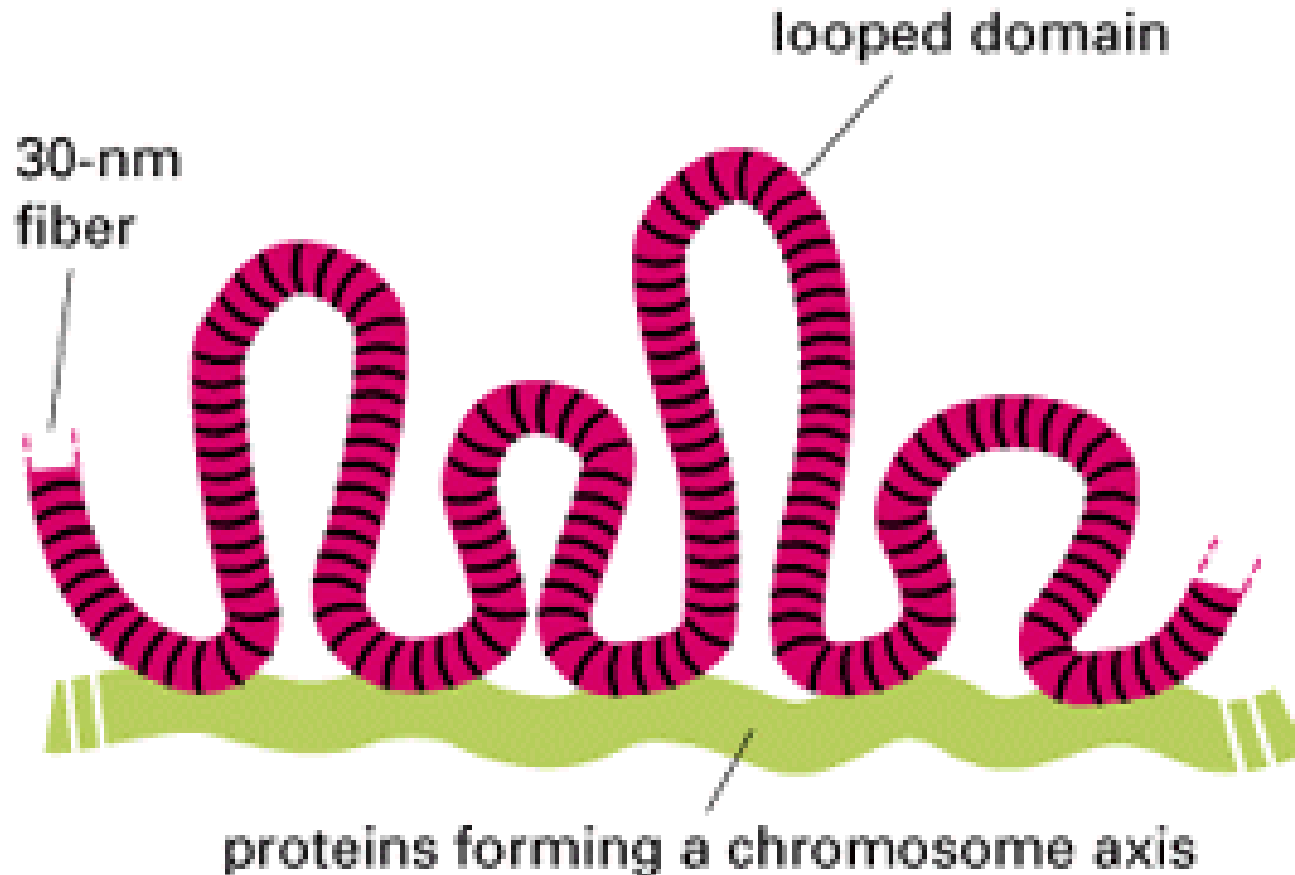
- A fibra de 30 nm constitui o segundo nível de compactação da cromatina (**zip 6:1**).



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

- A fibra de 30 nm forma alças ancoradas ao esqueleto protéico do cromossomo. Unidades funcionais?



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

- A acessibilidade ao DNA está limitada pela interação deste com as histonas e outras proteínas.

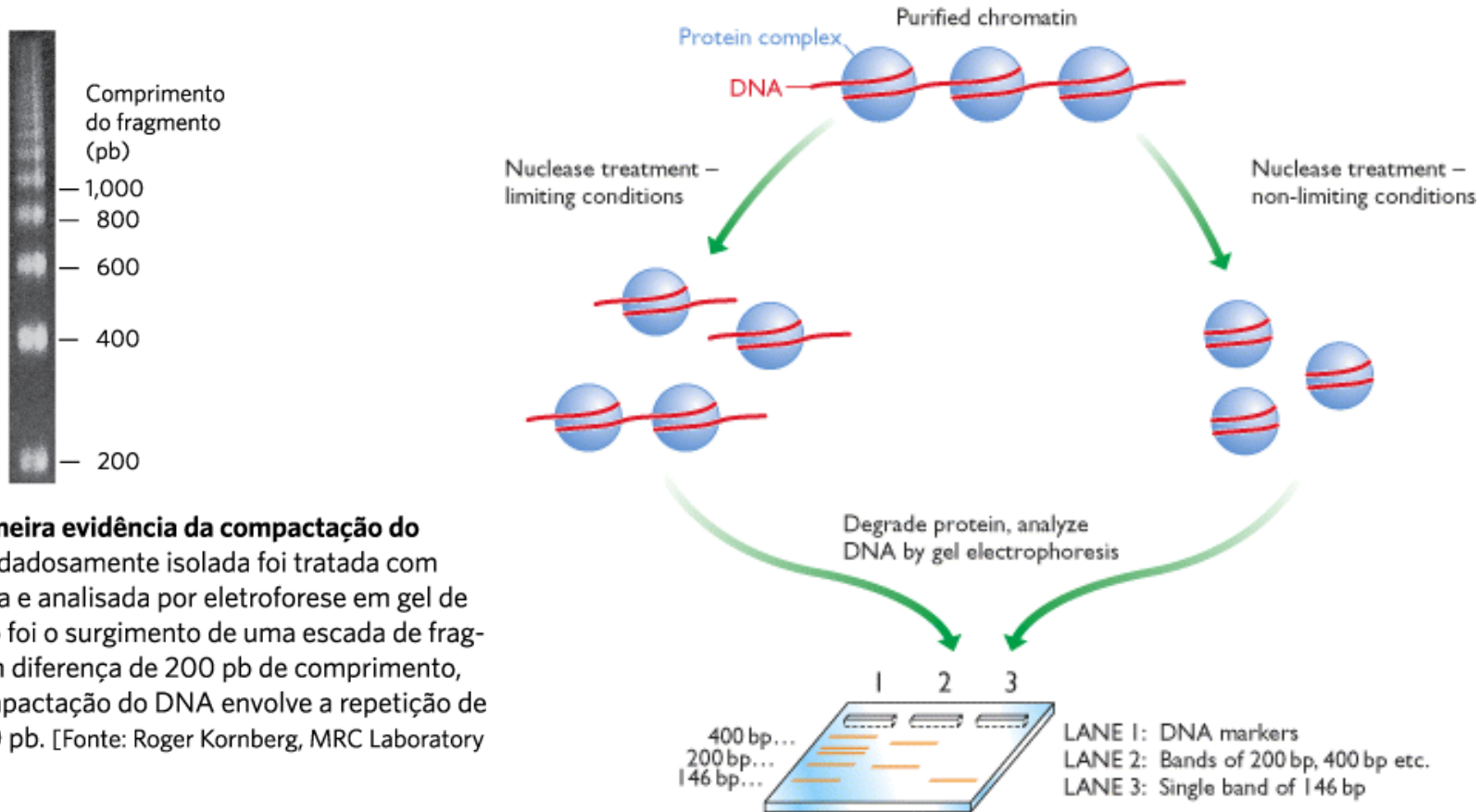


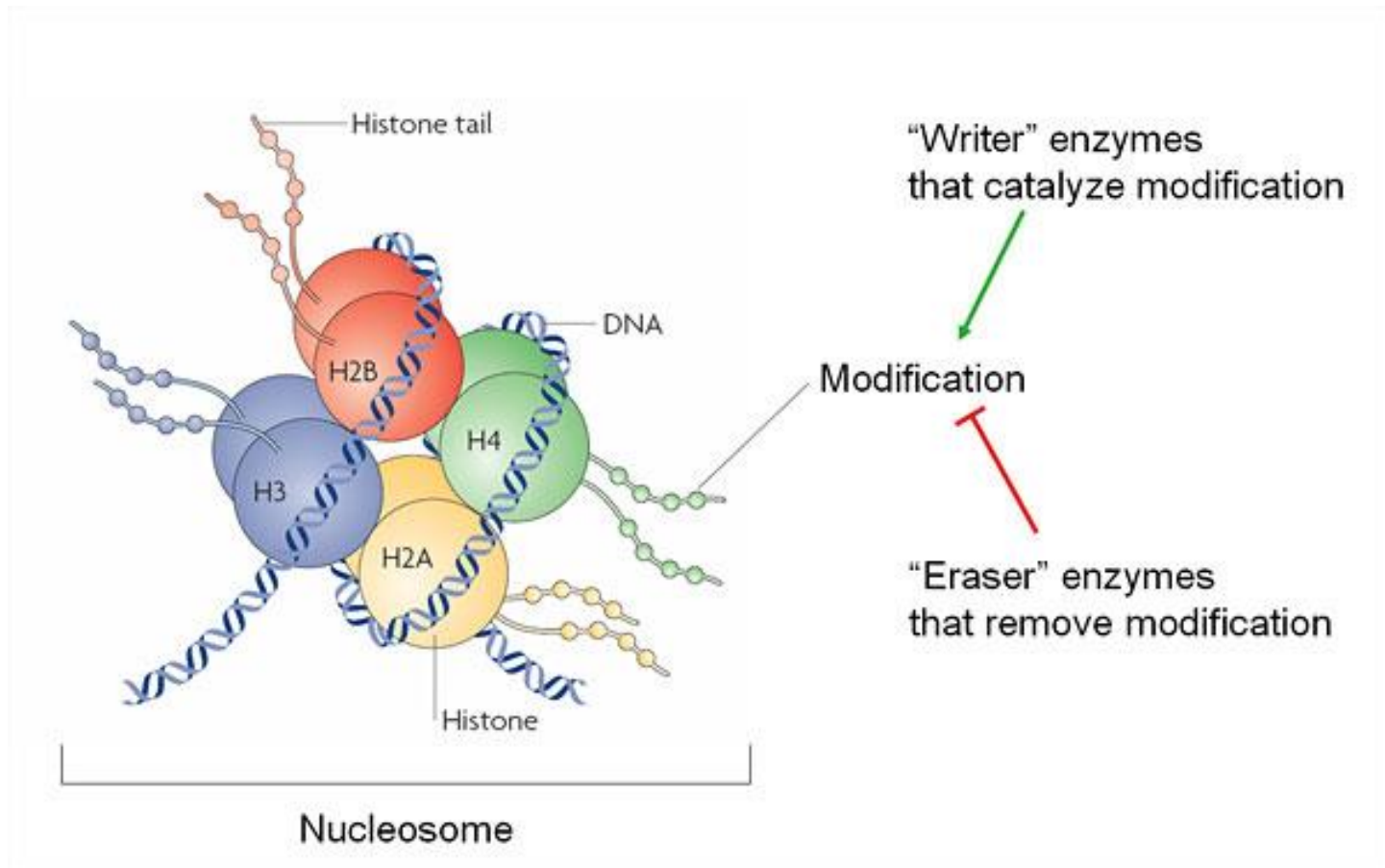
FIGURA 10-1 A primeira evidência da compactação do DNA. Cromatina cuidadosamente isolada foi tratada com nuclease microcócica e analisada por eletroforese em gel de agarose. O resultado foi o surgimento de uma escada de fragmentos de DNA com diferença de 200 pb de comprimento, sugerindo que a compactação do DNA envolve a repetição de uma unidade de 200 pb. [Fonte: Roger Kornberg, MRC Laboratory of Molecular Biology.]

Ensaio de proteção de nucleases

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

- O grau de compactação de cromatina é regulada por alterações pós-traducionais nas caudas das histonas.



Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

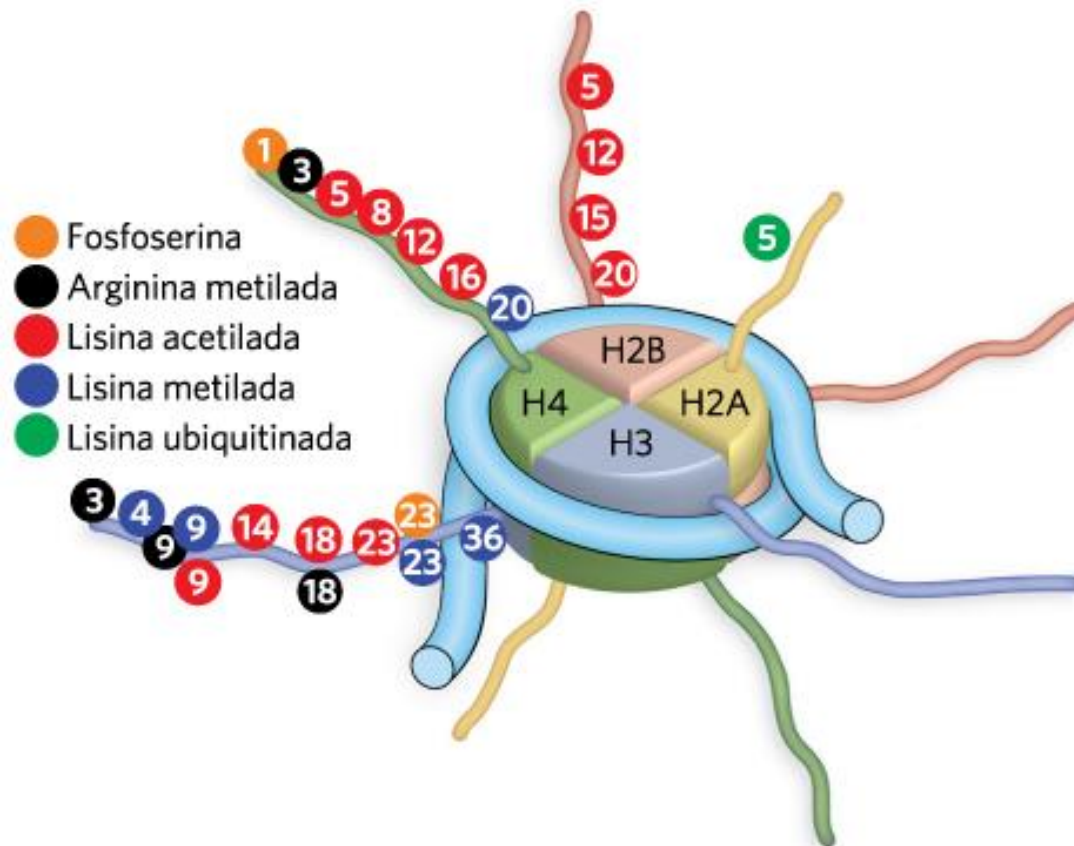
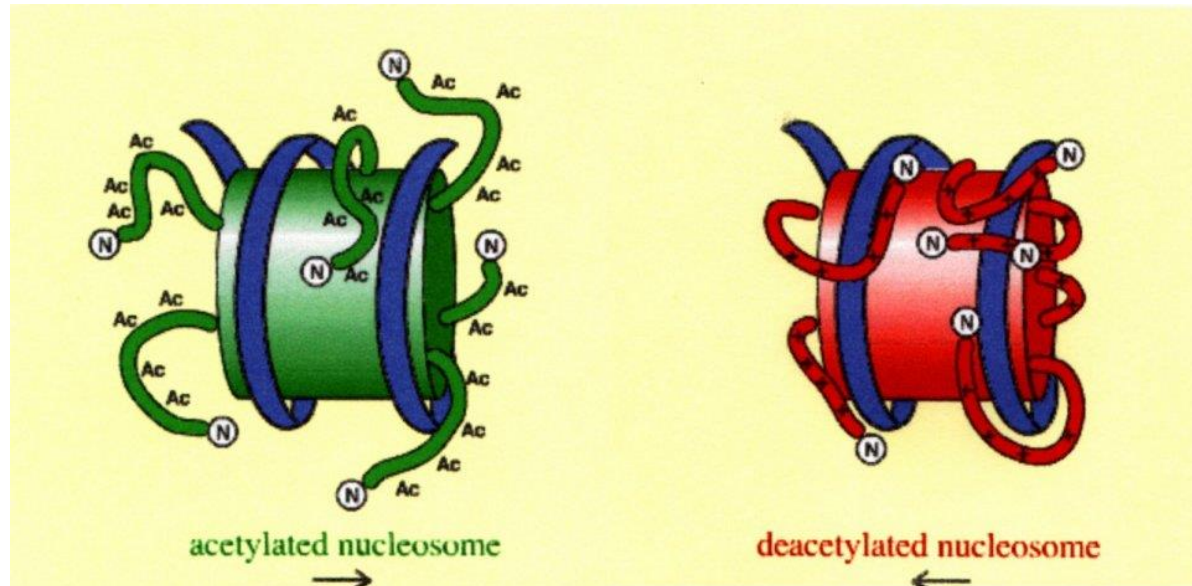
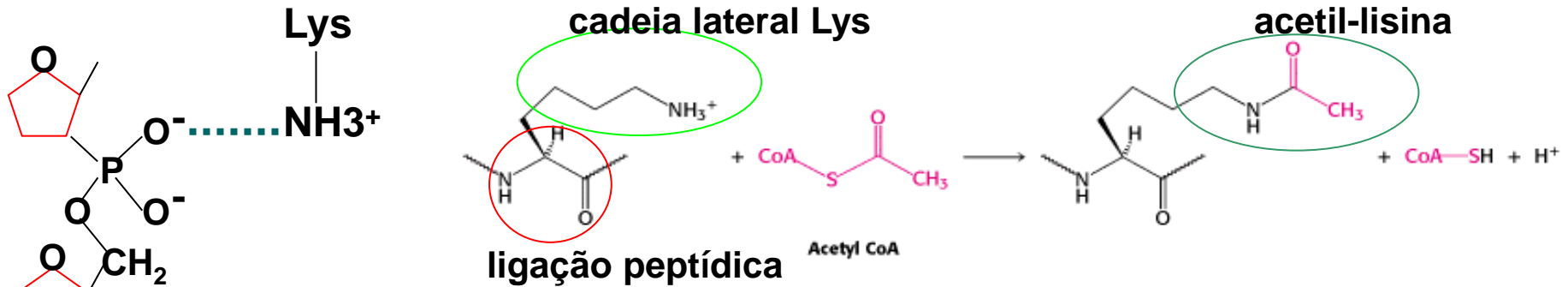


FIGURA 10-25 Modificações nas caudas N-terminais dos nucleossomos por pequenas moléculas. Representam-se as modificações em apenas uma cauda de cada tipo das histonas do núcleo. Indicam-se os números dos aminoácidos.

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

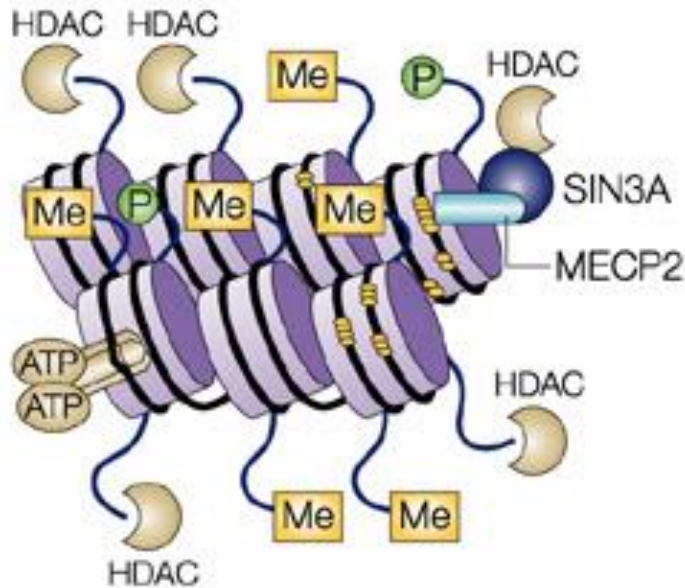
- A **acetilação** é mediada por Histona Acetil Transferases (HATs)



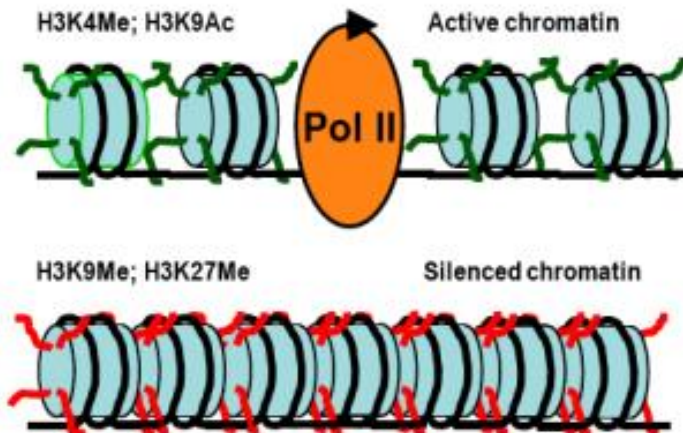
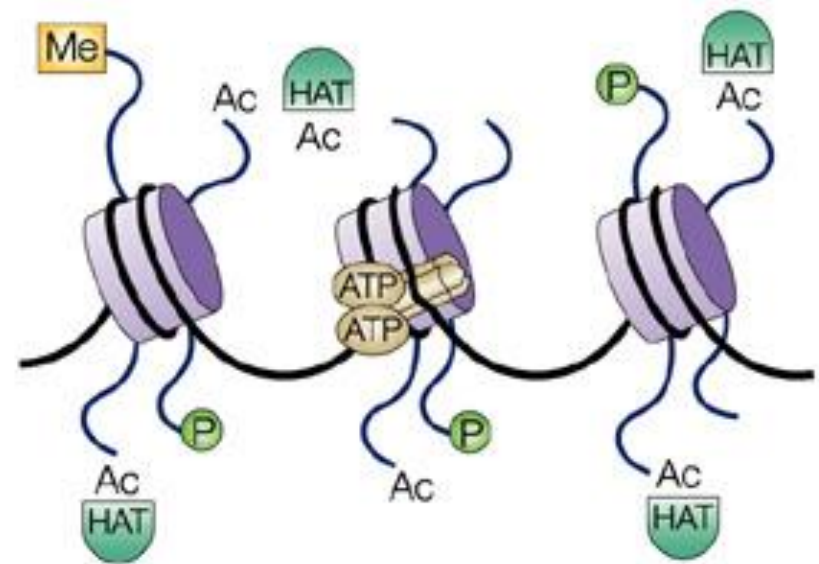
Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

a Closed chromatin: transcriptional repression



b Open chromatin: transcriptional activation



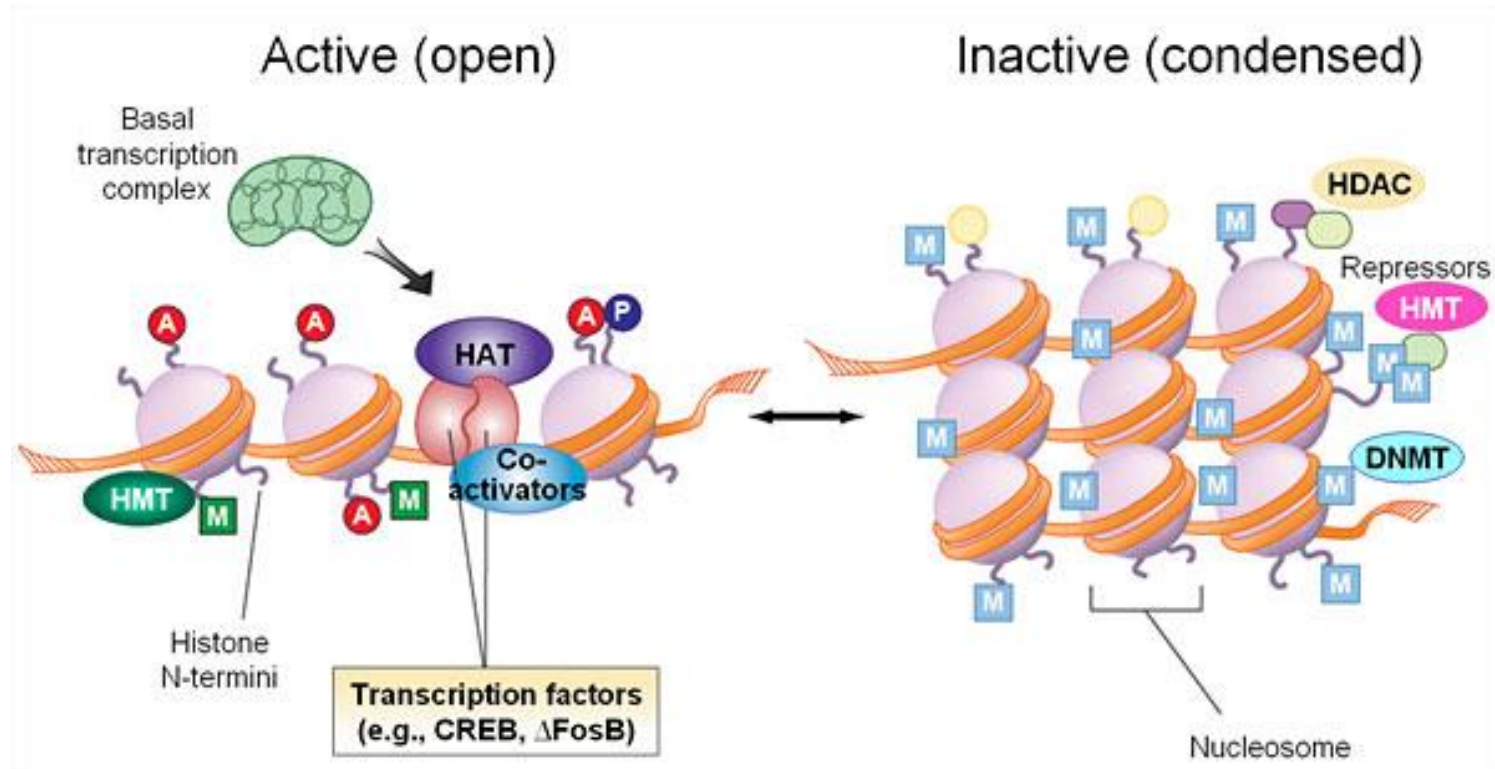
Nature Reviews | Drug Discovery

Em geral:

- a **acetilação** de histonas possibilita a transcrição (HAT vs HDAC).
- a **metilação** inibe a transcrição.

Regulação da expressão gênica

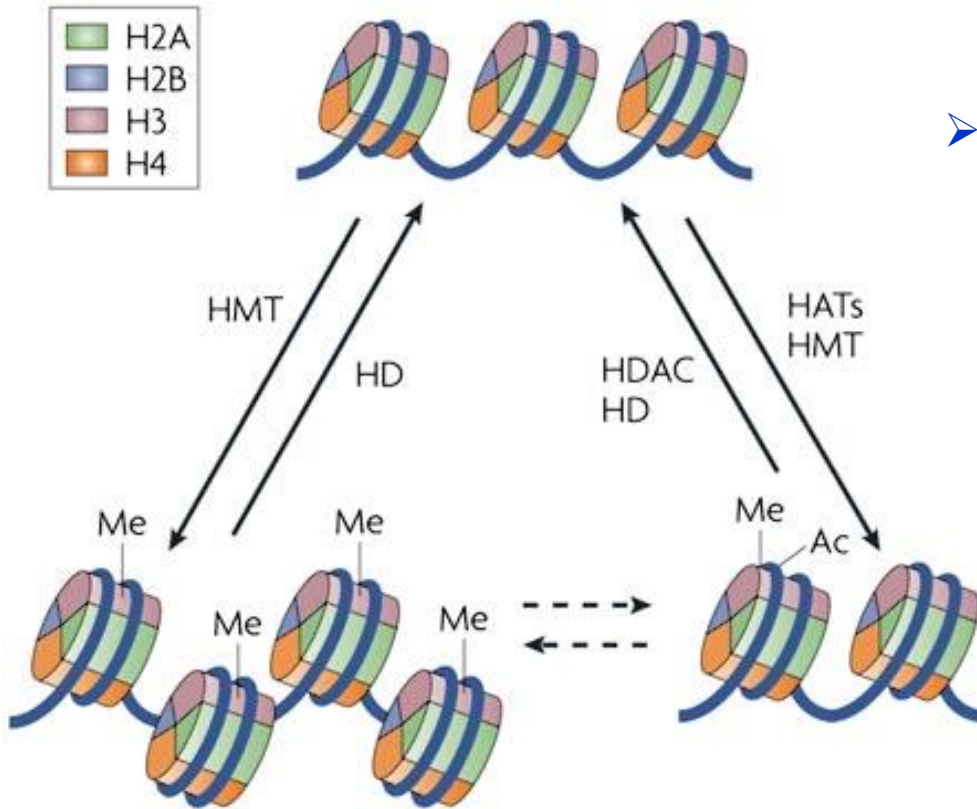
Organização da cromatina



- A atividade transcrricional de determinada região da cromatina depende da combinação de modificações na caudas das histonas dessa região: “**O código das histonas**”.

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina



➤ **Código de histonas:** as modificações nas caudas das histonas determinam a formação de eucromatina ou heterocromatina.

Examples of histone modifications

Heterochromatin

- H3K9me_{2,3}
- H3K27me₃
- H4K20me₃

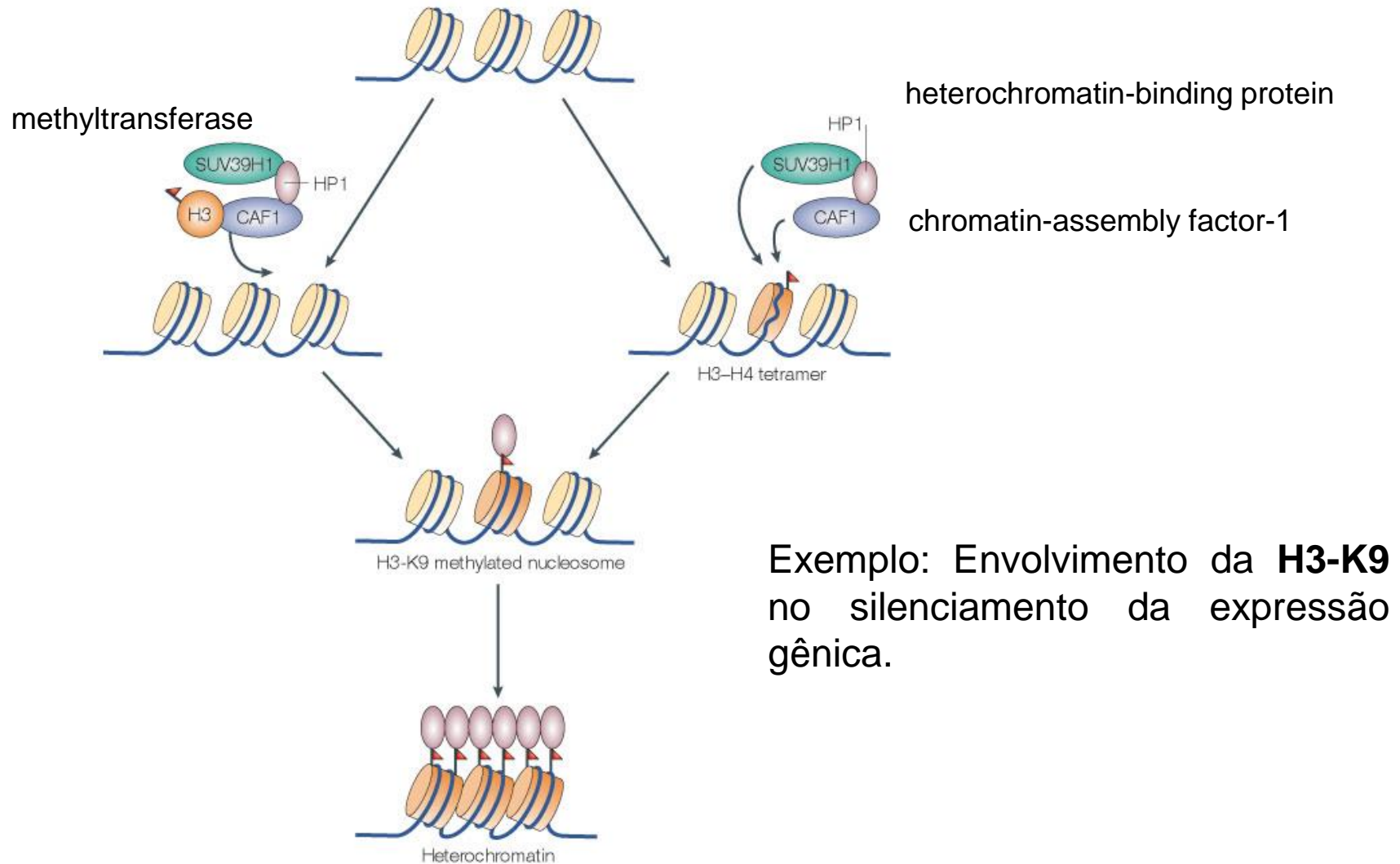
Euchromatin

- H3K4me_{2,3}
- H3K9ac, H3K14ac
- H4K5ac, H4K8ac
- H2AK5ac, H2BK12ac
- H2BK15ac

▪ Como podemos utilizar esses marcadores para determinar a conformação da cromatina em uma determinada região?

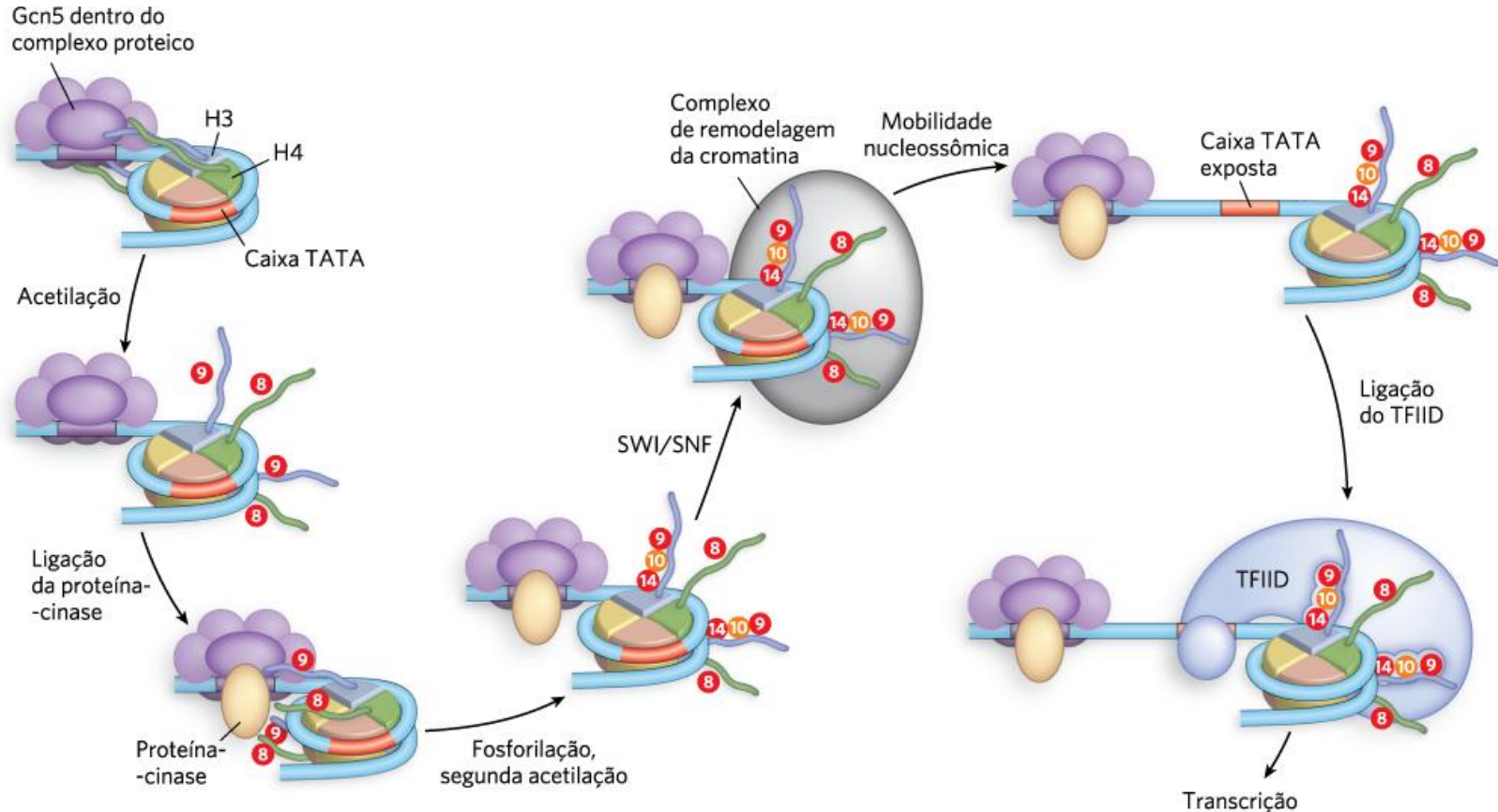
Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina



Regulação da expressão gênica

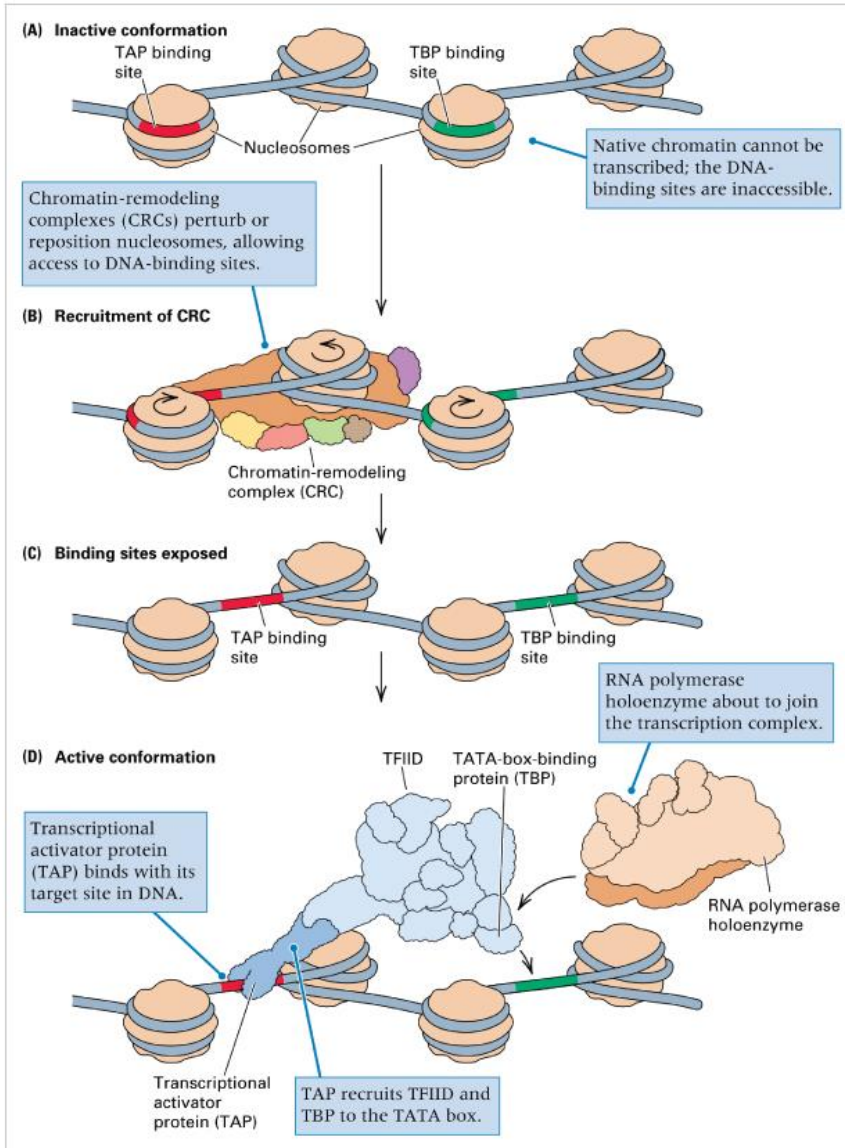
Organização da cromatina



- Alterações nas caudas das histonas e a ação de **complexos remodeladores da cromatina** permitem o acesso da maquinaria de transcrição a promotores específicos.

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina



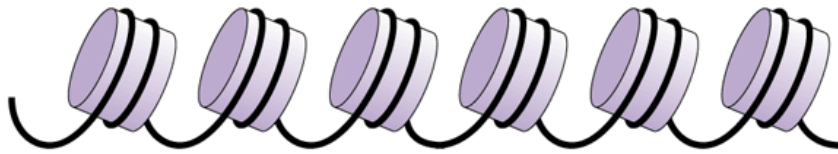
- Os **complexos remodeladores da cromatina** podem reposicionar, deslocar ou retirar nucleossomos de regiões específicas do genoma, favorecendo a transcrição.

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

Complexos remodeladores da cromatina

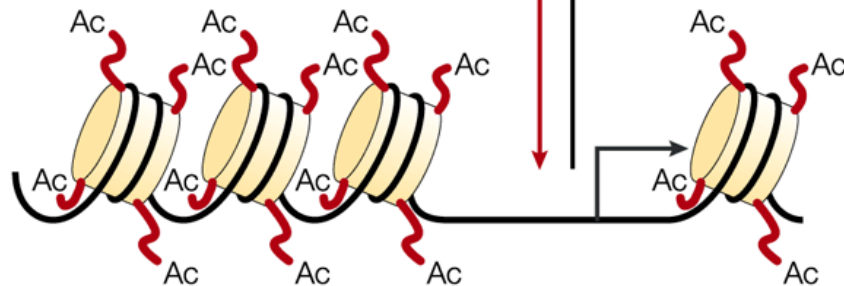
Inactive (closed)



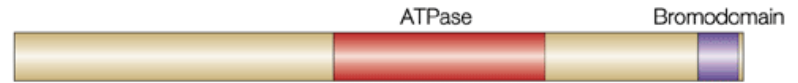
Swi/Snf (*Sc*, *Dm*, *M*)
 RSC (*Sc*)
 ISWI (*Dm*)
 CHD1 (*Dm*)
 INO80 (*Sc*)

Swi/Snf (*Sc*, *M*)
 RSC (*Sc*)
 ISW2(*Sc*)
 ISWI (*Dm*)
 Mi-2 (*M*)

Active (open)



SWI/SNF class



ISWI class



CHD class



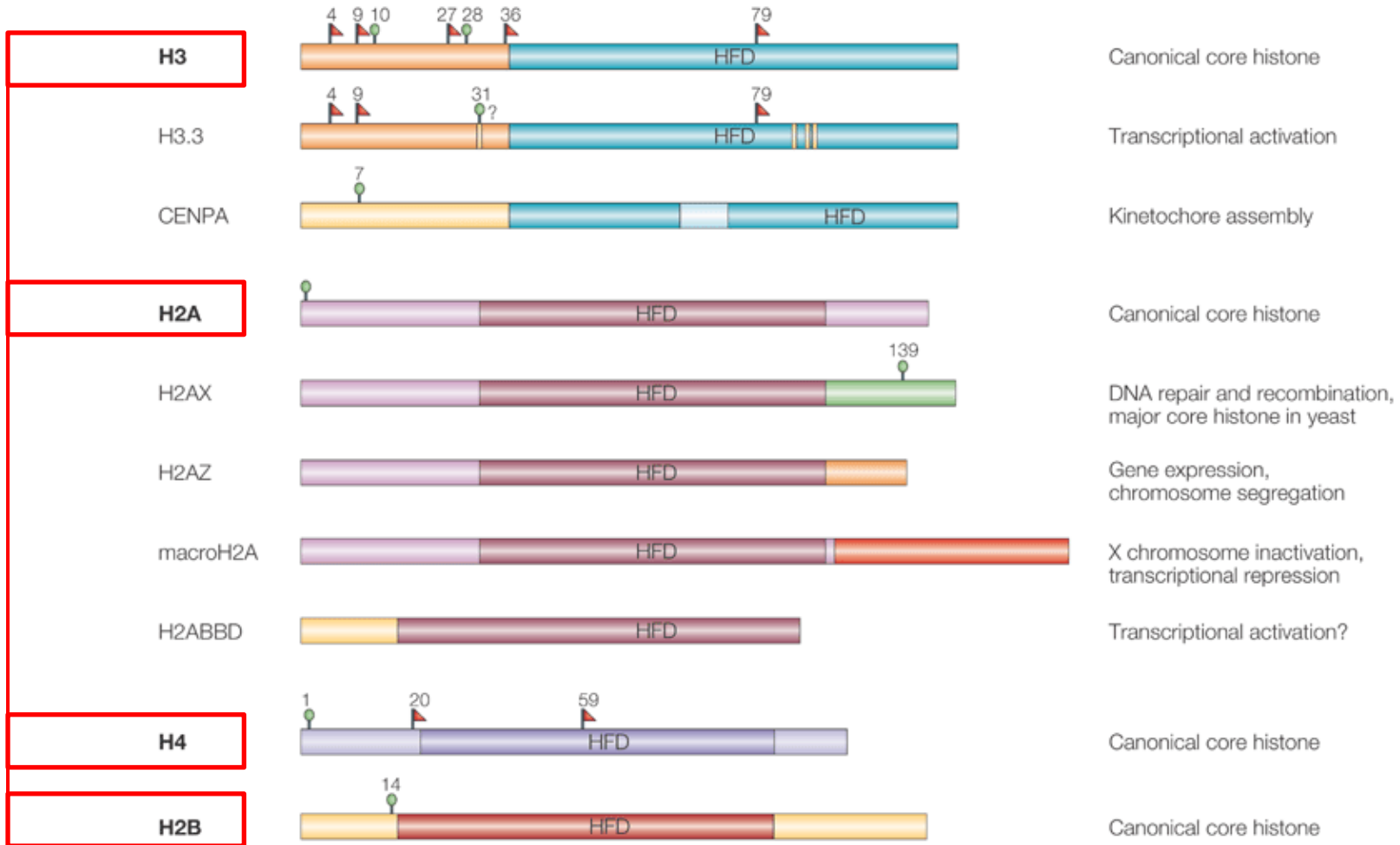
INO80 class



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Regulação da expressão gênica

Organização da cromatina

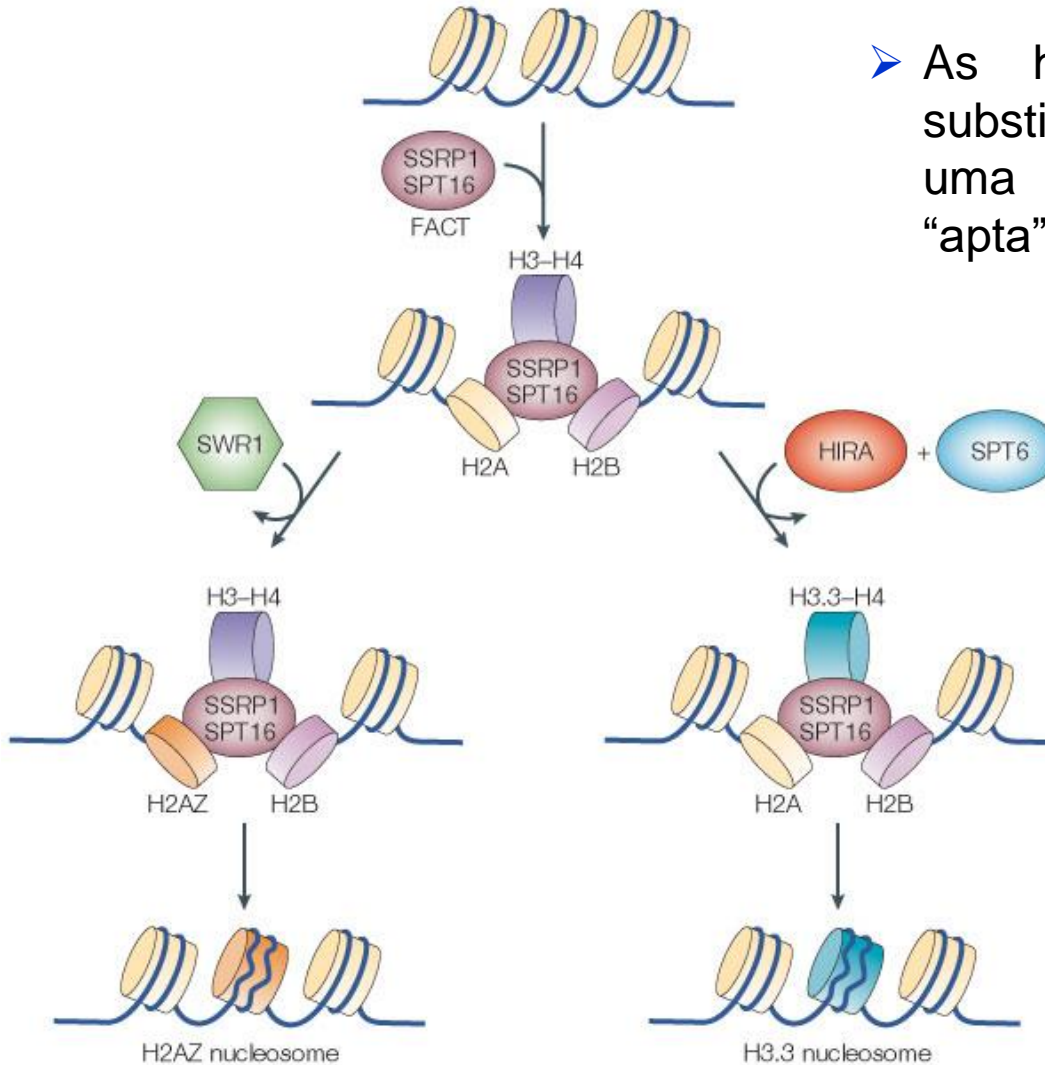


- Variantes de histonas podem ter funções específicas.

Regulação da expressão gênica

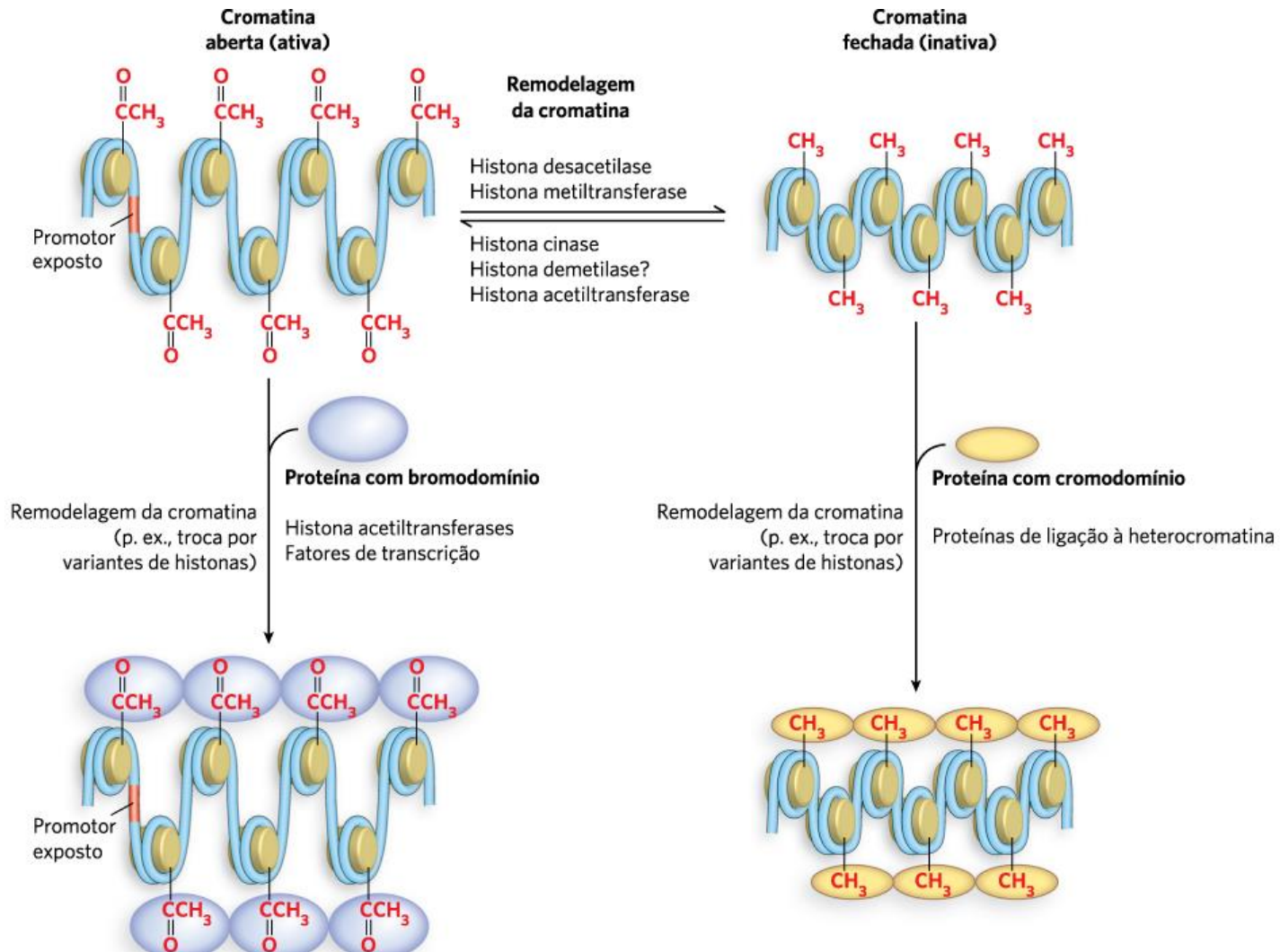
Organização da cromatina

- As histonas principais podem ser substituídas por variantes que permitam uma conformação da cromatina mais “apta” à transcrição.



Regulação da expressão gênica

Resumindo...



Regulação da expressão gênica

Cromatina: Propagação de marcas epigenéticas

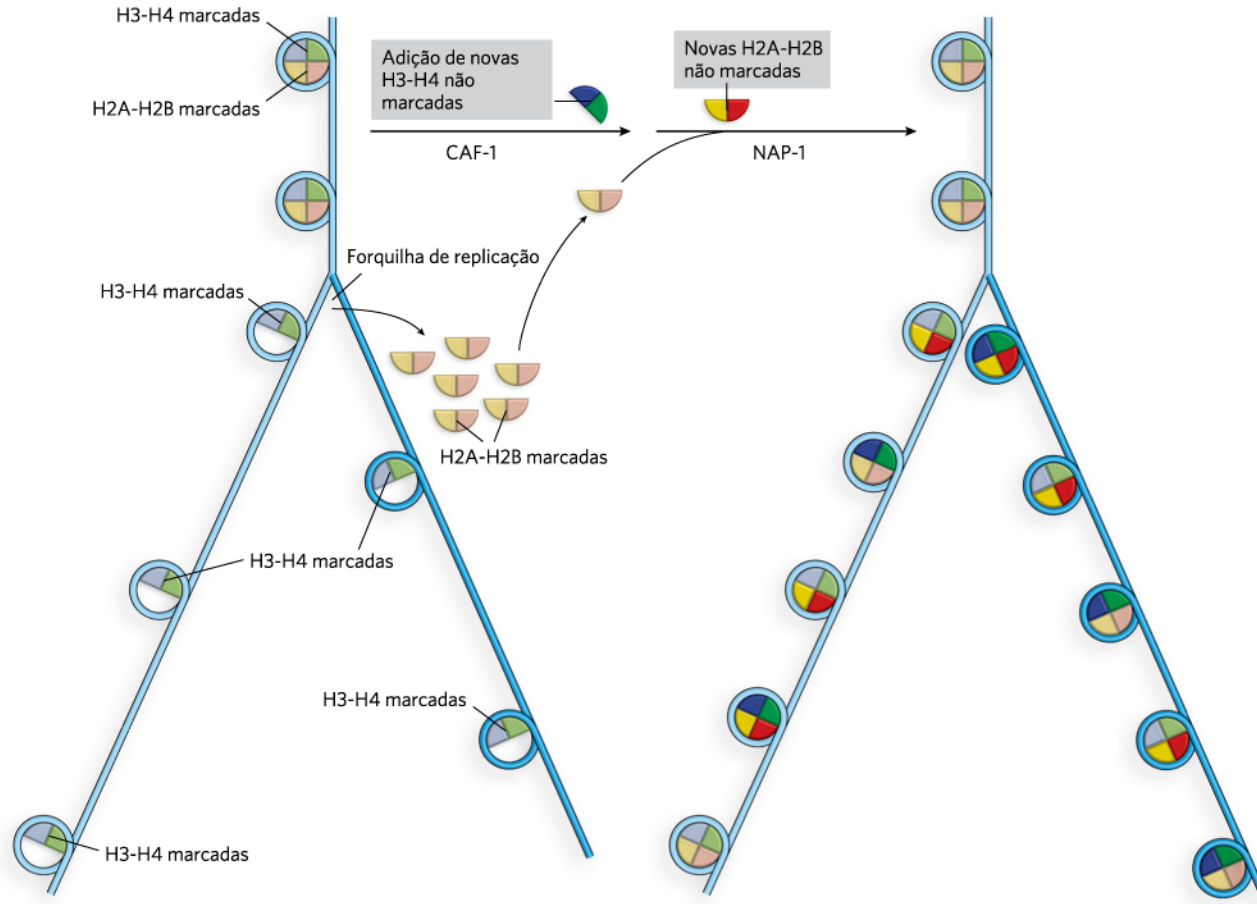


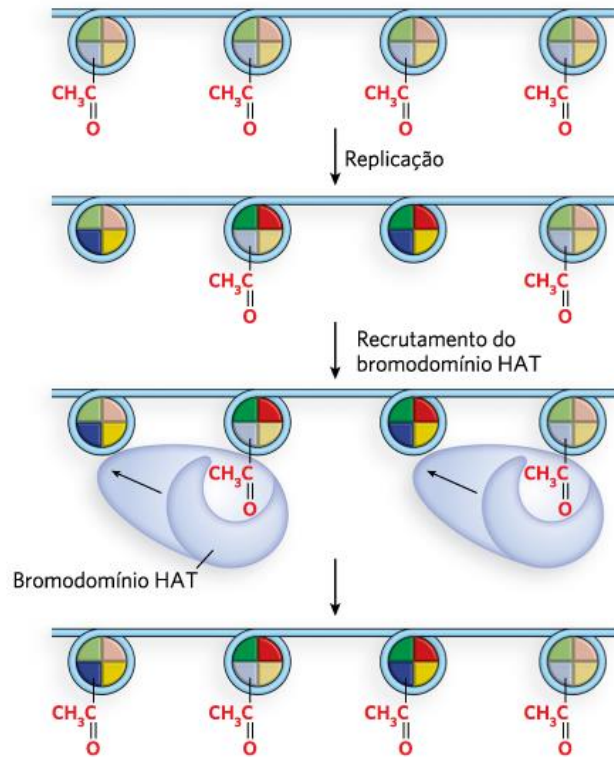
FIGURA 10-29 Conservação do padrão de modificação das histonas durante a replicação do DNA. Após a replicação do DNA, as duas fitas de DNA não possuem as histonas H2A-H2B, e os heterotetrâmeros H3-H4 são distribuídos entre as duas novas fitas (à esquerda). Os heterotetrâmeros originais (marcados) ligam-se rapidamente às duas fitas-filhas, junto com os heterotetrâmeros H3-H4 novos (não

marcados) (à direita). Os heterodímeros H2A-H2B novos (não marcados) e originais (marcados) são reorganizados aleatoriamente sobre as fitas-filhas contendo os heterotetrâmeros H3-H4 novos e originais. As marcas epigenéticas são, a seguir, propagadas para os nucleossomos adjacentes nas duas fitas-filhas, preservando o padrão de modificação de histonas do DNA original.

Regulação da expressão gênica

Cromatina: Propagação de marcas epigenéticas

(a) Mantendo o estado ativo (aberto) da cromatina



(b) Mantendo o estado de repressão (fechado)

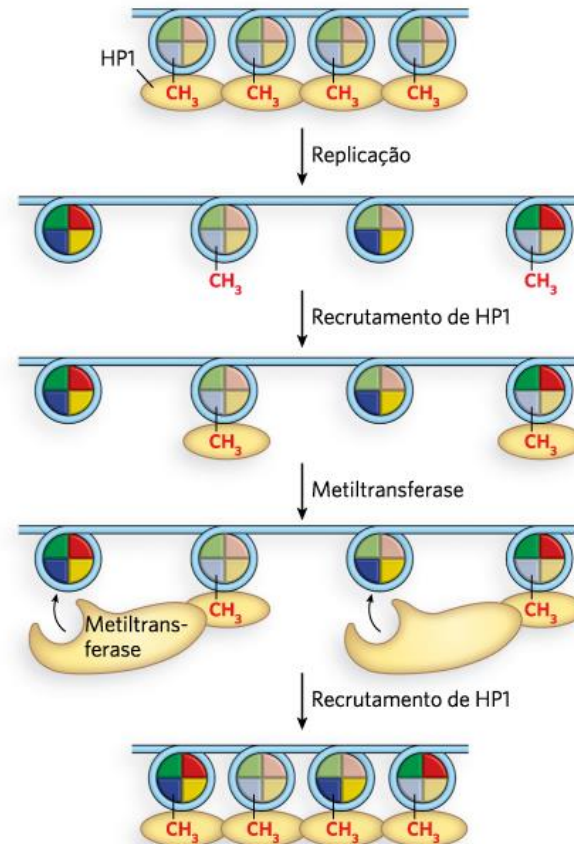


FIGURA 10-30 Propagação de estados epigenéticos após a replicação. (a) O estado aberto pode ser propagado pela ligação ao complexo contendo o bromodomínio que também contém uma subunidade HAT, que então acetila os mesmos resíduos nas proximidades dos octômeros de histonas. (b) O estado fechado pode ser propagado pela ligação a HP1,

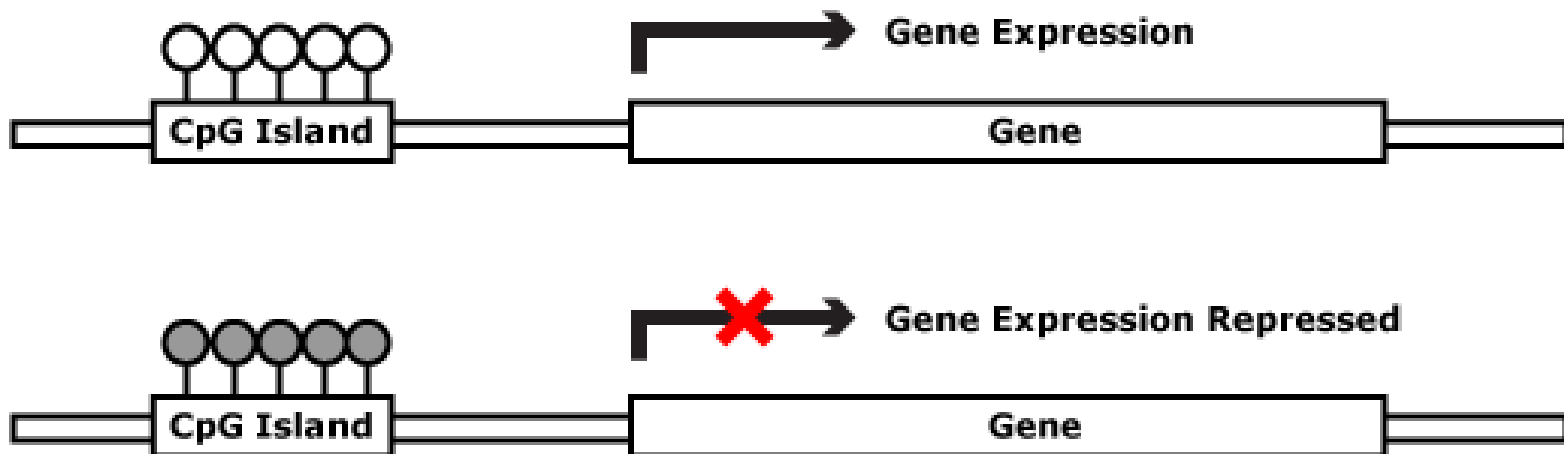
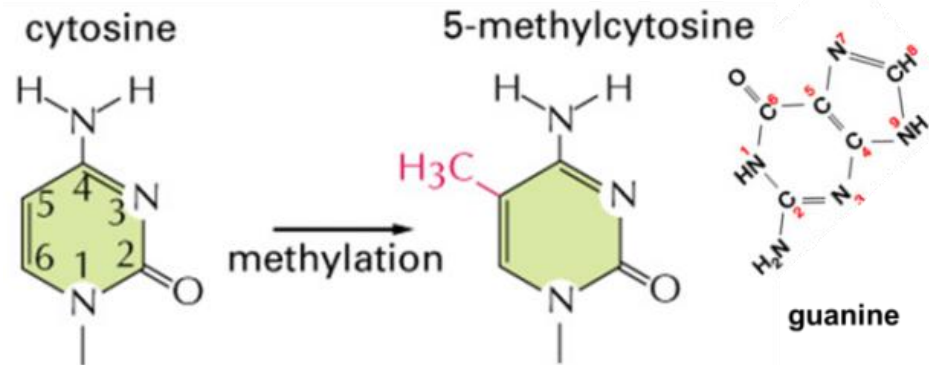
que se associa às histonas originais após a replicação e está relacionada com o estado de repressão da heterocromatina fortemente condensada. HP1 contém um cromodomínio que se liga a resíduos de lisina metilados nas histonas, e também atrai uma metiltransferase para propagar o padrão de metilação original na proximidade das novas histonas.

Regulação da expressão gênica

Metilação do DNA

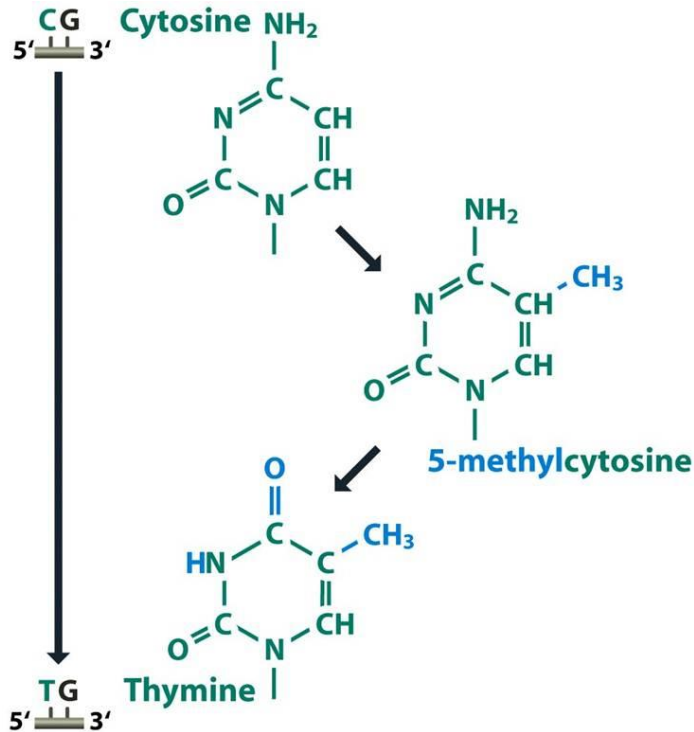
- **Metilação** de Citosinas em dinucleotídeos CpG. **Ilhas CpG** distribuídas de forma heterogênea pelo genoma, em geral, em promotores de genes.

5' CpG 3'
||
3' GpC 5'

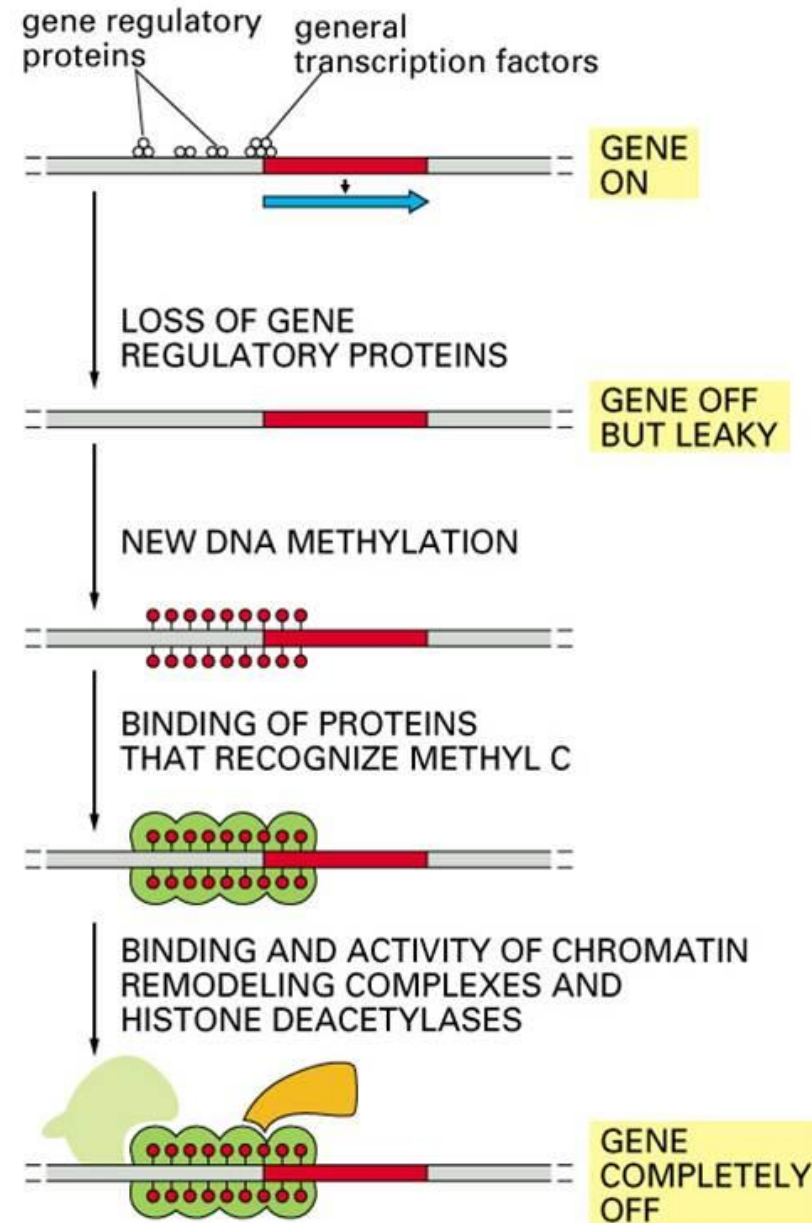


Regulação da expressão gênica

Metilação do DNA

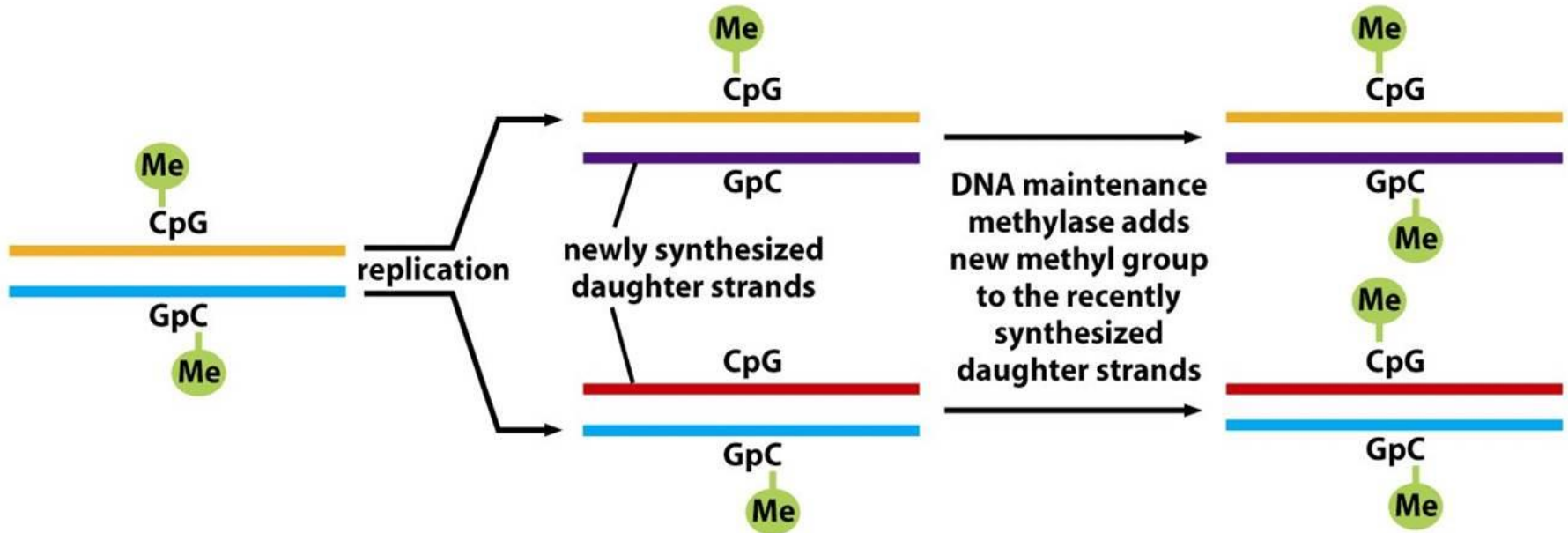


- **Ilhas CpG** distribuídas de forma heterogênea pelo genoma, em geral, em promotores de genes.



Regulação da expressão gênica

Metilação do DNA: propagação das marcas epigenéticas

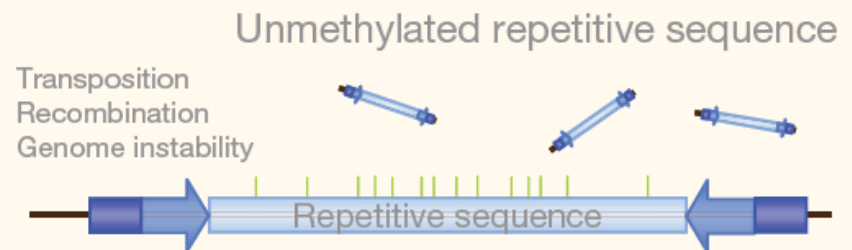
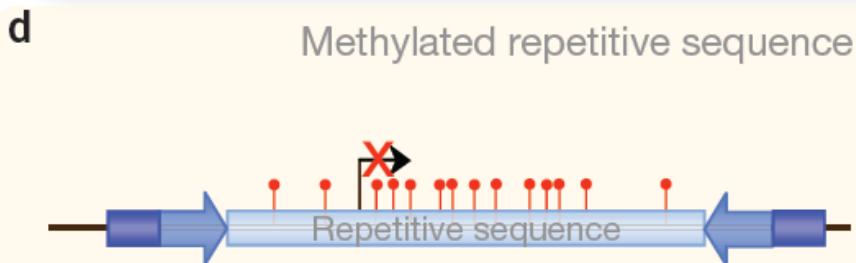
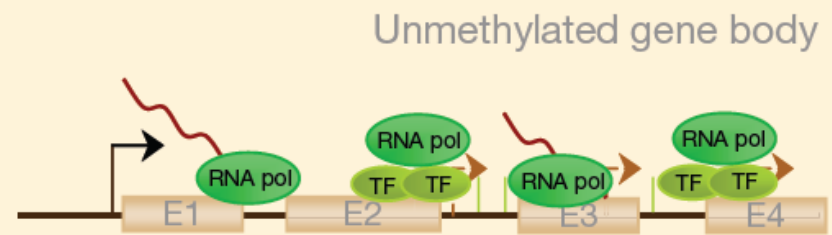
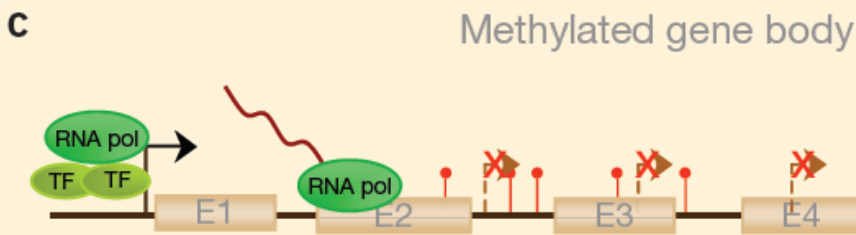
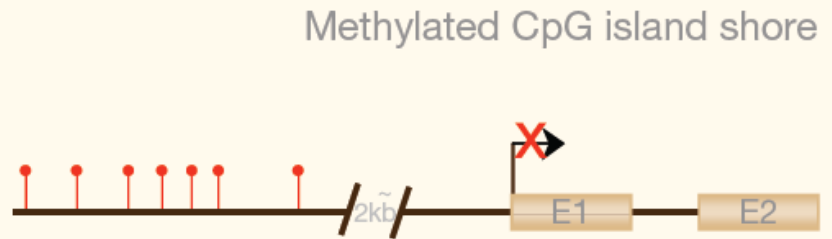
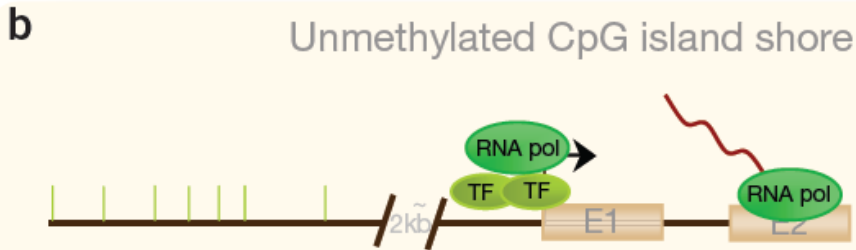
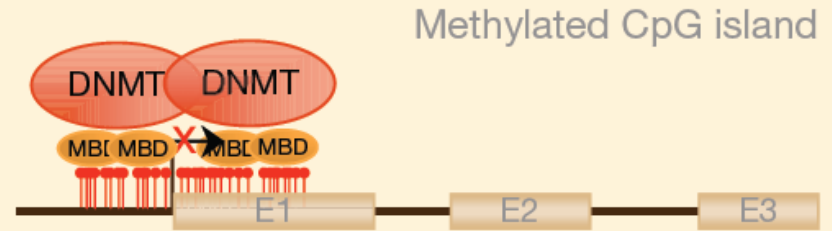
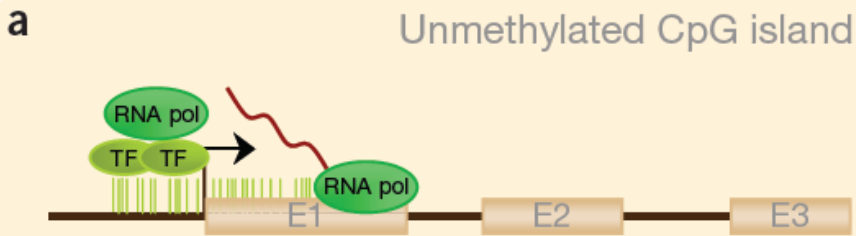


- A transmissão do padrão de metilação do DNA às células filhas é essencial para manter a expressão gênica normal.

Metilação do DNA: Alterações no padrão de marcas epigenéticas

Normal

Anormal



Próxima aula...

- Vias de transdução e sinais! Quem controla a atividade dos fatores de transcrição!
- RNA regulatórios! Coisas estranhas acontecem no mundo do pequeno!
- Temos proteína!!! E daí? Quem disse que vão funcionar. Tradução não é tudo!
- E outros eventos importantes, em...

Regulação da expressão gênica II

NÃO PERCAM!!!