

# **Regulação da expressão gênica I**

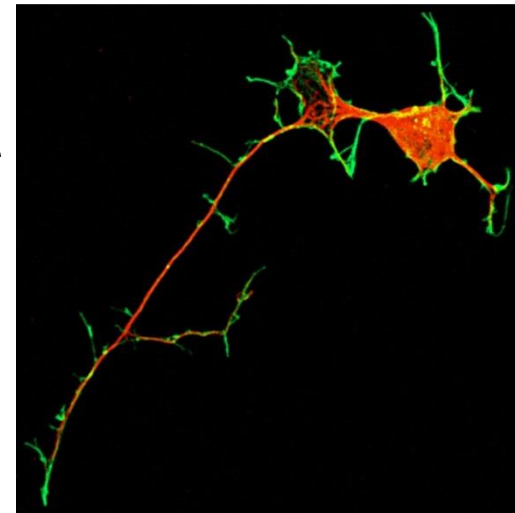
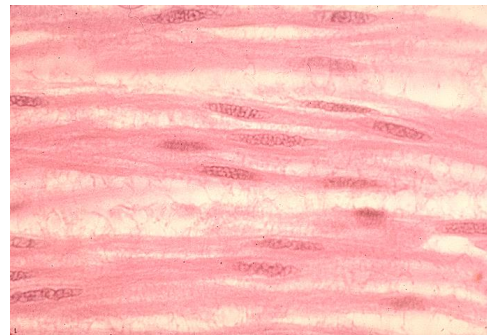
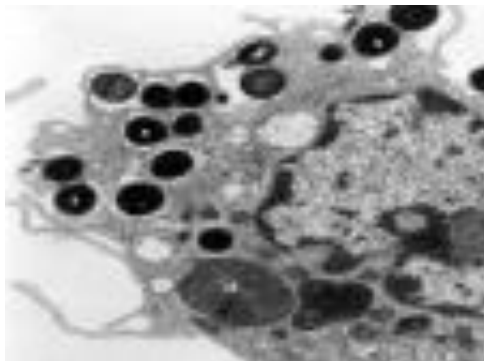
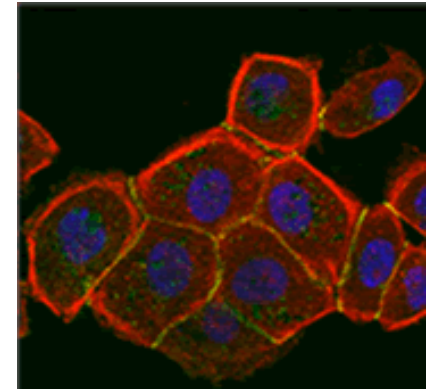
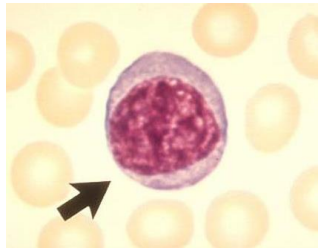
**“Potência sem controle não é nada!”**

**Enrique Boccardo**

**eboccardo@usp.br**

# Regulação da expressão gênica

Como é possível?

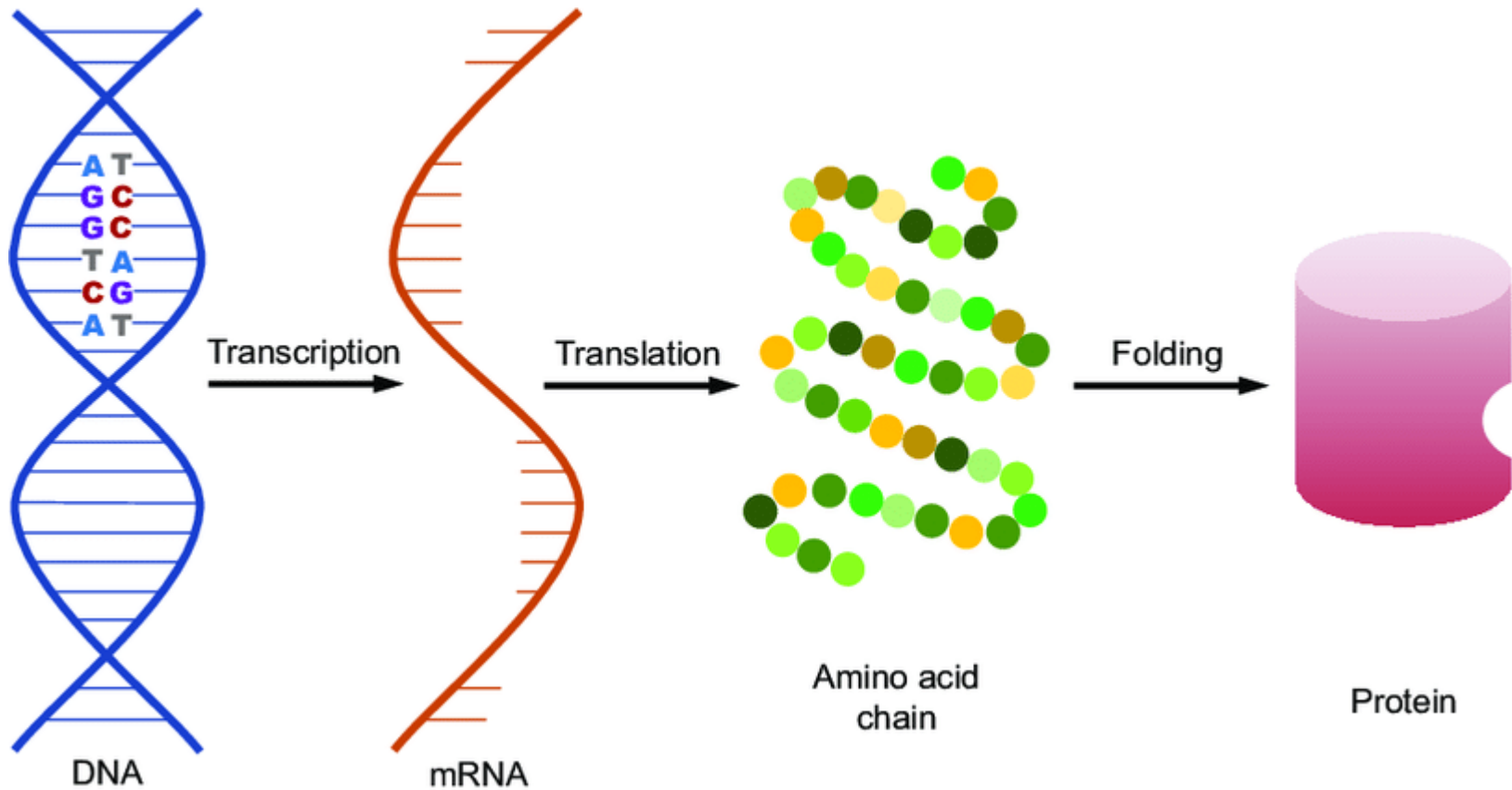


# Regulação da expressão gênica

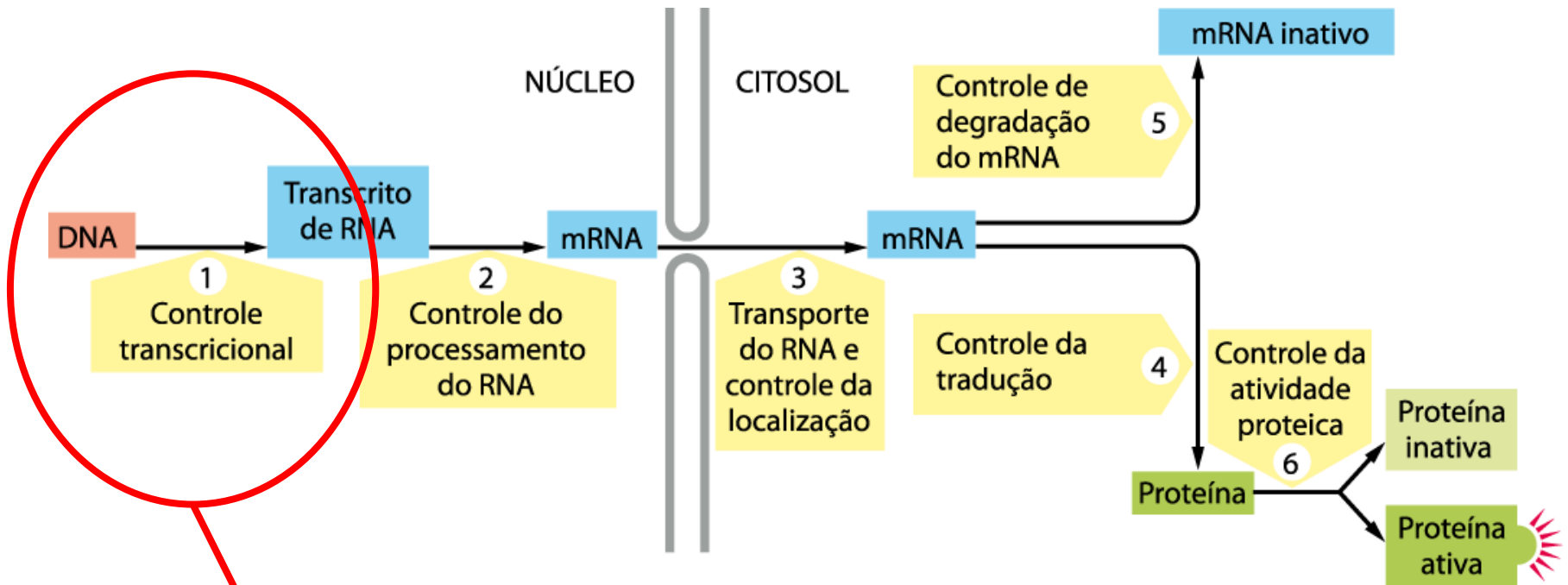
Tudo pode ser resumido a poucas questões simples...

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

# Regulação da expressão gênica



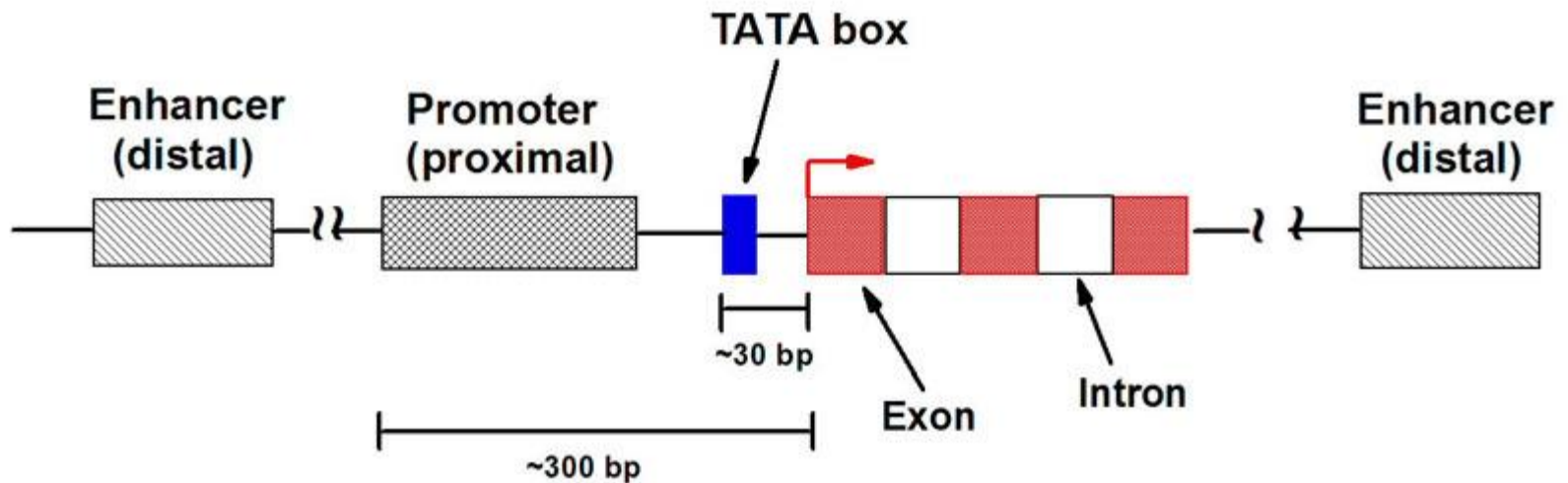
# Regulação da expressão gênica



O controle do início do transcrição é o principal

# Regulação da expressão gênica

Estrutura de um gene que codifica proteínas

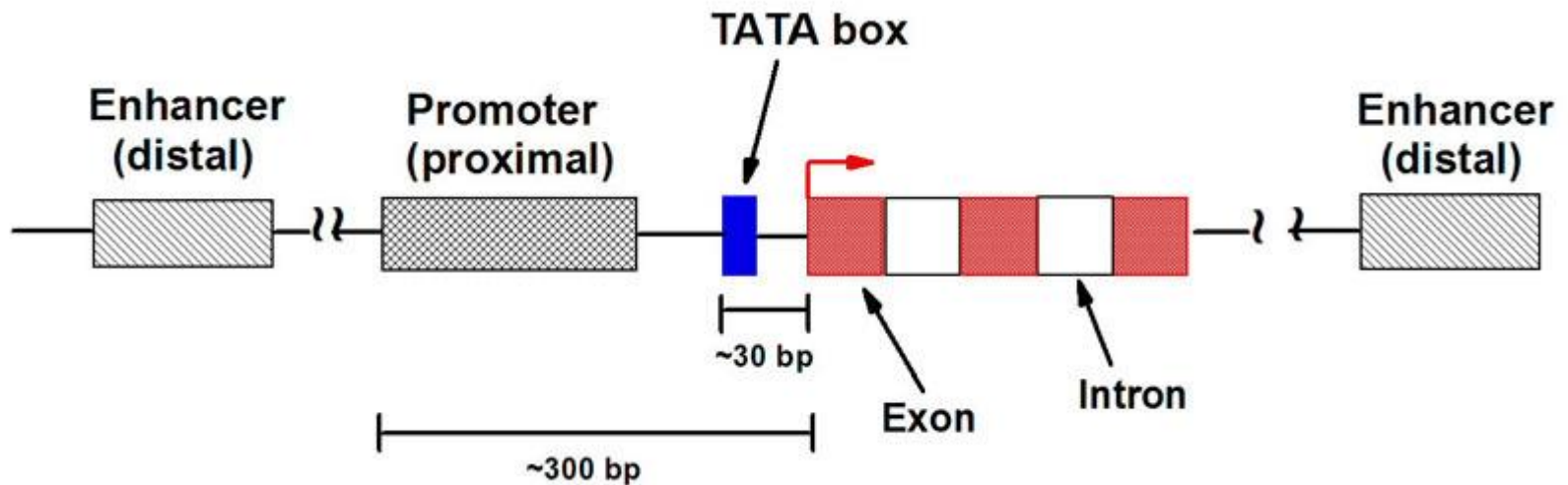


- Funcionalmente, um gene é maior do que a região que codifica a proteína ou o RNA funcional.

# 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

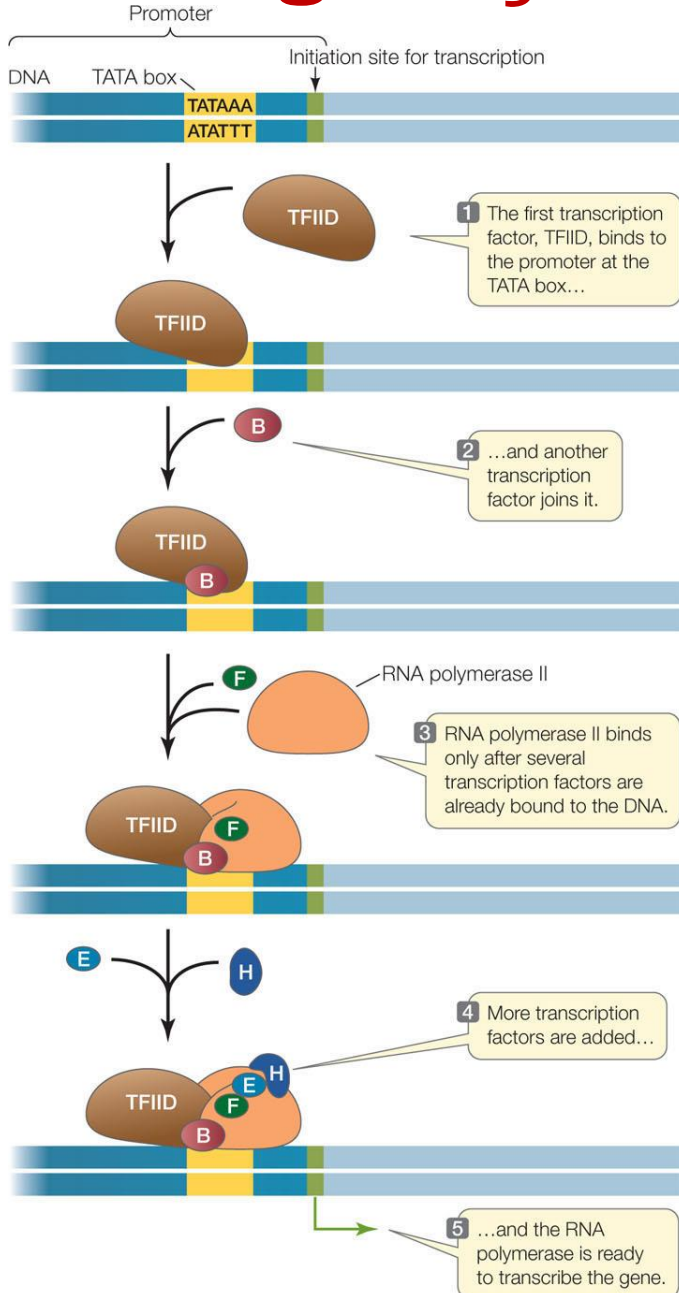
- A expressão de um gene começa com uma série de passos ordenados:

Complexo de pré-iniciação [preinitiation complex (PIC)]

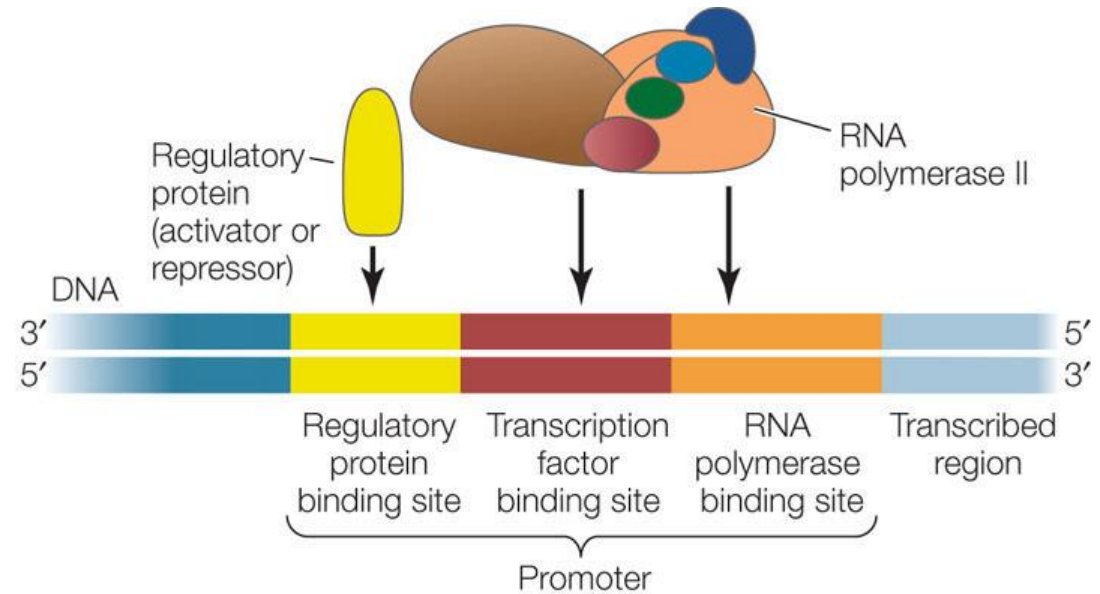
- A formação do PIC envolve vários fatores de transcrição gerais (GTFs: ligação à TATA box, helicases, quinases, ATPases) capazes de recrutar a RNA polimerase específica.
- No caso da RNA polimerase II existe também um complexo mediador (Mediator complex [MC]) composto por dezenas de subunidades.
- O MC está envolvido na regulação epigenética, remodelamento de cromatina e formação de *super enhancers*.



# Regulação da expressão gênica

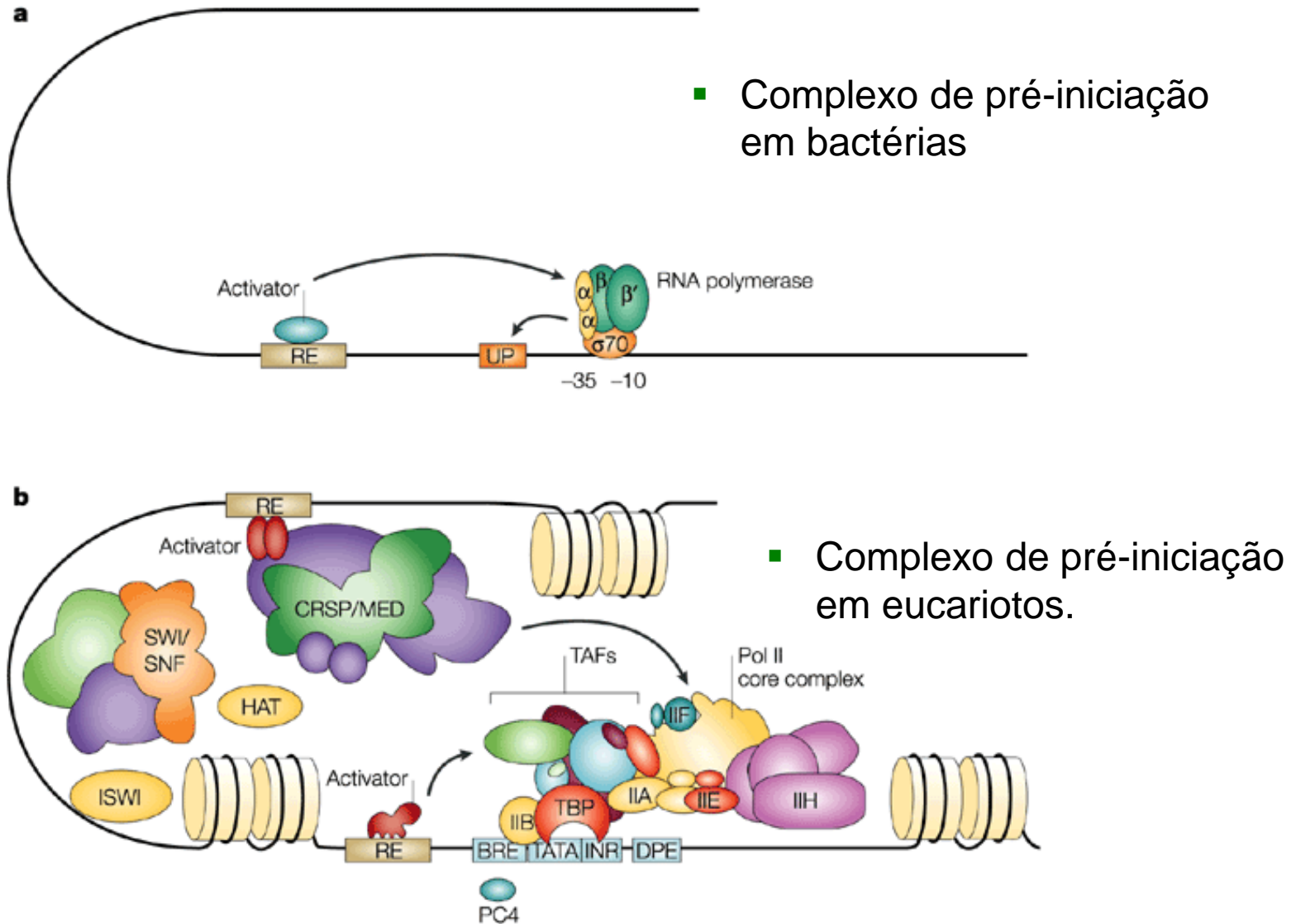


- A expressão de um gene começa com uma série de passos ordenados:



- Você reconhece os elementos em *cis* e *trans*?

# Regulação da expressão gênica



# Regulação da expressão gênica

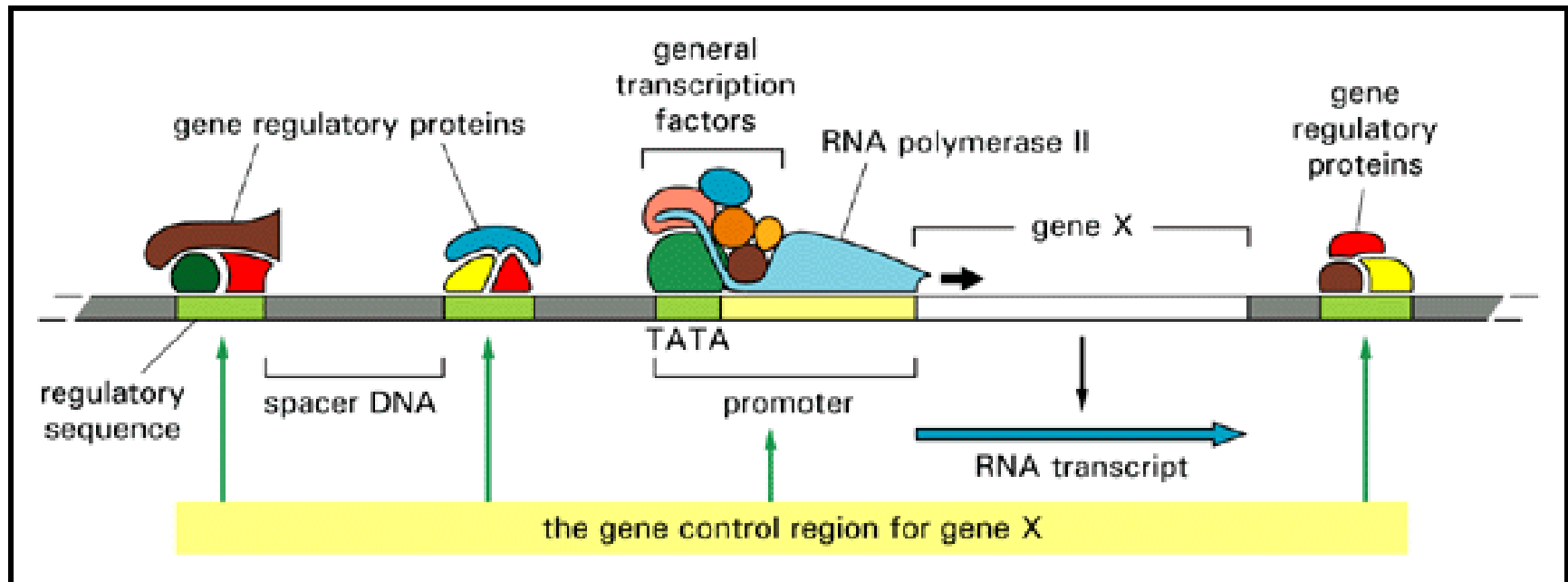
- A expressão de diferentes tipos de genes é executada por maquinarias moleculares diferentes:

Enzima	Produto de transcrição	Fatores de iniciação requeridos (mínimo)
RNA Pol I (14 subunidades)	rRNA 45S	SL1*/TIF1B/core factor TIF1A/RRN3 UBF/UAF
RNA Pol II (12 subunidades)	mRNA snRNA miRNA	TFIIA TFIIB TFIID* TFIIE TFIIF TFIIH
RNA Pol III (17 subunidades)	tRNA rRNA 5S small RNAs	TFIIIC TFIIIB*

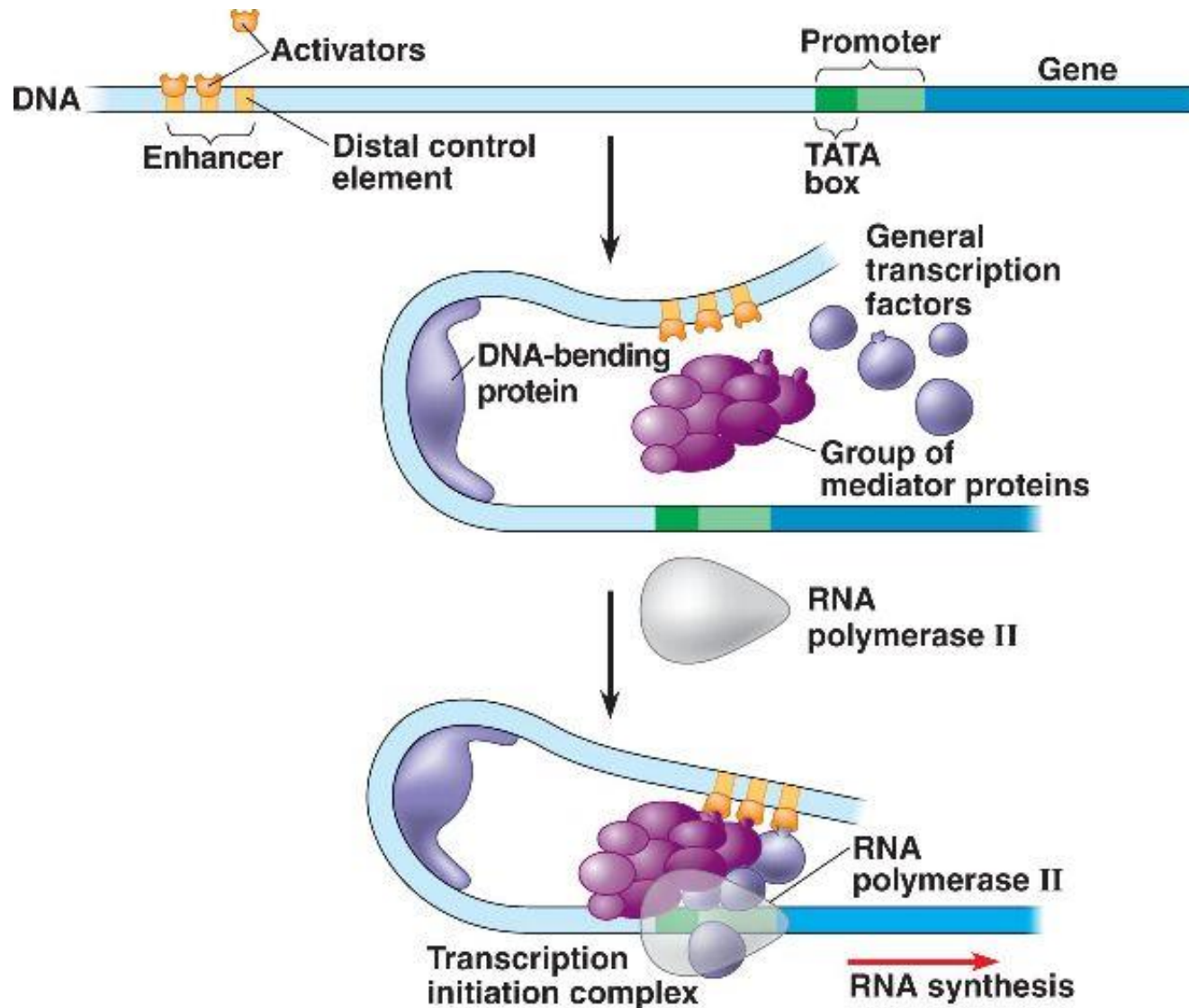
**\*contém a TATA-binding protein**

# Regulação da expressão gênica

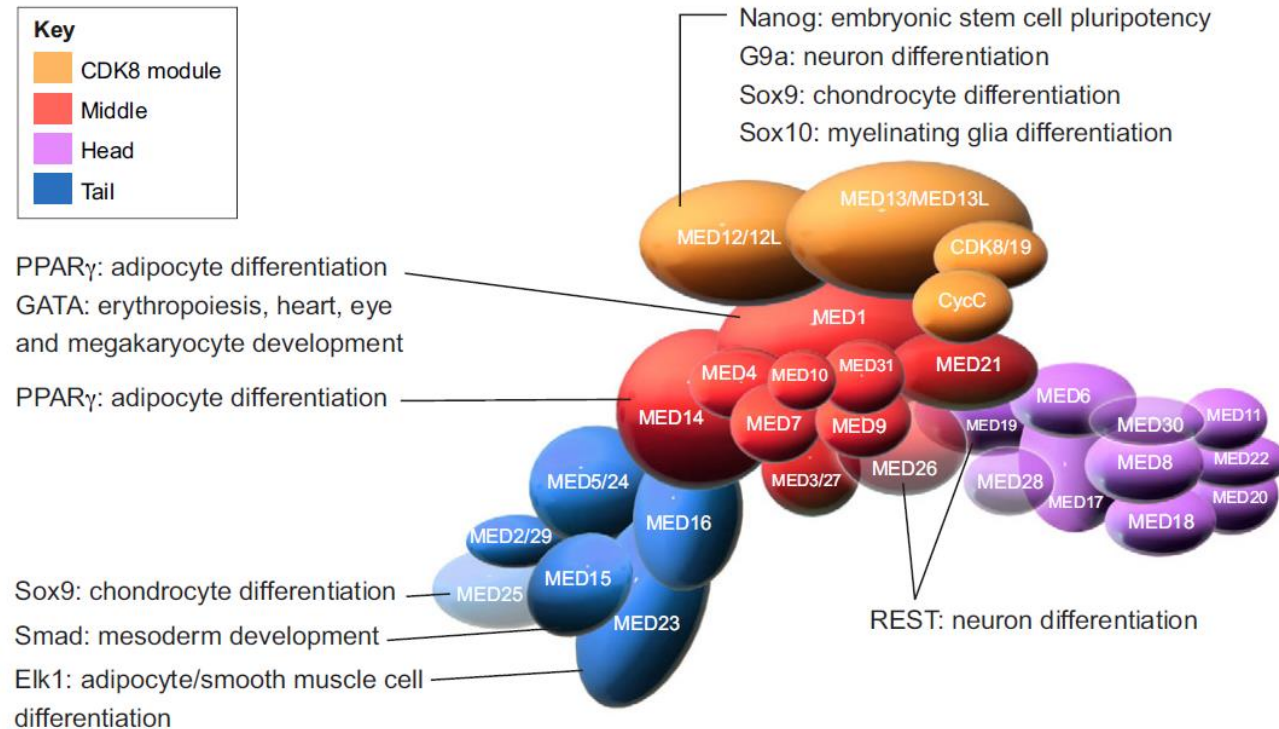
- A expressão de um gene é regulada por uma combinação de sequências regulatórias e fatores de transcrição.



# Regulação da expressão gênica

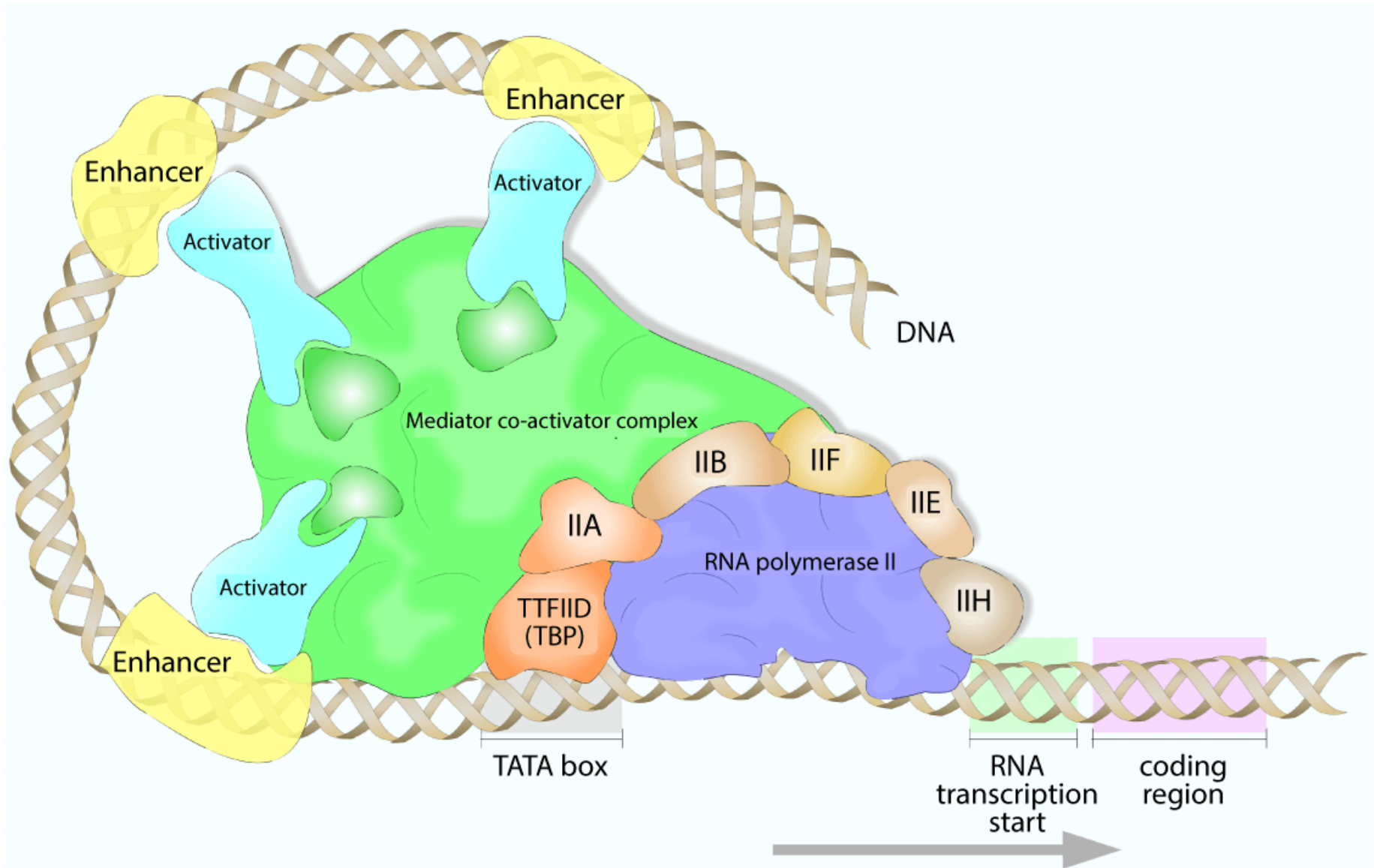


# Regulação da expressão gênica



**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



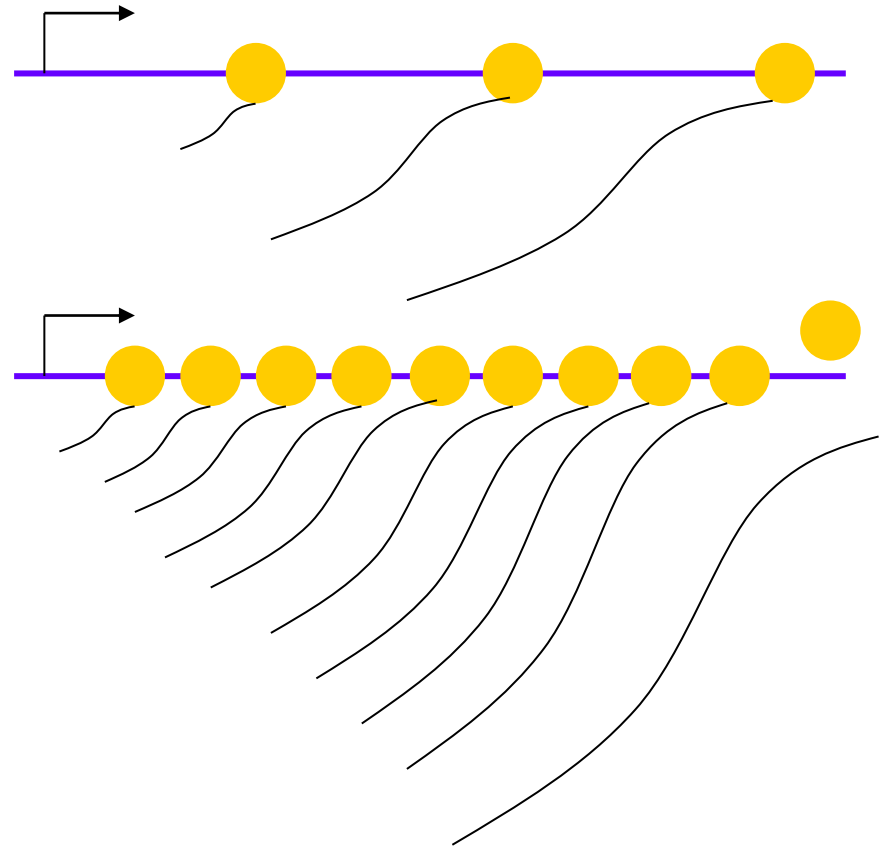
# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição

Fatores que decodificam mensagens do exterior da célula para o núcleo



Alteram a taxa de início de transcrição gênica





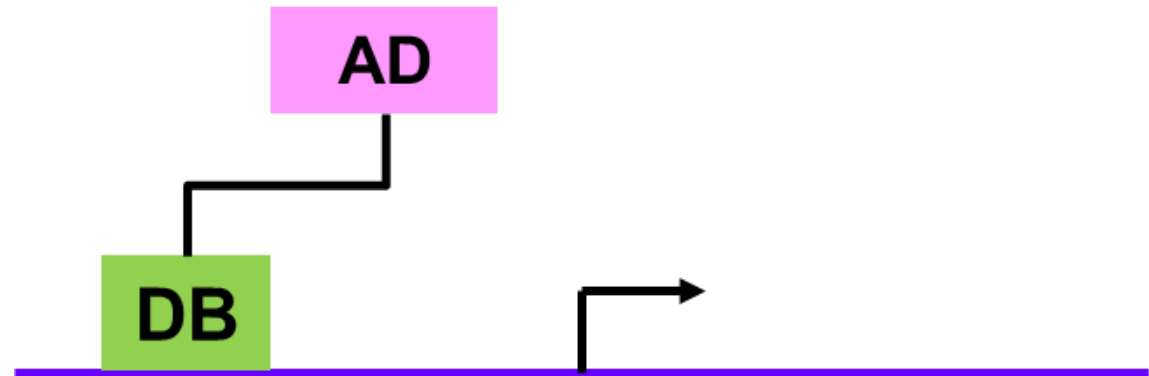
# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição

Fatores que decodificam mensagens do exterior da célula para o núcleo



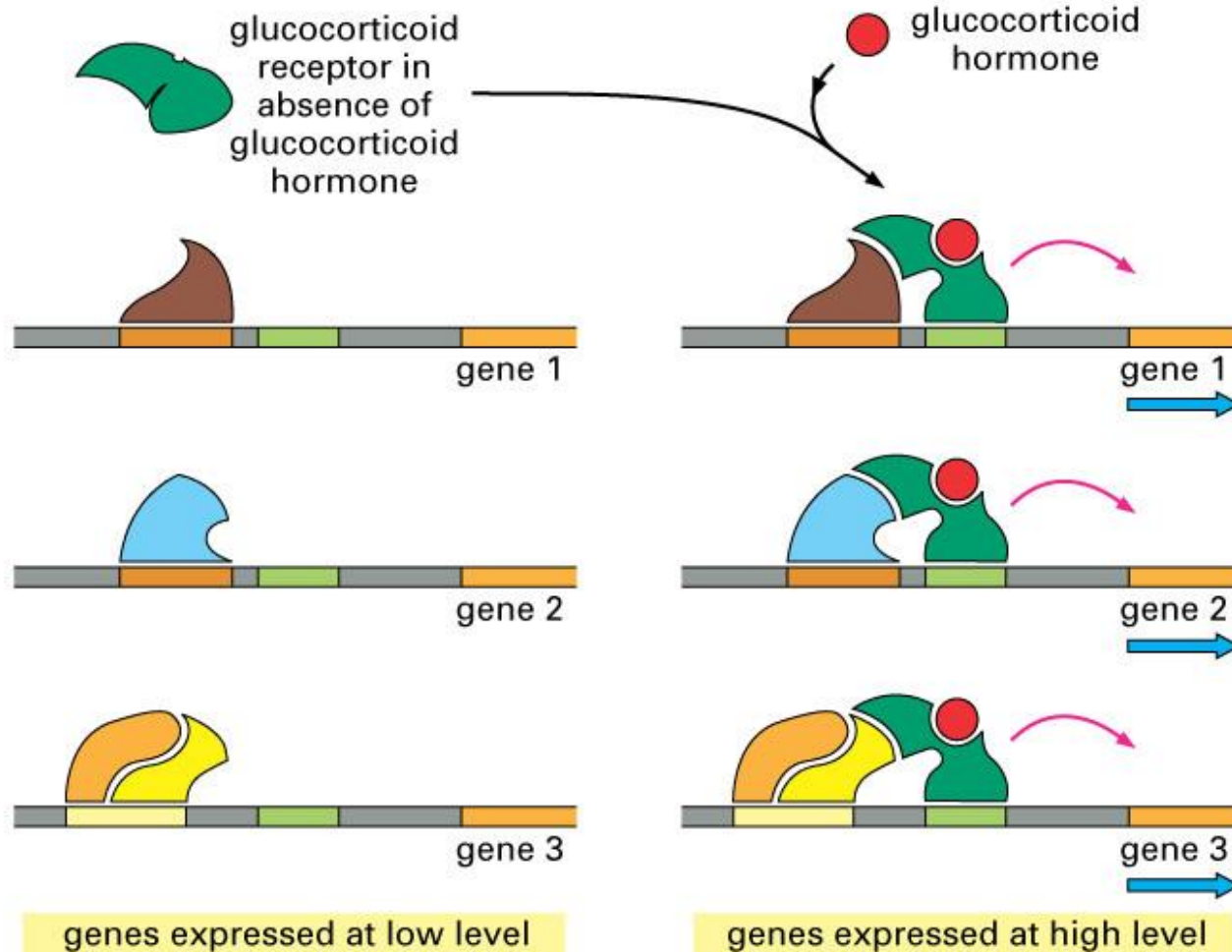
Alteram a taxa de início de transcrição gênica



# Regulação da expressão gênica

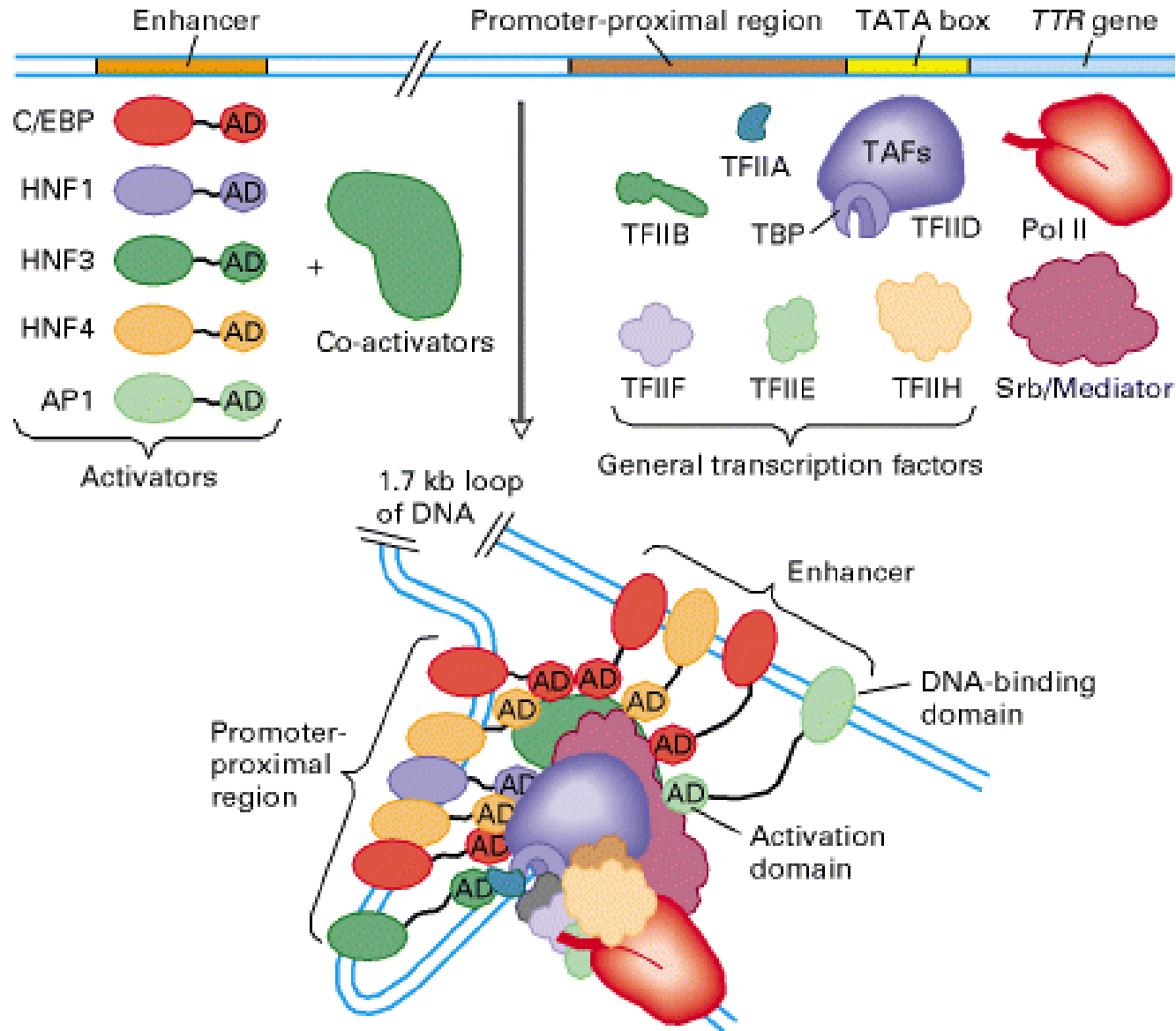
## Fatores de Transcrição

- A combinação é importante.



# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição



# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição

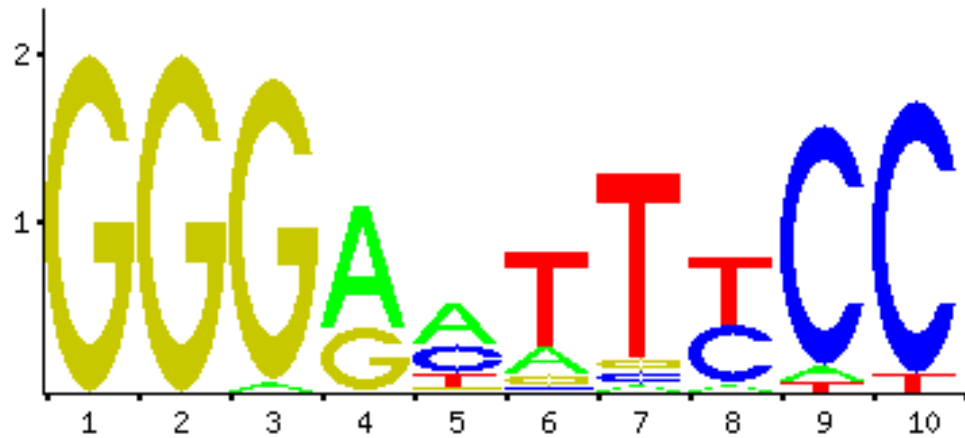
- Os fatores de transcrição atuam através de sua ligação a sequências específicas.

<b>Fator de Transcrição</b>	<b>Sítio de ligação consenso</b>
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

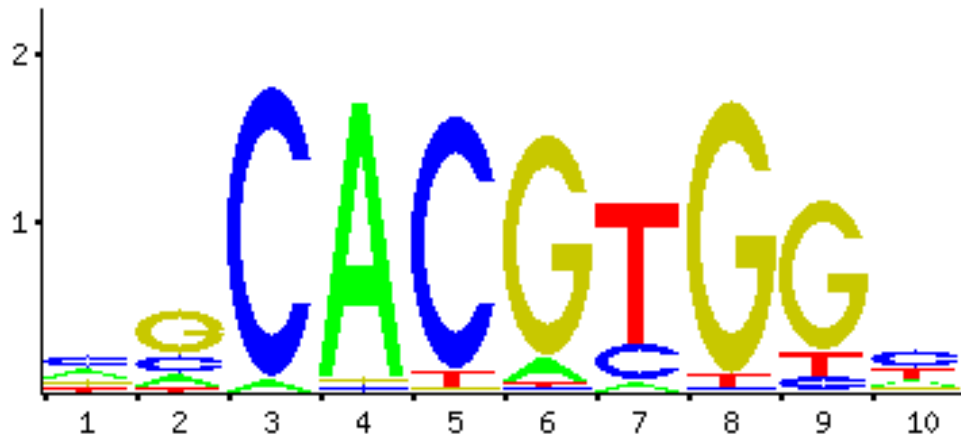
# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição



NF $\kappa$ B

- Cada fator tem sua seqüência consenso.

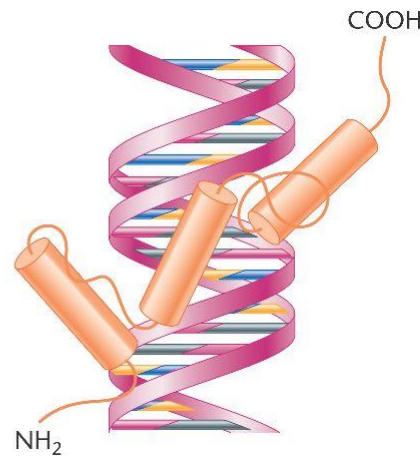
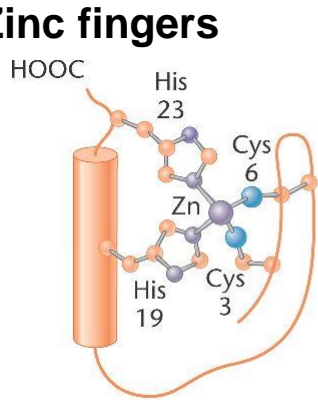


Myc

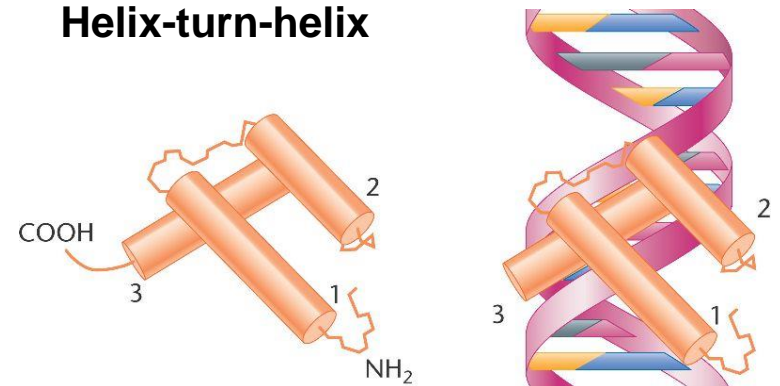
# Regulação da expressão gênica

## Fatores de Transcrição: estruturas específicas

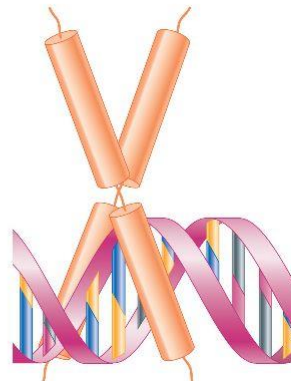
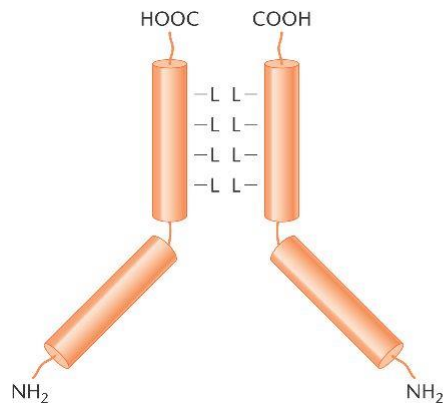
### Zinc fingers



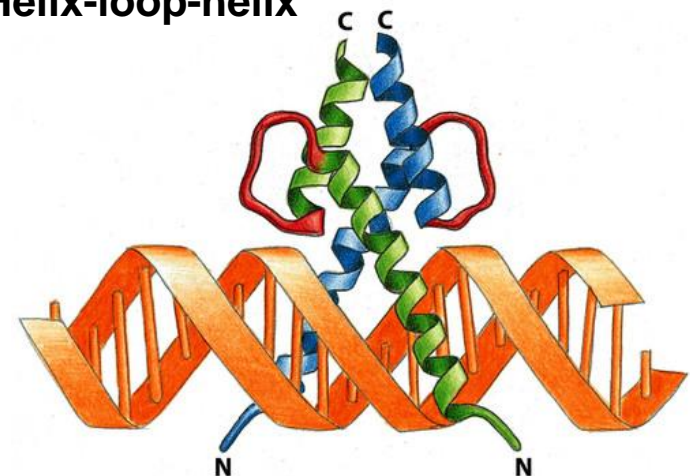
### Helix-turn-helix



### Leucine zipper

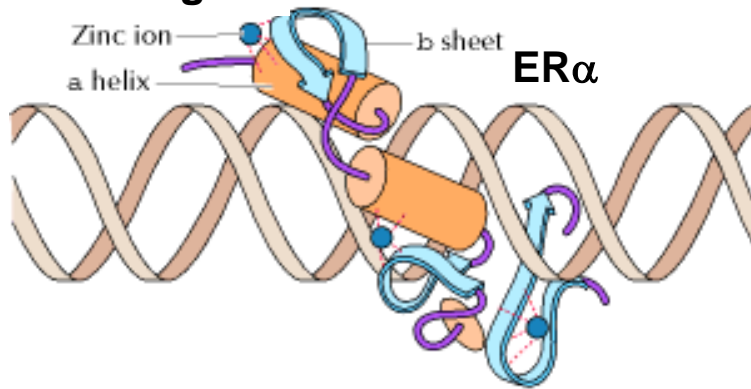


### Helix-loop-helix

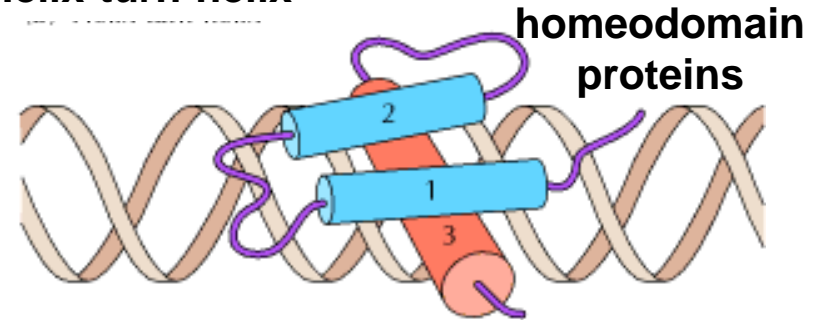


# Fatores de Transcrição: estruturas específicas

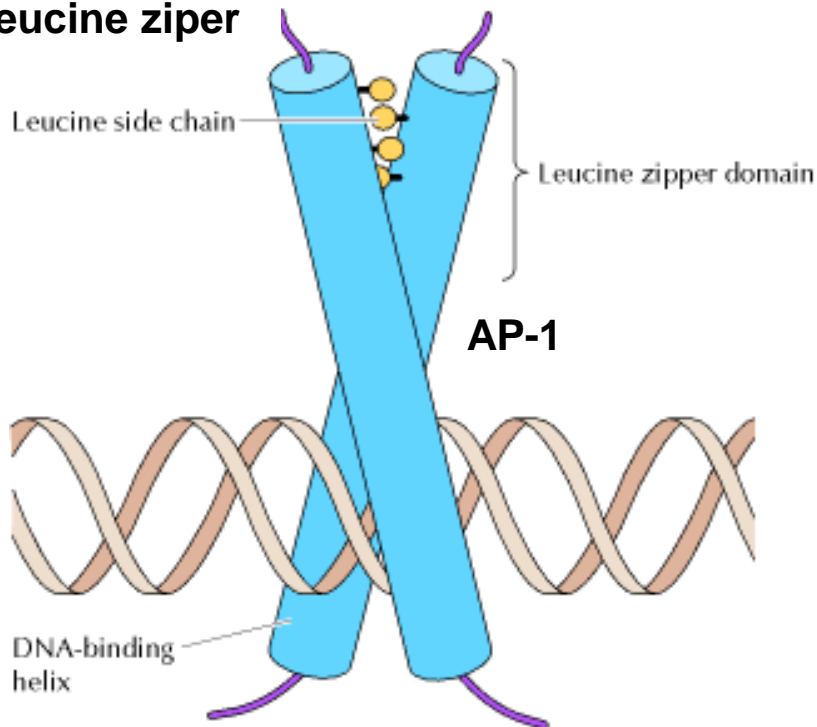
## Zinc fingers



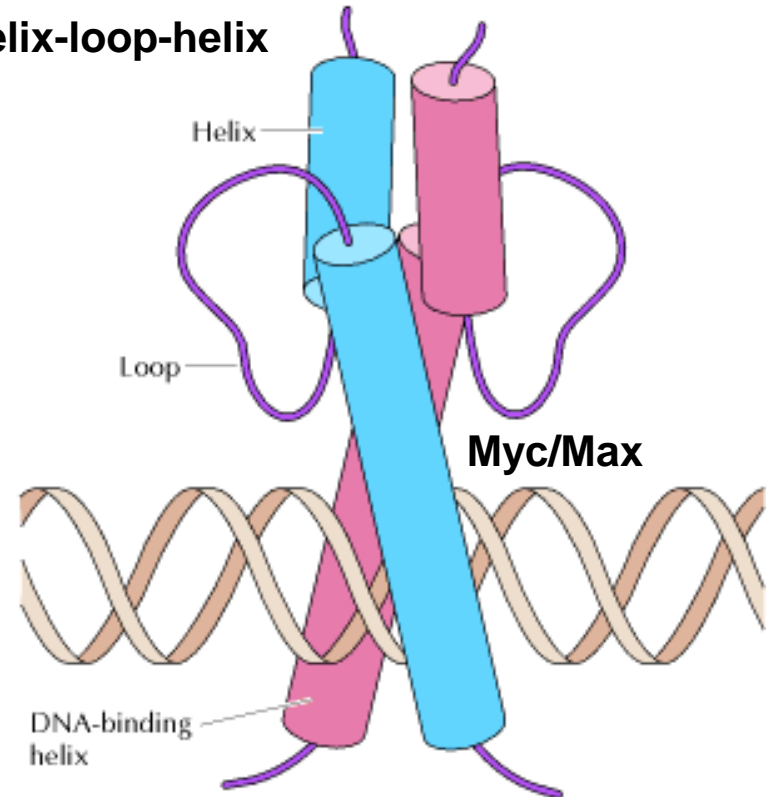
## Helix-turn-helix



## Leucine zipper

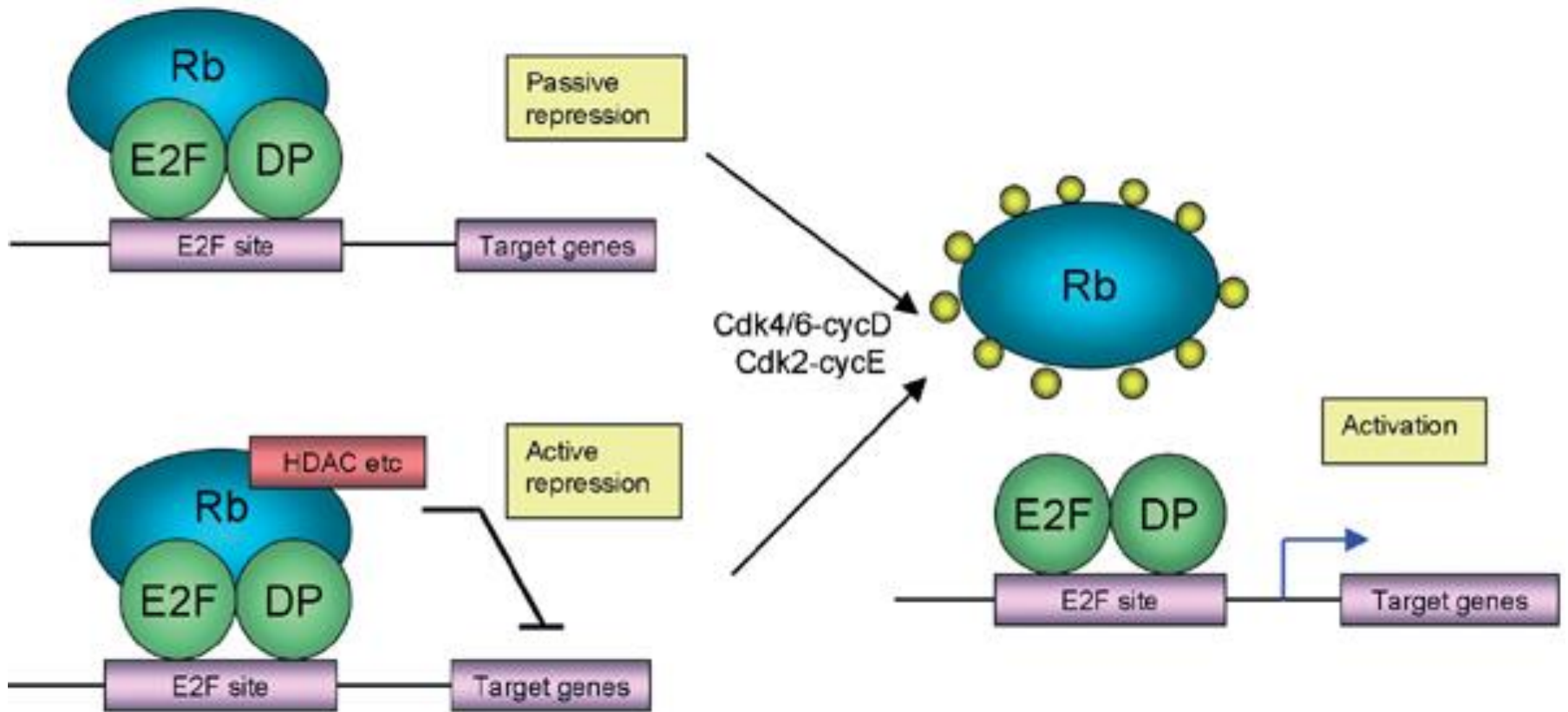


## Helix-loop-helix



# Regulação da expressão gênica

## Positiva vs. Negativa





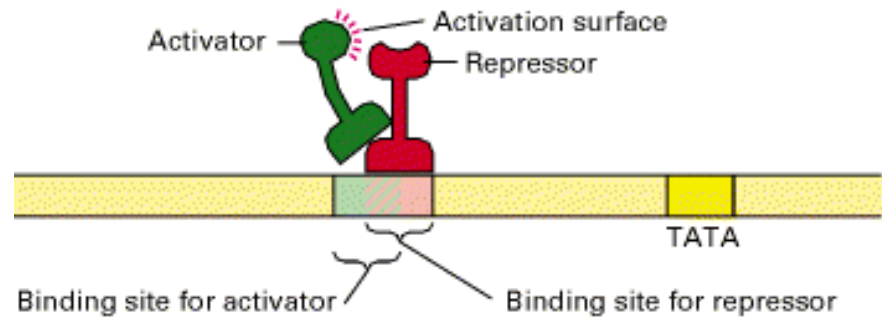
# Fatores de Transcrição

Fatores de transcrição também podem reprimir expressão gênica.

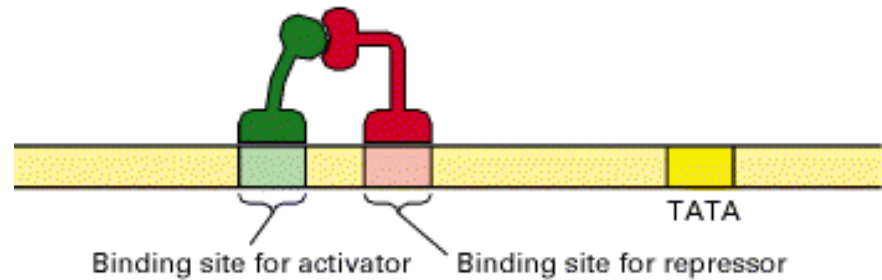
Interação direta com outros fatores de transcrição

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

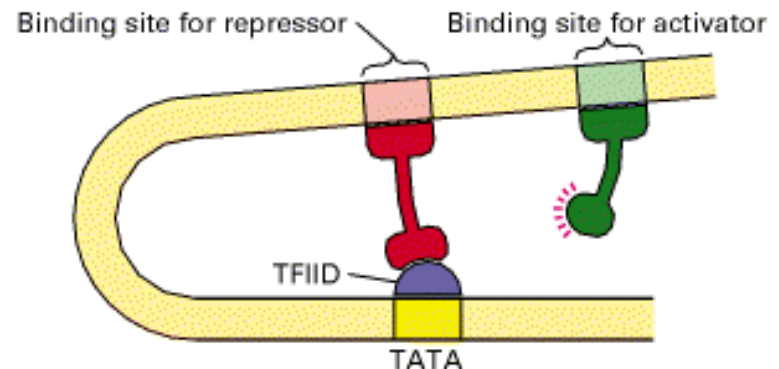
(a) Competitive binding with activator



(b) Interaction with activation domain of bound activator



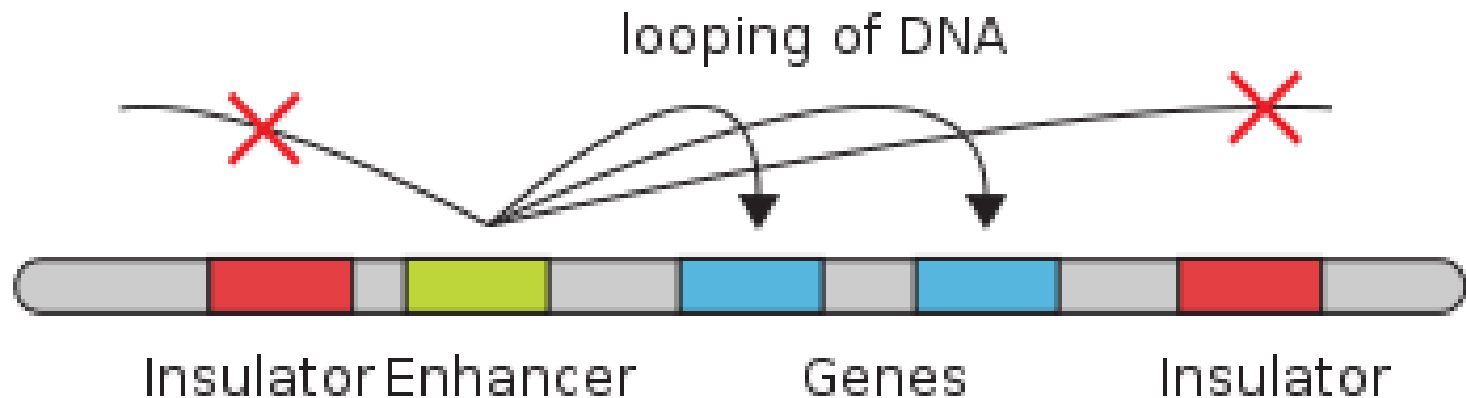
(c) Interaction with general transcription factors



# Regulação da expressão gênica

## 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**

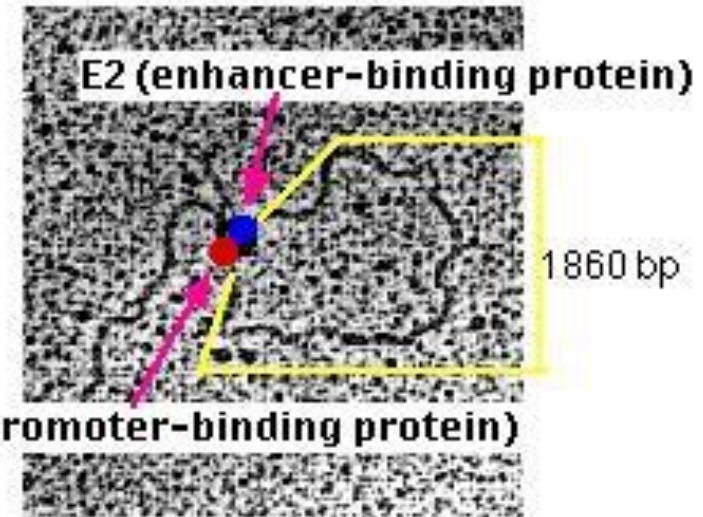
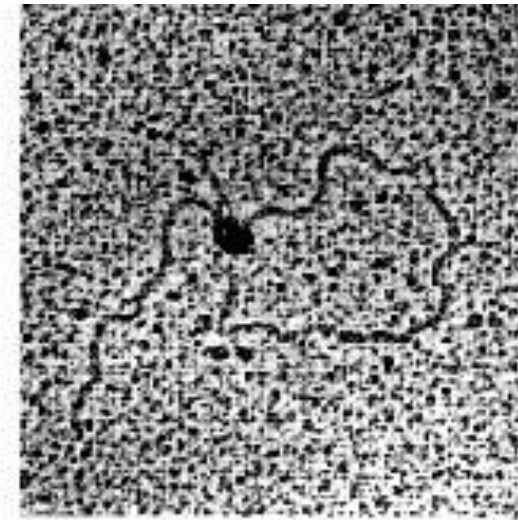
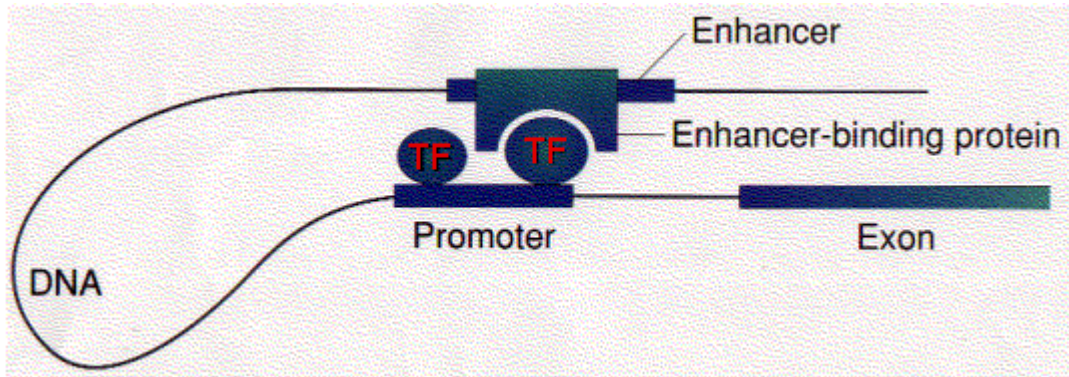
Recrutam enzimas que acetilam histonas para facilitar acesso de fatores de transcrição ou maquinaria basal ao DNA

### **TERMODINÂMICA**

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

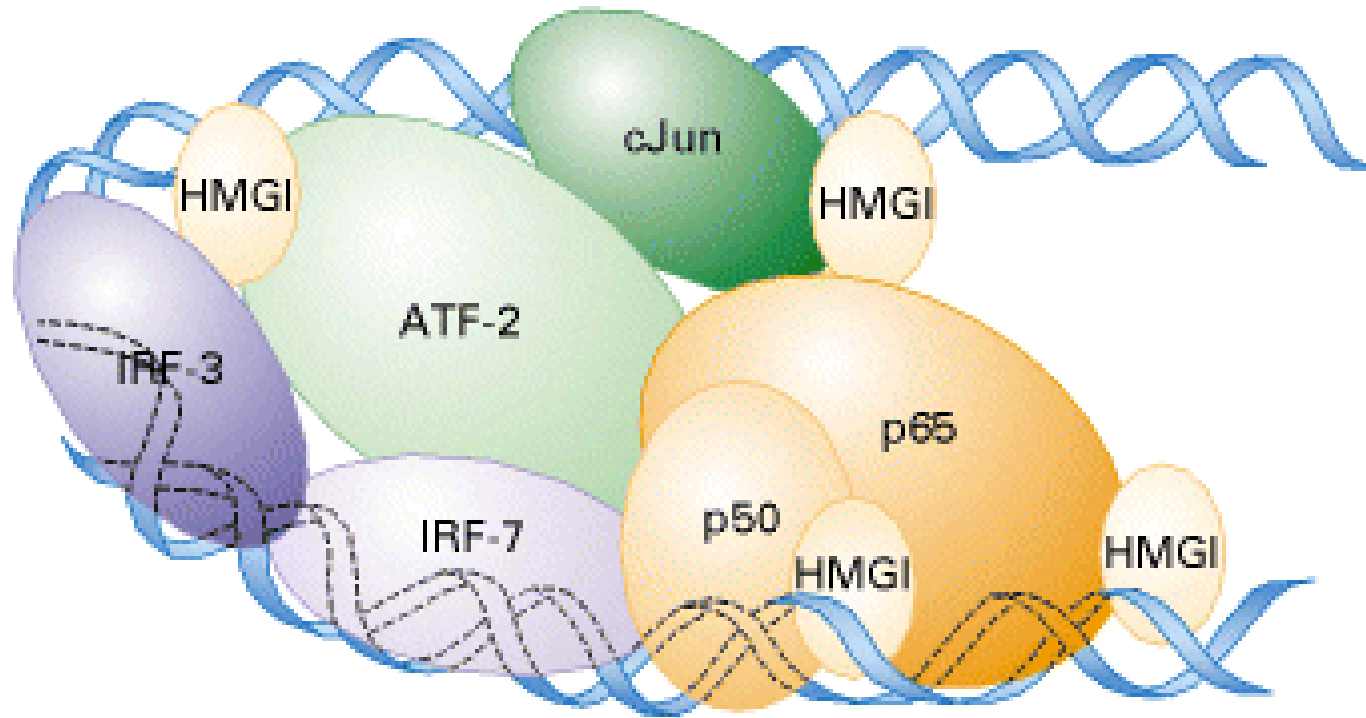
# Regulação da expressão gênica

## Elementos regulatórios: *Enhancers*



# Regulação da expressão gênica

## Elementos regulatórios: *Enhancers*

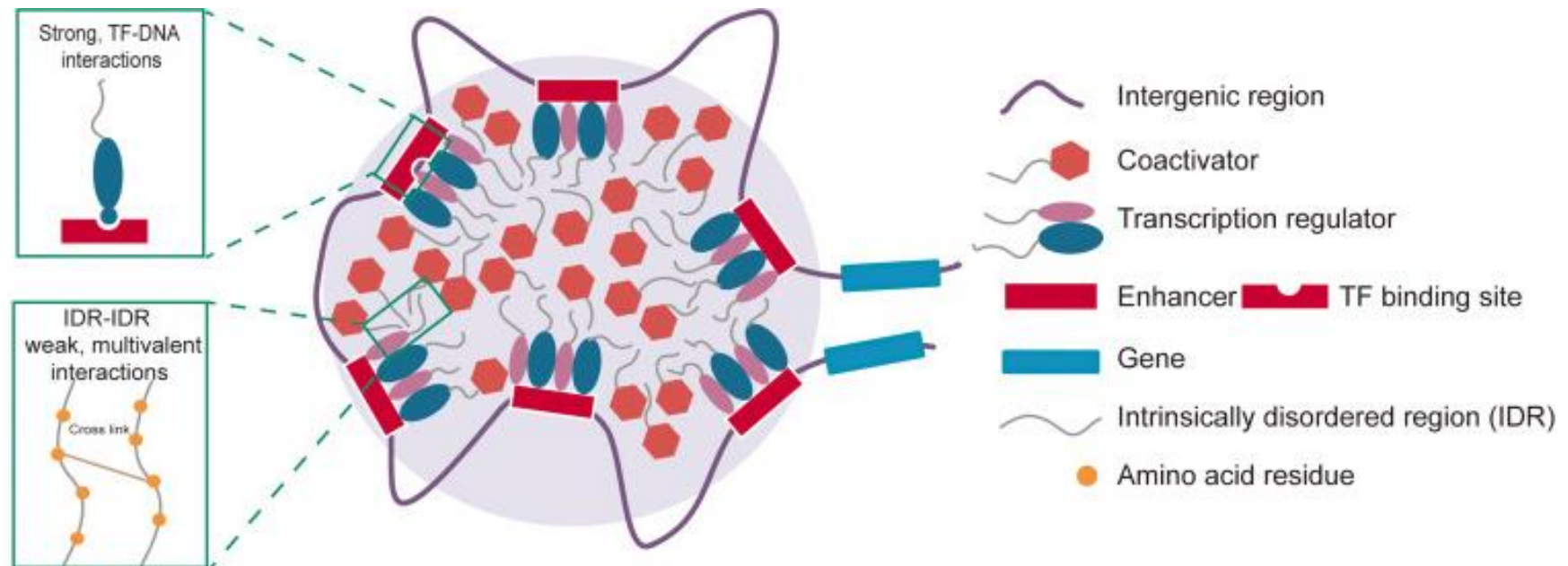


“**Enhanceossomo**” – complexo de fatores de transcrição que regulam a expressão de um determinado gene.

# Regulação da expressão gênica

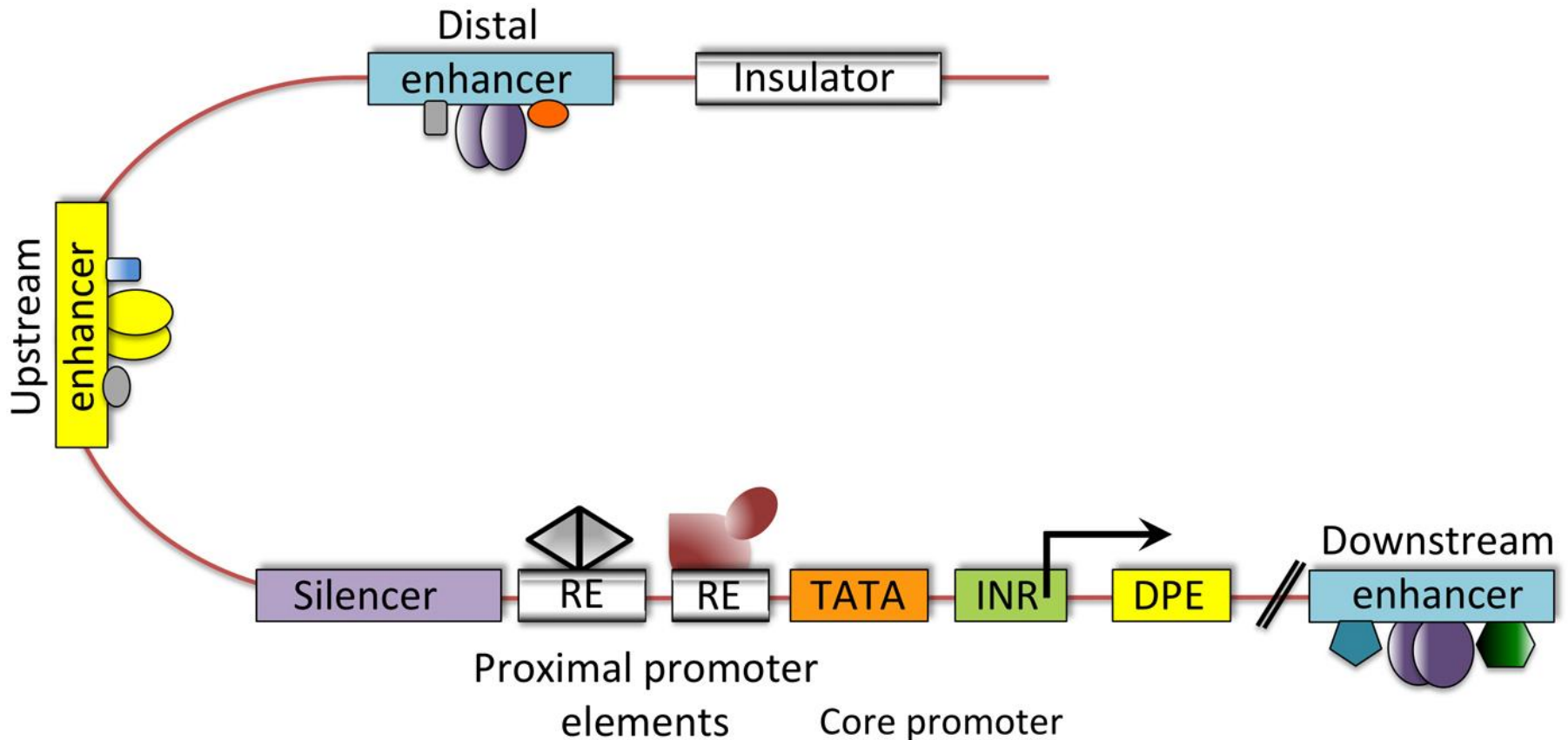
## Elementos regulatórios: *super Enhancers*

A



# Regulação da expressão gênica

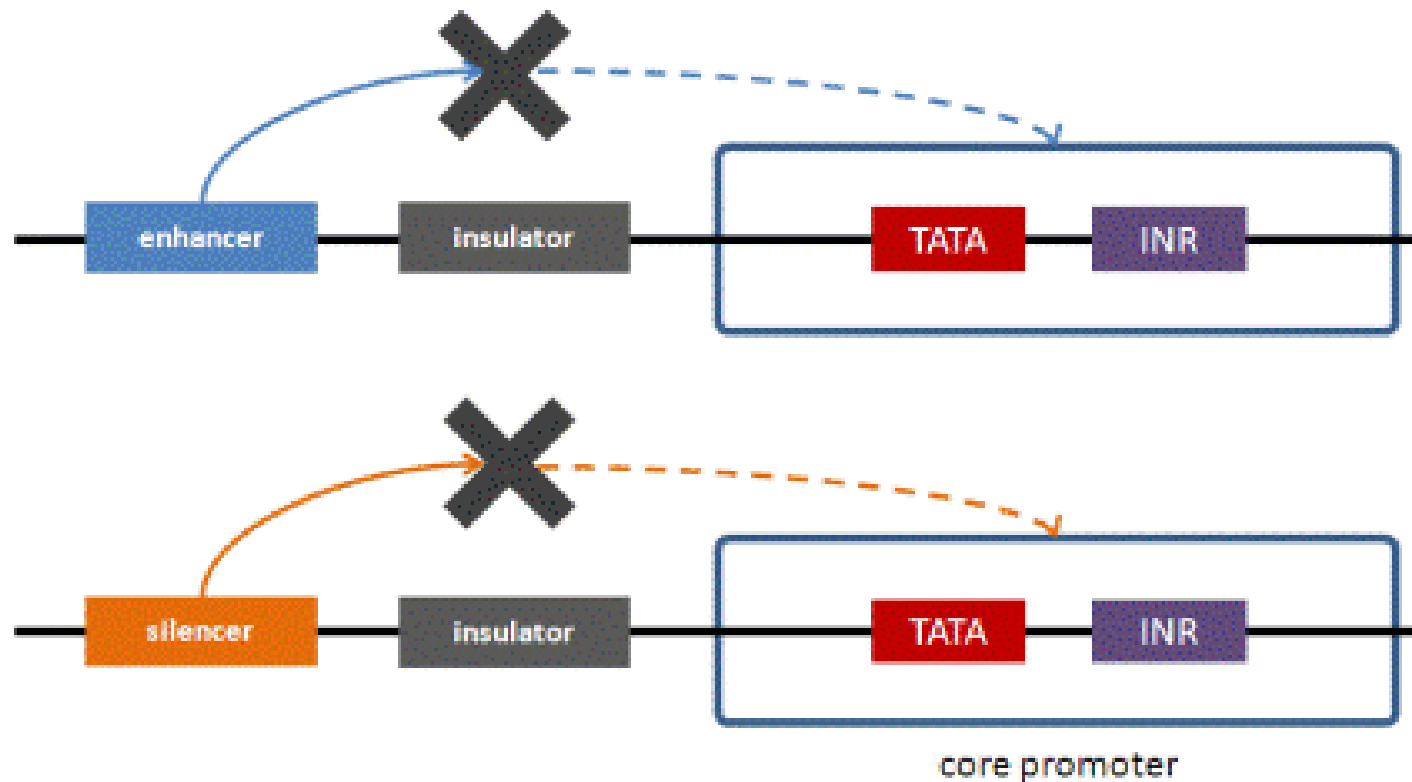
## Elementos regulatórios à distância: *Enhancers e insulators*



# Regulação da expressão gênica

## Elementos regulatórios: *Insulators*

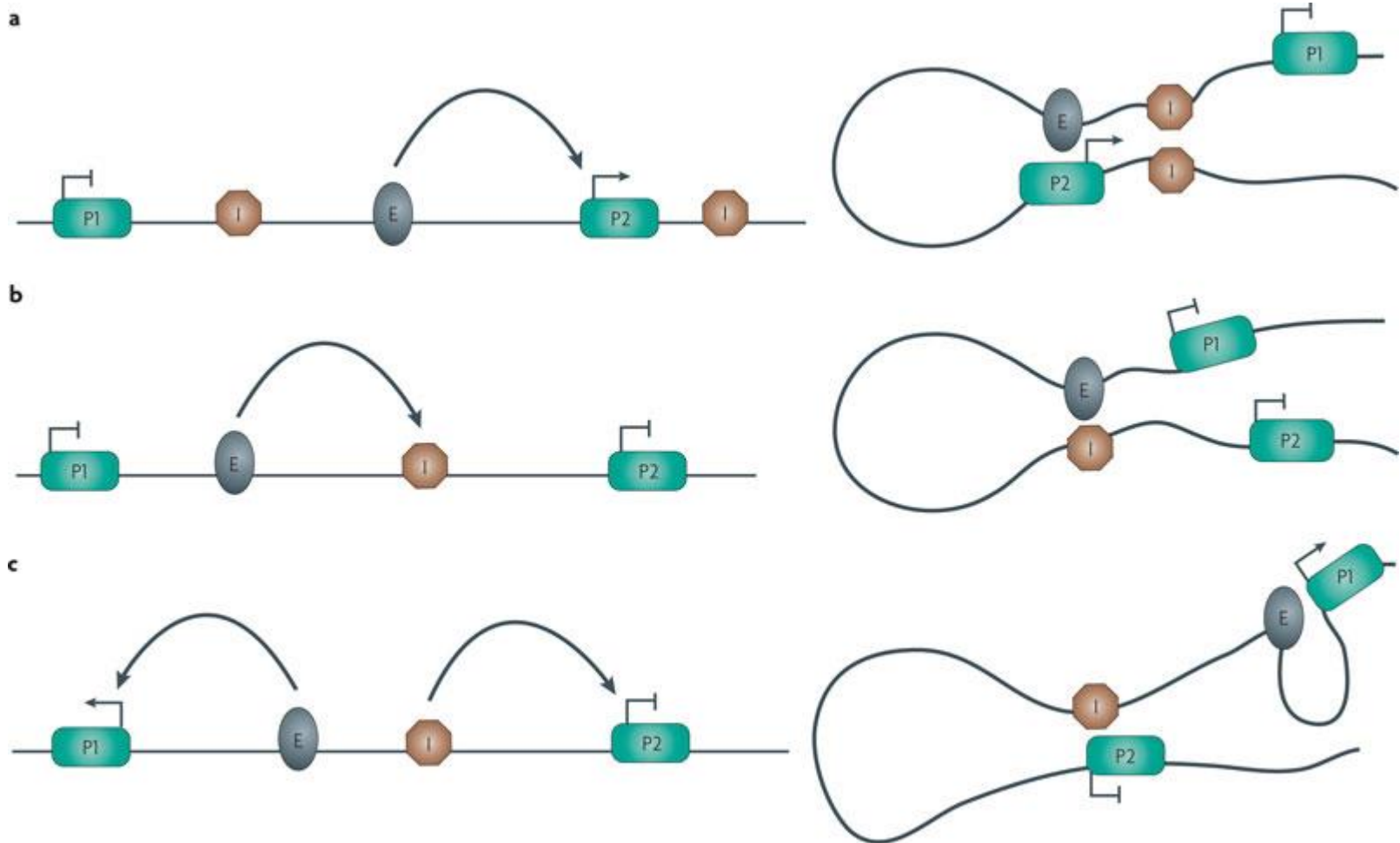
**Sequência de nucleotídeos** que age como barreira entre um *enhancer* (ou silenciador) e um promotor.





# Regulação da expressão gênica

## Elementos regulatórios: *Insulators vs Enhancers*



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

### Um pouquinho de DNA e matemática...

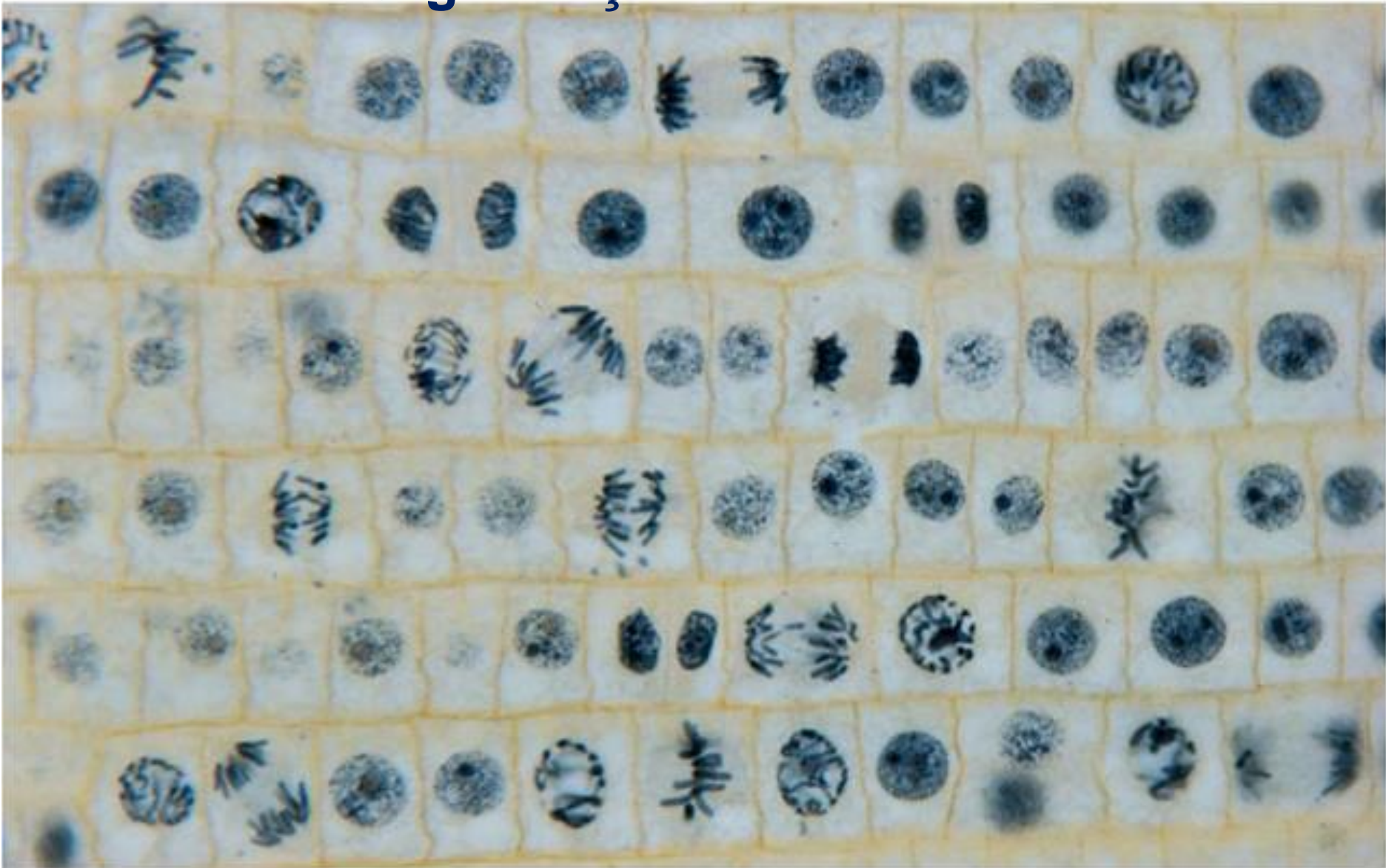
- Nosso genoma haploide é composto por  $\sim 3 \times 10^9$  pares de bases.
- Cada par de bases mede 0.34 nm ( $0.34 \times 10^{-9}$  metros).
- Logo, nosso genoma mede  $[0.34 \times 10^{-9} \text{ metros} (6 \times 10^9)] = 2,04$  metros
- O núcleo de uma célula humana mede  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diâmetro ( $10^{-5}$  metros).

### Temos um problema...

**Então é bom fazermos um intervalo de 10 minutos!!!**

# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

### Cromatina

**Eucromatina**  
**+ transcrição**

**- transcrição**

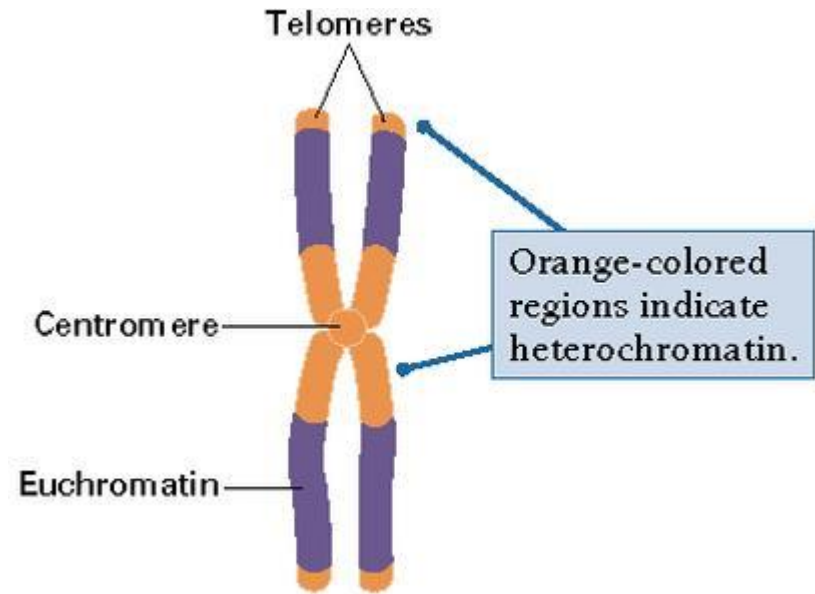
**Heterocromatina**

**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.

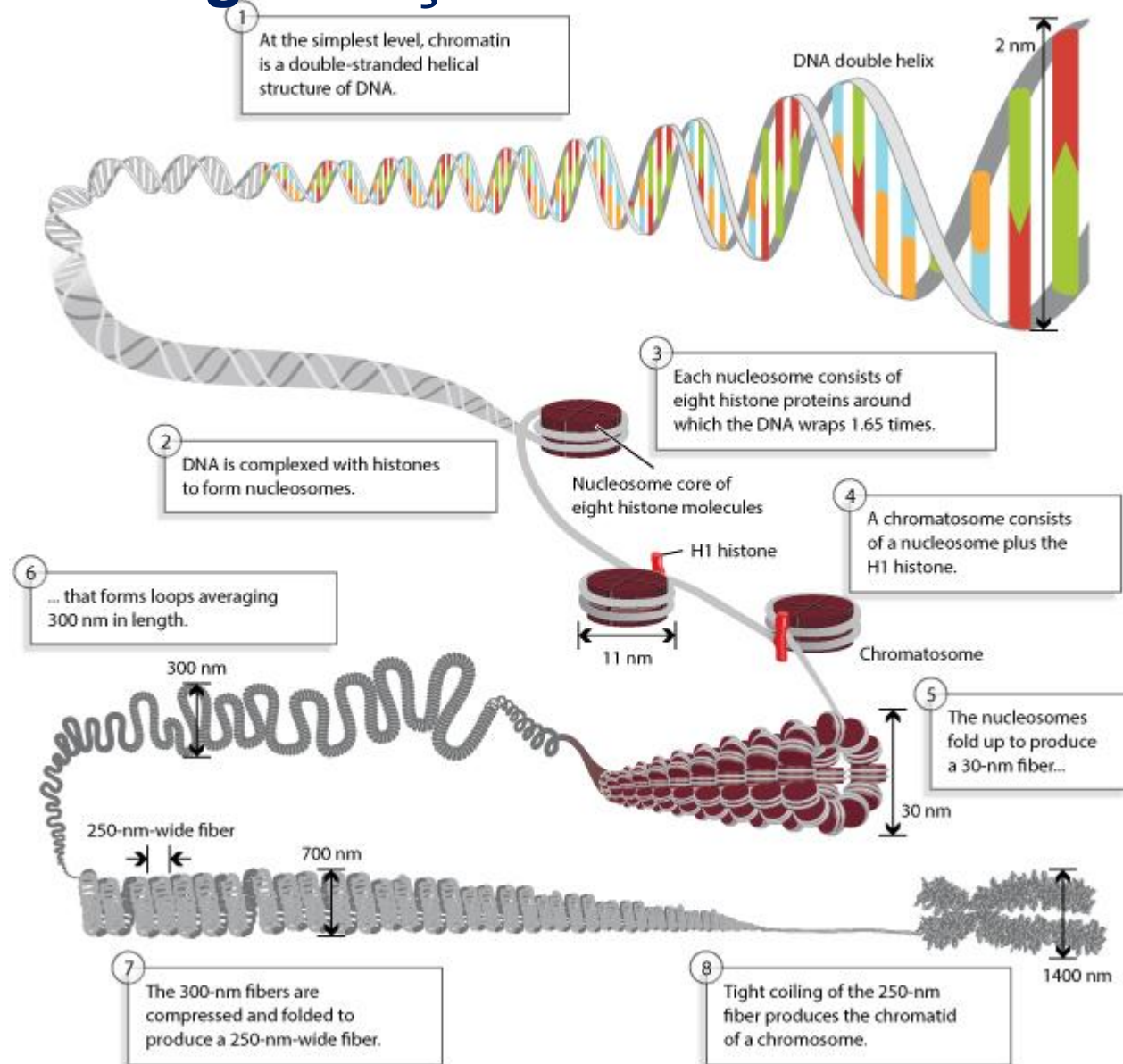
# Regulação da expressão gênica

**Nosso DNA está organizado em cromatina.**

**Cromatina:** DNA + Histonas + outras proteínas

# Regulação da expressão gênica

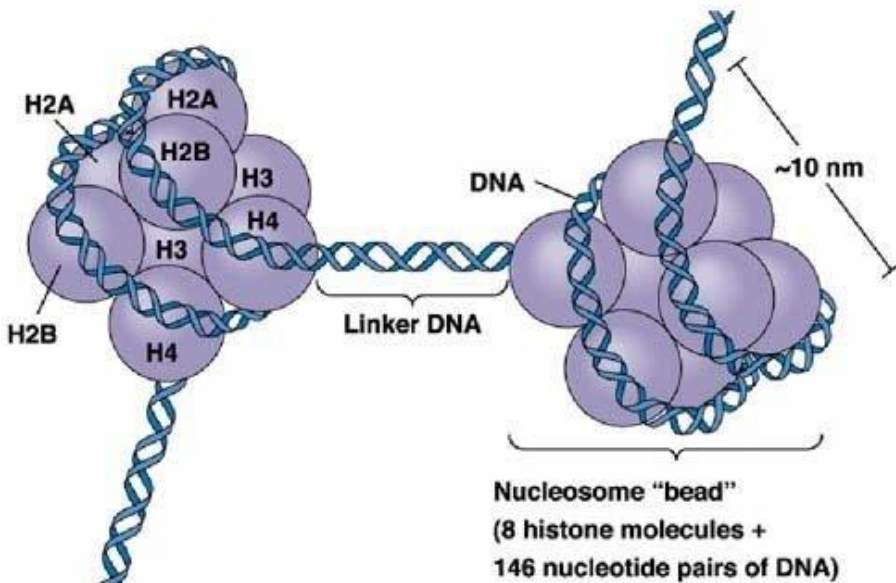
## Organização da cromatina



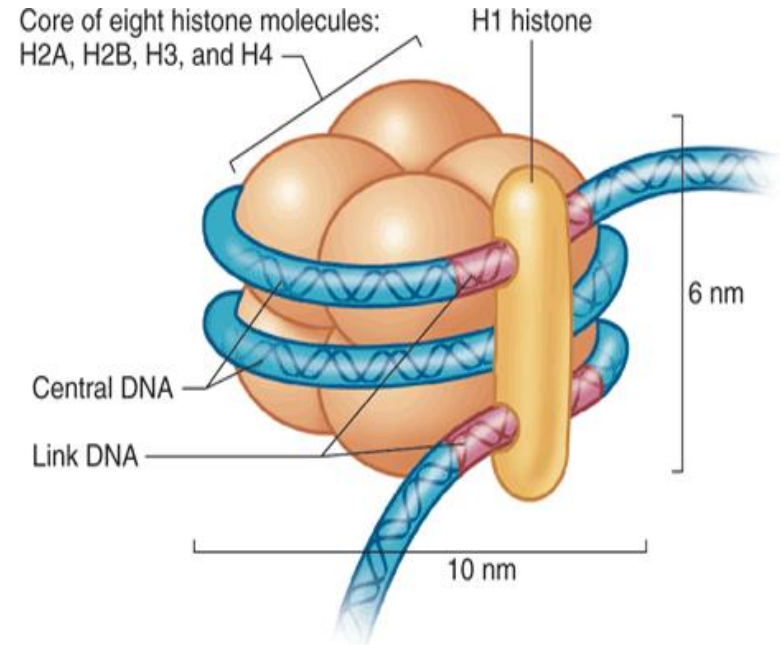
# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

- Os nucleossomos constituem o primeiro nível de compactação da cromatina



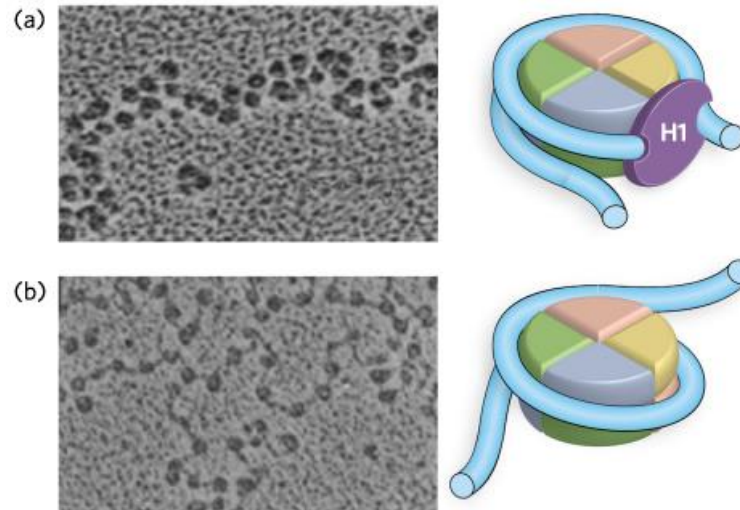
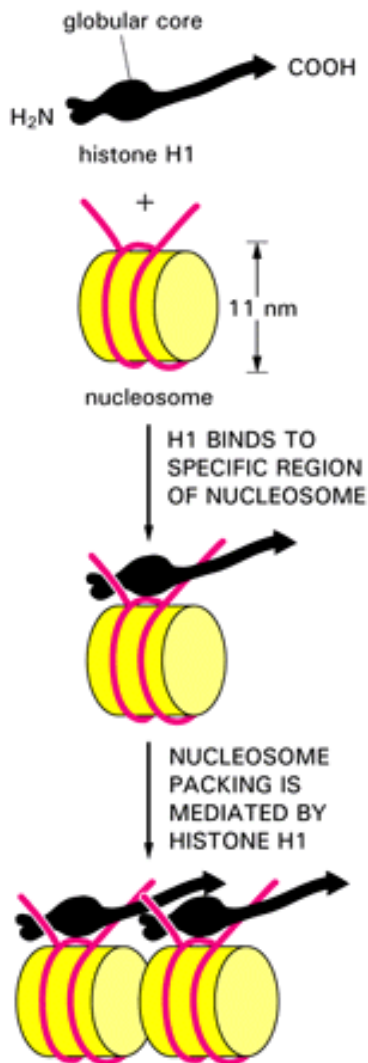
©Addison Wesley Longman, Inc.



# 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.



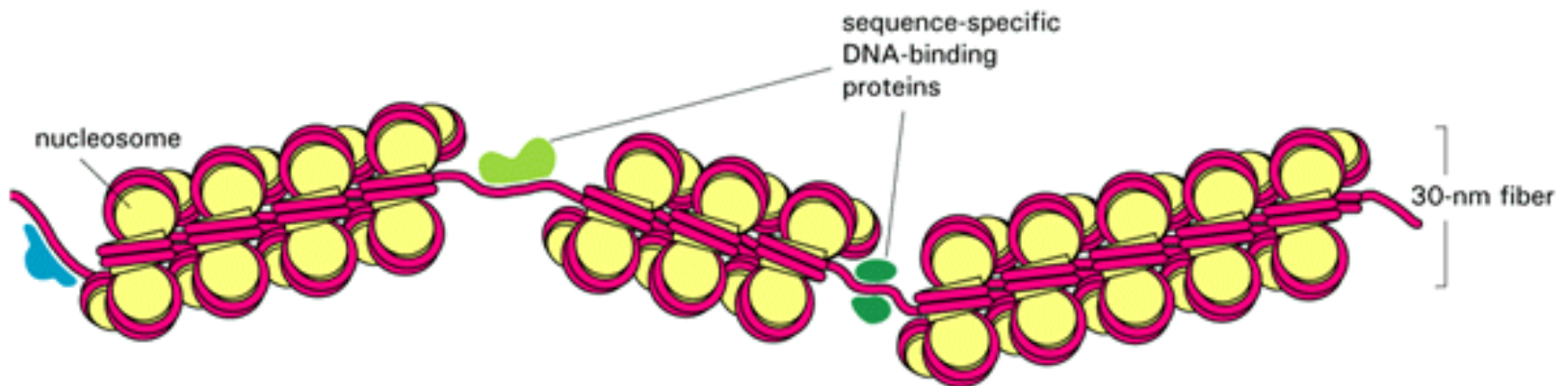
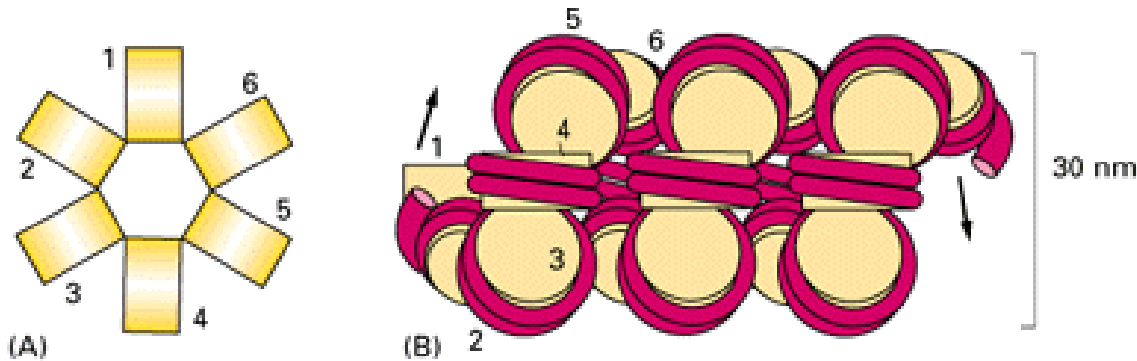
**FIGURA 10-12** Aparência de zigue-zague dos nucleossomos na presença de H1. Micrografia eletrônica de nucleossomos (a) na presença de H1 e (b) na sua ausência. H1 aumenta a aparência de zigue-zague porque reduz os ângulos de entrada e saída do DNA, como mostram as ilustrações à direita das micrografias. 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

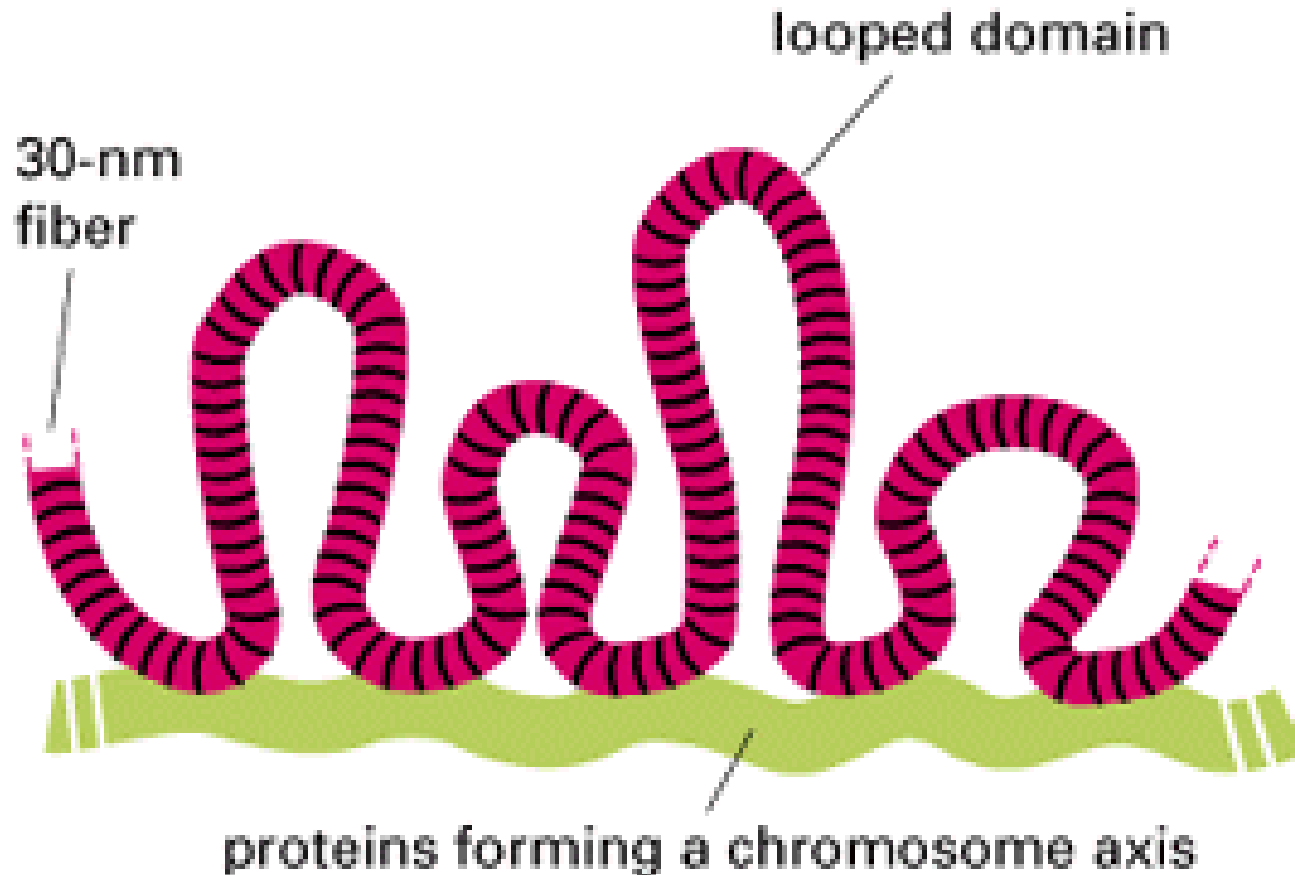
- A fibra de 30 nm constitui o segundo nível de compactação da cromatina (**zip 6:1**).



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

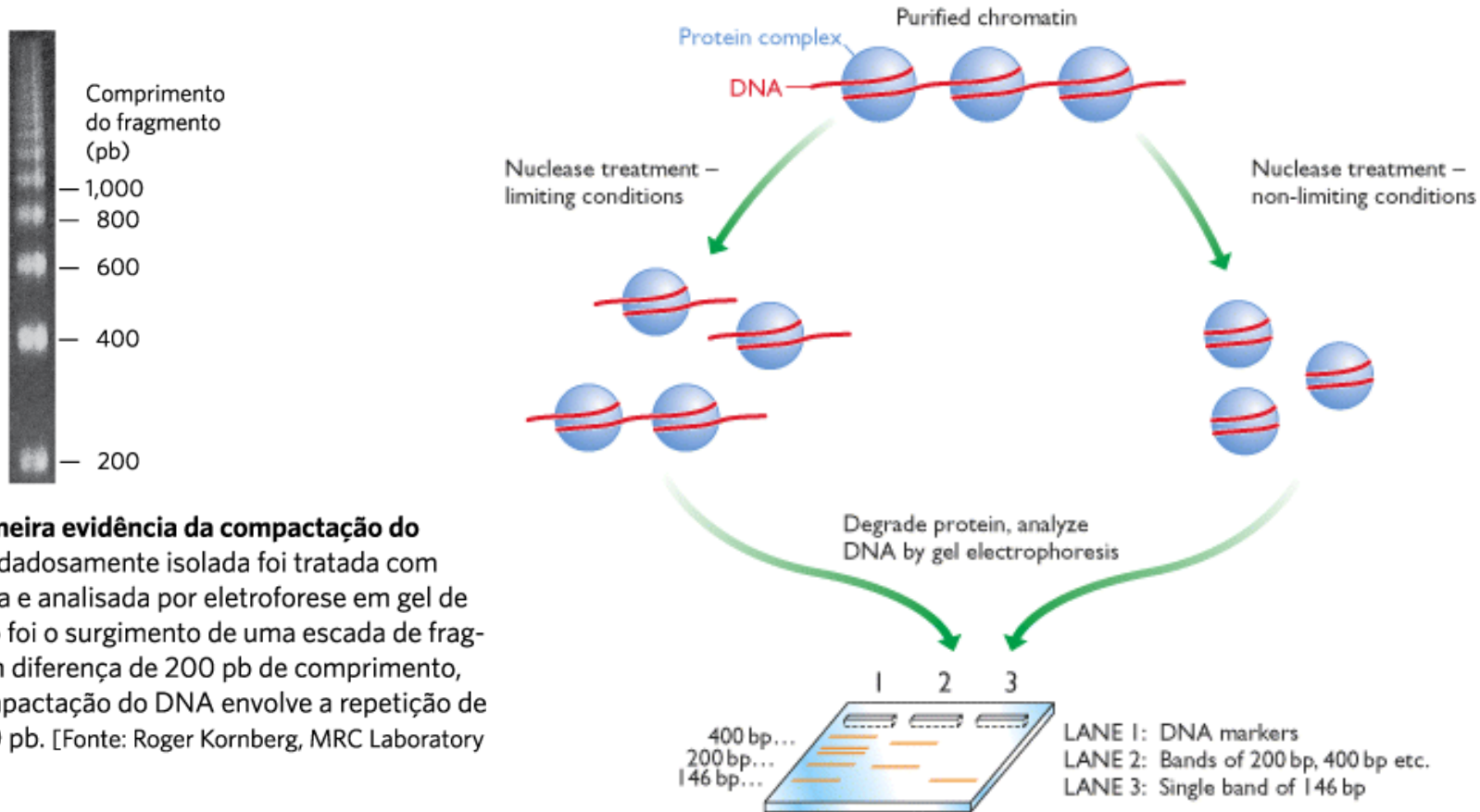
- A fibra de 30 nm forma alças ancoradas ao esqueleto protéico do cromossomo. Unidades funcionais?



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

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



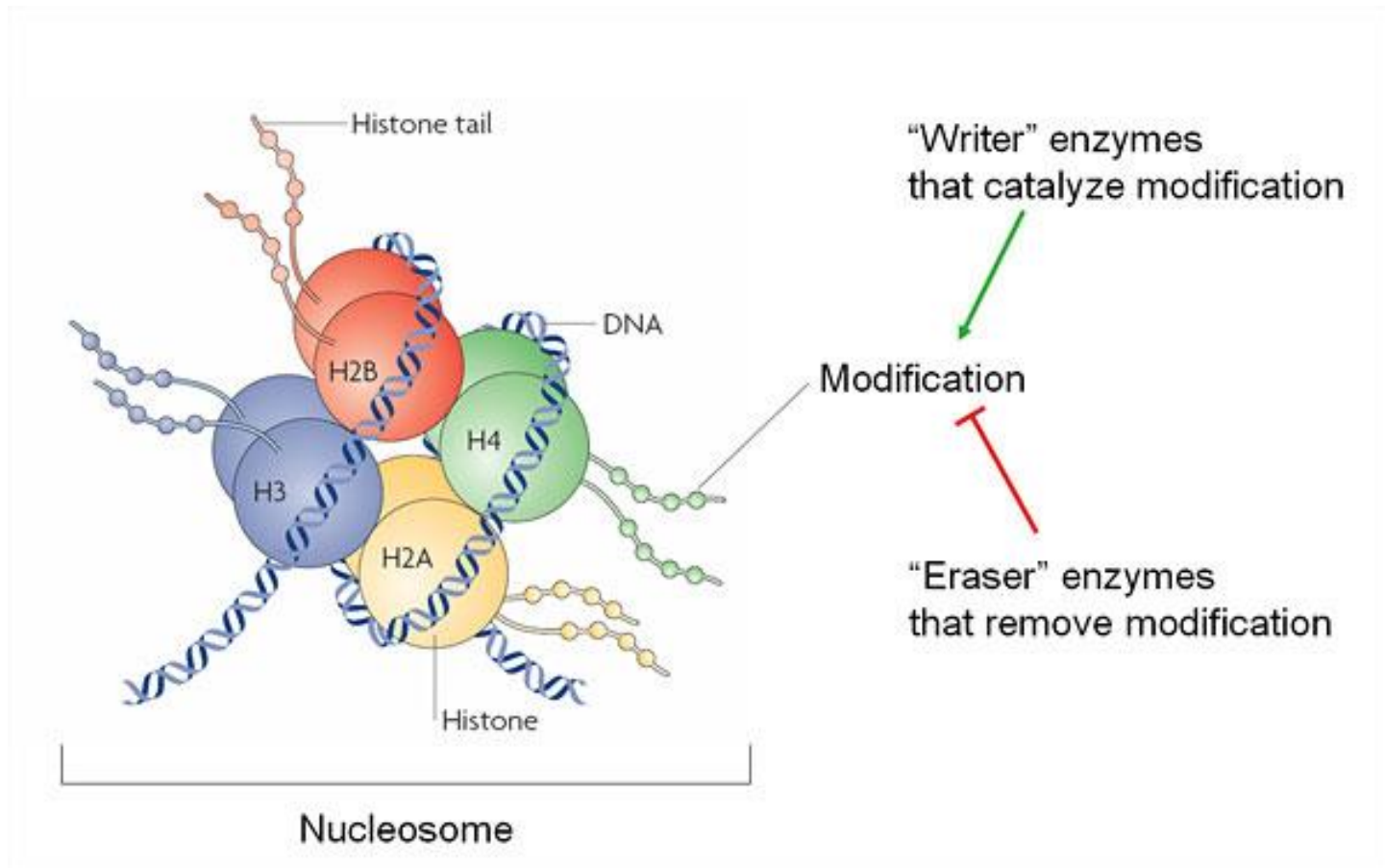
**FIGURA 10-1 A primeira evidência da compactação do DNA.** Cromatina cuidadosamente isolada foi tratada com nuclease microcócica e analisada por eletroforese em gel de agarose. O resultado foi o surgimento de uma escada de fragmentos de DNA com diferença de 200 pb de comprimento, sugerindo que a compactação 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

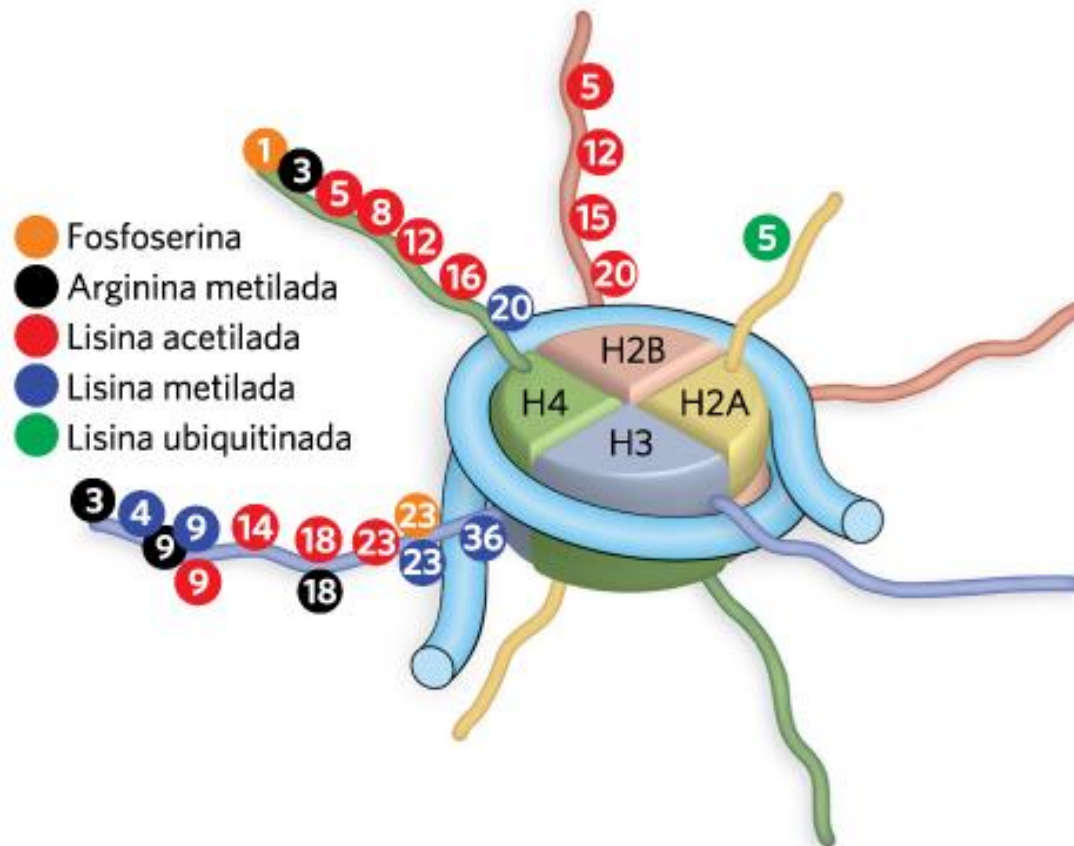
## Organização da cromatina

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



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

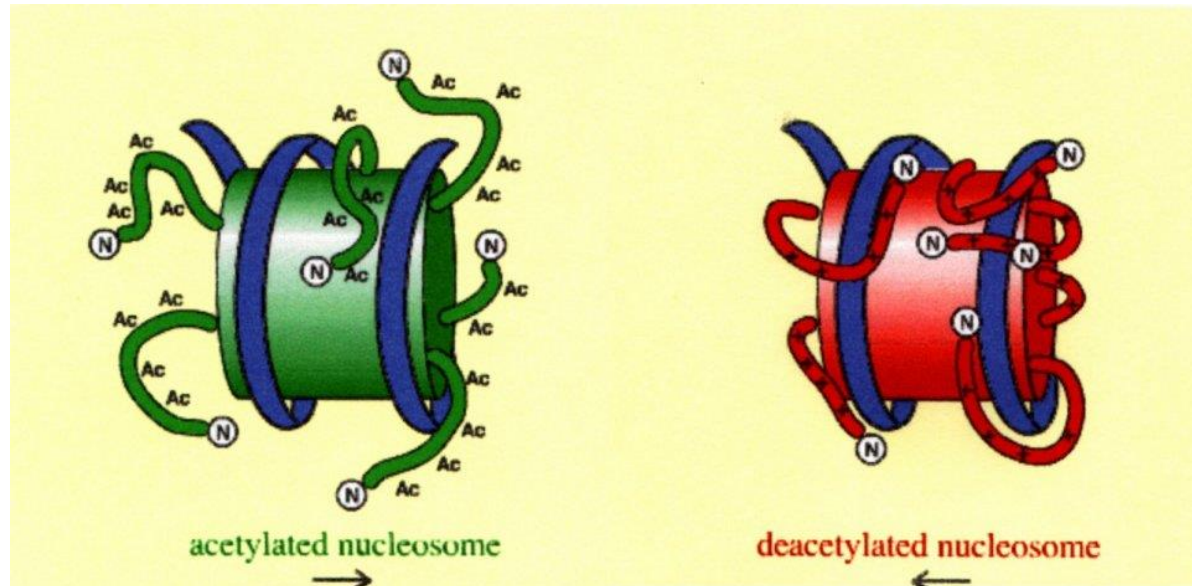
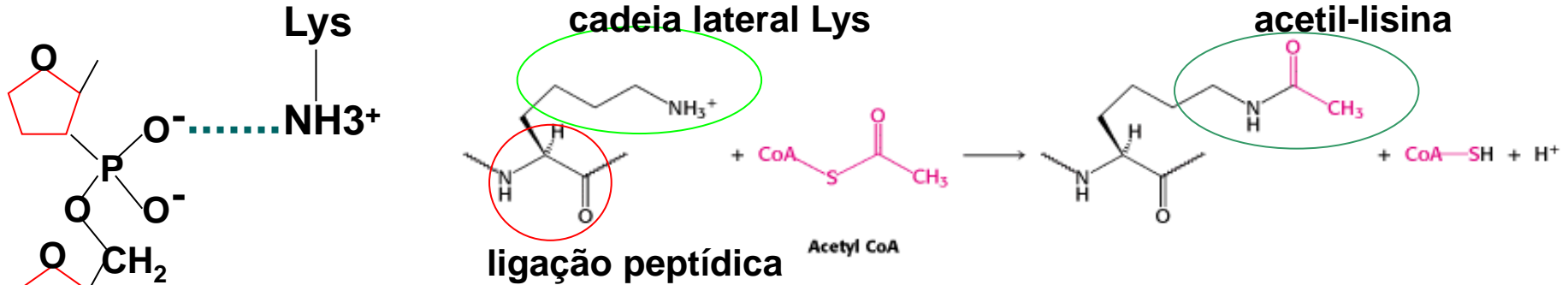


**FIGURA 10-25** Modificações nas caudas N-terminais dos nucleossomos por pequenas moléculas. Representam-se as modificações em apenas uma cauda de cada tipo das histonas do núcleo. Indicam-se os números dos aminoácidos.

# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

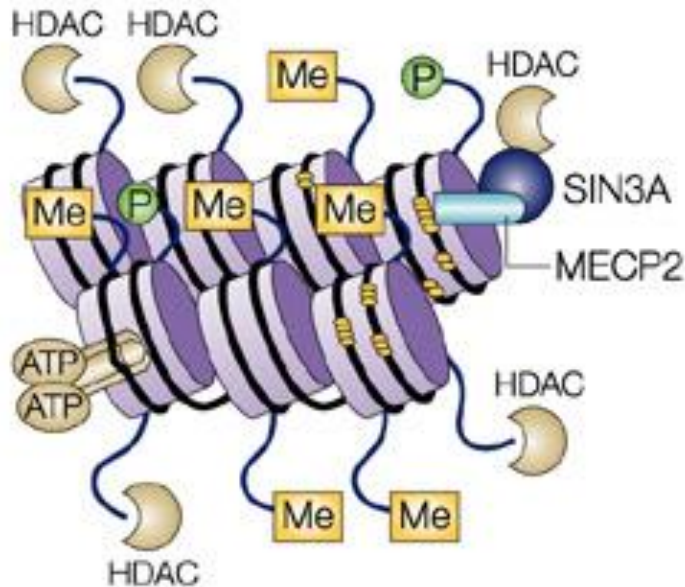
- A **acetilação** é mediada por Histona Acetil Transferases (HATs)



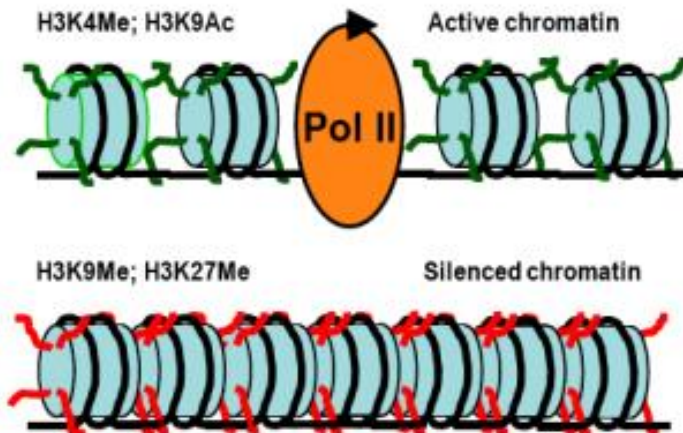
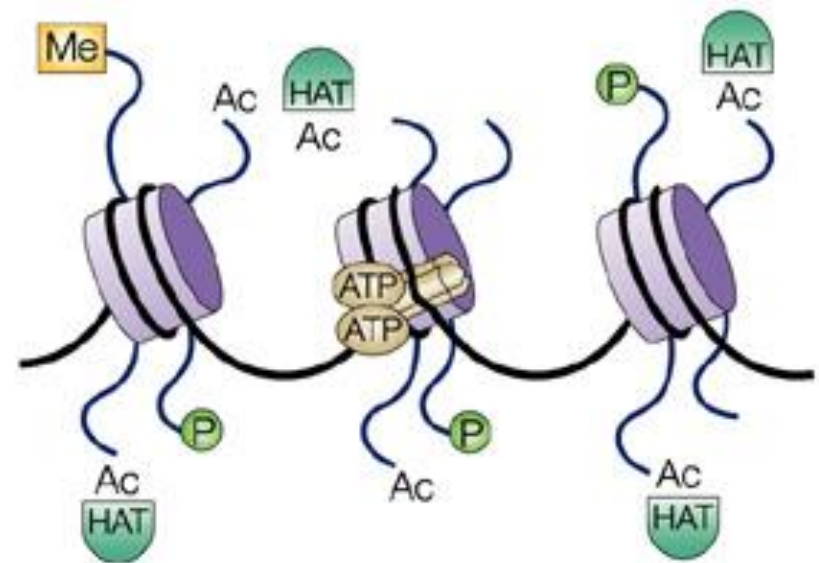
# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

**a** Closed chromatin: transcriptional repression



**b** Open chromatin: transcriptional activation



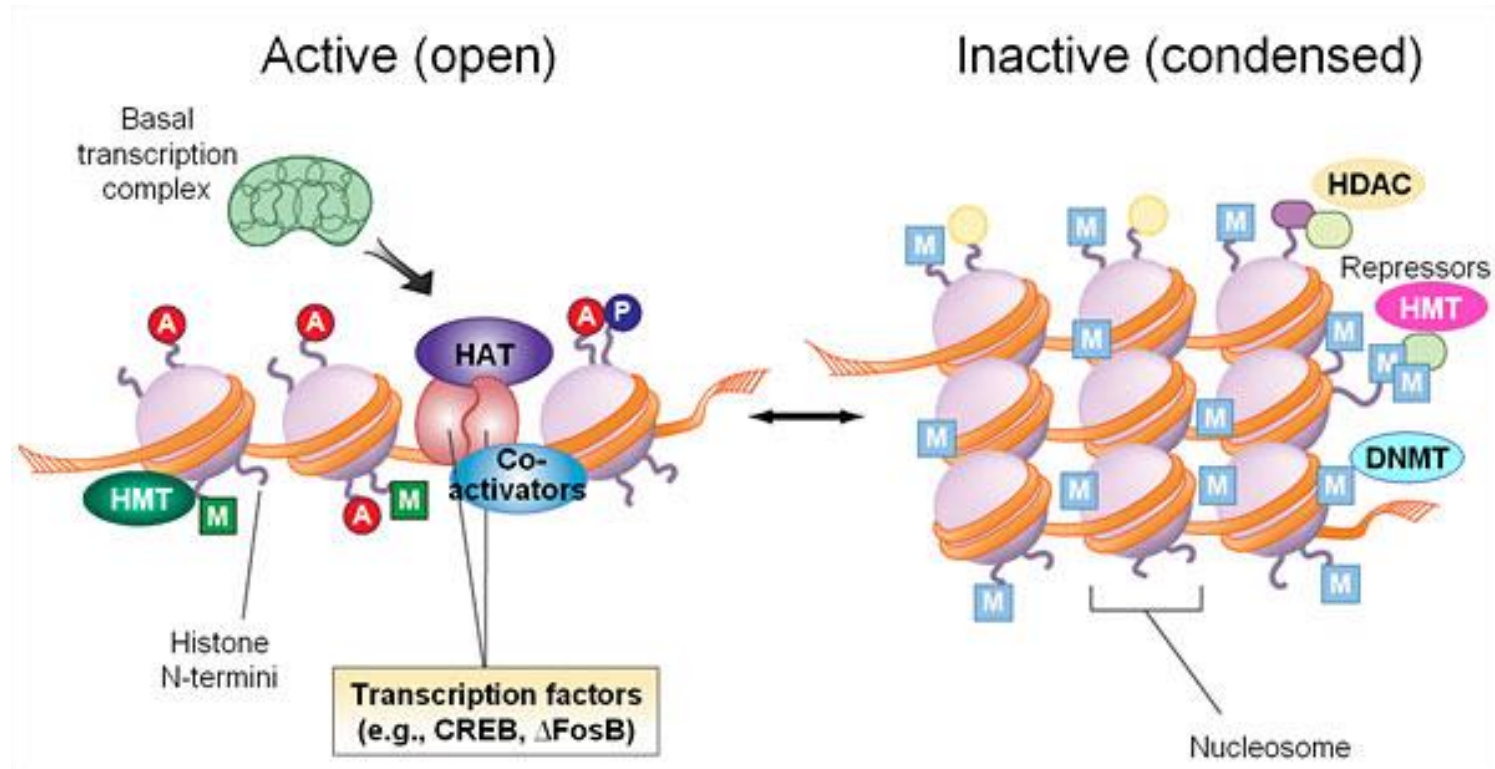
Nature Reviews | Drug Discovery

Em geral:

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

# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

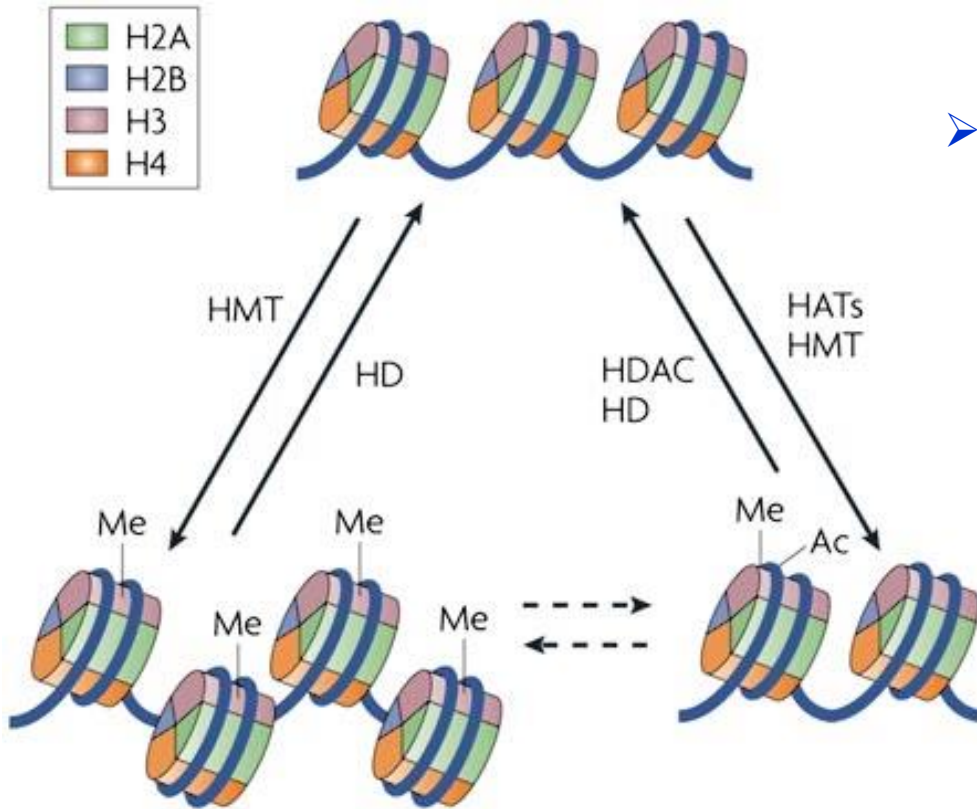


- A atividade transcrricional de determinada região da cromatina depende da combinação de modificações na caudas das histonas dessa região: “**O código das histonas**”.



# 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<sub>2,3</sub>
- H3K27me<sub>3</sub>
- H4K20me<sub>3</sub>

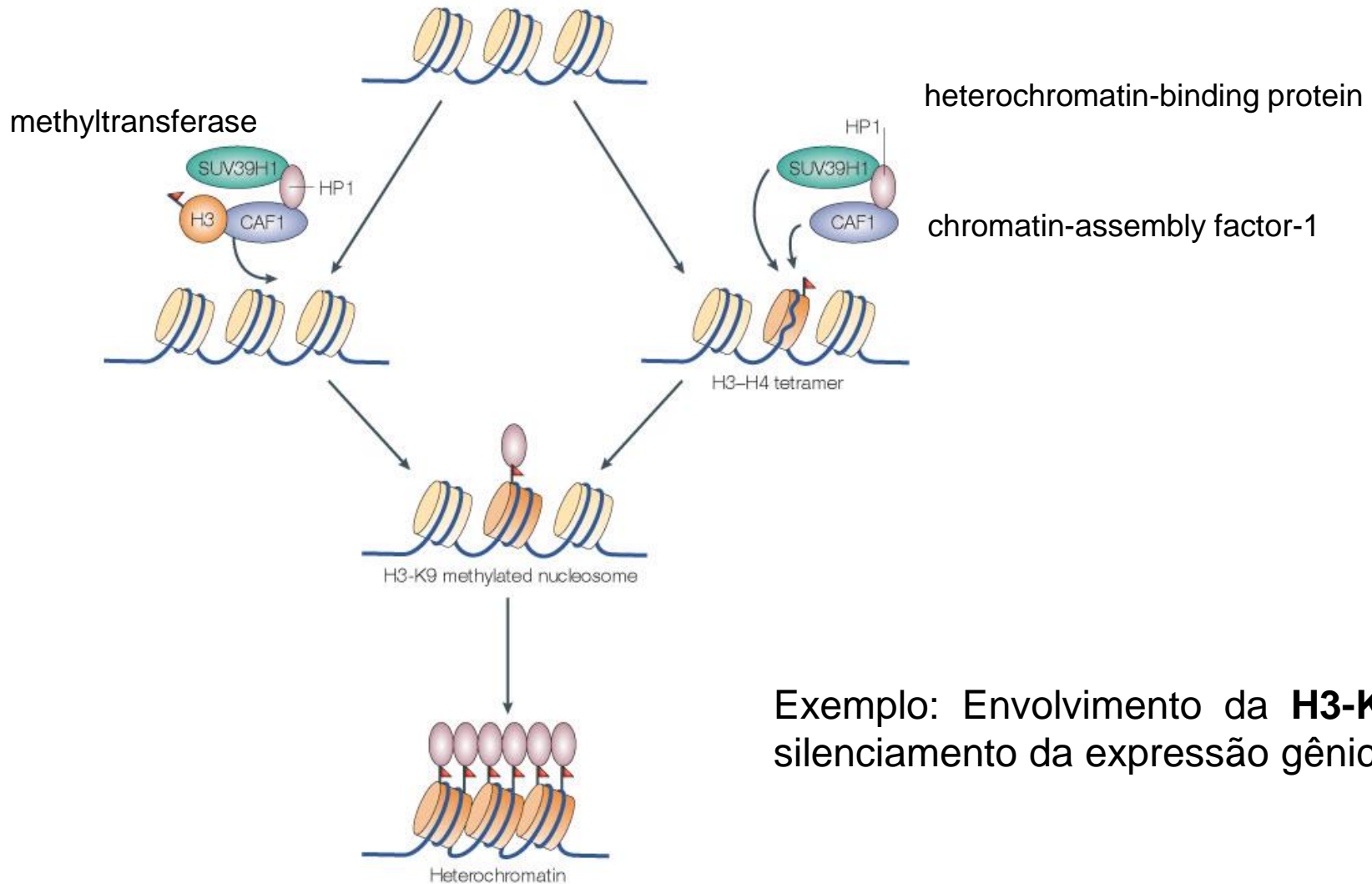
#### Euchromatin

- H3K4me<sub>2,3</sub>
- 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

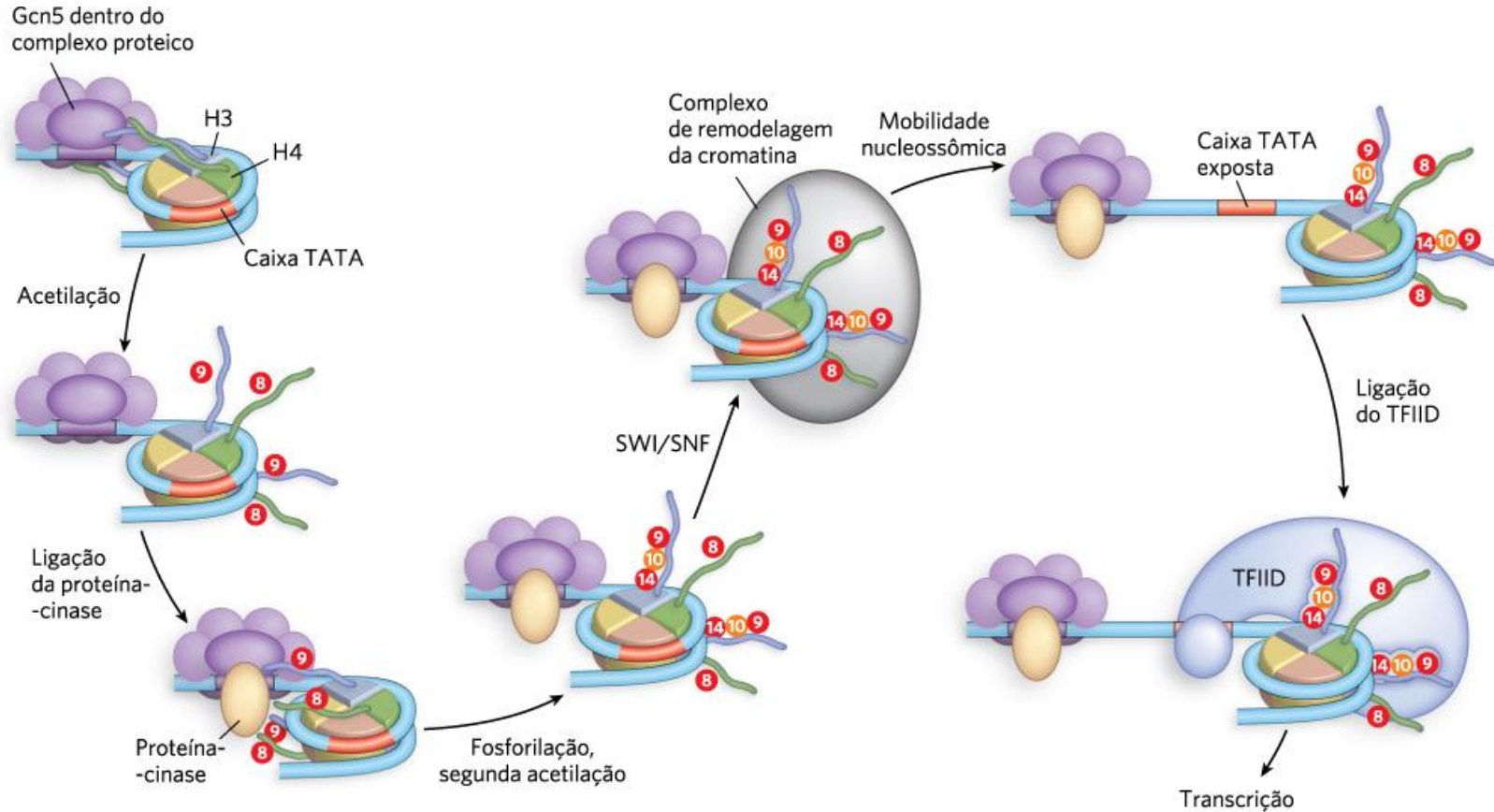
## Organização da cromatina



Exemplo: Envolvimento da **H3-K9** no silenciamento da expressão gênica.

# Regulação da expressão gênica

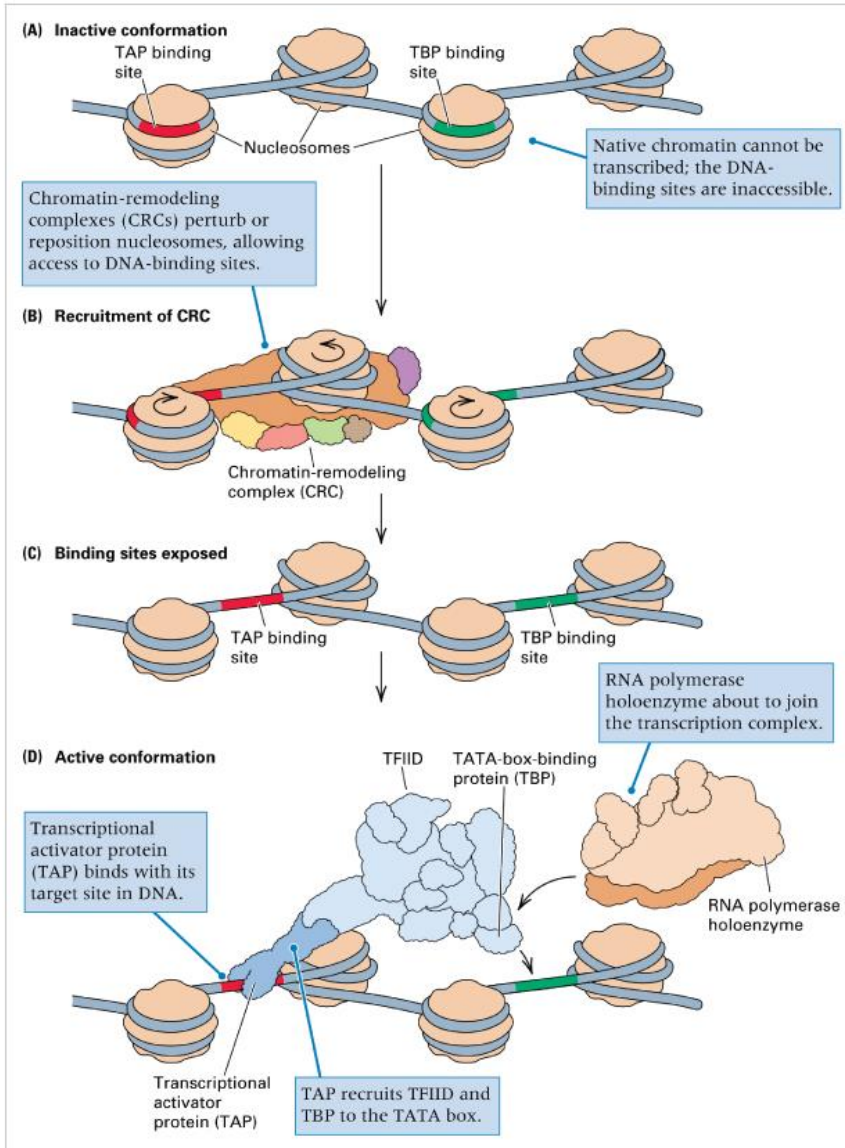
## Organização da cromatina



- 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



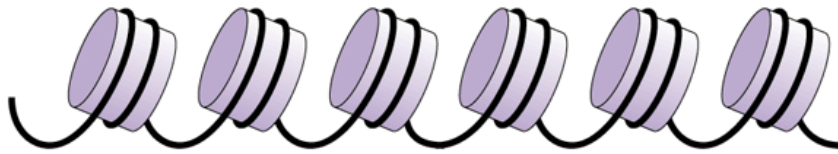
- Os **complexos remodeladores da cromatina** podem reposicionar, deslocar ou retirar nucleossomos de regiões específicas do genoma, favorecendo a transcrição.

# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina

### Complexos remodeladores da cromatina

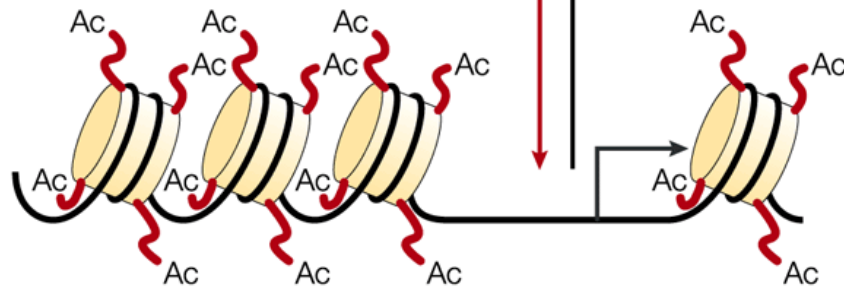
Inactive (closed)



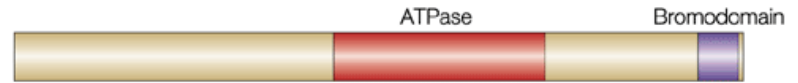
Swi/Snf (*Sc*, *Dm*, *M*)  
 RSC (*Sc*)  
 ISWI (*Dm*)  
 CHD1 (*Dm*)  
 INO80 (*Sc*)

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

Active (open)



SWI/SNF class



ISWI class



CHD class



INO80 class



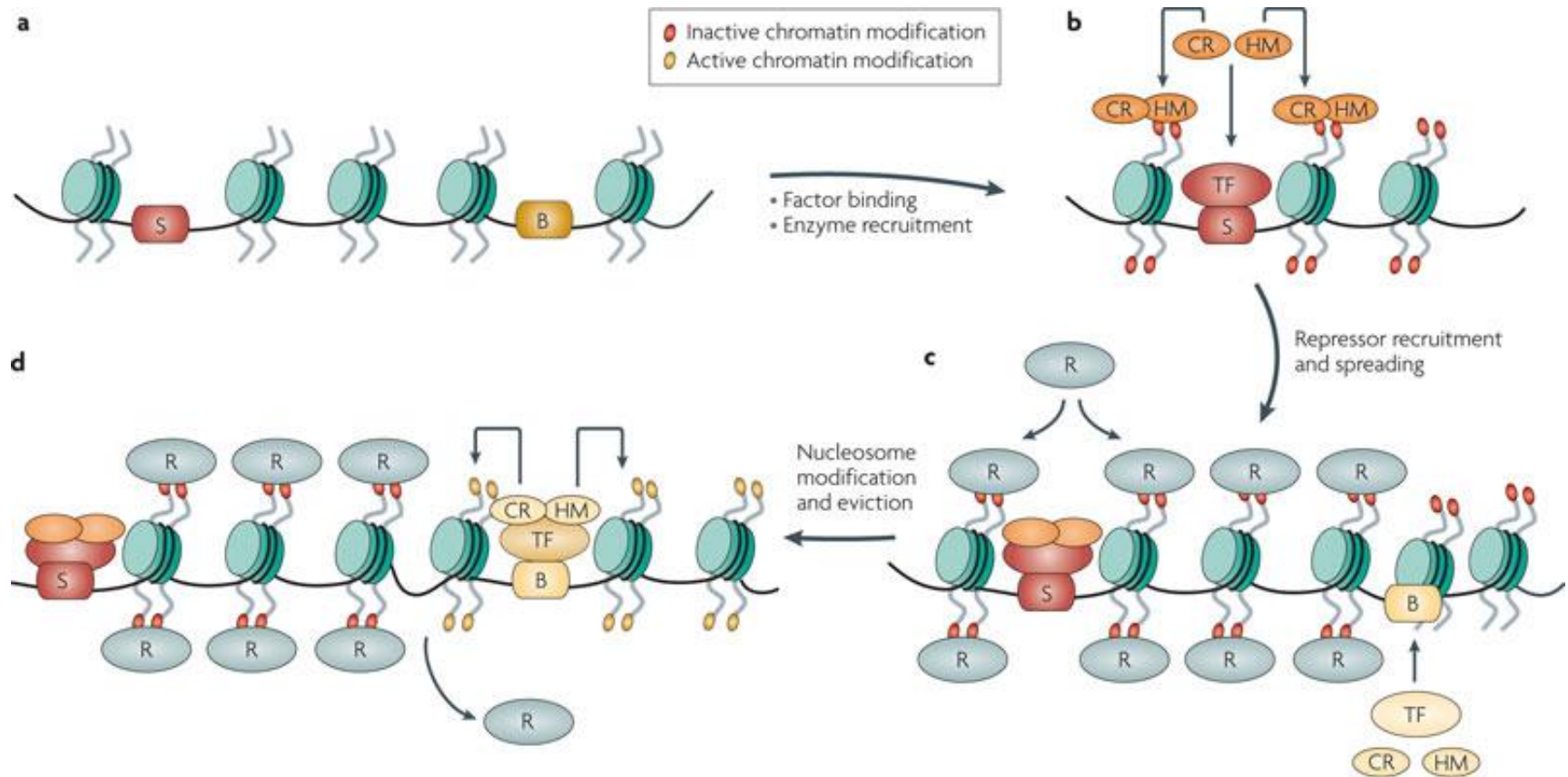
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

# Regulação da expressão gênica

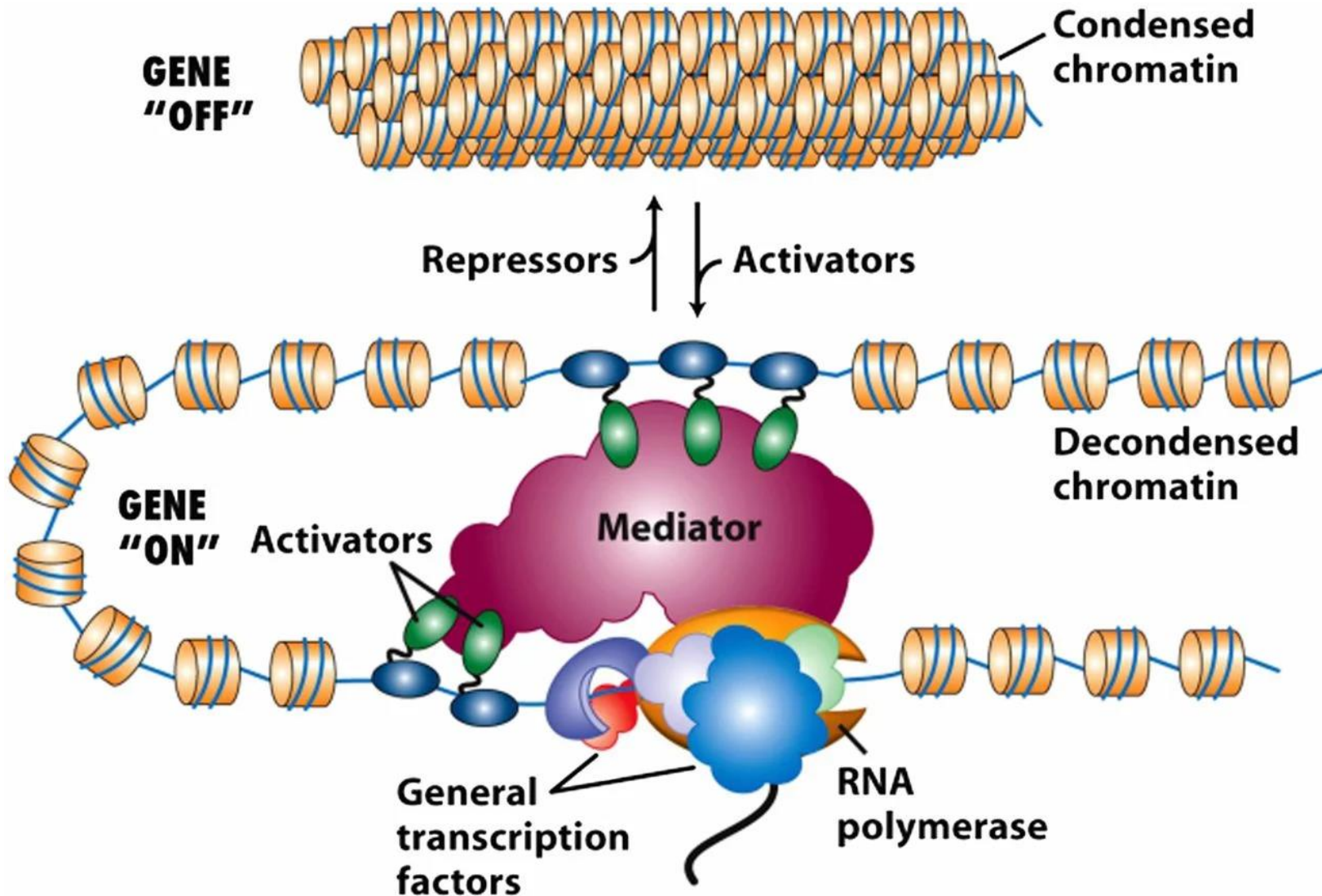
## Organização da cromatina

### Elementos regulatórios: *Insulators*

Também tem que ser regulados!!!!

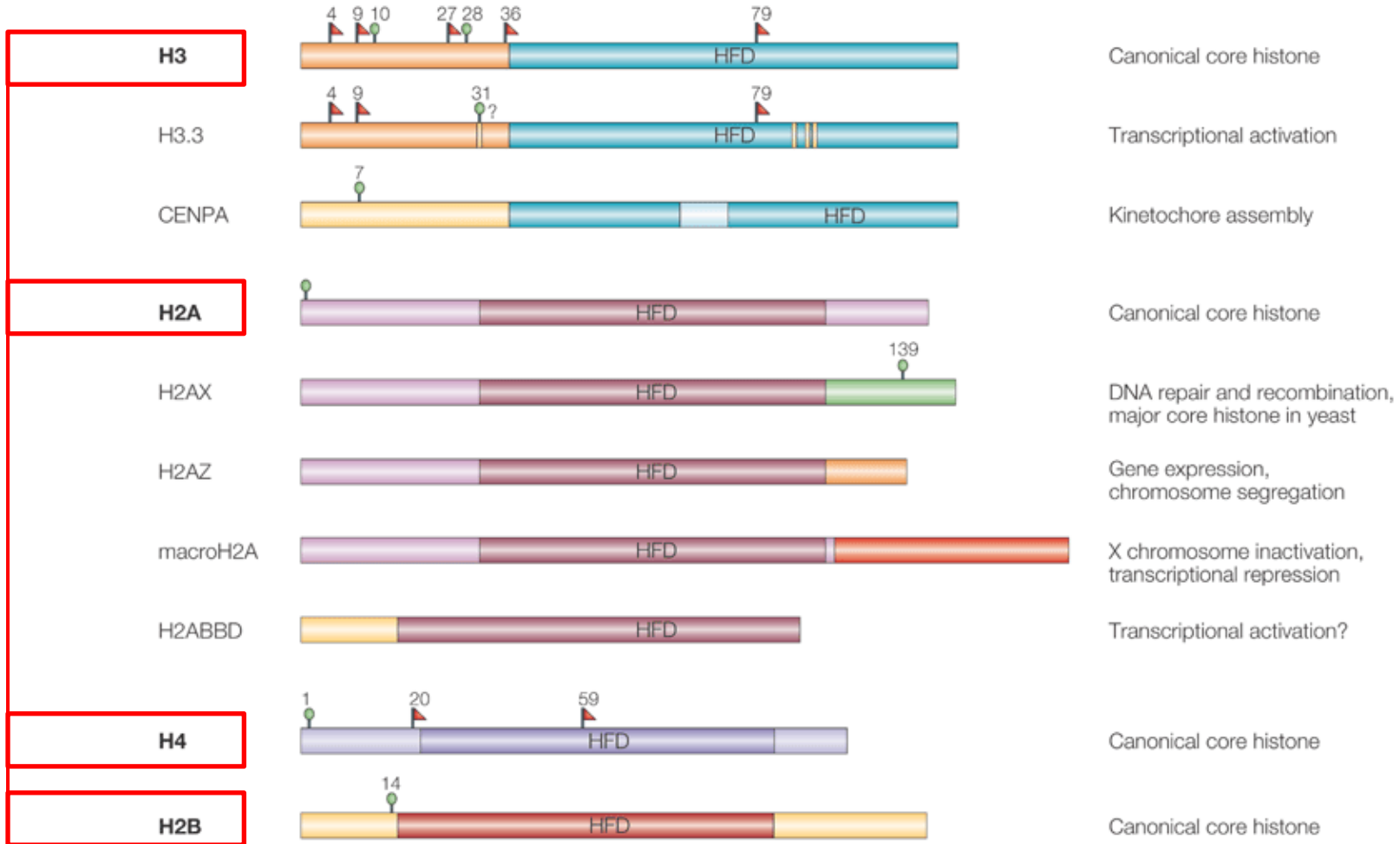


# Regulação da expressão gênica



# Regulação da expressão gênica

## Organização da cromatina



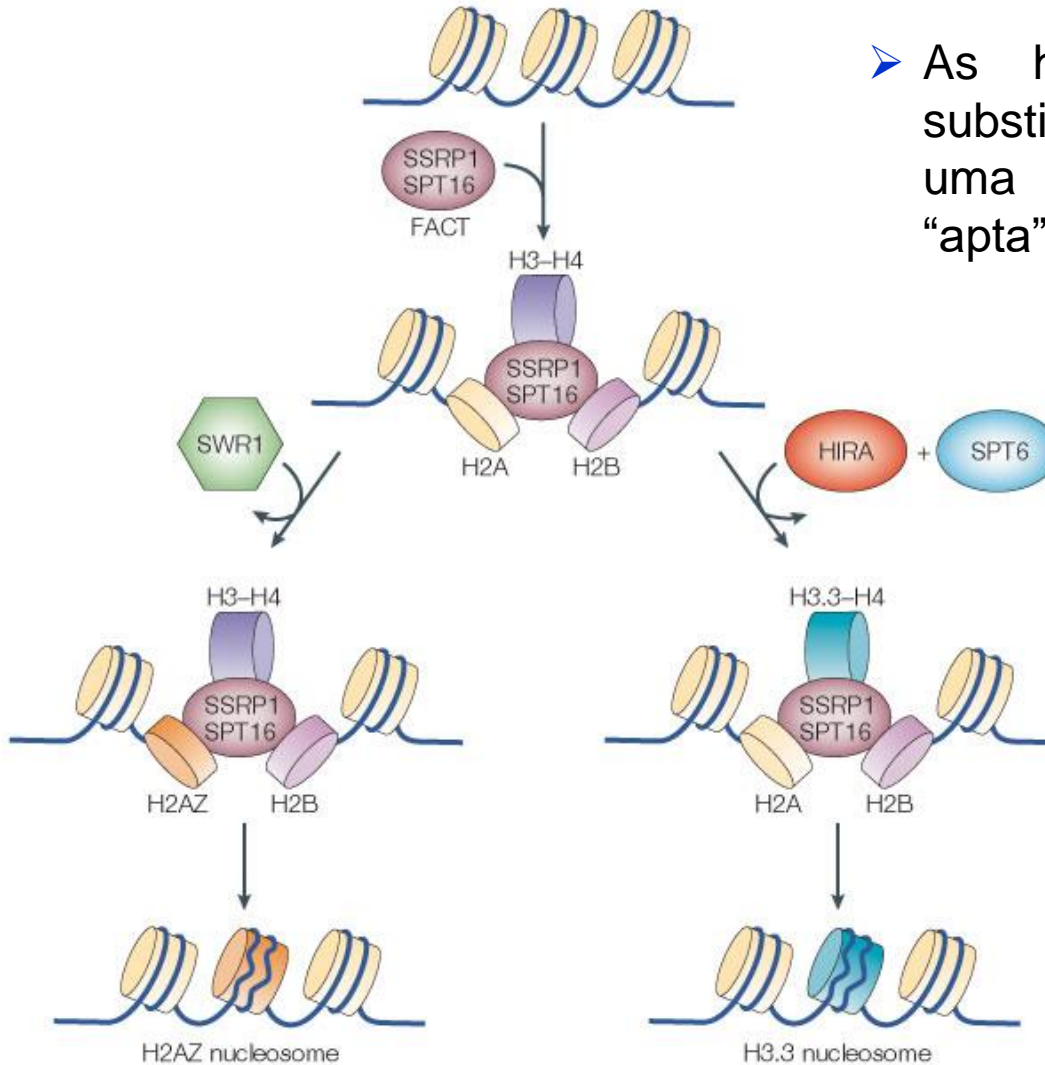
- Variantes de histonas podem ter funções específicas.



# Regulação da expressão gênica

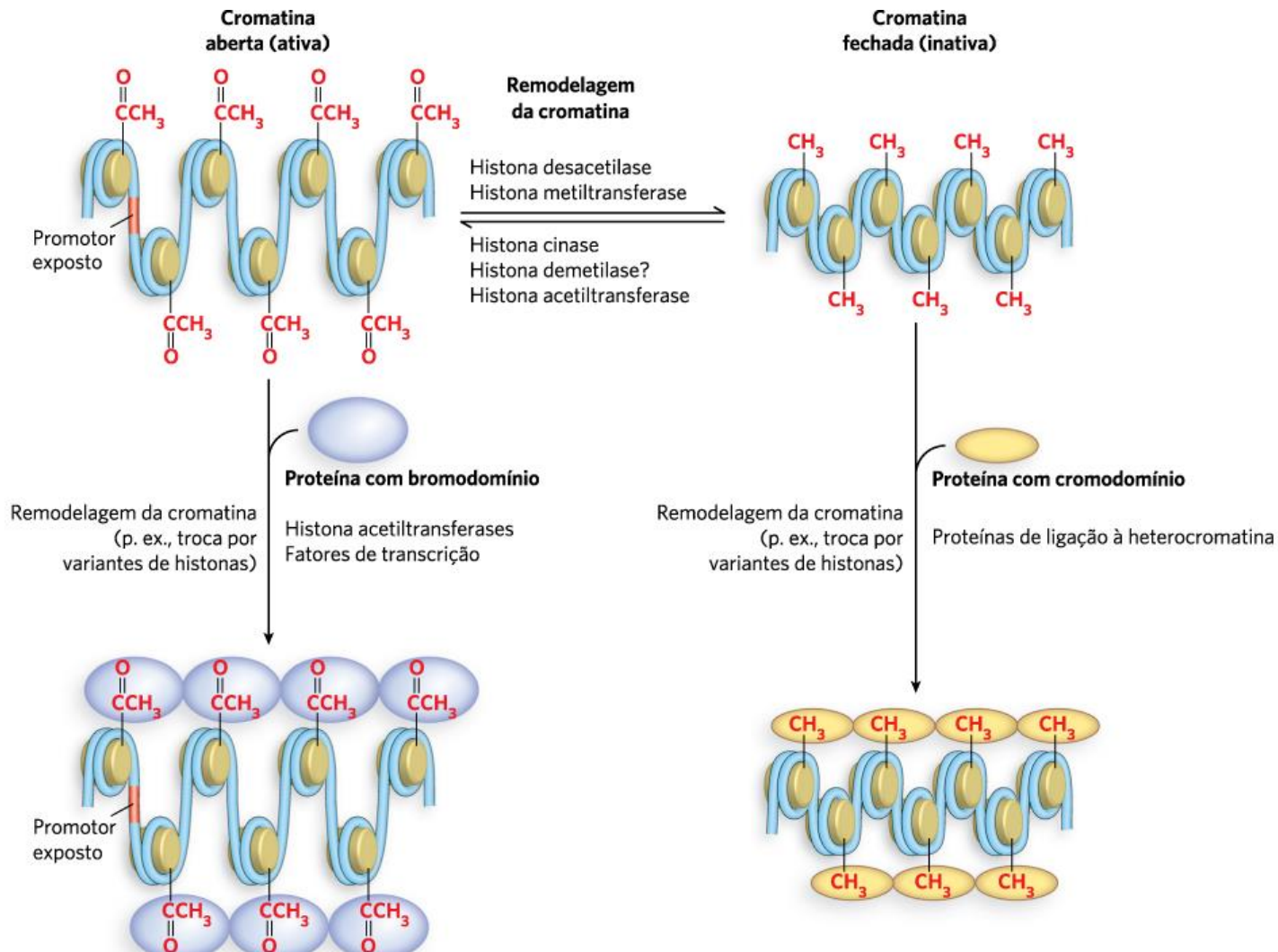
## Organização da cromatina

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



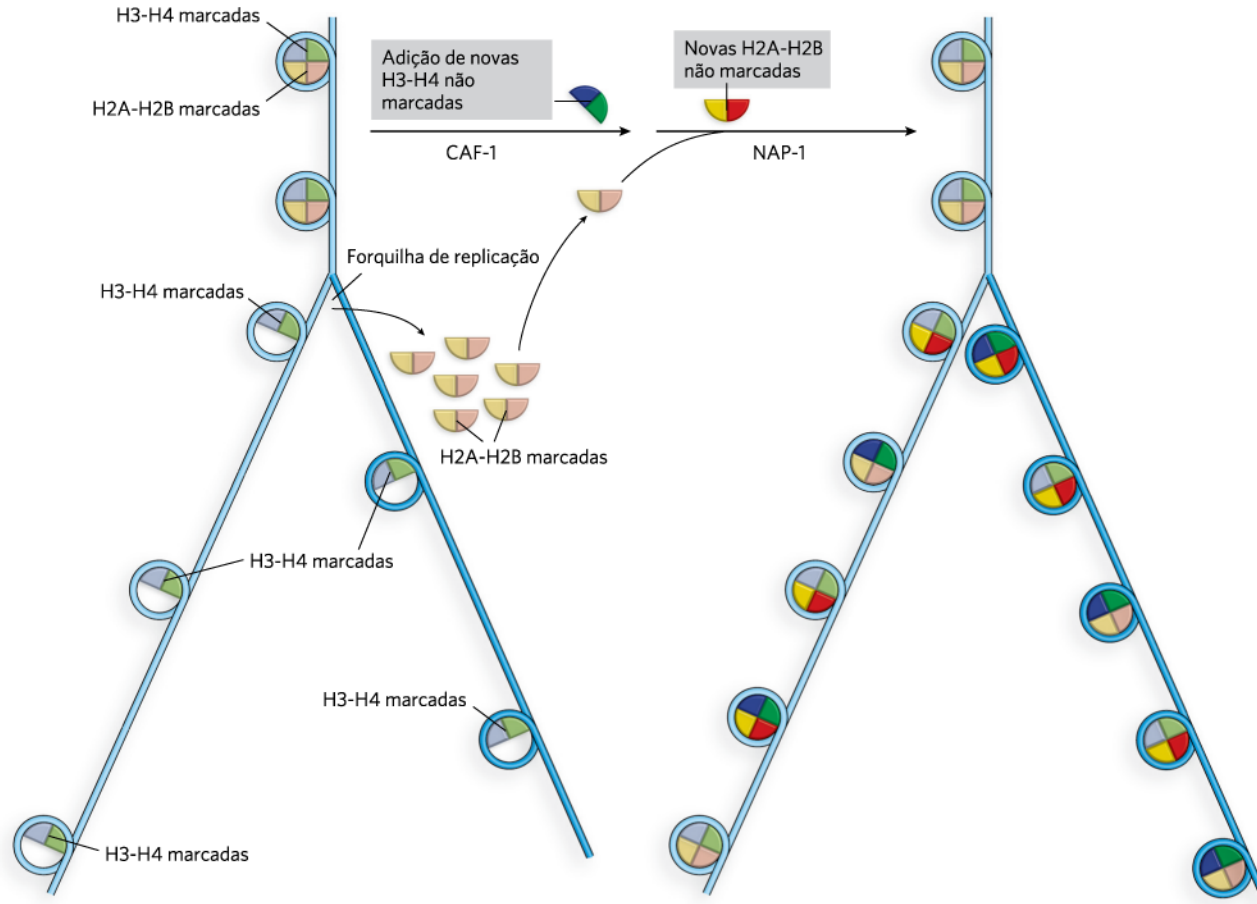
# Regulação da expressão gênica

## Resumindo...



# Regulação da expressão gênica

## Cromatina: Propagação de marcas epigenéticas



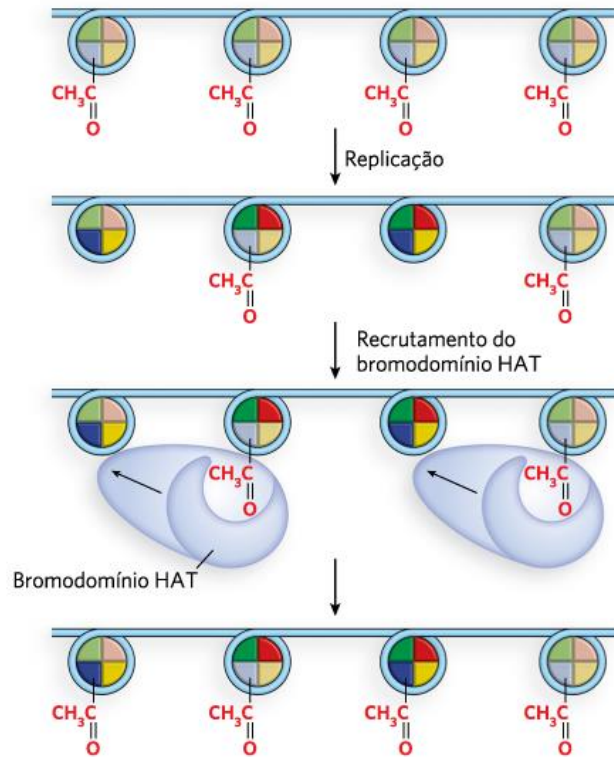
**FIGURA 10-29** Conservação do padrão de modificação das histonas durante a replicação do DNA. Após a replicação do DNA, as duas fitas de DNA não possuem as histonas H2A-H2B, e os heterotetrâmeros H3-H4 são distribuídos entre as duas novas fitas (à esquerda). Os heterotetrâmeros originais (marcados)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

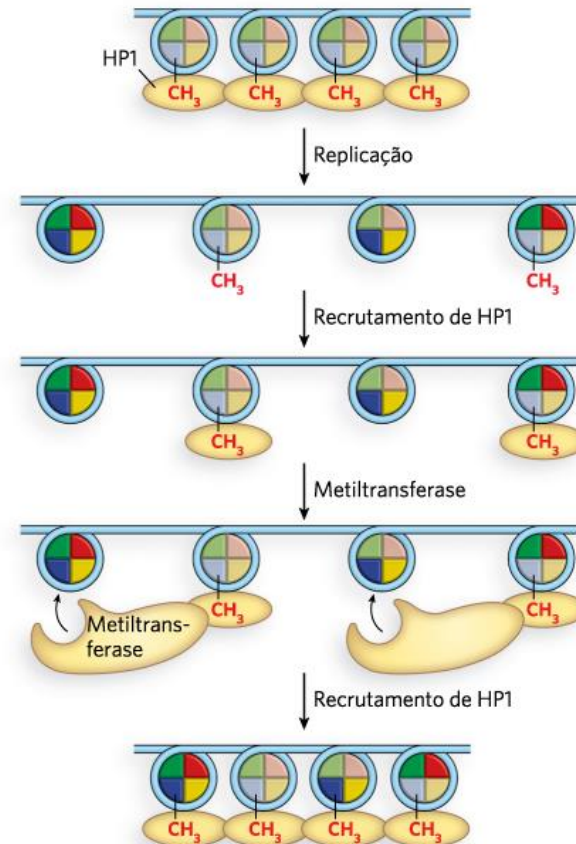
# Regulação da expressão gênica

## 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,

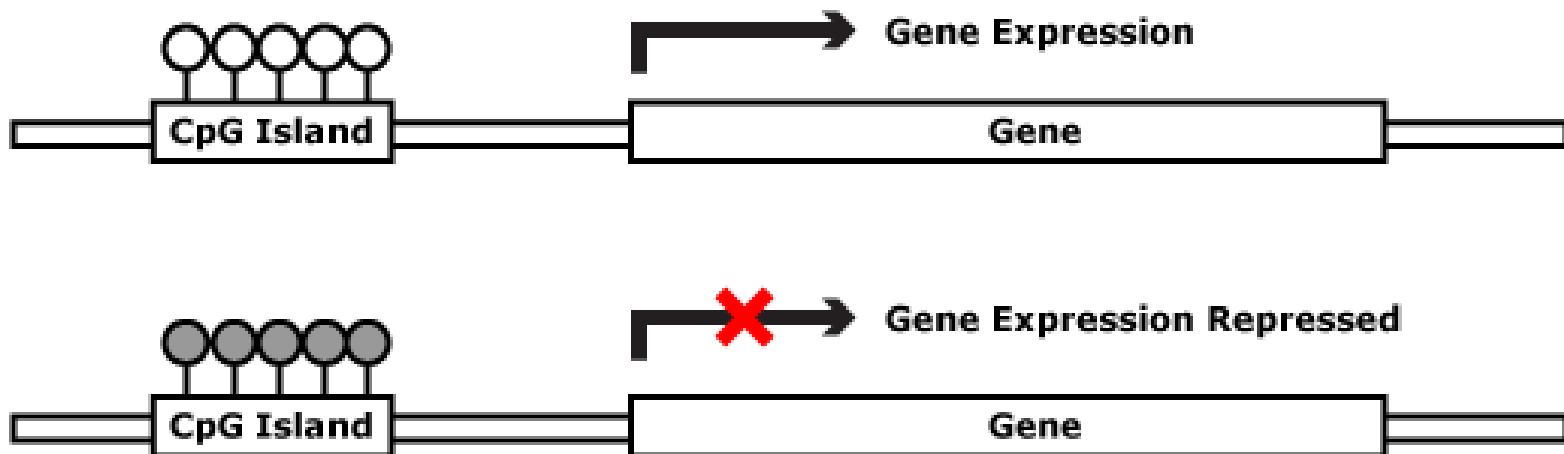
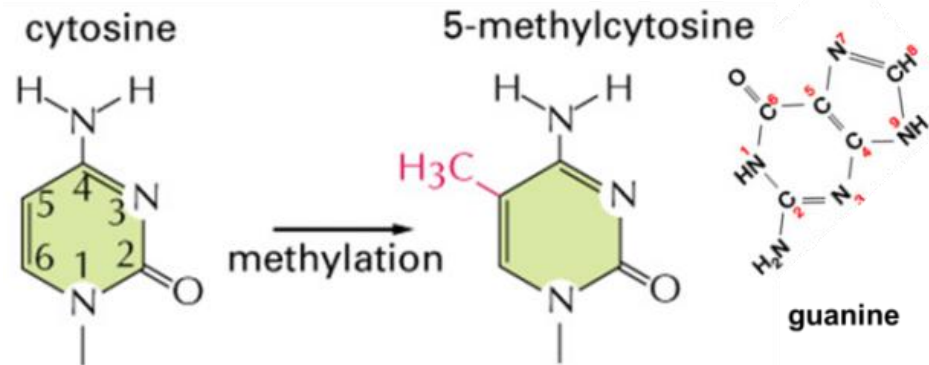
que se associa às histonas originais após a replicação e está relacionada com o estado de repressão da heterocromatina fortemente condensada. HP1 contém um cromodomínio que se liga a resíduos de lisina metilados nas histonas, e também atrai uma metiltransferase para propagar o padrão de metilação original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

# Regulação da expressão gênica

## Metilação do DNA

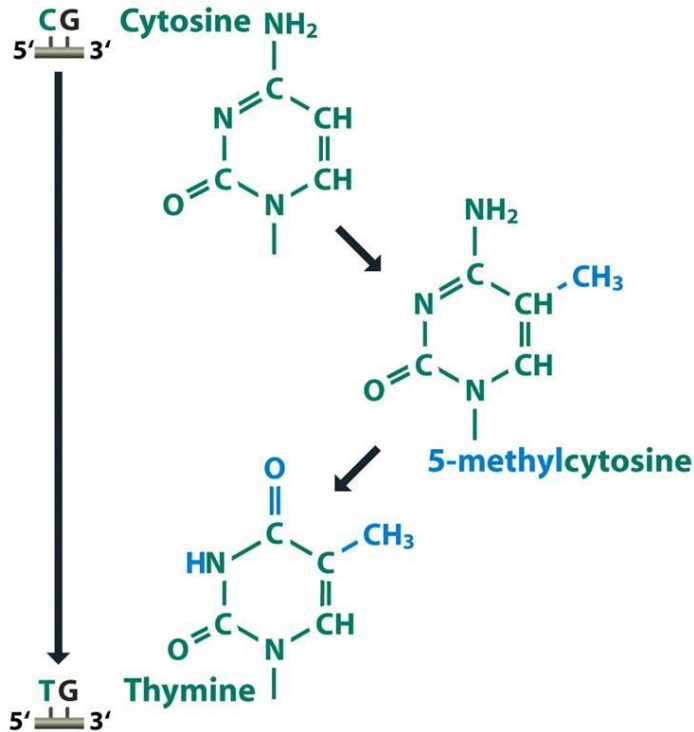
- **Metilação** de Citosinas em dinucleotídeos CpG. **Ilhas CpG** distribuídas de forma heterogênea pelo genoma, em geral, em promotores de genes.

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

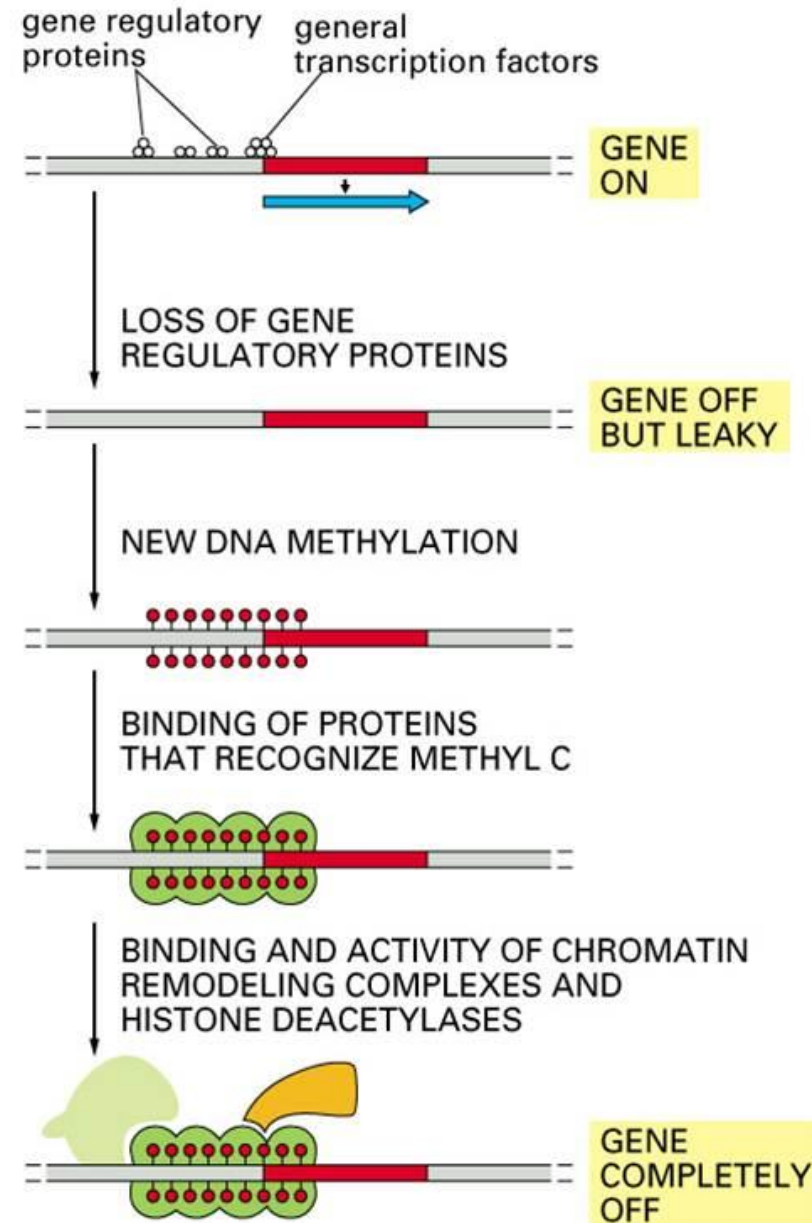


# Regulação da expressão gênica

## Metilação do DNA

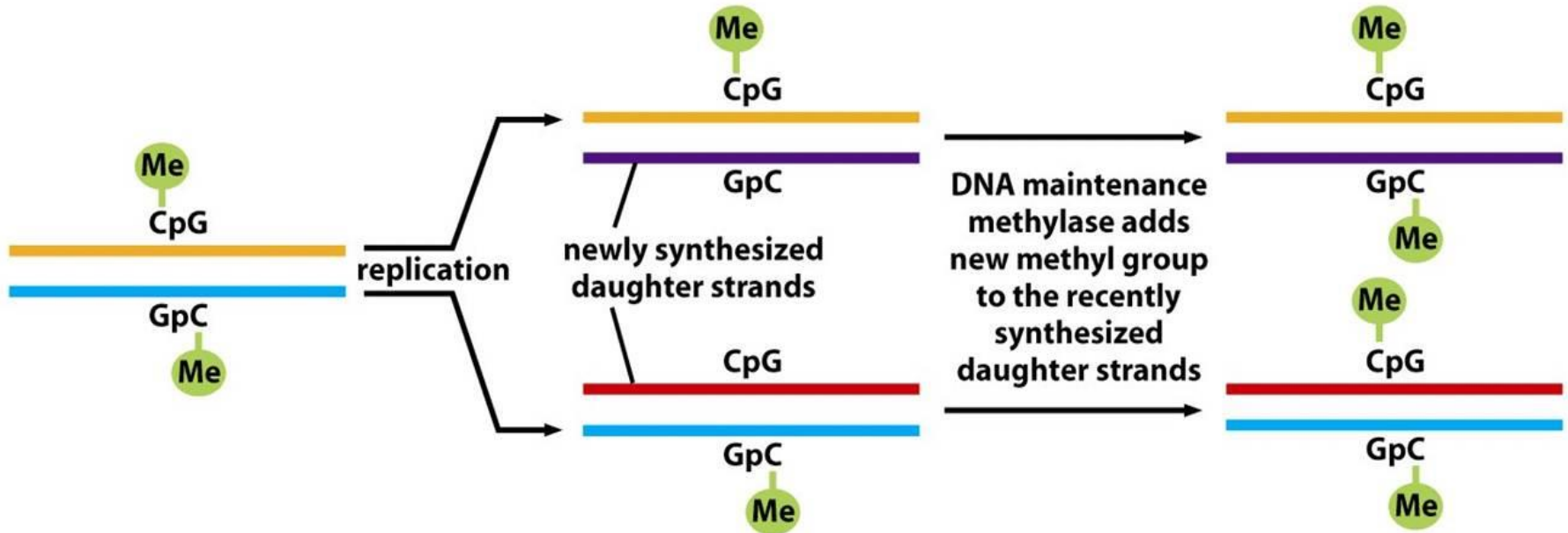


- **Ilhas CpG** distribuídas de forma heterogênea pelo genoma, em geral, em promotores de genes.



# Regulação da expressão gênica

## Metilação do DNA: propagação das marcas epigenéticas

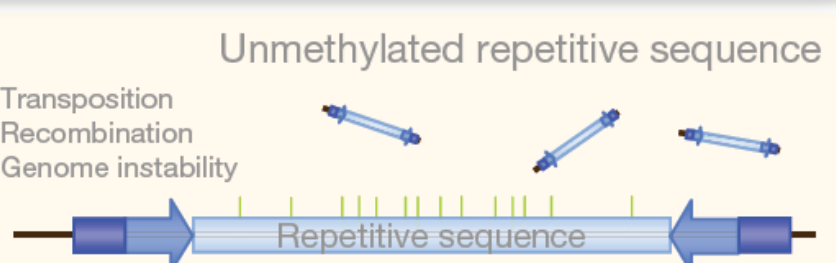
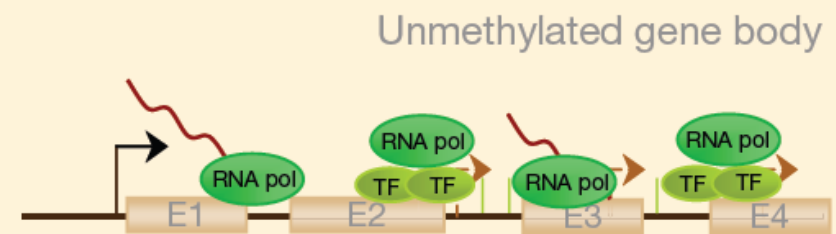
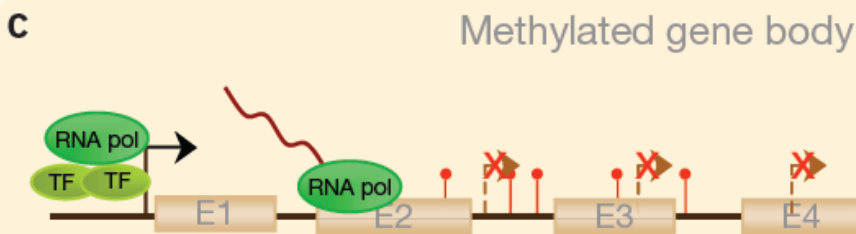
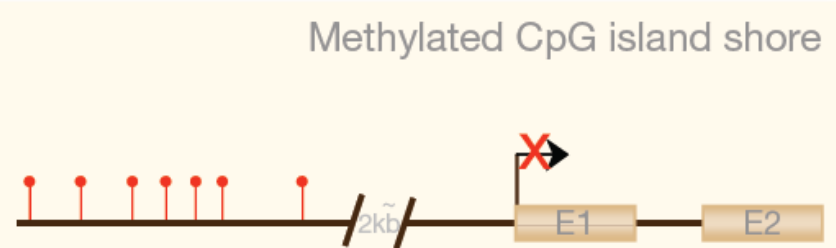
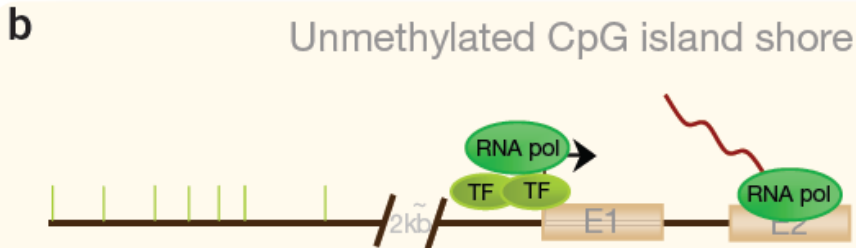
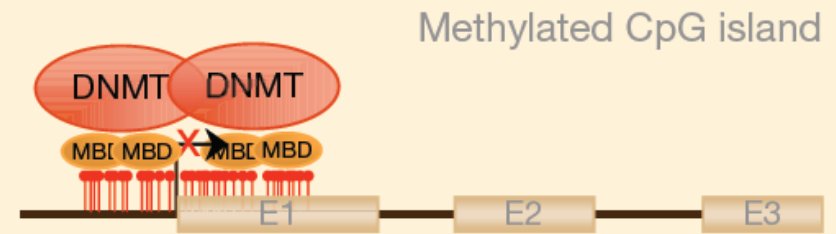
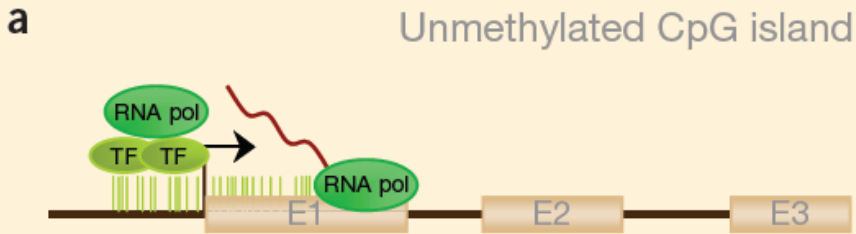


- A transmissão do padrão de metilação do DNA às células filhas é essencial para manter a expressão gênica normal.

# 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!!!**