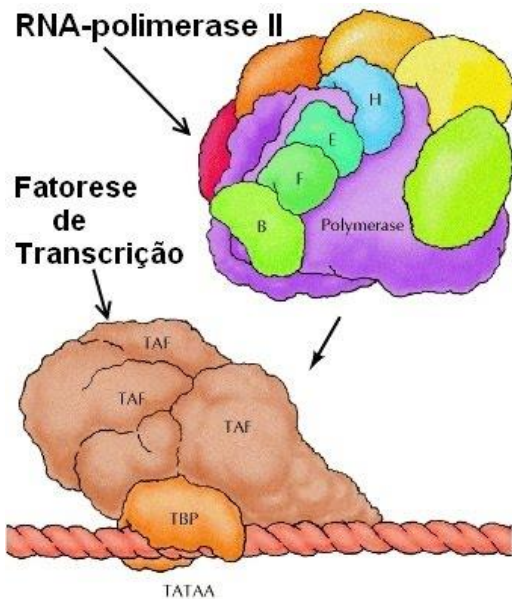


CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Aula 4

LGN0232 – Genética Molecular



Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

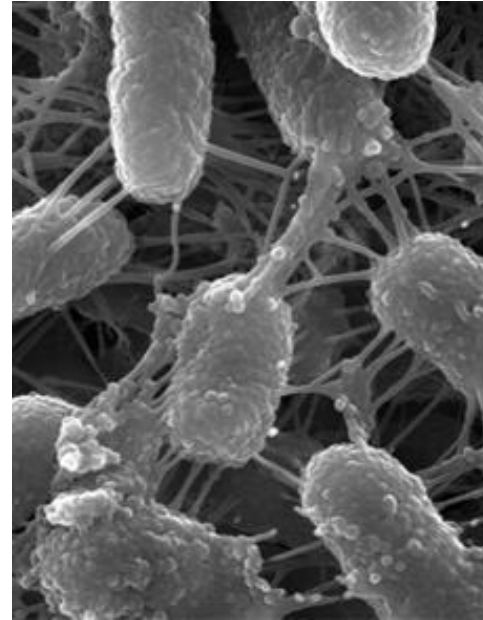
SUMÁRIO

- Sinalização;
- Controle em procariotos x eucariotos;
- Controle da transcrição;
- Controle pós-transcricional;
- Estudo dirigido.
-

O *lifestyle* INFLUÊNCIA...



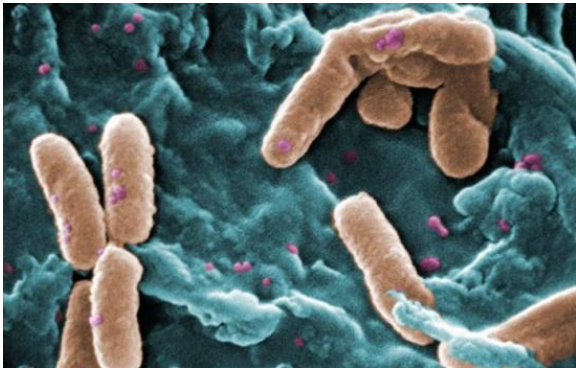
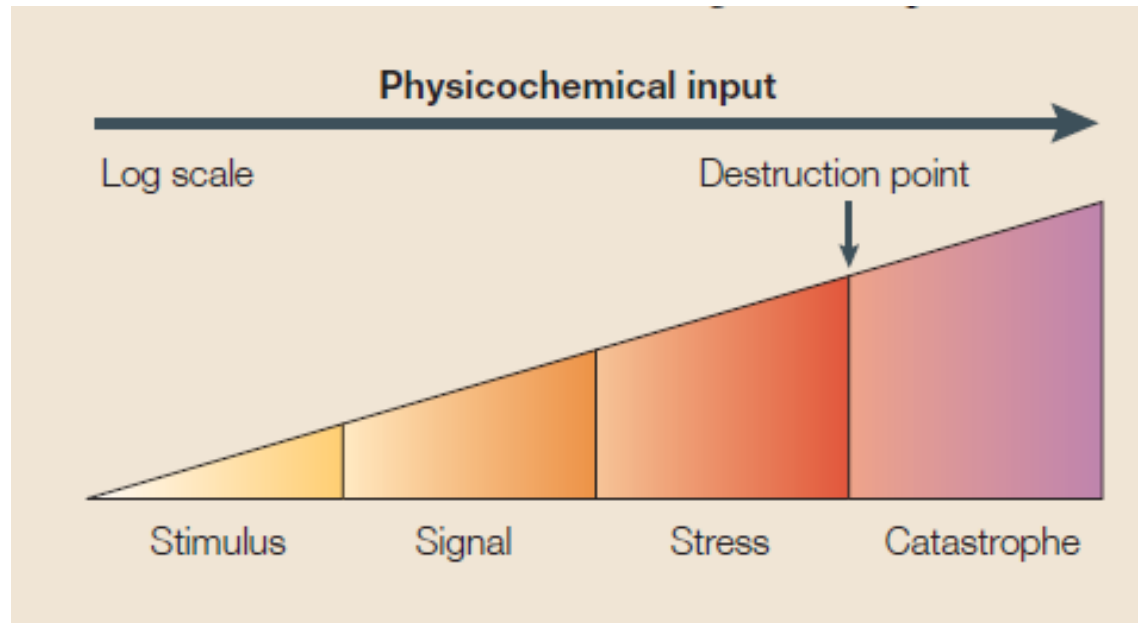
Mycobacterium
endossimbionte



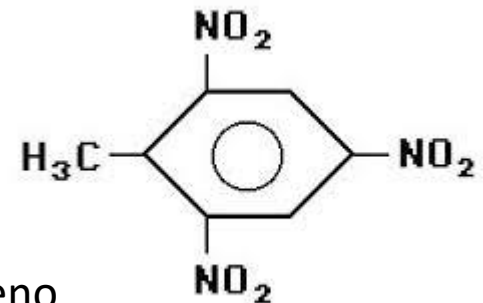
Pseudomonas
vida-livre

Qual dessas duas bactérias tem um sistema mais complexo de regulação gênica?

MAS O QUE SERIA UM ESTÍMULO?

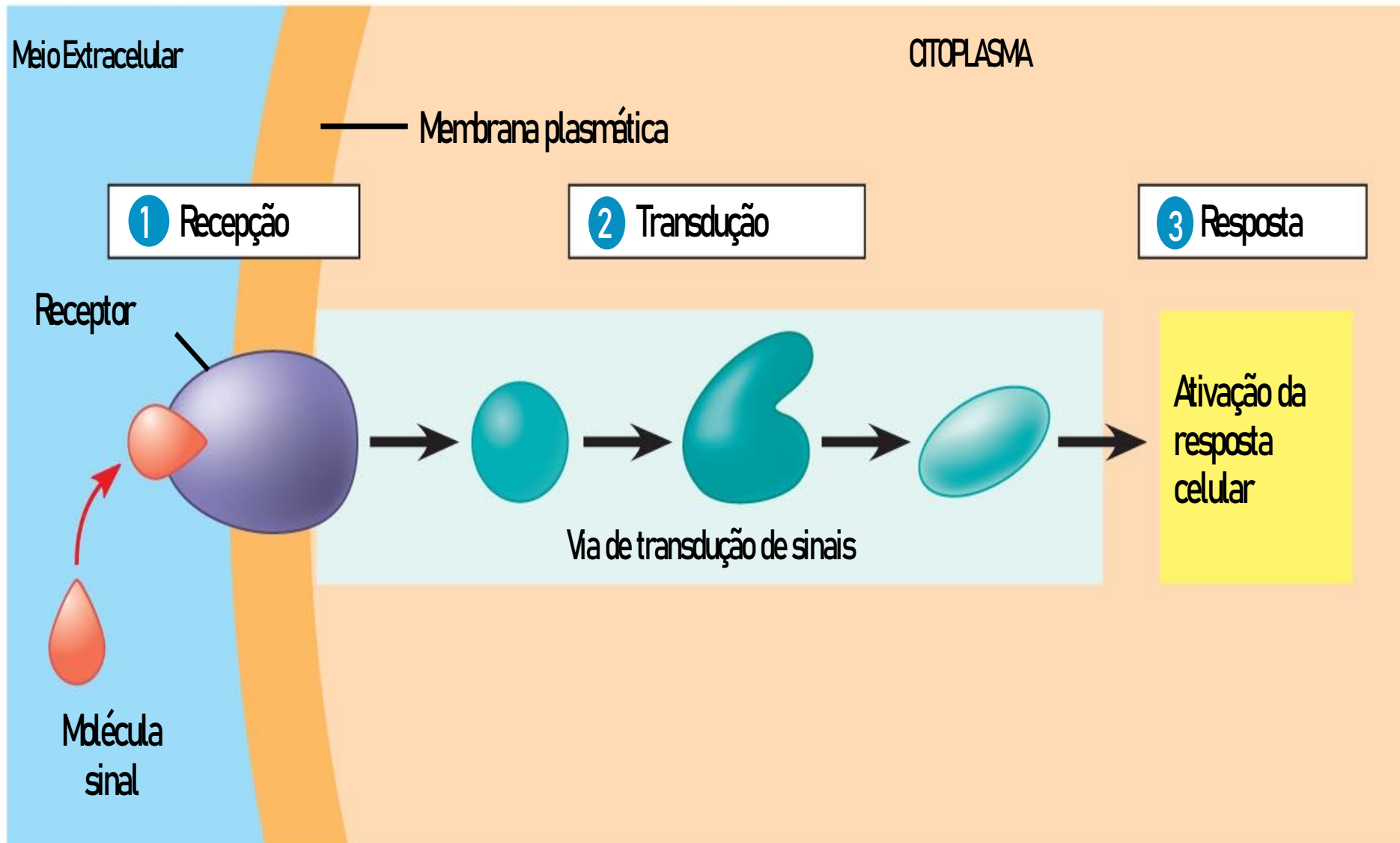


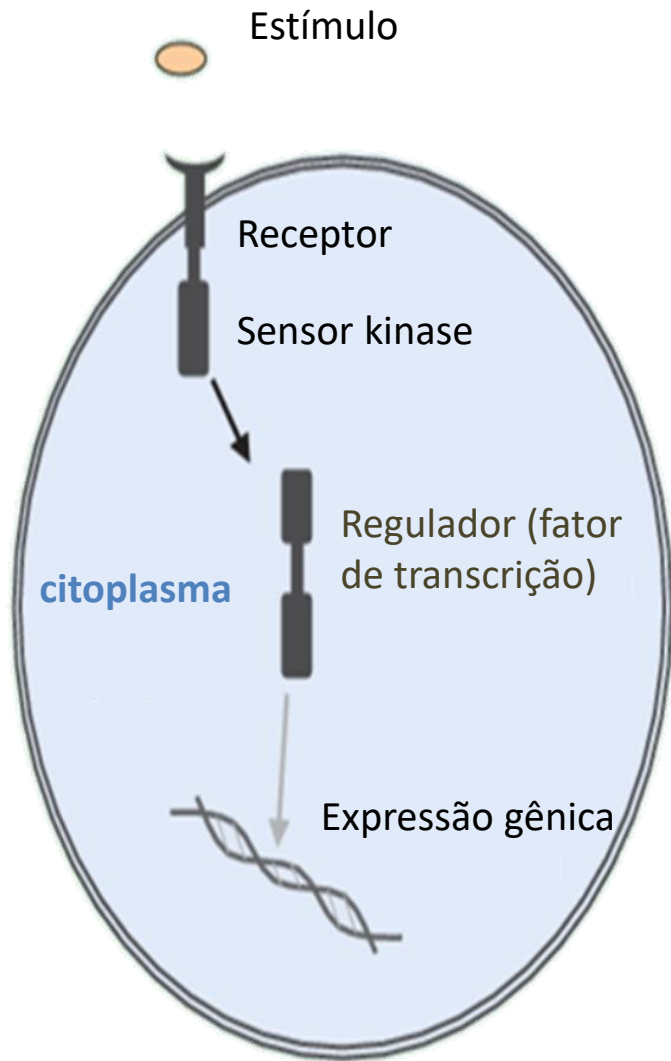
Pseudomonas sp. e
derramamento de petróleo



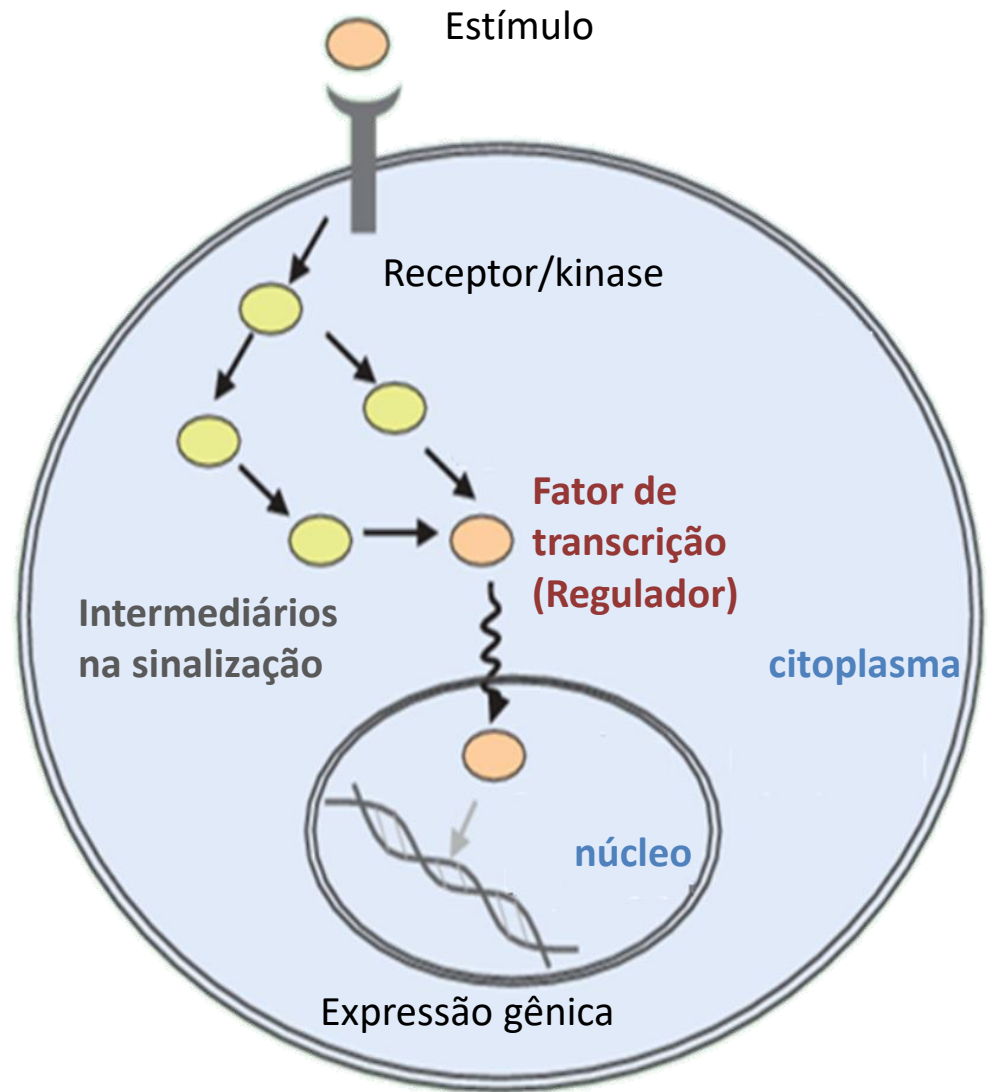
Tolueno

TRÊS ESTÁGIOS FAZEM PARTE DA SINALIZAÇÃO:

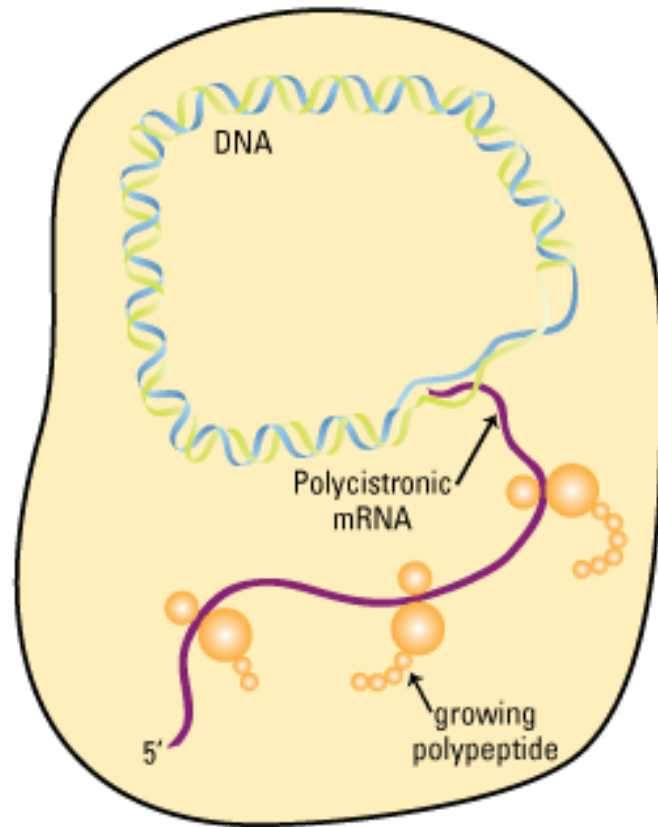




PROCARIOTO

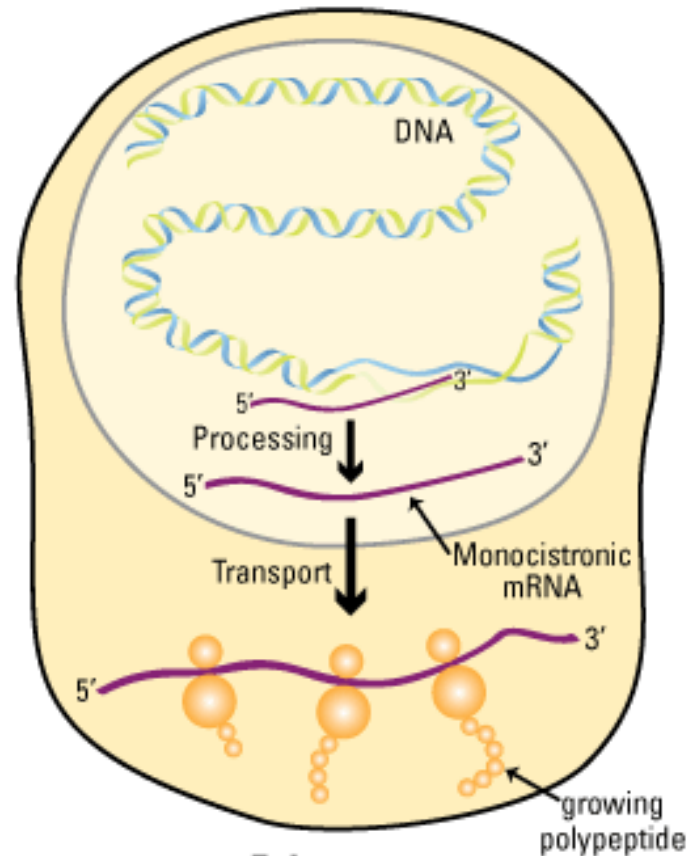


EUCARIOTO



Prokaryotes

PROCARIOTO



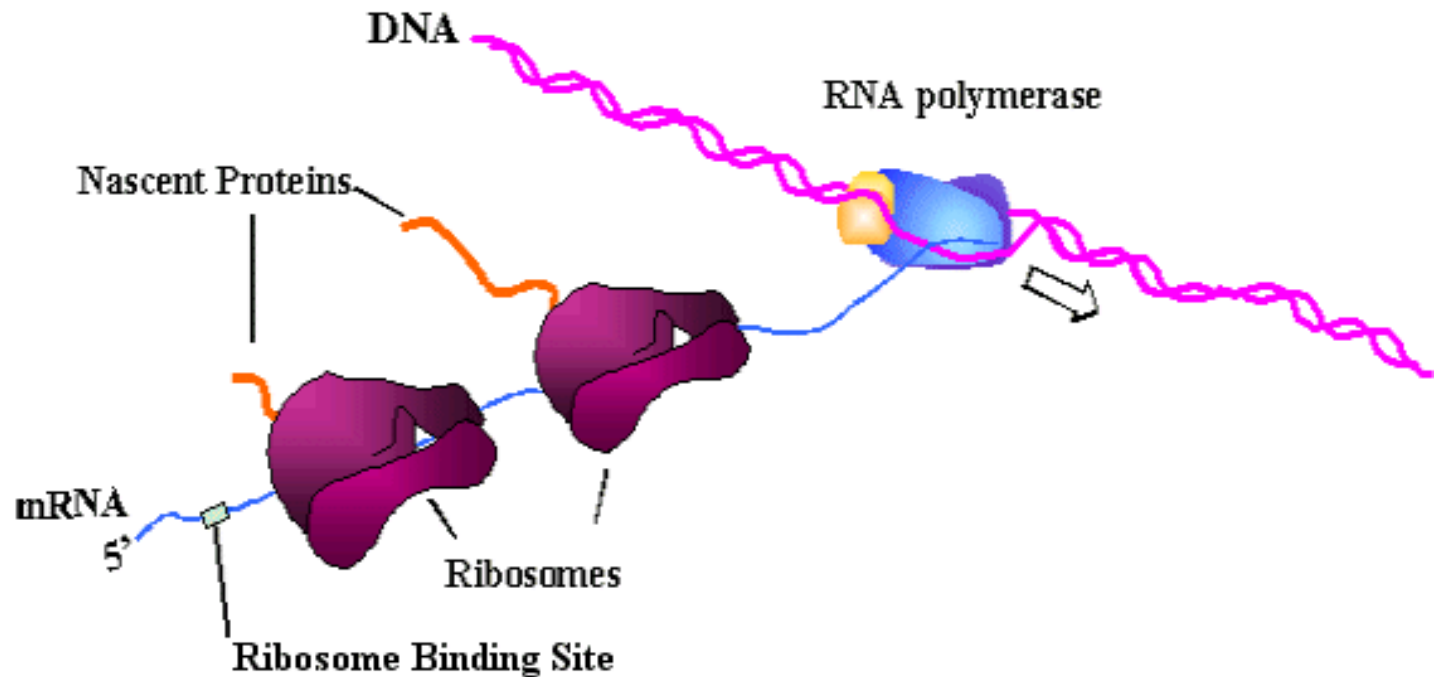
Eukaryotes

EUCARIOTO

COMO OCORRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO EM PROCARIOTOS?

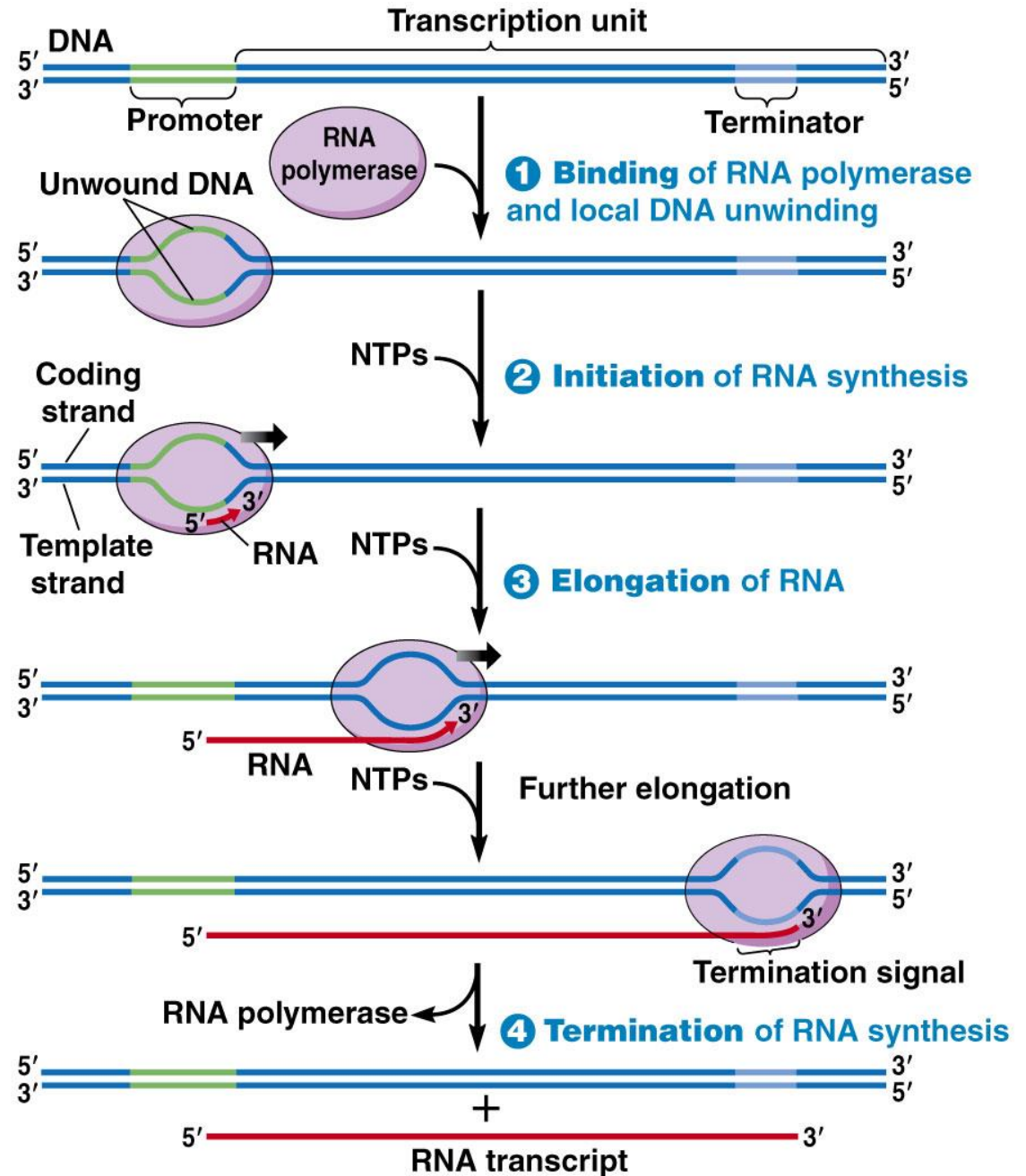


VALE A PENA LEMBRAR QUE EM PROCARIOTOS...

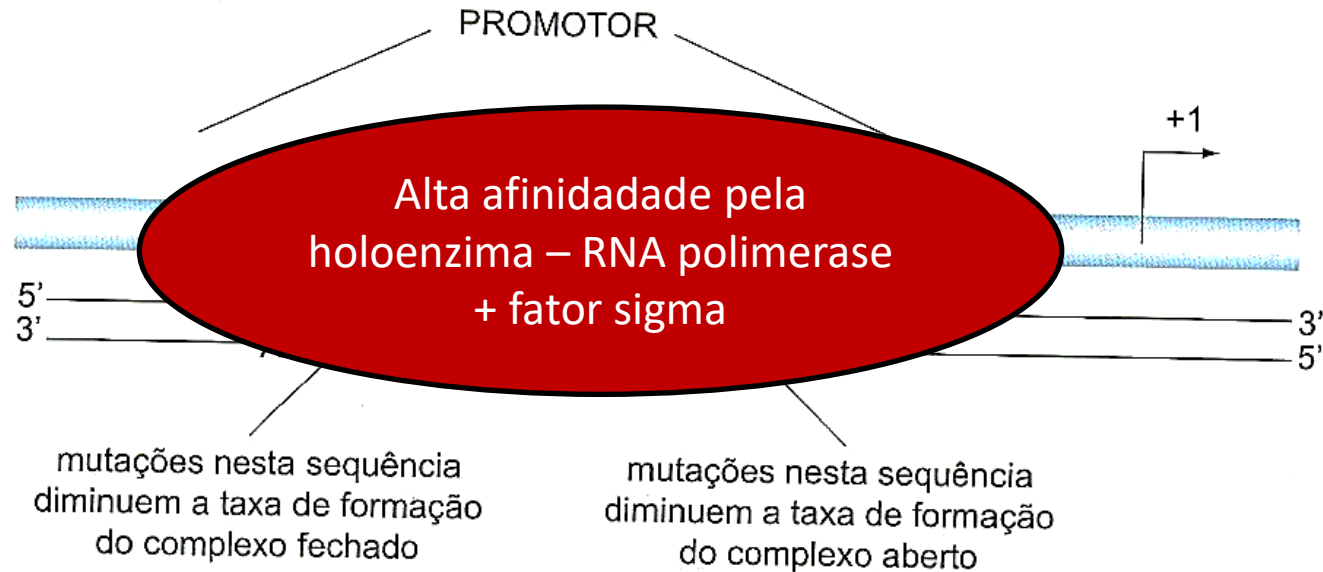


Transcrição e tradução simultâneas...Dai a importância do controle de expressão durante a transcrição!

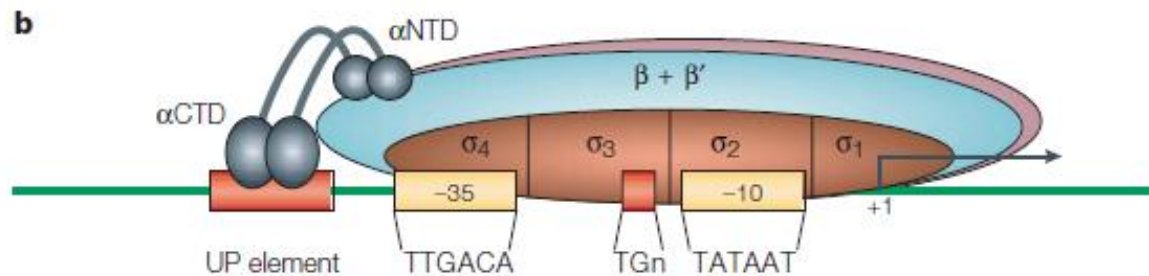
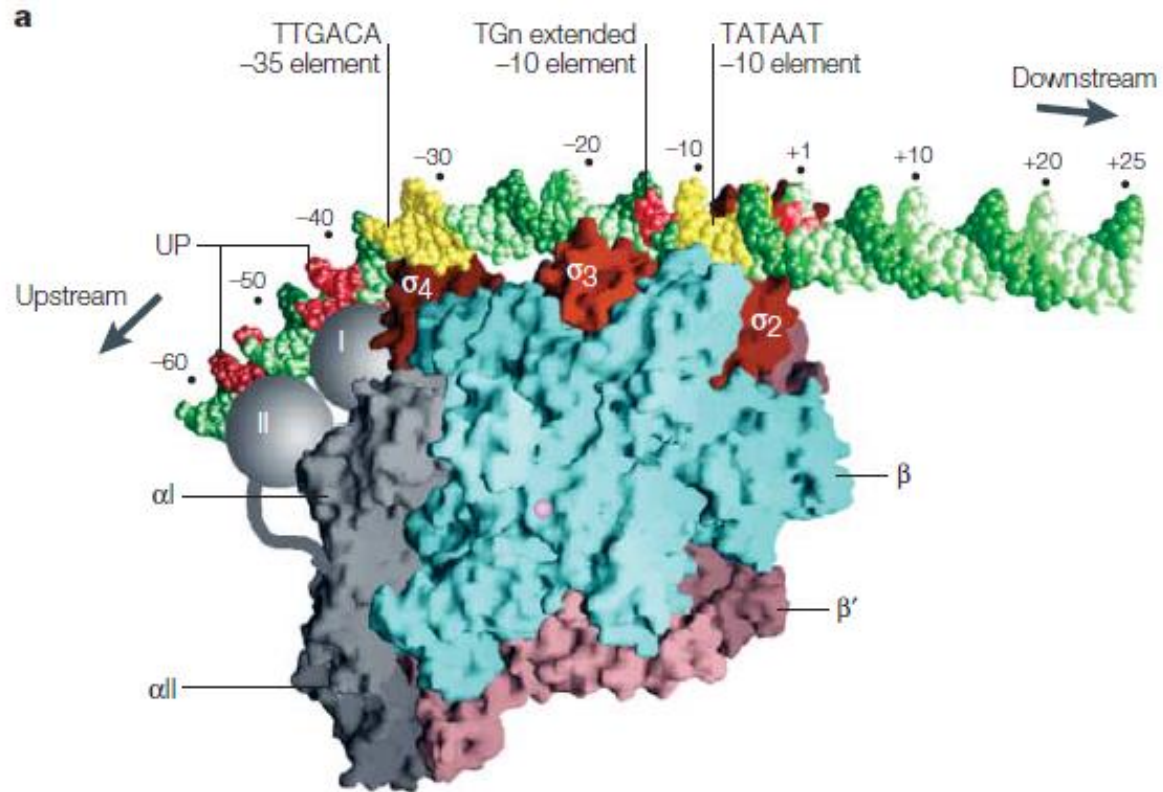
Estágio da transcrição



DUAS REGIÕES DETERMINANTES PARA O INÍCIO TRANSCRIÇÃO



Sequências com menor afinidade mais precisamente reguladas



FATORES SIGMA

1

core

RNAP core assembly

E. coli has several sigma factors

Gene

Factor

Use

rpoD

σ^{70}

general

rpoS

σ^S

stress

rpoH

σ^{32}

heat shock

rpoE

σ^E

heat shock

rpoN

σ^{54}

nitrogen starvation

fliA

σ^{28} (σ^F)

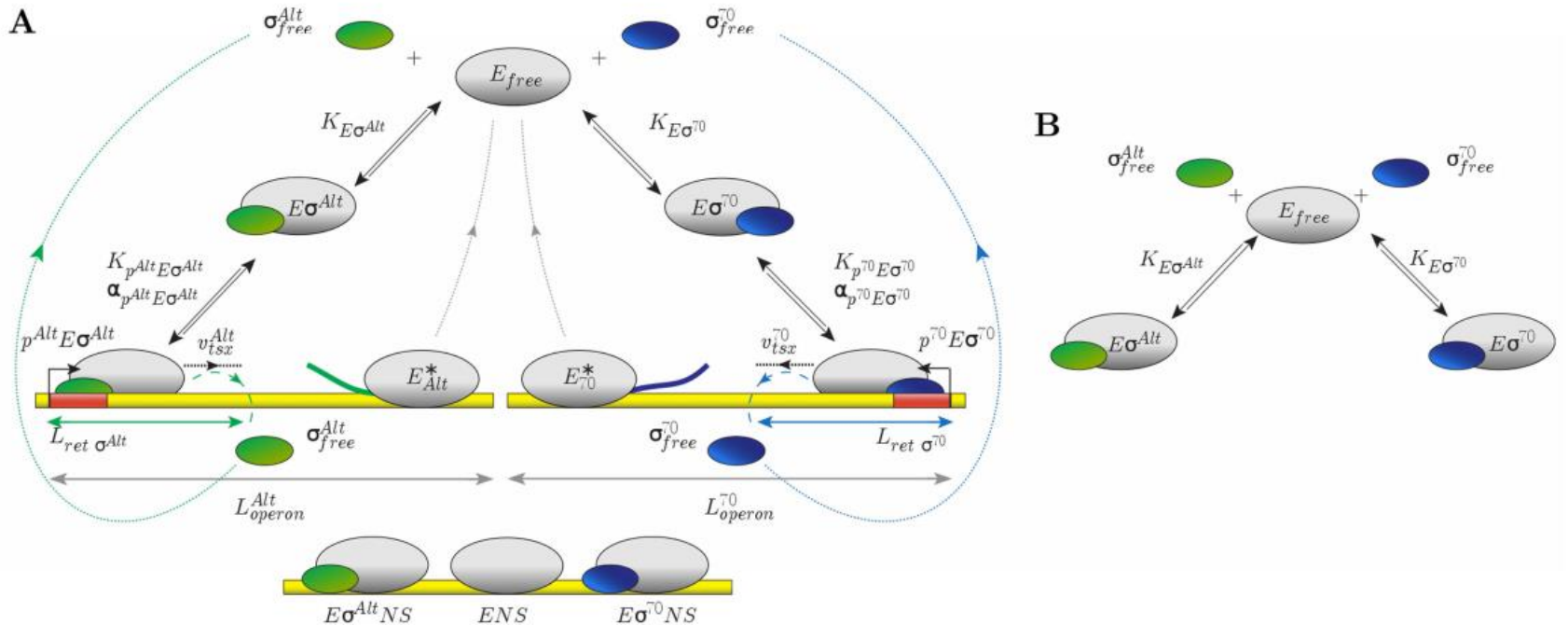
flagellar synthesis

σ

Termination

Número de RNA polimerase é limitado.. .4,000–5. 000 genes nas células gera competição!

Um gene pode ter mais de um promotor com afinidade diferentes por fatores sigmas!



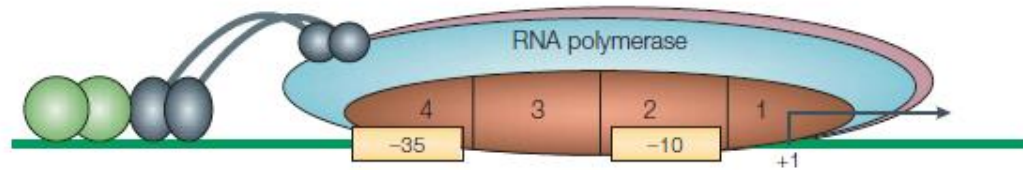
ATIVADORES X REPRESSORES X INDUTORES X CO-REPRESSORES

Fatores de transcrição ou **TFs** são proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim a transcrição e a futura tradução. Qualquer proteína necessária para o início da transcrição, mas que não seja parte integrante do RNA polimerase

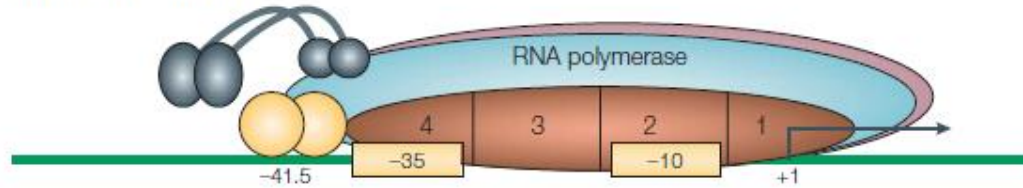
Usa-se o termo reguladores: proteínas que podem agir ativando ou reprimindo a expressão com a ajuda ou não de pequenas molecular não proteínas

CLASSES DE ATIVIDORES

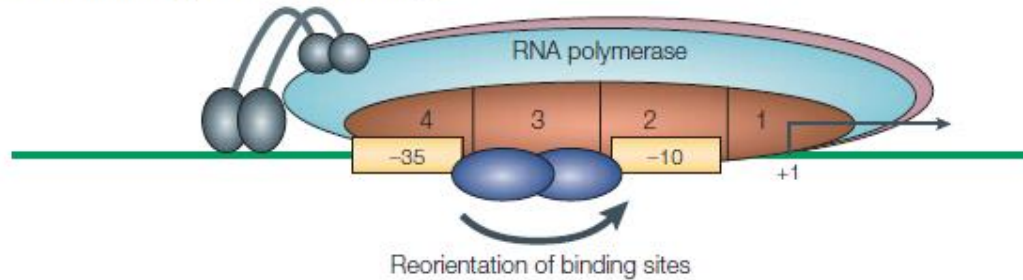
a Class I activation



b Class II activation

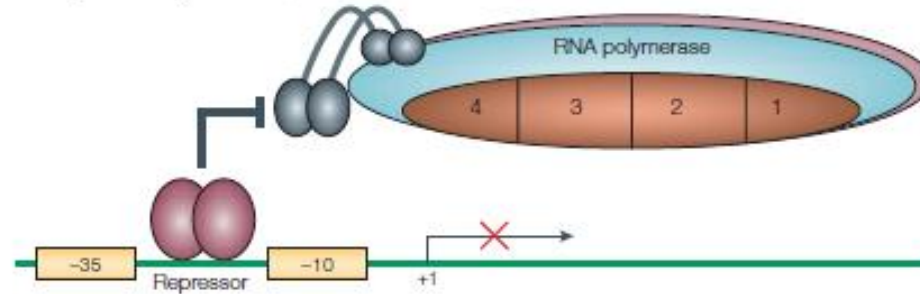


c Activation by conformation change

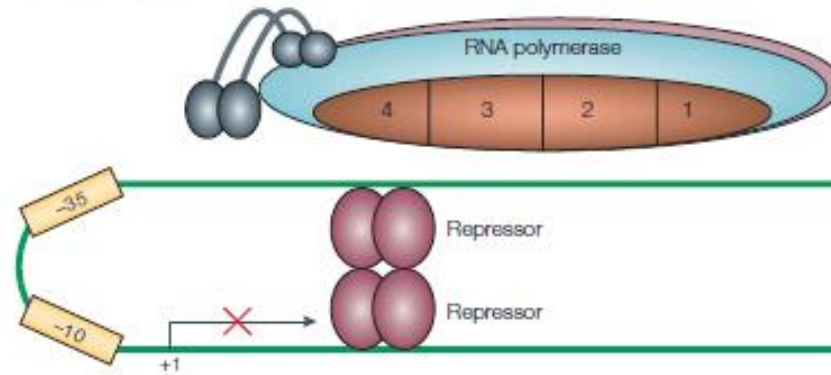


CLASSES DE REPRESSORES

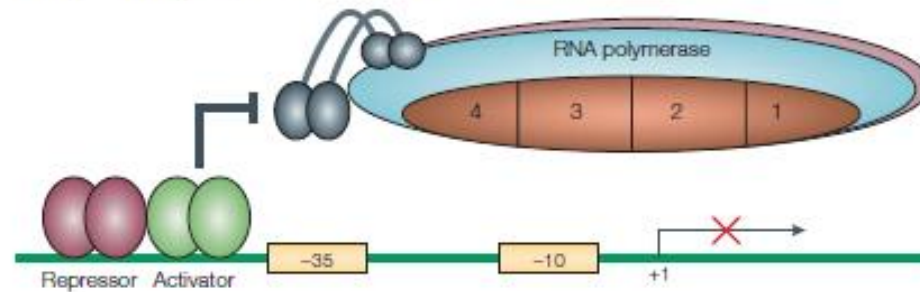
a Repression by steric hindrance



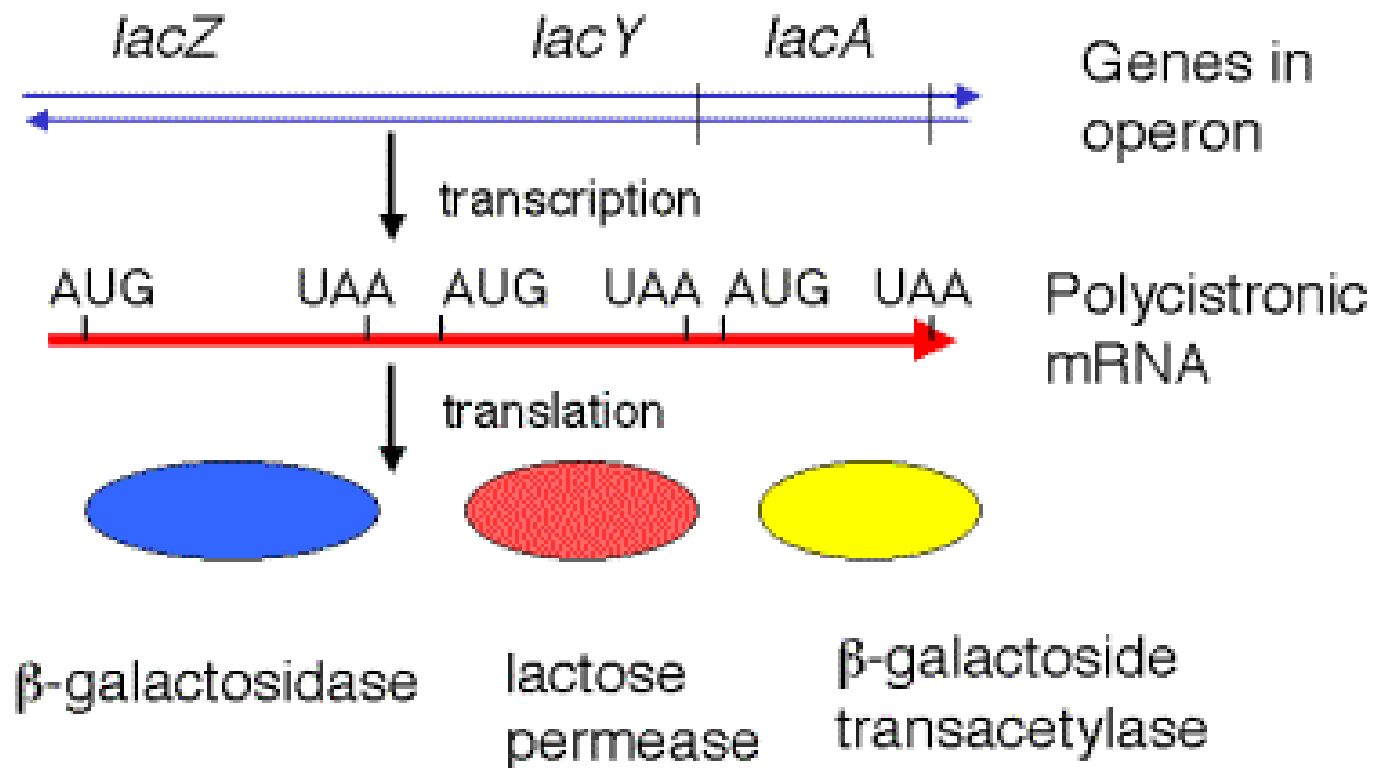
b Repression by looping



c Repression by modulation of an activator

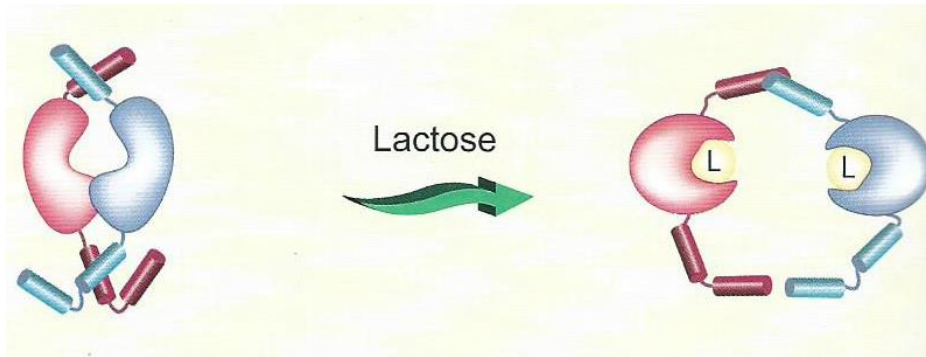


SISTEMA LACZ – SISTEMA MODELO...

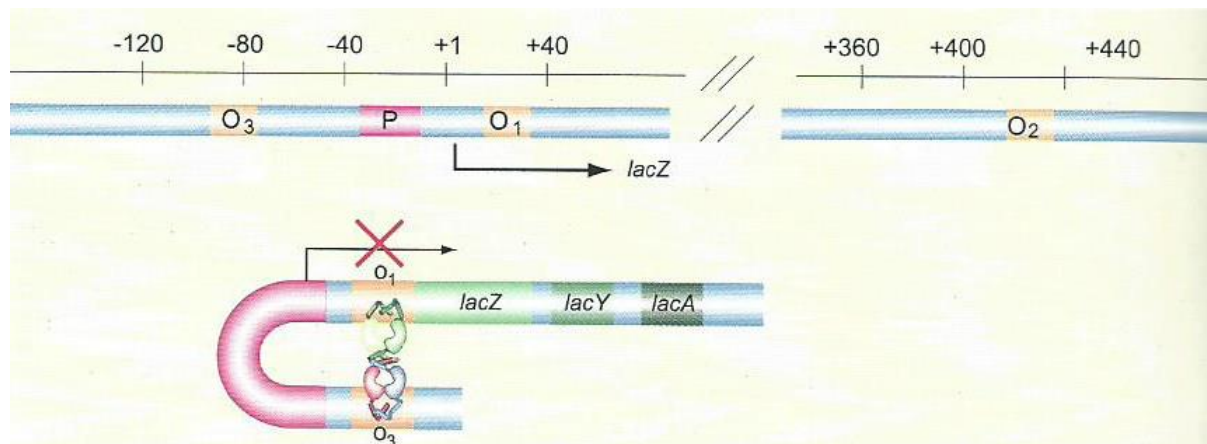


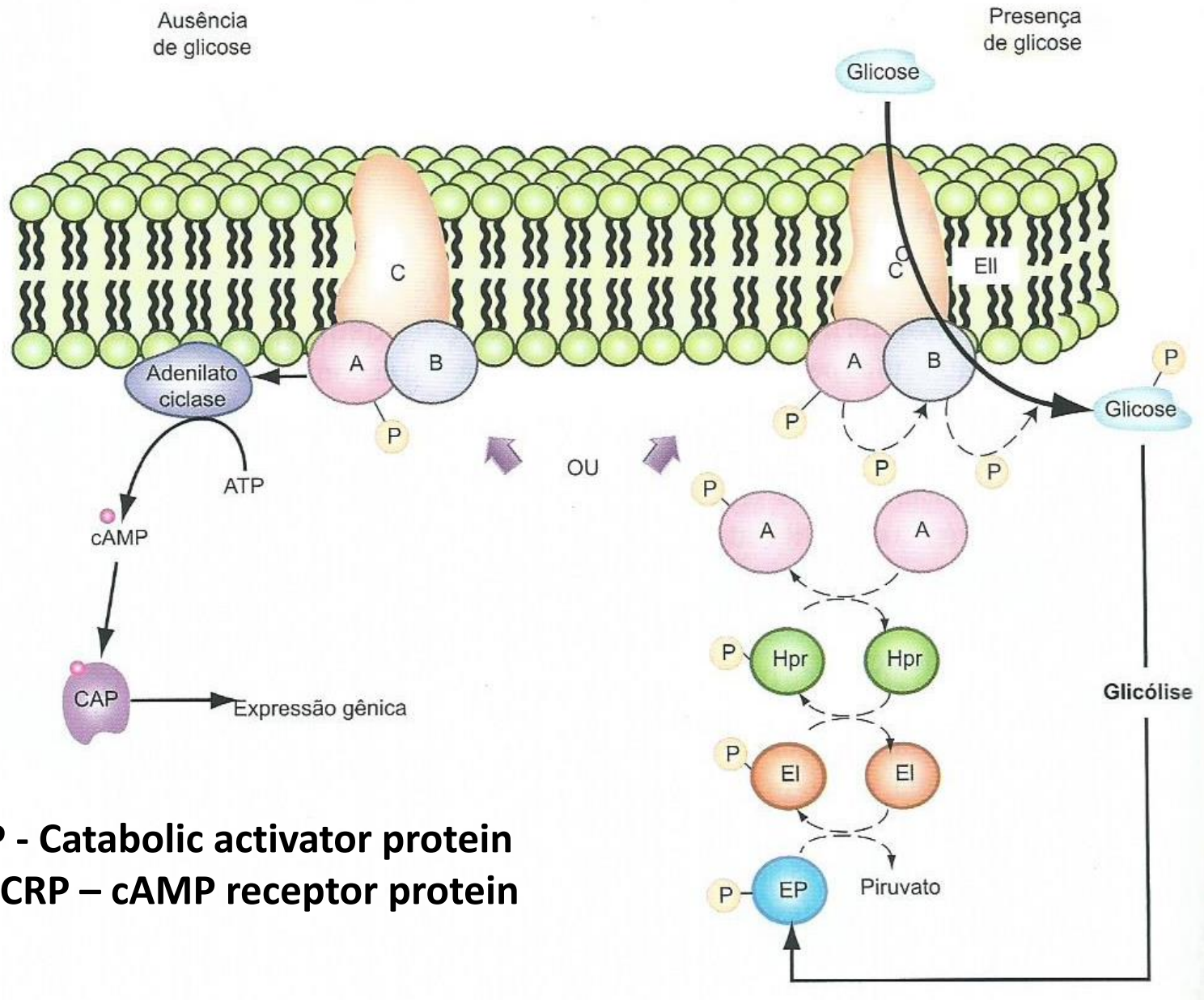
ECONOMIA É TUDO...

LacI



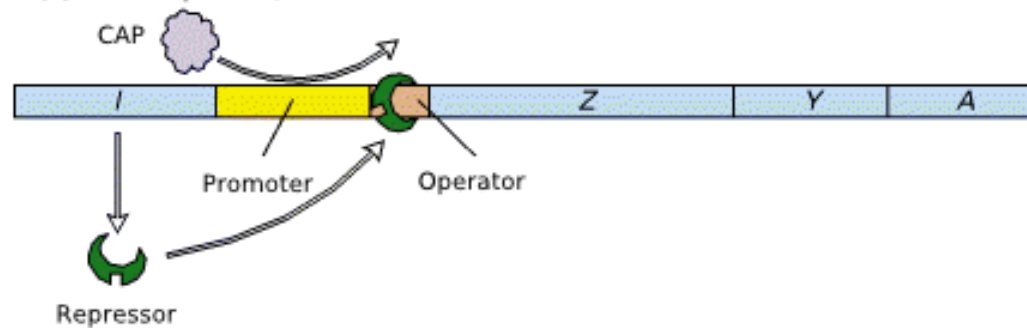
A logística é perfeita!!



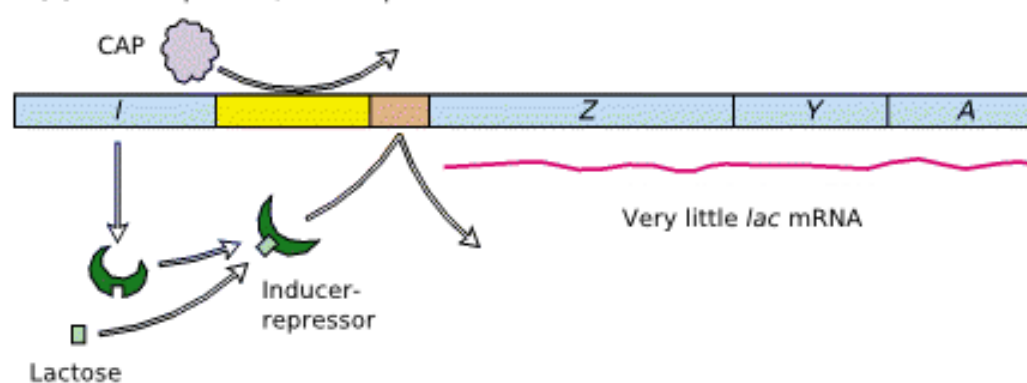


**CAP - Catabolic activator protein
ou CRP – cAMP receptor protein**

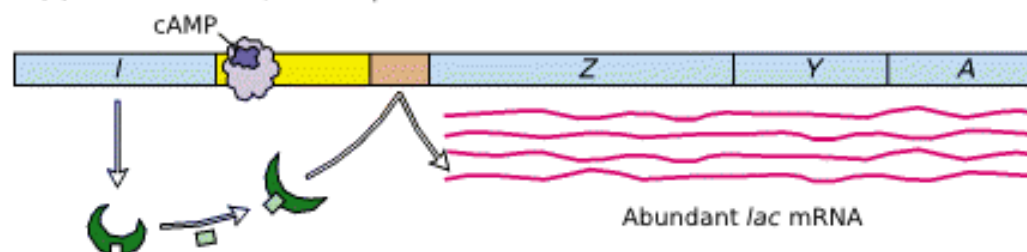
(a) Glucose present, lactose absent



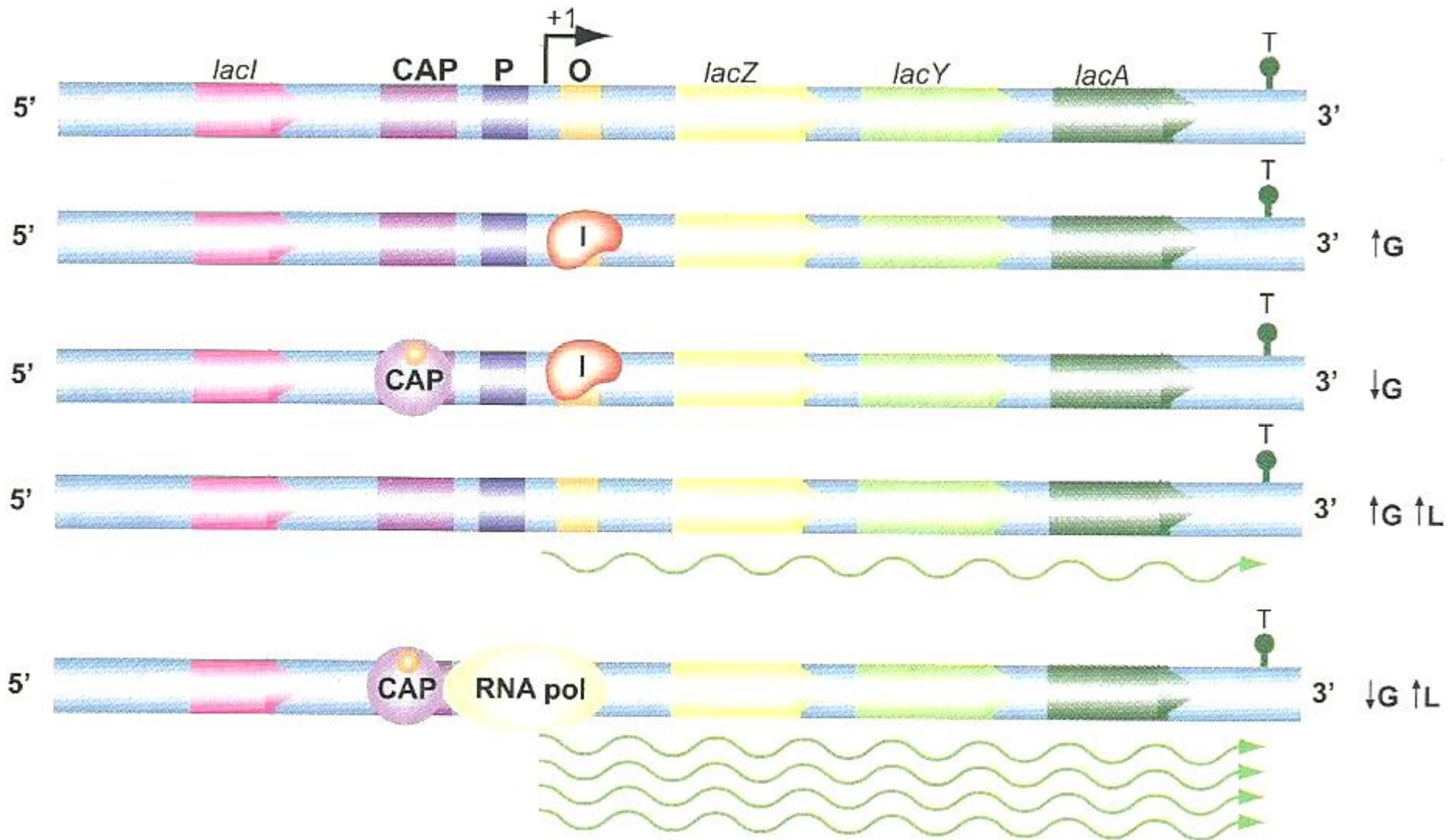
(b) Glucose present, lactose present



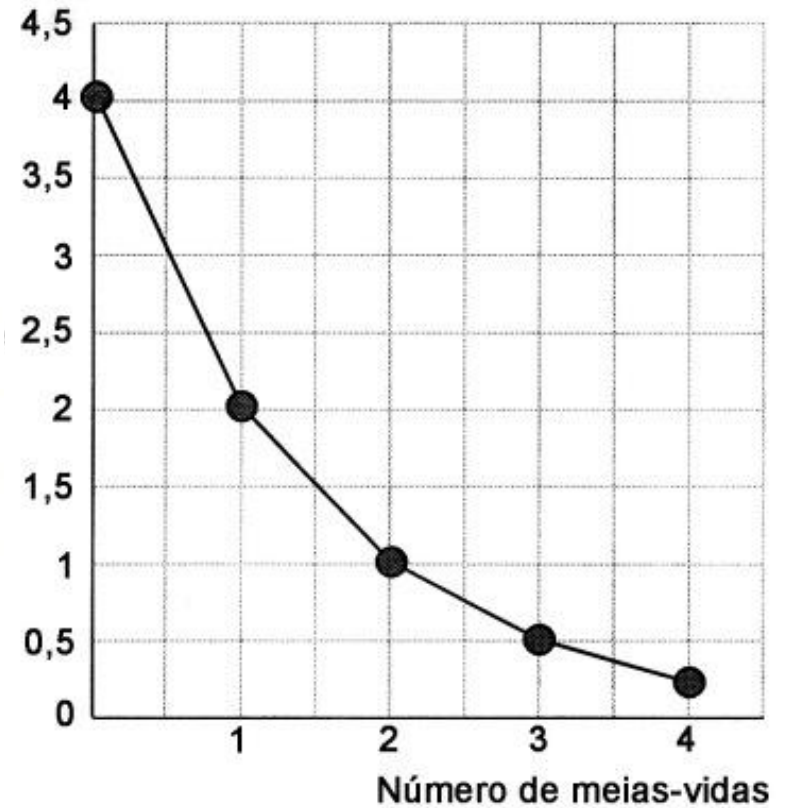
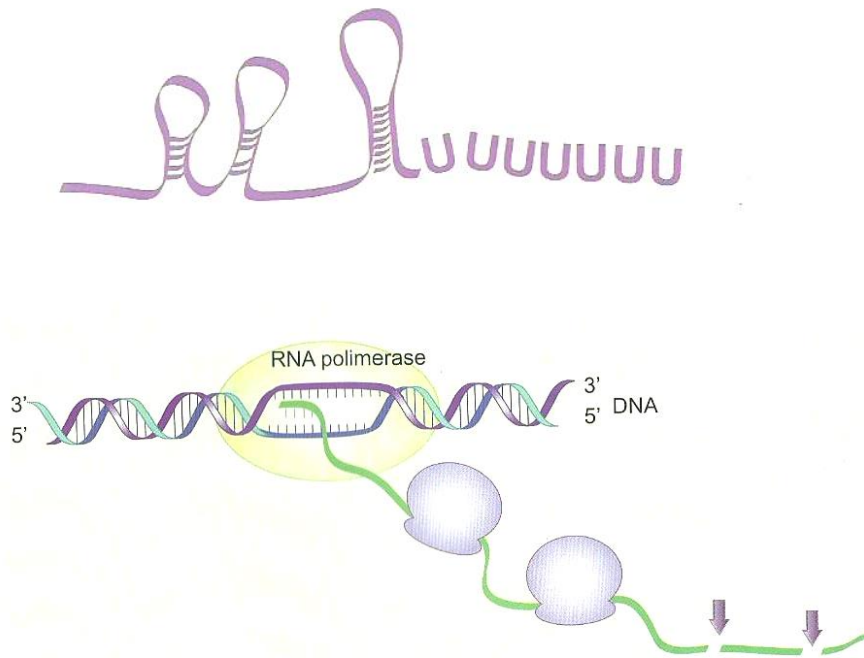
(c) Glucose absent, lactose present



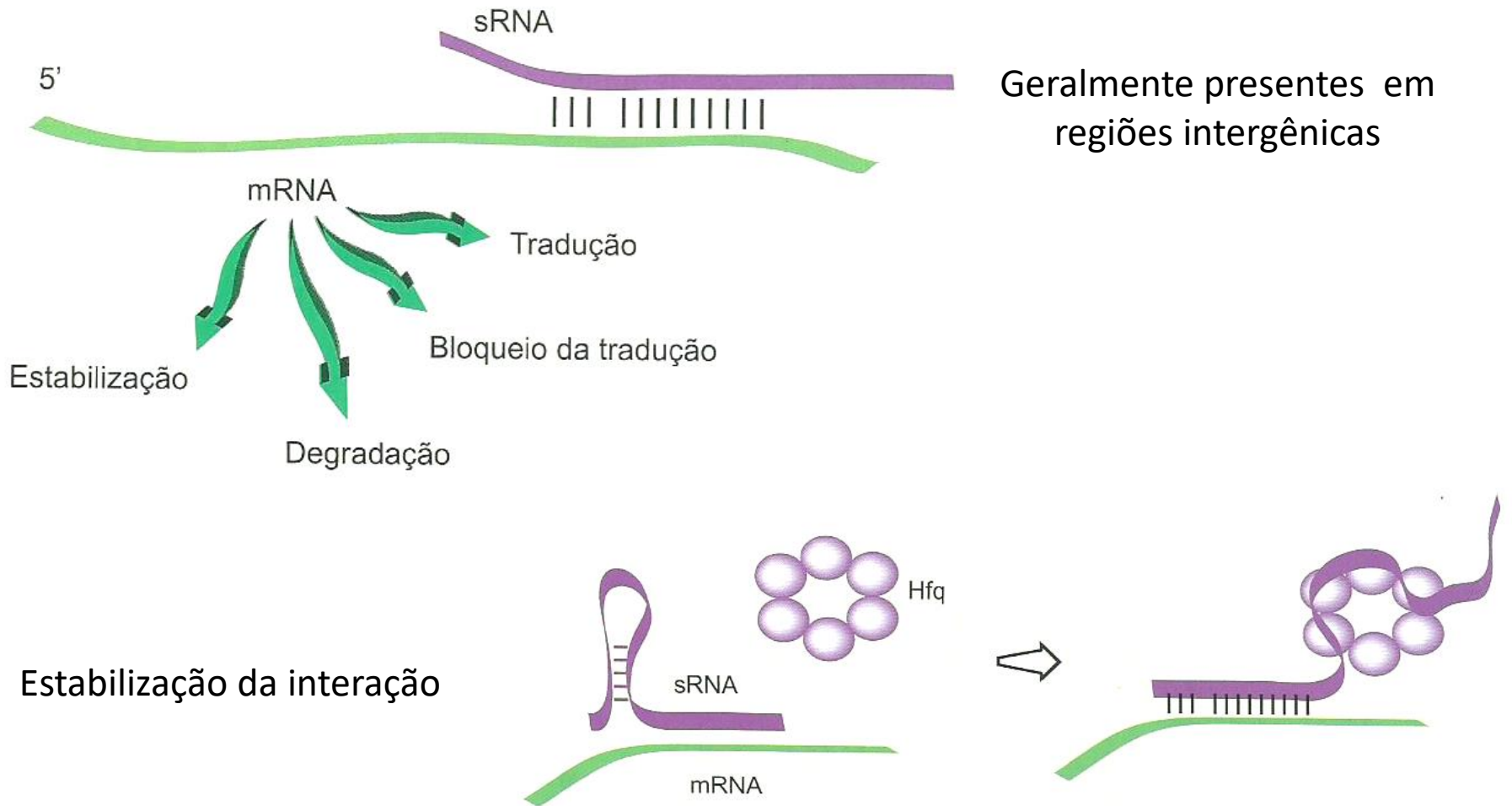
SÃO DOIS SISTEMAS INDEPENDENTES DE CONTROLE!



CONTROLE PÓS TRANSCRICIONAL



sRNA E SUAS DIVERSAS FUNÇÕES

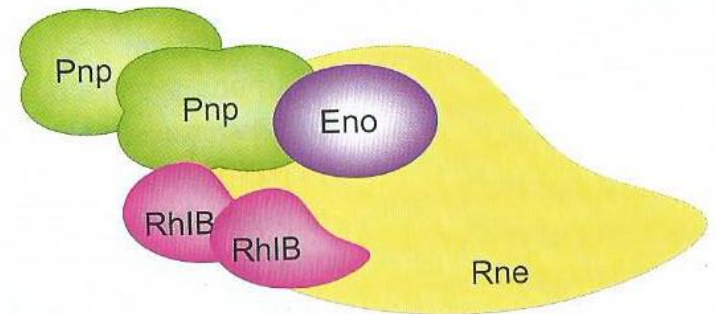
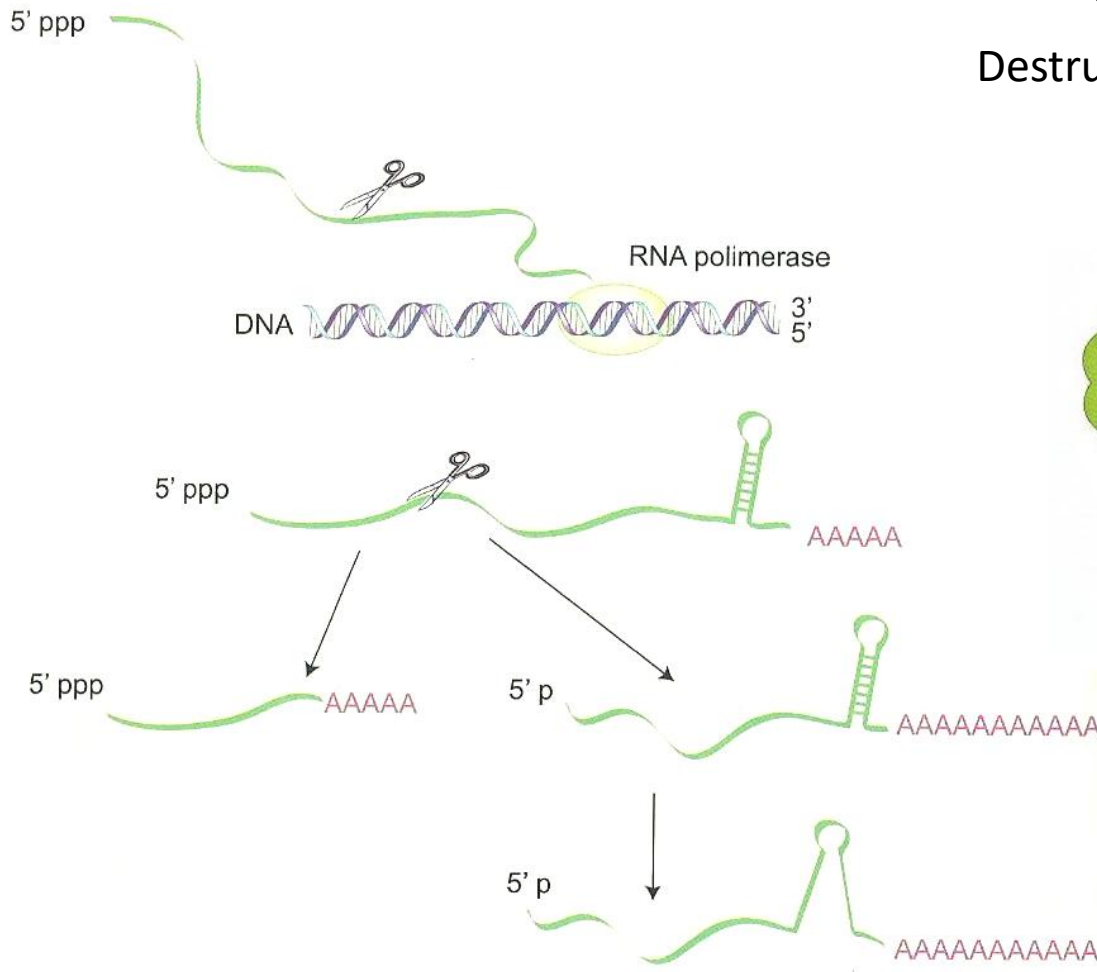


RNAase

Controle da expressão

Reciclagem de ribonucleotídeos

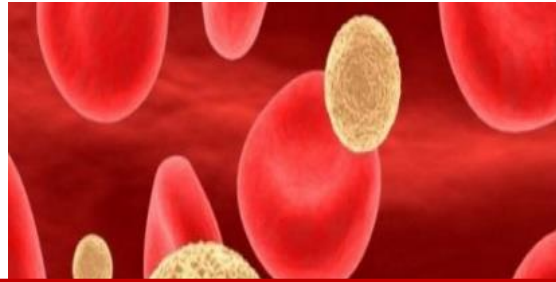
Destruição de RNA aberrantes



COMO OCORRE O CONTROLE DA EXPRESSÃO EM EUCARIOTOS?

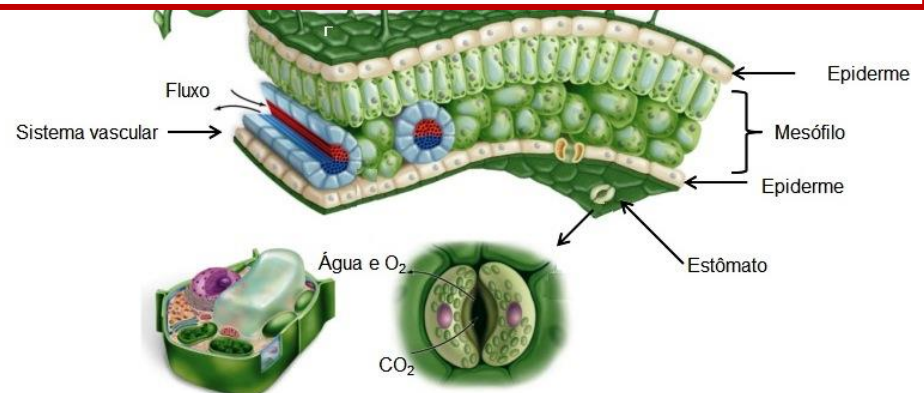


O GENOMA É O MESMO...O QUE MUDA SÃO OS GENES EXPRESSOS EM CADA TECIDO.



Muito mais complexo o controle da expressão gênica em eucariotos:

- compartimentalização do processo;
- diferenciação celular nos organismos pluricelulares.



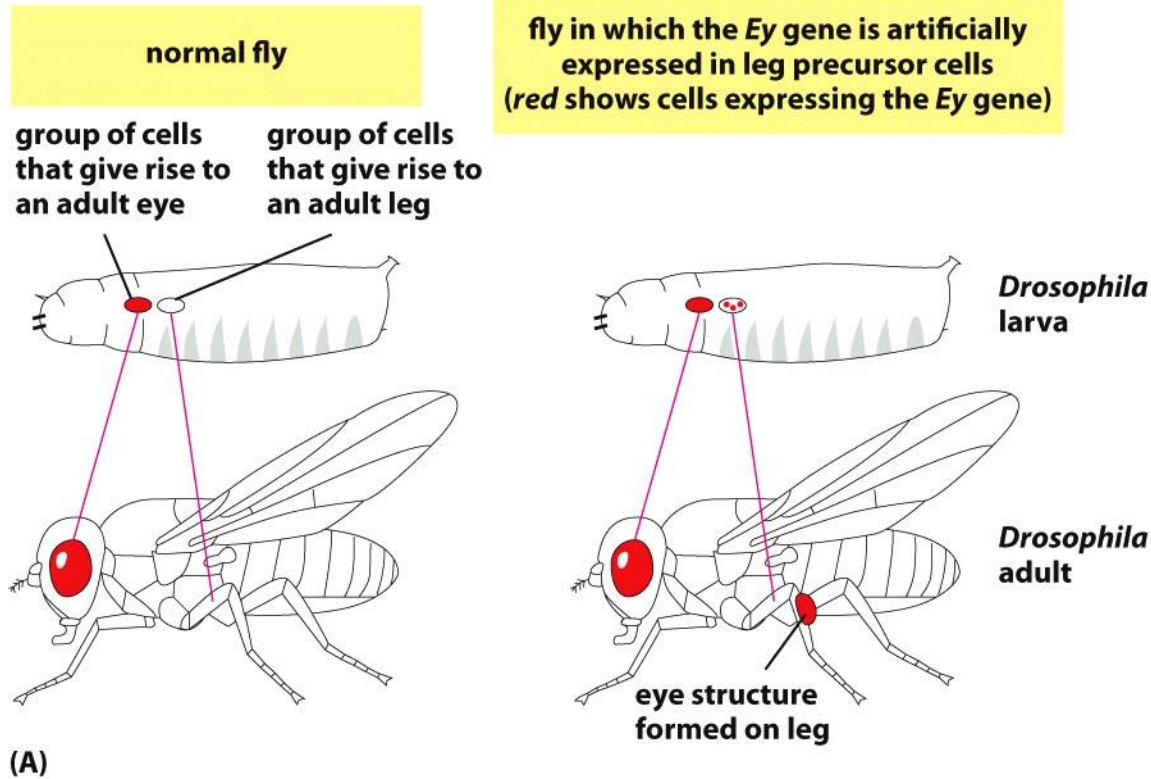
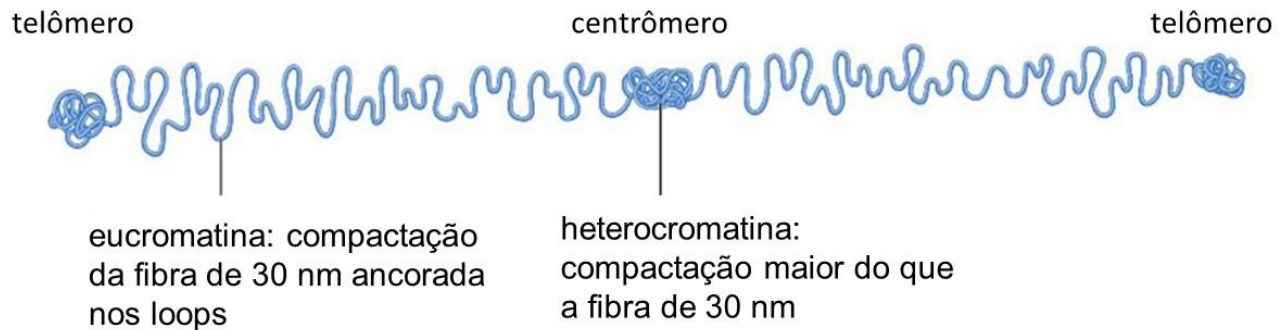
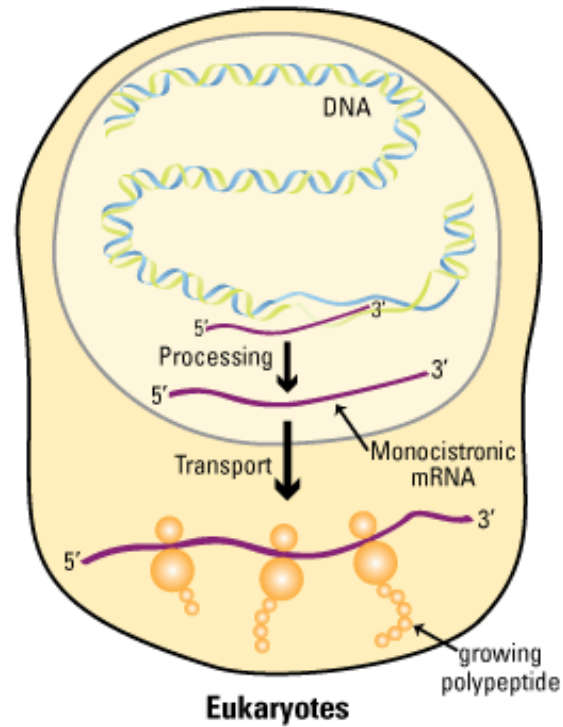
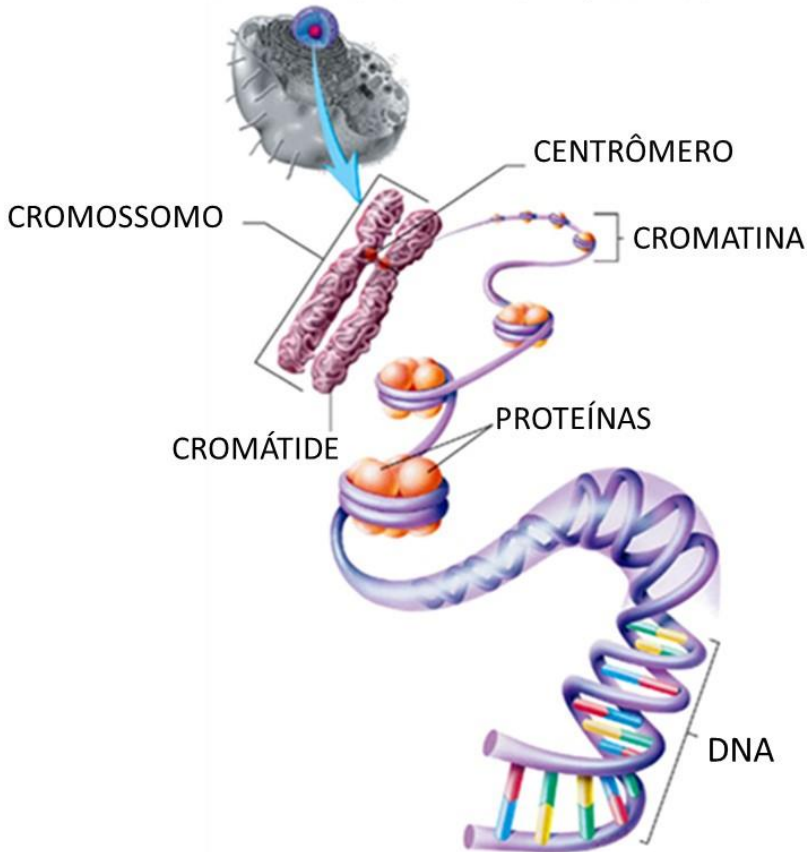


Figure 8-23 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)



EM EUCARIOTOS ...



ETAPAS NO CONTROLE DA EXPRESSÃO

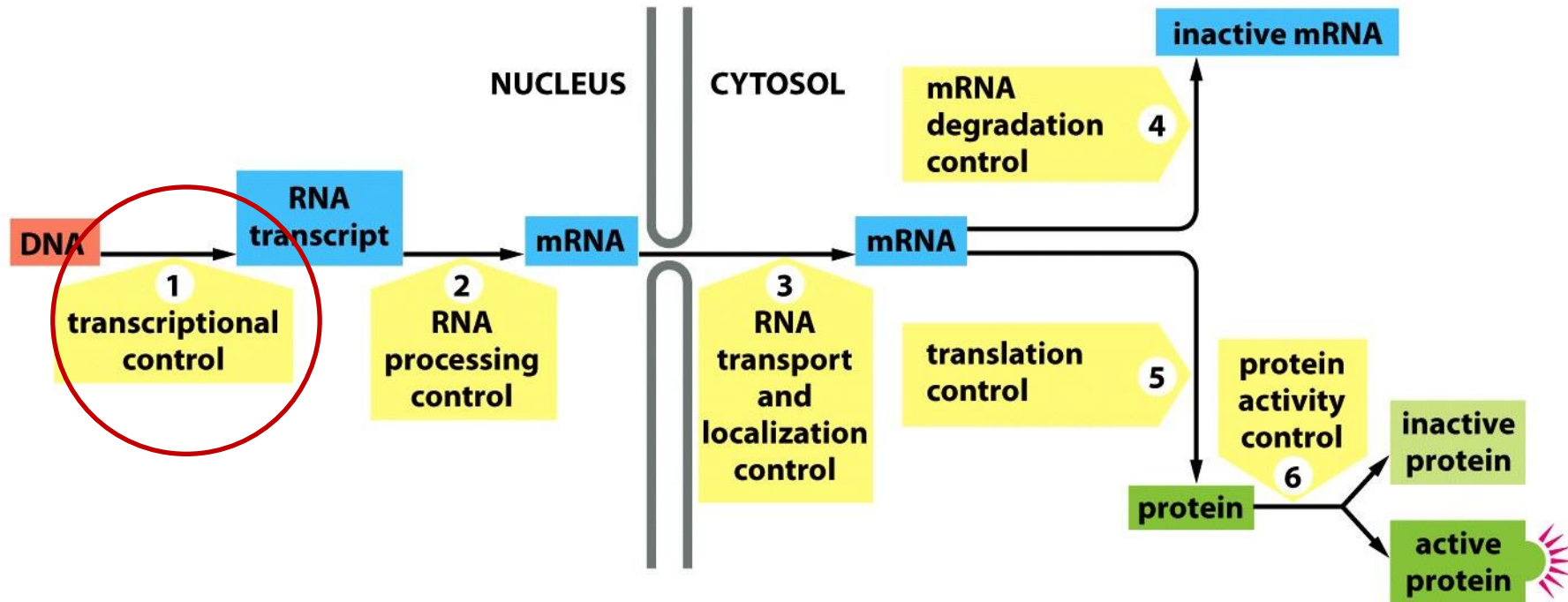


Figure 8-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Etapa - controle da transcrição é majoritária!

VÁRIAS RNA POLIMERASES!

Polimerases	RNA transcrito
RNA polimerase I	Pré-rRNA
RNA polimerase II	mRNA, snRNA, siRNA, miRNA
RNA polymerase III	tRNA, 5S-rRNA, sn RNA u6, outros pequenos RNA estáveis

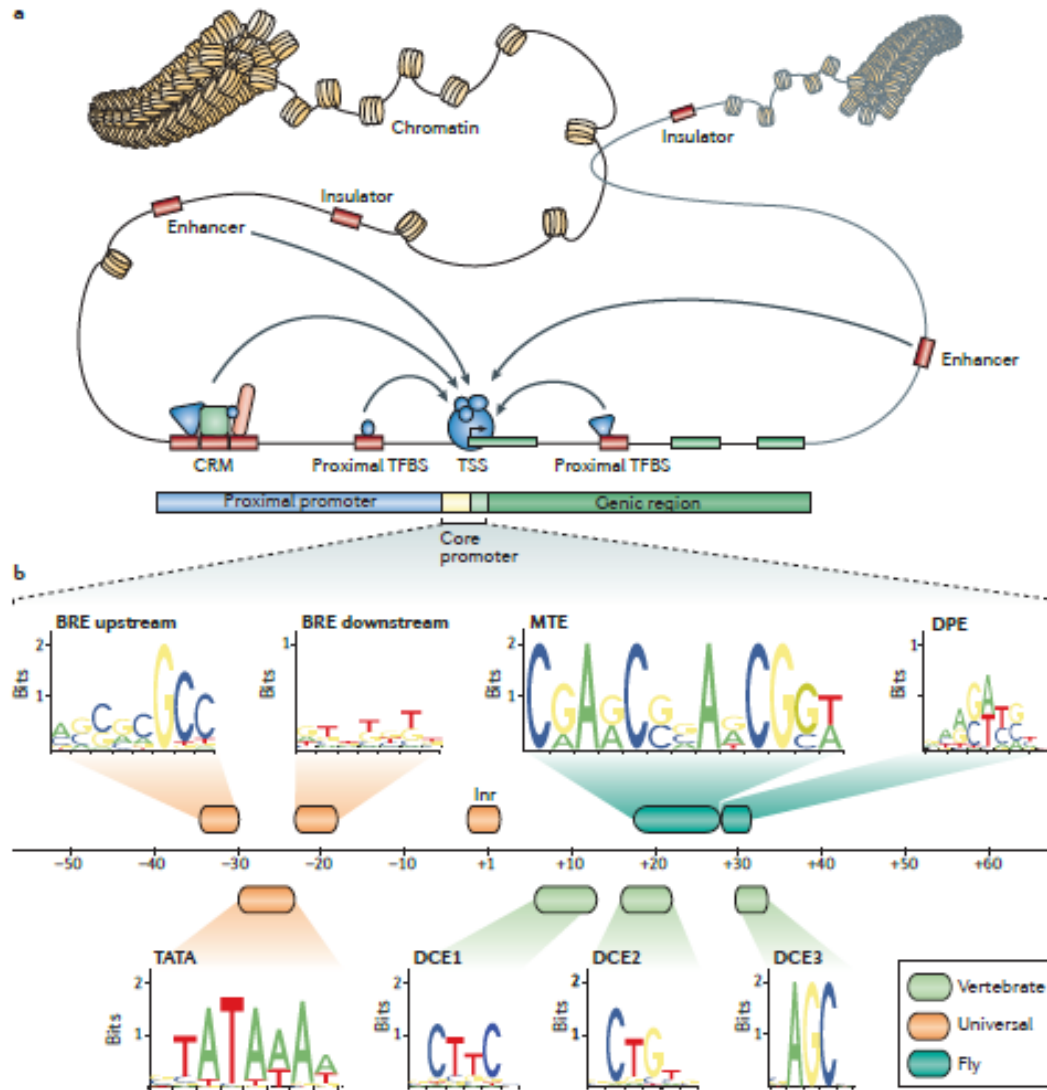
RNA Pol IV and V in Gene Silencing: Rebel Polymerases Evolving Away From Pol II's Rules

Ming Zhou¹ and Julie A. Law^{1,*}

¹Plant Biology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, 92037, USA

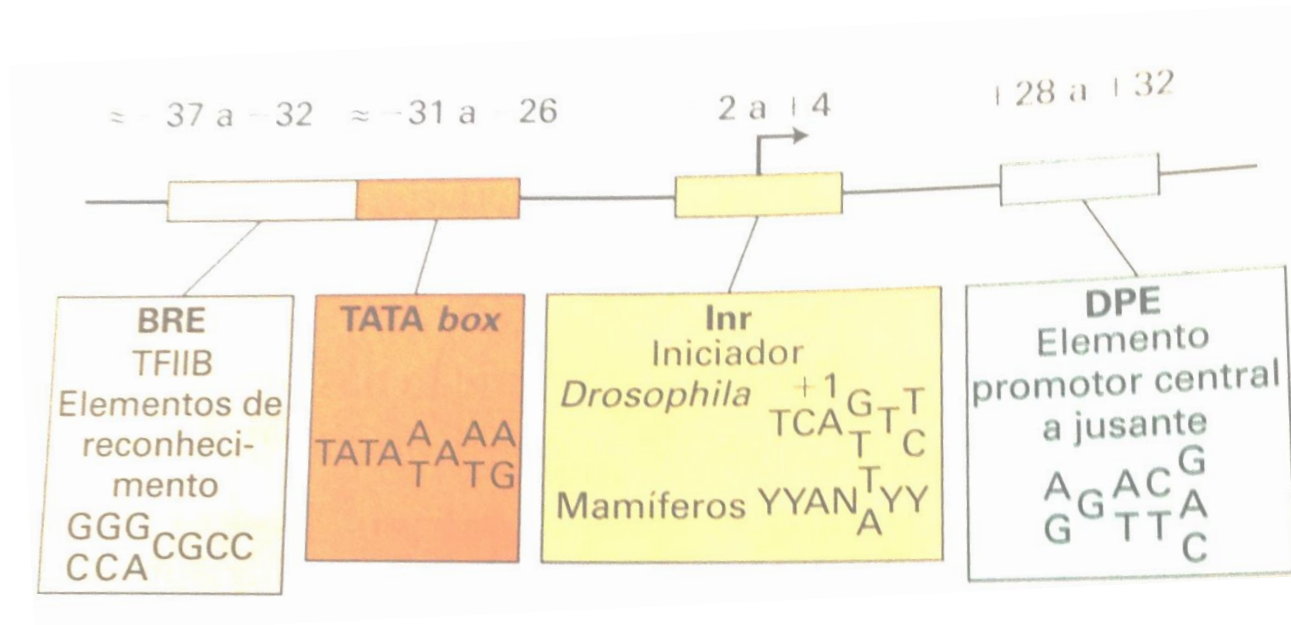
-- --

SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DA TRANSCRIÇÃO



REGIÃO PROMOTORA

Primeiros estudados – virus e genes *housekeeping* – **TATA box** mais comum??



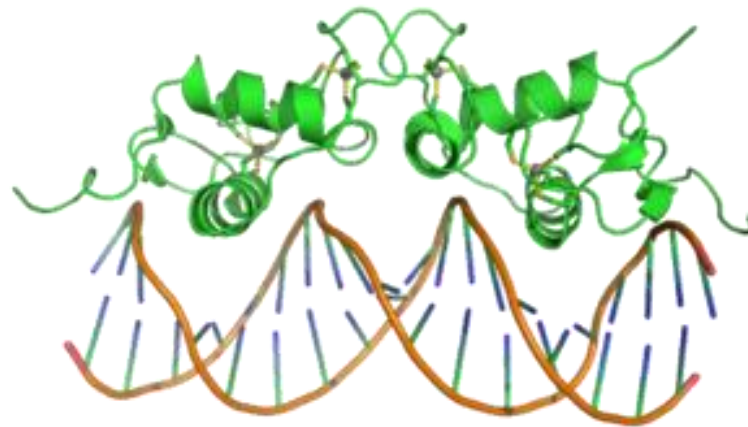
Sequencia iniciadoras – (5') Y Y A⁺¹ N T/A Y Y Y Y (3')

Y – uma pirimidina

Aumento a força de ligação por fatores de transcrição!

FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim a transcrição. Qualquer proteína necessária para o início da transcrição, mas que não seja parte integrante do RNA polimerase.



Sequências regulatórias x Reguladores transcricionais

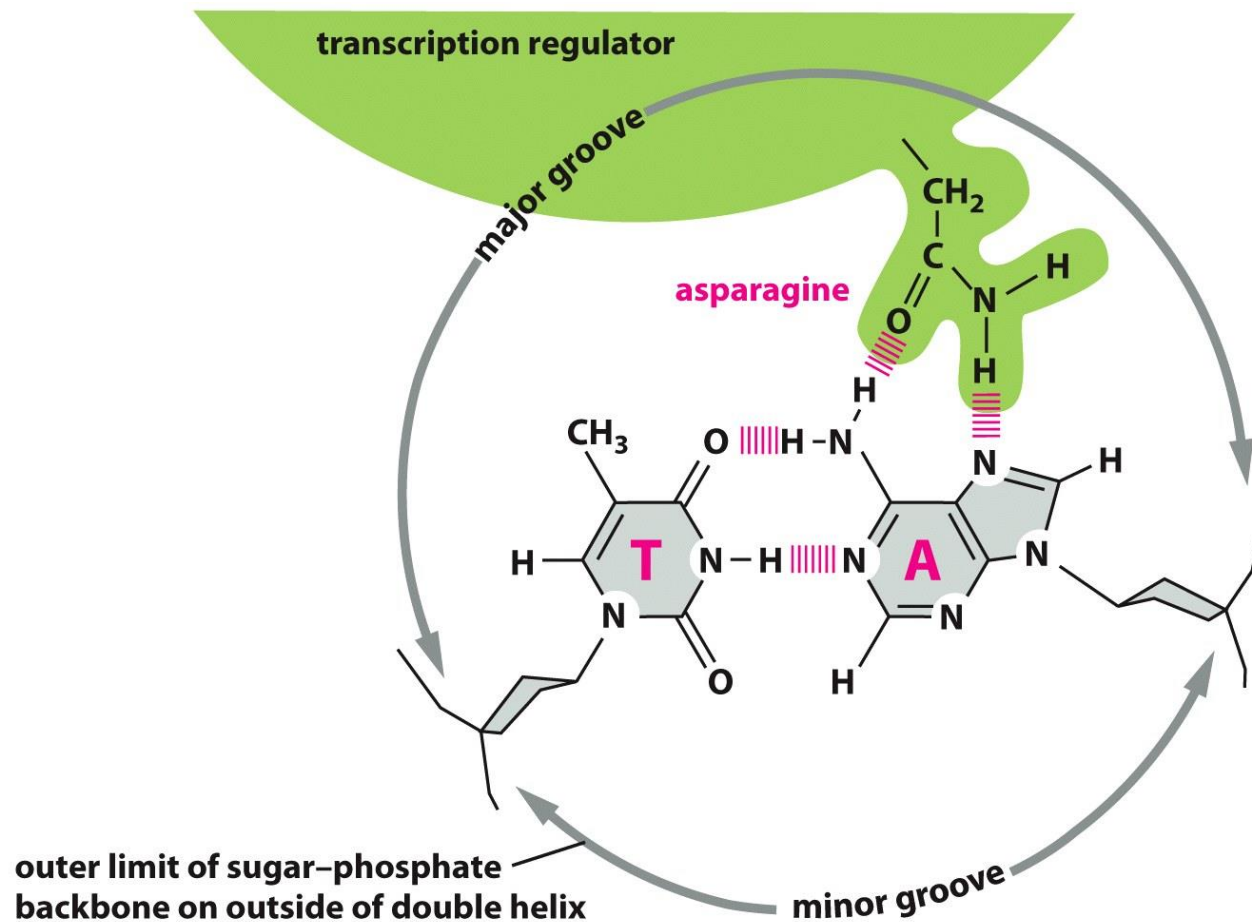


Figure 8-4 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Muito sitios de contato... a união faz a força!!!
 Geralmente dímeros – aumento o número de sítio que
 podem se ligar!!

FATORES DE TRANSCRIÇÃO COMO ATIVADORES E REPRESSORES

- Geralmente ação a distância;
- Ajuda a associação dos fatores gerais de transcrição e RNAPolII;
- Modelagem da cromatina.

TF I - proteínas que são imprescindíveis para a ligação a RNA-polimerase I, responsáveis pela transcrição de genes que resultam em RNAs ribossomais.

TF II - proteínas que são imprescindíveis para a ligação a RNA-polimerase II, responsáveis pela transcrição de genes que resultam em RNAs mensageiros.

TF III - proteínas que são imprescindíveis para a ligação a RNA-polimerase III, responsáveis pela transcrição de genes que resultam principalmente em RNAs transportadores.

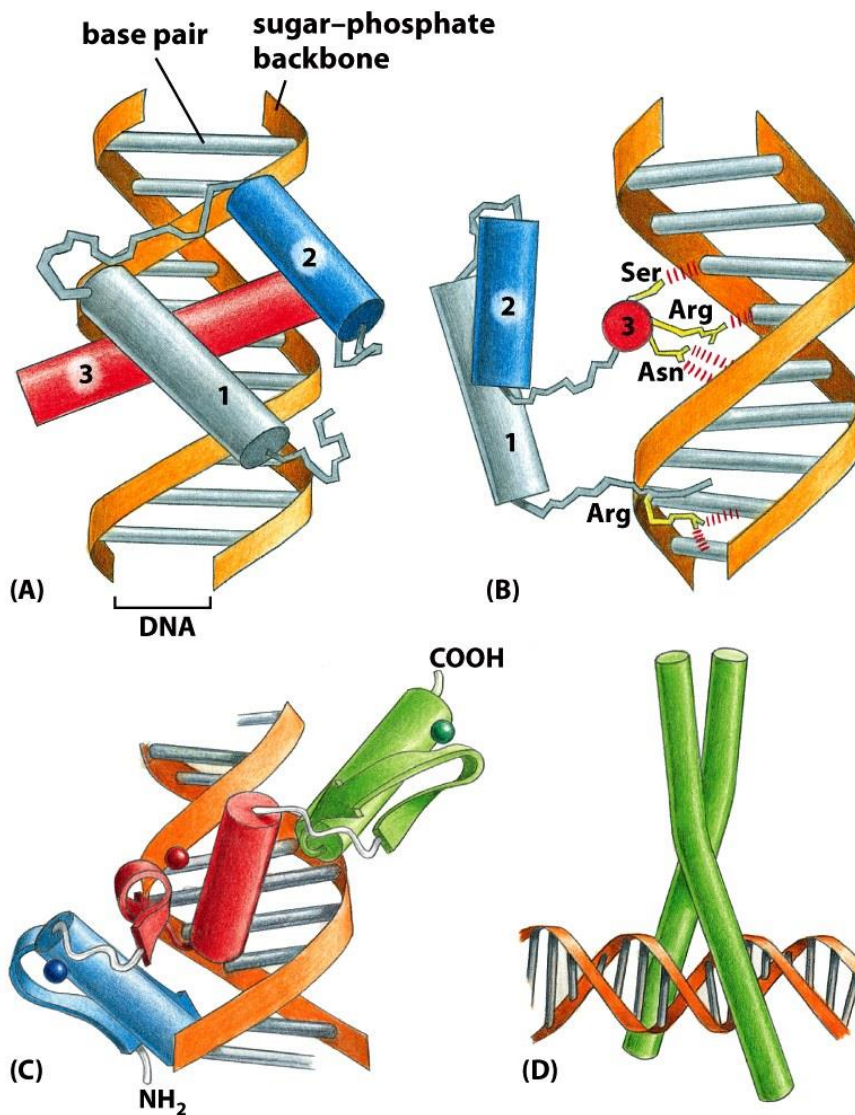


Figure 8-5 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Diferentes motivos de ligação ao DNA:

a e b – comum homeodomínios de α -hélice

c – motivos dedo de zinco

d - Zíper de leucina

MODELO ACEITO PARA O USO DAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS!

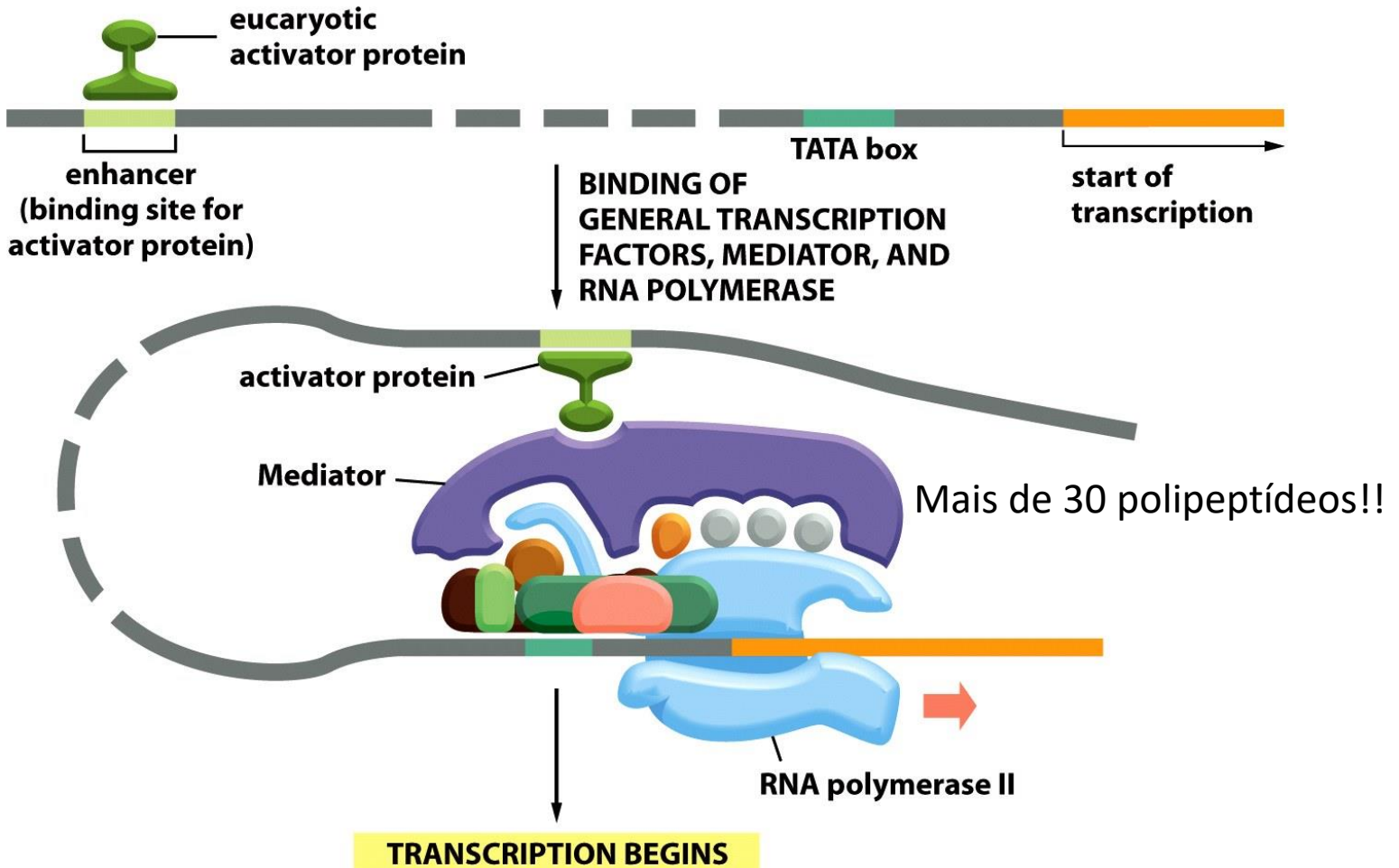


Figure 8-10 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

ETAPAS NO CONTROLE DA EXPRESSÃO

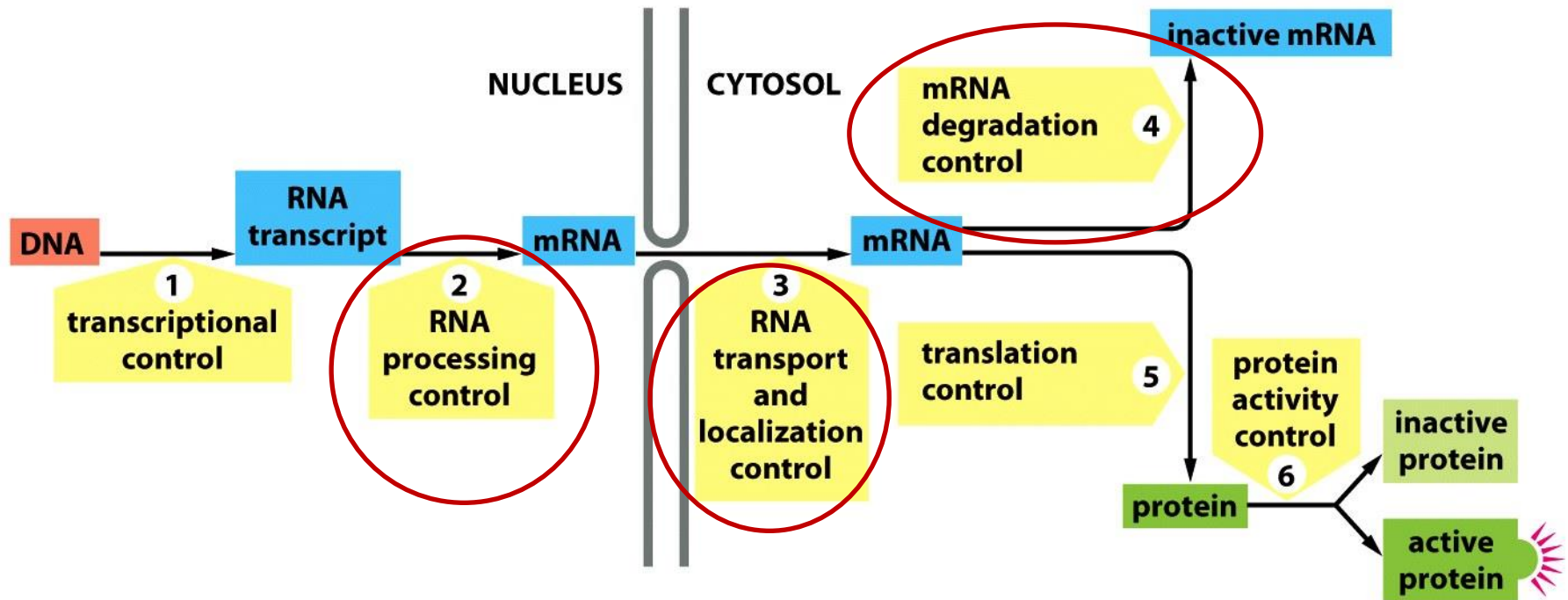
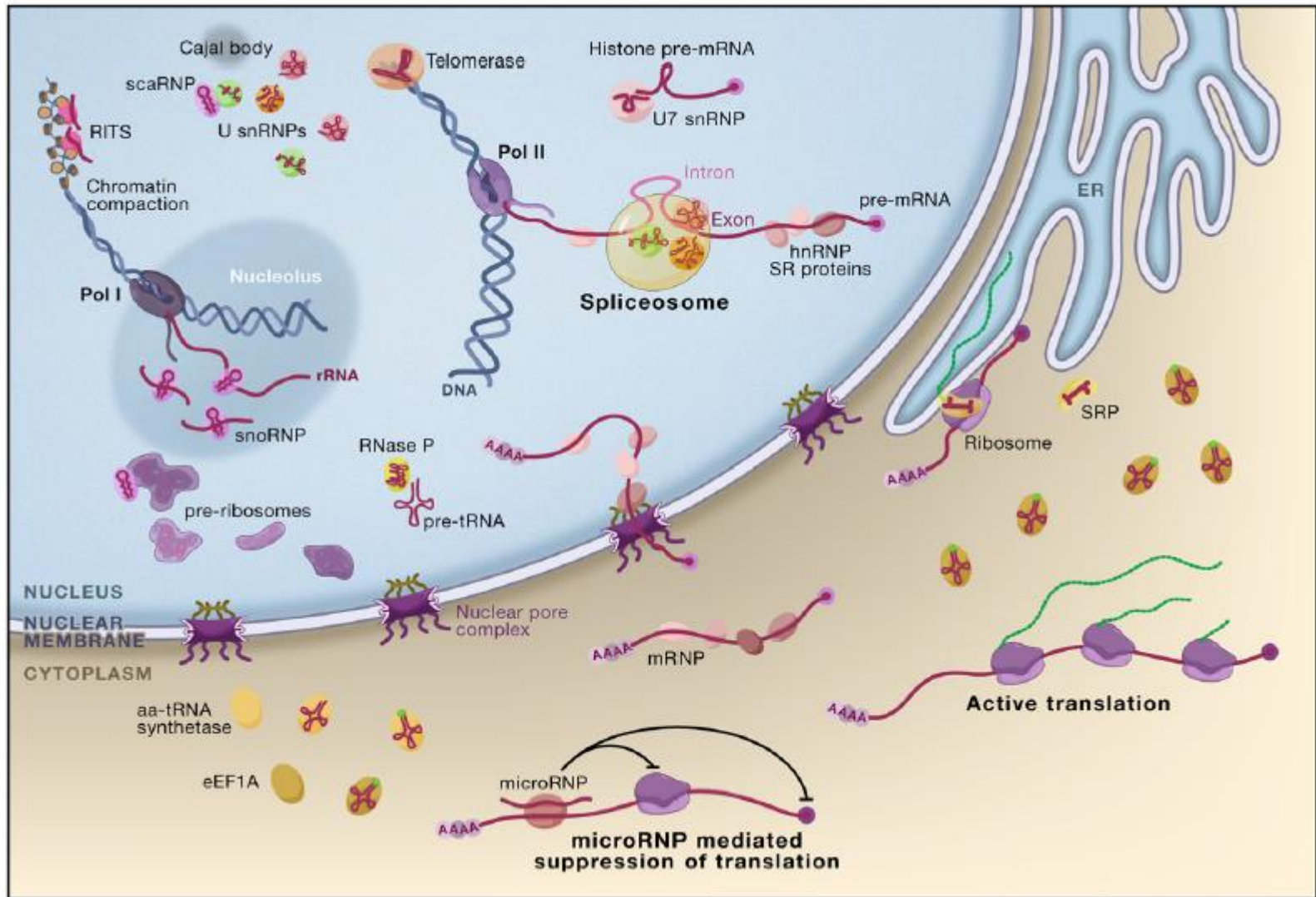


Figure 8-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

O controle pós-transcricional abrange várias etapas!

A estabilidade do RNA é altamente dependente de proteínas!

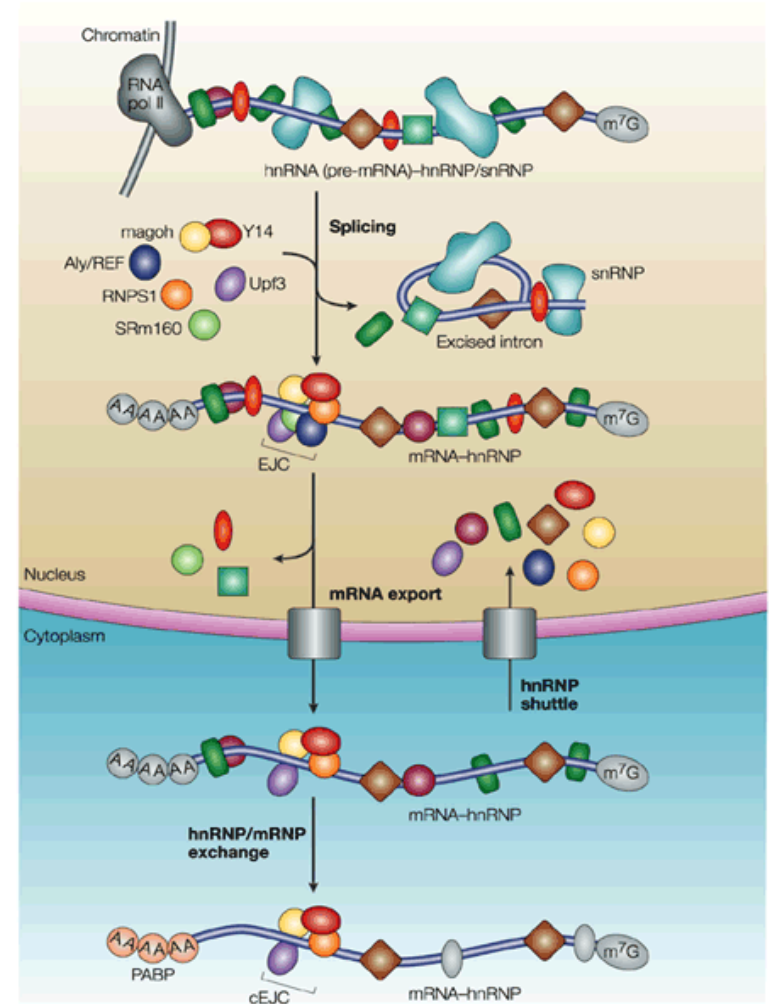


OS RNAs NÃO ESTÃO SOZINHOS!

Interdependência de proteínas e RNA!!!!

Termo correto: hnRNP e mRNP
“heterogeneous nuclear
ribonucleoproteins”

Abundantes tanto quanto histonas!!!

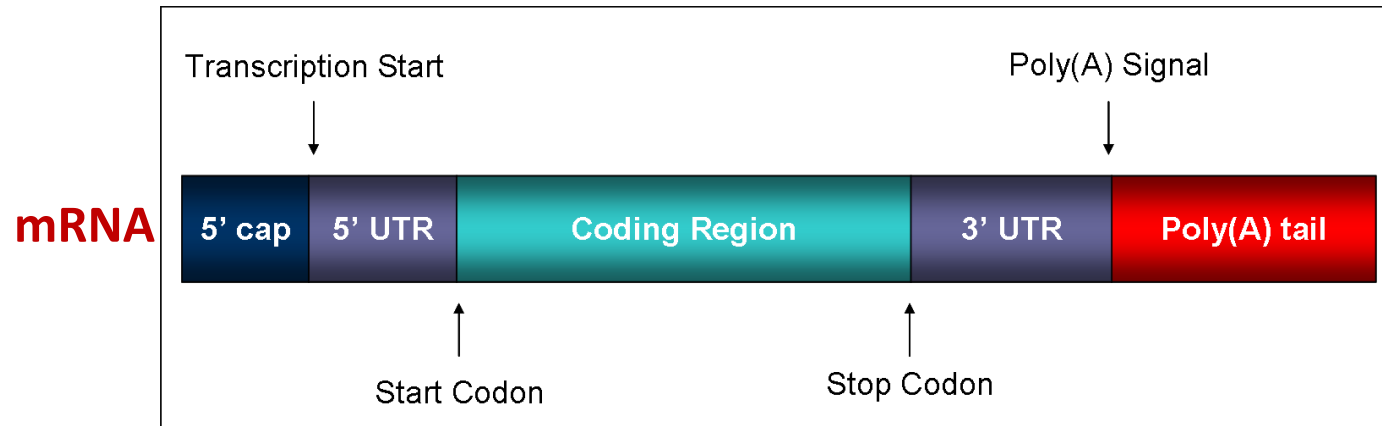


doi: 10.1038/nrm760

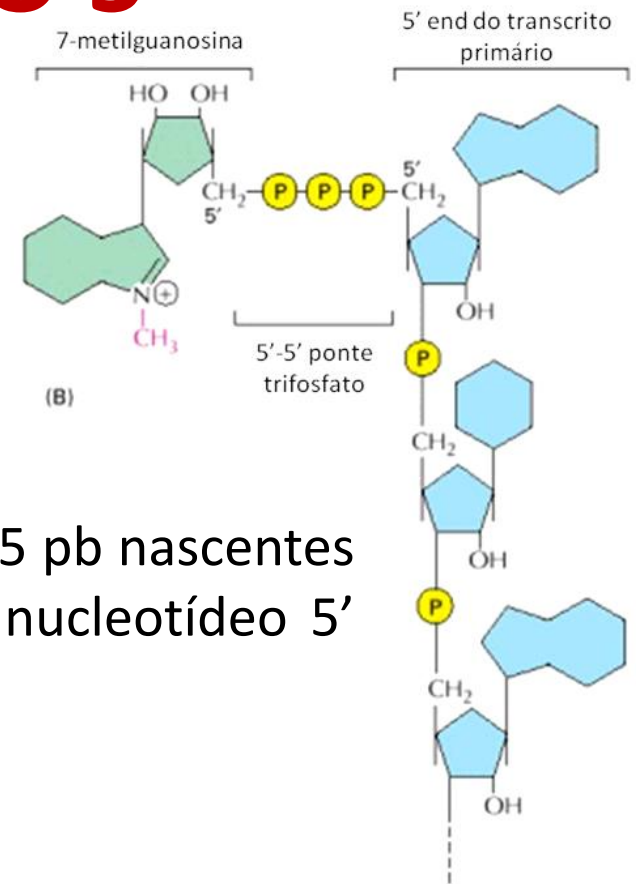
PROCESSAMENTO DO RNA

- **Durante a transcrição** as modificações que podem ocorrer nos transcritos nucleares são basicamente de três tipos:
 - Capeamento ("capping") do terminal 5';
 - Poliadenilação do terminal 3';
 - Montagem de segmentos codificadores ("*splicing*").
- Este conjunto de modificações no transcrito nuclear originará o mRNA, pronto para migrar para o citoplasma.

No RNA transcrito há sequências que sinalizam para seu processamento!!



CAPEAMENTO 5'



Logo após a transcrição, APROXIMADAMENTE 25 pb nascentes há a ligação de 7-metilguanósina ao primeiro nucleotídeo 5' do transcrito de RNA.

FUNÇÕES:

- . Proteger o transcrito do ataque de 5' exonucleases ;
- . Facilitar transporte para citoplasma;
- . Auxilia o encaixe dos ribossomos no mRNA.

POLIADENILAÇÃO

Após o término da transcrição – **clivagem terminal** do RNA;
Adição de cerca **de 200 resíduos de adenilato (AMP)**

FUNÇÕES:

- . Facilitar transporte para o citoplasma;
- . Estabilizar o mRNA;
- . Facilitar a tradução.

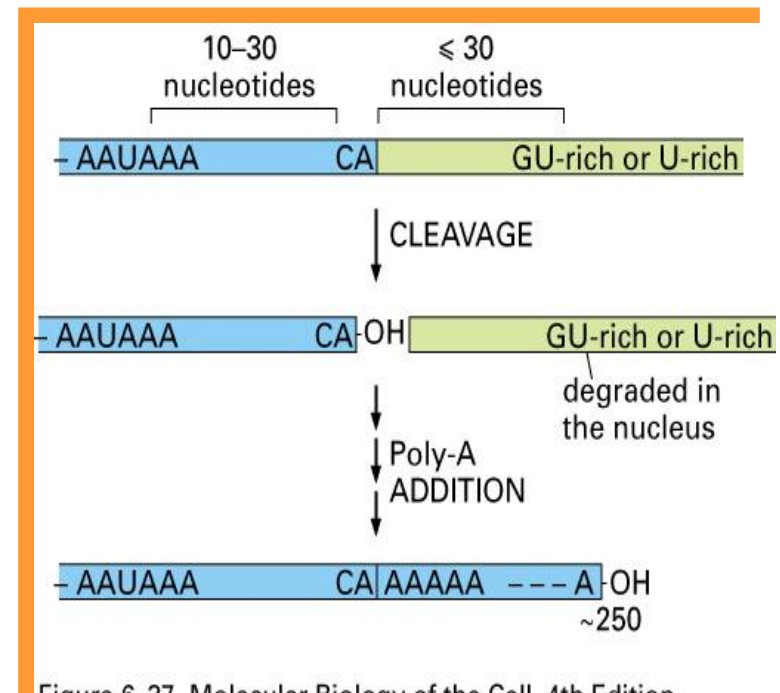
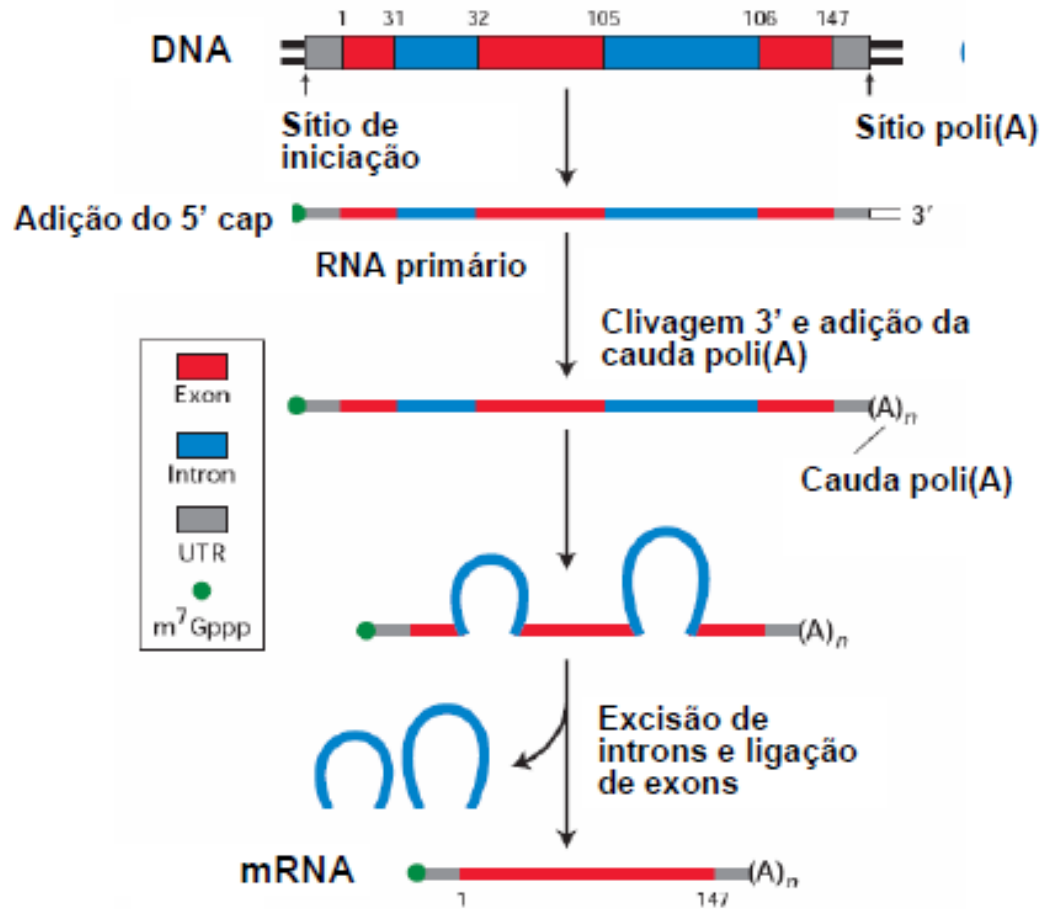


Figure 6-37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

SPLICING



NEM SEMPRE OCORRE NESSA ORDEM!

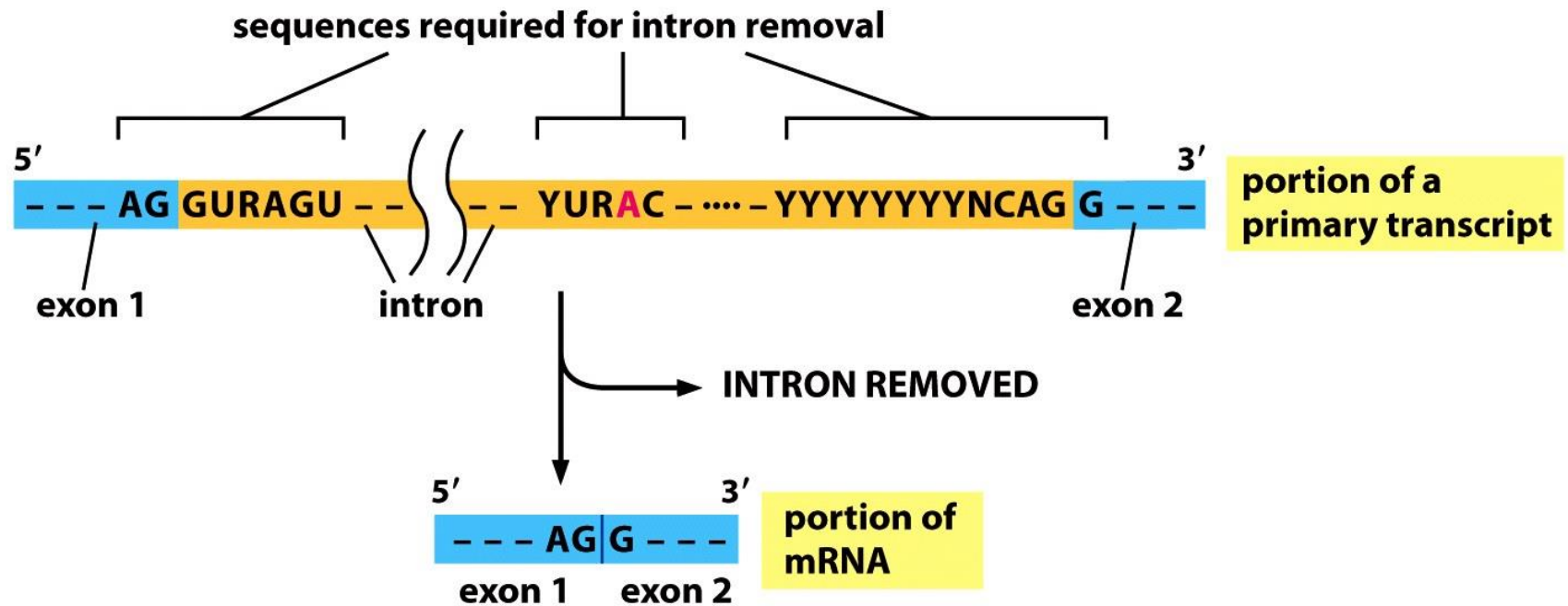
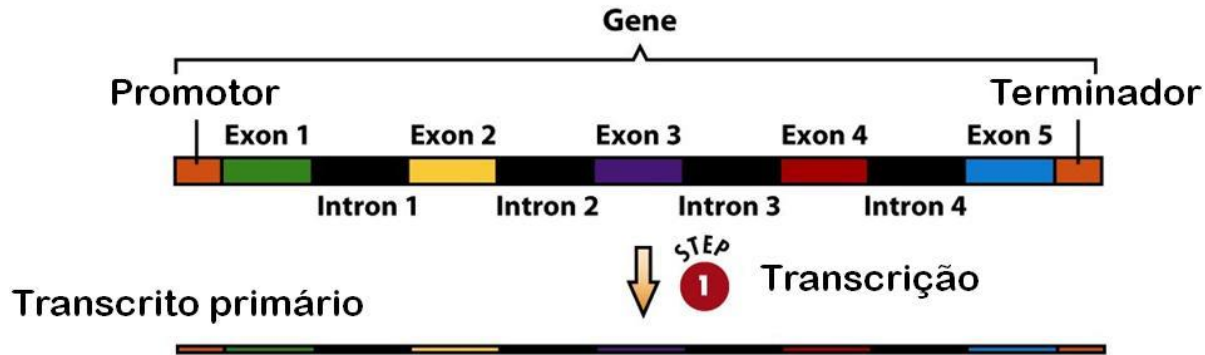


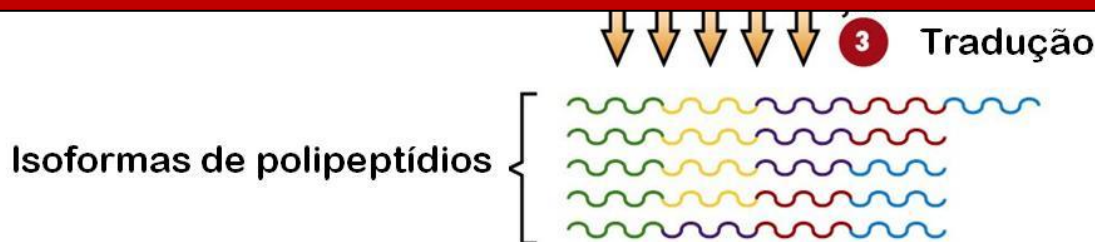
Figure 7-19 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Sequências específicas e snRNA (*small nuclear* RNA – pequenos RNA nucleares) auxiliam junto a proteínas (RPN) na retirada do introns

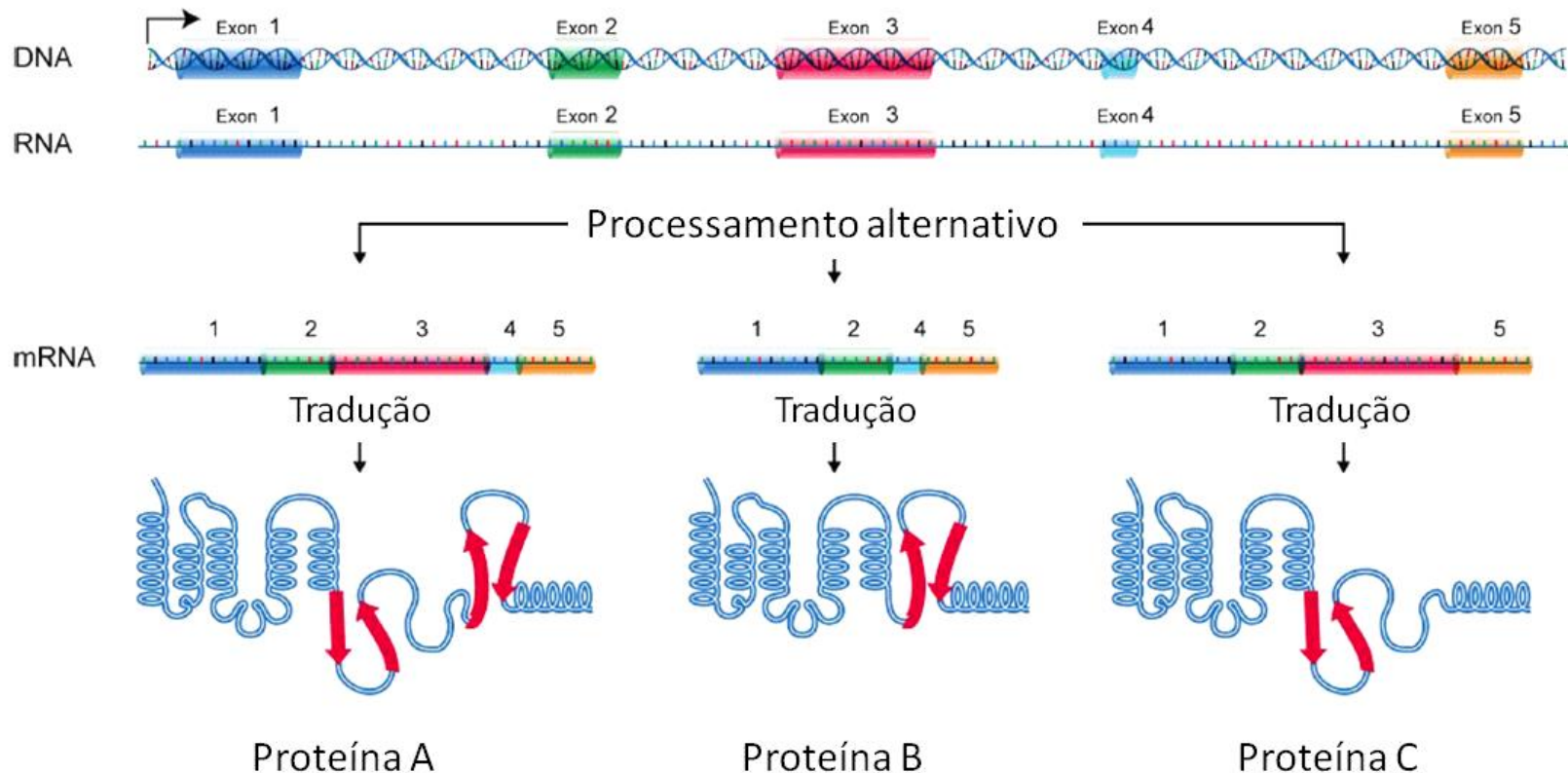
ISOFORMAS DE PROTEÍNAS



“Evolution can seek new solutions without destroying the old ... the genetic material does not have to duplicate to provide a second copy of an essential gene in order to mutate to a new function.” Walter Gilbert

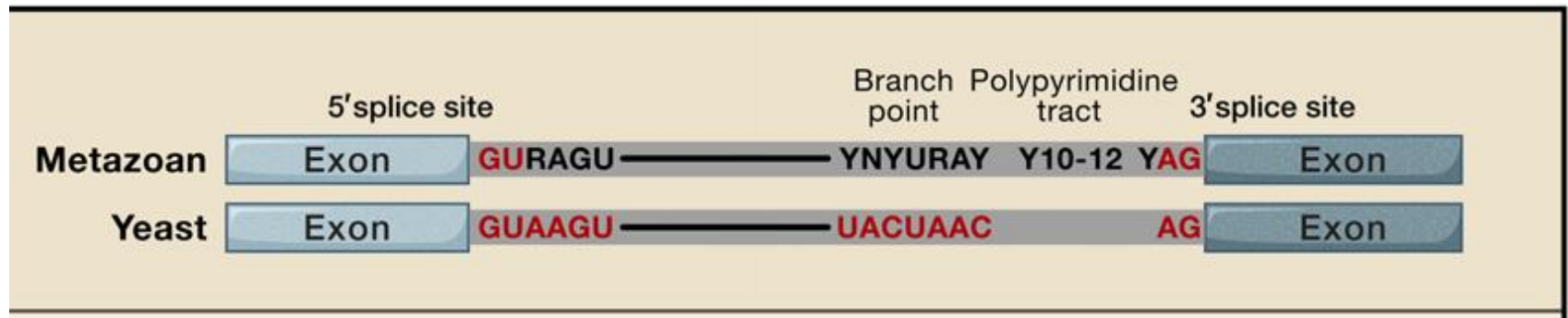


***SPLICING* ALTERNATIVO GERANDO DIVERSAS PROTEÍNAS**



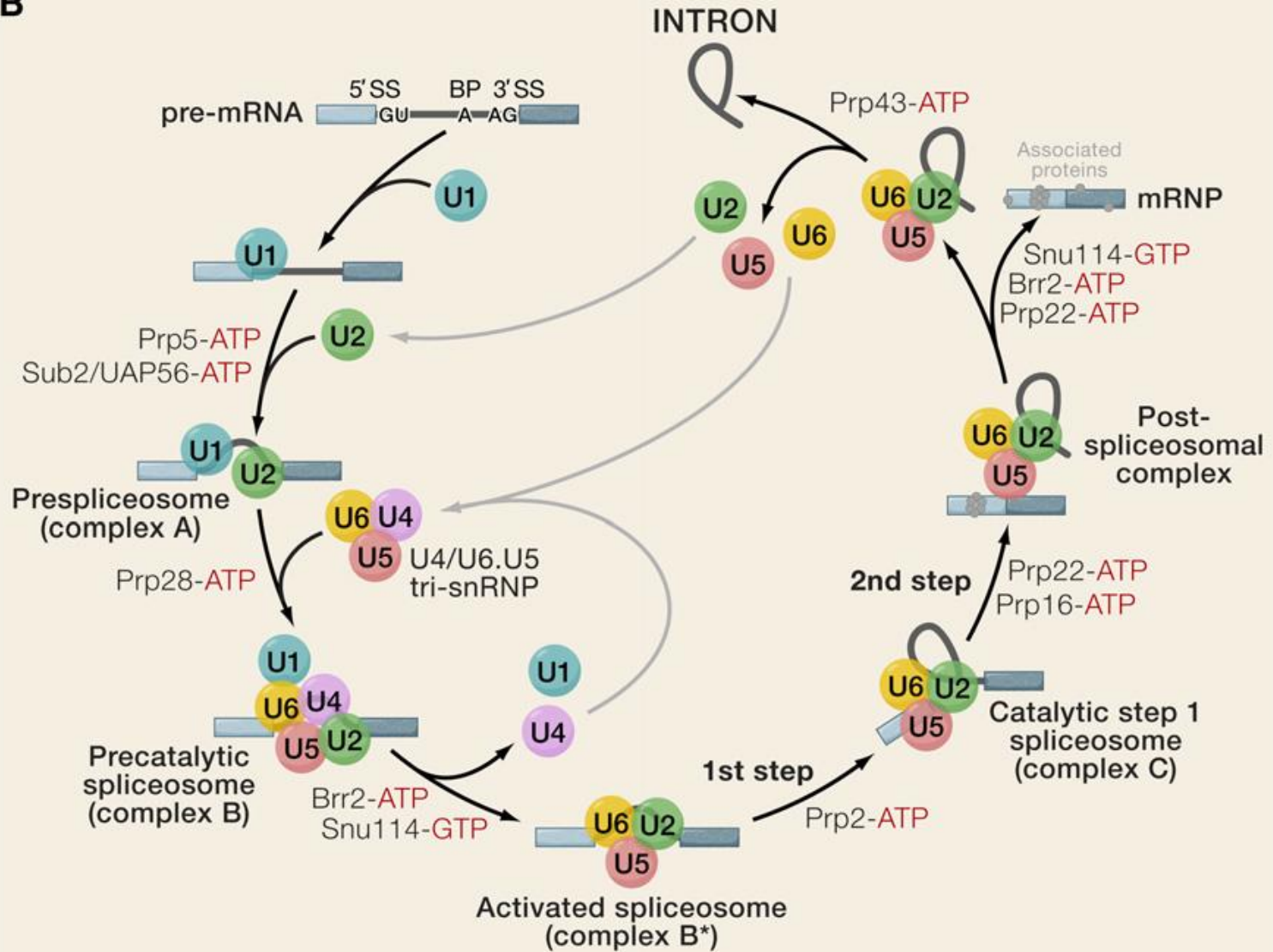
Para proporcionar uma enorme diversidade de proteínas em eucariotos superiores os *spliceossomos* devem não somente catalizar o *splicing* com grande precisão mas também exibir um alto grau de flexibilidade permitindo uma rápida resposta ao sinais regulatórios.

Sequências chaves para o controle do *splicing* ...



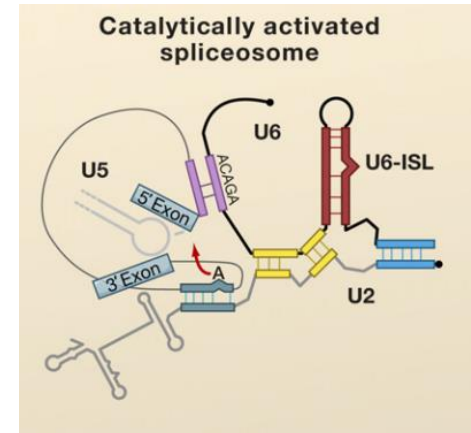
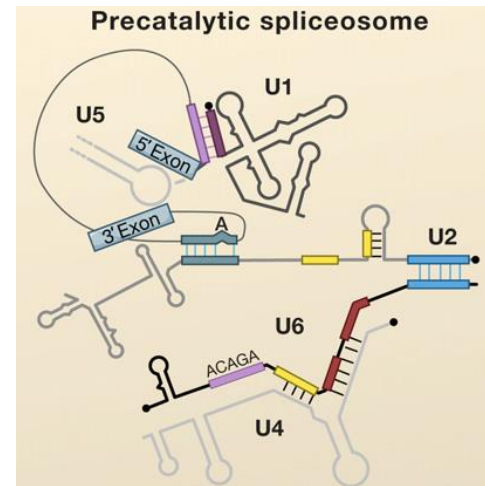
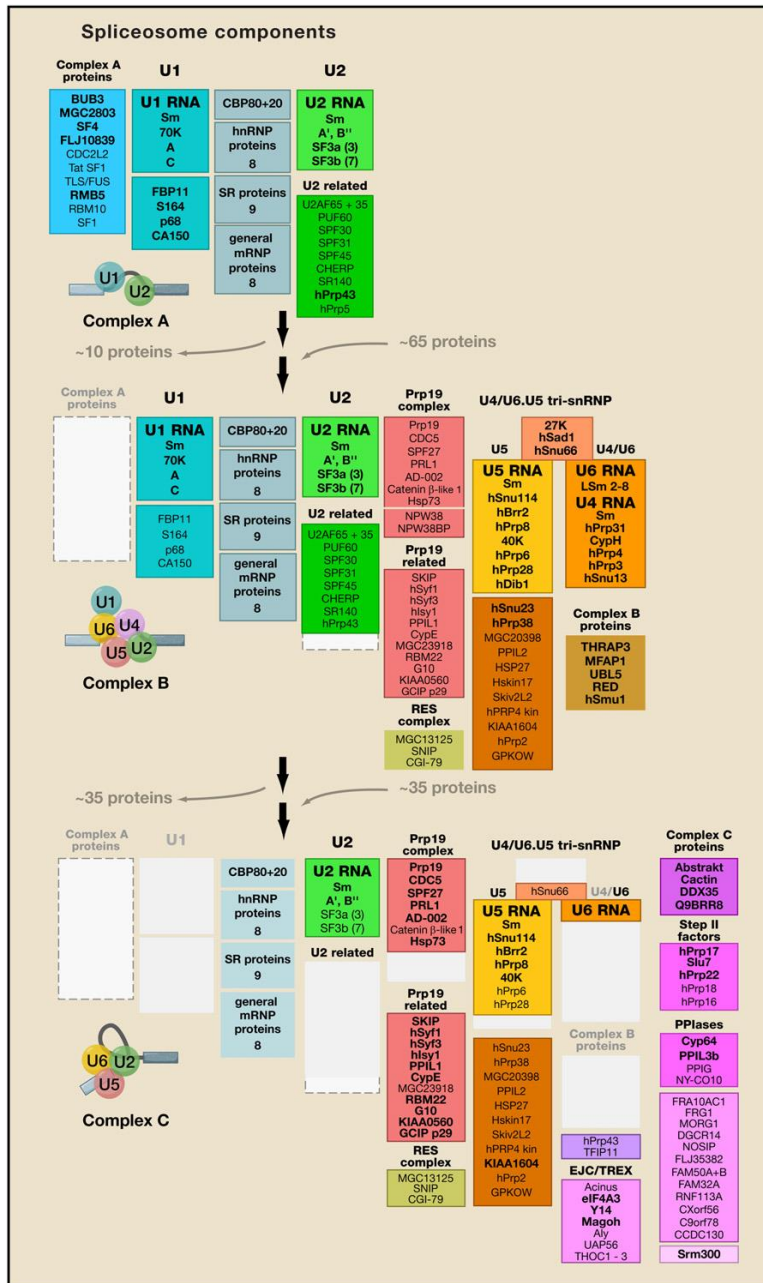
- 5'SS;
- Branch point – sitio de ligação de vários snRNP;
- Sequencias ricas em pirimidinas;
- 3'SS;

Mas como ocorre?

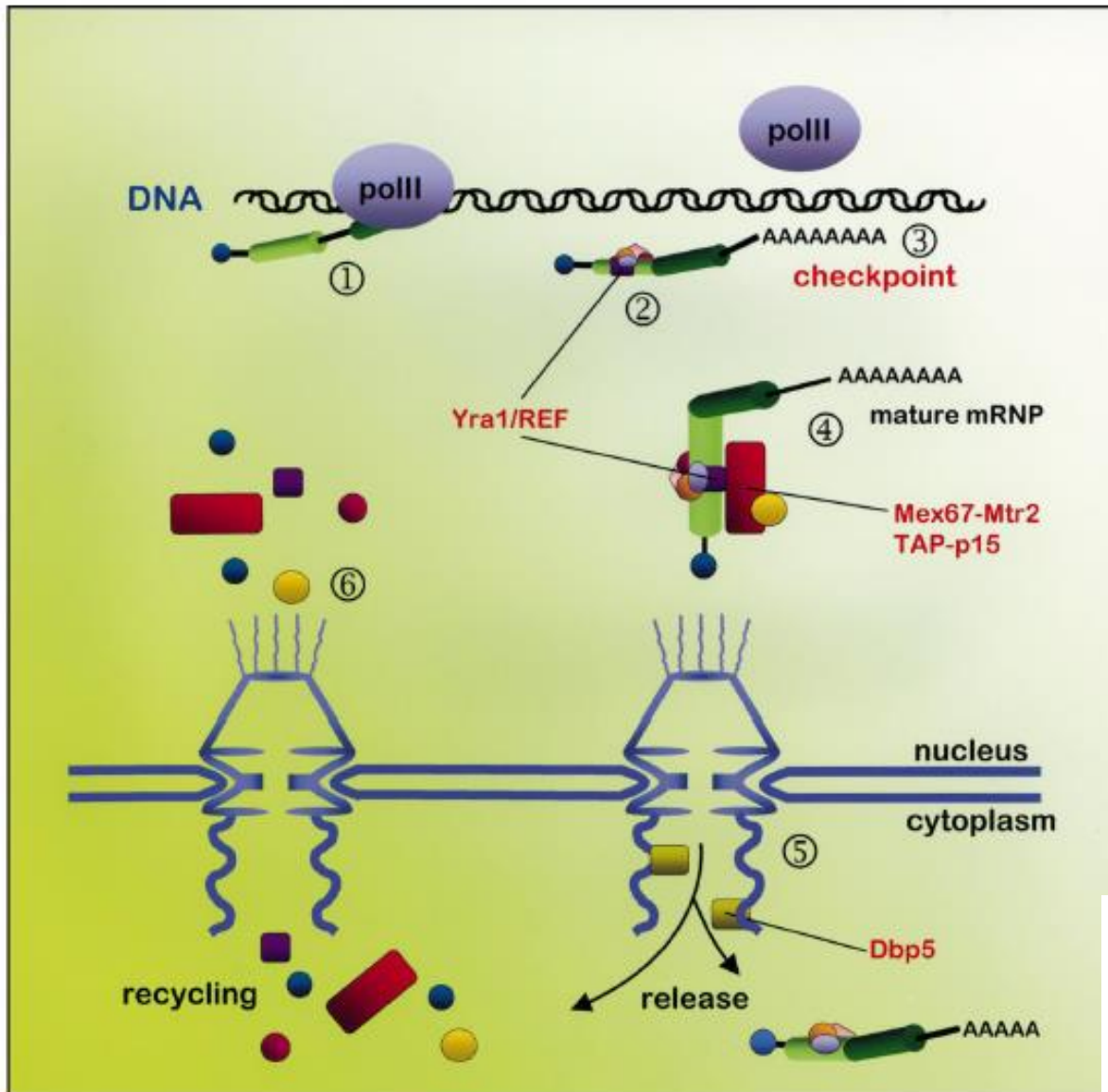
B

É muita proteína envolvida!!!

RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína regem o processo alternativo do RNA!!



EXPORTAÇÃO DO mRPN



Sinalização 20 a 25 pb
upstream de exons
para a ligação aos
receptores de
exportação – *splicing* e
exportação
acoplados!!!

Minireview
Nuclear export of mRNA

Daniel Zenklusen, Françoise Stutz*

Institute of Microbiology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, 44, rue du Bugnon, 1011 Lausanne, Switzerland

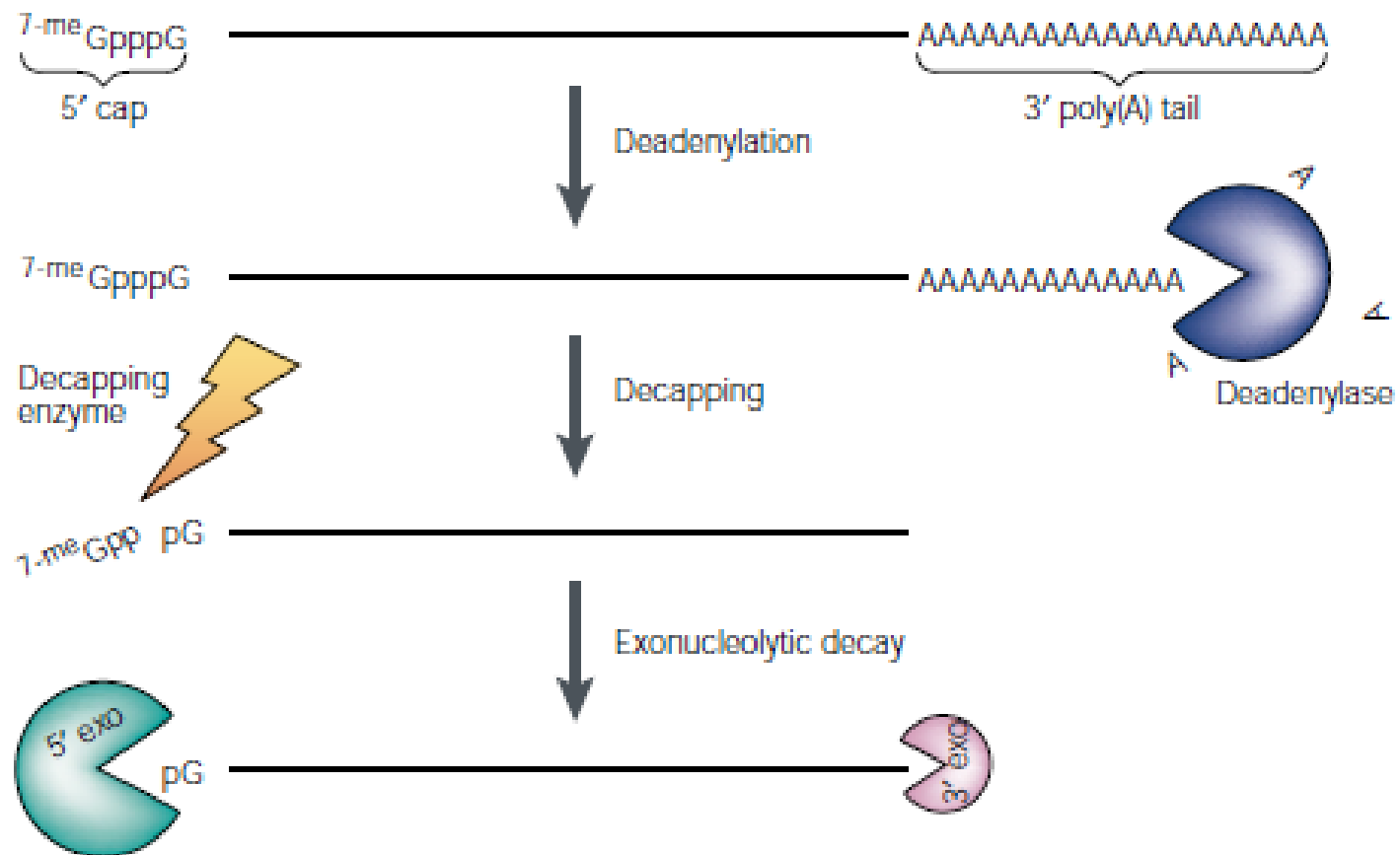
Received 4 May 2001; accepted 4 May 2001

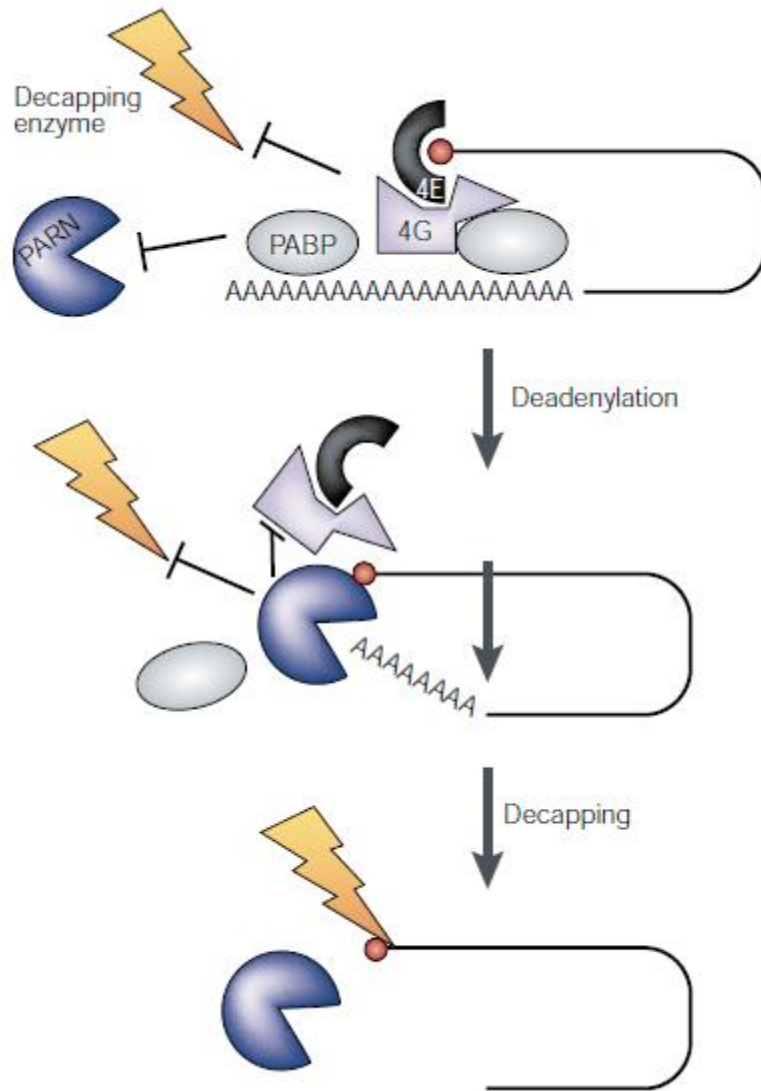
First published online 17 May 2001

Edited by Gunnar von Heijne

THE CAP-TO-TAIL GUIDE TO mRNA TURNOVER

Carol J. Wilusz, Michael Wormington*† and Stuart W. Peltz*†*





Fatores de tradução também protegem o mRNP durante a produção de proteínas.

ETAPAS NO CONTROLE DA EXPRESSÃO

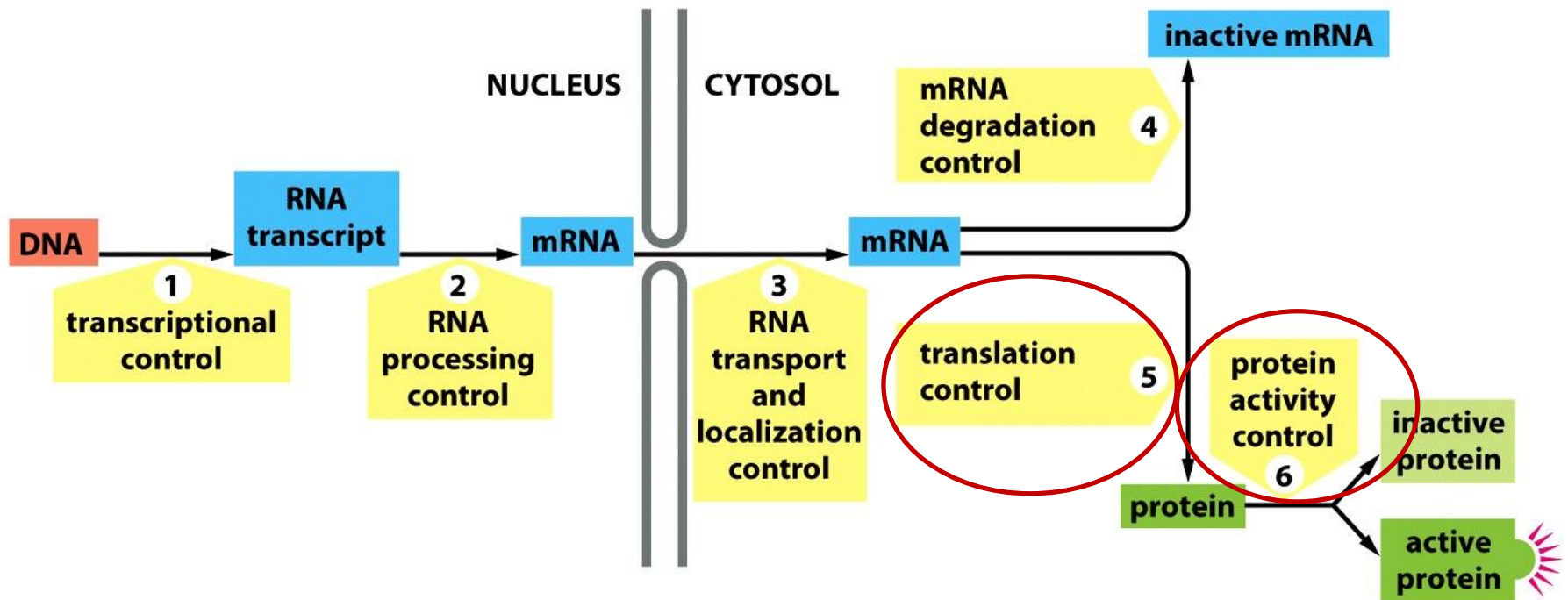
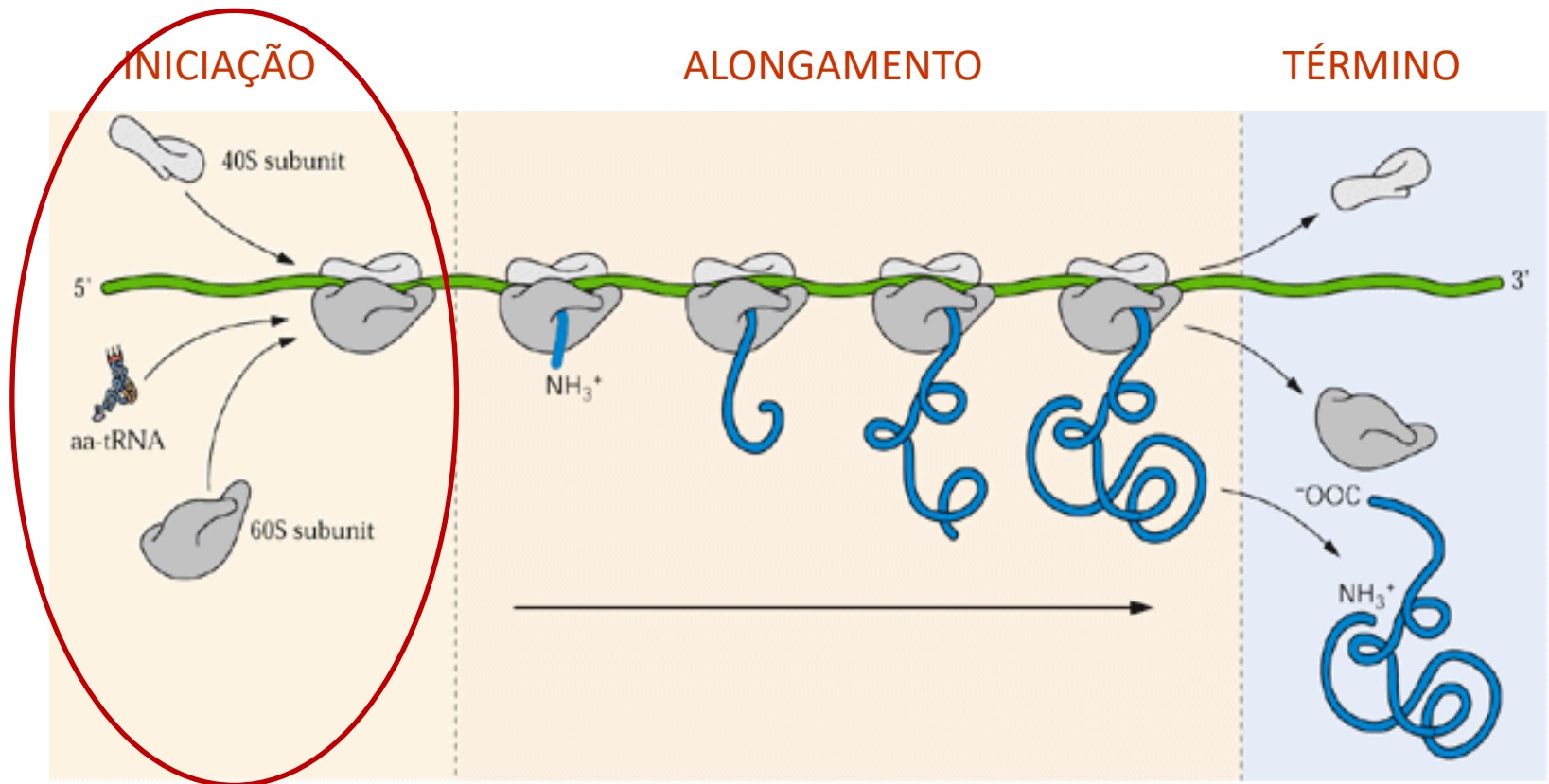


Figure 8-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

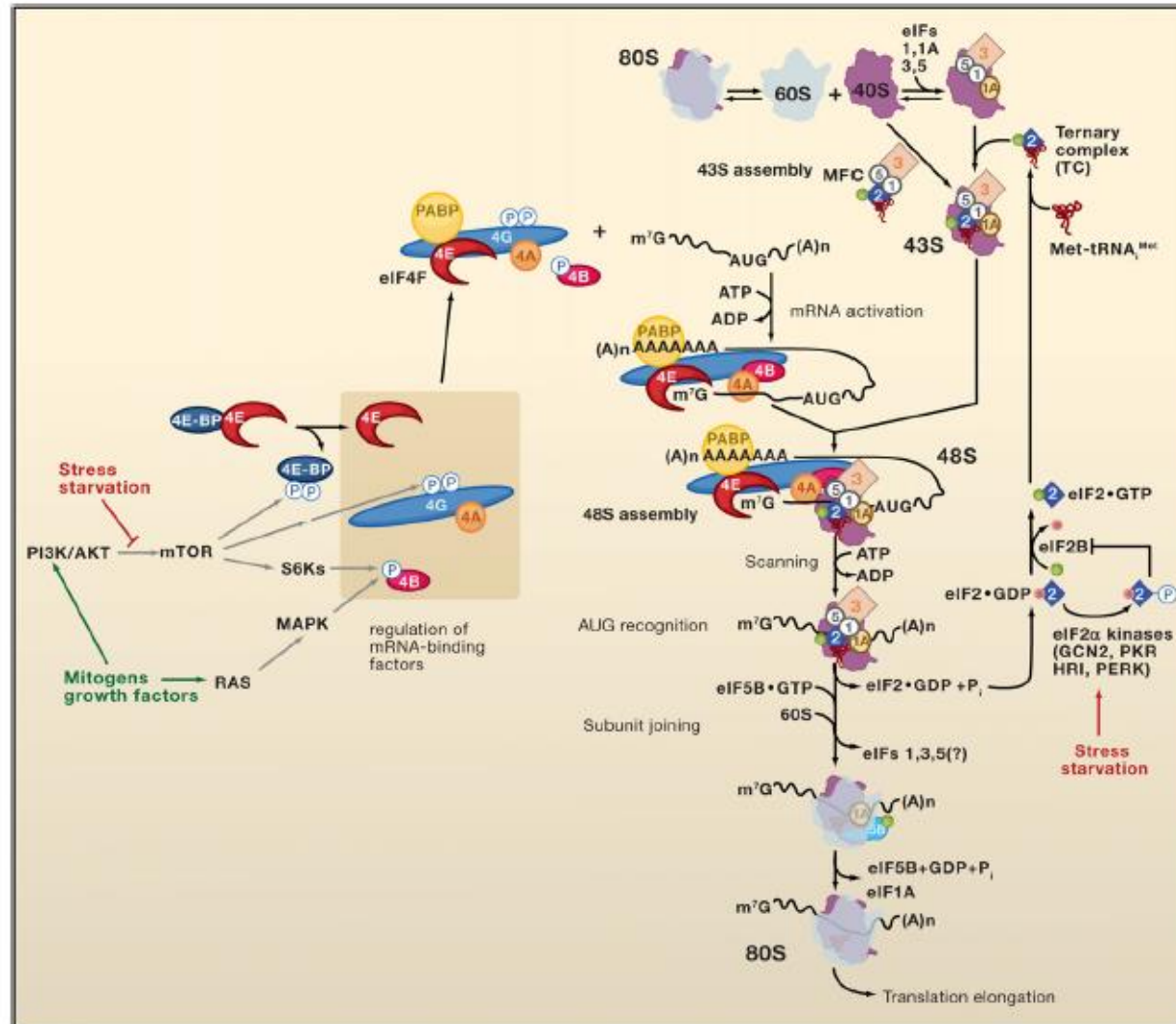
ETAPAS DA TRADUÇÃO



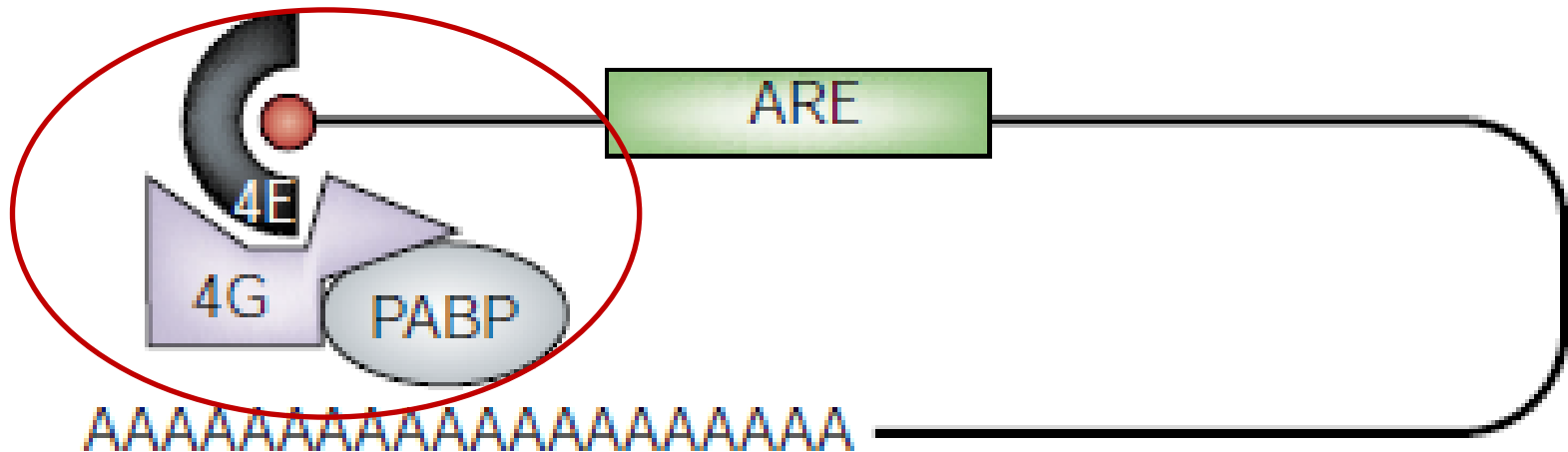
Maior diferença eucarioto x procarioto – **início da tradução**

Eucariotos – iniciação dependente de fatores de iniciação - eIF

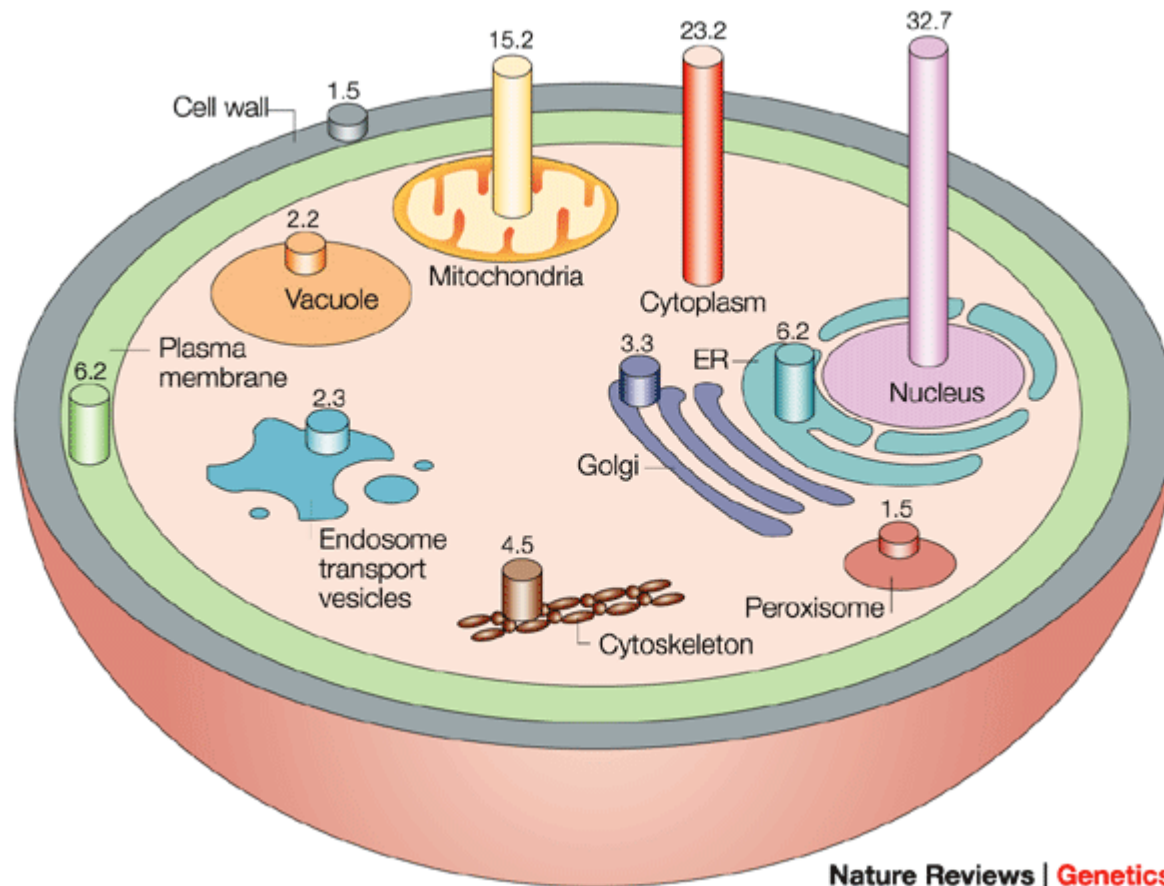
O controle do início da tradução é de vital importância para o controle traducional...



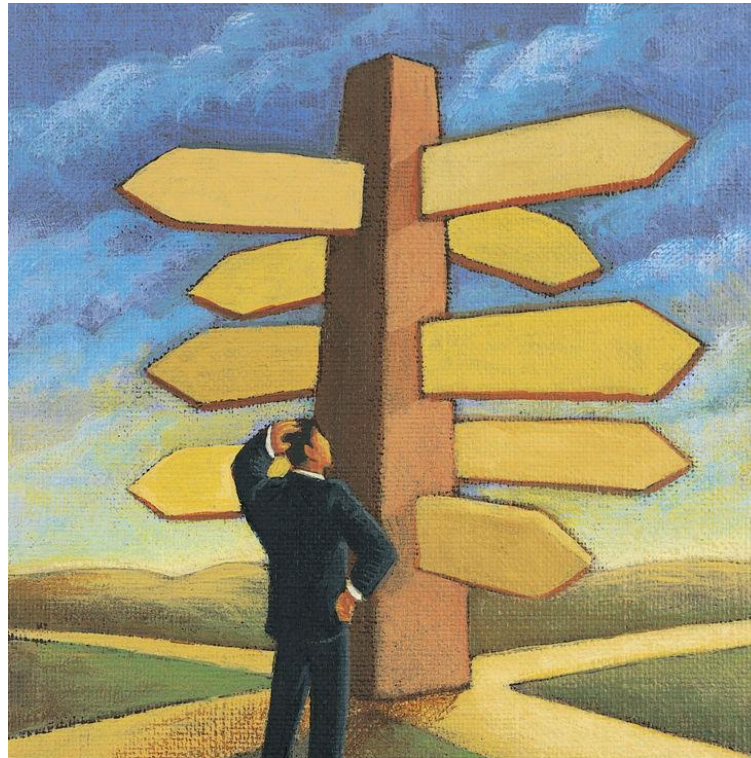
ESTRUTURA DO mRNP E O CONTROLE TRADUCIONAL



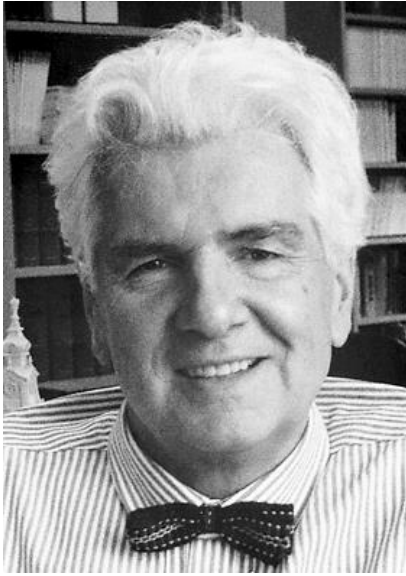
A função de uma proteína está ligada a sua correta localização subcelular e estrutura



Como a célula “sabe” para onde uma determinada proteína deve ser direcionada??



Sequência-Sinal ou Peptídeo-Sinal



Günter Blobel
Nobel em 1999

Sequências específicas de resíduos de aminoácidos
como parte de sua estrutura primária

Responsáveis pelo endereçamento da proteína para
um determinado compartimento celular

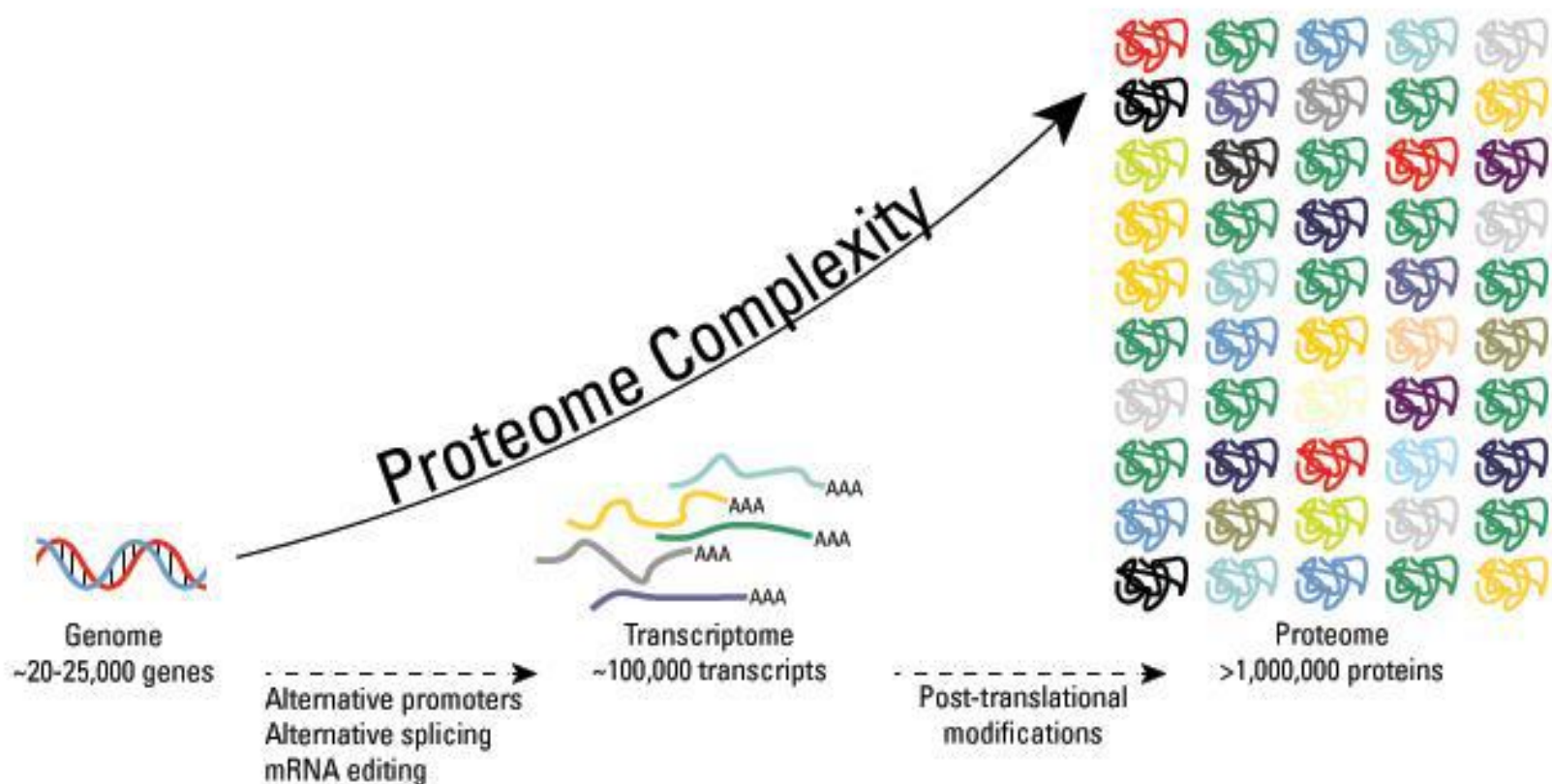


TABLE 12-3 Some Typical Signal Sequences

FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into nucleus	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Export from nucleus	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
Import into mitochondria	⁺ H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	⁺ H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	-Ser-Lys-Leu-COO ⁻
Import into ER	⁺ H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Return to ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻

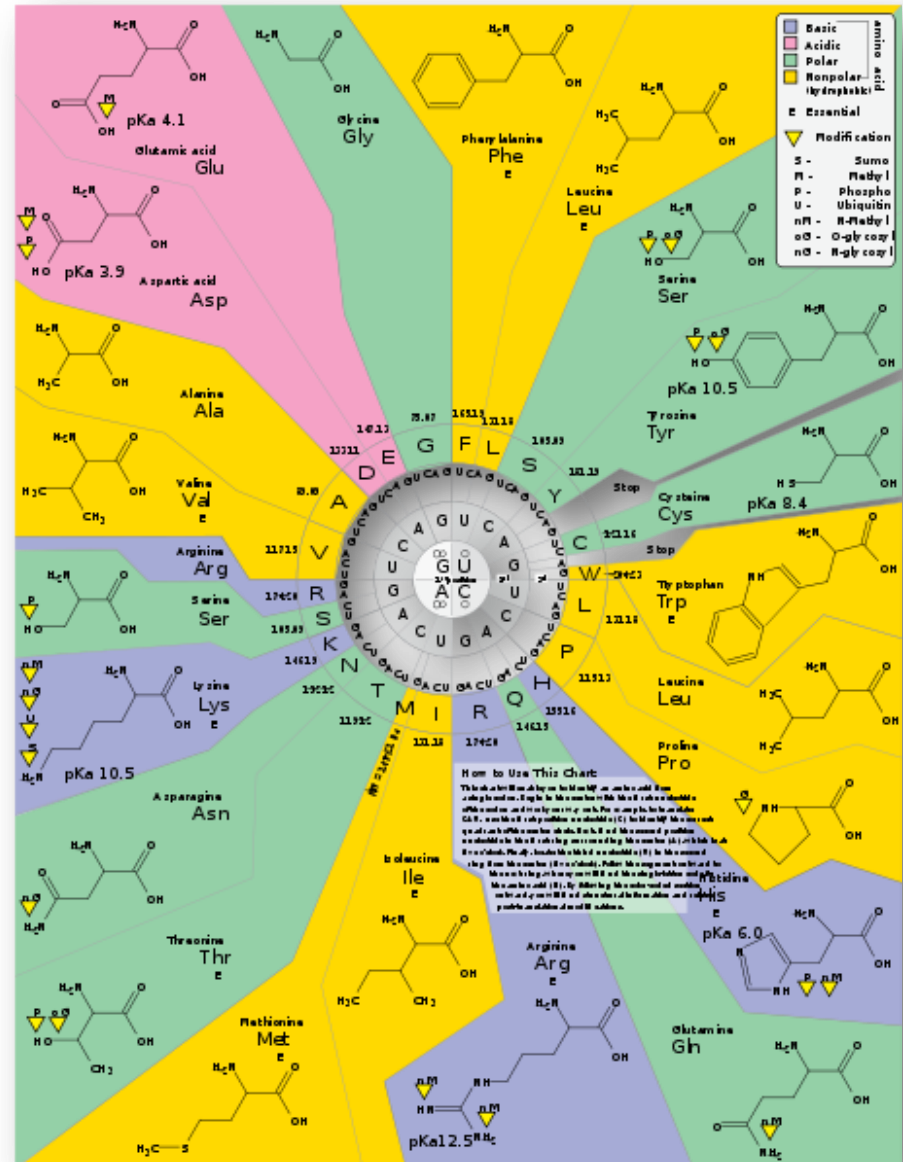
Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *yellow* and hydroxylated amino acids are shown in *blue*. ⁺H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.

Modificações pós-traducionais



Modificações pós-traducionais

- Fosforilação
- Acetilação
- Metilação
- Carbonilação
- Desaminação
- Nitrosilação
- Ubiquitinação
- Glicosilação
- Lipidação



ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceito de transdução de sinal;
2. Controle da expressão em procariotos x eucariotos;
3. Relevância do início da transcrição em procariotos (fatores sigma);
4. Degradação de RNA como mecanismos de controle em procariotos;
5. Entender as etapas do controle da expressão em eucariotos;
6. Papel das proteínas no controle de expressão gênica em eucariotos;
7. Direcionamento de proteínas;
8. Modificações das proteínas após a tradução.

Leitura recomendada:

Fundamentos da Biologia Celular

Albert Bruce

Capítulo 8 – Controle da expressão genica

Genética Molecular Básica: Dos Genes aos Genomas

Carlos F.M. Menck & Marie-Anne Van Sluys

Capítulos 6 e 7

