



ICB5781- Regulação da expressão gênica em células imune

Departamento Imunologia
Instituto Ciências Biomédicas
- Universidade de São Paulo -

2023





- aula introdutória
- formação de 2 grupos para discussão dos artigos
(Turma 1 e Turma 2: **T1 ou T2**)
- formação de grupos para preparo de projeto em grupo
(pensar em perguntas)- apresentação 10-15 min





RNA, transcrição e regulação

Departamento Imunologia
Instituto Ciências Biomédicas
- Universidade de São Paulo -

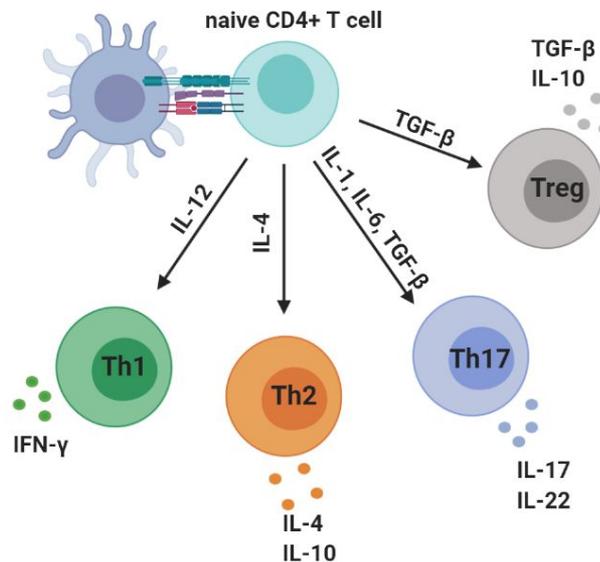
2023





Conjunto de genes que caracterizam:

- Diferentes subtipos de células do sistema imune
- Diferenciação
- Reconhecimento próprio e não-próprio
- Ativação
- Suas funções pró- ou anti-inflamatórias
- Tolerância
- Neuroimune



Created in BioRender.com 



1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

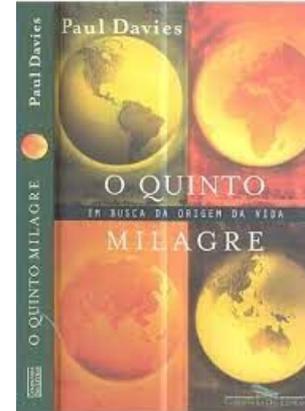
- **Conceito** - O que é gene?

1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- **Conceito** - O que é gene?

Segmento de uma **molécula de DNA** que contém a **informação** necessária para a síntese de um produto **biologicamente funcional**, seja proteína ou RNA, com funções catalíticas ou estruturais.

vida - complexidade - **informação**



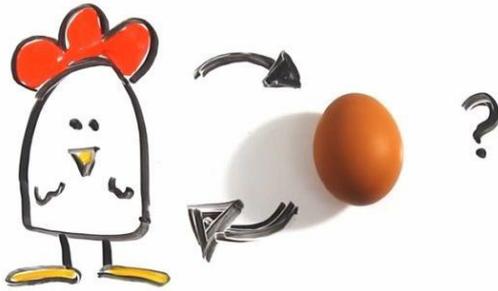
1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- **Conceito** - O que é gene?

Segmento de uma **molécula de DNA** que contém a **informação** necessária para a síntese de um produto **biologicamente funcional**, seja proteína ou RNA, com funções catalíticas ou estruturais.

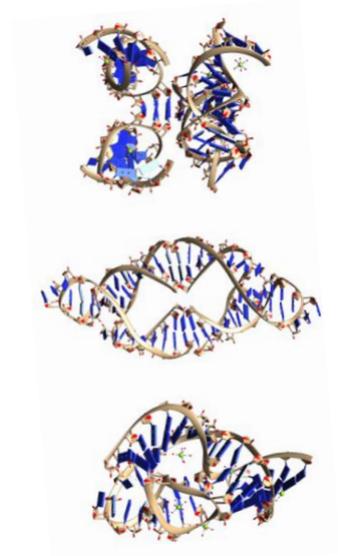
O RNA é a única macromolécula conhecida que tem um papel tanto no armazenamento da informação quanto na catálise

“o que levou a muita especulação a respeito do seu possível papel como intermediário químico no desenvolvimento da vida neste planeta. A descoberta de RNAs catalisadores, ou ribozimas, alterou a própria definição de uma enzima, estendendo-a além do domínio das proteínas”

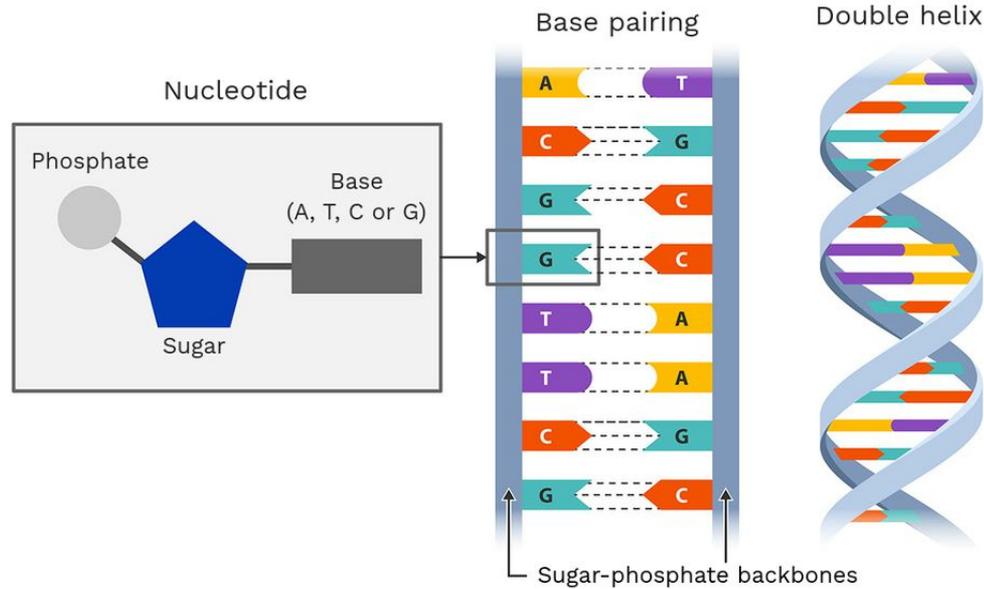


RNA tem função:
catalítica ou ribozima
Liga-se a aminoácidos, DNA e RNA

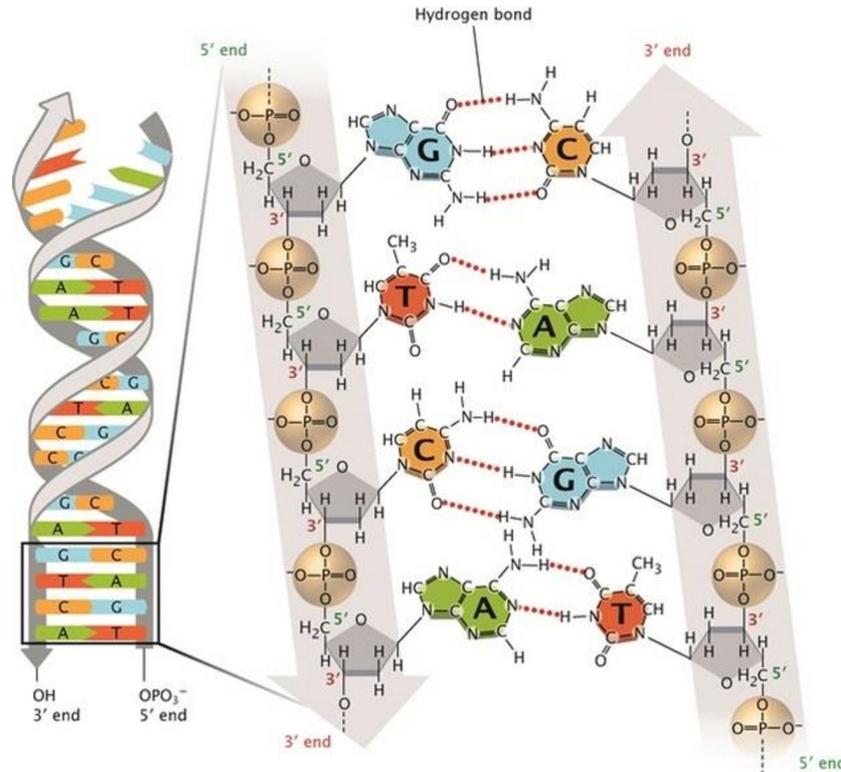
Seleção natural posteriormente favorece a
versatilidade das proteínas e estabilidade do RNA



1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento



1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

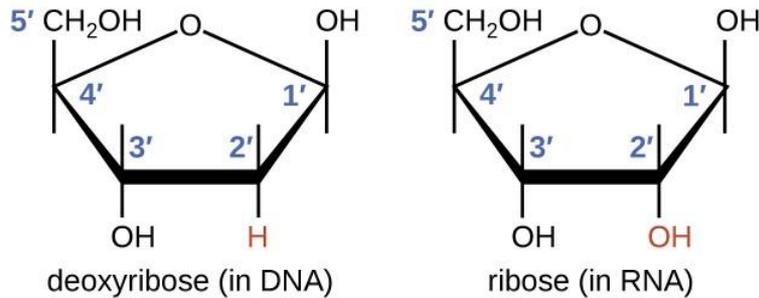


10

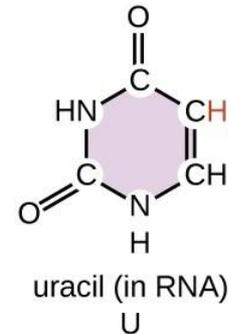
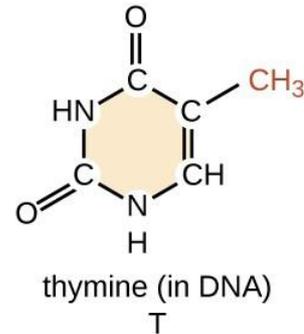
1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

DNA e RNA – diferenças

Desoxirribose e ribose

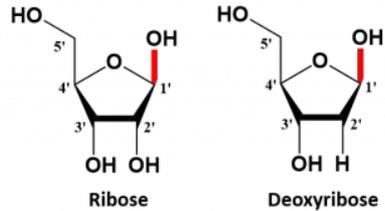
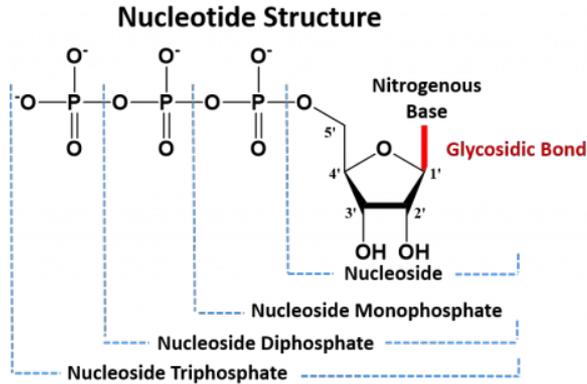


(a)

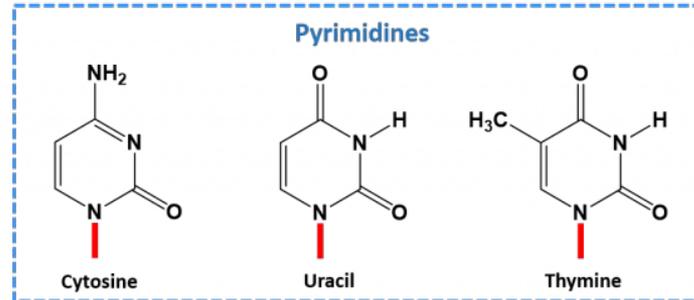
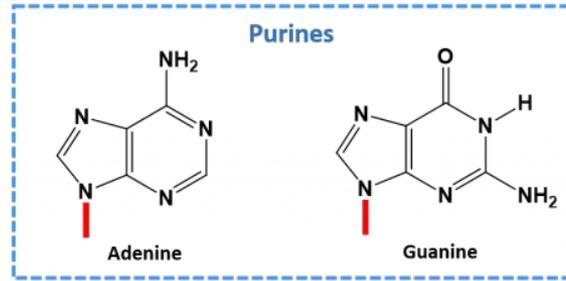


(b)

1.RNA: conceito, estrutura e enovelamento



Nitrogenous Bases

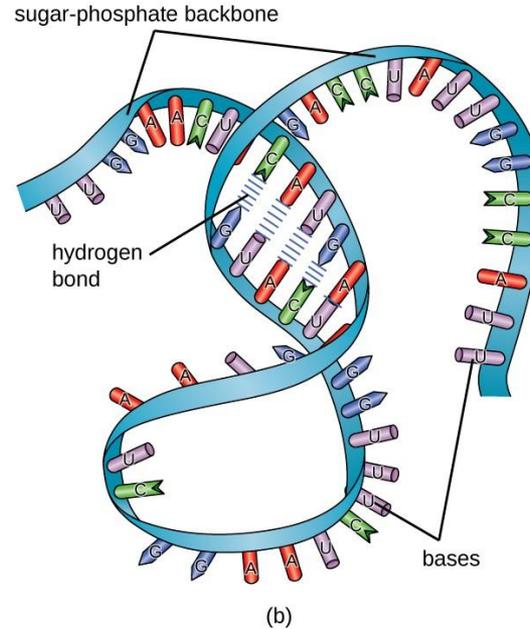
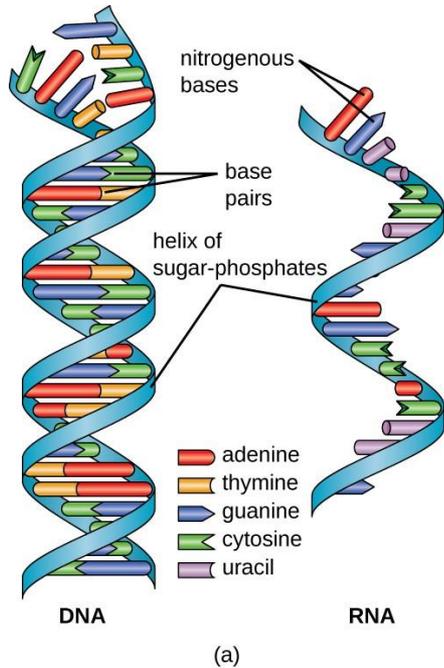




1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

DNA

**RNA – estrutura em fita simples
-dobrar e parear entre si**





1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

RNA – estrutura em fita simples - dobrar e parear entre si

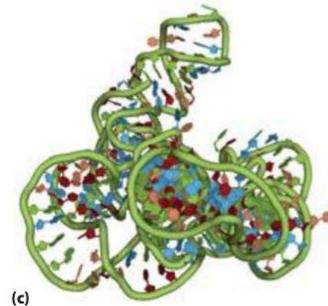
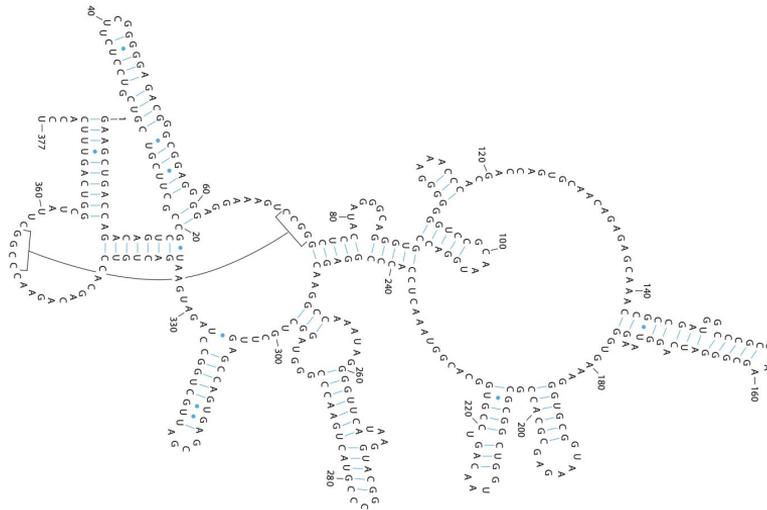
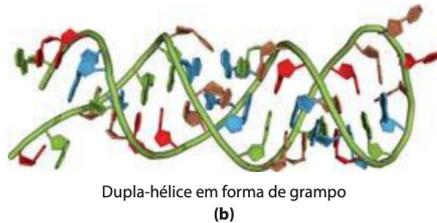
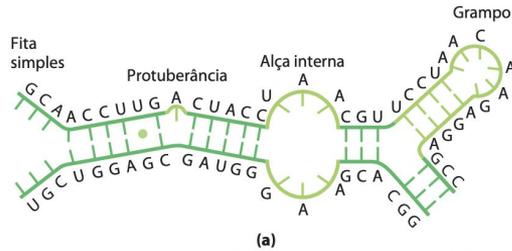


FIGURA 8-23 Estrutura secundária de RNA. (a) Protuberância, alça interna e grampo. (b) As regiões pareadas geralmente têm uma hélice direita na forma A, como mostrado no grampo (derivado do PDB ID 1GID).



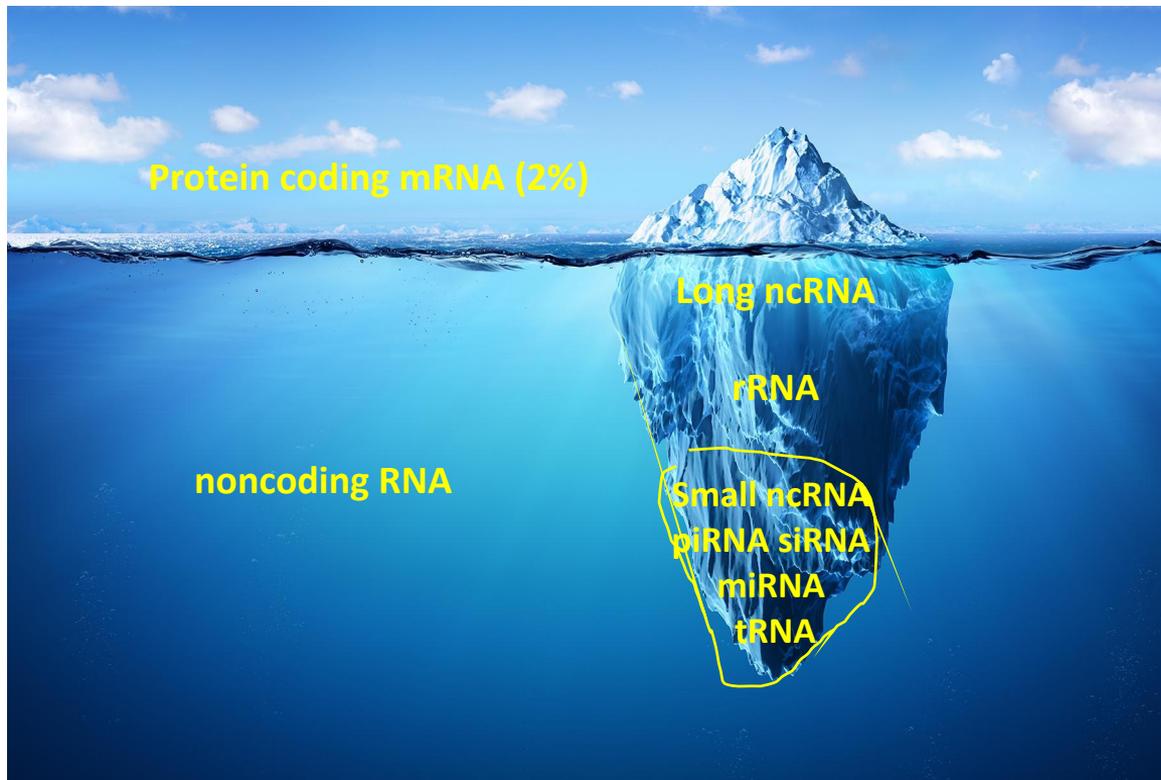


Most of genome is noncoding - **information?**





Most of genome is noncoding - information?





Genome size and number of protein coding genes

Species and Common Name	Estimated Total Size of Genome (bp)*	Estimated Number of Protein-Encoding Genes*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (unicellular budding yeast)	12 million	6,000
<i>Trichomonas vaginalis</i>	160 million	60,000
<i>Plasmodium falciparum</i> (unicellular malaria parasite)	23 million	5,000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	95.5 million	18,000
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	170 million	14,000
<i>Arabidopsis thaliana</i> (mustard; thale cress)	125 million	25,000
<i>Oryza sativa</i> (rice)	470 million	51,000
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	1 billion	20,000–23,000
<i>Canis familiaris</i> (domestic dog)	2.4 billion	19,000
<i>Mus musculus</i> (laboratory mouse)	2.5 billion	30,000
<i>Homo sapiens</i> (human)	2.9 billion	20,000–25,000

* There may be other estimates in the literature, but most estimates approximate those listed here.





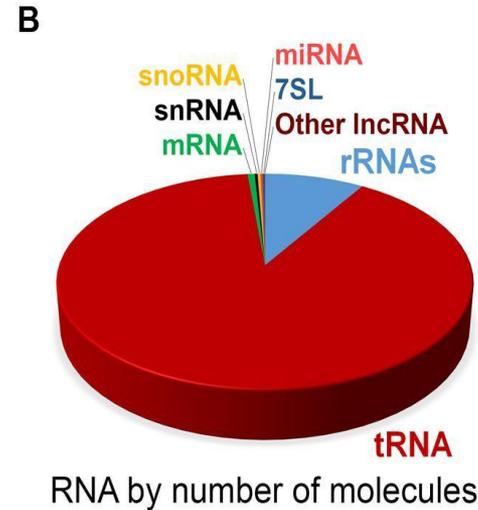
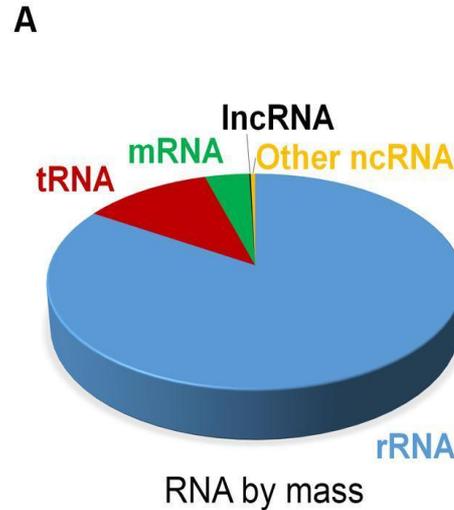
Estimate of RNA levels in a typical mammalian cell

- RNAs
- How many RNA are in the cells?





Estimate of RNA levels in a typical mammalian cell



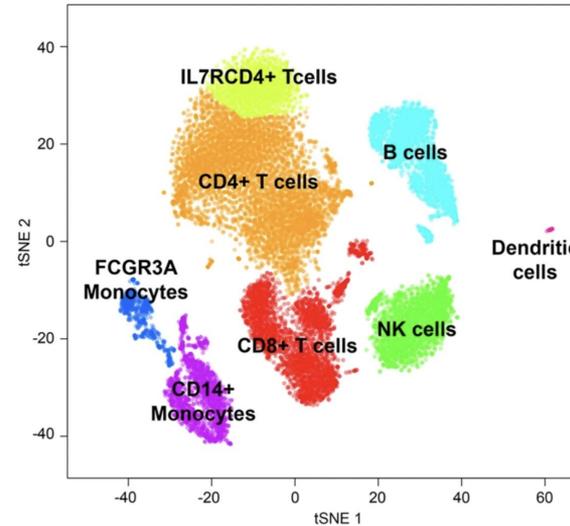
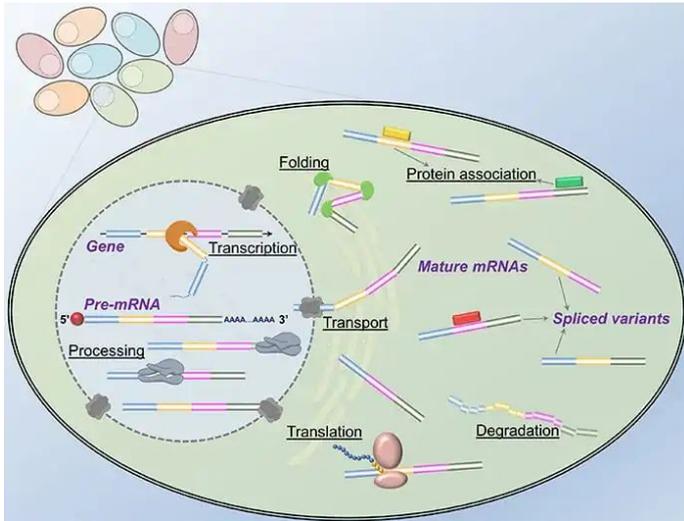
Percentage of Total RNA by mass:
rRNA - 80-90%
mRNA - 3-5%
miRNAs - 0.003-0.02%





1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- Transcriptoma: a soma de todas as moléculas de RNA produzidas em uma célula sob um determinado conjunto de condições

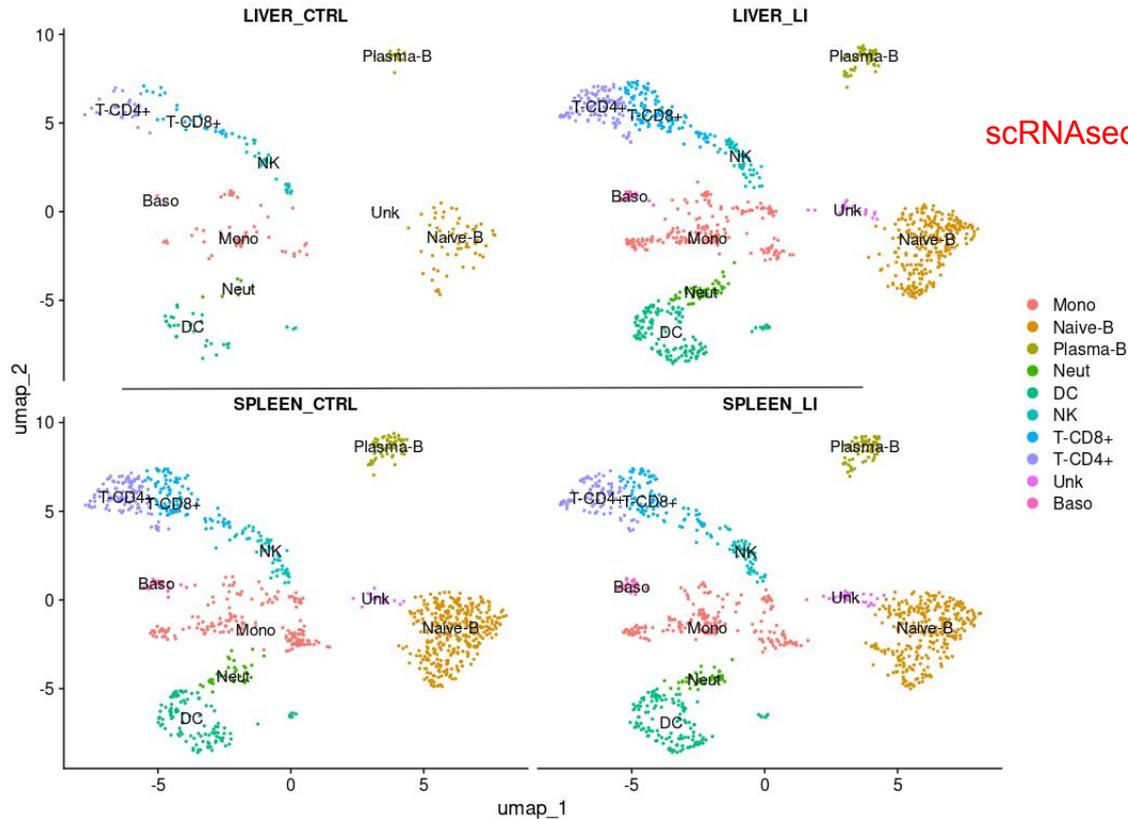
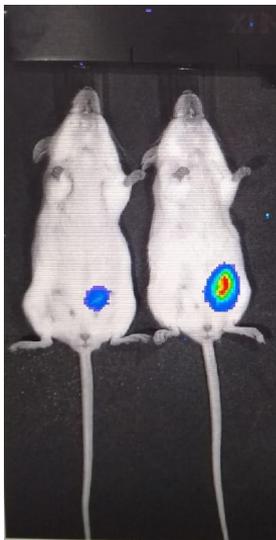


Single-cell Transcriptome Mapping Identifies Common and Cell-type Specific Genes Affected by Acute Delta9-tetrahydrocannabinol in Humans



scRNAseq analysis of BALB/c mice infected with *L. infantum*

BALB-c-mice 3-week infection with *L. infantum*-luciferase

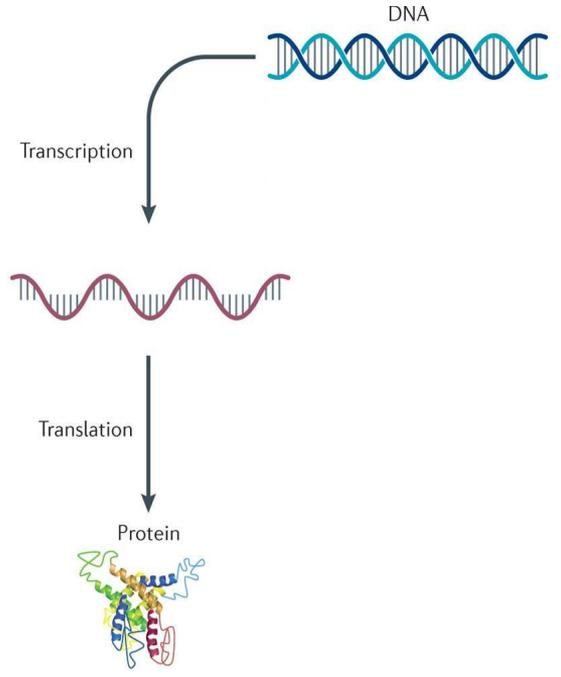


scRNAseq - BD Rhapsody





Regulação da expressão gênica: Non-coding RNAs



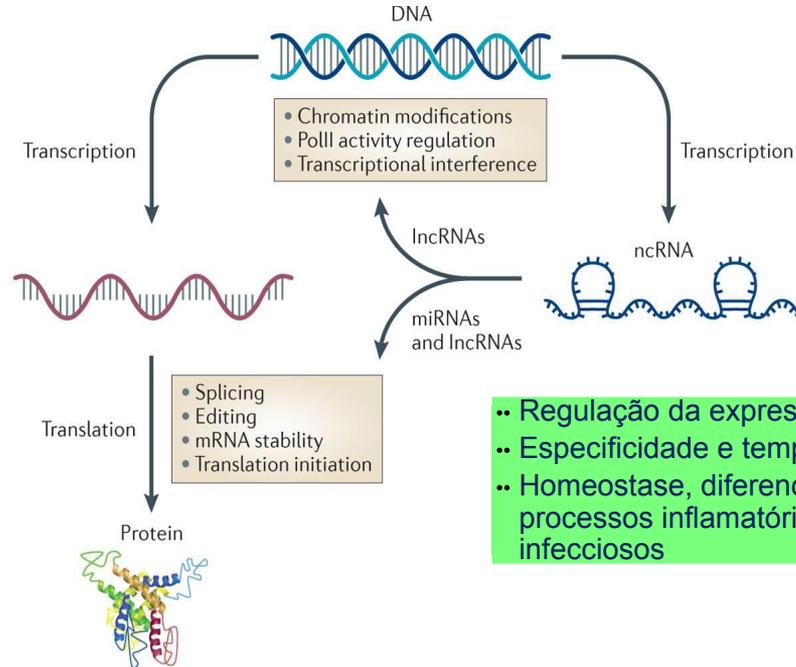
Nature Reviews | Drug Discovery

Claes Wahlestedt, Nature Reviews Drug Discovery, 2013; **Fernandes, JCR, et al. Non-coding RNA, Jan 2019.**





Regulação da expressão gênica: Non-coding RNAs



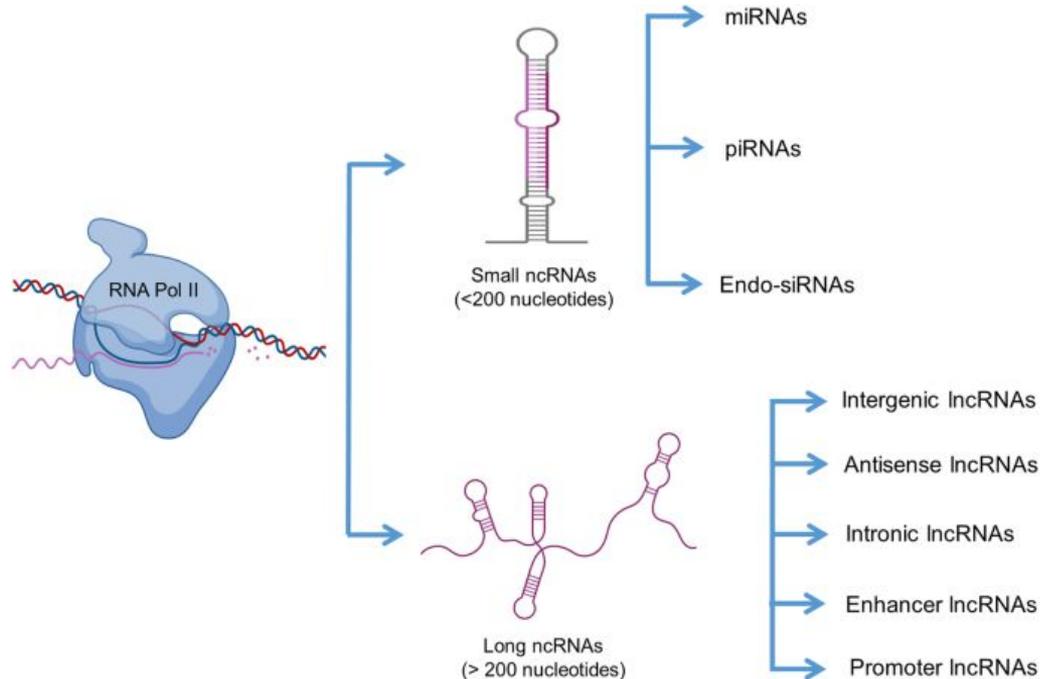
- Regulação da expressão gênica
- Especificidade e tempo
- Homeostase, diferenciação, processos inflamatórios e infecciosos





Classification of non-coding RNAs.

Based on size non-coding RNAs can be divided into small non-coding RNAs and long non-coding RNAs



1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- **tRNA:** transporta o aminoácidos ativados até os ribossomos

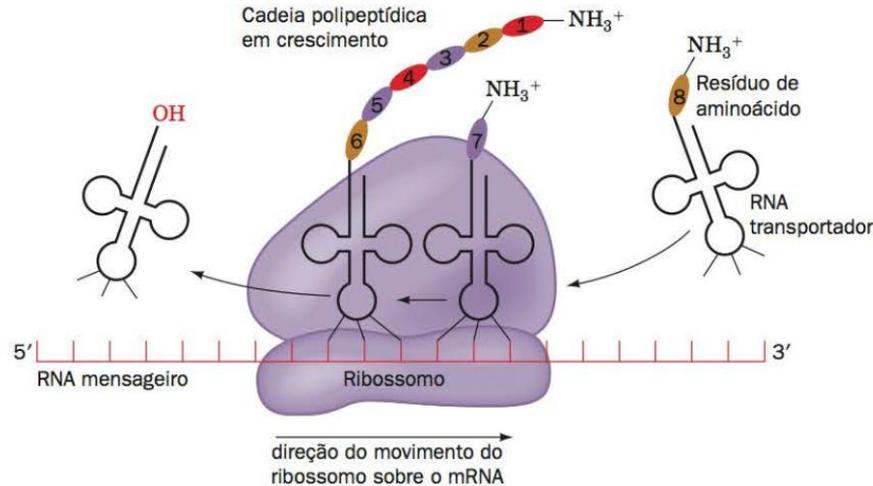


FIGURA 5.28 Diagrama esquemático da tradução. O ribossomo liga-se ao mRNA e a dois tRNAs e facilita a associação específica

1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- rRNA: principal componente dos ribossomos
- ~90% do RNA total das células
- Associado a proteínas ribossomais

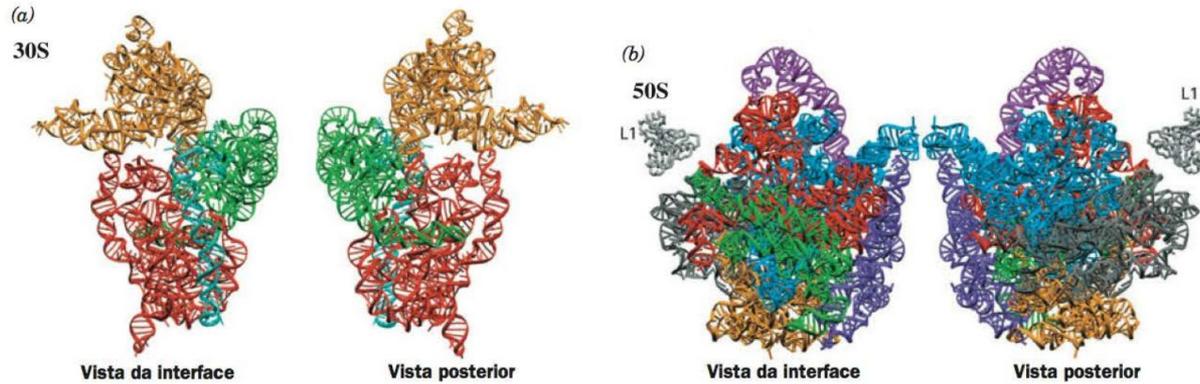
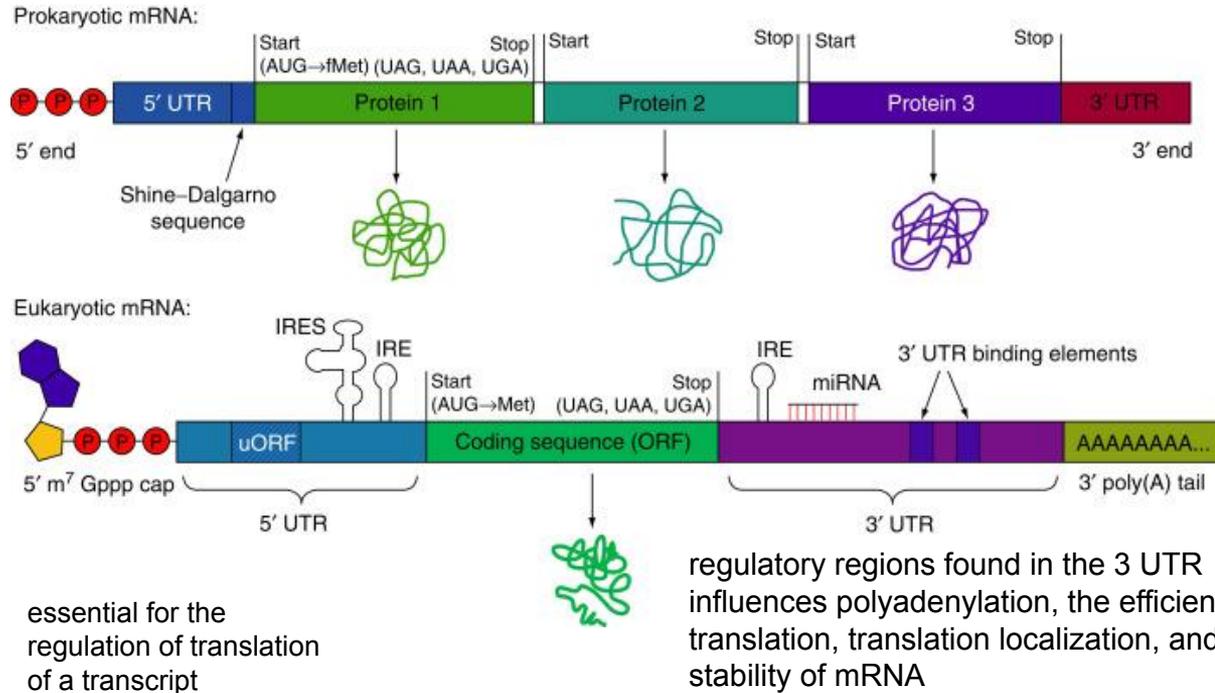


FIGURA 32.31 Estruturas terciárias dos RNAs ribossômicos. (a) O rRNA 16S de *T. thermophilus*. (b) O rRNA 23S de *H. marismortui*. Os rRNAs estão coloridos de acordo com o domínio, como na Fig. 32.27. A vista da interface de uma subunidade ribos-

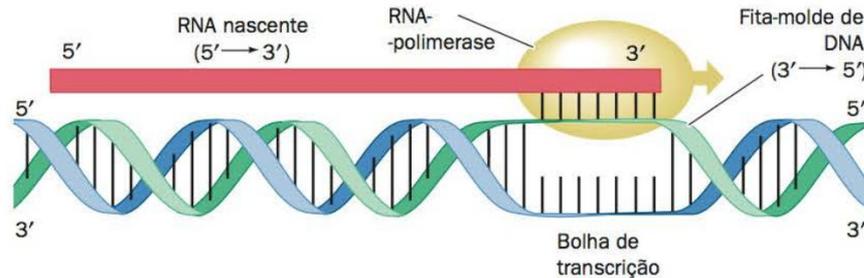
1. RNA: conceito, estrutura e enovelamento

- mRNA: proteínas



2. Transcrição – síntese de RNA

- Síntese de RNA depende do DNA-molde
- RNA-polimerase adiciona ribonucleotídeos a extremidade hidroxila 3', construindo o RNA na direção 5' → 3'
- A fita de DNA molde é copiada na direção 3' → 5' (antiparalela à nova fita de RNA), exatamente como na replicação do DNA.



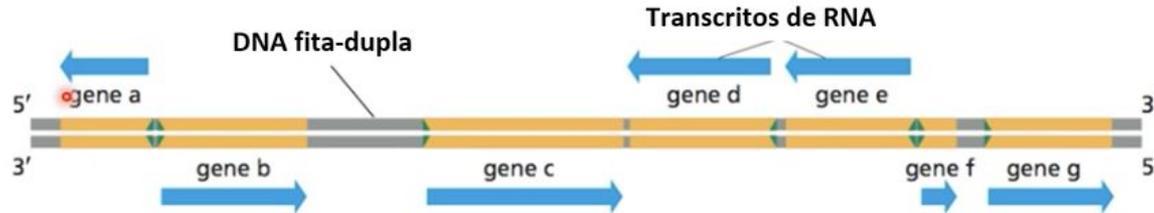
2. Transcrição – síntese de RNA

- Síntese de RNA depende do DNA-molde
- RNA-polimerase adiciona ribonucleotídeos a extremidade hidroxila 3', contruindo o RNA na direção 5' → 3'
- A fita de DNA molde é copiada na direção 3' → 5' (antiparalela à nova fita de RNA), exatamente como na replicação do DNA.



2. Transcrição – síntese de RNA

- Síntese de RNA depende do DNA-molde

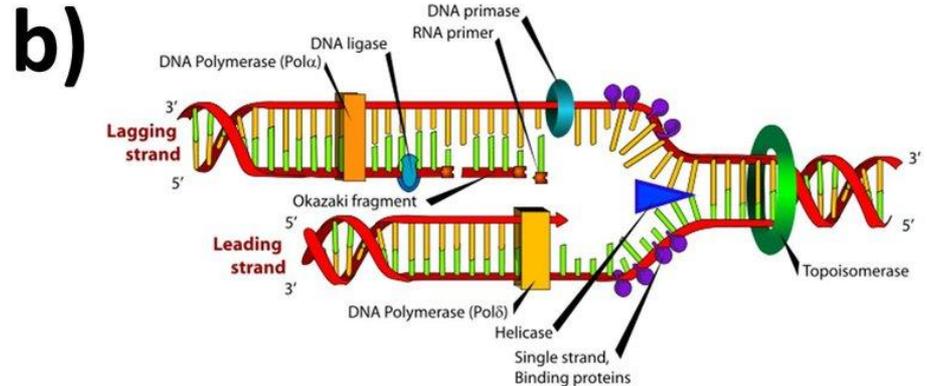
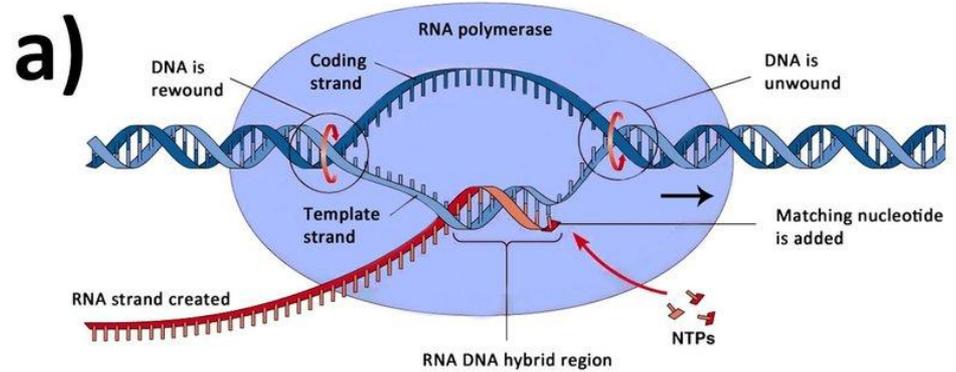


Alguns genes são transcritos de uma das fitas do DNA e outros da outra fita

Transcrição sempre de 5' → 3'

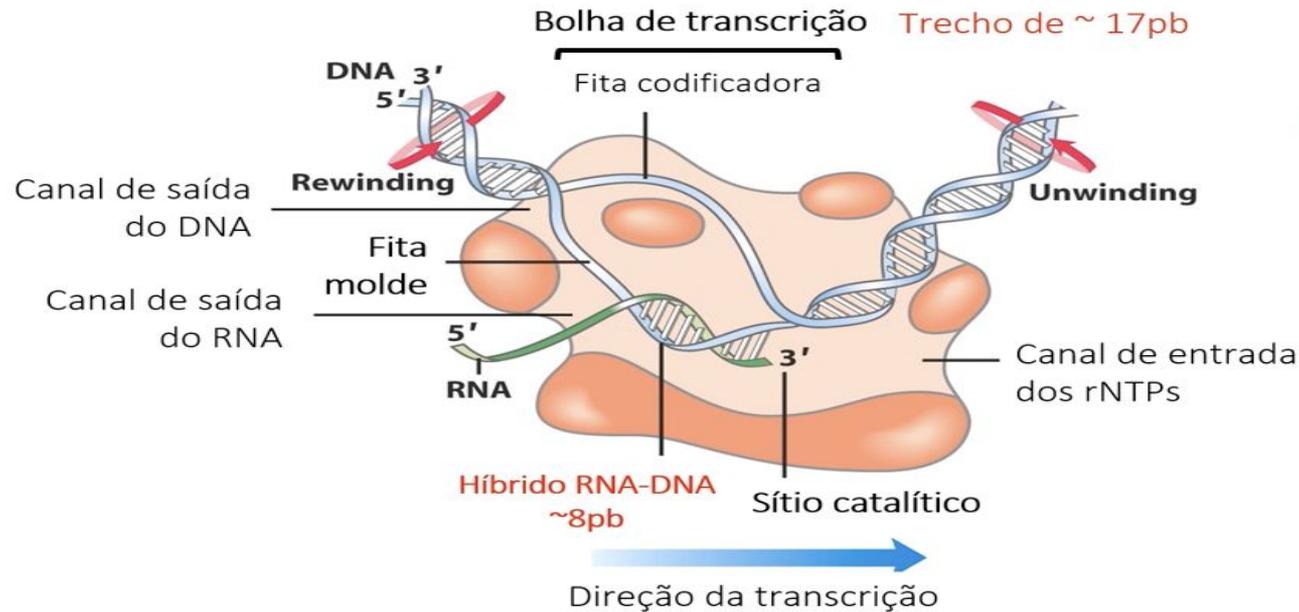
2. Transcrição – síntese de RNA

- Síntese de RNA depende do DNA-molde
- dupla-fita de DNA se desenrola e a RNA-polimerase sintetiza a fita complementar de RNA



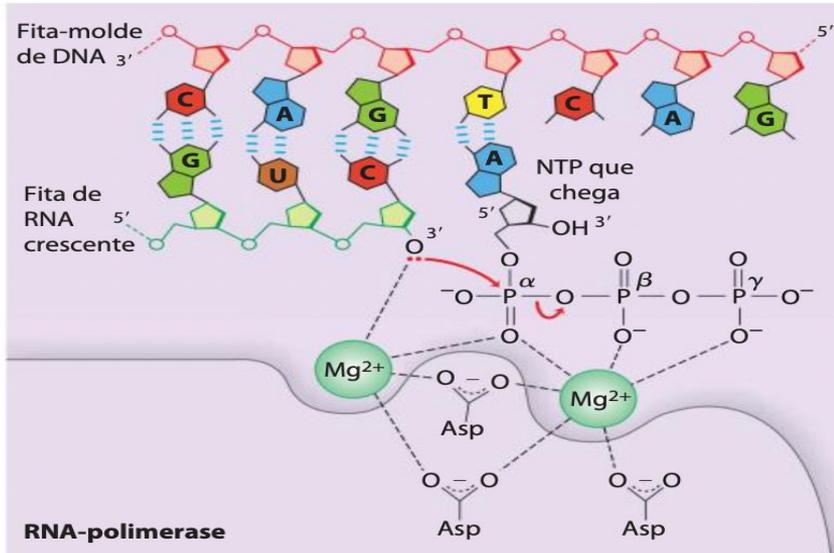
2. Transcrição – síntese de RNA

- holoenzima da RNA-polimerase da *E. coli* – síntese de RNA



2. Transcrição – síntese de RNA

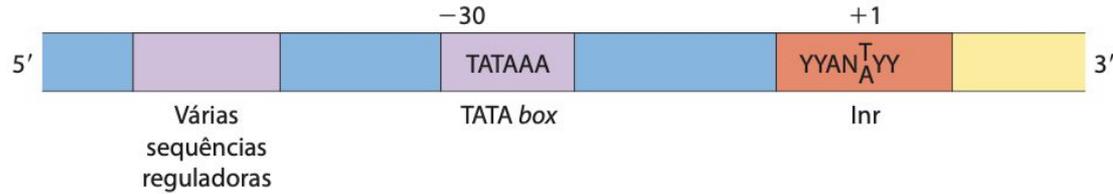
- Síntese de RNA depende do DNA-molde
- **RNA-polimerase dependente de DNA:**



- DNA-molde
- os quatro ribonucleosídeos 5'-trifosfatos (ATP, GTP, UTP e CTP) como precursores das unidades de nucleotídeos de RNA
- Liga ao Mg²⁺
- **não precisa de iniciador como a DNA-polimerase, pois se liga a sequências específicas no DNA (promotores)**

2. Transcrição – síntese de RNA

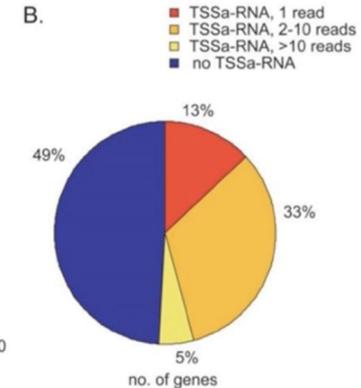
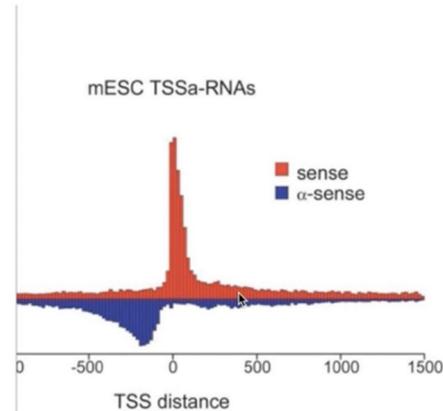
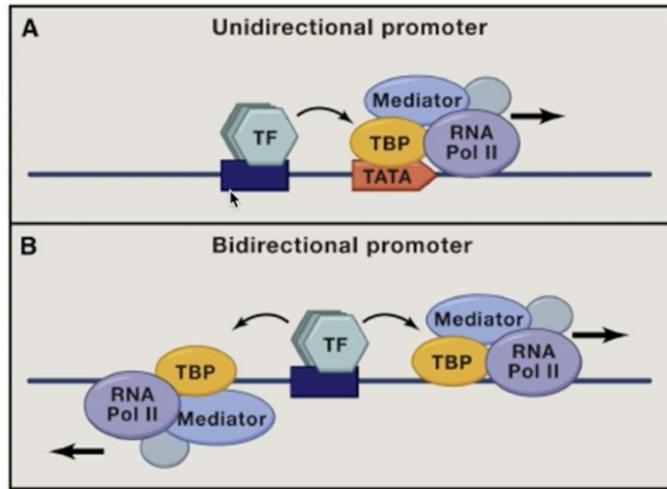
- RNA-polimerase em eucariotos
- **RNA-polimerase II** – síntese de mRNAs, RNAs reguladores, RNAs não codificadores de proteínas e alguns RNAs especializados –
- promotores da Pol II apresentam algumas sequências em comum:
TATA *box* (sequência consenso de eucariontes TATA(A/T)A(A/T)(A/G)) próxima do par de bases –30 e uma sequência Inr (iniciador) próxima do sítio de início do RNA em +1



2. Transcrição – síntese de RNA

- RNA-polimerase em eucariotos - promotor unidirecional ou bidirecional
- Duas fitas podem ser copiadas, seguindo a transcrição 5'--> 3'

RNA POL II engajada - transcrição nas duas direções em relação ao promotor



37

2. Transcrição – síntese de RNA

- **RNA-polimerase II** – numerosos fatores protéicos são associados - complexidade adicional da polimerase de eucariontes.

TABELA 26-2 Proteínas necessárias para iniciação da transcrição nos promotores da RNA-polimerase II (Pol II) de eucariontes

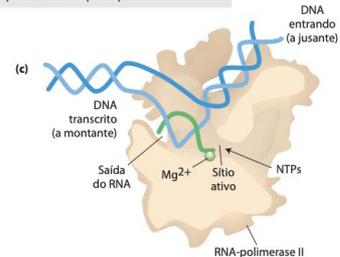
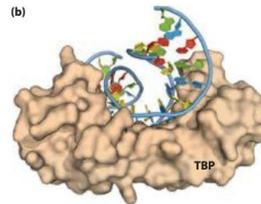
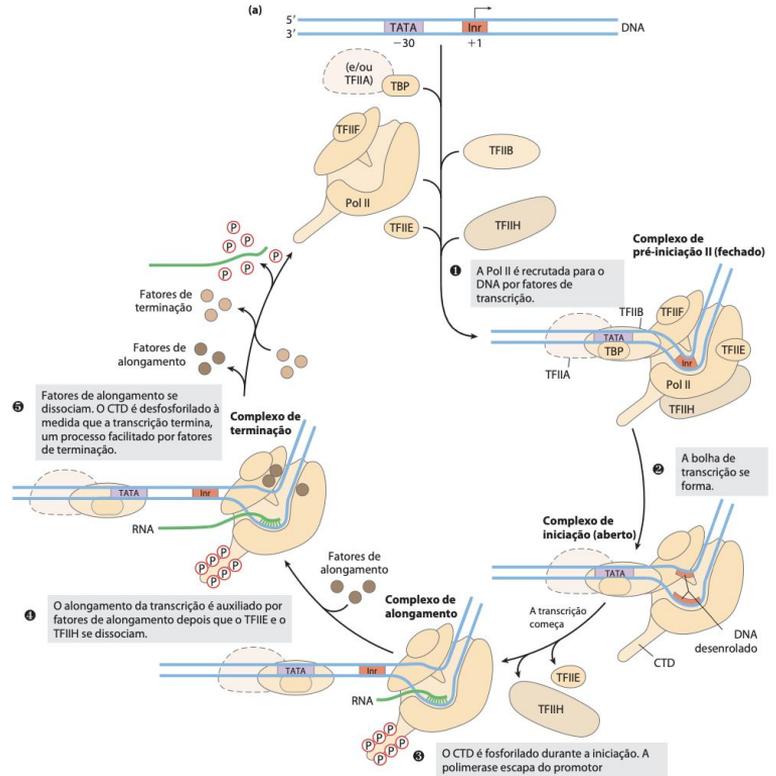
Proteína de transcrição	Número de subunidades	Subunidade(s) <i>M_r</i>	Função(ões)
Iniciação			
Pol II	12	10.000 – 220.000	Catalisa a síntese de RNA
TBP (proteína ligadora do TATA)	1	38.000	Reconhece especificamente a TATA <i>box</i>
TFIIA	3	12.000, 19.000, 35.000	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor
TFIIB	1	35.000	Liga-se ao TBP; recruta o complexo Pol II-TFIIF
TFIIE	2	34.000, 57.000	Recruta o TFIIH; tem atividades de ATPase e helicase
TFIIF	2	30.000, 74.000	Se liga fortemente à Pol II; se liga à TFIIB e impede a ligação da Pol II às sequências de DNA não específicas
TFIIH	12	35.000 – 89.000	Desenrola o DNA no promotor (atividade de helicase); fosforila a Pol II (no interior do CTD); recruta proteínas de reparo de excisão de nucleotídeos
Alongamento*			
ELL [†]	1	80.000	
pTEFb	2	43.000, 124.000	Fosforila a Pol II (no interior do CTD)
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elonguina (SIH)	3	15.000, 18.000, 110.000	

*A função de todos os fatores de alongamento é a de suprimir a pausa ou interrupção da transcrição pelo complexo Pol II-TFIIF.

[†]Nome derivado da leucemia rica em lisina 11-19. O gene para ELL é o local dos eventos de recombinação cromossomal frequentemente associados à leucemia mieloide aguda.

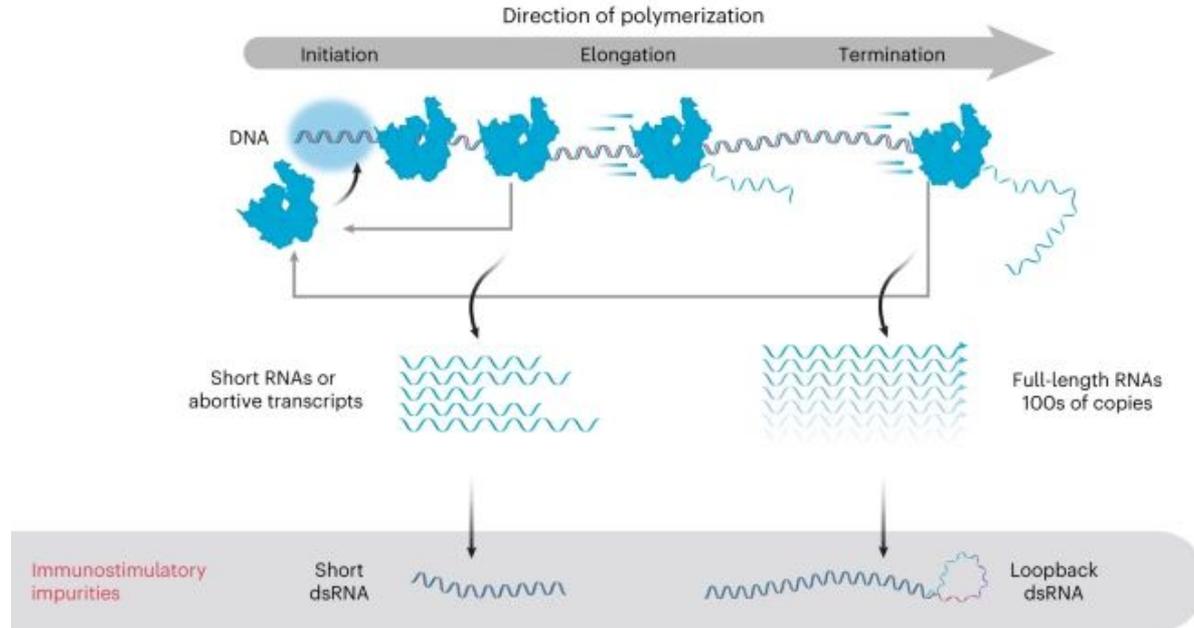
2. Transcrição –

- **RNA-polimerase II –** transcrição nos promotores



2. Transcrição – síntese de RNA

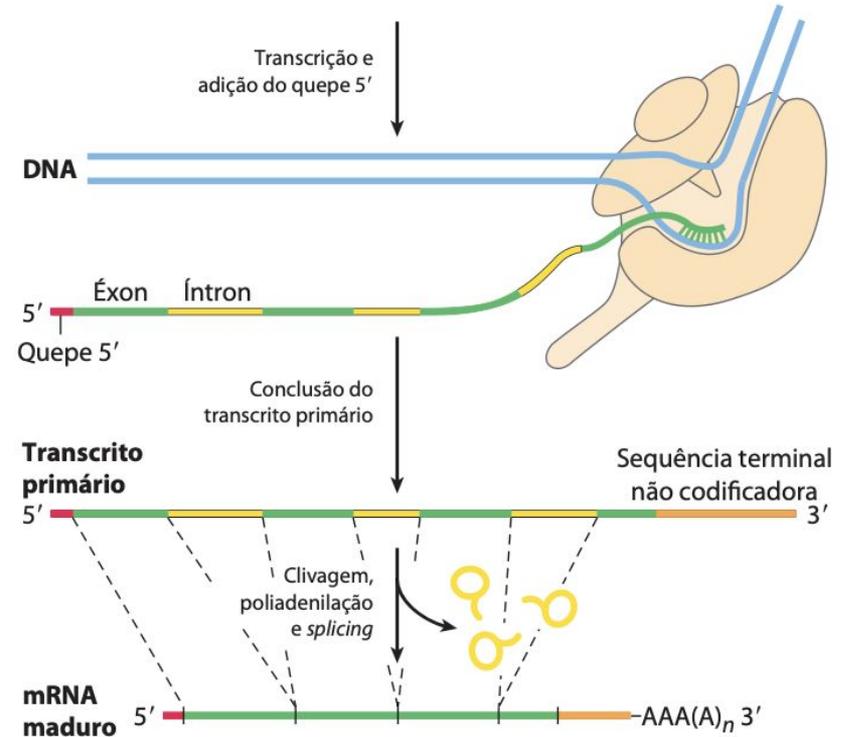
- DNA→RNA



40

3. Processamento de RNA

- RNA em bactérias e eucariotos são processadas após a síntese
- Ribozimas (Spliceosome -snRNAs): RNAs que catalisam essas reações de processamento pós-síntese
- RNA recém-sintetizada - **transcrito primário**
- **splicing de RNA** - remoção dos **íntrons** e ligação dos **éxons** - sequência contínua que especifica um polipeptídeo funcional (mRNA) ou RNA maduro
- **miRNAs e lncRNAs**



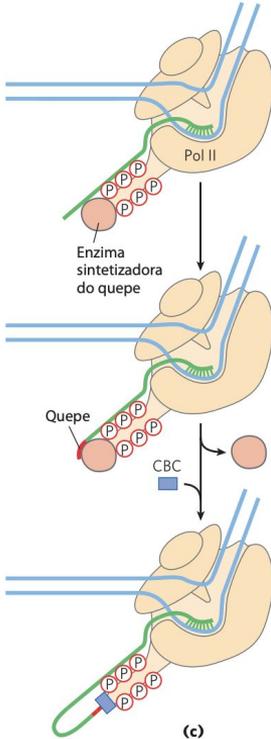
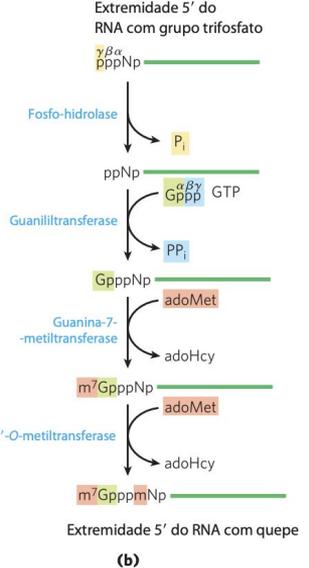
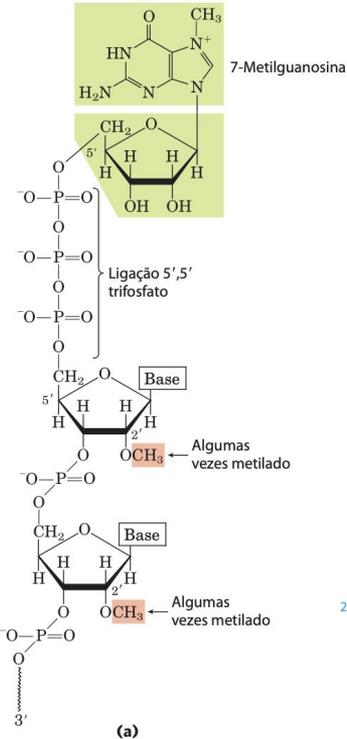
3. Processamento de RNA

mRNAs de eucariontes são modificados em cada extremidade:

- 5'CAP ou quepe 5' - adicionado na extremidade 5'
- “cauda” poli(A) - extremidade 3' é clivada e adiciona 80 a 250 resíduos

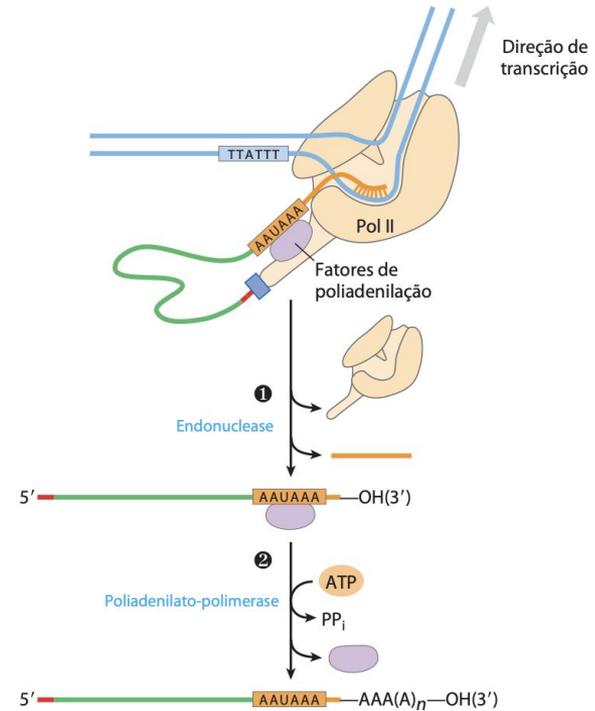
3. Processamento de RNA

5'CAP ou quepe 5'



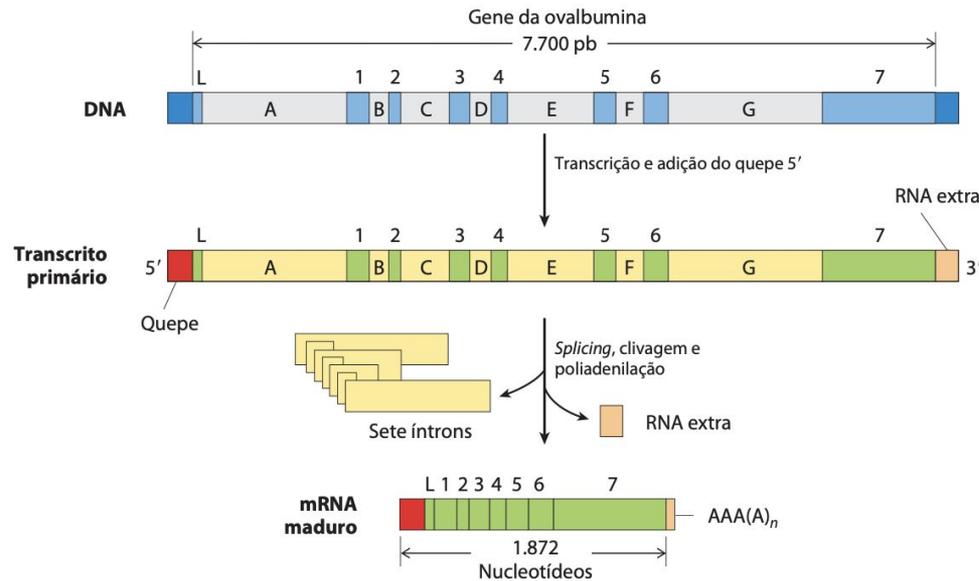
3. Processamento de RNA

- **cauda poli(A)**
extremidade 3', mRNAs eucarióticos
- Sinalização de clivagem (5') AAUAAA + complexo enzimático
- (endonuclease+ poliadenilato-polimerase+proteínas tem um filamento de 80 a 250 resíduos A)



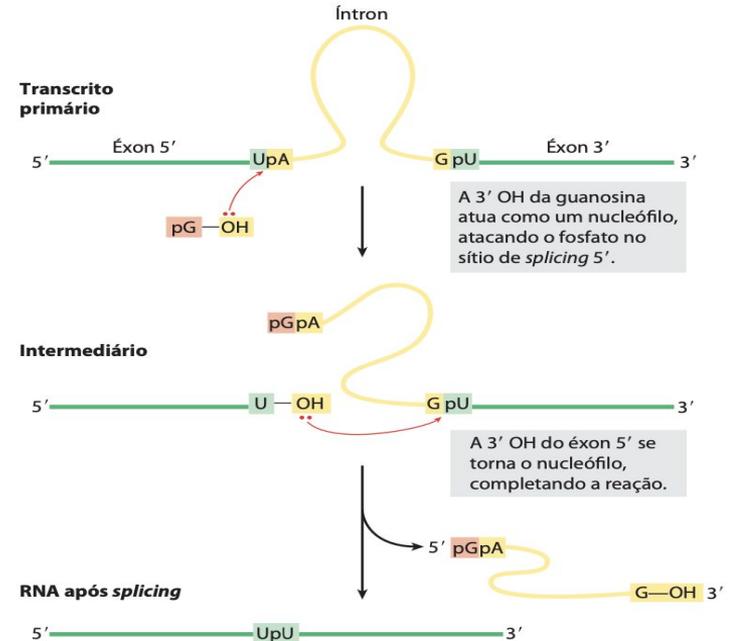
3. Processamento de RNA

- Processamento de mRNA



3. Processamento de RNA

- Splicing de íntrons:
- **Íntrons do grupo I** : *autosplicing* – reacções de transesterificação - nenhuma enzima proteica ou cofactor como fonte de energia - diferem em detalhes dos seus mecanismos de *splicing*
- nucleófilo na primeira etapa pode ser a guanosina, GMP, GDP ou GTP
- íntron que sofre *splicing* acaba degradado



3. Processamento de RNA

- Splicing de íntrons:
- **Íntrons do grupo II:** *autosplicing* – reacções de transesterificação - nenhuma enzima proteica ou cofactor como fonte de energia - diferem em detalhes dos seus mecanismos de *splicing*
- **intermediário em laço**, em que um ramo é uma ligação fosfodiéster 2',5'
- circRNA

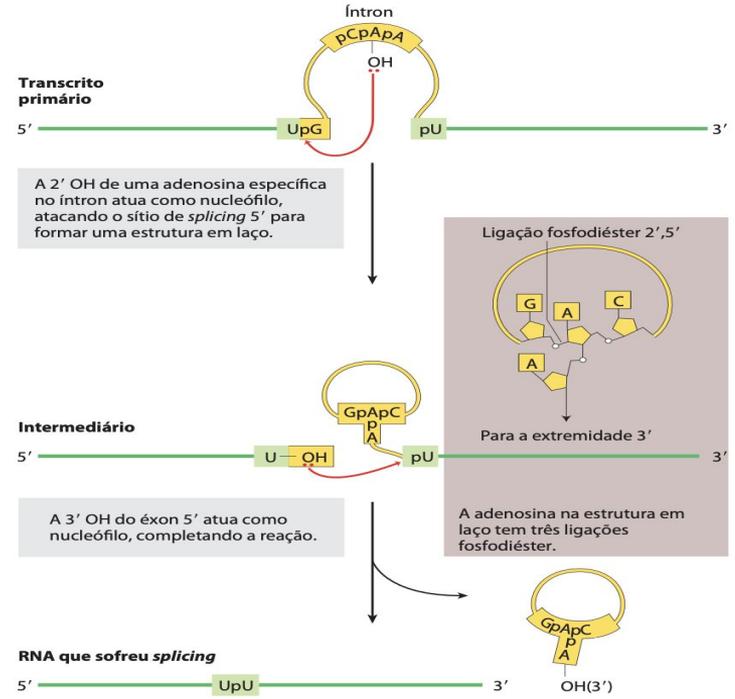
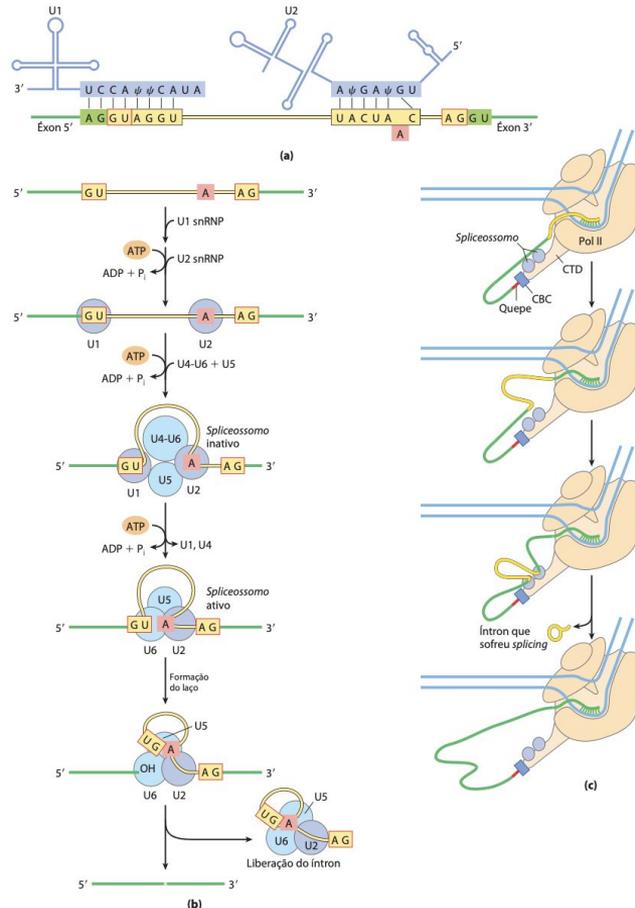


FIGURA 26-15
do grupo II. A
dos íntrons do g
filo na primeira
laço, em que un

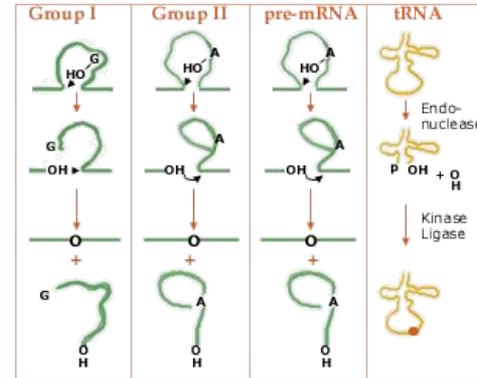
3. Processamento de RNA

- **Íntrons grupo III:** transcritos primários de mRNAs no núcleo.
- Íntrons do **spliceossomo** – catalisada por um grande complexo de proteínas
- Formação do **laço** como no grupo II
- Ribonucleoproteínas (snRNP) especializadas associadas a snRNA (100-200 nucleotídeos) U1, U2, U4, U5 e U6
- ATP usado para montagem do spliceossomo, mas não para clivagem-ligação do RNA



3. Processamento de RNA

- em eucariotos - Splicing
- Splicing de íntrons:
- **Íntrons do grupo I** : rRNAs, mRNAs e tRNAs - *autosplicing*
- **Íntrons do grupo II** : mRNAs e mtRNAs - *autosplicing* + estrutura em laço
- **Íntrons grupo III**: transcritos primários de mRNAs no núcleo -Íntrons do spliceossomo
- **Íntrons grupo IV**: encontrados em certos tRNAs - Reação de splicing precisa de ATP e de uma endonuclease





Regulação da Expressão Gênica

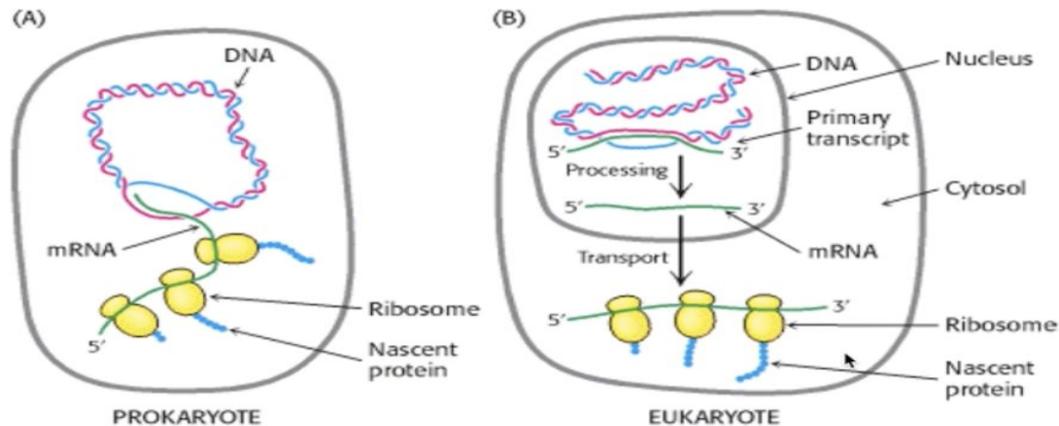
Departamento Imunologia
Instituto Ciências Biomédicas
- Universidade de São Paulo -

2023

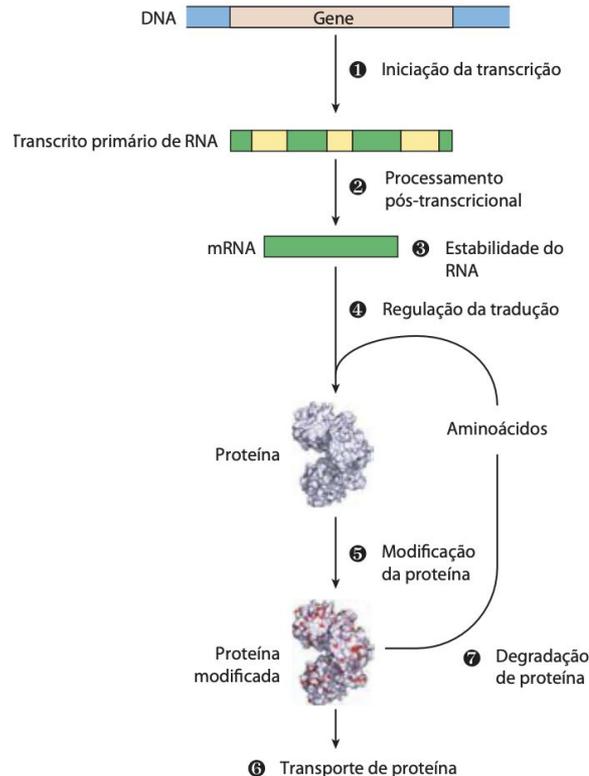


1. Princípios da regulação gênica

- síntese de RNAs funcionalmente distinta entre procariotos e eucariotos:
- Procariotos – transcrição e tradução acopladas
- Eucariotos: Presença de núcleo – implica transporte do RNA do núcleo ao citoplasma para a tradução



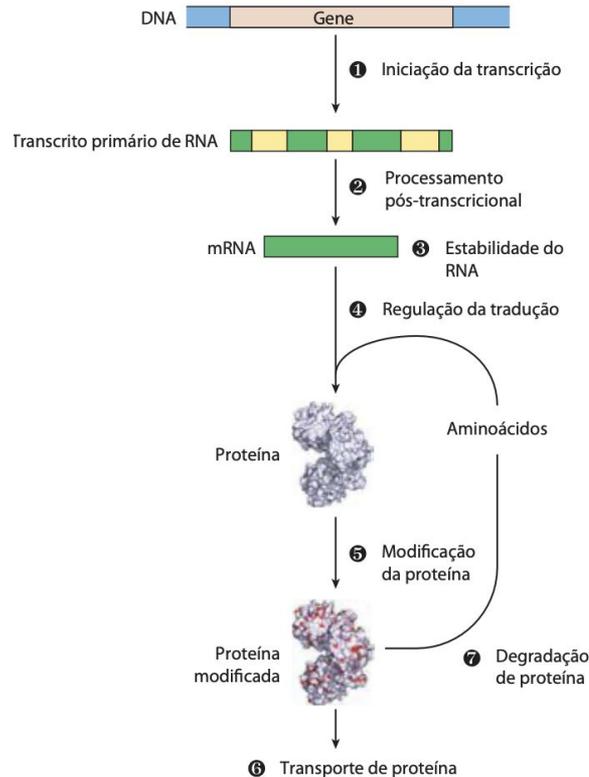
1. Princípios da regulação gênica



A concentração celular de uma proteína depende:

- Síntese do transcrito de RNA primário (transcrição)
- Modificação pós-transcricional do mRNA
- Degradação do RNA mensageiro
- Síntese proteica (tradução)
- Modificação pós-traducional de proteínas
- Direcionamento e transporte de proteínas
- Degradação de proteínas

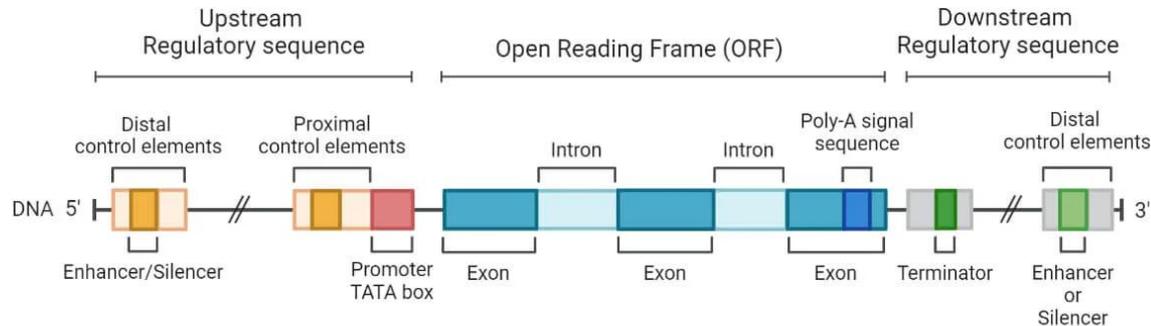
1. Princípios da regulação gênica



- Transcrição de RNAs em eucariotos é controlada em níveis moleculares adicionais aos observados em procariotos
- Taxa de transcrição pode ser controlada:
- Estados de enovelamento da cromatina
- metilação do DNA
- Síntese/disponibilidade dos fatores de transcrição
- Regulação do complexo mediador
- Controle da iniciação da transcrição

1. Princípios da regulação gênica

- síntese de RNAs é um processo estocástico: para que um **gene seja transcrito** é necessário que a ligação da RNA polimerase seja estabilizada
- **Proteínas** se ligam ao DNA para ajudar na estabilidade da RNA polimerase regiões:
- **Promotor** – local de ligação da maquinaria de transcrição
- **Sítio regulatório** – sítio de DNA onde uma proteína se liga
- **Sequências regulatórias** – região onde contém diversos sítios regulatórios
- **Enhancers** – sequências regulatórias que ajudam na ativação da transcrição



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

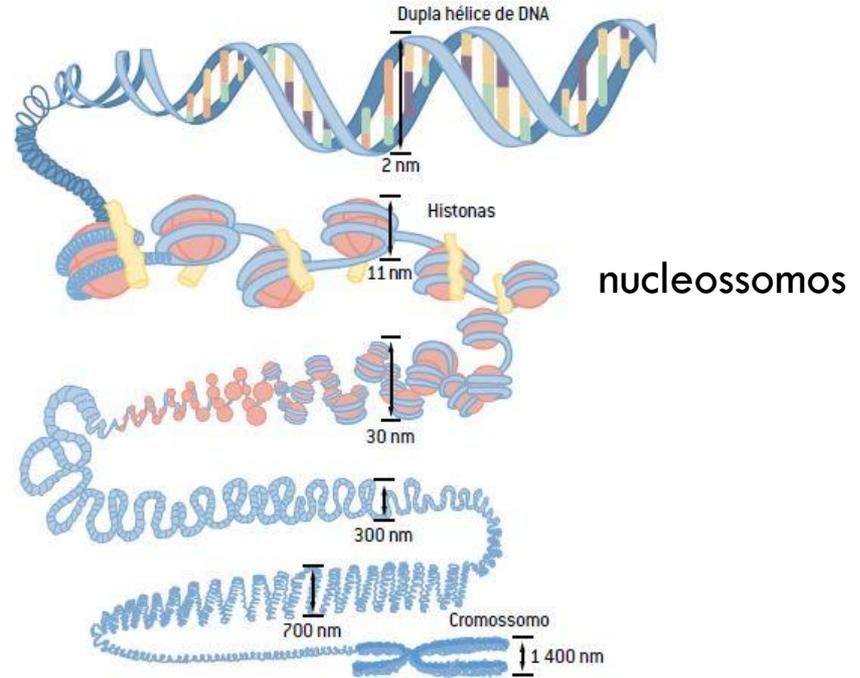
55

- Em eucariotos, os promotores estão inativos na ausência de proteínas regulatórias – estado da transcrição é restritivo:
- Acesso ao promotores é restrito pela **estrutura da cromatina** - ativação da transcrição depende da mudança na estrutura da cromatina;
- Mecanismos de **regulação positivos** são predominantes - todo gene precisa ter a transcrição ativada
- Presença de **proteínas regulatórias multiméricas** (maiores e mais complexas que em bactérias)
- **Transcrição ocorre no núcleo** e a tradução no citoplasma - transcrição e tradução separadas tanto no tempo quanto no espaço

2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

56

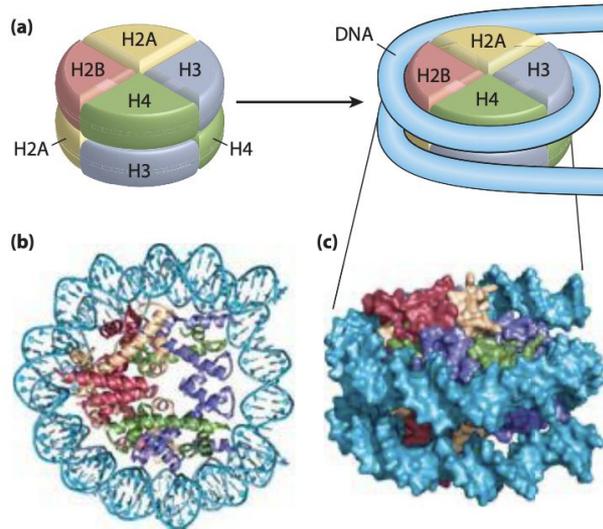
- Estrutura da cromatina
- **eucromatina:** menos condensada, maior parte desta é mais ativa na transcrição.
- **Heterocromatina:** 10% da cromatina em uma forma mais condensada - é inativa na transcrição (associada aos centrômeros)



DNA supertorcido e estrutura dos cromossomos

57

- **Nucleossomo e histonas**



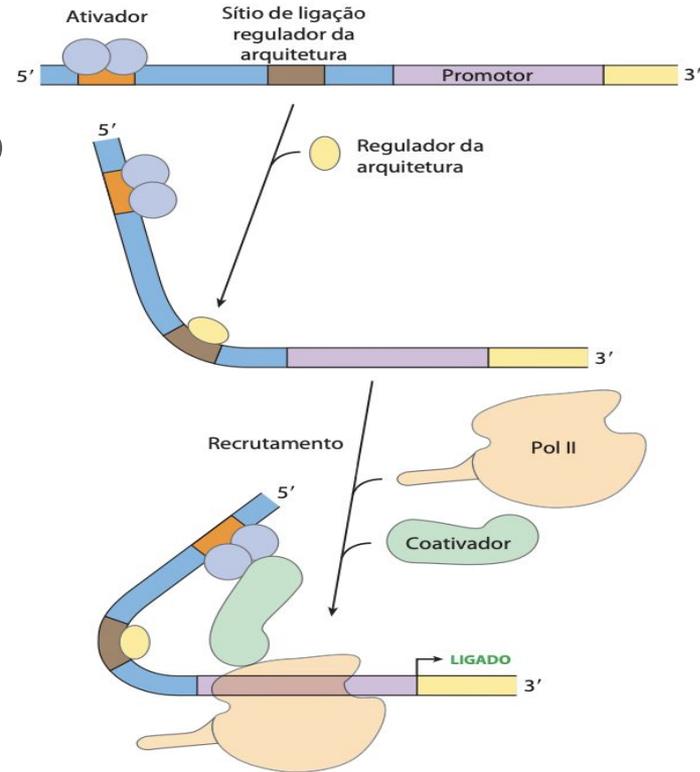
Nucleossomos são unidades fundamentais da organização da cromatina

Nucleossomo – DNA associado as histonas de maneira que o DNA fica empacotado e organizado

Epigenética- modificações covalentes em histonas (H2A, H2B, H3, H4; são modificadas pela **metilação** de resíduos Lys ou Arg, **fosforilação** de resíduos de Ser ou Thr, **acetilação**, **ubiquitinação** ou **sumoilação**)

1. Princípios da regulação gênica

- Em eucariotos:
- distância entre os sítios de ligação de ativadores ou repressores e promotores é reduzida pela alças (*looping*) no DNA
- proteínas **reguladores arquitetônicos** que se ligam a sítios de intervenção e facilitam o *looping* do DNA



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

59

- Remodelação da cromatina – complexos enzimáticos
- Reposicionamento ativo ou deslocamento dos nucleossomos (hidrólise de ATP)
- 5 complexos principais:
- 3 envolvidos na **ativação da transcrição** (SWI/SNF, NURF e SWR1)
- 2 envolvidos na **acetilação (HATs) e desacetilação de histonas (HDACs)**

TABELA 28-2 Alguns complexos enzimáticos que catalisam mudanças estruturais da cromatina associadas à transcrição

Complexo enzimático*	Estrutura oligomérica (nº de polipeptídeos)	Fonte	Atividades
Modificação de histonas			
GCN5 – ADA2 – ADA3	3	Leveduras	GCN5 tem atividade de HAT tipo A
SAGA/PCAF	>20	Eucariotos	Inclui GCN5-ADA2-ADA3; resíduos acetilados em H3 e H2B
NuA4	Pelo menos 12	Eucariotos	Componente Esa1 tem atividade HAT; acetila H4, H2A e H2AZ
Movimento de histona/enzimas de substituição que precisam de ATP			
SWI/SNF	≥6; M_r total 2×10^6	Eucariotos	Remodelagem de nucleossomos; ativação da transcrição
Família ISWI	Varia	Eucariotos	Remodelagem de nucleossomos; repressão da transcrição; ativação da transcrição em alguns casos (NURF)
Família SWR1	~12	Eucariotos	Deposição de H2AZ
Chaperonas de histonas que não precisam de ATP			
HIRA	1	Eucariotos	Deposição de H3.3 durante a transcrição

*As abreviações dos genes e proteínas eucarióticas são frequentemente mais confusas ou obscuras do que as abreviações usadas para bactérias. O complexo de proteínas GCN5 (controle geral não desrepressível, de *general control nonderepressible*) e ADA (alteração/ativação da deficiência, de *alteration/deficiency activation*) foi descoberto durante a investigação da regulação dos genes do metabolismo do nitrogênio em leveduras. Essas proteínas podem fazer parte do complexo maior SAGA (SPF, ADA2,3, GCN5, acetiltransferase) nas leveduras. O equivalente do SAGA em humanos é o PCAF (fator associado a p300/CBP). NuA4 é a acetiltransferase de nucleossomos de H4; ESA1 é a acetiltransferase essencial relacionada à SAS2. SWI (troca, *switching*) foi descoberta como uma proteína necessária para a expressão de certos genes envolvidos na troca do *mating type* em leveduras, e SNF (sacarose não fermentadora) como um fator de expressão do gene de leveduras para sacarose. Estudos posteriores revelaram múltiplas proteínas SWI e SNF que atuavam em um complexo. O complexo SWI/SNF tem um papel na expressão de um amplo número de genes e foi encontrado em muitos eucariotos, inclusive humanos. ISWI é imitação de SWI; NURF, o fator de remodelagem nuclear (*nuclear remodeling factor*); SWR1, uma Swi2/ATPase 1 relacionada à Snf2 e HIRA, um regulador de histonas tipo A.

2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

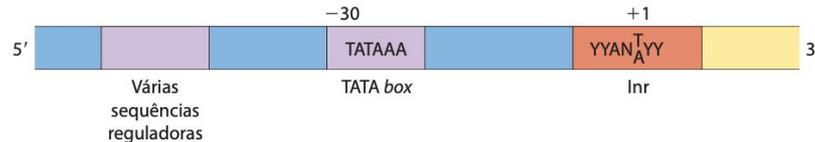
60

- Mecanismos de **regulação positivos dos promotores**
- **RNA-polimerase tem baixa afinidade pelos promotores** - início da transcrição depende de proteínas ativadoras
- **Especificidade da regulação positiva:** é a **combinação** entre **proteínas ativadoras** ligando-se em **sequências específicas** de DNA + número de sítios regulatórios (6 a 12) + ligação de várias **proteínas regulatórias positivas**
- **proteínas ativadoras** ~5-10% genes codificadores de proteínas em eucariotos superiores

Como vimos na aula de Transcrição – síntese de RNA

61

- RNA-polimerase (holoenzima) em eucariotos
- **RNA-polimerase II** – síntese de mRNAs, RNAs reguladores, RNAs não codificadores de proteínas e alguns RNAs especializados –
- promotores da **Pol II** apresentam algumas sequências em comum, incluindo uma **TATA box** (sequência consenso de eucariontes) próxima do par de bases -30 e uma sequência **Inr** (**iniciador**) próxima do sítio de início do RNA em $+1$
- Sequências regulatórias adicionais: **potenciadores (enhancers)** em eucariotos superiores ou **sequências ativadoras a montante (UAS)** em leveduras



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

62

- Para ligação ativa da **POL II** - ação combinada de **proteínas regulatórias multiméricas** :
 - (1) **ativadores de transcrição**, que se ligam a potenciadores ou UAS e facilitam a transcrição;
 - (2) **reguladores da arquitetura**, que facilitam o *looping* do DNA;
 - (3) **modificação da cromatina e proteínas remodeladoras** (Reposicionamento ativo ou deslocamento dos nucleossomos ou acetilação/desacetilação de histonas);
 - (4) **coativadores**; e
 - (5) **fatores de transcrição basais**, necessária na maior parte dos promotores da Pol II

Transcrição – síntese de RNA

63

- **RNA-polimerase II** – numerosos fatores proteicos são associados - complexidade adicional da polimerase de eucariontes.
- FATORES DE TRANSCRIÇÃO BASAIS

TABELA 26-2 Proteínas necessárias para iniciação da transcrição nos promotores da RNA-polimerase II (Pol II) de eucariontes

Proteína de transcrição	Número de subunidades	Subunidade(s) M _r	Função(ões)
Iniciação			
Pol II	12	10.000 – 220.000	Catalisa a síntese de RNA
TBP (proteína ligadora do TATA)	1	38.000	Reconhece especificamente a TATA <i>box</i>
TFIIA	3	12.000, 19.000, 35.000	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor
TFIIB	1	35.000	Liga-se ao TBP; recruta o complexo Pol II-TFIIF
TFIIE	2	34.000, 57.000	Recruta o TFIIH; tem atividades de ATPase e helicase
TFIIF	2	30.000, 74.000	Se liga fortemente à Pol II; se liga à TFIIB e impede a ligação da Pol II às sequências de DNA não específicas
TFIIH	12	35.000 – 89.000	Desenrola o DNA no promotor (atividade de helicase); fosforila a Pol II (no interior do CTD); recruta proteínas de reparo de excisão de nucleotídeos
Alongamento*			
ELL [†]	1	80.000	
pTEFb	2	43.000, 124.000	Fosforila a Pol II (no interior do CTD)
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elonguina (SIH)	3	15.000, 18.000, 110.000	

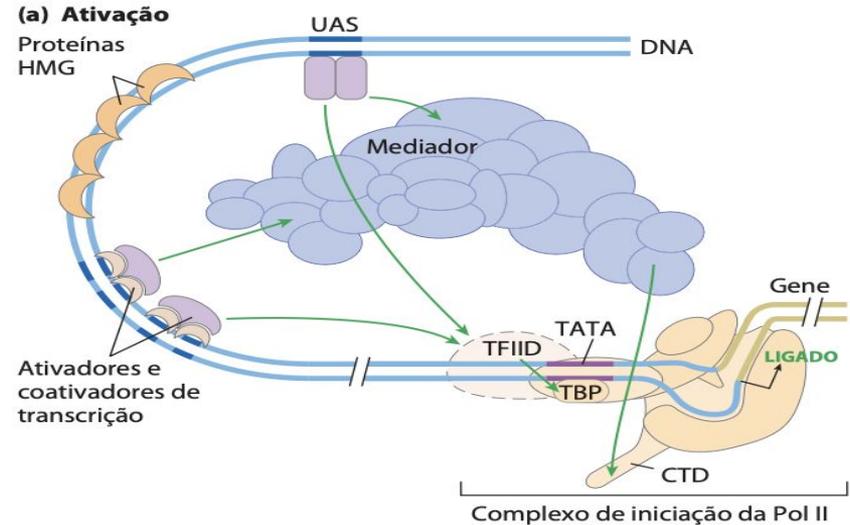
*A função de todos os fatores de alongamento é a de suprimir a pausa ou interrupção da transcrição pelo complexo Pol II-TFIIF.

[†]Nome derivado da leucemia rica em lisina 11-19. O gene para ELL é o local dos eventos de recombinação cromossomal frequentemente associados à leucemia mieloide aguda.

2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

Proteínas **ativadores** de transcrição
→ Complexo de iniciação **ligado**

- **MEDIADOR**: Complexo de proteínas **coativadoras** - liga fortemente ao domínio da carboxila terminal (CTD) da maior subunidade de Pol II
- **TBP**: proteína ligadora de TATA box – primeiro componente a ligar – faz parte do complex TFIIID



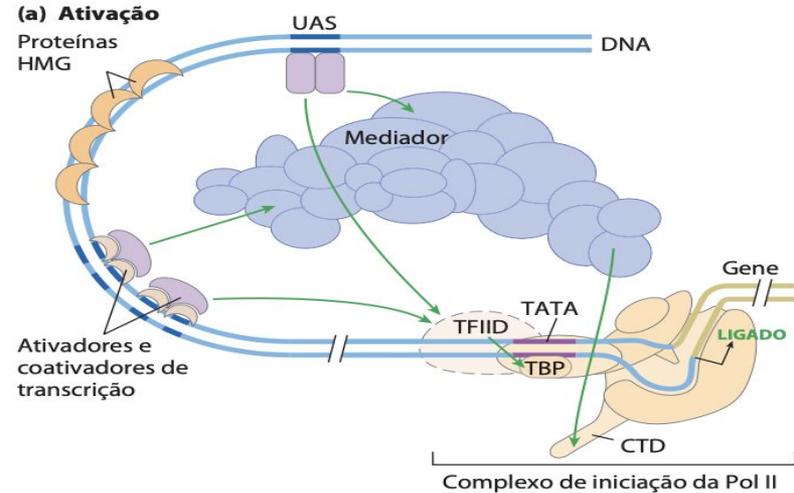
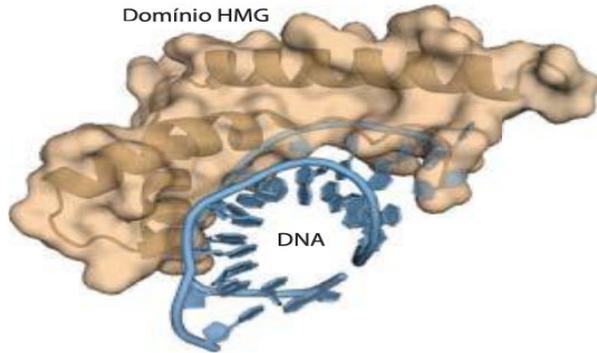
2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

65

Proteínas reguladoras de arquitetura

Permitem que as proteínas ativadoras atuem em regiões distantes da região promotora → formando alças no DNA

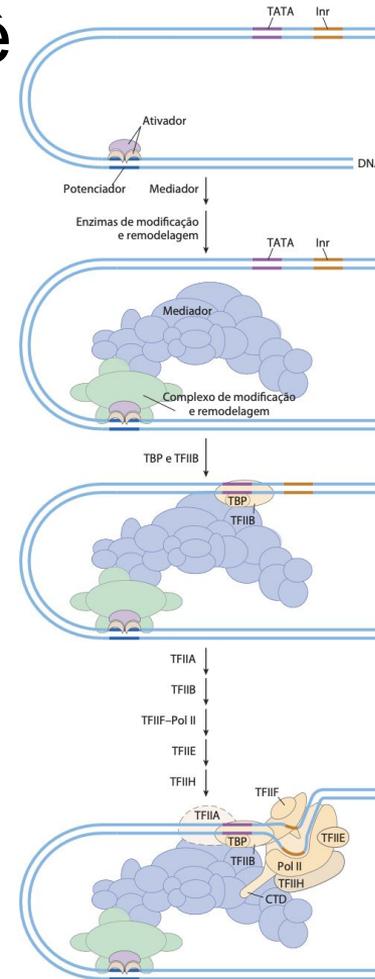
Grupo de alta mobilidade (HMG)



2. Princípios da regulação gênica

ariotos

- **Coreografia da ativação da transcrição**
- Ativadores
- Complexos de modificação de histonas/remodelagem
- Coativador (mediador)
- complexo TFIID: TBP + os fatores de transcrição basal TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH; **Pol II**; e talvez TFIIA.
- Complexo de iniciação da transcrição

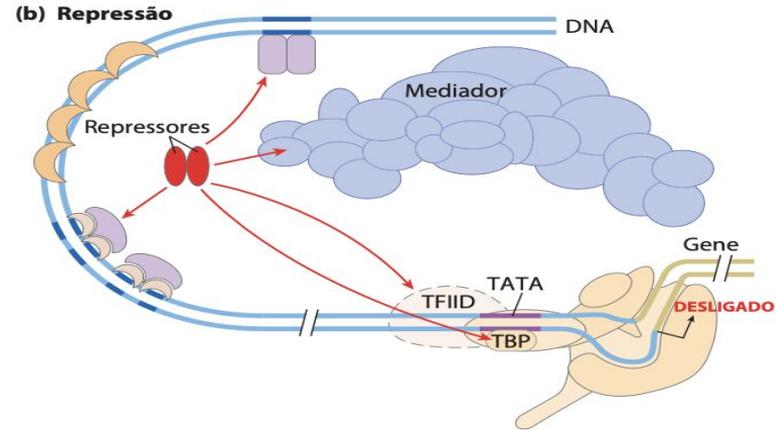
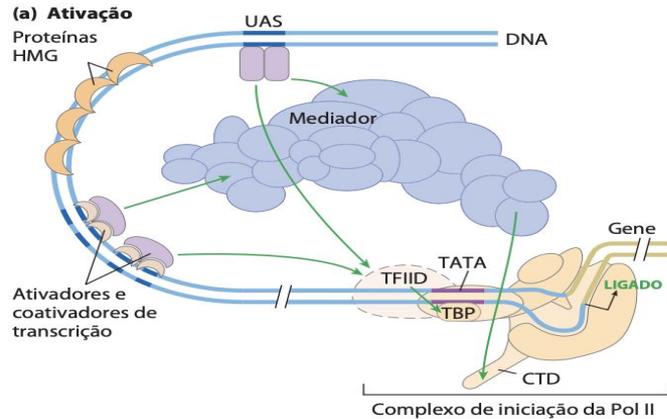


2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

67

Proteínas **ativadores e coativadoras** (Mediador) de transcrição → Complexo de iniciação **ligado**

Repressores - Complexo de iniciação **desligados**



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

68

- **Receptores monoméricos tipo I (NR I)**
- receptores intracelulares localizados no **citoplasma** - ativadores de transcrição.
- **Hormônios esteroides (estrogênio, progesterona e cortisol)** hidrofóbicos - transportados por proteínas carreadoras no sangue até liberação no tecido-alvo
- complexo hormônio-receptor liga-se a sequências de DNA específicas: **elementos de resposta hormonal (HRE)**

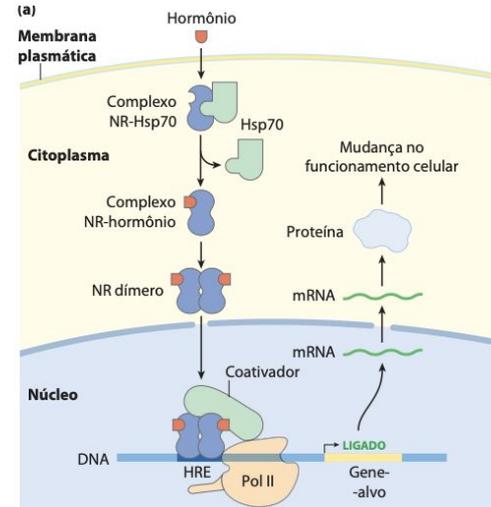


TABELA 28-4 Elementos de resposta a hormônio (HRE) ligados por receptores de hormônios do tipo esteroide

Receptor	Sequência consenso a que se liga*
Androgênio	GG(A/T)ACAN ₂ TGTTCT
Glicocorticoide	GGTACAN ₃ TGTTCT
Ácido retinoico (alguns)	AGGTCAN ₆ AGGTCA
Vitamina D	AGGTCAN ₆ AGGTCA
Hormônio da tireoide	AGGTCAN ₆ AGGTCA
RX [†]	AGGTCANAGGTGANAG GTCANAGGTCA

* N representa qualquer nucleotídeo.

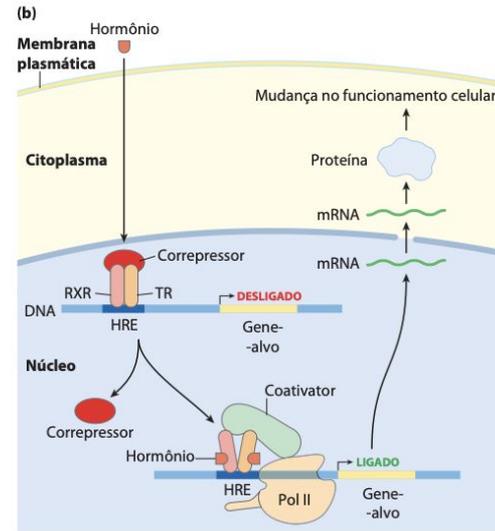
[†] Forma um dímero com o receptor do ácido retinoico ou com o receptor da vitamina D.

2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

69

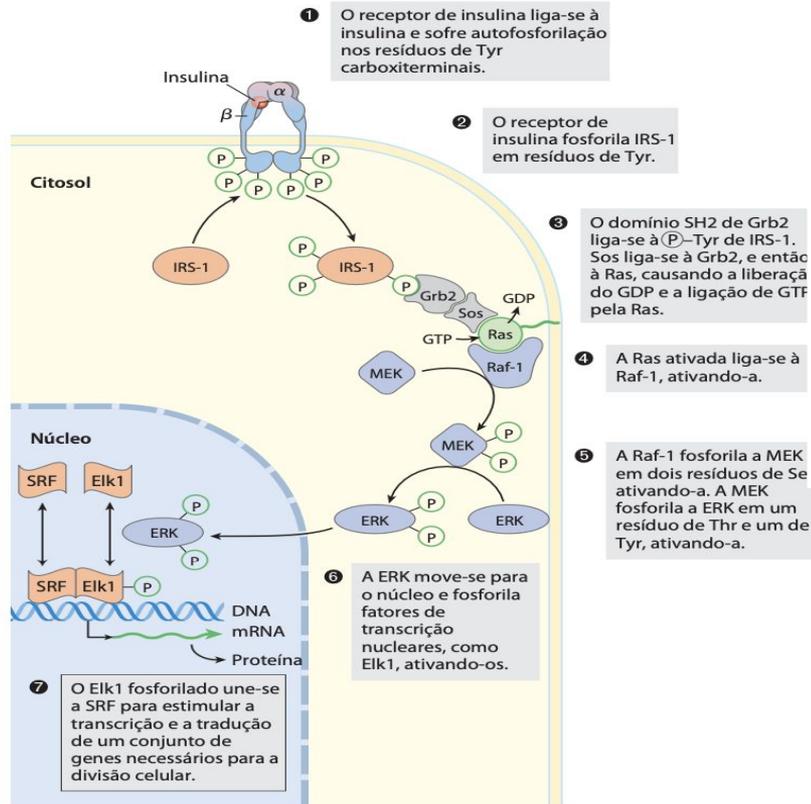
- **Receptores monoméricos tipo II (NR II)**
- receptores intracelulares localizados no **núcleo** – ligados ao **HRE** e associados ao **correpressor**
- Ex: Hormônios esteróides **tireóide**

- hormônio migra pelo citoplasma e se difunde através da membrana nuclear.
- No núcleo ele se liga a um heterodímero consistindo no receptor do hormônio da tireoide e do receptor retinoide X (RXR). Uma mudança na sua conformação leva à **dissociação do correpressor e o receptor então funciona** como ativador de transcrição.



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

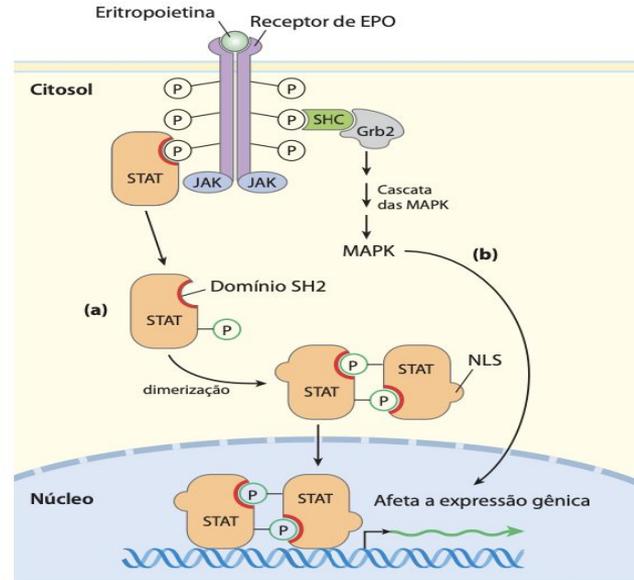
● Fosforilação de fatores de transcrição - insulina - MAPK



2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

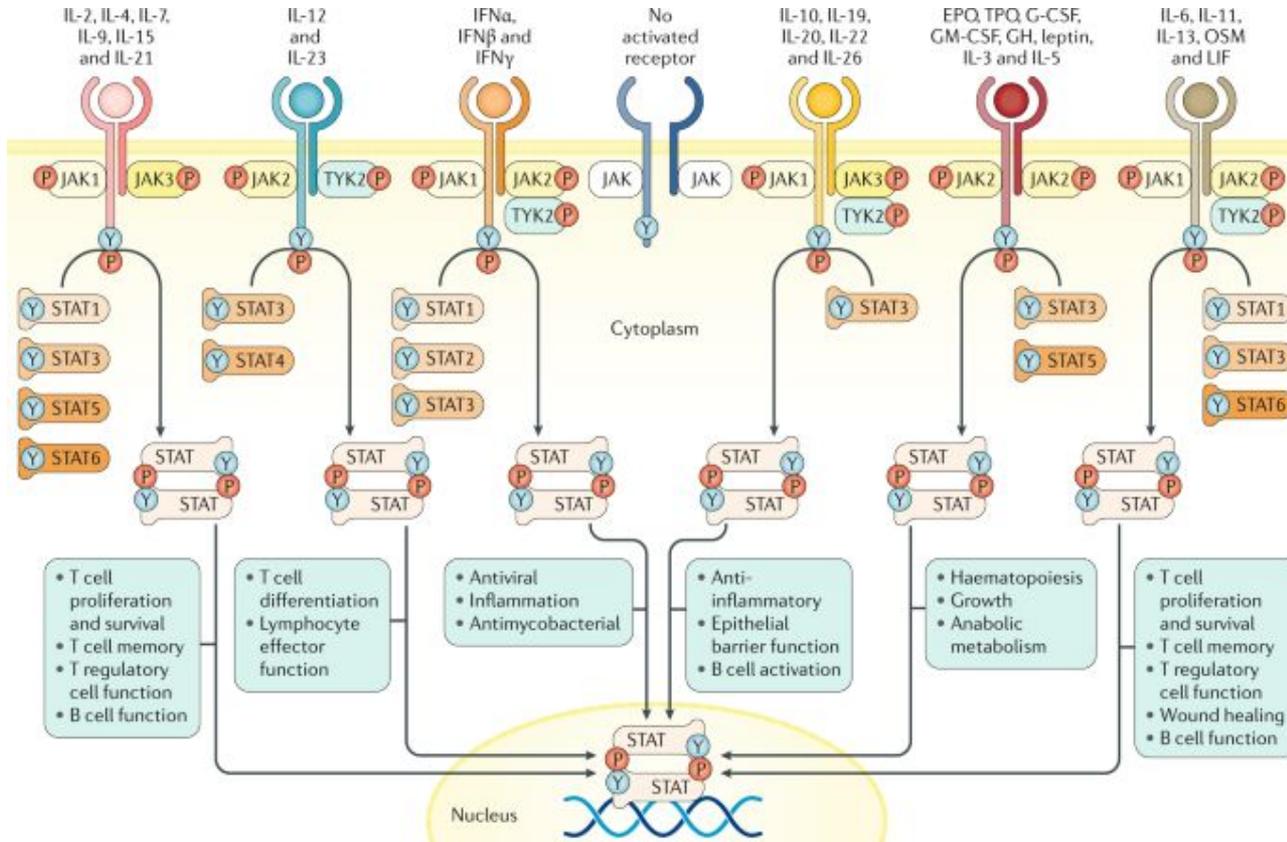
71

- Fosforilação de fatores de transcrição - JAK-STAT



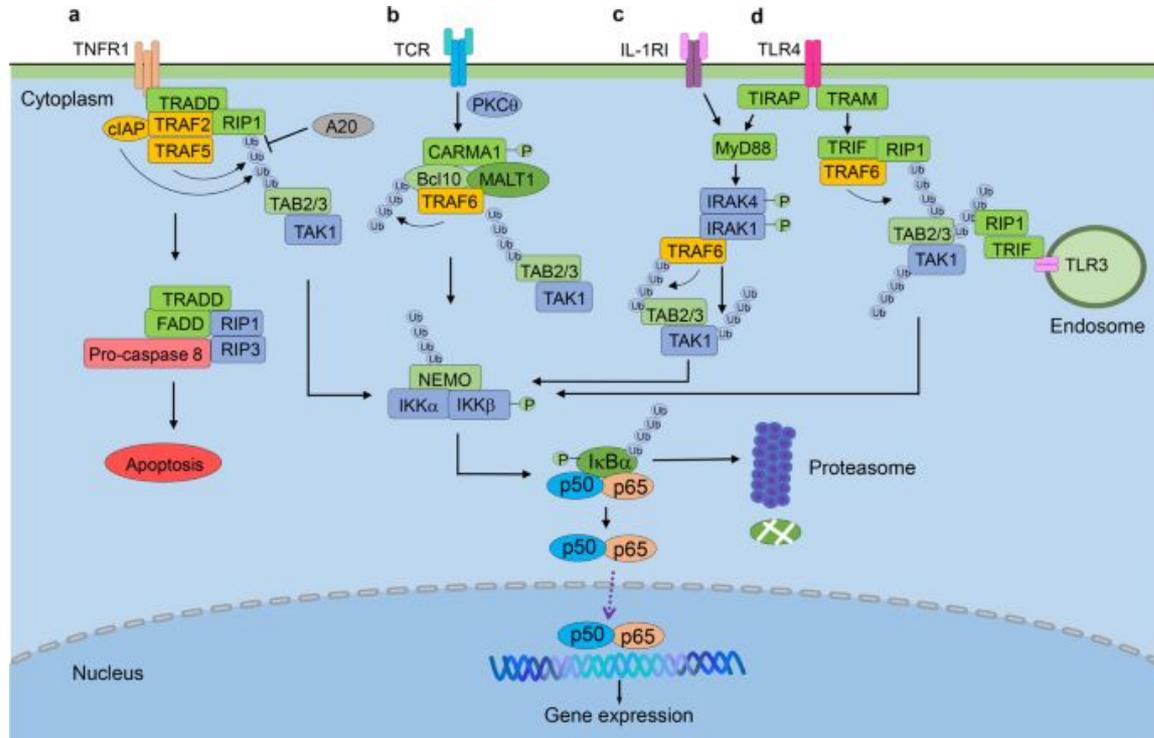
2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

72

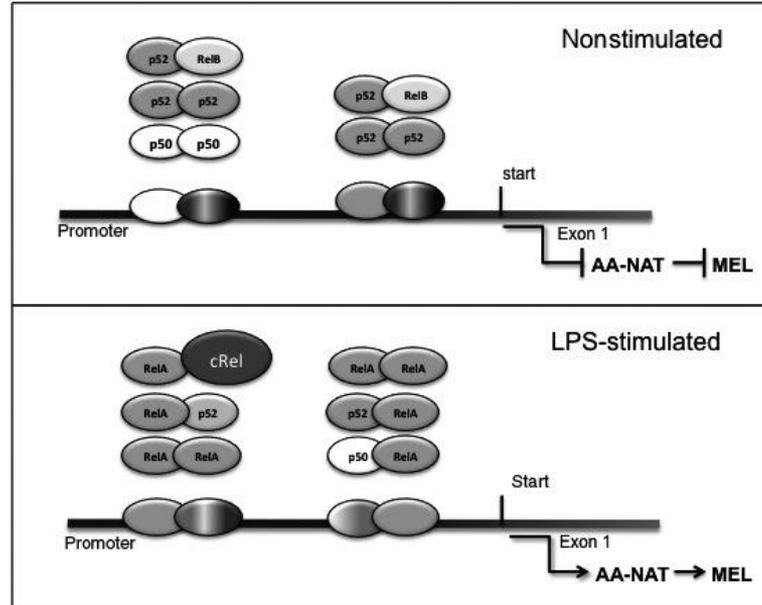


2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

- Fosforilação de fatores de transcrição - NFκB



The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages

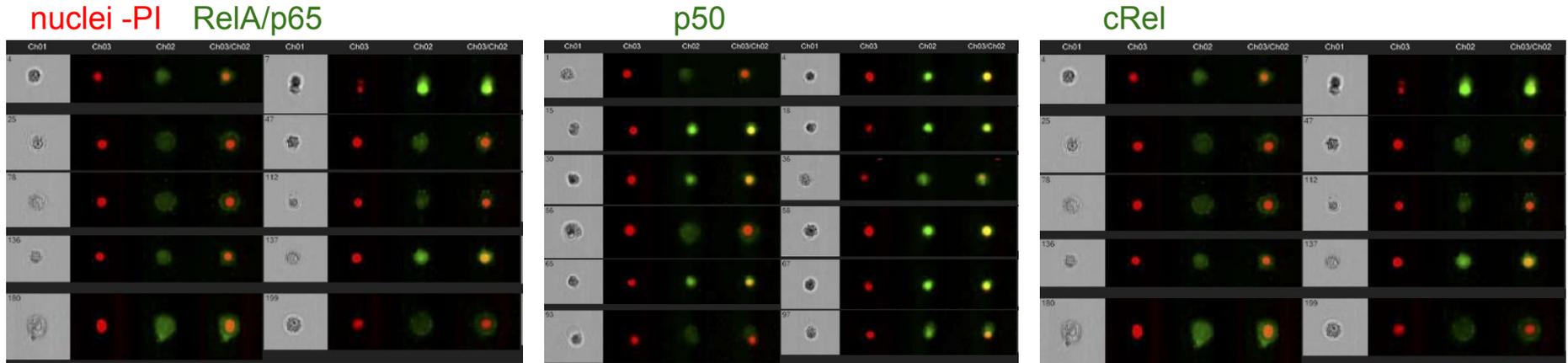


2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

75

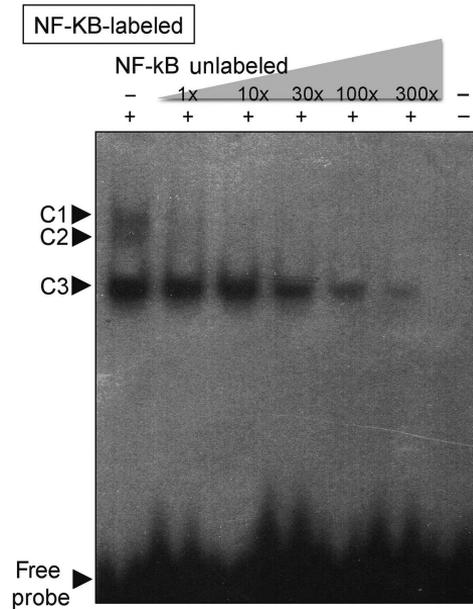
- Fosforilação de fatores de transcrição - NFkB

RAW - LPS 500ng/mL - 10 min



The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages

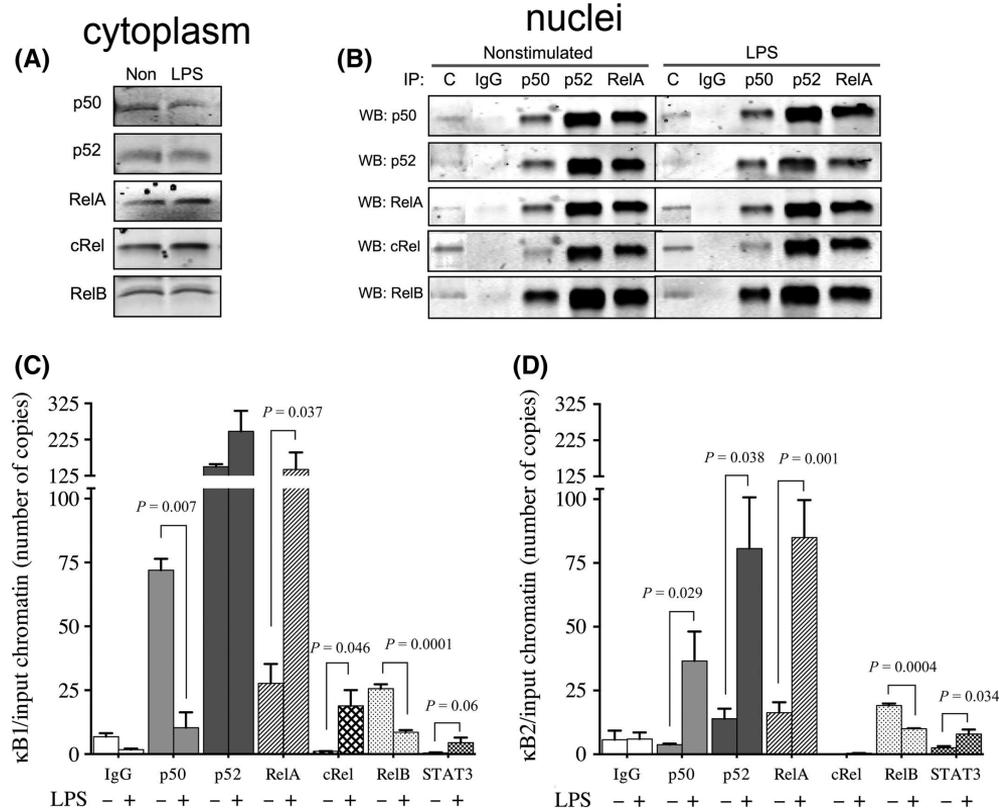
8 μ g of nuclear extract protein of nonstimulated RAW 264.7 cells incubated with **32 P-labeled double-strand NF- κ B probe** in the absence (-) or the presence (+) of 1-, 10-, 30-, 100-, or 300-molar excess of unlabeled NF- κ B double-strand oligonucleotide.



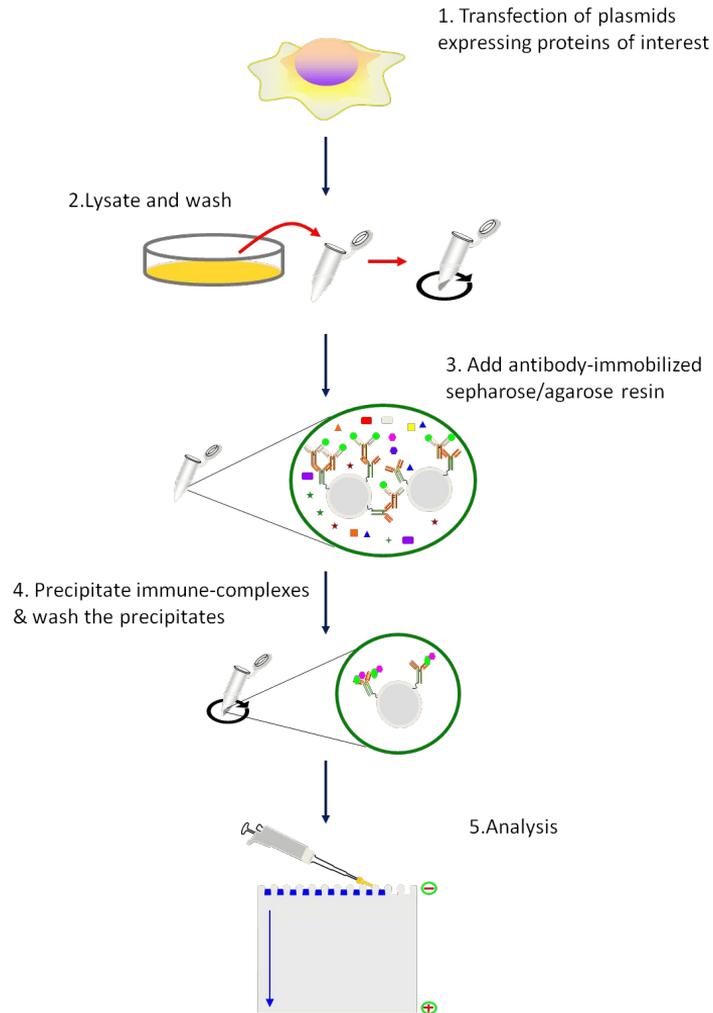
The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages

RAW 264.7 cells stimulated or not with LPS (500 ng/mL, 10 min)

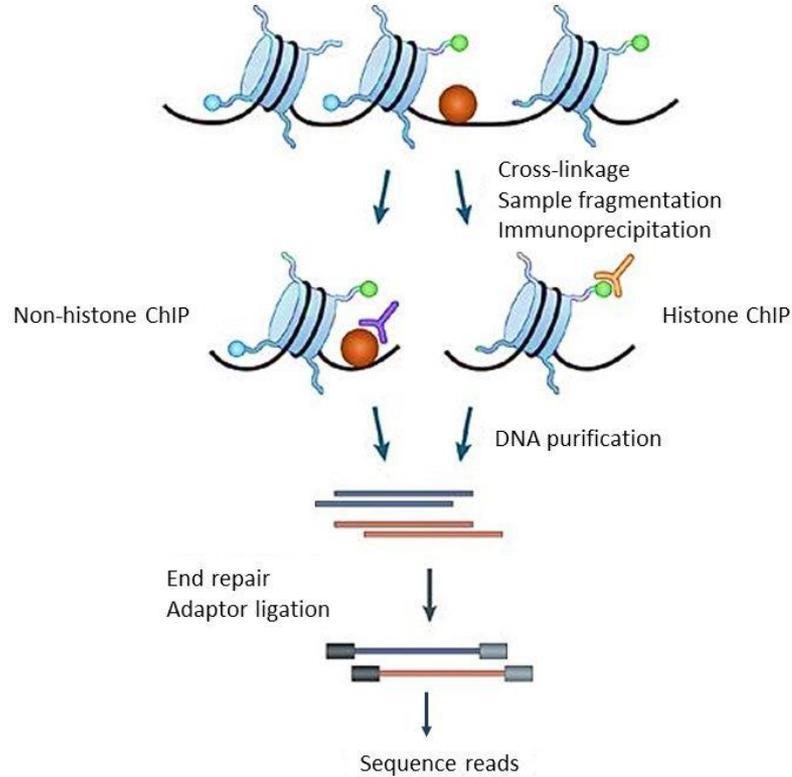
ChiP



IP



ChIP



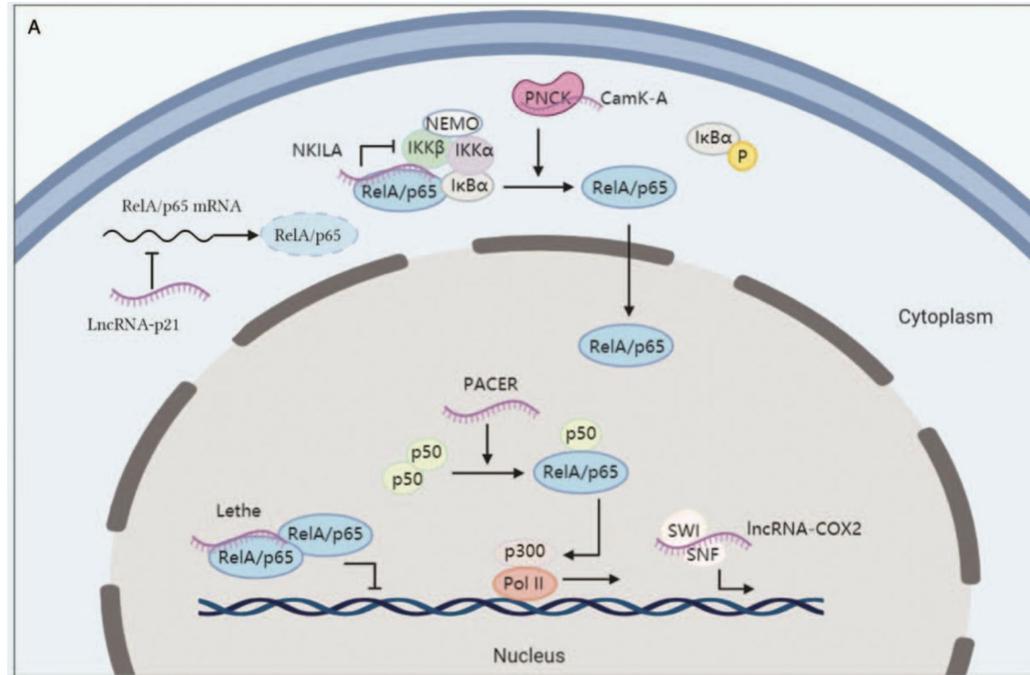
2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

80

- **ncRNA na regulação da expressão gênica**
- **Mecanismos transcricionais: lncRNA,**
- **Mecanismos pós-transcricionais: miRNAs e siRNAs,**

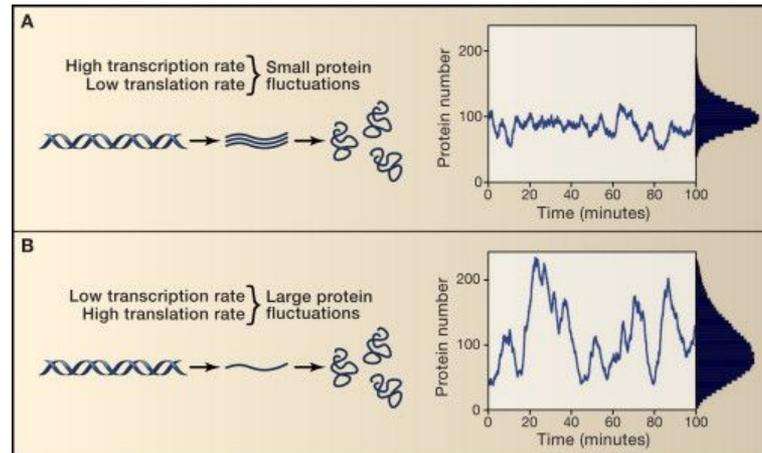
2. Princípios da regulação gênica em eucariotos

- ncRNA na regulação da expressão gênica
- Mecanismos transcricionais: lncRNA



Princípios da regulação gênica

- Transcrição é um processo estocástico: controle de transcrição - modula os níveis de transcritos e proteínas
- A transcrição não ocorre continuamente quando o gene está “ligado” – não oscila entre “ligado” e “desligado”, mas em vários estados ‘ligado’
- pensamos no controle da transcrição como um interruptor, mas é um processo probabilístico - **processo de ativação da transcrição gênica aumenta a probabilidade de um gene ser transcrito**



Princípios da regulação gênica

83

The Contribution of Transcriptional Bursts to Cell-to-Cell Variability

(A) Transcription without bursts with a relatively small amount of noise.

(B) Bursts in transcription can cause significantly higher variability, even when producing the same mean number of transcripts.

(C) In situ detection of individual mRNA molecules reveals large cell-to-cell variability in mammalian cells.

(D) Experimental histogram of mRNA numbers. The gray dashed line depicts the theoretical distribution one would expect in the absence of transcriptional bursts.

Raj et al., 2006, 2008.

<https://www.hubrecht.eu/research-groups/van-oude-naarden-group/>

