

BIOLOGIA MOLECULAR

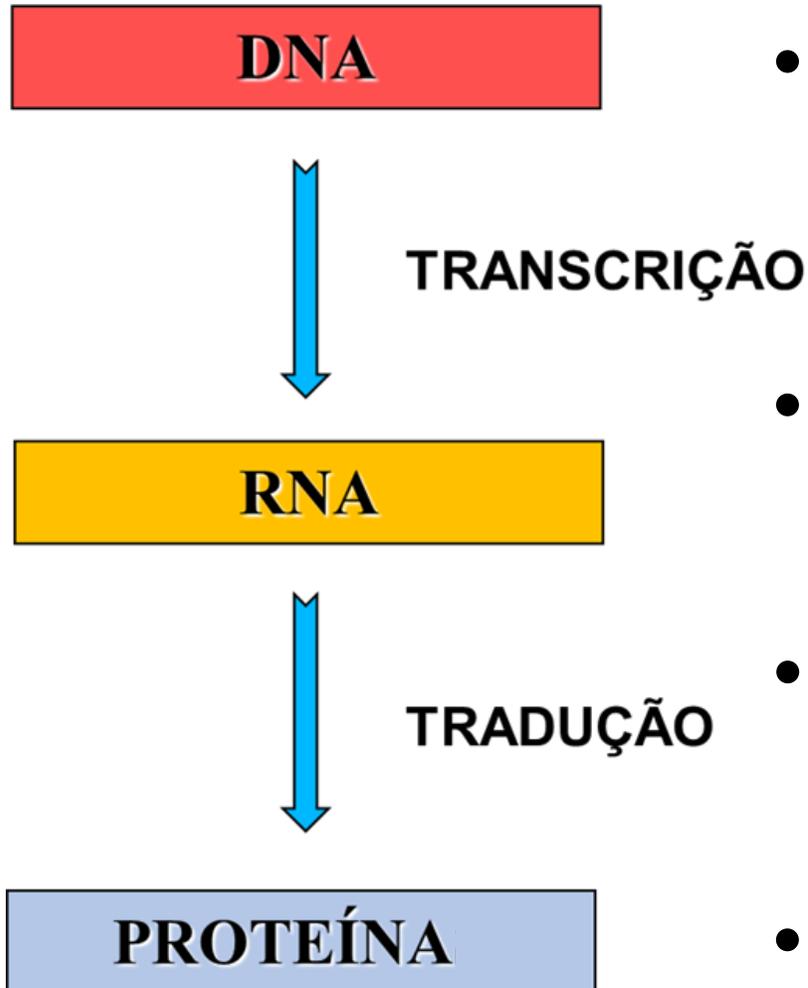
ACH5564-2023

**AULA_7- REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA EUCARIOTOS_II**

Prof. Luiz Paulo Andrioli

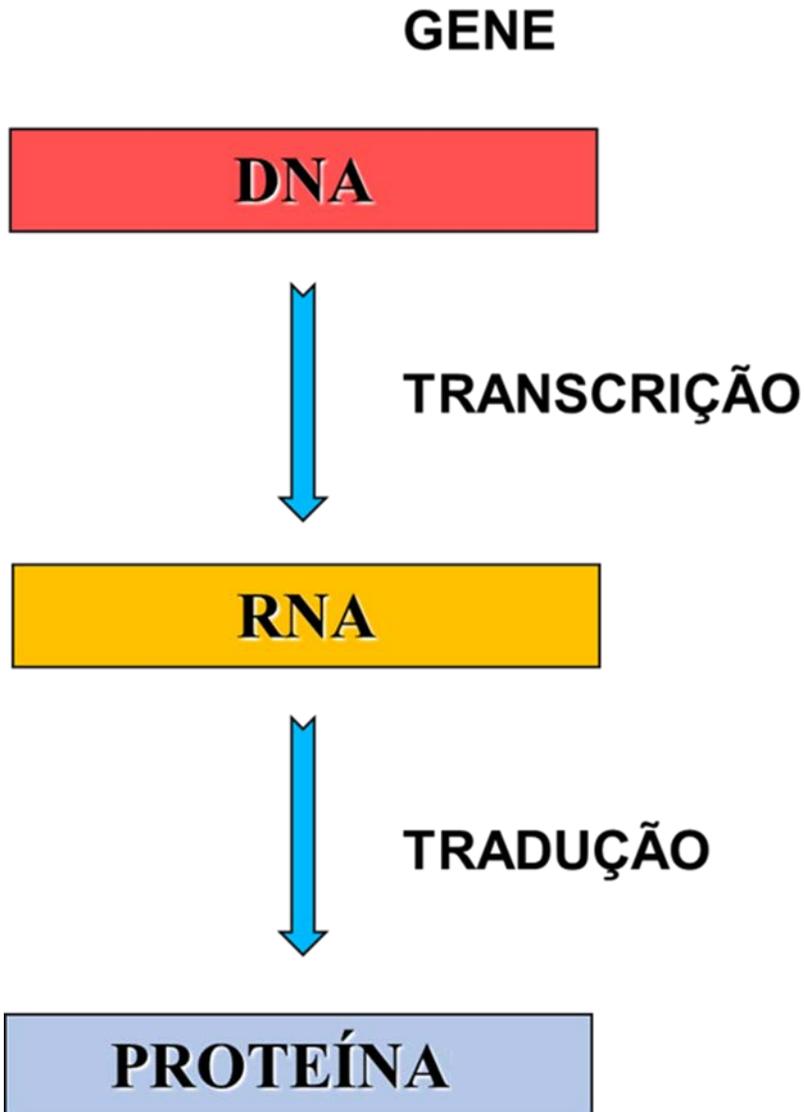
REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

GENE



- A regulação do início da transcrição;
- Por meio dos módulos reguladores, da região promotora e das proteínas associadas (fatores de transcrição/ RNA polimerase...)
- Tb em associação com os mecanismos de regulação da cromatina;
- Podem ser os únicos mecanismos na regulação de genes eucariotos;
- Ou, mais provavelmente, são os principais mecanismos da regulação gênica.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA



- No entanto, muitas vezes, além dos mecanismos de início de transcrição;
- Vários outros mecanismos podem contribuir para a regulação da expressão gênica;
- E podem se constituir;
- Nos mecanismos mais importantes para modular a expressão diferencial de alguns genes.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

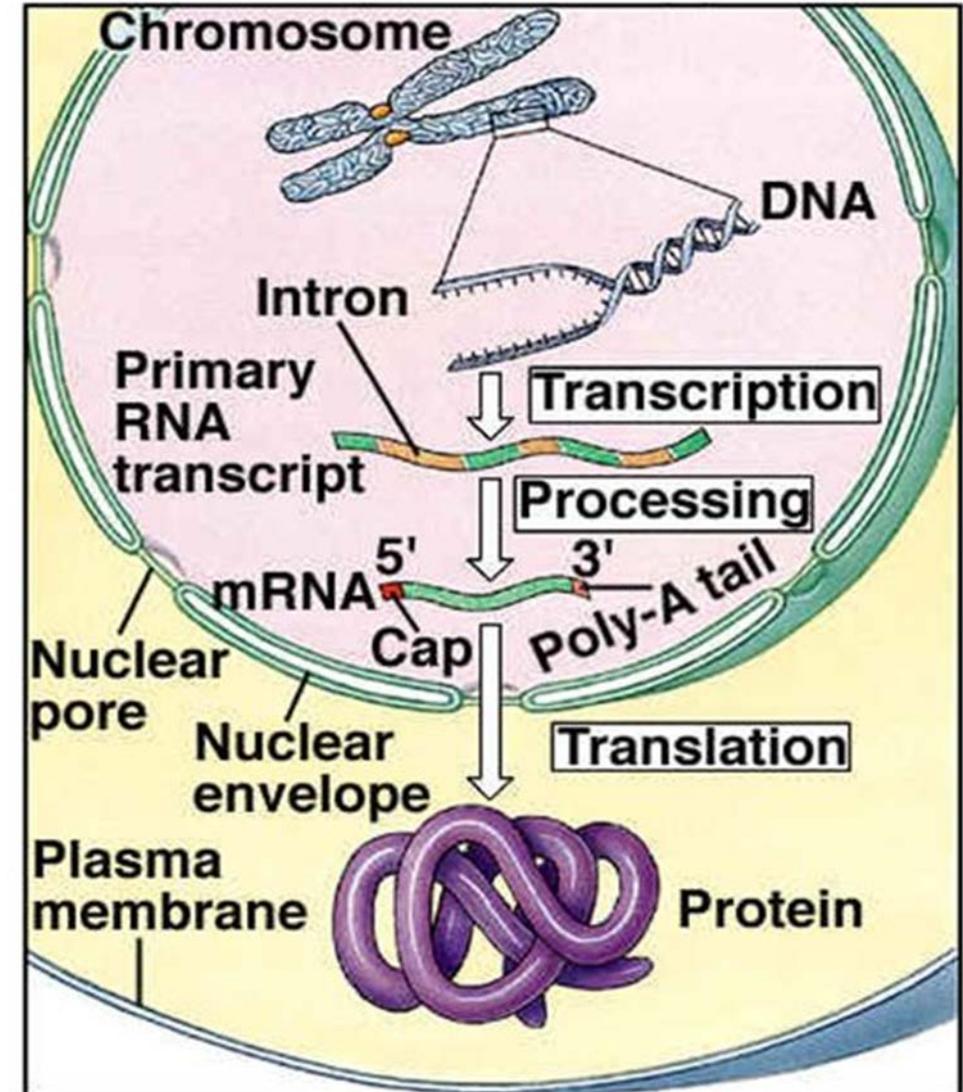
- Os sequenciamentos dos primeiros genomas mostraram que o tamanho do genoma ou mesmo o número de genes não têm uma relação direta com a complexidade estrutural/morfológica das espécies.

SURPRESA

- Então, “algo mais” deve compensar essa discrepância!

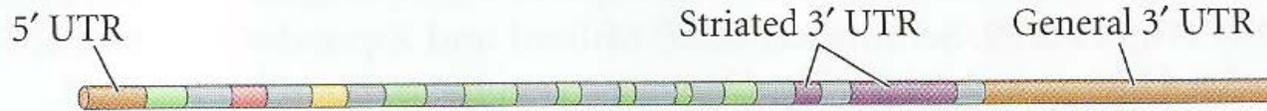
REGULAÇÃO envolvendo TRANSCRIÇÃO

- A segregação da transcrição e tradução em compartimentos distintos;
- Possibilitou o surgimento de mecanismos celulares;
- E oportunidades de regulação da expressão gênica;
- Por exemplo, durante o processamento de RNAm...

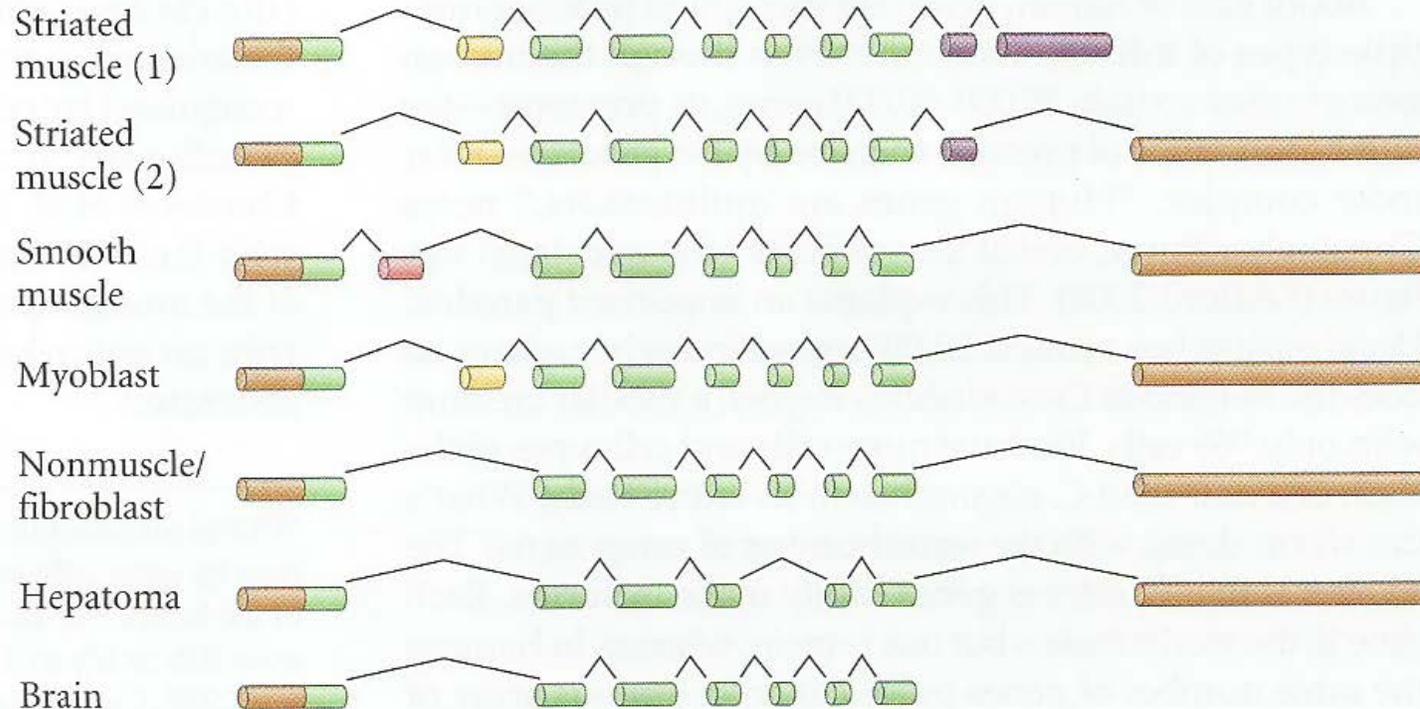


REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

- Processamento do RNA mensageiro (RNAm)- *SPLICING*



Alternative splicing of mRNA transcripts



***SPLICING* DIFERENCIAL**

GENE DA TROPOMIOSINA DE CAMUNDONGO pode originar diferentes mRNAs, portanto, proteínas diferentes

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

CONCLUSÃO

- Com a utilização do *splicing* diferencial;
- Um único gene pode gerar produtos diferentes;
- Ou seja, um gene equivale a vários genes!

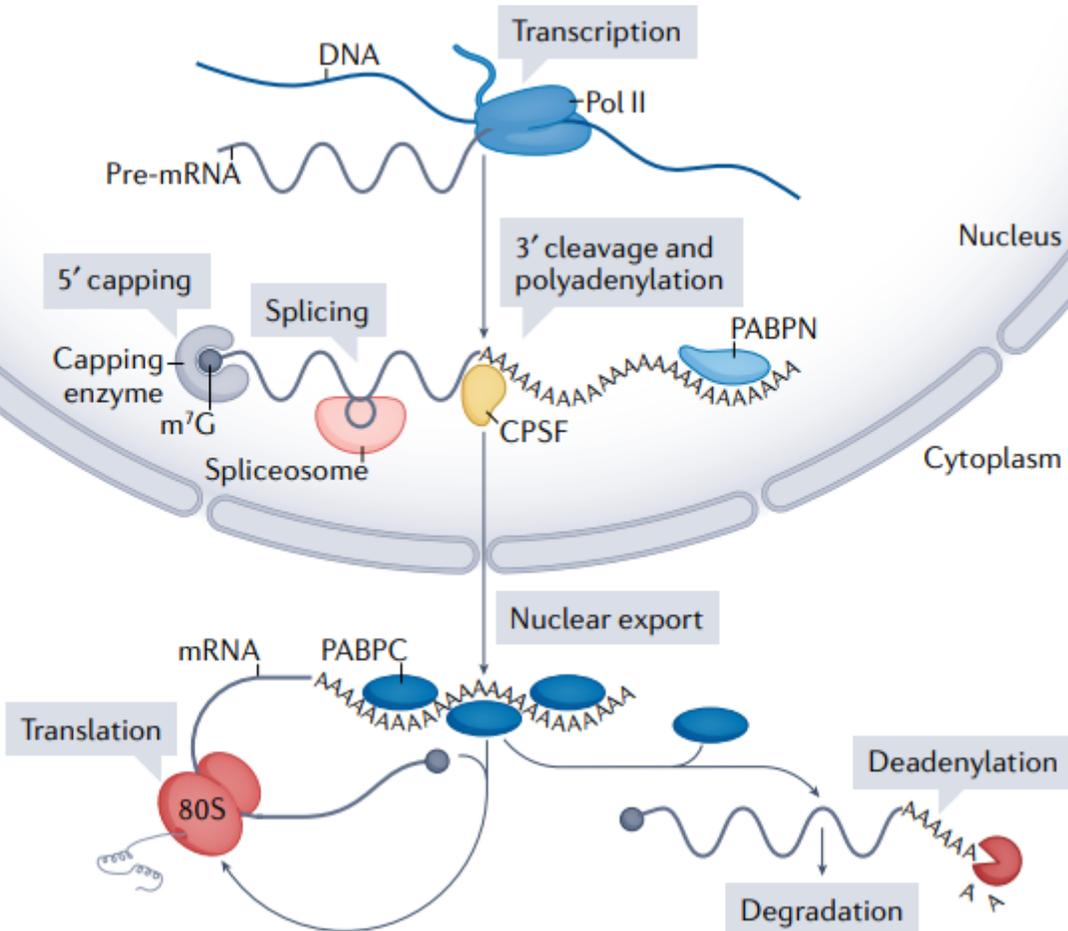
PREVISÃO

- O *splicing* diferencial é um mecanismo que ocorre durante a transcrição, mas devem haver outros mecanismos de regulação da expressão gênica subsidiando a complexidade morfológica.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

- Mecanismo de regulação da expressão gênica pós-transcricional

CONTROLE DA ESTABILIDADE de RNAm



- Proteína PABP participa na adição da cauda de poli A no núcleo;
- E é exportada pelo núcleo e mantida ligada a cauda de poli A;
- Mecanismos de encurtamento da cauda de poli A (remoção de adeninas);
- Diminui a associação e proteção de PABP;
- O RNAm fica mais exposto a ação de nucleases.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

- O início da embriogênese dos animais é uma fase na qual a regulação pós-transcricional/ pré-traducional é muito importante;
- Nessa fase, o embrião duplica o DNA, gera novas células, e precisa iniciar o processo de diferenciação;
- As custas de produtos maternos e de processos alternativos de regulação da expressão gênica;
- Inicialmente, o embrião não transcreve!
- **A drosófila, um exemplo...**

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

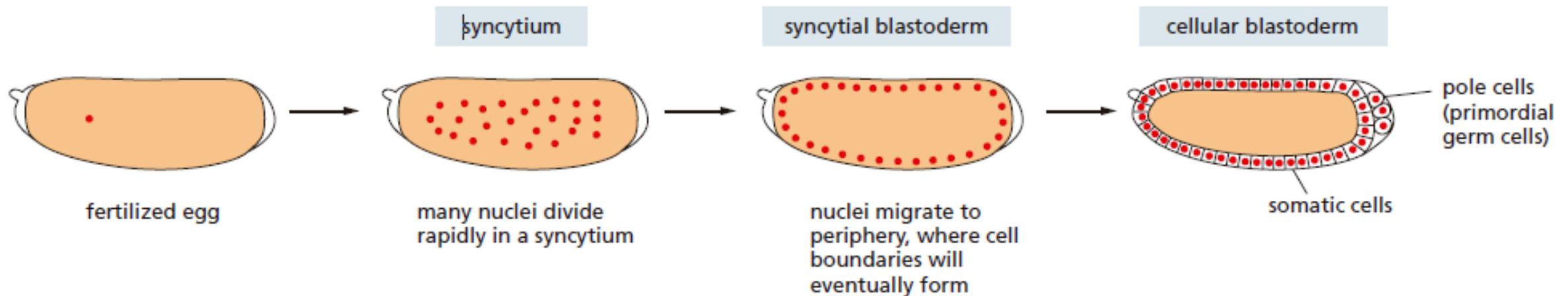
- **CONTEXTO**
- A oogênese na *Drosophila* e nos animais de uma forma geral é um processo que não só gera os gametas femininos, mas também prepara a célula que se constituirá na primeira célula, o zigoto, e possibilitará o início da embriogênese;
- As células foliculares e as células companheiras são determinantes para gerar instruções para o início do desenvolvimento do embrião.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

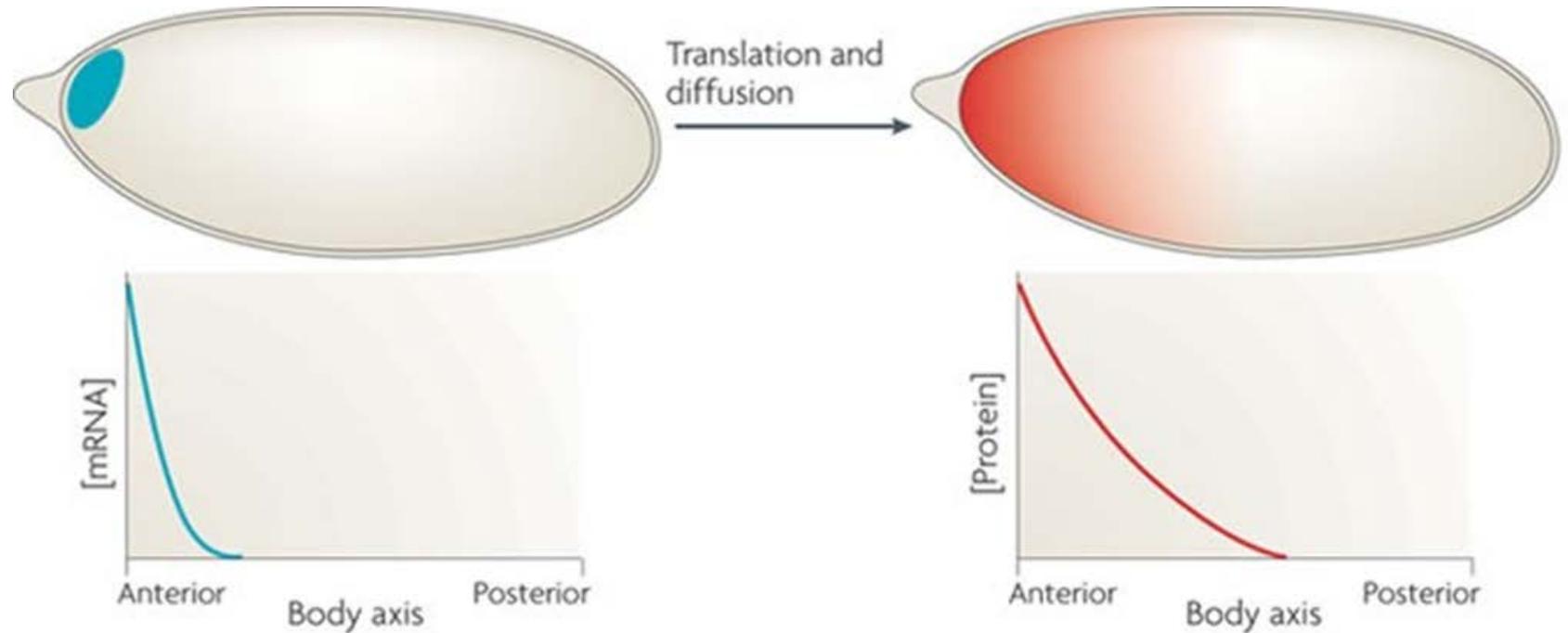
- **CONTEXTO**

- Diferente da maioria dos outros animais, nas primeiras divisões do embrião de insetos o DNA é duplicado, os núcleos se separam, mas não ocorre divisão do citoplasma;



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

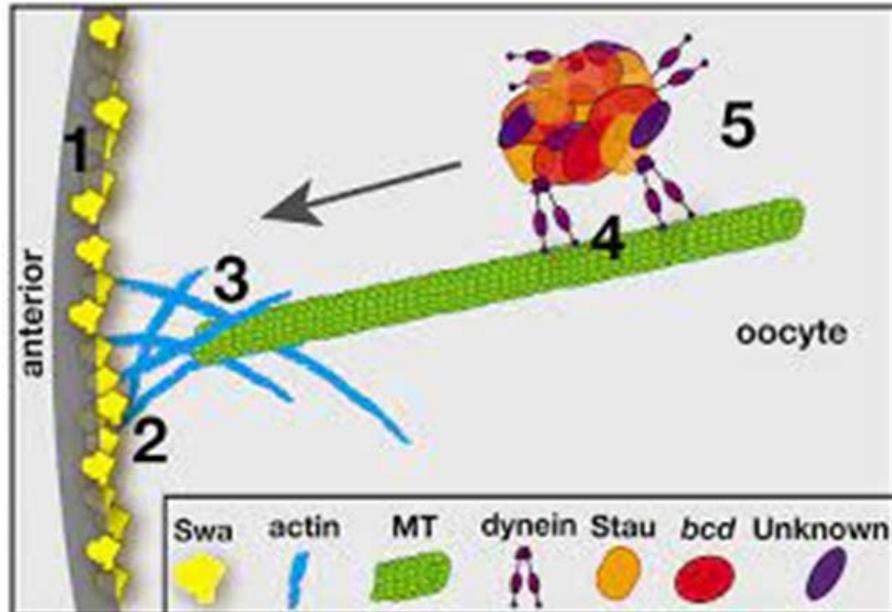
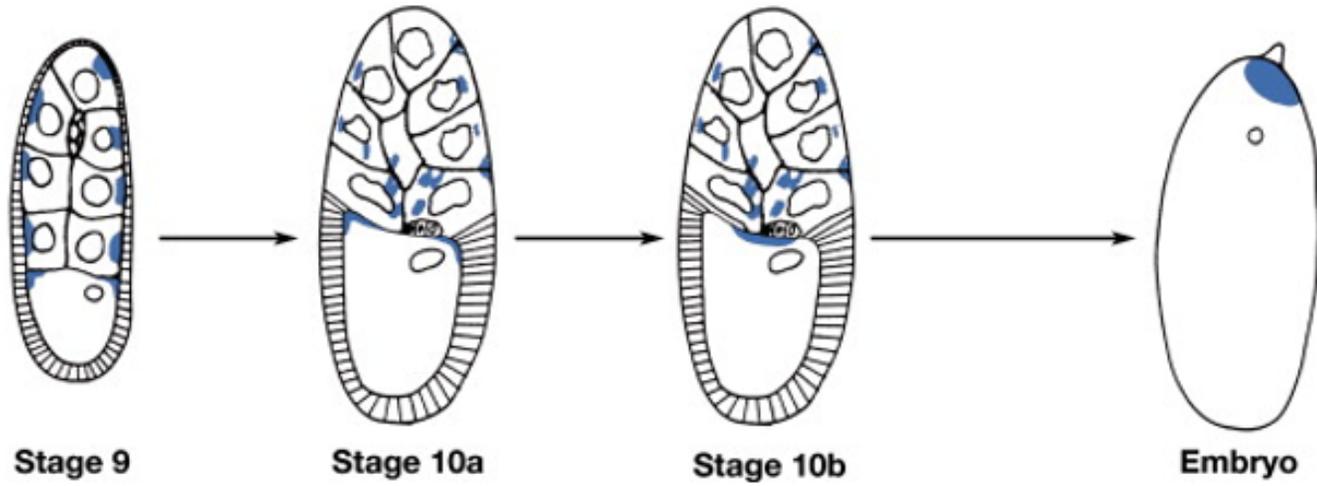
- CONTEXTO



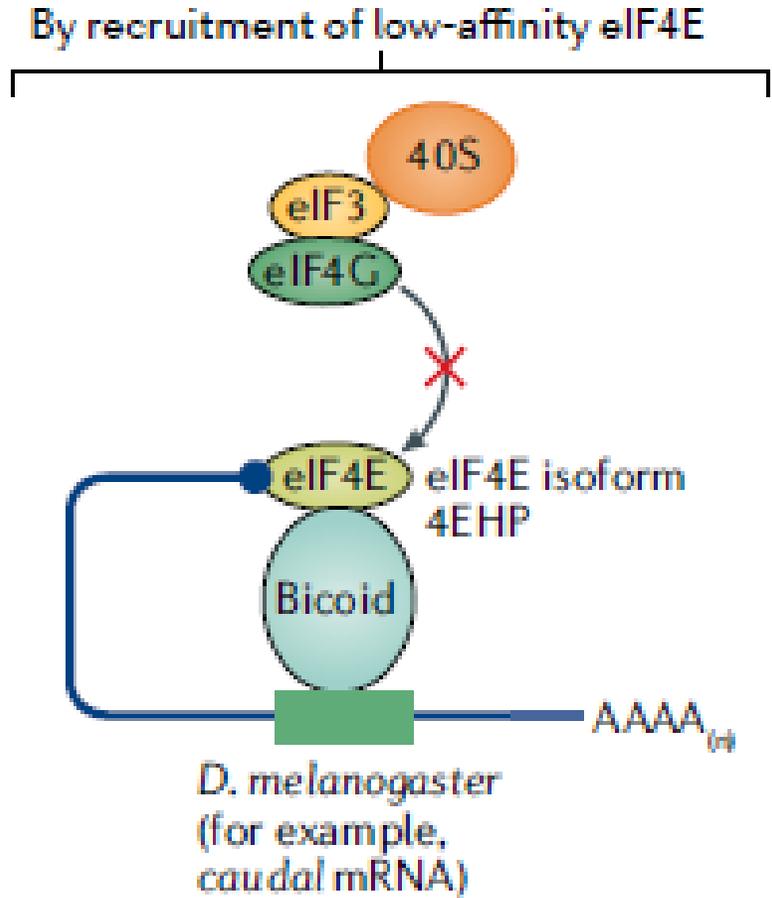
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

- A proteína Bicoid é uma proteína fundamental para ativar diferencialmente genes na região anterior do embrião de *Drosophila*;
- Por meio de um gradiente proteico gerado de RNAm retido na extremidade anterior do embrião;

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA



- Transporte do RNAm de *bicoid* para o oócito por meio de microtúbulos direcionados para a região anterior onde é retido pela actina e mantido sem tradução até a fertilização.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

• CONTEXTO

- O RNAm de *bicoid* é sintetizado pelas células companheiras durante a oogênese;
- Transportado para o oócito;
- E no oócito, *bicoid* fica estável e sem ser traduzido;
- Além de retido por interação com o citoesqueleto no polo anterior do embrião;
- Assim que ocorre a fecundação, a proteína é traduzida e se difunde no embrião que é um sincício
- Criando um gradiente citoplasmático que diminui em direção a região posterior do embrião.

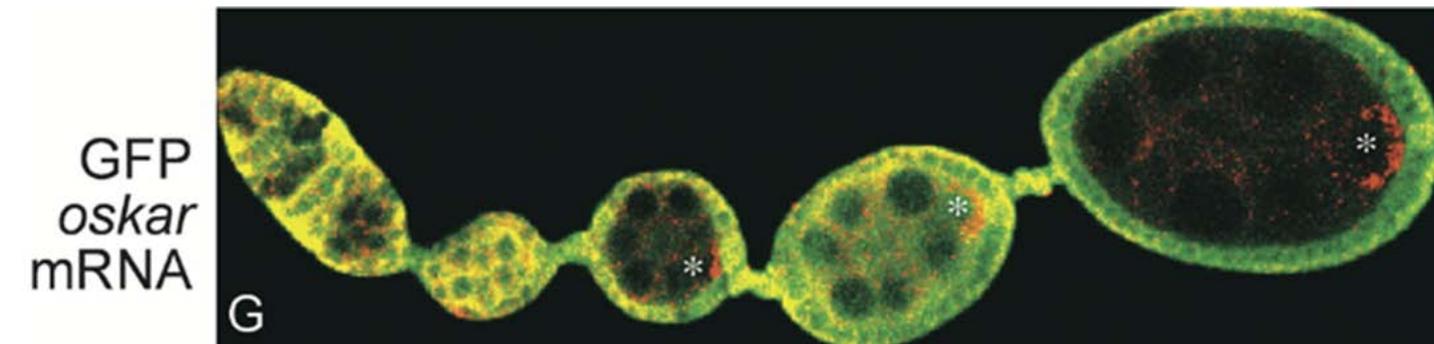
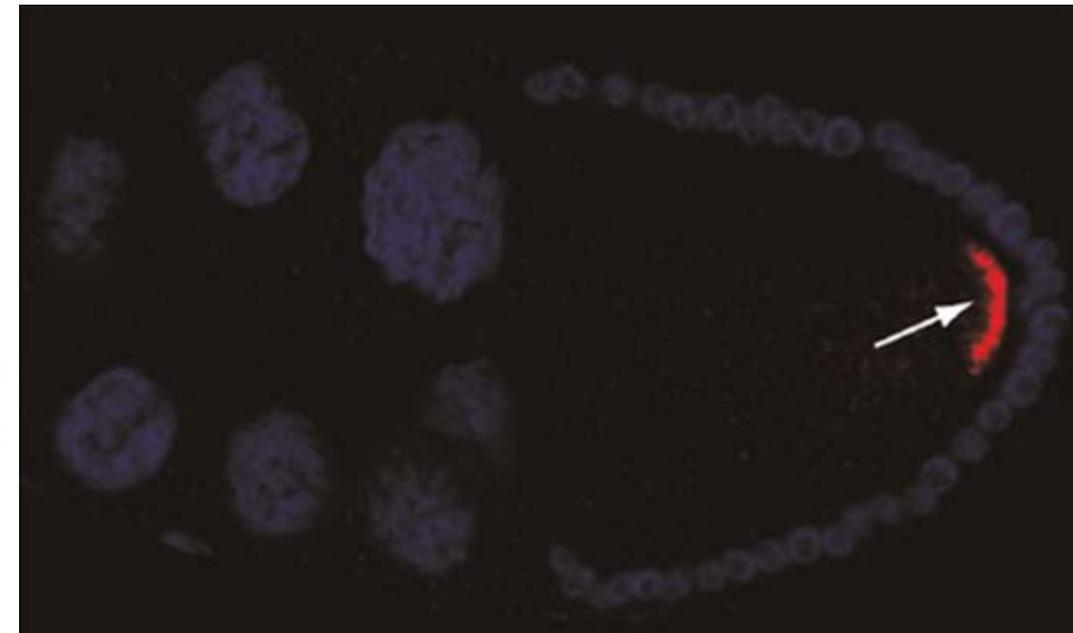
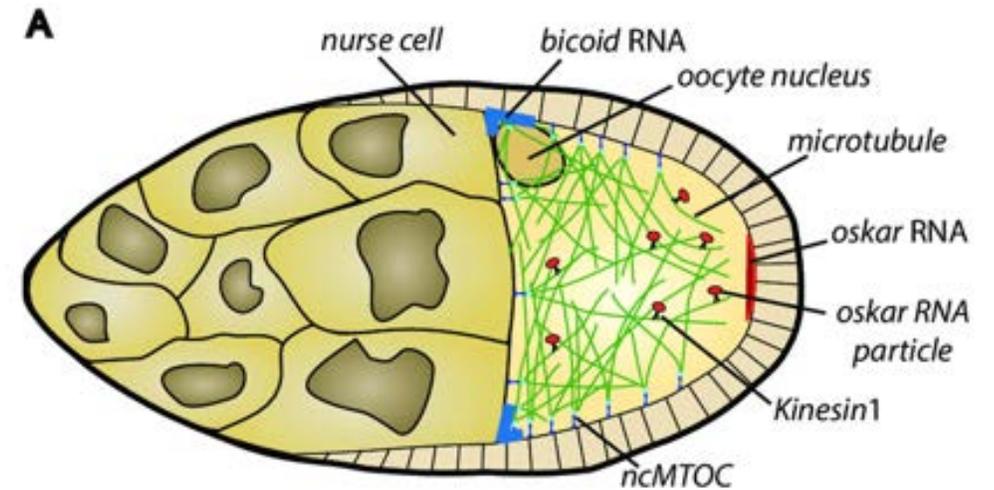
REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

- Os RNAs estão sujeitos a várias formas de regulação da expressão gênica:
 - **OUTROS MECANISMOS...**
- Controle da estabilidade (degradação);
- Controle do início da tradução;
- Transporte e ancoragem diferencial de RNAs;
- Mecanismos mediados por interações RNA- proteína/ RNA-RNA;
- Esses e ainda outros mecanismos pós-transcricionais e pré-traducionais são mais comumente utilizados do que costumamos imaginar...

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

• CONTEXTO

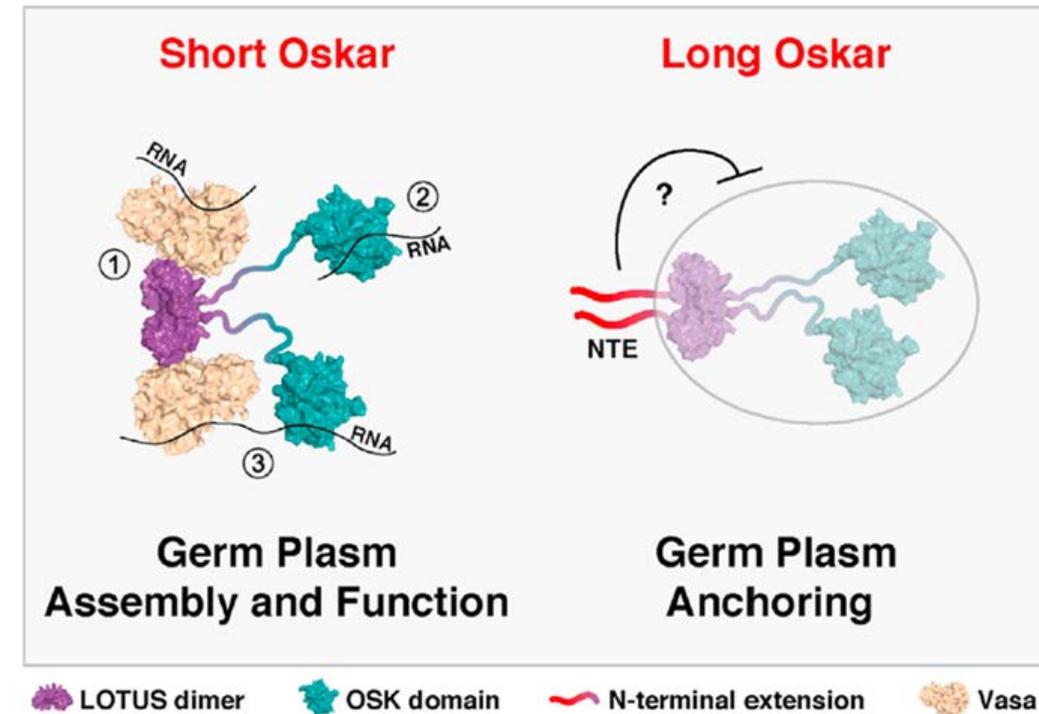
- Durante a oogênese, as células companheiras sintetizam RNAm de *oskar* que é transportado para o oócito e no oócito transportado para a região posterior;
- Acumulando na extremidade posterior do embrião em níveis cada vez maiores;
- Onde é posteriormente traduzido.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

• CONTEXTO

- Duas formas da proteína Oskar são sintetizadas, a curta e a longa;
- A forma longa tem papel na ancoragem do RNAm na região posterior;
- A forma curta tem dois papéis fundamentais;
- Na formação da região posterior do embrião e da linhagem germinativa;

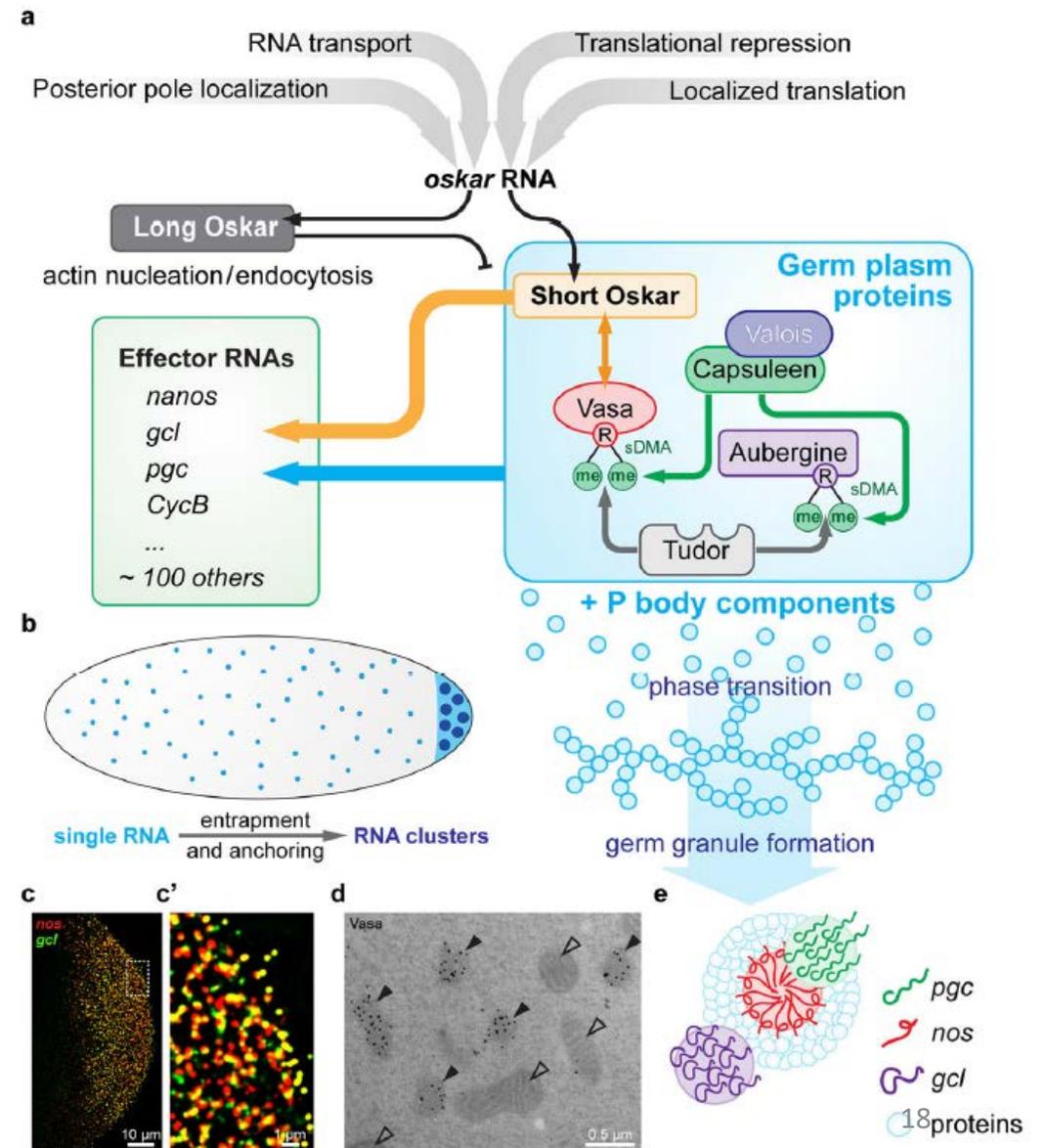


- MECANISMO DE REGULAÇÃO GÊNICA TRADUCIONAL: TRADUÇÃO DIFERENCIAL DO RNA MENSAGEIRO!

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

• CONTEXTO

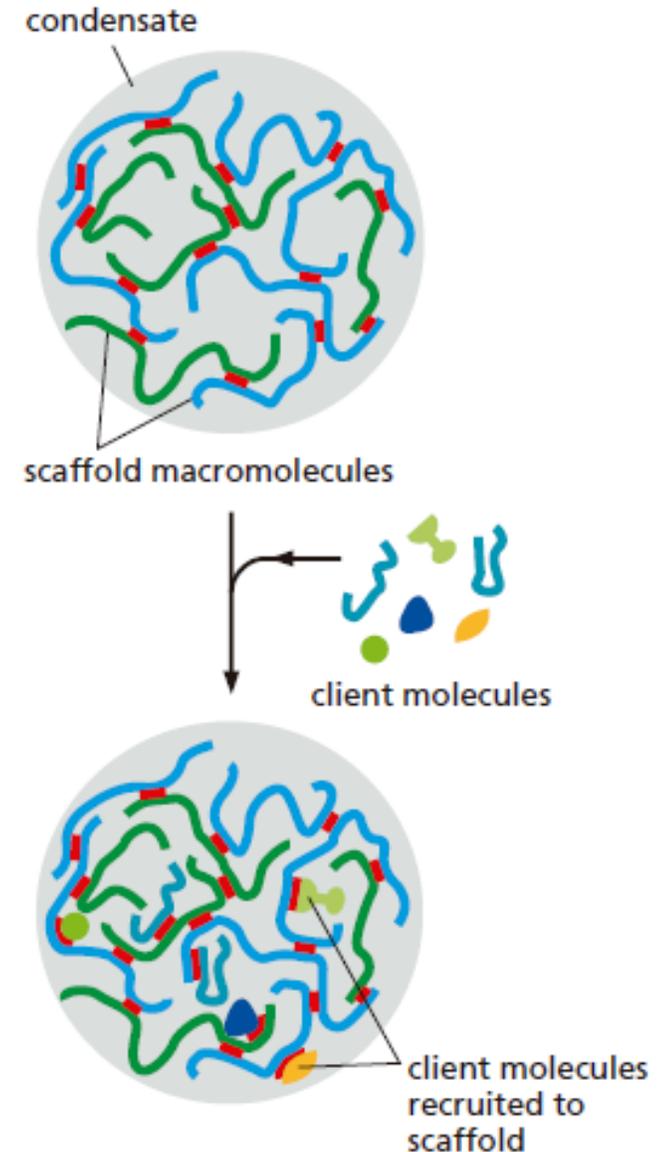
- A proteína Oskar tem papel na nucleação de RNAs e na região posterior do oócito;
- Mais de 100 RNAs maternos diferentes foram detectados como constituintes desses RNPs;
- Que são “lançados” no oócito no final da oogênese pelas céls companheiras e são movimentados conforme o fluxo no citoplasma do embrião;
- E capturados por afinidade com o citoplasma local (plasma germinativo/ grânulo germinativo);
- Esses grânulos concentram e regulam diferentes RNAs e proteínas que atuam de forma conjunta para um processo celular em comum.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

• CONDENSADOS BIOMOLECULARES

- As células apresentam organização de macromoléculas que são segregadas nas organelas, núcleo ou no citoplasma sem a delimitação por membranas, como o nucléolo e os grânulos de estresse;
- Independente da função, proteínas e RNAs diferentes interagem de forma específica mas interações fracas (não covalentes) em regiões não estruturadas dessas moléculas;
- O que caracteriza uma fluidez grande que remete estado de separação de fase líquido-líquido;
- No condensado encontram-se proteínas estruturais que formam uma arcabouço com proteínas e RNAs, retendo essas moléculas no local mas não impedindo a fluidez e a constante troca de moléculas com o meio circundante.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

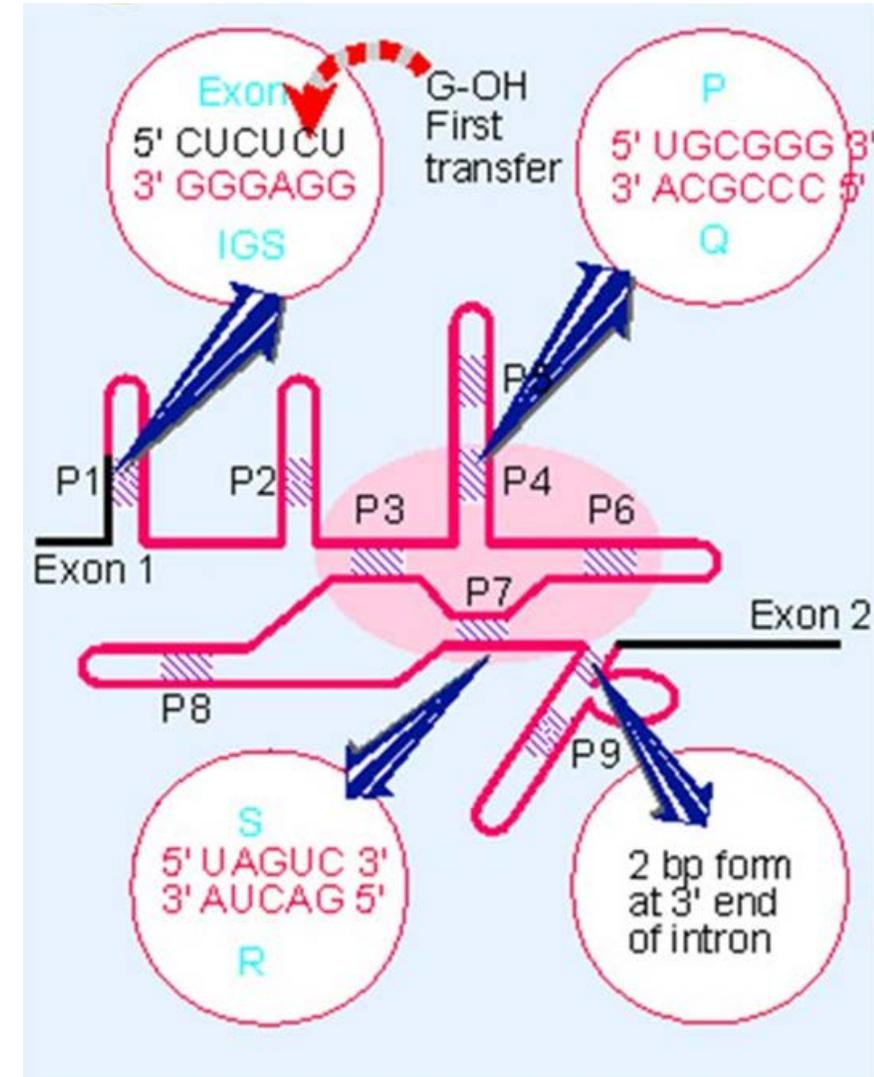
- Os RNAs “clássicos”: RNAm, RNAr, RNAt, foram inicialmente concebidos com funções secundárias e/ou estruturais na célula;
- Diferente da visão que se tem dos RNAs hoje;
- Por exemplo, os RNAr apresentam funções catalíticas (ribozimas);
- Mas existem outros exemplos:
- Como íntrons autocatalíticos em microrganismos e organelas.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

- As funções ribozimáticas ou todas as demais funções exercidas pelos RNAs não mensageiros;
- Decorrem da possibilidade de interações intramoleculares (pareamento de regiões complementares);
- Gerarem estruturas secundárias (grampos), com hastes e alças;
- Que também conferem uma especificidade para interação com outras moléculas de RNAs ou proteínas;
- E são alterações dinâmicas que modulam o estado funcional da molécula de RNA.

Estrutura secundária de íntron do grupo I

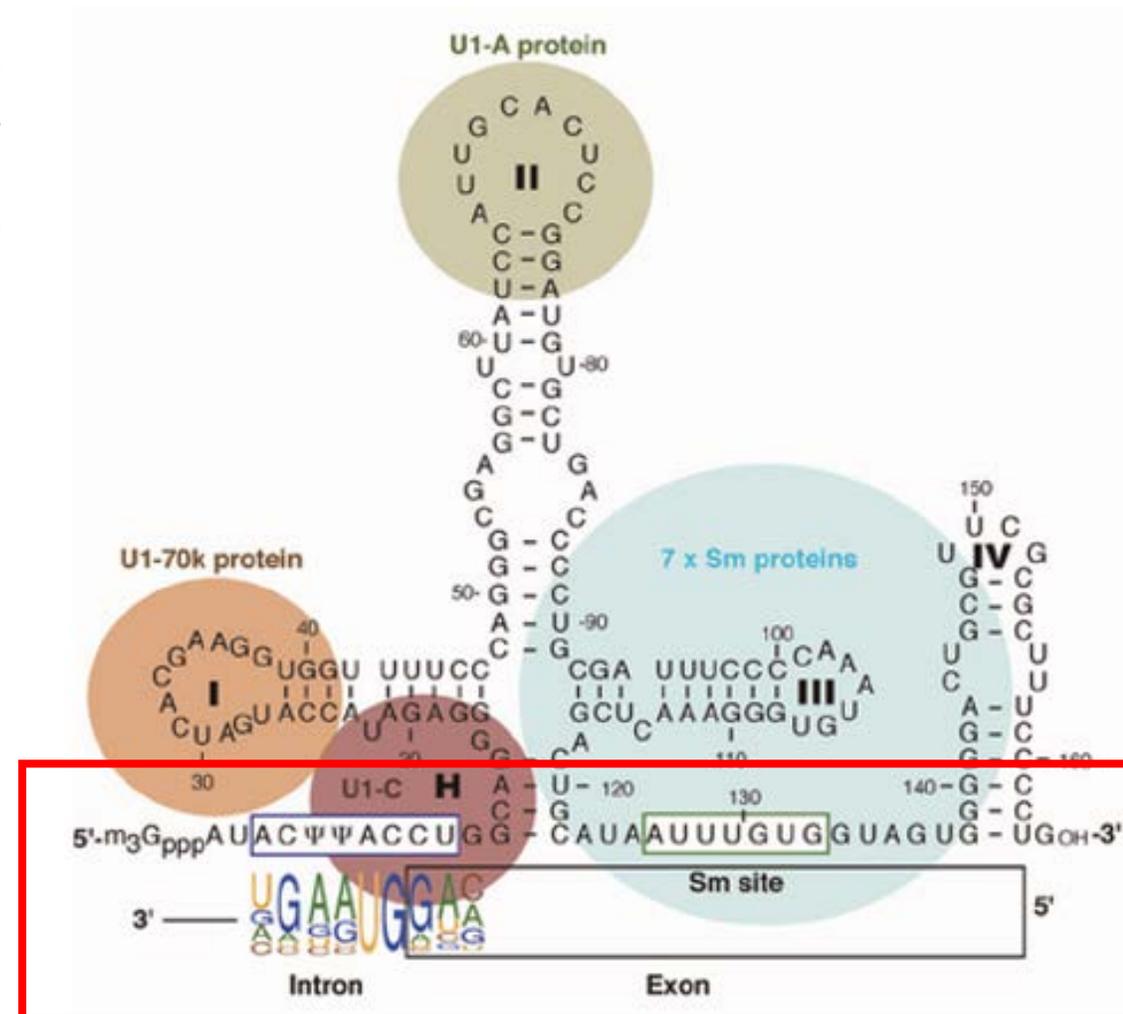


REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

- É muito comum a participação de proteínas ligadoras de RNA (RBP- RNA binding proteins) em complexos funcionais denominados ribonucleoproteínas;
- Um exemplo são as ribonucleoproteínas (snRNP) que participam do *splicing* ;
- Os snRNAs interagem com proteínas e com regiões dos íntrons dos RNAs.

Estrutura da ribonucleoproteína humana U1 (snRNP1)



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

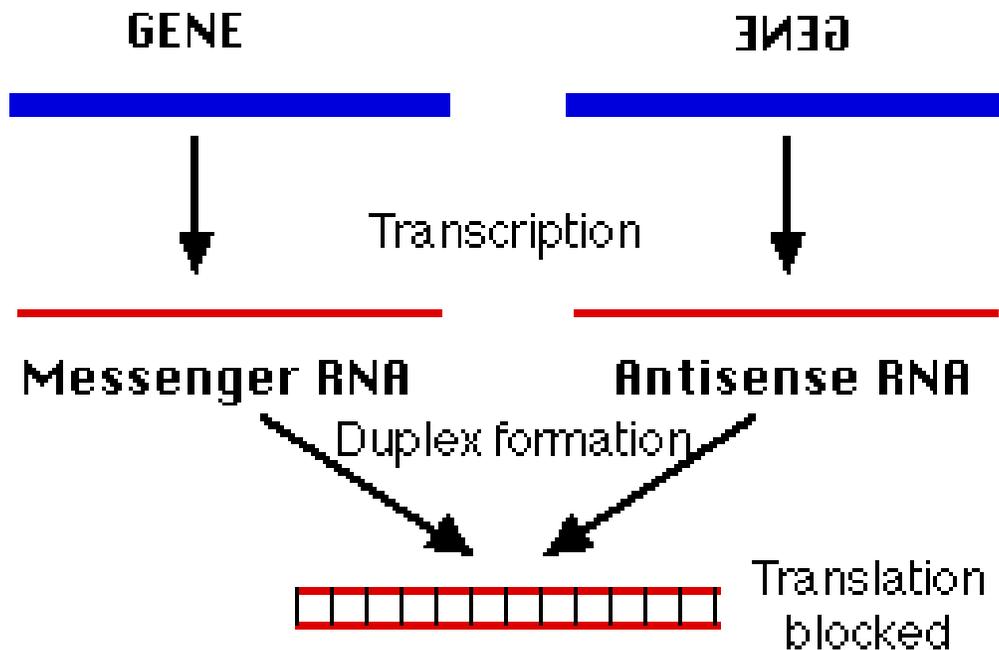
- Portanto, a complementaridade entre sequências não só possibilita a geração da estrutura secundária na molécula de RNA;
- Mas tb garante a especificidade entre interações com outros RNAs.

- Essa propriedade é muito explorada nas células;
- Como recurso para regular RNAs;
- Sendo as sequências (senso) dos RNAs alvo das sequências antisenso de RNAs reguladores.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

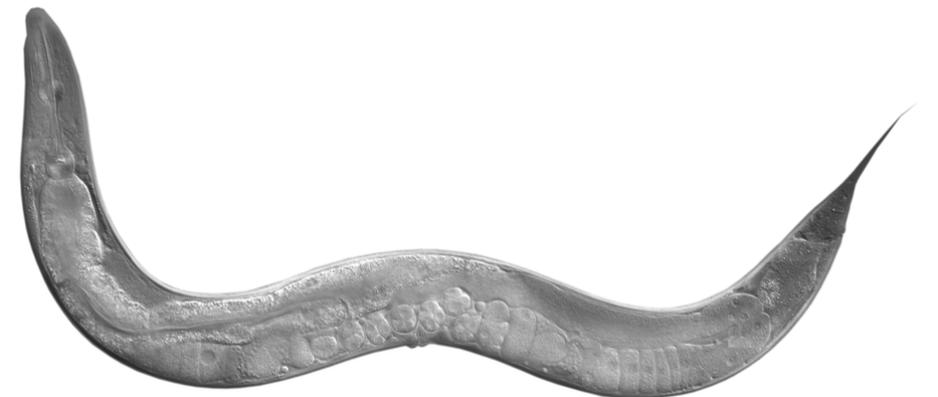
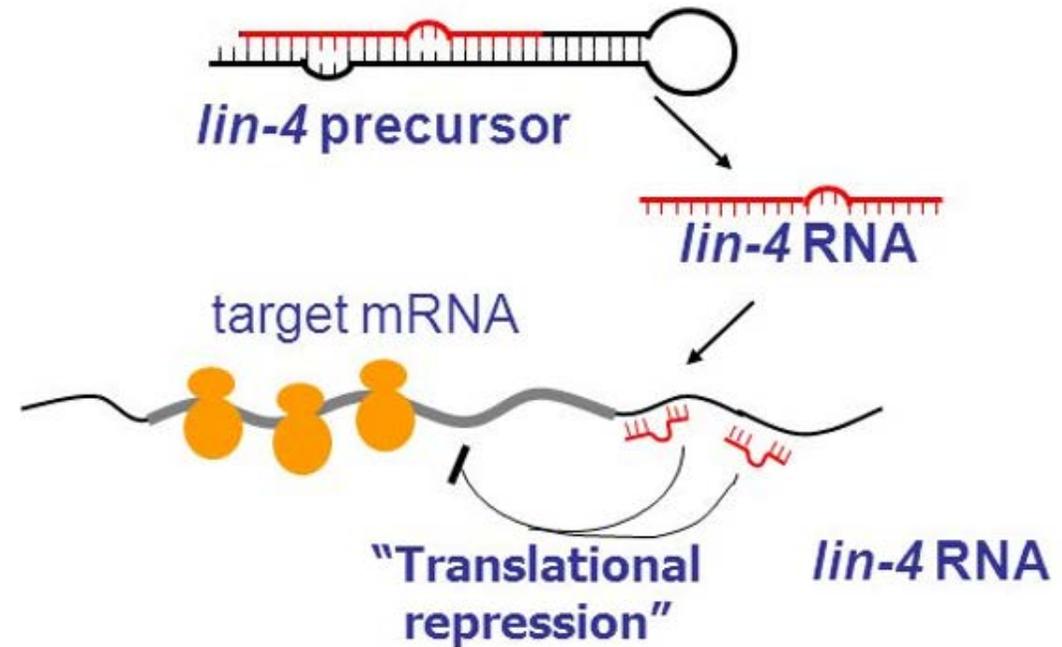
- Na década de 90 se descobriu a existência de genes que codificavam para RNAs antisenso;
- Cujos alvos eram RNAs específicos produzidos pela célula.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

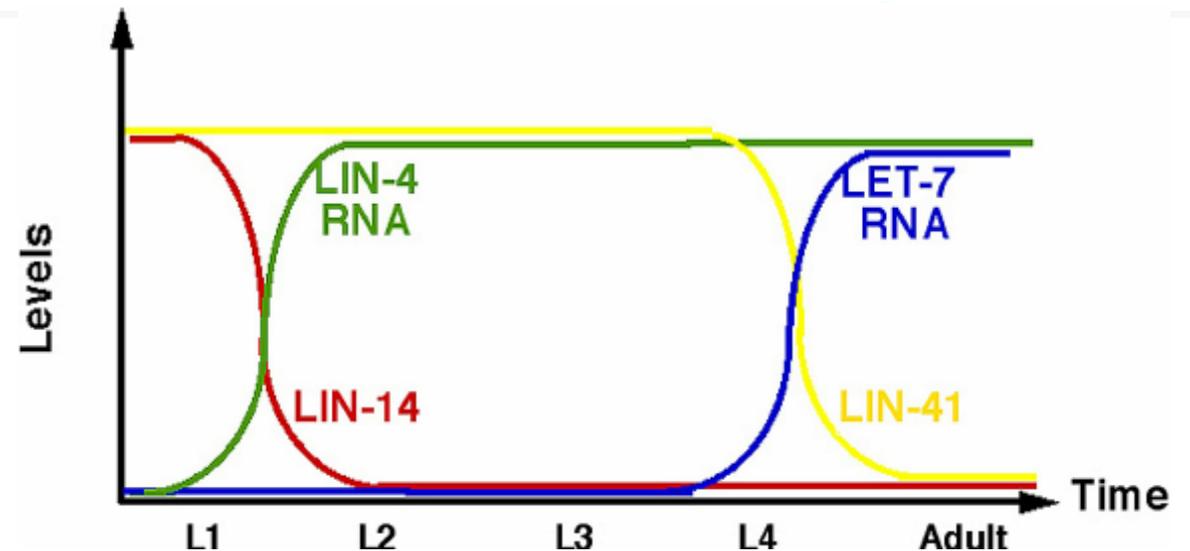
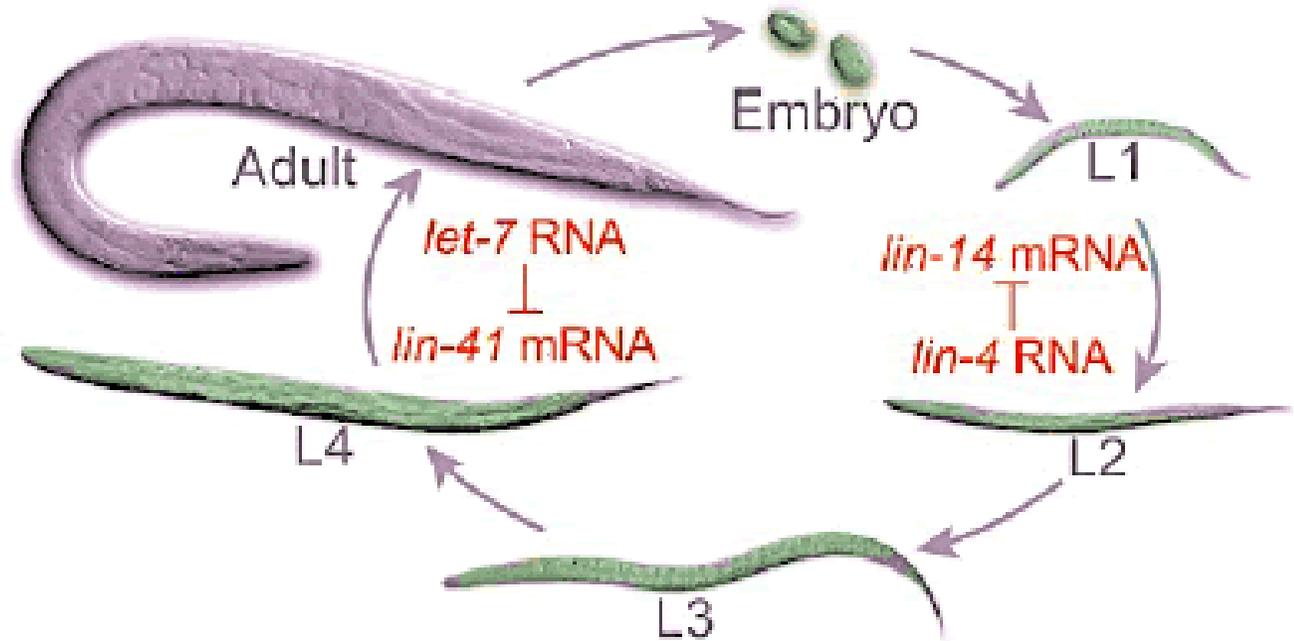
- Esses RNAs antisense foram denominados microRNAs;
- Pois são RNAs de pequeno tamanho;
- Foram inicialmente descobertos em *C. elegans*;
- Posteriormente, os microRNAs foram descobertos em outros eucariotos multicelulares.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

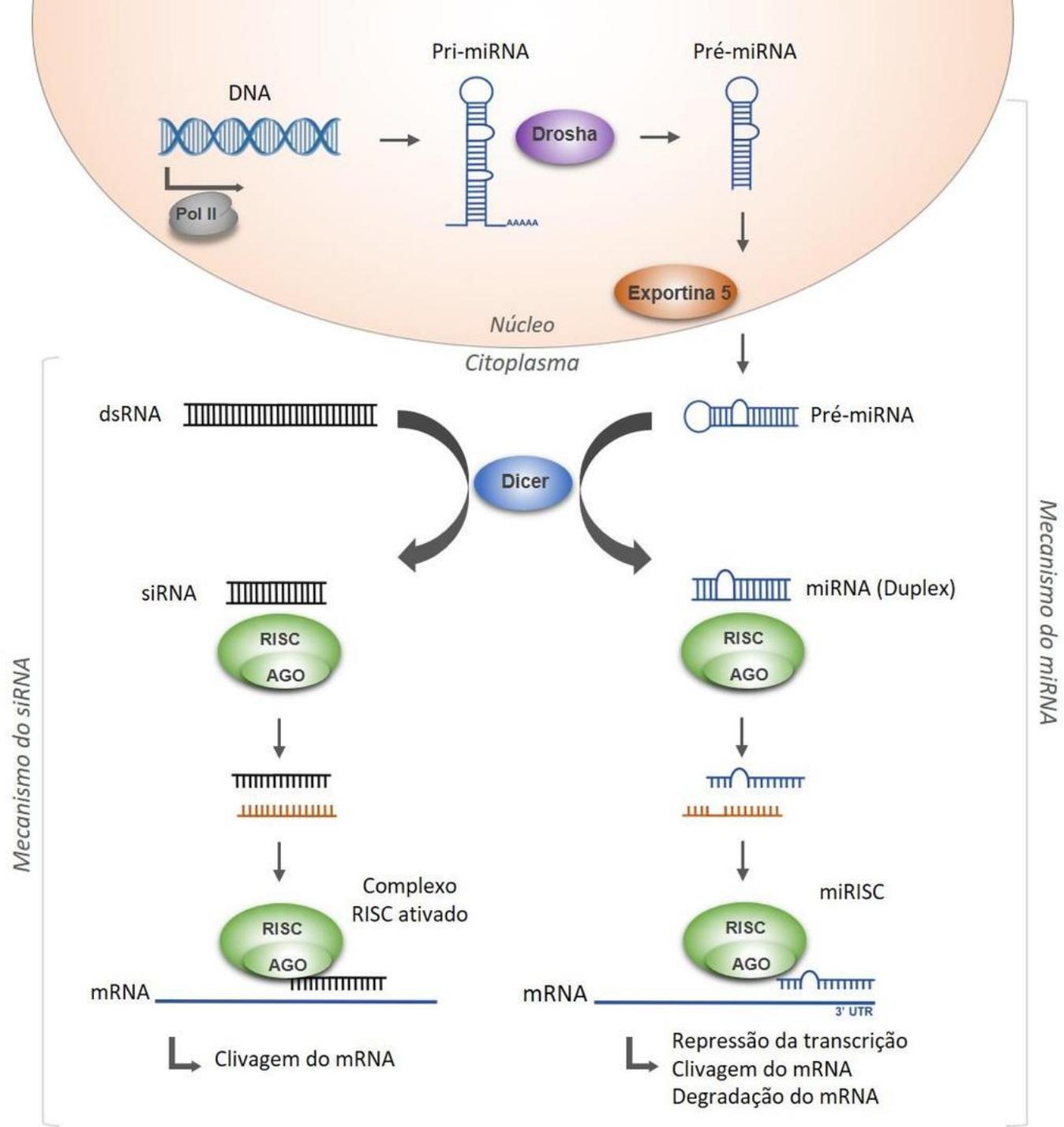
microRNAs

- O verme *C. elegans* apresenta vários estágios larvais entre a fase embrionária e a fase adulta;
- Cada estágio larval é mantido pela expressão de genes específicos para um estágio;
- E o surgimento de micro-RNAs; controlam a expressão dos genes fase-específica.



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

Mecanismo dos microRNAs



REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

microRNAs

- Esses genes transcrevem RNAs longos, que formam estrutura secundária;
- E são progressivamente processados por nucleases em produtos cada vez menores;
- O processamento é iniciado no núcleo por RNases e continua no citoplasma;
- Gerando um produto final que é uma cadeia de fita dupla com 22 nucleotídeos;
- Uma maquinaria celular desfaz a interação entre as cadeias e degrada uma das fitas;
- A fita remanescente é direcionada para a interação com RNAs celulares específicos;
- Nessa condição, o RNAm é direcionado para a degradação, ou impedido de ser traduzido.

REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

- O incremento das metodologias de sequenciamento e de outras abordagens que acessam o genoma como um todo;
- Levaram a duas constatações reveladoras:
 - Que os RNAs correspondem cerca de 1 a 2% dos transcritos de uma célula (98-99% de RNAs não codificadores de proteínas);
 - Portanto, a transcrição de RNAs é mínima dentre os RNAs.

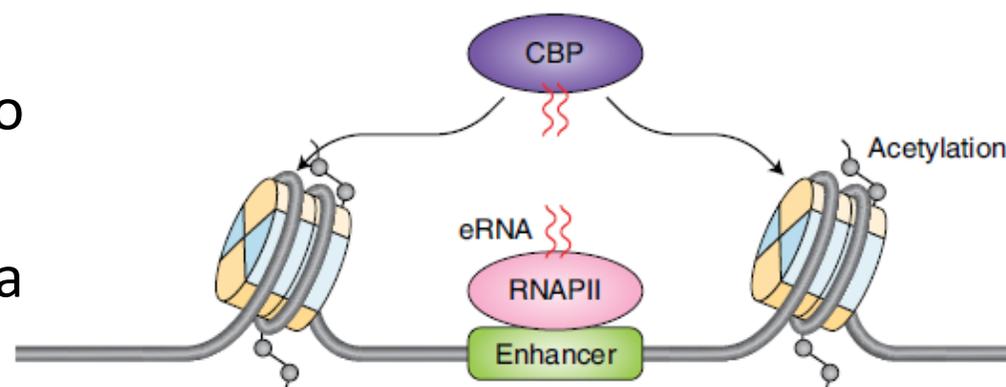
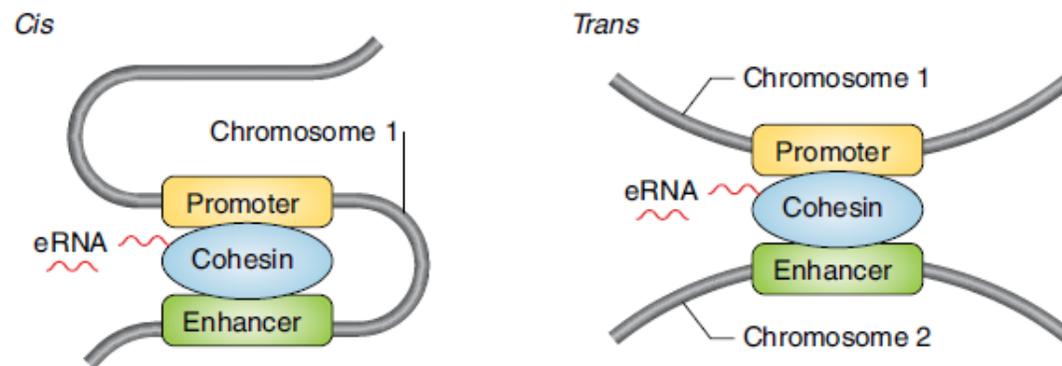
REGULAÇÃO da EXPRESSÃO GÊNICA

RNAs não codificadores (de proteínas)

- De fato, muitos genes não codificadores de proteínas foram descobertos nos genomas de eucariotos complexos, como em humanos;
- Por exemplo, em *C elegans* mais de 20.000 genes desse tipo, quase o mesmo número de genes codificadores de proteínas.
- Além disso, muitos RNAs não relacionados com genes foram identificados;
- O fato é que a transcrição nos genomas é muito mais presente do que se imaginava;
- São diferentes tipos de RNAs, que ainda estão sendo agrupados e cujos papéis biológicos estão sendo investigados;
- Mas principalmente, envolvidos com a regulação da expressão gênica.

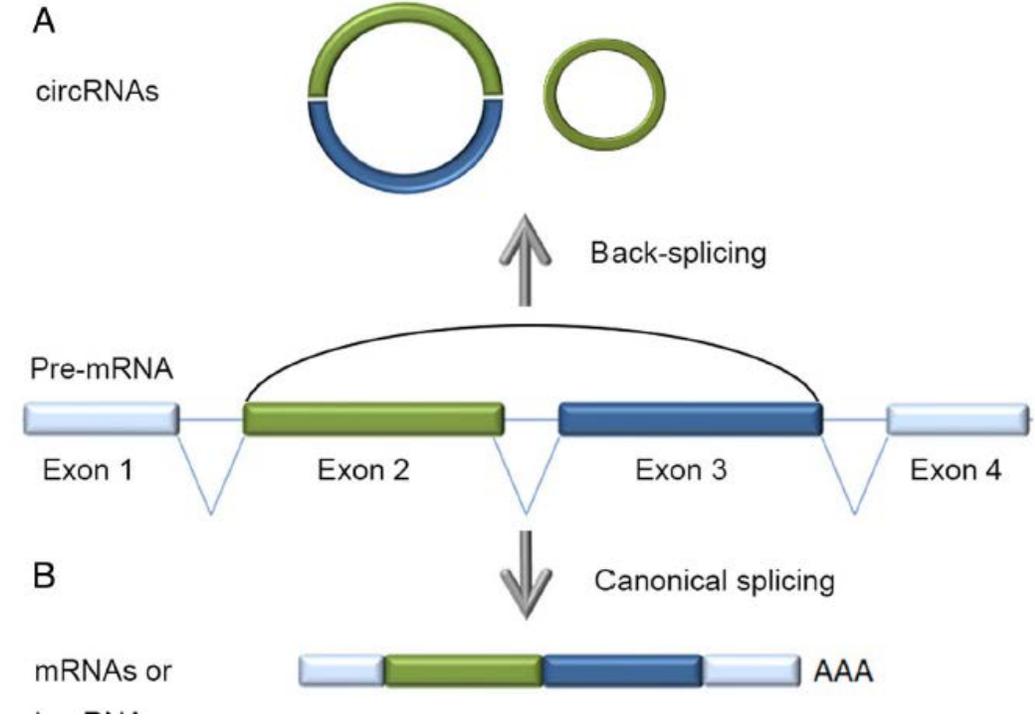
RNAnc • RNAs enhancers (eRNAs)

- 4×10^4 possíveis *enhancers* e de 4 a $6,5 \times 10^3$ eRNAs em céls humanas;
- Expressão massiva, tecido-específica, sinal-específica (regulada);
- *Enhancers* marcadores de regiões de transcrição ativa;
- São transcritos pela RNA pol II, bidirecionalmente, gerando RNAs pequenos, sem íntrons, e por não terem cauda de poli A, são instáveis;
- Em geral favorecem a transcrição do promotor do gene associado;
- Aumenta estabilidade e acessibilidade para transcrição;
- Mas talvez outros papéis como escape da RNA pol II e de genes não codificadores de RNAs longos.

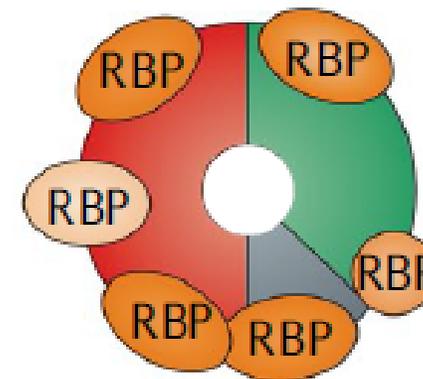


RNAnc

- **RNAs circulares (*circRNAs*)**
- RNAs simples fita circulares que surgem a partir de *splicings* alternativos não canônicos de RNAs;
- Região acceptora do 1º éxon se une a região doadora do 2º éxon (podendo ou não conter íntron);
- Pouco expressos, mas estáveis e em geral atuam no citoplasma (mesmo sem 5'CAP e cauda poliA);
- Mais de 100.000 tipos catalogados de céls humanas (tecido-específicos);
- Atuam como esponjas ou iscas para atrair microRNAs e protegê-los da degradação (ou inibir sua atividade);
- Ou ligam-se a proteínas RBPs que atraem respectivas proteínas para diferentes funções nas céls.



b Protein sponges or decoys



Regulation of
RBP-dependent
functions

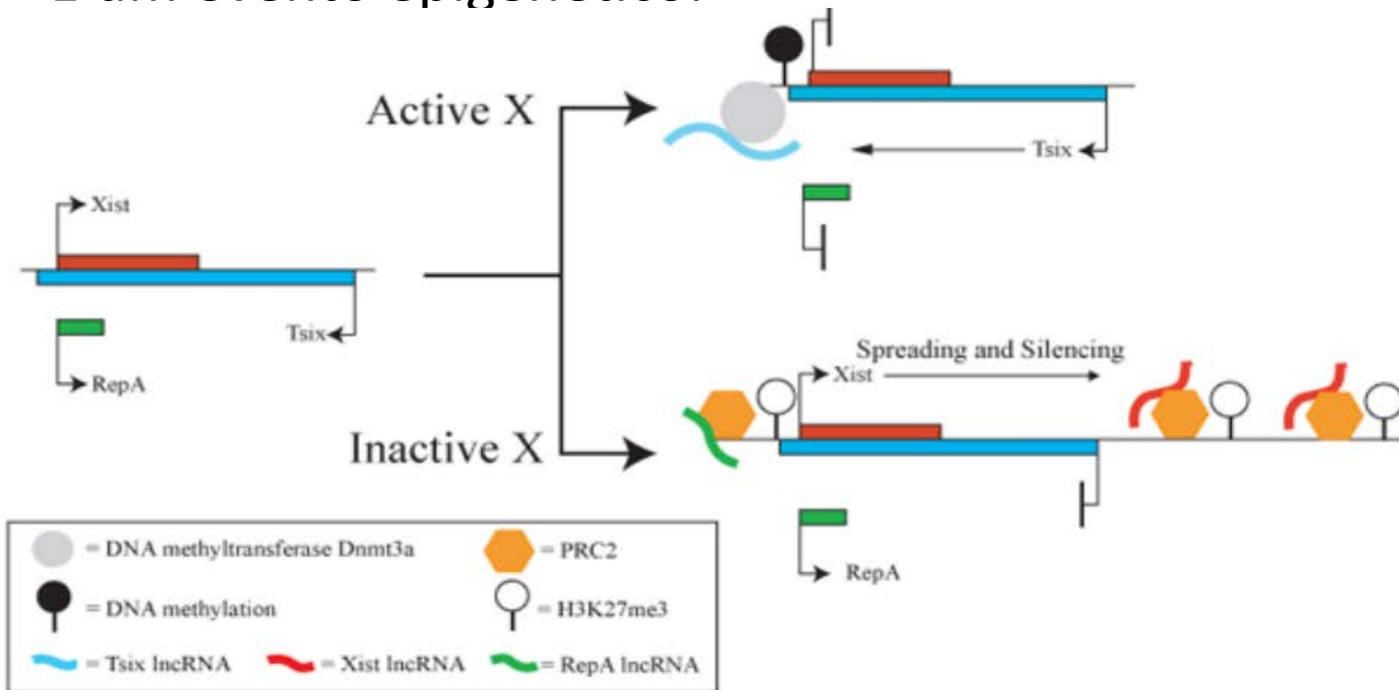
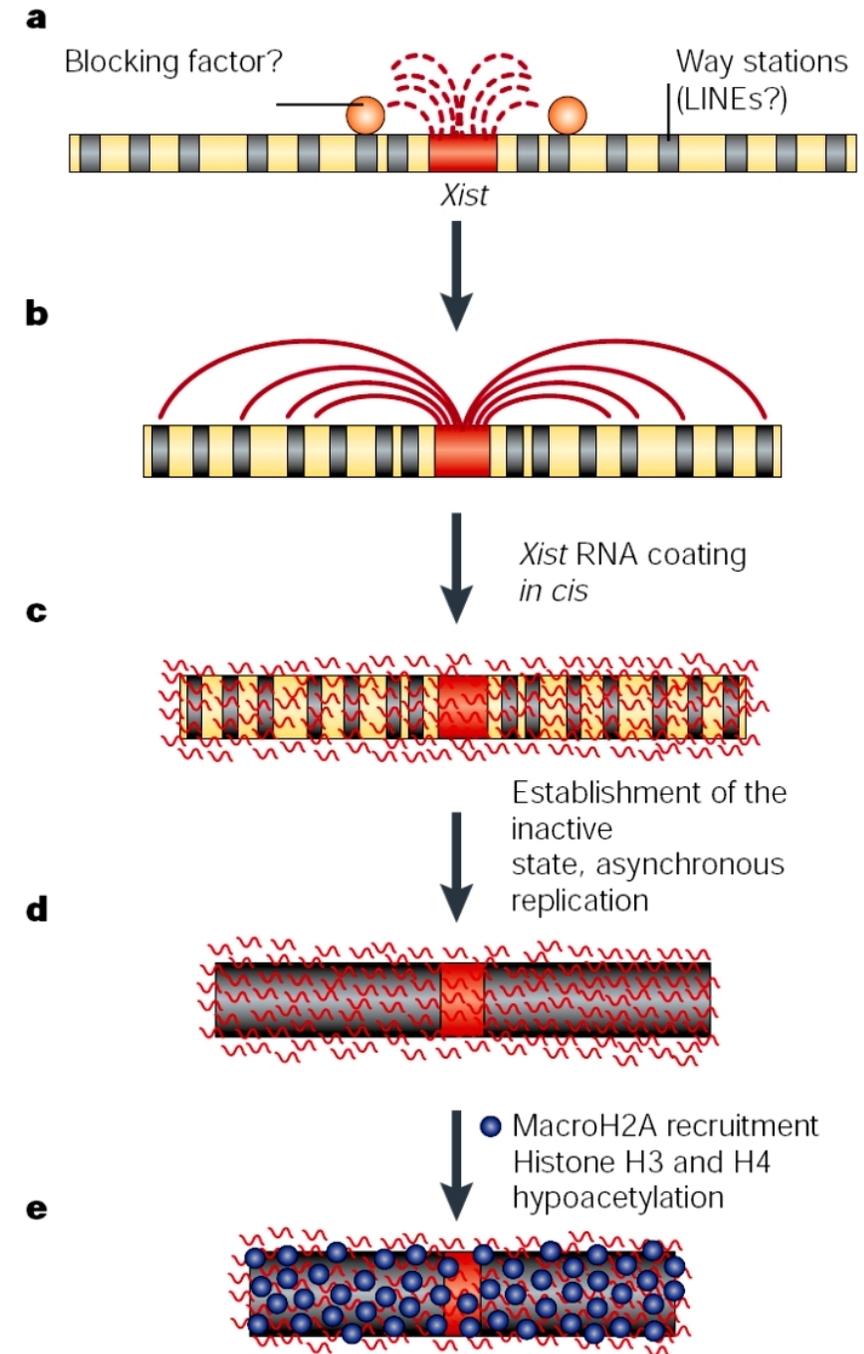
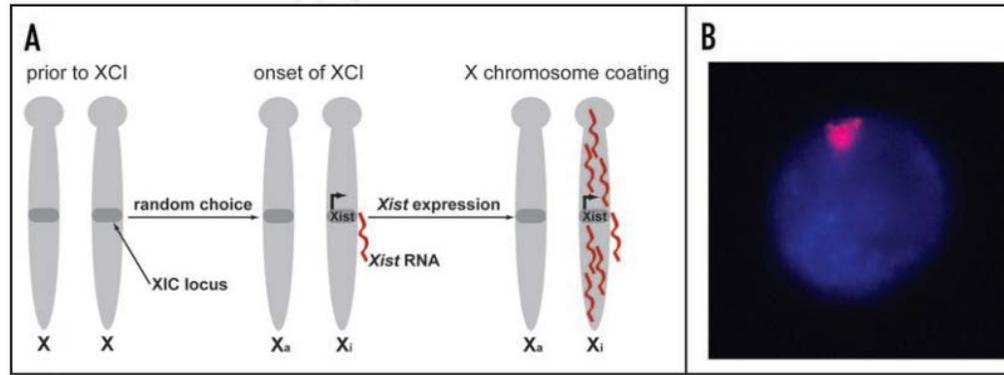
RNAnc

- **RNAs longos (*lncRNAs*)**
- Entre as formas mais representadas nos genomas, encontram-se os RNAs não codificadores longos, ao menos 16.000 tipos de RNAs (genes) em céls humanas;
- São RNAs com pelo menos 200 nucleotídeos, em geral transcritos pela RNA pol II e passível de todos processamentos típicos de RNAm;
- Genes de lncRNAs estão em regiões intergênicas ou se sobrepõem parcialmente ou estão inclusos em genes codificadores de proteínas, podendo gerar RNAs senso ou antisense em relação a esses genes;
- Em comparação com RNAs, menos éxons, menor nível de transcrição, preferencialmente localizados no núcleo (e genes menos conservados); Múltiplas funções celulares que estão sendo mapeadas, como interferência na regulação de genes próximos ou distantes;

RNAnc

- RNAs longos (*lncRNAs*)

- O silenciamento (inativação) de um cromossomo X em mamíferos é coordenado por lncRNAs;
- É um evento epigenético.



REGULAÇÃO envolvendo TRANSCRIÇÃO

- A regulação da expressão gênica também pode ocorrer antes, durante, ou após a tradução!

REGULAÇÃO envolvendo TRADUÇÃO

- Em bactérias, a regulação antes e durante a tradução é frequente, associada a transcrição, pelo fato desses dois processos serem acoplados nos procariotos;
- E embora não ocorra antiterminação em eucariotos;
- Existem mecanismos que atuam entre transcrição e tradução como os micro RNAs;
- Que ou direcionam o RNAm para degradação, ou impedem sua tradução.

REGULAÇÃO envolvendo TRADUÇÃO

- Mecanismos muito frequentes nos eucariotos são verificados após a tradução;
- A alteração de proteínas após sua síntese é um mecanismo que possibilita uma resposta celular rápida;
- Envolve alterações conformacionais e mudanças do estado funcional das proteínas:

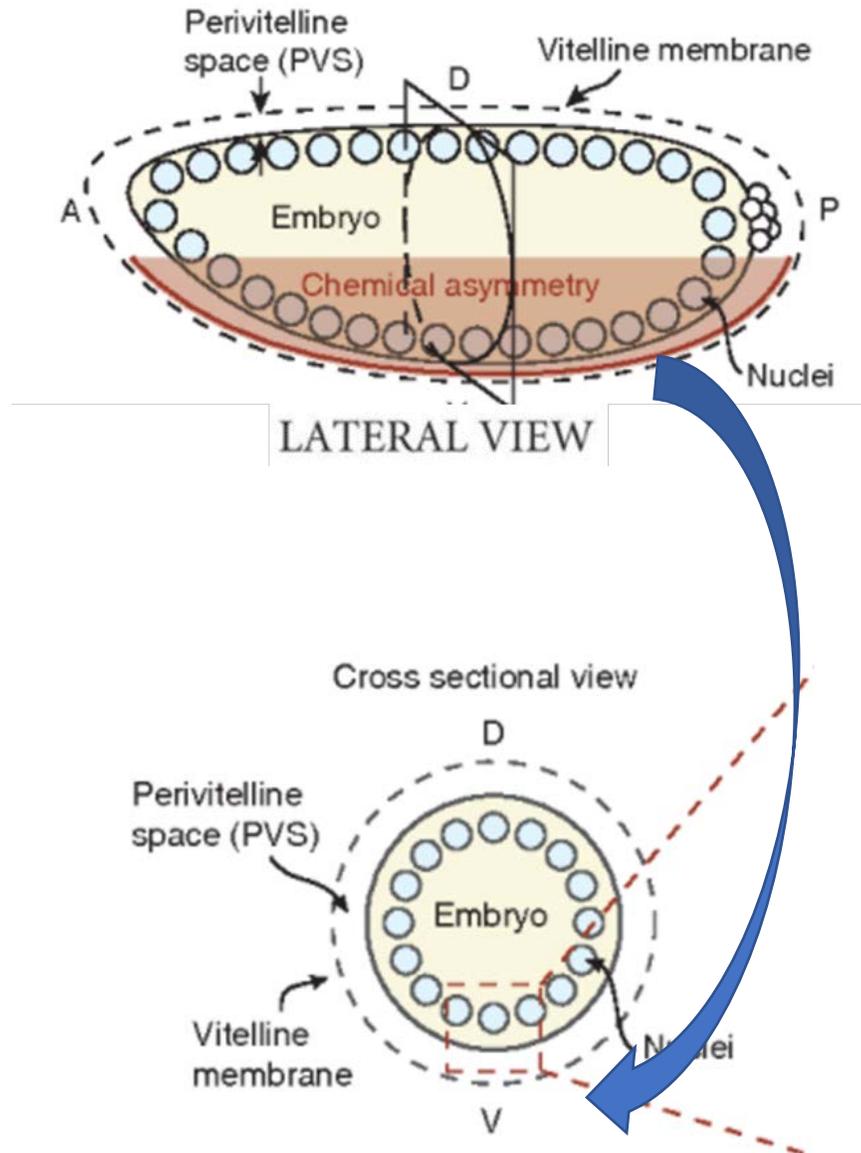
REGULAÇÃO envolvendo TRADUÇÃO

- Ligação de fator de ao seu receptor (RTK) induz alteração conformacional e ativação do RTK (dimerização e transfosforilação do domínio citoplasmático)
- As fosforilações criam locais de ancoragem para proteínas contendo SH2 como a proteína adaptadora Grb-2 e p120 RasGAP.
- Grb-2 associa-se ao fator de troca de nucleotídeo guanina Ras (GEF) Sos, em virtude de um dos domínios SH3 de Grb-2. Assim, o Sos é trazido para a membrana plasmática, alterando a conformação e estimulando Ras inativo trocar GDP por GTP;
- O Ras ativo ligado ao GTP agora é capaz de recrutar Raf para a membrana, que altera sua conformação e é assim ativado...
- Raf é então capaz de fosforilar MEK e ativar sua atividade quinase. MEK ativado então fosforila a MAP quinase ERK, que então fosforila uma série de proteínas alvo, incluindo fatores de transcrição.

REGULAÇÃO envolvendo TRADUÇÃO

- Mais exemplos de modificações ocorrendo após tradução de proteínas.
- E dá-lhe *Drosophila*...

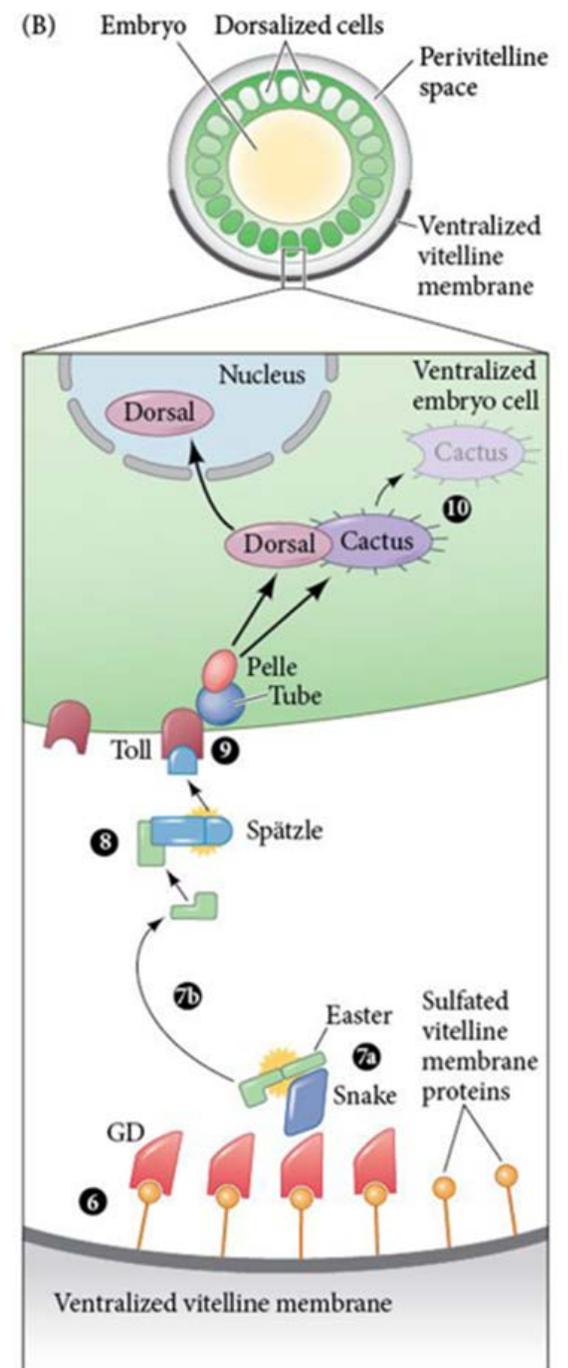
FORMAÇÃO EIXO DORSO-VENTRAL *DROSOPHILA*



- A proteína Pipe, produzida e secretada por células maternas no espaço perivitelino;
- Entre as membranas do ovo e a membrana citoplasmática do embrião;
- Apenas na região **ventral** do embrião da mosca;
- Vai iniciar a assimetria responsável pela diferenciação do eixo dorso-ventral do corpo.

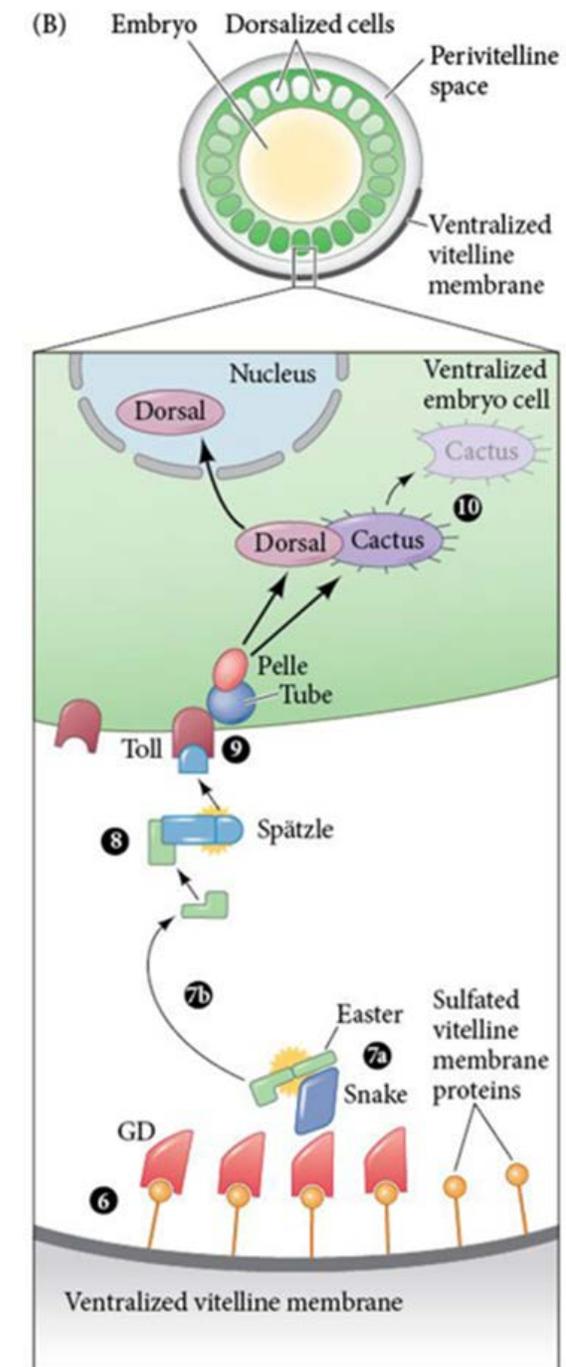
FORMAÇÃO EIXO DORSO-VENTRAL *DROSOPHILA*

- Pipe é responsável pela sulfatação de proteínas que são secretadas e se aderem a membrana vitelínica;
- A proteína GD interage com as proteínas sulfatadas e promove uma montagem de um complexo junto a membrana;
- GD é uma protease que tem como substrato a proteína Snake do espaço perivitelínico;
- A proteólise de Snake, gera uma protease ativa;
- Snake ativo e ainda ligado a GD atua em Easter;
- Easter tb é uma protease que atua em Spätzle;
- **QUAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS?**
- Modificação de proteínas (sulfatação);
- Proteólise;



FORMAÇÃO EIXO DORSO-VENTRAL *DROSOPHILA*

- Spätzle tb é clivado em dois fragmentos;
- Sendo um deles um ligante ativo que é reconhecido pelo receptor Toll presente na membrana do oócito;
- A interação entre Spätzle e Toll ativa o receptor que é uma proteína quinase, dando início a uma cascata de sinalização celular;
- Toll atrai Tube e Pelle para a membrana, promovendo a ativação de Pelle, que é uma quinase que se autofosforila quando ativada;
- Pelle fosforila Cactus;
- **QUAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS?**
- Modificação de proteínas (interação entre proteínas);
- Modificação de proteínas (fosforilação);

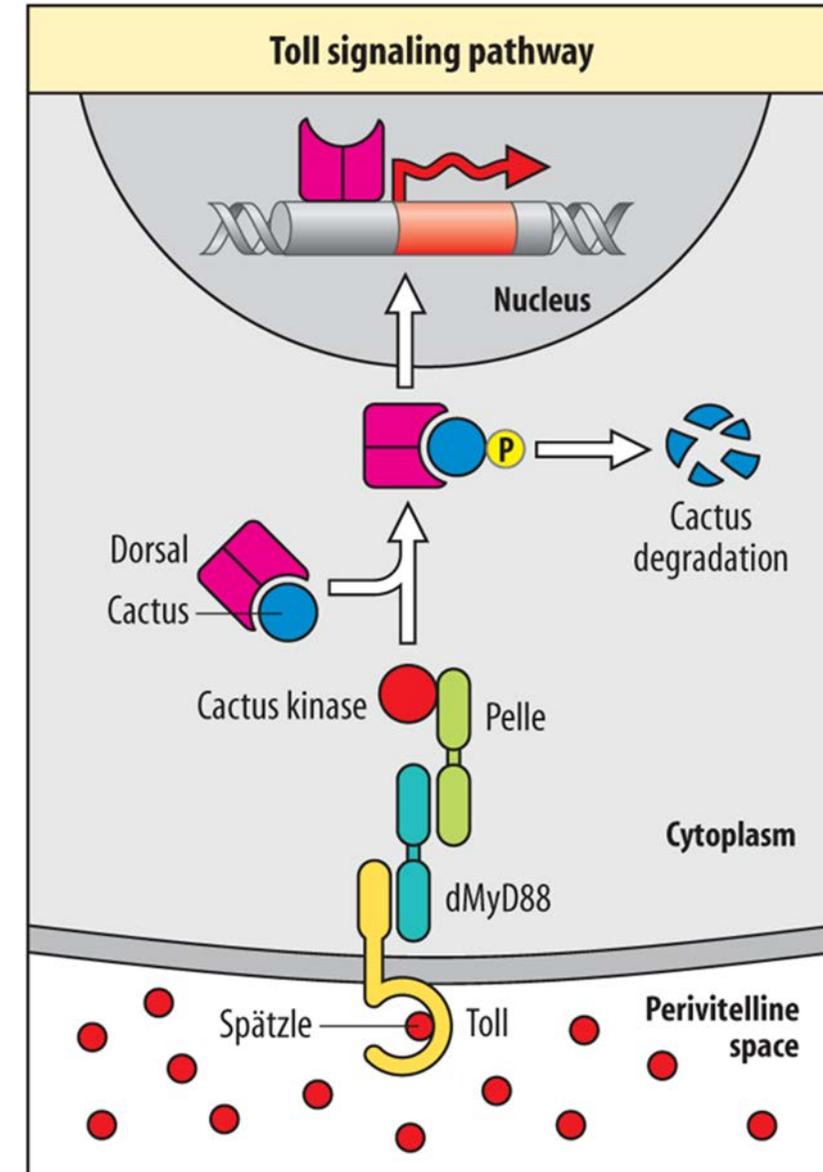


FORMAÇÃO EIXO DORSO-VENTRAL *DROSOPHILA*

- Cactus está ligado a Dorsal;
- A fosforilação de Cactus desfaz o dímero com Dorsal;
- A proteína Cactus fosforilada é marcada para degradação;
- A proteína Dorsal, agora desacoplada de Cactus pode entrar nos núcleos;
- Por ser um fator de transcrição liga-se a genes que nesse caso;
- São os genes comprometidos com a formação dos tecidos ventrais do embrião.

QUAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS?

- Localização celular (interação entre proteínas);
- Degradação de proteínas;
- Transcrição.



FORMAÇÃO EIXO DORSO-VENTRAL *DROSOPHILA*

- O desacoplamento entre Dorsal e Cactus e entrada de Dorsal nos núcleos é maior na região ventral e progressivamente menor em direção a região dorsal;
- Isso tb gera um gradiente de concentração de Dorsal nos núcleos com maiores concentrações da proteína da região dorsal para ventral;
- O gradiente diferencial de Dorsal é um dos mecanismos fundamentais para a expressão diferencial de genes para a geração inicial dos tecidos do corpo.

