

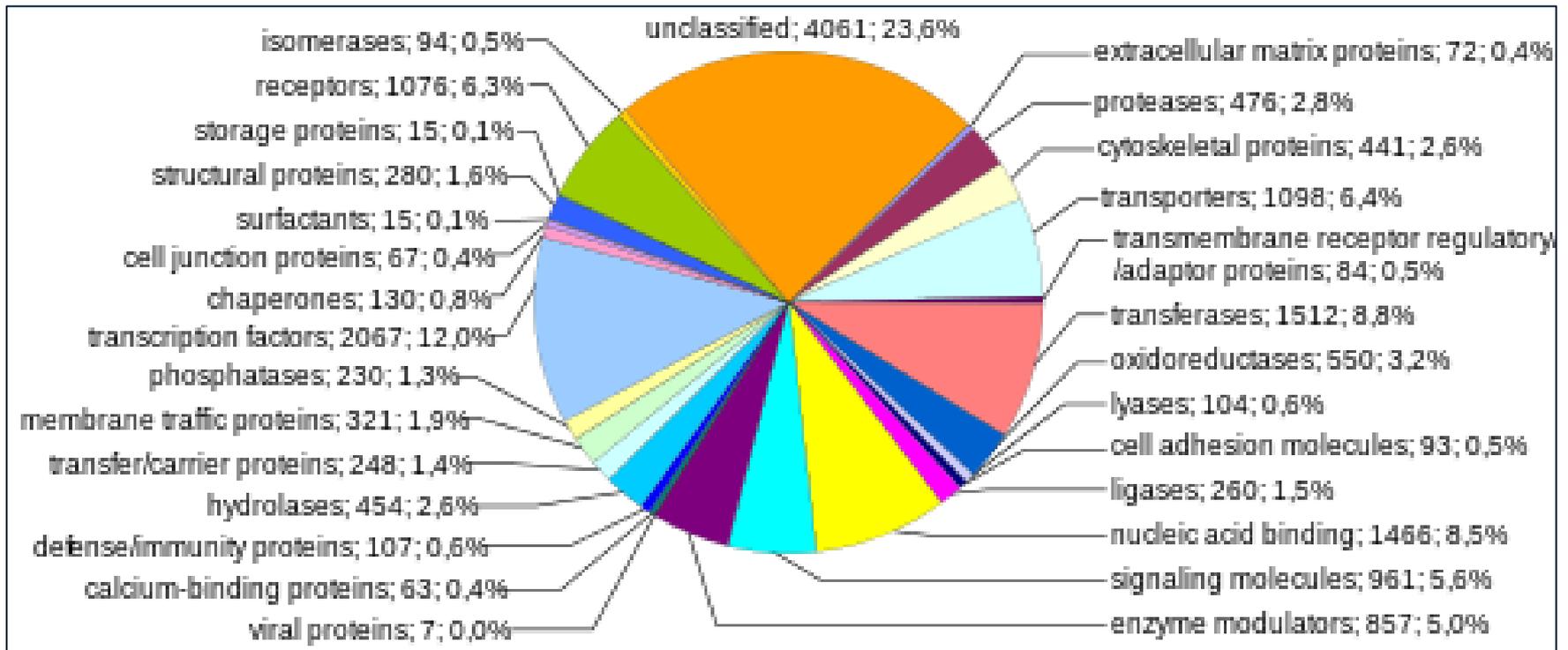
Controle da expressão gênica em eucariotos

Prof. Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química – USP

QBQ1354 – Biologia Molecular

O genoma humano contem cerca de 30 mil genes

Categorias funcionais de proteínas codificadas no genoma (número genes e % do total de genes)



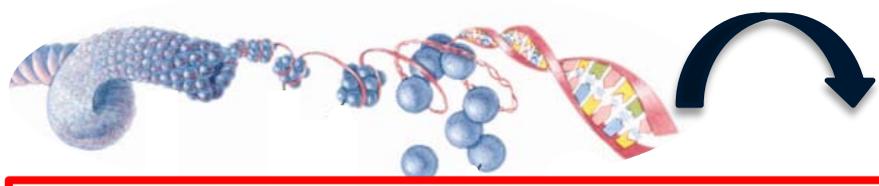
Tão importante quanto conhecer o conteúdo gênico é saber como, onde e quando cada um dos genes é expresso!



Transcritoma

Conjunto de todas moléculas de RNA (transcritos) de uma célula, tecido ou organismo em uma dada condição, em um dado instante

Níveis de Controle da Expressão Gênica em Eucariotos



A ativação da transcrição é o principal ponto de controle

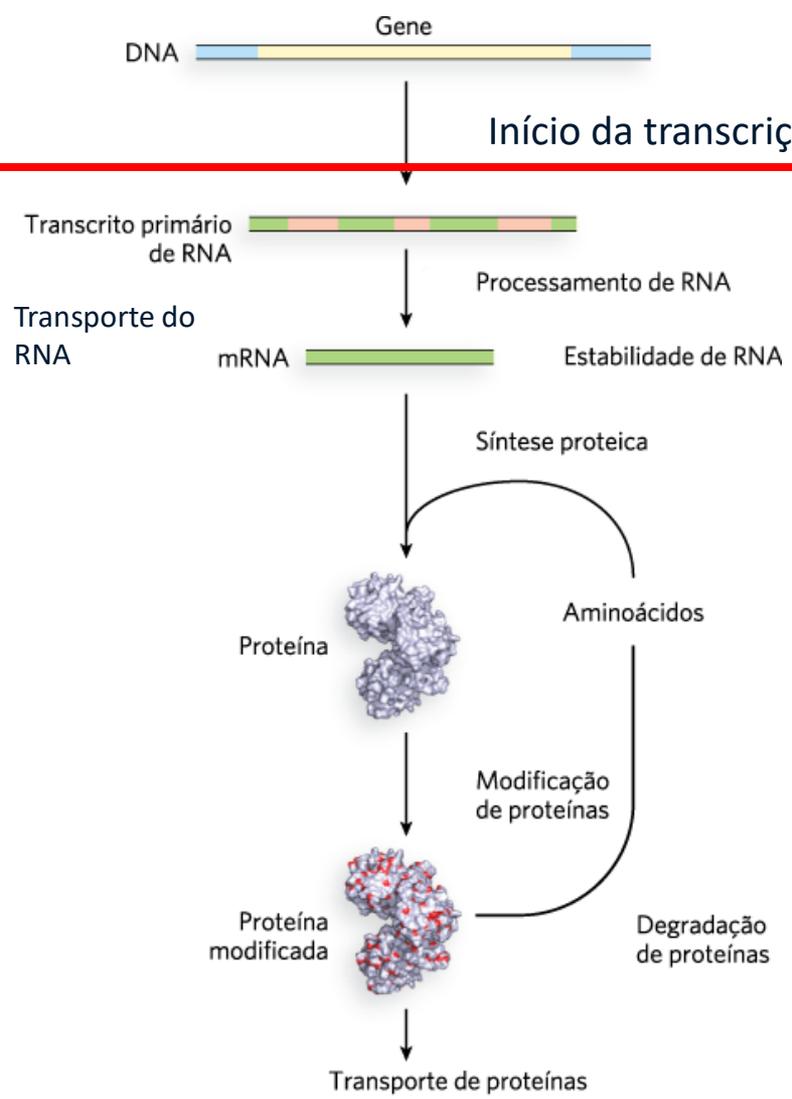
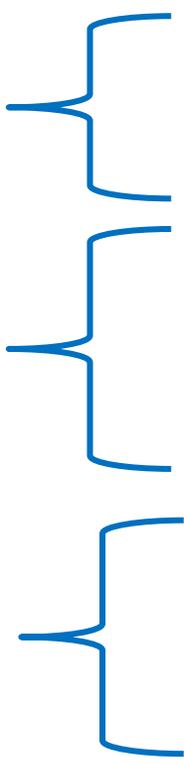
Modificação e Remodelamento da cromatina

- Transcricional

- Pós-transcricional

- Traducional

- Pós-traducional



Mecanismos de regulação da expressão gênica em eucariotos

Como o complexo de transcrição tem acesso ao DNA na cromatina?

Como os genes são “escolhidos” para serem mais ou menos expressos numa determinada condição?

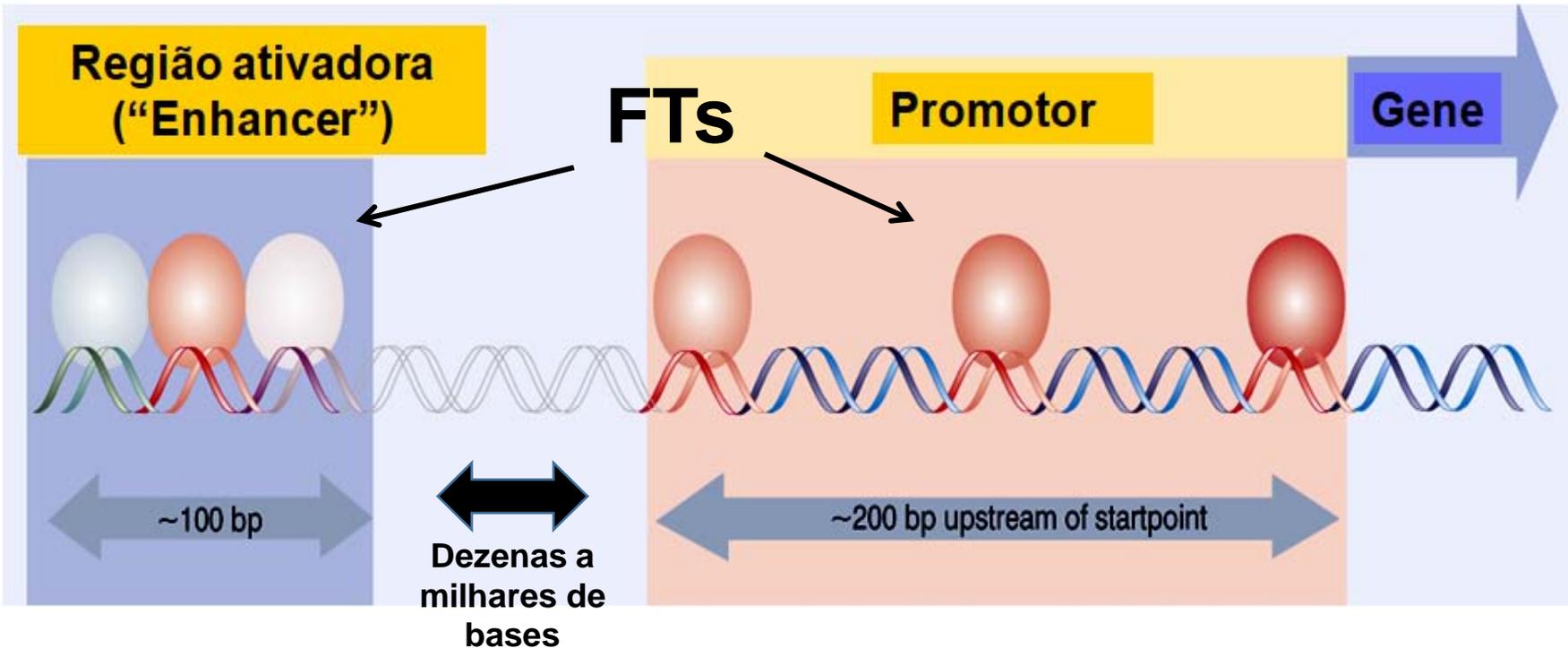
Mudança na acessibilidade do DNA à maquinaria de transcrição



Recrutamento e ativação da maquinaria de transcrição

Próximas aulas

Genes eucarióticos contêm regiões regulatórias que controlam a transcrição

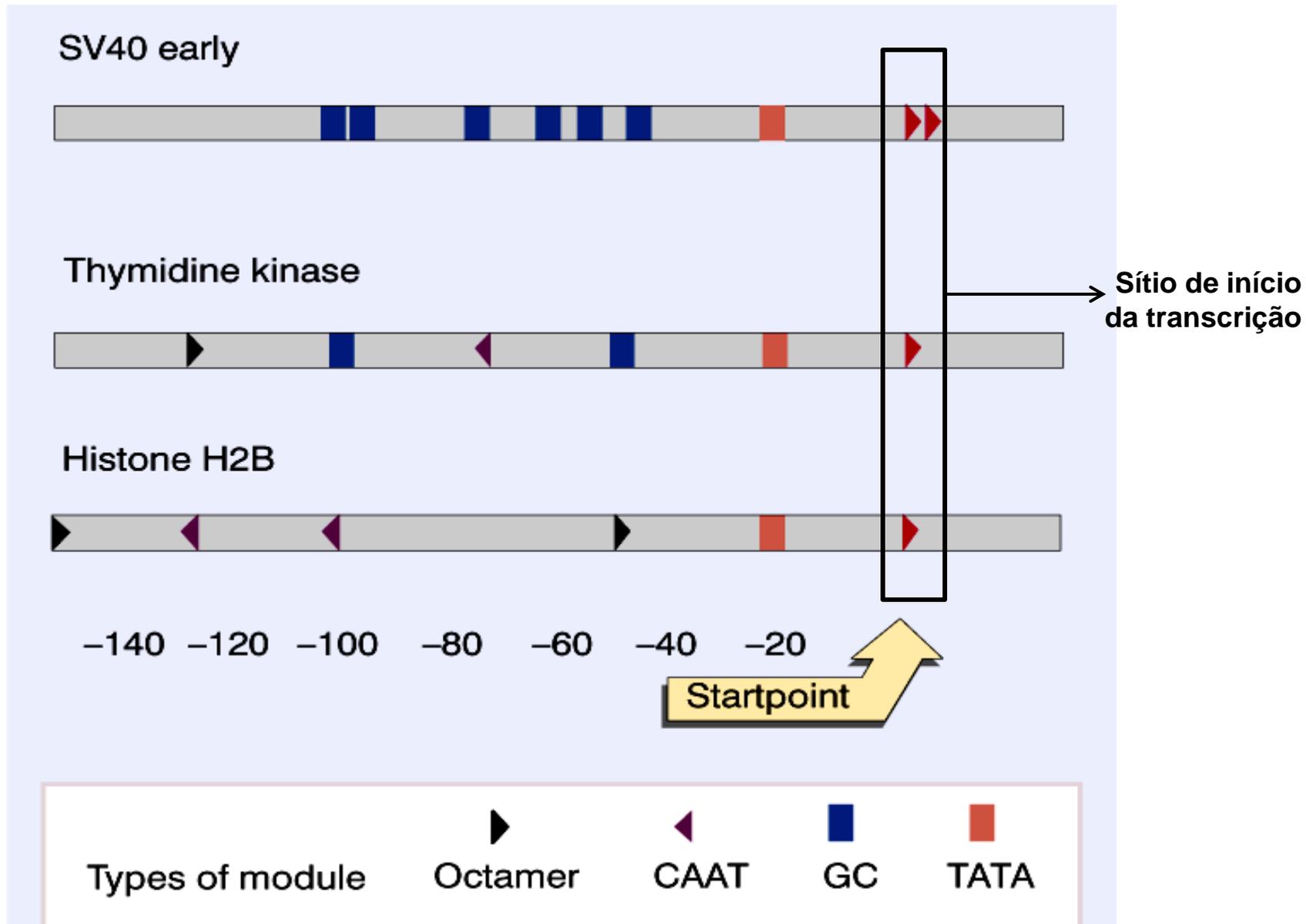


- **Promotores** se localizam sempre na vizinhança do sítio de início da transcrição

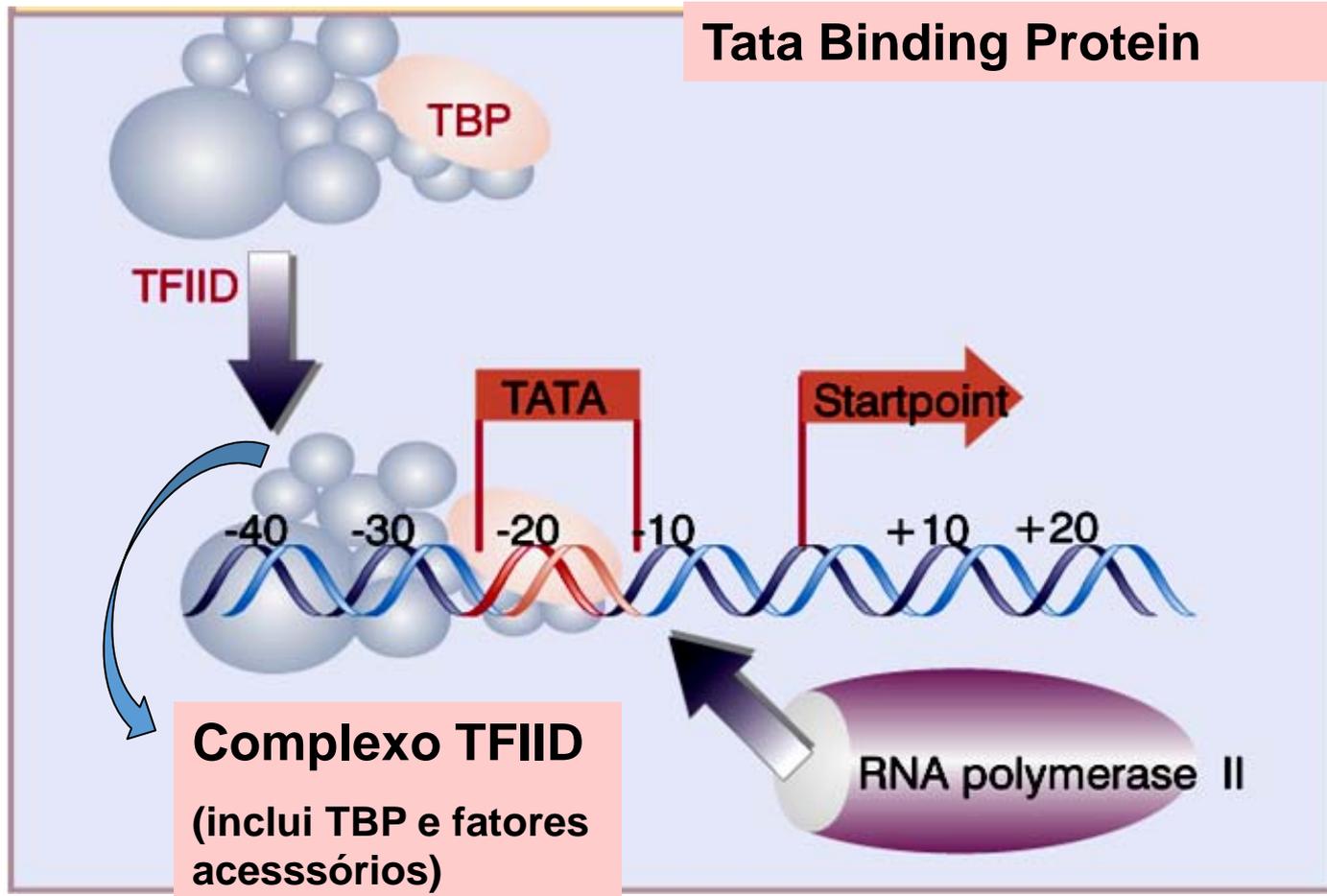
“**Enhancers**” podem estar fisicamente separados do promotor por centenas ou milhares de nucleotídeos.

- “Enhancers” e promotores contêm elementos na sequência de DNA que são reconhecidas por **fatores de transcrição (FTs)**, proteínas que ligam e regulam a transcrição

Estrutura de promotores eucarióticos reconhecidos pela RNA Pol II



Promotores de genes transcritos pela RNA pol II



Fatores gerais de transcrição + RNA Polimerase = **Complexo Basal de Transcrição**

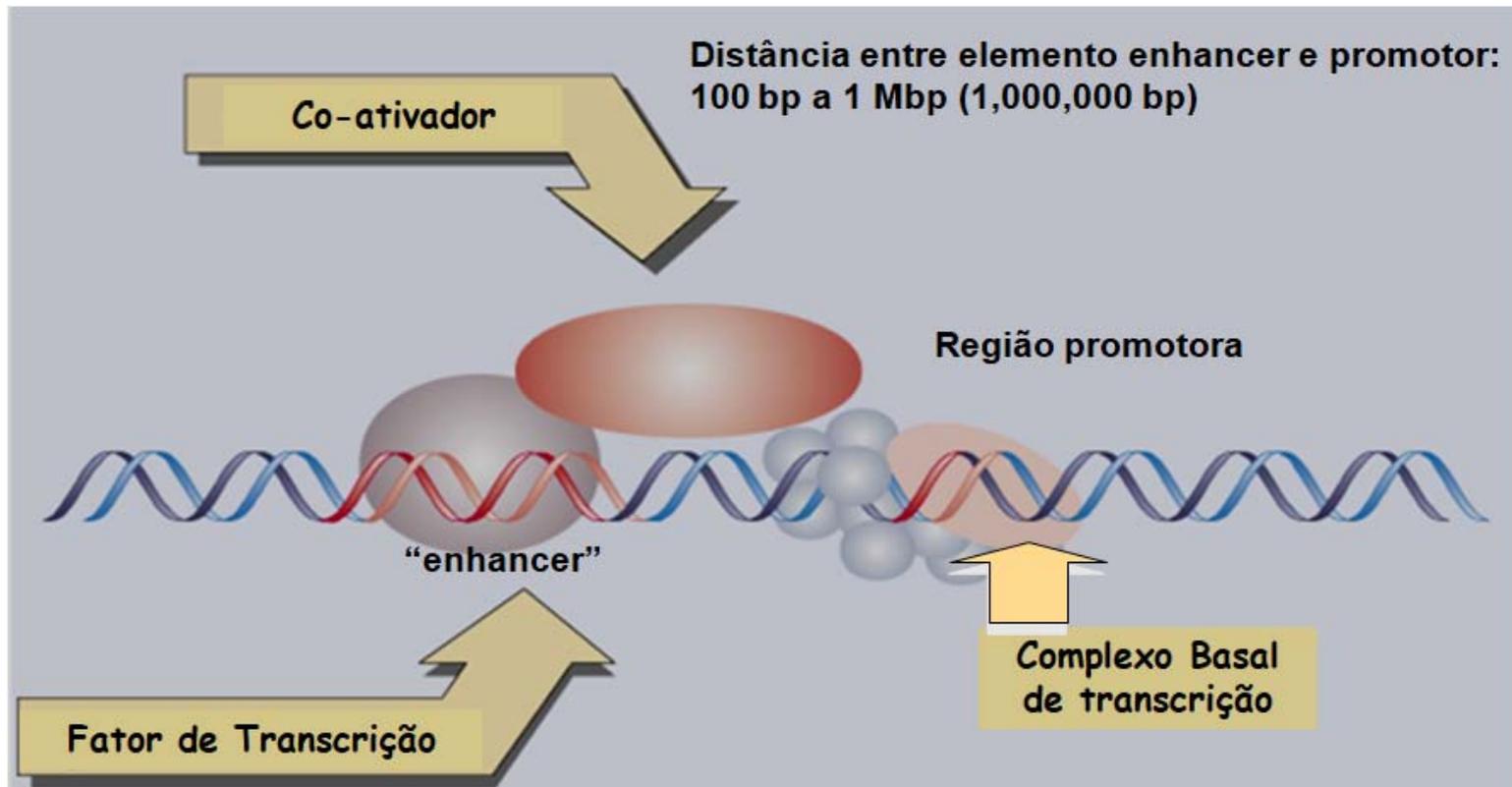
Diferentes proteínas interagem com o DNA e a maquinaria de transcrição nos promotores reconhecidos pela RNA Pol II

Fatores gerais de transcrição

Transcription factor	Number of subunits	Subunit M_r	Functions
Initiation			
RNA polymerase II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIIB and TBP to the promoter
TFIIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits RNA polymerase–TFIIF complex
TFIID	12	15,000–250,000	Interacts with positive and negative regulatory proteins
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to RNA polymerase II; binds to TFIIIB and prevents binding of RNA polymerase to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter; phosphorylates RNA polymerase; recruits nucleotide-excision repair complex
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
P-TEFb	2	43,000, 124,000	
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	

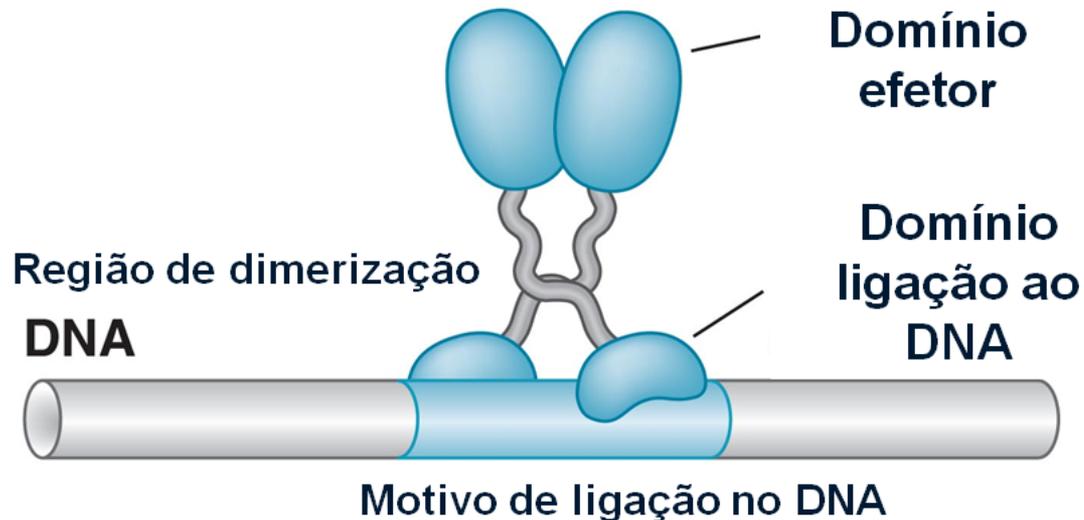
A transcrição em eucariotos depende obrigatoriamente de **fatores de transcrição ativadores** além do complexo de transcrição basal

- Ligam-se a elementos regulatórios no DNA (enhancers, promotores distais)
- Interagem com o complexo basal através de **proteínas co-ativadoras**
- Promovem especificidade da transcrição onde, quanto e quais genes são expressos



Fatores de transcrição

- Ligam DNA (sequências ativadoras/enhancers e promotores)
- Transcrição só inicia quando estão presentes
- Modulam frequência de início da transcrição
- Podem ligar moléculas que mudam a conformação (acessibilidade) da cromatina
- Estrutura modular: possuem domínios funcionais distintos



Domínios efetores de FTs podem ter múltiplas funções

Ex.: ligação de hormônio esteróide

Can regulate TF activity
e.g. ligand binding domains

Can mediate protein-protein interactions
e.g. BTB domain

Effector Domain(s)

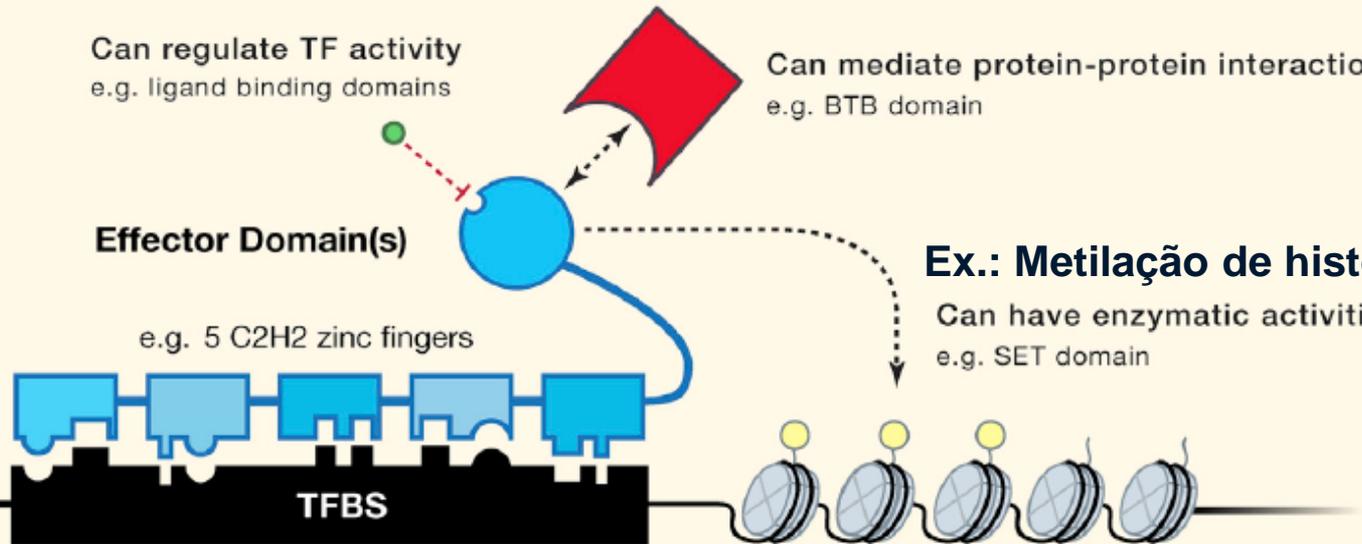
e.g. 5 C2H2 zinc fingers

Ex.: Metilação de histonas

Can have enzymatic activities
e.g. SET domain

DNA-binding domain(s)

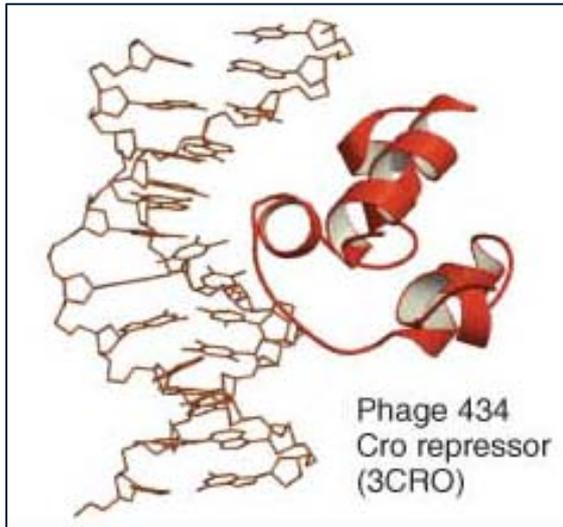
Recognize specific DNA sequences and sites



Fatores de transcrição formam estruturas no **domínio de ligação** que se ligam a sequencias consenso (5 a 15 bp) na fenda maior (“major groove”) do DNA

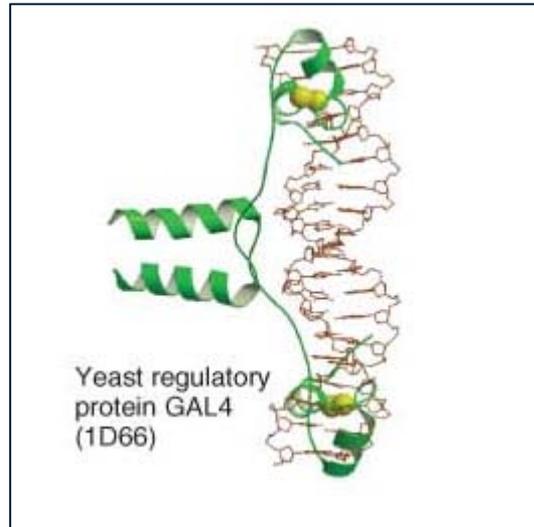
domínios estruturais frequentes em FTs

Homeodomínio



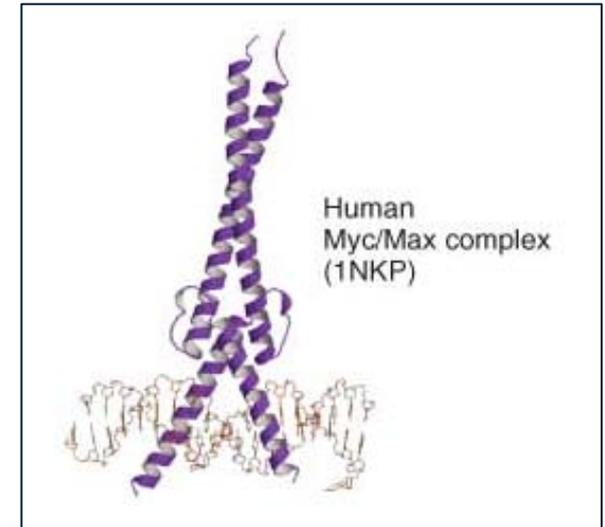
- Composto por uma hélice alfa-volta-hélice alfa
- Controla a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento corporal (genes homeóticos)

“Dedos de zinco”



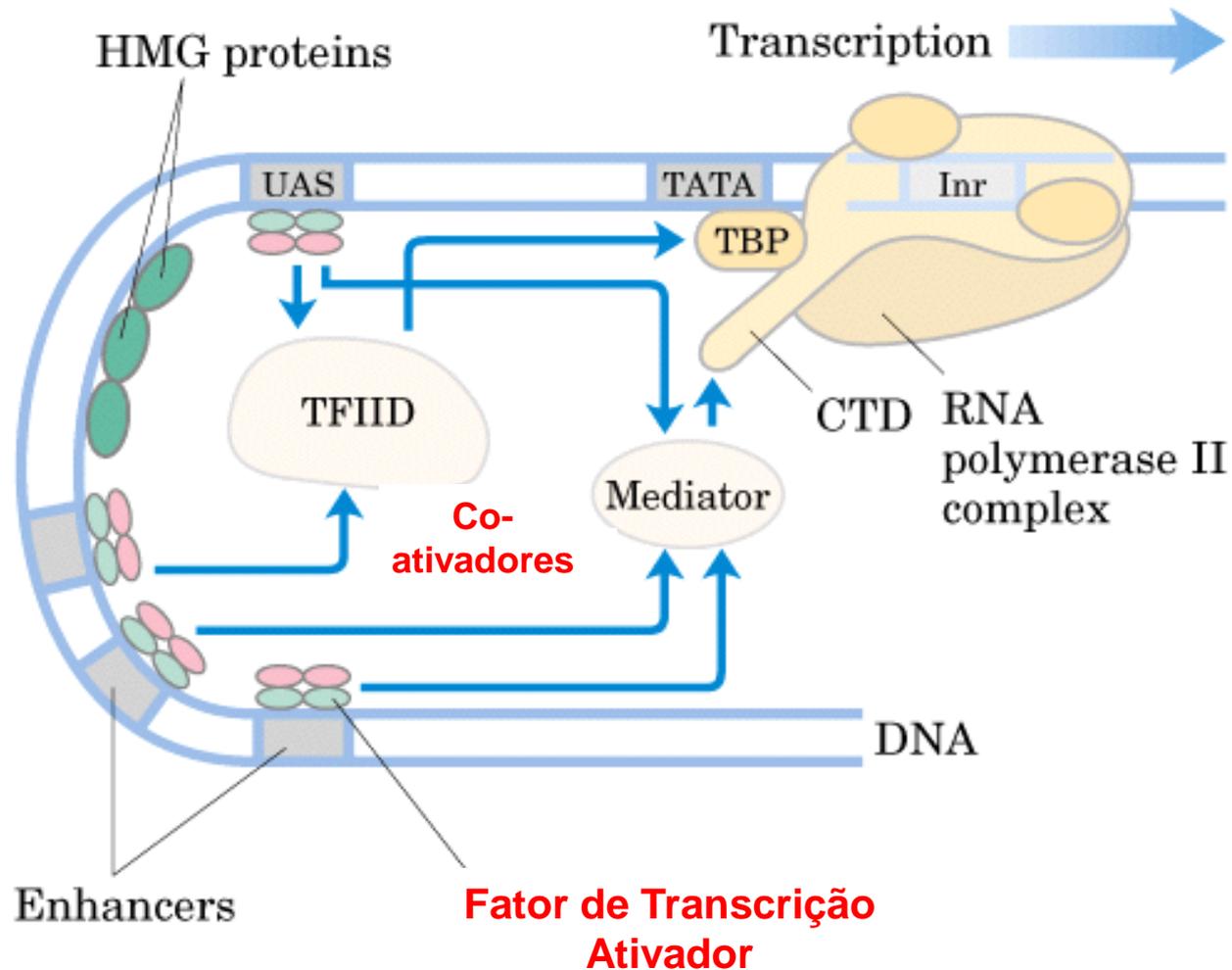
- Contem resíduos cisteína e histidina que coordenam com íons zinco formando hélices alfa que intercalam no DNA.
- presentes em receptores de hormônios esteróides

“Zipper de leucina”

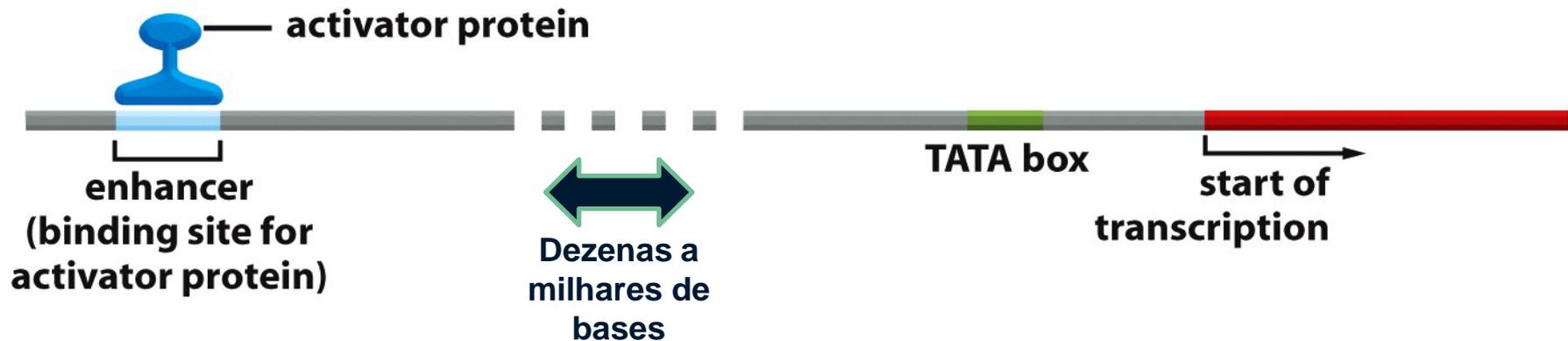


Dímeros contendo hélices anfipáticas com resíduos de leucina na interface de dimerização.

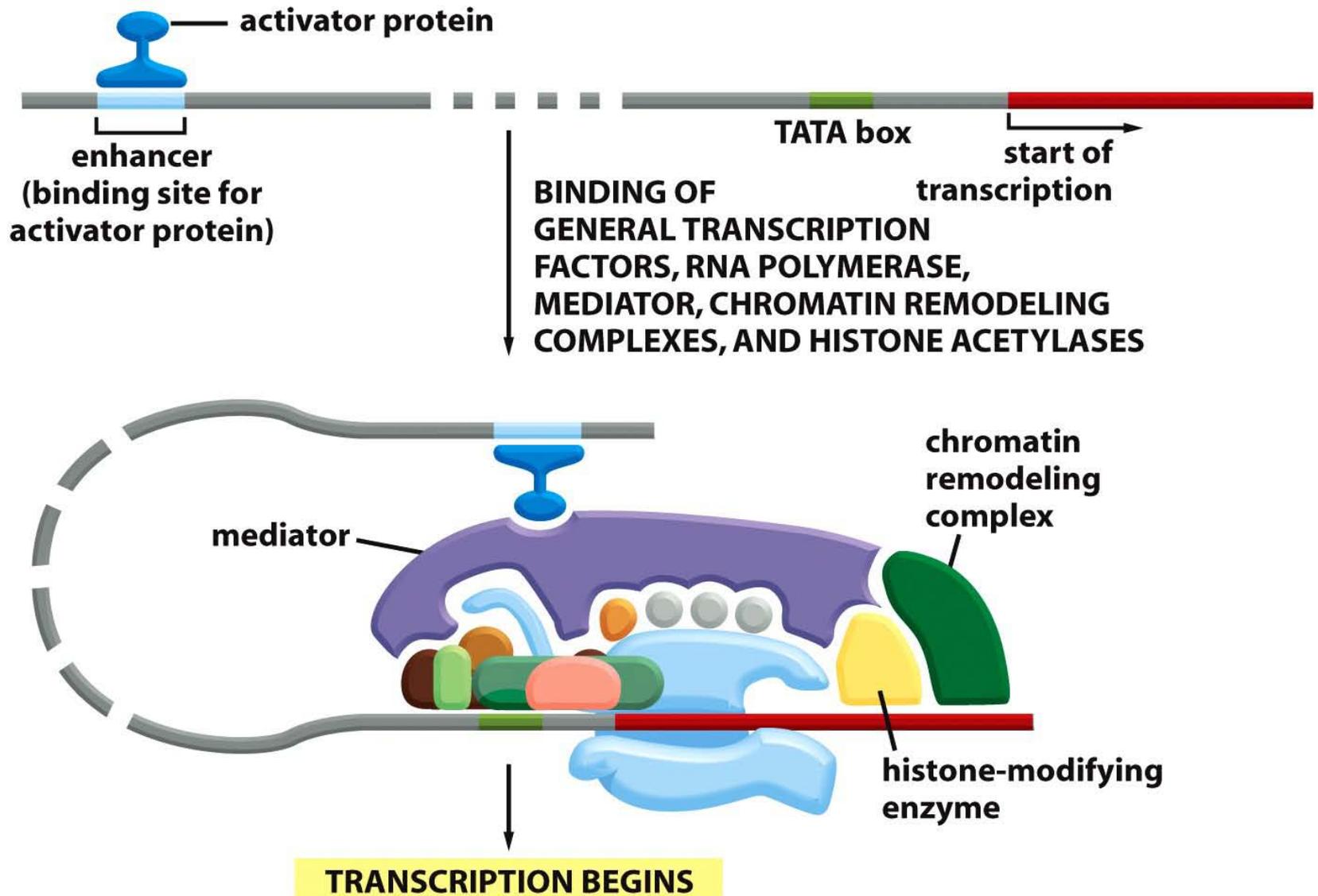
A maior parte dos genes eucarióticos são regulados positivamente por fatores de transcrição ativadores



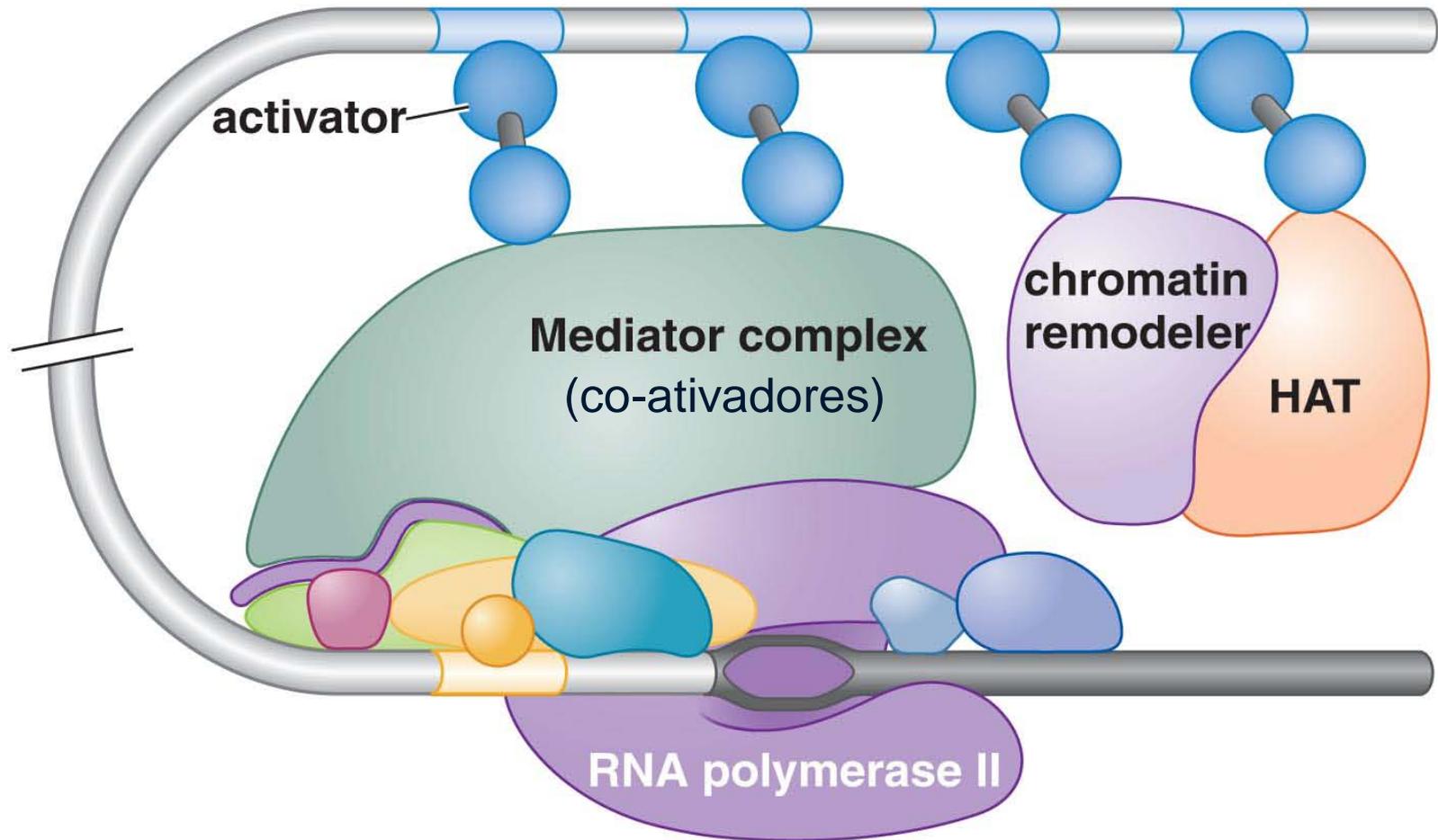
Se os enhancers estão longe do promotor, como eles ativam a transcrição?



Ativadores de transcrição interagem com outras proteínas

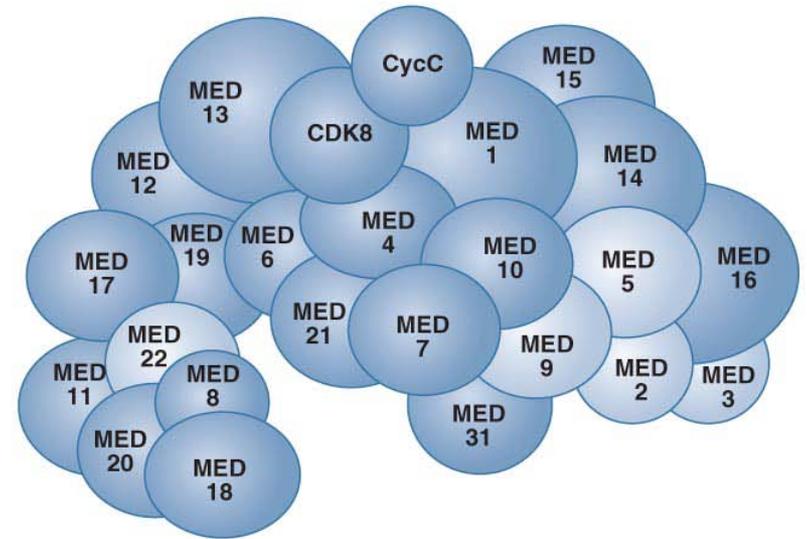


Ativadores e **co-ativadores** são necessários para o início da transcrição da RNAP II

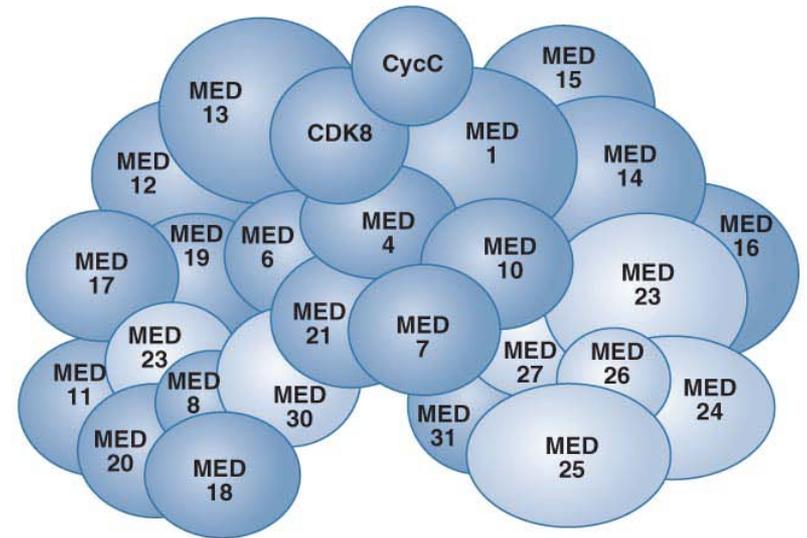


Co-ativadores

- Complexo proteico intermediário entre fatores de transcrição ativadores (ligados em enhancers) e o complexo de basal de transcrição (ligado no promotor)
- Não ligam DNA (Interações proteína-proteína)
- Ex. Complexo mediador: 20 a 30 polipeptídeos
- podem atuar junto a repressores de transcrição
- Conservados evolutivamente

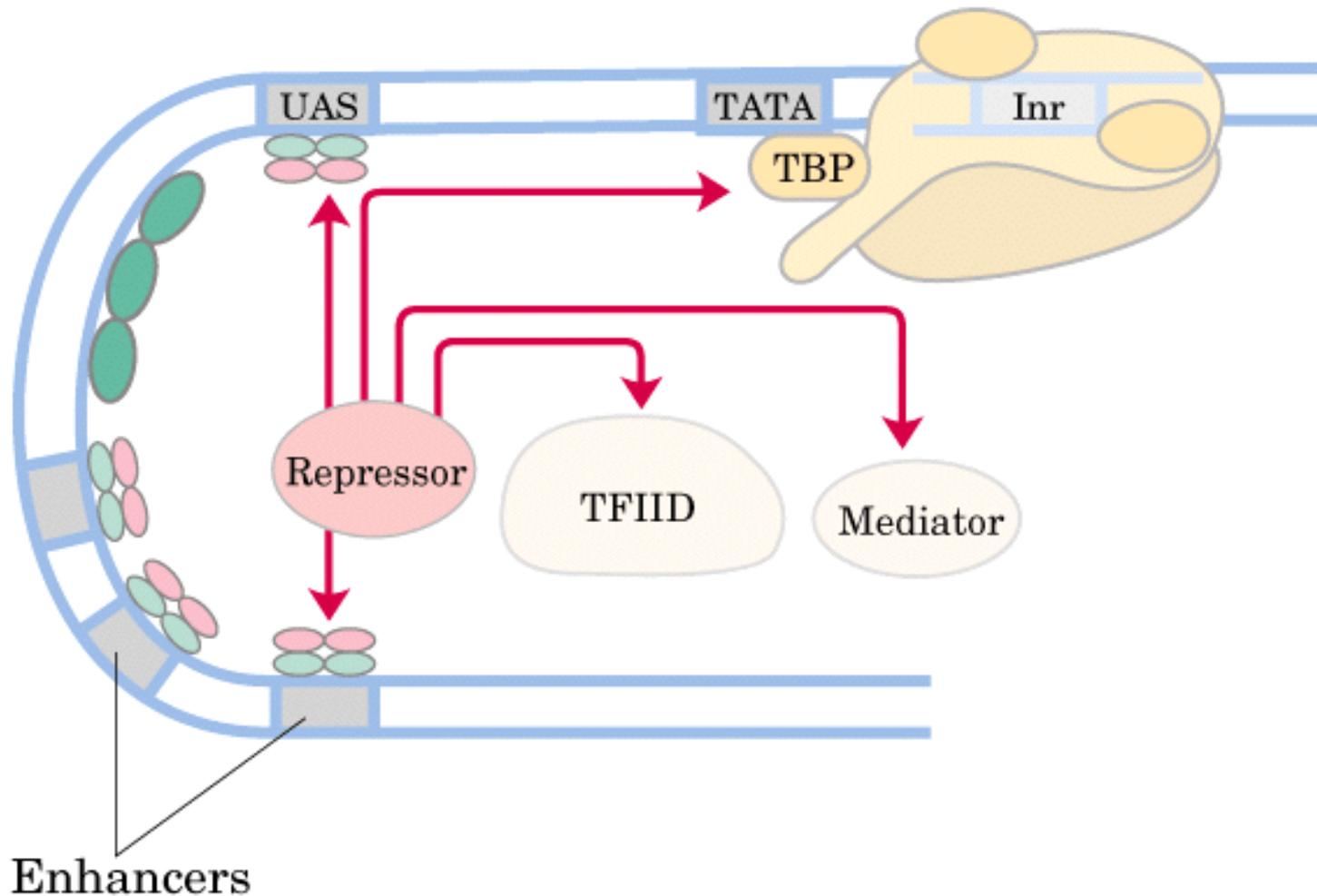


yeast Mediator



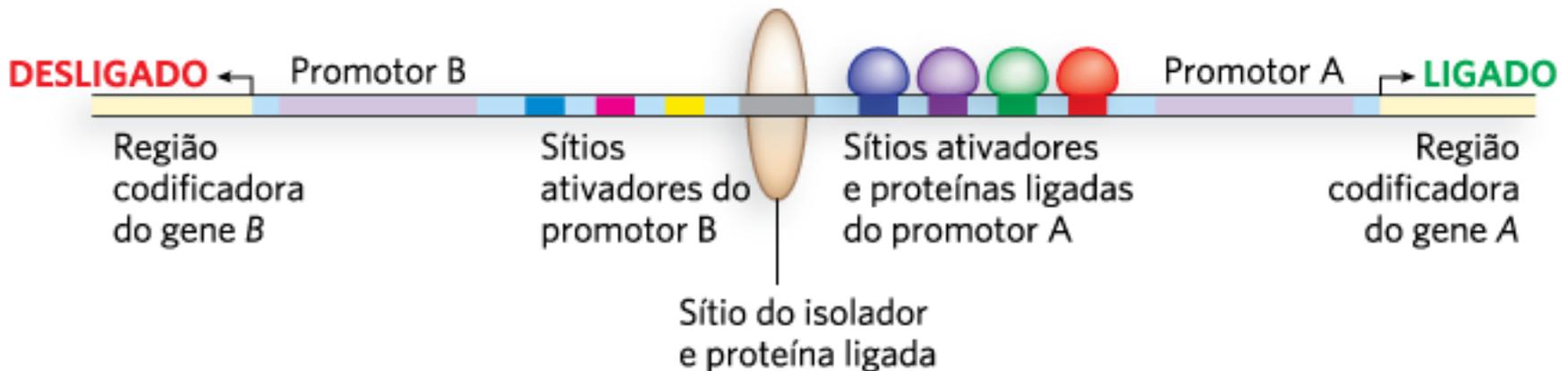
human Mediator

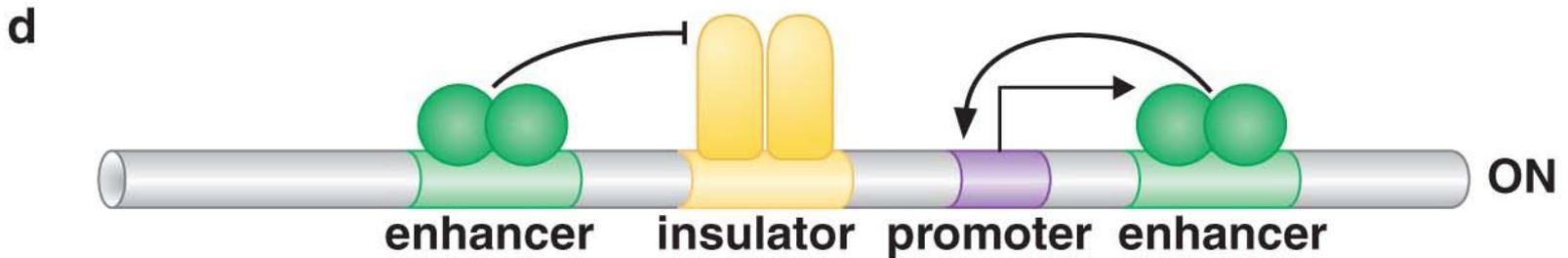
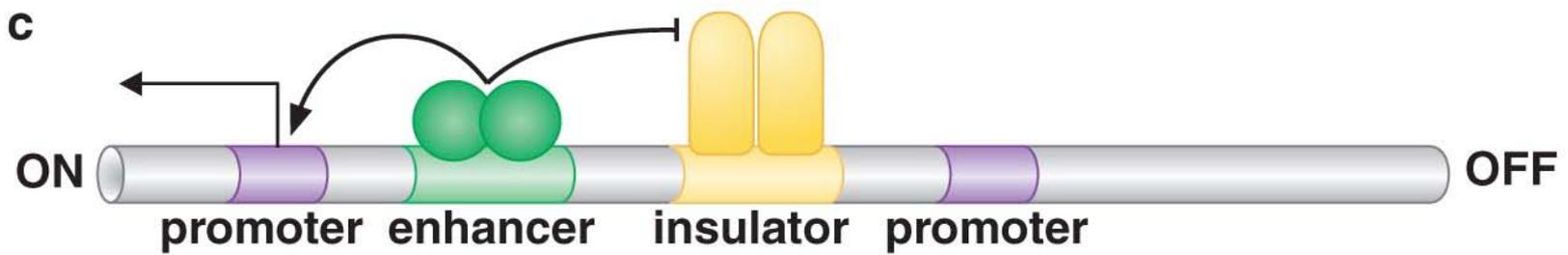
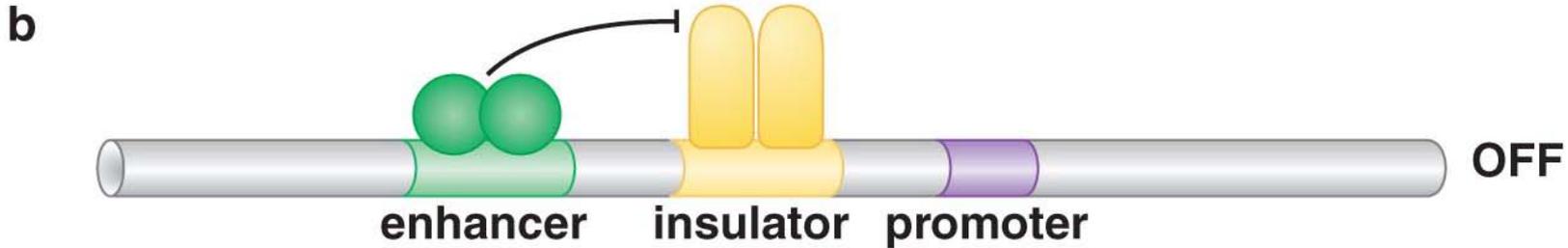
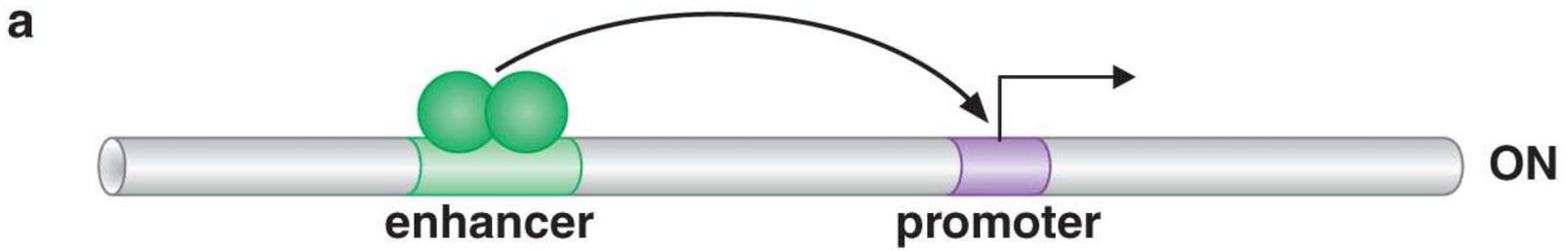
Existem também fatores de transcrição que reprimem a expressão gênica



Isoladores (“insulators”): sequências no DNA que ligam proteínas que impedem a comunicação cruzada entre promotores adjacentes que são ativados por fatores ativadores comuns.

O isolador impede a comunicação cruzada entre os reguladores dos promotores A e B.





Sinais que modulam a Expressão Gênica em células eucarióticas

- Hormônios
- Neurotransmissores
- Fatores de Crescimento
- Fatores de Diferenciação Celular
- Contato célula-célula
- Odores
- Alterações nutricionais
- Alterações ambientais (ex: temperatura)
- Luz
- Toque mecânico
- e outros.....

Exemplos de sinalização celular mediada por fatores de transcrição

Regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de galactose em levedura

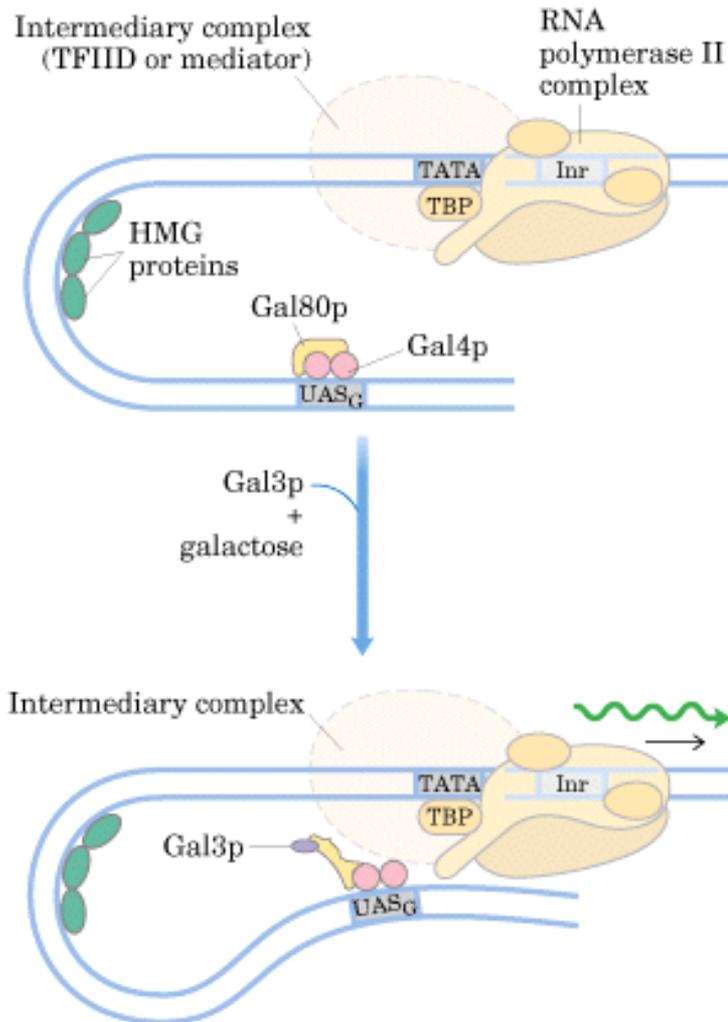
table 28–3

Genes of Galactose Metabolism in Yeast						
	Protein function	Chromosomal location	Protein size (number of residues)	Relative protein expression in different carbon sources		
				Glucose	Glycerol	Galactose
Regulated genes						
<i>GAL1</i>	Galactokinase	II	528	–	–	+++
<i>GAL2</i>	Galactose permease	XII	574	–	–	+++
<i>PGM2</i>	Phosphoglucomutase	XIII	569	+	+	++
<i>GAL7</i>	Galactose 1-phosphate uridylyltransferase	II	365	–	–	+++
<i>GAL10</i>	UDP-glucose 4-epimerase	II	699	–	–	+++
<i>MEL1</i>	α -Galactosidase	II	453	–	+	++
Regulatory genes						
<i>GAL3</i>	Inducer	IV	520	–	+	++
<i>GAL4</i>	Transcriptional activator	XVI	881	+/-	+	+
<i>GAL80</i>	Transcriptional inhibitor	XIII	435	+	+	++

Adapted from Reece, R. & Platt, A. (1997) Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast. *Bioessays* **19**, 1001–1010.

Gal4p se liga a região ativadora e recruta proteínas co-ativadoras da expressão de genes necessários para o metabolismo de galactose

UAS= “Upstream Activator Sequence” = “enhancer”



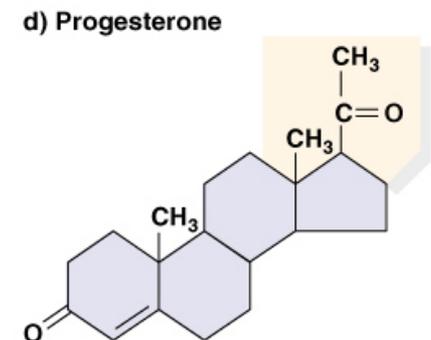
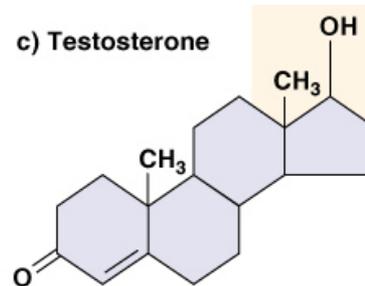
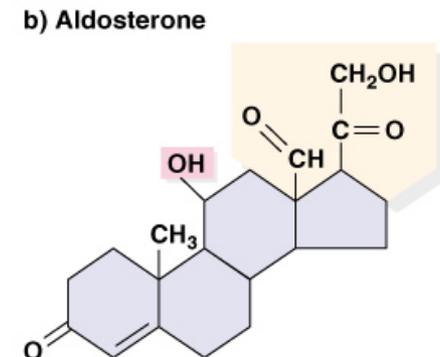
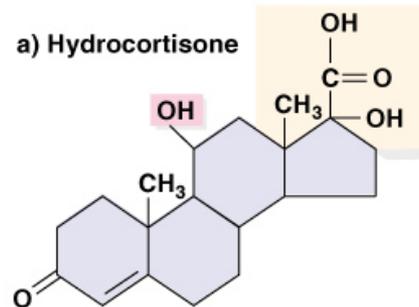
Na ausência de galactose,
Gal80p (fator de transcrição repressor) bloqueia a função de Gal4p (fator de transcrição ativador) e impede a ativação de genes envolvidos no metabolismo do açúcar.

Na presença de galactose,
Gal3p (indutor) se liga a Gal80p e muda sua conformação, permitindo que o fator de transcrição ativador Gal4p interaja com co-ativadores e promova a expressão dos genes alvo

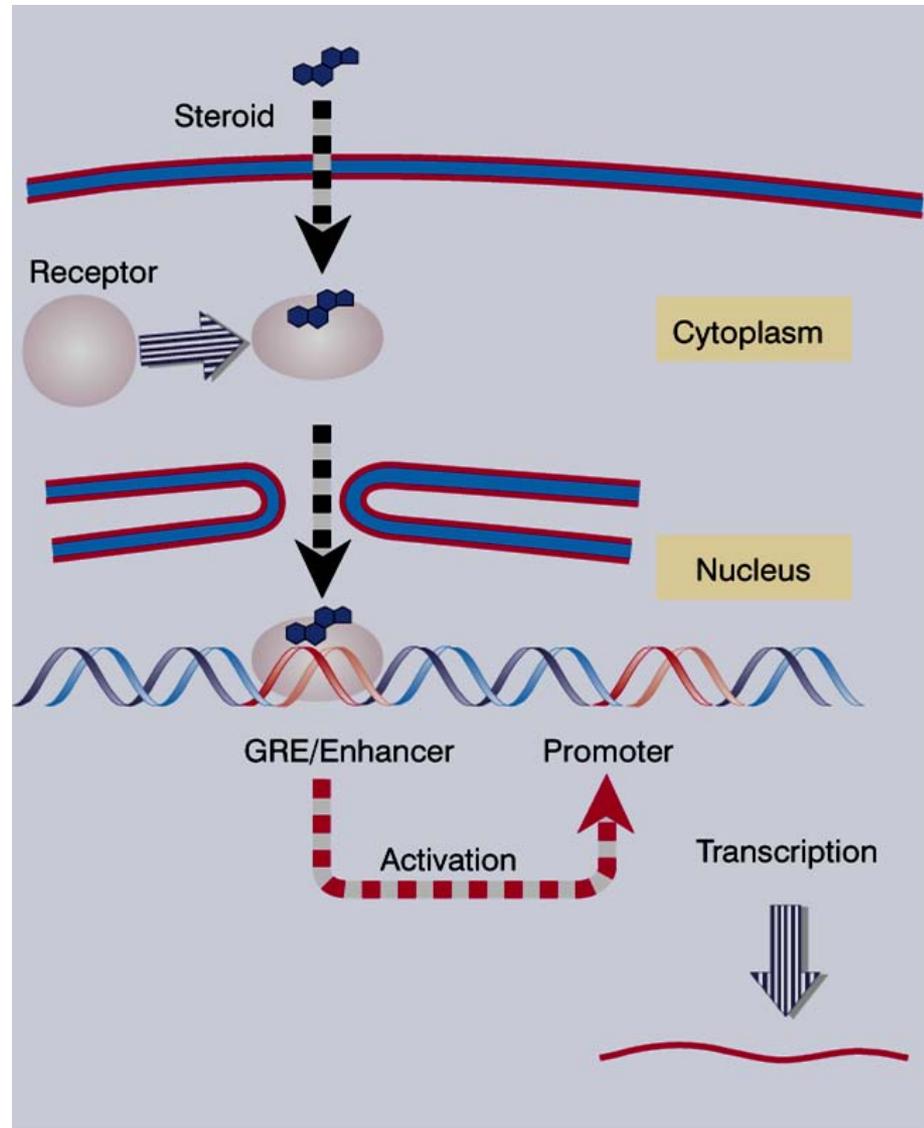
Regulação da expressão de genes por hormônios esteróides

Exemplos de hormônios esteróides de mamíferos

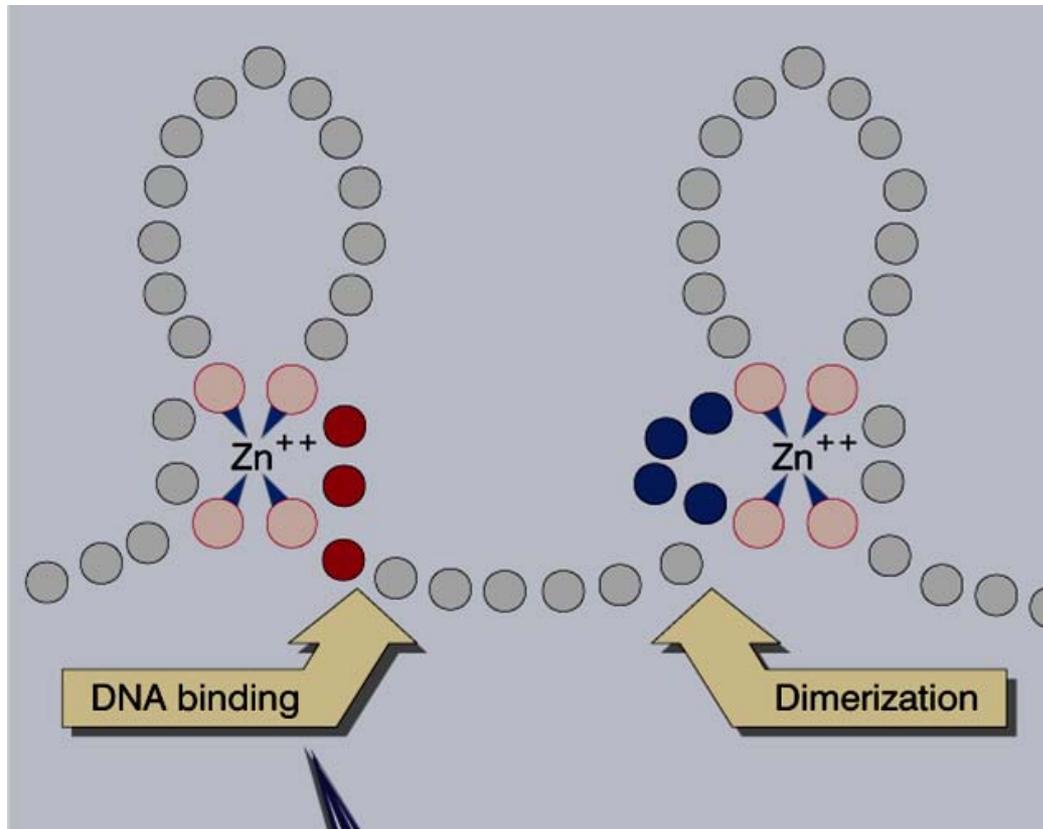
- Possuem esqueleto de carbono na forma de quatro anéis fundidos. **Altamente hidrofóbicos**
- Diferem pela presença de grupos funcionais distintos ligados aos anéis.



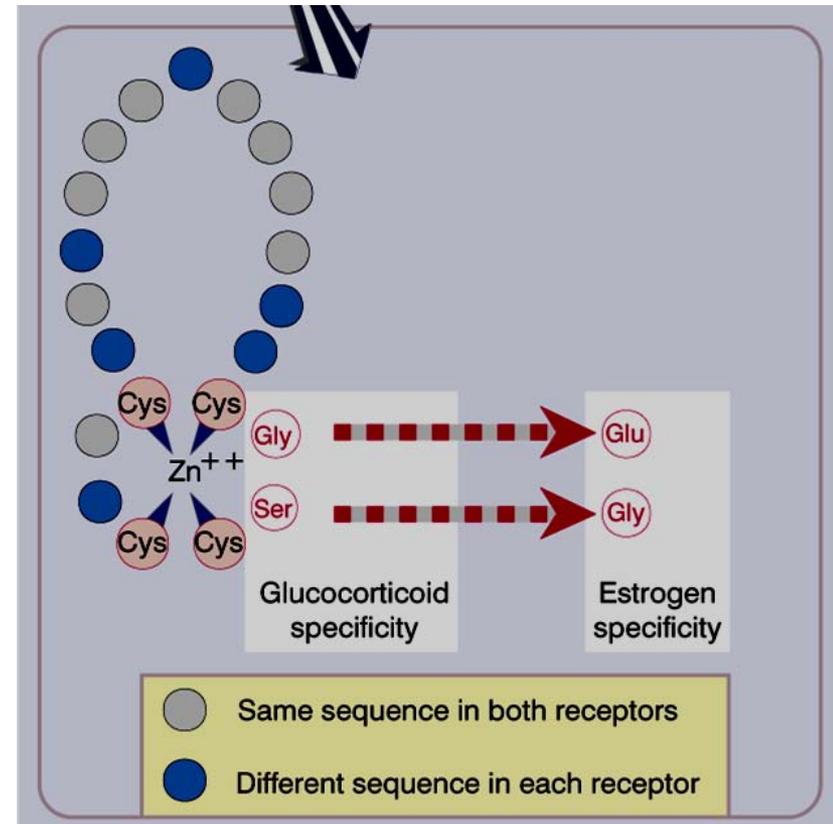
Ativação da transcrição por hormônios esteróides



Receptores esteroídicos são fatores de transcrição com domínios de ligação de DNA do tipo “dedos de zinco”



Especificidade dos receptores conferida por variações na sequência de aminoácidos dos “dedos de zinco”



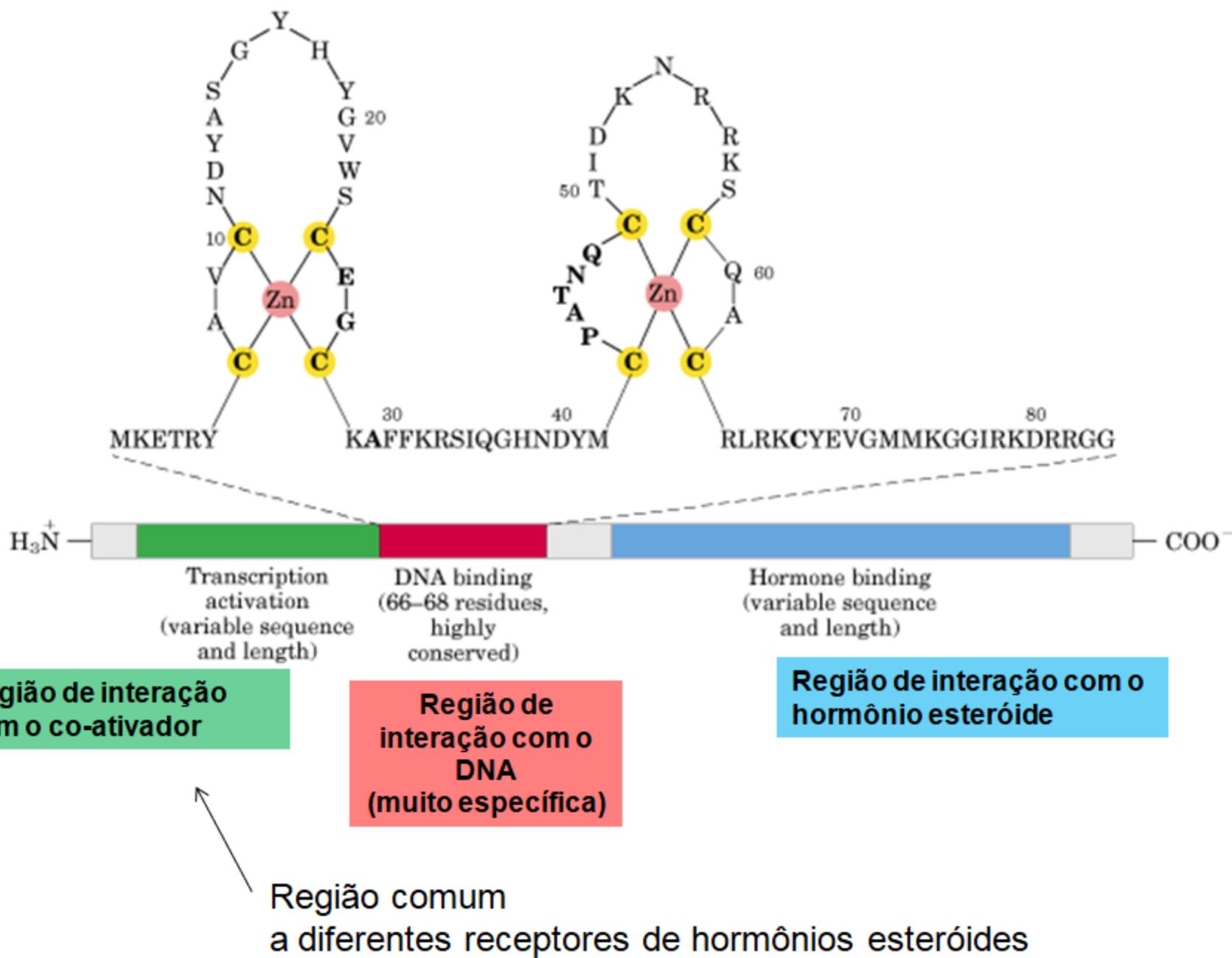


table 28-4

Hormone Response Elements Bound by Steroid-Type Hormone Receptors

Receptor	Consensus sequence bound*
Androgen	GG ^A _T ACAN ₂ TGTTCT
Glucocorticoid	GGTACAN ₃ TGTTCT
Retinoic acid (some)	AGGTCAN ₅ AGGTCA
Vitamin D	AGGTCAN ₃ AGGTCA
Thyroid hormone	AGGTCAN ₃ AGGTCA
RX [†]	AGGTCANAGGTCANAGGTCANAGGTCA

*N represents any nucleotide.

[†]Forms dimer with retinoic acid receptor or vitamin D receptor.

Resposta celular a hormônios: glucagon e epinefrina (adrenalina)

- mediada por receptores acoplados a proteínas G (sinalizador não atravessa a membrana citoplasmática)
- Ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA)
- fosforilação e ativação do fator de transcrição CREB (cAMP response element-binding protein)
- Recrutamento da proteína ligadora de CREB (CBP, co-ativador) e RNA Polimerase

