

QBQ1354 - Expressão Gênica

**Epigenética e imprinting
genômico**

Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química - USP

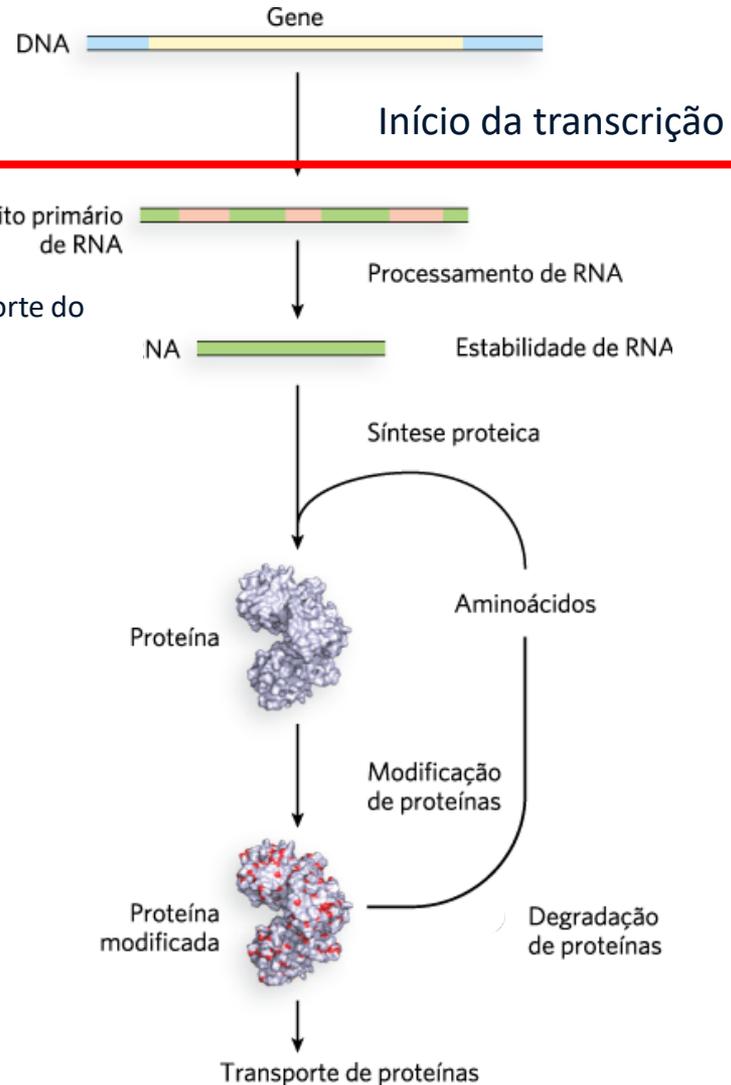


Estado de compactação da cromatina e acessibilidade do DNA estão intimamente ligados ao controle da transcrição

Modificação e Remodelamento da cromatina

- Transcricional
- Pós-transcricional
- Traducional
- Pós-traducional

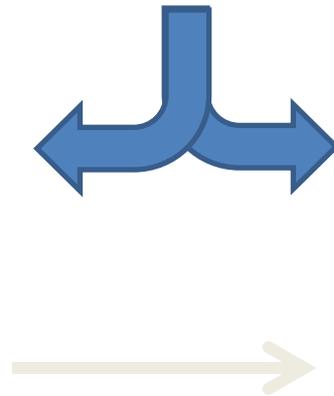
Níveis de Controle da Expressão Gênica em Eucariotos



Mudanças no padrão de expressão gênica se iniciam com modificações na acessibilidade do DNA

Regulação inicial da expressão gênica

Mudança na acessibilidade do DNA à maquinaria de transcrição (regulação epigenética)



Recrutamento e ativação da maquinaria de transcrição

Nas células eucarióticas, o DNA cromossomal está associado a proteínas na cromatina formando nucleosomos

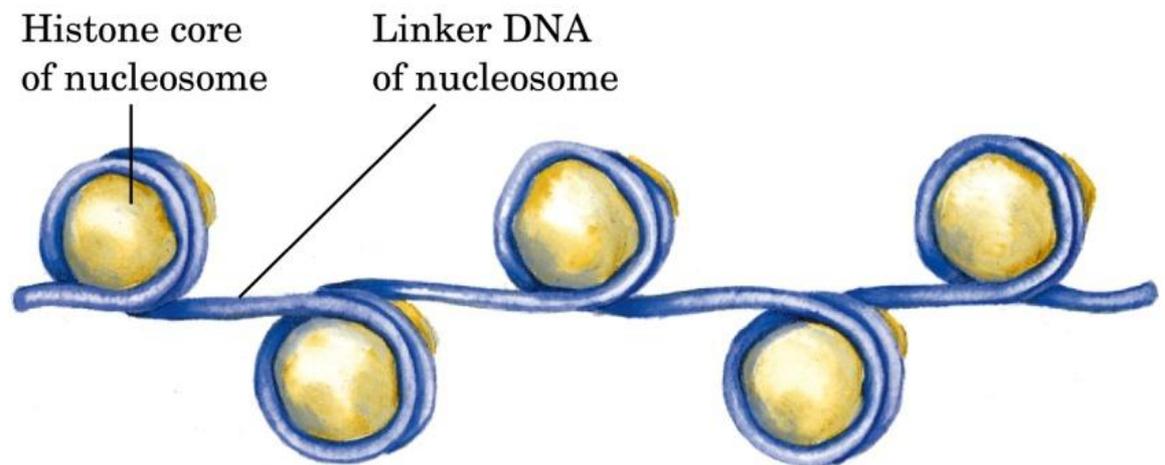
Cada nucleosomo é formado por um octâmero de histonas (2 x H2A, 2 x H2B, 2 x H3, 2 x H4)

Cada nucleosomo ocupa cerca de 150 pares de bases do DNA

A cromatina contém outras proteínas além de histonas: fatores de transcrição,

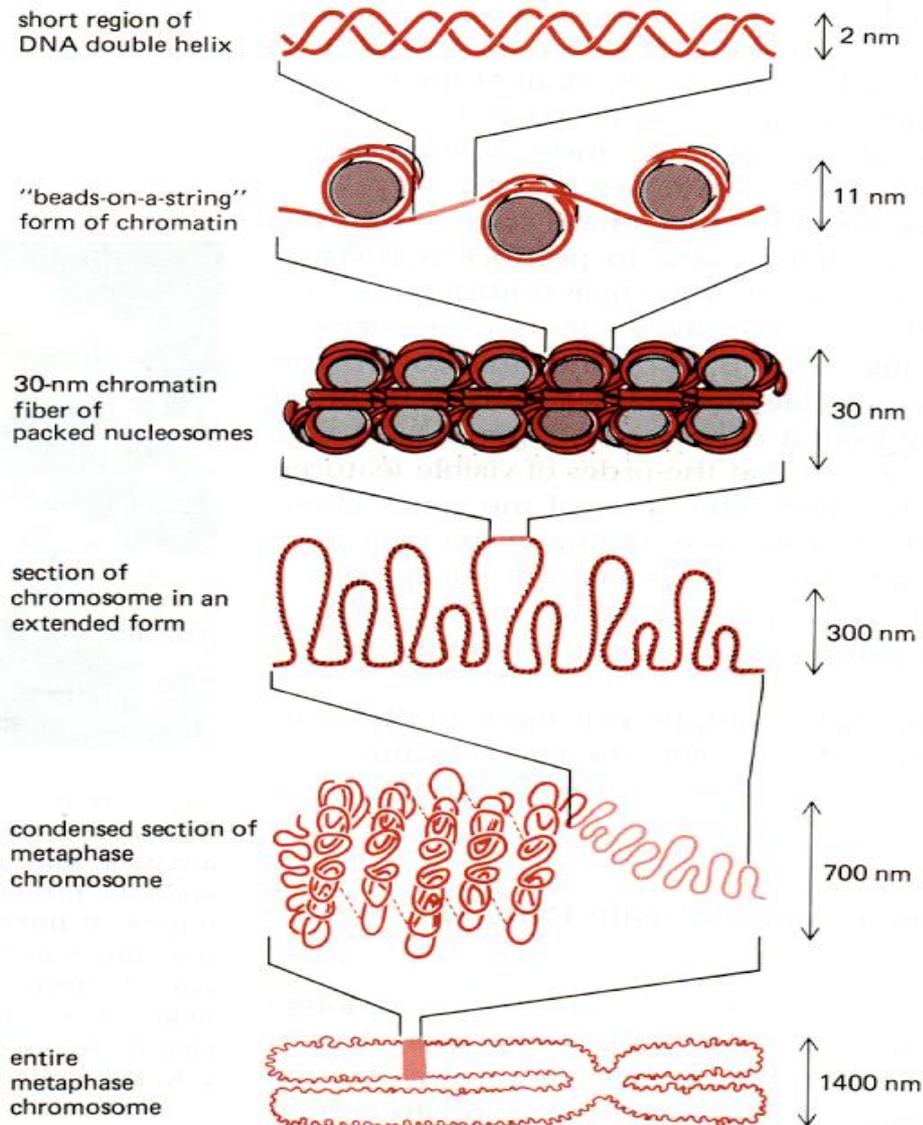
Histone	Molecular weight	Number of amino acid residues	Content of basic amino acids (% of total)	
			Lys	Arg
H1*	21,130	223	29.5	1.3
H2A*	13,960	129	10.9	9.3
H2B*	13,774	125	16.0	6.4
H3	15,273	135	9.6	13.3
H4	11,236	102	10.8	13.7

*The sizes of these histones vary somewhat from species to species. The numbers given here are for bovine histones.



(a)

Níveis hierárquicos de compactação da cromatina



Permite que 2 m de DNA caibam em um núcleo com 5 a 20 micrometros de diâmetro

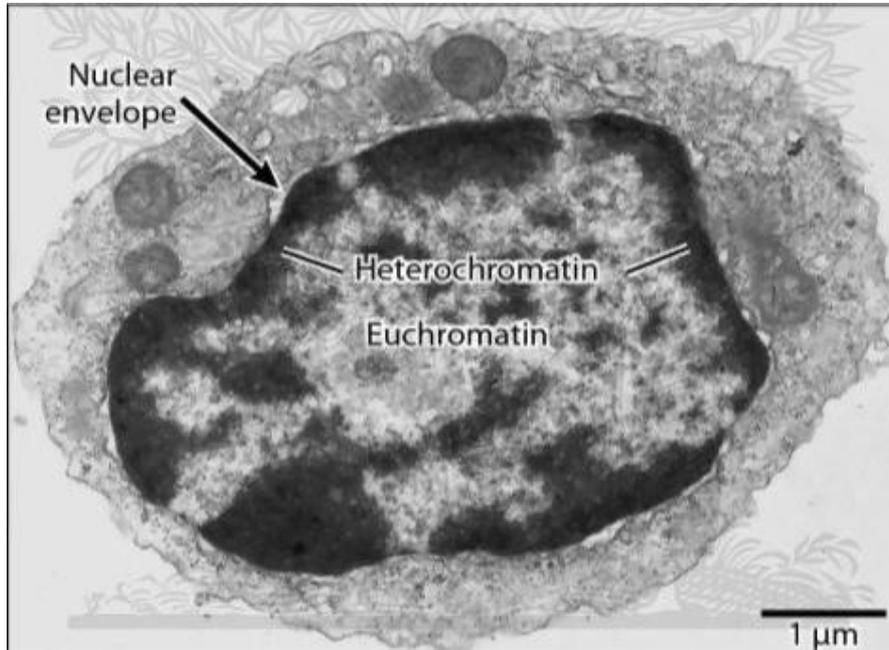
Fibra de 30nm

Fibra de 300nm
(alças de cromatina)

Razão de compactação
~1000-2000

Razão de compactação
~10000

Estado de compactação da cromatina é variável e dinamicamente regulado



Eucromatina

- Forma pouco condensada do DNA, dinamicamente regulada.
- Acessível a maquinaria de transcrição
- Transcritionalmente ativa

Heterocromatina

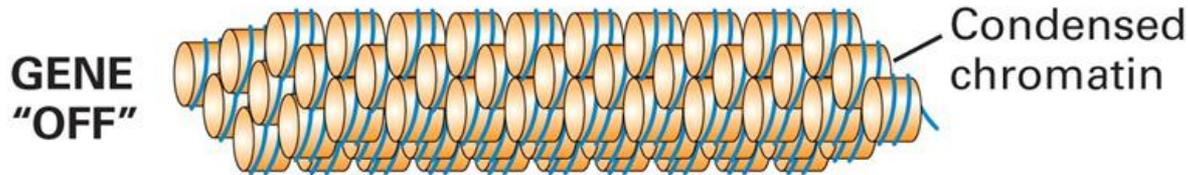
Facultativa (condicional)

Regiões inativas do DNA que podem variar entre tipos celulares no mesmo organismo.

Constitutiva

Altamente empacotada e permanentemente inativa. Forma predominante em regiões repetitivas do genoma, incluindo centrômeros e telômeros

Nucleossomos atuam como um inibidor geral da transcrição



- Inibem acesso da polimerase ao promotor
- Dificultam progressão da RNAP uma vez que transcrição é iniciada

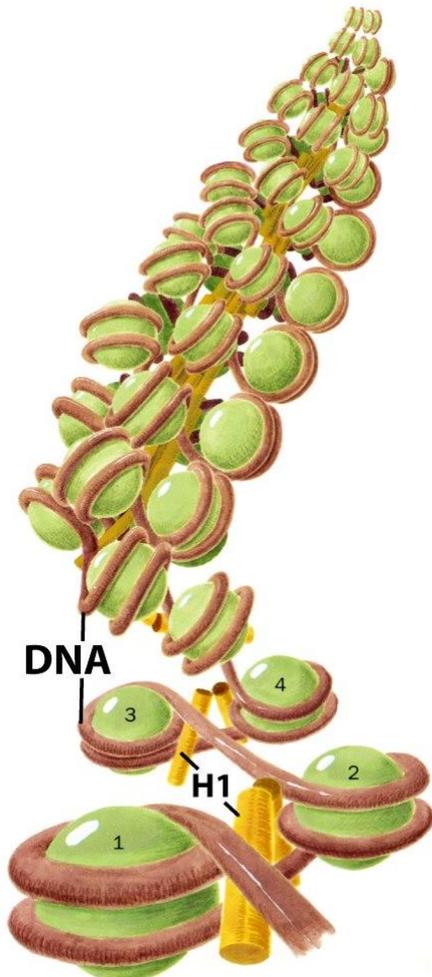
Existem complexos proteicos que "afrouxam" e reorganizam os nucleossomos no caminho da RNAP:

Complexos de remodelamento da cromatina



Como a cromatina se modifica para expor o DNA?

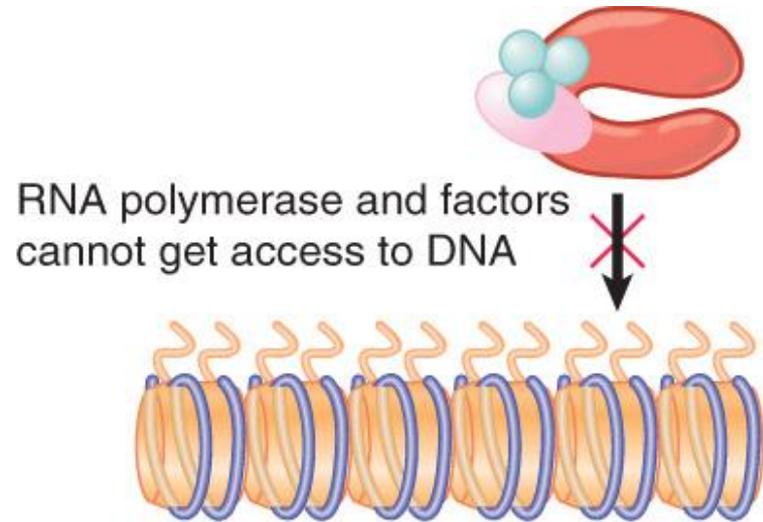
Fibras de 30nm são transcricionalmente inativas



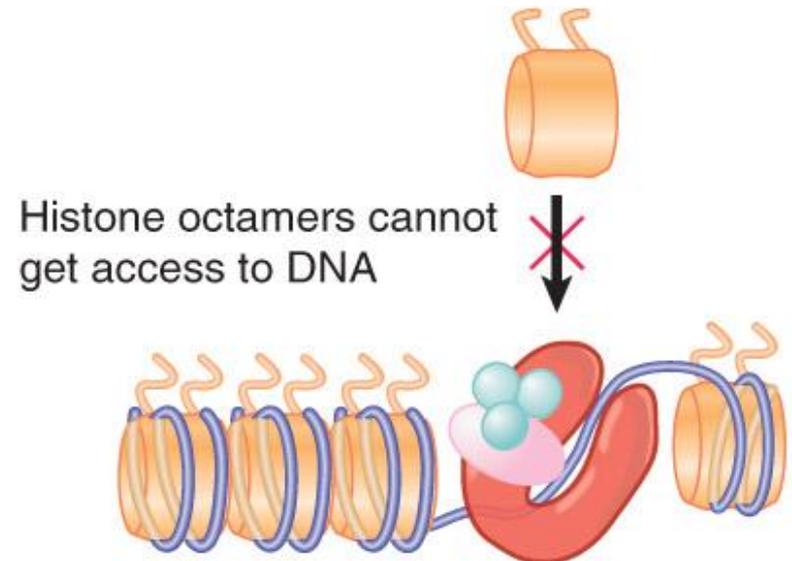
Nucleossomos precisam “abrir passagem” para o complexo de transcrição

Nucleossomos e aparato de transcrição são mutuamente excludentes

Genes estão silenciados quando protegidos pelos nucleossomos



Ocupação do DNA pelo complexo de transcrição exclui a ligação de nucleossomos

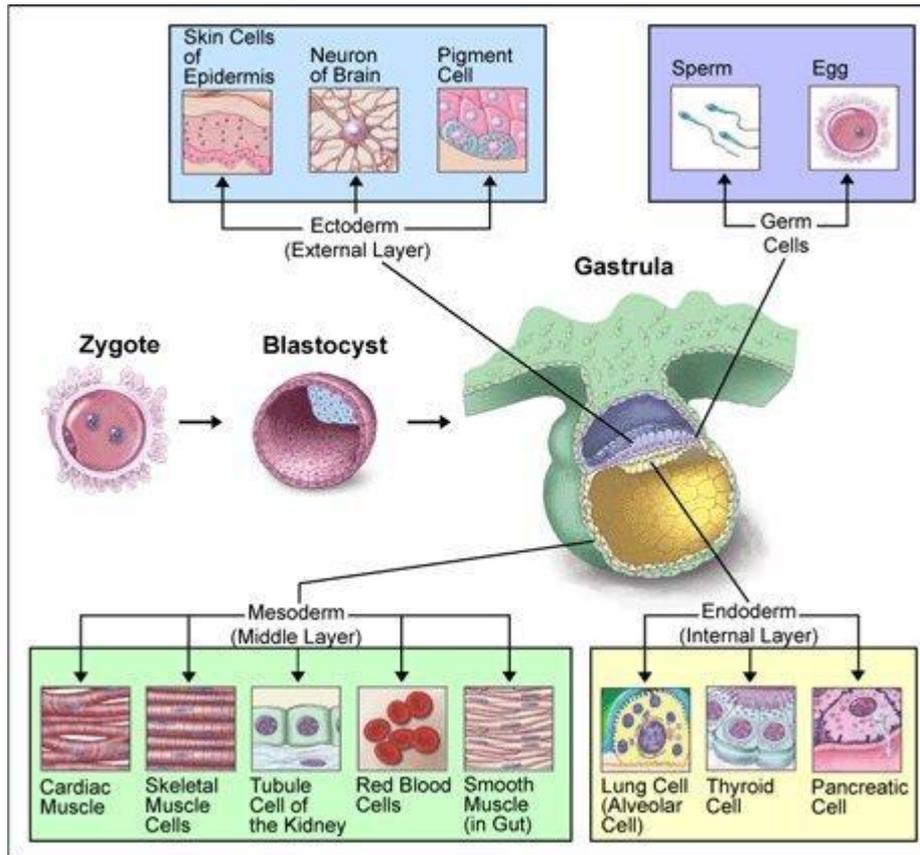


Modificações na cromatina estabelecem estados de ativação ou repressão dos genes que são mantidos durante a diferenciação e transmitidas durante a divisão celular

Epigenética

epi- (do grego: sobre, acima)

Termo cunhado por C. H. Waddington em 1942 para descrever a diferenciação celular a partir de seu estado totipotente durante o desenvolvimento embrionário

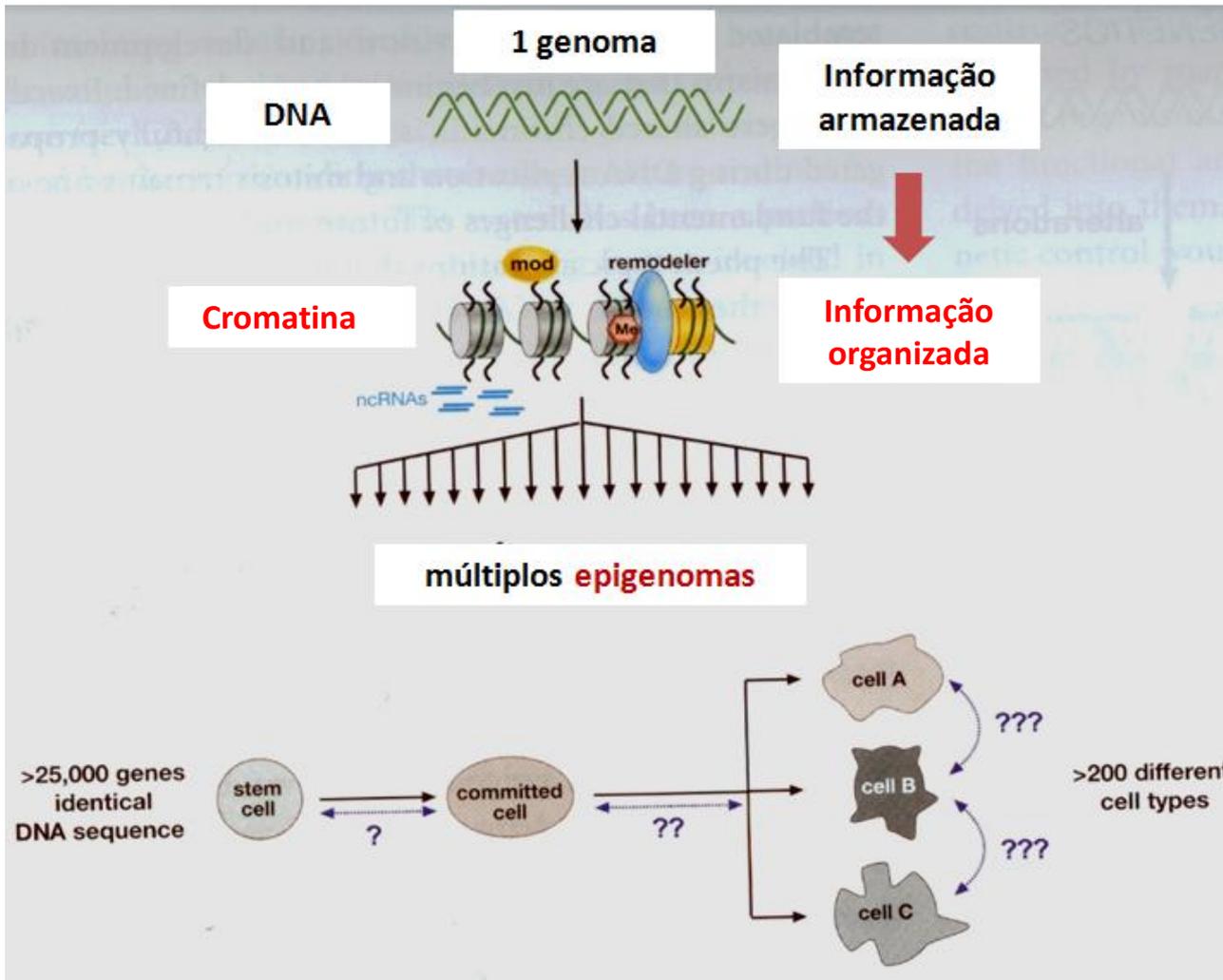


Corpo humano:

- 1 genoma (23 pares de cromossomos)
- ~ 25.000 genes
- > 200 tipos celulares distintos !!

Estudo das **mudanças hereditárias** no **fenótipo** (aparência) ou na **expressão gênica** causadas por mecanismos que **não envolvem modificações na sequência de DNA**

Modificações na cromatina tem um papel central para o desenvolvimento em organismos multicelulares

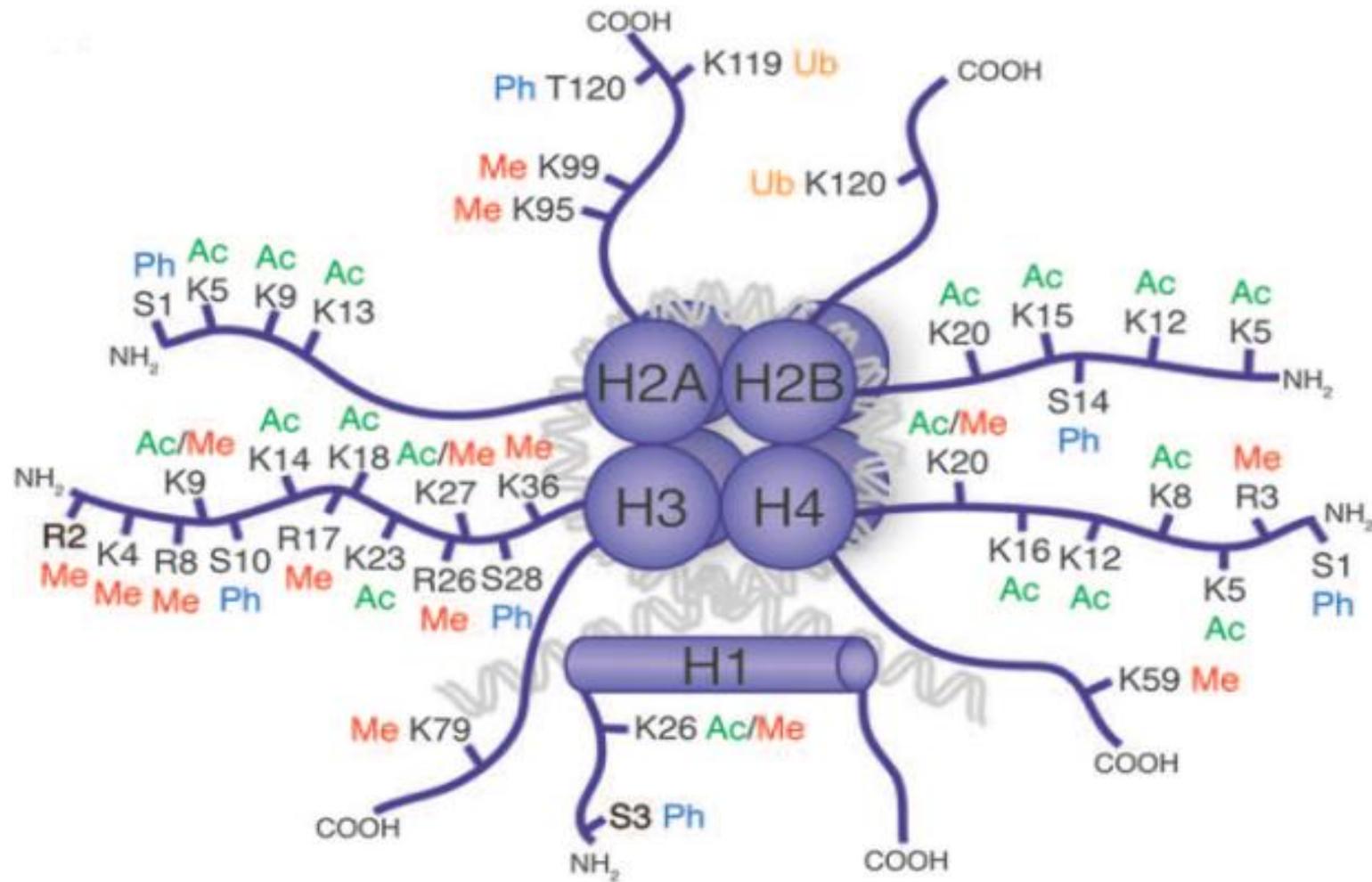


Quais as bases moleculares envolvidas?

Modificações funcionais na estrutura da cromatina

- modificações em histonas
- metilação do DNA
- remodelamento da cromatina
- Ação de RNAs não-codificadores

Extremidade N-terminal de proteínas histonas contem muitos resíduos que podem ser modificados covalente de forma reversível



Modificação de histonas

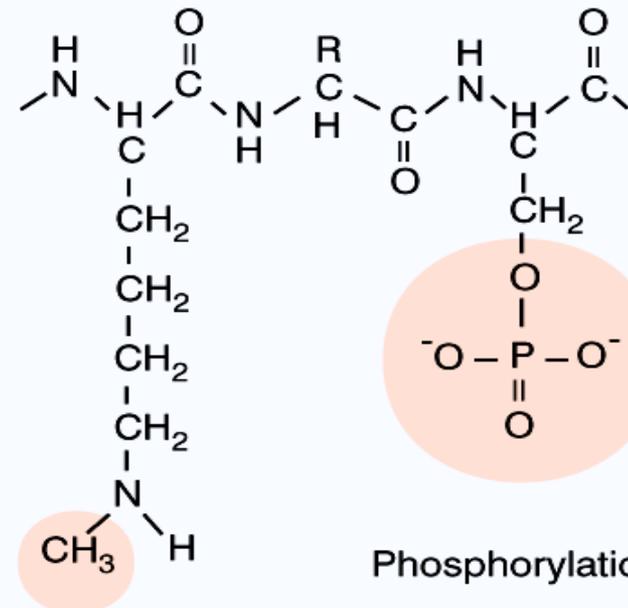
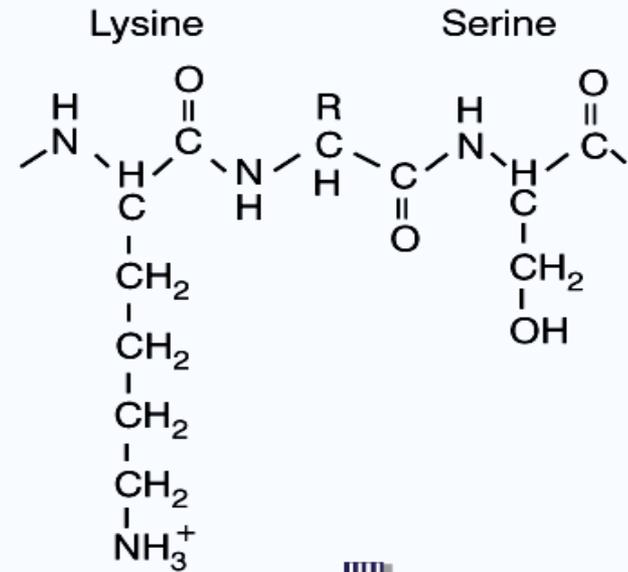
- Eventos essenciais no remodelamento da cromatina e, portanto, na expressão gênica
- Localizada (promotores) ou em vastas regiões do cromossomo
- Acetilação (K), Metilação (K, R), Fosforilação (S, T)
- Vários sítios (principalmente H3 e H4; H1)
- Atividade de modificação das histonas associada a fatores proteicos ativadores ou repressores de transcrição

Modificações pós-tradução em histonas

* Modificações reversíveis

Consequências das modificações

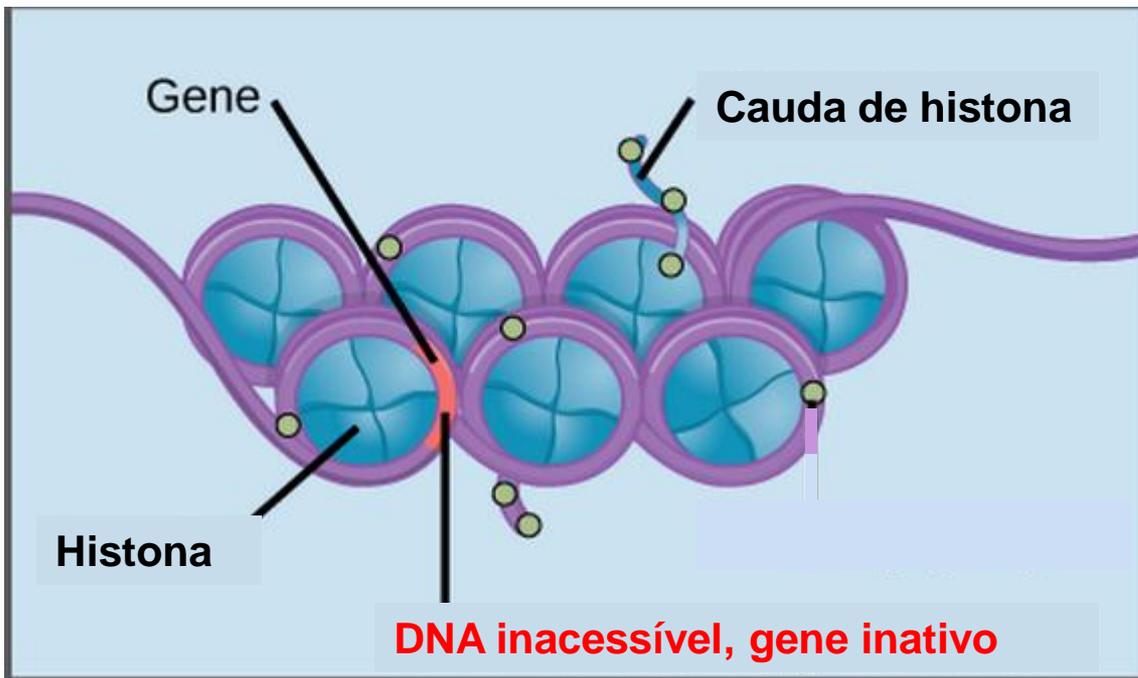
- Alteram a carga positiva líquida das histonas
- Criam domínios de reconhecimento por outras proteínas



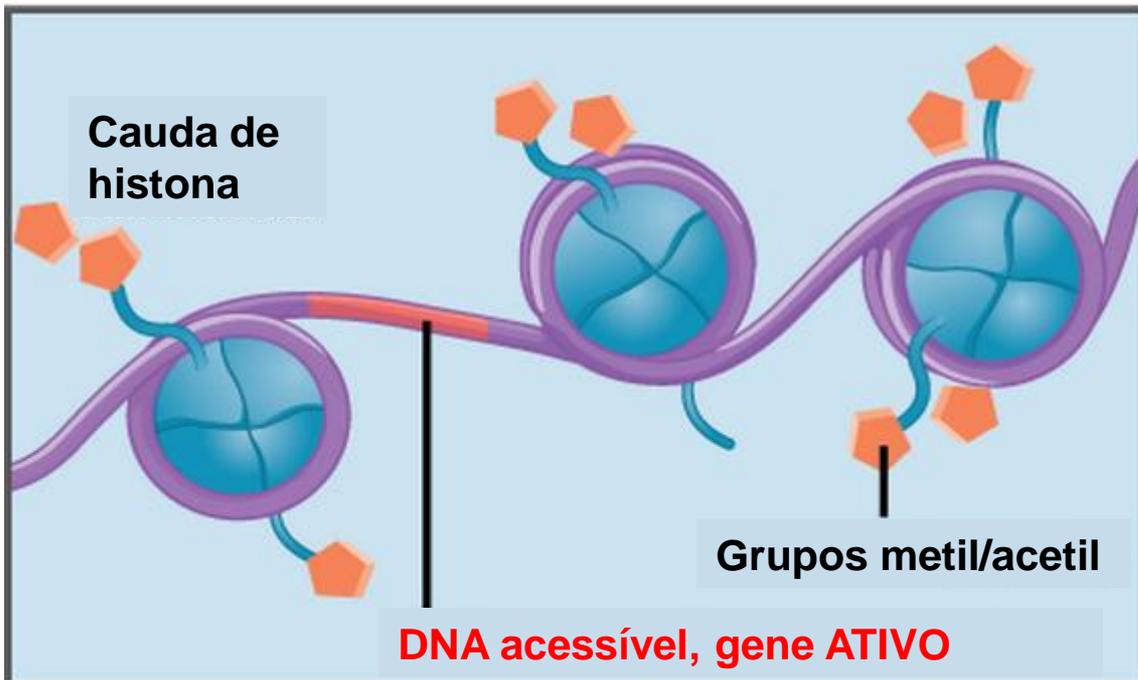
Acetylation

Methylation

Phosphorylation



- Proteínas histonas interagem fortemente com o DNA mantendo os nucleosomos altamente empacotados.
- A maquinaria de transcrição não consegue acessar o DNA e os genes estão inativos.



- Modificação de histonas (acetilação, metilação) resulta na diminuição do empacotamento dos nucleosomos.
- DNA se torna mais acessível a ligação de fatores de transcrição que ativam a expressão de genes

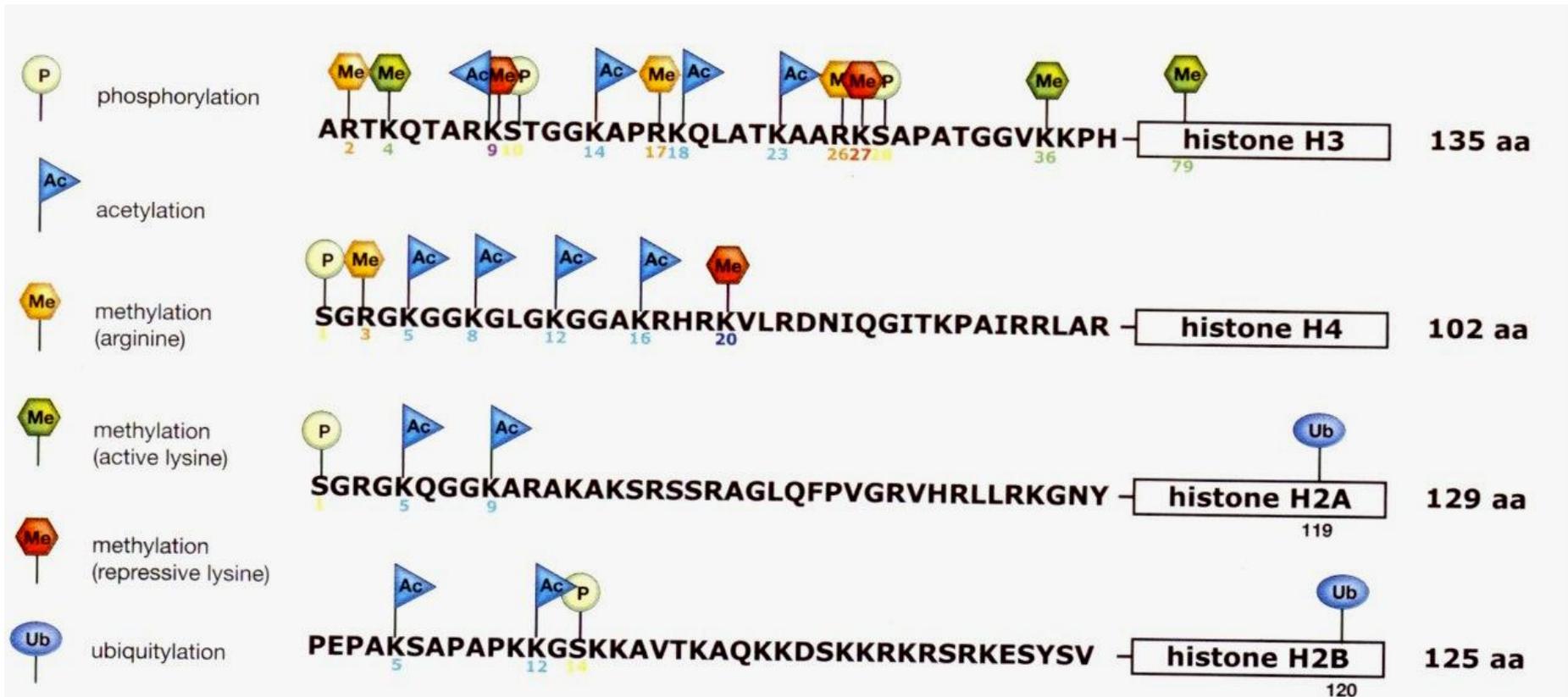
Modificações pós-tradução de histonas

		Papel na transcrição gênica	Resíduos modificados na histona
Acetilação	COCH ₃	ativação	H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8, K12, K16) H2A/H2B (K6, K7, K16, K17)
Fosforilação	PO ₃	ativação	H3 (S10)
Metilação	CH ₃	ativação repressão	H3 (K4, K36, K79) H4 (K20) H3 (K27)
Ubiquitinação	156 aa	ativação repressão	H2B (K123) H2A (K119)
Sumoilação	101 aa	repressão	H3 (?) H4 (K5, K8, K12, K16) H2A (K126) H2B (K6, K7, K16, K17)

Código das Histonas

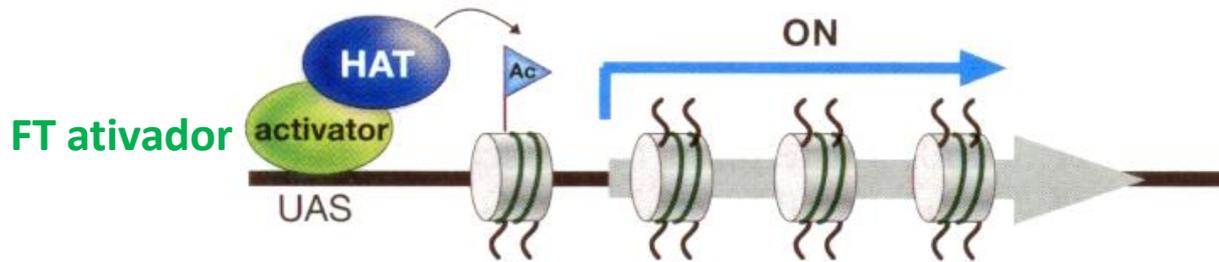
Combinações distintas de modificações covalentes em resíduos de histonas resultam em uma complexa rede de sinalização para o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina

Código ainda não é totalmente conhecido!



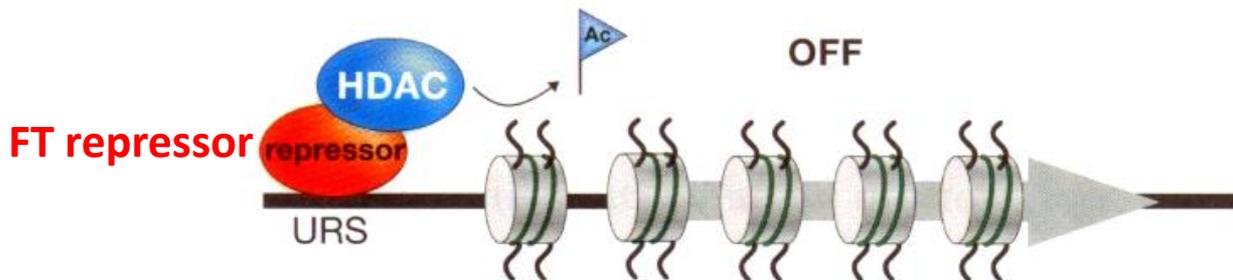
Enzimas modificadoras de histonas são recrutadas para regiões promotoras de genes por **fatores de transcrição (FT)** que se ligam ao DNA

FT ativadores recrutam Histonas acetiltransferase (HATs)



Histonas acetiladas,
Cromatina menos compacta,
Transcrição ativa

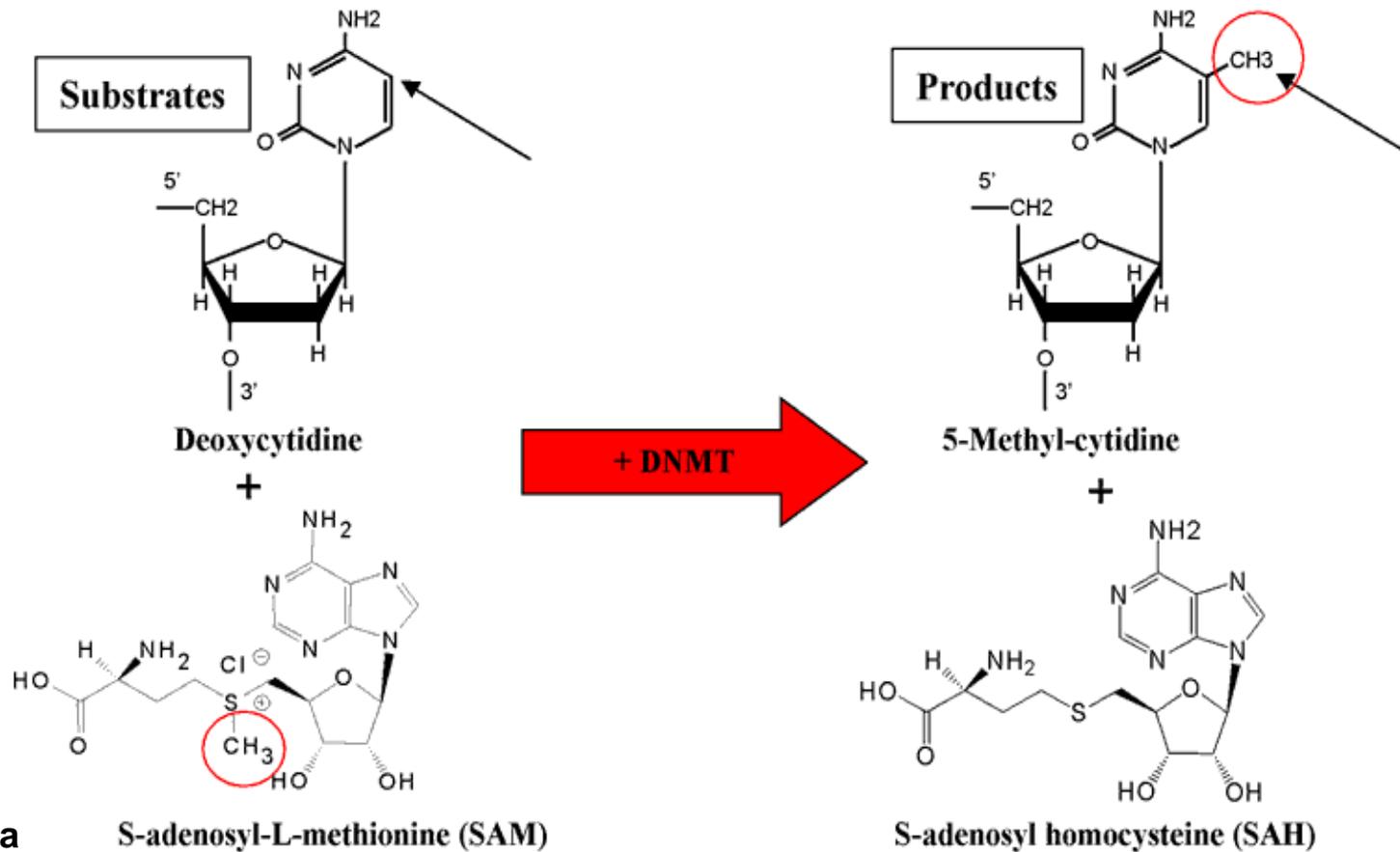
FT repressores recrutam Histonas deacetilases (HDACs)



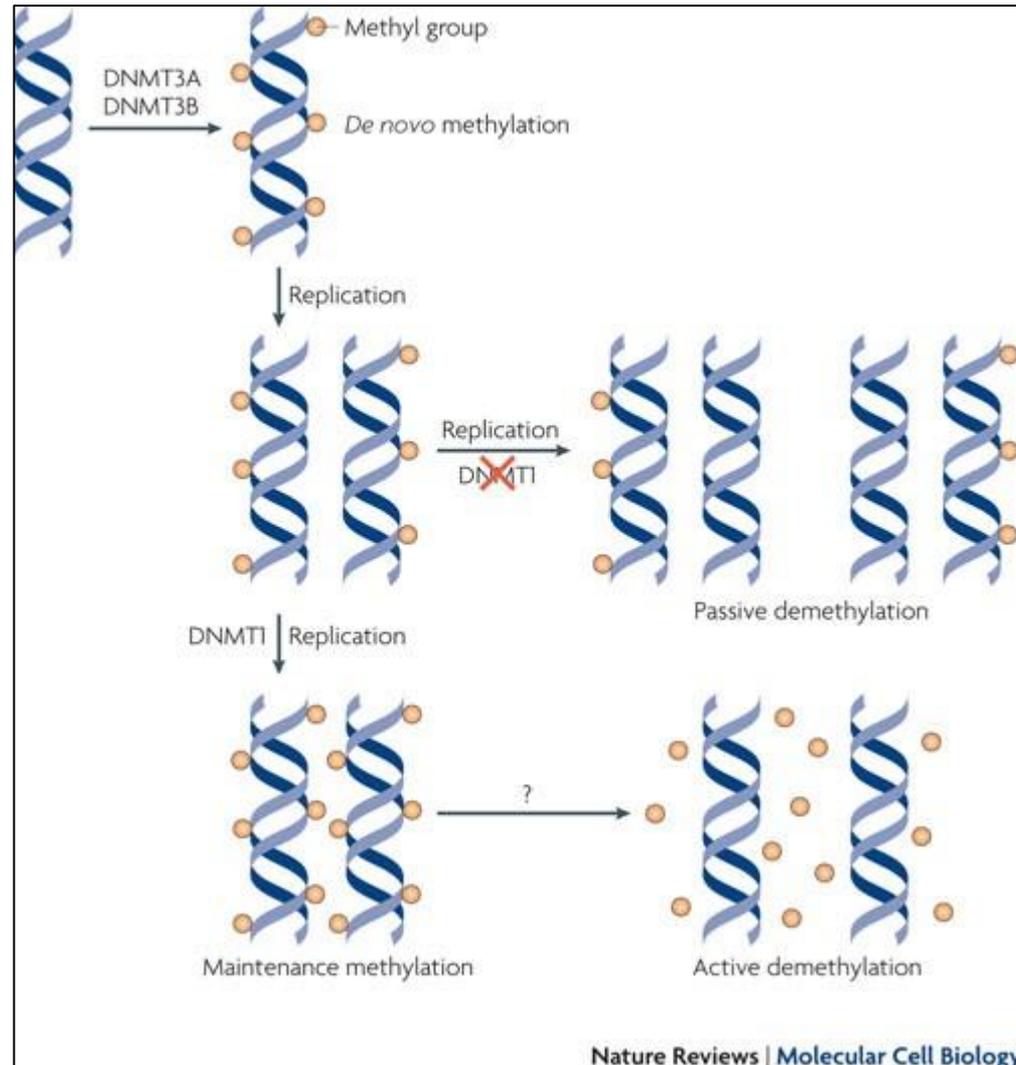
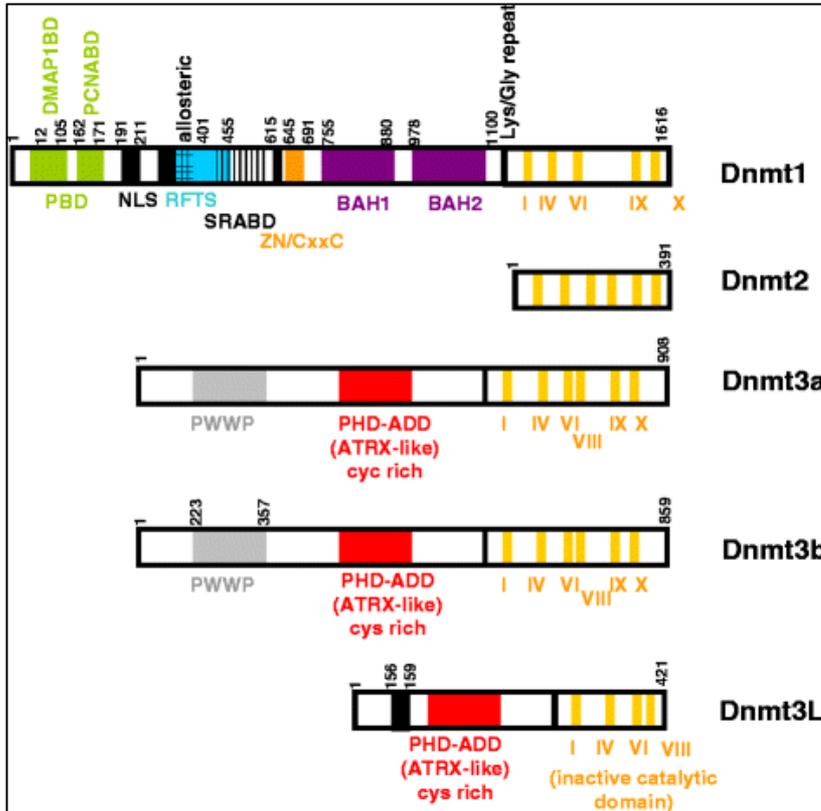
Histonas desacetiladas,
Cromatina mais compacta,
Transcrição inativa

Metilação do DNA

- A metilação de citosinas é uma modificação covalente do DNA, onde um grupo metil (CH₃) é transferido para a posição C-5 de uma citosina
- Ocorre predominantemente em **dinucleotídeos CpG**.
- Reação catalisada por membros da família de **DNA metiltransferases (DNMTs)**.
- Papel importante na regulação da expressão gênica.



Metilação do DNA é introduzida e mantida após a divisão celular por diferentes DNMTs

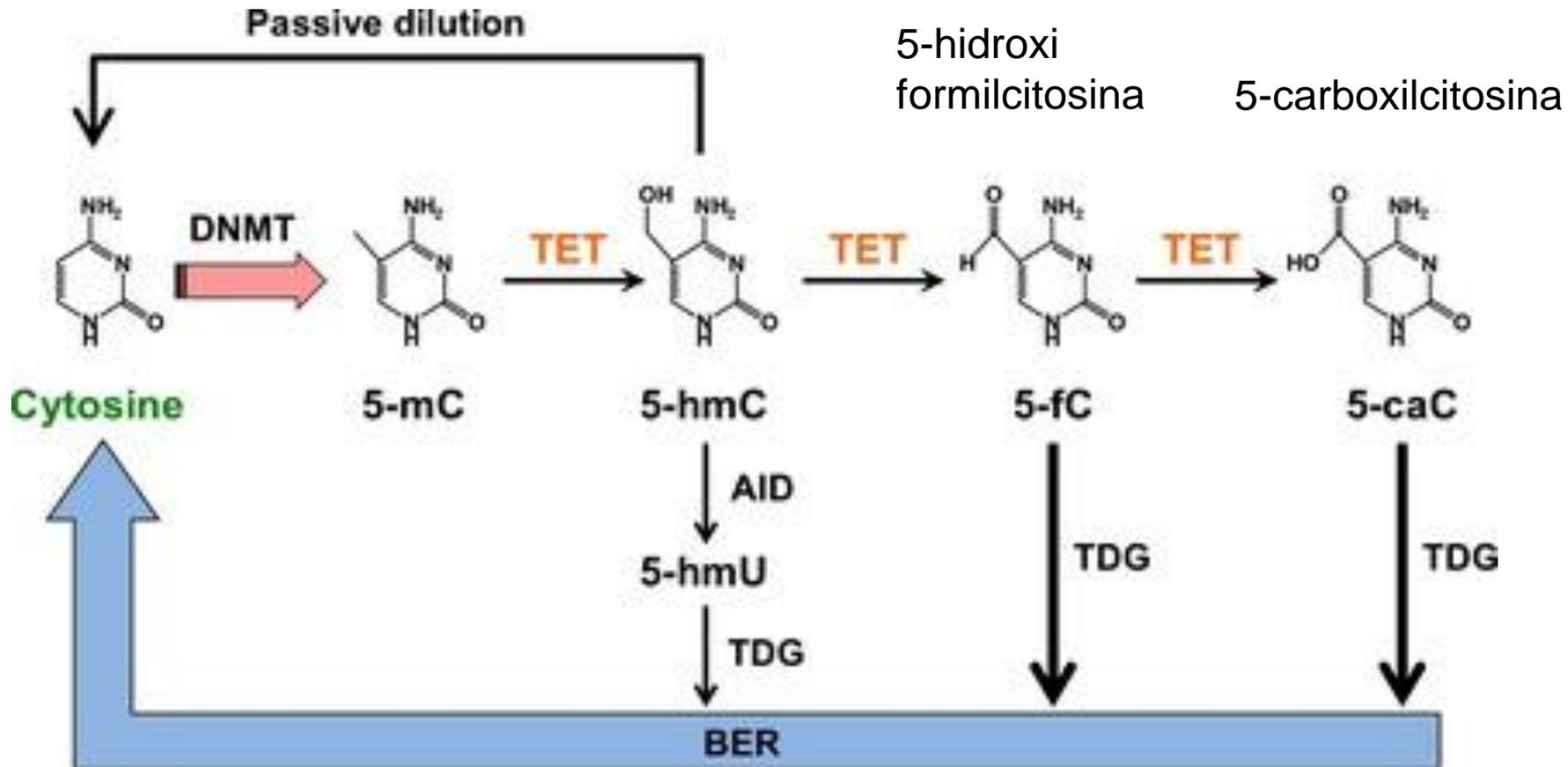


DNMT1: manutenção de citosinas metiladas

DNMT3A e B: "metilação de novo"

Desmetilação do DNA ocorre por via passiva e ativa

A desmetilação de citosinas metiladas depende da ação de enzimas (TET) que oxidam a metilcitosina em hidroximetilcitosina e outros derivados que não são substrato da DNMT de manutenção após a replicação do DNA (desmetilação passiva) ou que são convertidas em citosinas por enzima da via de reparo de DNA (desmetilação ativa)

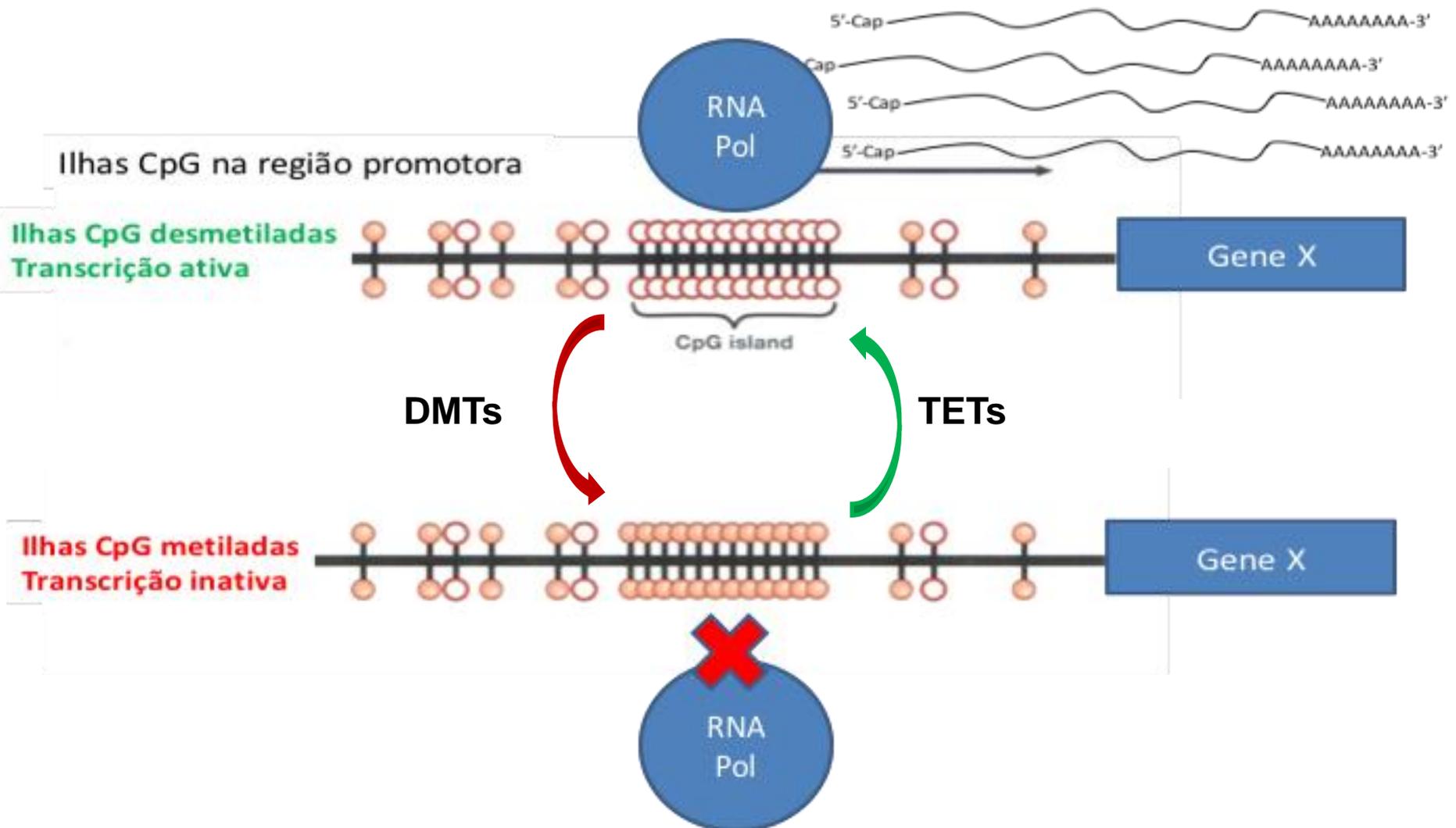


TDG: Timina DNA glicosilase

BER: Reparo de excisão de bases

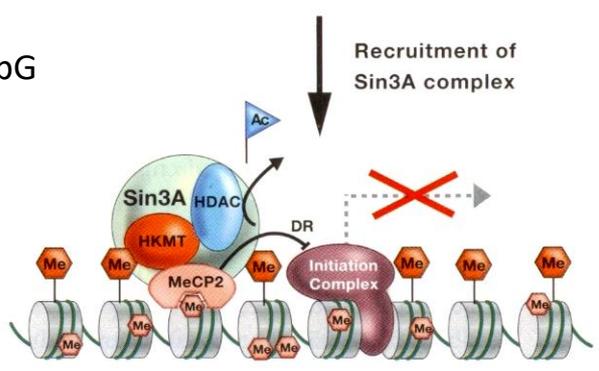
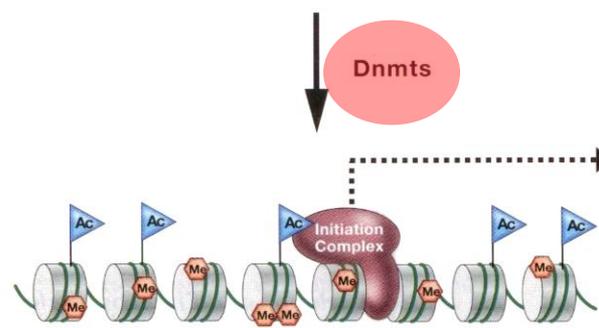
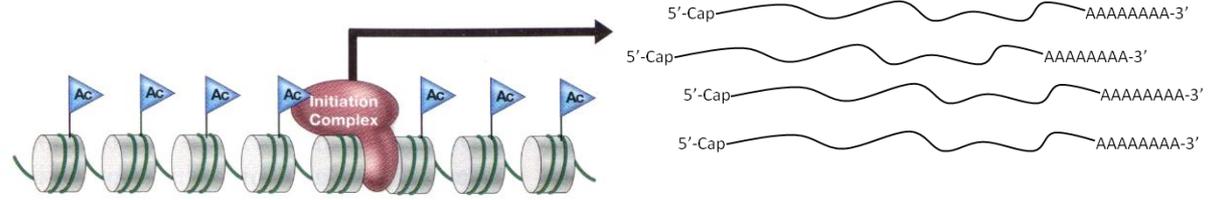
Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* 2014 Sep;105(9):1093-9

Ilhas CpGs localizam-se na vizinhança de **regiões promotoras** e seu grau de metilação controla a expressão de genes eucarióticos



Proteínas ligadoras de CpGs metilados promovem o remodelamento da cromatina e repressão da expressão gênica

**Ilhas CpG desmetiladas,
Histonas acetiladas
Transcrição ativa**



 Grupo acetil
 Grupo metil
 DNMT – DNA metiltransferase
 HDAC – Histona deacetilase

Metilação do DNA

↓

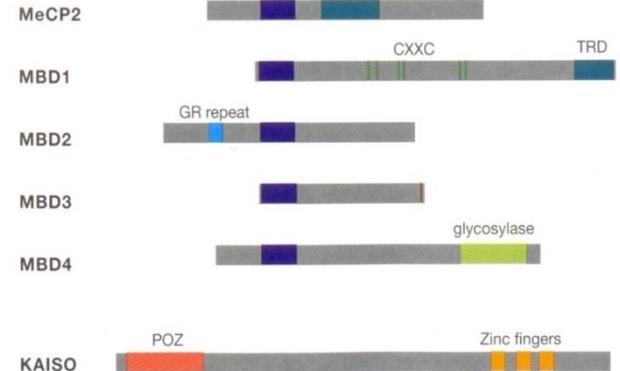
Proteínas ligadoras de metil-CpG

↓

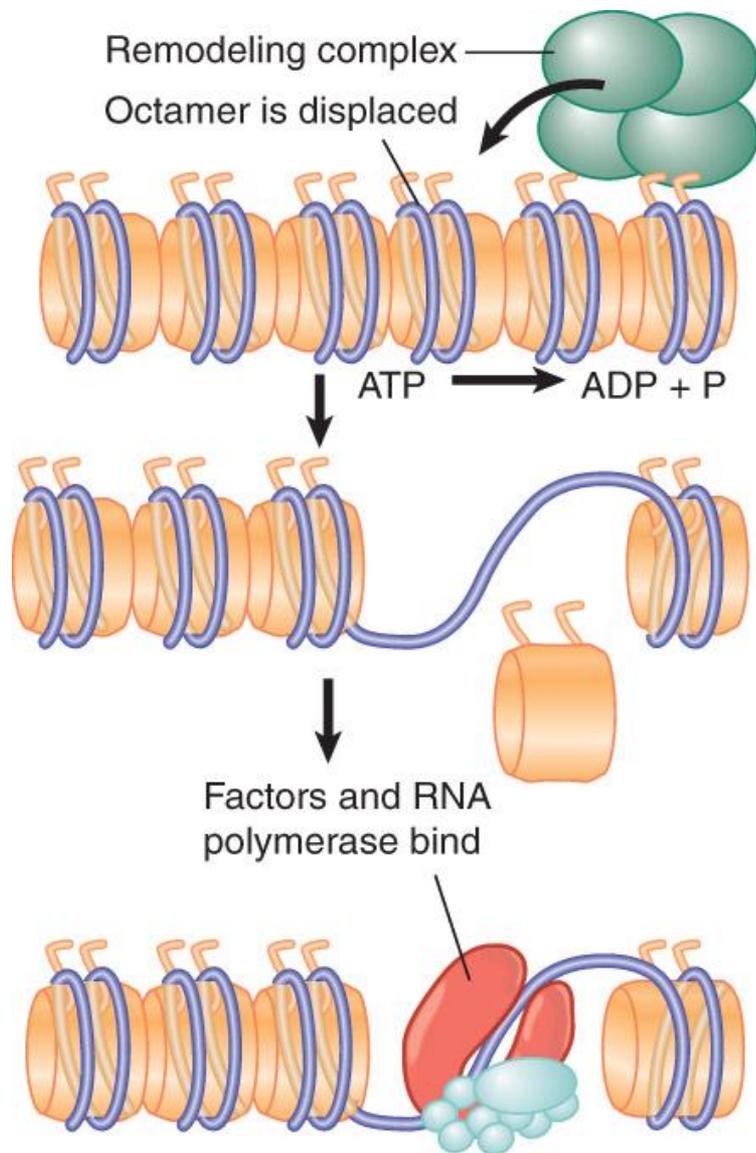
Recrutamento de HDACs

**Ilhas CpG metiladas,
Histonas deacetiladas
Transcrição inativa**

Família de proteínas ligadoras de Metil-CpG

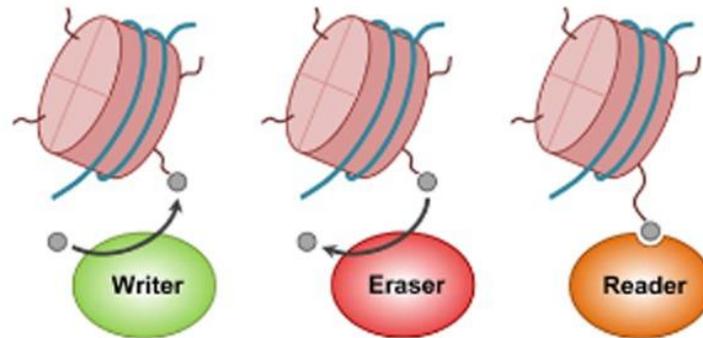
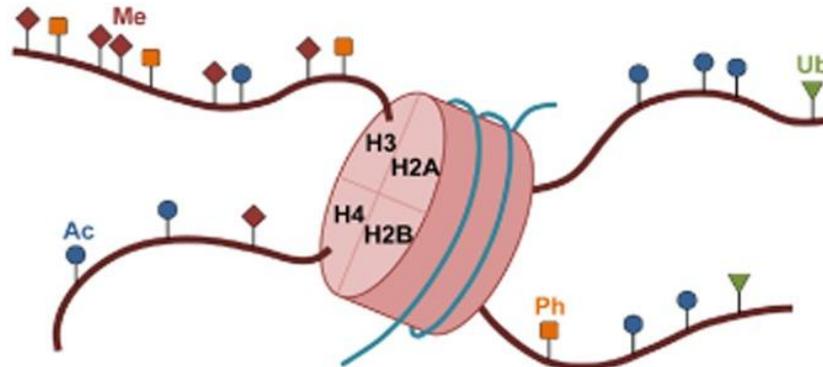


Remodelamento da Cromatina



- Reorganização dos nucleossomos para ativação da transcrição
- Processo ativo: envolve gasto de ATP
- Grandes complexos proteicos envolvidos

Complexos proteicos com atividade enzimática especializados na deposição, leitura e remoção de marcas epigenéticas

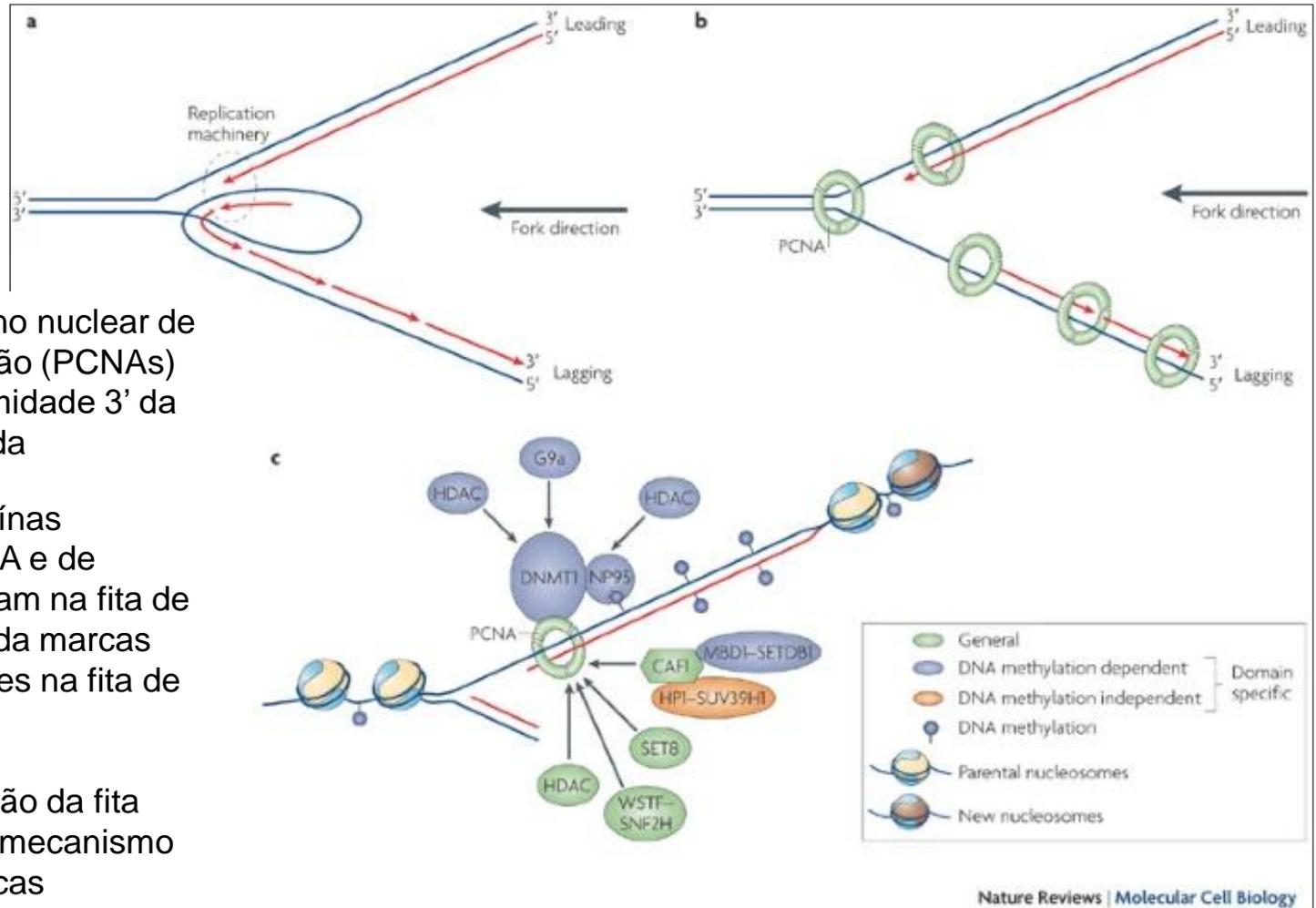


Writer
Histone methyltransferases and histone acetyltransferases

Eraser
Histone demethylases and histone deacetylases

Reader
Bromodomains, chromodomains, tudor domains, PHD fingers, PWWP domains and malignant brain tumour domains (MBT)

Metilação de bases do DNA e modificações específicas de histonas podem ser transmitidas para as fitas de DNA filhas durante a replicação



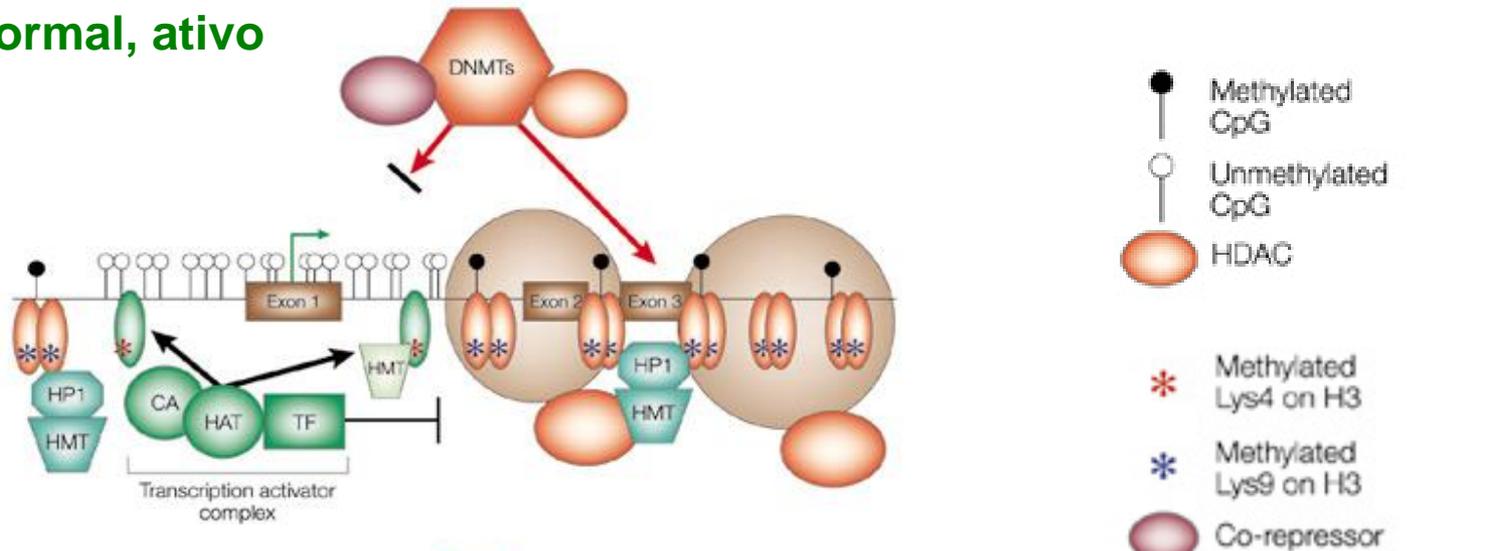
•Proteínas do antígeno nuclear de células em proliferação (PCNAs) se associam à extremidade 3' da fita de DNA sintetizada

•PCNA recruta proteínas modificadores do DNA e de histonas que depositam na fita de DNA recém-sintetizada marcas epigenéticas presentes na fita de DNA parental

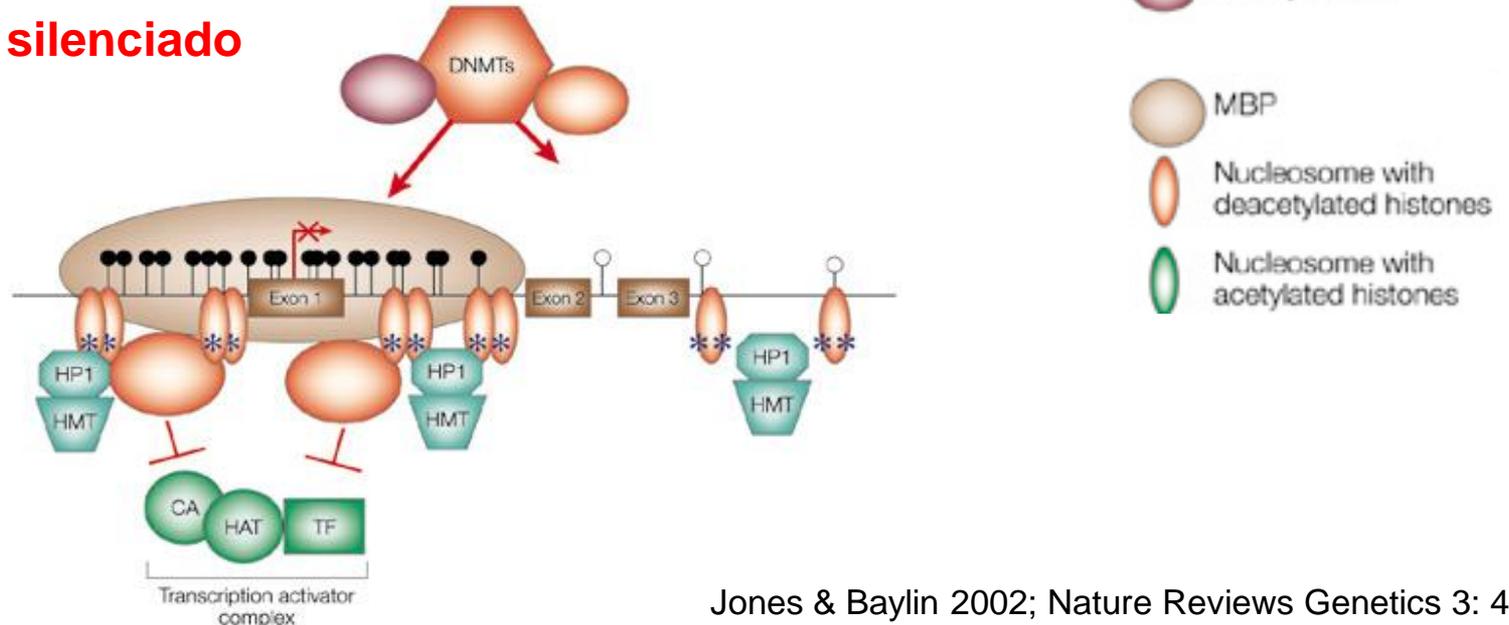
•O padrão de metilação da fita parental participa no mecanismo de reposição de marcas epigenéticas

Alterações epigenéticas são frequentes em tumores e contribuem para fenótipos malignos
 Ex. hipermetilação de região promotora de genes supressores de tumor

Tecido normal, ativo



Tumor, silenciado



Imprinting: mecanismo epigenético para controle da dose gênica em eucariotos

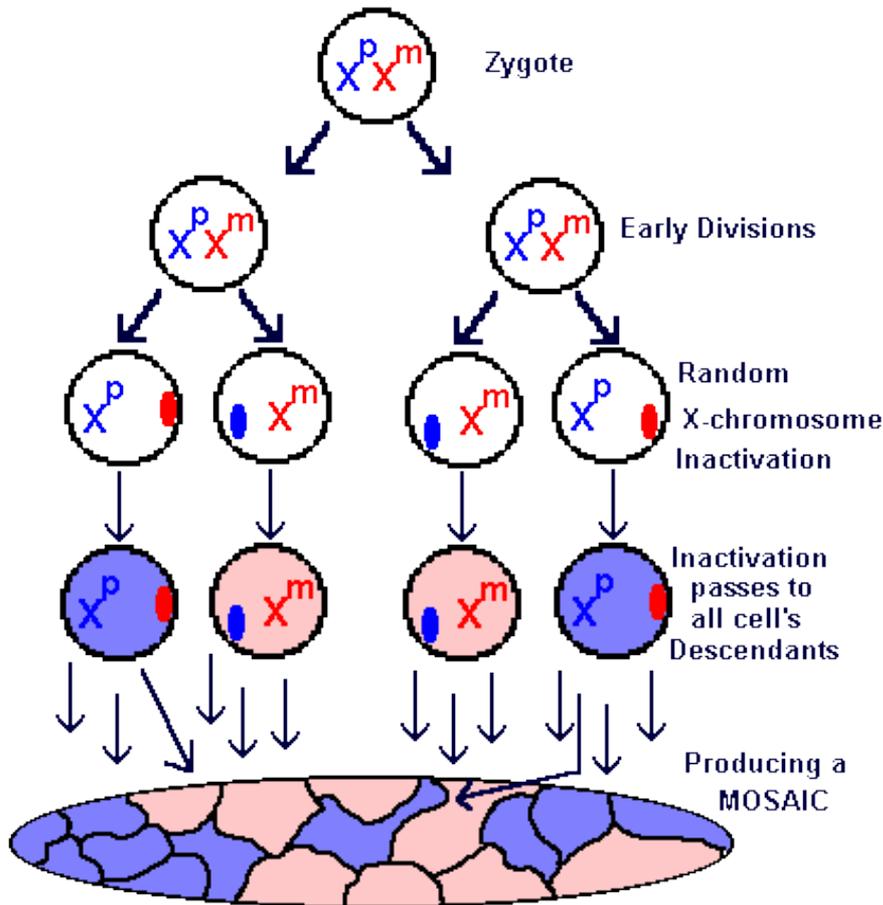
- mecanismo que regula a expressão gênica em organismos que possuem mais de uma cópia (alelo) do gene

Exemplos de imprinting:

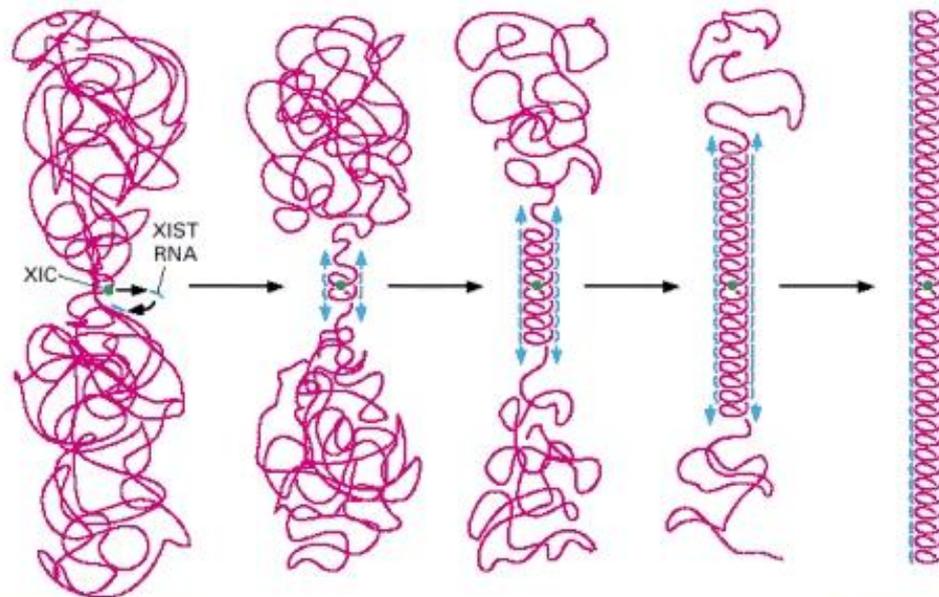
- Inativação do cromossomo X
- *Imprinting* genômico: silenciamento de genes específicos no cromossomo paterno ou materno

Inativação de uma cópia do cromossomo X em fêmeas de mamíferos

- Mecanismo de compensação de dose gênica (fêmeas **XX**, machos **XY**)
- leva a formação de **indivíduos mosaicos**



Inativação do cromossomo X é mediada por um RNA não codificador (XIST)



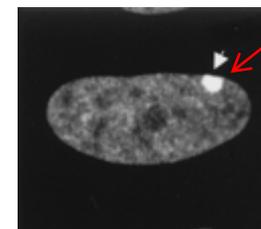
Cromossomo X
ativo

Cromossomo X
inativo

Célula
indiferenciada



Expressão do ncRNA XIST no
cromossomo X silenciado



Célula
diferenciada

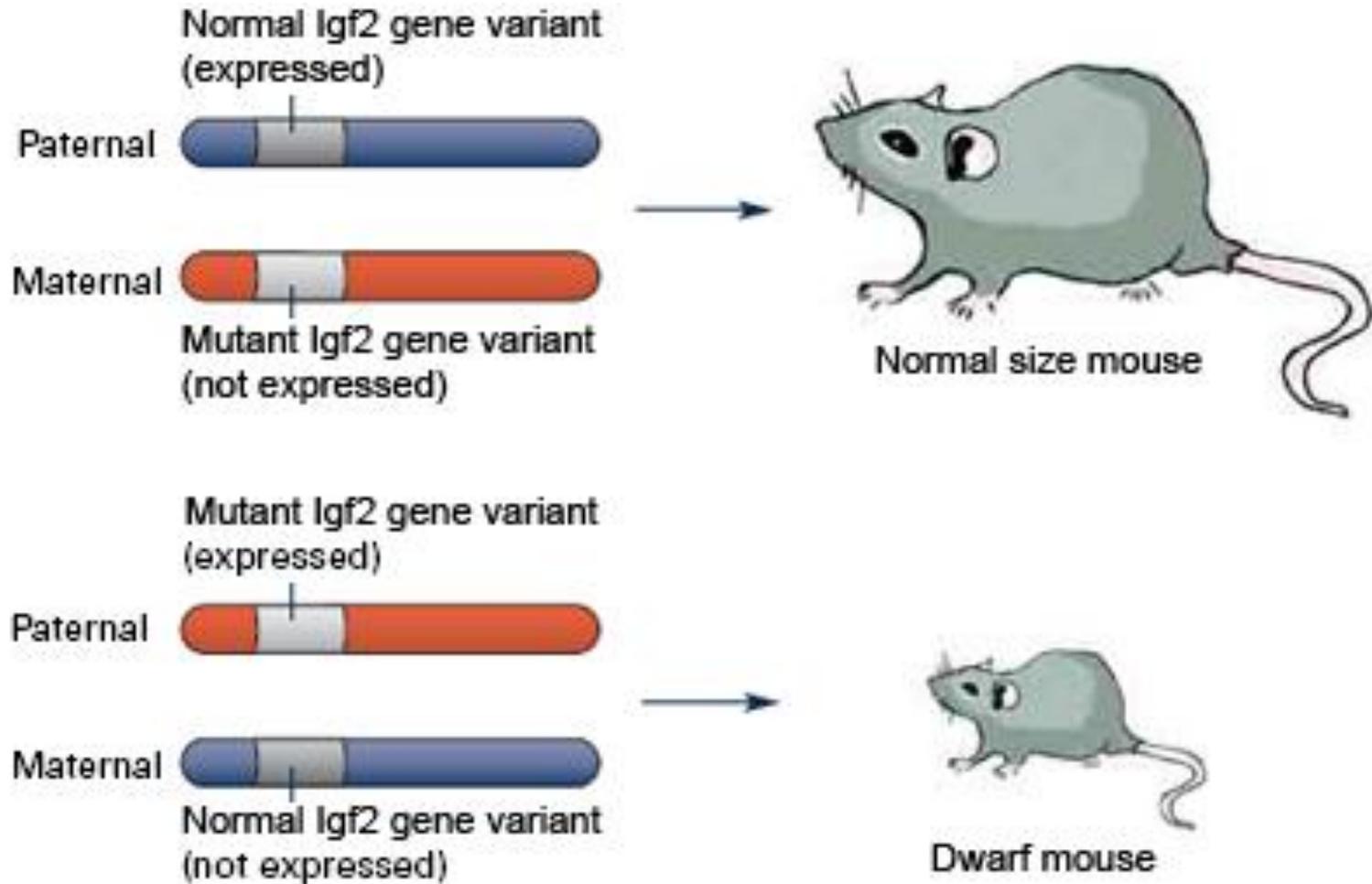
XIST contém uma região repetitiva conservada (região A) que interage com proteínas remodeladoras da cromatina (complexo PRC2) que induzem a **formação de heterocromatina** e o **silenciamento do cromossomo X**

Imprinting genômico em mamíferos

- Silenciamento específico de alelos de origem paternal ou maternal.
- Identificado em cerca de 80 genes (~1%).
- Após a fecundação, é **mantido pela metilação diferencial do DNA e modificação de histonas** na vizinhança dos genes regulados por *imprinting*.
- O *imprinting* controla genes que tem um papel essencial na regulação do crescimento embrionário e fetal.
- Perda de *imprinting* está associada a doenças genéticas

Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)

é um fator de crescimento expresso apenas no cromossomo paterno

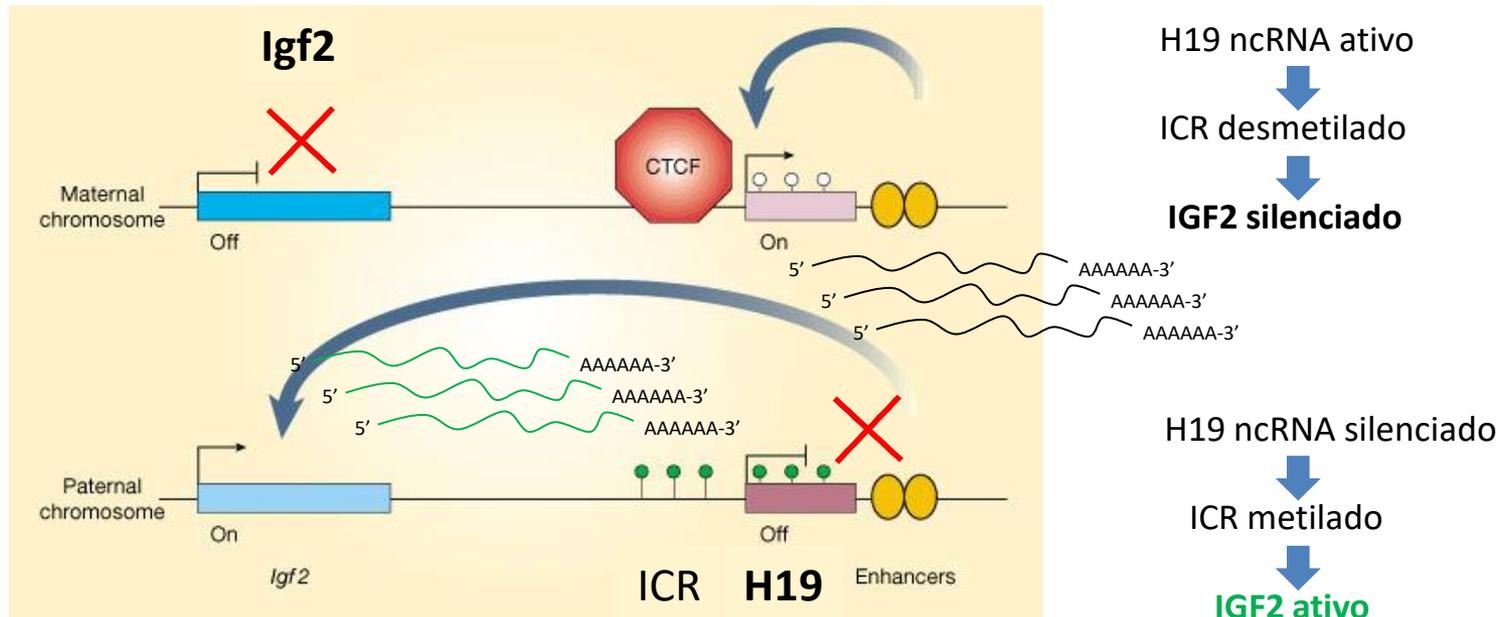


O silenciamento do gene IGF2 no cromossomo materno envolve a metilação do DNA e é controlada por um RNA não codificador longo (H19)

No **cromossomo materno**, a **proteína CFTR** (repressor) se liga a **região controladora do imprinting (ICR)** quando esta se encontra **desmetilada** e impede que o promotor de IGF2 interaja com o ativador da transcrição (“enhancer”), **silenciando** a expressão do gene.

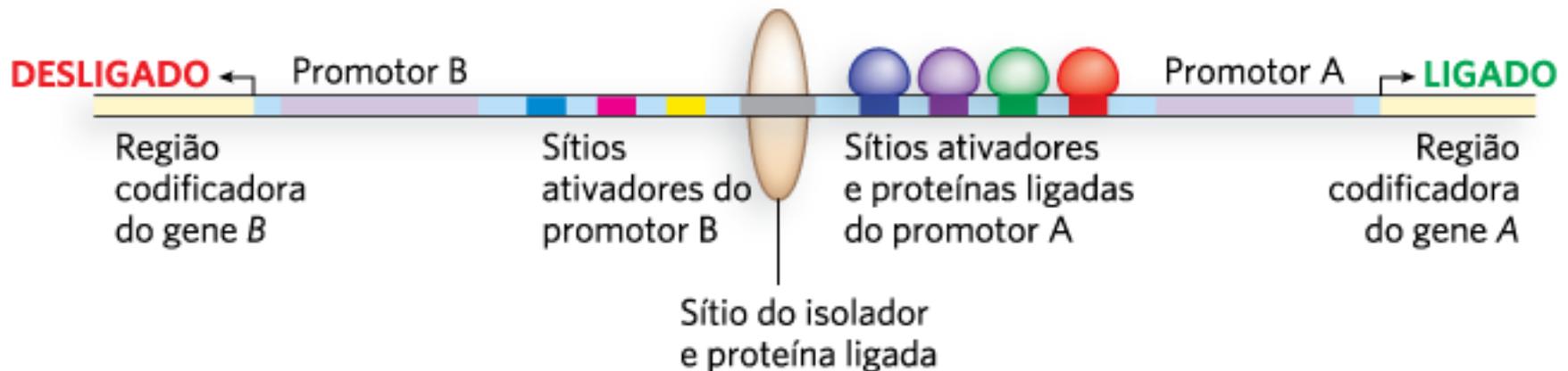
No **cromossomo paterno** o ICR encontra-se **metilado**. CFTR não se liga e ocorre a **ativação** da transcrição de IGF2

A metilação do DNA no ICR é afetada por H19, um RNA não codificador longo (2,3 kb) **expresso exclusivamente no cromossomo materno**.



A região controladora de imprinting onde CTCF se liga é um elemento **isolador** que impede que o enhancer ative a expressão de IGF2 no cromossomo materno

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



Perda de *imprinting* de IGF2 associada ao desenvolvimento de tumores de colon e rim

Ocorrência de Hipermetilação do ICR no cromossomo materno
(perda da expressão de H19 é um fator)



Aumento da expressão de Igf2 (ambos os alelos, materno e paterno são expressos)



Aumento da proliferação celular

