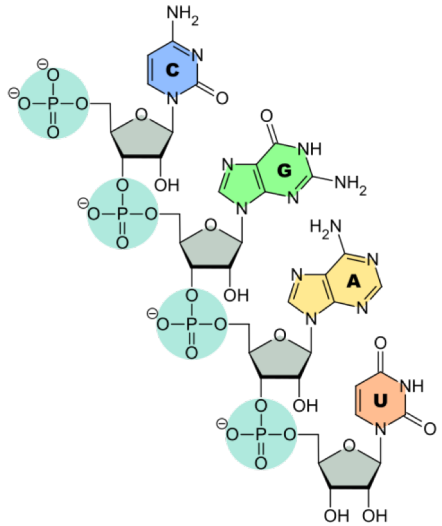
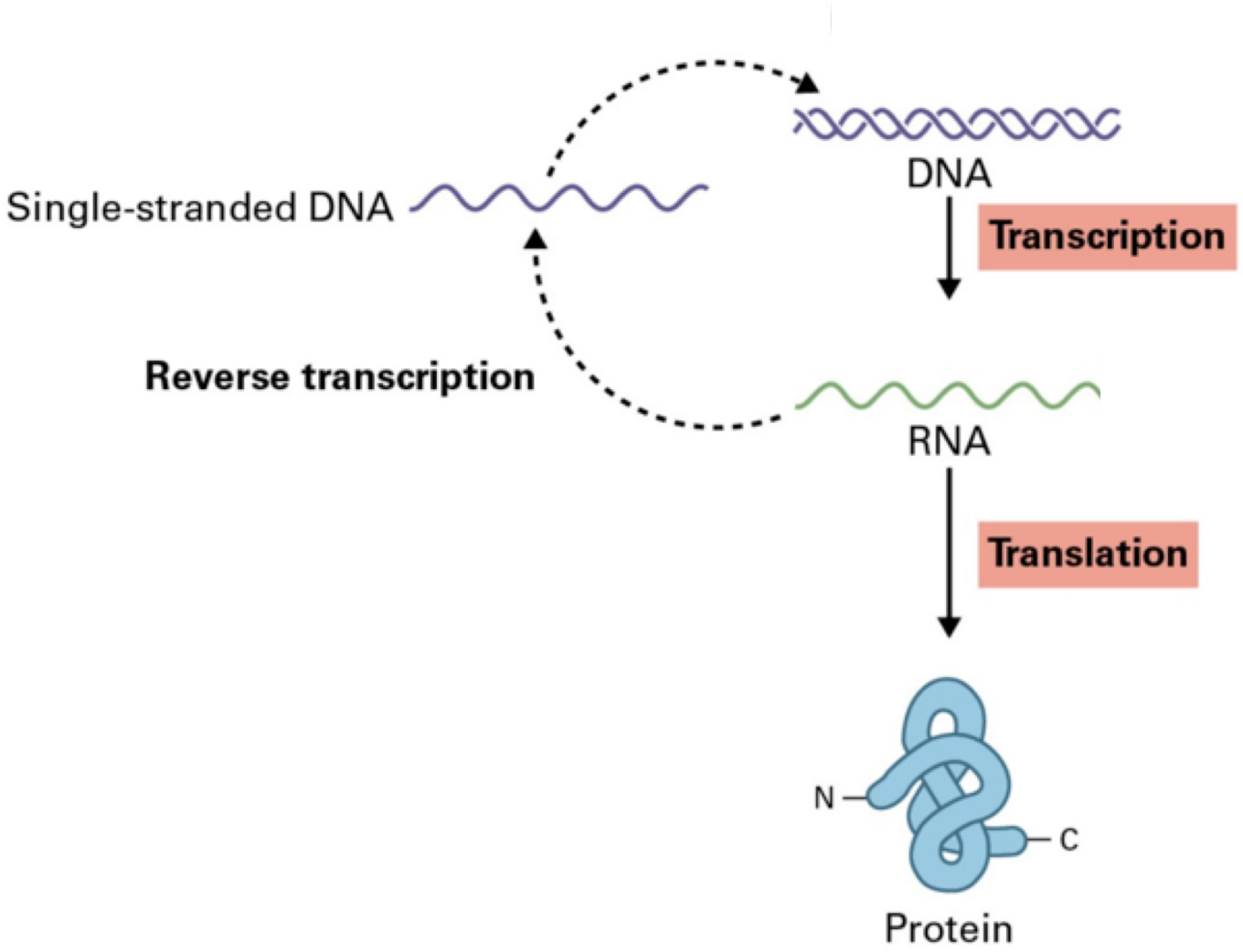
Regulação da expressão gênica em plantas



Processos envolvidos na transdução da informação



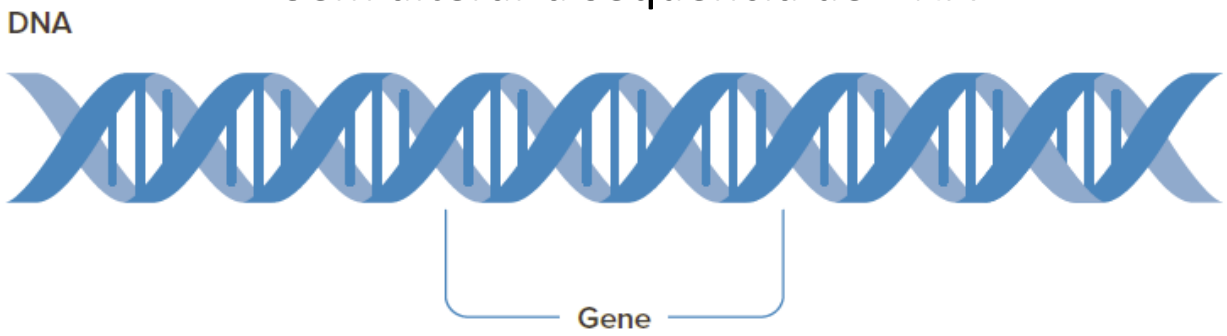
Regulação espacial e temporal da expressão gênica permite:

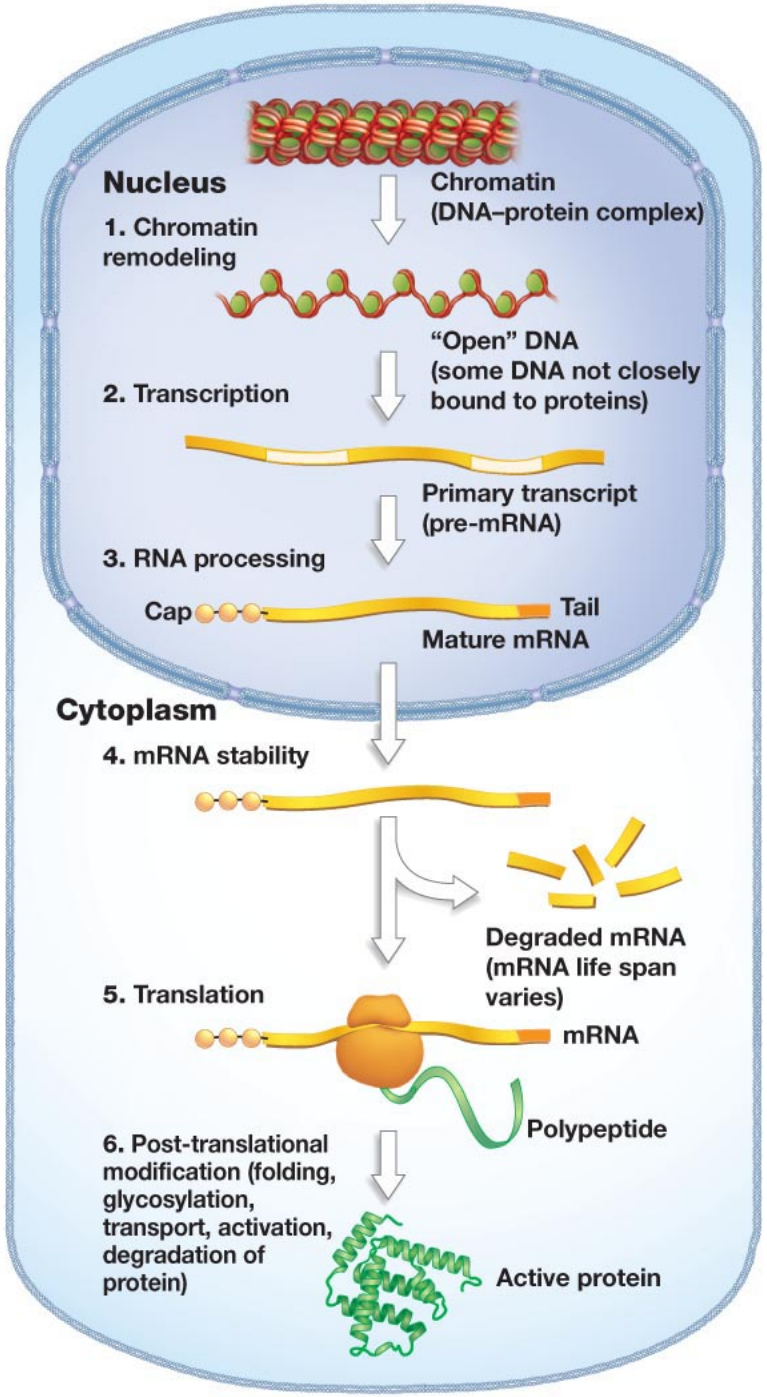
Quando?
Onde?
Quanto?
Como?

- diferenciação celular/tissular;
- respostas a fatores ambientais (bióticos ou abióticos).

Regulação nos diferentes níveis da expressão

Sem alterar a sequência de DNA

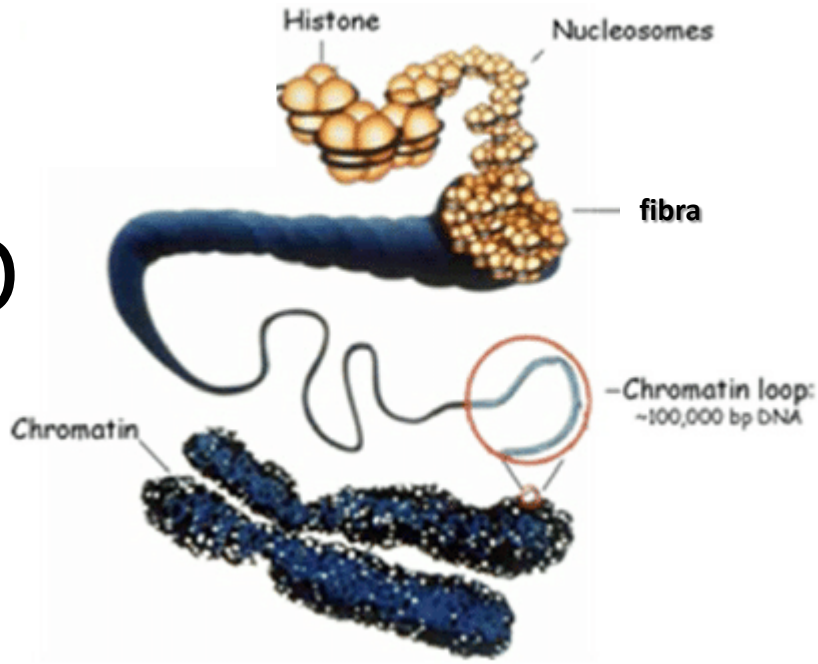




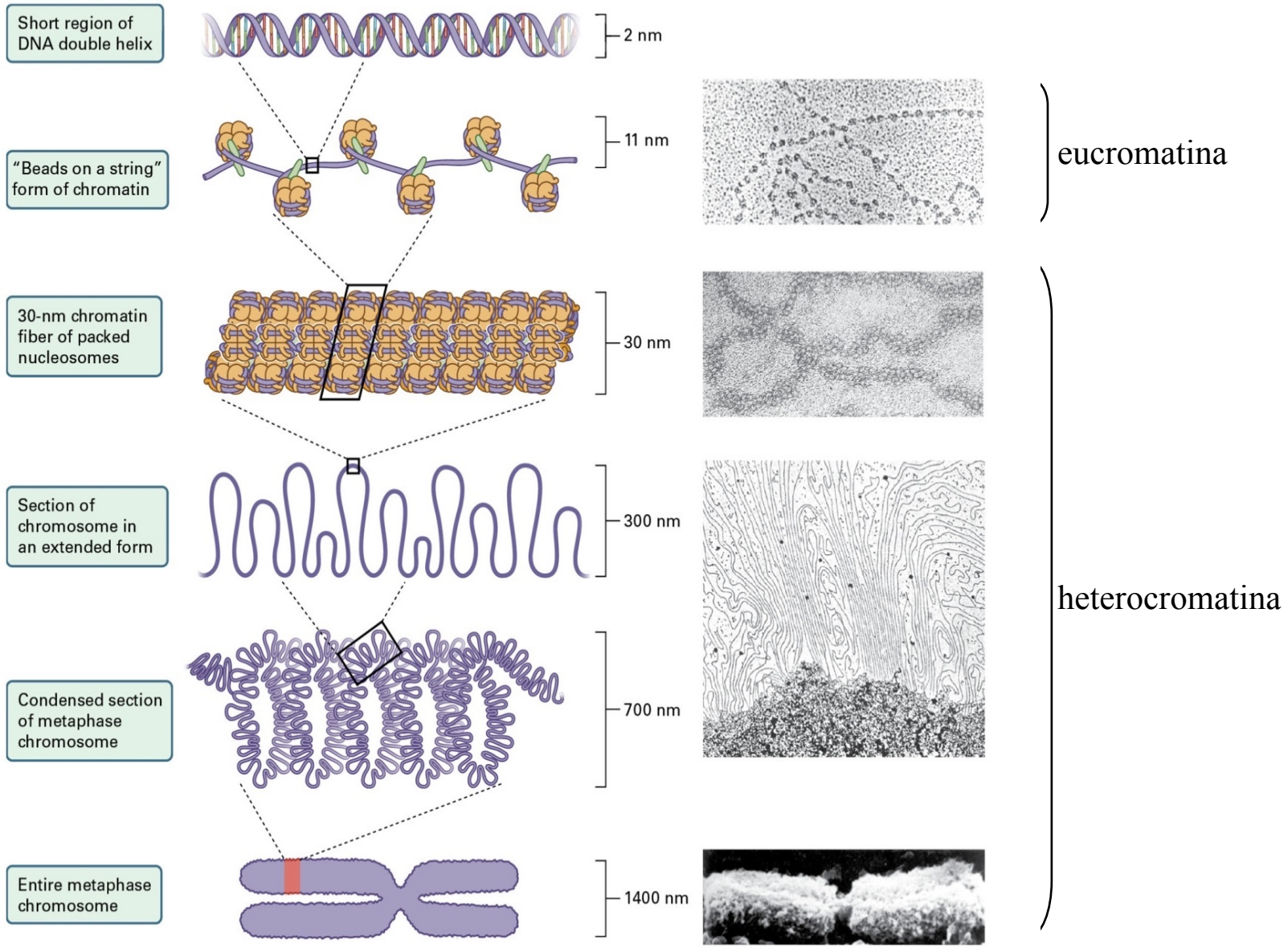
Plano de aula

1. Controle epigenético
2. Controle transcricional
3. Processamento do pré-mRNA e estabilidade do mRNA
4. Controle póstranscricional
5. Controle traducional
6. Controle póstraducional

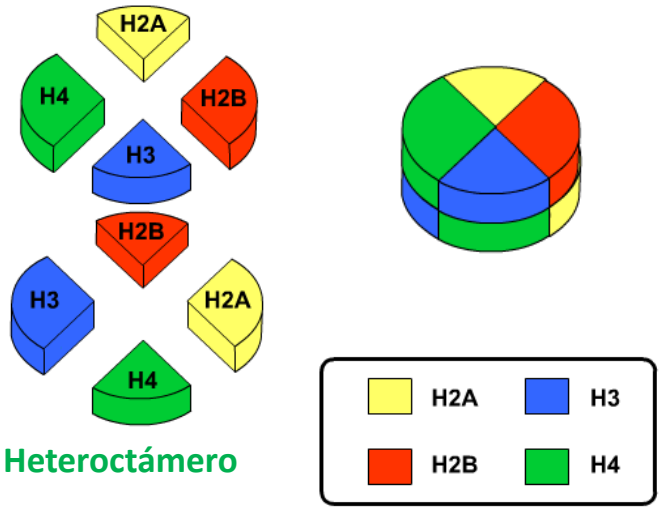
1. Controle epigenético



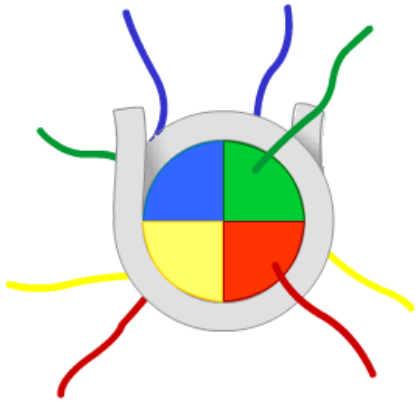
Cromatina - grau de condensação



Nucleossomo

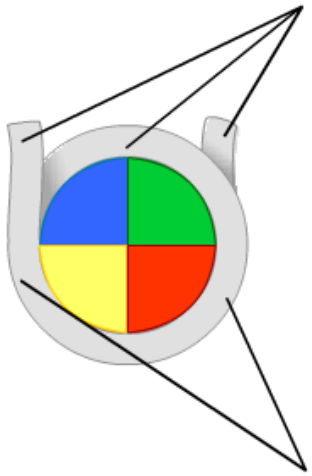


Heteroctámero



Cada subunidade tem uma cauda

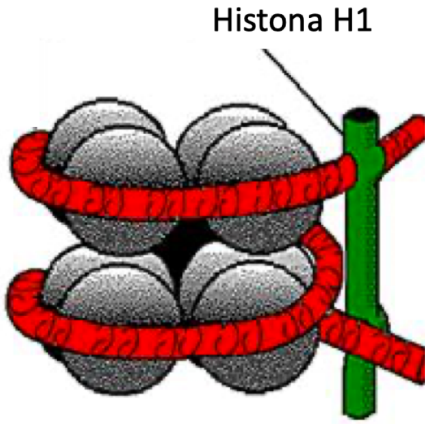
- DNA wraps around the histone core 1.65 times
- Core DNA contains 147 base pairs
- Hydrogen bonding binds DNA to the core



middle and ends of DNA bound to **H3 • H4 tetramer**

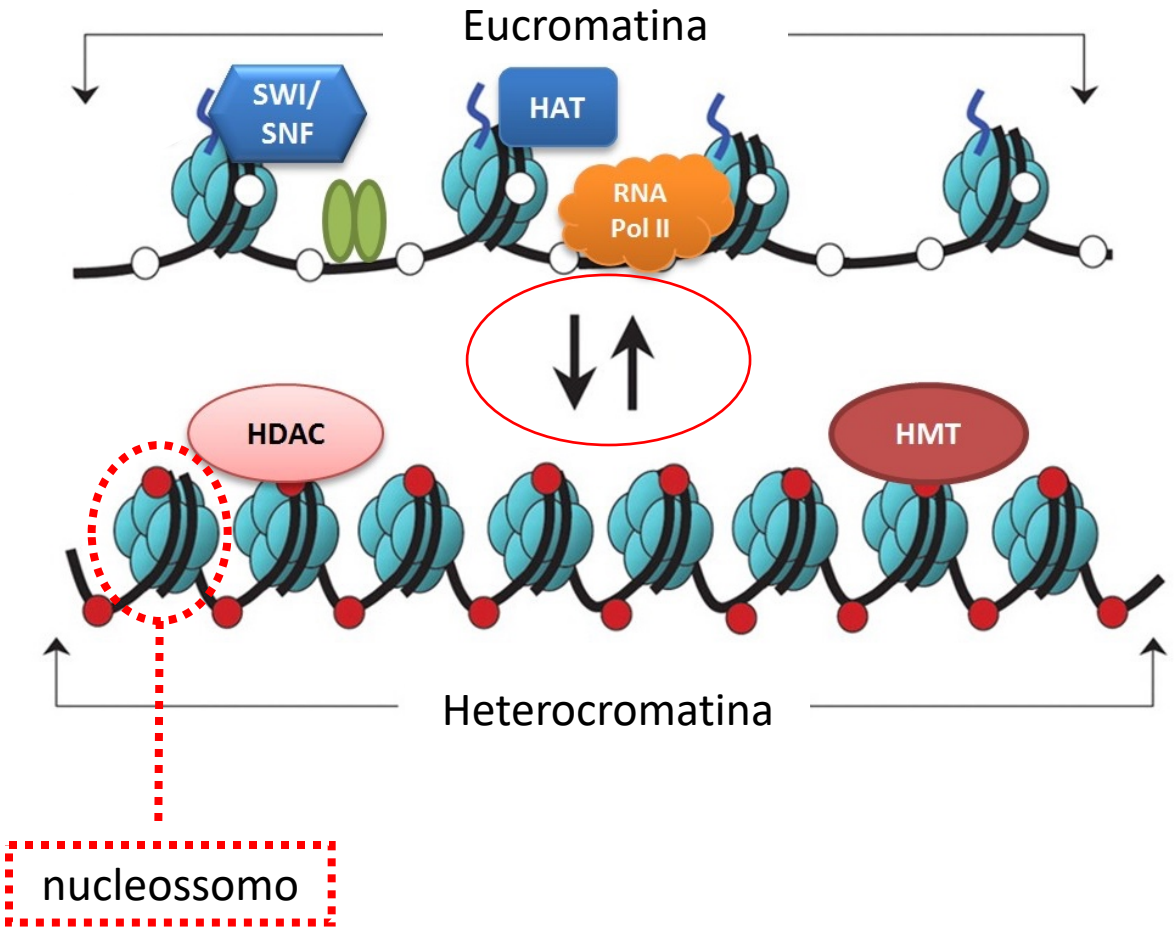
rest of DNA bound to **H2A • H2B dimers**

Estabiliza a estrutura do nucleossomo

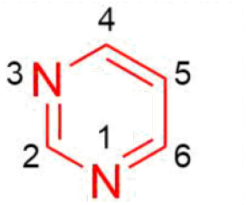


O controle epigenético

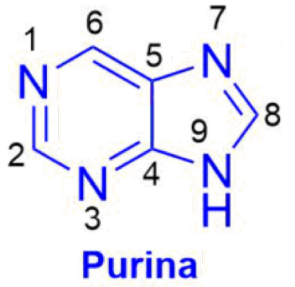
- Modificações reversíveis, “herdáveis”, que se encontram sob o DNA e controlam a expressão gênica **alterando a acessibilidade da maquinaria transcricional ao DNA**:
  - Metilação do DNA
  - Modificações pós-traducionais das caudas das histonas
  - Remodelação do nucleossomo

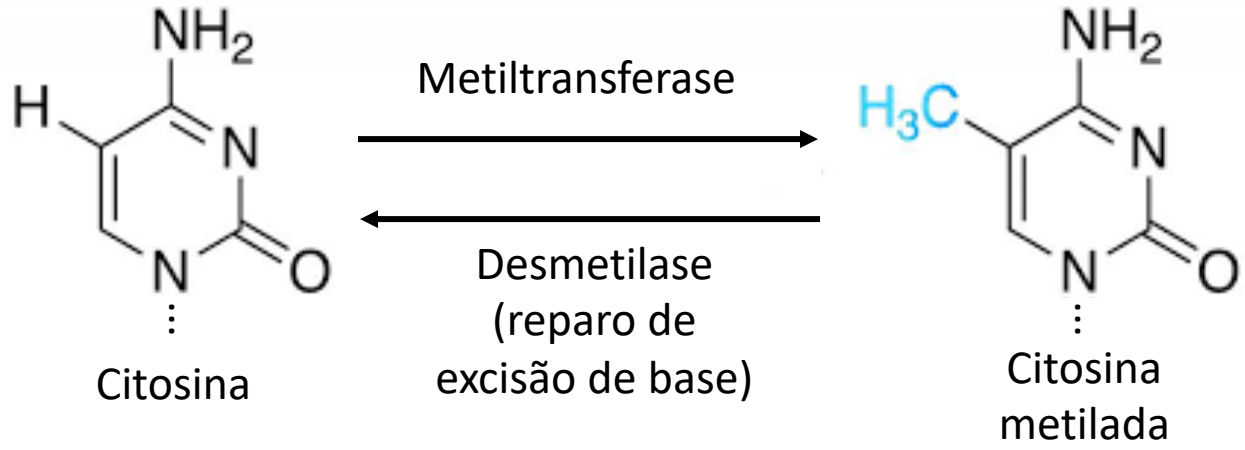


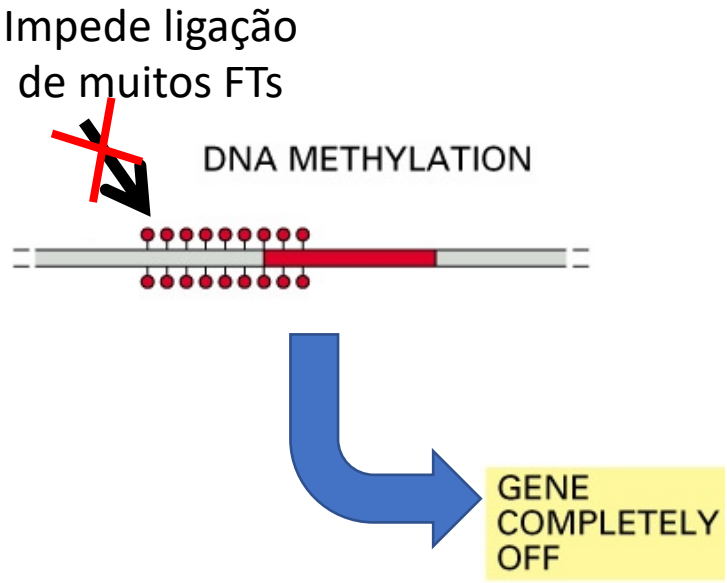
Metilação do DNA



Até 64% das citosinas em plantas podem estar metiladas



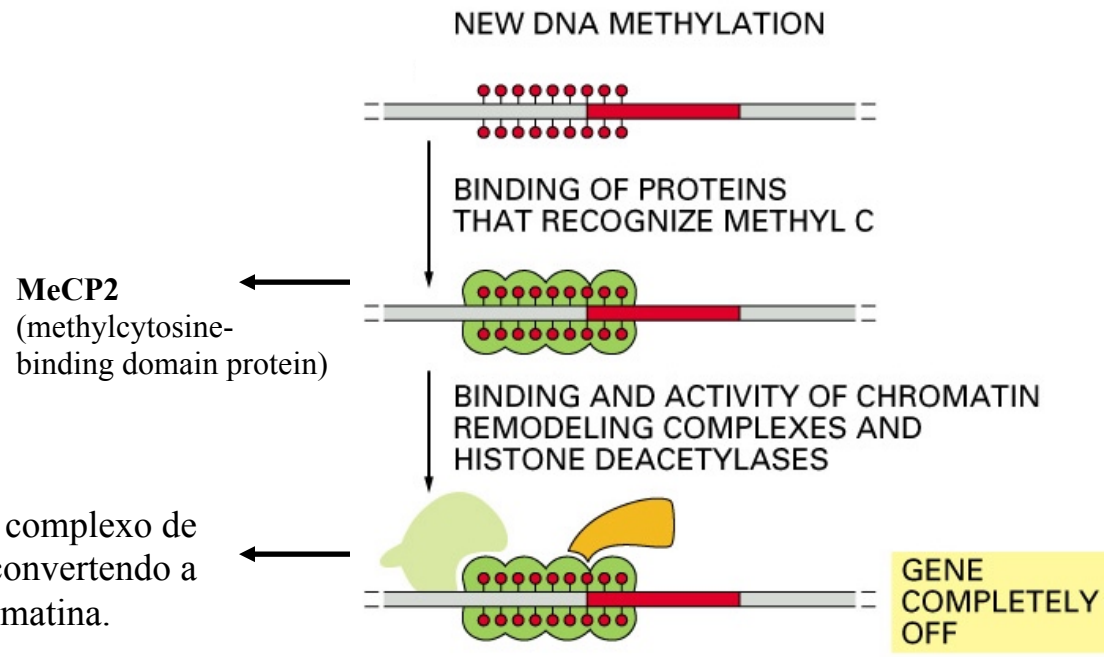


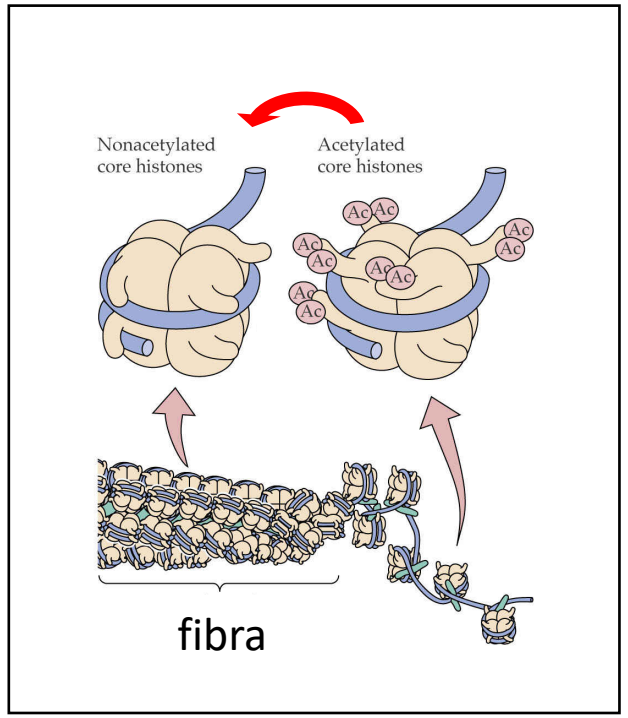


Alvos famosos:

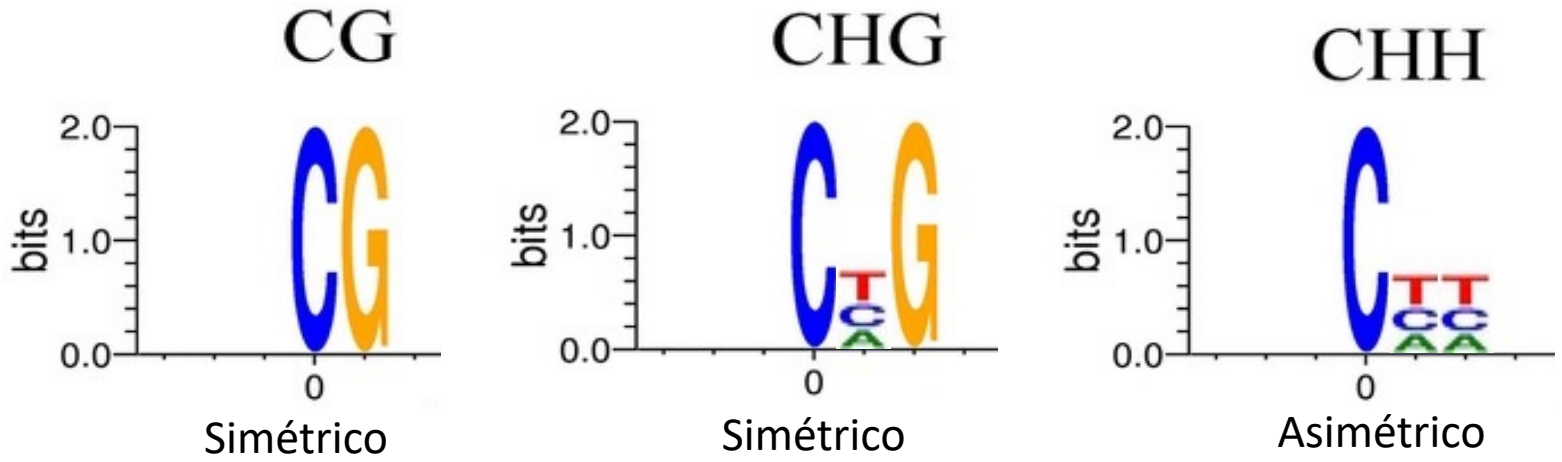
- Silenciamento de transposons

A metilação de citosina é um pré-requisito para o silenciamento transcricional mas não é suficiente





Três contextos de metilação do DNA: simétricos e não simétrico



	CG	CHG	CHH
Beta vulgaris (beet)	92.6	81.2	18.9
Selaginella moellendorffii	12.5	9.0	0.92
Vitis vinifera (grape)	46.0	20.4	1.2
Zea mays (maize)	86.0	74.0	5.4
Sorghum bicolor (sorghum)	52.5	27.1	2.1
Setaria viridis	44.5	23.3	1.6
Oryza sativa (rice)	58.4	31.0	5.5
Solanum tuberosum (potato)	70.9	> 42.2	> 15.8
Solanum lycopersicum (tomato)	84.1	54.8	8.4
Phaseolus vulgaris (green bean)	49.8	33.4	4.0
Glycine max (soybean)	63.2	38.4	4.1
Eutrema salsugineum	38.2	9.3	6.1
Brassica oleracea (wild cabbage)	52.6	22.0	5.1
Arabidopsis lyrata	41.0	21.0	6.5
Arabidopsis thaliana	30.5	10.0	3.9

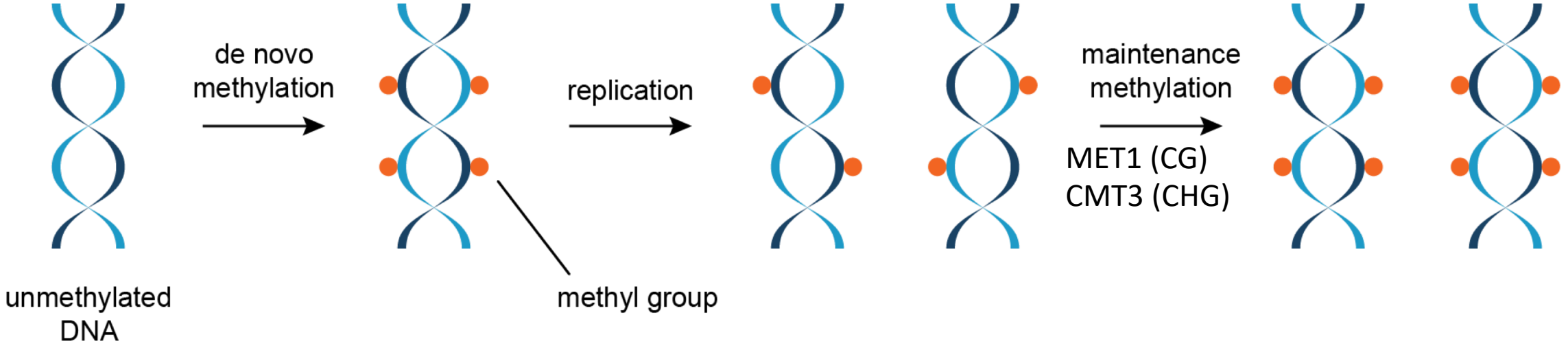
Bartels *et al.*, 2018, IJMS

Mecanismos de metilação do DNA

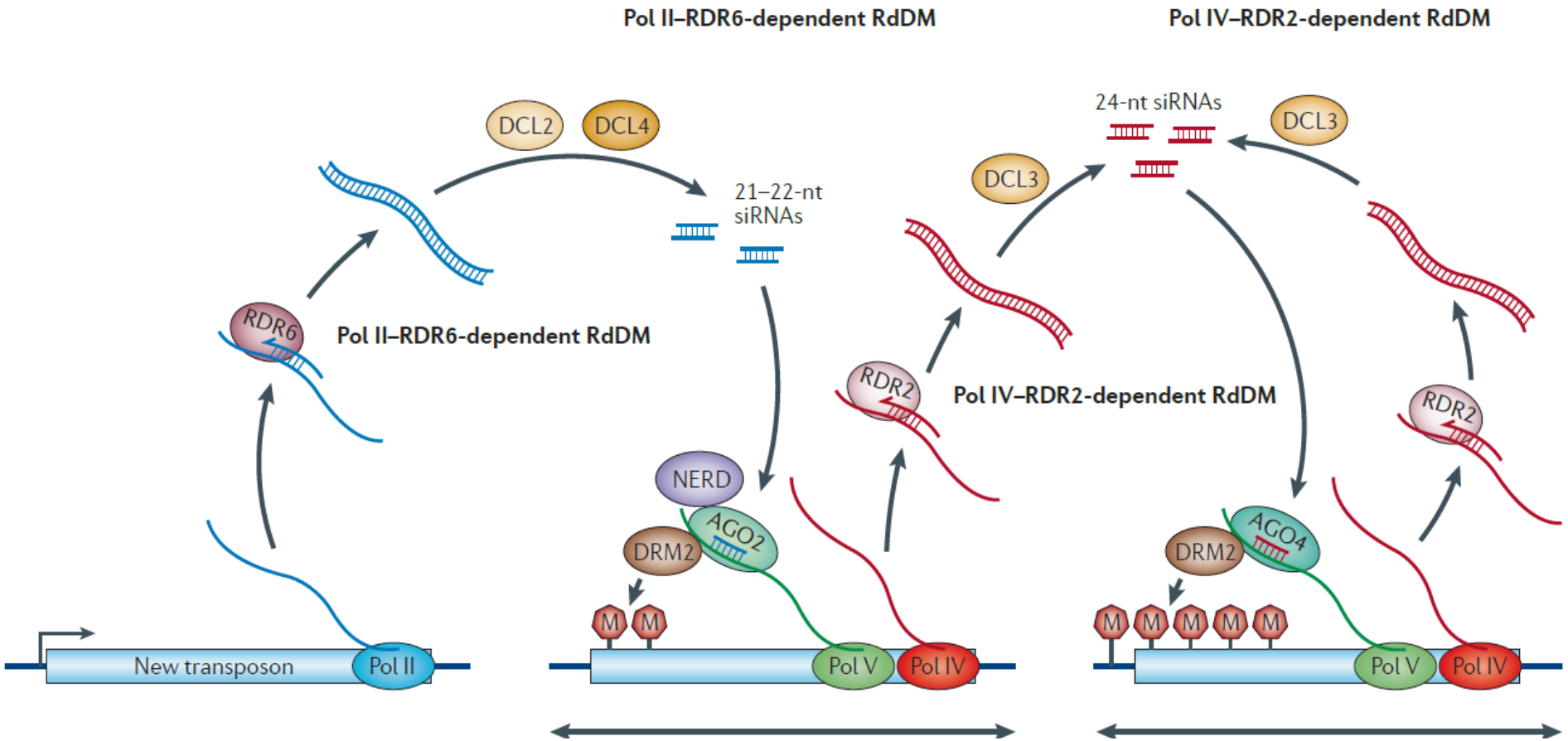
Via *de novo* (CG, CHG, CHH)

(próximo slide)

Via de manutenção (CG, CHG)

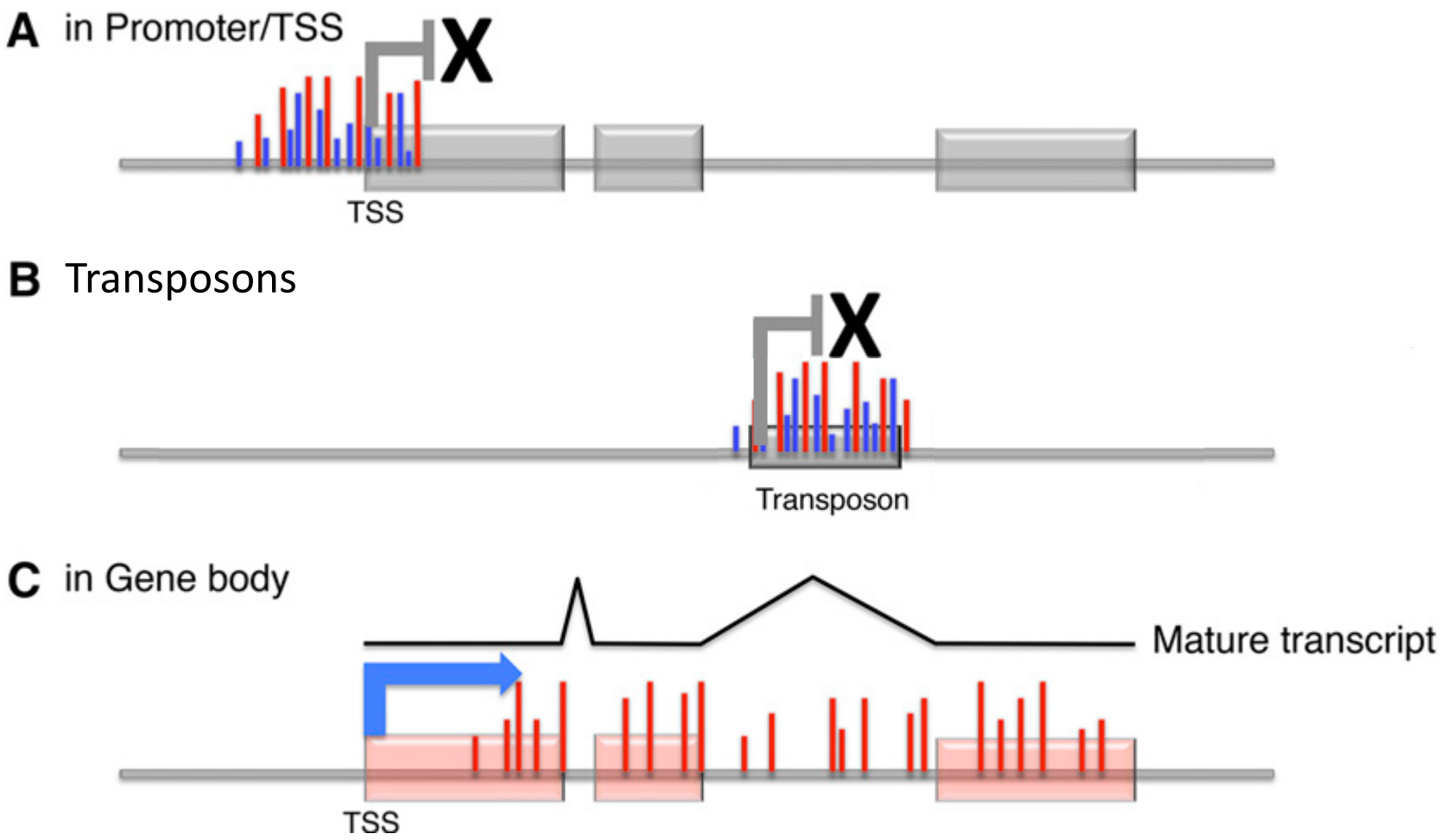


Via de novo:
Metilação do DNA direcionada por RNA (RdDM)



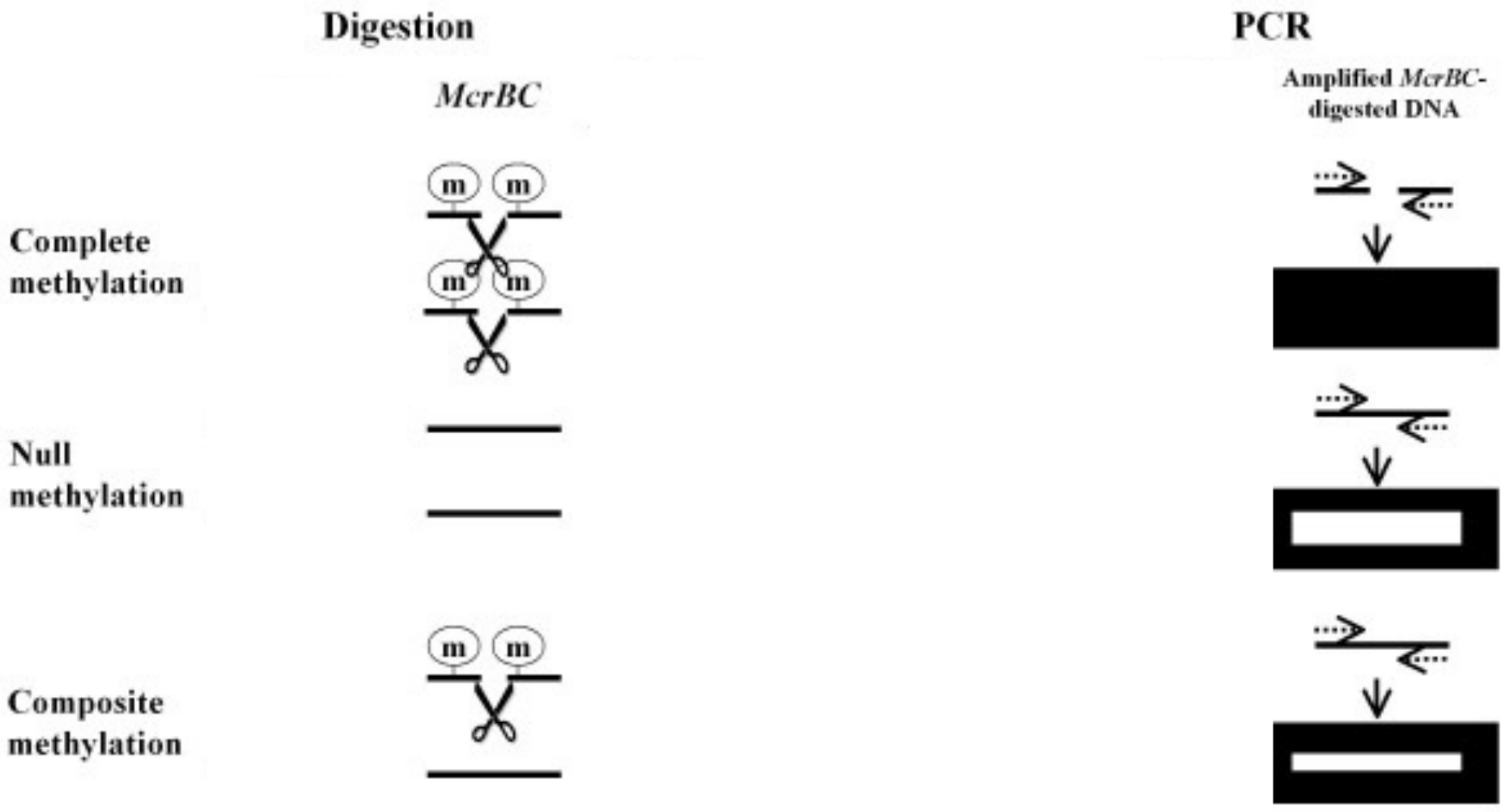
Aaptado de Matzke e Mosher, 2014

Regiões alvos de metilação e seus efeitos sobre a expressão



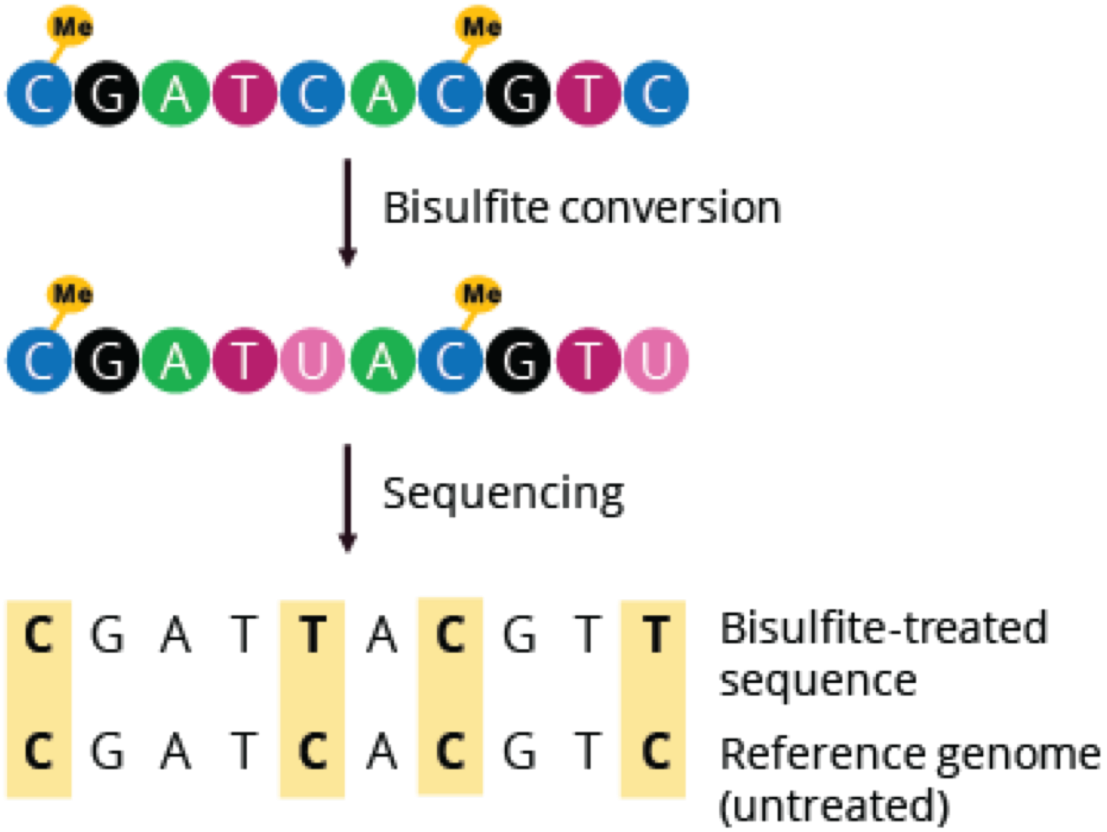
To et al., *2015, Plant Physiology*

Como detectar metilação no DNA genômico?



DOI:10.1186/1756-0500-4-179

Bisulfite treatment and sequencing

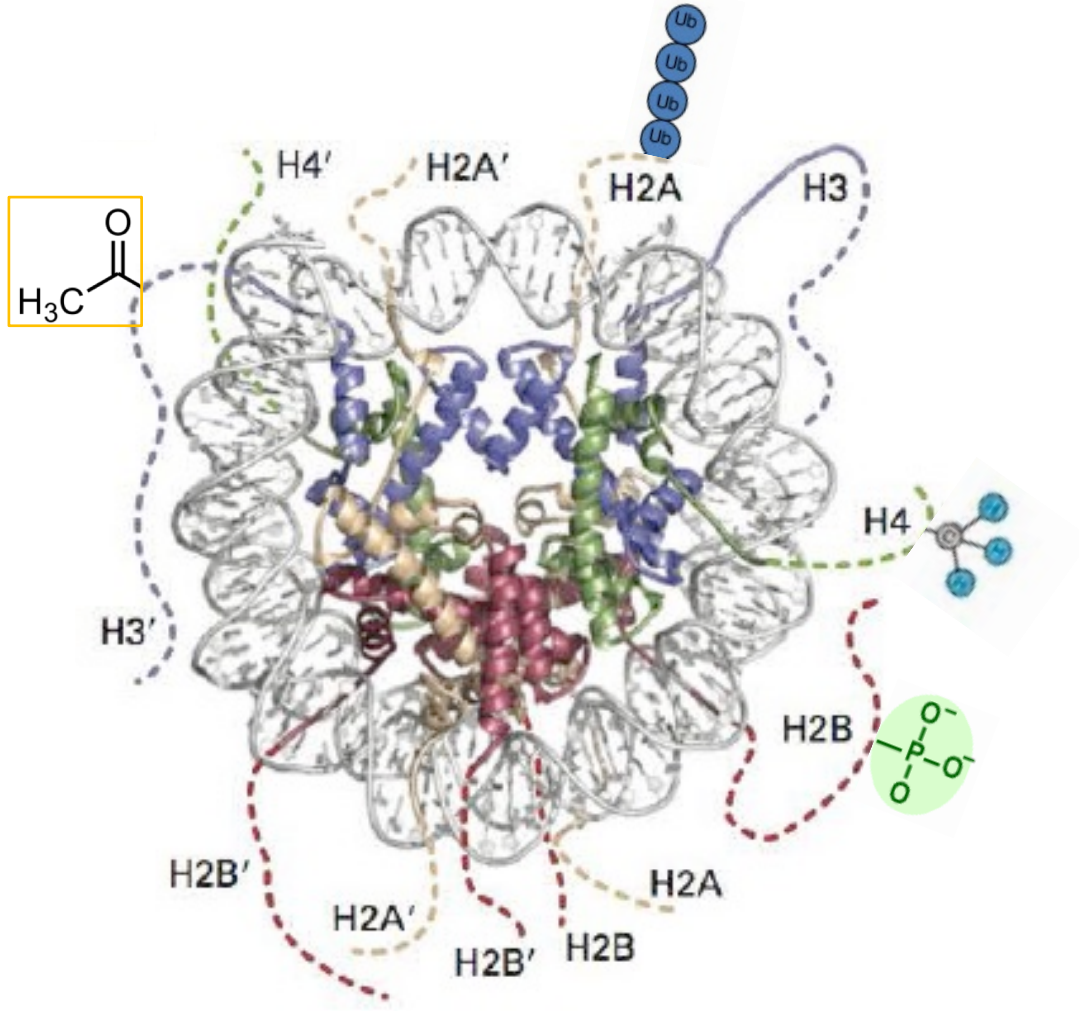


https://www.genewiz.com/Public/Services/Next-Generation-Sequencing/Epigenomics/Whole-Genome-Bisulfite-Sequencing/

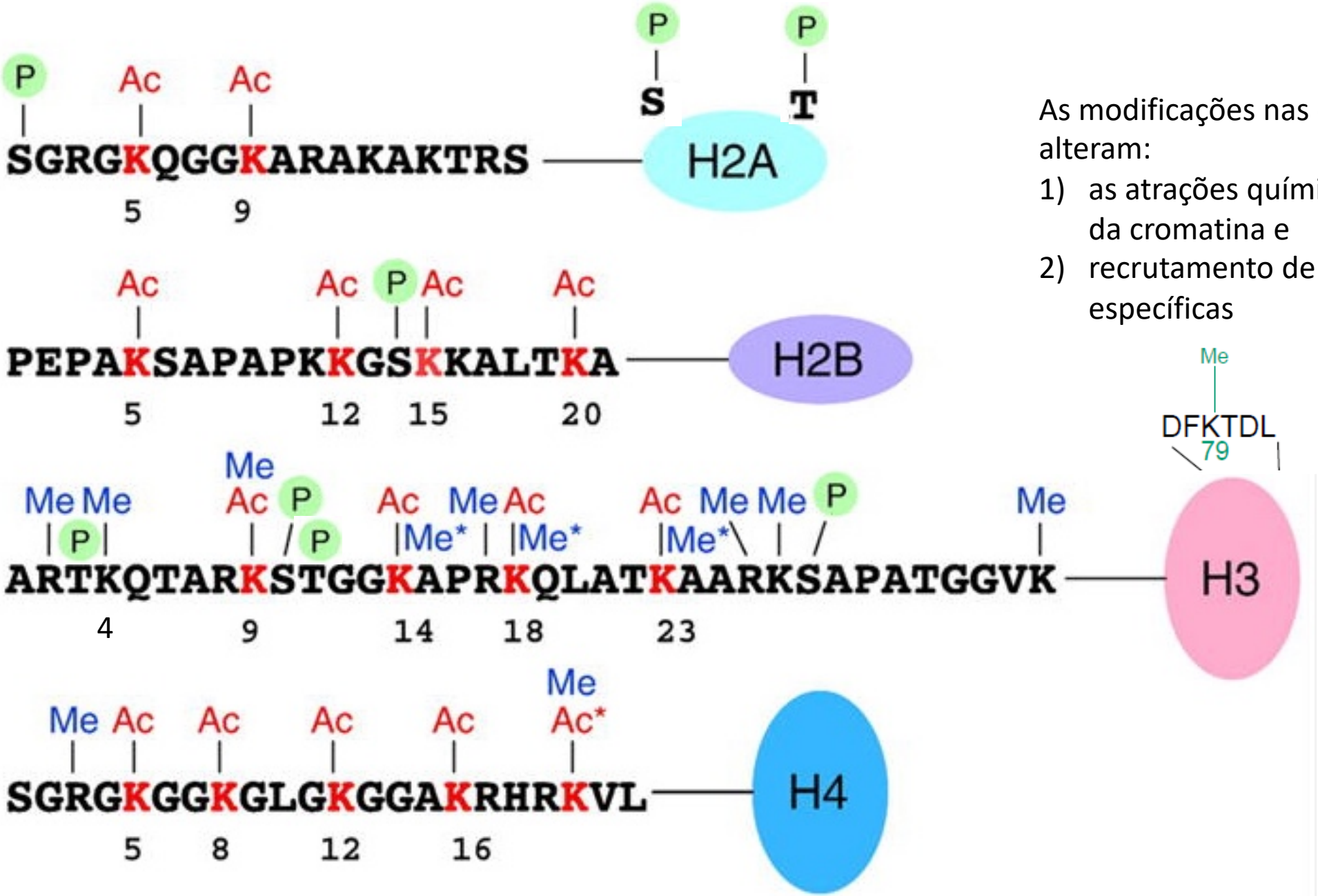
Modificações pós-traducionais das caudas das histonas

Modificações nas caudas das histonas

- Acetilação
- Metilação
- Fosforilação
- Ubiquitinação



Lodish et al., 2014



As modificações nas caudas das histonas alteram:

1) as atrações químicas de compactação da cromatina e
2) recrutamento de proteínas específicas

Amino Acid	Three Letter Code	One Letter Code
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartic Acid	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cysteine	Cys	C
Glutamic Acid	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Chen e Tian, 2007

Histone modification	Location	Function
H3K4me1	Enchancers	Activation
H3K4me3	Promoters	Activation
H3K36me3	Gene bodies	Activation
H3K79me2	Gene bodies	Activation
H3K9Ac	Enchancers, promoters	Activation
H3K27Ac	Enchancers, promoters	Activation
H4K16Ac	Repetitive sequences	Activation
H3K27me3	Promoters, gene-rich regions	Repression
H3K9me3	Satellite repeats, telomeres, pericentromere	Repression

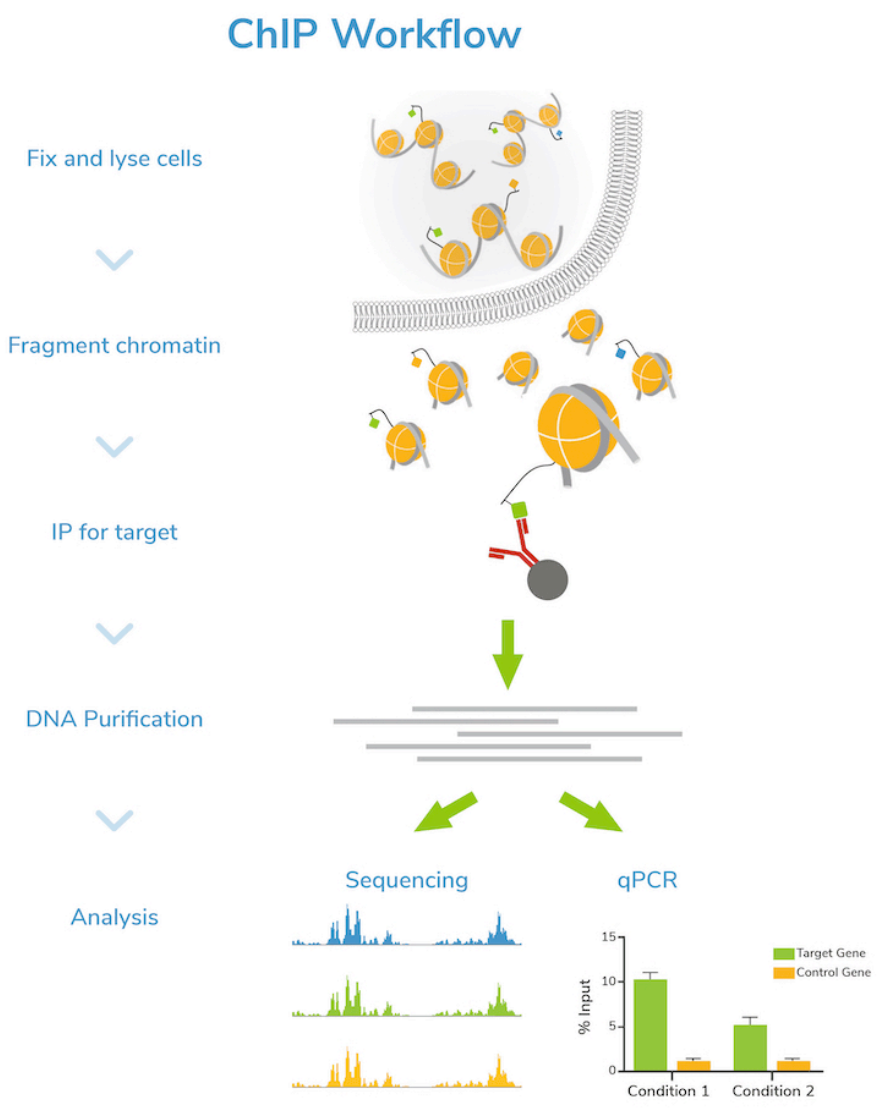
Table 1. The major categories of histone writers and erasers.

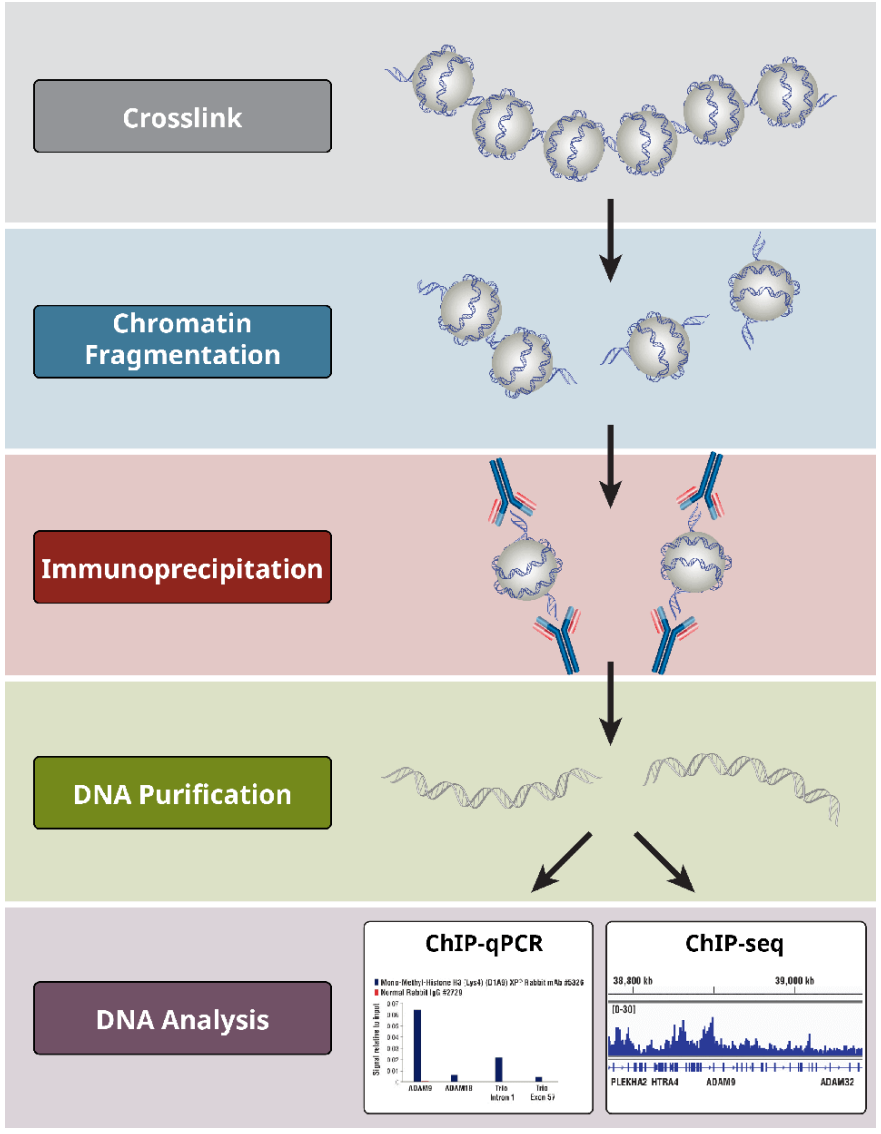
Modification	Writers	Erasers
Acetylation	Histone acetyltransferases (HATs)	Histone deacetylases (HDACs)
Methylation	Histone methyltransferases (HMTs/KMTs) and protein arginine methyltransferases (PRMTs)	Lysine demethylases (KDMs)
Phosphorylation	Kinases	Phosphatases

Modificações pós-traducionais das caudas das histonas

https://www.youtube.com/watch?v=eYrQ0EhVCYA

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

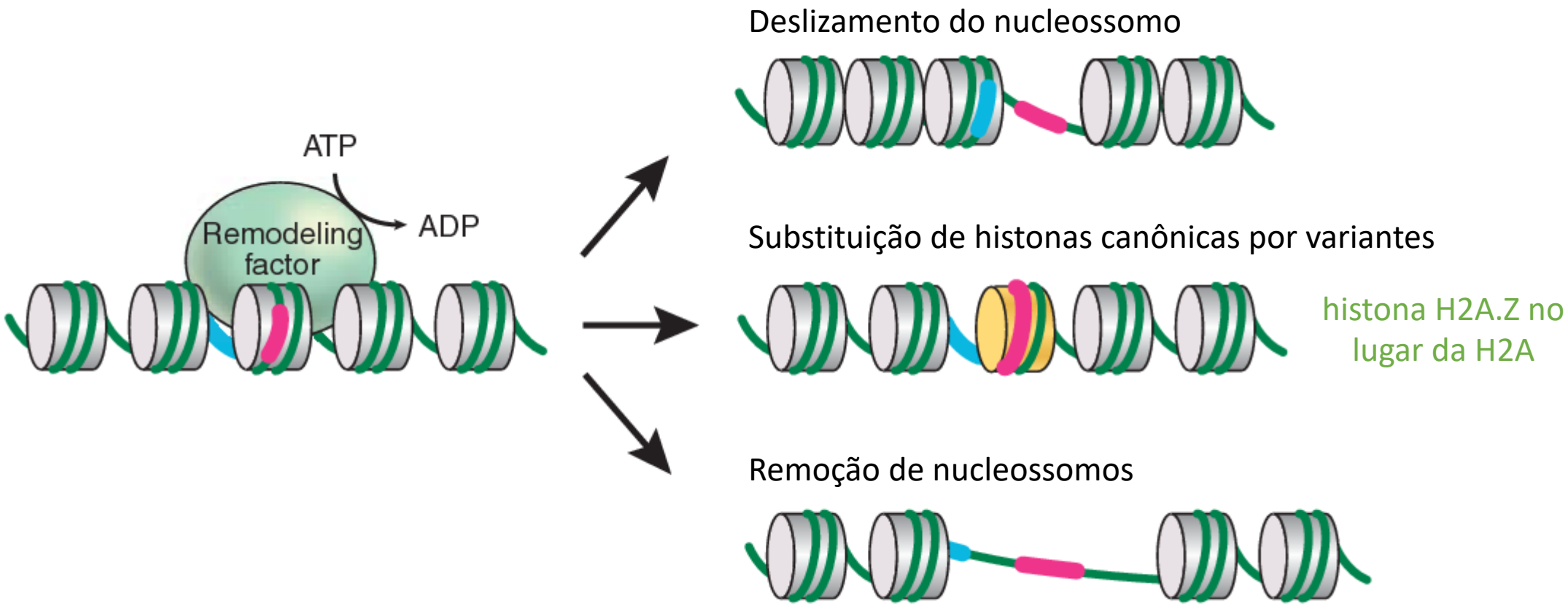




Remodelação do nucleossomo

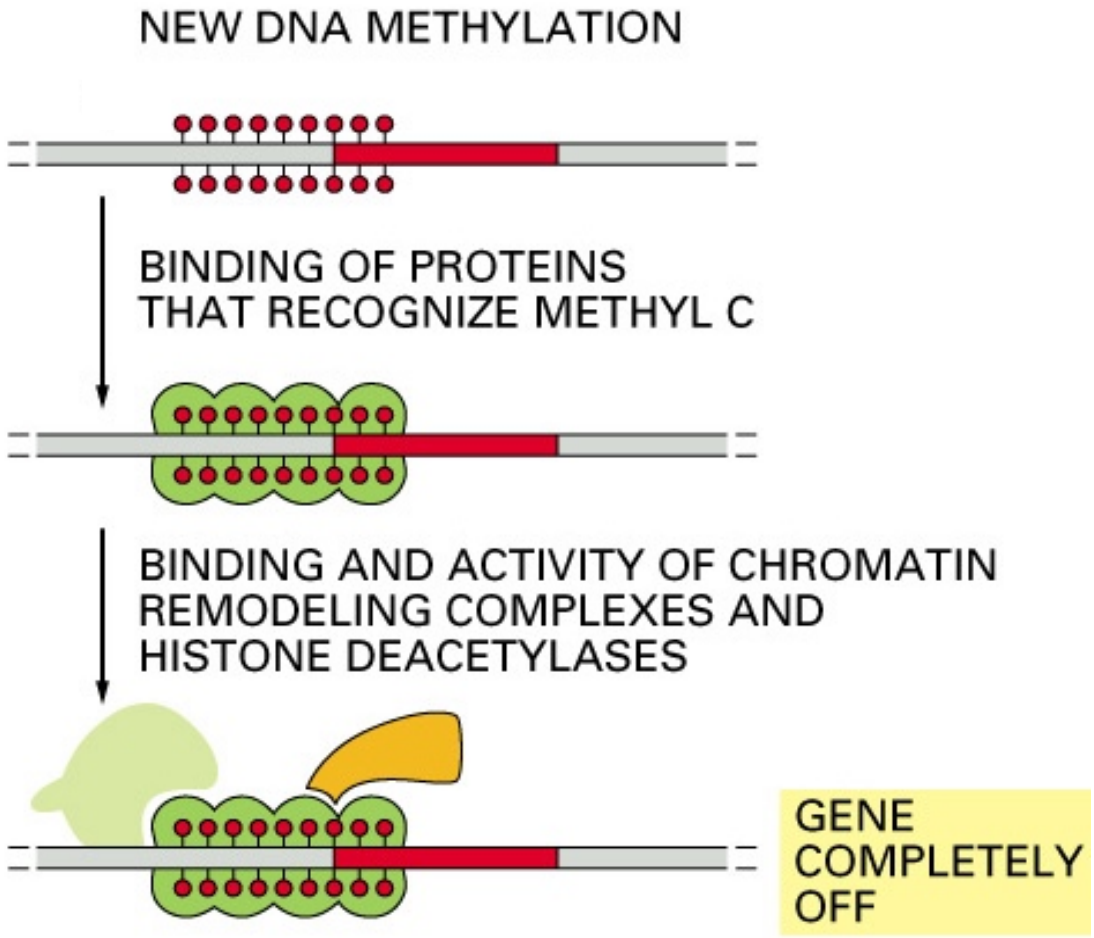
Remodelação do nucleossomo

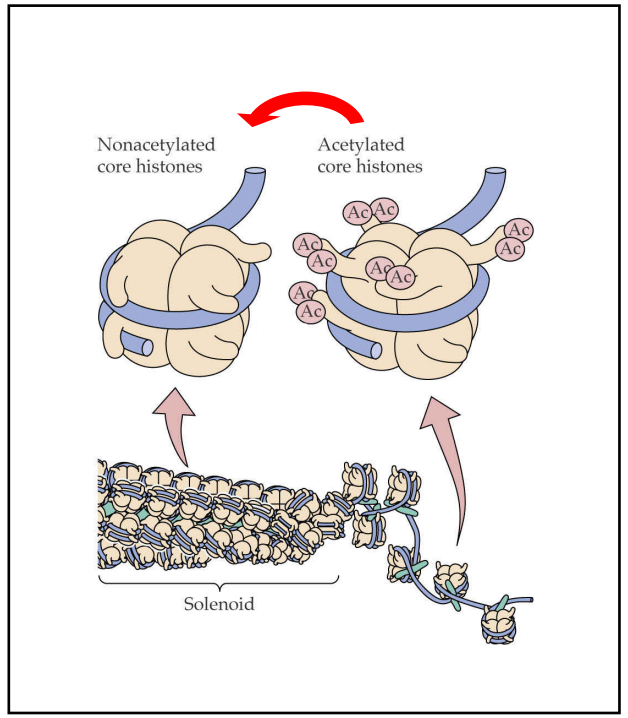
Dependendo do padrão da metilação e modificações de histonas presentes:



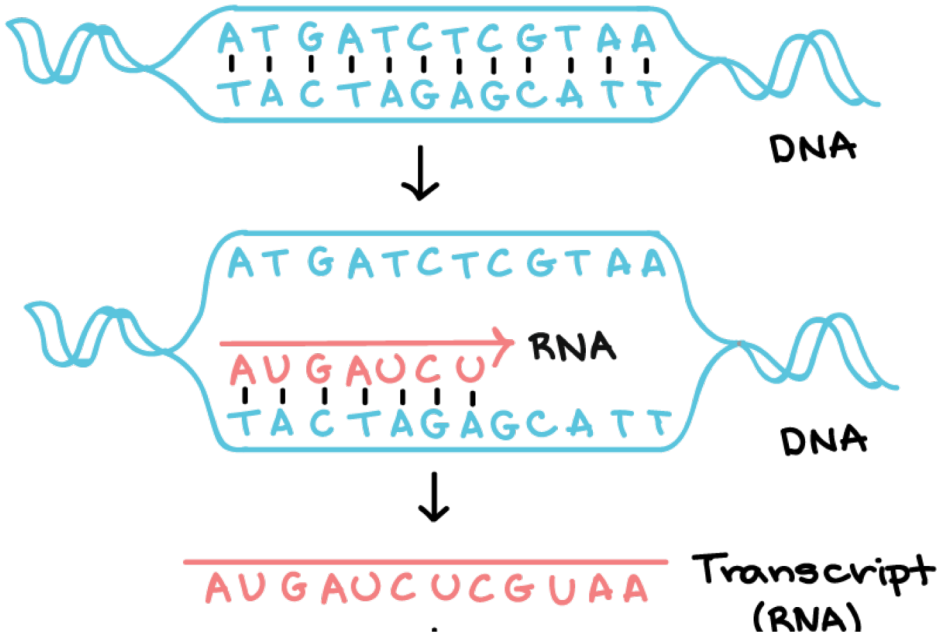
Becker e Workman, 2013 (doi:10.1101/cshperspect.a017905)

Metilação de DNA, modificação de histonas e remodelação de cromatina não são eventos independentes





2. Controle transcricional



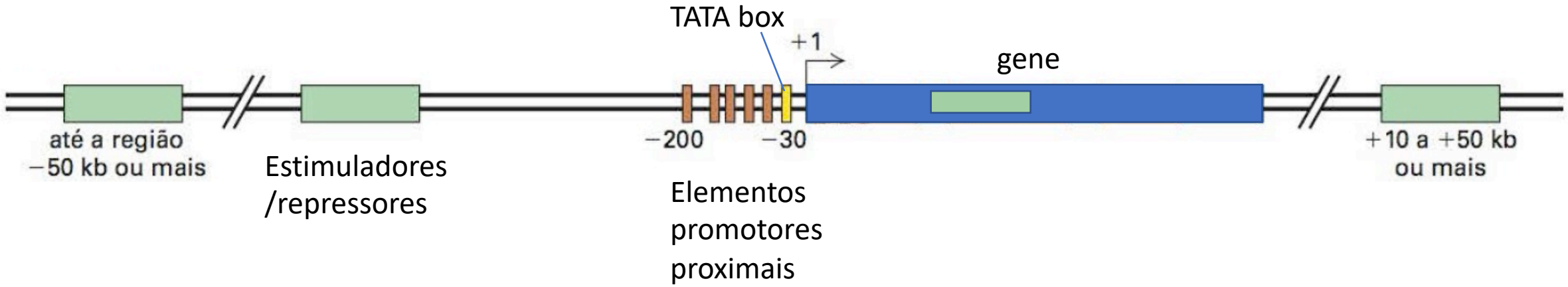
Transcrição de mRNA

- Catalisada pela RNA polimerase II.
- É regulada por interações entre <u>proteínas</u> e <u>sequências de DNA</u>:

trans *cis*

Fatores de transcrição (FTs)

Gene eucariótico transcrito pela RNApol II



Regiões ricas em GC requerem mais energia para curvá-las nas histonas, evitando assim a presença de nucleossomos, o que por sua vez facilita o acesso a TFs

Motivos regulatórios

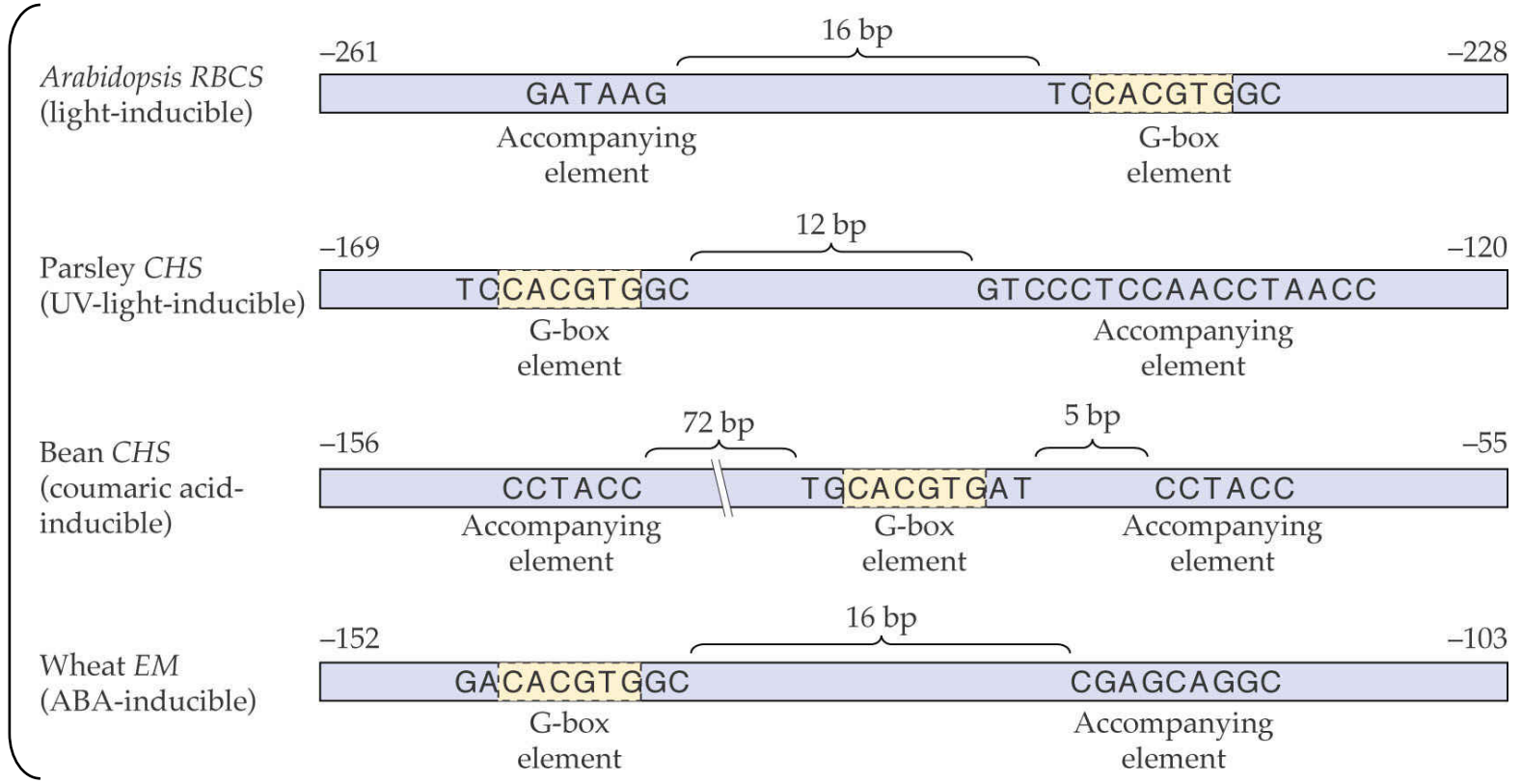
- Sequências consenso de sítios de ligação a FTs.

	Motif	Sequence	Position (from ATG codon)	Recognized by	Pathway
5'-UTR	AuxRE	GAGACA	-102 to -107	ARF7, ARF19	Auxin signaling
5'-UTR	EBS	CTCCGATTATC	-240 to -250	EIN3	Ethylene signaling
Promoter	TGAs	AACGAC	-352 to -357 -1036 to -1041	ARF7, ARF19	Auxin signaling
Promoter	FBS	CACGCGC	-379 to -385	FHY3, FAR1	Far red light response
Promoter	ACEs	ACGT	-410 to -413 -416 to -419	HY5	Photomorphogenesis

doi.org/10.3390/genes10121018

Promotores: combinação de motivos regulatórios

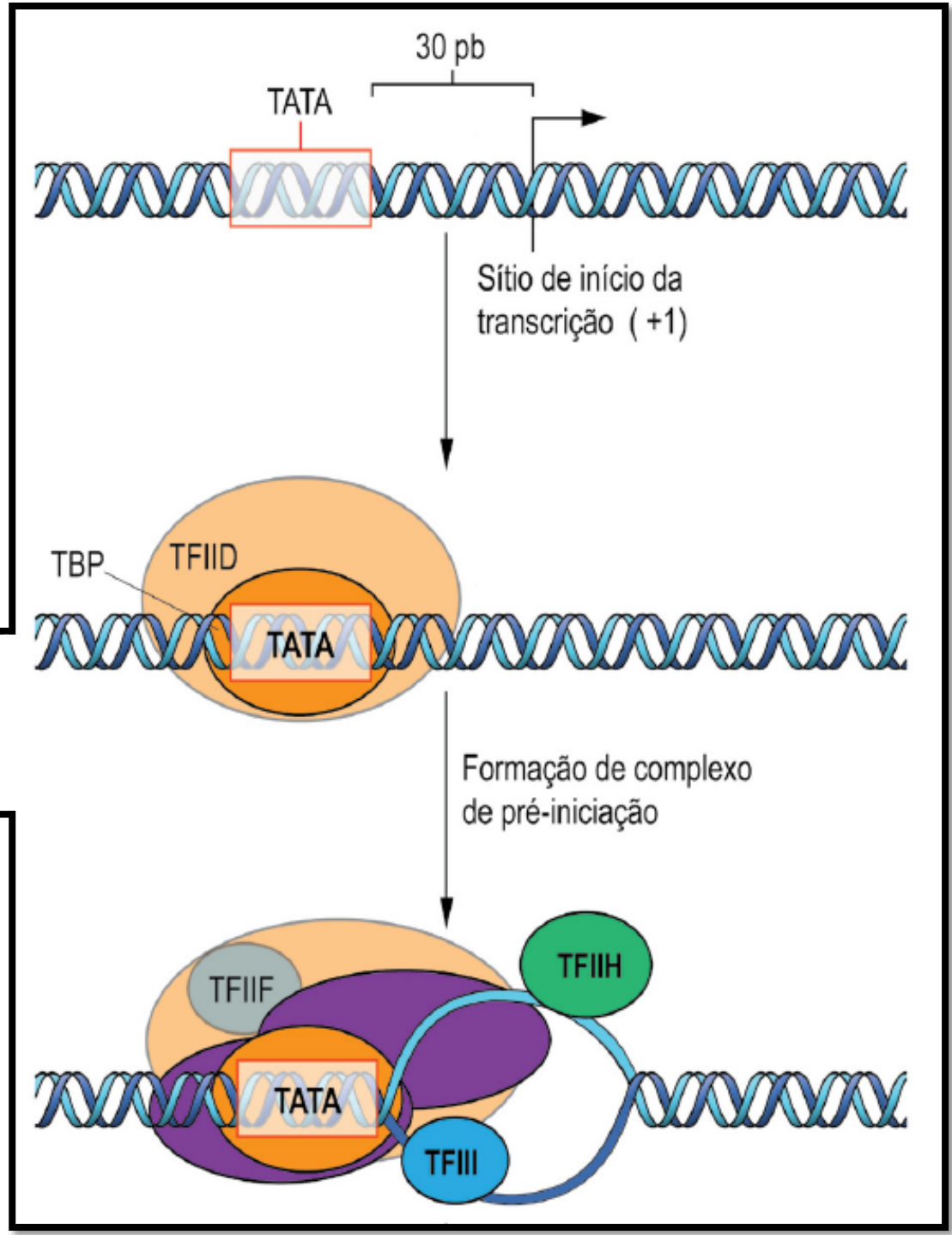
Mesmo elemento G-box, mas diferentes **combinações e espaçamento** com outros elementos



Transcrição

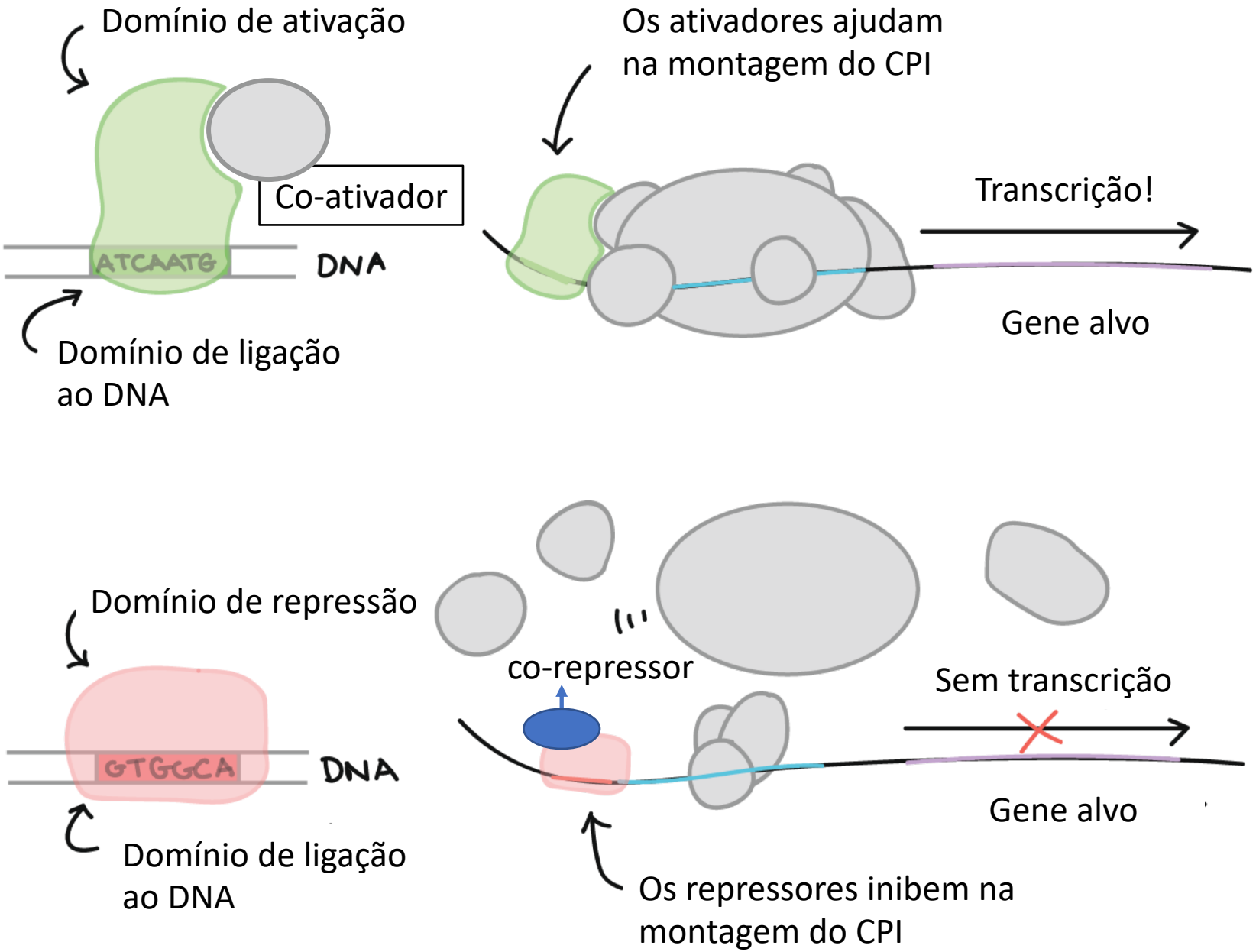
- Pode ser dividida em 4 eventos principais:
  1. Montagem do complexo de pré-iniciação (CPI):

Fatores basais de transcrição guiam a RNApol II

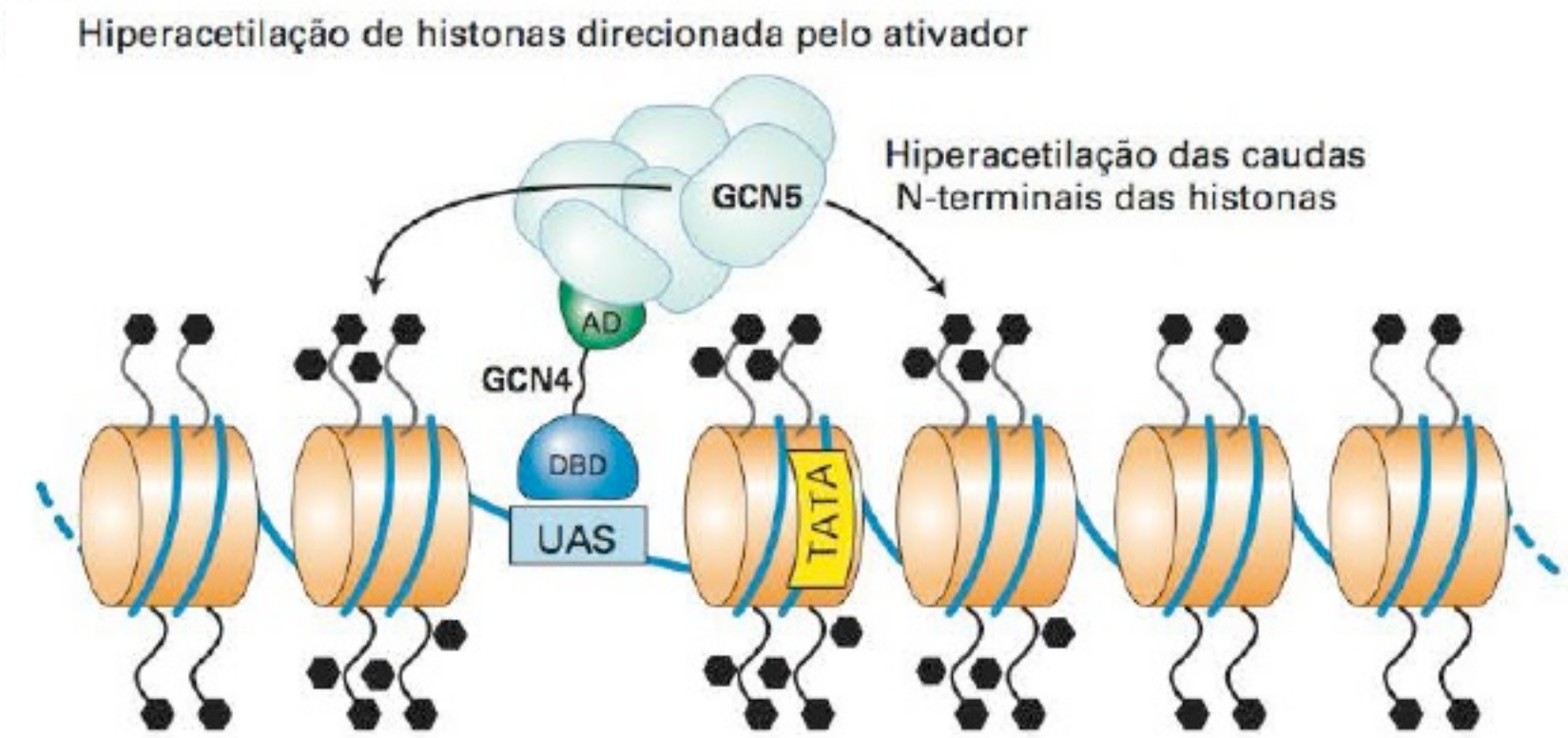


Durante todos os eventos, fatores especiais de transcrição podem interagir com os fatores basais e a RNApol, controlando a transcrição.

FTs: domínios funcionais distintos

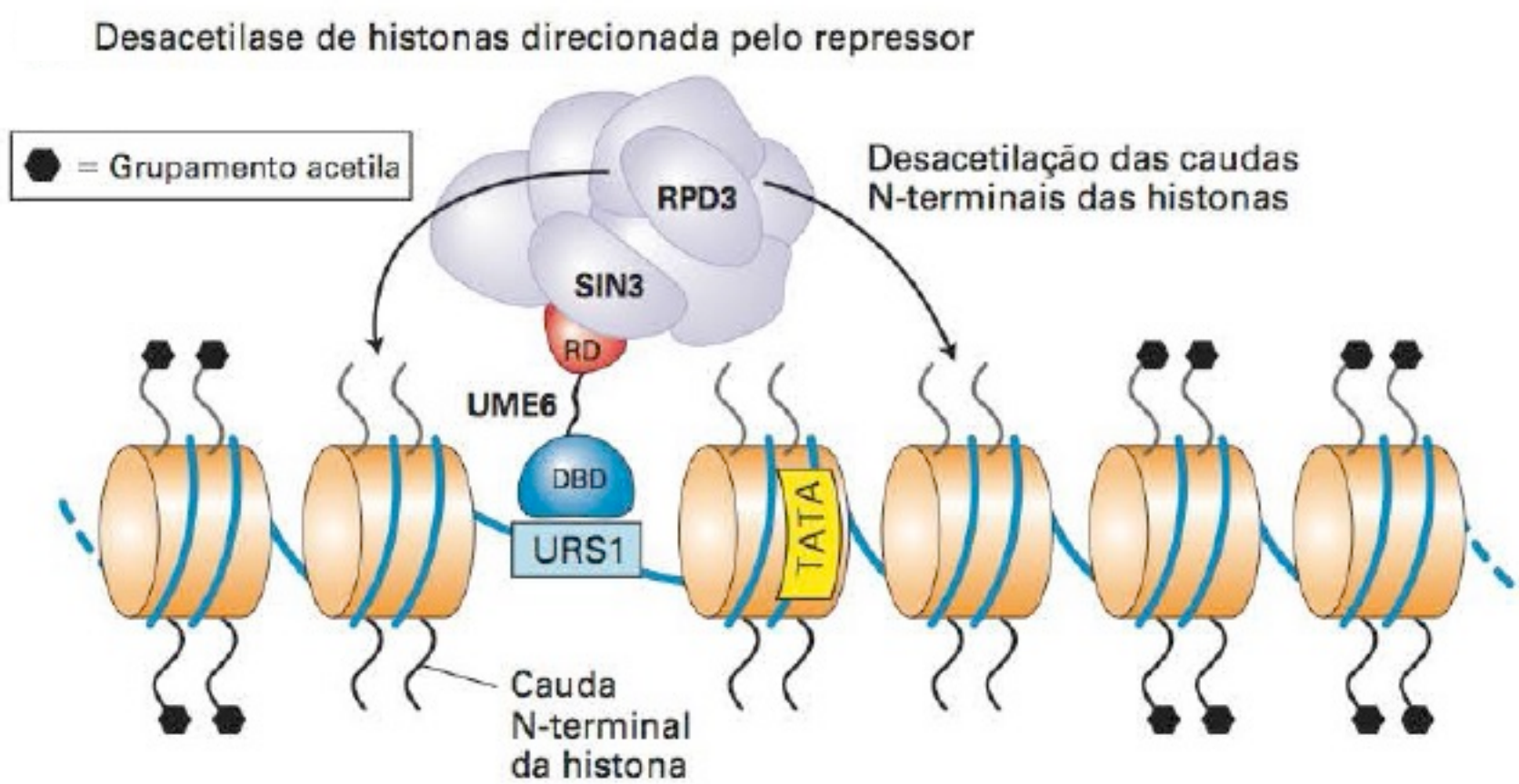


Ativadores podem direcionar a acetilação de histonas em genes específicos

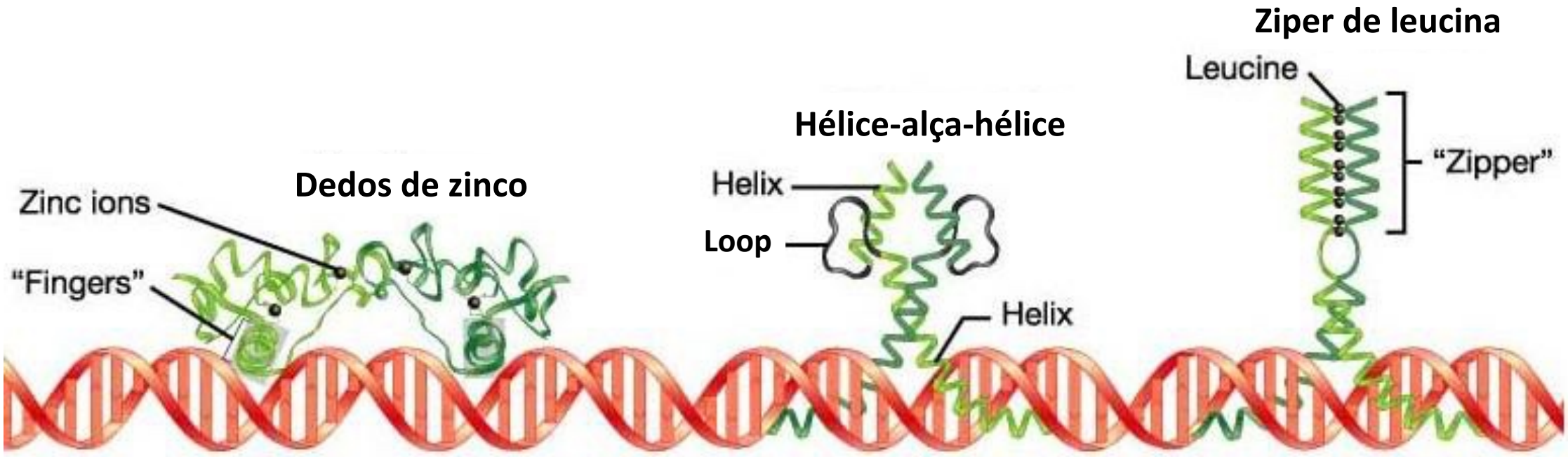


GCN4 atrai acetilaces permitindo o relaxamento da cromatina e o acesso de outros TFs e do complexo da PolII

Repressores podem determinar a desacetilação das histonas em genes específicos



Domínios de ligação ao DNA



União não covalente

Alfa hélice :: sulco maior do DNA (base)

Fatores de transcrição (FTs)

Dados da PlantTFDB

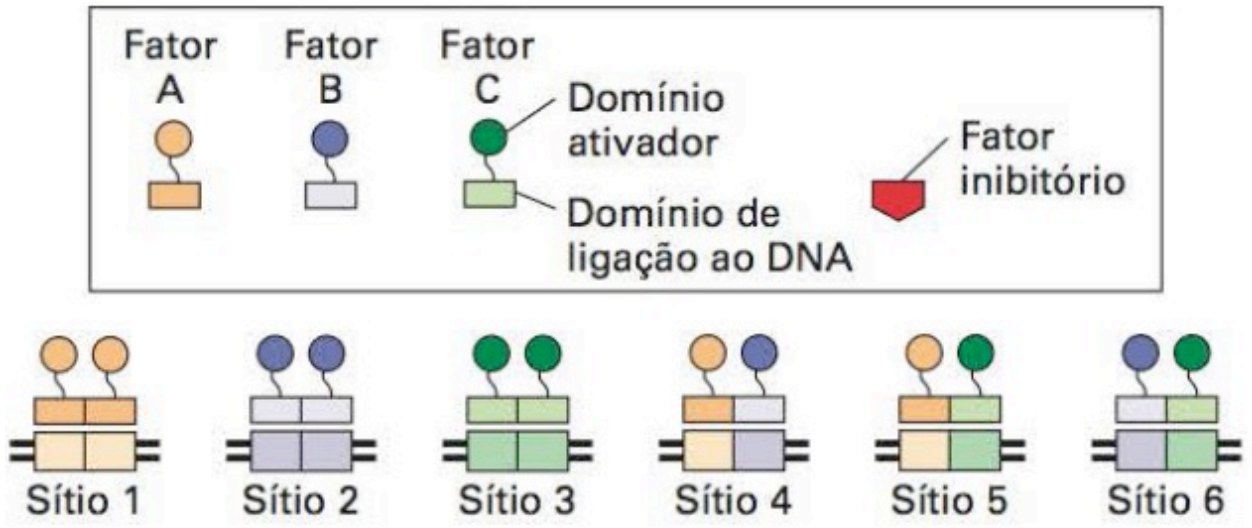
>1700 FTs

>1800 FTs

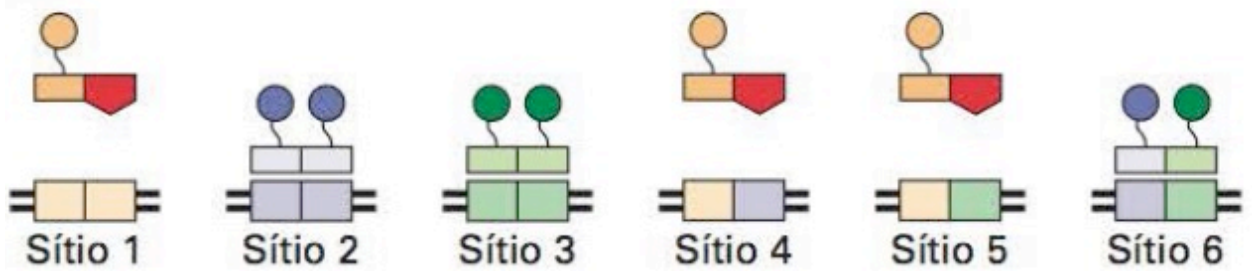
>3300 FTs

A transcrição de cada gene no genoma pode ser regulada de modo independente por combinação de FTs e motivos regulatórios

A interação entre os FTs (dímeros) aumenta as opções de controle gênico

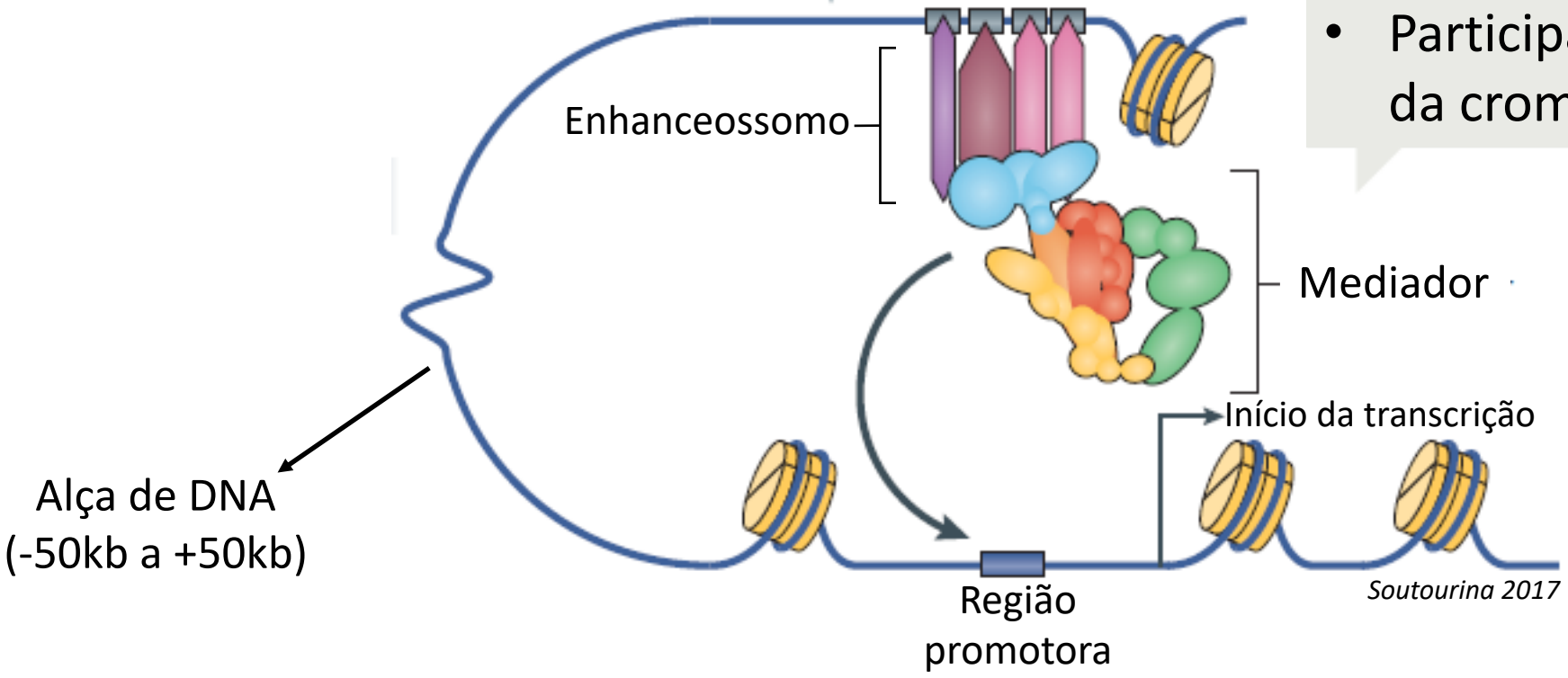


Homo ou heterodímeros



Enhancers e Mediadores

- Facilita a montagem do CPI
- Participa da remodelação da cromatina

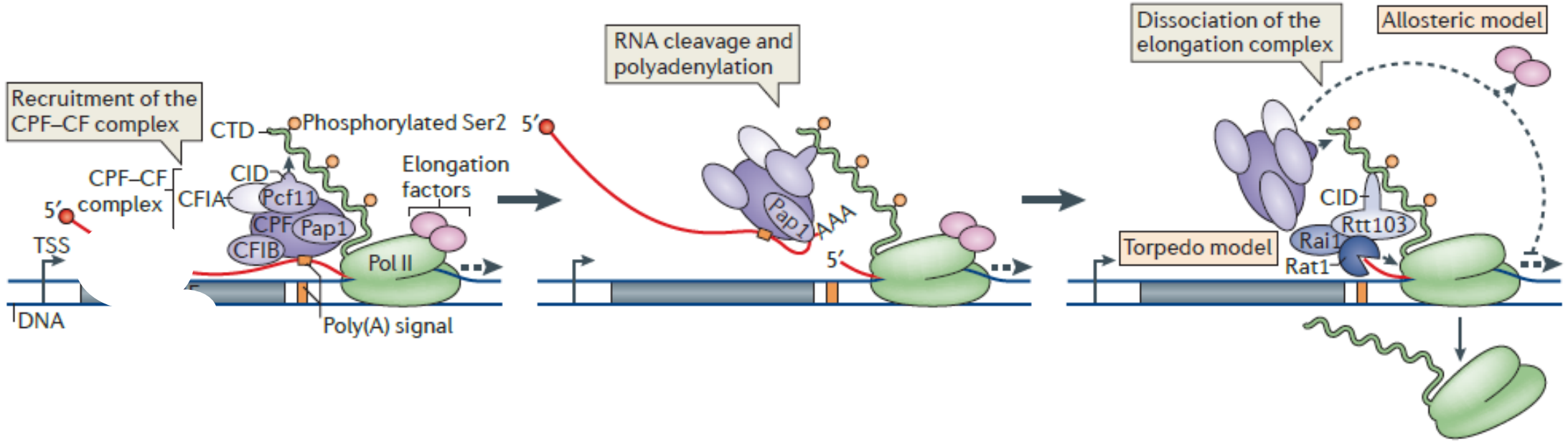


Transcrição

- Pode ser dividida em 4 eventos principais:
  1. Montagem do complexo de pré-iniciação (CPI):
  2. Fase de iniciação
  3. Fase de alongamento
  4. Término da transcrição

} Também são eventos regulados

Término depende da clivagem e poliadenilação do RNA

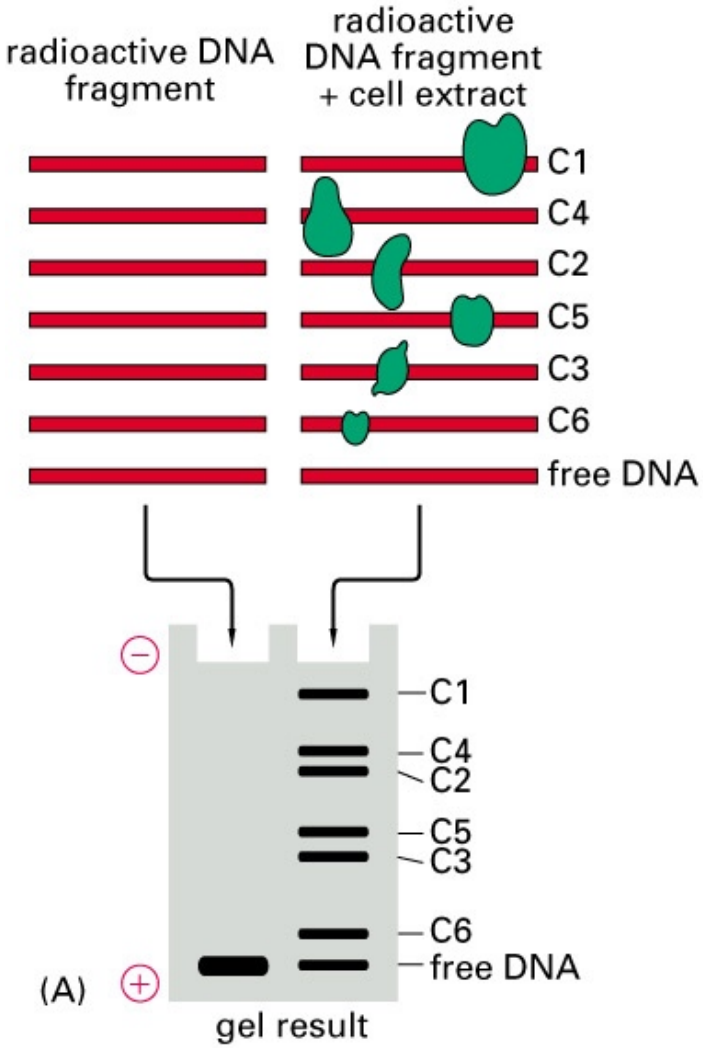


- Cleavage and polyadenylation factor (CPF) and cleavage factor (CF) complexes recognize specific sequences in the 3′ UTR of the transcript.
- Upon endonucleolytic cleavage of the transcript at the poly(A) site, poly(A) tails are added by the CPF-associated poly(A) polymerase Pap1.
- The 5′ end of the downstream portion of the transcript is then targeted by the Rat1 5′–3′ exonuclease.

Porrua e Libri, 2015

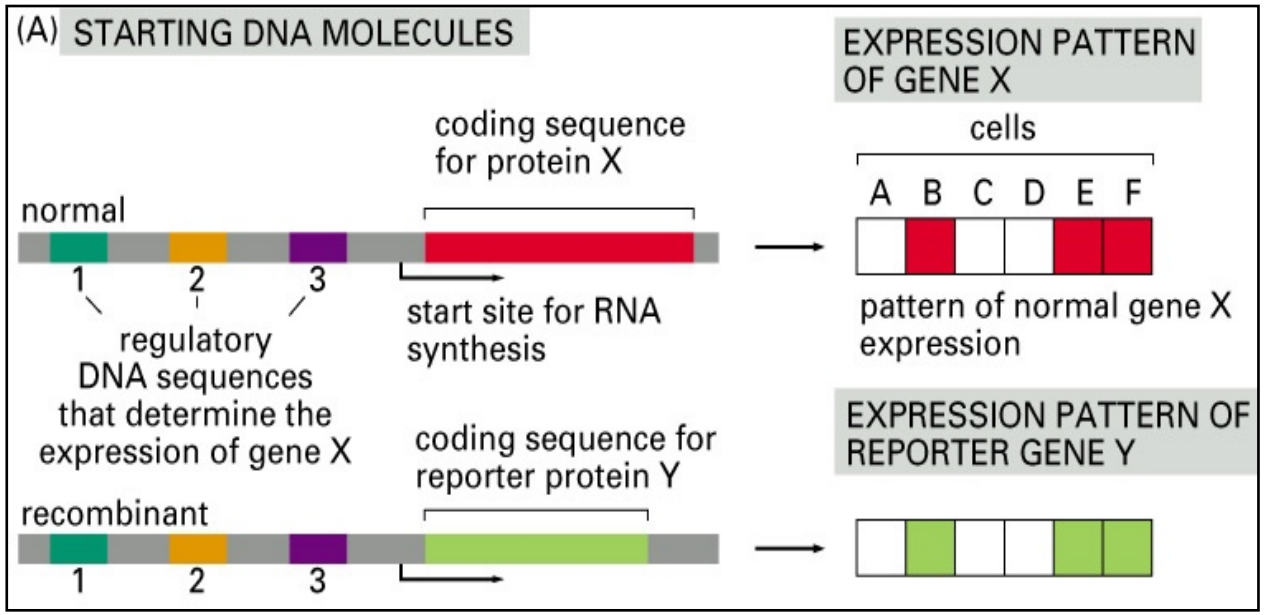
Gel shift: interação DNA (promotor)-proteína (fator de transcrição)

- Alterando a sequência do fragmento de DNA é possível determinar quais bases são imprescindíveis para a união das diferentes proteínas.

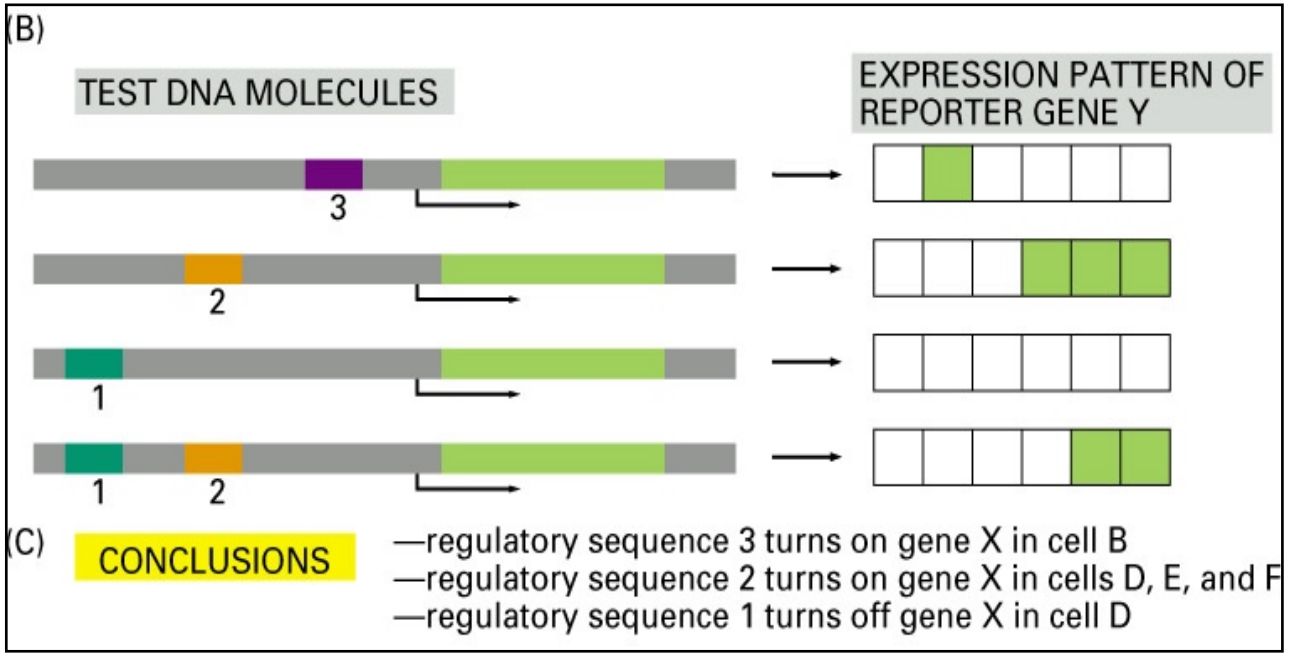


Estudo da expressão gênica: fusão do promotor de interesse com gene repórter

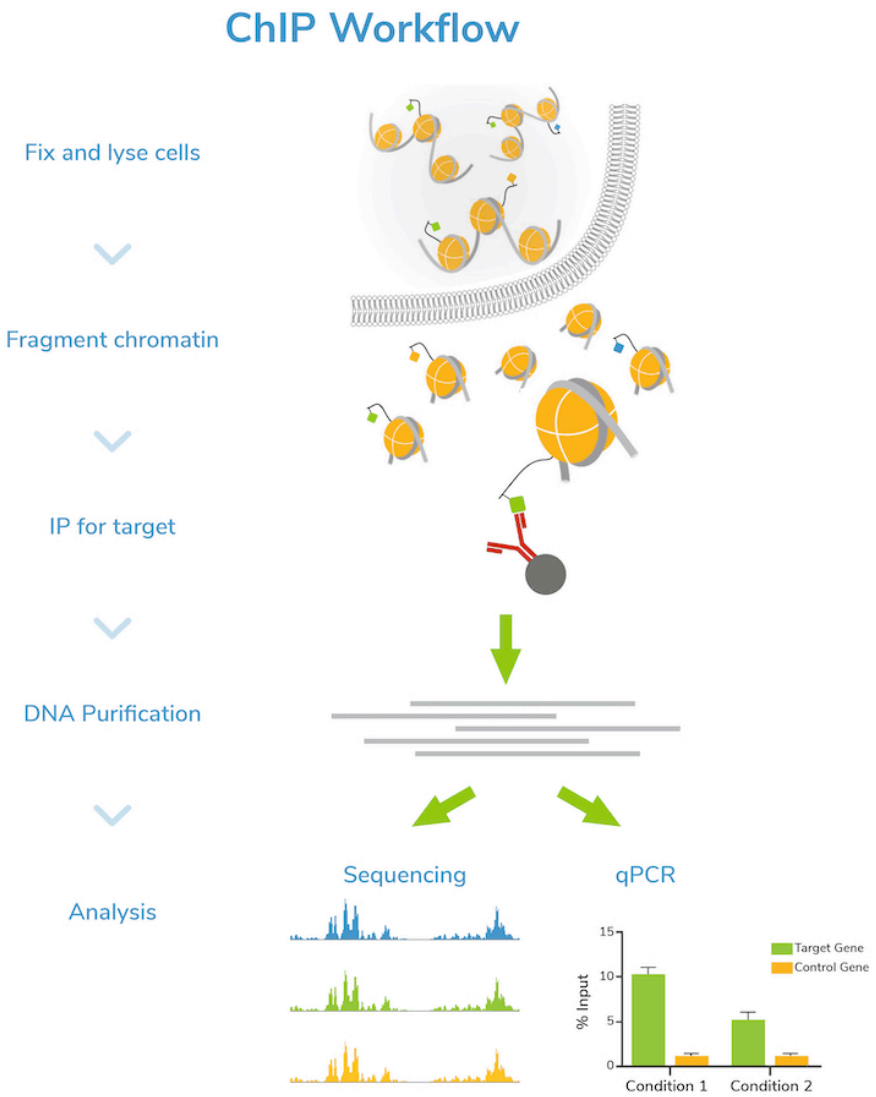
Em que células é expresso o gene?

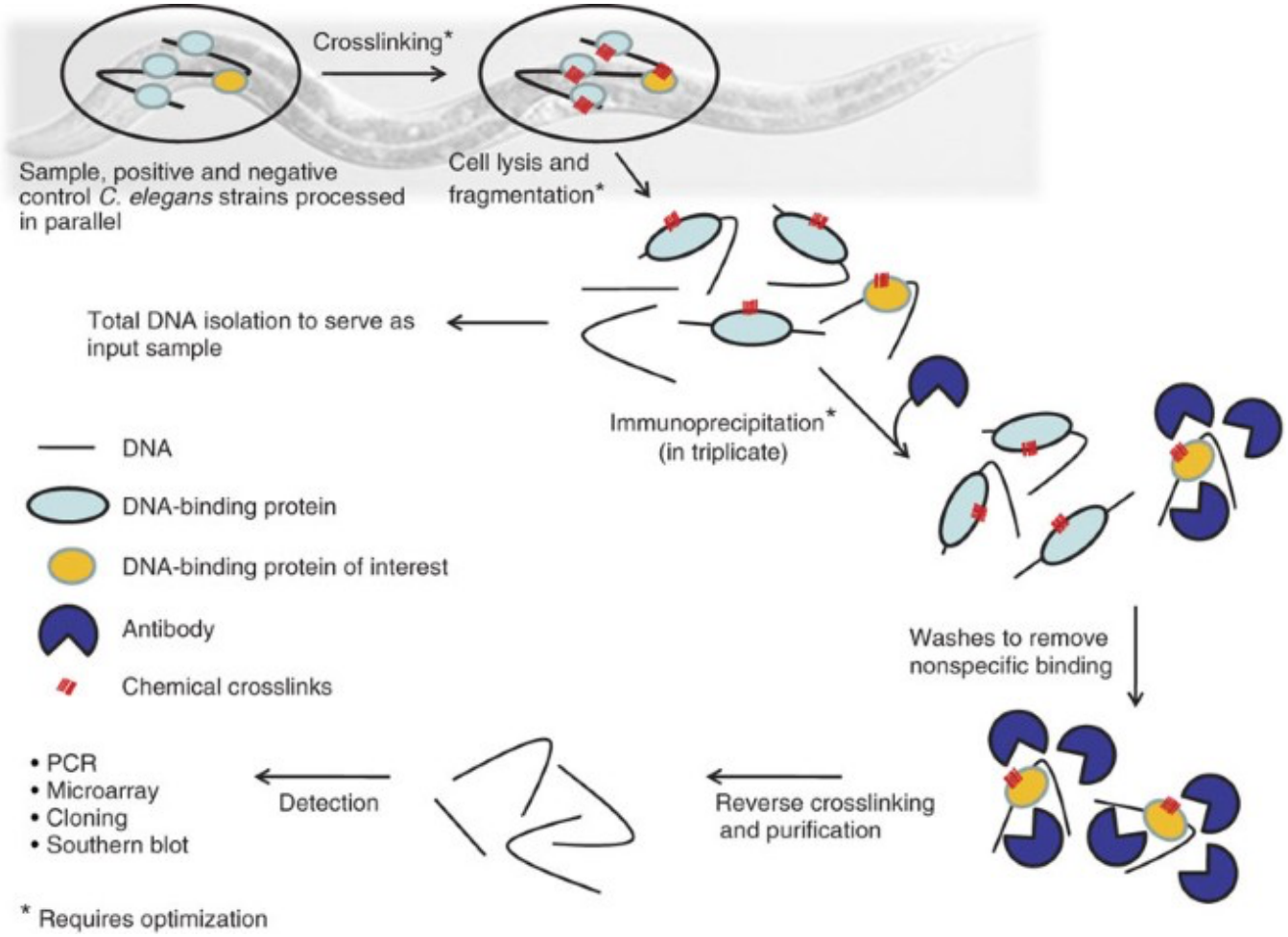


Onde estão os motivos regulatórios no promotor?



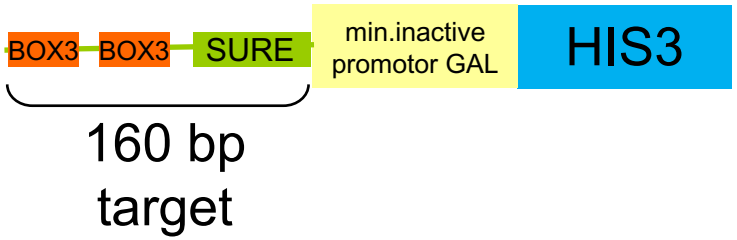
ChIP com anticorpo anti TF





One-hybrid system: procurar proteína que interage com sequência de DNA de interesse

Reporter construcs in histidine auxotrophic strain:



cDNA library

Coloco todos os cDNAs expressos na célula que estou estudando

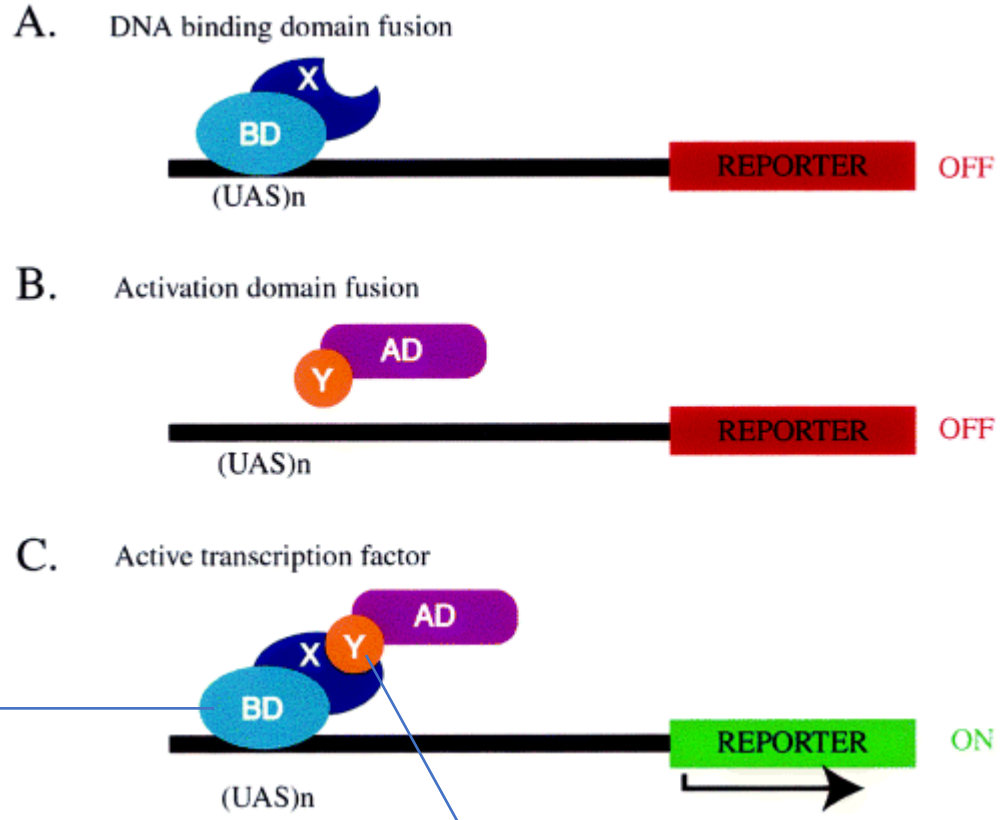
Transformation

1- Colonies express HIS3 (autotróficas)

Quando o cDNA codificar uma proteína que reconhece a minha sequencia de interesse, o ativador Gal4 AD ativará o promotor GAL e a levedura vai expressar HIS3 e crescerá SEM histidina.

Two-hybrid system: achar uma proteína (X) que interage com outra (Y)

Gal4 system in yeast
BD: binding domain
AD: activation domain

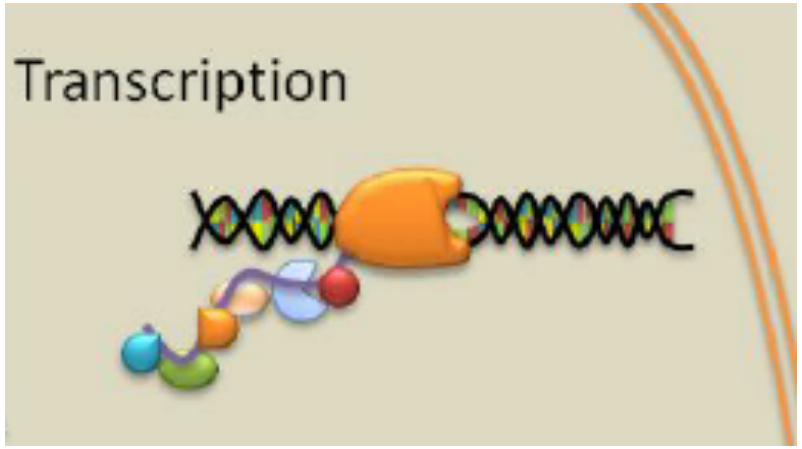


Para o gene repórter ser expresso, AD e BD precisam estar no mesmo complexo

A interação de X e Y faz com que AD e BD fiquem no mesmo complexo.

Intervalo!

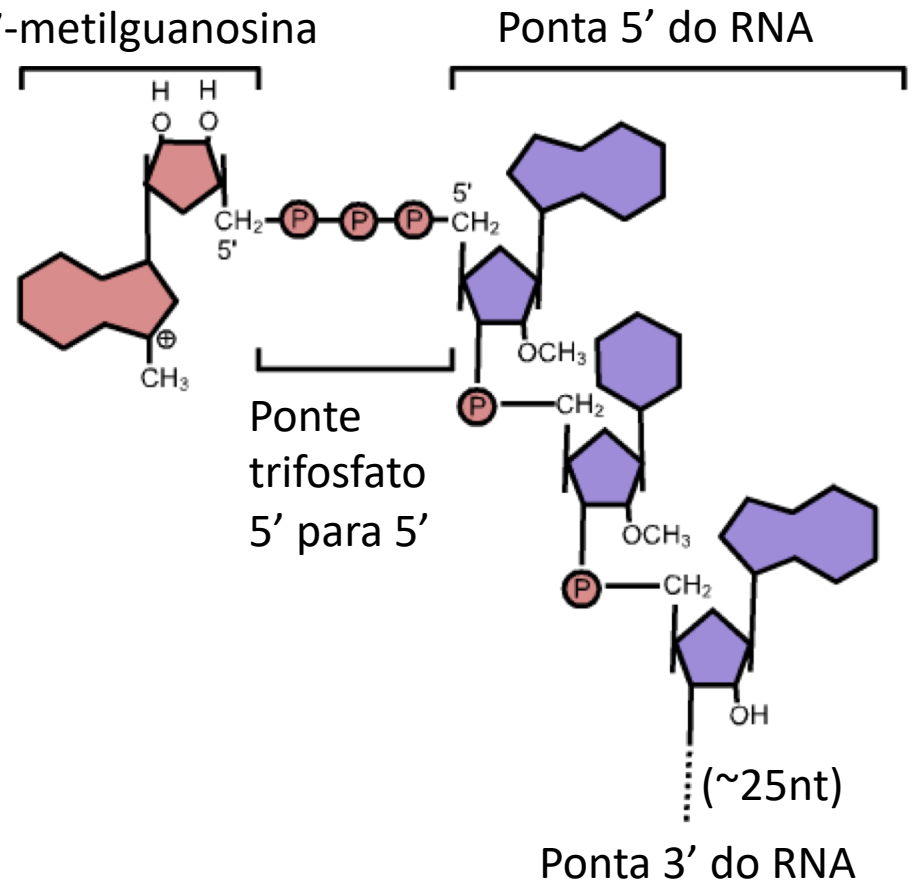
3. Processamento do pré-mRNA e estabilidade do mRNA

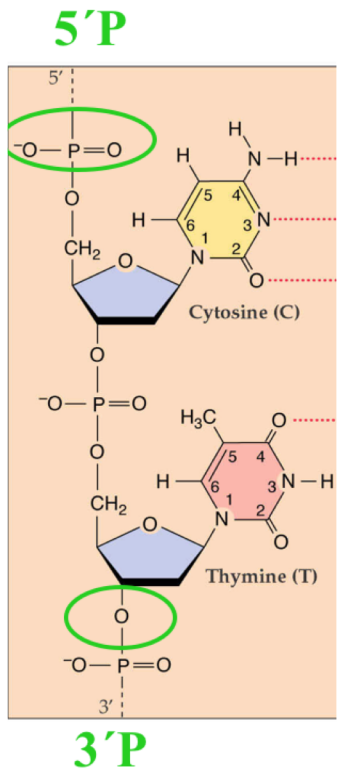


Processamento do pré-mRNA é concomitante com a transcrição

Estabilidade do mRNA

- Pode ser dividido em 4 eventos principais:
  1. Adição do “cap” 7-MG
     (durante a transcrição)
     Protege o extremo 5’ da ação das RNAses





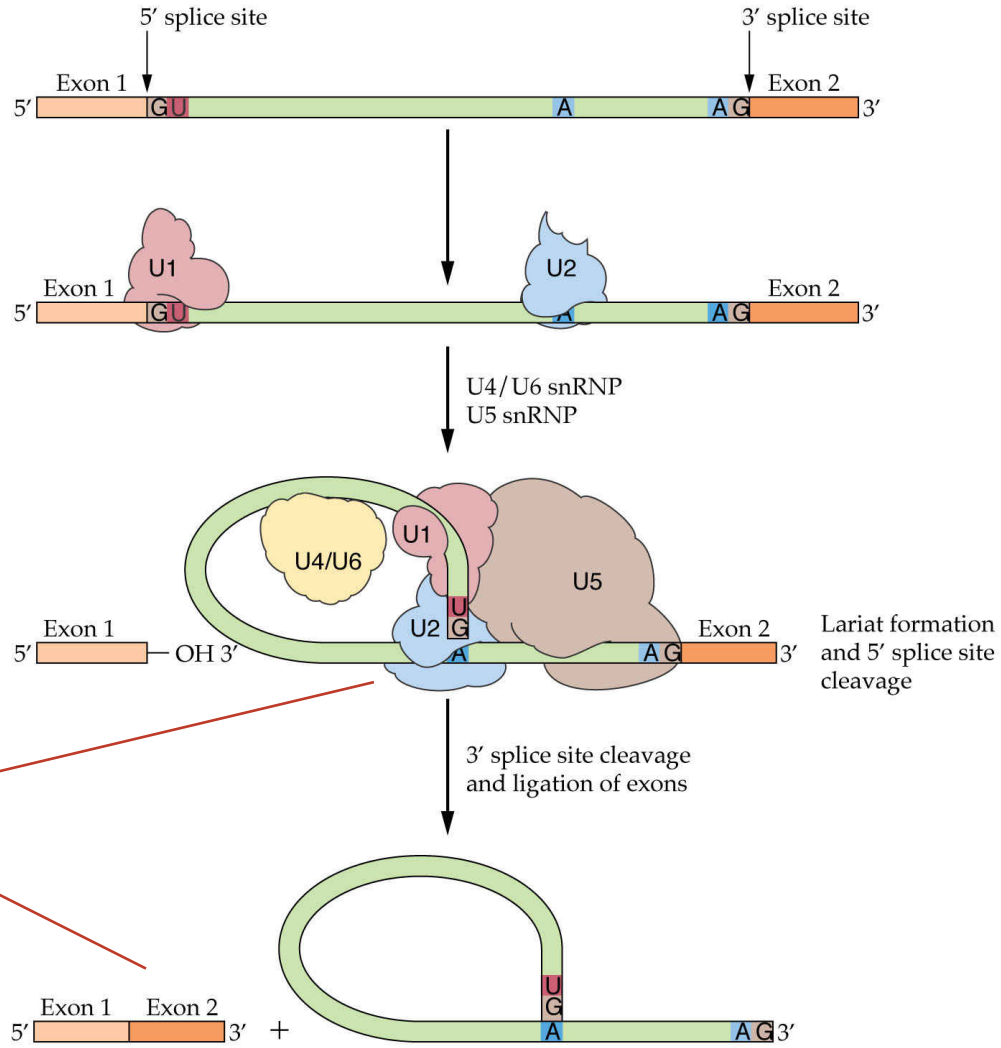
Processamento do pré-mRNA é concomitante com a transcrição

- Pode ser dividido em 4 eventos principais:
  1. Adição do “cap” 7-MG
  2. *Splicing*

  (durante a transcrição)

>3/4 dos genes em plantas possuem íntrons

duas reações de transesterificação

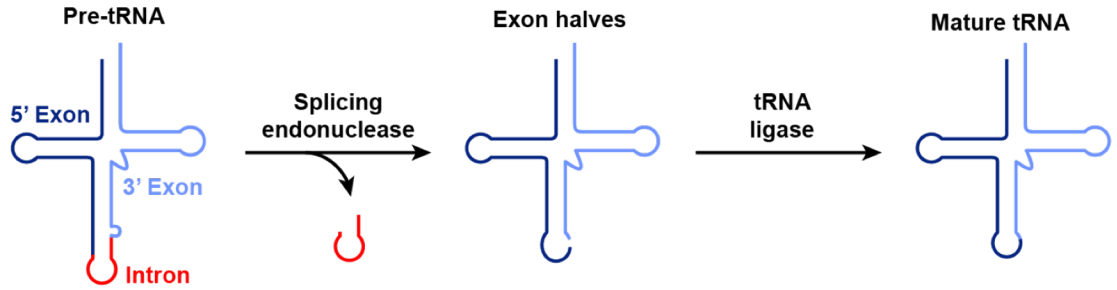


Splicing de RNA e o spliceossomo

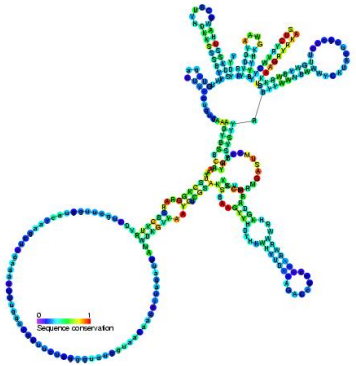
https://www.youtube.com/watch?v=CdwLKwseP9Q

Processamento de outros RNAs em plantas

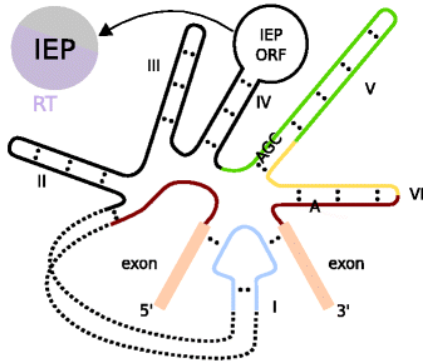
tRNAs – *splicing* enzimático



RNAs organelares (plastídios) – íntrons auto catalíticos

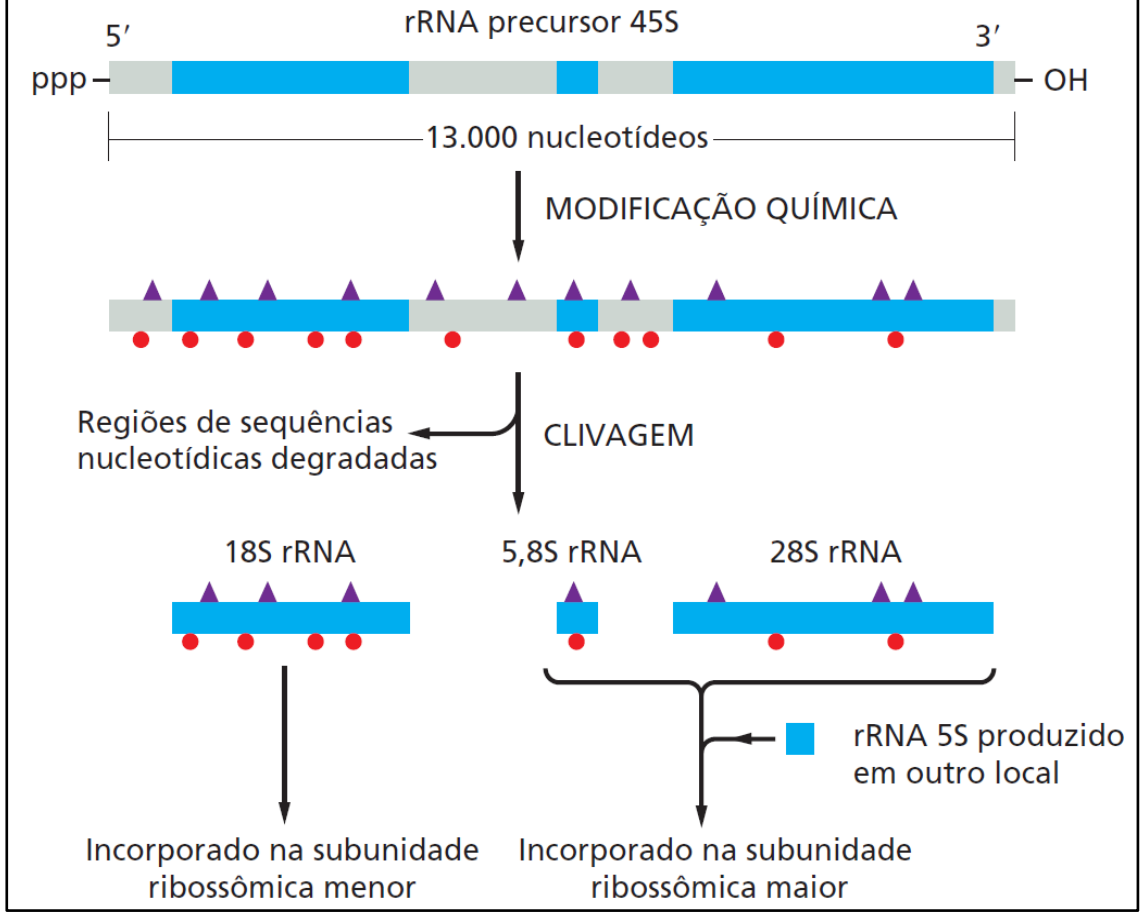


Intron Grupo 1



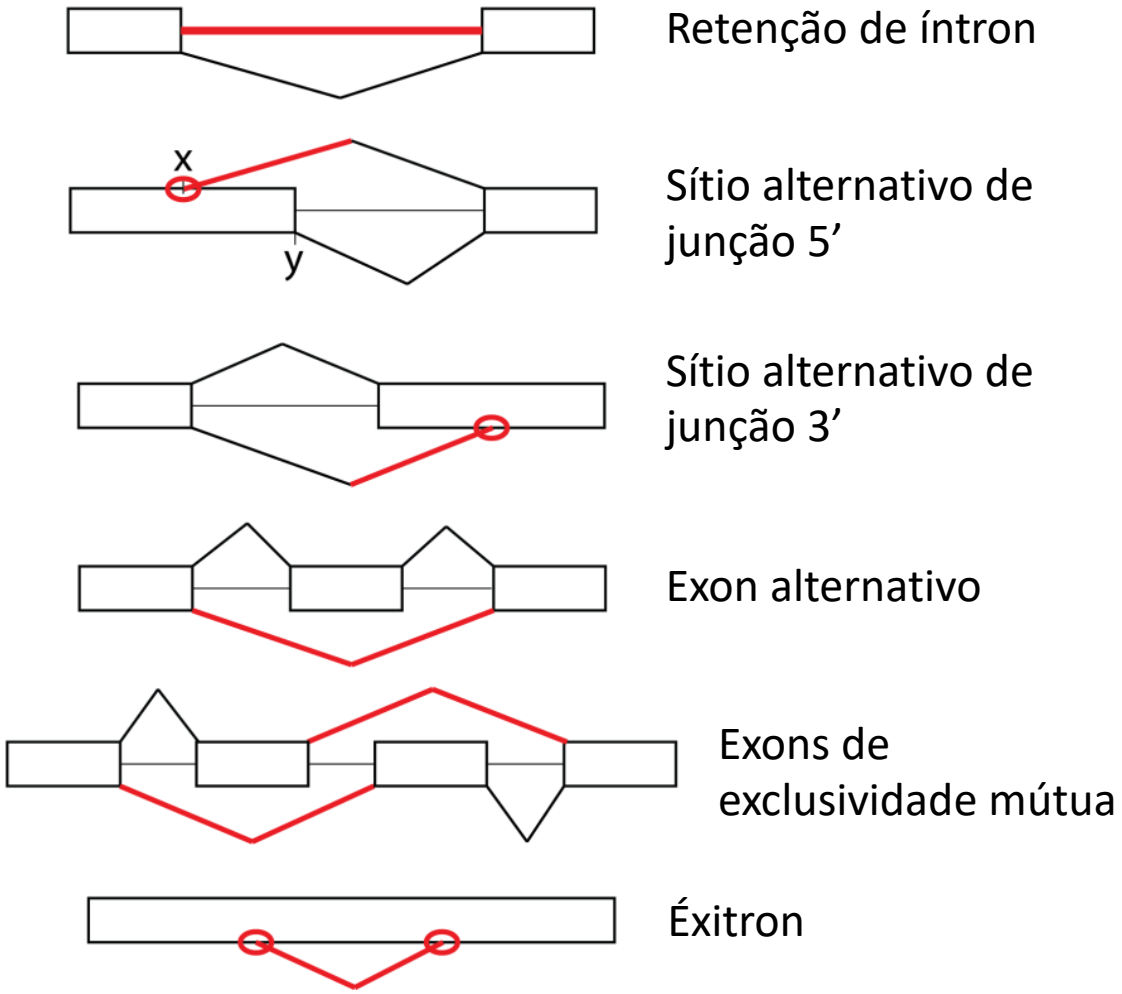
Intron Grupo 2

rRNAs – clivagem via snoRNPs



Splicing alternativo

- Até 70% dos genes de planta que contem íntron sofrem *splicing* alternativo



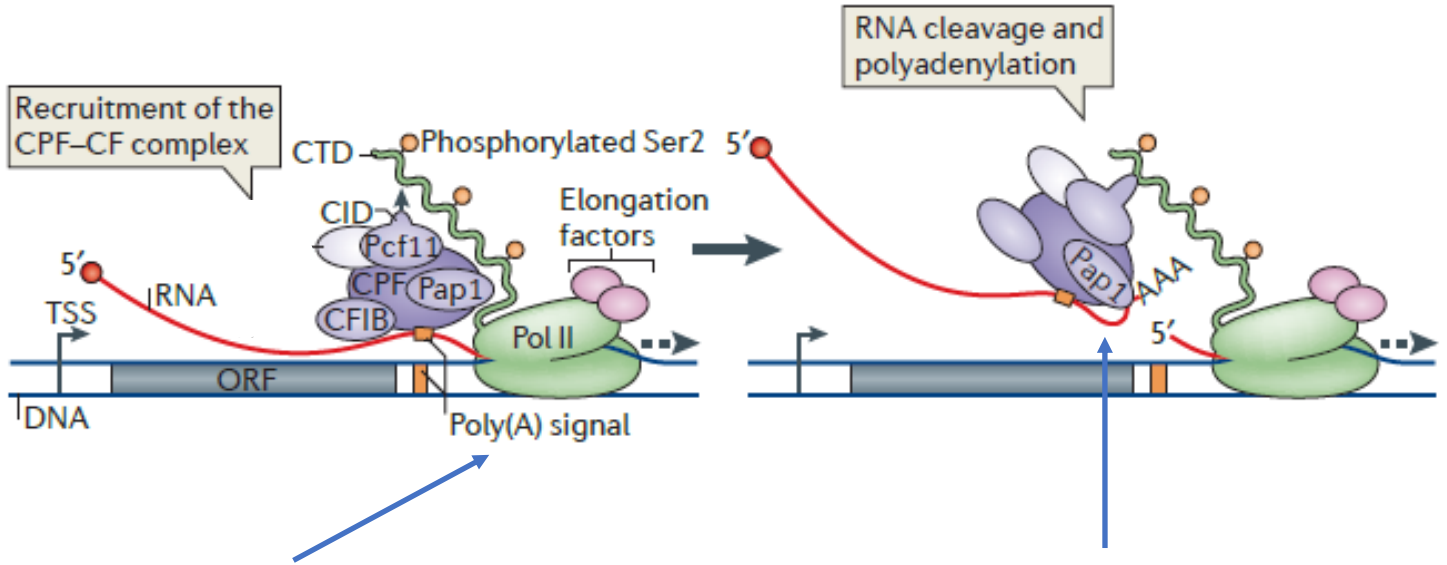
Estabilidade do mRNA

- Pode ser dividida em 4 eventos principais:
  1. Adição do “cap” 7-MG
  2. *Splicing*
  3. Poliadenilação

  (final da transcrição)

  ~70% genes em plantas

  (rRNAs não têm)



Uma endonuclease cliva o pre-mRNA após o 5´AAUAAA-3´ .

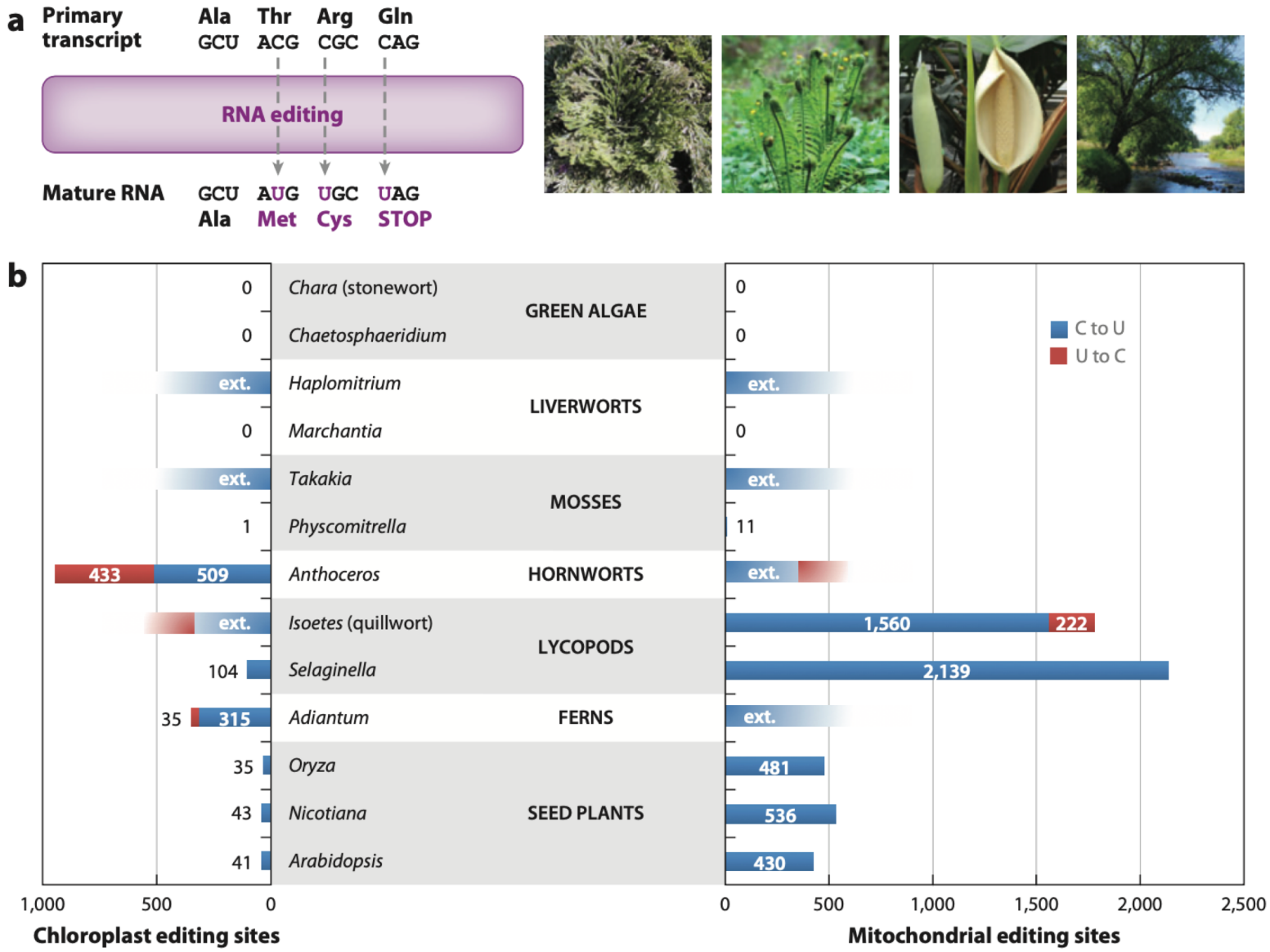
A poly (A) polimerase coloca 20-250 As.
O comprimento ajudará a determinar a vida media do mRNA.

- Cleavage and polyadenylation factor (CPF) and cleavage factor (CF) complexes recognize specific sequences in the 3′ UTR of the transcript.
- Upon endonucleolytic cleavage of the transcript at the poly(A) site, poly(A) tails are added by the CPF-associated poly(A) polymerase Pap1.
- The 5′ end of the downstream portion of the transcript is then targeted by the Rat1 5′–3′ exonuclease.

Porrua e Libri, 2015

Processamento do pré-mRNA

- Pode ser dividida em 4 eventos principais:
  1. Adição do “cap” 7-MG
  2. Splicing
  3. Poliadenilação
  4. Edição (substituir C por U, e vice-versa) modificando a sequencia do mRNA (mitocôndrias e plastídios)



Takenaka et al., 2013

Processamento do pré-mRNA

- Pode ser dividida em 4 eventos principais:
  1. Adição do “cap” 7-MG
  2. Splicing
  3. Poliadenilação
  4. Edição (substituir C por U, e vice-versa) modificando a sequencia do mRNA (mitocôndrias e plastídios)

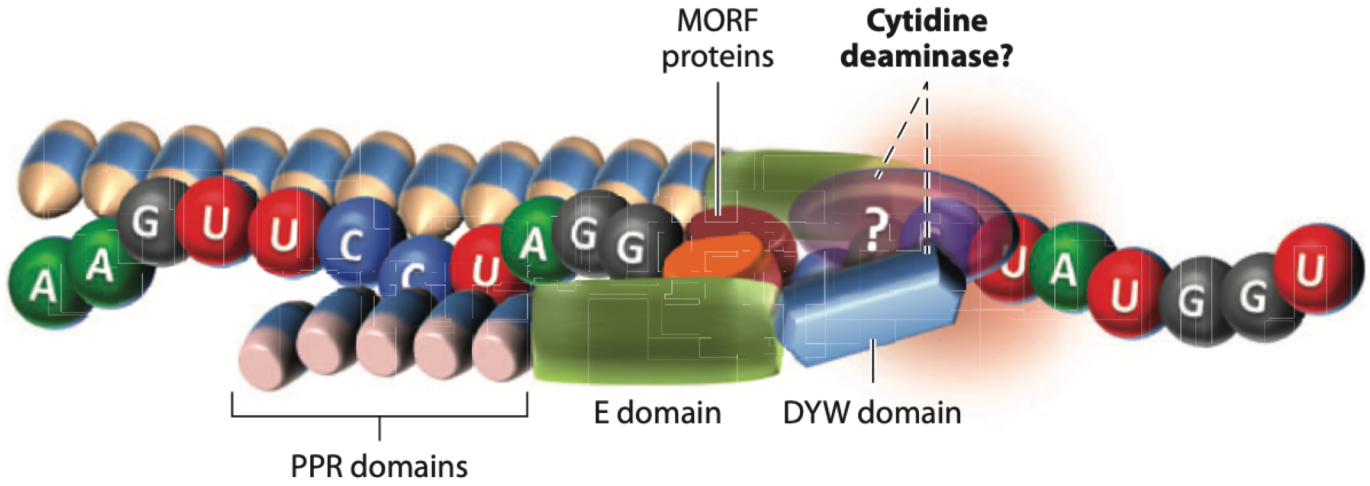


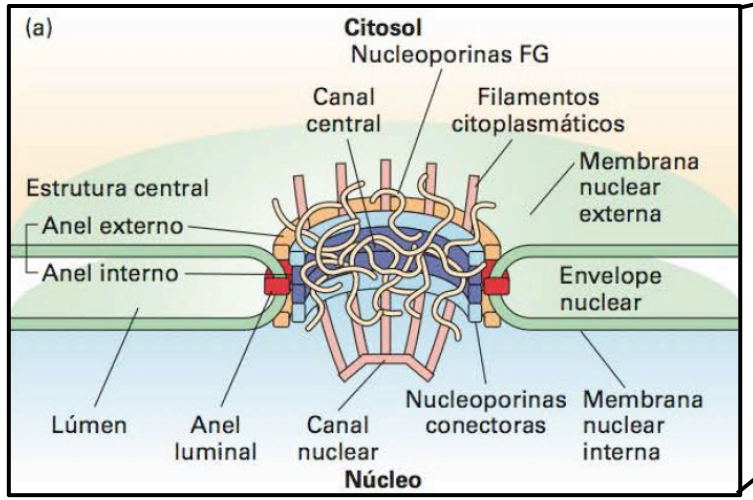
Figure 4

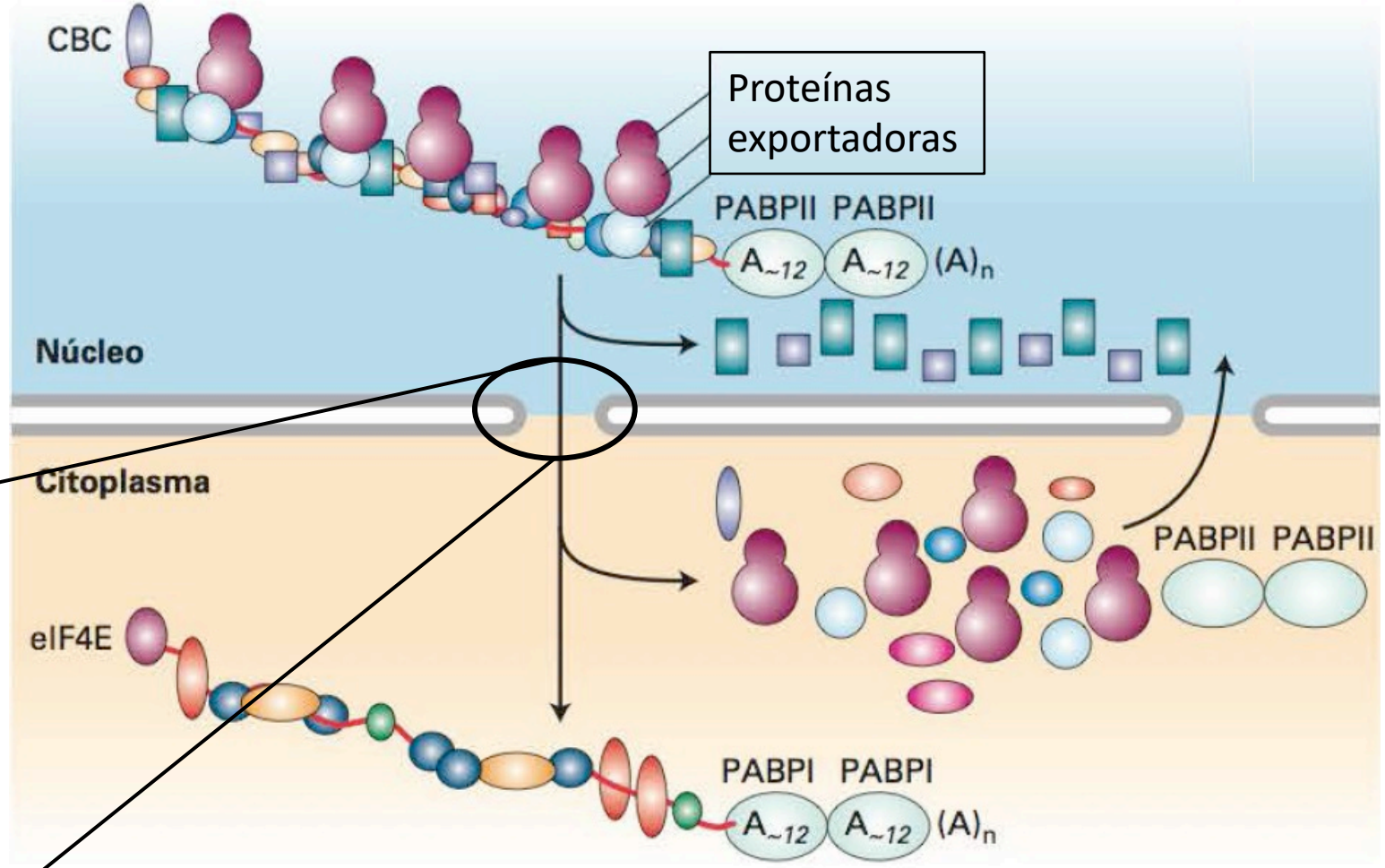
Model of the presently identified composition of the hypothetical editosome in flowering plant organelles. A pentatricopeptide repeat (PPR) protein binds to a specific combination of nucleotides in the RNA. One or more multiple organellar RNA-editing factor (MORF) proteins interact with the PPR protein and attract the enzymatic activity. This most likely deaminase activity may be a DYW domain from a respective (second) PPR protein or an entirely different moiety. Bullets represent nucleotides in the RNA. Cartridges in the PPR proteins denote the degenerate repeats of approximately 35 amino acids. The E and DYW domains of the respective PPR proteins are indicated.

Takenaka et al., 2013

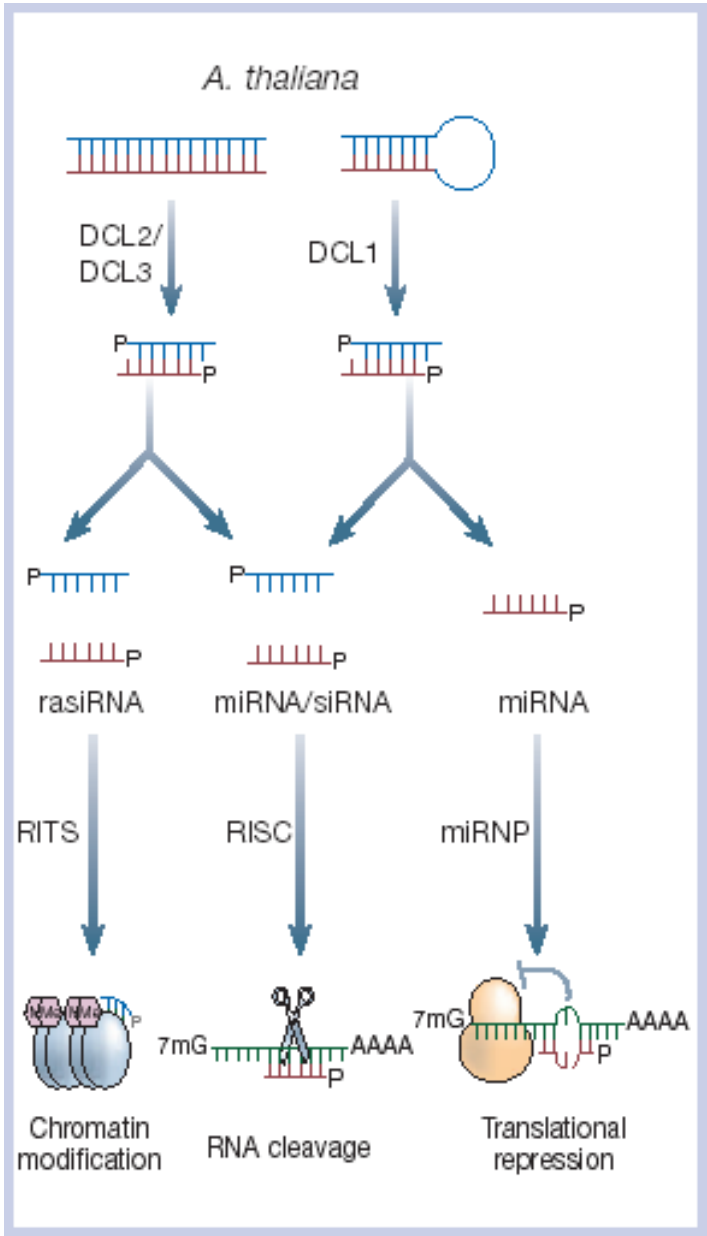
“Controle de qualidade” para exportação nuclear

- O mRNAs que foi corretamente processado recrutará as proteínas necessárias para ser transportado, de maneira contrária, o mRNA será degradado no núcleo...
- Proteínas citoplasmáticas de ligação ao mRNA substituem as proteínas nucleares.



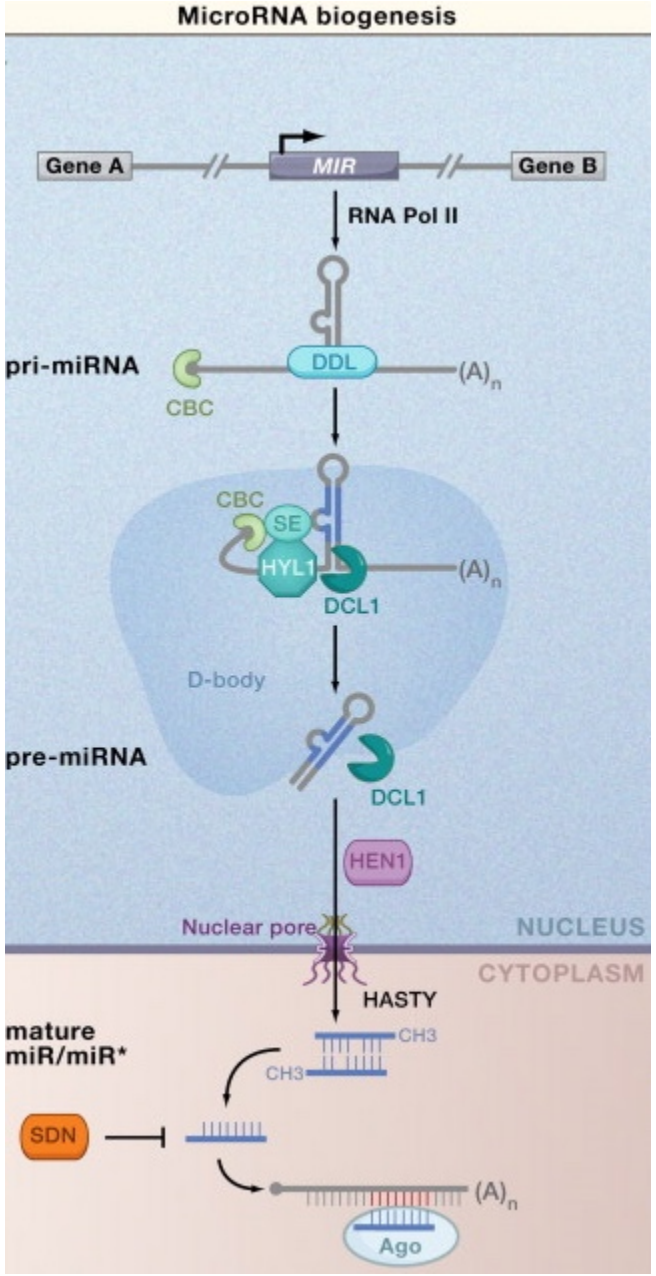


4. Controle póstranscricional

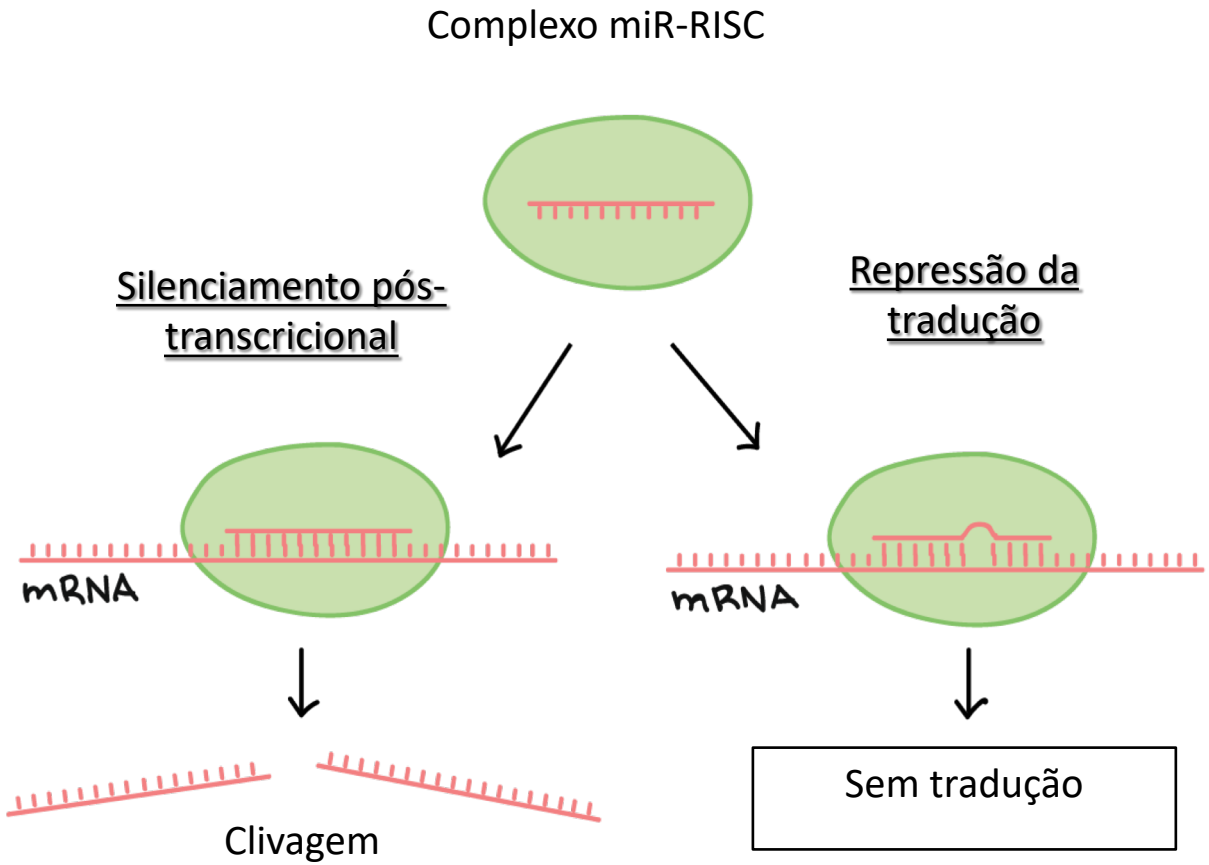


RNAs não codificadores envolvidos no controle pós-transcricional

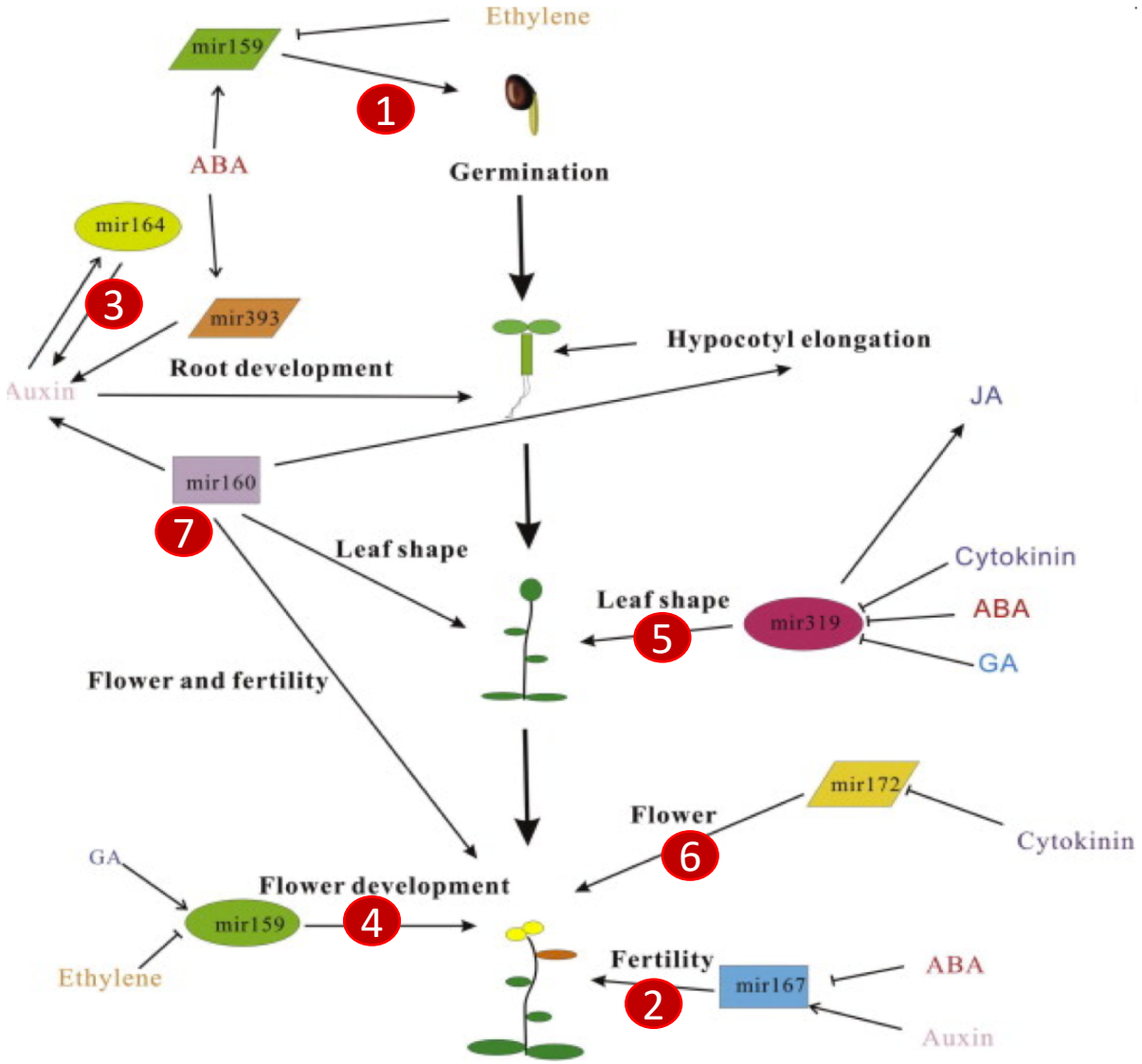
miRNAs



- RNA polymerase II
- Dicer-like 1 (**DCL1**)
- Methylated by **HEN1** protects from SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN) degradation
- **ARGONAUTA** + miRNA: RNA-induced silencing complex (**RISC**)



miRNAs regulam a resposta a fitormônios



1 Inibe efeito do ABA degradando os mRNAs dos FTs específicos: ativa germinação

2 Degrada a proteína responsiva a auxina ARF8 que diferencia órgãos reprodutivos. Então com stress, o ABA inibe o miR e a flor diferencia mais rapidamente.

3 Degrada NAC1 que é um ativador da transcrição dos genes induzidos por auxina, assim regula por feedback negativo a resposta a auxina. Mutantes acumulam NAC1 e desenvolvem muitas raízes laterais e perdem a resposta a auxina.

4 Degrada FT de resposta a GA demorando a floração, induzida pelo GA em excesso do próprio GA.

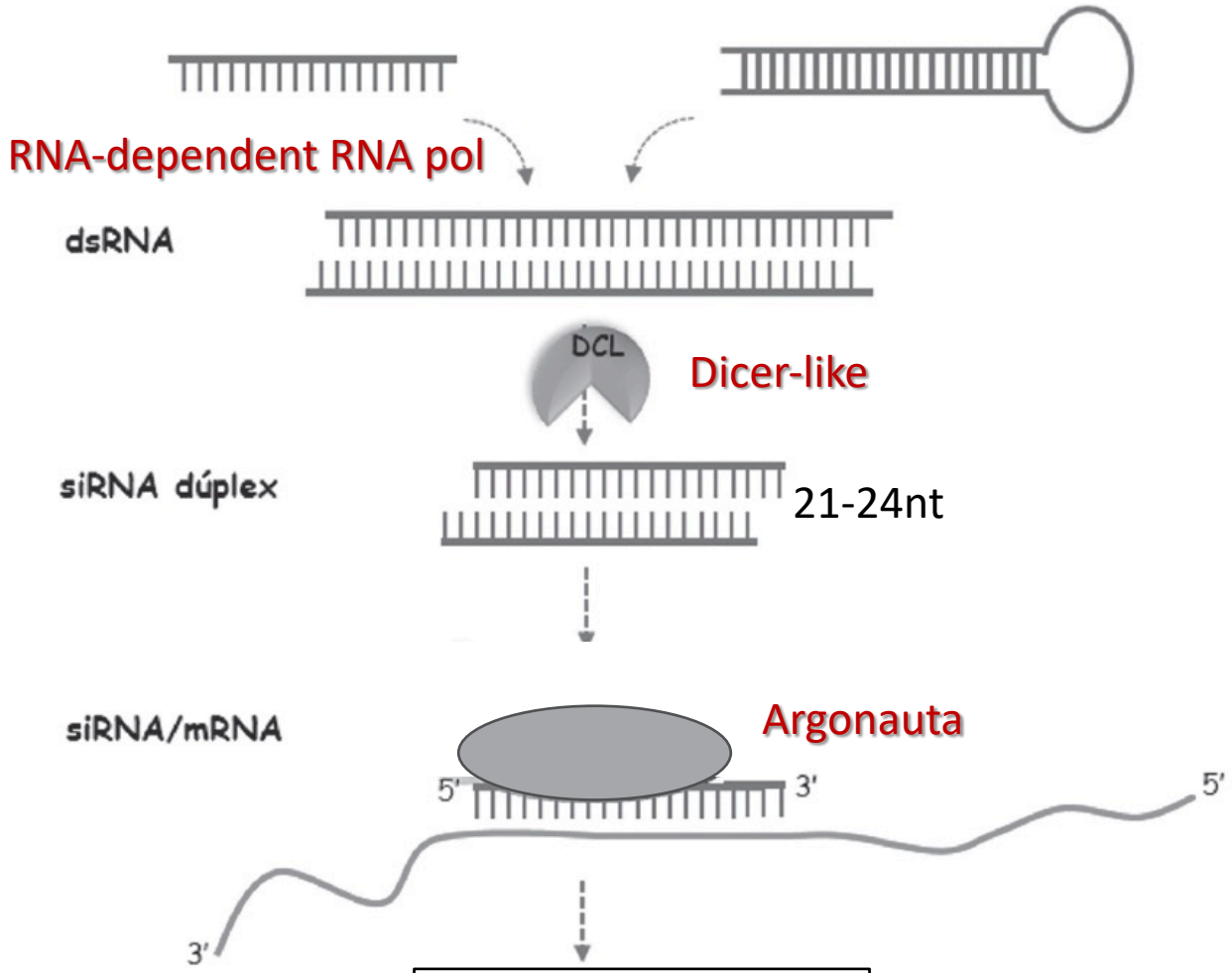
5 Degrada TCP FTs que inibem o crescimento de folhas e ativam a senescência via síntese de JA.

6 Degrada APETALA-2 circunscrevendo a sua expressão e permitindo a correta diferenciação dos órgãos florais.

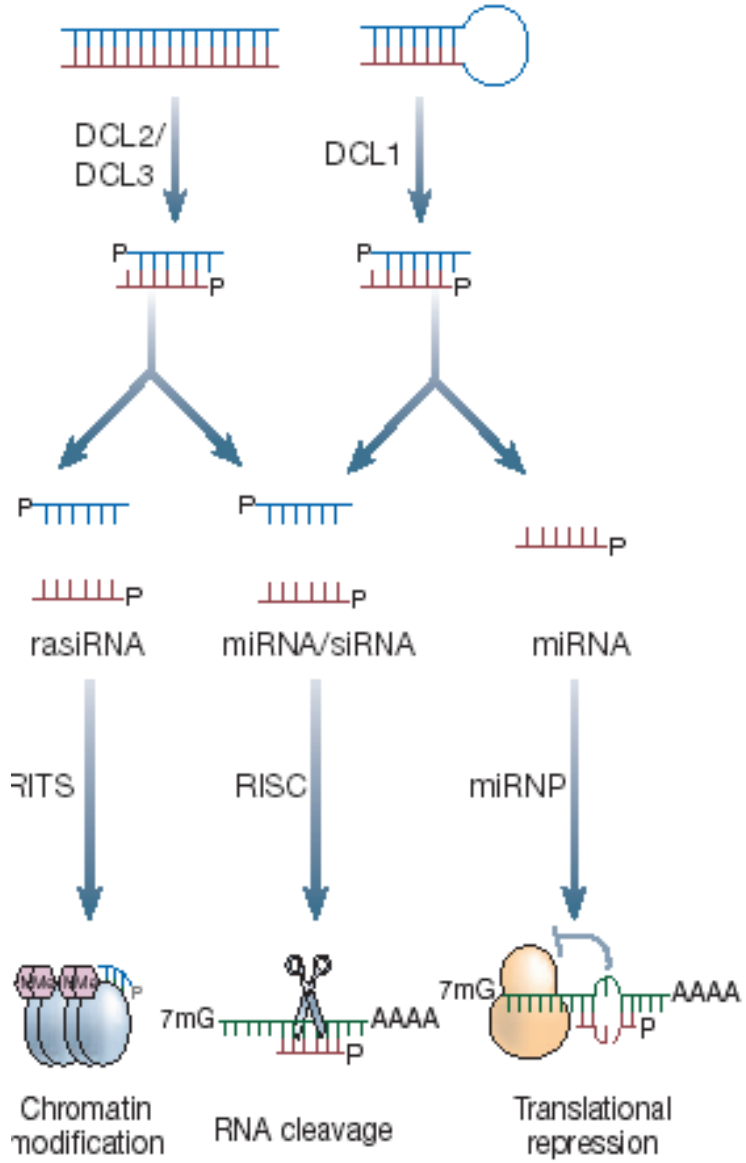
7 Degrada proteínas responsivas a auxina ARFs regulando todos os processos onde a auxina atua.

siRNAs

RNA endógeno, viral ou transgênico



Silenciamento gênico
- Pós-transcricional
- Epigenético



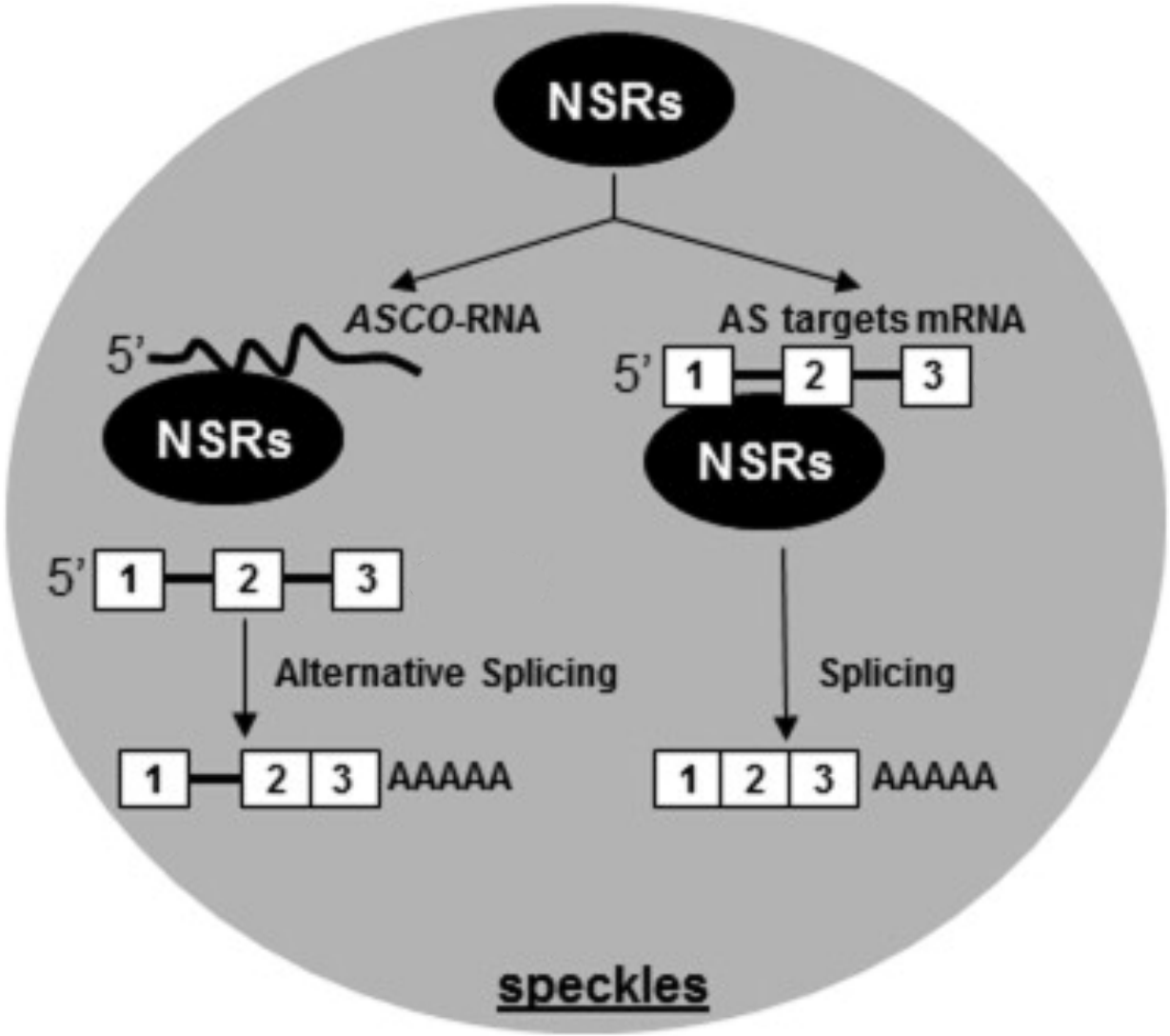
RITS: RNA-induced transcriptional silencing complex
RISC: RNA-induced silencing complex

Figura adaptada de Kulcheski e Margis, 2017

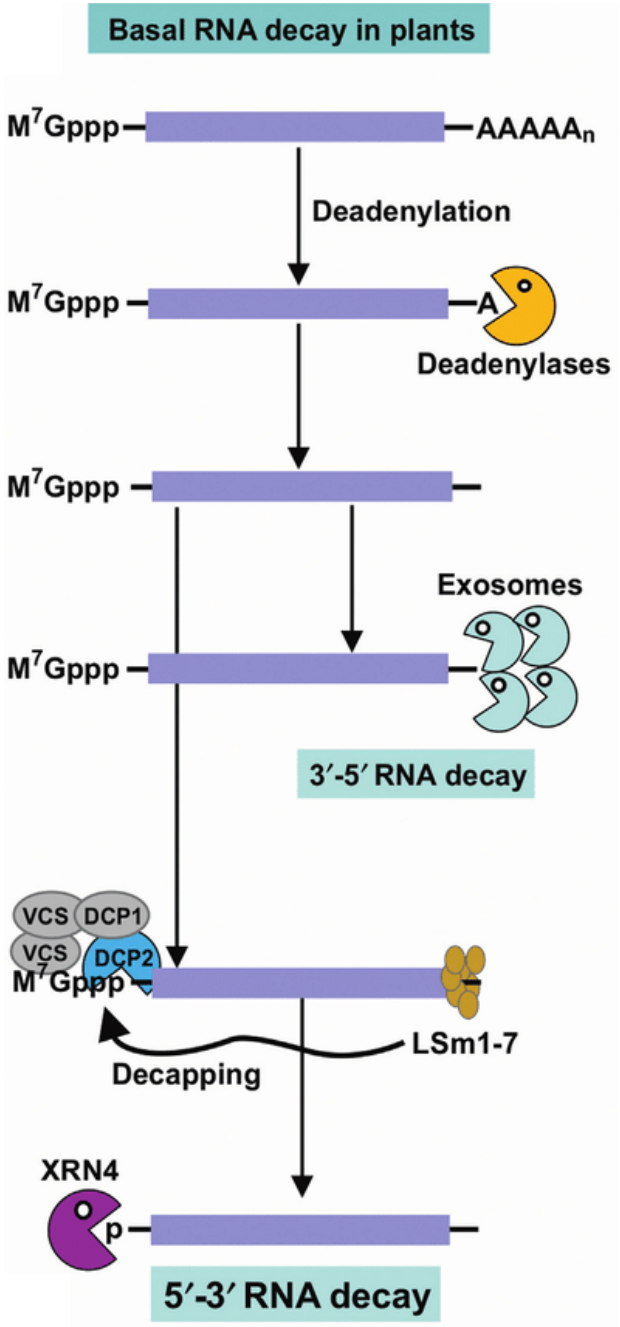
lncRNAs

NSR (nuclear speckle RNA-binding protein) são reguladores de splicing que se ligam a pré-mRNA alvos e modulam seu splicing

O lncRNA ASCO sequestra o complexo NSR resultando no splicing alternativo do gene.



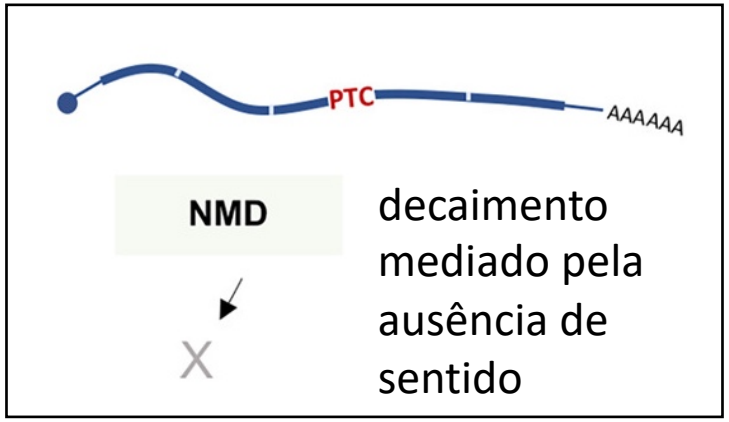
doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017



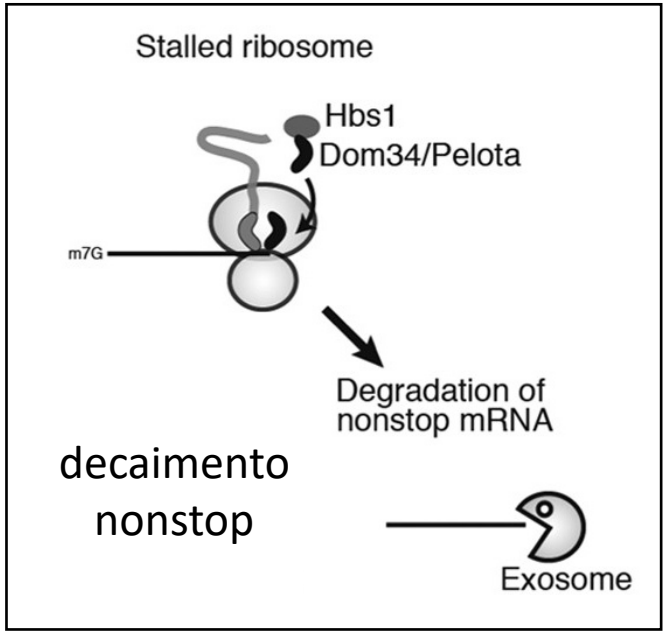
doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.007

Vida-média do RNA

- A vida-média do mRNA pode ser regulada de duas maneiras principais:
  - Perda das “proteções”
  - Erros no mRNA

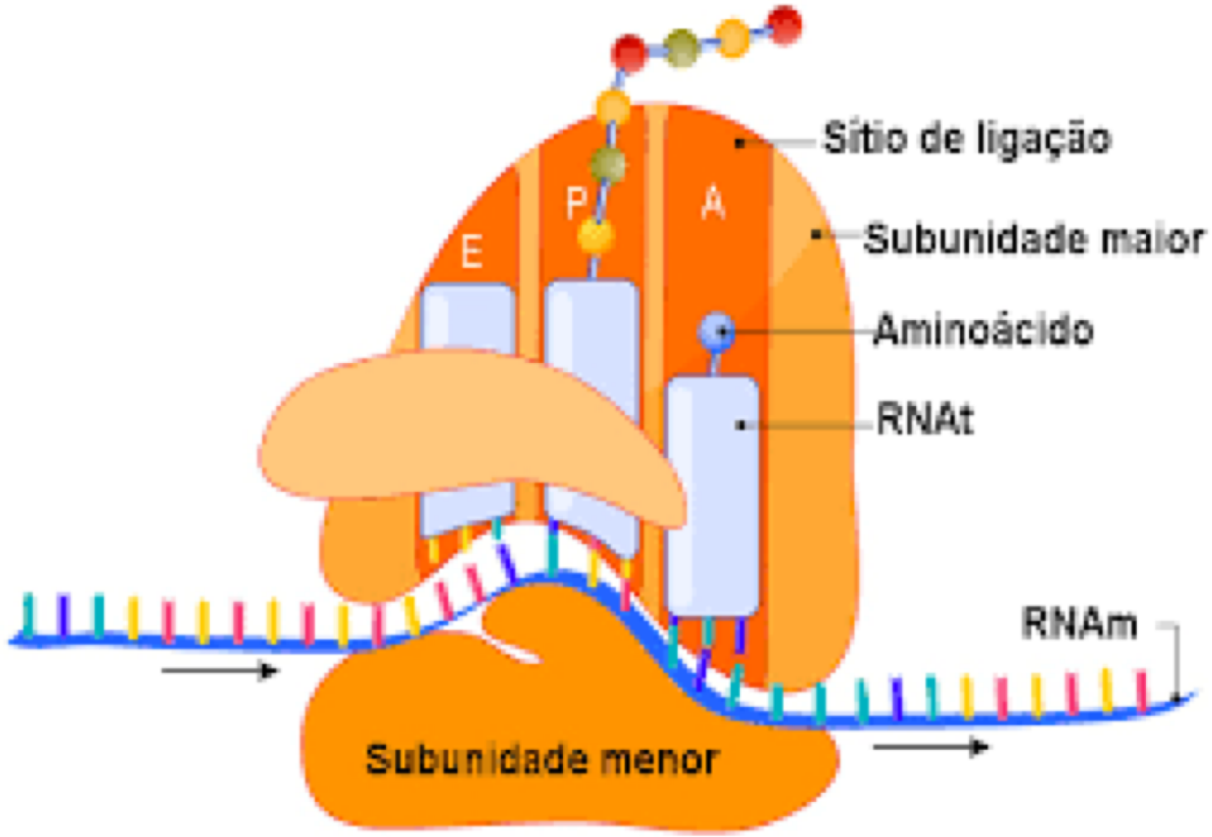


decaimento mediado pela ausência de sentido

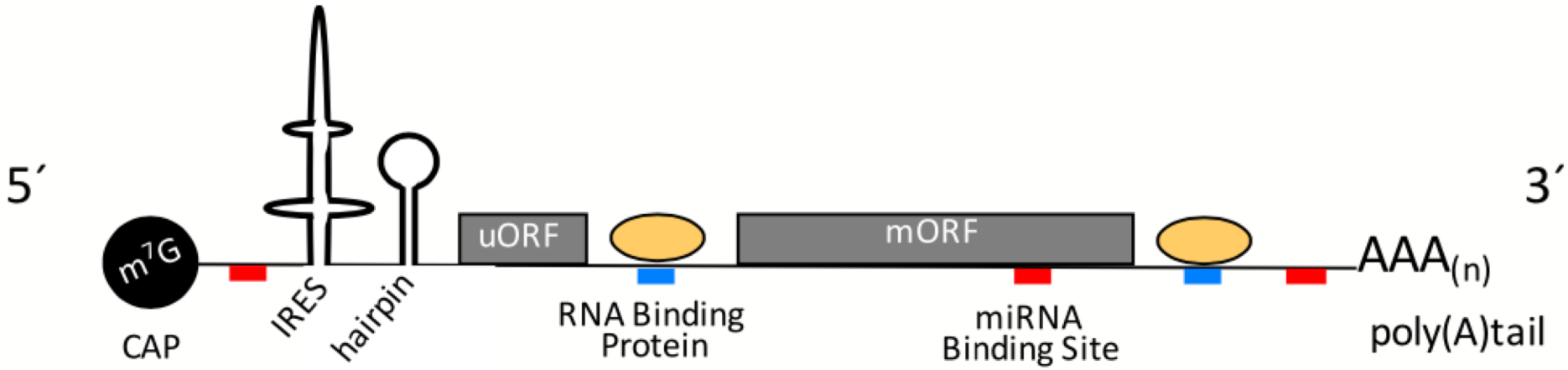


decaimento nonstop

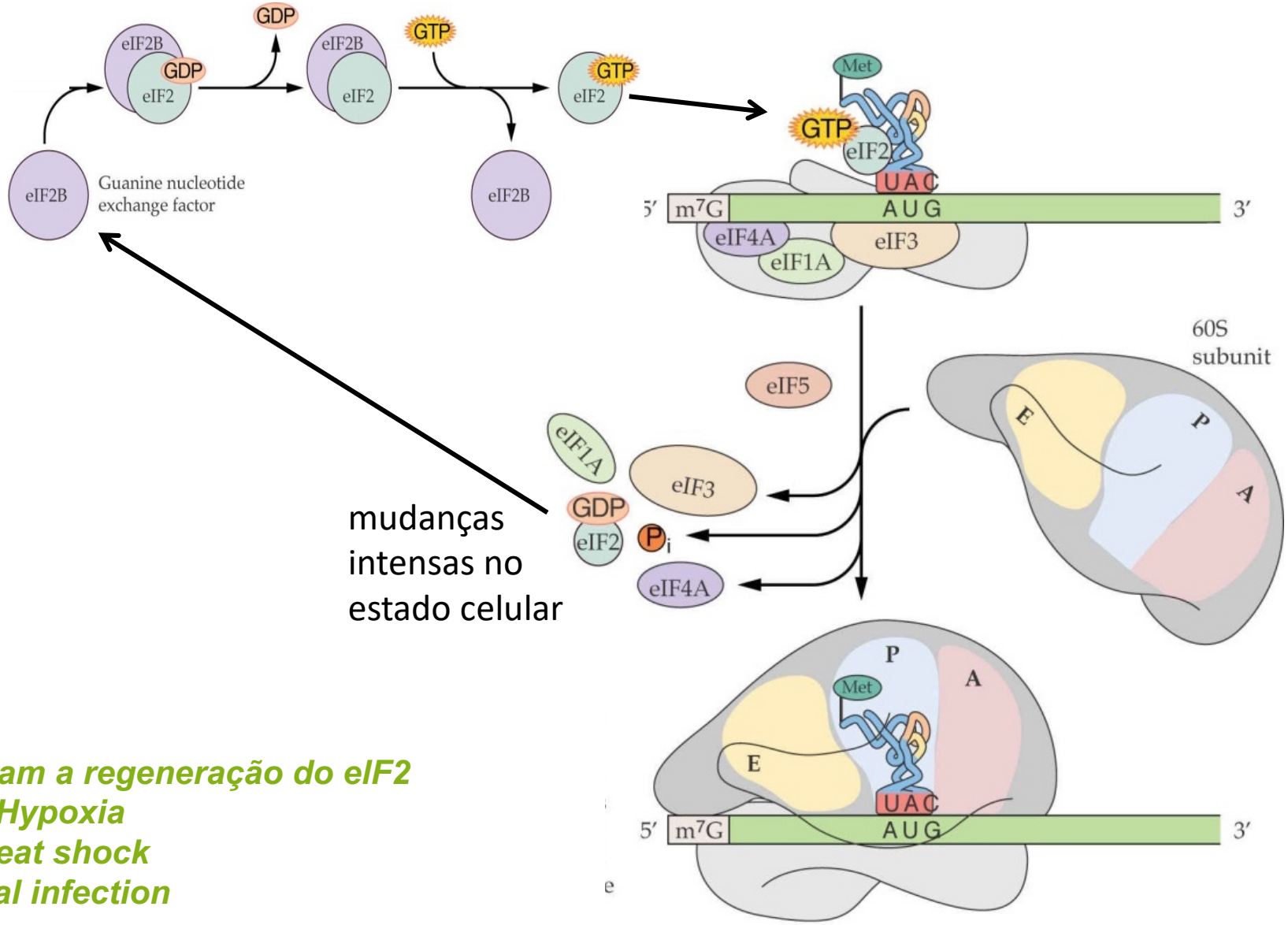
5. Controle traducional



- Presença de CAP e poliA induzem a tradução.
- Internal ribosomal entry sites (IRES) são necessários para o reconhecimento dos ribossomos.
- Hairpins e upstream ORFs inibem a tradução da ORF principal (mORF).
- Sequencias de binding de ptroteínas regulatórias podem induzir o reprimir a tradução.
- Sitios de reconhecimento por miRNA inibe tradução pela degradação do mRNA.



MERCHANTE ET AL. (2017)

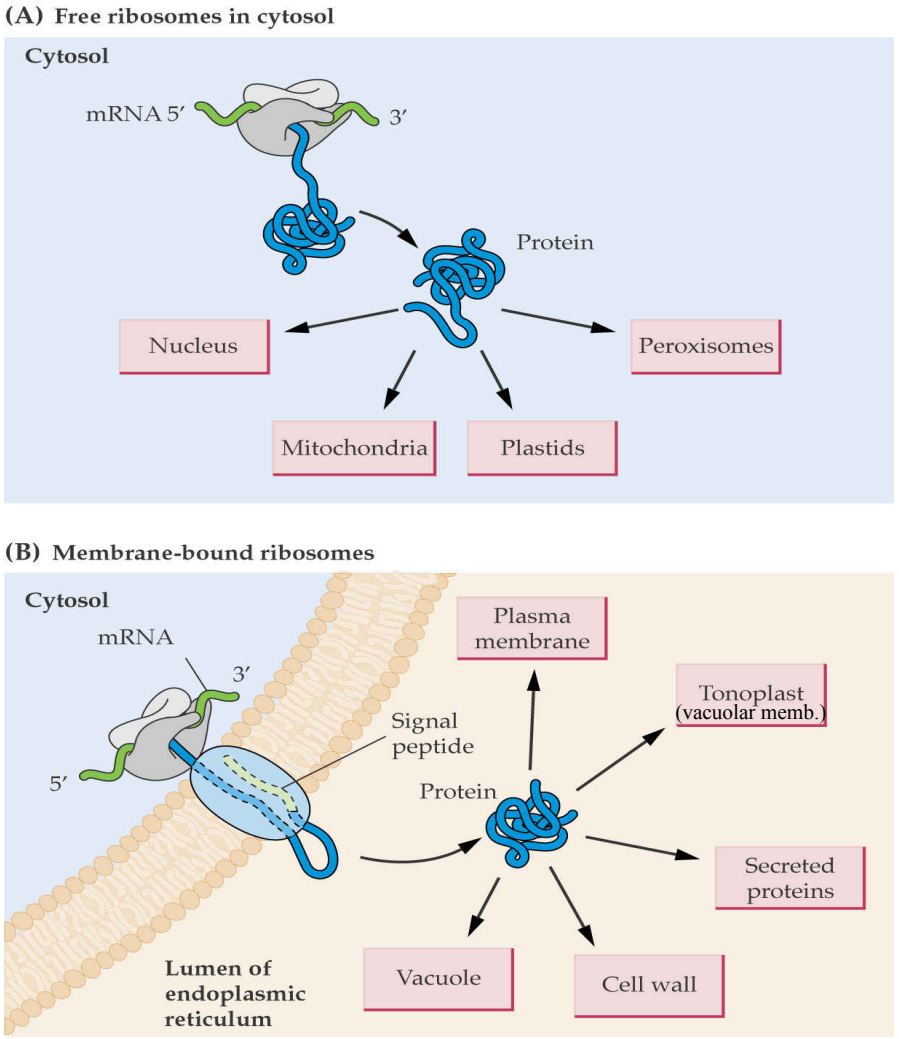


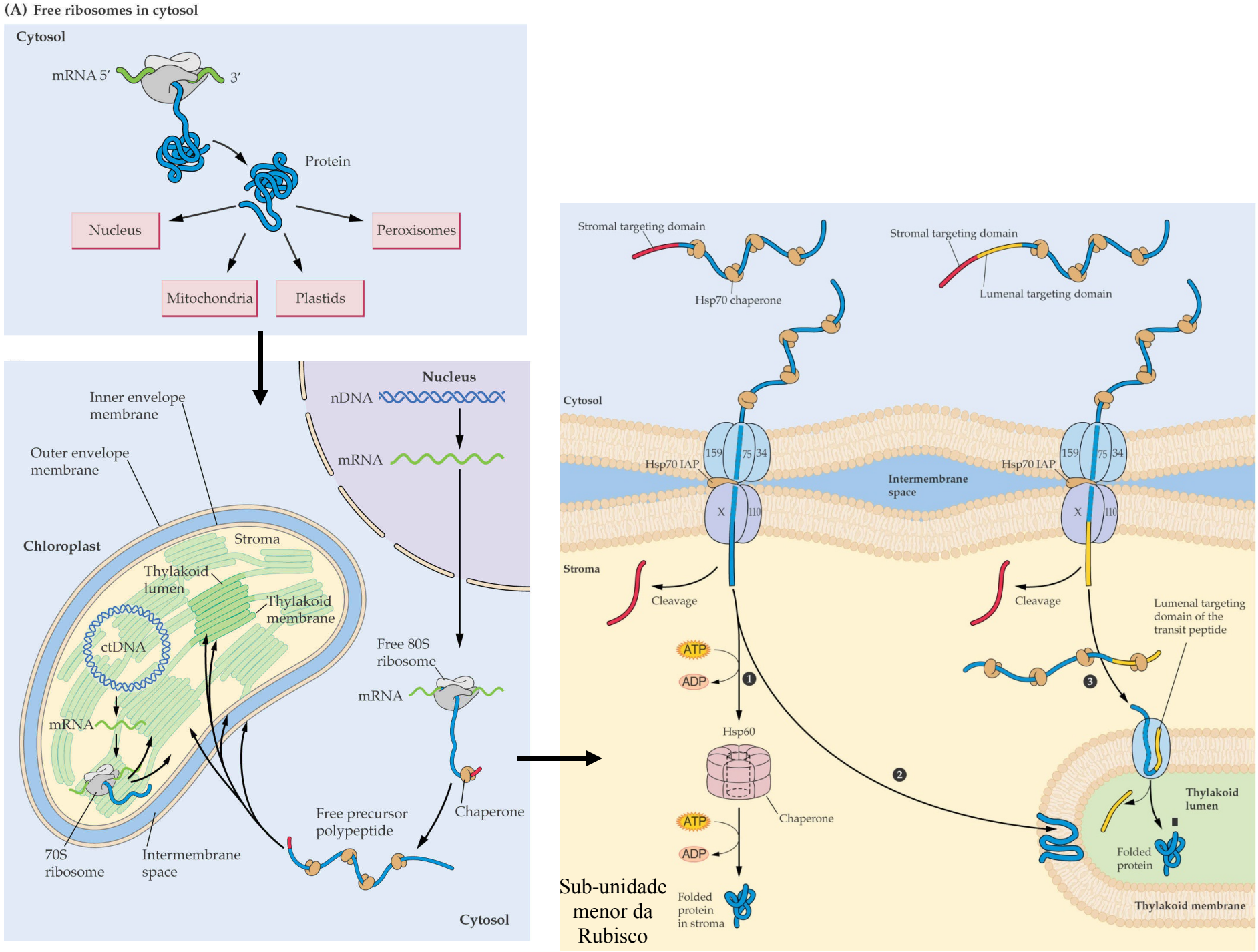
mudanças intensas no estado celular

Estresses bloqueiam a regeneração do eIF2
Hypoxia
Heat shock
Viral infection

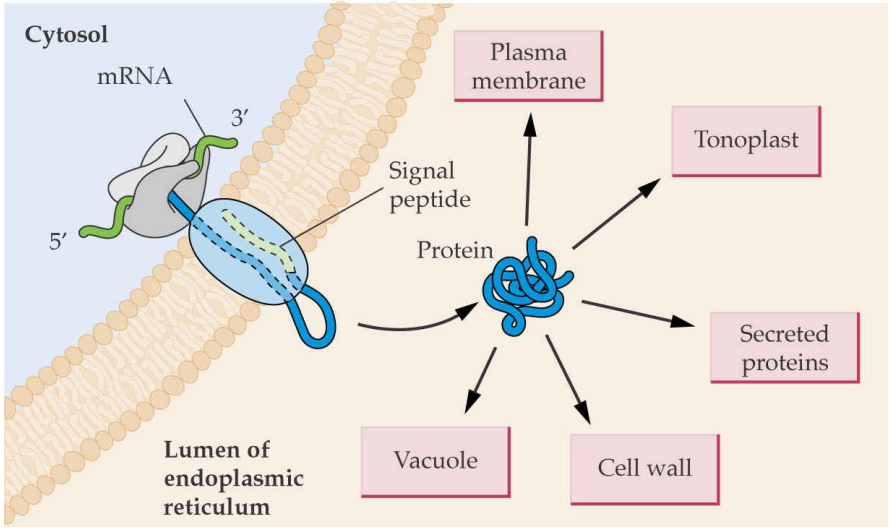
mRNAs de estresse não precisam de eIF2!!!!

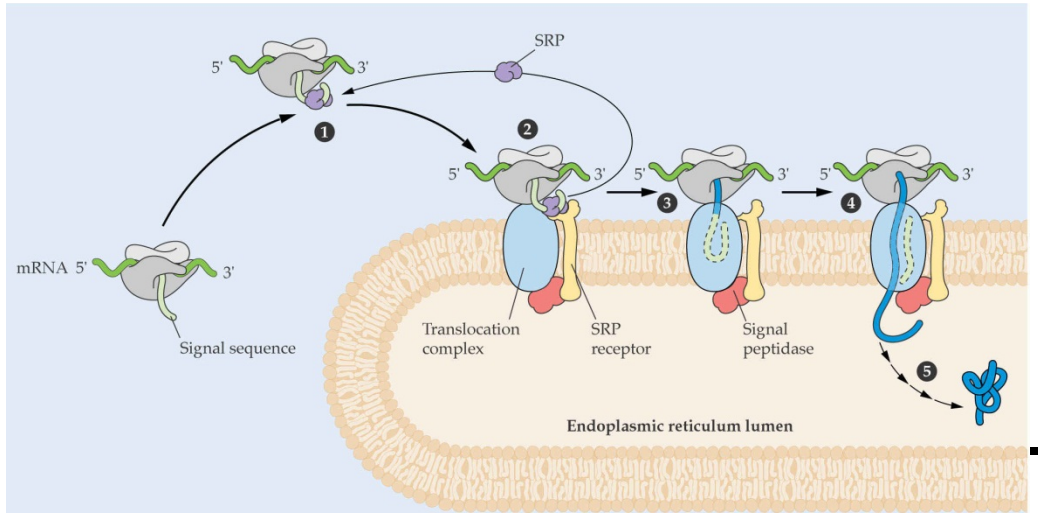
Tradução e direcionamento para organelas

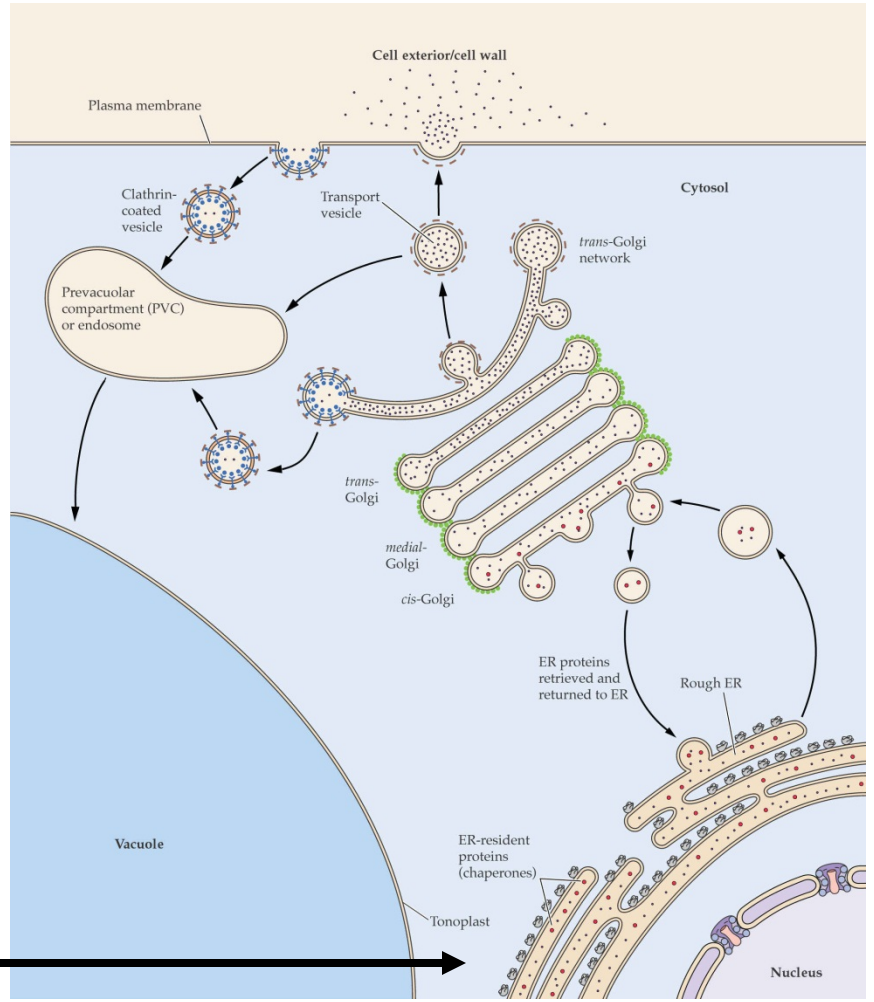


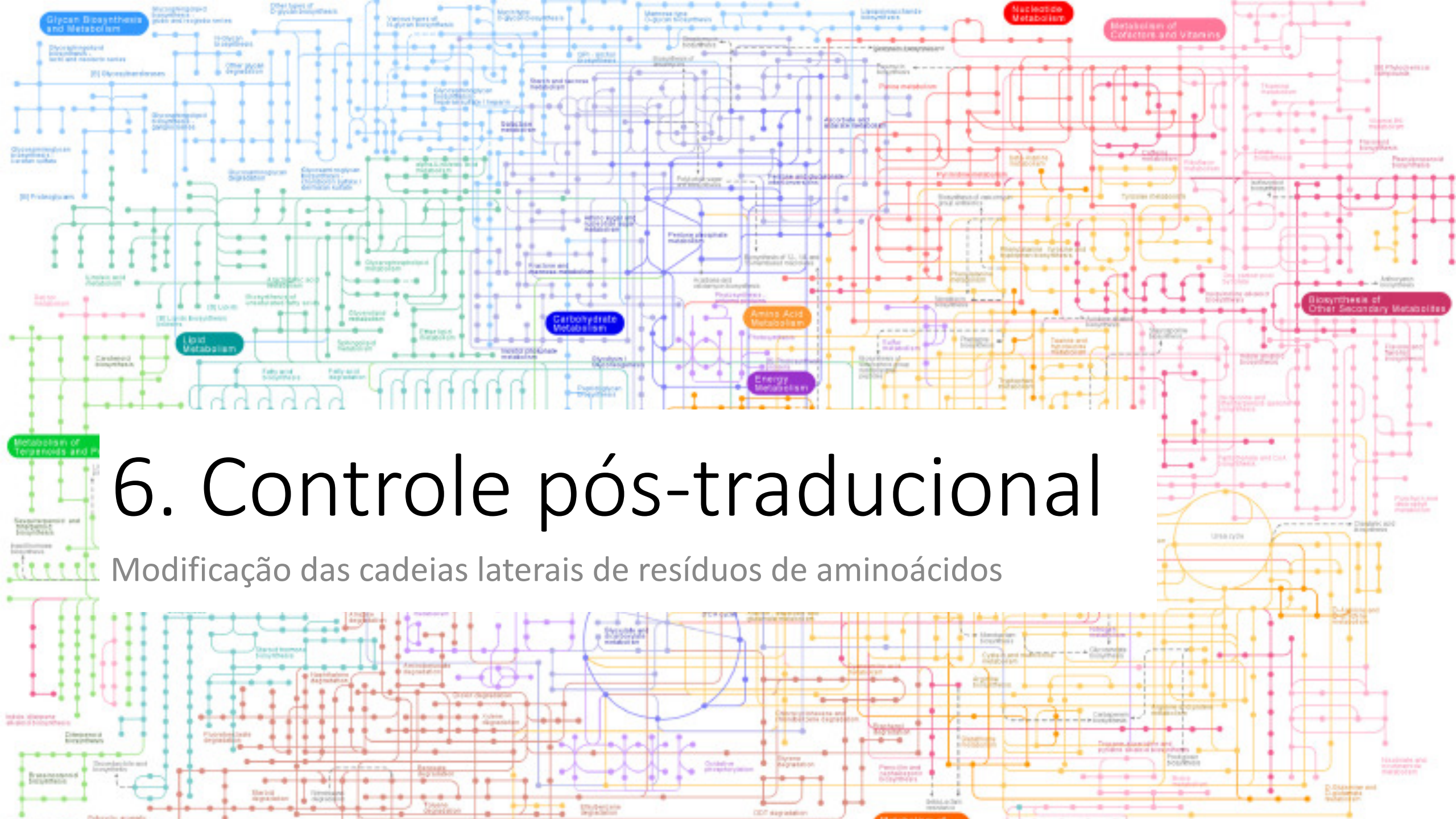

(A) Free ribosomes in cytosol
Cytosol
mRNA 5′
3′
Protein
Nucleus
Peroxisomes
Mitochondria
Plastids
Nucleus
nDNA
mRNA
Inner envelope membrane
Outer envelope membrane
Chloroplast
Stroma
Thylakoid lumen
Thylakoid membrane
ctDNA
mRNA
70S ribosome
Intermembrane space
Free 80S ribosome
mRNA
Chaperone
Free precursor polypeptide
Cytosol
Stromal targeting domain
Hsp70 chaperone
Stromal targeting domain
Lumenal targeting domain
Cytosol
Hsp70 IAP
159
75
34
X
110
Intermembrane space
Hsp70 IAP
159
75
34
X
110
Stroma
Cleavage
Cleavage
Lumenal targeting domain of the transit peptide
ATP
ADP
1
3
Hsp60
2
Chaperone
ATP
ADP
Thylakoid lumen
Folded protein
Folded protein in stroma
Thylakoid membrane
Sub-unidade menor da Rubisco

(B) Membrane-bound ribosomes





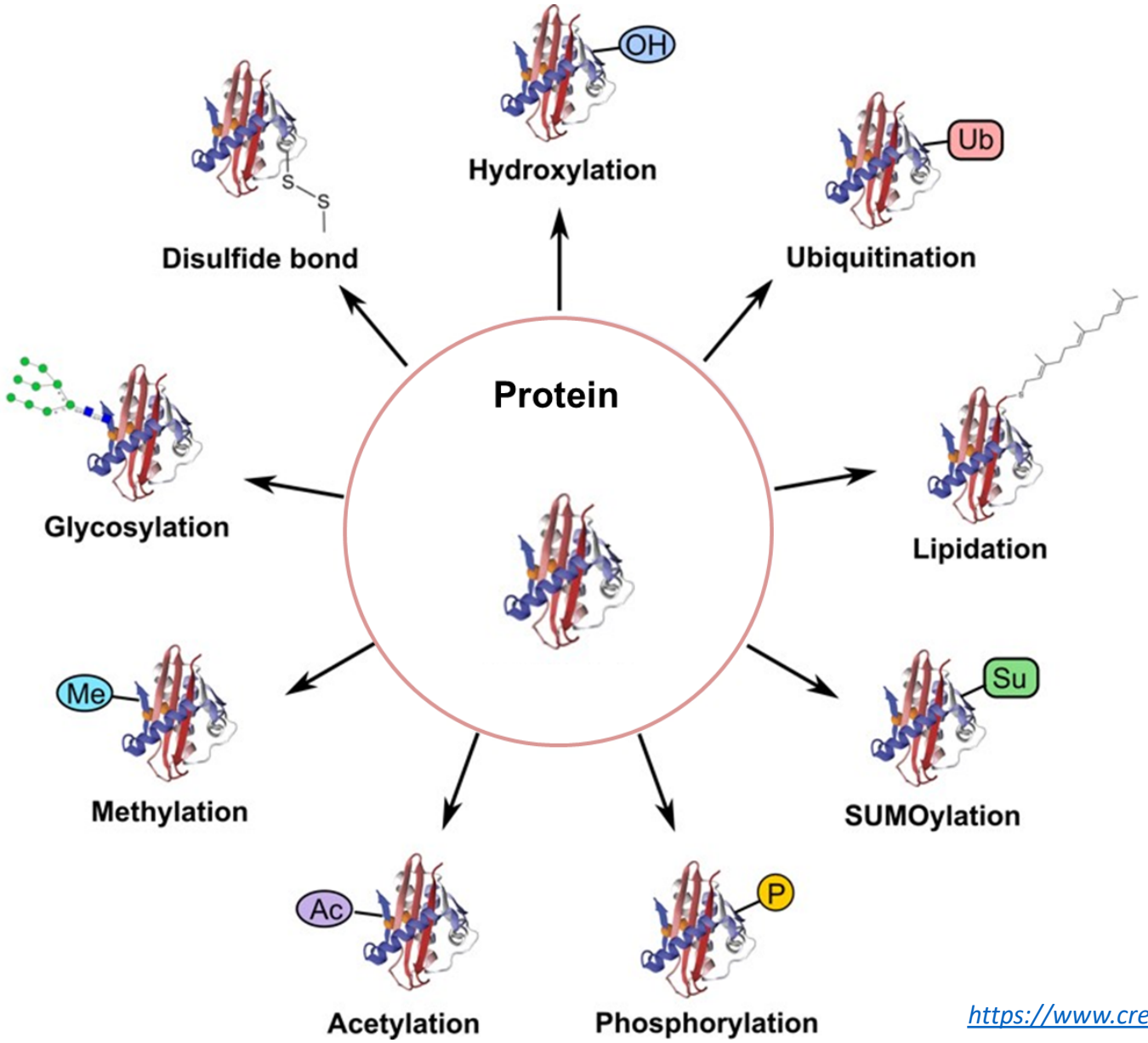




6. Controle pós-traducional

Modificação das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos

Tipos de modificações



~60 ~100 aa

Ubiquitination vs SUMOylation

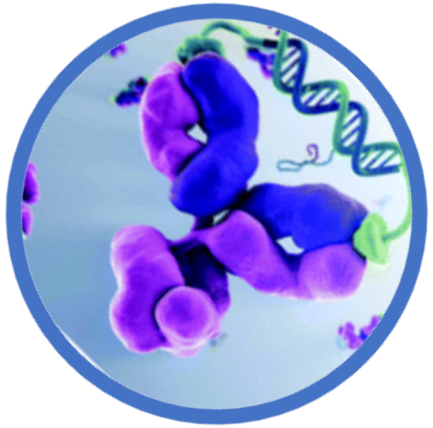
More Information Online WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM

	Ubiquitination	SUMOylation
DEFINITION	Ubiquitination is a post translational modification which covalently conjugates ubiquitin to proteins	SUMOylation is a post translational modification which adds SUMOs to proteins
MODIFIER	Ubiquitin	SUMO
MARKING PROTEINS FOR DEGRADATION	Can tag proteins for degradation	Not used in cells to mark proteins for degradation
IMPORTANCE	Targeting proteins for proteolytic degradation by proteasome and regulate localization and/or activity independent of proteolysis	Important roles in gene expression, chromatin structure, signal transduction, and maintenance of the genome
MODIFICATION	Covalently conjugate ubiquitin to proteins	Adds SUMOS to proteins

https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/strategies-for-post-translational-modifications-ptms/

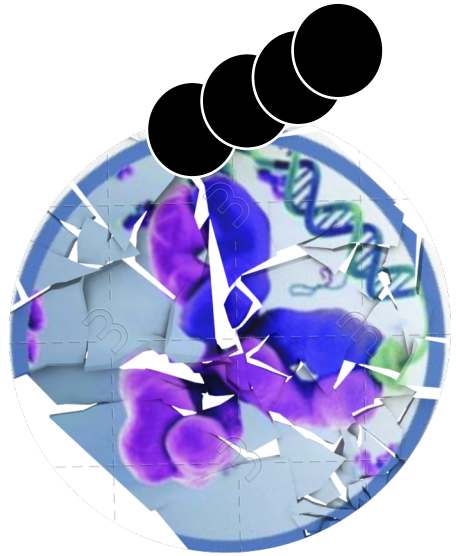
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier protein

Dois níveis de regulação pós-traducional



Função

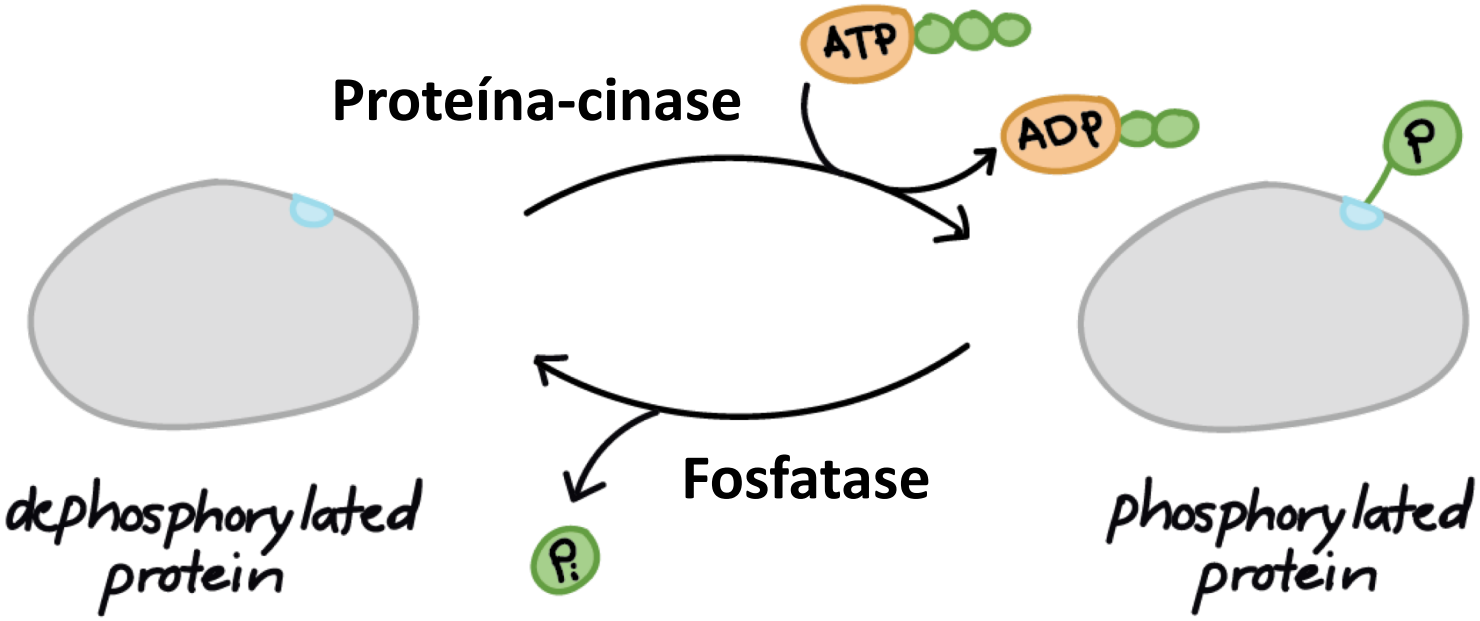
- Atividade
- Interação
- Localização



Proteólise
Ubiquitinação

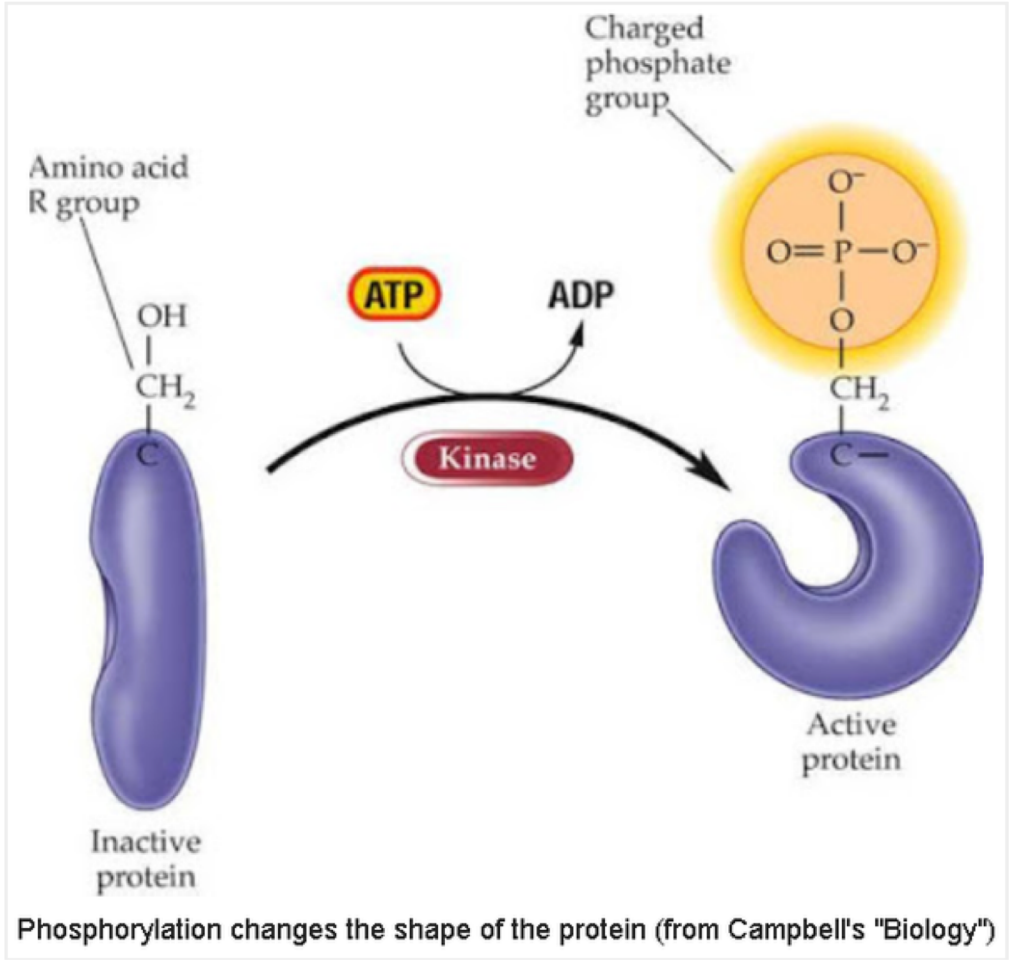
(Des-)Fosforilação

- Adicionado pelas **proteínas-cinase** e removido pelas **fosfatases**

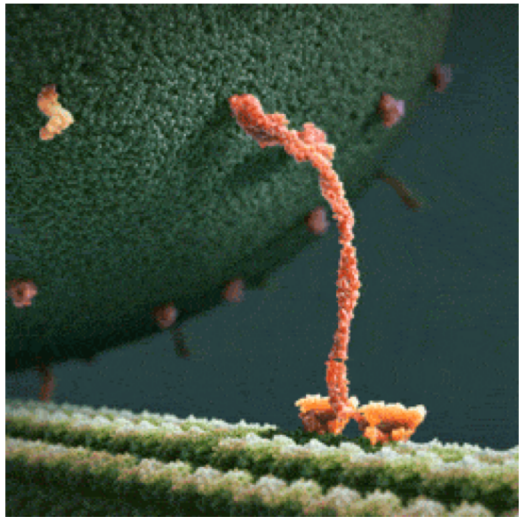


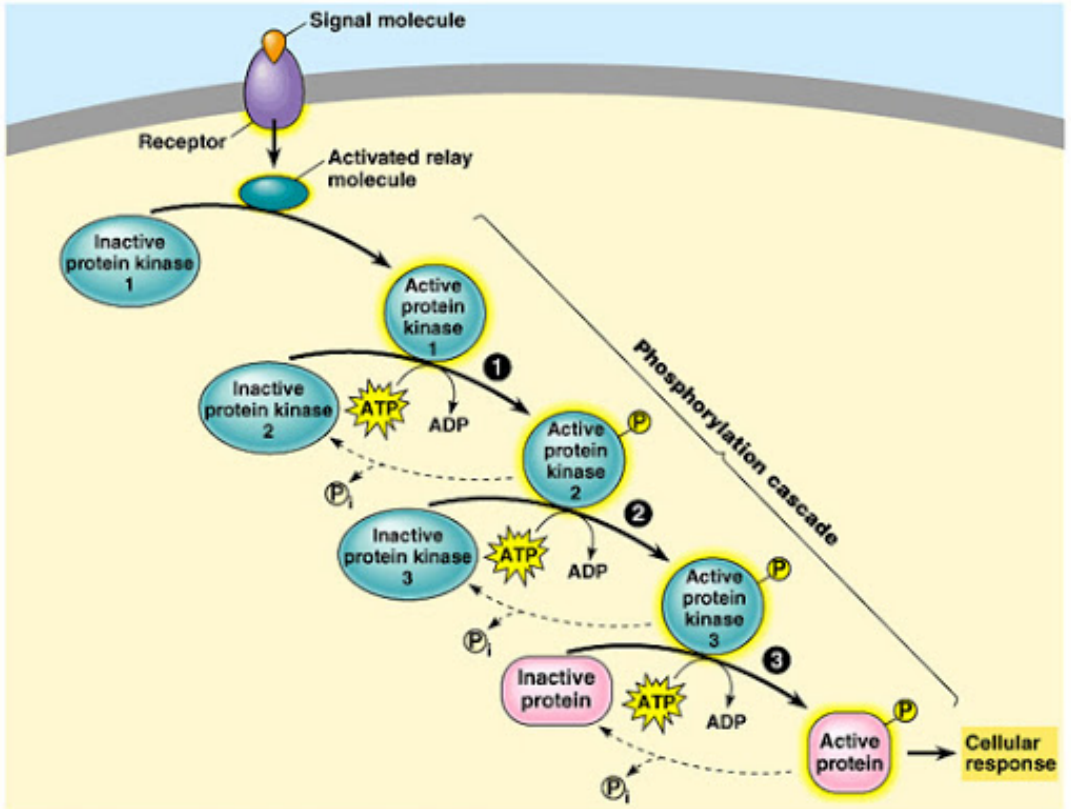
Khan Academy

(Des-)Fosforilação

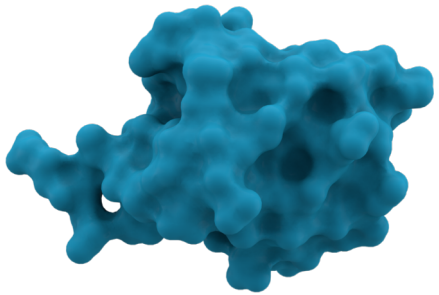


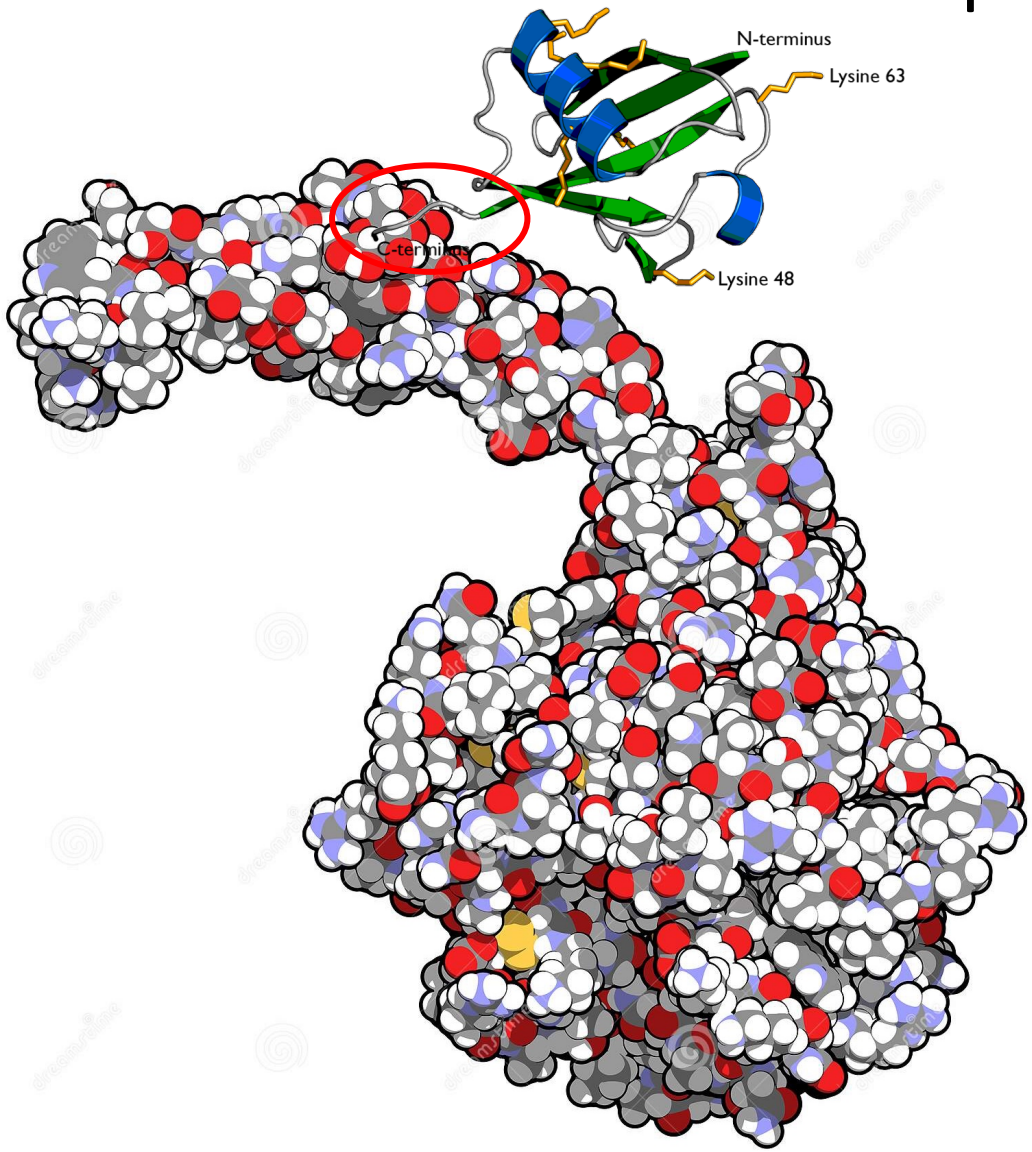
Phosphorylation changes the shape of the protein (from Campbell's "Biology")

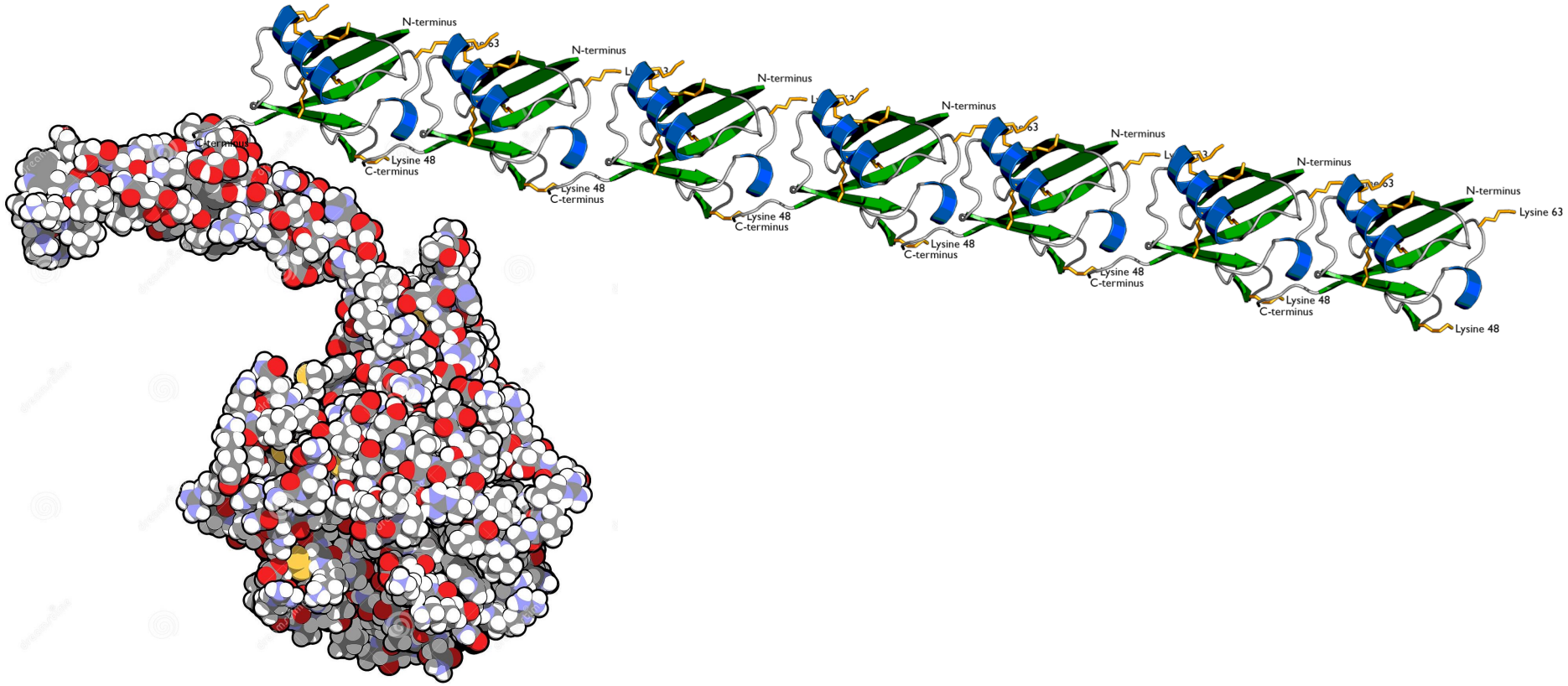


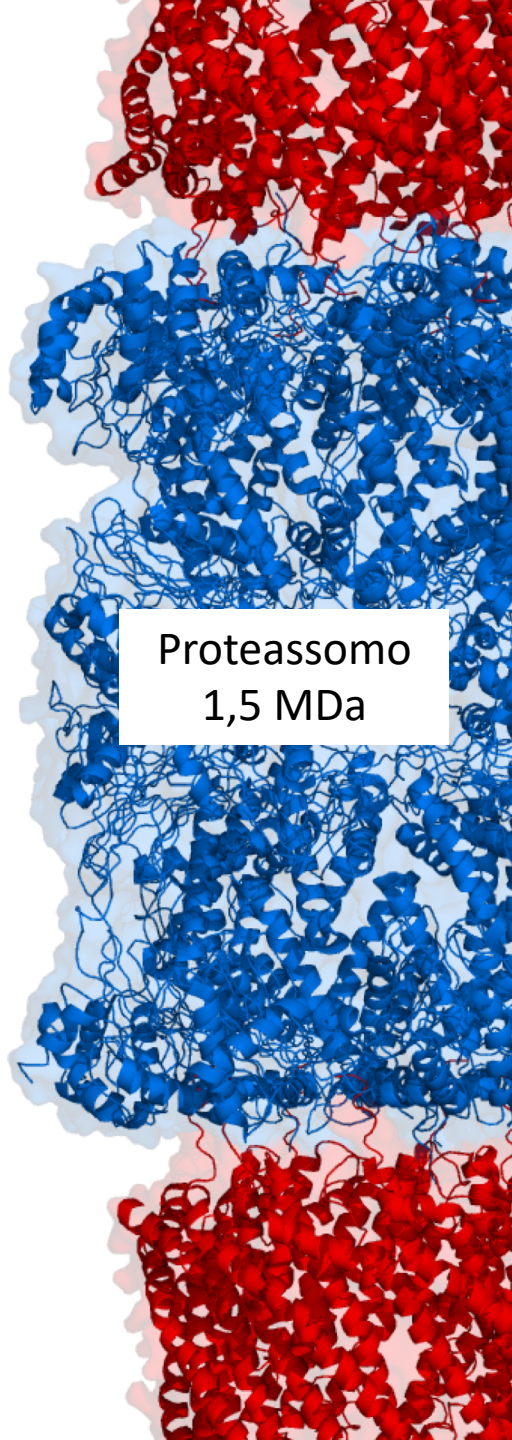


Ubiquitina







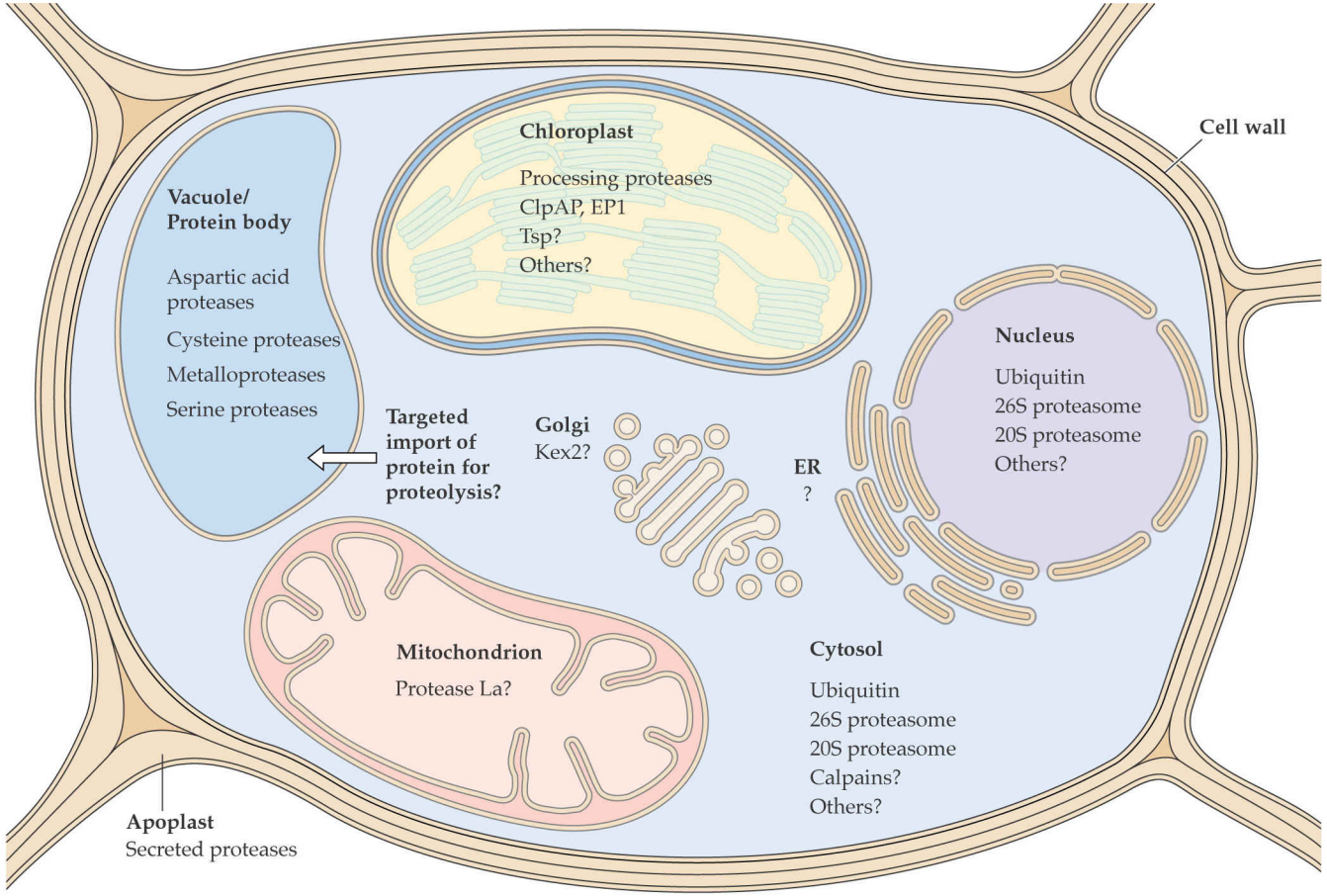


Proteassomo
1,5 MDa

A via da ubiquitina-proteassomo

https://www.youtube.com/watch?v=Si0tA-ej3So

Controle pós-traducional: degradação



- **A degradação é muito controlada e consome ATP.**
- **A seq. N terminal determina a vida média da proteína:**
  - **PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) é um sinal de proteólise.**
  - **Acetilação confere estabilidade.**
  - **AAs hidrofóbicos expostos é sinal de unfolded protein.**

OBRIGADA!

Epigenetics:
https://www.youtube.com/watch?v=eYrQ0EhVCYA

Splicing:
youtube.com/watch?v=CdwLKwseP9Q&ab_channel=HealthCare

Ubiquitin:
youtube.com/watch?v=Si0tA-ej3So&ab_channel=CristianeCalixto