

Metilação do DNA, histonas e remodelamento da cromatina

Departamento de Bioquímica - USP



Bibliografia:

Capítulo 8: Genome structure, chromatin and the nucleosome.

Pgs. 220-249

Capítulo 19: Transcriptional regulation in Eukaryotes.

Molecular Biology of the Gene. J.D. Watson, T.A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick. CSH Press, 7th edition (2013).

Existe uma diferença fundamental entre a transcrição em procariotos e eucariotos

- O estado basal em procariotos é permissivo porque o DNA está acessível para a maquinaria de transcrição
- O estado basal em eucariotos é restritivo porque o DNA está embebido na cromatina, que precisa ser re-estruturada para que ocorra transcrição.

Meta: entender como células eucarióticas regulam a estrutura da cromatina para que as proteínas que se ligam ao DNA possam interagir com as sequências envolvidas no controle da expressão gênica.

Objetivos:

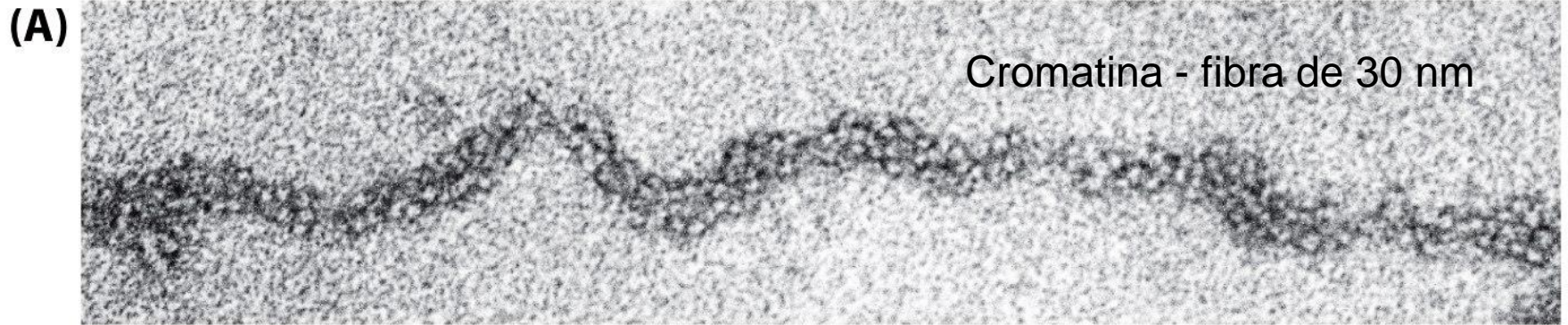
1. Descrever 3 maneiras utilizadas pelas proteínas remodeladoras de cromatina para reposicionar nucleossomos.
2. Explicar como HATs e HDACs alteram a estrutura da cromatina.
3. Entender a hipótese do “código de histonas”.
4. Explicar como um ativador, remodelador de nucleossomo e HAT atuam sucessivamente para controlar a expressão gênica.
5. Explicar como genes são transcricionalmente silenciados através da formação de heterocromatina e como a metilação do DNA afeta a expressão gênica em mamíferos.

1. Revisão da estrutura da cromatina

2. Remodeladores dependentes de ATP, HATs e HDACs

3. Silenciamento gênico: heterocromatina e metilação do DNA.

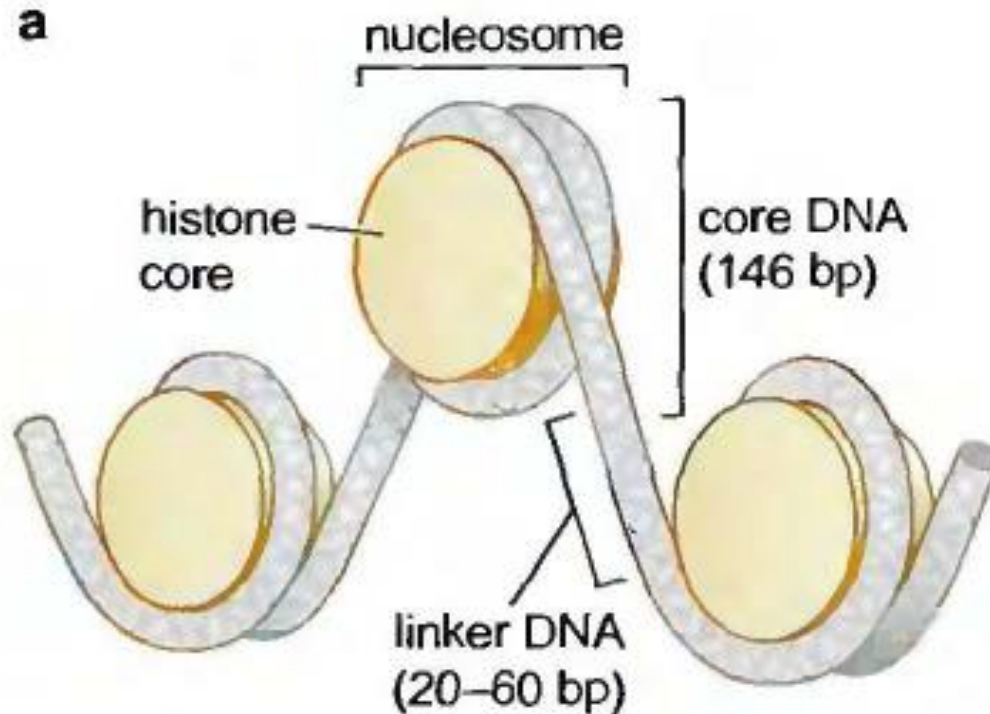
O DNA eucariótico não está livremente acessível –
sítios regulatórios estão “enterrados” na cromatina



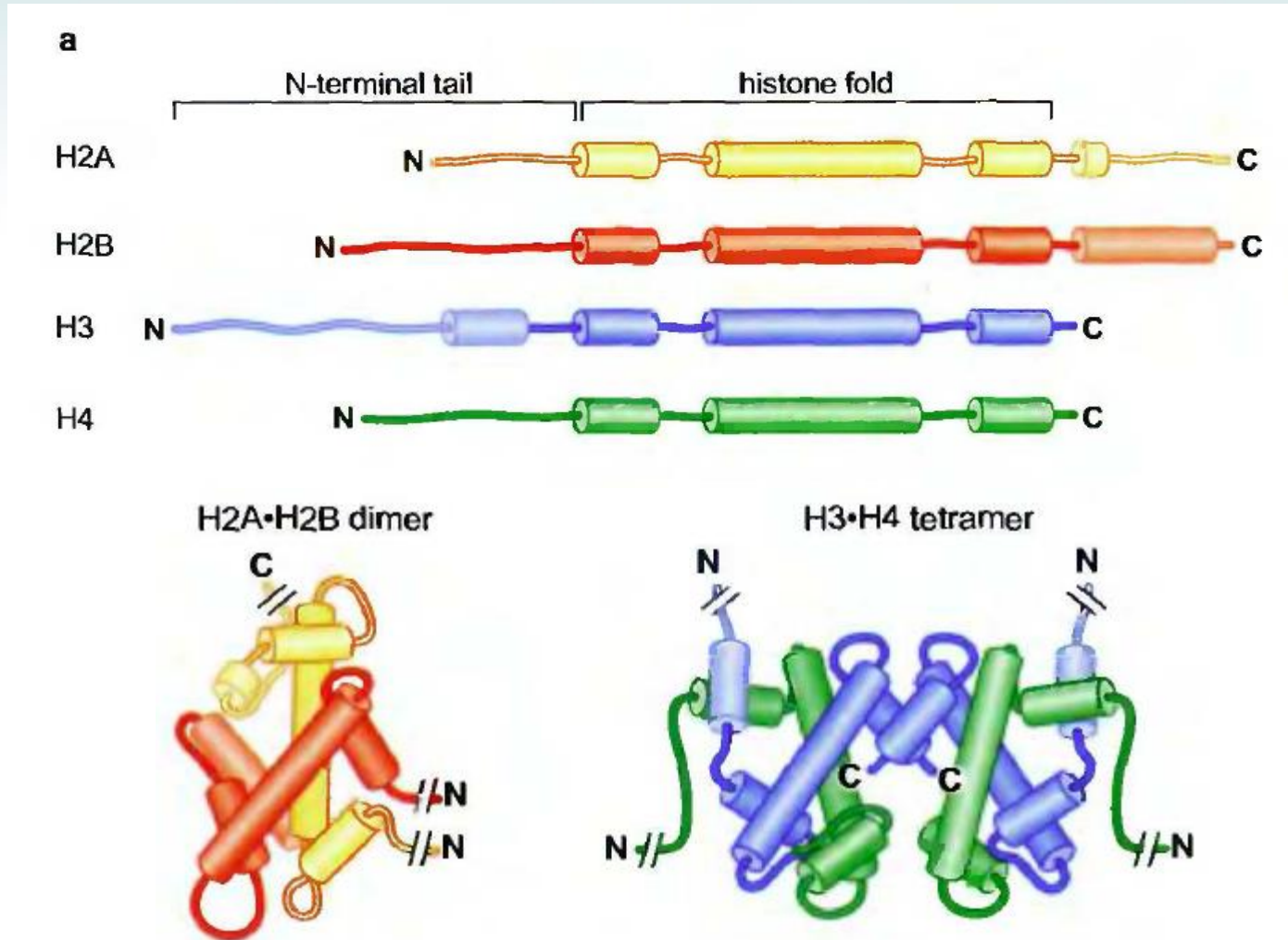
50 nm

DNA de eucariotos está na forma de cromatina

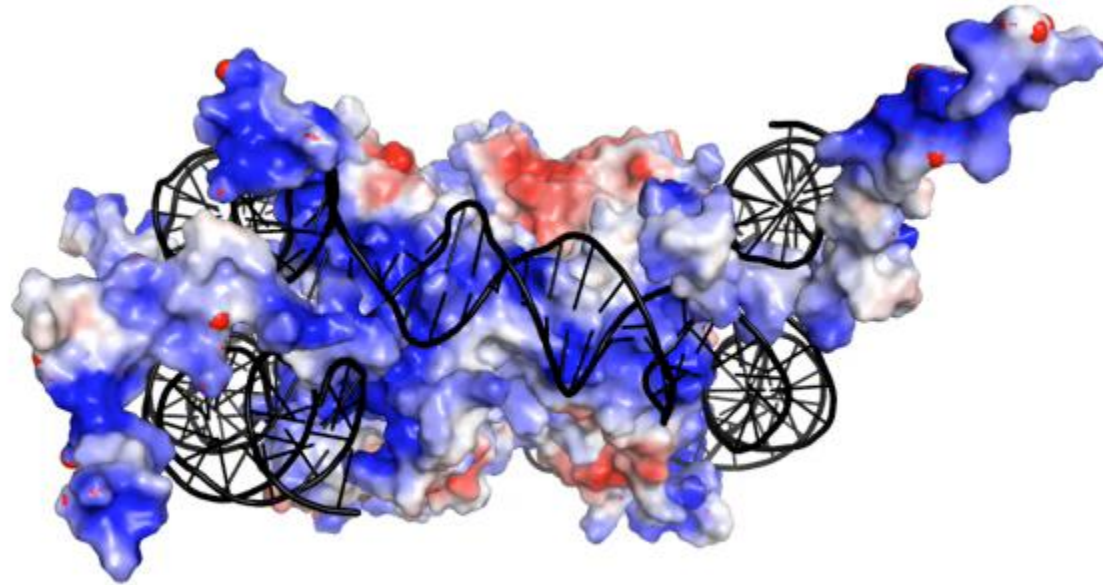
- A cromatina é formada por nucleossomos



- Histonas nucleossomais



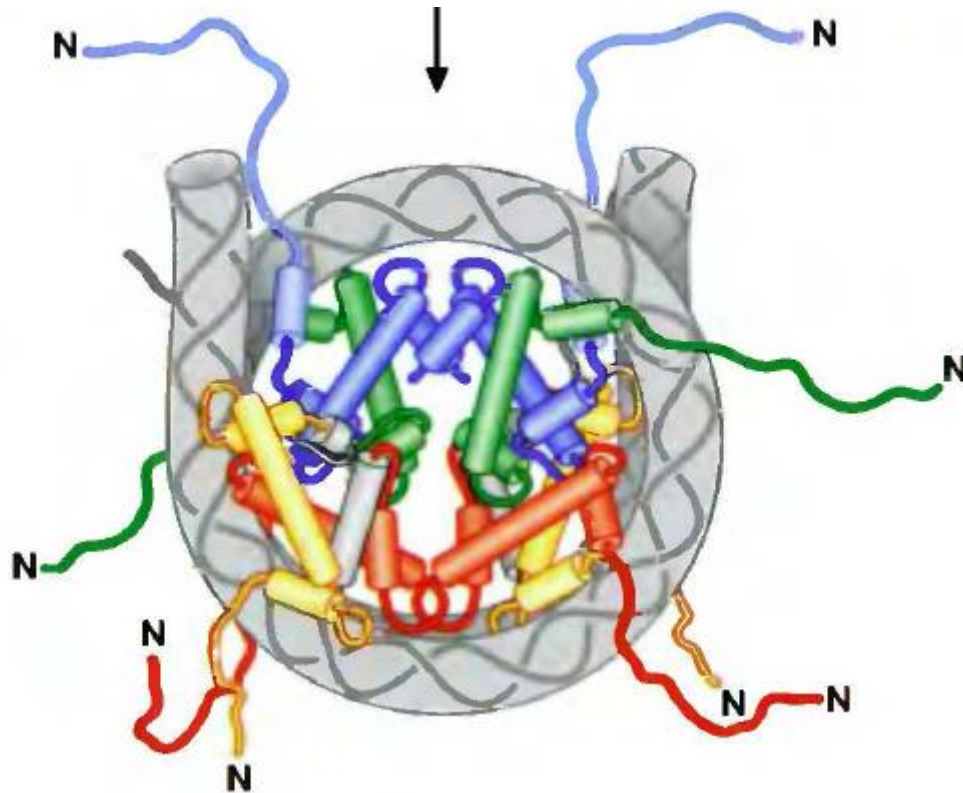
As histonas tem carga positiva



Proteínas básicas (carga +)
20% (lisinas e arginas)
Interagem com DNA (carga -)

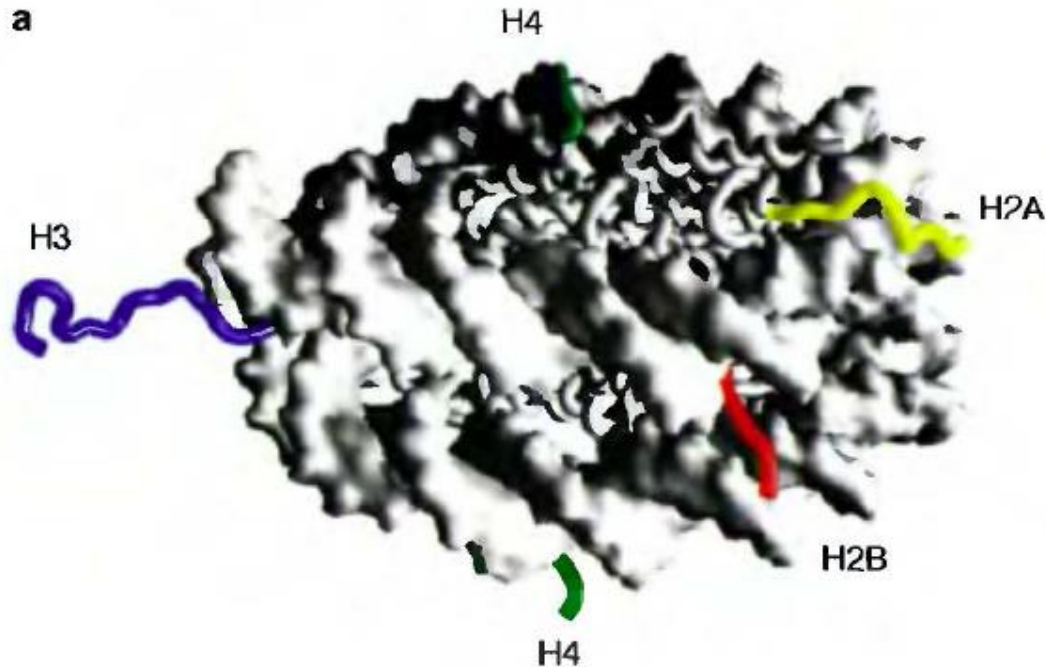
DNA de eucariotos está na forma de cromatina

- Histonas nucleossomais



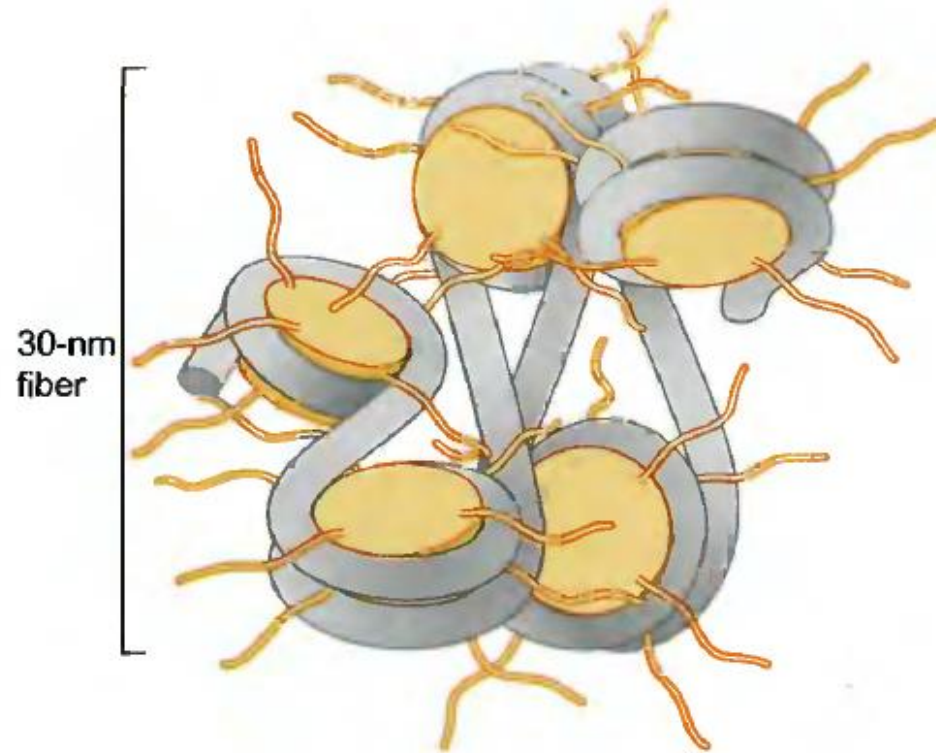
DNA de eucariotos está na forma de cromatina

- As caudas das histonas estabilizam o enrolamento do DNA em volta do octâmero



DNA de eucariotos está na forma de cromatina

- As caudas das histonas são necessárias para a formação da fibra de 30nm



1. Revisão da estrutura da cromatina
- 2. Remodeladores dependentes de ATP, HATs e HDACs**
3. Silenciamento gênico: heterocromatina e metilação do DNA.

A cromatina é dinâmica

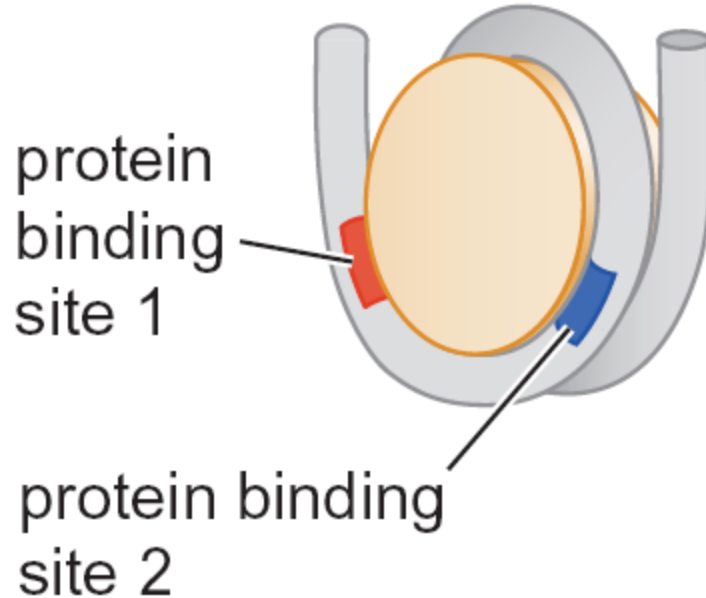
É frequentemente remodelada, com os nucleossomos sendo deslocados e modificados.

Os nucleossomos são alterados de duas maneiras:

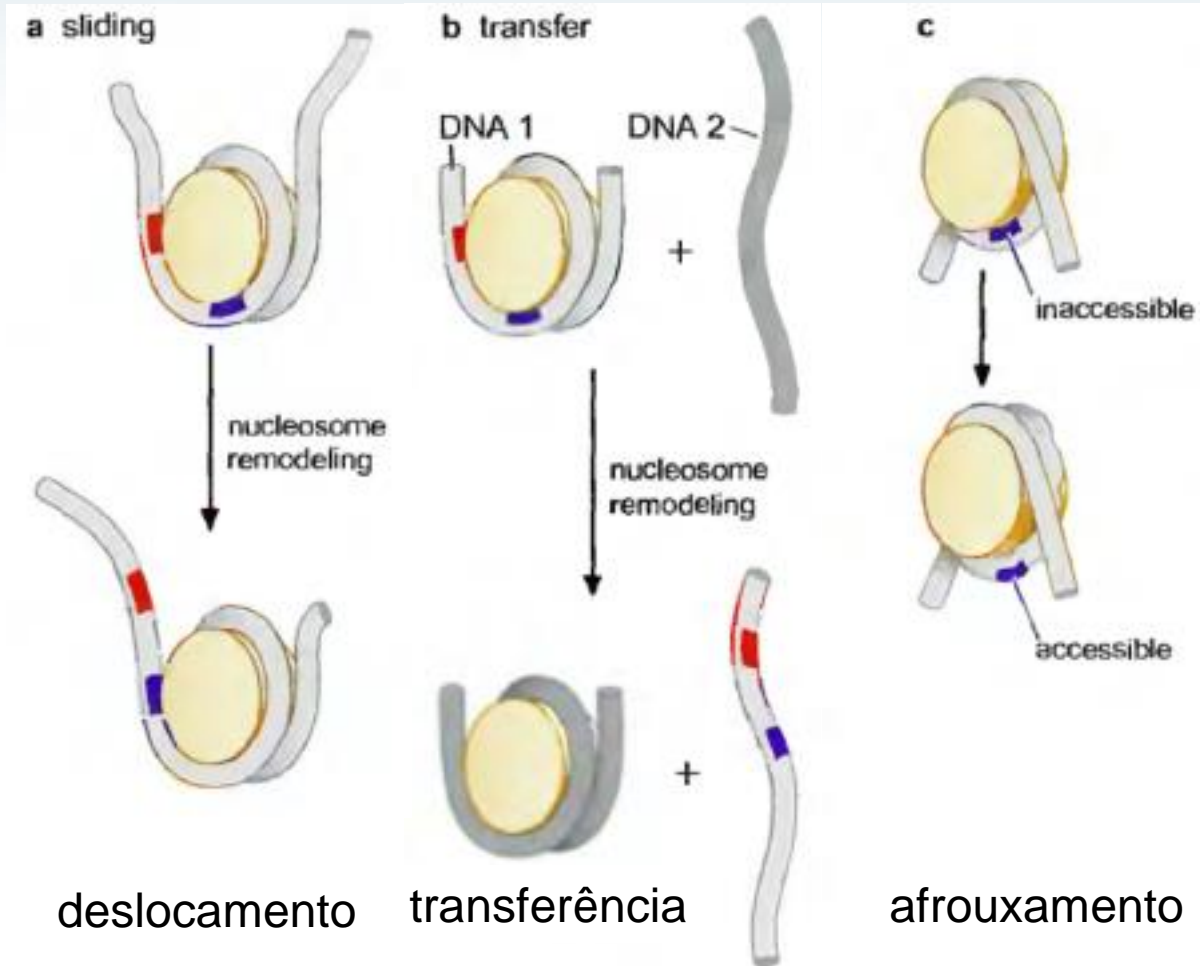
- ✓ Alterações não covalentes
- ✓ Alterações covalentes

Modificações não covalentes

- **Complexos remodeladores de nucleossomos dependentes de ATP** causam o reposicionamento dos nucleossomos.



Modificações não covalentes



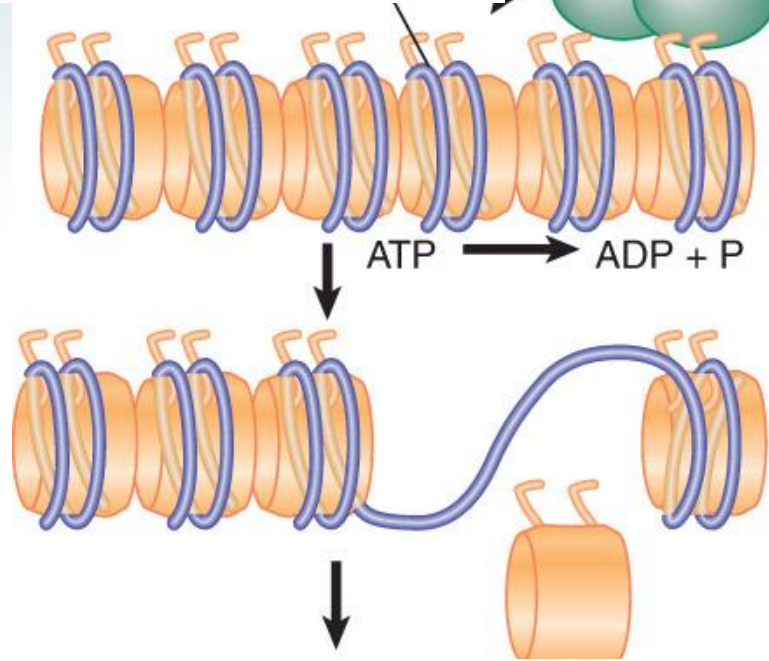
Complexos remodeladores de nucleossomos dependentes de ATP causam o reposicionamento dos nucleossomos.

Remodelamento de nucleossomos é um processo ativo

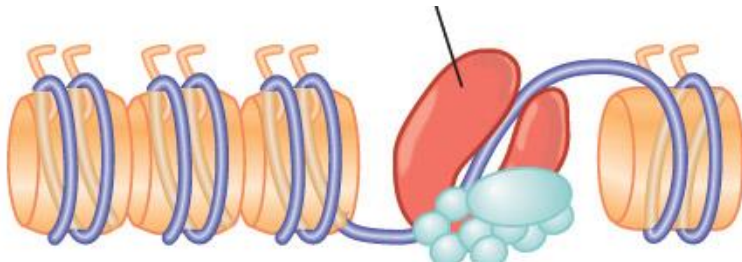
- Deslocamento ou reorganização dos nucleossomos depende de gasto de energia
- Existem vários complexos remodeladores de cromatina dependentes de ATP
- Todos os complexos contêm uma subunidade catalítica com atividade de ATPase e são agrupados em famílias de acordo com o grau de homologia entre as ATPases
- Não modificam covalentemente as histonas

Remodelamento da Cromatina

Complexo remodelador desloca octâmero

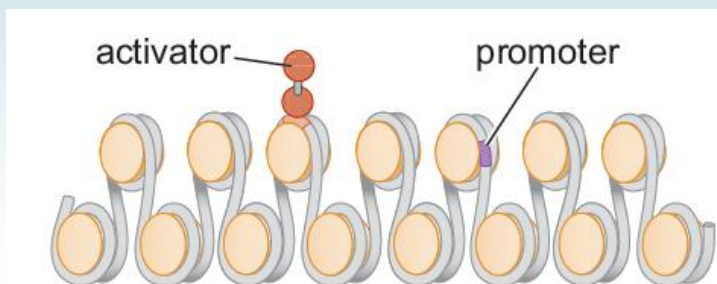


Fatores de transcrição e RNA polimerase se ligam ao promotor

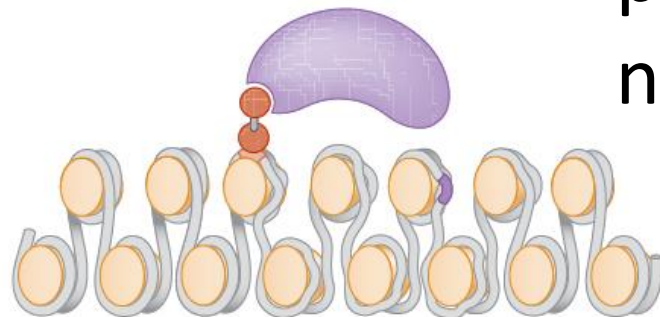
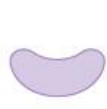


- Reorganização dos nucleossomos para ativação da transcrição
- Processo ativo
 - hidrólise de ATP

Ativadores podem afetar a estrutura da cromatina



chromatin-remodeling complex



remodeled nucleosomes

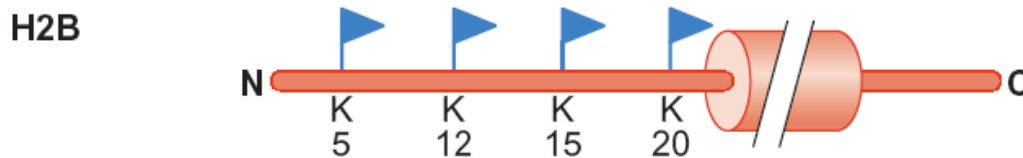


transcriptional machinery binds promoter

Repressores também podem reposicionar nucleossomos...

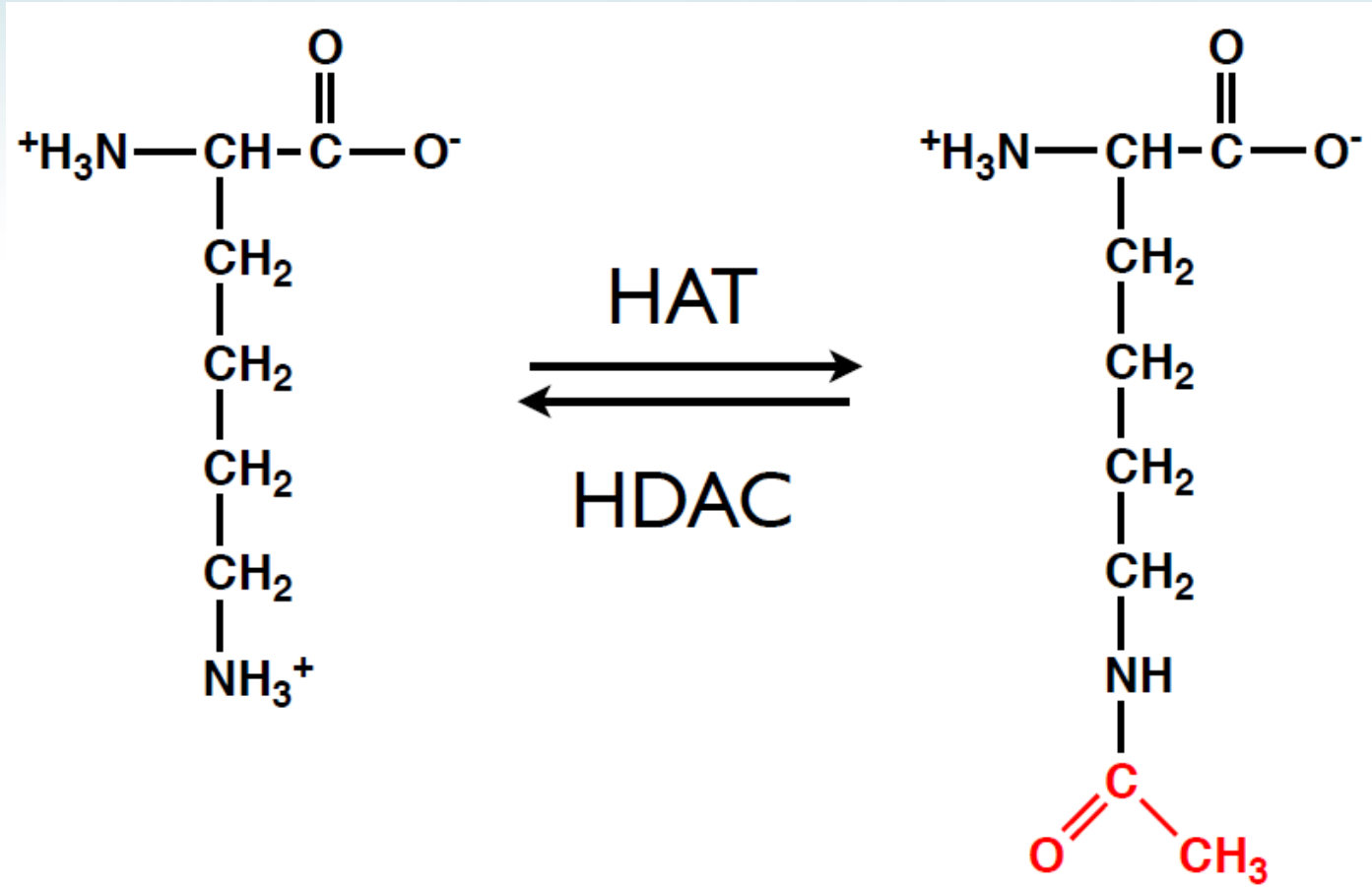
Modificações covalentes

Enzimas modificadoras de histonas como histona acetil transferases (HATs) e histona deacetilases (HDACs) adicionam e removem grupos acetil dos resíduos de lisina presentes nas caudas N-terminais das histonas.

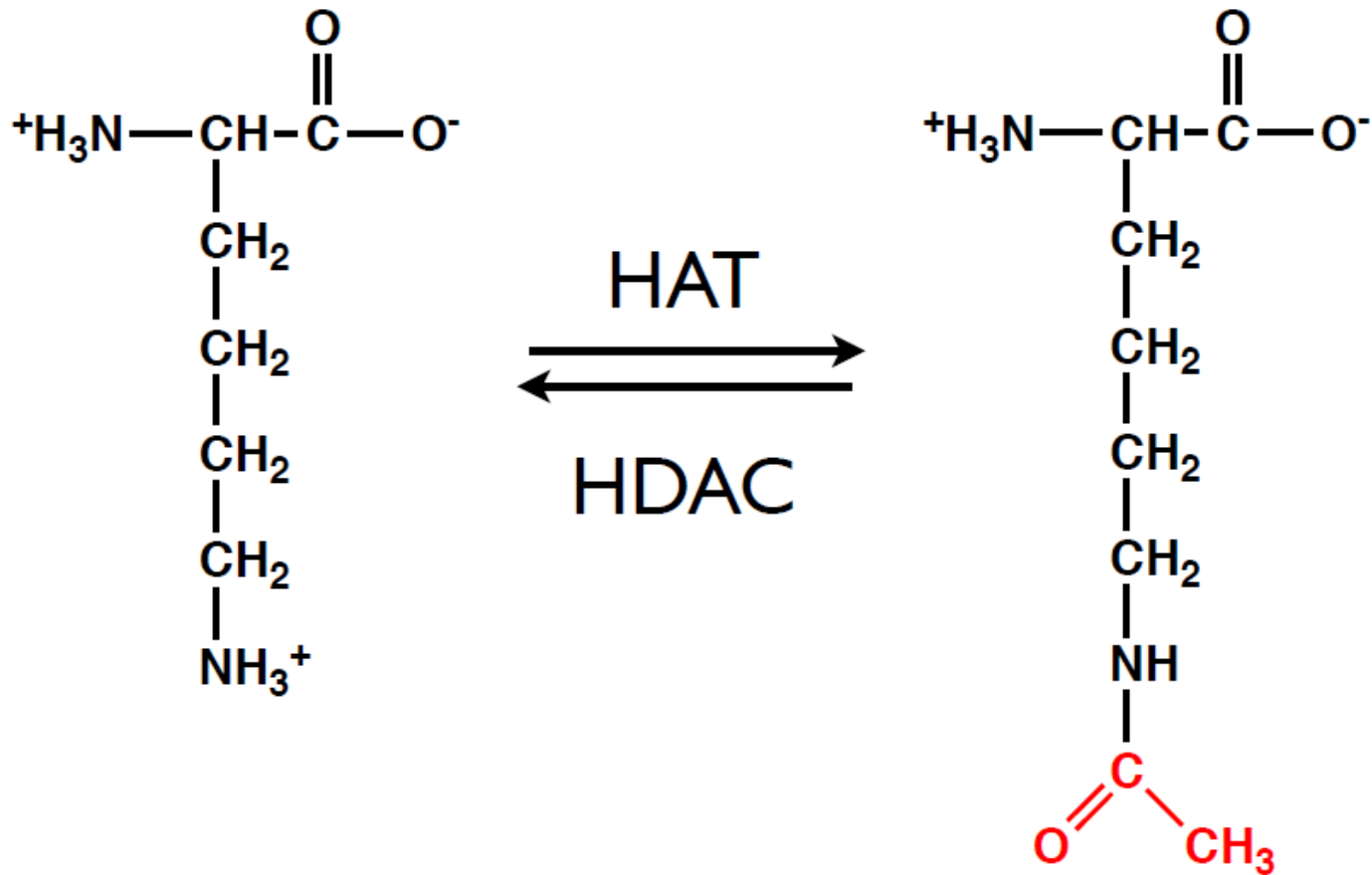


Estas modificações afetam a compactação da cromatina.

Histona acetil transferases acetilam o grupo ϵ -amino da lisina



... e as histona desacetilases removem grupos acetil da lisina.

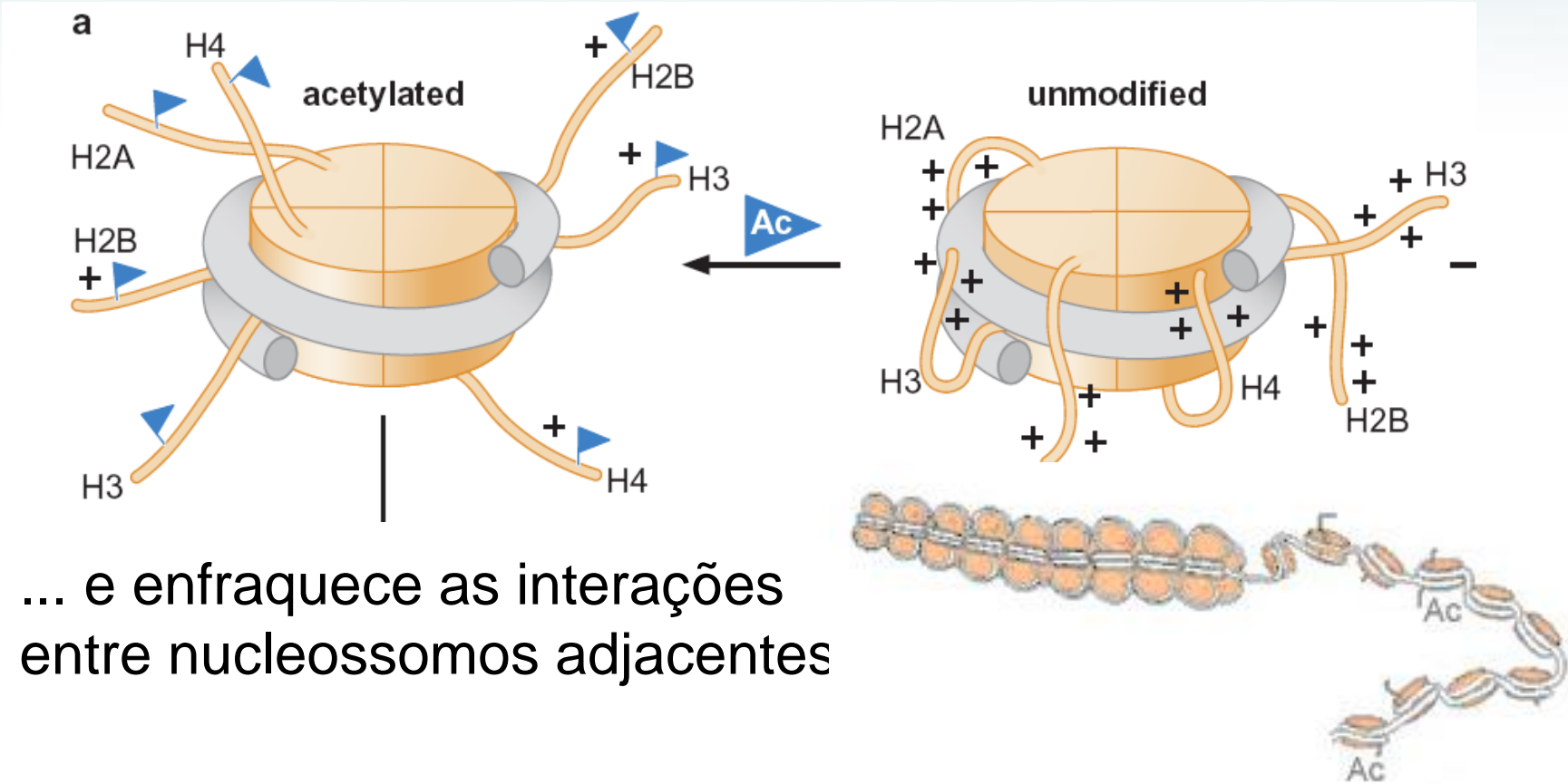


Qual é o impacto da acetilação sobre a estrutura da cromatina?

1) Compactar a cromatina ou

2) Descompactar a cromatina?

A acetilação diminui a afinidade das histonas pelo DNA...

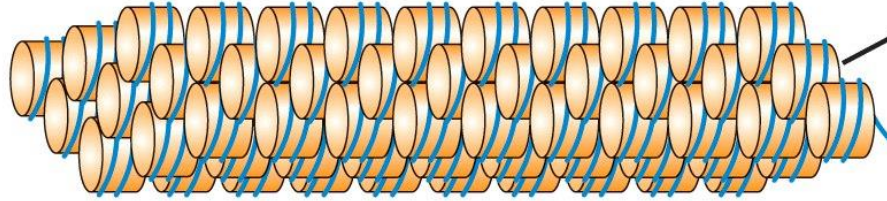


... e enfraquece as interações entre nucleossomos adjacentes

Regulação da estrutura da cromatina por modificações nas histonas

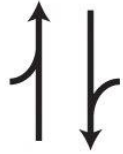
Geralmente...

Cromatina condensada : inativa



DNA - ACESSÍVEL

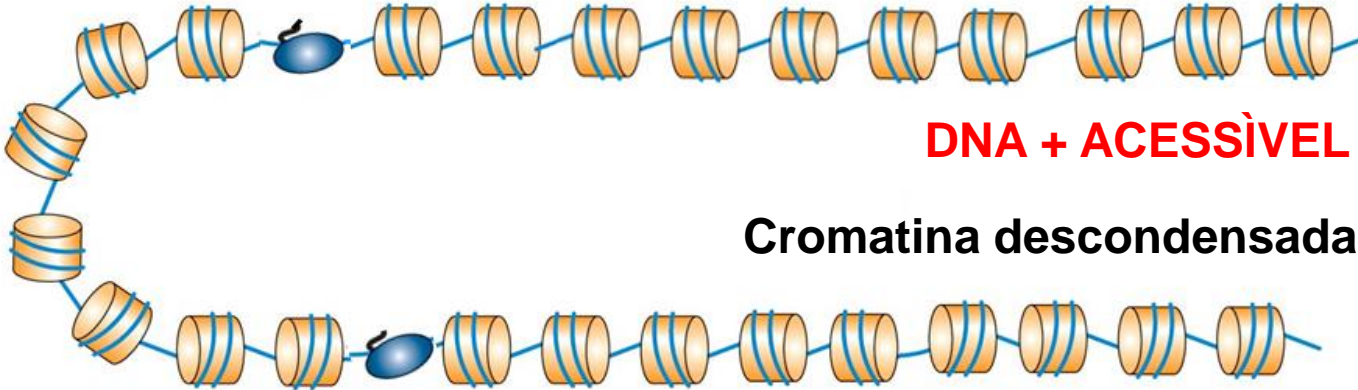
Desacetilação de histonas,






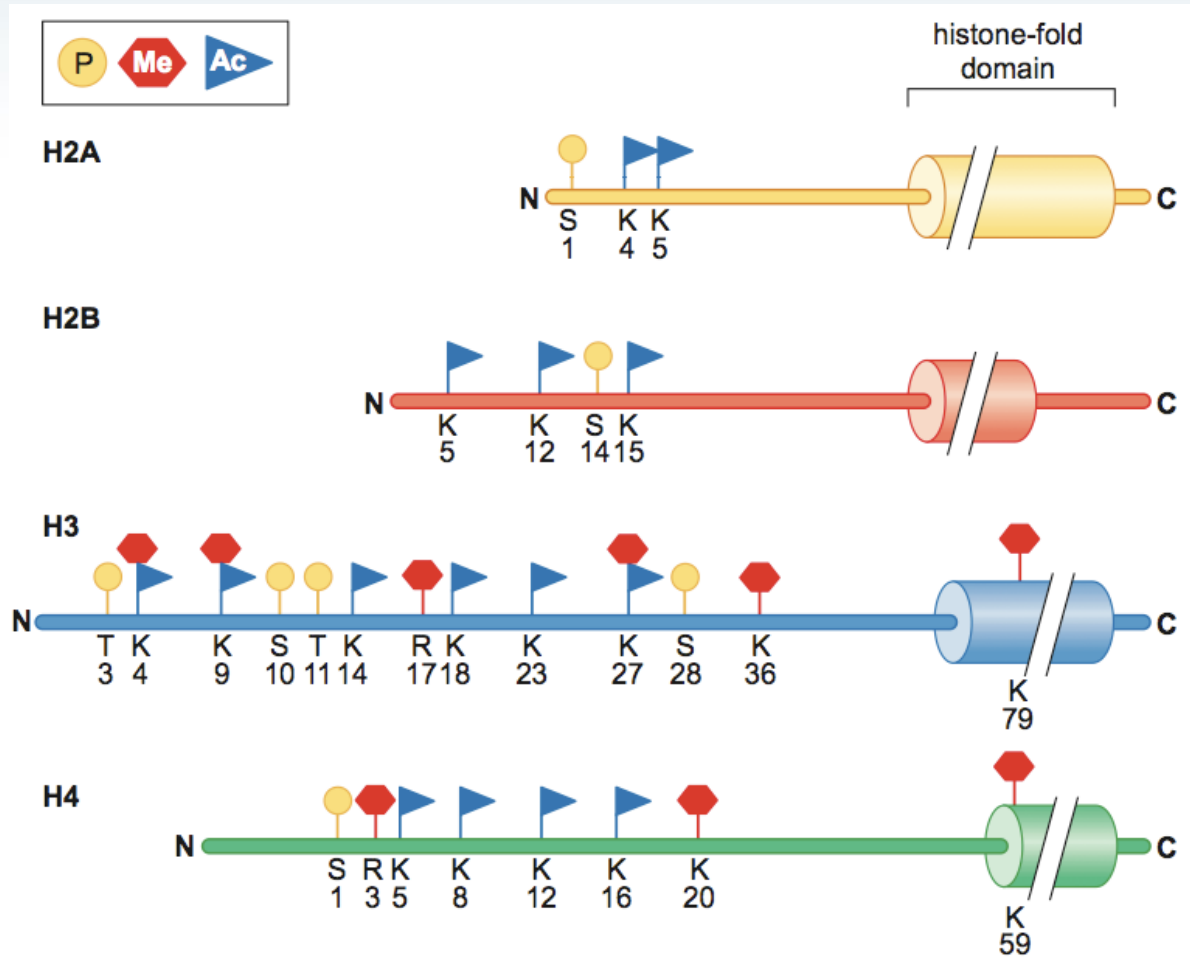
Acetilação de histonas

DNA + ACESSÍVEL

Cromatina descondensada: ativa

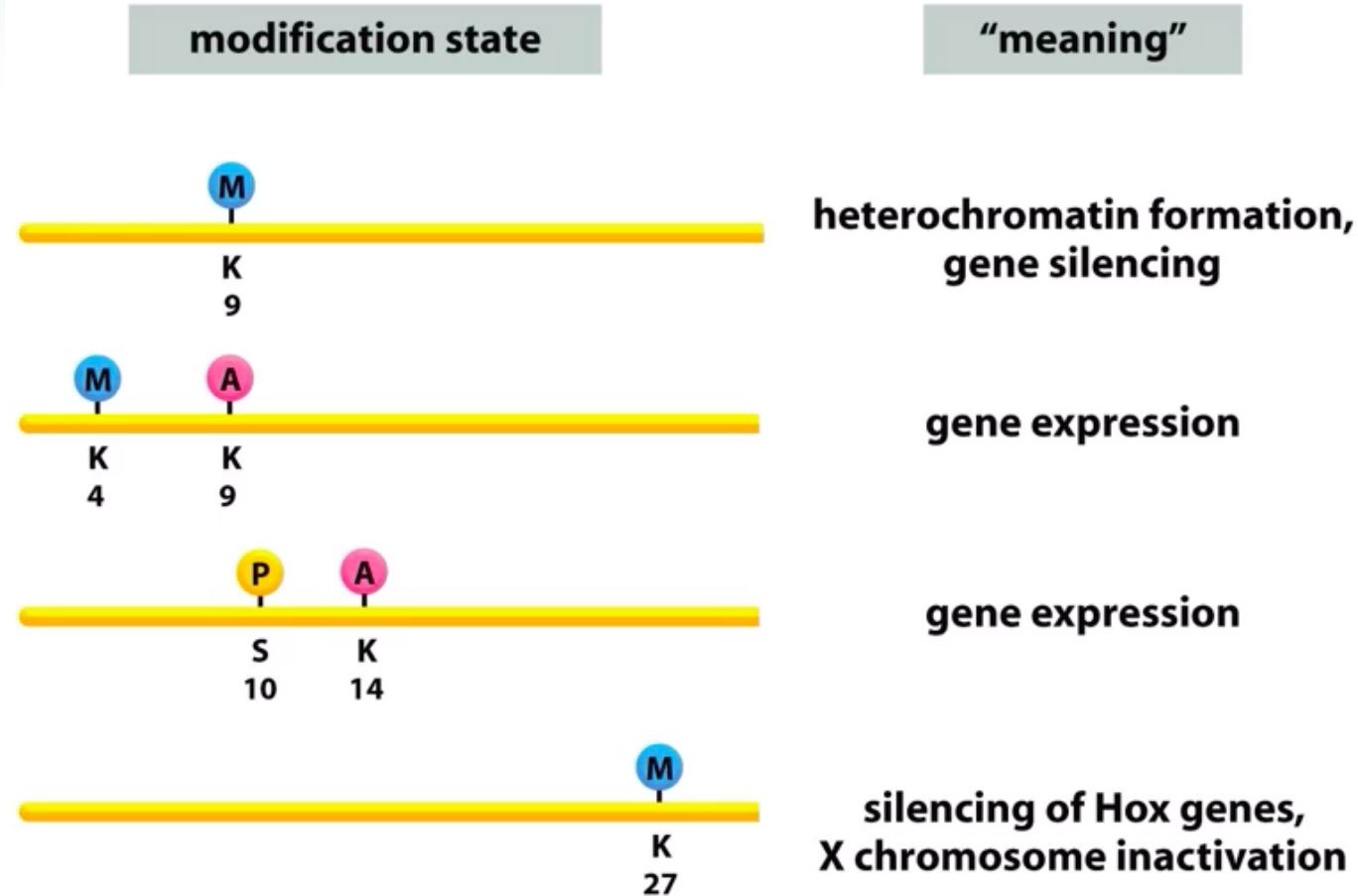


Além de acetilação (), as histonas podem sofrer metilação () e fosforilação () por outras enzimas modificadoras de histonas

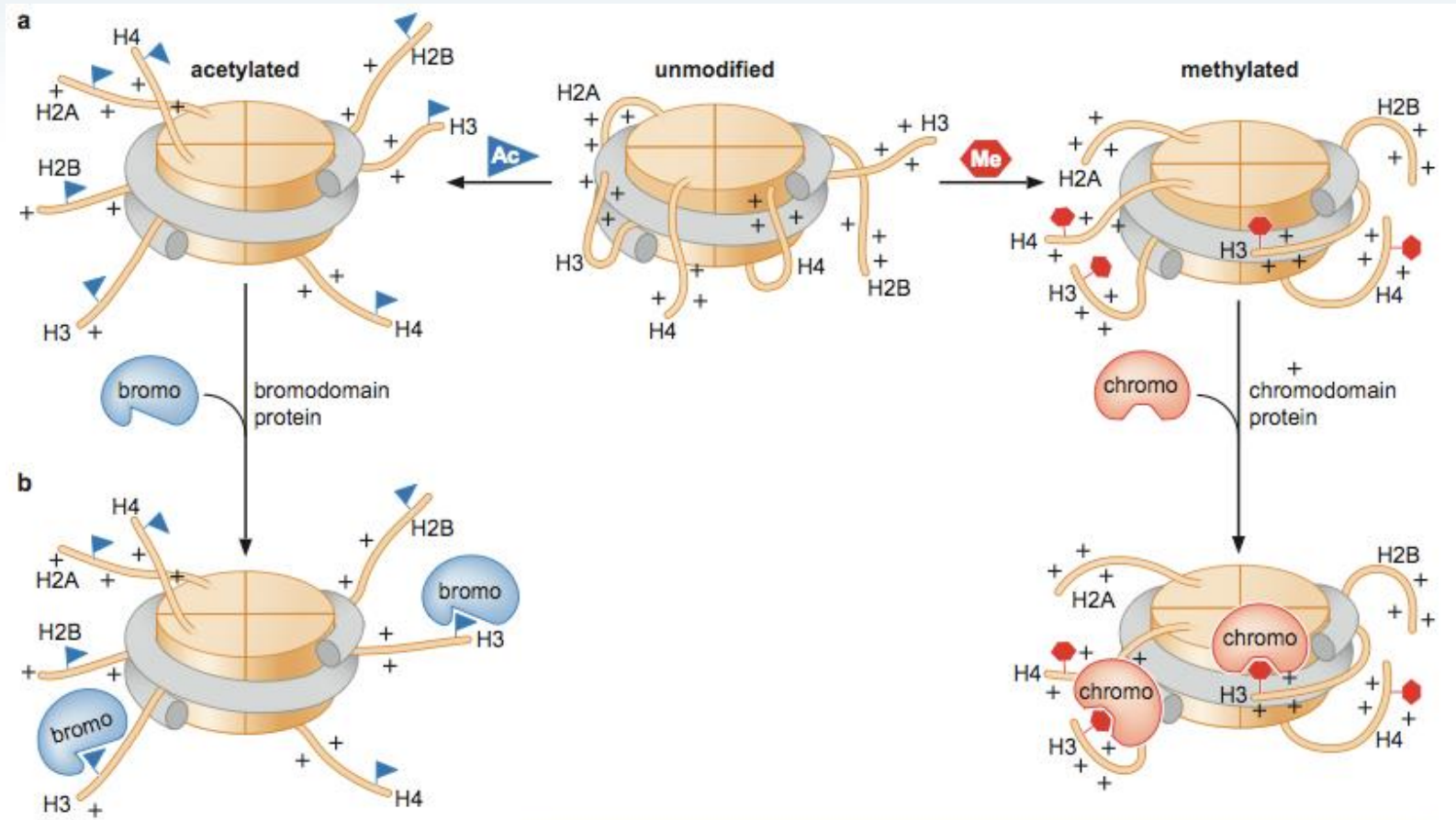


Combinações de modificações específicas definem a função de regiões locais da cromatina.

Código das histonas (ex: H3)

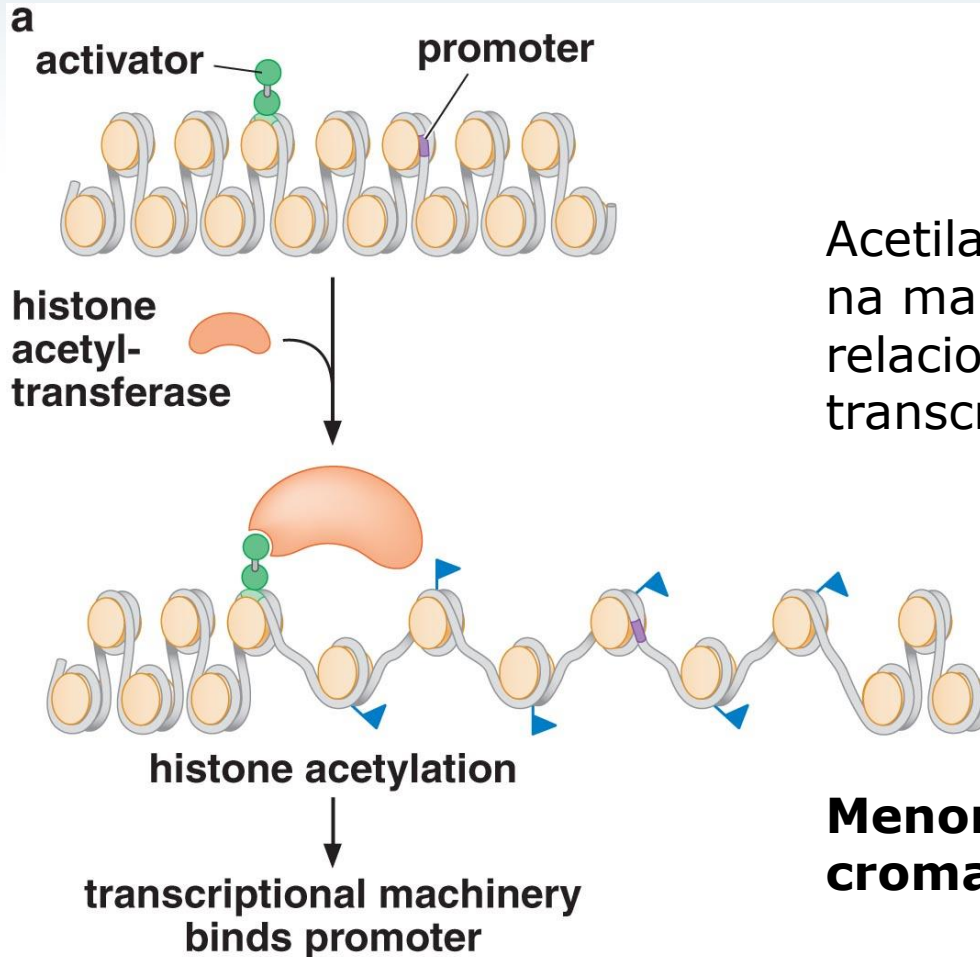


A modificação das histonas pode recrutar proteínas específicas para a cromatina.



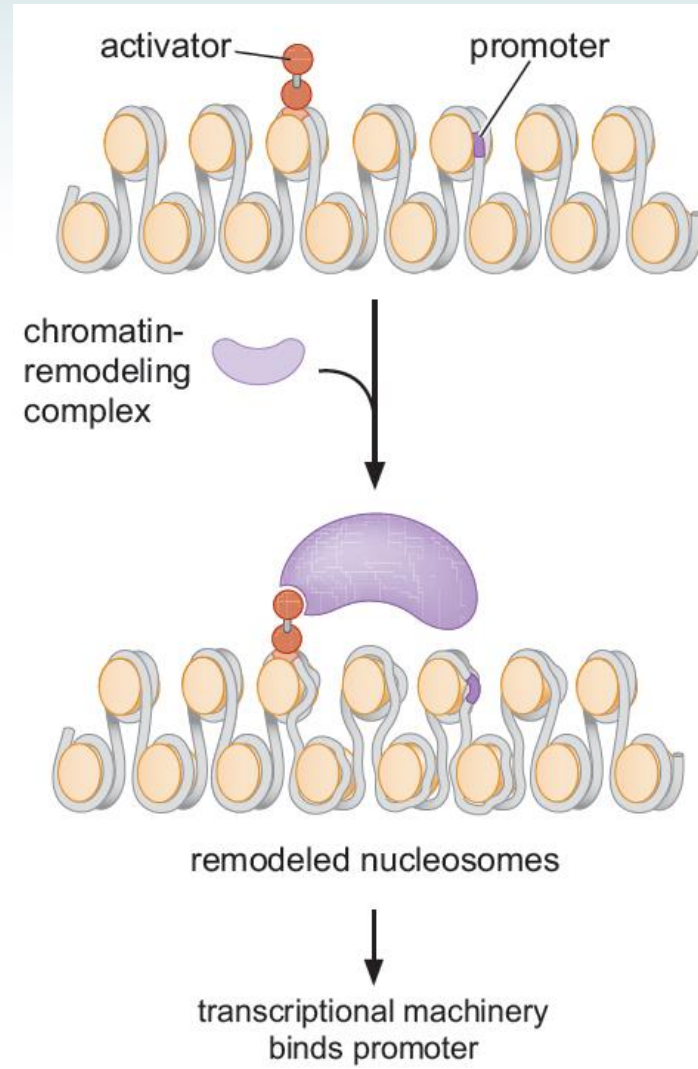
**Como as proteínas regulatórias
(ativadores e repressores) afetam a
estrutura da cromatina?**

Ativadores podem afetar a estrutura da cromatina



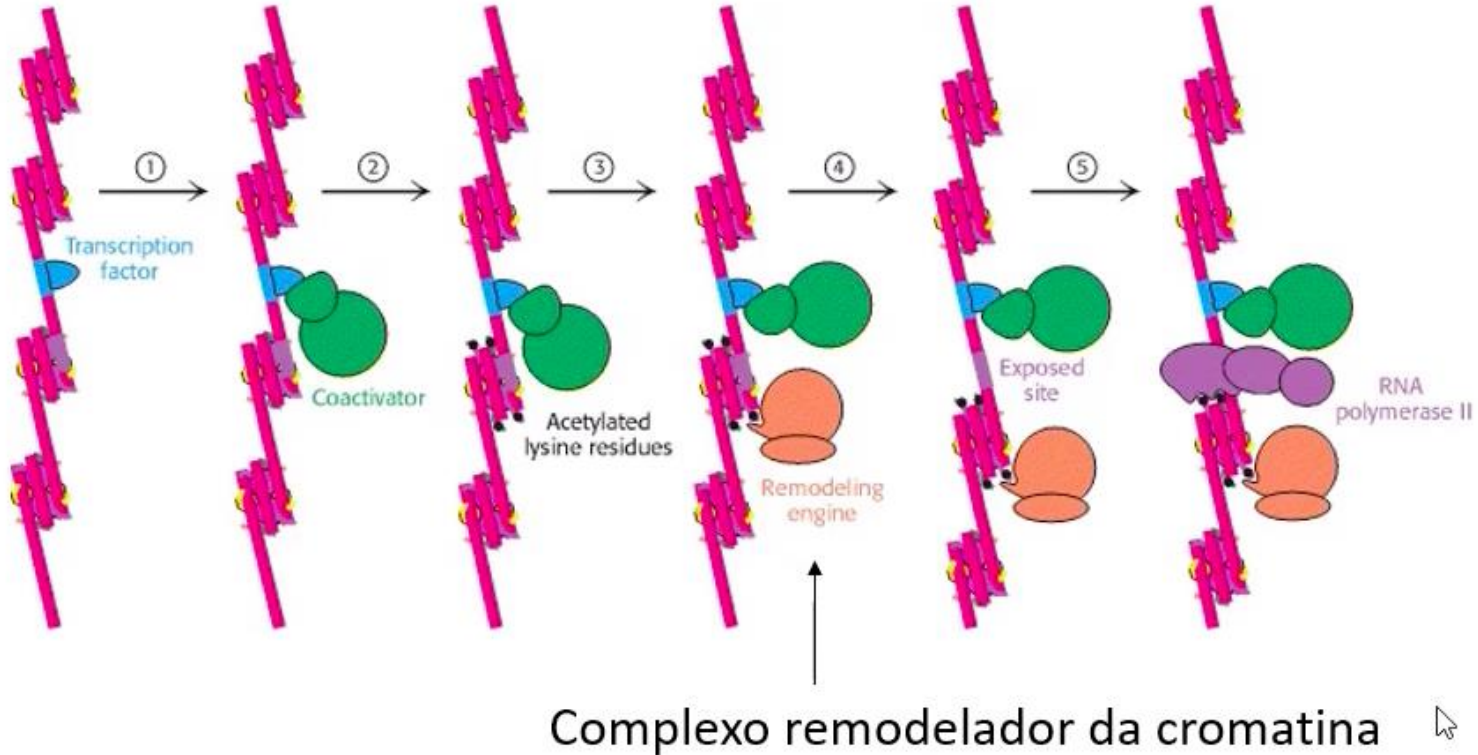
Acetilação está, na maioria dos casos, relacionada com regiões transcricionalmente ativas:

Ativadores podem afetar a estrutura da cromatina



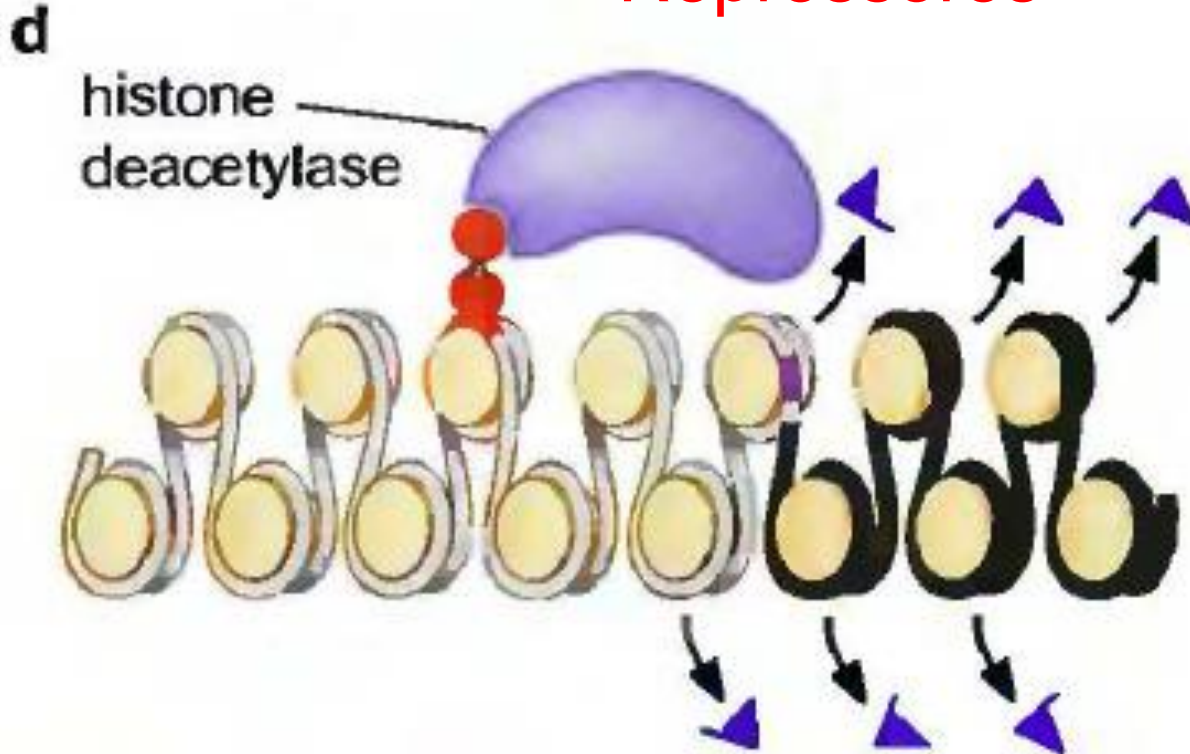
Diferentes eventos podem resultar na acessibilidade do DNA para a transcrição

Remodelamento de cromatina



Repressores podem afetar a estrutura da cromatina

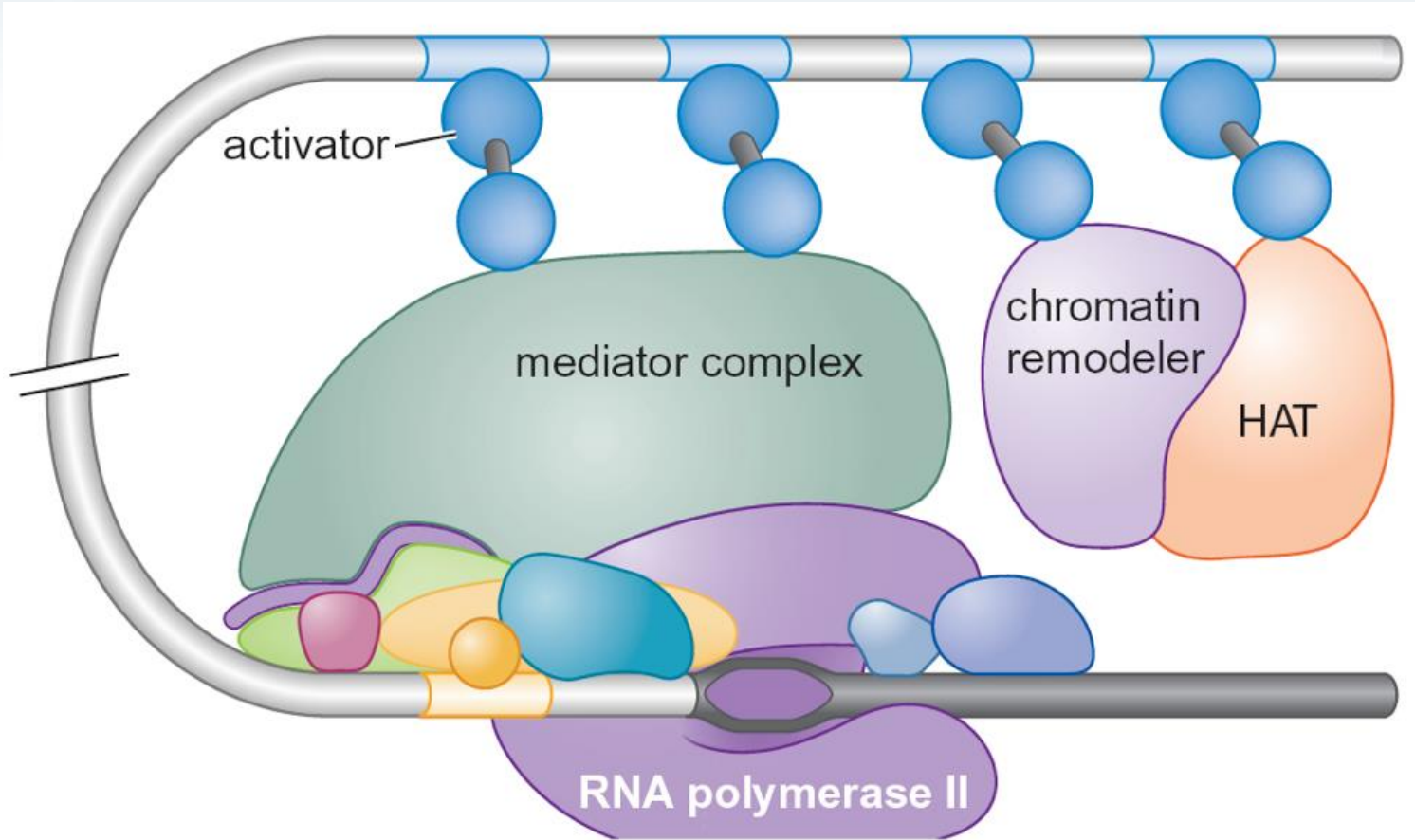
Repressores



Ausência de acetilação está, na maioria dos casos, relacionada com regiões transcricionalmente inativas:

Maior condensação da cromatina

Ativadores funcionam recrutando a maquinaria de transcrição **E** enzimas remodeladoras da estrutura da cromatina.

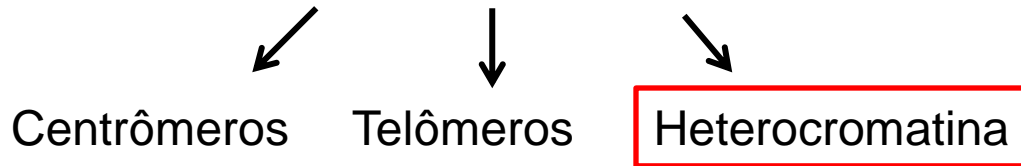


1. Revisão da estrutura da cromatina
2. Remodeladores dependentes de ATP, HATs e HDACs
3. **Silenciamento gênico: heterocromatina e metilação do DNA.**

Silenciamento Gênico

Até o momento, nós consideramos genes que são ligados e desligados ao nível da estrutura da cromatina em resposta à ação de proteínas regulatórias.

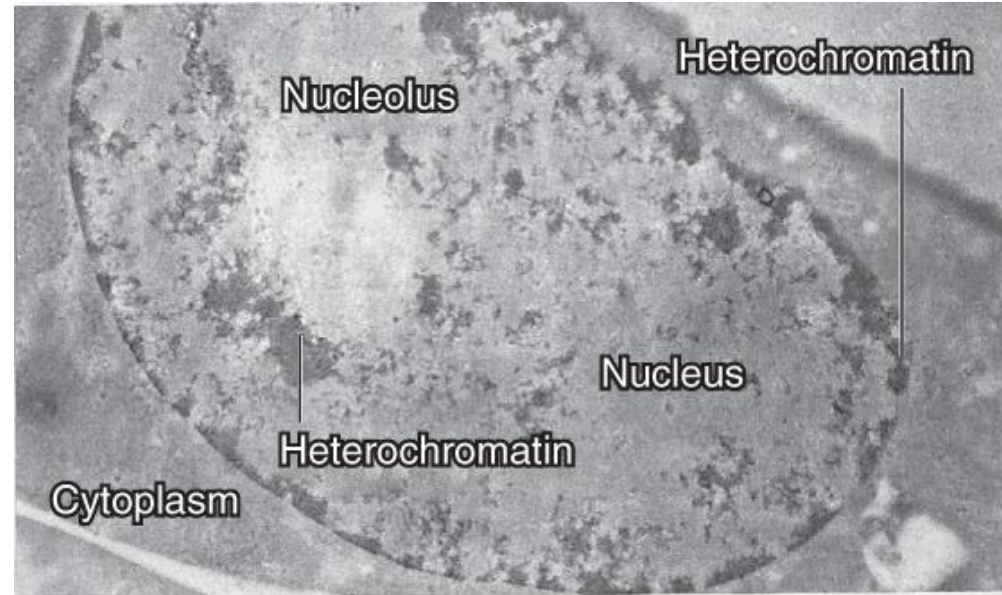
A cromatina também está envolvida em outro tipo de controle chamado **silenciamento gênico**, no qual grandes regiões do cromossomo são inativadas transcricionalmente pelo estabelecimento de um alto grau de empacotamento da cromatina.



A Cromatina é dividida em Eucromatina e Heterocromatina

- Cromossomos individuais só são observados durante a mitose.
- Na intérfase, a maior parte da cromatina está na forma de **eucromatina**, que é menos condensada que os cromossomos mitóticos.

FIGURA 12: Regiões de heterocromatina condensada estão agrupadas perto do nucléolo e da membrana nuclear.



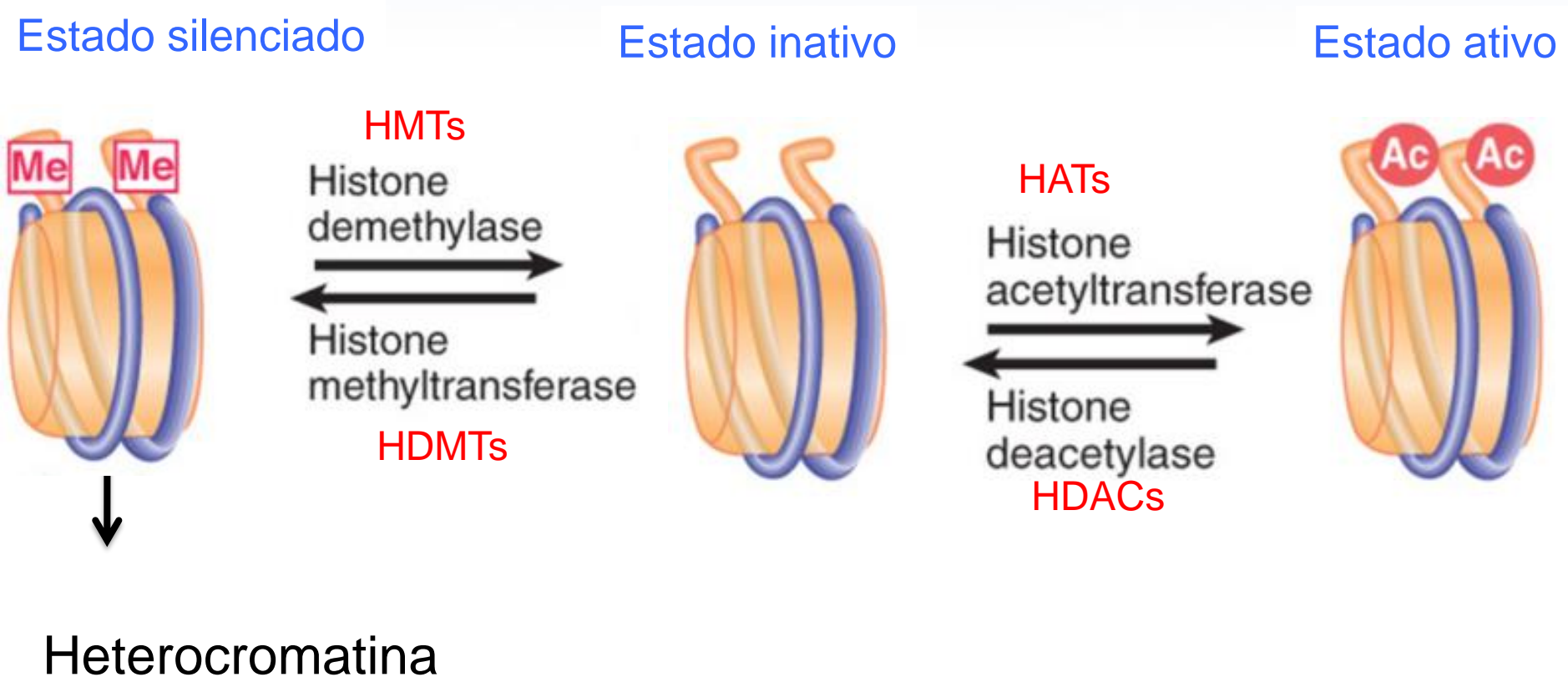
- **Heterocromatina**

- altamente condensada
- inativa
- constitutiva (centrômeros, regiões repetidas, etc)
- condicional (tipo celular/fase do ciclo)

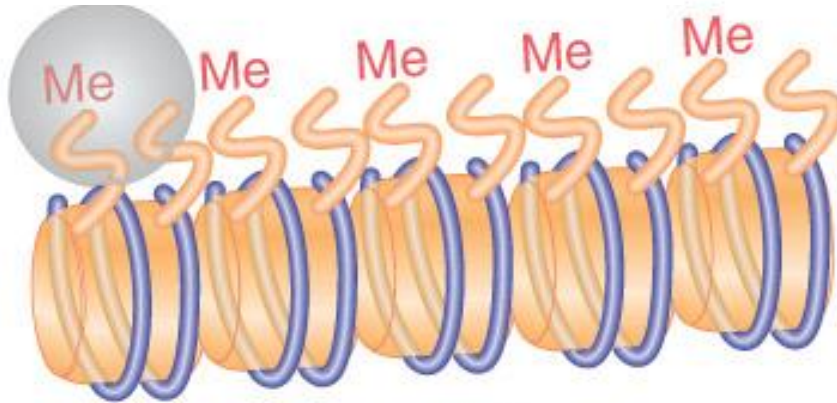
- **Eucromatina**

- menos condensada (nucleossomos se mantêm)
- competente transcritucionalmente

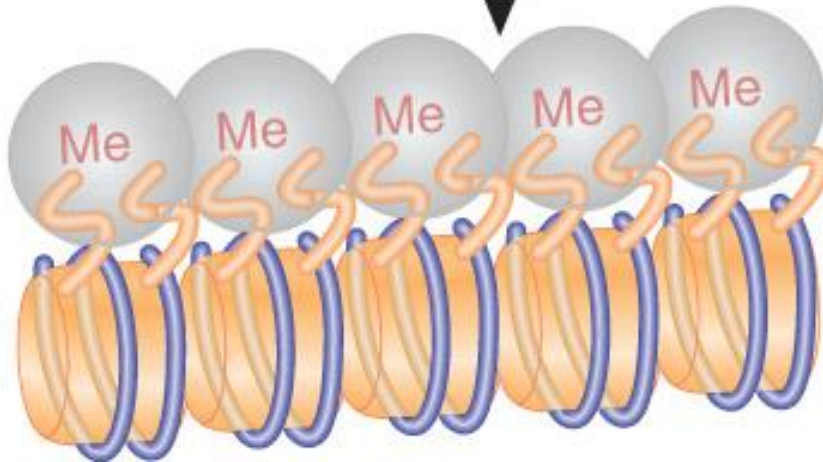
As modificações químicas das histonas estão associadas à formação de heterocromatina



H3 é metilada e recruta proteína proteína remodeladora (HP1)



HP1 auto-agrega



Metilação está,
na maioria dos casos,
relacionada com regiões
transcricionalmente inativas:

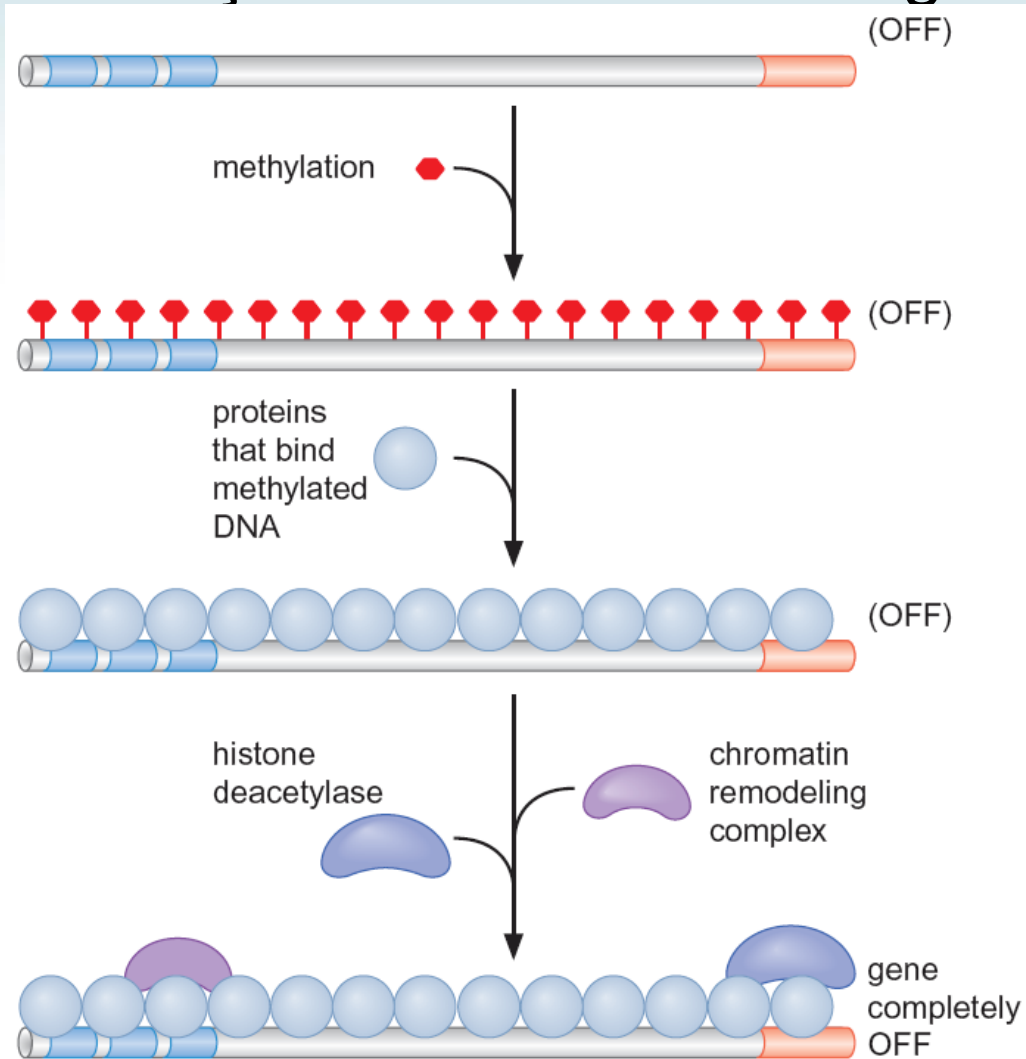
**Maior condensação da
cromatina → heterocromatina**

Metilação do DNA em mamíferos

Em mamíferos, o silenciamento gênico é também mediado pela metilação de resíduos de citosina no DNA, particularmente em regiões ricas em dinucleotídeos CG.

As citosinas metiladas recrutam HDACs e enzimas remodeladoras de nucleossomos, que causam silenciamento transcricional.

A metilação do DNA silencia genes



Metilação da citosina no DNA também está associada à inativação da cromatina

Estado de metilação do genes varia em diferentes tecidos



- ✿ Eventos de metilação de DNA e histonas são característicos de heterocromatina
- ✿ Metilação de H3 recruta DNA metilase
- ✿ Ilhas CpG metiladas são alvos de metilases de histonas
- ✿ De modo geral: metilação leva à inativação da expressão

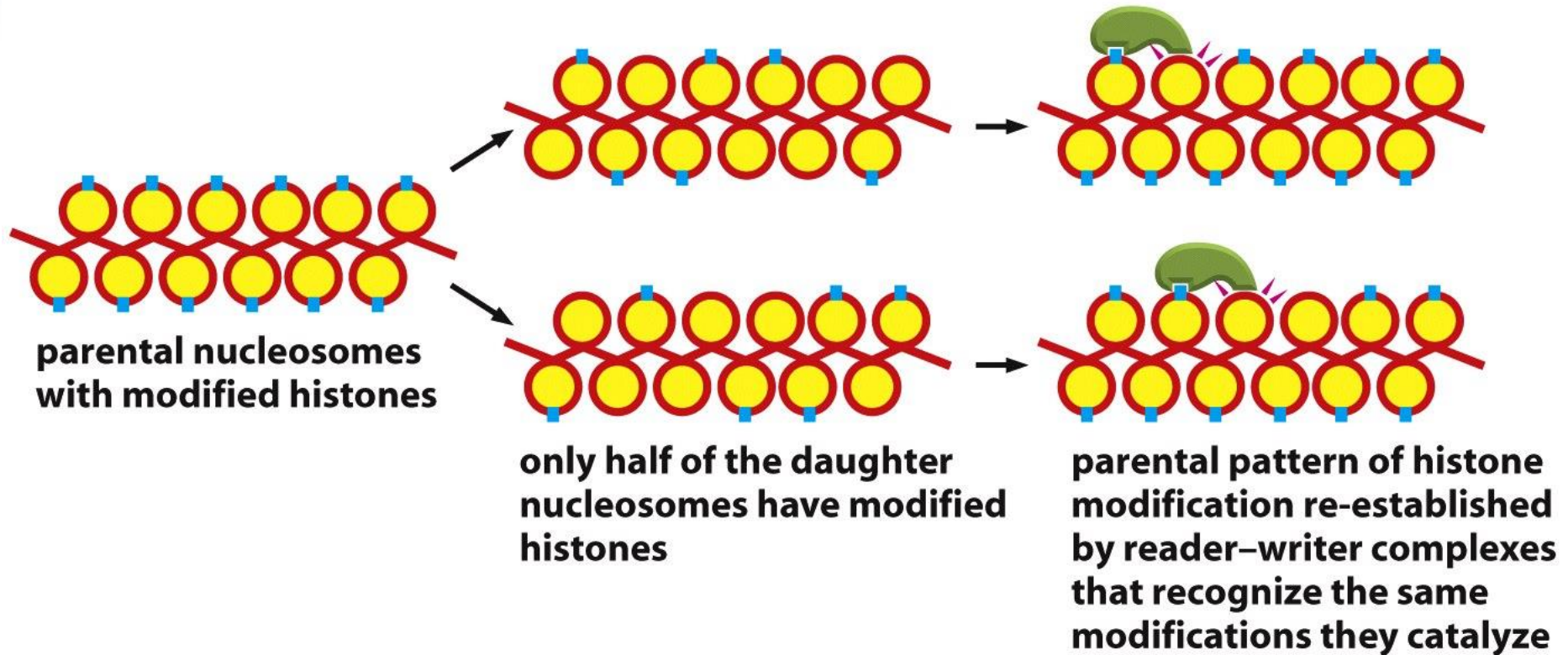
Alterações covalentes na estrutura da cromatina podem ser transmitidas/herdadas ao longo das divisões celulares (sem alteração na sequência de bases do DNA)

- ✿ Modificações pós-tradução de histonas
- ✿ Metilação do DNA



Modificações Epigenéticas

Modificações de Histonas



Uma metilase de manutenção mantém a metilação após a replicação do DNA

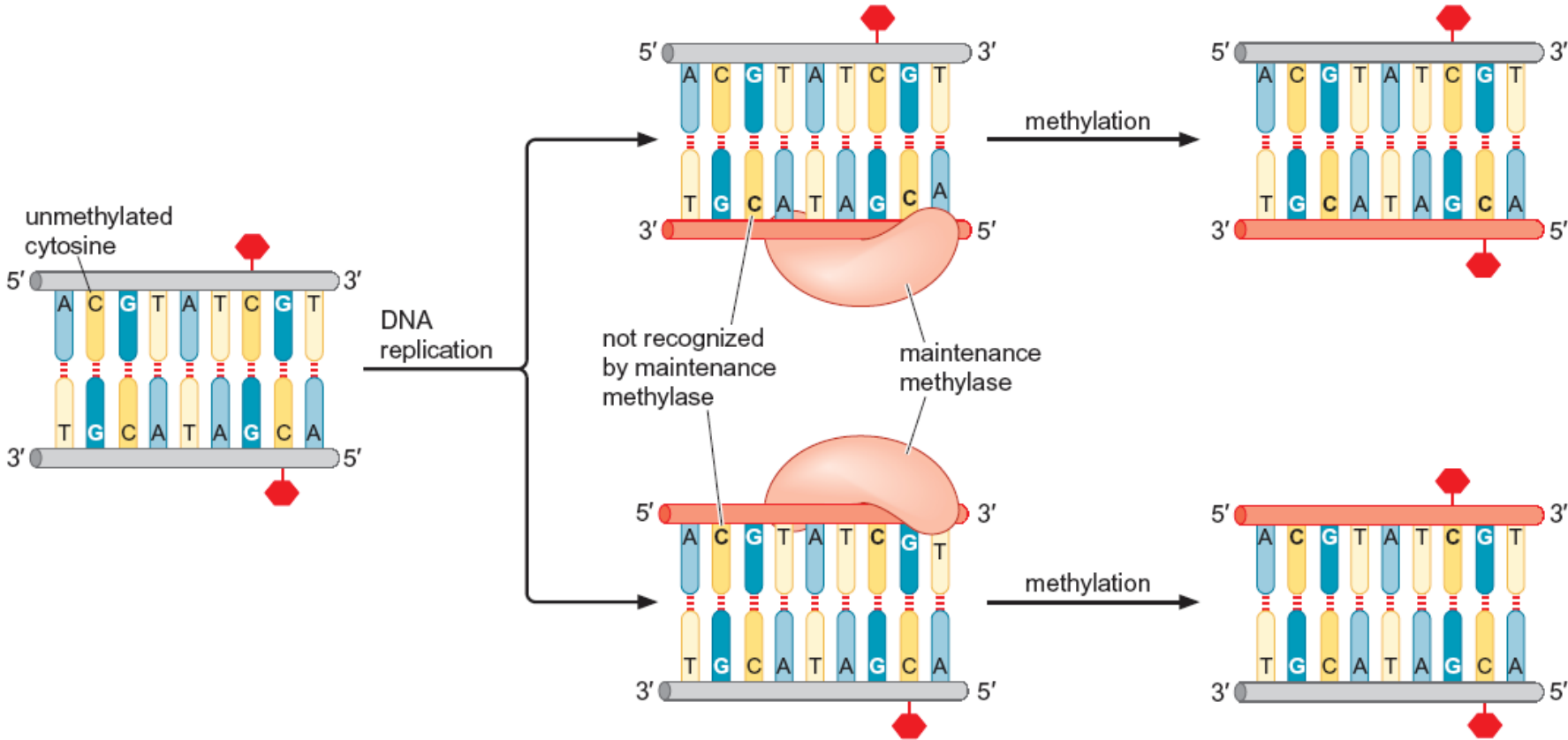


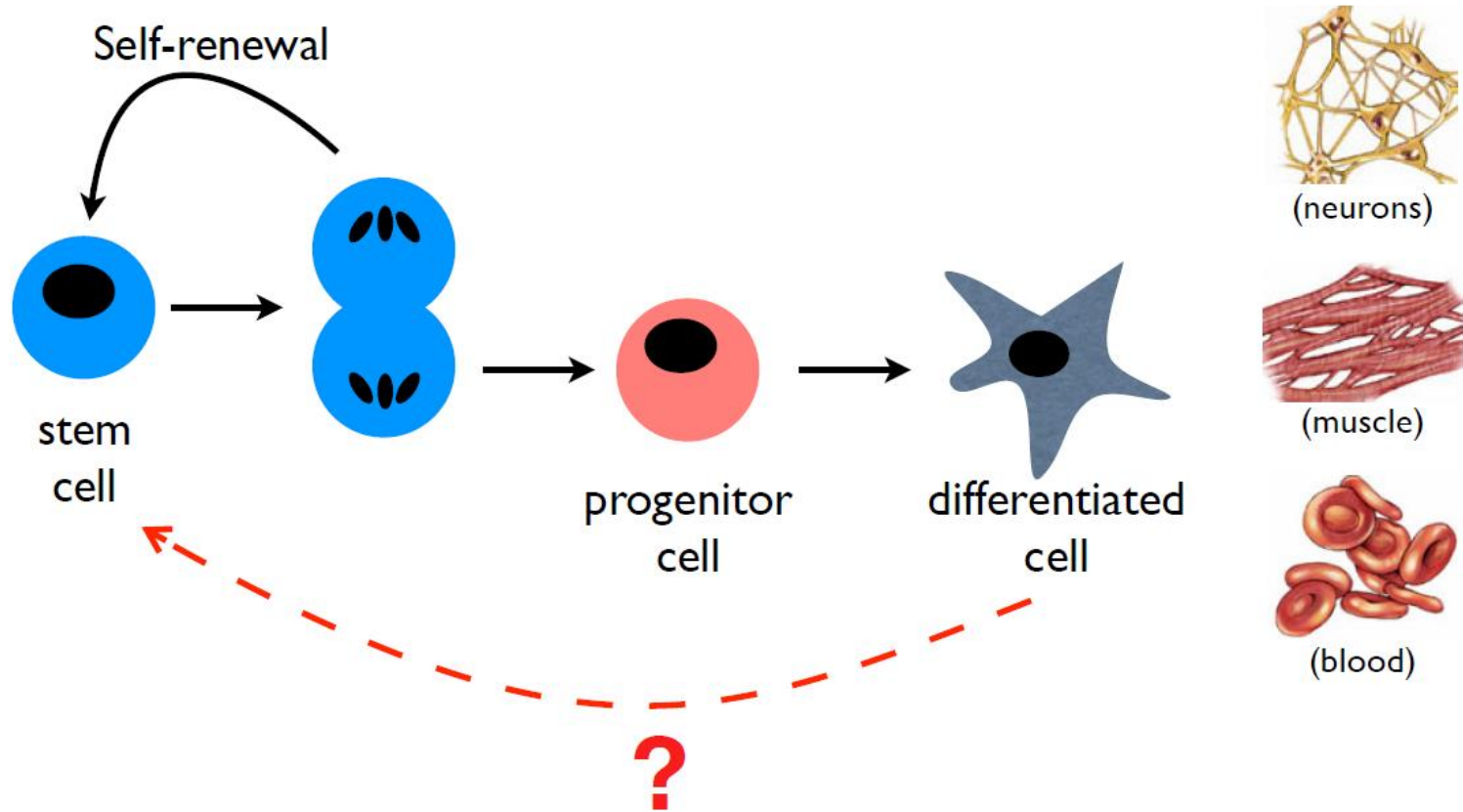


Figure 7-87 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Mini documentário sobre epigenética: <https://youtu.be/M4boKud1MRk>

O que é uma célula tronco embrionária?

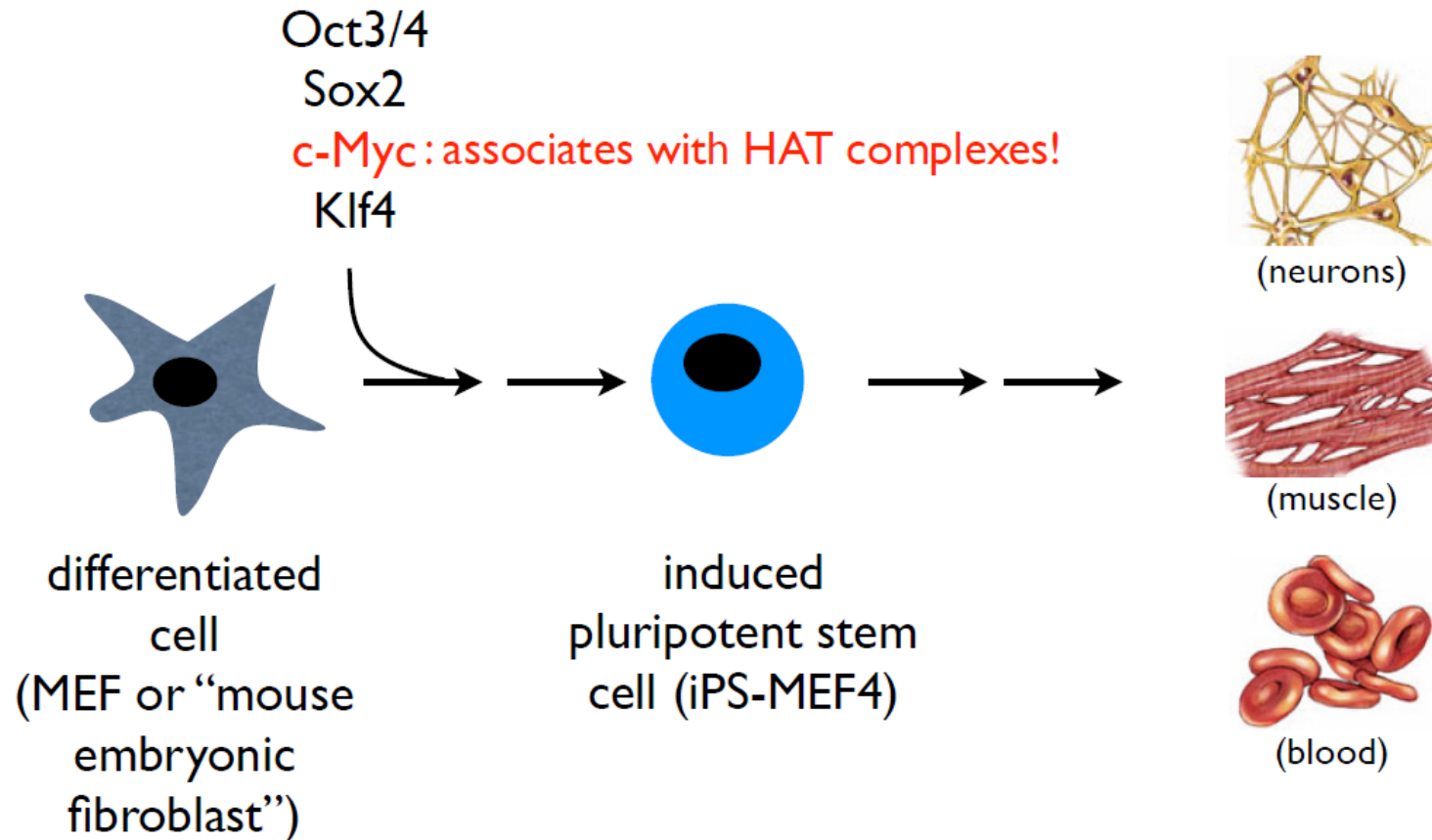
Estão presentes em embriões. Podem ser isoladas e cultivadas no laboratório, e são capazes de auto-renovação e diferenciação em muitos tipos celulares diferentes.



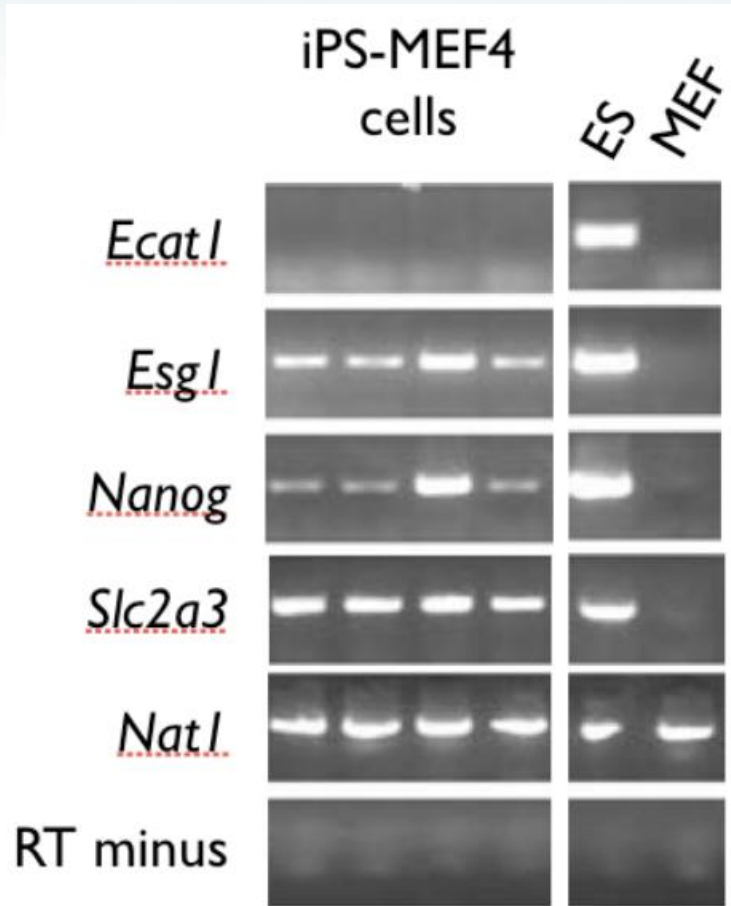
Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Cell

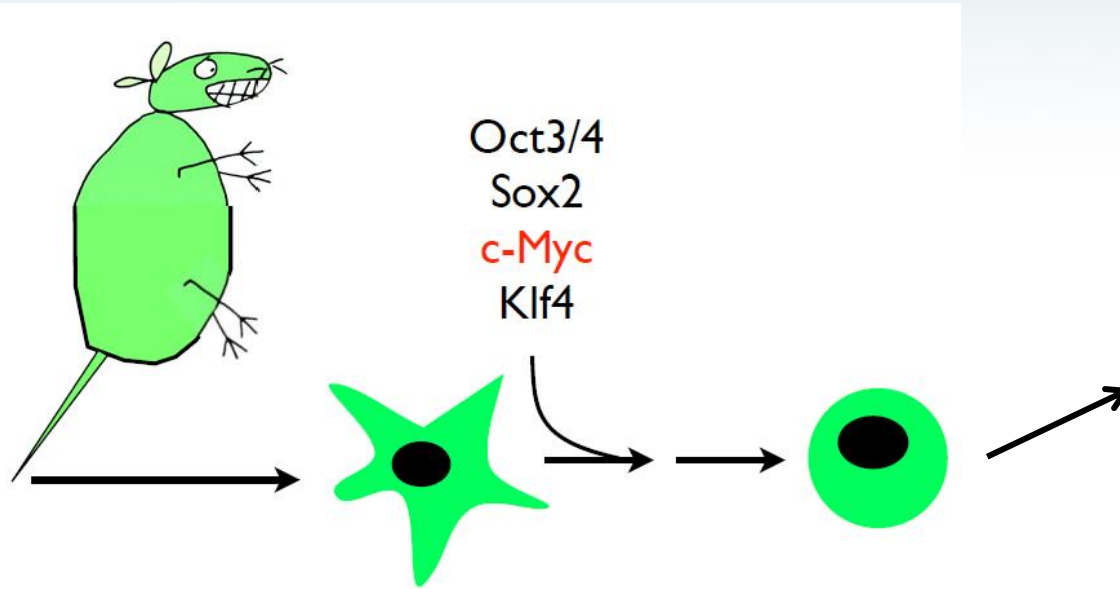
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}



A expressão de genes “marcadores” em células iPS (RT-PCR)

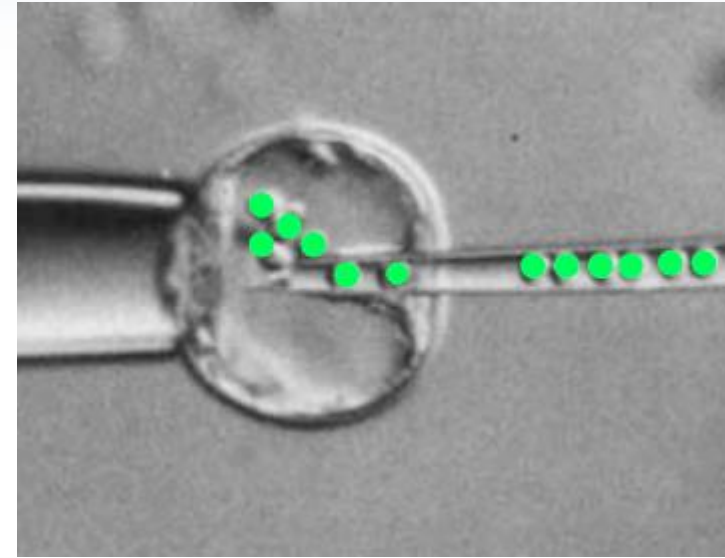


Indução de células tronco a partir de células adultas



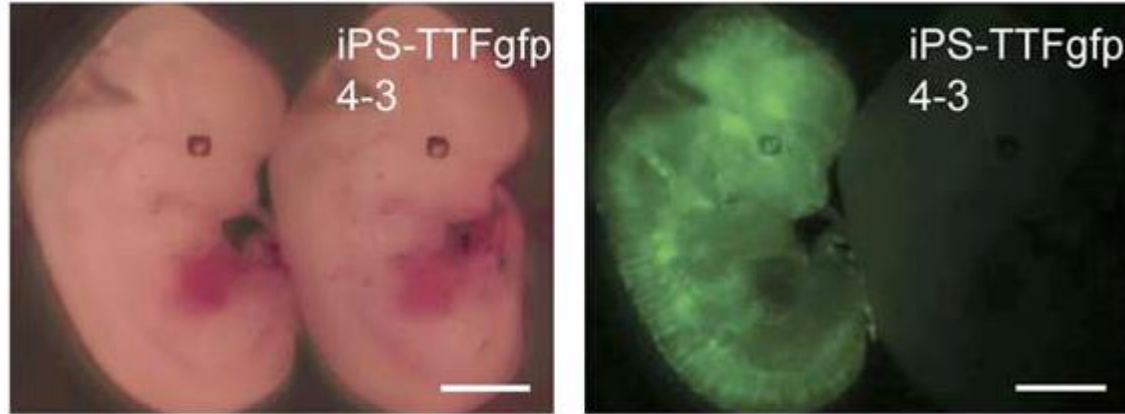
Fibroblastos da ponta da cauda de um camundongo GFP

Gerar células "iPS-GFP"



Injetar células iPS-GFP em embriões de um animal normal (sem GFP)

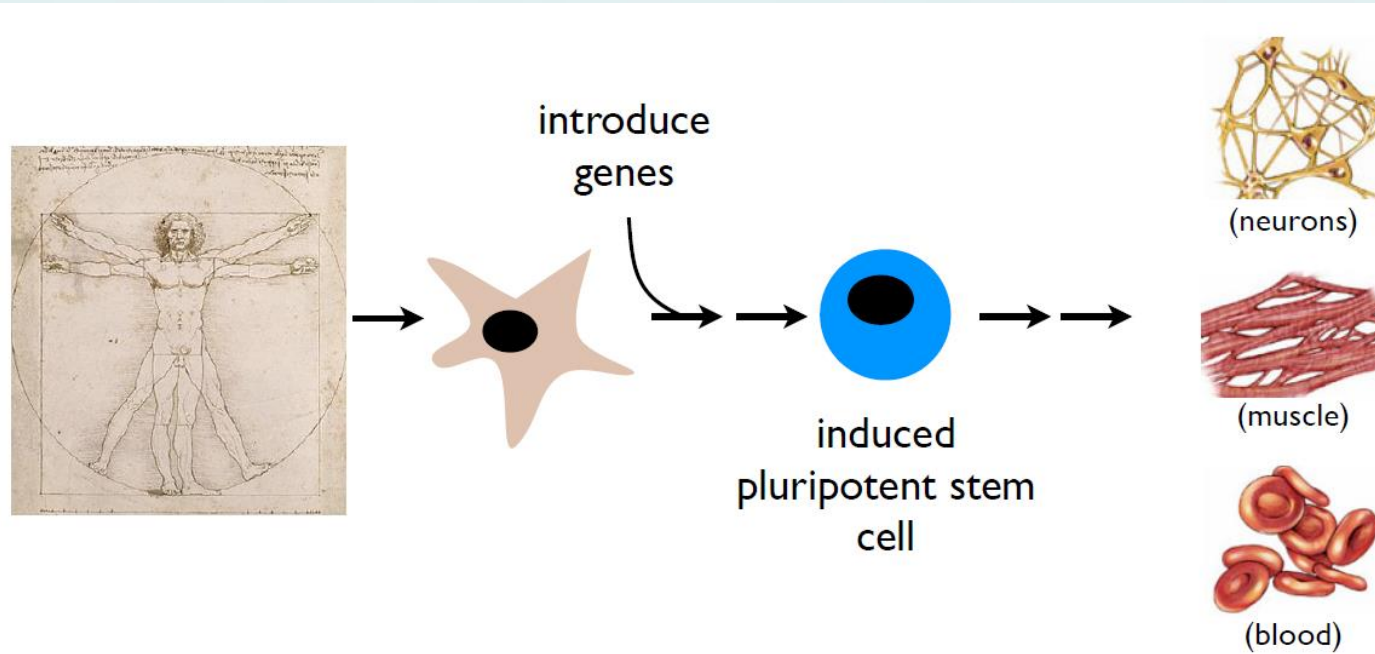
As células tronco induzidas de células adultas são pluripotentes



A análise histológica dos embriões quiméricos GFP confirmou que as células iPS-GFP deram origem a diferentes tipos celulares.

Este resultado apoia a hipótese de que 4 genes são suficientes para induzir pluripotência em células de camundongo adultas.

Será que esta abordagem funciona em humanos??



Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,¹ Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kiichiro Tomoda,³ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4,*}

Problemas a serem superados para o uso terapêutico desta abordagem:

- Um retrovirus foi usado para introduzir os genes nas células.
- Dois dos fatores (c-Myc e Klf4) são oncogênicos.

Os pesquisadores estão tentando superar estes obstáculos.

nature biotechnology ARTICLES

Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*

Danwei Huangfu¹, Kenji Osafune^{1,2}, René Maehr¹, Wenjun Guo³, Astrid Eijkelenboom^{1,4}, Shuibing Chen¹, Whitney Muhlestein¹ & Douglas A Melton¹

NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 26 NUMBER 11 NOVEMBER 2008

Cell Stem Cell Article

A Small-Molecule Inhibitor of Tgf-β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog

Justin K. Ichida,^{1,2,6} Joel Blanchard,^{1,6} Kelvin Lam,^{1,6} Esther Y. Son,^{1,2,3,5,6} Julia E. Chung,^{1,2,3} Dieter Egli,^{1,3} Kyle M. Loh,¹ Ava C. Carter,^{1,3} Francesco P. Di Giorgio,^{1,3} Kathryn Koszka,^{1,3} Danwei Huangfu,¹ Hidenori Akutsu,⁴ David R. Liu,⁵ Lee L. Rubin,^{1,*} and Kevin Eggan^{1,2,3,*}

Cell Stem Cell 5, 491–503, November 6, 2009

Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds

Pingping Hou,^{1*} Yanqin Li,^{1*} Xu Zhang,^{1,2*} Chun Liu,^{1,2*} Jingyang Guan,^{1*} Honggang Li,^{1*} Ting Zhao,^{1†} Junqing Ye,^{1,2†} Weifeng Yang,^{3†} Kang Liu,^{1†} Jian Ge,^{1,2†} Jun Xu,^{1†} Qiang Zhang,^{1,2†} Yang Zhao,^{1†} Hongkui Deng^{1,2†}

SCIENCE VOL 341 9 AUGUST 2013

Science

Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration

Matthias Stadfeld,^{1,2,4,5} Masaki Nagaya,^{3,5} Jochen Utikal,^{1,2,4,5} Gordon Weir,^{3,5} Konrad Hochedlinger^{1,2,4,5*}

7 NOVEMBER 2008 VOL 322 SCIENCE

Cell Stem Cell Article

Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA

Luigi Warren,^{1,17} Philip D. Manos,^{2,4,17} Tim Ahfeldt,^{4,6,7,18} Yui-Han Loh,^{8,9,18} Hu Li,^{11,12,18} Frank Lau,^{4,13} Wataru Ebina,¹ Pankaj K. Mandal,¹ Zachary D. Smith,¹⁴ Alexander Meissner,^{4,5,14} George Q. Daley,^{2,3,4,8,15,16} Andrew S. Brack,^{5,8} James J. Collins,^{11,12,19} Chad Cowan,^{4,6,13} Thorsten M. Schlaeger,^{2,8} and Derrick J. Rossi^{17,20,10*}

Review | Open Access | Published: 26 May 2022

Pioneering adult stem cell trial approved

By James Gallagher
Health and science reporter, BBC News

[Samaneh Dehghan](#), [Reza Mirshahi](#), [Alireza Shoaee-Hassani](#) & [Masood Naseripour](#) ✉

Journal of Tissue Engineering
Volume 13: 1–20
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/20417314221095339
journals.sagepub.com/home/tej
SAGE

Induced pluripotent stem cell-based organ-on-a-chip as personalized drug screening tools: A focus on neurodegenerative disorders

Review | Open Access | Published: 16 October 2020

Regenerative therapy for spinal cord injury using iPSC technology

[Narihito Nagoshi](#), [Hideyuki Okano](#) & [Masaya Nakamura](#) ✉

[Inflammation and Regeneration](#) 40, Article number: 40 (2020) | [Cite this article](#)

4476 Accesses | 15 Citations | [Metrics](#)

The first trial of stem cells produced from a patient's own body has been approved by the Japanese government.