

RNAs regulatórios em eucariotos

QBQ2503



Bibliografia:

Capítulo 20: Regulatory RNAs.

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).

Meta: entender como RNAs não codificadores regulam a expressão gênica.

Objetivos:

1. Descrever os passos básicos de interferência de RNA em eucariotos.
2. Entender como o entendimento de RNAs regulatórios pode ser aplicado como uma ferramenta de biologia molecular.
3. Entender como ocorre a biogênese dos microRNAs e como eles atuam.
4. Diferenciar o mecanismo e função de siRNAs e miRNAs na regulação da expressão gênica em eucariotos.
5. Entender o mecanismo de ação de RNAs não codificadores longos.
6. Entender como RNAs longos podem participar de modificações epigenéticas, usando como exemplo a inativação do cromossomo X.

RNAs na regulação gênica: visão geral

Os RNAs tem outras funções além da codificação de proteínas (RNAs não codificadores).

Os RNAs podem assumir estruturas terciárias funcionais.

Os RNAs podem reconhecer RNAs complementares por pareamento de bases.

Os RNAs podem recrutar proteínas para a cromatina

RNAs não codificadores na regulação da expressão gênica

PROCARIOTOS

1. Atenuação no operon do triptofano.
2. Riboswitches.
3. snRNAs
4. CRISPR RNAs (sgRNAs)

Regulação **em cis** do dobramento do RNA

Regulação **em trans**

RNAs não codificadores na regulação da expressão gênica

PROCARIOTOS

1. Atenuação no operon do triptofano.
2. Riboswitches.
3. snRNAs
4. CRISPR RNAs (sgRNAs)

Regulação **em cis** do dobramento do RNA

Regulação **em trans**

EUCARIOTOS

- 5. Interferência de RNA/siRNAs/miRNAs**
- 6. RNAs não codificadores longos**
-Xist e inativação do cromossomo X

Regulação **em trans**

Interferência de RNA (RNAi)

Fire e Melo descobriram que quando um **RNA dupla-fita** correspondente à sequência de um gene é injetado no verme *C. elegans*, a expressão do gene correspondente é suprimida.

O RNA dupla-fita interfere com a expressão do gene. Logo, este fenômeno recebeu o nome de **interferência de RNA** ou **RNAi**.

RNAi (RNA de Interferência)

Interferência de RNA é o mecanismo através do qual a presença de RNA dupla fita cuja sequência é complementar a um determinado gene interfere com a expressão deste gene.



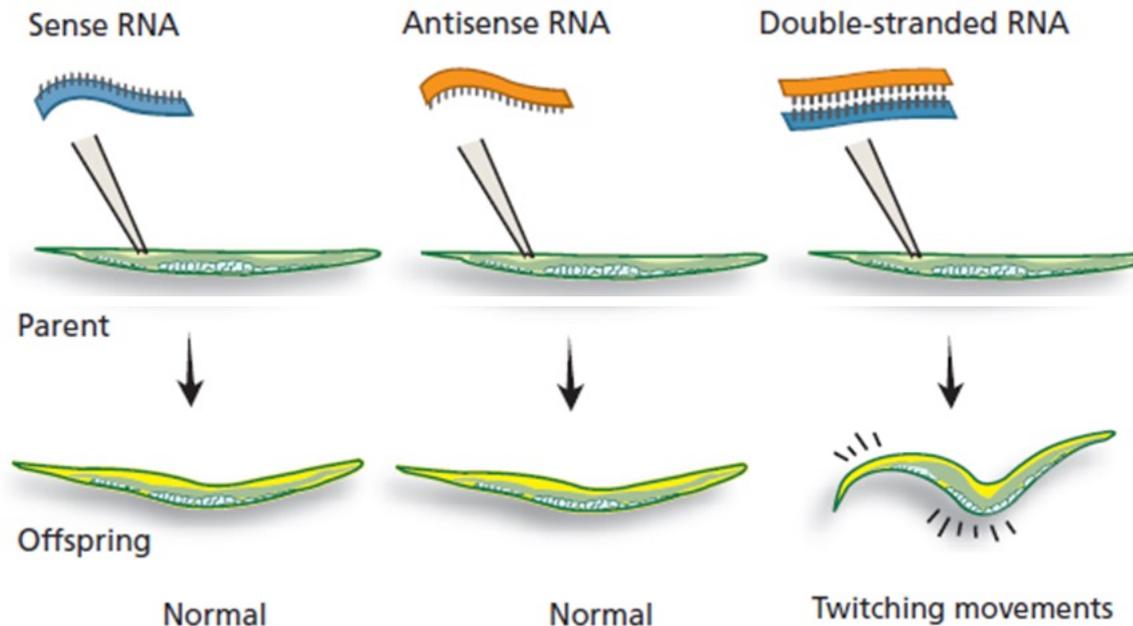
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello *"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"*



C. elegans

Nem a injeção de RNA sense ou antisense para a proteína muscular teve efeito

Entretanto após a injeção conjunta de fitas sense e antisense (que formam uma dupla-fita), o nematóide apresentou movimentos de “twitching” igual aos dos vermes cuja proteína muscular era defeituosa



A via de RNAi

RNA dupla fita (dsRNA) é clivado em fragmentos de 21 pb chamados de “**pequenos RNAs de interferência**” (**siRNA** – *small interfering RNA*) por uma ribonuclease chamada “**Dicer**”.

Estes siRNAs se associam a um complexo de proteínas chamado “**complexo de silenciamento induzido por RNA**” (**RISC** - *RNA-induced Silencing Complex*).

O complexo RISC remove a fita senso do siRNA e dirige a fita antissenso para mRNAs alvos com sequência complementar.

O pareamento do siRNA com o mRNA desencadeia a clivagem do mRNA por **Argonata** (uma proteína do complexo RISC, suprimindo assim a expressão gênica).

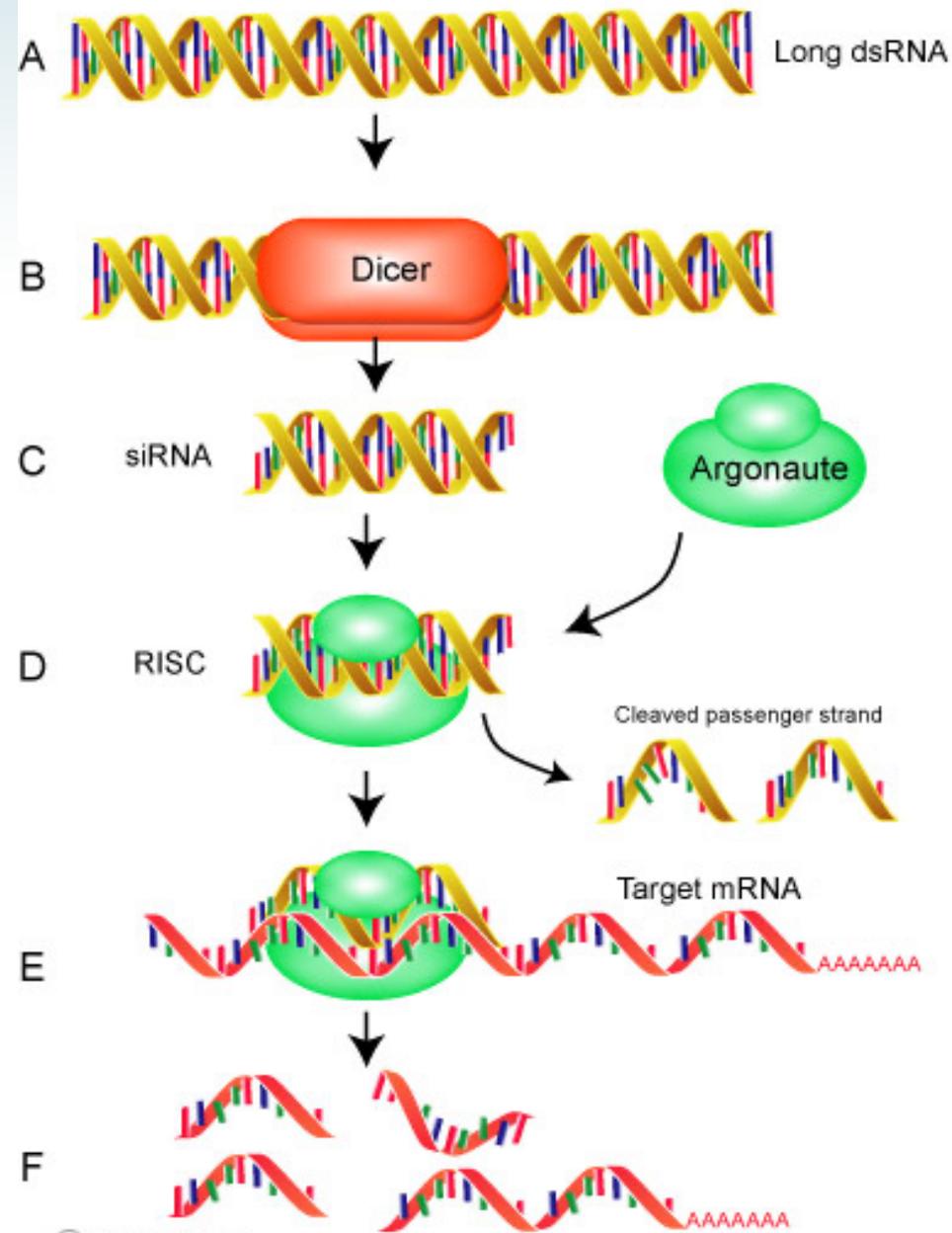


<https://www.youtube.com/watch?v=FMVLg0PCqUo> 1min 30s

Interferência de RNA mediada por siRNAs

A interferência de RNA frequentemente desencadeia a degradação de mRNAs complementares ao siRNA

Pequenos RNAs dupla fita (siRNAs) são usados para silenciar genes com mRNA complementar através de interação com o complexo RISC (RNA induced silencing complex).

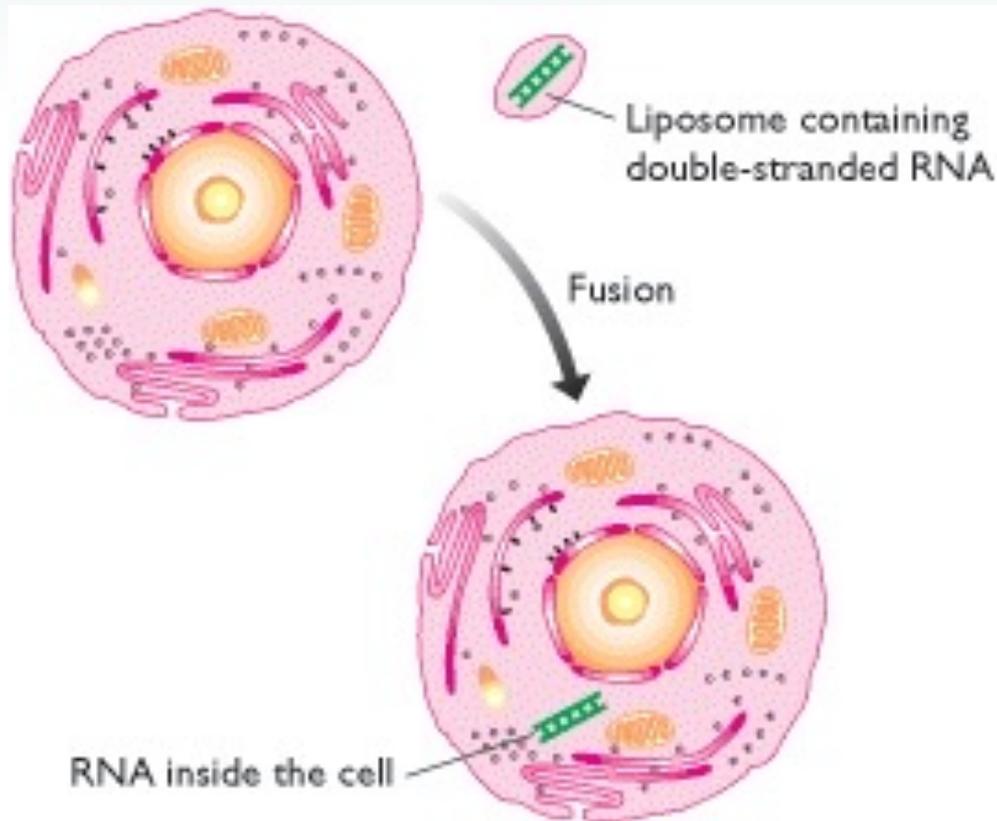


Interferência de RNA (RNAi)

Pequenos RNAs dupla-fita podem desencadear a degradação de mRNAs contendo a mesma sequência.

RNAi é uma ferramenta poderosa para bloquear artificialmente a função de genes em eucariotos de maneira dirigida.

RNAi pode ser utilizado para estudar função de genes



Knock down

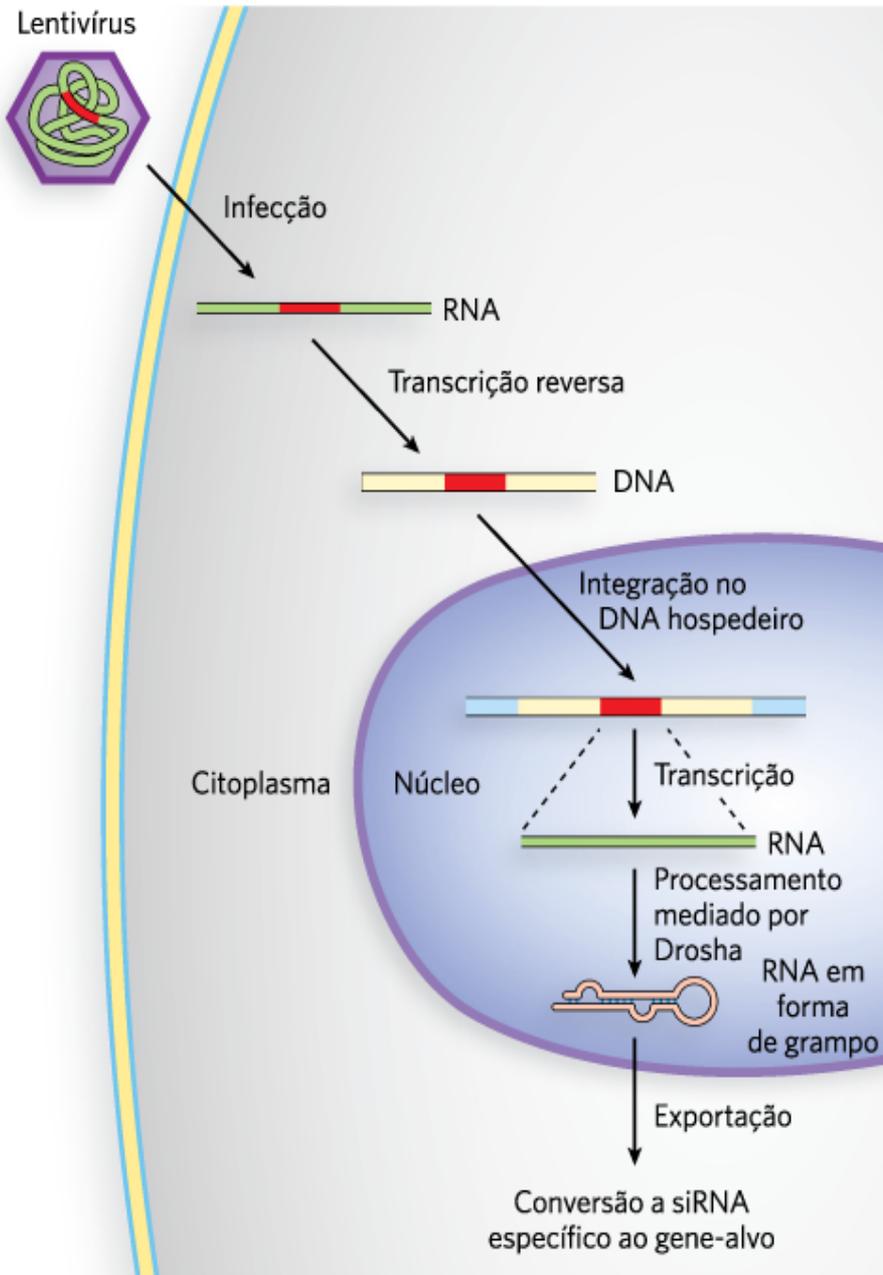


FIGURA 22-19 Silenciamento da expressão gênica baseado em siRNA em células humanas. Lentivírus, vírus de RNA que infectam células humanas, são usados como vetores. Uma sequência codificando uma estrutura do tipo grampo homóloga à presente no gene-alvo é clonada em um vetor lentiviral (vermelho). Na célula hospedeira, o RNA viral é convertido em DNA de fita dupla pela transcriptase reversa, e o DNA é integrado no genoma celular. A transcrição do gene integrado produz um RNA em forma de grampo que é convertido a siRNA específico do gene-alvo.

A RNAi pode ser usada para silenciar a expressão gênica em vários eucariotos

Em moscas e vermes, dsRNAs longos desencadeiam a interferência de RNA.

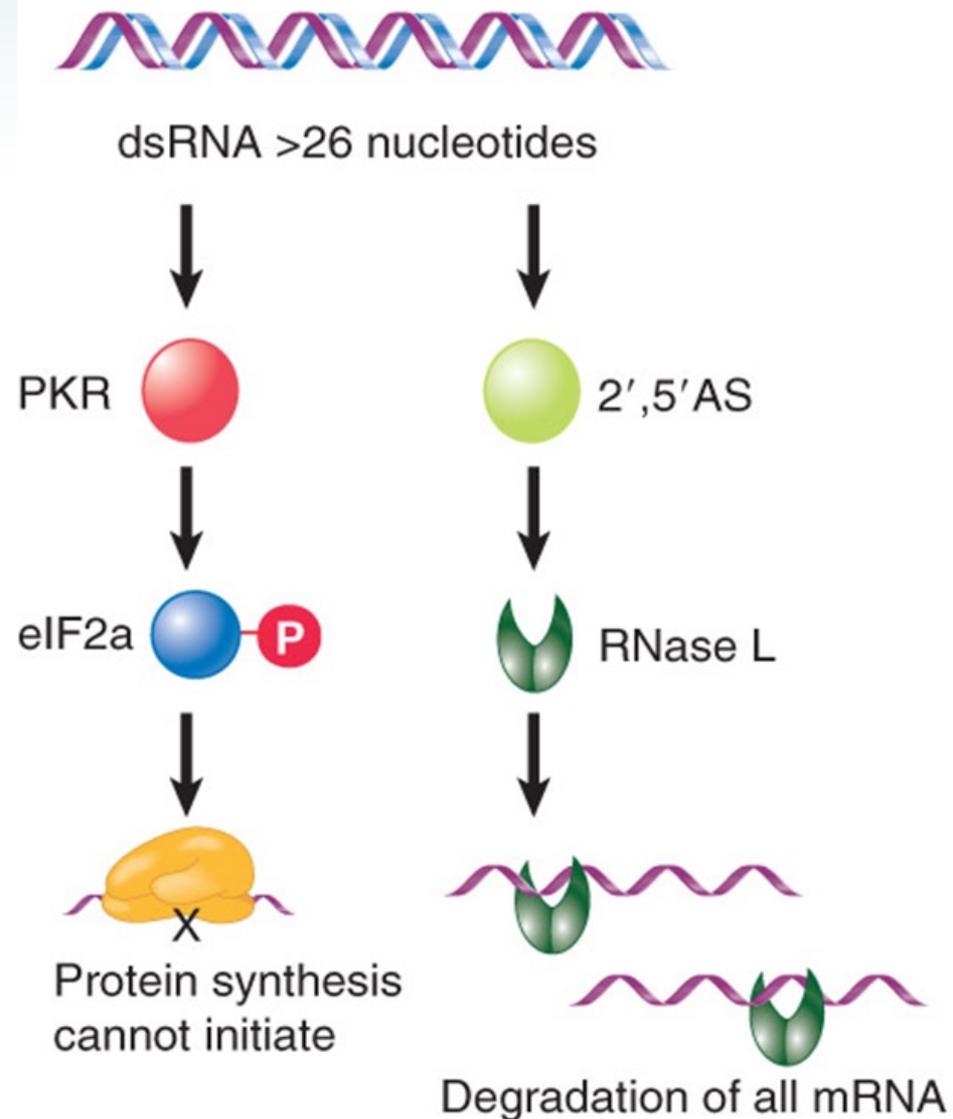
Em células de mamíferos, siRNAs são usados para desencadear a RNAi.

Em mamíferos a presença de RNAs dupla-fita longos leva a uma resposta celular generalizada

Resposta a RNAs dupla-fita longos é mediada por interferons (peptídeos antivirais) e promove um bloqueio generalizado da tradução e a degradação de todos os mRNAs celulares



Mecanismo de defesa antiviral



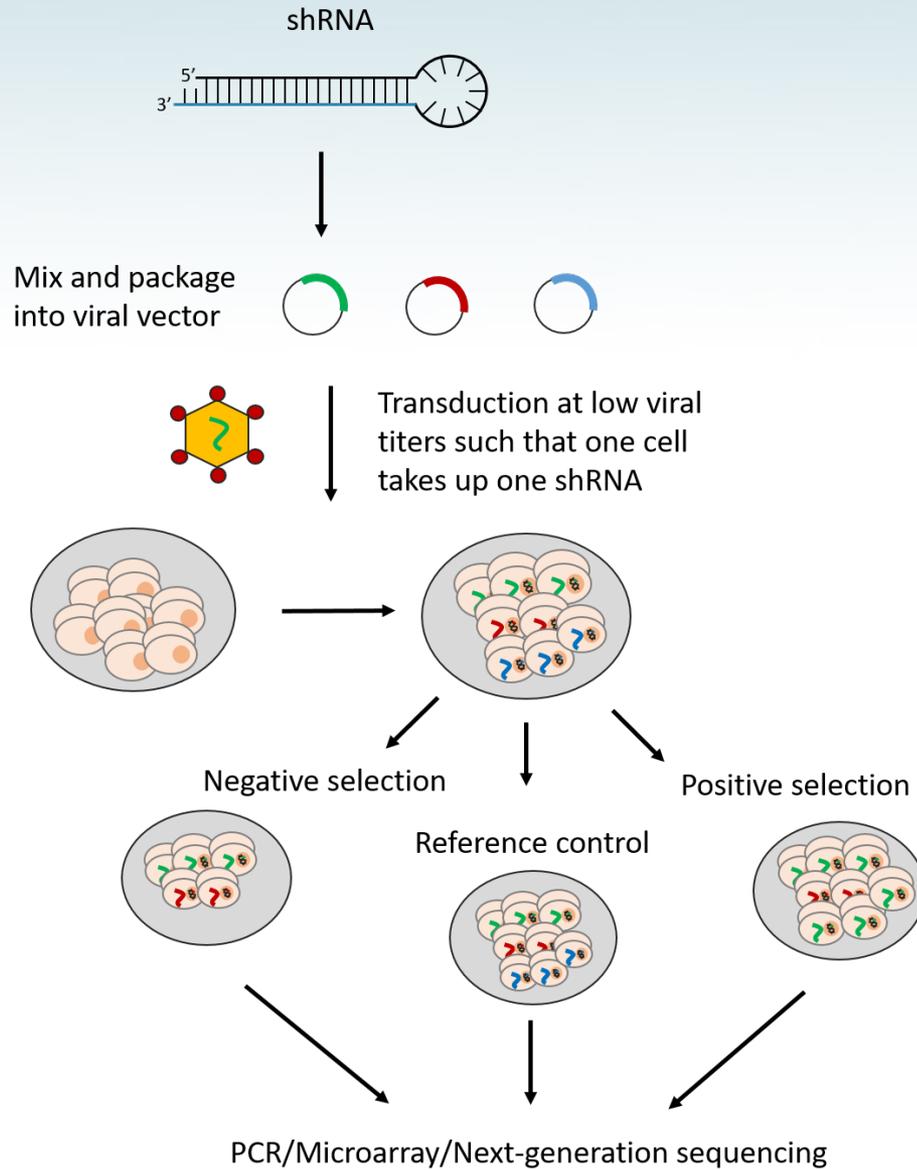
A RNAi pode ser usada para silenciar a expressão gênica em vários eucariotos

Em moscas e vermes, dsRNAs longos desencadeiam a interferência de RNA.

Em células de mamíferos, siRNAs são usados para desencadear a RNAi.

A RNAi foi usada para triagem funcional de genomas completos

Pooled screening



A RNAi pode ser usada para silenciar a expressão gênica em vários eucariotos

Em moscas e vermes, dsRNAs longos desencadeiam a interferência de RNA.

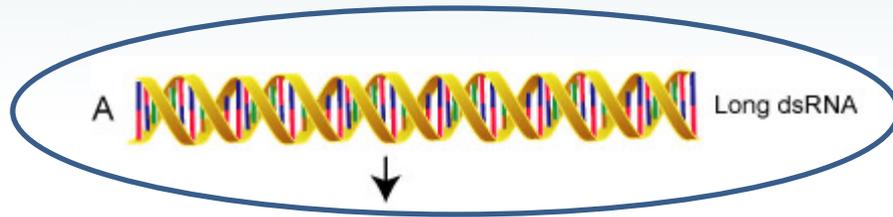
Em células de mamíferos, siRNAs são usados para desencadear a RNAi.

A RNAi foi usada para triagem funcional de genomas completos

Exemplos de siRNAs endógenos que levam à degradação de mRNAs são relativamente raros.

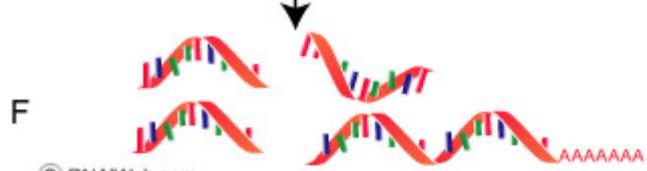
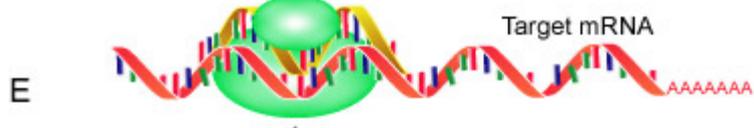
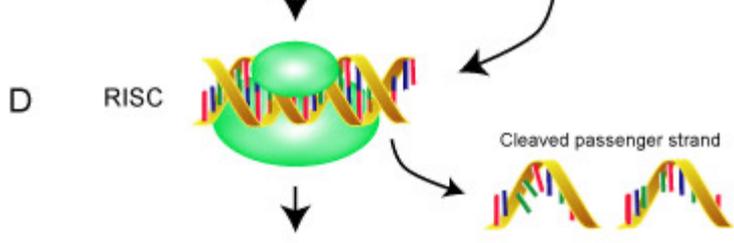
Qual é a origem dos siRNAs naturais?

Muitos siRNAs são originados a partir do processamento de RNAs dupla-fita longos pela RNaseIII DICER → Gera siRNAs de 21-23nt



→ Infecção viral

→ Transposons ativos



A RNAi pode ser usada para silenciar a expressão gênica em vários eucariotos

Em moscas e vermes, dsRNAs longos desencadeiam a interferência de RNA.

Em células de mamíferos, siRNAs são usados para desencadear a RNAi.

A RNAi foi usada para triagem funcional de genomas completos

Exemplos de siRNAs endógenos que levam à degradação de mRNAs são relativamente raros.

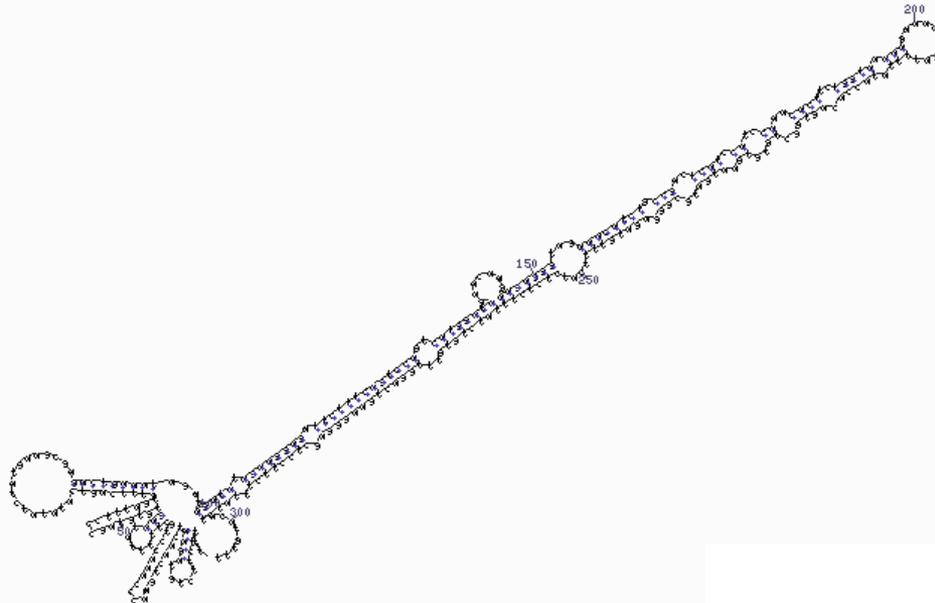
A descoberta de RNAi convergiu com a descoberta de vários tipos de RNAs regulatórios incluindo os microRNAs (miRNAs).

A RNAi como um processo natural

Nós agora sabemos que a RNAi é a manifestação de um processo natural envolvendo RNAs codificados no genoma chamados de **microRNAs (miRNAs)**.

miRNAs tipicamente formam grampos (*hairpins*), que são processados pela Dicer em siRNAs dupla-fita de 21 pb.

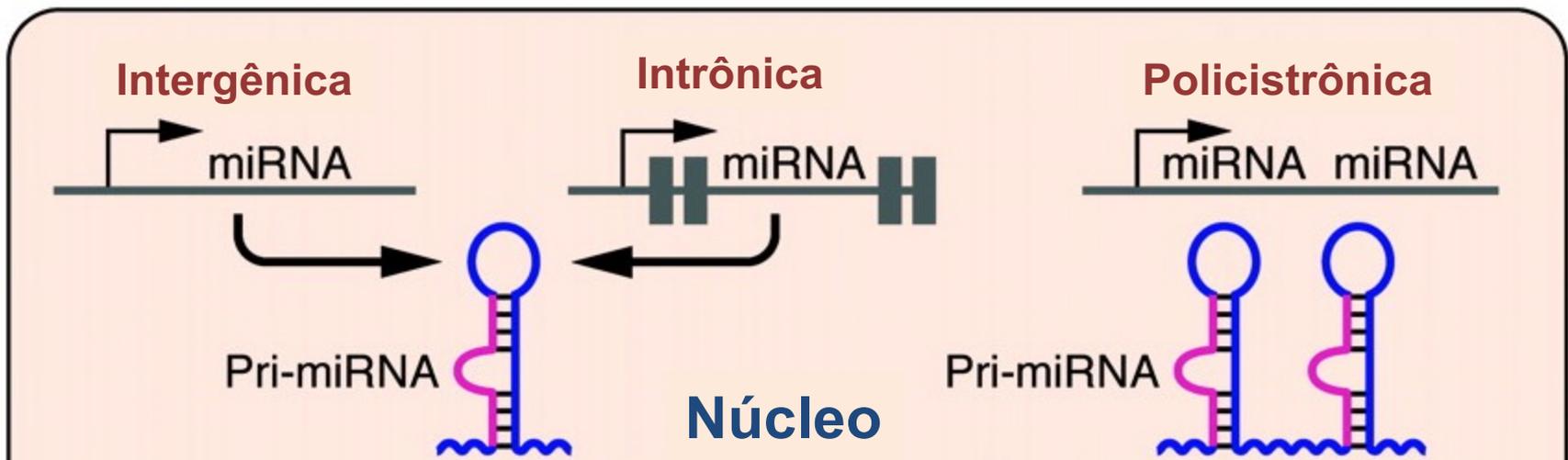
Os genomas de mamíferos codificam centenas de miRNAs que orquestram uma miríade de processos regulatórios.



A interferência de RNA também é mediada por microRNAs

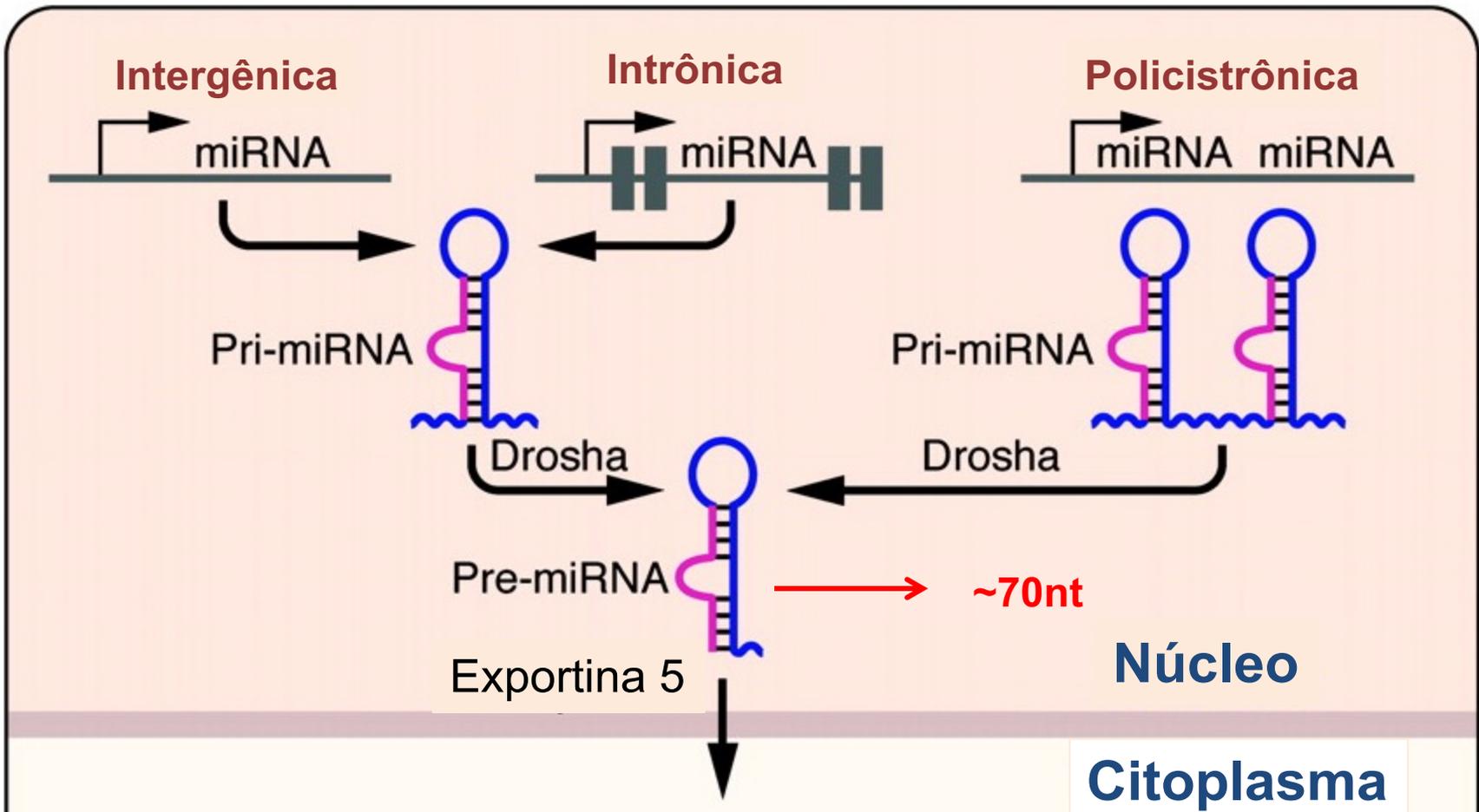
microRNAs são pequenos RNAs (~22 bases) codificados pelo genoma eucariótico.

- ✓ Os genes podem estar localizados em regiões intrônicas ou intergênicas
- ✓ Podem ser codificados de forma isolada ou em clusters
- ✓ O transcrito primário (pri-miRNA) assume a conformação de grampo(s) por pareamento intramolecular



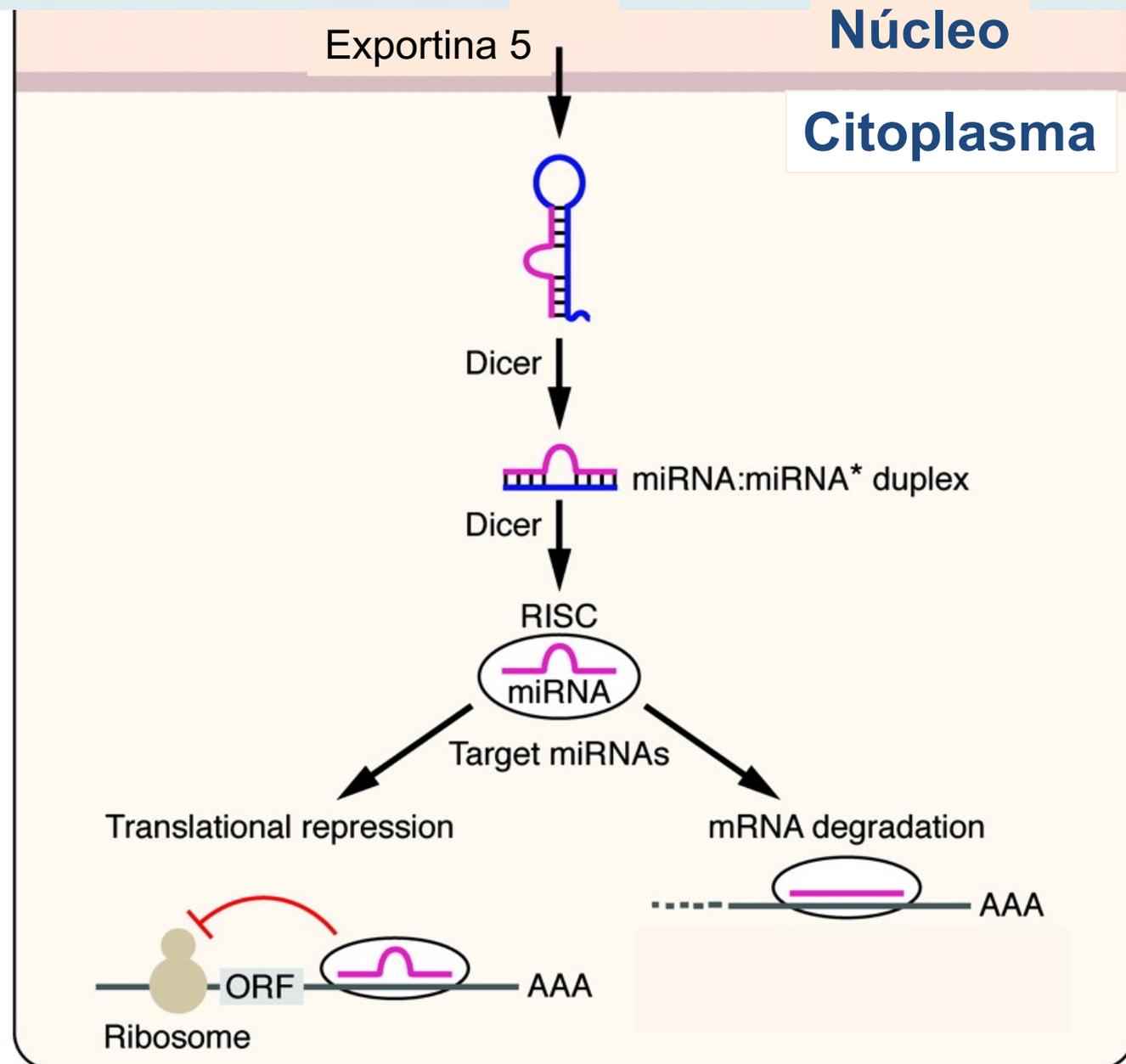
A interferência de RNA também é mediada por **microRNAs**

- ✓ Os pri-miRNAs são processados no núcleo pela Drosha (uma Rnase III) em pré-miRNAs de ~70nt (ainda possuem a estrutura de grampo)
- ✓ O pré-miRNA é exportado para o citoplasma



A interferência de RNA também é mediada por **microRNAs**

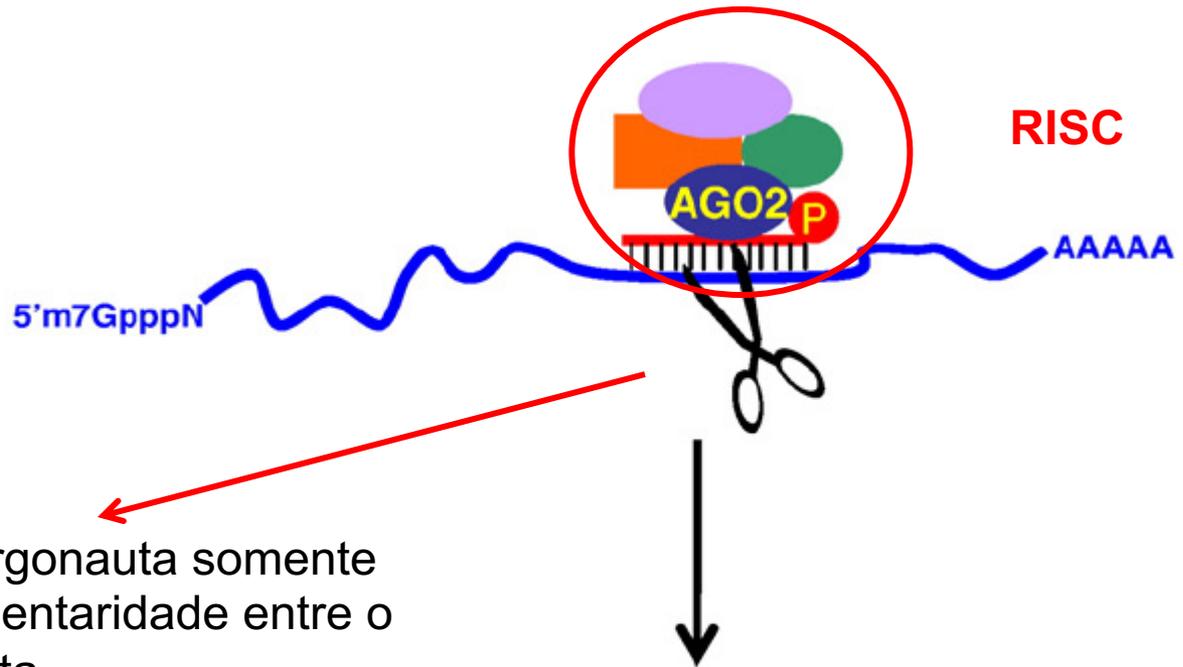
- ✓ Os pré-miRNAs são processados no citoplasma pela Dicer em miRNA dupla-fita (~22nt)
- ✓ O miRNA se associa a RISC e silencia mRNAs complementares de forma análoga aos siRNAs



RNA induced silencing complex (RISC)

RISC – partícula ribonucleoproteica composta por um RNA curto simples fita e por proteínas, incluindo a argonauta que tem atividade nucleásica e pode clivar os mRNAs complementares ao siRNA.

- Guia o siRNA/miRNAs para mRNAs complementares.



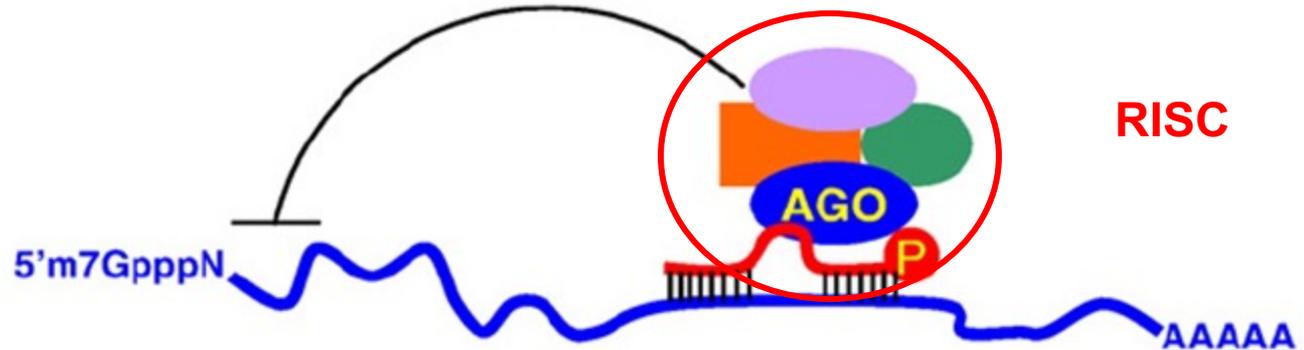
Clivagem do mRNA por Argonauta somente ocorre quando a complementaridade entre o miRNA e o mRNA é perfeita

Degradação do mRNA

RNA induced silencing complex (RISC)

RISC – partícula ribonucleoproteica composta por um RNA curto simples fita e por proteínas, incluindo a argonata que tem atividade nucleásica e pode clivar os mRNAs complementares ao siRNA.

- Guia o siRNA/miRNAs para mRNAs complementares.



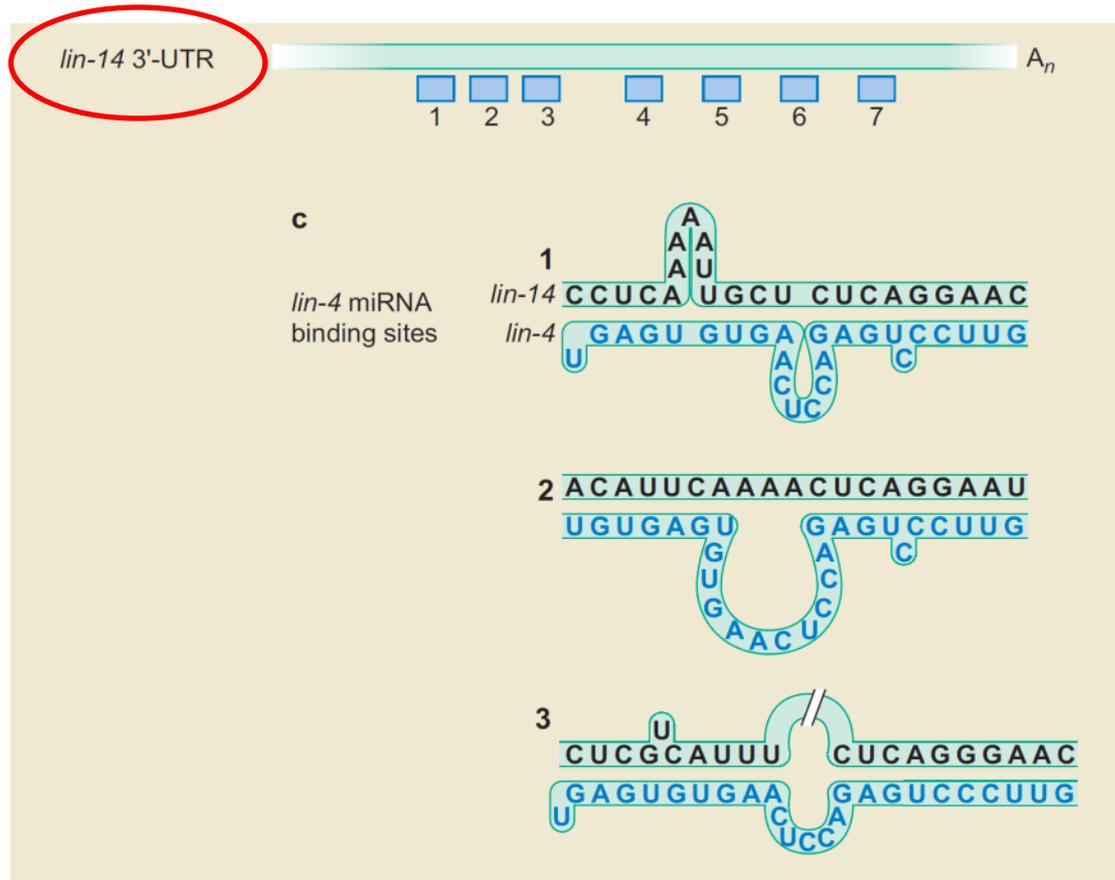
Quando a complementaridade entre o miRNA e o mRNA é imperfeita, RISC inibe a tradução do mRNA



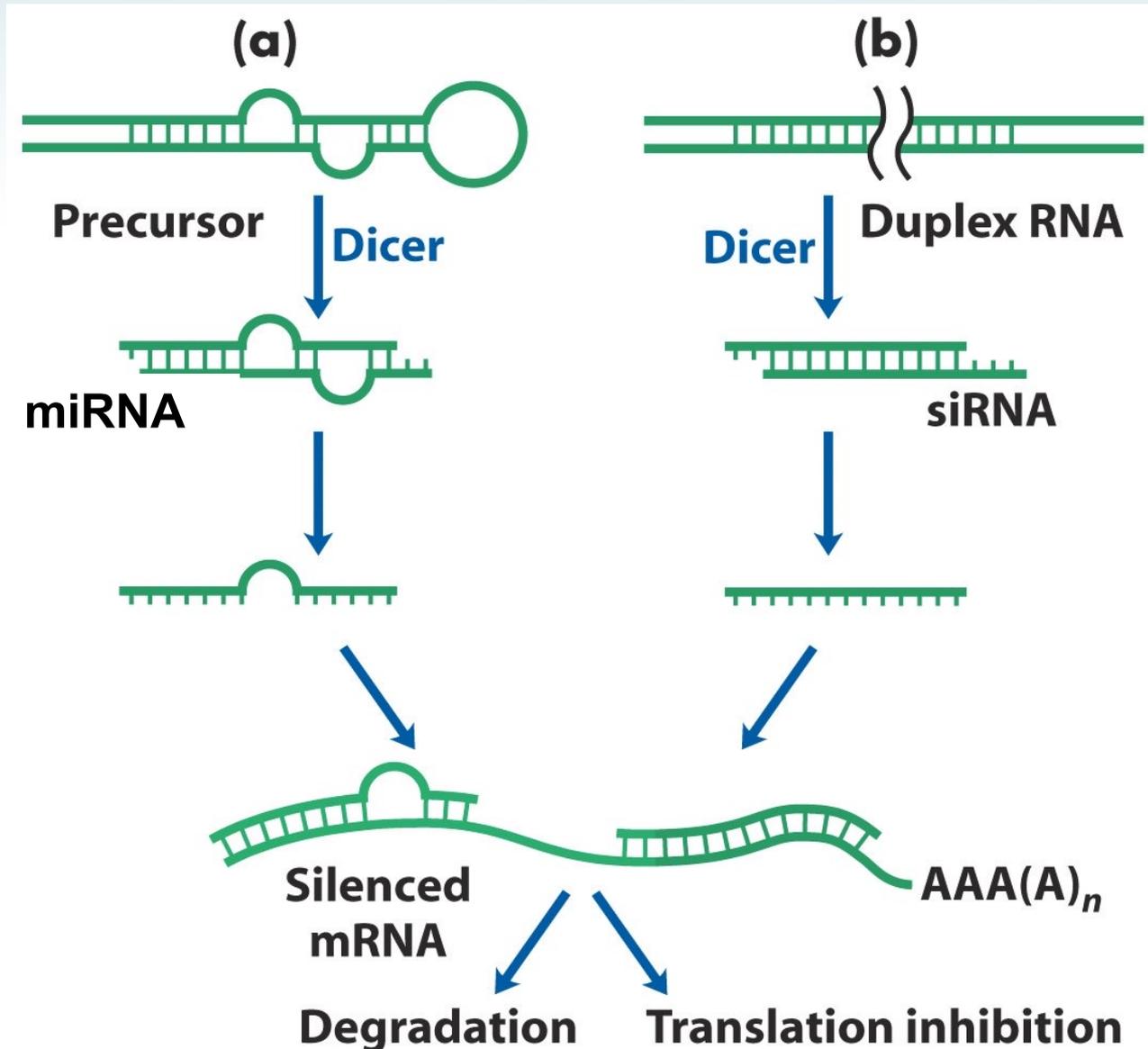
Supressão da tradução

miRNA inibem a expressão gênica pós-transcricionalmente

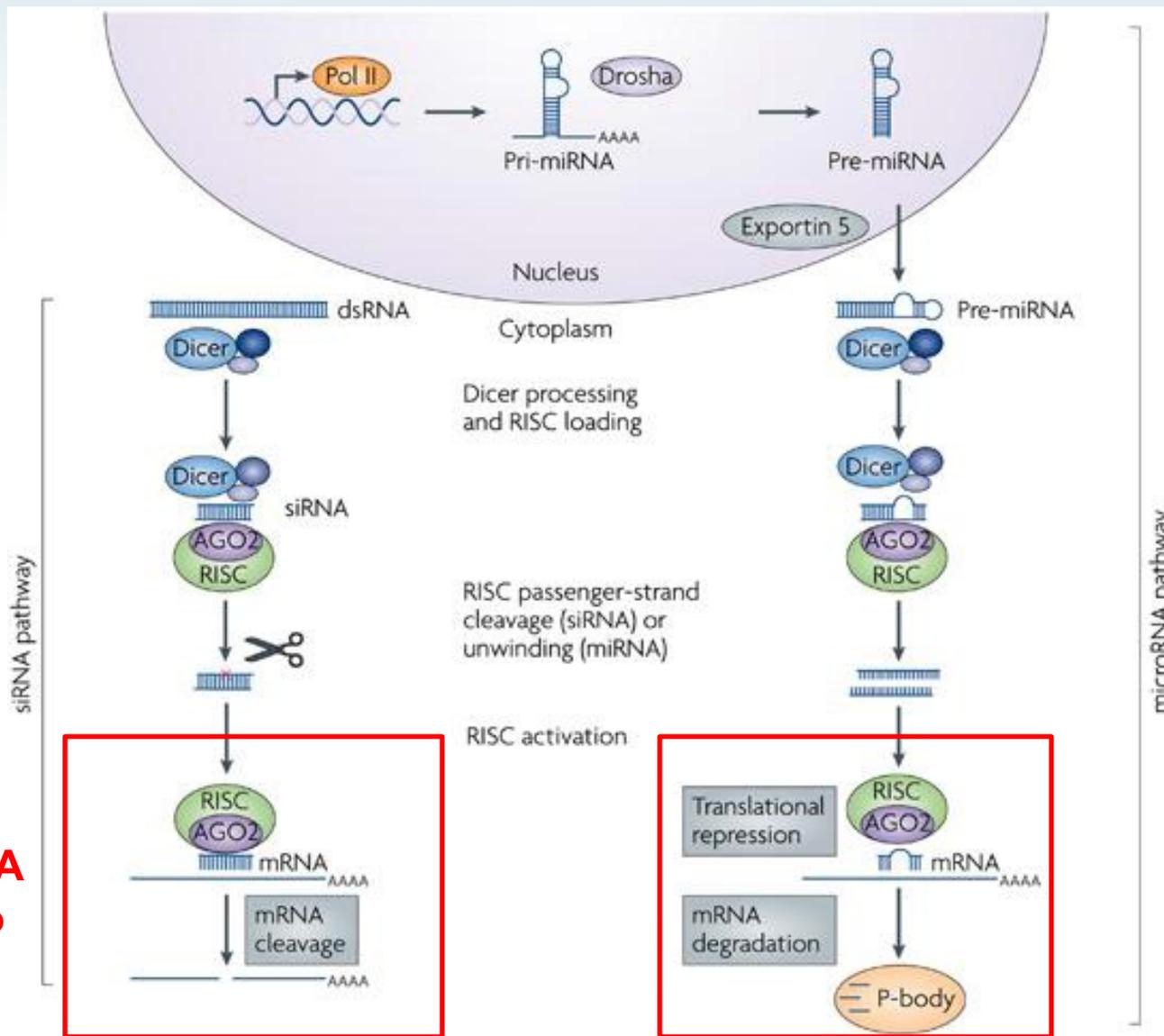
- miRNAs não são exatamente complementares às suas sequências alvo (exceto em plantas).
- miRNAs regulam a tradução
- miRNAs regulam a estabilidade do RNA através de mecanismos distintos dos siRNAs.
- miRNAs frequentemente possuem muitos alvos.



miRNA e siRNAs compartilham o mesmo mecanismo de silenciamento (via Dicer e RISC)



miRNA e siRNAs compartilham o mesmo mecanismo de silenciamento (via Dicer e RISC)



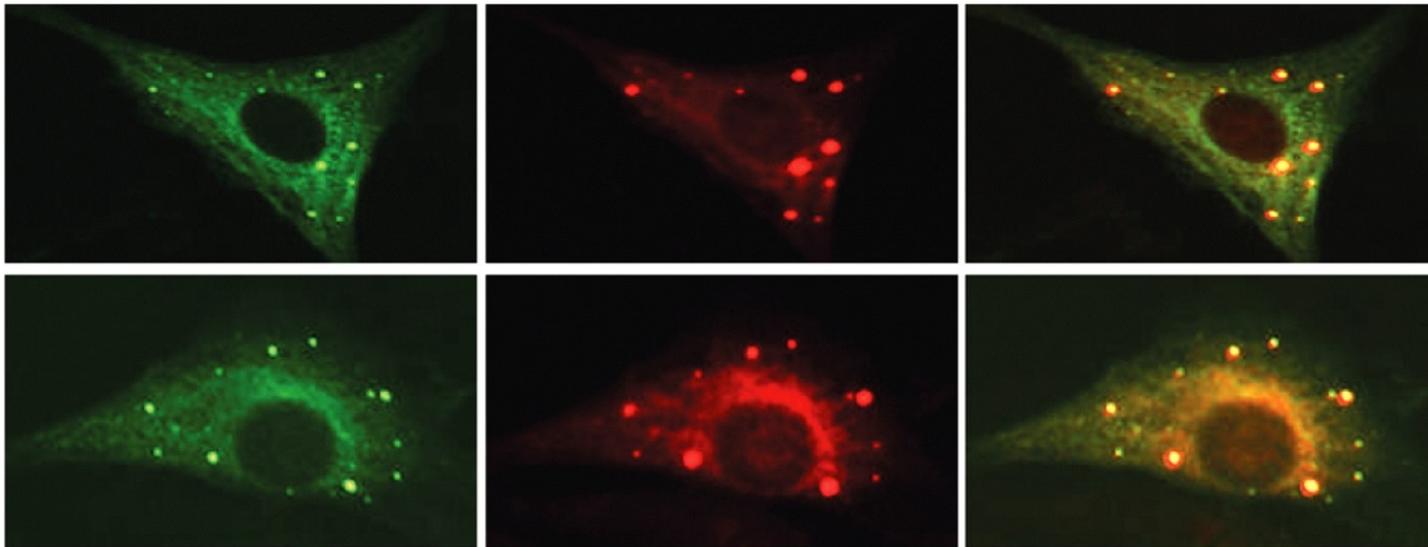
Complexo RISC/siRNA é reciclado

Complexo RISC/miRNA permanece associado a fita de mRNA

Corpos P (*P*-bodies)

DCp1a
(remove a capa 5')

Argonaute



20 μm

Figure 7-114 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Regulação de metástases por miRNAs

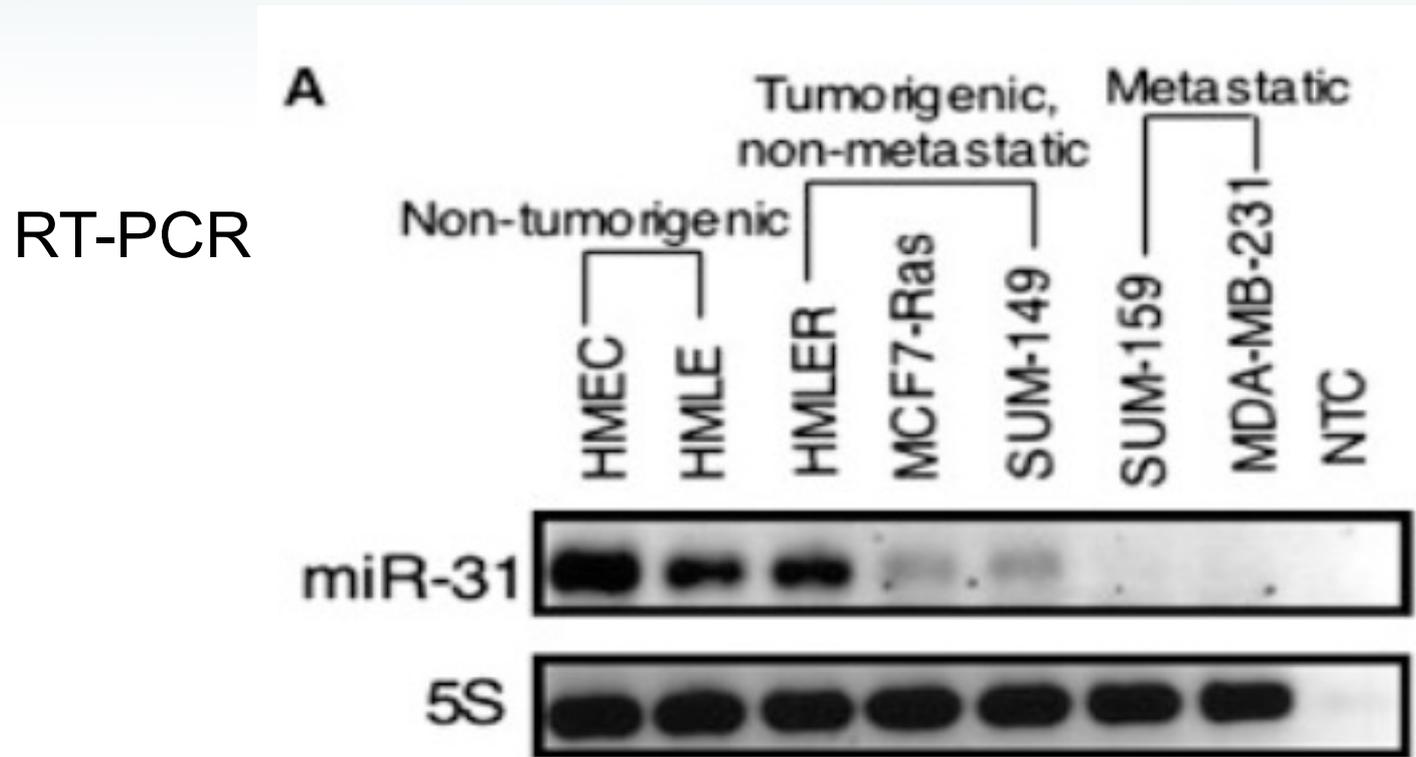
O processo de metástase é responsável por ~ 90% das mortes devido ao câncer.

Metástase é um processo complicado que envolve muitas mudanças na expressão gênica celular.

Muitos miRNAs tem níveis de expressão alterados na metástase.

Os miRNAs podem regular o processo metastático?

Os níveis do miRNA-31 estão inversamente correlacionados com a capacidade metastática de linhagens celulares de câncer de mama

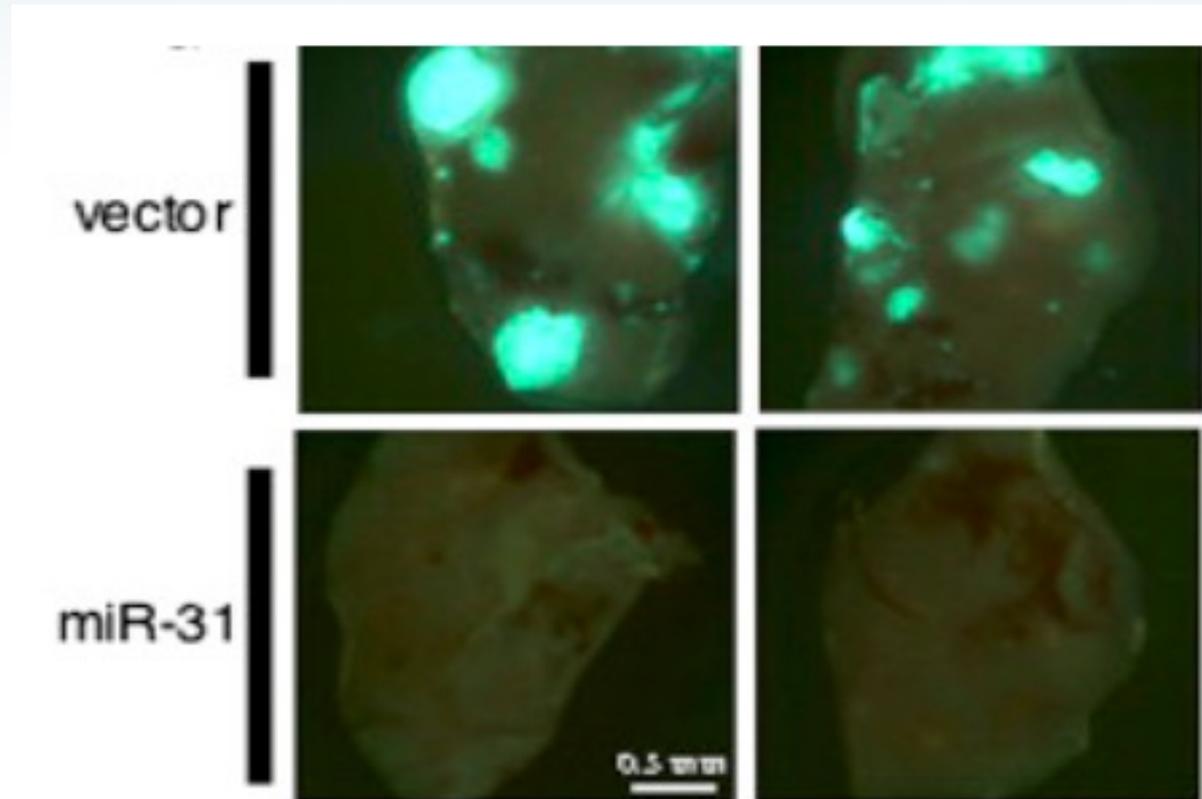


Será que a expressão de miRNA-31 impede a formação de metástases?

injetar células 231-GFP
na porção adiposa da
glândula mamária de
camundongos



Analisar a formação de
tumores em um sítio
distal (pulmões) que se
formam a partir de
metástases.

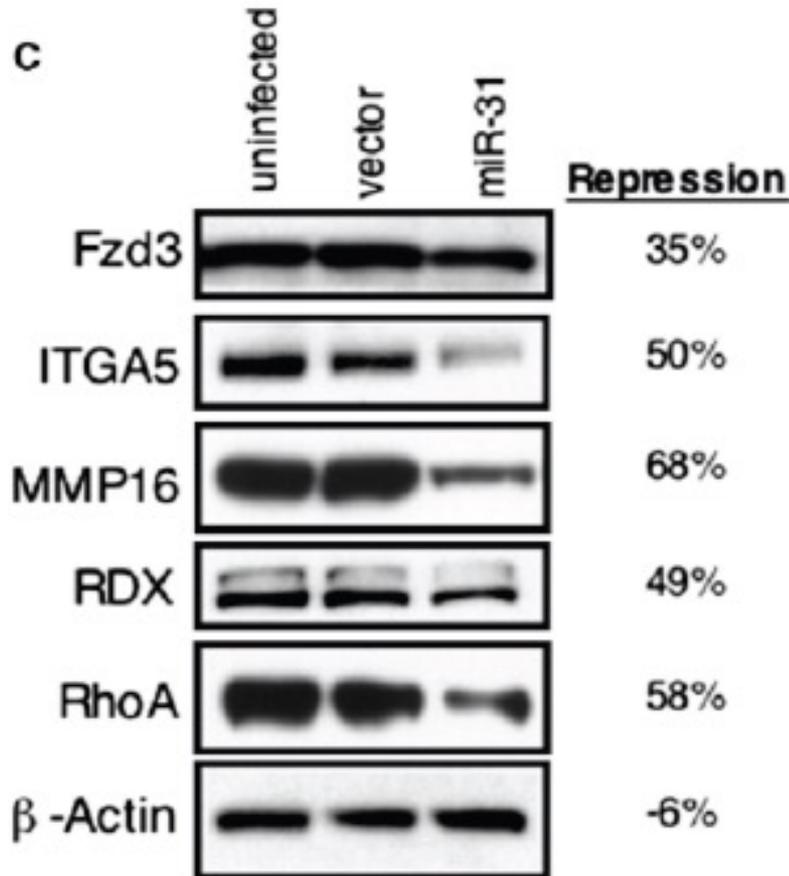


Como o miRNA-31 impede a formação de metástases?

Procurar genes com sequência 3' UTR complementar ao miRNA-31.

Testar como a expressão dos genes candidatos responde ao miRNA-31.

Testar como as sequências UTR respondem ao miRNA-31.



Na presença de miR-31, a expressão do gene reporter será menor se o sítio de ligação for um sítio verdadeiro.

O miR-31 bloqueia metástases

O miR-31 inibe vários genes envolvidos em motilidade celular, remodelação de citoesqueleto, adesão celular e polaridade celular, que encontram-se alterados em metástases.

3 destes genes (ITGa5, RhoA, RDX) são suficientes para mediar os efeitos do miR-31 (Valastyan et al., Genes & Development (2009) 23:2592–2597).

A reativação do miR-31 em células metastáticas pode reverter metástases (Valastyan et al., Genes & Development (2011) 25:646-659).

O miR-31 é um potencial alvo terapêutico no cancer.

RNAs não codificadores na regulação da expressão gênica

PROCARIOTOS

1. Atenuação no operon do triptofano.
2. Riboswitches.
3. snRNAs
4. CRISPR RNAs (sgRNAs)

Regulação **em cis** do dobramento do RNA

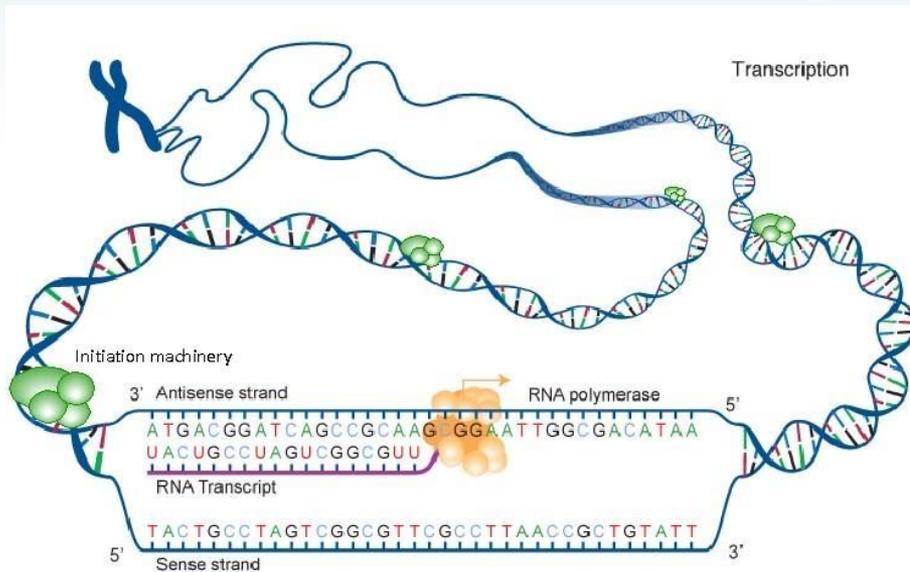
Regulação **em trans**

EUCARIOTOS

- 5. Interferência de RNA/siRNAs/miRNAs**
- 6. RNAs não codificadores longos**
-Xist e inativação do cromossomo X

Regulação **em trans**

RNAs não codificadores longos (lncRNAs)



▶ Intergênicos

Intergenic



■ Coding ■ Noncoding

● Transcritos a pelo menos 1kb de genes codificadores de proteínas;

Antisense



■ Coding ■ Noncoding

▶ Intragênicos:

- **antisense (lncRNA-AS)**
- **senso (sense intronic lncRNA)**

- Transcritos a partir da fita antisseno ou senso de genes codificadores de proteína, em regiões que apresentam sobreposição a introns;

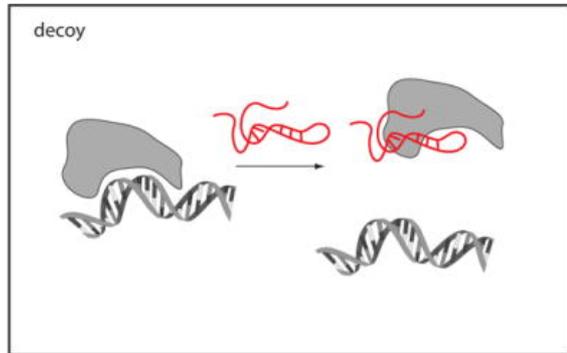
- ▶ A maior parte do genoma (75%) é transcrita em RNAs não codificadores
- ▶ RNAs > 200 nt que não codificam proteínas
- ▶ Classe muito abundante (4X > que mRNAs)
- ▶ Podem assumir estruturas versáteis com funções diversas

Mecanismos de ação dos lncRNAs

- ▶ Interações lncRNA + outras moléculas (proteínas, RNAs, DNA)
 - Atuam principalmente interagindo com complexos remodeladores ou modificadores de cromatina, resultando na modulação da expressão gênica

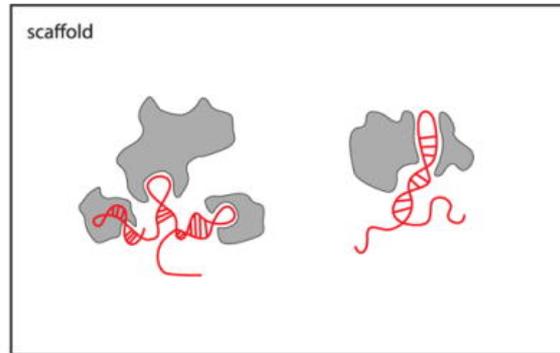
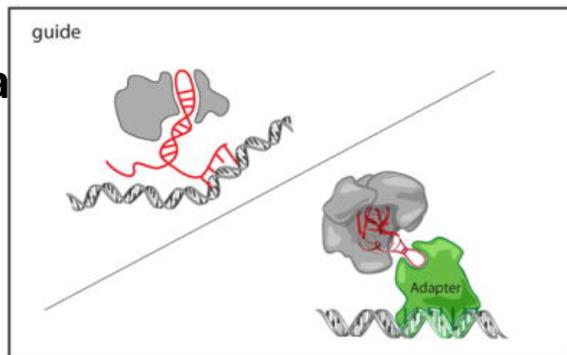
Iscas

Impedem acesso de proteínas regulatórias ao DNA



Modificação da estrutura da cromatina

Recruta proteínas, como enzimas modificadoras da cromatina, para regiões seletivas do DNA

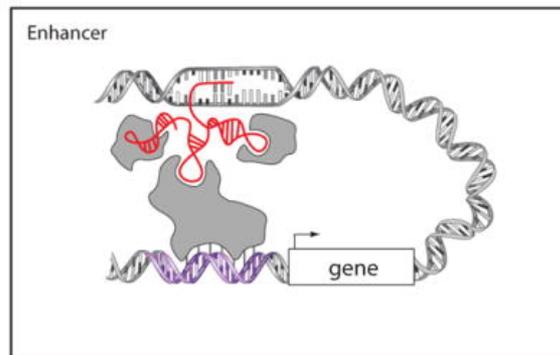


Adaptadores

Atraem duas ou mais proteínas para formar complexos

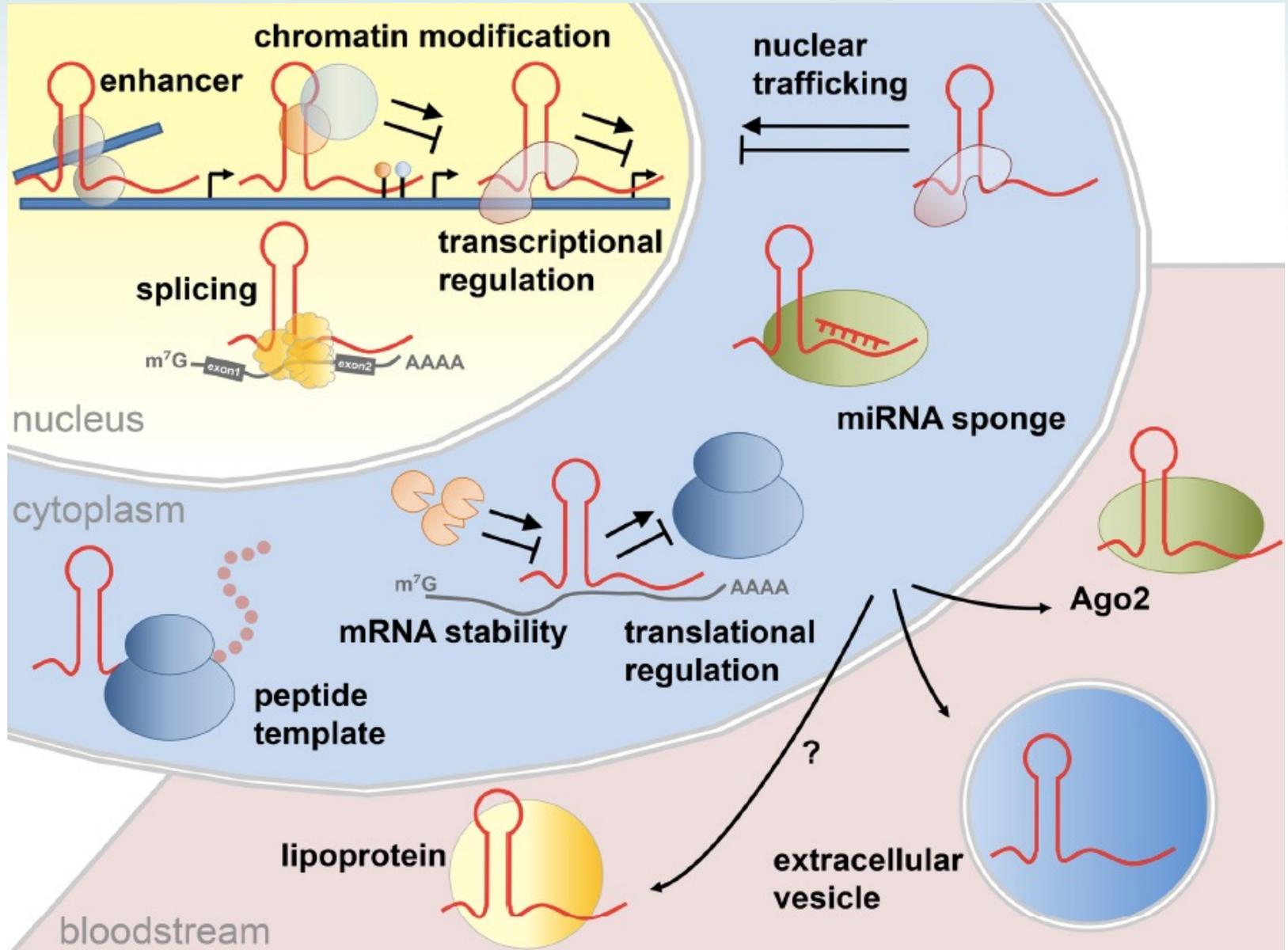
Aumento da expressão gênica

Formação de híbridos RNA/DNA, guiando complexos proteicos para sítios específicos do genoma, criando um looping



Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. Annu Rev Biochem. 2012;81:145-66.

Long Noncoding RNAs (LncRNAs)



RNAs não codificadores longos podem servir de arcabouços para recrutar reguladores da cromatina: Xist e inativação do cromossomo X

Fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X.

Isto gera um problema de “compensação de dose”.

O problema é resolvido pela inativação do cromossomo X: Durante a embriogênese (quando o embrião tem entre 32 a 64 células) um ou o outro cromossomo X é inativado randomicamente. O cromossomo X inativo é herdado durante o restante do desenvolvimento.

Portanto fêmeas adultas são um mosaico genético: elas são compostas de uma mescla de partes descendentes clonais de cada uma das células nas quais um dos cromossomos X foi inativado.

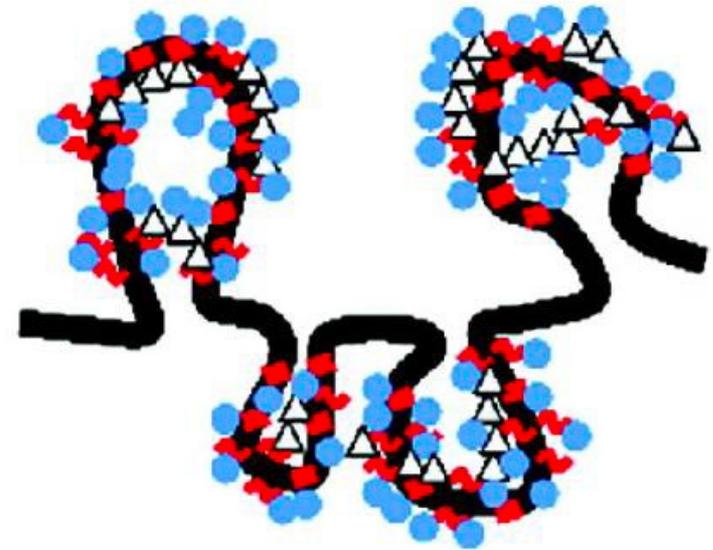
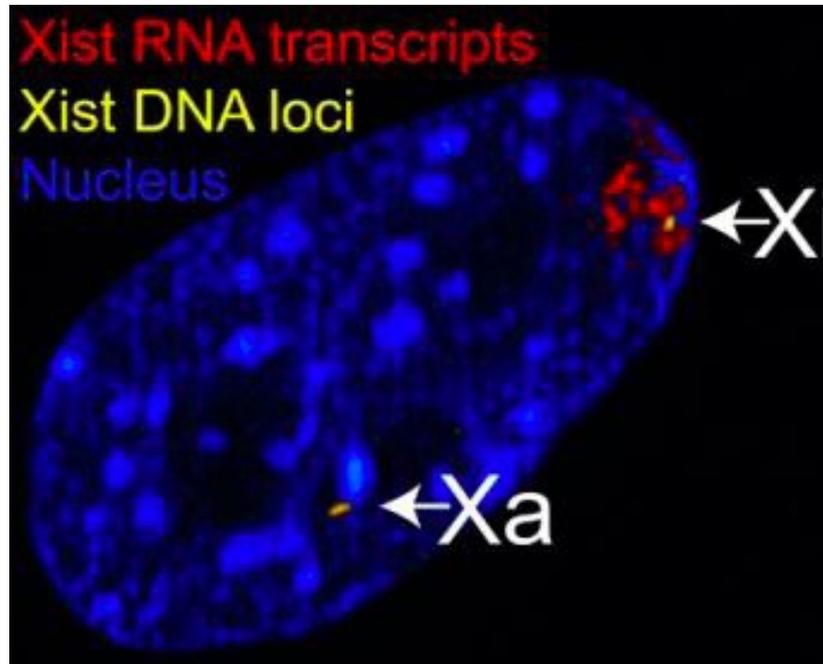
Isto explica porque portadoras heterozigotas de mutações dominantes associadas ao cromossomo X podem ser assintomáticas.

A inativação do X é mediada por um ncRNA longo chamado **Xist**

Xist é transcrito a partir do cromossomo X inativo.

Xist recobre o cromossomo X inativo.

Xist recruta proteínas modificadoras da cromatina para o cromossomo X inativo.



- cromatina
- complexo repressor nucleossomal
- △ proteína de ancoragem
- ♥ RNA Xist

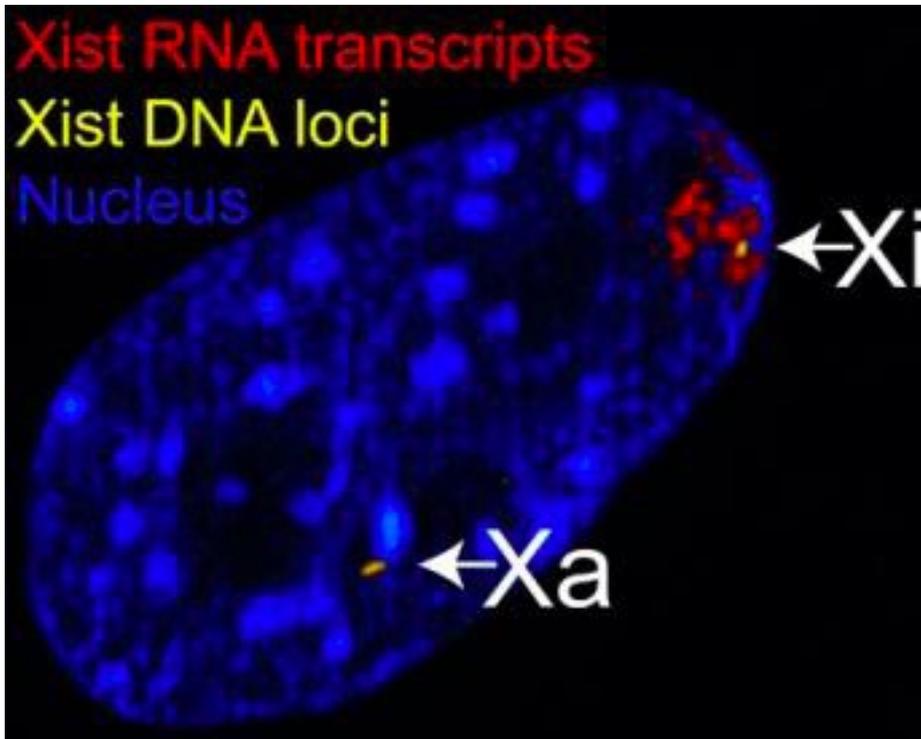
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AXistRNADNAFISH.jpg>

A inativação do X é mediada por um ncRNA longo chamado **Xist**

Xist é transcrito a partir do cromossomo X inativo.

Xist recobre o cromossomo X inativo.

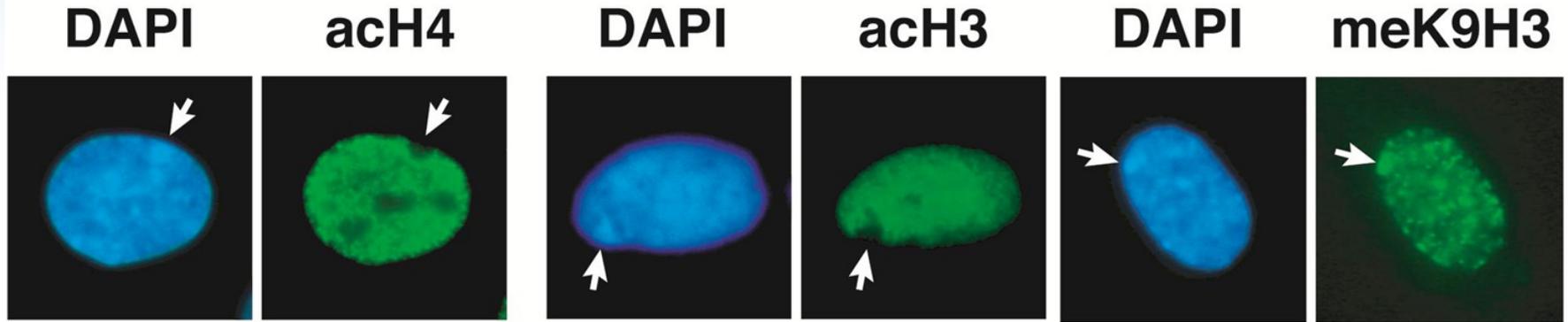
Xist recruta proteínas modificadoras da cromatina para o cromossomo X inativo.



Com base no seu conhecimento de modificações da cromatina, que modificações você esperaria encontrar em altos níveis no cromossomo X inativo?

Quais você esperaria encontrar em baixo nível?

Xist recruta proteínas modificadoras da cromatina para o cromossomo X.



O cromossomo X inativo tem baixos níveis de histonas acetiladas.

O cromossomo X inativo tem altos níveis de histonas metiladas.