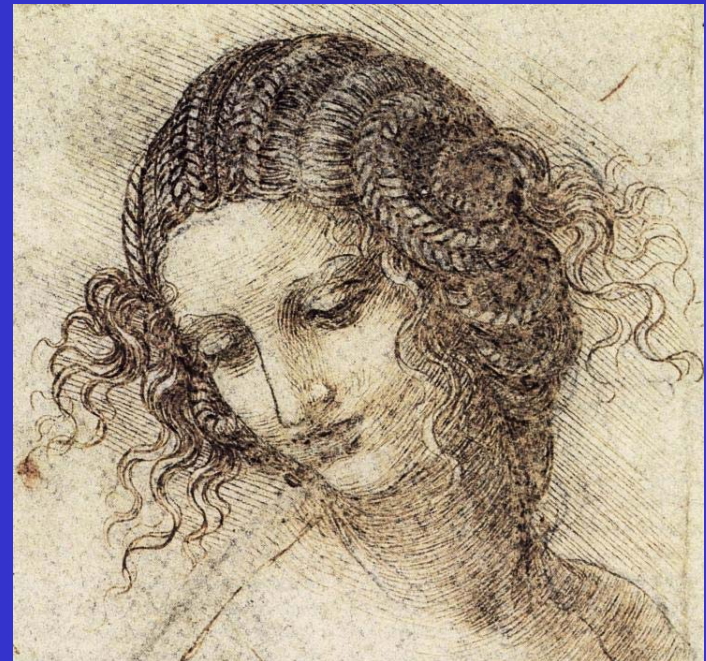
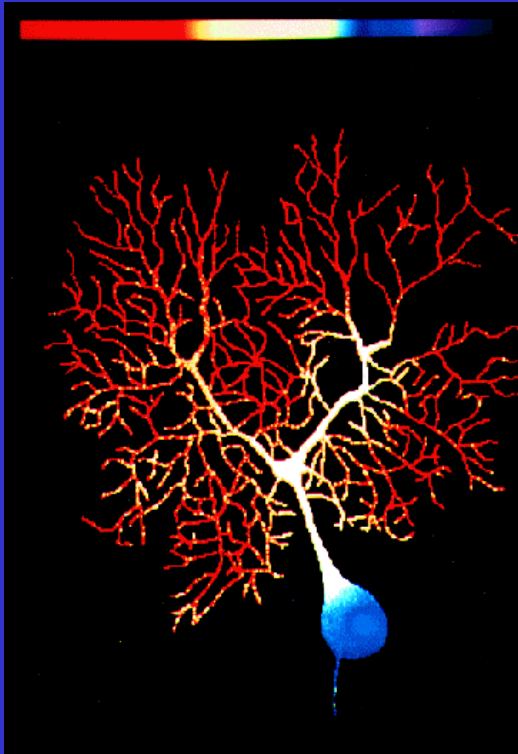


**COMO UMA SÓ CÉLULA FECUNDADA PODE
DAR ORIGEM A UM ORGANISMO COMPLEXO?**

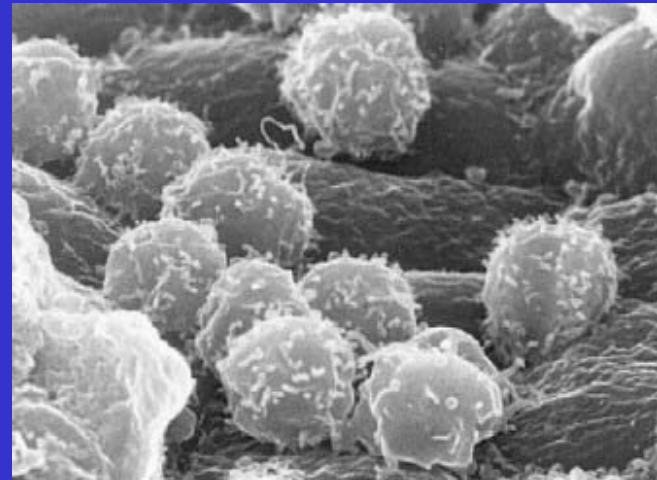


**DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS
NUM MESMO ORGANISMO
DIFEREM DRAMÁTICAMENTE**

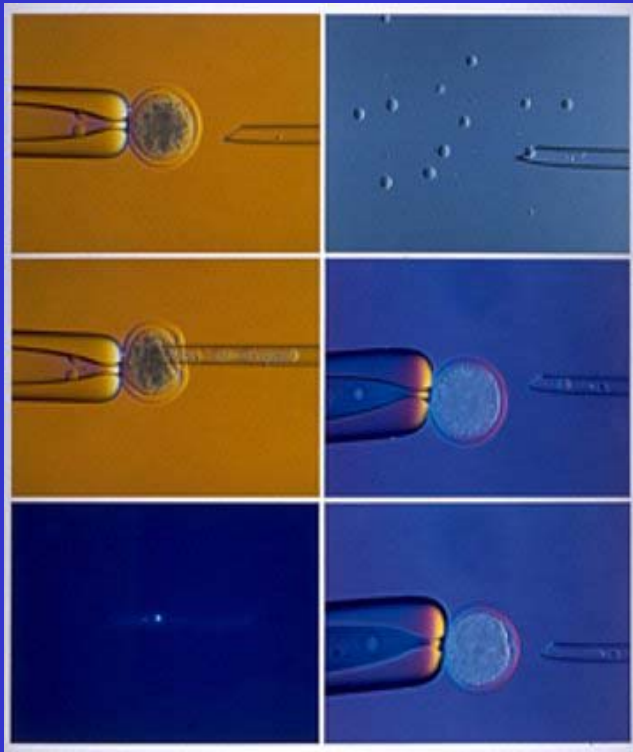


NEURÔNIO

LINFÓCITOS



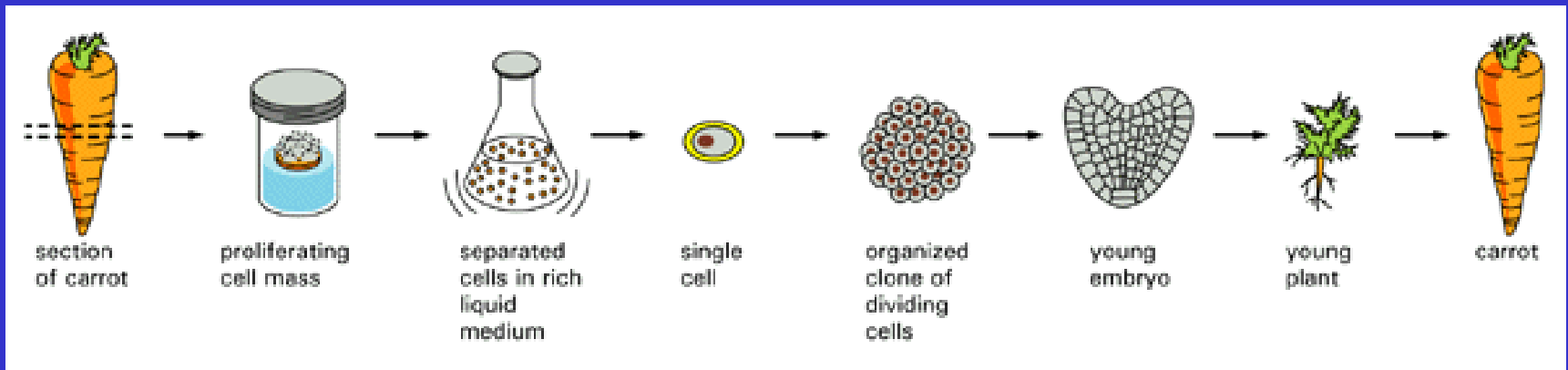
É POSSÍVEL *ATÉ* OBTER UM NOVO ORGANISMO A PARTIR DE UMA SÓ CÉLULA SOMÁTICA



DOLLY

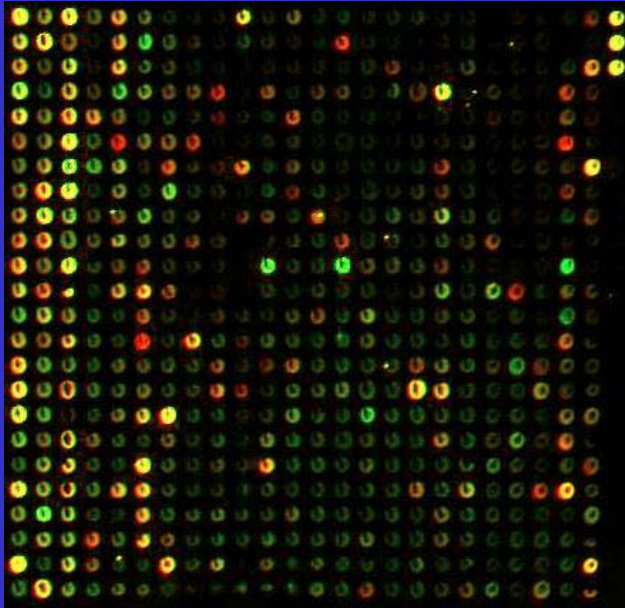
**TRANSFERÊNCIA
DE NÚCLEO**

PLANTAS TAMBÉM PODEM SE REGENERAR A PARTIR DE UMA CÉLULA



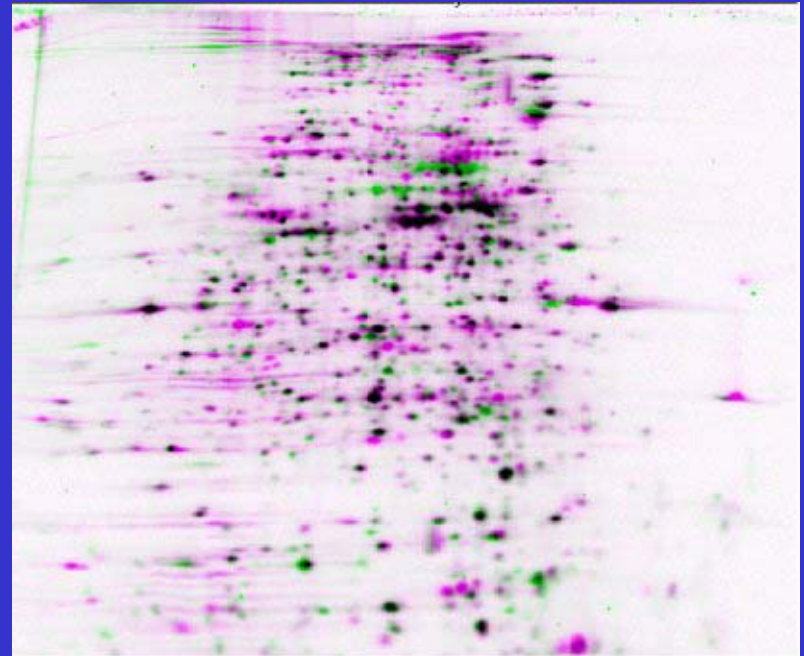
DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS OU ORGANISMOS É DADA PELA EXPRESSÃO DE DIFERENTES PROTEÍNAS:

- Muitas proteínas, são comuns (proteínas estruturais do citoesqueleto e cromosomas, ribossomais, enzimas metabólicas, etc.)**
- Outras MUITO específicas: hemoglobina.**
- Se as +/- 2000 proteínas + abundantes são comparadas entre diferentes células ou tecidos de um mesmo animal, grande maioria diferenças quantitativas de menos de 5X.**
- Aparentemente diferenças relativamente pequenas, de proteínas não majoritárias, causam grandes diferenças .**

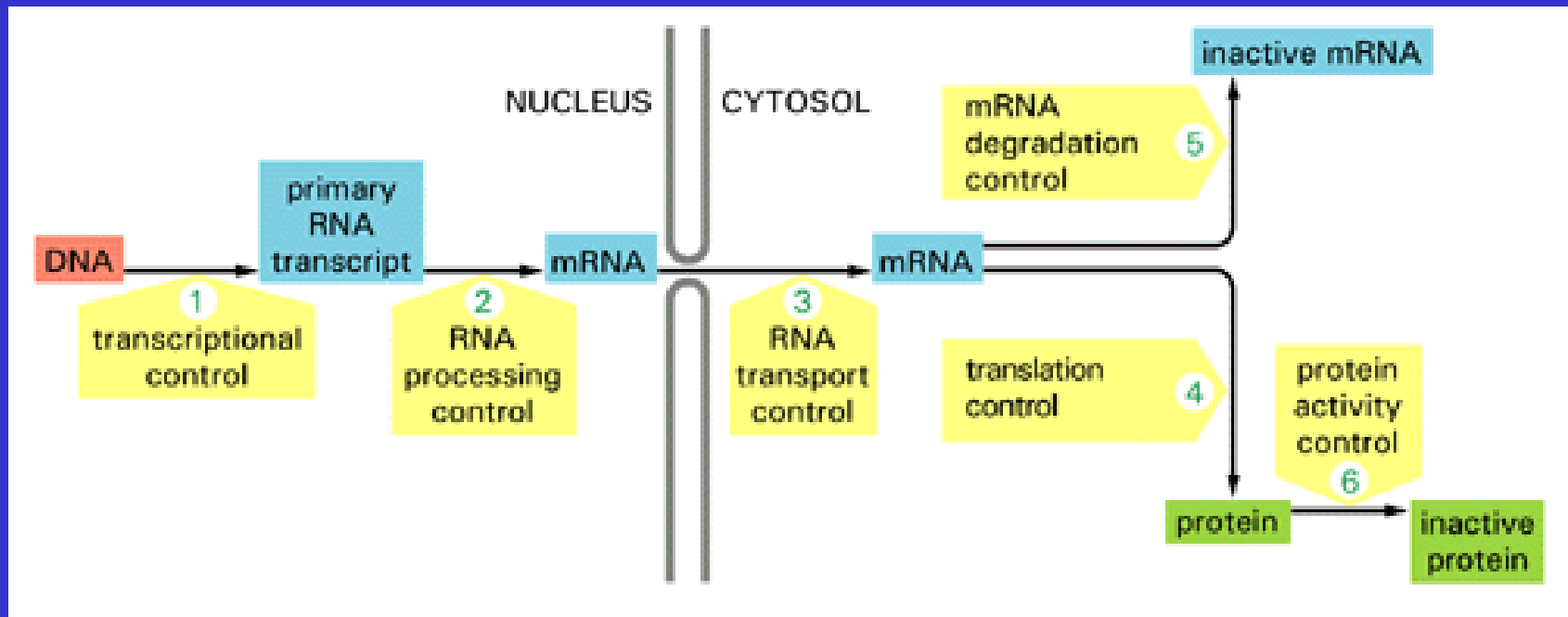


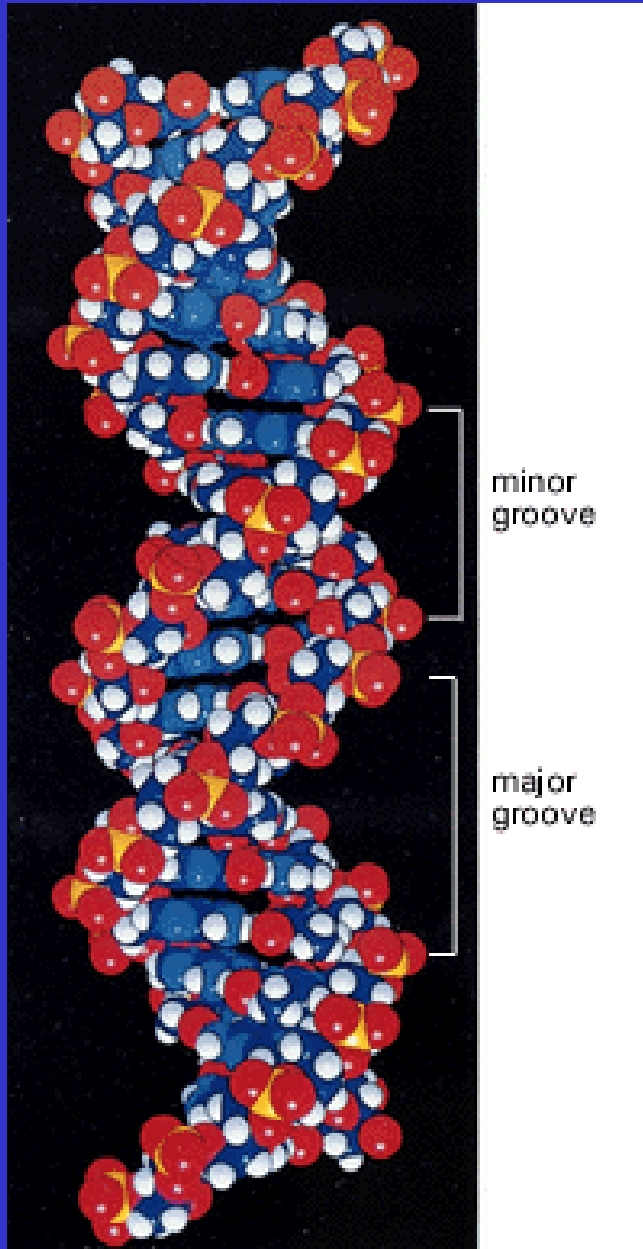
MICROARRAY

PROTEOMA



SEIS PASSOS NO CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUKARIOTOS

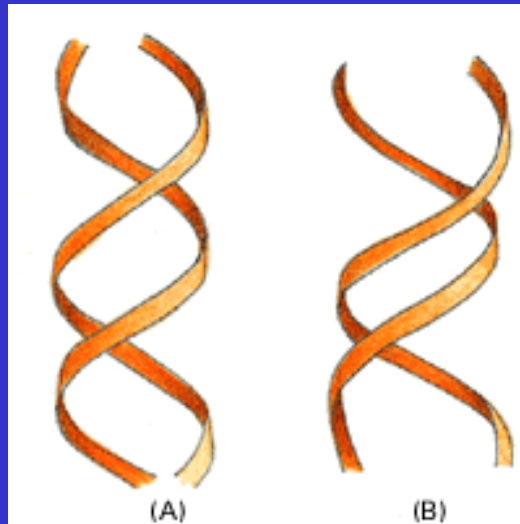




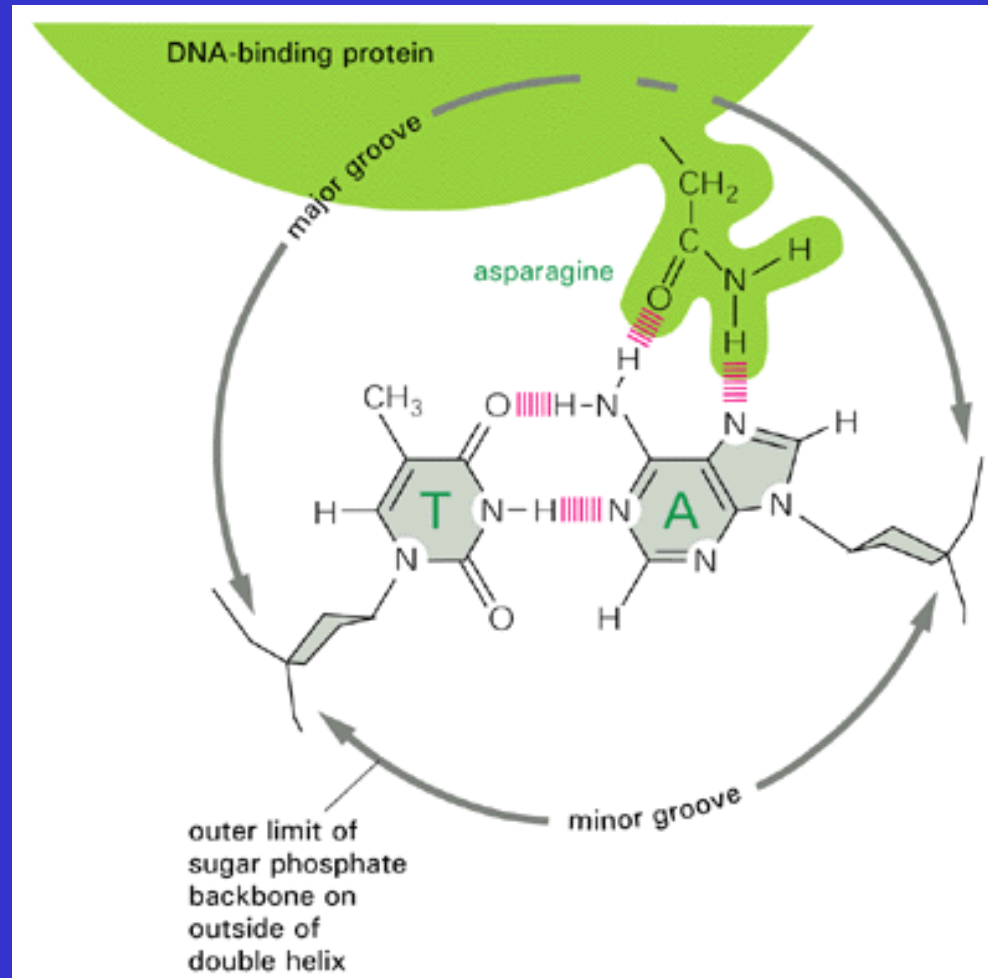
NESSE CENÁRIO SE DÃO AS INTERAÇÕES QUE VÃO PERMITIR A REGULAÇÃO GÊNICA

A beira das bases é exposta na superfície da dupla-hélice, apresentando um padrão de doadores ou receptores de ligações de hidrogênio, e regiões hidrofóbicas. No sulco maior, padrões únicos que definem o arranjo das 4 bases. Portanto, maioria das interações no sulco maior.

LIGAÇÃO DE MOLÉCULAS REGULATÓRIAS PODEM DEFORMAR O DNA



LIGAÇÃO DE PROTEÍNA REGULATÓRIA AO SULCO MAIOR DO DNA

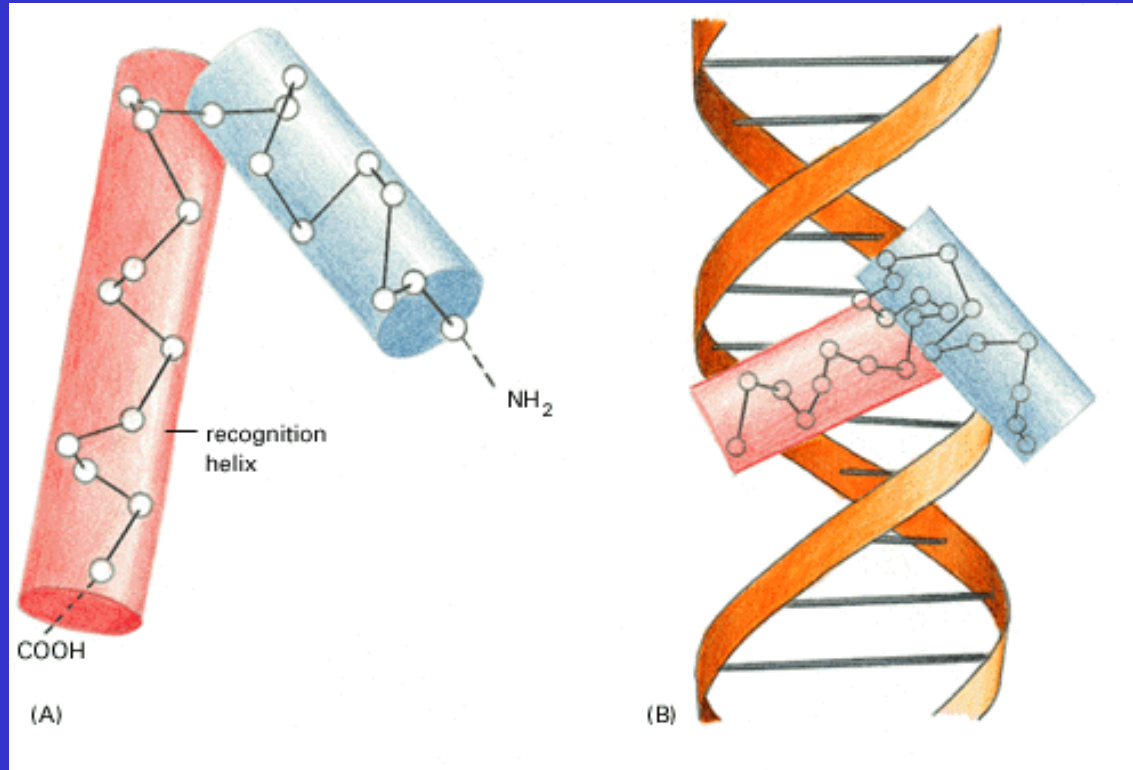


PODEM OCORRER 10-20 DESSES CONTATOS, COM DIFERENTES AMINO-ÁCIDOS, COM DIFERENTES ENERGIAS DE LIGAÇÃO. Interações DNA-proteína são das mais fortes e mais específicas conhecidas.

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE VÁRIAS INTERAÇÕES MOSTROU UM PEQUENO SET DE MOTIVOS LIGADORES A DNA, QUE USAM ALFA-HÉLICES OU FOLHAS BETA PARA SE LIGAR AO SULCO MAIOR.

**- HÉLICE-VOLTA- HÉLICE (“helix-turn-helix”): duas alfa hélices conectadas por cadeia curta de amino-ácidos (a volta-
”turn”), mantidas em ângulo fixo.**

O MOTIVO HÉLICE-VOLTA-HÉLICE (helix-turn-helix)

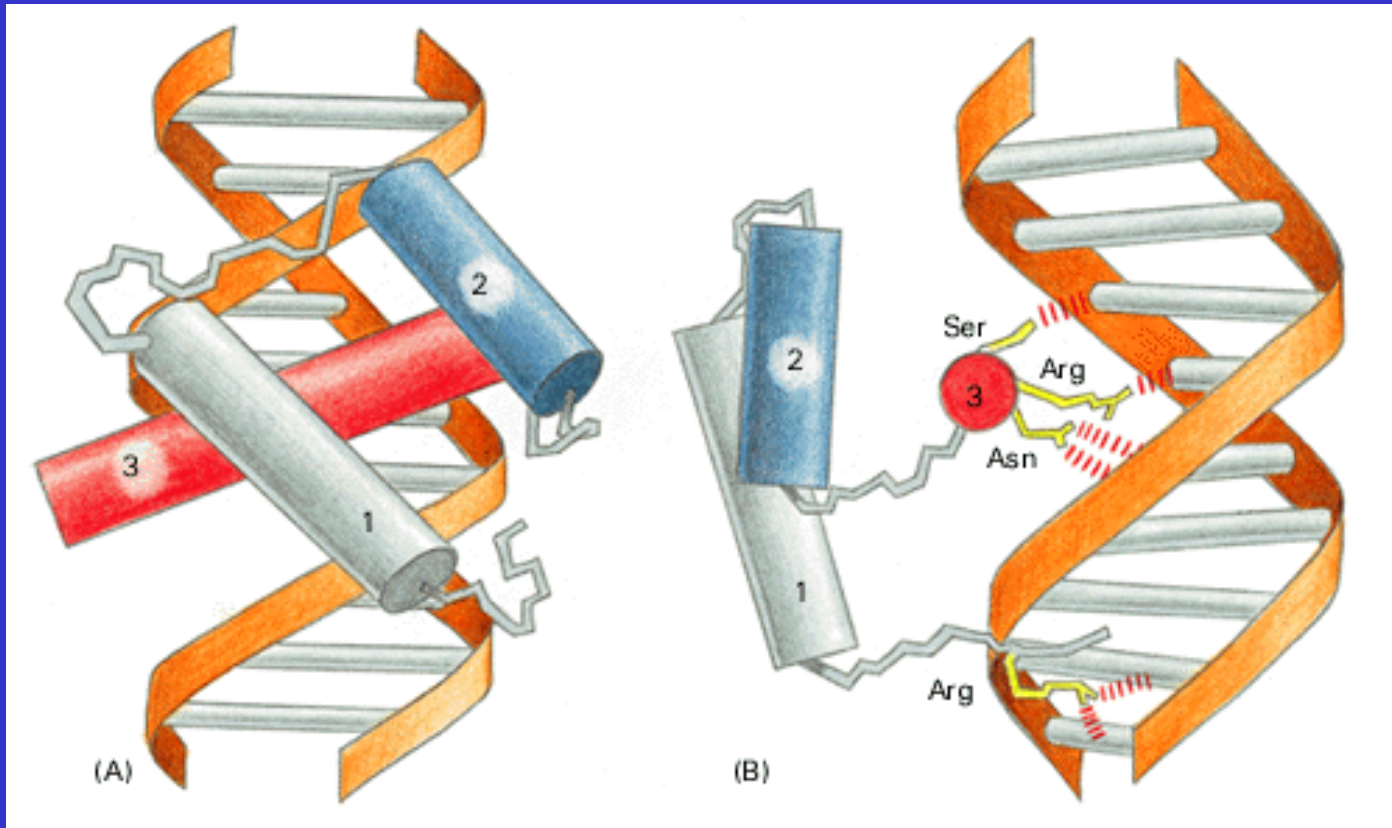


Círculo branco: carbono central de um amino-ácido. Hélice rosa, de reconhecimento, participa no reconhecimento de sequência específica. Encaixa no sulco maior, onde contata as beiras dos pares de bases.

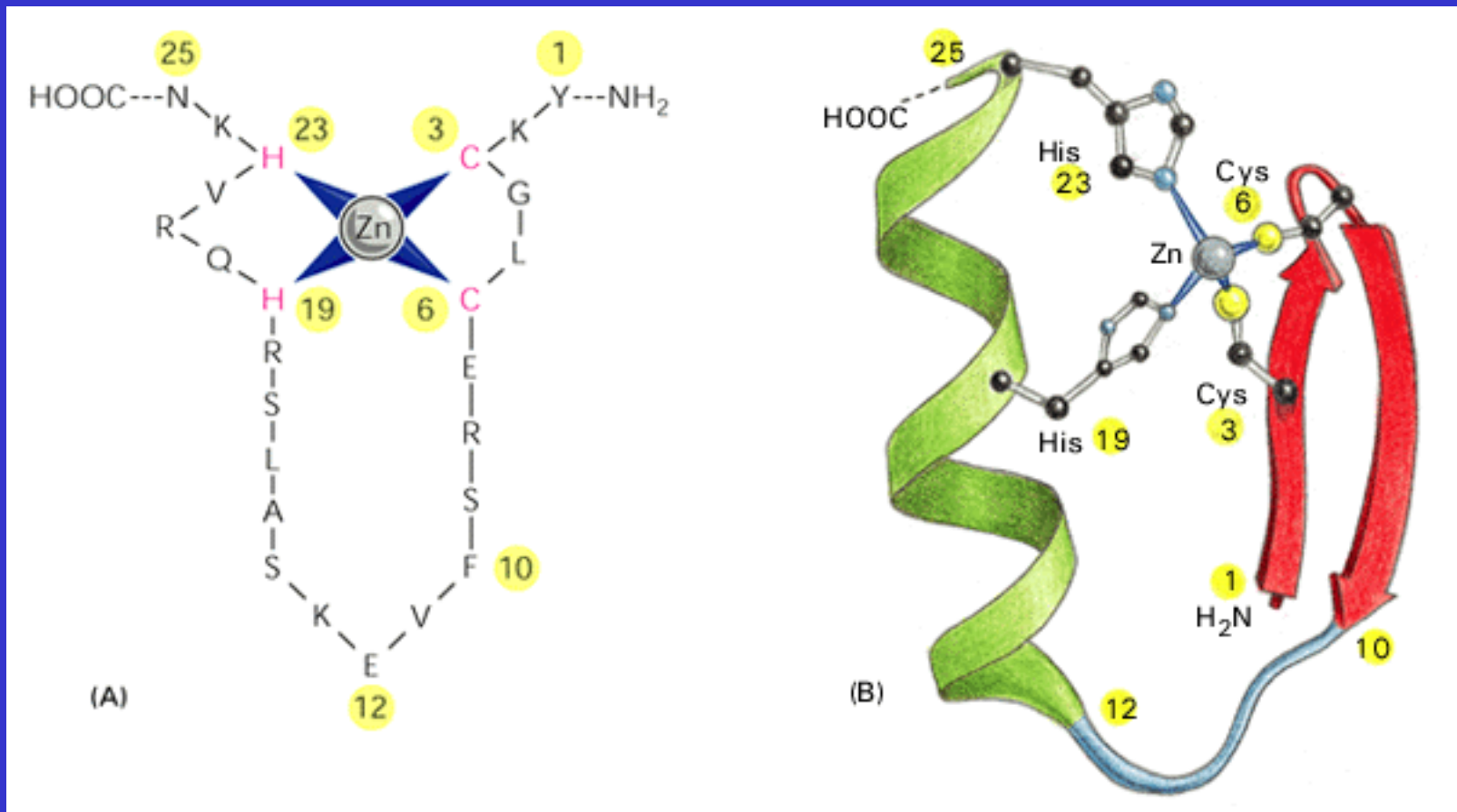
GENES HOMEÓTICOS, PRIMEIRO IDENTIFICADOS EM DROSOPHILA, ENVOLVIDOS EM DESENVOLVIMENTO. Conservados em eucariotos superiores, mamíferos

GRUPO DE PROTEÍNAS CARACTERIZADAS PELA PRESENÇA DE 60 AMINO-ÁCIDOS CONSERVADOS: HOMEODOMÍNIOS

CONSERVAÇÃO DE ESTRUTURA INDICA QUE INTERAÇÃO COM DNA SEMPRE PARECIDA. LEVEDURA E DROSOPHILA MESMA INTERAÇÃO, APESAR DE SO 17 DOS 60 AMINO-ÁCIDOS SEREM OS MESMOS.

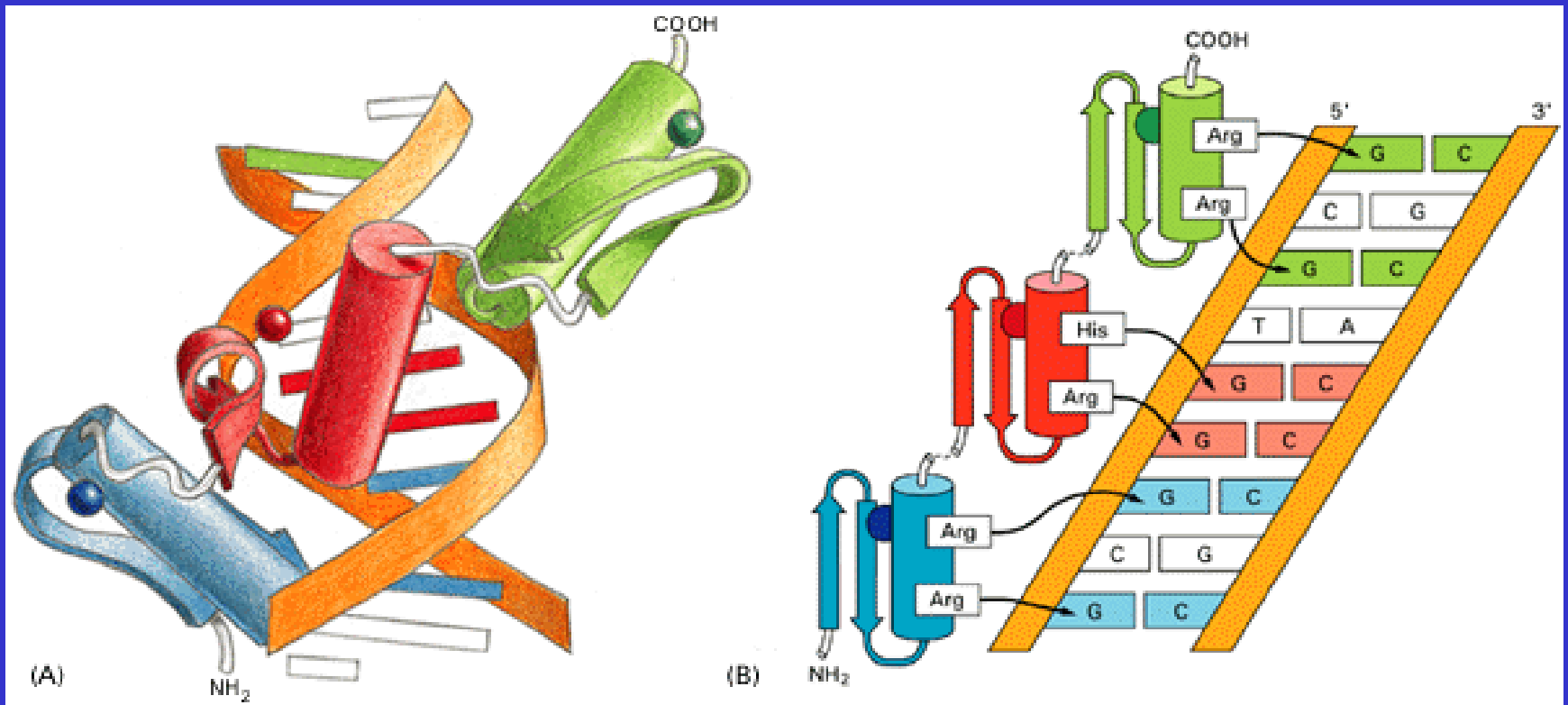


Homeodomínio com 3 alfa-hélices . Hélices 2 e 3 parecem o motivo hélice-volta-hélice. H3 asnXAdeninina. H1, haste flexível interagindo com arg na “small groove”. Levedura, similar a *Drosophila*.



MOTIVOS DE DEDOS DE ZINCO (“ZINK FINGER MOTIFS”)

(A) Nome vem do desenho esquemático. (B) Exemplo: proteína regulatória da transcrição de proteína ribossomal: uma alfa-hélice e uma folha beta, ligados pelo zinco.



.Proteína regulatória de camundongo, contendo 3 motivos de dedo de zinco em tandem. Aumento de número de repetições aumenta a especificidade da interação.

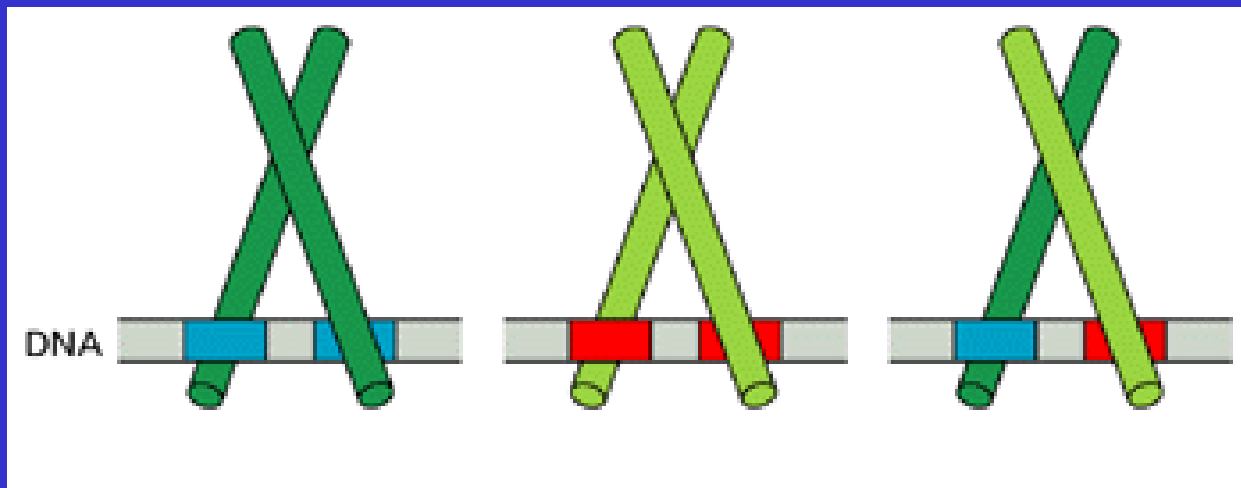
ZIPPER DE LEUCINA LIGADO AO DNA



CADA METADE DA ESTRUTURA SE LIGA À METADE DE UMA REGIÃO SIMÉTRICA DE DNA.

HETERODIMERIZAÇÃO DE ZIPPER DE LEUCINA

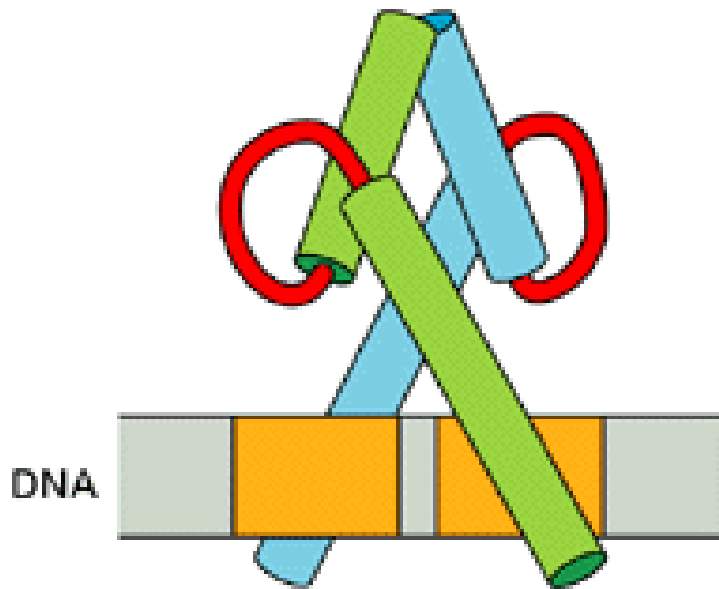
CONTROLE COMBINATÓRIO, ONDE COMBINAÇÕES DE PROTEÍNAS,
CONTROLAM O PROCESSO CELULAR.



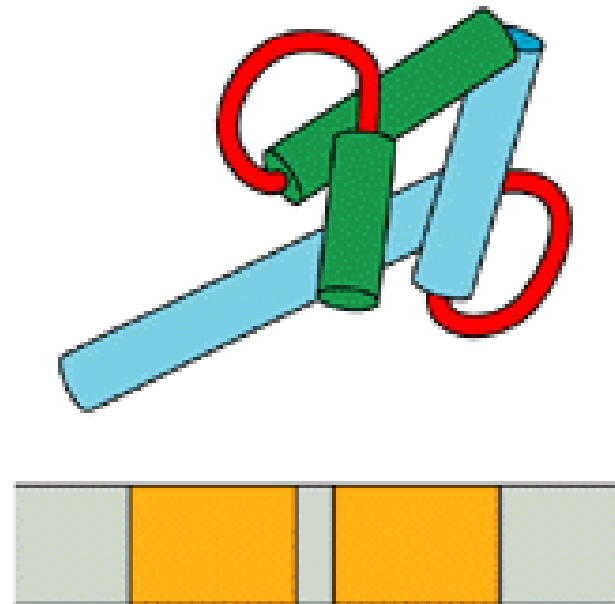
AZUL E VERMELHO, DIFERENTES SEQUENCIAS DE DNA

MOTIVO HÉLICE-LAÇO-HÉLICE (“helix-loop-helix”)

active HLH homodimer



inactive HLH heterodimer



**APESAR DE TODAS ESSAS
INFORMAÇÕES, É
IMPOSSÍVEL PREVER QUE
TIPO DE PROTEÍNA VAI
INTERAGIR COM UMA
SEQUÊNCIA DE DNA
ESPECÍFICA**

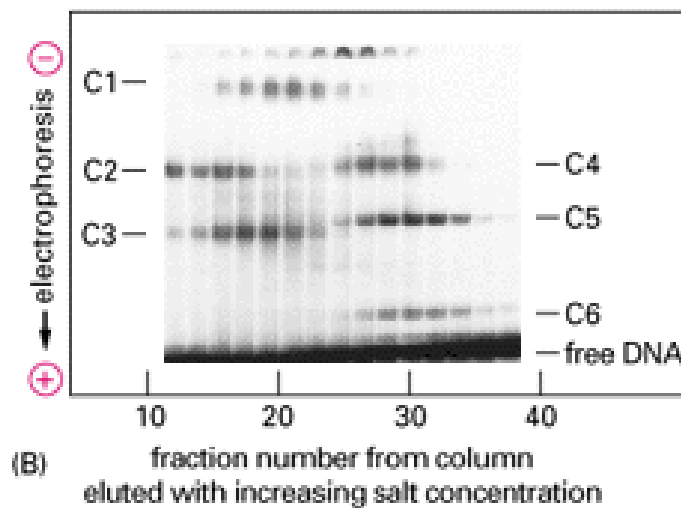
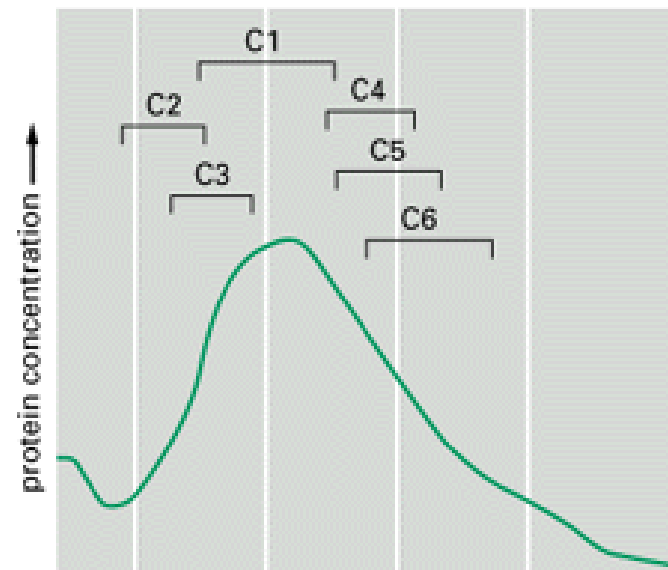
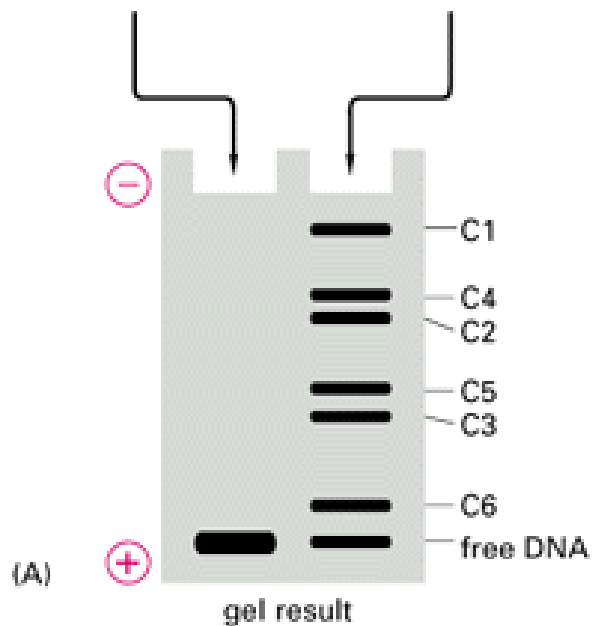
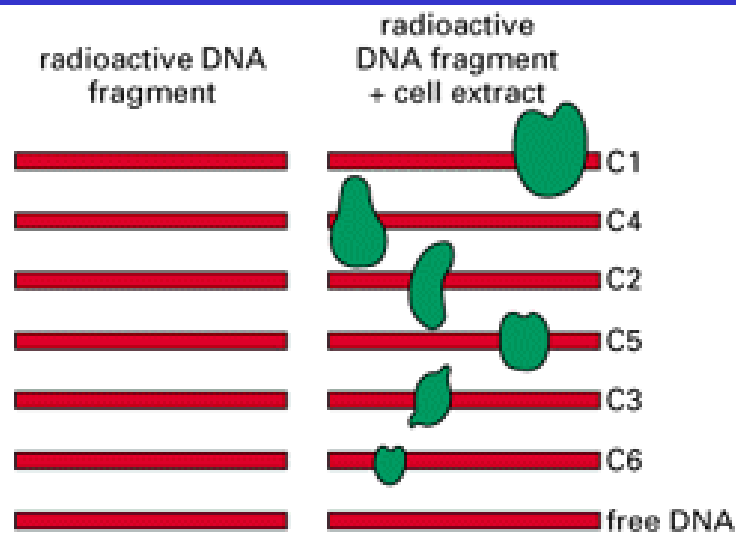
**NO FUTURO: DESENHO DE
PROTEÍNAS REGULATÓRIAS
NO LABORATÓRIO?**

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS

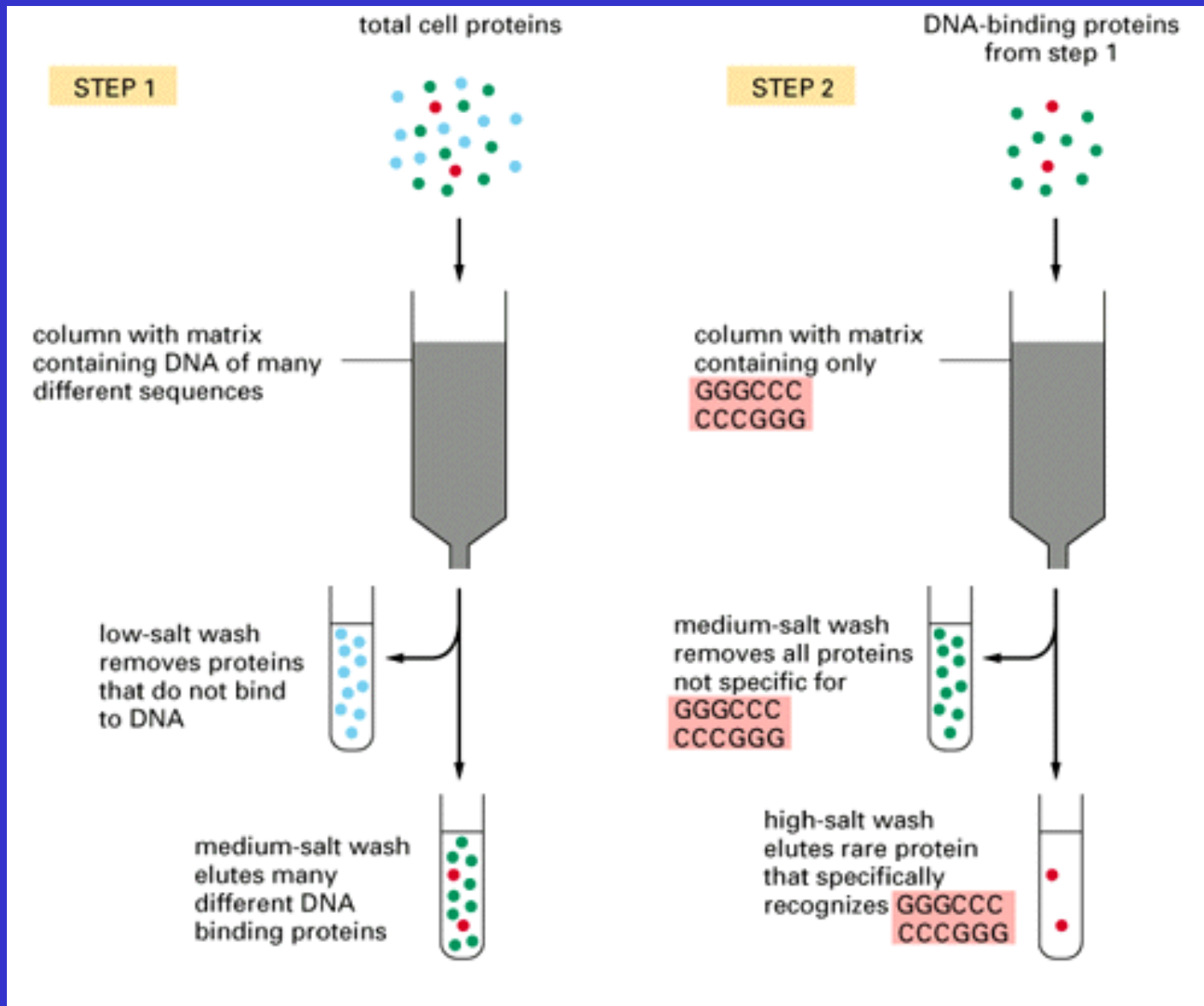
**EM DROSOPHILA, LEVEDURA, ATRAVÉS DA
GENÉTICA.**

EM VERTEBRADOS?

**GEL DE MODIFICAÇÃO DE MOBILIDADE
(MOBILITY SHIFT GEL)**

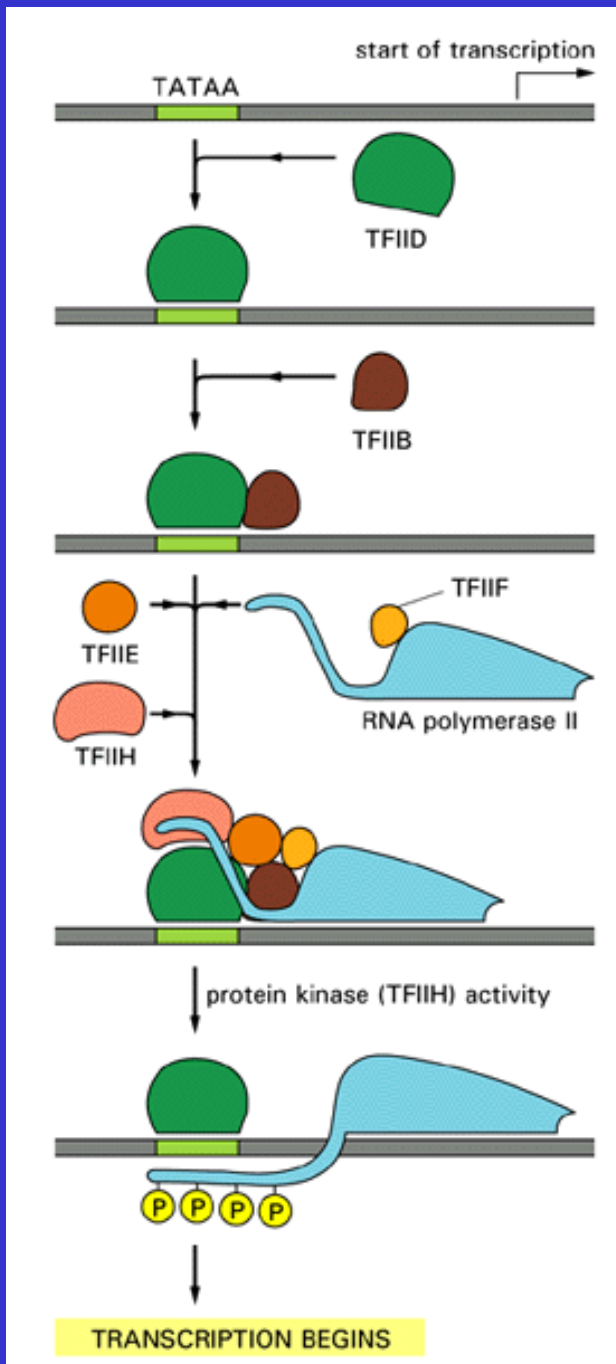


PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE SE LIGAM A SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE DNA



COMO REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE EUCARIOTOS DIFERE DE PROCARIOTOS?

- A POLIMERASE, PARA INICIAR TRANSCRIÇÃO, PRECISA DE FATORES GERAIS DE TRANSCRIÇÃO, QUE SE AGRUPAM NO PROMOTOR. NESTE PONTO EXISTEM MUITOS PASSOS, QUE PODEM PROVOCAR UMA ACELERAÇÃO OU DIMINUIÇÃO DO RITMO DE TRANSCRIÇÃO.
- MUITAS PROTEÍNAS REGULATÓRIAS PODEM INTERAGIR COM SEQUENCIAS QUE ESTÃO A MILHARES DE PB DO PROMOTOR QUE ELAS INFLUENCIAM.
- CROMATINA: NUCLEOSOMAS.



DESCOBERTA DE QUE POLIMERASE (POL II, ERSPONSÁVEL PELA TRANSCRIÇÃO DA GRANDE MAIORIA DOS GENES DE EUCARIOTOS) NÃO CONSEGUE TRANSCREVER DNA DE EUCARIOTOS IN VITRO LEVOU À BUSCA E DESCOBRIMENTO DE FATORES GERAIS DE TRANSCRIÇÃO

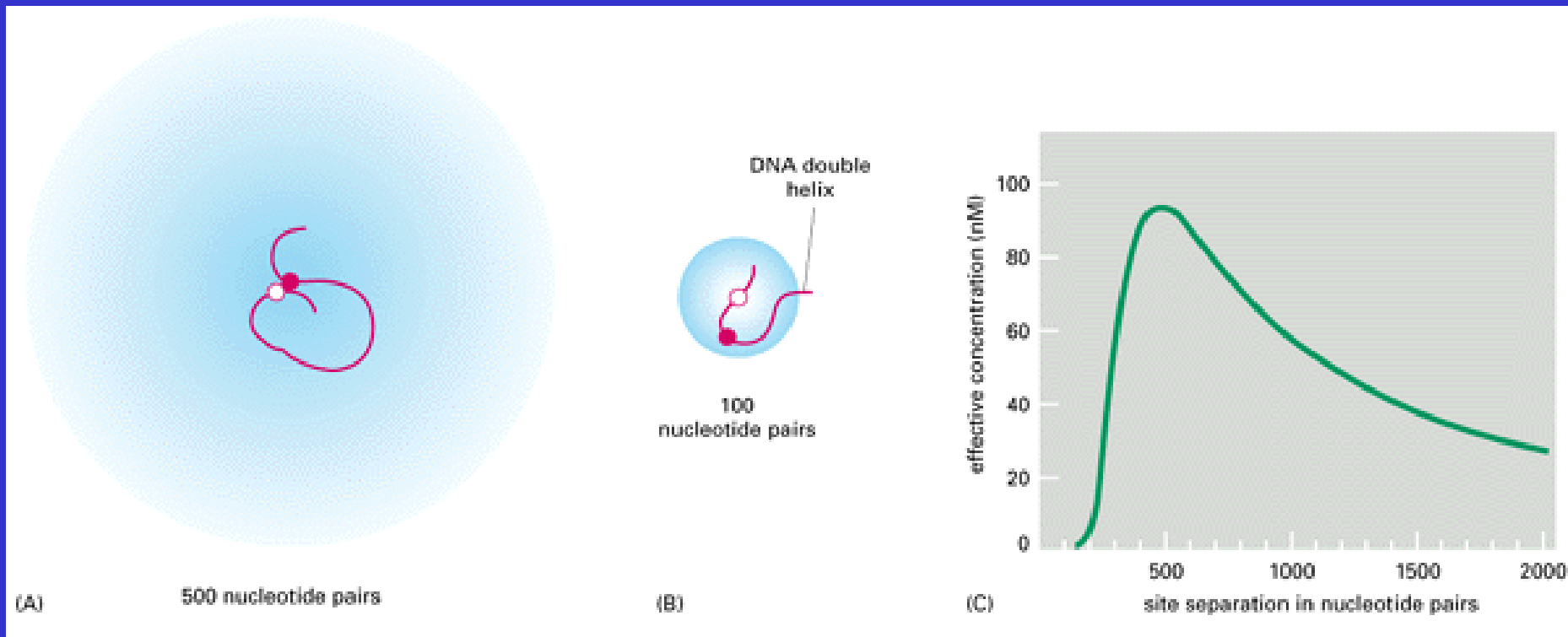
VISÃO GERAL DA TRANSCRIÇÃO:

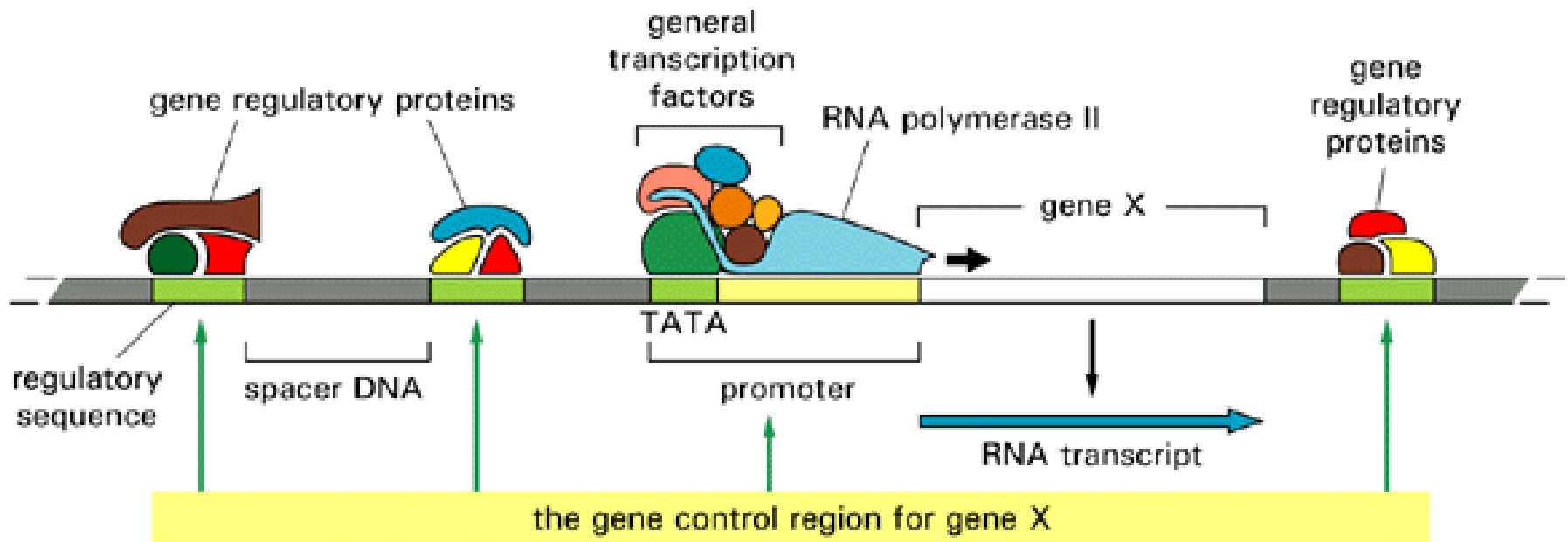
-TFIIB muitas subunidades, TBP=TATA binding protein

-TFIIH, uma subunidade fosforila a polimerase, inicia transcrição

ENHANCERS (1979) ATUAM A GRANDES DISTÂNCIAS DO PROMOTOR: REGRA E NÃO EXCEÇÃO.

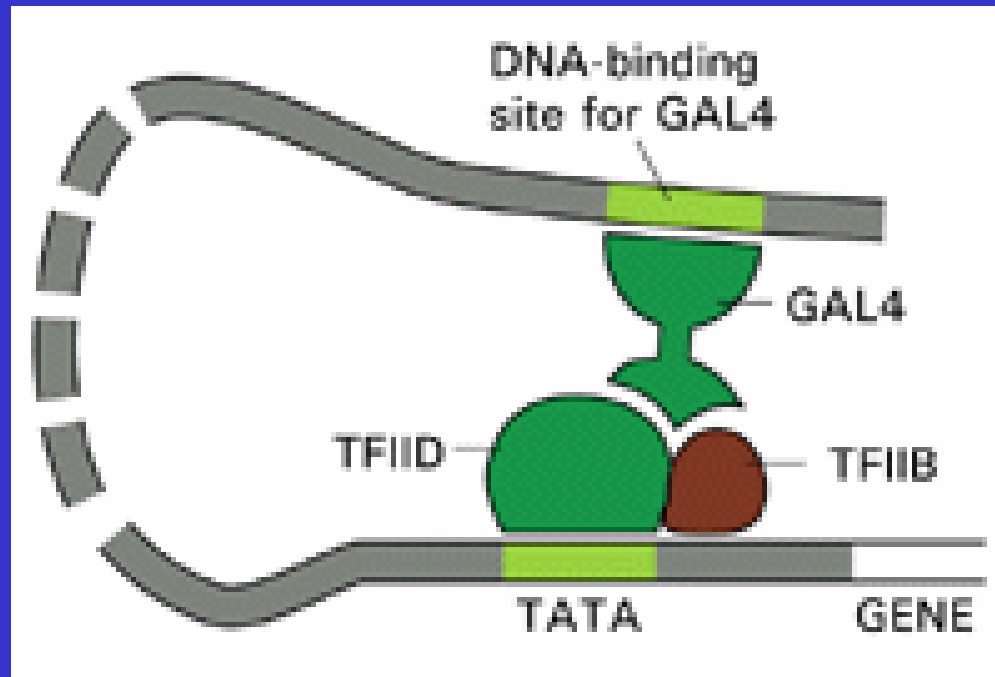
COMO FUNCIONA?





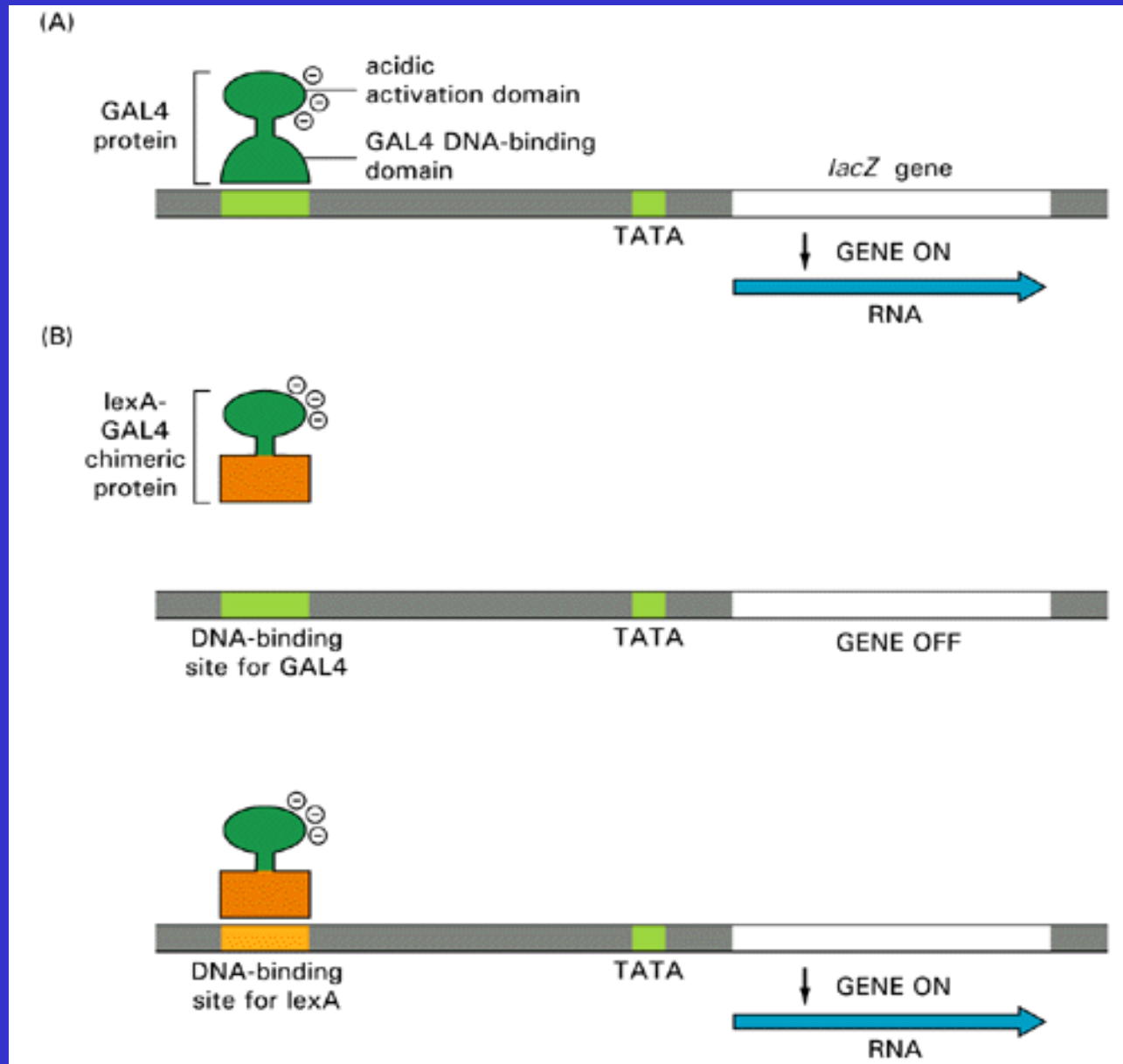
ENQUANTO FATORES GERAIS DE TRANSCRIÇÃO SÃO BASICAMENTE OS MESMOS PARA TODOS OS GENES TRANSCRITOS PELA POL II, AS PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DOS GENES, E SUA LOCALIZAÇÃO EM RELAÇÃO AO GENE, SÃO ESPECÍFICAS PARA CADA GENE. A MAIORIA AUMENTA TRANSCRIÇÃO, ALGUMAS FUNCIONAM COMO REGULADORAS NEGATIVAS

SÃO MENOS ABUNDANTES E RESPONSÁVEIS PELAS CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE CÉLULAS E ORGANISMOS.

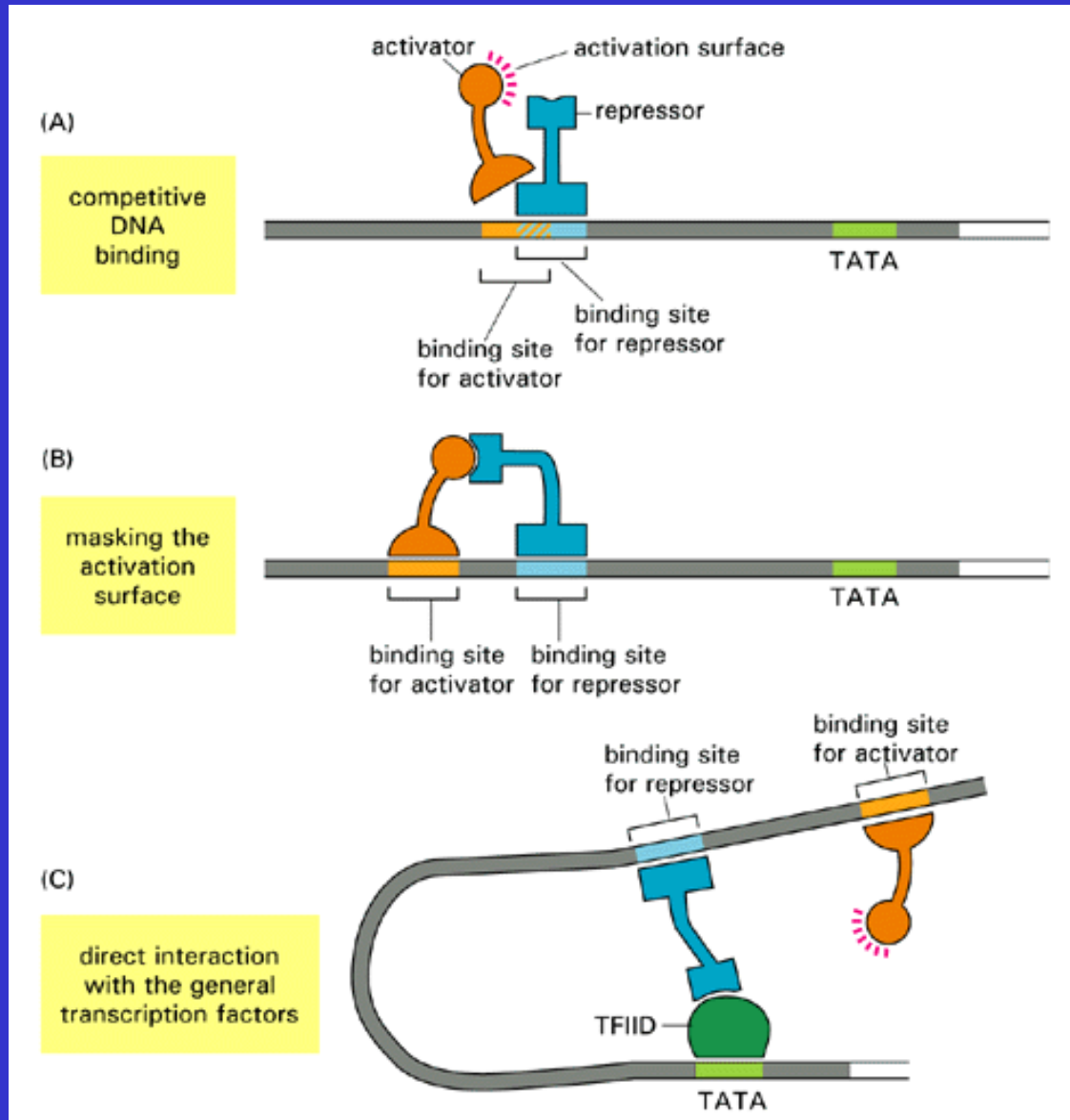


Modelo para a ação de ativadores acídicos. O ativador do gene para a proteína GAL4, liga-se nas proximidades do promotor facilita a dição de TFIIB aumentando a taxa de transcrição de 1000vezes.

DOMÍNIOS: DE ATIVAÇÃO E DE LIGAÇÃO AO DNA



POSSÍVEIS MANEIRAS DE AÇÃO DE UM REPRESSOR.

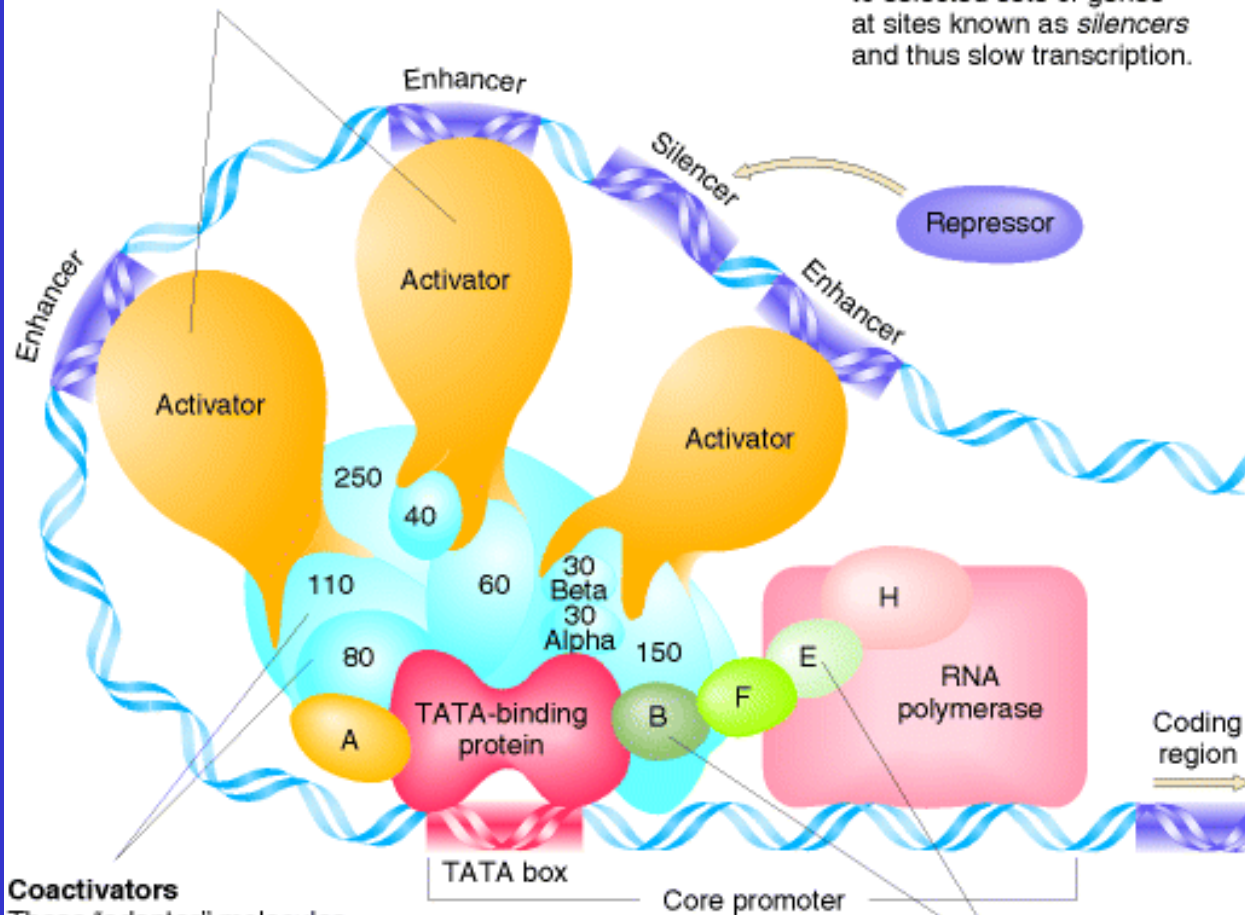


Activators

These proteins bind to genes at sites known as *enhancers* and speed the rate of transcription.

Repressors

These proteins bind to selected sets of genes at sites known as *silencers* and thus slow transcription.



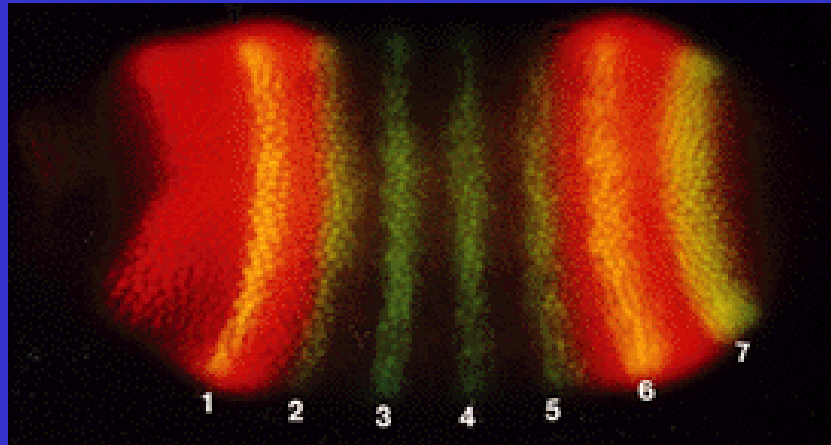
Coactivators

These "adapter" molecules integrate signals from activators and perhaps repressors.

Basal transcription factors

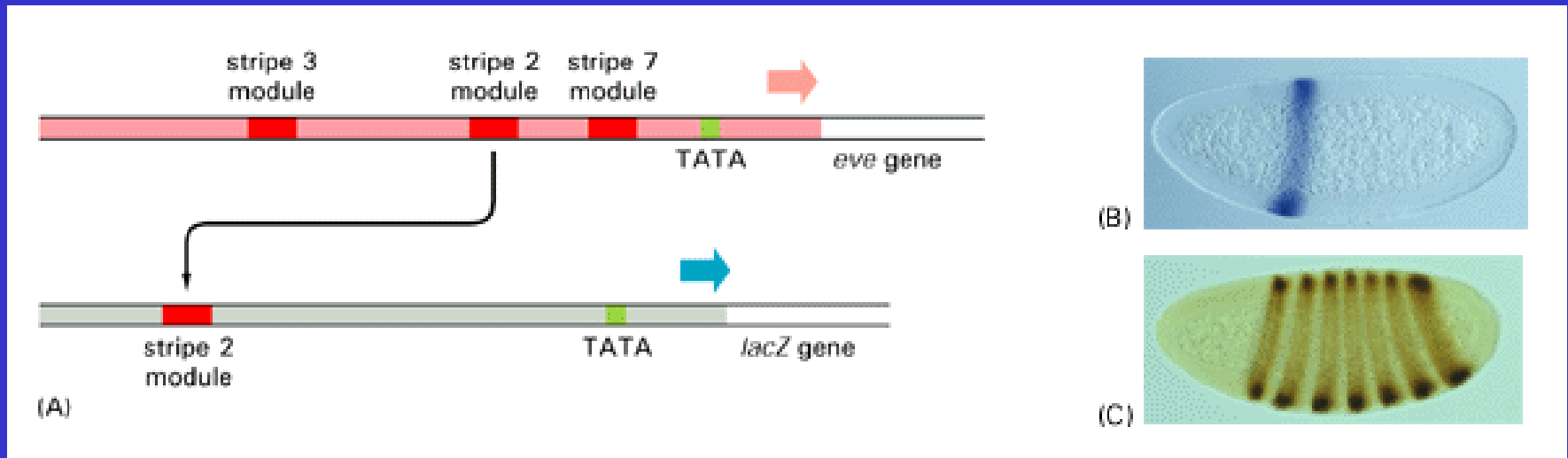
In response to injunctions from activators, these factors position RNA polymerase at the start of transcription and initiate the transcription process.

EXPRESSÃO DO GENE EVEN-SKIPPED DE DROSOPHILA (*eve*)



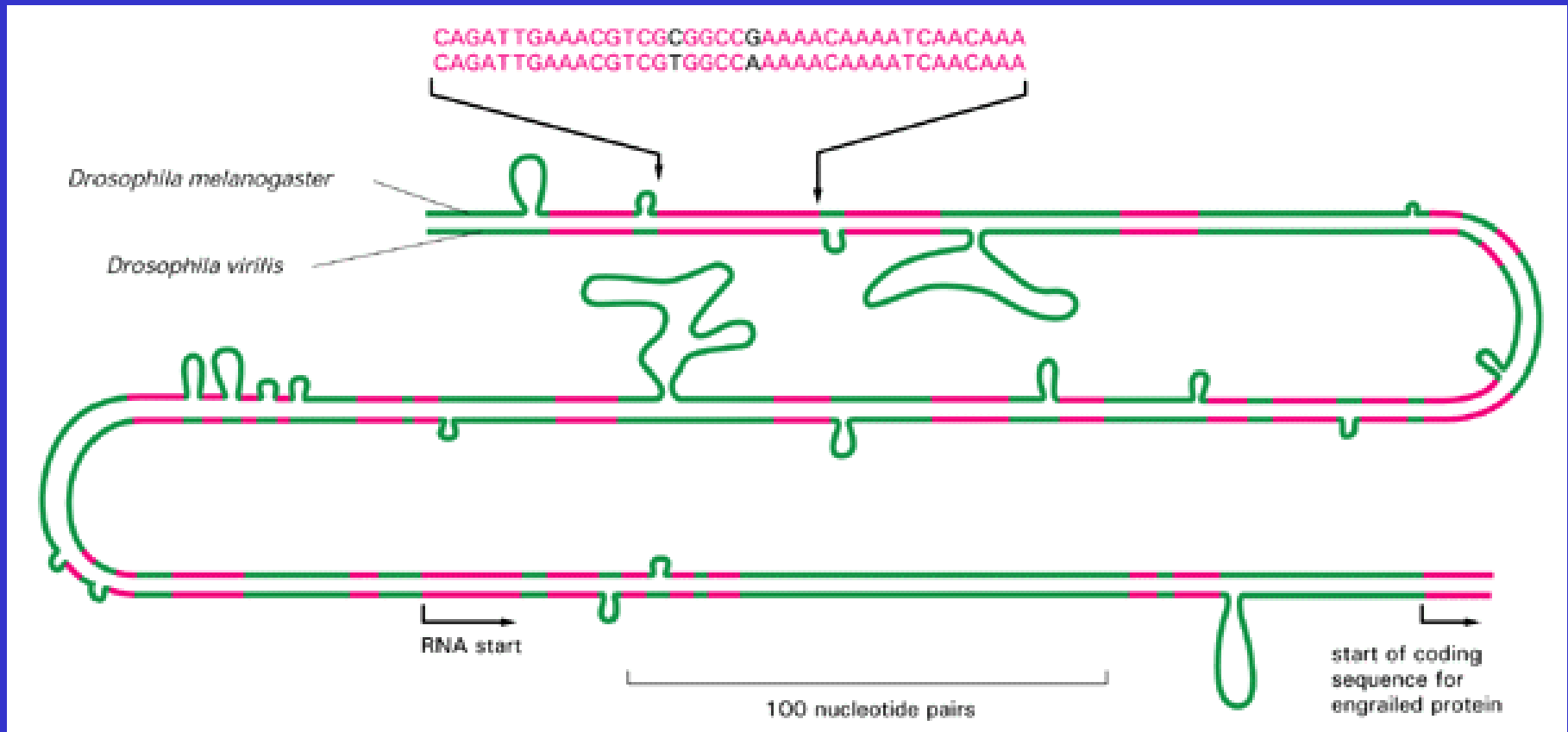
- papel no desenvolvimento
- gene inativo causa malformação e morte do embrião
- quando *eve* é expresso, no início do desenvolvimento, o embrião é uma gigantesca célula multinucleada.
- MAS, no citoplasma existe uma distribuição não uniforme de proteínas regulatórias = informação posicional.
- os núcleos, inicialmente iguais, passam a expressar genes diferentes, dando origem a 7 bandas

EXPRESSION DE EVE

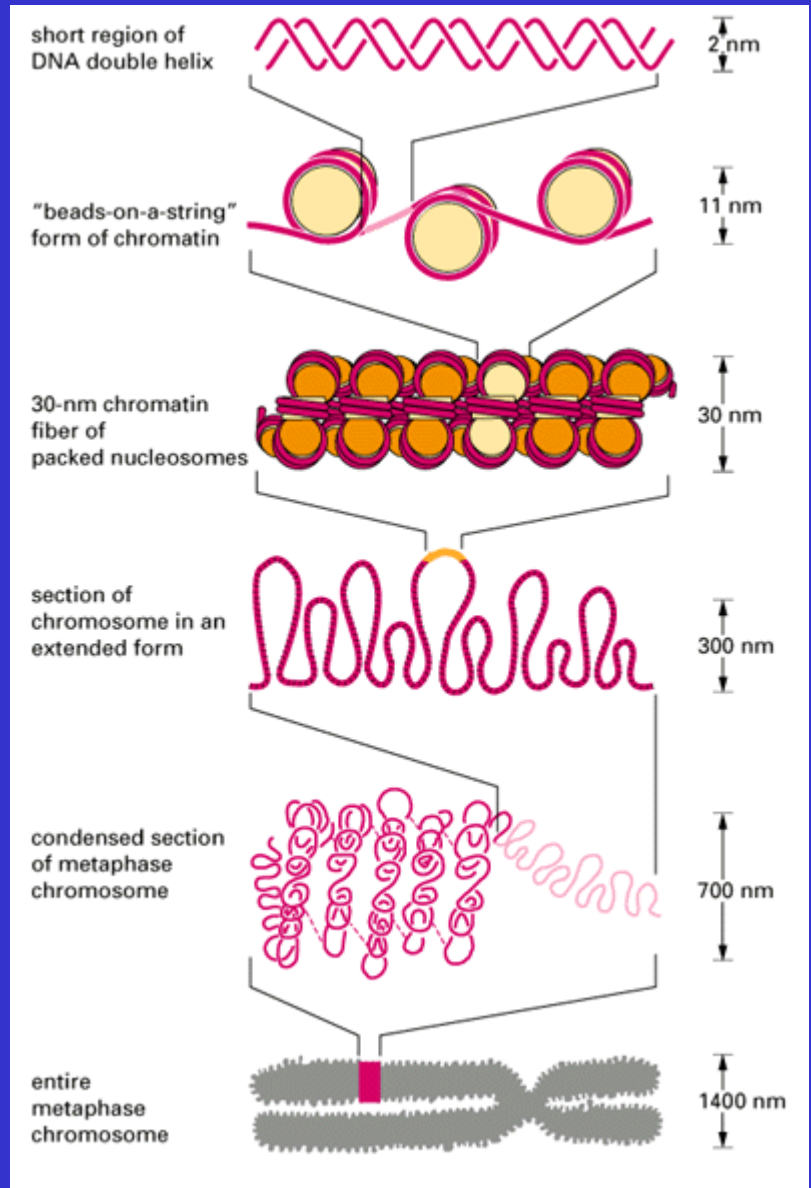
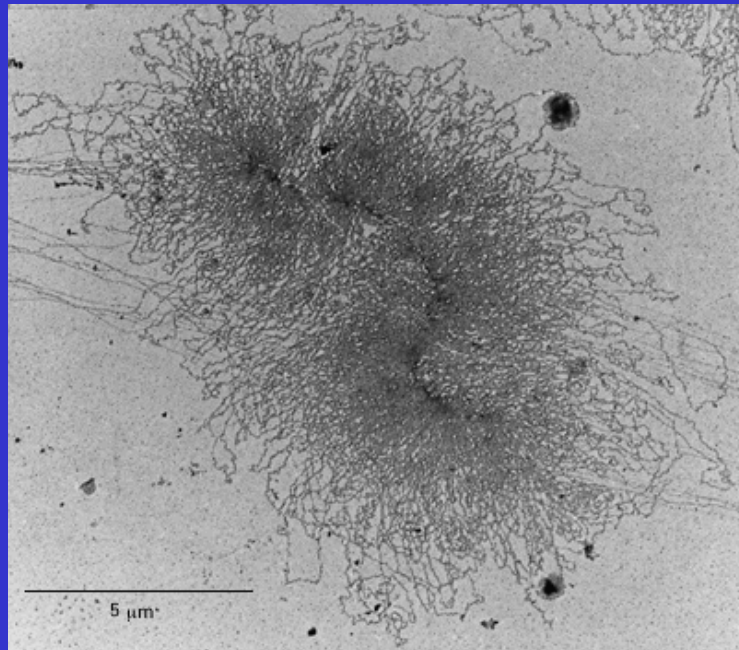
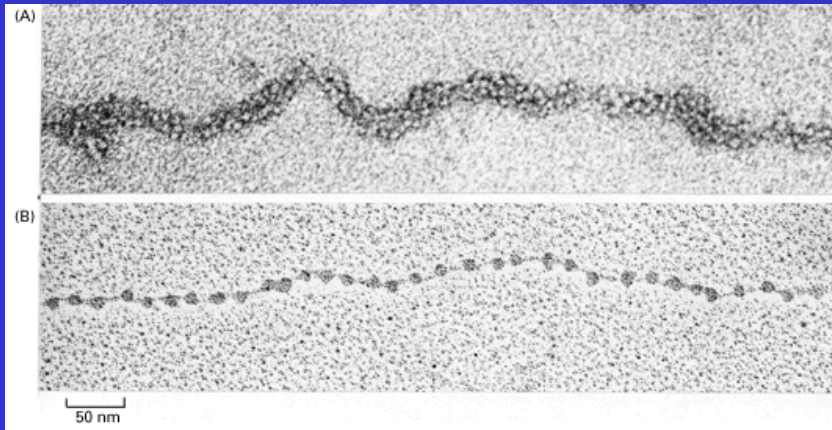


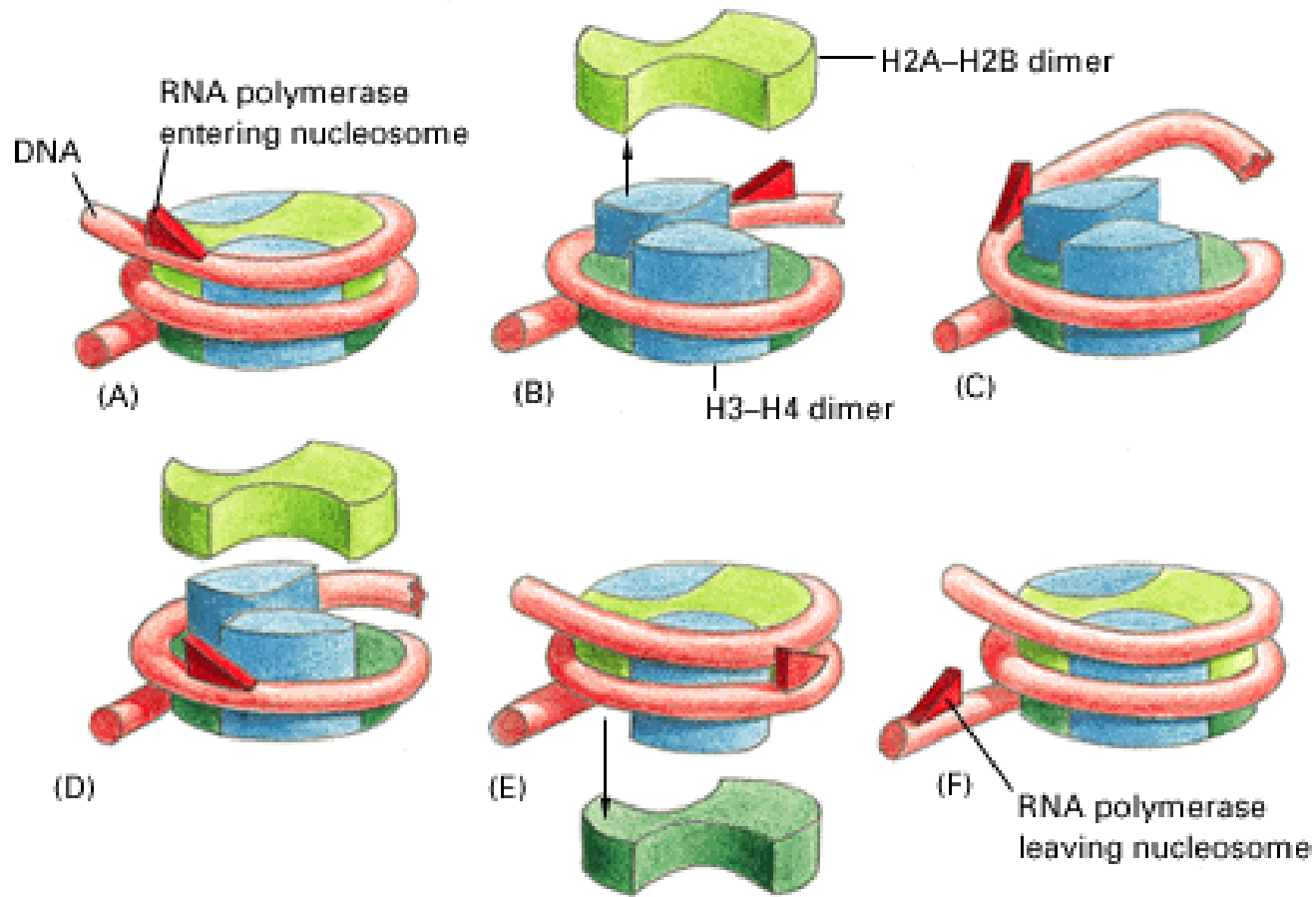
480 pb da região regulatória de *eve* inserida acima de gene repórter, reintroduzido no genoma, produz repórter exatamente na região esperada da banda,

COMPARAÇÃO DA REGIÃO CONTROLADORA DO GENE *engrailed* EM DUAS ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* QUE DIVERGIRAM HÁ 60 MILHÕES DE ANOS



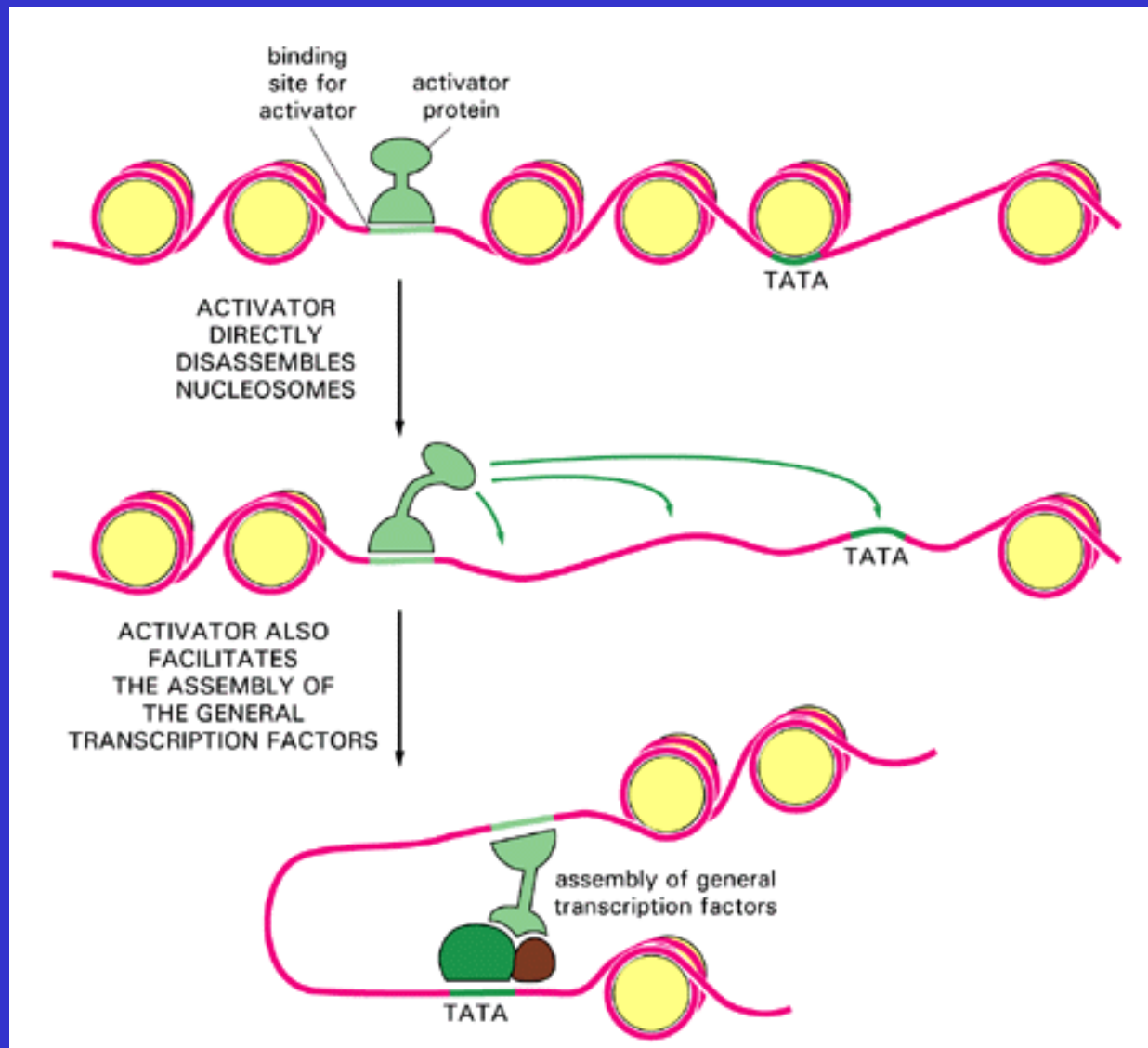
Vermelho: regiões conservadas, onde estão localizadas sequências importantes, onde se ligam proteínas regulatórias.





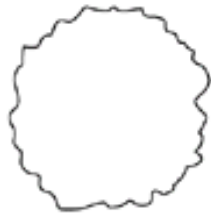
DNA polimerase consegue transcrever através do nucleosoma

**MAS...O EMPACOTAMENTO DO DNA TEM
PAPEL IMPORTANTE NO CONTROLE DA
EXPRESSÃO GÊNICA: SERVE PARA
SILENCIAR GRANDES TRECHOS DO
GENOMA, AS VEZES DE MANEIRA
REVERSÍVEL, AS VEZES NÃO.**

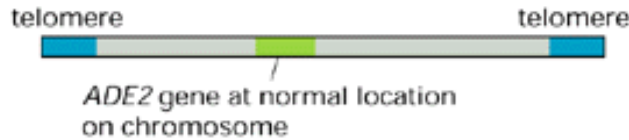


Fatores gerais de transcrição não conseguem se ligar a regiões compactadas por nucleosomas. Ativadores ajudam nesse processo.

(A)



white colony of yeast cells



red colony of yeast cells with white sectors



(B)



rare chromosome inversion

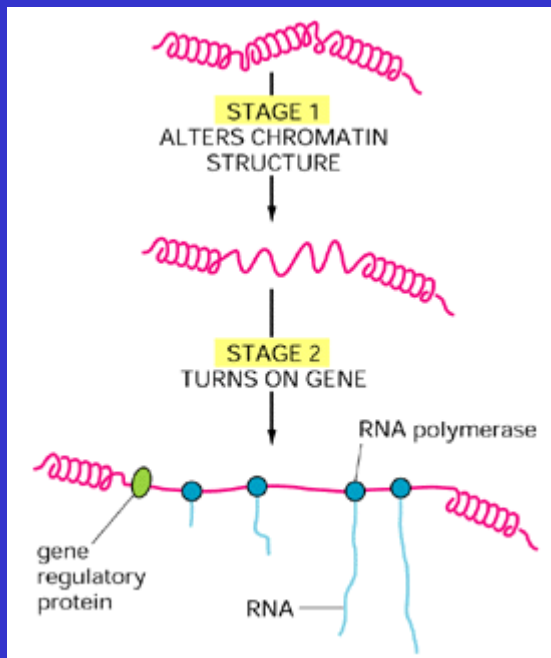
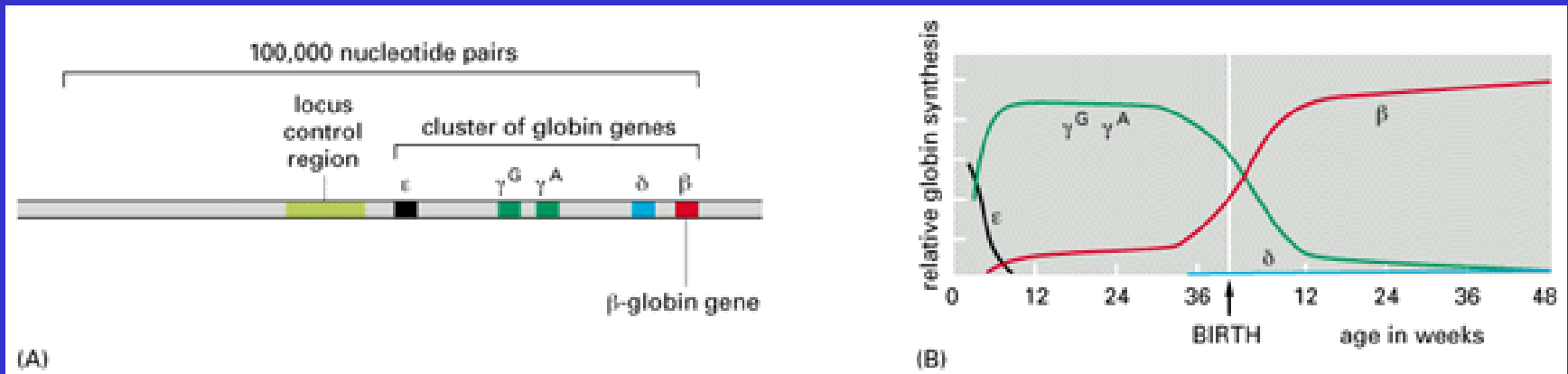


Efeito da posição em expressão gênica:

Genes posicionados em regiões contendo heterocromatina, ou perto de telômeros, não são transcritos.

Gene *ade2* de levedura, bloqueio da biosíntese de adenina, pigmento vermelho.

Gene *white* em *Drosophila*, mutação dá olho branco

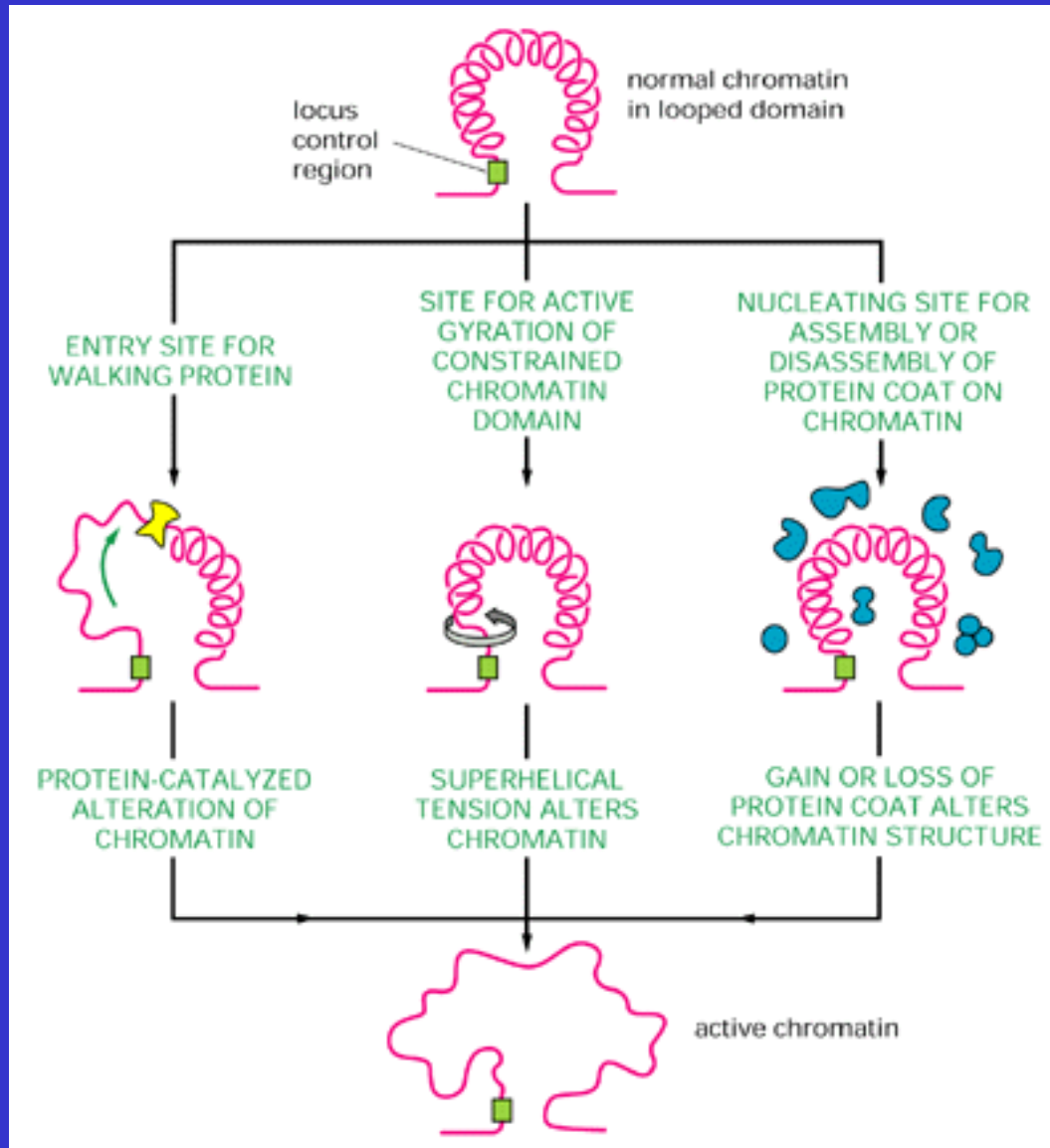


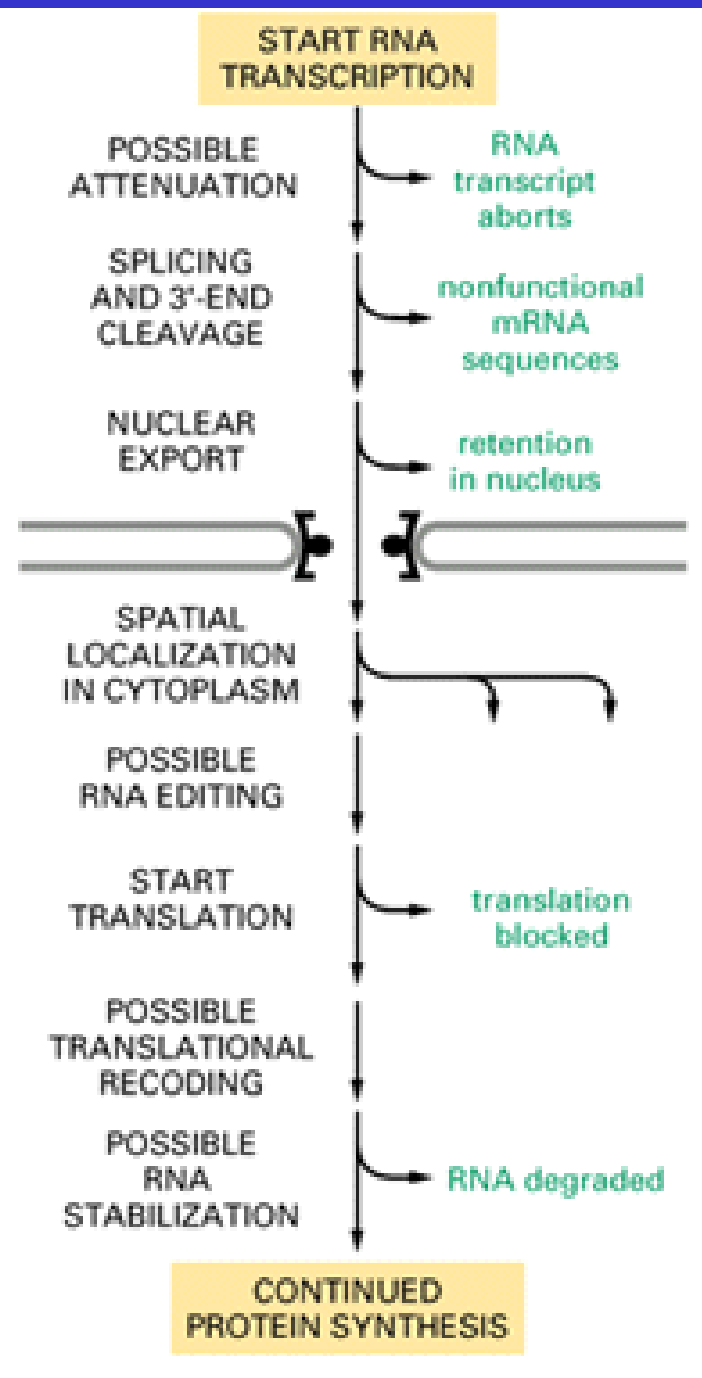
Regulação da expressão dos genes de hemoglobina, 2 passos:

1. Estrutura da cromatina muda (sensibilidade a DNase)

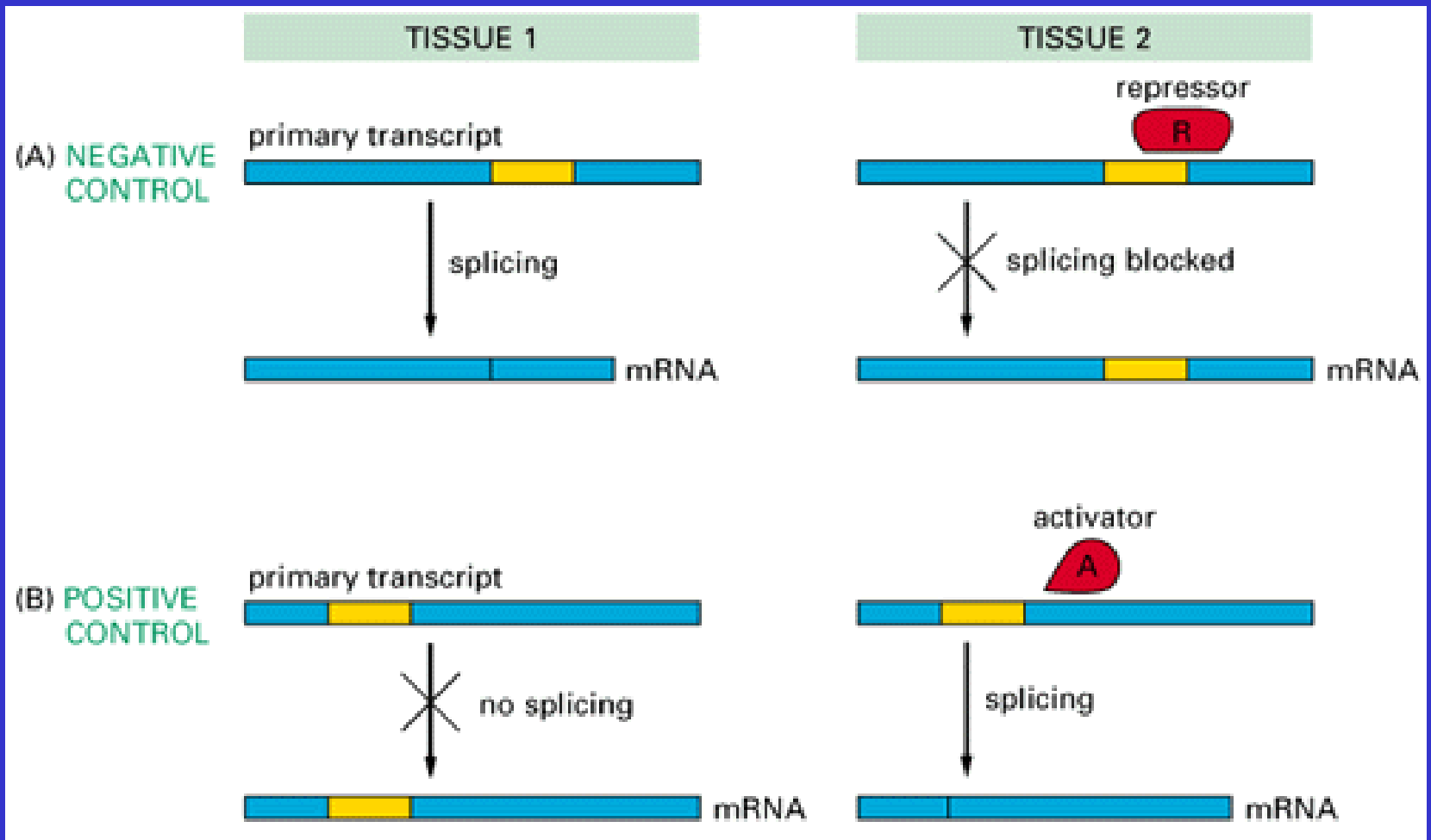
2. Proteínas regulatórias se ligam no DNA

POSSÍVEIS MECANISMOS DE DESCONDENSAÇÃO DE CROMATINA



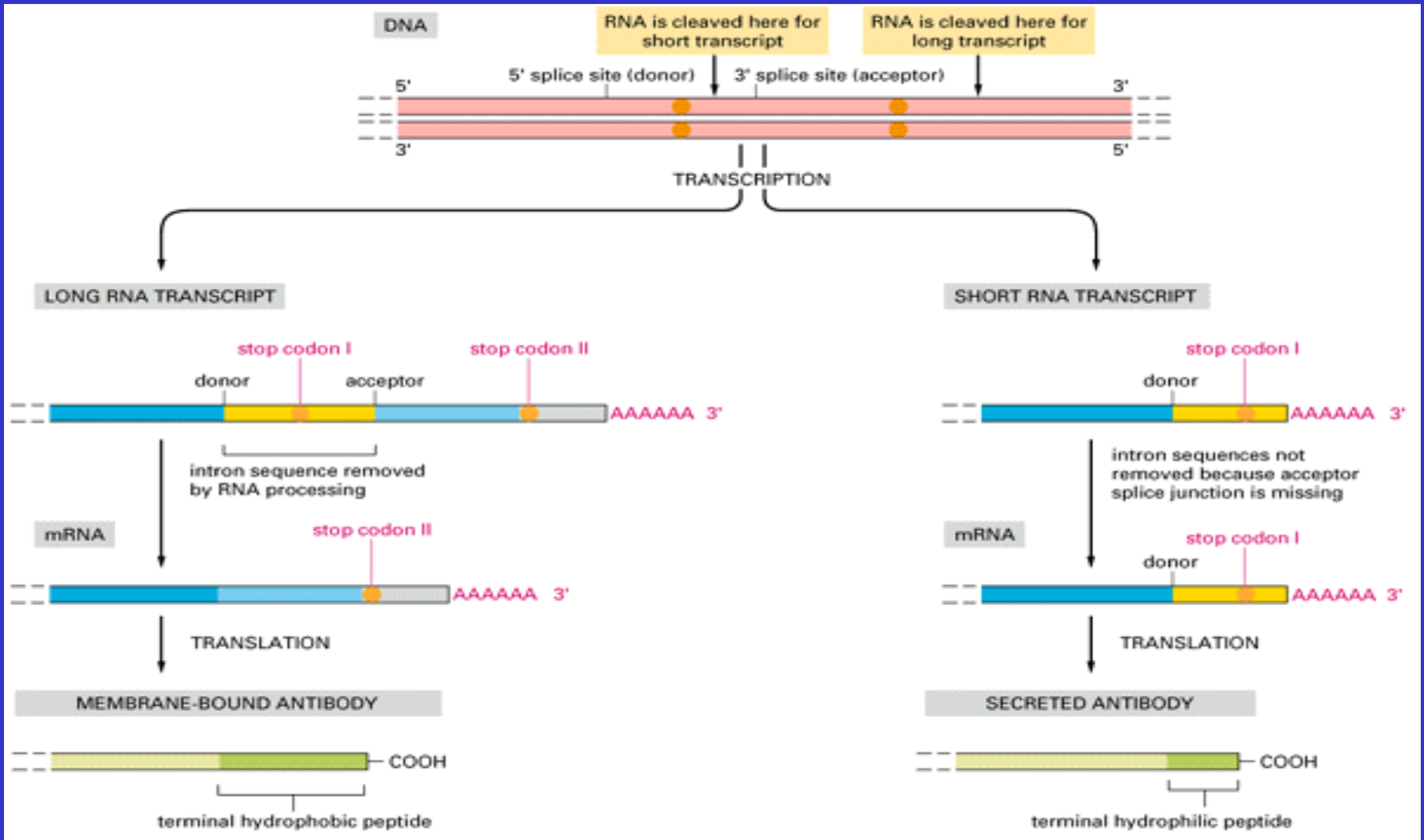


Controle pós-transcricional
menos comum que
controle
transcricional



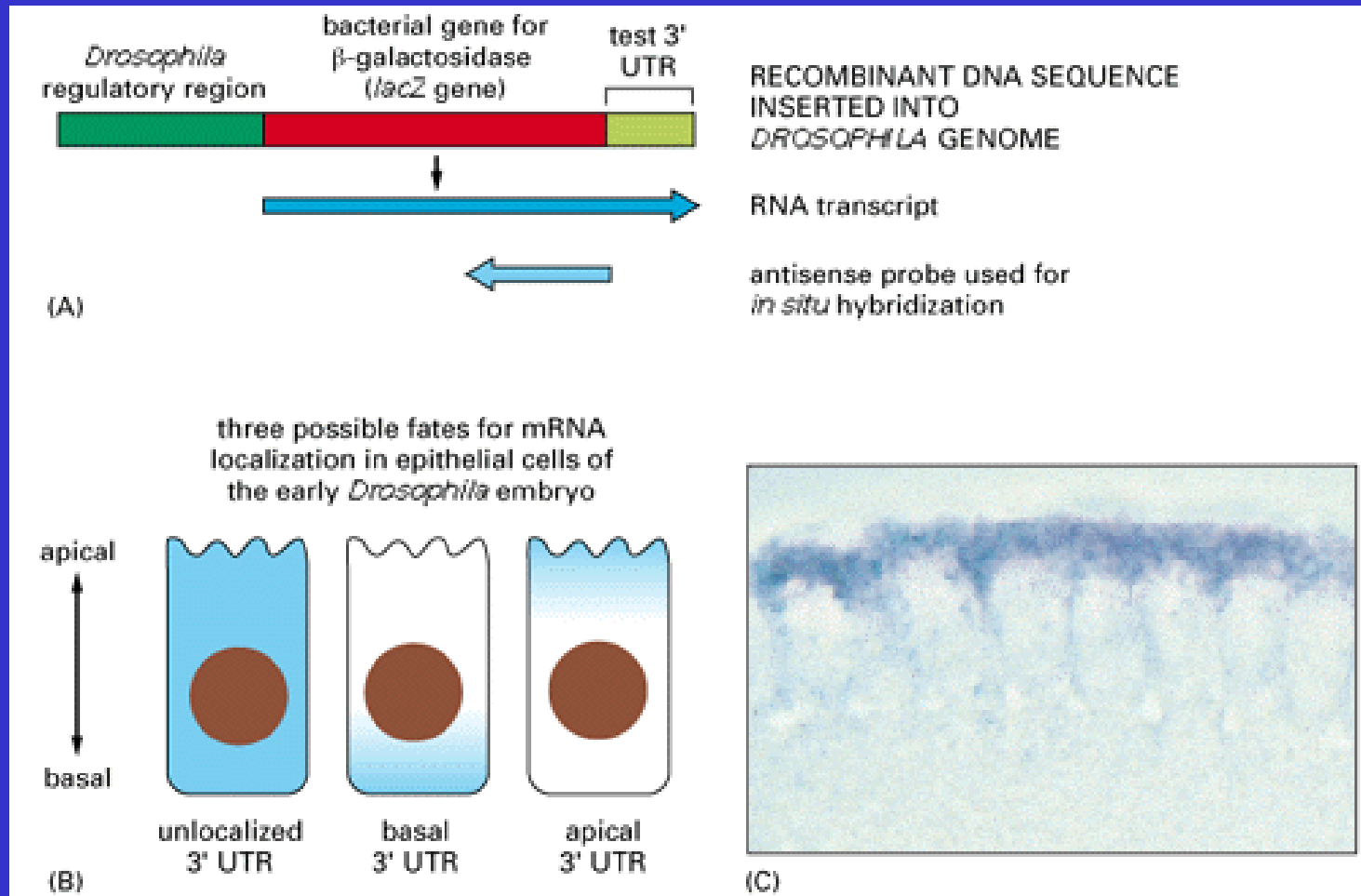
SPLICING DO RNA PODE SER REGULADO

Exemplo: transposase que cataliza a transposição do elemento P de *Drosophila* tem um intron que só é removido em células germinais, e não em células somáticas.

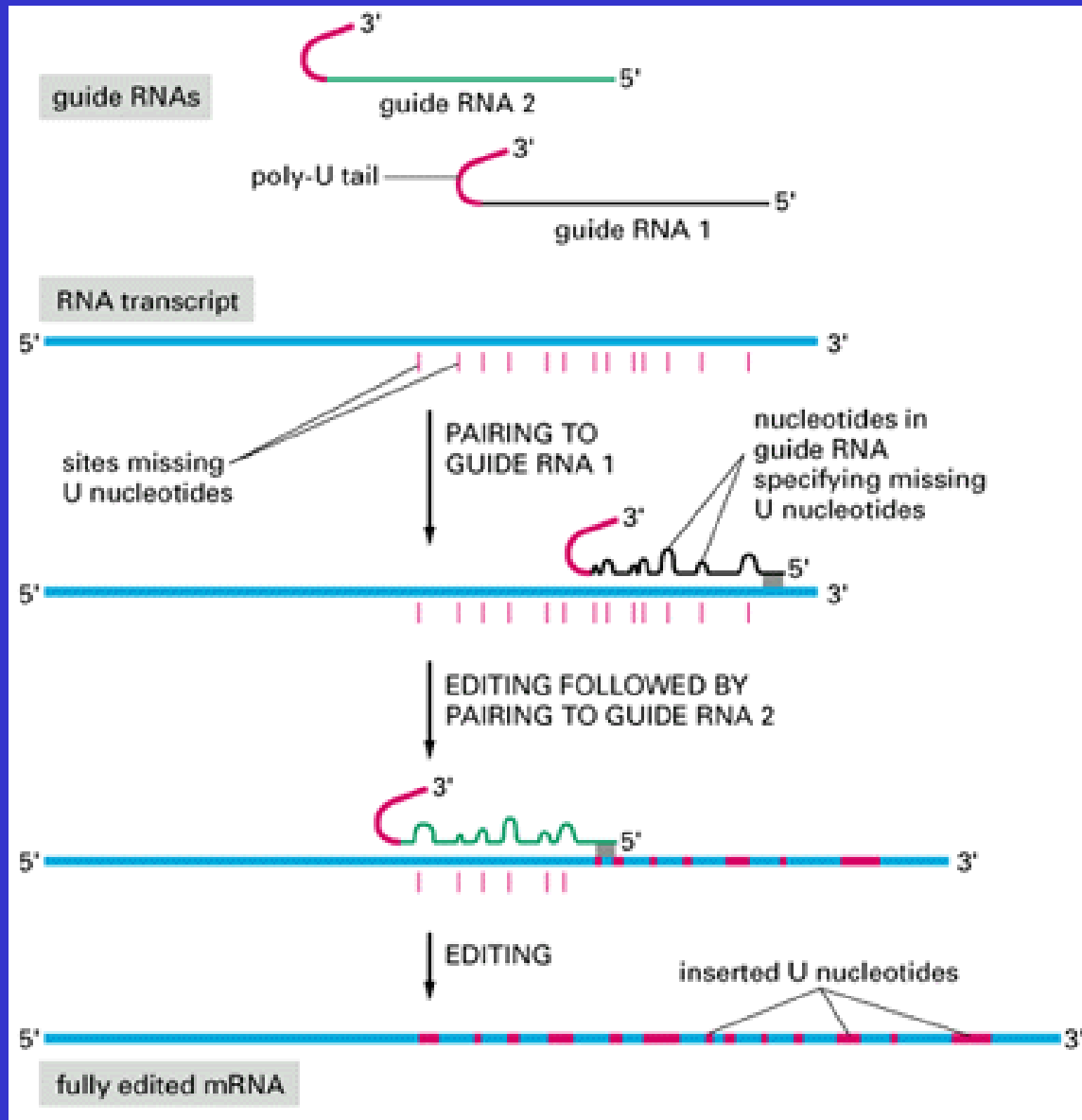


Anticorpo secretado (linfócito B estimulado) ou ligado à membrana (linfócitos B não estimulado) , dependendo do sítio de processamento.




PAPEL DA UTR3' NO POSICIONAMENTO DE mRNA NA CÉLULA



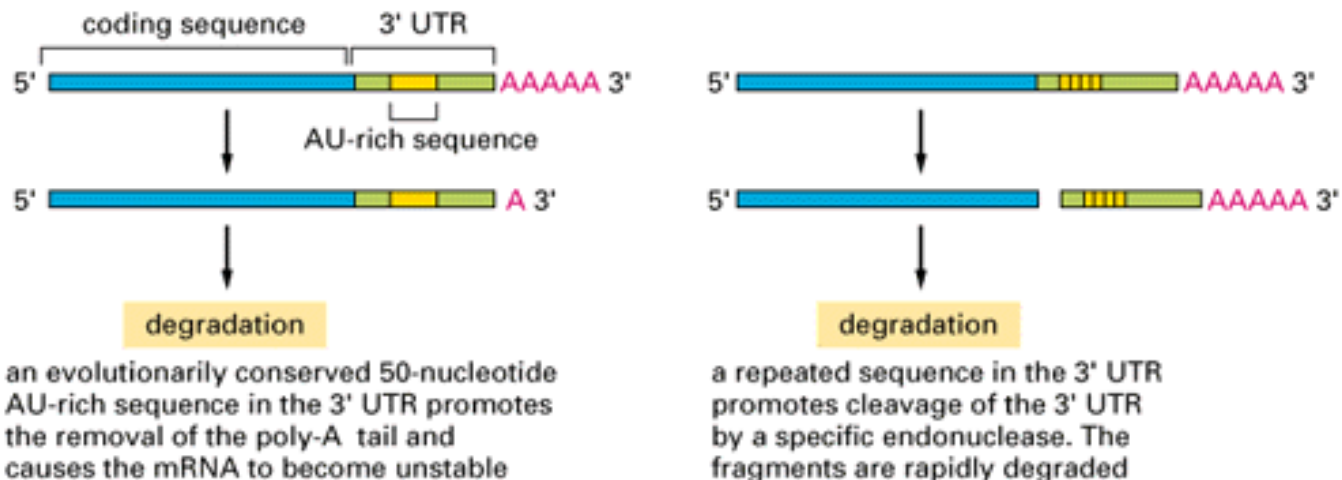
EDIÇÃO DE RNA NA MITOCONDRIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS

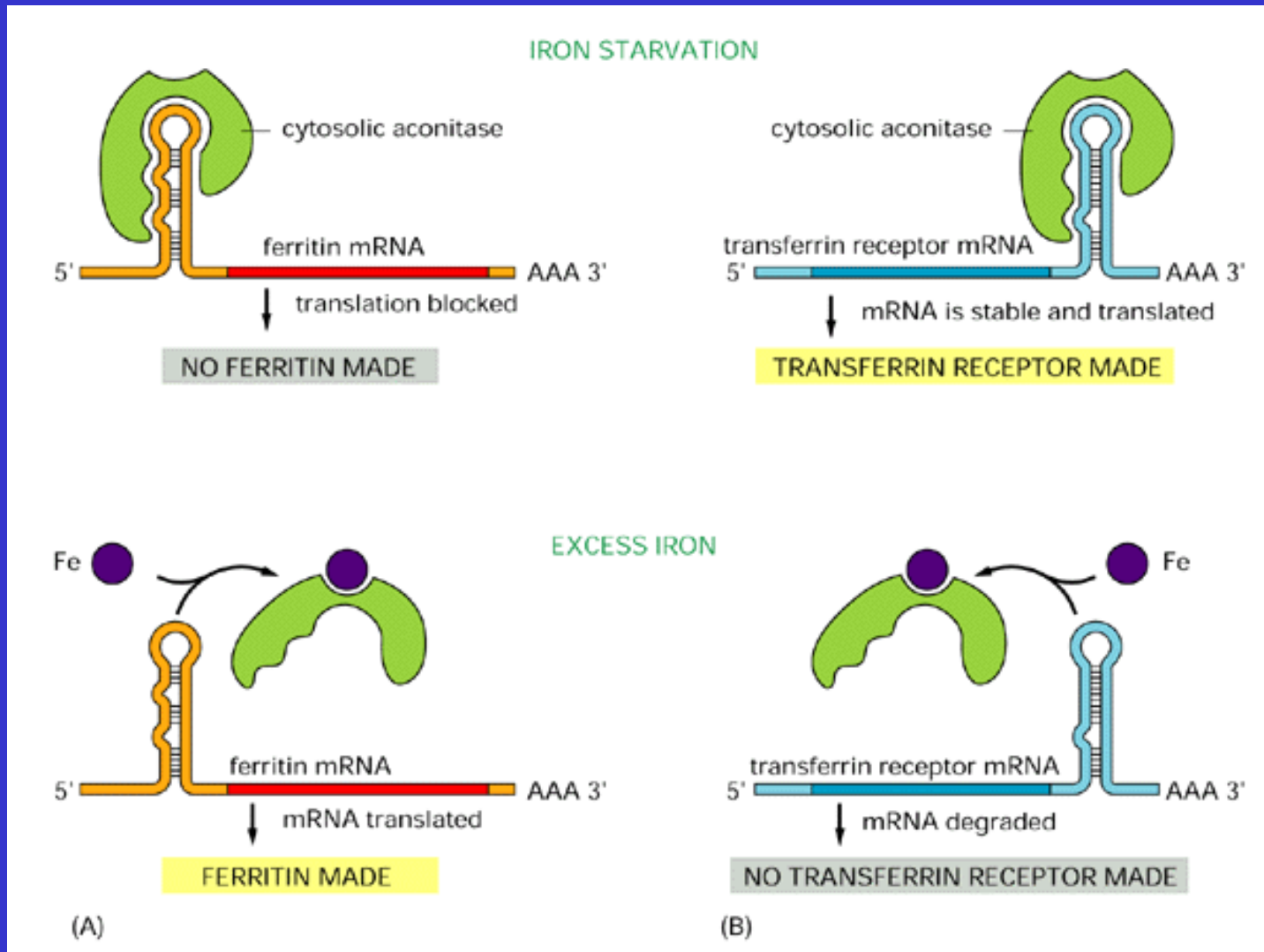


THE STABILITY OF NATURAL mRNAs

			HALF-LIFE
	β-globin mRNA	STABLE	> 10 hour
	growth factor mRNA	UNSTABLE	0.5 hour
	histone mRNA	DNA SYNTHESIS MODULATES STABILITY	1 hour when cell is synthesizing DNA, but 12 minutes when cell is not synthesizing DNA

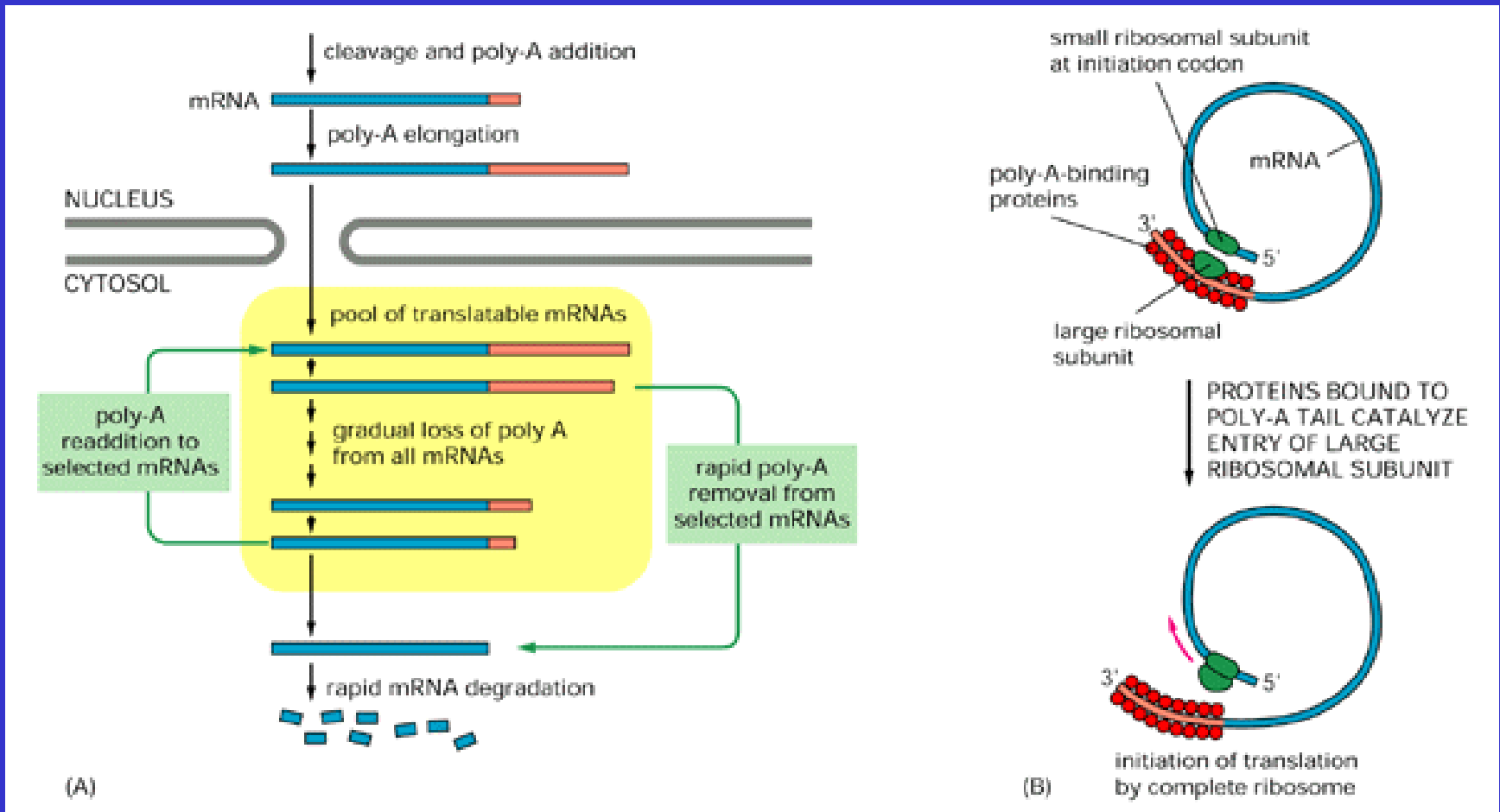
TWO MECHANISMS OF EUKARYOTIC mRNA DECAY

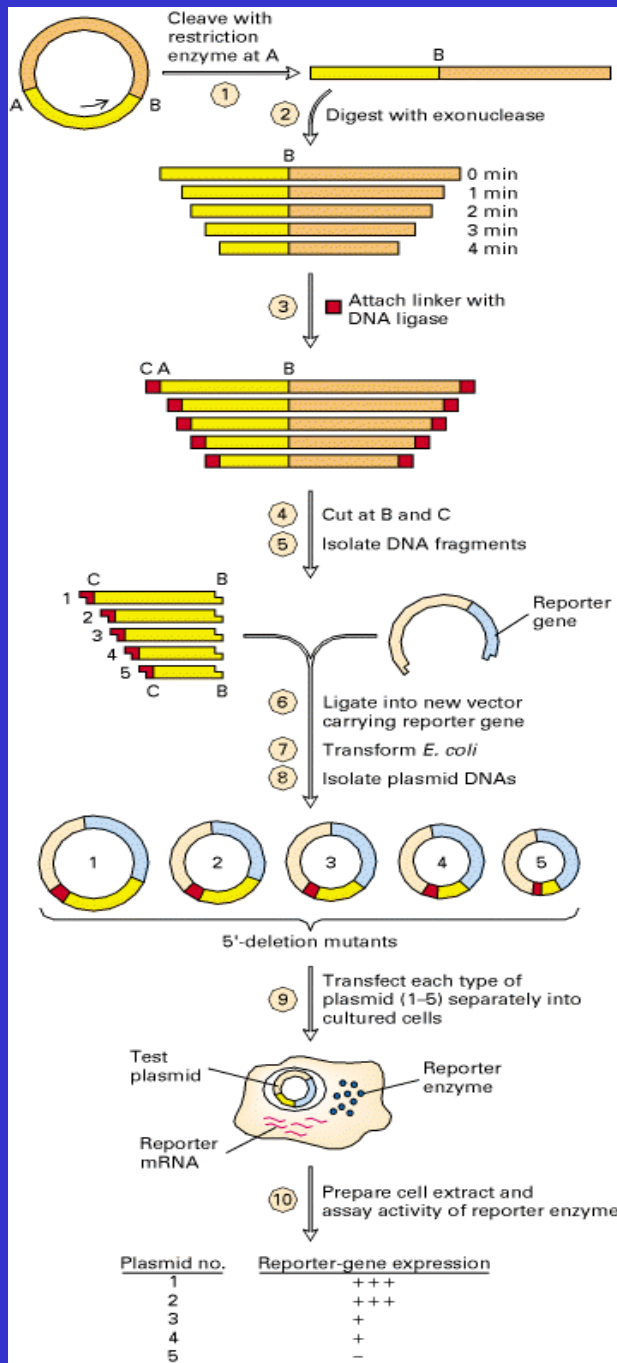




Ferritina: liga ferro; transferrina: importa ferro aconitase, molécula regulatória que responde ao ferro.

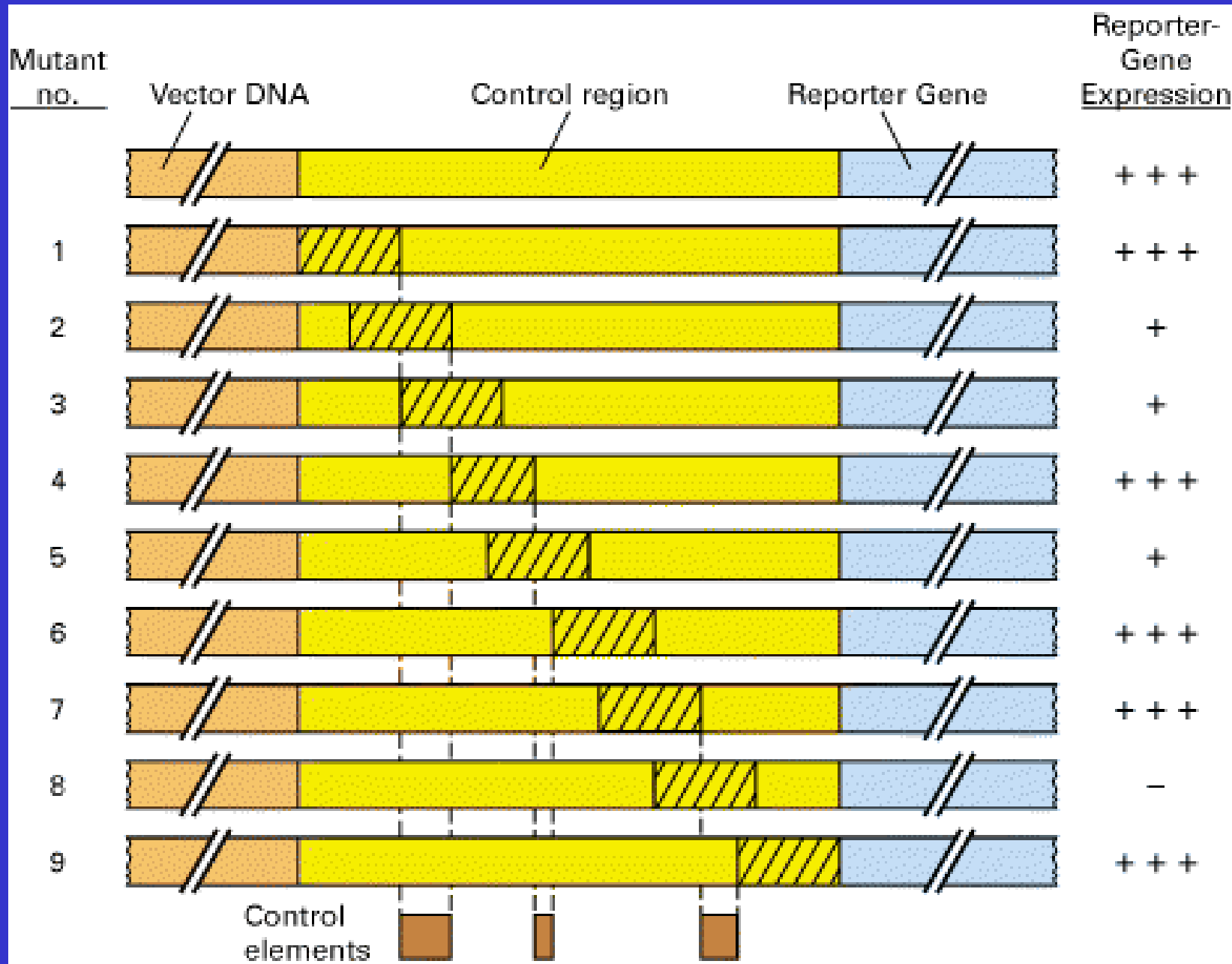
CONTROLE DO COMPRIMENTO DA CAUDA DE POLI-A AFETA ESTABILIDADE E TRADUÇÃO DO mRNA

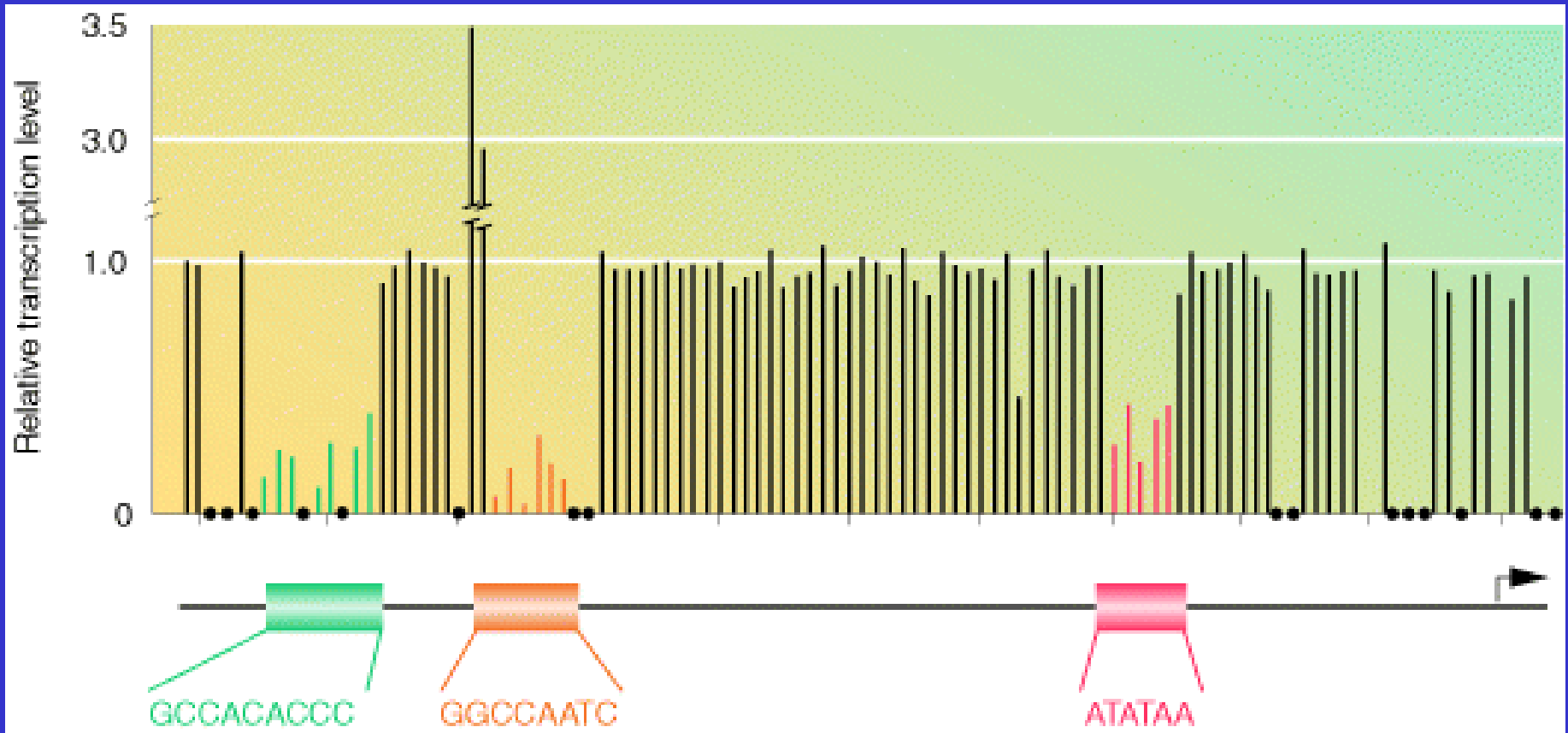




LOCALIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONTROLADORAS DE TRANSCRIÇÃO DE UM GENE DE EUCARIOTO:

- amarelo: sequência contendo o sítio de início de transcrição.





Mutações pontuais no promotor de beta-globina

Science

20 December 2002

Vol. 298 No. 5602
Pages 2271-2442 \$10

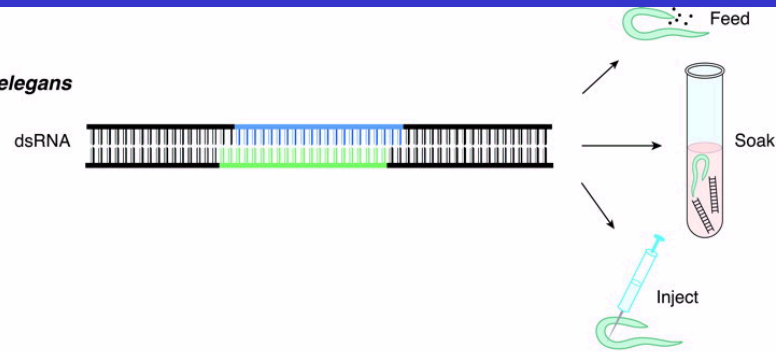
New roles
for **RNAs**

Breakthrough
of the Year

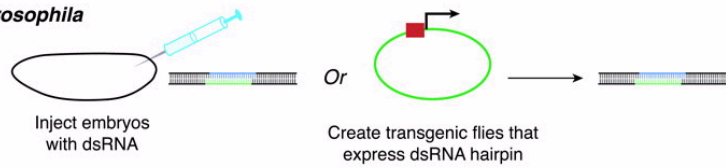


AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

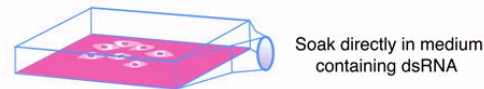
C. elegans



Drosophila



Cultured Drosophila cells



Cultured Mammalian cells

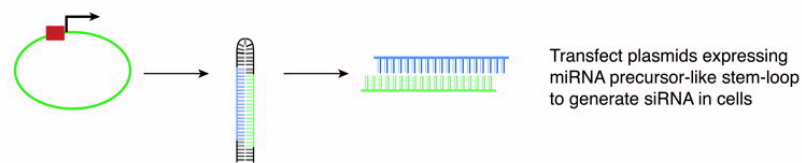
Embryonic cultured cells or oocytes or early embryos



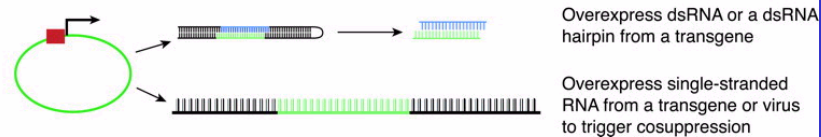
Differentiated cultured cells or whole organisms (in vivo)

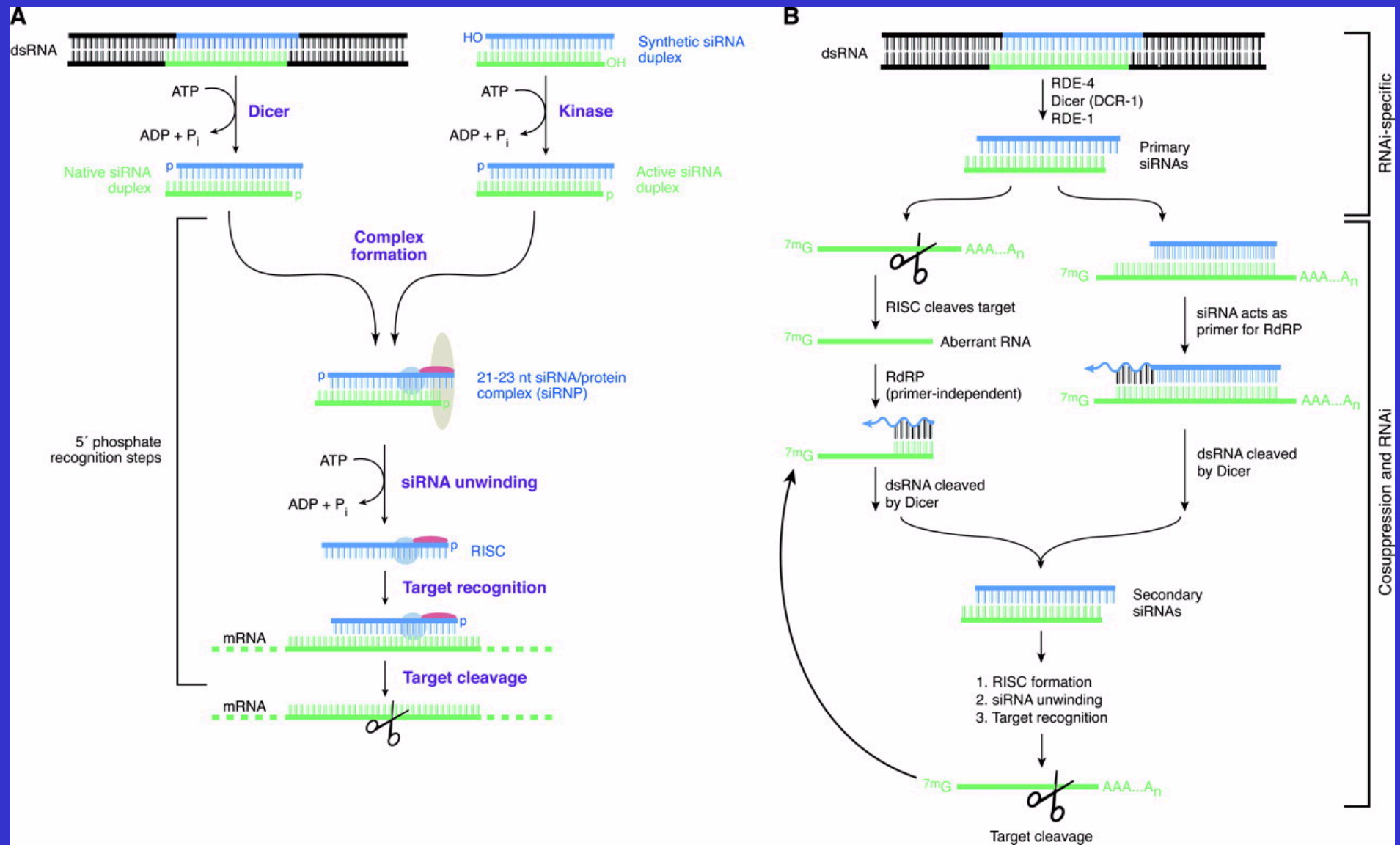


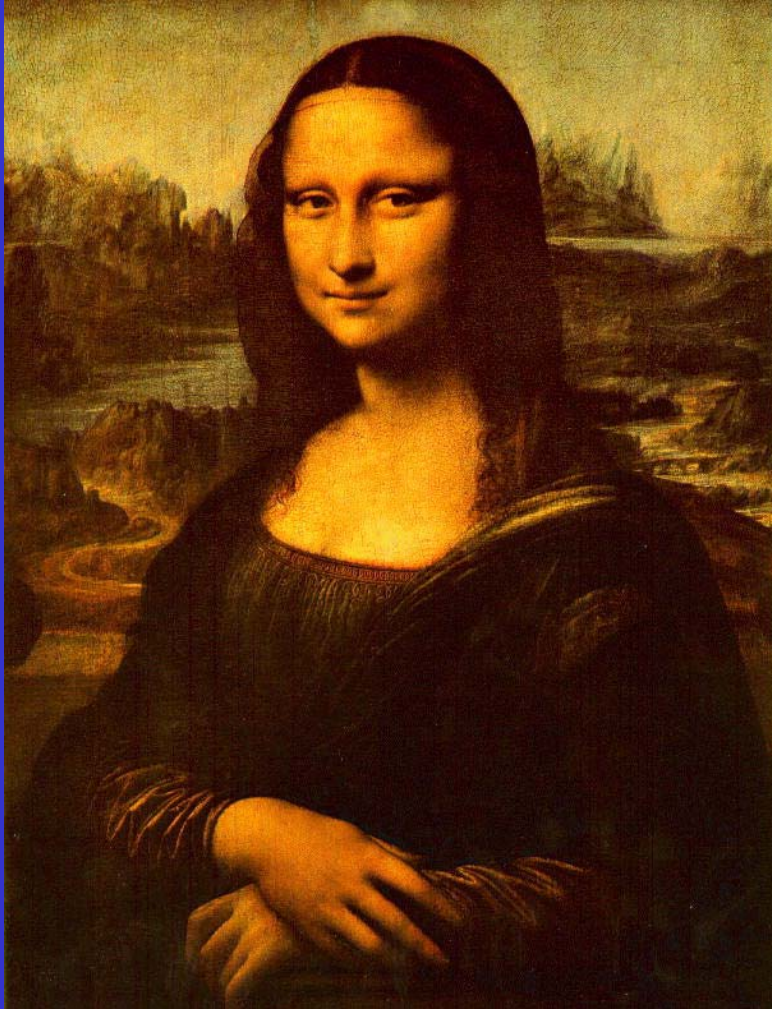
Or



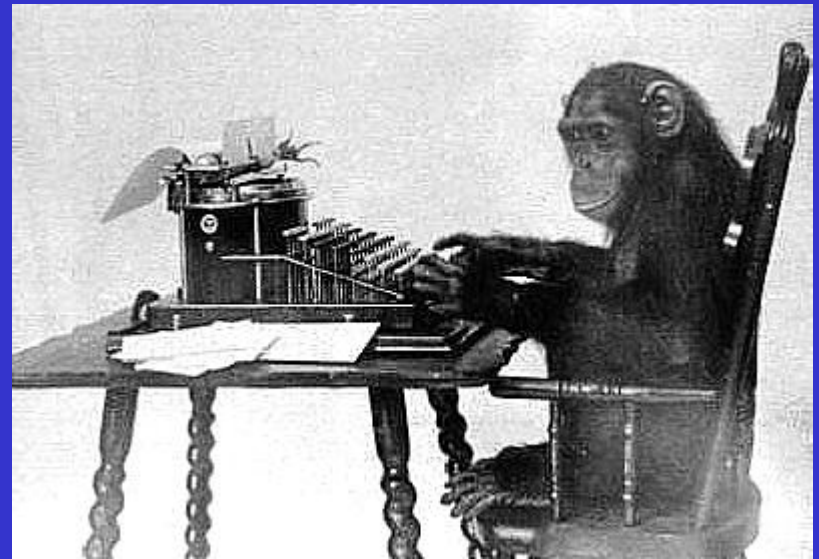
Plants

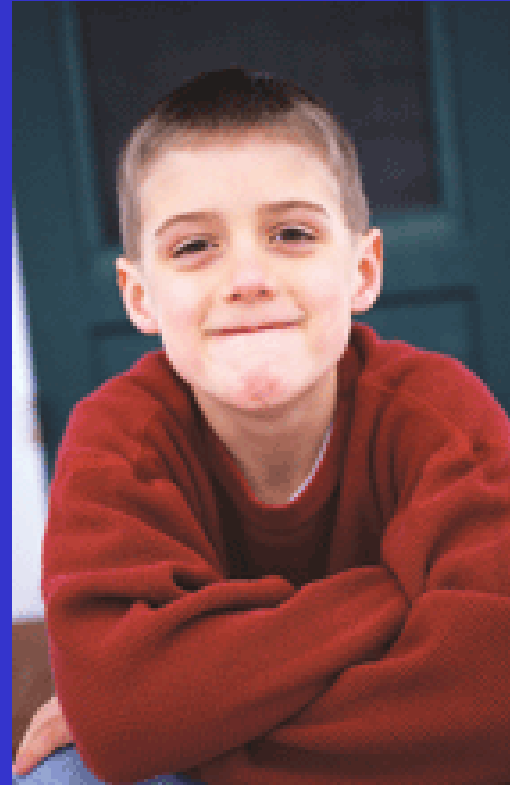
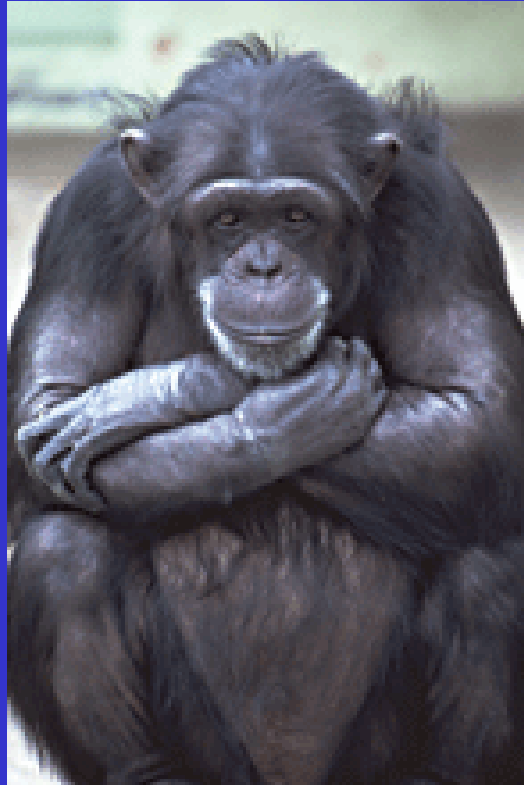






**UM POUCO DE
REGULAÇÃO GÊNICA
NOS SEPARA...**





GENOMAS 98.5% IDÊNTICOS?

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL

ALBERTS ET AL

(PRINCIPALMENTE)