

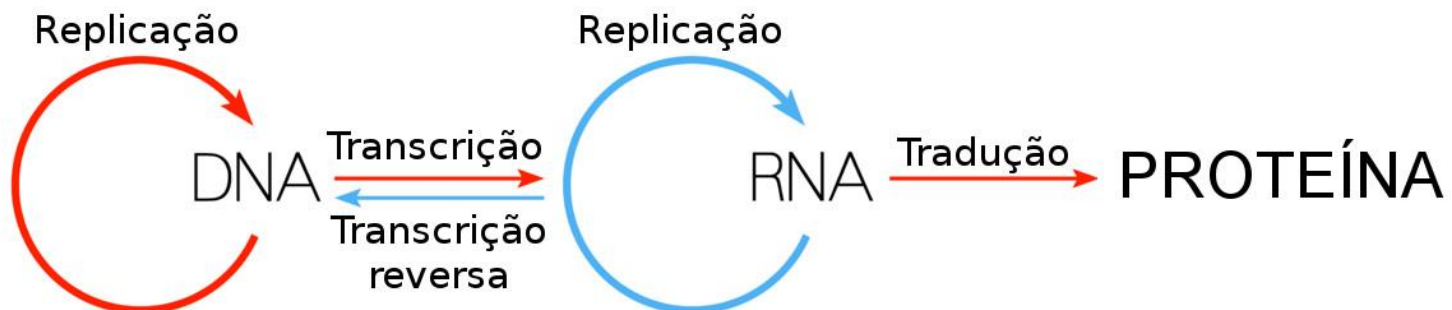
Empacotamento do DNA

Doutoranda: Deise Schroder Sarzi

Orientador: Prof^o. Dr. Francisco Prosdocimi

O dogma central

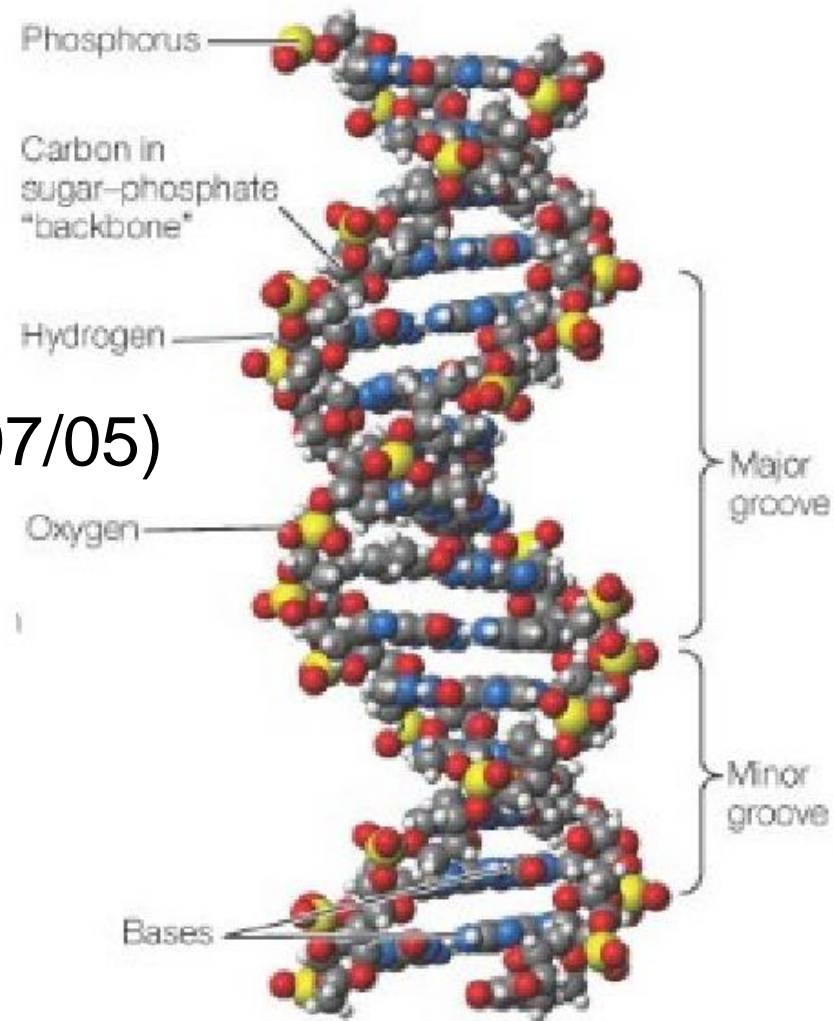
- Mas como o **DNA** está compactado no **núcleo**?
- Como ele **replica**?
- Como acontecem os processos de **transcrição** e **tradução**?
- Como a estrutura física dos processos **funciona**, minuciosamente?



Francis Crick, 1958

Panorama geral do bloco – Vias da informação

- Empacotamento (16/04)
- Replicação (18/04)
- Transcrição (25/04)
- Tradução (02/05)
- Recombinação e clonagem (07/05)
- Estudo dirigido (09 e 14/05)
- Avaliação (16/05)



Descoberta do DNA

- Buscava determinar os componentes químicos do núcleo celular
- Usava glóbulos brancos de pus (núcleos grandes e fáceis de isolar)
- 1869, descobriu a substância ácida no núcleo, rica em fósforo e nitrogênio (**ÁCIDOS NUCLEÍCOS**)



Johannes Miescher
1844-1895 (Sec. XIX)
Médico e biólogo Suíço

Descoberta da cromatina

- Descobriu uma estrutura celular que era altamente afim a corantes básicos
 - Chamou-a de cromatina
- Essas estruturas poderiam ser vistas no núcleo em pedaços
 - Cromossomos (corpos corados)
- Thomas Morgan provou que os cromossomos eram os portadores dos genes (*Drosophila melanogaster* e a cor do olho)



Walther Flemming

1843–1905

Médico e Biólogo alemão,
fundador da citogenética

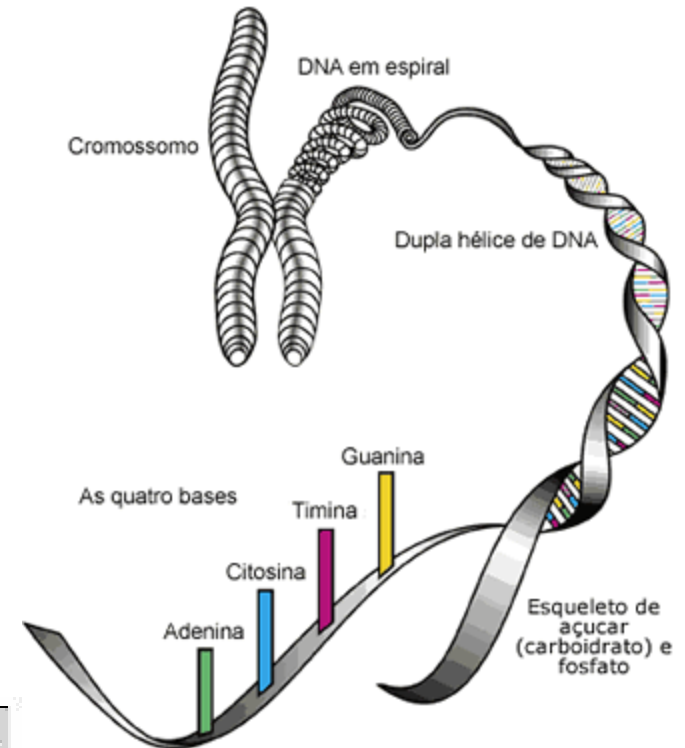
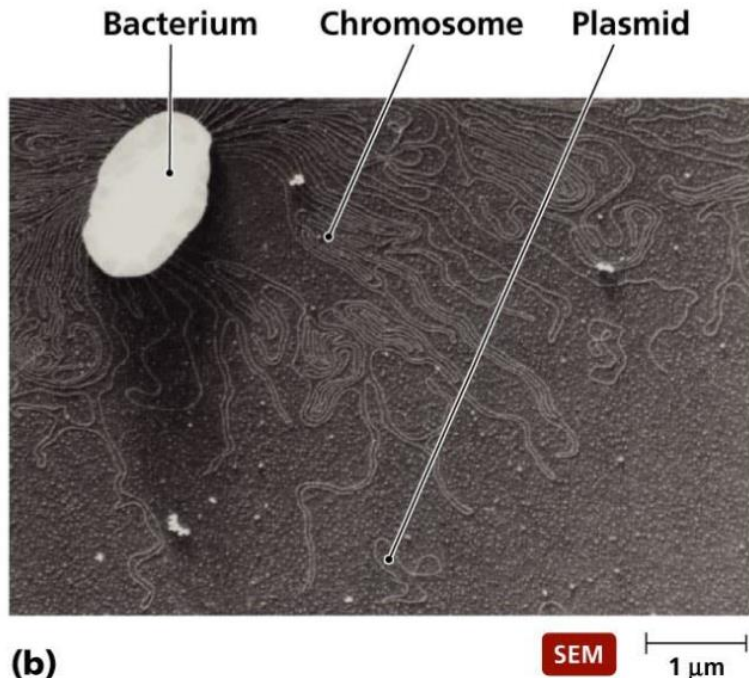


Thomas Morgan

1866 –1945



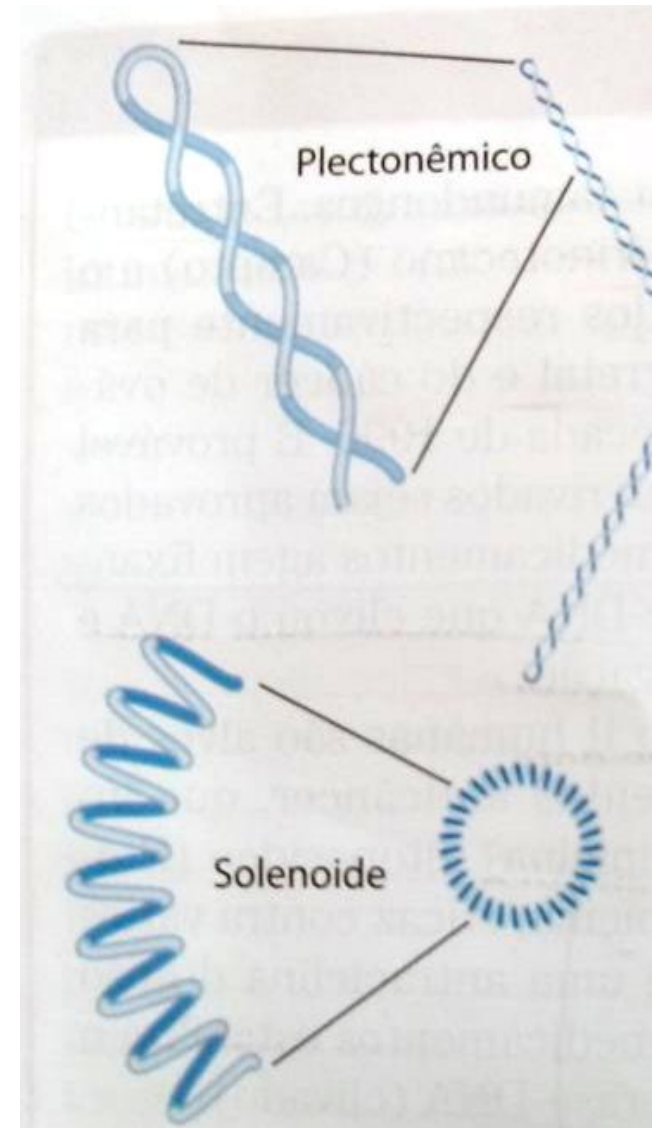
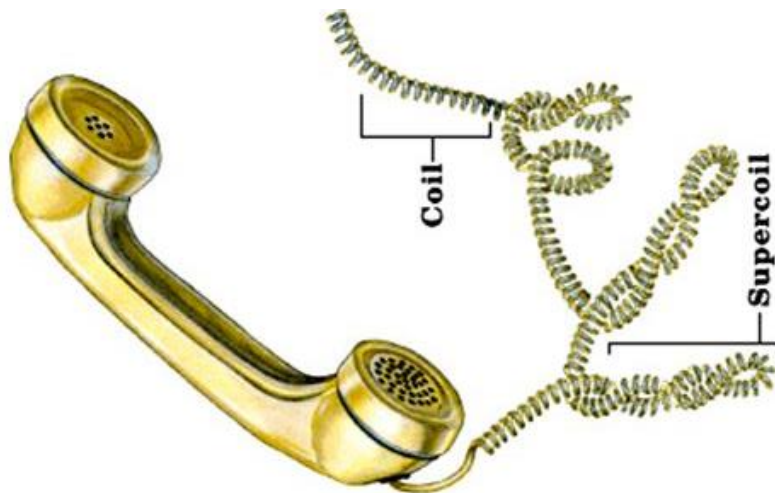
Como o DNA se organiza na célula?



espécie	nome comum	tamanho estimado do genoma (pb)	n.º de proteínas descritas
<i>Oryza sativa</i>	arroz	5.000.000.000	224.181
<i>Mus musculus</i>	camundongo	3.454.200.000	249.081
<i>Homo sapiens</i>	homem	3.400.000.000	459.114
<i>Rattus norvegicus</i>	rato	2.900.000.000	109.077
<i>Drosophila melanogaster</i>	mosca-da-fruta	180.000.000	86.255

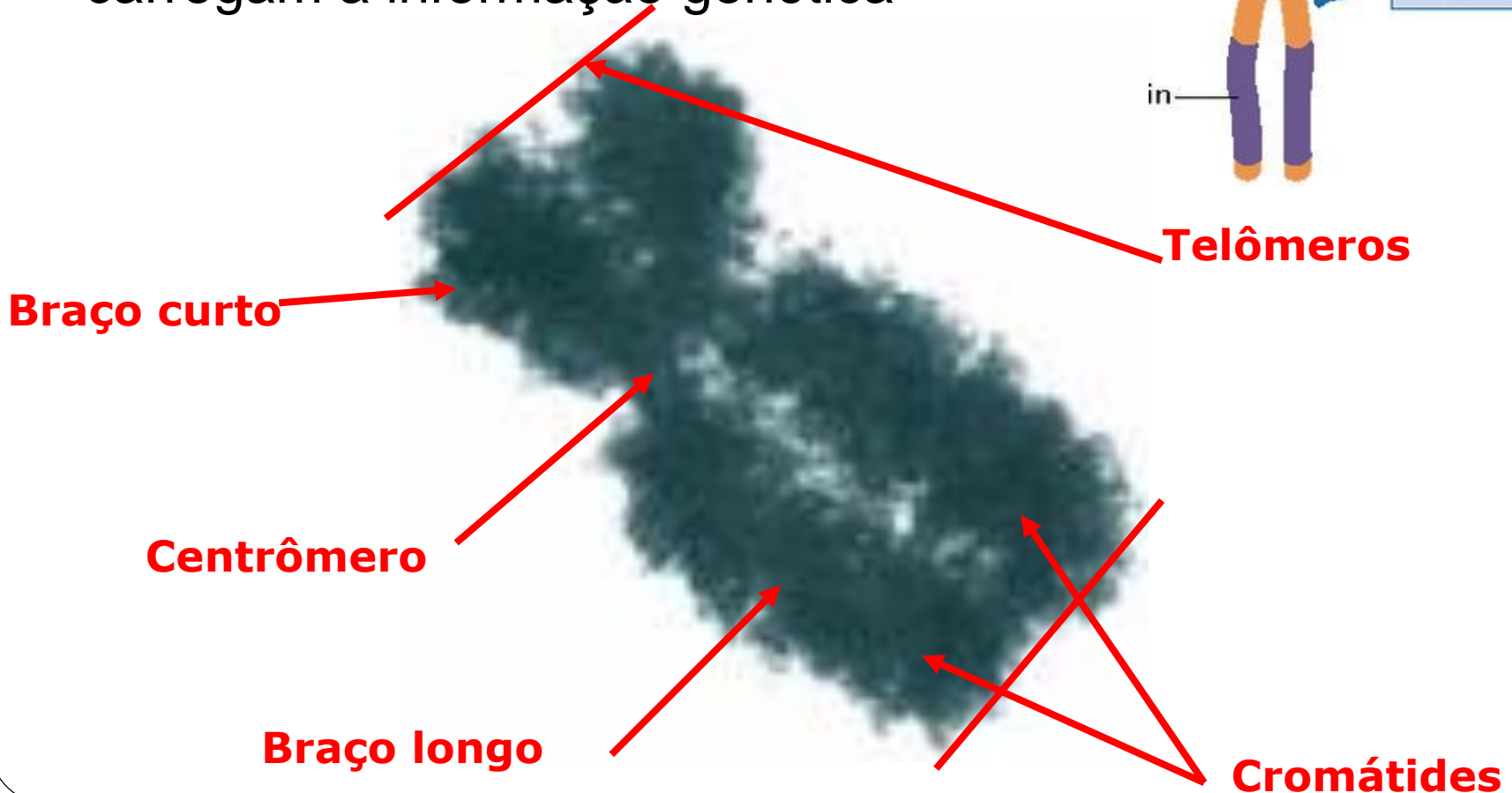
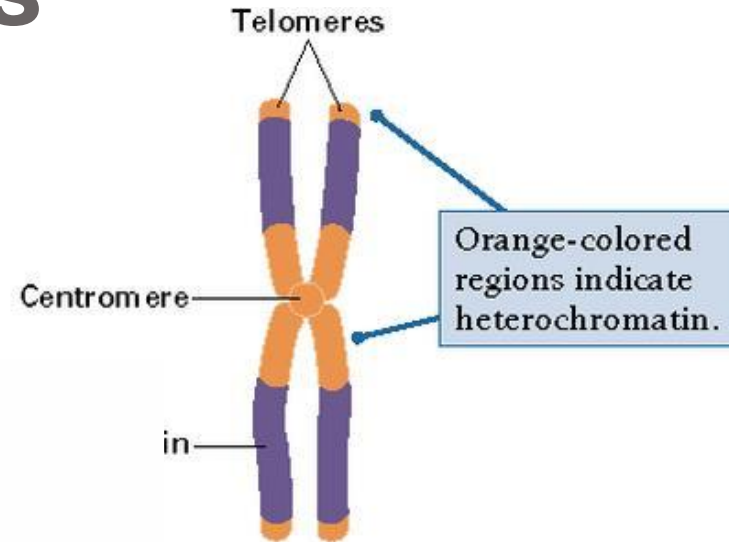
DNA supertorcido

- Supertorção = enrolar em espiral
- Mas não de qualquer forma!
 - **Solenoides** (voltas apertadas voltadas para a esquerda)
 - **Plectonêmica** (supertorções estendidas com orientação para a direita)



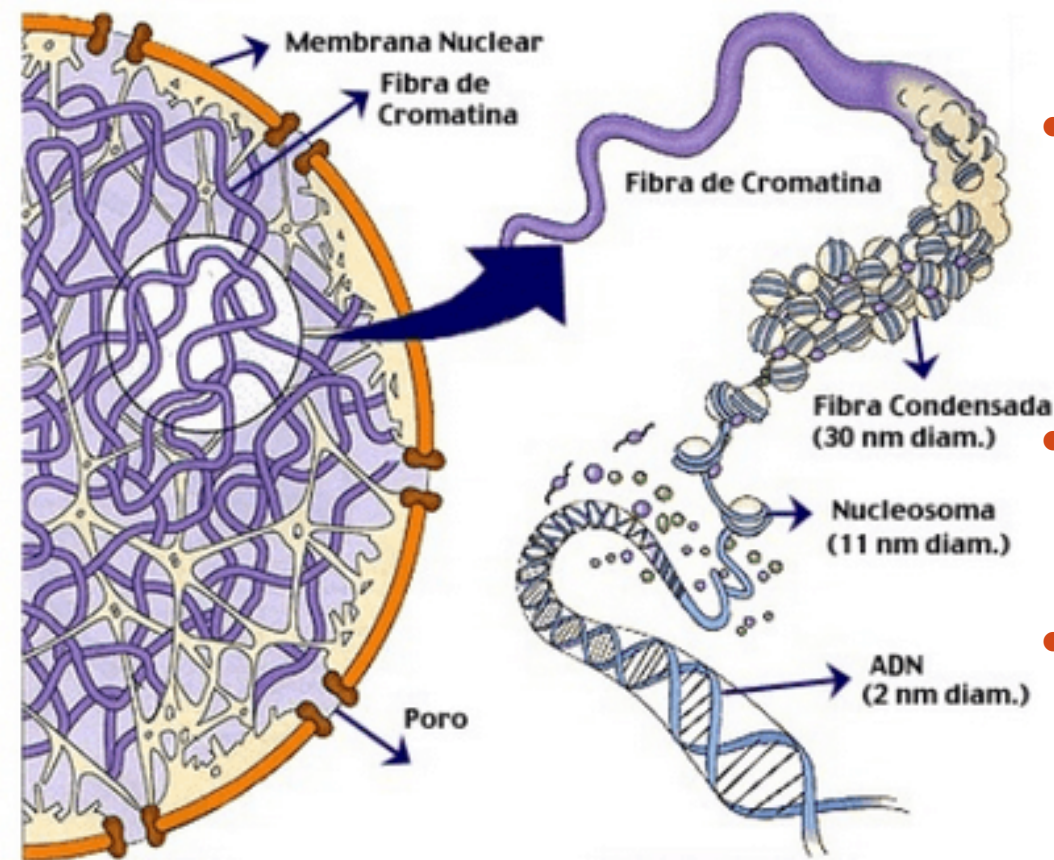
Cromossomos

- Corpos densamente corados observados no núcleo de células vistas em microscópio ótico, que carregam a informação genética



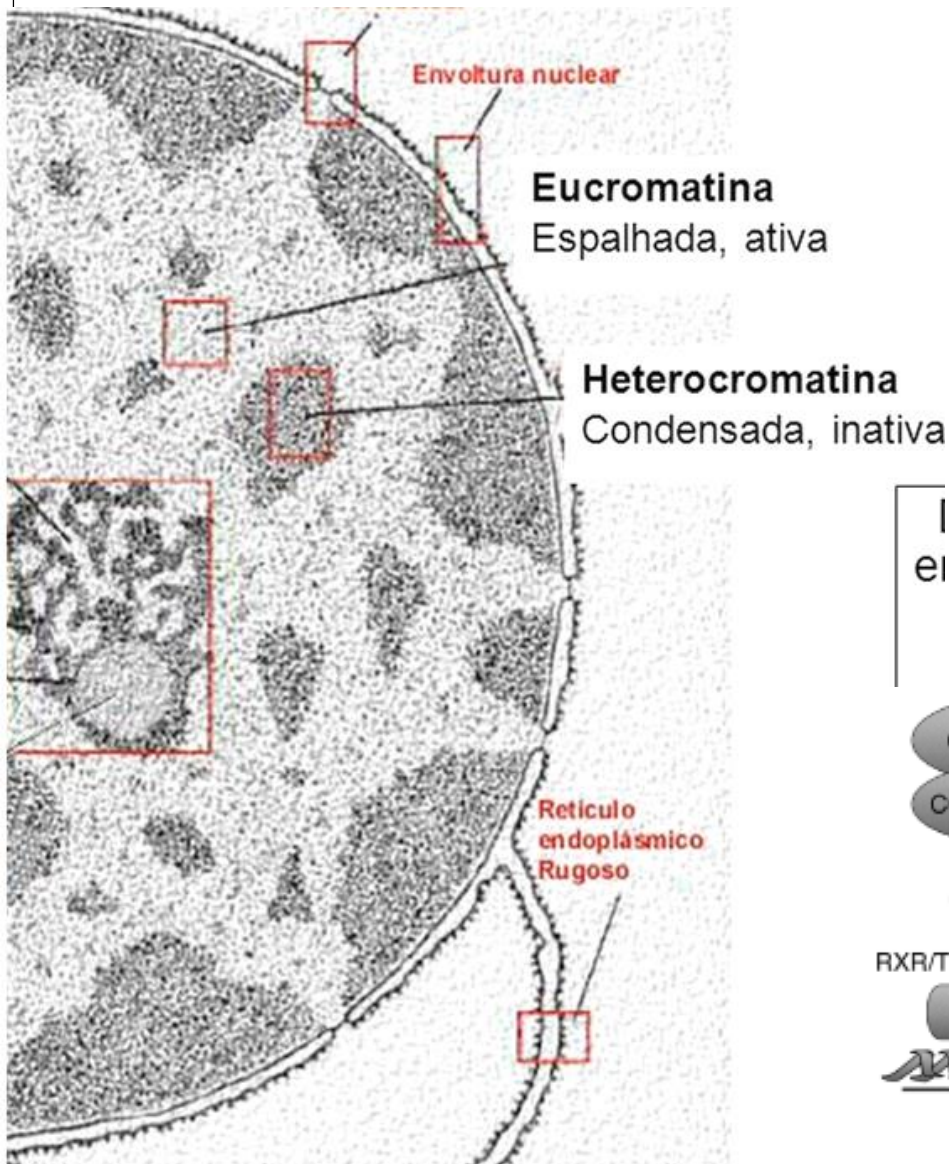
Cromatina

Cromatina.



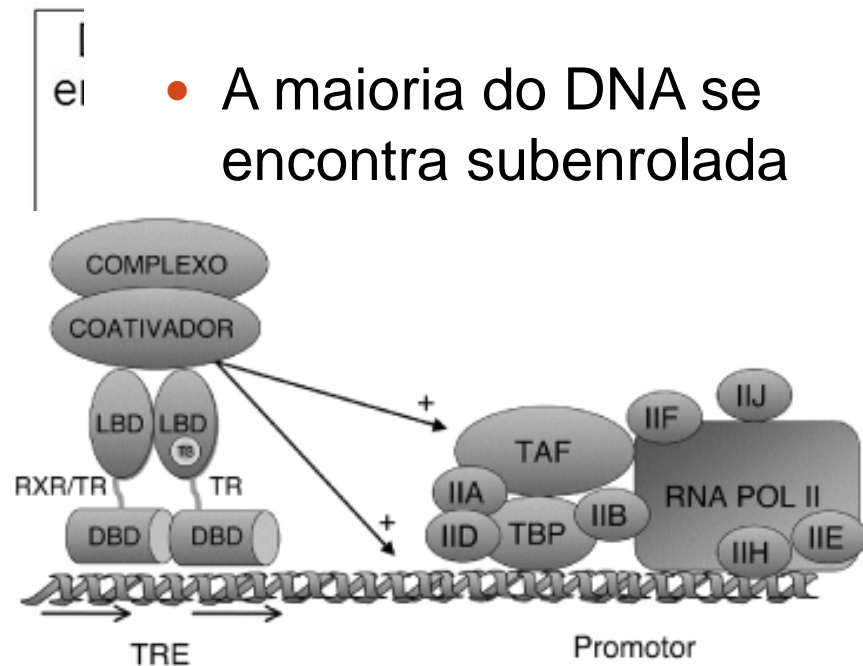
- A estrutura dos cromossomos se modifica ao longo do ciclo celular!
- Cromatina: Material cromossômico **amorfo e distribuído aleatoriamente** no núcleo
- É constituída por fibras contendo proteína e DNA
- Essas proteínas são as **histonas**, que empacotam e organizam o DNA em estruturas denominadas **nucleossomos**

A informação biológica precisa ser acessada!



- Supertorção afeta replicação e transcrição, pois essas necessitam que as duas cadeias do DNA se separem visto que há uma maquinaria para esses processos

- A maioria do DNA se encontra subenrolada



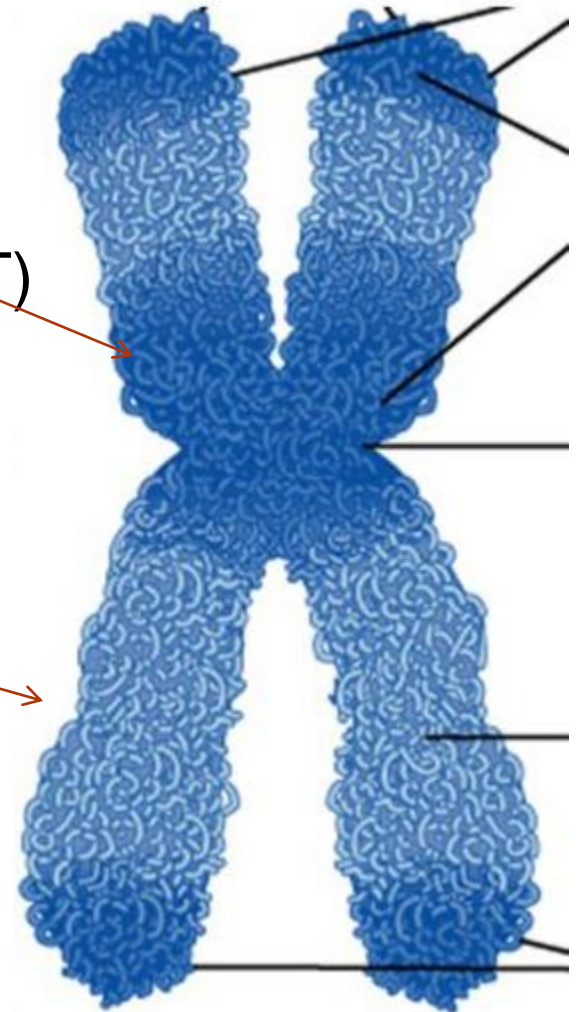
Heterocromatina e Eucromatina

- **Heterocromatina:**

- Mais condensada
- Poucos genes (Alto conteúdo de AT)
- Genes silenciados (metilados)
- Mais escura quando corada

- **Eucromatina:**

- Menos condensada
- Genes expressos
- Rica em genes (alto conteúdo GC)
- Mais clara quando corada



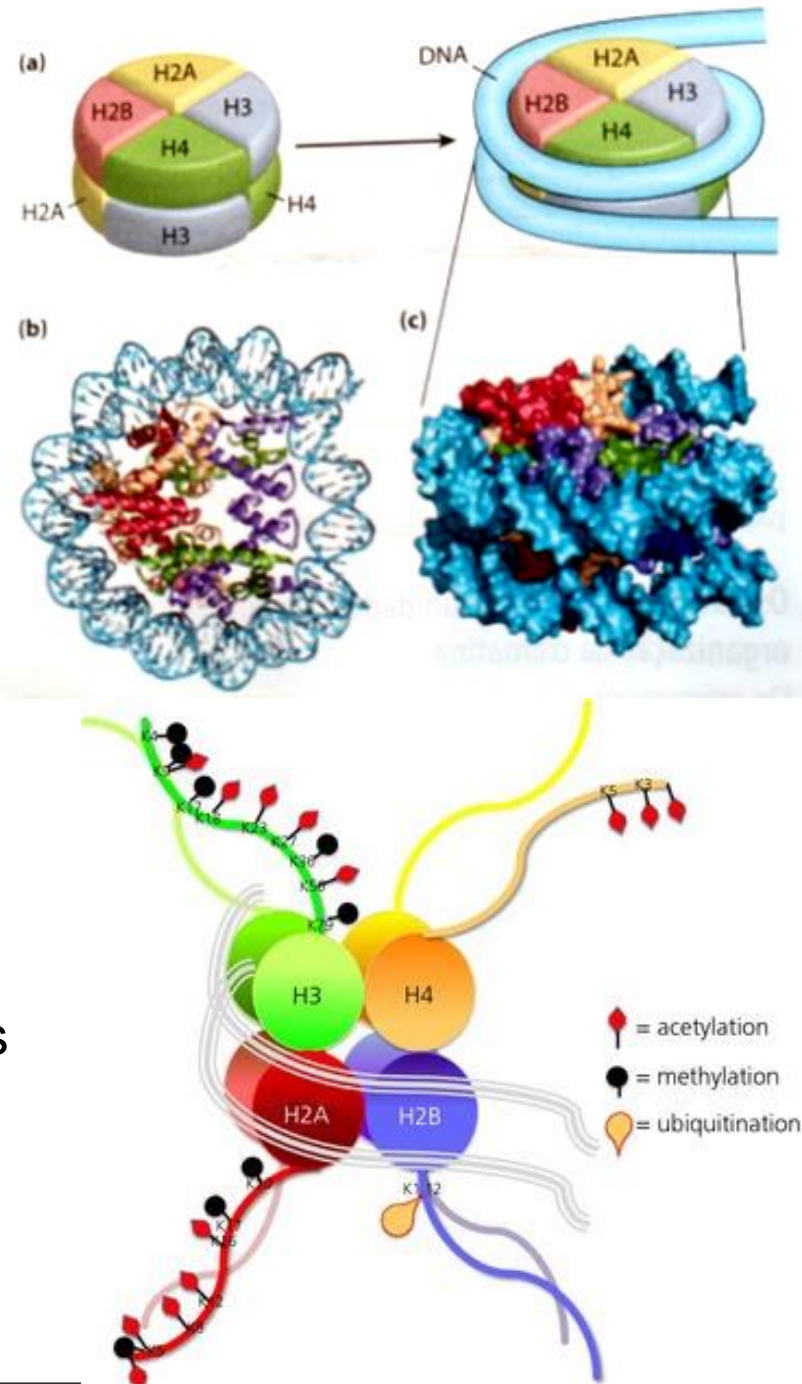
Histonas

- Proteínas pequenas e ricas nos aa básicos arginina e lisina
- Existem 5 tipos principais de histonas:

Classes e tipos

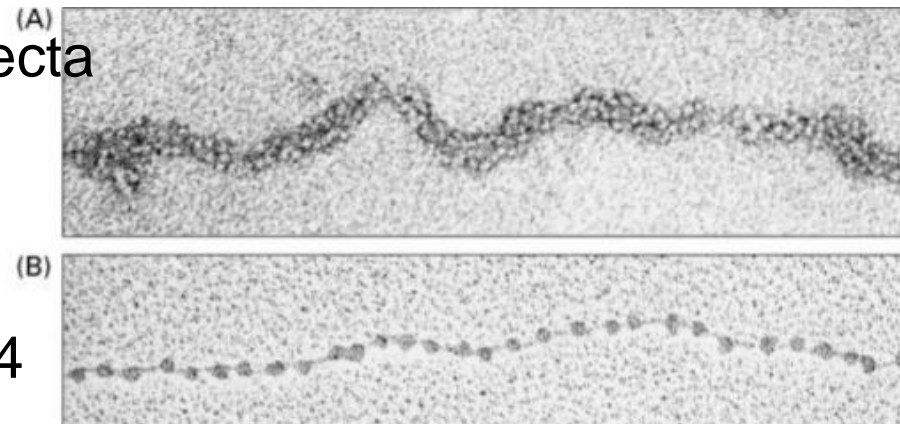
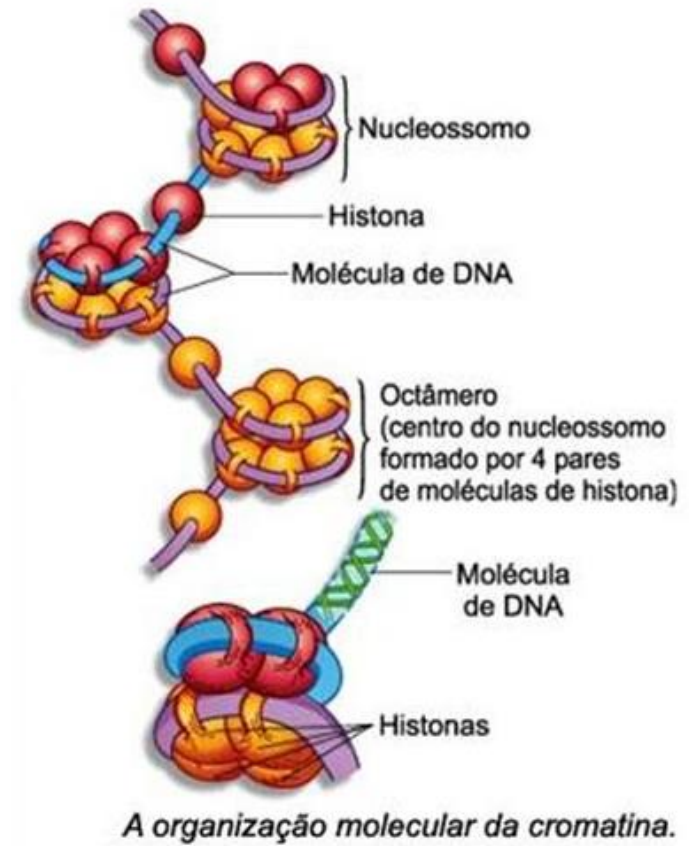
- **H1** → alto conteúdo de lisina
- **H2a; H2B** → baixo conteúdo de lisina
- **H3;H4** → alto conteúdo de arginina

- Estão sujeitas a modificações enzimáticas, como **metilação**, **acetilação** e isso afeta as propriedades das histonas, bem como as propriedades estruturais e funcionais da cromatina, participando na regulação da transcrição
- A maioria das modificações das histonas ocorre nas caudas



Nucleossomo, o octâmero de histonas

- Unidades fundamentais na organização da cromatina compactada de forma altamente ordenada
- Quando os cromossomos são submetidos à tratamentos de desenovelamento parcial, aparecem “**contas**” de um colar. Essas contas são complexos de DNA e histonas.
- As contas com o DNA que as conecta formam o **nucleossomo**
- A conta contém 8 moléculas de histonas: 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 e 2 H4

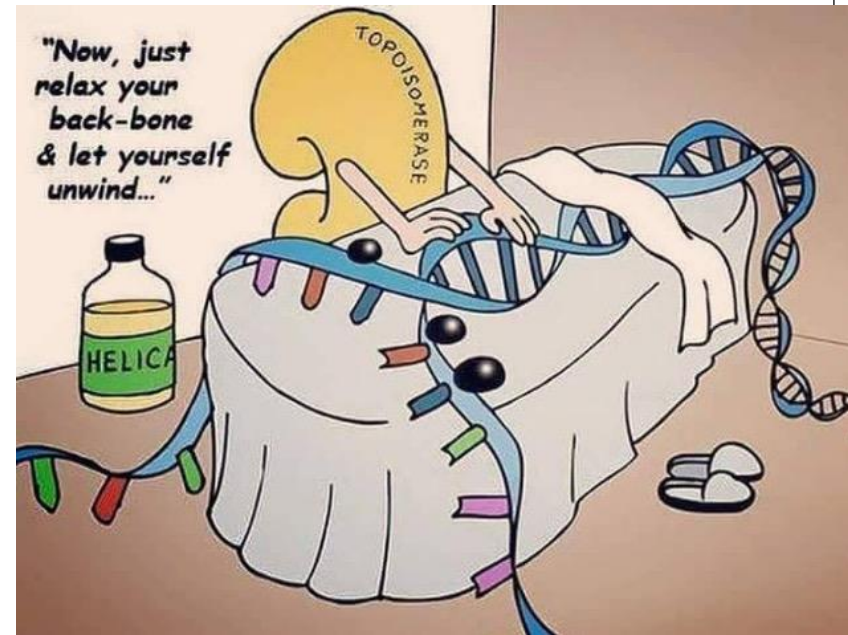


Mas...

- As histonas não ligam o DNA aleatoriamente: tendem se posicionar em localizações em que há uma abundância de bases A=T
- Os nucleossomos são depositados no DNA durante a replicação
- A deposição parece ocorrer em etapas: primeiro H3-H4 e depois H2A-H2B
- Processo é mediado por CHAPERONAS, que garantem enovelamento rápido e eficiente
- O posicionamento exato do centro dos nucleossomos exerce um papel na expressão de certos genes eucariotos.

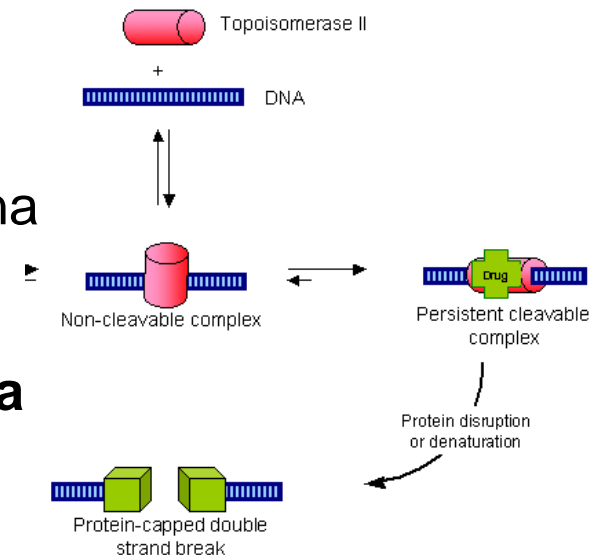
Topoisomerases

- A forte associação do DNA ao redor das histonas, necessita que uma volta da hélice de DNA seja removida.
- Essa remoção é feita pelas TOPOISOMERASES
- Topoisomerases I:
 - Quebra de uma cadeia de DNA
- Topoisomerases II:
 - Quebra em ambas as cadeias de DNA



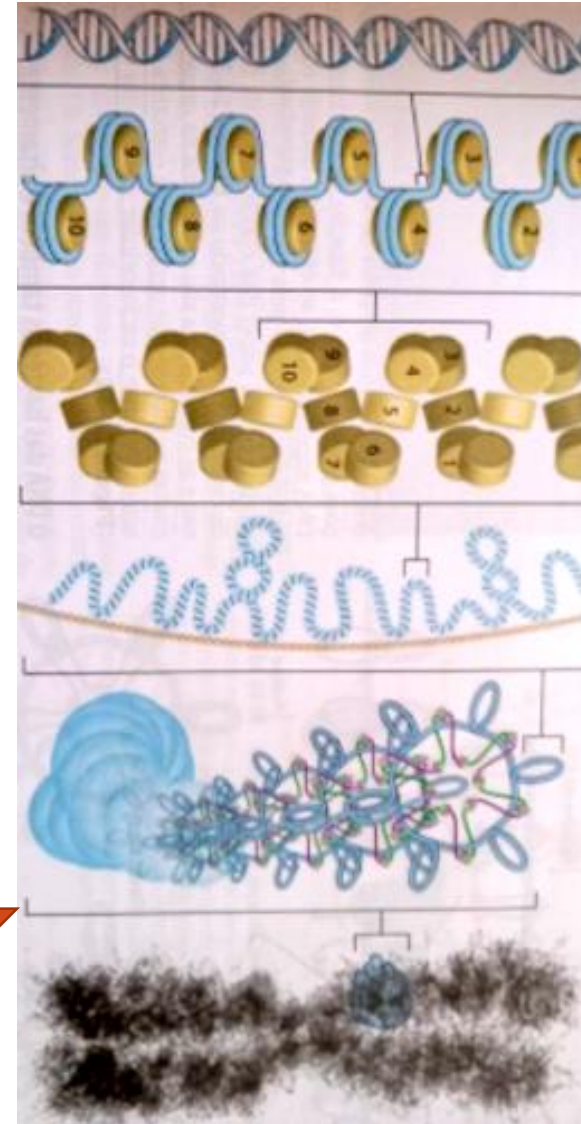
Inibidores de Topoisomerases como fármacos

- Sem elas as células não podem se replicar, compactar o DNA ou expressar os genes
- Mais importantes agentes **quimioterápicos para tratamento de câncer** são inibidores de topoisomerases humanas
- Nas células tumorais normalmente as topoisomerases estão presentes em níveis maiores que em outras células, devido ao metabolismo acelerado da célula tumoral
- Camptotecina, Doxorubicina, Etoposídeo e elipticina
- Esses medicamentos agem fixando o complexo topoisomerase-DNA que clivou o DNA e **inibindo a formação de nova ligação**
- Podem ser nocivos para tecidos não tumorais



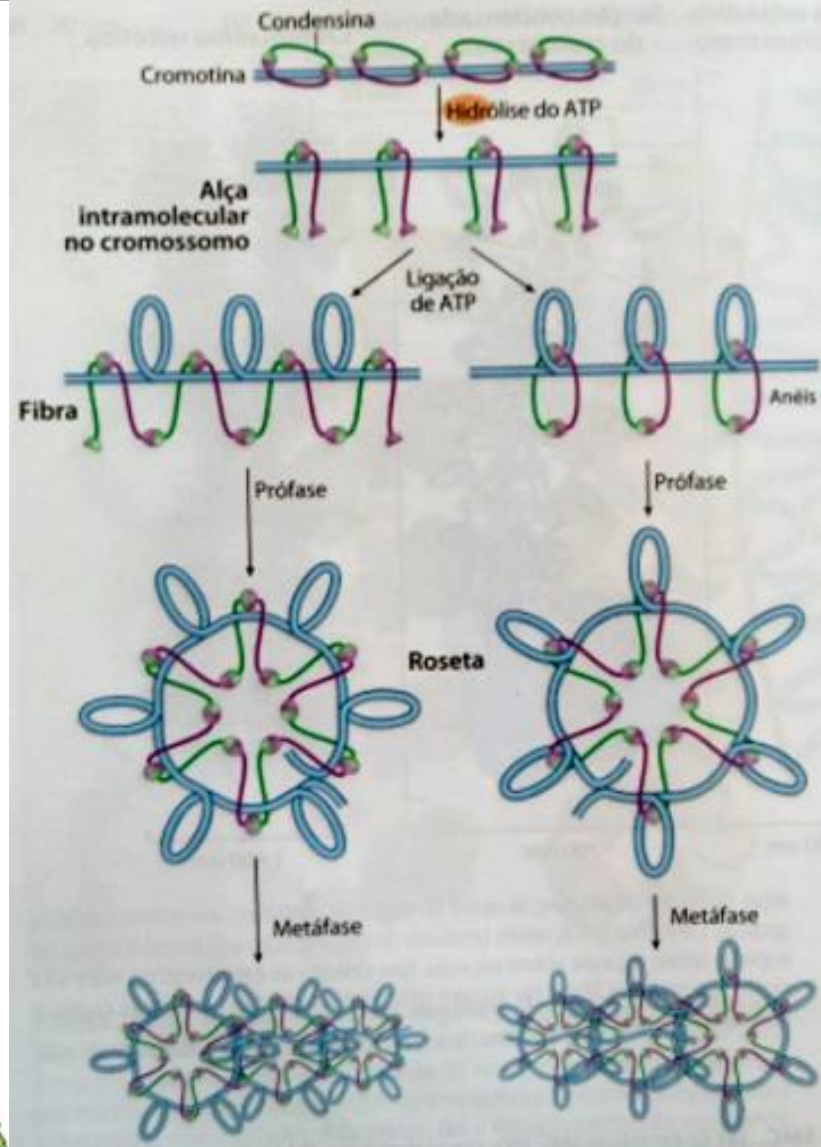
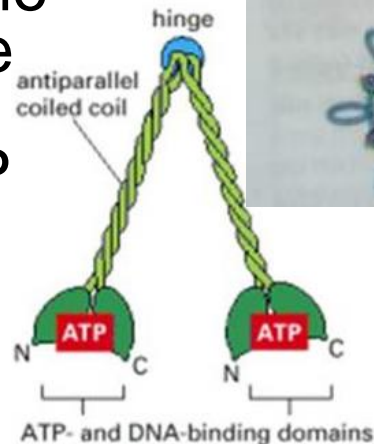
Nucleossomos são condensados em estruturas super organizadas

- O invólucro do DNA ao redor do centro do nucleossomo compacta o comprimento do DNA em cerca de 7 vezes
- Mas a compactação final é de ~10 mil vezes
- Sugere um maior nível de organização cromossomal: ideia de **andaimes cromossomais**
- Esse andaime é constituído por **topoisomerases e proteínas SMC**



Proteínas SMC

- Mantém a estrutura condensada dos cromossomos (Structural Maintenance of chromosomes)
- Proteínas diméricas globulares com um **domínio amino (N)** e um **carboxi (C)** terminal, cada um com parte de um sítio de hidrólise de ATP e se juntam para formar um sítio de hidrólise de ATP completo

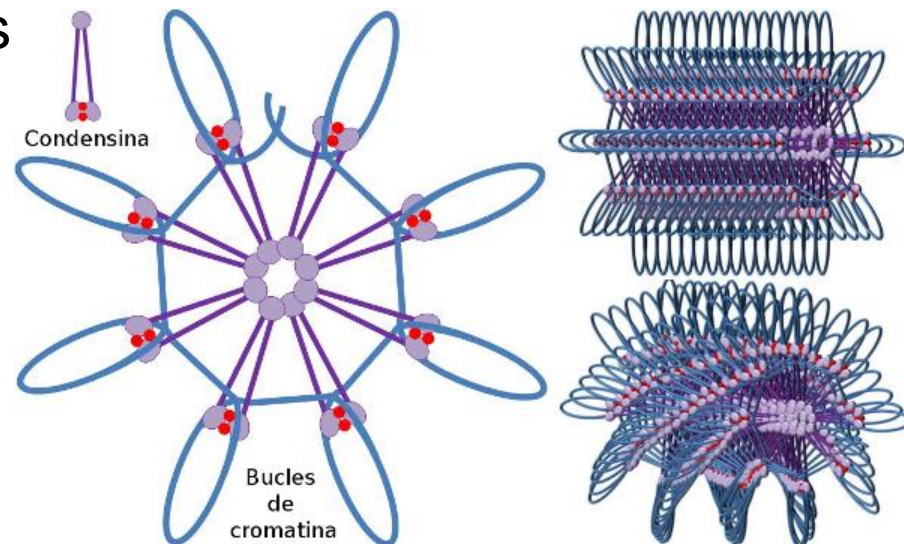
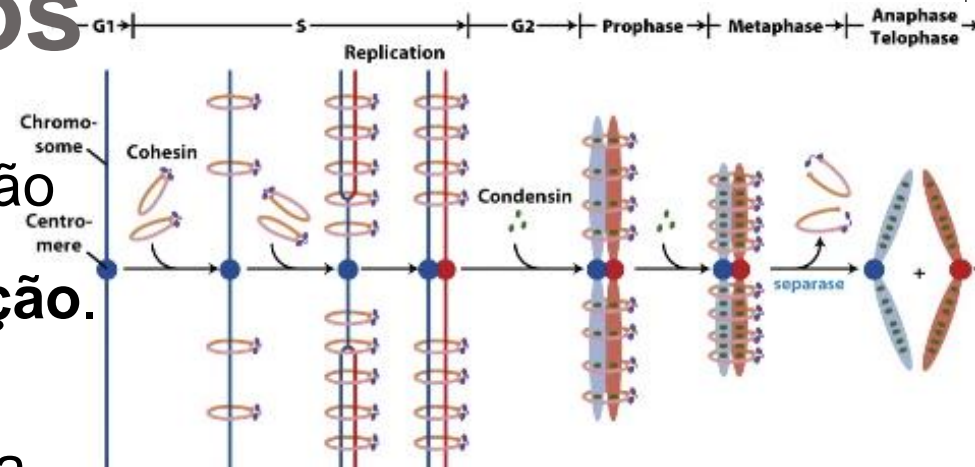


SMC em eucariotos

- **Coesinas:** manutenção da união das cromátides irmãs imediatamente após a **replicação**. Essencial para que os cromossomos sejam adequadamente segregados na divisão celular

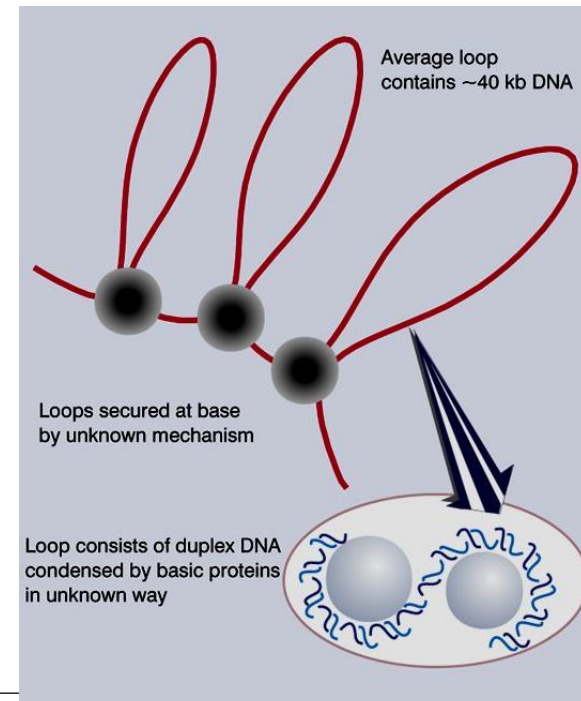
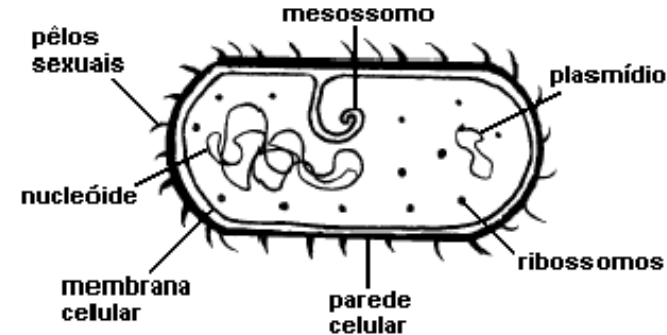
- **Condensinas:** condensação dos cromossomos quando a célula entra em **mitose**. A ligação de condensinas torna o DNA supertorcido

- Ambas são essenciais a orquestração das mudanças que ocorrem nos cromossomos durante o ciclo celular



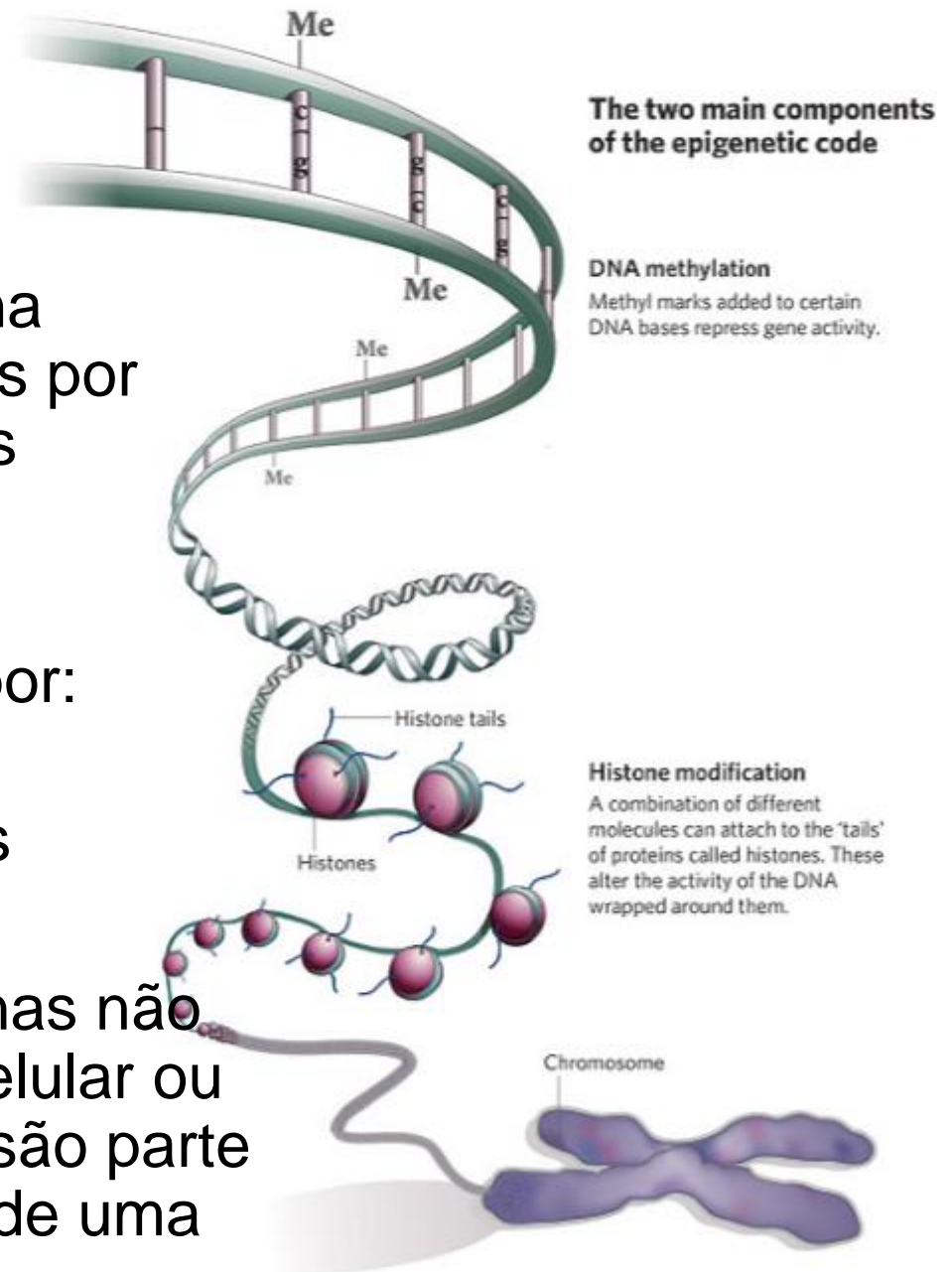
Organização do DNA em bactérias

- Compactado em um **nucleoide** (conhece-se menos do que sobre a cromatina)
- Existem proteínas **semelhantes às histonas**, mas se dissociam em minutos.
 - Nenhuma estrutura que possa se comparar com o nucleossomo
- Essas mudanças rápidas podem refletir uma **necessidade de acesso rápido à informação genética**.

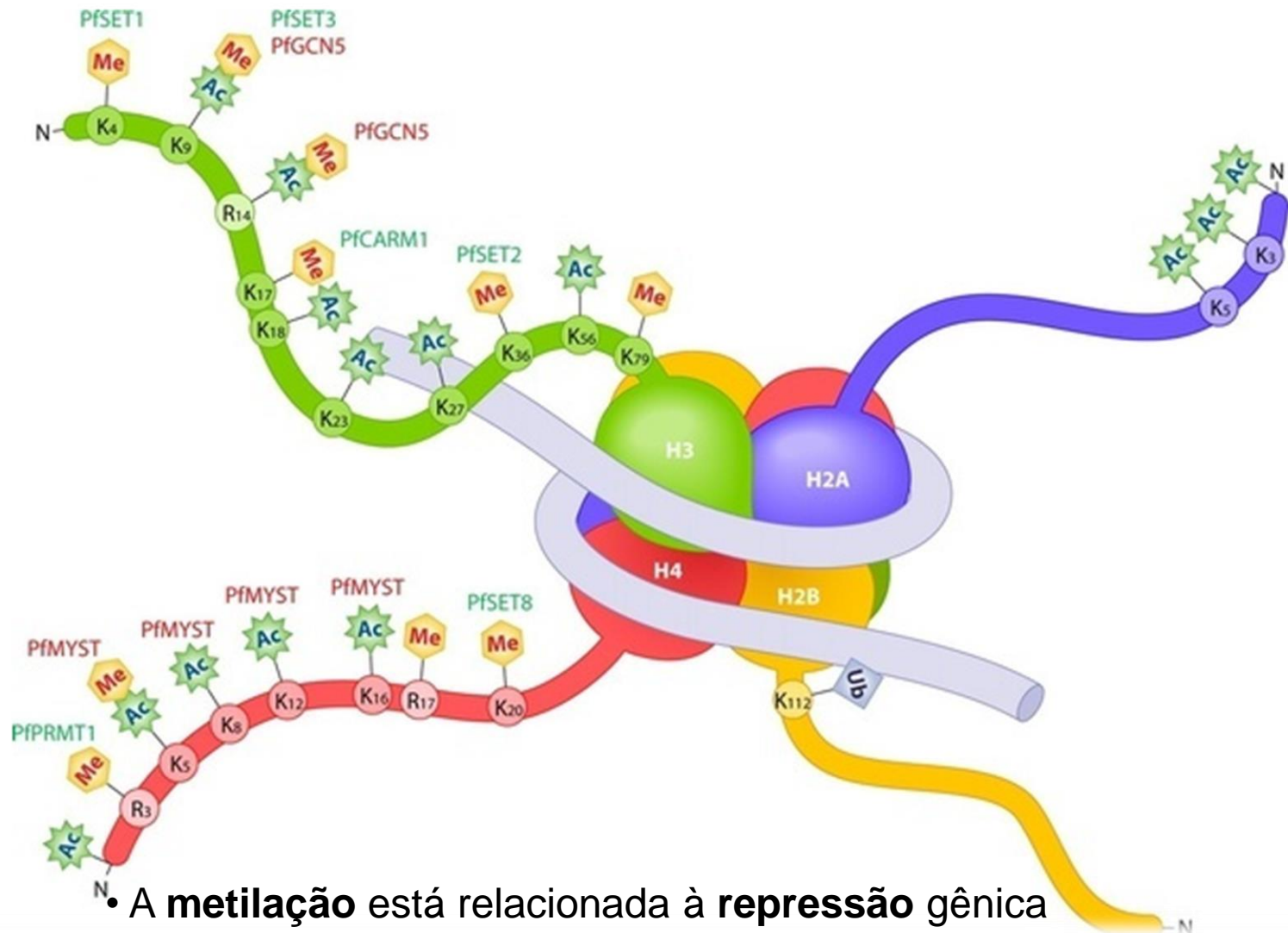


Epigenética

- Mudanças no fenótipo ou na expressão gênica causadas por mudanças não-mutacionais (genótipo)
- Principalmente causadas por:
 - Metilação do DNA
 - Modificação nas histonas
- As modificações nas histonas não desaparecem na divisão celular ou durante a meiose e assim são parte da informação transmitida de uma geração para a outra



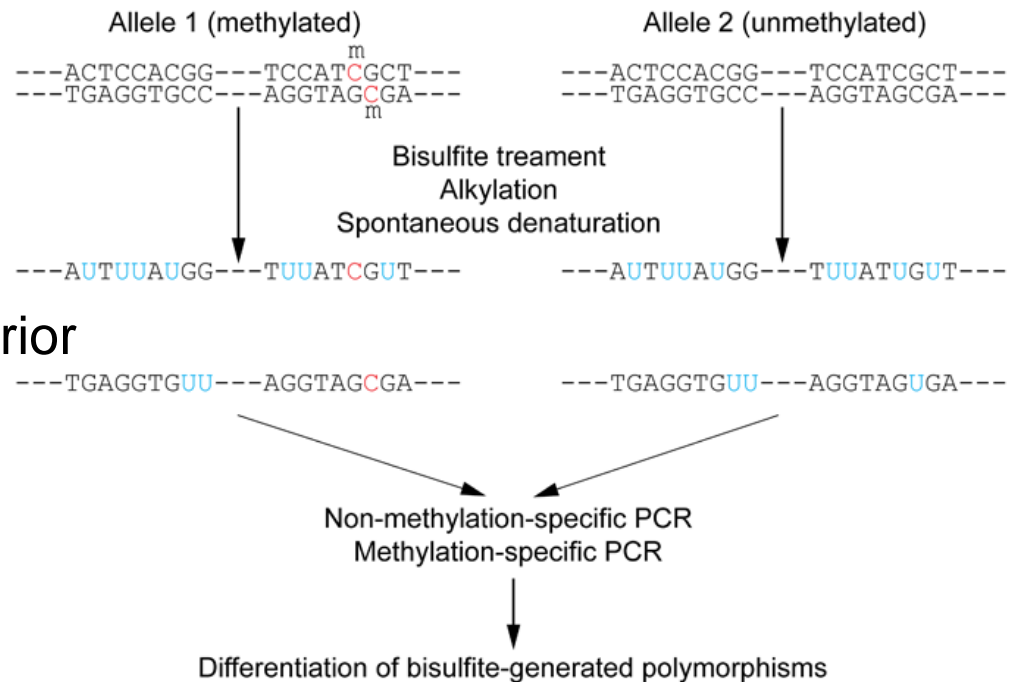
MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS NAS CAUDAS DAS HISTONAS DETERMINAM O DESTINO DE UM GENE



- A **metilação** está relacionada à **repressão** gênica
- A **acetilação** está geralmente relacionada à **ativação** gênica.

Tratamento com bissulfito

- Permite a **identificação** em larga-escala das **citossinas metiladas**
- Citossinas **não metiladas** são convertidas em uracila. As **metiladas** continuam **Citossina**
- Tratamento bioinformático posterior para identificação das regiões metiladas
- Acesso diferenciado pela maquinaria de transcrição



Imunoprecipitação da cromatina

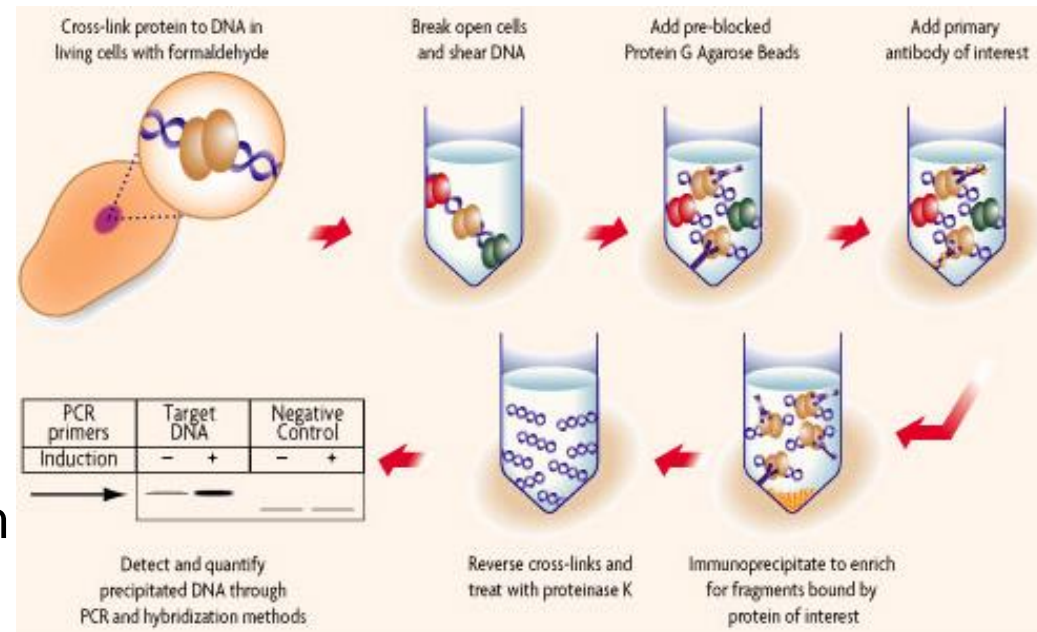
- ChIP

- Chromatin Immunoprecipitation

- Liga-se o nucleossomo a anticorpos específicos para histonas modificadas

- Libera-se o DNA e sequencia-se

- Permite reconhecer as regiões do DNA ligadas em histonas com determinadas modificações pós-traducionais





**Nutritional Control of Reproductive Status in Honey
Methylation**

R. Kucharski *et al.*

Science **319**, 1827 (2008);

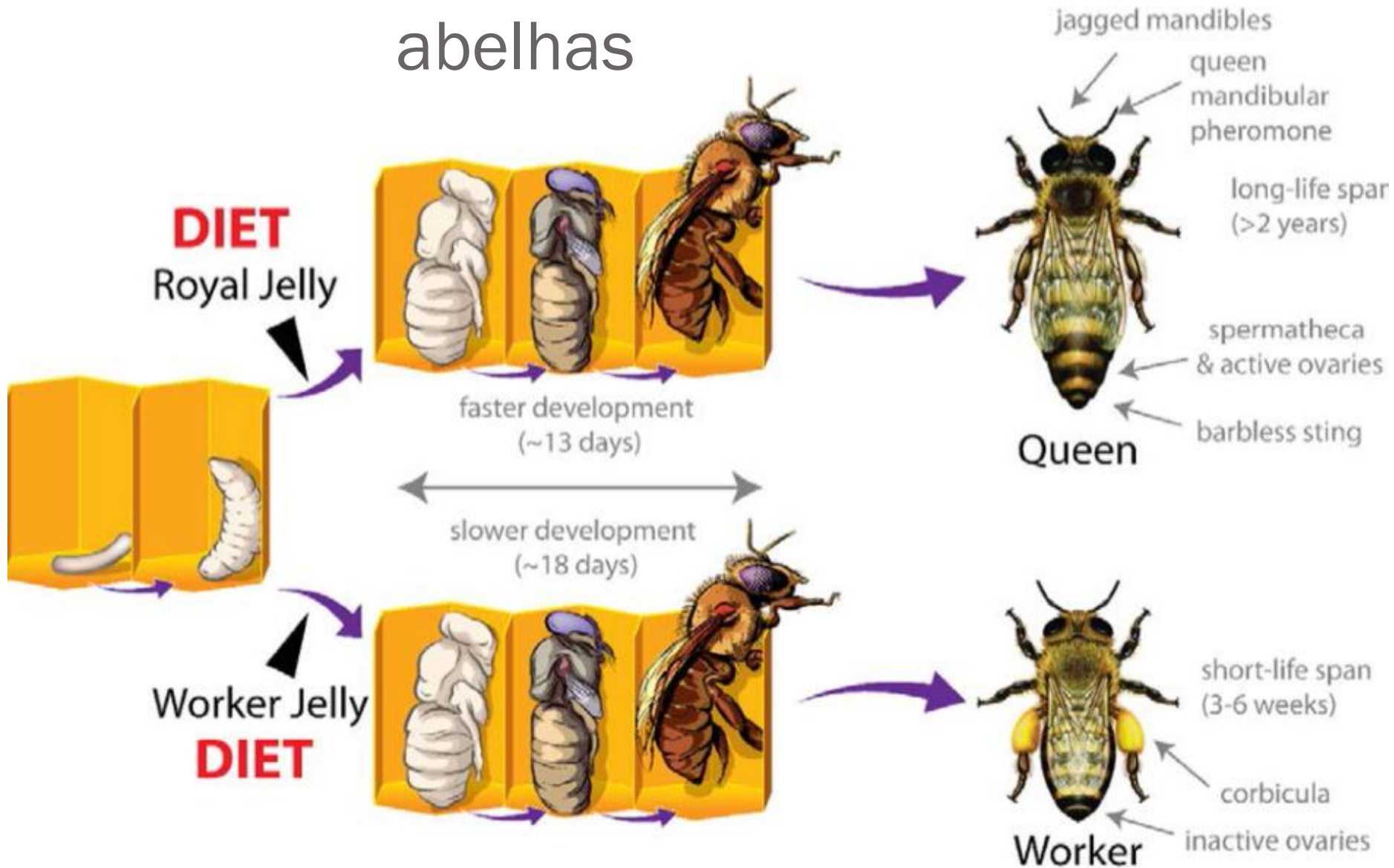
DOI: 10.1126/science.1153069

Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation

R. Kucharski,* J. Maleszka,* S. Foret, R. Maleszka†

Fertile queens and sterile workers are alternative forms of the adult female honeybee that develop from genetically identical larvae following differential feeding with royal jelly. We show that silencing the expression of DNA methyltransferase Dnmt3, a key driver of epigenetic global reprogramming, in newly hatched larvae led to a royal jelly–like effect on the larval developmental trajectory; the majority of Dnmt3 small interfering RNA–treated individuals emerged as queens with fully developed ovaries. Our results suggest that DNA methylation in *Apis* is used for storing epigenetic information, that the use of that information can be differentially altered by nutritional input, and that the flexibility of epigenetic modifications underpins, profound shifts in developmental fates, with massive implications for reproductive and behavioral status.

Determinação de castas em abelhas



Resumo

- O empacotamento se dá através da associação do DNA (-) com proteínas chamadas histonas (+)
- As histonas permitem a regulação da expressão gênica ao abrirem ou fecharem a cromatina, permitindo o acesso ao DNA por outras proteínas (fatores de transcrição)
- Os mecanismos de modificações pós-traducionais em histonas e de metilação do DNA interferem na expressão gênica e podem ser quantificados

Nível de cansaço:

