



Centro
Universitario
Rivera



CENUR
NORESTE



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

4a Clase

EPIGENÉTICA

Yasser V. Vega Requena

yassve2@gmail.com

Yasser.vega@cut.edu.uy

Prof. Adjunto

CENUR Noreste

UdelaR



Centro
Universitario
Rivera



CENUR
NORESTE



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

CONTENIDO

- ARNs no codificantes

 - LncRNA

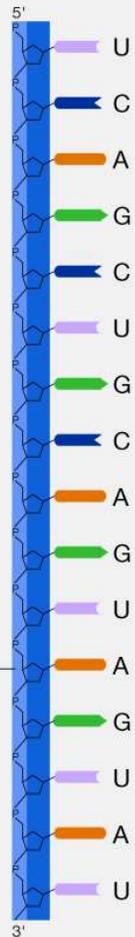
 - miRNA

 - piRNA

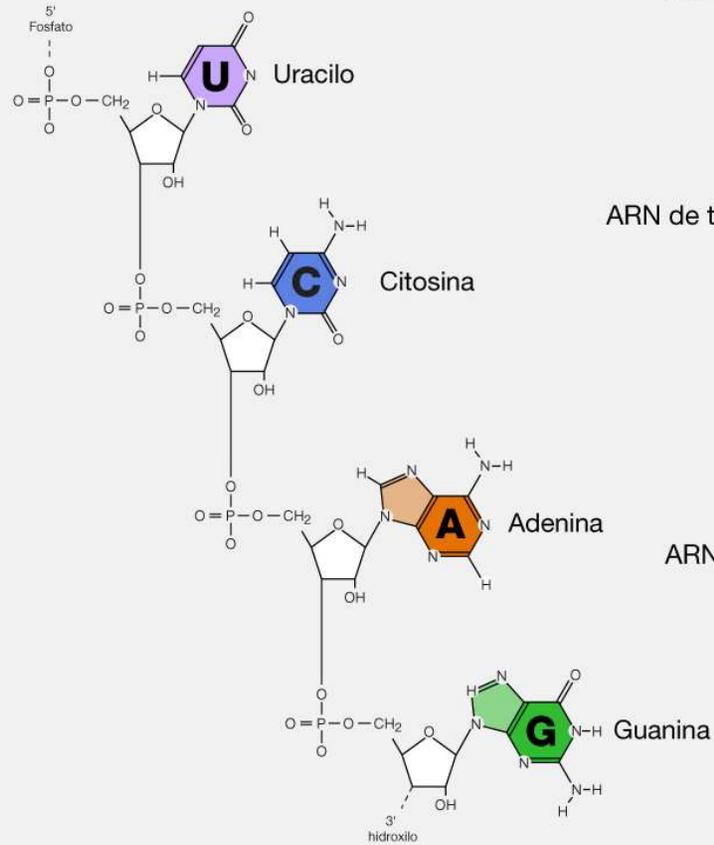
- Organización del núcleo y regulación de génica

- Repaso

Ácido ribonucleico (ARN)



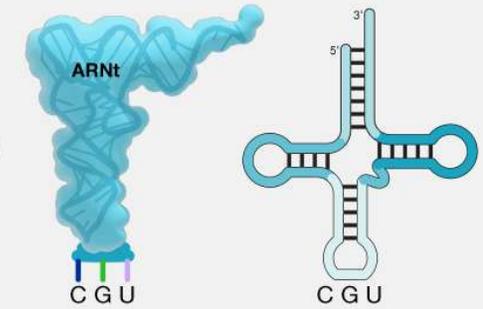
Estructura fundamental de azúcar-fosfato



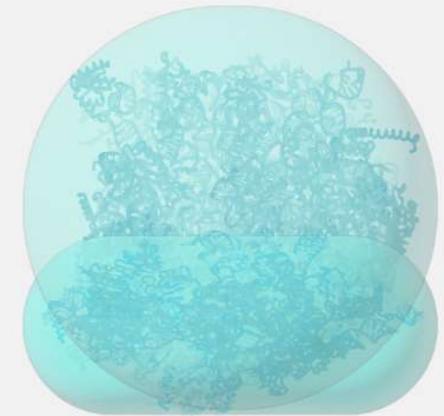
ARN mensajero (ARNm)

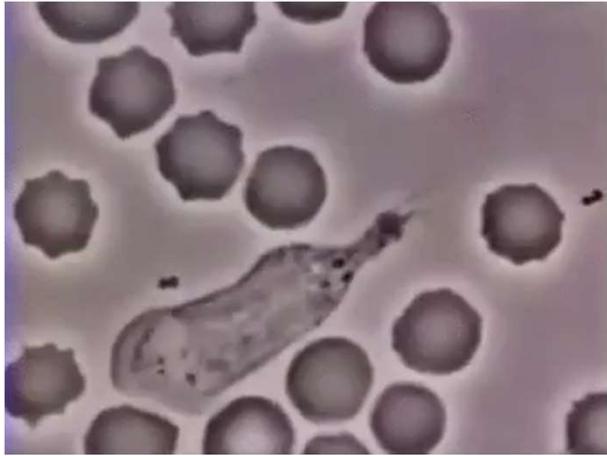


ARN de transferencia (ARNt)



ARN ribosómico (ARNr)

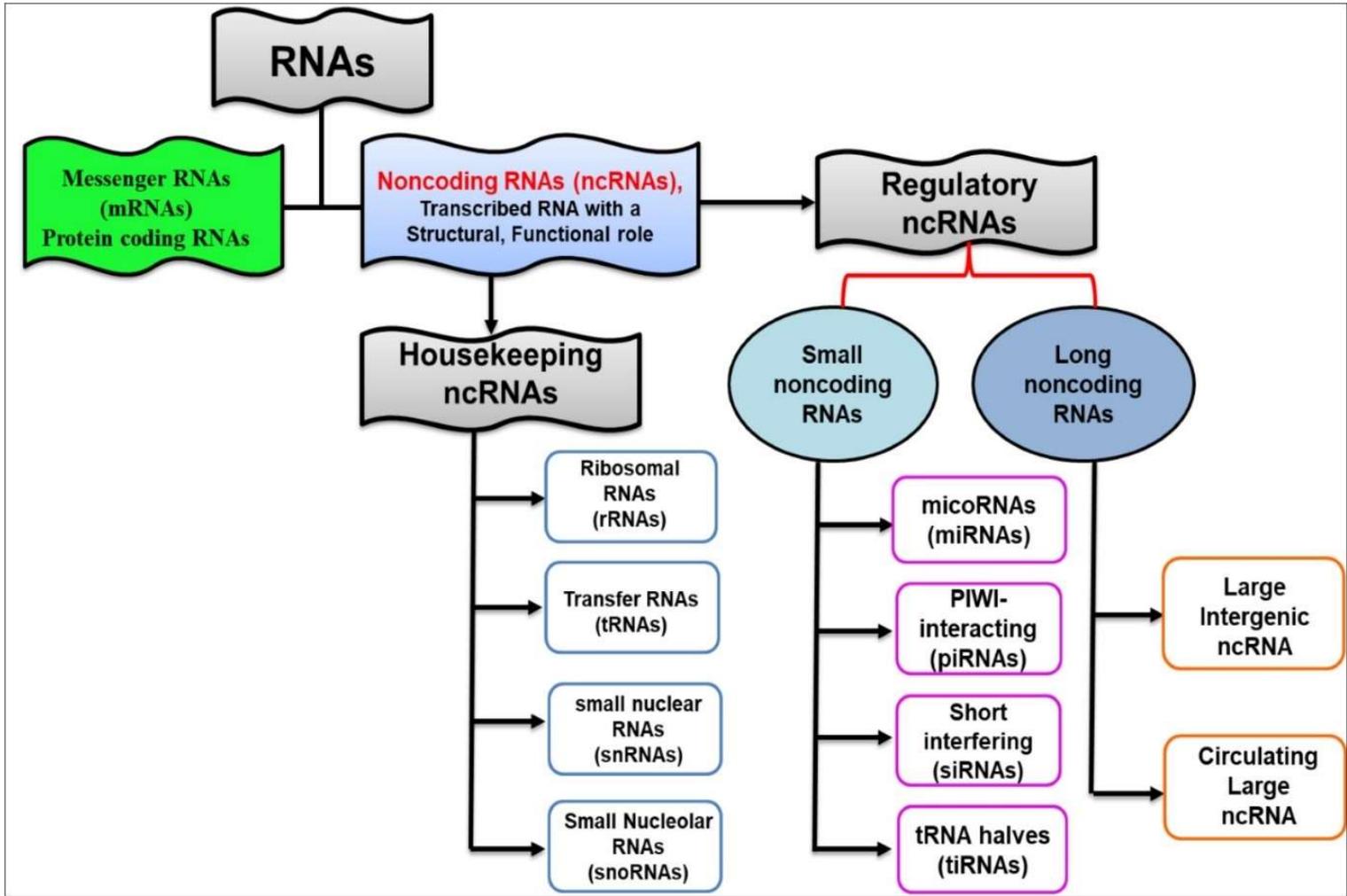




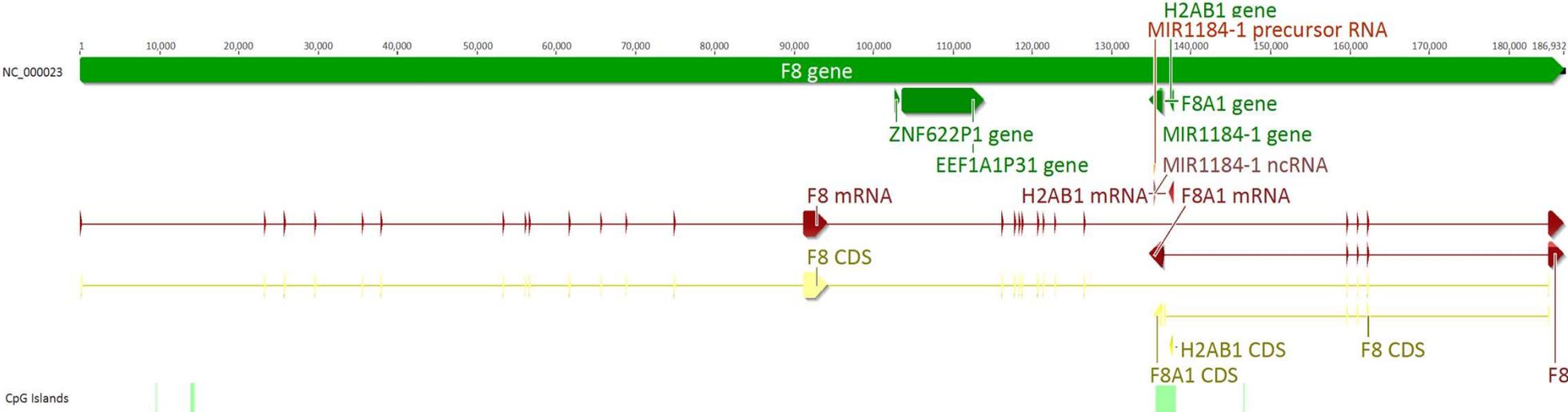
Macrófagos



1959 *Henry Harris*

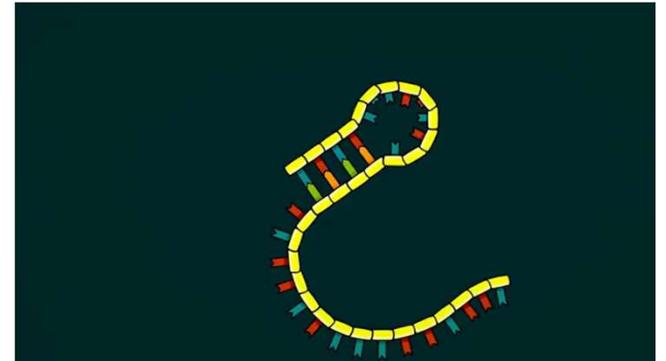


GEN DEL FACTOR VIII DE LA COAGULACIÓN



ARNs NO CODIFICANTES

- ✓ Pueden ser de pequeño, mediano y gran tamaño.
- ✓ Usualmente forman complejos proteicos.
- ✓ Regulan la expresión génica.
- ✓ Confieren estabilidad al genoma.



ARNs NO CODIFICANTES

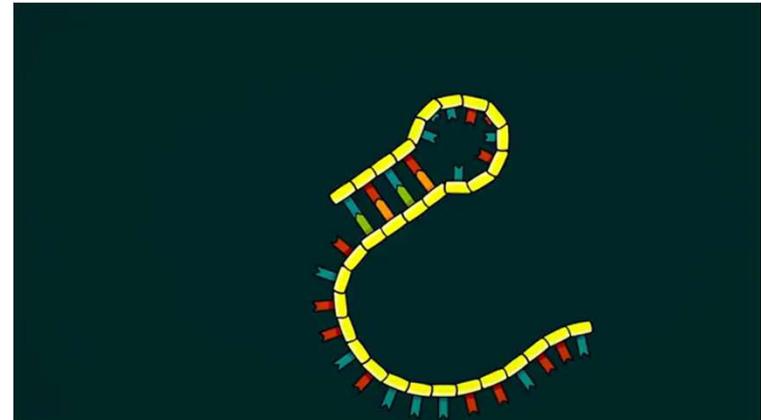
Long ARNs (lncRNAs)

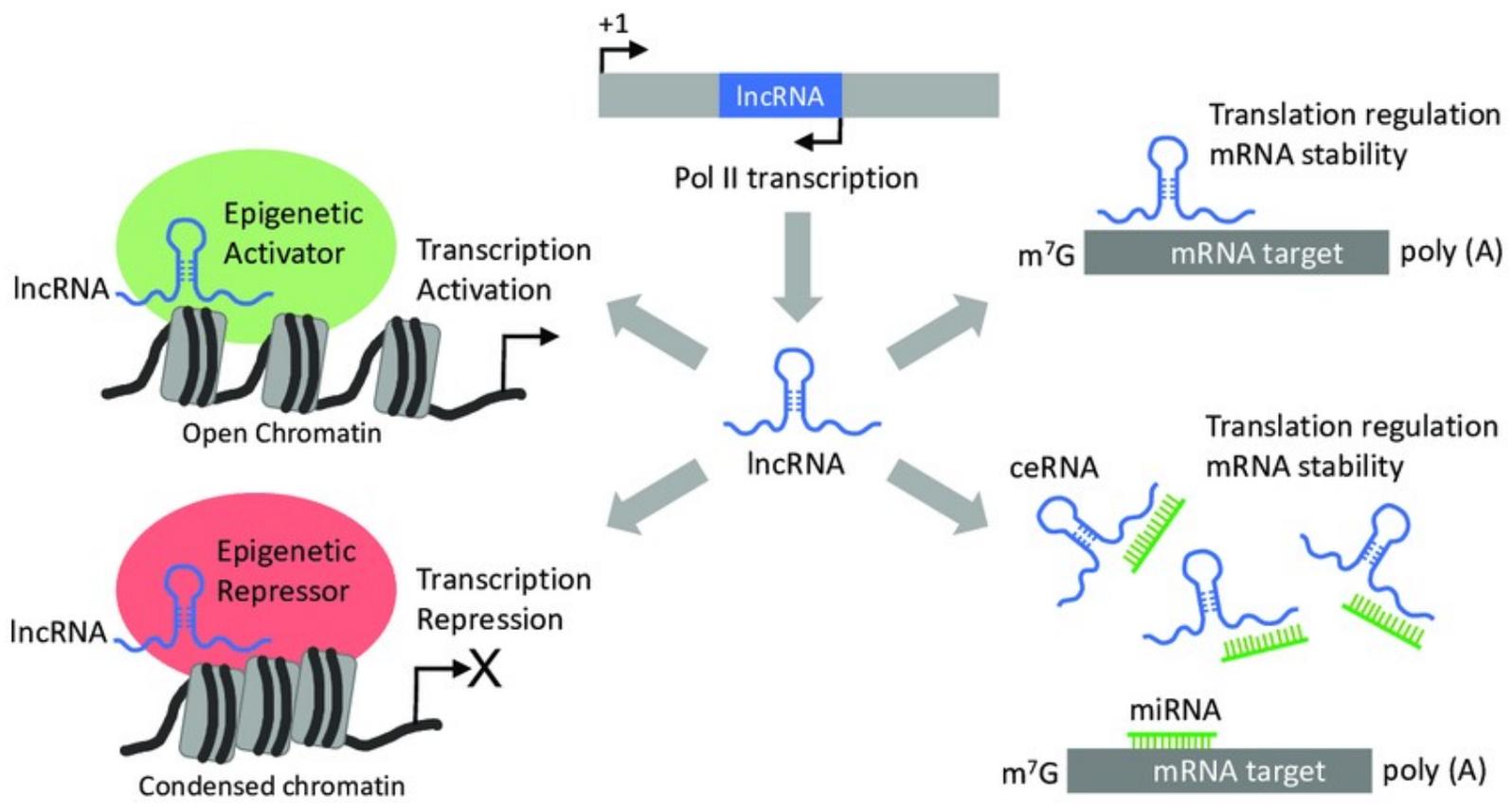
- ✓ Representan la mayoría de los transcritos en las células de mamíferos.
- ✓ > 200 nt
- ✓ Transcritos por la RNAPII.
- ✓ La forma más abundante de transcribirse es usando promotores en el sentido contrario del gen.
- ✓ Usando enhancers (en regiones codificantes o no codificantes). 2dos más abundantes.
- ✓ De regiones Intergénicas (**lincRNAs**).

ARNs NO CODIFICANTES

Long ARNs (lncRNAs)

- ✓ Estructura: Tienen propensión a generar estructuras secundarias, termodinámicamente estables.
- ✓ Interacción intermolecular:
 - RNA- Proteína
 - RNA-DNA
 - RNA-RNA





ARNs NO CODIFICANTES

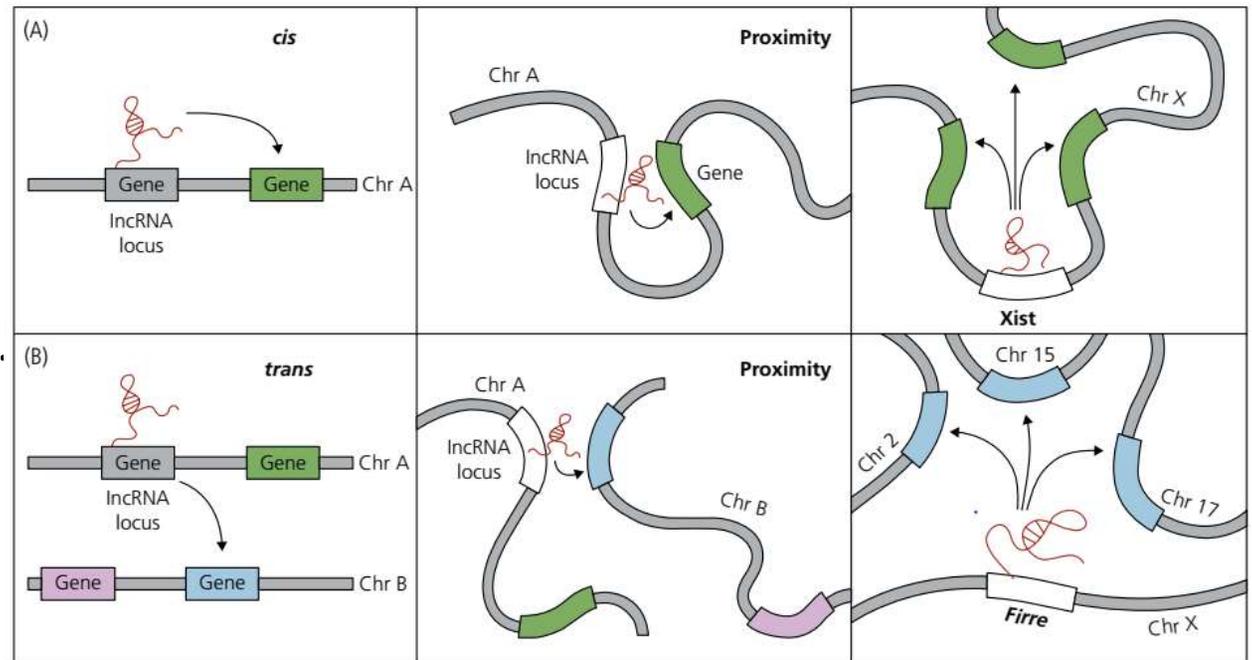
Long ARNs (lncRNAs)

✓ Localización celular:

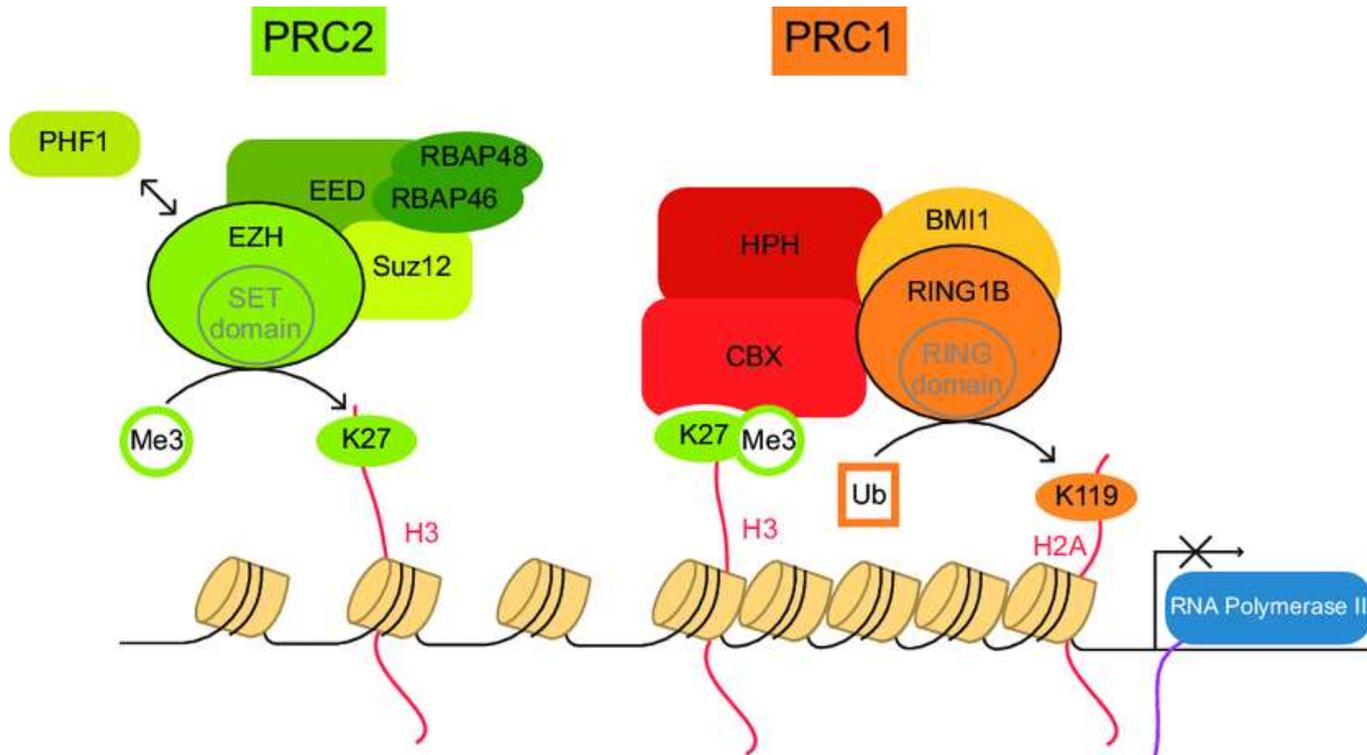
Nucleares que actúa en *Cis*.

Nucleares que actúan en *trans*.

Funcionan en el citoplasma.



Long Non Coding ARNs (lncRNAs – lincRNAs)



IncRNAs

MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN

Signal: PANDA (P21 associated ncRNA DNA damage activated)

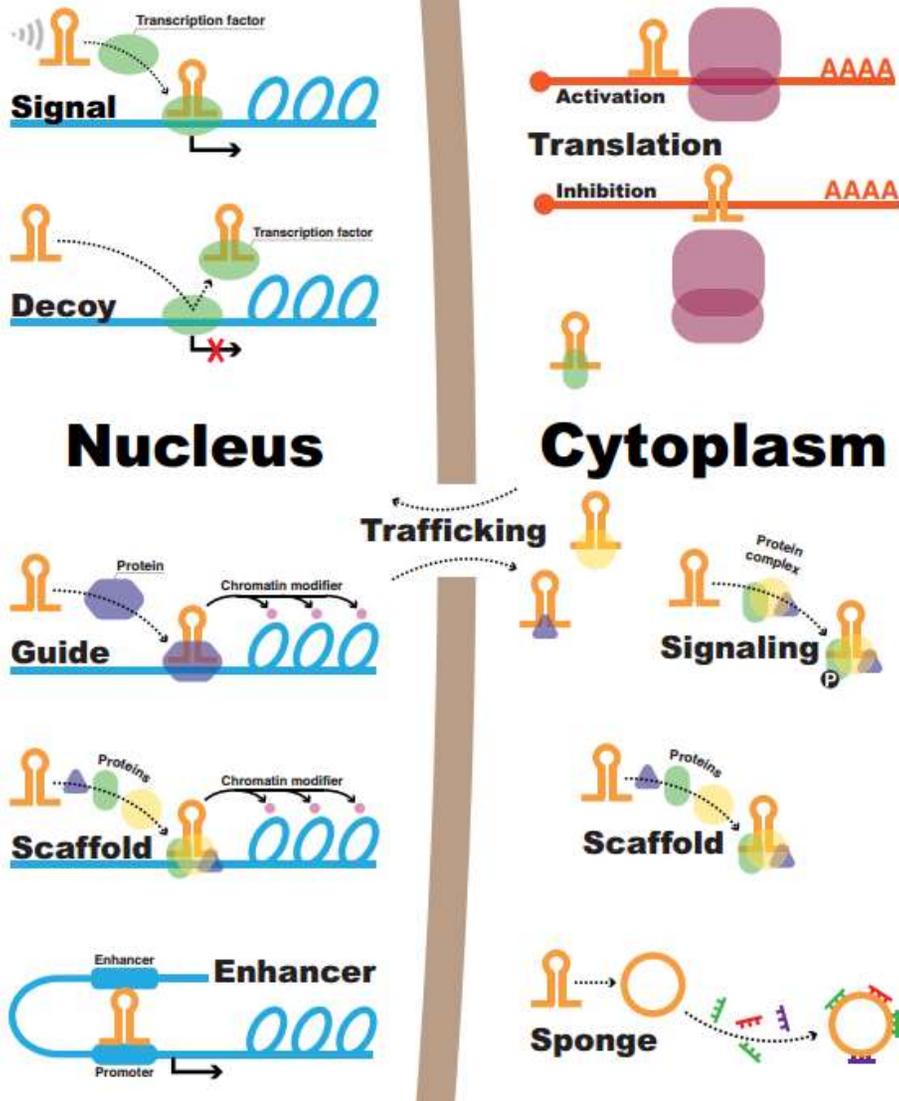
Localizado al Inicio de CDKN1A (Cyclin dependent Kinasa inhibitor A1)

Sí ocurre un daño en el ADN P53 se une al locus **CDKN1A** y activa a **PANDA** el cual interactúa con un factor de transcripción lo que genera una parada en el ciclo celular y genera apoptosis.

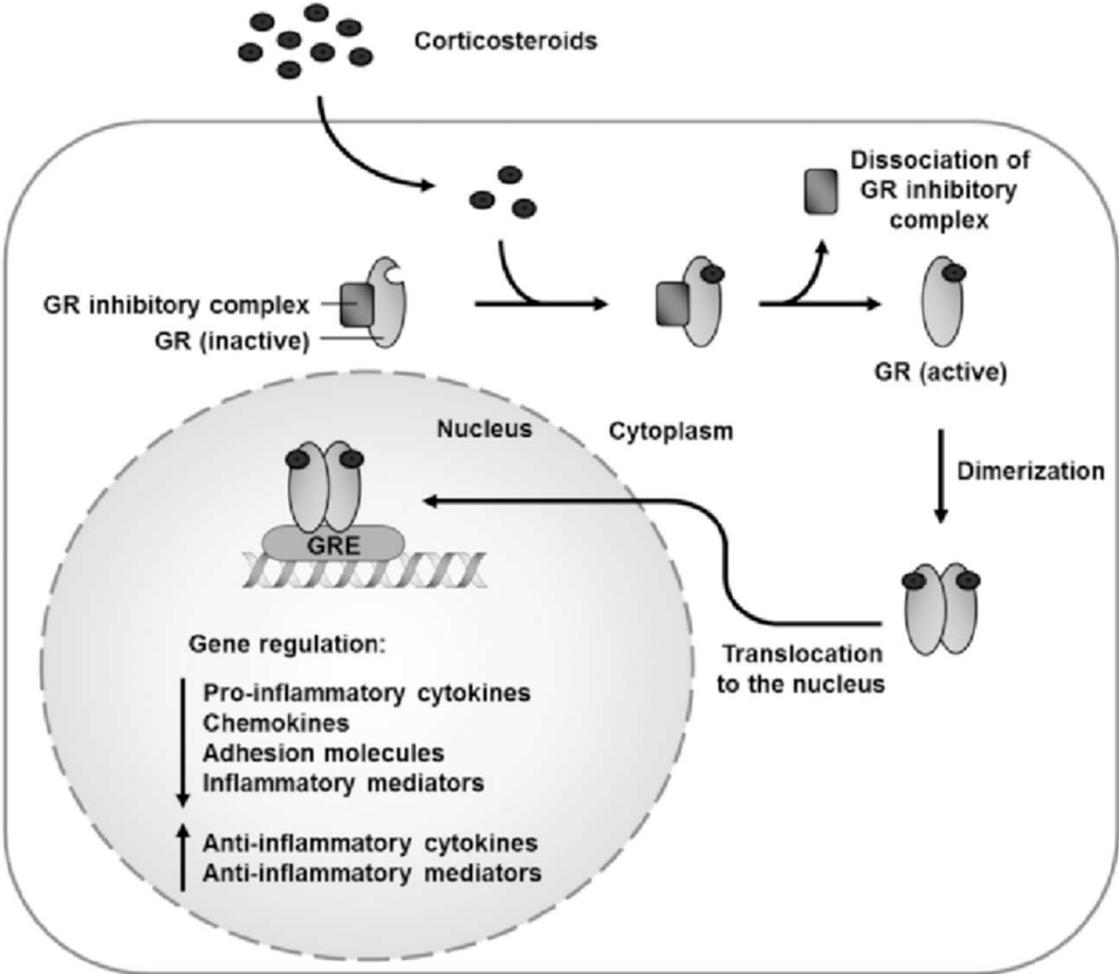
Decoy: GAS5 (grow arrest specific 5)

Los glucocorticoides actúan con el receptor de glucocorticoides (GR) que activado se une a **GREs** (Elementos del ADN de respuesta a glucocorticoides).

GAS5, se une con el complejo formado entre GR + GLC evitando su unión a GREs.



GAS5 (grow arrest specific 5)



IncRNAs

MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN

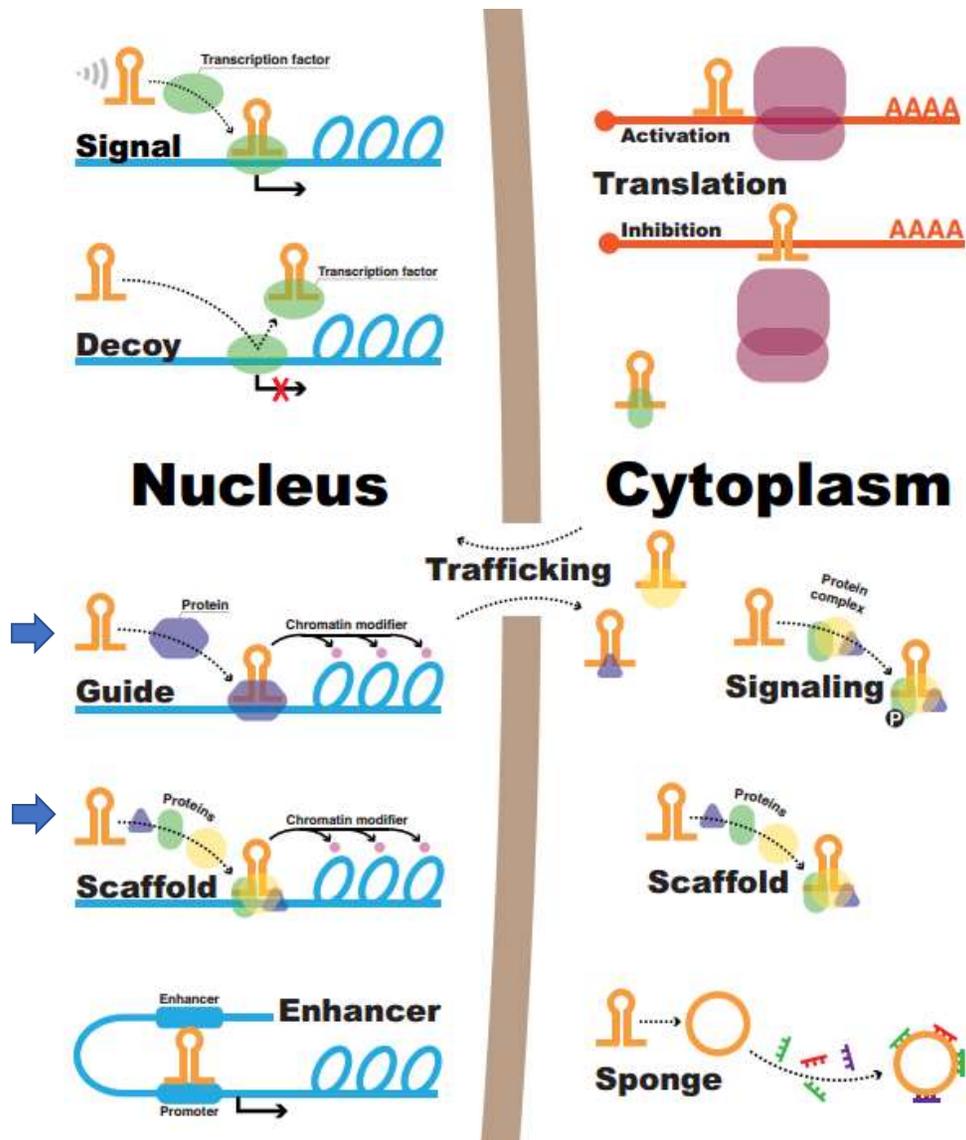
Guía: COLDAIR (cold assisted intronic noncoding RNA)

En *Arabidopsis thaliana*, el frío genera inactivación del represor floral.
Debido a la metilación de H3K27me3.

Ocurre por el aumento en COLDAIR + PRC2

Scaffold: ANRIL (antisense RNA in the INK4 locus)

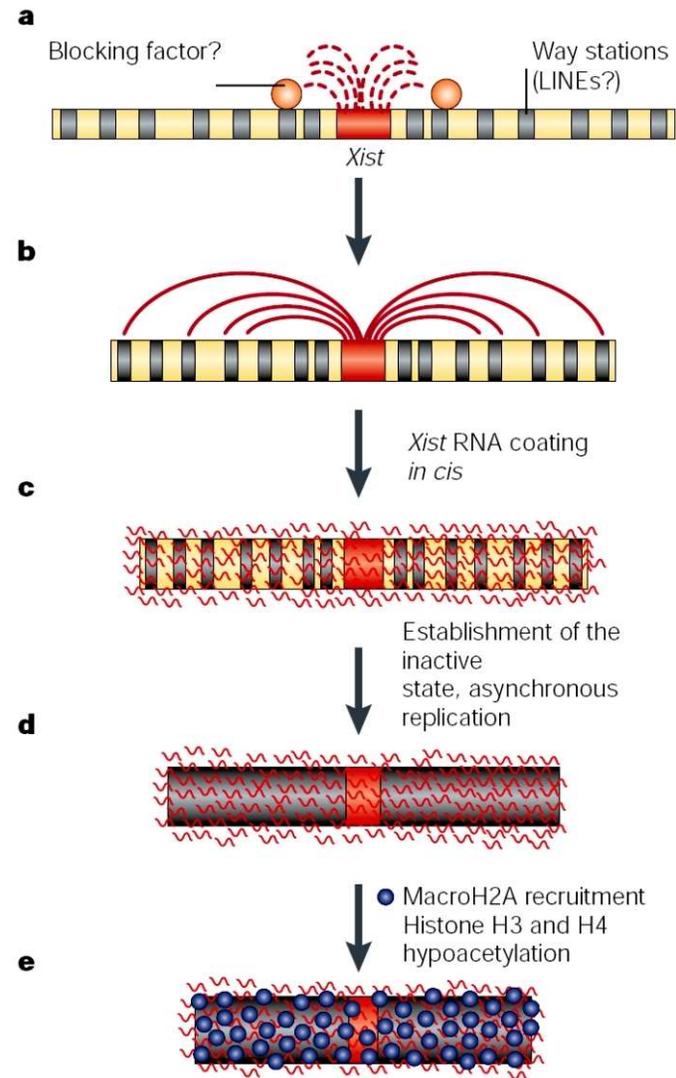
Interactúa con PRC2



IncRNAs

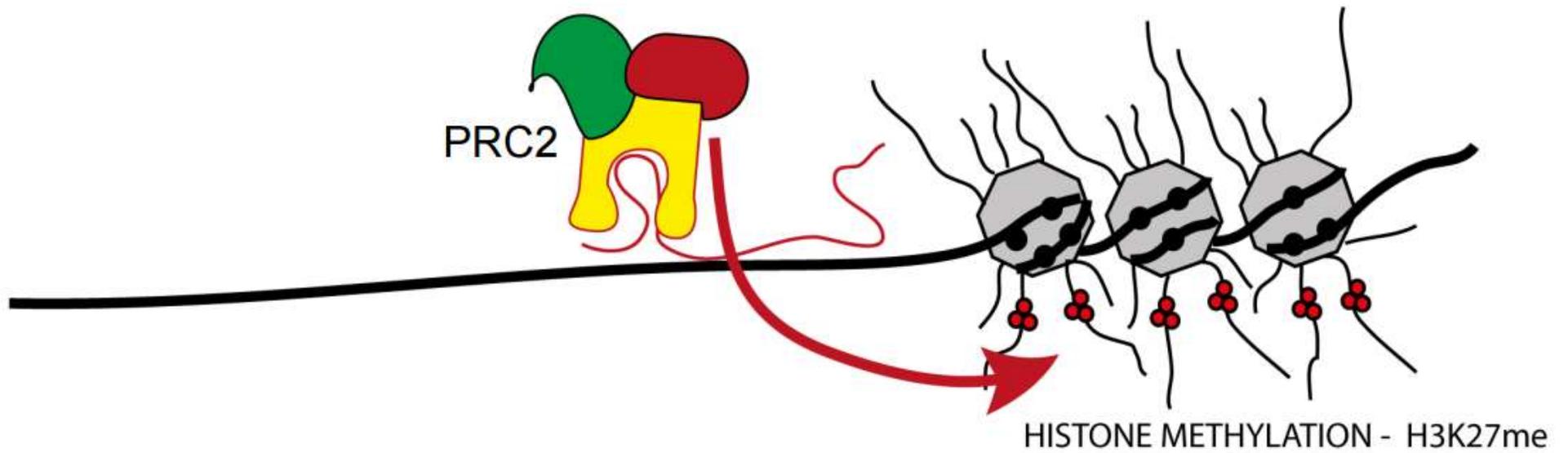
XIST

- ✓ XIST actúa en la inactivación del cromosoma X
- ✓ Es un ARN de 17 kb.
- ✓ Es el primer evento en la inactivación del X.
- ✓ Se expresa en sólo 1 cromosoma X.
- ✓ Determina cual será el cromosoma X inactivado.

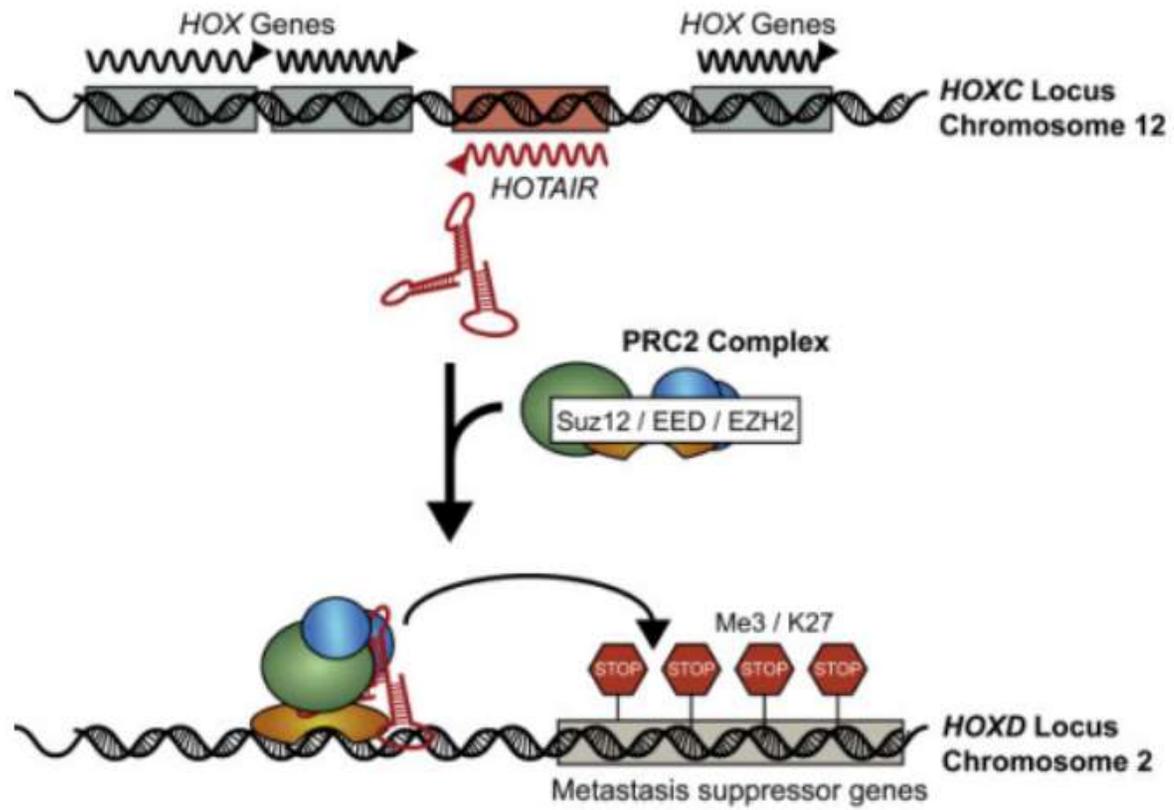


lncRNAs

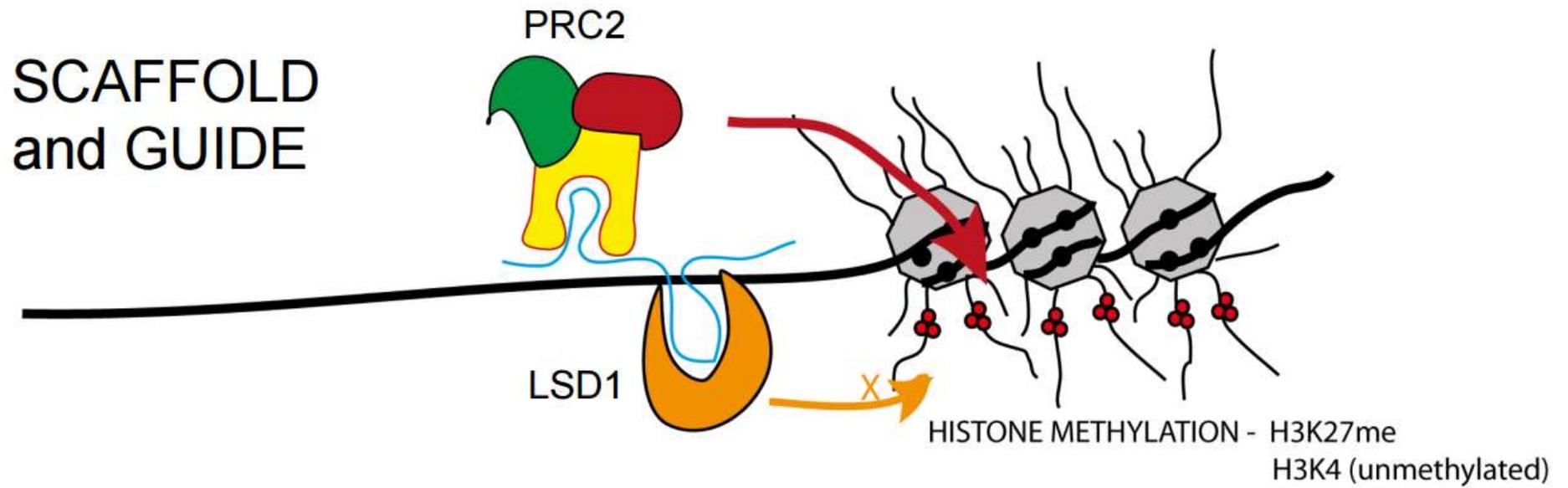
XIST



HOTAIR- ACTUA EN *TRANS*



HOTAIR- ACTUA COMO GUÍA Y SCAFFOLD



lncRNAs y enfermedades cardiovasculares

The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease

Clarissa P.C. Gomes,¹ Helen Spencer,² Kerrie L. Ford,³ Lauriane Y.M. Michel,⁴ Andrew H. Baker,² Costanza Emanueli,^{3,5} Jean-Luc Balligand,⁴ and Yvan Devaux¹ on behalf of the Cardioline network

¹Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, 1526 Luxembourg, Luxembourg; ²Centre for Cardiovascular Science, University of Edinburgh, Edinburgh EH8 9YL, UK; ³Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol BS8 1TH, UK; ⁴Unité de Pharmacologie et de Thérapeutique, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium; ⁵National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK

The popularization of genome-wide analyses and sequencing led to the discovery that a large part of the human genome, while effectively transcribed, does not encode proteins. Long non-coding RNAs have emerged as critical regulators of gene expression in both normal and disease states. Studies of long non-coding RNAs expressed in the heart, in combination with gene association studies, revealed that these molecules are regulated during cardiovascular development and disease. Some long non-coding RNAs have been functionally implicated in cardiac pathophysiology and constitute potential therapeutic targets. Here, we review the current microRNAs (miRNAs, the most popular class of small ncRNAs within the biomedical community). This is due to lncRNAs' multiple modalities of action and their low conservation among vertebrates.⁶ Therefore, a large gap remains between the number of lncRNAs identified, and then listed in databases, and their functional characterization and implications in pathophysiological situations. A list of databases and their major characteristics, such as number of lncRNAs, species, and association with function and other genes, is given in Table 1. So far, it has been demonstrated that lncRNAs can regulate gene expression through functional mechanisms including epigenetic,

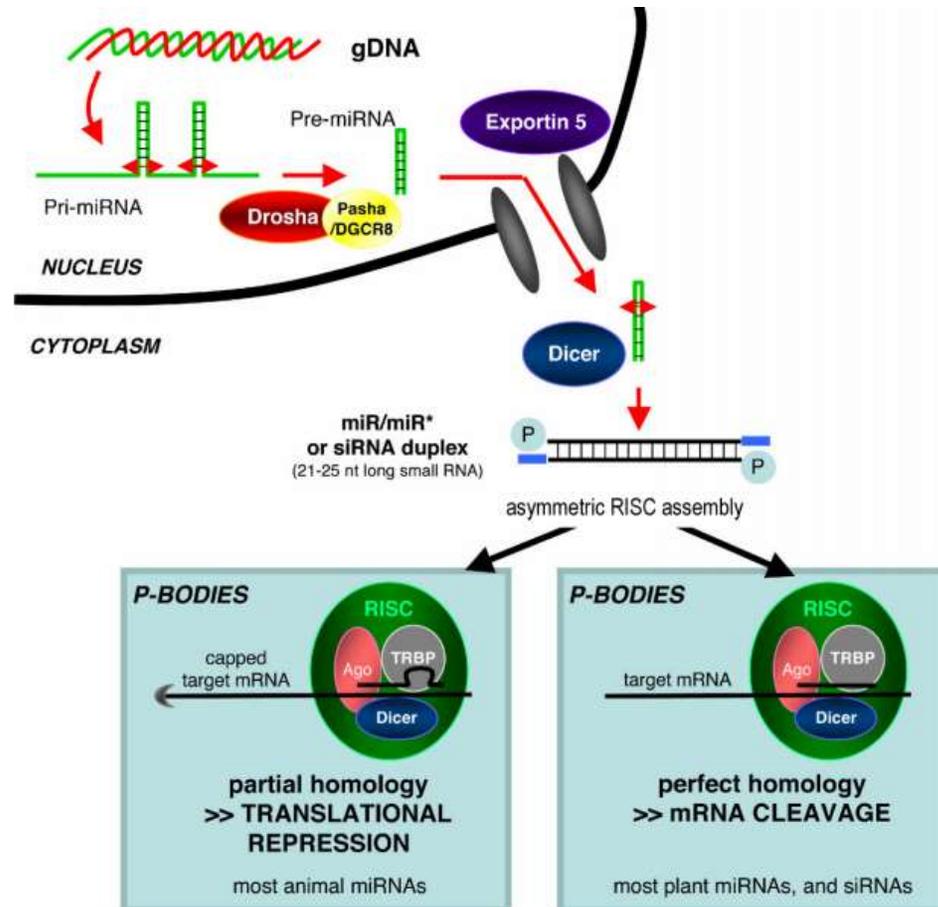
	Coronary Artery Disease	Myocardial Infarction/ Ischemia	Hypertension	Heart Failure
Up-regulated	H19	H19	H19	H19
		aHIF	aHIF	aHIF
		MALAT	MALAT	
	HAS2-AS1	APF	lnc-Ang362	Chaer
	RNCR3	Cdr1as		CHAST
	KCNQ1OT1		Chrf	
	Mirt 1, 2		LIPCAR	
			ROR	
Down-regulated	ANRIL	ANRIL	ANRIL	Mhrt
	SENCR	SENCR	GAS5	Hrcr
	CoroMarker	MIAT*		
	LincRNA-p21	MICRA		
		UCA1		



Human Mouse Rat

miRNA (micro RNA) o RNA de interferencia o siRNA (small interfering RNA)

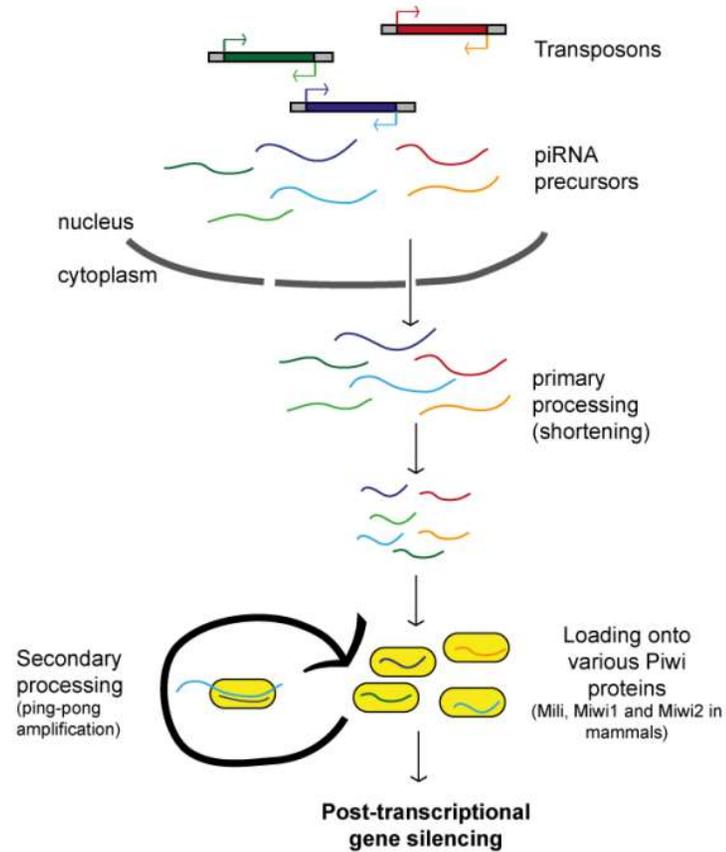
- ✓ Existen más de 1000 miRNAs en los mamíferos.
- ✓ Cada miRNA maduro tiene entre 19 a 24 nucleótidos.
- ✓ Son represores de la traducción.
- ✓ Involucrados en el desarrollo, en el cáncer y otras enfermedades.



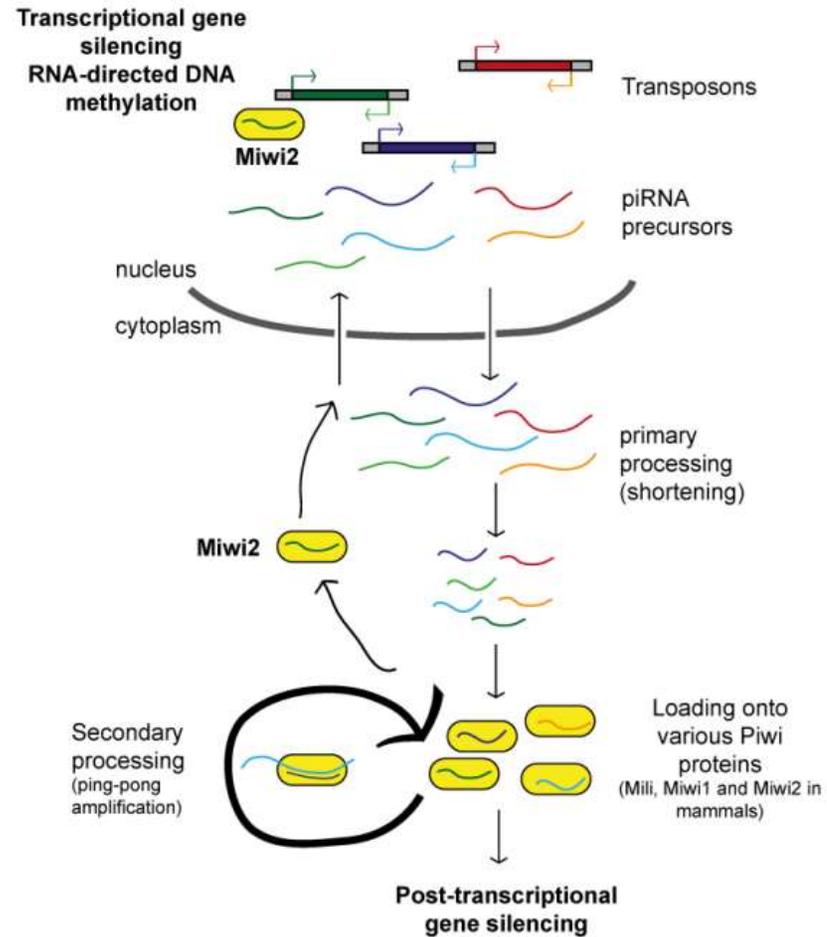
Piwi-interacting RNAs (piRNAs)

- ✓ Su principal función es inactivar a los elementos transponibles.
- ✓ Dirigen la metilación del ADN en los elementos transponibles.
- ✓ Tamaño de ~24-35 nt (mayores que miRNAs o siRNAs).
- ✓ Transcritos desde transposones activos.
- ✓ Se unen a proteínas PIWI (Mili, Miwi1, Miwi2 en mamíferos).

Biogénesis de Piwi-interacting RNAs (piRNAs)



Biogénesis de Piwi-interacting RNAs (piRNAs)

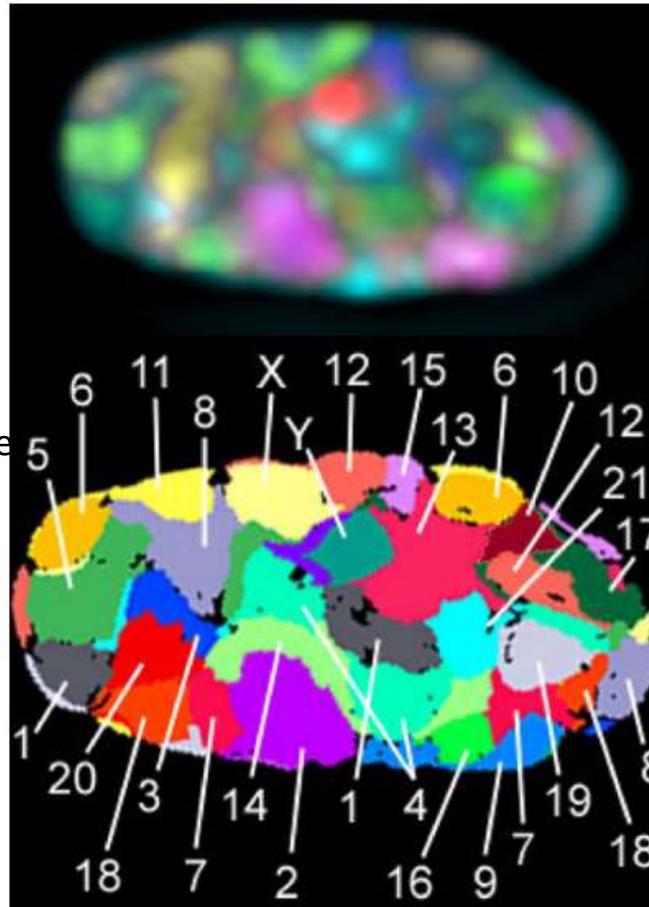


Piwi-interacting RNAs (piRNAs)

- ✓ Se forman por la degradación del ARN de los transposones.
- ✓ piRNAs son importantes en las células germinales y en stem cells.
- ✓ Ratones sin Mili1 and Mili2 son estériles presentan fallas en la espermatogénesis, asociado con el no silenciamiento elementos LINE1.
- ✓ En humanos, mutaciones en proteínas PIWI está asociado con infertilidad.
- ✓ Se han encontrado proteínas PIWI expresadas aberrantemente en el cancer, posiblemente relacionado con su rol en las stem cells.

ORGANIZACIÓN 3D DEL NÚCLEO

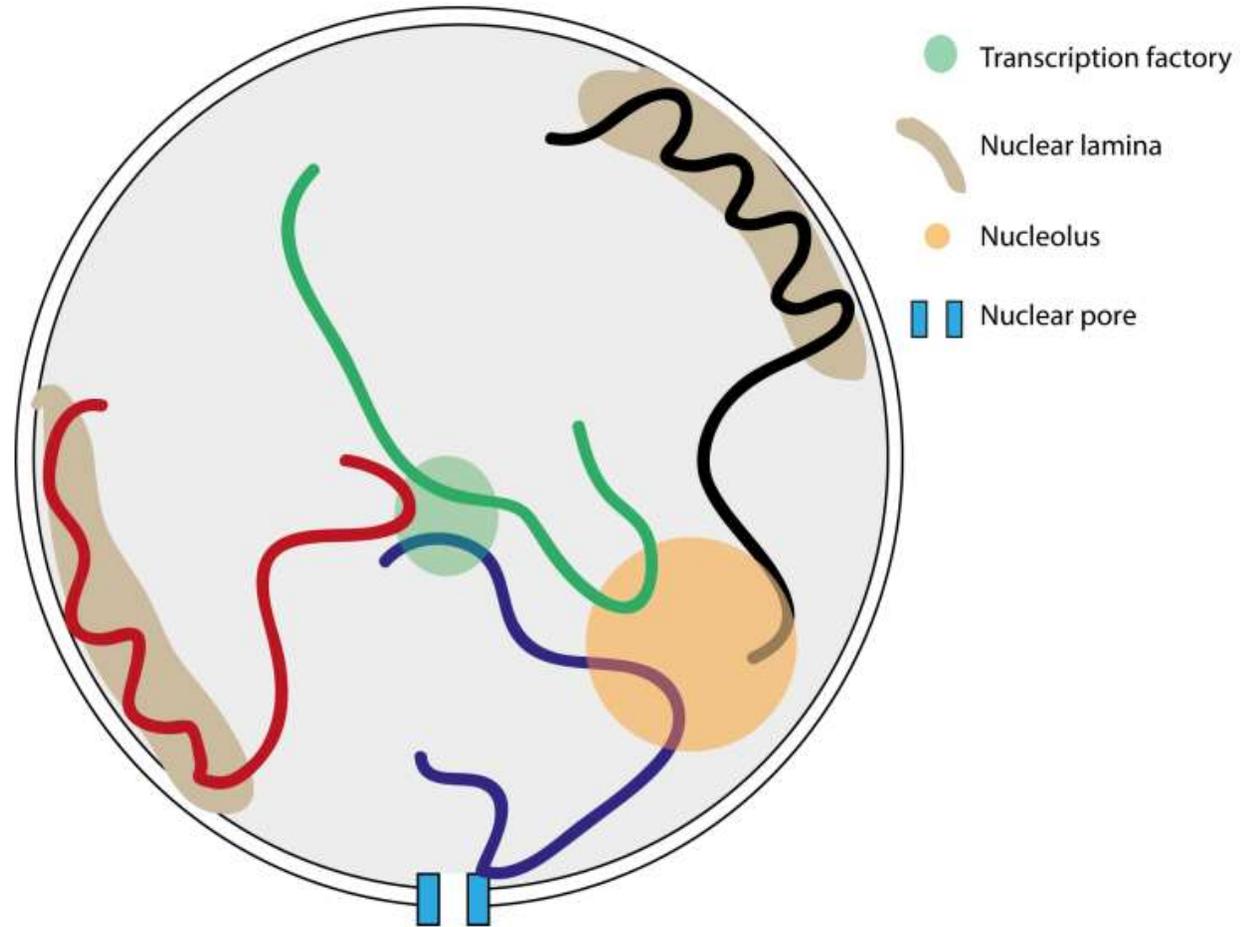
- ✓ Los cromosomas no están organizados al azar.
- ✓ La ubicación de los cromosomas en el núcleo cambia, según tipo de célula y el tiempo.
- ✓ Las translocaciones ocurren entre cromosomas que están cercanos.



Fibroblastos

ORGANIZACIÓN 3D DEL NÚCLEO

- ✓ En la periferia del núcleo se encuentra principalmente heterocromatina facultativa.
- ✓ En el interior se encuentra principalmente la eucromatina.
- ✓ En el interior, la RNA Pol II, se encuentra concentrada hasta >1000.
- ✓ En el interior hay concentración en general de factores de transcripción.



REPASO

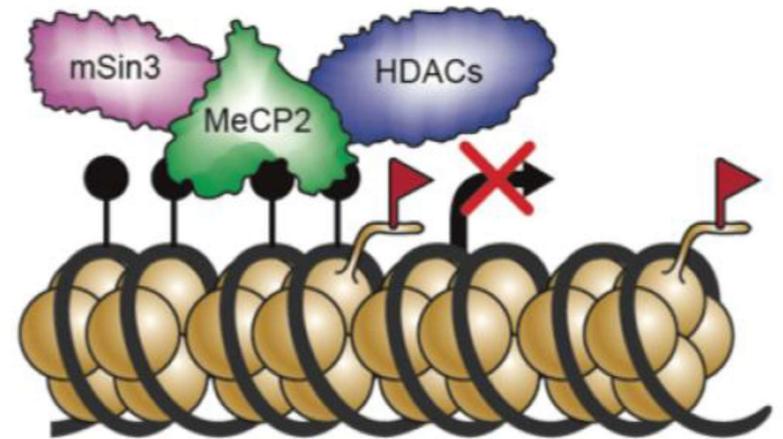
PRINCIPALES MECANISMOS EPIGENÉTICOS

- ✓ METILACIÓN DEL ADN.
- ✓ MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS.
- ✓ VARIANTES DE LAS HISTONAS.
- ✓ MECANISMOS DE REMODELACIÓN DE LA CROMATINA ATP DEPENDIENTES
- ✓ ncARNs .
- ✓ ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO.

Represión de la transcripción y metilación del ADN



Proteínas MBD (Methyl CpG Binding Domains)



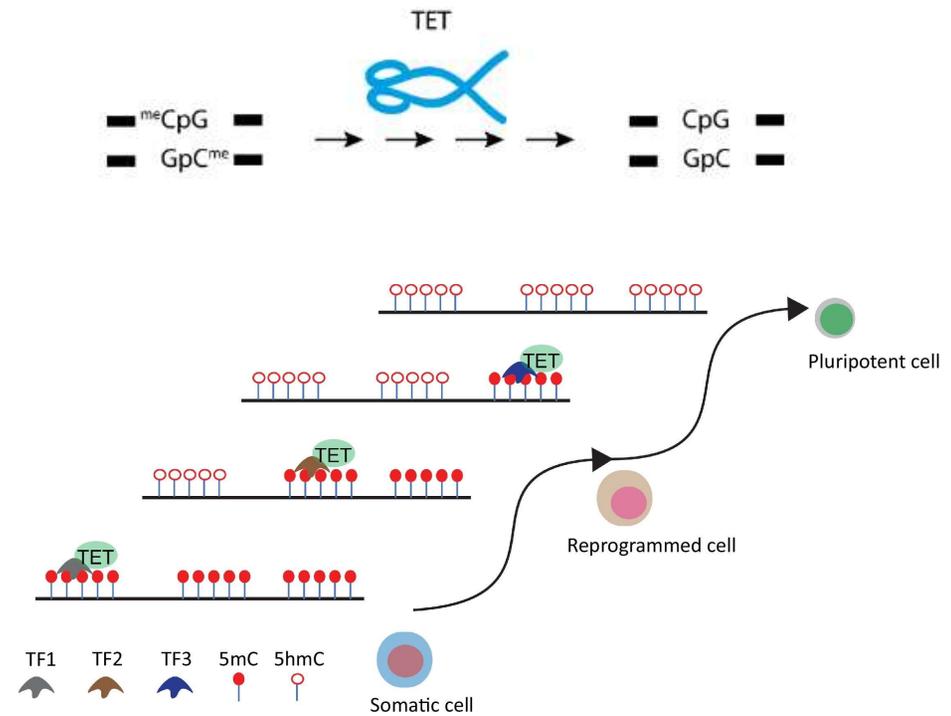
Desmetilación del ADN

Pasiva

Se va perdiendo la metilación en cada división celular y por ausencia de DMT1

Activa

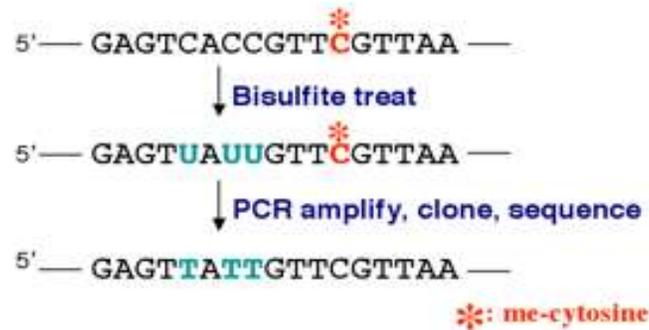
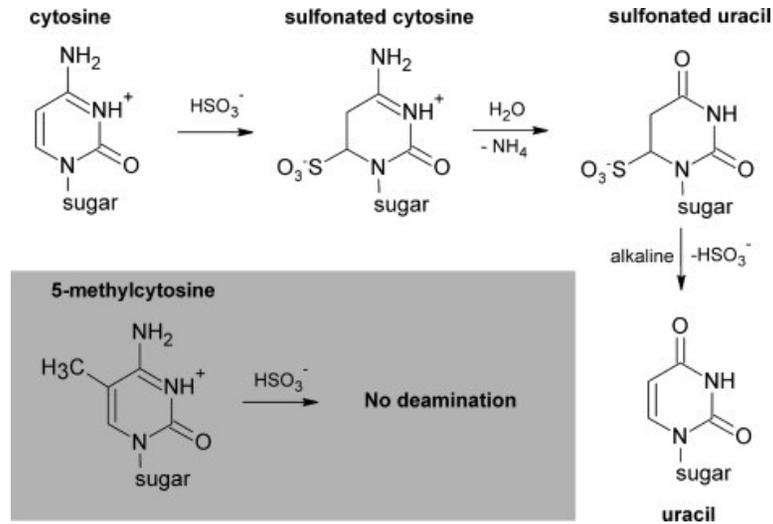
Mediante procesos enzimáticos TET



METODO: SECUENCIACIÓN CON BISULFITO

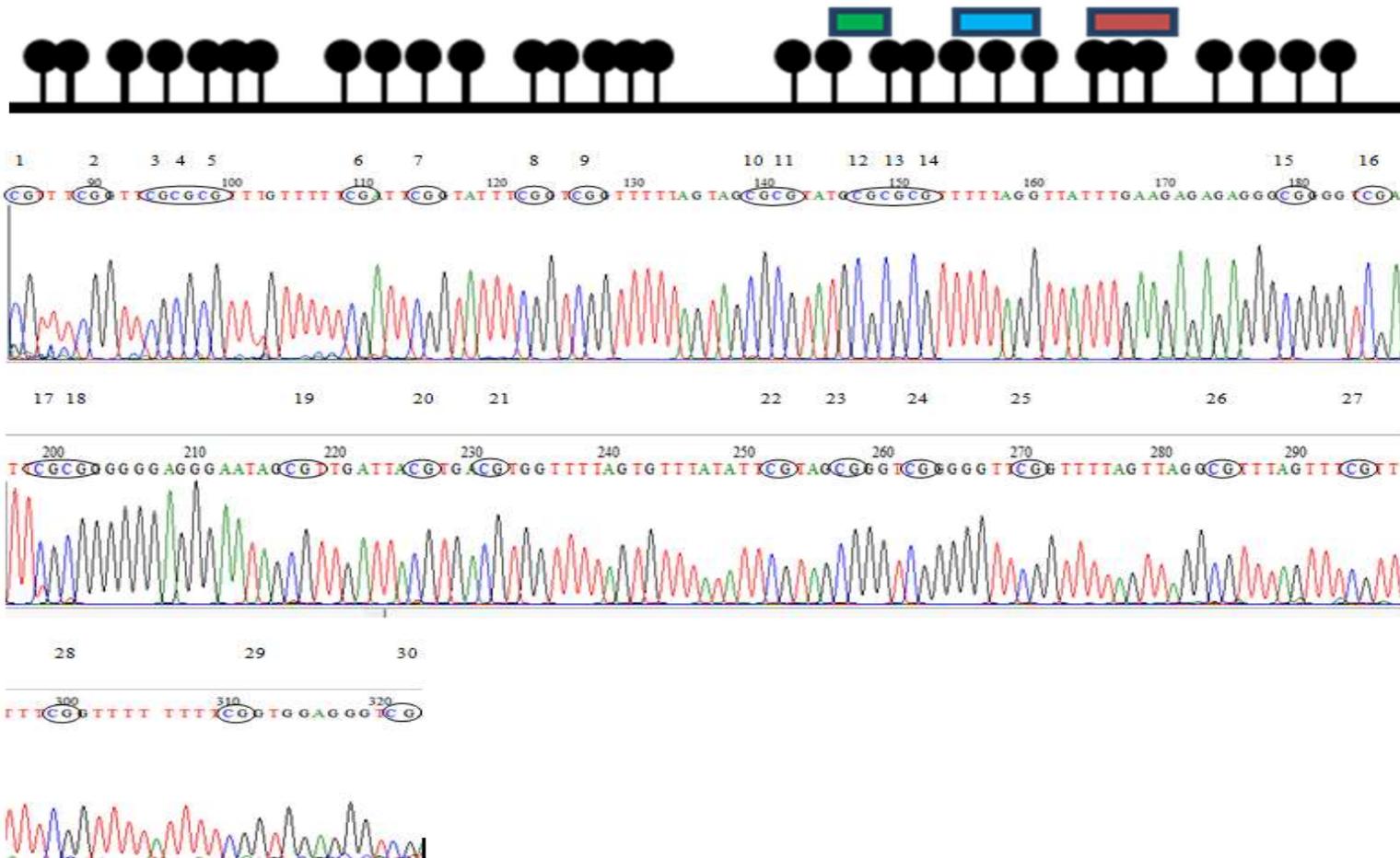
32

Tratamiento del ADN
con bisulfito de sodio



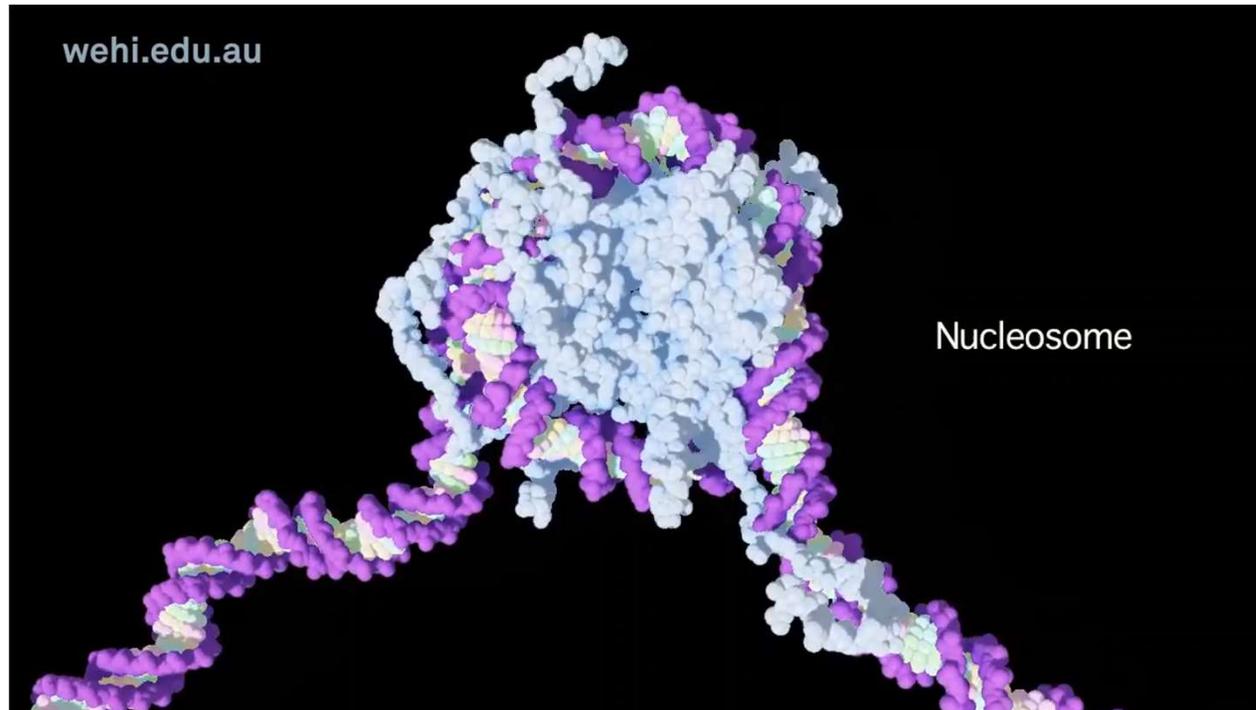
Pacientes 5 y 22
> 200 CGG

Secuenciación con bisulfito de la región promotora del gen *FMR1*.



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

- Acetilación
- Metilación
- Fosforilación
- Ubiquitinación
- Sumoilación
- Glicosilación



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

ACETILACIÓN

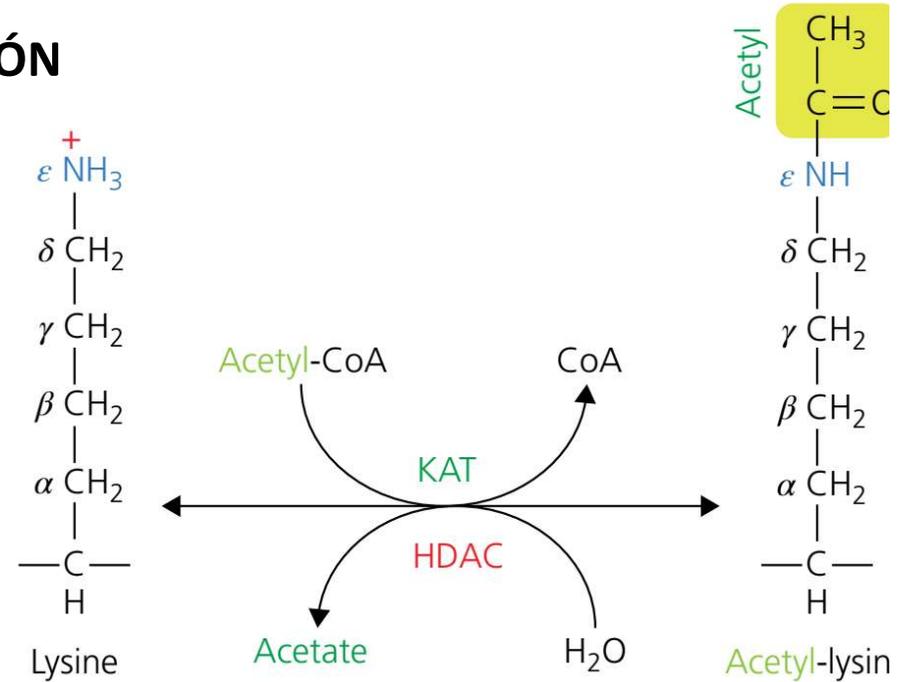
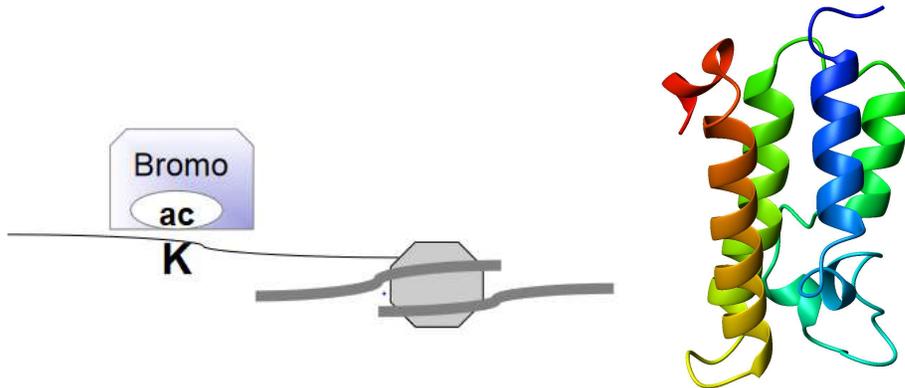
CORRELACIONADA CON ELEVADA EXPRESIÓN GÉNICA

- ✓ Reduce la carga positiva de la Lisina (K)



Disminuye la atracción de la histona por el ADN

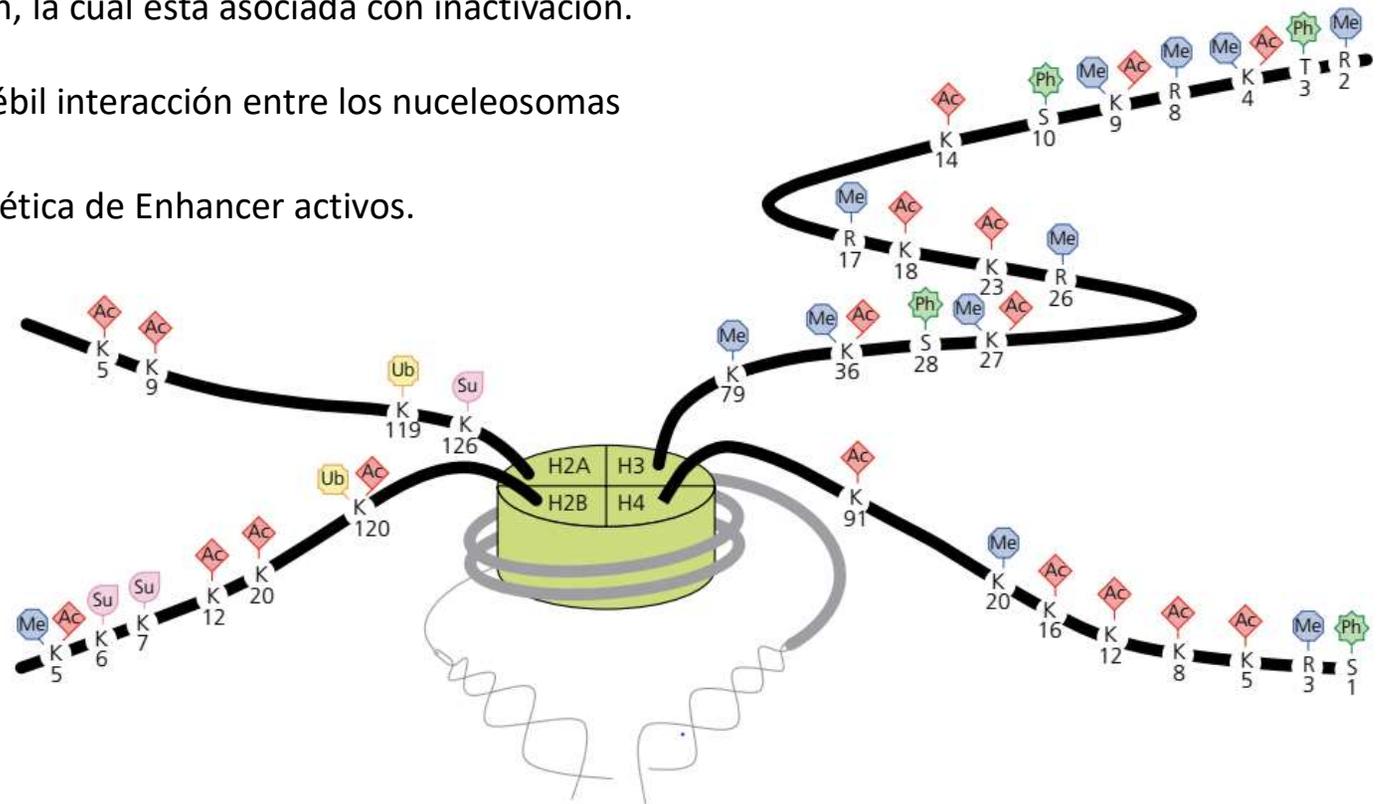
- ✓ Favorece de unión de Bromodominios



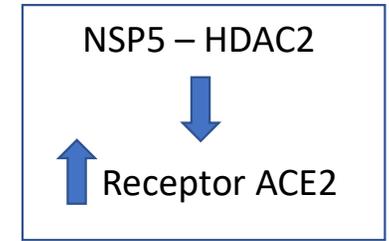
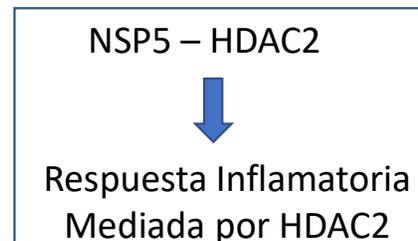
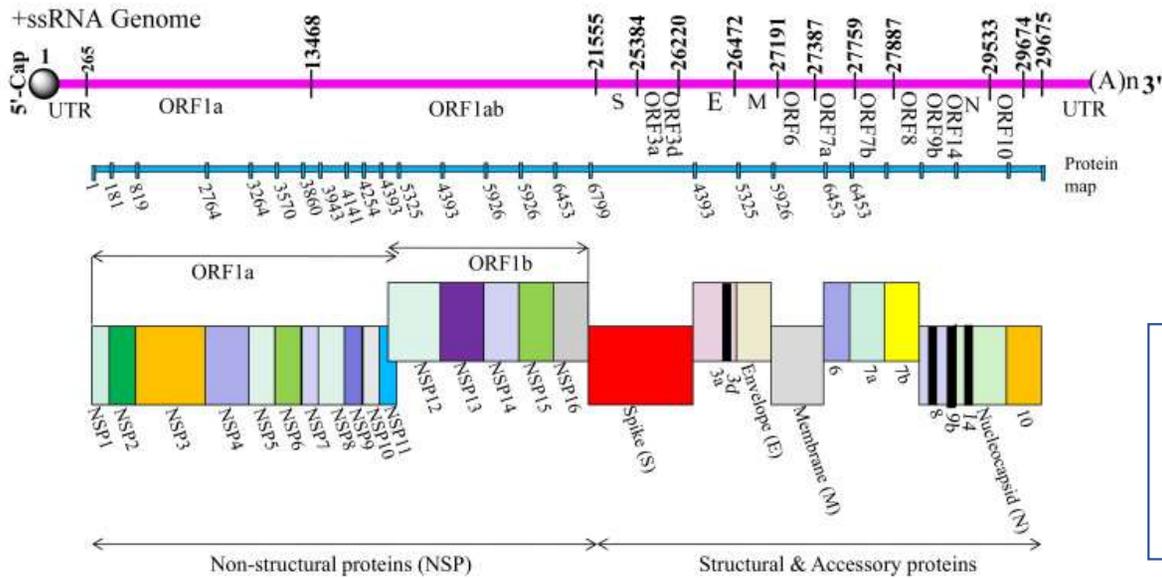
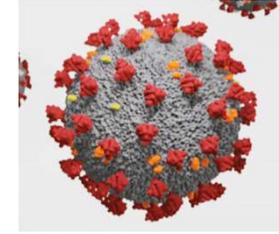
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

ACETILACIÓN

- ✓ **H3K9ac** previene la metilación, la cual está asociada con inactivación.
- ✓ **H4K16ac** se asocia con una débil interacción entre los nucleosomas
- ✓ **H3K27ac** es una marca epigenética de Enhancer activos.



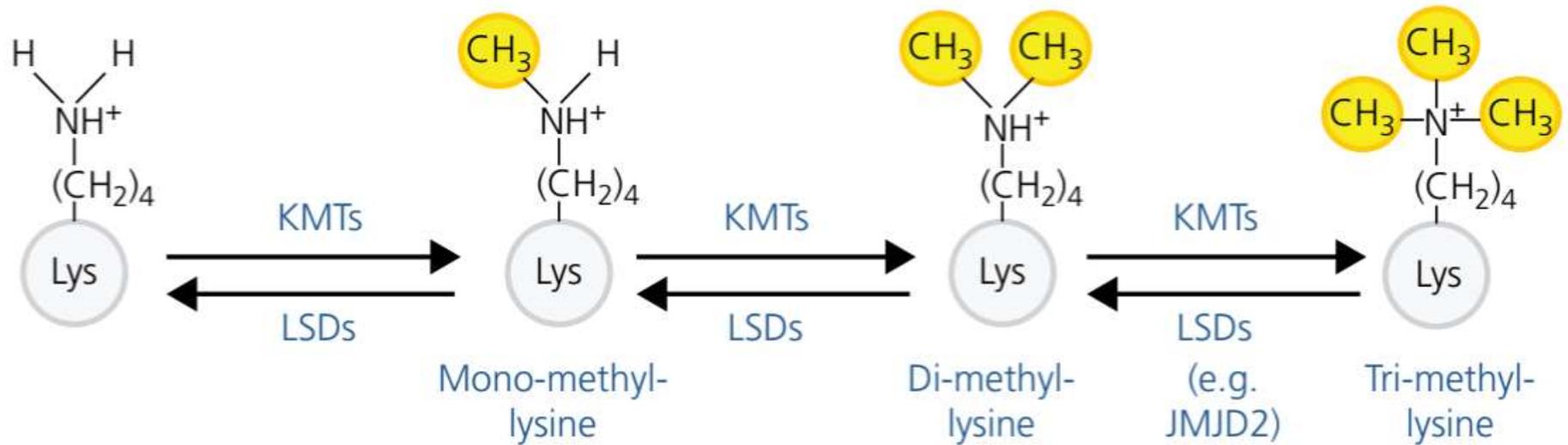
COVID-19 Y LAS HISTONAS



ACE2 es regulado por H3K4me1 y H3K4me3 y H3K27ac

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

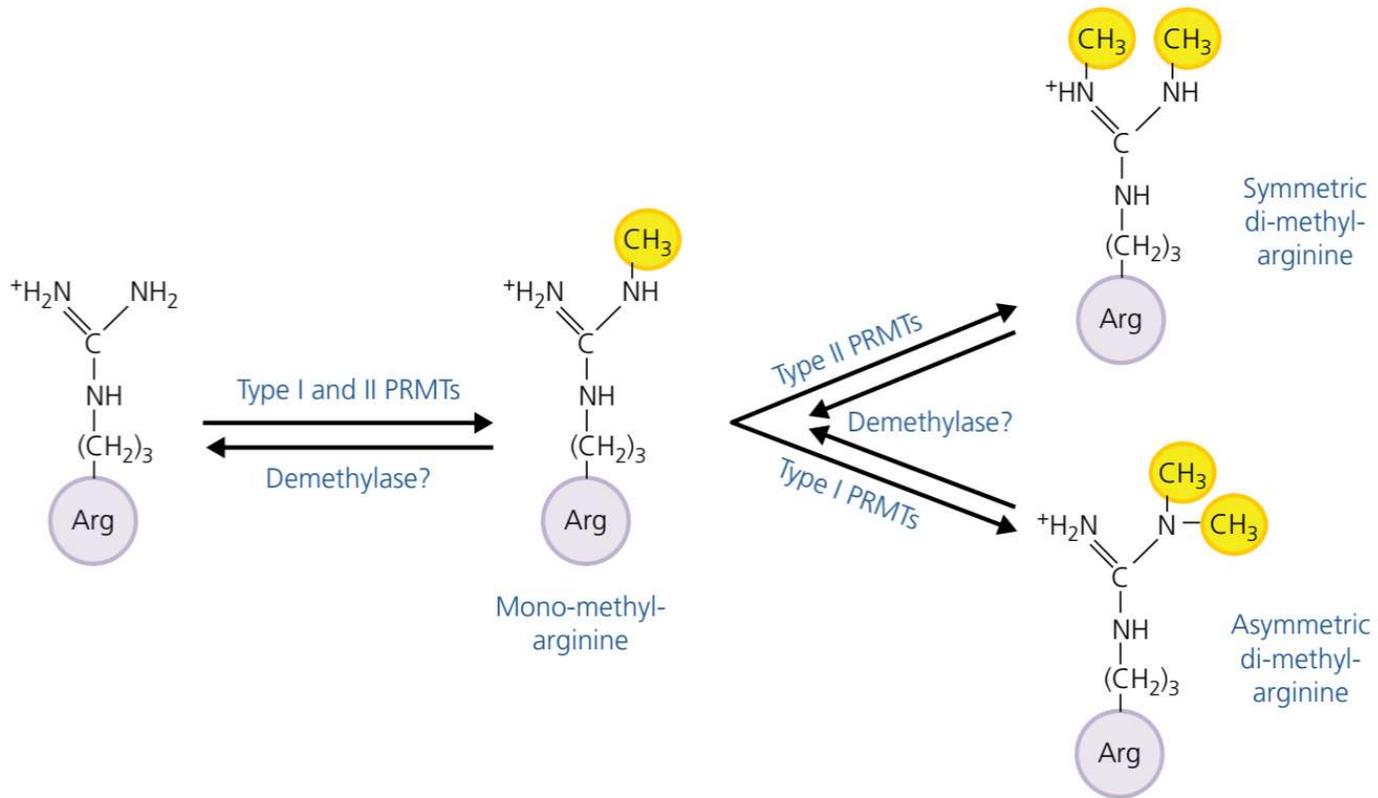
METILACIÓN



SAM (S-adenosilmetionina)

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

METILACIÓN



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

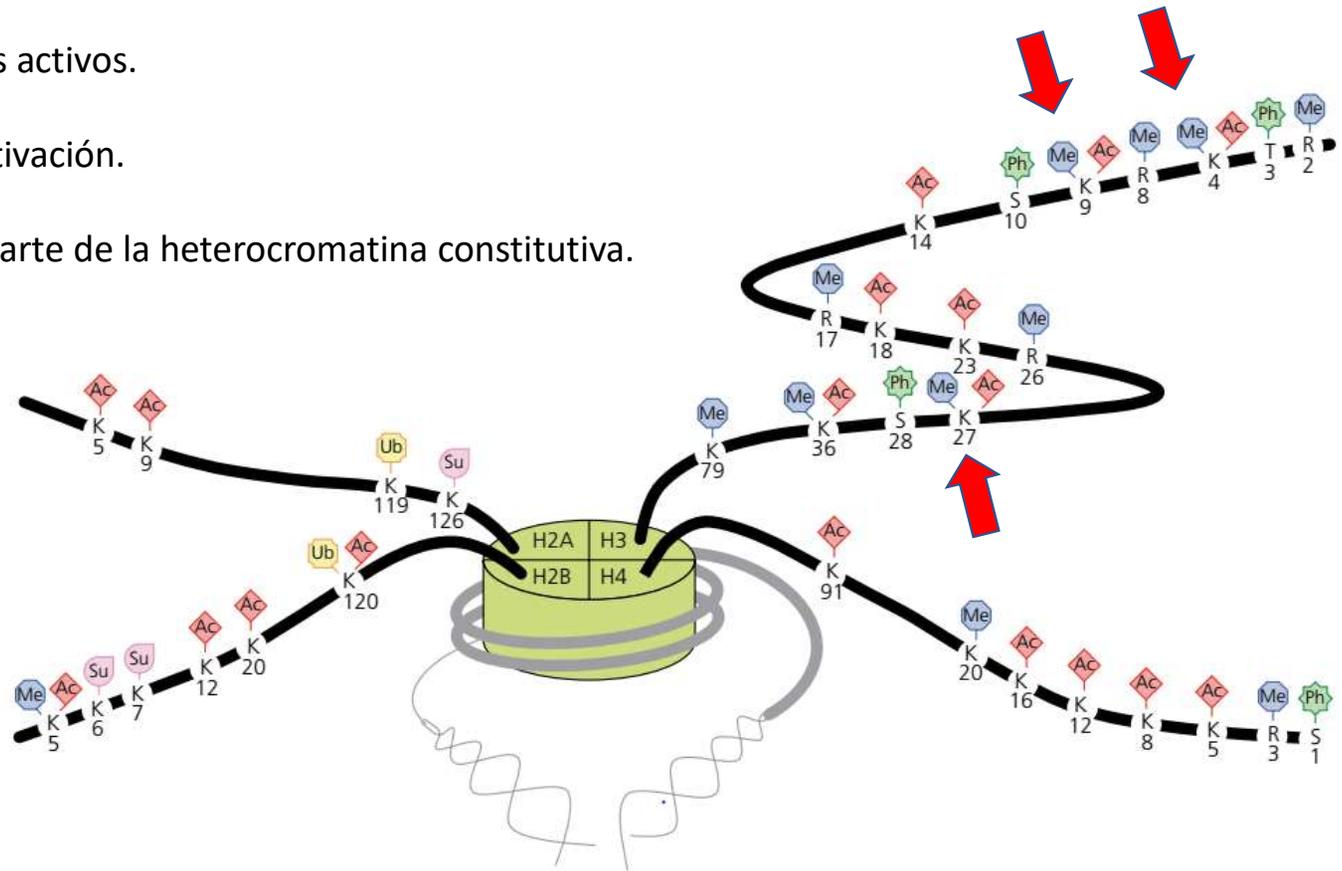
METILACIÓN

- ✓ La metilación de las histonas no altera su carga.
- ✓ Su rol es cumplido por el reclutamiento de otras proteínas y complejos.
- ✓ Puede estar relacionada con activación o represión.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

METILACIÓN

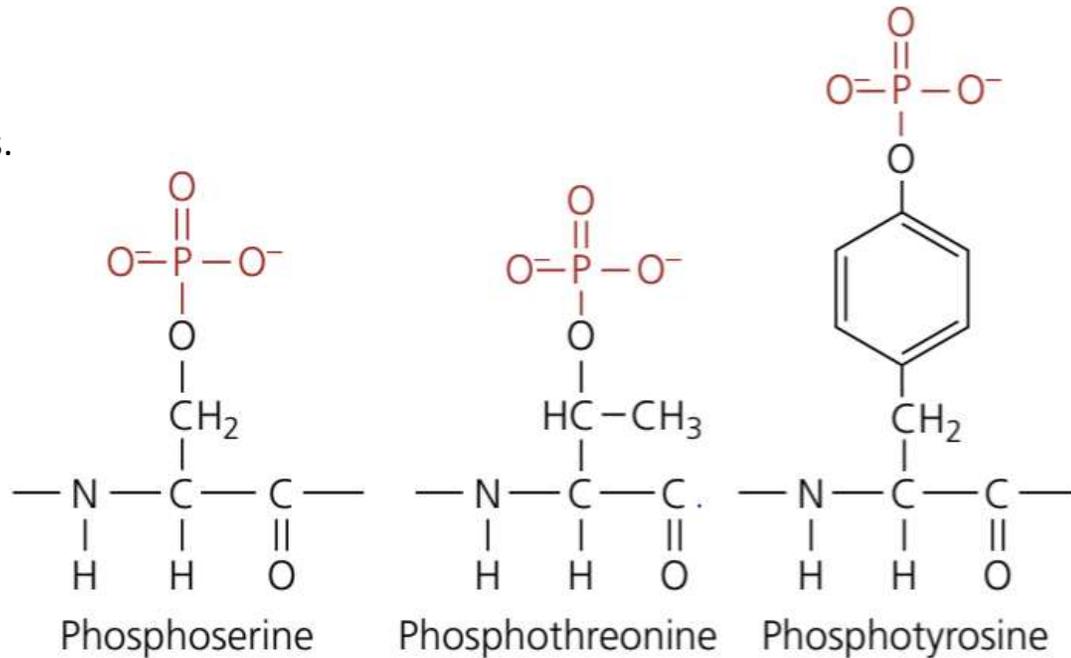
- ✓ **H3K4me** y **H3K4me3** está en genes activos.
- ✓ **H3K27me3** está asociada con inactivación.
- ✓ **H3K9me** se encuentra formando parte de la heterocromatina constitutiva.



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

FOSFORILACIÓN

- ✓ Puede ocurrir en las Serinas (S), Treoninas (T) o Tirosinas (Y).
- ✓ Quinasas, usan ATP.
- ✓ Reducen la carga positiva de las Histonas.
- ✓ Interfase.



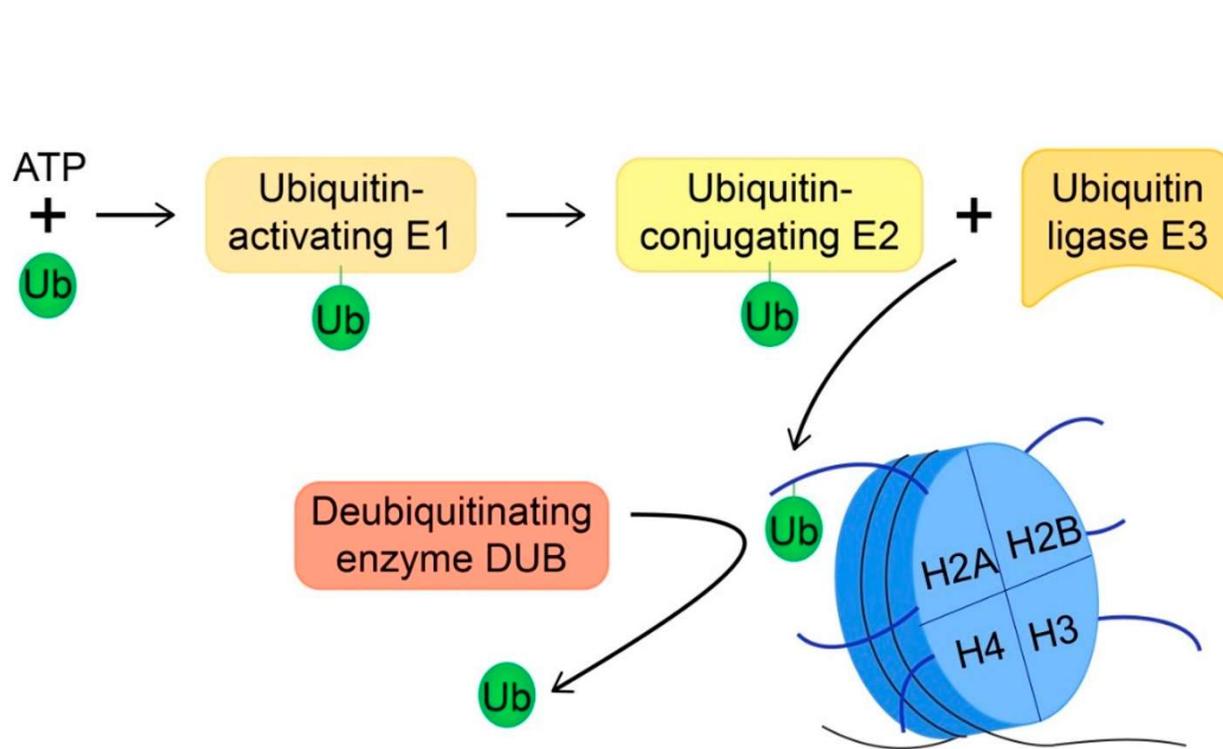
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

FOSFORILACIÓN

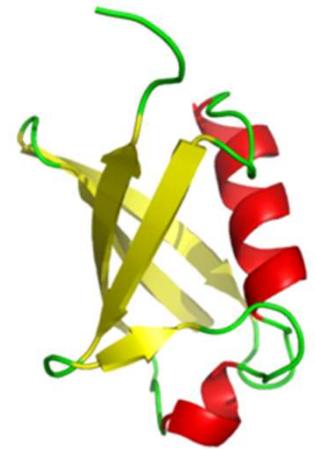
- ✓ **H3S10ph** en conjunto con **H3K14ac** o **H3K9ac** es necesaria para la activación transcripcional. (Sawicka and Seiser, 2012).
- ✓ **H3S28ph** y **H3K27ac** también activan positivamente la transcripción.
- ✓ **H3S10ph** y **H3S28ph** previene en la eucromatina la unión de silenciadores **H3K9me3** and **H3K27me3** conllevando a desmetilación and acetilación.
- ✓ **H3S10ph** and **H3K9me2** son marcas epigenéticas de la heterocromatina constitutiva.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

UBIQUITINACIÓN

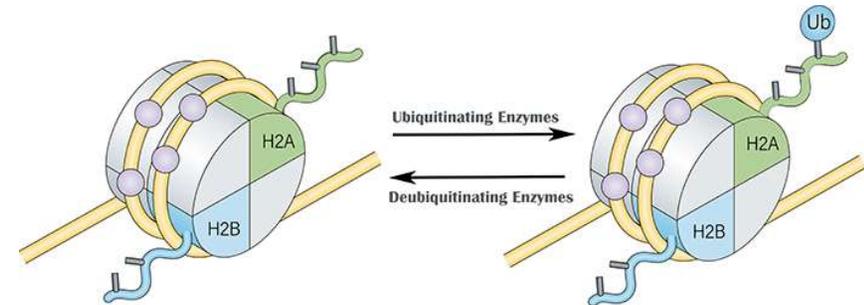
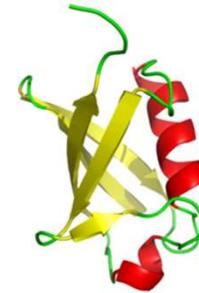
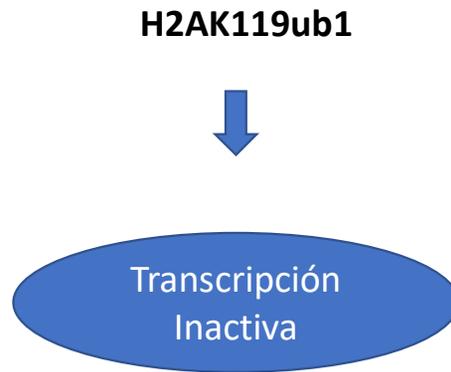
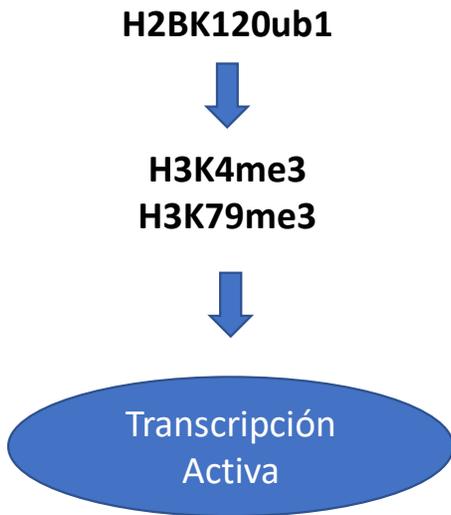


76 a.a



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

UBIQUITINACIÓN



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

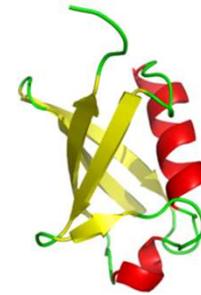
SUMOILACIÓN

SUMO = Small Ubiquitin – Related Modifier

Péptido de 100 a.a

Está asociada con represión transcripcional por el reclutamiento de HP1 y complejos represores como HKDACs.

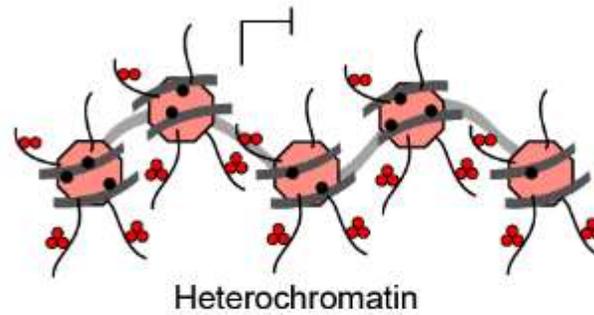
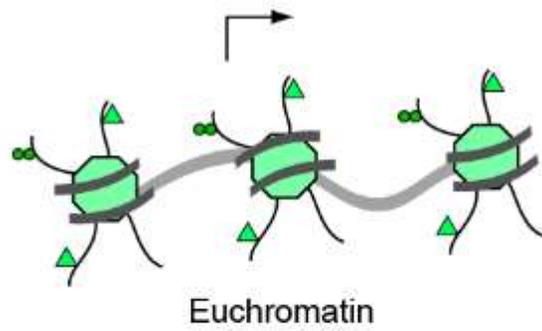
Puede ocurrir en las 4 histonas.



MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

Glicosilación

- ✓ β -N-acetyl-glucosamine residues (O-GlcNAc)
- ✓ Serina y Treonina de H3 principalmente.
- ✓ La Glicosilación en H2A y H2B facilita su dimerización con H3 y H4
- ✓ H3S10gly junto a H3K4me3 se asocia con la transcripción activa y con H3K9me3 con represión (Zhang et al., 2011).
- ✓ La ubiquitination de H2B en la Lisina 120 es potenciada por la glicosilación de la Serina 112 (Fujiki et al., 2011).

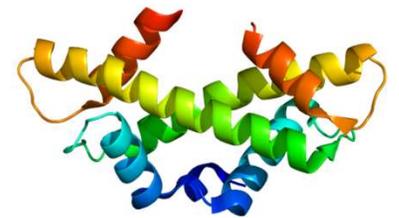
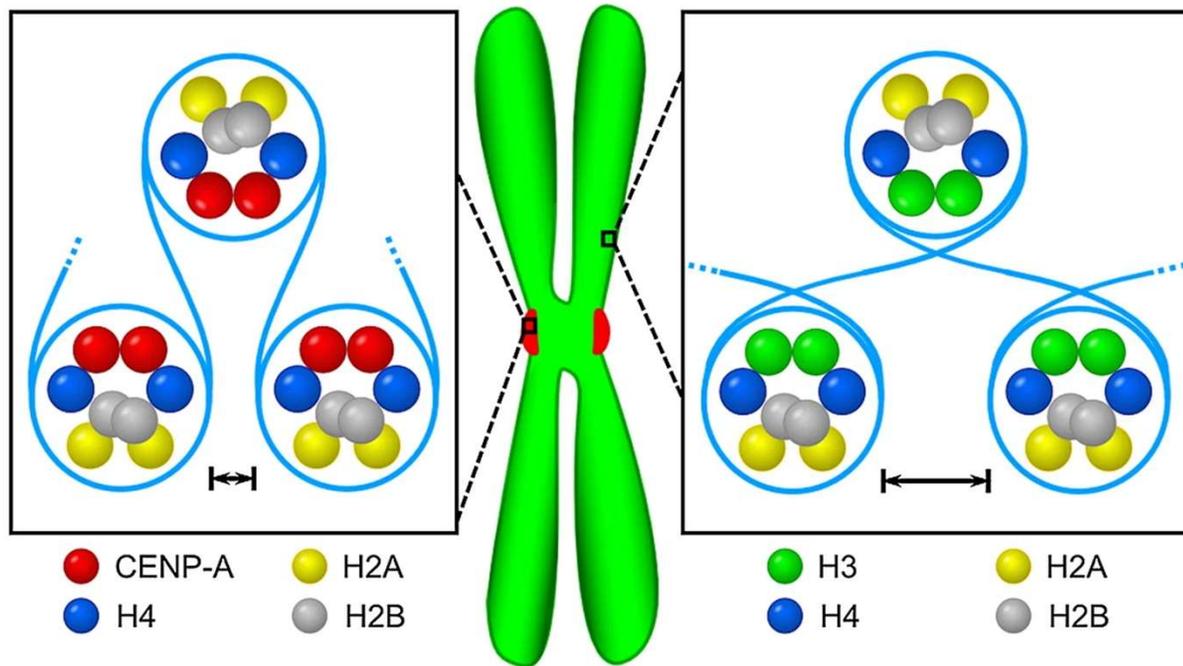


- ▲ Histone acetylation
- Histone methylation
- DNA methylation

VARIANTES DE LAS HISTONAS

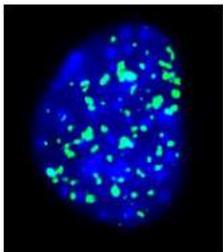
Histonas con dominios especializados que alteran la función del nucleosoma, variando la estabilidad de la cromatina.

CENP-A (Centromere Protein A)

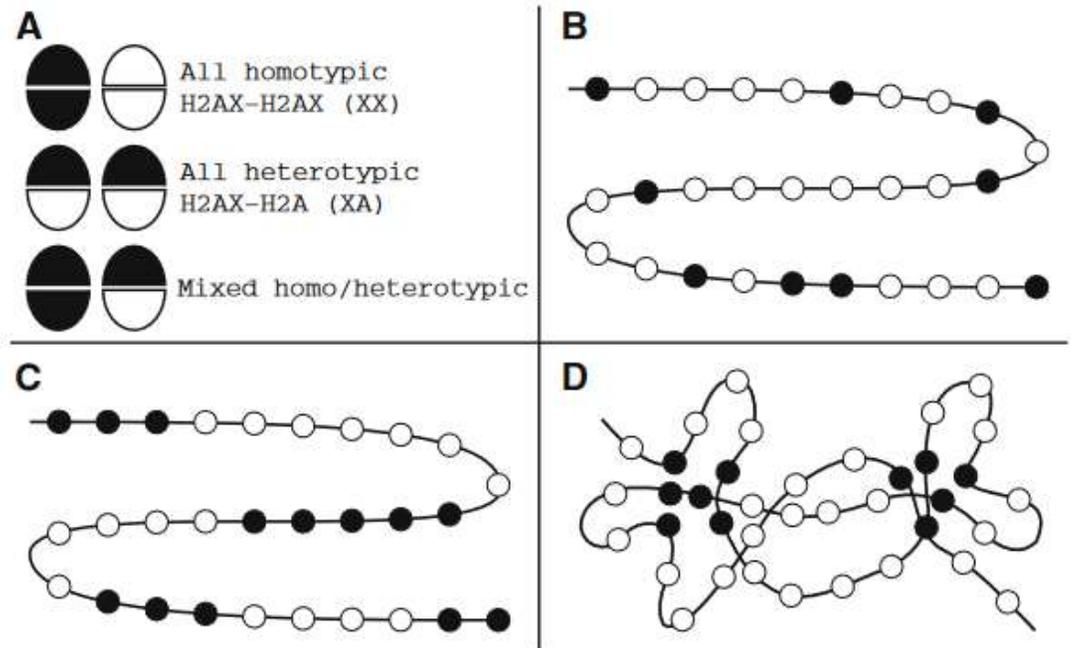


VARIANTES DE LAS HISTONAS H2A.X

- ✓ Variante del extremo C-terminal, de H2A
- ✓ Está asociada al reclutamiento de proteínas reparadoras del ADN.
- ✓ Serina 139 es fosforilada cuando ocurren rupturas en el ADN.



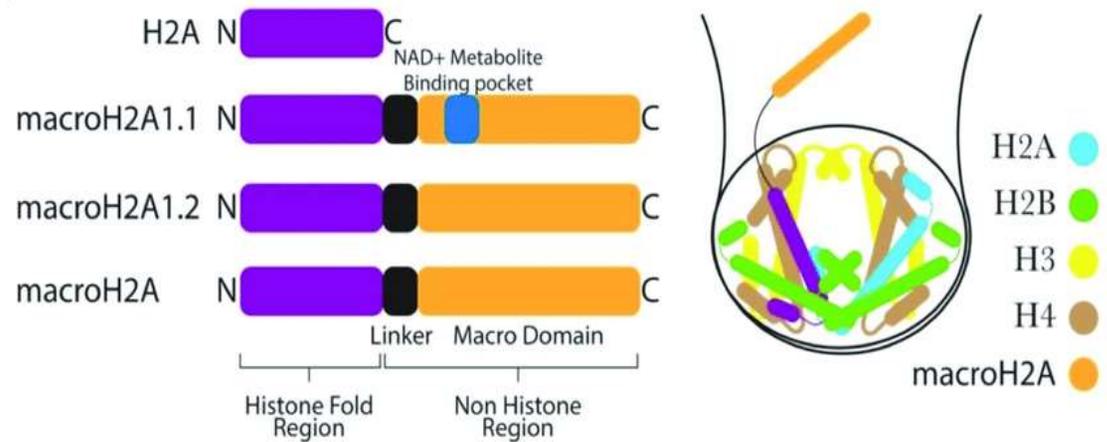
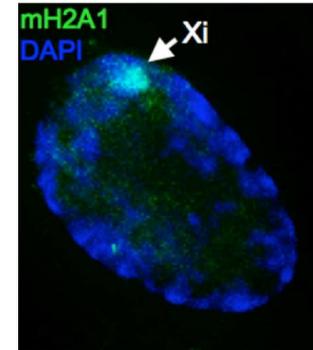
DNA stained blue
 γ -H2A.X green, marks DSB
post irradiation



VARIANTES DE LAS HISTONAS

Macro H2A

- ✓ Variante del extremo C-terminal, de H2A
- ✓ Encontrada sólo en vertebrados.
- ✓ Contiene un dominio de 200 a.a. (macrodominio).
- ✓ Encontrada en el cromosoma X inactivo.

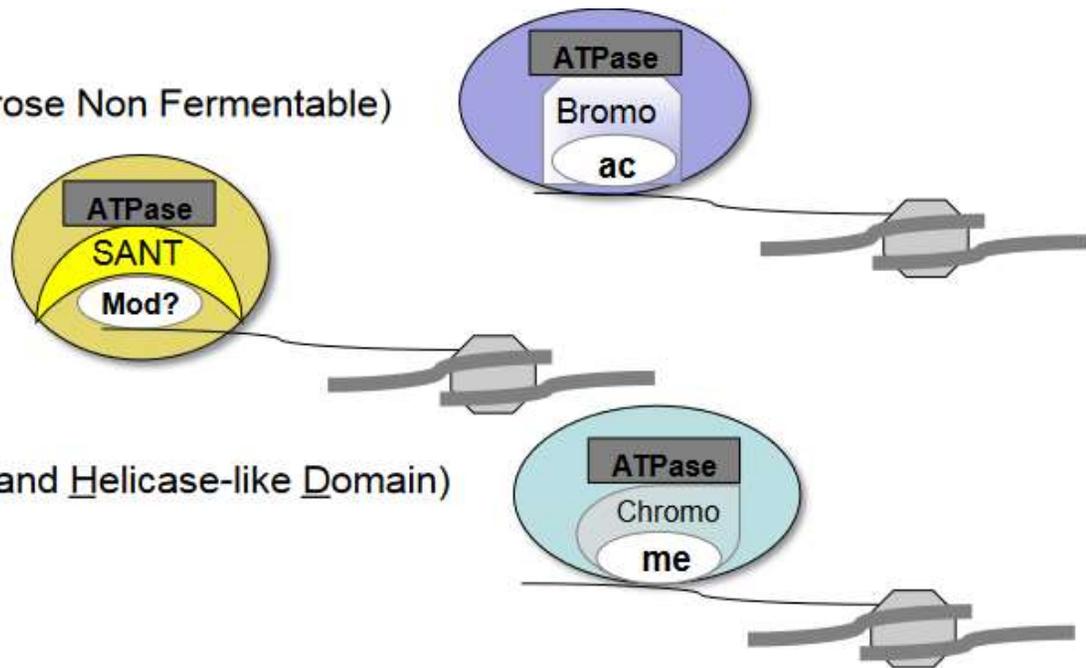


MECANISMOS DE REMODELACIÓN DE LA CROMATINA ATP DEPENDIENTES

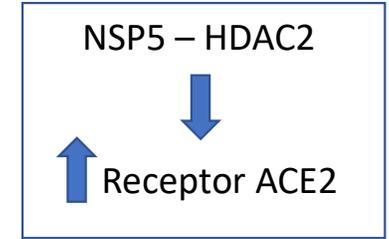
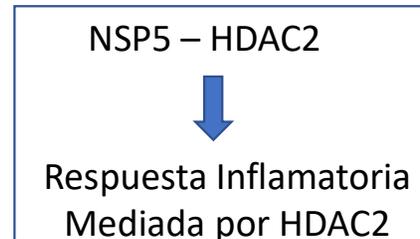
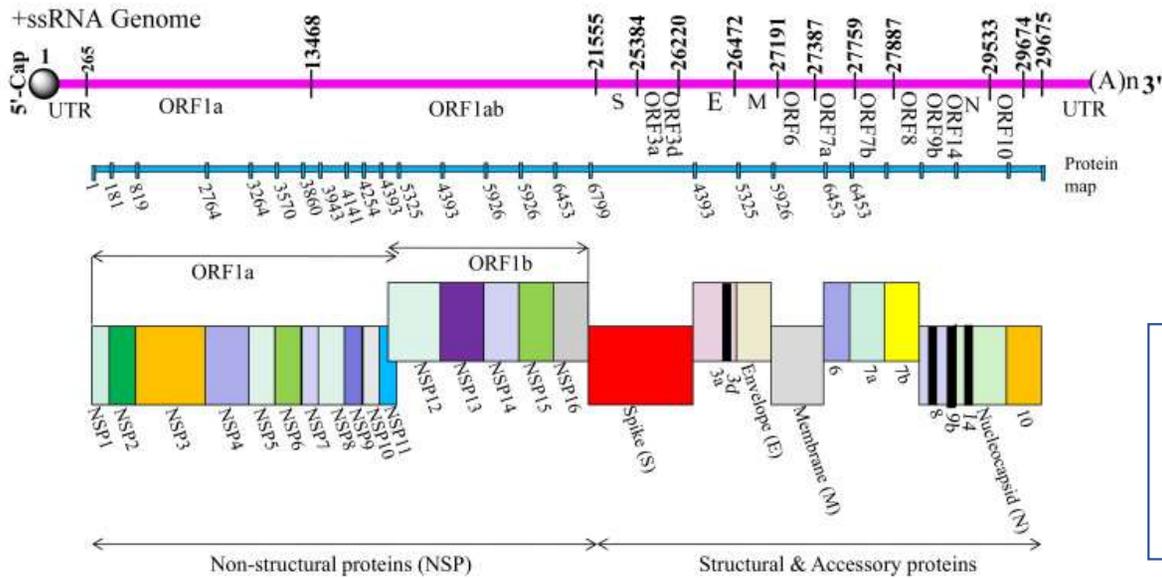
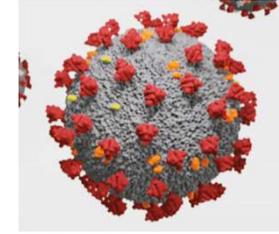
- **SWI-SNF** (SWItch/Sucrose Non Fermentable)

- **ISWI** (Imitation SWI)

- **CHD** (Chromo domain and Helicase-like Domain)



COVID-19 Y LAS HISTONAS



ACE2 es regulado por H3K4me1 y H3K4me3 y H3K27ac

RESUMEN

- ✓ Modificaciones postraduccionales de las Histonas: Acetilación, Metilación, Fosforilación, Ubiquitinación y Sumoilación.
- ✓ La acetilación en general se correlaciona con una elevada expresión génica.
- ✓ La metilación de las histonas no cambia la carga y se relaciona con reclutamiento de otras proteínas.
- ✓ Tres tipos de variantes de las histonas: CEP-A, macroH2A y H2A.X, cumplen funciones específicas.
- ✓ Los mecanismos de remodelación de la cromatina generan mayor o menor compactación de la cromatina y son esenciales para la viabilidad.



Centro
Universitario
Rivera



**CENUR
NORESTE**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

4a Clase

EPIGENÉTICA

Yasser V. Vega Requena

yassve2@gmail.com

Yasser.vega@cut.edu.uy

Prof. Adjunto

CENUR Noreste

UdelaR