

Regulação da expressão gênica em procariotos

(Parte I)

BIOLOGIA MOLECULAR I- BFB705
2018

Regulação da expressão gênica em procariotos

- ✓ Célula bacteriana estrutura e morfologia
- ✓ Adaptação ao ambiente e expressão gênica
- ✓ Níveis de regulação da expressão gênica

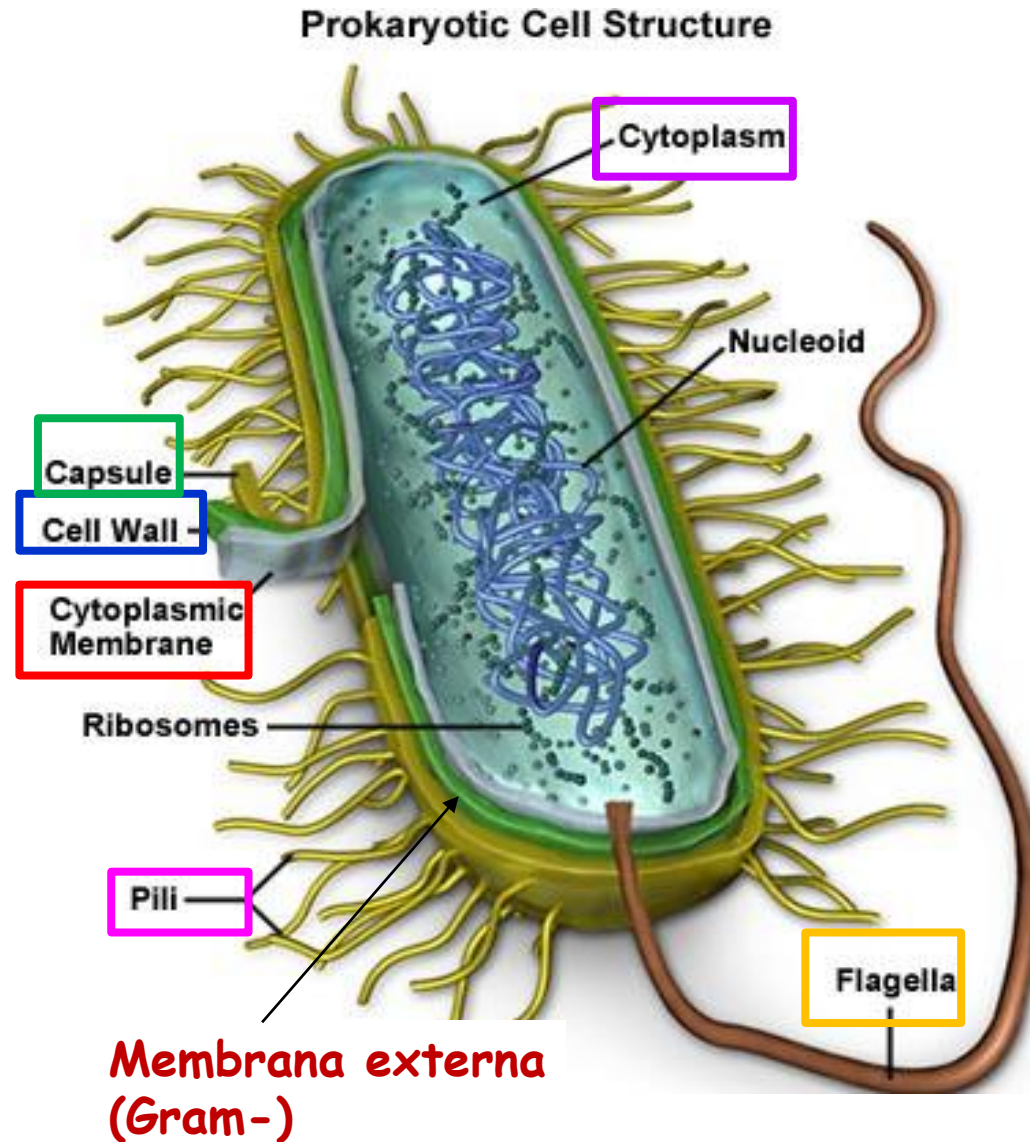
I- Regulação ao nível da transcrição

Fatores que afetam o início da transcrição:

- ✓ Sequência de bases do promotor
- ✓ Competição entre os fatores σ da RNA polimerase

Célula bacteriana: organismo unicelular sem organelas

- **Citoplasma**- matriz citoplasmática, DNA (nucleóide), ribossomos, plasmídeos, e onde a grande maioria das reações metabólicas ocorrem.
- **Membrana citoplasmática**- envolve o citoplasma limita o acesso ao interior da célula.
- **Parede celular** (peptideoglicana, mureína), resiste à pressão osmótica e dá forma à célula.
- **Flagelos** (apêndice para natação).
- **Pilus/pili** ou fimbria/fimbrias (para interação/adesão a superfícies bióticas ou abióticas).
- **Cápsula** (proteção).



Formas e arranjos celulares

- Três formas básicas:

1- Esféricas- arredondadas, ovóides ou achatadas em um dos lados.

2- Cilíndricas- Bastões, bacilos ou bastonetes (podem ter terminações achatadas, arredondadas, afiladas ou pontiagudas)

3- Espiraladas- espirilos (forma espiral ou saca-rolha)

1



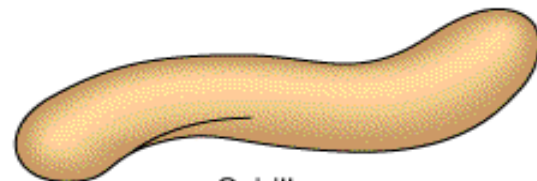
Coccus

2



Rod

3



Spirillum

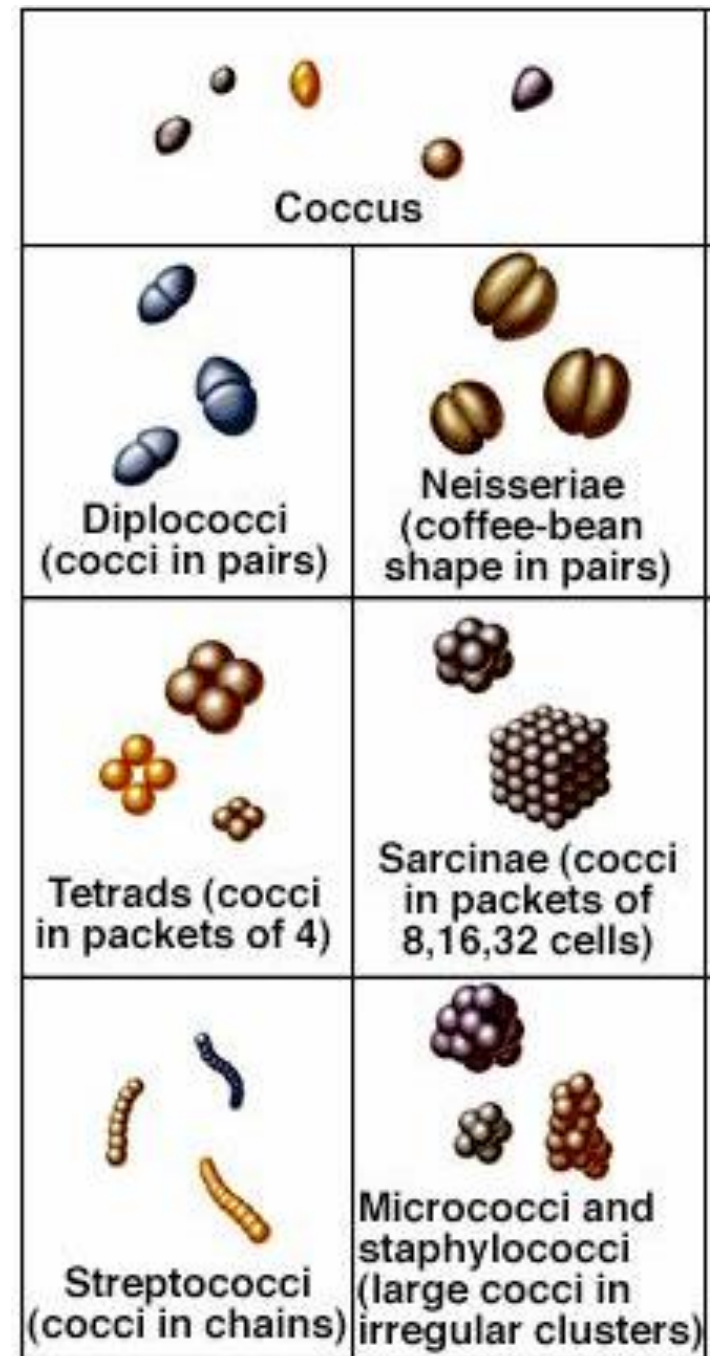
Morfologia bacteriana

Cocóide* (cocos, esférica):

- individuais, duplas, tétrade, sarcina (cubos)
- cadeias = estreptococos
- grupos = estafilococos

*(*Coccus/cocci*)

- Cocos- ~ 0,5-1,0 μm de diam.



Bastonete* (bacilo, alongada/curvos)

Individuais:

- Bacilos (a)
- Diplobacilos (b)
- Cocobacilos (d)

Cadeias:

Estreptobacilos (c)

*(*Bacillus/bacilli*)

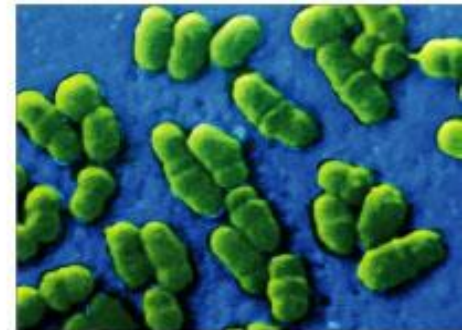
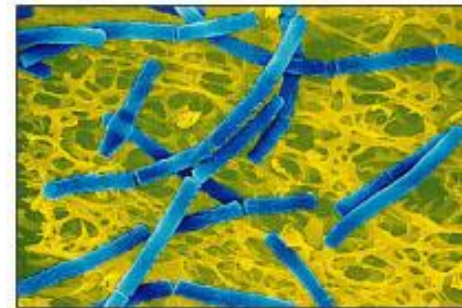
Bastonete ~ 0,5-1,5 μm diam
1-4 μm comprimento.

(a) Single bacillus

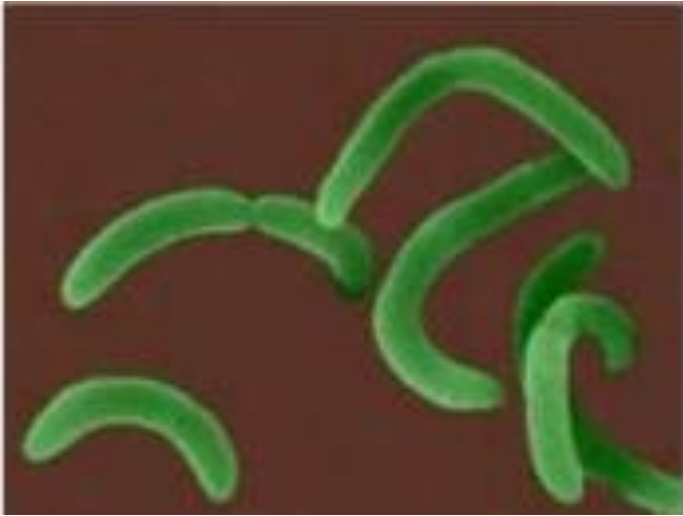
(b) Diplobacilli

(c) Streptobacilli

(d) Coccobacillus



Outras formas bacterianas



Bastonetes curvos- *Vibrio*



Pedunculadas- *Caulobacter*

Filamentosas e
ramificadas



Actinomyces

Espiraladas: Espirilos (A) e Espiroquetas (B)

A



SEM

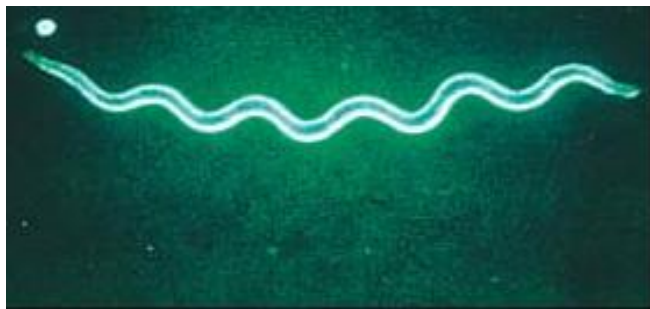
2 μm

Até 60 μm comp x 1,4-1,7 μm diam
(rígidas)



Helicobacter pylori (úlceras gástricas)

B



SEM

5 μm

5-250 μm comp x 0.1-0.6 μm de diam
(flexíveis)

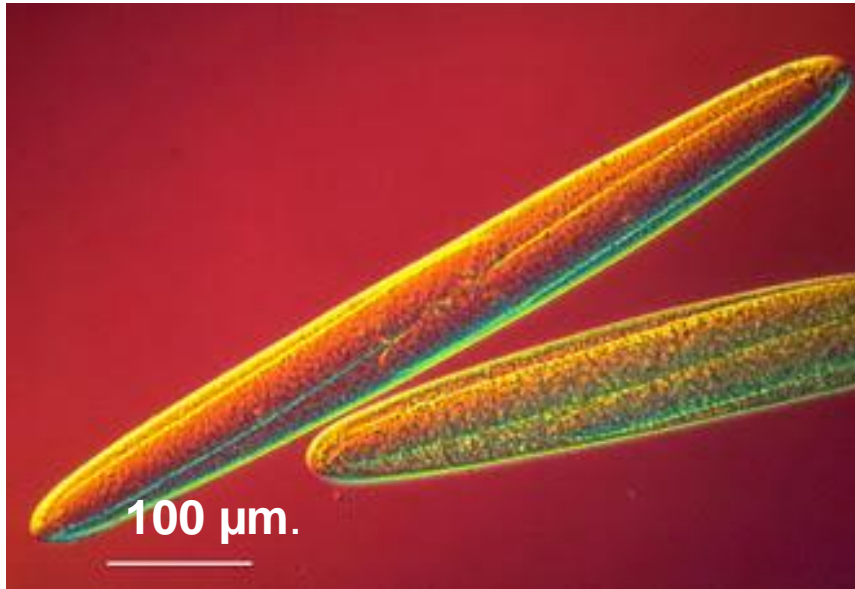


Treponema pallidum (sífilis)

Células bacterianas atípicas

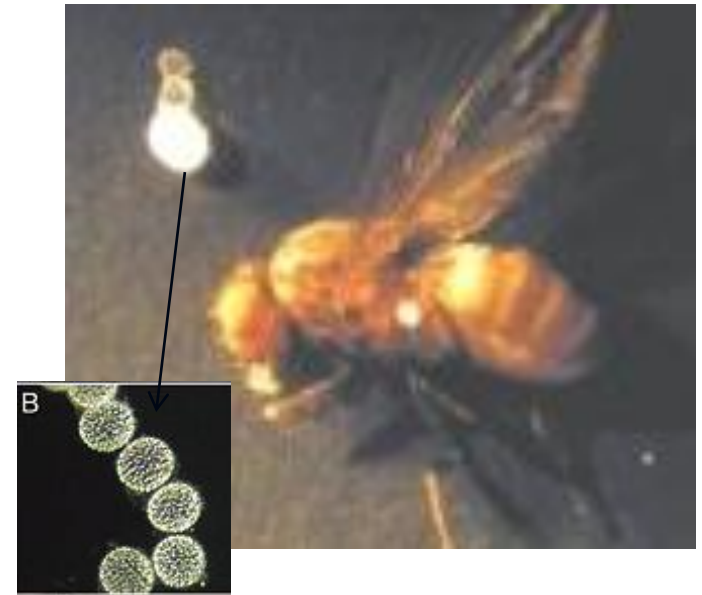
- Megabactéria- visível a olho nu.
 - 150-750 μm de diam (coco);
 - 40 μm /200 μm diam até 80 μm -700 μm comp (bastonete)

Megabactérias (visíveis a olho nu)



Epulopiscium fishelsoni - (80 μm x 600 μm) descoberta no intestino do "peixe cirurgião", no Mar Vermelho, em 1985, mas encontrada em outras regiões.

(<http://micro.cornell.edu/research/epulopiscium>)



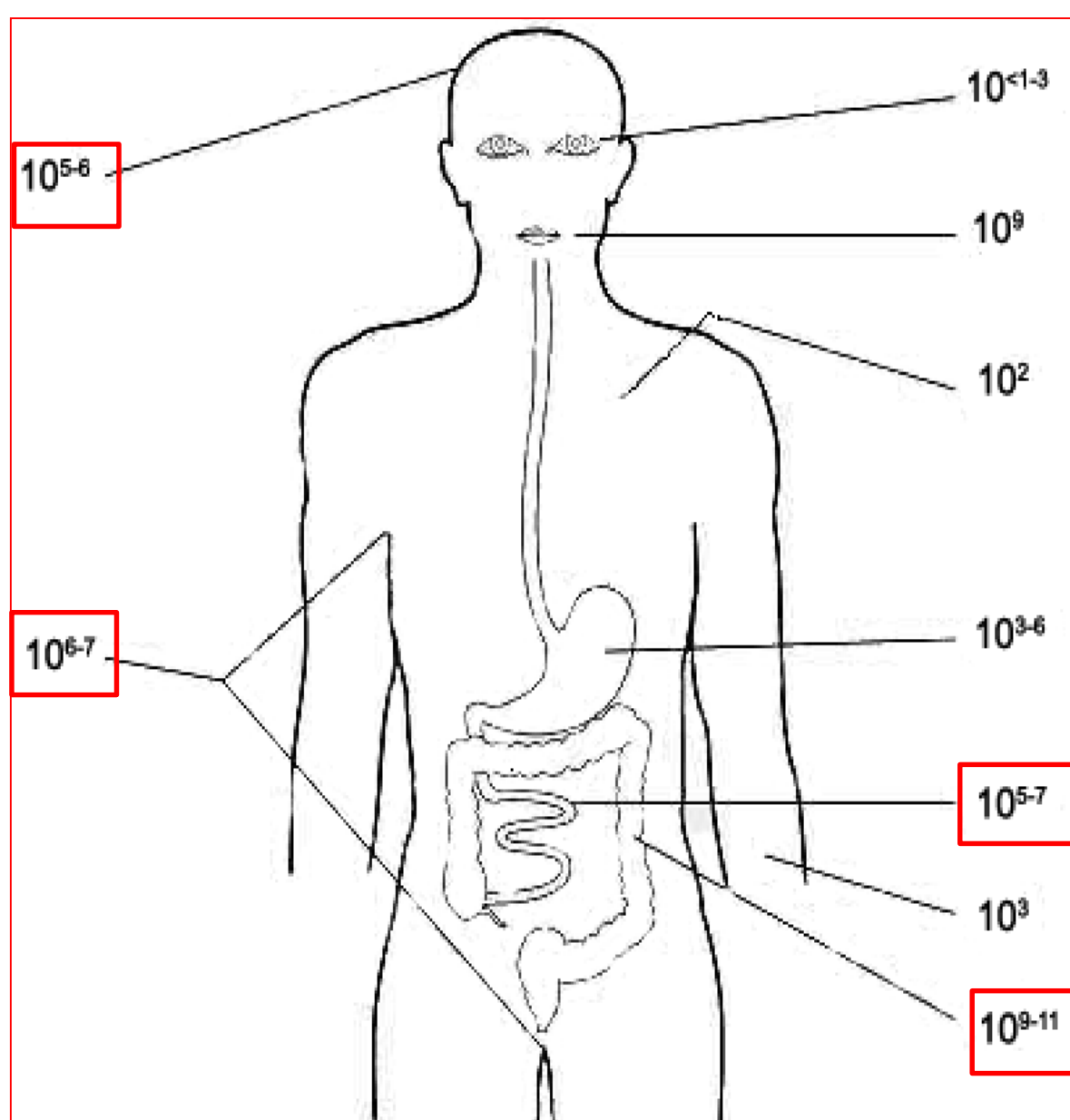
Thiomargarita namibiensis - a maior bactéria conhecida (coco de ~500 μm diâmetro, ~ cabeça de uma *Drosophila*) descoberta em 1997, em sedimentos marinhos na África.

Bactéria

A forma mais abundante de vida da Terra em biomassa e diversidade:

- em 1g de solo fértil: $\sim 10^9$ células bacterianas, ou 10^4 X o no. células eucarióticas
- no mar: as bactérias representam 90% peso total de todos os organismos

"The number of bacteria on earth is $\sim 5 \times 10^{30}$
(William Whitman/ University of Georgia/USA)



Onde são encontradas?

Corpo humano contém:

10^{13} células

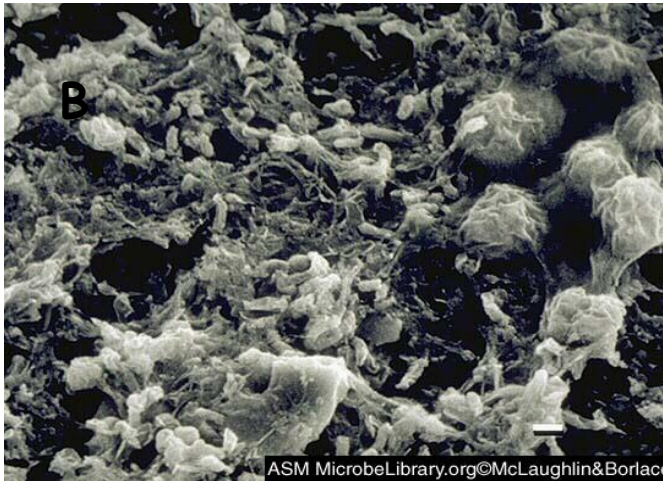
X

10^{14} bactérias

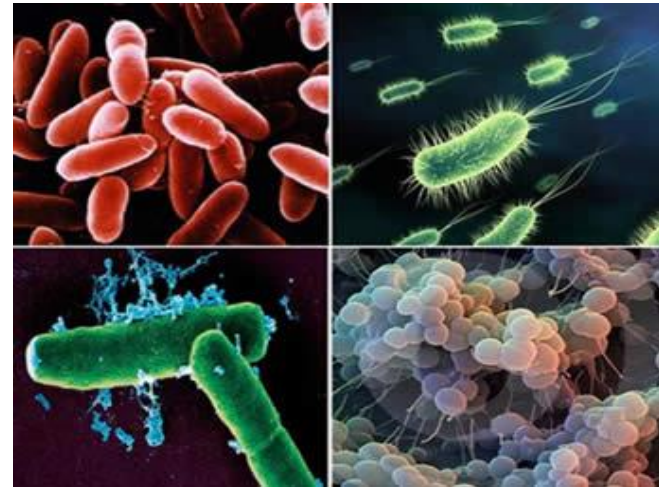
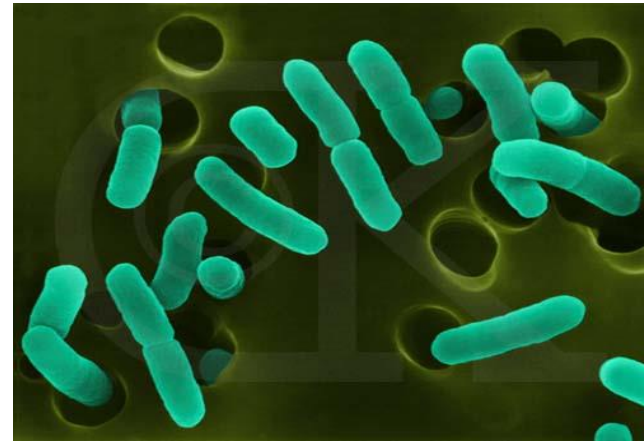
Flora microbiana normal- relativamente estável

Números de organismos por grama de tecido ou flúido ou por cm^2 de pele.

Tipos de vida: livre ou associadas a substratos bióticos ou abióticos em biofilmes

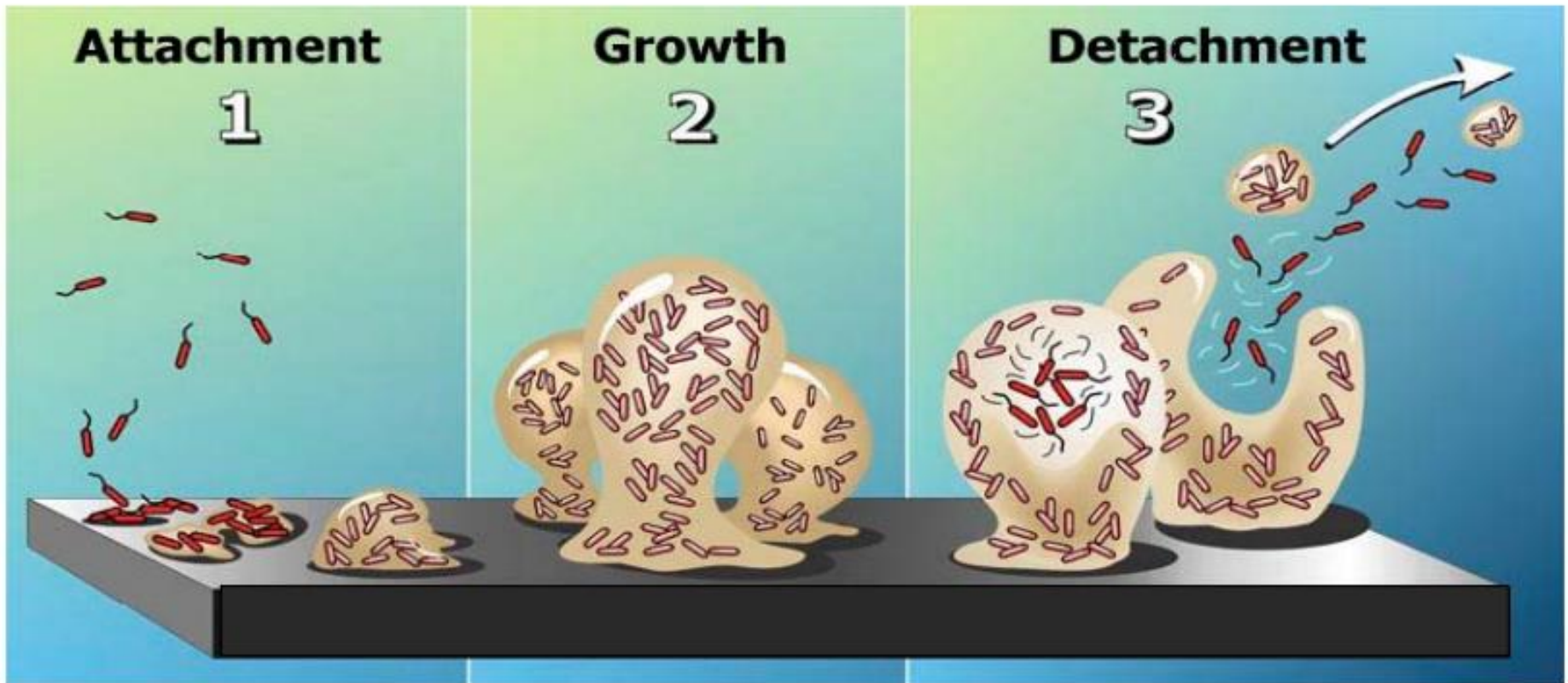


Biofilme na superfície de lago (A) e em lente de contato (B)

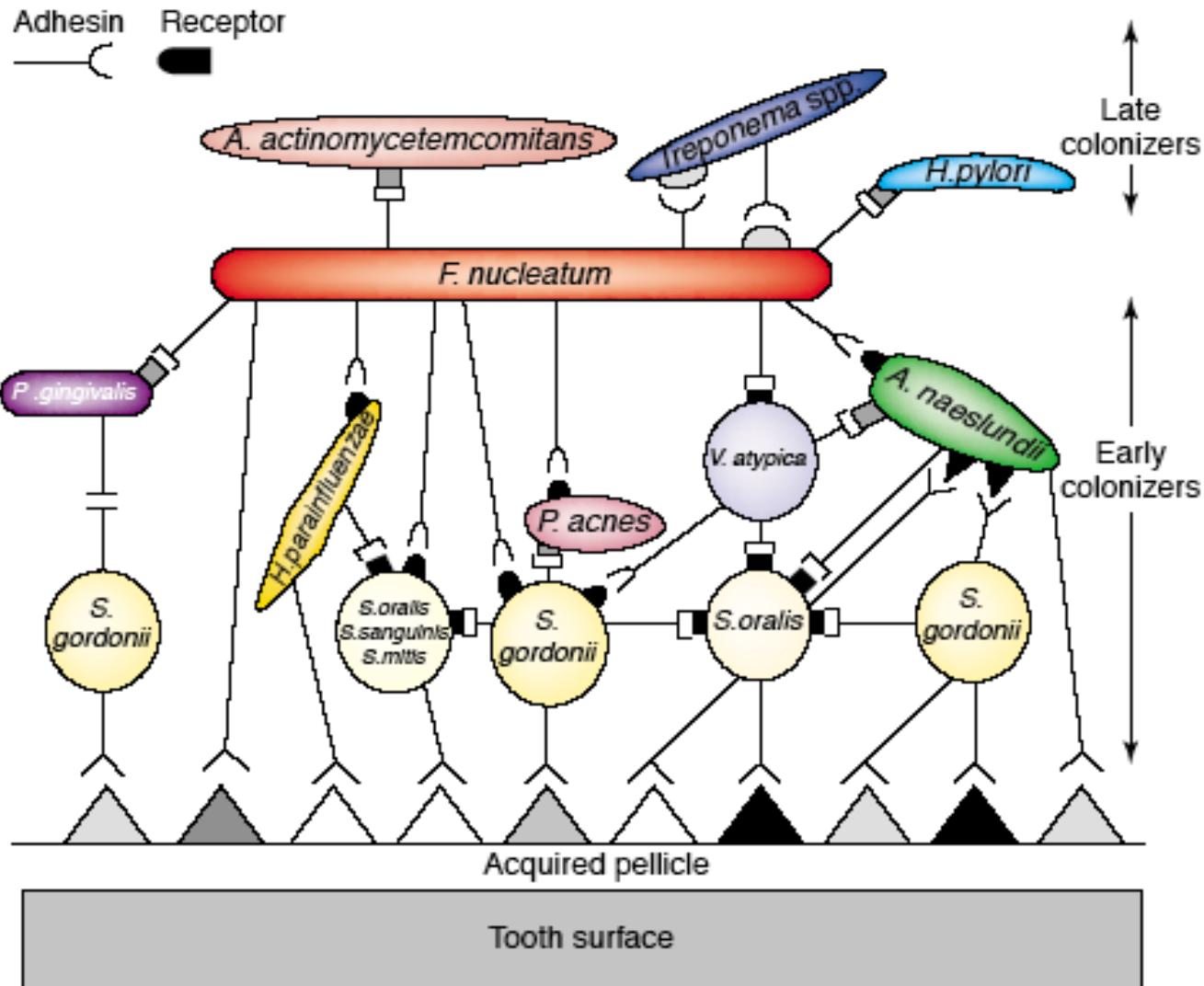


Células planctônicas (livres)

Biofilmes: Comunidades microbianas complexas e dinâmicas, formadas por micro colônias e micro canais, envoltas por uma matriz, geralmente polissacarídica. O biofilme se forma sequencialmente e sofre alterações ao longo do tempo.

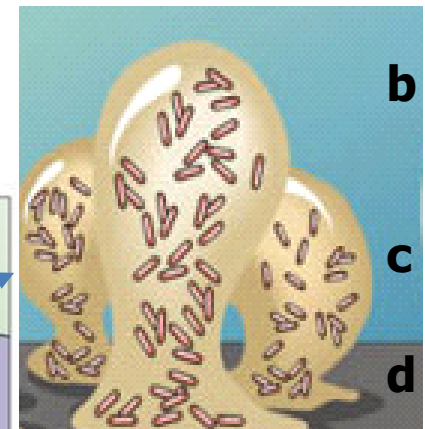
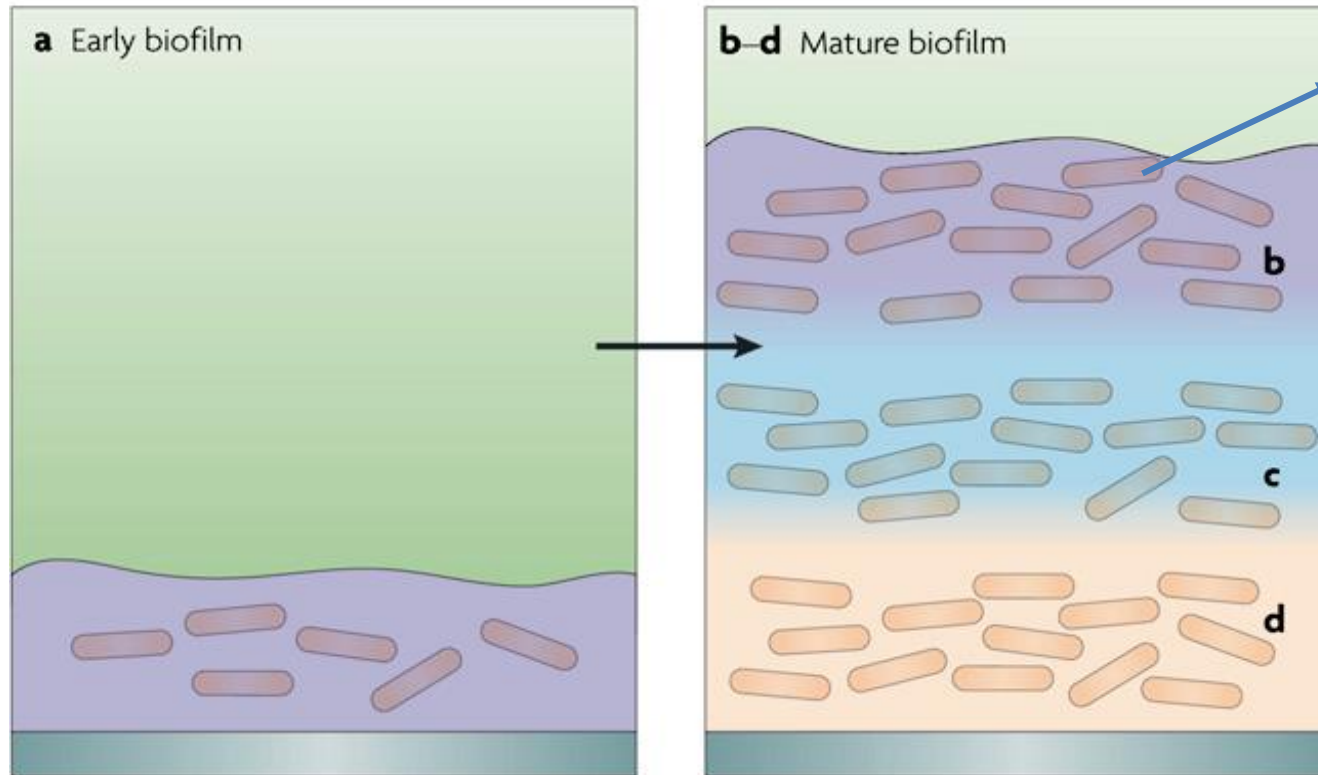


~90% das bactérias na natureza encontram-se em biofilmes mistos.



Biofilmes bacterianos ocorrem no corpo humano.

Bacterial co-aggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.*, (2003) **11**:94-100.



As condições ambientais em um biofilme maduro são heterogêneas e as bactérias têm que se adaptar a elas.

➤ **Um biofilme no estágio inicial de formação:**

(a) há abundância de substrato e oxigênio.

➤ **No biofilme maduro há ambientes que :**

(b) contêm substrato e oxigênio;

(c) contêm substrato, mas não tem oxigênio ;

(d) não contêm substrato, nem oxigênio.

Porque formar biofilmes?

Melhores condições de sobrevivência do que em vida livre.

- Proteção contra:
 - Radiações UV
 - Desidratação
 - Predadores
 - Antimicrobianos

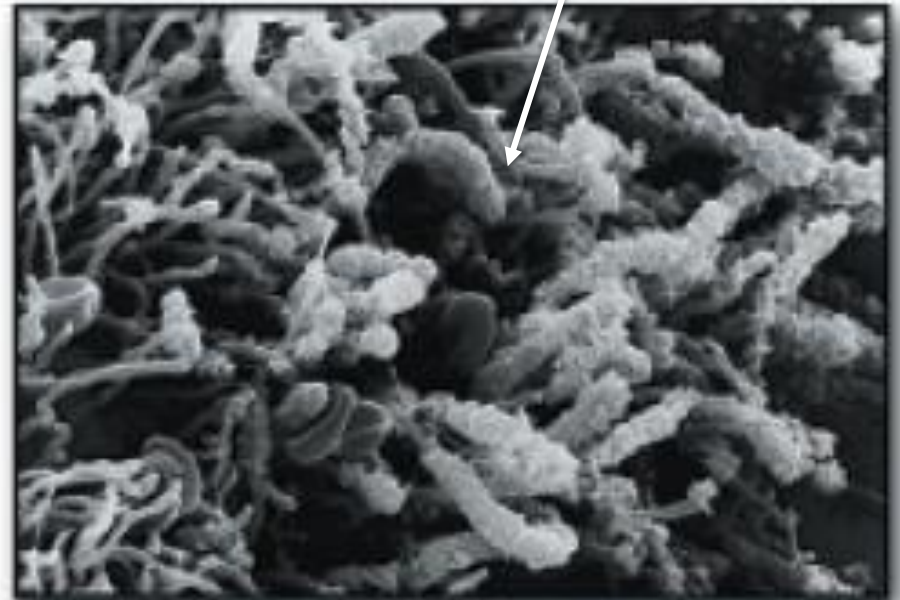


Figure 7: SEM of mature human dental plaque demonstrating corn cob formation. Bar = 10 microns at an original magnification of 2,020. Courtesy of Dr. Charles Cobb, University of Missouri-Kansas City

- Troca de material genético
- Maior aproveitamento de nutrientes

Considerações gerais sobre Bactérias

- Não controlam o ambiente que habitam, portanto, têm que se adaptar para sobreviver.
 - Ex: bactérias do solo ou água são sujeitas a flutuações constantes de:
pH, umidade, temperatura, disponibilidade e natureza dos nutrientes, tensão de oxigênio, presença de substâncias tóxicas, radiação solar, etc. Em biofilmes.... (*slide anterior*)
- Apesar disto, **bactérias são encontradas em todos os ecossistemas do planeta!**

Razão do sucesso

- Detectar as alterações ambientais (sinais)
- Produzir uma resposta adaptativa apropriada.



Ou seja, sintetizando um conjunto de moléculas (proteínas principalmente e sRNAs) por expressão dos genes correspondentes.

Portanto, sinais ambientais distintos induzem alterações na expressão gênica e a síntese de um novo conjunto de proteínas e sRNAs.

→ É esta expressão diferencial de genes que permite a adaptação da bactéria a ambientes distintos.

Porque regular a expressão gênica?

- A necessidade de alguns produtos gênicos depende das condições ambientais, portanto,
- só uma fração dos genes é expressa em um dado momento.

Alto custo da síntese de uma proteína de 300 aminoácidos:

1350 moléculas de ATP/GTP

1650 átomos de carbono

540 átomos de nitrogênio.

Além disto há uso de: ribossomos, polimerases, chaperonas...

E. coli possui genes que codificam ~ 4000 proteínas.....

A economia na produção de proteína é central para a fisiologia celular

O custo da produção de proteínas é comumente atribuído à tradução de proteínas.

Expressão gênica: constitutiva x regulada

- **Genes de expressão constitutiva**- expressos em taxas ~ constantes durante a vida da célula- genes de manutenção.

Ex: DNA polimerase, DNA girase, RNA polimerase etc.

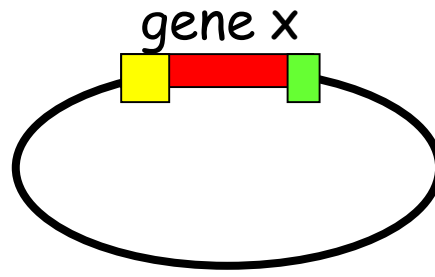
- **Genes regulados**- expressão varia em resposta a sinais ambientais- expressão regulada: **indução/repressão**

Ex: genes que controlam o crescimento e divisão celular, a produção de flagelo, de fimbrias, de toxinas etc

Níveis de controle da expressão gênica

- Em termos gerais são três as etapas principais:
 - Transcrição- controla **quando** e com que **frequência** um gene é transcrito- a principal etapa do controle em bactérias é o início da transcrição!
 - Tradução- a) taxa de degradação do mRNA
b) eficiência da tradução (vários fatores)
 - Pós-tradução- mecanismos de ativação:
 - reversíveis (fosforilação, glicosilação etc) ou
 - irreversíveis (processamento proteolítico, etc).

Regulação da expressão gênica



1. Transcrição



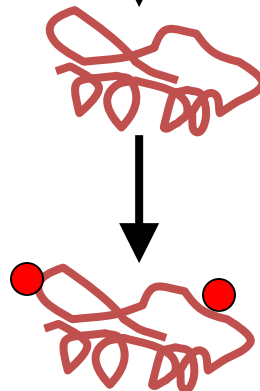
2. Tradução



transcrito primário → degradação do mRNA ou eficiência de tradução



3. Processamento pós-tradução



proteína inativa → degradação da proteína

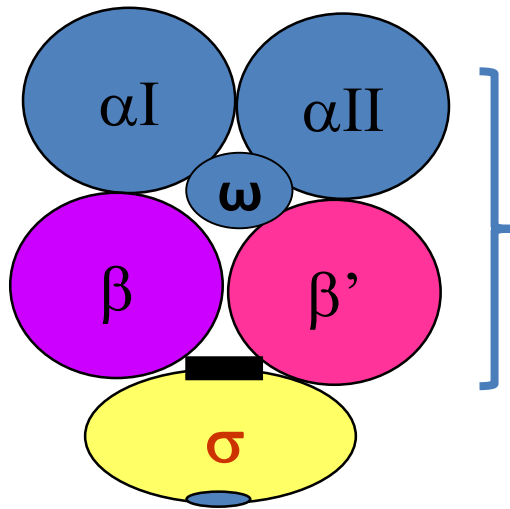
proteína ativa → degradação da proteína

1 - Regulação ao nível da transcrição

Regulação ao nível da transcrição

- Maioria dos genes bacterianos é regulada ao nível da transcrição: **principalmente no início do processo**
 - Processo mediado pela interação **proteína (s)-DNA**
 - Componente protéico central do processo- a enzima **RNA polimerase**
 - Em *Escherichia coli* e outras bactérias existe uma única RNA polimerase: um complexo de 6 sub-unidades, que catalisa a síntese de todos os RNAs celulares (5' → 3')
 - RNA polimerase se liga a **um sítio específico no DNA** a montante do gene a ser transcrito- **promotor**

RNA polimerase (RNAP) bacteriana



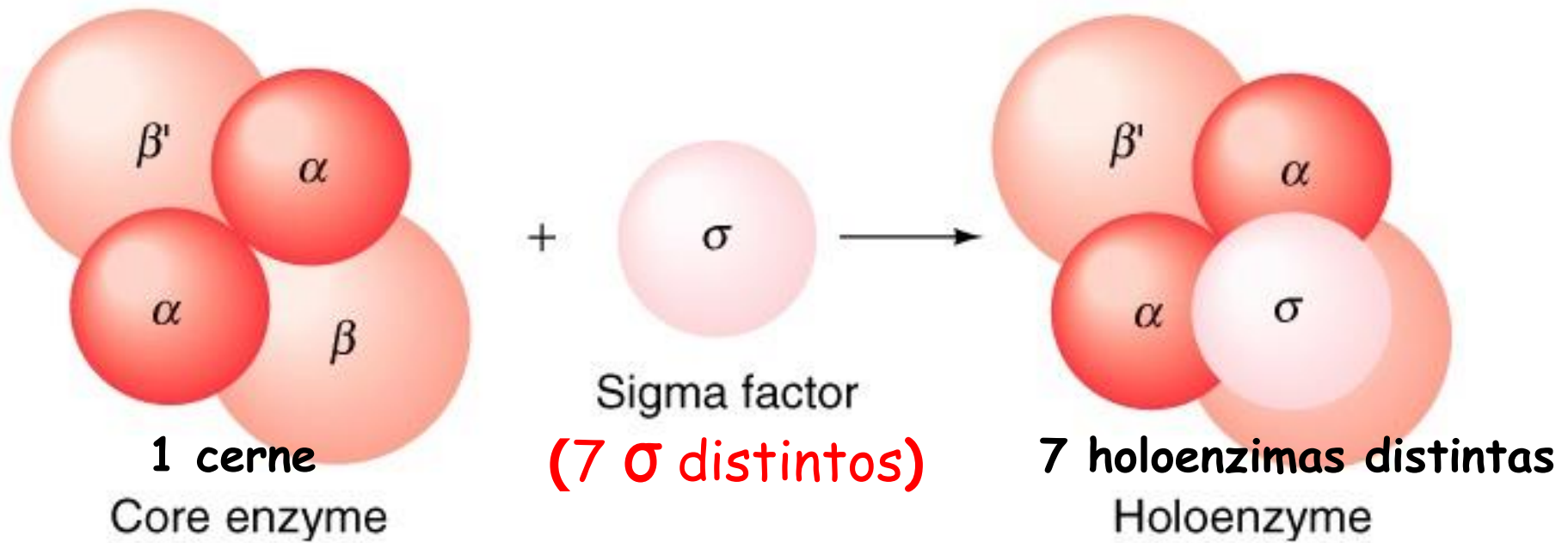
RNAP holoenzima

Cerne da enzima: $\alpha_2\beta\beta'\omega$;
(Alongamento da transcrição)

Holoenzima: cerne + σ
(Início da transcrição)

- $\beta\beta'$ juntas formam o sítio ativo.
- α é essencial para a estrutura e interação da enzima com proteínas reguladoras; α também se liga ao DNA.
- ω tem função estrutural
- **σ reconhece sequências do promotor no DNA** (a maioria das bactérias tem vários σ distintos)

RNA polimerase (RNAP) de *E. coli*



Adapted from K. M. Geszvain and R. Landick (ed. N. P. Higgins). The Bacterial Chromosome. American Society for Microbiology, 2004.

Fatores sigma (σ) bacterianos

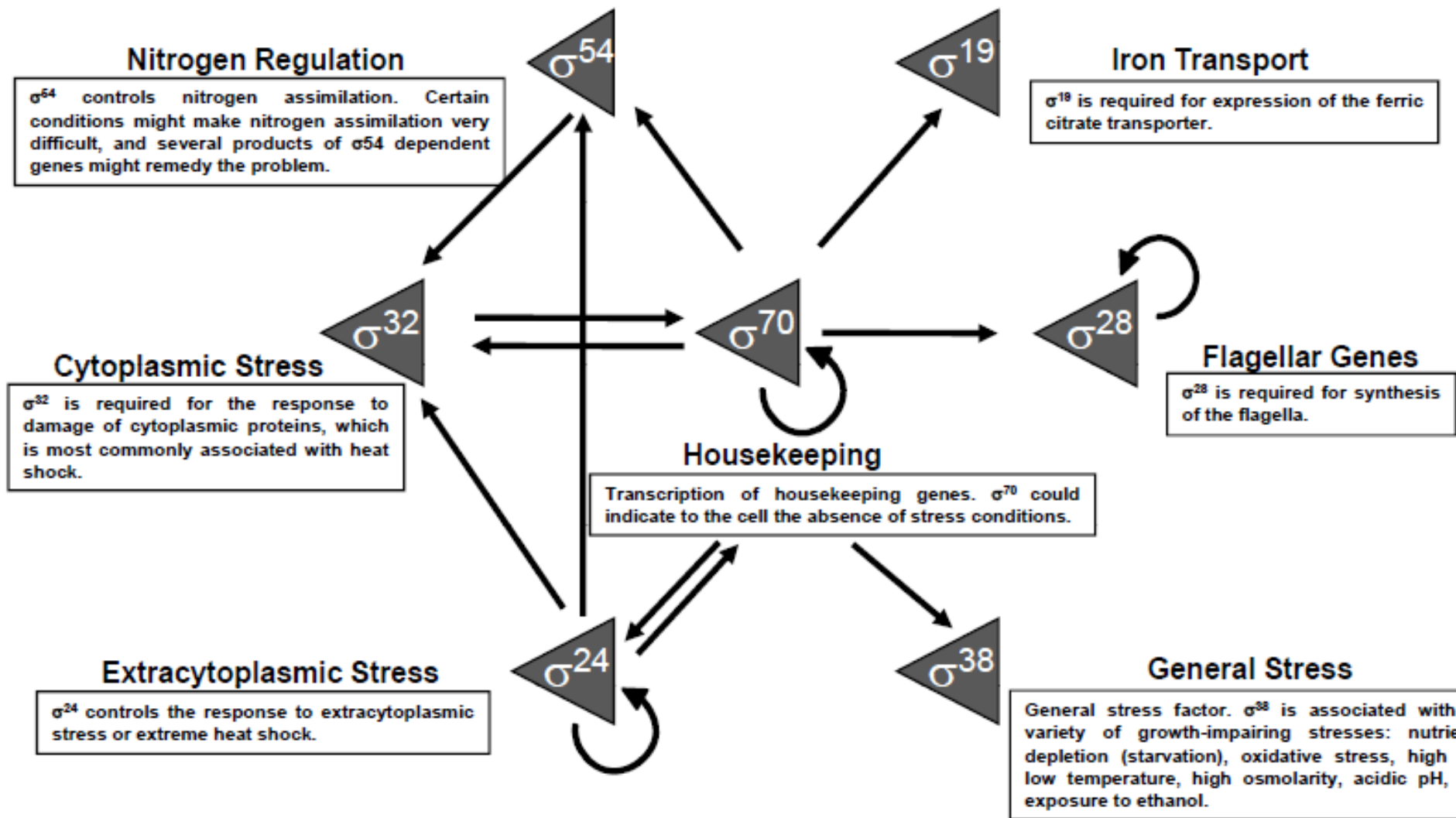
- O sequenciamento de genomas revelou que o número de subunidades σ varia entre diferentes espécies de bactérias:
 - A maioria dos genomas bacterianos codifica pelo menos 3 fatores σ . Mas,
 - *Sorangium cellulosum* contém 109 fatores σ .
 - *Mycoplasma genitalium* contém 1 fator σ ,
 - *Escherichia coli* tem 7 fatores σ
 - *Bacillus subtilis* tem 17 fatores σ
 - *Mycobacterium tuberculosis* tem 13.

"Bacteria that live in varied environments have more sigma factors"

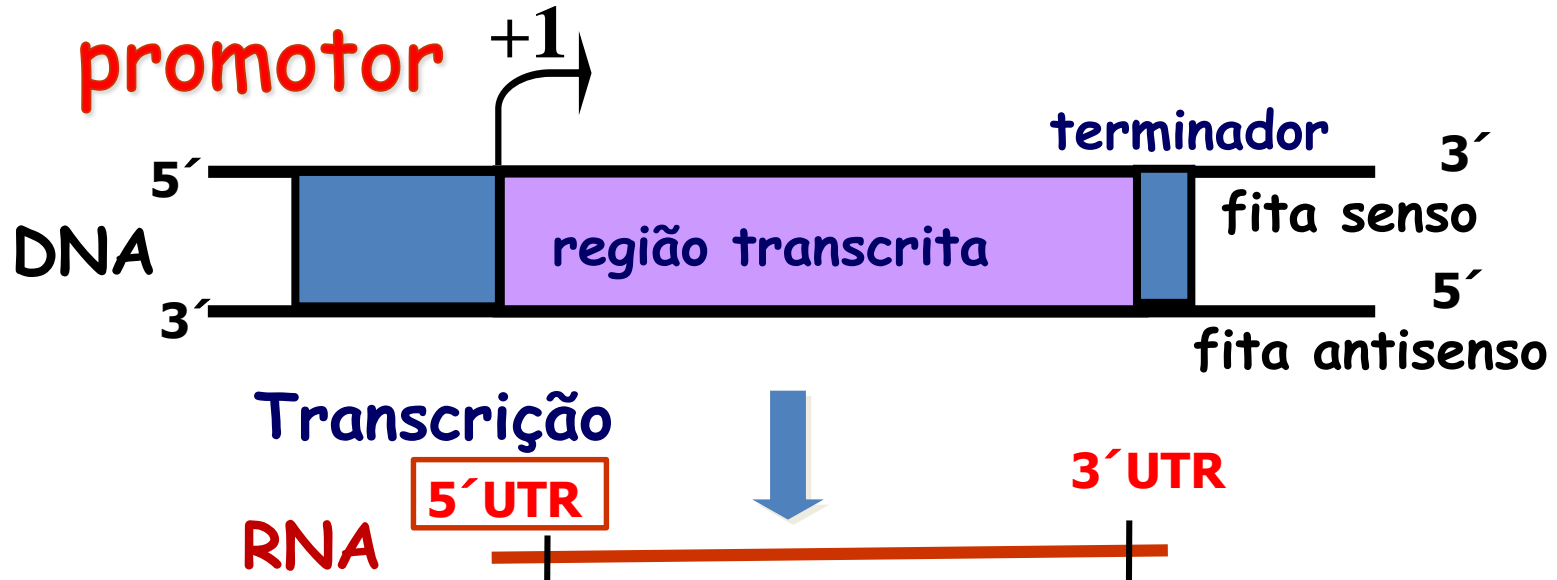
Fatores sigma (σ) bacterianos

- Os fatores σ bacterianos podem ser classificados em duas famílias distintas com base na similaridade de estrutura com os fatores de *Escherichia coli*:
- (1) a família do fator primário, σ^{70}/σ^D responsável pela maior parte da transcrição durante o crescimento;
- (2) a família do σ^{54}/σ^N , proteína estruturalmente distinta do σ^{70} e envolvida na expressão de genes de utilização de nitrogênio e interação com o meio exterior (síntese de cápsula, flagelo, etc)

Os sete fatores σ de *E. coli*: σ^{70} , σ^{32} , σ^{24} , σ^{38} , σ^{28} , σ^{19} ; σ^{54}

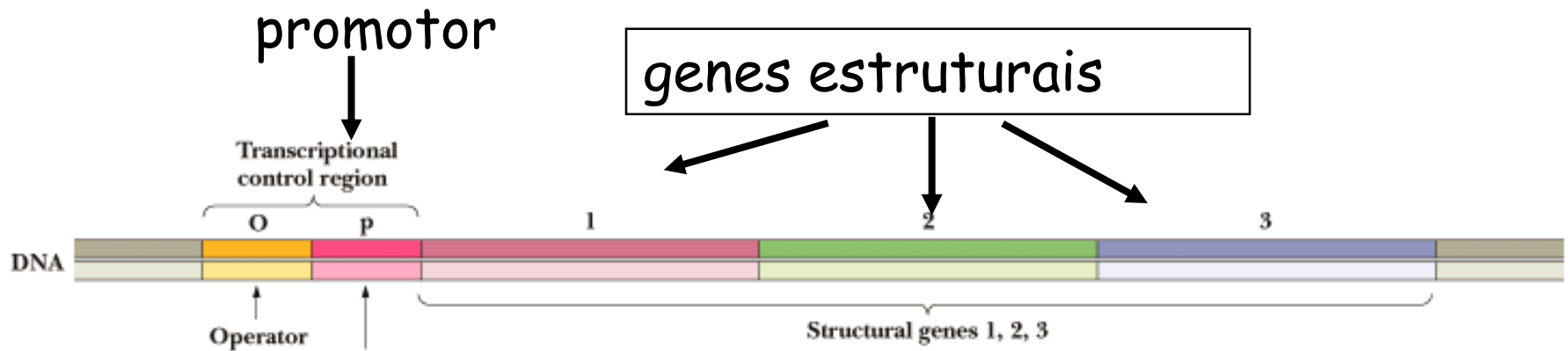


DNA: interação com a RNAPolimerase



Estrutura de uma unidade transcricional típica: um segmento de DNA que contém sinais para o início (**promotor**) e o término da transcrição (**terminador**) e é transcrito em uma molécula de RNA. [+1 - início da transcrição]

Unidades transcripcionais em bactéria: óperons



Óperon- conjunto de genes (cistrons) transcritos a partir de um mesmo promotor (25% dos genes de *E. coli*)

Uma molécula única de RNA é obtida na transcrição. Esta contém informação para a síntese de todas as proteínas codificadas no óperon: o produto é um mRNA policistrônico

Transcrição em bactérias: elementos importantes para o início da transcrição

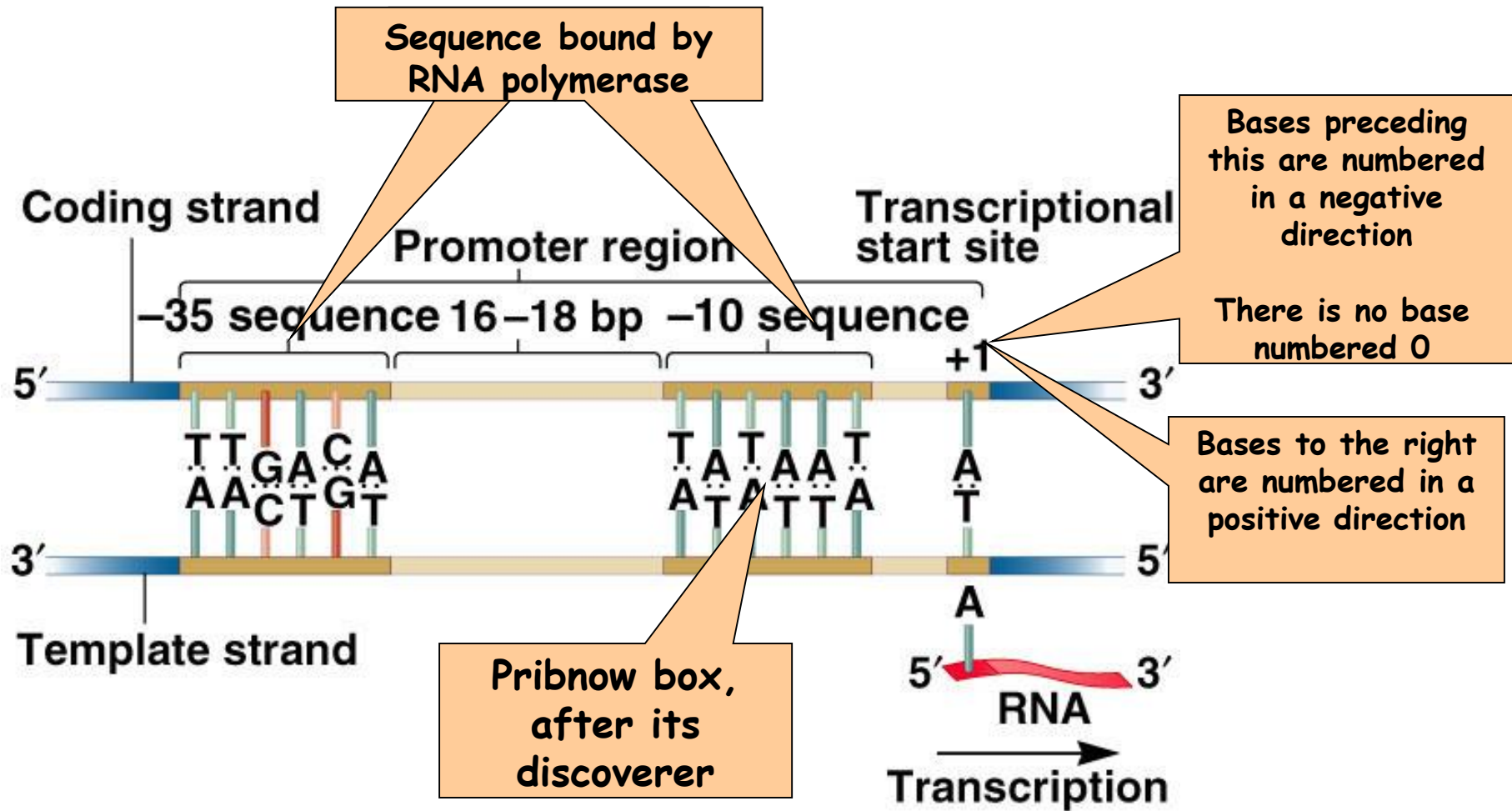
• Promotores

- sequências no DNA a montante (5') do gene, onde a RNAP se liga para dar início a transcrição.

• RNA polimerase (RNAP)

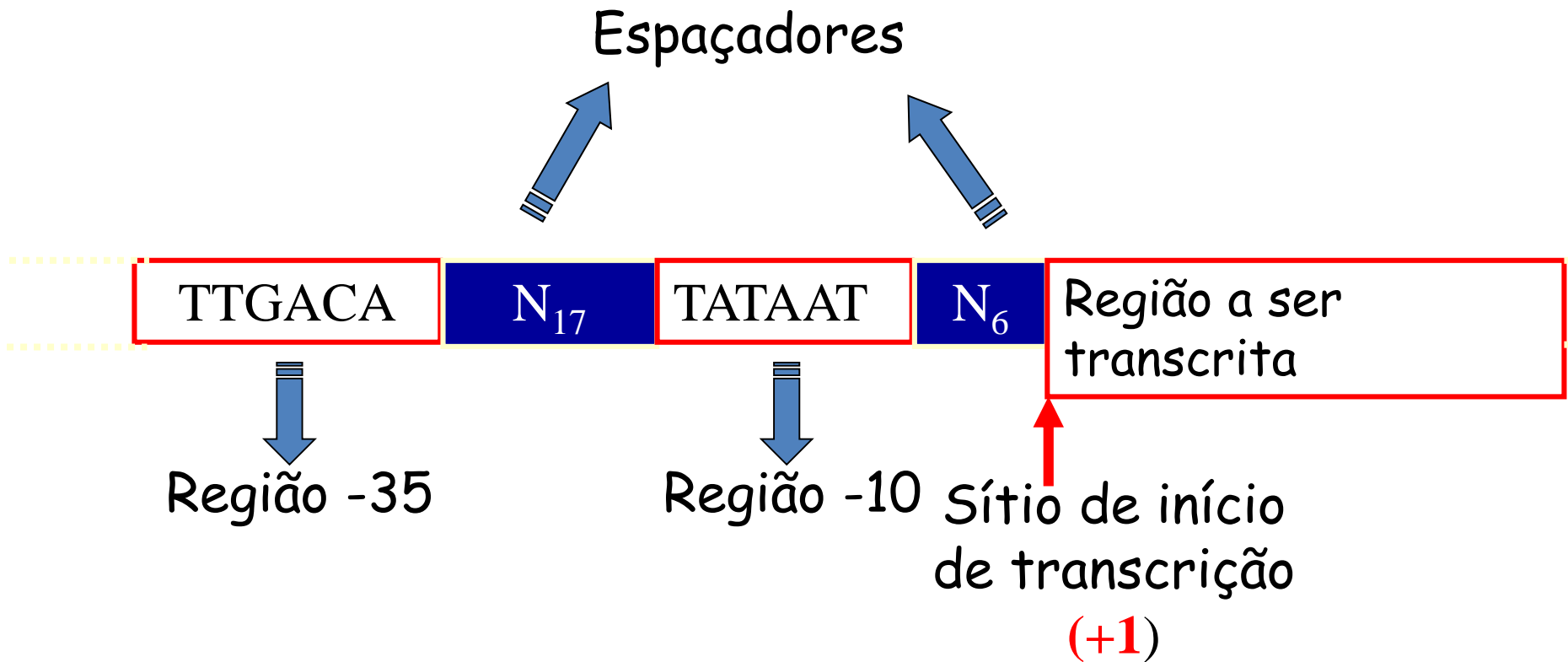
- enzima que interage com o promotor catalisa a transcrição do gene a jusante, com síntese do RNA.

Regiões comuns a maioria dos promotores bacterianos



Sequências de 6-7 bp centradas a -10 ("Pribnow box") e -35 (a 5') do ponto do início da transcrição (+1), reconhecidas pela maioria dos fatores σ (sigma) da RNAP bacteriana.

Região Promotora de ligação da RNAP- σ^{70}



Sequências a -10 e -35 consenso de um promotor de *Escherichia coli* reconhecido pela RNAP- σ^{70} responsável pela transcrição da maioria dos genes durante o crescimento celular

Sítios de ligação de σ distintos a promotores de *E. coli*

Factor	Use	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
σ^{70}	general	TTGACA	16-18 bp	TATAAT
σ^{32}	heat shock	CCCTTGAA	13-15 bp	CCCGATNT
σ^E	heat shock	not known	not known	not known
σ^{54}	nitrogen	CTGGNA (-24)	6 bp	TTGCA (-12)
σ^F	flagellar	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
$\sigma^{S/38}$	stress response	<u>TTGACA</u>	17 ± 2	TATACT

CTATACT

As sequências a -10 e -35 que reconhecem os fatores σ^{70} e σ^{38} apresentam similaridades, porem os promotores σ^{38} geralmente têm:

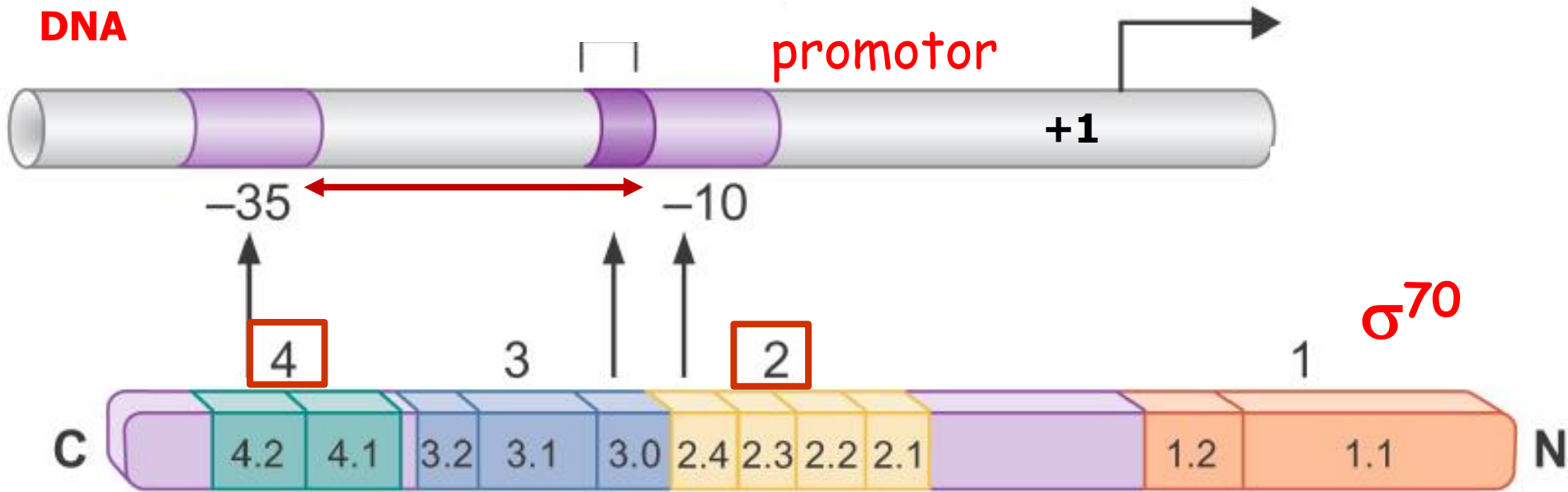
- a sequência a "- 10" centrada entre nucleotídeos os 7-14 ;
- a posição da sequência a -35 pode variar, assim como certas bases (itálico);
- distância entre -10 e -35 também variável (17 ± 2 bp)

Fatores que afetam o início da transcrição

- I- Sequência de bases dos promotores e interação com a RNAP
- II- Competição entre os fatores σ pelo cerne da RNAPol

**I- Sequência de bases do promotor e
interação com a RNAP**

Regiões da proteína σ que interagem com o promotor

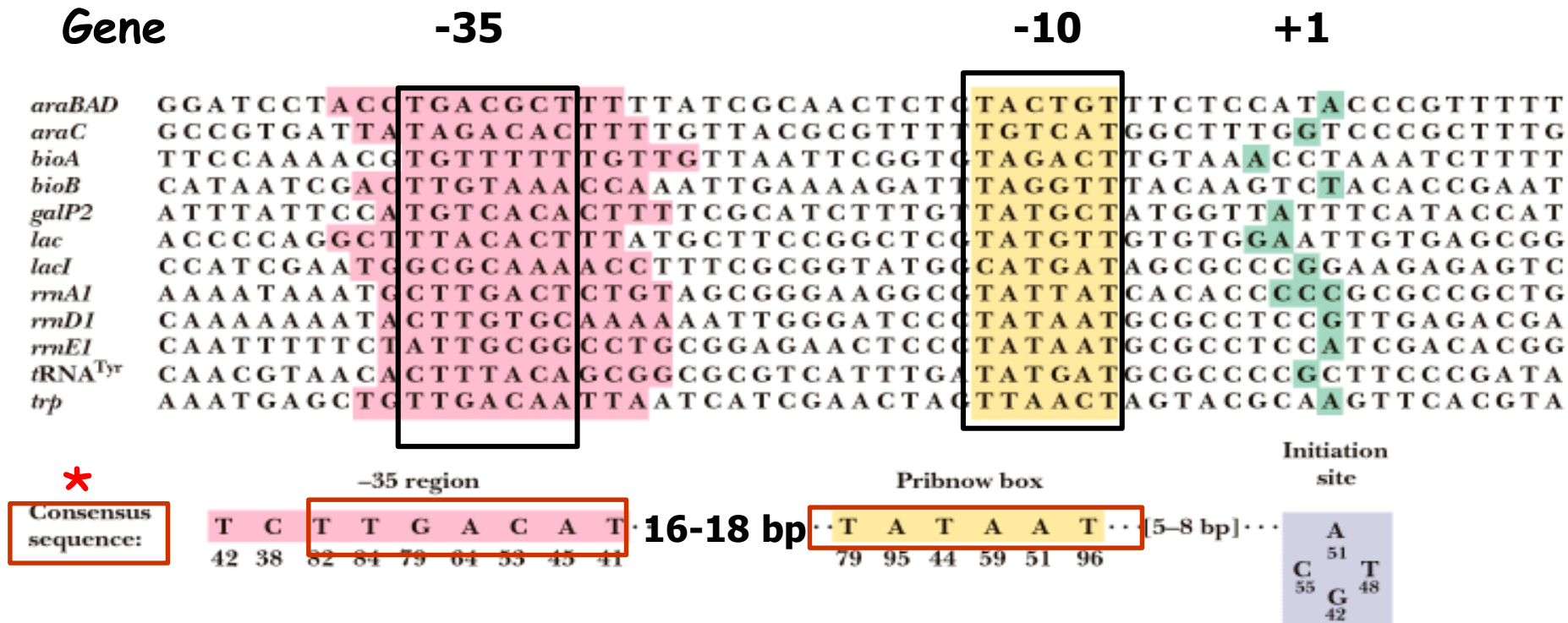


A proteína σ apresenta quatro domínios: $\sigma 1$ - $\sigma 4$ (N \rightarrow C)

A região 2 do σ reconhece a sequência -10 e a 4 do σ , reconhece a -35 do promotor. **O fator σ isolado não se liga ao promotor!**

RNAP- σ^{70} X DNA de *E. coli*: sequências consenso

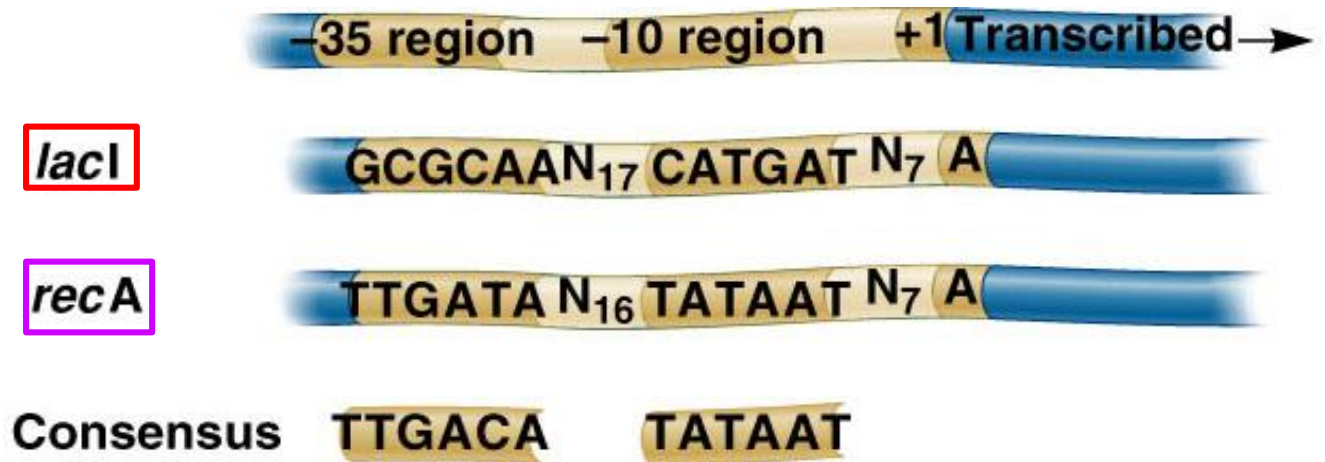
Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 31.3



* Sequência consenso- sequência ideal, na qual cada posição representa a base mais frequente quando muitas sequências são alinhadas.

Exs of (-35) and (-10) sequences within *E. coli* σ^{70} promoters

“For many bacterial genes, there is a good correlation between the rate of transcription and the degree of agreement between the promoter sequences with the consensus sequences”

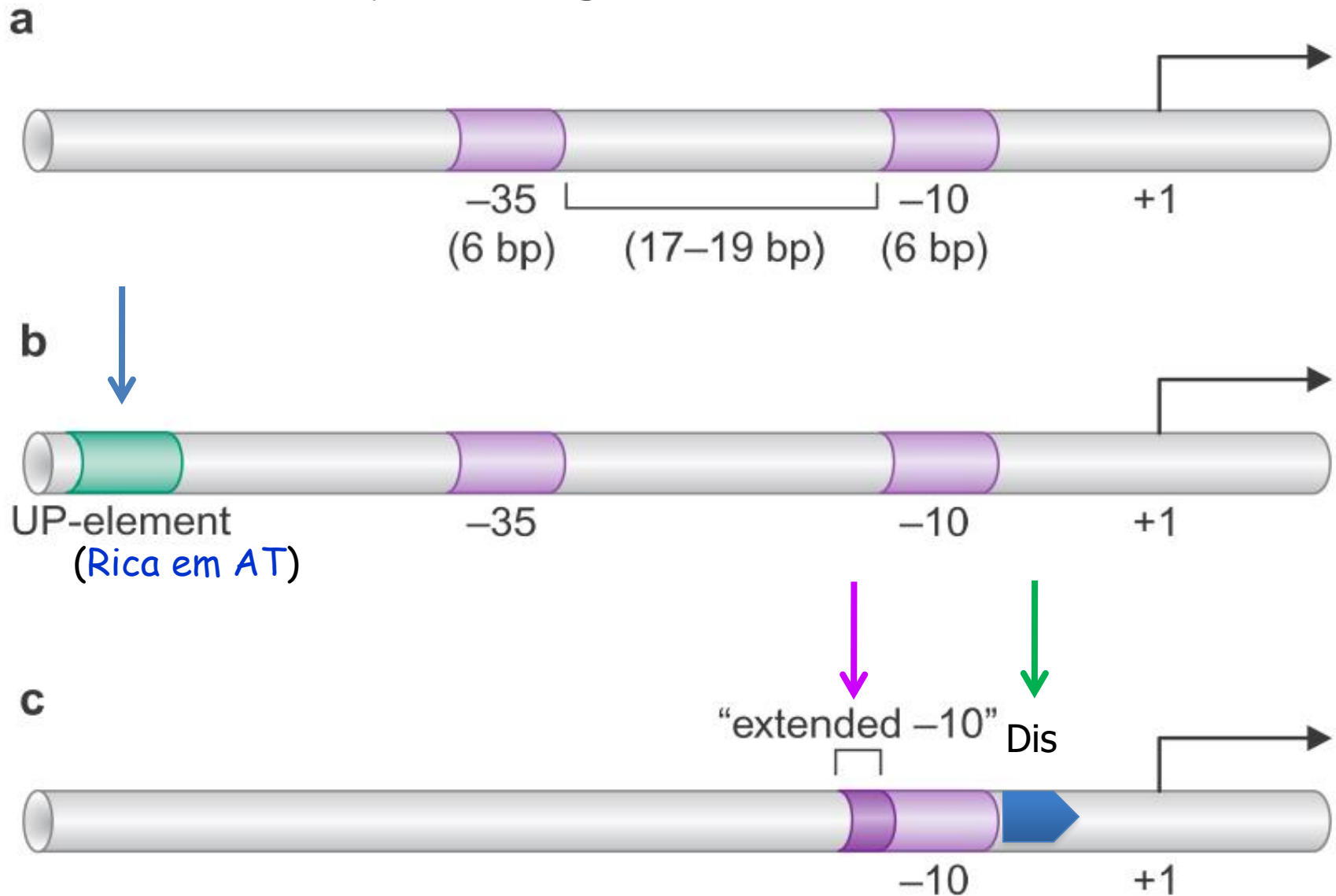


Desvio das sequências -10 e -35 do consenso pode levar a uma expressão gênica fraca. Ex: o promotor do gene *lacI* é considerado fraco; o promotor do gene *recA* é um dos mais fortes de *E. coli*!

Gene recA: is under repression by LexA protein, but even when repressed, the level of gene expression is high enough to maintain ~ 1000 RecA monomers/cell;

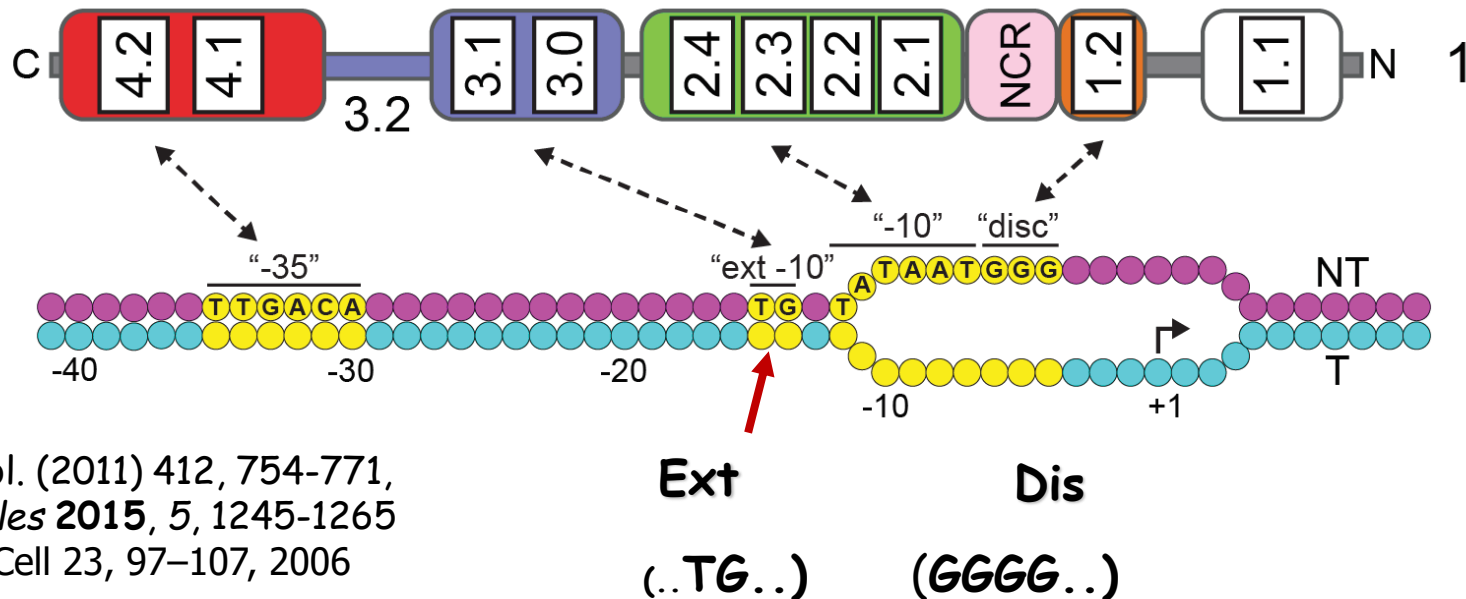
Gene lacI: is not under repression and ~160 LacI monomers are present per cell.

Outras regiões importantes em promotores bacterianos que se ligam a RNAP. σ^{70}



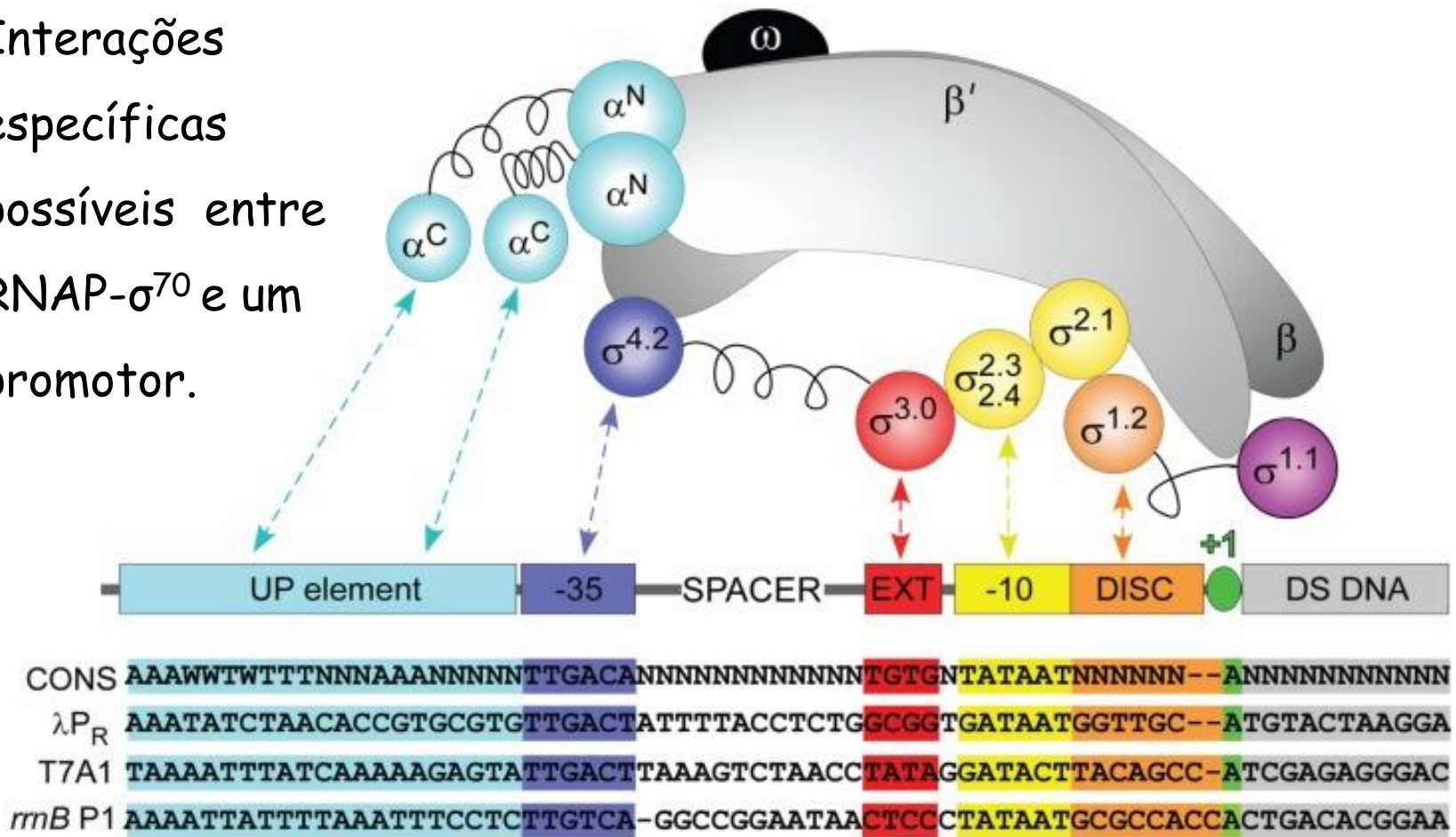
O σ^{70} pode contatar outras sequências no DNA para aumentar a eficiência da transcrição:

- **-10 Ext** ("extended"): alguns promotores contêm um motivo TG.. adicional localizado a montante do elemento - 10: crucial para a transcrição a partir de promotores de *E. coli* (~30%) e outras bactérias, cujos 6bps a -35 são pouco conservados em relação ao consenso ou ausentes.
- **Dis** ("discriminatory"), entre o elemento -10 e +1 rica em G (5'-GGG-3')
- está envolvida na regulação do tempo de vida do complexo aberto.



J. Mol. Biol. (2011) 412, 754-771,
Biomolecules **2015**, 5, 1245-1265
Molecular Cell 23, 97-107, 2006

Interações
específicas
possíveis entre
RNAP- σ^{70} e um
promotor.



RNAP- α : azul; β and β' : cinza; ω : preto; regiões do fator σ^{70} .

Promotor- elemento UP: azul claro; -35: azul escuro; "-10 extended": vermelho; -10: amarelo; "discriminator": laranja; +1, sítio de início da transcrição: verde.

As regiões de ligação entre os domínio de α de σ são mostradas como molas.

Características comuns dos promotores que afetam a interação com a RNAP- σ^{70}

- caixa de 6 bp a -10 e
- caixas de 6 bp a -35 e
- espaçamento de 17 ± 1 bp entre -10 e a -35

(espaçadores mais curtos ou mais longos que o consenso, diminuem a força do promotor)

- Com base apenas nestes parâmetros pode-se dizer que a taxa de transcrição de diferentes genes cujos promotores reconhecem a mesma RNAP pode variar: a partir de alguns promotores podem ser geradas poucas cópias de RNA/geração celular e de outros, podem ser transcritos dezenas de milhares de cópias de RNA/geração.

II- Competição entre os σ s pelo cerne da RNAP

FEMS Microbiology Reviews (2010)
[Vol 34, Issue 5](#), pages 646-657,

RNAP de *Escherichia coli*

~ 4.000 genes em *E. coli*

- ~ 8,000 RNAP, das quais, ~30% estão envolvidas na etapa de alongamento da transcrição, em determinado momento.

Demais moléculas de RNAP (hipóteses):

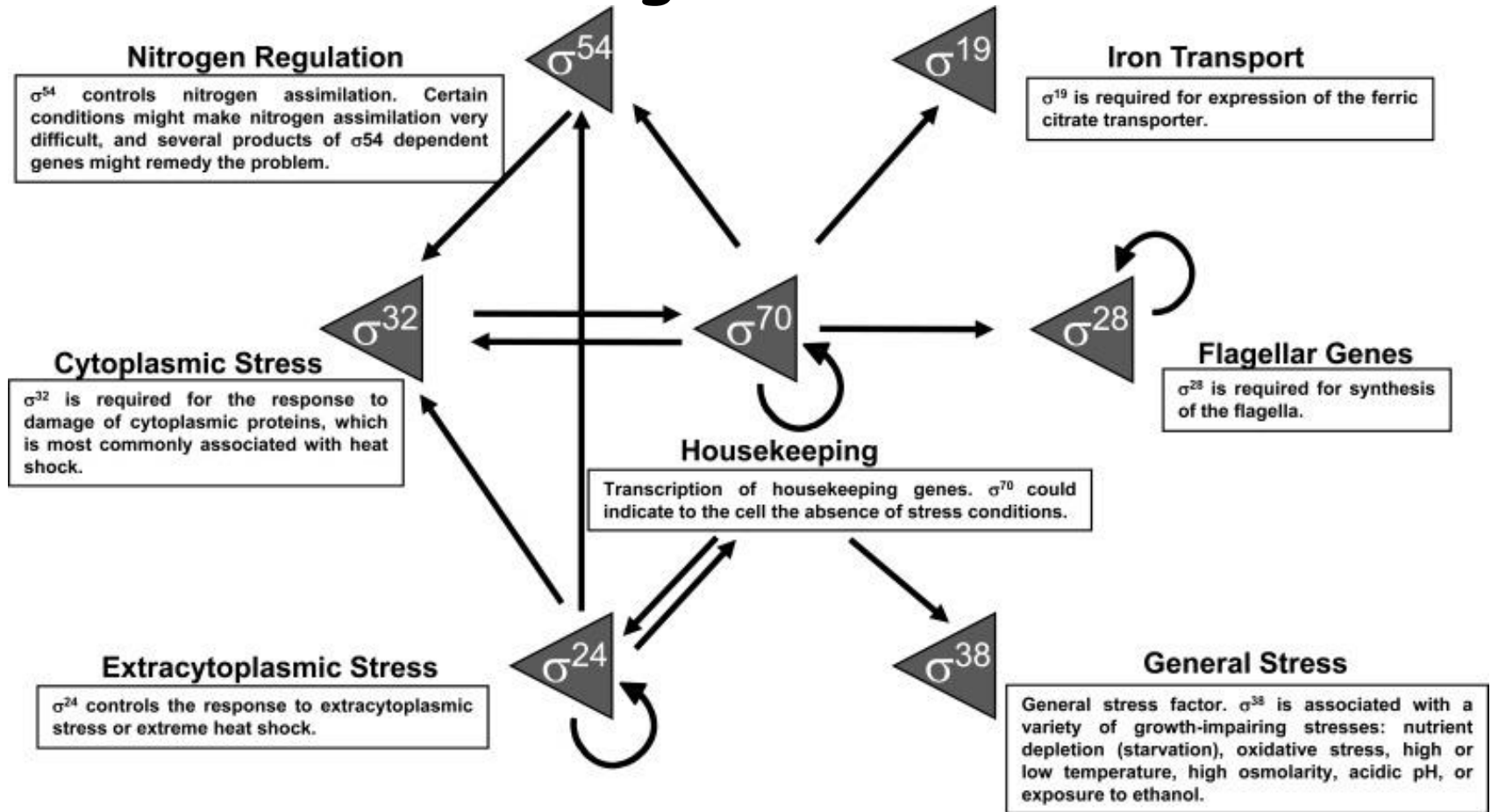
- Ligadas a promotores de mRNA (~23%)
- Ligadas ao DNA, mas pausadas ou em movimento muito lento durante a transcrição (30%),
- Ligadas não especificamente ao DNA e holoenzimas livres prontas para se ligar ao promotor (2%)
- Enzimas imaturas recém-sintetizada (15%).

Journal of Bacteriology, 2001, Vol. 183, No. 8, p. 2527-2534,

- Que RNAP- σ (s) atuarão em dado momento vai depender de dois parâmetros:
 - das concentrações celulares das subunidades σ , que vão depender das condições ambientais
 - da afinidade de ligação de cada σ pelo cerne da enzima RNAP

Concorrência entre as subunidades σ , para se ligar a uma oferta limitada do cerne da RNAP, é que vai determinar que genes serão expressos em dado momento.

Fatores Sigma de *E. coli*

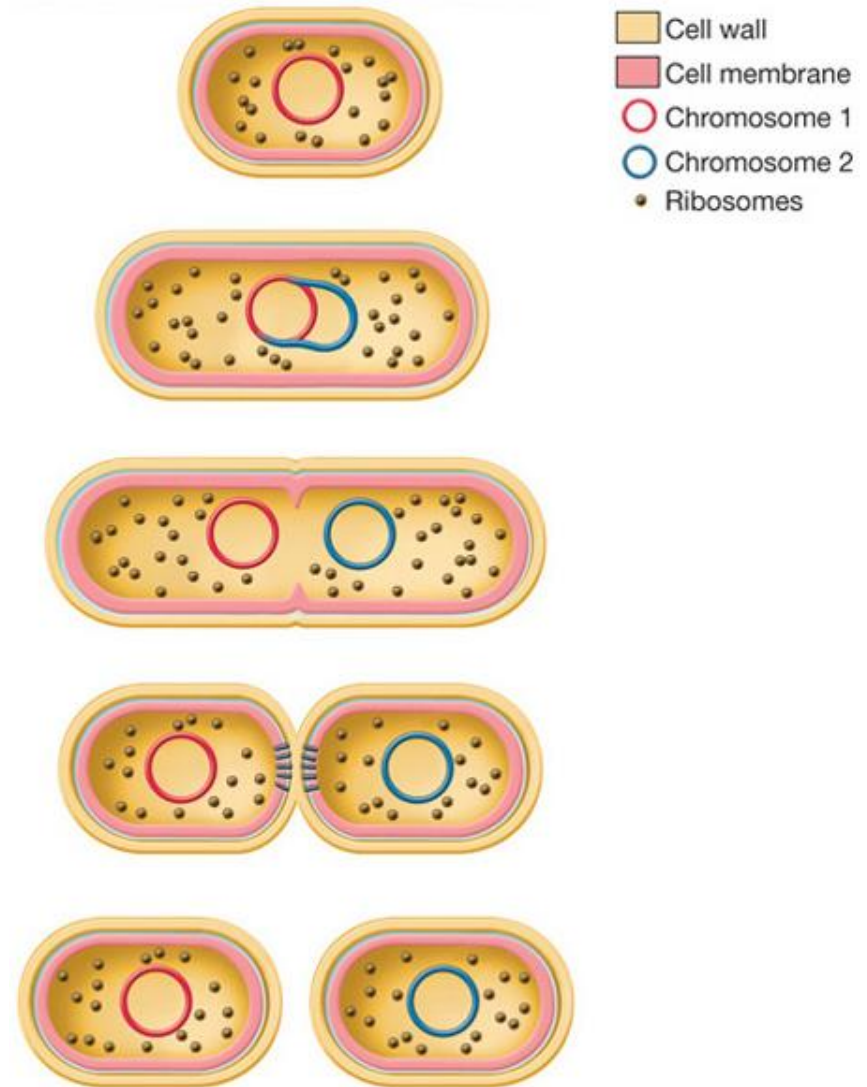


Afinidade de fatores σ pela RNAP de *E. coli*:

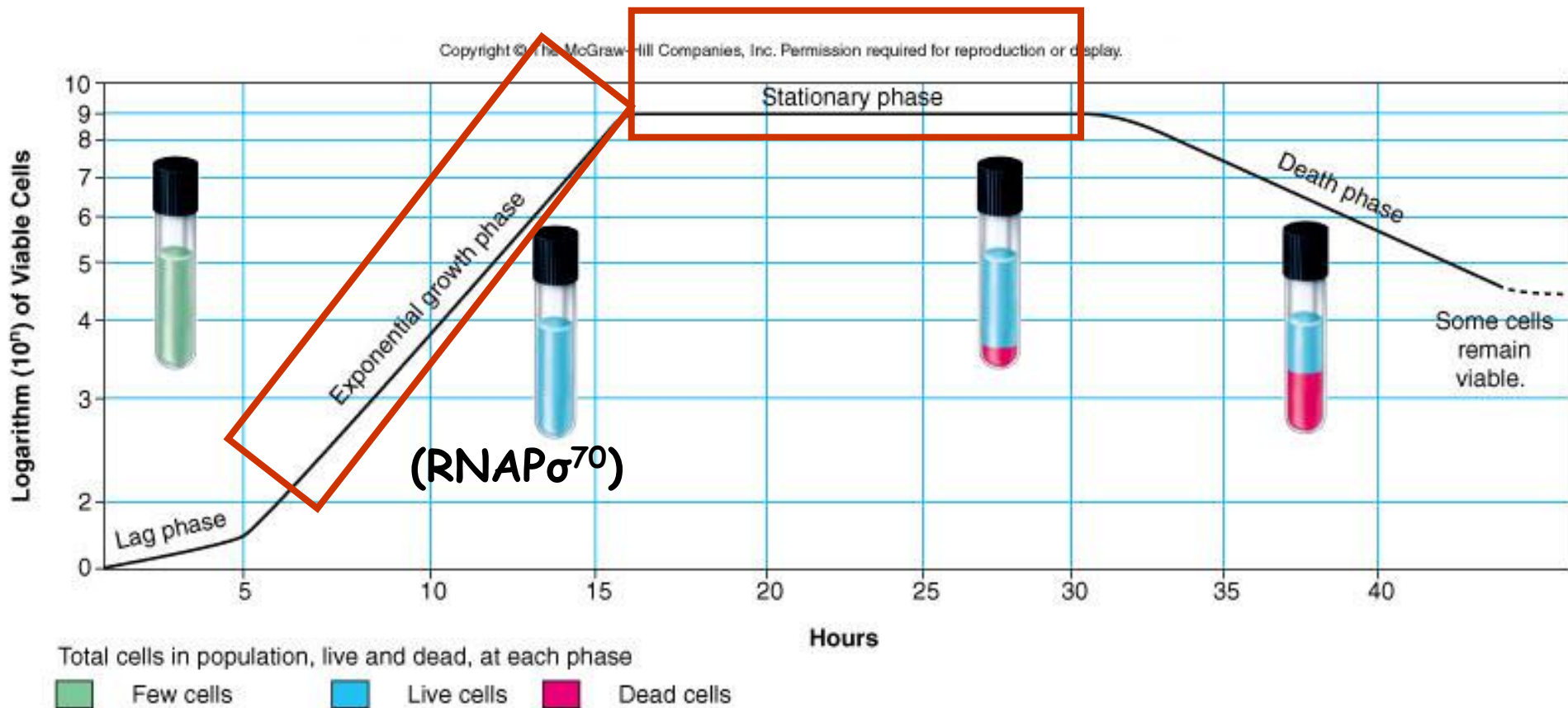
$$\sigma^{70}/D > \sigma^{54}/N > \sigma^{28}/F > \sigma^{24}/E / \sigma^{19}/FecI > \sigma^{32}/H > \sigma^{38}/S$$

Crescimento bacteriano

- O crescimento bacteriano: aumento no número de células, que ocorre com a divisão celular.
- A maioria das células bacterianas se tornam maiores e se dividem por fissão binária.



Acompanhando o crescimento bacteriano com o tempo: Cinética do crescimento bacteriano em sistema fechado

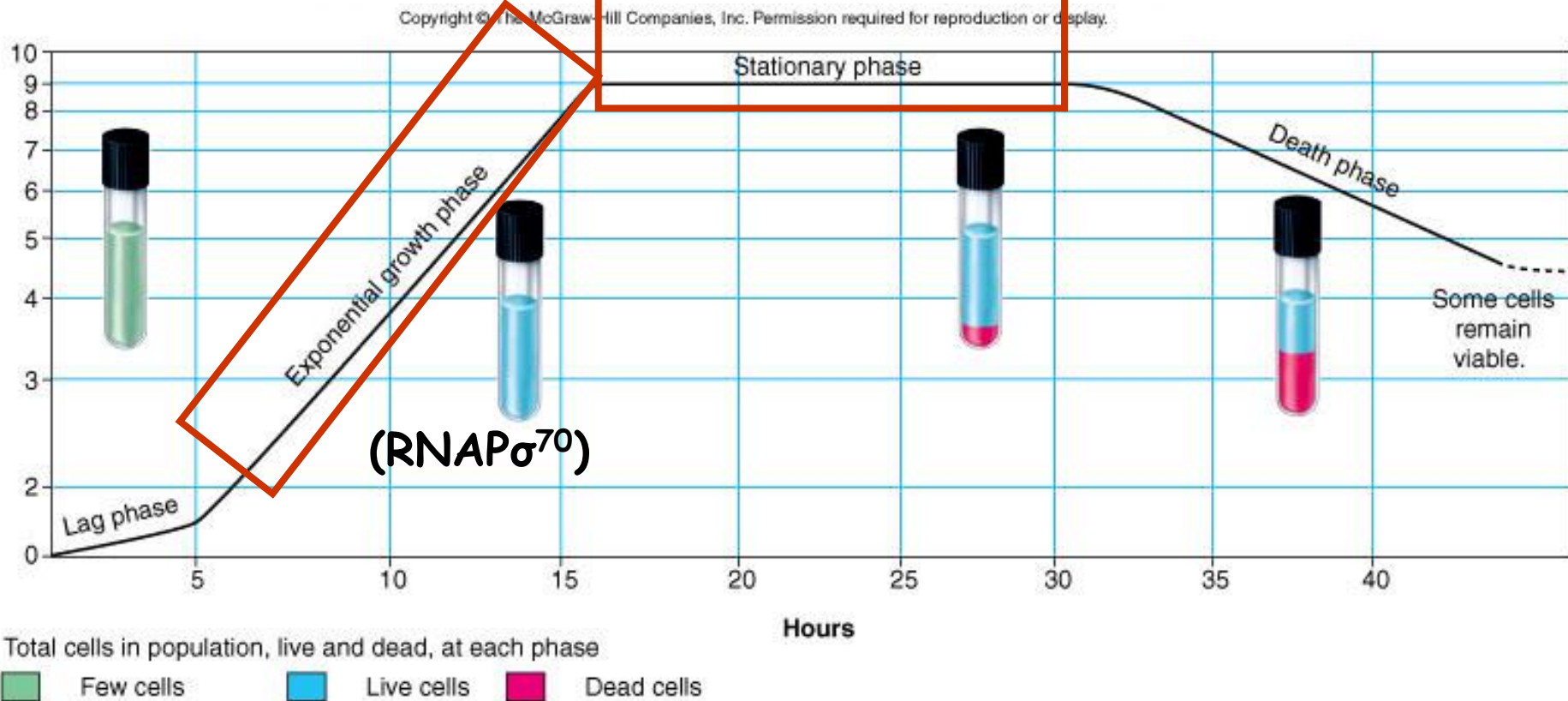


➤ Durante o **crescimento exponencial** de *Escherichia coli*:

- A maioria da atividade de transcrição é realizada pela **RNAP- σ^{70}** , devido maior concentração intracelular de σ^{70} e maior afinidade para pelo cerne da RNAP.
- Além do $\sigma^{70/D}$ (~60-90% of the total pool of sigma factors nesta fase), $\sigma^{54/N}$ e $\sigma^{28/F}$ também são encontrados nesta fase.
- A concentração intracelular de $\sigma^{70/D}$, $\sigma^{54/N}$ e $\sigma^{28/F}$ é constante nas fases exponencial e estacionária de células de *E. coli*
- Afinidade de fatores σ pela RNAP de *E. coli*:
 $\sigma^{70/D} > \sigma^{54/N} > \sigma^{28/F} > \sigma^{24/E} / \sigma^{19/FecI} > \sigma^{32/H} > \sigma^{38/S}$

Acompanhando o crescimento bacteriano com o tempo: Cinética do crescimento bacteriano em sistema fechado

RNAP $\sigma^{38/S}$



Durante a **fase estacionária** do crescimento de *Escherichia coli*:

- A célula bacteriana regula a transcrição de modo a **ativar** a expressão dos genes necessários para a sobrevivência sob estresse e deficiência de nutrientes e para **reduzir** a transcrição de genes "desnecessários".
- *E. coli* usa o fator **$\sigma^{S/38}$** codificada pelo gene *rpoS*, como o principal regulador da transcrição em resposta a várias formas de estresse.
- **$\sigma^{S/38}$** atua especificamente na fase estacionária: na fase exponencial, mesmo que haja transcrição do gene de **$\sigma^{S/38}$** , a tradução de seu mRNA é inibida e qualquer proteína **$\sigma^{S/38}$** que é sintetizada é rapidamente degradada.
- [Acta Naturae](#). 2015; 7(4): 22-33. J. Bacteriology 2014, vol 196, no 18, p. 3279–3288

➤ Regulação do nível do $\sigma^{S/38}$ de **fase estacionária** em *E. coli*

- Na **fase estacionária** a célula precisará de proteínas cujos genes são transcritos pela **RNAP. $\sigma^{S/38}$** , para se adaptar à nova condição.
- Nesta fase o **nível de $\sigma^{S/38}$** na célula **aumenta** para ~ 250-300/célula (~ 30-35% da [σ^{70}]).
- Mas, o nível de σ^{70} permanece constante, porém a frequência de transcrição dos genes sob controle de σ^{70} cai mais que 10 xs.

Jishage M. and Ishihama, A. (1998) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 4953-4958.

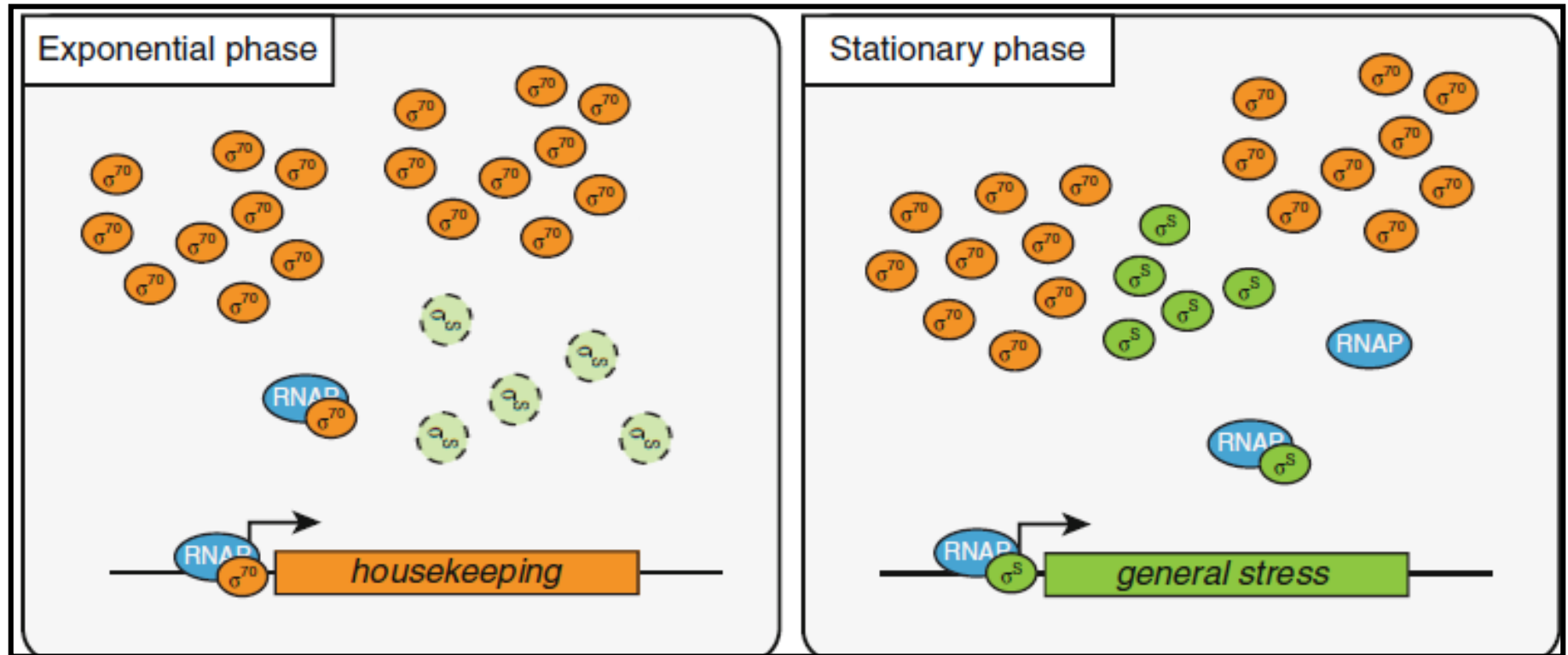
Genes regulados por $\sigma^{S/38}$ em *E. coli*

- O fator RpoS ou $\sigma^{S/38}$ é o principal regulador do resposta ao **estresse geral**- transcreve mais de **~500 genes** que conferem resistência às células na fase estacionária, e a fatores tais como estresse oxidativo, radiação UV, choque térmico, alta osmolaridade, pH ácido, etc.

RNA Biology, 2014, 11:5, 494-507;

Current Genomics, 2013, 14, 378-387

Fase exponencial x estacionaria do crescimento de *E. coli*



- 1- Na fase estacionária o nível de $\sigma^{S/38}$ na célula aumenta para ~ 250-300/célula (~ 30-35% da $[\sigma^{70}]$).
- 2- O nível de σ^{70} permanece o mesmo da fase exponencial, porém a frequência de transcrição dos genes sob controle de σ^{70} cai mais que 10 xs.

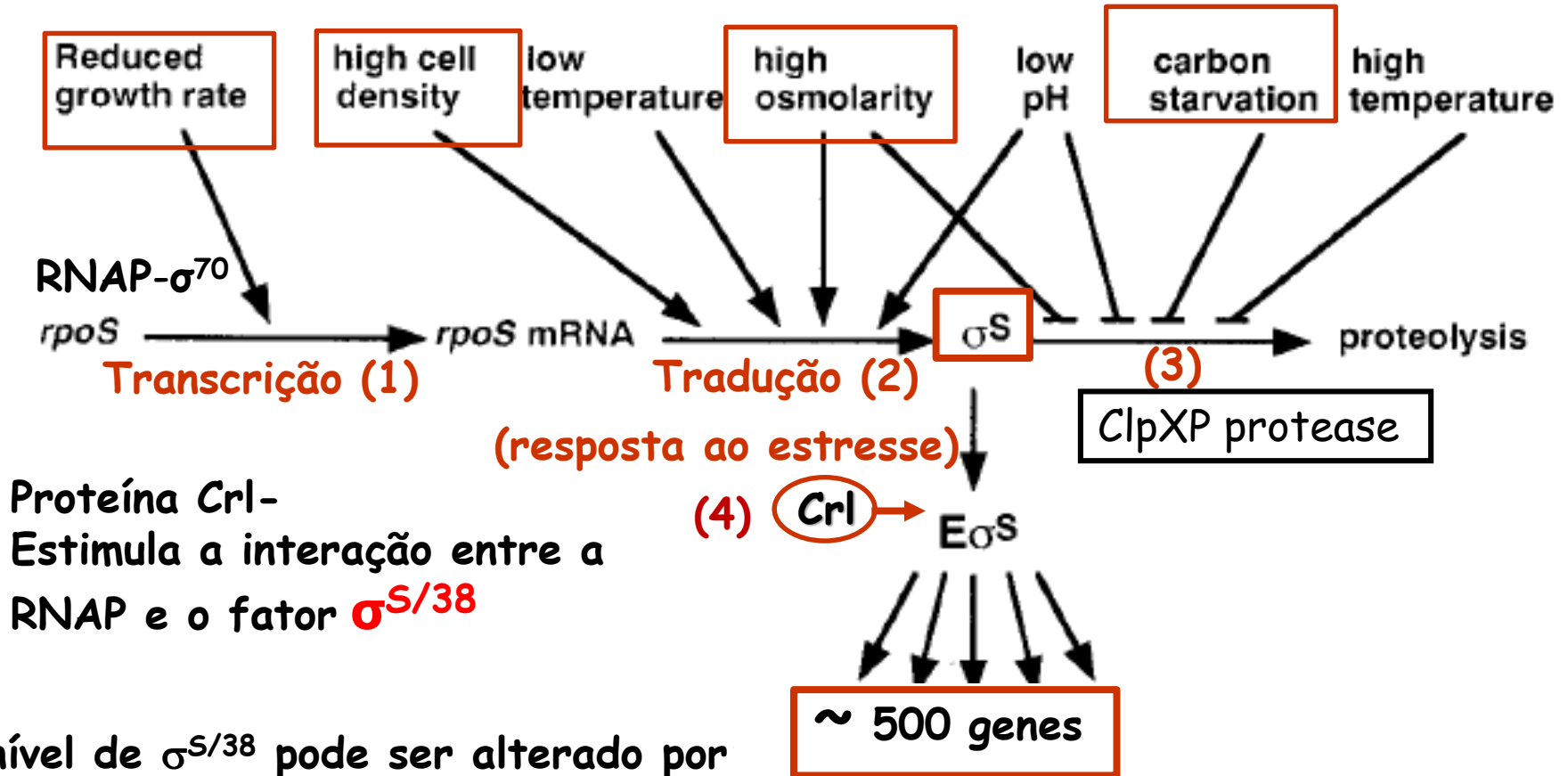
Proteolytic Regulation of Stress Response Pathways in *Escherichia coli*, 2013, Sub-cellular biochemistry 66:105-28; Jishage M. and Ishihama, A. (1998) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 4953-4958.

1- Mecanismos de aumento dos níveis de $\sigma^{S/38}$

- Aumento das taxas de transcrição de *rpoS* e tradução do *rpoS* mRNA,
- Estabilização de seu mRNA e da proteína $\sigma^{S/38}$.
- Ativação de $\sigma^{S/38}$

[Acta Naturae](#). 2015, 7(4): 22-33; [Proteolytic Regulation of Stress Response Pathways in *Escherichia coli*](#) (2013), *Sub-cellular biochemistry* 66:105-28

Acúmulo de $\sigma^{S/38}$ (RpoS) em *E. coli* na fase estacionária:



O nível de $\sigma^{S/38}$ pode ser alterado por

- aumento da taxa de transcrição de $rpoS$ pela RNAP- σ^{70} (1)
- aumento da taxa de tradução do $rpoS$ mRNA (2)
- inibição da degradação de $\sigma^{S/38}$ por ClpXP (3); ativação de $\sigma^{S/38}$ por Crl (4)

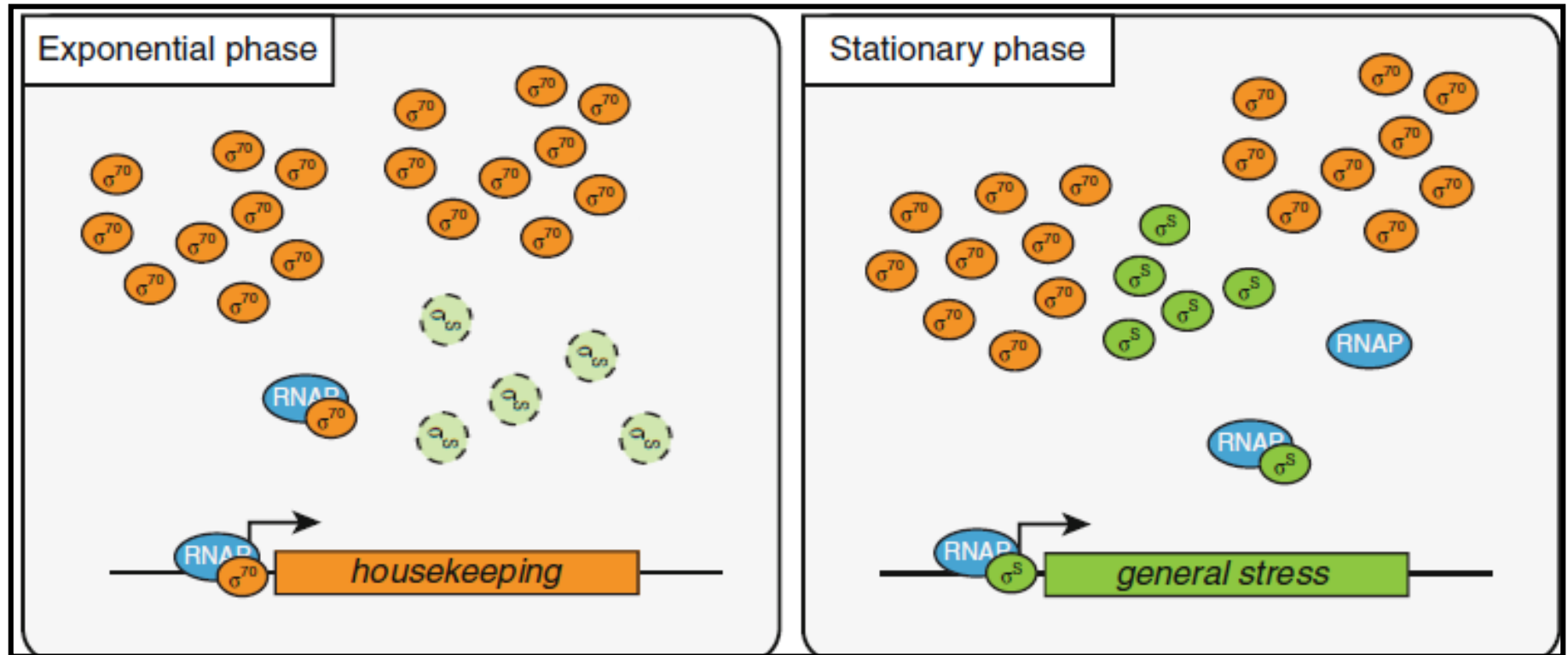
Ativação do $\sigma^{S/38}$ pela proteína Crl (pós-tradução)

- $\sigma^{S/38}$ /RpoS tem a menor afinidade para o cerne da polimerase dentre todos os fatores σ de *E. coli*.
- A interação de $\sigma^{S/38}$ com a proteína ativadora Crl, ajuda superar essa falta de afinidade, por estimular a interação entre $\sigma^{S/38}$ e o cerne da RNAP (mecanismo?)
- Assim, Crl desempenha um papel importante na regulação da expressão dos genes controlados por $\sigma^{S/38}$.

Gaal T, Mandel MJ, Silhavy TJ, Gourse RL (2006) Crl facilitates RNA polymerase holoenzyme formation. *J Bacteriol* 188 (22):7966-7970.

Banta, Amy B. et al. "Structure of the RNA Polymerase Assembly Factor Crl and Identification of Its Interaction Surface with Sigma S." *Journal of Bacteriology* 196.18 (2014): 3279-3288.

Fase exponencial x estacionaria do crescimento de *E. coli*



1 - Na fase estacionária o nível de $\sigma^{S/38}$ na célula aumenta para ~ 250-300/célula (~ 30-35% da $[\sigma^{70}]$).

2 - O nível de σ^{70} permanece o mesmo da fase exponencial, porém a frequência de transcrição dos genes sob controle de σ^{70} cai mais que 10 xs.

Proteolytic Regulation of Stress Response Pathways in *Escherichia coli*, 2013, Sub-cellular biochemistry 66:105-28; Jishage M. and Ishihama, A. (1998) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 4953-4958.

2- Mecanismos que contribuem para a redução da transcrição por RNAP- σ^{70} e aumento pela RNAP- $\sigma^{S/38}$ na fase estacionária

- **Interação de fatores Sigma com anti- σ**
- **Interação da RNAP- σ^{70} com moléculas que favorecem a transcrição pela RNAP- $\sigma^{S/38}$**

Interação com fatores anti- σ

Fatores anti- σ : interação reversível

- A atividade de fatores σ pode ser afetada por interação com "fatores anti- σ " - proteínas que se ligam a um σ de forma específica, bloqueando sua interação com a RNAP.
- Isto evita a transcrição de genes cujos produtos não são importantes naquela condição.
- É um processo reversível.

Fatores anti- σ afetam o início da transcrição

- Fatores anti- σ descritos em *E. coli*:
 - Anti- $\sigma^{70/D}$, anti- $\sigma^{24/E}$, anti- $\sigma^{28/F}$, anti- $\sigma^{38/S}$,
anti- $\sigma^{32/H}$, anti- $\sigma^{19/FecI}$, [anti- $\sigma^{54/N}$????]

Fatores anti- σ e σ correspondentes em várias espécies bacterianas

TABLE 1 List of anti-sigma factors and their cognate sigma factors

Organism	Sigma factors	Anti- σ factors	Size(aa)	Function
Bacteriophage T4	<i>E. coli</i> σ^{70}	AsiA	90	Housekeeping
<i>Bacillus subtilis</i>	σ^F	SpollAB	147	Sporulation
	σ^G	SpollAB	147	Sporulation
	σ^B	RsbW	160	Stress response
	σ^D	FlgM	97	Flagellar biosynthesis
<i>Salmonella typhimurium</i>	σ^{28}	FlgM	97	Flagellar biosynthesis
Eubacteria	σ^{32}	DnaK	638	Heat shock
<i>Streptomyces coelicolor</i>	σ^{WhiG}	?		Sporulation
ECF subfamily				
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	σ^{CnrH}	Orf1	192	Co/Ni resistance
<i>Azotobacter vinelandii</i>	σ^{AlgU}	MucA	194	Alginate biosynthesis
<i>Bacillus subtilis</i>	σ^{SigX}	?		
	σ^{SigV}	Anti-SigV	285	
	σ^{SigZ}	?		
<i>Erwinia amylovora</i>	σ^{22}	?		Virulence factors/ Hypersensitivity
<i>Escherichia coli</i>	σ^E	RseA/MclA	208	Extreme temperature survival
	σ^{FecI}	FecR	317	FelII-Citrate transport
<i>Haemophilus influenzae</i>	σ^E	RseA/MclA	195	
<i>Myxococcus xanthus</i>	σ^{CarQ}	CarR	221	Carotenoid biosynthesis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	σ^E	?		
<i>Mycobacterium leprae</i>	σ^E	?		
<i>Salmonella typhimurium</i>	σ^E	?		
<i>Streptomyces coelicolor</i>	σ^E	?		Agarase synthesis
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	σ^E	?		
<i>Synechocystis</i> sp.	σ^E	?		
<i>Photobacterium</i> SS9	σ^E	Orf2	232	High pressure survival
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\sigma^{22(AlgT/AlgU)}$	MucA	194	Alginate biosynthesis
	σ^{PvdS}	?		Pyoverdine biosynthesis
<i>Pseudomonas putida</i>	σ^{PupI}	PupR	316	Pseudobactin transport
<i>Pseudomonas syringae</i>	σ^{HrpL}	?		Virulence factors/ Hypersensitivity
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	σ^E	ChrR	213	Cytochrome c_2 expression

Exemplo:

- **Rsd** (Regulator of sigma D'ou σ^{70}) de *E. coli* é um fator anti- σ^{70} . Na fase estacionária, há um aumento na quantidade de fator Rsd/célula e ele se liga região 4 de σ^{70} , que é responsável pelo reconhecimento do promotor -35, bloqueando a associação com o núcleo da RNAP.
- Assim, na fase estacionária parte do σ^{70} é estocado inativo em complexo com a Rsd, favorecendo a interação do cerne da RNAP com outros fatores σ (especialmente σ^{38}).

2- Mecanismos que contribuem para a redução da transcrição por RNAP- σ^{70} e aumento pela RNAP- $\sigma^{S/38}$ na fase estacionária

- Interação de fatores Sigma com anti- σ
- Interação da RNAP- σ^{70} com moléculas que favorecem a transcrição pela RNAP- $\sigma^{S/38}$

(I)- Interação com (p)ppGpp [ppGpp ou pppGpp] (Alarmonas)

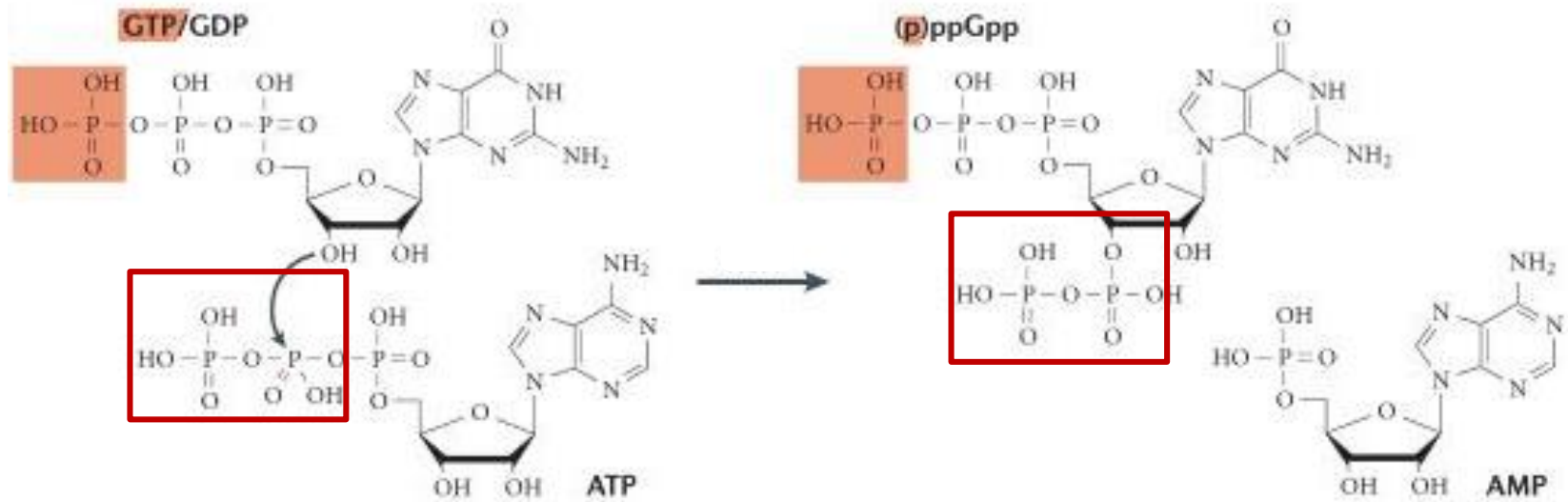
A resposta "estringente": modulação da expressão gênica durante estresses nutricionais e redução do crescimento celular pelas alarmonas

I- Resposta estrigente (severa, estrita)

- Em muitas espécies bacterianas a transcrição por RNAP. σ^{70} na fase estacionária é regulada por pequenas moléculas, "alarmonas":
 - guanosina penta/tetrafosfato ou (p)ppGpp interage com a holoenzima RNAP. σ^{70} e controla a transcrição gênica.
- (p)ppGpp acumula durante limitação de nutrientes (fase estacionária da cultura)/situação de estresse e atua na adaptação à estas condições.

"Resposta estrigente"

- Síntese de pppGpp via RelA: Na deficiência de amino ácidos, um tRNA não carregado se liga no sítio A do ribossoma. Isto induz a ligação da proteína RelA ao ribossoma e a síntese de (p)ppGpp a partir do ATP + GDP/GTP.
- Síntese de pppGpp via SpoT- em condição de estresse ou deficiência de nutrientes (C).
- SpoT também hidrolisa o (p)pGpp.

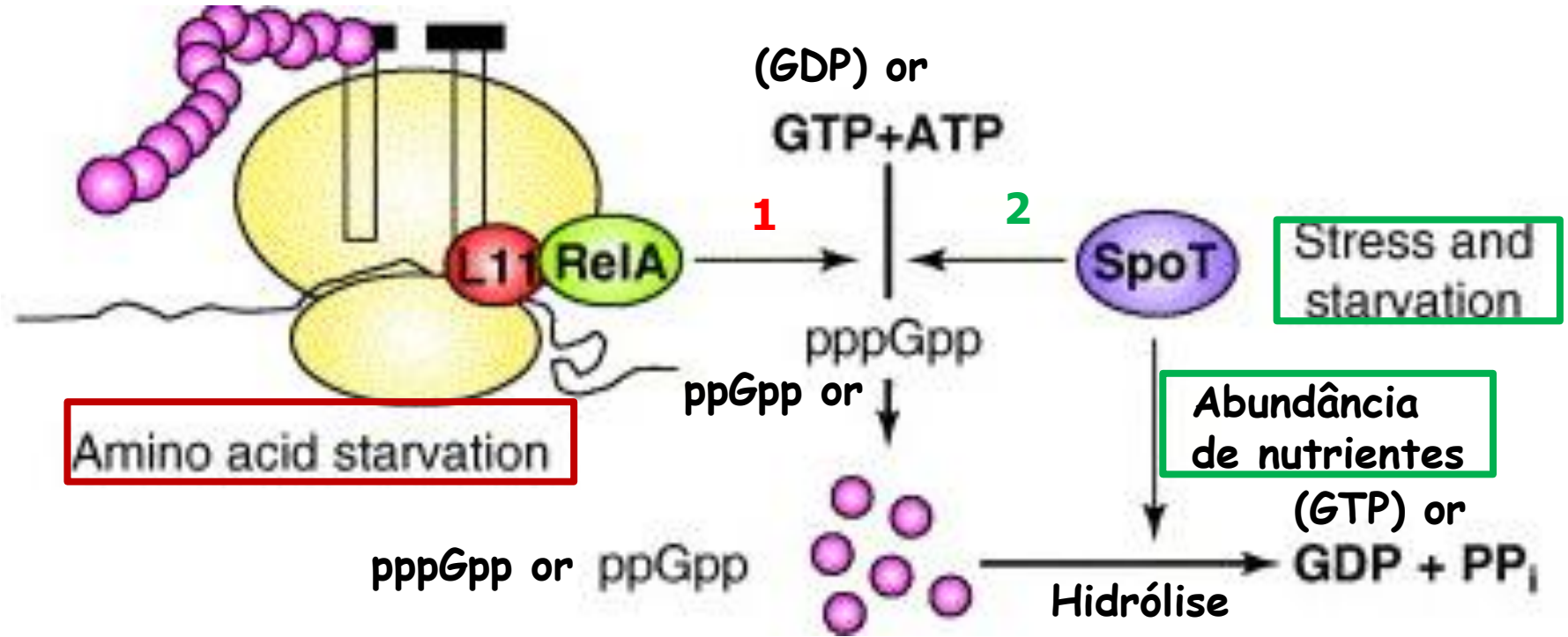


Reação catalisada pela RelA/SpoT em *E. coli*:



RelA/SpoT convertem GDP/GTP e ATP em ppGpp ou pppGpp pela adição de um grupo (PPi) derivado do ATP no carbono 3' carbon da ribose do GDP/GTP, liberando AMP.

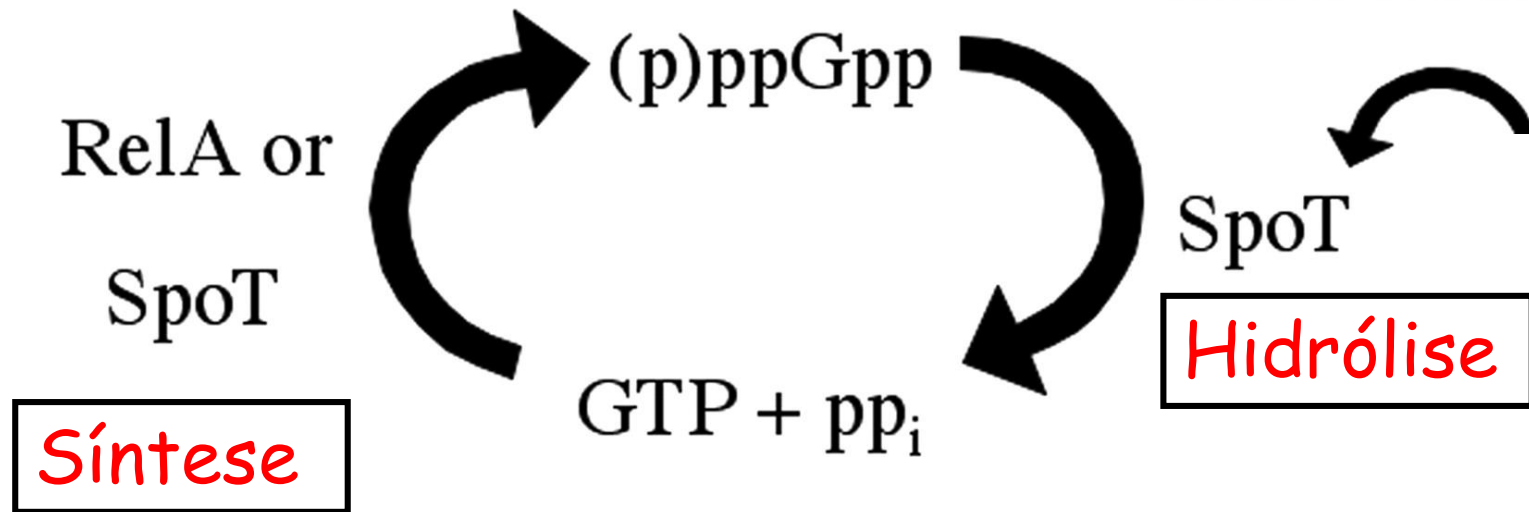
Síntese e hidrólise de (p)ppGpp em *E. coli*



SpoT: é uma enzima bifuncional, responsável por manter os níveis intracelulares de (p)ppGpp via degradação enzimática.

Nutrient Poor

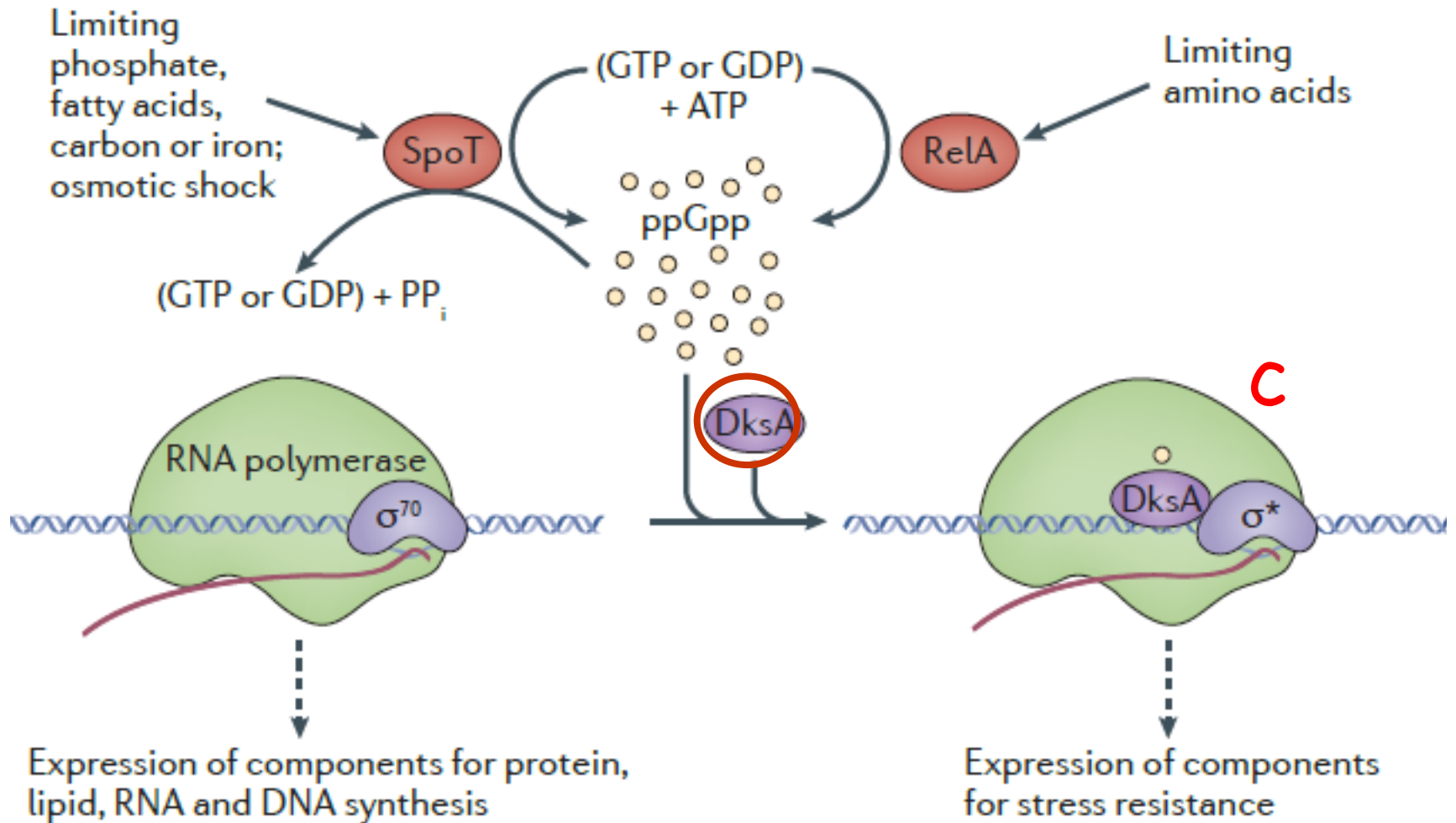
Nutrient Rich



O controle dos níveis celulares das (p)ppGpp é crucial para a viabilidade celular e depende da taxa de síntese e degradação destas moléculas.

Resposta estrigente

- (p) ppGpp afeta a transcrição em larga escala por ligação direta a RNAP. σ^{70} em espécies Gram-negativas (*E. coli*).
- Em geral, (p) ppGpp **reprime** a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na “**tradução**” e de “**fatores necessários para o crescimento e divisão celular**”, e ativa a expressão de genes de “**reposta ao estresse**”
- Porém, o mecanismos de ação não são completamente compreendidos.
- Boutte, C. C., & Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends in Microbiology*, 21(4), 174-180



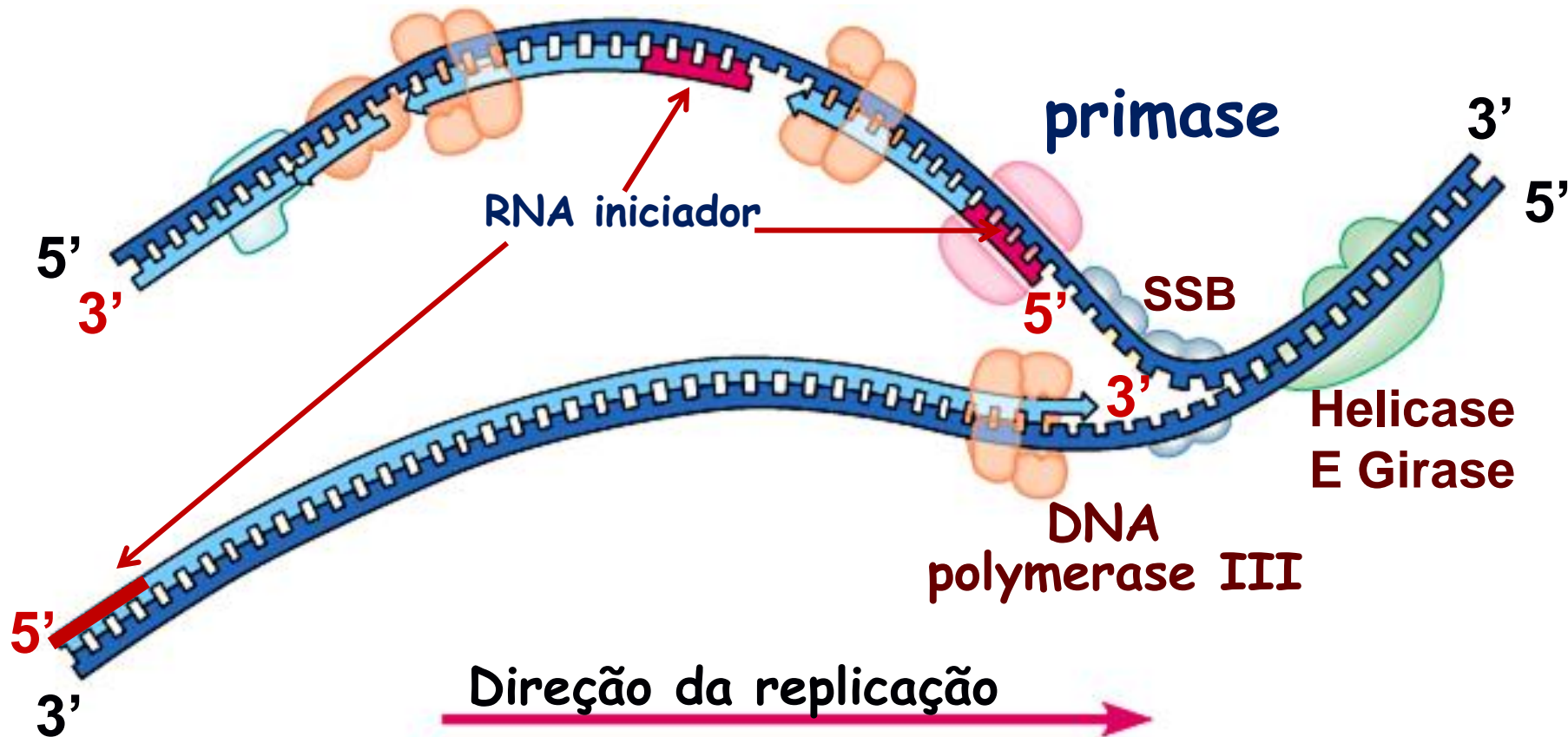
(p)ppGpp exerce grande parte de seus efeitos com ajuda da proteína **DksA**, que também se liga a RNAP. O complexo (**C**) atua positiva ou negativamente na transcrição, dependendo das propriedades de cada promotor.

Resposta estrigente

- Além da transcrição, em *E. coli*, (p) ppGpp também pode afetar diretamente a replicação cromossômica- inibição da “**primase**”, um componente essencial da maquinaria de replicação.
- Plasmid 63 (2010) 61-67

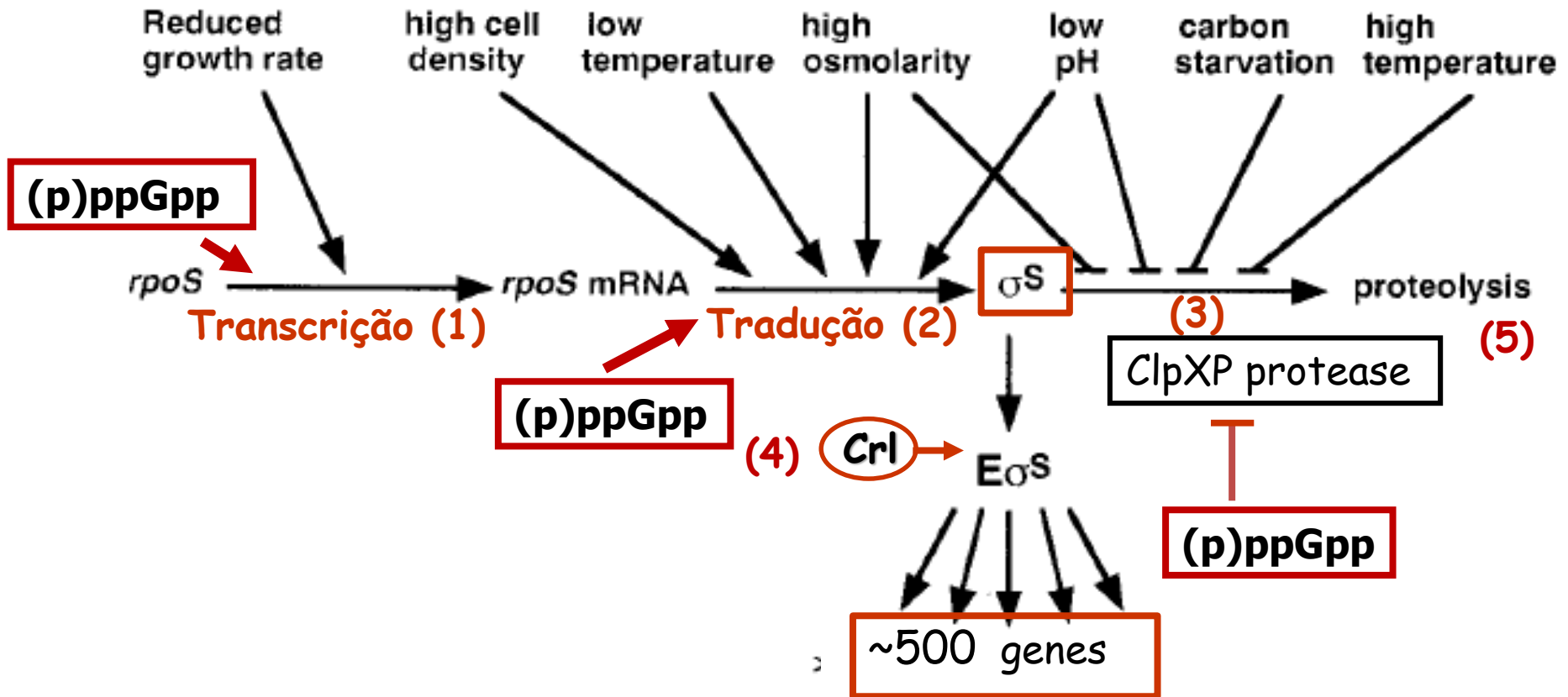
Forquilha de replicação

Alongamento pela DNA polimerase III (*E. coli*)



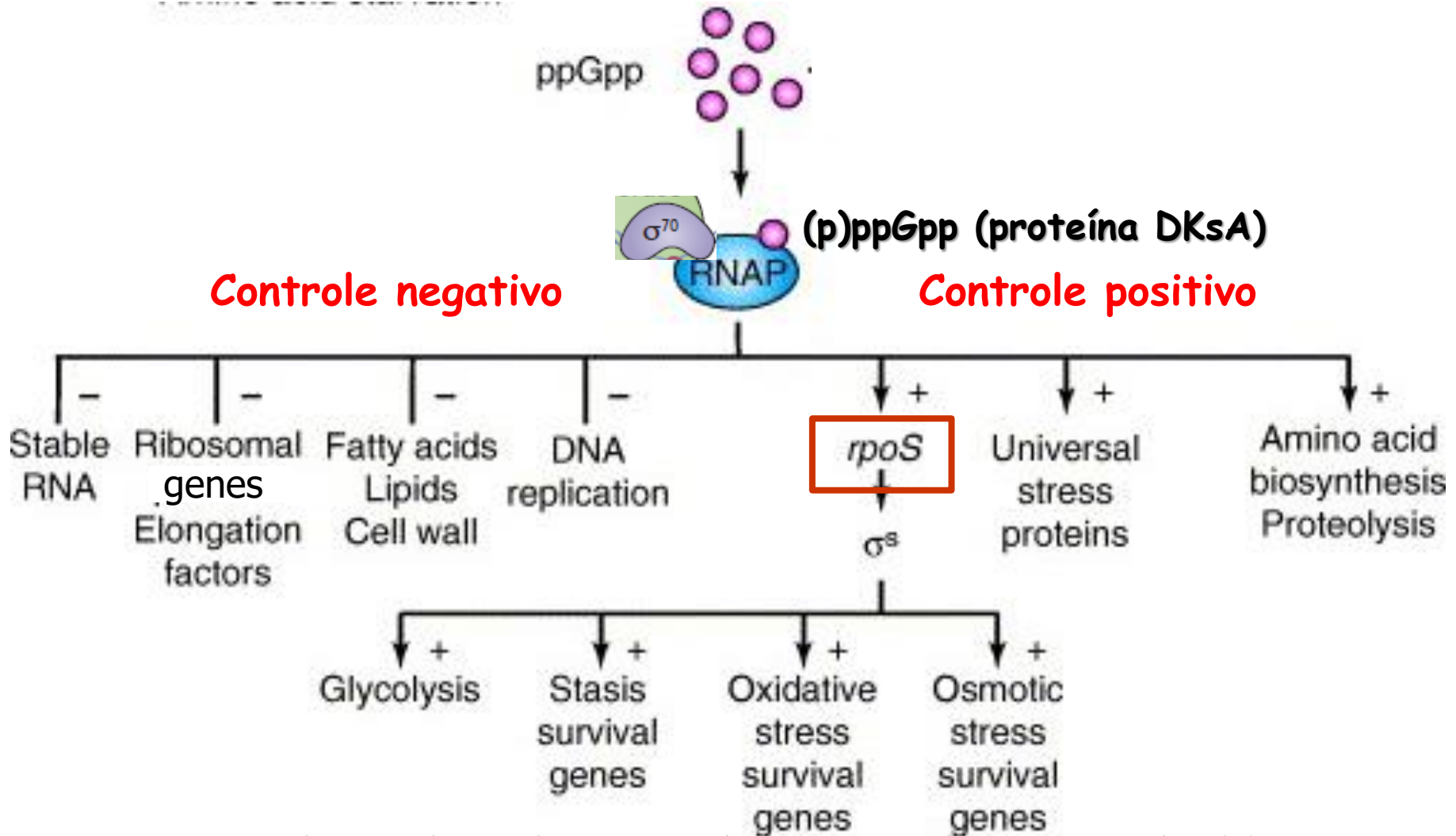
SSB = single-stranded binding proteins

Síntese de $\sigma^{S/38}$ em *E. coli* na fase estacionária



(p)ppGpp aumenta as taxas de transcrição de *rpoS* e tradução do mRNA do *rpoS*, inibe a degradação do RpoS e também estimula a atividade do RpoS.

Resposta estrigente em *E. coli*



"Protein DksA also binds to the RNA polymerase and augments the (p)ppGpp regulation of the transcription initiation at certain σ^{70} -dependent promoters, functioning both as negative and positive regulators".

Resposta estrigente: reprogramação da transcrição gênica

- É induzida pelo acúmulo da alarmona (p)ppGpp, que modula a transcrição (afeta também a replicação do DNA e tradução) de $\sim 1/3$ dos genes de *E. coli*.
- A célula **para de crescer e se dividir**, liberando energia para **síntese de amino ácidos e degradação de proteínas**, para produzir outras proteínas, necessárias à sobrevivência, até que as condições nutricionais melhorem.

(p)ppGpp é uma molécula pequena que controla vários eventos na vida de bactérias para permitir a sobrevivência sob condições desfavoráveis.

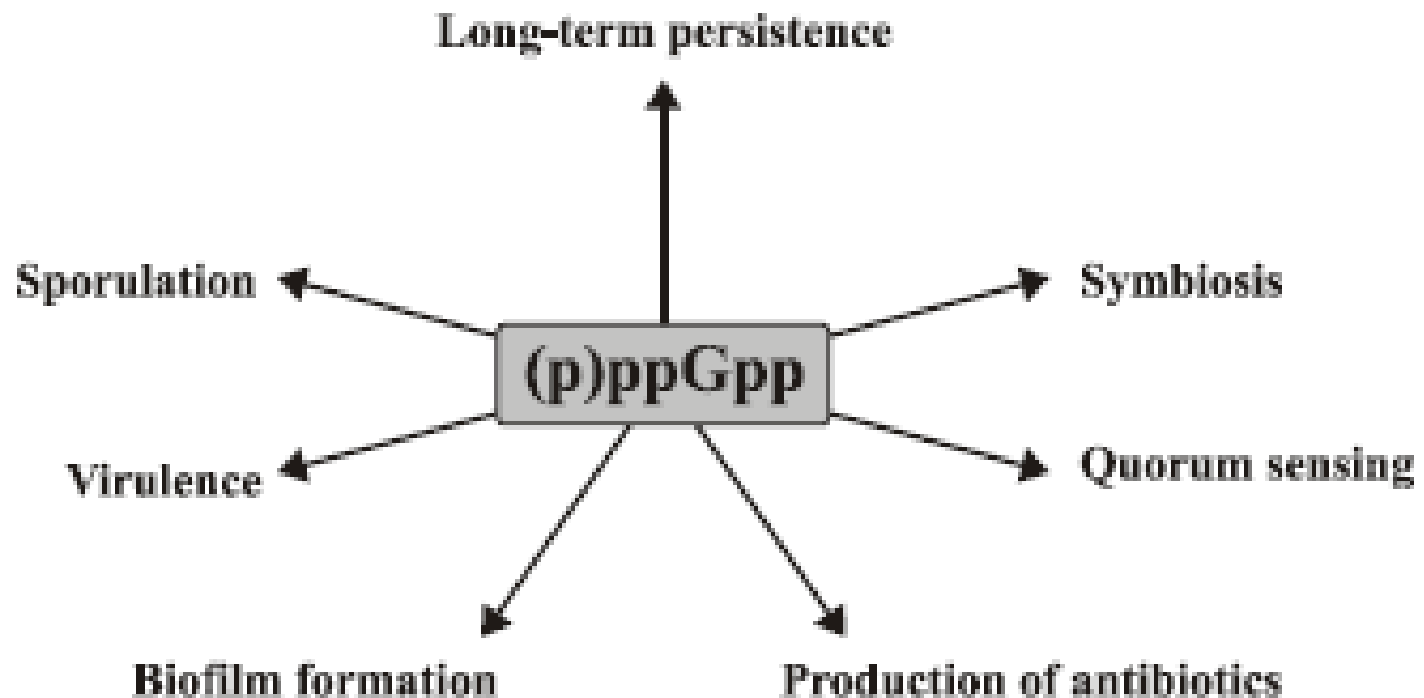
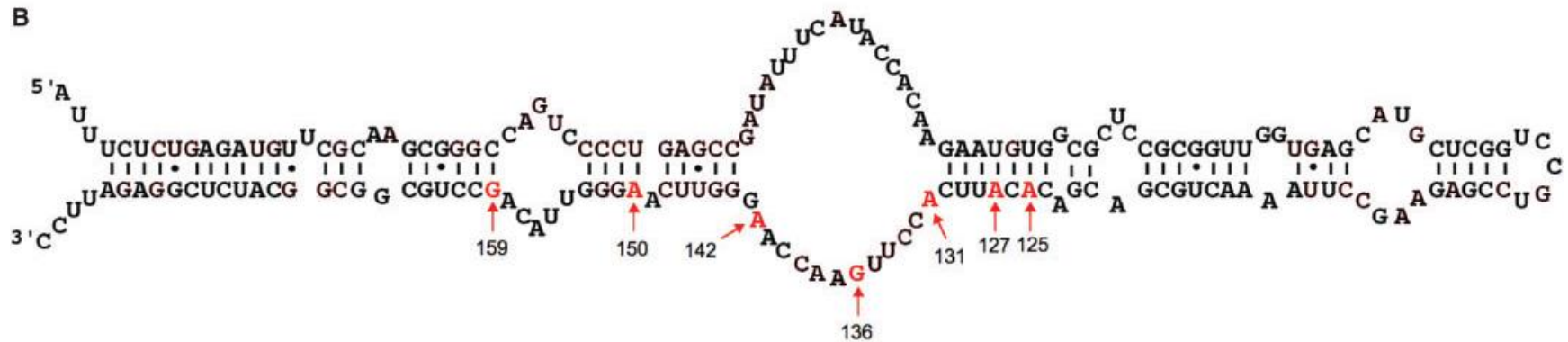


Fig. 4. Diagram depicting the various physiological aspects in bacteria affected by (p)ppGpp.

(II)- Interação com o RNA 6S: altera a interação do σ^{70} -RNAP com certos promotores em *E. coli*

6S RNA: pequeno RNA regulador da transcrição na fase estacionária de cultura



- O RNA 6S de *E. coli*, tem 184nt, é não codificante, e homólogos já foram encontrados em outras espécies bacterianas.
- As sequências primárias destes RNAs homólogos não é bem conservada, porém formam estruturas secundárias conservadas.
- Estrutura secundária: A molécula se dobra na forma de "grampo de cabelo" contendo uma grande "bolha" de RNA fita simples.
- * As posições dos nucleotídeo de 6S RNA que entram em contato com a σ^{70} -RNAP são indicadas com setas.

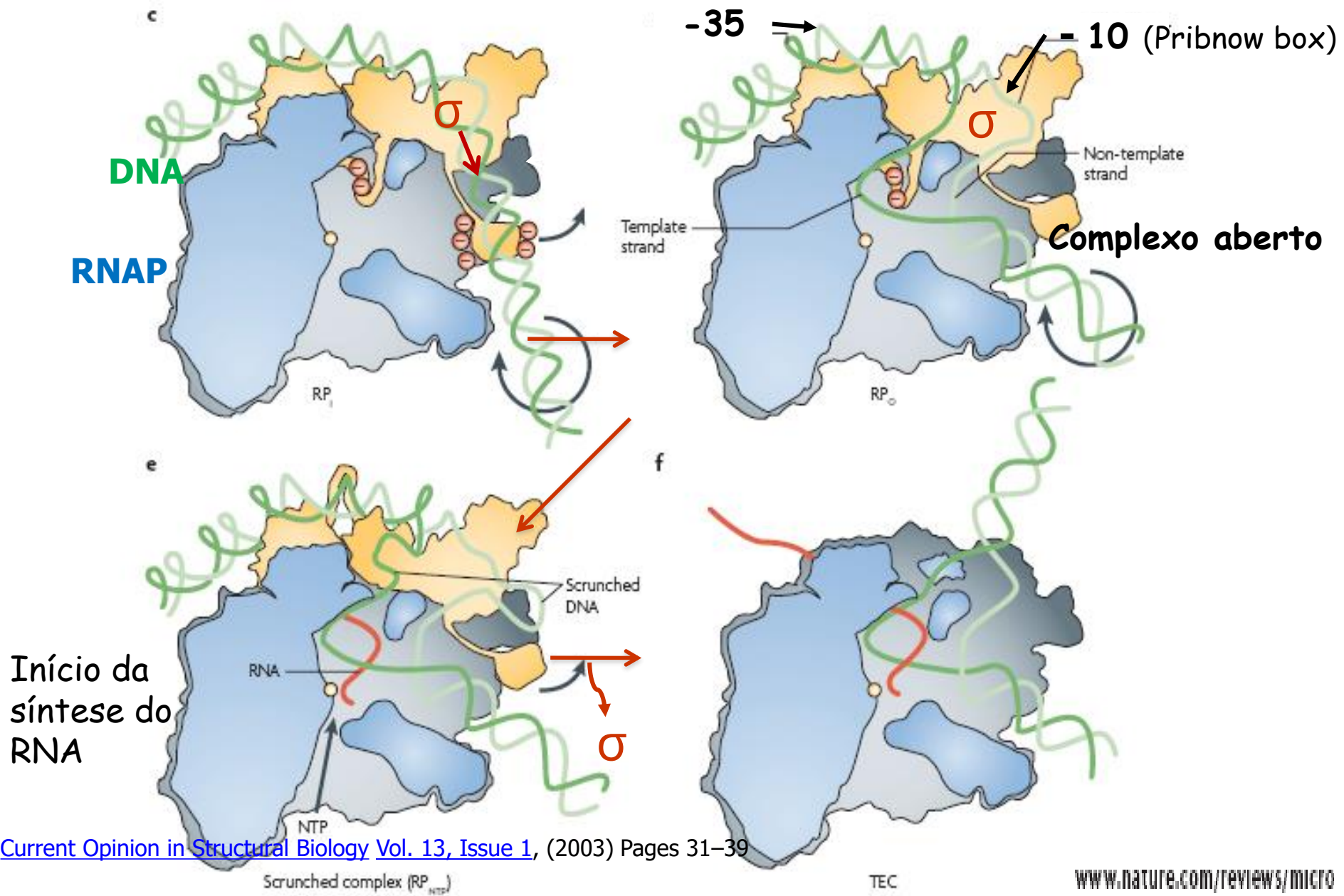
- O RNA 6S acumula na **fase estacionária** (~10,000/célula) e se liga especificamente a **75%** das σ^{70} -RNAP (na região 4 da σ^{70} e β/β' da RNAP), para formar o complexo σ^{70} -RNAP-6SRNA, que é a “principal forma da holoenzima na fase estacionária tardia”.

Como a σ^{70} -RNAP-6SRNA não se liga a promotores de centenas de genes inibindo sua transcrição.

Molecular Microbiology (2008) 67(6), 1242-1256

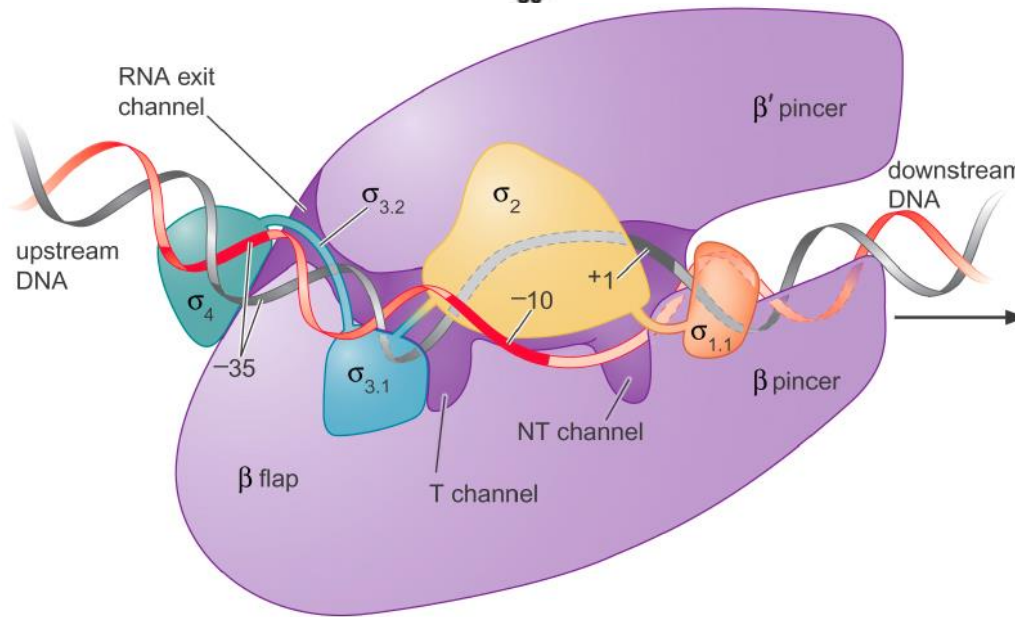
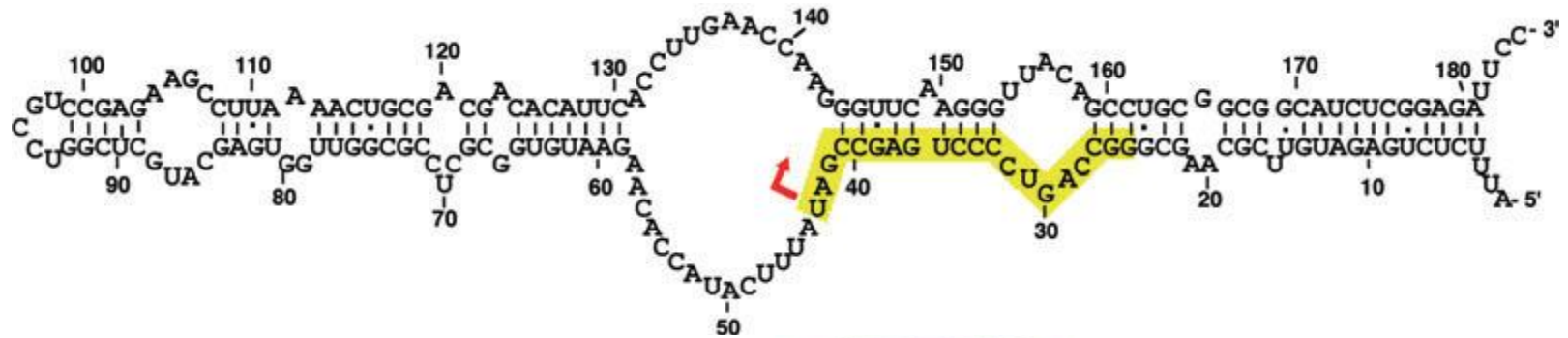
Biochemistry (Moscow), 2015, Vol. 80, No. 11, pp. 1429-1446.

Como o RNA 6S atua? Etapas iniciais da transcrição



Interação do RNA 6S com a RNAP

- A estrutura secundária do RNA 6S tem similaridade com a conformação do DNA no complexo aberto do início da transcrição.
- **O RNA 6S se ligar a σ^{70} -RNAP de modo semelhante ao DNA.**



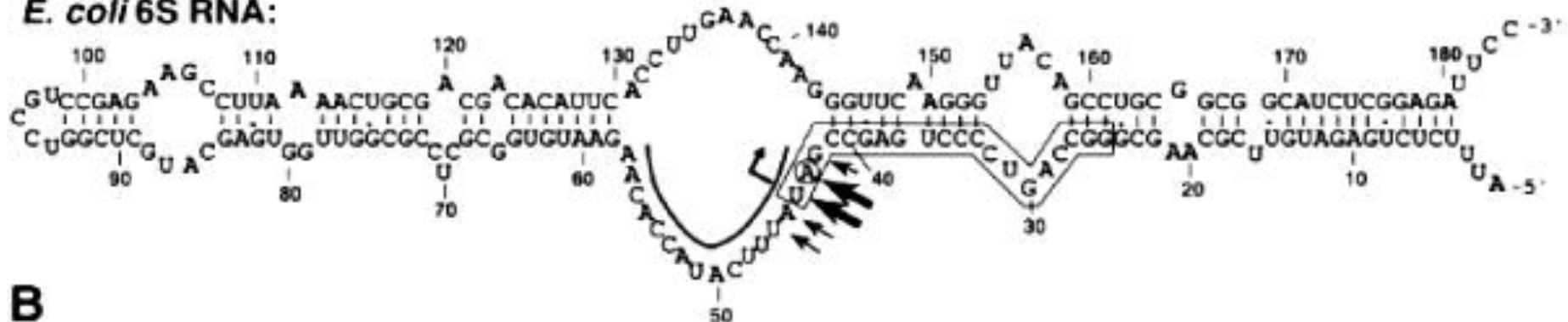
Abertura do DNAds
nas posições

-11 e +3- formação do
complex aberto

Estrutura do RNA 6S de *E. coli* x DNA bacteriano na conformação de complexo aberto durante o início da transcrição

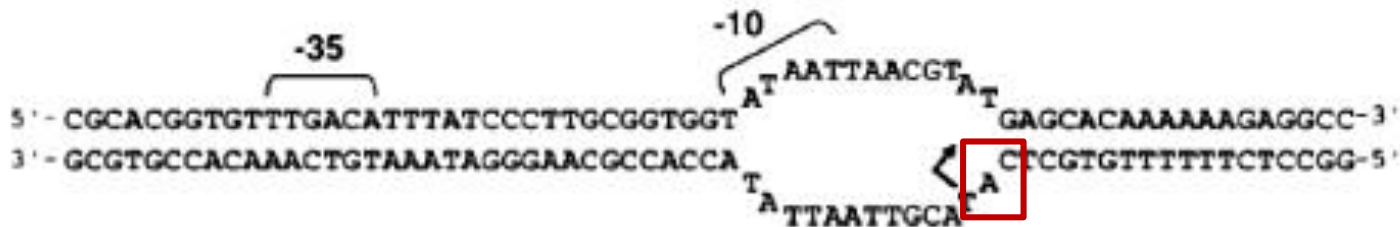
A

***E. coli* 6S RNA:**



B

Promoter DNA in open conformation:

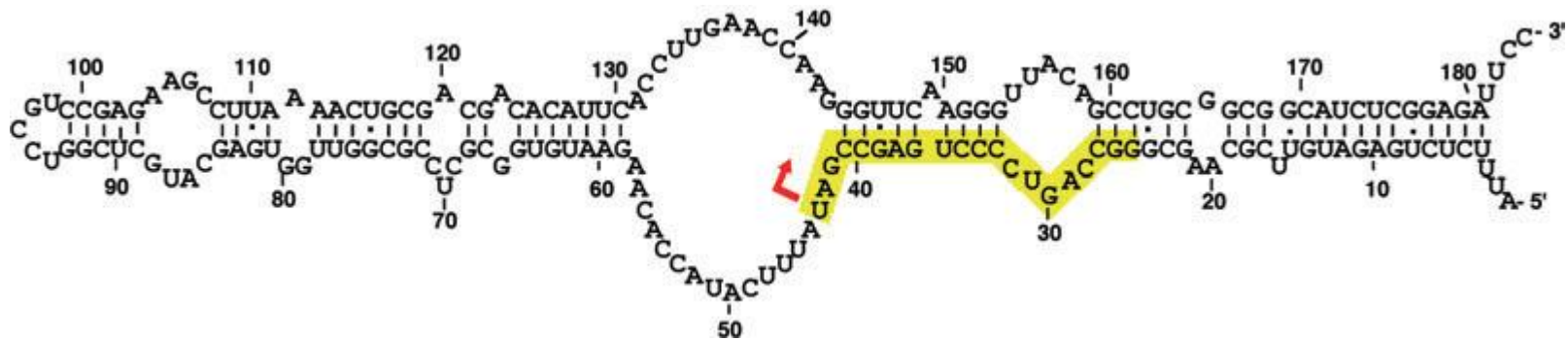


Atuação do RNA 6S

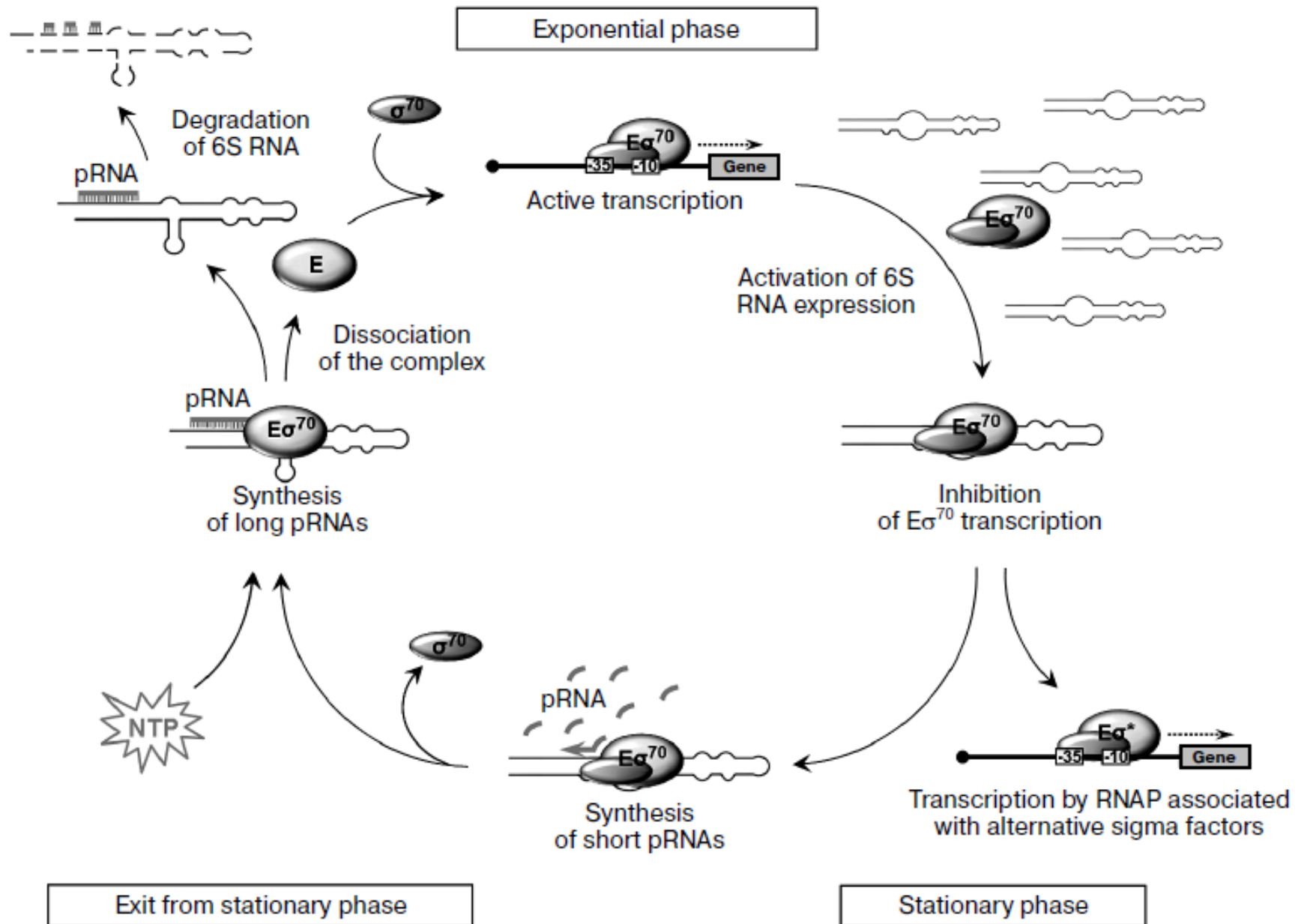
- O RNA 6S não interage com os promotores, mas apenas compete com eles pela RNAP- σ^{70} .
- Portanto, a inibição da transcrição deve depender da força do promotor, ou seja, de sua afinidade pela RNAP- σ^{70} .
- O efeito do RNA 6S é maior sobre promotores que possuem uma sequência a -35 fraca (que interage com na região 4 da σ^{70})
- Nestes casos, o RNA 6S bloqueia a interação entre a σ^{70} -RNAP e estes promotores, causando inibição da transcrição dos genes.
- Isto leva a liberação de nutrientes para síntese de proteínas produtos de genes regulados por RNAP- σ^{38} .

Síntese do pRNA e liberação da RNAP

- No complexo RNA 6S. σ^{70} - RNAP, a bolha de fita simples do 6S RNA fica próxima do sítio ativo da RNAP.
- Esta bolha apresenta uma sequência (amarelo) que pode ser utilizada como molde para síntese de um RNA ("RNA product" ou pRNAs, 14-20 nt), quando o suprimento de nutrientes voltar ao normal, liberando a RNAP.

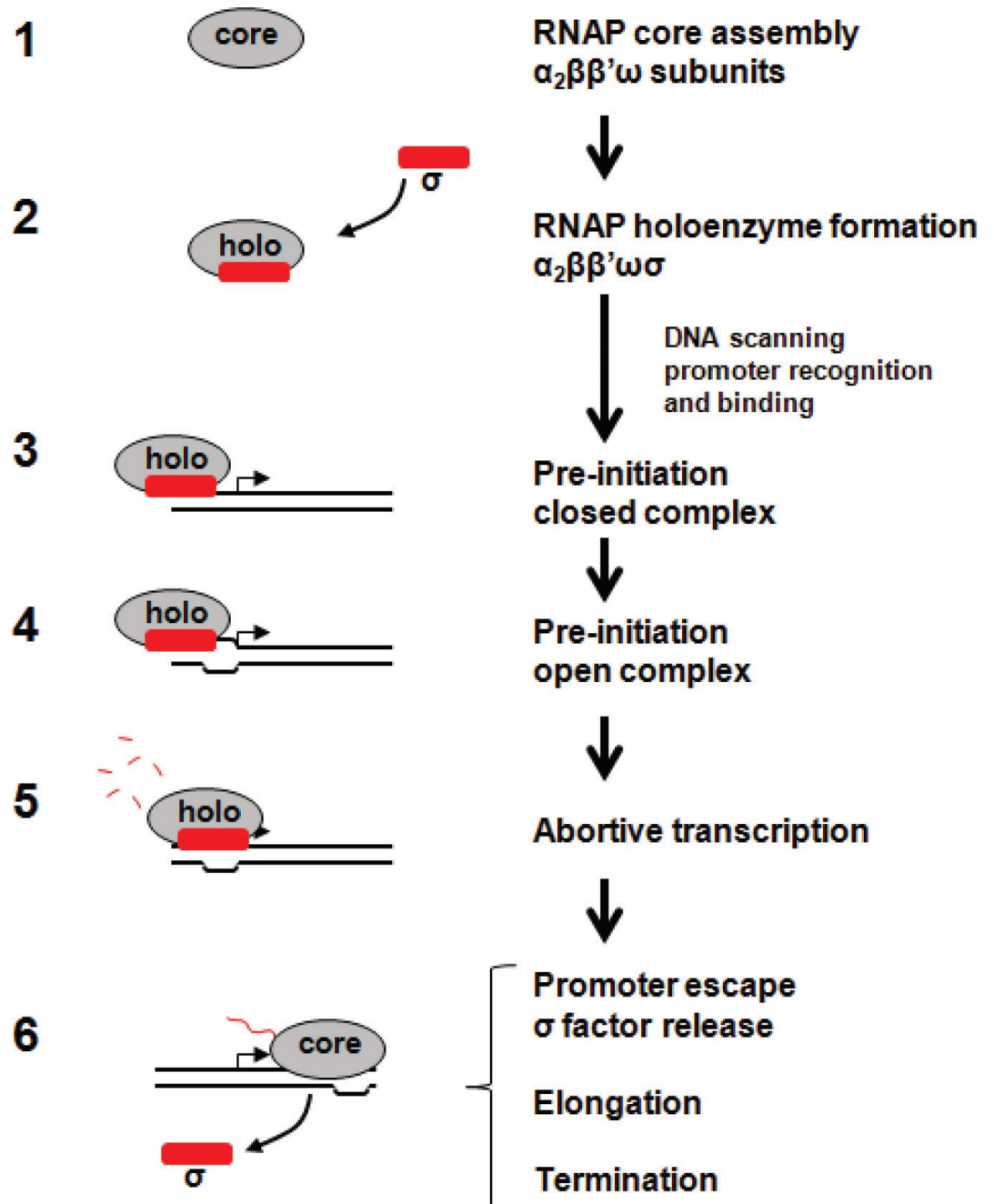


- Na presença de nutrientes: (a) as células entram em crescimento exponencial,
- (b) ocorre a síntese do pRNA, usando o RNA 6S como molde (amarelo)
- (c) ocorre a desestabilização do complexo RNA 6S. σ^{70} - RNAP, com liberação da RNAP e do RNA 6S.pRNA. Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No.



- Hipóteses para a maior eficiência do $\sigma^{S/38}$ na fase estacionária
- Nesta fase, o fator sigma σ^S acumula em *E. coli*, e regula a expressão de 500 genes, devido ao aumento da síntese e estabilidade, além disto:
 - Fator anti- σ^{70} (Rsd) reduz os níveis do σ^{70} livre
 - O (p)ppGpp causa aumento dos níveis celulares de σ^S , facilitando sua ligação a RNAP.
 - σ^{70} -RNAP.6S RNA (75% das σ^{70} -RNAP), reduz a transcrição pela holoenzima e junto (p)ppGpp atua liberando nutrientes para transcrição pela RNAP. $\sigma^{S/38}$.

O processo de transcrição



Fim