

# **Regulação da expressão gênica em procariotos (II )**

**2018**

# Regulação da expressão gênica em procariotos

## (Parte I)

- ✓ Célula bacteriana estrutura e morfologia
- ✓ Habitat e tipo de vida
- ✓ 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  $\sigma$  da RNA polimerase:  $\sigma^{70}$  x  $\sigma^{38/s}$

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

# Regulação da expressão gênica em procariotos

## (Parte II)

- I- Regulação ao nível da transcrição (cont)

Fatores de transcrição: ativadores e repressores e outras moléculas

- II- Regulação da expressão gênica ao nível de tradução (transcrição)
- II- Regulação da expressão gênica ao nível da pós-  
tradução

## Atuação de outros fatores sobre o início da transcrição

O início da transcrição de genes regulados é sujeito ao controle por moléculas que se ligam a RNAP ou ao promotor ou próximo a ele, em resposta a sinais ambientais.

## (a) Fatores de transcrição que interagem diretamente com a RNAP

1 - A ligação de DksA/(p)ppGpp (proteína e alarmona) com a RNAP- $\sigma^{70}$ :

- Afeta a transcrição a partir de certos promotores.

- É um mecanismo para reprogramar o transcriptoma em resposta ao aumento dos níveis de ppGpp, sob deficiência de nutrientes (amino ácidos e carbono).

## **(b) Fatores que interagem diretamente com o promotor**

- O início da transcrição dos genes regulados pode ser controlado por **fatores de transcrição (proteínas)**, que se ligam sequências de bases específicas dos promotores.
- Em resposta às sinais ambientais, estes fatores podem ter sua **conformação alterada, em geral, por interação com pequenas moléculas ou outras proteínas** e então se ligam a promotores, alterando sua a força basal.
- Alguns fatores de transcrição regulam a transcrição de apenas um único promotor, outros podem regular muitos promotores.

# Fatores de transcrição: repressores/ativadores

**Repressores e ativadores** transcrpcionais são proteínas que possuem pelo menos dois domínios:

- 1- **um sensor**, que é alterado por interação a um ligante ou com outra proteína em resposta a um sinal ambiental;
- 2- outro **domínio** cuja conformação é alterada pela modificação no domínio (1) e que passa a **interagir com o DNA**.
- Portanto, estes fatores existem em duas formas, ativa e inativa.
- A forma ativa comum destes fatores é dimérica.



# Interação de promotores com **ativadores**

A maioria dos ativadores transcricionais interage com DNA e recruta a RNAP, que passa a se ligar com maior afinidade aos promotores.

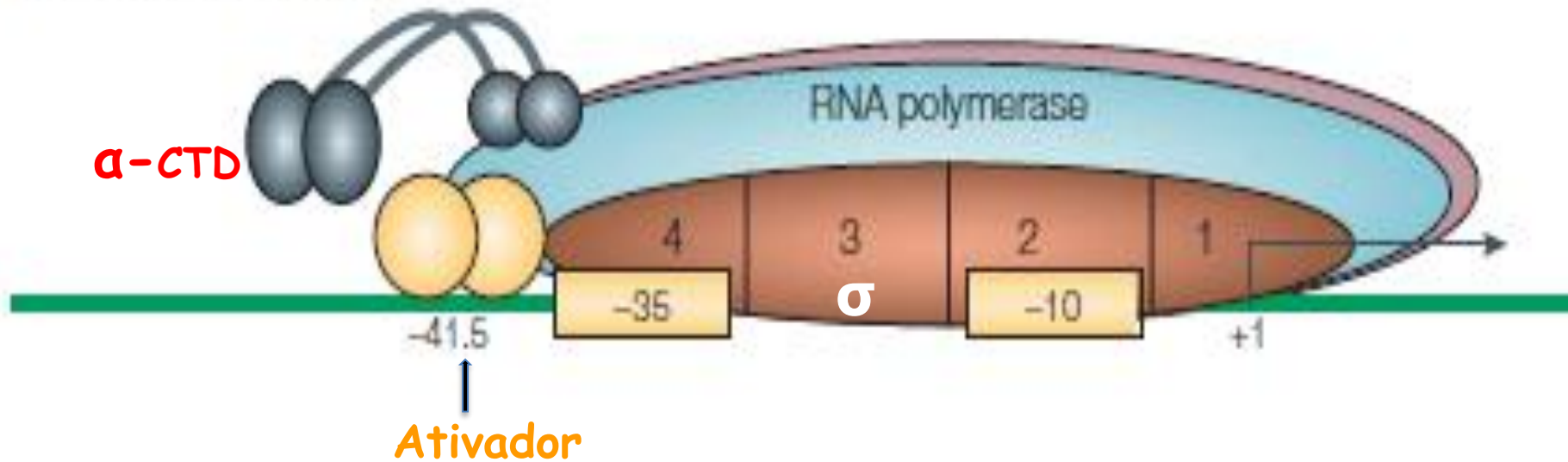
# 3、



# 3、

# 3、

## Ativadores classe II



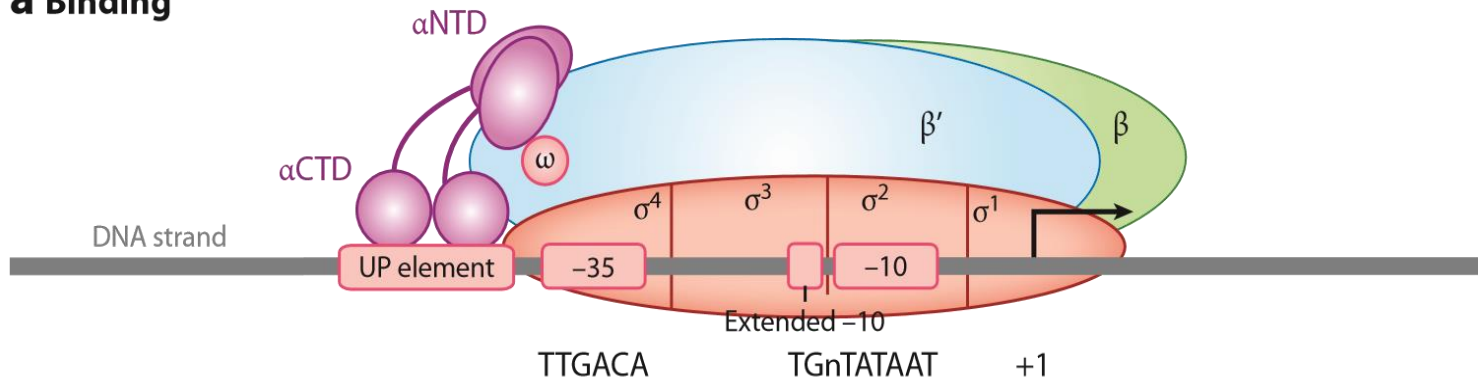
O ativador se liga adjacente a -35, desloca o  $\alpha$ -CTD e contata a RNAP via a subunidade  $\sigma$ .

Ex: PhoB~P (dímero, amarela) do SDC PhoB/PhoR, que se liga a caixa Pho próximo de -35 e interage com o fator  $\sigma^{70}$  da RNAP.

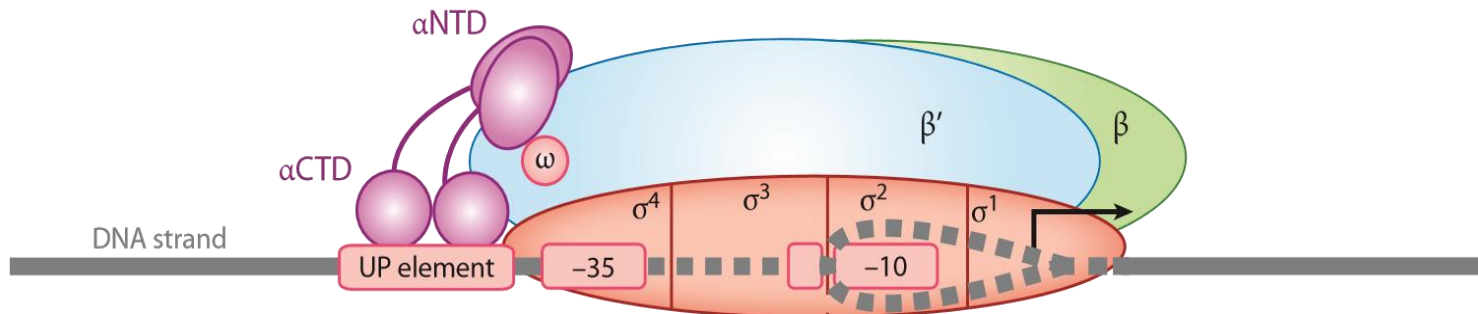
# c- Mecanismo alostérico de ativação

- Quando a RNAP. $\sigma$  se liga ao promotor (a) mas o complexo aberto de transcrição (b) não é formado.

**a Binding**



**b Isomerization**



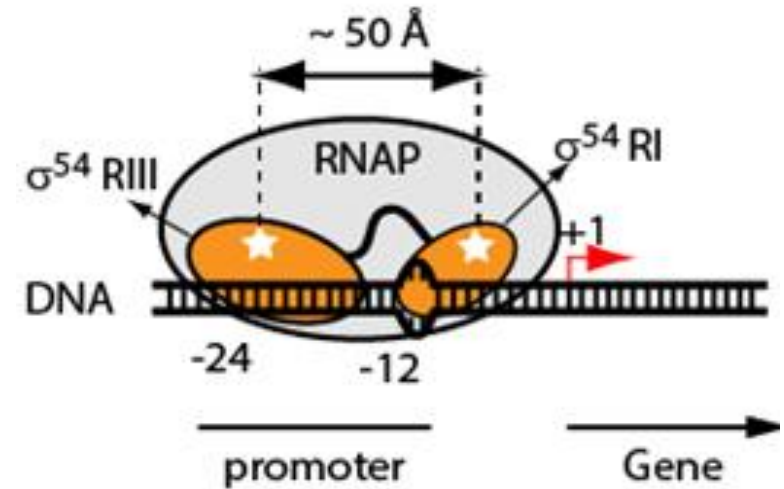
## Mecanismo alostérico de ativação da transcrição

- (1) Os ativadores se ligam ao DNA causam alteração na **conformação da RNAP** ligada ao promotor, estabilizando o complexo RNAP-promotor.
  - (2) Ou causam **alteração no DNA** ligado a RNAP.
- Em ambos os casos, eles estimulam a transição do complexo fechado para o complexo aberto, e a transcrição.

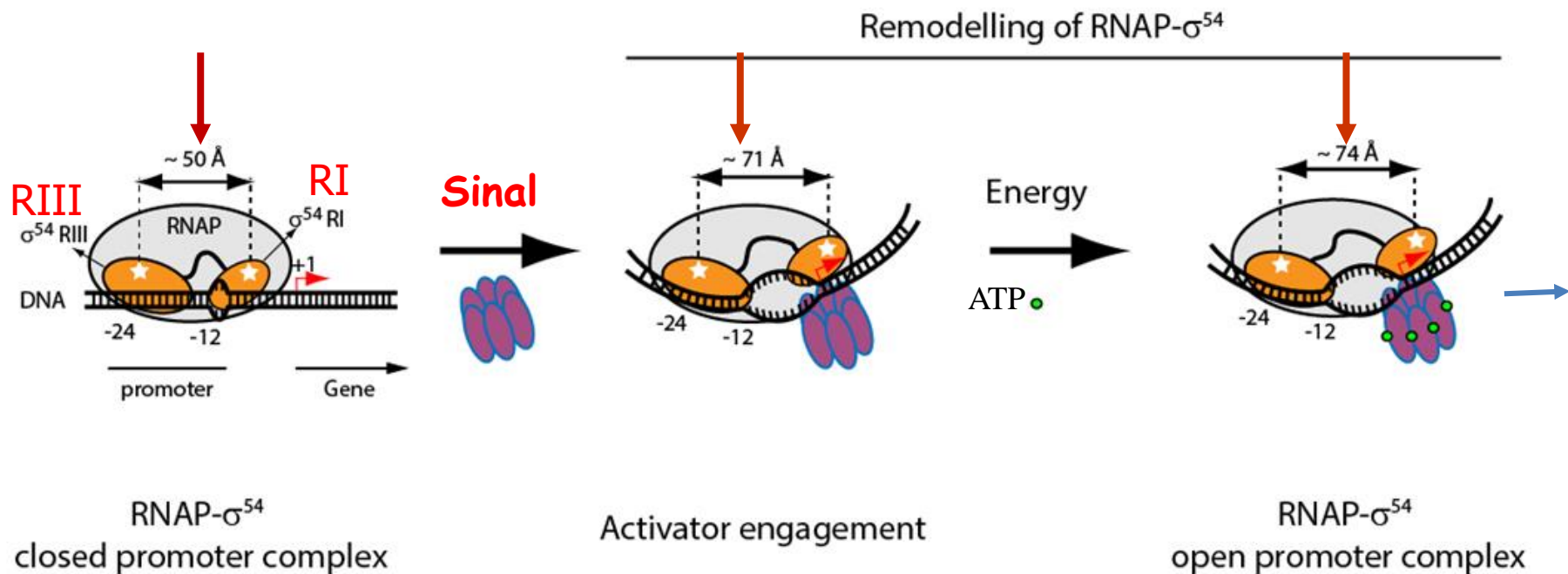
# (1) Alteração da conformação da RNAP- $\sigma^{54}$ ligada ao promotor

A RNAP-  $\sigma^{54}$  interage com um promotor específico e forma complexo fechado transcripcionalmente inativo.

Ao contrário da RNAP-  $\sigma^{70}$ , a RNAP-  $\sigma^{54}$  requer **ativadores dependentes de ATP** para formar o **complexo aberto** no promotor.



RNAP- $\sigma^{54}$   
closed promoter complex



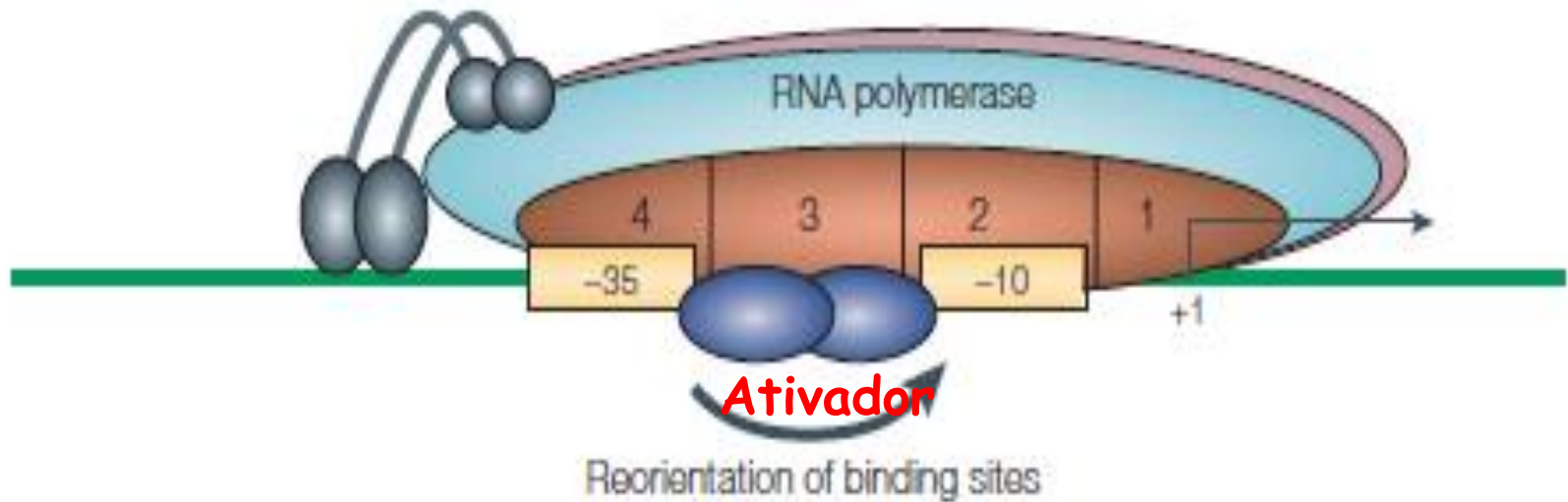
A indução da expressão do gene se dá quando uma **proteína ativadora específica**, em resposta a um sinal ambiental, se liga ao promotor e na presença de ATP, remodela o complexo fechado, gerando o complexo aberto e possibilitando a expressão gênica.

A remodelação ocorre por alteração na distância entre as regiões I (RI) e III (RIII) da RNAP- $\sigma^{54}$  (50 Å → 71 Å → 74 Å)

RNAP: cinza;  $\sigma^{54}$ : laranja; ativador: roxo; -24 / -12: promotor; sítio de início da expressão gênica: seta vermelha.

## (2) Ativadores causam alteração no DNA ligado a RNAP

c Activation by conformation change



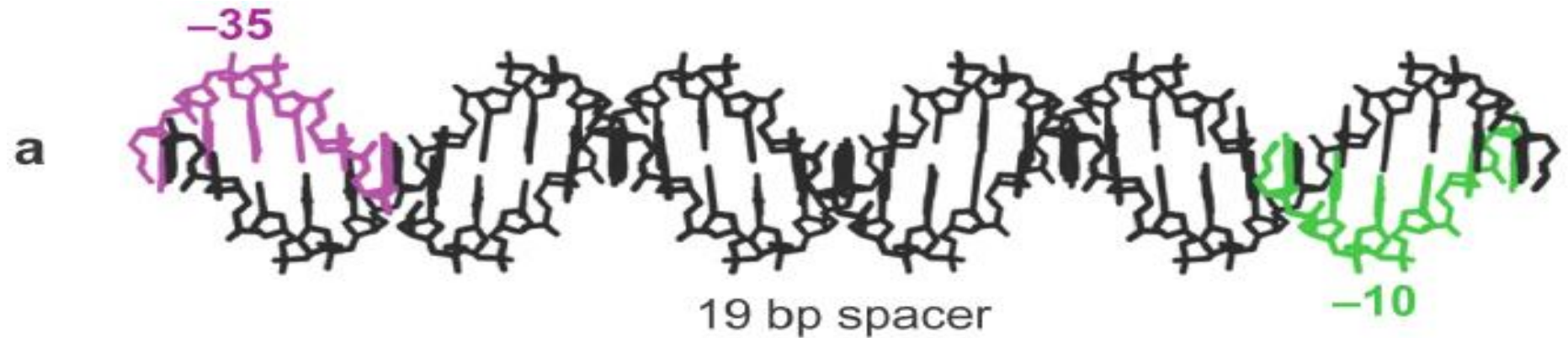
O ativador (azul escuro) se liga entre elementos do promotor (-10 e -35) ligados a RNAP; realinha as sequências do promotor e ativa a transcrição.



## Ex : Regulação da transcrição do gene *merT*

O promotor do gene *merT*, que codifica a enzima MerT, responsável por resistência a  $\text{Hg}^{2+}$  em bactéria, é atípico.

A distância entre as sequências -10 and -35 é de 19bp, ao invés de  $17 \pm 1$  bp, como nos promotores típicos de  $\sigma^{70}$ .



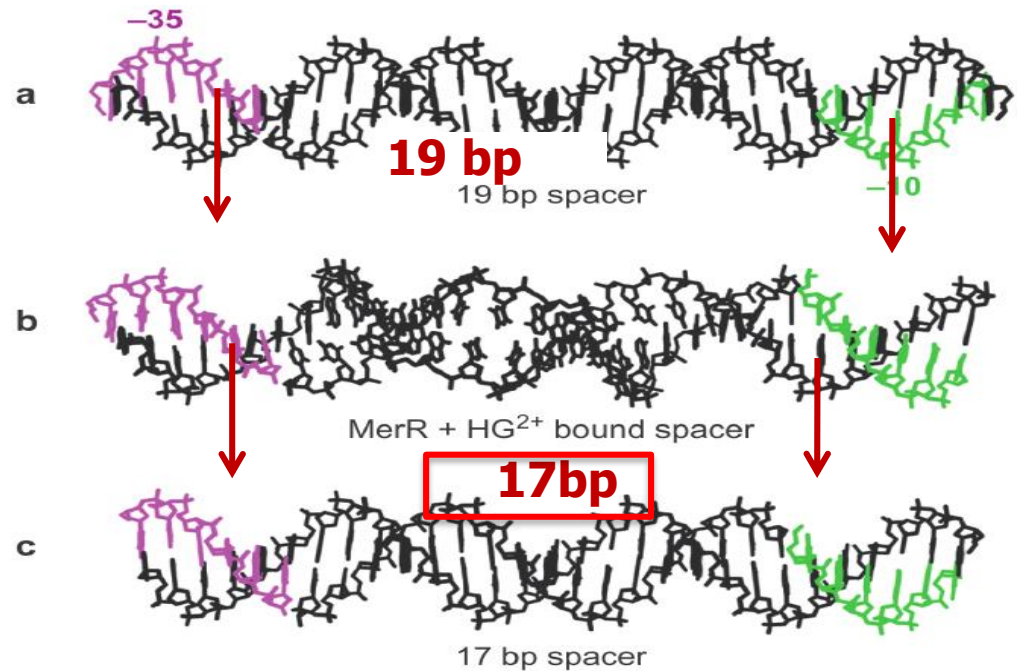
Promotor fraco que se liga a **RNAP**.  $\sigma^{70}$ , com baixa afinidade na ausência de  $\text{Hg}^{2+}$ . Annu. Rev. Microbiol. 2012. 66:125-52

Na presença de  $\text{Hg}^{2+}$ , a proteína MerR, a ativadora transcricional do gene *merT*, se liga a  $\text{Hg}^{2+}$ .

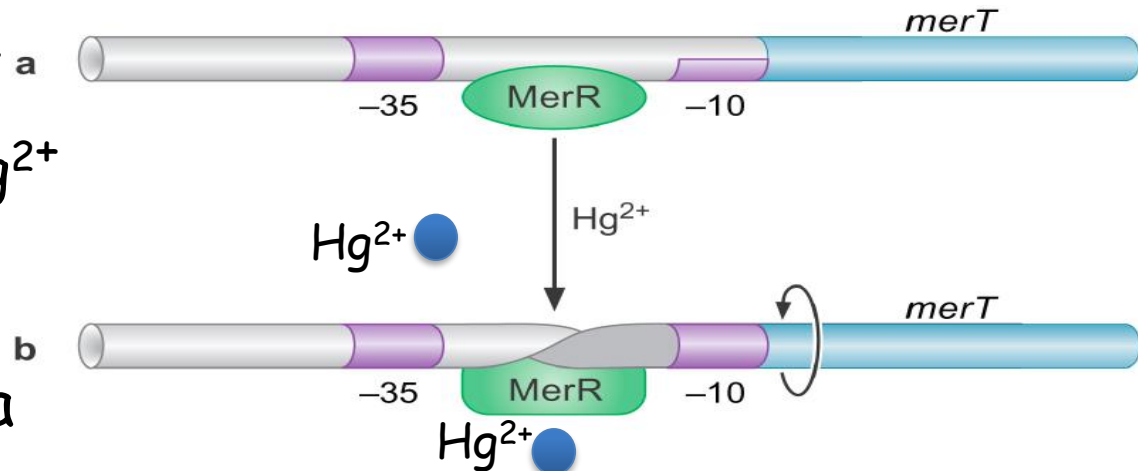
$\text{MerR.Hg}^{2+}$  tem conformação distinta de MerR e nessa forma se liga ao promotor de *merT*, entre as sequências -10 and -35, causando redução de 19 para 17bp, como em um promotor  $\sigma^{70}$  forte.



$\text{MerR.Hg}^{2+}$  interage com o DNA e introduz uma torção na hélice entre as sequências -10 e -35, reduzindo a distância entre elas e facilitando a interação com a  $\text{RNAP.}\sigma^{70}$  ativando a expressão de *merT* na presença de  $\text{Hg}^{2+}$   
 MerR- forma inativa  
 $\text{MerR.Hg}^{2+}$ - forma ativa



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

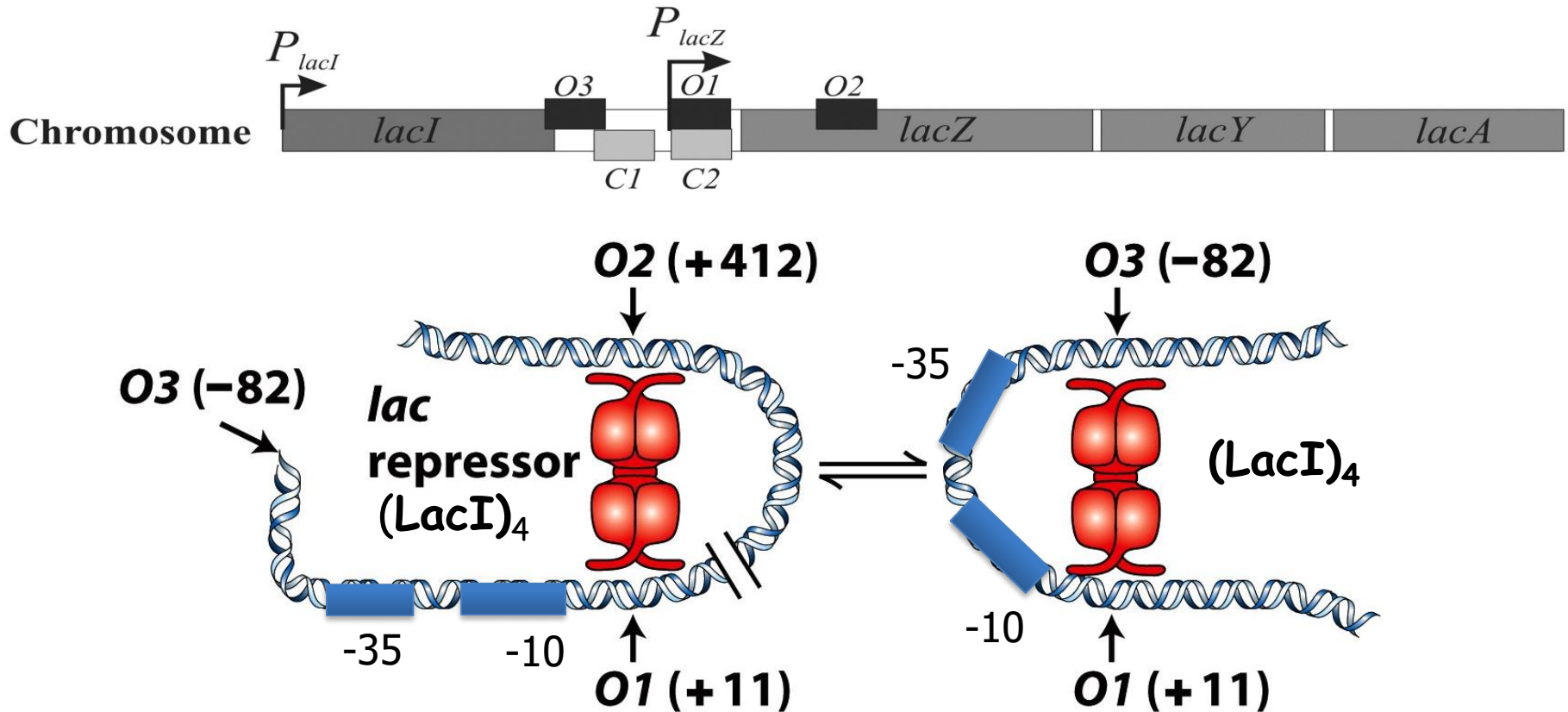


II- Interação do promotor com repressores

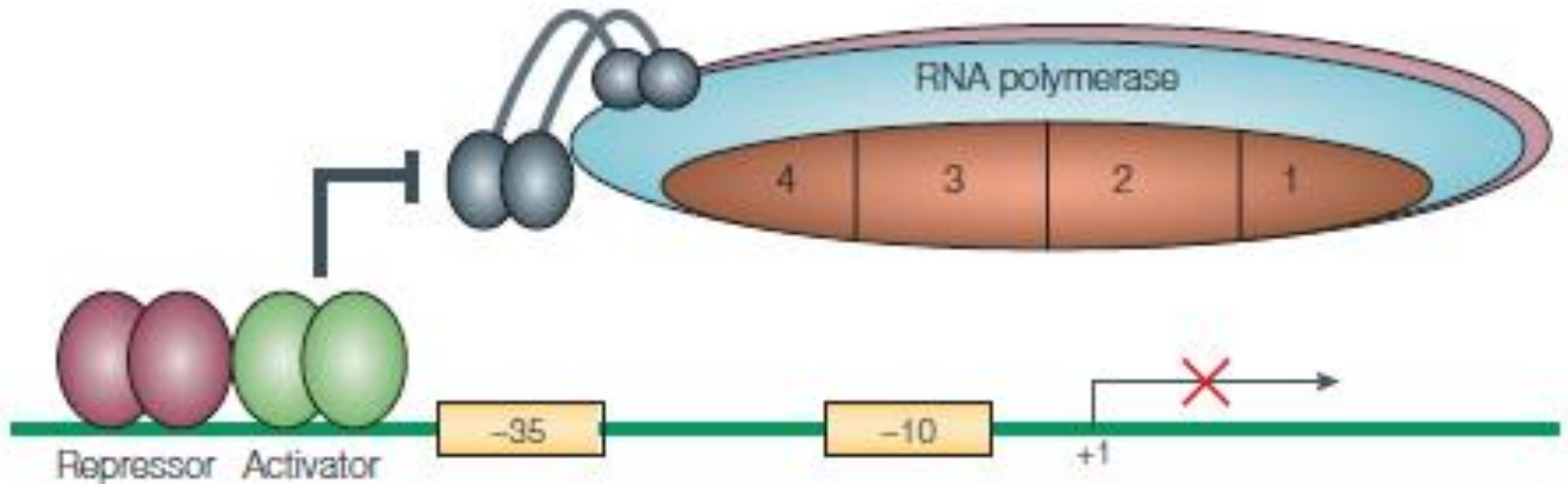
## **α- Repressão da transcrição por impedimento estérico**

Os sítios de ligação do repressor se encontra dentro ou próximo do promotor e impede a ligação/movimento da RNAP.

Ex: Repressão do operon *lac* por LacI ligado a O1, O2 e O3



### c Repression by modulation of an activator



**b- Repressão por modulação da atividade de uma proteína ativadora (A)**

O repressor (R) se liga ao ativador (A) muda sua conformação e impede a ligação da RNAP ao promotor.

## Ex: Regulação da expressão de genes controlada por CytR

- Em *E. coli* a proteína CytR (*cytidine repressor protein*) controla a expressão de vários genes envolvidos **transporte e catabolismo de nucleosídeos**.
- Na **ausência de nucleosídeos**, CytR interage com o CAP.cAMP (ativador) e forma o **repressor**  $\text{CytR} \cdot (\text{CAP} \cdot \text{cAMP})_2$  que se liga aos promotores de alguns destes genes.



# Arquitetura de um promotor regulado por CytR



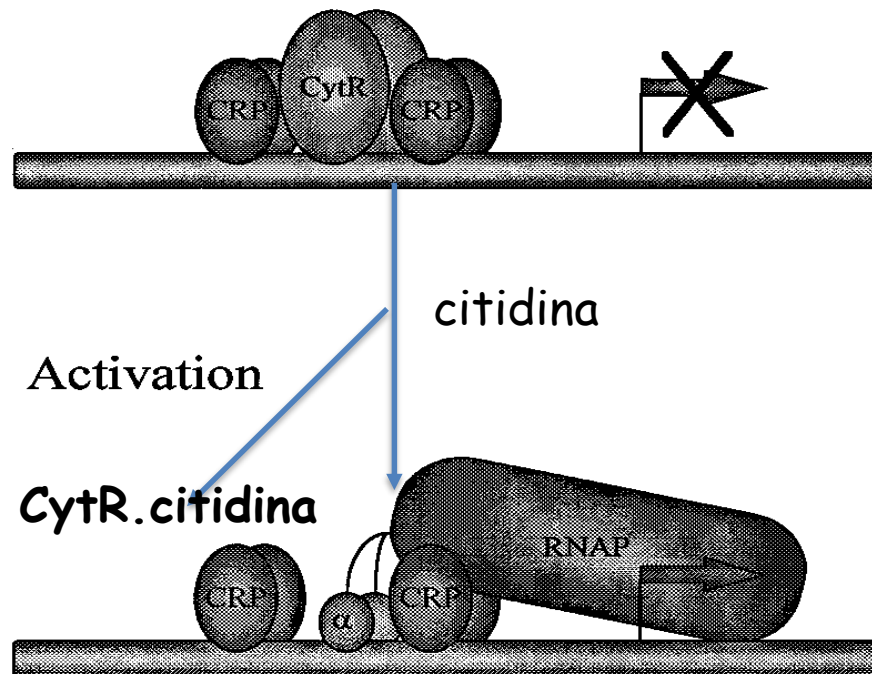
CRP1 e 2- sítios de ligação de CAP.cAMP; CytO- sítio de ligação do CytR

**Repressão:** ligação do complexo CytR.(CAP.cAMP)<sub>2</sub> ao DNA

**Indução:** na presença do indutor citidina, essa se liga a CytR, e a interação entre CytR e CAP.cAMP é desfeita.

As duas CAP.cAMP interagem com com subunidade  $\alpha$  (C e N ter) da RNAP e ativam a transcrição do gene a jusante.

Biochemistry 2013, 52, 8209-8218





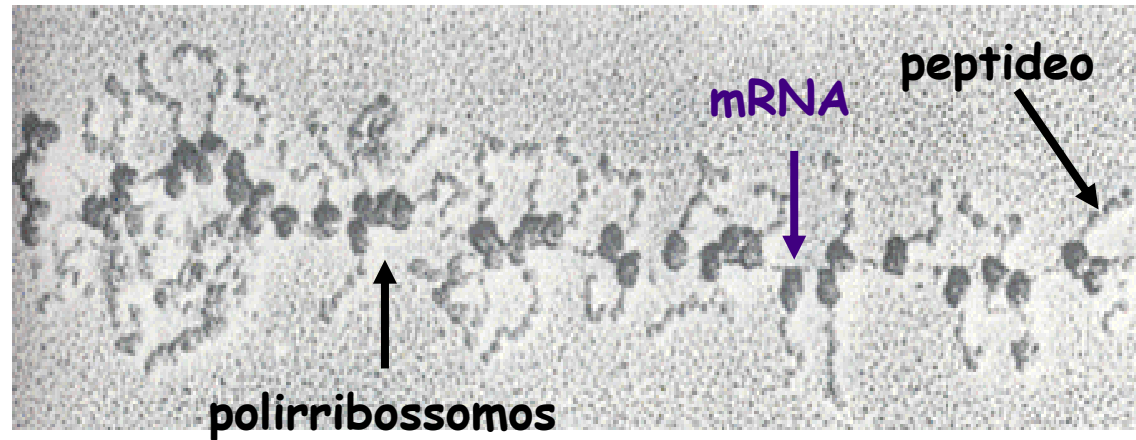
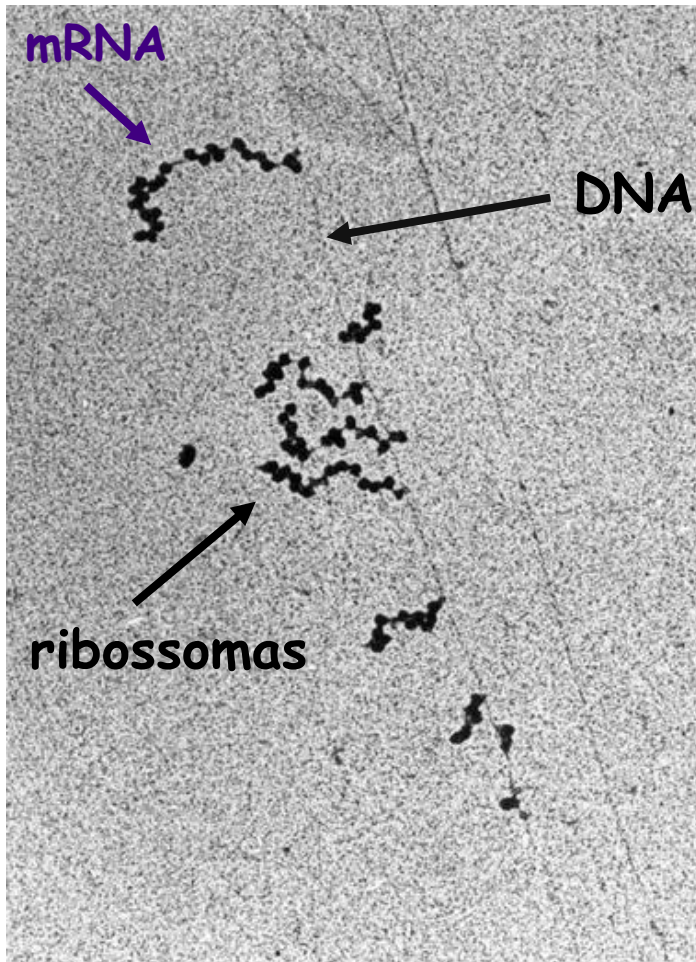
**Portanto:**

Em bactéria, a síntese de uma proteína pode ser regulada, positiva ou negativamente, a nível transcrição por fatores que atuam sobre a RNAP ou sobre o promotor por mecanismos diversos.

## 2- Regulação da expressão gênica ao nível da tradução em bactéria

“A rapid way to adapt the bacteria to the environment...”

# Transcrição e tradução: simultâneas em bactéria



Yusupov et al. 2001. Science 92:883

# Eficiência de tradução de um mRNA

A eficiência de tradução de um determinado mRNA depende de fatores envolvidos no **início** e na fase de **alongamento** da tradução, entre estes:

- concentração do mRNA na célula
- sequência de bases e conformação do mRNA
- recursos celulares- disponibilidade de ribossomos livres, aa-tRNAs e de fatores de tradução.
- Em bactéria, o **início** da tradução é a etapa fundamental para a **eficiência do processo**.

# Expressão gênica a nível do início da tradução

Relacionada à:

- a) Sequência do sítio de ligação do ribossoma ao mRNA- Shine Dalgarno (SD ou RBS) e sua posição relativa ao códon de início da tradução (TIR- região de início da tradução).
- A sequência **SD**, possui tipicamente de 3-6 nucleotídeos,
- situada 4-15 nucleotídeos a montante do códon de iniciação do mRNA

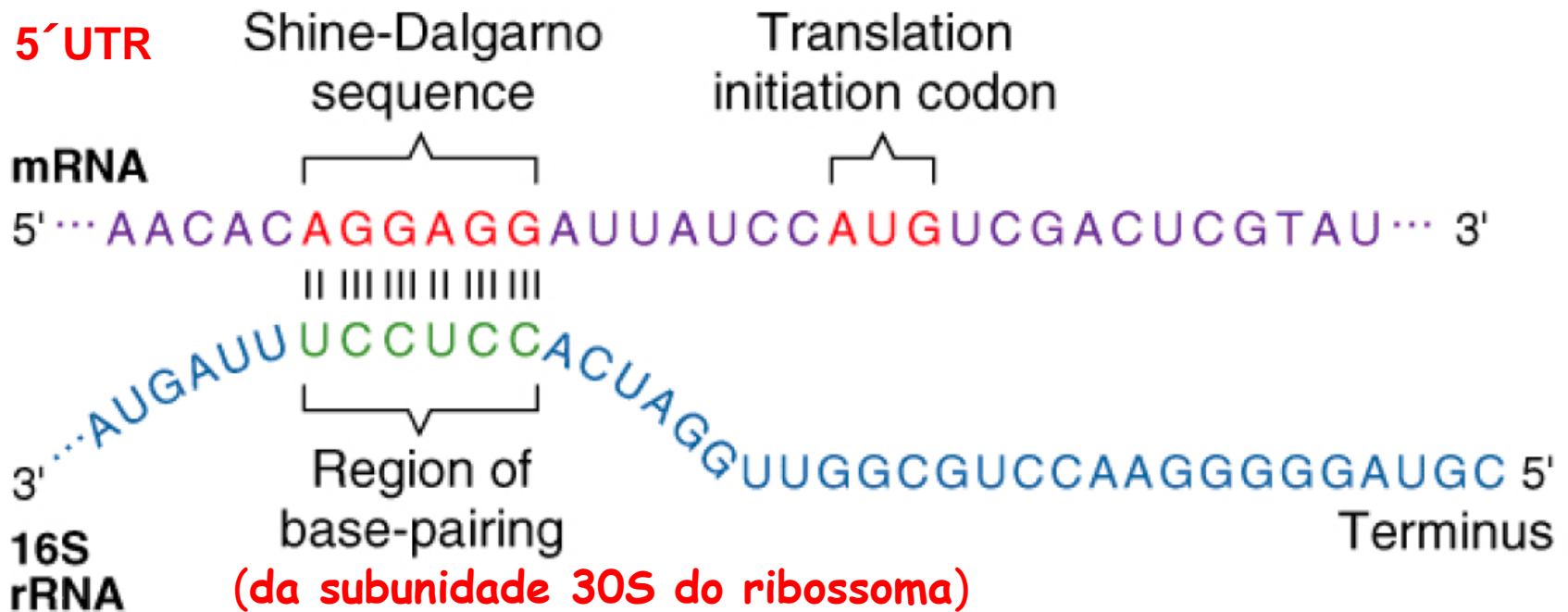
# Controle da expressão gênica a nível do início da tradução

b) Eficiência do início da tradução depende da conformação do mRNA (TIR) (ex: estruturas secundárias que afetam a interação e/ou a movimentação dos ribossomos).

d) Taxa de degradação do mRNA

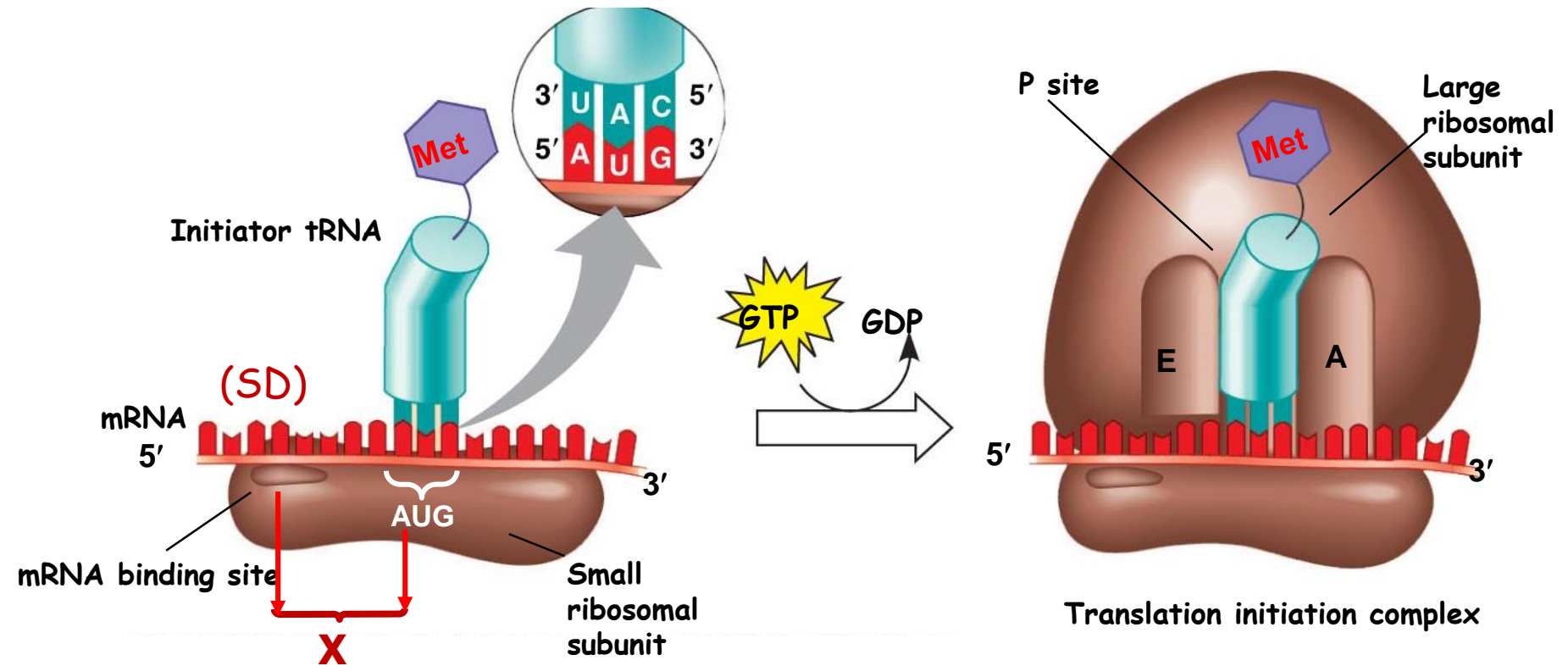
## (a) Controle da expressão gênica no início da tradução-interação ribossoma com o mRNA

- Em bactéria o TIR de um mRNA ou seja, sítio de ligação do ribossomo (SD/RBS) e o códon de início no mRNA (em geral AUG) têm um papel importante no início da tradução.
- Inicialmente, fatores de iniciação (IFs) e a subunidade 30S do ribossoma 70S se ligam no TIR , onde se encontra a Shine Dalgarno (SD), cujo consenso é: 5'-AGGAGG-3', a montante do códon de iniciação (AUG).



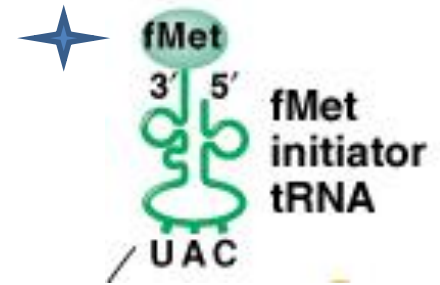
- O terminal 3' do rRNA 16S da subunidade 30S apresenta uma sequência complementar à sequência SD e se liga ao mRNA.
- Portanto, a eficiência do início de tradução do mRNA varia com a sequência SD- quanto mais similar ao consenso (5' -AGGAGG-3') mais eficiente será a interação entre o ribossoma e o mRNA e maior a taxa de tradução desse mRNA.





- Além da sequência de bases da SD, a **distância entre o SD e o códon de início** (X, distância ótima 4-9 pb) afetam a eficiência da tradução.
- O posicionamento do AUG do mRNA no local exato na subunidade 30S ribossomal depende do comprimento de X e define os sítios E, P e A no ribossomo. A (amino ácido); P (peptídeo) e E ("exit", saída).

# Códon de início da tradução



## 5'UTR

<i>E. coli trp A</i>	(5') A G C A C	G A G G G G	A A A U C U G	A U G	G A A C G
<i>E. coli ara B</i>	U U U G G A U	G G A G	U G A A A C G	A U G	G C G A U
<i>E. coli lac I</i>	C A A U U C A G	G G U G G	U G A A U	G U G	A A A C C
		(Shine-Dalgarno)		(códon de iniciação)	

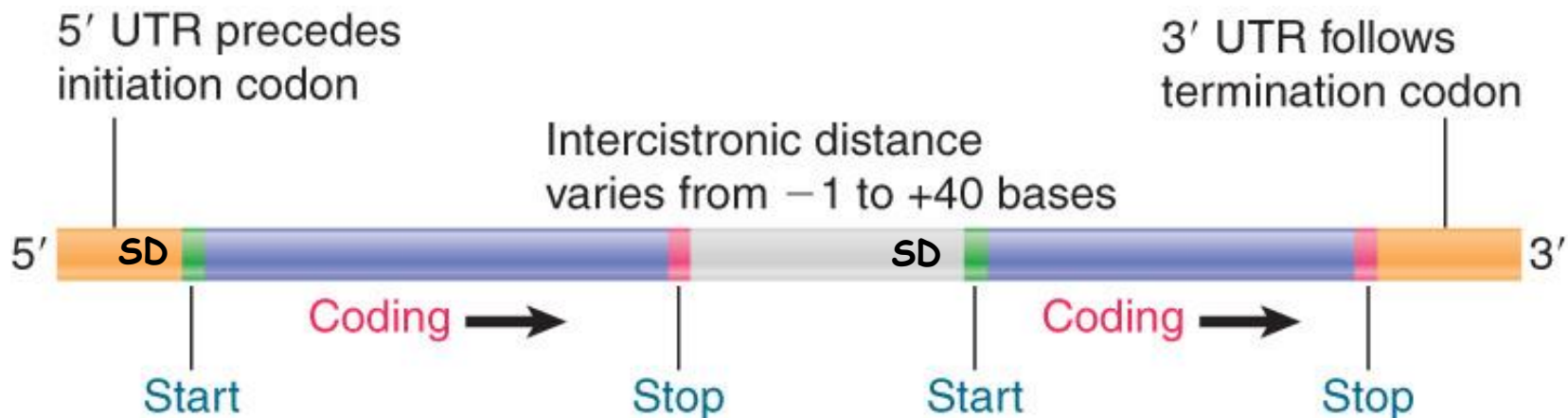
O codon de início (em verde) e sequências Shine-Dalgarno (rosa) em mRNAs de *Escherichia coli*.

Na maioria dos casos o códon de iniciação é **AUG**; **GUG** (8%) e **UUG** (1%).

- A eficiência de tradução é maior com o códon **AUG**, por formar um complexo (30SI) mais estável com o fMet-tRNA<sup>fMet</sup> que o **GUG** e **UUG**.
- Todos esses códons são traduzidos em formil-metionina.

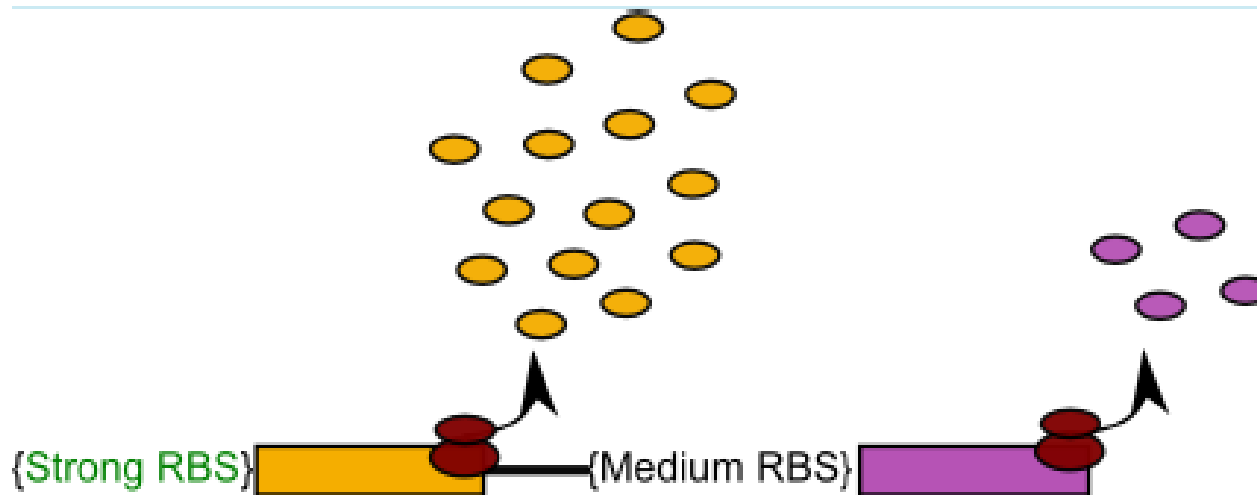
# Estrutura do mRNA bacteriano policistrônico

- **5' UTR**- A região no mRNA entre o início da mensagem e o primeiro códon.
- **3' UTR**- A região no mRNA entre o códon de término e o final da mensagem.
- **Região intercistrônica**- A sequência entre o códon de terminação de uma fase aberta de leitura (ORF) e o códon de início da próximo no mRNA policistrônico. Sequências SD ocorrem nestas regiões do mRNA policistrônico a 5' do códon de iniciação.



# Tradução de mRNA policistrônico: fatos

- A tradução de cada cistron do mRNA policistônico, em geral (mas nem sempre..) é independente das demais:
  - O ribossomo, após traduzir cada cistron se dissocia do mRNA, ou,
  - a subunidade 30S se mantém ligada ao mRNA e se desloca até o próximo SD para traduzir a ORF seguinte.
  - Diferentes cistrons do transcrito podem ser traduzidos em taxas distintas (dependendo da sequência SD que antecede cada um deles e da distância entre SD e AUG), gerando quantidades diferentes de proteínas.



**(b) Outros fatores que podem afetar a tradução de mRNA bacteriano: interação com proteínas ou outras moléculas e degradação do mRNA, temperatura**

# i-Regulação da iniciação da tradução por proteínas de ligação ao RNA

Certas proteínas podem se ligar ao mRNA para **reprimir** o início da tradução por uma ampla variedade de mecanismos:

- **competir diretamente com as subunidades ribossômicas 30S,**
- **promover a formação de um estrutura secundária sequestradora de SD**
- **aprisionar as subunidades 30S em um complexo inativo no mRNA.**

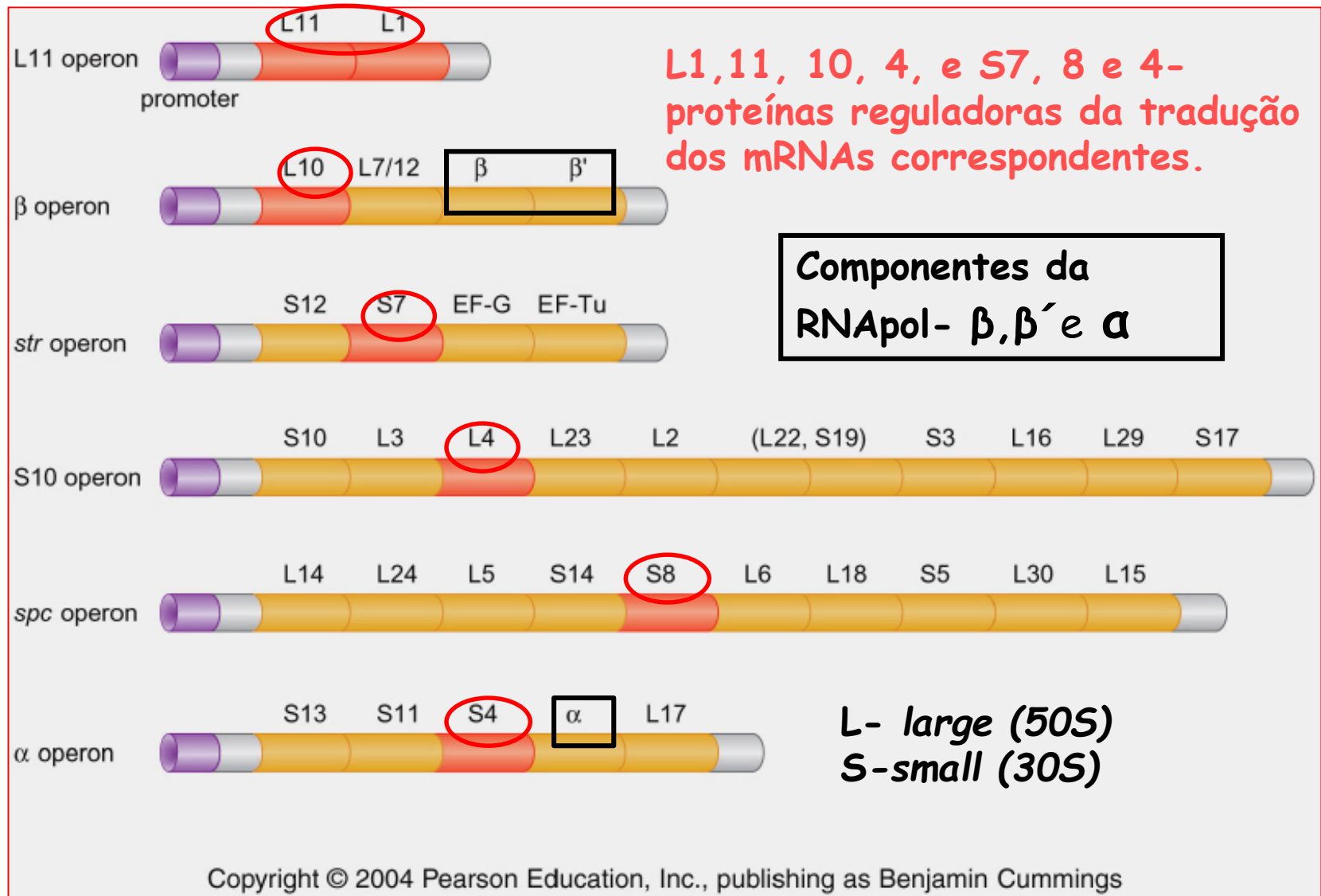
**A ativação da tradução por proteínas de ligação ao mRNA é rara**

- *Annu Rev Microbiol.* 2009 ; 63: 27-44. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073514.

## Repressão- Controle da expressão de proteínas ribossomais

1. Ribossomos bacterianos (70S) contêm mais de **50 tipos de proteínas**.
2. Seus genes estão distribuídos em mais de **20 óperons**.
3. O controle da síntese destas proteínas se dá principalmente ao nível da tradução e não da transcrição.
5. Quando em excesso, **uma proteína (ou mais) codificada** em cada um destes óperons funciona como repressor da tradução do mRNA correspondente.
6. Esta proteína **se liga ao mRNA próximo ao sítio de início da tradução e bloqueia** a ligação do ribossoma e a síntese de várias proteínas codificadas na mensagem policistrônica.

# Óperons que codificam proteínas ribossomais bacterianas





## O óperon *spc* de *E. coli*



L14	L24	L5	S14	S8	L6	L18	S5	L30	L15	secY
-----	-----	----	-----	----	----	-----	----	-----	-----	------

'10 ribosomal proteins translated from a polycistronic mRNA'

*secY*- codes for an integral membrane protein, SecY.

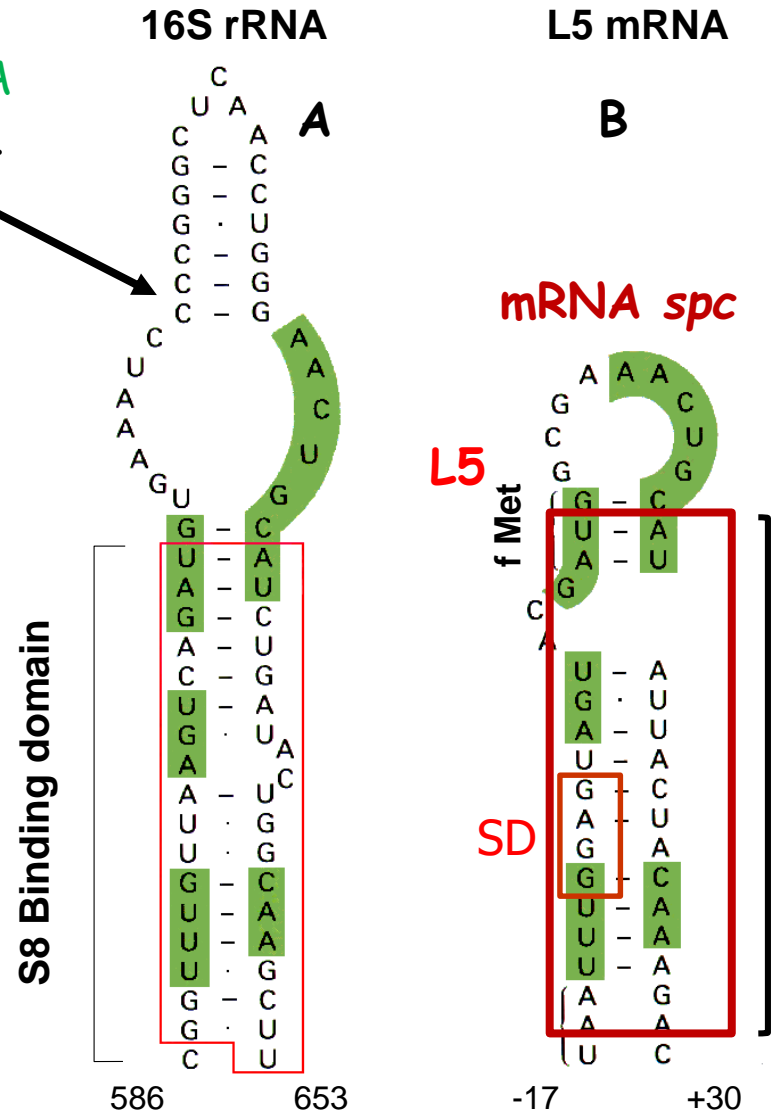


A proteína ribossomal **S8** se liga ao **rRNA 16S** da subunidade **30S** do ribossoma (A).

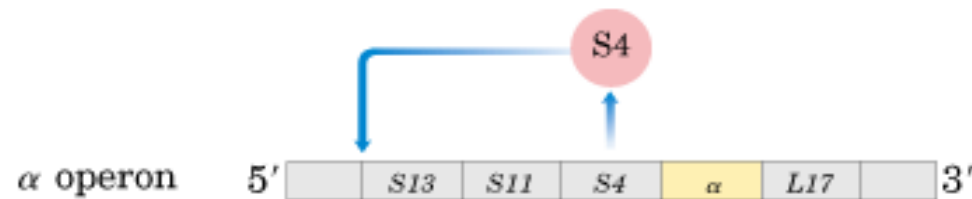
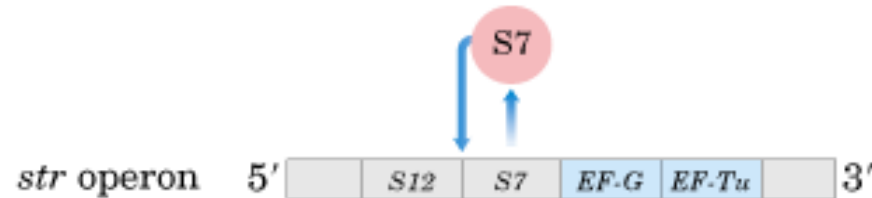
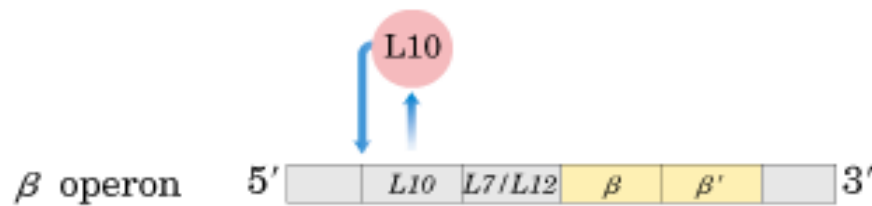
**S8** também pode se ligar ao **mRNA *spc*** policistrônico, dentro do **L5**, devido à similaridade de sequência entre regiões do rRNA 16S e L5 mRNA (em verde) (B).

**S8** em excesso: causará a repressão de sua expressão e das demais proteínas do operon *spc* por se ligar ao mRNA L5 (B).

Este tipo de mecanismo regula a expressão da maioria das proteínas ribossomais codificadas pelos demais óperons.



# Controle em nível pós-transcricional



Controle da expressão do mRNA em função da quantidade de proteínas ribossomais.

Em cada óperon, uma das proteínas exerce atividade repressora, quando em excesso.

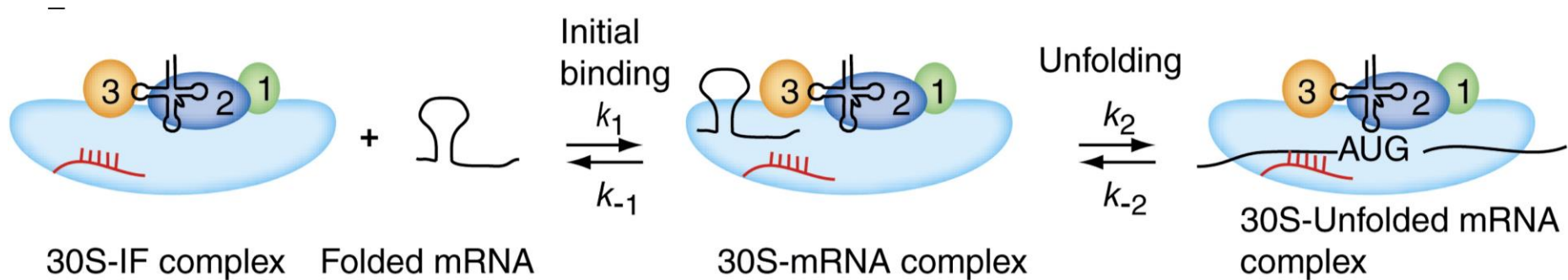
## ii- Efeito da estrutura do mRNA na tradução

O 5' UTR (TIR) de muitos mRNAs bacterianos formam **estruturas secundárias** que, em geral, reprimem a tradução no mRNA por:

- impedindo a ligação ribossômica ou
- por prender a subunidade ribossômica 30S em um complexo de inativo de pré-iniciação com mRNA.

Algumas **proteínas, metabólitos e RNAs** (RNAs pequenos) podem se ligar a estas estruturas para ativar a tradução do mRNA correspondente. Temperatura também pode ter efeito semelhante.

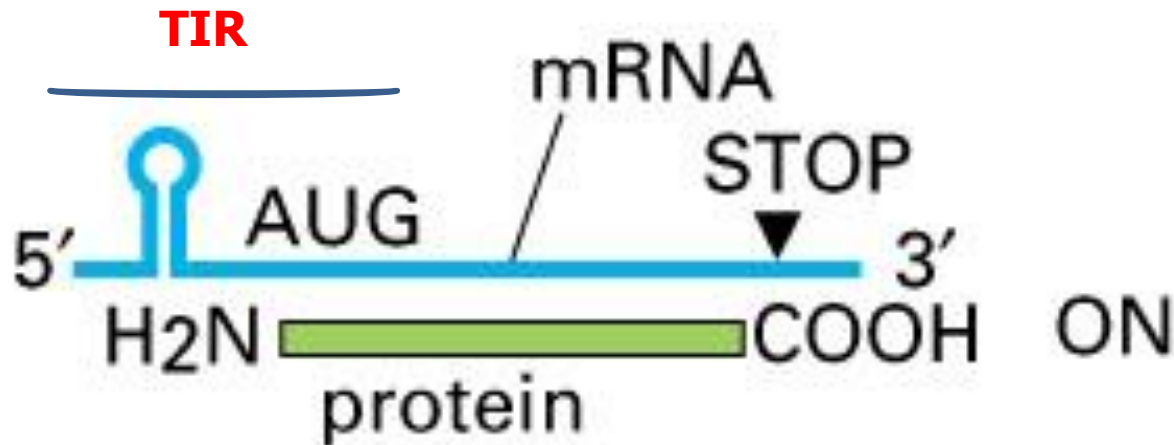
# Estruturas secundárias no TIR não afetam a tradução



Estruturas secundárias no mRNA no TIR em *Escherichia coli* podem inibir a tradução competindo com a ligação de ribossomos. Porém, quando o emparelhamento entre as bases do mRNA não é muito forte, esta se defaz com ajuda de proteínas ribossomais, resultando em tradução eficiente.

# Estruturas secundárias no mRNA afetam a expressão gênica

- Estrutura secundária no 5' UTR/TIR mRNA afetam a taxa de expressão do gene correspondente. Interação do mRNA com determinadas moléculas alteram a expressão do gene alvos.



# Riboswitches

Os *riboswitches* bacterianos são elementos presentes nos 5' regiões não traduzidas (UTRs) de mRNA que se ligam a certos metabólitos e regulam a expressão dos genes a jusante.

Estes mRNAs se comportam como sensores de pequenas moléculas, que regulam comumente a expressão de **genes de proteínas ou de RNAs não-codificantes**.

A maioria dos *riboswitches*, controlam a expressão gênica por meio da inibição *feedback* da expressão dos genes de biossíntese ou transporte dos metabólitos que se ligam ao mRNA.

# Riboswitches



Fazem parte da estrutura do mRNA que regulam e são geralmente encontrados na região 5' não traduzida, (5' UTR).

**Consistem de duas partes:**

(a) o "aptâmero", (~70-200 nt) sequência que se liga a um ligante pequeno (**lilás**) e

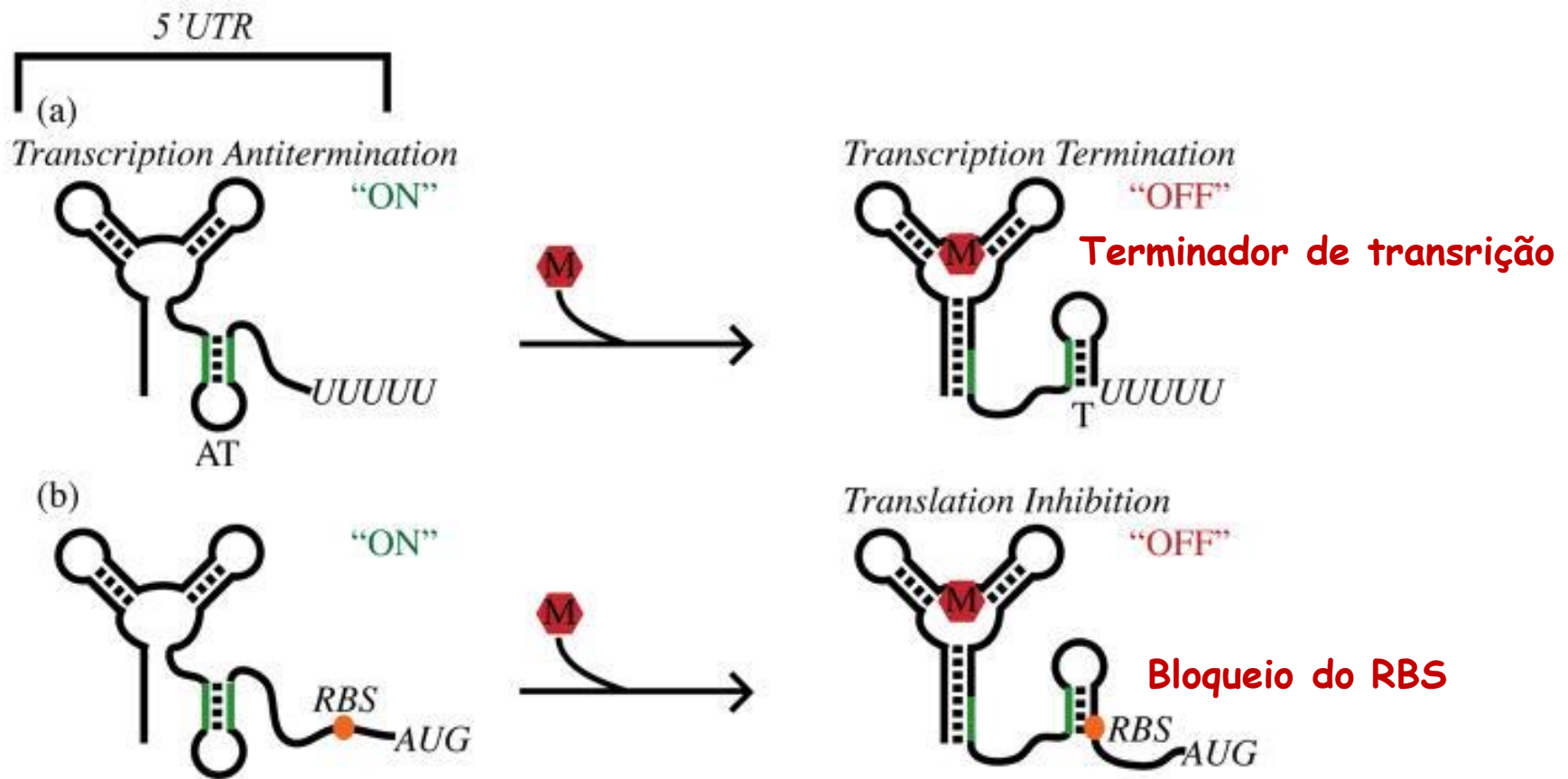
(b) a "plataforma de expressão", que regula a expressão gênica através da alteração da estrutura do RNA, podendo afetar

**tradução e transcrição**



"Riboswitch": um aptâmero (**lilás**),  
plataforma de expressão (**laranja**)  
Na região 5' UTR do mRNA (azul).  
RBS- sítio de ligação ao ribossoma



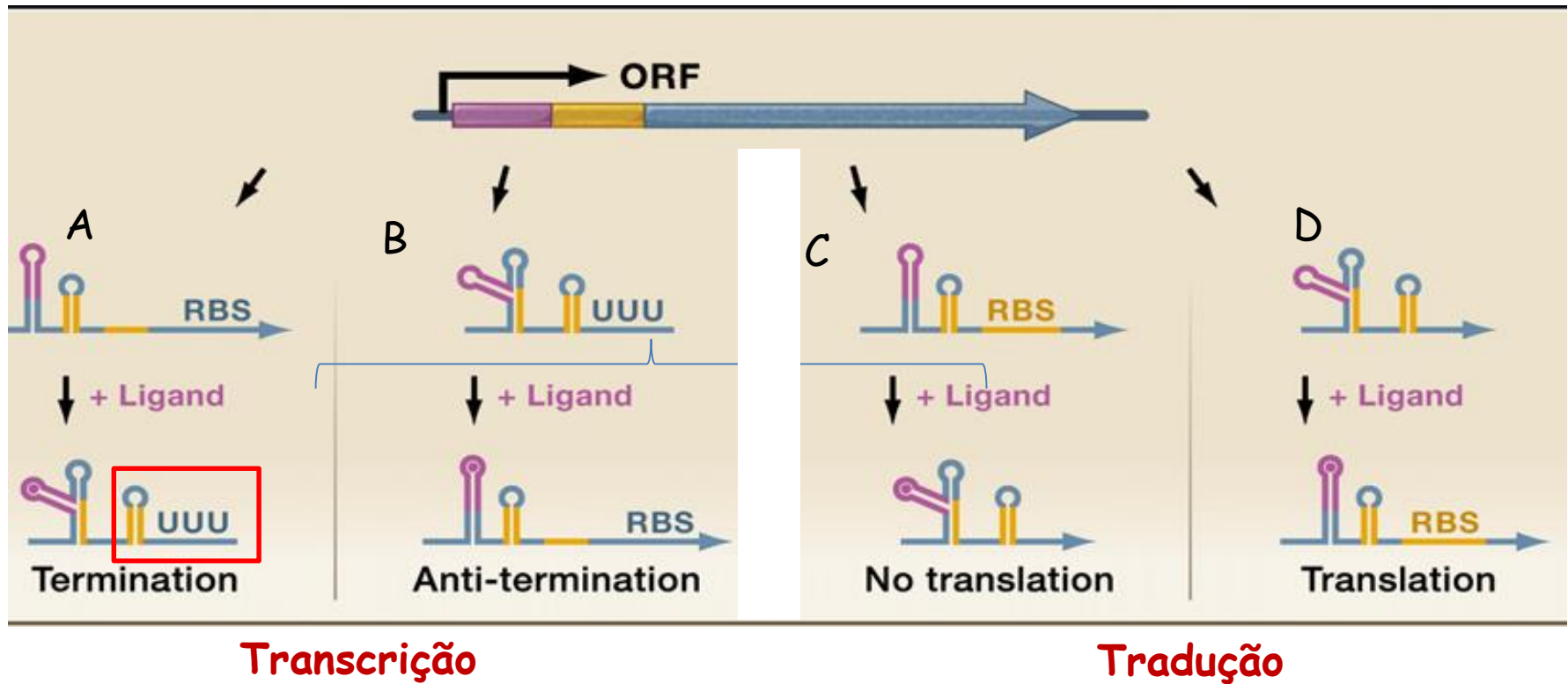


Controle genético por *riboswitches* sensíveis a metabólitos ("M").

(a) Controle da formação de um terminador de **transcrição** intrínseco por um *riboswitch* de ligação ao "M".

(b) Controle da eficiência da **iniciação da tradução** através de um *riboswitch* ligado a "M"

# Interação do aptâmero com um ligante pode afetar a transcrição do mRNA e/ou a tradução da proteína



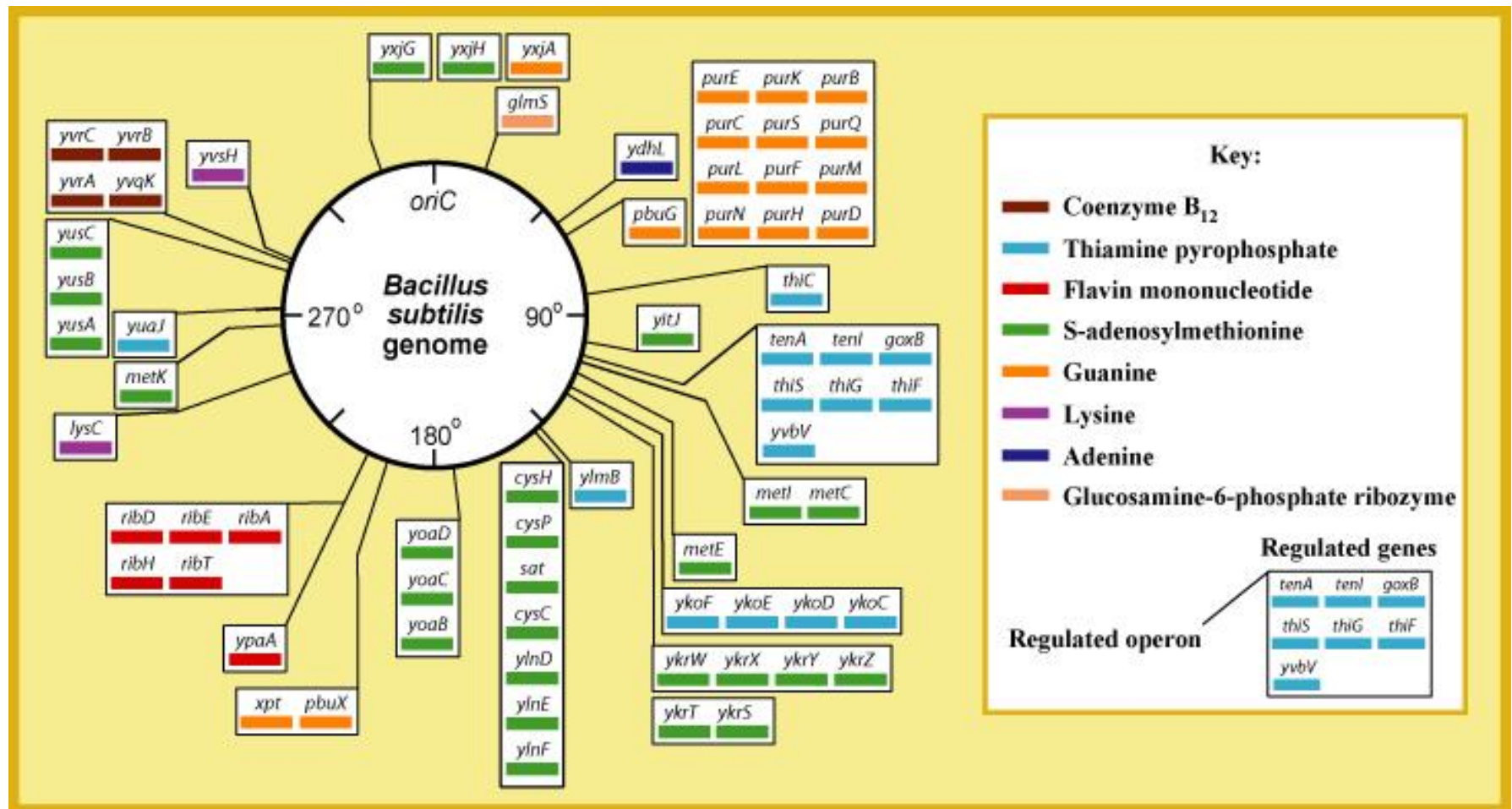
**A-** interação do ligante com o aptâmero causa alteração conformacional da 5' UTR, formação de estrutura (alça seguida de UUUU...) de **terminação da transcrição** e o RBS (sítio ligação ribossoma) no mRNA intacto **não fica acessível**, daí **inibição da tradução**.

**B-** Na ausência do ligante a 5' UTR do mRNA forma estrutura de **terminação de transcrição** sendo o RBS inacessível. Interação do ligante com o aptâmero causa alteração conformacional da 5' UTR destrói a alça de terminação e **libera o RBS**, **ativa a tradução**.

**C-** Na ausência do ligante o RBS é acessível. Interação com o ligante, alteração da estrutura do 5' UTR e RBS se torna **inacessível**, só **afeta a tradução**.

**D-** Na ausência do ligante o RBS é **inacessível**, interação com ligante **libera RBS**, **ativa tradução**.

“Riboswitches are an important mechanism of gene regulation: ~2% of the genes of *Bacillus subtilis* appear to be controlled by riboswitches”

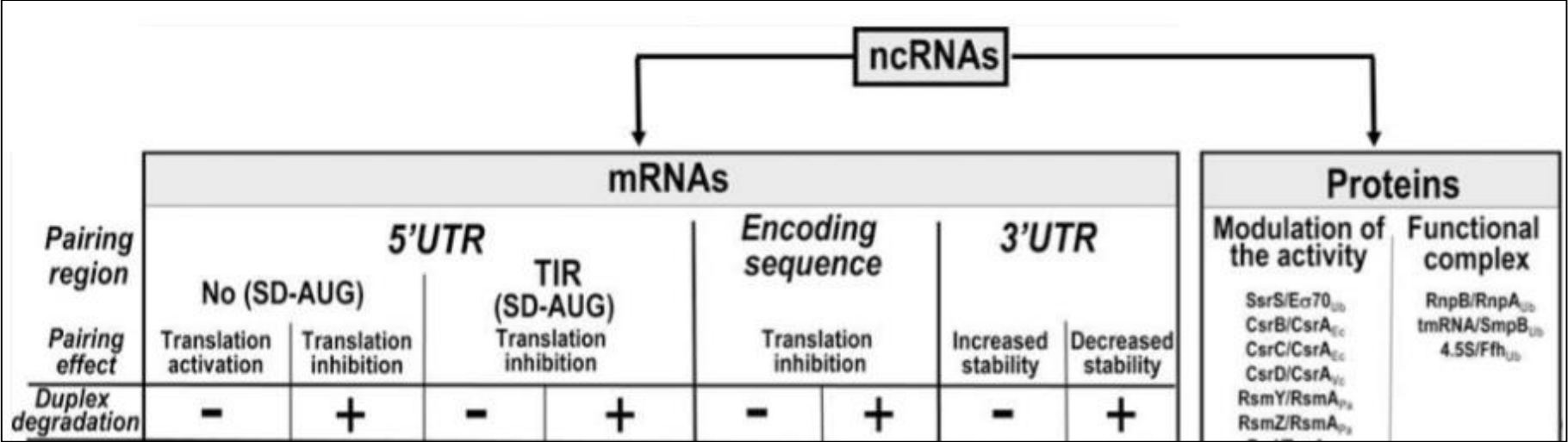


# Regulação da expressão gênica por ncRNA (sRNA)

- Os ncRNAs reguladores (RNAs não codificantes) são reguladores cruciais que permitem que a célula ajuste sua fisiologia às mudanças ambientais.
- Podem afetar a transcrição ou tradução.
- Possuem entre 50-550 nucleotídeos e são gerados por transcrição direta ou processamento de outros RNAs.

# Modos de ação de ncRNAs

- **Classe 1** - Os ncRNAs dessa pareiam com mRNAs para formar duplexes de RNA, que afetam eficiência de tradução e/ou a estabilidade de mRNAs.
- Em *E. coli*, alguns desses ncRNAs se ligam a uma chaperone de RNA, proteína Hfq, e agem por interação com mRNAs para regular, na maioria dos casos **negativamente**, a tradução e a estabilidade de mRNAs alvos.
- **Classe 2** - Os ncRNA dessa classe se ligam a proteínas e modificam suas atividades.

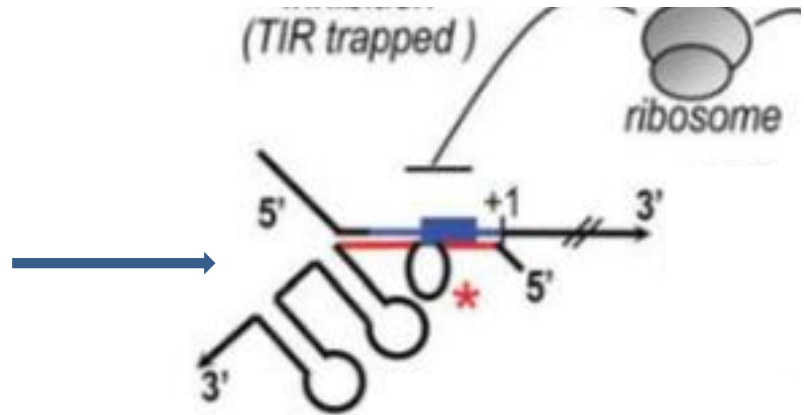
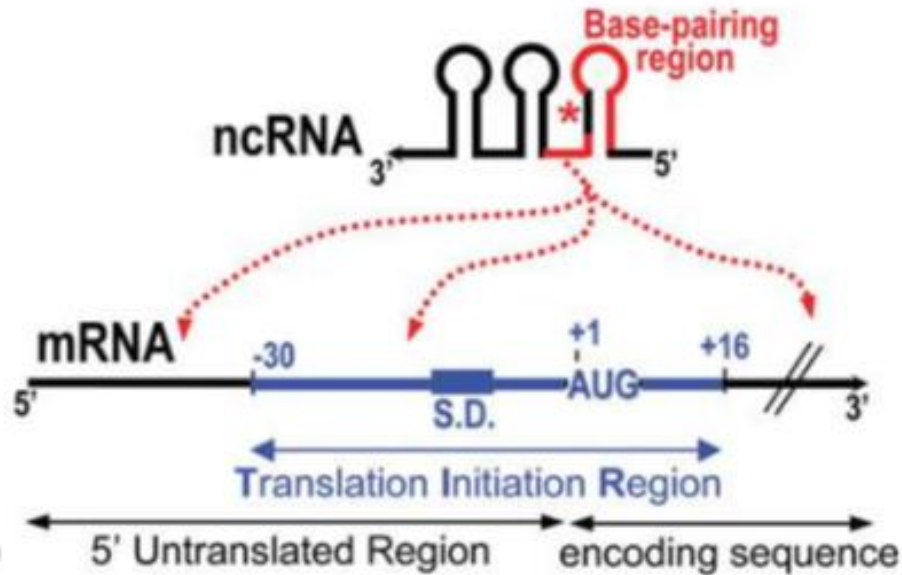


# Formação de duplex ncRNA:mRNA

- A maioria dos ncRNAs, até agora caracterizado, controlam a expressão gênica por "emparelhamento imperfeito" de bases com mRNAs- formação de duplex.
- Em geral, os genes que codificam o ncRNA e o mRNA alvo não se sobrepõem, mas as interações entre os ncRNAs e seus cognatos mRNAs podem ser eficientes, desde que haja alguns nucleotídeos que emparelham para formar o duplex.

# Inibição da tradução por ncRNA

## A. mRNA regions targeted by a ncRNA



## C. mRNA target degradation

Diferentes regiões do mRNA podem ser alvo de um ncRNA.

Parte que não interage com o mRNA alvo é indicada por \*. O ncRNA pode bloquear o TIR do mRNA causando **inibição da tradução**.

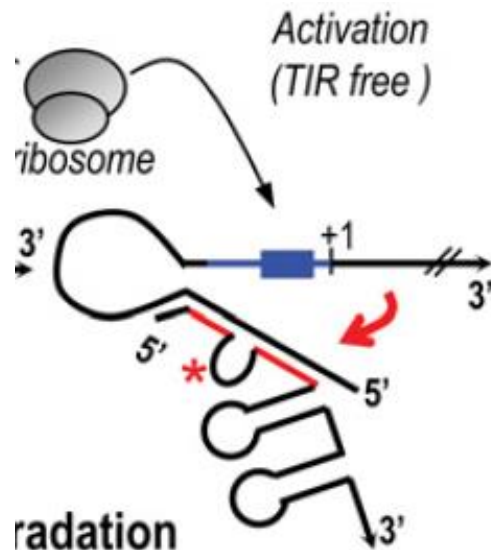
A inibição da tradução é geralmente associada a degradação rápida do duplex de ncRNA/mRNA



# Ativação da tradução por ncRNA

A ativação da tradução por ncRNAs ocorre em apenas alguns casos e envolve o emparelhamento de um ncRNA com o 5' UTR de um RNAm, a montante do TIR.

O emparelhamento induz alterações estruturais no mRNA, tornando o SD acessível aos ribossomos e ativando a tradução.



# ncRNA afetam a transcrição

Os ncRNAs em todos os organismos regulam a expressão gênica, geralmente, na etapa da tradução ou estabilidade do mRNA.

Mas, alguns regulam a transcrição.

Ex: RNA 6S (ou SsrS) bacteriano, que acumula na fase estacionária da cultura e inibe a **transcrição** por ligação direta á RNAP.  $\sigma^{70}$  em *E. coli*

O complexo  $\sigma^{70}$ -RNAP-6SRNA não se liga a promotores de centenas de genes inibindo sua transcrição.

# Atuação do RNA 6S na fase estacionária de cultura

- A inibição da transcrição deve depender da força do promotor, ou seja, de sua afinidade pela RNAP-  $\sigma^{70}$ .
- O efeito do RNA 6S é maior sobre promotores que possuem uma sequência a -35 fraca (que interage com na região 4 da  $\sigma^{70}$ )
- O RNA 6S bloqueia a interação entre a **RNAP- $\sigma^{70}$**  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- $\sigma^{38}$  na fase estacionária

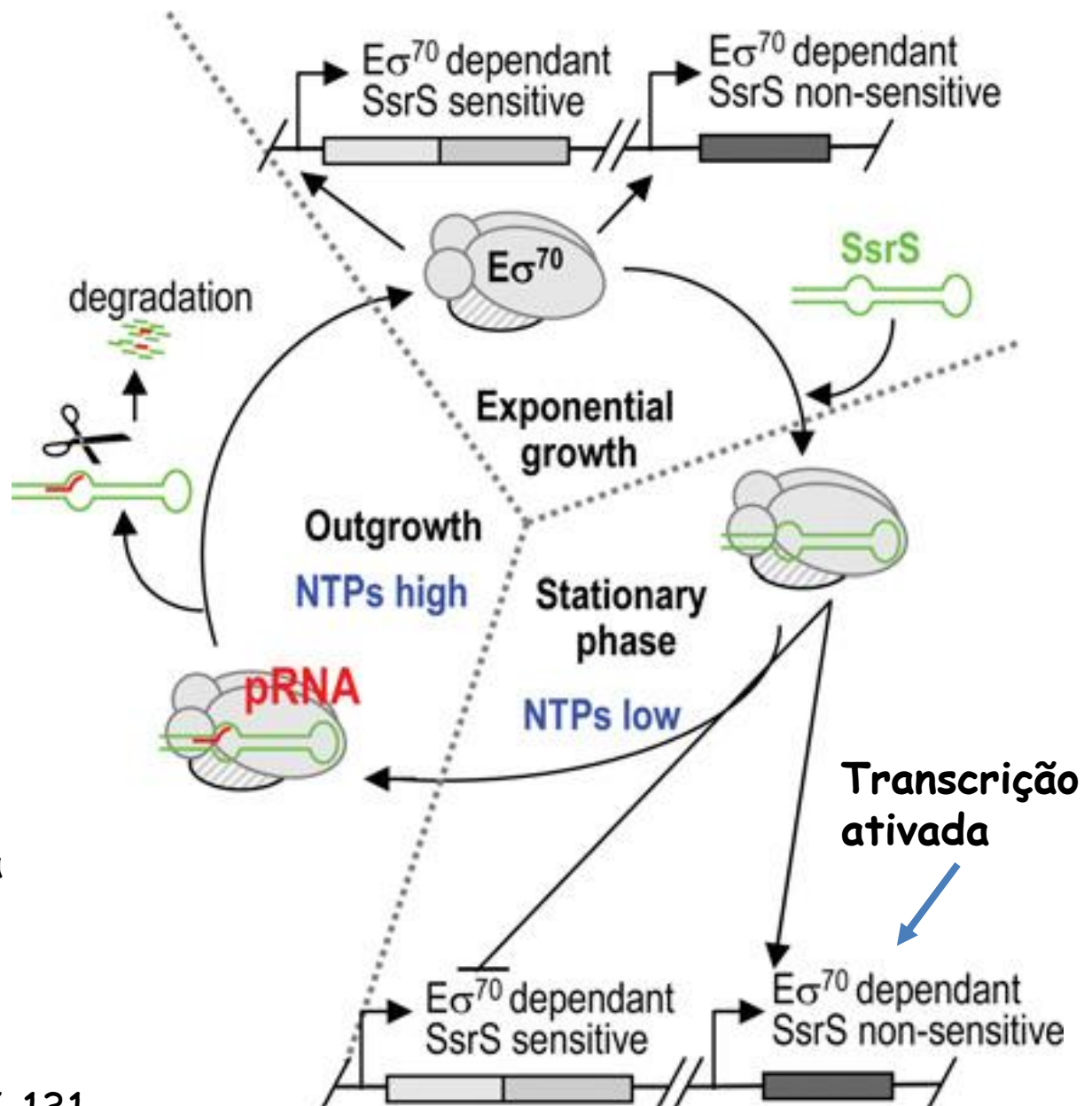
Na fase estacionária de uma cultura de *E. coli*, quando os níveis de NTPs são baixos:

~ 80% de **RNAP- $\sigma^{70}$**  está ligado a SsrS (6SRNA).

O complexo  **$\sigma^{70}$ -RNAP.6S RNA** só interage com certos promotores.

Assim, 6SRNA provoca uma reprogramação na atividade transcricional da **RNAP- $\sigma^{70}$**

Biol. Cell (2009) **101**, 117-131



# Estruturas secundárias: RNA com termosensores

Temperatura é um parâmetro importante que as células monitoram constantemente.

A expressão de genes de "choque térmico", "choque frio" e alguns genes de virulência é coordenada em resposta a mudanças de temperatura.

**Além da regulação gênica na transcrição em resposta a variação de temperatura, o mecanismo de controle da tradução por "termômetros de RNA" é um amplamente utilizado**

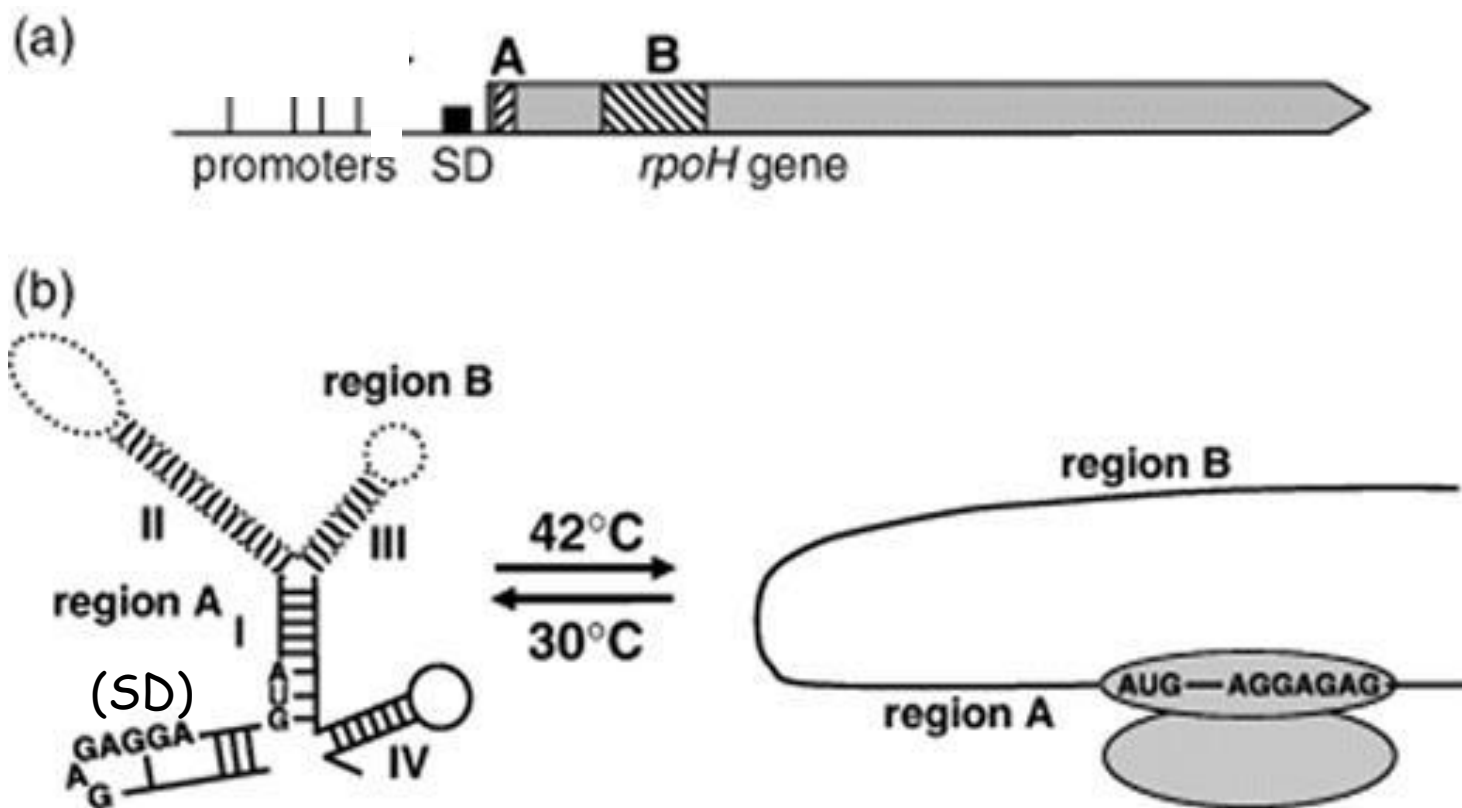
"Termômetros de RNA" são estruturas no próprio mRNA que mudam de conformação em resposta à temperatura.

Na maioria dos casos encontram-se no 5' UTR e mascaram o sítio SD/RBS de ligação ao ribossomo.

Com o aumento a temperatura estas estruturas de se fazem, o que permite o acesso ao ribossomo e o início da tradução.

## Termômetro de RNA: tradução do gene do fator sigma $\sigma^{32}$ (RpoH)

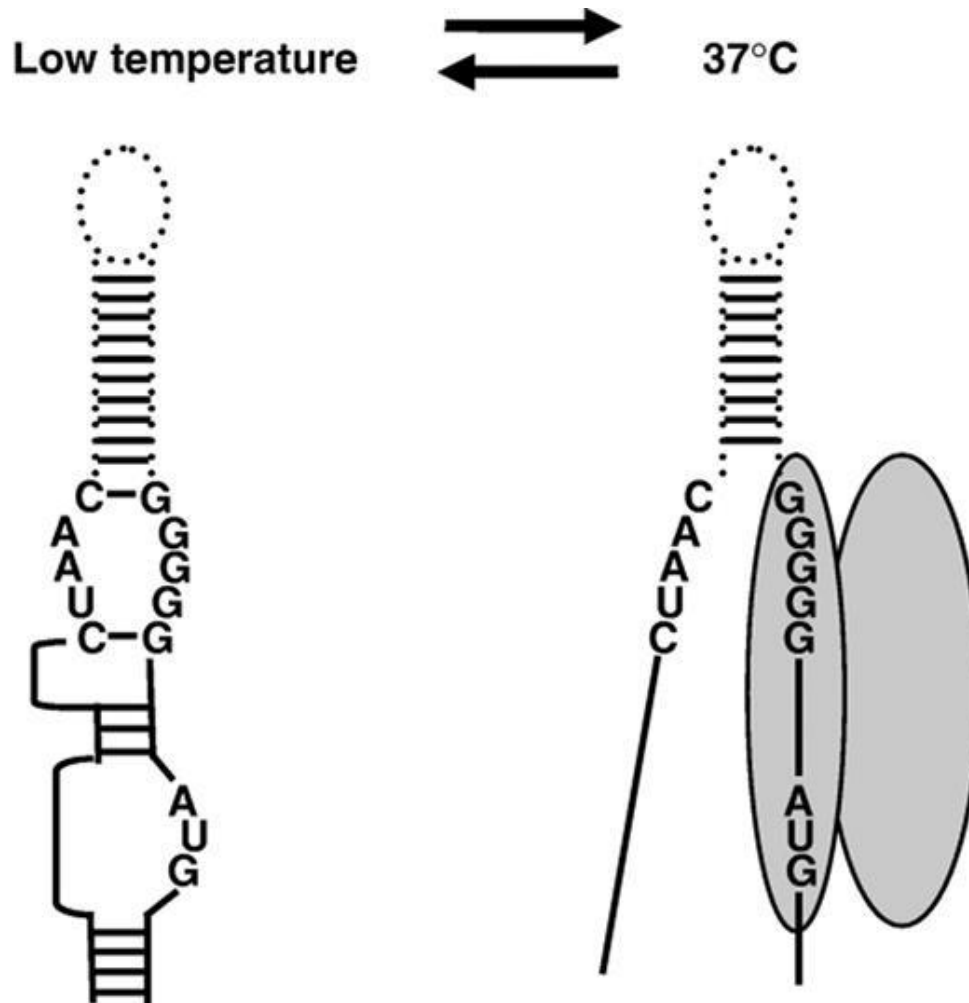
- A tradução do mRNA do fator gene *rpoH* do  $\sigma^{32}$  RNAP de *E. coli*, que atua na transcrição de genes de choque térmico, é controlada por um "termômetro de RNA", que assegura eficiência de tradução com a variação da temperatura.



Elementos reguladores do gene *Escherichia coli rpoH* (a).

Esquemático das estruturas secundárias ("termo sensores") envolvidas no controle translacional do termoregulador (b). AAGGAG, sequência Shine - Dalgarno (SD); AUG, códon de início da tradução

Ex. Modelo de termo-regulação da expressão de PrfA (ativador da expressão de genes de virulência da *Listeria monocytogenes*):



Em baixas temperaturas ( $\sim 30^{\circ}\text{C}$ ) *prfA* mRNA-5' UTR forma um estrutura secundária que mascara o RBS, impedindo a ligação do ribossoma.

A  $37^{\circ}\text{C}$  (temperatura do hospedeiro) a estrutura do *prfA* mRNA 5' UTR se desfaz parcialmente e permite a ligação do ribossoma ao SD

Tradução do mRNA de *prfA* permite a expressão dos genes de virulência *L. monocytogenes*.



**Portanto:**

Em bactéria, a síntese de uma proteína pode ser regulada, positiva ou negativamente, a nível da tradução, em um processo independente da transcrição, mas pode afetá-la.

# **3 - Regulação da expressão gênica pós-tradução**

# Controle da expressão gênica pós-tradução

Envolve mecanismos:

- reversíveis (mudança de conformação da proteína por fosforilação, glicosilação etc) ou
- irreversíveis (processamento proteolítico, "protein splicing", etc ).

# Modificações de proteínas

Interação com pequenas moléculas ou alteração química causando mudança de conformação.

Ex: LacI/lactose (operon *lac*)

CAP-cAMP

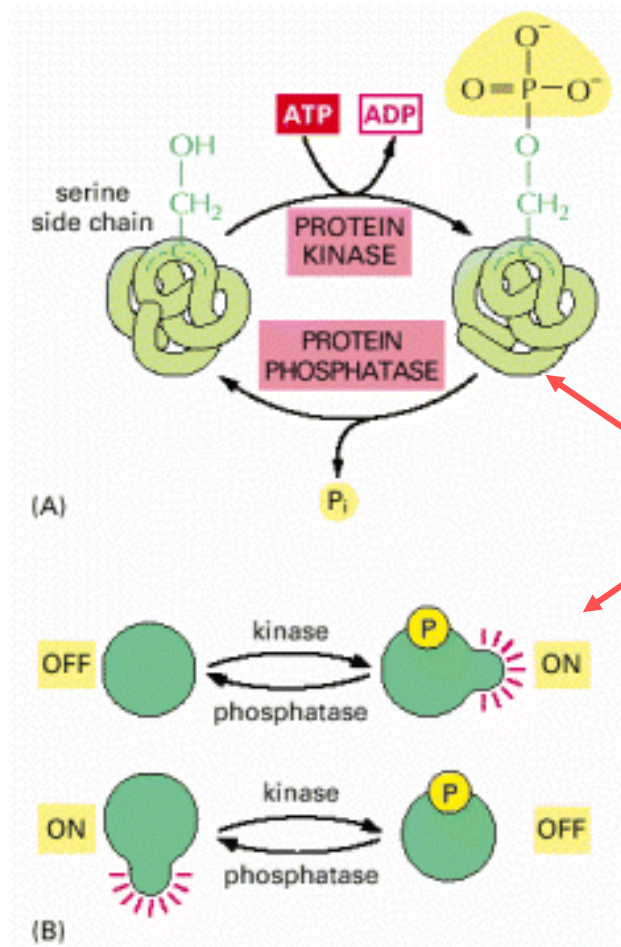
AraC/arabinose (operon *ara*)

Ion Fe, etc

Fosforilação, glicosilação,  
ou outras modificações reversíveis.

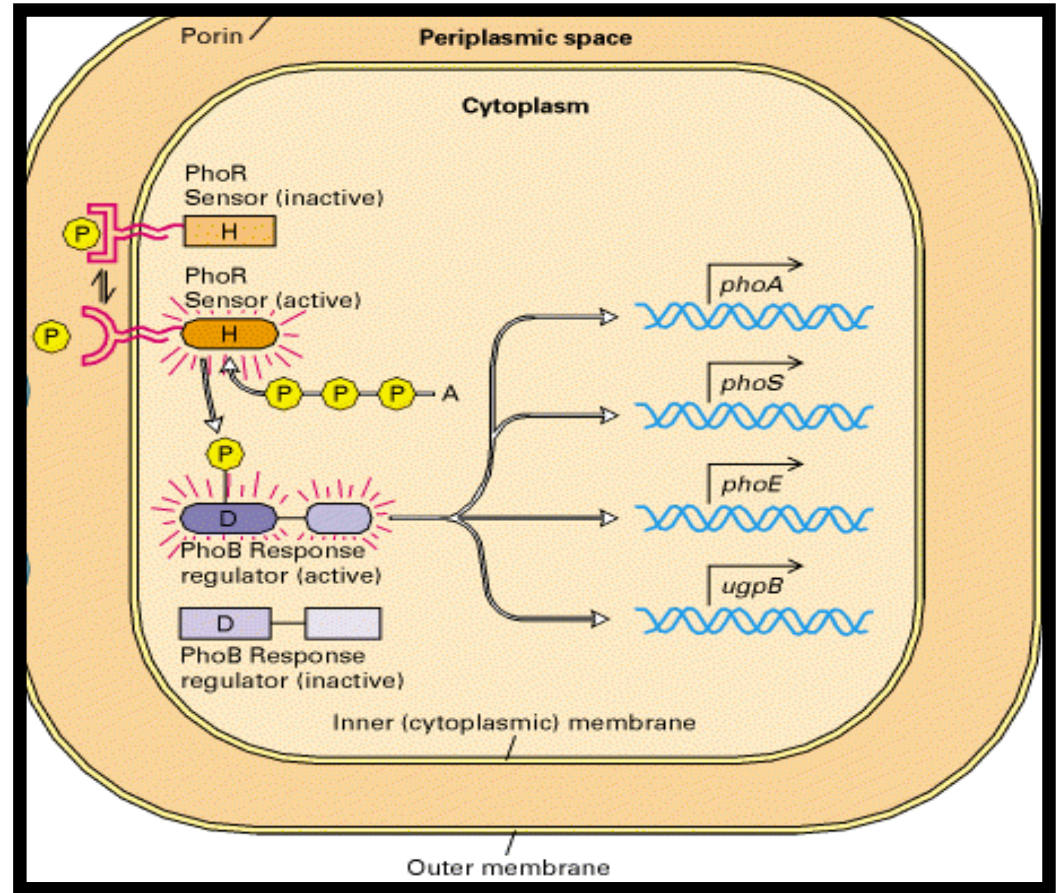
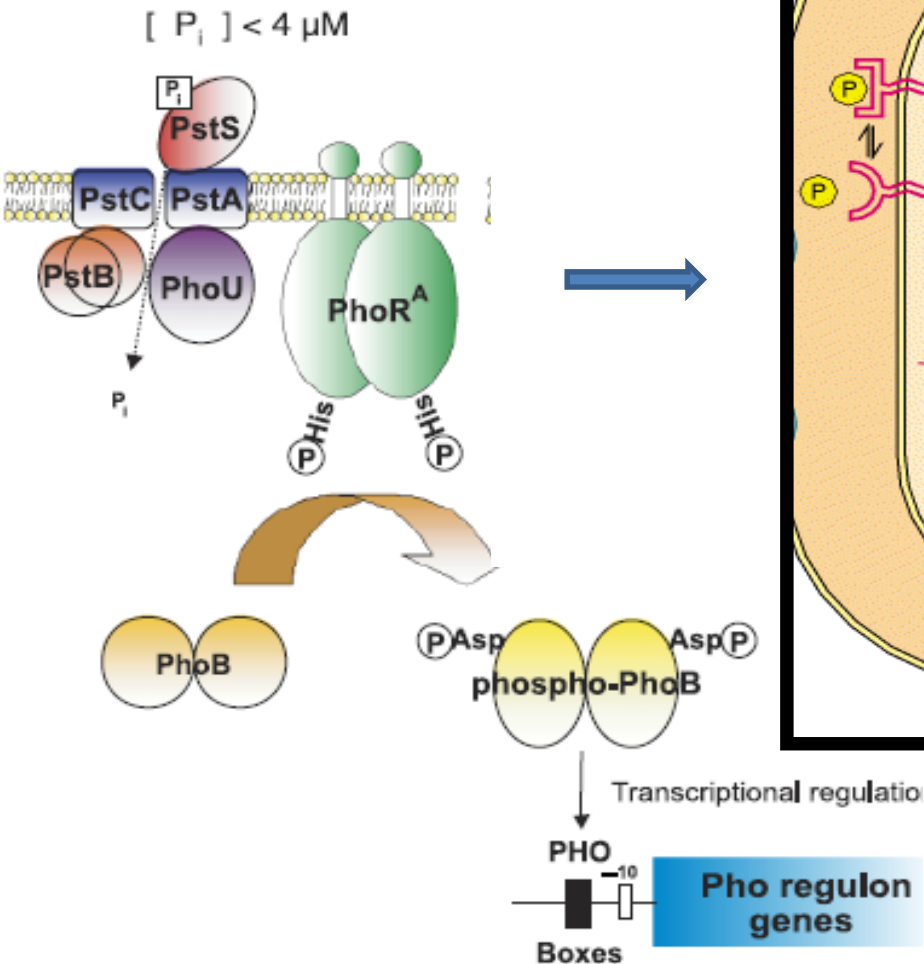
Processamento proteolítico.

**Alteração química ou hidrólise de uma proteína reguladora pode levar à alteração da expressão de vários genes (a nível da transcrição).**



**Fosforilação**

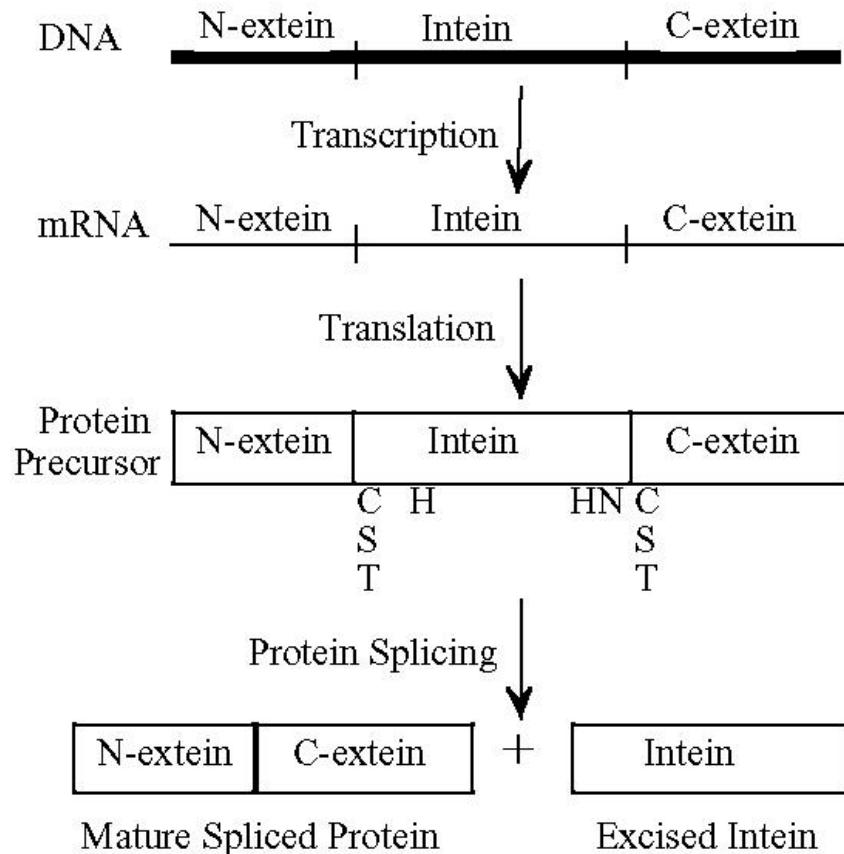
# Ativação de PhoB em resposta a limitação de Pi



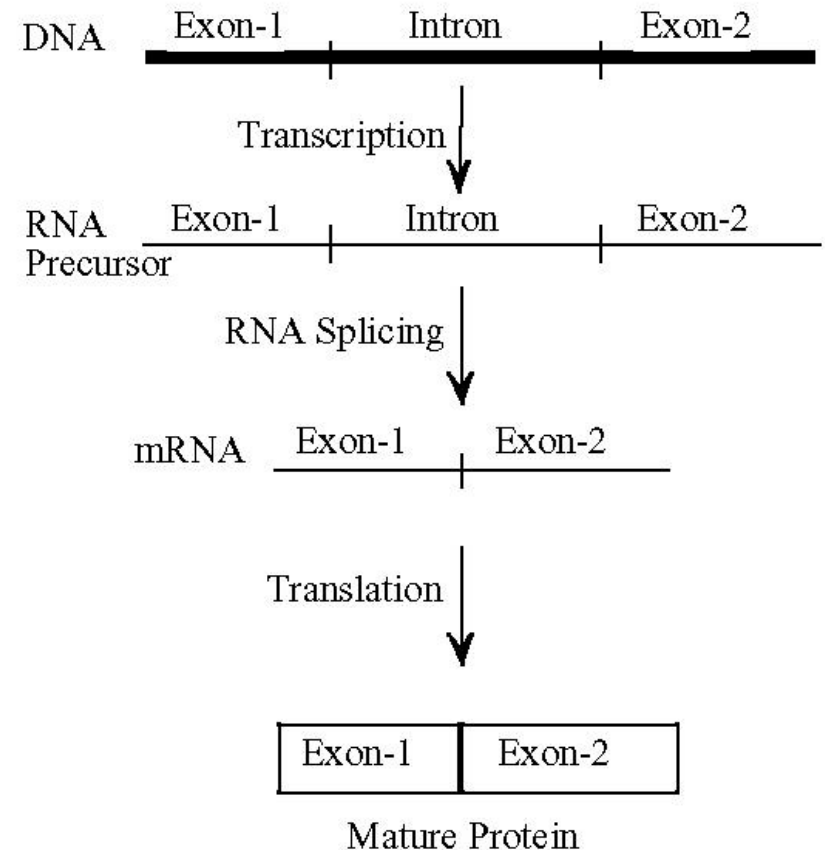
Indução da expressão de genes envolvidos na captação e metabolismo de  $P_i$  (fosfato inorgânico).

# Splicing de proteínas: análogo ao splicing de RNA

## Protein Splicing:

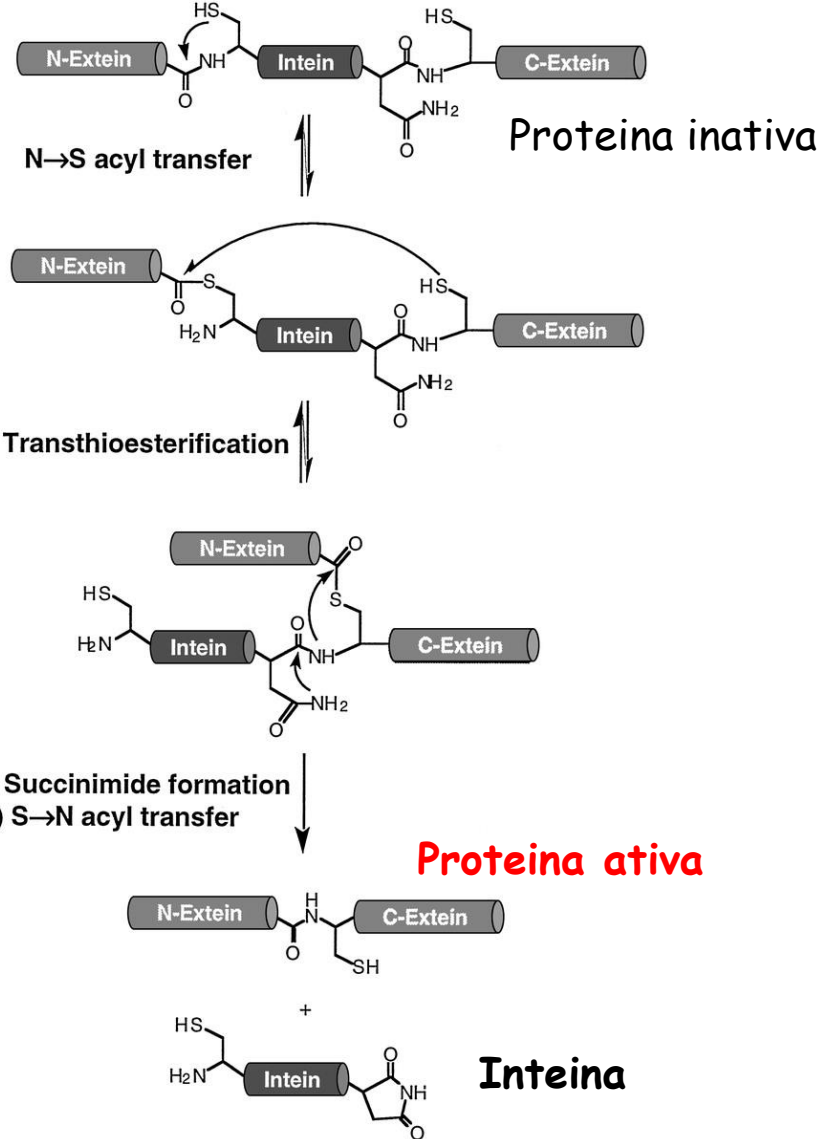
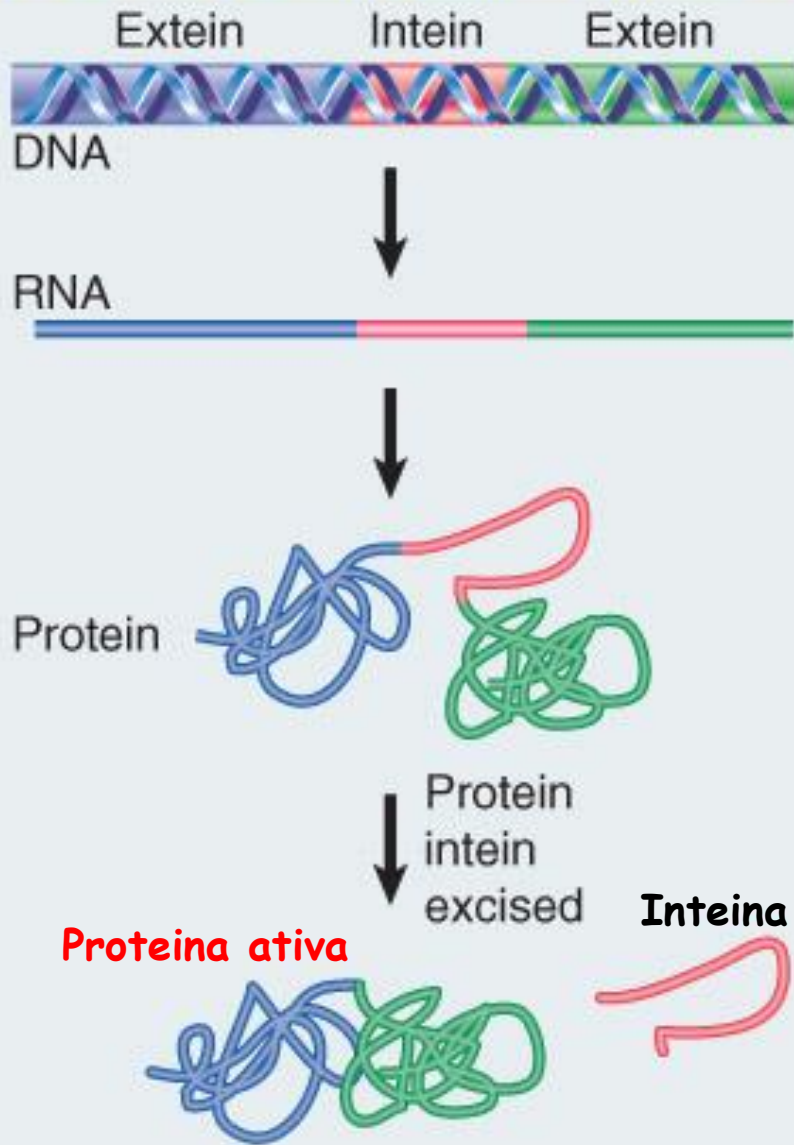


## RNA Splicing:



**Genes que codificam inteínas são elementos genéticos móveis que invadem genes "hospedeiros" no DNA e são então expressos como sequências intervenientes dentro de proteínas.**

## Protein splicing excises an intein

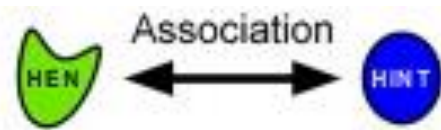


"Splicing" de proteínas é um processo autocatalítico através do qual uma inteína é removida de uma proteína e as exteínas são ligadas por ligações peptídicas.

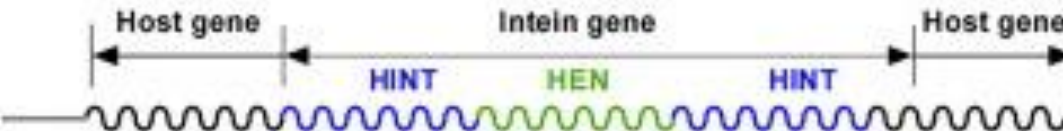
# Funções de inteínas

- Muitas inteínas encontram-se dentro de formas precursoras de proteínas críticas para a bactéria, como as envolvidas na replicação do DNA (helicase) recombinação e reparo (RecA/RadA).
- Algumas inteínas atuam como **endonucleases**, para propagação de seu gene no genoma bacteriano.
- . Current Biology, Volume 27, Issue 6, 2017, pp. R204-R206; Current Opinion in Microbiology, Volume 38, 2017, pp. 51-58; Current Biology vol 27, no. 6, R199-R217, 2017

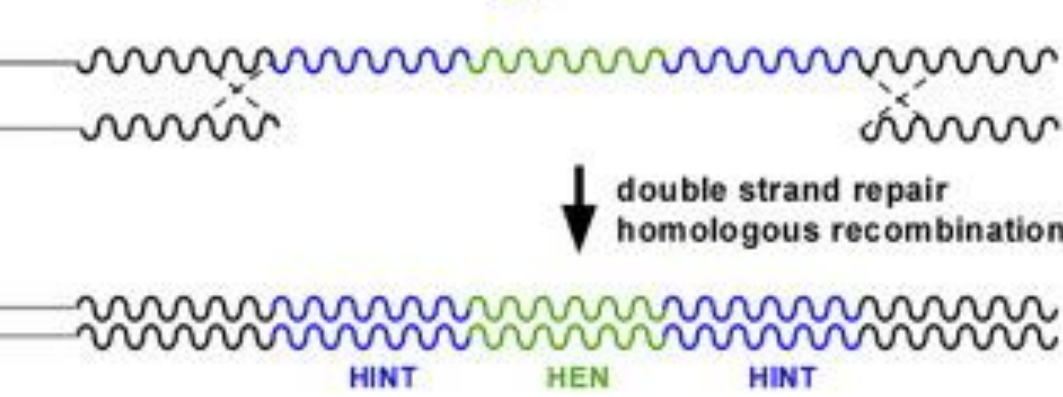
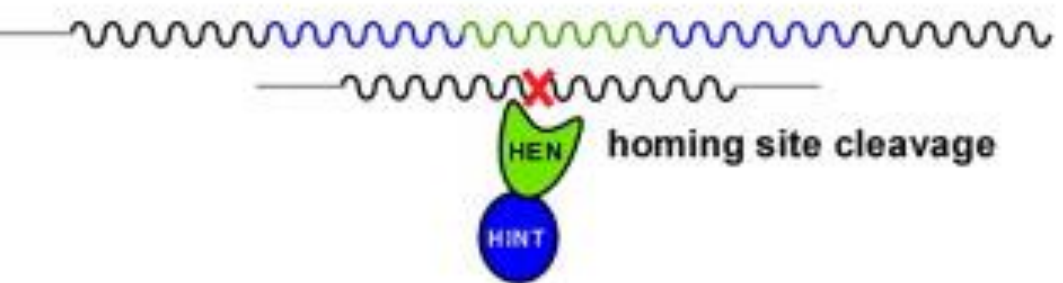




homing endonuclease (HEN)      Mini-intein (Hedgehog/INTein, HINT)



Transcription, Translation  
& Protein Splicing



# Endonucleases

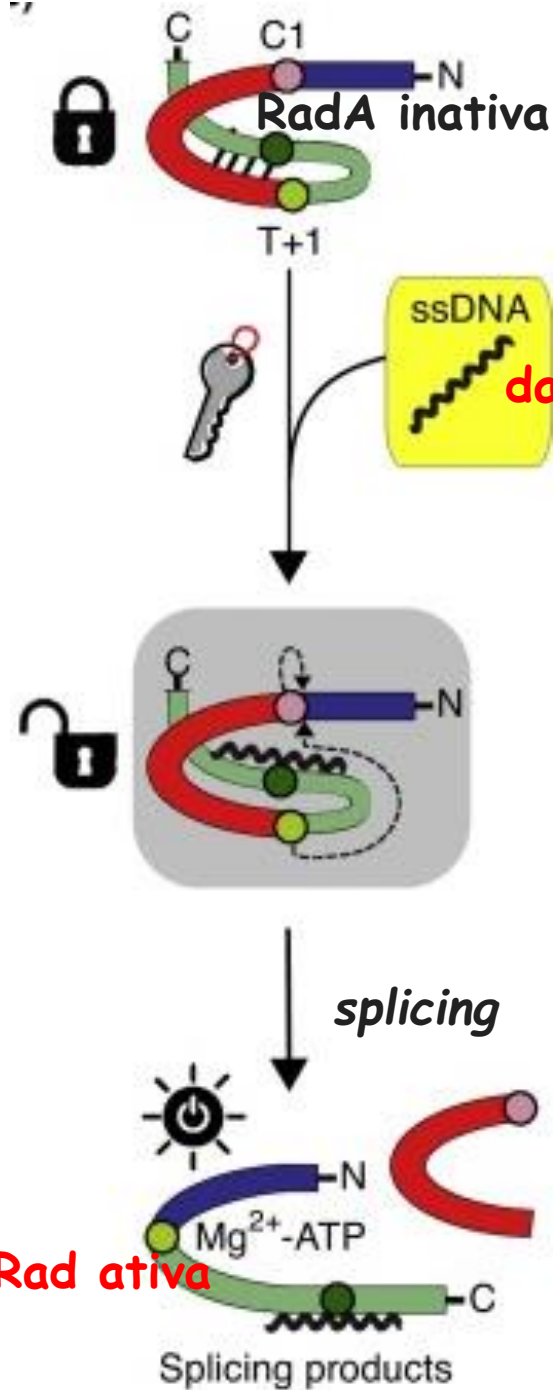
Muitas inteinas são bi-funcionais, contendo um domínio HINT (azul escuro) para o *splicing* de proteínas, e um domínio de **endonuclease** (HEN, verde), que é responsável por sua propagação por transferência horizontal de seu gene.

O domínio HEN cataliza a inserção da sequência codificadora (azul e verde) da inteina dentro de sítios específicos do DNA da bactéria.

# Inteínas como sensores ambientais

Inteínas também podem atuar como **sensores ambientais**: sendo removidas por *splicing*, em resposta a sinais específicos, regulando a função das proteínas em que estão inseridas.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS, *reactive nitrogen species*), temperatura, pH, sal e danos ao DNA, podem modular *splicing* de inteínas, que atuariam como sensores destes sinais.



Ex: *Splicing* do precursos da proteína Rad  
(homóloga a RecA) envolvida no repado de DNA

danos no DNA (DNA fita simples)

Estimulação de *splicing* do precursor da  
proteína RAD, por ssDNA, que sinaliza danos  
no DNA.

Interação do ssDNA com RAD estimula o  
*splicing* e a formação da forma ativa da  
proteína, Rad, é uma recombinase envolvida no  
reparo do DNA.

[Current Opinion in Microbiology](#)  
[Volume 38](#), August 2017, Pages 51-58

Genes Dev. 2016, 30::2663–2668

# Propriedades do *splicing* de proteínas

- É um processo intramolecular.
- Não requer coenzimas ou fontes de energia.
- Envolve rearranjo de ligações químicas entre amino ácidos da molécula, não havendo quebras e ressíntese de ligações.

**Portanto:**

a síntese de uma proteína pode ser regulada, positiva ou negativamente, a nível da pós-tradução e, dependendo da proteína (no caso por ex. de uma proteína reguladora), esta alteração pode afetar a expressão de outros genes.



Fim