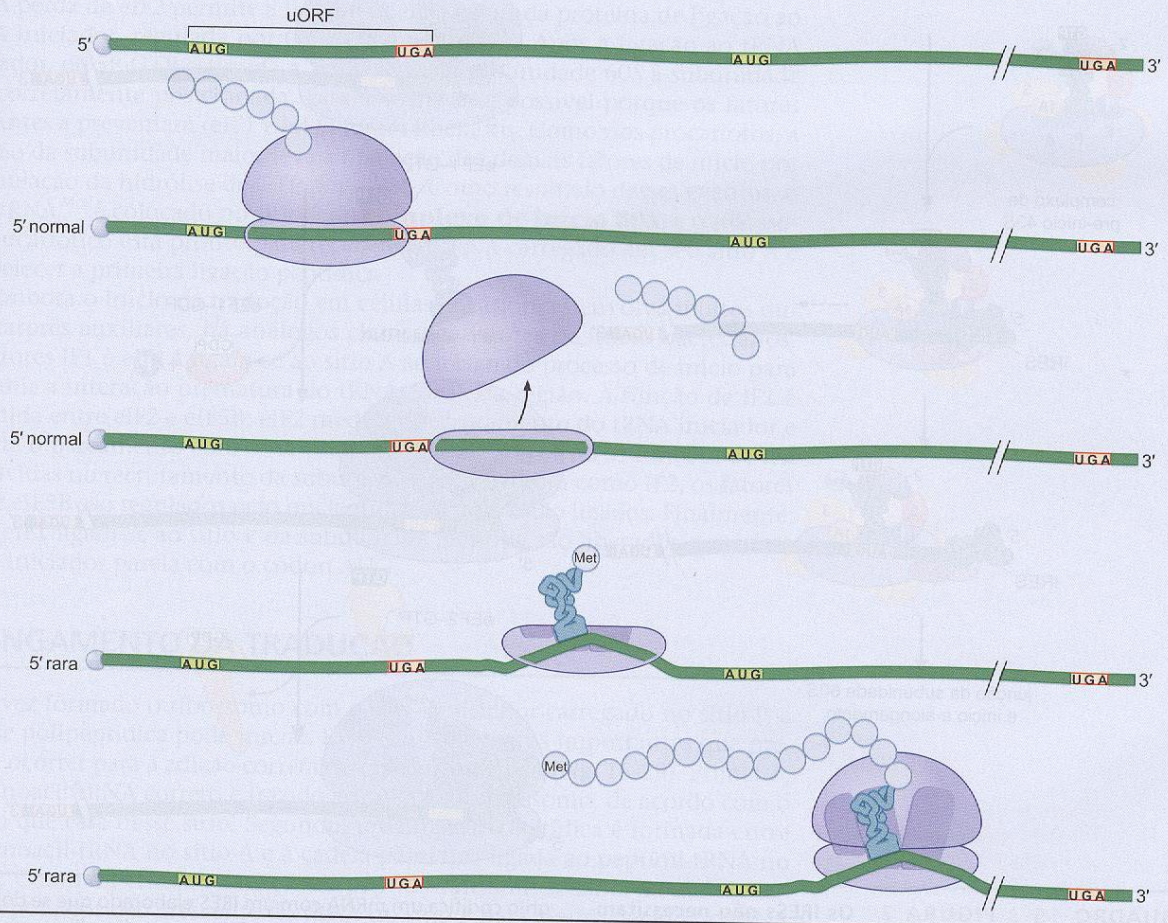
CONCEITOS AVANÇADOS

Quadro 15-3 uORFs e IRESs: exceções que confirmam a regra

Nem todos os polipeptídeos eucarióticos são codificados por fases de leitura que começam com o AUG mais próximo da extremidade 5′. Em alguns casos, o primeiro AUG não está em um contexto de sequência apropriado, sendo desconsiderado. Em outros casos, ORFs curtas, a montante (uORFs [u, do inglês, *upstream*], geralmente codificando peptídeos com menos de dez aminoácidos), são traduzidas, mas uma parcela (normalmente 50%) das subunidades 40*S* é retida no mRNA após o término da tradução da uORF. A curta extensão destas uORFs permite interações entre fatores de início (p. ex., eIF4G e eIF3) que prendem ao mRNA a subunidade 40*S*, a ser retida após o término (Fig. 1 deste quadro). A subunidade 40*S* retida continua a escanear pelo próximo AUG, mas só consegue identificar um AUG após ligar-se a um novo complexo ternário (TC; eIF2-tRNA iniciador) porque o anticódon do tRNA iniciador é necessário para detectar um AUG (ver Fig. 1 deste quadro). Em geral, as uORFs reduzem, mas não eliminam, a tradução da ORF primária. Adiante, neste capítulo, será discutido um exemplo específico de como as uORFs podem ser utilizadas para regular a tradução.

Um exemplo ainda mais extremo de início da tradução em sítios mais a jusante do AUG mais próximo da extremidade 5′ é demonstrado por sítios internos de acesso do ribossomo (IRESs, *internal ribosome entry sites*). Os IRESs são sequências de RNA que atuam como sítios procarióticos de ligação do ribossomo. Eles recrutam a subunidade menor para ligação e início mesmo na ausência de *cap* 5′ (Fig. 2 deste quadro). Os IRESs são geralmente codificados em mRNAs virais desprovidos de uma extremidade *cap* 5′ e que necessitam explorar ao máximo as sequências em seu genoma. Ao utilizar IRESs, um mRNA viral pode codificar mais de uma proteína, diminuindo a necessidade de extensas sequências de regulação da transcrição para cada sequência codificadora de proteína. Ao evitar a necessidade de um ou mais fatores de início, um IRES pode continuar funcionando na ausência do fator. Esta necessidade distinta pode ser explorada para permitir que apenas um pequeno subconjunto de mRNAs

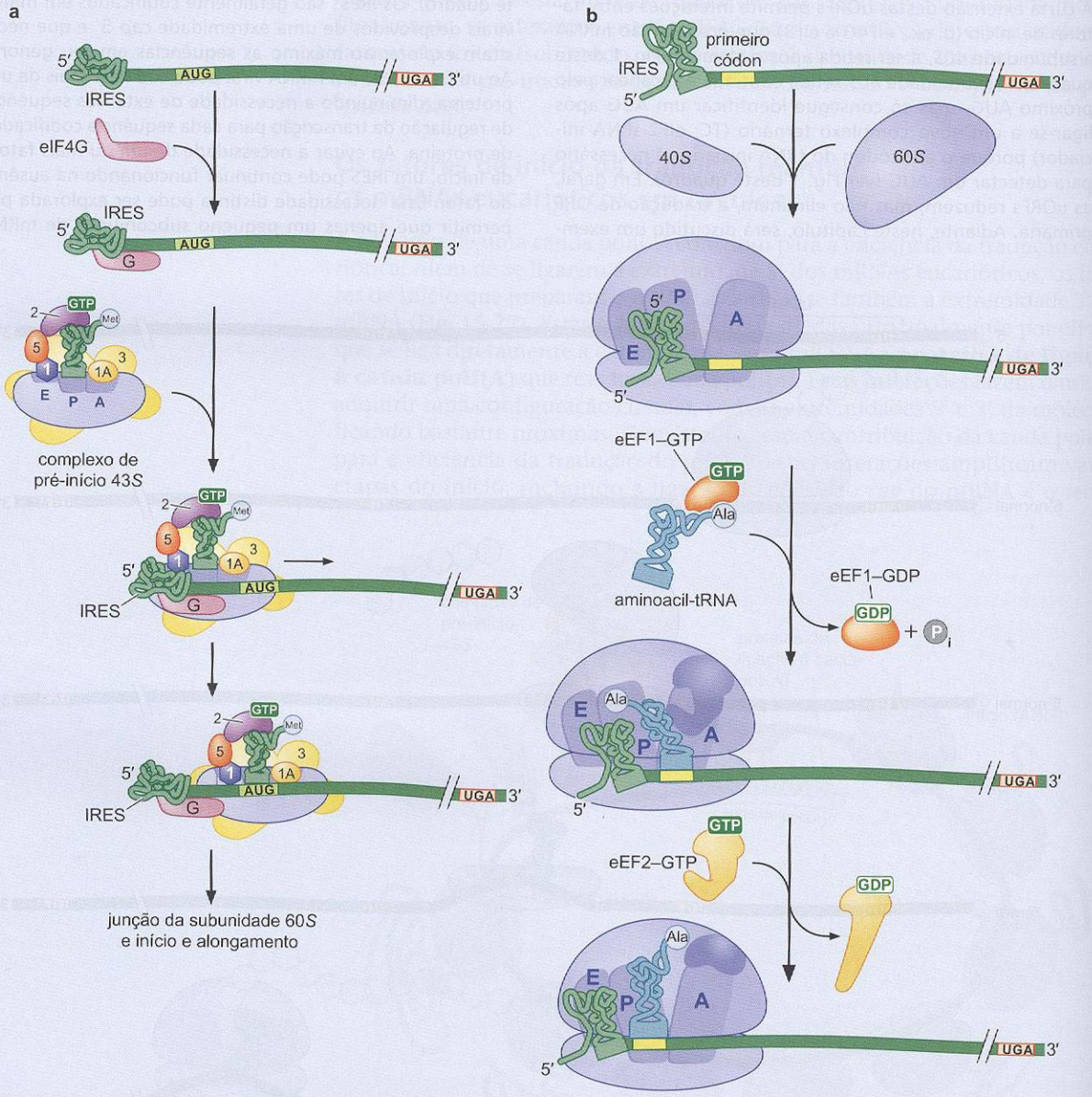


QUADRO 15-3 FIGURA 1 As uORFs regulam a tradução de ORFs a jusante. Em alguns casos, depois que um ribossomo traduz uma uORF, a subunidade menor permanece no mRNA e inicia a busca por um segundo AUG. Ela só conseguirá reconhecer um segundo AUG quando estiver ligada a um novo tRNA iniciador.

(continua)

portadores de IRES seja traduzido em uma célula desprovida de um fator de início. Por exemplo, durante a apoptose (ou morte celular programada), proteases recém-ativadas destroem o eIF4E, mas um subconjunto de proteínas necessárias para a apoptose continua a ser traduzido devido à presença de sequências de IRES em suas regiões 5′ não traduzidas (5′-UTRs) que não necessitam de eIF4E.

Diferentes sequências de IRESs funcionam de modos diferentes. Pelo menos uma IRES viral liga-se diretamente ao eIF4G, não necessitando da proteína eIF4E de ligação ao *cap* 5′ para recrutar eIF4E (Fig. 2a deste quadro). O tipo mais extremo de IRES é exemplificado pelo mRNA do vírus da paralisia do grilo. A 5′-UTR desse mRNA forma uma estrutura de RNA complexa que mimetiza um tRNA ligado a um mRNA no estado híbrido PE e se liga diretamente ao sítio P da subunidade 40*S*. Desta maneira, o mRNA evita a necessidade de fatores de início e de um tRNA iniciador (Fig. 2b deste quadro). É importante observar que a sequência de RNA a jusante desta estrutura está posicionada no sítio A do centro de decodificação, permitindo-a atuar como o primeiro códon. A existência de IRESs que não necessitam de fatores de início levou à hipótese de que, no início da evolução, todos os mRNAs possuíam esses IRESs e que os fatores de início evoluíram posteriormente, tornando a tradução mais eficiente e versátil.



QUADRO 15-3 FIGURA 2 Os IRESs não necessitam de fatores para o início da tradução. Os vírus geralmente codificam sequências IRESs que se dobram em estruturas de RNA que não requerem um ou mais fatores de início eucarióticos. (a) O IRES do poliovírus evita a necessidade de um *cap* 5′ ao ligar-se diretamente a eIF4G. (b) O vírus da paralisia do grilo codifica um mRNA com um IRES elaborado que se dobra de maneira semelhante a um tRNA que se liga diretamente ao sítio P das subunidades ribossomais 40*S* e 60*S*. O mRNA a jusante é posicionado no sítio A e codifica uma Ala como primeiro aminoácido.

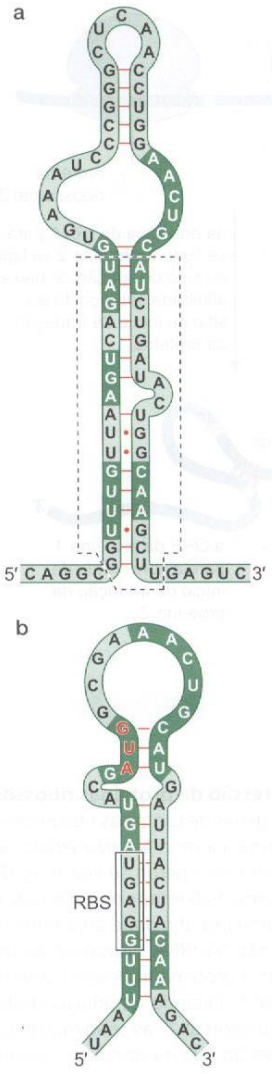


FIGURA 15-45 A proteína ribossomal S8 se liga ao rRNA 16*S* e a seu próprio mRNA. A comparação mostra as regiões dos dois RNAs ligados pela proteína ribossomal S8 (codificada pelo óperon *spc*) (Fig. 15-43). (a) Região do rRNA 16*S* ligada pela proteína S8. (b) Sítio de início da tradução da proteína ribossomal S8 que é ligado quando não há rRNA 16*S* disponível para ligação. Sequências compartilhadas estão sombreadas em verde-escuro. As linhas pontilhadas ressaltam a região do rRNA 16*S* protegida pela proteína S8. O AUG (em vermelho) e o sítio de ligação ao RBS (enquadrado) para o mRNA da proteína S8 estão indicados (b). (Adaptada, com permissão, de Cerretti D.P. et al. 1988. *J. Mol. Biol.* **204**: 309–329. ©Elsevier.)

Reguladores globais da tradução eucariótica têm como alvo fatores fundamentais necessários para o reconhecimento do mRNA e ligação do tRNA iniciador ao ribossomo

Sob condições de nutrientes reduzidos ou outros estresses celulares, em geral, é útil para as células eucarióticas reduzir globalmente a tradução. Nestes casos, duas etapas iniciais do início da tradução eucariótica são alvo para inibição: o reconhecimento do mRNA ou a ligação do tRNA iniciador à subunidade 40*S*. Deve-se ter em mente a discussão anterior sobre o início da tradução eucariótica, na qual se viu que estes eventos ocorrem de maneira independente um do outro, mas que a inibição de qualquer um deles abole a síntese de novas proteínas. Em ambos os casos, o mecanismo de inibição é controlado por fosforilação.

Um mecanismo comum de inibição é mediado pela fosforilação de eIF2. Lembre-se de que o eIF2 ligado ao GTP é necessário para direcionar o tRNA iniciador ao sítio P da subunidade 40*S* do ribossomo eucariótico. Várias proteínas quinases foram identificadas como atuantes na fosforilação da subunidade α de eIF2. A fosforilação dessa subunidade inibe a ação de um fator de troca de GTP para eIF2, chamado eIF2B, levando à redução dos níveis de eIF2–GTP. Com atuação semelhante ao EF-Ts sobre EF-Tu–GDP, o eIF2B estimula o eIF2–GDP a liberar seu GDP ligado e ligar-se a GTP. Como o eIF2 ligado ao GTP é necessário para escoltar o tRNA iniciador à subunidade 40*S*, níveis reduzidos de eIF2–GTP limitam o início da tradução. As conhecidas quinases eIF2α são ativadas por várias condições celulares diferentes, incluindo redução nos níveis de aminoácidos (ver discussão a seguir), infecção viral e temperatura elevada.

Um segundo mecanismo de inibição global do início da tradução tem como alvo a proteína de ligação ao *cap* 5′: eIF4E. Após a ligação ao *cap* 5′, eIF4E liga-se a eIF4G. O curto domínio de eIF4G que é reconhecido por eIF4E também é encontrado em uma pequena família de proteínas chamadas proteínas de ligação a eIF4E (4E-BPs). Essas proteínas competem com eIF4G pela ligação a eIF4E e, portanto, atuam como inibidores gerais do início da tradução (Fig. 15-46). Como eIF2, as 4E-BPs são também reguladas pela fosforilação. Em seu estado não fosforilado, as 4E-BPs ligam-se fortemente a eIF4E e inibem a tradução. Em contrapartida, a fosforilação das 4E-BPs inibe sua ligação a eIF4E (Fig. 15-46).

A fosforilação das 4E-BPs é mediada por uma proteína quinase celular essencial, chamada mTor. Fatores de crescimento, hormônios e outros fatores que estimulam a divisão celular ativam essa quinase e, portanto, aumentam a capacidade de tradução geral da célula. Essas observações levaram à hipótese de que o controle da capacidade de tradução é cuidadosamente coordenado com a proliferação celular. De fato, a superexpressão de eIF4E pode resultar em transformação cancerígena das células, e os inibidores de mTor (p. ex., rapamicina) são agentes quimioterápicos eficazes. Embora estes mecanismos reguladores tenham sido discutidos no contexto do controle global da tradução, ambos são também utilizados para regular a tradução de mRNAs específicos da célula, como será visto mais adiante.

Controle espacial da tradução por 4E-BPs mRNA-específicas

Além de regular globalmente a tradução, a ligação a eIF4E também é utilizada para regular a tradução de mRNAs específicos. Por exemplo, o estabelecimento correto do eixo anteroposterior do oócito (ovo) de *Drosophila melanogaster* e do embrião em desenvolvimento requer a correta localização de várias proteínas em um grande citoplasma compartilhado (ver Cap. 21 para uma descrição completa desses eventos). Em várias situações, a tradução espacialmente restrita destas proteínas reguladoras essenciais exerce um papel fundamental no controle de sua localização.

A proteína Oskar é cuidadosamente localizada nas regiões posteriores do oócito, antes de sua fertilização. Apesar disso, o mRNA de *Oskar* é sintetizado por células-enfermeiras (do inglês, *nurse cells*) anexas ao ovário da mosca-mãe

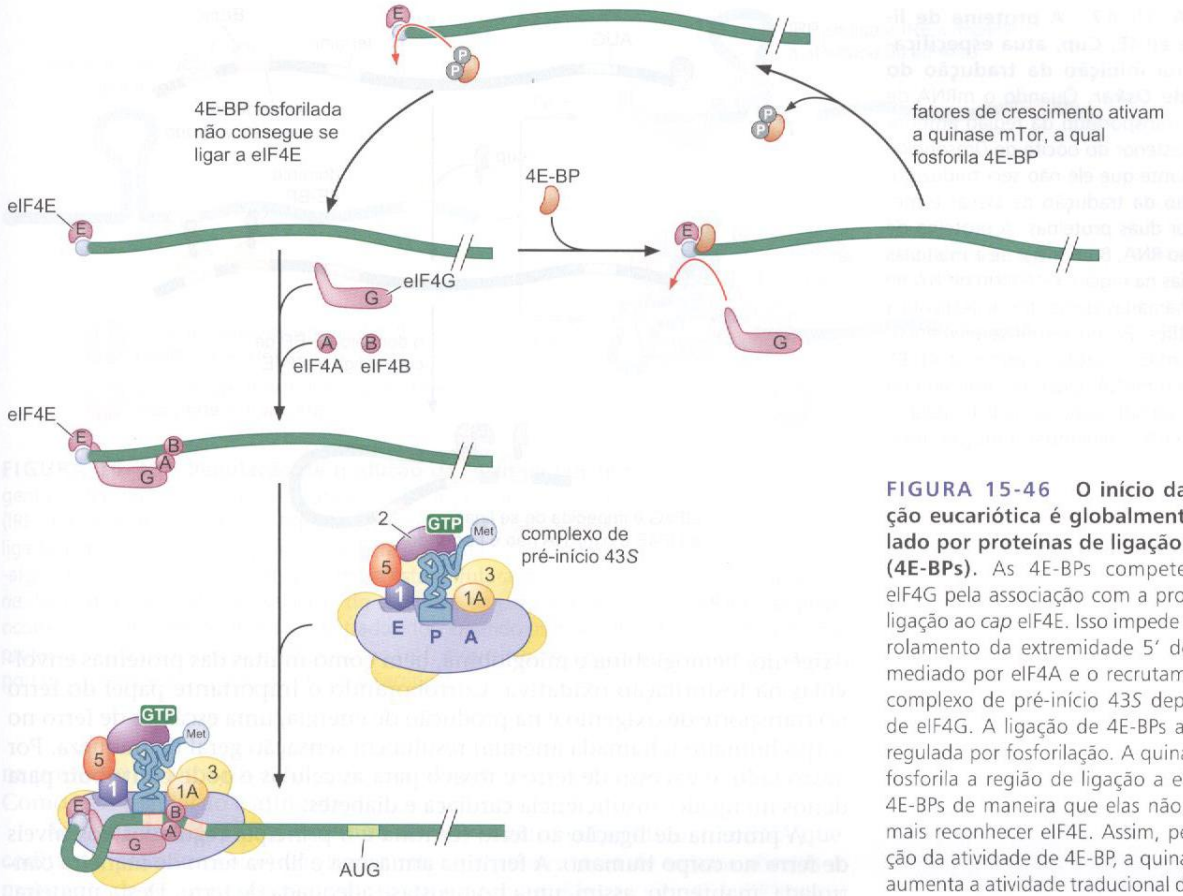


FIGURA 15-46 O início da tradução eucariótica é globalmente regulado por proteínas de ligação a eIF4E (4E-BPs). As 4E-BPs competem com eIF4G pela associação com a proteína de ligação ao *cap* eIF4E. Isso impede o desenrolamento da extremidade 5′ do mRNA mediado por eIF4A e o recrutamento do complexo de pré-início 43*S* dependente de eIF4G. A ligação de 4E-BPs a eIF4E é regulada por fosforilação. A quinase mTor fosforila a região de ligação a eIF4E das 4E-BPs de maneira que elas não possam mais reconhecer eIF4E. Assim, pela inibição da atividade de 4E-BP, a quinase mTor aumenta a atividade traducional da célula.

e depositado na região *anterior* do oócito antes da fertilização. O mRNA de *Oskar* é, então, transportado para a região posterior do oócito. Para que a célula restrinja a expressão de Oskar à região posterior, é fundamental que o mRNA de *Oskar* não seja traduzido à medida que se desloca da região anterior para a posterior do oócito.

A atuação de uma 4E-BP chamada Cup é essencial para reprimir especificamente a tradução do mRNA de Oskar (Fig. 15-47). O mRNA de *Oskar* contém várias sequências na região 3′-UTR que se ligam especificamente a uma proteína chamada Bruno. Bruno, por sua vez, liga-se a Cup, recrutando esta 4E-BP para o mRNA de *Oskar*. Quando localizada no mRNA de *Oskar*, Cup sobrepõe-se a eIF4G na competição pela ligação a eIF4E, inibindo, assim, a tradução do mRNA. Cup não é abundante o suficiente para atuar de maneira geral em todas as traduções, como fazem as 4E-BPs descritas anteriormente. Ainda assim, quando localizada em um determinado mRNA, Cup torna-se um inibidor de tradução bastante efetivo. Esse mecanismo não é exclusivo de Oskar. A proteína Nanos, de *Drosophila*, também é regulada pelo recrutamento de Cup para seu mRNA. De maneira semelhante, uma proteína de ligação a mRNA chamada CPEB recruta uma 4E-BP chamada Maskin para alguns mRNAs cuja tradução é inibida durante o desenvolvimento do oócito de vertebrados.

Uma proteína de ligação ao RNA, regulada pelo ferro, controla a tradução da ferritina

A regulação dos níveis de ferro é essencial para o corpo humano. Muitas proteínas utilizam o ferro como cofator, incluindo as proteínas de transporte de

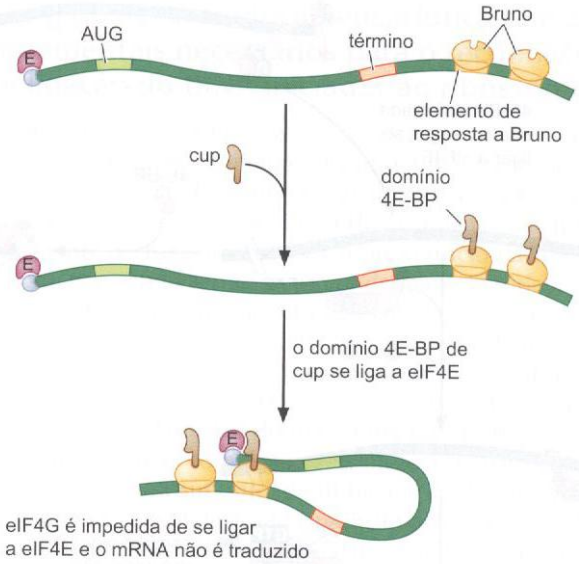


FIGURA 15-47 A proteína de ligação a eIF4E, Cup, atua especificamente na inibição da tradução do mRNA de *Oskar*. Quando o mRNA de *Oskar* é transportado da região anterior para a posterior do oócito de *Drosophila*, é importante que ele não seja traduzido. A inibição da tradução de Oskar é mediada por duas proteínas. A proteína de ligação ao RNA, Bruno, liga-se a múltiplas sequências na região 3′-UTR do mRNA de *Oskar*, chamadas elementos de resposta a Bruno (BREs, *Bruno response elements*). Bruno, então, recruta a proteína 4E-BP Cup para o mRNA. Quando localizada no mRNA, Cup sobrepõe-se a eIF4G pela ligação a eIF4E, inibindo a tradução deste mRNA.

oxigênio, hemoglobina e mioglobina, bem como muitas das proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. Corroborando o importante papel do ferro no transporte de oxigênio e na produção de energia, uma escassez de ferro no corpo humano (chamada anemia) resulta em sensação geral de fraqueza. Por outro lado, o excesso de ferro é tóxico para as células e pode contribuir para danos no fígado, insuficiência cardíaca e diabetes.

A proteína de ligação ao ferro ferritina é o principal regulador dos níveis de ferro no corpo humano. A ferritina armazena e libera ferro de maneira controlada, mantendo, assim, uma homeostase adequada de ferro. Desta maneira, os níveis de ferritina devem responder rapidamente aos níveis de ferro livre no corpo. A necessidade de responder rapidamente a alterações nos níveis de ferro livre resultou na regulação da expressão de ferritina em nível de síntese proteica.

A tradução da ferritina é regulada por proteínas de ligação ao ferro chamadas proteínas reguladoras do ferro (IRPs, *iron regulatory proteins*). Essas proteínas são também proteínas de ligação ao RNA que reconhecem uma estrutura em grampo específica formada na extremidade 5′ do mRNA da *ferritina*, chamada elemento regulador de ferro (IRE, *iron regulatory element*) (Fig. 15-48). É importante notar que a habilidade de essas proteínas reconhecerem o IRE é controlada pelos níveis de ferro na célula. Em células deficientes em ferro, a concentração de ferro é muito baixa para ligar-se às IRPs. Na ausência de ferro ligado, essas proteínas ligam-se fortemente ao IRE e inibem a habilidade de eIF4A/B desfazer a estrutura em grampo do IRE. A presença continuada do grampo atua como um bloqueio estérico para a ligação do mRNA ao complexo 43*S*. Em contrapartida, quando a concentração de ferro livre na célula for elevada, as IRPs ligam-se ao ferro. Quando ligadas ao ferro, as IRPs perdem sua habilidade de ligar-se ao IRE e, portanto, não conseguem inibir a tradução.

A tradução do ativador transcricional de levedura Gcn4 é controlada por curtas ORFs a montante e pela abundância de complexo ternário

O Gcn4 é um ativador transcricional de levedura que regula a expressão de genes codificadores das enzimas que promovem a biossíntese dos aminoácidos. Embora seja um ativador de transcrição, o próprio Gcn4 é regulado em nível de tradução. Na presença de baixos níveis de aminoácidos, o mRNA de *Gcn4* é traduzido (e, assim, as enzimas de biossíntese são expressas). Contudo,

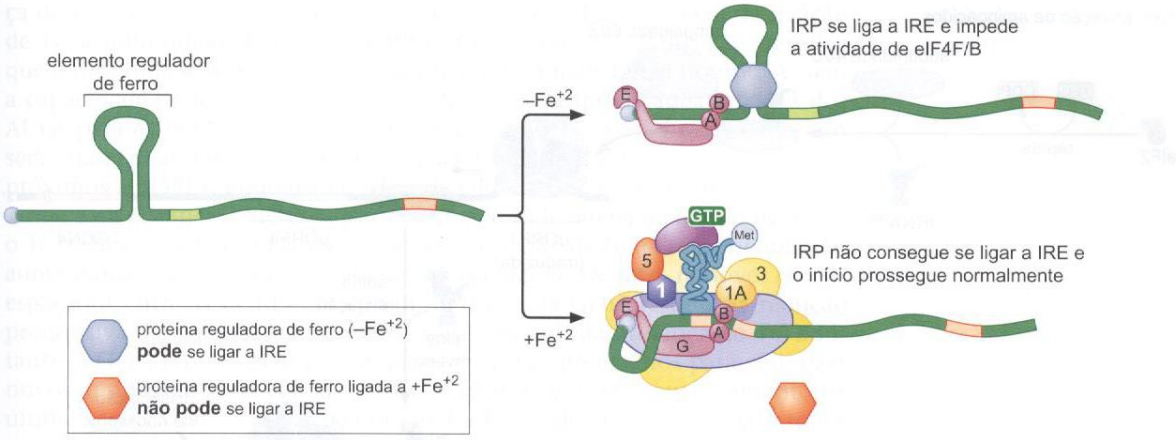


FIGURA 15-48 Regulação da tradução da Ferritina por ferro. A região 5'-UTR dos genes de *ferritina* inclui uma estrutura em haste-alça chamada de elemento regulador de ferro (IRE, *iron regulatory element*). A proteína reguladora de ferro (IRP, *iron regulatory protein*) se liga fortemente a este sítio quando não está ligada a Fe^{2+}. Ao estabilizar a estrutura de haste-alça de IRE, IRP impede que eIF4A remova esta estrutura da extremidade do mRNA da *ferritina*. Sob estas condições, a associação do complexo de pré-início 43*S* com o mRNA não pode ocorrer e os genes da *ferritina* não são traduzidos. Quando os níveis de ferro estão elevados e a proteína Ferritina é necessária, IRP se liga ao Fe^{2+}, o que inibe sua habilidade de se ligar a IRE e, portanto, permite a tradução da proteína Ferritina.

na presença de altos níveis de aminoácidos, o mRNA de *Gcn4* não é traduzido. Como essa regulação é atingida?

Ao contrário da típica estrutura do mensageiro eucariótico, o mRNA que codifica a proteína Gcn4 contém quatro pequenas fases de leitura abertas a montante da sequência codificadora (chamadas uORFs) de Gcn4. A ORF mais a montante delas (uORF1) é reconhecida de maneira eficiente por ribossomos que escaneiam o mensageiro a partir da extremidade 5'. Após a tradução da uORF1 pelos ribossomos, uma propriedade exclusiva dessa ORF permite que 50% das subunidades menores dos ribossomos continuem ligados ao RNA e prossigam em sua busca por códons de início (AUG) a jusante na mensagem (Fig. 15-49) (ver Quadro 15-3).

O controle de qual AUG a jusante é reconhecido pela subunidade menor é feito pela ligação da subunidade ao eIF2 complexado a um tRNA iniciador. Na ausência de um tRNA iniciador no sítio P, a subunidade 40*S* não consegue reconhecer uma sequência AUG no mRNA. Assim, antes de iniciar a tradução em qualquer ORF a jusante, a subunidade 40*S* precisa ligar-se ao eIF2·Met-$tRNA_i^{Met}$ (a partir deste momento chamado de TC, do inglês, *ternary complex* [complexo ternário]).

Quando os níveis de aminoácidos não são limitantes, o TC religa-se aos ribossomos logo após concluir a tradução da uORF1 (Fig. 15-49a). Uma vez religadas ao TC, as subunidades menores podem reconhecer um AUG e reiniciar a tradução em uma das outras uORFs (2, 3 ou 4). Ao contrário do que ocorre com a uORF1, após a tradução de qualquer uma destas uORFs, o ribossomo dissocia-se completamente do mRNA e não consegue alcançar a ORF de Gcn4. Portanto, a proteína Gcn4 não é produzida.

Sob baixo níveis de aminoácidos, uma combinação de eventos reduz a taxa na qual o TC se liga à subunidade 40*S*. Níveis limitados de aminoácidos levam a uma abundância de tRNAs não carregados, o que, por sua vez, ativa uma eIF2α quinase chamada Gcn2. Conforme descrito para o controle global da tradução por eIF2α quinases, quando Gcn2 fosforila eIF2, a população de eIF2-GTP é reduzida, porque a interação de eIF2 com o fator de troca de GTP, eIF2B, é inibida. Como eIF2 pode ligar-se a Met-$tRNA_i^{Met}$ apenas na presen-

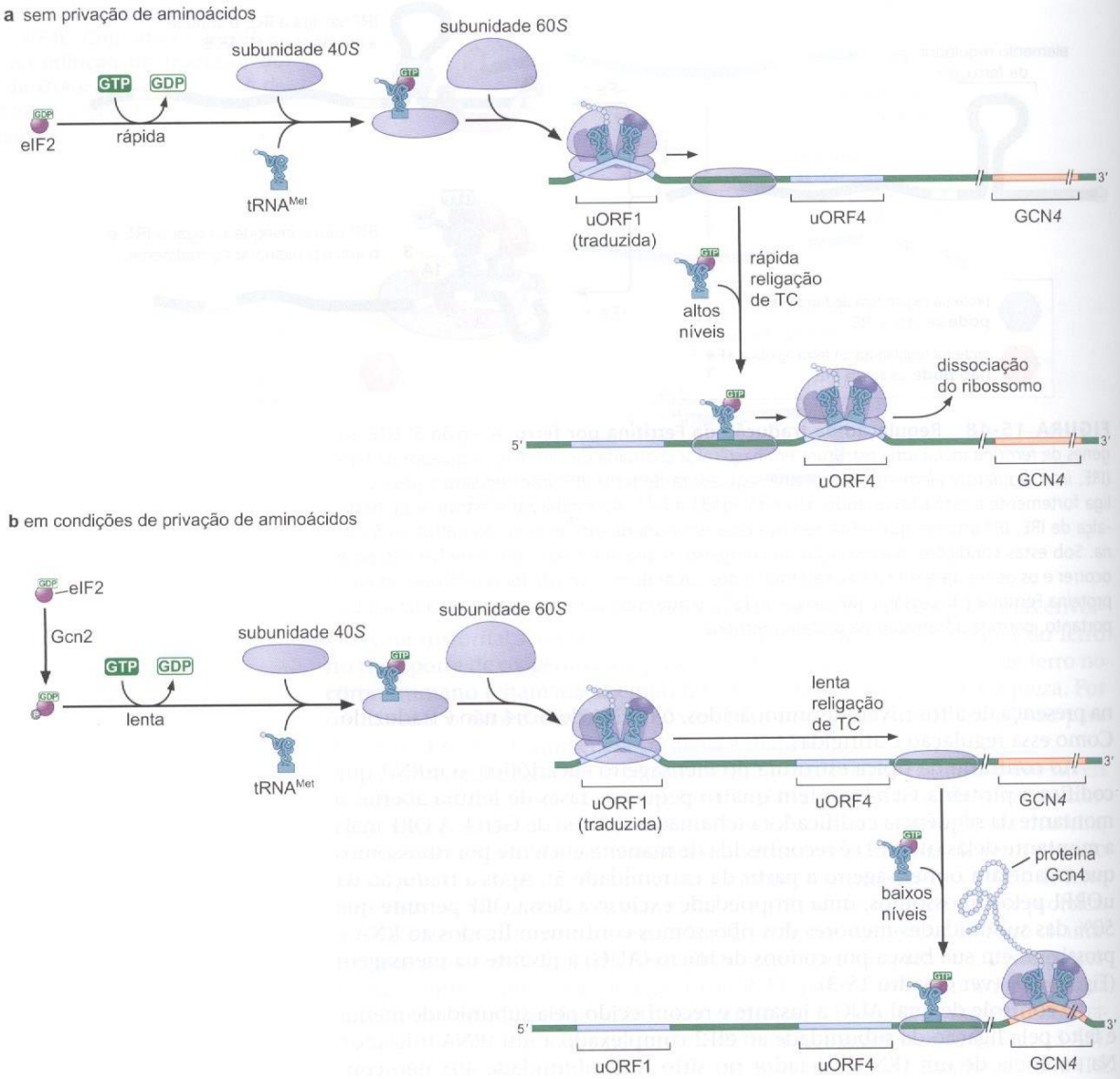


FIGURA 15-49 Controle traducional de Gcn4 em resposta à privação de aminoácidos. Conforme descrito em detalhes no texto, a ORF que codifica o ativador de levedura Gcn4 é precedida por quatro ORFs curtas chamadas uORFs (aqui, apenas uORF1 e uORF4 estão representadas). A primeira destas ORFs a montante é traduzida inicialmente e, devido a propriedades especiais desta ORF, aproximadamente metade das subunidades 40*S* é retida após o término da tradução para continuar escaneando o mRNA de *Gcn4*. (a) Quando há aminoácidos em abundância, eIF2B estimula eIF2 a trocar GDP por GTP rapidamente. Isso permite a rápida ligação de eIF2–GTP–Met-tRNA$_i^{Met}$ à subunidade 40*S* e a habilidade para reconhecer uma das outras três ORFs curtas. A tradução de qualquer uma destas uORFs resulta no término completo da tradução. (b) Sob condições de baixos níveis de nutrientes, a fosforilação de eIF2 pela quinase eIF2α, Gcn2, reduz a habilidade de eIF2B estimular a ligação de GTP a eIF2. Níveis reduzidos de eIF2-GTP resultam em ligação mais lenta de eIF2–GTP–Met-tRNA$_i^{Met}$ à subunidade 40*S*. Esta velocidade reduzida de ligação ao tRNA iniciador aumenta a chance de o ribossomo que está fazendo o escaneamento venha a passar pela uORF4 antes de conseguir reconhecer um AUG e, portanto, favorece a tradução de Gcn4. (Modificada, com permissão, de Hinnebusch A.G. 1997. *J. Biol. Cell* **272**: 21661–21664, Fig. 1. © American Society for Biochemistry & Molecular Biology.)

ça de GTP, essas condições levam a menos TC e reduzem a taxa de ligação de TC à subunidade 40*S* (Fig. 15-49b). A reduzida taxa de ligação significa que a subunidade 40*S* continua a escanear ainda mais longe no mRNA, sem a capacidade de reconhecer um AUG. Se o ribossomo escanear através dos AUGs para as uORFs 2 a 4 antes de religar-se ao TC, então essas ORFs não serão traduzidas. Os códons de início para as uORFs 2 a 4 estão relativamente próximos a uORF1, enquanto o AUG da ORF de Gcn4 está muito mais a jusante. Esta distância adicional fornece uma grande janela de tempo para que o TC se ligue à subunidade menor antes que a ORF de Gcn4 seja encontrada, aumentando as chances de o ribossomo traduzi-la. De fato, remover o RNA espaçador entre as uORFs e o códon de início de Gcn4 resulta na redução progressiva da expressão da proteína Gcn4. Assim, na presença do TC limitante, a Gcn4 é produzida e pode ativar os genes necessários para sintetizar novos aminoácidos na célula. O uso de tecnologias de sequenciamento de última geração para analisar padrões de tradução global – isto é, medir todos os mRNAs que estão sendo traduzidos – é descrito no Quadro 15-6, Perfil de ribossomo e polissomo.

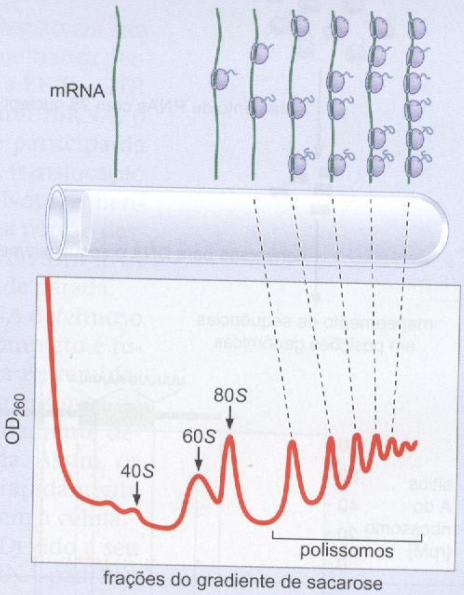
TÉCNICAS

Quadro 15-6 Perfil de ribossomo e polissomo

Existem várias maneiras para medir o nível de expressão gênica de uma célula. Muitos ensaios têm como enfoque a determinação da quantidade do produto primário da expressão gênica, o RNA. Por outro lado, a existência de um mRNA em uma célula não significa que a proteína codificada pelo mRNA esteja sendo expressa. Para determinar se uma proteína está realmente sendo sintetizada em uma célula, deve-se medir a tradução deste mRNA.

Estudos iniciais para determinar a extensão da tradução de um mRNA focavam na associação do mRNA com os polissomos. Nesses estudos, os pesquisadores adicionavam o fármaco ciclo-heximida às células para interromper a tradução no estágio de translocação. As células tratadas eram, então, rompidas, e o extrato celular resultante separado por centrifugação em um gradiente de sacarose (Fig. 1 deste quadro). Devido ao grande tamanho do ribossomo, os mRNAs associados a ele migram muito mais rapidamente durante a centrifugação em relação ao mRNA livre. Além disso, os mRNAs que fazem parte de um polissomo migram ainda mais rápido. A medida da proteína total por meio do gradiente revela vários picos correspondentes ao mRNA associado a números crescentes de ribossomos (i.e., em polissomos). A medida da presença de mRNA nestas frações (p. ex., por *Northern blot* ou RT-PCR) revela se o mRNA está sendo traduzido.

Mais recentemente, este ensaio foi adaptado para tirar vantagem das novas tecnologias de sequenciamento e obter uma medida global dos mRNAs que estão sendo traduzidos em uma população celular. Chamado de perfil ribossomal, assim como no ensaio de perfil de polissomo, este ensaio começa com o tratamento da população celular com ciclo-heximida e a obtenção de um extrato celular. A próxima etapa do ensaio tira vantagem do achado de que um ribossomo em alongamento protege o trecho de ~28 bases do mRNA que está no centro de decodificação contra a digestão por RNase I (Fig. 2a deste quadro). Assim, antes da centrifugação no gradiente de sacarose, o extrato celular é tratado com RNase I. Após a centrifugação, as frações contendo as partículas 80*S* (ribossomo mais mRNA protegido) são isoladas e desnaturadas, e os RNAs de 28 bases associadas são isolados por purificação em gel. Após a conversão em DNA de dupla-fita, os RNAs são submetidos a sequenciamento. Analisan-



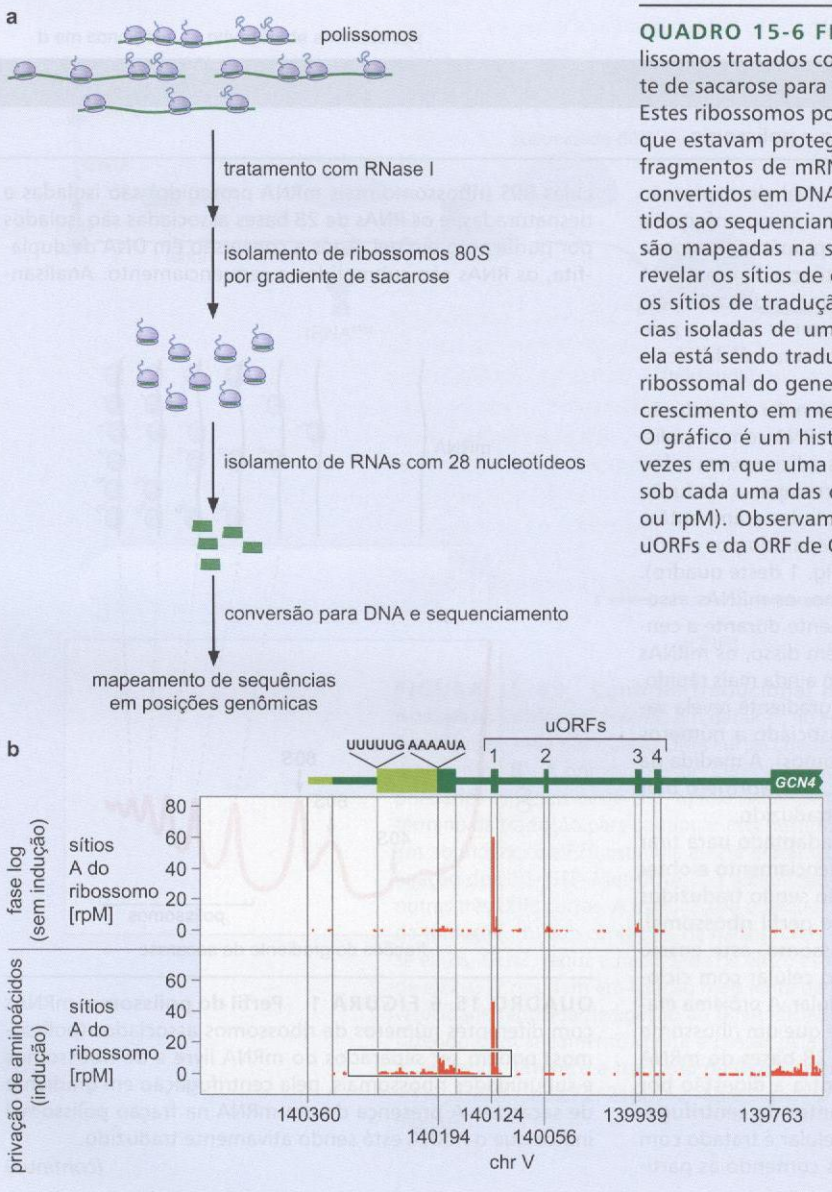
QUADRO 15-6 FIGURA 1 Perfil do polissomo. mRNAs com diferentes números de ribossomos associados (polissomos) podem ser separados do mRNA livre e de ribossomos e subunidades ribossomais, pela centrifugação em gradiente de sacarose. A presença de um mRNA na fração polissomal indica que o mRNA está sendo ativamente traduzido.

(continua)

Quadro 15-6 *(Continuação)*

do as sequências de DNA resultantes, pode-se determinar prontamente não apenas os mRNAs que estavam sendo ativamente traduzidos no momento do tratamento com ciclo-heximida, mas também exatamente onde cada ribossomo estava localizado. De fato, o método é preciso o suficiente para determinar quais códons estavam nos sítios A e P.

Esta abordagem tornou-se rapidamente um método importante para analisar a expressão gênica. Ao comparar os números das leituras de sequências de cada gene entre duas populações celulares, pode-se identificar as alterações nas proteínas que são produzidas nas duas populações celulares (p. ex., crescimento em níveis altos ou baixos de aminoácidos) (Fig. 2b deste quadro). Além disso, devido à sua precisão, este método pode revelar também atributos da tradução. Por exemplo, esta técnica foi utilizada para determinar que muitos dos sítios de pausa traducional em *E. coli* ocorrem devido à presença de uma sequência semelhante ao RBS nas ORFs.



QUADRO 15-6 FIGURA 2 Perfil do ribossomo. (a) Polissomos tratados com RNase I são separados em um gradiente de sacarose para isolar monorribossomos (partículas 80*S*). Estes ribossomos possuem apenas 28 nucleotídeos de mRNA que estavam protegidos da degradação pelo ribossomo. Os fragmentos de mRNA resultantes são purificados em gel e convertidos em DNA (usando transcriptase reversa) e submetidos ao sequenciamento de DNA. As sequências resultantes são mapeadas na sequência genômica do organismo para revelar os sítios de contato com ribossomos, representando os sítios de tradução. Quanto maior o número de sequências isoladas de uma determinada região, mais ativamente ela está sendo traduzida. (b) Dados representativos do perfil ribossomal do gene *GCN4* de *S. cerevisiae* sob condições de crescimento em meio rico e com escassez de aminoácidos. O gráfico é um histograma de um número normalizado de vezes em que uma determinada sequência estava presente sob cada uma das condições (leituras por milhão de bases, ou rpM). Observam-se as diferentes taxas de tradução das uORFs e da ORF de Gcn4 nas duas condições.