

QBQ2503 – 2023

Expressão Gênica

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes (B12T, sala 1211)

Profa. Dra. Daniela Basseres (B12T, sala 1208)

IQ-USP

Local e Horário:

- Quintas-feiras, das 14h às 15:40h,
IQ - Bloco 6 inferior – Sala 608

Visão Geral do Curso

- 1 - Aulas Teóricas
- 2 - Listas de exercícios
- 3 - Duas avaliações escritas
- Nota final :
 $0,9 \times (\text{média das avaliações}) + 0,1 (\text{média dos exercícios})$

Bibliografia Recomendada:

- **Lehninger** - Principles of Biochemistry.
David Nelson & Michael Cox.
- **B. Lewin** - Genes
- **Alberts** - Molecular Biology of the Cell
- **Zaha** – Biologia Molecular

Revisões e artigos (em inglês) serão utilizados para complementar os assuntos das aulas.

QBQ2503 – 2023
Expressão Gênica
Aula 1

Transcrição em bactérias
Fatores sigma

Regulação da Expressão Gênica

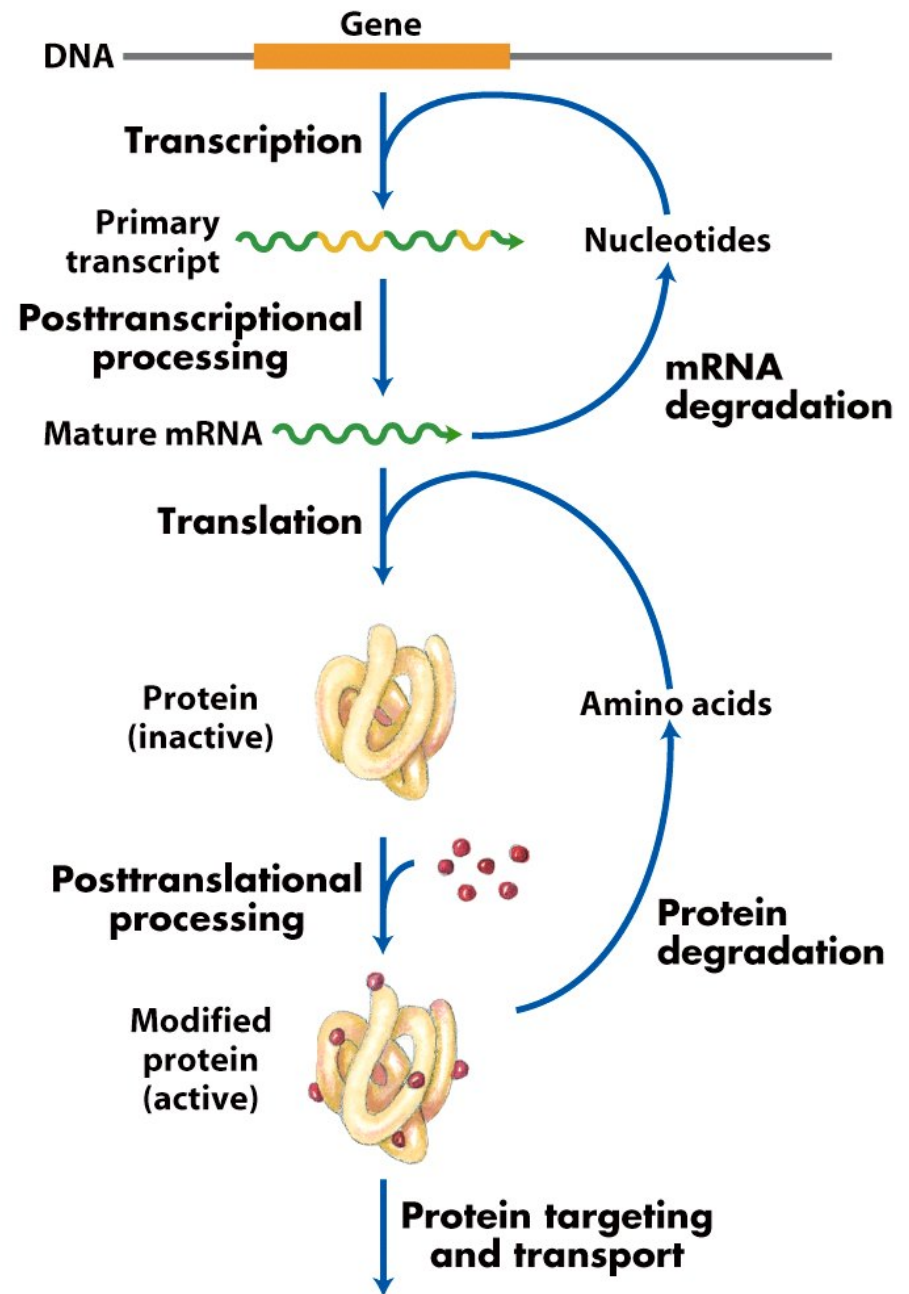
Bactérias:

- Resposta direta a variações nas condições nutricionais e ambientais (Expressão Gênica Induzida-Indução; Expressão Gênica Reprimida - Repressão)
- Expressão Gênica Constitutiva (genes necessários em todas as condições de crescimento, que não apresentam mudanças na expressão em diferentes condições ambientais)
- Transcrição é o nível mais importante da regulação gênica
- Transcrição é acoplada com a tradução (simultâneas)

Como a informação genética é transferida do DNA para constituir uma célula ou organismo?

Fluxo da informação genética

- Fluxo da informação genética



Principais tipos de RNAs

mRNA (RNA mensageiro)

tRNA (RNA transportador)

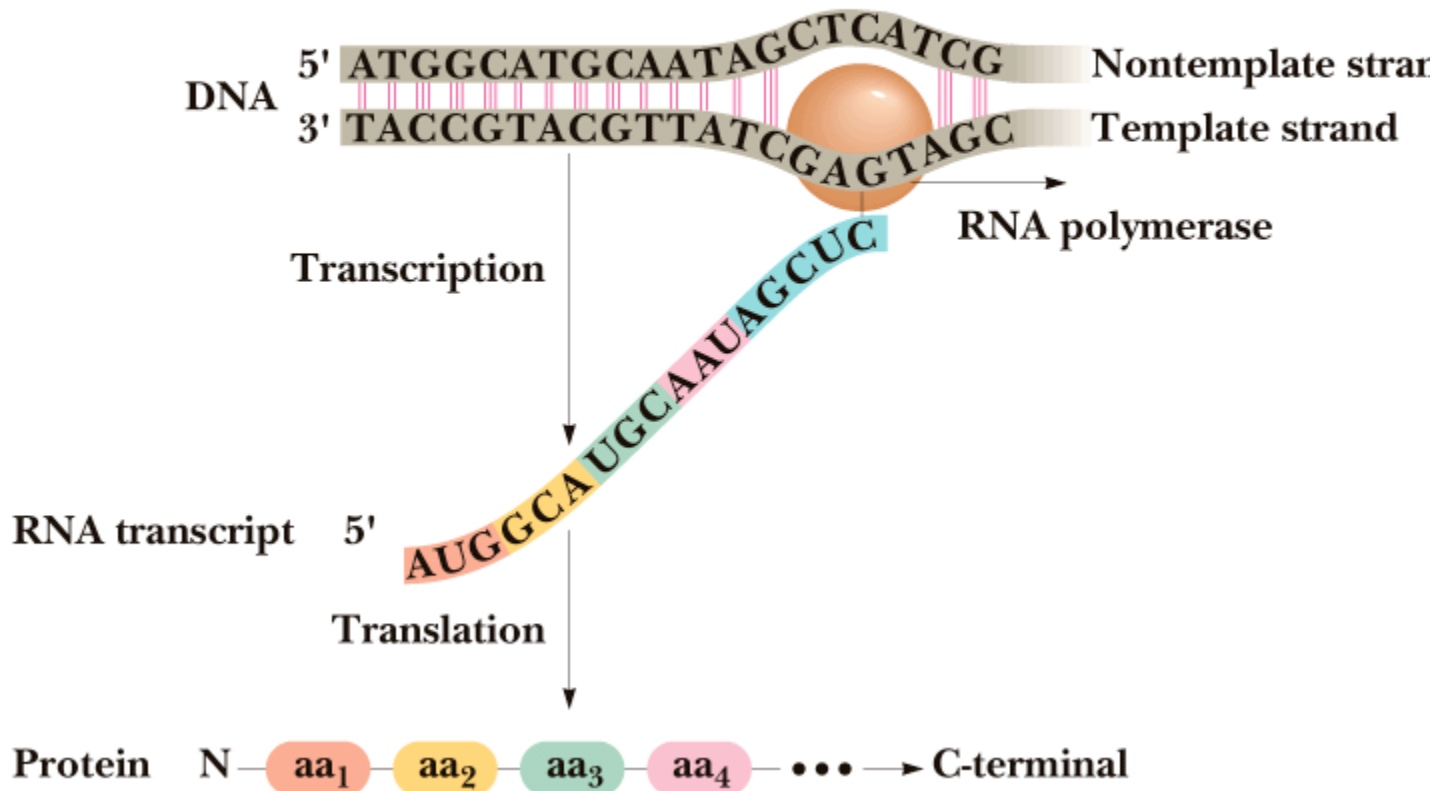
rRNA (RNA ribossômico)

sRNA (RNA regulatório)

QUADRO 5.2 Moléculas de RNA em *E. coli*

Tipo	Quantidade Relativa (%)	Coefficiente de Sedimentação (S)	Massa (kd)	Número de Nucleotídeos
RNA ribossômico (rRNA)	80	23	$1,2 \times 10^3$	3.700
		16	$0,55 \times 10^3$	1.700
		5	$3,6 \times 10^1$	120
RNA transportador (tRNA)	15	4	$2,5 \times 10^1$	75
RNA mensageiro (mRNA)	5		Heterogêneo	

Diferentes papéis na tradução e na regulação gênica (**sRNAs**)



Fita
codificadora ou
Senso 5'- 3'

Fita-molde,
Não-
codificadora ou
Anti-senso 3'- 5'

Fluxo da Informação Gênica

DNA 5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'

3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5'

↓ Transcrição

Fluxo da Informação Gênica

DNA 5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'

3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5'



Transcrição

mRNA 5' — A-G-A-G-G-U-G-C-U — 3'

Fluxo da Informação Gênica

DNA **5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'**
3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5'

↓ **Transcrição**

mRNA **5' — A-G-A-G-G-U-G-C-U — 3'**

tRNAs **3' U-C-U C-C-A C-G-A 5'**

└───┘ └───┘ └───┘
| | |
Arginine Glycine Alanine

Fluxo da Informação Gênica

DNA 5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'

3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5'

↓ **Transcrição**

mRNA 5' — A-G-A-G-G-U-G-C-U — 3'

tRNAs 3' U-C-U C-C-A C-G-A 5'

└─┬─┘ └─┬─┘ └─┬─┘
Arginine Glycine Alanine

↓ **Tradução**

Protein —Arginine—Glycine—Alanine—

Fluxo da Informação Gênica

DNA 5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'

3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5'

↓ **Transcrição**

mRNA 5' — A-G-A-G-G-U-G-C-U — 3'

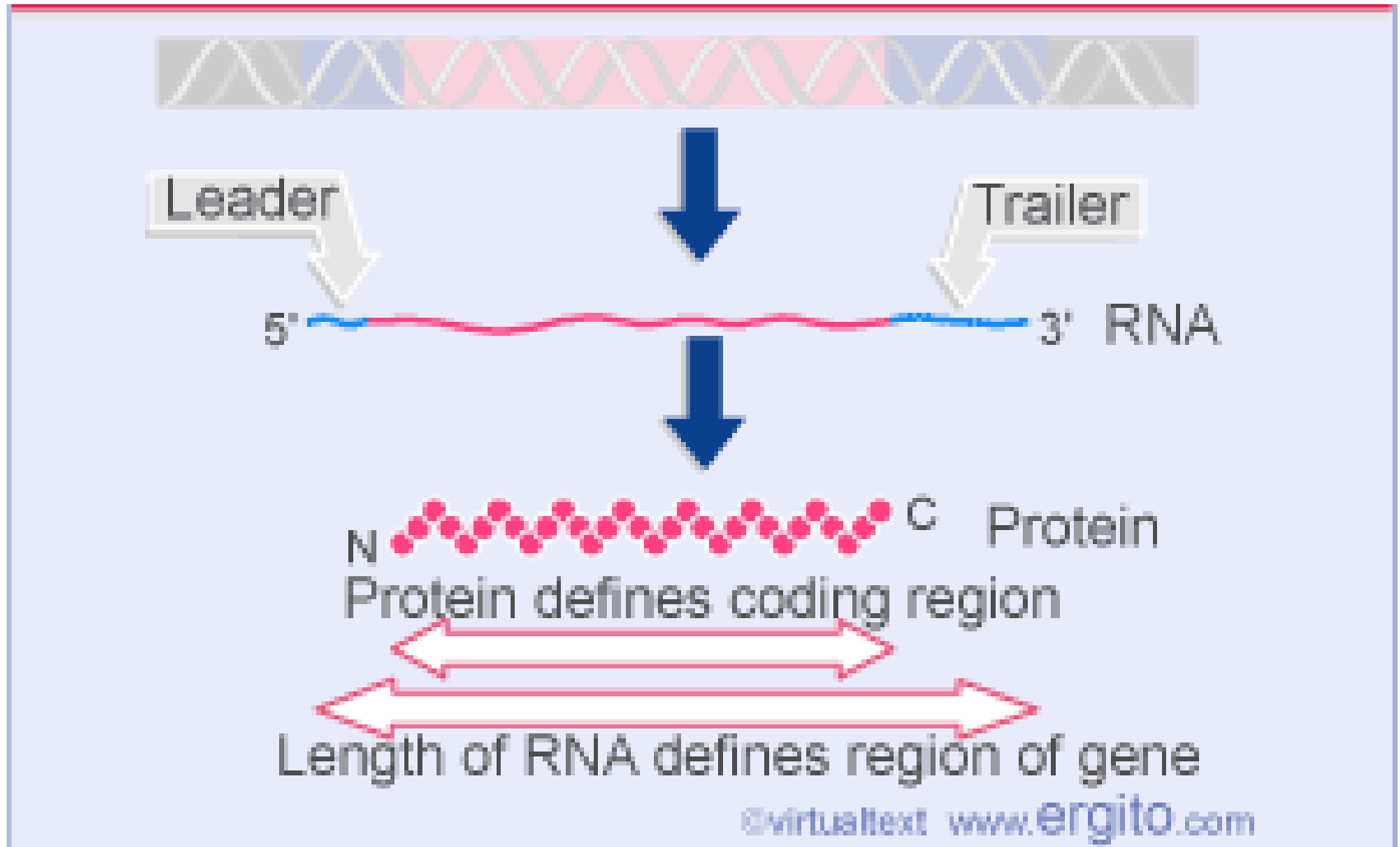
tRNAs 3' U-C-U C-C-A C-G-A 5'

└─┬─┘ └─┬─┘ └─┬─┘
Arginine Glycine Alanine

↓ **Tradução**

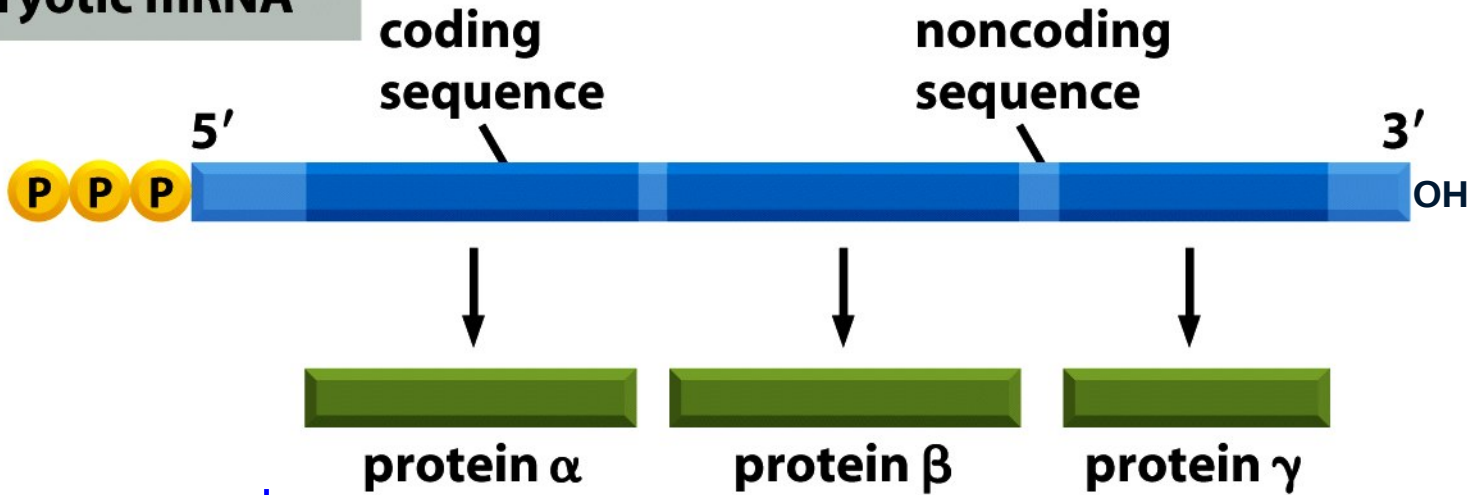
Protein —Arginine—Glycine—Alanine—

Cada RNA transcrito corresponde a um ou mais genes no cromossomo



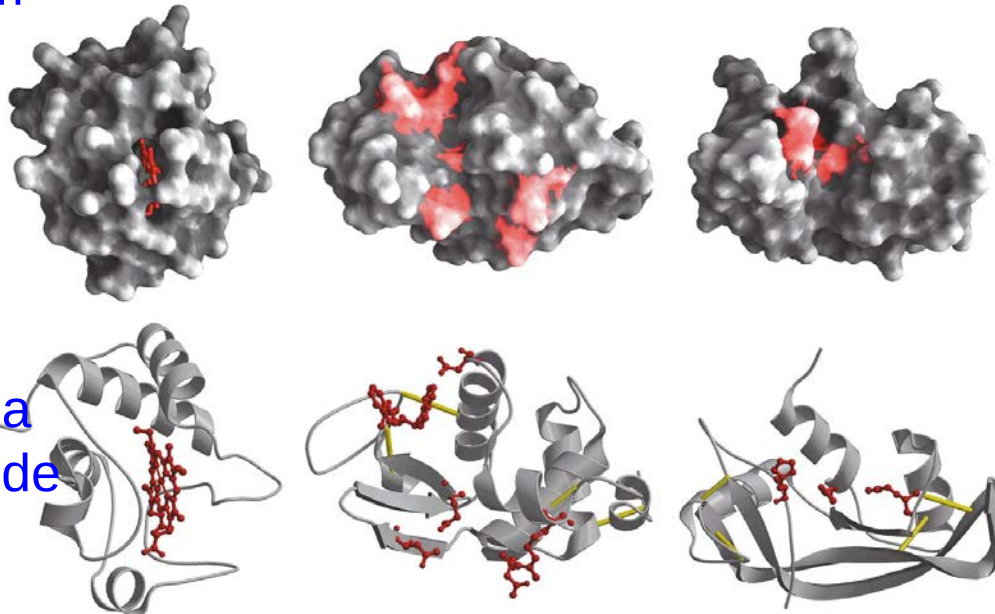
Em bactérias muitos mRNAs são policistrônicos

procaryotic mRNA



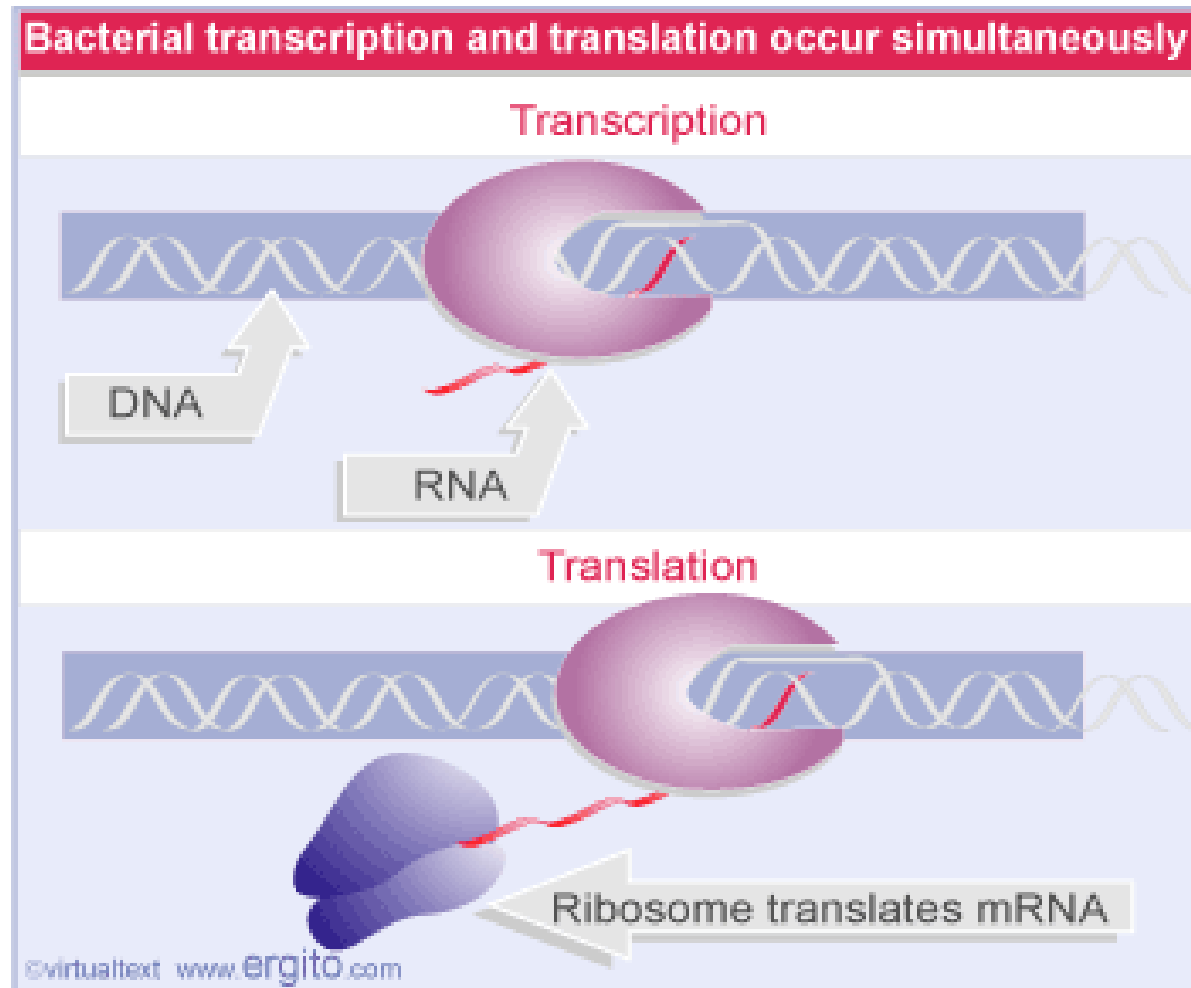
- Vários genes podem ser transcritos num único mRNA

- Estes genes estão organizados na forma de operon: conjunto de genes regulados coordenadamente



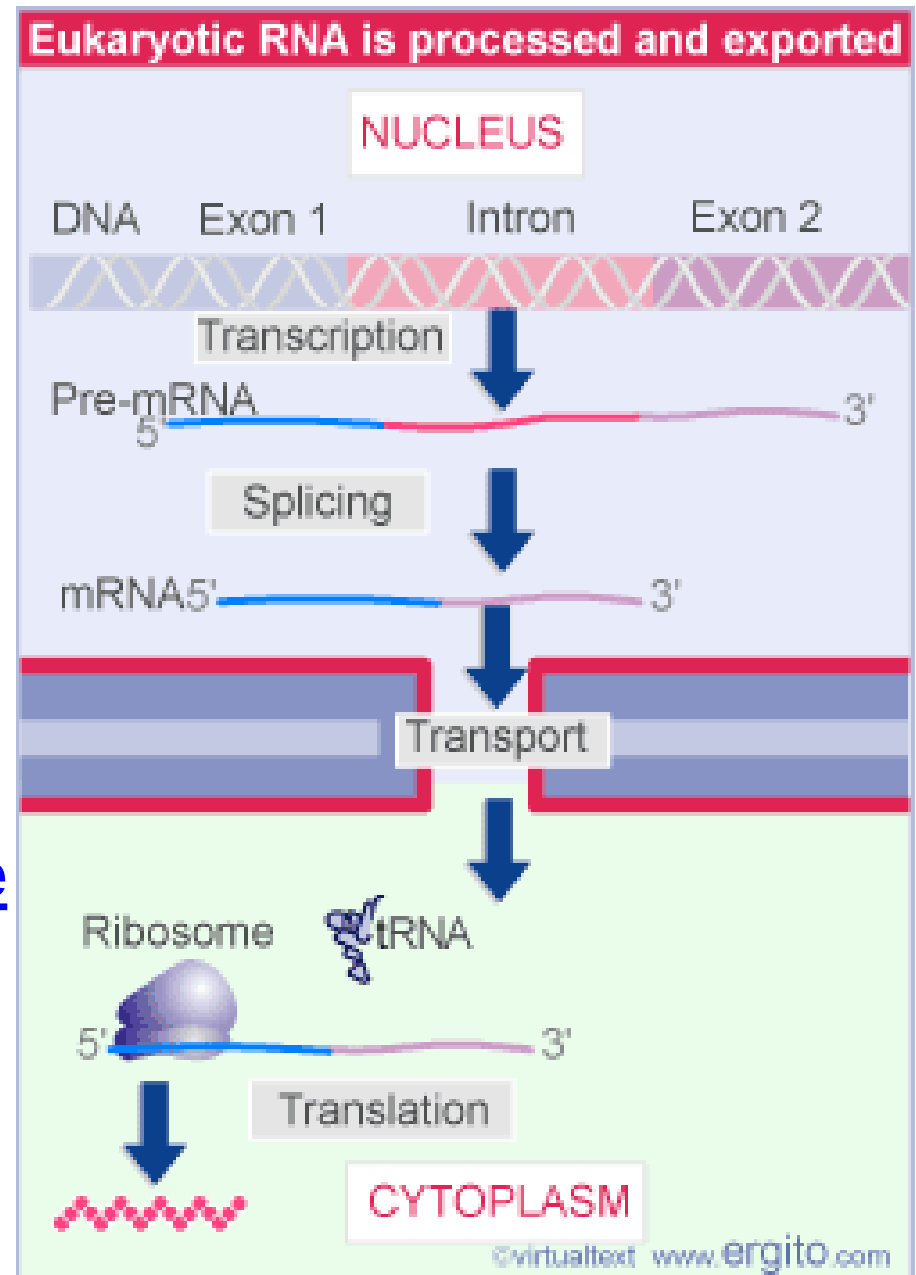
Nas bactérias a transcrição e a tradução estão acopladas

- A tradução começa logo após o início da transcrição

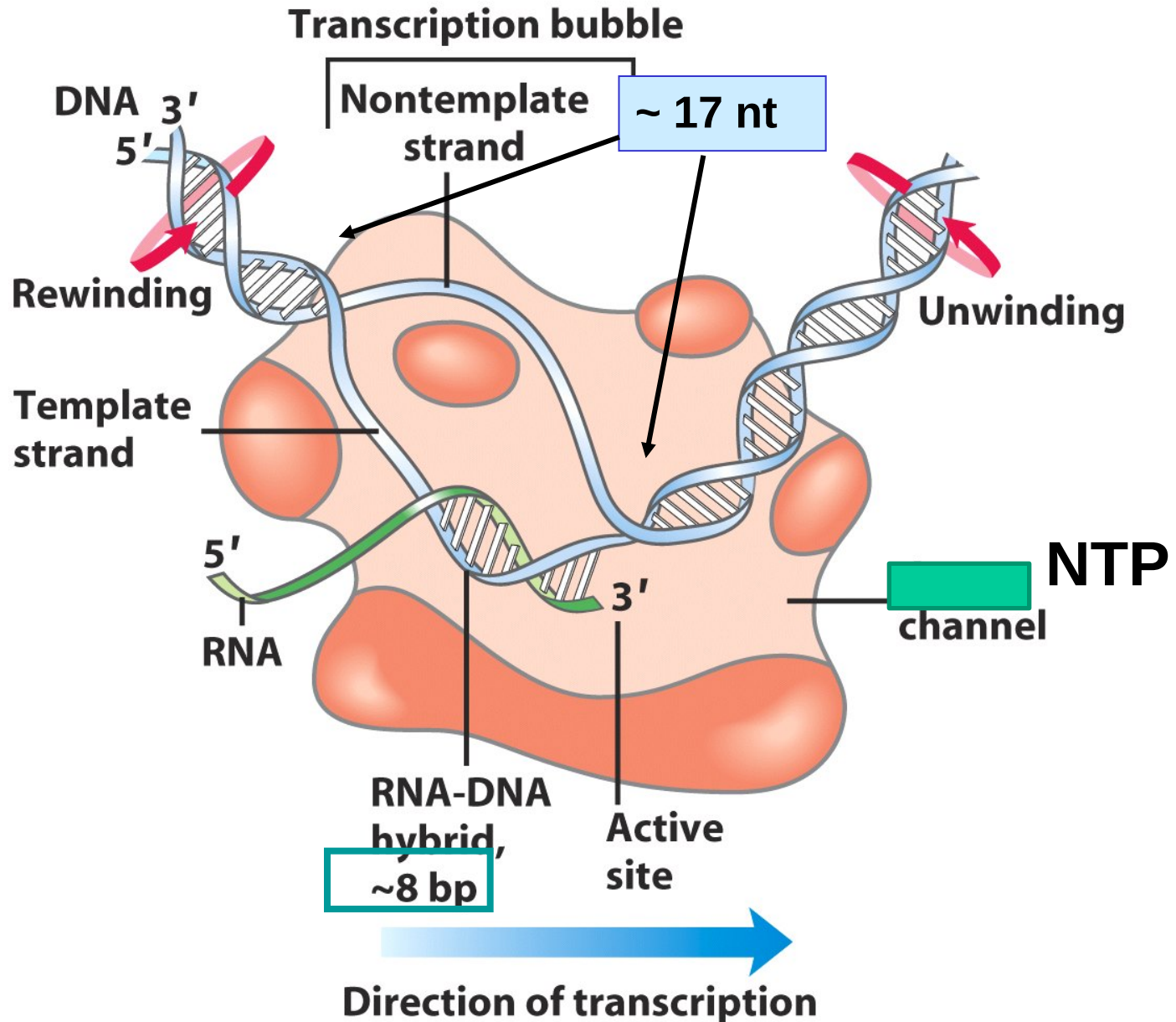


**Em eucariotos,
os mRNAs são transcritos
no núcleo, processados e
exportados para
o citoplasma**

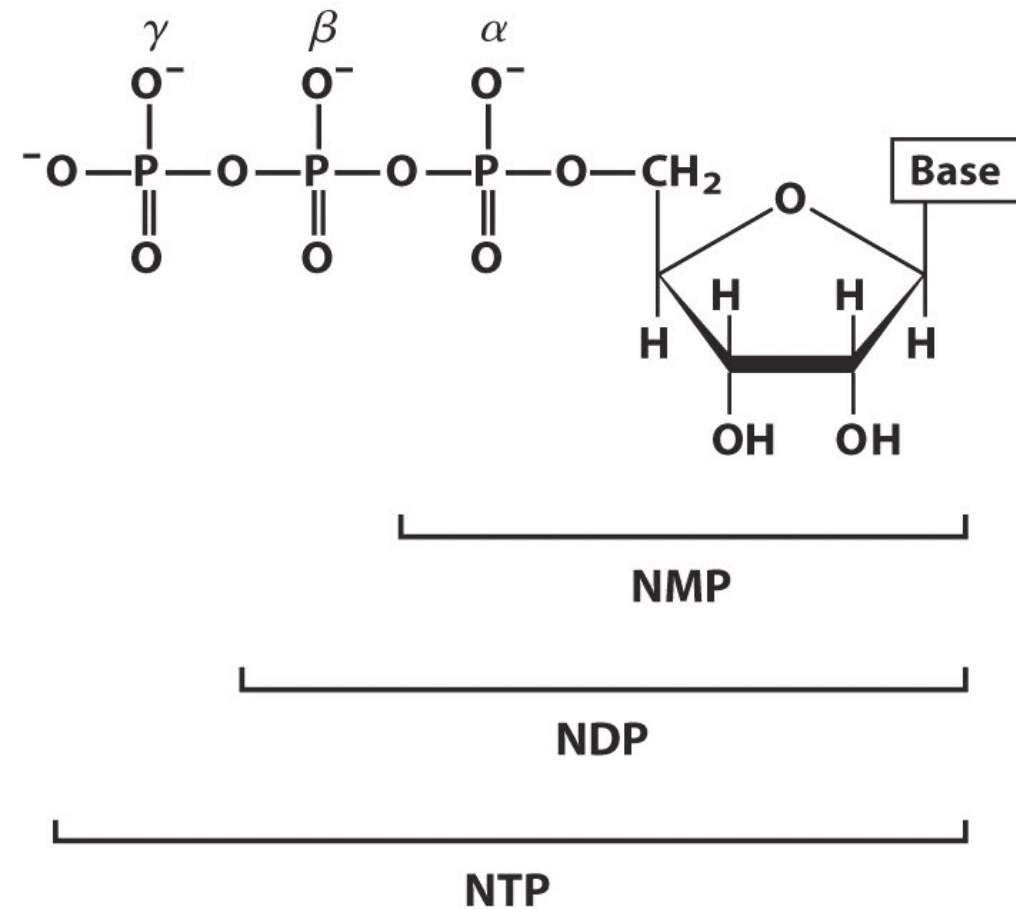
**(não há acoplamento entre
transcrição e tradução)**



RNAs são sintetizados pela RNA polimerase



- **Substratos das RNA polimerases**



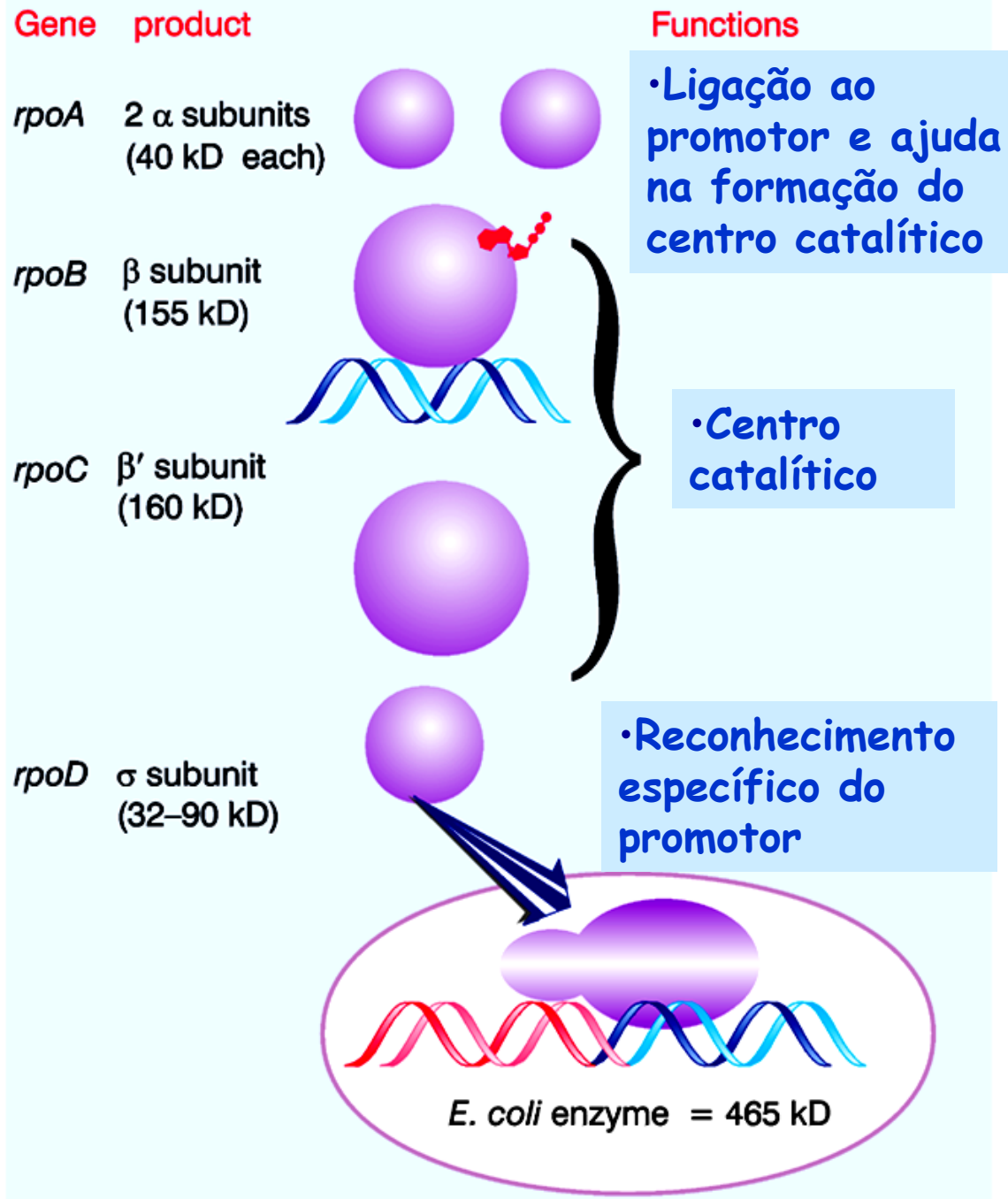
Abbreviations of ribonucleoside 5'-phosphates			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenine	AMP	ADP	ATP
Guanine	GMP	GDP	GTP
Cytosine	CMP	CDP	CTP
Uracil	UMP	UDP	UTP

- **Ribonucleosídeos 5' trifosfatos**

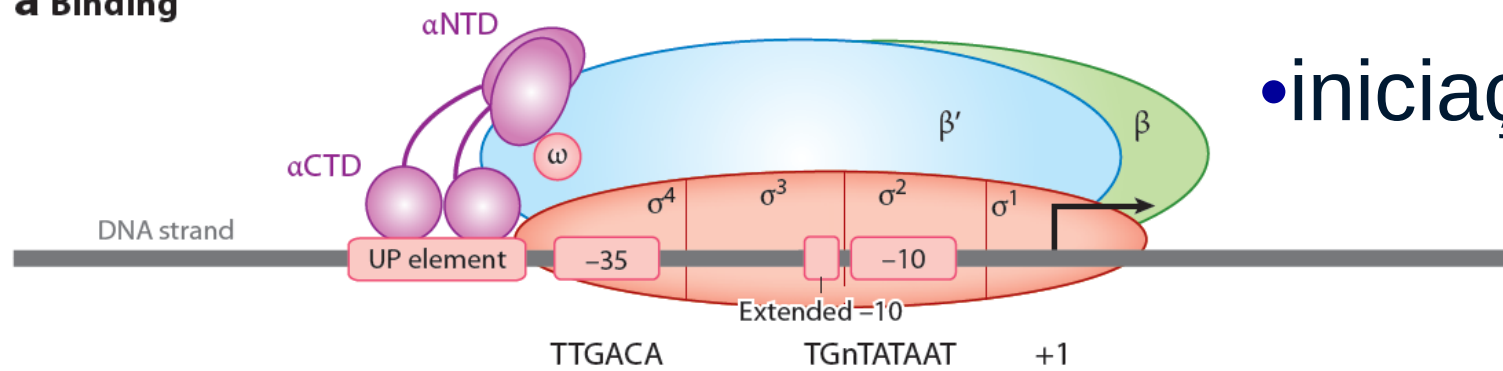
•RNA polimerase de *E. coli*

•As RNA polimerases não tem mecanismo de correção de erro (taxa de erro 10^{-5})

•Subunidade ω (ômega) atua como chaperone na montagem da holoenzima

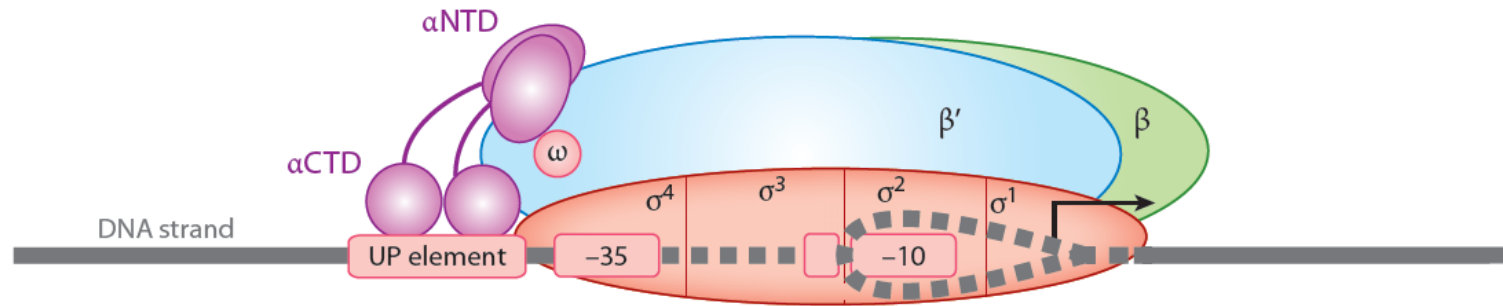


a Binding

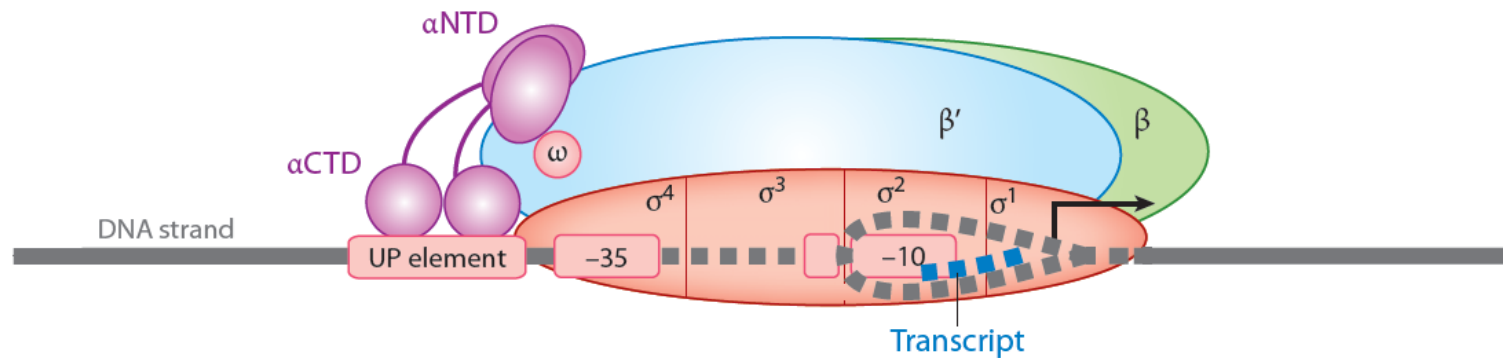


• iniciação

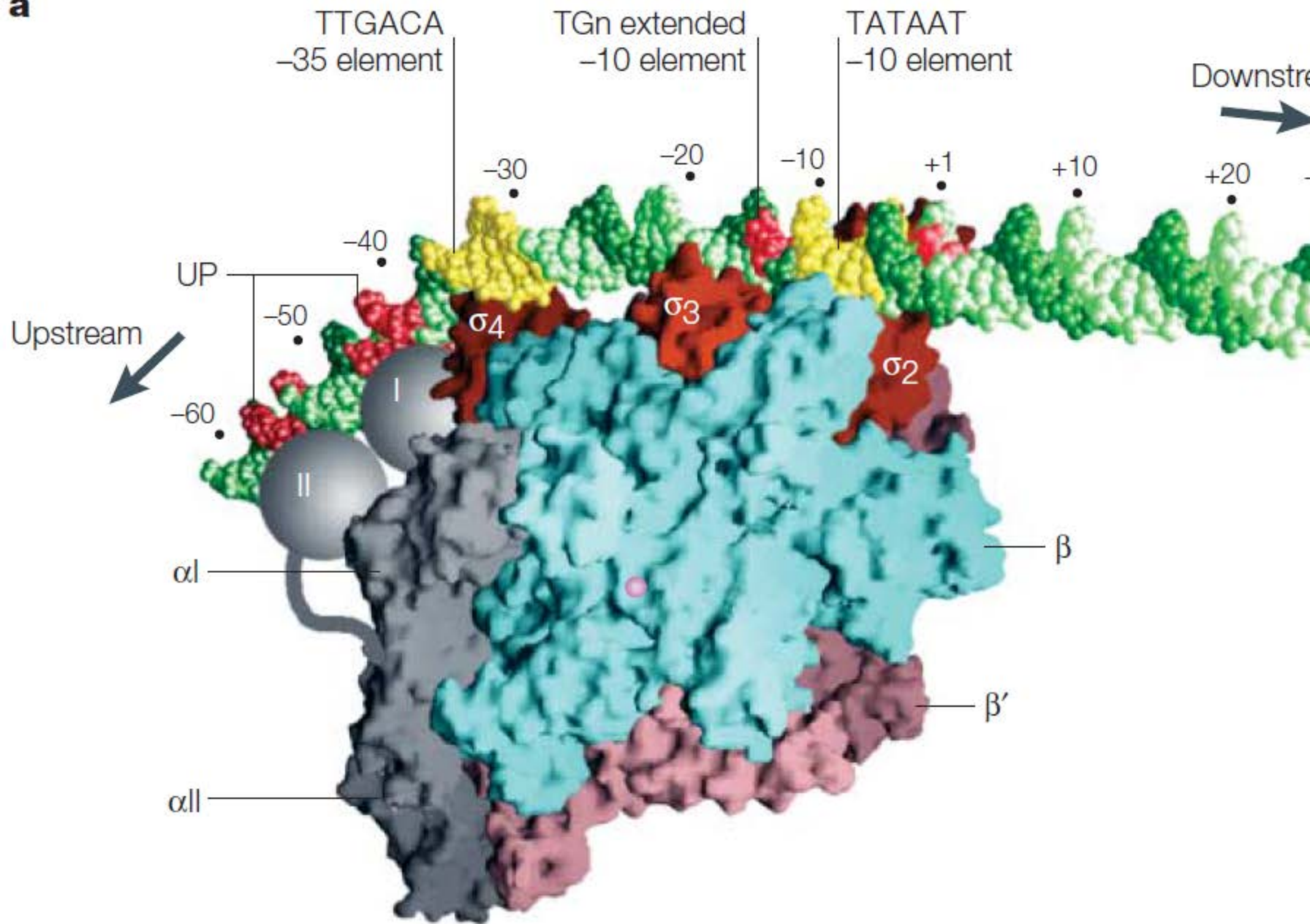
b Isomerization



c Transcript formation

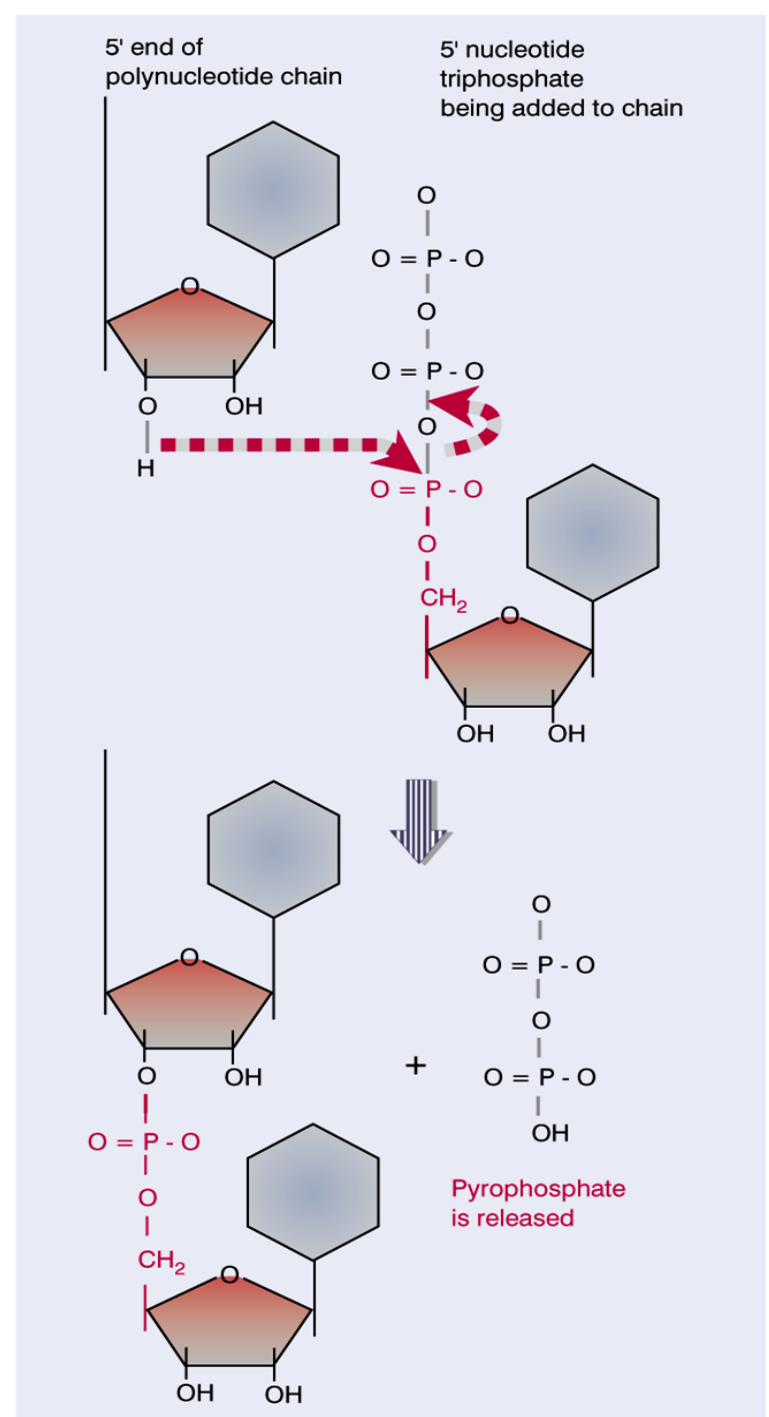


a

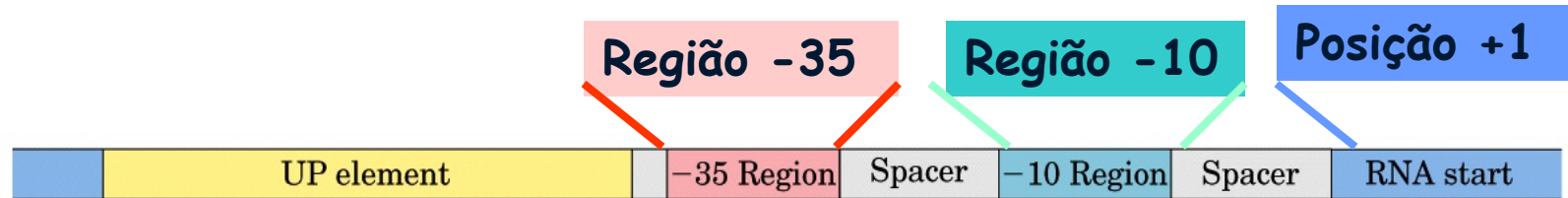


- Síntese de RNA: formação da ligação fosfodiester envolve o ataque nucleofílico do 3' OH da cadeia crescente no fosfato alfa do carbono 5' da ribose do nucleosídeo trifosfato que será incorporado

- As RNA polimerases não requerem um iniciador (primer) para iniciar a síntese do RNA



Região promotora de genes bacterianos reconhecidos pelo Sigma 70 (fator sigma principal de E. coli)



Consensus
sequence



rrnB P1



trp



lac



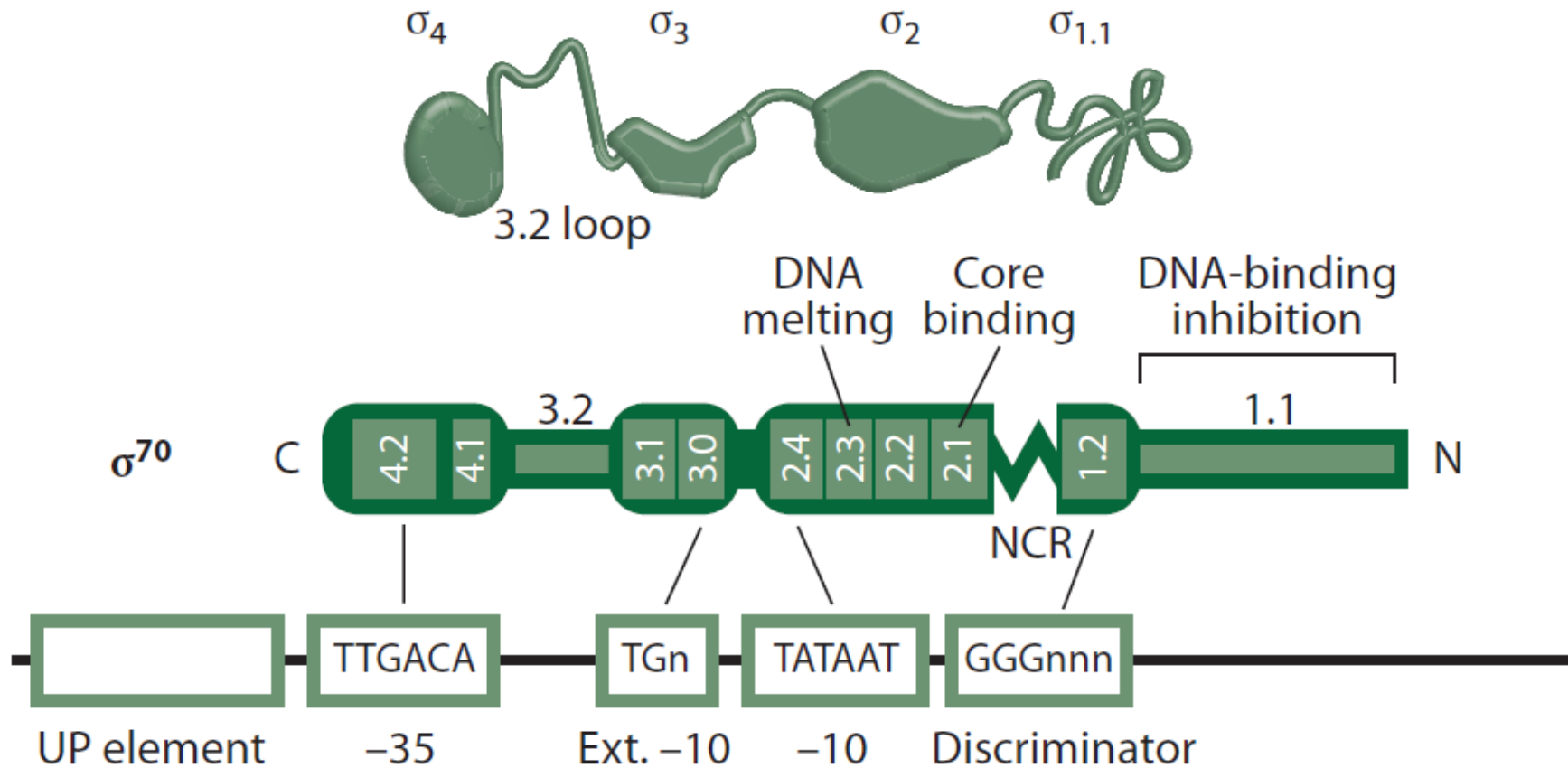
recA



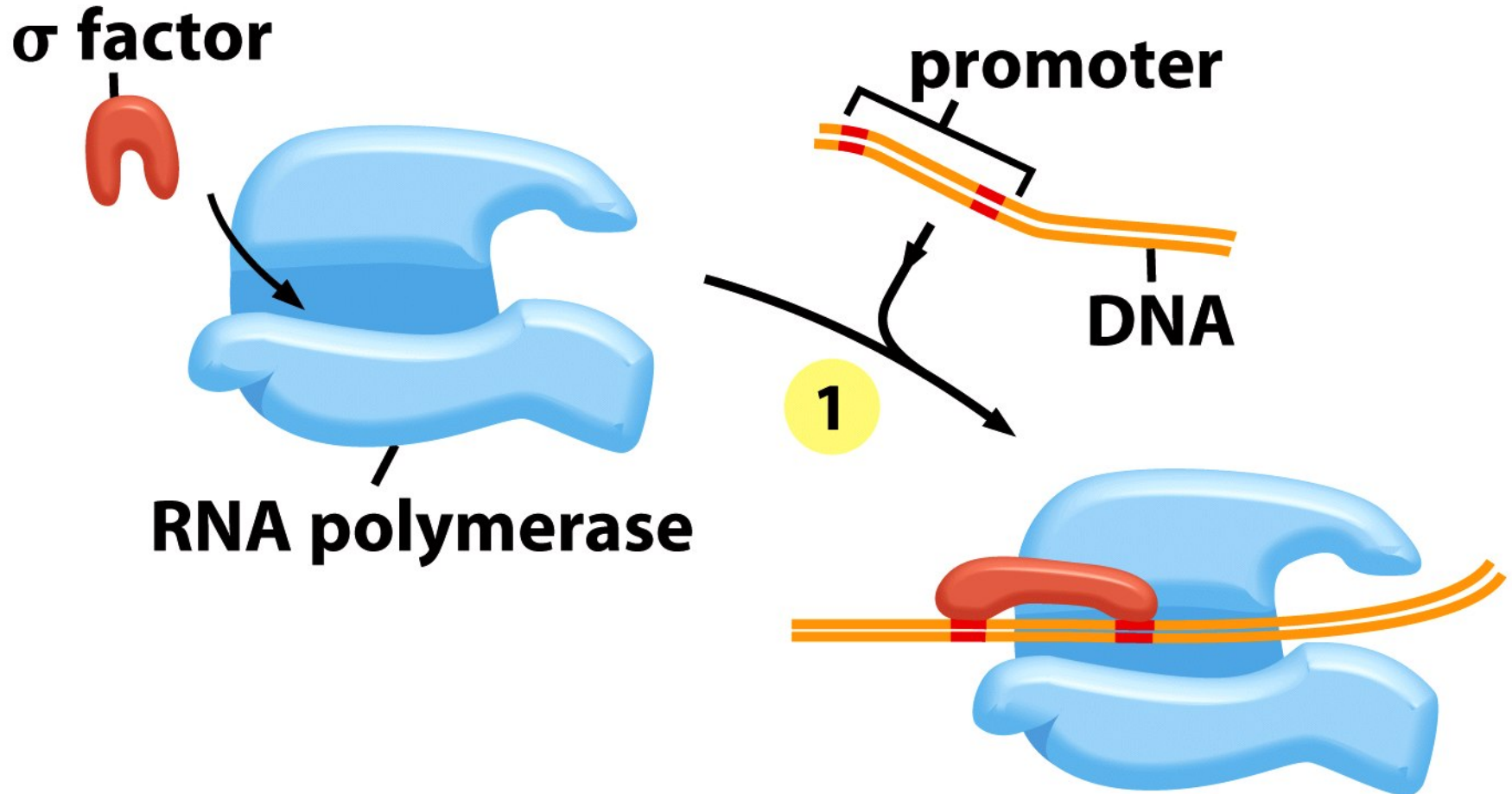
araBAD



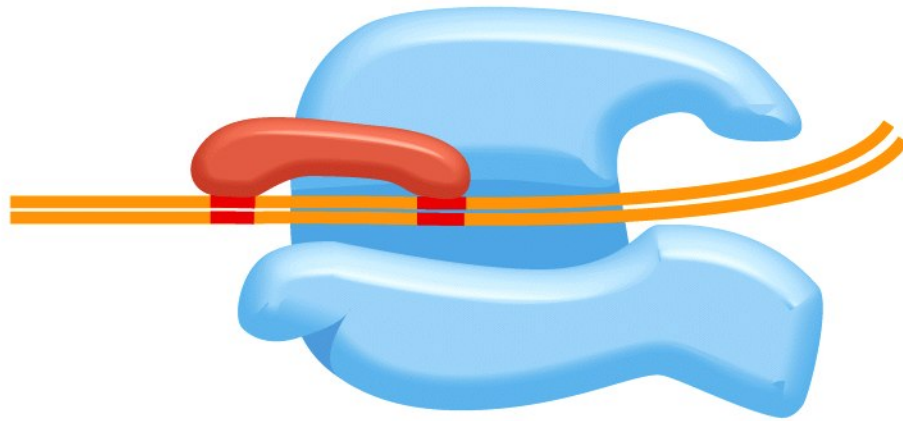
Domínios do fator sigma 70 e sua funções



- RNA pol Holoenzima (cerne + fator sigma) reconhece e se liga ao promotor específico



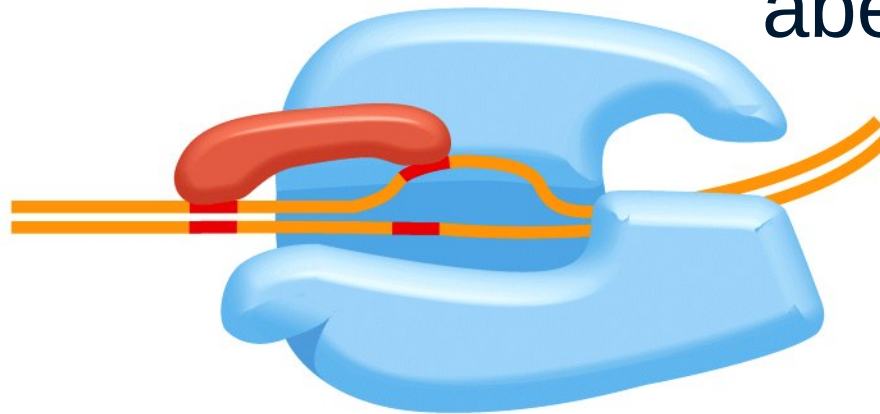
- Iniciação da transcrição

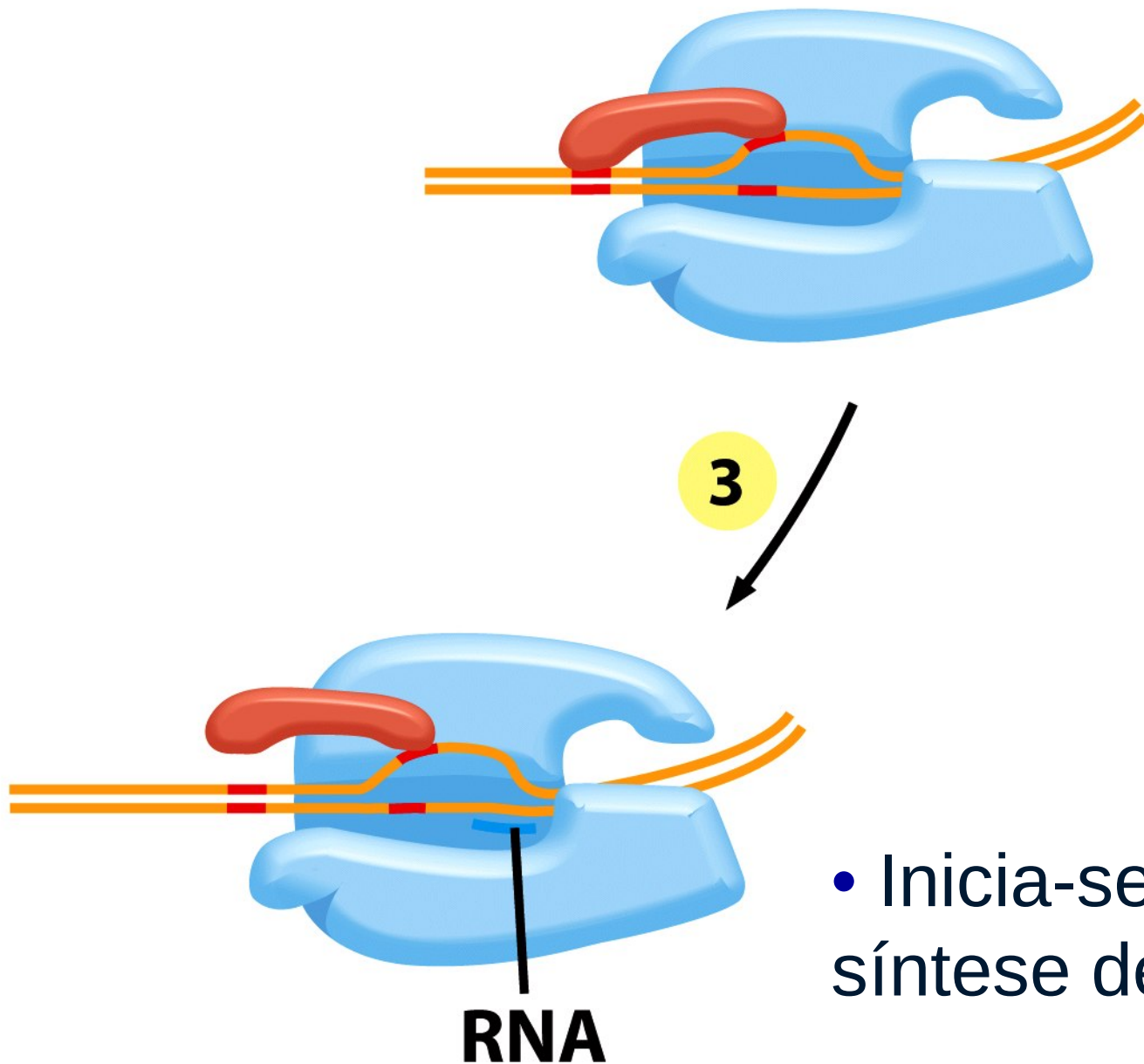


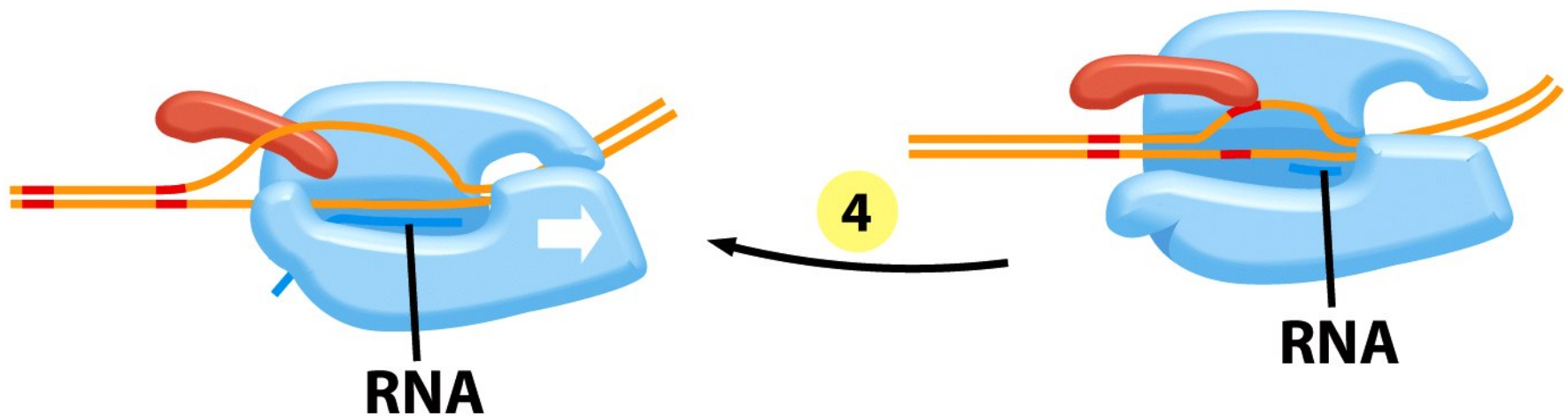
2



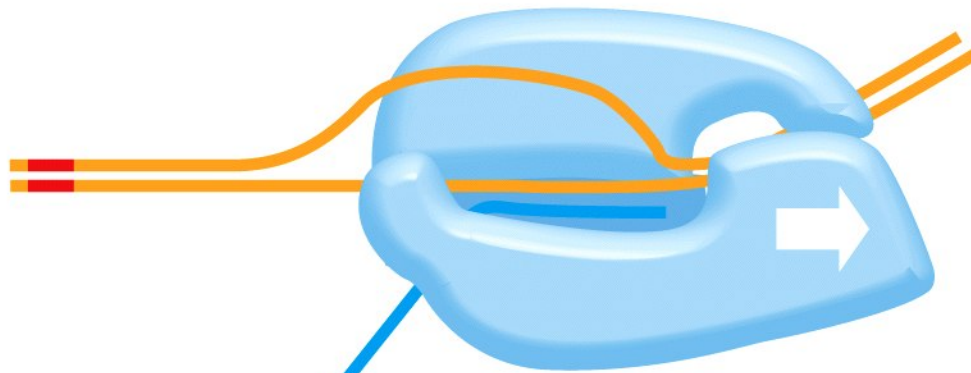
- Forma-se o complexo aberto



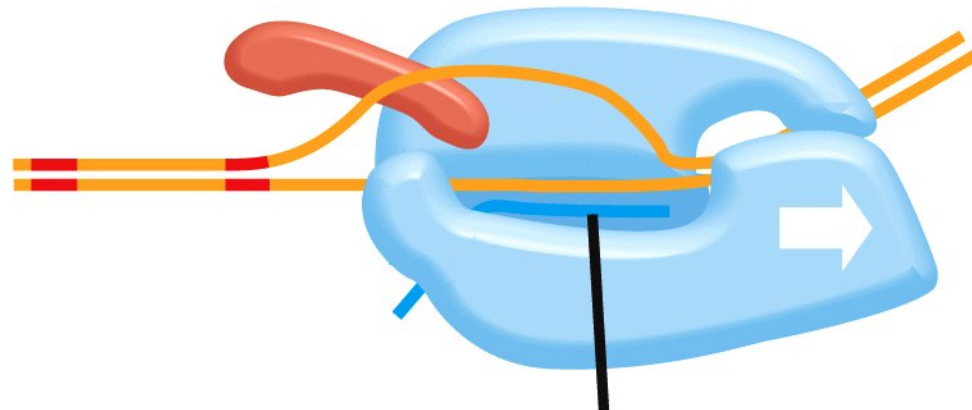
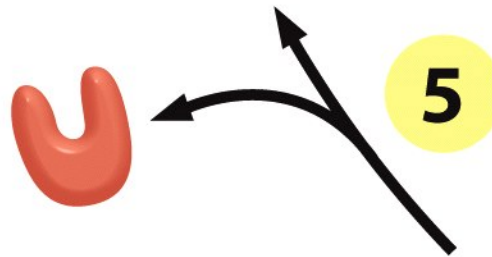




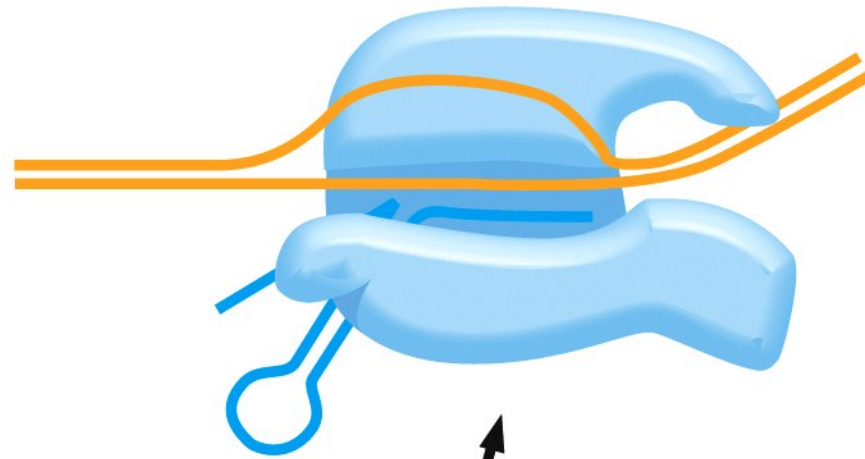
- Fator sigma se desliga da RNA pol holoenzima e só o cerne faz a elongação



- Elongação pelo cerne da RNA pol

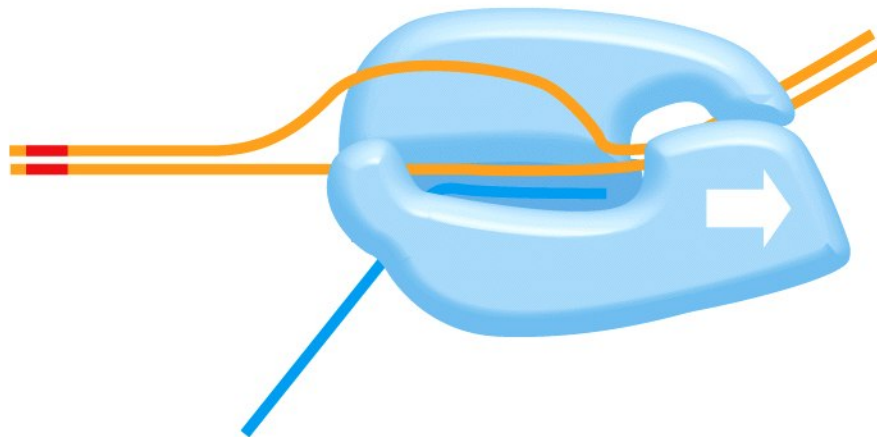


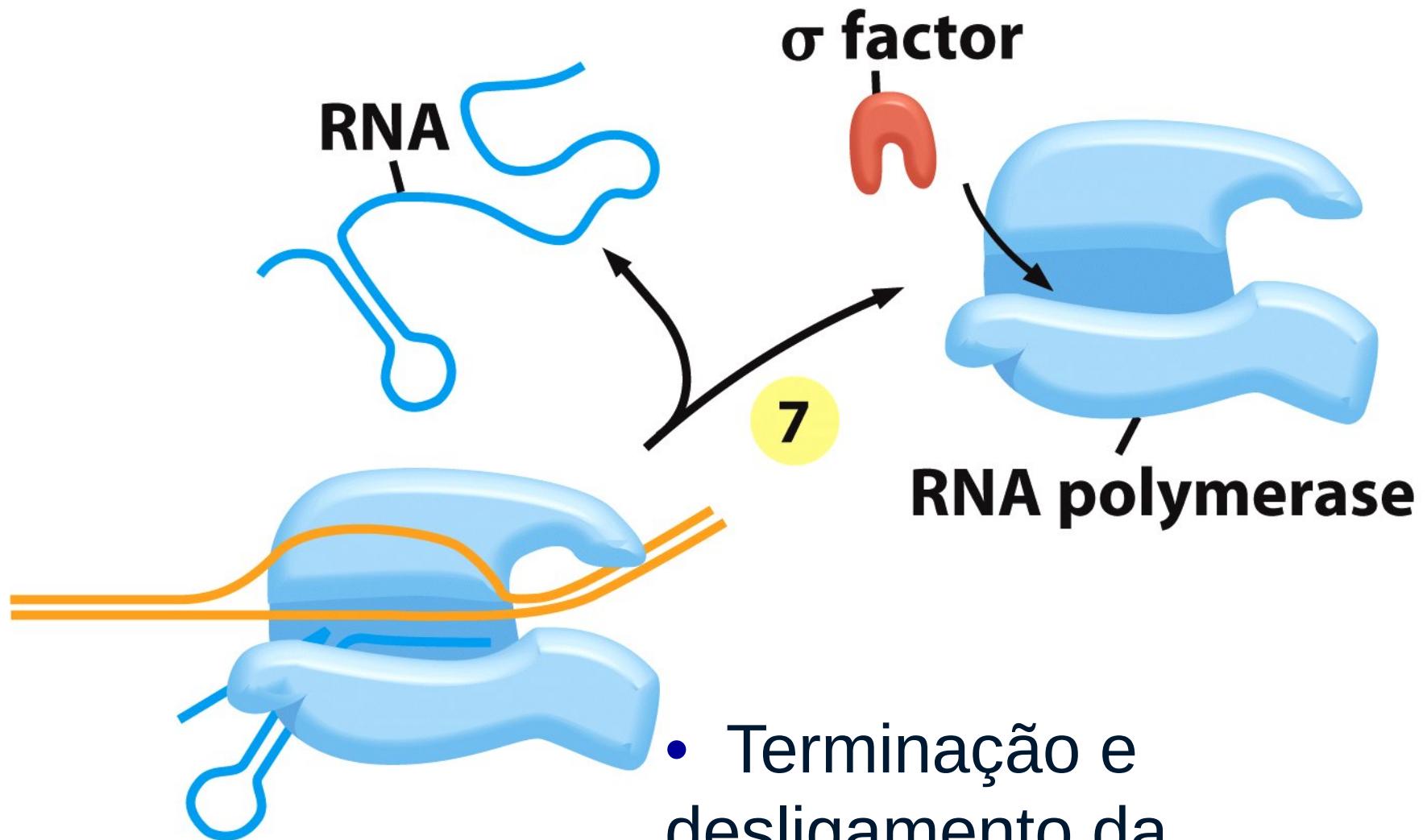
RNA



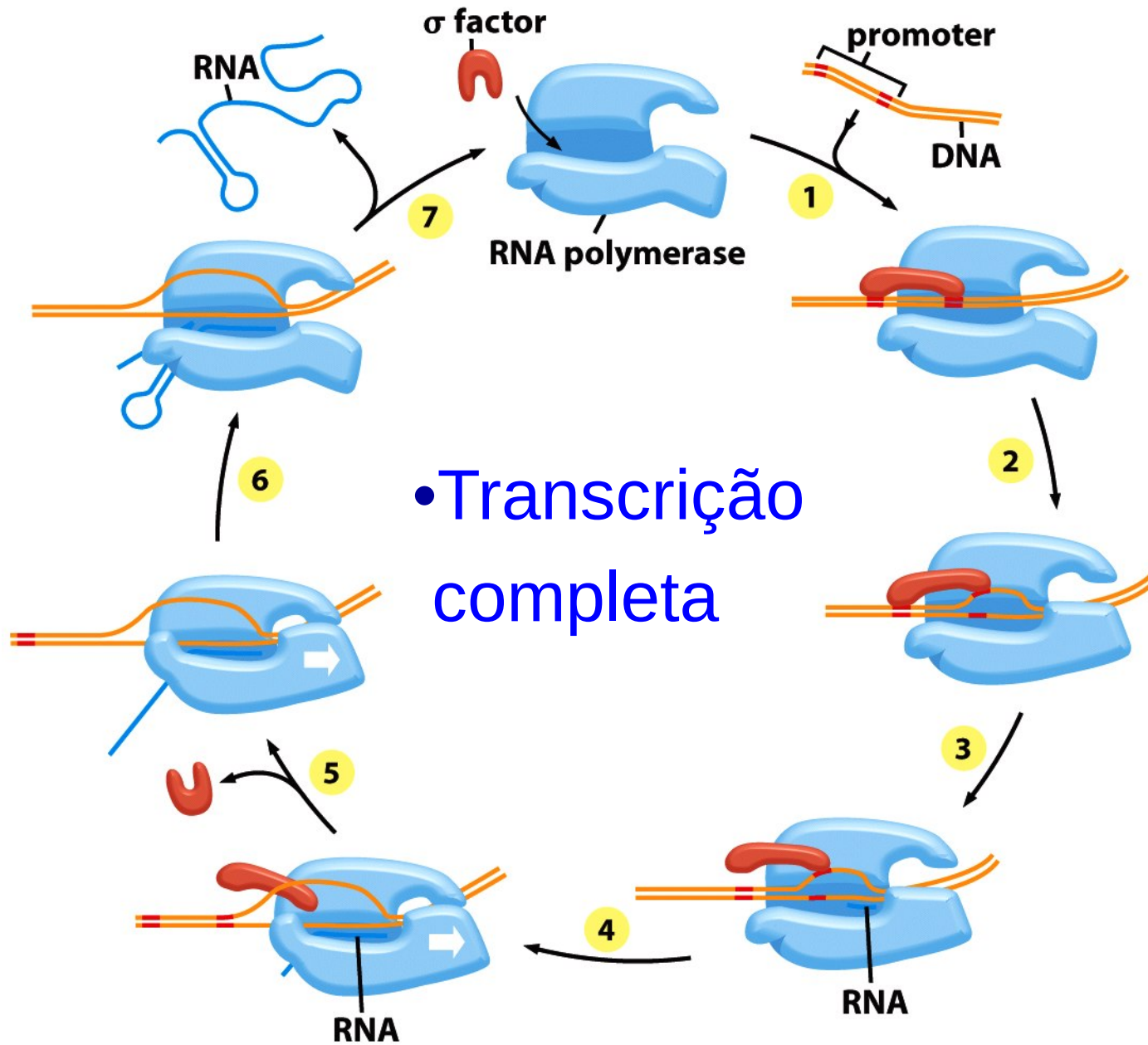
6

- Continua a alongação





- Terminação e desligamento da RNA pol do DNA

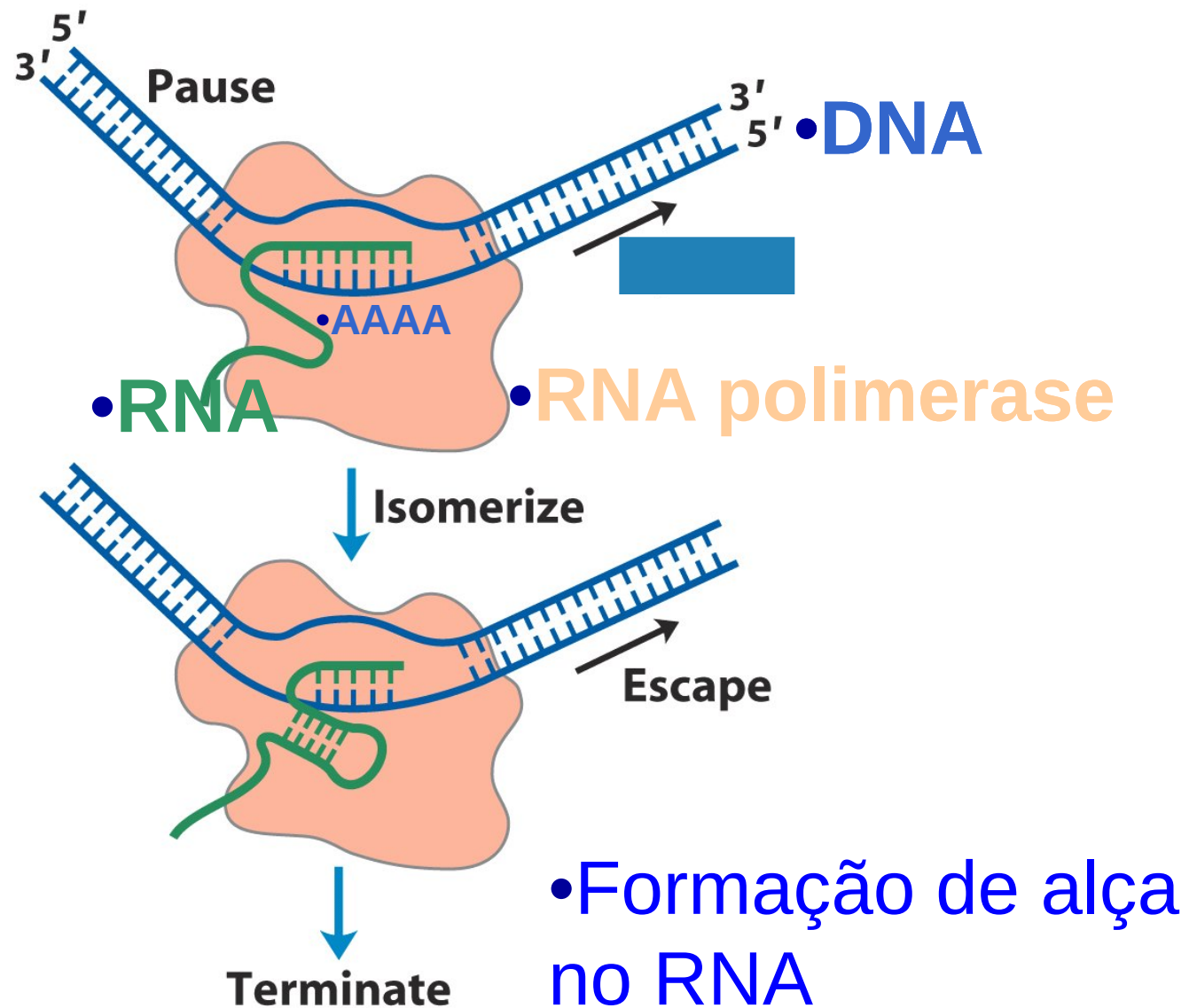


• Transcrição completa

• Terminação da Transcrição

- 1. Independente do fator ρ (rho);
- 2. Dependente do fator ρ (rho).

Terminação Independente de rho



- Sequencia rica em GC seguida por cauda poliU
- Terminação independente de rho

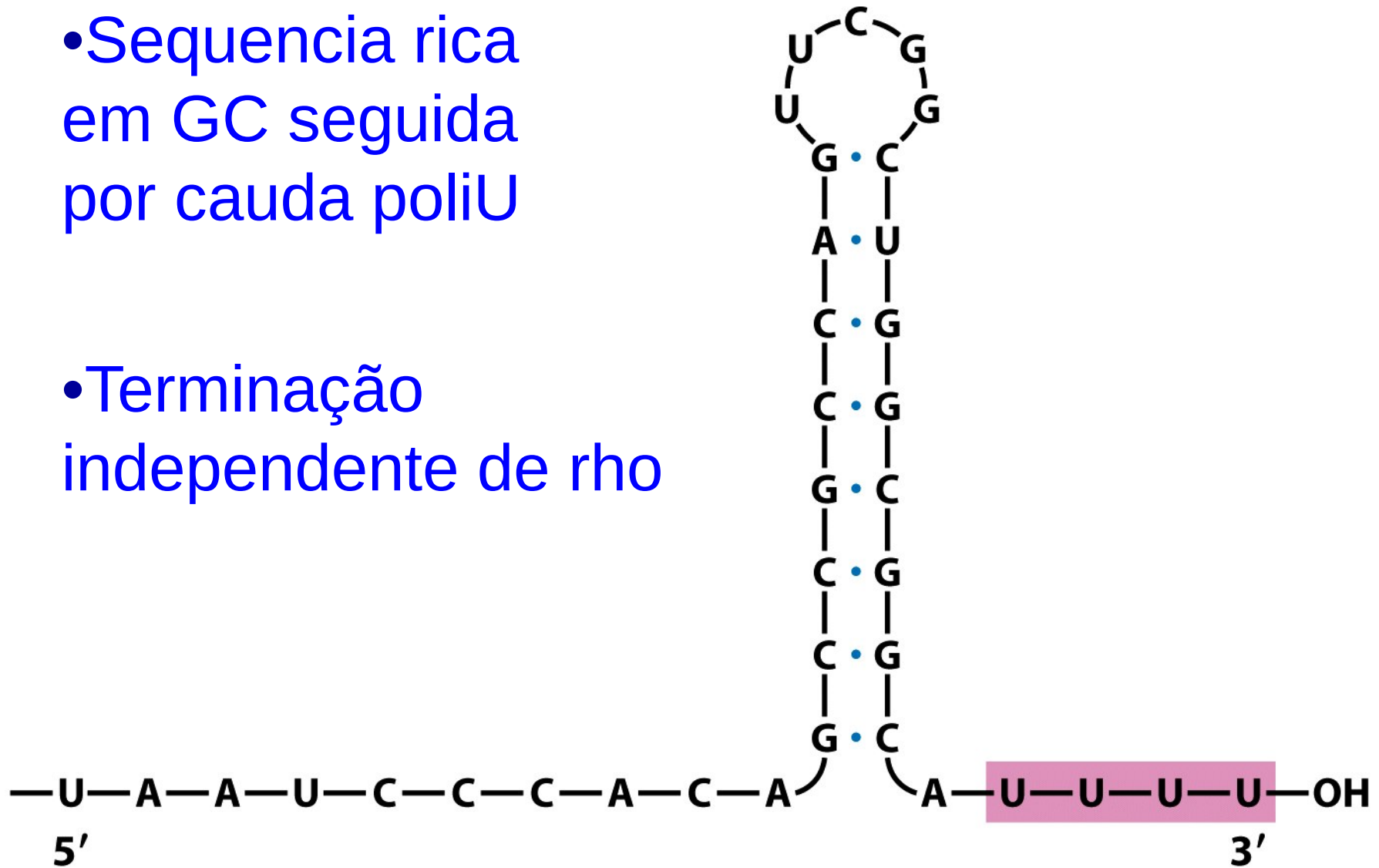


Figure 29-10
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

- Terminação **Dependente** de rho

- 1. Região de terminação da transcrição **não** tem sequência rica em A (poliU)
- 2. Nesta região há sequência rica em **CA**, reconhecida por rho

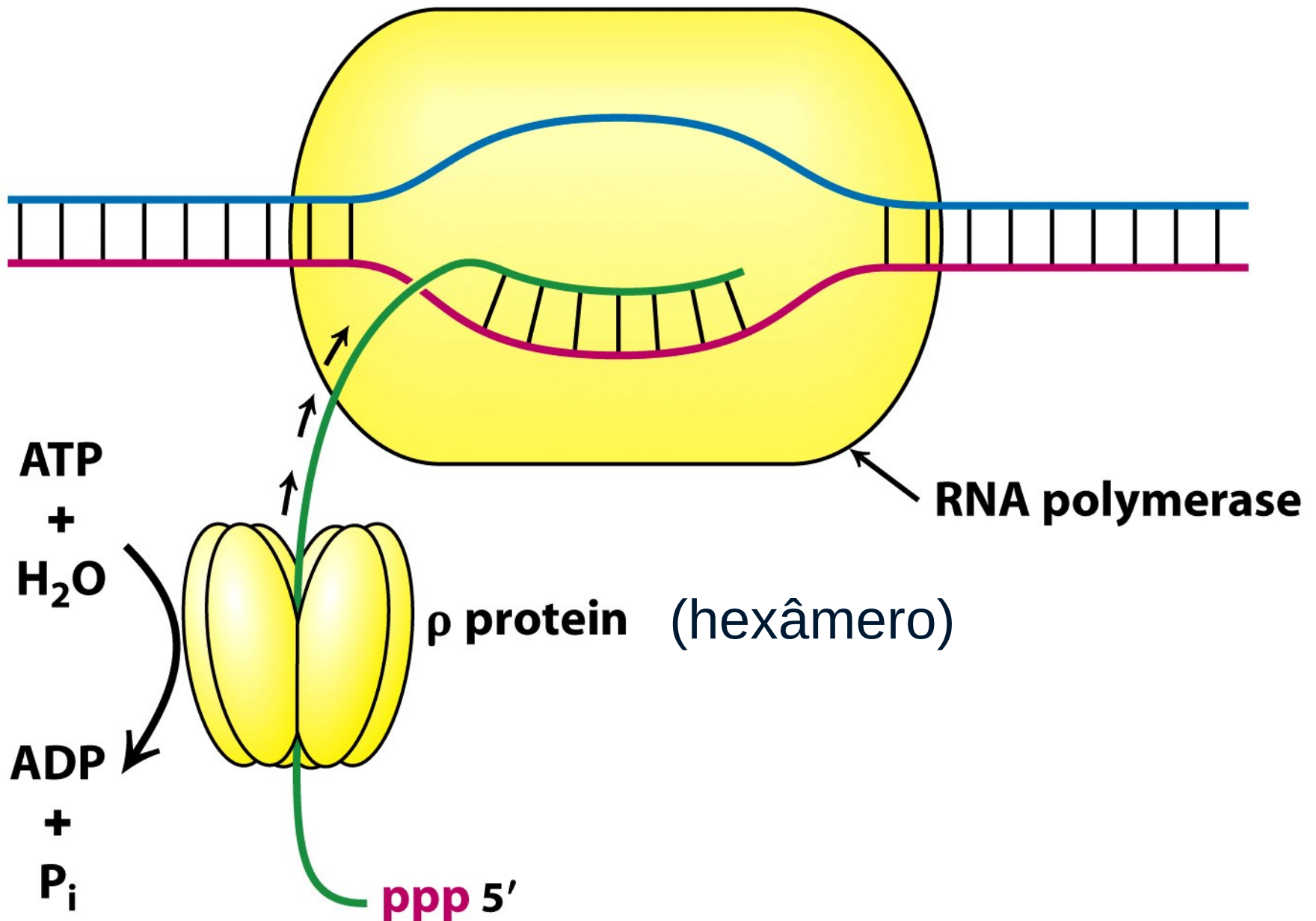
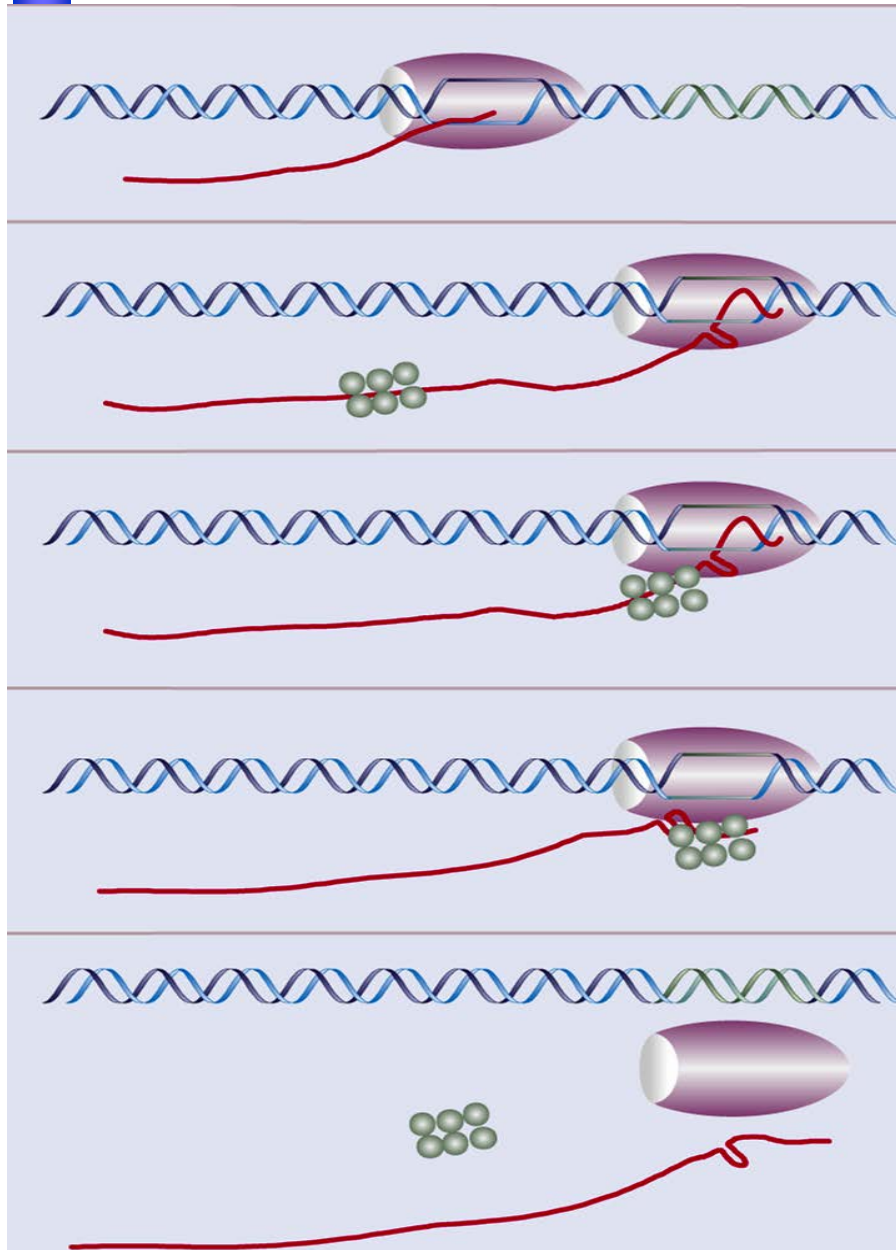


Figure 29-12
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



• Terminação da transcrição dependente da proteína Rho

- O monômero de Rho tem 46kDa e é ativo como hexâmero. Move-se ao longo do RNA acompanhando a RNA polimerase, utilizando energia da hidrólise de ATP
- Com a pausa da RNA polimerase na sequência de terminação, Rho alcança a enzima

• Rho desenrola o híbrido RNA-DNA

- O cerne da RNA pol é liberado, assim como o mRNA e o próprio hexâmero de Rho, que vai então se ligar a outro mRNA

• Sequência de Terminação dependente de Rho: rica em C

AUCGCUACCUCAUAUCCGCACCUCUCAAAACGCUACCUCGACCAGAAAGGCGUCUCUU

Fatores sigma de *E. coli*

A troca dos fatores sigma na Holoenzima da RNA polimerase permite a mudança no conjunto de genes que são transcritos

Gene	Factor	Use	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
<i>rpoD</i>	σ^{70}	general	TTGACA	16–18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	σ^{32}	heat shock	CCCTTGAA	13–15 bp	CCCGATNT
<i>rpoE</i>	σ^E	heat shock	not known	not known	not known
<i>rpoN</i>	σ^{54}	nitrogen	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	σ^F	flagellar	CTAAA	15 bp	GCCGATAA

<i>rpoS</i>	σ^S	vários estresses: choque osmótico, estresse oxidativo, fase estacionária de crescimento da bactéria
-------------	------------	--

A afinidade de cada fator sigma pelo cerne da RNA pol é diferente

Table 1. Binding affinities of sigma factors to core RNAP of *Escherichia coli* (Maeda et al., 2000) and *Bacillus subtilis* (Fujita & Sadaie, 1998; Lord et al., 1999)

Protein	<i>E. coli</i>								<i>B. subtilis</i>			
	<i>E</i>	$\sigma^{70} (\sigma^D)$	$\sigma^{54} (\sigma^N)$	$\sigma^{38} (\sigma^S)$	$\sigma^{32} (\sigma^H)$	$\sigma^{28} (\sigma^F)$	$\sigma^{24} (\sigma^E)$	$\sigma^{18} (\sigma^{FecI})$	<i>E</i>	σ^A	σ^B	σ^F
Affinity (K_d) in nM	–	0.26	0.30	4.26	1.24	0.74	2.43	1.73	–	22.5	1287	561

- Fator sigma 70 (principal) tem a maior afinidade pelo cerne ($\alpha_2\beta\beta'$)

(a) Strong *E. coli* promoters

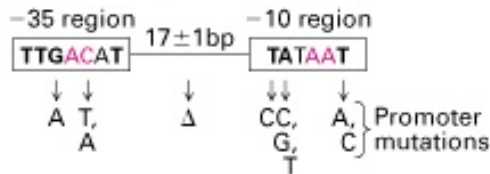
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC	TTTACAGCGGCG	•CGTCATTTGA	TATGAT	GC•GCCCCG	CTTCCC	GATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAATAC	TTGTGCAAAAAA	•TTGGGATCCC	TATAAT	GCGCCTCC	TTGAGAC	GACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCCGC	TTGTCTTCTTGA	•GCCGACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	ATCGACAC	GGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG	TTGACTCTGAAA	•GAGGAAAGCG	TAATAT	AC•GCCAC	CTCGCGAC	AGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTTCTA	TTGCGGCCTGCG	•GAGAACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	ATCGACAC	GGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTCT	TTGTCAAGGCCGG	•AATAACTCCC	TATAAT	GCGCCACC	ACTGACAC	GGGAACAA
rrn A2	GCAAAAAATAAATGC	TTGACTCTGTAG	•CGGGAAGGCG	TATTAT	GC•ACACC	CCGCGCCG	CTGAGAA
λ P _R	TAACACCGTGCGTG	TTGACTATTTTA	•CCTCTGGCGGTG	TATAAT	GG••TTGCA	TGTACTA	AAGGAGGT
λ P _L	TATCTCTGGCGGTG	TTGACATAAATA	•CCACTGGCGGTG	TATAAT	GA••GCACA	TCAGCAGG	ACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGG	TTGACAACATGA	•AGTAAACACGG	TACGAT	GT•ACCACA	TGAAACG	ACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA	TTGACTTAAAGT	•CTAACCTATAGG	TATAAT	TA•CAGCCA	TCGAGAGG	GACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTA	TTGACAACATGA	AGTAACATGCAG	TAAAGT	AC•AAATC	GCTAGGTA	ACACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCG	TTGTACTTTTGT	•TCGCGCTTGG	TATAAT	CG•CTGGGG	GTCAAAGAT	GTAGTG

-35

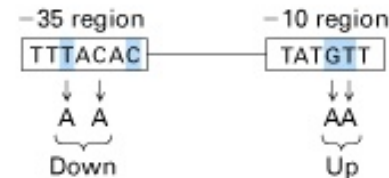
-10

+1

(b) Consensus sequences of σ^{70} promoters



(c) *Lac* promoter sequence



•Promotor do operon lac é fraco
|

Promotores fortes reconhecidos pela holoenzima contendo o fator sigma 70 são os que seguem melhor o consenso

- RNA pol com o fator sigma 32 (sigma de choque térmico) reconhece promotores dos genes choque térmico

PubMed Central : Microbiology. 2009 August; 155(Pt 8): 2560-2572. doi: 10.1099/mic.0.029058-0. - Mozilla Firefox

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2888120/table/t4/

Table 4.

Heat-induced genes with a potential σ^{32} -binding sequence in the promoter region

Distance*	Length†	Binding site sequence	Locus	Gene product‡
34	27	CTTGAAAAACAGCAAAGTATCCTTAAG	FTL_0094	ClpB protein
81	30	CTTGAAAAAATACTTCCACTCTCATATA	FTL_0267	Heat-shock protein 90, HspG
84	27	CTTGATTTATATAAAAAAGACCTTATA	FTL_0281	Heat-shock protein, Hsp40
7	28	CTTGAAATGATTAGAAAAAGTATTTTA	FTL_0663	Hypothetical protein
101	29	CTTGTCATATATTTAATAATAACATATA	FTL_0891	Trigger factor
162	28	CTTGAGTGATGTTTCATATACCTTCAT	FTL_0894	DNA-binding, ATP-dependent protease La
48	29	CTTGAAAAATTTAATCAATTCATTTA	FTL_0965	ATP-dependent protease, peptidase subunit, HslV
82	29	CTTGAAAATACAGAATTAATCACTATCTA	FTL_1190	Chaperone protein GrpE (heat-shock protein family 70 cofactor)
92	29	CTTGAAAAGATTATAAATATGCCCATCTA	FTL_1191	Chaperone protein DnaK (heat-shock protein family 70 protein)
68	30	CTTGAAAATTAATAAAAGCCCCCAATTTTC	FTL_1265	2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine pyrophosphokinase/dihydropterolate synthase
98	29	CTTGAAAATTTTTTTTTTGACTCAATATC	FTL_1715	Chaperonin protein, GroES
40	29	CTTGATTTAGCATGATCGATCATTCCTT	FTL_1805	ATPase
75	27	CTTGAAATTTTAAAAACCGATCATATA	FTL_1957	Heat-shock protein

*Distance from ATG start codon.
†Length (nucleotides) of the putative σ^{32} -binding site.
‡Gene product according to TIGR.

Microbiology. 2009 August; 155(Pt 8): 2560-2572.
doi: 10.1099/mic.0.029058-0.
Copyright © 2009, SGM

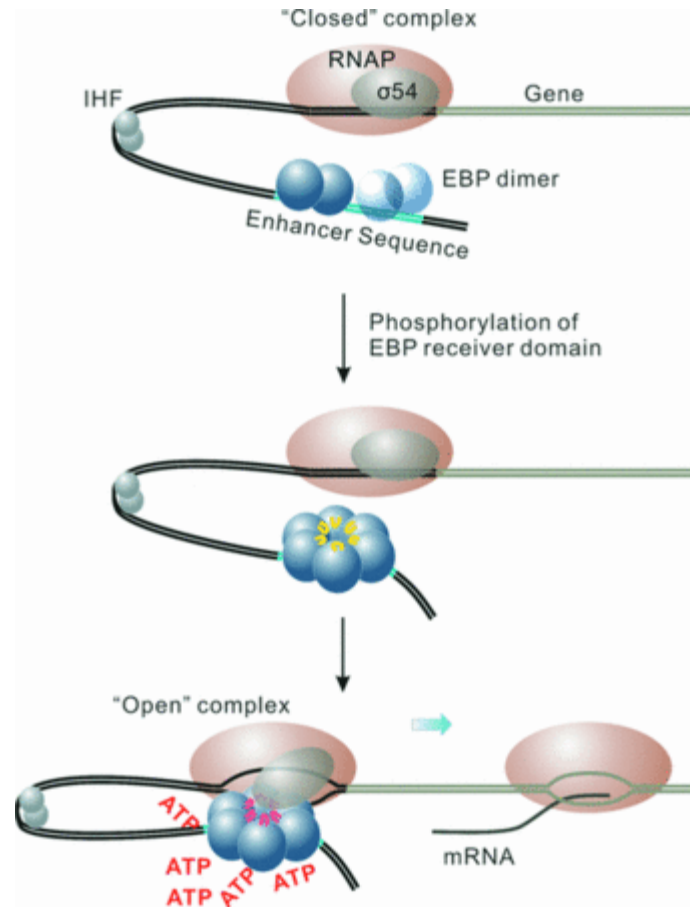
Concluído

• Genes de CT codificam chaperones e proteases



- Sequencia consenso é diferente!
- Choque Térmico = aumento brusco de temperatura

Holoenzima RNA pol-sigma 54 necessita de ativador para iniciar a transcrição

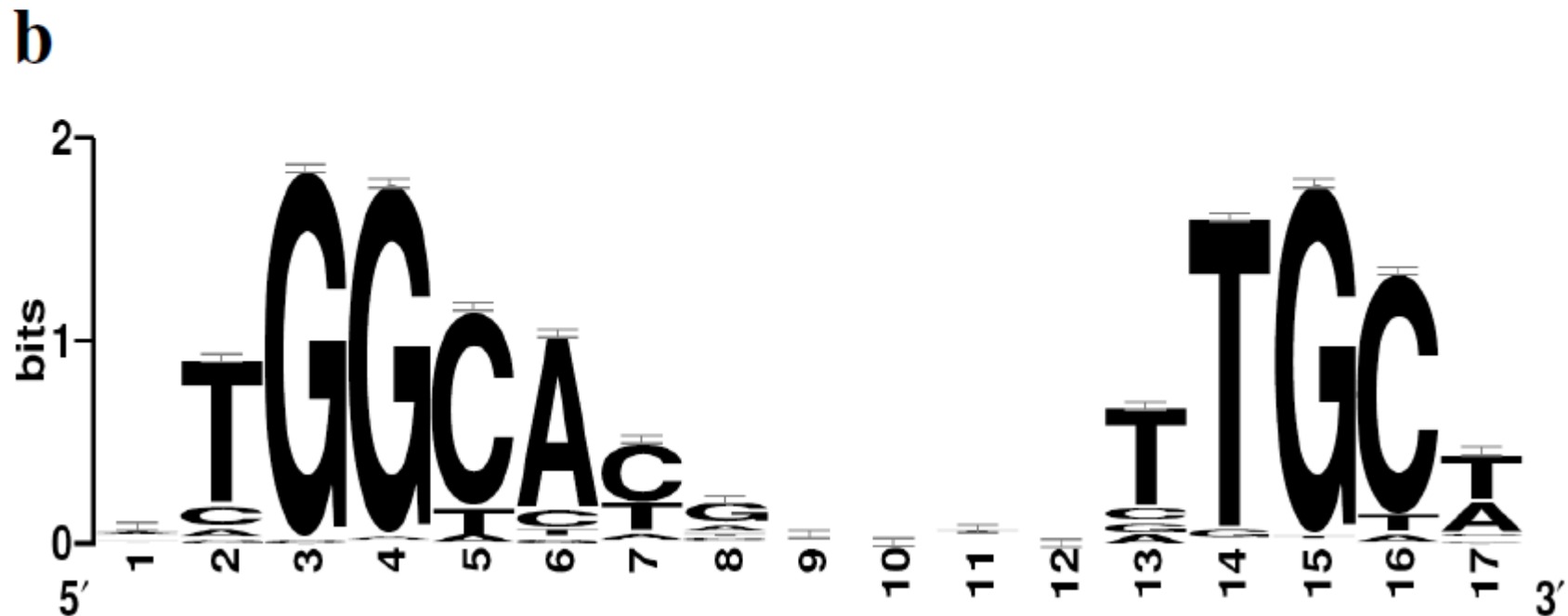


- Reconhece promotores de genes regulados por carência de nitrogênio

• Promotores reconhecidos pelo sigma 54

a

<i>glnB</i>	(GSU1836)	TAGGCAGACTATTTGCTTTTATATTTGC
<i>dcuB</i>	(GSU2751)	TTGGTATCCCCCTTGCTCATTGAAGGGT
<i>fliL</i>	(GSU0420)	CTGGCATTTCGGTTGCAATAGCCGTATCGGT
<i>fdnG</i>	(GSU0777)	TTGGCACAATGCTTGCCCGTATACGCTTCCG
<i>nifEN</i>	(GSU2806)	TTGGCACGTGGGGTGCAAAAGGAGCGTTTGA
<i>flgJ</i>	(GSU3046)	TTGGCACATAACATGCTGTCCTCAGAACAGGG
consensus (from b)		TGGCACGNNNTTGCA/T



Regiões: -24

-12

Conclusão:

Diferentes fatores sigma ativam a transcrição de conjuntos de genes distintos quando as bactérias encontram condições ambientais adversas participando assim do

Controle da Expressão Gênica



Regulação da Expressão Gênica

Eucariotos multicelulares:

- Limitação na resposta direta às variações nas condições nutricionais e ambientais (células estão organizadas em tecidos e órgãos)
- Expressão diferencial de conjuntos de genes dependendo do tecido ou órgão, ou da fase do desenvolvimento
- Transcrição ocorre em compartimento distinto da tradução eliminando a possibilidade de acoplamento
- Transcrição é o nível mais importante da regulação gênica

Controle da Resposta ao Choque Térmico em Bactéria:

O papel do fator sigma 32 de choque térmico

**Exemplo de como uma mudança nos níveis de um fator
sigma leva a uma mudança na expressão gênica!**