

Controle da Resposta ao Choque Térmico em Bactérias: Fatores sigma alternativos

Suely Lopes Gomes

QBQ-2503

IQUSP

2023

Choque térmico (Heat Shock)

- **Aumento** brusco de temperatura
 - desnaturação de proteínas
 - mudanças na fluidez de membrana
 - alteração na estrutura secundária de ácidos nucleicos
- Resposta **universal** ao choque térmico:
 - Aumento transitório da expressão de proteínas de choque térmico (HSPs)
 - Controle geralmente no nível de transcrição
 - Permite que a célula lide com o estresse

Proteínas de Choque Térmico (HSPs)

- Chaperones moleculares

- Renaturam proteínas desnaturadas ou as protegem da desnaturação
- GroEL (Hsp60), DnaK (Hsp70), ClpB

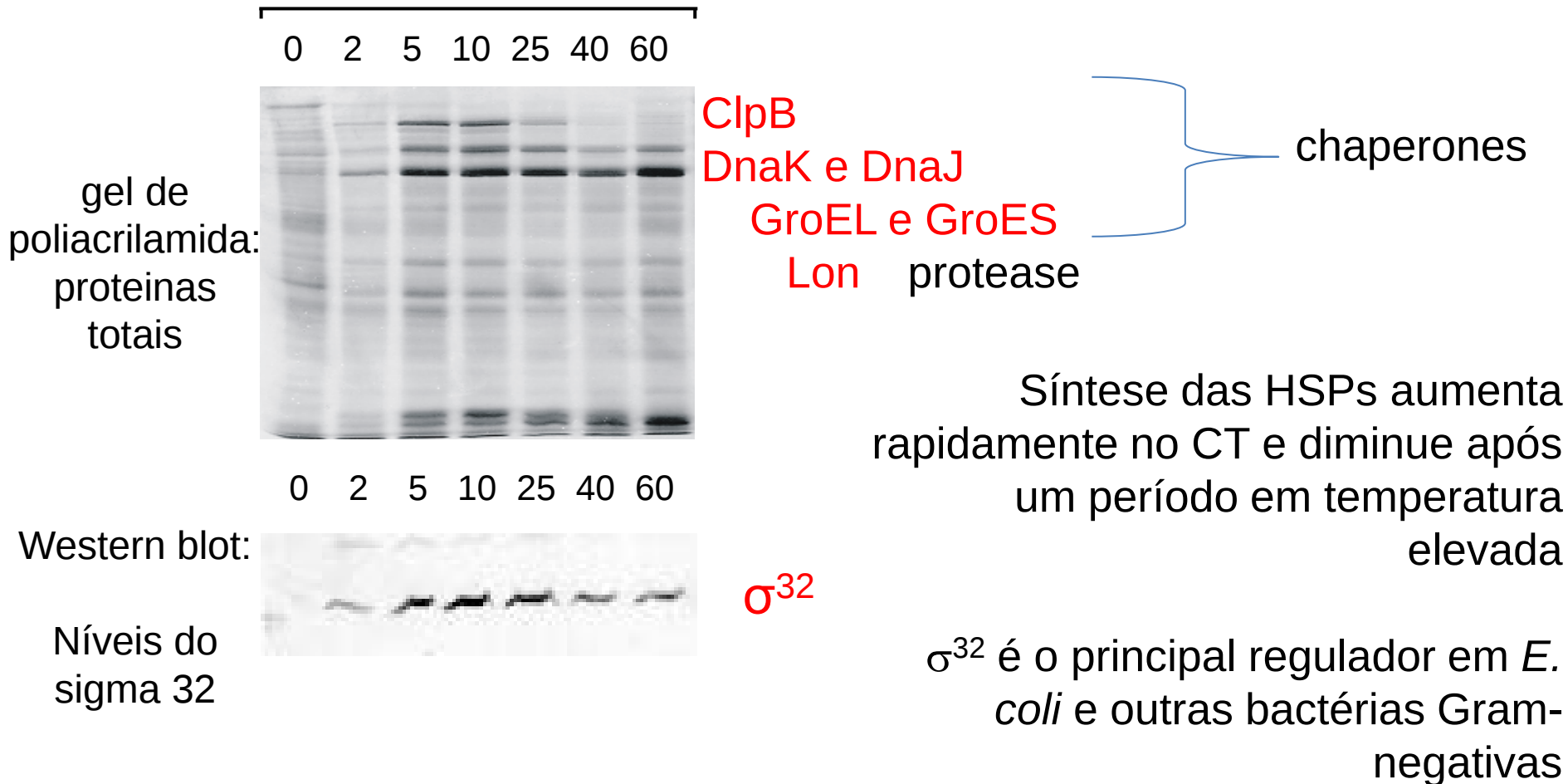
- Proteases

- Degradam proteínas irremediavelmente desnaturadas
- Lon, HtrA, FtsH

- Existem em níveis baixos nas células em condições normais de temperatura

A resposta ao choque térmico é transitória

Choque térmico (30 → 42°C)

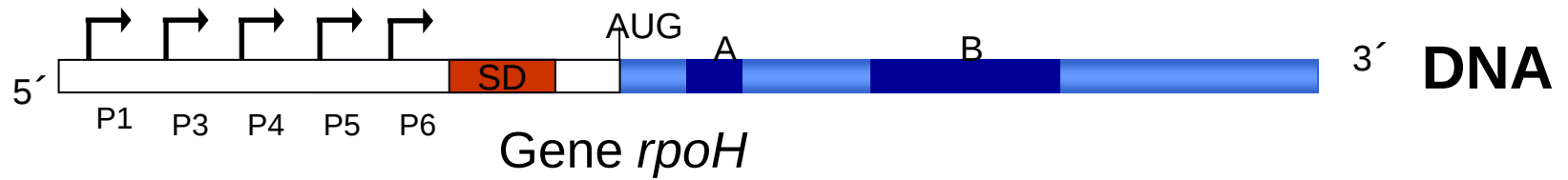


Fator sigma 32 (σ^{32} ou RpoH) de *E. coli*

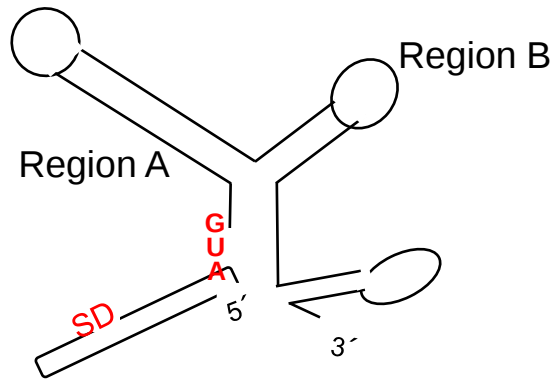
Exemplo de como uma mudança nos níveis de um fator sigma leva a uma mudança na expressão gênica

- Níveis de σ^{32} aumentam cerca de 20x no HS (choque térmico)
- Regulação é pós-transcricional:
 - Aumento da tradução do mRNA de *rpoH*
 - Diminuição da degradação da proteína σ^{32}
 - Transcrição do gene *rpoH* praticamente não varia

Regulação da síntese de σ^{32}



Transcrição

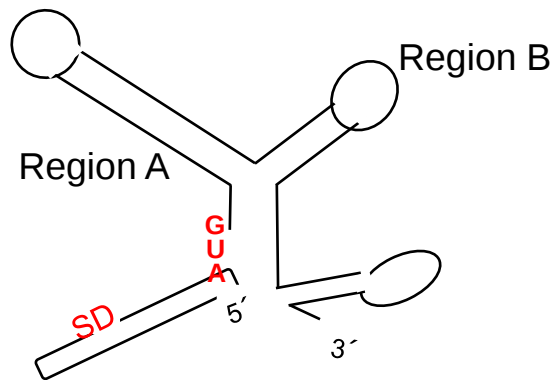
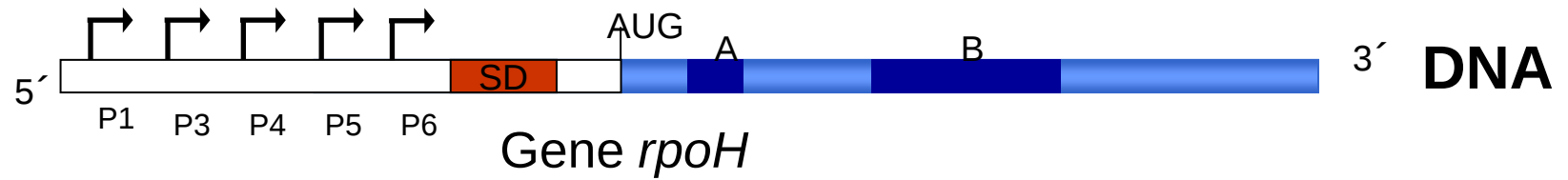


RNA

A **30°C**, o mRNA apresenta uma estrutura secundária que deixa a região Shine-Dalgarno (**SD** ou RBS) encoberta, impedindo a tradução

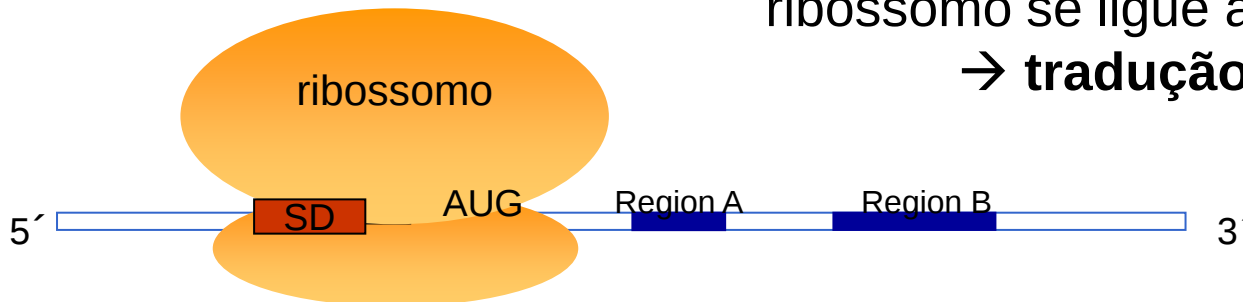
Shine-Dalgarno ou RBS: região do mRNA onde a subunidade menor do ribossomo se liga para iniciar a tradução

Regulação da síntese de σ^{32}

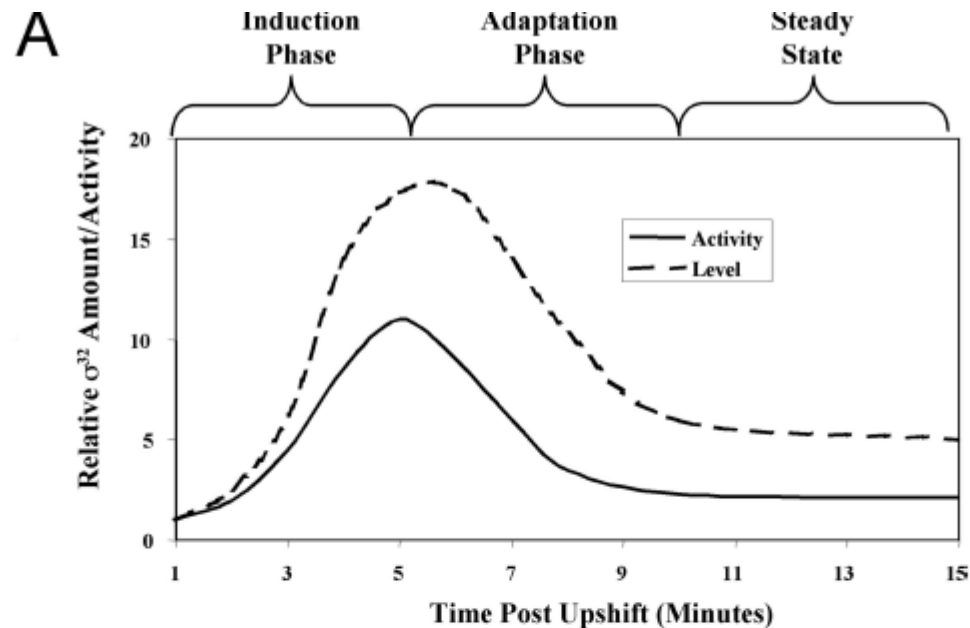


30°C

A 42°C, a estrutura secundária no mRNA se desnatura, permitindo que o ribossomo se ligue à SD
→ tradução de σ^{32}



Níveis do σ^{32} aumentam de forma rápida e transitória durante o HS



Após, o choque térmico, a protease FtsH degrada σ^{32} na presença dos chaperones DnaK/ DnaJ desligando a resposta de HS

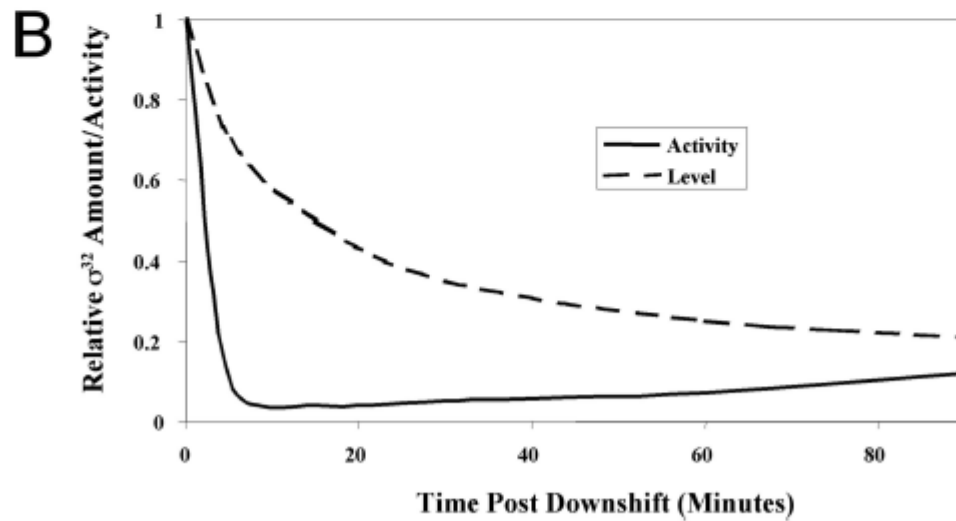
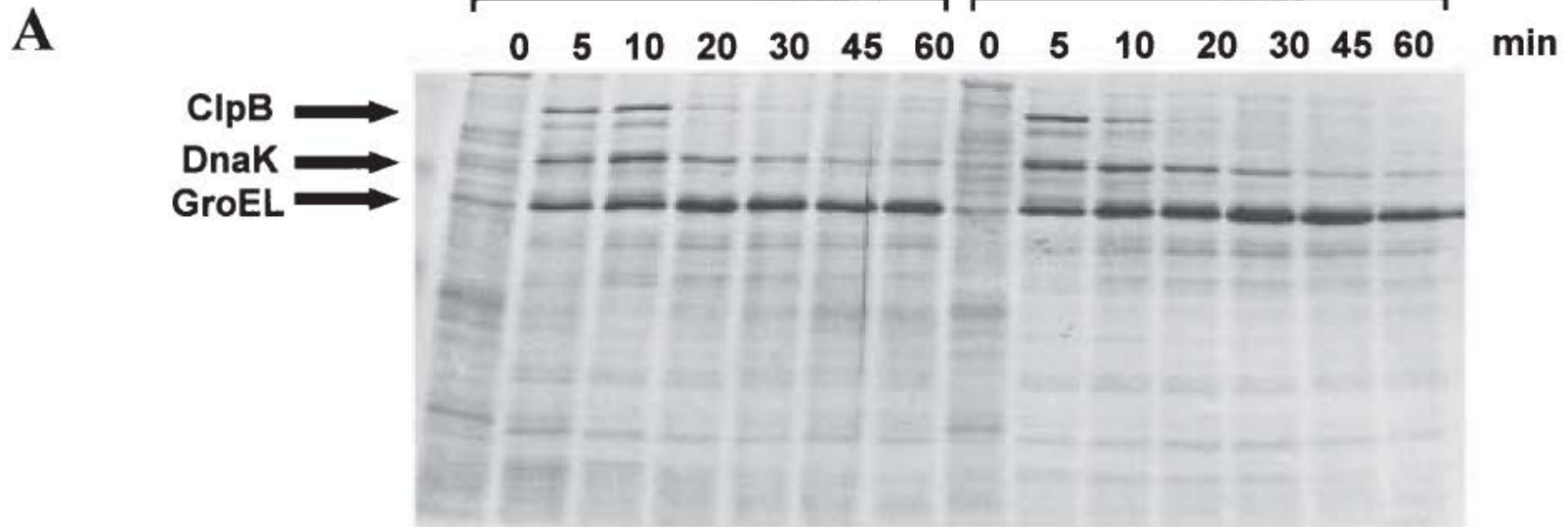


FIG. 1. Activation and repression of the HSR during temperature upshift and downshift. (A) Activation of the HSR during a temperature shift from 30 to 42°C reveals three distinct phases: induction, adaptation, and steady state. (B) Repression of the HSR during a temperature shift from 42° to 30°C. The relative σ^{32} activities measured by HSP synthesis are shown by the solid lines; relative σ^{32} levels measured by Western blotting analysis are shown by the dotted lines.

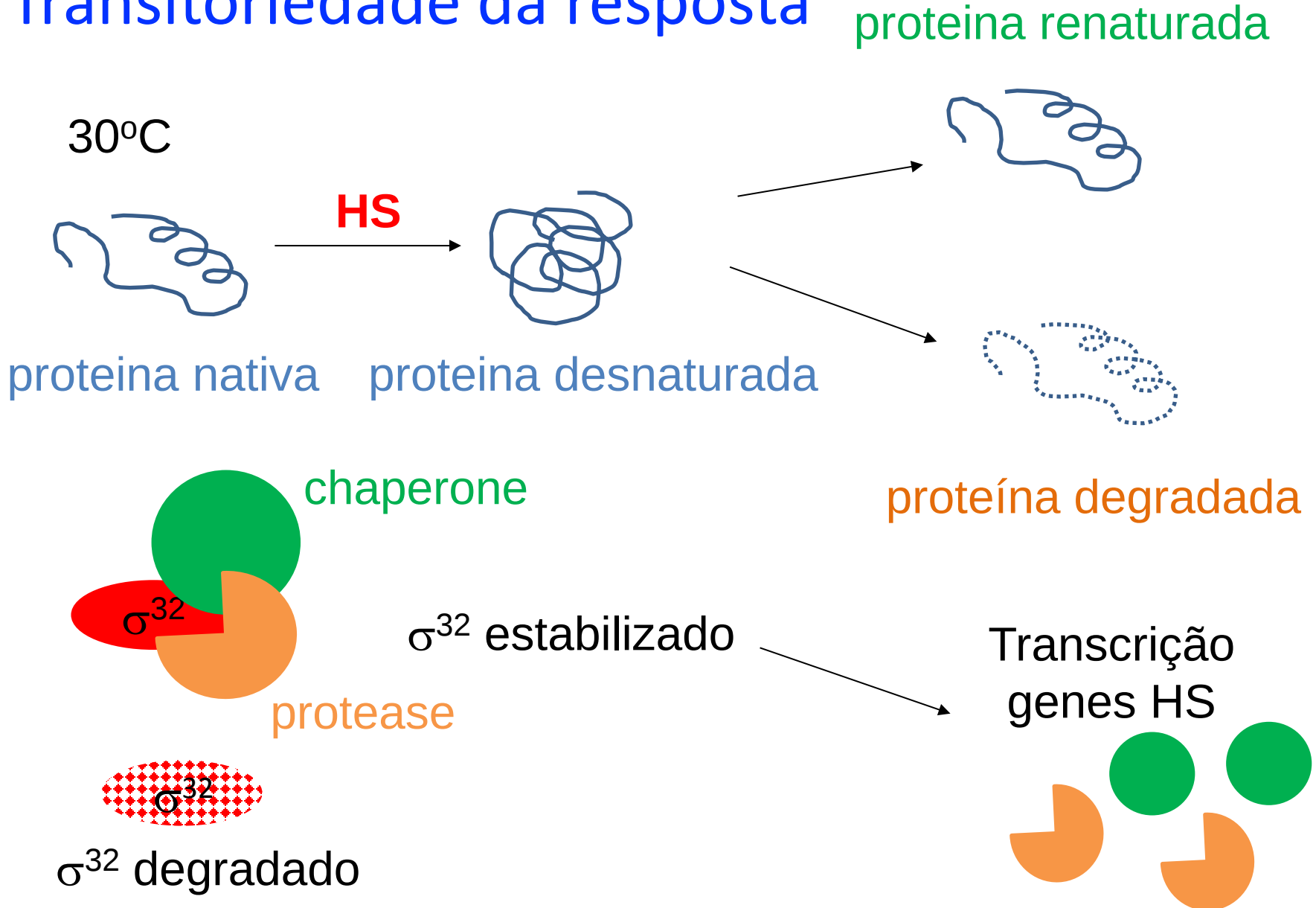
A protease FtsH degrada σ^{32}

bactéria selvagem mutante sem FtsH

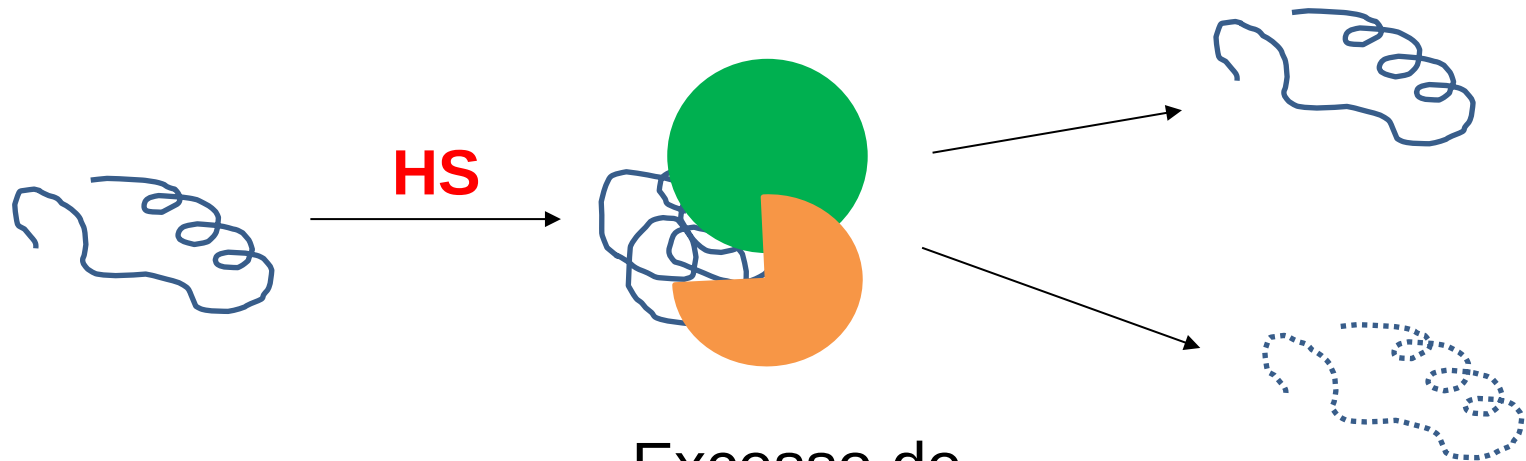


Níveis do sigma 32 após choque térmico

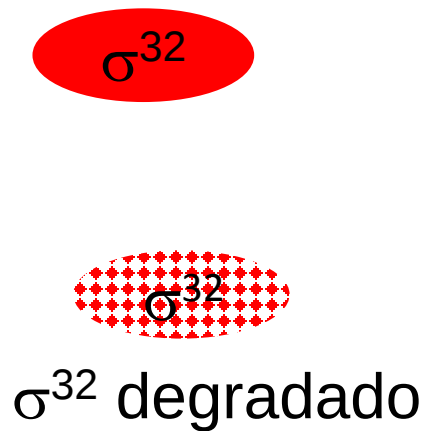
Transitoriedade da resposta



Transitoriedade da resposta



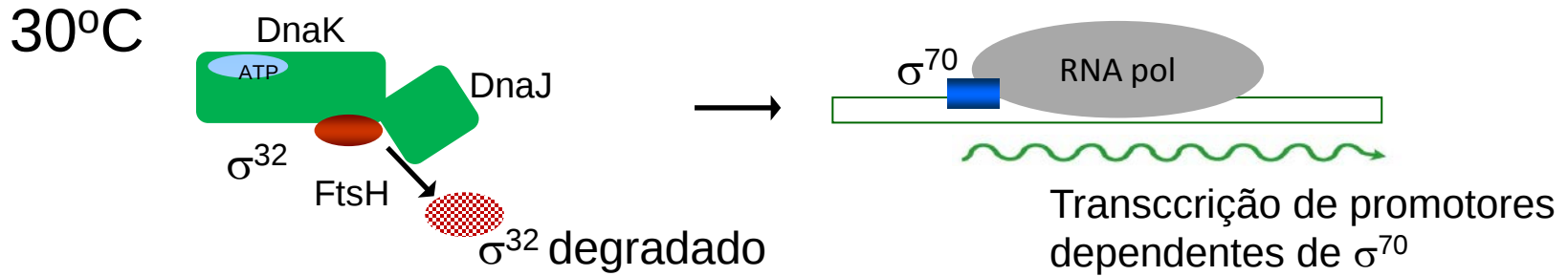
Excesso de
proteínas HS



Resposta
silenciada

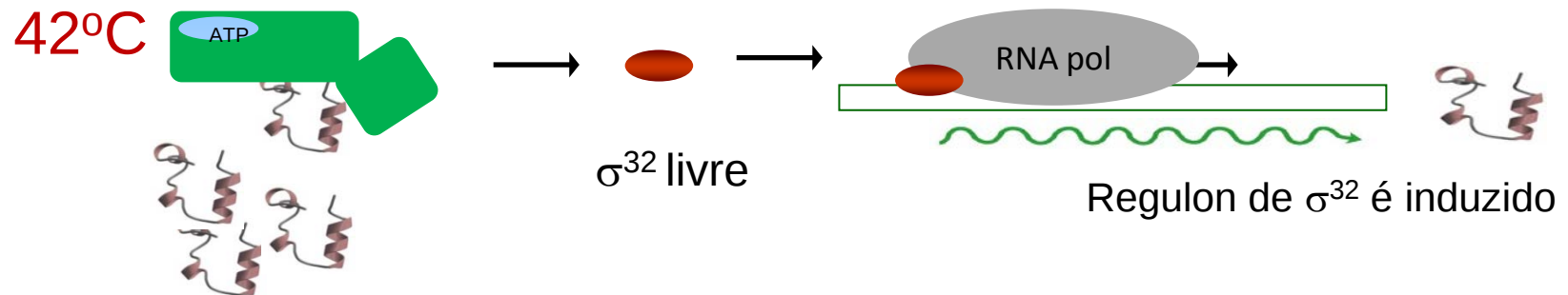
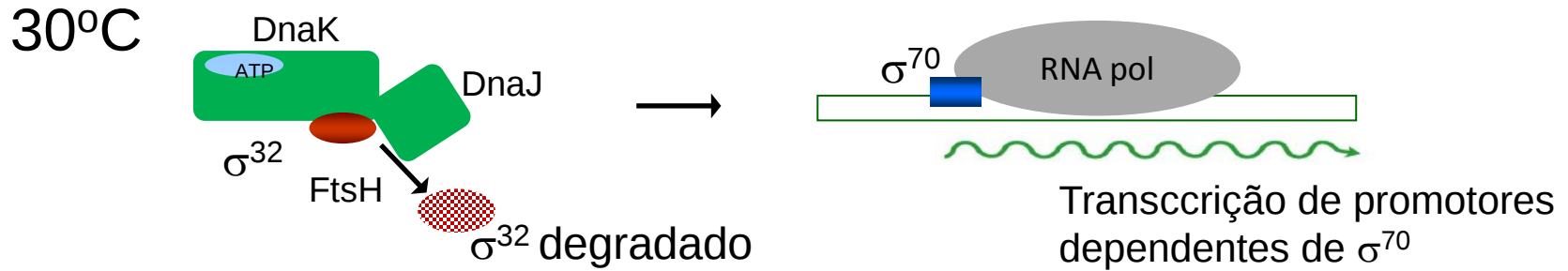


Transitoriedade da resposta



- As chaperones DnaK/DnaJ recrutam σ^{32} para ser degradado pela protease FtsH
- Transcrição de genes com promotores reconhecidos por σ^{70} (*housekeeping*)

Transitoriedade da resposta



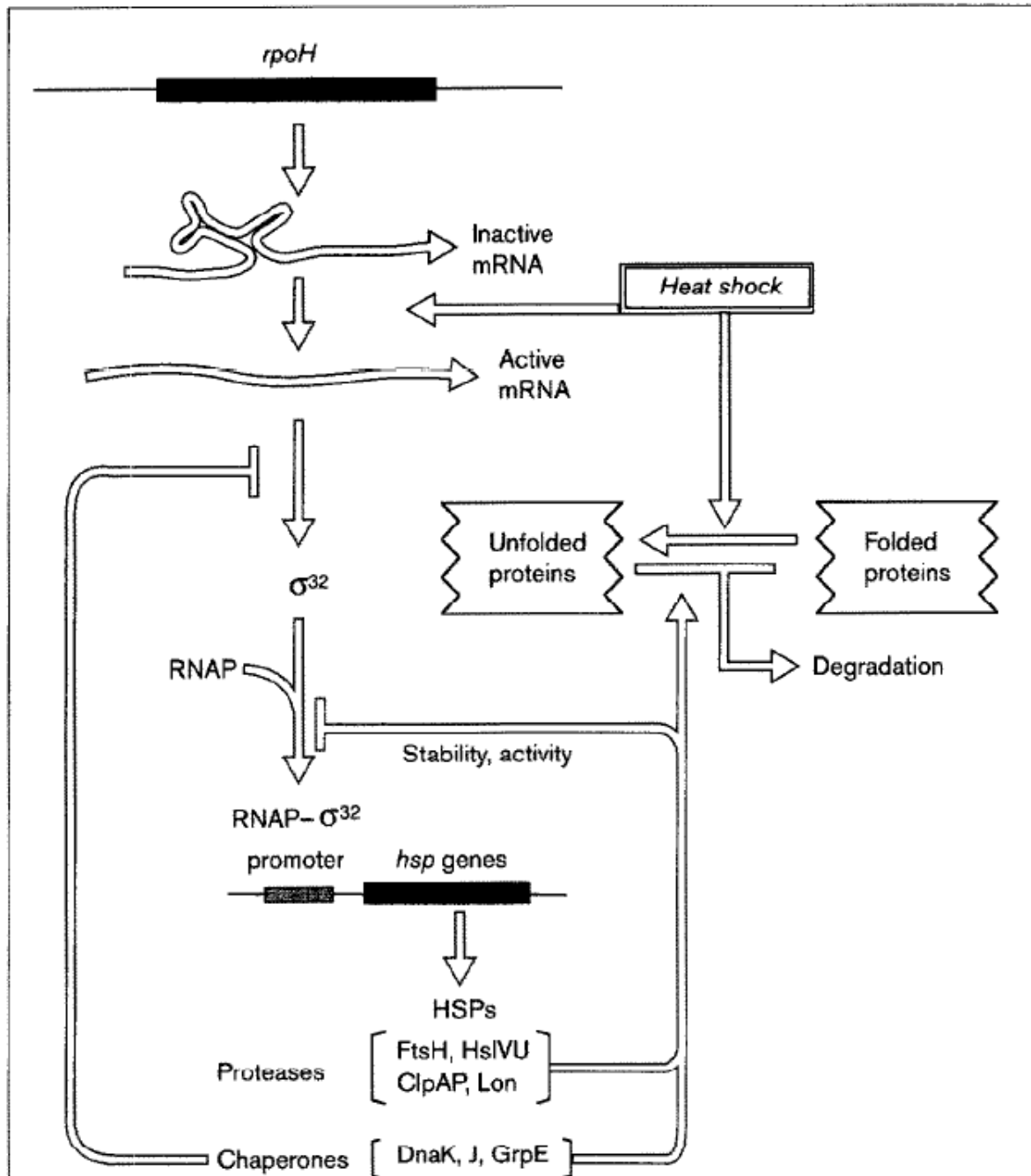
- DnaK/DnaJ se ligam a proteínas desnaturadas pelo calor
- σ^{32} fica livre para se ligar ao cerne da RNA polimerase e ativar a transcrição de genes HS

Papel das chaperones DnaK e DnaJ na regulação da resposta ao choque térmico

- São **moduladores negativos da atividade do σ^{32}**
 - possuem atividade de anti-sigma
 - sequestram σ^{32} em temperaturas fisiológicas (normais)
- São **moduladores positivos da degradação do σ^{32}** pela **protease FtsH**
 - apresentam σ^{32} para degradação por FtsH em temperaturas fisiológicas

DnaK e DnaJ são assim denominadas porque foram descobertas como necessárias para a replicação do DNA

Figure 1



Regulatory circuits of the σ^{32} regulon in *E. coli*. Heat shock enhances the level of σ^{32} both by activating translation of *rpoH* mRNA and by stabilizing normally unstable σ^{32} . The latter is thought to occur by sequestering DnaKJ chaperones (and perhaps the proteases) away from σ^{32} by unfolded proteins produced upon heat shock, and thereby permitting σ^{32} to bind to RNAP and concomitantly activating heat-shock gene transcription. Subsequent build-up of HSPs (DnaKJ chaperones, ATP-dependent proteases) brings about negative feedback control by inhibiting translation, stabilization, and activity of σ^{32} .

**Circuito regulatório
do Choque Térmico
regulado por σ^{32}
em *E. coli***

Regulação da resposta de Choque Térmico

- Excesso das chaperones DnaK/DnaJ livres ligam e inativam o σ^{32} na temperatura fisiológica.
 - Protease FtsH degrada o σ^{32} , chaperones DnaK e DnaJ participam deste processo.
- A temperatura controla diretamente a velocidade de síntese do σ^{32} devido à estrutura secundária no 5' do mRNA que esconde a SD (RBS) e se desfaz no CT.
- Proteínas desenoveladas no CT deslocam DnaK e DnaJ de suas funções regulatórias, liberando o σ^{32} ativo para transcrever os genes de CT.
 - Assim, a síntese das chaperones e proteases aumenta, para proteção das células na alta temperatura.

Promotores reconhecidos por σ^{32}

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

Distance*	Length†	Binding site sequence	Locus	Gene product‡
34	27	CTTGAAAAACAGCAAGTATCCTTAAG	FTL_0094	CpfI protein * *
81	30	CTTGAAAAACTAAGCTTCAGCTCTCATATA	FTL_0267	Heat-shock protein 90, HspG *
84	27	CTTGATTTATATAAAAAGACCTTATA	FTL_0281	Heat-shock protein, Hsp40 *
7	26	CTTGAAATGATTAGAAAAAGTATTTTA	FTL_0863	Hypothetical protein
101	29	CTTGTCATATAATTAATAATAACATATA	FTL_0891	Trigger factor
162	26	CTTGAAGTGATGTTTCATATAAGCTTCAT	FTL_0894	DNA-binding, ATP-dependent protease La
48	29	CTTGAAAAATTTAATATCAATTCATTTTA	FTL_0965	ATP-dependent protease, peptidase subunit, HspV *
82	29	CTTGAAAATACAGAAATTAATCACTATCTA	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	CTTGAAATTAAAAAAAGCGCCCAATTTTC	FTL_1265	2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-5-hydroxy-2,4-pyrimidine diphosphate synthase
98	29	CTTGAAAATTTTTTTTTTGAATCAATATC	FTL_1715	Chaperonin protein, GroES *
40	29	CTTGATTTAGCATGATCGTATCATTTCTT	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 B): 2569-2571.
doi: 10.1093/mic/155.5.2569

* chaperones

* proteases



-35

-10

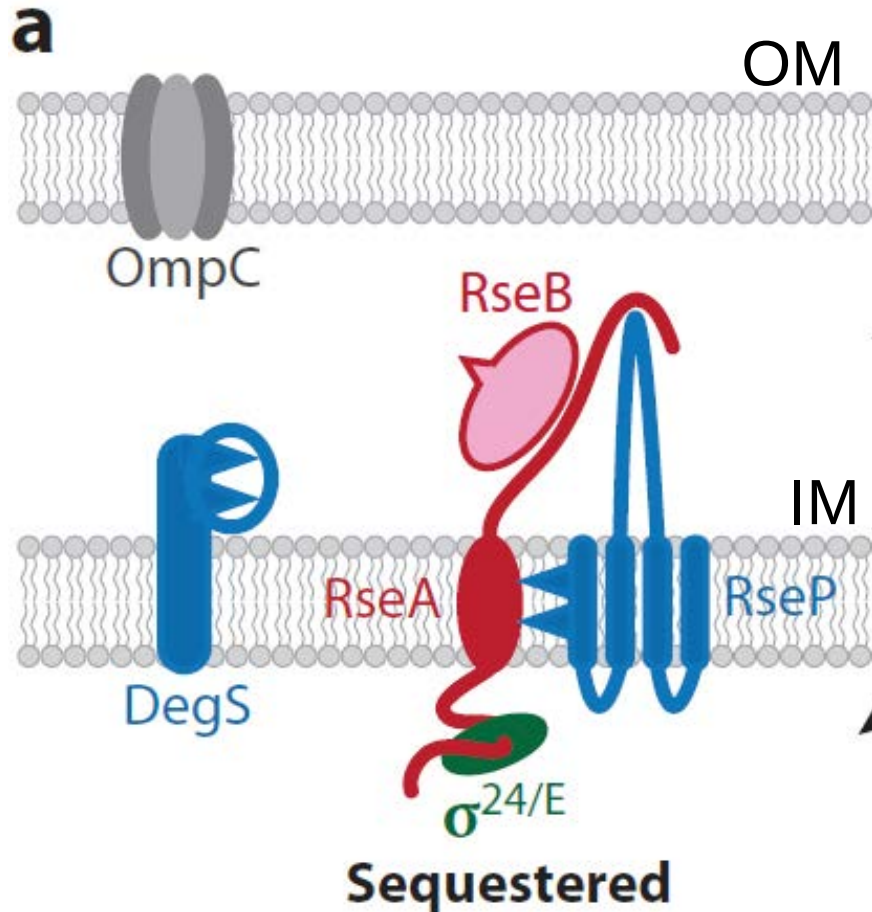
consenso

Parte 2: outros modelos de regulação do choque térmico

Choque térmico extremo (*E. coli*)

- Temperaturas acima de 45°C
- Outro fator sigma alternativo entra em ação:
 - σ^E (ou **RpoE** ou σ^{24})
 - Parte da subfamília dos fatores sigma ECF
- Resposta a proteínas desnaturadas no periplasma (espaço entre as membranas de bactérias Gram-negativas)

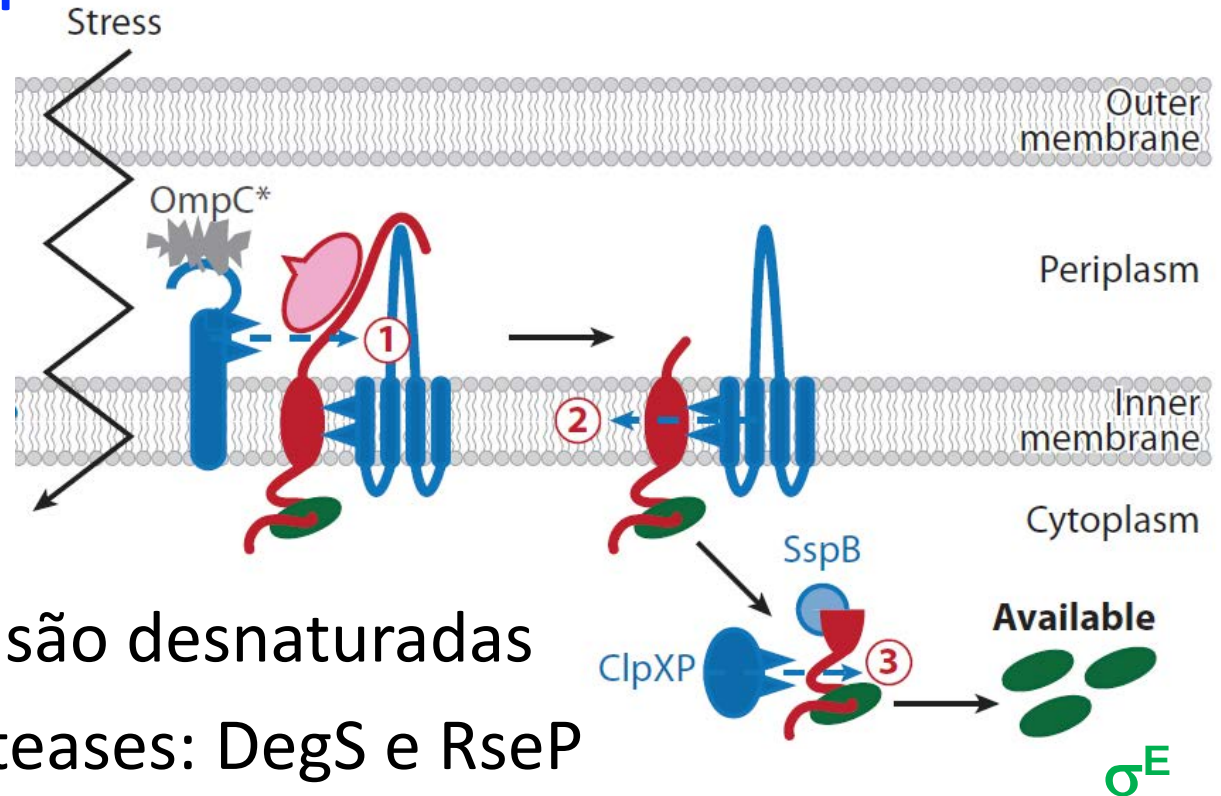
Regulação do fator σ^E/σ^{24} : condições normais



- Em condições normais, σ^E é sequestrado pela proteína de membrana **RseA**, que é um **anti-sigma**
 - σ^E **inativo**, pois não pode interagir com o cerne da RNA polimerase
 - Genes com promotores reconhecidos por σ^E não são transcritos

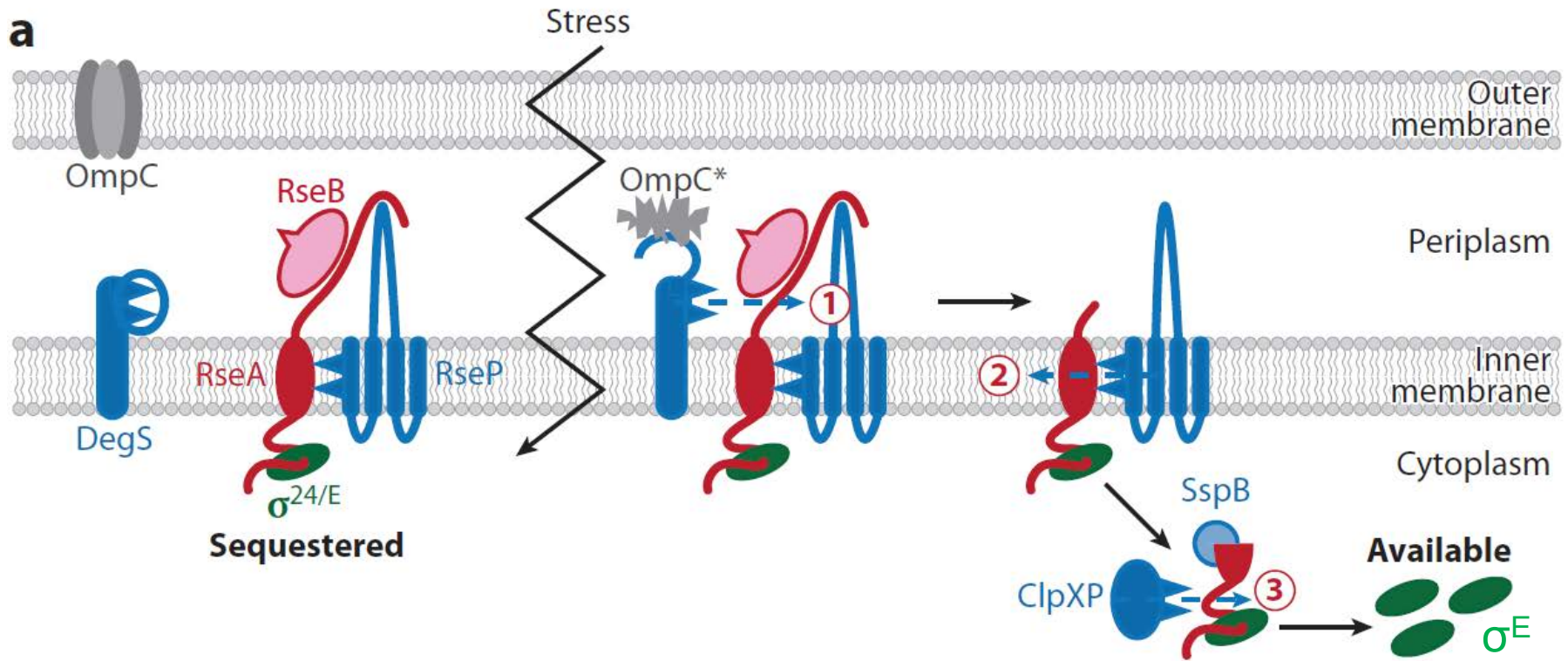
OM: membrana externa; IM, membrana interna

Regulação do fator σ^E/σ^{24} : choque térmico extremo



- Porinas (OmpC) são desnaturadas
- Ativação de proteases: DegS e RseP
- Degradação do anti-sigma RseA
- σ^E livre para interagir com o cerne da RNA polimerase
- **Transcrição dos promotores dependentes de σ^E**

Regulação do fator σ^E/σ^{24}



- O fator σ^E não é degradado (como no exemplo de σ^{32}), apenas inativado, a temperaturas normais.
- A proteólise do fator anti-sigma RseA no CT, libera σ^E

A regulação por fatores sigma é uma regulação positiva

Os fatores sigma aumentam a transcrição dos genes de proteínas que irão proteger contra o estresse térmico.

Há exemplos de regulação por repressão da transcrição em outras bactérias:
CIRCE e HrcA

O sistema CIRCE/HrcA

- HrcA é uma proteína repressora em condições normais de temperatura
 - Liga-se ao DNA e impede a transcrição de genes de CT
 - HrcA é um fator de regulação *in trans*
- CIRCE é uma sequência repetida invertida no DNA
 - Sítio de ligação de HrcA
 - CIRCE é um fator de regulação *in cis*
- Durante o choque térmico, HrcA é inativada e a transcrição dos genes de choque térmico é induzida

Não existe em *E. coli*

Controle negativo do choque térmico por HrcA/CIRCE (*Bacillus subtilis*)

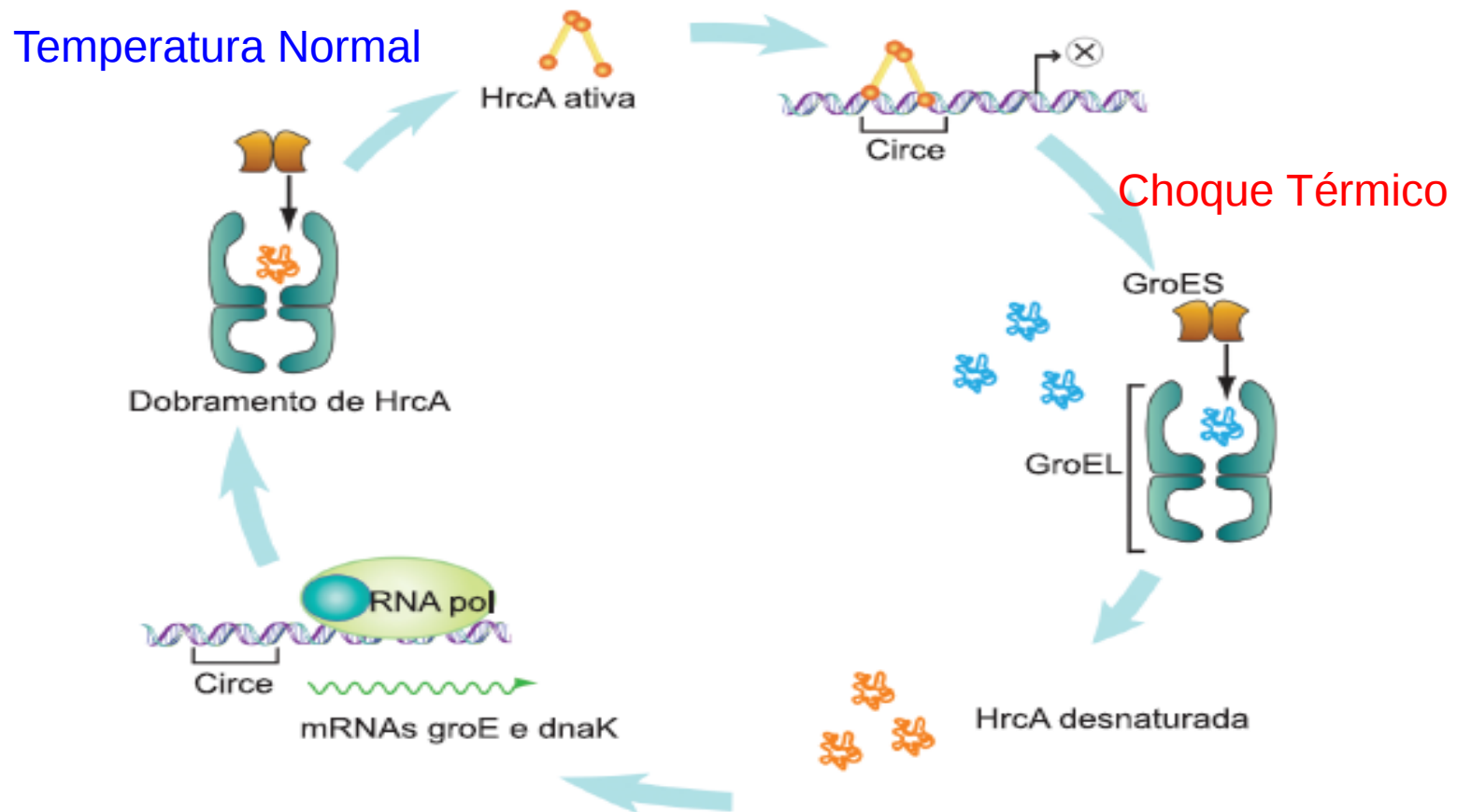
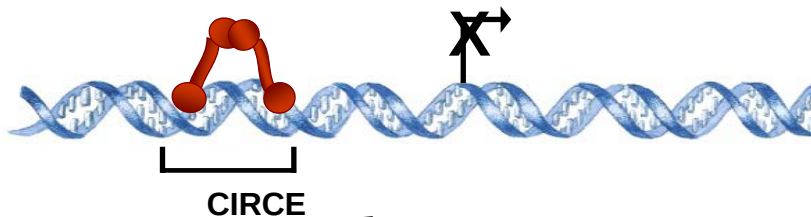


Figura 17.3. A atividade do repressor HrcA depende das chaperonas GroES/GroEL. Na ausência de estresse térmico, o sistema GroES/EL converte a proteína HrcA para sua forma ativa. HrcA liga-se à repetição invertida CIRCE que está presente nos genes de choque térmico. A ligação impede o acesso da holoenzima da RNA polimerase, reprimindo assim a transcrição. Durante o aumento de temperatura, proteínas desenoveladas ligam GroES/EL, provocando a inativação de HrcA, que se desliga de CIRCE. A transcrição dos genes de choque térmico é então induzida, levando a um acúmulo de GroES/EL que ativa HrcA; esta se liga a CIRCE, desligando a transcrição dos operons de choque térmico dependentes do sistema CIRCE/HrcA.

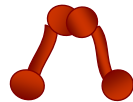
O repressor HrcA é inativado no choque térmico

Temperatura
normal

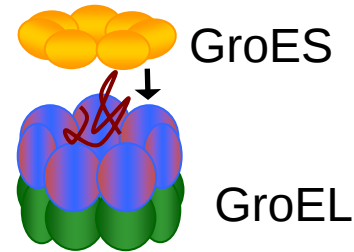
Não há transcrição dos
promotores com elemento CIRCE



HrcA ativa se liga
ao elemento
CIRCE no DNA

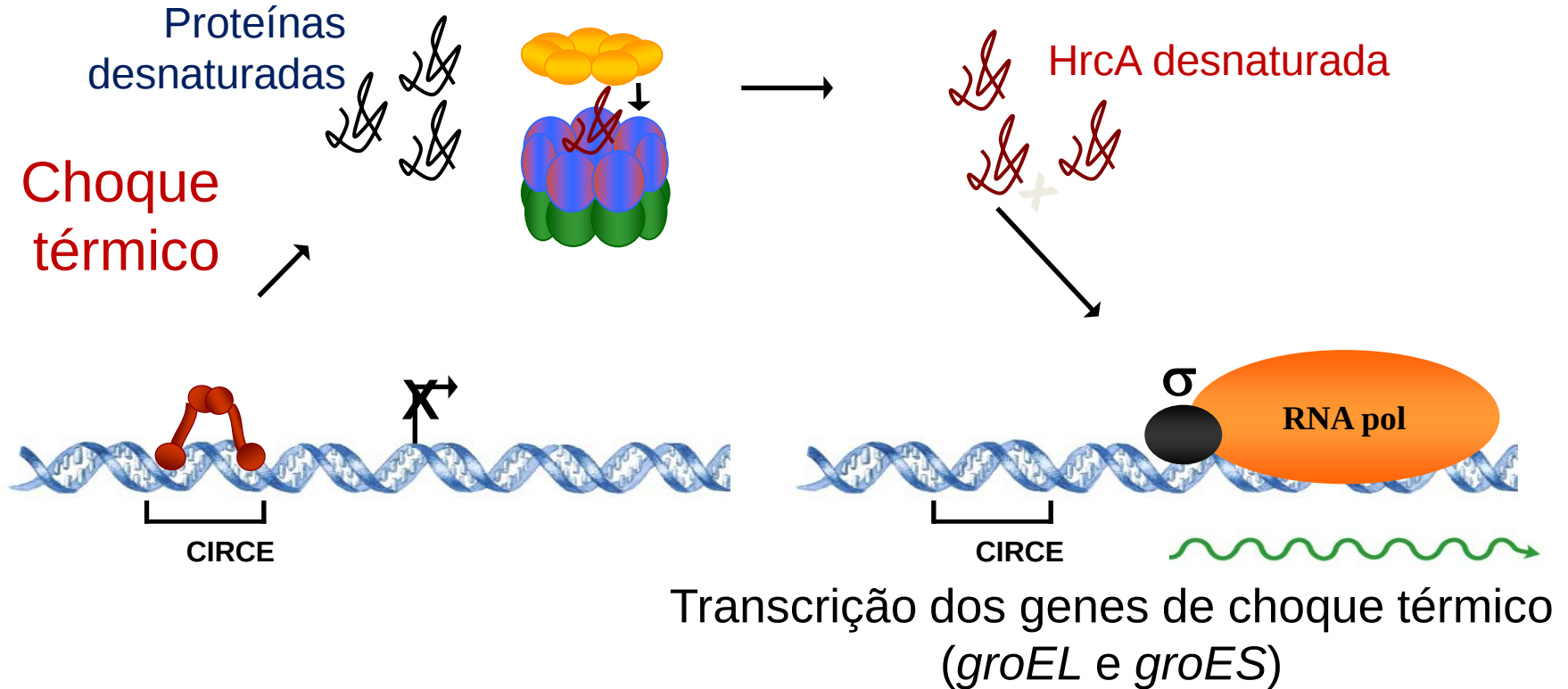


As chaperones GroEL/GroES
mantém HrcA na sua
conformação nativa



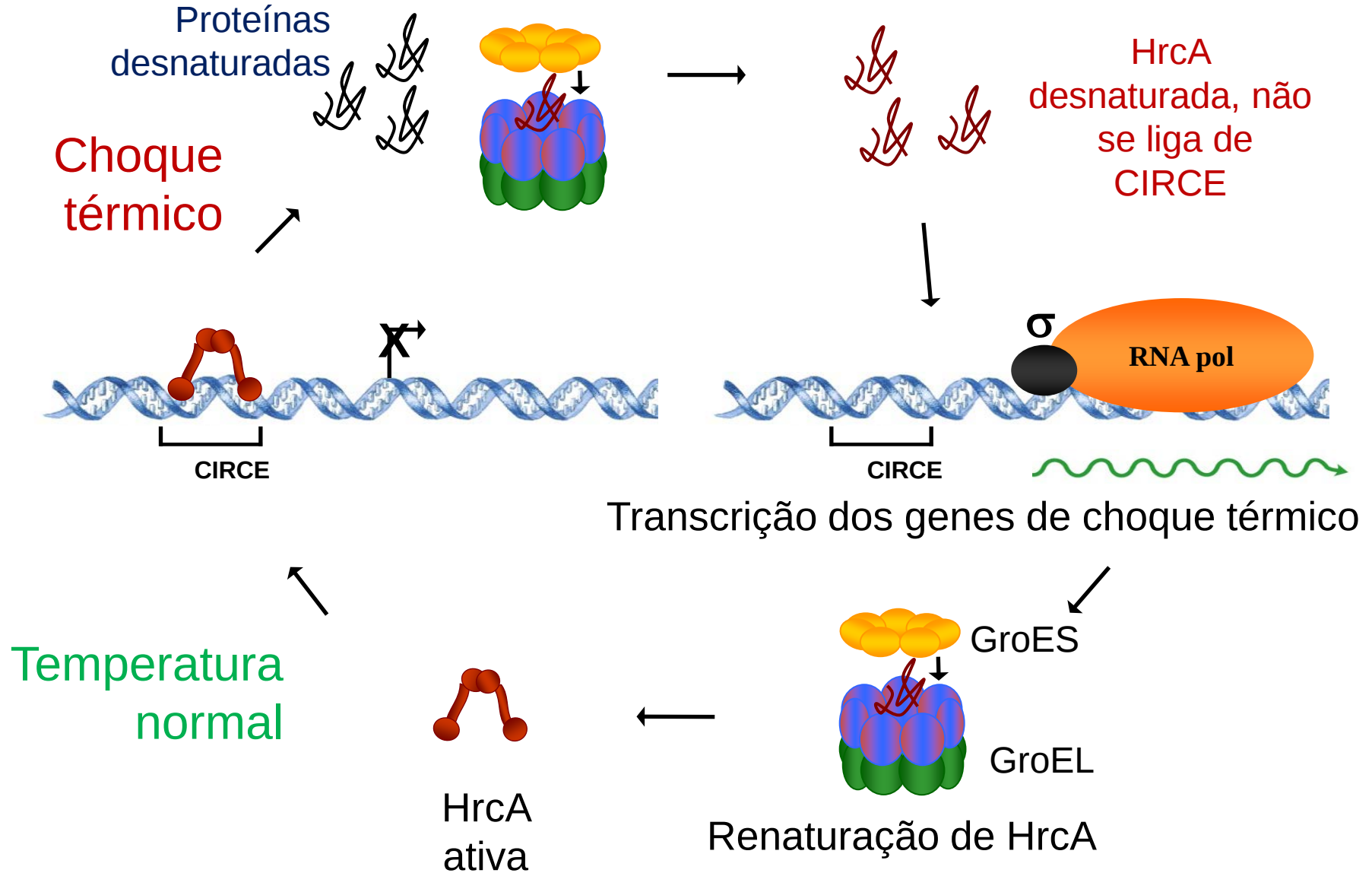
Renaturação de HrcA

O repressor HrcA é inativado no choque térmico

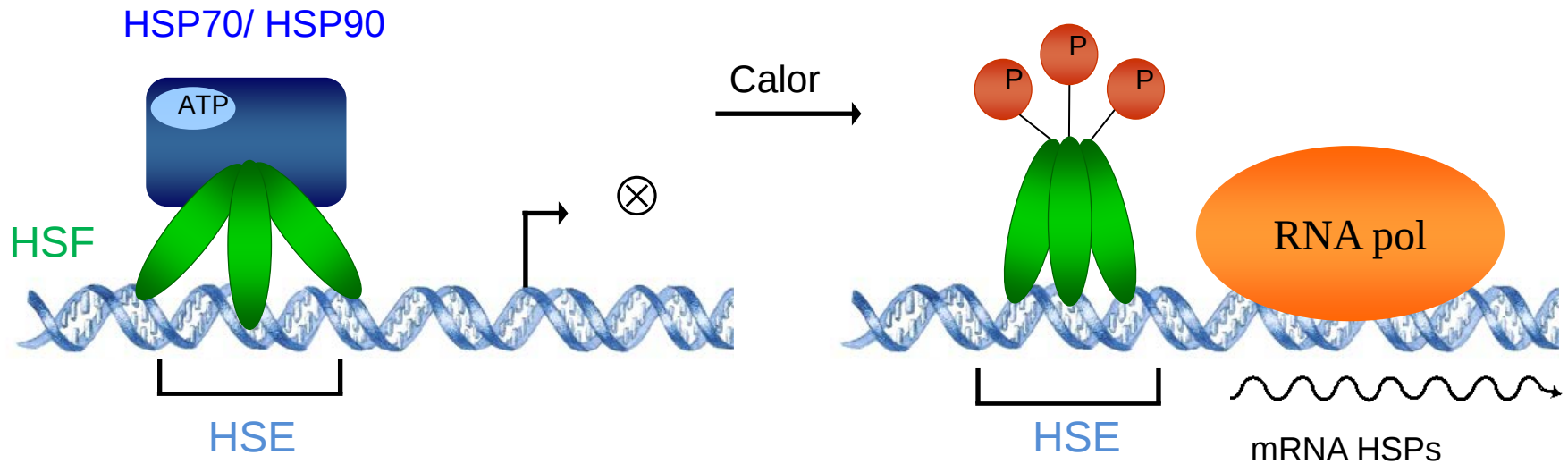


- As proteínas desnaturadas pelo calor ocupam GroEL/GroES
- HrcA fica desnaturada e não se liga ao DNA
- Ocorre a transcrição dos genes de choque térmico pela RNA polimerase ligada ao fator sigma A (principal)

O repressor HrcA é inativado no choque térmico



Regulação do choque térmico em eucariotos



HSF = fator de transcrição de choque térmico,
inibido em temperaturas normais por HSP70/HSP90

HSE = elemento de choque térmico no DNA, sítio de ligação do
HSF (repetição GGATTC)

HSF é ativado por fosforilação durante o choque térmico

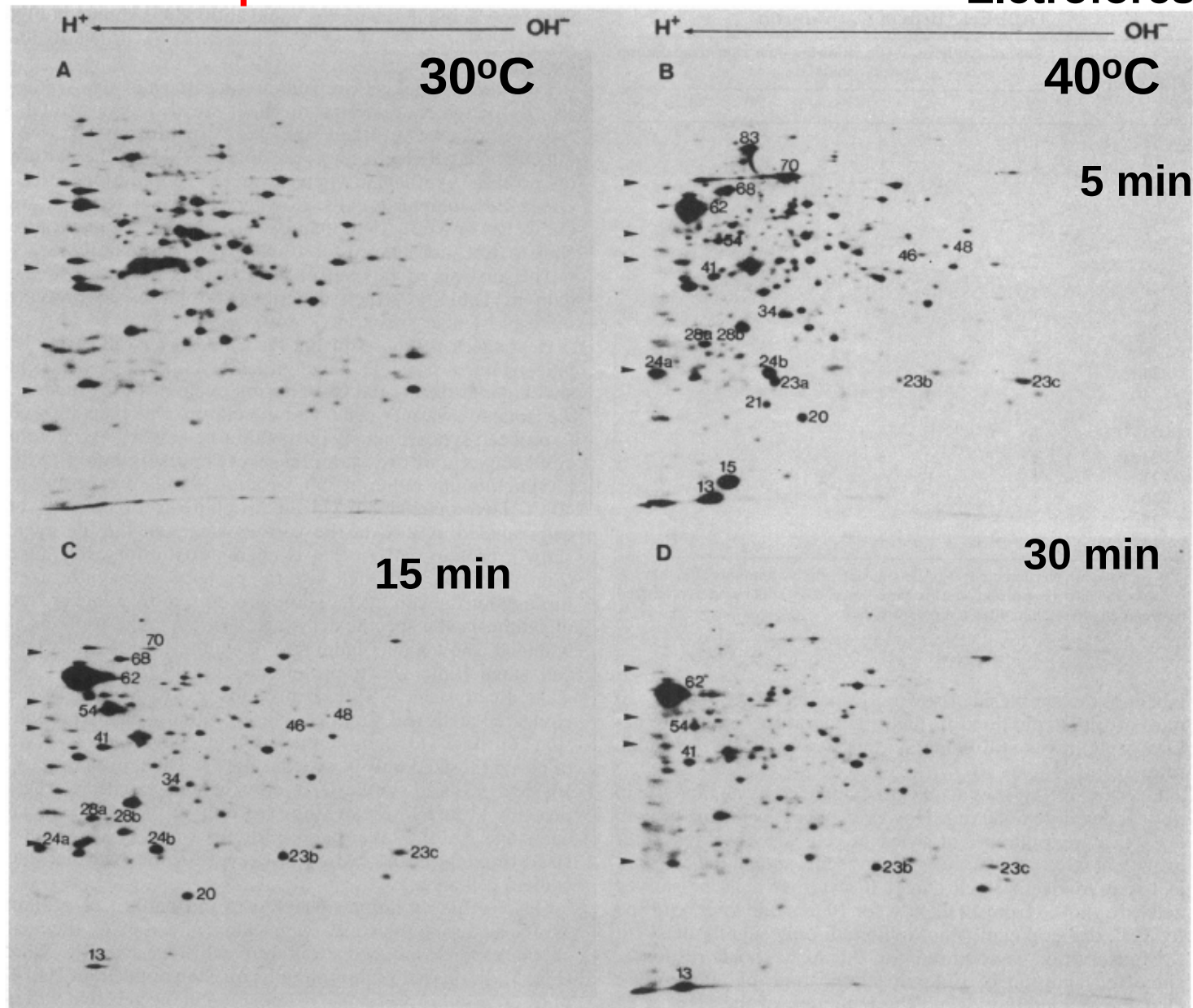


FIG. 3. Two-dimensional gel electrophoresis of heat shock proteins. Cells of CB15F were labeled for 10 min with [³⁵S]methionine at 30°C (A) or 5 (B), 15 (C), and 30 (D) min after temperature shift to 40°C. Cell extracts were subjected to isoelectric focusing (first dimension) with a pH range of 5 to 8 and then SDS-PAGE (second dimension). Arrowheads indicate molecular size markers in descending order (65, 55, 45, and 25 kDa).