

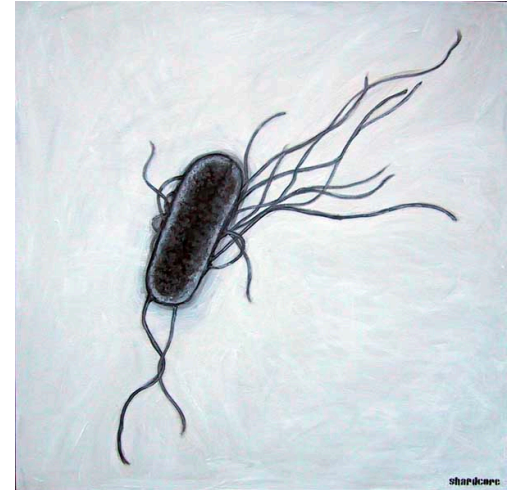


Universidade de São Paulo
Instituto de Química

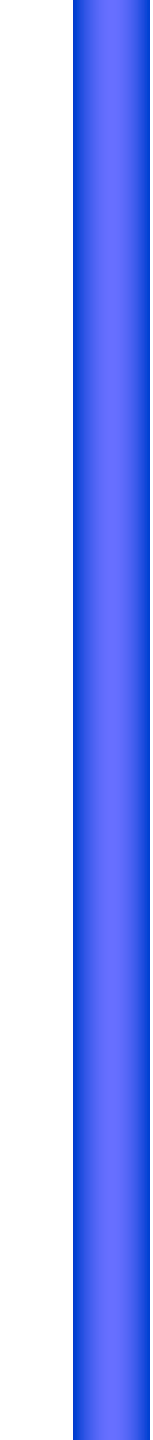
QBQ0317 – 2020

Aula 8

Transcrição em bactérias

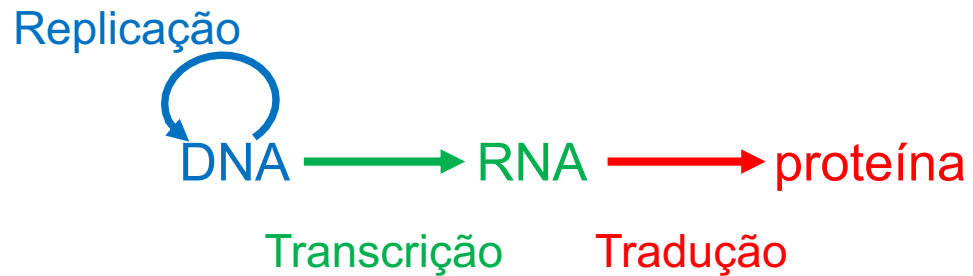


Regina Baldini (baldini@iq.usp.br)

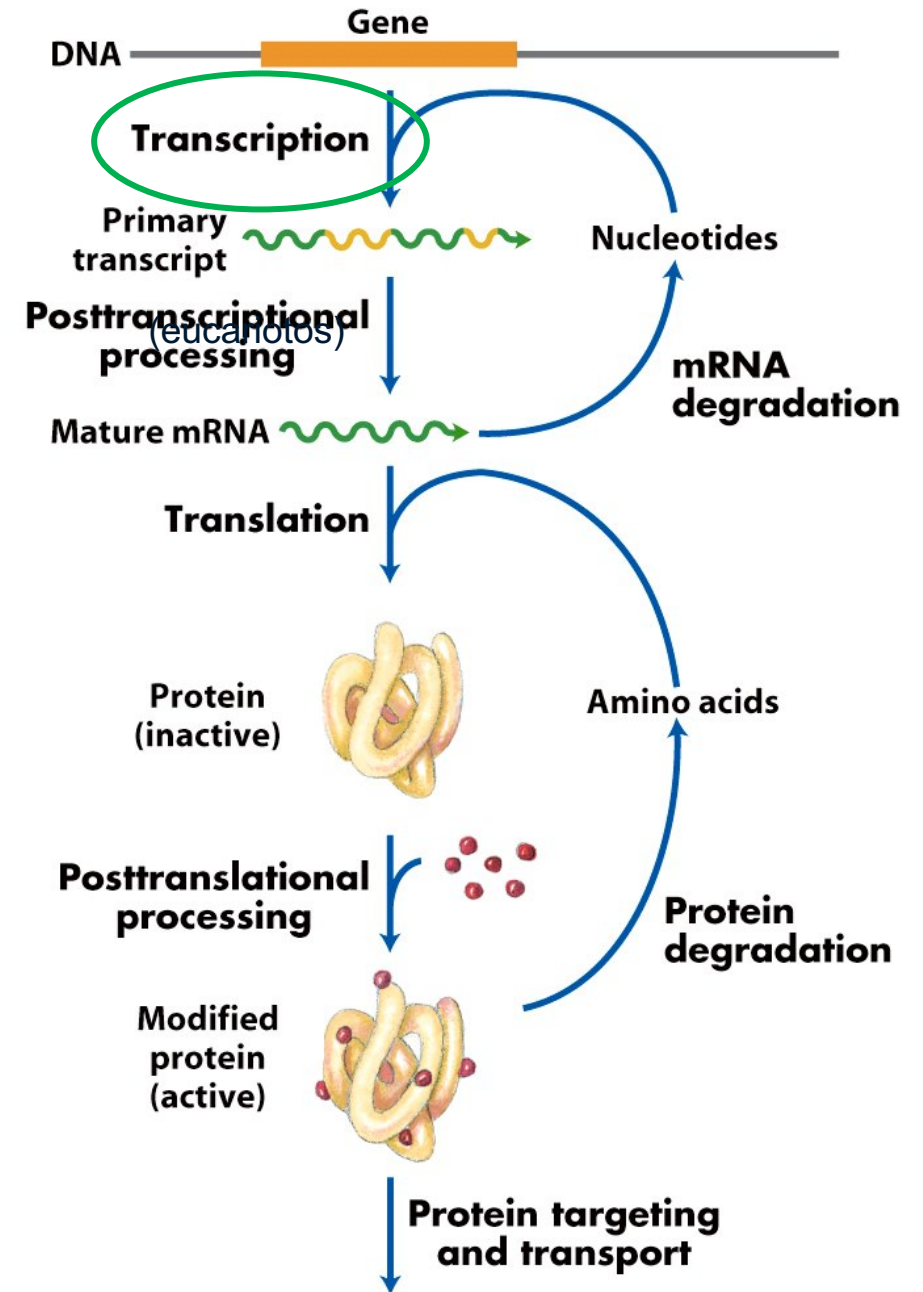


Como a informação é transferida do
DNA para constituir uma célula ou
organismo?

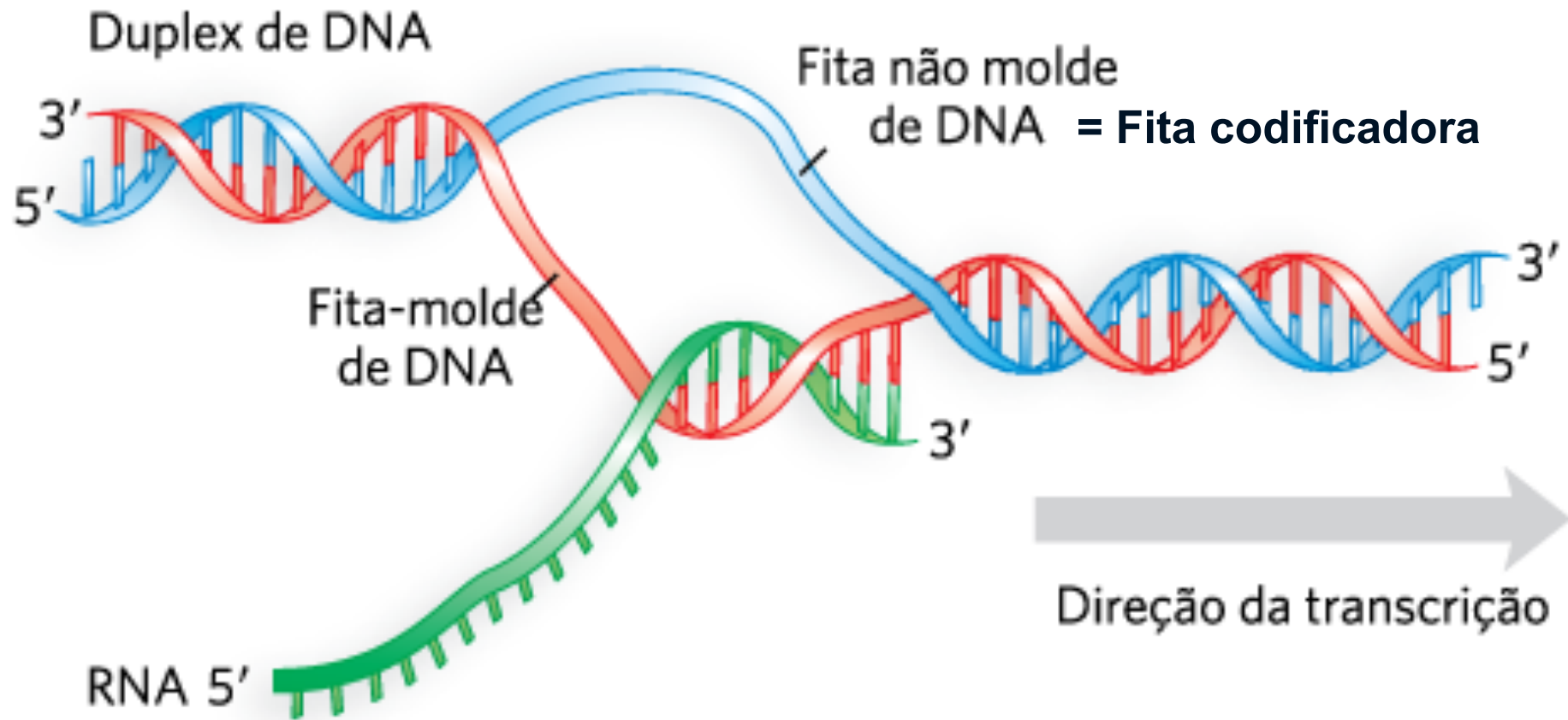
Transcrição é essencial para o fluxo da informação gênica



É também um dos principais pontos de regulação da expressão gênica, mas não o único.



Transcrição



A transcrição acontece de 5' para 3' da fita de RNA

Fluxo da informação genética

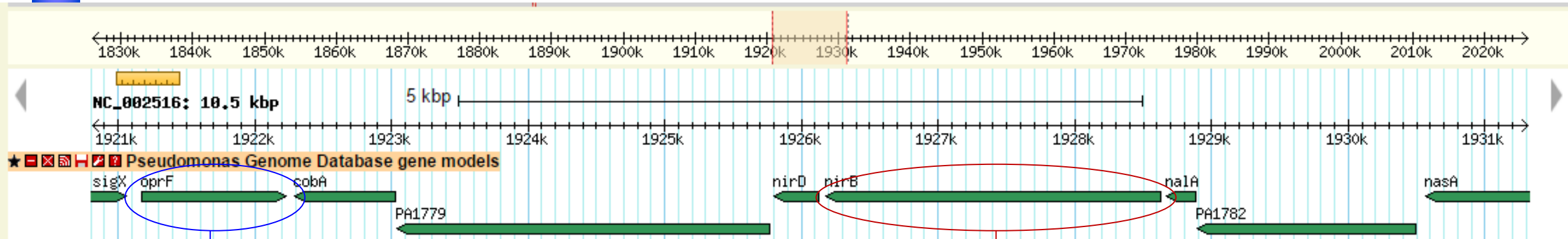
DNA **5' — A-G-A-G-G-T-G-C-T — 3'** → Fita codificadora
3' — T-C-T-C-C-A-C-G-A — 5' → Fita molde

Transcrição



mRNA **5' — A-G-A-G-G-U-G-C-U — 3'**

Os genes podem estar em orientações opostas no genoma

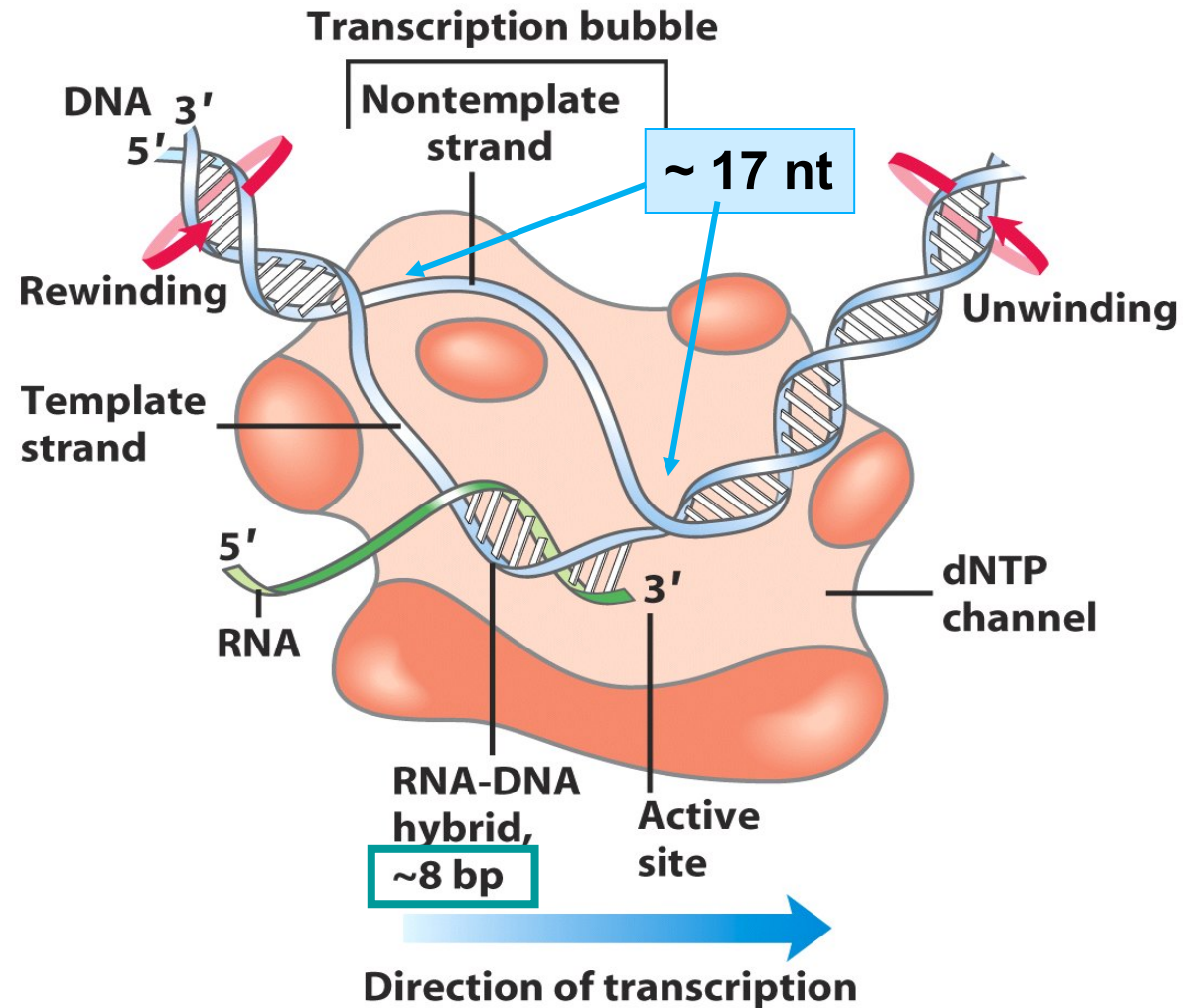


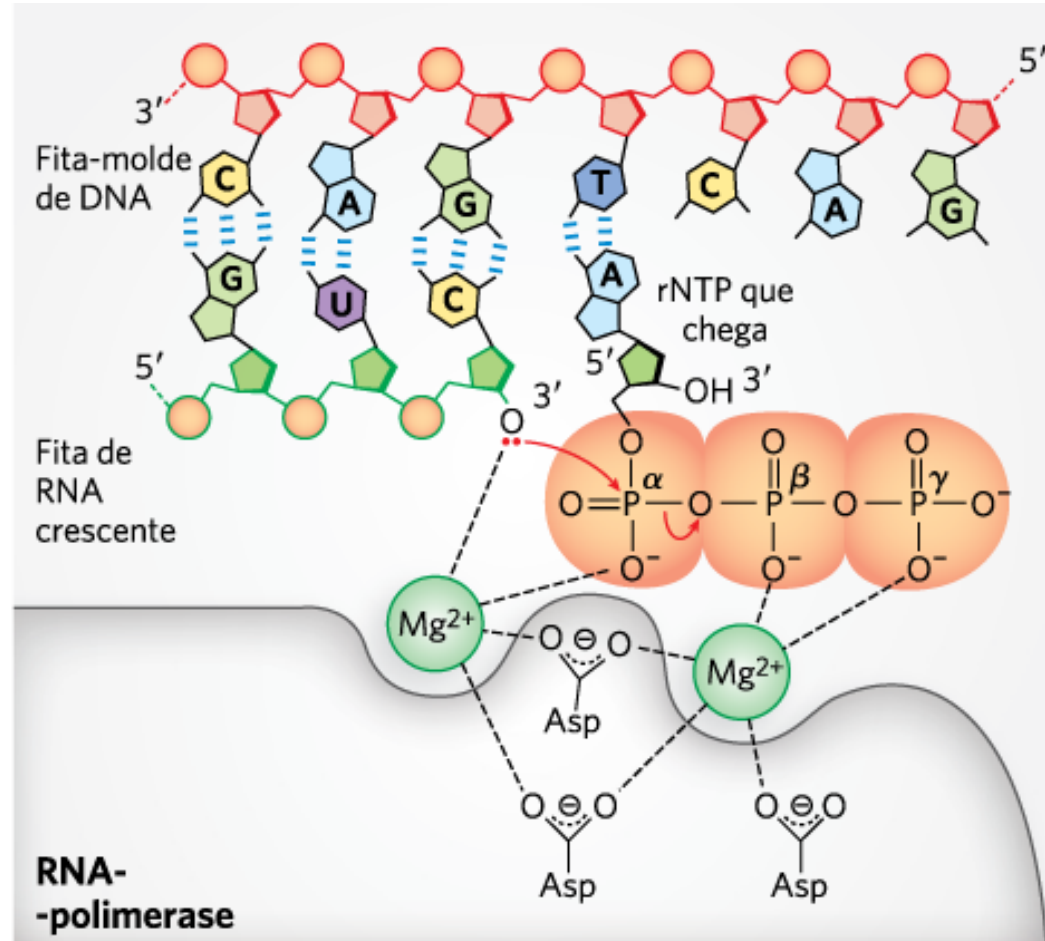
Fita “de cima” é a codificadora

Fita “de baixo” é a codificadora

- Portanto, as duas fitas do DNA podem ser transcritas e qual delas é a codificadora vai depender da orientação do gene
- A sequência codificadora é sempre representada de 5' para 3'

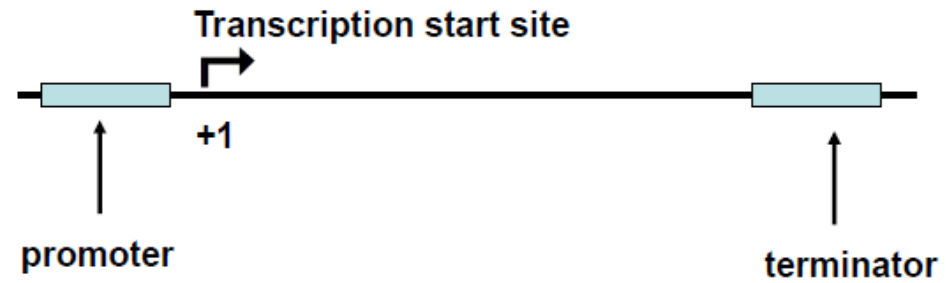
RNA é sintetizado pela RNA polimerase



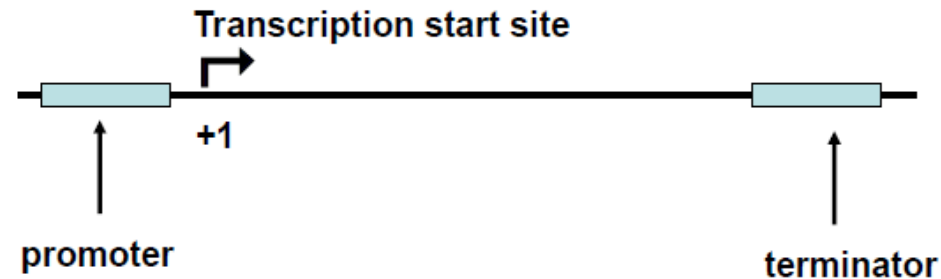


RNA polimerase é capaz de colocar o **primeiro nucleotídeo**, ao contrário da DNA polimerase **Energia** vem da quebra das ligações fosfodiéster dos nucleotídeos trifosfato

Unidade de transcrição



Unidade de transcrição



- Segmento de DNA “copiado” em RNA, mais a região regulatória e o terminador
- A RNA polimerase reconhece a sequência do promotor
- A transcrição se inicia num ponto específico do DNA
- Delimitadas por um terminador de transcrição
- Uma unidade de transcrição em bactérias pode conter um ou mais genes → operon

INITIATION

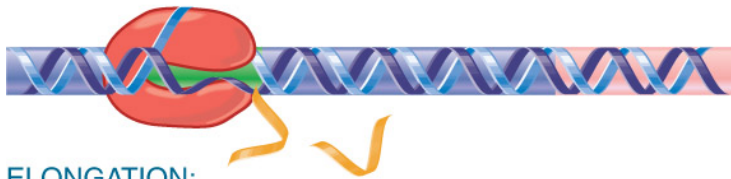
Template recognition: RNA polymerase binds to duplex DNA



DNA is unwound at promoter

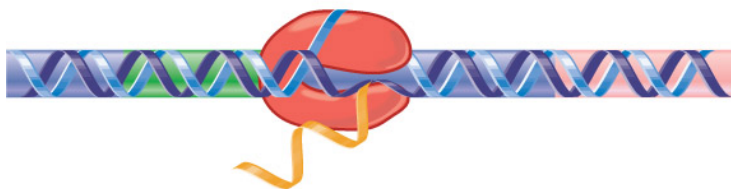


Very short chains are synthesized and released



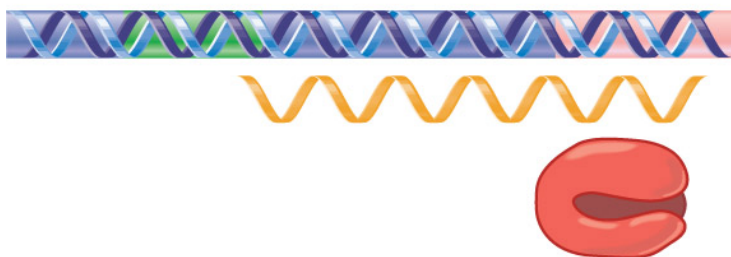
ELONGATION:

Polymerase synthesizes RNA



TERMINATION:

RNA polymerase and RNA are released



Etapas da transcrição

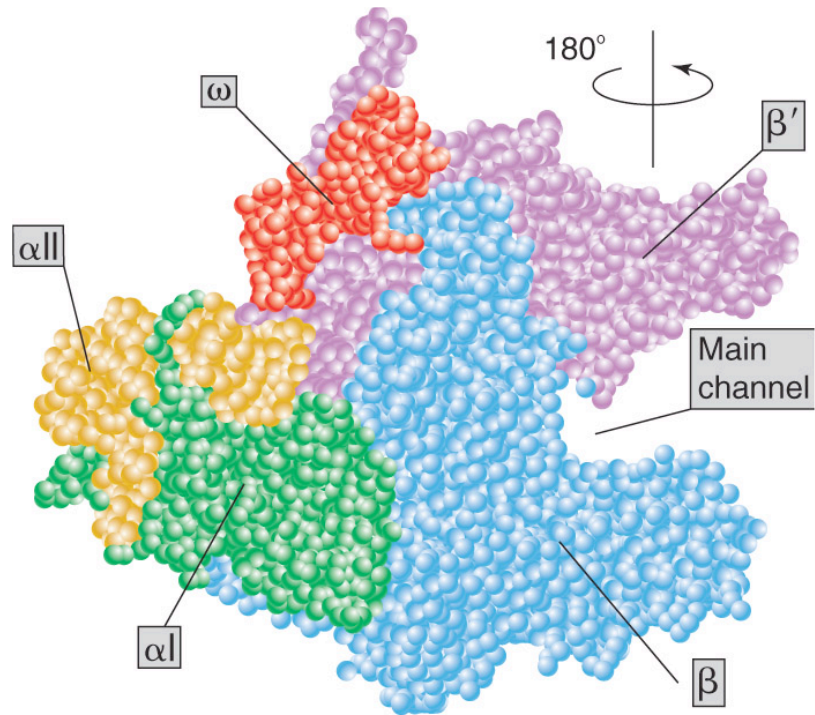
- Reconhecimento do promotor e início
- Elongação
- Terminação

RNA polimerases são formadas por várias subunidades

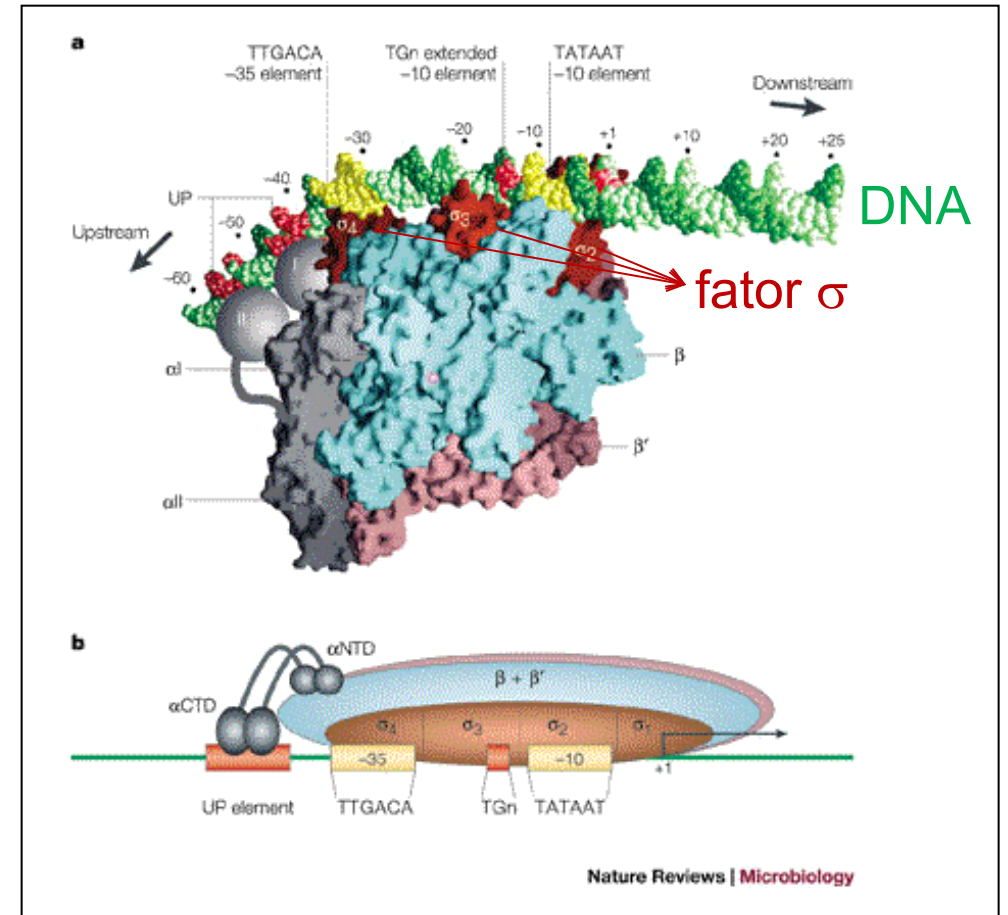
RNA polimerase bacteriana

Gene	product	Functions
<i>rpoA</i>	2 α subunits (37 kD each)	enzyme assembly promoter recognition binds some activators
<i>rpoB</i>	β subunit (151 kD)	catalytic center
<i>rpoC</i>	β' subunit (155 kD)	
<i>rpoD</i>	σ subunit (18–70 kD)	promoter specificity
<i>rpoZ</i>	ω subunit (10 kD)	
<i>E. coli</i> enzyme = 460 kD		

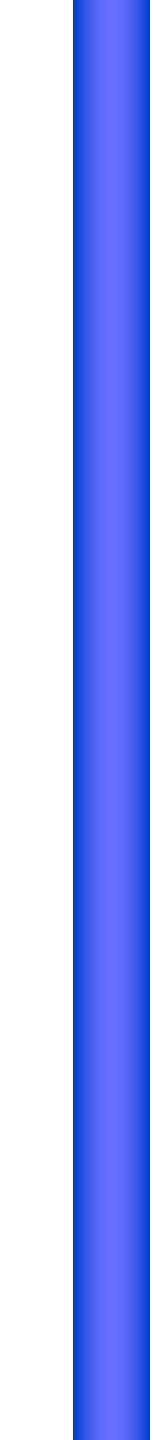
RNA polimerase



Cerne da RNA polimerase de bactérias



holoenzima =
cerne + fator sigma

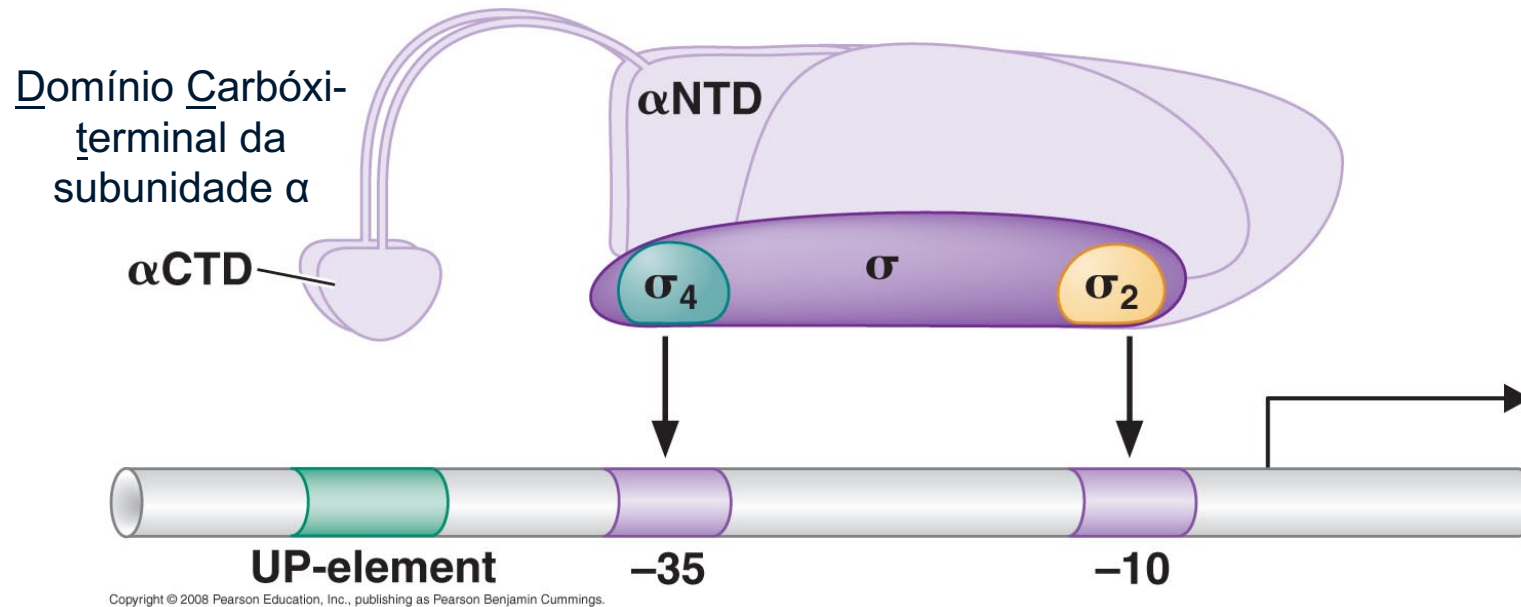


Onde e como a transcrição
é iniciada?

Como a RNA polimerase bacteriana reconhece os sítios de início de transcrição?

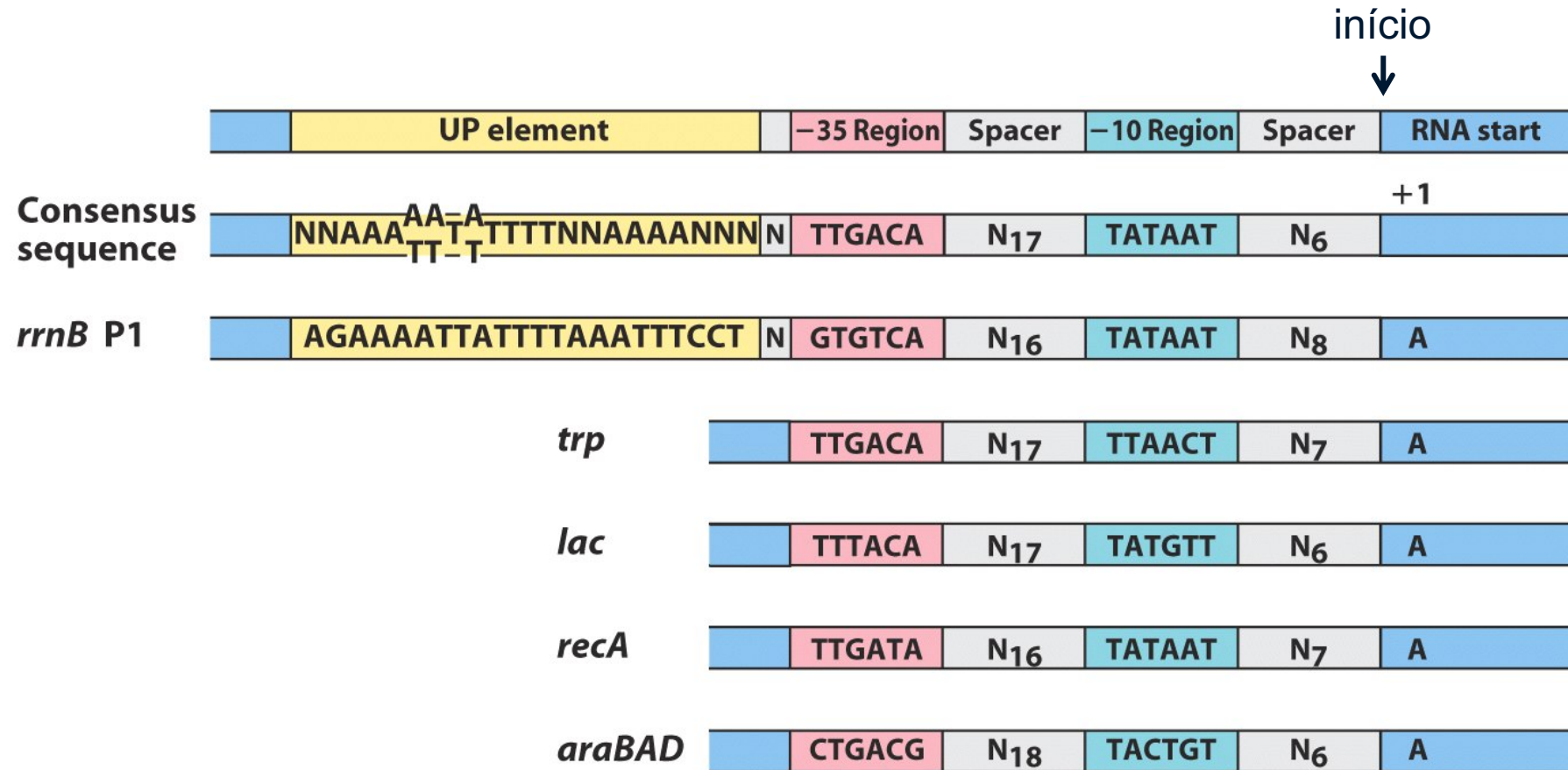
- $\alpha\beta\beta'\omega$ (cerne):
 - afinidade por qualquer sequência de DNA
- Holoenzima (cerne + $\sigma = E\sigma$)
 - menor afinidade por sequências aleatórias
 - grande afinidade por sequências promotoras

RNA polimerase bactérias



- **cerne:** α , β , β' , ω
 - sítio catalítico, ligação ao up
 - **fator sigma (σ): especificidade**
- } **Holoenzima**
- Liga no DNA em regiões a -10 e -35 do início de transcrição

Sequências de promotores de σ^{70} de *E. coli*



O domínio C-terminal (CTD) da subunidade α reconhece o elemento "UP", presente em alguns promotores

Fator sigma reconhece sequências consenso localizadas nas posições -10 e -35

Como se define um consenso?

(a) Strong *E. coli* promoters

	TTGACAT	TATAAT				
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC	TTTACAGCGGCG	CGTCATTTGATATGATGC	GCCCCGCTTCCC	GATAAAGGG	
rrn D1	GATCAAAAAAATAC	TTGTGCAAAAAA	TTGGGATCCC	TATAATGCGCCTCC	GTTGAGACGACAACG	
rrn X1	ATGCATTTTTCCGC	TTGTCTT	CCTGA	GCCGACTCCC	TATAATGCGCCTCC	ATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG	TTGACTCTGAAA	GAGGAAAGCG	TAATATAC	GCCACCTCGCGACAGTGAGC	
rrn E1	CTGCAATTTTTCTA	TTGCGGCCTGCG	GAGA	ACTCCC	TATAATGCGCCTCC	ATCGACACGGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTC	TTGTCAGGCCGG	AATA	ACTCCC	TATAATGCGCCACCA	CTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGC	TTGACTCTGTAG	CGGGAAGGCG	TATTATGC	ACACCCCGCGCCGCTGAGAA	
λ P _R	TAACACCGTGCGTG	TTGACTATTTTA	CCTCTGGCGGTGATAAT	GG	TTGCATGTACTAAGGAGGT	
λ P _L	TATCTCTGGCGGTG	TTGACATAAATA	CCACTGGCGGTGATACT	GAG	GCACATCAGCAGGACGCAC	
T7 A3	GTGAAACAAAACGG	TTGACAACATGA	AGTAAACACGGTACGAT	GT	ACCACATGAAACGACAGTGA	
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA	TTGACTTAAAGT	CTAACCTATAGGATACT	TA	CAGCCATCGAGAGGGACACG	
T7 A2	ACGAAAACAGGTA	TTGACAACATGAAGTAACATGCAGTAAGAT	AC	AAATCGCTAGGTAACACTAG		
fd VIII	GATACAAATCTCCG	TTGTACTTTGTT	TCGCGCTTGGTATAAT	CG	CTGGGGGTCAAAGATGAGTG	
	-35		-10		+1 	

Alinhamento das fitas codificadoras

Como se define um consenso?

(a) Strong *E. coli* promoters

	TTGACAT	TATAAT
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC TTTACAG CGGGCG••CGTCATTTGAT TATGAT GC•GCCCCGCTTCCCGATAAGGG	
rrn D1	GATCAAAAAAATAC TTGTG CAAAAAA••TTGGGATCCC TATAAT GCGCCTCCGTTGAGACGACAACG	
rrn X1	ATGCATTTTTCCGC TTGTCTT CCTGA••GCCGACTCCC TATAAT GCGCCTCCA T CGACACGGCGGAT	
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG TTGACT CCTGAAA••GAGGAAAGCG TAATAT AC•GCCAC C TCGCGACAGTGAGC	
rrn E1	CTGCAATTTTTCTA TTGCG GCCTGCG••GAGAACTCCC TATAAT GCGCCTCCA T CGACACGGCGGAT	
rrn A1	TTTTAAATTTCTC TTGTCA GGCCGG••AATAACTCCC TATAAT GCGCCACCA C TGACACGGGAACAA	
rrn A2	GCAAAAATAAATGC TTGACT CCTGTAG••CGGGAAGGCG TATTAT GC•ACACCC C CGCGCCGCTGAGAA	
λ P _R	TAACACCGTGCGTG TTGACT ATTTTA•CCTCTGGCGGTG GATAAT GG••TTGCATGTACTAAGGAGGT	
λ P _L	TATCTCTGGCGGTG TTGACAT AAATA•CCACTGGCGGTG GATACT GA••GCACATCAGCAGGACGCAC	
T7 A3	GTGAAACAAAACGG TTGACA AACATGA•AGTAAACACGG TACGAT GT•ACCACATGAAACGACAGTGA	
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA TTGACTT AAAGT•CTAACCTATAGG ATACT TA•CAGCCA T CGAGAGGGACACG	
T7 A2	ACGAAAACAGGTA TTGACA AACATGAAGTAACATGCAG TAAGAT AC•AAATCG C TAGGTAACACTAG	
fd VIII	GATACAAATCTCCG TTGTACT TTGTT••TCGCGCTTGG TATAAT CG•CTGGGG G GTCAAAGATGAGTG	
	-35	-10 +1

Comparação entre seqüências:
Quanto mais similar ao consenso,
maior a força do promotor

(c) *Lac* promoter sequence



Como se define um consenso?

(a) Strong *E. coli* promoters

	TTGACAT	TATAAT
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC TTTACAG CGGGCG••CGTCATTTGAT TATGAT GC•GCCCCGCTTCCCGATAAGGG	
rrn D1	GATCAAAAAAATAC TTGTG CAAAAAA••TTGGGATCCC TATAAT GCGCCTCCGTTGAGACGACAACG	
rrn X1	ATGCATTTTTCCGC TTGTCTT CCTGA••GCCGACTCCC TATAAT GCGCCTCCA T CGACACGGCGGAT	
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG TTGACT CCTGAAA••GAGGAAAGCG TAATAT AC•GCCAC C TCGCGACAGTGAGC	
rrn E1	CTGCAATTTTTCTA TTGCG GCCTGCG••GAGA ACT CCC TATAAT GCGCCTCCA T CGACACGGCGGAT	
rrn A1	TTTTAAATTTCTC TTGT CAGGCCGG••AATA ACT CCC TATAAT GCGCCACCA C TGACACGGGAACAA	
rrn A2	GCAAAAATAAATGC TTGACT CCTGTAG••CGGGAAGGCG TATTAT GC•ACACCC C CGCGCCGCTGAGAA	
λ P _R	TAACACCGTGCGTG TTGACT ATTTTA•CCTCTGGCGGTG TATAAT GG••TTGCATGTACTAAGGAGGT	
λ P _L	TATCTCTGGCGGTG TTGACAT AAATA•CCACTGGCGGTG TATAAT TGA••GCACATCAGCAGGACGCAC	
T7 A3	GTGAAACAAAACGG TTGACA AACATGA•AGTAAACACGG TACGAT GT•ACCACATGAAACGACAGTGA	
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA TTGACTT AAAGT•CTAACCTATAGG TATAAT TA•CAGCCATCGAGAGGGACACG	
T7 A2	ACGAAAACAGGTA TTGACA AACATGAAGTAACATGCAG TAAAGAT AC•AAATCGCTAGGTAACACTAG	
fd VIII	GATACAAATCTCCG TTGTACTT TGTGTT••TCGCGCTTGG TATAAT CG•CTGGGGGTCAAAGATGAGTG	
	-35	-10 +1

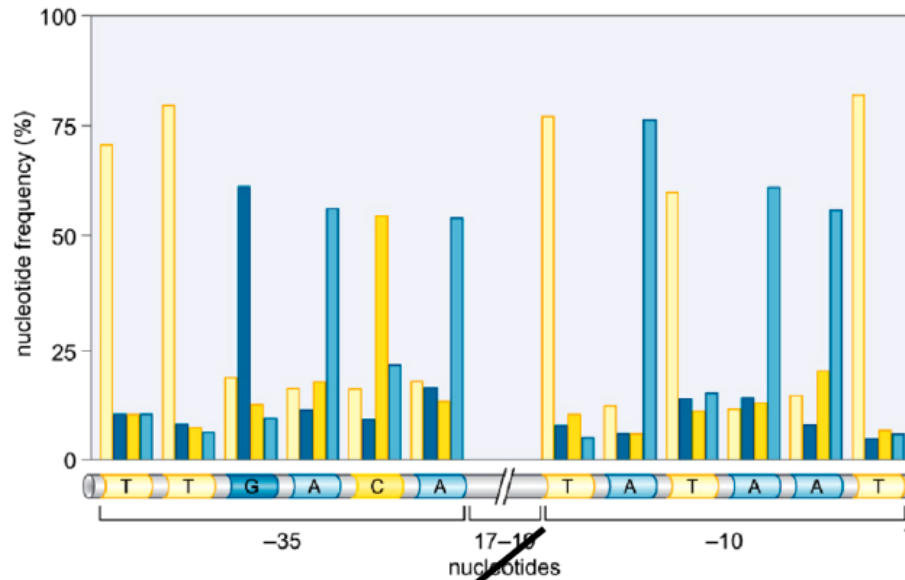
Comparação entre sequências:
Quanto mais similar ao consenso,
maior a força do promotor

(c) *Lac* promoter sequence



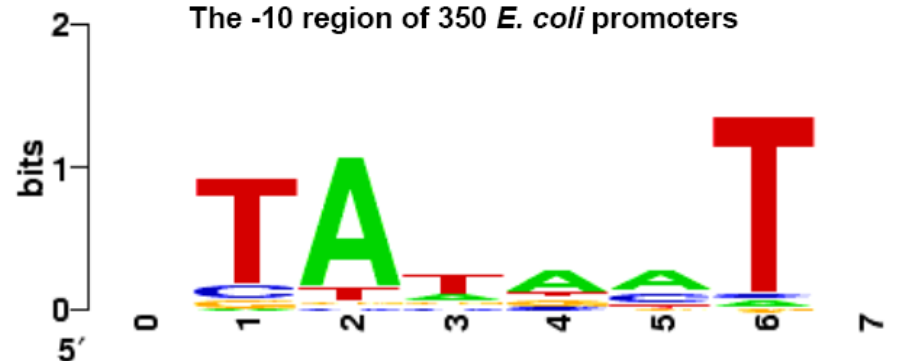
- Consenso é uma sequência ideal, baseada no nucleotídeo mais frequente em cada posição
- Raramente um promotor obedece perfeitamente ao consenso
- Variação em relação ao consenso é fisiologicamente importante

Logos são uma maneira de representar consensos, levando em conta a frequência de cada base em cada posição



Sequence Logo

The -10 region of 350 *E. coli* promoters



Bactérias possuem vários fatores sigma: função regulatória

TABLE 10-1 Sigma Factors of *E. coli*

Sigma Factor	Promoters Recognized	Promoter Consensus	
σ^{70}	Most genes	-35 Region TTGACAT	-10 Region TATAAT
σ^{32}	Genes induced by heat shock	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
σ^{28}	Genes for motility and chemotaxis	CTAAA	CCGATAT
σ^{38}	Genes for stationary phase and stress response	?	?
σ^{54}	Genes for nitrogen metabolism and other functions	-24 Region CTGGNA	-12 Region TTGCA

SOURCES: C. A. Gross, M. Lonetto, and R. Losick, 1992, in S. L. McKnight and K. R. Yamamoto, eds., *Transcriptional Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; D. N. Arnosti and M. J. Chamberlin, 1989, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **86**:830; R. Hengge-Aronsis, 1996, *Mol. Microbiol.* **21**:887.

Duas famílias evolutivamente distintas:

- σ^{70} (subfamílias e vários representantes)
- σ^{54}

Cada fator sigma reconhece um consenso diferente

Etapas da transcrição

INITIATION

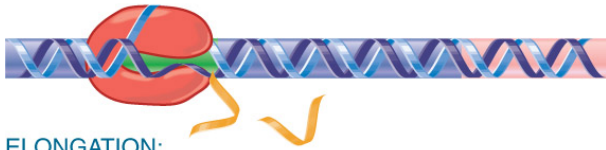
Template recognition: RNA polymerase binds to duplex DNA



DNA is unwound at promoter

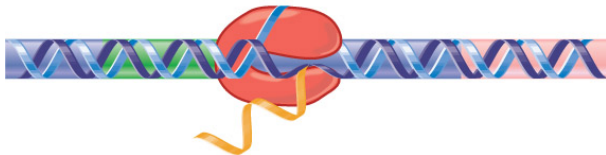


Very short chains are synthesized and released



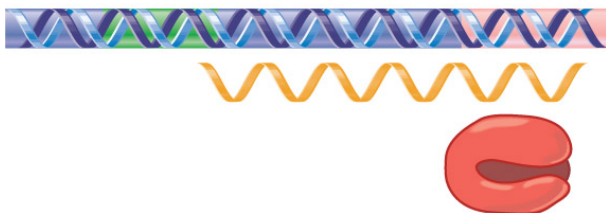
ELONGATION:

Polymerase synthesizes RNA



TERMINATION:

RNA polymerase and RNA are released

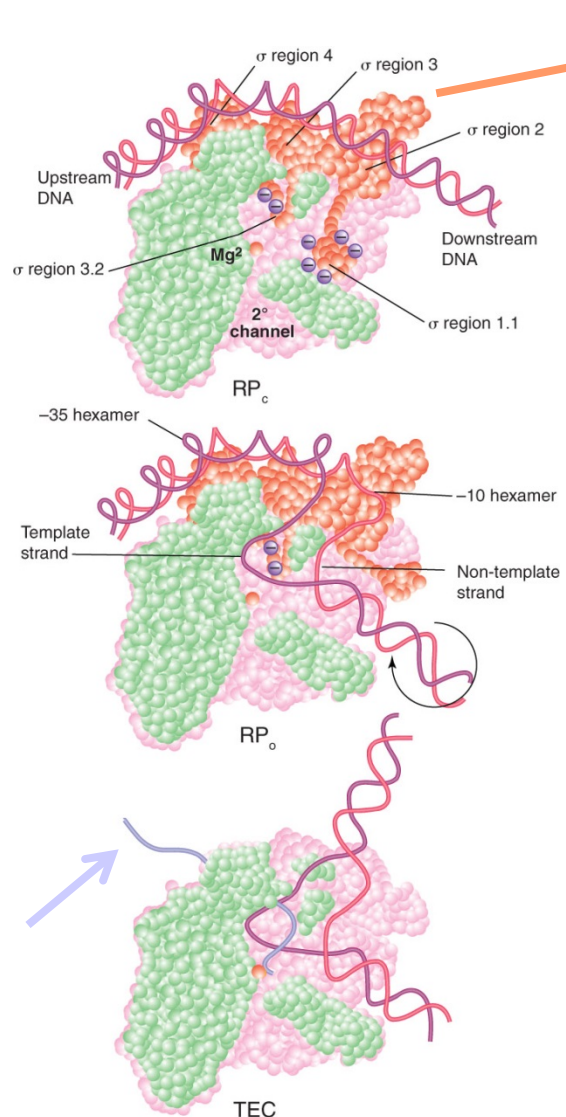


- Reconhecimento do promotor e início

➤ Holoenzima: Fator sigma

- Elongação
- Terminação

Fator sigma muda de conformação e é liberado na elongação



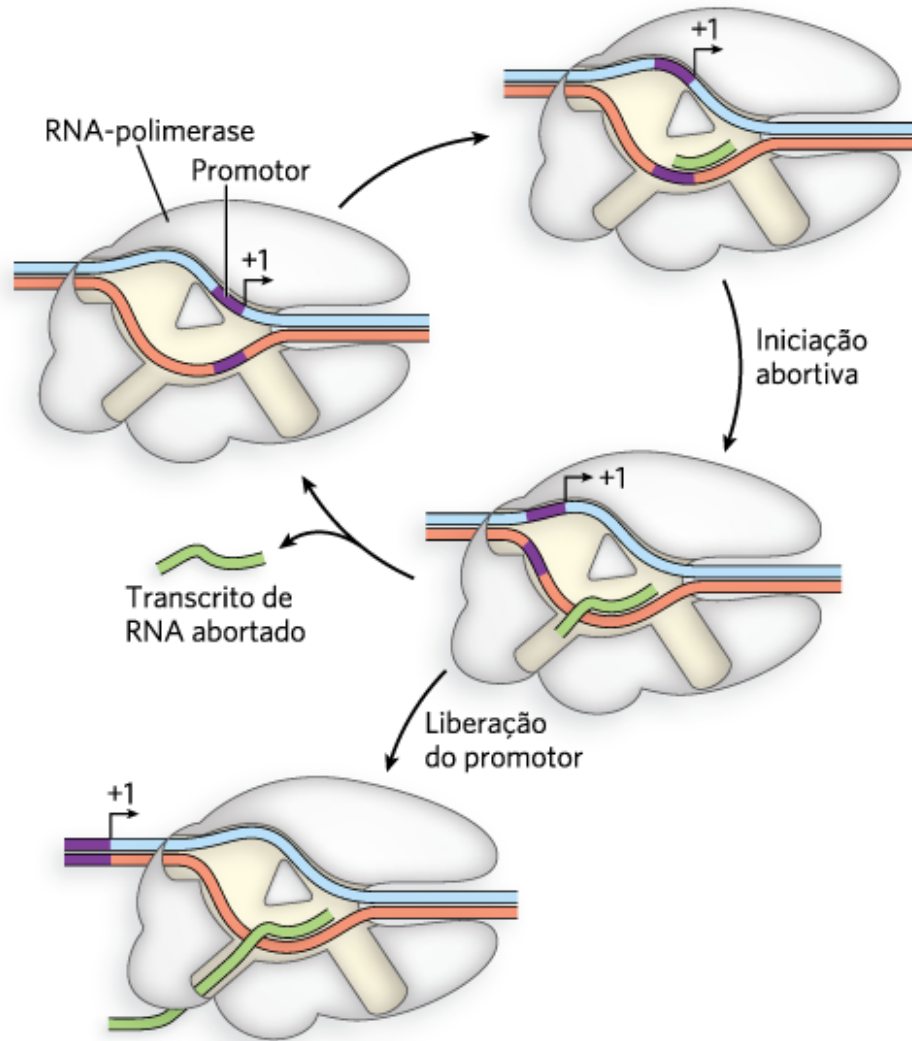
Fator σ^{70}

Complexo fechado

Complexo aberto

Complexo de elongação:
desligamento do sigma libera canal
de saída do RNA

Início da transcrição: transcrição abortiva



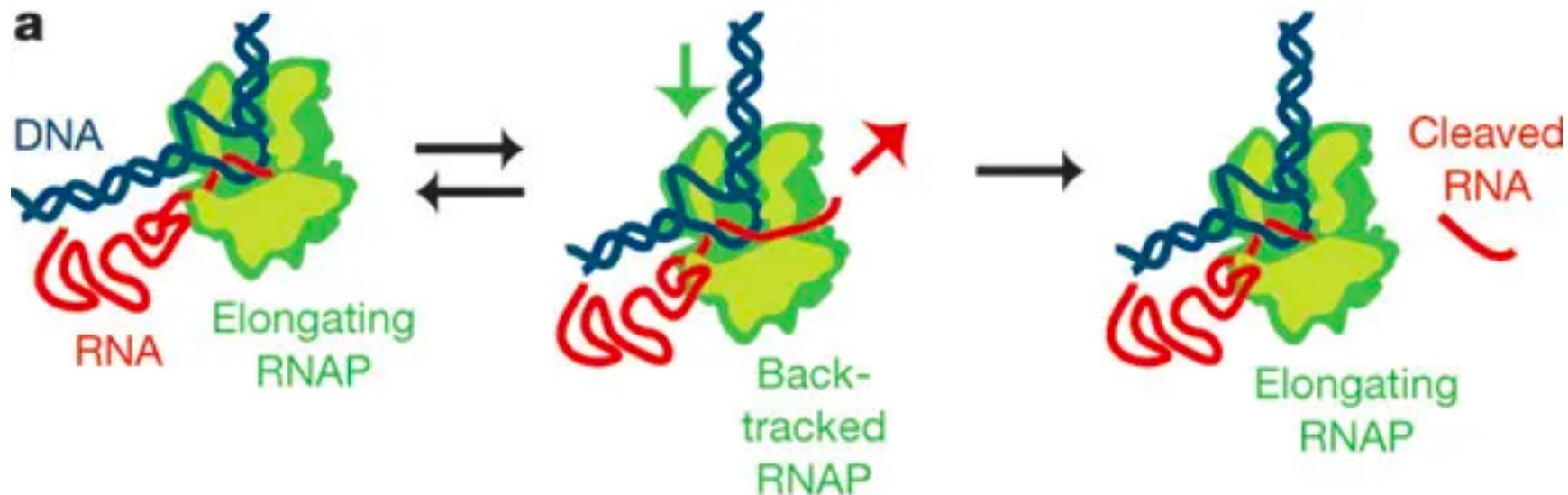
- Pequenos transcritos (8-10 nt) são liberados enquanto a RNA polimerase está no promotor
- Após saída do sigma, RNA polimerase começa a alongação

Elongação

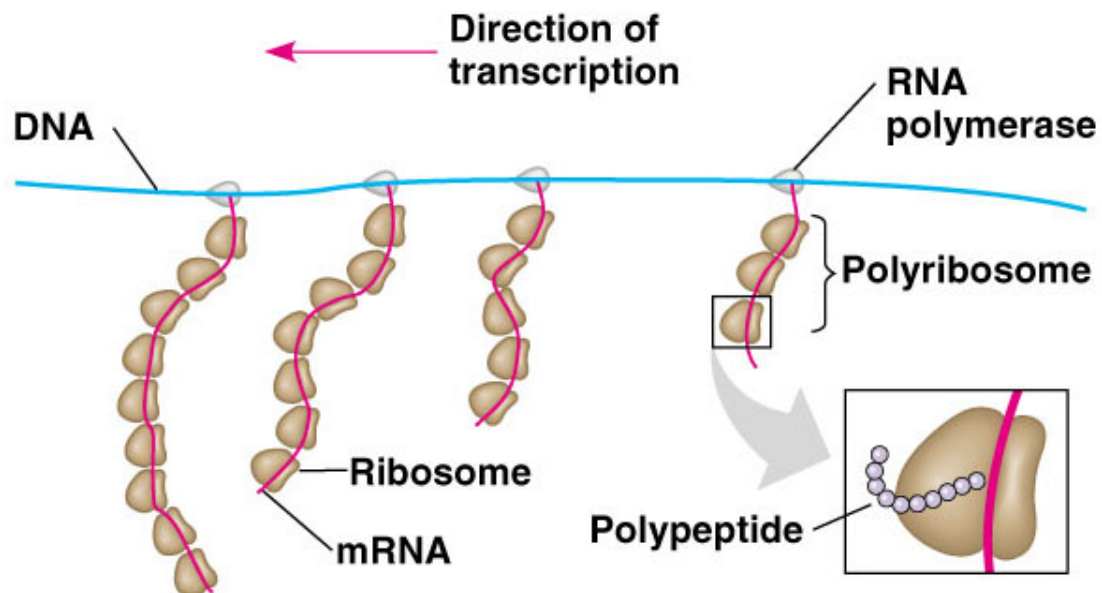
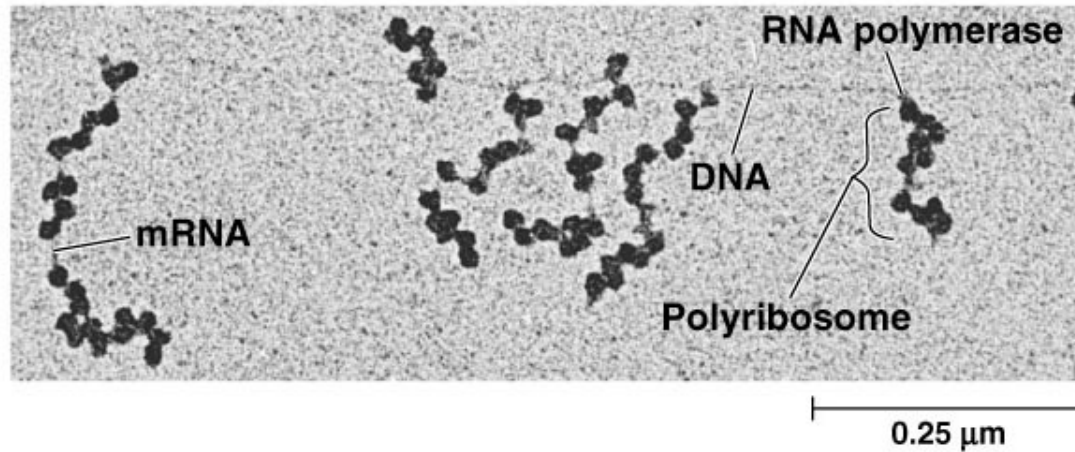
- RNA polimerase faz pausas ao longo do molde, mas não se desliga
 - Importante para regulação da expressão gênica e outros processos
- 40-50 nt/seg (replicação: 800 nt/seg)
- Possibilidade de correção de pareamento errado pela própria RNA polimerase

RNA polimerase também faz revisão de prova

- Nucleotídeo mal-pareado faz a RNA pol pausar e voltar alguns nucleotídeos para trás (*backtracking*)
- Um pequeno segmento do RNA contendo o erro é clivado e descartado
 - fator GRE é necessário
- Transcrição pode prosseguir com nucleotídeo correto



Ribossomos se ligam ao mRNA nascente e iniciam a tradução

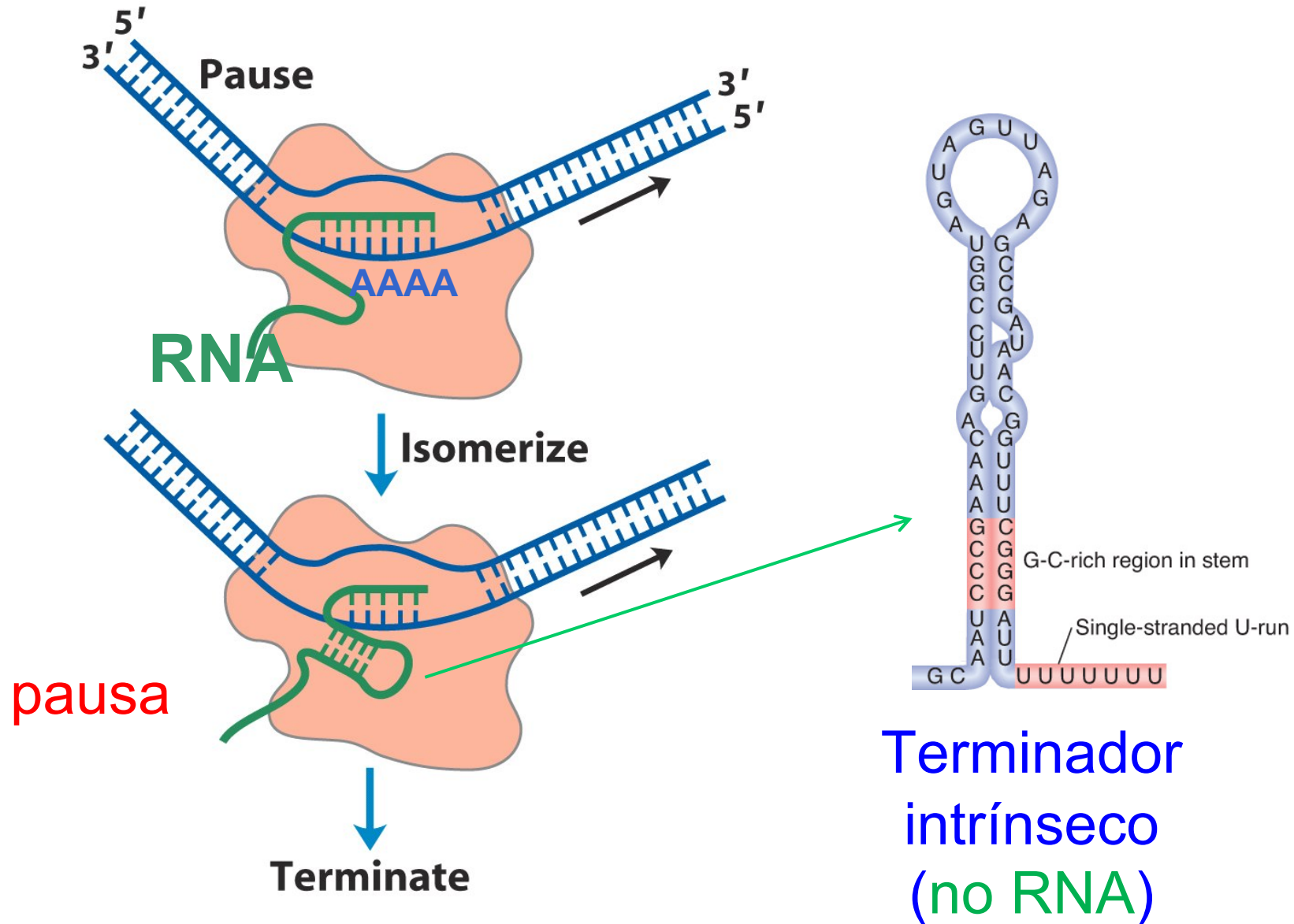


- Acoplamento de transcrição e tradução em procariotos

Terminação de transcrição em *E. coli*

- Dois mecanismos:
 - terminação intrínseca
 - terminação dependente de rho
- Os dois envolvem sequências presentes no transcrito (RNA)

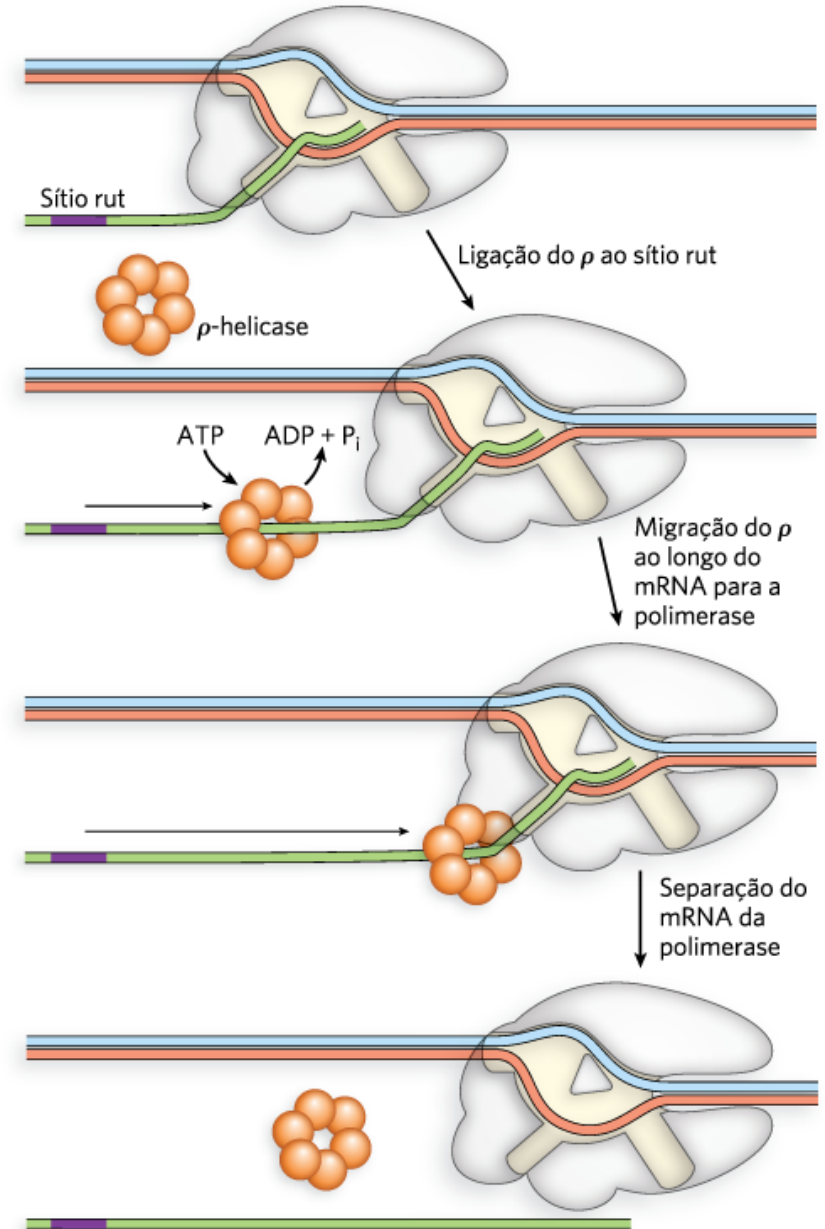
Terminação Intrínseca (Independente de Rho)



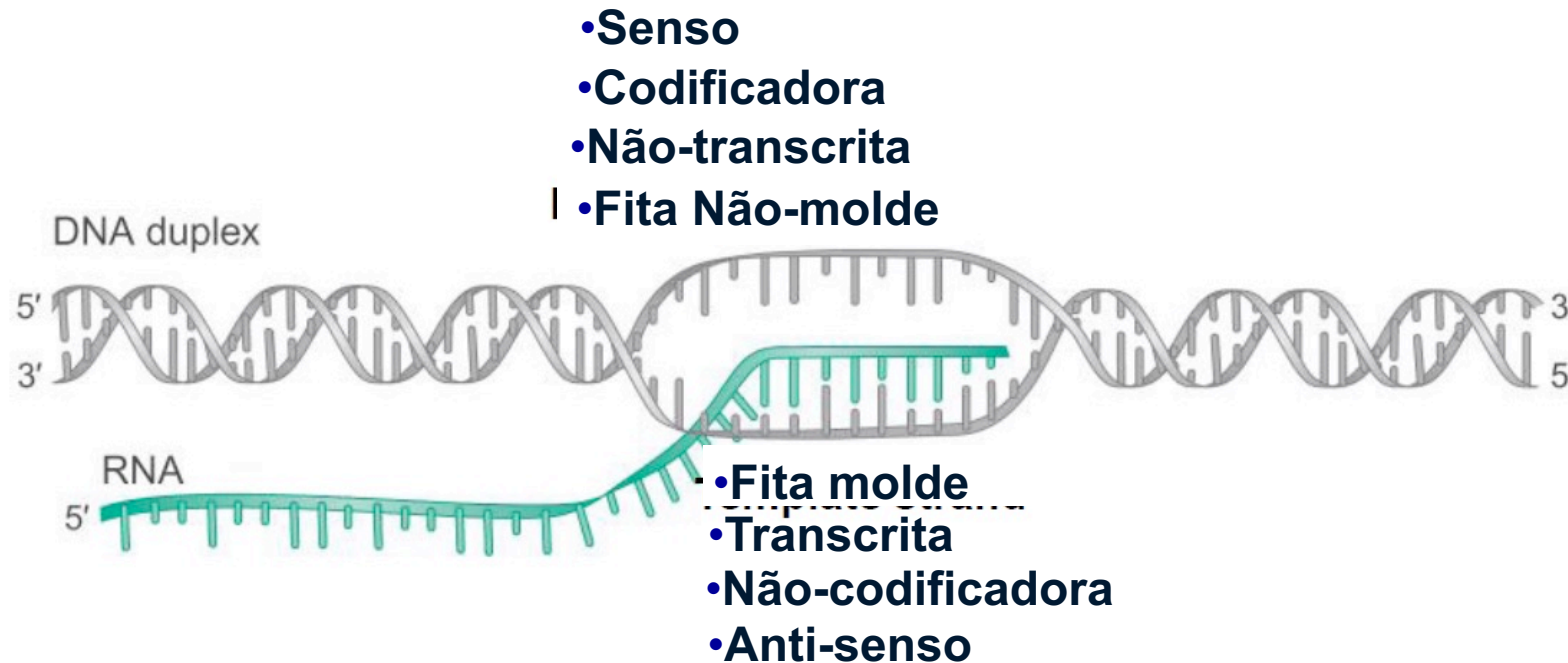
Terminação da Transcrição dependente de Rho

- Sítio *rut*:
 - sequência rica em **C** e pobre em **G** no **RNA**
- Proteína Rho
 - reconhece *rut*
 - função de helicase dependente de ATP
 - desfaz o híbrido DNA-RNA quando a polimerase faz uma pausa na região de terminação

(b) Terminação dependente de ρ



Fatos Básicos da Transcrição



- Síntese 5' → 3' do RNA
- Só uma das fitas é transcrita de cada vez - assimetria
- Produto não se mantém pareado com a fita molde
- RNAP não necessita de um “primer” (iniciador)
- Utiliza ribonucleotídeos (2'OH), uracila no lugar de timina
- Só partes/trechos do genoma são transcritos e há genes nas duas orientações no DNA