

**Regulação da Expressão
Gênica em Bactérias
Ativadores e Repressores**

**QBQ-2503
IQUSP
2023**

Ativadores e Repressores na Regulação da Expressão Gênica em Bactérias

Além dos fatores sigma, a regulação da expressão gênica pode variar pela presença ou ausência de ativadores e repressores

Ativadores e/ou Repressores são Proteínas que se ligam às Regiões Regulatórias dos Genes e Operons em Bactérias causando Mudanças Drásticas nos Padrões de Expressão Gênica

Expressão gênica constitutiva

Não muda com variações no meio ambiente

X

Expressão gênica regulada

Muda com variações no meio ambiente

Indução



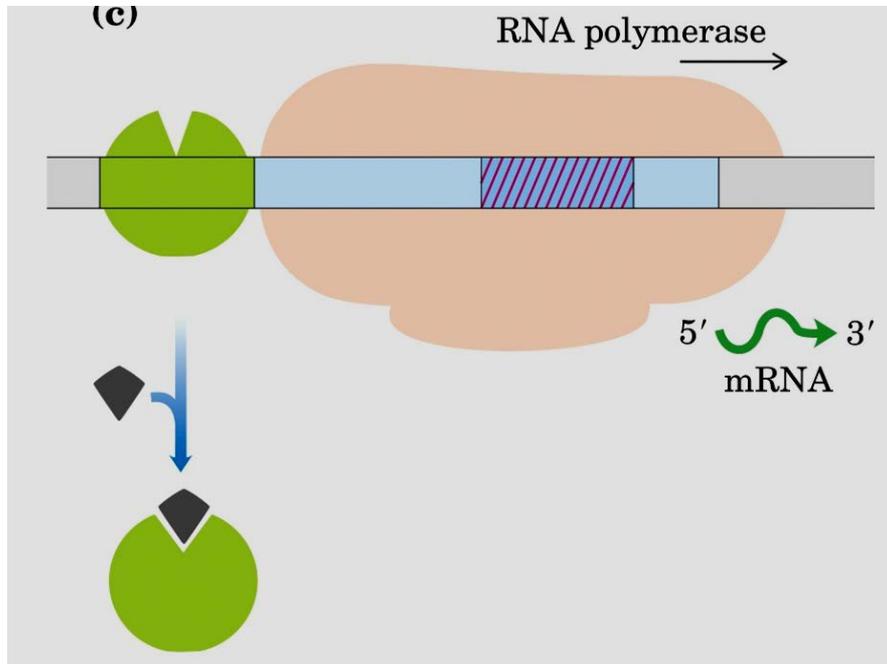
Expressão aumenta em resposta a sinal do meio

Repressão



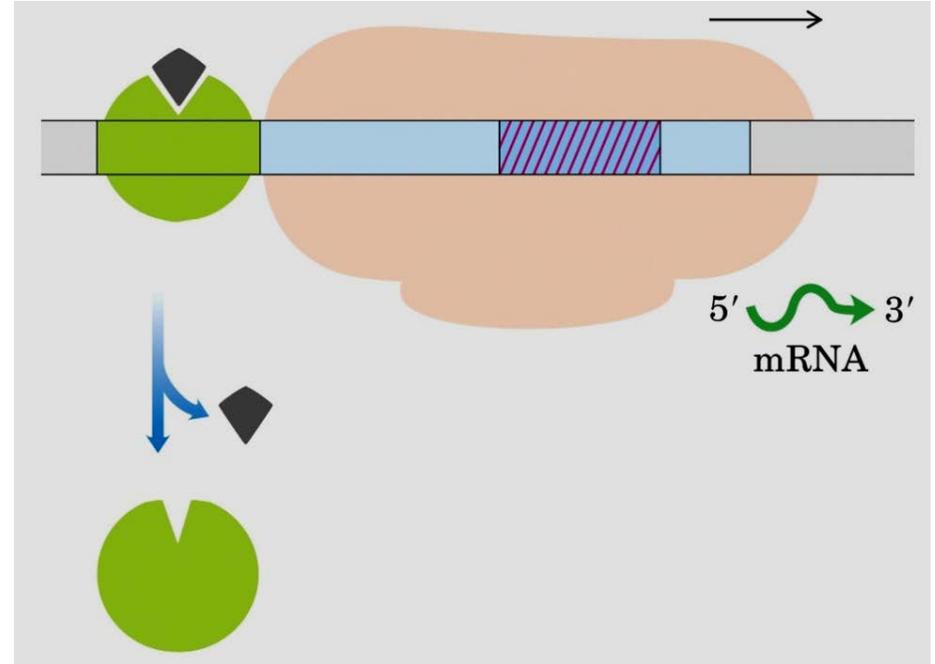
Expressão diminui em resposta a sinal do meio

Regulação Positiva: Ativador ligado Ativa a Transcrição



Sinal molecular inativa o ativador causando dissociação do **ativador** do seu sítio no DNA

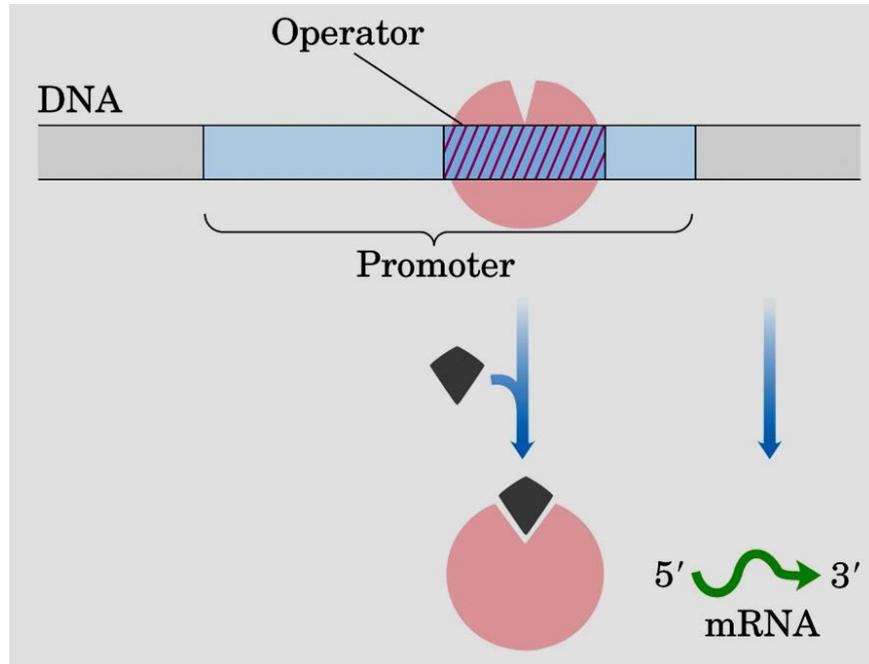
Sinal: Inibidor



Sinal molecular ativa o ativador ocorrendo a ligação do **ativador** ao seu sítio no DNA

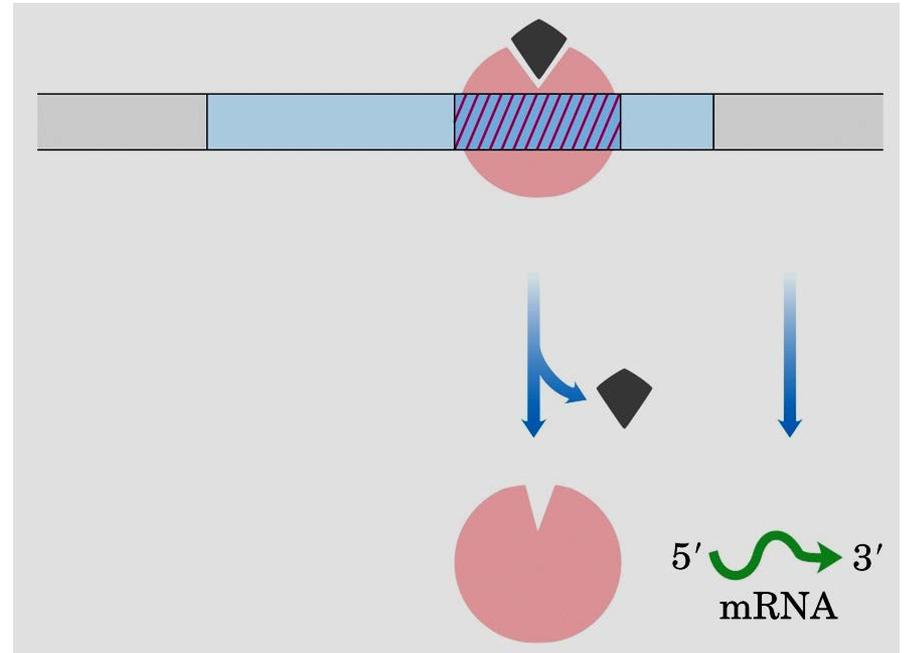
Sinal: Co-ativador

Regulação Negativa: Repressor Ligado Reprime a Transcrição



Um **sinal molecular inativa o repressor** causando **dissociação** do **repressor** do sítio operador no DNA, **induzindo a transcrição**

Sinal: Indutor



Um **sinal molecular ativa o repressor** causando **ligação** do **repressor** ao sítio operador no DNA, **reprimindo a transcrição**

Sinal: Co-repressor

ATIVACÃO DA TRANSCRIÇÃO POR ATIVADOR QUE PROVOCA MUDANÇA DE CONFORMAÇÃO DO PROMOTOR

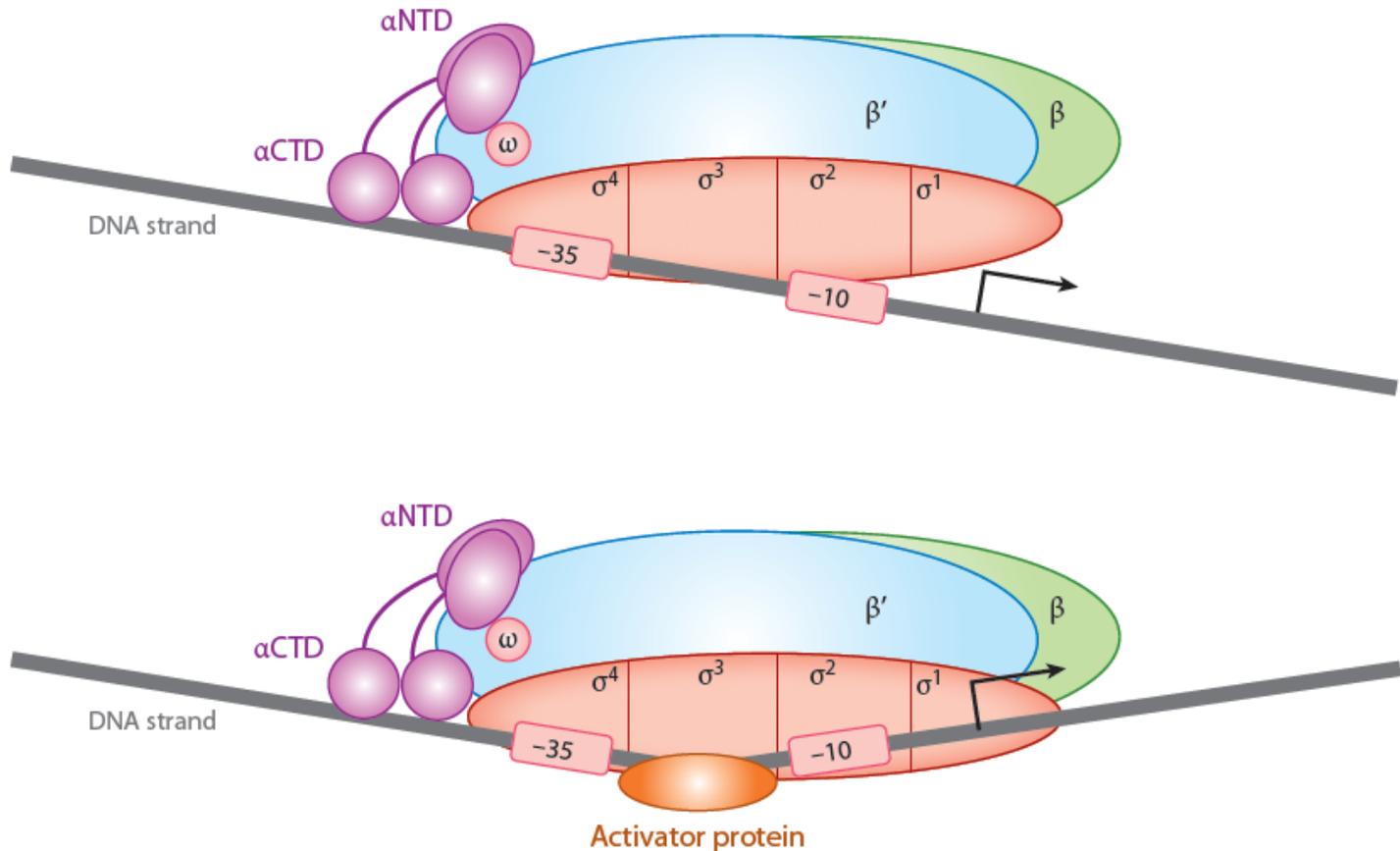
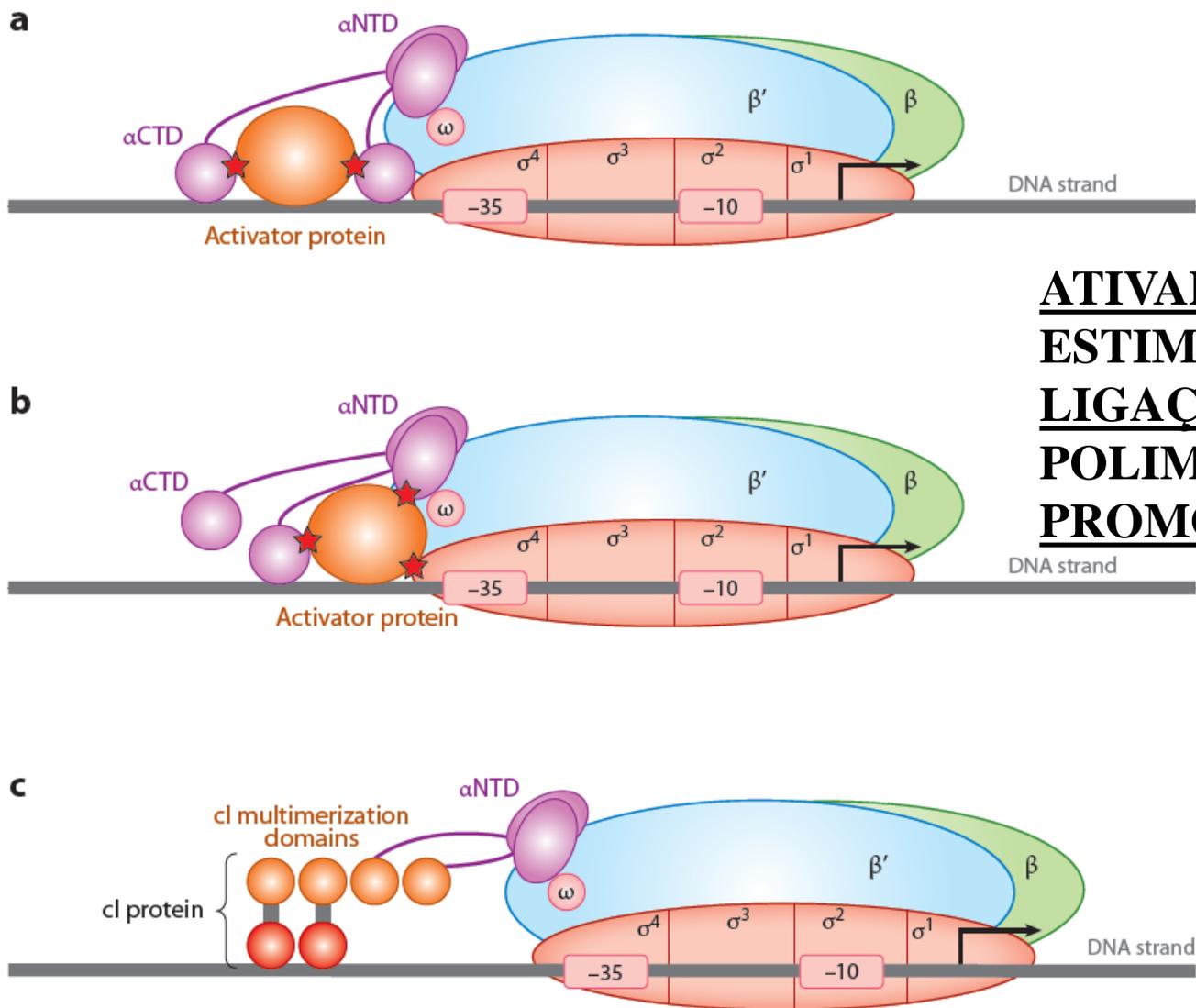


Figure 2

Simple activation by conformational change. The activator protein binds between the -10 and -35 elements and induces a conformational change in the DNA, allowing RNA polymerase to fully engage with the promoter. Abbreviations: CTD, C-terminal domain; NTD, N-terminal domain.



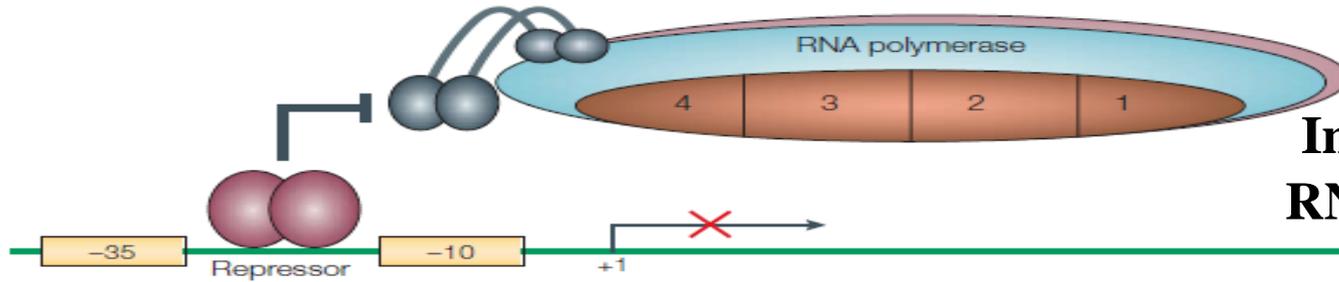
ATIVADORES QUE ESTIMULAM A LIGAÇÃO DA RNA POLIMERASE AO PROMOTOR

Figure 3

Simple activation by recruitment. (a) The activator protein binds upstream of RNA polymerase and contacts (red stars) one or both α subunit C-terminal domains (CTD). (b) The activator binds close to RNA polymerase and interacts with different polymerase subunits. (c) Artificial activation in which the DNA-bound cI (bacteriophage λ repressor) protein activates transcription by interacting with the cI multimerization domains fused to the RNA polymerase α subunit N-terminal domain (NTD).

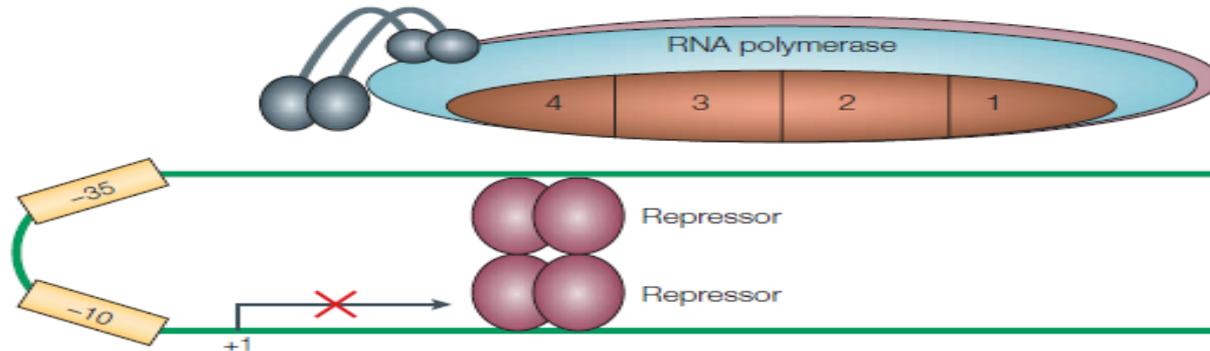
Mecanismos de Repressão

a Repression by steric hindrance



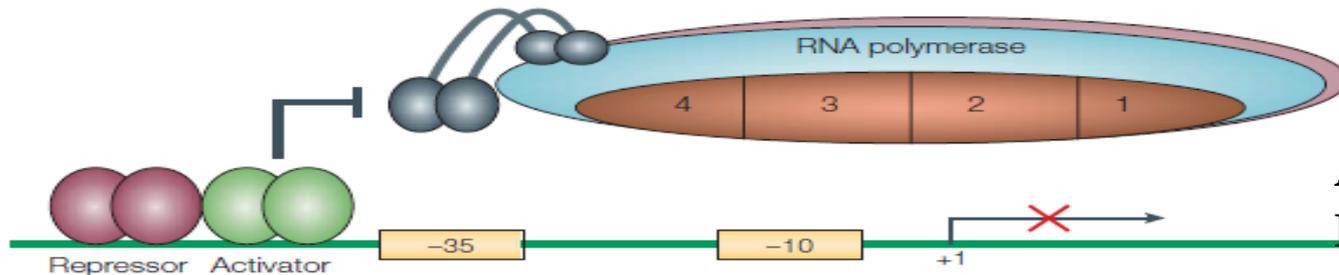
Impedimento da
RNAP

b Repression by looping



Dobramento
do Promotor

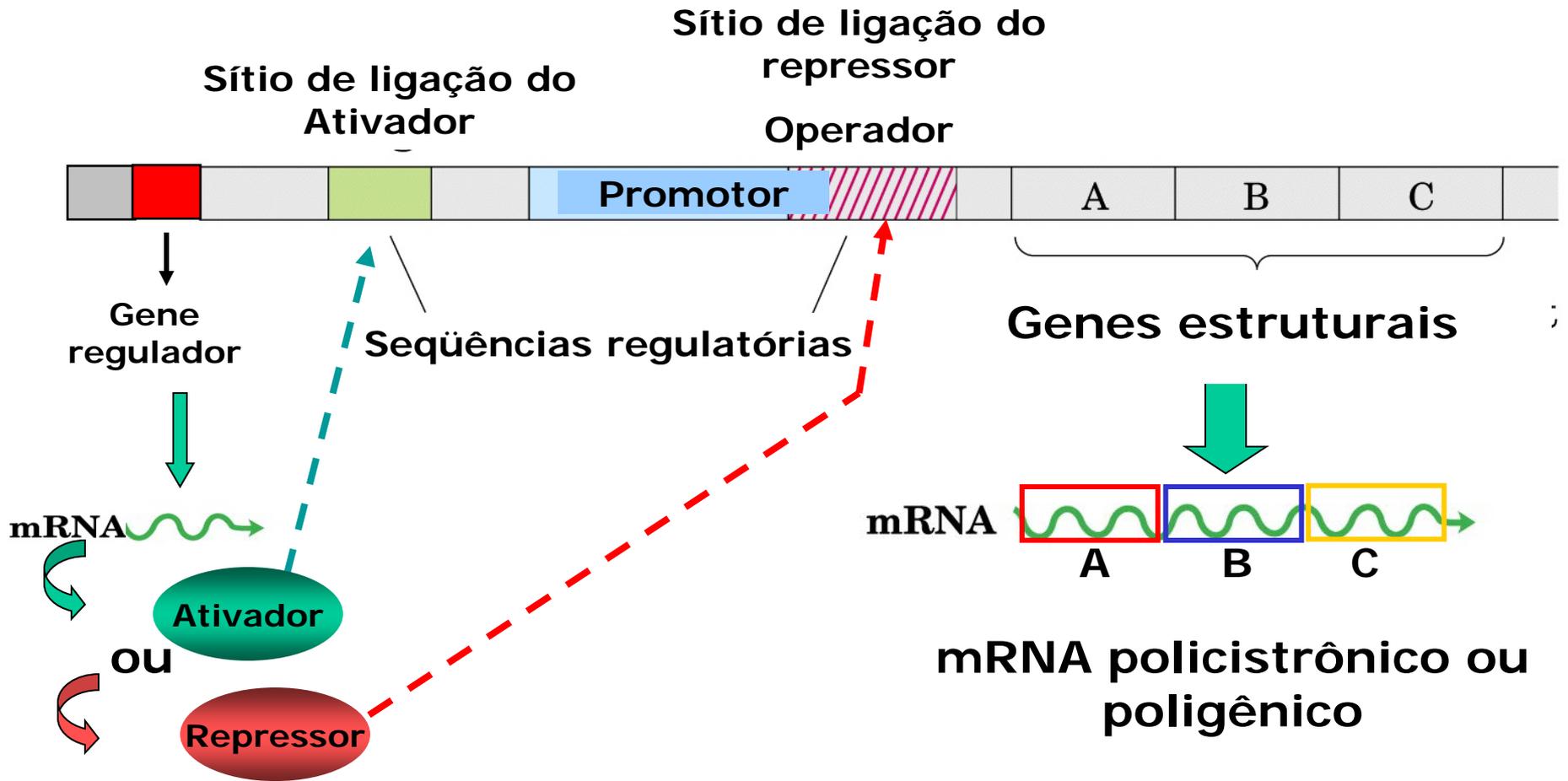
c Repression by modulation of an activator



Modulação do
Ativador:
Repressor bloqueia
o Ativador

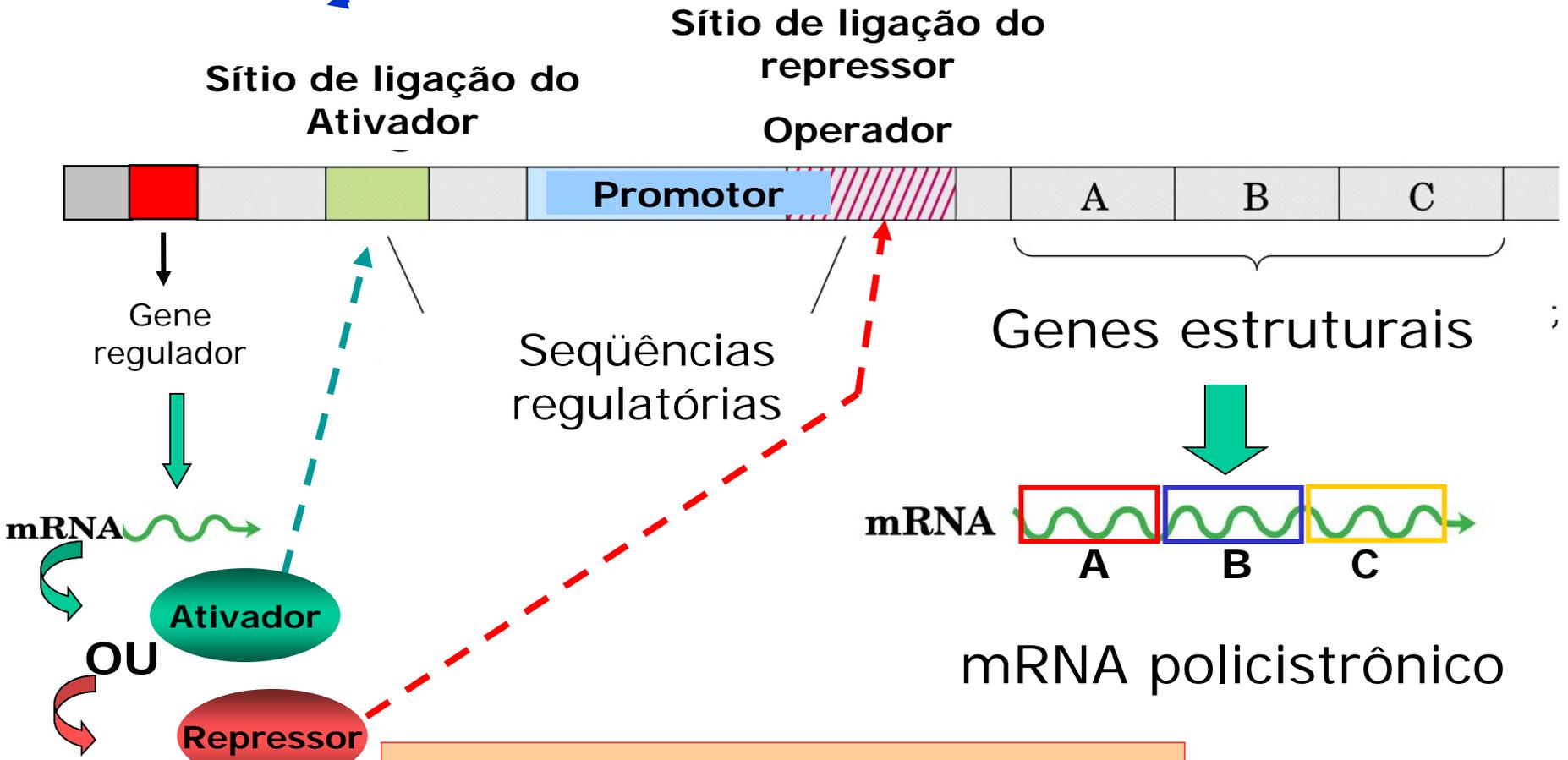
Figure 4 | **Mechanisms of repression.** **a** | Repression by steric hindrance. The repressor-binding site overlaps core promoter elements and blocks recognition of the promoter by the RNA polymerase holoenzyme. **b** | Repression by looping. Repressors bind to distal sites and interact by looping, repressing the intervening promoter. **c** | Repression by the modulation of an activator protein. The repressor binds to an activator and prevents the activator from functioning by blocking promoter recognition by the RNA polymerase holoenzyme.

Bactérias têm um mecanismo simples para coordenar a expressão de genes que são relacionados: estes genes estão organizados em uma **unidade transcricional** chamada operon



Proteínas regulatórias

Sequências gênicas que atuam *in cis* (não são difusíveis, funcionam “dentro” do DNA)



Produtos gênicos como proteínas regulatórias, atuam *in trans* (são difusíveis na célula)

Primeiro modelo descrito de regulação gênica

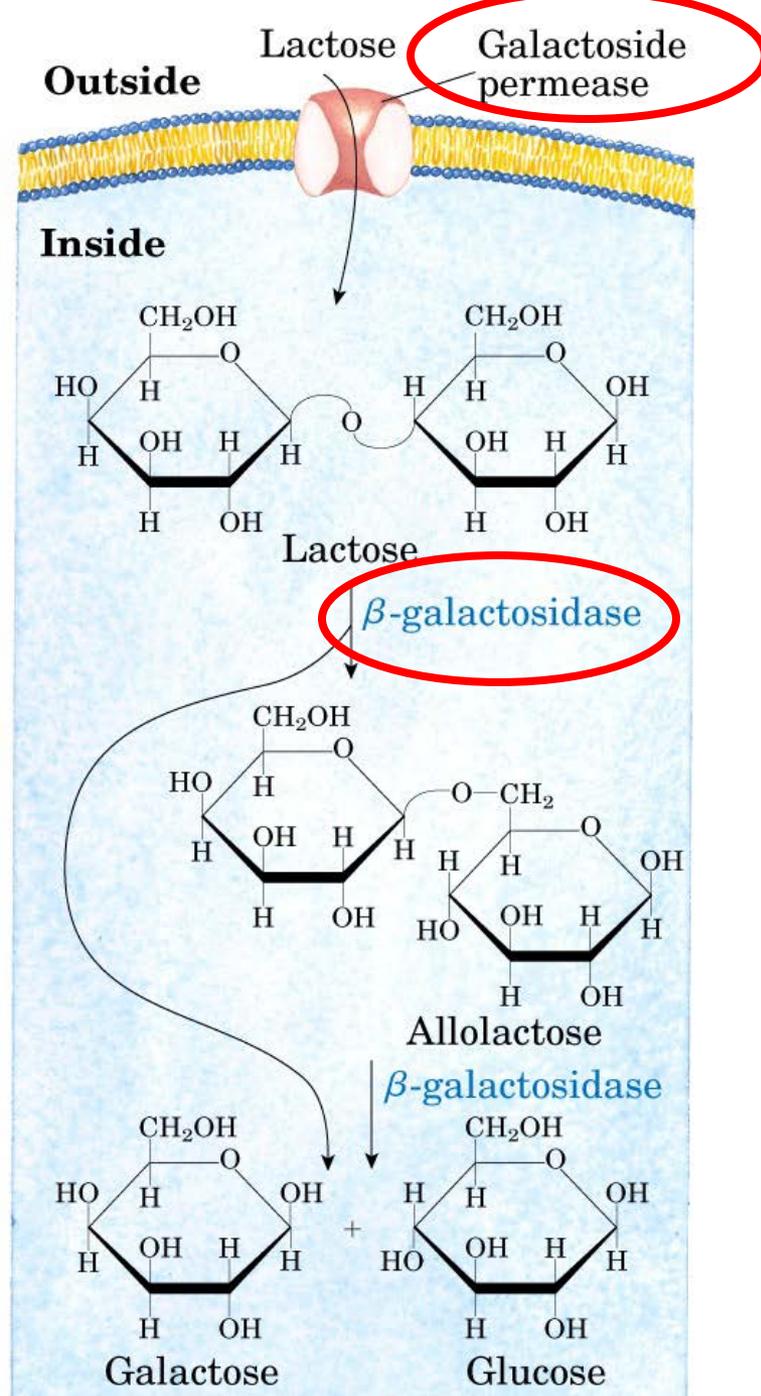
- Modelo do Operon da Lactose (Operon Lac),
proposto por François Jacob e Jacques Monod na
década de 1950-1960**
- O modelo foi proposto com base no estudo do
metabolismo de lactose na bactéria *Escherichia coli*
utilizando genética clássica e bioquímica**

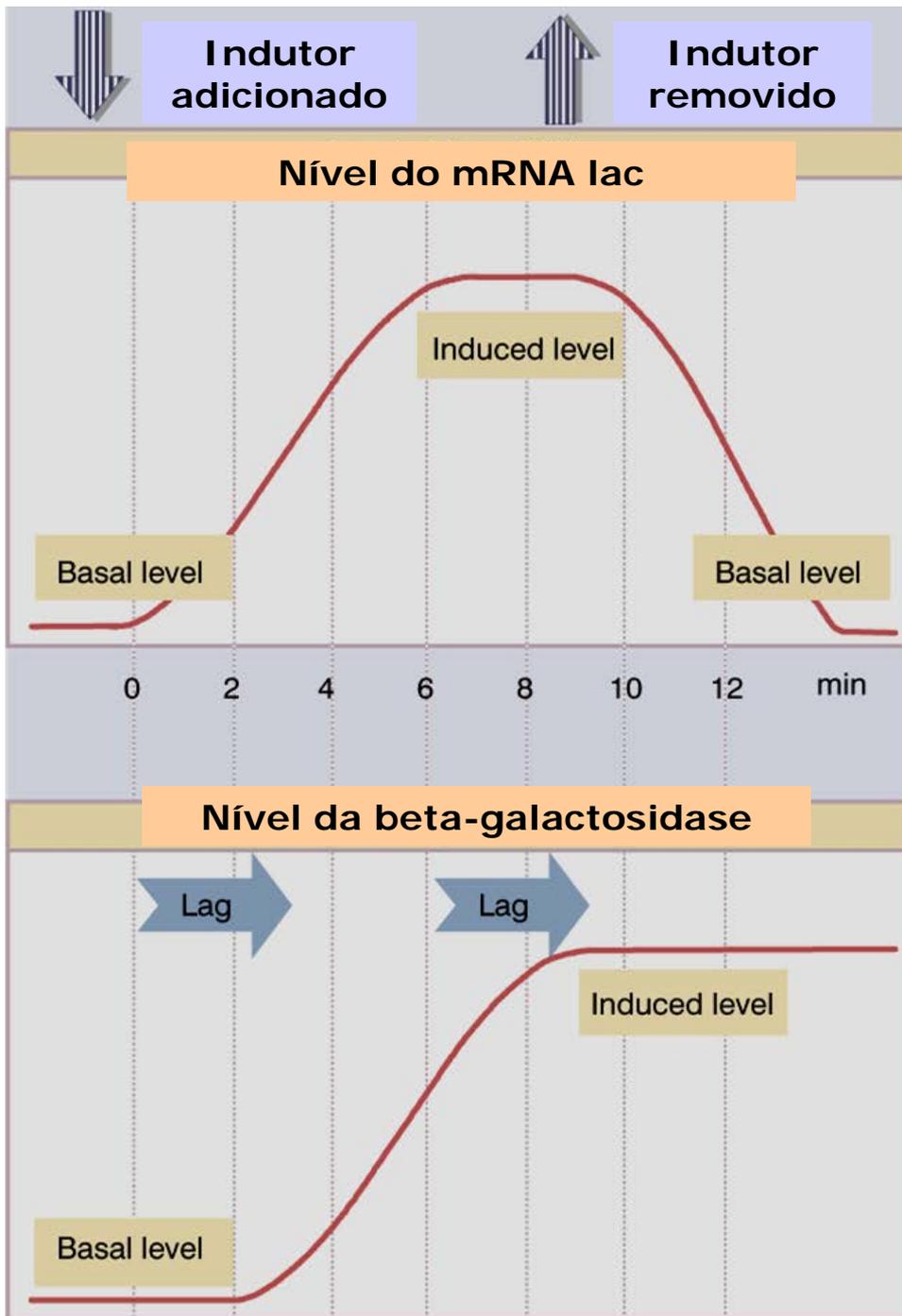
Metabolismo de lactose em *E.coli*

Jacob e Monod propuseram a **regulação coordenada** de genes envolvidos no metabolismo do *dissacarídeo lactose*

Na presença de lactose e ausência de glicose as bactérias expressam enzimas para assimilar e metabolizar a lactose:

B-galactosidade e a Galactosídeo permease



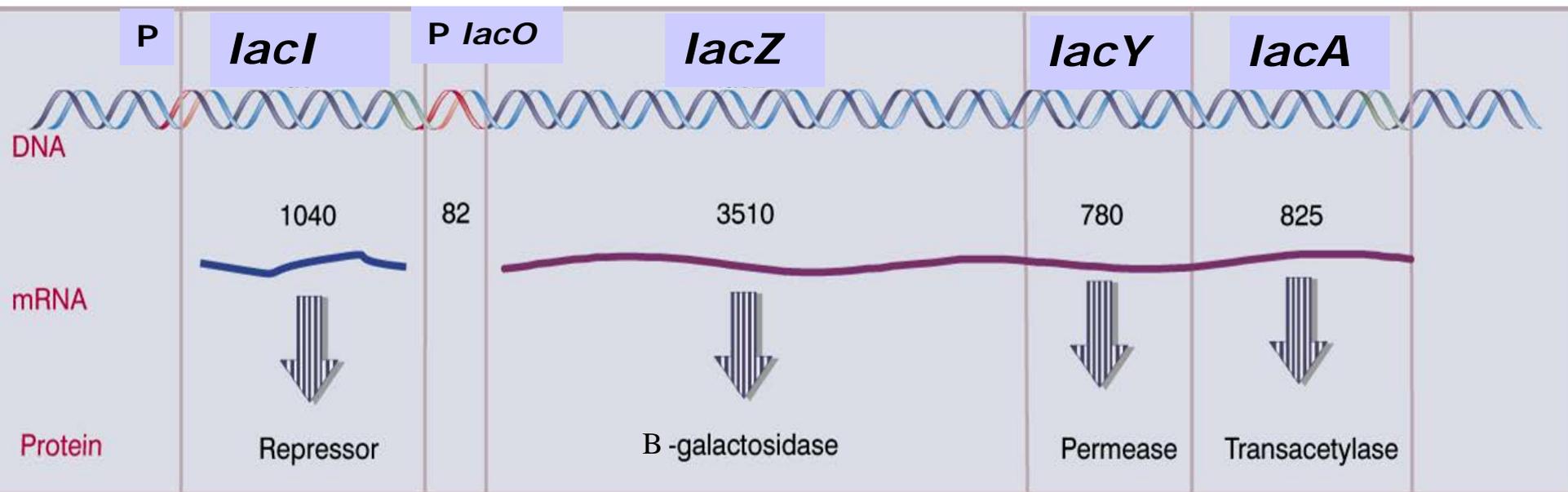


Expressão Regulada: Indução

- Na **ausência de lactose** tem-se baixos níveis da **B-galactosidase**.
- Quando **lactose** é adicionada **altos níveis da enzima** são detectados.
- Bactérias respondem rapidamente à adição do **indutor** (lactose ou alolactose)

Operon Lac: ~6000 bp

Sítio Operador (O) onde se liga o Repressor (I) ocupa 26bp



Genes Regulatórios: *lacI* (repressor)
lacO (operador)

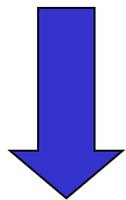
Genes Estruturais: *lacZ*, *lacY* e *lacA*

Mutações nos **genes regulatórios** (I e O) influenciam a expressão de todos os **genes estruturais** (Z, Y e A) do **Operon lac**

Operon Lac

Regulação negativa: **repressor** ligado inibe a transcrição

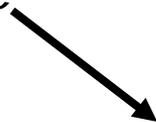
Um sinal molecular (**Indutor-alolactose**) causa dissociação da proteína regulatória (**Repressor**) do sítio **Operador**



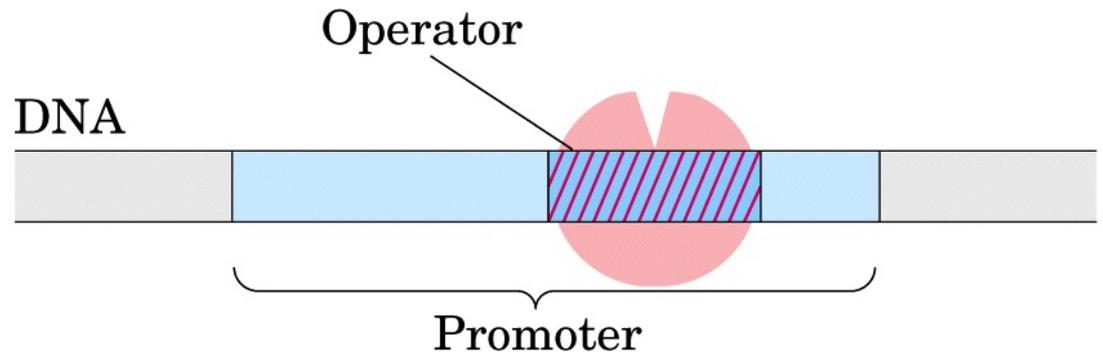
Indutor

Alolactose

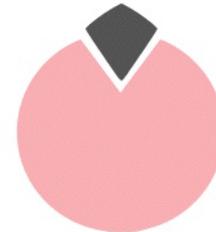
ou
IPTG



Isômero da lactose gerado pela pouca beta-galactosidase existente



Alolactose



Repressor inativo



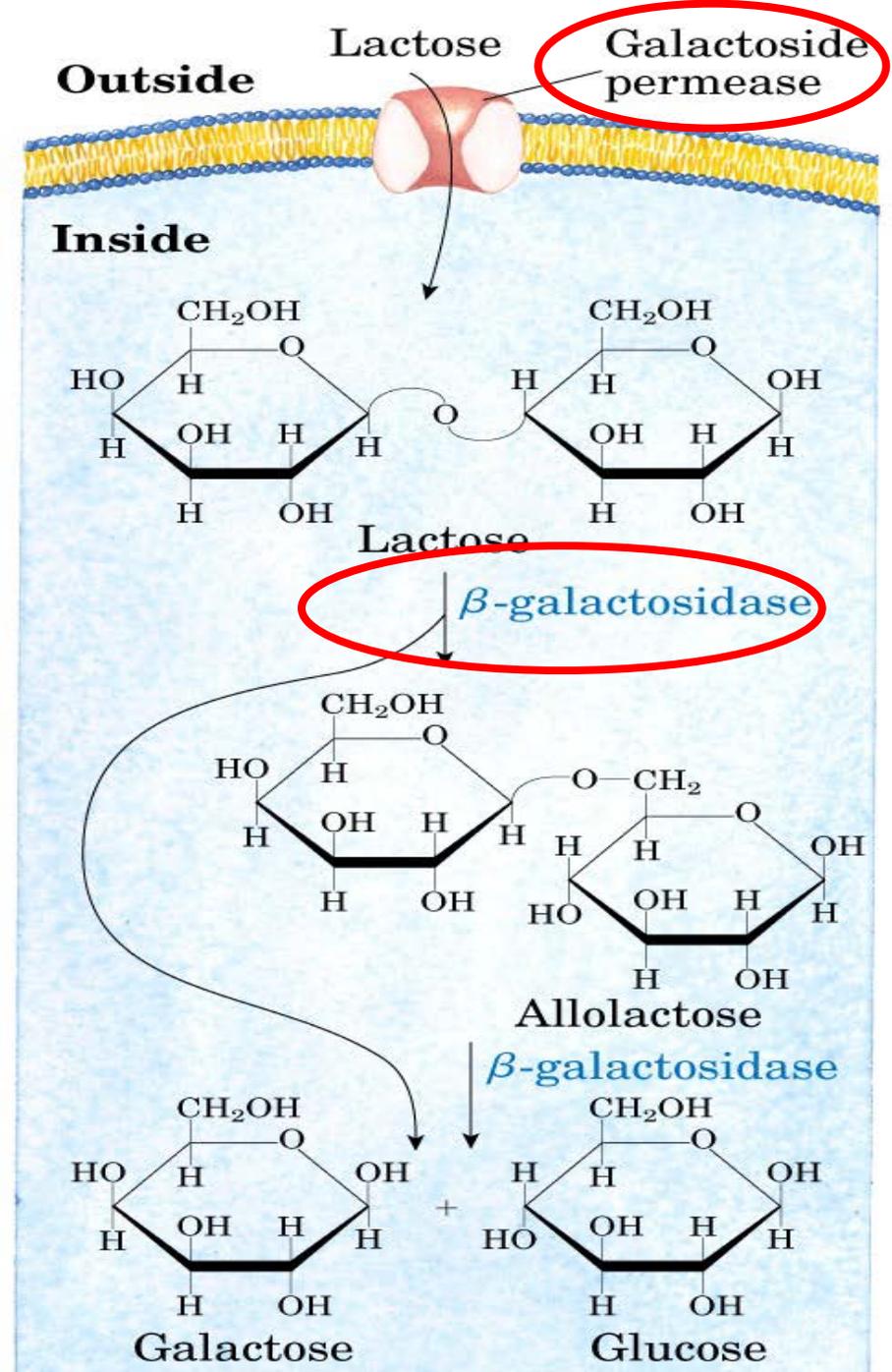
5'  3'
mRNA

Metabolismo de lactose em *E.coli*

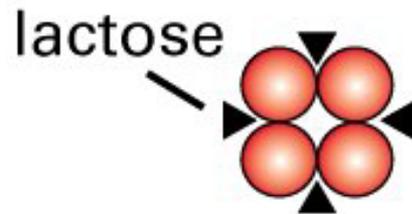
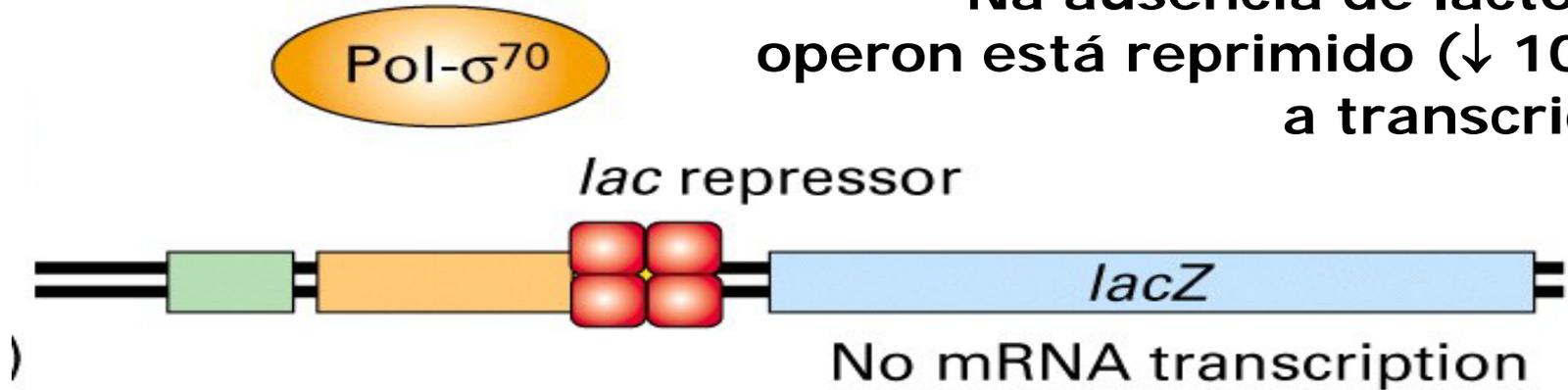
Jacob e Monod propuseram a **regulação coordenada** de genes envolvidos no metabolismo da lactose

Na presença de lactose e ausência de glicose as bactérias expressam enzimas para assimilar e metabolizar a lactose

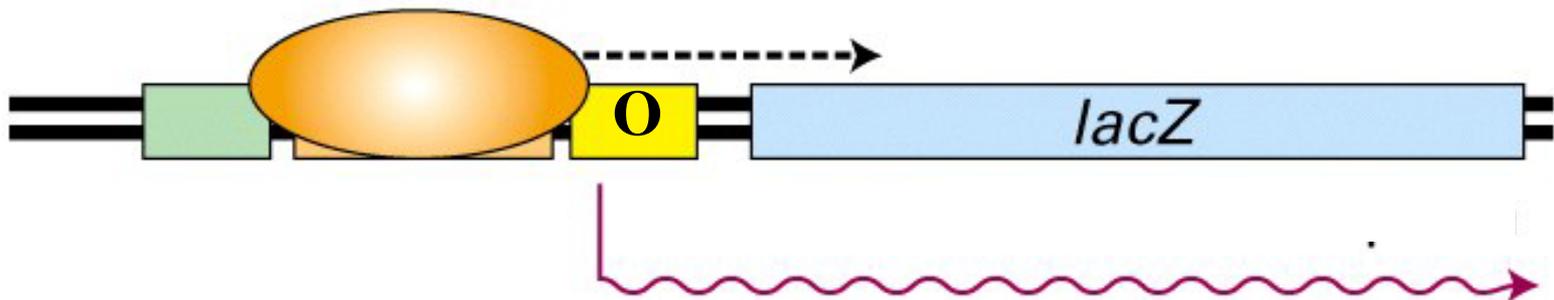
Alolactose é o verdadeiro indutor (produto de transglicosilação da lactose, catalizado pela B-galactosidase)

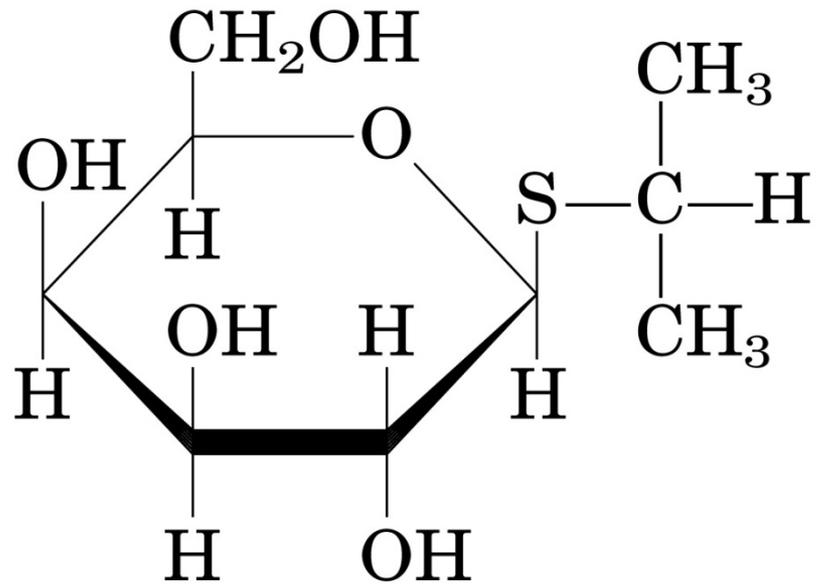
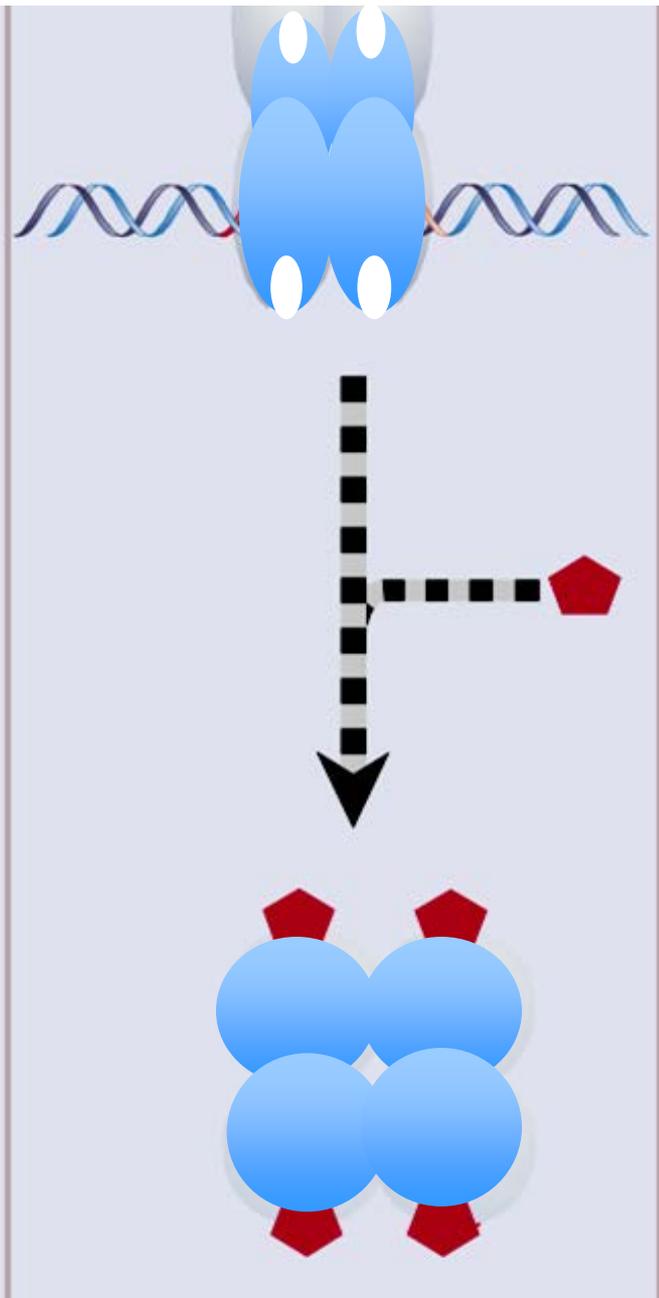


Na ausência de lactose o operon está reprimido (\downarrow 1000x a transcrição)



Adição do Indutor promove a dissociação do repressor do operador



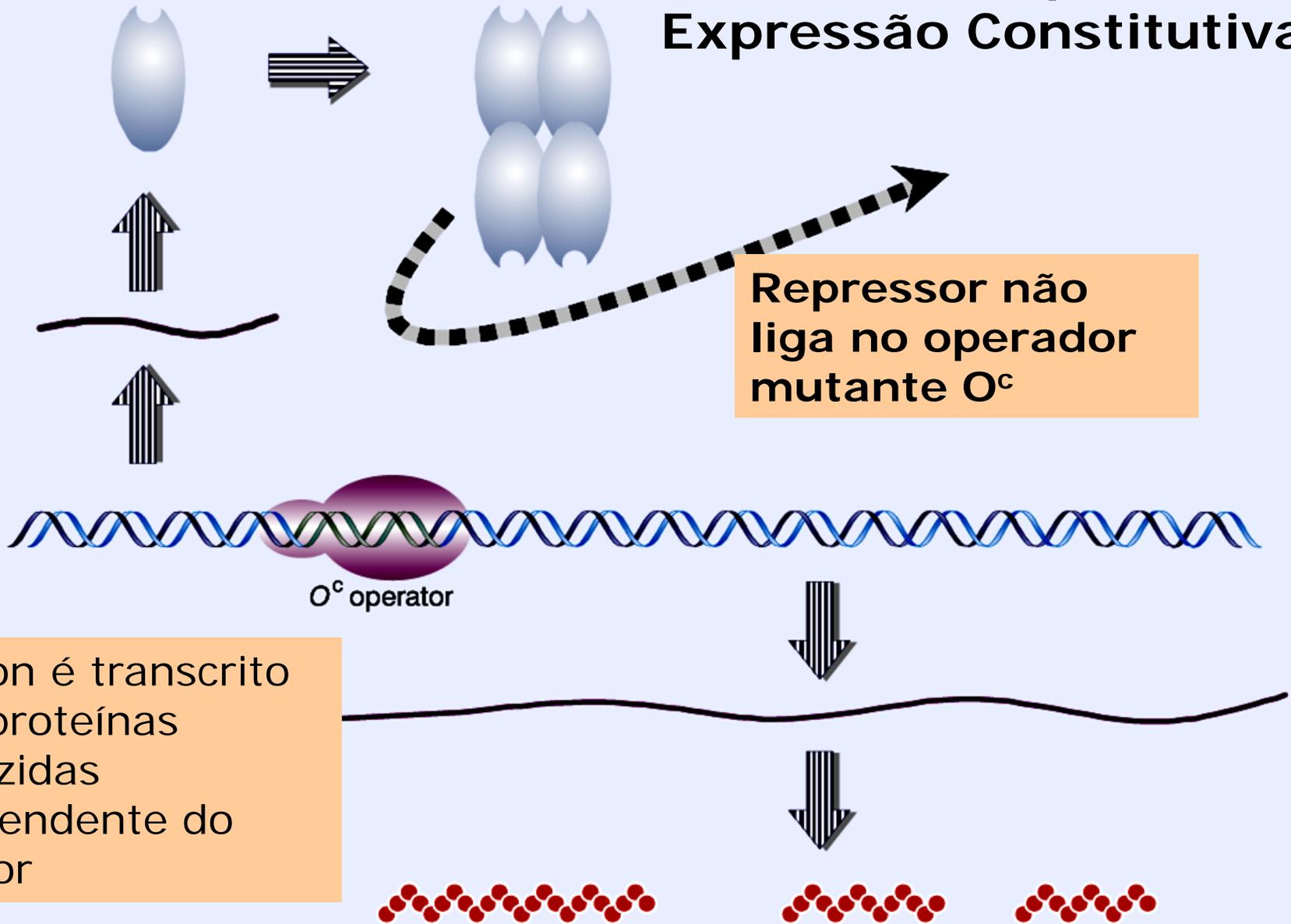


Isopropylthiogalactoside
(IPTG)

Indutor não metabolizável

Indutor: liga o **Repressor**
promovendo sua dissociação
do sítio **Operador**

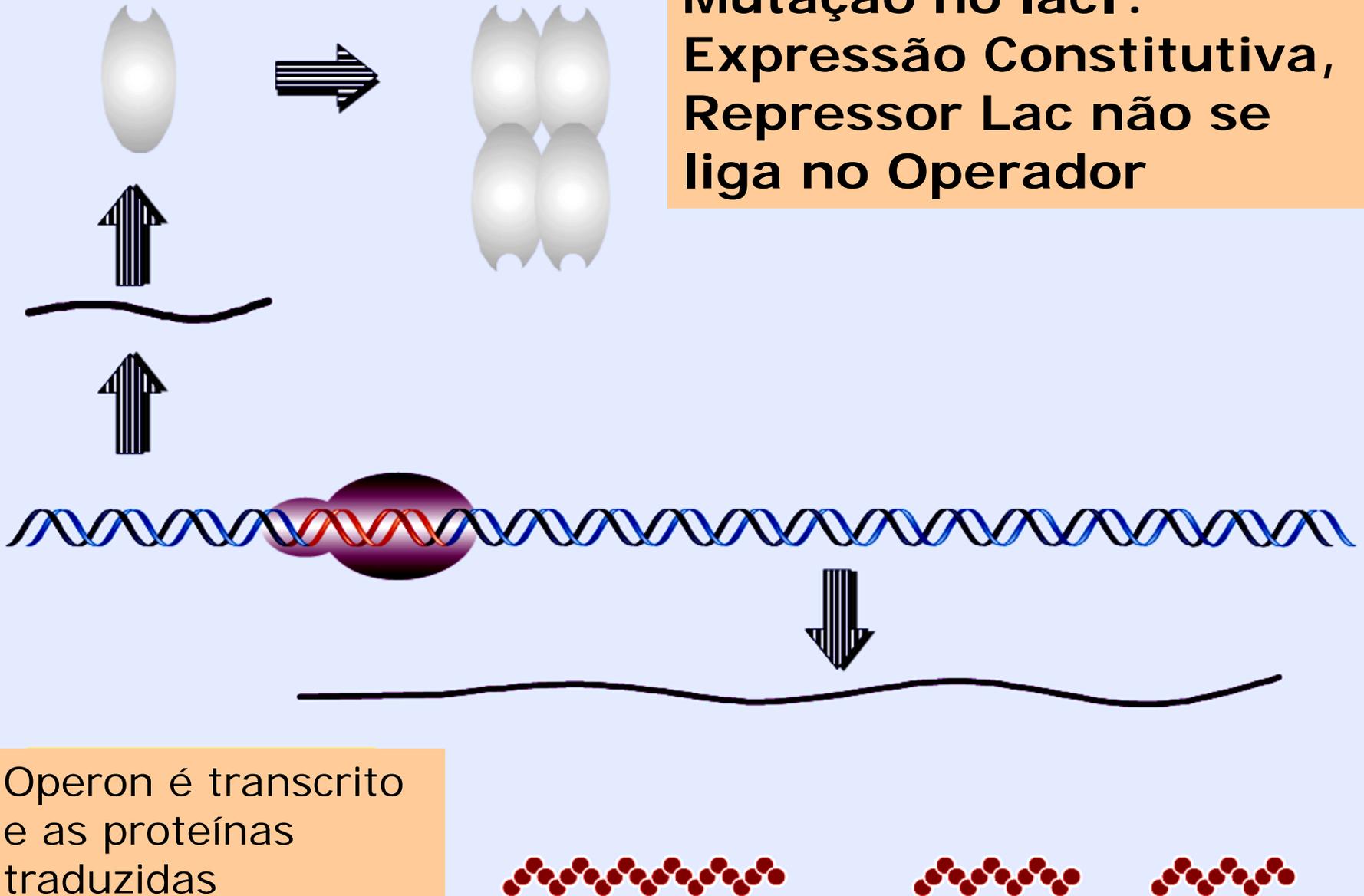
Mutação no Operador: Expressão Constitutiva



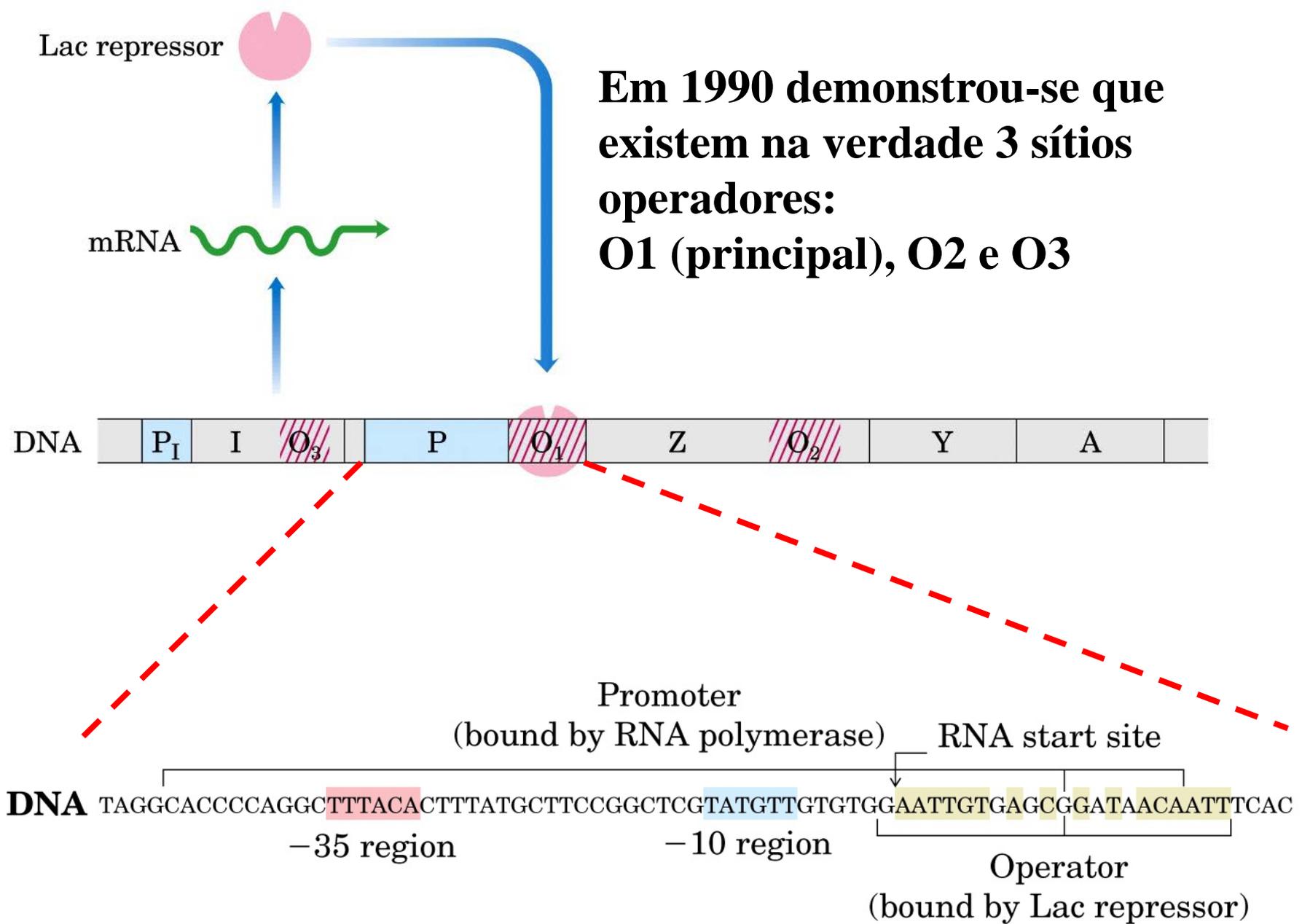
Repressor não
liga no operador
mutante O^c

Operon é transcrito
e as proteínas
traduzidas
independente do
indutor

**Mutação no lacI:
Expressão Constitutiva,
Repressor Lac não se
liga no Operador**

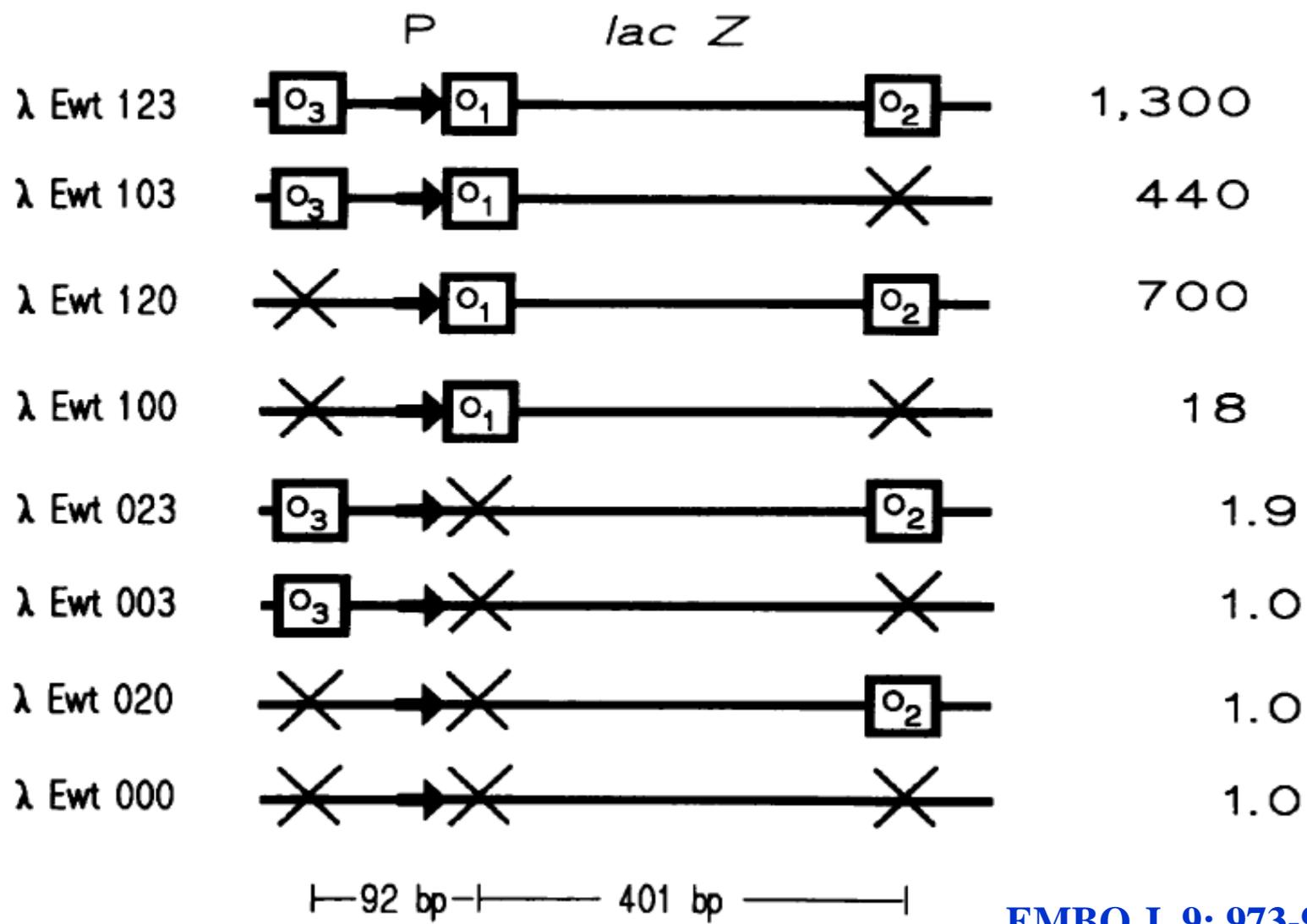


Operon é transcrito
e as proteínas
traduzidas



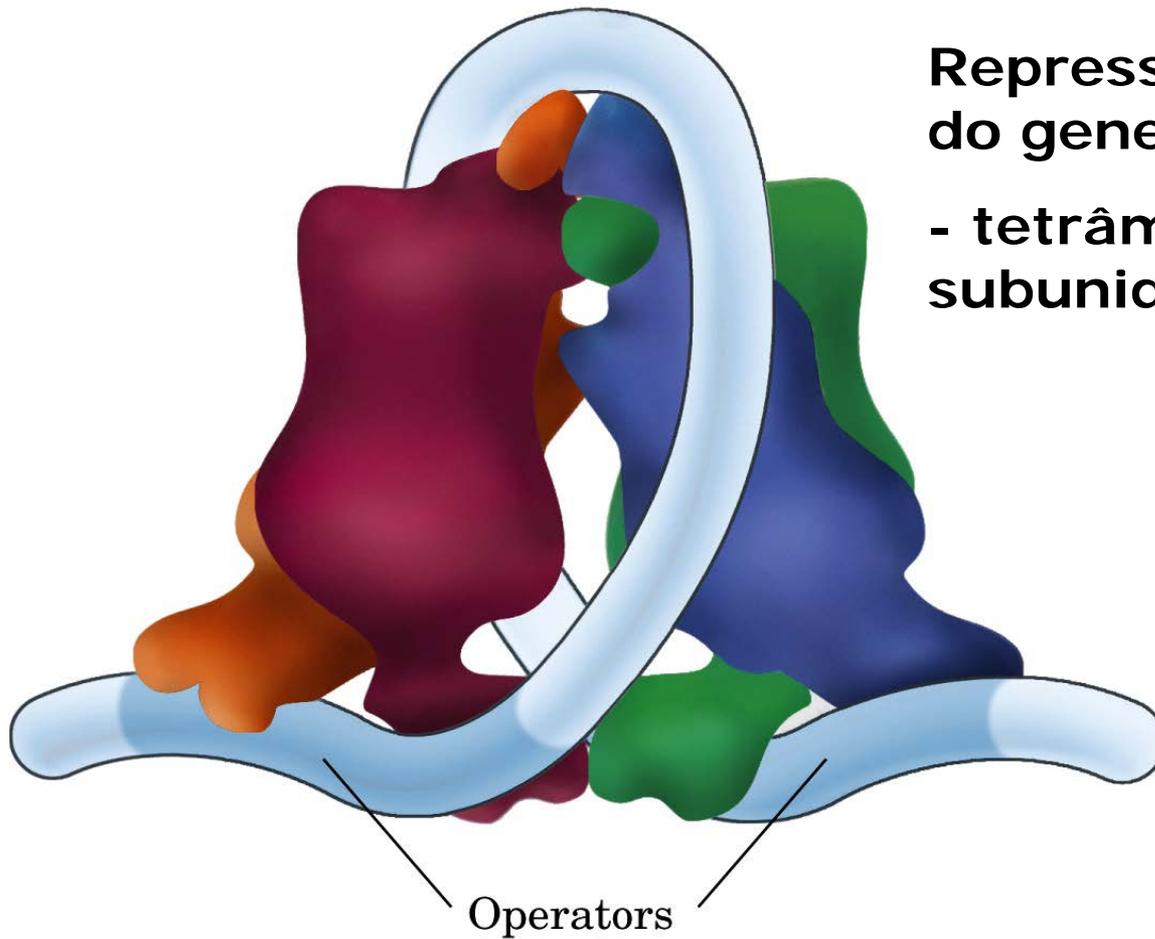
Eficiência de repressão dos operadores: O1(original e principal), O2 e O3

Repression by chromosomal i^+

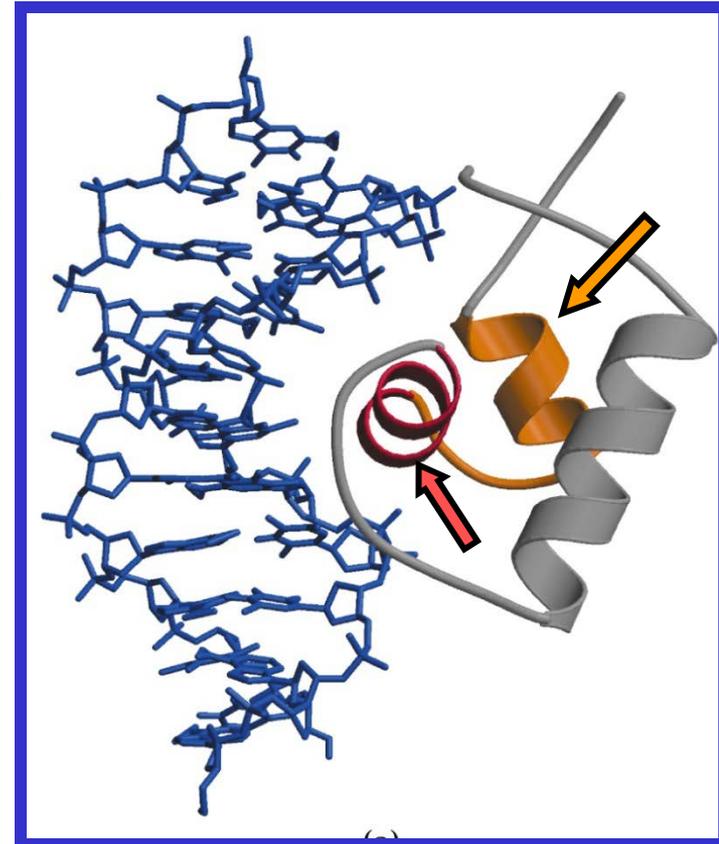


Repressor Lac (produto do gene *lacI*)

- tetrâmero com subunidades de 36kDa

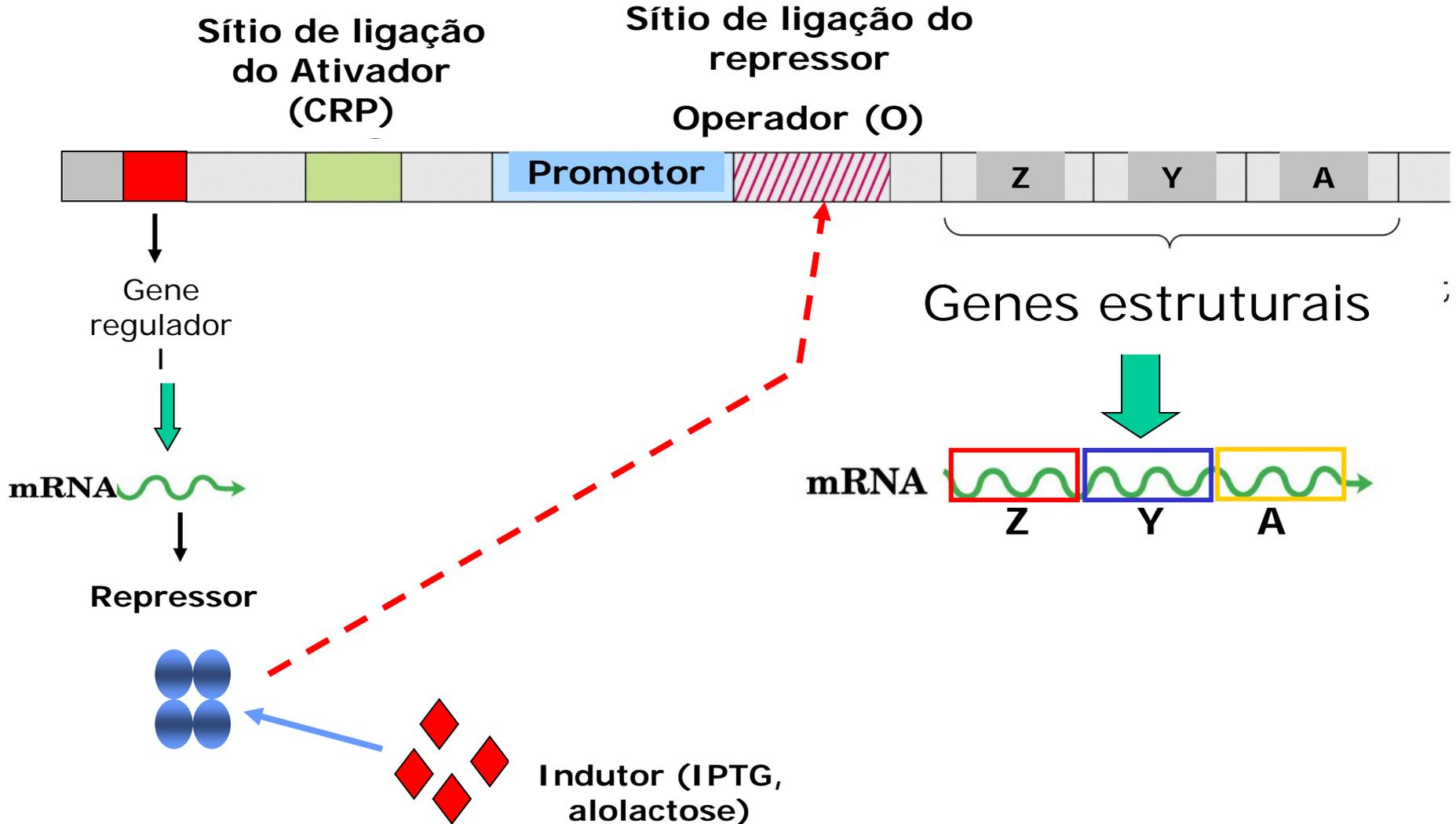


Detalhe do domínio de interação do repressor com o DNA: motivo hélice-volta-hélice



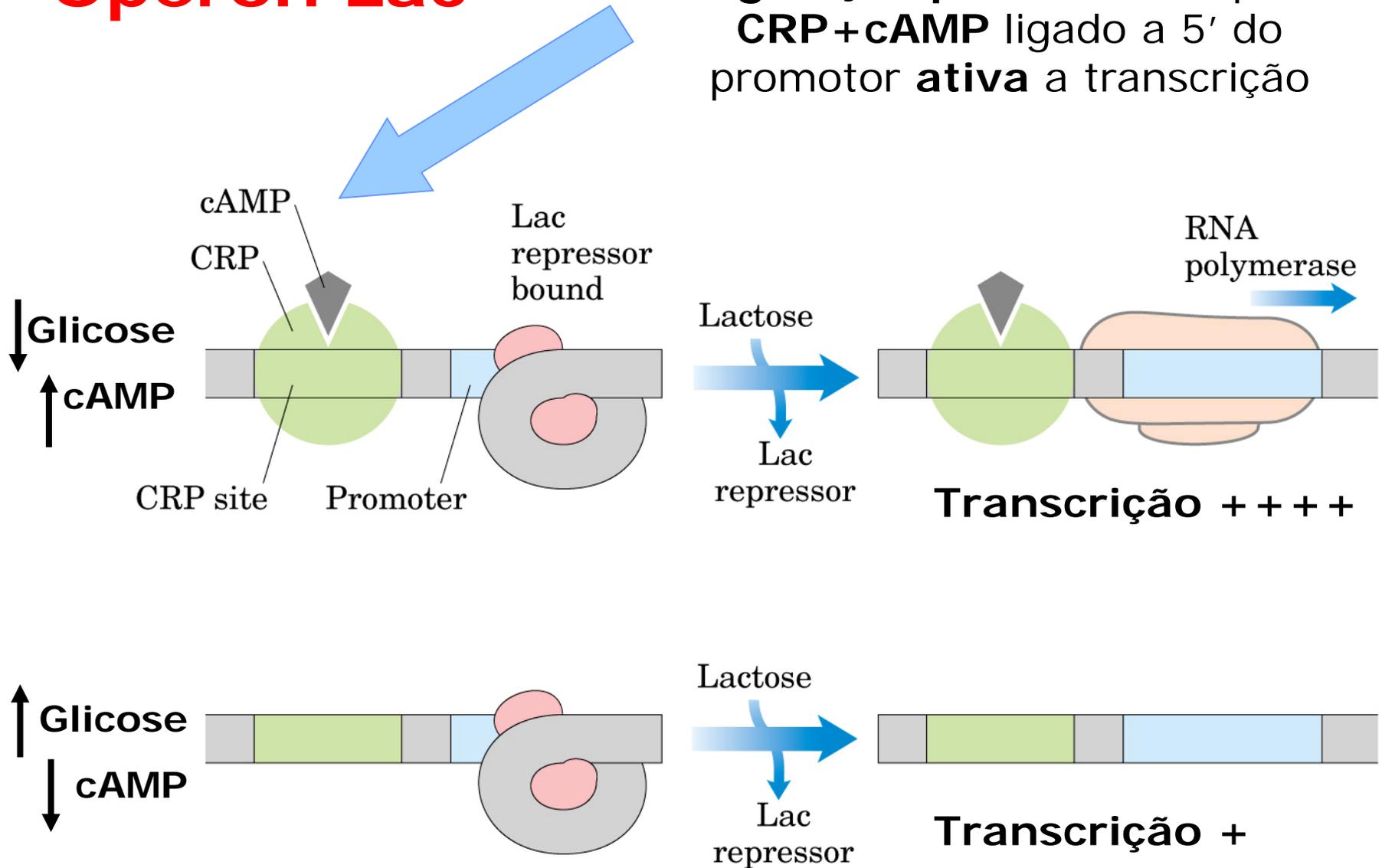
Regulação Positiva no operon lac

Proteína receptora de cAMP (CRP) só é ativa quando ligada ao cAMP

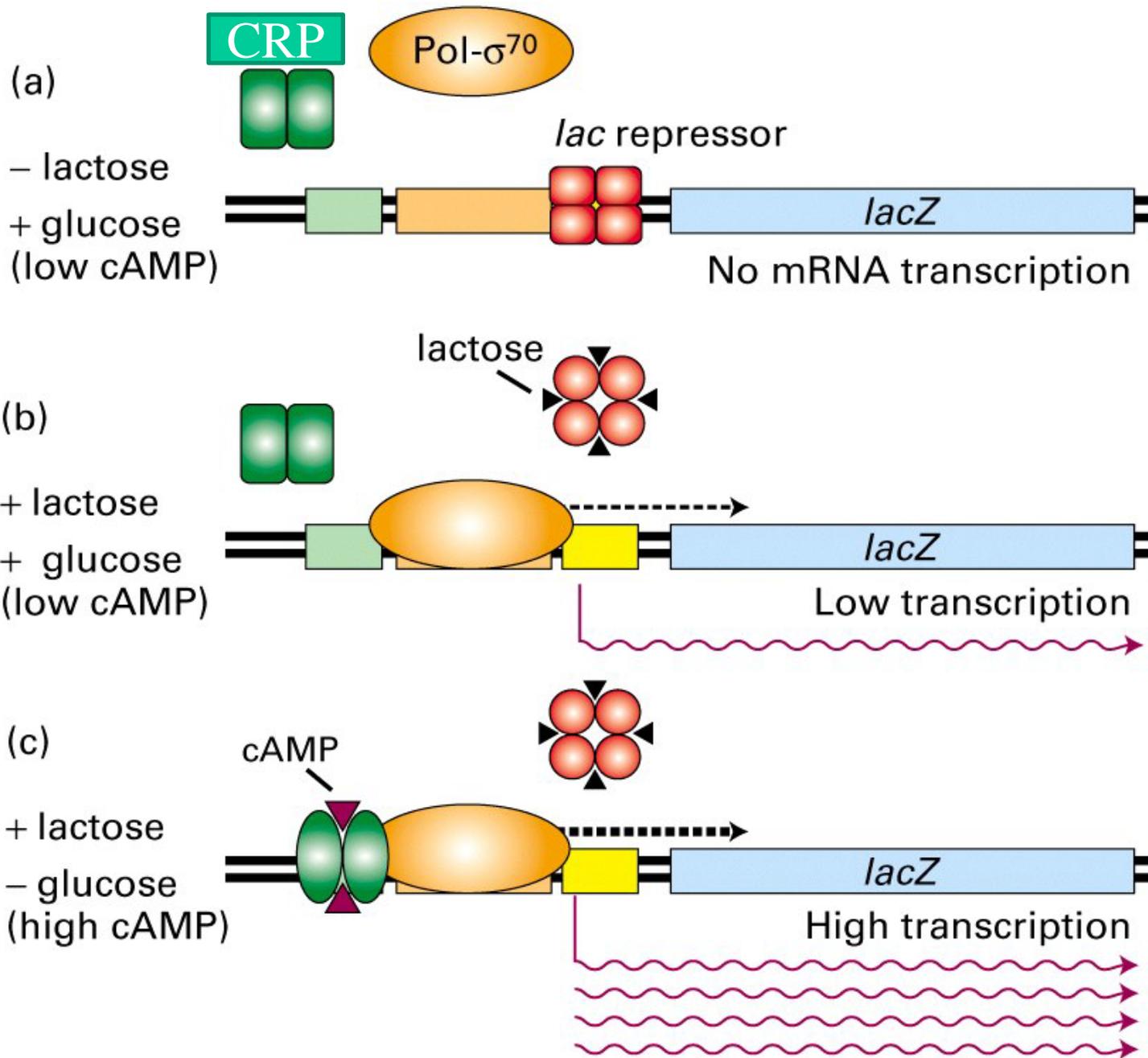


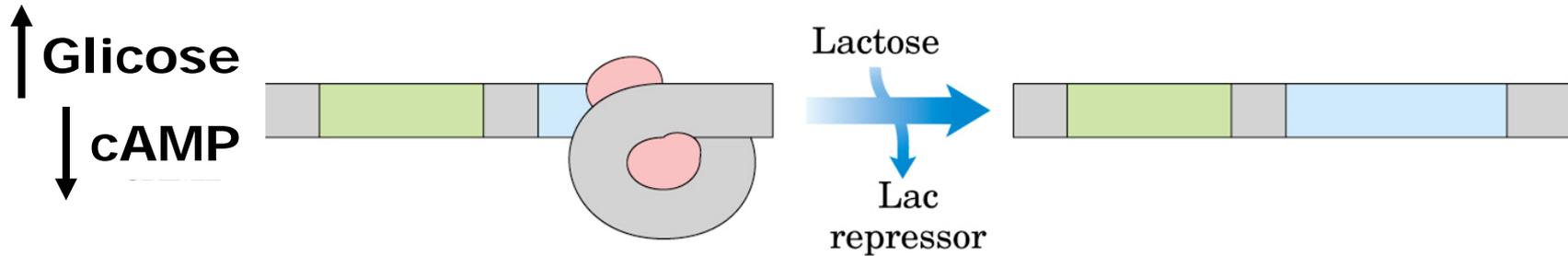
Operon Lac

Regulação positiva: complexo **CRP+cAMP** ligado a 5' do promotor **ativa** a transcrição

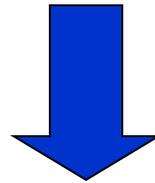


Na presença de glicose temos baixos níveis de transcrição pois a Adenilato Ciclase (cAMP) está inibida!

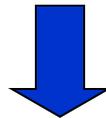




**Na presença de glicose ocorre “repressão por catabólito”:
Este mecanismo regulatório previne a expressão de genes
do metabolismo de lactose, arabinose e outros açúcares
quando a glicose está presente**



**O ativador CRP+cAMP regula coordenadamente vários
operons do metabolismo de carbono**



Regulon

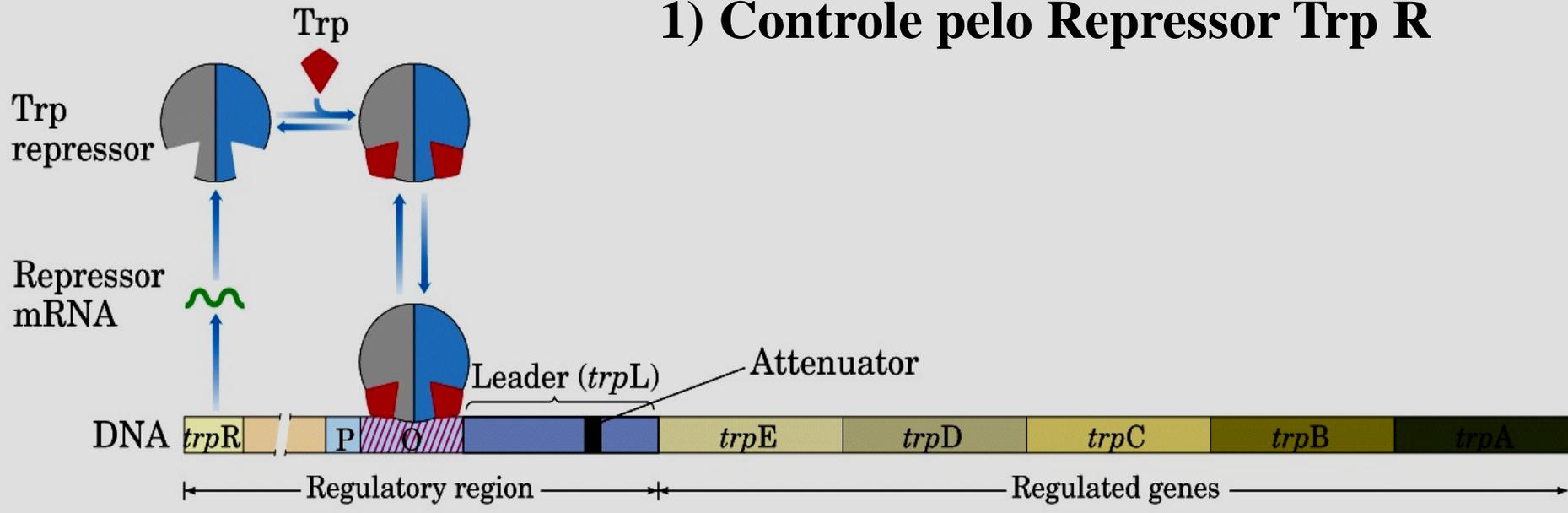
ATENUAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

- A transcrição é iniciada, mas é interrompida antes de chegar aos genes estruturais do operon

Muitos genes relacionados a biossíntese de aminoácidos são regulados por atenuação da transcrição: quando o aminoácido é abundante no meio nutriente, as enzimas para sua biossíntese são desnecessárias e o operon correspondente encontra-se reprimido...

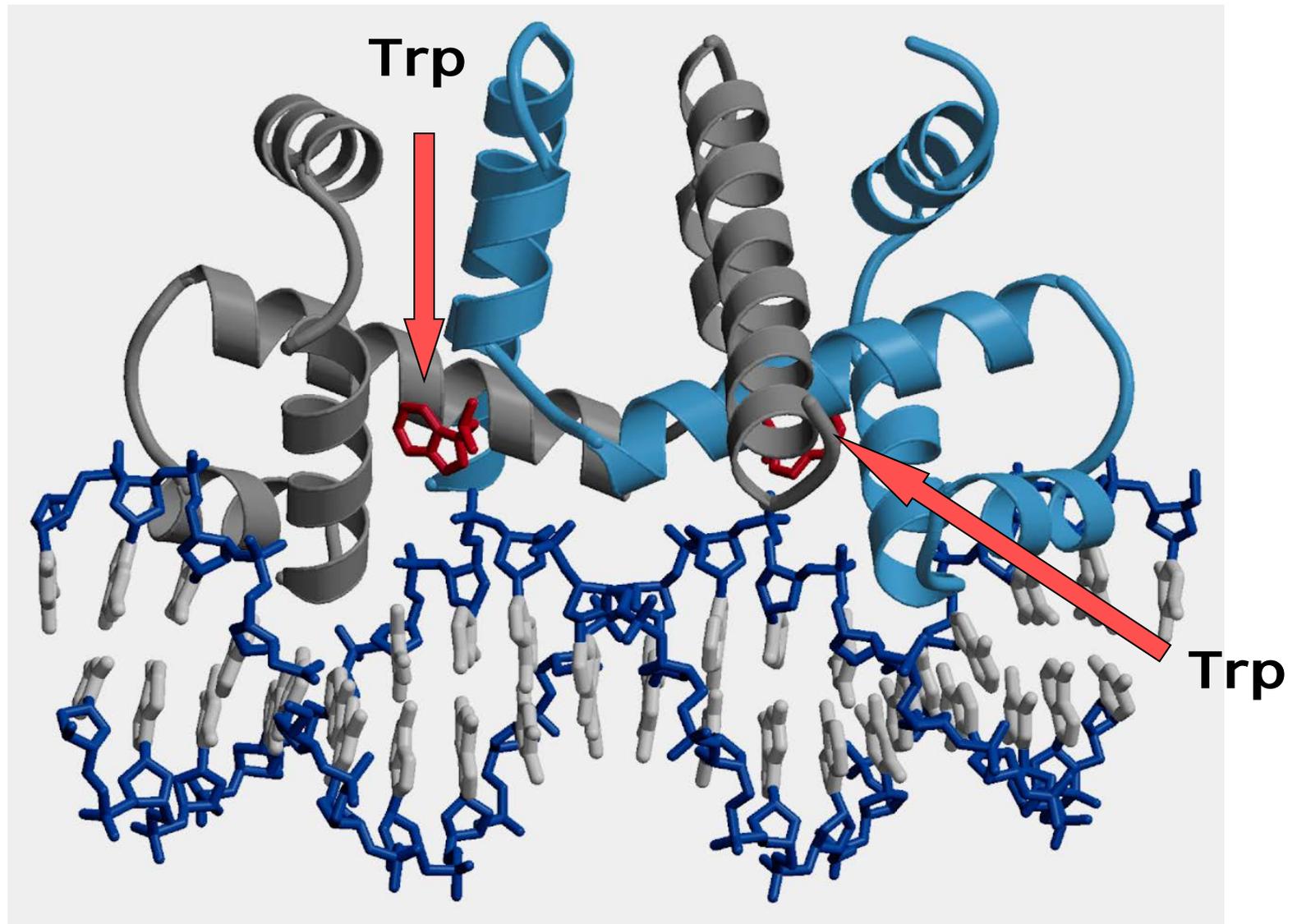
Operon do Triptofano

1) Controle pelo Repressor Trp R



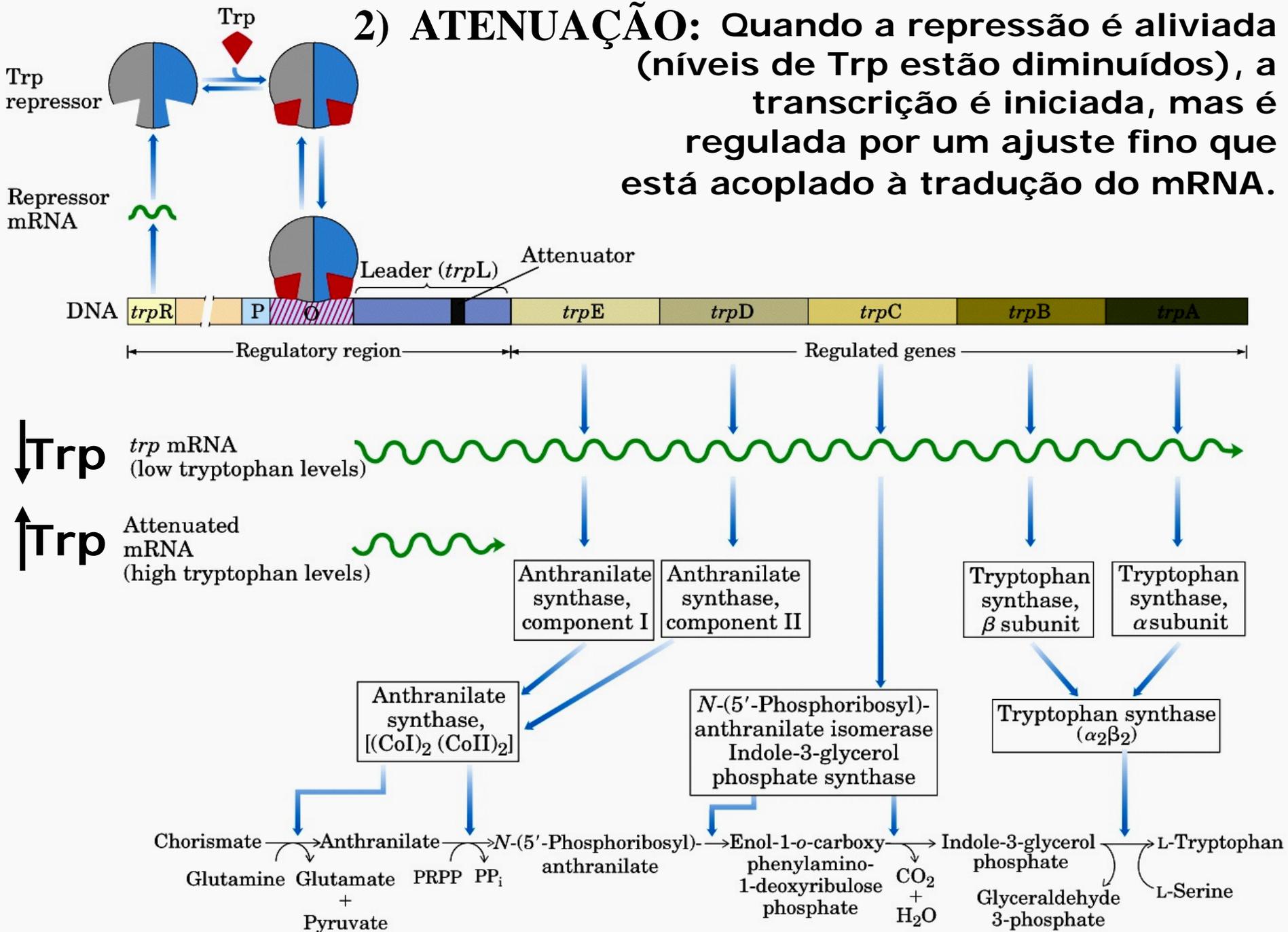
- Quando os níveis de triptofano estão altos, o repressor TrpR ligado ao triptofano (Trp) liga-se ao operador (O), bloqueando o promotor (P) e a transcrição do Operon do Triptofano

- Triptofano (Trp) funciona como co-repressor do repressor TrpR



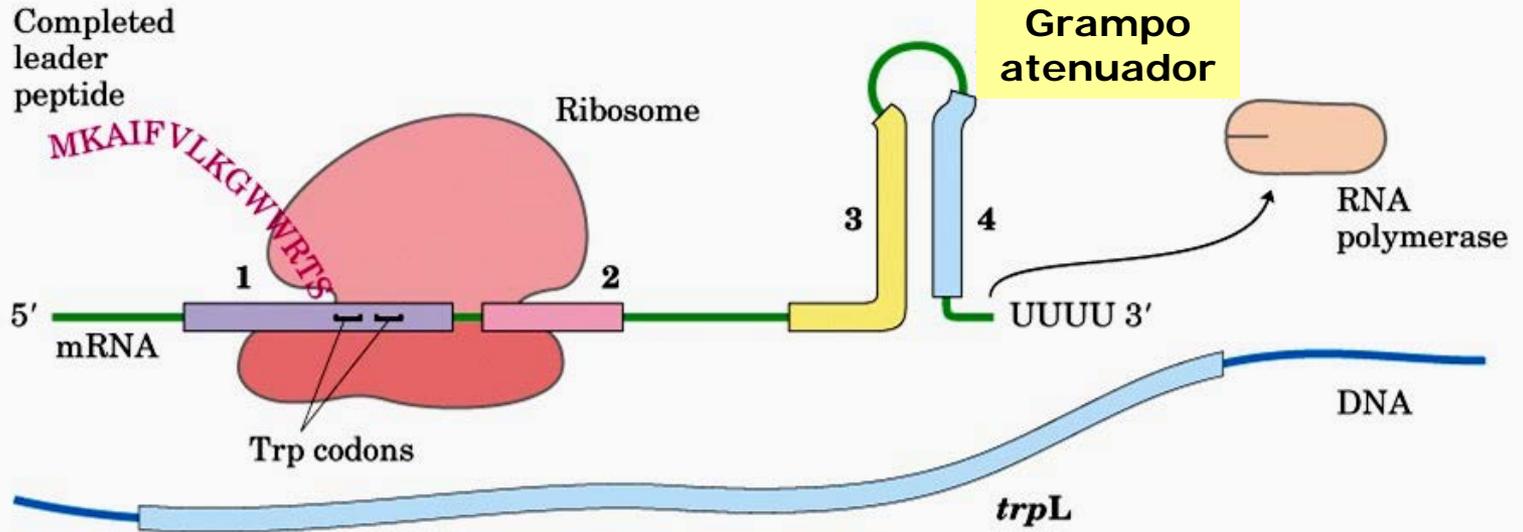
Trp Repressor (dímero) + triptofano ligado ao operador

2) ATENUAÇÃO: Quando a repressão é aliviada (níveis de Trp estão diminuídos), a transcrição é iniciada, mas é regulada por um ajuste fino que está acoplado à tradução do mRNA.



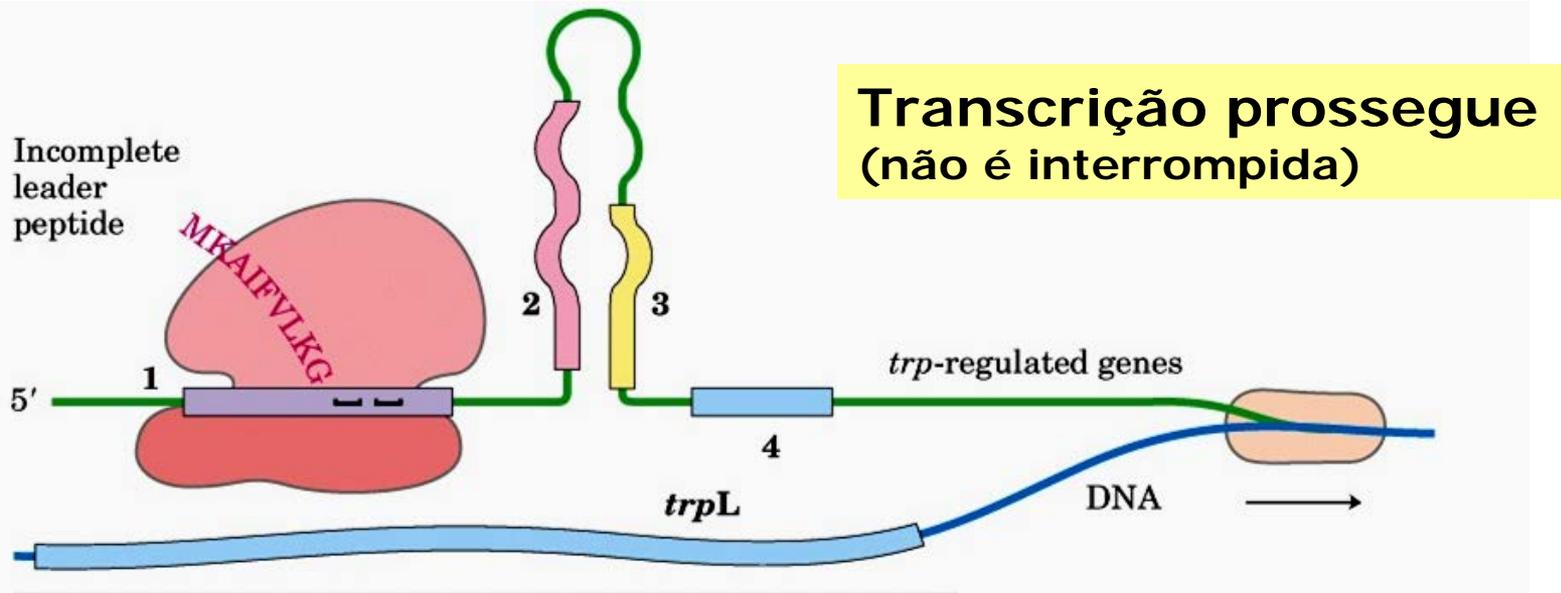
Sinal de terminação independente de rho

↑ Trp



Atenuação: transcrição interrompida

↓ Trp



Mecanismo de atenuação similar ao do operon do triptofano é utilizado por outros operons da biossíntese de aminoácidos:

Operon Phe – peptídeo líder de 15aa com 7 Phe

Operon Leu - peptídeo líder com 4 Leu

Operon His – peptídeo líder com 7 His

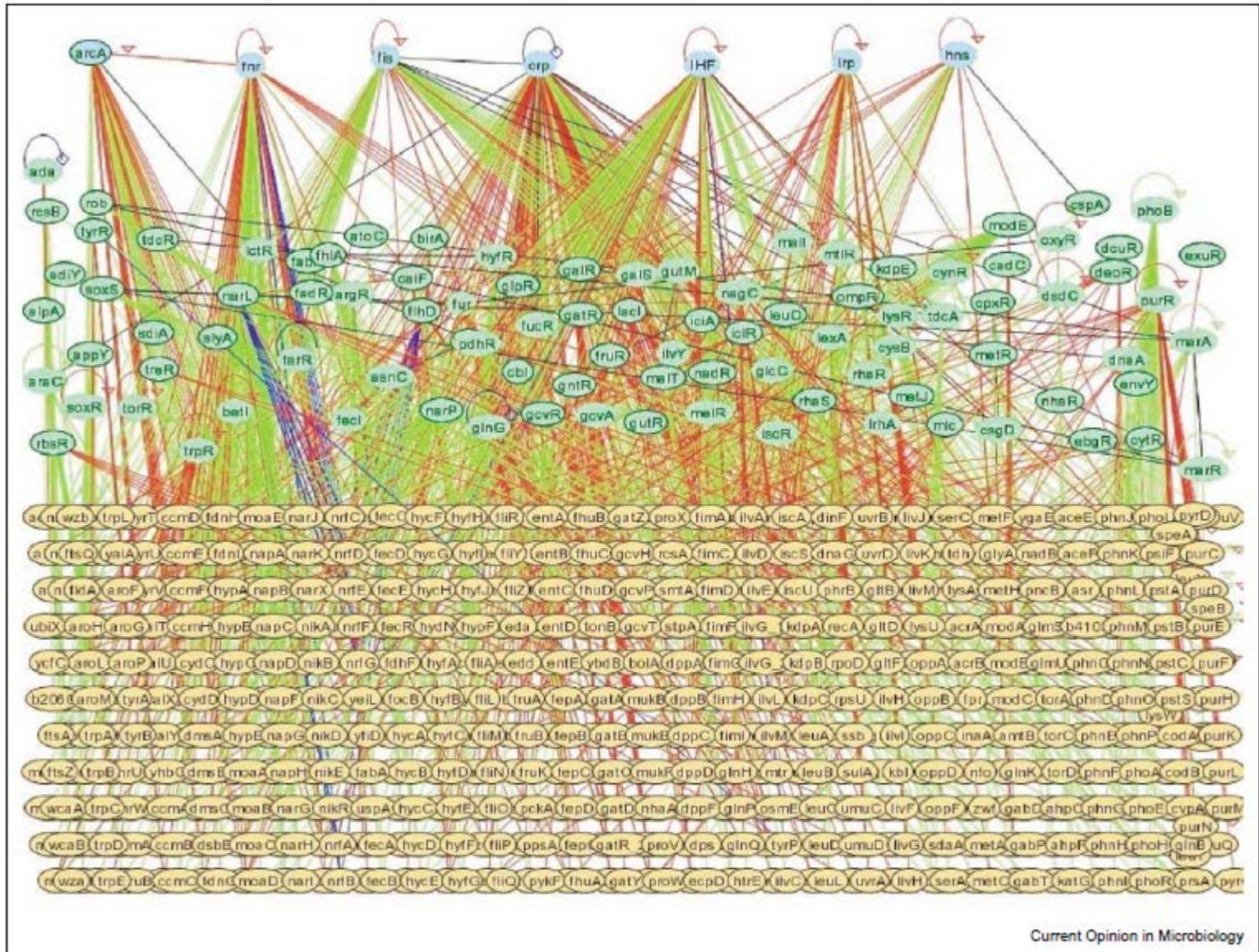
Fatores Globais de Transcrição

BOX 2 | **CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL and Lrp**

These are the seven *Escherichia coli* transcription factors that control most of the regulated genes. Like many *E. coli* proteins, their three-letter names derive from acronyms that describe their function. The fourth letter, which is present in some names, denotes a particular gene product amongst several that are involved in the same function. So, CRP is the cyclic AMP receptor protein, a gene regulatory protein that is activated by cyclic AMP. Confusingly, CRP is often also referred to as CAP, the catabolite gene activator protein, which is named after its role in catabolite repression. FNR was named as the factor necessary for induction of fumarate reductase and nitrite reductase, but it is now known to regulate many more genes in response to oxygen starvation. IHF and Fis denote integration host factor and factor for inversion stimulation, respectively. These names refer to functions that are used by certain bacteriophages during infection of *E. coli*, but it is now known that these factors have extensive roles in non-infected cells. Arc and Nar denote anaerobic respiratory control and nitrate regulation, respectively, and ArcA and NarL are the products of particular genes that are involved in each process. Lrp denotes the leucine regulatory protein, which is a little understood regulatory factor that has different roles at many promoters.

Metade dos genes de *E. coli* são regulados por 7 Fatores de Transcrição Globais

CRP
IHF
FIS
FNR
ArcA
Lrp
Hns



Current Opinion in Microbiology

Overview of the transcriptional regulatory network in *E. coli*. Regulated genes are shown as yellow ovals, TFs are shown as green ovals and TFs considered to be global regulators are shown as blue ovals. The green lines indicate activation, red lines indicate repression and dark blue lines indicate dual regulation (activation and repression).

REDE REGULATÓRIA DE TRANSCRIÇÃO EM *E. COLI*

Table 1

Summary of transcriptional interactions of major TFs, in the transcriptional regulatory network of *E. coli*.

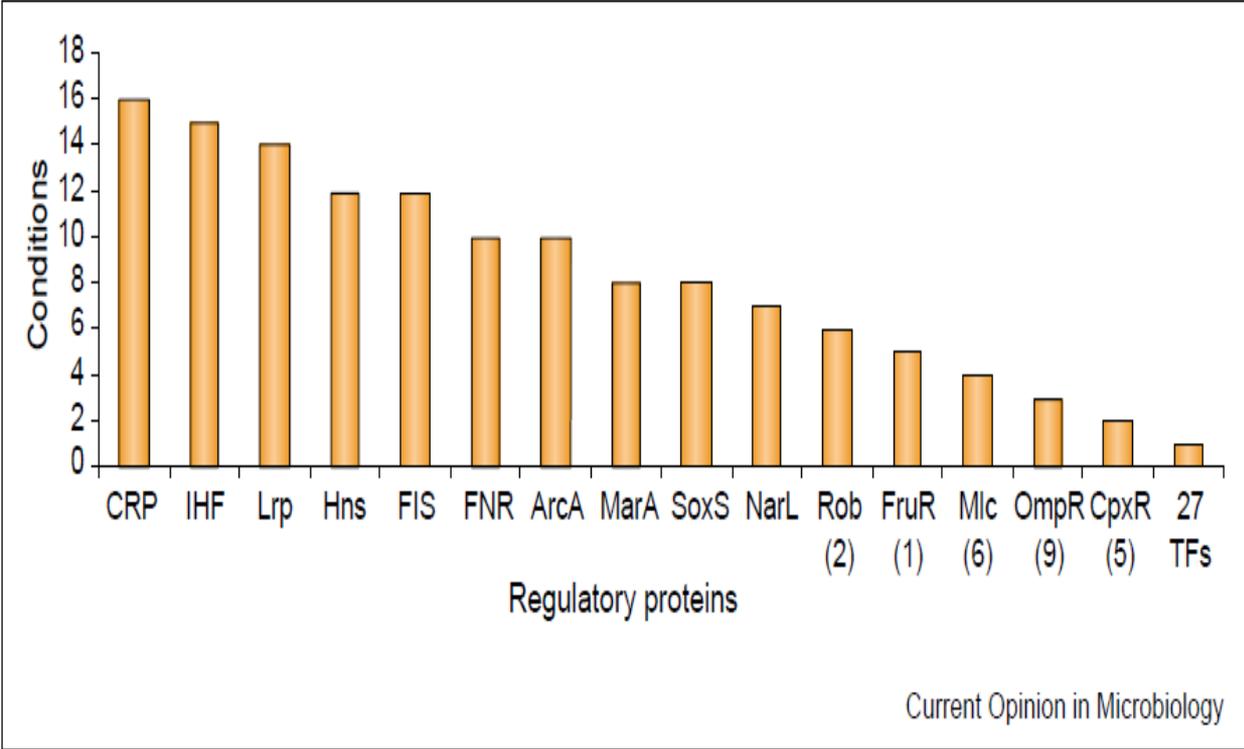
Transcription factor	Genes regulated*	Co-regulators [†]	TFs regulated [‡]	Sigma factors [§]	Functional classes of genes regulated [#]	Family (members) [¶]
CRP	197	47	22	$\sigma^{70,38,32,24}$	48	CRP (2)
IHF	101	28	9	$\sigma^{70,54,38}$	26	HI-HNS (2)
FNR	111	20	5	$\sigma^{70,54,38}$	22	CRP (2)
FIS	76	15	4	$\sigma^{70,38,32}$	20	EBP (14)
ArcA	63	18	2	$\sigma^{70,38}$	17	OmpR (14)
Lrp	53	14	3	$\sigma^{70,38}$	15	AsnC (3)
Hns	26	14	5	$\sigma^{70,38,32}$	17	Histone-like (1)
NarL ^v	65	10	1	$\sigma^{70,38}$	14	LuxR/UhpA (17)
OmpR	10	9	3	$\sigma^{70,38}$	5	OmpR (14)
Fur ^v	26	8	2	$\sigma^{70,19}$	9	Fur (2)
PhoB	26	1	3	σ^{70}	9	OmpR (14)
CpxR	9	2	1	$\sigma^{70,38,24}$	5	OmpR (14)
SoxRS	9	10	3	$\sigma^{70,38}$	10	AraC/XylIS (24)
Mlc ^v	5	3	1	$\sigma^{0,32}$	3	NagC/XylR (7)
CspA ^v	2	2	1	σ^{70}	2	Cold (9)
Rob ^{**}	7	8	2	$\sigma^{70,38}$	6	AraC/XylIS (27)
PurR ^{**}	28	7	1	σ^{70}	10	GalR/LacI (13)

*Total number of genes regulated directly. [†]Number of different TFs with which at least a gene or TU is jointly co-regulated. [‡]Number of regulated genes that codify for TFs. [§]List of σ factors of the regulated promoters. [#]Number of functional classes of the gene products regulated [44].

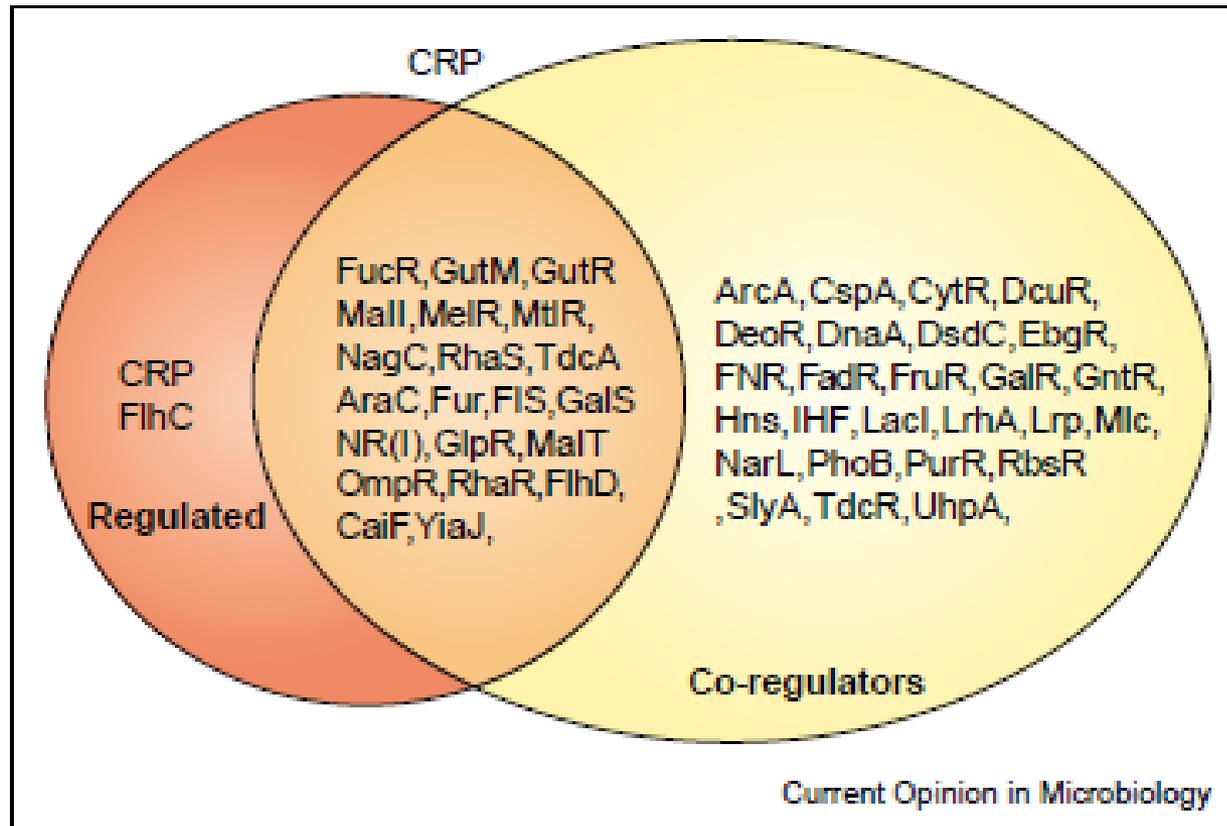
[¶]TF family and in parenthesis the number of members of the family. In addition to the seven global TFs considered here there are TFs suggested by

^vBabu and Teichmann, 2003, [42^{**}] and ^{**}Shen-Orr *et al.*, 2002, [50^{**}].

Condições de crescimento e do meio ambiente nas quais ativadores de transcrição (TFs) atuam

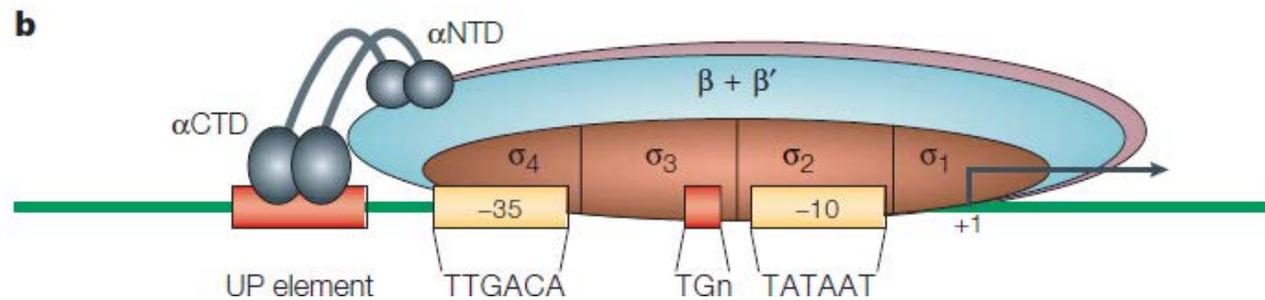
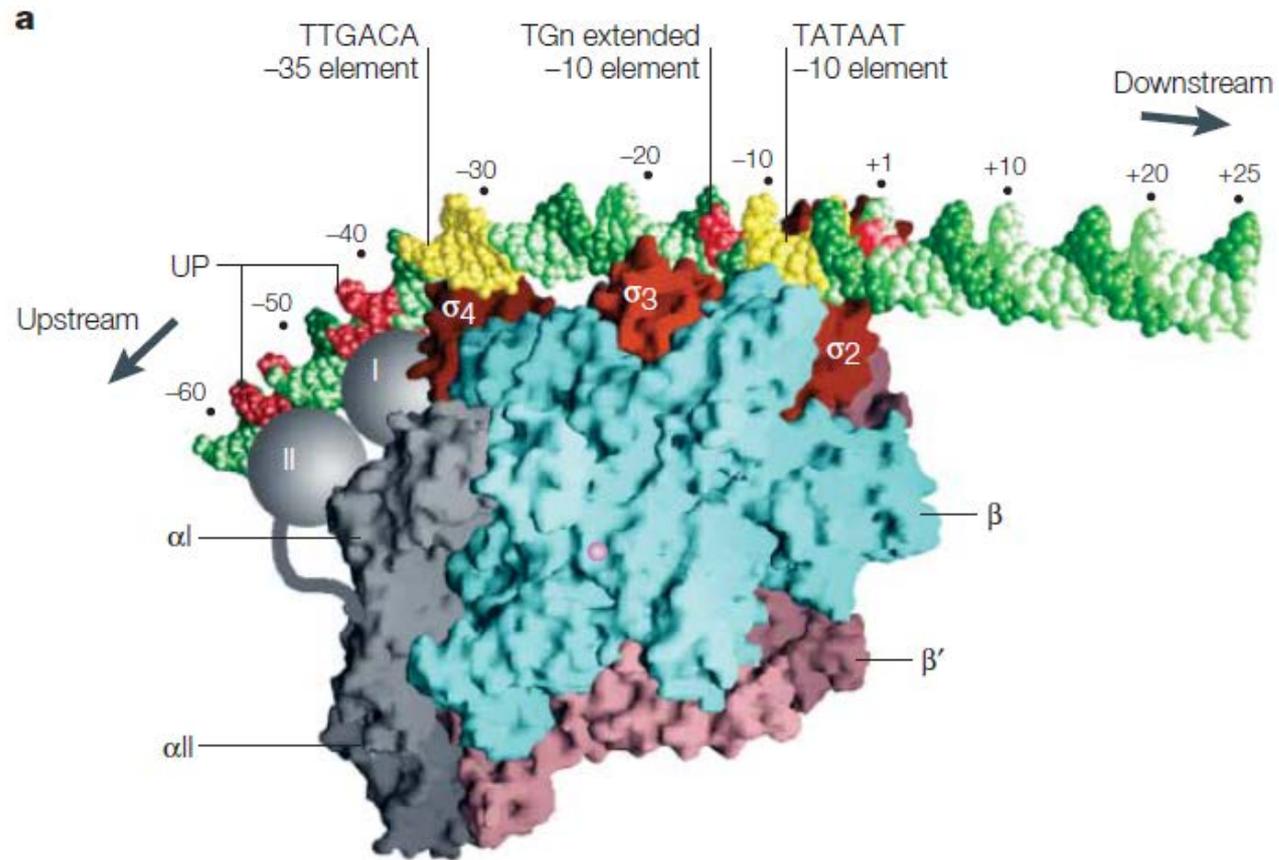


Global environment growth conditions in which TFs are regulating. To see the detailed list of conditions see RegulonDB page: http://www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb/SupMat/conditions. Numbers in brackets indicate how many additional TFs participate in the same number of conditions.

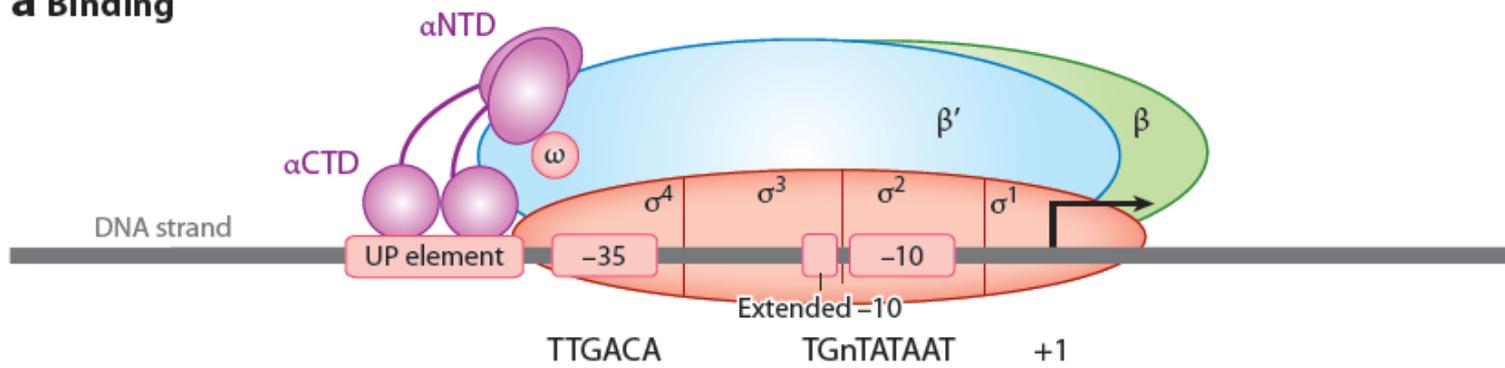


Regulated genes and co-regulators of CRP. The intersection contains those TFs that are directly regulated by CRP and which work as co-regulators with CRP.

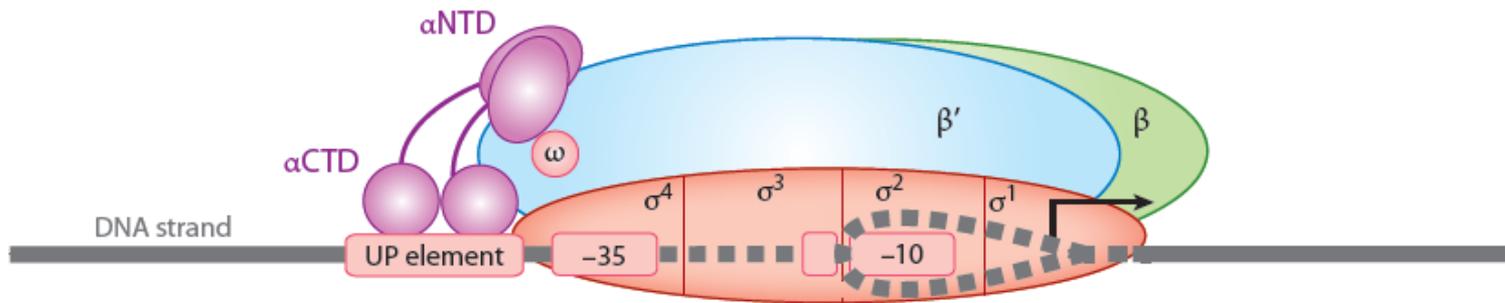
Ligação da RNA polimerase ao promotor



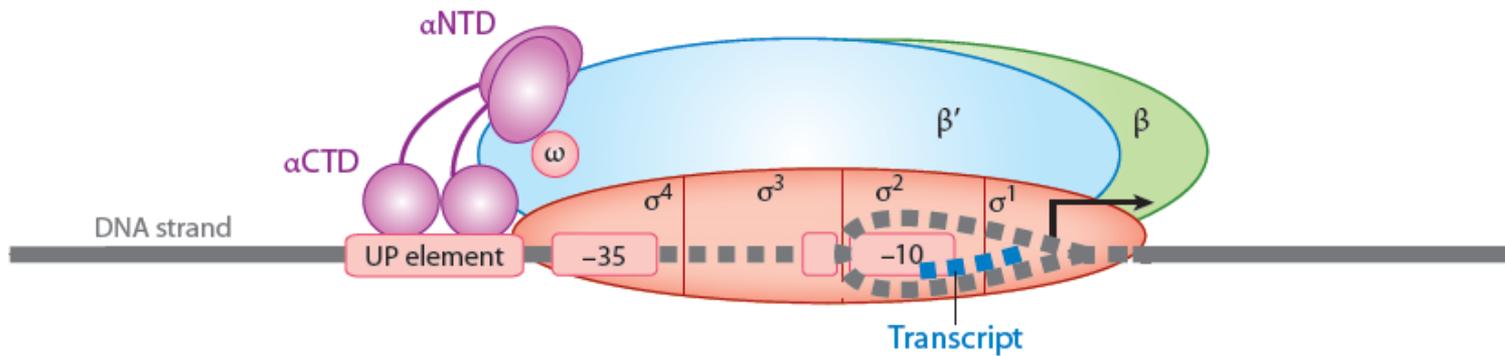
a Binding



b Isomerization



c Transcript formation



ATIVACÃO POR CRP (cAMP RECEPTOR PROTEIN)

CRP + cAMP

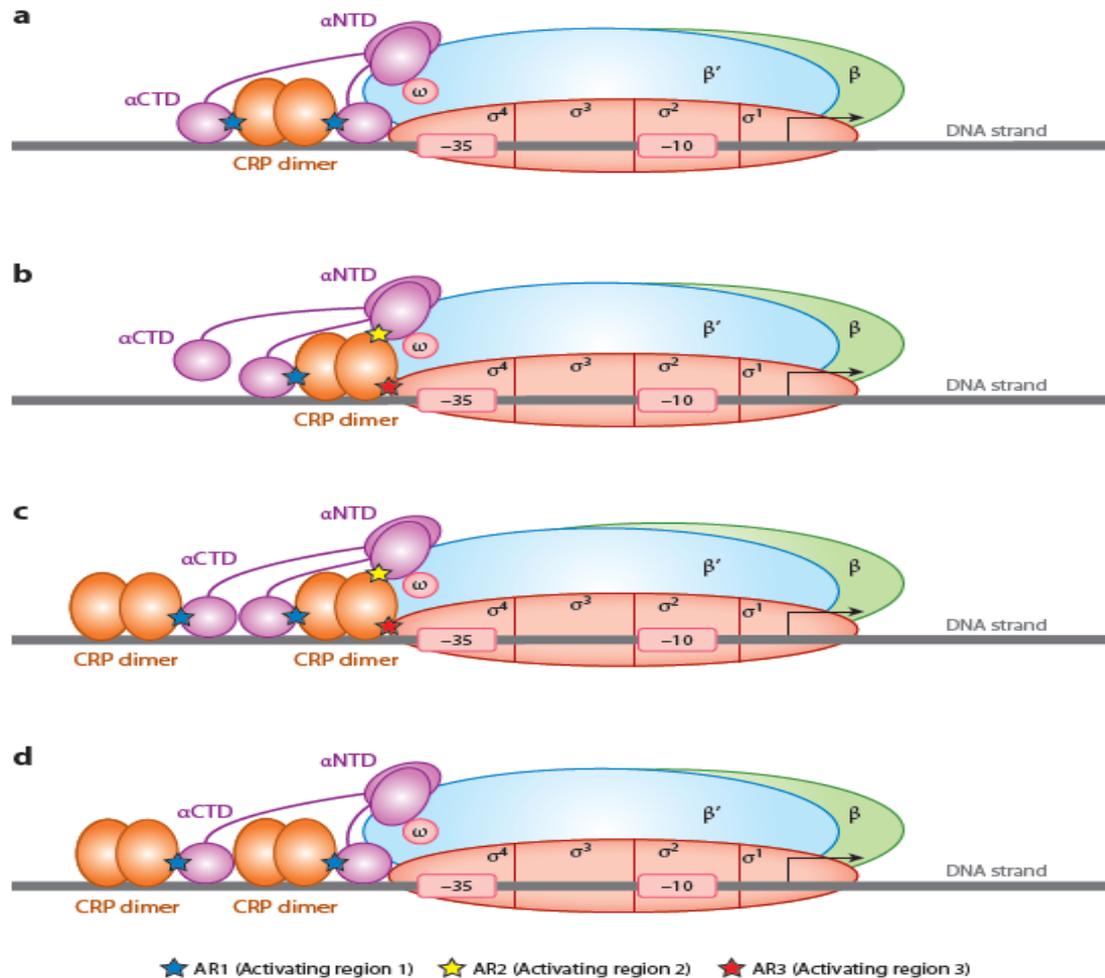
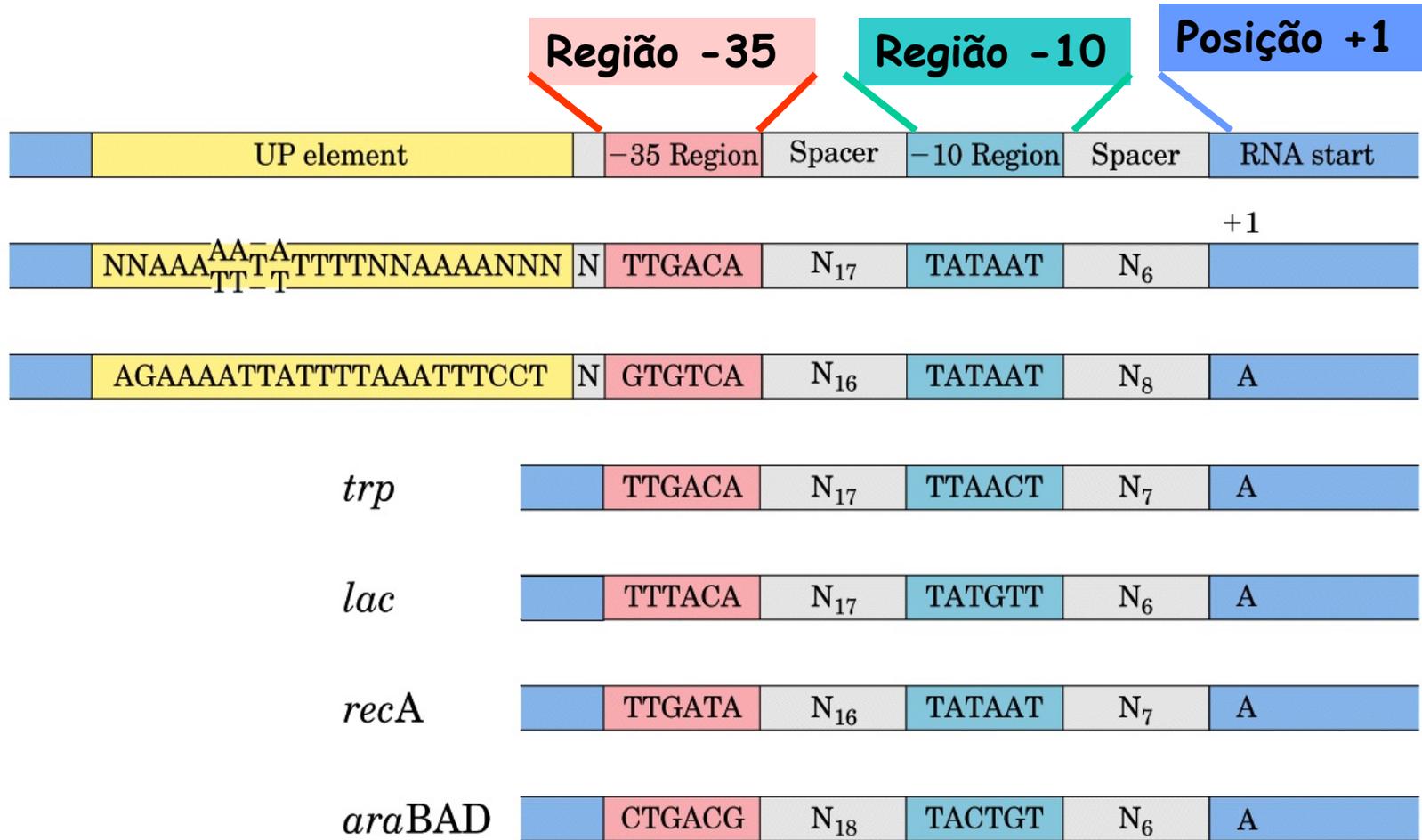


Figure 4

Activation of transcription by the cyclic AMP receptor protein (CRP). (a) The CRP dimer binds upstream of RNA polymerase and contacts one or both α subunit C-terminal domains (CTD) via AR1 (activating region 1) (blue star). (b) CRP binds adjacent to RNA polymerase and interacts with different polymerase subunits: AR1 interacts with α CTD, AR2 interacts with an α subunit N-terminal domain (NTD), and AR3 interacts with σ^4 . (c) Activation by tandem-bound CRP dimers where the downstream CRP is in a Class II position (as in panel b). (d) Activation by tandem-bound CRP dimers where the downstream CRP is in a Class I position (as in panel a).

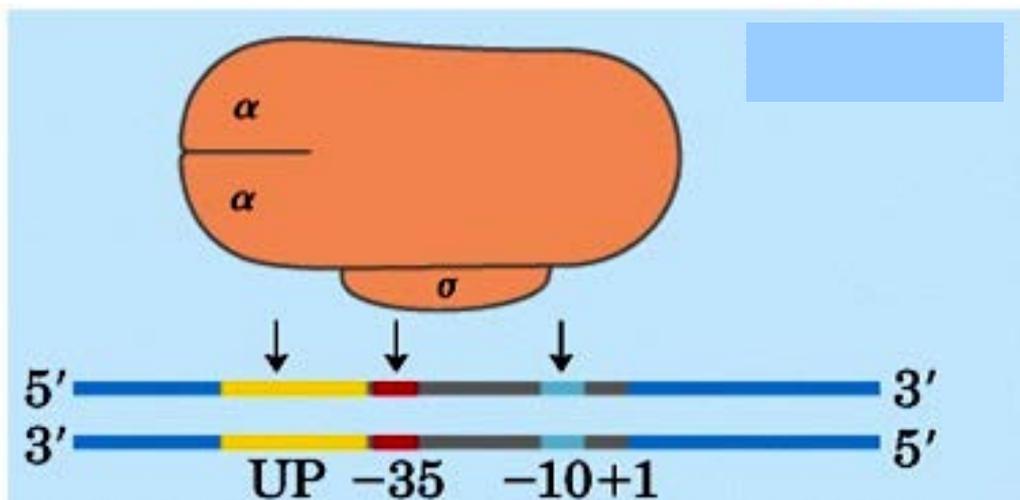
Promotores do tipo Sigma70 de genes de *E. coli*



O fator sigma 70 é o sigma principal sendo responsável pela transcrição da maioria dos genes cujas funções estão associadas aos processos fisiológicos essenciais da bactéria!

Substituição do fator sigma (σ) da RNA pol controla a iniciação:

Os distintos fatores sigma reconhecem promotores diferentes



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>		stationary phase			

Troca do fator sigma na holoenzima causa mudanças no padrão de expressão gênica na bactéria

Genótipos e atividades enzimáticas para o Operon lac de E. coli

Genótipo	atividade β -galactosidase*	
	induzido	não induzido
(a) i^+z^+	100	<0.1
i^+z^-	0.0	0.0
i^-z^+	100	100
$i^+z^+/F' i^-z^+$	240	<1.0
$i^-z^+/F' i^+z^+$	280	<1.0
(b) $i^s z^+$	<1.0	<0.1
$i^s z^+/F' i^+z^+$	<1.0	<0.1
(c) $o^c z^+$	95	75
$o^+ z^+/F' o^c z^+$	220	70
$o^+ z^+/F' o^c z^-$	90	<0.1
$i^s o^+ z^+/F' i^+ o^c z^+$	310	100

*Os valores são relativos a i^+z^+ induzido.

i^- e $o^- (o^c) \rightarrow$ expressões constitutivas de β -galactosidase

i^- (recessiva)

i^s e o^c (dominantes)

Ativação da transcrição no promotor dependente do fator sigma 54

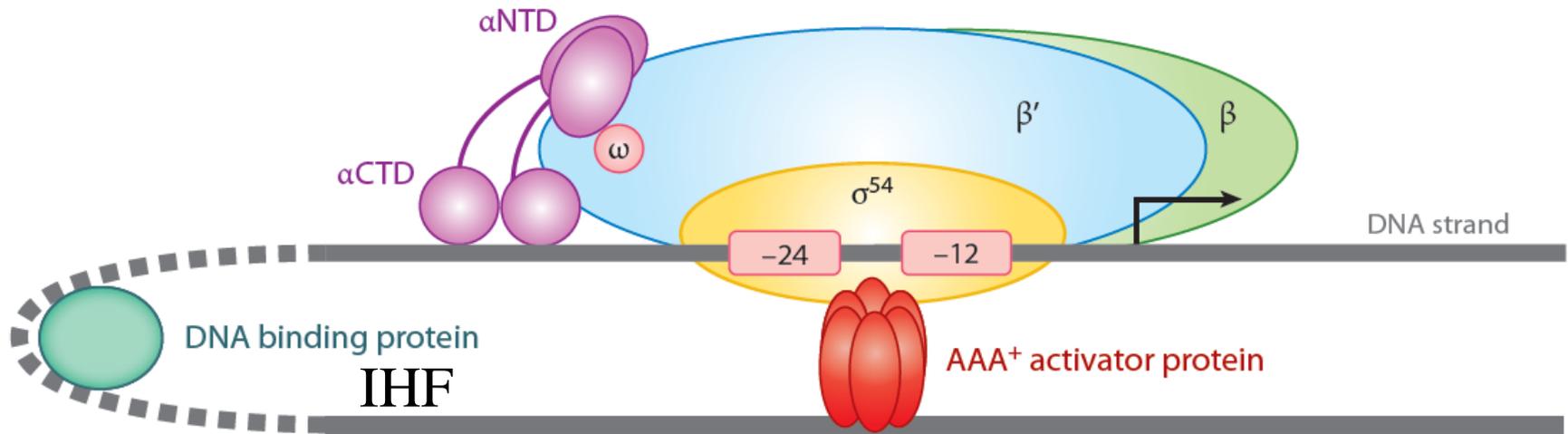


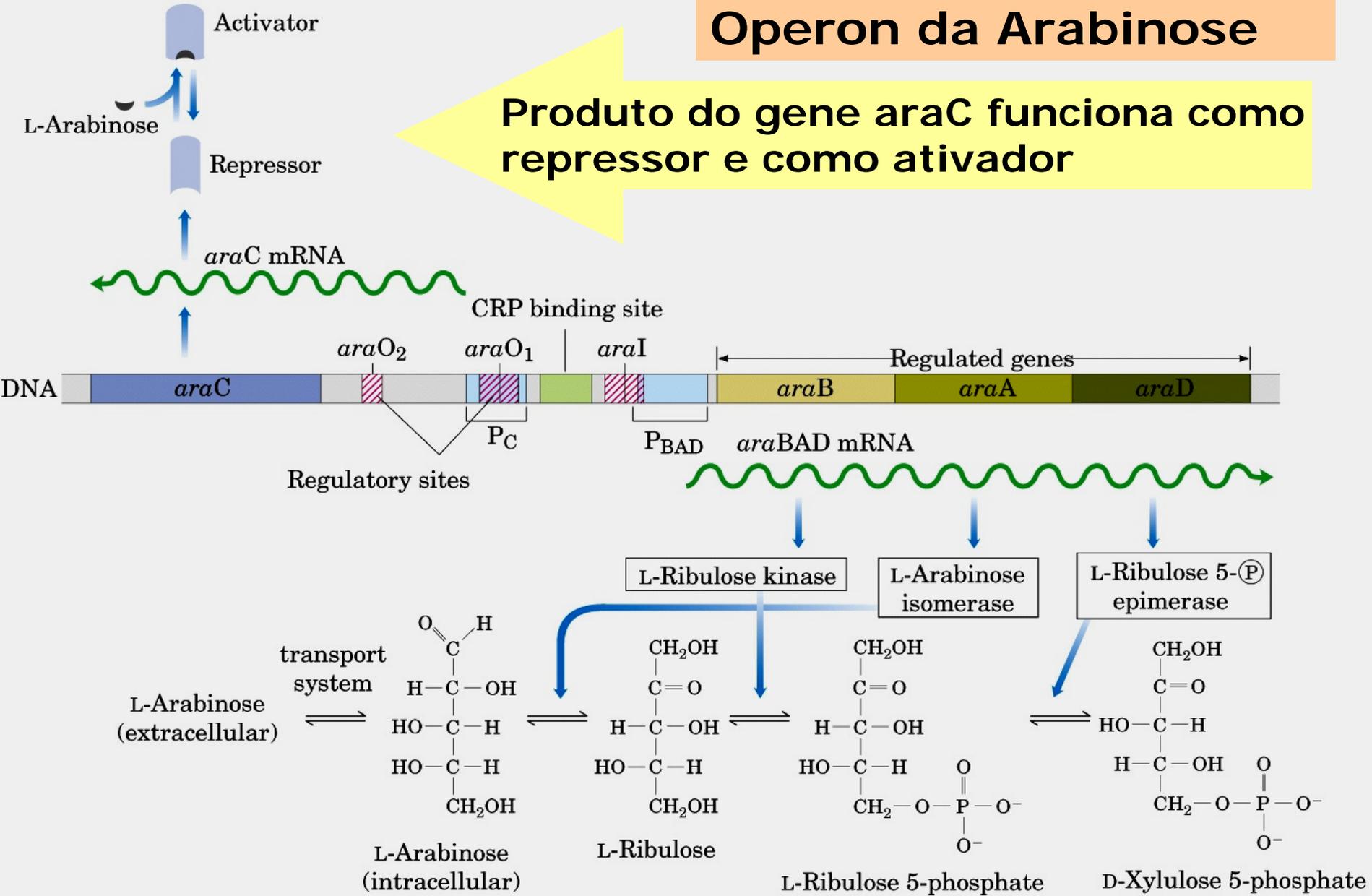
Figure 5

Transcription activation at a σ^{54} -dependent promoter. RNA polymerase containing σ^{54} binds to the -12 and -24 promoter elements. Interaction with the AAA⁺ activator protein is often facilitated by DNA looping caused by a DNA-bending protein. Abbreviations: CTD, C-terminal domain; NTD, N-terminal domain.

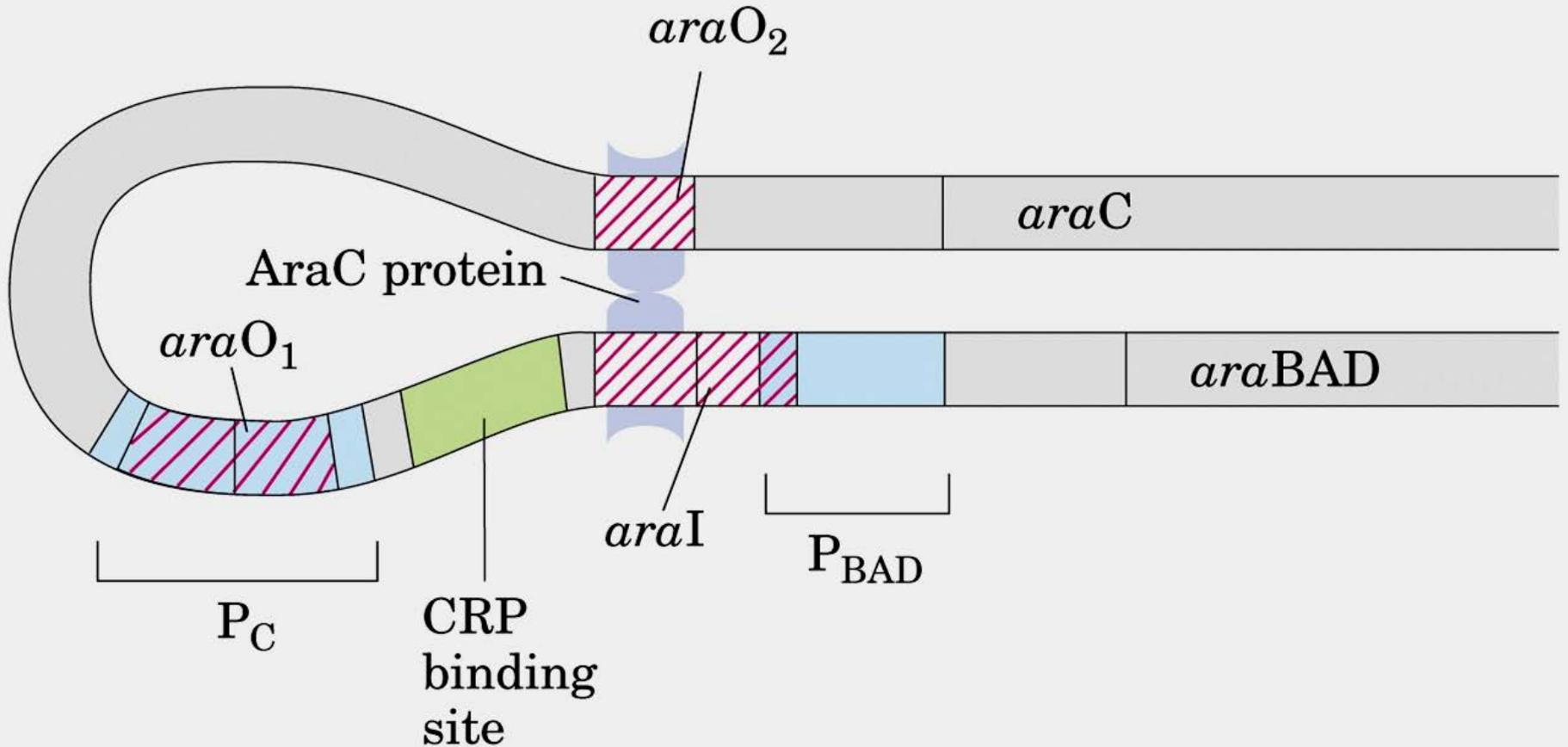
Ativador hidrolisa ATP para provocar mudanças de conformação na RNAP e formar o complexo aberto e iniciar a transcrição

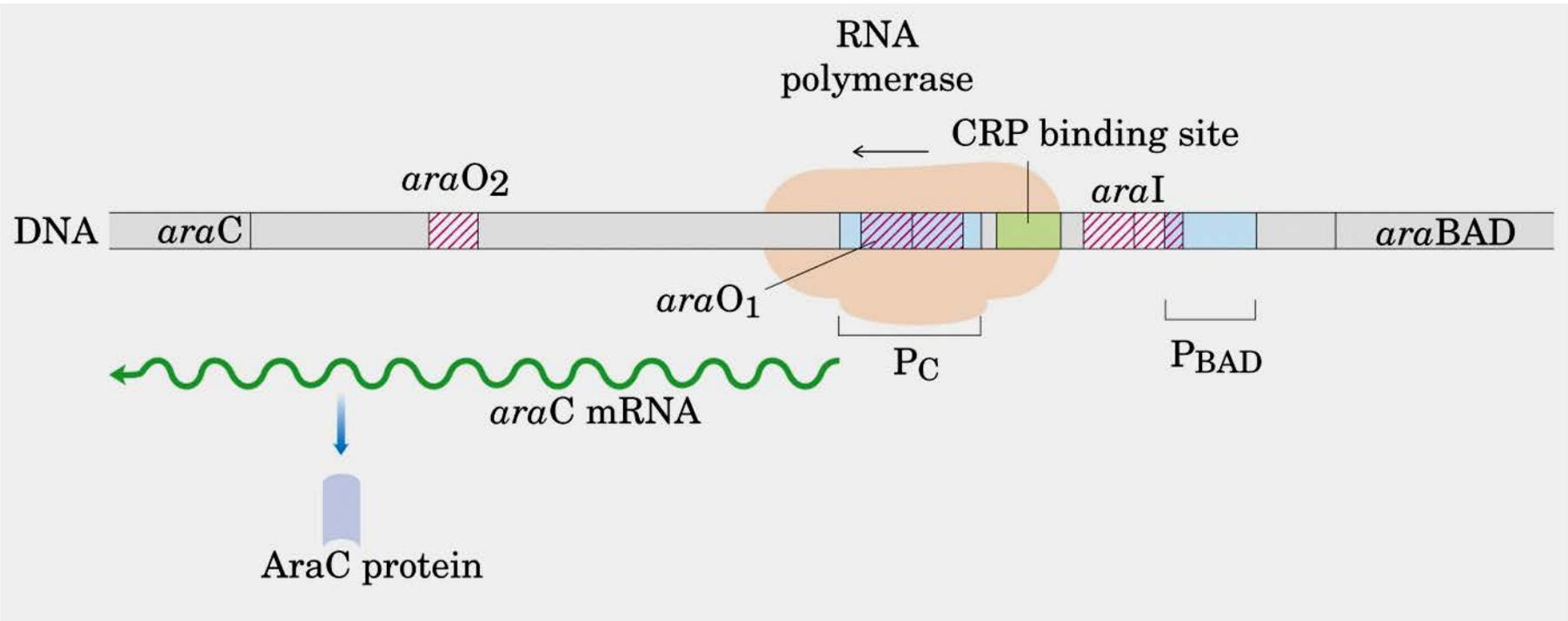
Operon da Arabinose

Produto do gene *araC* funciona como repressor e como ativador



-AraC ligada a $araO_2$ e $araI$, aproxima estas regiões e o operon é reprimido

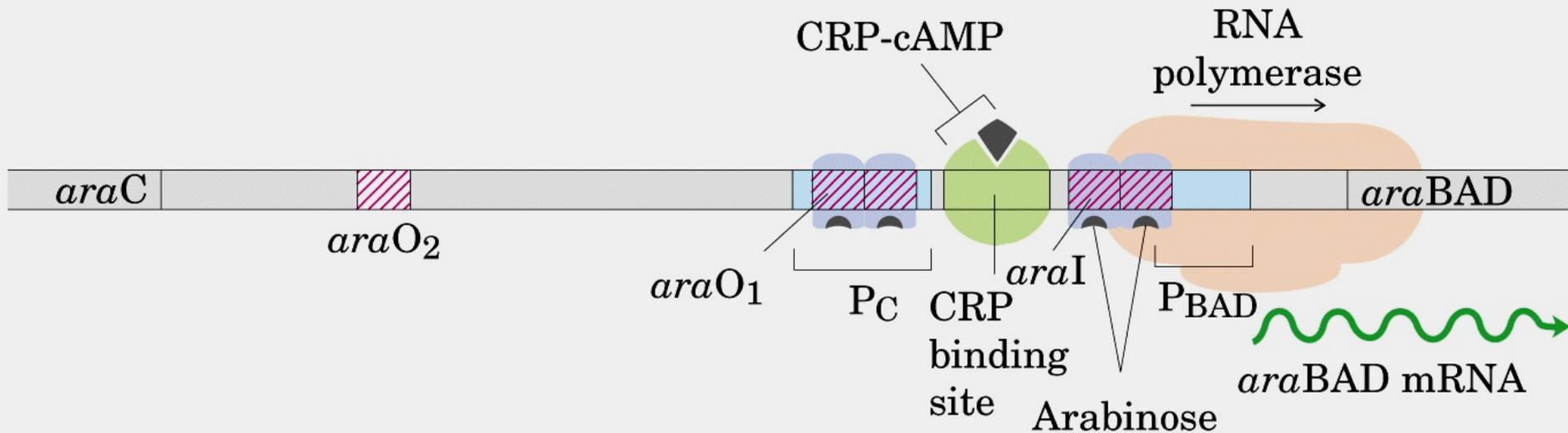




-Quando níveis de AraC diminuem, o gene *araC* é transcrito a partir de seu promotor *P_C*. Se Ara C aumentar, ela mesma bloqueia a transcrição de seu gene ligando-se a *araO₁*

- Se os níveis de glicose forem altos e de arabinose forem baixos, AraC irá ligar-se aos operadores *araO₂* e *araI*.....

-Quando arabinose está presente e a concentração de glicose é baixa, AraC liga arabinose, muda sua conformação e torna-se um ativador, que se liga a $araO_1$ e $araI$ (a alça de DNA é aberta). Em conjunto com CRP+cAMP, as moléculas de AraC ativam a transcrição dos genes $araBAD$



(c)

