

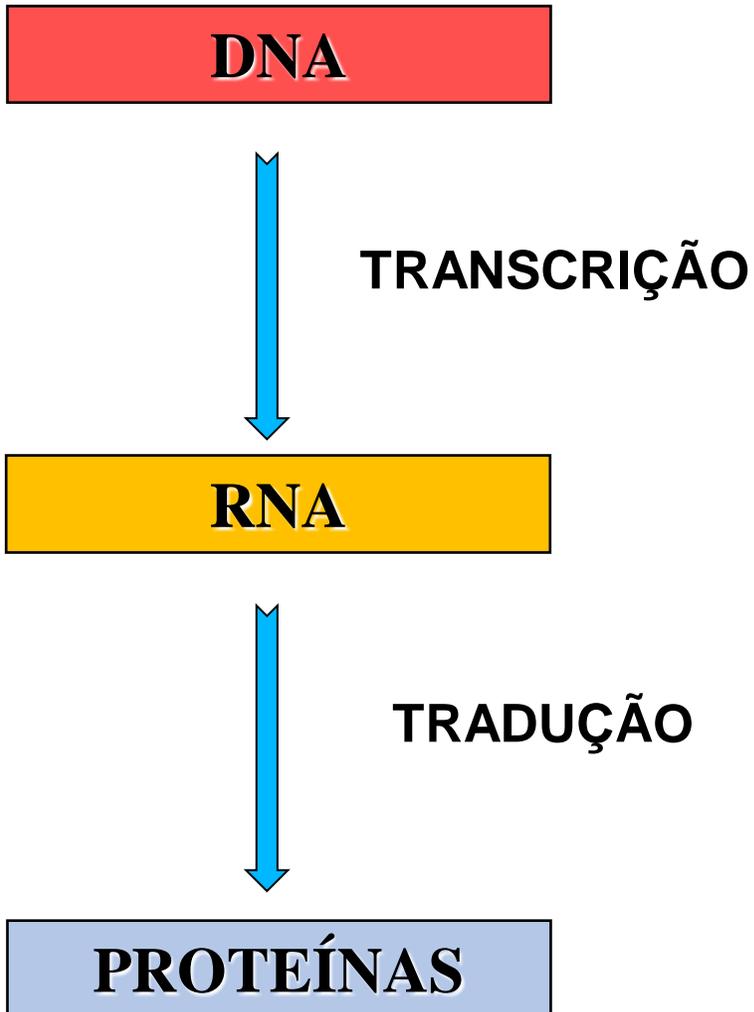
BIOLOGIA MOLECULAR

ACH5564-2022

**AULA_5- REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA BACTÉRIA**

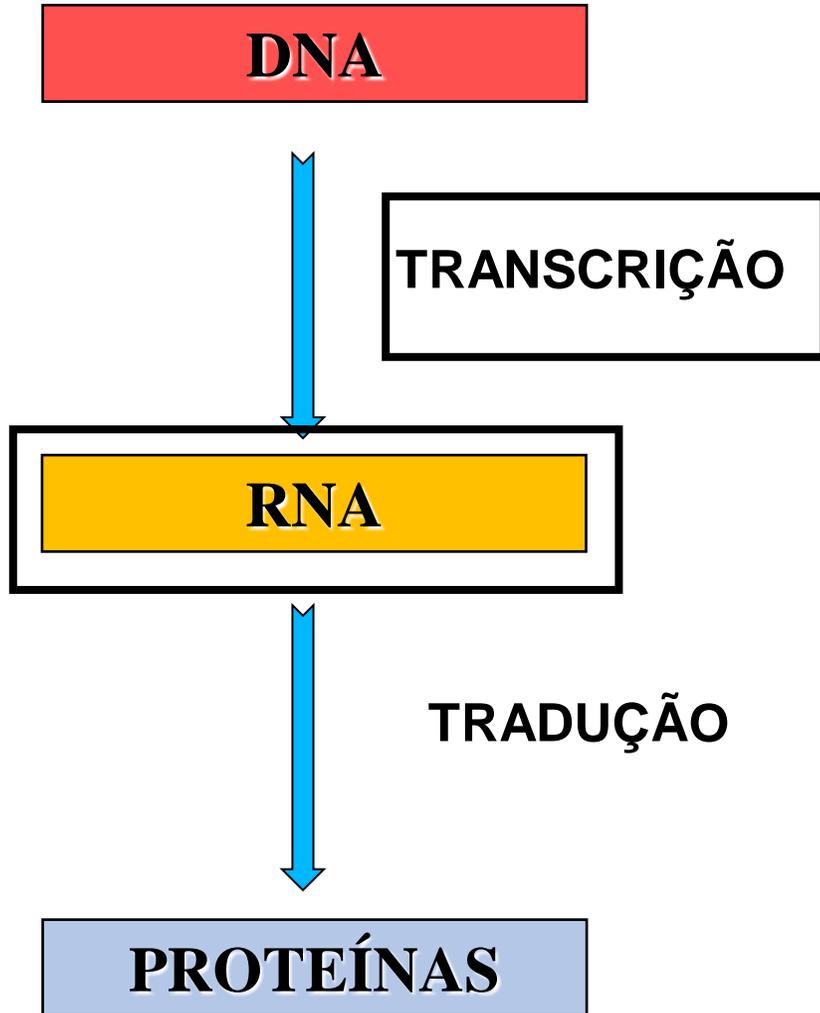
Prof. Luiz Paulo Andrioli

REGULAÇÃO GÊNICA



- A expressão gênica é normalmente realizada em duas etapas;
- Então, a **regulação/ controle/ modulação da expressão gênica** pode acontecer a qualquer momento dessas etapas;
- Nos eucariotos, com maior complexidade e mais mecanismos celulares, existem maiores oportunidades de regulação, e de fato;
- Os eucariotos utilizam mais estratégias diferentes para regular a expressão gênica;

REGULAÇÃO GÊNICA



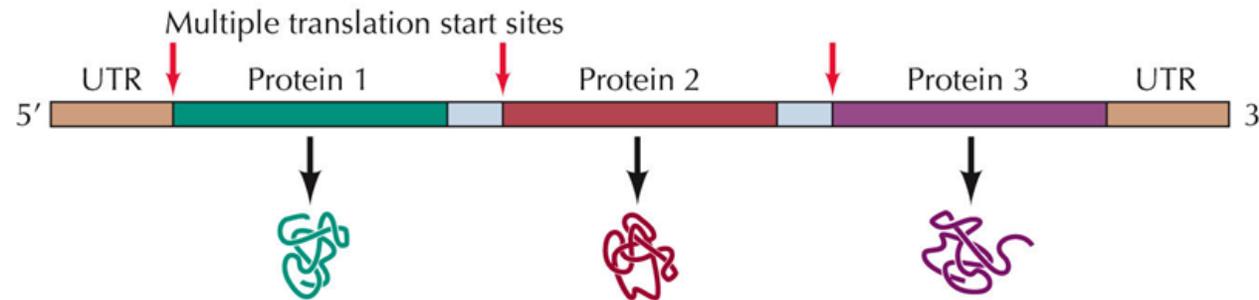
- No entanto, o controle do início da transcrição, por ser a primeira etapa da expressão gênica;
- É normalmente a etapa principal na regulação da expressão dos genes;
- Tanto em bactérias quanto em eucariotos;
- Mas a regulação no início da transcrição ganha uma importância ainda maior no caso das bactérias (com menos mecanismos moduladores da expressão gênica).

REGULAÇÃO GÊNICA BACTÉRIAS

- Geração de proteínas não utilizáveis é um gasto energético desnecessário e uma condição altamente desvantajosa para “o estilo de vida” das bactérias;
- Por outro lado, as bactérias estão sujeitas a flutuações diversas nas condições ambientais, muitas vezes alteradas de forma drástica e repentina;
- Por exemplo, flutuações de temperatura, presença de predadores ou competidores ou da fonte de nutrientes;
- Então, a célula necessita se ajustar rapidamente a essas alterações no ambiente;
- O que implica alterar o perfil de proteínas celulares;
- Conseguindo principalmente por meio de alterações imediatas na transcrição de genes;
- Ativando a expressão de alguns genes e reprimindo a expressão de outros até então ativos.
- **Em bactérias, um dos mecanismos mais recorrentes de regulação no início da transcrição envolve a região promotora.**

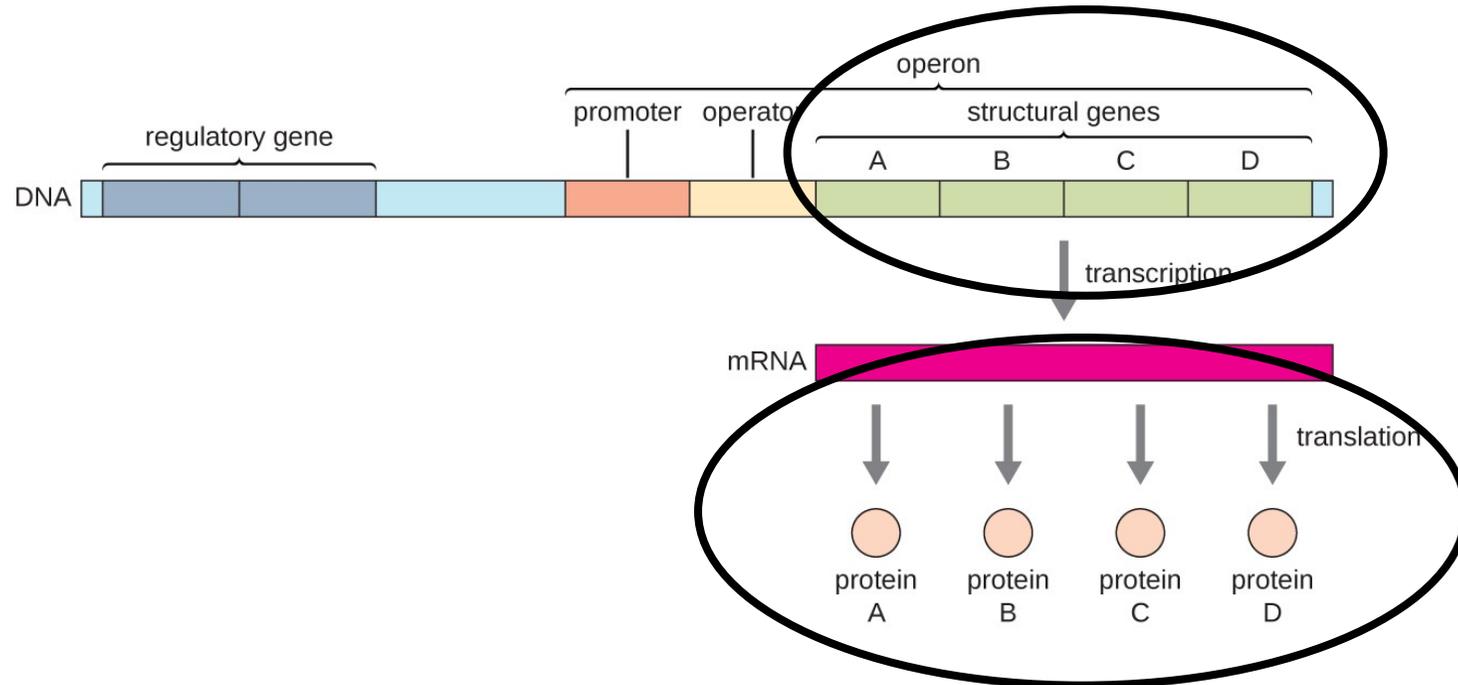
REGULAÇÃO GÊNICA BACTÉRIAS

- Uma evidência da efetividade das bactérias: **genes policistrônicos**;
- Genes policistrônicos: genes situados lado a lado no cromossomo que são transcritos simultaneamente a partir de um promotor comum;
- Gerando uma molécula única de RNAm contendo todos transcritos ligados entre si, imediatamente traduzidos em polipeptídeos individualizados;



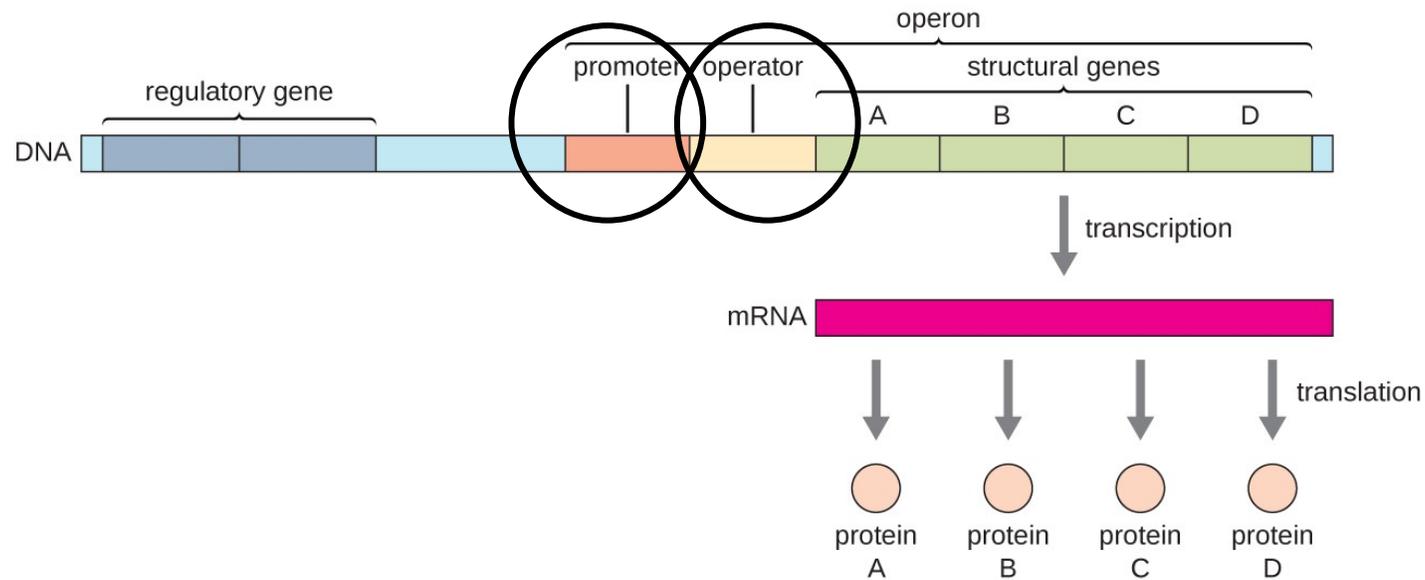
- Essa organização estrutural e funcional reflete a atuação integrada de proteínas participando de um processo celular comum;
- Essa organização estrutural e funcional é recorrente nas bactérias e denominada **operon**;
- Não raro, a resposta celular deve integrar diferentes operons para uma ação coordenada global, gerando um **regulon**.

ESTRUTURA DO OPERON



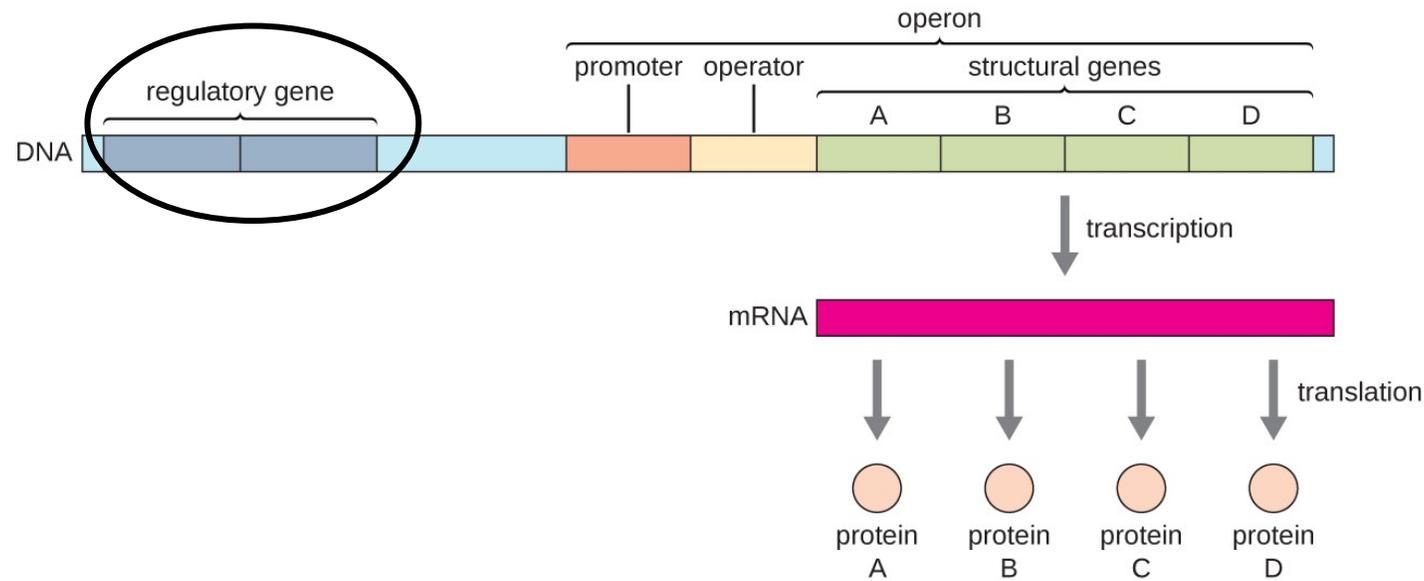
- Os genes policistrônicos que fazem parte do operon são **genes estruturais**;
- Genes estruturais: genes cujos produtos, RNAs ou proteínas, atuam para a diversidade de funções celulares, desde papel estrutural até enzimático.

ESTRUTURA DO OPERON



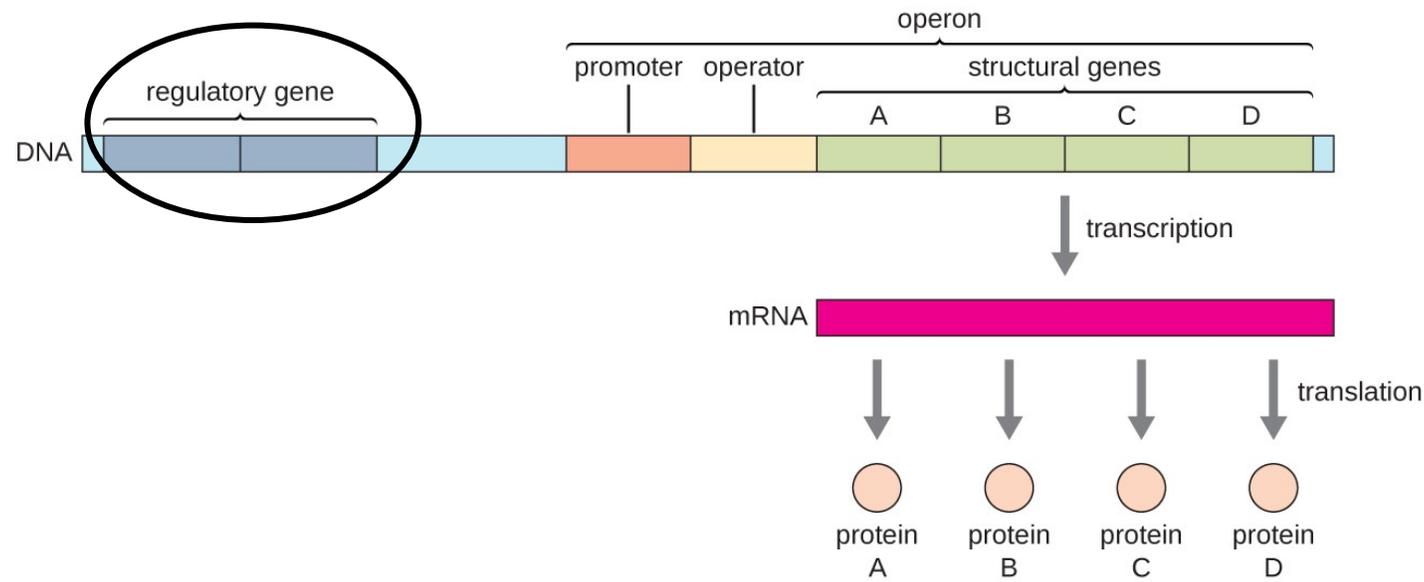
- Os genes estruturais estão agrupados e sujeitos a transcrição simultânea e coordenada a partir de um único promotor;
- O promotor pode se sobrepor parcialmente, ou estar próximo e as vezes até mesmo distante da região operadora (**operador**);
- O operador interage com uma **proteína reguladora (fator de transcrição)**, que atua positivamente ou negativamente para a transcrição.

ESTRUTURA DO OPERON



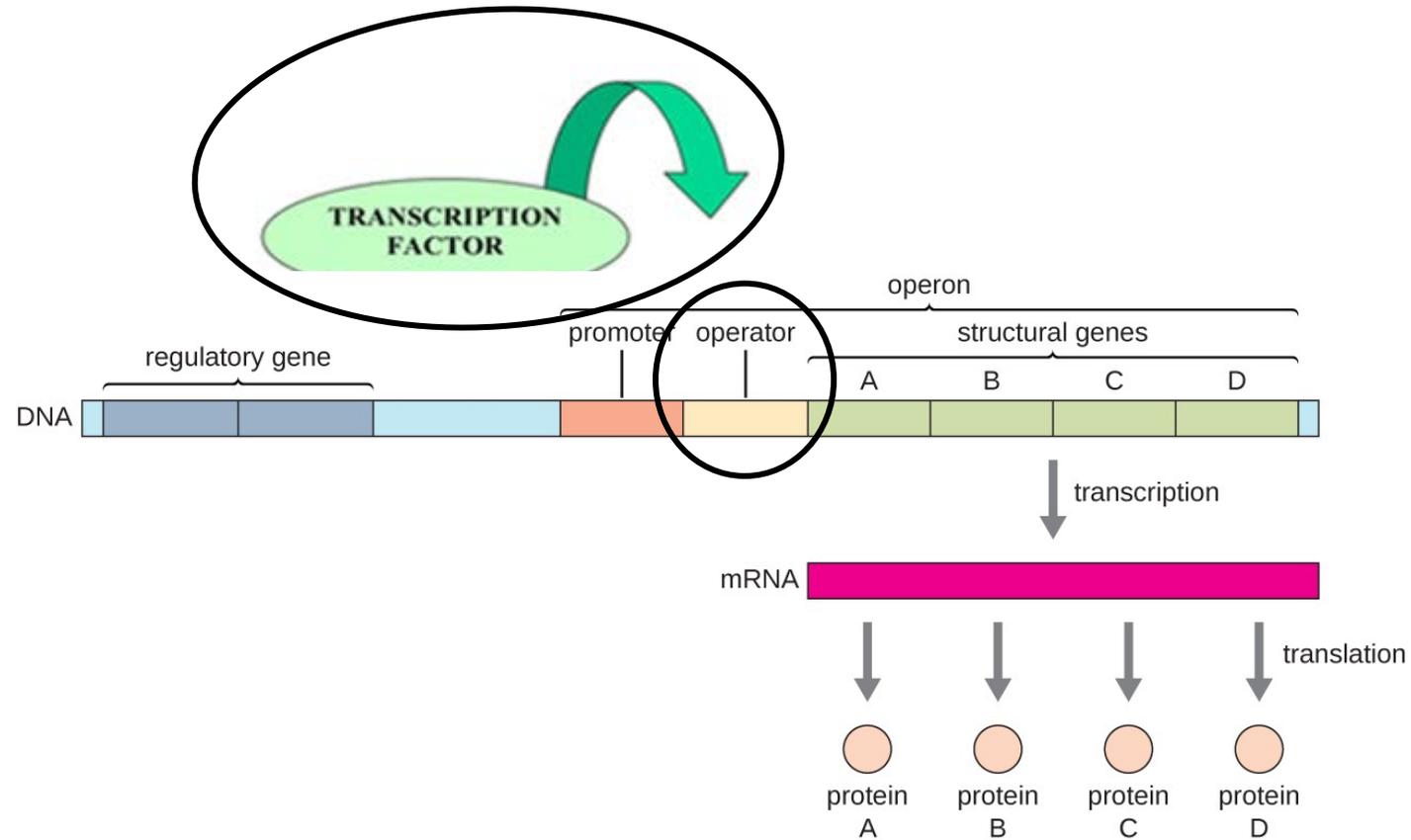
- O fator de transcrição é sintetizado pelo **gene regulador**;
- O gene regulador não faz parte do operon, e embora possa estar próximo do operon alvo;
- O gene regulador possui um promotor independente, em geral em uma unidade monocistrônica.

ESTRUTURA DO OPERON



- Diferente dos genes estruturais, **genes reguladores** codificam para produtos, RNAs ou proteínas, cuja função é apenas e tão somente regular a expressão de outros genes;
- Os genes reguladores que atuam nos operons frequentemente codificam para proteínas que são **fatores de transcrição**.

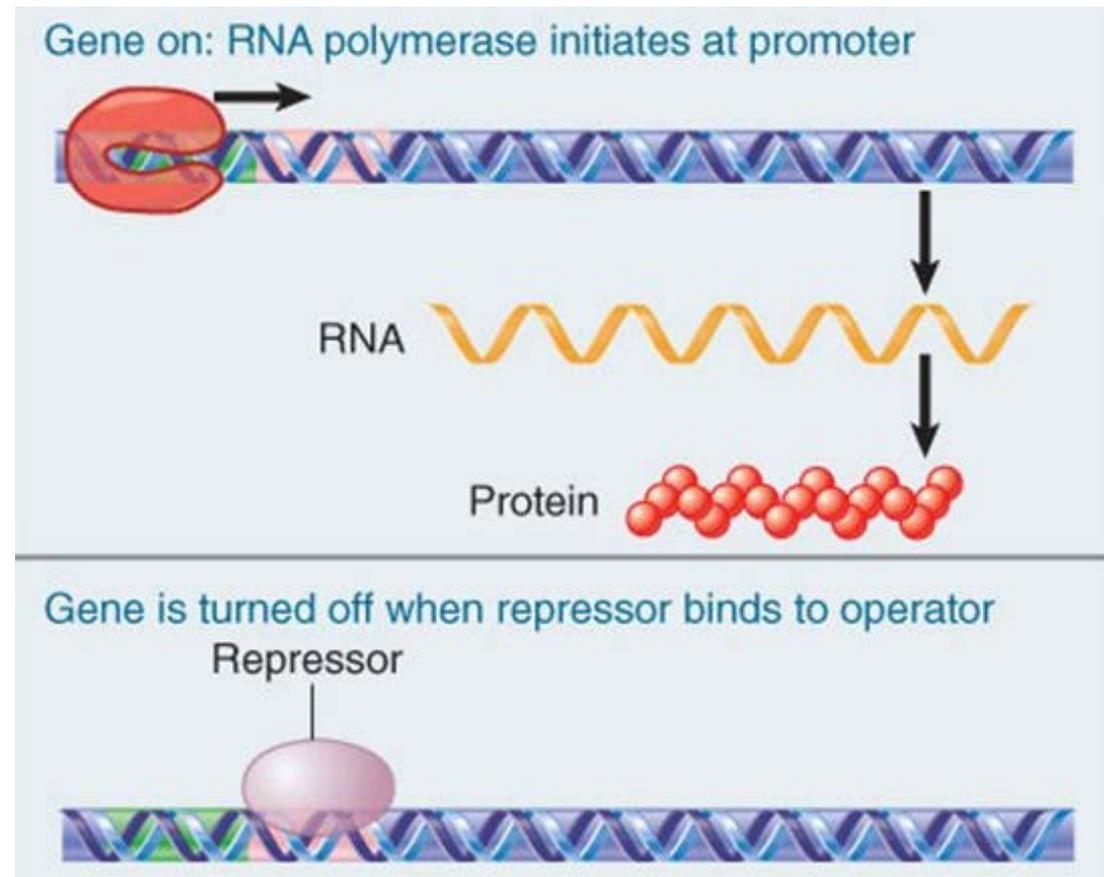
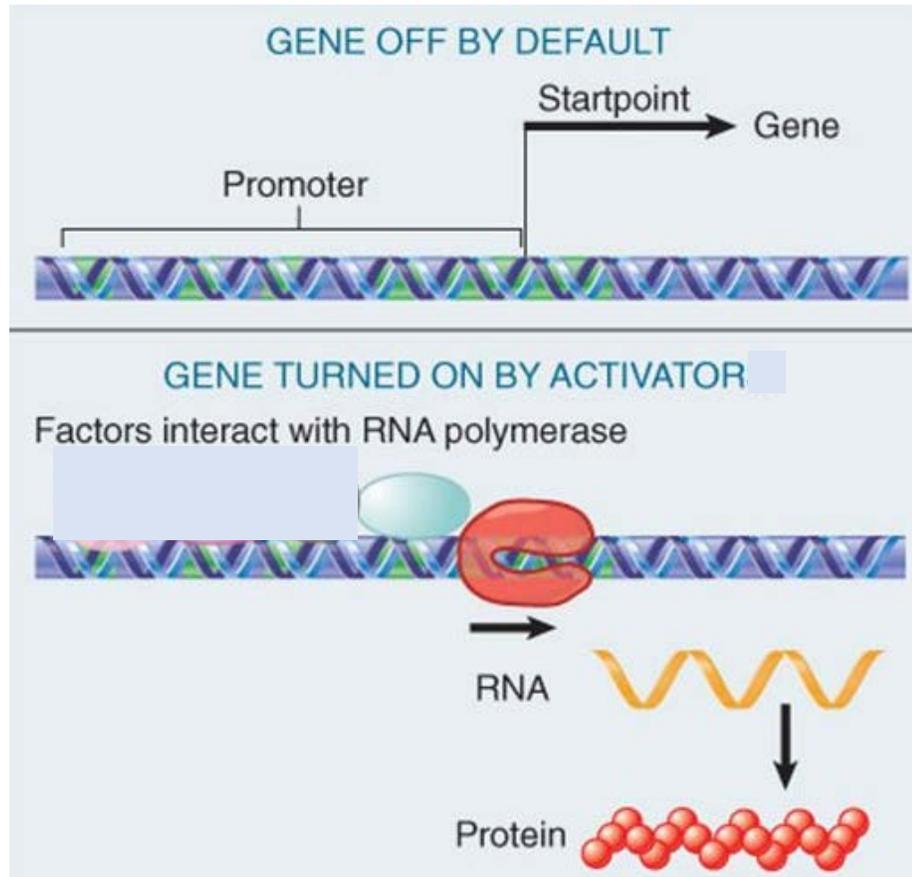
FATOR DE TRANSCRIÇÃO



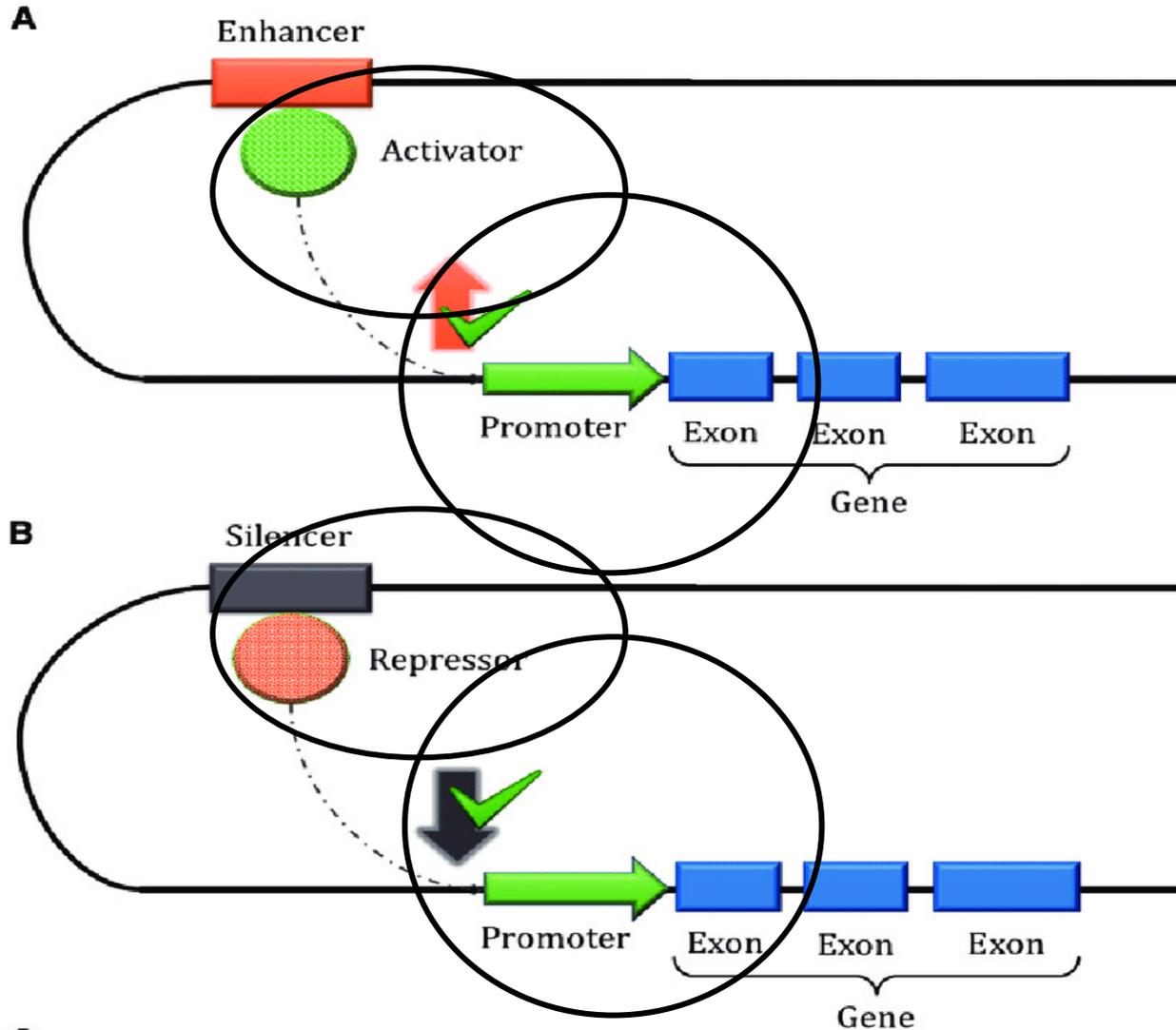
- Nas bactérias, o fator de transcrição codificado pelo gene regulador se liga no **operador** regulando o funcionamento do operon.

FATOR DE TRANSCRIÇÃO

- O fator de transcrição exerce um controle positivo ou negativo no operon;
- Facilitando ou tornando possível a transcrição;
- Ou reprimindo a transcrição.

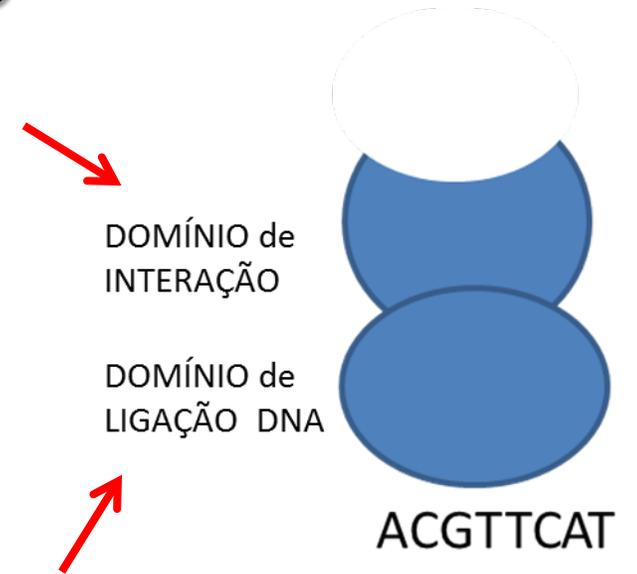
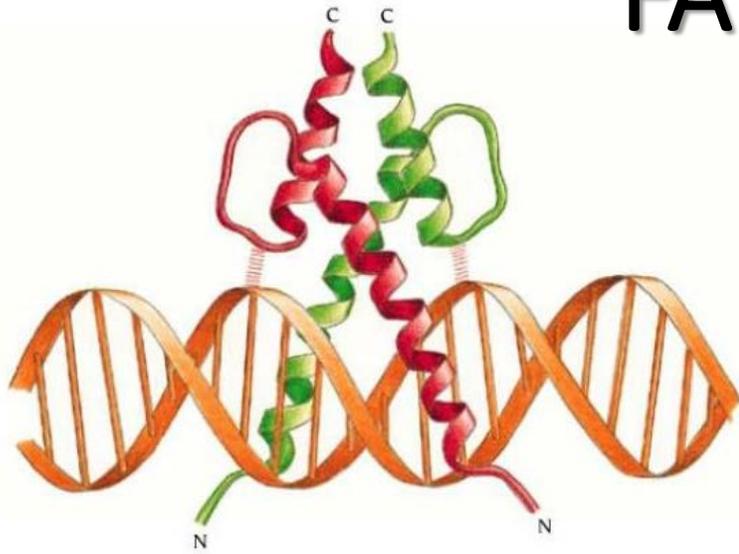


FATOR DE TRANSCRIÇÃO



- Nos eucariotos, os fatores de transcrição também modulam a transcrição de genes;
- Atuando nos *enhancers* (módulos reguladores);
- Modulam o complexo transcricional montado na região promotora.

FATOR DE TRANSCRIÇÃO



- O fator de transcrição interage de forma específica no DNA;
- O fator de transcrição é uma proteína formada por ao menos dois domínios funcionais;
- O **domínio de ligação**, que reconhece e se liga a uma sequência de nucleotídeos no DNA;
- E ao menos um domínio que serve para interagir com outras proteínas, **domínio de interação (domínio efetor)**.

FATOR DE TRANSCRIÇÃO

- Diferentes fatores de transcrição reconhecem diferentes **sítios de ligação** no DNA;

TABLE 7-1 Some Gene Regulatory Proteins and the DNA Sequences That They Recognize

	NAME	DNA SEQUENCE RECOGNIZED*
Bacteria	lac repressor	5' AATTGTGAGCGGATAACAATT 3' TTAACACTCGCCTATTGTTAA
	CAP	TGTGAGTTAGCTCACT ACACTCAATCGAGTGA
	lambda repressor	TATCACCGCCAGAGGTA ATAGTGGCGGTCTCCAT
Yeast	Gal4	CGGAGGACTGTCCTCCG GCCTCCTGACAGGAGGC
	Mato2	CATGTAATT GTACATTAA
	Gcn4	ATGACTCAT TACTGAGTA
<i>Drosophila</i>	Kruppel	AACGGGTAA TTGCCAATT
	Bicoid	GGGATTAGA CCCTAATCT
Mammals	Sp1	GGGCGG CCCGCC
	Oct-1 Pou domain	ATGCAAAT TACGTTTA
	GATA-1	TGATAG ACTATC
	MyoD	CAAATG GTTTAC
	p53	GGGCAAGTCT CCCGTTCAGA

- Na realidade, um fator de transcrição é capaz de reconhecer diferentes sequências em torno de uma **sequência preferencial (consenso)**.

HEM13 CCCATTGTTCTC

HEM13 TTTCTGGTTCTC

HEM13 TCAATTGTTTAG

ANB1 CTCATTGTTGTC

ANB1 TCCATTGTTCTC

ANB1 CCTATTGTTCTC

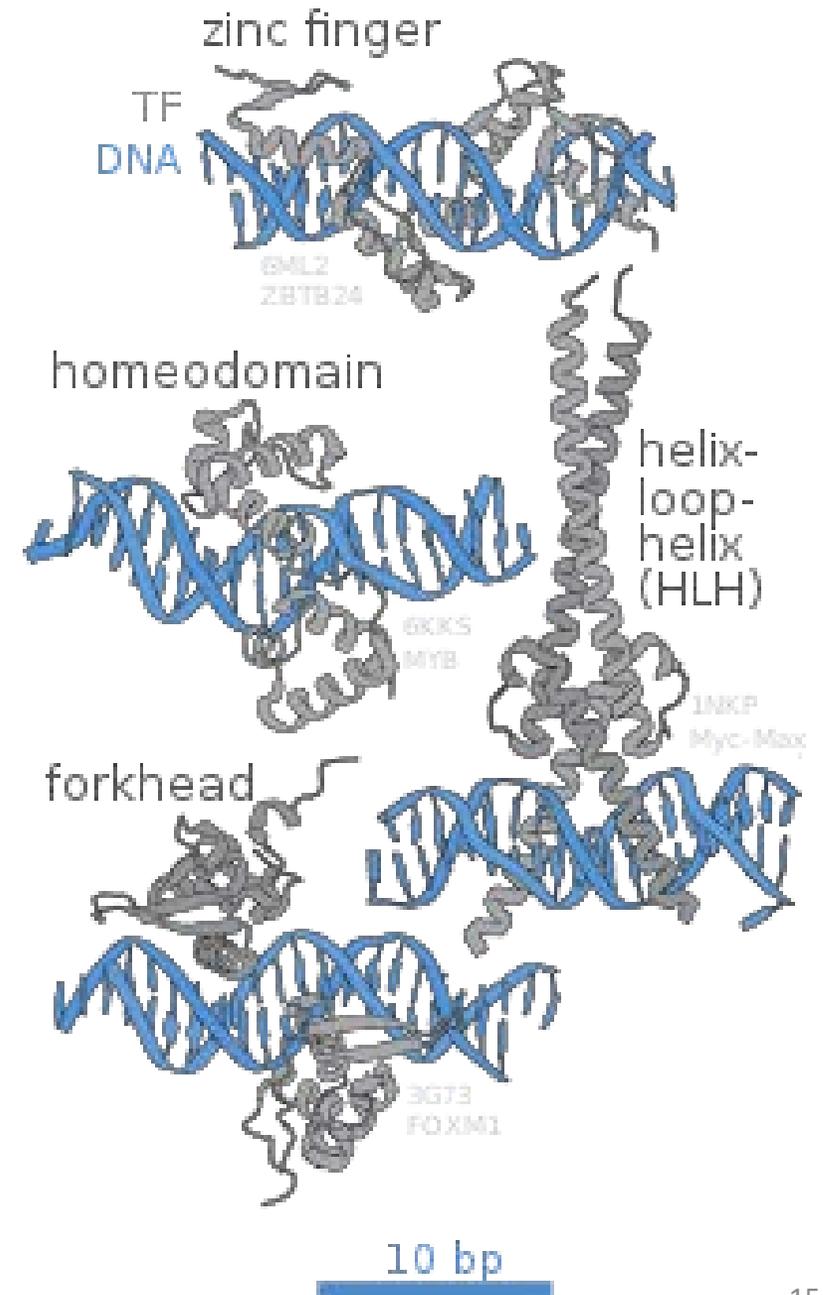
ANB1 TCCATTGTTCGT

ROX1 CCAATTGTTTGG

YCHATTGTTCTC

FATOR DE TRANSCRIÇÃO

- O domínio de ligação é a região de cada proteína de um fator de transcrição que reconhece e se liga à sequências específicas de nucleotídeos;
- Fatores de transcrição homólogos (**parálogos**) que apresentam o mesmo tipo de domínio ligador constituem uma família.

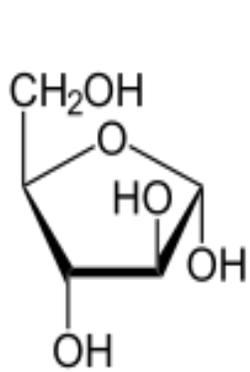


***Escherichia coli*, como modelo experimental**

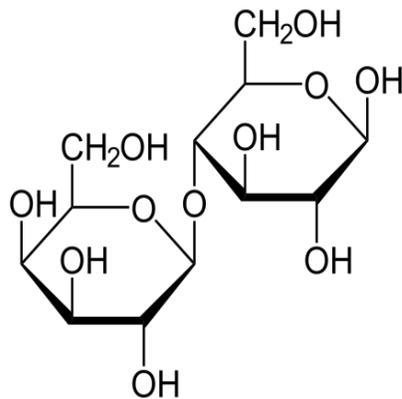
- Estudos de genética clássica com *E coli* na década de 50;
- Iniciados antes mesmo da descoberta da estrutura do DNA (em 1953);
- Foram fundamentais para compreender a estrutura, funcionamento e regulação de genes de *E coli*;
- Esse conhecimento é válido até hoje e muito dele também é aplicável aos eucariotos ou serviu como “porta de entrada”.
- **Um dos primeiros sistemas investigados foi o funcionamento do operon lac para utilização do açúcar lactose, trabalho de Jacob e Monod na década de 60.**

Escherichia coli, como modelo experimental

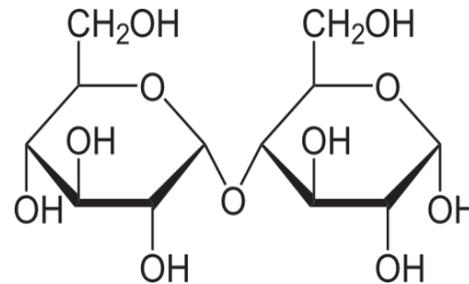
- A *Escherichia coli* é uma bactéria de intestino, sujeita as diferentes condições proporcionadas pelo hospedeiro;
- Como a presença de diferentes fontes de açúcar:



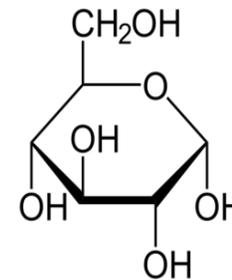
glicose



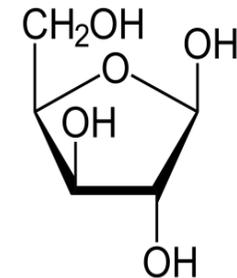
lactose



maltose



arabinose

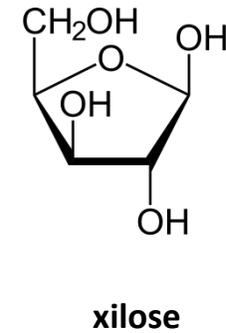
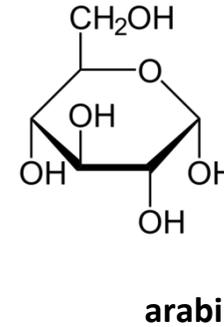
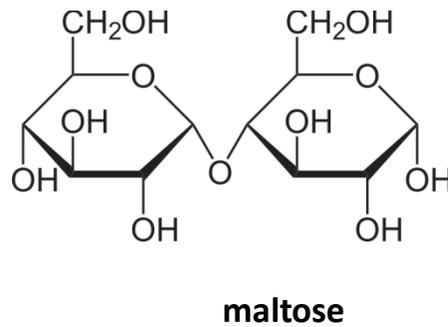
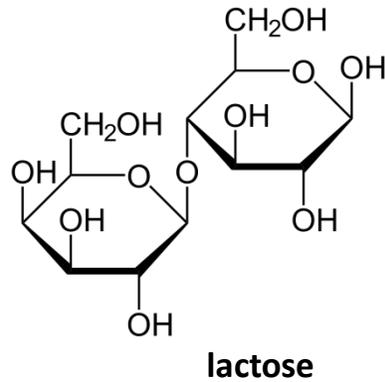
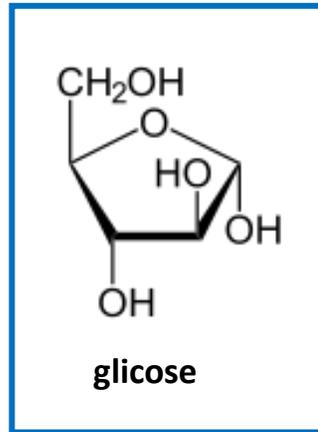


xilose

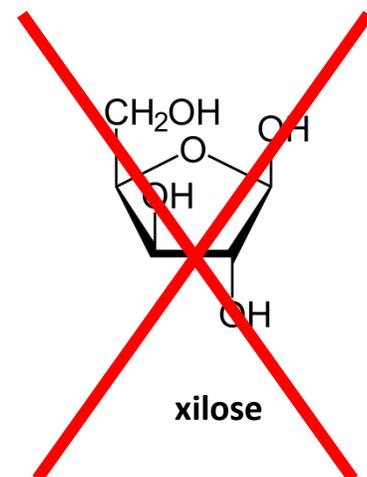
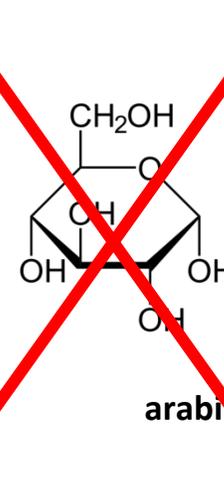
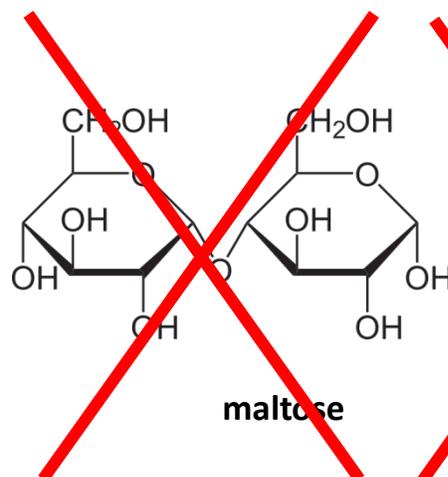
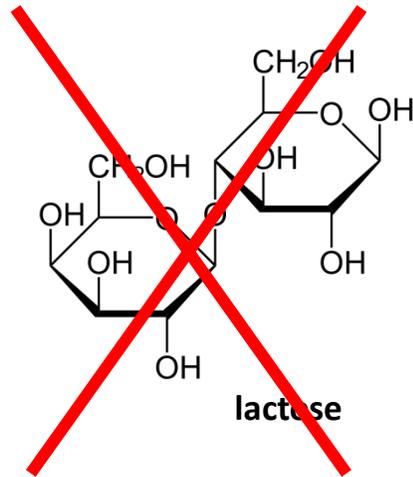
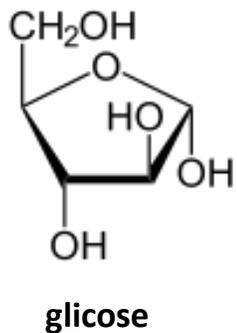
- E a *E coli* está preparada para utilizar os diferentes açúcares como fonte de nutriente.

Escherichia coli, como modelo experimental

Presença da glicose

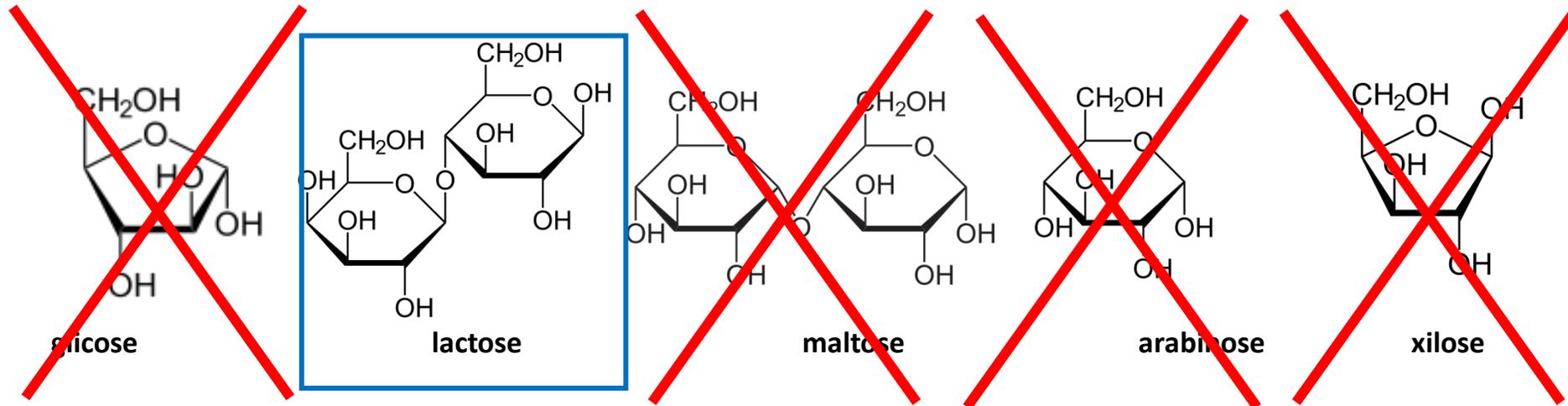


Metabolismo da glicose ligado e dos outros desligados

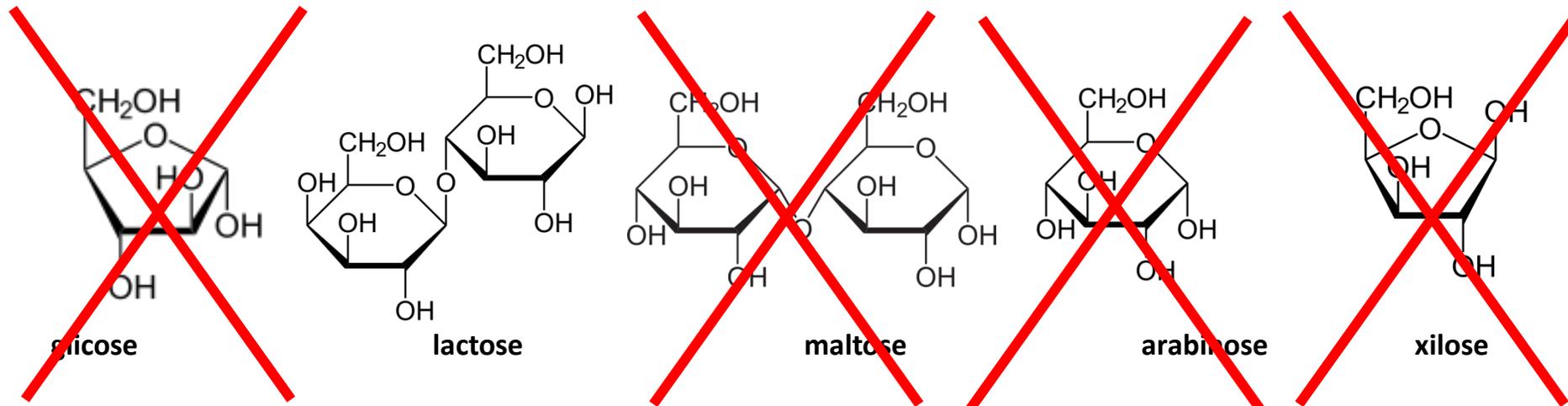


Escherichia coli, como modelo experimental

Presença da lactose e ausência de glicose



Metabolismo da lactose ativado e dos outros desligados

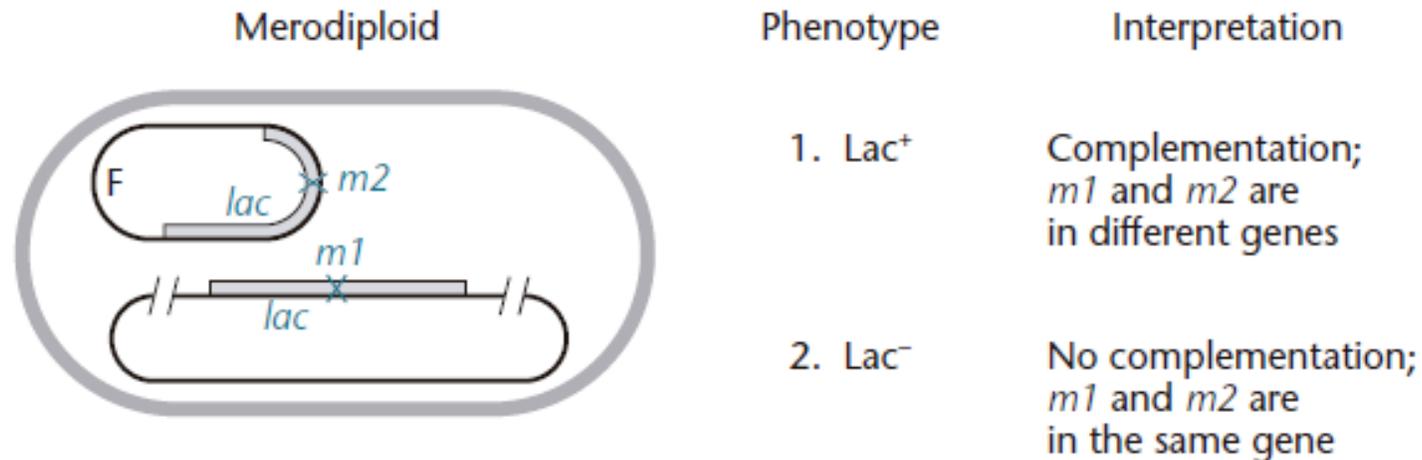


***Escherichia coli*, como modelo experimental**

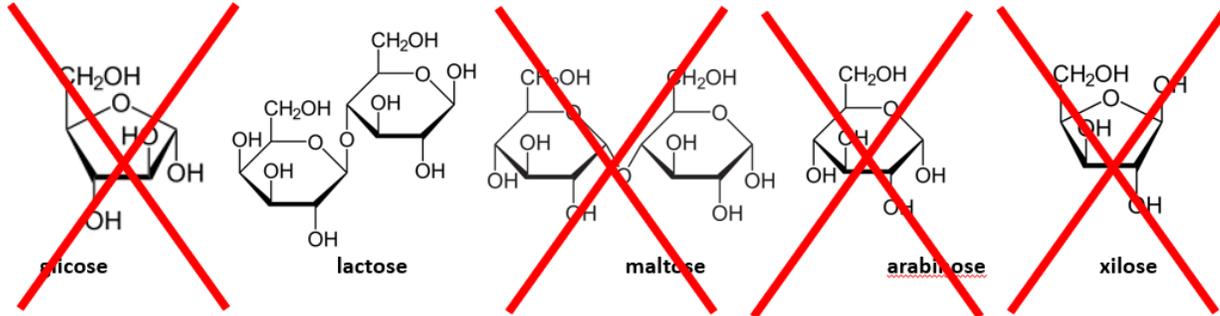
- Para investigar os genes e a regulação do metabolismo da lactose;
- Foi necessário criar uma metodologia e toda uma terminologia para sistematizar o trabalho!
- Primeiro isolaram genes envolvidos no metabolismo da lactose

Escherichia coli, como modelo experimental

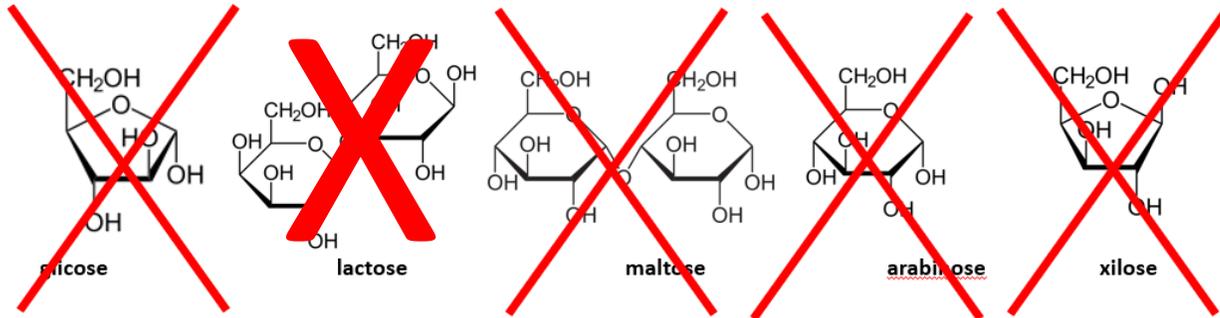
- Como a bactéria é haplóide;
 - Desenvolveram um sistema experimental diplóide;
 - Utilizando o fator F' por meio de conjugação bacteriana;
 - Em experimentos de complementação gênica.
- Por exemplo, teste de complementação gênica de duas mutações recessivas:



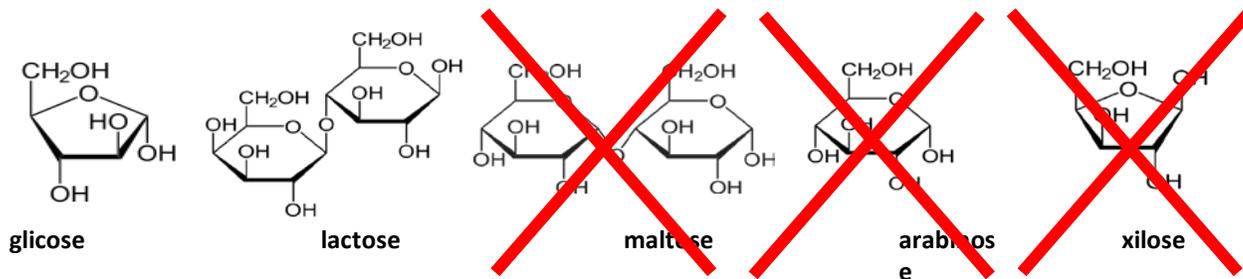
Escherichia coli, como modelo experimental



Metabolismo da lactose ativado



**Metabolismo da lactose não funcional
Mutantes lacZ-**

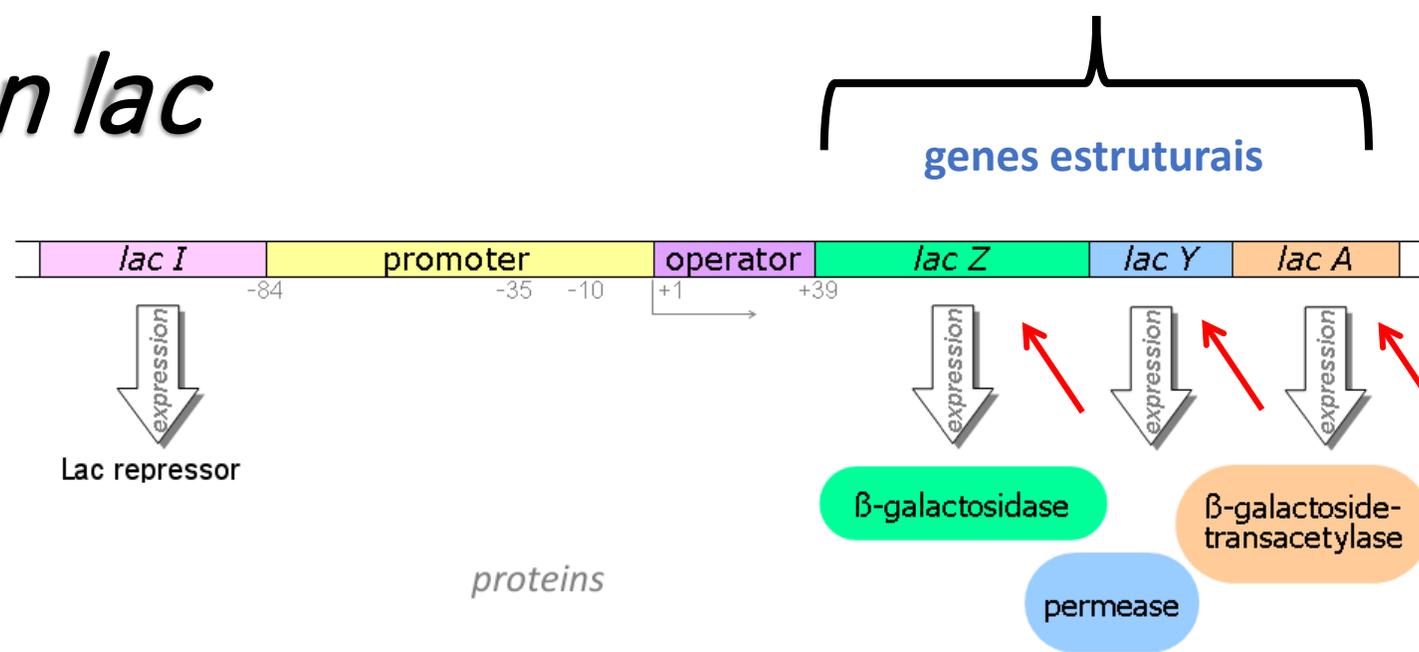


**Metabolismo da lactose ativado
Mutantes lacZ+ (expressão constitutiva)**

Escherichia coli, como modelo experimental

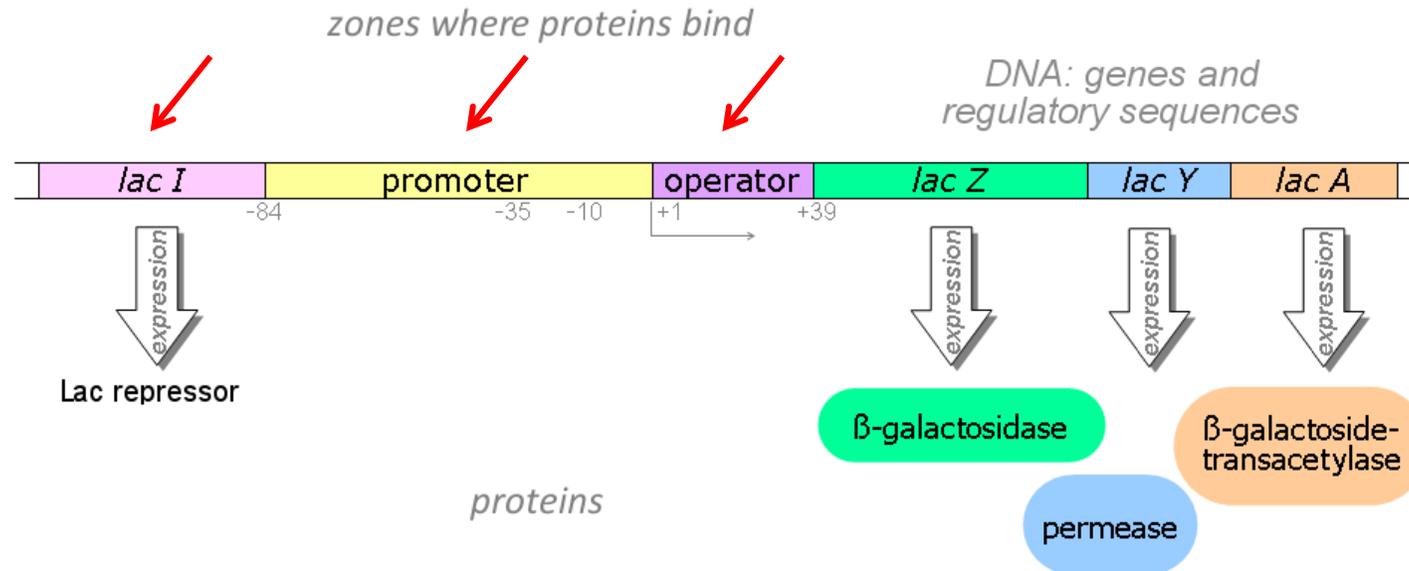
- Esse sistema foi utilizado para investigar não só o metabolismo da lactose, mas também de outros operons da bactéria, possibilitando descobrir:
 - A existência dos operons;
 - A existências de elementos cis e trans reguladores;
 - O porque dos fenótipos dominantes e recessivos dos mutantes;
 - A atuação de fatores de transcrição como ativadores ou repressores dos operons;
 - A existência de moléculas (indutores ou correpressores), modulando a atividade de fatores de transcrição;
- **No caso da lactose...**

Operon lac



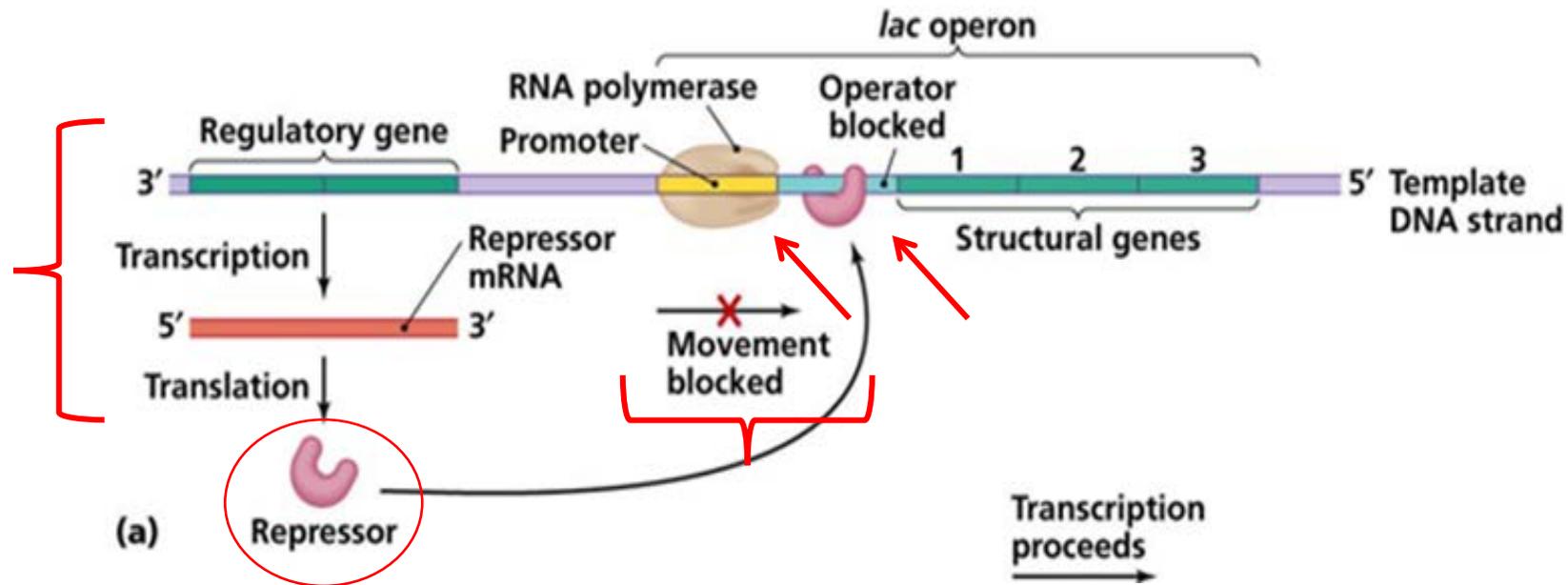
- O metabolismo da lactose está sob controle do **Operon lac (Operon da lactose)**;
- Três genes estruturais fazem parte do *operon lac*: *lac Z*, *lac Y*, *lac A*;
- *lac Z*: Codifica para a β-galactosidase que é a enzima que catalisa lactose em glicose e galactose (e também em alolactose);
- *lac Y*: Codifica para a β-galactosídeo permease que é uma proteína de membrana responsável pelo transporte ativo (entrada) de lactose na célula;
- *lac A*: Codifica para a β-galactosídeo transacetilase que acetila galactosídeos que não são metabolizados e são assim marcados para degradação.

Operon lac



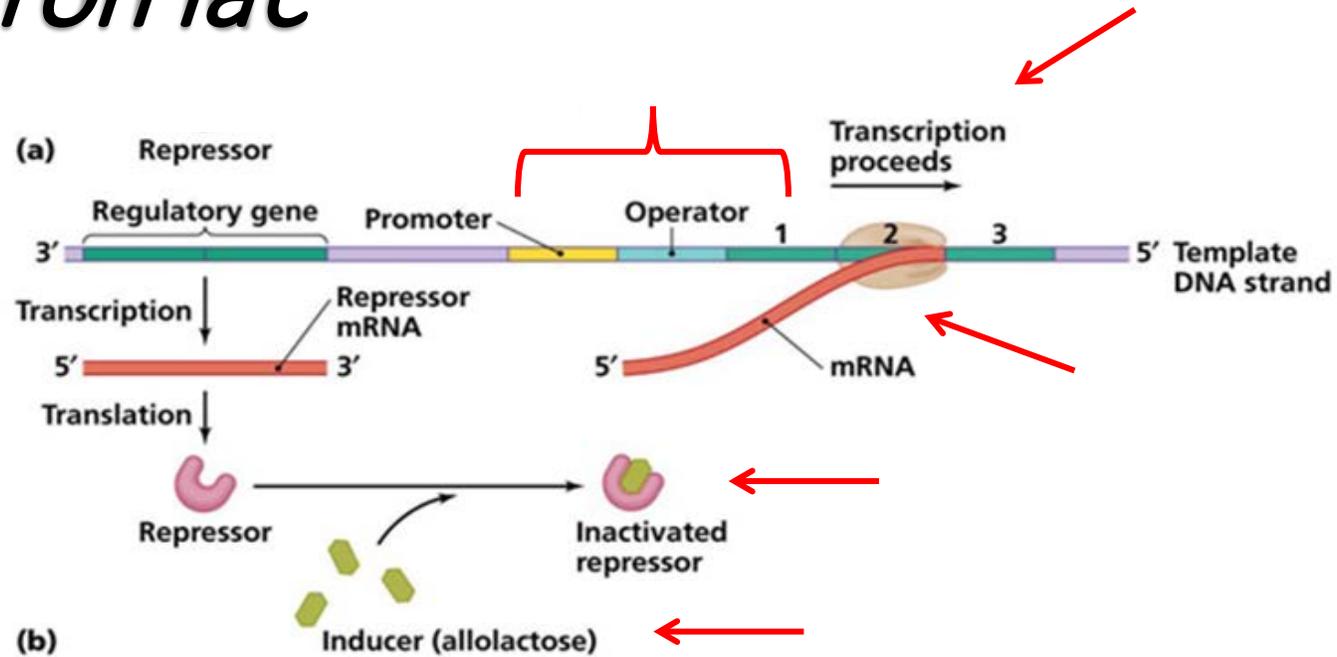
- Os genes estruturais são transcritos a partir de um promotor único;
- O promotor é ladeado downstream pelo operador;
- O *lac I*, gene regulador, próximo ao *operon lac*, produz a proteína reguladora, um repressor;
- O repressor é um fator de transcrição com função negativa para a transcrição;
- Então, a proteína repressora ativa (funcional) impede a transcrição.

Operon *lac*



- Na ausência de lactose, o operon *lac Z* está desligado;
- O *lac I* é constitutivo, expressa de forma constante, portanto;
- O repressor está sempre presente;
- A proteína reguladora (repressora) se liga na região operadora;
- Dessa forma bloqueia a RNA polimerase e impede a transcrição.

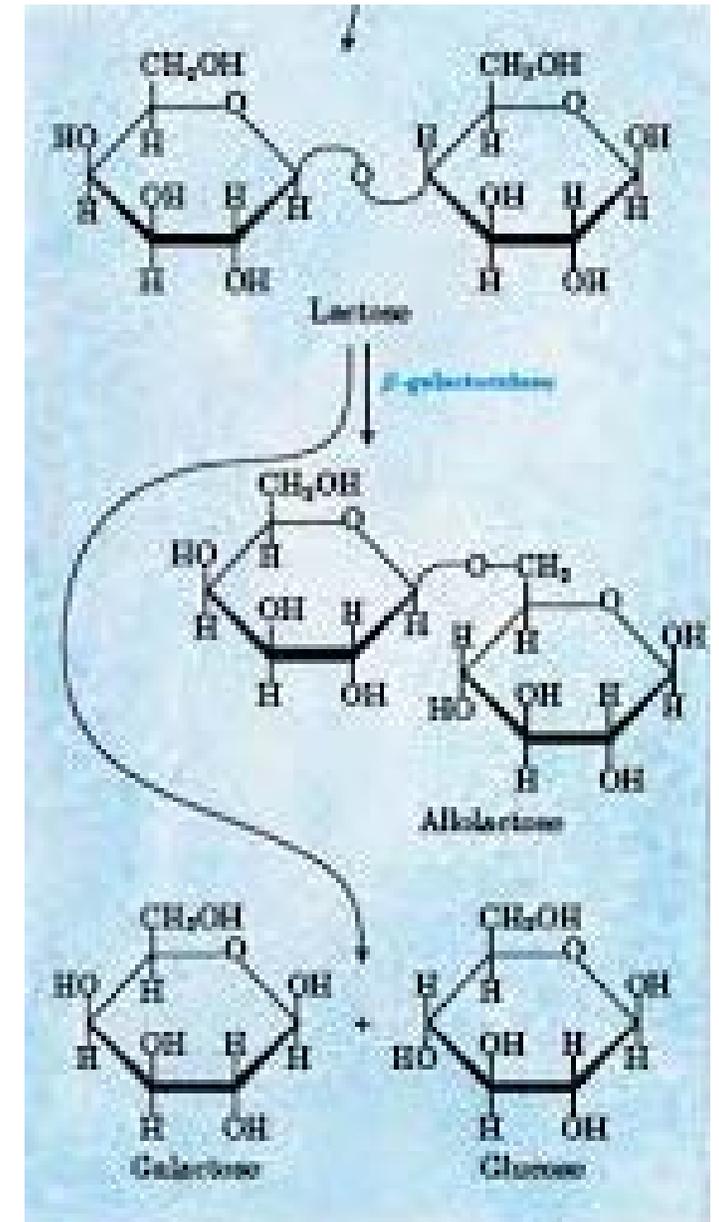
Operon *lac*



- Na presença de lactose, o operon *lac Z* está ligado;
- A β -galactosidase converte lactose em glicose e galactose, além de alolactose;
- A alolactose, por sua vez, interage com a proteína repressora, alterando sua conformação;
- Nessa condição o repressor é inativado e não se liga no operador;
- A RNA polimerase desimpedida fica livre para transcrever.

Operon lac

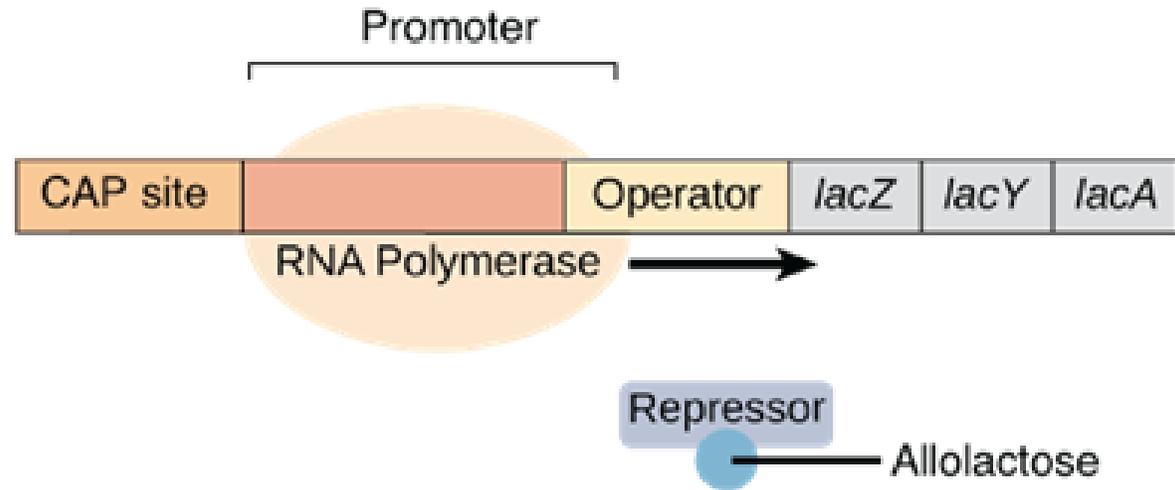
- O *operon lac* é um **operon negativo induzível**;
- Na presença de lactose, a β -galactosidase também converte a lactose no isômero alolactose, que é um produto secundário da enzima;
- A alolactose se liga ao repressor inibindo a atuação do repressor no DNA.
- A alolactose e não a lactose é o **indutor** do operon.



Operon lac

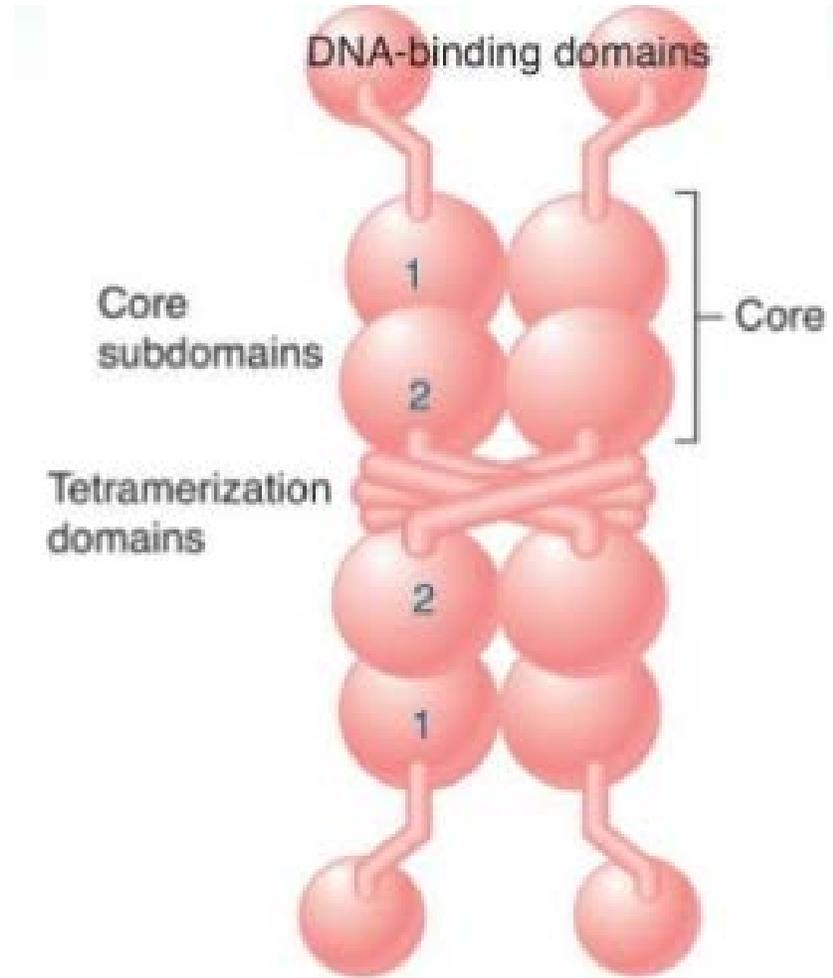
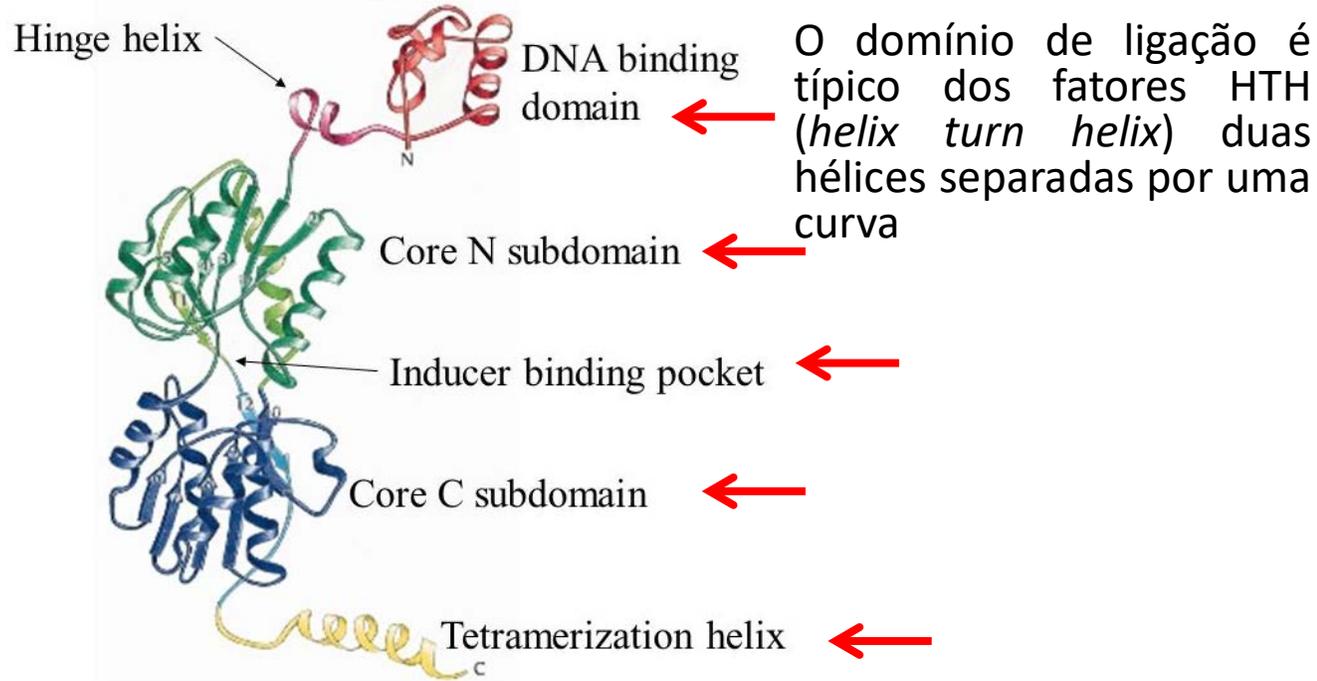
- O operon *lac* é um **operon negativo induzível**;
- O **repressor** atua **negativamente** na expressão do operon;
- Mas o **repressor** apesar de ser expresso de **forma constitutiva**, é encontrado em poucas moléculas na célula;
- O que possibilita uma expressão mínima do operon *lac*;
- E permitir o ingresso de lactose na célula e iniciar o metabolismo se esse açúcar estiver disponível para a célula;
- A **alolactose** é um subproduto da β -galactosidase;
- A **alolactose** atua como *indutor* do operon;
- **Liga-se ao repressor e altera sua conformação, e o repressor não reconhece e não mais se liga a região operadora.**

Operon lac



- O *lac I* é constitutivo, mas tem um promotor “fraco” e um RNA “fraco”;
- O promotor *lac I* tem uma sequência de baixa afinidade para a RNA polimerase e transcreve com baixa eficiência;
- Seu RNAm não possui 5' UTR (sem a sequência Shine-Delgarno), ou seja, sua tradução também é ineficiente;
- O que gera baixa quantidade de moléculas do repressor na célula;
- E possibilita um nível basal de expressão do operon *lac*, mesmo na ausência de lactose (0,1 % do nível de indução).

Operon lac

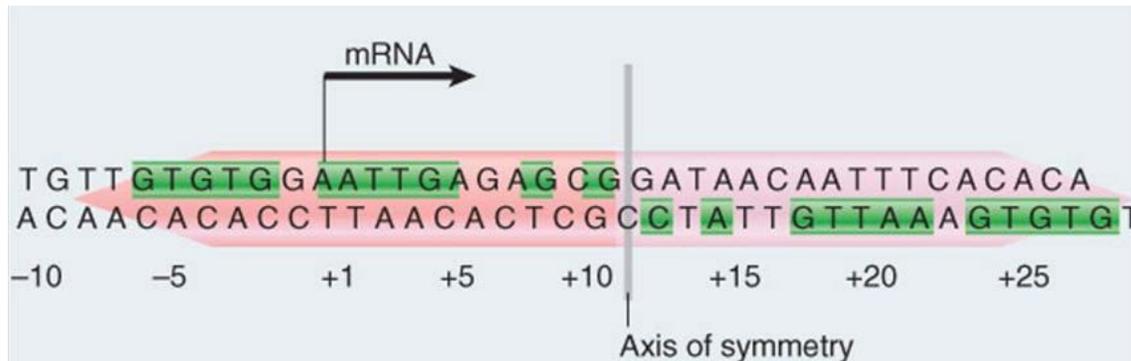
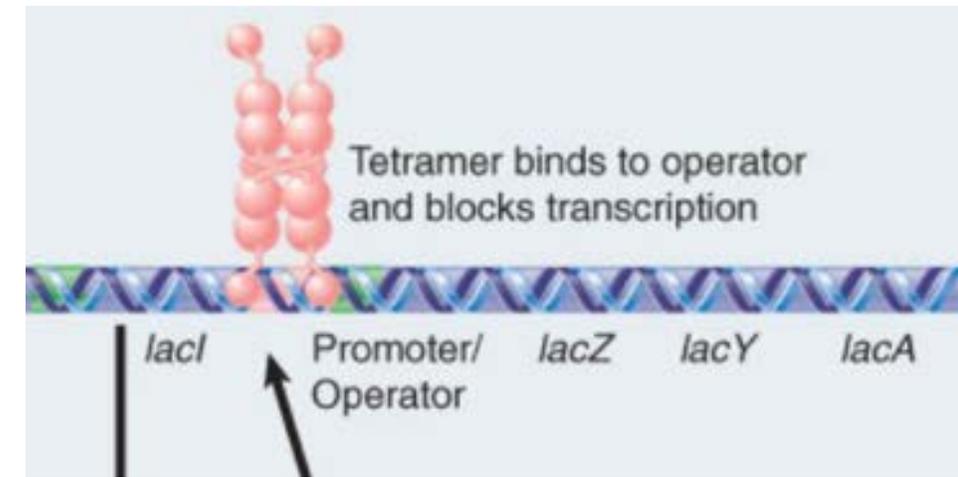
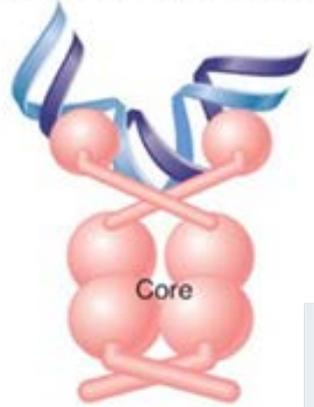


- O repressor possui diferentes domínios;
- O domínio N-terminal é para ligação no DNA;
- Existe um domínio para ligação no indutor;
- Dois domínios para dimerização e outro para formar o tetrâmero;
- O repressor funcional é um tetrâmero.

Operon *lac*

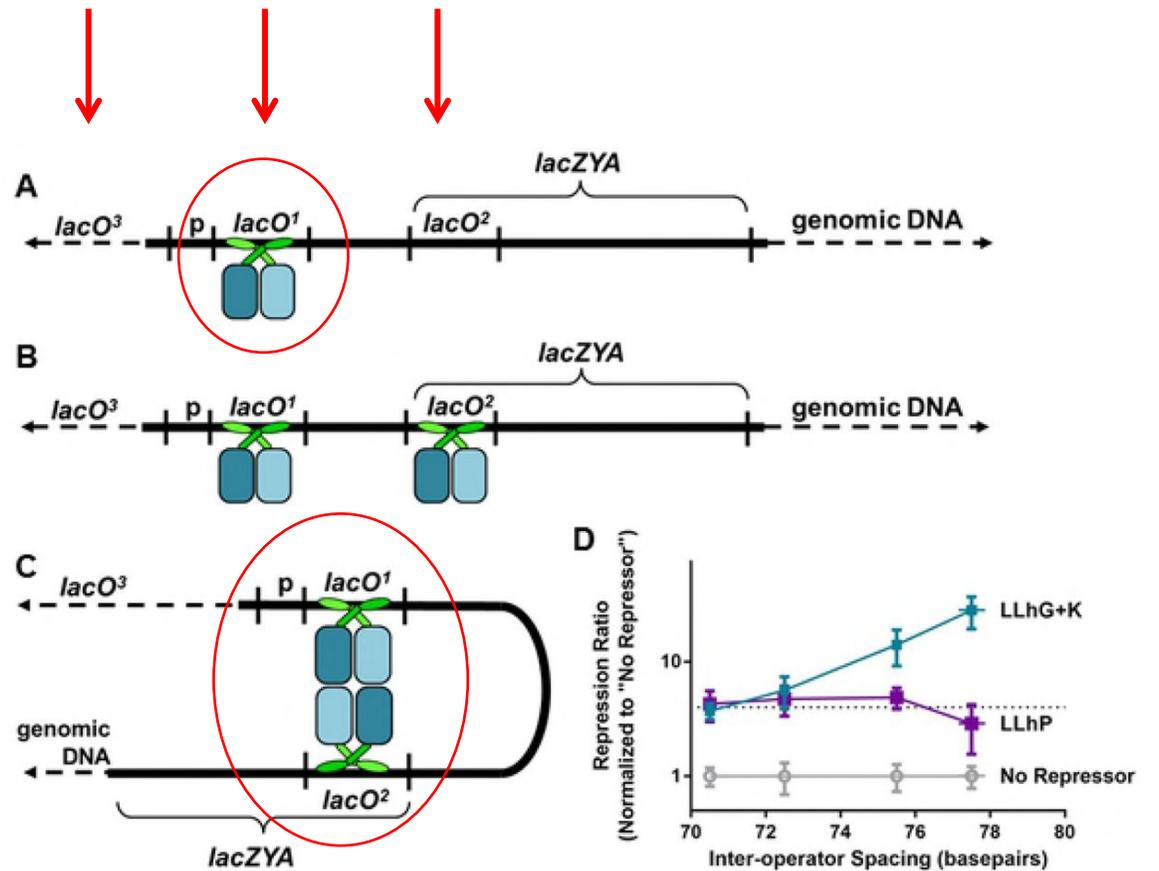


Headpieces bind successive turns in major groove



- O repressor (tetrâmero) se liga no operador como um dímero;
- O operador é formado por duas metades simétricas, cada qual contendo uma mesma sequência palíndrome (repetida e invertida);
- Cada domínio de ligação do dímero se liga a uma metade do operador;

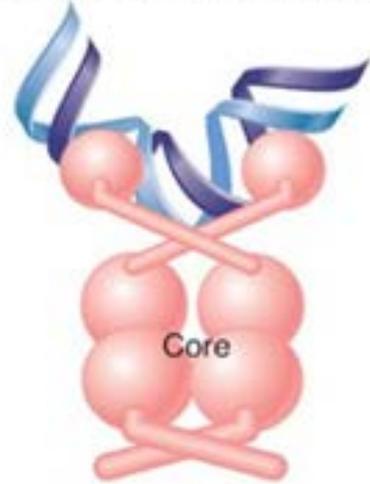
Operon *lac*



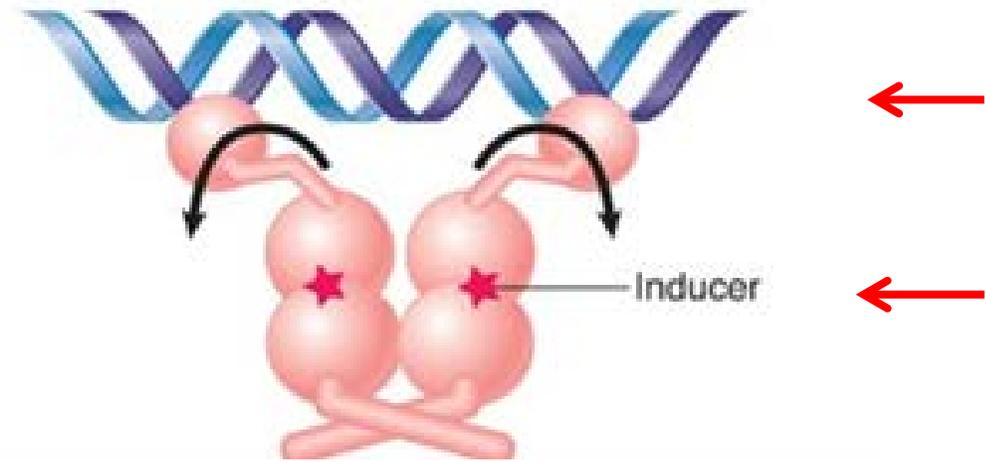
- Além do operador imediatamente à frente dos genes constitutivos;
- Dois outros operadores distantes existem e atuam em colaboração para aumentar em até 50x a repressão;
- Esses operadores são ligados pela outra metade do tetrâmero e geram uma alça na estrutura do DNA;

Operon lac

Headpieces bind successive turns in major groove

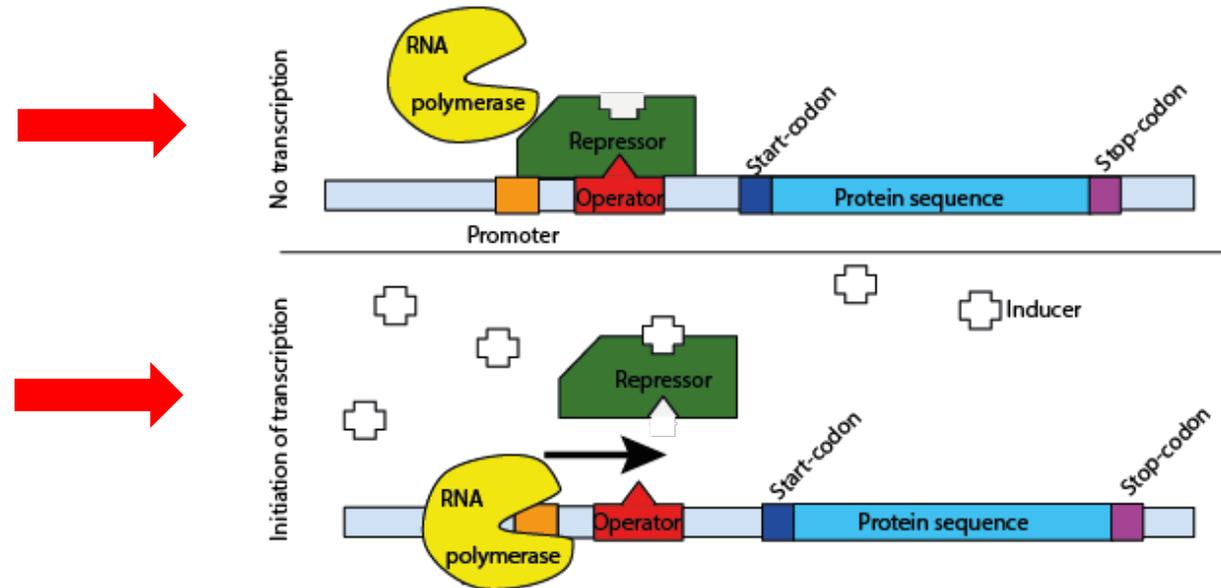


Inducer binding changes conformation



- A ligação da alolactose (indutor) altera a conformação dos domínios de interação e de forma alostérica;
- Também altera conformação do domínio de ligação, diminuindo sua afinidade com a sequência do operador e capacidade de ligação.

Operon lac



- O mecanismo de ação prevê que RNA polimerase e repressor podem estar simultaneamente ligados nos respectivos sítios;
- A presença do repressor no operador reforça a presença da polimerase no promotor;
- Então, a interação com o indutor desestabiliza o repressor que é liberado do DNA e a polimerase já pode iniciar a transcrição imediatamente.

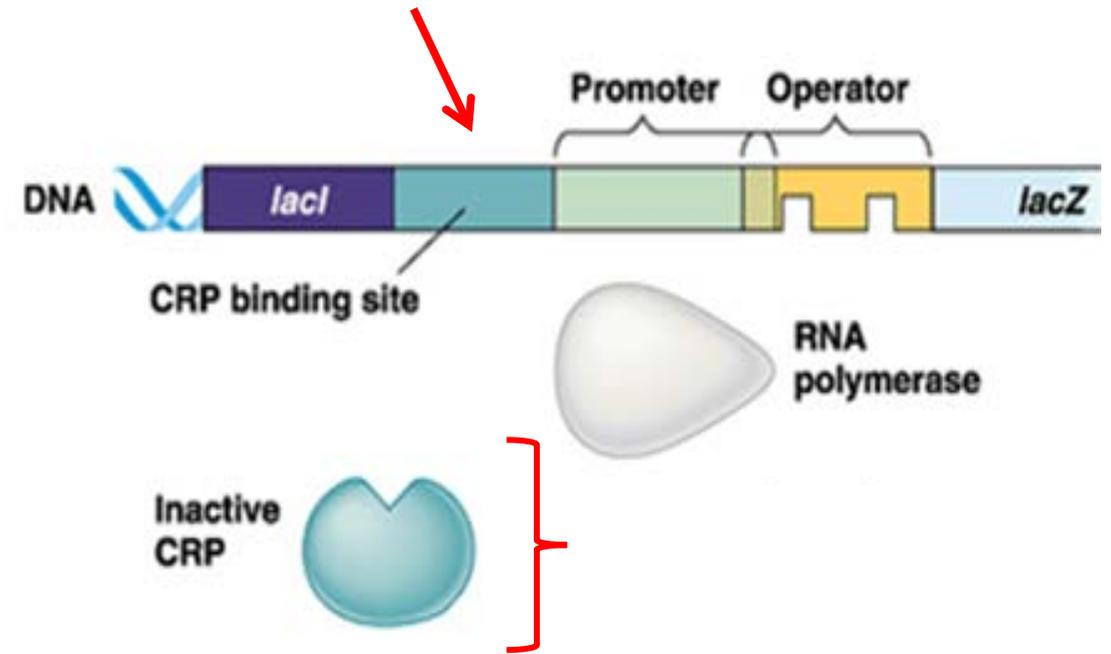
Operon lac

- Na presença de lactose e na ausência de glicose, a lactose é utilizada como fonte de energia;
- Mas a glicose é a fonte preferencial de obtenção de energia da bactéria;
- Então, na presença de glicose a bactéria faz uso do operon para a glicose;
- E utiliza um mecanismo para diminuir a expressão do operon *lac* assim como a de outros operons;
- Esse mecanismo é chamado de **repressão catabólica**.

Operon lac

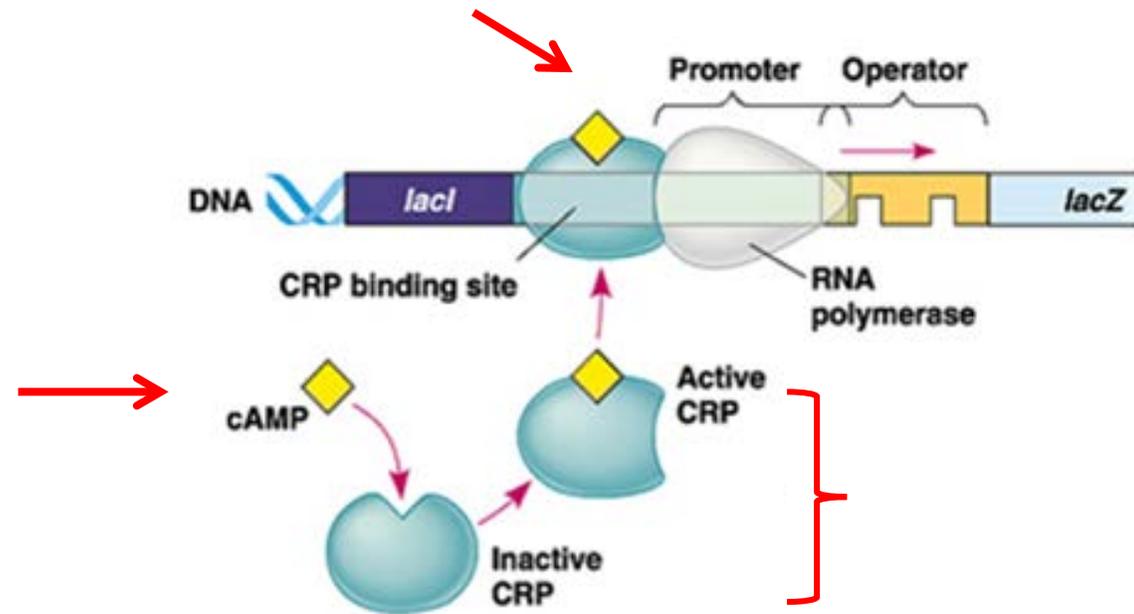
- Por outro lado, na ausência de glicose e na presença de lactose, a expressão do operon *lac Z* é acentuada;
- O mecanismo de repressão catabólica é dependente dos níveis de AMP cíclico;
- Presente na célula em concentrações inversamente proporcionais a glicose.

REPRESSÃO CATABÓLICA



- Na presença de glicose, os níveis de AMPc são baixos;
- CRP (*catabolite repressor protein*) ou CAP (*cAMP receptor protein*) não é ativada e não se liga no seu sítio próximo do promotor;
- A transcrição do *operon lac* é mantida em níveis baixos mesmo na presença de lactose.

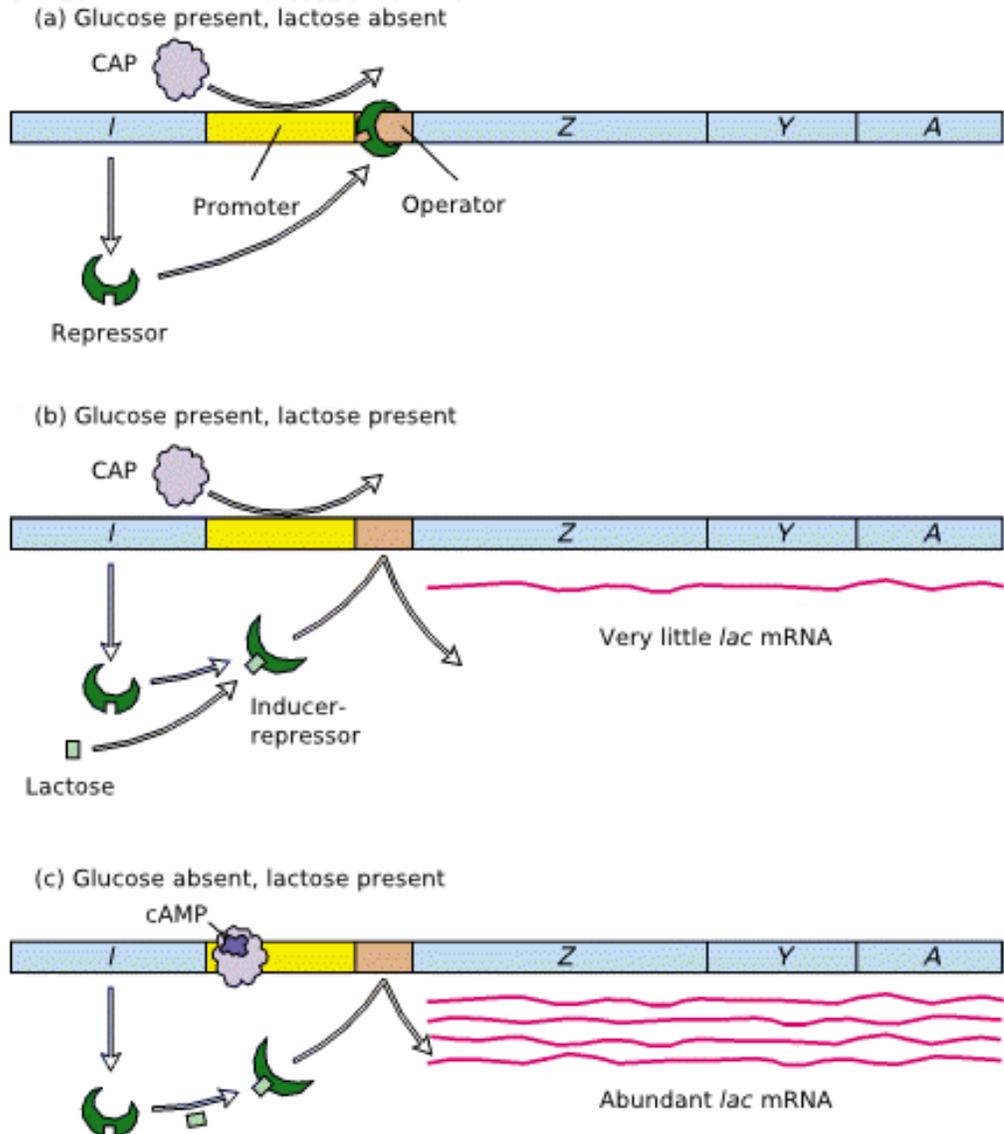
REPRESSÃO CATABÓLICA



- Na ausência de glicose, os níveis de AMPc na célula são altos;
- A alta concentração de AMPc possibilita sua ligação e ativação da proteína dimérica CRP (*catabolite repressor protein*) ou CAP (*cAMP receptor protein*);
- Essa proteína é um fator ativador da transcrição;
- A proteína ativada reconhece um sítio vizinho 5' ao promotor do operon *lac Z*, e nessa condição interage positivamente com a RNA polimerase aumentando a efetividade da transcrição.

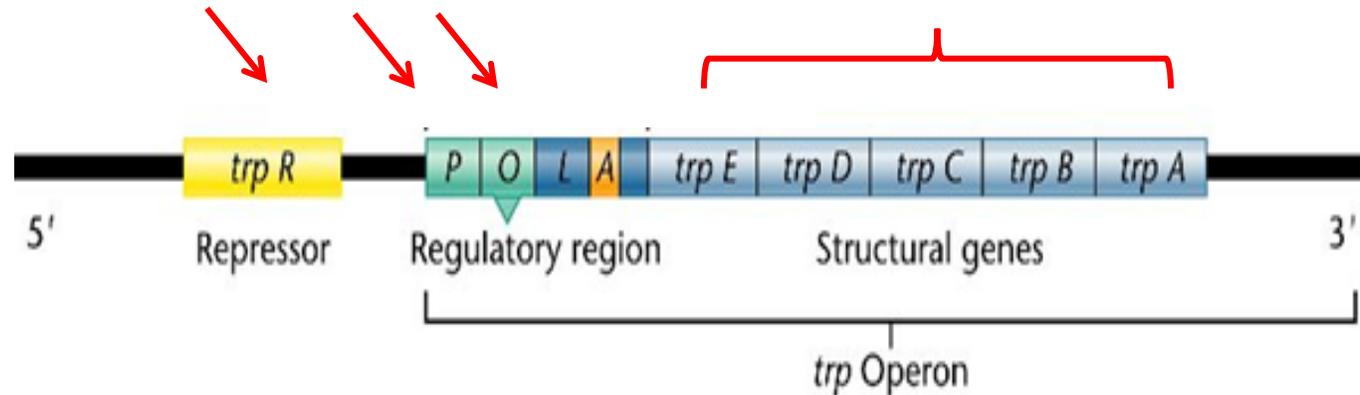
METABOLISMO da LACTOSE

- OPERON LAC de *Escherichia coli*



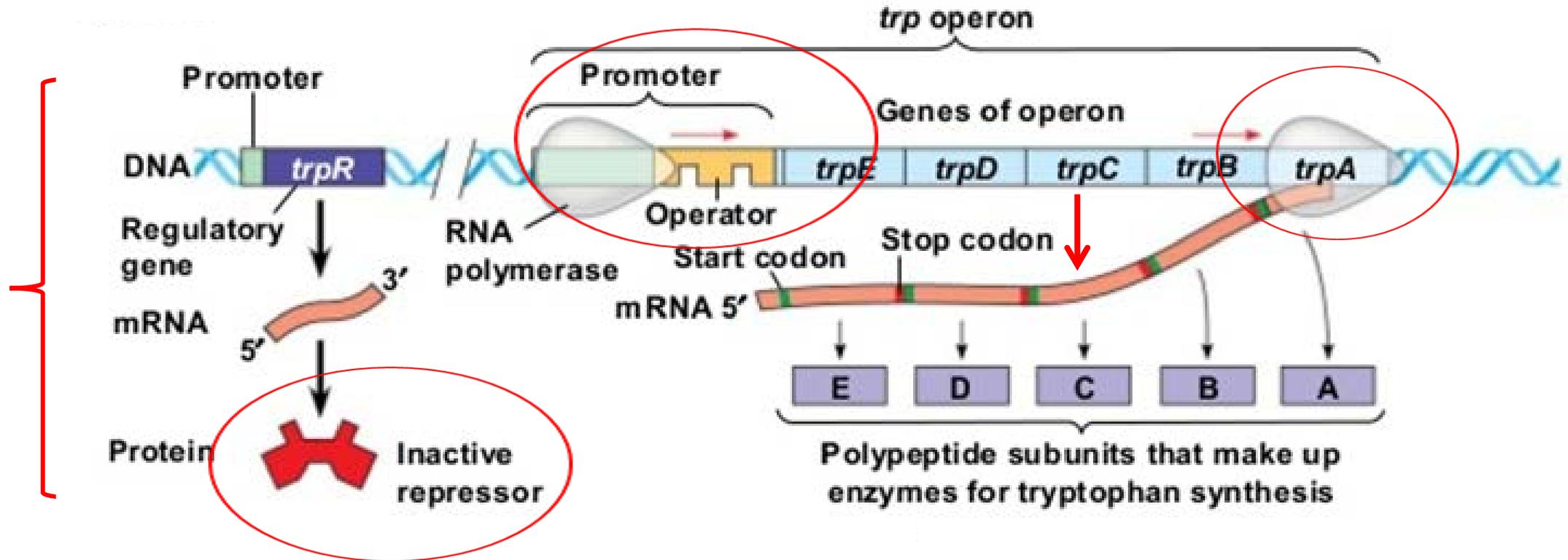
- Na presença de lactose (ausência de glicose), a expressão de proteínas necessária para o metabolismo da lactose é aumentada 1000x em 3 min.

OPERON *trp* de *Escherichia coli*



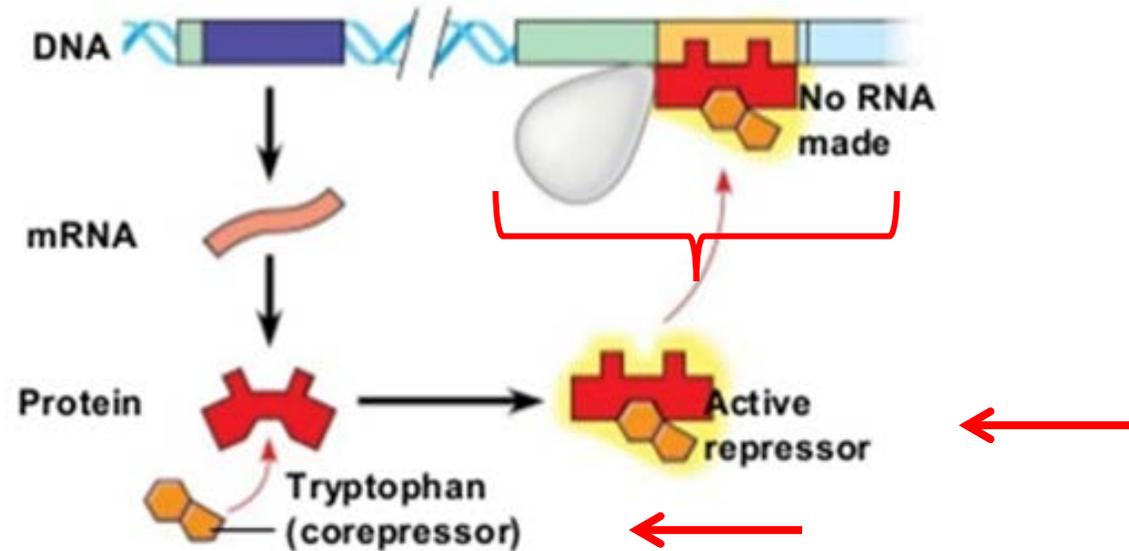
- O Operon *do triptofano* (Operon *trp*) tem 5 genes estruturais envolvidos na biossíntese do aminoácido;
- Um promotor gera o RNAm comum para os 5 transcritos;
- E um operador vizinho a 3' do promotor contendo um palíndrome imperfeito;
- Reconhecido pelo repressor que é um dímero;
- O repressor é sintetizado por um gene regulador que não faz parte da estrutura do operon;
- O operon *trp* está normalmente transcrevendo, mas é um **operon reprimível**.

OPERON *trp* de *Escherichia coli*



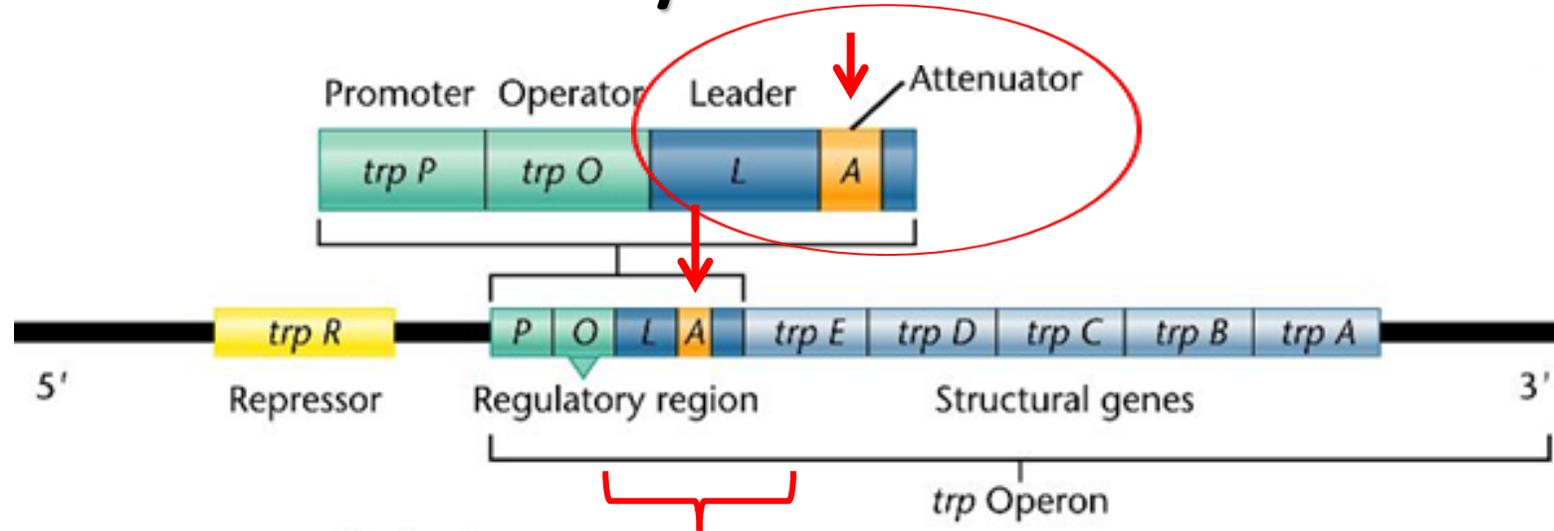
- O repressor é produzido de forma constante mas inativo;
- Nessa situação o operador está desbloqueado e a expressão do operon *trp* é constitutiva;

OPERON *trp* de *Escherichia coli*



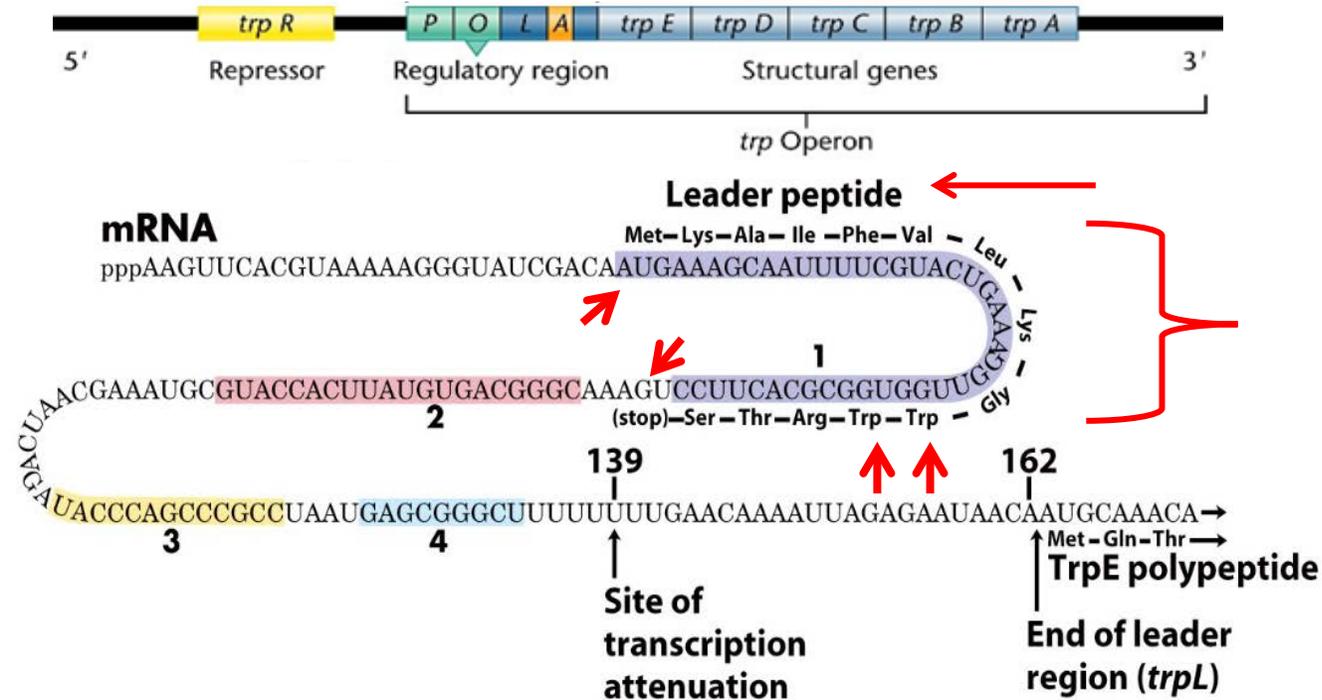
- Com o aumento dos níveis de triptofano, duas moléculas de triptofano se ligam ao repressor dimérico;
- Ocorre uma mudança conformacional no repressor levando a sua ativação;
- O triptofano nessa situação é denominado **corepressor**;
- O repressor então liga no operador e impede a RNA polimerase transcrever;
- Esse **operon é do tipo negativo reprimível** .

OPERON *trp* de *Escherichia coli*



- O operon *trp* assim como operon *lac* também tem um segundo nível de regulação;
- Mas bem diferente, baseado na **atenuação**;
- Esse mecanismo depende da região atenuadora (atenuador), localizada entre o operador e os genes estruturais;
- O atenuador faz parte do 5' leader do RNAm, portanto, é uma região transcrita;

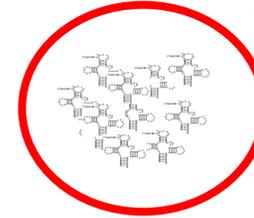
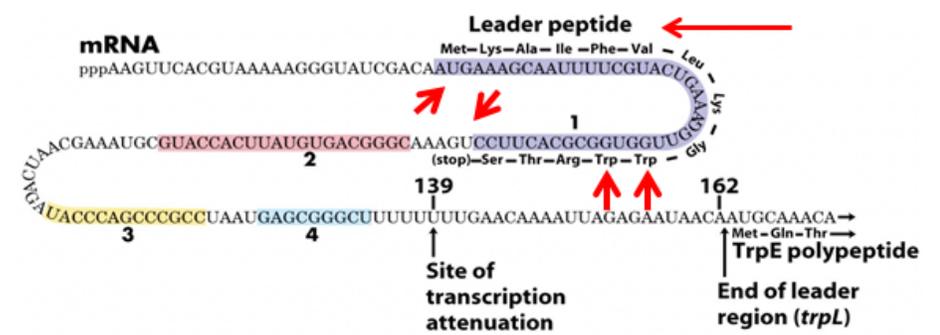
OPERON *trp* de *Escherichia coli*



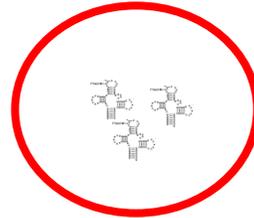
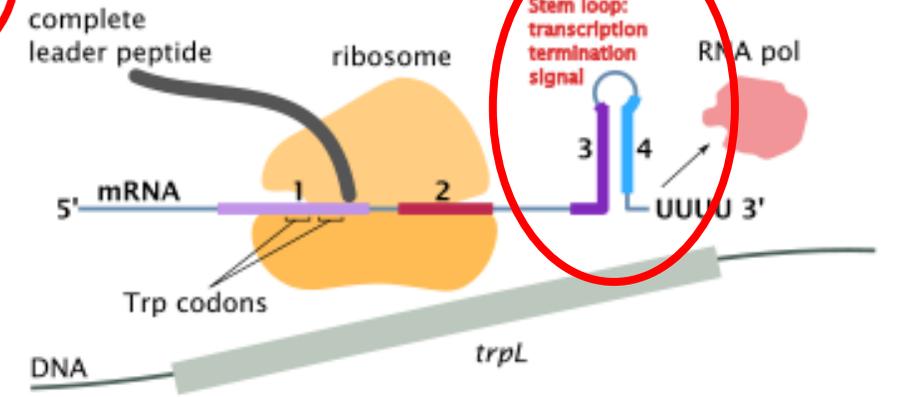
- O atenuador não só é transcrito, como também possui uma pequena ORF (*Open Reading Frame*) (fase de leitura) para 14 aminoácidos;
- Esse oligopeptídeo é chamado de **peptídeo líder ou peptídeo atenuador**;
- Possui códons de iniciação e de terminação;
- E dois códons seguidos para *trp*;

OPERON *trp* de *Escherichia coli*

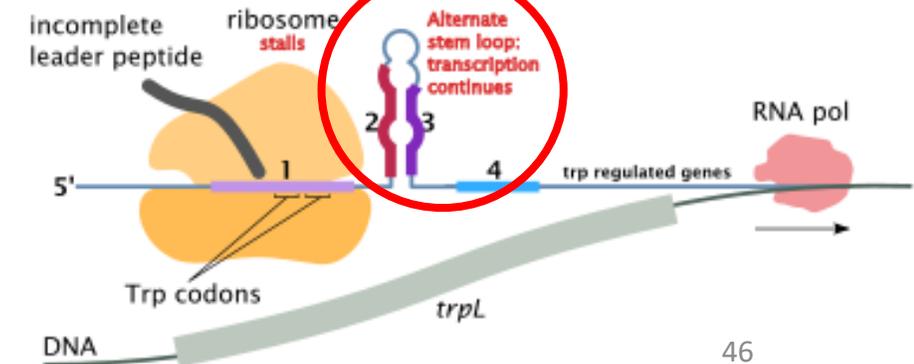
- A velocidade de tradução do peptídeo líder é o aspecto determinante da regulação;
- A tradução é regulada pela quantidade de RNAs de *trp* carregados disponíveis na célula;
- A velocidade da tradução, por sua vez, determina dois estados alternativos na estrutura secundária do RNAm;



High level of tryptophan

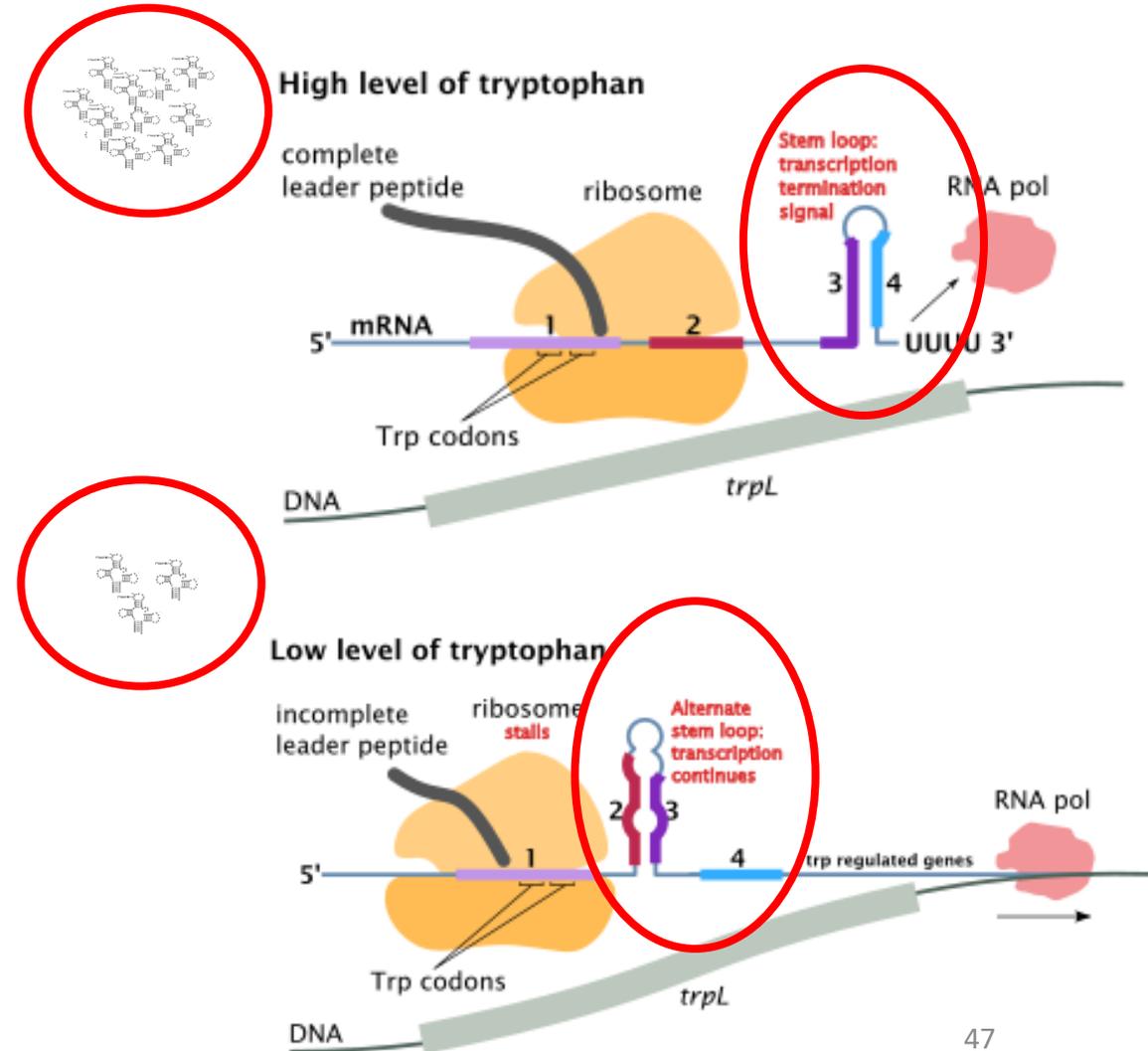


Low level of tryptophan

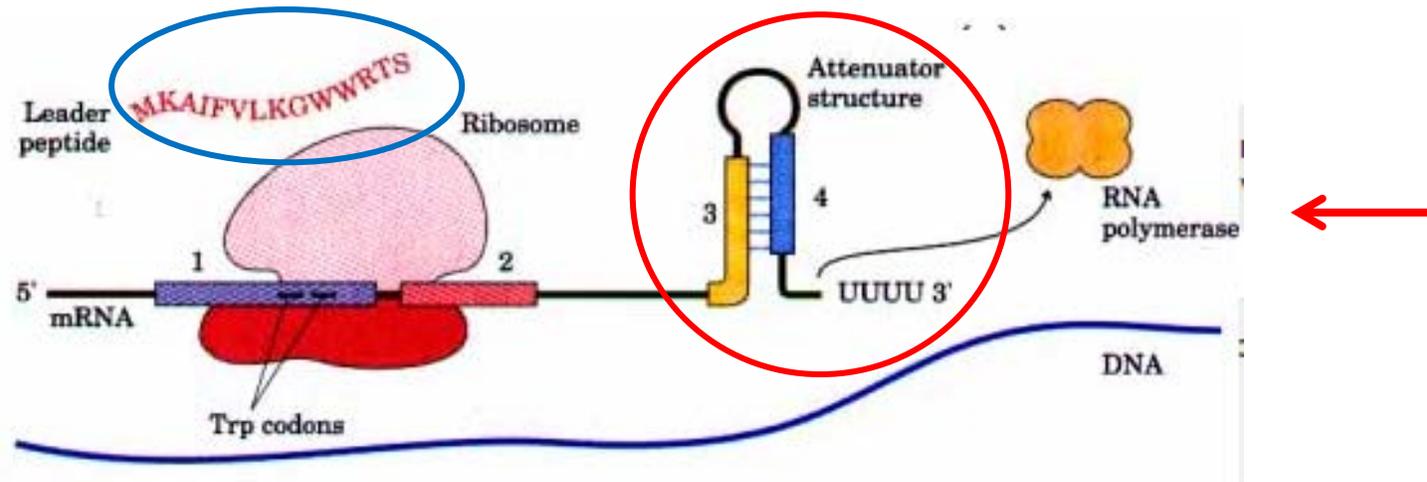


OPERON *trp* de *Escherichia coli*

- Níveis altos de RNAs do *trp* geram um grampo de terminação e o término de transcrição;
- Níveis baixos de RNAs do *trp* geram um grampo antiterminação e possibilitam a continuidade da transcrição dos genes estruturais.

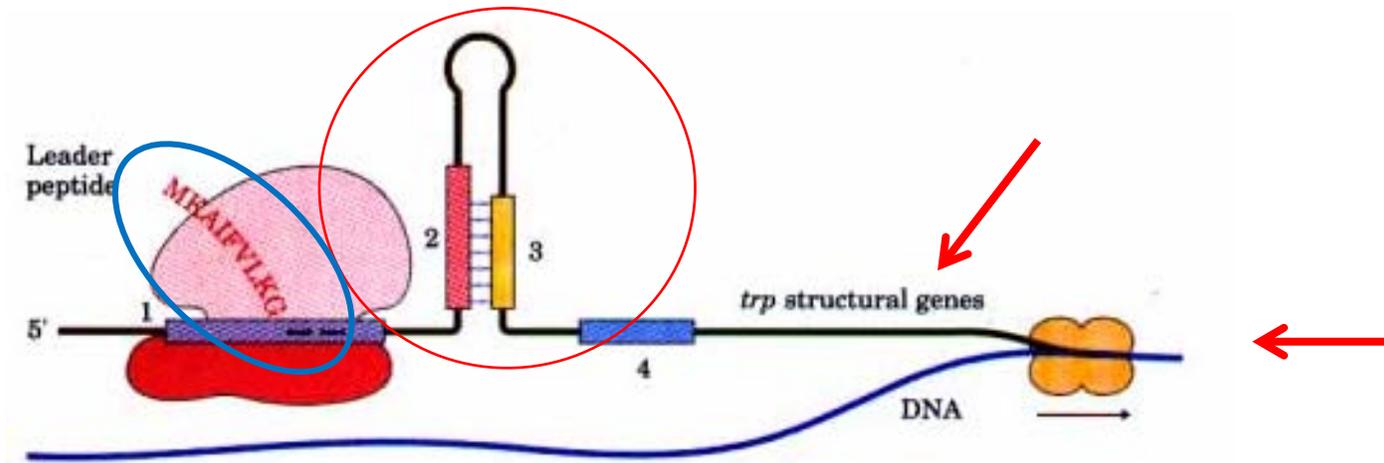


OPERON *trp* de *Escherichia coli*



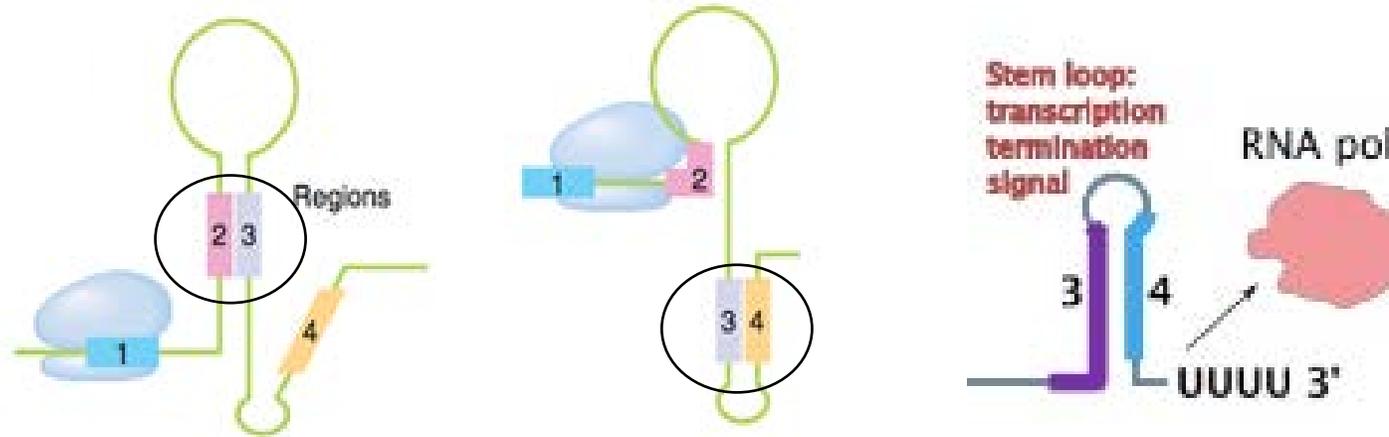
- A atenuação é um processo altamente coordenado entre transcrição e tradução;
- Na presença de RNAt *trp* a tradução do peptídeo atenuador é contínua;
- E dessa forma, regiões do RNAm tem a oportunidade de formar um grampo de terminação;
- Que leva ao desligamento da RNA polimerase e ao término da transcrição (atenuação da transcrição);

OPERON *trp* de *Escherichia coli*



- Na ausência de RNAt do triptofano, a tradução é desacelerada;
- O ribossomo procrastina a tradução na ausência de um insumo;
- Isso possibilita a formação de um grampo na estrutura do RNAm;
- Que impede a formação do grampo posterior de terminação;
- E a RNA polimerase segue com a transcrição;

OPERON *trp* de *Escherichia coli*

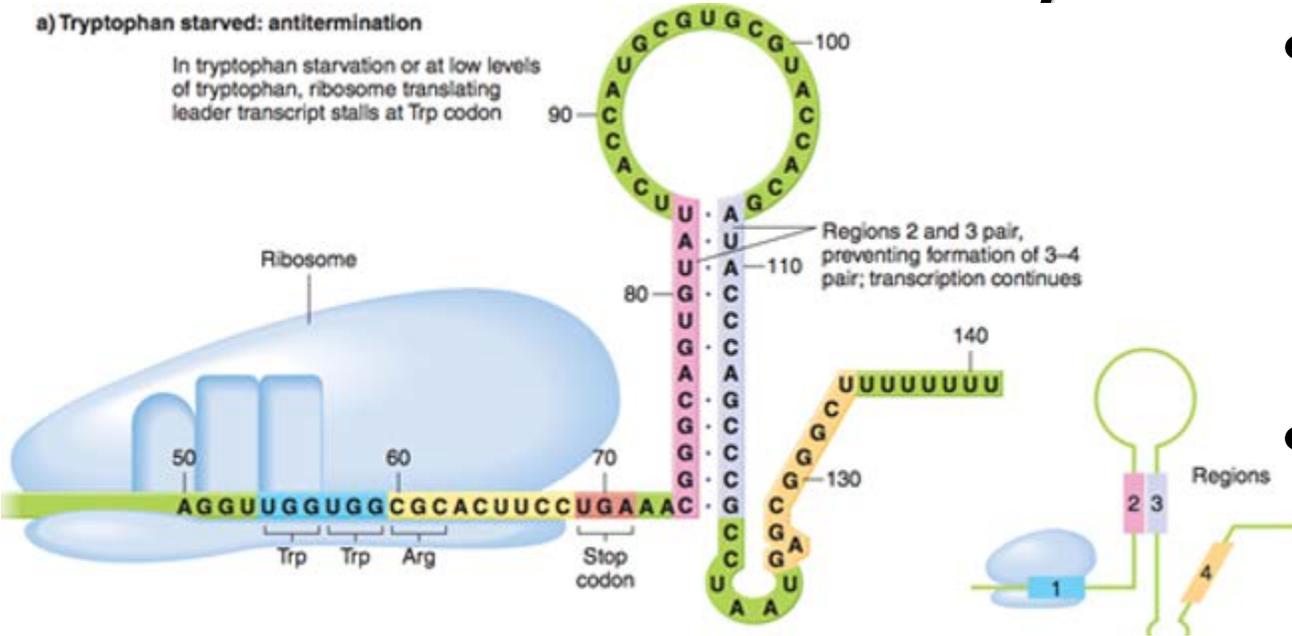


- A região atenuadora é capaz de formar dois grampos mutuamente exclusivos pelo pareamento alternativo de regiões;
- A região 3 pode parear com a 2 e formar um grampo anterior, ou;
- A região 3 pode parear com a 4 e formar um grampo posterior, que é o grampo de terminação (atenuador) (esse grampo é seguido por uma sequência de uracilas o que define um sinal de parada da transcrição);
- Na possibilidade de parear com 2 ou 4, o pareamento preferencial de 3 é com 2, formando o grampo de terminação (atenuador);

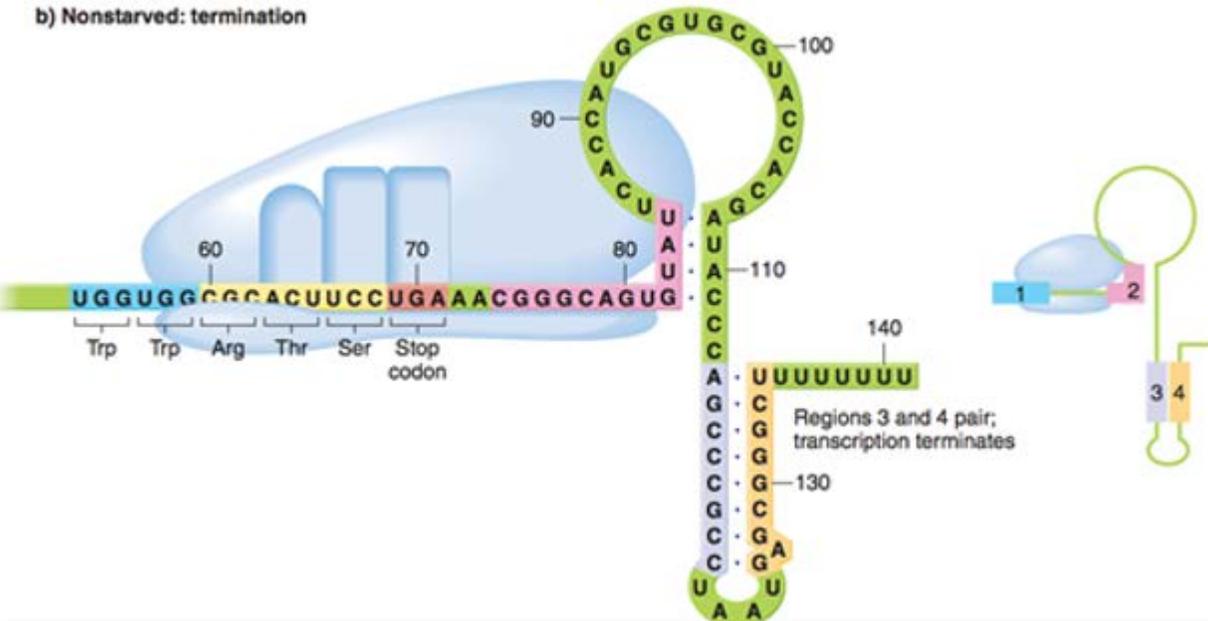
OPERON *trp* de *Escherichia coli*

a) Tryptophan starved: antitermination

In tryptophan starvation or at low levels of tryptophan, ribosome translating leader transcript stalls at Trp codon



b) Nonstarved: termination



- Com a velocidade da tradução diminuída pela ausência do RNAt de *trp*;
- O ribossomo cobre a região 1 e possibilita a região 2 ficar livre para o pareamento com a região 3 e a formação do grampo anterior (**antiterminação**);
- Se a tradução é contínua, ocorre pareamento entre 3 e 4, e a formação do grampo posterior de terminação (**atenuação**).

OPERON *trp* de *Escherichia coli*

- A atenuação é resultado da transcrição e tradução simultânea em procariotos, e mostra como esses eventos podem interferir diretamente um no outro.
- Em geral, a biossíntese de aminoácidos é controlada apenas pelo mecanismo de atenuação e não tem um segundo mecanismo de repressão como o operon *trp*, que é uma exceção;
- O controle do início da transcrição tem um efeito de 70x na regulação do operon, enquanto o da atenuação 10x (juntos 700x!).