

Controle da Expressão Gênica em procariotos

**Prof. Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química – USP**

**QBQ1354
Química**

Bactéria *Xylella fastidiosa* – 2.7 milhões bp 2,904 genes

Como os genes são ativados ?

- Apenas uma fração dos genes é transcrito de forma constante
- Transcrição da maior parte dos genes é regulada.



Características da regulação da expressão gênica

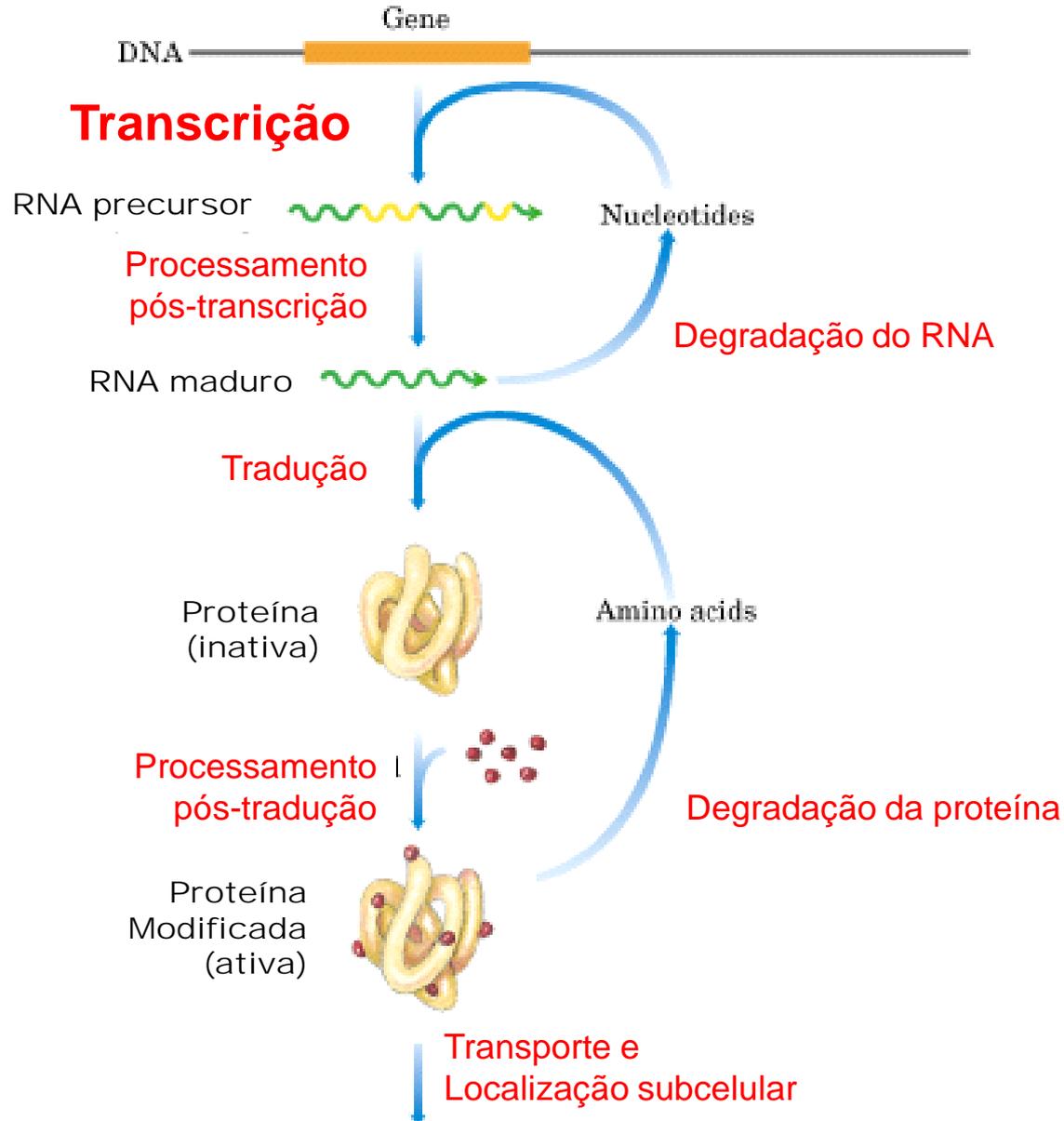
Procaríotos:

- Principalmente através da resposta direta a variações nas condições ambientais (genes ativados e reprimidos)
- Transcrição acoplada com a tradução (processos simultâneos)

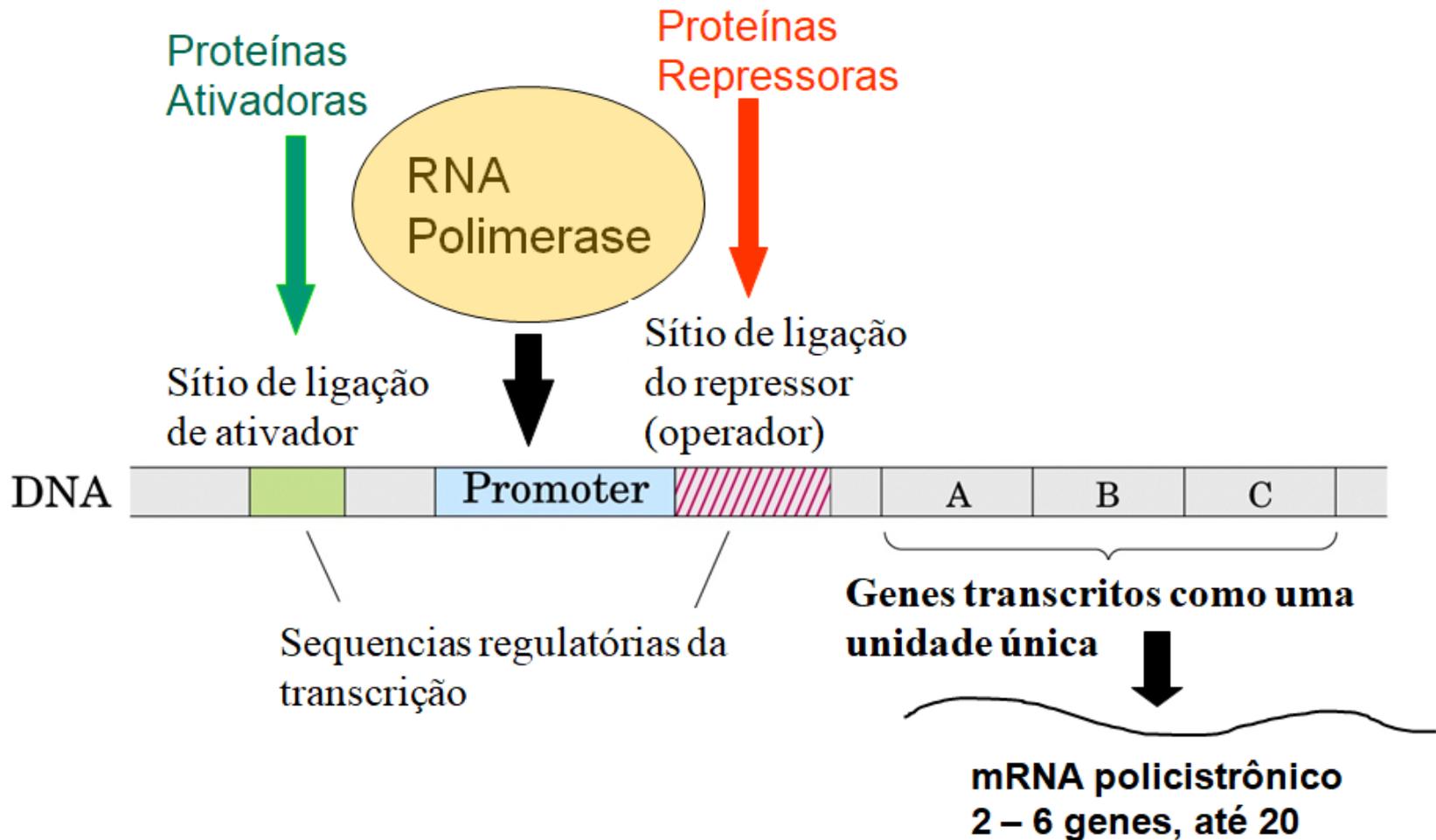
Eucariotos multicelulares:

- Células estão organizadas em tecidos e órgãos. Resposta direta às variações nas condições ambientais é limitada. Resposta em função de sinalização hormonal.
- Transcrição ocorre em compartimento distinto da tradução eliminando a possibilidade de acoplamento

Principais pontos de regulação da expressão gênica



Genes em procariotos são regulados em unidades transcricionais chamadas **operons: conjuntos de genes sob controle de uma região regulatória comum**



Exemplos de operons em bactérias

- **Genes de vias biossintéticas de aminoácidos**

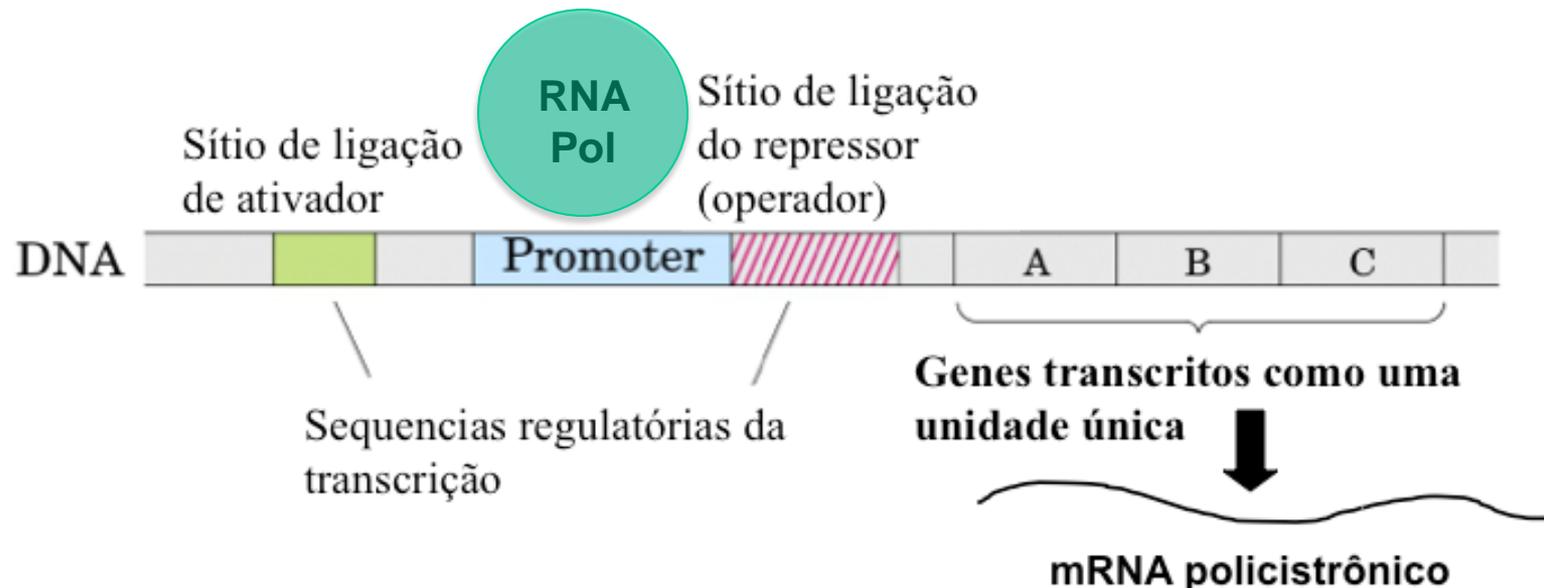
ex: operon *Trp*,

- **Genes para utilização de diferentes substratos como fonte de carbono**

ex: operons *Lac*, *Ara*

- **Genes envolvidos em respostas celulares específicas**

ex: operon SOS (Reparo de DNA)



Expressão gênica constitutiva

Genes com taxas de **transcrição constante** ao longo do ciclo de vida da célula

X

Expressão gênica regulada

Genes cuja **transcrição é induzida ou reprimida em função de estímulos** específicos

Características de genes com expressão constitutiva

Nível de transcrição aproximadamente constante na célula:

- proteínas estruturais (ex. citoesqueleto)
- enzimas de vias metabólicas (ex. Ciclo do ácido cítrico)



- (Procariotos) Taxa de transcrição de genes constitutivos é dada pela **alta afinidade** da ligação da RNA polimerase (holoenzima) à região promotora
- (Eucariotos) a transcrição basal também depende da presença de **fatores de transcrição**

Mecanismos básicos de regulação da transcrição em procariotos

Regulação negativa

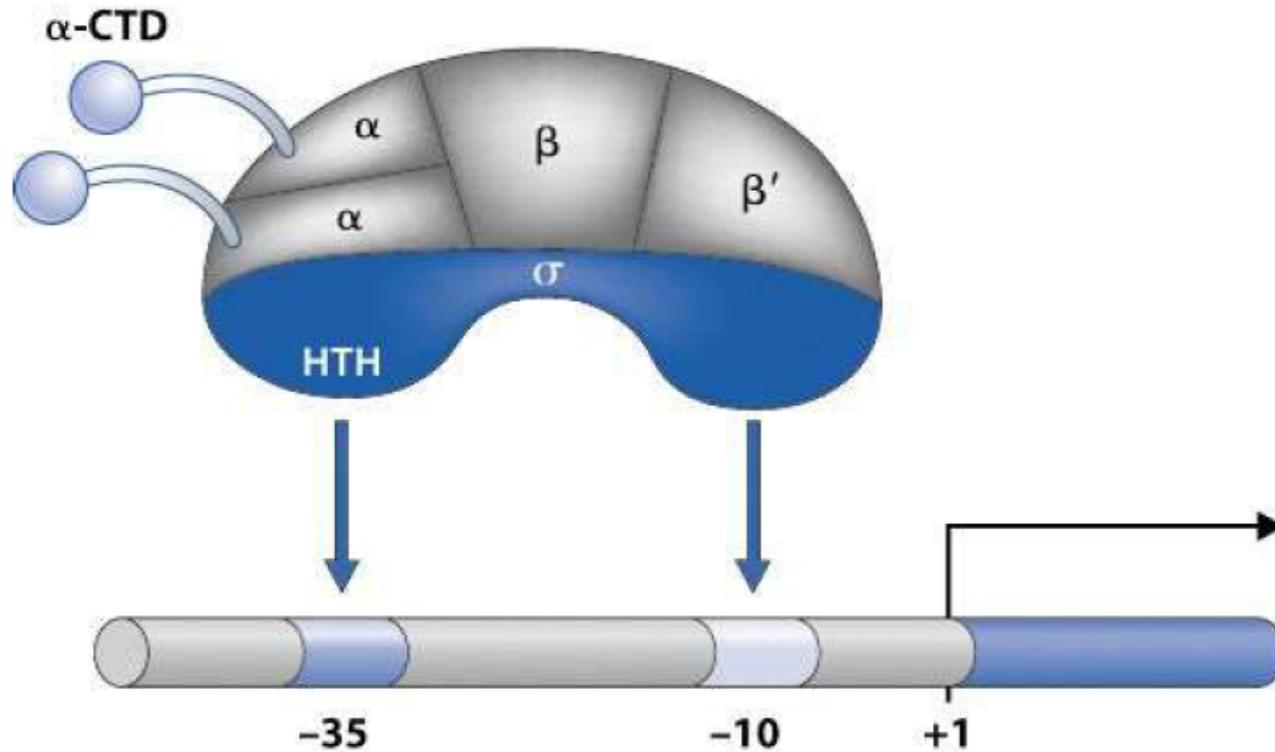
(uma proteína repressora ligada ao DNA inibe a transcrição)

Regulação positiva

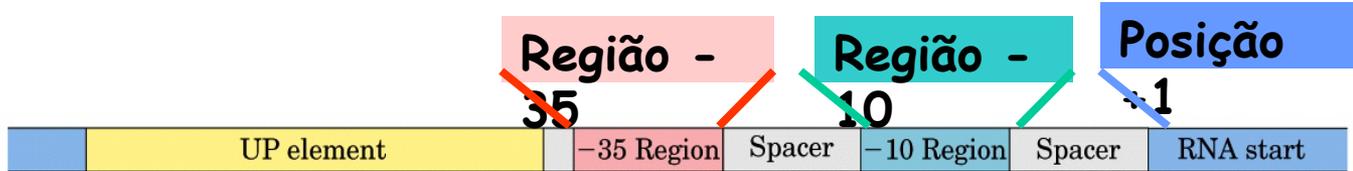
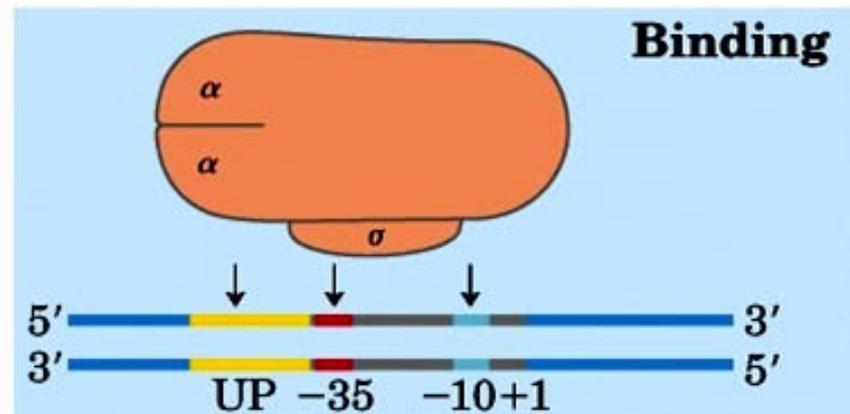
(uma proteína ativadora ligada ao DNA facilita a transcrição)

Em ambos os casos, a afinidade do ativador/repressor pelo DNA é modulada pela interação com **moléculas sinalizadoras**

Promotores são reconhecidos pela RNA polimerase através de sua subunidade sigma



Promotores de genes bacterianos



Consensus sequence



rrnB P1



trp



lac



recA



araBAD



Fatores sigma alternativos

E. coli possui 7 fatores sigmas

σ subunit	K_d (nM)	Molecules/cell*	Holoenzyme ratio (%)*	Function
σ^{70}	0.26	700	78	Housekeeping
σ^{54}	0.30	110	8	Modulation of cellular nitrogen levels
σ^{38}	4.26	<1	0	Stationary phase genes
σ^{32}	1.24	<10	0	Heat shock genes
σ^{28}	0.74	370	14	Flagella and chemotaxis genes
σ^{24}	2.43	<10	0	Extracytoplasmic functions; some heat shock functions
σ^{18}	1.73	<1	0	Extracytoplasmic functions, including ferric citrate transport

Source: Adapted from Maeda, H., Fujita, N., & Ishihama, A. (2000) *Nucleic. Acids Res.* 28, 3500.

Note: σ factors are widely distributed in bacteria; the number varies from a single σ factor in *Mycoplasma genitalium* to 63 distinct σ factors in *Streptomyces coelicolor*.

*Approximate number of each σ subunit per cell and the fraction of RNA polymerase holoenzyme complexed with each σ subunit during exponential growth. The numbers change as growth conditions change. The fraction of RNA polymerase complexed with each σ subunit reflects both the amount of the particular subunit and its affinity for the enzyme.

Table 26-1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

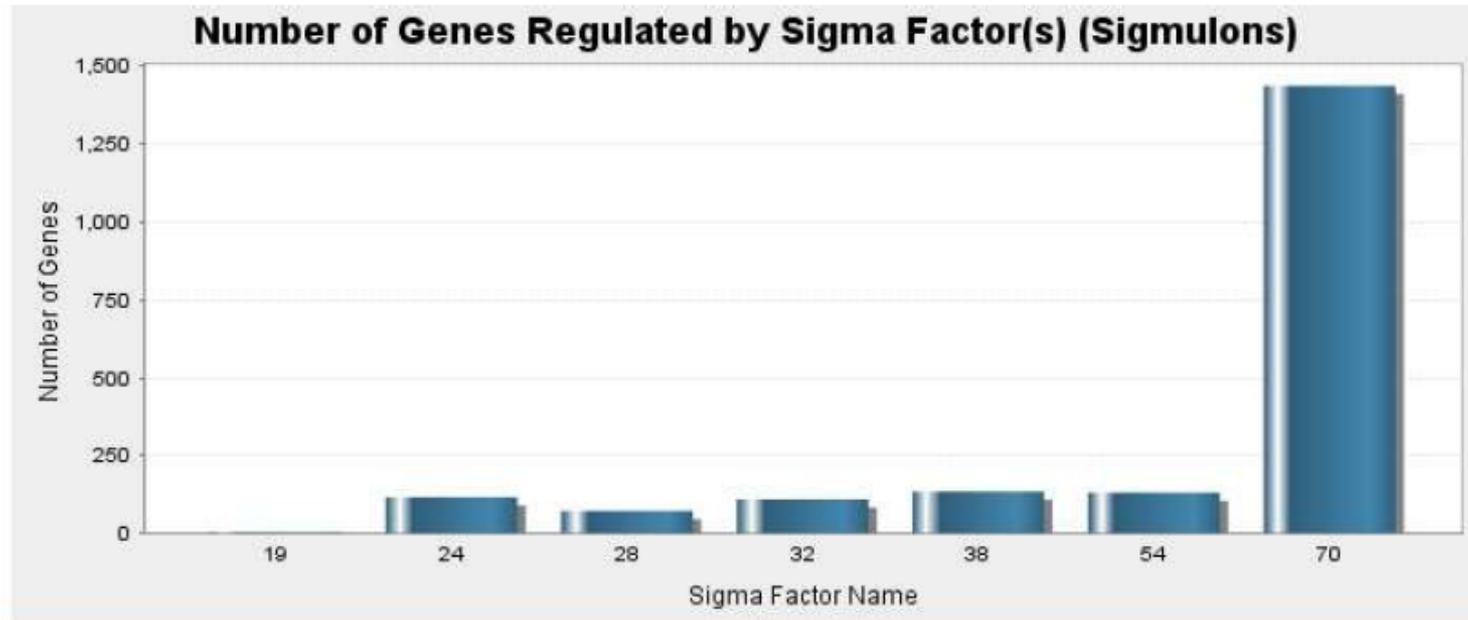
Em geral existe um sigma principal (“housekeeping”) e sigmas ditos “alternativos”

Sigmas reconhecem diferentes sequências consenso dos elementos -10 e -35 de promotores

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-Aronis, 1996, *Mol. Microbiol.* **21**:887.

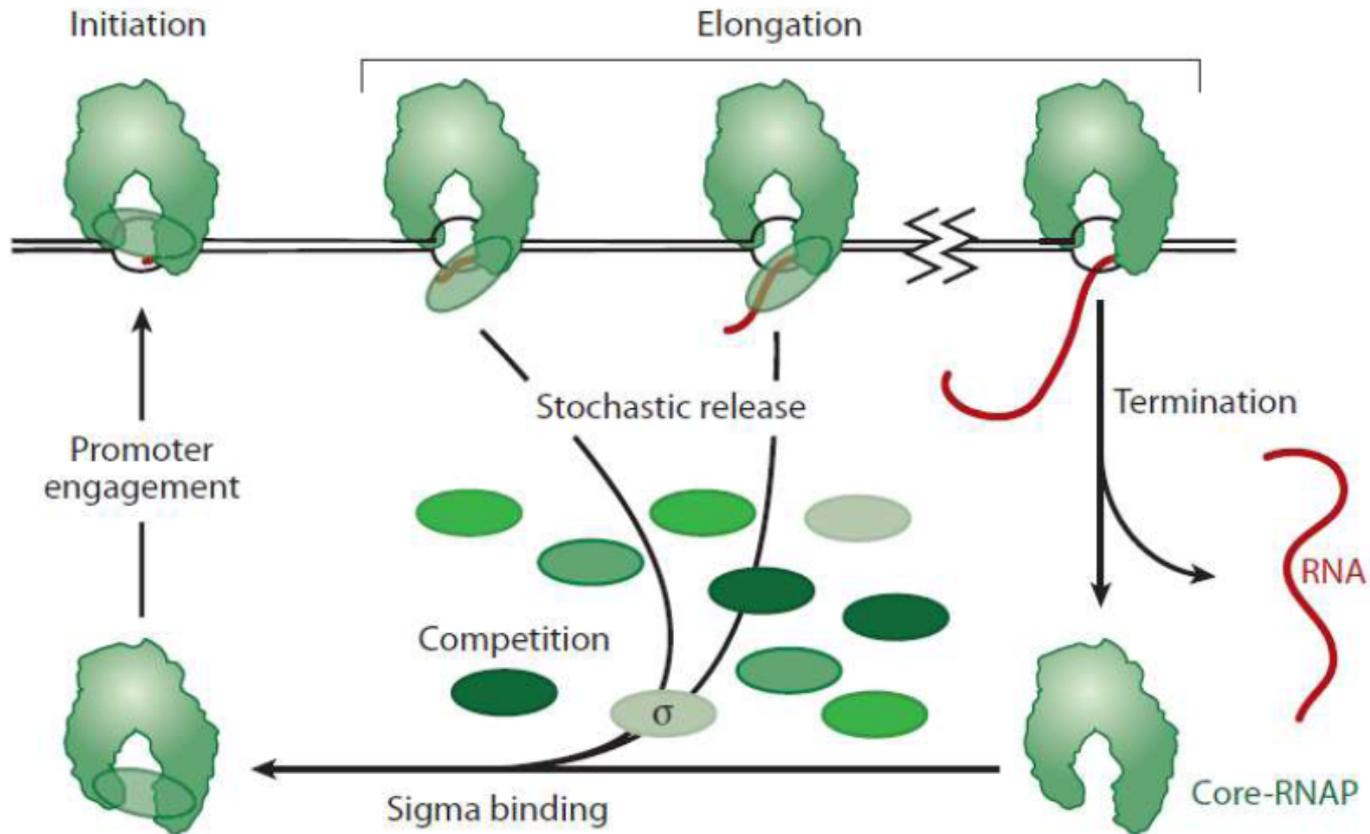


Sigma Factor Name	Number of Genes
Sigma19	5
Sigma24	117
Sigma28	73
Sigma32	110
Sigma38	135
Sigma54	132
Sigma70	1437

©1998-2011, CCG/UNAM All Rights Reserved.
RegulonDB 7.2, 06-MAY-11.

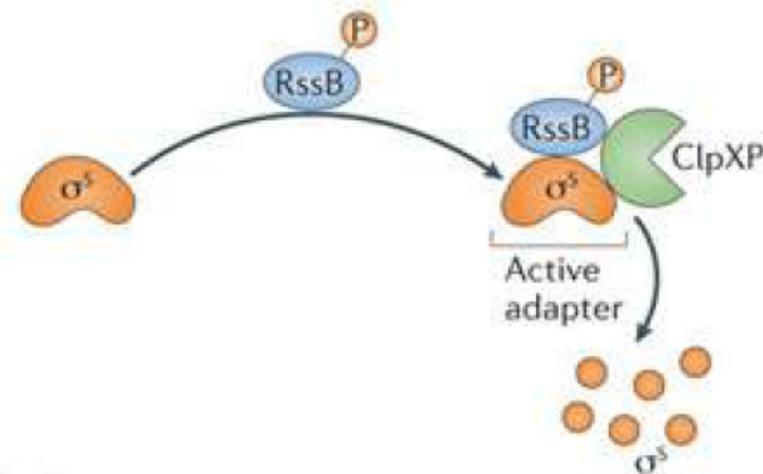
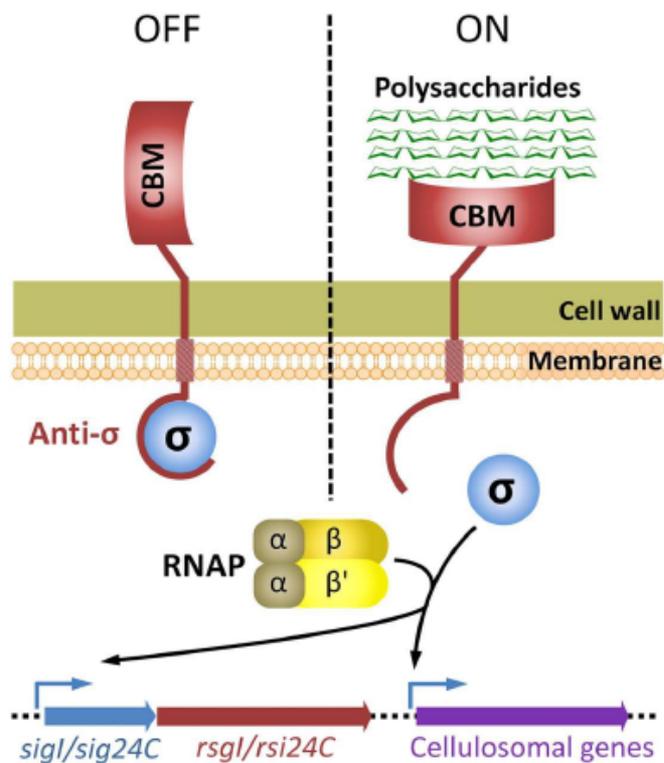
Grupo de genes controlados por um mesmo fator de transcrição ou estímulo é chamado de “Regulon”

Sigmas competem pela RNA polimerase



Sigmas alternativos tem que ser mantidos inativos até que necessários

Duas principais maneiras de manter sigmas alternativos inativos



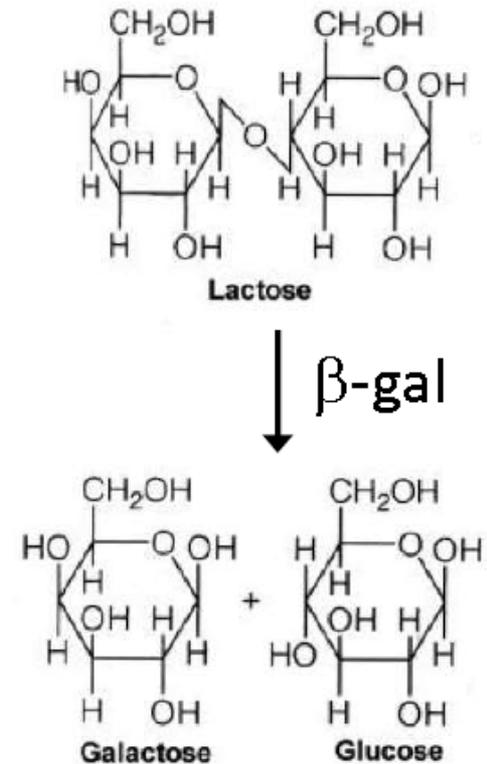
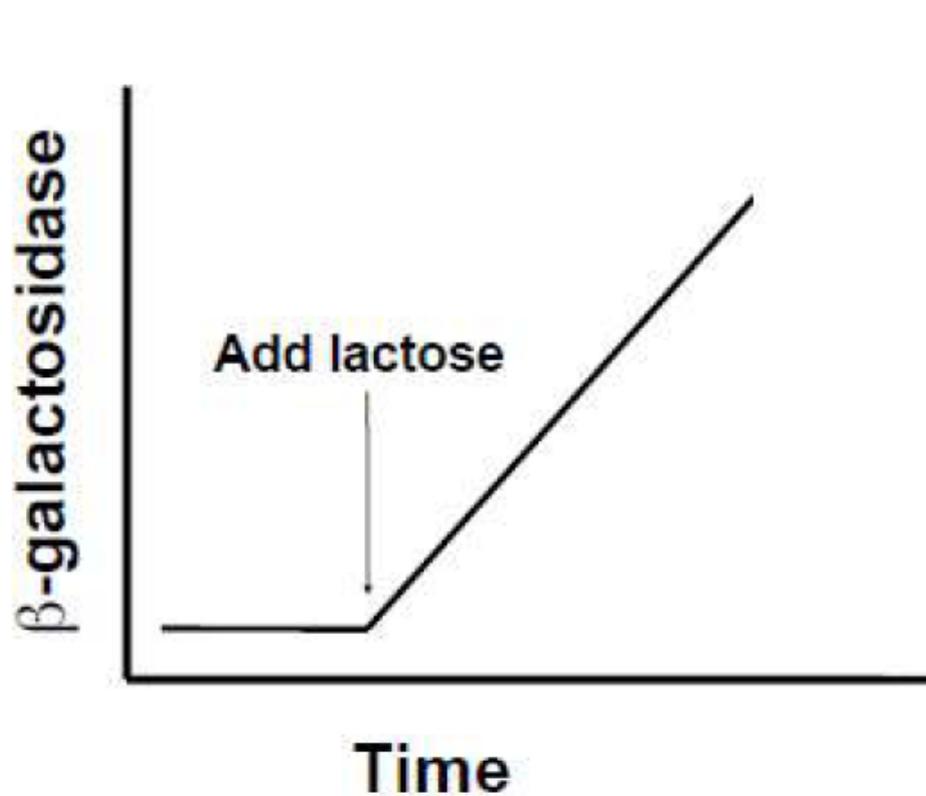
Inibição da tradução/
desestabilização

Seqüestro por um “anti-sigma”

François Jacob e Jacques Monod, em 1960, foram os primeiros a propor um mecanismo que explicasse como genes poderiam ser ligados e desligados:
modelo do operon

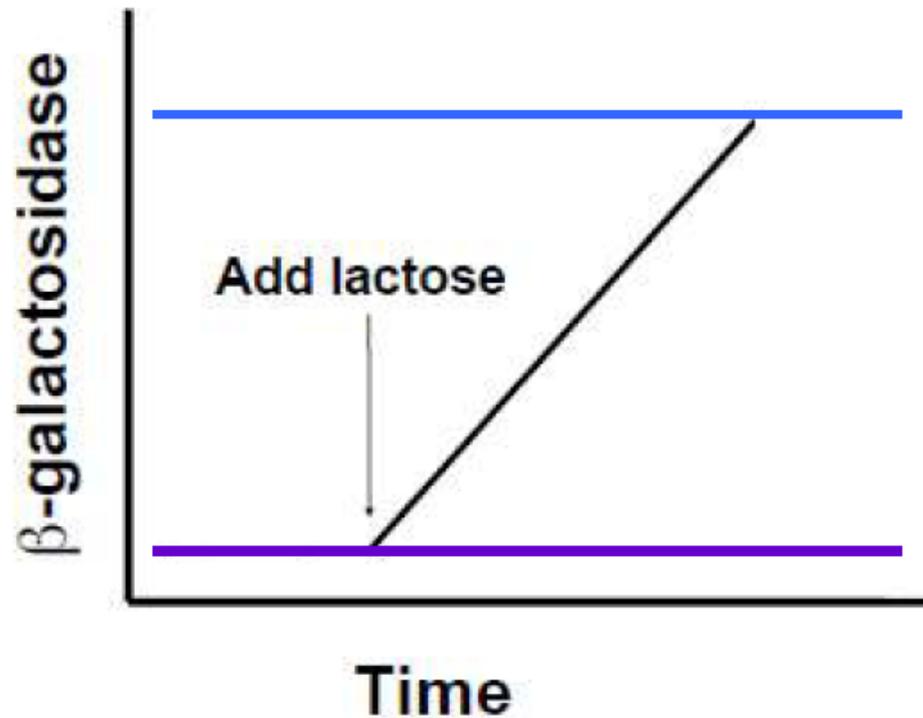
Prêmio Nobel da Medicina em 1965 pela demonstração de que os níveis de enzimas celulares são reguladas ao nível de transcrição por um mecanismo de *feedback* controlado pelos níveis do substrato das mesmas enzimas.

O fenômeno da inducibilidade



Enzima necessária para a metabolização da lactose só era produzida quando as bactérias eram cultivadas na presença deste açúcar. Lactose é um **indutor** !

Jacob e Monod usaram apenas genética e lógica para propor um modelo que explicasse este fenômeno

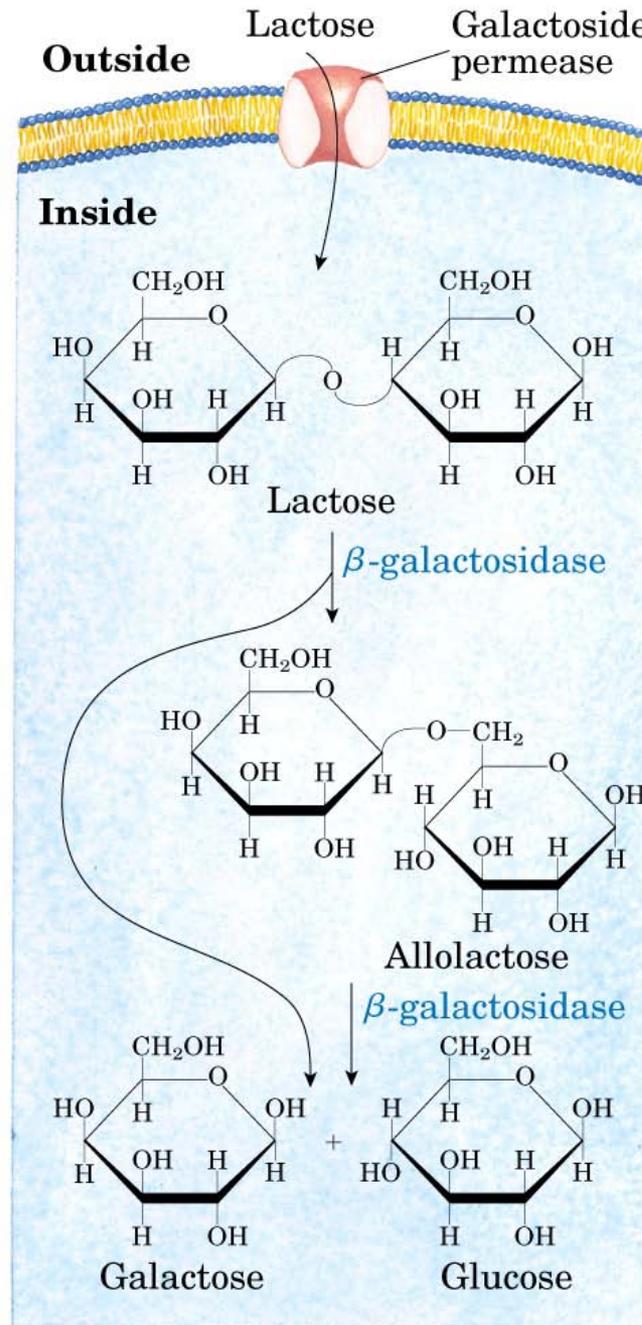


Isolaram mutantes que não tinham mesma resposta de indução:

1) Mutantes que mesmo na presença de lactose não produziam mais beta-galactosidase – **não indutíveis**

2) Mutantes que produziam beta-galactosidase independente da presença de lactose – **constitutivos**

Rota de utilização da lactose como fonte de carbono pelas células



Ligação glicosídica β 1-4

Ligação glicosídica β 1-6

O modelo do *operon*

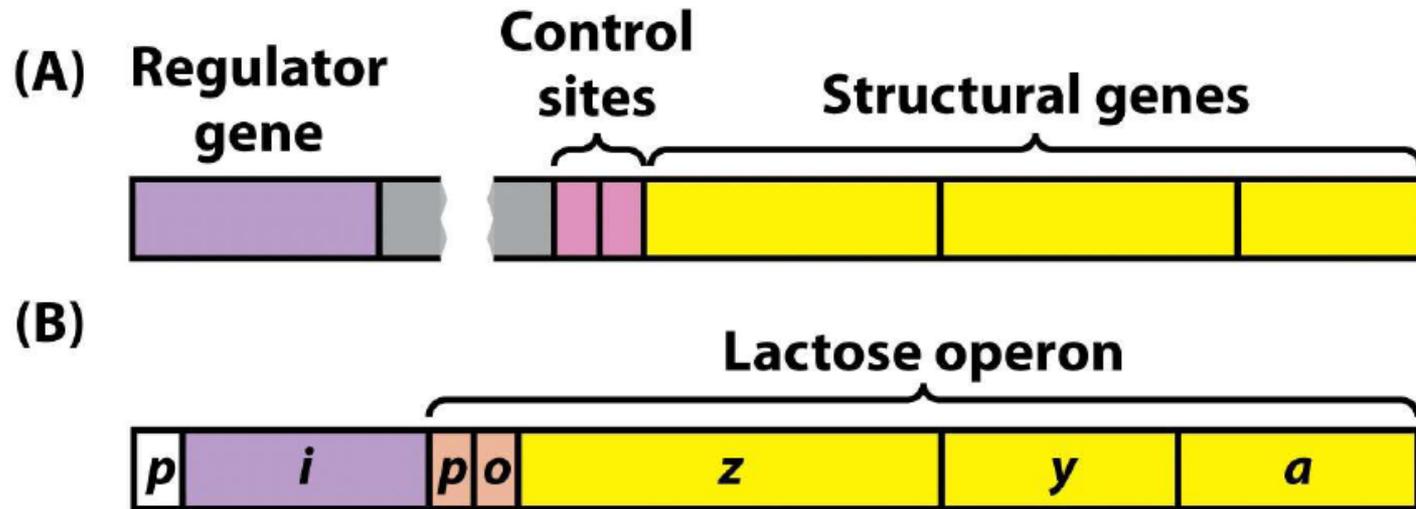


Figure 31-10
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

- Genes estruturais são controlados por gene regulador.
- Gene regulador codifica proteína (repressor) que se liga a sítio (operador) na região promotora do operon
- Gene regulador não é parte do operon. Expresso de seu próprio promotor

Operon *lac* na ausência de lactose

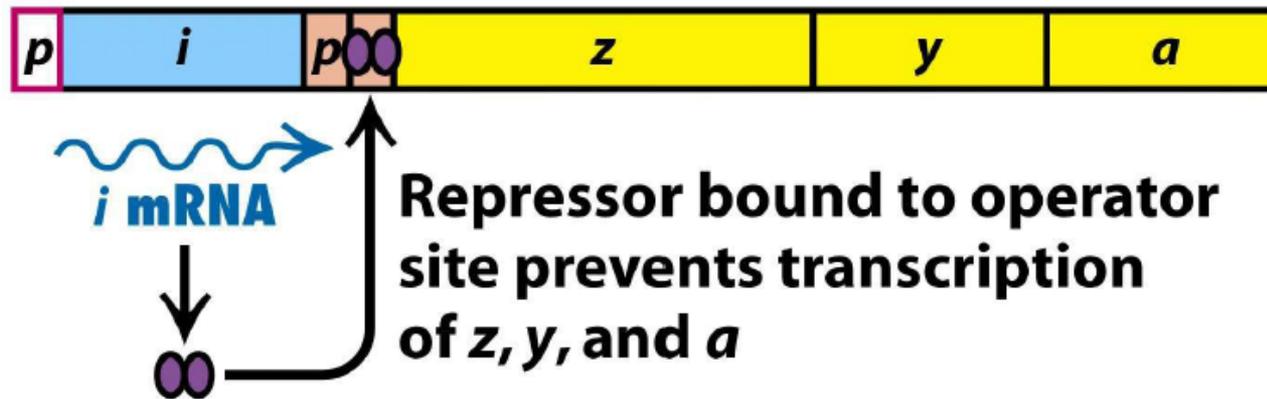


Figure 31-13a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

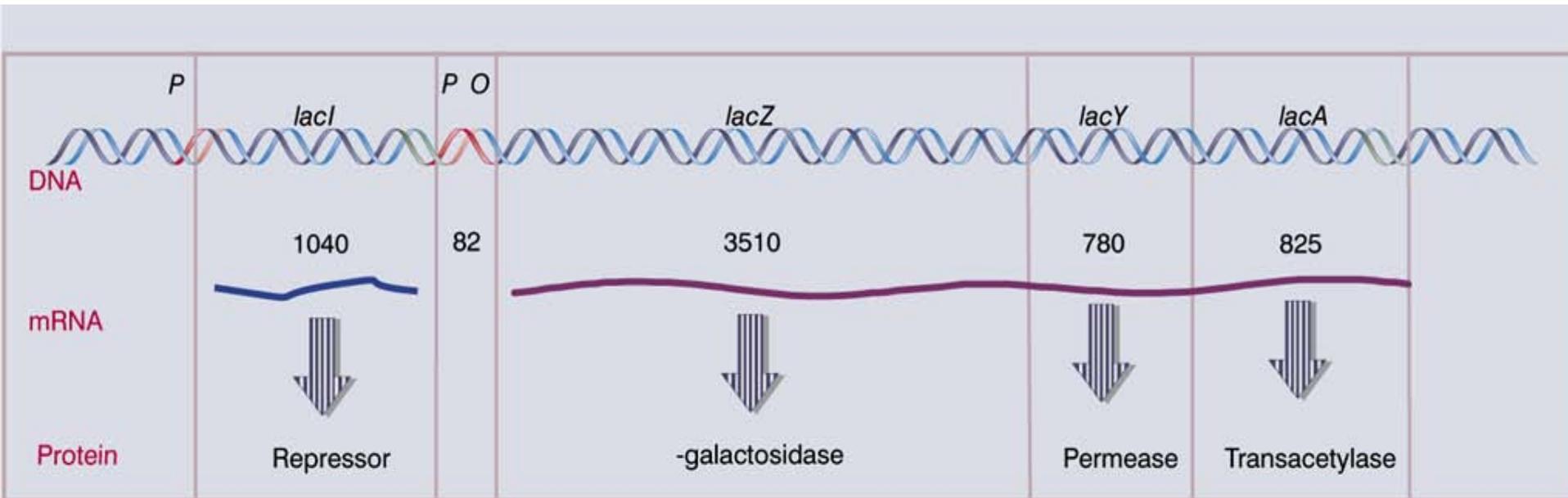
reprimido - OFF

Expressão do repressor (LacI) é constitutiva (gene sempre ligado)

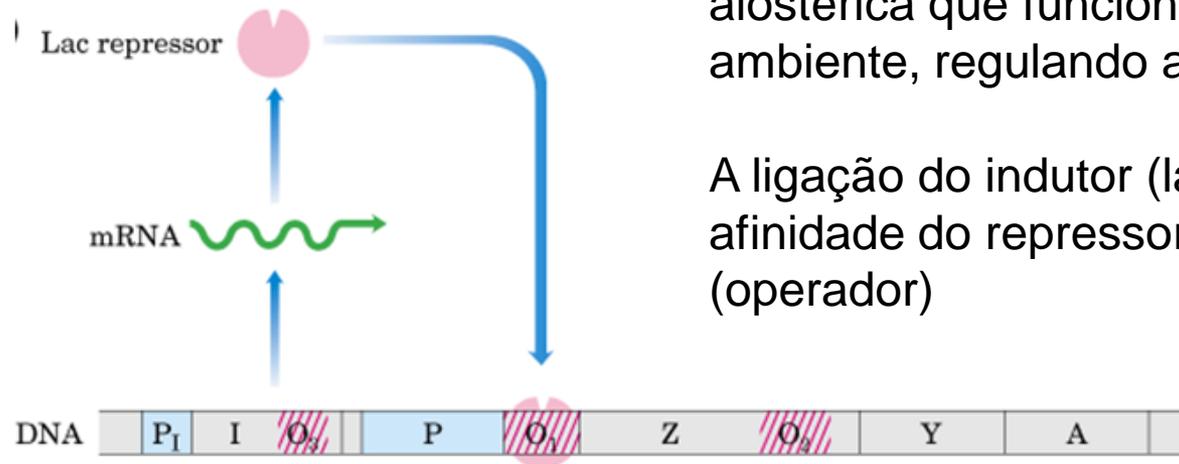
Operon Lac: ~6000 bp

Operador ocupa 26 bp do DNA acima do gene lacZ

Repressor Lac I expresso de forma constitutiva sob controle de outro promotor

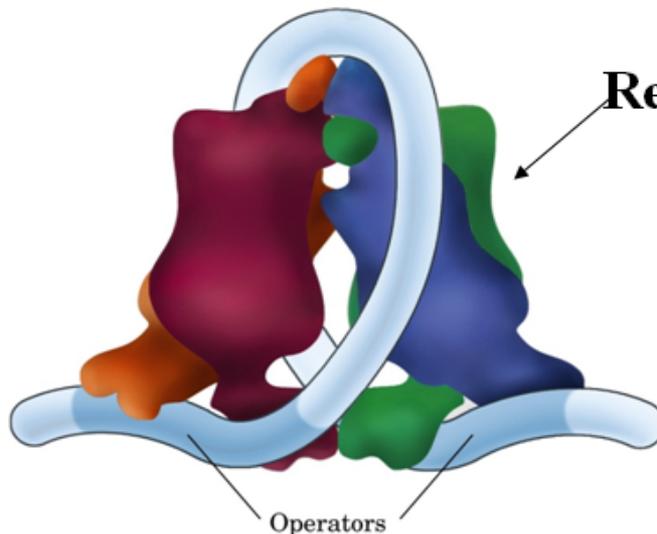


Na ausência de lactose a transcrição do operon Lac encontra-se reprimida: o **repressor Lac**



Repressor Lac: exemplo de proteína alostérica que funciona como sensor do ambiente, regulando a expressão gênica.

A ligação do indutor (lactose) muda a afinidade do repressor pelo DNA (operador)



Ligação do **repressor Lac** diminui **1.000 x** a transcrição do operon

Operon *lac* na presença de lactose

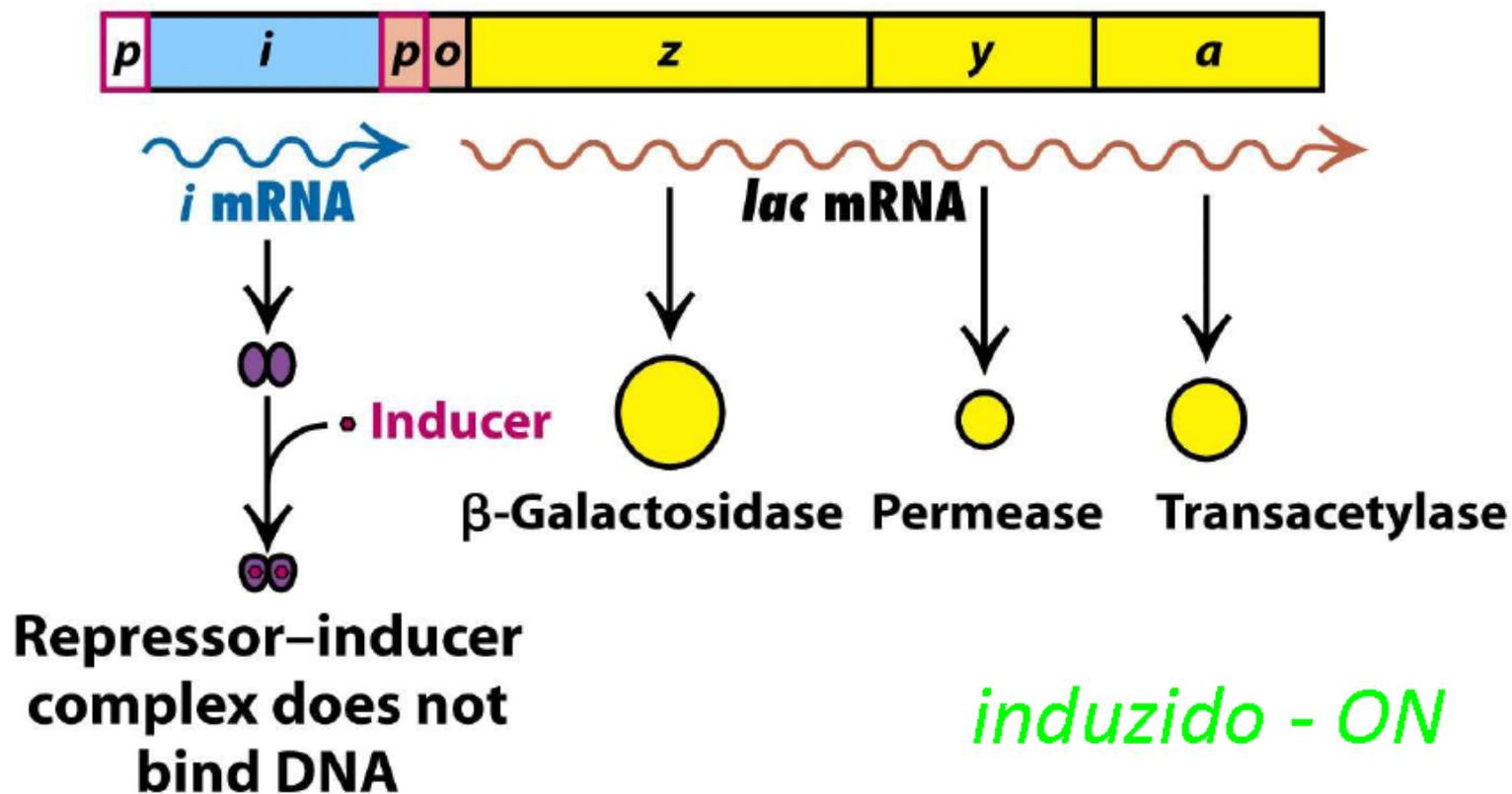
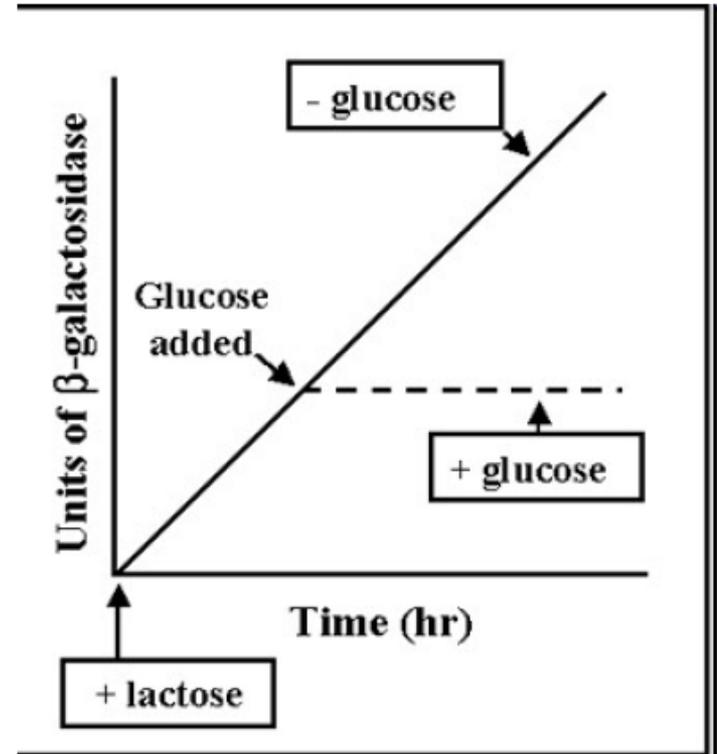
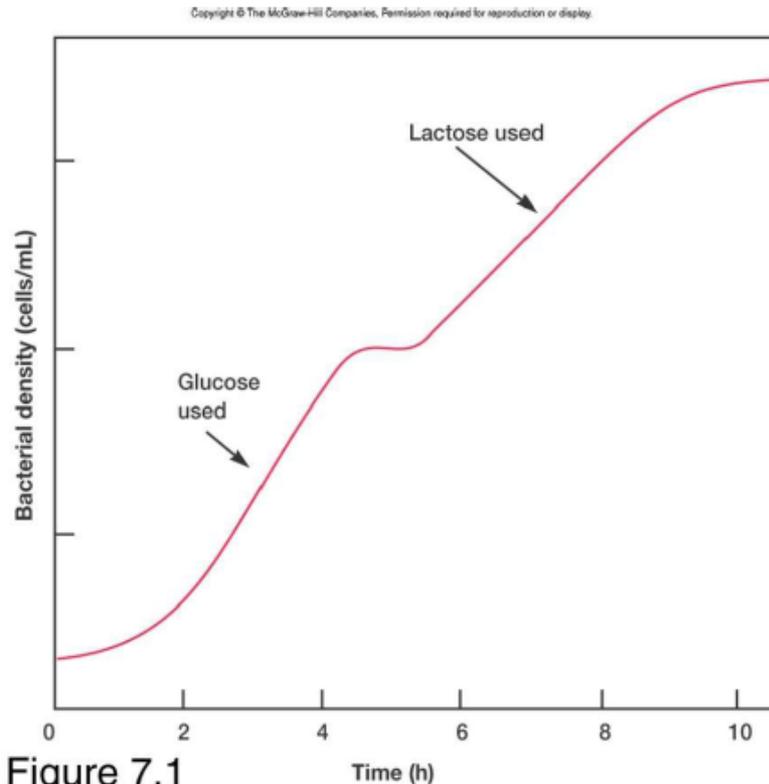


Figure 31-13b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Regulação Negativa!

Operon *lac* também é sujeito a regulação positiva

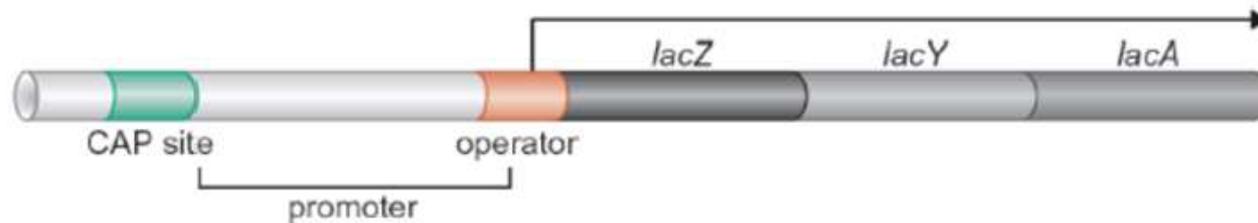


Glicose é a fonte de carbono preferida da *E. coli*
“diauxia” – curva de crescimento com duas fases
Glicose inibe a produção de β -gal induzida por lactose
“Repressão por Catabólito”

Operon Lac – Mecanismo de Repressão pelo catabólito

- mecanismo que previne a expressão de genes envolvidos no catabolismo de lactose e outros açúcares **na presença de glicose.**
- mediado por **AMP cíclico (cAMP)** e pela **Proteína receptora de cAMP (CRP)** (também chamada CAP, “Catabolyte gene Activator Protein).
- ao contrário do repressor Lac, **CRP é um elemento regulador positivo** que **responde aos níveis de glicose.**

Operon *lac* é regulado positivamente pela proteína CAP



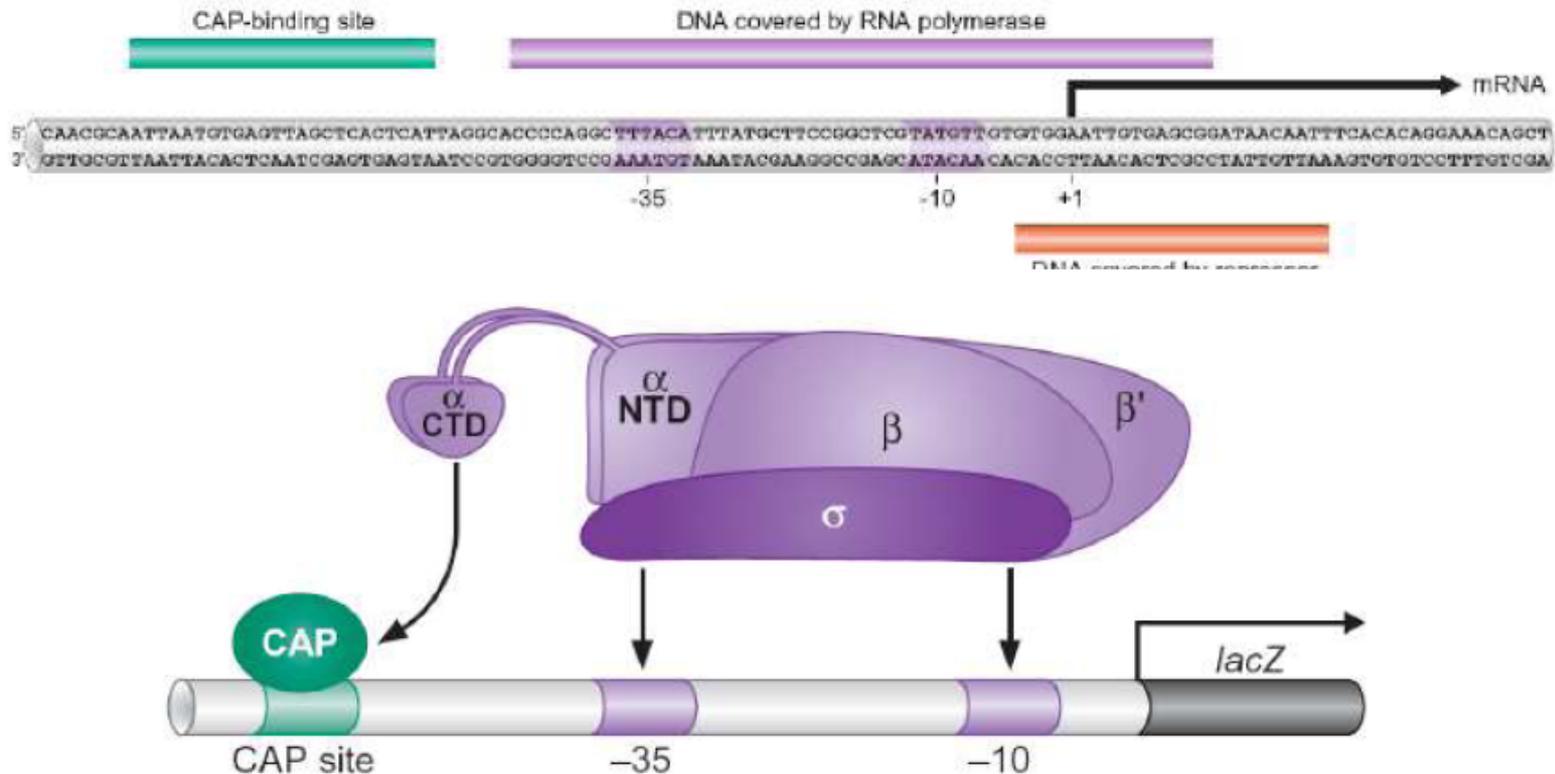
CAP – catabolite activator protein

ou

CRP – cyclic AMP receptor protein

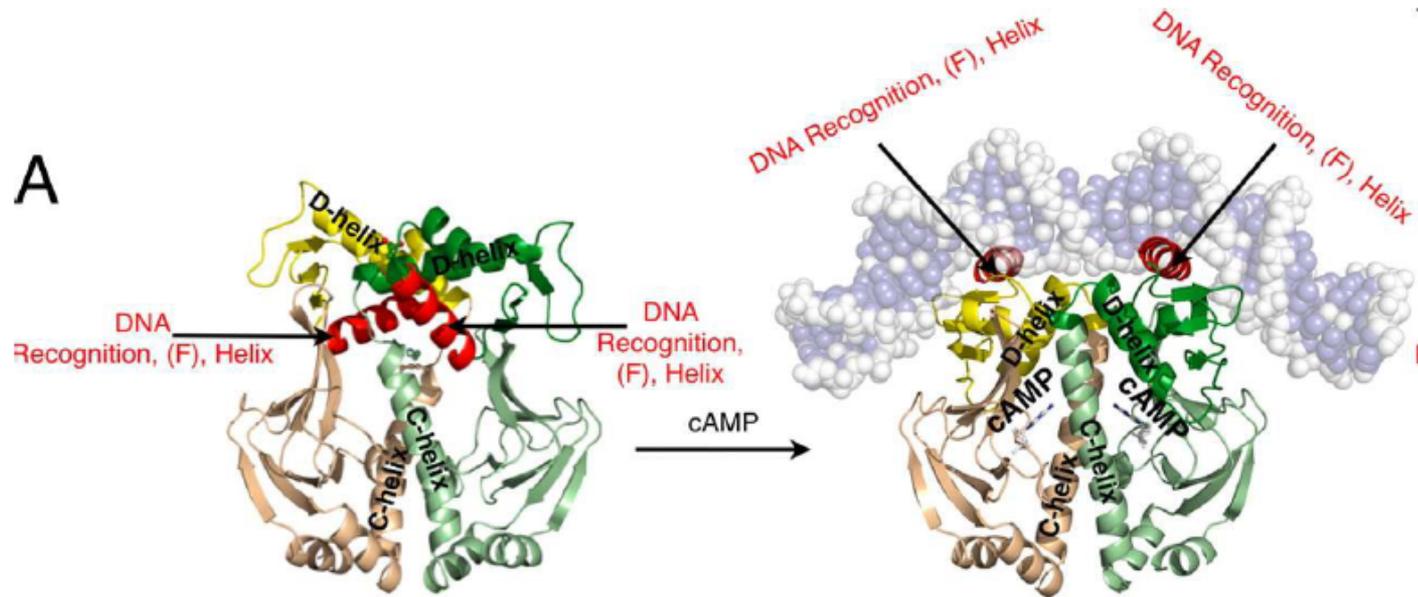
CAP é um fator de transcrição (ativador) que se liga a um sítio (CAP site) logo acima do promotor *lac*

CAP se liga logo acima do promotor e recruta RNA polimerase



Qual a relação entre a ligação de CAP e a disponibilidade de glicose ?

CAP é uma proteína que só liga no DNA se estiver ligada a cAMP



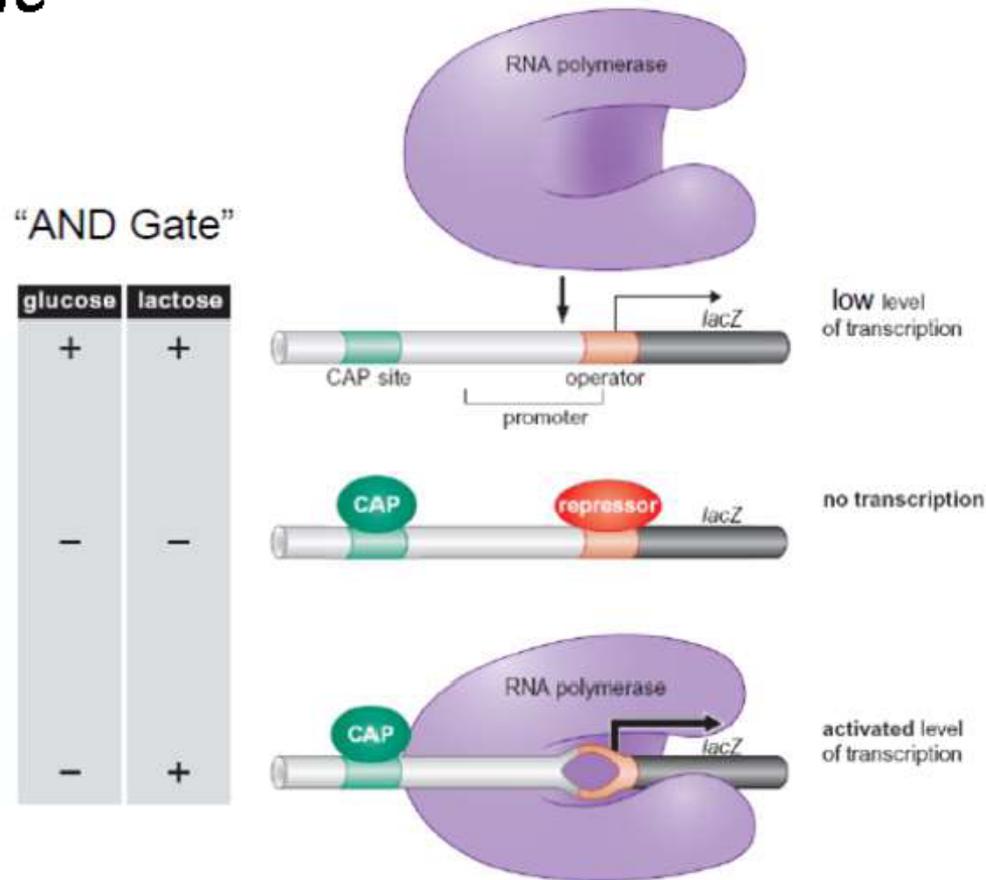
Em *E. coli*, produção de cAMP só ocorre quando não há glicose:

Alta glicose → Baixo cAMP

Baixa glicose → Alto cAMP

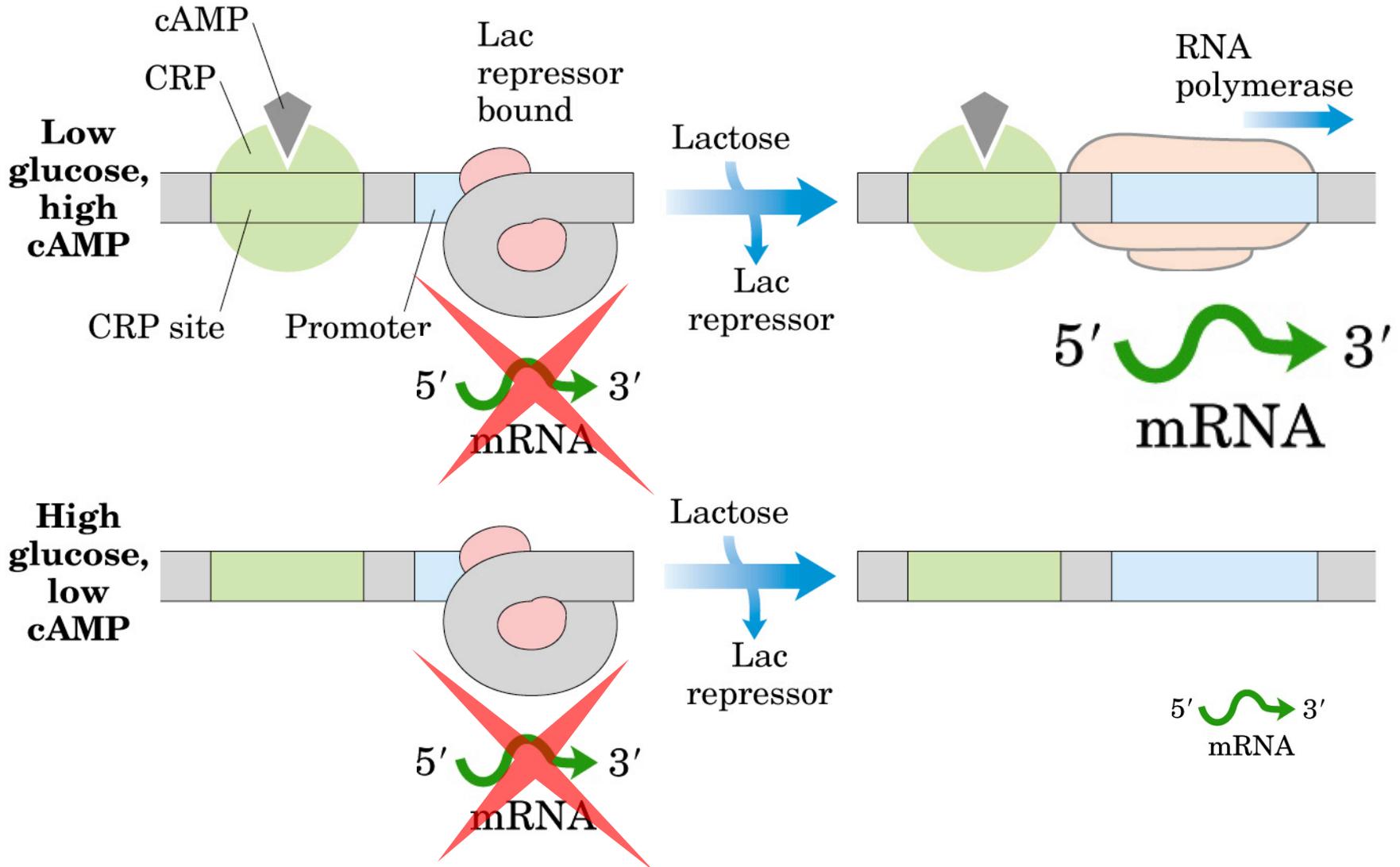
CAP só liga ao DNA quando falta glicose !

Controle combinatorial da expressão gênica no operon *lac*

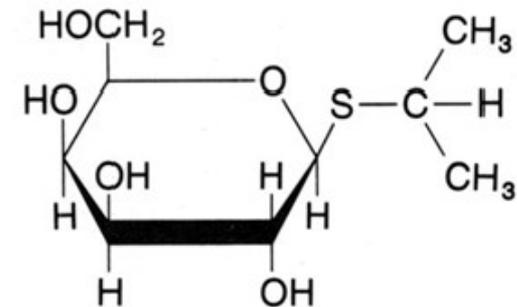
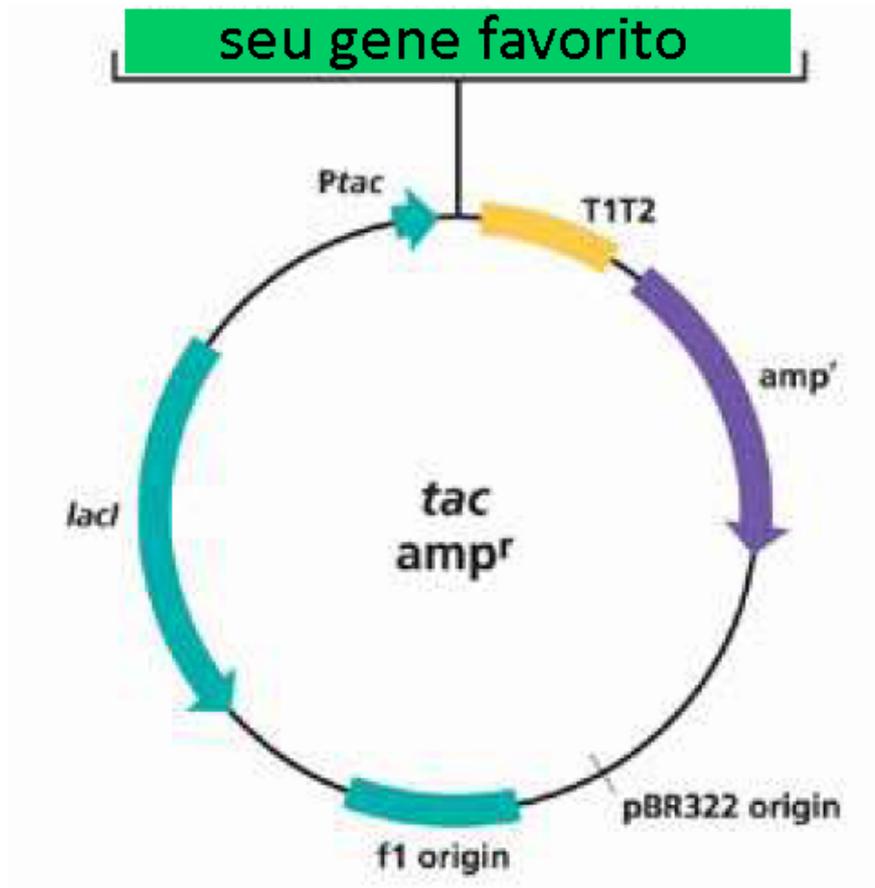


Duas condições (uma E outra) precisam ser atendidas para que o operon seja totalmente induzido
Cada regulador monitora um fator (input)

Operon *Lac* é controlado simultaneamente por regulação negativa (repressor *Lac*) e positiva (CRP)



Ferramentas geradas pelo estudo operon *lac*



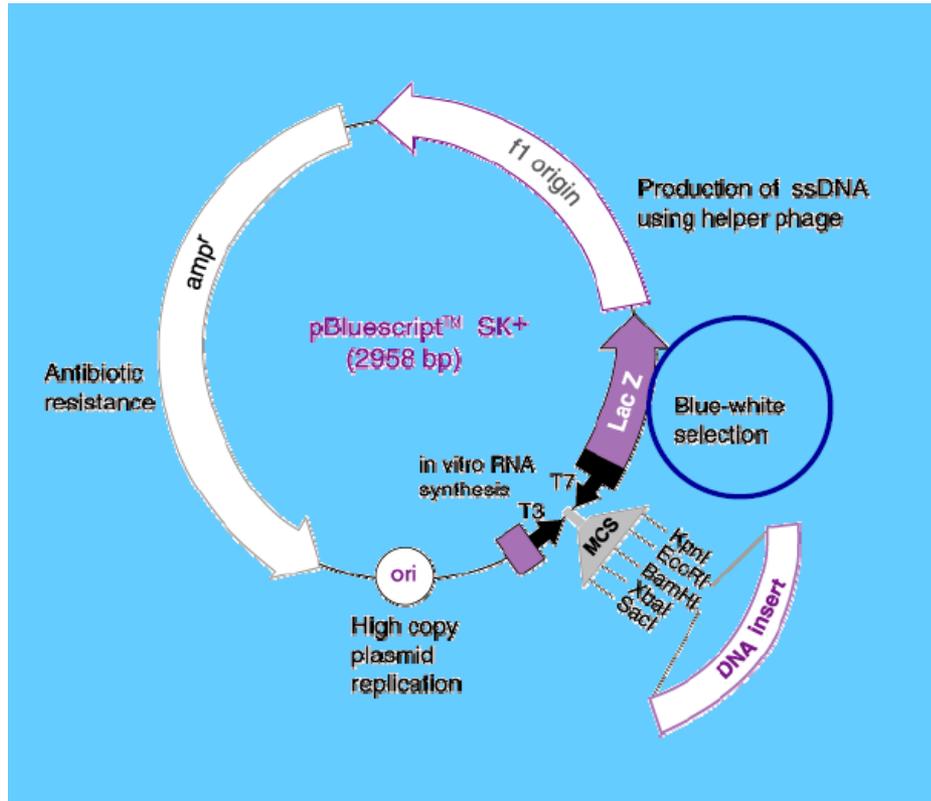
Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

“indutor gratuito”

- + IPTG – expressão *ON*
- IPTG – expressão *OFF*

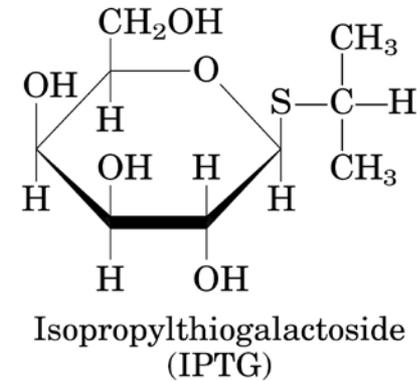
Vetores de expressão indutível

Utilização do operon lac para seleção de bactérias contendo plasmídeo de interesse



IPTG: análogo não-metabolizável de lactose

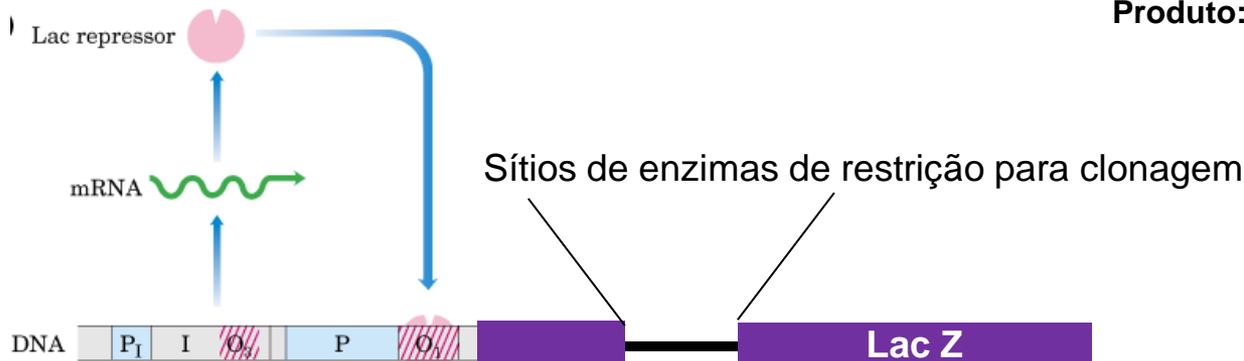
Ativa a expressão do operon Lac



X-Gal: substrato análogo de lactose cuja hidrólise gera produto com coloração azul

X-Gal: incolor

Produto: 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo: azul



Clonagem de gene de interesse no plasmídeo interrompe a sequencia de LacZ e as bactérias não hidrolizam X-Gal

REGULONS: conjunto de operons com reguladores comuns e que permitem a expressão coordenada de genes relacionados a uma mesma via metabólica.

ex. Além do operon Lac, a proteína CRP controla outros operons que codificam para enzimas responsáveis pelo metabolismo de outros açúcares (ex. arabinose).

Outros regulons existentes em procariotos: genes de choque térmico, resposta SOS à danos no DNA.