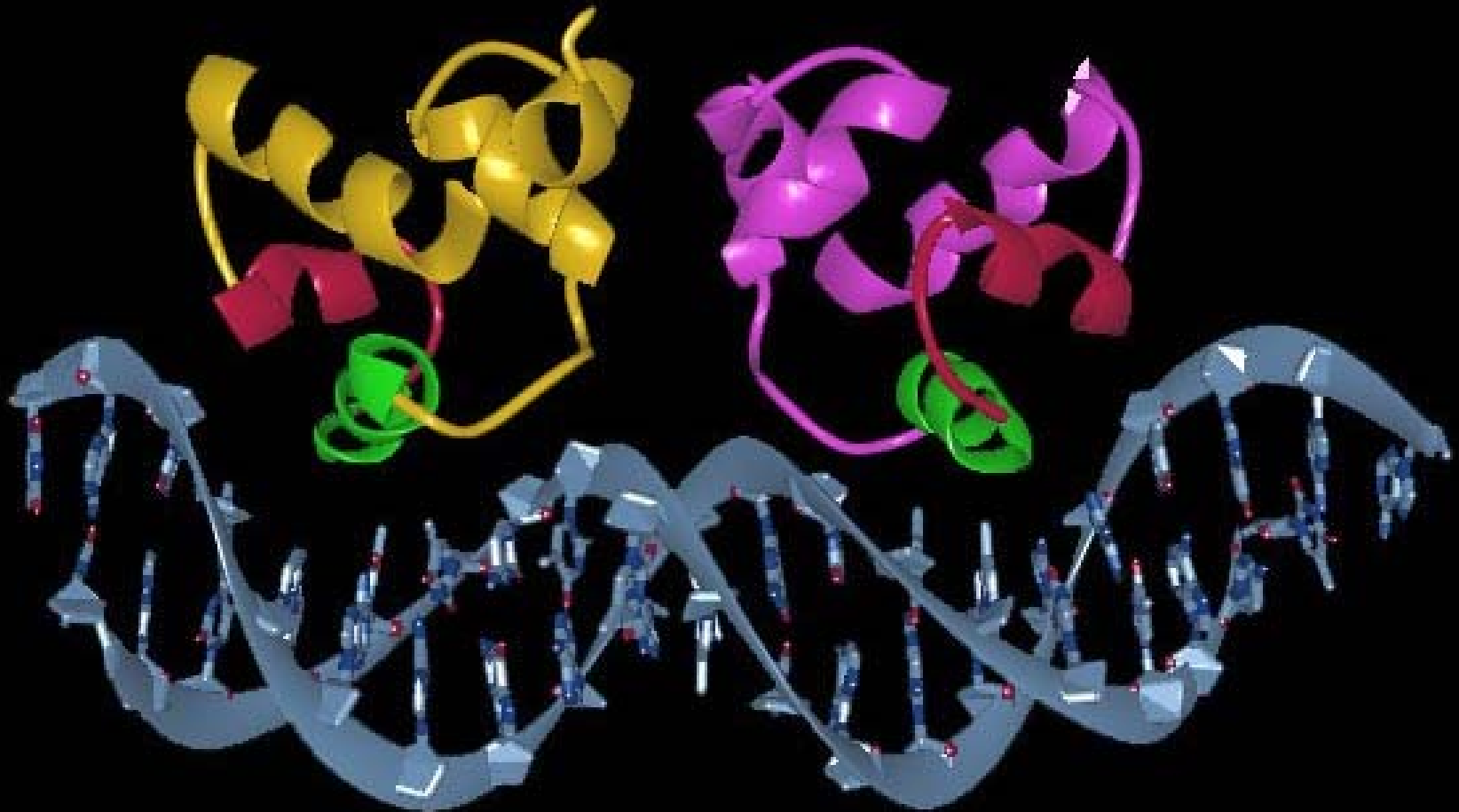


Regulação da Expressão Gênica em Procariotos





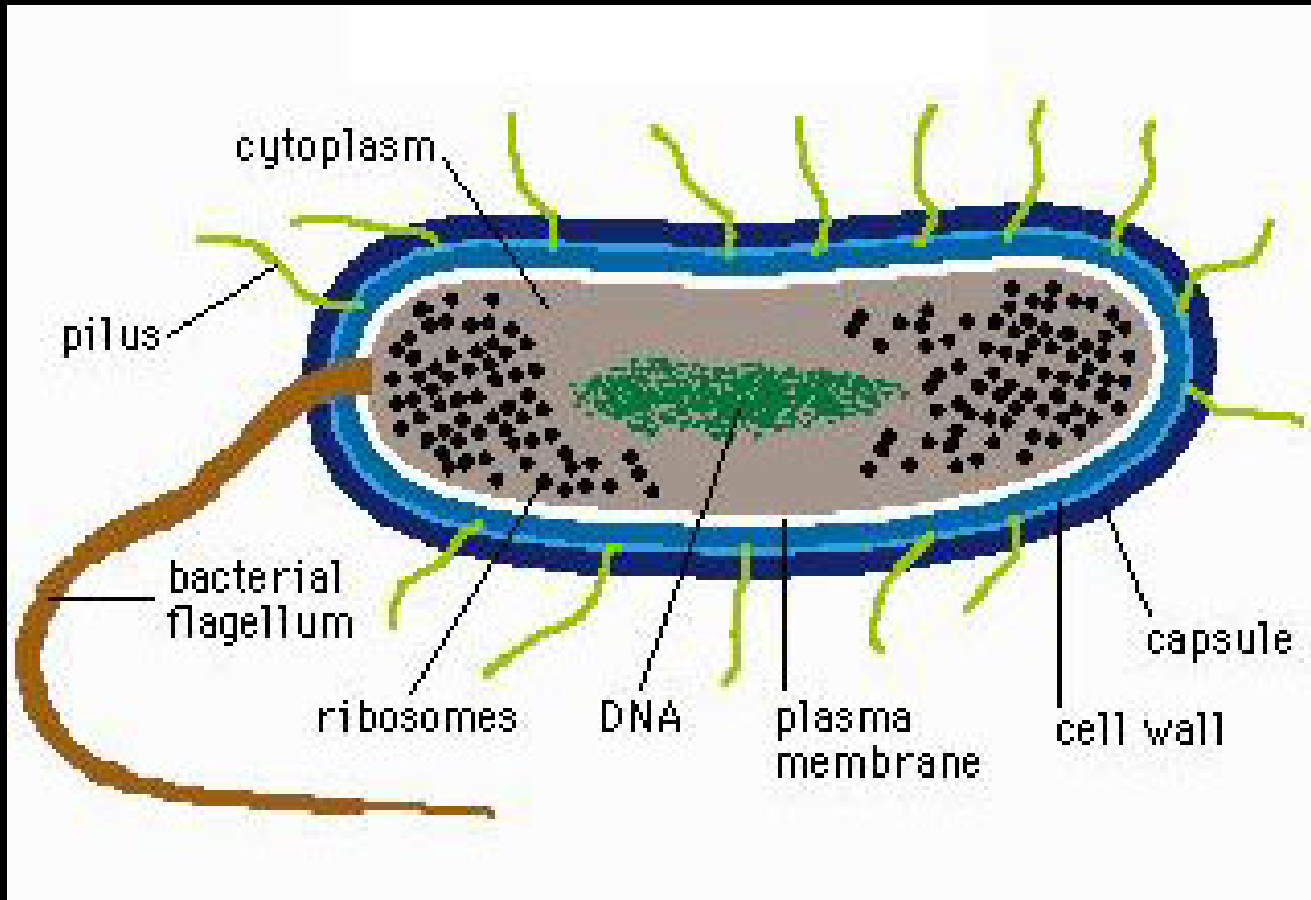
Legionella

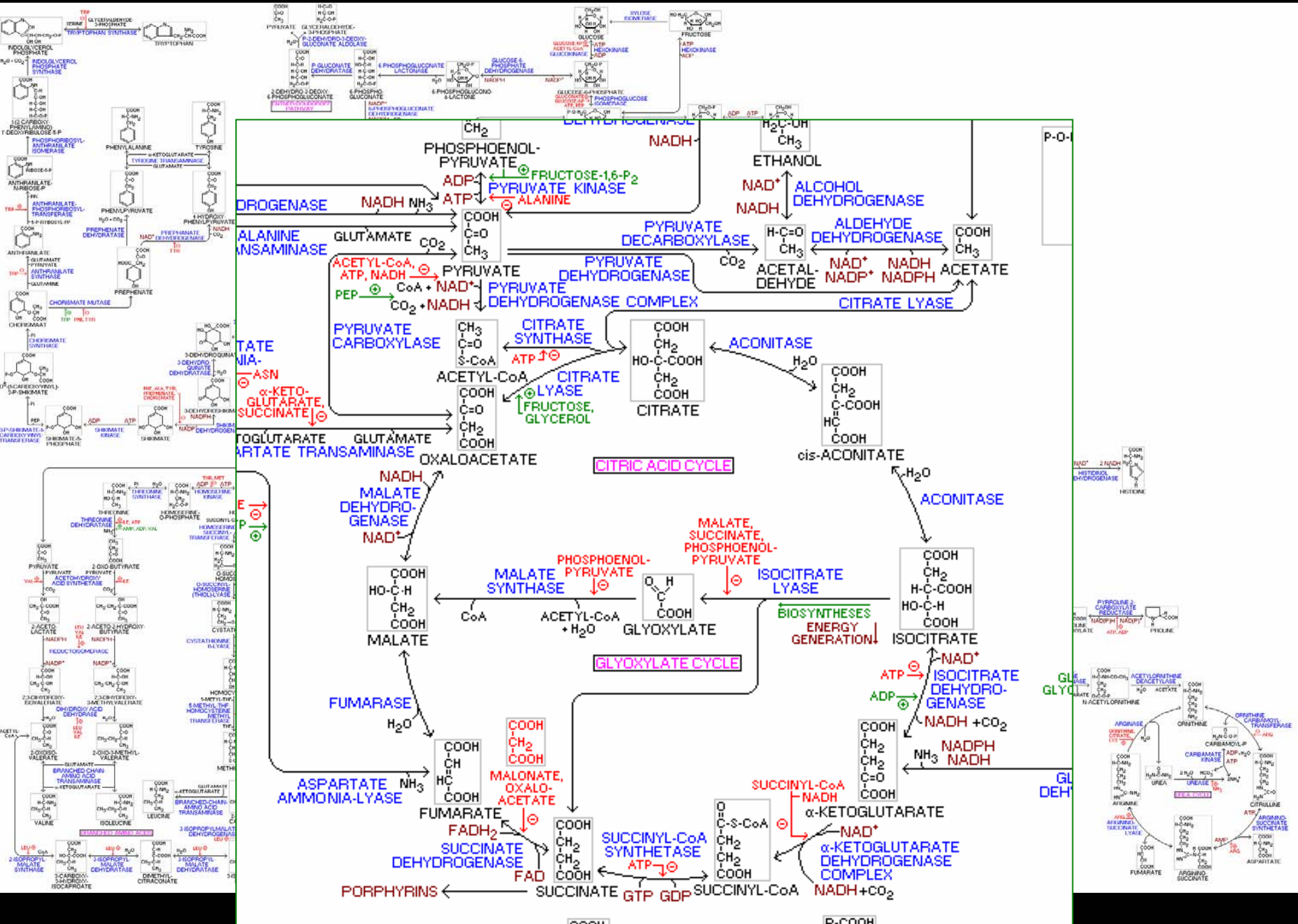


E. coli



Staphylococcus





“De acordo com o conceito estrutural estrito, o genoma é considerado como um mosaico de mapas moleculares independentes para a construção de constituintes celulares individuais. Entretanto, na execução destes mapas, a coordenação é evidentemente de valor absoluto para a sobrevivência. A descoberta de genes reguladores e operadores, e da regulação repressora da atividade de genes estruturais, revela que o genoma contém não somente uma série de mapas, mas um programa coordenado de síntese de proteínas e os meios para controlar sua execução”.

François Jacob e Jacques Monod, 1961

Porque regular?

Qual o custo (em termos de energia e recursos) para fazer uma proteína?

Para uma proteína de tamanho médio (300 aminoácidos):

1350 moléculas de ATP

1650 átomos de carbono

540 átomos de nitrogênio

Escherichia coli tem cerca de 4000 genes que codificam aproximadamente 2000 proteínas.

Imaginem o custo se todas estas proteínas fossem produzidas todo o tempo!

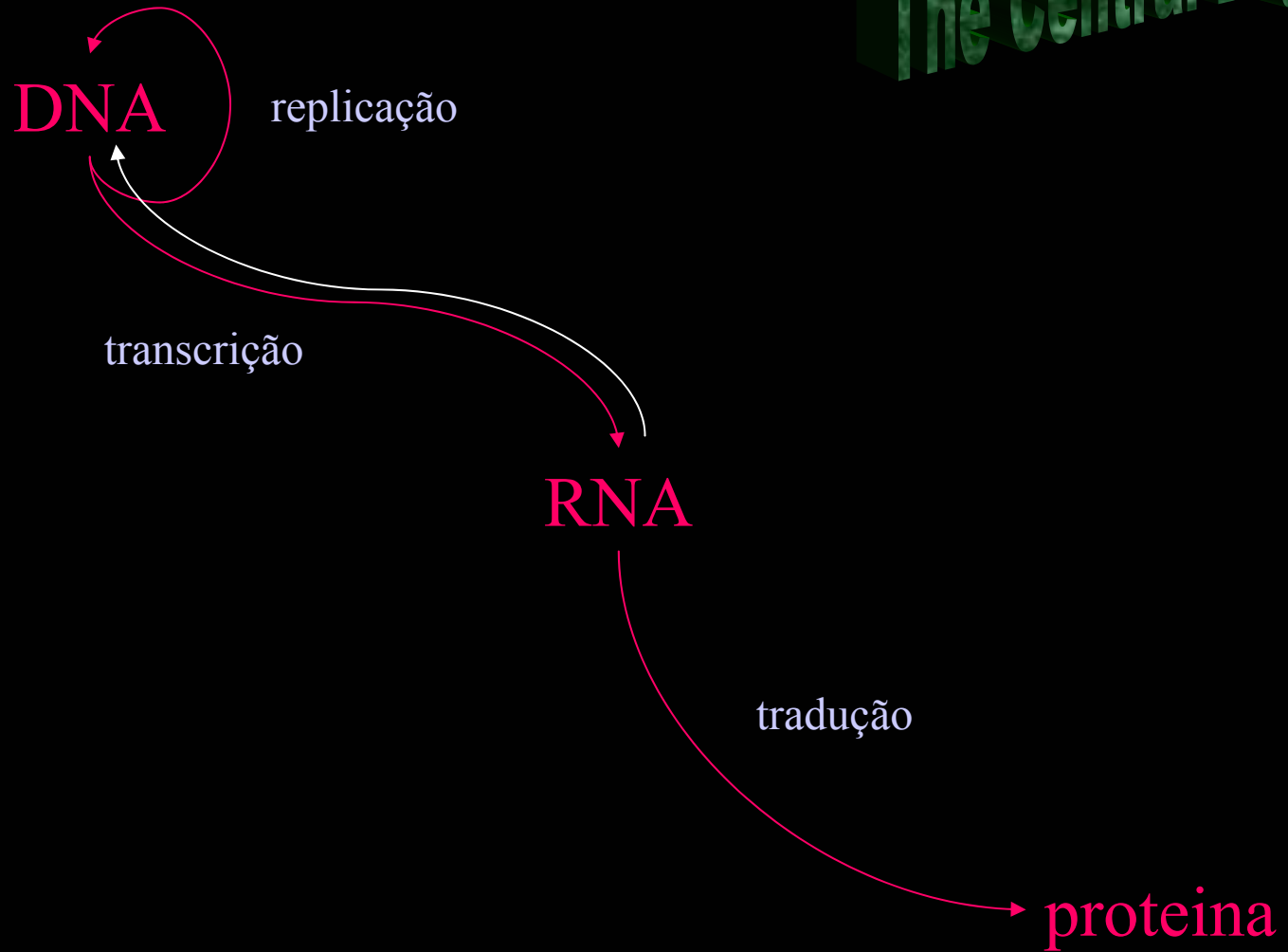


Quem, quando, quanto:

Já que a síntese de proteínas requer grandes quantidades de energia e recursos, as bactérias (e eucariotos) desenvolveram mecanismos elaborados para controlar a escolha de *quais* proteínas são feitas em diferentes momentos, sob diferentes condições ambientais.

Isso é regulação gênica.

The Central Dogma



Elementos da sequência de DNA

5' ou 'upstream'

3' ou 'downstream'

+1 (início de transcrição)



-35

-10

RBS

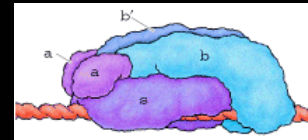
ATG

TAA

term

DNA

promotor



transcrição

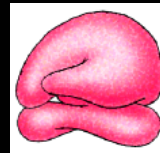
mRNA

5' UTR

AUG

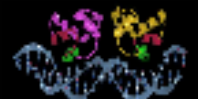
3' UTR

UAA

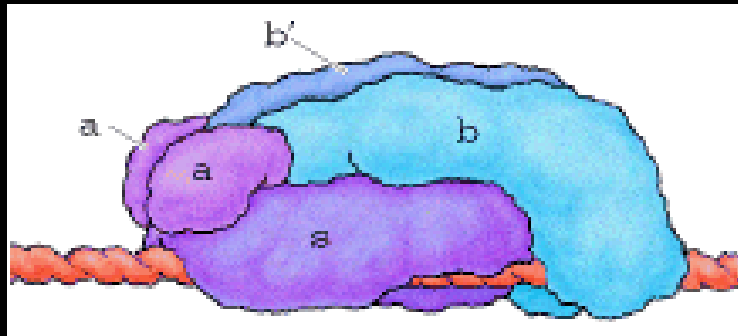


tradução

proteína



RNA Polimerase Bacteriana

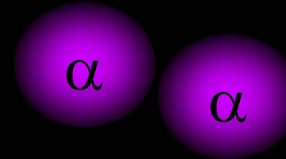


gene

produto

Função

rpoA



Montagem da enzima
Reconhecimento promotor
Ligação a ativadores

rpoB



Centro catalítico

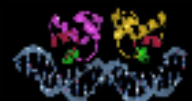
rpoC




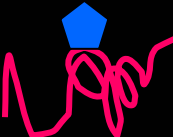
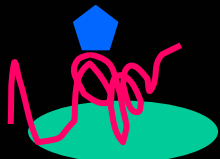


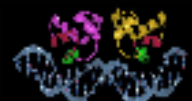
rpoD



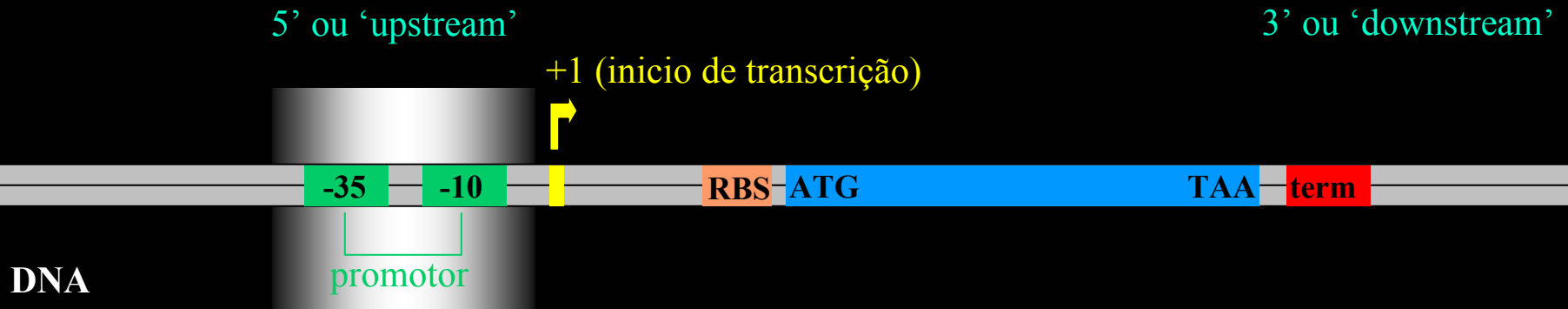
Especificidade promotor



Nível de Metabolismo	Mecanismo de Controle	Exemplo
DNA 	Mudança na estrutura do gene (poucos)	Variação de fase
mRNA 	Modulação da frequência de transcrição de genes (muitos)	Indução ou Repressão
proteína 	Modulação da frequência de tradução (alguns)	Proteínas ribossomais
proteína modificada 	A função da proteína é controlada pela modificação pós-traducional	Adenilação da glutamina sintetase
atividade enzimática 	A função catalítica de algumas proteínas (proteínas alostéricas) é modulada pela concentração de pequenos ligantes	Várias enzimas de vias biosintéticas ou reguladoras



PROMOTORES



O reconhecimento do promotor depende de uma sequência consenso

- A conservação de sequências consenso curtas é uma característica típica de regiões reguladoras (como promotores) tanto no genoma de procariotos quanto eucariotos
- Existem 4 elementos conservados nos promotores bacterianos:
 - o início de transcrição
 - a região ‘ -10 ’
 - a região ‘ -35 ’
 - a distância entre as regiões -10 e -35



A substituição de fatores sigma pode controlar a iniciação

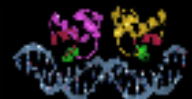
O reconhecimento de sequências promotoras é controlado por fatores que auxiliam ou interferem com a RNA Polimerase

Mudanças no tipo de fator sigma acontecem nos casos aonde há uma reorganização global do padrão de transcrição.

Isso permite à RNA Polimerase iniciar a transcrição em promotores que não são normalmente reconhecidos pelo σ^{70} :

- esporulação
- mudanças ambientais
- resposta choque térmico

Gene	MW	Uso	-35	espaçador	-10
<i>rpoD</i>	70 kD	geral	TTGACA	16-18	TATAAT
<i>rpoH</i>	32 kD	choque térmico	CCCTTGAA	13-15	CCCGATNT
<i>rpoE</i>	24 kD	choque térmico	not known	desconhecido	desconhecido
<i>rpoN</i>	54 kD	nitrogênio	CTGGNA	6	TTGCA
<i>fliA</i>	28 kD	flagelar	CTAAA	15	GCCGATAA



Nível de Metabolismo

Mecanismo de Controle

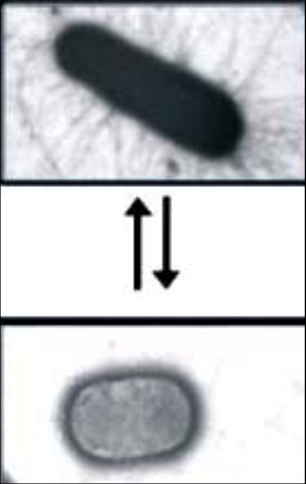
Exemplo

DNA



Mudança na estrutura do gene
(poucos)

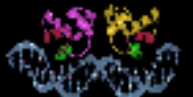
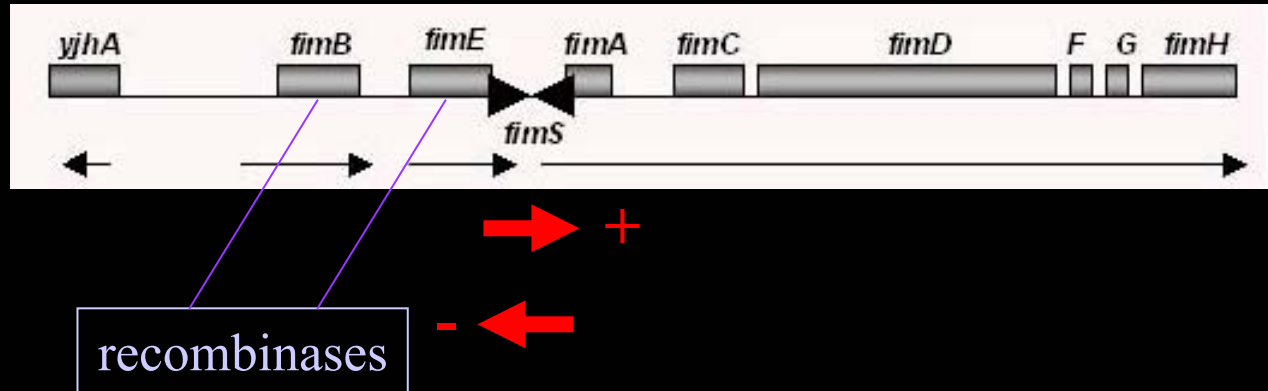
Varição de fase



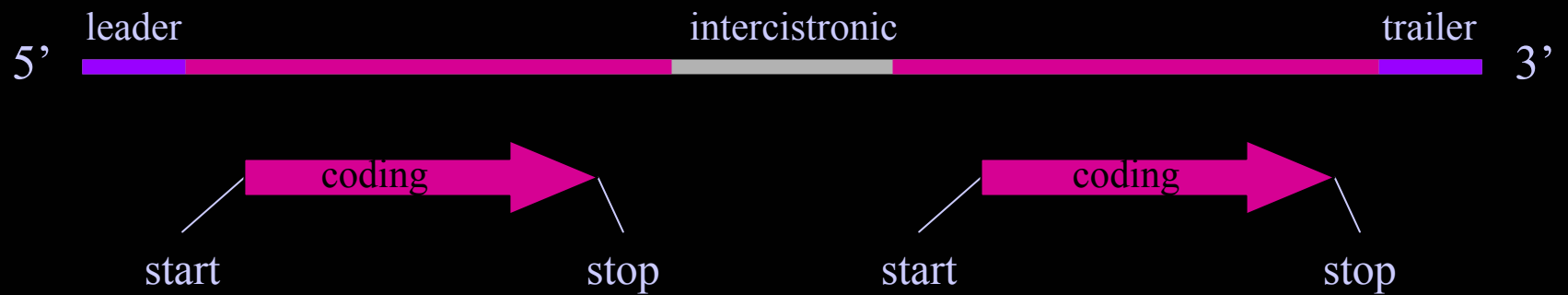
Variação de Fase

A variação de fase é uma forma de regulação que produz populações contendo uma mistura de células que expressam (fase ligada) ou não (fase desligada). Este tipo de controle provavelmente permite uma otimização da sobrevivência em ambientes onde a vantagem seletiva da expressão do gene regulado por variação de fase não é uma garantia.

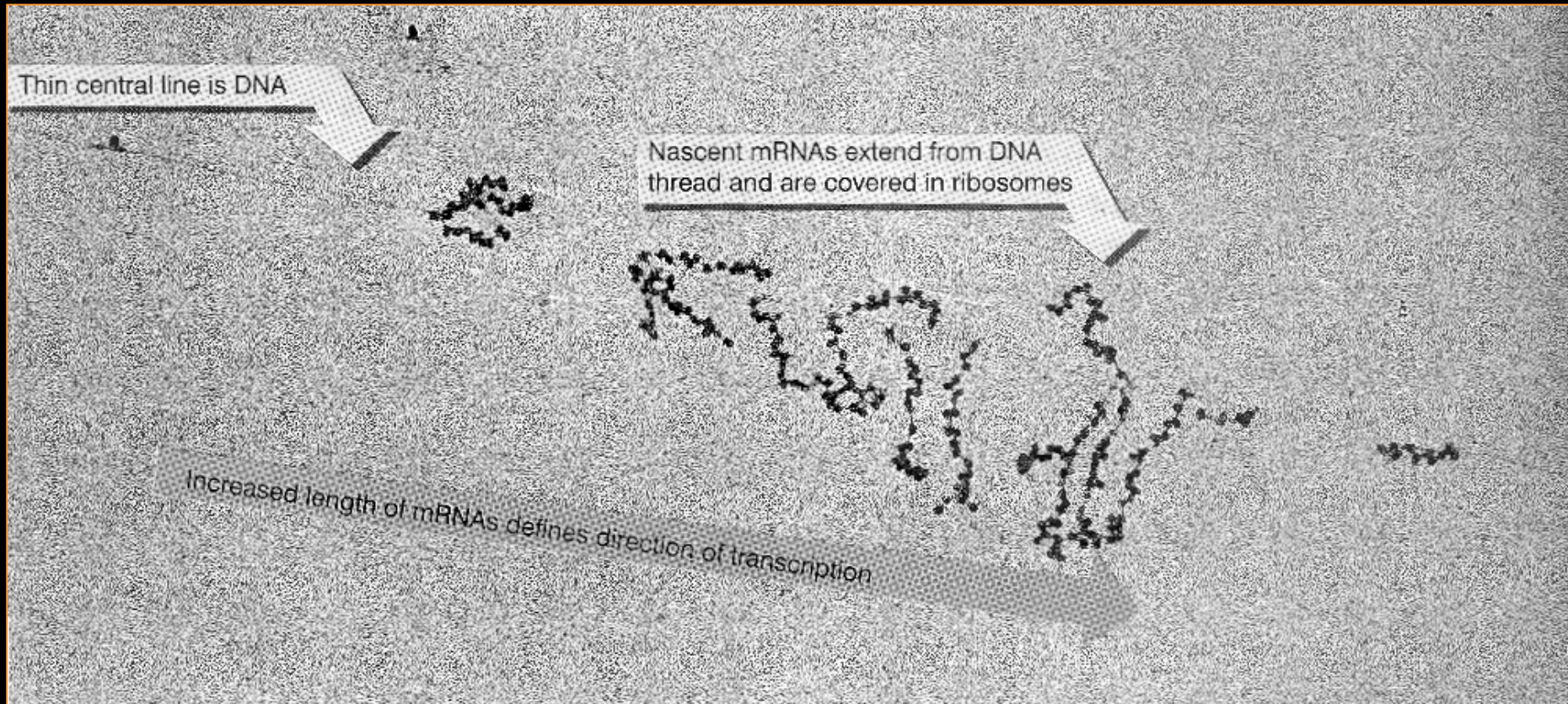
Variação de fase na expressão da adesina em *Escherichia coli*



A maioria dos genes bacterianos são expressos em mensagens policistrônicas



A transcrição e a tradução ocorrem simultaneamente nas bactérias



transcricional

Iniciação de transcrição
Terminação de transcrição
Processamento do RNA
Estabilidade do mRNA

traducional

Iniciação de tradução
Velocidade de alongação (tradução)
Mudança de fase de leitura

pós-traducional

Velocidade de degradação da proteína
Modificação da atividade da proteína:
 associação de ligantes
 modificações covalentes
 interações proteína-proteína

Controle da expressão gênica à nível transcricional:

Iniciação da transcrição:

a energia não é desperdiçada produzindo transcritos desnecessários

mas...

o organismo tem que ser capaz de mudar o padrão de expressão gênica rapidamente.

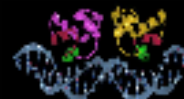
Terminação da transcrição:

pode ser utilizado para evitar que a transcrição prossiga após um terminador, transcrevendo o próximo gene (por outro lado, proteínas antiterminadoras podem permitir a continuação da transcrição)

Disponibilidade dos transcritos (mRNAs):

estabilidade do mRNA

estrutura secundária em torno do códon de iniciação de tradução



The Operon



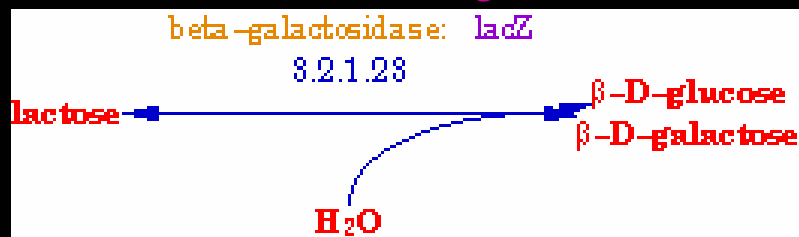
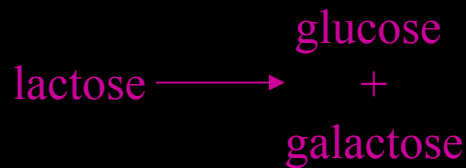
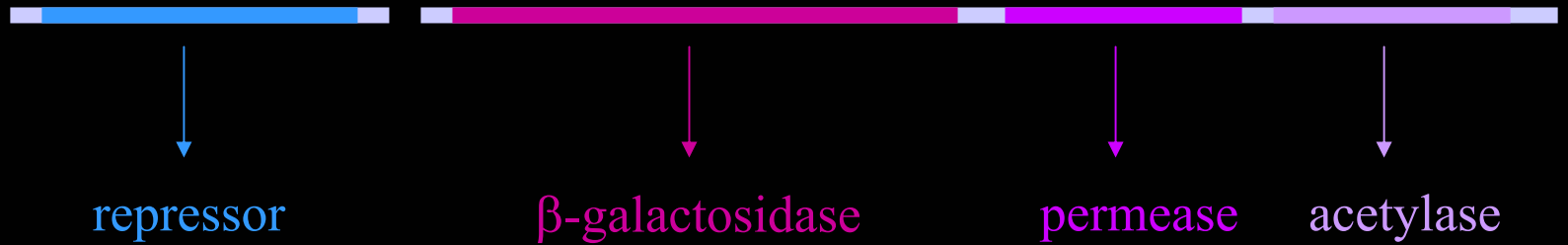
François Jacob



Jacques Monod

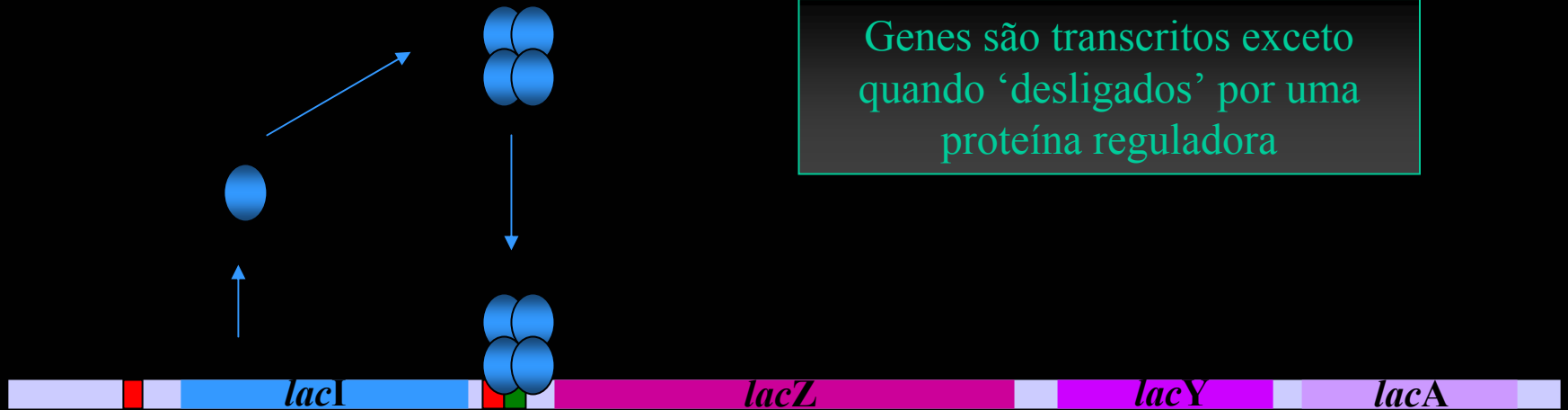
François Jacob & Jacques Monod
Genetic regulatory mechanisms
in the synthesis of proteins
J Mol Biol 3:318-356, 1961

Lactose operon



O operon *lac* é controlado por **regulação negativa**

Genes são transcritos exceto quando 'desligados' por uma proteína reguladora

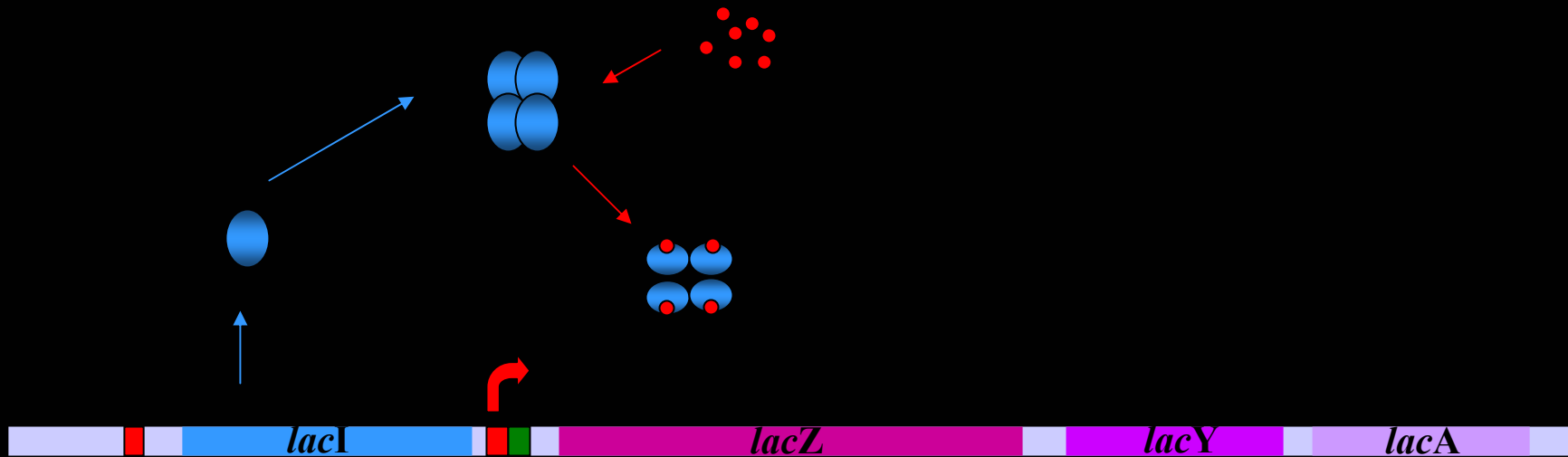


O gene *lacI* sintetiza o monômero do repressor, que forma tetrâmeros

O tetrâmero LacI se liga à sequência operadora bloqueando a transcrição

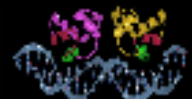


O indutor “liga” os genes



O indutor converte o repressor *lac* a uma forma inativa, incapaz de ligar o operador

O promotor *lac* fica livre para ligação da RNA Pol - a transcrição ocorre



Mensagem *lac* : Indução

- Flexibilidade a bactéria precisa responder rapidamente a mudanças ambientais
- Economia alto custo de produção desnecessária de todas as enzimas de uma via metabólica na ausência de seus substratos

A síntese de enzimas em resposta ao aparecimento de um substrato específico se chama
indução

Crescimento na ausência de β -galactosídeos: <5 moléculas de β -Gal

Crescimento na presença de β -galactosídeos: até 5000 moléculas



Controle positivo ou negativo

Sistemas de controle positivo ou negativo são definidos pela resposta do operon na ausência de proteínas reguladoras

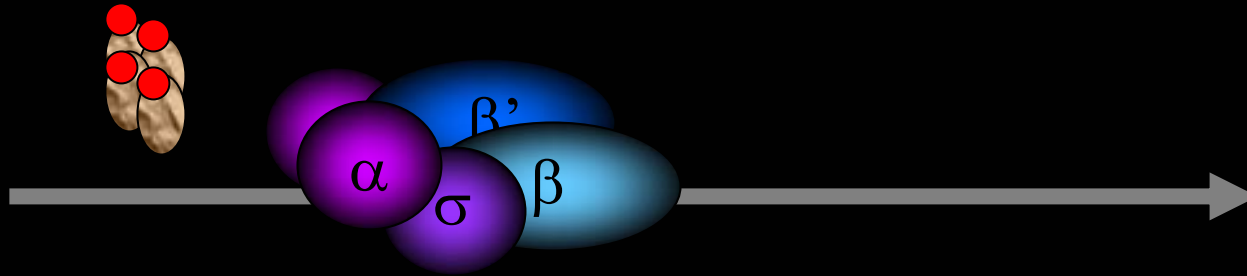
Controle Negativo: os genes são expressos a não ser que sejam 'desligados' por uma proteína repressora

Controle Positivo: os genes são expressos somente quando uma proteína reguladora ativa está presente

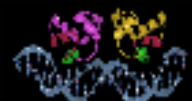
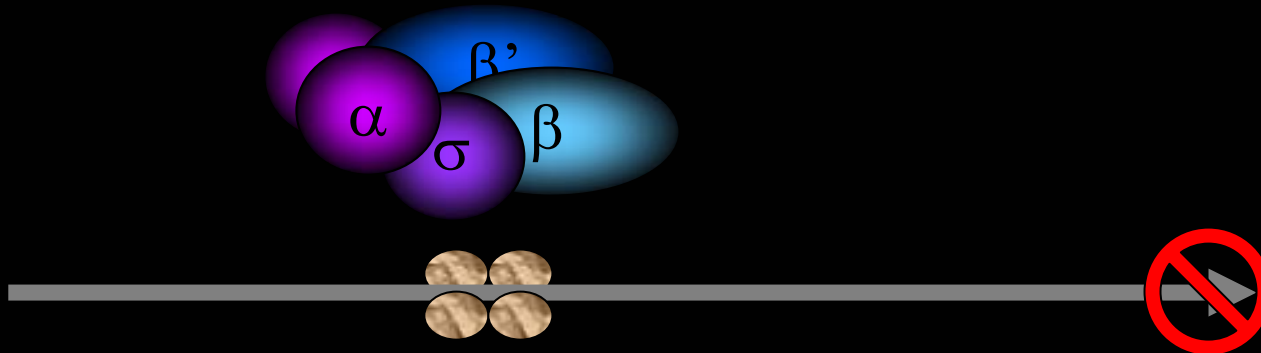


Controle Negativo:

os genes são expressos

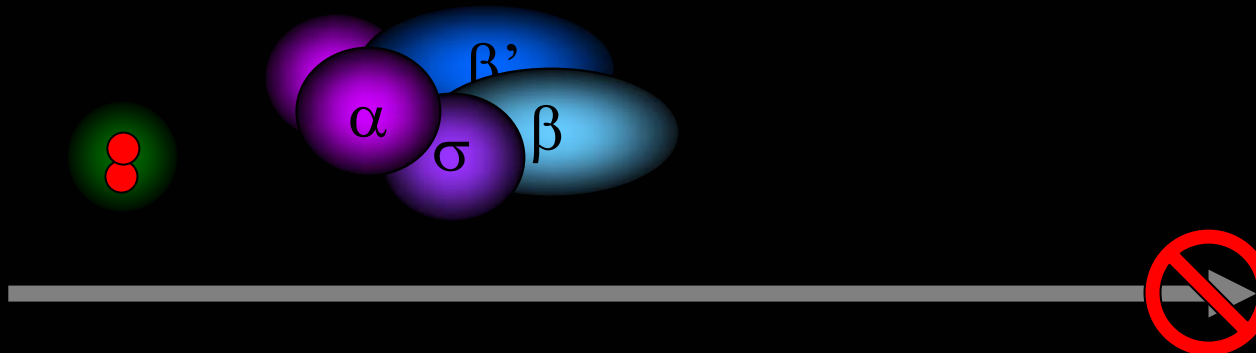
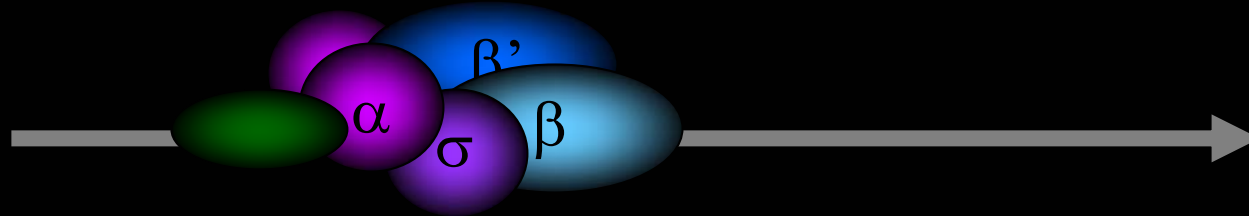


a não ser que sejam 'desligados' por uma proteína repressora



Controle Positivo:

os genes são expressos somente quando uma proteína reguladora ativa está presente

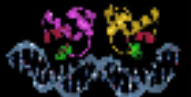


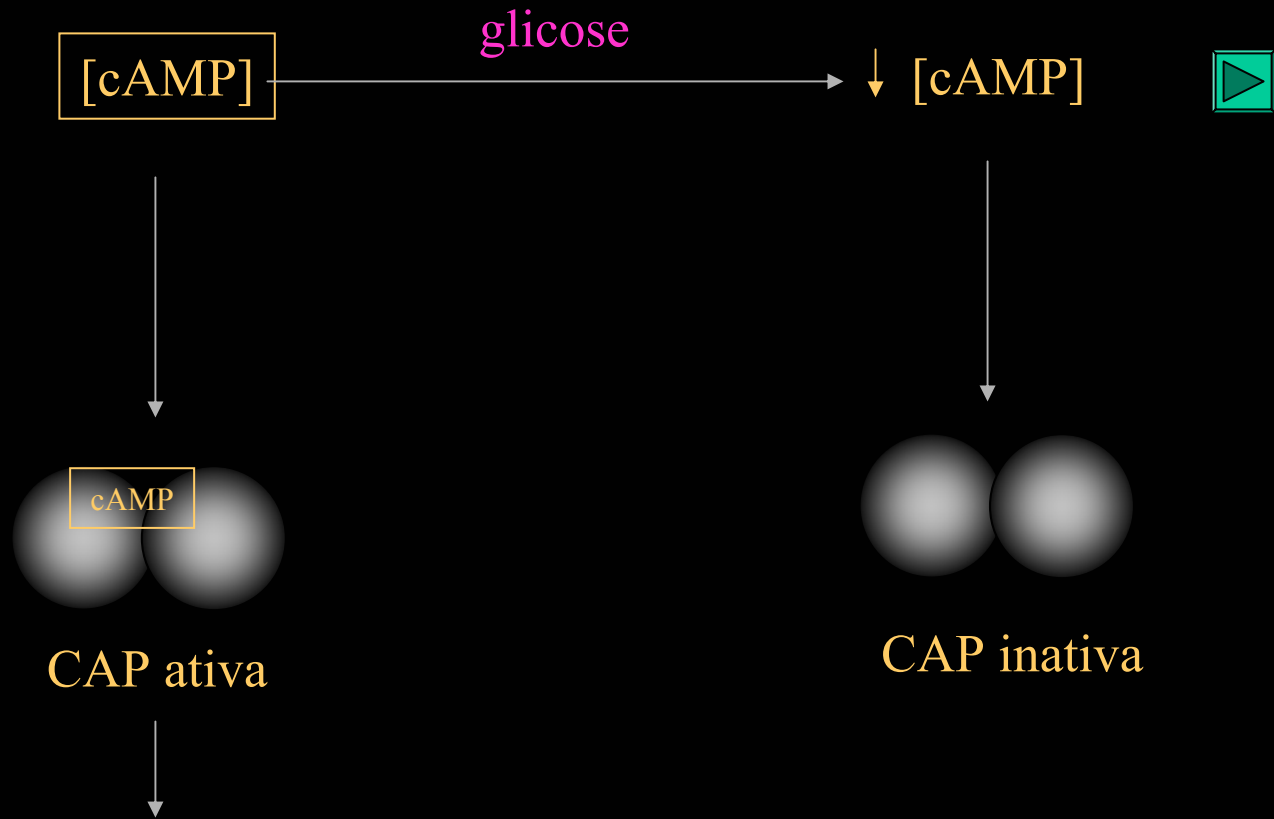
Repressão Catabólica:

Glicose, quando disponível como fonte de energia, é utilizada preferencialmente a outros açúcares por *E. coli*; a glicose leva a um maior rendimento de ATP por unidade de energia gasta.

Operons para catabolismo de outros açúcares (como lactose, arabinose e galactose) são reprimidos na presença de glicose.

A repressão catabólica resulta da redução nos níveis de cAMP na célula pela presença de glicose.





CAP se liga ao DNA ativando a transcrição a partir de promotores CAP-dependentes

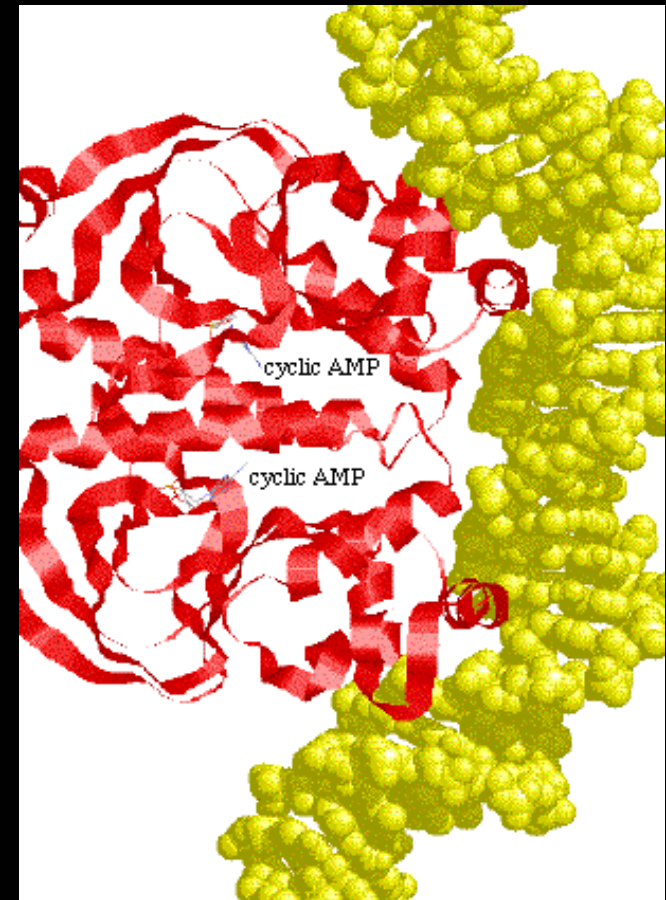
CAP: *Catabolite Activator Protein*

CAP (*catabolite activator protein*), também conhecida como CRP, se liga ao DNA quando *sente* a presença de AMP cíclico na célula.

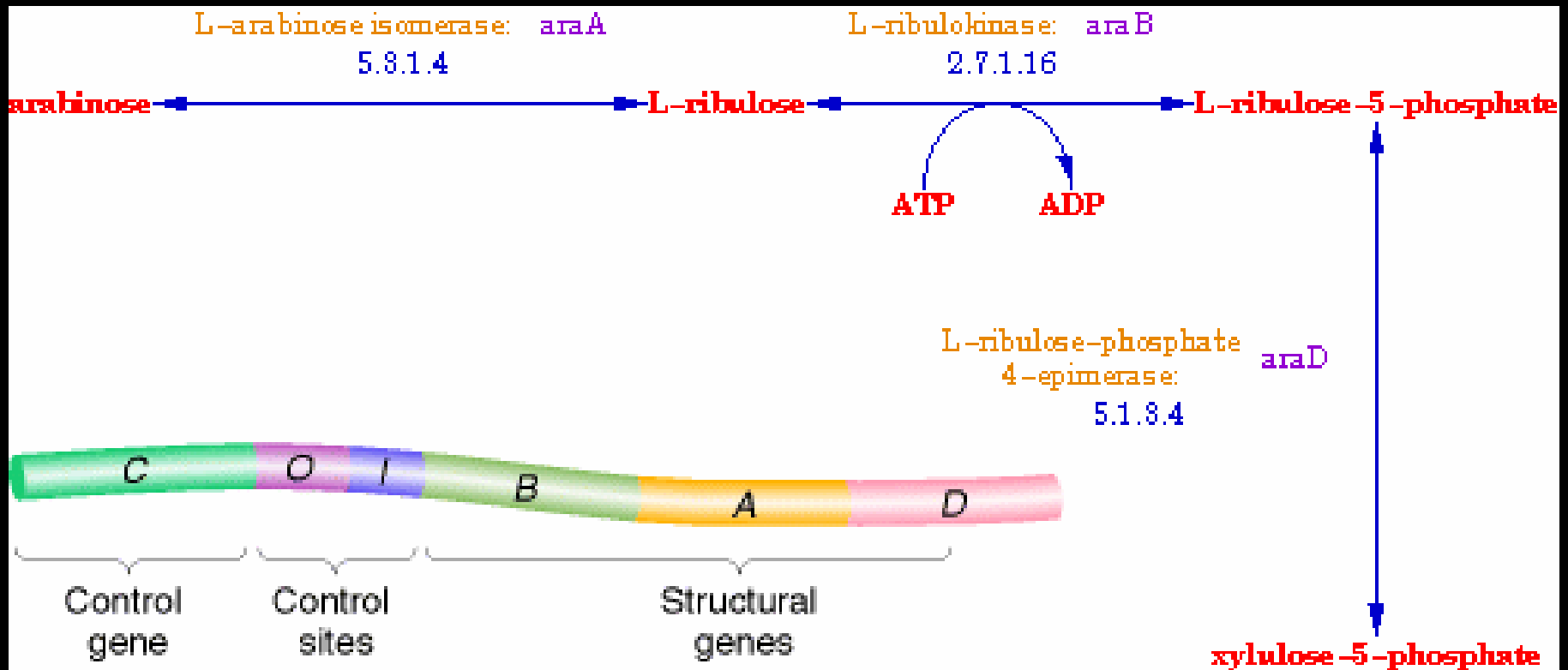
No operon *lac*, aonde esta proteína foi estudada pela primeira vez, a região de ligação cobre aproximadamente 62 pb acima do sitio de inicio de transcrição.

A ligação de CAP curva o DNA significativamente, trazendo o complexo RNA Pol + sigma (ligado ao promotor) em contato com CAP devido a esta curvatura. Este contato intensifica a transcrição.

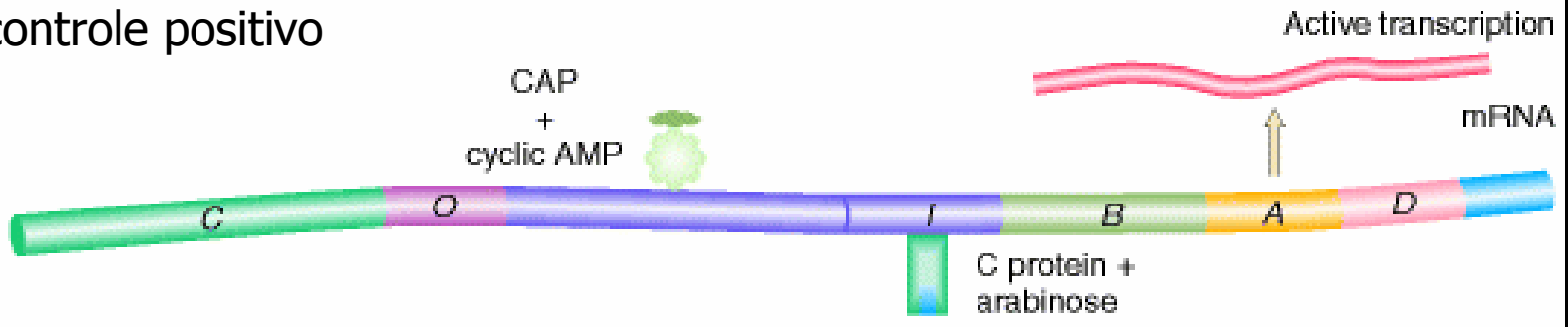
Este *motivo*, uma helice curta que se encaixa na dobra maior do DNA, é frequentemente encontrado em proteínas que se ligam ao DNA, como o repressor Cro de λ .



Controle positivo e negativo: o operon de arabinose



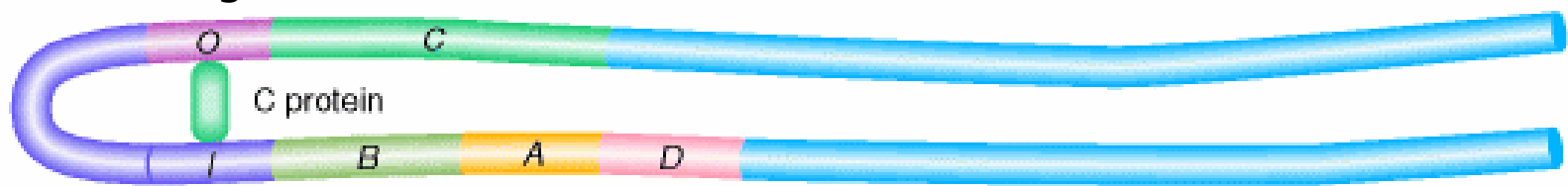
controle positivo



Na presença de arabinose, a proteína AraC se liga à região *araI* ;
a proteína CAP, ligada a cAMP, se liga a um sítio adjacente à região *araI*;

TRANSCRIÇÃO DE *araB*, *araA* e *araD*

controle negativo



Na ausência de arabinose, a proteína AraC se liga a ambas as regiões *araI* e *araO*,
formando um loop de DNA

IMPEDE A TRANSCRIÇÃO DO OPERON



Esporulação em *Bacillus subtilis*: cascata de fatores sigma

O processo de esporulação é resultado de uma mudança drástica nas atividades biosintéticas da bactéria, envolvendo mais de 50 genes diferentes, sob o controle de 8 genes de esporulação.

O controle básico está ao nível da transcrição

No final do processo cerca de 40% do mRNA é específico da fase de esporulação

A cada etapa do processo, um novo fator sigma substitui o antigo, acarretando na transcrição de um grupo diferente de genes (sigma = reconhecimento do promotor)



Etapas da esporulação:



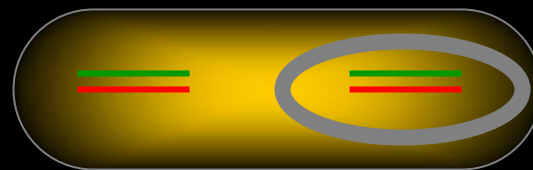
Bactéria vegetativa



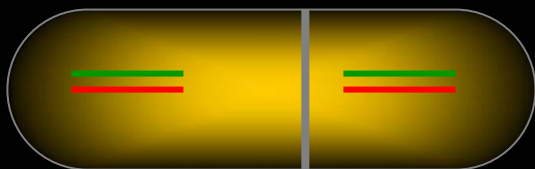
Esporo inicial



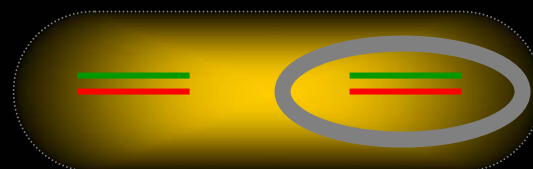
Replicação do DNA



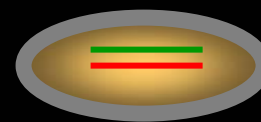
Esporo tardio



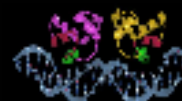
Formação do septo



Lise da célula mãe



Esporo liberado



Condições ambientais

Cascata de fosforilação

SpoOA

SpoOA*

Regulador de transcrição

σ^{43}

σ^H

σ^F

pro- σ^E

+

σ^E

σ^K

Transcrição de genes específicos (tardios)

Célula mae

σ^F

Transcrição de genes esporulação-específicos (iniciais)

σ^G

Transcrição de genes esporulação-específicos (tardios)

Pré-esporo

Atenuação

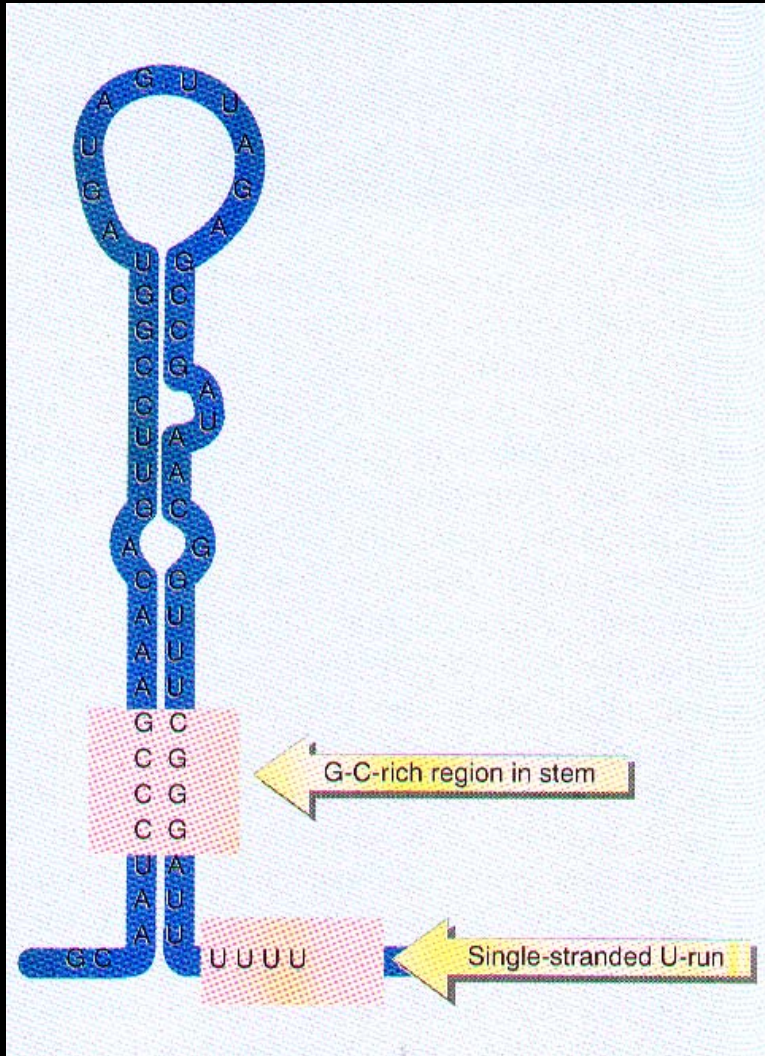
Vários operons são controlados por **atenuação**: um mecanismo que controla a capacidade da RNA Pol de transcrever através de um *atenuador* (terminador intrínstico), localizado no início de uma unidade de transcrição.

Algum evento externo controla a formação da estrutura secundária em *grampo* necessária para a terminação intrínstica.

As mudanças na estrutura secundária do mRNA que controlam a atenuação são determinadas pela posição dos *ribosomas* no mRNA



Terminadores Intrínsecos



Contêm regiões palindrômicas que formam grampos variando em extensão de 7 a 20 bp

O grampo contém uma região rica em G+C e é seguido de uma carreira de U's

Formação do grampo no RNA leva a RNA Polimerase a diminuir sua velocidade, ou até parar a síntese de RNA.

Esta pausa dá uma oportunidade para ocorrer a terminação de transcrição.

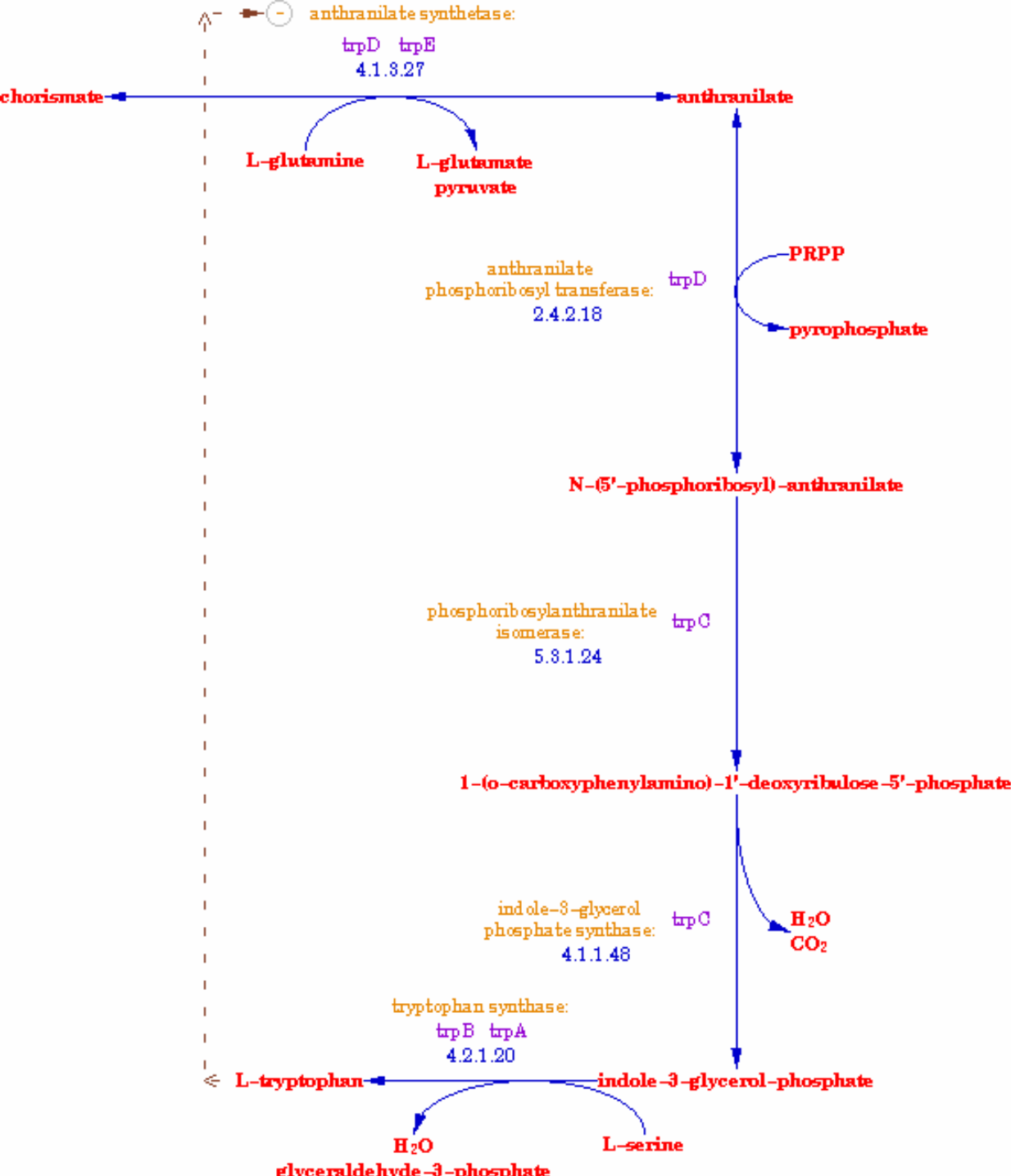
Mas...

Uma carreira de U's bem localizada é essencial para levar a Polimerase a se dissociar do molde durante a pausa.

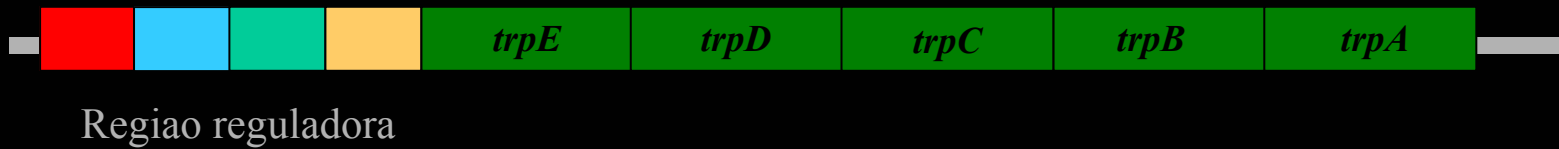


Biosíntese de Triptofano

Exemplo de regulação por atenuação



Controle por atenuação: o operon triptofano



Trp

Codifica peptídeo
líder de 14
aminoácidos

Terminador
intrínscico causa
terminação pela
RNA Polimerase

- Terminação no atenuador é dependente dos níveis de triptofano:
- na presença de *trp*, terminação é eficiente
 - na ausência de *trp*, RNA Pol transcreve resto do operon



A região líder codifica para vários resíduos de triptofano.

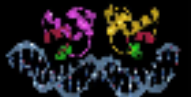
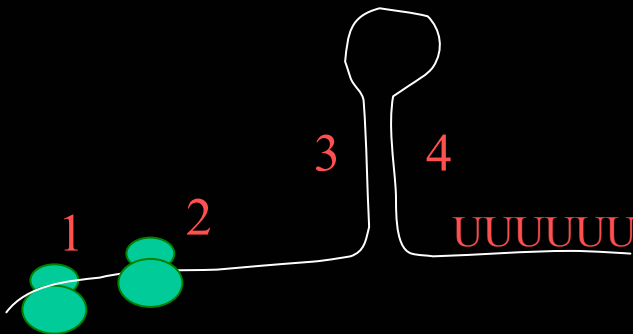
A concentração de triptofanil-tRNA na célula determina a velocidade de tradução do peptídeo líder. Desta forma, a velocidade de movimento do ribossoma na região líder do mRNA reflete a concentração de Trp-tRNA no citoplasma da bactéria.

Alta concentração de Trp = alta concentração de Trp-tRNA

- ribossoma passa rapidamente pela região líder chegando à região 1 e 2
- Região 3 só pode parear com região 4
- Terminador intrínscio é formado (grupo rico em G/C seguido de Us)

Baixa concentração de Trp = baixa concentração de Trp-tRNA

- ribossoma demora na região 1 esperando Trp-tRNA
- região 2 é capaz de parear com região 3
- Terminador intrínscio não se forma e operon é transcrito





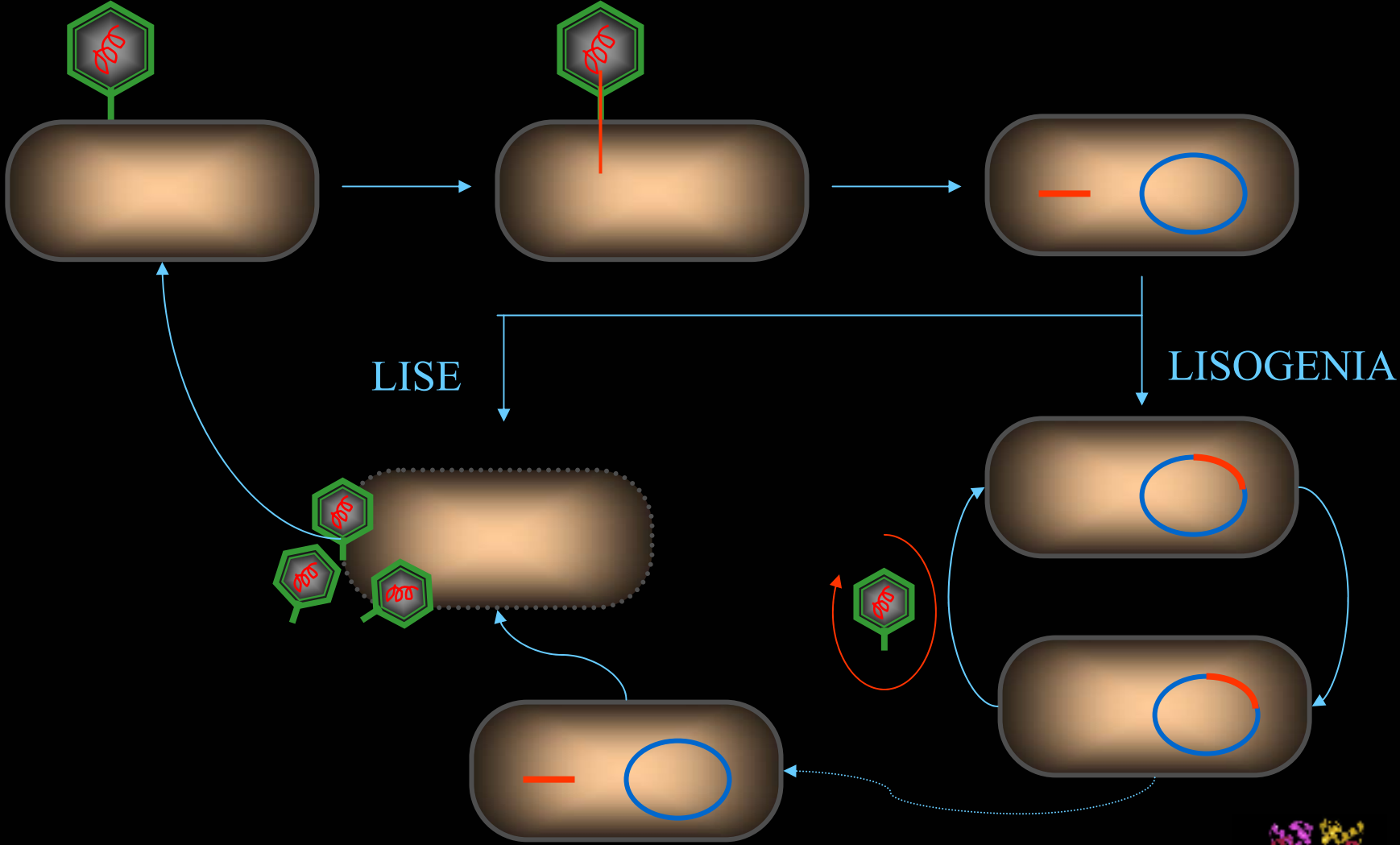
Title: Lambda cookie , Artist: Brandi Baros, University of Pittsburgh

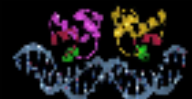
Medium: Gingerbread, icing, displayed on aluminum foil-covered support.

This work is a to-scale genetic map of bacteriophage Lambda, in which block length indicates the length of the ORF, and blocks are decorated with gene name labels.

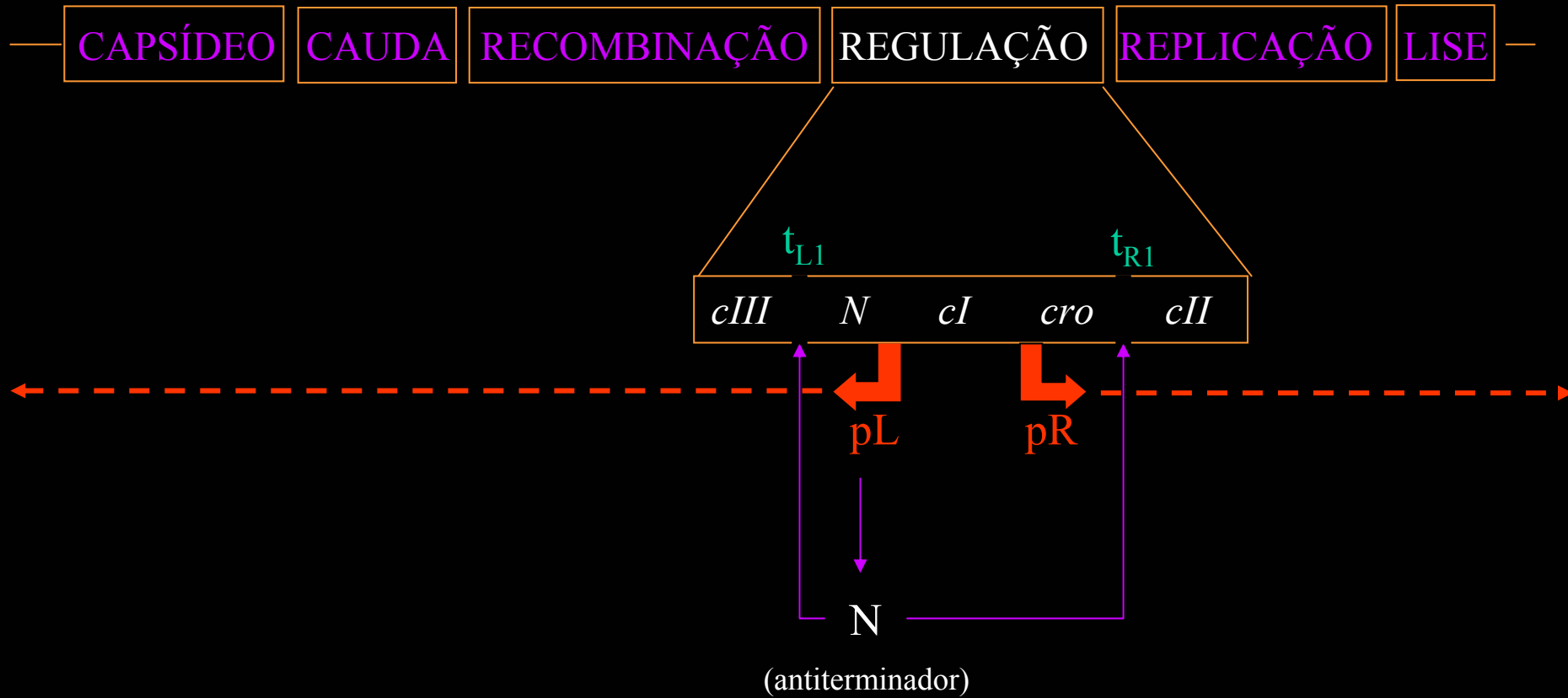
This work was disincorporated on the day of its international debut at the holiday party of the University of Pittsburgh Department of Biological Sciences in December 1998, when it was transmogrified into the bodies of various biologists. Subsequently the various media of which it was composed (except for the plastic) were decomposed to CO₂ and at this moment of your viewing it its atoms may be in the very air you are breathing.

LAMBDA

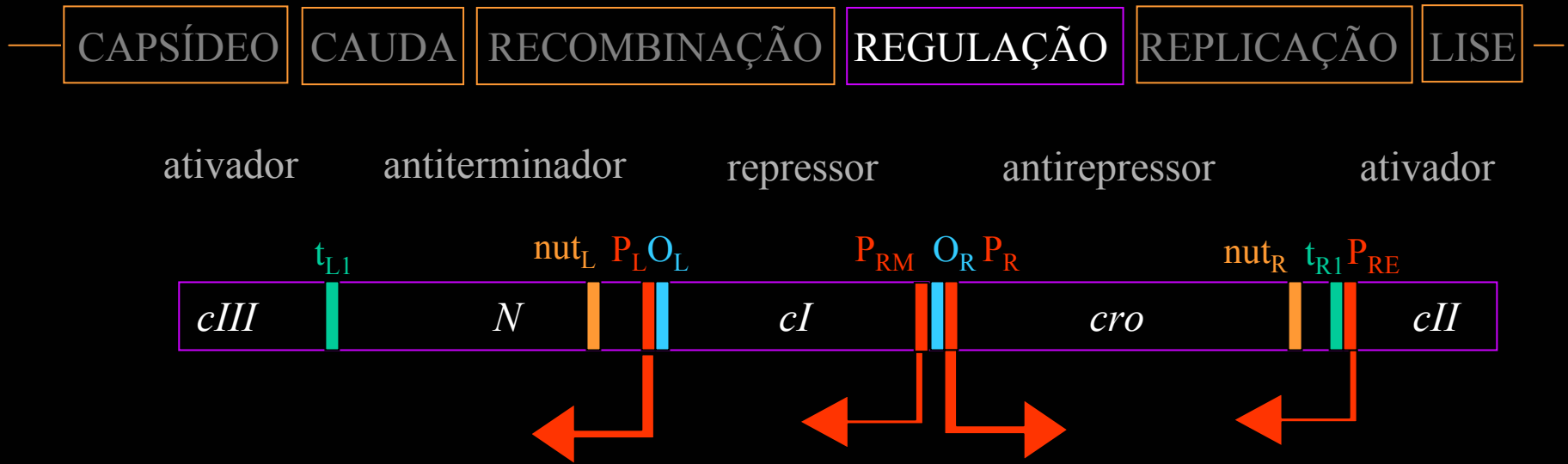




Ciclo Lítico

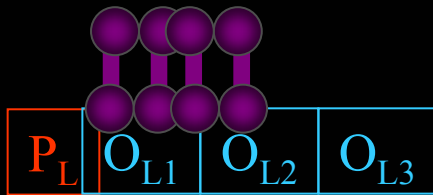
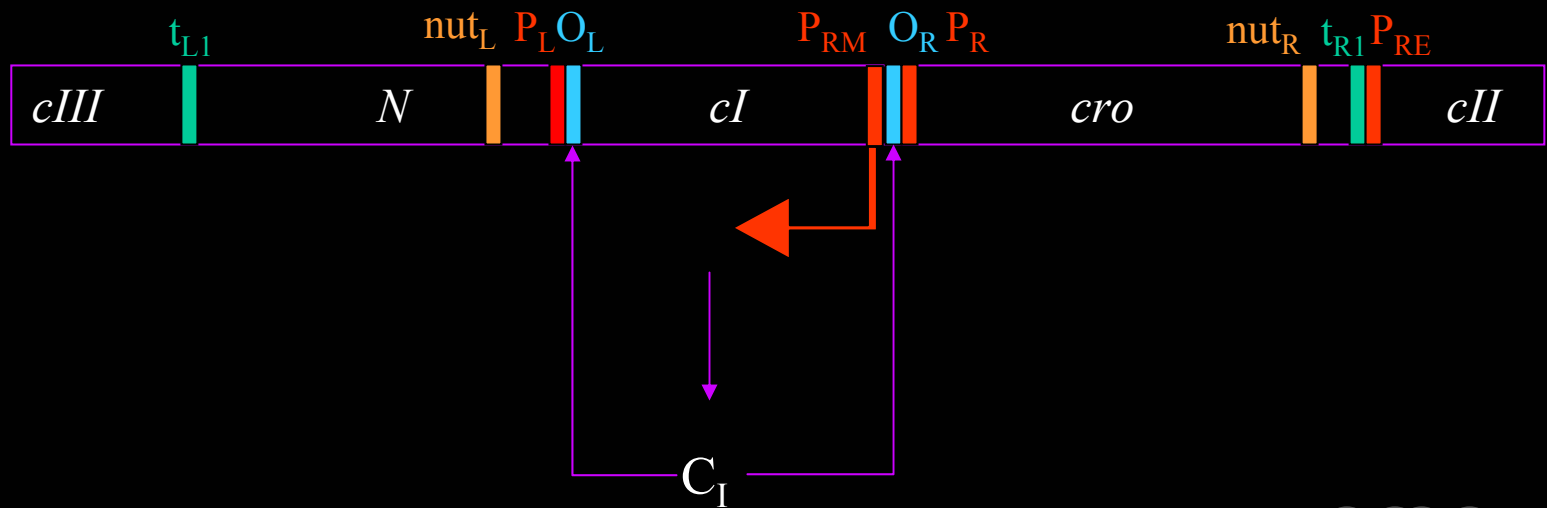


Ciclo Lisogênico

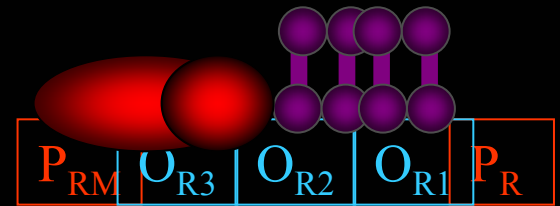




ativador antiterminador repressor antirepressor ativador



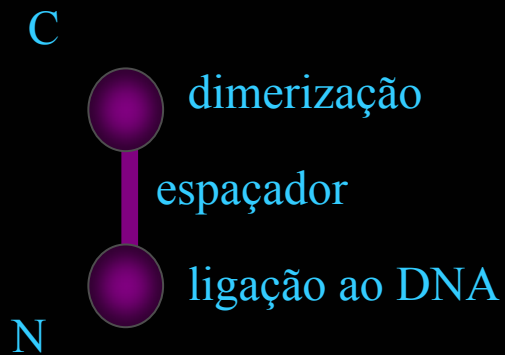
Regula negativamente P_L e P_R



Regula positivamente P_{RM}



O repressor é um dímero



O repressor só se liga ao DNA como um dímero

A estrutura dimérica é crucial para manutenção de lisogenia

Clivagem no espaçador resulta em entrada no ciclo lítico

O equilíbrio entre lisogenia e ciclo lítico depende da concentração do repressor

baixa concentração = monômeros
alta concentração = dímero



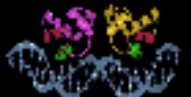
Como é estabelecida a síntese de repressor?

... já que a presença de repressor é necessária para sua própria síntese?

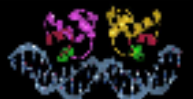
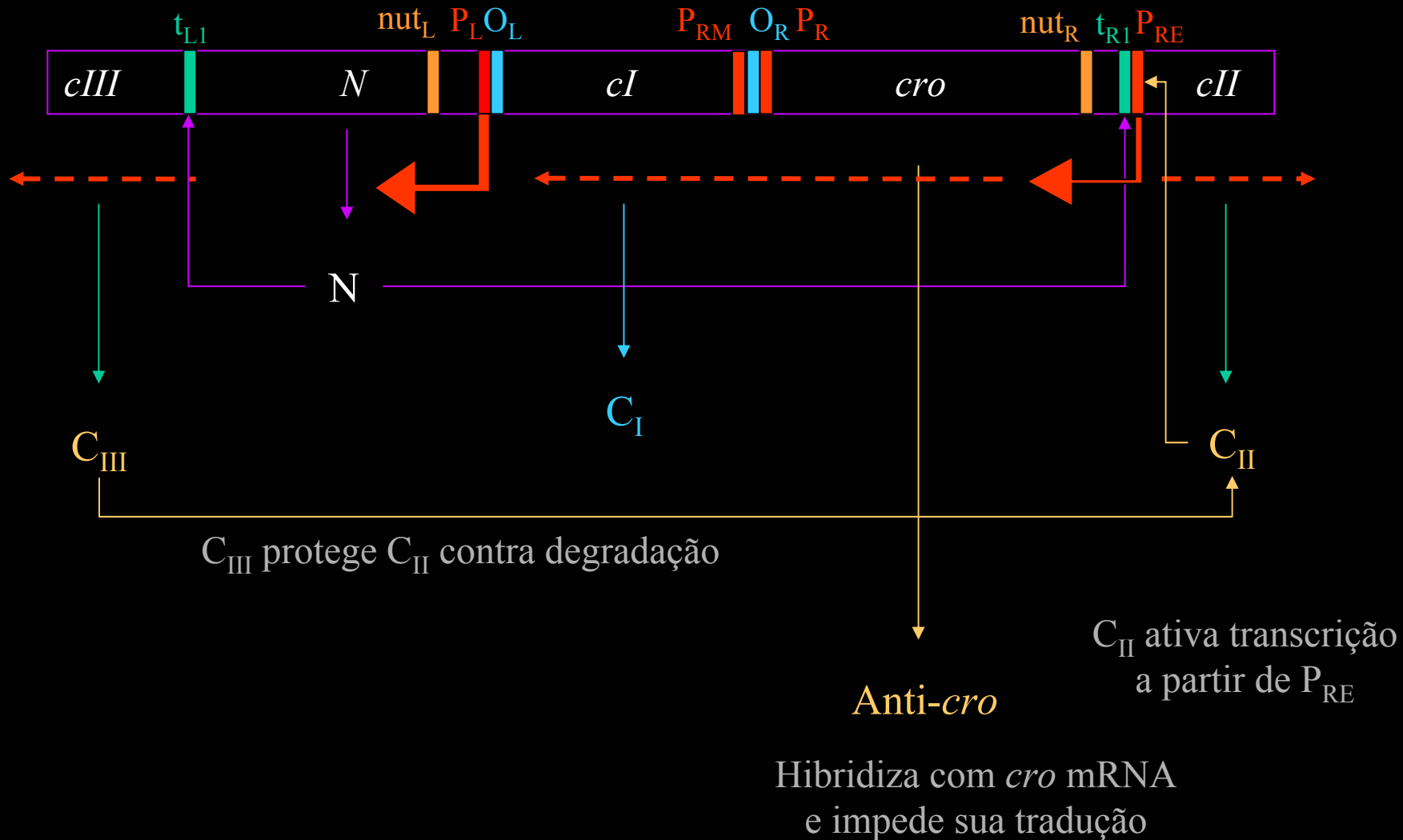
Quando λ infecta uma célula, C_I não é sintetizado já que não há C_I disponível para auxiliar a ligação da RNA Pol ao P_{RM}

Genes N e cro são transcritos a partir de P_L e P_R

A proteína N permite transcrição de $cIII$ e cII , graças a sua ação de antiterminador em t_R e t_L



C_{III} e C_{II} : estabelecimento da síntese de repressor C_I



Um segundo repressor é necessário para o ciclo lítico

Cro é responsável por impedir a síntese do repressor C_I

Esta ação impede o estabelecimento de lisogenia

Cro impede a síntese de repressor a partir de P_{RM}

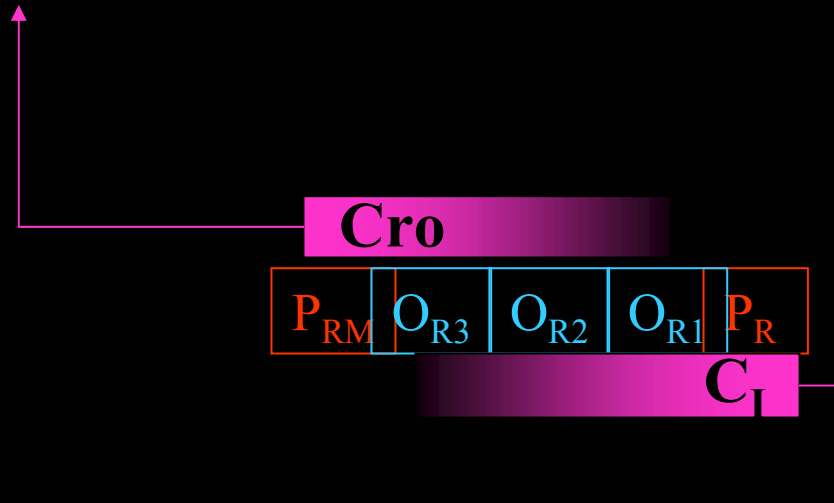
Cro impede a transcrição a partir de P_L e P_R (mas não totalmente)

Cro forma um dímero e se liga simetricamente aos mesmos operadores do que C_I



A diferença entre Cro e C_I está na diferente afinidade pelos operadores.

Impede RNA Pol de se ligar a P_{RM}



Impede RNA Pol de se ligar a P_R
Auxilia RNA Pol a se ligar a P_{RM}



O delicado equilíbrio entre lise e lisogenia

O estágios iniciais da infecção por λ são idênticos

A decisão entre lise e lisogenia depende de quem vai ocupar primeiro os operadores: Cro ou C_I ?

A influência crítica sobre esta decisão depende de C_{II}



Exemplos

Bactérias crescidas em meio rico produzem mais proteases que degradam CII, levando λ a 'preferir' o ciclo lítico.

Ao contrário, em condições de falta de nutrientes, a lisogenia é favorecida (falta de nutrientes para um crescimento lítico eficiente).

Resposta SOS:

A proteína RecA é necessária para o reparo do DNA por recombinação, mas sua atividade proteásica é induzida por agentes mutagênicos (como luz UV), levando à clivagem da proteína LexA (um repressor) de modo a ativar os genes necessários para o reparo.

Mas RecA também cliva o espaçador da proteína C_I de λ , liberando-o dos operadores e ativando a transcrição a partir de PL e PR. Cro é então produzido, reprimindo a síntese de CI e desencadeando o ciclo lítico.

O fago λ pode então escapar da célula danificada em vez de morrer com ela.



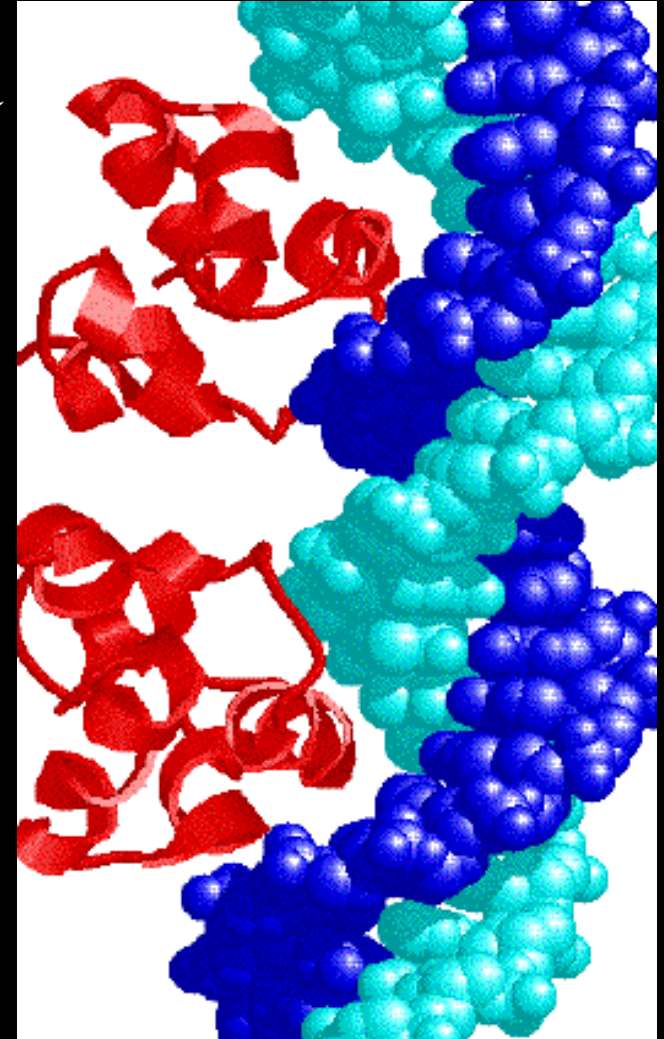
Cro: Repressor do bacteriófago λ

A proteína Cro é um dímero, reconhecendo uma sequência de DNA que ocorre 2 vezes, separadas por 10pb.

A região reconhecida por Cro ocorre próxima ao sítio de ligação da RNA Polimerase. A ligação de Cro a esta região interfere fisicamente com a transcrição de genes adjacentes pela RNA Pol.

Cro é um REPRESSOR.

O motivo mostrado é comum em proteínas que se ligam ao DNA e é conhecido como “helix-turn-helix”.





Hunter Panel of Fremont period petroglyphs, circa 1200 A.D. - Nine Mile Canyon, Utah
Slightly modified by Sherwood Casjens © circa 2000 A.D.

T7

Classe I
promotores de *E. coli*

5 genes

T7 RNA Pol

interferência com o
hospedeiro

Classe II
promotores de T7

7 genes

síntese de DNA

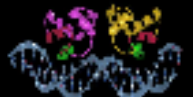
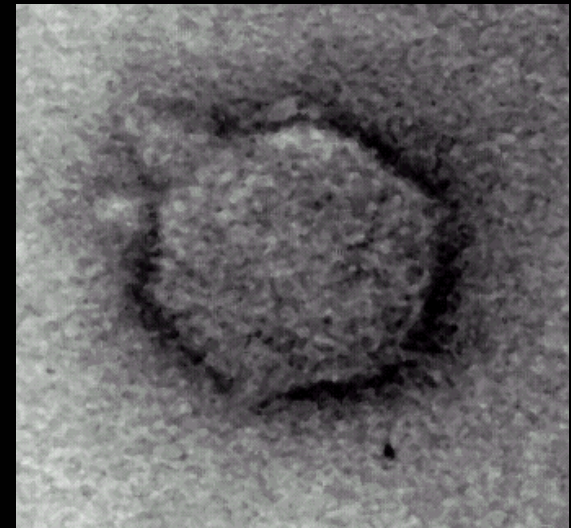
lisozima

Classe III
promotores de T7

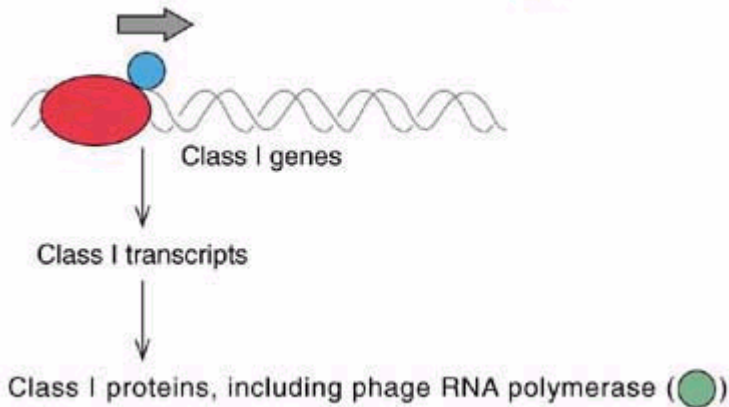
13 genes

empacotamento

maturação de DNA



Early transcription; specificity factor: host σ (●)



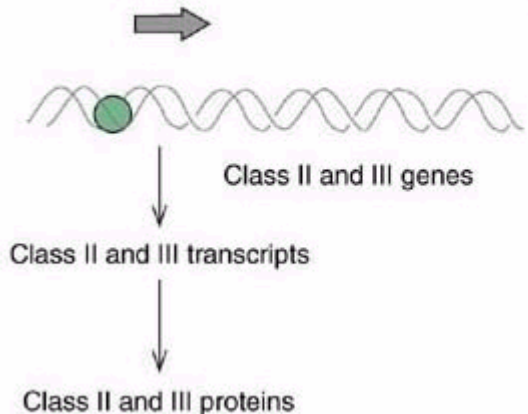
A transcrição do fago T7 é subdividida em 3 classes:

I, II e III.

Classe I: é a fase inicial e ocorre nos 3 primeiros minutos da infecção.

Um dos genes transcritos codifica uma RNA Polimerase

Late transcription; phage RNA polymerase (●)



A T7 RNA Pol tem especificidade de promotor muito diferente da RNA Pol de E. coli.

Tem apenas uma subunidade (E. coli RNA Pol tem 4)

Não tem um fator σ associado

Reconhece promotores diferentes dos de E. coli

-40	-30	-20	-10	+1	+10
TTGAC		TATAAT			
Class I: recognized by host RNA polymerase					
TAATAC					
Class II: recognized weakly by T7 RNA polymerase					
TAATACGACTCACTATAGGGAGA					
Class III: recognized strongly by T7 RNA polymerase					

"2-component regulatory systems"

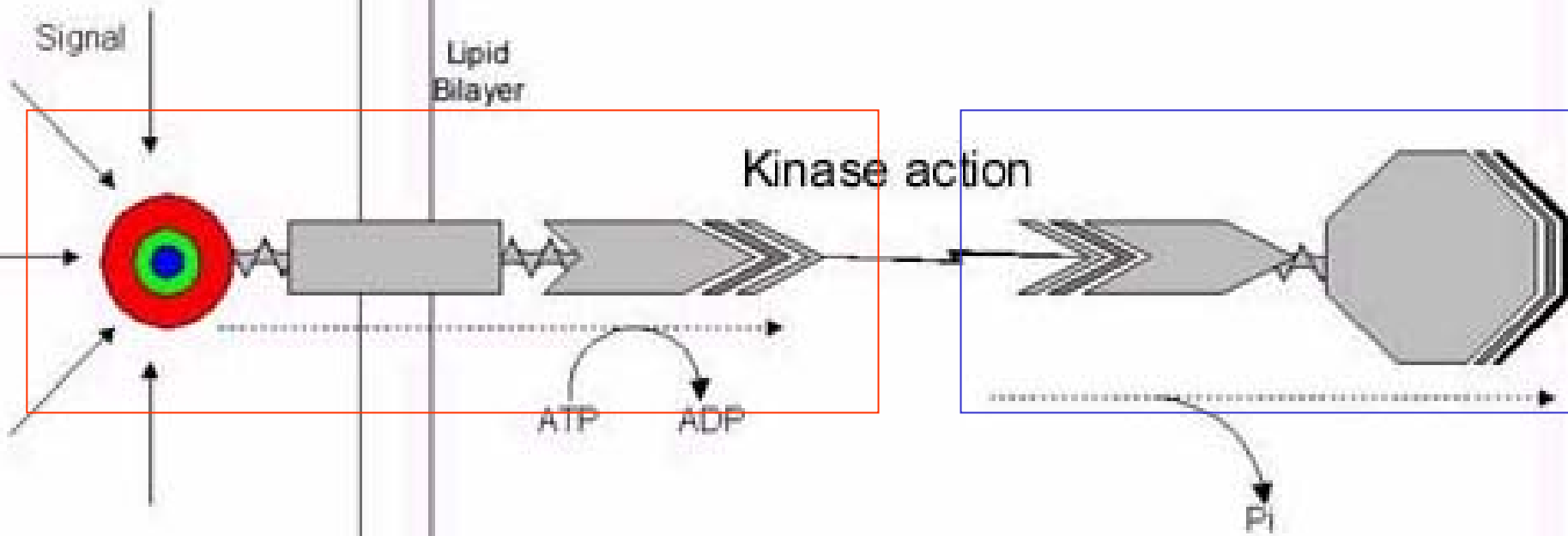
Procaríotos desenvolveram sistemas complexos para responder à mudanças no seu meio-ambiente. Sistemas regulatórios de 2-componentes são uma forma de efetivar esta resposta.

- quase universais entre espécies bacterianas
- Em *E. coli* mais de 40 sistemas de 2-componentes já foram identificados

Atendem às seguintes necessidades celulares:

- Quimiotaxia: Deslocamento da célula para uma localização mais favorável
- Regulação osmótica (resposta da bactéria à diferentes concentrações de solutos no meio ambiente)
- Transporte de magnésio
- Tolerância a pH
- Esporulação
- etc...

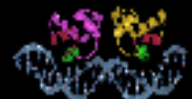




A primeira é o **sensor** (kinase)- *percebe* um aspecto do meio ambiente e gera um sinal

A segunda é um **regulador de resposta**, que recebe o sinal da primeira proteína e então age de alguma forma.

2 proteínas diferentes

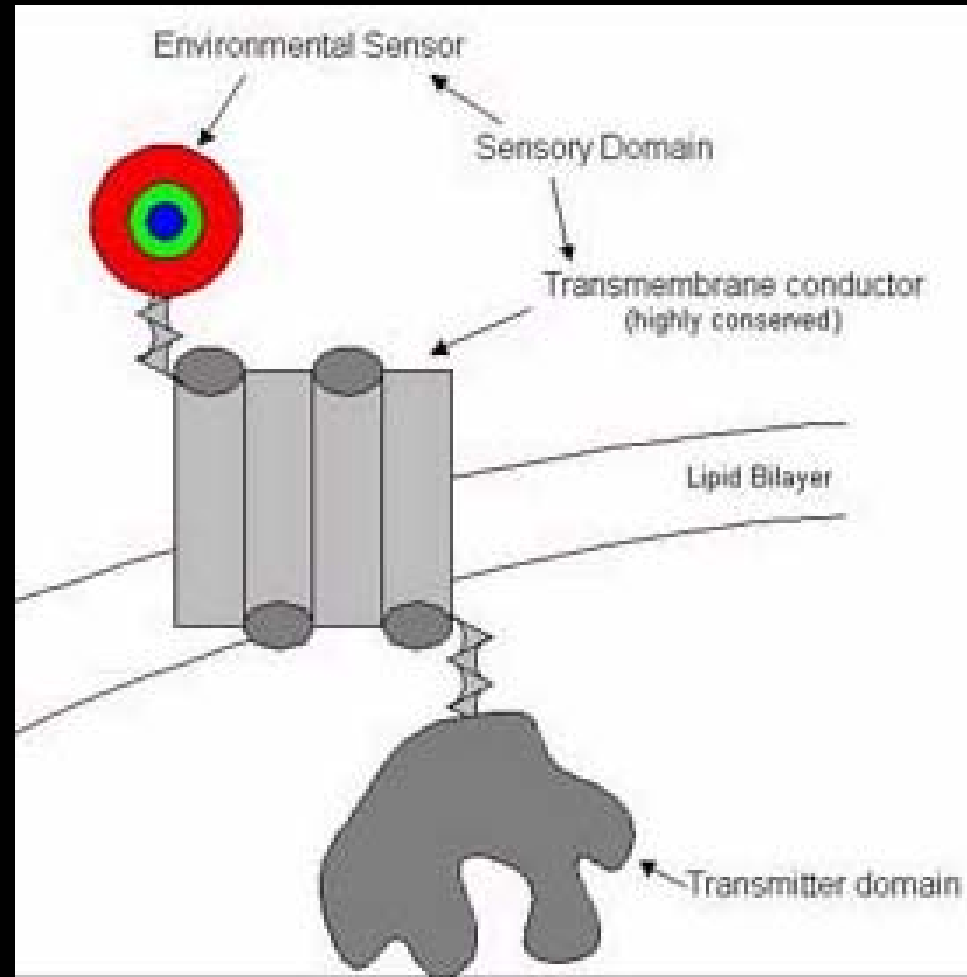


Sensor (kinase)

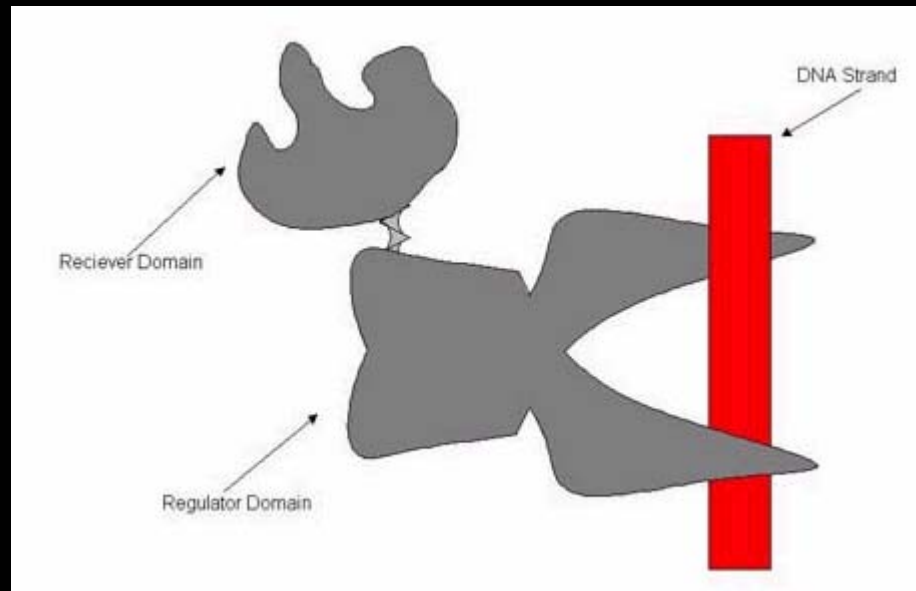
Tem 2 domínios:

Sensorial: frequentemente um sensor transmembrana

Transmissor: uma proteína kinase específica



Regulador de Resposta



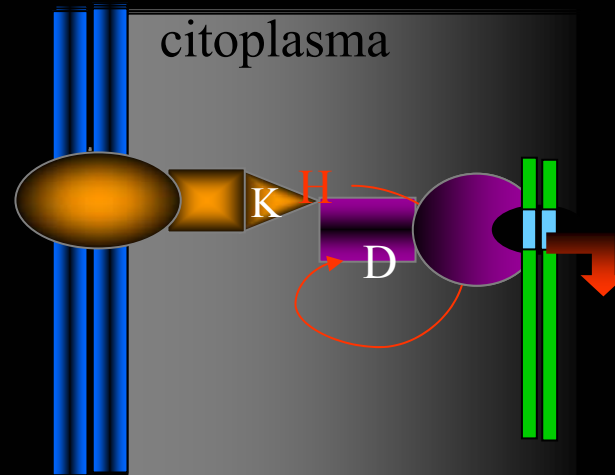
Conduz o sinal gerado pelo sensor para a destinação final do estímulo; para facilitar este trabalho, esta proteína é um difusor citoplasmático.

2 domínios:

Receptor: Localizado na porção N-terminal. Recebe um grupamento fosfato em um resíduo de histidina altamente conservado; transfere este fosfato para um resíduo de aspártico interno. Esta transformação *ativa* o domínio *regulador da resposta*.

Regulador da Resposta: está de alguma forma envolvido na ativação de transcrição. Uma vez desencadeado o sinal, a proteína retorna ao seu estado original, esperando pelo próximo sinal.

meio
externo



Uma mudança no ambiente leva à estimulação do **sensor**

... que causa uma mudança conformacional na porção transmembrana do **sensor**

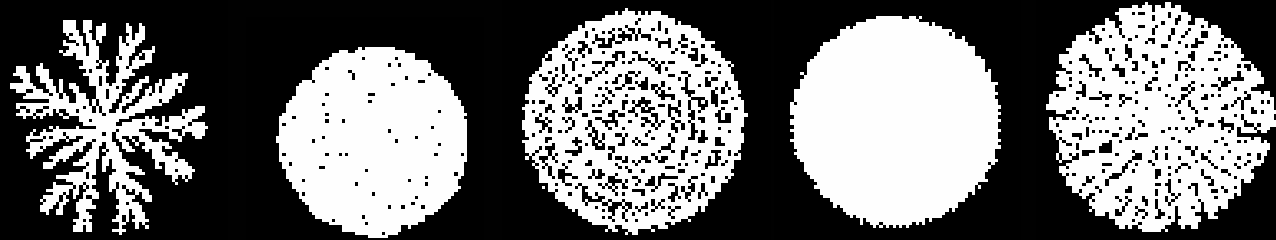
... e ativa a atividade kinase do domínio **transmissor**, fosforilando o resíduo de histidina altamente conservado do domínio **receptor** da proteína reguladora de resposta

... que leva o domínio **receptor** a autocatalizar a transferência deste fosfato da posição de alta energia na histidina para um posição de baixa energia no aspartato, e esta mudança conformacional permite a ativação do domínio **regulador**

O domínio **regulador** se liga então a um sítio específico no genoma, promovendo a transcrição de um novo produto naquele local



Osmoregulação



A habilidade para responder a mudanças na concentração de solventes do meio

O sensor deste sistema regulatório de 2-componentes é a proteína EnvZ

O regulador de resposta é a proteína OmpR

"Somos uma temível mistura de ácidos nucléicos e lembranças,
de desejos e de proteínas.

O século que termina ocupou-se muito
de ácidos nucléicos e de proteínas.

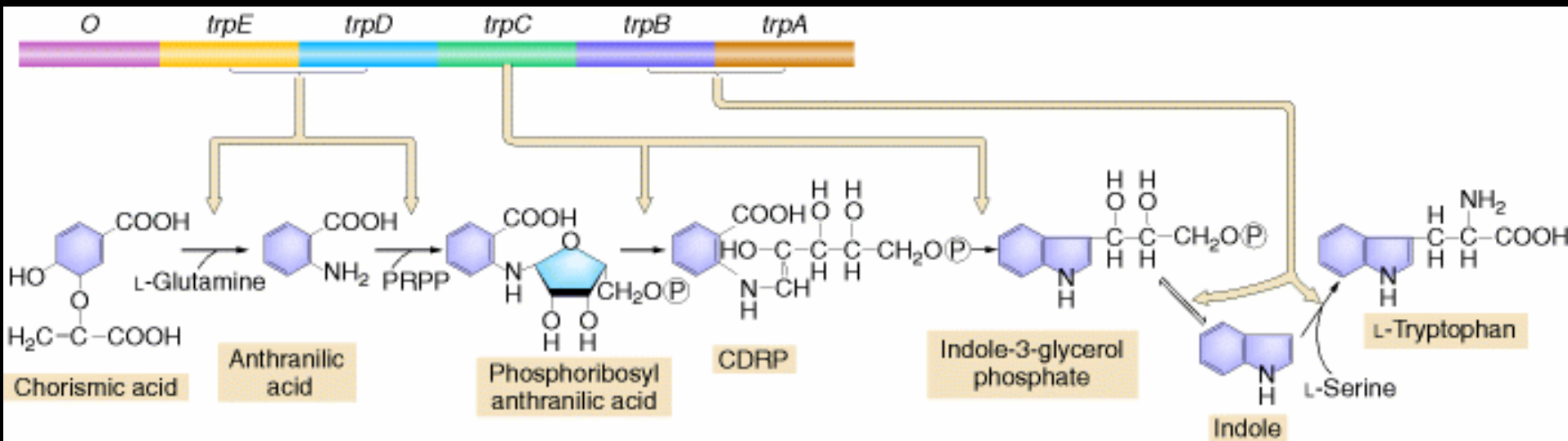
O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos.

Saberá ele resolver essas questões?"

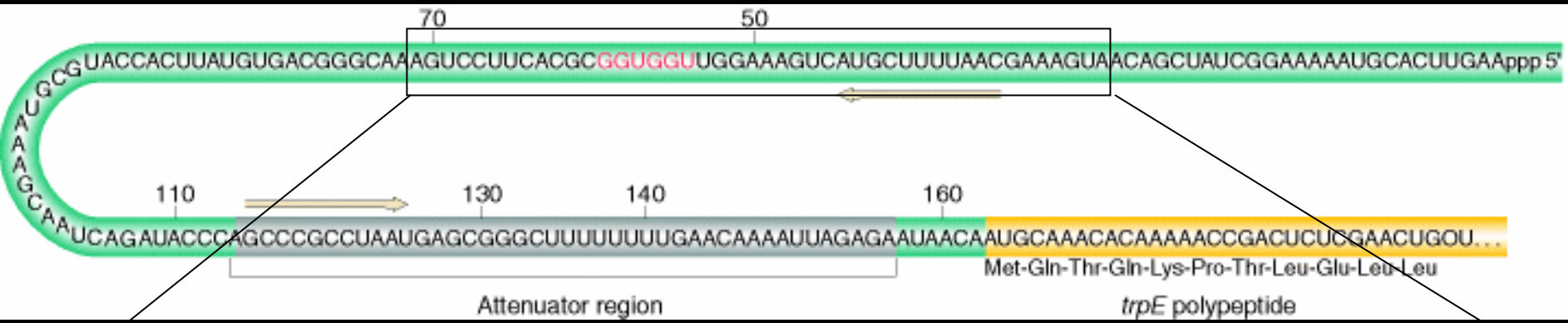
O Ratinho, a Mosca e o Homem, de François Jacob
Tradução de Margarida Sérvulo Correia
Revisão científica de Leonor Parreira
Gradiva, 1997, 183 pp.

FIM





Promotor Operador líder atenuador



Met - Lys - Ala - Ile - Phe - Val - Leu - Lys - Gly - Trp - Trp - Arg - Thr - Ser - Stop

5' AUG AAA GCA AUU UUC GUA CUG AAA GGU UGG UGG CGC ACU UCC UGA 3'

50



Glucose

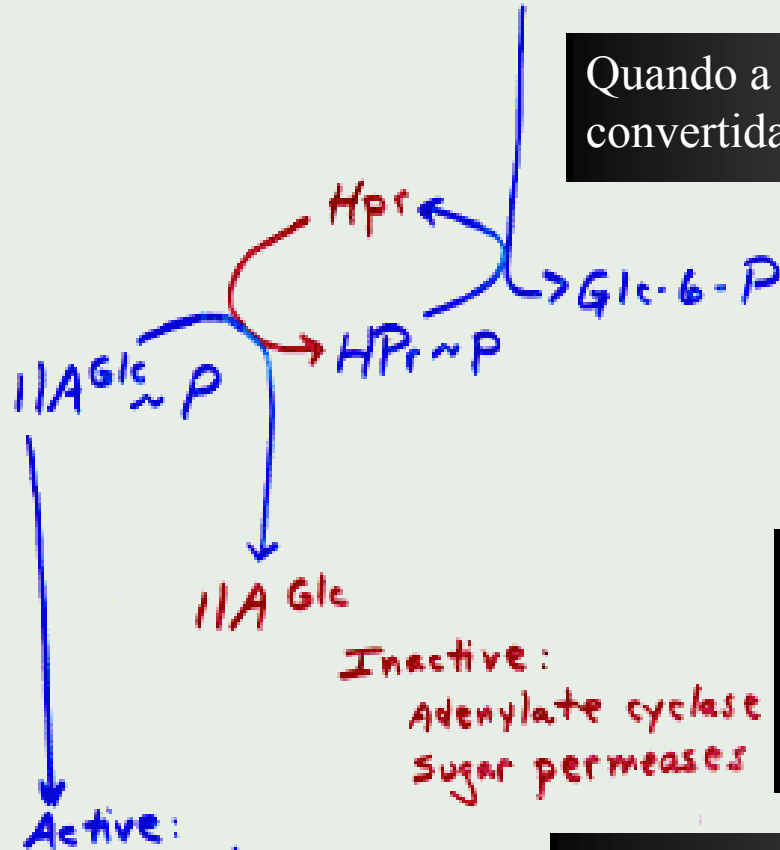
Quando a glicose é transportada para dentro da célula é convertida em glicose-6-fosfato.

O grupamento fosfato vem da forma fosforilada da HPr, que transfere o fosfato obtido da forma fosforilada da IIA-Glc.

Assim, quando a glicose se encontra disponível na célula, a proteína IIA-Glc se encontra na forma defosforilada e inativa a adenilato ciclase e outras permeases de açúcares.

Na ausência de glicose, a proteína IIA-Glc se encontra na forma fosforilada, ativando a adenilato ciclase e permeases de açúcares.

Assim, quando a glicose está ausente, o cAMP é sintetizado pela adenilato ciclase.



Inactive:
Adenylate cyclase
Sugar permeases

Active:
Adenylate cyclase
(ATP → cAMP)
Sugar permeases

PEP-dependent sugar phosphotransferase

