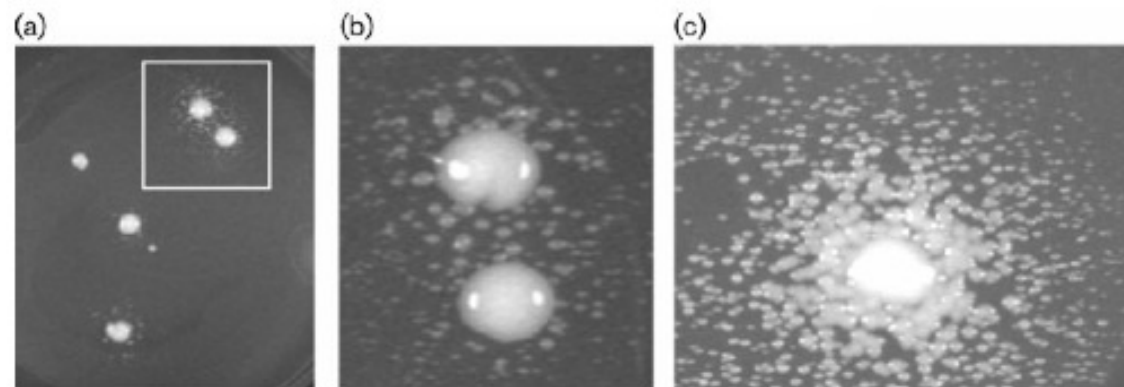
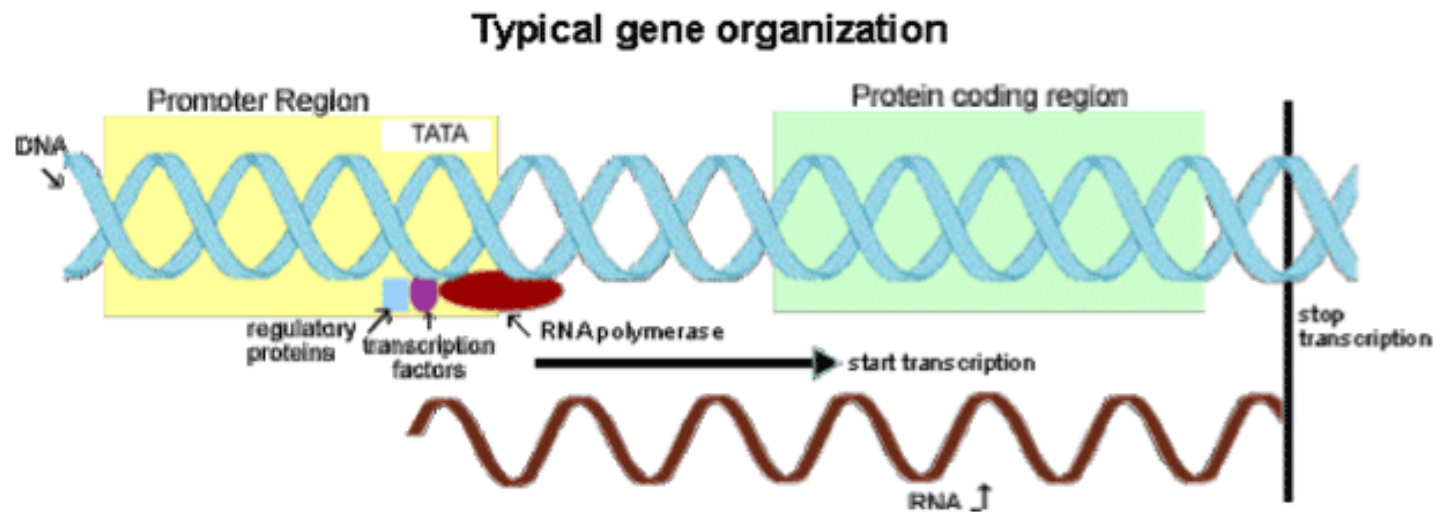


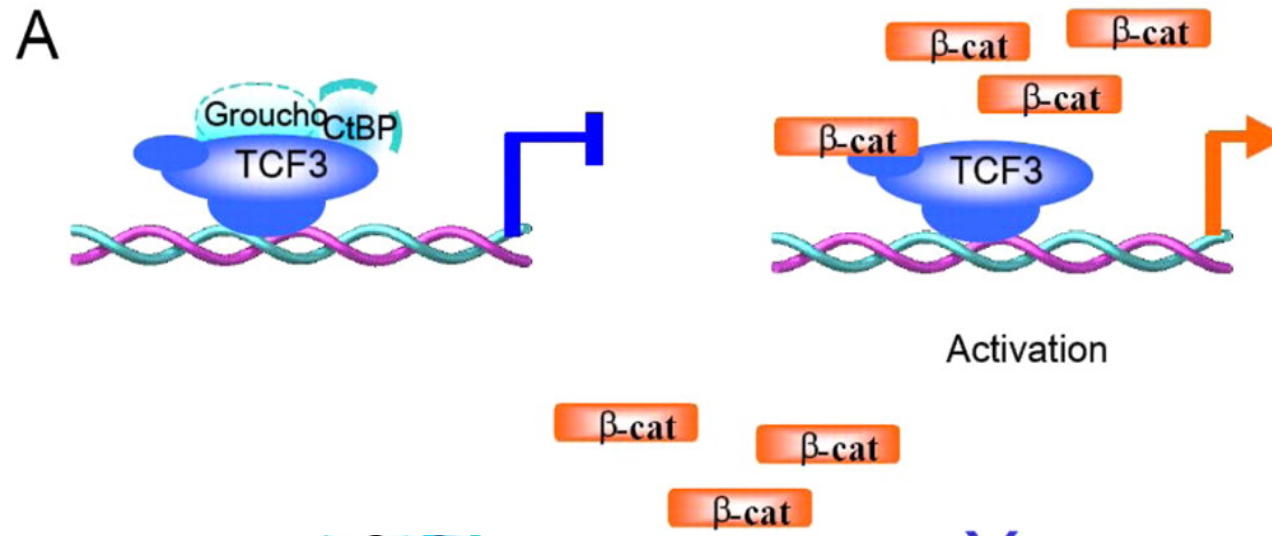
Colónias satélite: ao fim de 2 dias (a e b) e de 4 (c)



Regulação da expressão de genes



- A decisão em **iniciar a transcrição** de um gene que codifica uma proteína em particular é o **principal mecanismo que controla a produção dessa mesma proteína**:



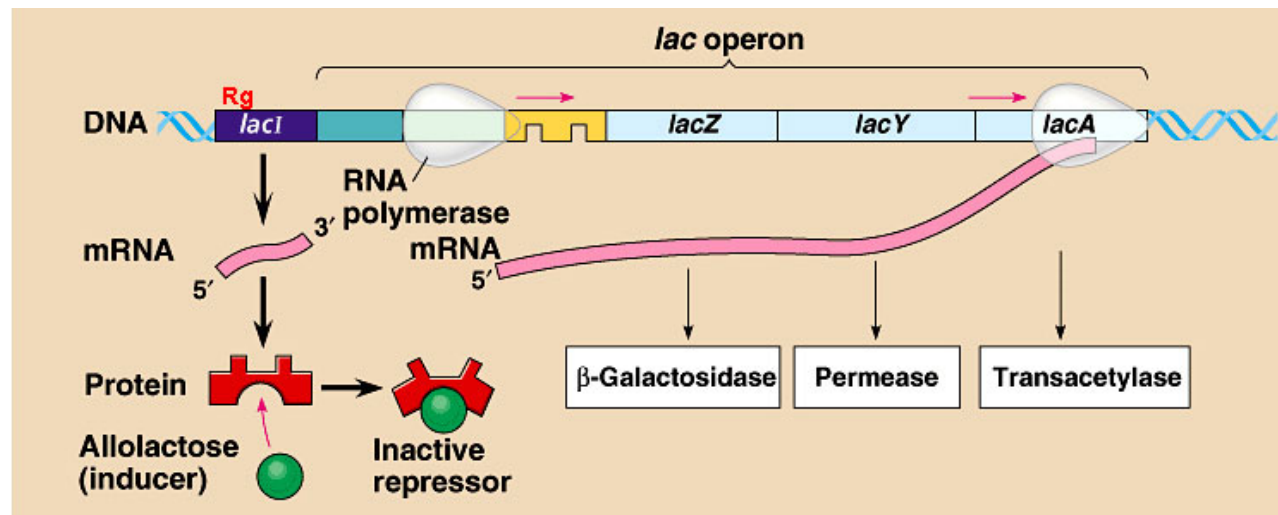
- **Expressão reprimida:** há pouca síntese de mRNA e da proteína correspondente;
- **Expressão activada:** há produção elevada de mRNA e da respectiva proteína.

Unicelular vs multicelular

- Organismos unicelulares:
 - A expressão de genes é regulada de modo a ajustar a célula às alterações nutricionais e físicas no meio ambiente.
- Organismos pluricelulares:
 - A expressão dos genes é regulada de modo a garantir que o gene correcto está a ser expresso no momento e no tecido certos.

Operão

- Nos **procariotas**, cerca de 50% dos genes estão organizados em “pacotes” – **operões** – que codificam:
 - Enzimas envolvidas numa determinada via metabólica, ou
 - Proteínas que interagem de modo a formar uma proteína com várias subunidades.



Regulação da transcrição do operão

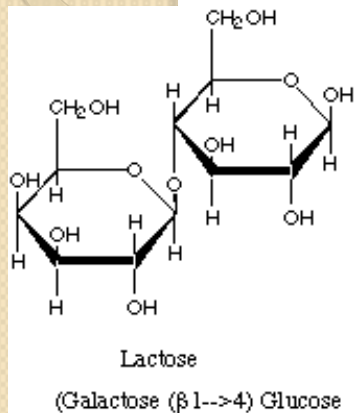
- O operão é transcrito a partir de um local único.



- Todos os genes do operão são regulados de modo coordenado, i.e., são activados ou reprimidos ao mesmo tempo.
- A transcrição do operão, assim como dos genes eucariotas, é regulada pela interacção entre a RNA polimerase e proteínas repressoras / activadoras específicas.


O operão *lac* de *Escherichia coli*

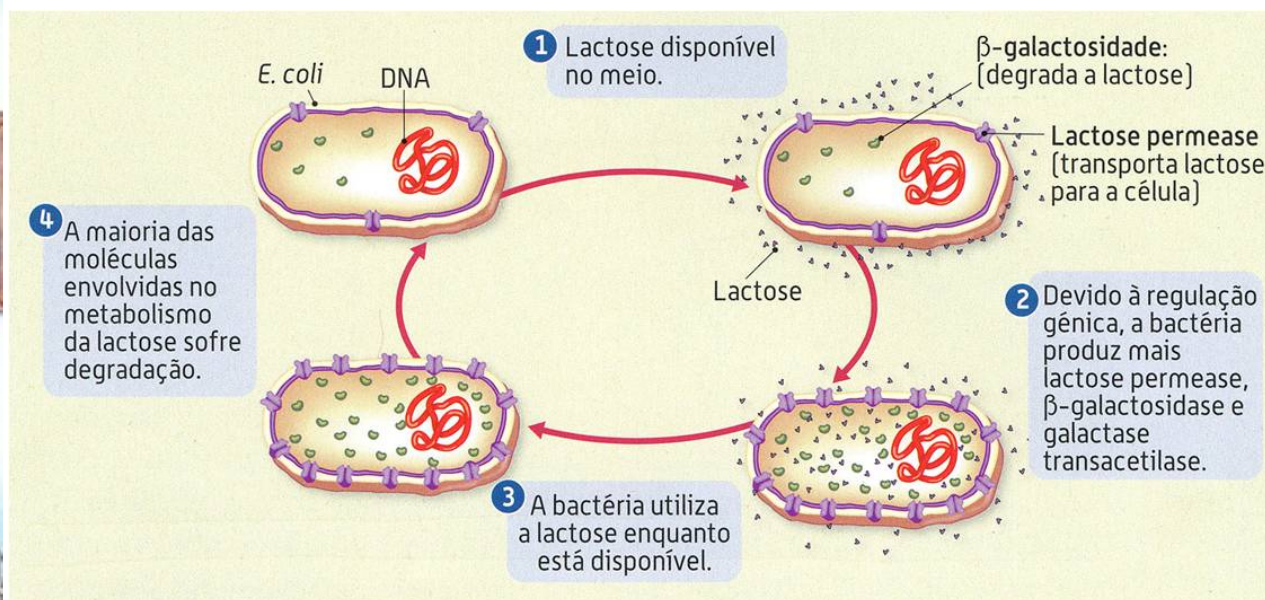
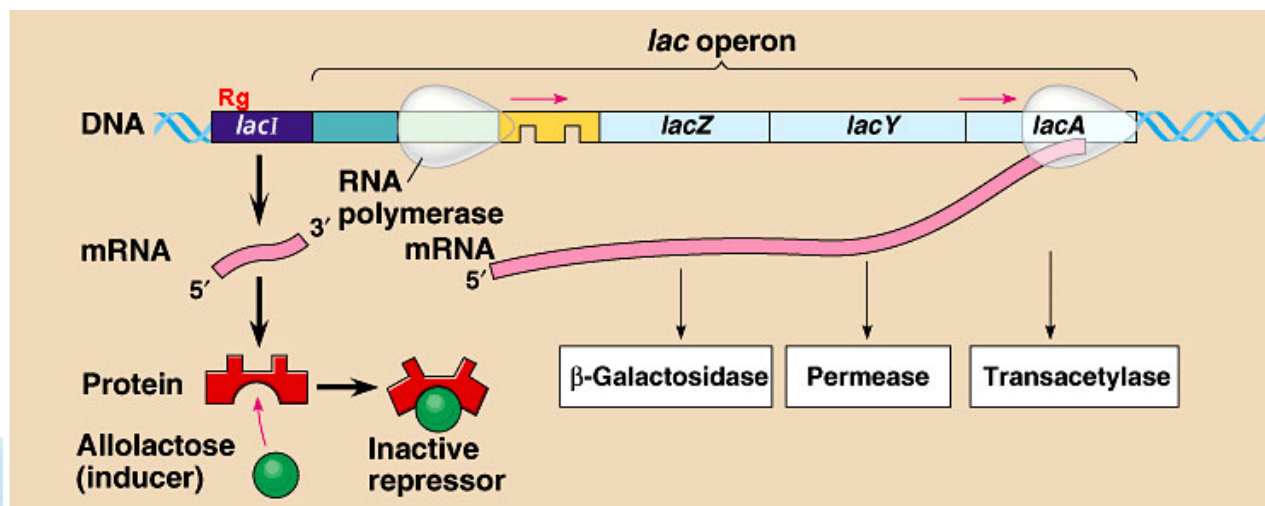
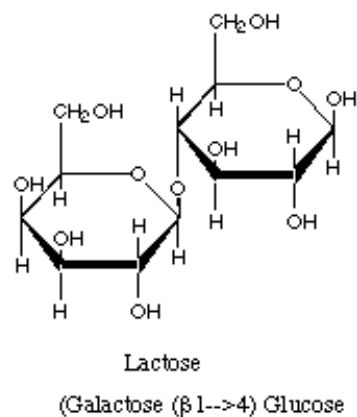
- Quando a *E. coli* se encontra num ambiente:



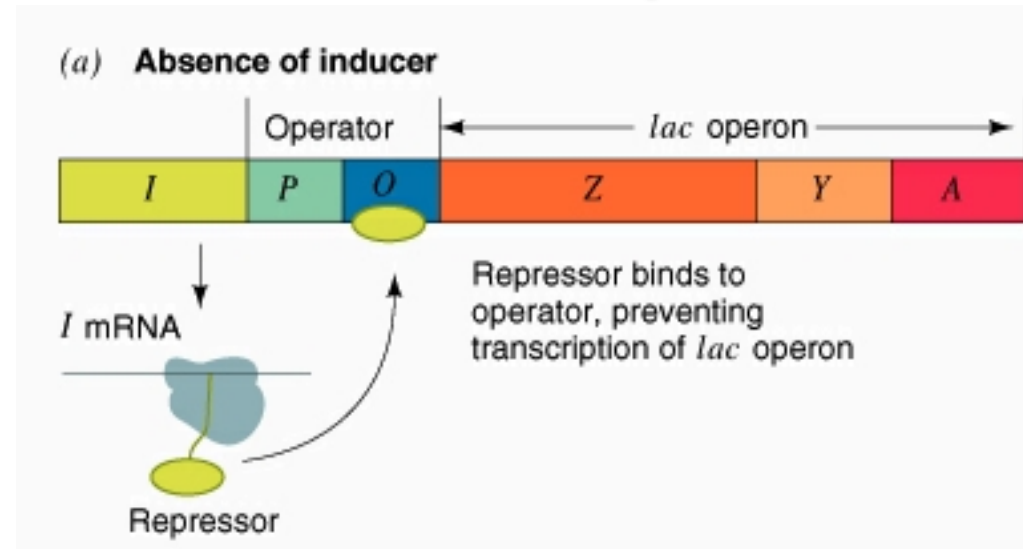
- Sem lactose: há **repressão** da síntese do mRNA *lac*;
- Com lactose e glucose: a célula usa a glucose; há **repressão** da síntese do mRNA *lac*;
- Só com lactose: há **ativação** da síntese do mRNA *lac*;

- A regulação da transcrição do operão *lac* é controlada por:

- 
- Repressor *lac*;
 - CAP (“Catabolite Activator Protein”) (situação de “fome”).
 - Ligam-se a uma sequência específica na região promotora que controla a transcrição do operão – **operador**.



Sem lactose – repressão

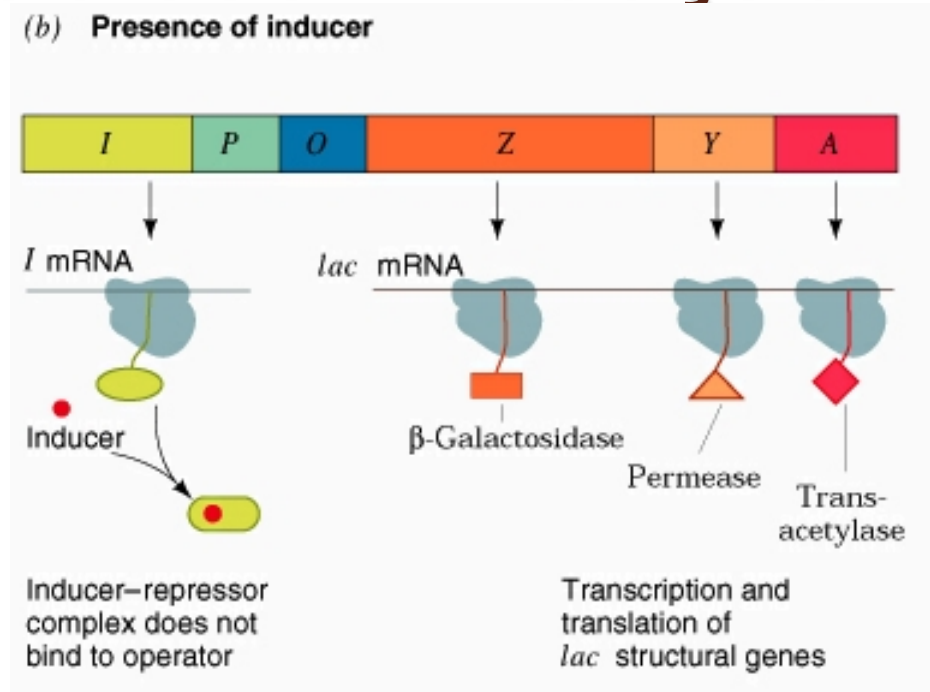


- Há ligação do repressor *lac* a uma sequência designada **operador *lac***, a qual engloba o local de início da transcrição;



- Bloqueia a ligação da RNA polimerase ao P_{lac} ;
- Não há transcrição.

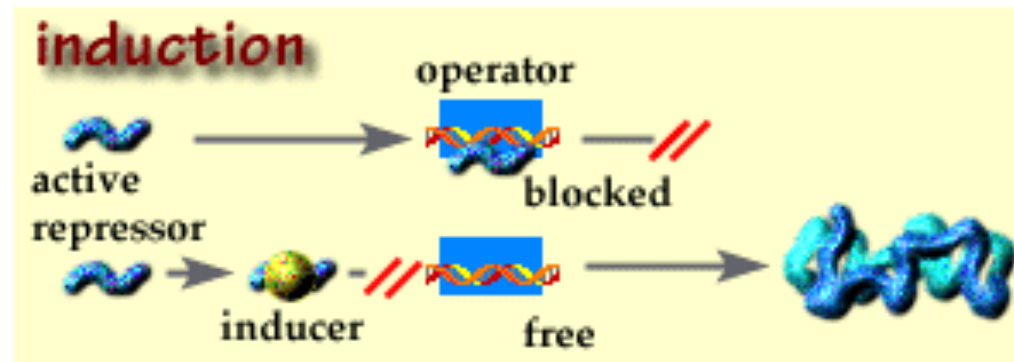
Com lactose – indução



- A lactose associa-se ao repressor *lac*, alterando a sua conformação;
- O repressor dissocia-se do operador *lac*;
- A RNA polimerase associa-se ao P_{lac} e inicia a transcrição.

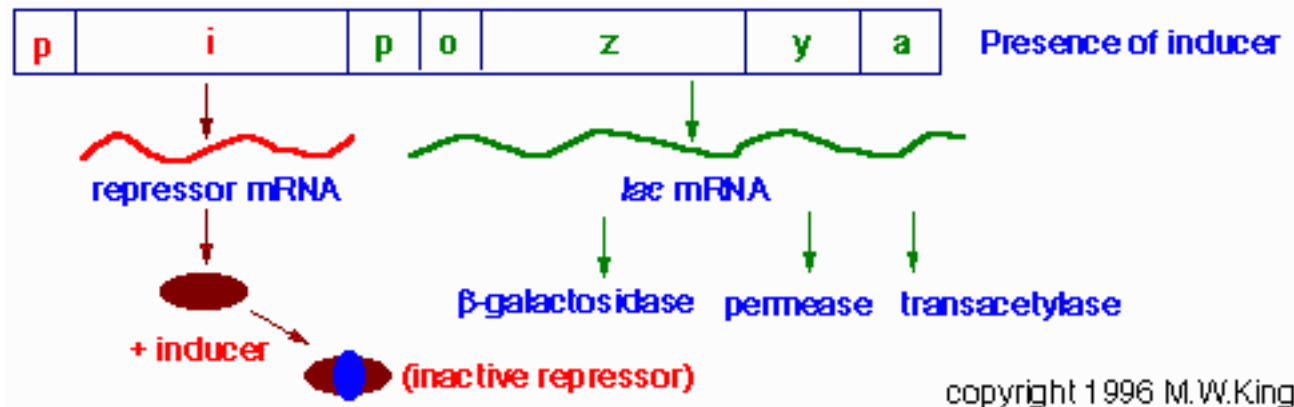
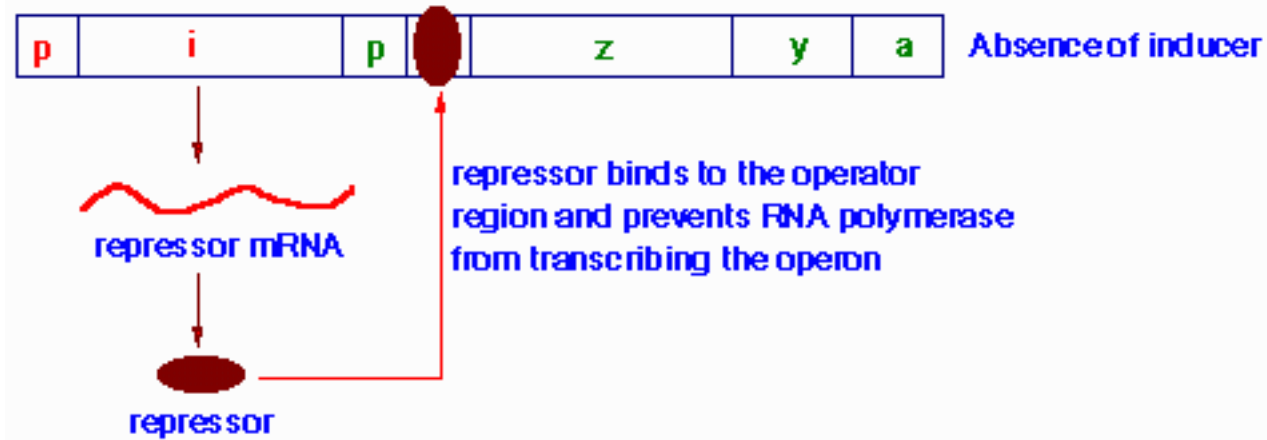
Porquê?

- Na maioria dos operões, a **sua não transcrição** deve-se à ligação de um **repressor** no operador do promotor;

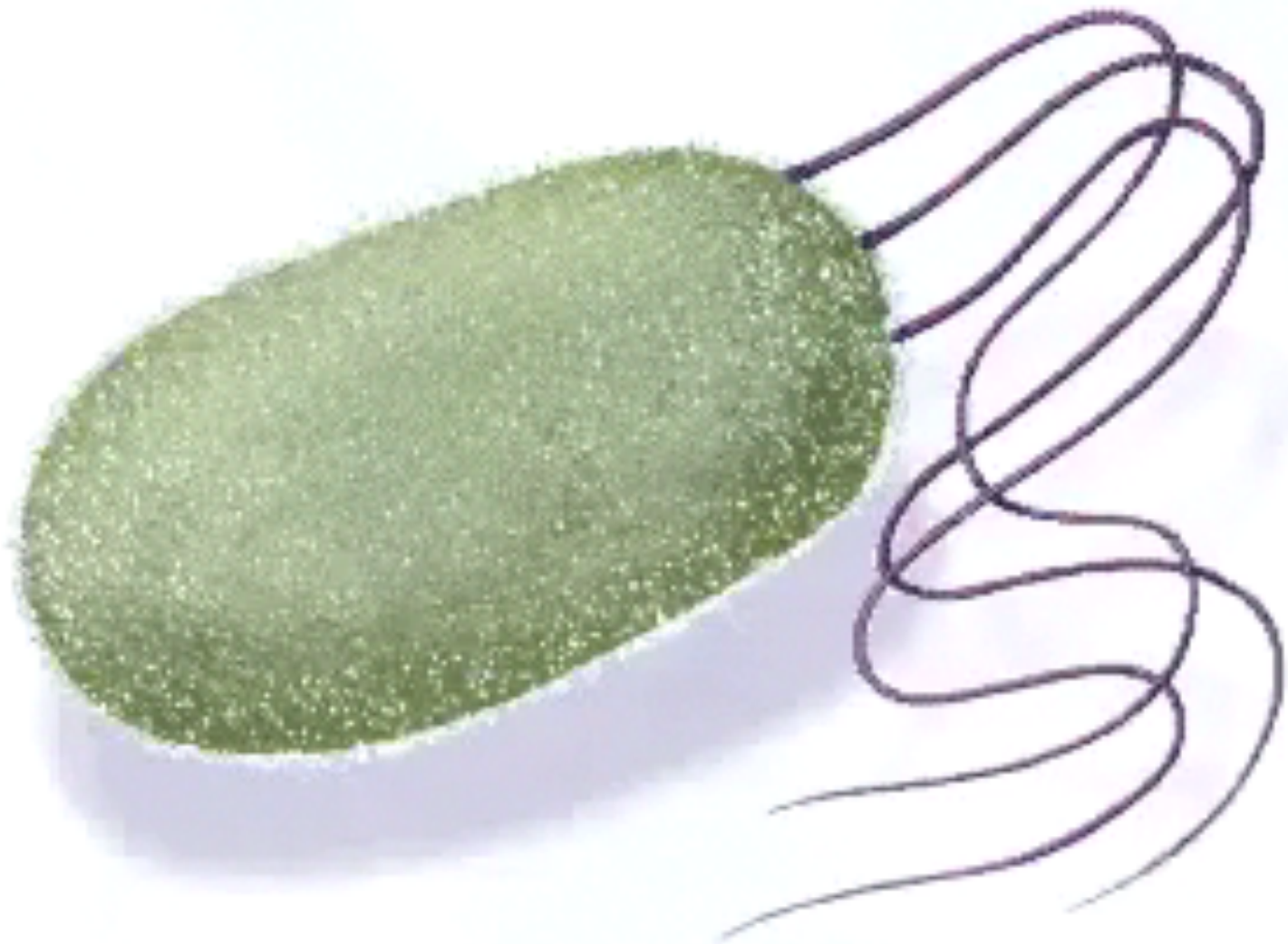


- A ligação de uma (ou várias) pequenas moléculas ao repressor – **indutores** – vai alterar a sua capacidade de ligação ao operador, **fazendo com que se dissocie**;
- Há **INDUÇÃO** da síntese de mRNA.

The *lac* Operon

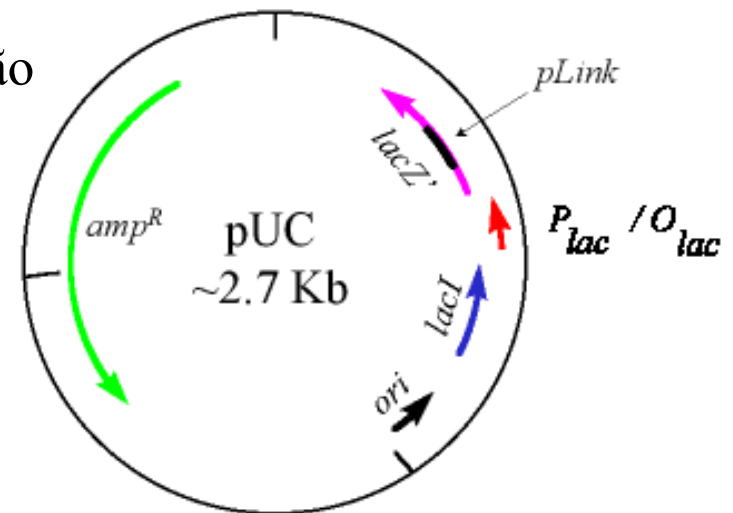


copyright 1996 M.W.King



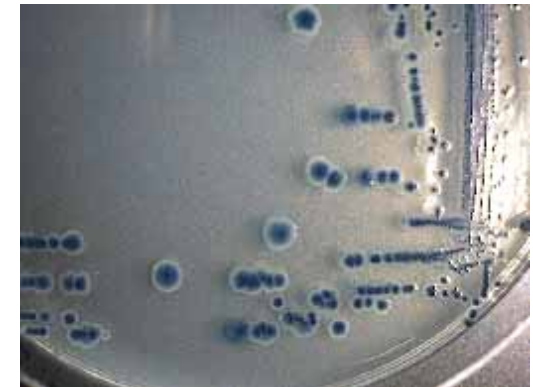
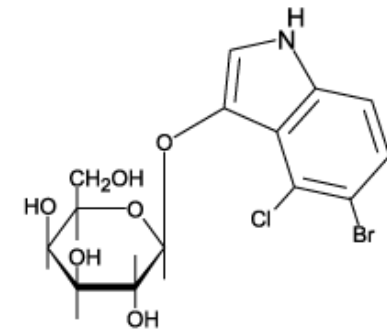
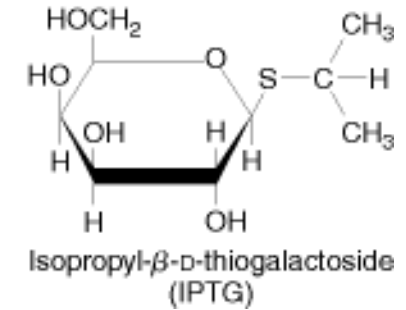
Plasmídios derivados do pUC

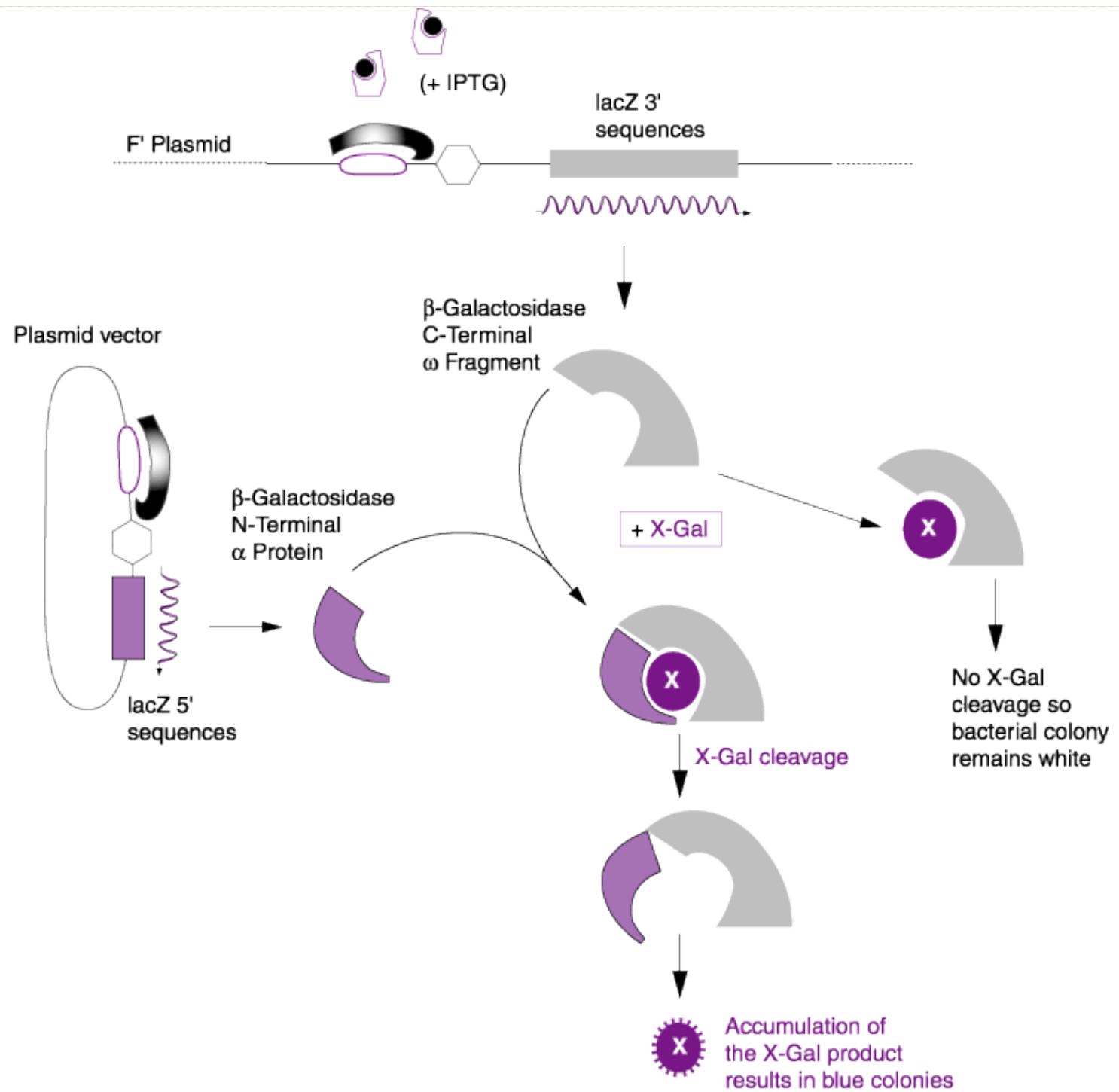
- UC = Universidade da Califórnia
- local de clonagem múltipla inserido na grelha de leitura correcta do gene *lacZ'* \Rightarrow proteína funcional/não funcional...
- possuem um segmento de DNA derivado do operão *lac* de *E. coli* que codifica o fragmento amino-terminal (correspondente aos primeiros 146 aa) da β -galactosidase (LacZ) – fragmento α (LacZ')
- as estirpes usadas com estes vectores são **mutantes** - possuem uma **delecção no gene que codifica o fragmento α da LacZ ($\Delta M15$)**, mas **possuem a informação para a restante LacZ (fragmento ω)**



Seleccção de bactérias pela cor

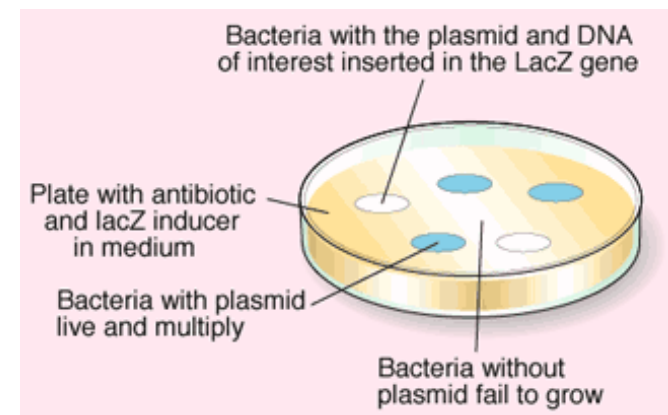
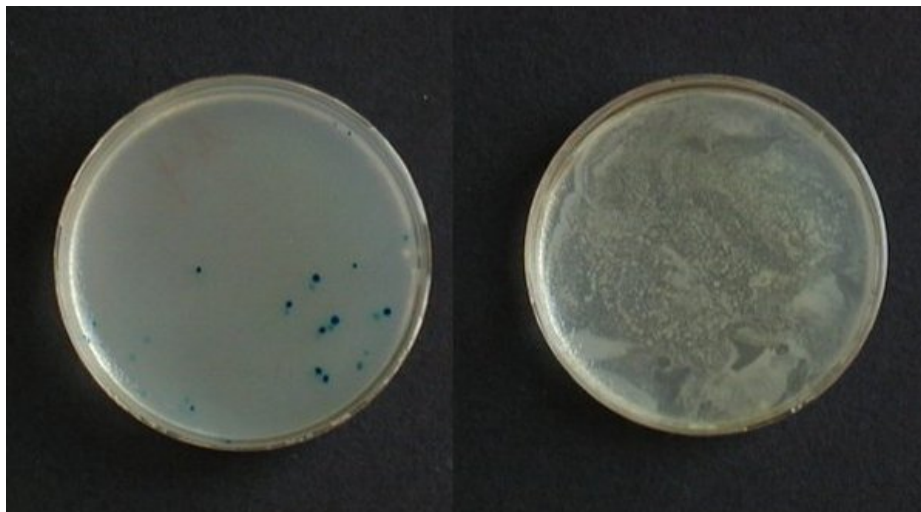
- a síntese do fragmento α pode ser induzida pelo IPTG (isopropil-tio- β -galactosídeo) – análogo da lactose
- se ambos os fragmentos (α e ω) forem sintetizados na bactéria, interagem um com o outro originando uma β -galactosidase funcional – α complementação
- esta β -galactosidase funcional pode degradar a substância cromogénica X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -galactosídeo), conduzindo à formação de colónias azuis
- As bactérias são não recombinantes!!

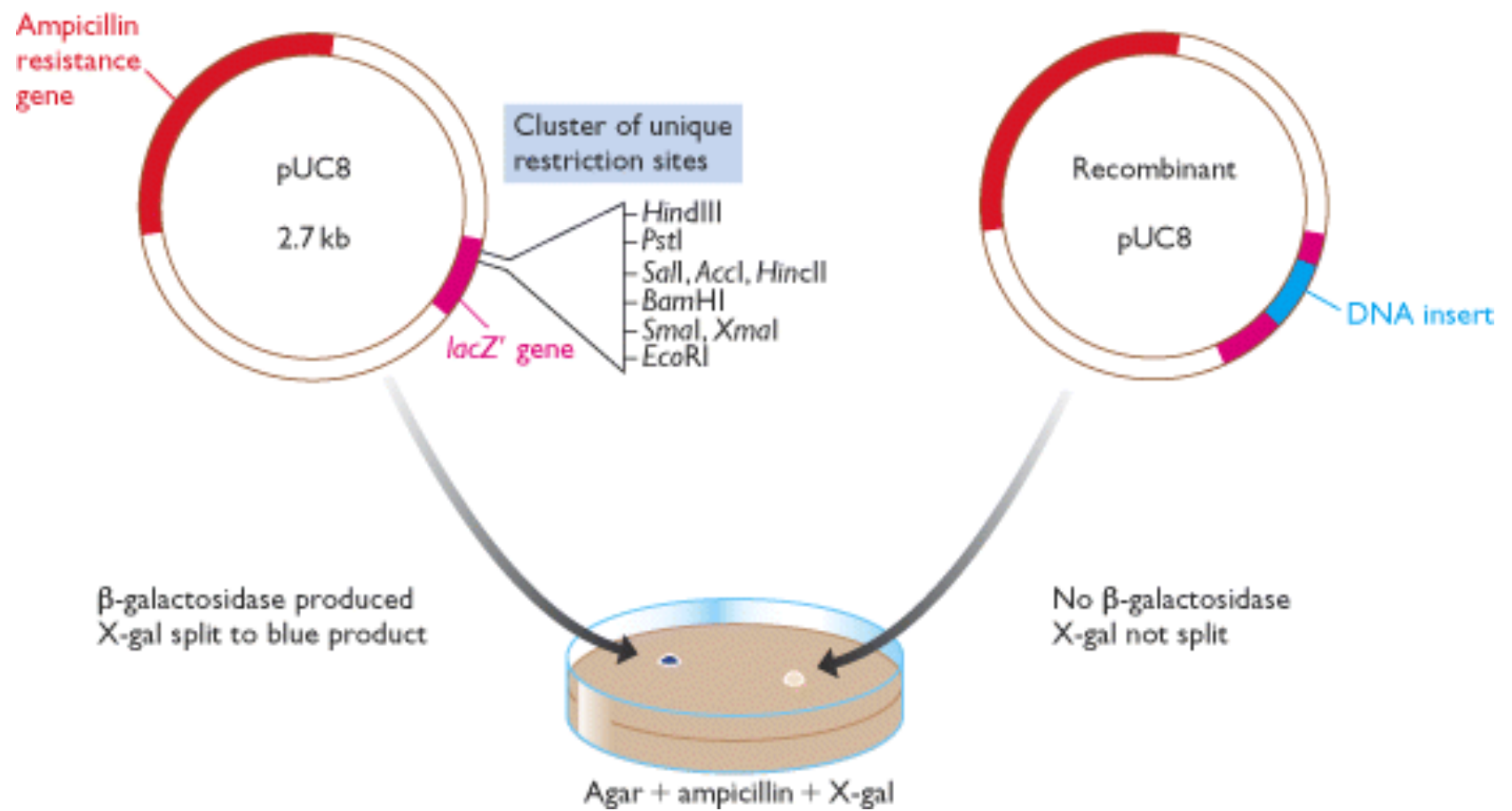


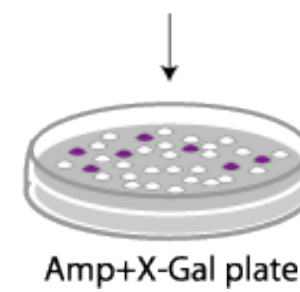
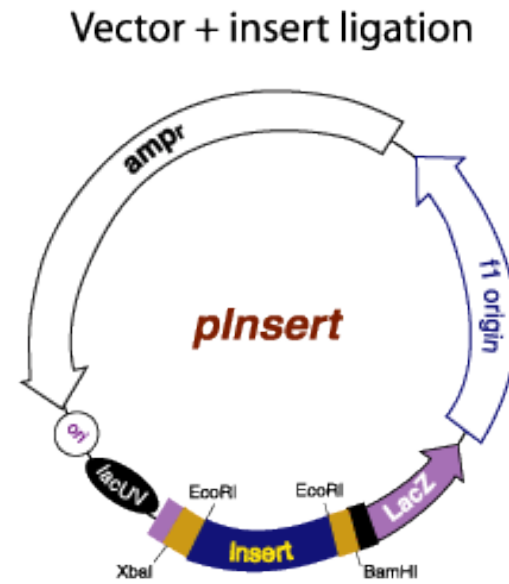
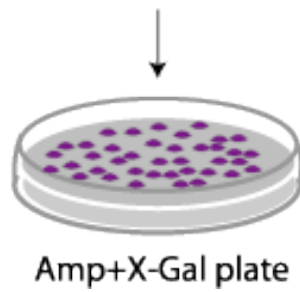
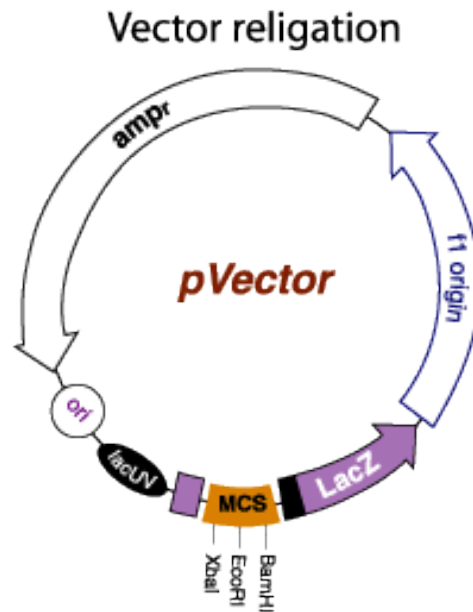


Bactérias recombinantes

- nos vectores derivados do pUC, o local de clonagem múltipla encontra-se inserido no gene *lacZ*, o que permite a distinção histoquímica das bactérias recombinantes das não recombinantes
- a inserção de DNA estranho no *polylinker* conduz à **inativação do gene *lacZ*** tornando as bactérias incapazes de produzir uma β -galactosidase funcional. Neste caso, as colónias resultantes **não serão azuis**

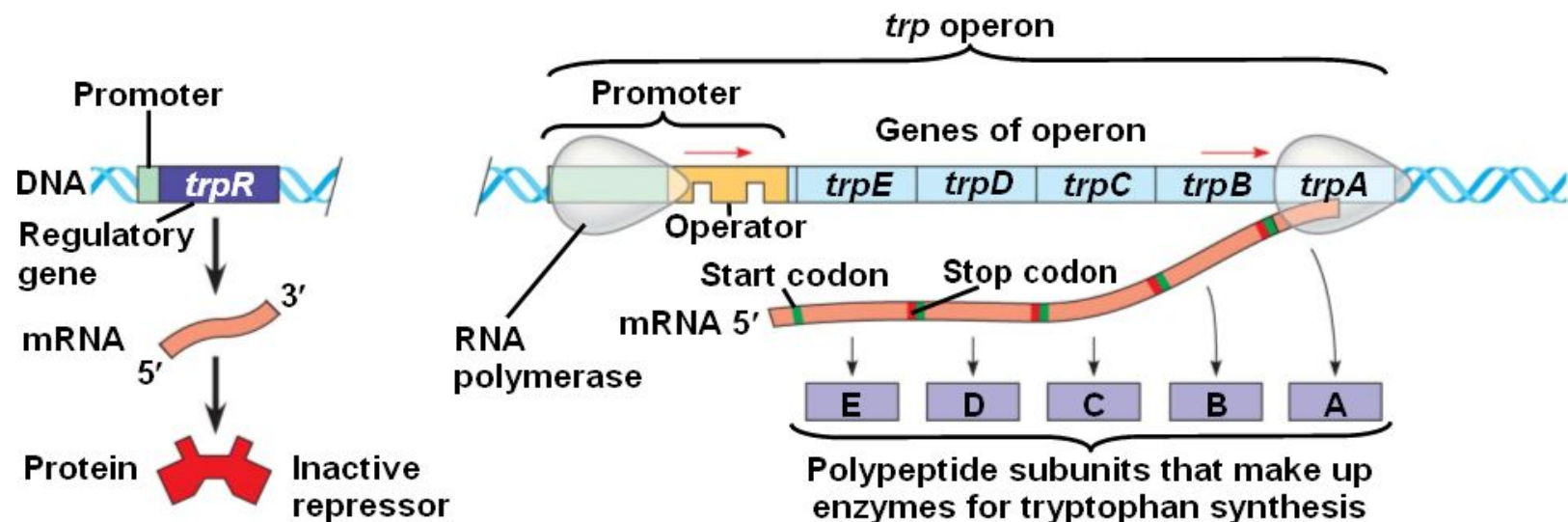






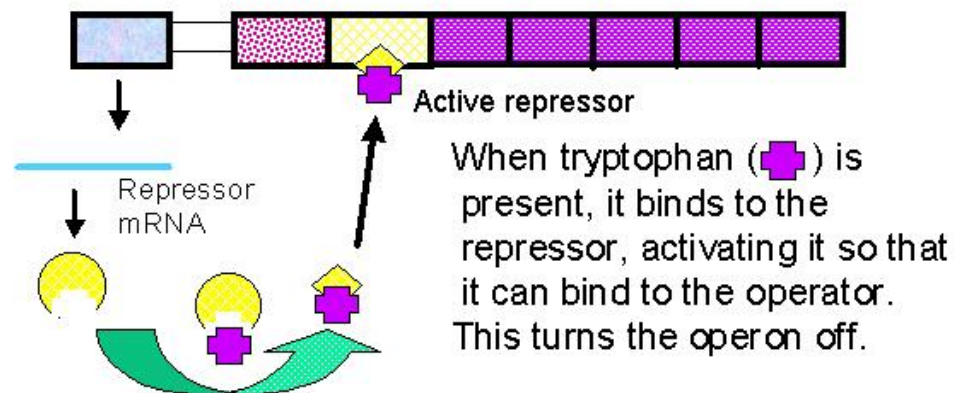
O operão *trp* de *E. coli*

- Codifica 5 enzimas envolvidas na **biossíntese do triptofano**;
- Quando no **citósol ou meio ambiente** há:
 - ↑ **triptofano**: **Não** há síntese de mRNA *trp*;
 - ↓ **triptofano**: **Há** síntese de mRNA *trp*.



Regulação pelo triptofano

- Há ligação do triptofano ao repressor *trp*;
- Causa uma modificação conformacional do repressor *trp*;
- Há associação deste ao operador *trp*;
- Não há síntese de mRNA *trp*;
- Há **REPRESSÃO** da transcrição.



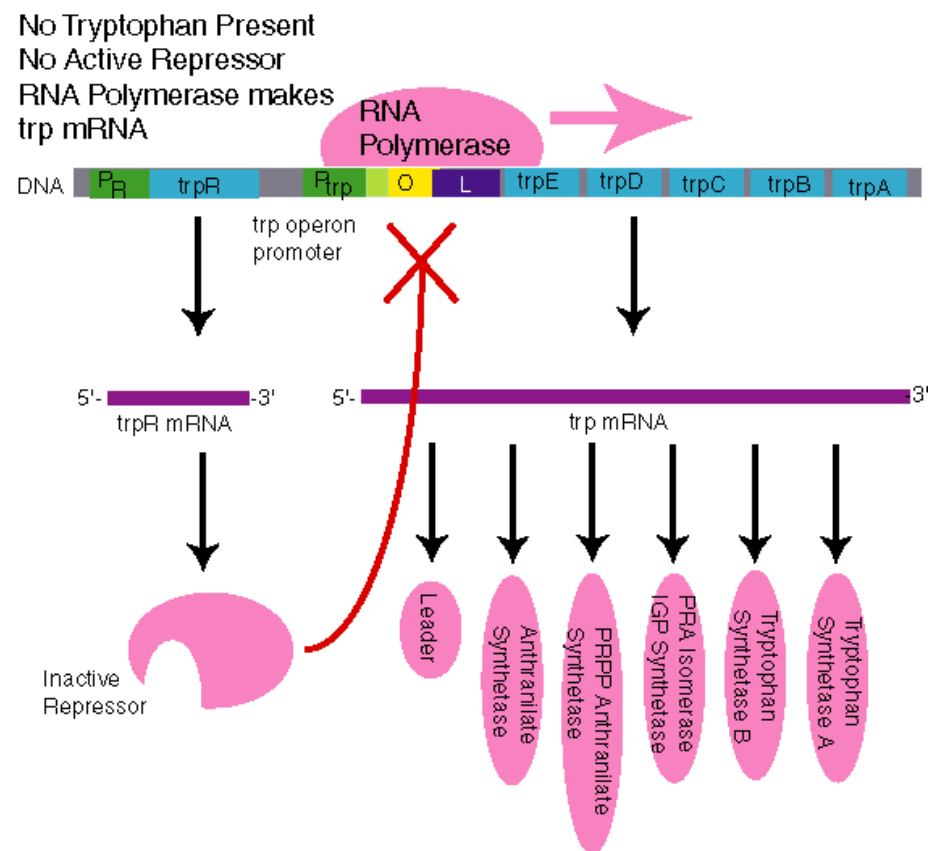
Na ausência de triptofano

- Há dissociação do triptofano do repressor *trp*;

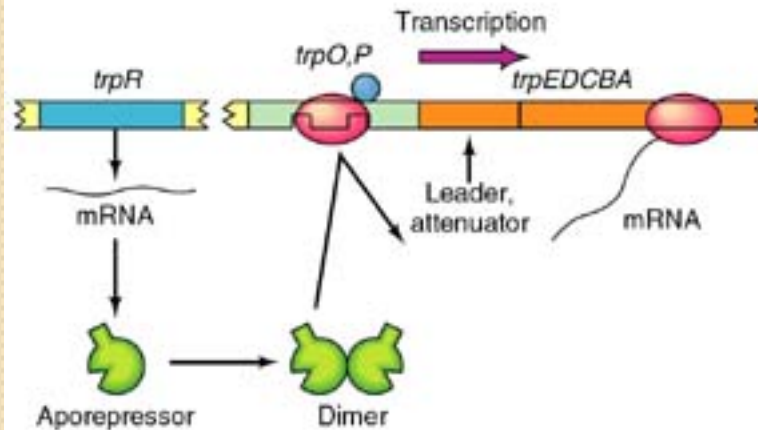
- O repressor sofre modificação conformacional;

- Dissocia-se do operador;

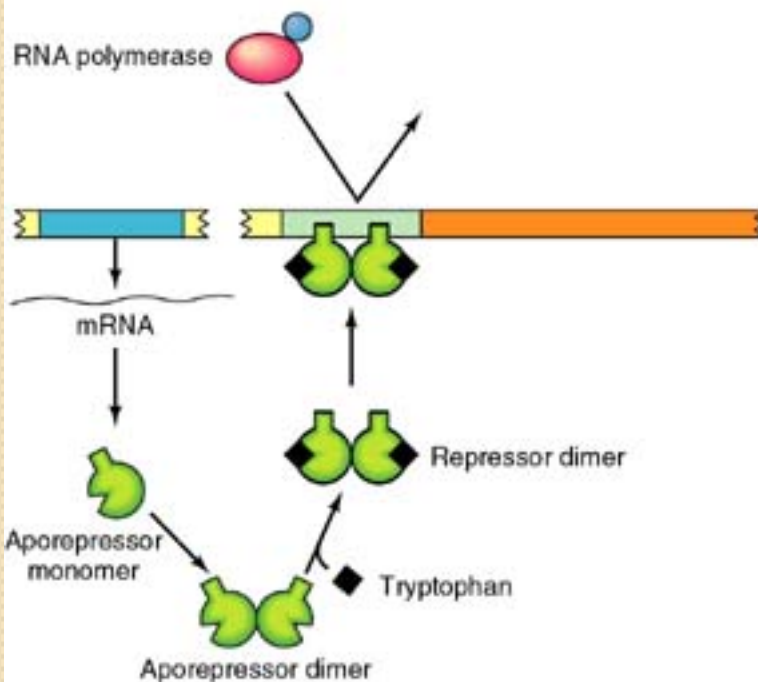
- Há transcrição do mRNA *trp*.



Low tryptophan: no repression

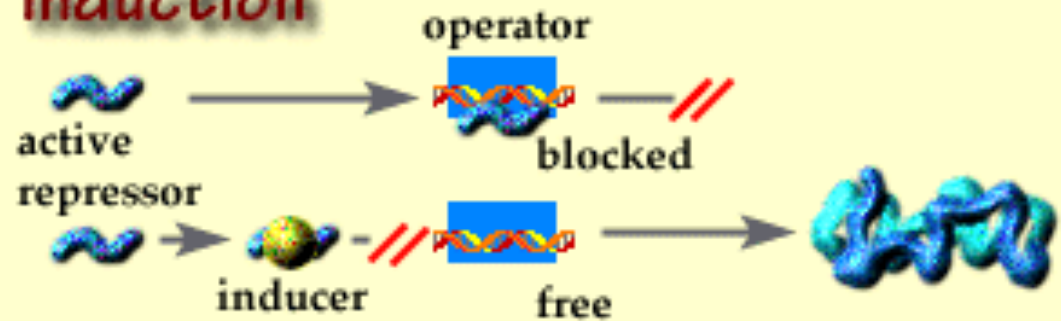


High tryptophan: repression

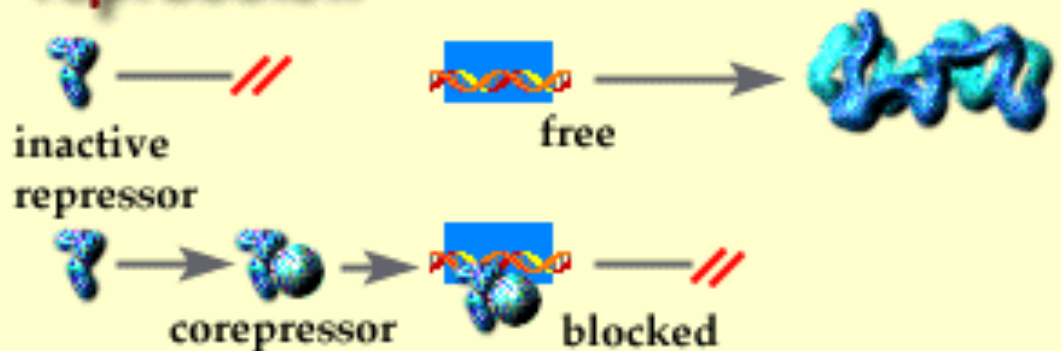


Gene Regulation summary

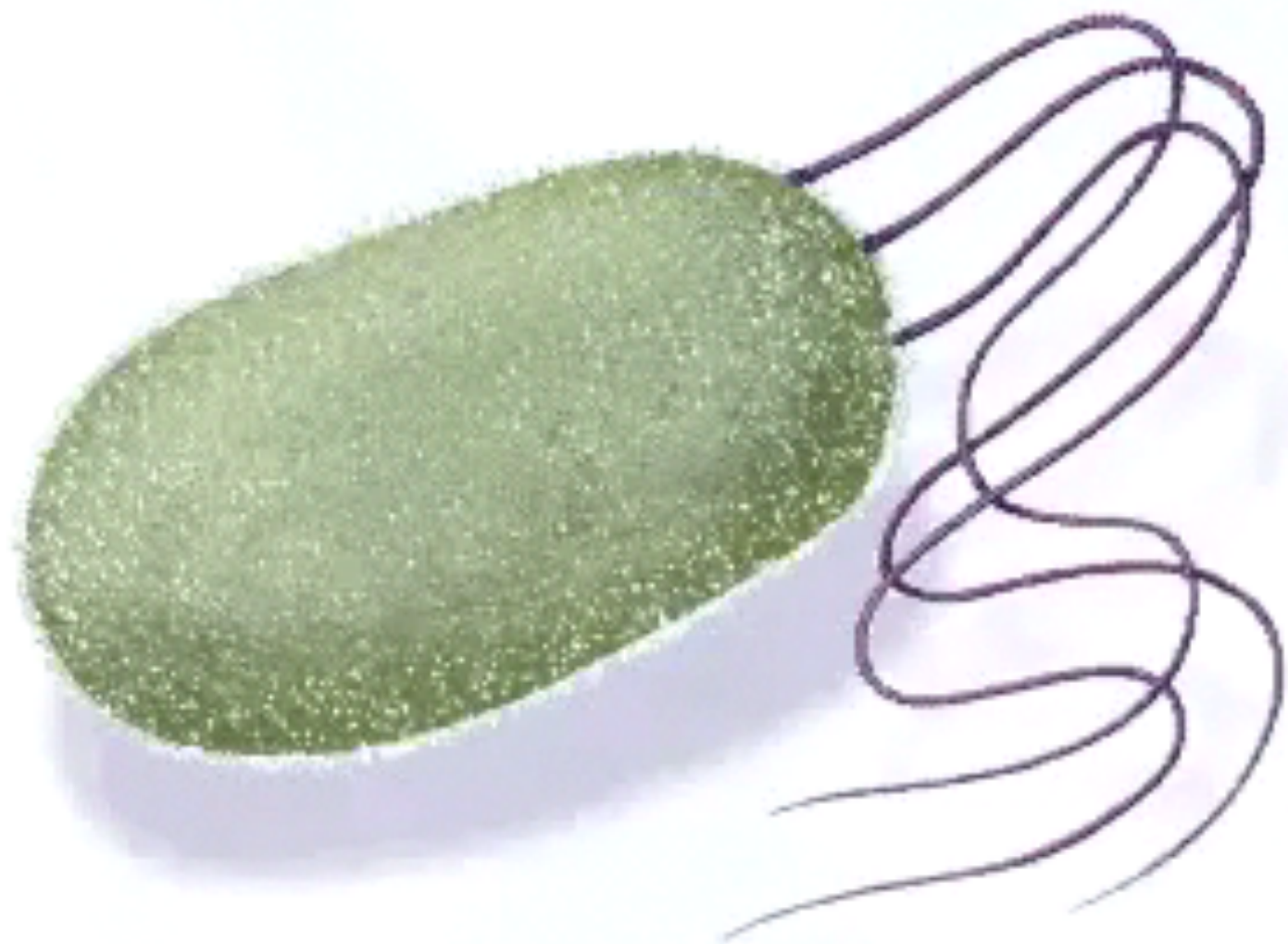
induction



repression

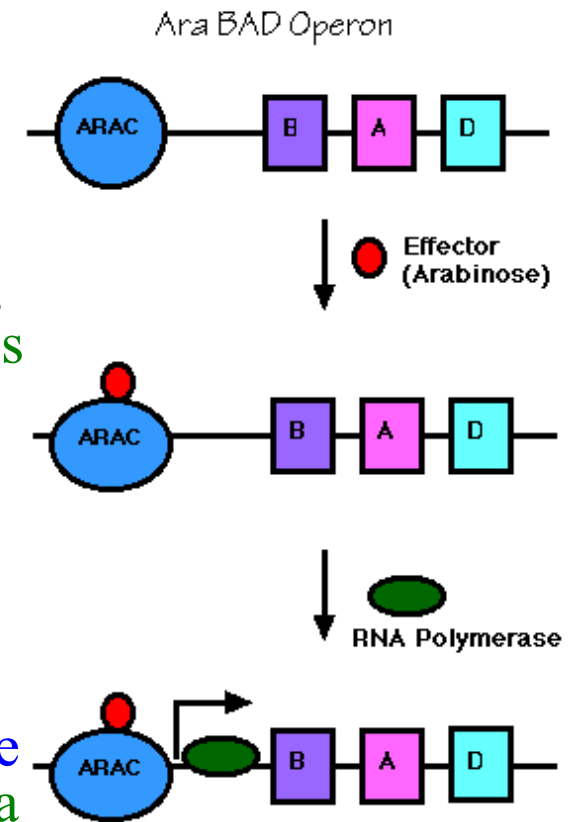


Em qualquer dos casos (↑) só **há** **transcrição** se o **repressor** estiver **dissociado do promotor** do operão!



O operão *ara* (e o pGLO)

- Codifica 3 enzimas envolvidas no **metabolismo da arabinose** (açúcar): **AraB, AraA e AraD** (BAD);
- O **operão** é **regulado pela proteína AraC**, a qual também **funciona como sensor dos níveis de arabinose na célula**;
- A principal função da **AraC** é **induzir a expressão do mRNA *bad***;
- O **promotor deste operão está geralmente desligado**, sendo **ligado pela AraC após a percepção da arabinose**;
- **Regulação positiva da transcrição.**



O que se passa no pGLO

- O operão *bad* foi substituído pela sequência codificante da proteína verde fluorescente – GFP.
- A arabinose liga-se à AraC, alterando a sua conformação e **ativando-a**.
- A **AraC ativada** associa-se ao promotor P_{BAD} promovendo a ligação da RNA polimerase;
- Há transcrição do mRNA *gfp* e consequente produção da proteína fluorescente.

