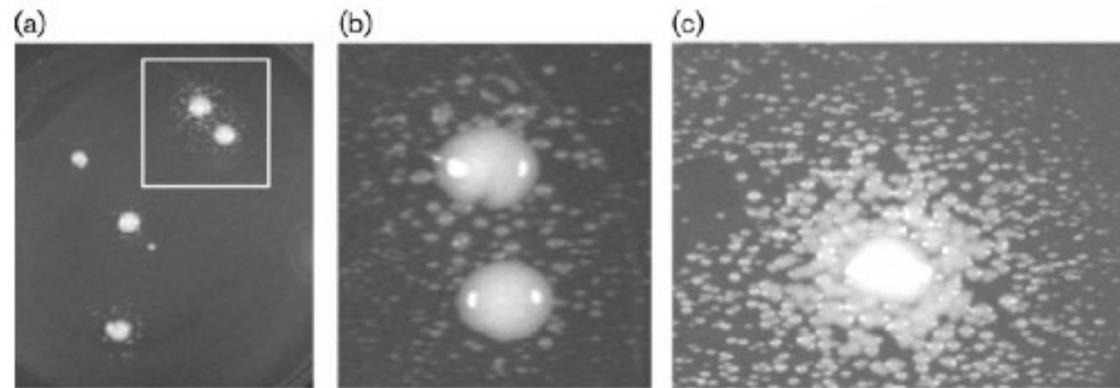
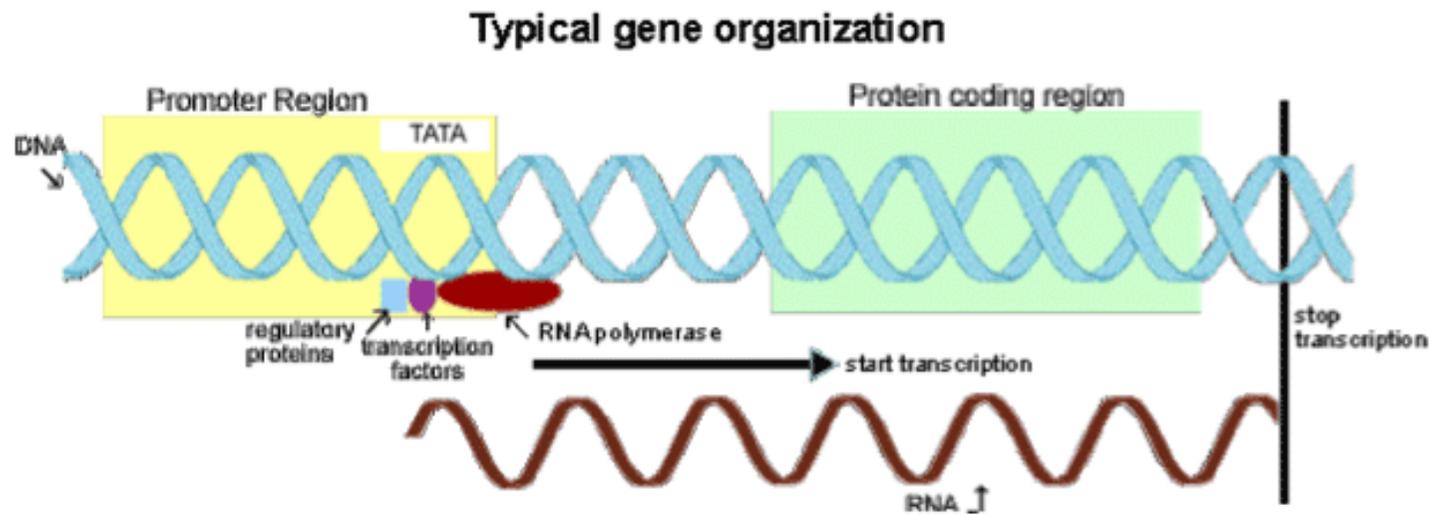


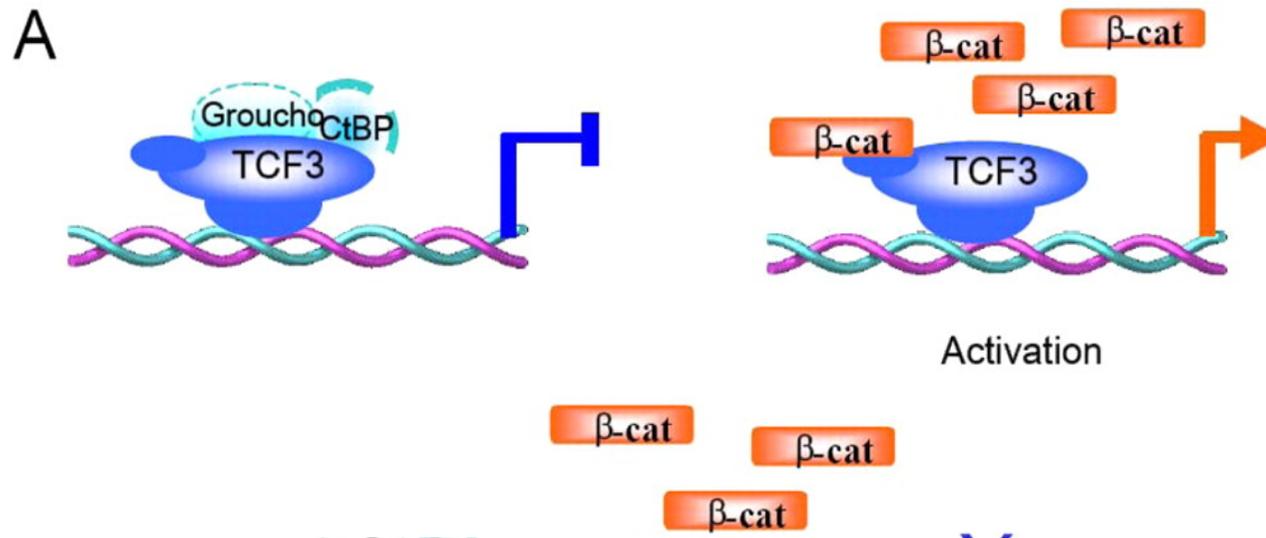
Colónias satélite: ao fim de 2 dias (a e b) e de 4 (c)



# 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**:



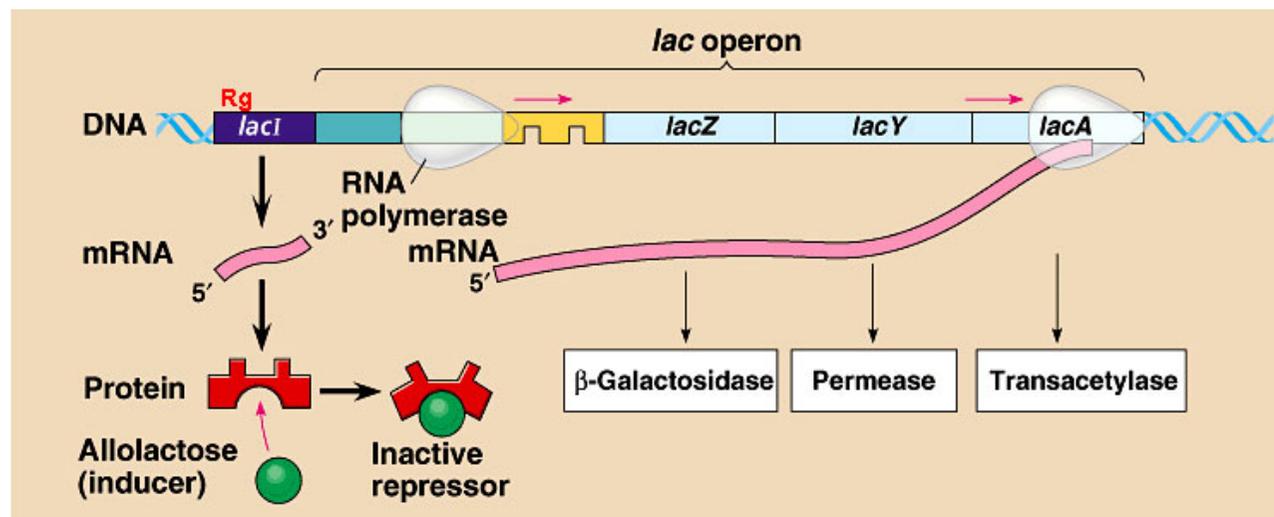
- **Expressão reprimida**: há pouca síntese de mRNA e da proteína correspondente;
- **Expressão activada**: há produção elevada de mRNA e da respectiva proteína.

# 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

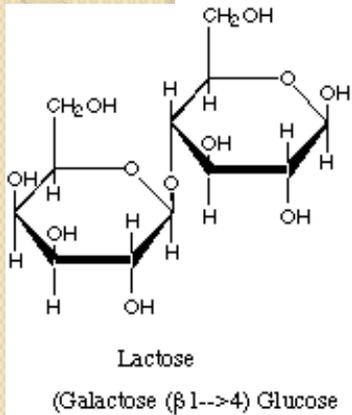
- O operão é transcrito a partir de um local único.



- 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*

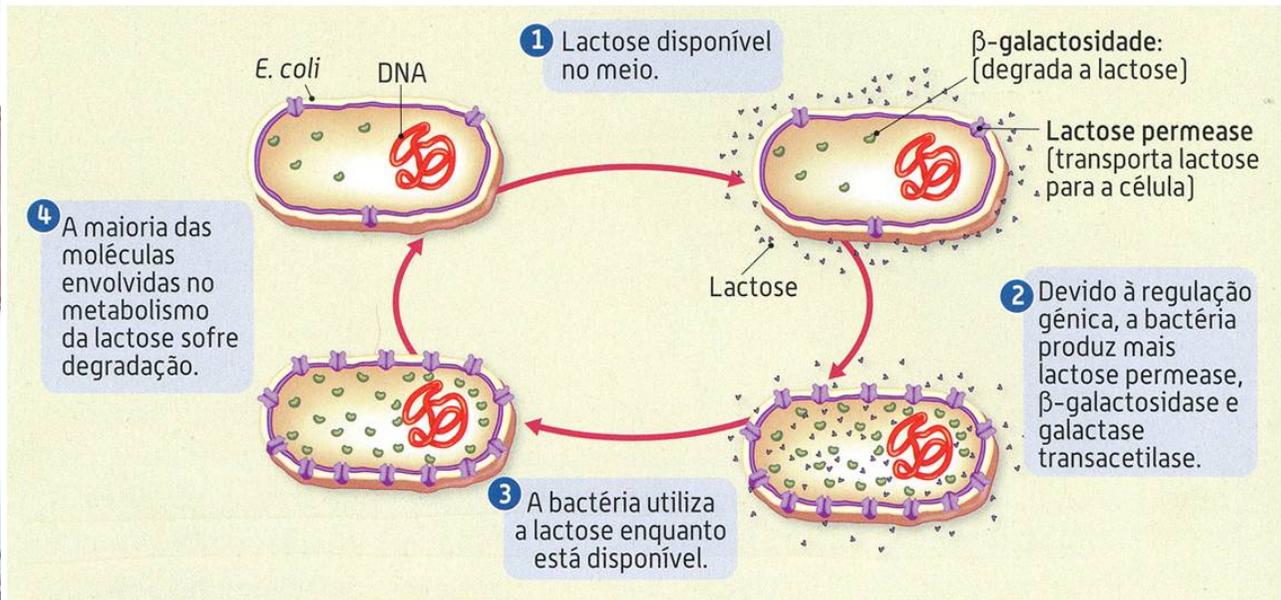
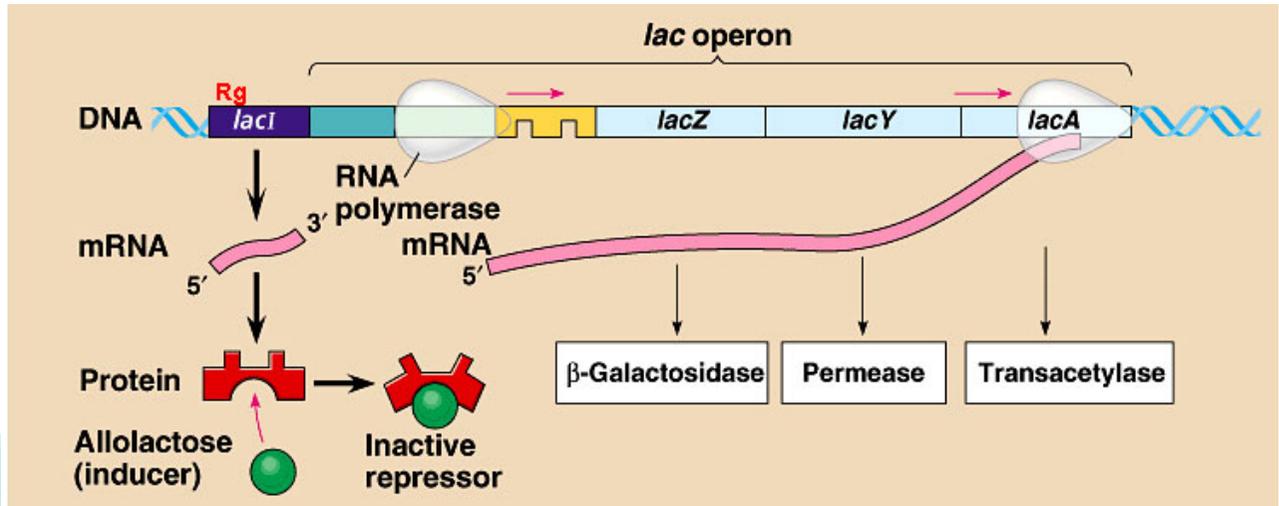
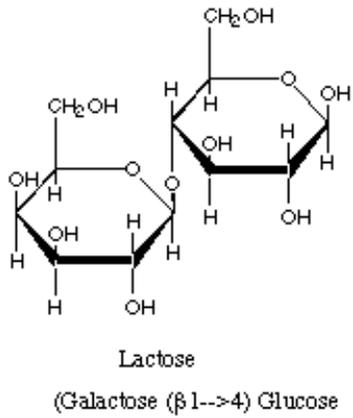
- Quando a *E. coli* se encontra num ambiente:



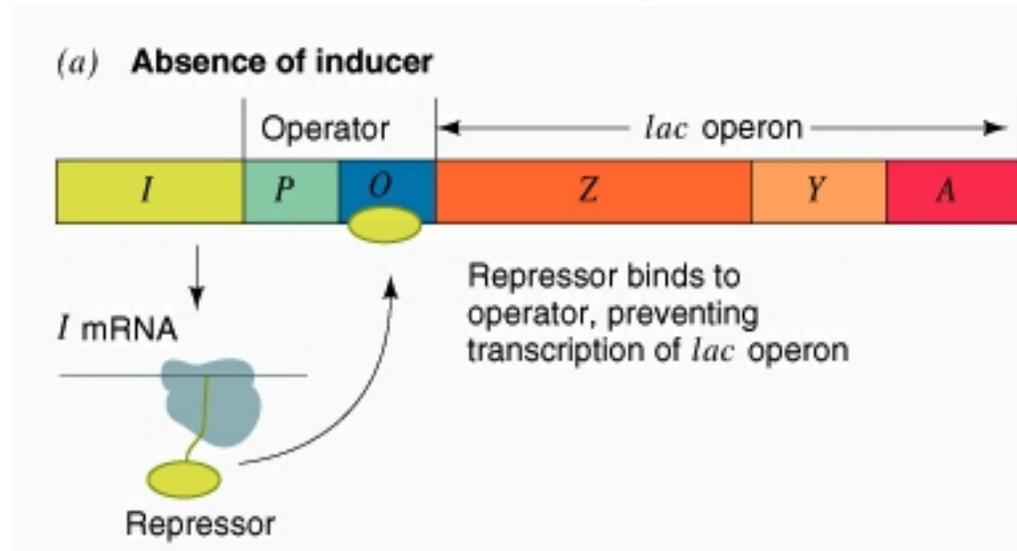
- **Sem lactose**: há **repressão** da síntese do mRNA *lac*;
- **Com lactose e glucose**: a célula usa a glucose; há **repressão** da síntese do mRNA *lac*;
- **Só com lactose**: há **ativação** da síntese do mRNA *lac*;

- 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**.

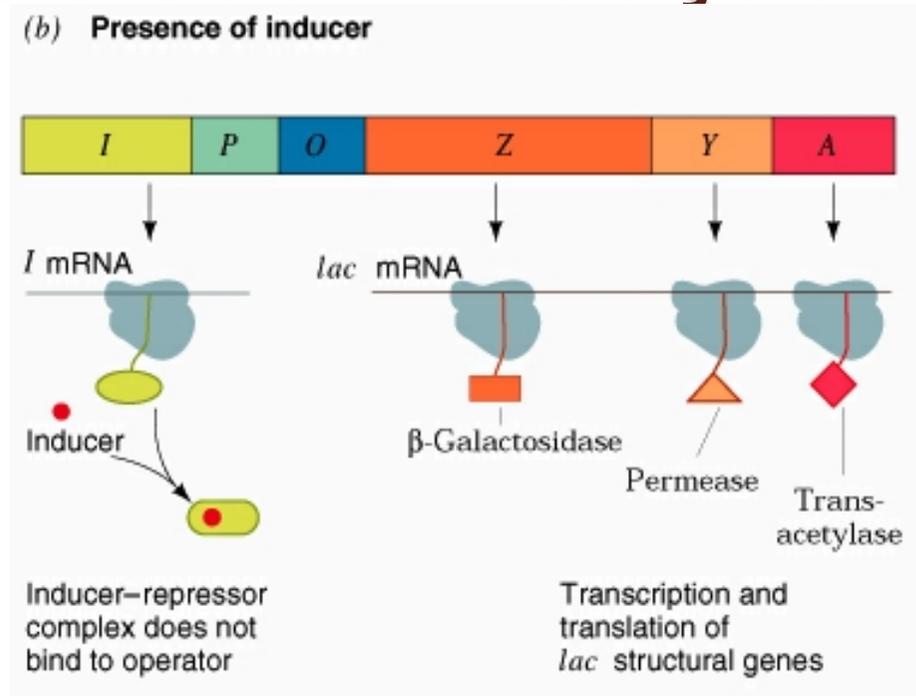


# Sem lactose – repressão



- 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.

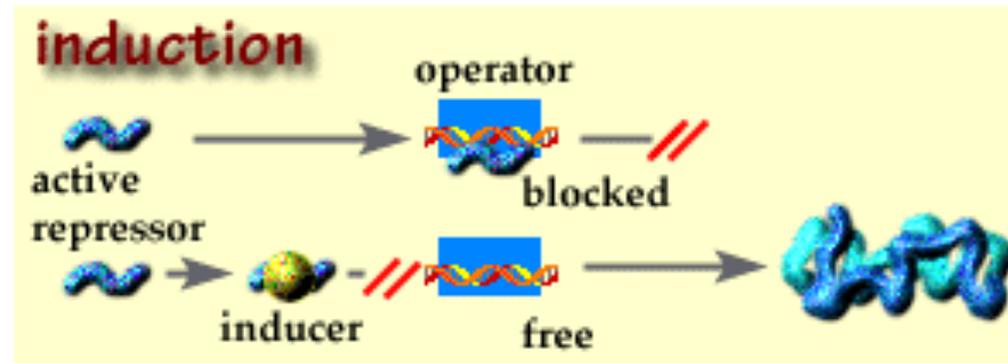
# Com lactose – indução



- 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.

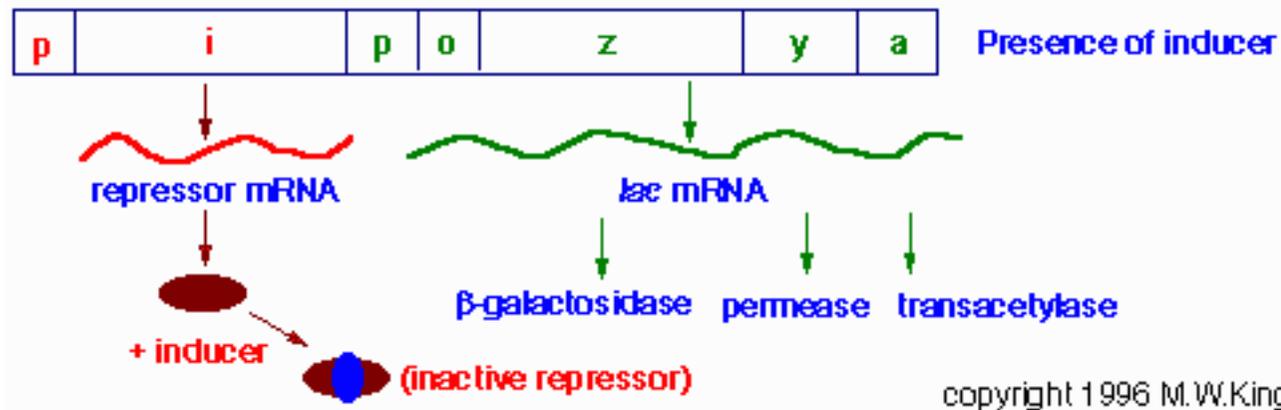
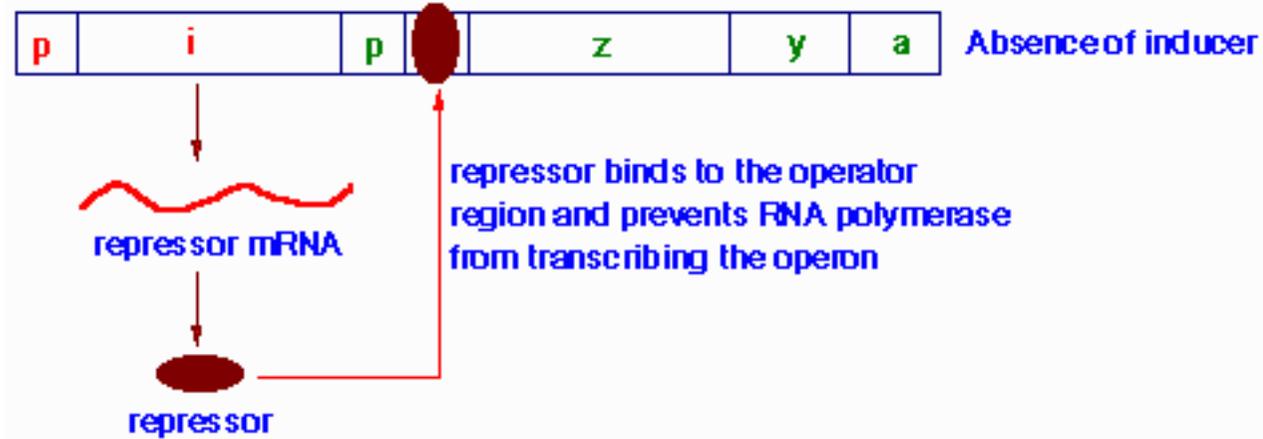
# Porquê?

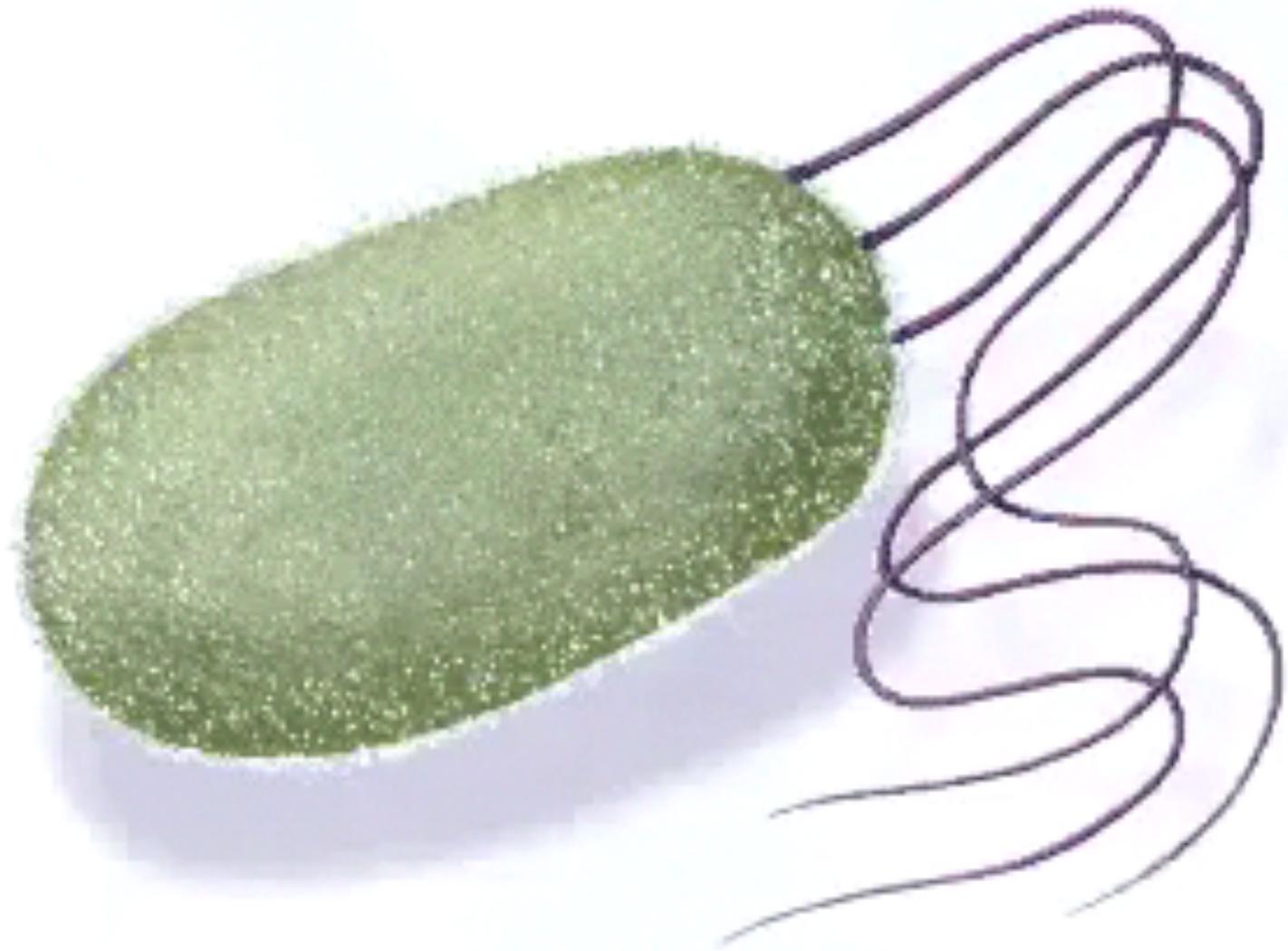
- Na maioria dos operões, a **sua não transcrição** deve-se à ligação de um **repressor** no operador do promotor;



- 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.

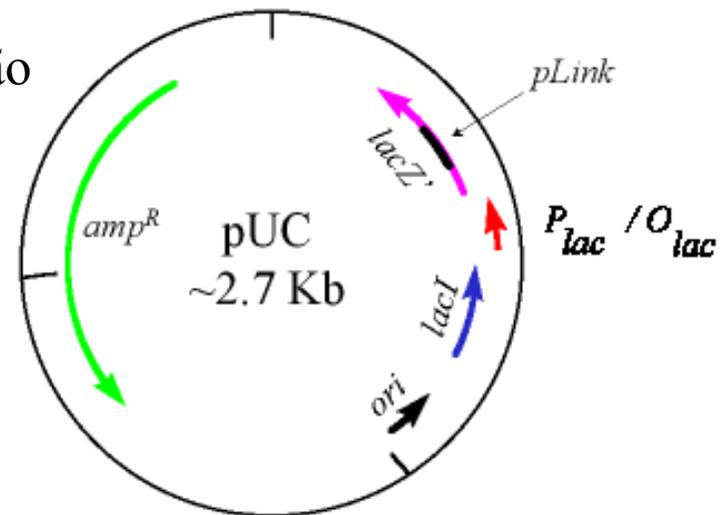
## The *lac* Operon





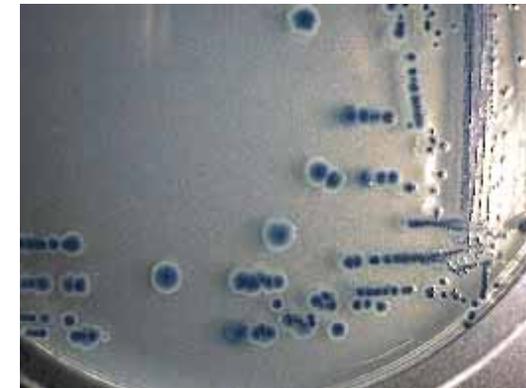
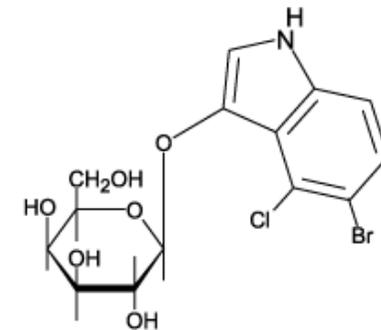
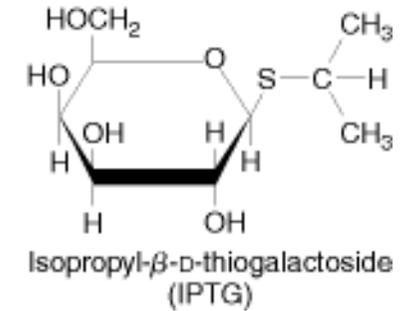
# Plasmídios derivados do pUC

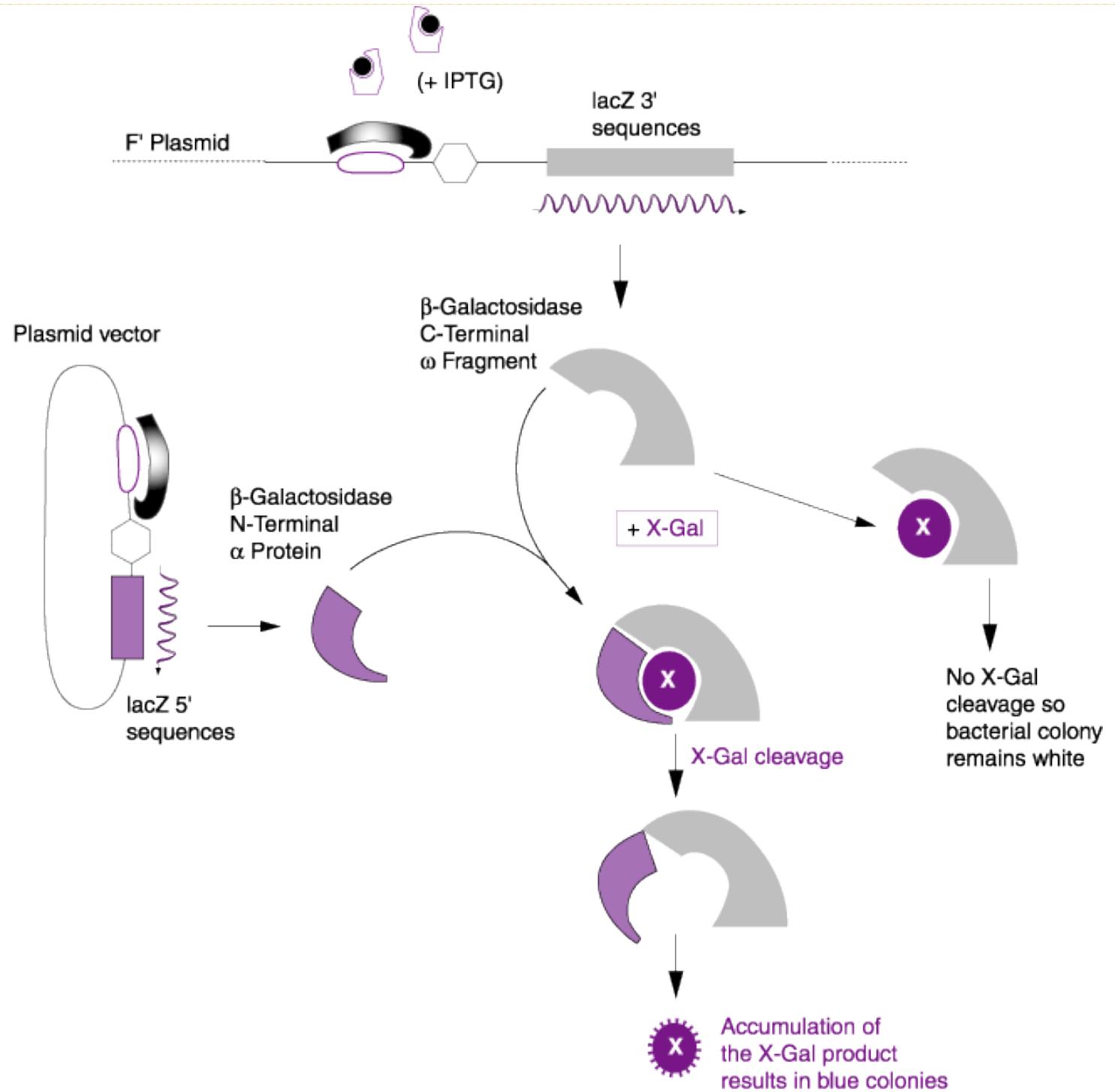
- UC = Universidade da Califórnia
- local de clonagem múltipla inserido na grelha de leitura correcta do gene *lacZ'*  $\Rightarrow$  proteína funcional/não funcional...
- possuem um segmento de DNA derivado do operão *lac* de *E. coli* que codifica o fragmento amino-terminal (correspondente aos primeiros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



# Seleccção de bactérias pela cor

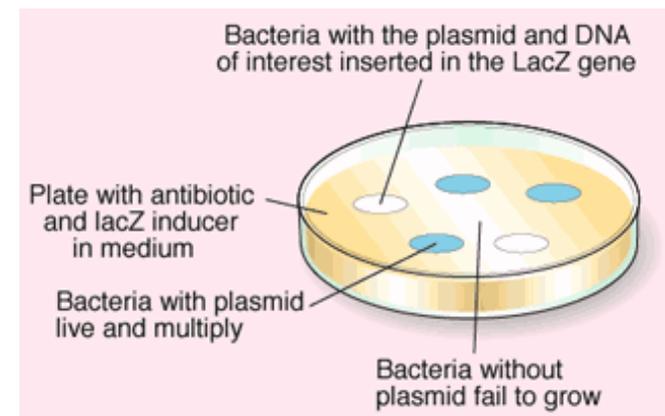
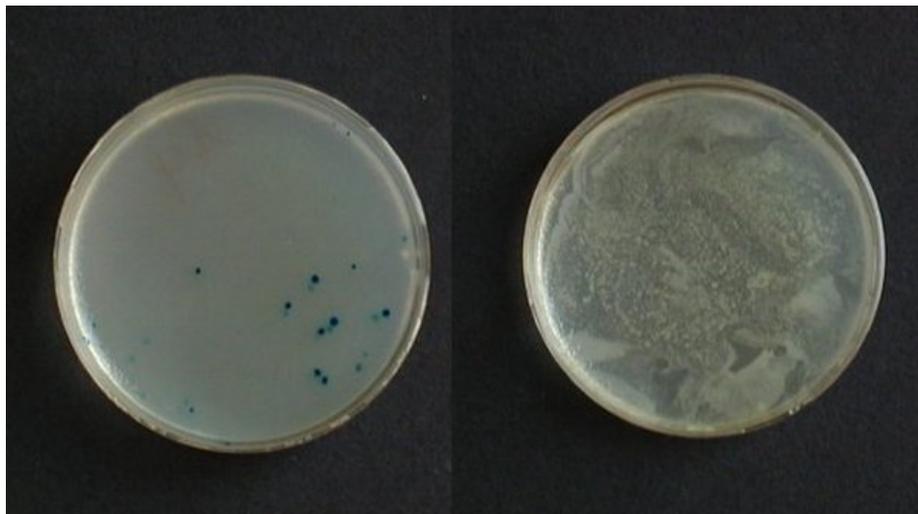
- a síntese do fragmento  $\alpha$  pode ser induzida pelo IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -galactosídeo) – análogo da lactose
- se ambos os fragmentos ( $\alpha$  e  $\omega$ ) forem sintetizados na bactéria, interagem um com o outro originando uma  $\beta$ -galactosidase funcional –  $\alpha$  complementação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

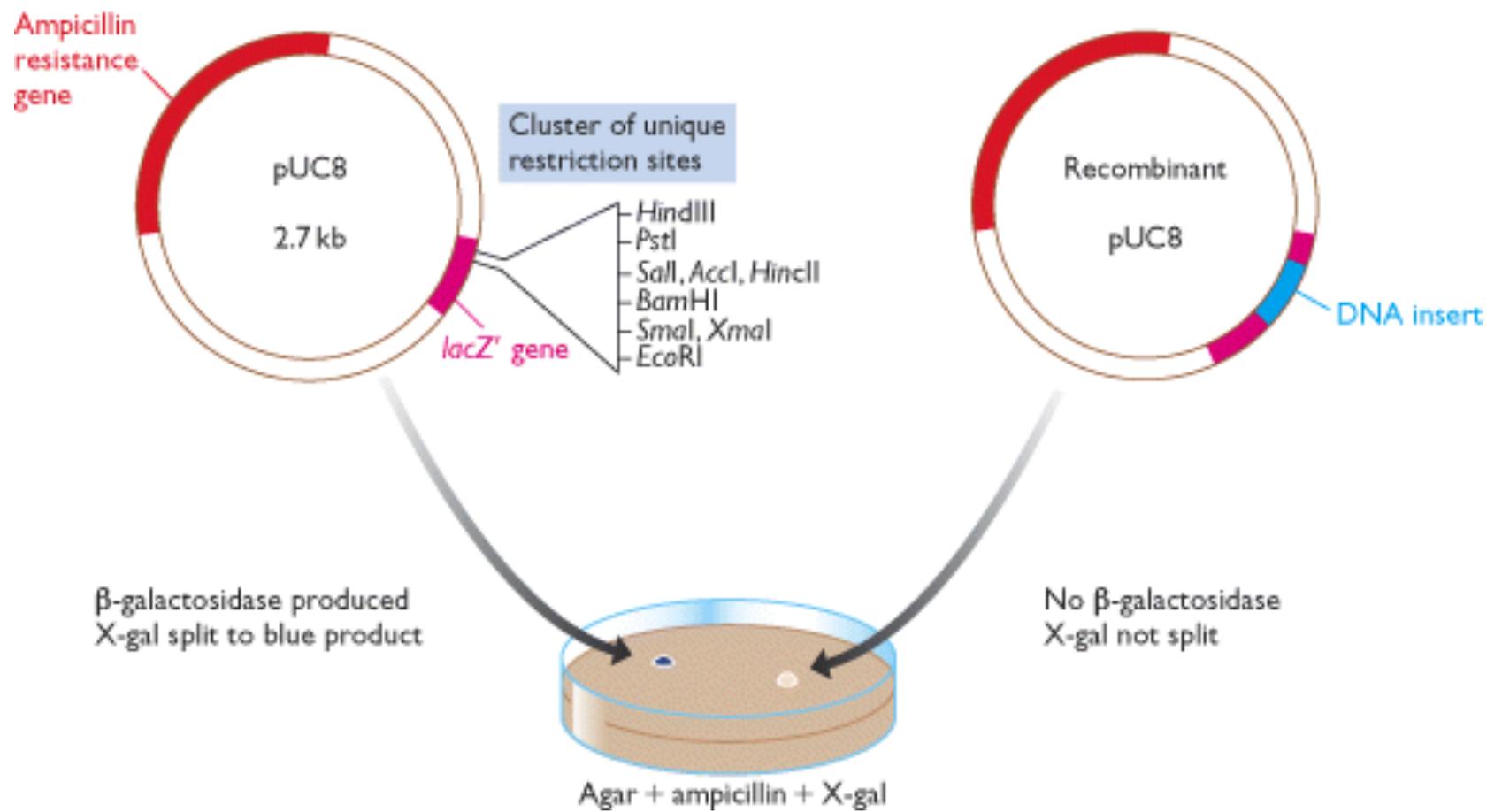


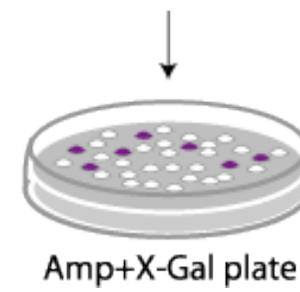
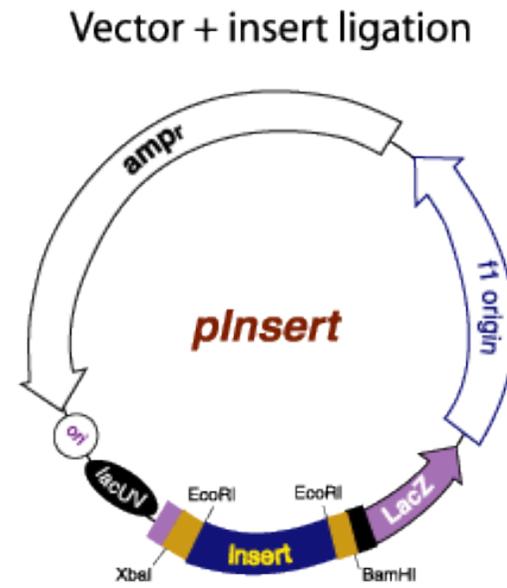
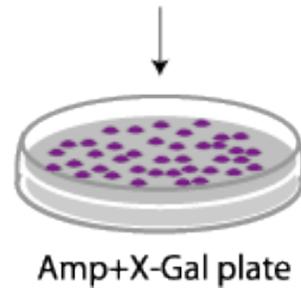
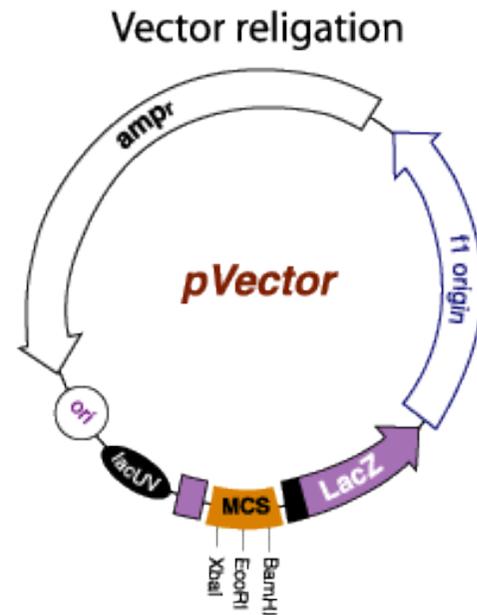


# Bactérias recombinantes

- nos vetores 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  $\beta$ -galactosidase funcional. Neste caso, as colónias resultantes **não serão azuis**

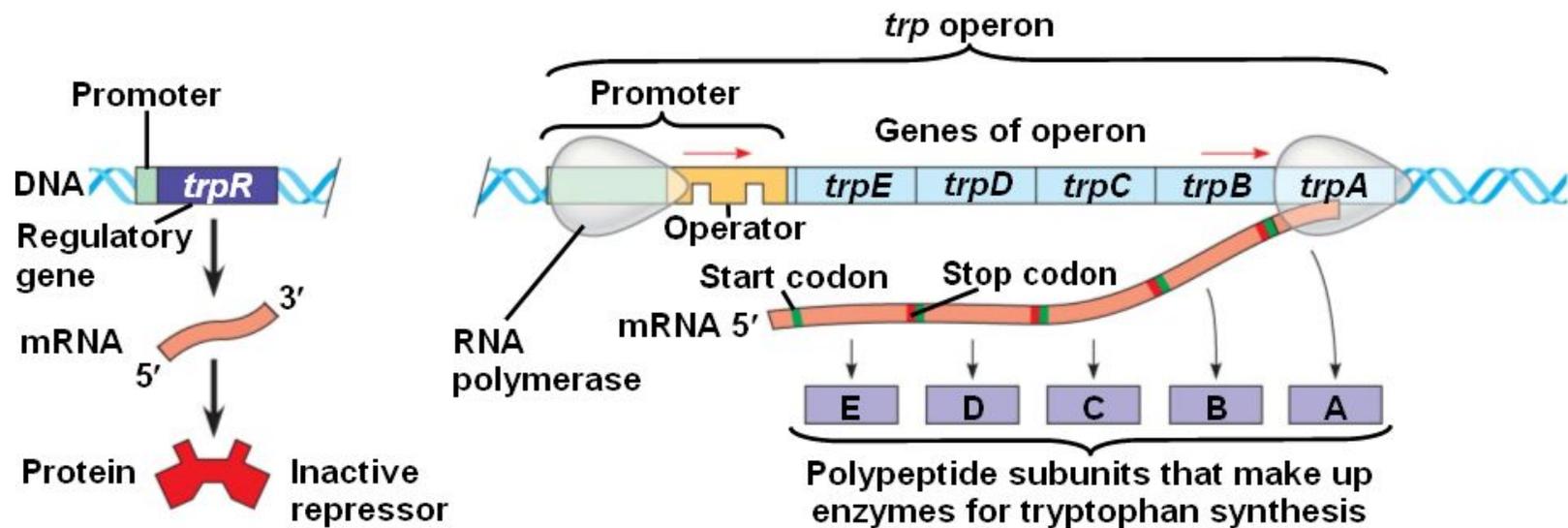






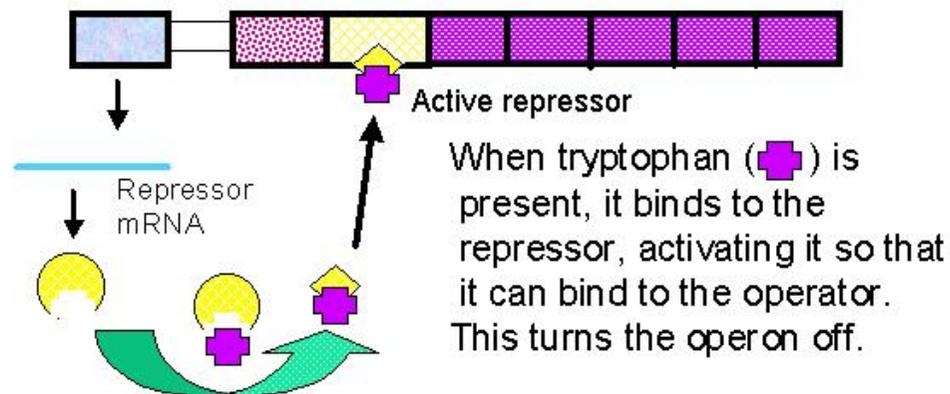
# O operão *trp* de *E. coli*

- 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*.



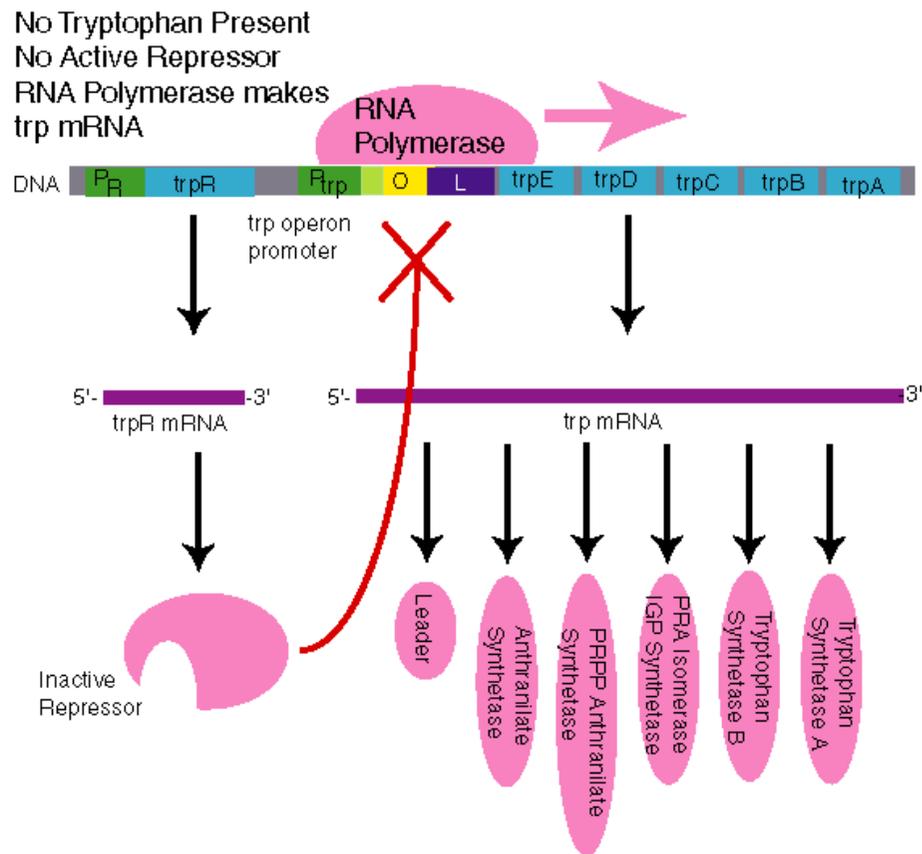
# Regulação pelo triptofano

- 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.



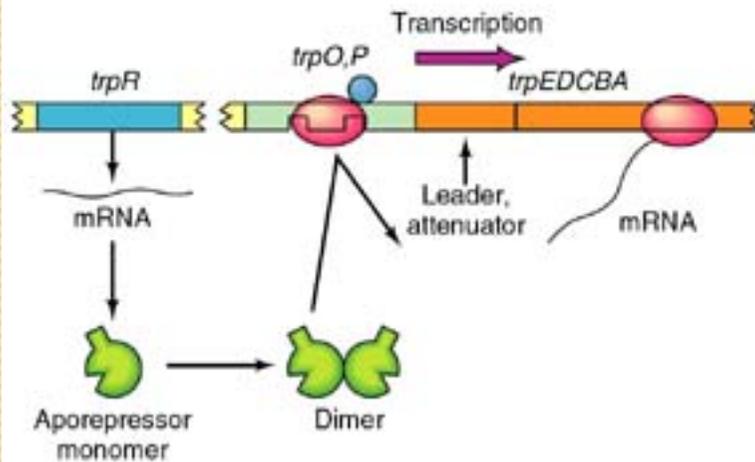
# Na ausência de triptofano

- Há dissociação do triptofano do repressor *trp*;
- O repressor sofre modificação conformacional;
- Dissocia-se do operador;
- Há transcrição do mRNA *trp*.

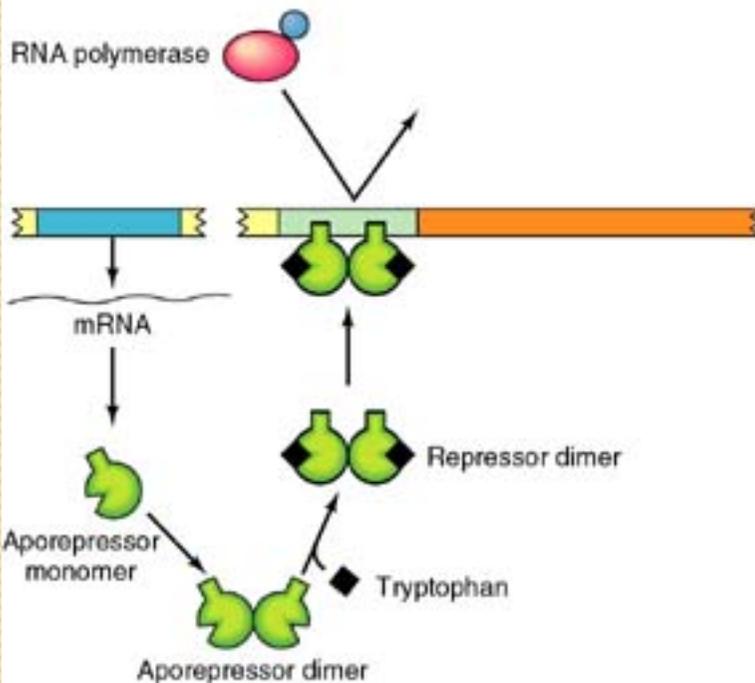


# Gene Regulation summary

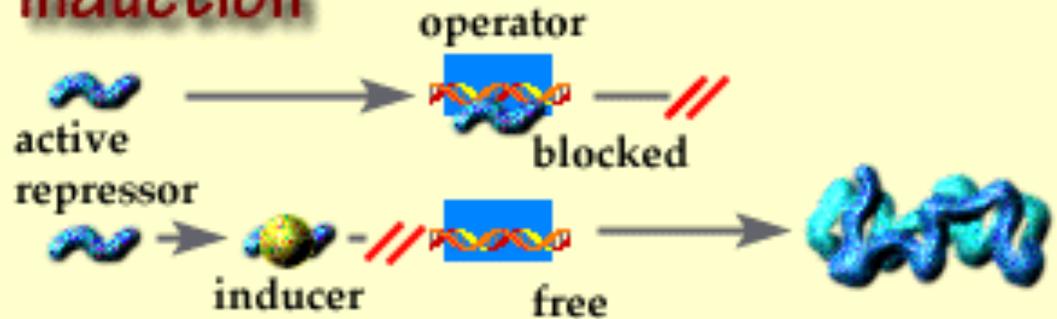
Low tryptophan: no repression



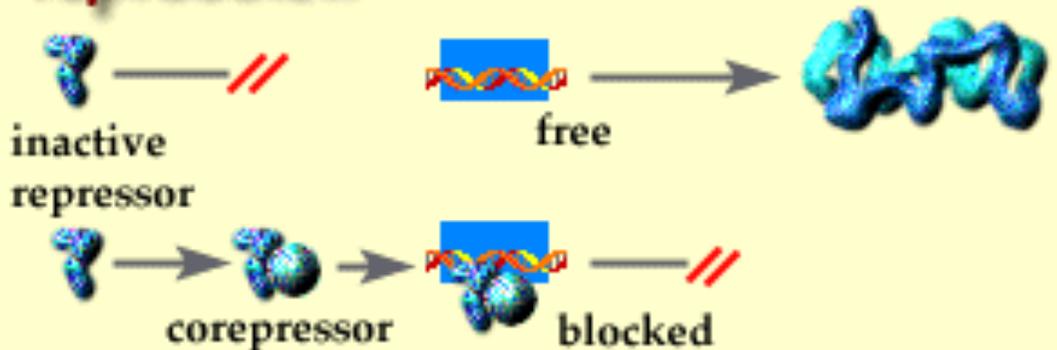
High tryptophan: repression



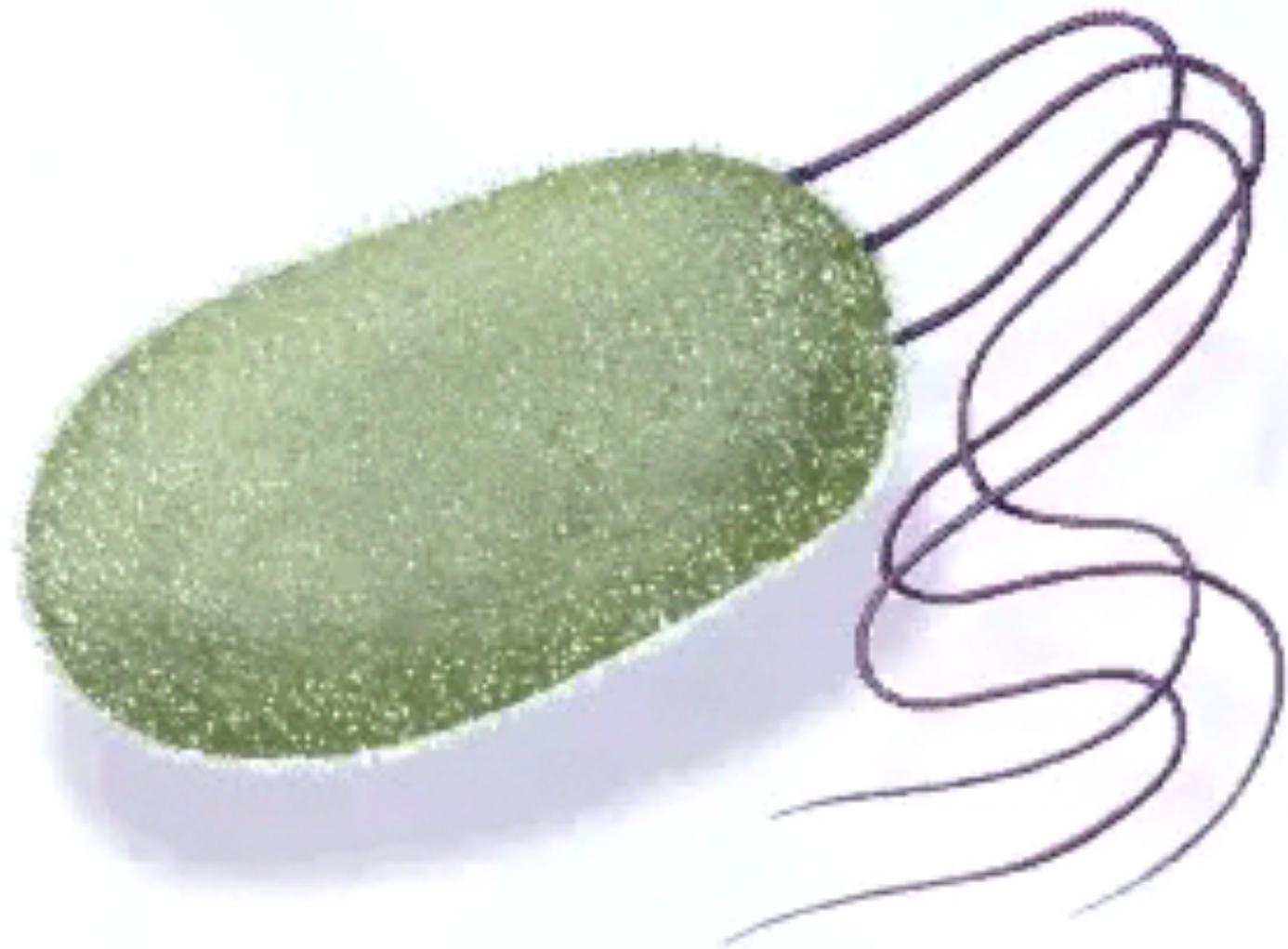
**induction**



**repression**

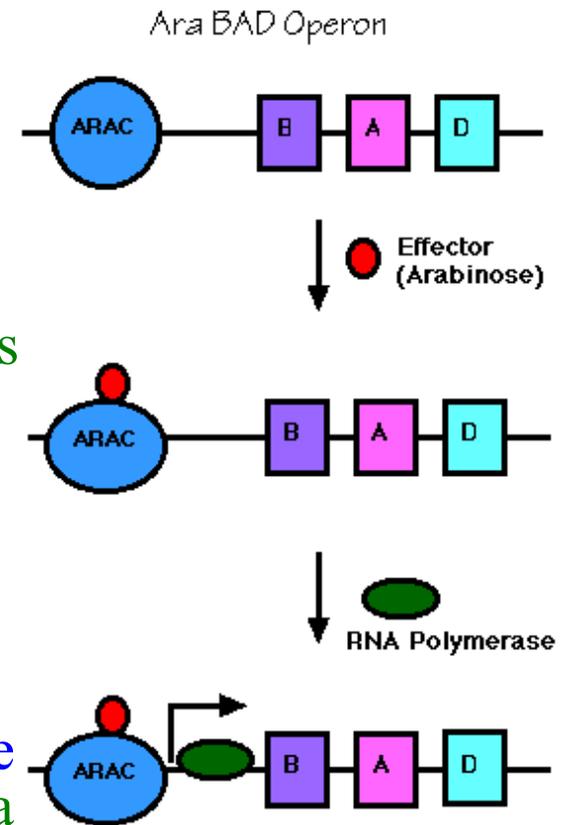


Em qualquer dos casos (↑) só há transcrição se o repressor estiver dissociado do promotor do operão!



# 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.

