

CAPÍTULO 2

Regulación de la Expresión Génica

Melina Anello, Nathalie Arnal y Gisela Barbisan

Regulación de la expresión génica en Procariotas

Los organismos procariotas poseen aproximadamente 4000 genes, de los cuales sólo se expresa una pequeña parte dependiendo del ambiente en el que está creciendo la bacteria. No todos los productos génicos se necesitan de forma simultánea, ni a los mismos niveles. Es por eso, que existe un sistema de regulación que va a permitir, o no, la transcripción y traducción de determinados genes en un momento dado. El control de la síntesis de las macromoléculas se denomina regulación de la expresión génica.

Los procariotas deben utilizar parte de su dotación genética para poder adaptarse adecuadamente a su entorno, con el que están estrechamente relacionados y del que son muy dependientes y, de este modo, garantizar su supervivencia. Estos organismos tienen los procesos de transcripción y traducción acoplados, es decir, que se producen uno inmediatamente a continuación del otro. Además, numerosos genes se encuentran organizados en operones, los que están conformados por una unidad regulatoria seguida de varios genes estructurales que dan origen a proteínas, las cuales cumplen funciones relacionadas y presentan una regulación coordinada. Estos genes suelen transcribirse juntos en un solo ARNm, denominado ARNm policistrónico.

Estructuralmente, un **operón** consta de una secuencia de ADN previa a los genes estructurales, que es la secuencia promotora o promotor, o secuencia de inicio, donde la ARN polimerasa se une al ADN para iniciar la transcripción. Entre el promotor y los genes estructurales se sitúa el operador, una secuencia de ADN donde se une la proteína reguladora. El operador está a menudo solapado con el promotor de forma tal que, dependiendo de si tiene (o no) unida una proteína reguladora, la ARN polimerasa podrá realizar (o no) la transcripción (Figura 1).

Debemos mencionar también la existencia de un gen regulador (R) que no forma parte del operón, pero es necesario para su funcionamiento. El gen regulador codifica la proteína reguladora que, como fue mencionado anteriormente, interactúa con el sitio operador controlando la síntesis de los genes estructurales. Este gen regulador, a su vez cuenta con su propio promotor y una sola región estructural, de este modo vemos que en los organismos procariotas podemos encontrar genes organizados en operones y otros que no lo están.

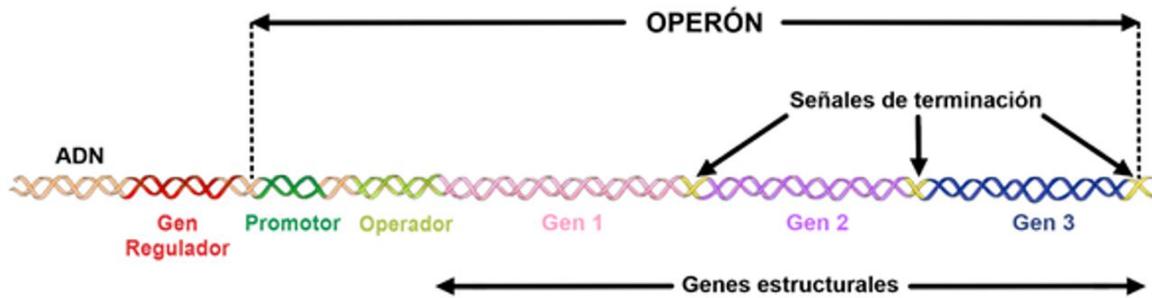


Figura 2.1. Esquema simplificado de la estructura de un operón procarionta.

Cada uno de los niveles de los que depende la expresión de la información génica puede estar sometido a algún tipo de regulación, aunque lo más frecuente es la regulación al inicio de la transcripción. En este sentido, podemos encontrar dos modos de regulación: la inducción y la represión. Teniendo en cuenta el tipo de regulación que se presenta, podemos realizar una primera clasificación de los operones en inducibles y reprimibles.

Sistemas inducibles: en estos sistemas es el sustrato el que provoca la síntesis de los genes estructurales. Por esta razón, al compuesto que desencadena la síntesis se lo denomina *Inductor*. Son sistemas que están apagados y pueden activarse por la presencia del inductor. Los sistemas inducibles se relacionan con procesos catabólicos o de degradación.

Sistemas represibles o reprimibles: en estos sistemas una molécula, normalmente aquella que es sintetizada a partir de la expresión de los genes estructurales, impide la expresión del operón. A esta molécula se la denomina *corepresor*. Son sistemas que están activos de manera predeterminada, pero se pueden desactivar por la acción del corepresor. Los sistemas represibles se corresponden con procesos anabólicos o de síntesis.

Tanto si la regulación es inducible como reprimible, puede estar bajo control positivo y negativo. En el caso de **control negativo** el producto del gen regulador reprime o impide la expresión de los genes estructurales, actuando como un represor. Como consecuencia la expresión génica se produce siempre, a menos que sea desconectada por el represor. En cambio, en el **control positivo** el producto del gen regulador activa la expresión de los genes estructurales, por eso la transcripción se produce sólo si la molécula activadora estimula directamente la producción de ARNm.

En principio existen cuatro tipos de sistemas posibles de regulación de la expresión génica:

- Tipo 1:** Inducible, control negativo (operón lactosa y operón galactosa)
- Tipo 2:** Inducible, control positivo (operón lactosa, operón arabinosa y operón maltosa)
- Tipo 3:** Represible, control negativo (operón triptófano y operón histidina)
- Tipo 4:** Represible, control positivo (no se han descrito)

Un operón puede estar sujeto a más de un tipo de control, como sucede en el caso del operón lactosa (operón lac), que está bajo control negativo ejercido por la **proteína represora** y bajo control positivo ejecutado por **una proteína activadora por catabolitos (CAP)** también llamada **proteína activadora del AMP cíclico (CRP)**, del inglés **catabolite repressor protein**.

Operón Lactosa

Escherichia coli presenta un único cromosoma circular que cuenta con la información genética necesaria para regular la expresión de muchos de sus genes en función de los niveles intracelulares de metabolitos específicos, que varían según el medio ambiente que rodea a la célula. Los estudios genéticos sobre la utilización de lactosa como fuente de carbono permitieron describir un modelo de regulación de expresión génica, el **operón lac**, que es uno de los ejemplos mejor caracterizados de regulación a nivel de la transcripción. Dicho operón está formado por una serie de genes estructurales, “z”, “y”, “a”, que codifican tres enzimas: **β -galactosidasa (z)**, **galactósido permeasa (y)** y **tiogalactósido transacetilasa (a)**. La β -galactosidasa es la encargada del clivaje de la lactosa en glucosa y galactosa, mientras que la función de la permeasa es facilitar el ingreso de este azúcar en la célula. Por su parte, la tiogalactósido transacetilasa tiene la función de catalizar la transferencia del grupo acetilo de la acetil Coenzima A al 6-OH de un aceptor tiogalactósido. Así, cuando la célula utiliza la lactosa como combustible, se necesita la acción catalítica de las tres enzimas mencionadas. El conjunto formado por los tres genes estructurales, el promotor y el operador constituye estructuralmente el operón lac. En la figura 2 se muestran las partes del operón lac y su funcionamiento cuando está presente la lactosa como única fuente de energía. Cuando las bacterias crecen en un medio sin lactosa, el operón lac es rápidamente reprimido por una proteína llamada **represor**, codificada por el gen I, que no forma parte del operón propiamente dicho. Esta proteína represora se une al **operador (O)** bloqueando la transcripción de los genes estructurales del operón lac. La unión de lactosa (alolactosa) al represor genera un cambio conformacional en él, permitiendo su salida del sitio O. Una vez liberado el sitio O del represor, el ARN polimerasa puede iniciar la transcripción.

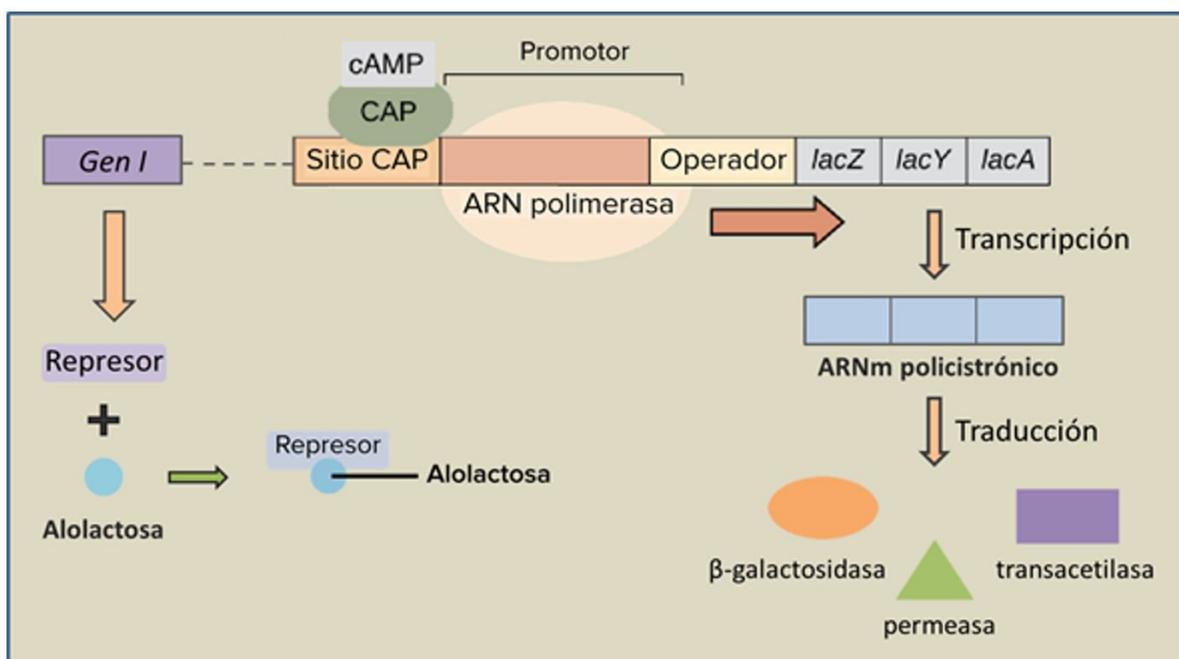


Figura 2.2. Estructura y funcionamiento del operón lac en presencia de lactosa (y ausencia de glucosa).

El operón lac presenta además otro tipo de regulación mediada por el **adenosín monofosfato cíclico** (AMPc) y la **proteína CAP** (*catabolite activator protein*) o **CRP** (*catabolite repressor protein*). La proteína CAP se encuentra en forma de dímero y sólo es activa cuando lleva unido AMPc. El complejo CAP-AMPc se une a un sitio CAP, estimulando la fijación de la ARN polimerasa al promotor.

Cuando hay glucosa en el medio extracelular *E. coli* cataboliza directamente, y preferentemente, este azúcar sin la inducción de ninguna enzima. A medida que se consume la glucosa, la célula comienza a producir AMPc. Una vez que la mayoría de la glucosa ha sido catabolizada, los niveles de AMPc son muy altos favoreciendo la transcripción de los genes estructurales del operón lac. Los mutantes para la enzima adenilato ciclasa (que no producen AMPc) o para la proteína CAP presentan niveles muy bajos de expresión de los genes del operón lac. Por lo tanto, sin CAP o sin AMPc el sistema permanecería apagado.

En bacterias, este mecanismo de control positivo se puede hacer extensivo a otros operones correspondientes al catabolismo de otras fuentes de carbono, como la arabinosa.

Operón triptófano

El operón triptófano (operón Trp) de *E. coli* posee cinco genes estructurales necesarios para la síntesis de este aminoácido a partir de precursores sencillos. Si hay triptófano (trp) en el medio de crecimiento, la célula lo toma y no necesita sintetizarlo, por lo tanto, el operón está reprimido. Esta represión es llevada a cabo por medio de una proteína represora. Cuando hay trp en el medio, éste se une a la proteína represora haciendo que cambie de conformación y sea capaz de unirse al sitio operador inhibiendo la expresión del operón. Por este motivo, se dice que es un sistema reprimible, actuando el mismo trp como **correpresor**. Es importante tener en cuenta que la represión no es total. El operón trp posee además otro mecanismo regulatorio: la *atenuación*.

La **atenuación** implica la terminación de la transcripción del operón antes del inicio de la transcripción de los genes estructurales, y su frecuencia depende de los niveles de trp en la célula. El proceso de atenuación ocurre en el sitio atenuador ubicado hacia la región 3' del promotor. Esta zona está compuesta por 4 regiones que presentan sitios complementarios que pueden aparearse formando estructuras en horquillas (Figura 3). Según el trp esté presente o no, pueden generarse distintas conformaciones en la hibridación de estas secuencias. La región 1 determina si la secuencia 3 va a hibridar con la 2 o con la 4, y codifica un pequeño péptido que posee dos residuos trp. Si se aparean las regiones 2 y 3 no se produce la estructura atenuadora (horquilla entre las regiones 3 y 4). Cuando comienza la transcripción de este operón, simultáneamente se produce la traducción. Si hay trp en el medio, va a haber ARNt cargados con este aminoácido permitiendo la traducción de la región 1 por parte de los ribosomas. Al traducirse la región 1, la maquinaria de traducción queda parada sobre la región 2, impidiendo que ésta se una con la región 3. Por lo tanto, la región 3 se aparea con la 4 formando una hor-

quilla que es seguida por una secuencia rica en residuos uracilos, formando así la estructura atenuadora. La estructura atenuadora implica un mecanismo de finalización de la transcripción del tipo Rho-independiente. Si no hay *trp* en el medio, no se puede traducir la región 1, la maquinaria de traducción queda detenida en este lugar permitiendo que las regiones 2 y 3 se unan, y no se forma la estructura atenuadora. Esto permite la completa expresión del operón *trp* para poder sintetizar este aminoácido.

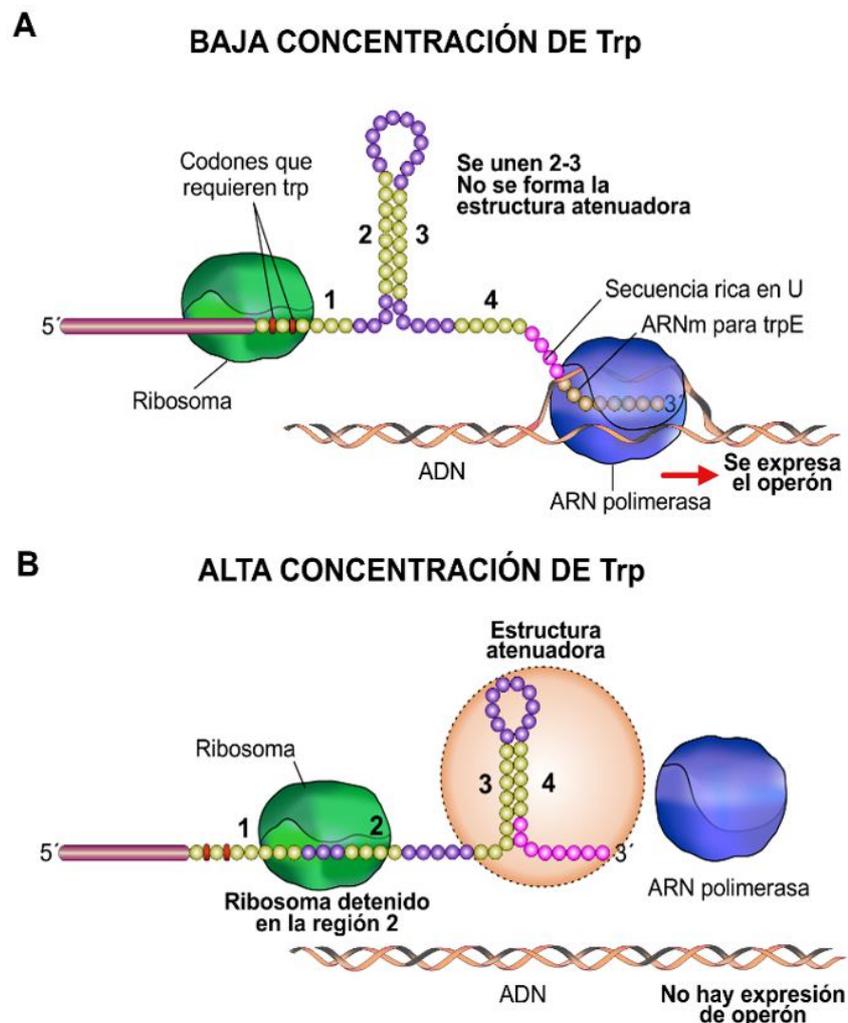


Figura 2.3. La zona atenuadora posee 4 regiones auto complementarias. La región 1 posee dos codones que requieren *trp* para ser traducidos. Dependiendo de los niveles de *trp* en el medio donde se encuentra, la bacteria va a necesitar sintetizar, o no, *trp*. **A.** Cuando hay baja concentración de *trp* en el medio no hay ARNt cargados con *trp* para traducir la región 1, por lo que la ARN polimerasa queda detenida en esa región. Las regiones 2 y 3 se pueden aparear formando una horquilla que está separada de la secuencia poli U por la región 4, por lo tanto, no se forma la estructura atenuadora. **B.** Cuando hay alta concentración de *trp* en el medio se puede traducir la región 1 y la ARN polimerasa queda detenida en la región 2. Las regiones 3 y 4 se unen formando una horquilla que es seguida por la secuencia poli U formando la estructura atenuadora.

La atenuación es un sistema de control genético en una amplia variedad de operones biosintéticos, especialmente de aminoácidos. En todos los casos el segmento inicial del polipéptido transcrito es rico en el aminoácido que controla dicho operón. Otros ejemplos de operones que utilizan este sistema de control son el operón *his* (síntesis de histidina), operón *phe* (sínte-

sis de fenilalanina) y el operón leu (síntesis de leucina). Algunos de estos operones sólo poseen atenuación como mecanismo de control, mientras que otros poseen además la regulación por represión.

A lo largo de la historia se ha logrado un mejor conocimiento del funcionamiento de los operones gracias a la incorporación de diploides parciales en el estudio. En genética microbiana se describen como **diploides parciales** o **merodiploides** a aquellos organismos haploides que han incorporado un fragmento exógeno que contiene parte de su información genética, duplicándola. Así, dicha información se presenta tanto en el cromosoma bacteriano como en el ADN exógeno incorporado. En el caso de las bacterias se produce por la presencia de plásmidos (F'), moléculas de ADN extracromosómicas circulares o lineales que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico.

Regulación de la expresión génica en Eucariotas

Los organismos eucariotas superiores están constituidos, en su mayoría, por numerosos órganos diferenciados, estando cada órgano formado por diferentes tipos de células. Sin embargo, los millares de células que constituyen estos organismos provienen de una sola célula diploide y para llegar a este resultado, se ponen en juego dos procesos: la multiplicación y la diferenciación celular. La diferenciación es el resultado de "encender" y "apagar" diferentes genes. Pero para obtener un organismo "funcional" no es suficiente que sus células se diferencien, sino que también hace falta que éstas respondan de manera adecuada al ambiente. Para esto, es necesario que la expresión de cada uno de los genes que van a expresarse esté perfectamente regulada.

En eucariotas, los sistemas de regulación y selección se realizan en múltiples etapas y a menudo son arborescentes. Un solo gen puede ser regulado por muchos mecanismos diferentes. No existe, pues, un modelo general de regulación como es el caso de los procariontes, sino que existen numerosas posibilidades.

La regulación de la expresión génica en organismos eucariotas puede darse a distintos niveles (Figura 4), a saber:

- Cromatina
- Transcripcional
- Postranscripcional
- Traduccional
- Postraduccional

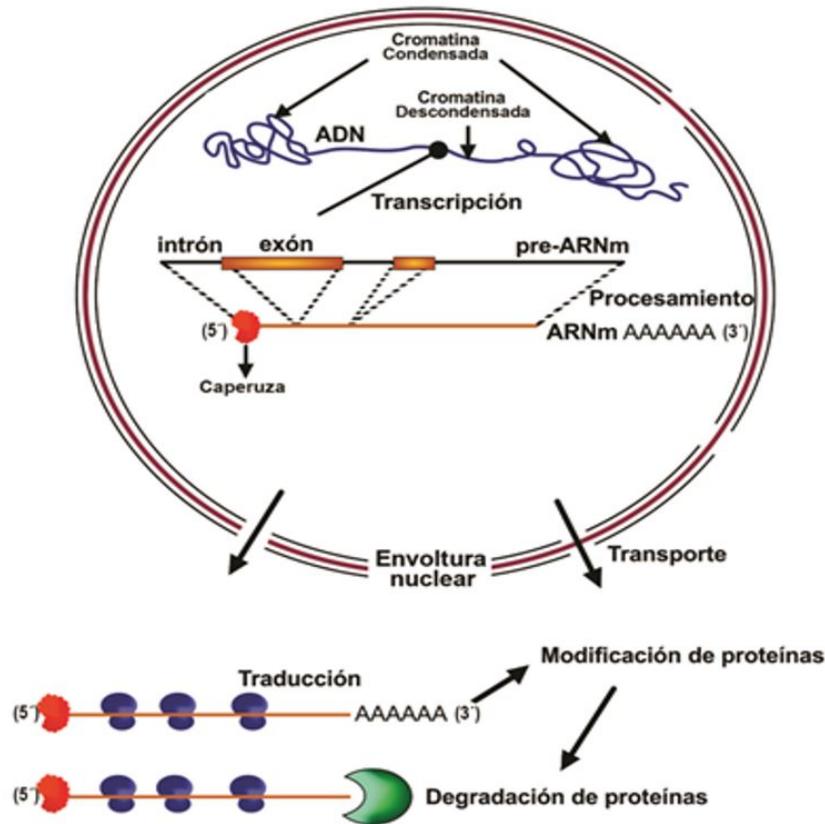


Figura 2.4. Puntos de regulación de la expresión génica en organismos eucariotas.

Condensación de la cromatina

La descondensación de la cromatina representa el primer nivel de regulación. Es a este nivel que se llevará a cabo la selección de los genes que la célula deberá transcribir y aquellos que no debe transcribir. La cromatina está constituida por el ADN enrollado alrededor de una serie de proteínas histónicas formando los nucleosomas. Algunas regiones están fuertemente condensadas en el núcleo interfásico, formando la heterocromatina, transcripcionalmente inerte. Otras regiones se encuentran empaquetadas de forma más relajada, formando la eucromatina, que contiene genes transcripcionalmente activos. Los cambios en la organización de la cromatina, denominados remodelación de la cromatina, son esenciales para muchos procesos celulares, como ser la unión de las polimerasas y el inicio de la transcripción, así como también para la replicación, la reparación y la recombinación del ADN.

La remodelación de la cromatina implica un cambio en la interacción entre el ADN y las histonas en los nucleosomas. La estructura química particular de las histonas es el principal factor determinante del grado de empaquetamiento que presenta la cromatina. Las histonas pueden sufrir varios tipos de modificaciones, entre las cuales encontramos las **acetilaciones**. El agregado de grupos acetilos a residuos conservados de lisinas en el extremo N-terminal es mediado por las enzimas Histona Acetiltransferasas (HATs). Esta modificación provoca una reducción en la afinidad de las histonas por el ADN al neutralizar la carga negativa del ADN, y de esta

manera impedir su interacción con las cargas positivas de las histonas. Esto posiblemente tenga también un efecto en la interacción individual de los nucleosomas, desestabilizando a la fibra de cromatina de 30 nm. Como resultado del proceso de remodelación de la cromatina las secuencias promotoras quedan libres de histonas y son accesibles a las proteínas que inician la transcripción, regulando de esta manera la expresión de los genes correspondientes.

Metilación del ADN

Otra manera de lograr importantes modificaciones en la actividad del genoma es realizando cambios químicos en el mismo ADN. Estos cambios están asociados con el silenciamiento semipermanente de regiones del genoma. Muchas veces pueden involucrar cromosomas completos, y con frecuencia son heredados a las células hijas por medio de la división celular. Tales modificaciones son provocadas por la metilación del ADN.

La metilación del ADN tiene lugar en citosinas que son modificadas a 5-metilcitosina por la adición de un grupo metilo mediada por las enzimas ADN metiltransferasas. La mayoría de los grupos metilo se encuentran en los "dupletes" o "islas" CpG, y, de hecho, la mayoría de las secuencias CpG están metiladas. En vertebrados hasta un 10% del total de citosinas del genoma están metiladas y en las plantas el porcentaje puede llegar hasta un 30%. Podemos distinguir dos tipos de metilación: 1- la **metilación de mantenimiento**, responsable de agregar grupos metilos a la nueva cadena sintetizada, luego de la replicación del genoma, tomando como referencia los sitios metilados de la cadena parental; 2- la **metilación *de novo***, que agrega grupos metilo en posiciones completamente nuevas y cambia de esta manera el patrón de metilación de una determinada región del genoma. Tanto la metilación de mantenimiento como la *de novo* tienen como resultado la represión de la expresión génica. De todos los genes humanos entre el 40% y 50% se localizan cerca de islas CpG. De esta manera encontramos que el estado de metilación de la isla CpG refleja el patrón de expresión del gen adyacente. Los genes de mantenimiento, por ejemplo, debido a que se expresan en todos los tejidos, presentan islas CpG no metiladas. Al igual que como sucede con otros cambios en la cromatina, parece probable que la ausencia de grupos metilo esté asociada con la posibilidad de transcripción y no con el propio acto de la transcripción.

Nivel transcripcional

La transcripción de un gen en estado activo está controlada en el **inicio** por la interacción de la ARN polimerasa con su promotor. En la mayoría de los genes, éste es el punto de control más importante y probablemente sea el nivel más común de regulación. Hasta el momento no existen evidencias de control en otras etapas de la transcripción en las células eucariotas.

Regulación en CIS y en TRANS

Un **elemento regulador en cis** es una secuencia contigua a un gen que tiene un efecto regulador sobre la tasa de transcripción de ese gen. En los eucariontes las secuencias necesarias para la regulación de la transcripción se encuentran en los **promotores** y en regiones denominadas **amplificadores** (también se conocen como enhancers o potenciadores) ubicadas hacia la región 5', alejadas de los promotores. En estas regiones se encuentra toda una serie de elementos cis, como por ejemplo las cajas CAAT y GC, los cuales serán reconocidos por proteínas específicas que funcionan como **factores de transcripción** necesarios para que la ARN polimerasa inicie la transcripción. Estas proteínas pueden modificar la velocidad de la transcripción, regulando el proceso. A este tipo de regulación se la llama **regulación en trans**.

Las proteínas reguladoras que se fijan al ADN son capaces de fijarse tanto a los intensificadores como a los elementos del promotor, o pueden actuar de forma independiente. Algunas proteínas reguladoras activan la transcripción (activadores) y otras la inhiben (silenciadores). Los factores de transcripción contienen al menos dos dominios: uno de fijación al ADN, que permite a la proteína reconocer sus genes "diana" y un dominio de acción sobre la transcripción que provocará los efectos positivos o negativos sobre la transcripción. Este último dominio puede unirse a la ARN polimerasa II o con proteínas reguladoras también llamadas mediadoras. Los factores de transcripción se agrupan en familias de acuerdo con el dominio de fijación que poseen.

Además, ambos tipos de dominio pueden intercambiarse entre los diferentes factores de transcripción, mediante ingeniería genética. De esta forma, una proteína constituida por un dominio de activación de la transcripción proveniente de un factor de transcripción de mamífero acoplado a un dominio de fijación al ADN proveniente de una levadura será perfectamente funcional y activará todos los genes que posean la secuencia diana del dominio de fijación al ADN.

Un ejemplo de una situación en la cual muchos genes están controlados por un solo elemento cis es el de la respuesta al choque térmico. Un aumento de la temperatura apaga la transcripción de algunos genes, enciende la transcripción de los genes de choque térmico y provoca cambios en la traducción de los ARNm. Los genes de choque térmico poseen una secuencia consenso común (HSE) que es reconocida por un factor de transcripción independiente. La activación de este factor ofrece los medios para iniciar la transcripción en un grupo específico de genes que contienen una determinada secuencia diana en su promotor.

Otro ejemplo de regulación en la transcripción es la inducción de la transcripción de genes que participan en el metabolismo de la galactosa en levaduras. La expresión de los genes GAL en levadura está controlada por activadores y represores. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce enzimas inducibles que metabolizan la galactosa cuando crece en presencia del azúcar. Sus cinco genes se inducen por el activador GAL4. Participan en la regulación el activador GAL4, un represor GAL80 y una secuencia UAS (upstream activation sequence) asociada a los genes. El represor no se une al ADN, sino al activador formando un complejo y posee además otro dominio para activar la transcripción. GAL4 se

fija a una secuencia específica de 17 pb del UAS que actúa como enhancer. El mecanismo propuesto es el siguiente: en ausencia del inductor (la galactosa), el complejo GAL4-GAL80 se une al sitio de unión de GAL4 en la UAS. Al estar acompañado con GAL80, GAL4 no puede activar la transcripción. En presencia del inductor se disocia GAL80 de GAL4 y ésta puede activar la transcripción de los genes GAL que codifican la quinasa, la transferasa y la epimerasa que convierten la galactosa en glucosa.

Este mecanismo de regulación se ha aprovechado para transformar líneas de mosca *Drosophila melanogaster* que permiten realizar experimentación en regulación génica de eucariotas. La estrategia consiste en insertar la secuencia GAL4 e independientemente en otra línea de moscas la secuencia UAS. Al obtener descendencia entre ambas líneas, se tendrá el sistema completo para experimentar mecanismos de regulación, por ejemplo, cómo funciona un promotor en particular, o cuándo y dónde se expresa una proteína determinada.

Nivel post-transcripcional

A nivel postranscripcional, la regulación de la expresión de los genes eucariotas se subdivide en:

1. Corte y empalme alternativo de exones (Splicing diferencial)
2. Regiones regulatorias de los ARNm
3. Estabilidad y almacenamiento de los ARNm
4. Silenciamiento génico por ARNs pequeños

Corte y empalme alternativo de exones (Splicing diferencial)

Como ya se ha visto, para formar el ARNm maduro existe un proceso de “corte y empalme” o “splicing” mediante el cual se eliminan los intrones, y los exones son unidos de manera consecutiva. Muchos genes se transcriben en un único ARNm maduro, pero los ARNs de algunos genes tienen patrones de **splicing diferencial**. Es decir, un solo gen da lugar a más de una secuencia de ARNm maduro. En tales casos, un solo transcrito primario se empalma en más de una forma, y los exones internos pueden sustituirse, añadirse o eliminarse. En algunos casos, en la misma célula se sintetizan todos los productos (múltiples) posibles, pero en otros casos el proceso se regula de tal manera que los patrones muy específicos de splicing ocurren sólo bajo determinadas condiciones.

Un ejemplo es el de los murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), que presentan un sensor en un órgano especial de la cara que detecta la radiación infrarroja y les sirve para ubicar a sus presas de sangre caliente. Si bien el gen que codifica este sensor está presente en todos los mamíferos, normalmente sólo se activa frente a temperaturas superiores a los 60 °C para alejarlos del calor excesivo y evitar quemaduras. Sin embargo en ciertos tejidos de estos vampiros, a través de mecanismos de splicing alternativo, el umbral de detección baja a 30 °C, y eso les permite ubicar a sus presas que suelen mantener su cuerpo a 36-37 °C. Este proceso

está presente selectivamente sólo en determinadas áreas del rostro de los vampiros que usan para detectar a sus presas y no en el resto del cuerpo. Se trata entonces de un splicing alternativo específico de la especie y del tejido.

Una de las preguntas más apremiantes respecto al splicing es la determinación de los controles que utilizan estas vías alternas. Se han identificado proteínas que intervienen para desviar el uso de sitios alternos de splicing. Las formas alternas de splicing pueden dar lugar a una variedad de proteínas a partir de un gen individual, así como también pueden introducir un codón de terminación o cambiar un marco de lectura.

Regiones regulatorias de los ARNm

Por otro lado, los ARNm maduros también cuentan con elementos específicos en su secuencia que pueden regular su expresión. La localización de estos elementos son las **regiones no traducidas 5' y 3' (untranslated region, UTR)**.

Las 5'UTR son importantes regiones regulatorias ya que controlan la expresión de los genes a través de distintos elementos presentes en su secuencia: sitios internos de entrada de ribosomas (IRES), sitios de unión a proteínas represoras o activadoras, estructura secundaria de la región, codones de inicio no AUGs, entorno del AUG, codones de inicio previos al marco de lectura (uAUG) y marcos de lectura previos al principal (uORF).

Muchos genes emplean regiones 5'UTR alternativas que regulan la expresión espacial o temporal de los ARNm. Por ejemplo, en ratones de vientre claro y en conejos con el mismo fenotipo, la distribución de pigmentos está controlada por transcritos del gen ASIP con diferentes 5'UTR.

Otra posibilidad de obtener varios tipos de ARNm a partir de un mismo transcrito primario reside en la variabilidad de elección del sitio de poliadenilación, ubicado en la región 3'UTR. Los cambios del sitio de corte y adición de la cola poli A pueden modificar el extremo carboxilo-terminal de la proteína. En estos casos, los diferentes productos de maduración terminan en polipéptidos que poseen actividades totalmente diferentes. La elección de una vía de maduración u otra depende probablemente de factores celulares específicos de tejido o de la ontogénesis.

Estabilidad y almacenamiento de los ARNm

La modificación de la duración de la vida de los mensajeros es un factor importante en la regulación de la expresión de algunos genes. La vida media de los ARNm puede variar en un amplio rango. Los elementos estructurales generales que se encuentran en los extremos 5' y 3' del ARNm, así como los elementos de secuencia específicos ubicados dentro de un transcrito, pueden contribuir a la estabilidad general del mensaje. En este sentido, la presencia del casquete o capuchón 5' (CAP) y de la cola poli-A confiere estabilidad al ARNm y lo protege de la degradación prematura.

Un ejemplo de regulación por control de la estabilidad del mensajero está dado por las histonas. Fuera de las divisiones celulares, la duración de vida de los mensajeros de histonas es

muy débil para poder estimarse. Durante la división, su duración de vida es de alrededor de 15 a 60 minutos. Si la replicación del ADN está bloqueada por inhibidores, la duración de vida de los mensajeros de histona se derrumba. La síntesis de histonas está, por tanto, estrechamente acoplada a la replicación del ADN, teniendo por efecto una perfecta adecuación entre la cantidad de histonas fabricadas y la del ADN sintetizado. La regulación de la estabilidad de los mensajeros de histonas pone en juego una estructura especial, la de horquilla, situada en el extremo 3' de los ARNm. La delección de esta estructura conlleva una estabilización de los mensajeros y su acoplamiento a un mensajero estable lo desestabiliza.

Se han propuesto varios mecanismos moleculares para explicar la disminución de la duración de la vida de los mensajeros. Una región rica en AU en la porción 3' del mensajero podría ser la diana para la fijación de una proteína que pudiera provocar un acortamiento de la cola poli A, la cual se sabe que juega un importante rol estabilizador en los mensajeros. Los ARNm de las histonas no son poliadenilados, pero la estructura en horquilla que poseen en 3' podría interactuar con el ribosoma al cual se asocia una actividad 3' exonucleasa susceptible de destruir el ARN.

El almacenamiento de los ARNm, tanto en el núcleo como en el citoplasma, es un medio de regulación. Numerosos genes son transcritos y jamás aparecen sus productos de traducción, aunque no se conoce en profundidad cómo se decide ese almacenamiento y cuáles son los mecanismos que lo rigen.

Silenciamiento génico por ARNs pequeños

En los organismos eucariotas superiores existe una clase de pequeños ARNs cuya función es silenciar genes, ya sea por degradación o evitando la traducción. Este mecanismo es una regulación fina de la expresión y es mucho menos demandante que regular la transcripción en sí.

Los que más se estudiaron son los **microARN**: el mecanismo empieza con la síntesis de un pri-miARN en el núcleo celular, que es procesado por una proteína llamada “microprocessor” y se forman los pre-miARN o HAIRPIN. Estos son exportados al citoplasma donde la enzima DICER los corta en pequeños fragmentos doble cadena que se unen con proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas *Argonata*. Estos fragmentos se acoplan con el complejo RISC (proteínas argonautas Ago) y por medio de una actividad similar a una helicasa asignada al complejo, desenrolla la doble hélice del ARNsi quedándose con la hebra antisentido o guía. Este complejo es el que va a unirse al ARNm blanco produciendo el silenciamiento (Figura 5).

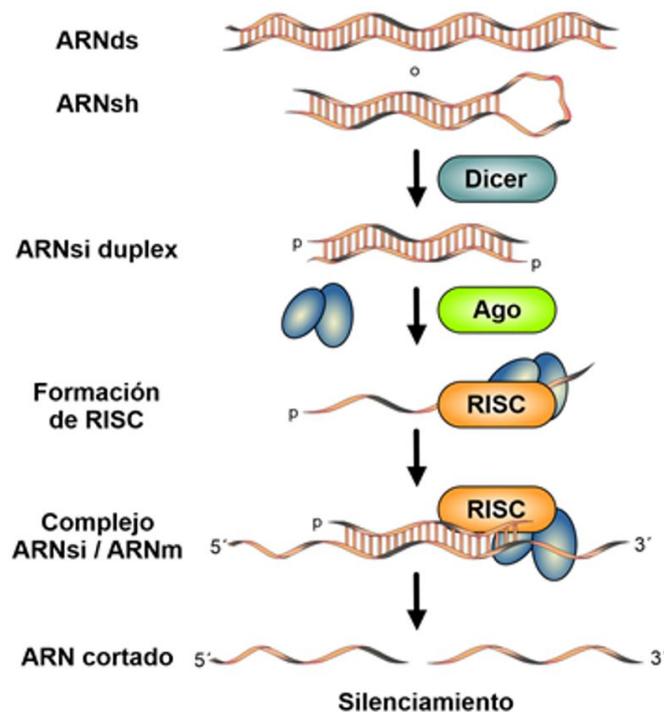


Figura 2.5. Silenciamiento génico por ARN pequeños.

Nivel traduccional

Este nivel de regulación es el menos conocido de todos. Un mecanismo de regulación del **inicio de la traducción** en eucariotas involucra la unión de proteínas citoplasmáticas a sitios específicos del ARNm. Un ejemplo de ello es lo que sucede en la traducción de las proteínas ferritina y el receptor de transferrina. La ferritina es una proteína involucrada en el almacenamiento intracelular del hierro, mientras que el receptor de transferrina se une a la proteína transferrina quien es la responsable de transportar este metal en la sangre. Ambos ARNm poseen una secuencia de aproximadamente 30 nucleótidos llamada *elemento de respuesta al hierro* (iron responsive element: IRE). En el ARNm que codifica la ferritina el IRE se ubica hacia el extremo 5', mientras que en el ARNm que codifica el receptor de transferrina el IRE se ubica hacia el extremo 3'. Cuando los niveles de hierro son bajos, la aconitasa citosólica se une a los IRE. Esta unión en el extremo 5' del ARNm de la ferritina impide el ensamblaje de la maquinaria para la traducción impidiendo que se produzca más proteína. Por el contrario, la unión de la aconitasa en el extremo 3' del ARNm del receptor de transferrina lo desestabiliza, debido a que posee una secuencia desestabilizadora rica en AU, y favorece la traducción de esta proteína. Si la concentración de hierro aumenta, este metal se une a la aconitasa haciendo que cambie de conformación, liberando al IRE. De esta manera se induce la traducción del ARNm de la transferrina y se impide la del receptor de transferrina, ya que es rápidamente degradado.

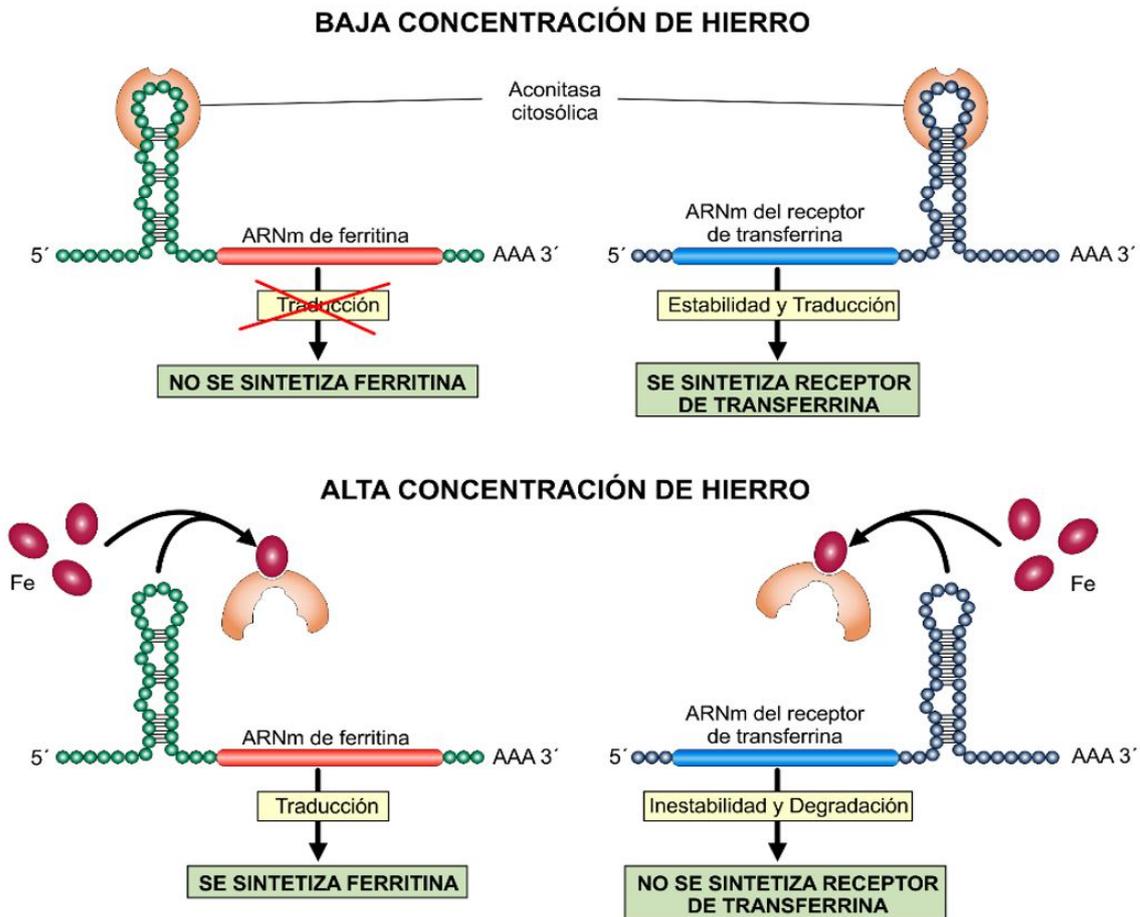


Figura 2.6. Regulación de la traducción de los ARNm que codifican para las proteínas ferritina y receptor de transferrina.

Algunas proteínas de unión al ARNm también pueden regular la traducción de otros ARNm, por ejemplo, la hormona prolactina se une y estabiliza al ARNm que codifica la caseína, mientras que en su ausencia éste es degradado.

Otro mecanismo de regulación de la traducción es la degradación mediada por mutaciones sin sentido, en donde se degradan los ARNm en los que uno o más exones han sido cortados y empalmados de manera incorrecta. En la mayoría de los ARNm con corte y empalme de exones correcto, el codón de terminación se encuentra en el exón final. Cuando el proceso de corte y empalme es defectuoso se modifica el marco de lectura y puede generarse un codón de stop dentro del gen. Esto último desencadena la rápida degradación del ARNm debido a la presencia de uno o más complejos de la unión de exones (EJC). EJC es un complejo proteico que se une aguas arriba de una unión exón-exón, durante el splicing. La presencia de EJC funciona como un mecanismo de control de calidad celular en el que el ribosoma juega un papel esencial, escaneando el ARNm en sentido 5'-3' y retirando los complejos. Si el ribosoma se desensambla por el reconocimiento de un codón de stop prematuro, implica que uno o más EJC no sean retirados, hecho que desencadenará la degradación del ARNm por la vía de *degradación mediada por mutaciones sin sentido*. Esto ocurre por ejemplo en los pacientes con talasemia β^0 . Las personas que tienen talasemia β^0 expresan muy poco β -globina. Muchas veces, la baja expresión de β -globina se debe a la delección de un único par de bases en el

exón 1 o 2 del gen que codifica esta proteína. Cuando los ribosomas traducen el ARNm mutado encuentran un codón de stop dentro del gen como resultado de la delección. En consecuencia, no se traduce la última unión entre exones del ARNm y no elimina el complejo EJC promoviendo la degradación del ARNm.

La hidrólisis de un GTP a GDP en el factor de iniciación de la traducción eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*) también se considera un mecanismo de regulación de la traducción. La proteína eIF2 es una proteína G trimérica y, como todas las proteínas G, puede tener asociado un GTP o un GDP. Cuando eIF2 tiene unido un GTP es capaz de reclutar a un ARNt iniciador cargado con el aminoácido metionina y asociarse con la subunidad ribosómica pequeña. Luego, el factor de iniciación de la traducción eIF2 junto con el ARNt cargado y la subunidad ribosómica menor se unen al ARNm para buscar, en dirección 3', el codón AUG (inicio de la traducción). Cuando se aparean el ARNt con AUG, el GTP ubicado en eIF2 es hidrolizado a GDP liberando al complejo eIF2-GDP.

Finalmente, la concentración citoplasmática de los ARNt y la concentración de las subunidades ribosomales para formar los polirribosomas también son mecanismos fundamentales que regulan la expresión génica a nivel traduccional.

Nivel post-traduccional

Las proteínas recién sintetizadas pueden sufrir modificaciones postraduccionales que son, a su vez, una manera de controlar la expresión de los genes en eucariotas. Esta regulación puede ser cuantitativa o cualitativa. Se trata de glicosilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, ribosilaciones, etc. Muchas de las proteínas que las células secretan suelen incorporar una serie de aminoácidos hidrofóbicos en su extremo N-terminal. Esta prolongación, llamada **péptido señal**, funciona como una señal que envía a las proteínas hacia el retículo endoplásmico durante la traducción. Cuando esta secuencia sale del ribosoma, un complejo proteico llamado partícula de reconocimiento de señal (SRP) la reconoce y lleva al ribosoma hacia el retículo endoplásmico. Ahí el ribosoma facilita la entrada de la cadena de aminoácidos hacia el lumen (interior) del RE conforme se produce. Otras proteínas se sintetizan como precursores inactivos que deben ser clivados para generar proteínas activas. Ejemplos de ello son, entre otros, las caspasas que se sintetizan como pro-caspasas inactivas, las hormonas insulina y glucagón y las enzimas tripsina y quimotripsina.

Comparación de la regulación génica en Procariotas y Eucariotas

En la tabla 1 se destacan las principales diferencias entre la regulación génica de organismos procariotas y eucariotas.

Tabla 1. Diferencias entre procariotas y eucariotas en cuanto a mecanismos de regulación de la expresión génica

PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
ADN con bajo grado de empaquetamiento. No hay regulación a nivel cromatina	ADN altamente empaquetado, asociado a histonas. Regulación por condensación/descondensación de cromatina
ADN disponible para la transcripción.	Regiones o zonas con ADN metilado. La metilación provoca represión de la expresión génica
Los genes pueden encontrarse en operones con un único promotor. Sistemas inducibles y represibles	Cada gen tiene su propio promotor. Presencia de enhancers y elementos regulatorios en cis y trans
Transcripción y traducción ocurren de manera acoplada en el citoplasma celular.	Transcripción y traducción están separados física y temporalmente. Ambos participan de la regulación de la expresión génica
ARNm policistrónicos	ARNm monocistrónicos
ARNm no se procesa	ARNm se procesa (regiones 5' y 3' UTR, splicing diferencial). Diferencias en el procesamiento regula la estabilidad y la expresión del ARNm
No existe transporte ni almacenamiento de ARNm	Transporte y almacenamiento de ARNm alteran su expresión
La traducción no se regula	La traducción puede ser regulada
No hay modificación postraducciona de proteínas	Las proteínas recién sintetizadas pueden sufrir modificaciones postraduccionales

Ejercicios

Regulación génica en procariotas

Se han estudiado diferentes cepas de *Escherichia coli*, en las cuales el gen A de la proteína represora, la región operadora B y el gen C que codifica la enzima, son necesarios para la expresión de un sistema inducible de control negativo. Cada una de estas cepas presenta mutaciones en alguno de estos genes. También se han analizado diploides parciales que poseen un plásmido F', el cual contiene información correspondiente al sistema enzimático bajo análisis. Complete la siguiente tabla determinando si se producirá (+) o no (-) la síntesis de la enzima en cada una de las cepas bacterianas estudiadas, en presencia y en ausencia del inductor.

		Producción de Enzima	
	Cepa bacteriana	inductor presente	inductor ausente
1)	A ⁺ B ⁺ C ⁺		
2)	A ⁻ B ⁺ C ⁺		
3)	A ⁺ B ⁻ C ⁺		
4)	A ⁺ B ⁺ C ⁻		
5)	A ⁻ B ⁺ C ⁺ / F' A ⁺ B ⁻ C ⁻		
6)	A ⁺ B ⁺ C ⁻ / F' A ⁻ B ⁻ C ⁺		

Resolución: 1) En esta cepa no hay mutaciones presentes, por lo tanto el sistema funcionará normalmente, habrá producción de enzima en presencia del inductor y no habrá producción de enzima en ausencia de inductor.

2) En esta cepa el gen que codifica la proteína represora está mutado. Como consecuencia, no se producirá la proteína represora y por lo tanto no se podrá reprimir el sistema. Habrá producción de enzima tanto en presencia como en ausencia de inductor.

3) En la cepa 3 se encuentra mutado el operador. Una mutación en esta secuencia provocará que la proteína represora no reconozca esta región y no se una a ella. Habrá una síntesis constitutiva de la enzima, esto quiere decir que habrá producción de enzima tanto en presencia como en ausencia de inductor.

4) En esta cepa existe una mutación en el gen que codifica la enzima. Si bien la regulación del sistema funciona normalmente, no habrá producción de enzima estando o no presente el inductor.

5) En esta cepa, merodiploide, encontramos dos mutaciones presentes en el plásmido, una en el operador y otra en el gen de la enzima. Como consecuencia de estas mutaciones no hay producción de enzima por parte del plásmido. En el cromosoma bacteriano el operón posee una mutación en el gen de la proteína represora. Al ser el represor un elemento que actúa en trans, esta mutación puede ser salvada por la copia normal del gen que está presente en el plásmido. Como consecuencia, todo el sistema va a funcionar normalmente y habrá producción de enzima en presencia de inductor y no habrá producción en ausencia del mismo. En este caso la mutación en el gen del represor es recesiva con respecto a la copia normal del gen.

6) En el caso de esta cepa, también merodiploide, la mutación presente en el gen que codifica la enzima en el cromosoma bacteriano, tiene como resultado el que no haya producción de la enzima por parte del operón. Sin embargo, como consecuencia de la mutación en el operador del plásmido, este sistema va a presentar una síntesis constitutiva de la enzima. El operador es un elemento que actúa en cis y una mutación en esta región es dominante y no puede ser sal-

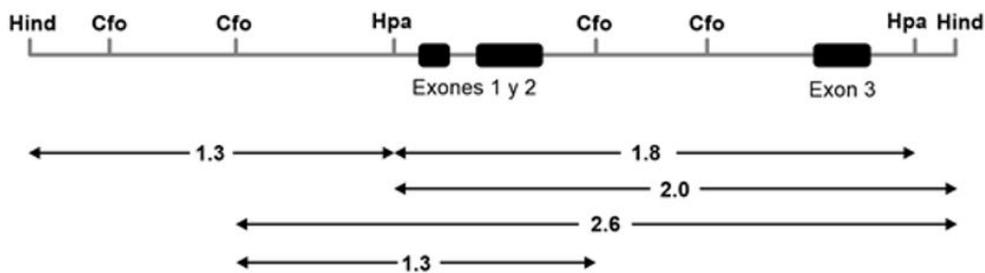
vada por una copia normal del operador. Como resultado, el sistema en su conjunto va a presentar síntesis constitutiva de la enzima.

Regulación génica en eucariotas

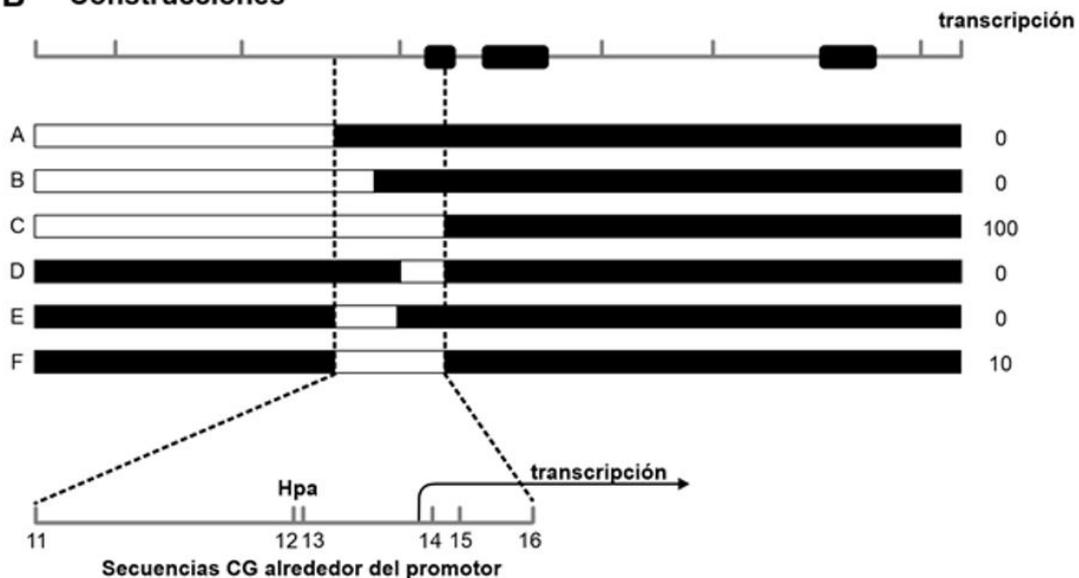
Para estudiar el rol de la metilación del ADN en el control de la expresión génica se utilizó el gen de la β -globina humana como sistema de ensayo. Al introducir este gen humano en el genoma de fibroblastos de ratón puede detectarse el ARNm correspondiente. Sin embargo, si el gen es metilado en sus 27 sitios CG, la expresión es bloqueada completamente. Para decidir si existe un sitio crítico de metilación suficiente para determinar la expresión de globina se generaron, por ingeniería genética, varias construcciones que están metiladas en diferentes regiones del gen.

La siguiente figura muestra las construcciones donde las regiones metiladas se indican en negro. La disposición de los seis sitios de metilación alrededor del promotor se muestra debajo. Los sitios 11, 12 y 13 no están metilados en las construcciones B y E. Los sitios 14, 15 y 16 están metilados en la D. En la construcción F ninguno de los seis sitios está metilado.

A Mapa de restricción



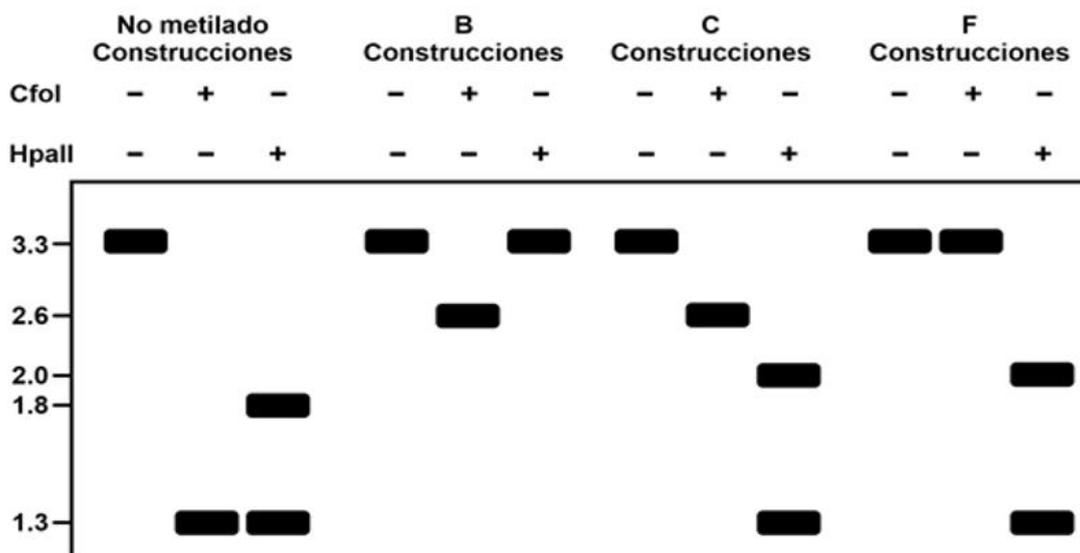
B Construcciones



Estas construcciones se incorporaron en los fibroblastos de ratón y se midió la síntesis de ARNm de β -globina humana. A la derecha de la figura se indican los valores obtenidos para cada construcción relativa a la línea celular que contiene la construcción no metilada.

A) ¿Puede afirmarse que la síntesis de ARN de β -globina humana depende de un único sitio crítico de metilación para determinar la expresión genética? Explique.

Resolución A: Los resultados de la construcción A indican que cuando los sitios 11-27 están metilados y no hay transcripción, o sea que sólo con los sitios 1-10 activos no se puede llevar a cabo la transcripción. La construcción B tiene activos los sitios 1-13 y tampoco se detectó síntesis de ARNm, demostrando que se necesitan otros sitios activos para llevar a cabo la transcripción. Contrariamente, en la construcción C, que posee los sitios 1-16 no metilados (activos), se observa un 100 de transcripción. Según los resultados presentados hasta el momento podría pensarse que los sitios críticos para la transcripción están entre el 11-16. Esta región se analizó con más detalle en las construcciones D y E, donde se dejaron activos sólo los sitios 14-16 y 11-13 respectivamente. Sin embargo, ninguna de estas construcciones fue capaz de activar la síntesis de ARNm. Por último, en la construcción F se metilaron los sitios 1-10 y 17-27, dejándose activos sólo los sitios 11-16. Se observó que esta construcción es capaz de llevar a cabo la síntesis de ARNm, pero en un porcentaje mucho menor. Es decir que no existe un único sitio crítico que determine la expresión de β -globina humana, si no que ésta depende de que se encuentren activos varios sitios entre el 1 y el 16.



Para confirmar si los patrones de metilación fueron heredados correctamente, se aislaron muestras de ADN de las líneas celulares conteniendo las construcciones B, C y F y se digirieron con las enzimas de restricción HindIII más CfoI o HpaII. Las enzimas CfoI y HpaII no digieren el ADN si los sitios de reconocimiento están metilados. Los fragmentos de ADN se separa-

ron mediante electroforesis en gel y se visualizaron mediante hibridación con una sonda radiactiva correspondiente al fragmento HindIII (Figura 2)

B) A partir de los patrones de restricción obtenidos, ¿puede concluirse que las secuencias CG que fueron metiladas durante su creación se mantuvieron en la célula?

Resolución B: Cuando se corta la construcción no metilada sólo con HindIII se espera obtener una única banda de 3.3 kpb según el mapa de restricción. Esta construcción posee 4 sitios de restricción para CfoI, lo cual resultaría en 5 fragmentos de restricción, sin embargo, sólo el más grande de ellos (1.3kpb), podrá ser detectado en la electroforesis en gel que se realizó, ya que en el gel se ven bandas entre 1.3 y 3.3 kpb. Al digerir la misma construcción no metilada con HpaII se obtendrán 3 fragmentos de restricción, uno de 1.3 kpb, otro de 1.7 kpb y un tercero más pequeño que tampoco se podrá observar en el gel realizado.

Se espera que las construcciones generadas presenten los mismos sitios de restricción para HindII y que varíen sus patrones de digestión para CfoI y HpaII según cuáles sitios están metilados.

En la construcción B sólo quedan sin metilar los dos primeros sitios de restricción de CfoI, por lo cual esta enzima generará 3 fragmentos, dos pequeños que no se detectarán en el gel y uno grande que tendrá un tamaño de 2.6 kpb, ya que abarca desde el segundo sitio de restricción hasta el final de la construcción. En cambio, todos los sitios de HpaII estarán metilados en esta construcción y se espera obtener un patrón igual al de HindIII.

En la construcción C quedan sin metilar los dos primeros sitios de restricción de CfoI y sólo uno de HpaII. Por lo tanto, para la primera enzima se espera obtener el mismo patrón que en el caso anterior (construcción B), mientras que se espera que la digestión con HpaII de cómo resultados 2 fragmentos: uno de 1.3 kpb y otro de 2 kpb.

Finalmente, la construcción F tiene todos los sitios de CfoI metilados, por lo que se espera que la digestión con esta enzima presente el mismo patrón que HindIII. Para HpaII hay sólo un sitio de restricción sin metilar y se espera que la digestión resulte en dos fragmentos de 1.3 y 2.0 kpb.

Dado que todos los patrones esperados coinciden con lo que se observa en el gel de electroforesis puede concluirse que las secuencias CG que fueron metiladas durante su creación se mantuvieron tal cual en la célula.

Referencias

- Barbosa, C., Peixeiro, I., & Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pgen.1003529.
- Boehm V. & Gehring N. H. (2016). Exon Junction Complexes: Supervising the Gene Expression Assembly Line. *Trends Genet.*, 32(11):724-735. doi: 10.1016/j.tig.2016.09.003.

- Brown, T. (2008). *Genomas*. 3ra Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires.
- Blakey, C. A., & Litt, M. D. (2015). Epigenetic gene expression—an introduction. In *Epigenetic Gene Expression and Regulation*. Academic Press, pp. 1-19.
- Conway, R. C. & Conway, J. W. Eds. (1994). *Transcription: Mechanisms and regulation*. Raven Press, New York.
- Griffiths, A. J. F., Lewontin, R. C., Carroll, S. B. & Wessler, S. R. (2008). *Genética*. Editorial Mc Graw Hill, Madrid.
- Kaplan, J. C. & Delpech, M. (1993). *Biologie Moléculaire et Médecine*. 2e édition. Editorial Flammarion Médecines-Sciences, Paris.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. & Killian, D. (2019). *Concepts of genetics*. Twelfth edition. Pearson Education Limited, London.
- Landes, E. S., & Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 355–356. doi:10.1038/ng0496-355.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. 5ta Edición. Editorial Oxford University Press. Oxford.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2005). *Biología Celular & Molecular*. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* 9, 563–576. doi:10.4161/rna.20231.
- Meyers, R. A. (2012). *Epigenetic Regulation and Epigenomics*. Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, Alemania.
- Pierce, B. A. (2003). *Genetics: a Conceptual Approach*. Editorial W.H. Freeman and Company, New York.
- Ramos Morales, P. (1993). *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*, McGraw-Hill Interamericana de México.
- Rosengren Pielberg, G., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M. H., *et al.* (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.* 40, 1004–1009. doi:10.1038/ng.185.
- Strickberger M. W. (1988). *Genética*. 3ra Edición. Editorial Omega, Barcelona.
- Stryer, L., Berg, J.M. & Tymoczko, J. L. (2003). *Bioquímica*. 5ta. Edición. Editorial Reverté. Barcelona.
- Suzuki D. T., Griffiths A. J. F., Millar J. H., Lewontin R. C. (1994). *Introducción al análisis genético*. Editorial Interamericana. McGraw-Hill.