

# **Regulación de la expresión génica**

## Propósitos:

- ✓ Ajuste a cambios ambientales (microorganismos)
- ✓ Ejecución del programa genético vinculado al desarrollo embriológico (organismos multicelulares)

Los diferentes tipos celulares de un organismo multicelular contienen el mismo ADN, no obstante, la diferenciación celular se logra por cambios en la expresión génica.

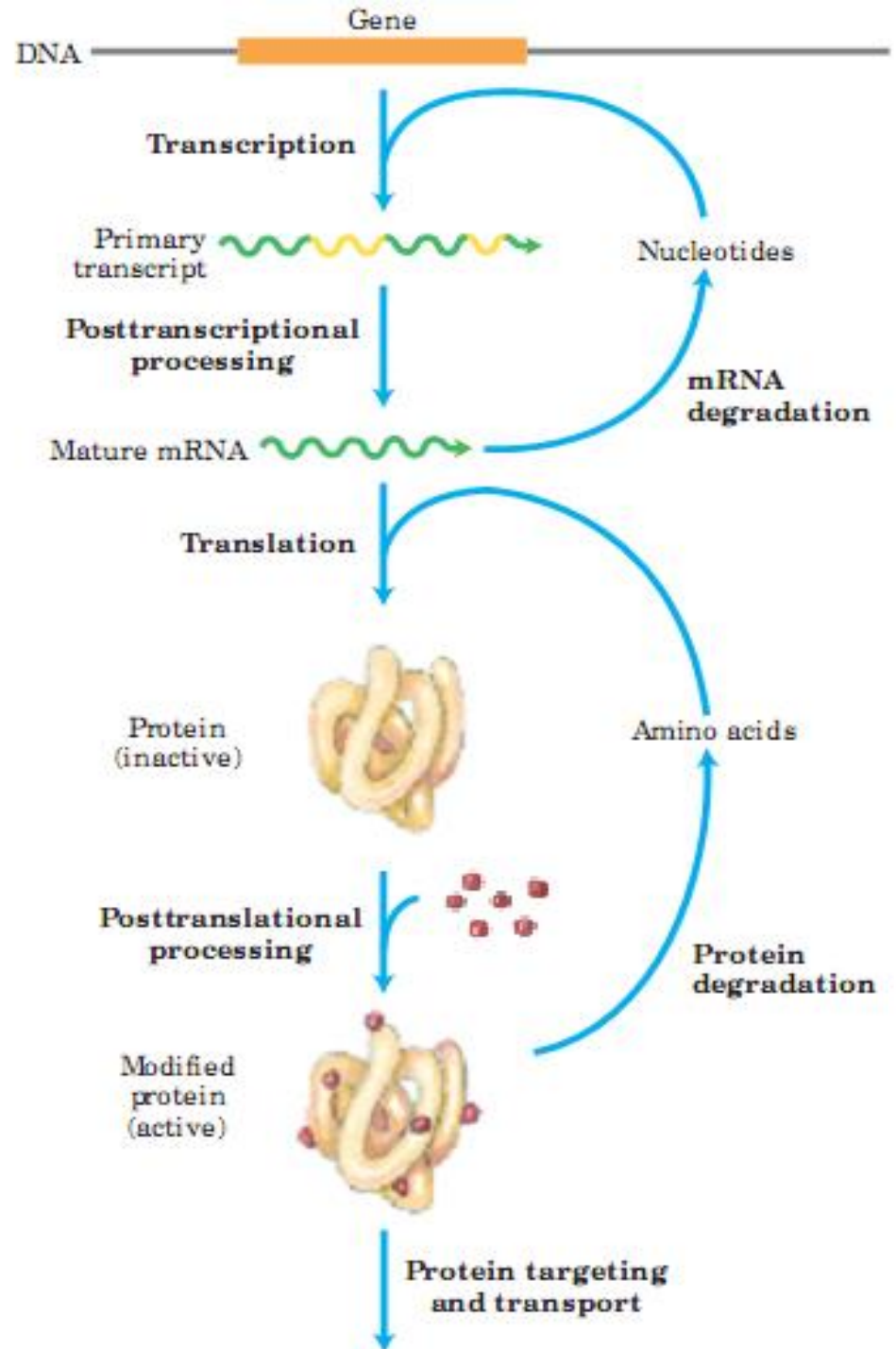
**Genes de expresión constitutiva:** se expresan en forma permanente en todas las células (ARN polimerasas, enzimas de procesos metabólicos básicos)

**Genes de expresión regulable:** se expresan bajo la influencia de señales en determinado momento y/o tipo celular

# Niveles de control de la expresión génica

Puede afectar:

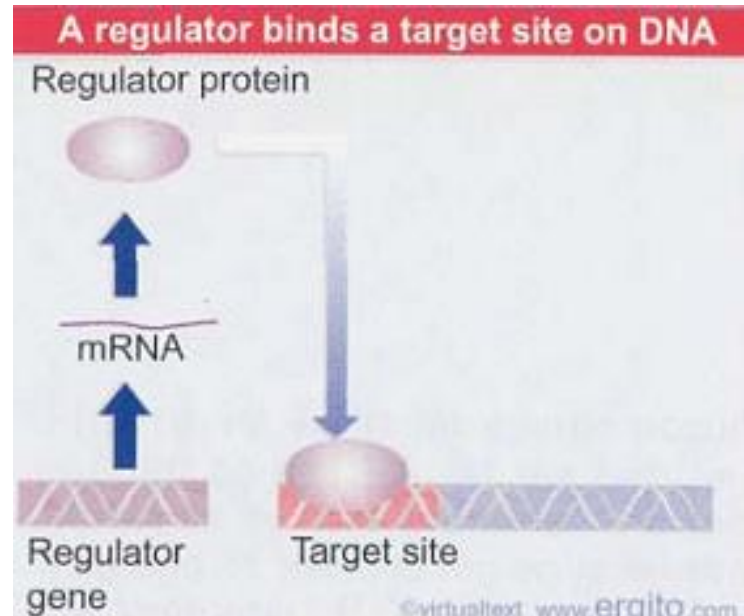
- Actividad de una proteína preexistente (respuesta rápida)
- Cantidad de una proteína (respuesta lenta)



# Control de la Transcripción

## Paso de control más frecuente (al inicio)

Interacciones específicas de **productos *trans-acting*** (reguladores) y **secuencias *cis-acting*** (ej. sitios en el ADN)

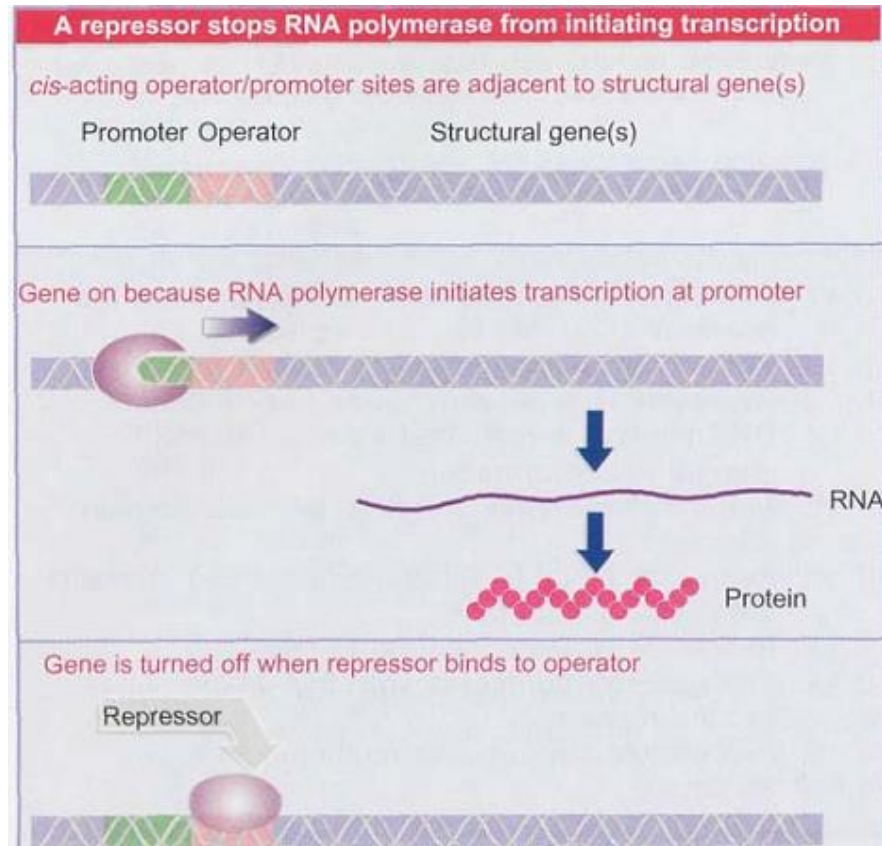


**Activador:** aumenta la velocidad de transcripción

**Represor:** inhibe la transcripción

# La regulación génica puede ser positiva o negativa

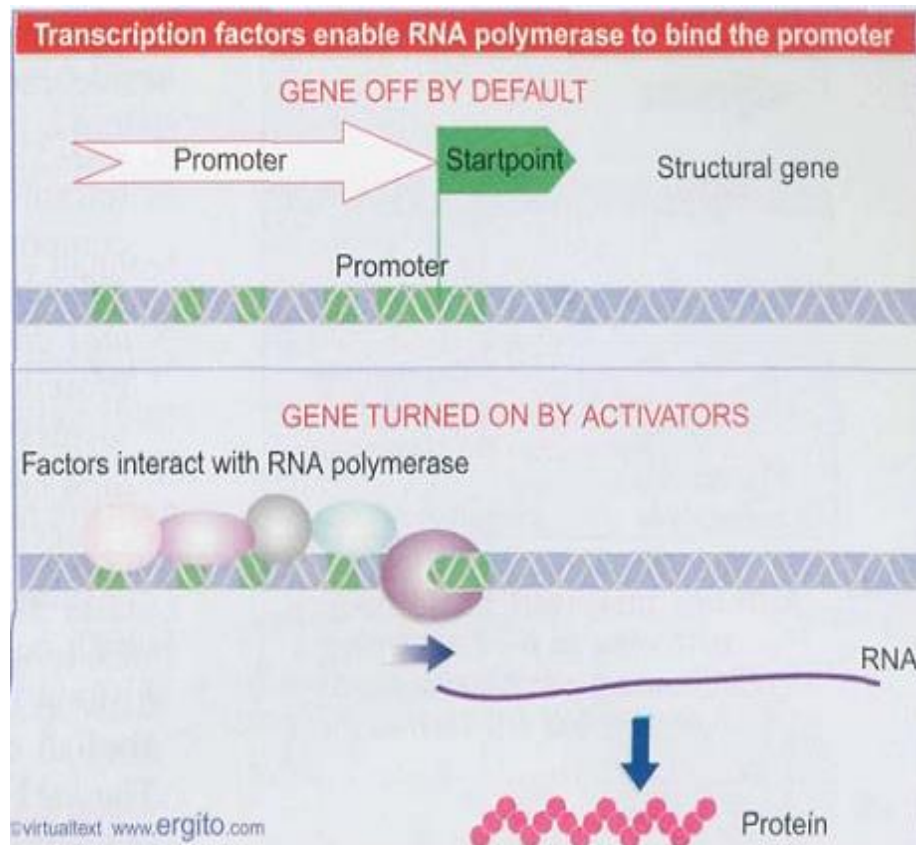
**Control negativo:** La proteína reguladora es un **represor**. Frecuente en bacterias



El represor se une al **sitio operador** e impide la transcripción

Una mutación en el represor o en el sitio operador da **expresión constitutiva** (constante) del gen

**Control positivo:** La proteína reguladora es un **activador**



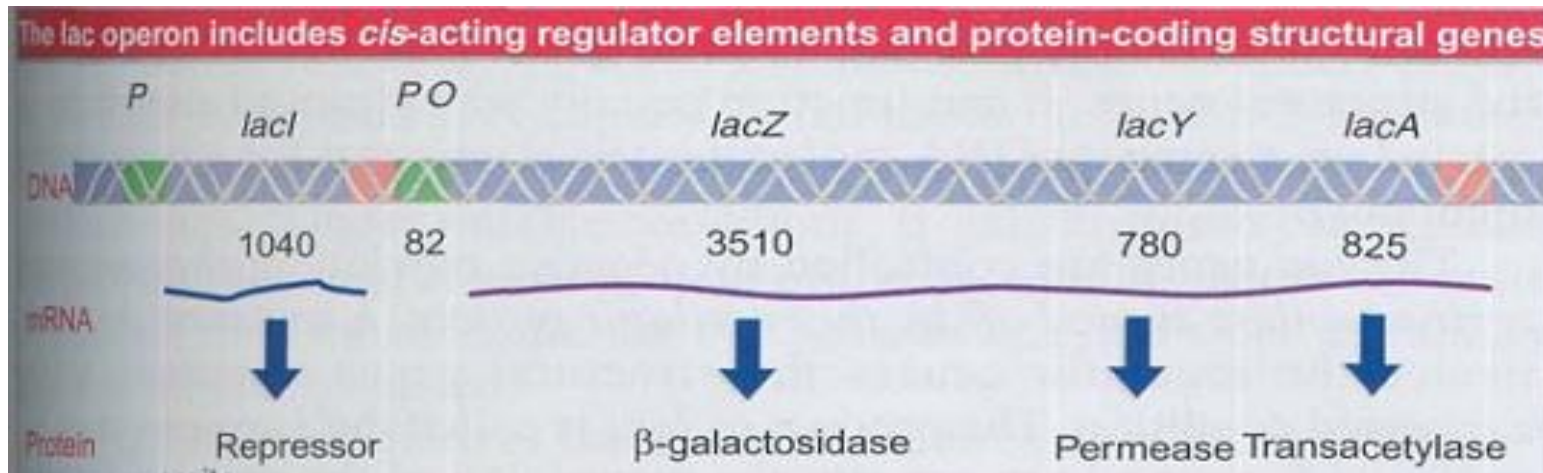
El activador se une al sitio específico y facilita la transcripción por la ARN polimerasa

Una mutación en el activador o su sitio de unión da **expresión no inducible** (disminuida) del gen

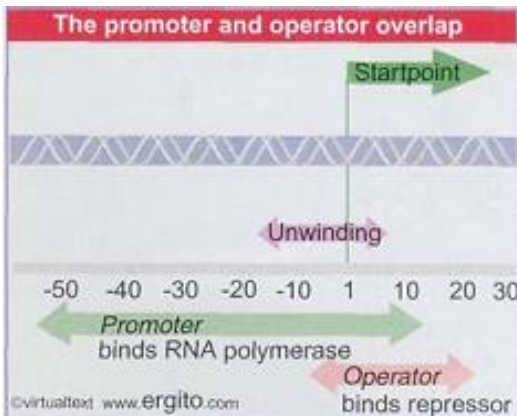
Jacob y Monod (1961) aportaron conceptos básicos sobre el control de la transcripción mediante el estudio de los genes del catabolismo de lactosa en las bacterias

**Operón:** Conjunto de genes contiguos transcritos a partir del mismo promotor.

Codifican proteínas funcionalmente relacionadas. Presentan expresión coordinada. Bacterias.



**Operón *lac***  
**Catabolismo de lactosa**



**P:** promotor

**O:** sitio operador

El represor y la ARN polimerasa se unen a sitios que se superponen alrededor del sitio de inicio de la transcripción del operón *lac*

# Inducción del operón *lac* en presencia de lactosa

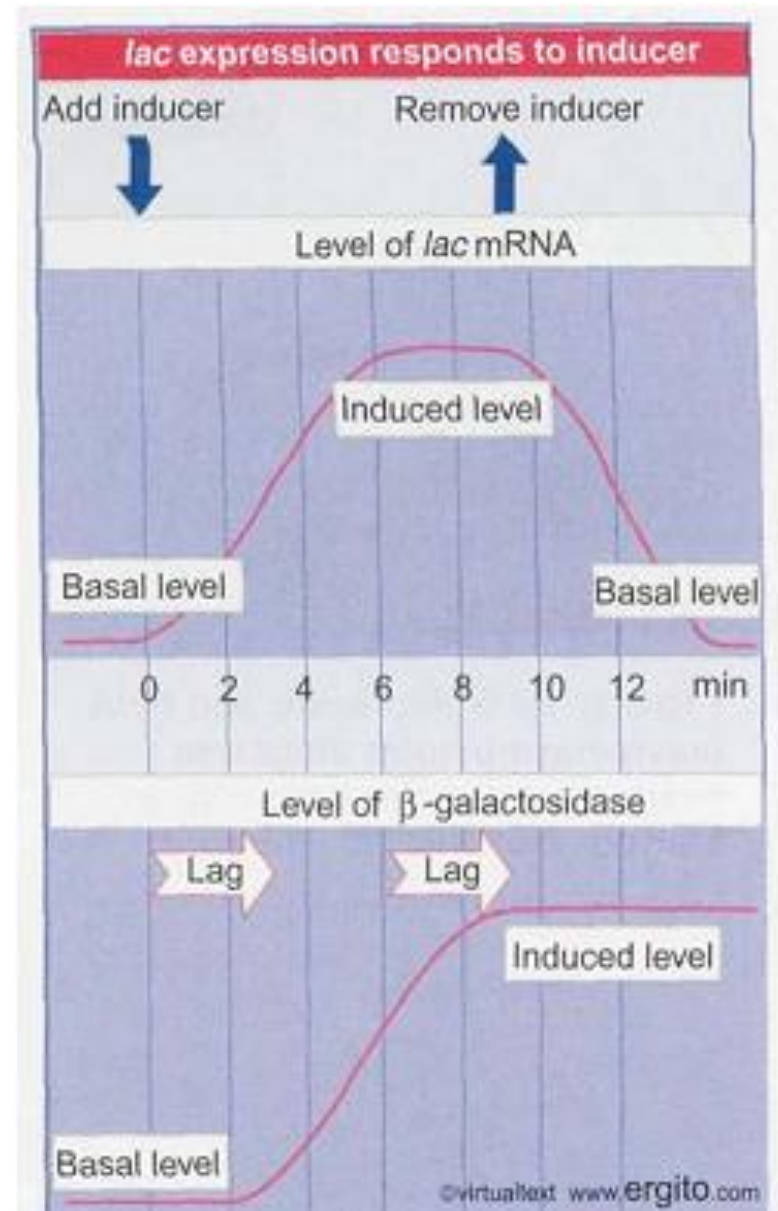
## Inducción:

Síntesis de enzimas en respuesta a la presencia del sustrato

Rutas catabólicas (operón *lac*)

## Inductor:

Compuesto/metabolito específico que estimula la expresión de un gen (para el operón *lac*, la lactosa)



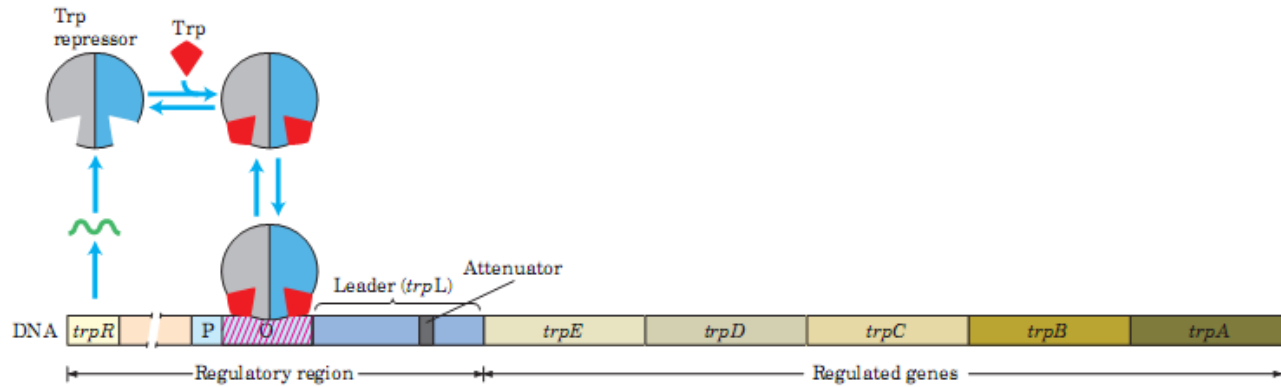


# Represión del operón *trp* en presencia de *trp*

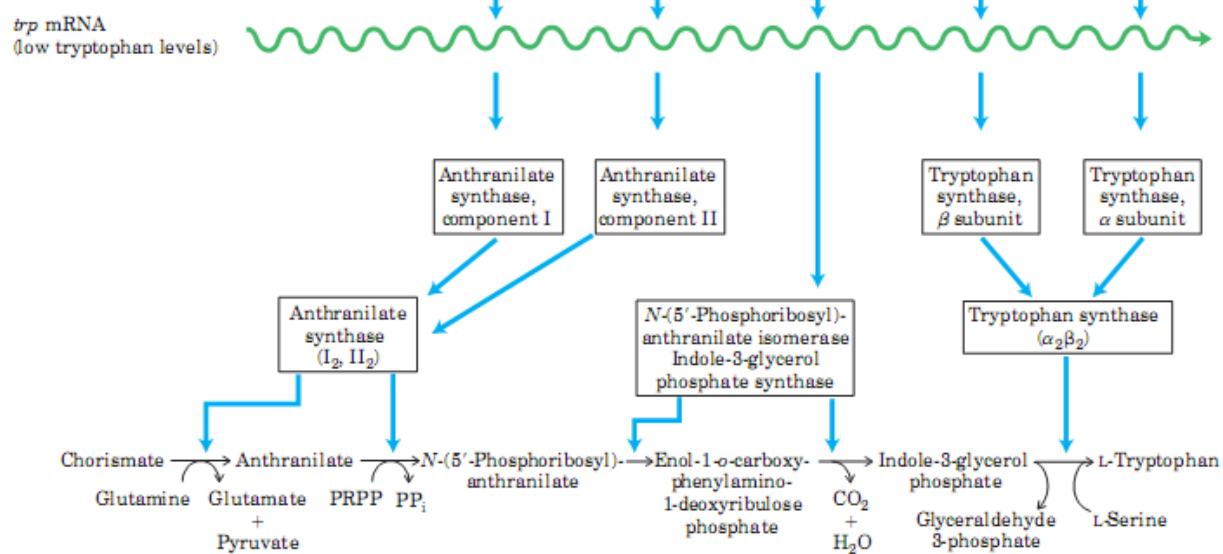
**Represión:** Inhibición de la síntesis de enzimas en presencia del producto

Rutas biosintéticas. **Regulación del operón *trp* en *E. coli***

**Co-represor:** Compuesto específico que inhibe la expresión de un gen (***trp***, producto de la ruta)



**Trp en baja conc.**

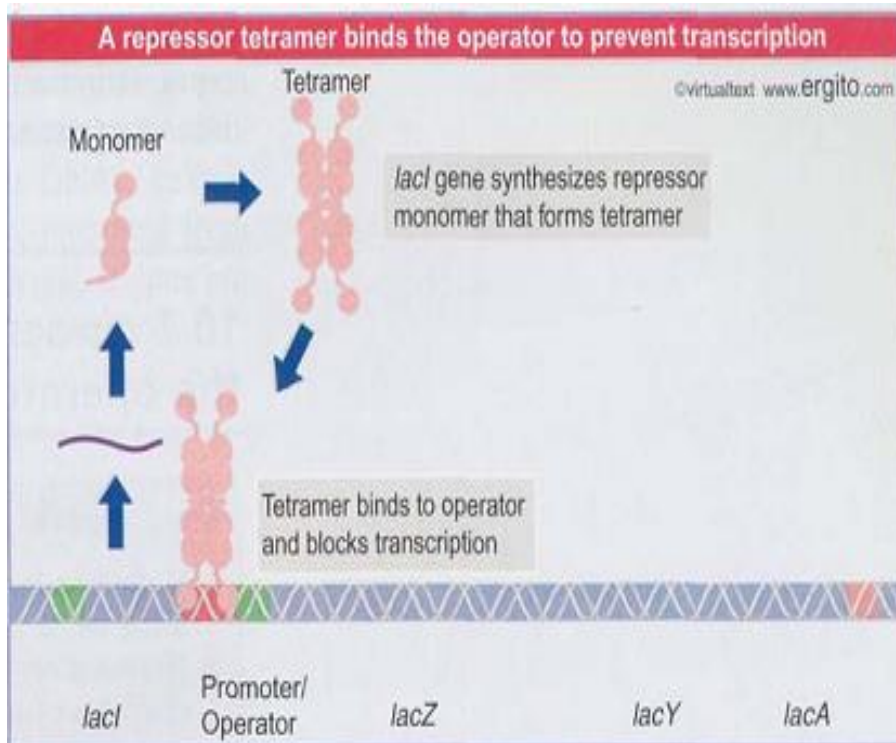


# Cómo funciona el inductor del operón *lac*?

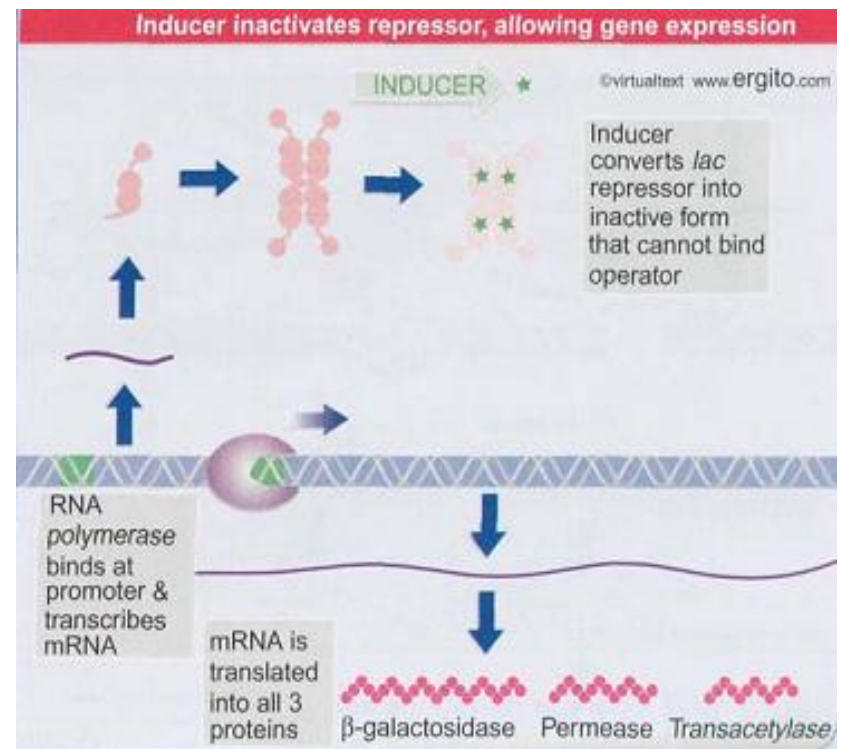
El represor es un tetrámero, cada subunidad posee 2 sitios de unión: uno al operador y otro al inductor

El **represor es inactivado por interacción alostérica con el inductor** (lactosa), modificando su capacidad de pegado al sitio operador (disminuye afinidad)

## Sin lactosa



## Con lactosa



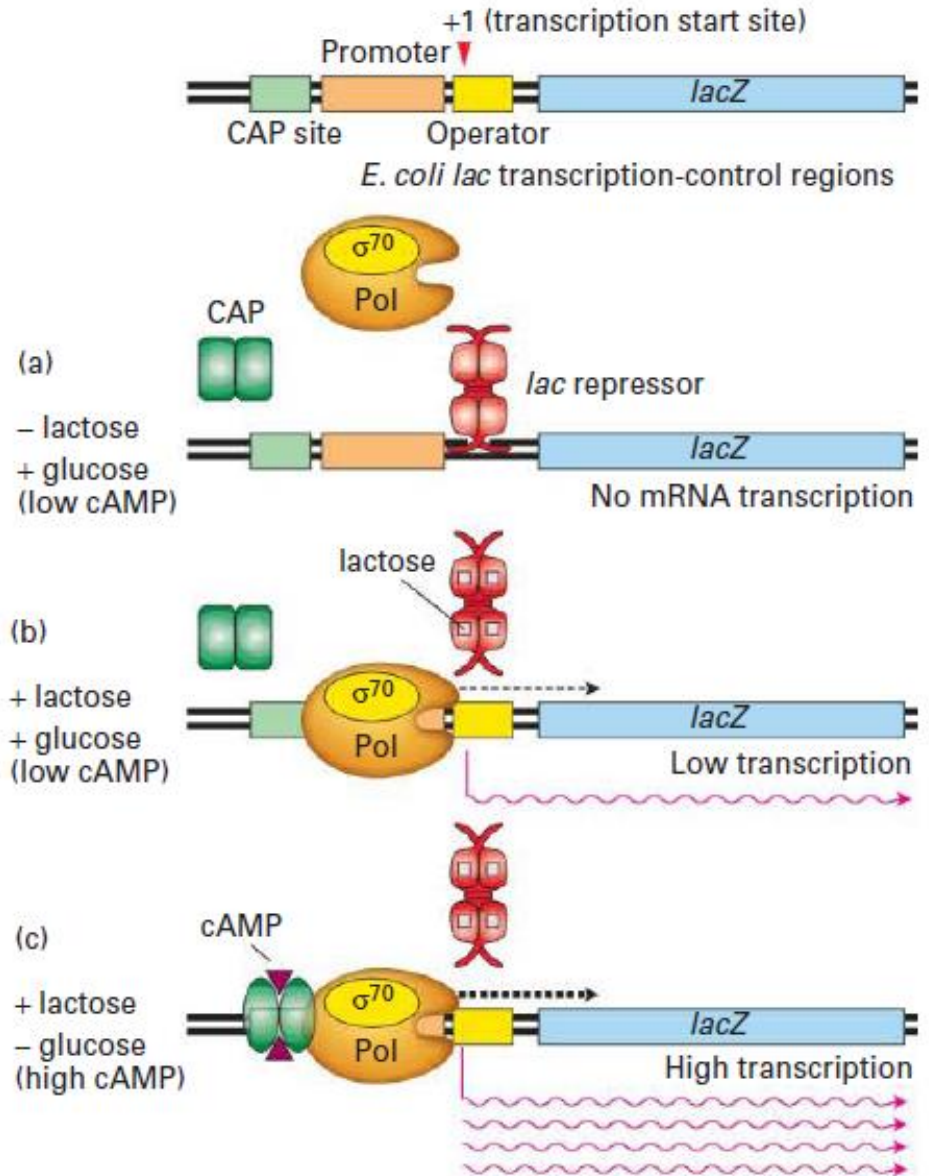
# El operón *lac* es regulado por el represor *lac* y por la proteína activadora CAP

## Represión catabólica de Carbono

La glucosa (sustrato preferencial) controla la utilización de fuentes de carbono alternativas en las bacterias

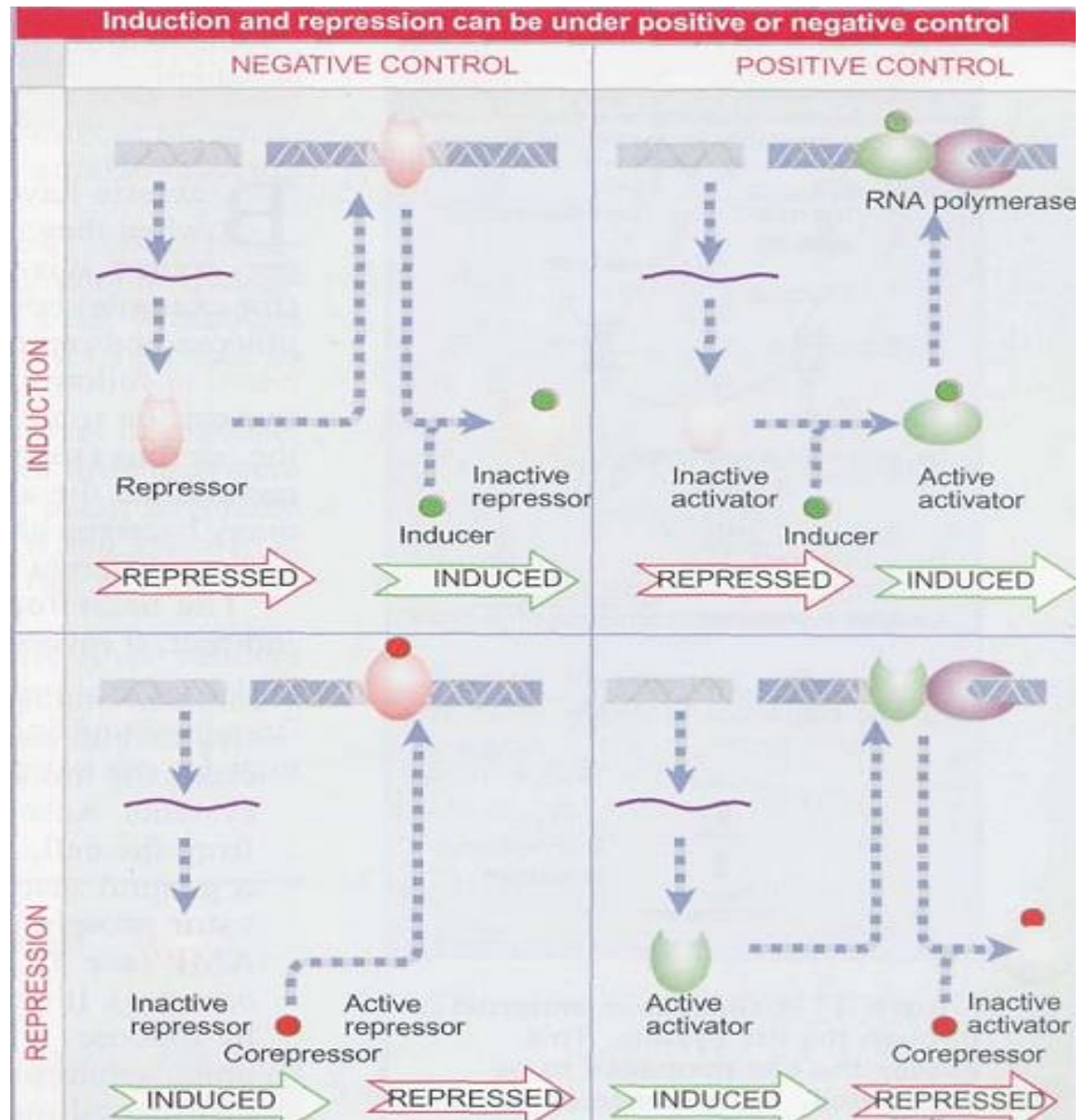
**CAP** (*catabolite activator protein*) es una **proteína activadora** que se une a la secuencia específica en el promotor *lac* (*CAP site*)

CAP es activada alostéricamente por cAMP cuando los niveles de glucosa del medio son bajos

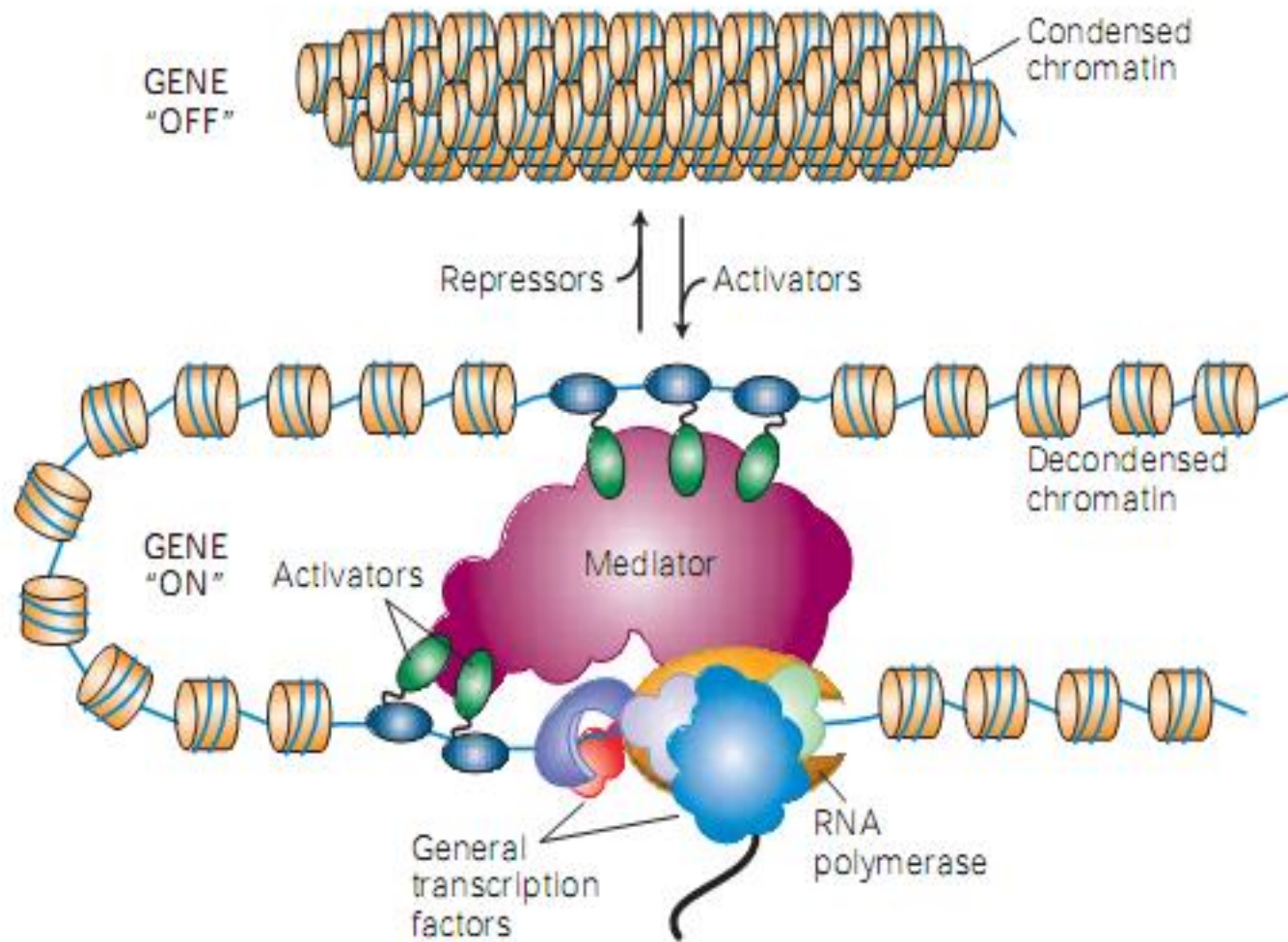


# La inducción y la represión pueden lograrse por control positivo o negativo

El inductor y el co-represor modifican la afinidad de la proteína reguladora por su sitio blanco

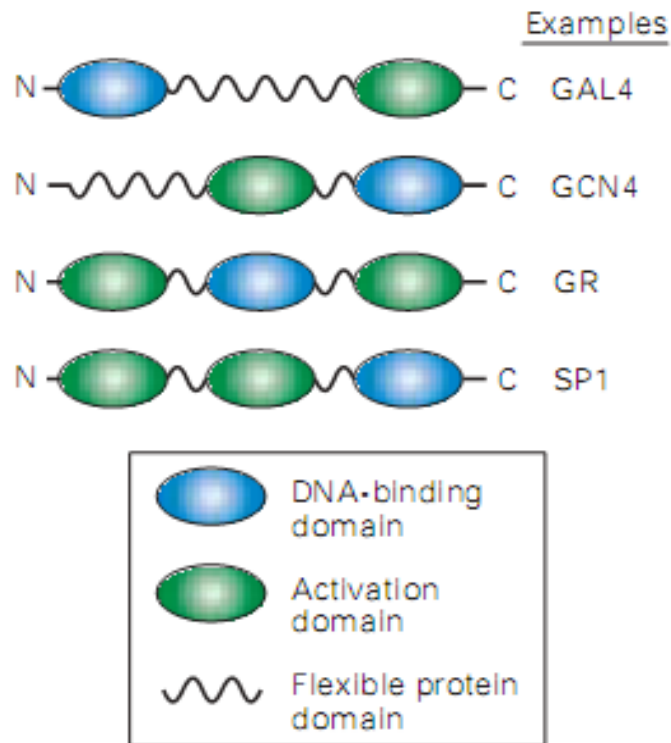


# Control de la transcripción en organismos eucariontes multicelulares



## Las proteínas reguladoras (factores de transcripción, TFs) tienen una estructura modular separable:

- **Dominio de unión al ADN.** Se une a regiones del ADN específicas
- **Dominio de activación (o represión) de la transcripción** (1 o más). Interacciona con otras proteínas y/o ARN polimerasa
- Dominio flexible



**Los FT que estimulan o reprimen la transcripción se unen a elementos proximales del promotor o a secuencias amplificadoras (*enhancers*)**

# Dominios de unión al ADN de los FT

Son estructuras proteicas que se unen a secuencias específicas del ADN

**Los FTs se clasifican en familias en base al tipo de dominios de unión al ADN**

## Hélice-giro-hélice (HTH)

Poseen 2 hélices  $\alpha$

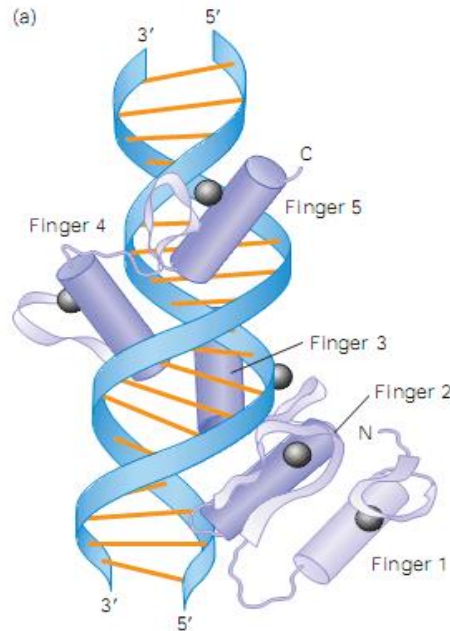
Represores bacterianos



## Proteínas con «Zn-fingers»

Regiones que se pliegan alrededor de  $Zn^{2+}$ .

Receptores de hormonas esteroides



## Proteínas con cierres de leucinas «leucine zipper».

Poseen leu en cada séptima posición de la secuencia del dominio. Se unen al ADN como dímeros. Las leu son necesarias para la dimerización.

FT GCN4



- ✓ Las regiones de control (región promotora) de genes eucariotas poseen sitios de unión para múltiples FTs localizadas cerca o distantes del sitio de inicio de la transcripción
- ✓ **La transcripción génica varía según el repertorio particular de FTs que se expresan y activan en una célula dada en un momento particular**
- ✓ Los **dominios de activación y represión en los TFs** presentan variedad de secuencias aa y estructuras tridimensionales (ej. Gal 4 residuos acídicos). Interactúan con **proteínas co-activadoras o co-represoras**
- ✓ Muchos FTs se unen en forma cooperativa para activar la transcripción

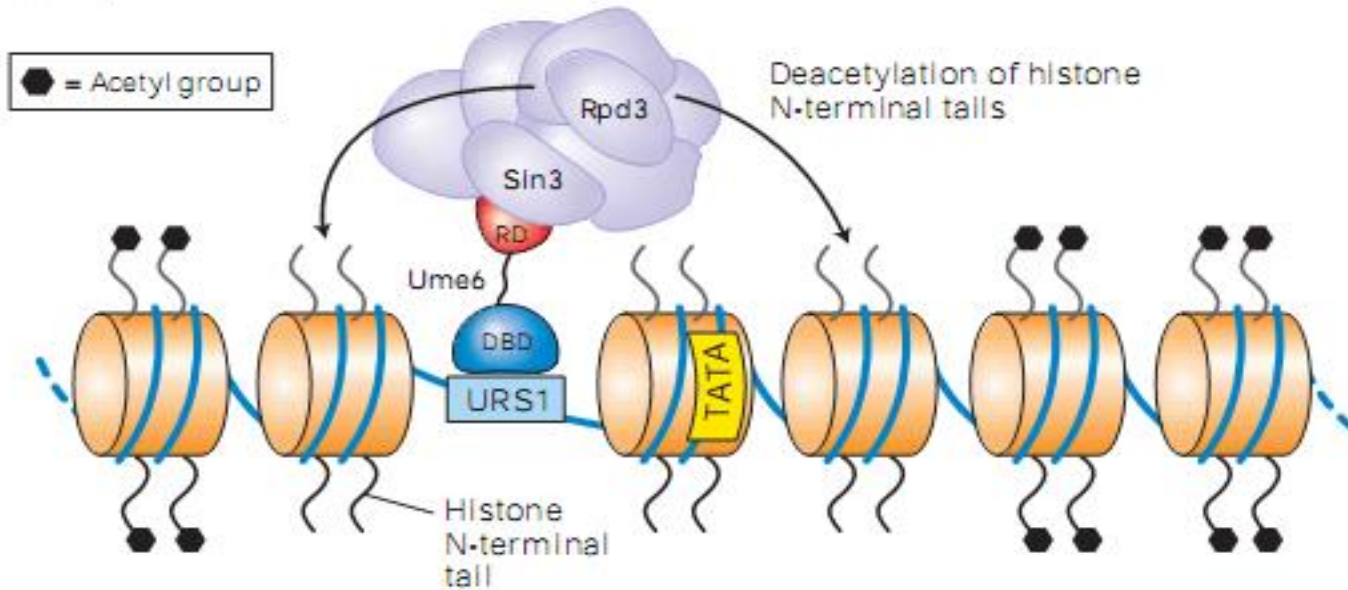


## Las proteínas reguladoras de genes eucariotas (FTs) actúan mediante dos mecanismos:

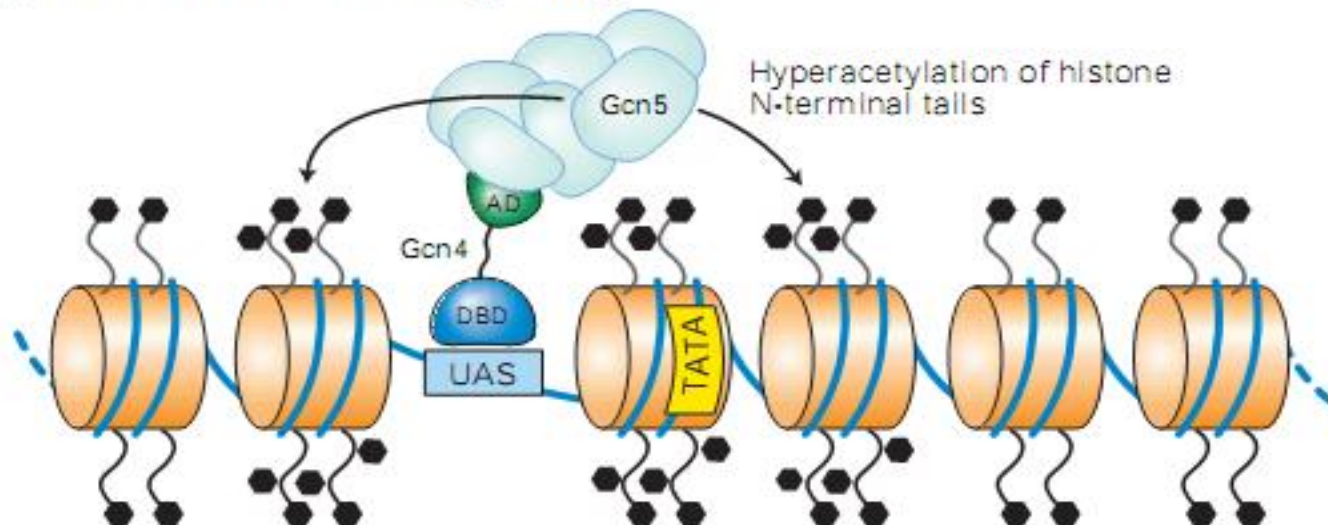
1. **Interaccionan con proteínas que remodelan la cromatina**, afectando la capacidad de los FTs generales y la ARN pol II de unirse a los promotores e iniciar la transcripción.
2. **Interactúan con un complejo multi-proteico, mediador del complejo de transcripción**, que se une a la ARN pol II y regula el ensamblaje del complejo de pre-iniciación.

# Mecanismo de desacetilación/hiperacetilación de las histonas en el control de la transcripción en levaduras

(a) Repressor-directed histone deacetylation



(b) Activator-directed histone hyperacetylation



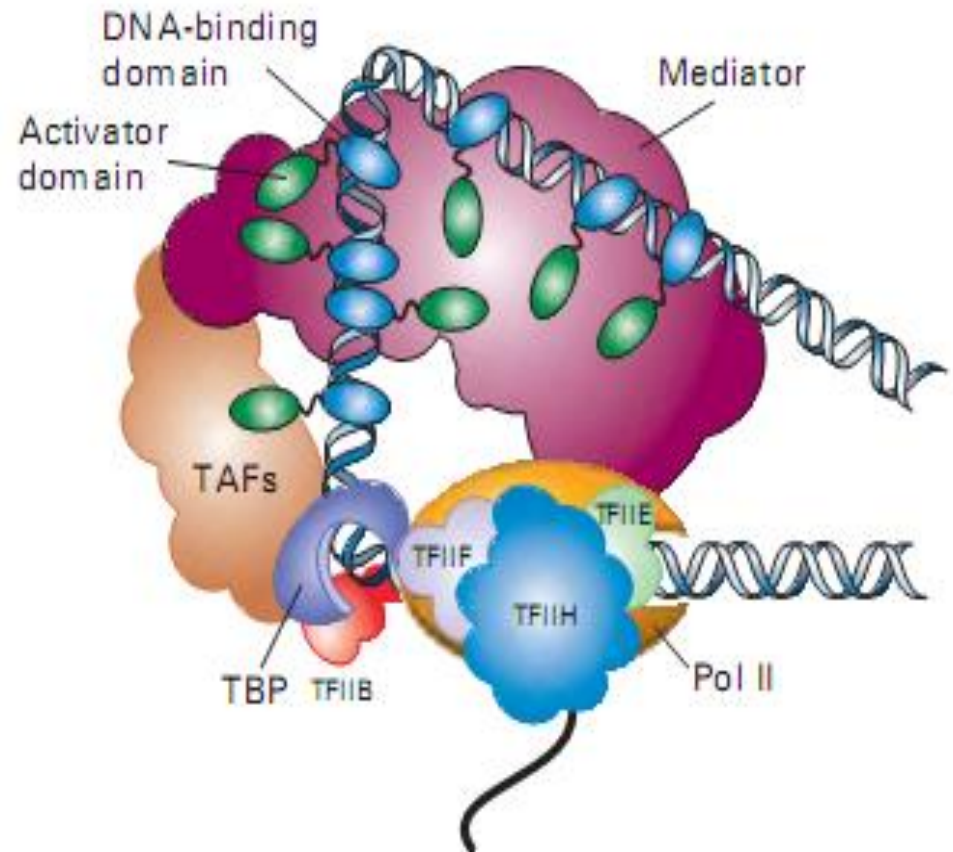
El **complejo mediador** es un **co-activador transcripcional**

Actúa como un puente que conecta la ARN polimerasa II y el dominio de activación de proteínas activadoras

**Integra señales de varios activadores en un único promotor**

Una de la subunidades del mediador **posee actividad histona-acetilasa**, mantiene la región promotora hiperacetilada

Los activadores unidos a secuencias amplificadoras o elementos proximales del promotor pueden interactuar con un mediador asociado a un promotor debido a que **el ADN es flexible y puede formar un bucle acercando regiones reguladoras y el promotor**



# Regulación de la actividad de los FT

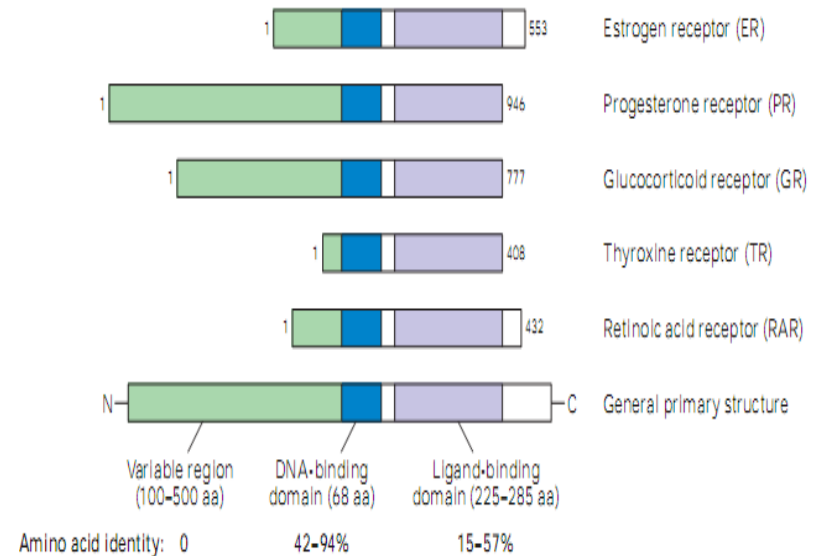
La **expresión de un gen** depende de la **concentración y actividad de los FTs** en la célula

La expresión de los FT está finamente regulada y depende de múltiples interacciones reguladoras

## Los organismos multicelulares reciben señales externas:

- ✓ Moléculas con receptores en superficie celular (péptidos/proteínas), transducción de señales
- ✓ **Hormonas liposolubles**, difunden por la membrana e **interactúan con FTs: Familia de receptores nucleares**

### Diseño general de los FT familia de receptores nucleares

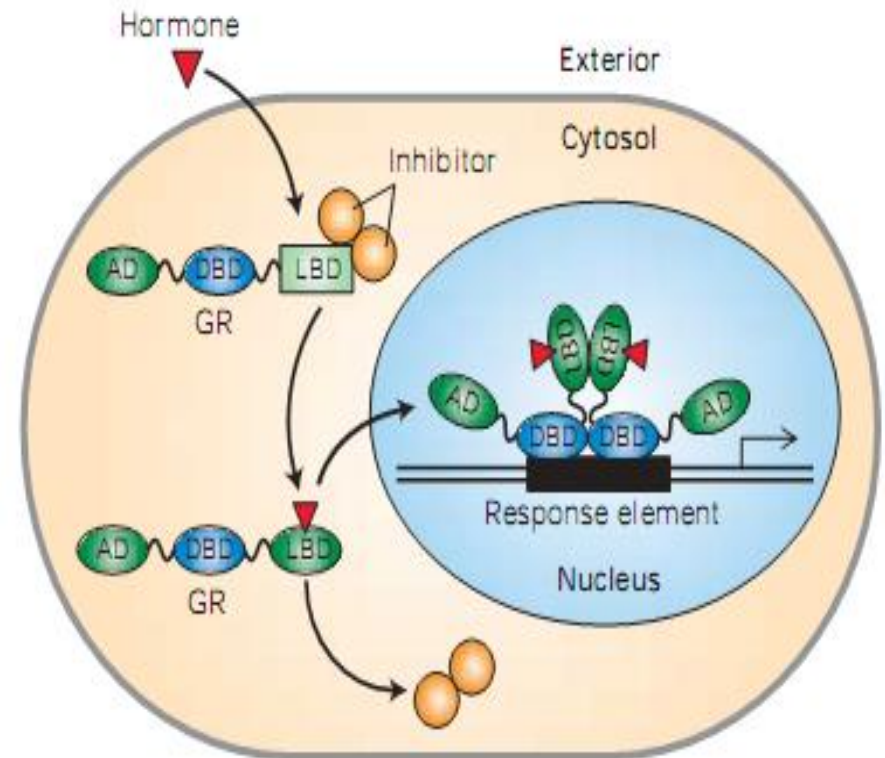


# Activación génica hormona-dependiente por un receptor dimérico nuclear

Los receptores de hormonas liposolubles se unen a sitios específicos en el ADN: **elementos de respuesta (ER)**.

Estos receptores modifican su actividad por interacción con el ligando y activan la transcripción.

Algunos receptores se localizan en el núcleo (receptor h. tiroidea) y otros en el citoplasma y se translocan al núcleo después de interactuar con el ligando.



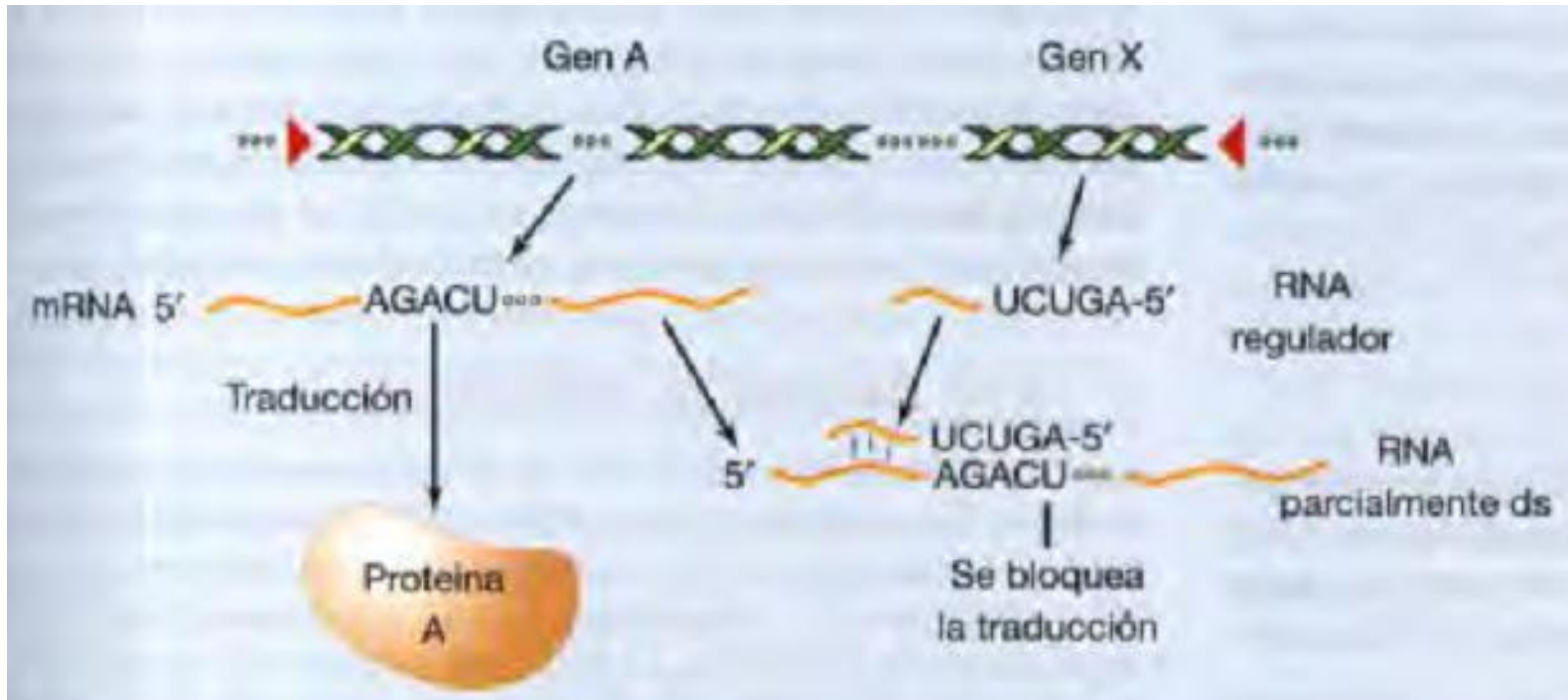
AD, dominio de activación de la transcripción

DBD, dominio unión al ADN

LBD, dominio unión al ligando

# Control de la traducción: Regulación por ARN

## Control *antisense* por ARNs no codificantes pequeños (ncRNA)



Son RNAs pequeños simple cadena que se aparean a regiones complementarias de un ARNm bloqueando su expresión (procesamiento o traducción)

Procariontes y eucariontes

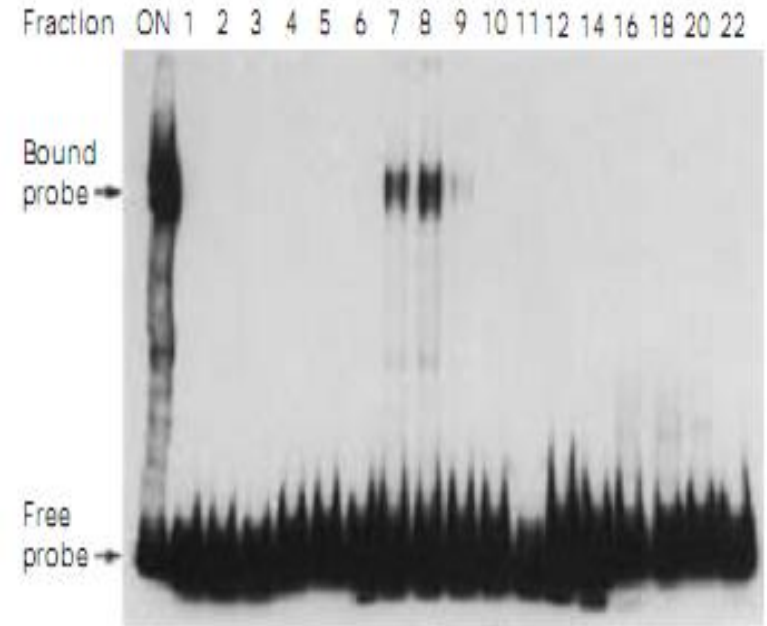
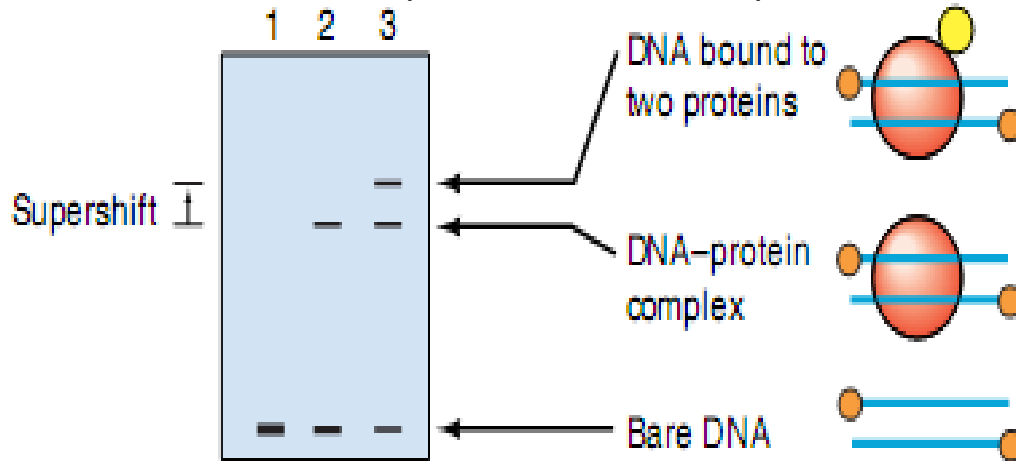
Aplicación práctica: La estrategia del ARN antisentido se usa para apagar la expresión de un gen a conveniencia para investigar su función

# Técnicas para el estudio de la Interacción entre ADN y proteínas

## Geles de retardo (*gel shift assay* o **EMSA**, *Electrophoretic mobility shift assay*)

Se incuba un fragmento de ADN marcado con una secuencia de interés (ej CAAT box) en ausencia y presencia de una proteína específica o un extracto proteico. Se siembra en gel nativo y se identifican las bandas por autorradiografía.

1. ADN solo; 2. ADN + proteína; 3. ADN + 2 proteínas



La aparición de bandas con movilidad retrasada respecto al control (ADN solo) indican la formación de un complejo ADN-proteína

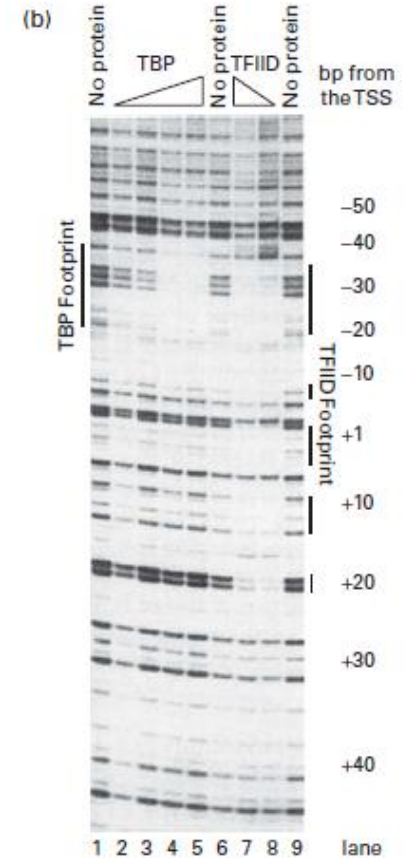
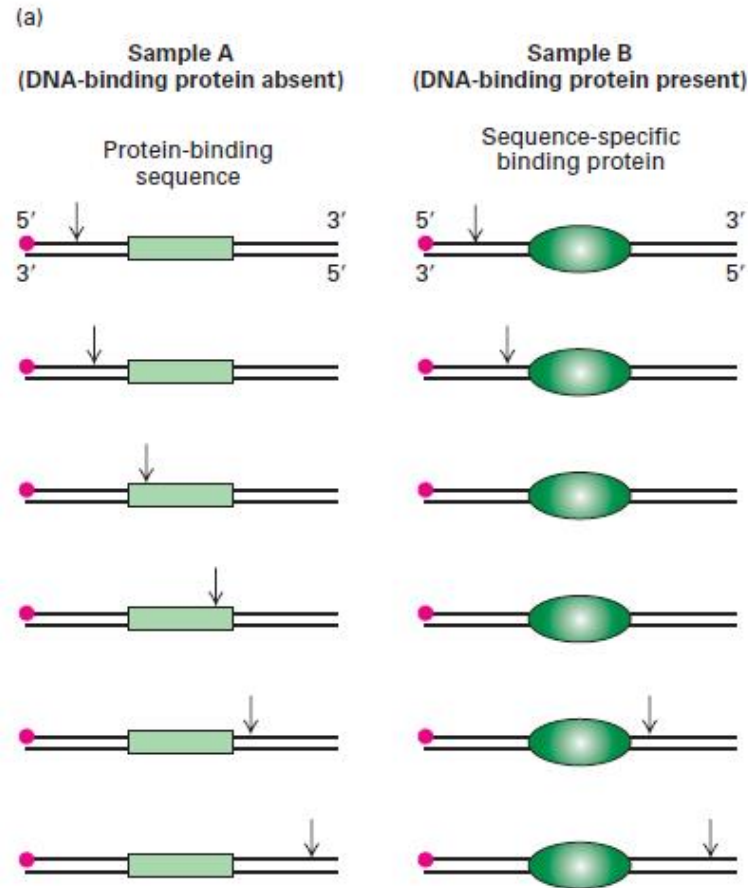
# Huellas de ADN (ADN footprinting)

Permite identificar la secuencia de ADN específica a la cual se une un FT

Pasos:

1. Marcación del fragmento de ADN
2. Incubación del ADN marcado con/sin proteína (FT)
3. Incubación con DNasa I
4. Electroforesis en gel desnaturalizantes y autorradiografía

La **región protegida por la proteína** se visualiza como una **huella en el patrón de bandas**





# Ensayos con genes reporteros

**Genes reporteros:** Codifican proteínas fácilmente medibles (B-gal, luciferasa, GFP)

Permiten Identificar/caracterizar elementos de control de la transcripción en el ADN

Fragmentos de ADN de longitudes variables en extr.5' se clonaron en un plásmido río arriba de un gen reportero carente de su propio promotor.

Se trasformaron células y se midió la actividad del gen reportero.

