

TRANSCRIPCIÓN Y REGULACIÓN EN PROCARIOTAS.....	3
<i>Promotores</i>	4
RNA polimerasa (<i>E.coli</i>)	4
Reconocimiento del promotor	5
Iniciación de la transcripción	5
Fase de elongación	5
Terminación de la transcripción.....	6
Intrínsecas o independientes de rho.....	6
Dependientes de rho	6
<i>Regulación de la transcripción.</i>	6
Operones.....	6
Operón Arabinosa.....	7
Respuesta SOS en <i>E.Coli</i>	7
Activación de RecA.....	8
Esporulación en <i>B.subilis</i>	8
<i>Regulación del ciclo del fago λ</i>	9
Fago λ	9
Genes tempranos inmediatos	9
Lisogenia	10
Lisis	11
Proteína CI.....	11
Proteína Cro.....	12
Lisis o lisogenia.....	12
Integración del DNA y escisión	12
Establecimiento de la lisogenia	13
Lisis	13
Inducción	13
TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS	14
RNA polimerasas nucleares	14
<i>Tipos de genes</i>	14
Genes de clase I.....	14
Promotores de los genes de clase I.....	15
Estructura de la IGS.....	15
Genes de clase II.....	16
Promotores de los genes de clase II.....	16
Promotor genérico	16
Genes de clase III	17
tRNAs	17
Promotores de los genes de clase III	17
<i>Procesos de maduración</i>	17
Capping.....	17
Poli A.....	17
Terminación de la transcripción	18
Mecanismos de splicing	18
Precusores del tRNA.....	18
Eliminación de los intrones del mRNA.....	19
Autosplicing	20
Splicing alternativo.....	20

Determinación del sexo en <i>Drosophila</i>	21
RNA – editing.....	21
<i>Regulación de la transcripción</i>	22
Eucariotas superiores.....	23
Regiones reguladoras.....	23
Retraso en gel	24
Footprinting	24
Análisis de deleciones	24
Genes reporteros.....	24
CAT	24
<i>Dominios de unión a DNA</i>	25
Zn fingers.....	25
Helix – Turn – Helix (HTH).....	25
Helix – Loop – Helix (HLH).....	25
Leucine zipper	25
<i>Represores</i>	26
<i>Factores constitutivos</i>	26
Factores.....	26
EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIBLE	27
Respuesta al AMPc.....	27
Genes inducibles por el calor	27
Transcripción inducible por hormonas esteroideas	28
Capacidad de desplazamiento de los nucleosomas.....	28
Receptor de la hormona tiroidea.....	28
Posicionamiento de los nucleosomas	29
Metilación del DNA	29
TRADUCCIÓN.....	30
<i>Mecanismo de traducción</i>	30
Iniciación en procariotas.....	30
tRNA iniciador	31
Iniciación en eucariotas	31

Transcripción y regulación en procariotas

La transcripción consiste en la copia de 1 cadena de DNA para dar una cadena de RNA, gracias a la complementariedad de bases. La cadena que se copia se conoce como cadena molde o cadena transcrita. Esta cadena será obviamente complementaria al RNA.

Se conoce como unidad de transcripción a aquel DNA que da lugar mediante el proceso de transcripción a una molécula de RNA. No siempre se corresponderá una unidad de transcripción con un gen, ya que en los organismos procariotas podrán existir operones, con lo que se coordinarán varios genes, que se transcribirán de manera simultánea.

Para la transcripción resulta básica la presencia de la RNA polimerasa, ya que este enzima es el encargado de sintetizar el RNA, gracias a la complementariedad con la cadena molde. La RNA polimerasa da inicio a la transcripción cuando se une al promotor. Se conoce como punto +1 al punto donde se inicia la transcripción. El enzima se deslizará por el molde hasta alcanzar la secuencia acabadora, situada en la parte final de la unidad de transcripción. Todos los nucleótidos situados antes de +1 son los situados upstream o hacia 5'. Estos nucleótidos reciben numeración negativa. Los situados después de +1 están situados downstream o hacia 3'.

A lo largo del DNA, las unidades de transcripción pueden situarse en cualquiera de las dos cadenas, lo que implicaría dificultades para ilustrar este proceso. Se ha determinado arbitrariamente, que la transcripción se inicie siempre de izquierda a derecha, desde 3' a 5'. En paralelo a la cadena de RNA se pone una sola cadena de DNA, pero no la complementaria, sino la que es idéntica al RNA, con las diferencias típicas entre DNA y RNA, como la sustitución de T por U.

El RNA que se forma como resultado de la transcripción, podrá ser el transcrito primario. Se ha de tener en cuenta que existe tres tipos de RNA, dos de los cuales son productos finales, como el rRNA y el tRNA, mientras que el mRNA deberá llegar a los ribosomas, donde podrá dar lugar a las proteínas.

Dentro del proceso de la transcripción puede haber otras proteínas implicadas, que serán las proteínas reguladoras. Se ha de tener en cuenta que la mayoría de los genes está sometidos a regulación, de manera que existirán diferentes ritmos de síntesis de RNA, con más o menos frecuencia. Esta regulación afecta a la expresión del gen, actuando a nivel de la transcripción normalmente.

Muchas de las cosas anteriormente mencionadas se pueden aplicar tanto a procariotas como a eucariotas, por lo que nos centraremos a partir de este punto en la transcripción en procariotas.

El caso que estudiaremos más el de la bacteria *E.coli*, que posee unos 5000 genes. Al tratarse de una bacteria, posee un único cromosoma, circular. La regulación se da principalmente a nivel de la transcripción. Siendo una bacteria, posee un sistema de regulación típico en las bacterias, que es la coordinación de diferentes genes mediante una estructura característica de las bacterias, que se conoce como operones. Los operones permiten la coordinación de diferentes genes bajo un mismo promotor, dando como resultado un único RNA. La inmensa mayoría de los organismos procariotas carece de intrones repartidos a lo largo de su genoma.

La RNA polimerasa es el único enzima de síntesis de RNA, capaz de sintetizar los 3 tipos diferentes de RNA. Existirán 2 tipos de promotores, los fuertes, con un alto índice de transcripción, y los débiles, con una transcripción más reducida. Estos promotores dependen de su afinidad por la RNA polimerasa.

PROMOTORES

Se trata de una secuencia, cuya única función es la de ser reconocida por proteínas. Nunca se transcribe o traduce. Al realizar el estudio, se buscaba una secuencia conservada en los distintos promotores. Esta secuencia no tenía que estar conservada al 100%, sino que se ha de tratar de una secuencia consenso, para lo cual en cada posición de la secuencia ha de haber una base más frecuente que las demás. Se trata de una secuencia ideal, ya que en realidad es poco probable que se encuentre, ya que la mayoría de las secuencias reales tendrán diferencias con esa secuencia. Cuando se analizó la secuencia consenso se descubrió que:

- En el punto de inicio, en +1, se suele encontrar una purina, en el 90% de los casos. Esta purina suele ser mayoritariamente A.
- En la posición -10 encontramos la Pribnow Box.
- En la posición -35 se halla otra secuencia consenso.
- La distancia entre ambas secuencias suele ser entre 16 y 19 pares de bases, y la distancia óptima es de 17pb.

Las mutaciones en los promotores pueden ser muy importantes, ya que no afectan al producto en sí, sino que afectan a la cantidad de producto que se producirá en la célula. Encontraremos dos tipos de mutaciones en los promotores, que pueden ser o bien “down”, con lo que la producción disminuirá, o bien mutaciones “up”, en las que la producción aumentará. Las mutaciones “down” se producirán debido a que las mutaciones provocarán más cambios en el promotor, respecto a la consenso, o bien provocarán que la distancia entre las dos cajas se diferencie más de la óptima de 17pb. Las mutaciones “up” están producidas por mutaciones que actúen en sentido contrario, con lo que la secuencia del promotor se aproximará más a la consenso o la distancia entre ambas cajas se aproximará a 17pb.

También depende de la similitud con la secuencia consenso la fortaleza de los promotores, de manera que los promotores más fuertes serán aquellos que se parezcan más a la secuencia consenso, mientras que los débiles diferirán más. Si todos los promotores fuesen como la secuencia consenso se perderían opciones de regulación. Existen algunos genes que presentan diferencias con estos promotores, pero se trata sólo de excepciones.

RNA polimerasa (*E.coli*)

La RNA de *E.coli* tiene una serie de características que son comunes a las demás polimerasas, pero también tiene características específicas de la RNA polimerasa bacteriana. Algunas características de la RNA polimerasa son:

- Está formada por diversas subunidades.
- Su función es la de sintetizar RNA a partir de NTP, por lo que necesitarán un DNA molde.
- La síntesis de RNA se produce en dirección 3' - 5'.
- No necesita primer.

El enzima entero, el holoenzima, consta de 5 subunidades, distribuidas así: $(\alpha_2\beta\beta')\sigma$. Podemos diferenciar dos partes en el enzima, el núcleo o core y la subunidad σ . Si bien el core tiene la capacidad de sintetizar nuevo RNA, sólo el enzima entero sería capaz de realizar correctamente la transcripción, ya que la subunidad σ es básica para el reconocimiento del punto de inicio, ya que sin ella, la transcripción empezaría en cualquier punto.

Unidad	Gen	Peso
α	RpoA	40 KDa
β	RpoB	155 KDa
β'	RpoC	160 KDa
σ	rpoD	32 - 90 KDa

El conjunto de toda la RNA polimerasa pesa unos 455 KDa. La función de α es la de mantener unido el enzima y la de permitir la unión de otras proteínas reguladoras. β y β' forman el centro catalítico, que sintetiza el RNA. Existen antibióticos que pueden actuar a nivel de estas proteínas, como la rifampicina. Estas dos subunidades tienen unidos dos átomos de Zn. σ es la parte que es capaz de reconocer específicamente y de manera estable el promotor. Su función es la de aumentar las probabilidades de que

se una donde debe. Una vez se ha iniciado la transcripción, σ se desprende y continúa el core la transcripción. La transcripción consta de 4 partes.

Reconocimiento del promotor

Se cree que la RNA polimerasa está unida al DNA y se va deslizando por encima de él, hasta encontrar un promotor. Se considera probable que el enzima tenga la capacidad de reconocer las estructuras de los puentes de hidrógeno de las cajas de -10 y -35 . La RNA polimerasa se coloca principalmente sobre una de las dos cadenas que componen el DNA. El DNA, cuando la RNA polimerasa reconozca al promotor, deberá pasar de un complejo cerrado, con las dos cadenas unidas, a uno abierto, con las cadenas separadas, para poder realizar la transcripción. La región de DNA cuyas dos cadenas se separan va de -9 a $+20$. Esta es la primera función de la RNA polimerasa, separar las dos cadenas. El enzima completo cubre desde la posición -55 a la $+20$. Se cree que la secuencia de -35 es la de reconocimiento por el enzima, mientras que la de -10 es la que indica el punto donde se deberían separar las dos cadenas. Se trata de una región rica en T y A, por lo que será más fácil de separar. Además se forma una pequeña curva en el DNA, donde se transcribe, que es básica para el inicio de la transcripción.

Iniciación de la transcripción

El primer nucleótido puede ser cualquier purina, aunque normalmente se trata de A, en más del 50% de los casos. El inicio de la transcripción es una iniciación abortiva, en la cual la RNA polimerasa sintetiza un oligonucleótido de entre 2 y 9 bases. Después deja ir a este nucleótido e inicia la síntesis de nuevo. Este proceso se repite unas cuantas veces, momento en que se dice que la RNA polimerasa está en forma de iniciación. La subunidad σ sigue unida todavía al RNA en esta fase, hasta que consiga alcanzar la siguiente fase. Es en esta fase cuando la RNA polimerasa puede ser inhibida por la rifampicina.

La fase se conoce como promotor clearance o despeje del promotor. Esta fase implica una limitación de velocidad, el tiempo que tarda en superar esta fase. Los promotores fuertes tardan menos tiempo. Pasado un cierto tiempo, se consigue superar esta fase y se entra en la siguiente fase, mucho más estable.

Fase de elongación

El factor σ se libera y el core del enzima continúa la síntesis por su cuenta. Se forma en esta fase lo que se conoce como burbuja de transcripción, que abarca unos 17 nucleótidos. El RNA permanece unido al DNA unos 12 nucleótidos. Las zonas ricas en A y T se sintetizan de manera más rápida, mientras que las ricas en G y C serán más lentas, siendo conocidas como zonas de pausa. La velocidad de elongación puede ser de entre 30 y 6 nucleótidos por segundo, pero en las zonas de pausa puede llegar a 0,1 nucleótido por segundo. En la etapa de elongación, la RNA polimerasa cubre unos 60 pb. Cuando el RNA tiene unos 15 nucleótidos, el enzima se compacta y pasa a cubrir solo 35 pb. El enzima va avanzando a trompicones, ya que la elongación avanza, pero el frente del enzima no avanza paulatinamente, sino que lo hará de golpe. La elongación implica por lo tanto un proceso de contracción y elongación del enzima.

Terminación de la transcripción

No existe una secuencia consenso a partir de la cual se detenga la transcripción, sino que la terminación de la transcripción se da gracias a secuencias ya transcritas de RNA. Se trata de regiones ricas en G y C, con lo que la polimerasa irá más lenta. Además, en esas regiones, las bases están colocadas de manera que al irse transcribiendo se de complementariedad en el RNA y se formen bucles o "hairpins". En *E.coli* se conocen 2 tipos de terminación de la transcripción.

Intrínsecas o independientes de rho

Este tipo de terminación depende solo de la secuencia. Se trata de regiones ricas en G y C, con simetrías para que se formen los hairpins cerca del final del gen, a unos 20 nucleótidos. Además encontramos una tira de A en la cadena molde, de entre 6 y 8 bases, justo después de la formación de los hairpins.

La presencia de los hairpins provoca una ralentización de la polimerasa, que no será suficiente para terminar la transcripción. La cadena de A provoca que la polimerasa se pueda liberar, ya que es un fragmento muy débil.

Dependientes de rho

Su estructura no está tan bien definida como en el caso anterior. Se cree que existen regiones que permiten la formación de los bucles, pero que en este caso no existe la tira de A al final. Para terminar la transcripción necesita la colaboración de la proteína rho.

Rho es una proteína con función ATPasa. Rho se une al RNA en una relación de 1 a 1. Se cree que rho se va deslizando por la cadena de RNA que está sintetizando la polimerasa, hasta que la alcanza, ya que está frenada en los bucles. La proteína es un hexámero que necesita unos 50 nucleótidos para poderse unir al RNA. Puesto que en bacterias la síntesis de proteínas se da de manera simultánea a la transcripción, la proteína rho no se podrá unir hasta que se haya sobrepasado el codón de terminación, mientras que la transcripción continuará más allá.

En *E.coli* existe un factor que se puede unir a la polimerasa, siempre y cuando no este σ . Este factor se conoce como NusA podría provocar que la polimerasa se frenase al llegar al bucle del final.

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.

Distinguimos entre 2 tipos de genes, por un lado los genes estructurales, cuyos productos son enzimas o proteínas estructurales, y por el otro los genes reguladores, que codifican para proteínas reguladoras que pueden ser activadoras o represoras.

Operones

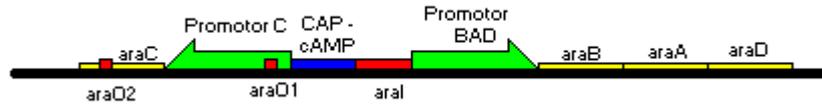
Se trata de regiones que contienen una serie de genes que codifican para proteínas de una misma vía metabólica, siendo coordinado todo por una misma región reguladora.

Existen operones de control positivo, activadores, y otros de control negativo, represores. Los activadores promueven la transcripción. Sólo se producirá la transcripción si está la proteína reguladora. Los negativos inhiben la transcripción, de manera que sólo se dará la expresión si no está la proteína reguladora.

En procariontes se suele tratar de control negativo, mientras que en eucariotes suele ser de control positivo. También podemos clasificar los operones en función de si son inducibles o reprimibles. En función de esto hablaremos de inductor o coactivador e inhibido o represor, respectivamente.

Operón Arabinosa

Lo constituyen los genes de los enzimas del metabolismo de la arabinosa.



El gen *araC* codifica para la proteína reguladora C. C es un activador, solo si está unido a la arabinosa. El operón también es sensible a la glucosa, ya que si la concentración de glucosa es baja, habrá más CAP – cAMP, con lo que se activará la transcripción. Si la concentración de glucosa es alta, pasará lo contrario. El CAP – cAMP es también activador. La proteína C es capaz de autorregularse, inhibiendo su propia síntesis. Existen tres lugares de unión de la proteína C, marcados en el esquema superior. *AraO1* es donde se une una proteína C para autorregularse, ya que impide la transcripción del gen *araC*. *AraI* y *araO2* actúan de manera conjunta en la regulación del promotor BAD.

En presencia de arabinosa, la proteína C estimulará la síntesis de los productos codificados por los genes BAD. Si no hay proteína C, se estimulará la síntesis de ésta. Si no hay arabinosa, se formará un bucle que impedirá que haya transcripción de los genes BAD.

En resumen, para que haya transcripción ha de haber arabinosa, proteína C y Cap – cAMP. Si no hay arabinosa, la proteína C se unirá a *araI* y a *araO2*, con lo que se formará el bucle represor, por lo que no habrá síntesis. La formación del bucle depende de la presencia de arabinosa.

La proteína C actúa como un homodímero. Cada una de las subunidades tiene un dominio de unión a DNA y otro dominio de polimerización. En el dominio de polimerización encontramos el punto donde se une la arabinosa. Existe un brazo que une los dos dominios, y además un pequeño brazo en el extremo amino terminal. En ausencia de arabinosa, el dímero irá desde *araI* a *araO2*, provocando la formación del bucle. Si hay arabinosa, ésta se unirá al dímero, lo que provocará un cambio conformacional que hará que el brazo amino terminal se repliegue y no se una al dominio de unión a DNA. La proteína C se une a *araI1* y a *araI2*. La presencia del bucle represor impide que la RNA polimerasa llegue a cualquiera de los promotores, y además impide la unión del CAP – cAMP.

Respuesta SOS en E.Coli

Se trata de un conjunto de mecanismos que se observan cuando se somete a las células a daños considerables en su DNA, a causa de rayos UV, por ejemplo. Se trata de una capacidad incrementada de reparación del DNA. Los responsables de esta capacidad son los genes SOS, de los que se conocen entre 15 y 20.

Todos estos genes están regulados de manera coordinada por la proteína represora LexA, del gen *lexA*. Se conoce este mecanismo como regulón. Existe un gen, el *recA*, que codifica para la proteína RecA, que es la inductora de la respuesta del regulón. El gen *lexA* es capaz de autorregularse, y de regular a *recA*. La proteína RecA se activa al sufrir daños, provocando la degradación del represor.

En una situación normal, LexA está reprimida, por lo que no habrá transcripción de los genes SOS, y sólo habrá transcripción basal de *lexA* y de *recA*. En una situación donde se producen daños, RecA se activará, degradando la proteína LexA, por lo que se iniciará la transcripción de los genes SOS, con lo que también habrá una mayor transcripción de los genes *recA* y *lexA*.

La transcripción de los genes SOS estimula los mecanismos de reparación de la célula, como por ejemplo los genes *uvrA*, *uvrB*,...

La síntesis de *recA* inhibe la acción incrementada de *recA*. Cuando cesa la situación de emergencia, se puede volver a reprimir los genes SOS, debido a la síntesis existente de *lexA*.

Activación de RecA

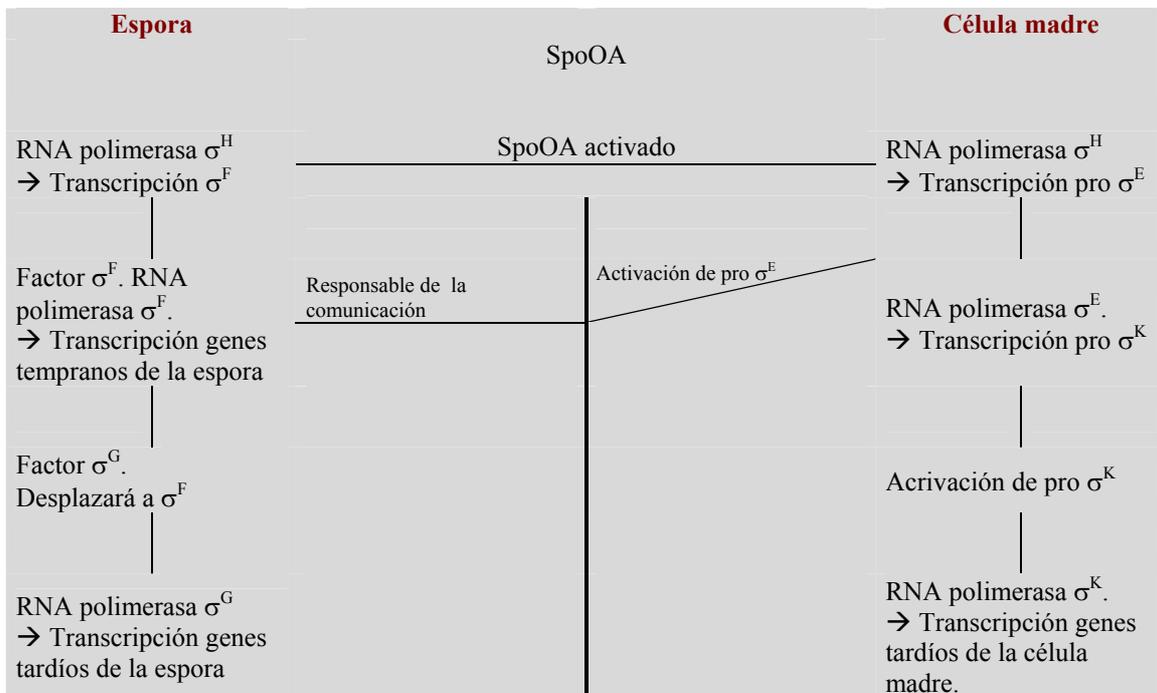
No se conoce el mecanismo exacto in vivo, pero se cree que en condiciones in vitro la proteína es capaz de reconocer cadenas de DNA sencillas, de una sola cadena. Esto sólo se ha podido comprobar in vitro. Los promotores de los genes SOS han de tener alguna secuencia conservada, de manera que puedan ser reconocidos por LexA. Se ha comprobado que todos tienen lo que se conoce como la caja SOS. Se trata de una secuencia consenso. La caja SOS consta de 20 nucleótidos, de los cuales 7 son siempre iguales. La posición de la caja SOS va variando. El gen *uvrB* está regulado sólo en parte por el sistema SOS, ya que tiene 2 promotores y solo un sistema SOS. Parece ser que siempre habrá un mínimo de transcripción de *uvrB*, por lo que habrá un sistema de reparación rápido.

Esporulación en B.subilis

Puede existir en 2 fases morfológicamente diferenciadas. Puede ser una célula vegetativa normal en un medio rico, o se una célula vegetativa en un medio pobre. En un medio rico, se dividirá por multiplicación, pero en un medio pobre se dará una división asimétrica. El resultado de esta división será de dos células. Una célula dará lugar a la espora, mientras que la otra célula lizará.

Este proceso está regulado transcripcionalmente. El proceso dura unas 8 horas e implica grandes cambios en las características y capacidades de la bacteria. Algunos genes de la etapa vegetativa dejan de expresarse y se expresan otros que antes no se expresaban.

La esporulación va asociada a cambios en la subunidad σ . Dependiendo de la subunidad σ que esté asociada en un momento dado, se reconocerán unos u otros promotores. Normalmente se denominaba a las unidades σ por el peso molecular, pero actualmente se emplean letras. LA σ característica de las bacterias y la mayoritaria es la σ^{55} o σ^A . Esta forma se encuentra en un 90% de los casos. El cambio de la subunidad σ provocará que se reconozcan otros promotores. En ambos compartimentos sucede lo mismo, al cambiar la subunidad σ se inicia la transcripción de diferentes genes, entre los que habrá otra unidad σ . Esta unidad σ sustituirá a la que está unida a la polimerasa, iniciando la transcripción de otros genes. Este proceso se irá dando hasta que se forme la espora y la célula madre lise.



Resulta básico para el funcionamiento del proceso el hecho de que E y F han de activarse solo en la parte que les toca, por lo que deberán estar inhibidos allí donde no se les necesita. Actualmente se sabe que:

- F puede formar un complejo con SpoIIAB, de manera que si se libera de esa proteína, resultará activado.
- SpoIIAB está controlado por SpoIIAA. Si SpoIIAA no está fosforilado, se puede unir a SpoIIAB, con lo que esta proteína no se podrá unir a σ^F , que será activa. Si AA está fosforilado, σ^F será activo.
- El encargado de fosforilar SpoIIAB es SpoIIE, sólo en la espora.

El proceso de activación de σ^F es más complejo, y se da por rotura proteolítica, mediante la proteasa SpoIIGA, que está situada en el tabique de separación de espora y célula. Esta proteína resulta activada por SpoIIR, que se transcribe por acción de la polimerasa unida a σ^F . El proceso de activación de σ^K es muy similar al de la σ^E , pero con IVF y IVB en lugar de GA y R. Este proceso está muy claro en los esquemas.

La activación de SpoOA se da por fosforilación, respondiendo a señales externas, debido a ciertas condiciones ambientales, en un proceso mediado por quinasas. La activación de SpoOA activa la cascada de factores σ que se ha descrito anteriormente. Se ha de tener en cuenta que existe comunicación entre ambos compartimentos de la célula, tanto espora como célula madre.

Existen otros organismos procariotas que pueden tener diferentes unidades σ , como por ejemplo E.coli. El cambio de unidades σ se como respuesta al cambio de determinadas condiciones ambientales, activando así los genes necesarios para responder a esa condición. E.coli tiene como principal σ la 70, pero también podemos encontrar otras como la 32 o la 54. Los genes que las codifican son respectivamente rpoD, rpoH y rpoN.

Se sustituye la 70 por la 32 en condiciones de shock térmico, permitiendo así la transcripción de 17 genes. Uno de los primeros genes en transcribirse, aún por la 70 es el rpoH, que permitirá la posterior transcripción del resto de genes. La unidad 54 se activa cuando en el medio no hay N suficiente, permitiendo así el aprovechamiento de fuentes alternativas de N.

REGULACIÓN DEL CICLO DEL FAGO λ

En los años 50, A. Lwoff, observó que cepas de E.coli sometidas a UV, después de 90', dejaban de crecer y lisaban, liberando fagos λ . Si estos fagos λ infectaban otras cepas de E.coli, algunas lisaban, mientras que otras seguían creciendo, a no ser que se las sometiese a radiación UV, cuando lisaban y liberaban fagos. Este ciclo debía estar regulado a nivel de transcripción. Fue estudiado por Jacob y Monod, que ganaron el Nobel.

Fago λ

Tiene DNA de cadena doble, lineal, pero tiene extremos cohesivos cos, que al entrar en las células bacterianas se circularizan. El DNA tiene unas 48,5 Kb, aproximadamente unos 40 genes. Muchos de estos genes están organizados en forma de operones, en muchos casos. Diferenciaríamos entre genes tempranos y tardíos. Dentro de los tempranos distinguiríamos entre inmediatos y retardados. Cuando el fago entra en una bacteria, siempre se inicia una la síntesis de los genes tempranos. Si se expresan los genes tardíos, se entrará en fase lítica.

Genes tempranos inmediatos

Gen N: Codifica una proteína, N, que es un factor antiterminador, que provoca la expresión de los genes tempranos retardados.

Gen cro: Impide la síntesis del represor. Acaba la expresión de los genes inmediatos tempranos cuando ya no se necesitan.

Genes tempranos retardados

Genes de recombinación

Genes de replicación

Genes de regulación: cII, cIII y Q

cII y cIII son necesarios para iniciar la transcripción del gen cI

Q codifica la proteína Q, que es un factor antiterminador que permite la transcripción de los genes tardíos

Una vez se ha sintetizado la proteína N, ésta proteína impide que la polimerasa se detenga en el terminador, permitiendo que se transcriban los genes que hay al otro lado. Permiten saltarse los terminadores.

Los genes tardíos se sintetizan a partir de un promotor, el PR'. Es constitutivo, pero tiene un terminador TR' situado. Si no hay proteína Q, no se podrá superar el terminador. Por lo tanto, es la proteína Q la que permite sintetizar los genes tardíos.

La lisis está ligada a la antiterminación. Se necesita que los genes tempranos inmediatos estén adyacentes a los retardados, solo separados por lo terminadores. Estos procesos de antiterminación se pueden dar en muchos fagos, pero se descubrieron en λ .

Se conocen como genes adyacentes aquellos genes separados únicamente por los terminadores.

El lugar de reconocimiento es diferente del lugar de actuación. Son básicas para este proceso las cajas nut. La proteína N actuará en la caja nut, permitiendo así a las polimerasas sobrepasar los terminadores. Conocemos dos cajas nut, la nutL y la nutR, en función de si permiten sobrepasar el terminador TL o TR1. Estas cajas nut son las que permiten pasar de los genes inmediatos tempranos a los retardados. Cuando la polimerasa pasa por la caja nut, la proteína N se le une, permitiendo así que supere los terminadores. La caja nut desempeña una función idéntica en la antiterminación para pasar a los genes tardíos.

Además de la proteína N harán falta otros factores, que serán los factores Nus, como Nus A, Nus B – S10 o Nus G. Sin estos factores no habrá antiterminación. En principio Nus A sería un factor terminador, pero a partir de N se organiza un complejo proteico necesario para que la polimerasa no se detenga en los terminadores.

Lisogenia

Asociada al gen cI. En el operador es donde actúa la proteína reguladora. Tenemos 2 operadores enabalgados sobre el promotor, que son OL y OR. De manera, que si está unida la proteína reguladora, la polimerasa no podrá acceder a los promotores PL y PR, por lo que acabará el ciclo lítico. CI es el represor que se unirá a los operadores. En OL no permite la transcripción de los genes N y de los siguientes, a partir del promotor PL. Por el OR no se permite la transcripción de cro, a la vez que se estimula la síntesis de cI, de manera que para sintetizar cI necesitaremos cI. Mientras haya cI se sintetizará más cI, lo que explica que la lisogenia sea estable. Lo es hasta que por alguna razón se degrada cI o ésta deja de ser funcional.

Esta misma región es la responsable de la inmunidad que presenta la bacteria frente a otras infecciones, ya que el represor actuará sobre todos los operadores, los del fago original y sobre los de la nueva infección.

Se han aislado diferentes tipos de mutantes:

- cI⁻: No pueden sintetizar el represor. Siempre entrarán en la vía lítica.
- λ vir: mutación en la región operadora. La proteína CI no podrá unirse, por lo que entrará en la vía lítica.

Si uno de los primeros mutantes infecta un fago lisogénico no habrá lisis, pero si la nueva infección se produce por el segundo mutante se producirá la lisis.

Para iniciar la síntesis de CI hay una vía alternativa. Si se sintetizan CII y CIII, que son proteínas retardadas, que actúan como reguladoras positivas, provocando la síntesis de CI. CII es un activador necesario para la síntesis de CI. Pero CII es muy inestable y fácilmente degradable por los mecanismos de degradación de la bacteria. Actuará CIII para estabilizarla. Por lo tanto, se sintetizará CI a partir de la unión de CII y CIII al promotor de establecimiento, PRE. Este promotor promueve la entrada en la fase de lisogenia. El promotor provocará la transcripción de un mensajero que pasará por cro hasta cI, pero lo que se transcribirá de cro será antisentido, por lo que no dará ninguna proteína, mientras que los de CI si será correcto. Este transcrito antisentido de cro se podrá unir al transcrito sentido de cro, inactivándolo, ya que cro está relacionado con la lisis. La otra mitad del transcrito sintetizará CI, que se unirá a los operadores e iniciará la entrada en lisogenia, que se mantendrá estable gracias a la autorregulación.

Lísis

Cro está asociada a la lisis. Es una proteína represora del represor, de cI. Se trata pues de un antirrepresor. Se une a OR y a OL, igual que CI. Una vez se ha unido a los operadores, impedirá la síntesis de CI. También inhibe la síntesis de los genes tempranos que ya no son necesarios.

Por lo tanto, la lisis o la lisogenia dependerán de la unión de cro o de cI a los operadores OR y OL. Cada una de las regiones operadoras consta de 3 regiones de unión al represor. OR3 está superpuesta a PM, mientras que OR2 está parcialmente superpuesta a PR y OR1 está totalmente superpuesta a PR. Por otro lado, OL1 está superpuesta a PL y OL2 está parcialmente superpuesta a PL.

CI se une preferentemente a 1. La afinidad por 1 es unas 10 veces más alta. Cuando el represor en forma de dímero se une a 1, se unirá otra unidad automáticamente a 2, ya que presenta una elevada cooperatividad. Para que se una a 3 hará falta una elevada cantidad de represor. La polimerasa no podrá transcribir. Se impedirá por lo tanto la transcripción por PR, pero se seguirá pudiendo transcribir por PM. Con una elevada cantidad de represor, se impedirá también esa síntesis.

Proteína CI

Es un dímero con dos dominios N terminales que contactarán con el operador. Los extremos C terminales serán los encargados de formar el dímero. Cada una de las subunidades pesa 27 KDa y tiene unos 236 AA. Cuando se degrada se rompe a nivel del puente conector de los dos dominios, por lo que no podrá actuar como represor.

Si cro está en OR/L 1, se unirá también a 2, con lo que podrá haber síntesis desde PR/L. Si hay CI en OR2, entonces habrá transcripción desde PM, pero si se une CI a OR3, entonces ese promotor tampoco podrá ser usado para la síntesis.

Proteína Cro

Pesa 9 KDa y tiene unos 60 AA. Se trata de un dímero, pero con solo un dominio. Tiene más afinidad por el sitio 3, tanto de OR como de OL, unas 10 veces más que por los otros dos sitios. Se une a 1 y 2 sin cooperatividad. Si cro solo está en 3, se podrá transcribir desde los PR y PL, y se impedirá la transcripción desde PM, con lo que se producirá la lisis y se acabará la lisogenia. Si cro está en 1, 2 y 3, entonces no habrá síntesis desde ningún promotor.

Con la radiación ultravioleta, se activarán los genes SOS, debido a la activación de RecA, que inactivará Lex A. Rec A también rompe los conectores de CI, induciendo la lisis. El dominio de unión al DNA en muchas proteínas está formado por hélices α , que en algunos casos pueden ser las que contacten directamente con el DNA. En CI tenemos 5 hélices. La 3 es la encargada de unirse al DNA, mientras que la 2 es la que posiciona la 3 correctamente, y las demás no intervienen. La unión es por puentes de H entre AA y nucleótidos. Se formarán 3 contactos entre la proteína y el DNA: Glu – A; Ser – G y Ala – G. Este es el caso de OR1, donde los dos primeros son más frecuentes. En OR3 solo se establecerán 2 puentes de hidrógeno, debido a una menor afinidad.

La proteína Cro se une al DNA de manera similar. Establece 4 uniones con OR3: Glu – A; Ser – G; Asn – A y Lys – G. Las uniones más frecuentes son también las dos primeras. En OR1 solo podrá establecer 2 puentes de H.

Lisis o lisogenia

A continuación veremos un resumen de la entrada en lisis o lisogenia, en función de los factores que se unan al DNA.

- Cro se une al promotor de CI y ésta no se puede sintetizar: lisis.
- CII y CIII presentes y activos: lisogenia.
- CII y CIII: Si cII no es activa o no está acompañada de CIII, lisis. Si son activos se realizará la síntesis de CI a partir del promotor de establecimiento.
- Si la bacteria vive en un medio rico, la bacteria tendrá proteasas activas y fuertes, con lo que se degradará CII y se entrará en lisis, lo que beneficiará al virus. Si el medio es pobre, entrará en fase de lisogenia.
- Si la bacteria es mutante en los genes de las proteasas, no inactivarán CII y habrá una alta frecuencia de lisogenia.

Integración del DNA y escisión

Para la integración del DNA, el virus necesitará la proteína Int. Para la escisión harán falta la proteína Int y la Xis. Existen 2 mecanismos de control. Por un lado a nivel de la presencia o no de CII y por otro a nivel de degradación de DNA.

Si hay CII, el virus entrará en lisogenia, para lo cual deberá haber niveles altos de Int y bajos de Xis. CII se une al DNA a nivel del promotor de Int, activando la transcripción de este gen. El promotor de int está en xis.

Establecimiento de la lisogenia

Necesitará altos índices de Int, cuyo promotor está en xis. CII actuará como activador, pero también puede haber síntesis a partir del promotor PL. Será necesario, no obstante, CII para que se transcriba desde el promotor de int, lo que impedirá la transcripción de xis, con lo que entraremos en lisogenia. Existirá, además, transcripción de xis desde PL, pero los niveles de Int serán más altos que los de Xis, por lo que se realizará la fase lisogénica.

El promotor de Int tiene un terminador que finaliza la síntesis justo después de int, pero en el caso de PL, no se acaba en ese punto, sino que se transcribirá xis, ya que estará presente la proteína N, que se unirá a la polimerasa en la caja nut. Si se comienza a nivel del promotor de Pint, no se pasará por la caja nut y no se sobrepasará el terminador.

Lisis

Si hay mucha Xis y poca Int, se entrará en fase de lisis. Esto podrá estar ocasionado por niveles bajos de CII, con lo que la transcripción desde Pint será baja y la mayor parte de la transcripción se hará a partir del PL. En este caso deberíamos tener igual cantidad de Xis que de Int. Pero después de transcribir int, existe la secuencia sib, que también se transcribe. Esta secuencia formará un bucle que atraerá la RNAasa III, con lo que se degradará. Se degradará también en parte int, pero el daño al RNA no llegará a xis, con lo que se podrá transcribir la proteína Xis. Este tipo de regulación se llama retroregulación. No se trata de regulación a nivel de transcripción, sino que afecta a la estabilidad del transcrito.

Inducción

Para volver al ciclo vírico harán falta Xis e Int. Entre Int y Sib está la zona de recombinación entre el fago y la bacteria, para la zona attB. Sib quedará por lo tanto al lado contrario de Xis e Int, por lo que el RNA no se degradará como se ha descrito antes.

En el caso de este fago λ , se produce una modificación de la polimerasa por acción de las proteínas antiterminadoras, para poder pasar a transcribir otros genes. En el caso del fago Sp01, de *B.subtilis*, se produce una modificación de la polimerasa a nivel de la incorporación de una nueva σ , que reconocerá otros genes. Este es el caso también del fago T4. En el caso de los fagos T3 y T7, se produce una nueva RNA polimerasa, producto de los genes tempranos, de manera que se reconocerán los promotores del DNA, de los siguientes bloques de genes.

Transcripción en eucariotas

El DNA está a partir de ahora distribuido en diversos cromosomas. No habrá operones, por lo que no habrá RNA policistrónico, excepto en el caso de los RNA ribosómicos. Entre los diferentes genes encontraremos fragmentos de DNA no codificador. El DNA codificador solo es el 3% del total. En genomas más complejos encontraremos más genes y diferentes combinaciones de genes. Por otro lado, en eucariotas podemos encontrar ya genes con intrones. En *Saccharomyces* solo hay algunos genes con intrones, mientras que en *Drosophila*, hay algunos genes todavía no tienen intrones. En humanos se cree que solo los genes de las histonas no tienen intrones. Además, la membrana nuclear separa la transcripción y la traducción en el espacio y el tiempo. Podemos encontrar 3 RNA polimerasas nucleares, a las que hay que añadir las que podemos encontrar en cloroplastos y mitocondrias.

RNA polimerasas nucleares

Existen tres RNA polimerasas: I, II y III. La polimerasa I no es sensible a la α amanitina, mientras que la II sí lo es y en el caso de la polimerasa III dependerá de la especie. La polimerasa I está en el nucleolo y la II y la III en el nucleoplasma. La polimerasa I transcribe los genes de tipo I, que son los ribosómicos, con excepción de uno. Los genes transcritos por la II son los genes de tipo II, que comprenden los que traducidos darán lugar a las proteínas, y los RNA pequeños. Los genes de tipo III, transcritos por la polimerasa III son los RNAt.

Son enzimas grandes, con muchas subunidades, de más de 500 KDa de peso. Constan de 2 subunidades grandes, 2 medianas y muchas pequeñas. Las polimerasas bacterianas son $(\alpha_2\beta\beta')$ σ . β y β' de eucariotas son homologas entre ellas y con las bacterianas. Son las unidades encargadas de componer el centro catalítico del enzima. Las 2 α son también homólogas con las bacterianas. Mantienen la unión del enzima. Las unidades pequeñas son más variables.

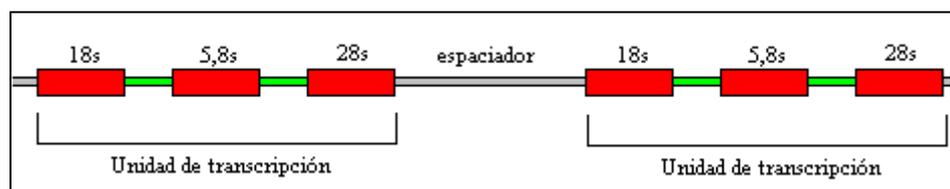
En la polimerasa II encontramos unas 10 subunidades. La grande, similar a β' , tienen un dominio C terminal, el CTD, que consta de secuencias de 7 aminoácidos repetidas una serie de veces, dependiendo del organismo. Se puede repetir desde 17 hasta 50 veces, en mamíferos. Parece ser que si eliminamos la mitad de las repeticiones de estas secuencias, la polimerasa deja de funcionar. Es posible que se una al DNA, pero sobre todo se cree que interacciona con otros factores de transcripción y su función se podrá modificar por fosforilación.

Los enzimas nucleares son muy diferentes a los de mitocondrias o cloroplastos, pero estos últimos suelen estar codificados por genes nucleares. En cloroplastos encontramos enzimas grandes, similares a los de las bacterias, codificados pese a todo en el núcleo en su mayor parte y alguno en el propio cloroplasto. La polimerasa de las mitocondrias es más pequeña, con una sola subunidad. Pesa unos 70 KDa y tiene solo una subunidad.

TIPOS DE GENES

Genes de clase I

Codifican el rRNA 28s, 18s y el 5,8s, pero **nunca** el 5s. Debido a las necesidades de la célula de un elevado número de ribosomas, los genes que codifican para todos estos componentes de los ribosomas están repetidos varias veces, estando agrupados los 3 en unidades de transcripción. Estas unidades de transcripción se repiten entre 40 y 50 veces en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos.



En ocasiones a este DNA se le ha llamado rDNA. Estos genes están agrupados en los nucleolos. Es totalmente lógico pensar que los genes deben estar agrupados, facilitando así su coordinación, pero en ese caso la pregunta obvia es porque el 5s está en otra parte del núcleo, codificado incluso por otra polimerasa.

Las diferentes unidades de transcripción están separadas por lo que se conoce actualmente como IGS, Inter Gene Spacing. Antes se le llamaba NTS, Non Transcrival Sequence. La unidad de transcripción puede medir de 8 a 14 Kb, dependiendo del organismo. El IGS puede llegar hasta las 30 Kb. Dentro de una misma especie se mantiene estable.

Dentro de una unidad de transcripción también hay secuencias de espaciado entre los genes, que se conocen como ETS y ITS. La unidad de transcripción da lugar a un único transcrito de 45 s, que deberá pasar por una serie de modificaciones para dar lugar al rRNA, pasando por lo tanto por un proceso de maduración.

Se incorporarán una serie de grupos metilo y se cortará el RNA. Se desconoce si la metilación es un proceso cotranscripcional o bien si es posterior. Los cortes se producirán en 5' del 18s y en 5' del 5,8s. Quedará por lo tanto una unidad de 20s que por un proceso de maduración pasará a ser de 18s y otra unidad que contendrá el 28s y el 5,8s. Estos dos fragmentos se unirán por complementariedad y se cortará la cadena que los une. Es posible que todavía falte algún tipo de degradación de los extremos de este fragmento para llegar a la situación definitiva, pero se desconoce. Se desconocen también los enzimas que intervienen en el proceso.

Promotores de los genes de clase I

Serán promotores reconocidos por la RNA polimerasa I. Se trata de secuencias consenso muy caracterizadas en humanos. Existen 2 regiones involucradas en el proceso de transcripción:

- core promoter. Va de -45 a -20. Es una secuencia rica en G y C.
- Elemento de control upstream (UCE), situado hacia 5'

Si solo está el core promoter, se podrá realizar la síntesis, pero si está presente el UCE, la síntesis será mejor. La composición de bases del UCE es similar a la del core promoter.

Para poder funcionar, la polimerasa requerirá una serie de factores:

- UBF1: se une a la región del core y a UBF1, que también se une al UCE. Normalmente actúa como un dímero
- SL1: Este factor está formado a partir de 4 monómeros. Requiere a UBF1 para funcionar. Una de las unidades que lo componen es TBP. TBP interviene junto con las otras polimerasas en los procesos de transcripción. La polimerasa contacta con SL1 a través de TBP. Actúa como un posicionador de la polimerasa, permitiendo el correcto posicionamiento de esta antes de iniciar la transcripción.

Estructura de la IGS

Se trata de una estructura que depende de la especie, pero cuya estructura es bastante general. Dentro de la IGS está el promotor, main promoter, con la estructura ya descrita. Secuencias similares a esta pueden estar repartidas por toda la IGS, siendo los promotores de la IGS. Se van sintetizando gracias a esto pequeñas cadenas de RNA que se irán acumulando, permitiendo así una mejor síntesis del rRNA cuando llegue el momento.

El RNA finaliza antes de entrar en el IGS, porque justo en la entrada hay unas secuencias terminadoras, ocho. Se trata de un bloque de 17 / 18 pb, repetidos 8 veces. Estas repeticiones pueden ser reconocidas por algún factor que permitirá el fin de la transcripción. Este es el ejemplo descrito, pero puede estar sujeto a variaciones según la especie. La función de los promotores de las IGS no acaba de estar clara. En *Xenopus* no existen las secuencias de terminación, sino que hay una región que permite la liberación de la polimerasa, aunque parece ser que es posible que solo se libere el RNA. Antes del promotor principal habría una terminación.

Genes de clase II

Serán transcritos por la polimerasa de tipo II. Son genes que darán lugar a mRNA y por tanto proteínas, o bien genes que darán lugar a los smRNA, que formarán los uRNAs, que forman parte de las smRNP, ribonucleoproteínas pequeñas, con excepción del U6. Después de ser transcritos pasarán por procesos de maduración para dar lugar al producto final. Todos sufrirán modificaciones en el extremo 5'. En los mRNA se producirá un capping con la metilguanosa, mientras que en las uRNAs el capping se dará con la 2,2,7 trimetilguanosa. La cola de poliA en el extremo 3' se añadirá solo en los mRNA, que además pasará por un proceso de eliminación de intrones, el splicing. Los uRNA no pasarán por ninguno de los dos procesos. El capping en 5' se da siempre, no así los otros dos procesos.

Promotores de los genes de clase II

La RNA polimerasa II no puede iniciar la transcripción ella sola. Necesita factores de transcripción. El conjunto conformará lo que se ha llamado aparato de transcripción. Dentro del promotor habrá una serie de zonas más conservadas que otras.

Promotor genérico

Veremos ahora lo mínimo que se necesita para iniciar la transcripción. Los factores que necesita la polimerasa para iniciar la transcripción son los factores basales o iniciales, conocidos como TFI, TFII, ..., de transcription factor. Un promotor genérico funcionará a una frecuencia más baja que otros promotores. Se necesitarán otras secuencias, reconocidas por otros factores para alcanzar una tasa de transcripción más eficaz.

Algunas posibilidades de promotores son $\text{Pyr}_2\text{CAPyr}_5$, o bien PyrCAPyr_2 . Estas son dos secuencias iniciadoras, donde Pyr quiere decir pirimidina y Pur, purina. Esta es la forma más simple que puede ser reconocida por la RNA polimerasa. En muchos casos encontraremos también la TATA box, situada en -25. Es el único elemento regulador que tiene una posición fija. Se trata de una secuencia consenso, bastante estable. Es similar a la Pribnow box, determinando donde empieza la transcripción. Se han localizado una serie de genes que parece ser que carecen de la caja TATA. Cada día se conocen más de estos genes. Se les conoce como genes "House Keeping". Estos genes se expresan en todas las células y entre ellos podemos encontrar algunos componentes del ciclo de Krebs.

La iniciación de la transcripción requerirá la correcta asociación de los factores de transcripción, en un orden determinado. El primer factor que se unirá será TFIID, compuesto por:

- TBP: TATA binding protein. Se une a la caja TATA. Se trata de una proteína pequeña, que desempeña un papel posicionador.
- TAFs: TBP additional factors.

El siguiente factor que se unirá será TFIIF, al que seguirá el TFIIB. A continuación vendrá TFIIF, compuesto por 2 subunidades, la grande, que parece ser que es la que posee actividad helicasa, ya que parece ser que se romperá la cadena para poder iniciar la transcripción; y la pequeña que se une a la RNA polimerasa II. Llegados a este punto es cuando la polimerasa establece el contacto TFIID interaccionará con el dominio C terminal de la polimerasa II, a la vez que parece ser que TFIIB también contacta.

Hasta este punto, se ha estado preparando para transcribir, pero todavía hacen falta más factores para iniciar la transcripción. Se unirán todavía TFIIE y TFIIIS, y por último TFIIH, que parece presentar 3 funciones diferentes: helicasa, quinasa, fosforilando el dominio CTD de la polimerasa, y parece estar involucrado en la reparación.

Al fosforilar TFIIH el dominio CTD, se desprenderán la mayoría de los factores, y solo quedará unido el TFIIH, momento en que la polimerasa empieza a transcribir. El TFIIIS es un gen que evita la terminación prematura, es un factor de elongación.

En los genes sin caja TATA se requieren los mismos factores que los vistos hasta ahora, incluso TFIID. Existen teorías que afirman que TFIID puede reconocer el inicio de la transcripción, mientras que otras teorías afirman que hay algún factor que reconoce el inicio y es, a su vez, reconocido por TFIID.

Genes de clase III

Son reconocidos por la polimerasa III. Sus productos son muy heterogéneos, como tRNAs, rRNA 5s, smRNA como U6, o AluRNA. Podemos diferenciarlos según su procesamiento. Todos los RNA con excepción de los tRNAs no tienen procesamiento. El gen del rRNA 5s se sintetiza a partir de genes repetidos. Todos tienen estructuras muy conservadas.

tRNAs

Constituye el 15% del RNA total de las células eucariotas. Constan de entre 70 y 80 nucleótidos, pero deberán pasar por un procesamiento, donde podrán perder algunos nucleótidos de los extremos y donde se le añadirá en el extremo 3' el CCA, donde se unirá el AA. Un elevado porcentaje de bases de estos RNAs son bases modificadas. En muchos casos existe un intrón central en el RNA.

Promotores de los genes de clase III

Existen 2 tipos de promotores en estos genes, los promotores internos y los promotores no internos. Encontramos promotores internos en los tRNA y en el rRNA 5s. Los promotores no internos se dan en el resto de los genes de esta clase. Se descubrieron cuando se observó que se podía eliminar toda la parte anterior a +1 en un gen, sin que la transcripción de este se viese afectada.

Los genes que tienen promotores no internos tienen promotores similares a los de la clase II, tienen incluso caja TATA. Hacen falta los TFIIA, TFIIB, y TFIIC para transcribir el 5s, mientras que solo C para los de transferencia. De nuevo, TFIIB está formado por TBP y otros factores. En el caso del rRNA 5s se une en primer lugar TFIIA, después TFIIC y finalmente TFIIB, al que se unirá la polimerasa. Parece ser que al unirse la polimerasa e iniciarse la transcripción, se desprenderán los factores, con excepción de TFIIB. La proteína TFIIA es una proteína con dominio de unión al DNA por dedos de Zn. En el caso de la transcripción de los tRNA no es necesario el factor TFIIA, sino que solo TFIIC y TFIIB podrán transcribir ya. Parece ser que la polimerasa se detendrá al llegar a una determinada región, rica en TA, entre zonas de GC.

PROCESOS DE MADURACIÓN

El resultado de la acción de la RNA polimerasa II es un RNA heterogéneo, o transcrito primario. Este transcrito deberá pasar por un proceso de maduración antes de ser el producto definitivo.

Capping

El RNA maduro eucariota necesita un capping en el extremo 5'. Consiste en la adición del 7 metilguanilato en el extremo 5' de la cadena, impidiendo así que haya extremos 5' libres en la cadena. Actúan una serie de enzimas, como la guanil transferasa, que añade el guanilato; la guanil – 7 – metil transferasa, que metila el guanilato en la posición 7; y por último, la 2' – O – metil transferasa, que es capaz de metila grupos en posición 2' O.

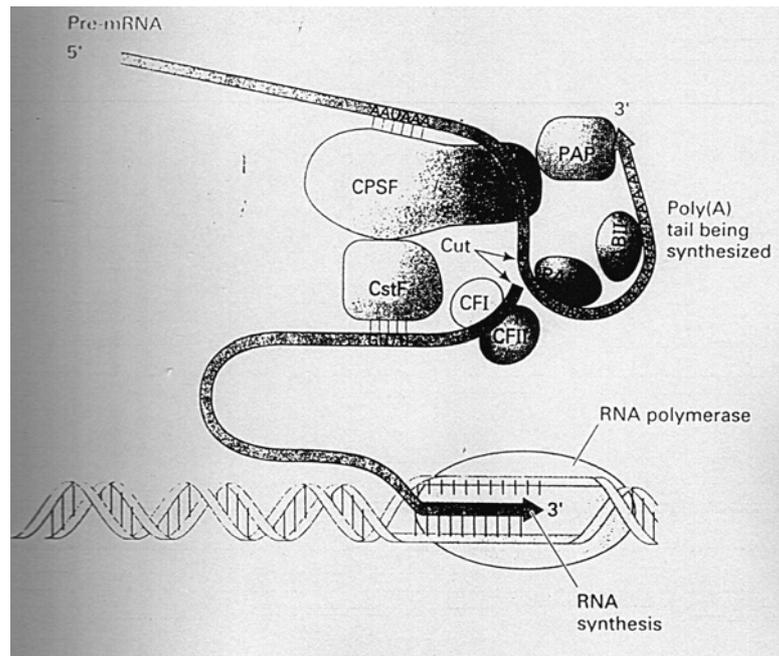
El capping es necesario para iniciar la traducción, ya que sin capping, no se podrá traducir. Se cree que el capping puede influir en el transporte del RNA y que además le puede proteger contra una posible degradación.

Poli A

LA mayoría del RNA eucariota tienen una cola de 20 a 200 As, que no están codificadas por la secuencia de DNA, sino que se añaden después.

Para que se produzca la adición de A es necesaria la presencia de una secuencia concreta, que es la señal AATAAA, en el DNA. Está situado entre 10 y 30 pb de distancia de CA, donde se producirá el corte. Se ha visto que existen zonas de GTGT a 10 – 30 pb en dirección de CA, en dirección 3'. Hacen falta una serie de factores para que se produzca la adición de poli A.

- CFI y CFII (Cleavage factor): son los factores que tienen actividad endonucleasa y permiten cortar el RNA.
- CPSF (Cleavage poly adenilation stimulating factor): reconocerá la secuencia AAUAAA.
- CstF: Se une a la región rica en GU.
- Poli A polimerasa: sintetia la cola de poli A.
- PAB (poly A binding protein): provoca que se de la adición de A a la secuencia de RNA.



Si mutase la secuencia AATAAA, no se produciría la cola de poli A, a la vez que tampoco se podría producir una correcta terminación de la transcripción. No se producirá una correcta terminación si la polimerasa no pasa por la señal de poli A. Es posible que sea debido a algún factor antiterminador, unido a la polimerasa, que al pasar por esta señal se libera. Es posible también que la polimerasa no tenga antiterminador, sino que funcione sin él, lo que provocaría que una parte de los transcritos que se sintetizasen fuesen incompletos. Se cree posible que el factor antiterminador pueda ser el TFIIS.

Terminación de la transcripción

La transcripción va más allá del punto donde se añadirá la secuencia de poli A en el RNA. No está claro si existe señales de terminación. En algunos genes parece ser que sí hay zonas de terminación, pero en otros parece ser que no. Por lo visto, son zonas ricas en T, lo que podría provocar el final de la transcripción.

Mecanismos de splicing

Podríamos distinguir 3 tipos de splicing, a grandes rasgos:

- Reconocimiento de secuencias consenso al inicio y final de cada intrón, donde limita con los exones.
- Autosplicing. Es un proceso por el cual el RNA elimina por sí mismo una secuencia intrónica. Se da en muy pocos genes, como en algunos de los grupos I y II.
- Reconocimiento de una conformación característica. Se da en el proceso de maduración de los tRNA que poseen intrones.

Precursores del tRNA

Algunos de los genes que codifican los tRNA tienen intrones, entre un 10 y un 20% del total de genes. Estos intrones son relativamente cortos. En levaduras hay un intrón en el extremo 3'. No existen secuencias consenso en los extremos del intrón. Cuando hay un intrón, se produce normalmente un alargamiento del brazo del anticodón.

Lo primero que se hace es eliminar el intrón, mediante una ribonucleasa, con lo que queda un grupo fosfato unido a un extremo 3' del exon upstream y un grupo OH unido al extremo 5' del exon downstream. Estos extremos se unen por la complementariedad de bases típica y son unidos por una RNA ligasa.

Eliminación de los intrones del mRNA

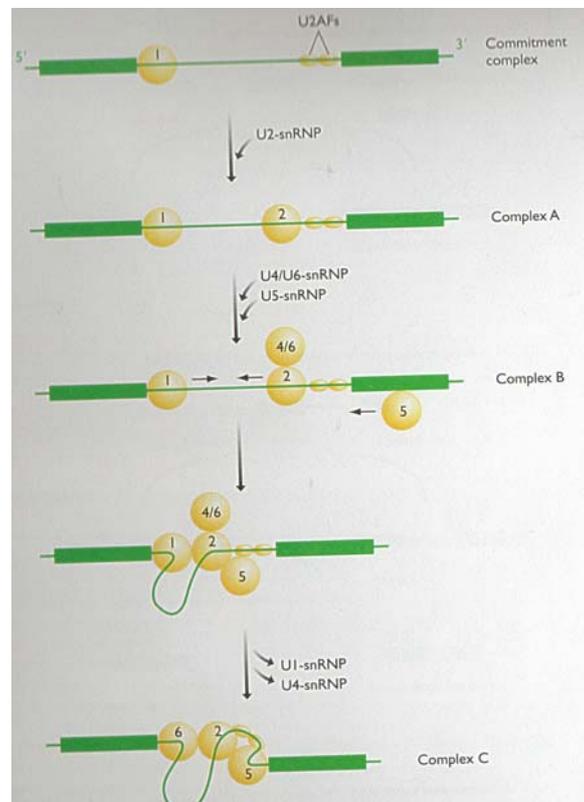
La mayoría de los mRNA tienen intrones, normalmente varios y de diferentes tamaño. Hemos de preguntarnos si, cuando existen varios intrones en un gen, se eliminarán siempre en el mismo orden. Esto se ha estudiado con Northernblots. Se ha observado que hay un orden preferente de eliminación de intrones, tal y como se ve en la tabla. No se eliminan en orden secuencial 5' – 3', sino que sigue otro orden. Parece ser que el hecho de eliminar un intrón favorece la eliminación de otros. Para localizar los intrones emplearemos la comparación del DNA genómico con el cDNA.

Número de intrones eliminados	Frecuencia de pérdida de los intrones individuales						
	A	B	C	D	E	F	G
1	5	0	0	0	30	60	5
2	20	20	0	2	60	60	25
3	5	5	5	30	100	95	60
4	10	25	35	95	90	90	55
5	40	75	65	85	100	75	60
6	55	100	80	90	100	100	80

No existen grandes regiones de homología en las zonas de conexión intrón – exón, sino que se trata de pequeñas secuencias consenso. Siempre existe la misma secuencia al empezar y acabar el intrón, GT – intrón – AG. Obviamente hay excepciones, ya que hay genes que pueden tener secuencias que pueden ser AT – intrón – AG. En eucariotas superiores también habrá regiones ricas en pirimidinas antes de AG en el extremo 3' del intrón.

Un mRNA puede pasar correctamente por el proceso de splicing en cualquier célula, una excepción serían lo que se conoce por splicing alternativo, como ya veremos más adelante. Existen enfermedades que pueden estar ocasionadas por mutaciones en el proceso de splicing. Además, existen lugares de splicing crípticos, que no utilizarán en condiciones habituales, pero que sí se emplearán en caso de que le ocurra algo al lugar de splicing habitual.

La liberación del lugar de splicing 5' se produce por una transesterificación provocada por el grupo hidroxilo unido al carbono 2' de un nucleótido de Adenosina, de una secuencia conservada que es 5'-UACUAAC-3'. El resultado de esta reacción es la rotura del enlace fosfodiéster que une el primer nucleótido del intrón, acompañado por la formación de un nuevo enlace fosfodiéster de este primer nucleótido con la adenosina del centro del intrón, del centro de ramificación, mediante una unión 5' – 2'. El intrón tiene ahora una estructura en forma de loop que se conoce como lariat. La rotura del lugar 3' de splicing y la unión de los exones es el resultado de una nueva transesterificación, provocada por el grupo OH unido a la parte upstream del exon. Este grupo ataca la unión fosfodiéster en el lugar 3' de splicing, provocando la liberación del intrón en forma de lariat, que será linearizado y degradado. Al mismo tiempo, los extremos de los exones se unirán.



Las secuencias de splicing son reconocidas por las smRNPs, small ribonucleoproteins, formadas a partir de smRNAs y unas diez proteínas. En el proceso de splicing hacen falta smRNPs, como U₁, U₂ y U₅, además de U₄/U₆. Junto a esto harán falta algunos factores de splicing más.

Se observó que la smRNP U₁ tiene en su extremo 5' 14 nucleótidos no aparejados, que son bastante complementarios a los del lugar 5' de splicing, de manera que por complementariedad se unirán. U₂ tienen complementariedad con el punto de ramificación. U₃ se une al extremo 3' de splicing,

pero no por complementariedad, sino por interacciones de proteínas. Todo esto se une sobre el precursor, formando lo que se conoce como spliceosoma.

En primer lugar se une U_1 al lugar 3' de splicing, para que después se unan los factores que se conocen como U_2AF , que son factores auxiliares que se unirán a la tira de pirimidinas, de manera que permitirán la unión de U_2 . U_2 se une por complementariedad al punto de ramificación, formando el total lo que se conoce como complejo A. Se unen también las proteínas SR, ricas en serinas y argininas. El papel de estas proteínas es el de evitar que al hacer splicing se salten intrones en lo que se conoce como Intron skipping. Estas proteínas unen U_1 con U_2AF , lo que provoca una curvatura en el RNA. Después llega el complejo U_4/U_6 , que se une a U_2 . U_5 se une al exón situado downstream. Este es el momento cuando se establece contacto entre U_1 y U_2 . El proceso de splicing se inicia al liberarse U_1 y U_4 . U_6 se unirá donde se unía U_1 . La proximidad de U_2 y U_6 dispara las reacciones de transesterificación, con lo que se liberará el intrón.

Autosplicing

Este tipo de splicing se da en algunos orgánulos. Se formarán estructuras características, que permitirán que se produzca el splicing. En el caso de los intrones de tipo II, el proceso de splicing es similar al descrito anteriormente, ya que se produce una reacción de un grupo OH con una A, mientras que en los de tipo I, el grupo OH reacciona con una G externa del RNA.

Estos tipos de RNA tienen la capacidad de realizar splicing in vitro, por sí mismos, aunque in vivo puede intervenir alguna proteína en el proceso. Se han de formar unas estructuras específicas, mediante las cuales se darán los cortes en el RNA, ya que las estructuras formarán centros catalíticos. En los intrones de tipo II se formarán estructuras similares a las descritas anteriormente, formándose incluso el lariat. Los centros catalíticos que se formarán serán también similares a los anteriores.

El splicing ha ido evolucionando desde una fase inicial autocatalítica, con capacidad de splicing promovida por el propio RNA hasta el caso de los mRNA, donde el RNA ha perdido la capacidad de formar las estructuras que forman los centros catalíticos, sino que requieren la formación del spliceosoma. Estos intrones con capacidad autocatalítica, de tipo I o II son muy escasos, están solo en los orgánulos.

Splicing alternativo

No se ha de confundir el splicing alternativo con la maduración diferencial. La mayoría de los genes de clase II se transcriben dando lugar a un mRNA precursor que madurará para dar lugar a un mRNA maduro. Pero se ha visto que en ocasiones un mismo gen puede dar diferentes mRNA. Puede haber diferencias en los extremos 3' o 5', pero incluso puede haber diferentes tipos de splicing. Si se utilizan diferentes tipos de splicing hablaremos de splicing alternativo. Si se trata de diferentes modificaciones en los extremos 3' o 5', se tratará de maduración diferencial.

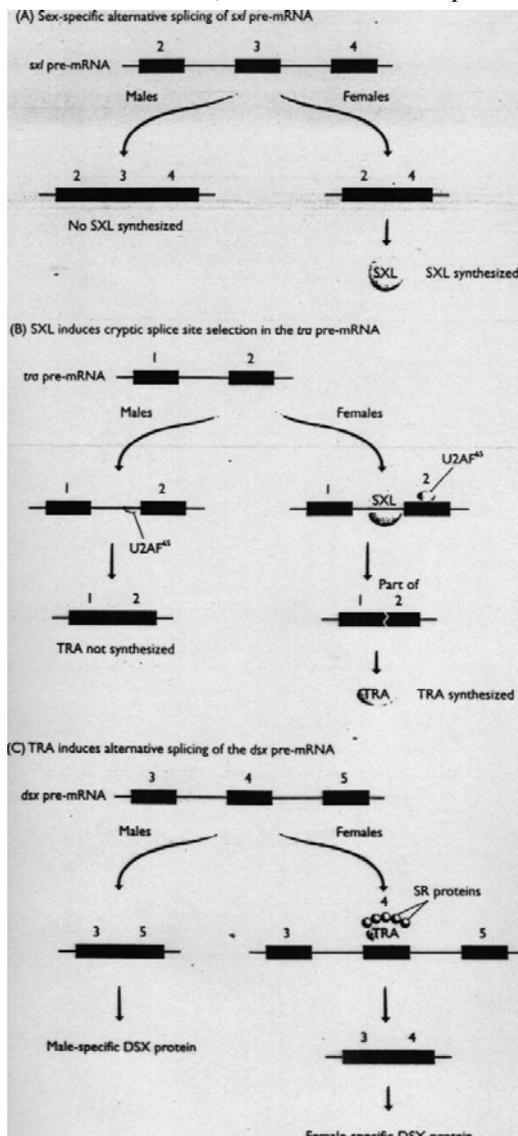
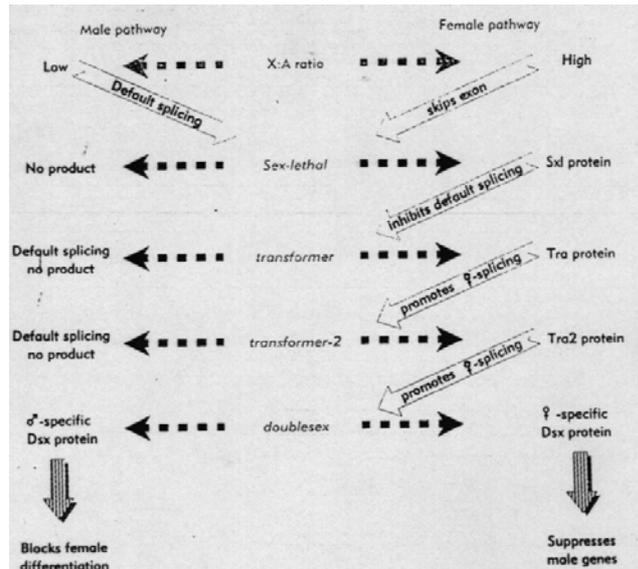
Estos patrones de splicing se da solo en función de una expresión diferencial del gen, pero también es posible que los diferentes productos de un gen se expresen en una misma célula, al mismo tiempo, pero en diferente proporción.

A nivel de splicing, puede ser posible que uno de los dos lugares de splicing sea fijo, mientras que el otro puede ir variando. En algunos casos puede ser que al variar el splicing se modifique la secuencia de aminoácidos, provocando la aparición o no de un codón de stop, con lo que se modificaría el tamaño de la proteína.

Se conocen muchos casos de genes con splicing alternativos, como el caso en SV40, con los diferentes antígenos T y t, donde dependiendo del splicing se pasará o no por un determinado codón de stop, de manera que la proteína será más o menos larga. Hay una parte que puede actuar como intrón o como exón. El RNA de t será más largo, pero será la proteína T la que tenga más aminoácidos, ya que en t hay un codón de stop. Este tipo de splicing tienen lugar en todas las células, variando la proporción de T y t. En células con alta proporción en t, de manera que se usaban los sitios de splicing más cercanos, se identificó un factor, el SF2, que se observó que favorecía la utilización de sitios de splicing más cercanos. La proteína del adenovirus E1A también pasa por procesos de splicing alternativo para dar lugar a tres proteínas diferentes.

Determinación del sexo en *Drosophila*

Implica la interacción de una serie de genes. Cada uno de estos genes tendrá un splicing diferencial, cuyo producto influirá sobre el siguiente gen de la cascada génica, determinado así el sexo. Todo depende de la relación entre cromosomas sexuales y autosomas. El primer gen que se ve influido por este proceso es el gen sex – lethal, que posee 7 exones, pero en el 3 hay un codón de stop. En hembras se provoca un splicing alternativo que provoca que se elimine ese exón de la proteína final. Por lo tanto, en machos no hay proteína funcional, pero en hembras sí será funcional y influirá en el siguiente splicing. El siguiente gen del proceso es el transformer, donde podemos encontrar 4 exones, con un codón de stop en el segundo. Debido a la proteína Sxl, producida por el gen sex – lethal, se inhibe el splicing normal y se activa un splicing alternativo, en un lugar críptico, que eliminará el codón de stop. En hembras habrá una proteína resultante de este proceso, mientras que en machos la proteína no será funcional. El producto, Tra, influirá sobre el gen siguiente, el transformer 2, donde pasará aproximadamente como en el caso anterior. Estos 2 último productos influirá en la expresión del último gen, que es el doublesex, que posee 6 exones, con un codón stop en el cuarto. El Tra y el Tra2 son factores de splicing que provocan que el splicing en hembras se haga de manera normal, de manera que se pasará por el codón de stop del cuarto exón. En machos se eliminará el exón con el codón stop, con lo que la proteína será más larga. La proteína Dsx de las hembras elimina la expresión de los genes de los machos, mientras que las proteínas Dsx de los machos bloquean los genes de las hembras.



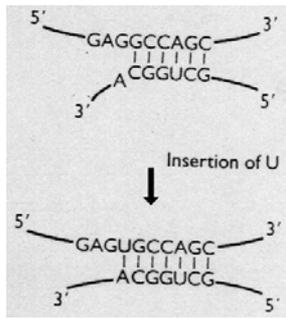
sex – lethal, se inhibe el splicing normal y se activa un splicing alternativo, en un lugar críptico, que eliminará el codón de stop. En hembras habrá una proteína resultante de este proceso, mientras que en machos la proteína no será funcional. El producto, Tra, influirá sobre el gen siguiente, el transformer 2, donde pasará aproximadamente como en el caso anterior. Estos 2 último productos influirá en la expresión del último gen, que es el doublesex, que posee 6 exones, con un codón stop en el cuarto. El Tra y el Tra2 son factores de splicing que provocan que el splicing en hembras se haga de manera normal, de manera que se pasará por el codón de stop del cuarto exón. En machos se eliminará el exón con el codón stop, con lo que la proteína será más larga. La proteína Dsx de las hembras elimina la expresión de los genes de los machos, mientras que las proteínas Dsx de los machos bloquean los genes de las hembras.

La proteína Sxl impide que U2AF se una en el punto normal del intrón por lo que lo hace en el interior del exón, con lo que se provoca el splicing alternativo. Las proteínas Tra y Tra2 interaccionan con las proteínas SR. Sin estas proteínas se da un splicing que elimina el exón 4. En presencia de estas proteínas SR, el exón no es eliminado. El lugar donde se unen las proteínas Tra se conoce como splicing enhancer.

RNA – editing

La información contenida cambia a nivel del RNA. Es una forma muy rara de procesamiento transcripcional. Provoca un cambio en la información. Se sustituyen, añaden o eliminan nucleótidos. Las sustituciones se pueden dar en algunos genes de mamíferos, mientras que las adiciones o eliminaciones se suelen dar en genes de las mitocondrias de algunos protozoos.

Se han descrito 4 tipos de RNA editing en mamíferos. El gen de la apolipoproteína B es uno de estos casos. En el hígado se da un producto de 4536 AA, mientras que en el intestino es de 2152 AA. Se sustituye un codón CAA, de ácido glutámico, por otro de stop, lo que determina que la proteína sea más corta. Este cambio está producido por una desaminasa. En mamíferos casi todos los tipos de RNA editing son sustituciones y sus responsables son las desaminasas. Parece ser que en el caso de la apolipoproteína B se produce una estructura secundaria, pero no se ha observado en otros casos.



En protozoos suele haber más complejidad. Se suele tratar de inserciones o extensiones, generalmente de U. Estas inserciones se realizan con lo que se conoce como RNA guía, complementario en parte al mRNA, provocando que se inserten nuevas U, ya que en la guía hay algunas A desaparejadas.

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Un ejemplo de la regulación de la transcripción se da con los genes gal de las levaduras. Encontramos 4 genes principales involucrados en el proceso.

- gal 2 Permeasa, permite el paso de la galactosa al interior celular
- gal 1 Kinasa; galactosa → galactosa 1P
- gal 7 Transferasa; galactosa 1P → glucosa 1P
- gal 10 Epimerasa; UDP Gal → UDFG

Gal 1, 7 y 10 están en el cromosoma 2, mientras que gal 2 está en el cromosoma 12. Se trata de genes que en ausencia de galactosa están inactivos, pero que al detectar la presencia de galactosa incrementarán su síntesis unas 1000 veces. El inductor dependerá de la galactosa.

- gal 4 Proteína activadora
- gal 80 Proteína represora

Gal 80 se une a gal 4 e impide su función, por lo que la activación de gal 4 está bloqueada por gal 80. Gal 4 está situado en el cromosoma 16, mientras que gal 80 está en el 12. Si gal 80 está unida a gal 4 no se activarán los demás genes gal.

Existen unas secuencias, que son las reconocidas por Gal 4, que son las secuencias UAS gal. UAS significa Upstream Activator Sequence. Tiene unos 17 pares de bases y simetría axial. Estas secuencias pueden estar repetidas antes de cada gen.

Gal 4 pesa unos 100KDa y actúa como un dímero. Se une a UASgal. Tiene 4 dominios importantes

Unión a DNA por dedos de Zn

Va del Aminoácido 1 al 65. Se une al DNA mediante este dominio.

Activación de la transcripción

Comprende el espacio entre los aminoácidos 148 y 196 y del 768 al 881. Se trata de una región rica en aminoácidos básicos, de manera que se activará la síntesis de manera más efectiva cuantos más aminoácidos básicos haya.

Punto de dimerización

Va del aminoácido 65 al 94. Permite la dimerización de la proteína.

Punto de unión a Gal 80

Comprende los aminoácidos desde el 851 al 881. Si se une Gal 80 no se podrá utilizar el dominio activador, porque están solapados. Mediante la unión a este dominio Gal 80 inhibe la función de activación de transcripción de Gal 4.

Si está presente el inductor, cambiará la conformación de Gal 80, con lo que no se podrá unir a Gal 4, por lo que se activará la transcripción. Este proceso puede verse afectado por la presencia de otros azúcares, como la glucosa, ya que la glucosa da siempre un mayor rendimiento energético, por lo que con varios azúcares en el medio, se preferirá glucosa. Parece ser que la represión por glucosa está mediada por CRP, que se unirá a Gal 4 en la zona de unión al DNA. Se comprobó también que el dominio de unión al DNA era necesario para que se realizase la transcripción, pero que no valía un dominio de unión a DNA cualquiera, sino que era necesario el propio de Gal 4.

Eucariotas superiores

Todas las células de un organismo tienen todos los genes, por lo que ha de haber una regulación en la expresión de estos genes. Dentro de esta regulación distinguimos entre regiones reguladoras y factores de transcripción.

Regiones reguladoras

Promotores

Elementos o secuencias de control, situados en 5', normalmente "Enhancers", que puede estar en 5' o 3', o incluso, lejos del gen

Factores de transcripción

Factores generales o basales

Factores constitutivos

Factores específicos

Regiones reguladoras

Para que haya una correcta expresión del gen, debe haber regiones que controlen esta expresión, que son las secuencias de control o reguladoras. Suelen tener unos 18pb, a la vez que suelen ser también palindrómicas. Suelen actuar también en forma dimérica, en cuyo caso están separadas unos 10 pb, lo que sería equivalente a 1 giro en la hélice de DNA, para que las proteínas que se unan a estas secuencias se mantengan unidas a un mismo lado de la hélice. Puede haber secuencias también de unos 4pb, pero en ese caso se suelen repetir algunas veces. Para estudiar las regiones reguladoras se utilizan técnicas de interacción entre el DNA y las proteínas.

Retraso en gel

Footprinting con DNAasas.

Retraso en gel

Consiste en el hecho de que si se une una proteína al DNA, este avanzará más despacio en el gel. Se hace correr al DNA en un gel, pero permitiendo que vaya libremente al principio. En otro caso se le expone a alguna proteína, de manera que si la proteína se une al DNA, la movilidad bajará. En las regiones que se haya unido esta proteína tendremos posiblemente regiones de control.

Footprinting

Se somete al DNA a un baño proteico, para después someter ese DNA a la acción de las DNAasas. Si queda algún fragmento entero, será debido a que se le había unido alguna proteína, ya que en ese caso la proteína protegerá al DNA.

Se pueden marcar una serie de fragmentos de DNA, y se permite su unión a la proteína, para después someter los fragmentos a DNAasas, de manera que la diferencia entre un fragmento y otro sea una base. Al hacer una electroforesis veremos que no habrá señal en la zona donde está la proteína.

A partir de este punto tenemos las secuencias donde se unen las proteínas, pero no su función, para lo que se pueden emplear análisis de deleciones.

Análisis de deleciones

Partimos de la expresión conocida de una proteína, con todas sus regiones reguladoras. A partir de esa expresión deducimos si se trata de un activador o de un represor en función de si al eliminar ese fragmento la expresión aumenta o disminuye.

Genes reporteros

La expresión de este gen permite estudiar toda la región reguladora sin el problema de que la expresión afecte a la célula. Las características principales de un gen reportero son que el producto que sintetiza sea inocuo para la célula, y que sea de fenotipo fácilmente detectable. Algunos de los genes que se usan son CAT, cloranfenicol acetil transferasa; lacZ, β galactosidasa; y lux, luciferina, que otorga bioluminiscencia.

CAT

CAT es el enzima que cataliza la transferencia del grupo acetil del Ac. CoA al cloranfenicol. Puede formar dos tipos de cloranfenicol, en función de la cantidad de grupos acetil que tenga. Estos distintos tipos de cloranfenicol se podrán distinguir por cromatografía en capa fina, y si se emplea C14 se podrán ver por autorradiografía. Cuanto más CAT haya más acetilación del cloranfenicol se producirá, de manera que podremos diferenciar los dos tipos de cloranfenicol, ya que migrarán de diferente manera. El vector CAT que se emplea ha de contener la región que estamos estudiando, al lado del gen cat, de manera que se exprese este. Si estamos haciendo un análisis por deleciones de la región reguladora, tendremos diferentes tipos de vectores CAT.

Actualmente se emplea la bioluminiscencia, mediante la luciferaza, de manera que depende de la cantidad de luz.

En las fotocopias podemos observar diferentes ejemplos de cómo trabajar con las deleciones. En un primer caso observamos como se va eliminando la parte anterior al inicio de un gen, con lo que se va reduciendo la síntesis. En el segundo caso se van eliminado fragmentos, con lo que el efecto sobre la síntesis dependerá de si se trata de un enhancer o de un silencer. Si se trata de un activador, la expresión bajará, pero si se trata de un silenciador, la síntesis aumentará.

DOMINIOS DE UNIÓN A DNA

Podemos clasificar los factores de transcripción según sus dominios de unión al DNA.

Zn fingers

Consta de 23 AA, y de una región de conexión entre ellos de unos 7 u 8. En el centro de cada una de las estructuras podemos encontrar un átomo de Zn unido a dos AA de Cys y 2 de His. Cada una de estas estructuras se puede repetir una serie de veces, hasta 30. la primera proteína donde se descubrió esto fue en el TFII, que presenta 9 dedos. SP1 presenta 3. Gal 4 es un caso especial, ya que tiene 4 Cys unidas 1 átomo de Zn.

La parte amino terminal de dedo forma una estructura en forma de lámina β , mientras que la parte carboxi terminal forma una hélice α , que es la que se une al DNA. Las proteínas que presentan dedos de Zn es muy probable que sean factores de transcripción.

Hay otro tipo de proteínas, las receptoras de los esteroides, que forman un receptor en forma de dedos. Dos hélices α con 6 Cys, que cuando se unen a 2 Zn forman un dominio de unión al DNA.

Helix – Turn – Helix (HTH)

Fue la primera estructura de unión al DNA que se descubrió. Consta de dos hélices y una vuelta β , de 4 AA, de los que 1 siempre es lisina. Este giro permite orientar la cadena hacia el DNA. Se identificó este dominio en la proteína Cro de λ y en el represor de lac. En eucariotas forma parte del homodímero de proteínas homeóticas. La longitud de este dominio suele ser de unos 20 AA.

Helix – Loop – Helix (HLH)

Se unirá al DNA de forma dimérica. Consta de 30 a 40 AA. Está formado a partir de AA anfipáticos, por lo que podrá formar dímeros. Una vez se ha formado el dímero, unos cuantos aminoácidos básicos contactan con el DNA. Si mutase la región de AA básicos, no se podría dar la unión al DNA, así como si mutase la zona de dimerización, de manera que no se formase el dímero. Este sistema se ha visto en la proteína myo D.

Leucine zipper

Es un sistema bastante abundante, localizado principalmente en procariotas. Forma dímeros, que se unen formando una hélice anfipática. Como antes, la leucina no será la encargada de unirse al DNA, sino que la unión al ácido nucleico será producida a través de AA básicos.

Existe otro tipo, donde la unión al DNA no se produce a partir de una hélice α , sino que se produce a partir de una lámina β , por lo que la unión al DNA se produce mediante un sistema Ribbon – Helix – Helix.

La TBP no contacta de ninguna de estas maneras.

La mayoría de proteínas se unen al DNA en el surco mayor. La mayoría son específicas de secuencias concretas del DNA. Reconocen las secuencias mediante el reconocimiento de las bases, de la secuencia de puentes de H,... Se observó que la secuencia de AA de Gal 4 tenía grupos ricos en AA ácidos, como la Gln o la Pro.

Las interacciones de los dominios activadores pueden ser de dos tipos, indirectas o directas. En el caso de las directas, la proteína se une a la secuencia, y después se establece el contacto con los factores de transcripción basales. Se observó, no obstante, que existían también proteína adaptadoras, que hacían de unión entre el factor de transcripción y la maquinaria basal, lo que se conoce como interacción indirecta. Una de las primeras que se descubrió fue VP16, que tenía un dominio activador fuerte, pero ningún

dominio de unión al DNA. Se han encontrado proteínas de este tipo en muchos organismos. Se conocen como proteínas adaptadoras o coactivadores.

REPRESORES

La regulación no ha de ser necesariamente activando la síntesis, sin oque también se puede dar reprimiendo la expresión de los distintos genes. Se cree que hay 3 tipos de represores:

- Competición por el DNA: Se cree que puede existir competición entre 2 proteínas, una activadora y otra represora, por unirse al DNA, reconociendo una determinada secuencia. Este es el mecanismo más simple. En este caso, el represor tiene afinidad por el DNA.
- “Squelching” o secuestro: El represor se une a una proteína adaptadora, impidiendo así la activación.
- Heterodimerización: El represor se une al activador, impidiendo el funcionamiento de este. Se cree que esa unión es posible porque ambos pueden formar dímeros.

Se puede dar regulación también alterando la estructura de la cromatina.

FACTORES CONSTITUTIVOS

Pueden hacer falta elementos de control para regular la transcripción. Los elementos de control más frecuentes son:

Caja CAAT	Caja GC	Caja Octámero
GGCCAATCT	GGGCGC	ATTGCAT

Estas cajas son reconocidas por factores constitutivos. Puede haber diferentes cajas en una misma zona de regulación y pueden estar repetidas. Se necesita una serie de estos controles para que la regulación funcione bien, pero no hay ninguno imprescindible.

Factores

La caja GC es reconocida por el factor SP1, que está en todo tipo de células. “In vitro” estimula la transcripción de genes con la caja GC. Se une al DNA mediante dedos de Zn y su región activadora es rica en glutamina. La caja CAA puede ser reconocida por el factor CTF. En ocasiones se le puede llamar también NF1. Los factores CP también se pueden unir a la caja, tanto el CP1 como el CP2. Estos dos factores son constitutivos. A la caja CAAT se le puede unir también otra proteína, la EBP, pero esta proteína se expresa mucho más en el hígado. El octámero es reconocido por el factor Oct1, que es ubicuo, presente en todos los tipos celulares. En el caso de las células linfoides podemos encontrar otra proteína de unión que es el Oct2. La caja CAAT es reconocida por un represor, que es la proteína CDP.

Por ejemplo, existe un gen que solo se expresa en la espermatogénesis del erizo de mar, el gen H28, que no se expresa en ningún otro tejido, ya que en otros tipos celulares se le une la proteína CDP, de manera que se inhibe la síntesis. CDP compite con la proteína activadora por la unión al DNA.

Expresión génica inducible

Existen genes que se pueden activar en respuesta a tratamientos específicos. Se induce la transcripción como respuesta a un posible estímulo.. Se conocen varios casos:

- respuesta al AMPc
- respuesta al calor
- respuesta a hormonas esteroideas

Respuesta al AMPc

En este tipo de respuesta son muy importantes los factores CREB y CREM. Median en la respuesta de la célula al AMPc, ya que se unen a los factores CRE. Nos centraremos en el caso de CREM, ya que ha sido mejor descrito.

En CREM encontramos dominios de unión al DNA, mediante cremallera de leucina, dominios activadores, y lugares de fosforilación. Solo se puede fosforilar posttraduccionalmente y solo una vez fosforilada será una proteína activa. La presencia de AMPc activa una proteína que fosforilará a CREM, con lo que se activará la transcripción. Además, el gen de CREM tiene dos promotores, uno dependiente de CREM y otro independiente. Cuando se forma la proteína a partir del promotor de CRE, la proteína será más corta y carecerá de dominio de activación. Esta proteína se denomina ICER, Inducible cAMP early repressor. Estos factores detendrán la síntesis de las proteínas dependientes de CREM. La síntesis de las proteínas inducibles por cAMP será por lo tanto muy corta y fugaz. Dependerá de la fuerza y del equilibrio de los factores. Parece ser que es ICER el que predomina.

Genes inducibles por el calor

Si se somete a las células al calor, a un shock térmico, se provocará la síntesis de las proteínas heat shock, una de las cuales es hsp70. Parecía ser que era el elemento HSE el encargado de inducir la síntesis a causa del calor. Para comprobarlo se trasladó el elemento HSE a otro gen que no tuviese síntesis inducida por calor. El gen que se empleó es el de la timidina quinasa. Se observó que con el elemento HSE se transformaba en inducible. Además, el HSE era de *Drosophila*, y el gen que se empleó era de mamífero.



Se observó que en *Drosophila*, la temperatura a la que había activación de la transcripción era a unos 37°, ya que la normal es de 25°. En cambio en mamífero, la temperatura normal es de 37°, para tenerse que activar a los 42°. En el caso descrito, se activaba a los 42°, y no a los 37° característicos de *Drosophila*. En la activación por calor interviene un factor que se une a HSE que es HSF.

Se ha comprobado que en la región reguladora de las Hsp hay zonas muy sensibles a DNAsas, ya que no tienen nucleosomas. El factor, en circunstancias normales no se puede unir, pero con el calor se activa y se une, con lo que se inicia la síntesis. Se comprobó que era un factor que se activaba con el calor, y no un factor que se sintetizaba con el calor sometiendo a la célula a calor, en presencia y ausencia de cicloheximida, que es un inhibidor de la síntesis proteica. El resultado fue el mismo en ambos casos, por lo que se deduce que se trata de un factor ya presente en la célula y no sintetizado “de novo”.

La activación en respuesta al calor es un proceso que se da en dos pasos. Primero se activa HSF y se une a HSE. Después se podrá fosforilar, por lo que se podrá activar la transcripción. Parece ser posible que en la forma inactiva el dominio de unión a DNA esta replegado, pero que al subir el calor pase por una modificación de su estructura, con lo que se abrirá y se podrá unir. El proceso de fosforilación crea un dominio de activación bastante fuerte, lo que provocará la transcripción. Se considera posible que la activación este provocada por una quinasa que sea activada por calor.

Transcripción inducible por hormonas esteroideas

Se trata de sustancias derivadas del colesterol, que están ligadas a muchos procesos. Un grupo muy importante son los glucocorticoides. Estas moléculas se unen a un receptor específico, provocando la activación de la transcripción de los genes inducibles por estas hormonas. El receptor se une a determinadas zonas, con lo que se activará la transcripción de los genes que tengan los elementos de control adecuados. Estos son factores de activación inducibles.

La hormona puede atravesar la membrana libremente, por lo que entra en el citoplasma, donde se encuentra con el receptor. Debido a la unión de ambos, se activa, por lo que se dirige al núcleo, uniéndose a la zona de reconocimiento de la zona GRE, activando así los genes que estén regulados de esta manera. Todos los receptores tienen una región N terminal que es el dominio activador. Otra región es el dominio de unión al DNA, mediante dedos de Zn. Por último, existen otros dos dominios, que son de unión a la hormona y de dimerización.

La activación del receptor parece estar directamente relacionada con la unión de la hormona. Al unirse la hormona es posible que el receptor cambie su conformación, con lo que pasará a poderse unir al DNA. Pero se comprobó que si se purifica el receptor, éste sí tiene capacidad de unión al DNA, por lo que no es debido a la conformación. "In vivo" ha de haber otro factor que le impida la unión al DNA. La presencia de la hormona provocará, por lo tanto, la liberación de la proteína inhibidora, con lo que se podrá unir al DNA. La proteína inhibidora es hsp90, que bloquea el dominio de unión a DNA y el de dimerización. La proteína activa es un dímero.

Estos genes están unidos a nucleosomas, pero la presencia del receptor unido al DNA provocará que se produzca un desplazamiento de estos, con lo que se generarán zonas hipersensibles a DNAsas, donde, ahora sí, se podrá unir un factor de transcripción, iniciando así la síntesis. El dominio activador del receptor contactará con el factor de transcripción, iniciando la síntesis. Hasta ahora hemos hablado de la activación de diferentes genes por hormonas esteroideas, pero se ha de tener en cuenta que igual que pueden activar pueden inhibir algún gen.

Capacidad de desplazamiento de los nucleosomas

La mayoría de los estudios en este campo se han hecho en levaduras, donde podemos observar las zonas SWI o SNF, que disrumpionan la cromatina. En Drosophila encontramos también el gen Brama, mientras que en mamíferos existe el gen BRG1. Se ha estudiado en muchos casos, relacionado con los genes regulados por los glucocorticoides. El receptor de la hormona actúa sobre el complejo BRG1, permitiendo así que se produzca el desplazamiento de los nucleosomas, con lo que se podrá producir transcripción. El complejo BRG1 tiene acetil transferasa, ya que la ordenación de los nucleosomas puede cambiar en función del grado de acetilación.

Las hormonas esteroideas, como ya se ha dicho, pueden inhibir la transcripción. Se unen al receptor, que se unirá al DNA. La secuencia es diferente a la de activación. La secuencia de activación es la GRE, mientras que la de inhibición es la nGRE. Pese a todo se trata de secuencias similares. Es posible que actúe como inhibidor impidiendo la unión de un activador.

Receptor de la hormona tiroidea

El receptor no forma complejo con hsp90. El receptor puede unirse al DNA aún en ausencia de la hormona, en el sitio TRE. Si hay hormona actuará con un efecto positivo, mientras que si no hay hormona tendrá un efecto negativo. Es decir, la activación o inhibición dependerá de la presencia o no de la hormona.

Para que se pueda dar la expresión de determinados genes en los diferentes tipos celulares hará falta que en estos tipos celulares se expresen factores específicos. Algunos de estos ejemplos los vemos en el siguiente cuadro.

Factor	Tipo celular	Gen regulado
Myo D	Músculo esquelético	Miosina
Oct 2	Células B	Ig
NF- κ B	Células B	Ig

Los linfocitos B son los encargados de producir anticuerpos contra determinados antígenos. Los genes que codifican para esas proteínas solo se expresarán en este tipo celular. Están regulados por elementos de control en 5' y por un enhancer dentro del primer intrón. La proteína Oct 2 sólo se sintetiza en las células B.

No suele ser frecuente que el factor de respuesta a un estímulo no esté presente en la célula y se sintetice de nuevo al llegar el estímulo, sino que lo más común suele ser que el factor esté en forma inactiva, pero que se active al llegar el estímulo adecuado. Es posible que se active el factor al unirse a un ligando específico, como el caso de las hormonas esteroideas. También es posible que la proteína este unida a una proteína inactivadora, que al llegar la orden libere la proteína para que se active.

El DNA se expresa de manera variable, dependiendo del grado de empaquetamiento de la cromatina, en función de si es eucromatina o heterocromatina, pero no se expresará si está muy compactada.

Posicionamiento de los nucleosomas

La expresión de los genes variará en función de la presencia de los nucleosomas en la zona. La presencia de los nucleosomas podrá impedir la unión de algunas proteínas necesarias para la transcripción. Los cambios de posición de los nucleosomas dependen de la acetilación de las histonas. En el extremo N terminal de estas hay muchos lugares con cargas positivas si no están acetilados, por lo que esos lugares se podrían unir al DNA, que tiene carga negativa.

Metilación del DNA

La metilación del DNA suele estar asociada con la no expresión génica. En caso de que se produzca metilación no se podrá producir transcripción del DNA. Si se produce metilación de un promotor, ese gen no se expresará.

Traducción

Harán falta los 3 tipos de RNAs: mRNA, rRNA y tRNA. El rRNA estará formando parte de los ribosomas, que se componen de dos subunidades, que dependiendo del momento pueden estar juntas o separadas. En procariotas son las unidades 50s y 30s, mientras que en eucariotas son la 60s y la 40s. La conformación de los ribosomas puede variar en la síntesis proteica

En el extremo 3' de los tRNA siempre encontramos la secuencia CCA. En el tRNA también podemos encontrar la secuencia del anticodón, complementaria a codón del mRNA. Por el extremo 3' el tRNA está unido a un aminoácido. Como mínimo hay un tRNA por cada aminoácido, pero puede haber varios. Las enzimas que cargan los tRNAs son las tRNA sintetasa. Son las encargadas de catalizar la carga del AA, proporcionando un lugar de conexión. Tienen 3 dominios: unión a ATP, unión a AA y unión a tRNA. Primero reacciona el AA con el ATP y se forma el AA-AMP. El AA se transferirá entonces al tRNA. Cada sintetasa puede reconocer solo a un AA, por lo que hay 20 sintetasa diferentes. Los diferentes tRNAs que aceptan un mismo AA se conocen como isoaceptores. Se conoce vagamente el proceso por el que se reconoce el tRNA. Parece ser que reconoce alguna base del anticodón, como mínimo 1. También se da la circunstancia de que la base justo antes de CCA es invariable en todos los isoaceptores. También se considera posible que reconozca algunas bases del brazo aceptor.

El dominio catalítico de la tRNA sintetasa varía en función de si se trata de tipo I o de tipo II. Las de tipo I tienen el dominio en el extremo N terminal, mientras que las de tipo II lo tienen en el extremo C terminal. Parece probable que en un principio solo existiese una sintetasa, por lo que solo habría un aminoácido.

MECANISMO DE TRADUCCIÓN

Los ribosomas tienen dos subunidades, cada una con una función determinada. El mRNA se asocia a la unidad pequeña. El ribosoma cubre unos 30 codones, pero tan solo 2 serán activos. El tRNA se inserta en los lugares adecuados para ello, que van desde la unidad grande hasta la pequeña. En el lugar A se representa el codón de un aminoácido, mientras que en el lugar P se coloca el tRNA que lleva la cadena polipeptídica ya sintetizada. El codón sobre el que estará situado este tRNA será el correspondiente al último aminoácido de la cadena polipeptídica. En el proceso de traducción se traslada el polipéptido desde el lugar P al lugar A. El ribosoma se desplaza entonces una unidad sobre el mRNA, con lo que el tRNA estará de nuevo sobre el lugar P.

La traducción se divide en 3 fases:

- Fase de iniciación: Abarca todos los procesos que se dan antes de la formación del primer enlace peptídico. Es el tiempo que tarda en formarse el complejo de iniciación.
- Fase de elongación: cubre el proceso desde el primer enlace hasta el último.
- Fase de terminación: es el proceso desde el último enlace hasta que se liberan todos los componentes necesarios en la traducción.

Se necesitarán diferentes factores para poder llevar a cabo este proceso, y también energía, que vendrá dada en forma de ATP.

Iniciación en procariotas

La unión de las unidades 30s y 50s da lugar al ribosoma completo 70s. Para la iniciación de la traducción es necesario que estén las unidades libres. Los ribosomas están en una situación de equilibrio con las unidades libres. Para que los ribosomas sigan libres es necesario que haya una serie de factores. La unión del RNA al ribosoma se produce en la zona de unión a ribosoma. Está situada a unos 10 nucleótidos de AUG. La secuencia es AGGAGG, que se conoce como secuencia Shine – Delgarno. Sobre esta secuencia se monta la unidad pequeña del ribosoma. Se formará por lo tanto el complejo de iniciación, aunque para esto harán falta una serie de factores:

IF1: Se une a 30s, estabilizando el complejo.

IF2: Se une al tRNA iniciador, controlando su unión al ribosoma.

IF3: Permite que el complejo se una al lugar adecuado, ya que permite la unión del ribosoma, debido a complementariedad de bases. Si no está IF3, el ribosoma siempre estará unido, y no habrá unidades libres. Hasta que no se libera IF3 no se une la unidad 50s.

Llegados a este punto se liberan todos los factores

tRNA iniciador

Todas las proteínas se inician con la Metionina, con el codón AUG. En procariotas puede haber otros codones que pueden ser GUG o UUG. Existen 2 tRNA diferentes unidos a Met, el tRNA iniciador y el tRNA que reconoce las secuencias AUG en el proceso de elongación. El iniciador lleva metionina formilada, mientras que el otro no tiene metionina formilada. Tan solo el tRNA iniciador es capaz de iniciar la traducción. Otro RNA unido a Met no podría. Normalmente, los tRNA va directos al lugar A, mientras que en el caso del iniciador va directamente al lugar P, sin pasar por A. Llega unido a IF2, que permite su unión al sitio P. Existen más diferencias entre el tRNA iniciador y el que actúa en la elongación. Se trata de diferencias sobre todo situadas en la estructura del tRNA, como el hecho de que la última base antes de CCA no tiene complementario, ya que si la tuviese podría actuar en la elongación. Además, cerca del anticodón hay 3 pares de bases que son complementarios, que son G – C.

La formilación de la metionina se pierde de manera cotraduccional, por acción de una formilasa. En aproximadamente el 50% de las proteínas queda Met en la posición inicial, en el resto se elimina.

Iniciación en eucariotas

Los ribosomas constan de unidades 40s y 60s. La primera en actuar es la 40s, que está asociada a factores de separación. Es esta unidad la que reconoce el capping de 5'. Se va deslizando entonces la subunidad por el mRNA hasta que encuentra la secuencia AUG, que ha de estar en una secuencia consenso. Llegados a este punto deberán actuar una serie de factores, como el eIF2, que está unido al tRNA iniciador. El tRNA iniciador es diferente del de elongación, pero en este caso no se trata de una metionina formilada, sino que las diferencias son mucho más sutiles, a nivel de estructuras secundarias por fosforilación, que permiten que el tRNA vaya directo al sitio P.

Se une el GTP a eIF2, con lo que se incrementa la afinidad por el tRNA iniciador. En este momento se une la unidad pequeña y después llega el mRNA, por el que se deslizará este complejo. El complejo eIF-4F es capaz de unirse a 5'. Está compuesto por:

4E: Reconocimiento y unión al cap 5'.

4A: ATPasa, con capacidad de deshacer estructuras secundarias, de unos 15 nucleótidos

4G: Factor de ensamblaje. Es capaz de contactar con las otras.

4B: Unido a 4A permite deshacer estructuras secundarias.

eIF3 contacta con la subunidad pequeña del ribosoma. Puede unirse a 4G.

Cuando llegue a AUG se unirá la subunidad grande. Intervendrá el factor eIF6, manteniendo las unidades disociadas. Para que se desprendan todos los factores será necesario que intervenga el eIF5, que es una GTPasa, que provoca la liberación de todos los factores de iniciación.

Elongación en eucariotas

En este proceso está el ribosoma entero. Los nuevos aminoacil tRNA han de ir entrando en el sitio A, excepto el iniciador, que va al P. Es necesario un factor de elongación, el EF-Tu, que se asocia al ribosoma, solo para permitir la entrada, pero una vez ha entrado, se libera. Este factor puede estar asociado a GTP, en cuyo caso será una forma activa, o bien a GDP, en cuyo caso será inactivo. El TuGTP se une al AA-tRNA, formando un complejo terciario, el Tu-GTP-AA-tRNA, que se puede introducir en el sitio A del ribosoma. Sólo se puede unir si en P hay un tRNA. Se produce un reconocimiento codón anticodón, con lo que se produce un cambio de conformación que provoca la hidrólisis del GTP.