

# V. REGULACIÓN DEL METABOLISMO

## REGULACION GENÉTICA EN EL OPERÓN LAC

M. en C. Esdras Israel Carrizosa Carbajal

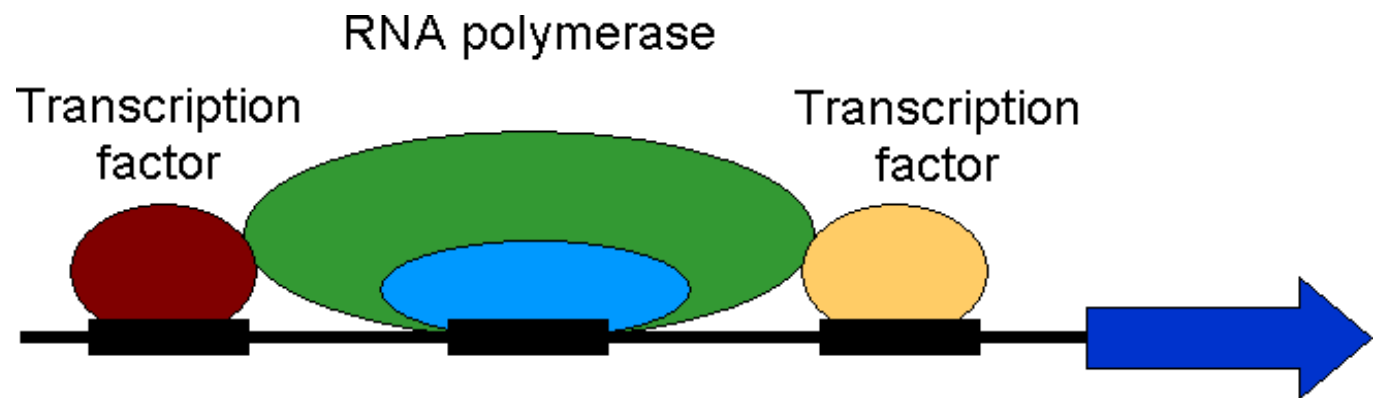
# Regulación de la expresión génica

De los 4,000 genes presentes en el genoma bacteriano, o de los 100,000 estimados para el genoma humano, únicamente se expresa una fracción en un momento dado.

**La regulación metabólica** es el **incremento o el decremento** de una reacción enzimática o de toda una secuencia de reacciones enzimáticas de las rutas metabólicas. La regulación surge de la necesidad de la célula de estar en equilibrio.

Existen al menos seis puntos potenciales en los que la cantidad de proteína puede ser regulada:

- 1) Síntesis del transcrito primario de RNA
- 2) Procesamiento post-transcripcional del mRNA
- 3) Degradación del mRNA
- 4) Síntesis proteica (traducción)
- 5) Modificación postraducciona de proteínas
- 6) Degradación proteica.



# Genes constitutivos (housekeeping)

Son productos génicos que son necesarios siempre y sus genes se expresan a nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de una especie u organismo.

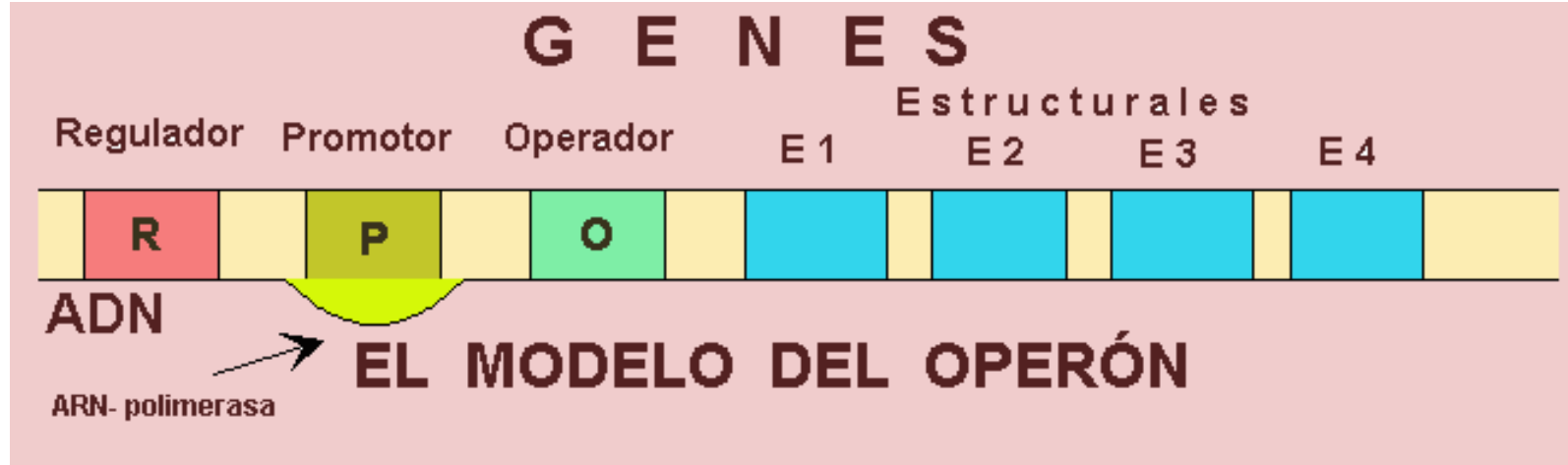
La expresión constante de un gen, aparentemente no regulada, es conocida como expresión génica **constitutiva**.

Los productos génicos que incrementan su concentración bajo determinadas circunstancias moleculares son conocidos como inducibles, y el proceso que da lugar al incremento de la expresión del gen se denomina **inducción**.

Los producto génicos que disminuyen su concentración en respuesta a una señal molecular se conocen como reprimibles, y la disminución en la expresión génica se denomina **represión**.

La **transcripción** está mediada y regulada mediante **interacciones proteína-DNA**. El componente central es la RNA polimerasa.

# Estructura de un operón



## Promotor (P)

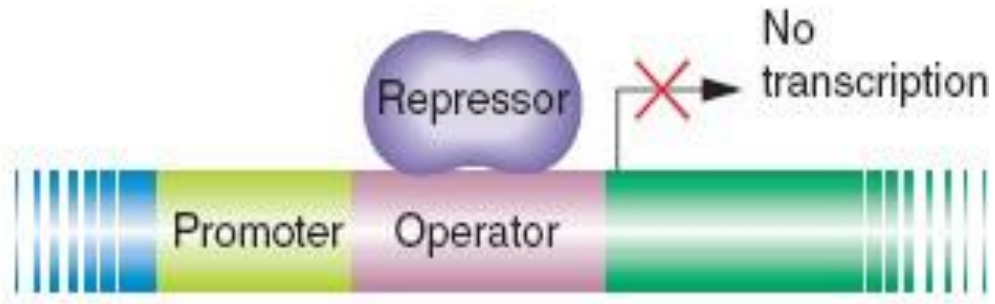
Región del DNA, precedente a los genes estructurales, que reconoce la RNA polimerasa para llevar a cabo la transcripción.

## Operador (O)

Región del DNA localizada entre el promotor y el comienzo de los genes estructurales, que es reconocida por la proteína represora.

# Represores y activadores

## Negative regulation

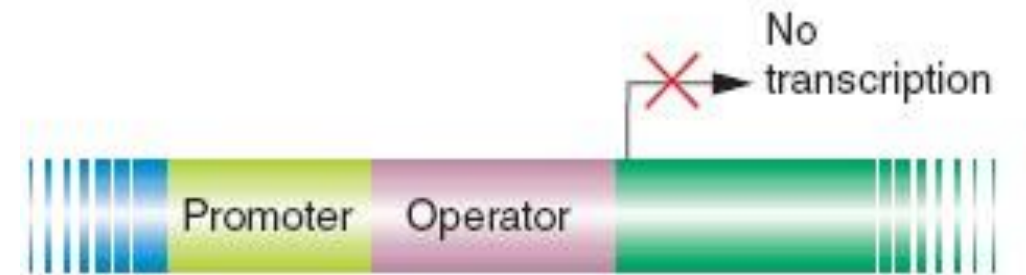
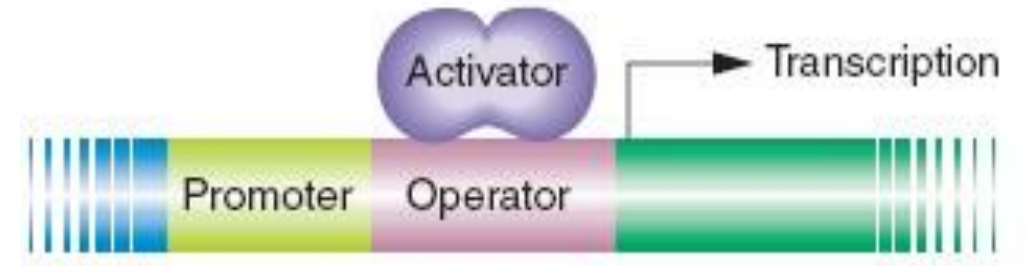


(No repressor)

Los represores se unen a sitios específicos del DNA. La regulación mediante una proteína represora que se une al DNA bloqueando la transcripción se denomina **regulación negativa**.

induciéndole un cambio conformacional

## Positive regulation



(No activator)

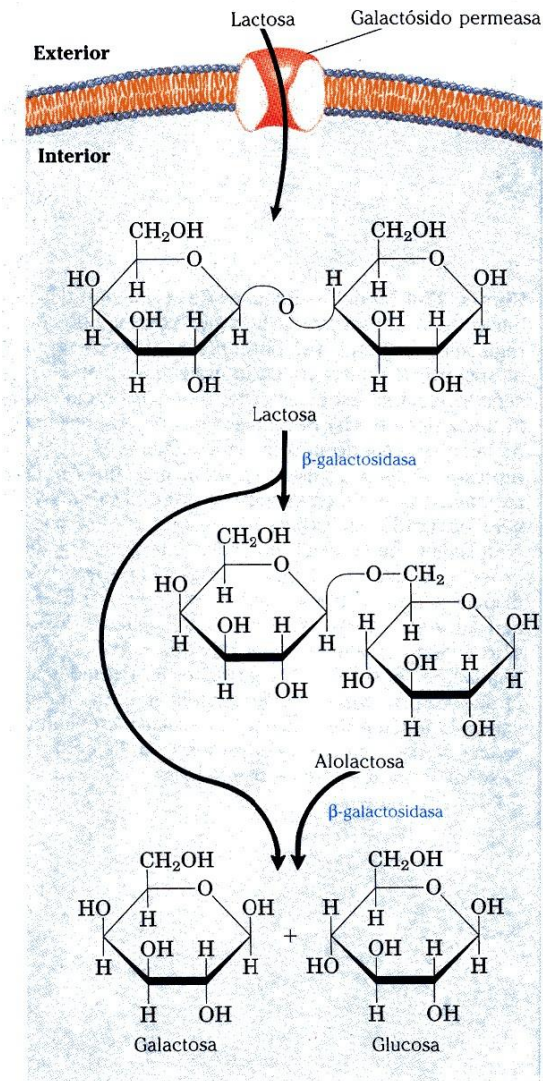
La regulación mediada por un activador se denomina **regulación positiva**. Los activadores se unen a sitios adyacentes al promotor reforzando tanto la unión como la actividad de la RNA polimerasa en ese promotor.

# Modelo del Operón lac



F. Jacob    J. Monod    A. Lwoff

## Expresión inducible



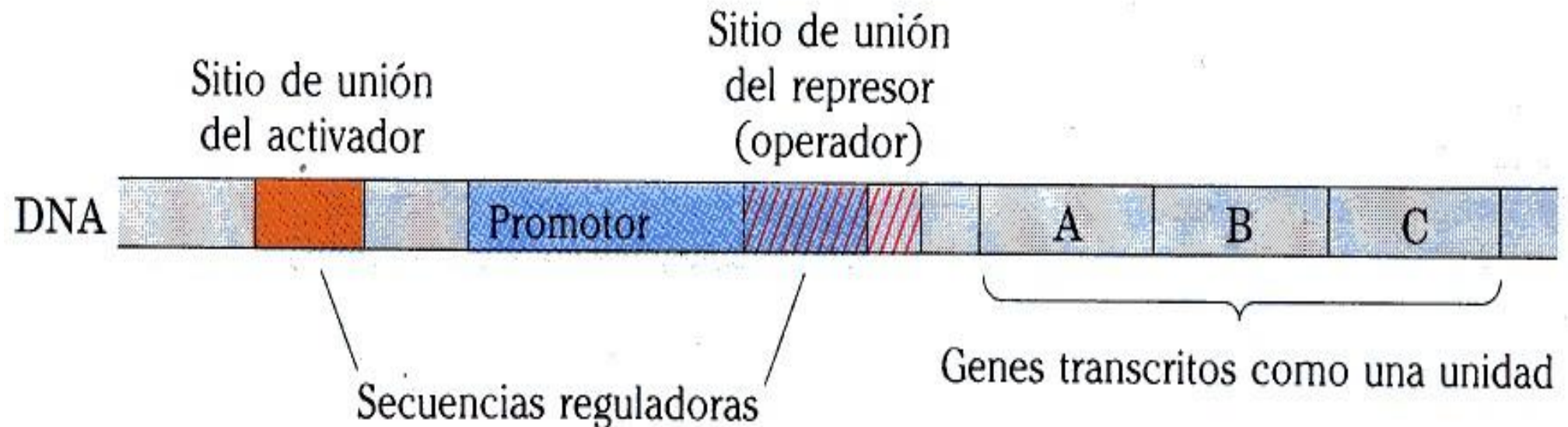
Premio Nobel de 1965 por su teoría del operón



# Operón

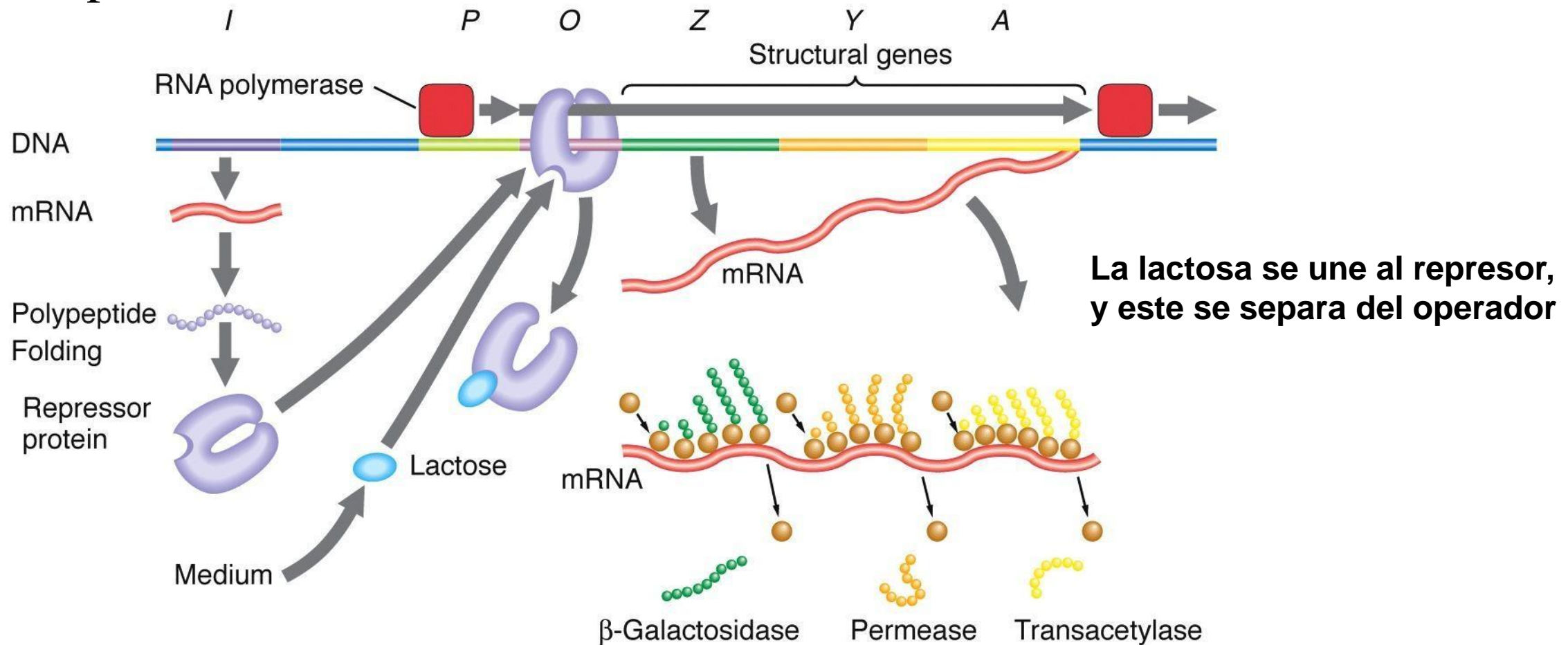
El conjunto formado por el grupo de genes, el promotor, y las secuencias adicionales implicadas en la regulación, se denomina **operón**.

Son comunes los operones que contienen de 2 a 6 genes y que se transcriben como una unidad; algunos operones contienen 20 o más genes.



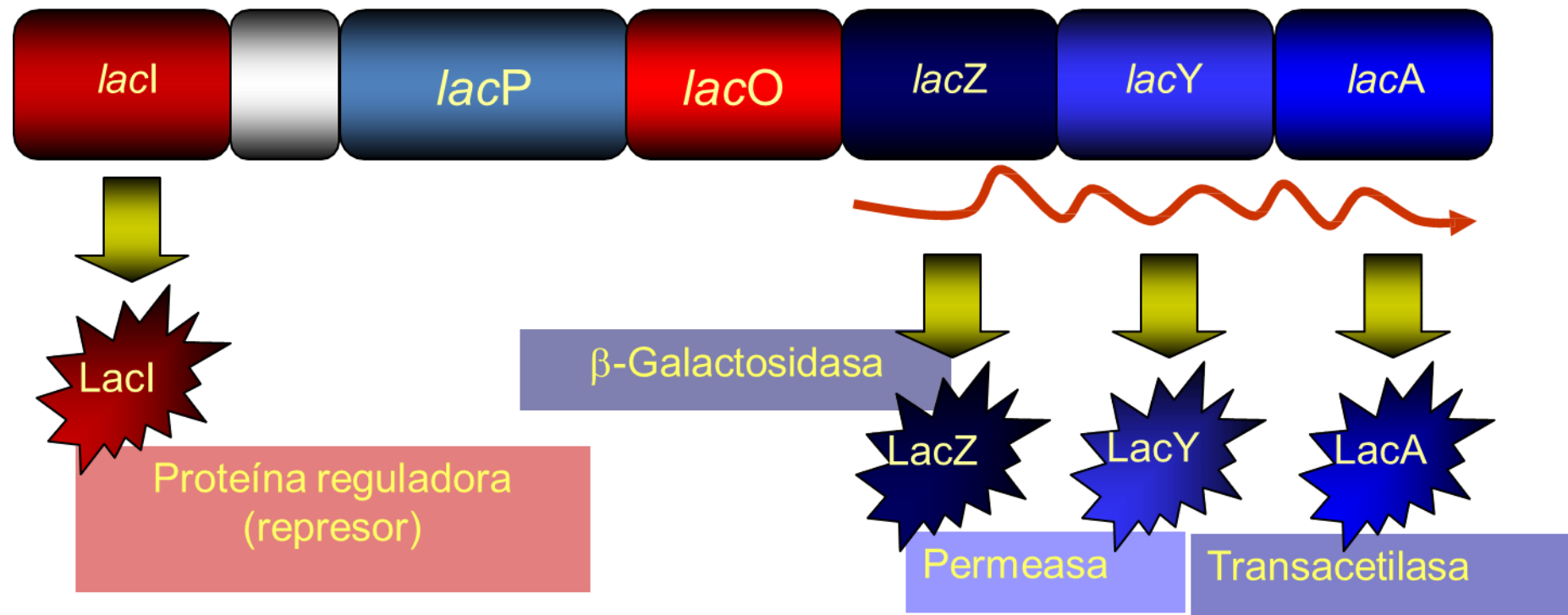
# Operón *lac*

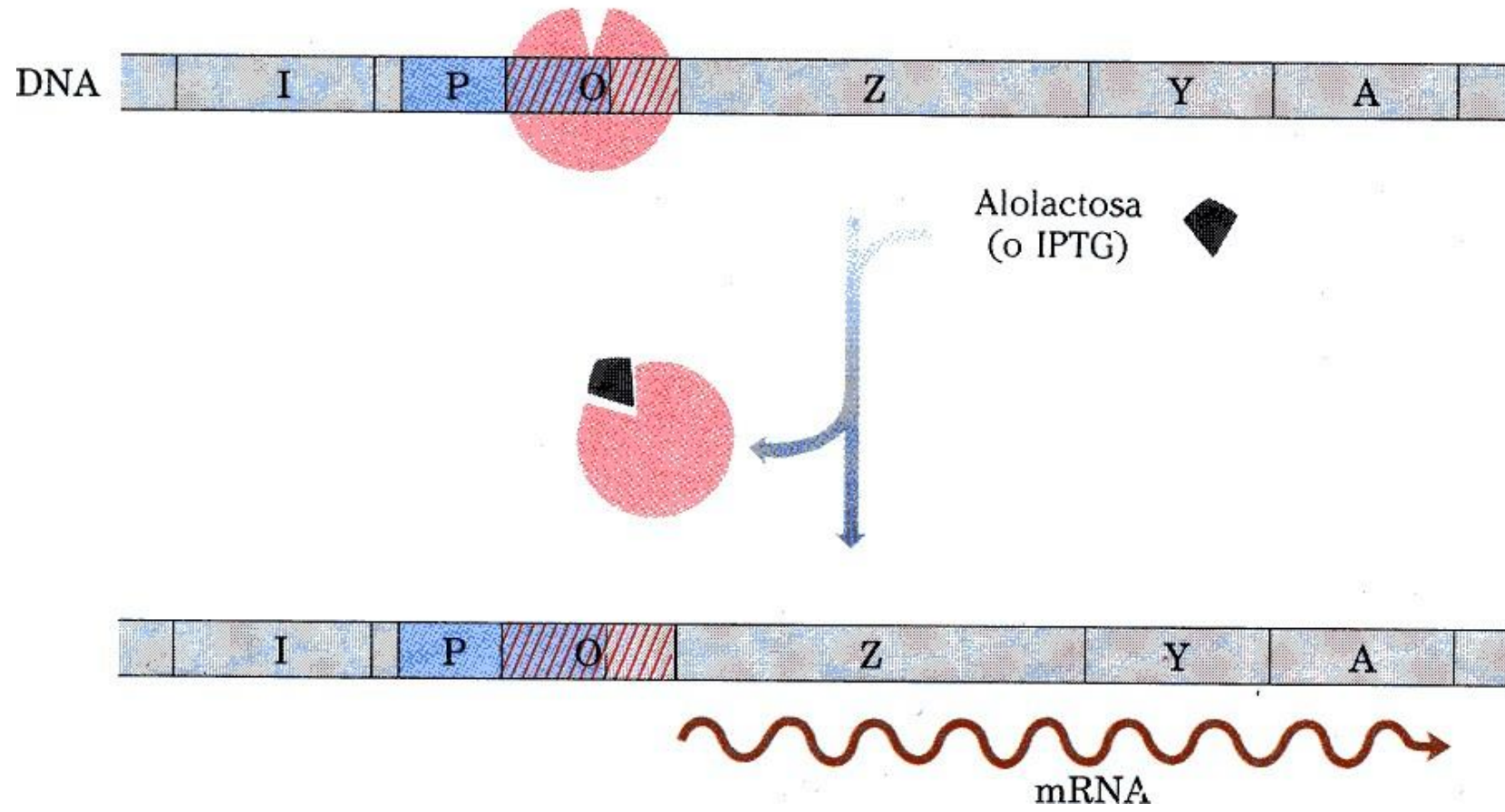
El operón *lac* incluye los genes de la  $\beta$ -galactosidasa (Z), de la galactósido permeasa (Y), de la tiogalactósido transacetilasa (A). Cada uno de los genes está precedido por señales de traducción que dirigen la unión del ribosoma y la síntesis proteica.



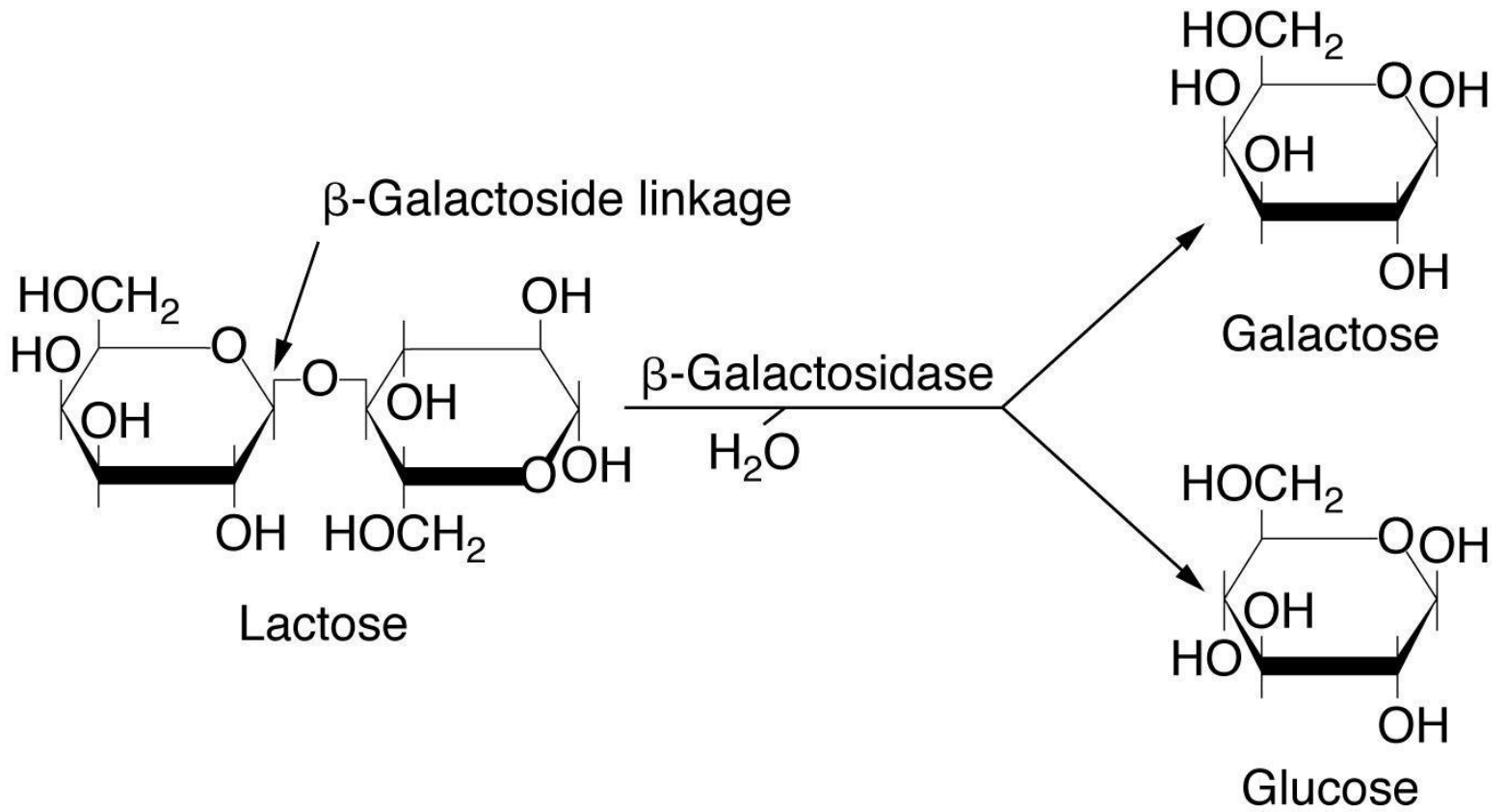
En ausencia del sustrato lactosa, los genes del operón *lac* están reprimidos, y sólo hay unas pocas copias de  $\beta$ -galactosidasa por célula.

Cuando las células reciben una carga de lactosa, el operón *lac* se induce. Una molécula inductora se une a un sitio específico del represor, originándole un cambio conformacional que provoca su disociación del operador. El inductor de este sistema no es la lactosa propiamente dicha sino un isómero de la misma llamado **alolactosa**.



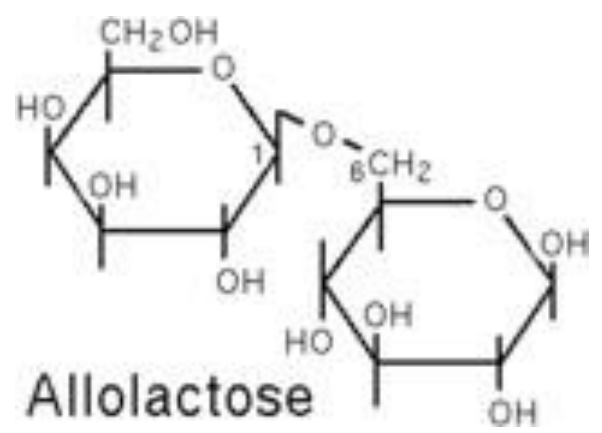
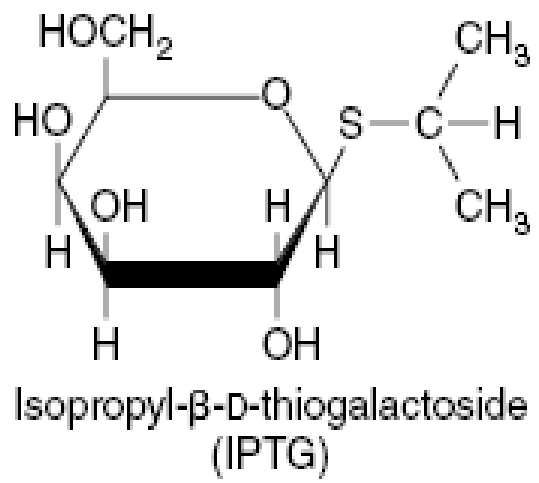


**Lactosa**



**IPTG**

Inductor sintético del Operón Lac;  
No hidrolizable por  $\beta$ -gal

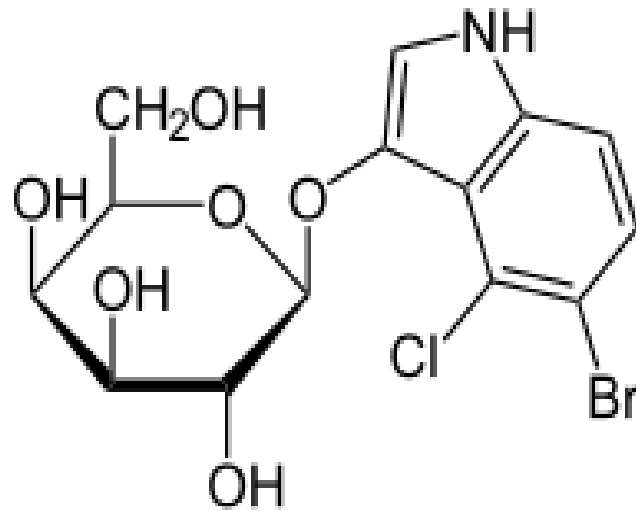


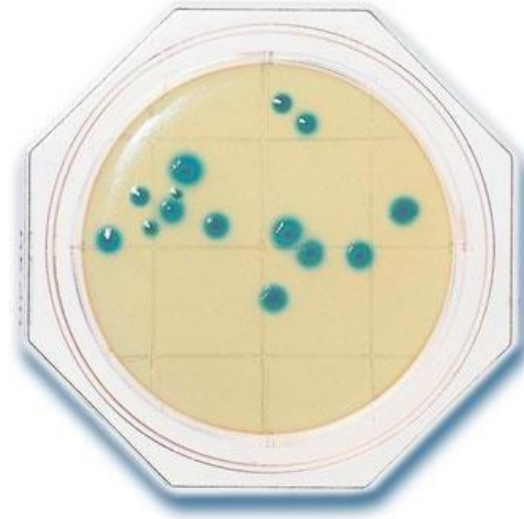
## Fenil-Gal (fenil- $\beta$ -D-galactosa)

Es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa, pero no es un inductor del operón, ya que es incapaz de unirse al represor LacI. Esto hace que las cepas bacterianas silvestres sean incapaces de crecer cuando su única fuente de carbono es fenil-gal. Sólo aquellos mutantes donde se encuentre ausente el represor LacI podrán crecer en esta fuente de carbono.

# X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactósido)

Es otro sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, el cual presenta un intenso color azul.





Es utilizado como indicador de expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en colonias bacterianas creciendo en placa.

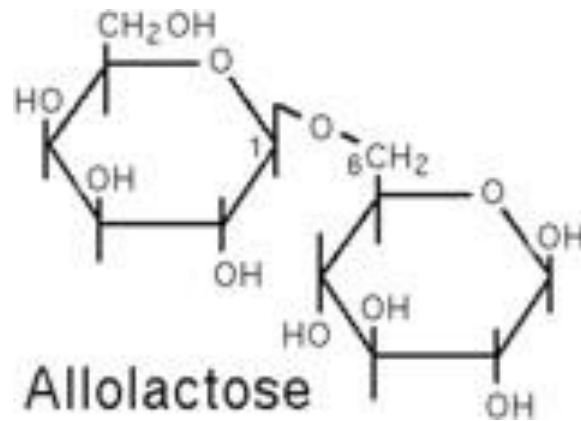
Aquellas colonias que estén expresando la enzima se tornarán de un color azul más o menos intenso en función de la cantidad de enzima que estén expresando.



# Alolactosa

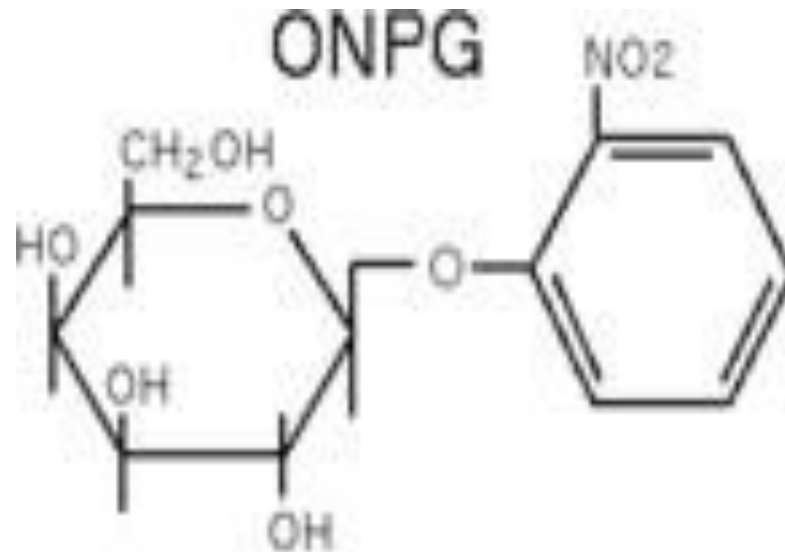
Es un isómero de la lactosa y es el verdadero inductor del operón *lac*. Mientras que la lactosa es galactosa-( $\beta$ 1-4)-glucosa, la alolactosa es galactosa-( $\beta$ 1-6)-glucosa.

La lactosa, una vez en el citoplasma bacteriano, es transformada en alolactosa por la  $\beta$ -galactosidasa.



# ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido)

Es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (ortonitrofenol) que presenta un intenso color amarillo. El ONPG es muy utilizado en los ensayos *in vitro* de  $\beta$ -galactosidasa, en los que se puede obtener la concentración de  $\beta$ -galactosidasa en función de la intensidad del color amarillo, medida por absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.



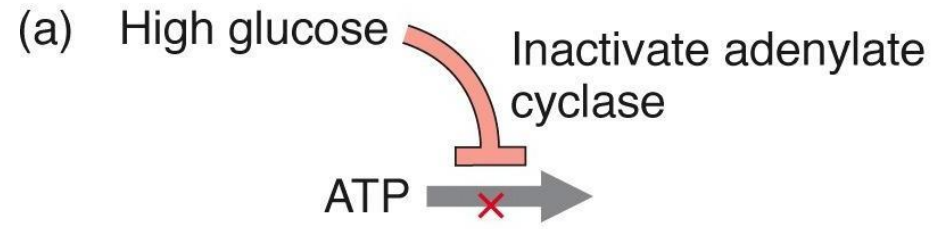
# Modelo de represión catabólica

Un mecanismo regulador, es el llamado represión por catabolito, ha evolucionado para mantener reprimidos los genes implicados en el catabolismo de la lactosa, arabinosa y otros azúcares en presencia de glucosa incluso cuando estos azúcares secundarios también están presentes.

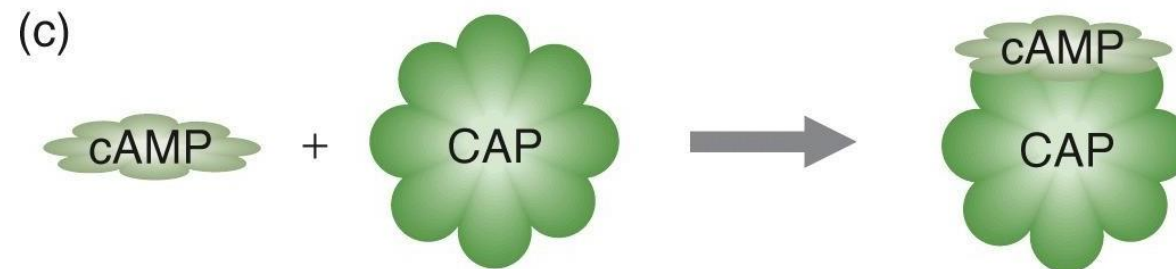
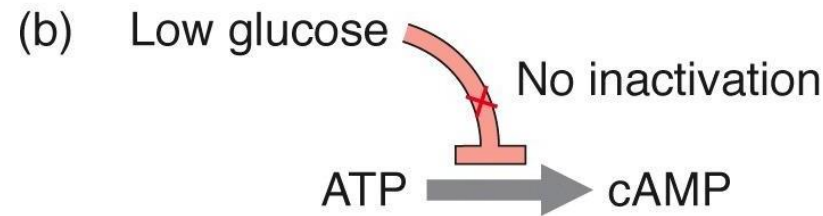
El efecto represor de la glucosa está mediado por el cAMP y una proteína llamada **proteína activadora del catabolito**, abreviada **CAP**.

# Represión por catabólito del operón *lac*

*(Elección del mejor azúcar a metabolizar)*



En ausencia del represor, el promotor del operón *lac* no es muy fuerte, por lo que requiere la actividad de otras proteínas.



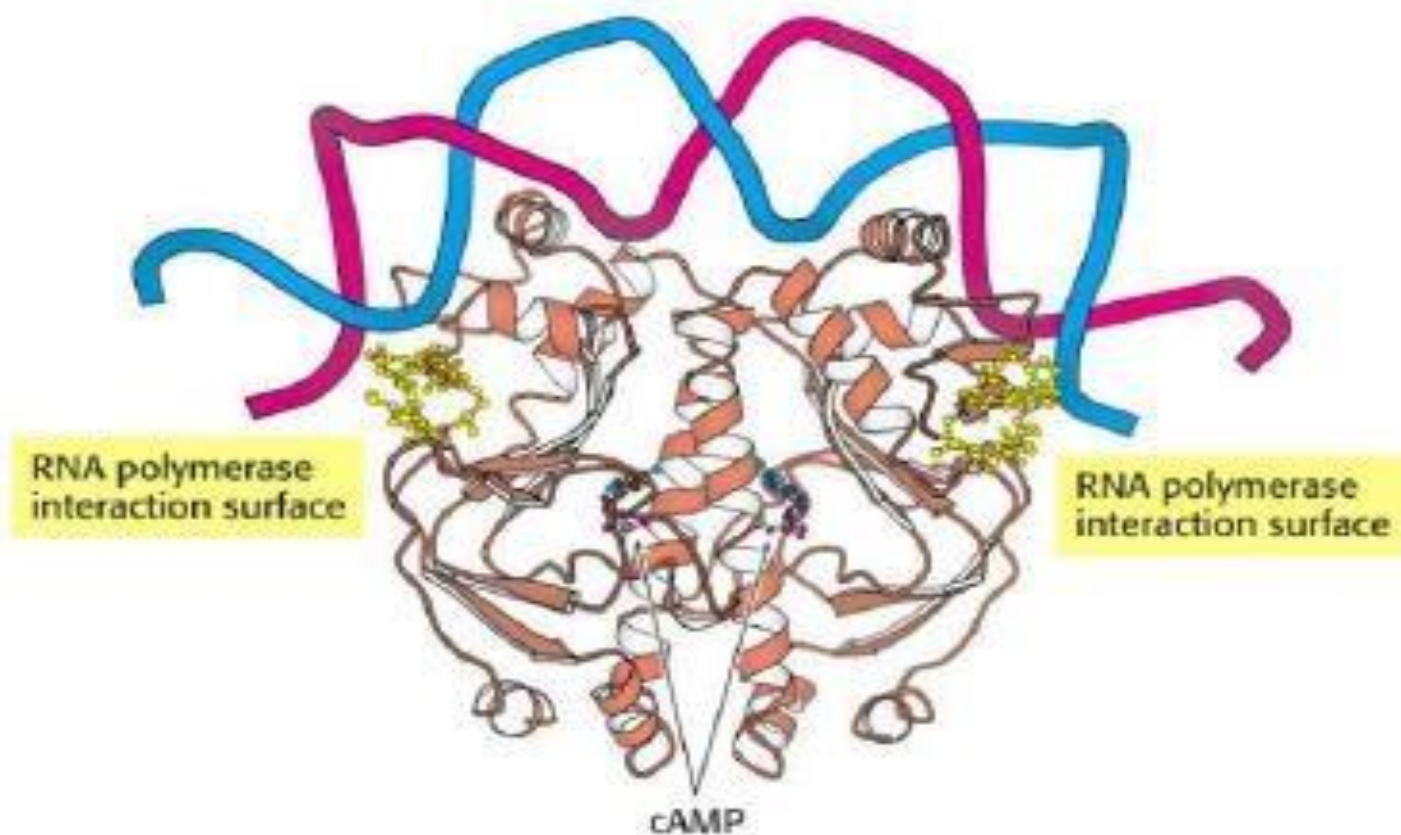
Si los niveles de glucosa son altos.

Si los niveles de glucosa son bajos.

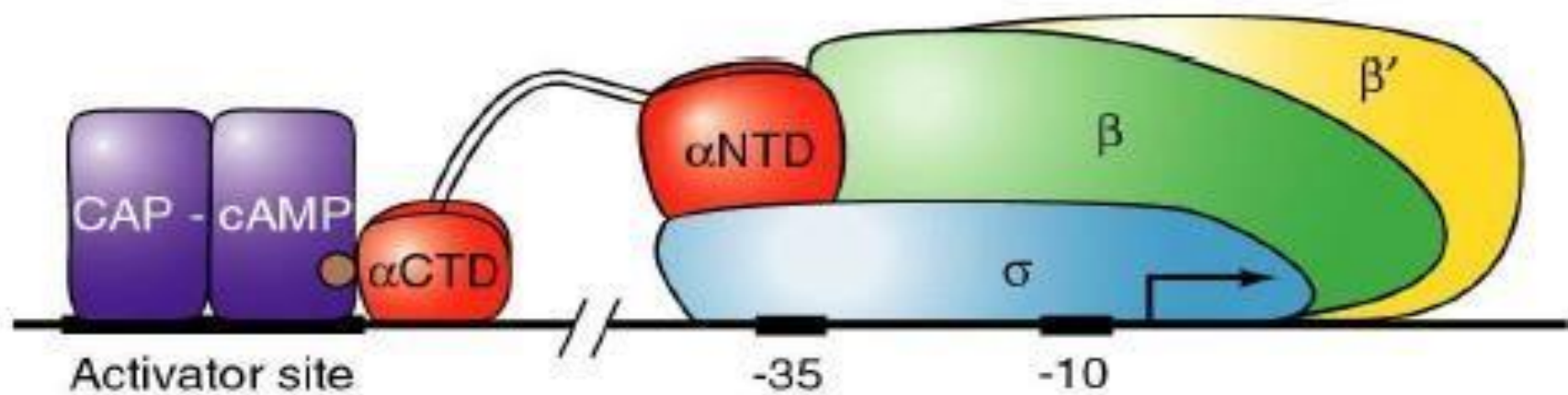
CAP= Catabolite activator protein



Cuando los niveles de AMPc se incrementan, se une a la proteína CRP/CAP

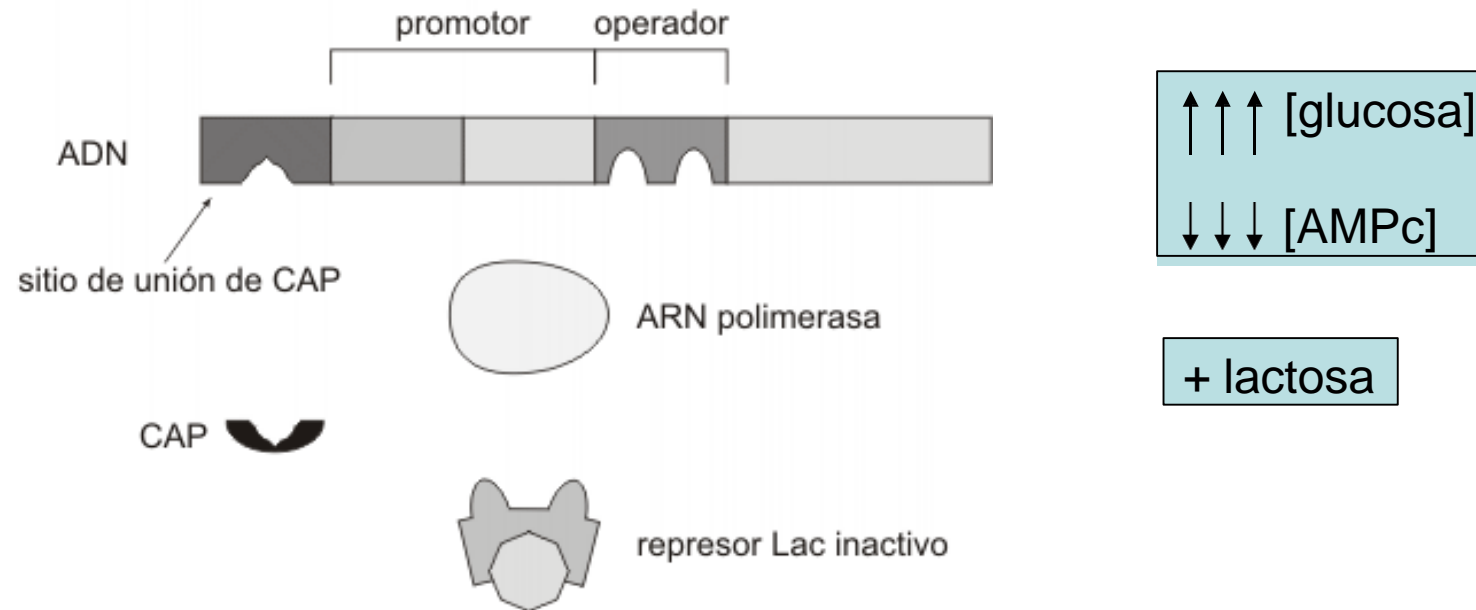
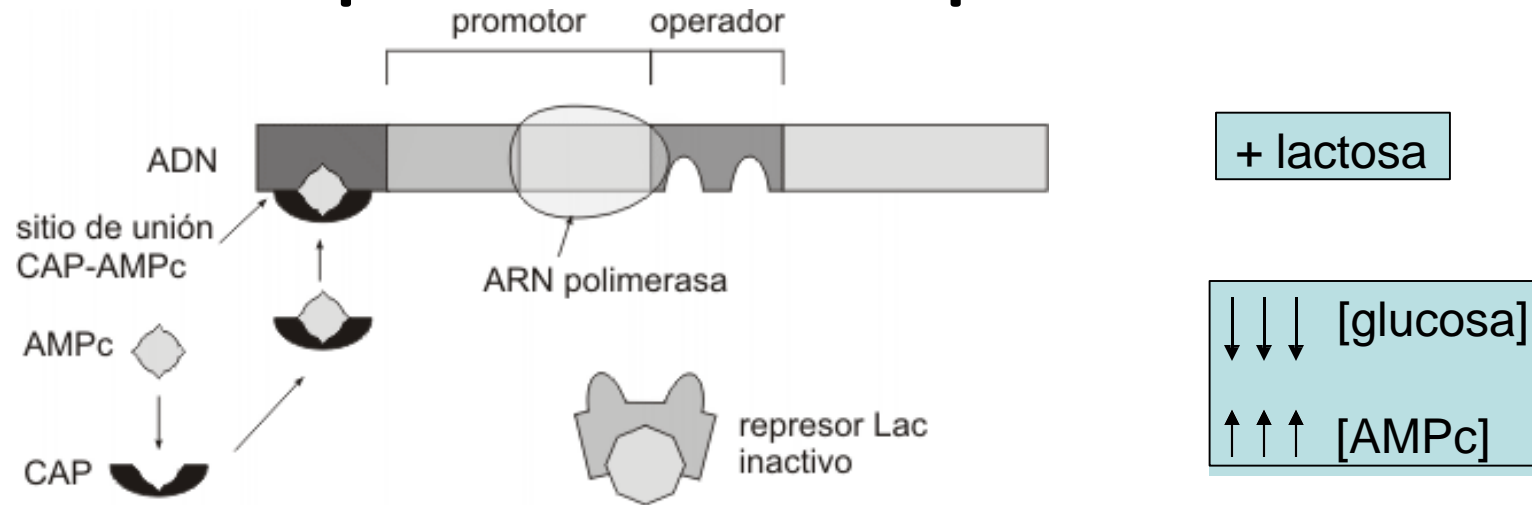


El complejo CRP-AMPc se une al promotor del operón de lactosa y causa un giro en el DNA que facilita la unión de la RNA polimerasa al promotor.

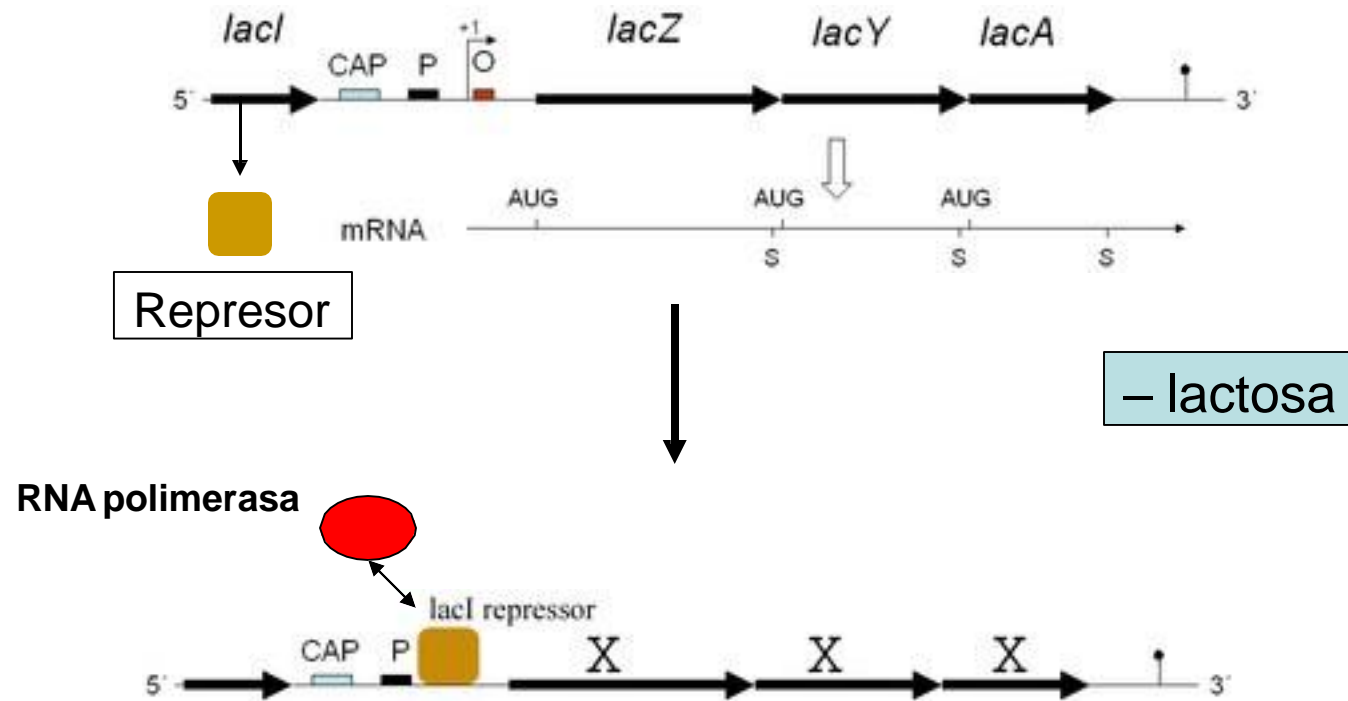


El complejo CRP-AMPC se une al promotor del operón de lactosa facilita la unión de la RNA polimerasa al promotor y se incrementa 50 veces la transcripción.

# Regulación positiva del operón *lac*



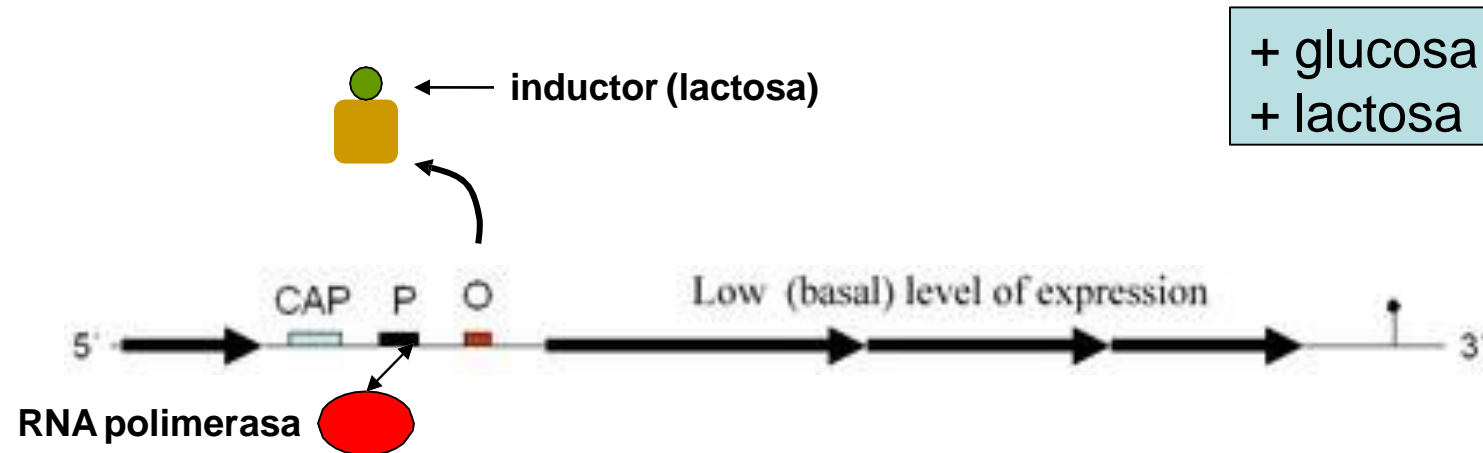
# En ausencia de lactosa



¡No hay transcripción!

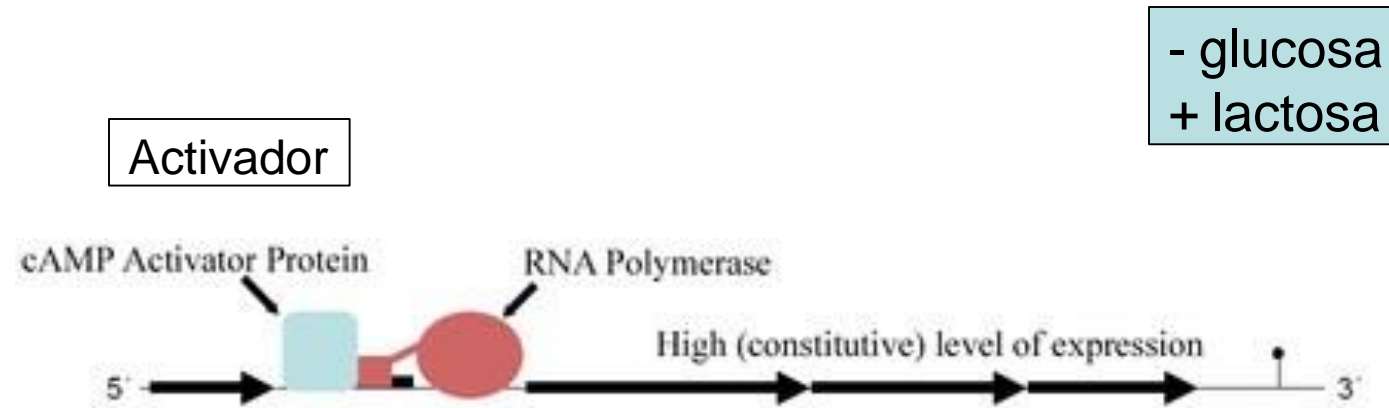


# En presencia de lactosa y glucosa



¡La transcripción es baja (basal)!

# En presencia de lactosa y ausencia de glucosa



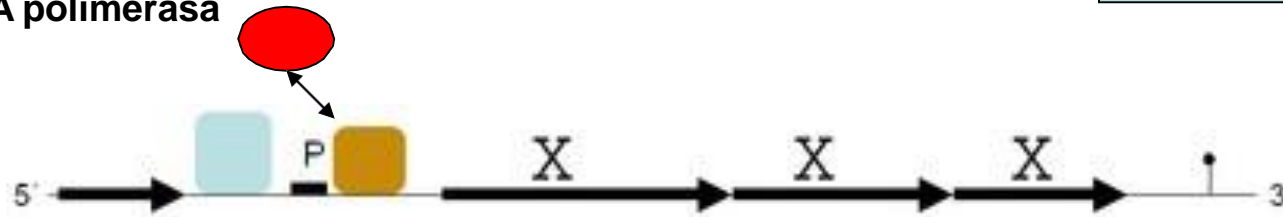
¡La transcripción es alta (constitutiva)!

# En ausencia de lactosa y glucosa

Aunque el activador esté presente....

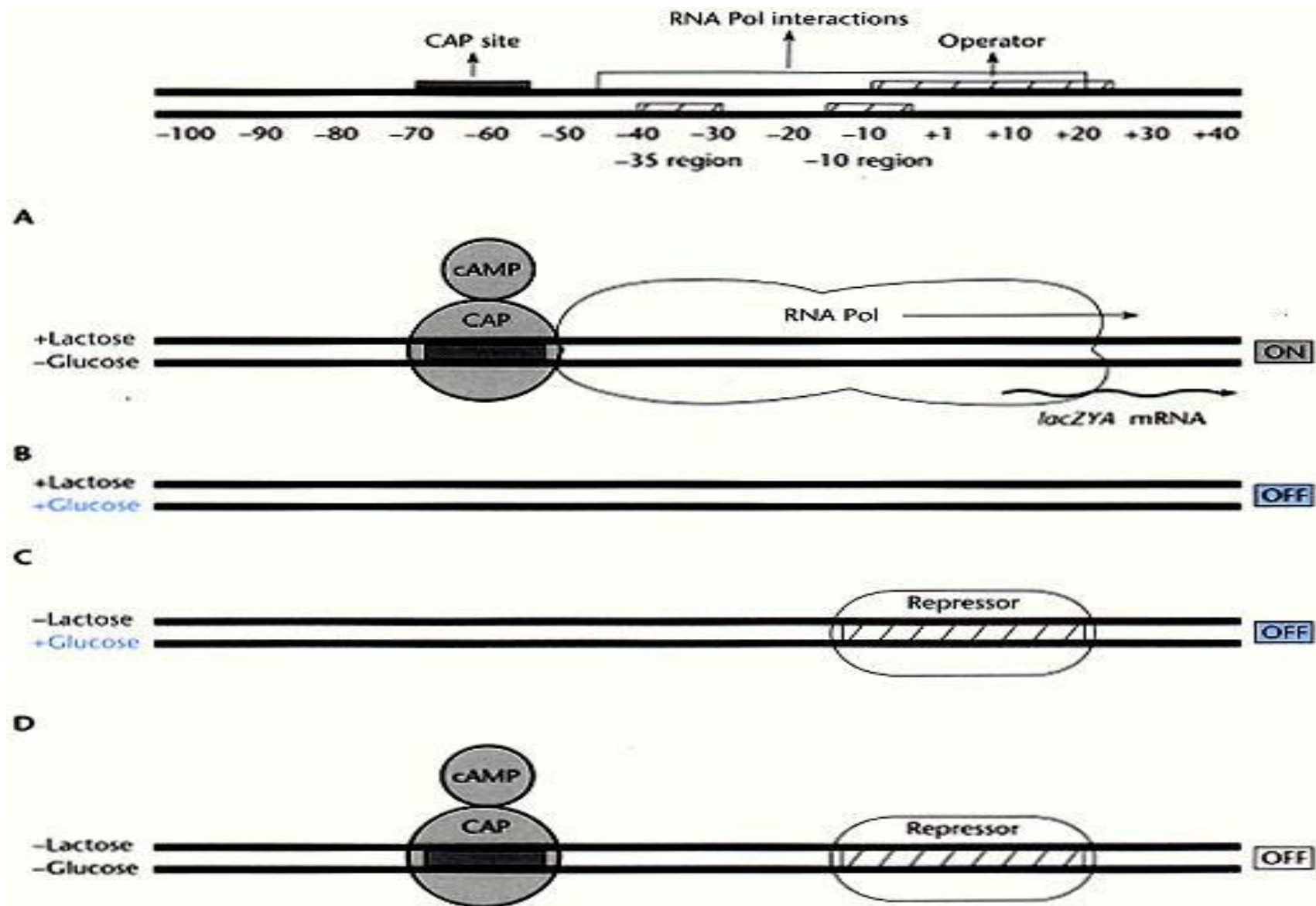
- glucosa  
- lactosa

RNA polimerasa



¡No hay transcripción!

# Resumen



El **operón lac** es un ejemplo de operón **inducible**, es decir aquel en el cual la presencia de una sustancia específica (en este caso la lactosa) induce la transcripción de los genes estructurales.

El **operón lac** también se encuentra bajo *control positivo*. Cuando en el medio hay glucosa, la bacteria metaboliza este monosacárido ignorando cualquier otra fuente de carbono disponible. Cuanto menor es la concentración de glucosa en el medio, mayor es la concentración de AMPc, el cual tiene influencia en **la activación** del operón lac.

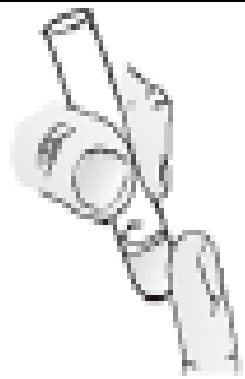
El AMPc actúa uniéndose a una proteína fijadora de AMPc denominada CAP (proteína activadora de catabolitos). Cuando la concentración de este complejo es alta (poca glucosa), el CAP-AMPc se fija a un sitio específico del promotor lac, aumentando la afinidad de la región promotora para la ARN polimerasa, lo que estimula la transcripción del operón.

**Para que se exprese el operón lac deben darse dos condiciones en el medio: que esté presente la lactosa y que la concentración intracelular de glucosa sea baja.**

# En la práctica...

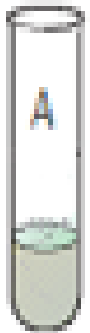
## Objetivos

- Comprender la importancia de la regulación genética como mecanismo para controlar los niveles de enzimas en la célula.
- Conocer los elementos que integran el operón de la lactosa.
- Entender el funcionamiento del operón de la lactosa en presencia y ausencia de este carbohidrato.
- Conocer el concepto de represión catabólica y cómo se lleva a cabo.

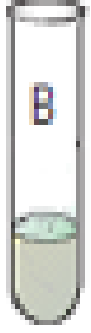


Cultivo *E.coli*

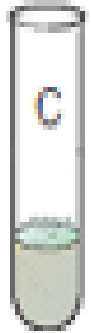
Colocar 1 mL / Tubo



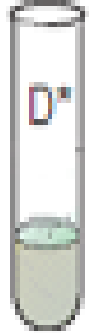
250  $\mu$ L  
Glucosa 2%



250  $\mu$ L  
Lactosa 2%



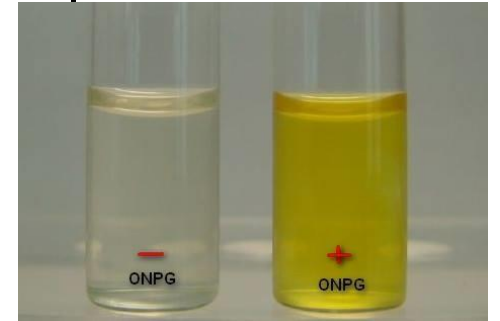
250  $\mu$ L  
Glucosa 2%  
Lactosa 2%



250  $\mu$ L  
Glucosa 2%



250  $\mu$ L  
Glucosa 2%  
Lactosa 2%



Incubar a 37 °C / 15 min

(\*A los 7.5 min de incubación añadir 250 µL de lactosa 2% al tubo D)



Centrifugar a 10,000 rpm / 1 min

Decantar el sobrenadante



1. Resuspender el paquete celular en 250 µL amortiguador Z

2. Añadir 25 µL de CHCl<sub>3</sub> + 12.5 µL SDS 0.1%



Agitar suavemente 10 seg

Añadir 50µL de reactivo ONPG



Agitar e Incubar a T<sub>amb</sub> / 2 min

Añadir 125µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M



Observar intensidad del color amarillo o leer Absorbancia a 420 nm