

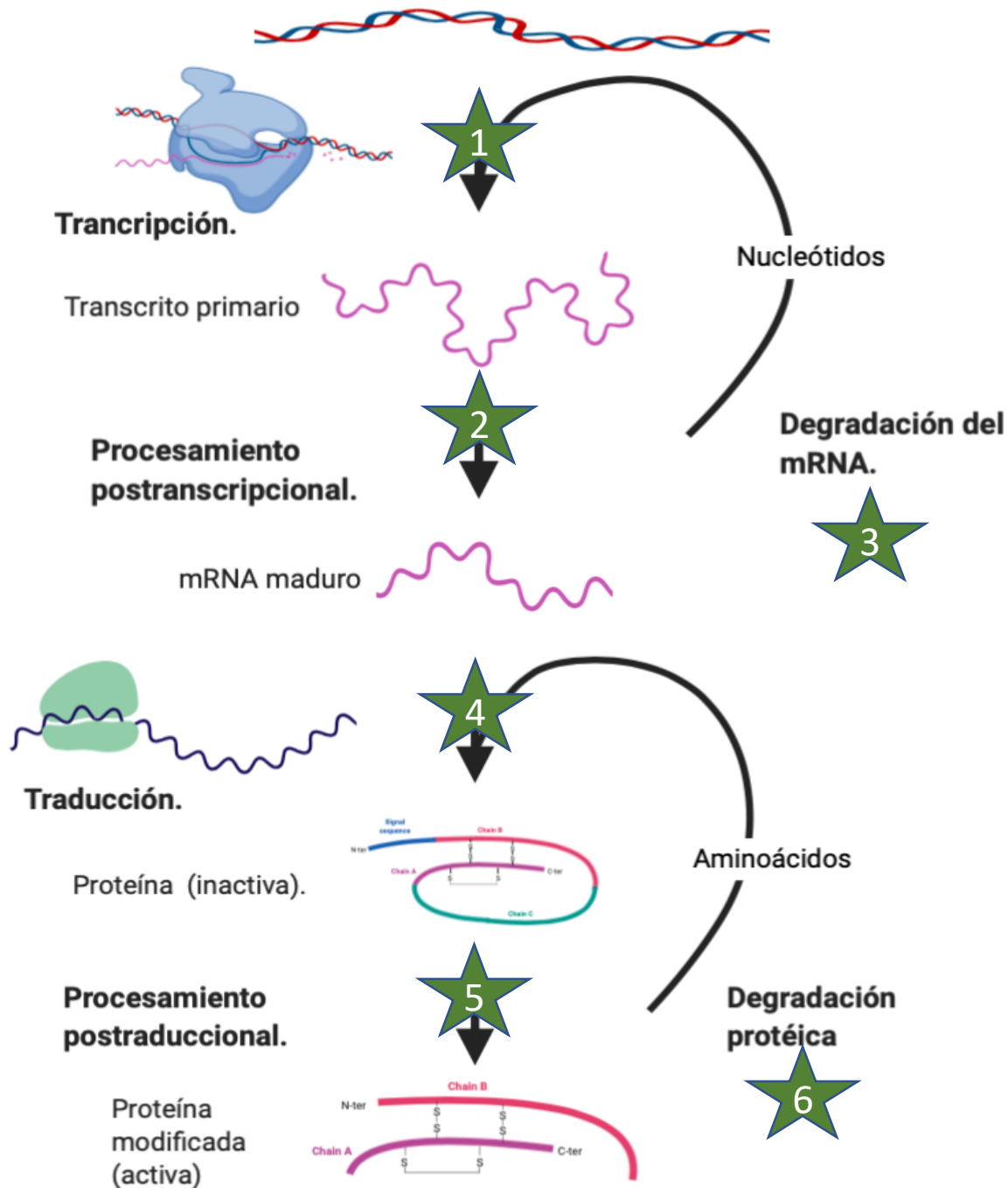
# Regulación del metabolismo.

Regulación genética en el Operón Lac.

QFB Andrés Burgos Palacios.

# Regulación de la expresión génica.

- El ser humano tiene aprox. 30,000 genes, en comparación con los 4,300 genes de *E. coli*. sin embargo, únicamente se expresa una fracción en un momento determinado.



- Se han identificado al menos seis puntos 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 postraduccional de proteínas
6. Degradación protéica

# Regulación al inicio de la transcripción.

- Es el lugar más eficiente para regular la vía, pues se evita una biosíntesis innecesaria. Evita invertir energía.
- Es la regulación más estudiada y parece ser la más común.
- Es un punto excelente para coordinar la regulación de múltiples genes cuyos productos muestran actividades interdependientes.

# Genes constitutivos (housekeeping).

- Son productos génicos que son siempre necesarios, la expresión de estos es más o menos estable en todas las células de una especie u organismo.
- La expresión constante de un gen, que aparentemente no está regulada, se conoce como expresión génica constitutiva.

# Genes inducibles.

- Los productos génicos que incrementan su concentración en determinadas circunstancias moleculares.
- Al proceso que da lugar al incremento en la expresión de un gen, se le denomina **inducción**.

# Genes reprimibles.

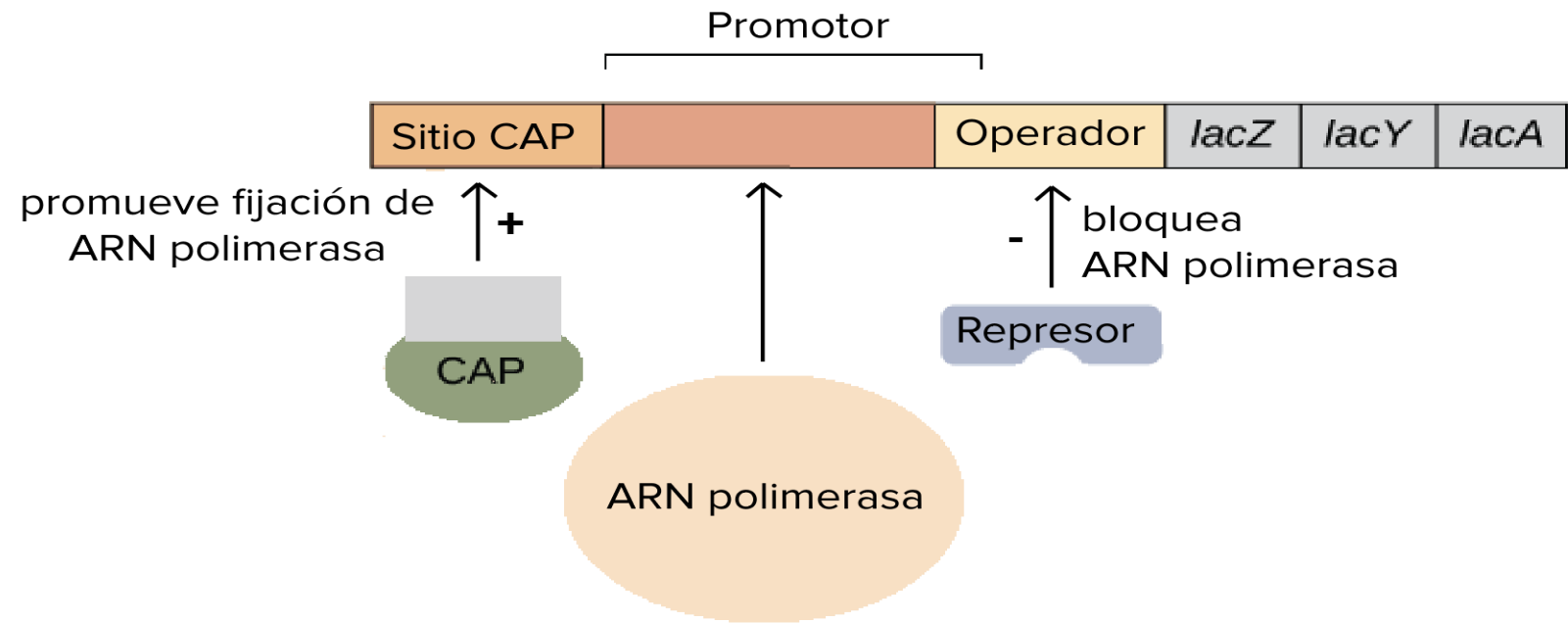
- Los productos génicos que disminuyen su concentración en respuesta a una señal molecular.
- Se le denomina **represión** a la disminución de la expresión génica.

# Regulación de la expresión génica.

- En **eucariontes** la mayoría de los genes estructurales se transcriben de forma individual.
- En **procariontes** los genes están acomodados en tandem a lo largo de una hebra simple, de modo que puedan transcribirse juntos.
- Estas unidades genéticas se llaman **operones** y por lo general tienen genes con **funciones relacionadas**.



# Operón.



## Promotor (P)

Región del DNA, **precedente a los genes estructurales**, que es reconocido por la **RNA polimerasa** para que lleve a cabo la transcripción.

## Operador (O)

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

# Regulación del inicio de la transcripción.

- **Factores de especificidad:** Modifican la especificidad de la RNA polimerasa para un promotor determinado.
- **Represores:** Que, al unirse al promotor, **bloquean** el acceso de la RNA polimerasa.
- **Activadores:** Se unen a zonas cercanas al promotor y **umentan** la interacción RNA pol-promotor.

# Represores.

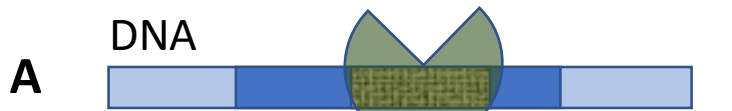
- Se unen a sitios específicos del DNA, en procariotas dichas regiones se denominan **operadores**.
- La regulación mediante una proteína represora que bloquea la transcripción se denomina **regulación negativa**.
- La unión proteína represora-DNA, está regulada mediante señales moleculares. Generalmente una molécula pequeña que induce un **cambio conformacional** en la proteína que permite su unión al DNA.

# Activadores.

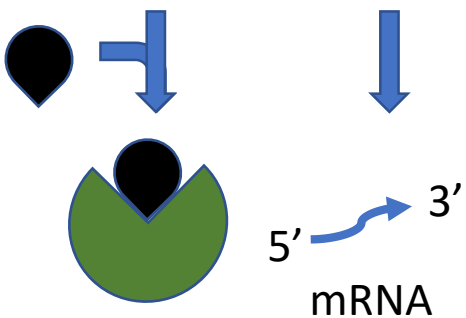
- La regulación mediada por un activador es denominada **regulación positiva**. Los activadores se unen a sitios adyacentes al promotor, lo que refuerza tanto la unión como la actividad de la RNA polimerasa.
- Sin los activadores la RNA polimerasa se une débilmente o no se une en absoluto.

# Regulación negativa

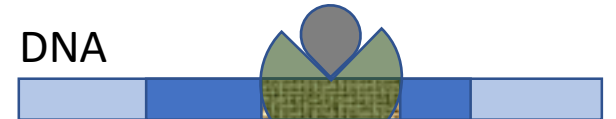
(el represor unido inhibe la transcripción)



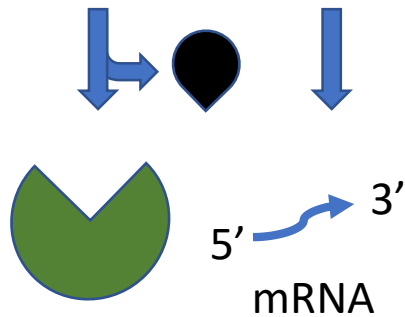
Molécula señal  
origina la disociación  
de la proteína  
reguladora al DNA



**B**

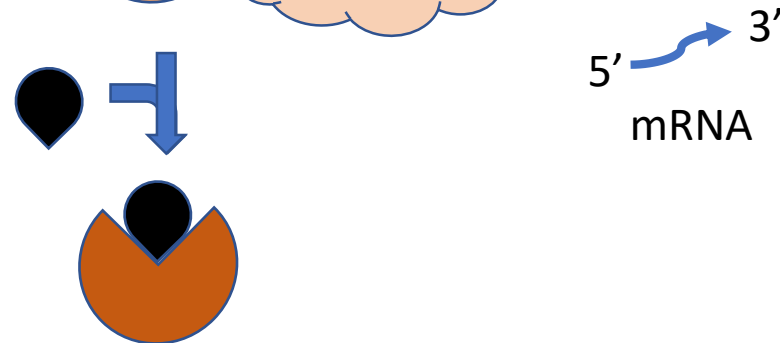
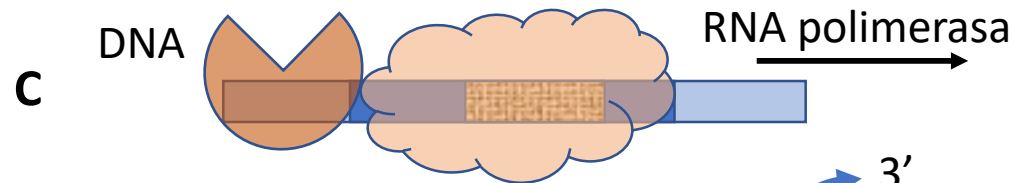


Molécula señal  
origina la unión de la  
proteína reguladora  
al DNA

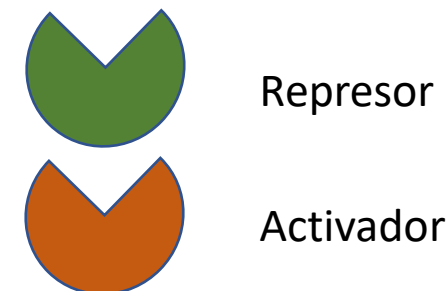
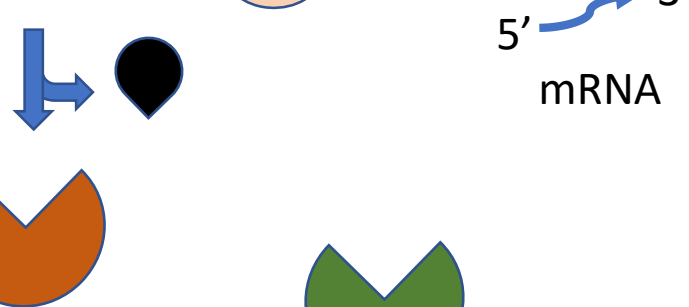
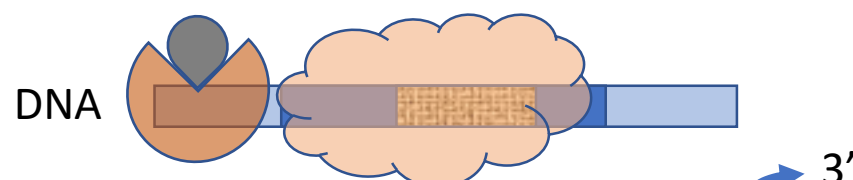


# Regulación positiva

(el activador unido facilita la transcripción)

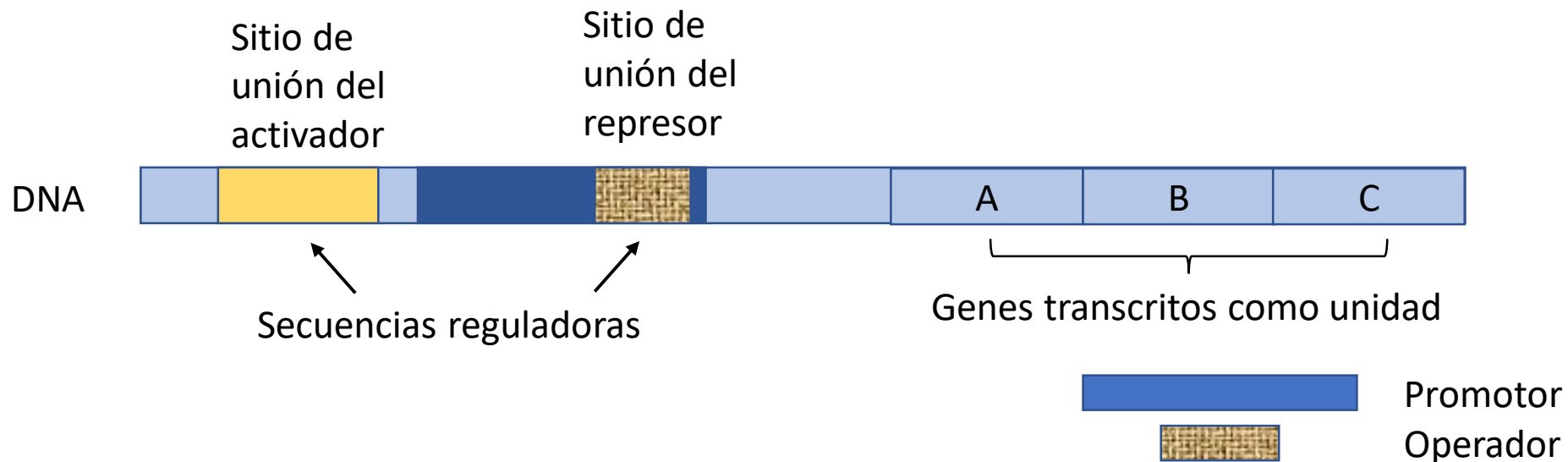


**D**



# Operón.

- Conjunto de genes que pueden **regular su propia expresión** dependiendo de la presencia o ausencia de un sustrato.
- Es común que los operones contengan entre 2 a 6 genes, los cuales se transcriben como unidad, algunos operones tienen 20 genes o más.

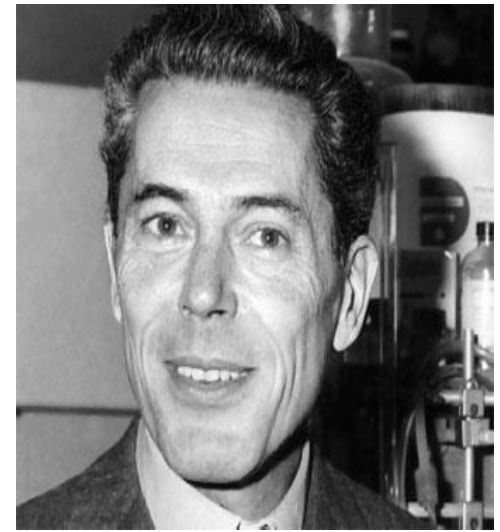


- Los estudios realizados sobre la regulación del metabolismo de la lactosa en *E. coli*, ayudaron a establecer los principios que rigen la regulación de la expresión génica en procariotas.
- *E. coli* tiene la capacidad de usar al disacárido Lactosa, como única fuente de carbono.



François Jacob

Jacques Monod

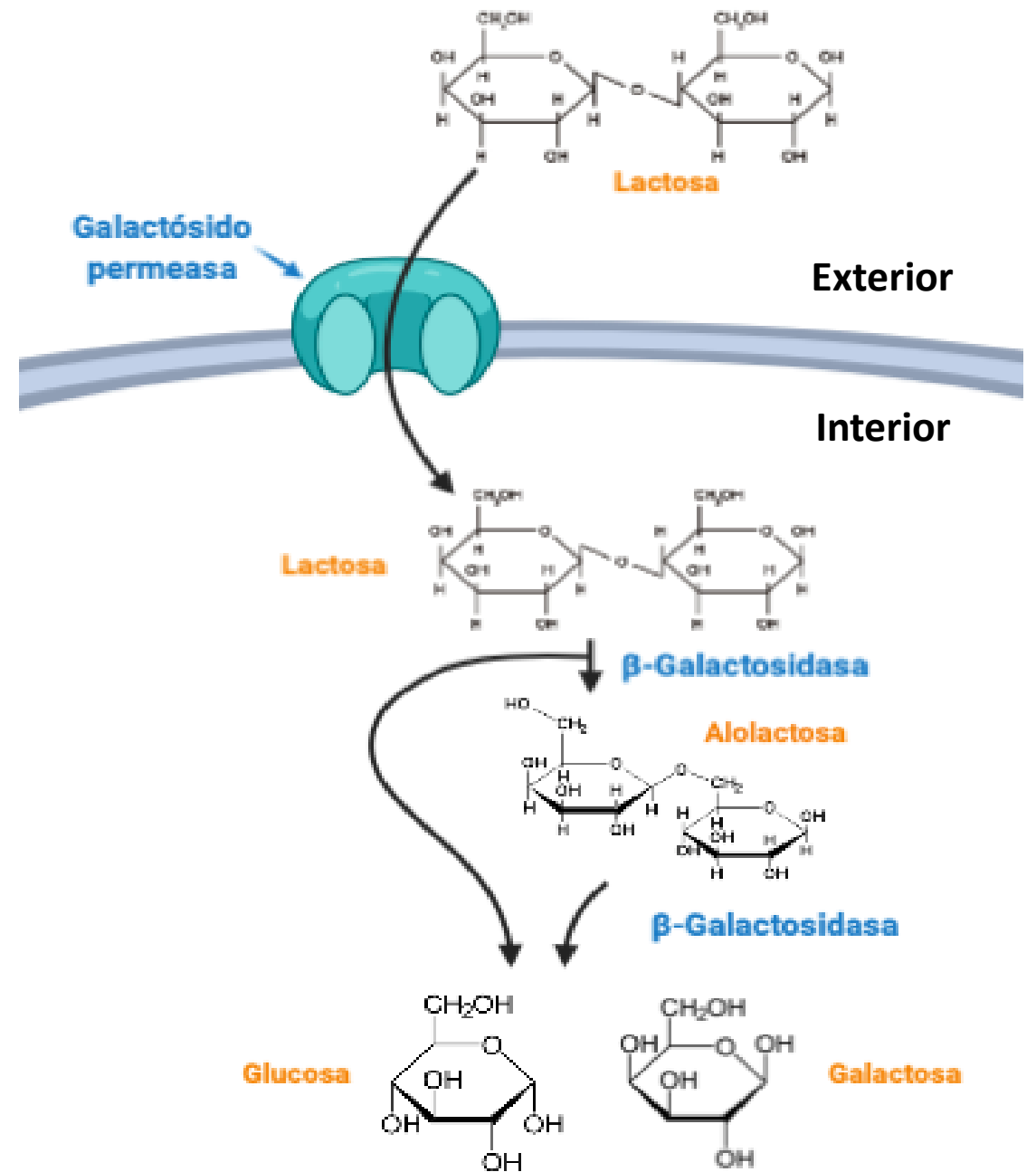


- François J. y Jacques M. **1960** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, Vol 3, (3) 318-356.
- Demostraron que dos genes implicados en el metabolismo de la lactosa estaban regulados coordinadamente mediante un elemento adyacente a ellos.



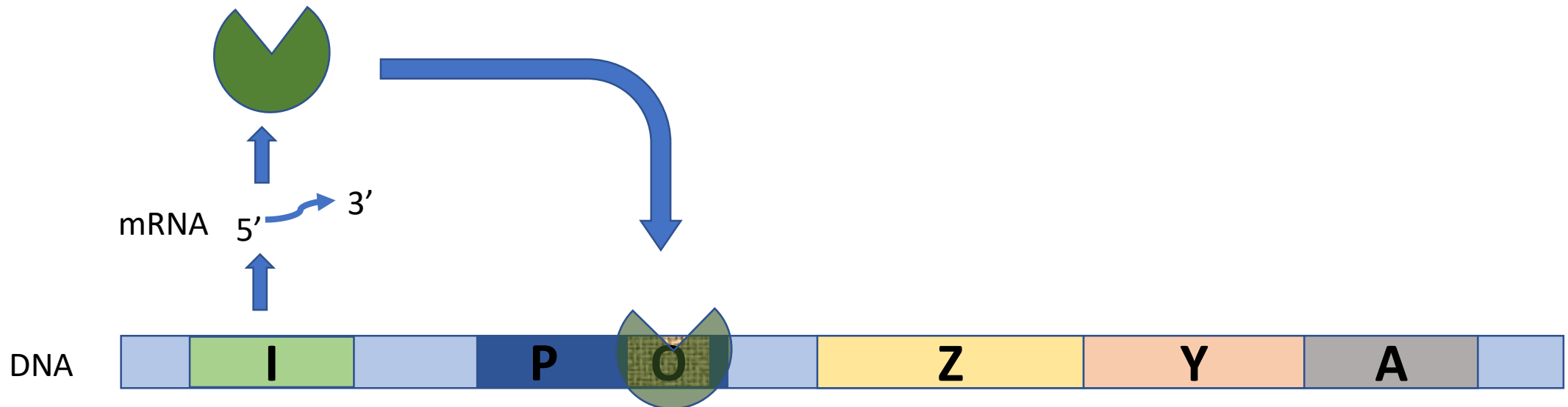
# Operón lac funciona para la utilización de lactosa como fuente de carbono.

- Se trataba de los genes de la  **$\beta$ -galactosidasa**, que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa y la **galactósido permeasa**, que transporta la lactosa al interior de la célula.
- Introducen los términos operón y operador



# Operón de la lactosa (Operón *lac*)

- Genes: (Z)  $\beta$ -Galactosidasa, (Y) Galactósido permeasa y (A) Tiogalactósido transacetilasa.
- Cada uno está precedido de señales de traducción que dirigen la unión del ribosoma y la síntesis proteica.

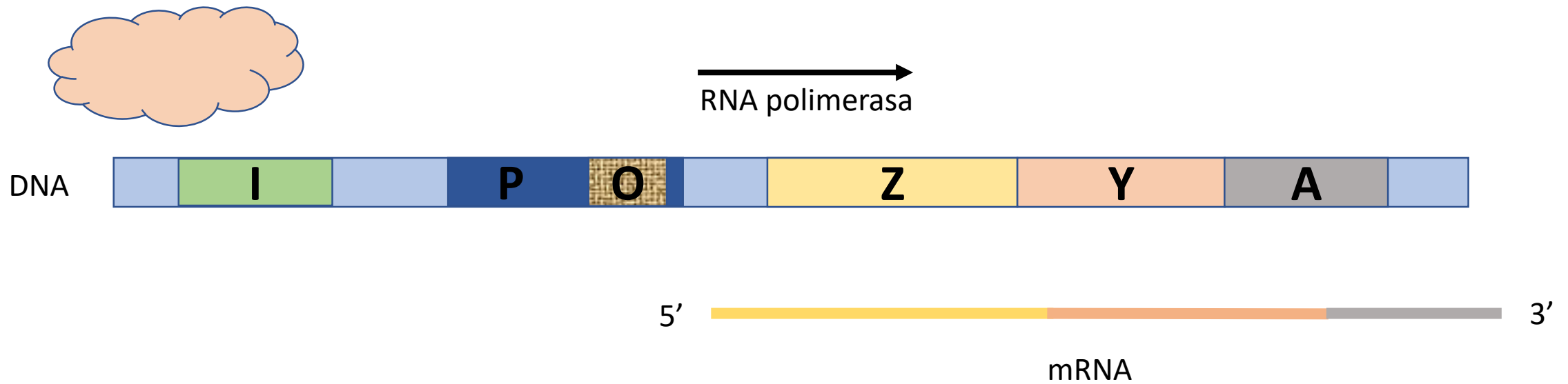
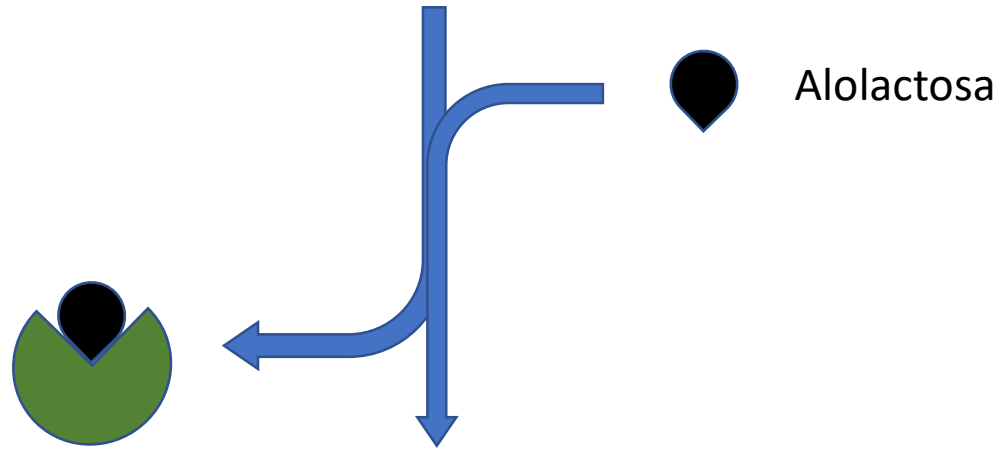
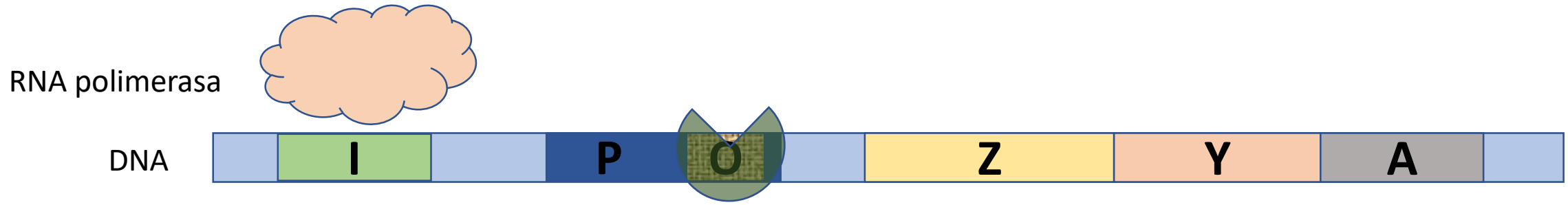


# LacA

- Tiogalactósido-transacetilasa.
- Transfiere acetilos del Acetil-CoA a los  $\beta$ -galactósidos.
- **No esencial** para el catabolismo de la lactosa.
- Parece ser necesaria para destoxificar la célula de otros productos que puedan entrar por acción de la permeasa.

# Regulación del Operón *lac*

- En ausencia del sustrato lactosa, los genes del operón *lac* están **reprimidos**. Existen pocas copias de  $\beta$ -Galactosidasa por célula.
- Si entra una molécula de lactosa, esta será metabolizada a **Allolactosa**, la cuál es una molécula que permite un **cambio conformacional** en el **repressor** del operón de lactosa, **disminuyendo su afinidad** por el DNA, lo que conlleva a la **expresión** de los genes del operón.



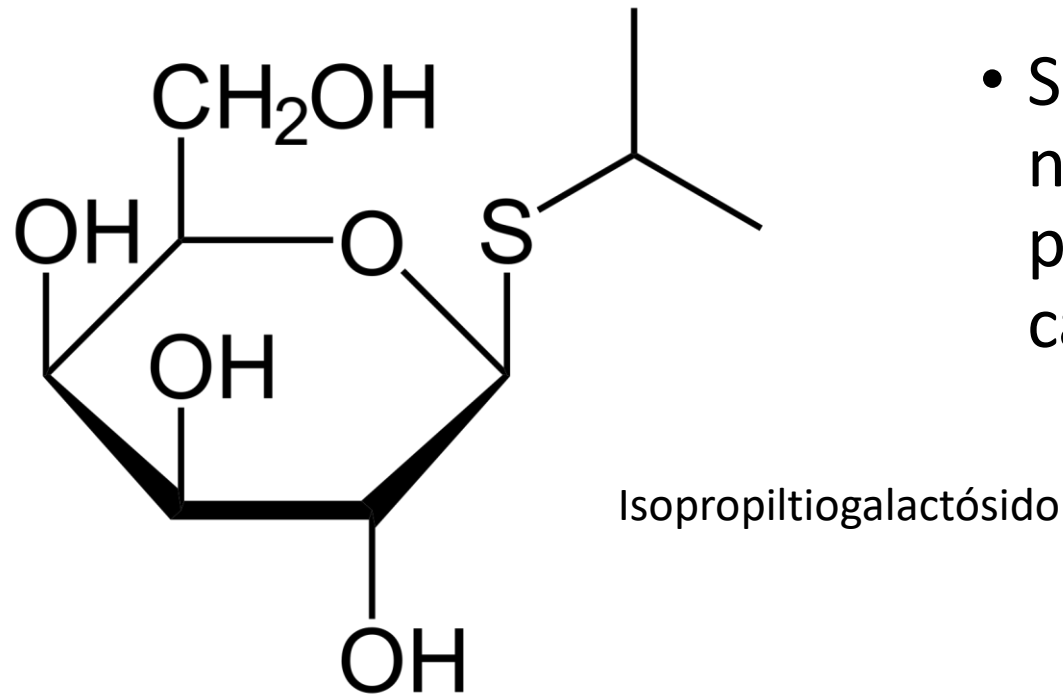
# Análogos de la lactosa

La mayoría son galactósidos derivados de la lactosa. En los cuales la **glucosa** ha sido **sustituida** por un radical o grupo químico.

- IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido)
- Fenil-Gal (fenil- $\beta$ -D-galactosa)
- ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido)
- X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido)
- Alolactosa

# IPTG

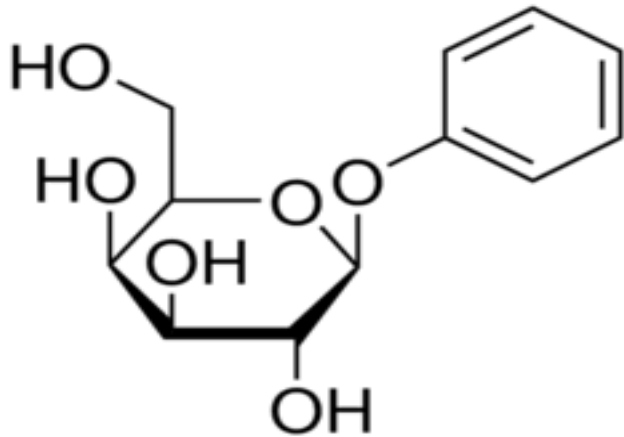
- Inductor del operón lac.
- No metabolizable.



- Se usa como **inductor artificial**, pues no es sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa y por tanto no puede ser fuente de carbono para la bacteria.

# Fenil-Gal

- Sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa.
- No es inductor del operón lac, no puede unirse al represor LacI



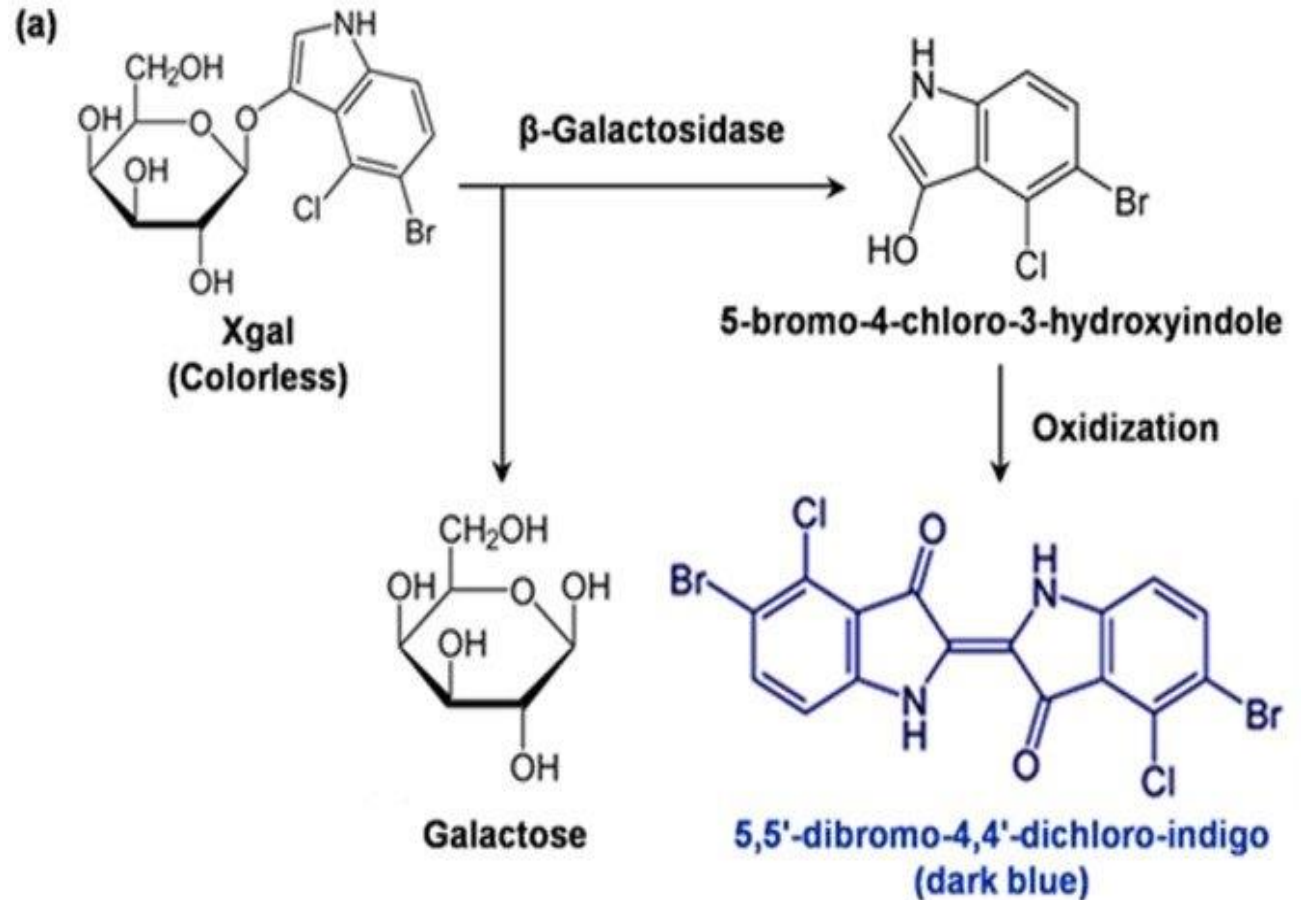
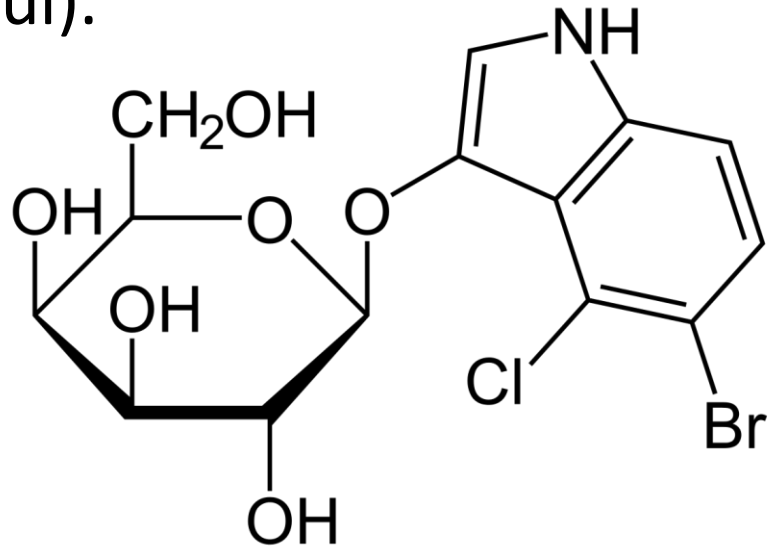
Fenil- $\beta$ -D-galactosa

- Cepas silvestres no crecen cuando la única fuente de carbono es Fenil-gal.
- Sólo los mutantes de LacI podrán crecer en esta fuente de carbono.



# X-gal

- Sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa, al ser hidrolizado produce un compuesto indoxil que al contacto con el aire se transforma en índigo insoluble (azul).



5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido

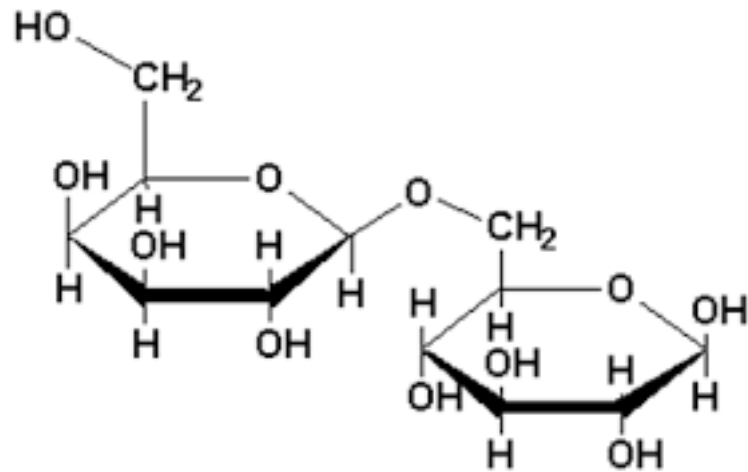
# X-gal



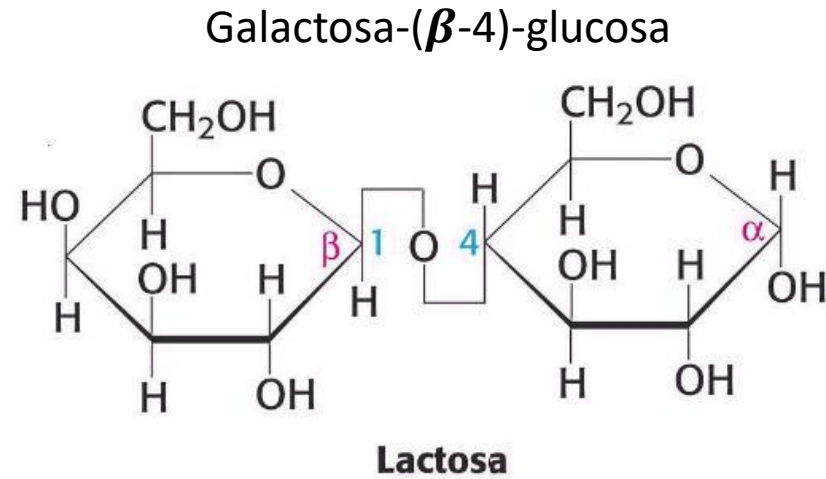
Utilizado como indicador de la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa.

Si se expresa la enzima, X-Gal es metabolizado y dichas colonias tendrán un color azul intenso, en función de la cantidad de enzima expresada

# Alolactosa.



Galactosa-( $\beta$ -6)-glucosa

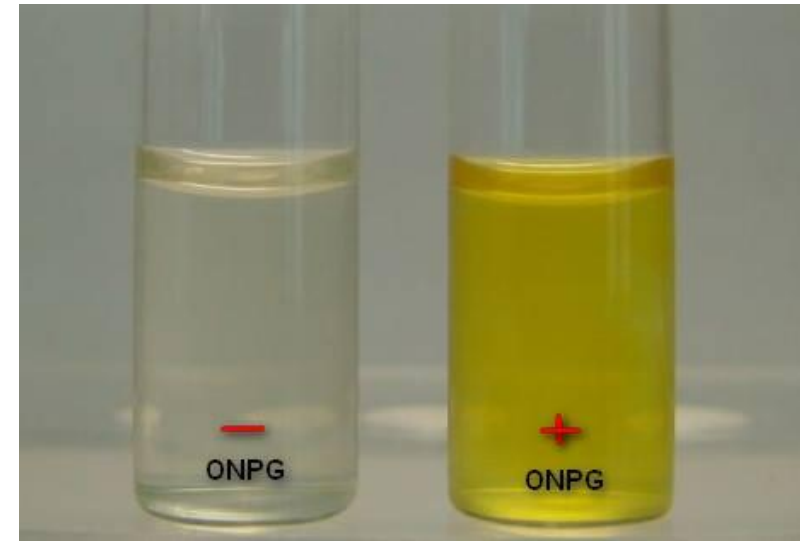
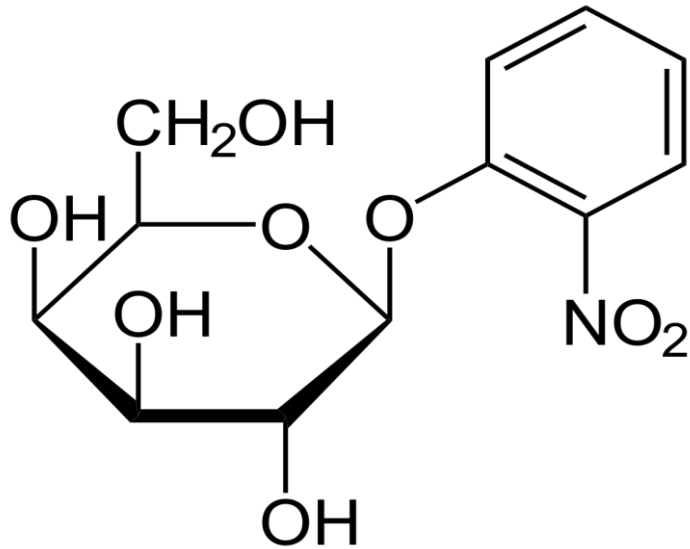


Lactosa

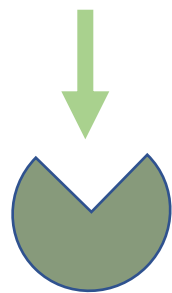
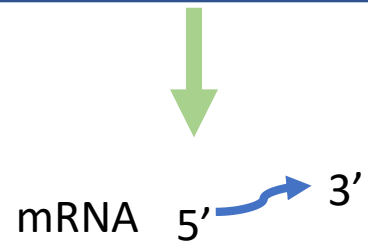
- Isómero de la lactosa, el verdadero inductor de operón lac.
- La lactosa es transformada en alolactosa por la  $\beta$ -galactosidasa en el citoplasma bacteriano.

# ONPG

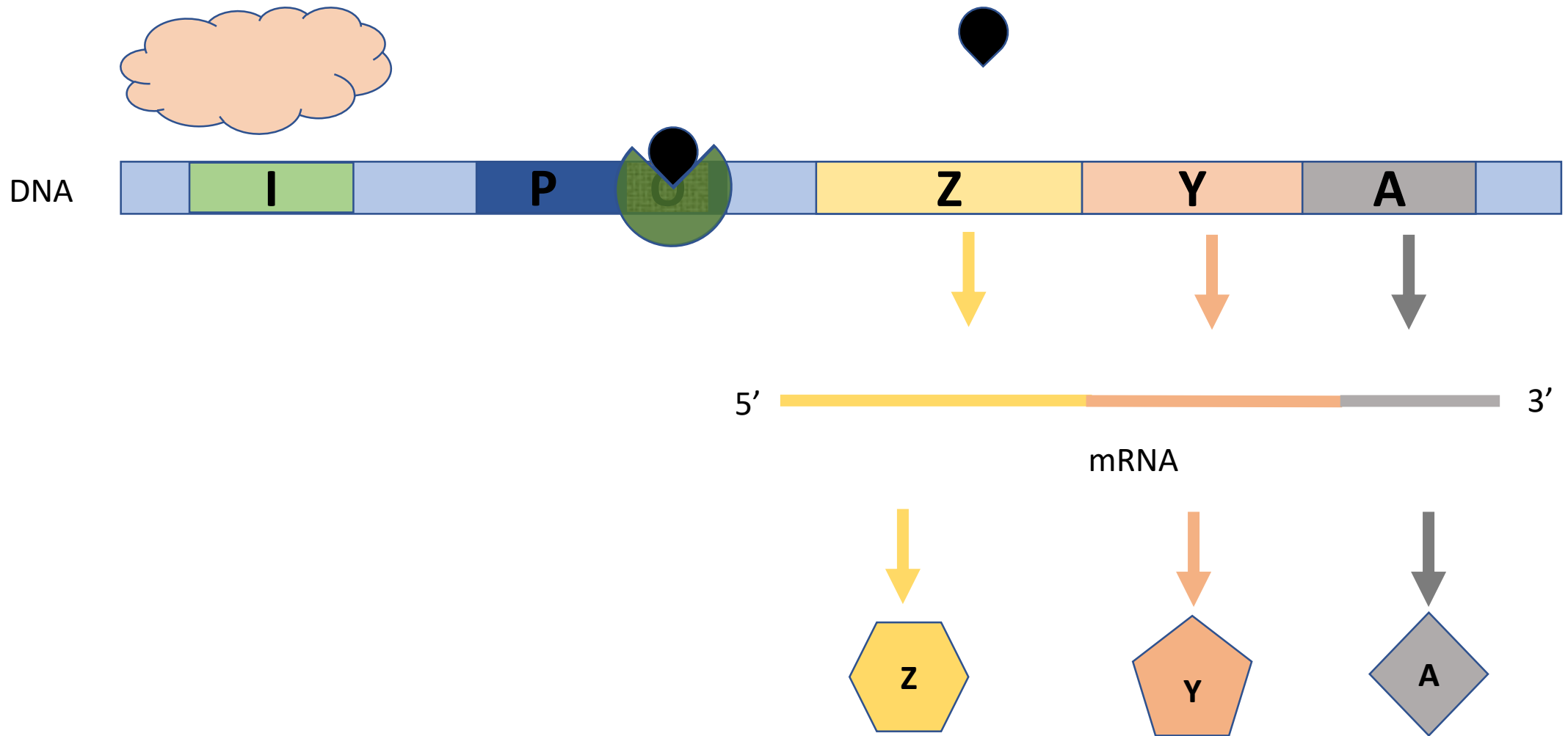
- Sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (ortonitrofenol) que presenta un color amarillo.



- Suele usarse en ensayos *in vitro* para obtener la concentración de  $\beta$ -galactosidasa, en función de la intensidad del color amarillo, medida por la absorbancia a  $\lambda=420\text{nm}$



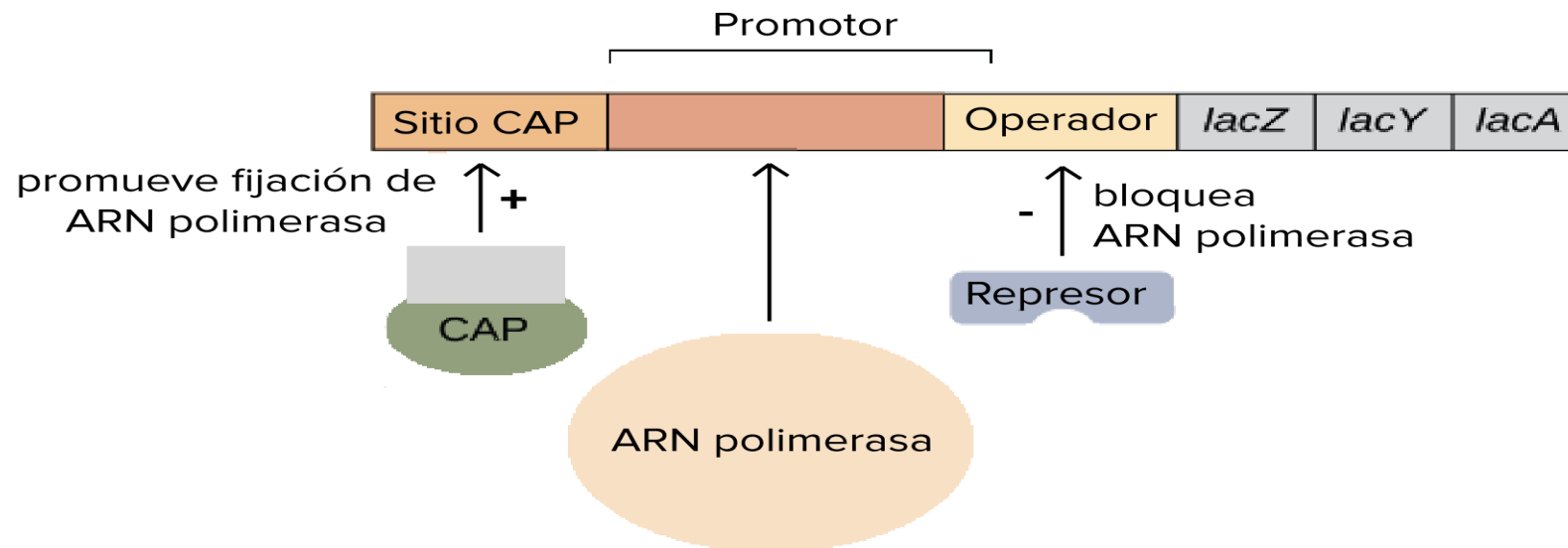
Proteína reguladora (Represor)



(Z)  $\beta$ -Galactosidasa (Y) Galactósido permeasa y (A) Tiogalactósido transacetilasa.

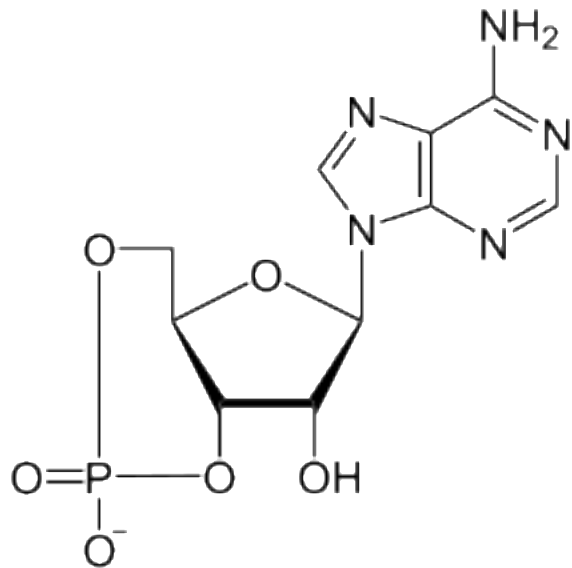
# Modelo de represión catabólica.

- Un mecanismo regulador, es el llamado represión por catabolito, mantiene reprimido los genes implicados con el catabolismo de lactosa, arabinosa y otros azúcares en presencia de glucosa incluso cuando estos azúcares secundarios están presentes.



- El efecto represor de la glucosa está mediado por el cAMP y una proteína llamada proteína activadora del catabolito (CAP)

- Aún en ausencia del represor, el promotor del operón *lac* no es muy fuerte, por lo que requiere la actividad de otras proteínas.
- Activador CRP. cAMP receptor proteín.
- También se le llama CAP: Catabolite Activator Protein.



AMP cíclico

[cAMP]



Si los niveles de glucosa son altos

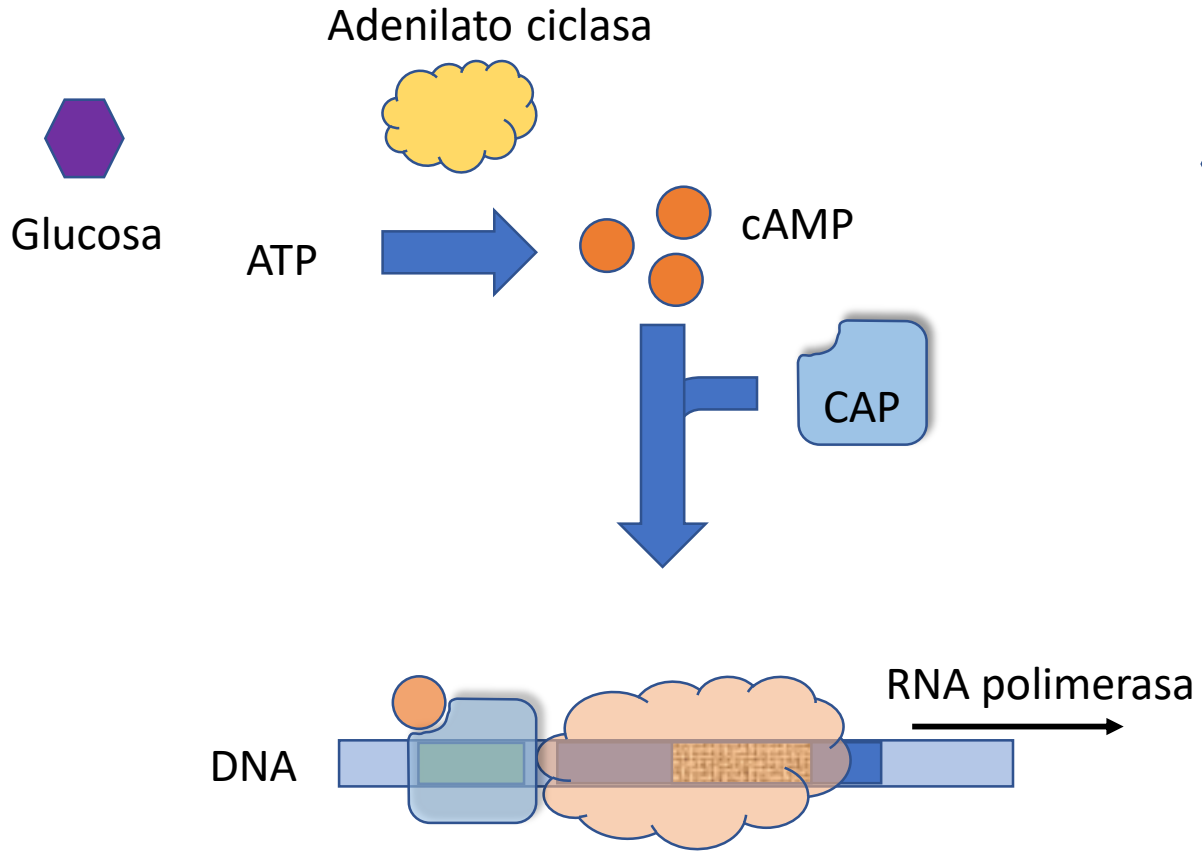
[cAMP]



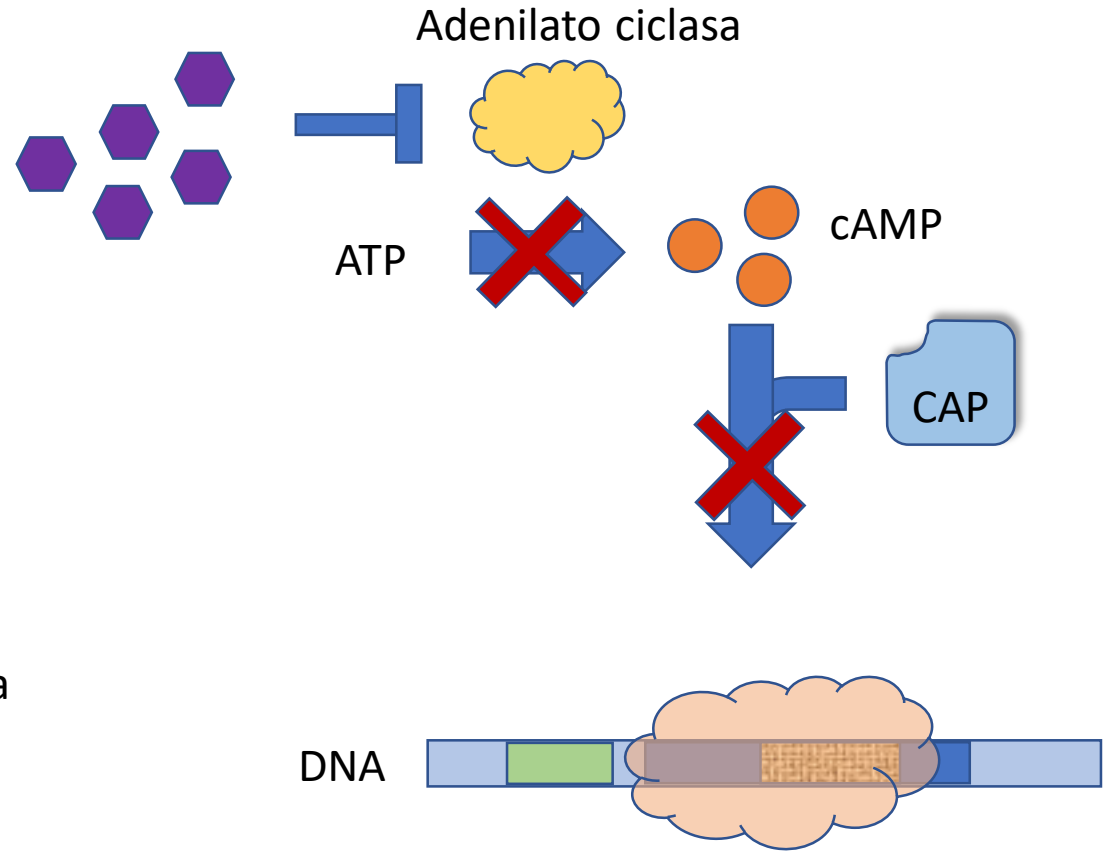
Si los niveles de glucosa son bajos



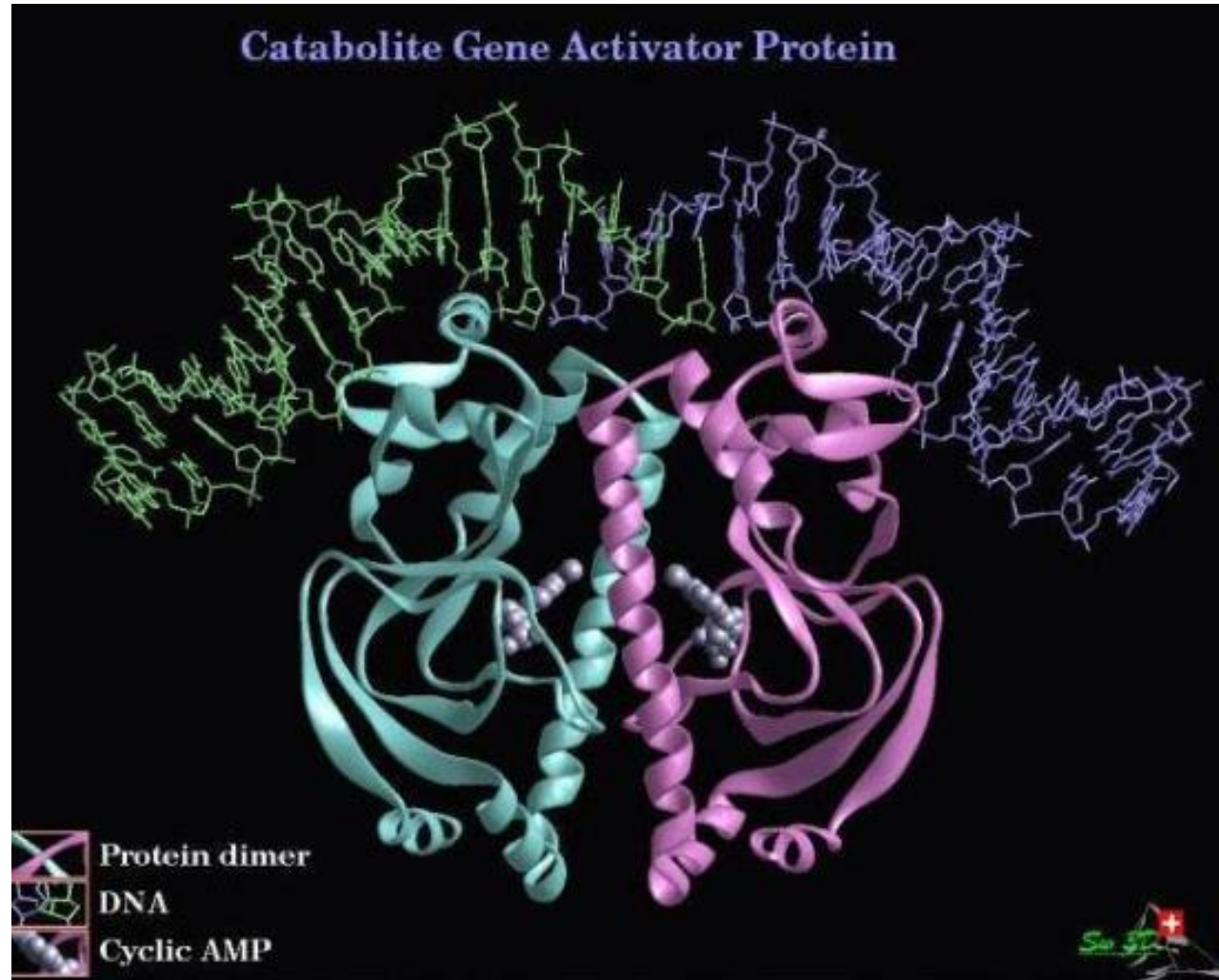
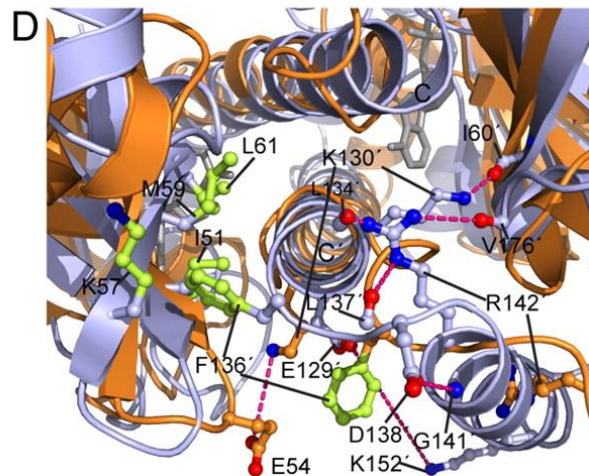
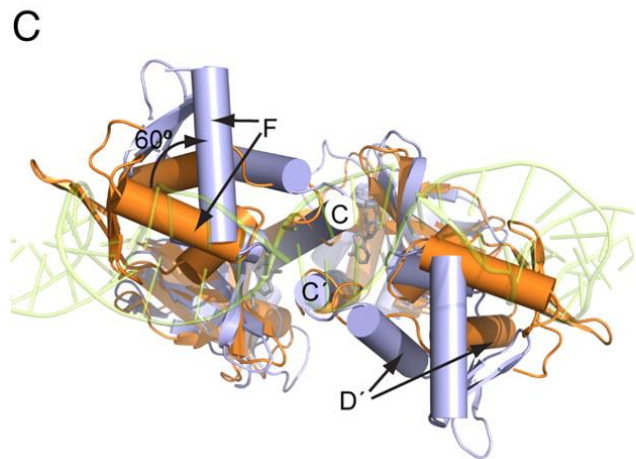
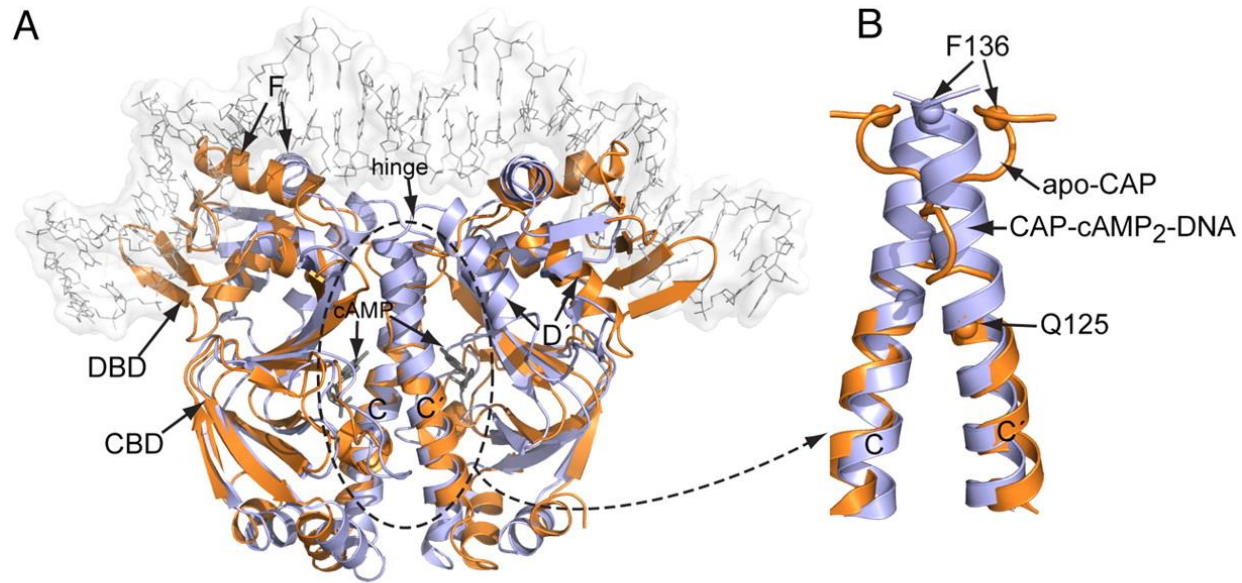
# Baja concentración de glucosa



# Alta concentración de glucosa

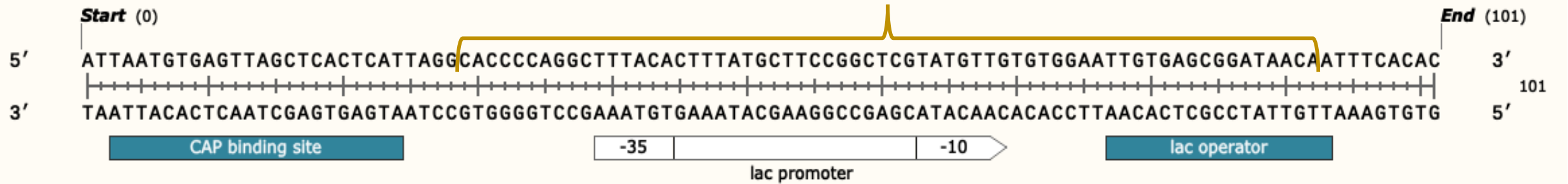


# Estructura tridimensional del homodímero CAP

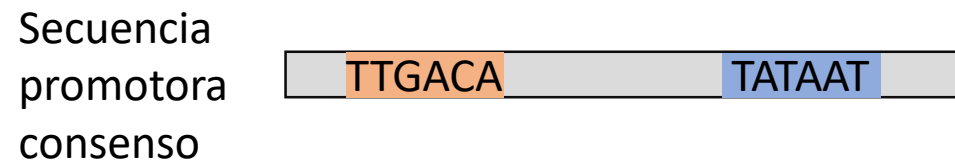
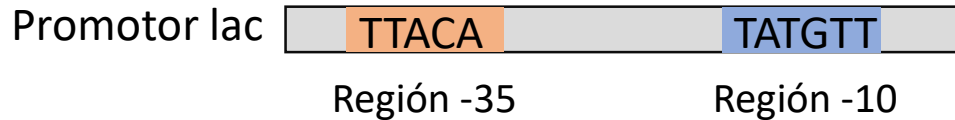


- Cuando los niveles de cAMP se **incrementan**, se une a la proteína CRP/CAP.
- El complejo CAP-cAMP se une al promotor del operón de lactosa y causa un **giro** en el DNA que **facilita** la unión de la RNA polimerasa al promotor.
- Dicha unión incrementa 50 veces la transcripción.

## Sitio de unión de la RNA Polimerasa

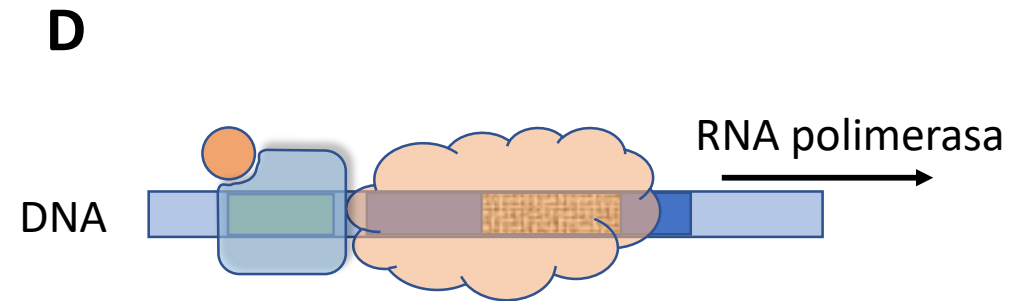
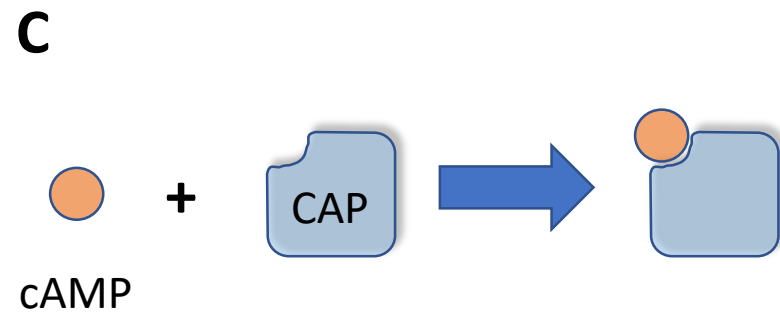
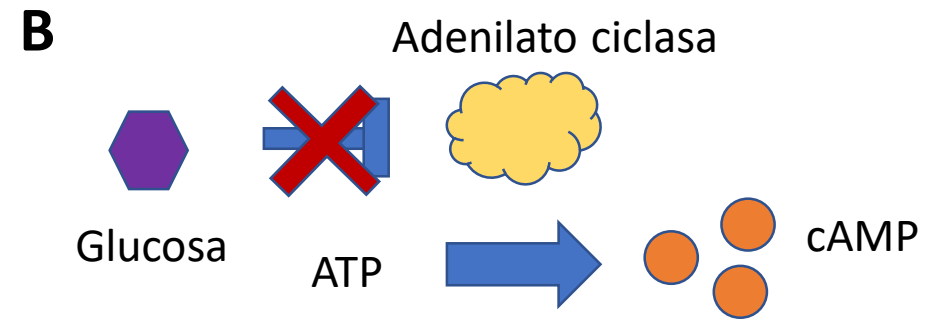
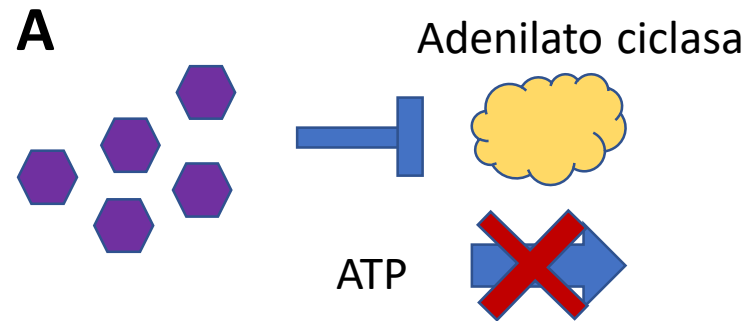


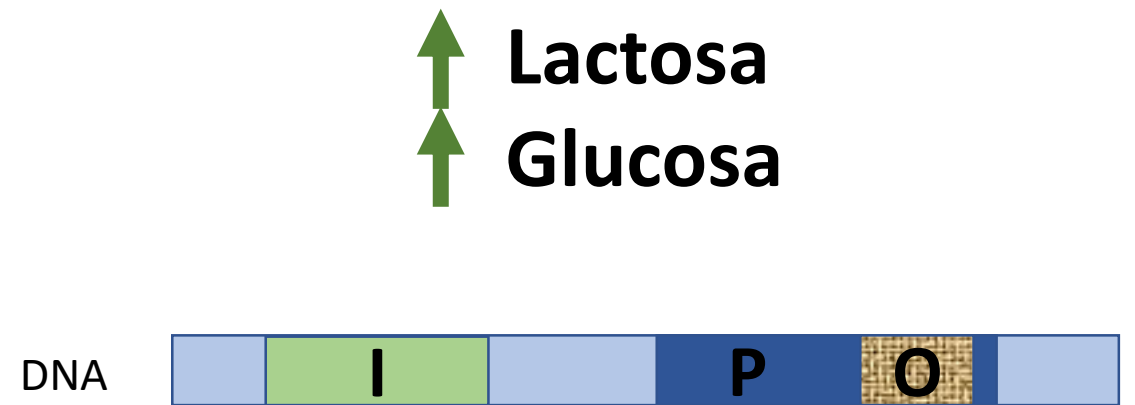
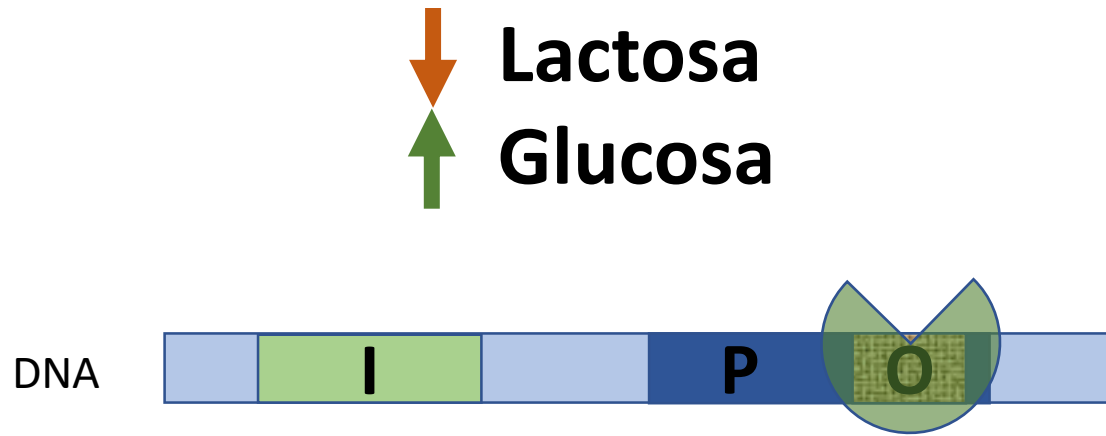
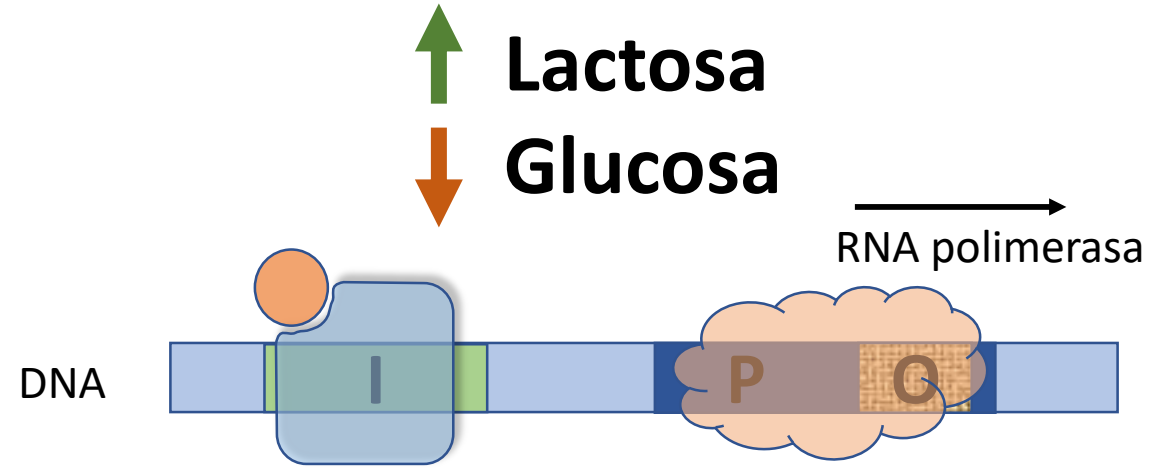
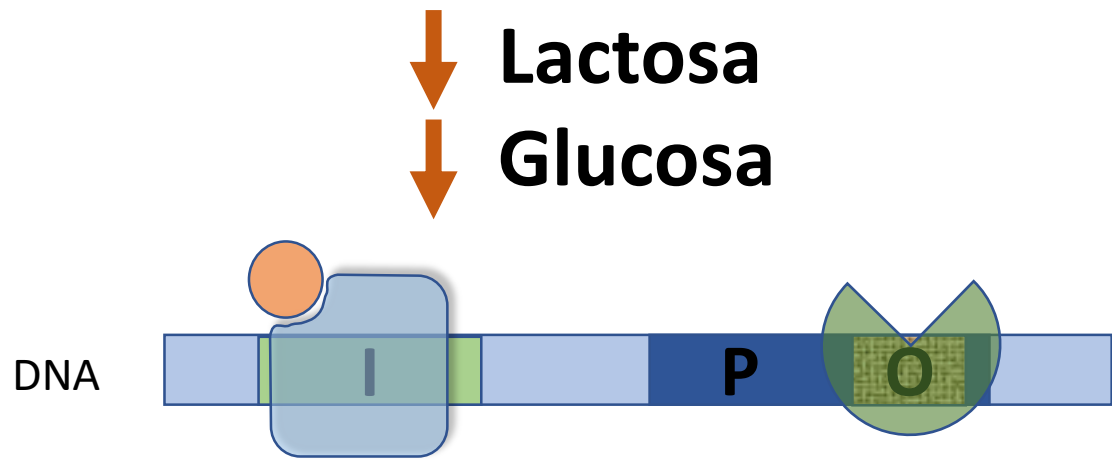
El sitio de unión para CAP está próximo al promotor.



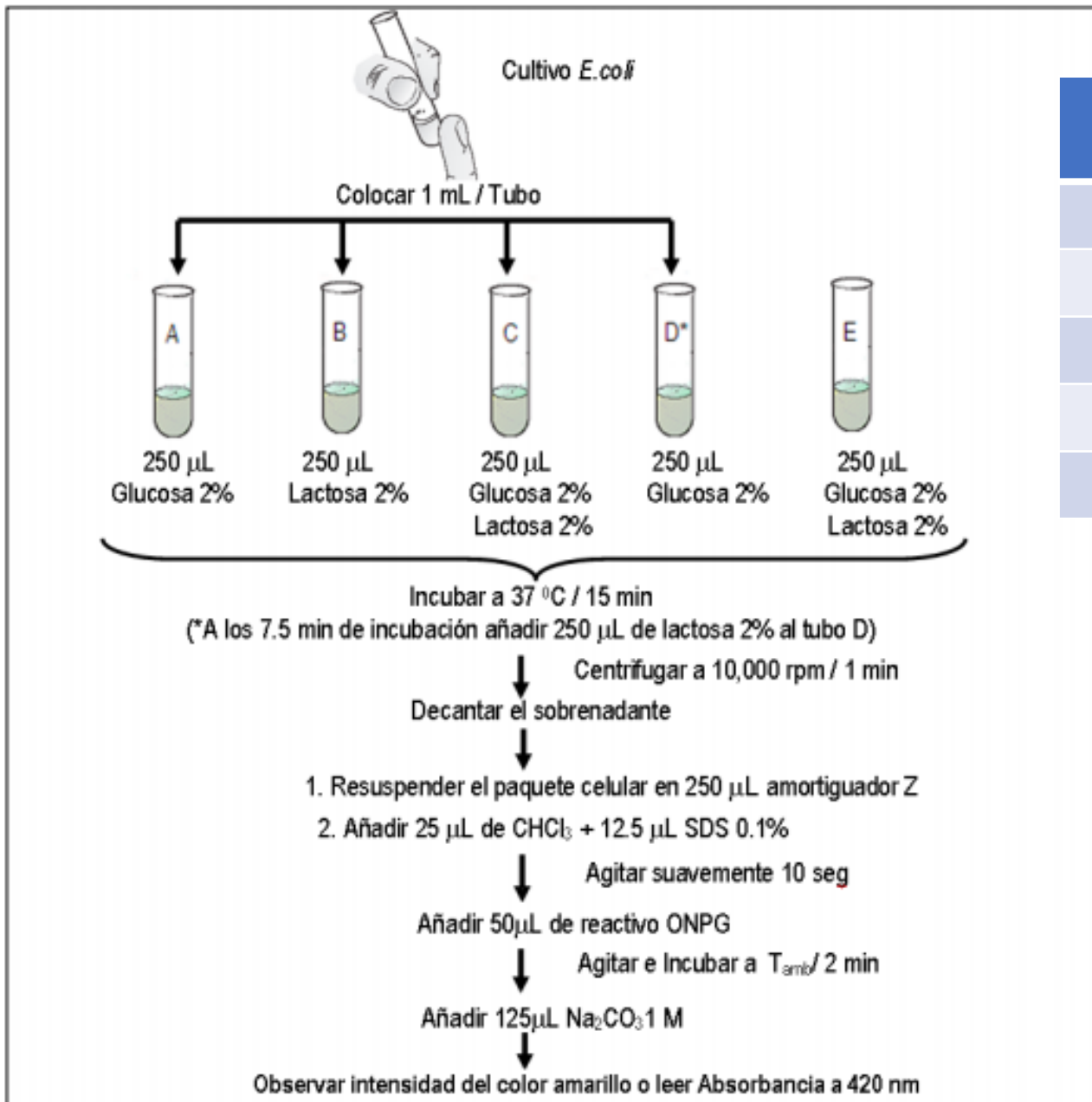
Las diferencias en la secuencia del promotor lac y las secuencias consenso originan una unión relativamente débil de la RNA polimerasa al promotor lac y la correspondiente necesidad de activación por CAP.

# Represión por catabolito del operón *lac*





- La CAP y el cAMP están implicados en la regulación coordinada de muchos operones, principalmente aquellos que codifican enzimas del metabolismo de otros azúcares secundarios como la galactosa y arabinosa. Esta red de operones con un regulador común se denomina regulón.



Tubo	Lactosa	Glucosa	Activador	Represor	Expresión genes <i>lac</i>
A					
B					
C					
D					
E					

Tubo	A	B	C	D	E
ONPG					

Figura 5.2. Protocolo de inducción de expresión de los genes involucrados en la utilización de lactosa