



Expresión de la información genética en eucariotas

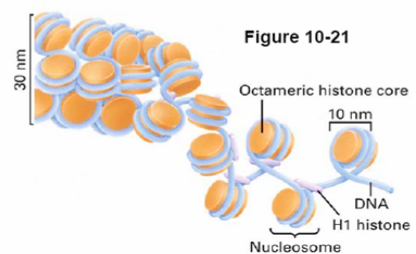
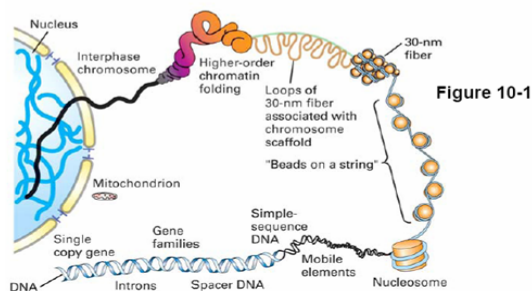
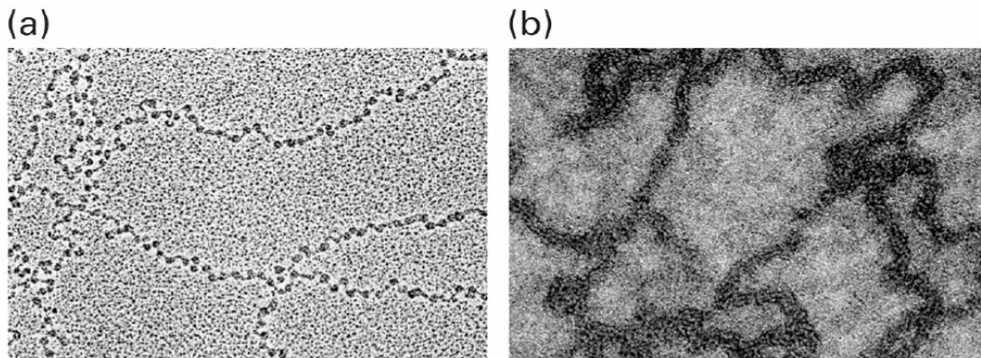
transcripción

► regulación de la transcripción

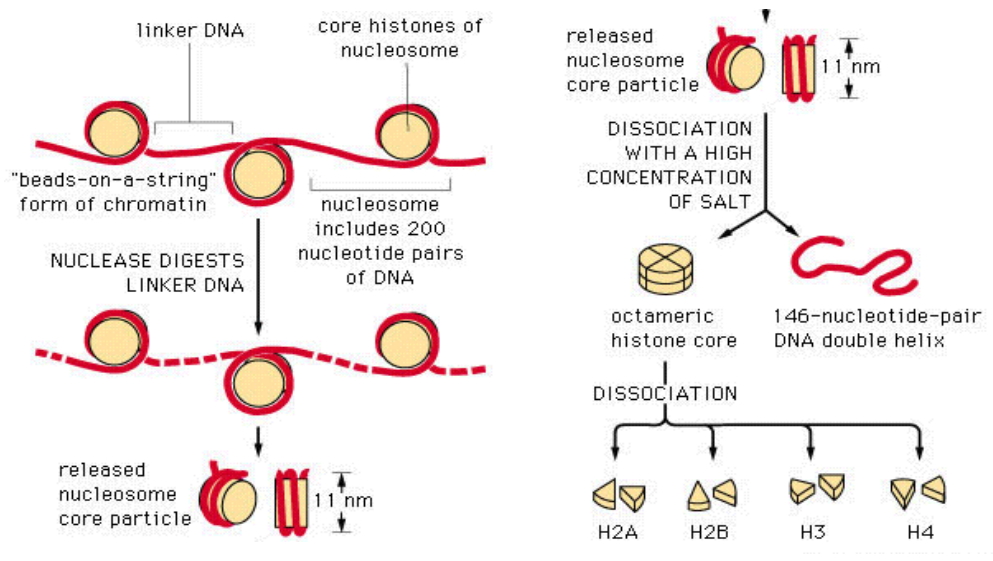
ver cap. 15 Alberts: receptores y señales
Alberts – Molecular Biology Of The Cell. 5th.Ed. pdf

Víctor Romanowski, 2012.

Figure 10-19. Chromatin can exist in either the open, 10 nm beaded string, or a solenoid form of about 30 nm diameter. This solenoid and the more compact forms are probably inactive in transcription.

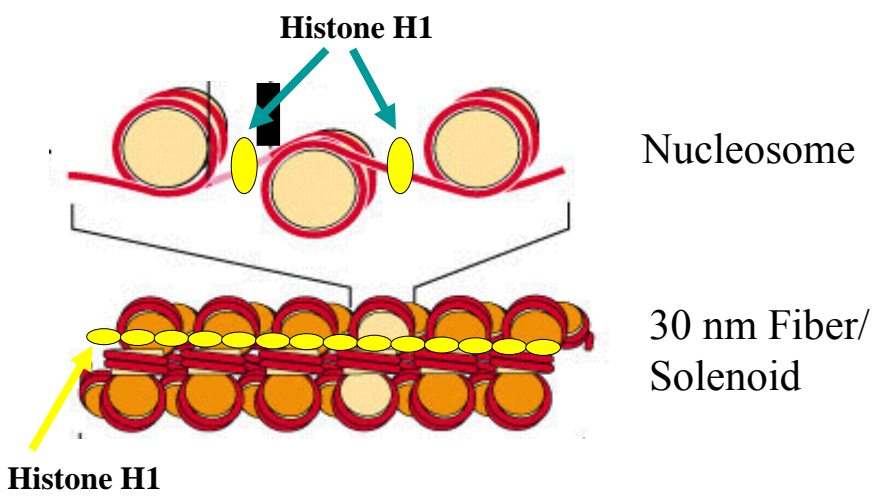


El nucleosoma



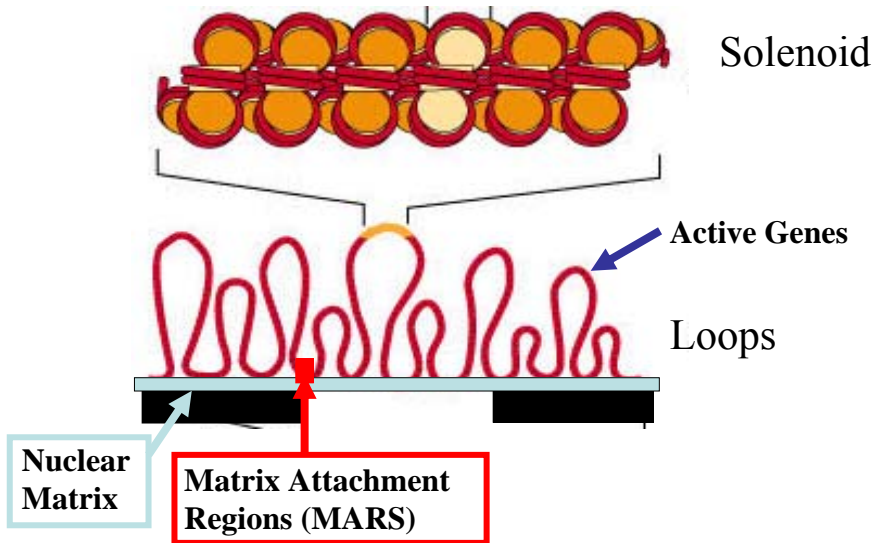
Modified from Figure 8-9, Page 252 from: *Essential Cell Biology* by Alberts et al. 1997, Garland Publishing Inc. New York, NY

Del nucleosoma al solenoide



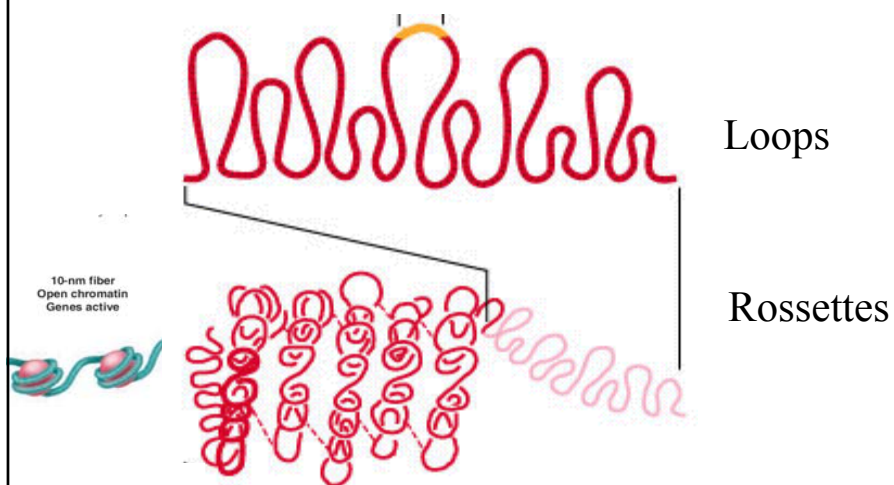
Modified from Figure 8-10, Page 253 from: *Essential Cell Biology* by Alberts et al. 1997, Garland Publishing Inc. New York, NY

Del solenoide a los lazos



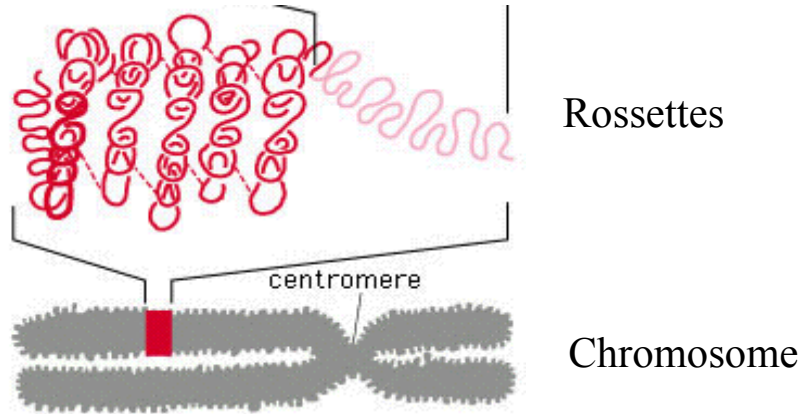
Modified from Figure 8-10, Page 253 from: *Essential Cell Biology* by Alberts et al. 1997, Garland Publishing Inc. New York, NY

De los lazos a las rosetas



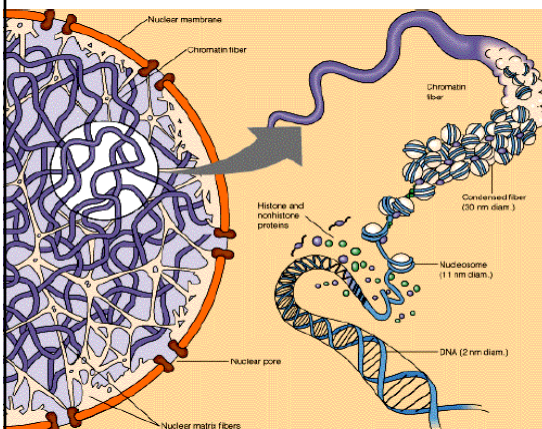
Modified from Figure 8-10, Page 253 from: *Essential Cell Biology* by Alberts et al. 1997, Garland Publishing Inc. New York, NY

De las rosetas al cromosoma



Modified from Figure 8-10, Page 253 from: *Essential Cell Biology* by Alberts et al. 1997, Garland Publishing Inc. New York, NY

Regulación de la expresión génica en eucariotas



~6000 -35,000 genes en levaduras y mamíferos.

- Los elementos regulatorios *cis* están empaquetados en la cromatina, lo que limita su accesibilidad.

- La **cromatina** es dinámica y participa activamente en la regulación de la transcripción eucariota.

- 5-10% del proteoma está directamente involucrados en la transcripción y su regulación (similar a bacterias)

Regulación en eucariotas

La **iniciación** de la transcripción en eucariotas requiere la participación de factores de **transcripción basales** que se unen al promotor, a distancias concretas del inicio.

Además, existen **secuencias intensificadoras (enhancers) o silenciadoras** que pueden actuar a gran distancia y en cualquier orientación.

Estas controlan la estructura de la cromatina y la tasa de transcripción. Aquí se unen otros factores de transcripción, la mayoría activadores.

La **actividad de los factores de transcripción** se puede controlar:

- en el momento de su síntesis,
- por modificación covalente (por ejemplo: fosforilación),
- por unión a un ligando,
- por unión a un inhibidor.

Factores de transcripción

Tienen dos dominios:

dominio de unión a DNA y dominio the *trans*-activación (AD = Activation Domain)

Ejemplos de dominios de unión a DNA (DBD = DNA Binding Domain):

HTH: hélice-vuelta-hélice

HLH: hélice-giro-hélice

Zinc fingers: Dedo de zinc

bZIP: dominio básico

Remodeladores de la cromatina.

Regulación múltiple. Regulación hormonal.

La **complejidad**¹ de las distintas clases de mRNA en células de mamíferos²

Abundance class	Abundance (copies/cell)	Number of different mRNA species	Total
high	12,000	9	108,000
intermediate	300	700	210,000
low (rare)	15	<u>11,500</u>	<u>172,500</u>
		12,209	490,500

Basada en estas medidas, las células contienen:

- ~ 12,209 especies distintas de mRNA
- ~490,500 moléculas de mRNA totales

¹determinada a través de experimentos de hibridación RNA-DNA análogos a curvas Cot ² poly(A)⁺ RNA de hígado de ratón

¿Cómo se generan estos mRNAs y qué determina sus cantidades relativas?

Velocidad de síntesis vs. velocidad de *turnover* (degradación)

Transcripción por las RNA polimerasas II

Mecanismos de activación y represión

¿Qué es transcripción activada?

Transcripción BASAL más _____

Activadores ubicuos
Activadores tejido-específicos
Activadores de desarrollo
Factores activadores de *stress*
Receptores hormonales
Otros....



Regulación

Organización del promotor

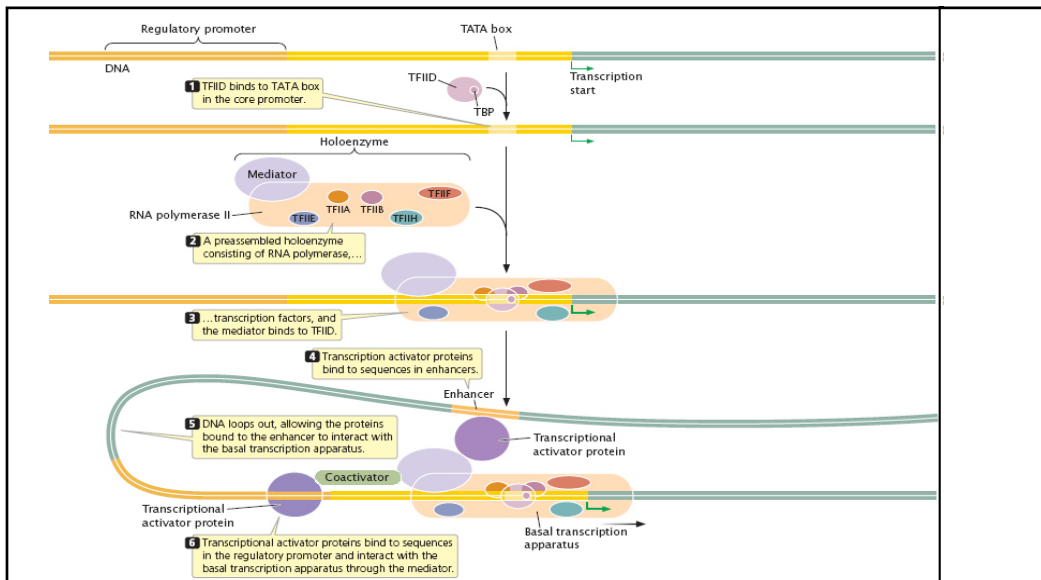
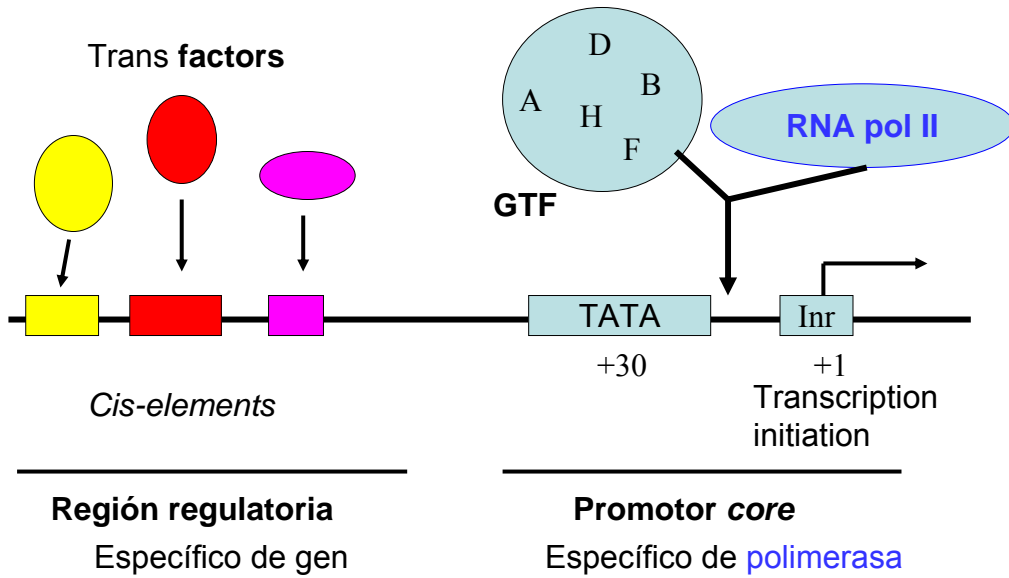
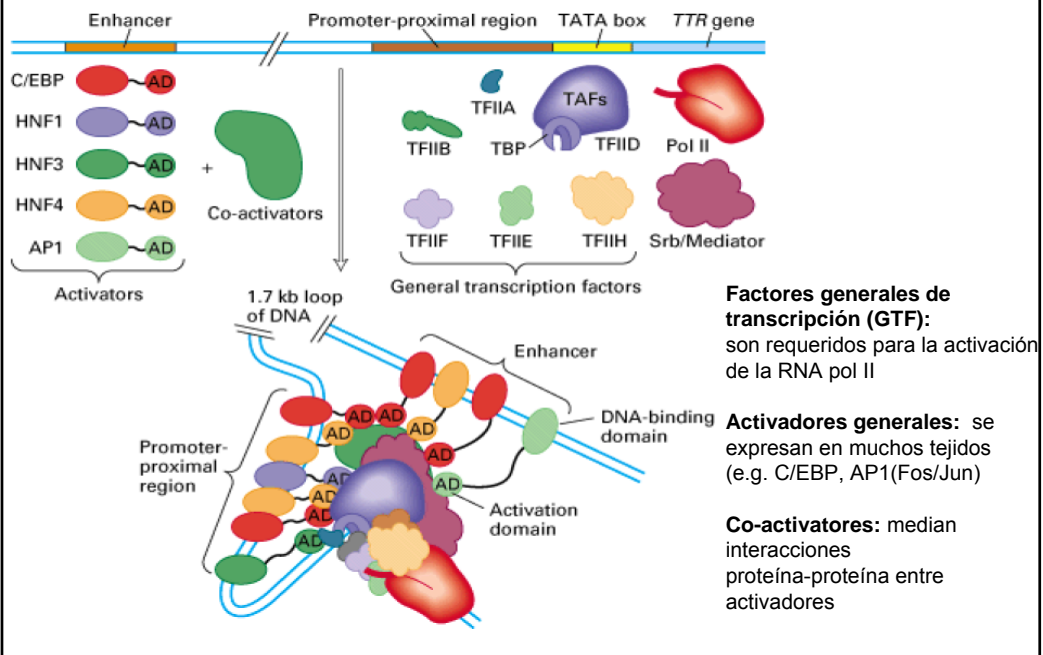


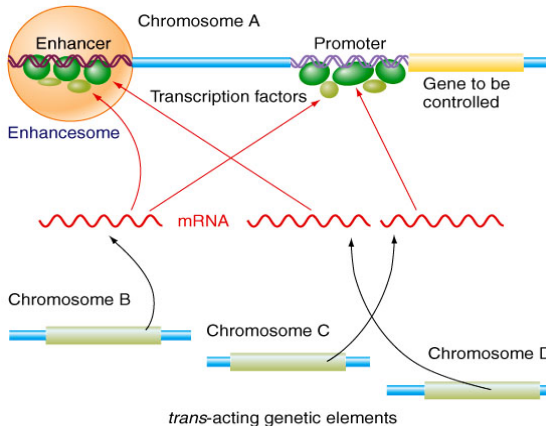
Figure 5 : Transcription is initiated at RNA polymerase II promoters when the TFIID transcription factor binds to the TATA box, followed by the binding of a preassembled holoenzyme containing general transcription factors, RNA polymerase II, and the mediator. Steps 4 and 5 illustrate the binding of transcription activator proteins to the enhancer region, followed by the looping of DNA in order to allow the newly-formed structure to interact with the transcription apparatus. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-gene-colinearity-and-transcription-430>

Factores generales de transcripción y activadores



Factores trans-acting

(b) *trans*-acting gene products interact with *cis*-acting elements

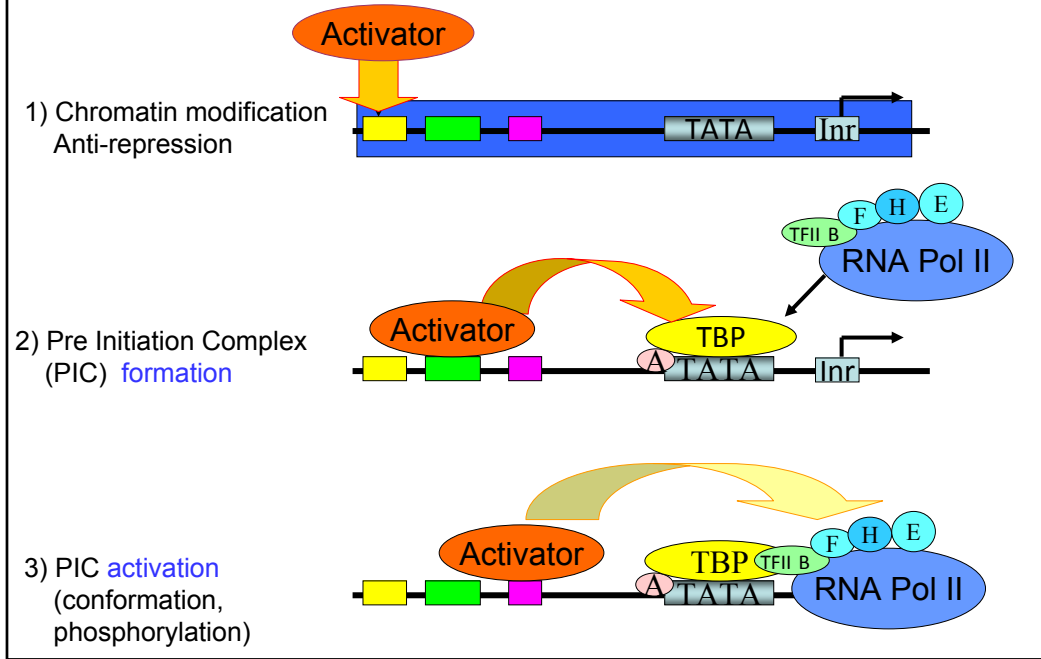


Activadores: proteínas que, cuando se unen a secuencias específicas del DNA, ya sea cercanas o lejanas de los genes, producen una activación de la transcripción.

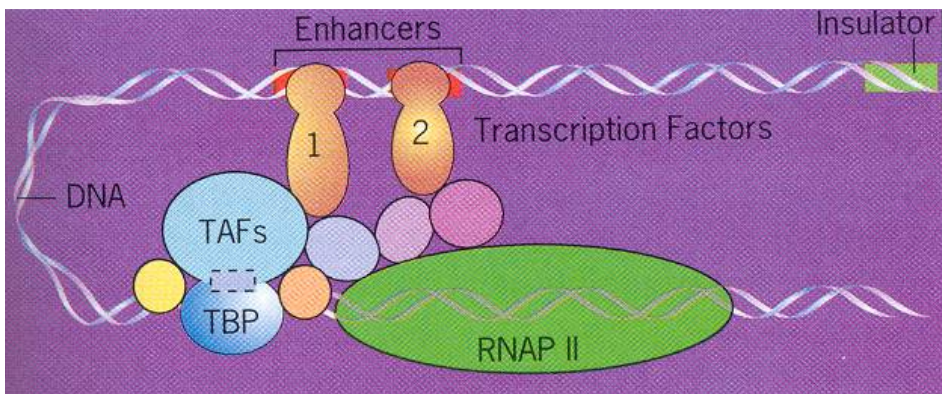
Represores: proteínas que, cuando se unen a secuencias específicas del DNA, ya sea cercanas o lejanas de los genes, producen una represión de la transcripción.

Algunas proteínas regulatorias pueden funcionar como activadores o represores, dependiendo del gen que regulan.

¿Cómo actúan los factores de transcripción?

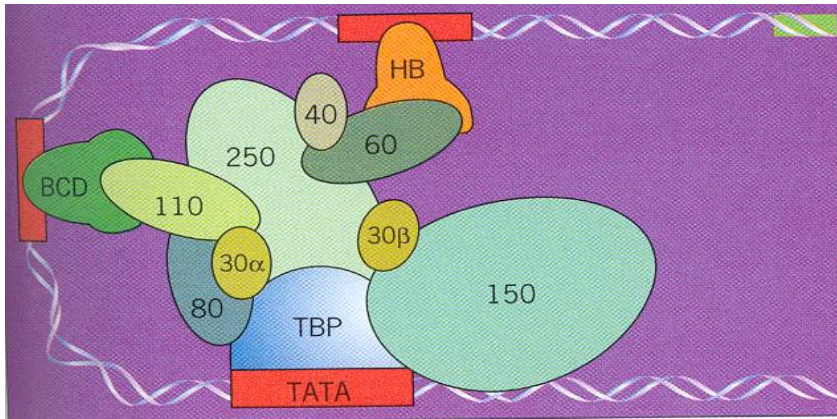


Modelo de transactivación transcripcional



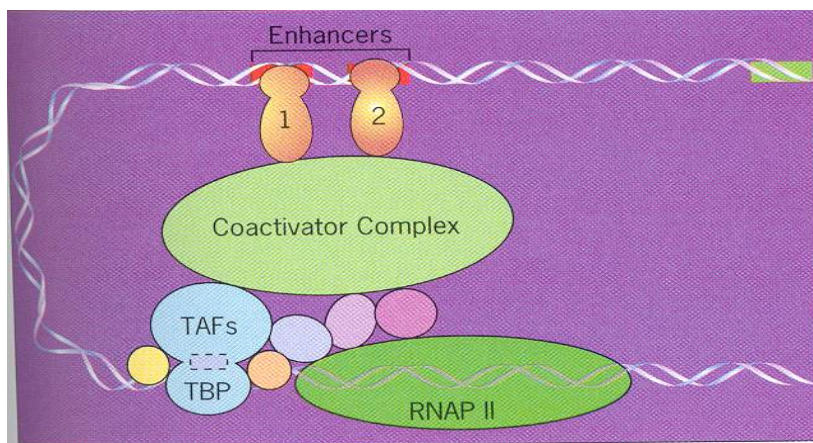
A. Los factores de transcripción favorecen el **reclutamiento** de factores generales de transcripción y de la RNA pol II al promotor core

Modelo de transactivación transcripcional



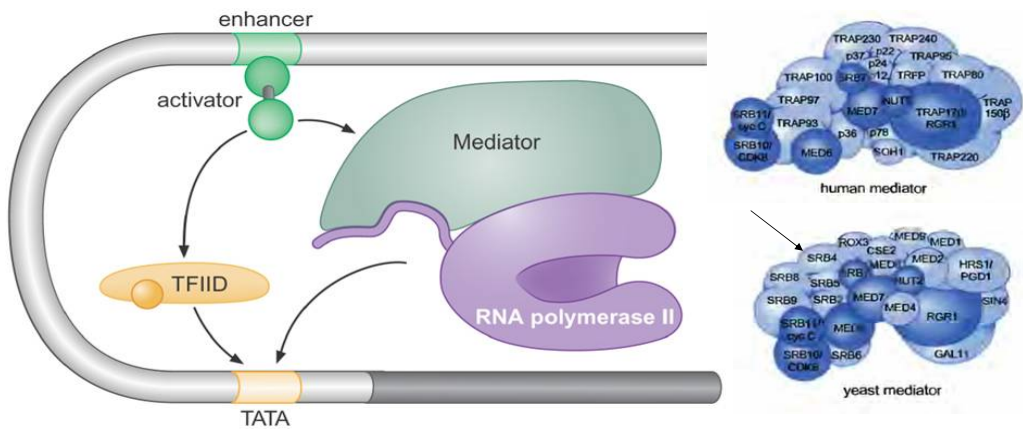
B. Los factores de transcripción **estabilizan** la maquinaria de transcripción ensamblada previamente.

Modelo de transactivación transcripcional



C. Los factores de transcripción **favorecen la interacción** con el core promoter vía el complejo coactivador (mediator)

Modelo de transactivación transcripcional



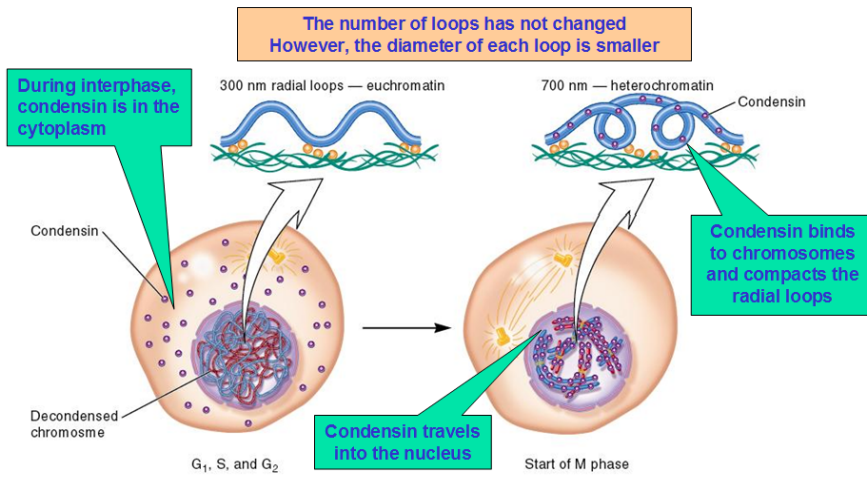
D. Los factores de transcripción interactúan con el CTD de la RNA pol II a través del mediador

Etapas de la transcripción que pueden regularse

el orden puede variar

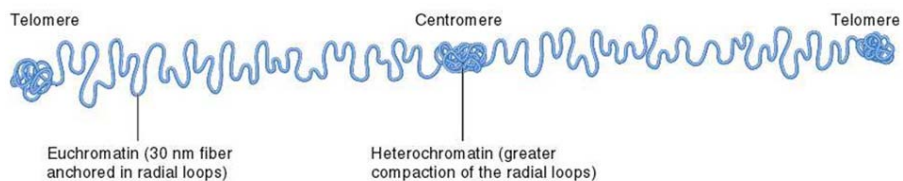
1. Desrepresión de la cromatina
El activador afecta remodeladores y modificadores de histonas
2. Unión de más activadores, co-activadores, desplazamiento de represores
3. Interacción con TFII D y TFII B
4. Formación del complejo de preiniciación
5. Isomerización del complejo cerrado en complejo abierto
6. Paso de la iniciación abortiva a elongación
7. Transcripción a través de nucleosomas
8. Supresión del pausado y frenado (TFIIS)
9. Terminación

Condensación del cromosoma



Eucromatina y heterocromatina

Heterocromatina: Se tiñe fuertemente
 Condensada durante todo el ciclo celular
 Transcripcionalmente inactiva
 Contiene DNA repetitivo y algunos genes
 Puede ser **constitutiva**: telómeros, centrómeros y DNA repetitivo
facultativa: regulada por desarrollo y diferenciación

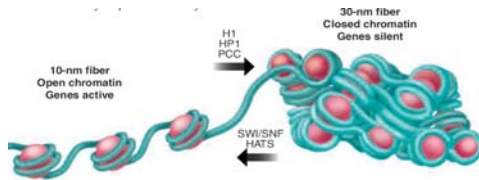


Eucromatina y heterocromatina

Heterocromatina:

Se tiñe fuertemente
Condensada durante todo el ciclo celular
Transcripcionalmente inactiva
Contiene DNA repetitivo y algunos genes

Puede ser **constitutiva**: telómeros, centrómeros y DNA repetitivo
facultativa: regulada por desarrollo y diferenciación

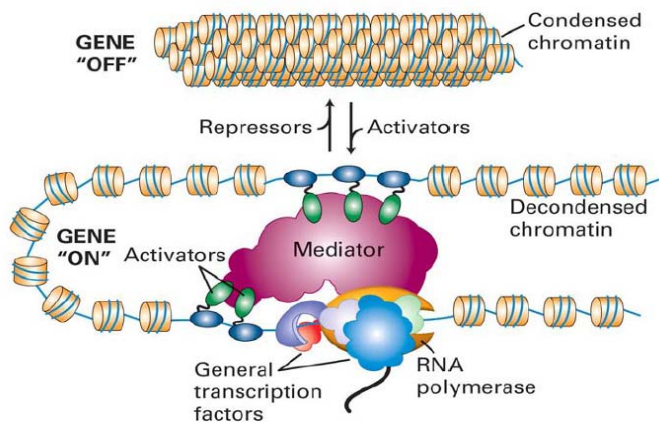


Eucromatina: Regiones menos condensadas que se tiñen menos
Transcripcionalmente activa
Contiene genes *housekeeping* y genes individuales
Fibra de 30 nm organizada en *loops*

¿Cómo ocurre el cambio de la cromatina del estado inactivo a activo?

Algunas regiones de la cromatina nunca son activas.

En otras regiones, ocurre una activación que involucran tanto **modificaciones** como **remodelamiento o reposicionamiento** de las histonas en un gen.

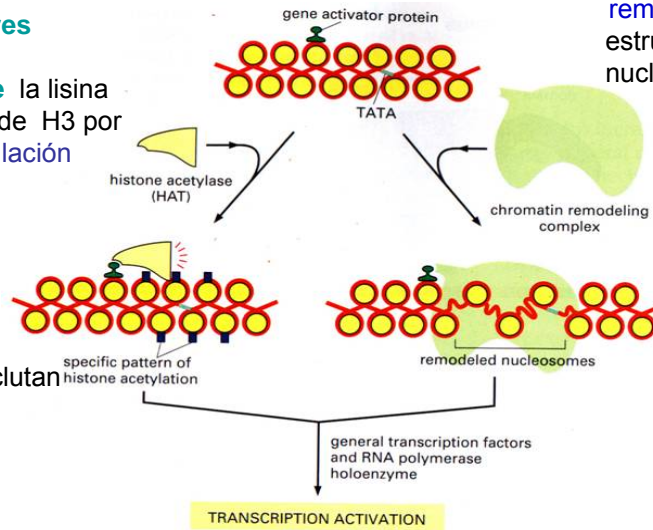


¿Cómo se modifica la estructura de la cromatina para que ocurra la transcripción?

1. Los **activadores modifican covalentemente** la lisina 9 del N terminal de H3 por **acetilación / metilación**

2. Las **histonas modificadas reclutan** otras proteínas

3. Los **activadores remodelan** la estructura del nucleosoma



Modifications of Specific Residues in Histone Tails Control Chromatin Condensation

Euchromatin (active/open)

H3 ARTKQTARK^{Ac}STGGK^PAPRKQL^{Ac}
9 10 14

H3 ARTK^{Ac}QTARKSTGGK^{Me}APRKQL¹⁴

H4 SGRGK^{Ac}GGK^{Me}GLGKGGAKRHRK
3 5

Heterochromatin (inactive/condensed)

H3 ARTKQTARK^PSTGGK^PAPRKQL¹⁰

CENP-A MGPRRR⁷SRKPEAPRRRSP

H3 ARTKQTARK^{Me}STGGK^{Ac}APRKQL⁹

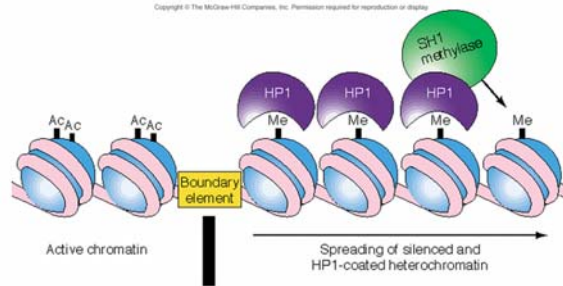
H4 SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK¹²

▲ FIGURE 11-33 Examples of the histone code. Specific post-translational modifications of the N-terminal tails in histones H3 and H4 are found in euchromatin, which is accessible to proteins and transcriptionally active. Different modifications are found in heterochromatin, which is condensed and thus largely

inaccessible to proteins and transcriptionally inactive. Histone tail sequences are shown in the one-letter amino acid code. CENP-A is a variant form for H3 found in nucleosomes associated with the centromeres of mammalian chromosomes. [Adapted from T. Jenuwein and C. D. Allis, 2001, *Science* **293**:1074.]

Chromatin-Remodeling Factors Help Activate or Repress Some Genes: In addition to histone acetylase complexes, another type of multiprotein complex, called the *SWI/SNF chromatin remodeling complex*, is required for activation at some yeast promoters. Several of the SWI/SNF subunits have homology to DNA helicases, enzymes that use energy from ATP hydrolysis to disrupt interactions between base-paired nucleic acids or between nucleic acids and proteins. The SWI/SNF complex is thought to transiently dissociate DNA from the surface of nucleosomes

cromatina activa y heterocromatina



(a) Repressor-directed histone deacetylation

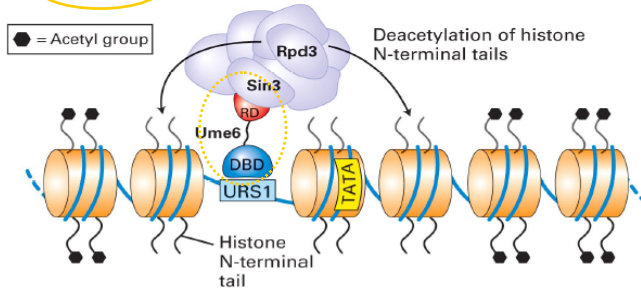
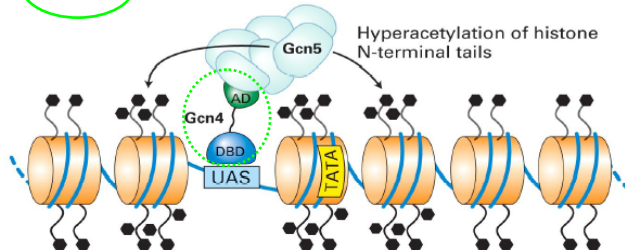


Figure 11-32. Genetic studies in yeast have identified proteins involved in histone modification. The pattern of histone modification forms another genetic code.

Ume6 is a repressor protein

(b) Activator-directed histone hyperacetylation

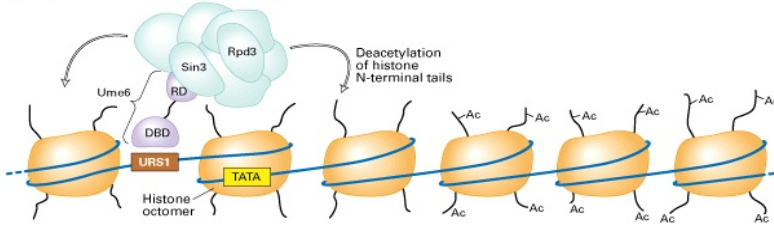


Gcn4 is a transcription activator

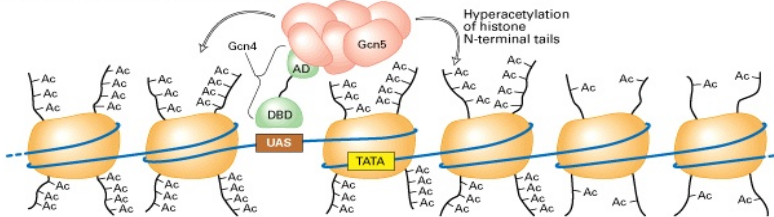
Also, remember that although it is the most studied, histone acetylation is NOT the only histone modification.

Repressors and activators can direct histone deacetylation and hyperacetylation at specific genes

(a) Repressor-directed histone deacetylation

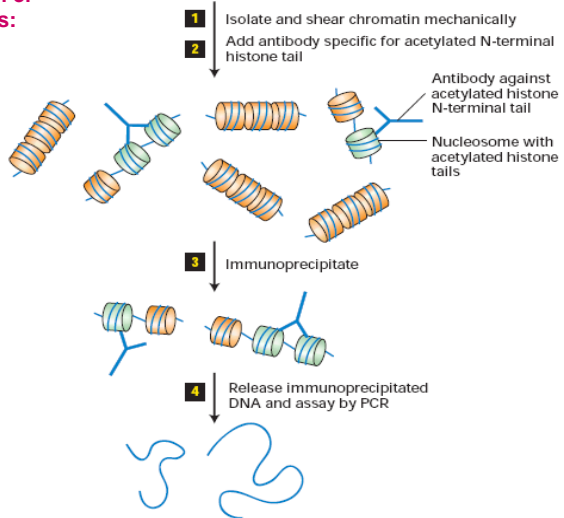
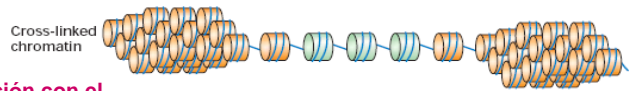


(b) Activator-directed histone hyperacetylation



Acetilación de histonas y su relación con el nivel transcripcional de un gen de interés: detección por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y amplificación de secuencias del gen de interés.

► EXPERIMENTAL FIGURE 11-31
The chromatin immunoprecipitation method can reveal the acetylation state of histones in chromatin. Histones are lightly cross-linked to DNA in vivo using a cell-permeable, reversible, chemical cross-linking agent. Nucleosomes with acetylated histone tails are shown in green. Step 1: Cross-linked chromatin is then isolated and sheared to an average length of two to three nucleosomes. Step 2: An antibody against a particular acetylated histone tail sequence is added, and (step 3) bound nucleosomes are immunoprecipitated. Step 4: DNA in the immunoprecipitated chromatin fragments is released by reversing the cross-link and then is quantitated using a sensitive PCR method. The method can be used to analyze the in vivo association of any protein with a specific sequence of DNA by using an antibody against the protein of interest in step 2. [See S. E. Rundlett et al., 1998, *Nature* 392:831.]

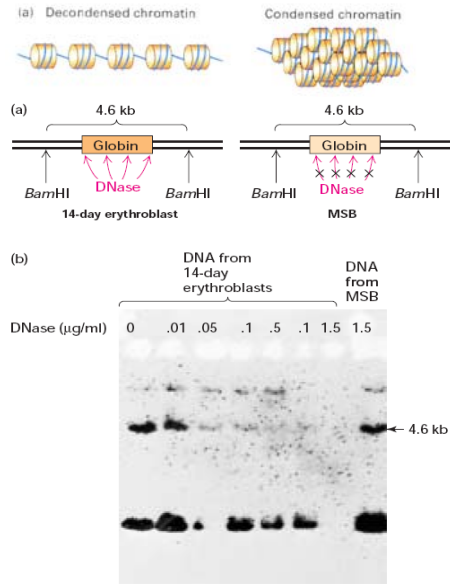


El DNA de genes que se transcriben se encuentra más accesible a la digestión con DNasa I

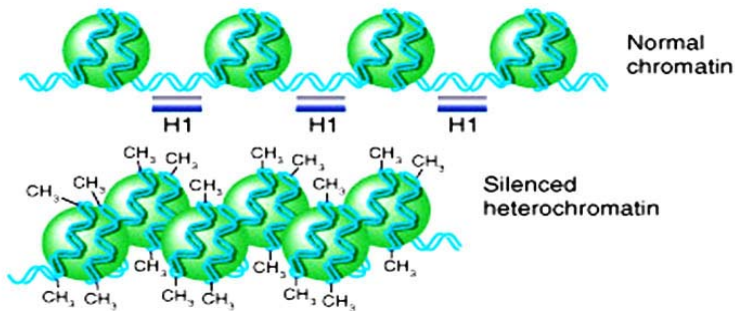
Nontranscribed genes are less susceptible to DNase I digestion than active genes.

Chick embryo erythroblasts at 14 days actively synthesize globin, whereas cultured undifferentiated MSB cells do not.

(a) Nuclei from each type of cell were isolated and exposed to increasing concentrations of DNase I. The nuclear DNA was then extracted and treated with the restriction enzyme *Bam*HI, which cleaves the DNA around the globin sequence and normally releases a 4.6-kb globin fragment. (b) The DNase I- and *Bam*HI-digested DNA was subjected to Southern blot analysis with a probe of labeled cloned adult globin DNA, which hybridizes to the 4.6-kb *Bam*HI fragment. If the globin gene is susceptible to the initial DNase digestion, it would be cleaved repeatedly and would not be expected to show this fragment. As seen in the Southern blot, the transcriptionally active DNA from the 14-day globin-synthesizing cells was sensitive to DNase I digestion, indicated by the absence of the 4.6-kb band at higher nuclease concentrations. In contrast, the inactive DNA from MSB cells was resistant to digestion. These results suggest that the inactive DNA is in a more condensed form of chromatin in which the globin gene is shielded from DNase digestion. [Stalder et al., 1980, *Cell* 19:973]



El DNA que forma parte de la heterocromatina está muy metilado



Metilación del DNA

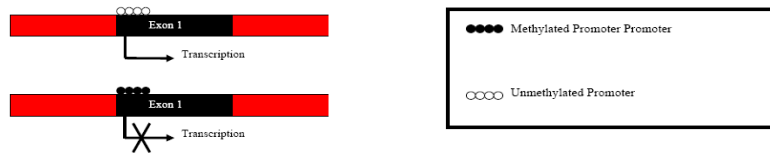
Metilación *de novo* – por acción de DNA metiltransferasa (DMT) específica de DNA no metilado

Mantenimiento de la metilación – por DMT específica de DNA hemi-metilado

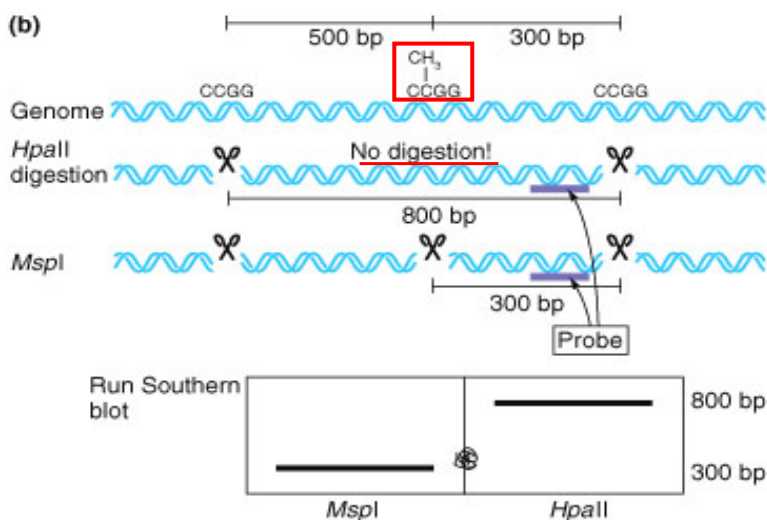
Ambas ocurren en CpG's dentro de transposones, elementos repetidos y dentro de los genes.

Islas CpG

- ◆ Los genes poseen en su extremo 5' secuencias ricas en GC
- ◆ Muchas secuencias GCs son parte de **sitios de unión de factores de transcripción** como Sp1.
- ◆ En el genoma humano, hay aproximadamente 45 000 islas CpG y la mitad de ellas se encuentran asociadas a genes *house-keeping*
- ◆ En las islas CpG se metila la citosina de dinucleótidos 5'-CG-3'
- ◆ La citosina metilada es reconocida por proteínas (como MeCP2) que **reclutan histona deacetilasas**
- ◆ **Altos niveles de CG metilados** se asocian a **bajos niveles de histonas acetiladas** y viceversa
- ◆ Altos niveles de histonas acetiladas se encuentran en genes que se transcriben activamente, por lo que las islas CpG metiladas **suprimen la expresión génica** si se encuentran en zonas promotoras.
- ◆ Los patrones de metilación varían de un tipo celular a otro.



Identificación de secuencias metiladas



Es posible diferenciar el DNA metilado empleando enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia, pero muestran distinta sensibilidad a la presencia de grupos metilo.

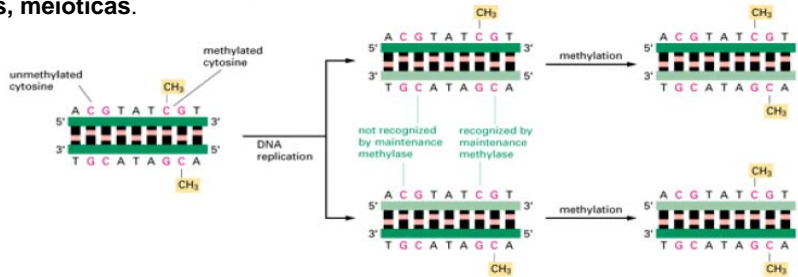
Regulación epigenética

- Herencia epigenética: **alteraciones heredables que no afectan a la secuencia de nucleótidos del DNA**

Metilación

- La metilación de adenina en bacterias controla la transcripción de algunos genes
 - En animales la metilación se produce en las **citocinas de los dobletes 5'-CG-3'** (también llamados CpG). Hay promotores con alta concentración de CG (islas CpG). **Cuando el promotor está metilado no hay transcripción.**

- El **estado de metilación se perpetúa en las divisiones mitóticas y, en algunos casos, meióticas.**



En la **impronta parental (imprinting)**, el patrón de metilación, establecido durante la **gametogénesis** es distinto para cada sexo.

Características asociadas con cromatina transcripcionalmente activa e inactiva

Característica	Cromatina transcripcionalmente activa	Cromatina transcripcionalmente inactiva
conformación de la cromatina	conformación abierta y extendida	Conformación altamente condensada, particularmente en heterocromatina (facultativa y constitutiva)
metilación del DNA	Relativamente no metilada, especialmente en regiones promotoras	Metilada, incluyendo en regiones promotoras
metilación de histonas	Histonas no metiladas	Histonas metiladas
acetilación histonas	Histonas acetiladas	Histonas desacetiladas

Factores epigenéticos.

Epigenética: “Fuera de la genética convencional”

*Modificación covalente del DNA o del core de histonas que regulan la actividad génica, **sin alterar la secuencia del DNA**. Se puede transmitir después de la división celular a las células hijas.*

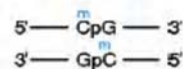
Mecanismos: Metilación del DNA y modificación de histonas.

Modificaciones epigenéticas.

Cambios en la configuración de la cromatina: Formación de heterocromatina (silente) por mecanismos de Metilación del DNA y metilación y desacetilación de histonas (H3 y H4).

Tipos de Modificaciones epigenéticas.

•Regulación de la actividad transcripcional
Metilación de islas CpG

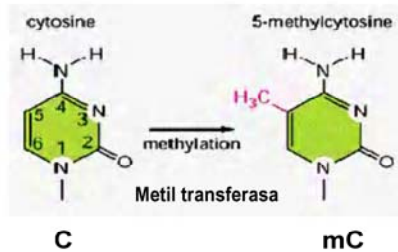


•Silenciamiento de regiones centroméricas,
teloméricas y zonas de DNA repetidos

•Inactivación del cromosoma X

•Imprinting

Regulación de la actividad transcripcional. Metilación del DNA



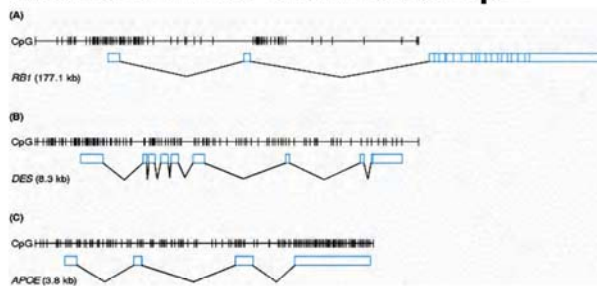
DNA Metil transferasas (DNMT) :

- para metilación de novo
- para el mantenimiento de la metilación

Funciones de metilación:

- Regulación de expresión génica
- Evitar retrotransposición

Metilación del DNA. Islas CpG

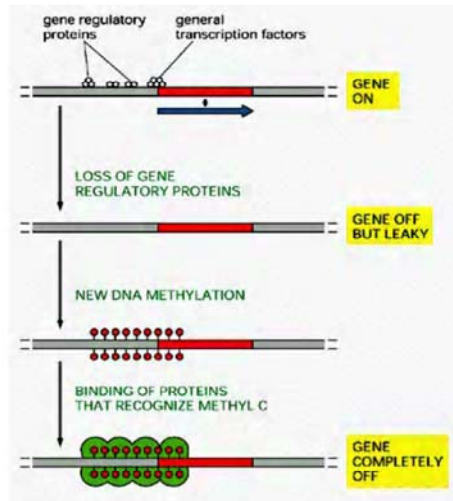


- Islas CpG: segmentos de 200-2.000 bp con una alta concentración de dinucleótidos CpG.
- 56% de los genes humanos tienen islas CpG cercanas al extremo 5'.
- Housekeeping genes permanecen **no** metilados por lo que se expresan en todos los tejidos.
- Genes tejido específicos permanecen **no** metilados **SOLO** en tejidos donde deben expresarse.

Metilación bloquea los sitios de unión para TF

Bloquea los sitios de unión para factores de transcripción

Actuarían como sitios de reconocimiento para histonas desacetilasas



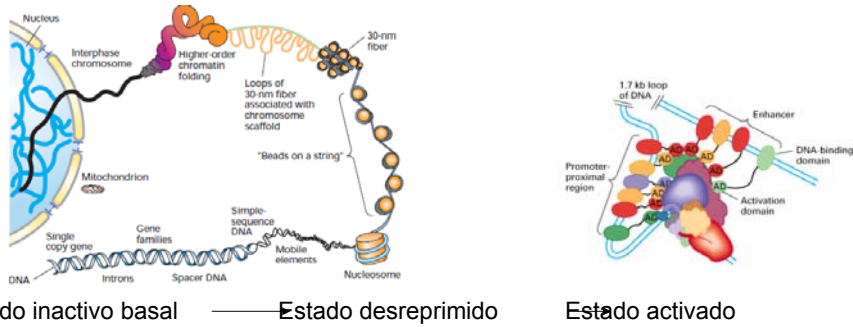
Algunos genes expresan selectivamente sólo uno de los dos alelos parentales (*exclusión alélica*).

En humanos y otros mamíferos, existen varios genes en que se expresan sólo el alelo paterno o sólo el alelo materno, pero no ambos. El otro alelo es reprimido.

Esto puede ser una propiedad de células seleccionadas o de tejidos, y las demás células del mismo individuo puede expresar ambos alelos a la vez.

1. Exclusión alélica independiente del origen cromosómico. Es al azar y heredable durante las mitosis.
2. Exclusión alélica dependiente del origen cromosómico. **Imprinting genómico (impronta)**. No es al azar y también es heredable durante las mitosis.

Niveles de activación transcripcional

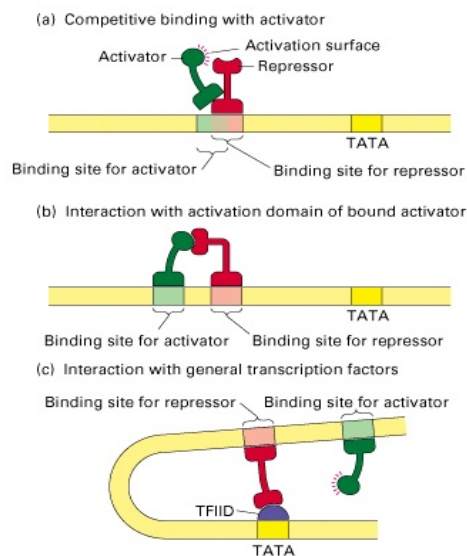


Estado inactivo basal Estado desreprimido Estado activado

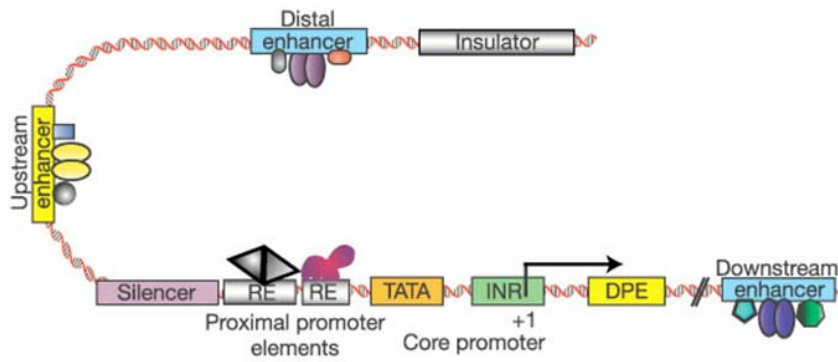
Des-represión

Activación

Los represores interfieren directamente con la iniciación de transcripción de varias maneras



Factores de transcripción e interacciones DNA-proteína y proteína-proteína



La organización de los lazos depende del *insulator*

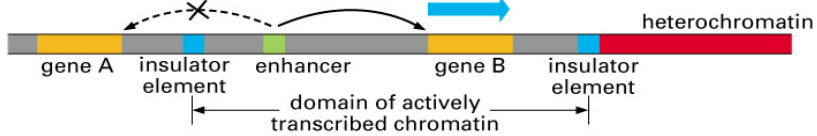


Figure 7-61. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

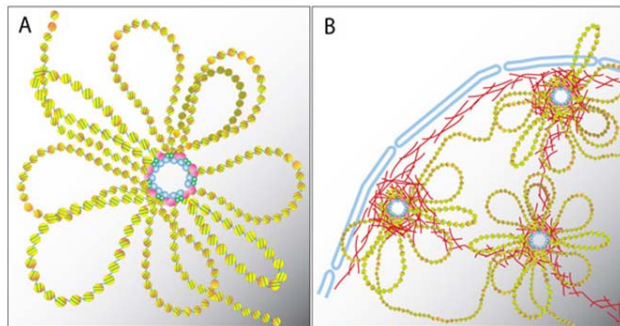
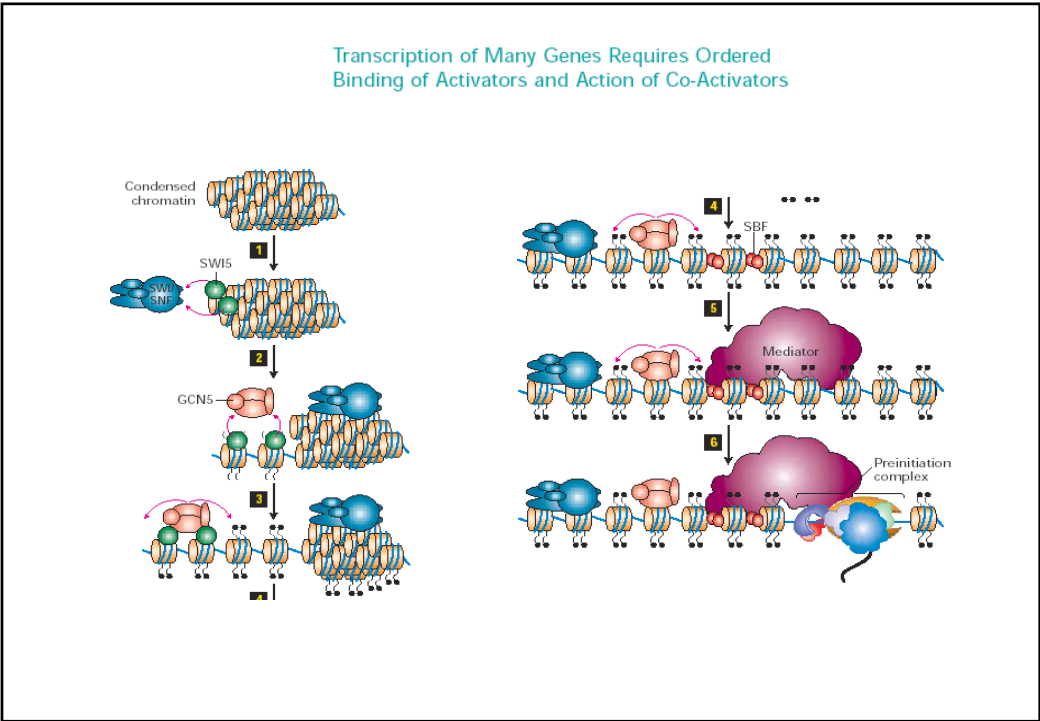
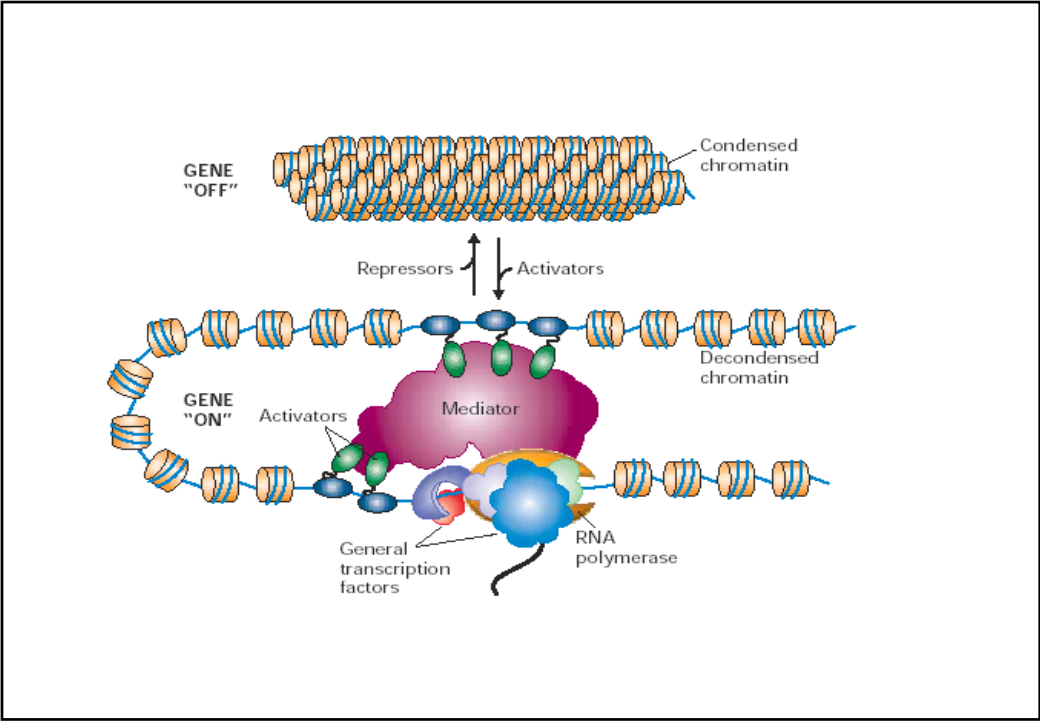
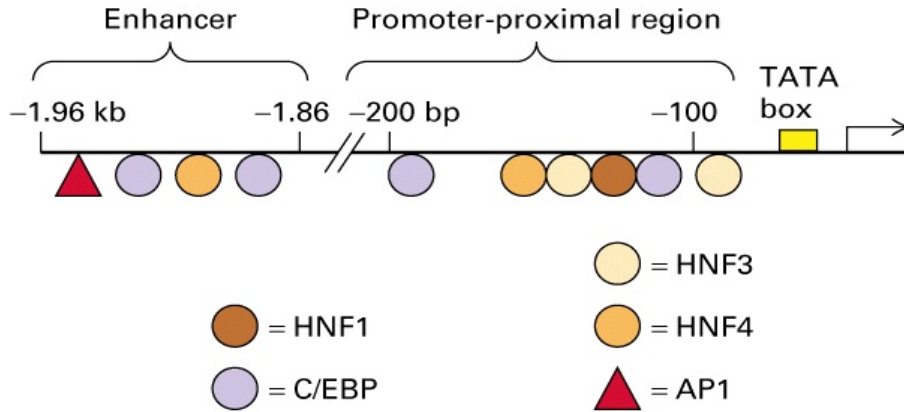


Figure 12. Insulator elements organize the chromatin fiber in the nucleus by establishing separate compartments of higher-order chromatin structure. (A) Domains of open chromatin (yellow nucleosomes) are flanked by insulators (pink, blue and green spheres) that interact together to form a loop. (B) Diagram showing part of a nucleus with compartmentalized chromatin, anchored in part to the nuclear periphery by interactions of the insulators with the nuclear lamina (red lines).

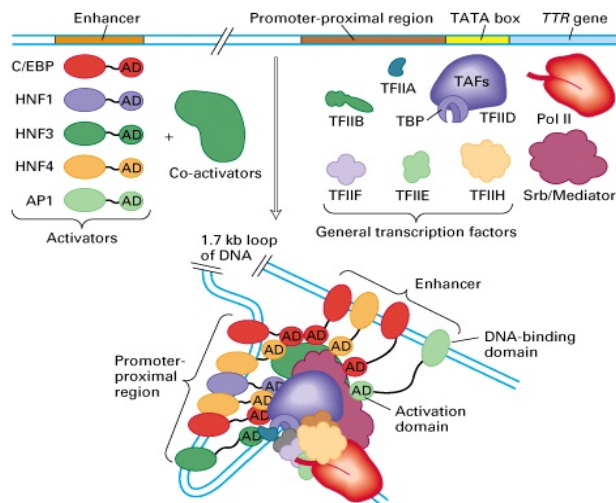


Activators stimulate the highly cooperative assembly of initiation complexes

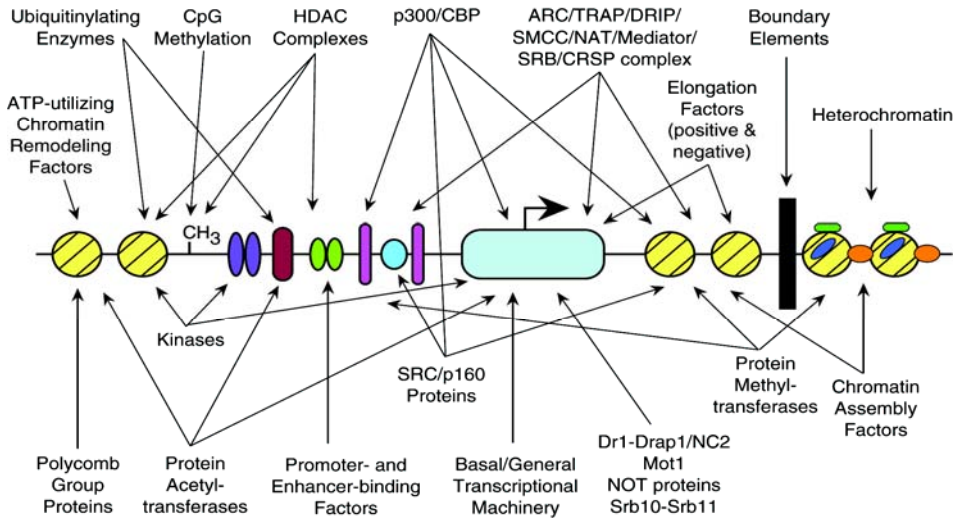
Binding sites for activators that control transcription of the mouse *TTR* gene



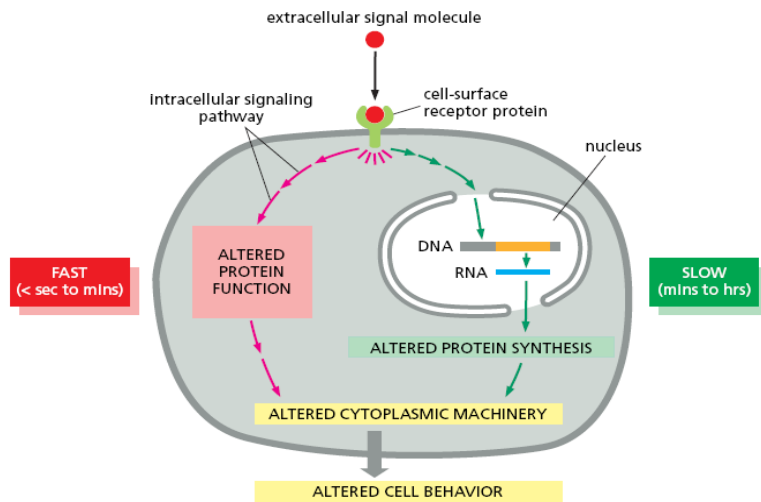
Model for cooperative assembly of an activated transcription-initiation complex in the *TTR* promoter



Many Factors Affect the Regulation of Transcription by RNA Polymerase II

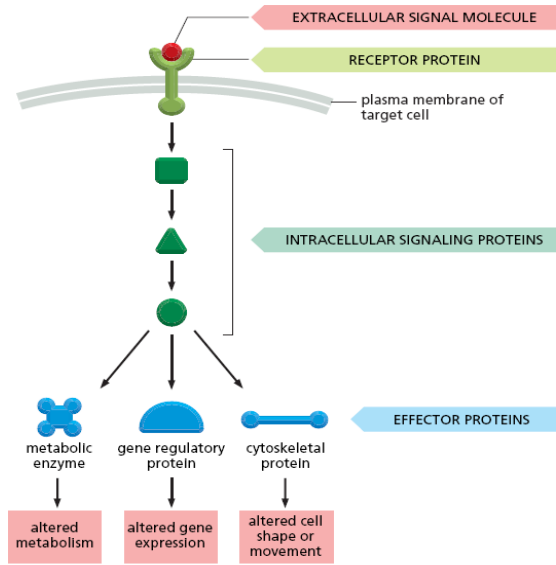


Respuesta a estímulos ambientales



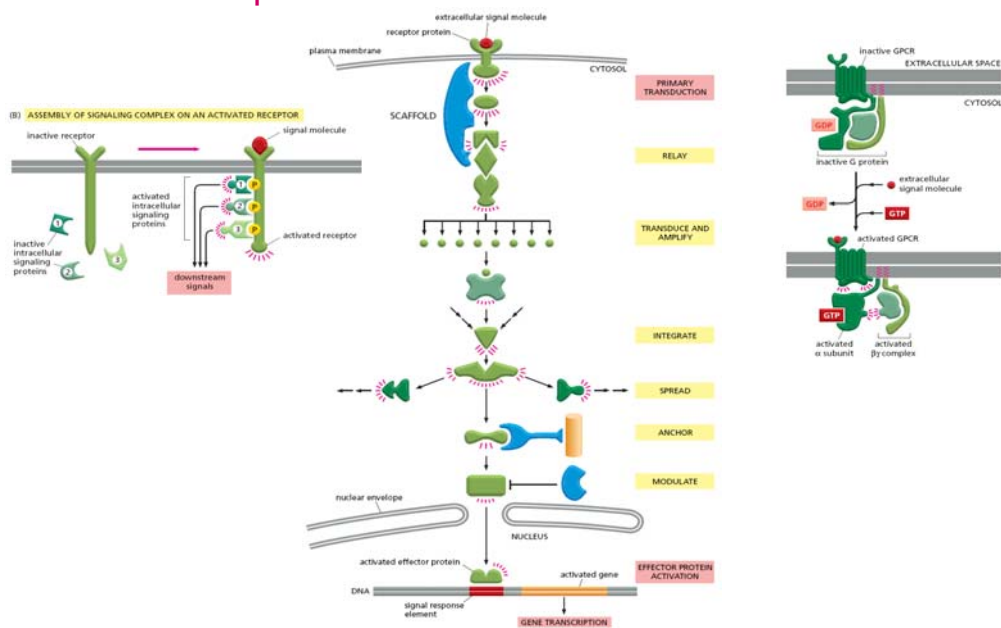
Señal ►►► transcripción ► expresión regulada ► respuesta... fenotipo...

Respuesta a estímulos ambientales



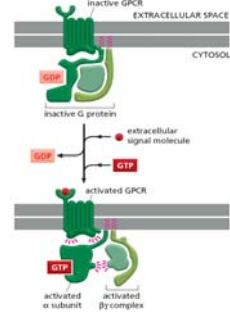
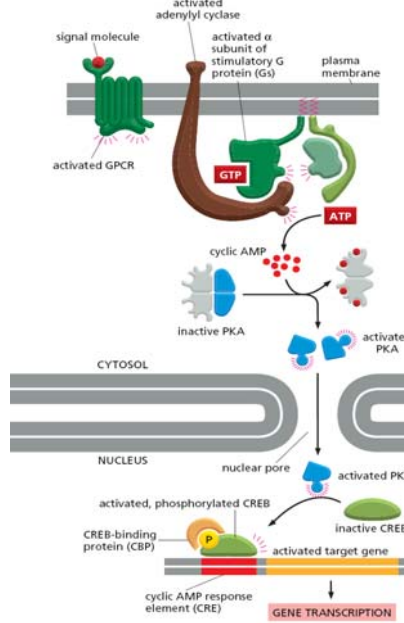
Señal ►►►entre otros efectos: transcripción ► expresión regulada ► respuesta...

Respuesta a estímulos ambientales



Señal ►►►entre otros efectos: transcripción ► expresión regulada ► respuesta...

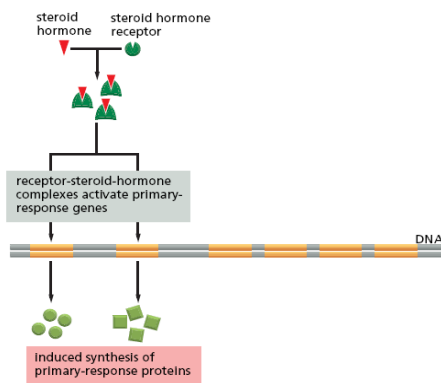
Respuesta a estímulos ambientales



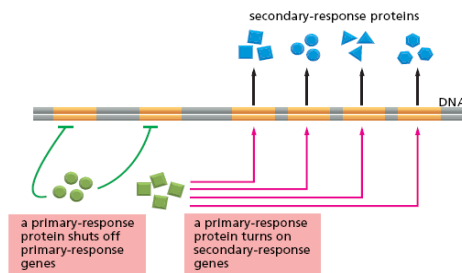
Señal ►►►entre otros efectos: transcripción ► expresión regulada ► respuesta...

Respuesta a estímulos ambientales

(A) PRIMARY (EARLY) RESPONSE TO STEROID HORMONE

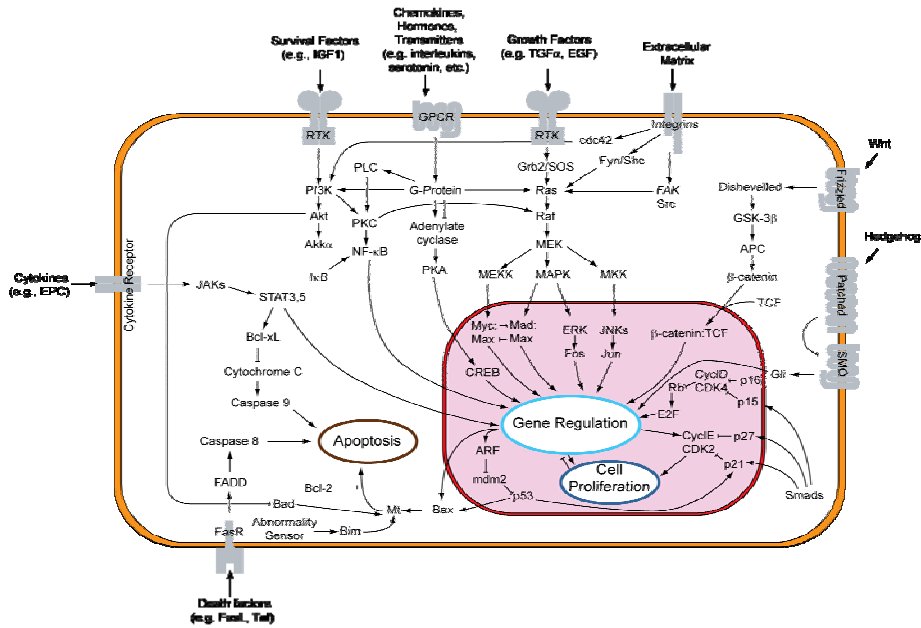


(B) SECONDARY (DELAYED) RESPONSE TO STEROID HORMONE



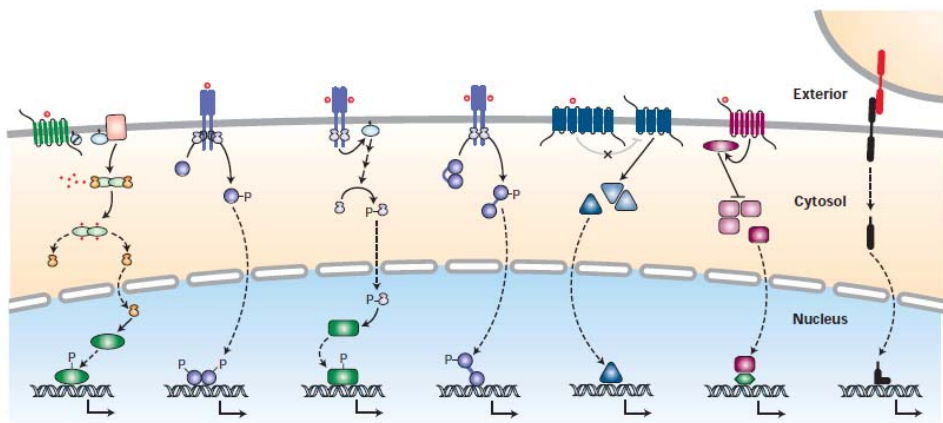
Señal ►►►entre otros efectos: transcripción ► expresión regulada ► respuesta...

Respuesta a estímulos ambientales



Señal ►►► transcripción ► expresión regulada ► respuesta... fenotipo...

Respuesta a estímulos ambientales



G protein-coupled receptors

Linked to a trimeric G protein that controls the activity of an effector protein (here adenylyl cyclase)

Cytokine receptors

Associated with cytosolic JAK kinases

Receptor tyrosine kinases

Cytosolic domain with tyrosine kinase activity

TGFβ receptors

Cytosolic domain with serine/threonine kinase activity

Hedgehog (Hh) receptors

Hh ligand tethered to membrane of signaling cell by cholesterol anchor

Wnt receptors

Palmitoylated Wnt ligand binds seven transmembrane protein receptor complex

Notch receptor

Ligand, Delta, is a transmembrane protein on signaling cell

Regulación hormonal:

Hormonas y factores de crecimiento hidrosolubles

Receptores de membrana

(transducción de señales, forforilación, activación, traslocación al núcleo...)

Hormonas liposolubles

Receptores intracelulares

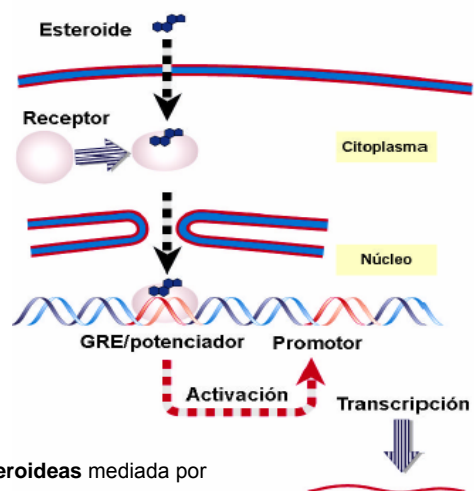
(factores de transcripción localizados en citosol o en el núcleo, traslocación al núcleo y/o activación...)

Regulación hormonal

Es frecuente que **un mismo factor de transcripción controle a un gran número de genes**. Esto se debe a la existencia de elementos de respuesta para ese factor en los promotores o potenciadores de esos genes.

Ejemplos:

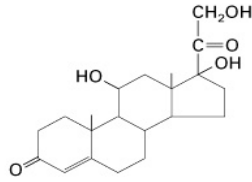
- HSE: elemento de respuesta a choque térmico
- GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides
- SRE: elemento de respuesta al suero



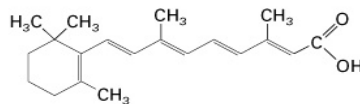
Respuesta a **hormonas esteroides** mediada por elementos GRE.

Estas hormonas se sintetizan en respuesta a un gran variedad de actividades neuroendocrinas y controlan crecimiento, desarrollo de tejidos y homeostasis corporal. Todas tienen un modo de acción similar: **se unen a un receptor citoplásmico haciendo que este se una al DNA y active la transcripción**

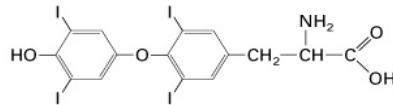
Lipid-soluble hormones control the activities of nuclear receptors



Cortisol

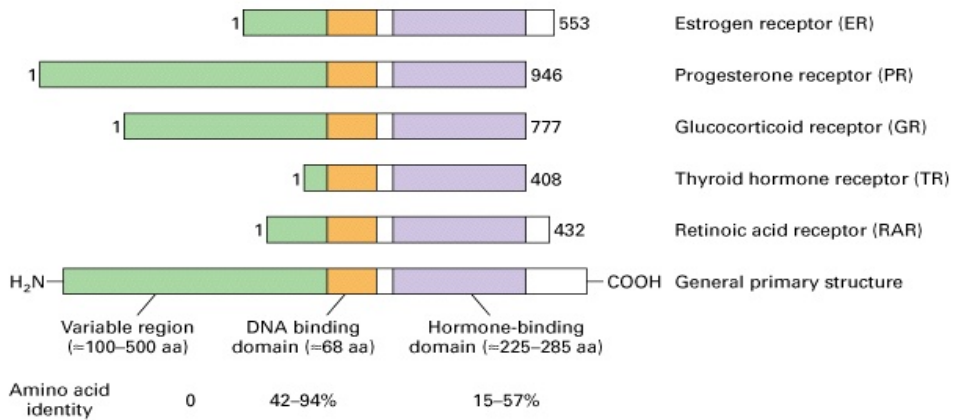


Retinoic acid



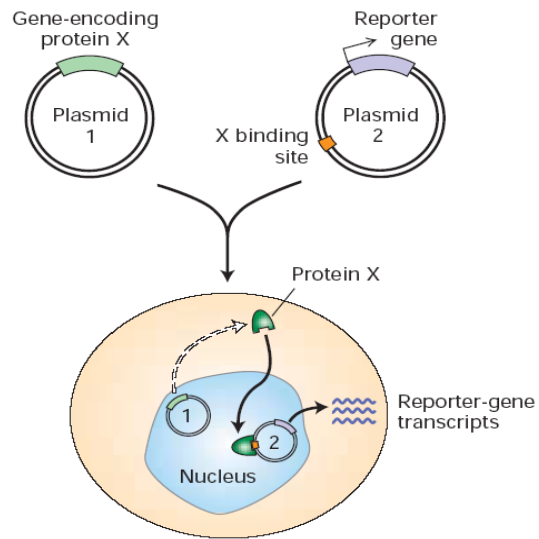
Thyroxine

Domain structure of nuclear receptors



▲ EXPERIMENTAL FIGURE 11-16
***In vivo* transfection assay**
measures transcription activity to
evaluate proteins believed to be
transcription factors.

The assay system requires two plasmids. One plasmid contains the gene encoding the putative transcription factor (protein X). The second plasmid contains a reporter gene (e.g., *lacZ*) and one or more binding sites for protein X. Both plasmids are simultaneously introduced into cells that lack the gene encoding protein X. The production of reporter-gene RNA transcripts is measured; alternatively, the activity of the encoded protein can be assayed. If reporter-gene transcription is greater in the presence of the X-encoding plasmid, then the protein is an activator; if transcription is less, then it is a repressor. By use of plasmids encoding a mutated or rearranged transcription factor, important domains of the protein can be identified.



Deletion mutants of the
GAL4 gene in yeast with a
UAS_{GAL} reporter-gene construct
demonstrate the separate functional
domains in an activator.

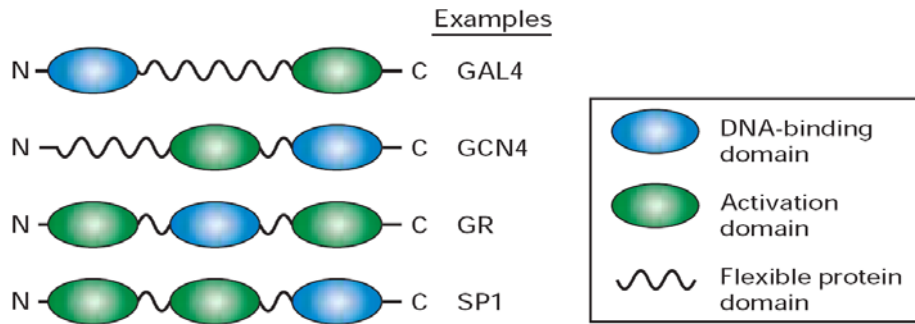


(b) Wild-type and mutant GAL4 proteins

Protein	Binding to UAS _{GAL}	β-galactosidase activity
Wild-type	+	+++
N- and C-terminal deletion mutants		
50-881	-	-
74-848	+	+++
74-823	+	+++
74-792	+	++
74-755	+	+
74-692	+	-
74	+	-
Internal deletion mutants		
74-684-881	+	+++
74-738-881	+	+++
74-768-881	+	++

▲ EXPERIMENTAL FIGURE 11-17 Deletion mutants of the GAL4 gene in yeast with a UAS_{GAL} reporter-gene construct demonstrate the separate functional domains in an activator. (a) Diagram of DNA construct containing a *lacZ* reporter gene and TATA box ligated to UAS_{GAL}, a regulatory element that contains several GAL4-binding sites. The reporter-gene construct and DNA encoding wild-type or mutant (deleted) GAL4 were simultaneously introduced into mutant (*gal4*) yeast cells, and the activity of β-galactosidase expressed from *lacZ* was assayed. Activity will be high if the introduced GAL4 DNA encodes a functional protein. (b) Schematic diagrams of wild-type GAL4 and various mutant forms. Small numbers refer to positions in the wild-type sequence. Deletion of 50 amino acids from the N-terminal end destroyed the ability of GAL4 to bind to UAS_{GAL} and to stimulate expression of β-galactosidase from the reporter gene. Proteins with extensive deletions from the C-terminal end still bound to UAS_{GAL}. These results localize the DNA-binding domain to the N-terminal end of GAL4. The ability to activate β-galactosidase expression was not entirely eliminated unless somewhere between 126–189 or more amino acids were deleted from the C-terminal end. Thus the activation domain lies in the C-terminal region of GAL4. Proteins with internal deletions (bottom) also were able to stimulate expression of β-galactosidase, indicating that the central region of GAL4 is not crucial for its function in this assay. [See J. Ma and M. Ptashne, 1987, *Cell* 48:847; I. A. Hope and K. Struhl, 1986, *Cell* 46:885; and R. Brent and M. Ptashne, 1985, *Cell* 43:729.]

modular structure of eukaryotic transcription activators

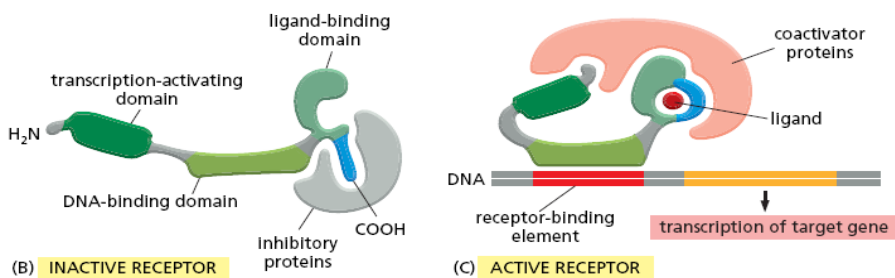


Schematic diagrams illustrating the modular structure of eukaryotic transcription activators.

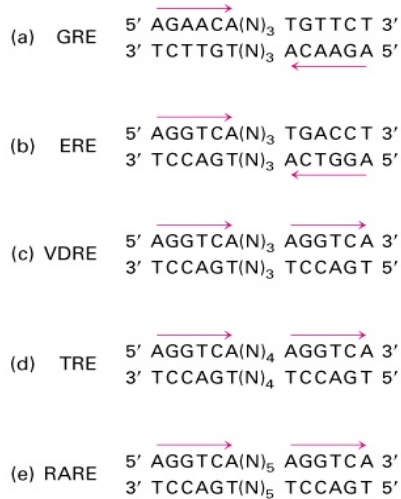
These transcription factors may contain more than one **activation domain (AD)** but rarely contain more than one **DNA-binding domain (DBD)**.

GAL4 and GCN4 are yeast transcription activators. The glucocorticoid receptor (GR) promotes transcription of target genes when certain hormones are bound to the C-terminal activation domain. SP1 binds to GC-rich promoter elements in a large number of mammalian genes.

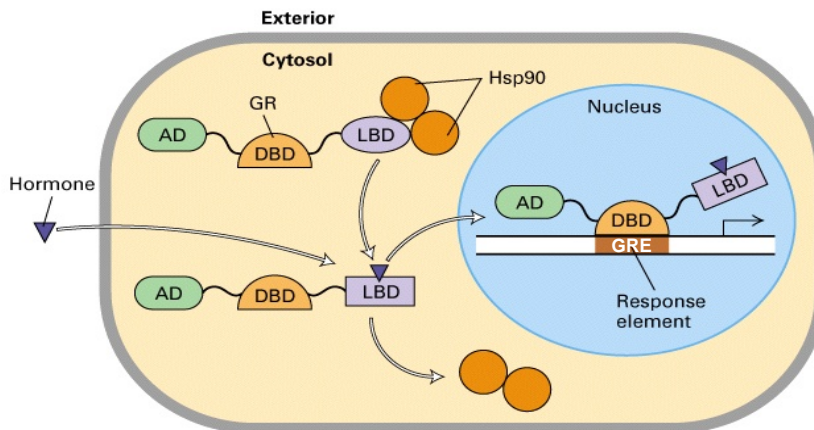
nuclear receptors-transcription factors



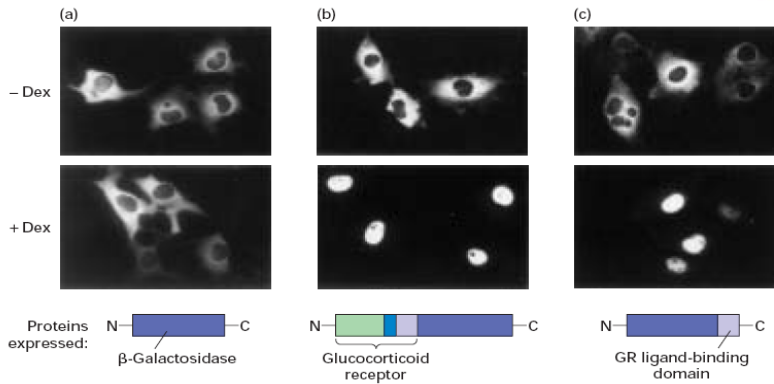
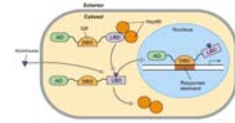
Response elements are DNA sites that bind several major nuclear receptors



Model of hormone-dependent gene activation by the glucocorticoid receptor (GR)

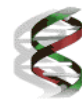


Experimento que demuestra la traslocación del GR al núcleo



▲ EXPERIMENTAL FIGURE 11-43 Fusion proteins from expression vectors demonstrate that the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor (GR) mediates translocation to the nucleus in the presence of hormone. Cultured animal cells were transfected with expression vectors encoding the proteins diagrammed at the bottom. Immunofluorescence with a labeled antibody specific for β -galactosidase was used to detect the expressed proteins in transfected cells. (a) In cells that expressed β -galactosidase alone, the enzyme

was localized to the cytoplasm in the presence and absence of the glucocorticoid hormone dexamethasone (Dex). (b) In cells that expressed a fusion protein consisting of β -galactosidase and the entire glucocorticoid receptor (GR), the fusion protein was present in the cytoplasm in the absence of hormone but was transported to the nucleus in the presence of hormone. (c) Cells that expressed a fusion protein composed of β -galactosidase and just the GR ligand-binding domain (light purple) also exhibited hormone-dependent transport of the fusion protein to the nucleus. [From D. Picard and K. R. Yamamoto, 1987, *EMBO J.* 6:3333; courtesy of the authors.]



Regulación de la expresión génica en eucariotas

silenciamiento por RNAi



Andrew Z. Fire Craig C. Mello

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

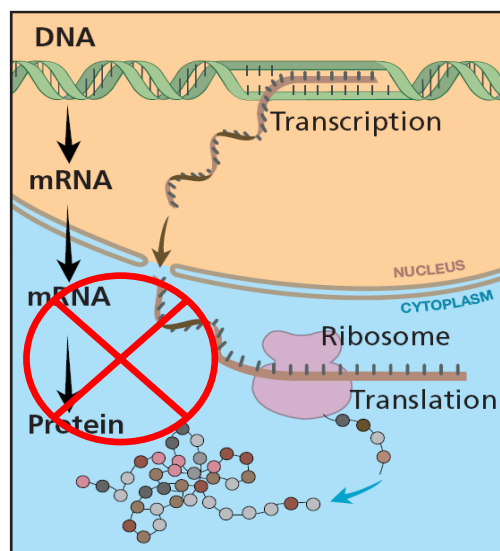
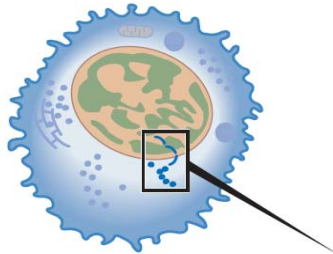
"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/index.html

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html



RNA interference



http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

RNA interference



How RNA interference works

Double-stranded RNA (dsRNA) binds to a protein complex, Dicer...



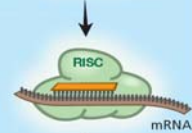
...which cleaves dsRNA into smaller fragments.



The fragments bind to another protein complex, RISC.



One of the RNA strands is eliminated, while the other serves as a search probe and links RISC to an mRNA molecule.



The mRNA molecule is cleaved and broken down.

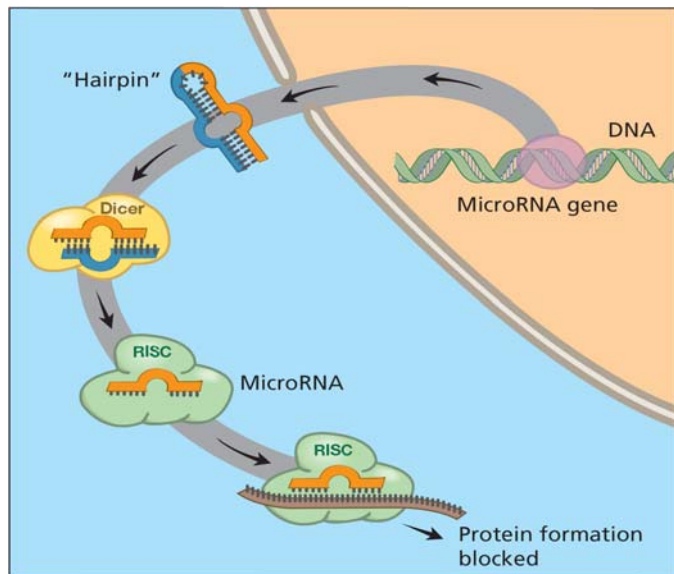


The gene for which the mRNA is a messenger has been silenced and no protein is formed.



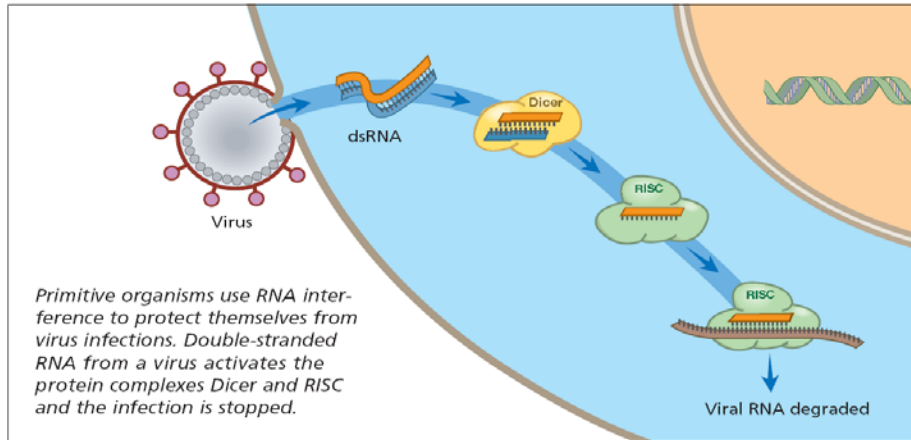
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

RNA interference



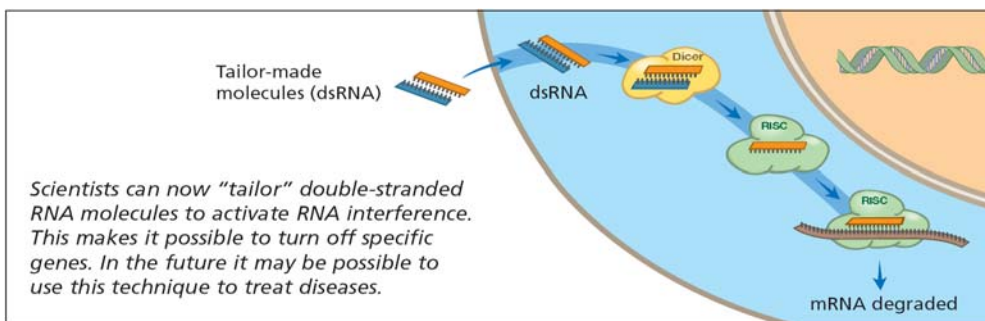
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

RNA interference



http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

RNA interference



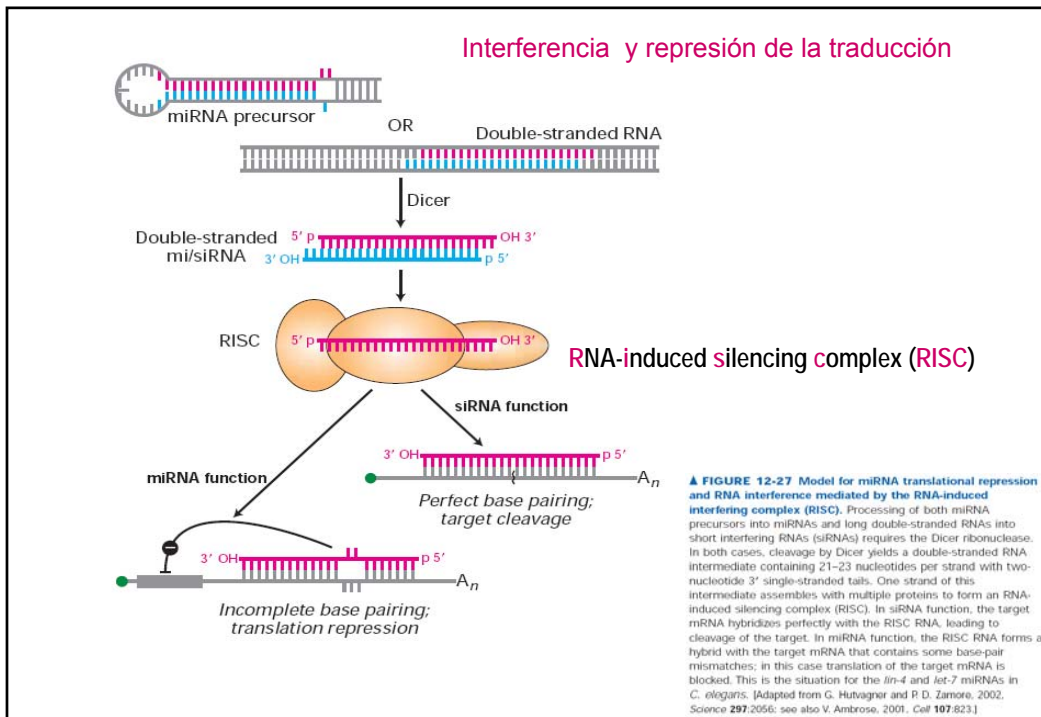
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

Interferencia - silenciamiento

RNAi (RNA interferente): procesos en los que la expresión génica es regulada por dsRNAs cortos

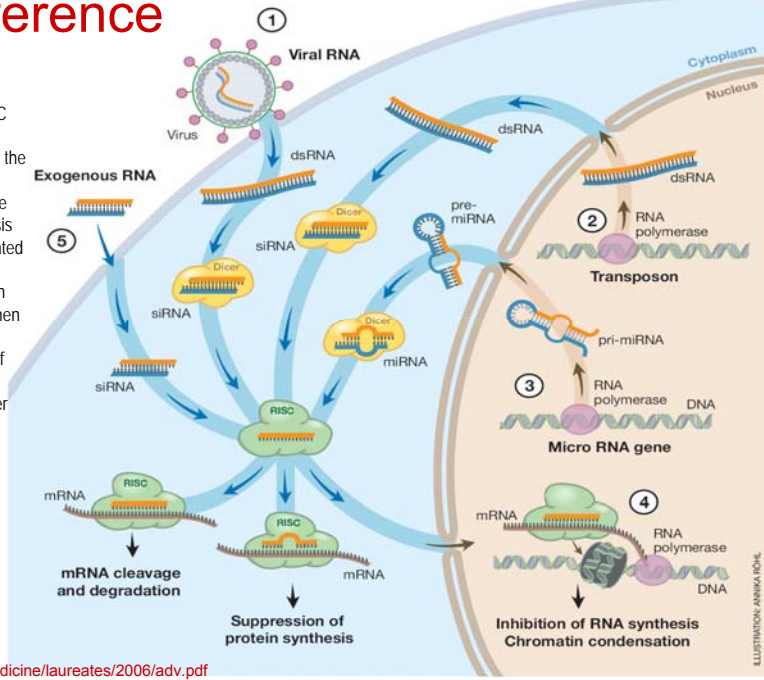
La interferencia produce **degradación o inactivación específica de RNAs**

En este proceso se forma un **complejo** entre un **RNA corto (short interfering siRNA)** o **micro (micro interfering miRNA)** y una **RNasa llamada Dicer** que desencadena una degradación selectiva del RNA específicamente silenciado



RNA interference

Cellular processes dependent on the RNAi machinery. The Dicer and RISC complexes play a central role in the destruction of invading viral RNA (1), the elimination of transcripts from mobile elements (transposons) and repetitive DNA (2), the block of protein synthesis brought about by small RNAs generated within the cell (3), and the RNAi-mediated suppression of transcription (4). The machinery is also utilized when siRNA is introduced into the cell experimentally to inhibit the activity of specific genes (5). The figure is schematic, and the Dicer and RISC complexes can vary dependent on cellular process.



http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.pdf

miRNA in the human genome

180 known miRNAs in human

130 intergenic

50 intronic

60 polycistronic

70 monocistronic

