

27

CAPÍTULO

Transcripción del ADN

Con anterioridad se estudió cómo la replicación del ADN es el fundamento molecular de la transferencia de información de una célula u organismo a sus descendientes. Se asegura que en el ADN radica la información que determina las características estructurales y funcionales de las células que lo contienen; luego en las células deben existir mecanismos por medio de los cuales se logre la expresión de la información genética, ese mecanismo en líneas generales consiste en sintetizar proteínas, cuya secuencia de aminoácidos está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN, y este proceso consta de 2 etapas fundamentales.

En la primera la secuencia de bases del ADN se copia en una molécula específica de ARNm, esta etapa es la transcripción. La segunda consiste en utilizar la secuencia de bases del ARNm para, a partir de ella, sintetizar una cadena polipeptídica con una secuencia específica de aminoácidos, esta etapa es la traducción (Fig. 27.1).

Estos 2 procesos que ocurren de manera continua -en algunos casos hasta simultáneamente- constituyen el mecanismo fundamental, mediante el cual el ADN determina las características estructurales y funcionales de una célula y de un organismo como un todo; por eso, como se vio anteriormente, no es imprescindible la duplicación exacta de todos los componentes celulares al producirse la división celular, pues basta con la división del ADN y los componentes celulares que intervienen en su expresión para que las células hijas sean de la misma especie que las parentales.

Aspectos generales

La transcripción es el proceso central en el crecimiento y desarrollo de las células, en la cual los genes que se encuentran en el ADN de los cromosomas son selectivamente localizados, reconocidos y transcritos, produciendo ARN mensajeros, ribosomales (estructurales) y de transferencia (adaptadores). El notable progreso en los últimos años de la genética bacteriana, el ADN recombinante, la bioquímica-física, etcétera, ha ampliado considerablemente los conocimientos sobre este proceso. Aun cuando puedan existir diferencias en los mecanismos de transcripción en diferentes organismos, hay una serie de características comunes a todos ellos que se enumeran a continuación.

Los precursores de la síntesis de los ARN son los 4 ribonucleósidos trifosfatados, ATP, GTP, UTP y CTP. En la reacción de polimerización, los ribonucleótidos son añadidos uno a uno al extremo de una hebra en crecimiento por enzimas denominadas ARN polimerasas dependientes de ADN o ARN polimerasas.

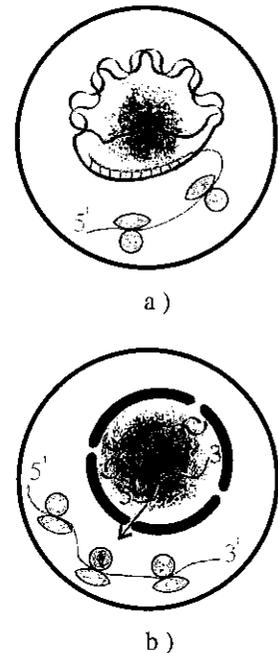


Fig. 27.1. Relación transcripción traducción. En los procariotes (a) al no existir envoltura nuclear la traducción comienza generalmente antes de terminar la transcripción. En los eucariotes (b) el ARNm se forma en el núcleo y allí se procesa antes de ser transportado al citoplasma donde es traducido.

La secuencia de bases del ARN es complementaria a la hebra de ADN, que se está copiando. Aunque el ADN es en general de doble hebra, en cada sector específico sólo una de ellas se utiliza como molde o patrón para la síntesis de ARN.

La hebra de ARN crece en el sentido $5' \rightarrow 3'$, mientras va copiando la hebra del ADN que está en dirección $3' \rightarrow 5'$, luego la síntesis es antiparalela y unidireccional. La reacción básica de polimerización consiste en la adición de un ribonucleósido trifosfatado al extremo $3' -OH$ del nucleótido precedente, con liberación de pirofosfato, formándose un enlace fosfodiéster. Al igual que en la replicación, la polimerización avanza acoplada a la hidrólisis del pirofosfato. Las ARN polimerasas son capaces por sí mismas de iniciar la síntesis, luego no hay necesidad de un iniciador.

En resumen, la transcripción se produce por el mecanismo básico de complementaridad de bases, añadidas en formas gradual, unidireccional y antiparalela, sin necesidad de un iniciador y acoplada a la hidrólisis del pirofosfato.

Etapas de la transcripción

En el estudio de este proceso se seguirá el mismo ordenamiento que con el estudio de la replicación: la iniciación, la elongación y la terminación, así como los eventos previos a la iniciación (preiniciación) y los posteriores a la terminación (postterminación). En primer lugar se analizará cómo ocurre el proceso en los organismos procariontes, que son los mejores conocidos. Más tarde se tratará la transcripción en eucariontes donde se ha producido un extraordinario avance en los últimos años. La transcripción es un proceso más simple que la replicación. En la *E. coli* una sola enzima es suficiente para la realización de todo el proceso; se comienza por describir las características estructurales y funcionales de la enzima para no interrumpir la secuencia de los eventos moleculares.

Esta enzima debe realizar múltiples acciones para llevar adelante la transcripción: reconocer el comienzo de la cadena de ARN que se debe sintetizar en una doble hebra de ADN, para lo cual debe identificar una secuencia de bases específica, debido a las irregularidades de la estructura del ADN en esa zona del genoma; colocar cada nucleótido en su posición correcta de acuerdo con la secuencia de bases del ADN; realizar la síntesis total de la molécula de ARN desde el principio hasta el final; reconocer las señales que indica el lugar apropiado para la terminación del proceso; debe además reconocer sitios reguladores tanto en el ADN como en el ARN transcrito, y poder interactuar con factores proteínicos y pequeñas moléculas que modulan la actividad de la enzima en su recorrido sobre el ADN.

La ARN polimerasa mejor conocida es la de *E. coli*, que fue descubierta por *Weiss y Gladstone* en 1959. Esta enzima está constituida por 5 subunidades; 2 subunidades α de 136 kD de masa molecular cada una; una β de 150 kD; una β' de 155 kD, y una σ de 70 kD, para un total de más de 450 kD. Es una de las mayores enzimas conocidas. Cada célula bacteriana contiene aproximadamente unas 3 000 moléculas de la enzima.

Diversos procedimientos experimentales permiten afirmar que la subunidad β está relacionada con la unión de los ribonucleótidos sustratos y de los inhibidores de la polimerización, así como la subunidad β' en la unión con el ADN. Ambas subunidades contienen un ion Zn^{2+} por molécula. La función de la subunidad α está relacionada con el ensamblaje de la enzima. Ninguna de las subunidades presenta actividad catalítica, ni de unión con el ADN en ausencia de las otras. La subunidad σ se disocia fácilmente de la holoenzima, quedando el núcleo constituido por el resto de las subunidades. Recientemente se ha reportado la existencia en la *E. coli* de, por lo menos, 5 subunidades σ diferentes.

La holoenzima presenta una forma más bien alargada, con una longitud máxima de 25 nm, es lo suficientemente grande para entrar en contacto con casi 75 pares de bases del

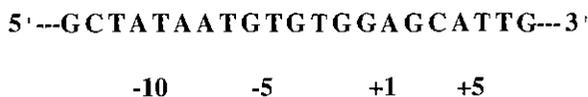
ADN, sin embargo, el núcleo sólo presenta 10 nm de longitud que le permite cubrir aproximadamente 30 pb.

El núcleo de la enzima tiene gran afinidad por el ADN, y se une a éste fuertemente en cualquier lugar de la cadena.

Eventos previos a la iniciación (preiniciación)

Los eventos de preiniciación consisten en la localización, por parte de la ARN polimerasa, de un sitio específico del ADN y la separación de las 2 cadenas, de forma que la secuencia de bases sea accesible a la enzima.

Por convención se representa la hebra de ADN, que no es copiada, y se designa como la hebra codificante por ser muy parecida en su secuencia al ARN, ésta se debe escribir de izquierda a derecha en el sentido 5' → 3'. La otra hebra se denomina molde porque esa es precisamente su función. La primera base que se transcribe se toma como referencia y se designa como +1. Las escritas a su izquierda llevan números negativos y las que van hacia la derecha números positivos -la posición 0 no existe-, por ejemplo:



Téngase presente que si en la secuencia escrita a partir de la adenina +1 sustituimos las T por U, tendríamos la secuencia del ARN transcrito primario.

El elemento central en la regulación de la transcripción es el promotor, que se define como un segmento de ADN, éste contiene las señales para la unión adecuada de la holoenzima de la ARN polimerasa y su posterior activación para formar un sitio capaz de iniciar la transcripción. El promotor contiene, además, en sí o en sus alrededores, otras señales que controlan la unión específica de proteínas reguladoras. Estas proteínas modulan la efectividad de la unión de la polimerasa con el promotor. Para designar la efectividad que tiene la transcripción en los diferentes promotores se utiliza el concepto de fortaleza del promotor, de donde se derivan los promotores fuertes (muy efectivos) y débiles (poco efectivos).

Al parecer el reconocimiento entre la ARN polimerasa y el promotor se debe a la presencia de un grupo de donantes y aceptores de puentes de hidrógeno orientados específicamente, que interactúan con grupos similares en el dominio de unión de la enzima; estos determinan la especificidad del reconocimiento. A la estabilidad contribuyen otras interacciones menos específicas, pero más fuertes, como las interacciones iónicas entre las cargas negativas de la parte monótona de la estructura del ADN y residuos básicos del dominio de unión de la proteína, y quizás interacciones hidrofóbicas entre el metilo de la timina y grupos apolares de la superficie de la enzima.

En este momento es conveniente hacer la distinción entre 2 términos que se utilizarán frecuentemente y se refieren a las secuencias consenso y a las conservadas, ambas derivan del análisis de sectores homólogos del ADN. Las secuencias consenso se construyen a partir de las bases que ocupan una determinada posición, en la mayoría de los casos estudiados, aunque como tal no exista en ninguno de ellos. Las conservadas son las secuencias que aparecen completas en la mayor parte de los casos estudiados, luego son reales. Las secuencias consenso en general sólo existen como posibilidad (Fig.27.2).

En los promotores conocidos se distinguen 2 secuencias consenso importantes. La primera aparece alrededor de la posición -10 y tiene la estructura TATAATG. La otra

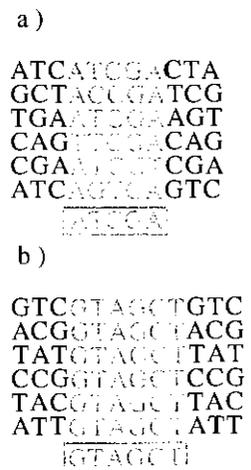


Fig. 27.2. Secuencias consenso y conservadas. Las secuencias consenso (a) se obtienen a partir del análisis de un número de secuencias de sectores equivalentes del ADN, y no siempre existen en la realidad. Las secuencias conservadas (b) son aquéllas que se mantienen casi inalterables en todos los organismos analizados.

secuencia importante aparece alrededor de la posición -35 y contiene típicamente 8 pares de bases, por ejemplo, TGTTGACA, donde existe un predominio de pares AT. La distancia entre las posiciones más conservadas de -10 y -35 es por lo general 17 (\pm 1). En la figura 27.3 se muestra la estructura primaria de algunos promotores.

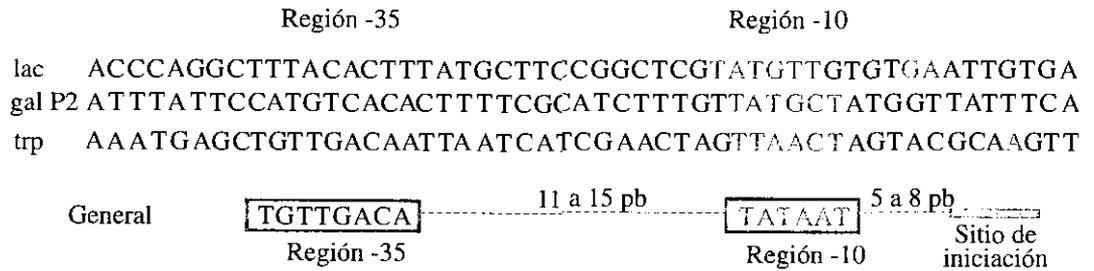


Fig. 27.3. Estructura del promotor. Se muestra la secuencia del promotor de 3 operones. En azul, la secuencia de -35 que parece estar muy conservada. En rojo, la región -10 con su secuencia consenso TATAAT. La letra roja corresponde con el primer nucleótido, en ser transcrito que generalmente es A.

La fortaleza de los promotores está relacionada con estas características. Si la secuencia se asemeja más a la consenso, la fortaleza del promotor aumenta, disminuyendo en la medida que se hace más diferente. La distancia entre las secuencias que da la mayor fortaleza es de 17 pb.

La subunidad σ , al unirse al núcleo de la polimerasa, aumenta la afinidad por estas secuencias, de manera que permite a la enzima unirse a esta zona específica del ADN. Se cree que la unión se produce primero en la zona de -35 y después en la otra más cercana, pero ambas son indispensables.

La unión de la polimerasa en el sitio adecuado provoca un desenrollamiento local del ADN (favorecido por el elevado contenido de pares AT) que incluye aproximadamente las bases de -10 a +5. Esta estructura es muy estable y recibe el nombre de promotor abierto (Fig. 27.4).

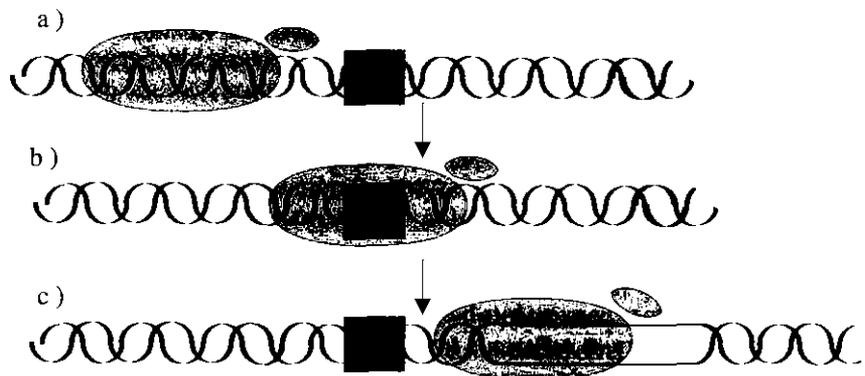


Fig. 27.4. Unión de la ARN polimerasa al promotor. Para realizar la unión al promotor, la ARN polimerasa rastrea la señal sobre el ADN (a) hasta localizar el promotor (b) al cual se une firmemente y logra una desnaturalización limitada (c), que permite el acceso a la secuencia de bases de la hebra molde.

Una vez formado el promotor abierto, la enzima comienza a deslizarse sobre el ADN hasta arribar a la primera base que va a ser copiada. En ocasiones para la unión de la polimerasa con el sitio adecuado se requieren proteínas adicionales (capítulo 34).

En resumen, los eventos de preiniciación comprenden el reconocimiento de señales específicas, la unión ADN-enzima formando un promotor cerrado y su transformación posterior en un promotor abierto. La enzima se desliza hasta la posición +1 para dar comienzo al proceso.

Iniciación

La iniciación de la transcripción comienza con la unión al complejo, formado por la polimerasa y el promotor abierto del ribonucleósido trifosfato que formará el extremo 5'-P de la cadena nascente de ARN. La unión del segundo nucleótido y la formación del enlace fosfodiéster forma también parte de la iniciación; por lo tanto, consiste en la formación de un complejo ternario entre la polimerasa, el ADN y un segmento de ARN, lo suficientemente largo para que el complejo sea estable y no se disocie.

La ARN polimerasa contiene 2 sitios de unión para nucleósidos trifosfatados, llamados sitios de iniciación y de elongación. El primero une frecuentemente nucleótidos de purina (93 % en una serie estudiada), casi siempre ATP (52 % en la misma serie), luego la primera base en ser copiada es casi siempre la timina, que ocupa la posición +1 en nuestro ejemplo. Una vez formado el par AT se incorpora otro nucleósido trifosfatado al sitio de elongación; sólo se incorporará aquél capaz de formar un par con la base +2, por ejemplo, la citosina (Fig. 27.5).

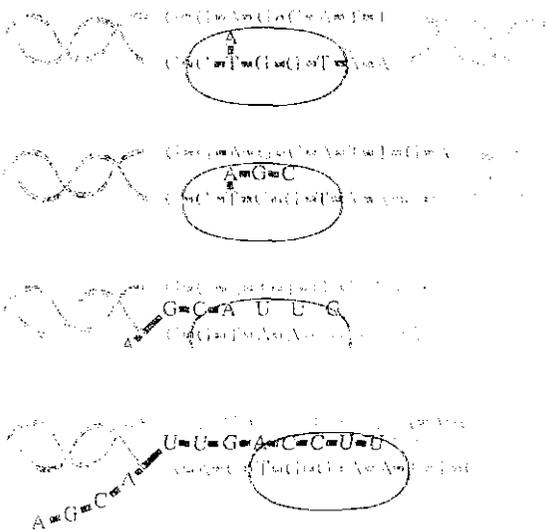


Fig. 27.5. Iniciación. Una vez formado el promotor abierto la polimerasa comienza a unir los nucleótidos, dirigida por una de las bandas del ADN. Cuando la cadena contiene de 6 a 8 nucleótidos se separa la subunidad σ y sólo continúa actuando el núcleo de la polimerasa.

Cuando los 2 sitios están ocupados se produce la reacción y queda formado el primer enlace fosfodiéster. Inmediatamente después se produce el movimiento de la polimerasa hacia el nucleótido siguiente. El final de la iniciación está determinado por la separación del factor σ y la formación de un complejo ternario estable. Se creía que esto ocurría con la formación del primer enlace fosfodiéster, pero estudios posteriores demostraron que se requiere la incorporación de 6 a 9 nucleótidos para que esto ocurra, como se muestra en la figura 27.6.

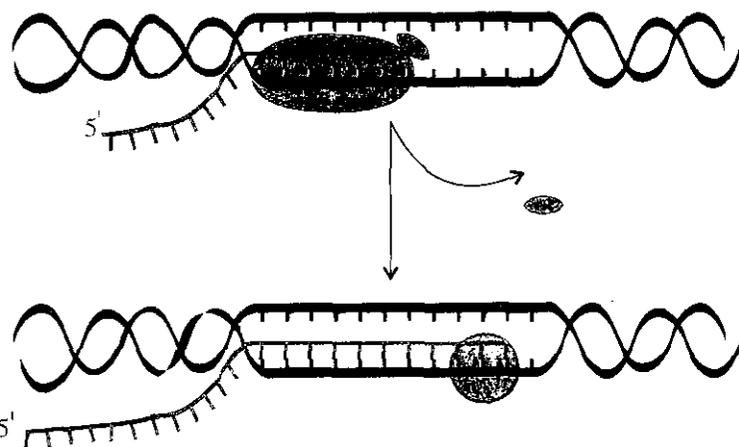


Fig. 27.6. Final de la iniciación. Al separarse la subunidad σ se produce un cambio de conformación en la polimerasa que reduce sus dimensiones, haciendo que el número de bases cubierto por la enzima sea mucho menor.

Elongación

Una vez liberado el factor σ , la polimerasa adquiere una nueva conformación y se forma un complejo ternario (polimerasa :ADN:ARN naciente) que es muy estable.

La reacción de elongación comprende los pasos siguientes:

1. Unión a la enzima del nucleósido trifosfato sustrato, es específica tanto para la base como para la ribosa.
2. Ataque nucleofílico del $P(\alpha)$ al $3' -OH$ con la formación del enlace fosfodiéster, generando pirofosfato.
3. Liberación del pirofosfato de la enzima, que es hidrolizado por las pirofosfatasas.
4. Translocalización de la polimerasa a lo largo del ADN en un nucleótido, con el desenrollamiento por delante y el reenrollamiento por detrás.

La zona de elongación tiene una longitud constante de 17 pb, lo que sugiere que esto se debe a una propiedad de la enzima y no a la secuencia de bases del ADN. La velocidad promedio de la elongación está entre 30 y 60 nucleótidos por segundo (Fig. 27.7).

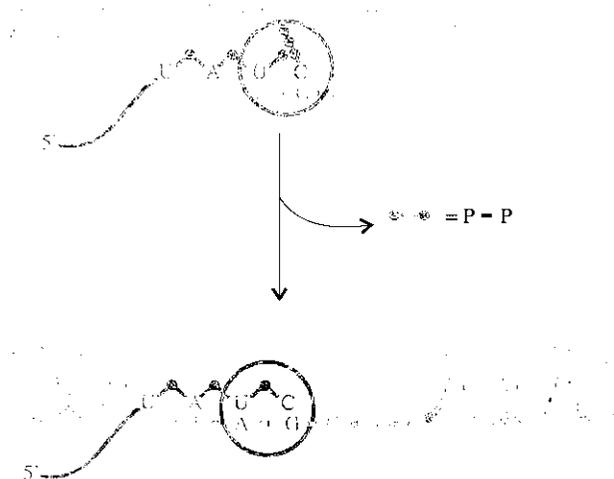


Fig. 27.7. Elongación. Un nucleósido trifosfato, cuya base es complementaria a la del molde, es colocado en el sitio de elongación; se forma el enlace fosfodiéster con la liberación de P-P y la polimerasa avanza hacia el próximo nucleótido. Estos eventos se repiten tantas veces como nucleótidos tenga el gen que se está transcribiendo.

Un detalle interesante es que el desplazamiento de la polimerasa no se produce a una velocidad constante; hay zonas en que el desplazamiento es más rápido que en otras, incluso existen pausas donde la enzima se detiene totalmente, estas pausas están relacionadas con las zonas ricas en pares CG. La polimerasa en su movimiento va desenrollando la doble hebra del ADN, y esto es más difícil en las zonas donde predominan los pares CG.

Durante esta fase al núcleo de la polimerasa se une la proteína NusA (69 kD) y al parecer evita la terminación prematura de la cadena; su acción no es procesativa, pues con frecuencia se asocia y disocia de la polimerasa.

En la elongación se forma un híbrido ADN:ARN, pero mucho más corto que el formado en la iniciación de la replicación. Algunos autores aseguran que la zona híbrida sólo comprende unos 12 pares de bases. En la medida que la polimerasa avanza, el ADN vuelve a enrollarse detrás de ella.

En resumen, la elongación consiste en el aumento gradual de la cadena polirribonucleotídica por acción fundamentalmente del núcleo de la ARN polimerasa. El complejo de la ARN polimerasa, moviéndose sobre el ADN, es estabilizado por proteínas auxiliares que impiden la dislocación de la enzima.

Terminación

La terminación de la síntesis del ARN ocurre en sitios de secuencia de bases específicas en la molécula del ADN. Se conocen numerosas de estas secuencias y todas tienen las características que se muestran en la figura 27.8.

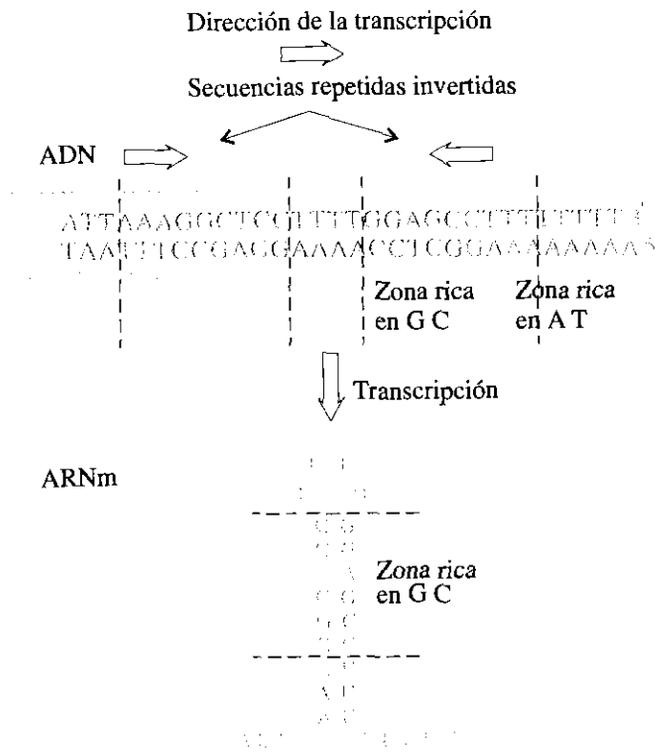


Fig. 27.8. La señal de terminación. Las características de la secuencia del ADN en la zona de terminación pueden dar lugar a una estructura cruciforme en el ADN y a una estructura de "tallo y asa" en el ARN transcrito.

Existen 3 regiones importantes:

1. Una secuencia repetida-invertida con un segmento no repetido central, o sea, la secuencia en una hebra del ADN sería del tipo:



donde: A y A', B y B' y las demás son bases complementarias. De esta forma la secuencia es capaz de formar pares de bases intracatenarios, dando lugar a una estructura en «tallo y asa» en el ARN y posiblemente también en el ADN.

2. Una secuencia rica en CG muchas veces está localizada dentro del tallo, aunque puede parcialmente encontrarse dentro del asa.
3. Es usual que se presente a continuación una secuencia rica en AT, que sale fuera del tallo y hace que el ARN contenga una adenina seguida por 4 a 8 uridinas.

Todo parece indicar que la formación de la estructura en "tallo y asa", en la molécula del ARN, está implicada notablemente en el mecanismo de la terminación. Se ha comprobado que mientras mayor sea el contenido de pares GC de la estructura en "tallo y asa", y mayor la longitud de la cola de poli(U), la terminación será más efectiva.

No se conoce con exactitud cómo se produce la terminación, pero parece estar relacionada con una pausa en el movimiento de la polimerasa. El proceso incluye: el cese de la elongación de la cadena de ARN, la liberación del ARN neoformado y la liberación de la ARN polimerasa del ADN (Fig. 27.9). En el proceso de terminación intervienen proteínas específicas, cuya acción no está totalmente esclarecida.

Existen 2 tipos de mecanismos de terminación: la señalada con anterioridad, que es reconocida por la propia polimerasa.

El otro tipo de terminación ocurre por la acción de una proteína específica denominada rho (ρ); ésta es una proteína oligomérica que no se une ni a la polimerasa ni al ADN. Su unión al ARN le estimula una fuerte actividad de nucleosidotrifosfatasa (NTPasa). Aun cuando el mecanismo del factor rho no está totalmente esclarecido, se

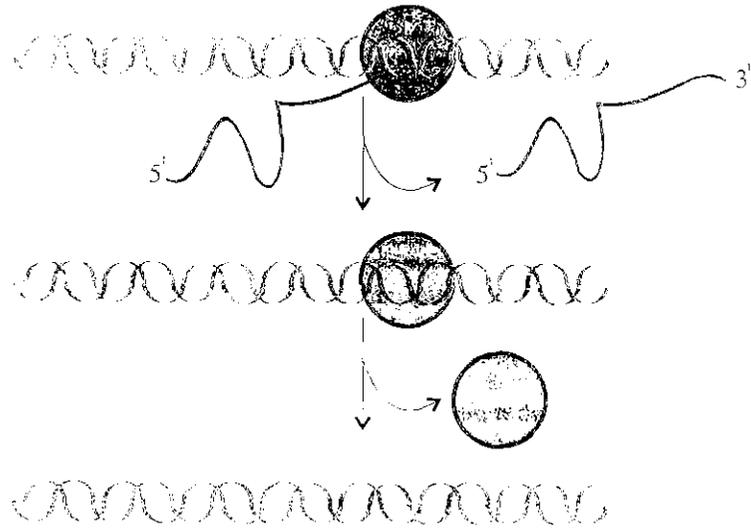


Fig. 27.9. Terminación. La terminación consta de los pasos siguientes: cese de la elongación, separación del ARN neoformado y separación de la ARN polimerasa.

encuentra relacionado también con la existencia de pausas en el movimiento de la polimerasa, aunque no se ha detectado ninguna homología en las secuencias estudiadas. Rho es una proteína formada por 6 subunidades de 46 kD cada una, cuya agregación se estabiliza por la unión al ARN en presencia de ATP; cada monómero se une a un segmento de 12 a 14 bases, por lo que en total se unen de 72 a 84 bases (Fig.27.10).

En resumen, la terminación incluye el detenimiento de la elongación, la liberación del ARN y de la polimerasa. En ocasiones son necesarias secuencias específicas del ADN y en otras se requieren proteínas específicas.

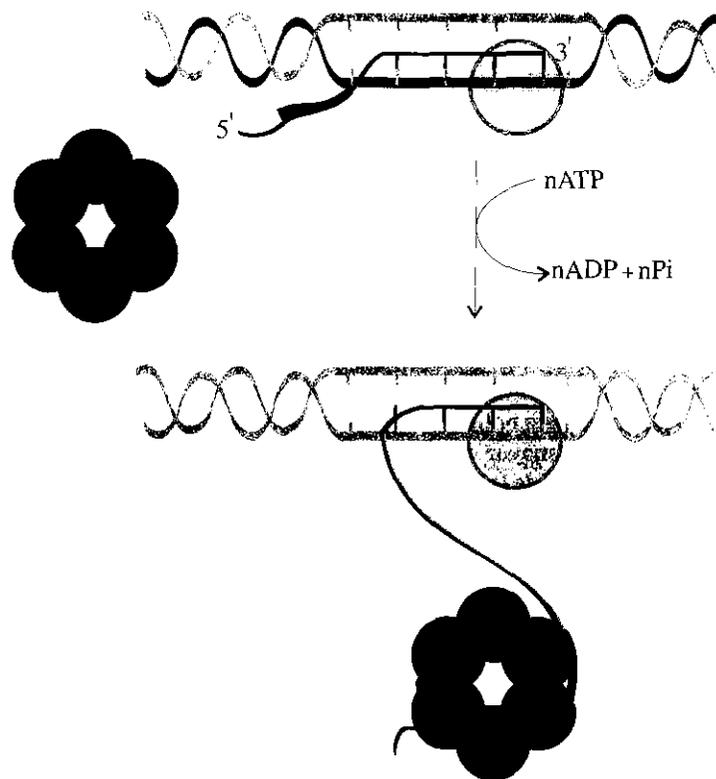


Fig. 27.10. Unión de Rho al ARN. El factor Rho se une a una secuencia específica del ARN, lo cual estimula su acción hidrolítica provocando la terminación de la transcripción.

Eventos postterminación

En procariontes los distintos tipos de ARN sufren diferentes grados de modificación antes de ser totalmente funcionales. A continuación se tratará someramente este proceso llamado de maduración.

Los ARN mensajeros no sufren modificaciones; la estructura típica de un mensajero contiene 4 sectores funcionalmente diferentes. Una secuencia inicial hacia el extremo 5', conocida como secuencia conductora y que contiene una zona rica en purinas y un triplete de bases específico, el AUG, llamado también codon de iniciación (Fig. 27.11).

```

5'- AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGC
5'- UUUGGAUGGAGUGAAAC GAUGGCGAUU
5'- GGUAACCAGGUAACAACCAUGCGAGUG
5'- CAAUUCAGGGGGUGAAG UAUGAAAUCA
  
```

Fig. 27.11. Extremo 5' del ARNm de procariontes. Hacia el extremo 5' del codon de iniciación (en rojo) aparece una zona rica en purinas conocida como secuencia de Shine y Dalgarno, y es la que va a permitir la fijación del ARNm al ribosoma en la posición precisa.

Hacia el extremo 3' contiene también una secuencia de longitud variable, conocida como secuencia de terminación. Un tercer tipo de sector está constituido por las secuencias codificadoras, aquellas que contienen la información para la síntesis de polipéptidos específicos.

La figura 27.12 resume las principales características estructurales de los ARNm de procariontes.

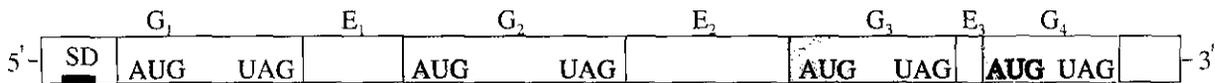


Fig. 27.12. Estructura de un ARNm policistrónico. Los ARNm de procariontes son policistrónicos, contienen la información para varias cadenas polipeptídicas (G1, G2, G3 y G4), cada una de las cuales presenta su codon de iniciación (AUG) y de terminación (UAG) separados por secuencias espaciadoras (E1, E2 y E3), la zona conductora hacia el extremo 5' que contiene la secuencia de Shine y Dalgarno (SD), así como la zona no traducible del extremo 3'-OH.

Los ARN mensajeros de procariontes contienen típicamente información para varias cadenas polipeptídicas, por lo que reciben el nombre de policistrónicos. En la *E. coli* un solo ARN mensajero codifica para 3 enzimas relacionadas con el metabolismo de la lactosa, y uno sólo, para las 10 enzimas de la síntesis de la histidina.

Entre las secuencias codificadoras se encuentran zonas de longitud variable conocidas como espaciadores. Los ARN policistrónicos tienen una longitud típica de 3 000 a 8 000 bases, aunque los hay mayores como el de la histidina que contiene 12 000 nucleótidos. Los ARNm de procariontes se comienzan a traducir generalmente antes de que termine su transcripción, o sea, los 2 procesos son simultáneos, lo que indica que estas moléculas no deben experimentar ningún proceso de maduración; es el tipo de ARN de mayor labilidad metabólica, pues su vida media alcanza como promedio 1,8 minutos.

En cuanto a los demás tipos de ARN, su síntesis no difiere de la del mensajero, pero hay hechos que indican que ni los ARNt ni los ARNr son los transcritos primarios (productos inmediatos de la transcripción) como son:

1. El extremo 5' presenta un nucleósido monofosfato y no un trifosfato, como cabe esperar de un transcrito primario.
2. Los ARNt y los ARNr son mucho más cortos que los transcritos primarios.
3. Todos los ARNt contienen bases raras que no aparecen en las moléculas recién sintetizadas.

Todos estos cambios se realizan después de la transcripción en un proceso llamado modificaciones postranscripcionales o maduración.

Maduración de los ARNt

El ARNt mejor conocido es uno de la *E. coli* que lee el codon GAU y transfiere tirosina, que está formado por 85 nucleótidos. La *E. coli* tiene 2 genes para este ARNt que están adyacentes y presentan 2 secuencias idénticas de 350 bases, cada una con un espaciador de 200 nucleótidos. Los 2 genes son transcritos en un solo ARN, que es cortado cuando se ha completado su síntesis. La transcripción comienza 41 bases antes del extremo 5' -P del ARNt y termina 224 bases después del extremo 3' -OH.

Primero ocurre la transformación del extremo 3' por la eliminación de las bases en varios pasos enzimáticos, hasta dejar sólo 2 nucleótidos después del CCA; después se eliminan las bases anteriores al extremo 5', quedando éste formado. La enzima ribonucleasa P (ARNasa P) hidroliza la molécula en el lugar adecuado, pues reconoce su estructura tridimensional en esta zona; inmediatamente la misma enzima elimina los 2 nucleótidos sobrantes del extremo 3', con lo cual la molécula adquiere su tamaño definitivo. Por último, se produce la modificación de las bases nitrogenadas en sitios específicos y se forma la pseudouridina, la tiouridina, la metilguanosa y la isopenteniladenosina (Fig. 27.13).

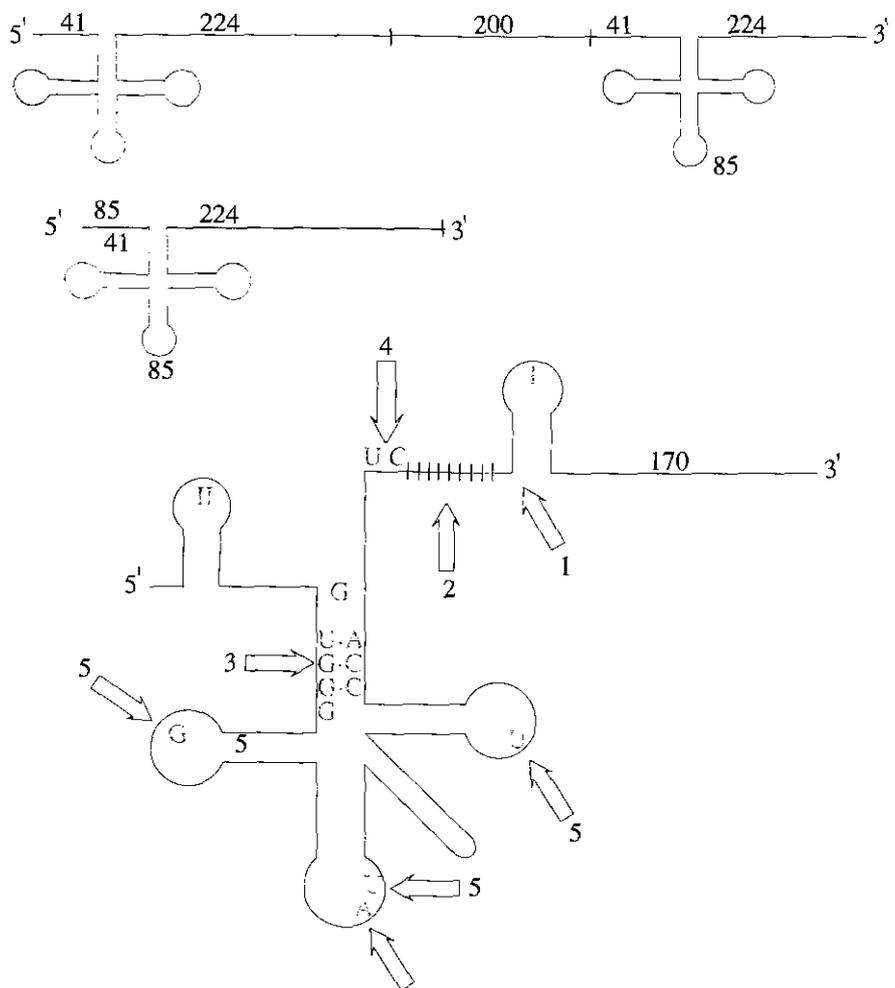


Fig. 27.13. Maduración del ARNt. Los pasos indicados en el esquema se explican detalladamente en el texto.

Maduración de los ARNr

Los ribosomas bacterianos contienen 3 tipos de ARN conocidos como ARNr de 5 S, 16 S y de 23 S, los cuales contienen 120, 1 541 y 2 904 nucleótidos, respectivamente. Estas moléculas junto con las de algunos ARNt son sintetizadas en un precursor que contiene más de 5 000 nucleótidos. Un caso típico puede ser el siguiente:

ARNr 16S - ARNt(Ile) - ARNt(Ala) - ARNr 23S - ARNr 5S - ARNt(Asp) - ARNt(Trp)

El transcrito primario va siendo hidrolizado en la medida que se va formando por un conjunto de enzimas del tipo de las endonucleasas y exonucleasas; esta forma de transcribir los ARNr tiene la ventaja de que éstos son sintetizados en la misma proporción (1:1:1) en que son utilizados por la célula en la formación de los ribosomas.

En resumen, las características más sobresalientes de la maduración en procariontes se resumen en los puntos siguientes:

1. Todos los ARNt y ARNr son procesados, no así los ARNm.
2. Se requieren cerca de 10 tipos de ARNasa que generan tanto el extremo 3'-OH como el 5'-P.
3. Las ARNasas reconocen preferentemente a las estructuras tridimensionales más que a las secuencias de bases.
4. Las bases raras son formadas por transformación enzimática de las comunes.

Transcripción en eucariontes

Los conocimientos sobre la transcripción en eucariontes se han incrementado intensamente en los últimos 10 años y han mostrado que el proceso es mucho más complejo que en los procariontes, aunque en líneas muy generales es similar. A continuación se hará un breve resumen de los hechos más sobresalientes de este proceso en los organismos superiores.

La transcripción en el núcleo de los eucariontes se realiza por 3 tipos de enzimas ARN polimerasas denominadas I, II y III. Además, existe una enzima en las mitocondrias y otra en los cloroplastos. La pol I se localiza en el nucléolo y realiza la síntesis de los ARNr. La tipo II es del nucleoplasma y realiza la síntesis de los ARNm, en tanto la de tipo III que es también del nucleoplasma, lleva a cabo las síntesis de los ARNt y del ARNr de 5 S. Cada enzima está formada por unas 10 subunidades y las 3 mayores presentan gran similitud con las subunidades α , β y β' de la *E. coli*. Estas enzimas se distinguen por su sensibilidad al inhibidor α -amanitina, que tiene un efecto intenso sobre la polimerasa II, menos marcado sobre la III y ninguno sobre la I.

La reacción de polimerización catalizada por estas enzimas es similar a la de las polimerasas de procariontes. Todas ellas requieren de varias proteínas adicionales llamadas factores de transcripción. Estos factores son específicos para cada polimerasa y pueden dividirse en 2 grandes grupos: los generales y los genicoespecíficos. Los generales son aquéllos necesarios para la transcripción de cualquier gen por una polimerasa dada, y así existen factores generales de la polimerasa I, de la II y de la III. Los genicoespecíficos sólo se han descrito para la polimerasa II, pues se trata de la enzima que debe transcribir genes con mayor grado de variabilidad en su expresión. Los factores de transcripción generales de la polimerasa I son UBF y SL-I; los de la polimerasa II son TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF y TFIIH; y los de la polimerasa III son TFIIIA, TFIIB y TFIIC. Los genicoespecíficos sólo se mencionarán en los casos necesarios.

La formación del complejo de preiniciación comprende 3 etapas básicas, en cada una de las cuales participa al menos un factor de transcripción. El primer paso consiste en la unión de un factor de transcripción a una secuencia específica del promotor. El

segundo, en la unión de otro factor de transcripción que va a servir como una especie de puente para la unión de la polimerasa. El tercer paso es la unión de la polimerasa. Sólo en el caso de la ARN polimerasa II hay factores de transcripción que se integran al complejo con posterioridad a la entrada de la enzima.

Síntesis y maduración de los ARNr

La transcripción de los ARNr (excepto el de 5 S) se realiza en el nucléolo por acción de la ARN polimerasa I. Los genes están repetidos numerosas veces y organizados en tándem. En el ser humano cada unidad de transcripción en dirección 5' -P-> 3' -OH contiene los genes para los ARNr de 18; 5,8 y 28 S, está formada por un segmento de ADN de aproximadamente 13 700 pb y separada de la siguiente por un espaciador de 30 000 pb. Estas unidades se encuentran localizadas en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Cada unidad da origen a un transcrito primario de 45 S que durante la maduración produce los ARNr definitivos. La transcripción puede ser vista mediante el microscopio electrónico, donde se obtiene una imagen arborescente (Fig. 27.14).

La formación del preARNr de 45 S demora de 3 a 4 minutos. Durante la síntesis se le transfieren más de 100 grupos metilos a las bases y ribosas de nucleótidos específicos. Una vez terminada la transcripción, una ARNasa hidroliza un enlace fosfodiéster que reduce el tamaño de la molécula en algunos cientos de nucleótidos en el extremo 5' -P; después se produce un corte hacia el extremo 3' -OH del preARNr de 18 S, que es el primero que adquiere su forma definitiva al eliminarse los restantes nucleótidos del extremo 5' -P. Simultáneo a dicho proceso, este ARN se va uniendo a proteínas hasta formar la subunidad menor del ribosoma, que es liberada hacia el citoplasma donde se le incorporan otros 4 grupos metilos. La maduración del otro fragmento se produce de forma similar.

Los genes para el ARNr de 5 S están localizados en el cromosoma 1 y su transcripción la realiza la ARN polimerasa III, y no tiene proceso de maduración.

Por métodos de ingeniería genética han podido determinarse las secuencias necesarias para su transcripción, lo más asombroso es que para la síntesis se requiere de una zona de unos 50 nucleótidos que comienza en la posición +47, dentro del gen. Un factor general de transcripción se une a esta secuencia y permite la unión de la polimerasa III, que comienza la transcripción en la posición +1 que es ocupada por una G. Las alteraciones producidas en la secuencia alrededor del punto de iniciación sólo cambian el sitio de iniciación, sin embargo, el proceso se ve seriamente afectado por cambios en la zona de +47, por lo que se concluye que la única señal necesaria es la que aparece en el interior del gen. La proteína que allí se une fue el primer factor activador de la transcripción, purificado a partir de células de eucariotes (Fig. 27.15).

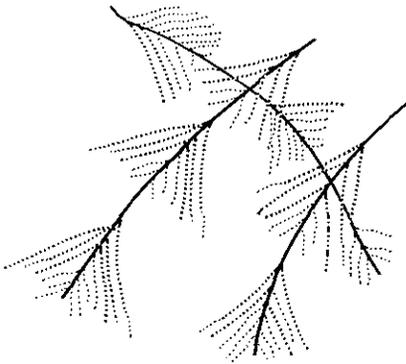


Fig. 27.14. Transcripción de genes organizados en tándem. La figura simula una microfotografía electrónica. Cuando un gen se encuentra repetido en el genoma y está organizado en tándem, o sea, uno a continuación del otro, al producirse la transcripción con numerosas polimerasas es posible observar una imagen arborescente.

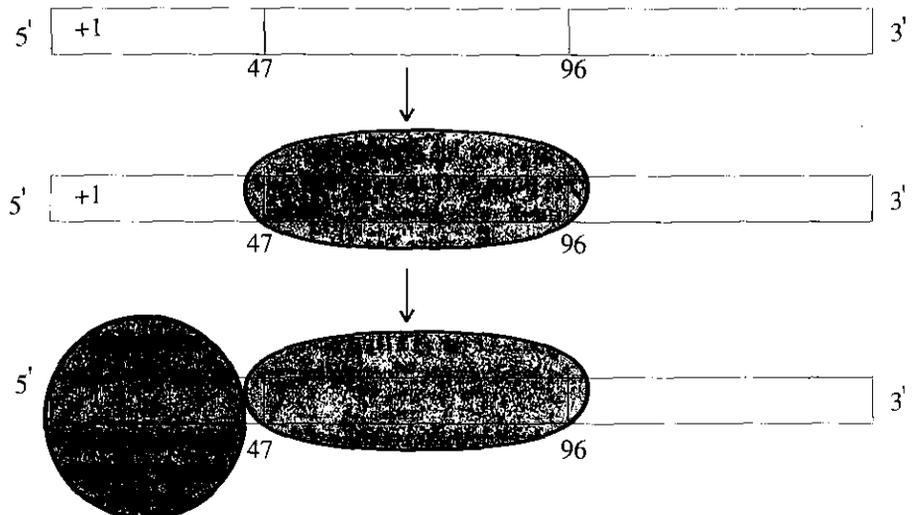


Fig. 27.15. Promotor del ARNr de 5S en eucariotes. Lo más curioso en la estructura de este promotor es que una de las secuencias que lo integran se localiza en el interior del gen entre las posiciones 47 y 96.

Síntesis y maduración de los ARNt

Los genes de los precursores de los ARNt son transcritos por la ARN polimerasa III, de muchos de ellos se conoce totalmente la secuencia de bases y a partir de ella se han podido precisar las secuencias necesarias para la transcripción. Hacen falta 2 regiones: la primera, localizada entre las posiciones +10 y +20 y la segunda, entre +50 y +60 del ARNt maduro -las señales están dentro del gen- y éstas corresponden a las asas D y TC, respectivamente; luego estas zonas tienen una función dual: en la estructura tridimensional de la molécula y en la promoción de la transcripción de sus genes (Fig. 27.16).

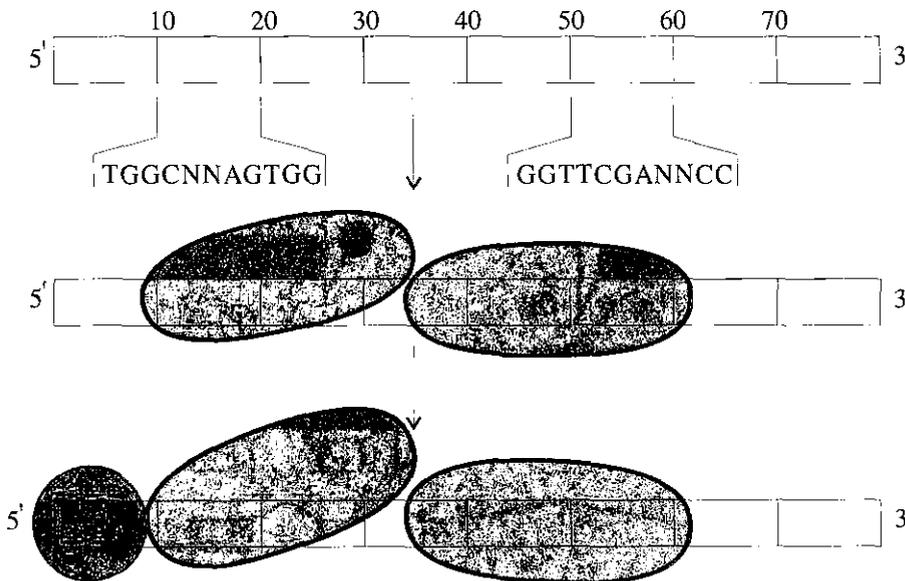


Fig. 27.16. Promotor del ARNt en eucariotes. Hay 2 secuencias integradas de manera funcional en el promotor de este gen y que se encuentran dentro de éste. Esas secuencias corresponden con 2 asas del ARNt maduro; luego desempeñan 2 funciones importantes.

Los ARNt se forman a partir de un precursor de mayor tamaño, que es procesado hasta el estado definitivo. La maduración incluye la reducción del tamaño en los 2 extremos, la modificación de las bases nitrogenadas (aproximadamente una de cada 10), la adición del extremo CCA y la eliminación de los intrones que comprende los pasos siguientes:

1. Hidrólisis por endonucleasas de los enlaces fosfodiéster en las uniones exón-intrón e intrón-exón, y se forman un extremo 3'-P y uno 5'-OH.
2. Una quinasa transfiere un P del ATP al exón, formando un extremo 5'-P. El P de la posición 3' del otro extremo se traslada a la posición 2' espontáneamente.
3. Por acción de una ligasa (similar a la ADN ligasa) se unen los 2 extremos en una reacción dependiente del ATP.
4. Una fosfatasa elimina el P de la posición 2'.

La figura 27.17 muestra todo el proceso.

Después que el proceso de maduración se ha completado -y nunca antes- los ARNt maduros son transportados hacia el citoplasma.

Unidades de transcripción

Antes de describir la maduración de los ARNm es conveniente hacer algunas consideraciones. En primer lugar, los ARNm de eucariotes son monocistronicos, sólo tiene información para la síntesis de una cadena polipeptídica. Tanto el extremo 5'-P como el 3'-OH están modificados por una estructura en forma de casquete, el primero, y por una larga secuencia de adeninas repetidas, poli(A), el segundo. Los ARNm maduros no contienen las secuencias de bases que corresponden a los intrones en el ADN, pues son eliminadas durante la maduración.

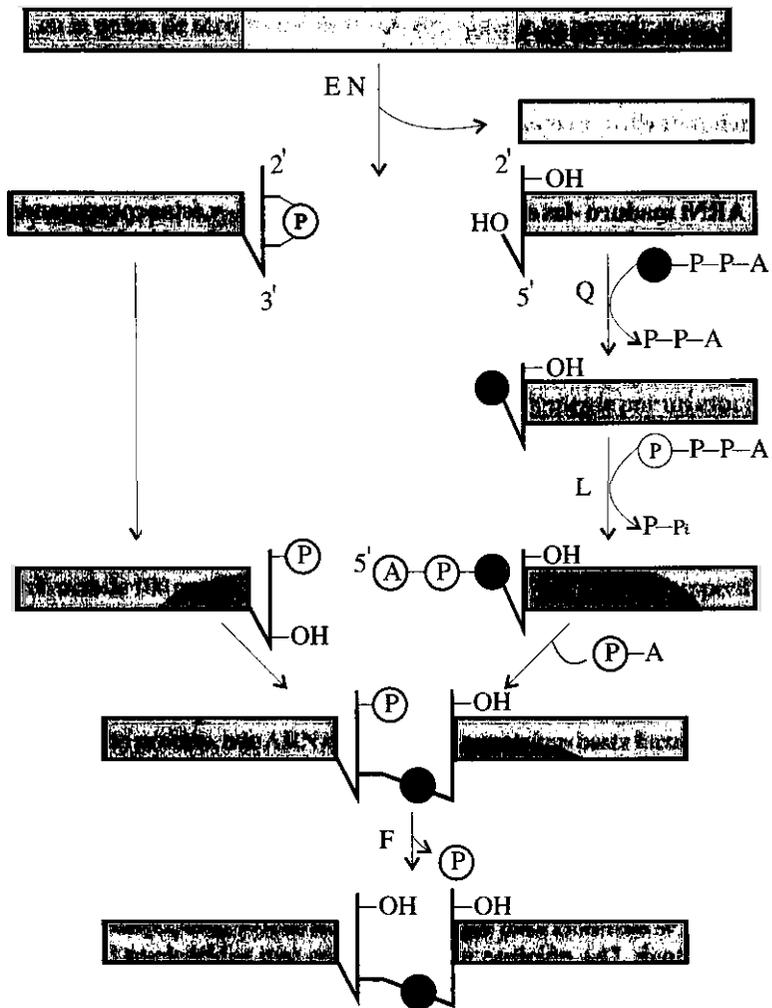


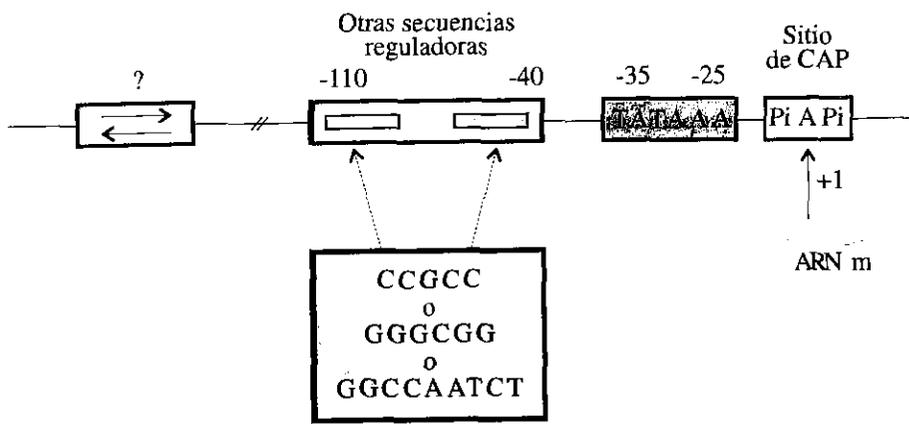
Fig. 27.17. Eliminación de intrones en los ARNt. En la eliminación de los intrones, los 2 exones son procesados de forma diferente. Una endonucleasa (EN) hace el corte en los sitios de unión del intrón. El fosfato de la posición 3' pasa a la 2' espontáneamente, en tanto, una quinasa (Q) adiciona un grupo fosfato al extremo 5', que después es activado por una ligasa (L) que le transfiere un grupo adenilato. Por último, se forma el enlace fosfodiéster, mientras que una fosfatasa (F) elimina el grupo fosfato de la posición 2'.

Al segmento de ADN que contiene la secuencia de bases que transcribe la ARN polimerasa II se le denomina unidad de transcripción. Estas unidades pueden ser simples si dan origen a un solo tipo de ARNm, o complejas si dan lugar a más de uno. Una unidad simple de transcripción típica contiene la zona del promotor por la cual se une la polimerasa II; estos promotores presentan una secuencia consenso (TATAAT) aproximadamente entre las posiciones -25 y -35. Otras secuencias se encuentran más alejadas hacia el extremo 5' y sirven como sitios de unión para los factores genicos específicos y, por lo tanto, pueden variar en número y estructura en concordancia con cada gen en particular; estos factores de transcripción pueden incrementar la intensidad del proceso cientos de veces, a partir del nivel basal de expresión que logran los factores generales. Otras secuencias más alejadas pueden actuar como elementos potenciadores (Fig. 27.18).

La incorporación de nucleótidos comienza en la base +1 a la cual durante la maduración se añadirá el casquete (cap); después aparecen exones e intrones de forma alternativa. En el último exón aparece una secuencia consenso, la AATAAA, que indica el punto donde debe añadirse la cola de poli(A). El sitio exacto donde termina la transcripción no está del todo conocido.

Las unidades complejas son menos regulares y pueden presentarse las situaciones siguientes:

1. Varios sitios de iniciación y uno de terminación, pero con procesamiento diferente del transcrito primario.
2. Un sitio de iniciación y varios de terminación, con procesamiento diferente.
3. Varios sitios de iniciación y terminación, pero con igual procesamiento.
4. Un sitio de iniciación y uno de terminación, con diferente procesamiento.



En la figura 27.19 se muestra un resumen de las posibles unidades complejas de transcripción.

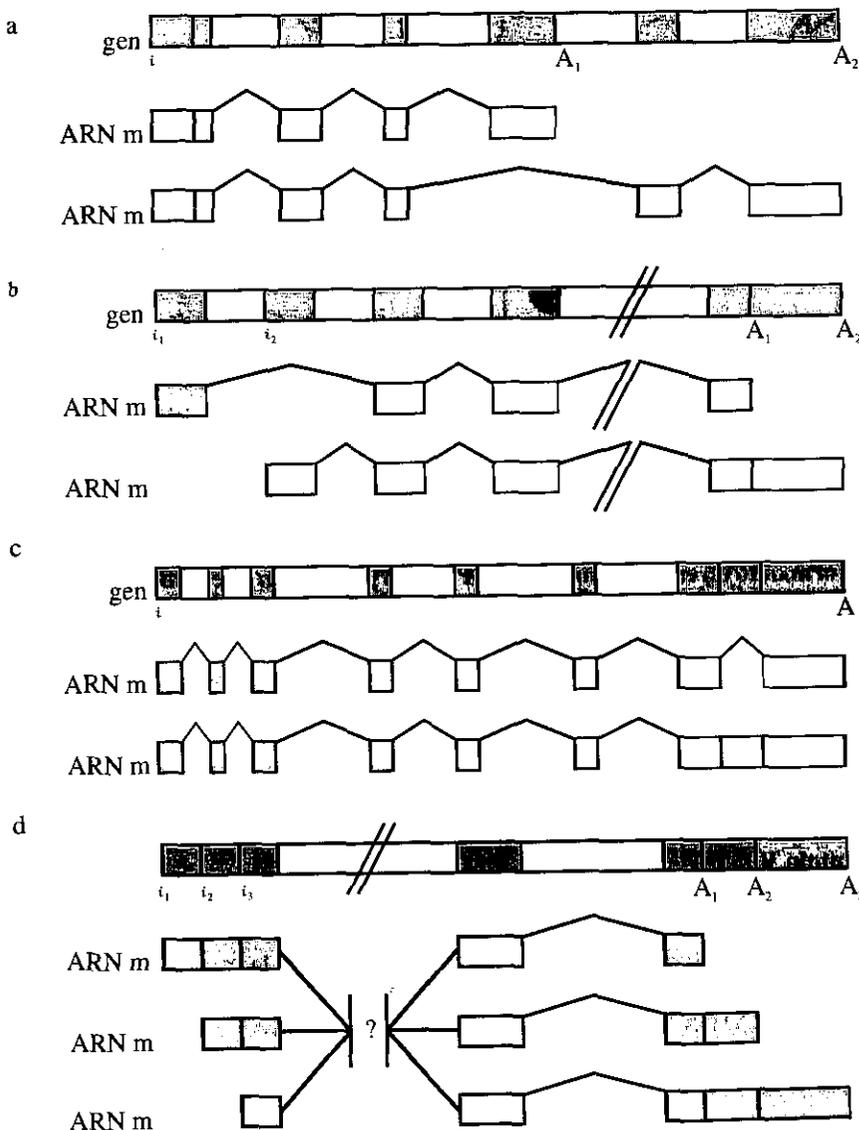


Fig. 27.18. Estructura general de los promotores eucariontes. Los promotores eucariontes son más complejos que los procariontes. El sitio para el CAP corresponde con el primer nucleótido en ser transcrito, por lo que representa la posición +1. En la región de -25 a -35 se encuentra la secuencia TATAAA; entre -40 y -110 se encuentran 2 secuencias que pueden corresponderse con alguna de las representadas en el cuadro inferior y en otra zona que puede ser la representada- estar más hacia el extremo 5' o incluso hacia el extremo 3'- se encuentran secuencias que estimulan mucho la transcripción (*enhancer*), pero que no parecen ser constantes en todos los genes.

Fig. 27.19. Unidades transcripcionales complejas. (a) El gen de la calcitonina con un solo sitio de iniciación (i) y 2 de poliadenilación (A) y maduración diferente que, según el primer caso, da origen a la calcitonina en el tiroides y, según el segundo caso, origina un péptido relacionado con la calcitonina que aparece en el hipotálamo y en otras regiones del SNC. (b) Unidades con varios sitios de iniciación y de poliadenilación, como sucede con el gen de la amilasa de ratón que en el primer caso da lugar a la enzima salivar y en el segundo, a la pancreática. (c) Hay un solo sitio de iniciación y de poliadenilación, pero el procesamiento es diferente como los genes del gamma fibrinógeno de la rata que origina el tipo A, en el primer caso, y el tipo B, en el segundo. (d) Presencia de varios sitios de iniciación y de poliadenilación, pero no hay diferencias en la maduración, como se observa en el gen que codifica diferentes formas de la enzima dihidrofolato reductasa de ratón. Estas diferentes variantes disímiles que, sin embargo, están codificadas en el mismo segmento de ADN.

Síntesis y maduración de los ARNm

La síntesis del ARNm, una vez comenzada, se produce de forma ininterrumpida hasta el final, se copian tanto los exones como los intrones. De manera simultánea algunas de sus adeninas son metiladas (0,1 %) y el ARN naciente va uniéndose con proteínas formando las partículas de ribonucleoproteínas que contienen ARN nuclear heterogéneo (PRNnh) (Fig. 27.20).

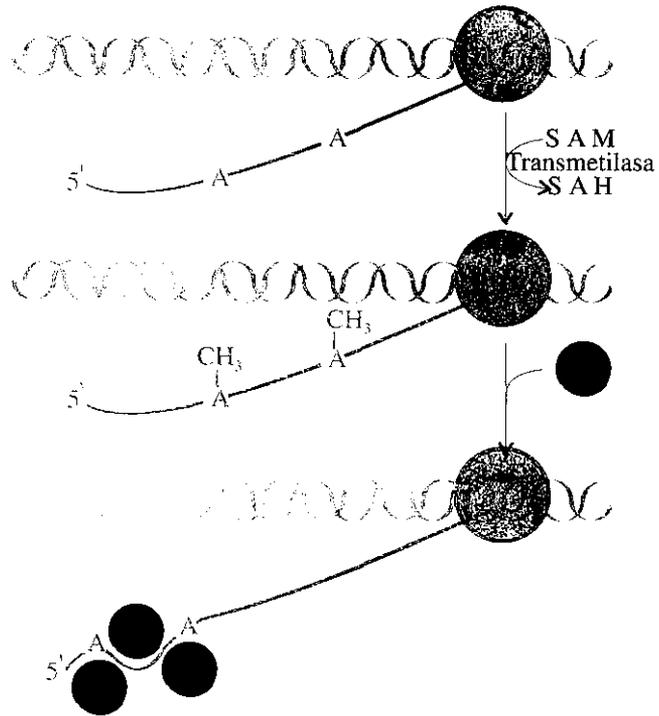


Fig. 27.20. Iniciación en eucariontes. A medida que el ARNm se va formando, una transmetilasa que utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como cofactor, metila diferentes nucleótidos de adenina, lo cual convierte al cofactor en S-adenosil-homocisteína (SAH). Cuando el ARNm tiene un tamaño adecuado comienza a unirse con proteínas, dando lugar a la formación de las partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (PNPhn).

Poco después de comenzada la síntesis -menos de 100 nucleótidos- se produce la incorporación del casquete, proceso que al parecer consta de los pasos siguientes:

1. Una fosfatasa elimina el P(γ) del extremo 5' -P.
2. La guanilato transferasa incorpora el grupo guanilato del GTP al extremo 5' -P-P, formando un enlace anhídrido 5' -P-5' y el pirofosfato que es hidrolizado por las pirofosfatasa, lo cual favorece la reacción energéticamente.
3. Un grupo de transmetilasas transfieren sucesivamente grupos metilos a la posición 7 (Cap 0) de la guanina y a la posición 2' del primer (Cap 1) y segundo (Cap 2) nucleótidos, utilizando como cofactor la S-adenosil-metionina (Fig. 27.21).

El significado de esta metilación se discute, pero 2 conclusiones parecen ser convincentes: la transformación del extremo 5' -P protege al ARN de la acción de las exonucleasas, y esta estructura está relacionada con la unión del mensajero al ribosoma (capítulo 30).

La terminación no está bien esclarecida. La polimerasa II continúa su acción después de la secuencia AATAAA, pero entre 500 y 2 000 nucleótidos posteriores se producen el cese del crecimiento de la cadena y el fin de la transcripción. En pocos segundos (90 a 120) la cadena se corta en un punto que dista 15 a 30 nucleótidos de la secuencia AATAAA, y las poli(A) polimerasas van incorporando uno a uno los nucleótidos de adenina hasta un total que puede variar entre 120 y 250 nucleótidos (Fig. 27.22).

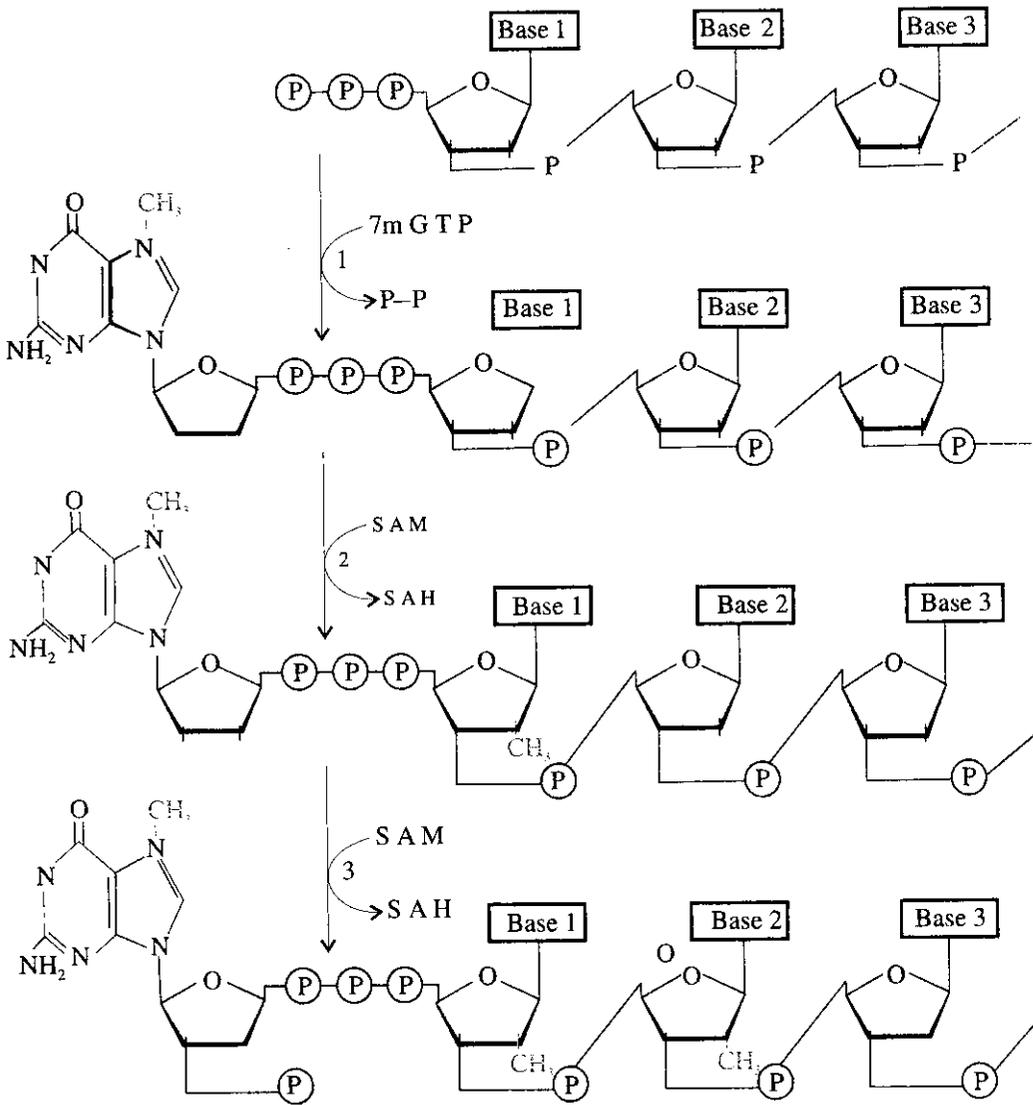


Fig. 27.21. Formación del CAP. Una quinasa específica transfiere un grupo 7-metil-guanilato al extremo 5' del ARNm formando un enlace anhídrido fosfórico (1), quedando formada la estructura del CAP 0. Una transmetilasa transfiere un grupo metilo de la S-adenosil- metionina (SAM) a la posición 2' del primer nucleótido, originando la estructura CAP 1; una segunda metilación en la posición 2' del segundo nucleótido da origen al CAP 2. No todos los ARNm presentan la estructura completa.

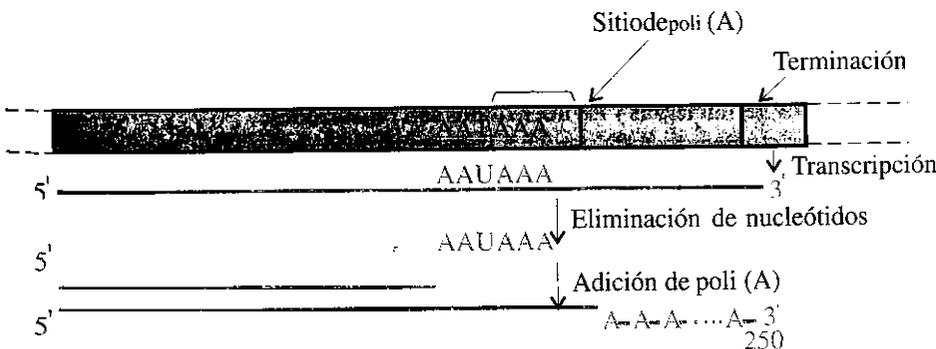


Fig. 27.22. Formación de la cola de Poli A. La secuencia AATAAA indica que, en unos 20 pb más adelante, se debe producir la incorporación de la cola de poli adenina poli(A). Al realizarse la transcripción, una endonucleasa hidroliza el ARNm en el sitio adecuado y la poli(A) polimerasa adiciona adeninas que pueden llegar alcanzar el número de 250.

De esta manera quedan formados los extremos 5' y 3' a los pocos minutos de terminada la transcripción; estos extremos no experimentan ninguna otra modificación durante la maduración.

El siguiente paso consiste en la eliminación de los intrones, donde intervienen ribonucleoproteínas que contienen los ARN nucleares pequeños U1, U2 y U5 (Fig. 27.23).

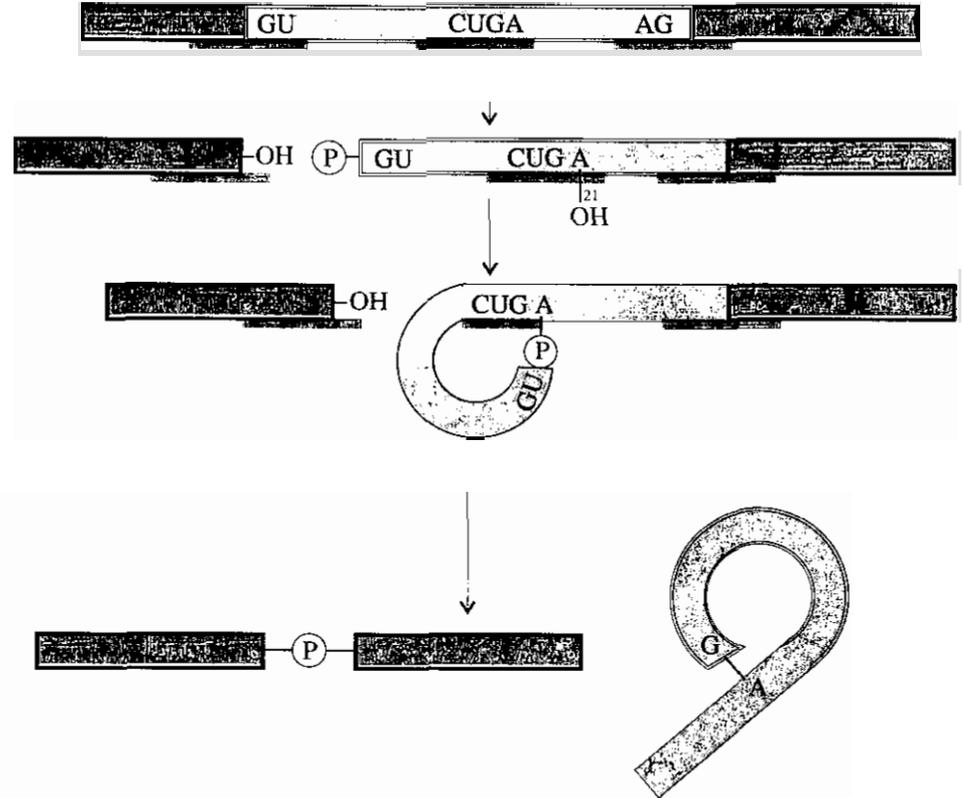


Fig. 27.23. Corte y empalme de exones en el ARNm. El primer corte se produce en el extremo 5' del intrón, que va seguido de su circularización y el segundo corte, concluye con el empalme entre los 2 exones. En todo el proceso intervienen los ARNpn y proteínas específicas.

Los intrones se eliminan uno a uno, esta etapa al parecer comprende los pasos siguientes:

1. Se produce la unión del preARNm con las ribonucleoproteínas, y la asociación del U1 a la zona de unión exón-intrón favorece la hidrólisis del enlace fosfodiéster para formar un extremo libre 3' -OH en el exón.
2. Existe una secuencia de bases en el intrón separada de su extremo 3' por 20 a 40 nucleótidos -en las levaduras es UACUAAC-, que está muy conservada y favorece la formación de un asa intraintrón, a lo cual contribuye el U2. Esta asa se estabiliza por la formación de un enlace fosfodiéster 2' -5' entre el extremo 5' -P del intrón y una adenosina próxima al extremo 3' de éste.
3. Se produce la hidrólisis del enlace fosfodiéster en la unión intrón-exón, generando un exón con el extremo 5' -P. En este paso participa el U5. El intrón separado es atacado por las nucleasas y los nucleótidos son reutilizados.
4. Se produce el enlace fosfodiéster 3' -5' que une los extremos de los 2 exones. Esto puede realizarse ya que durante todo el proceso de corte y empalme se forma un gran complejo ribonucleoproteínico que mantiene unidos a todos los componentes del sistema.

Todo el proceso requiere ATP como cofactor -que no puede ser sustituido por ningún otro NTP- y Mg^{2+} a bajas concentraciones, pues muy elevadas tienen un efecto inhibitorio.

Como se dijo anteriormente si la unidad transcritiva es simple, el corte y el empalme se producen siempre de la misma forma, originando siempre un mismo ARNm; pero en las unidades complejas se emplean diferentes sitios de iniciación o de incorporación del poli(A), o formas distintas de corte y empalme que pueden originar ARNm diferentes y que, por lo tanto, darán origen a distintas proteínas. Se ha insistido en que la maduración del ARNm constituye un punto de control fundamental en el mantenimiento de los niveles adecuados de ARNm en el citoplasma.

Sobre el transporte de ARNm al citoplasma poco se sabe, solamente está comprobado que ocurre una vez que el proceso de maduración ha concluido. Al contrario de los ARNm de procariontes, los de eucariontes son muy estables en el citoplasma y tienen una vida media de horas; se ha pensado que esto se debe a la modificación de sus 2 extremos. Un fenómeno curioso es que la cola de poli(A) se va acortando en el citoplasma. Dos experiencias son claves en estas conclusiones: se aislaron ARNm que eran muy estables, se les eliminó la cola de poli(A) y se inyectaron en el citoplasma de una célula y se comprobó que presentaban un recambio muy rápido. Por otra parte, se tomó el ARNm de histonas que no contiene poli(A), se le añadió éste, se inyectaron en el citoplasma celular y se observó que la velocidad de recambio disminuyó considerablemente.

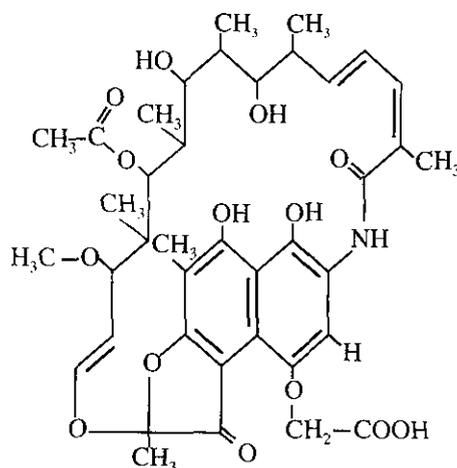
El conocimiento de estos procesos ha permitido conocer el origen de algunas enfermedades, de las cuales las más conocidas son algunos tipos de talasemia; ésta comprende un grupo de entidades nosológicas que se caracterizan por la ausencia total o parcial de una de las cadenas de la hemoglobina.

En algunos pacientes que presentan el tipo β^0 (no sintetizan cadenas β) se ha descubierto una mutación que origina un cambio $G \rightarrow A$ en el extremo 5' del segundo intrón; esto inactiva a este sitio y se produce un ARNm a partir de otro sitio donante dentro del intrón. En otros casos del tipo β^+ (producen un bajo nivel de cadenas β) se han localizado mutaciones en el primer intrón, donde se crea un nuevo sitio aceptor. Se produce un corte y empalme anormales, utilizando este nuevo sitio con preferencia al normal y disminuyendo así la formación de cadenas β normales. Por último, se han descrito casos del tipo α^0 (no sintetizan cadenas α) que han perdido las 5 bases inmediatas al primer exón, con lo cual se pierde el sitio donante para el corte y el empalme. Al no poderse utilizar este sitio se emplea otro que está localizado dentro del exón.

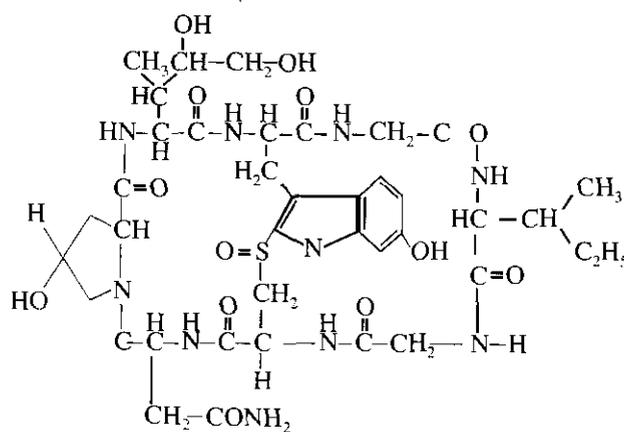
Todos estos fenómenos son conocidos recientemente por lo que existen muchos puntos no esclarecidos. Es de esperar que en los próximos años se tenga un conocimiento más completo de los mecanismos empleados y del significado biológico de este complejo proceso de síntesis de los ARNm en las células eucariontes.

Inhibidores de la transcripción

Pudieran considerarse 2 tipos de inhibidores: los que impiden la separación de las cadenas del ADN, que por lo general son también inhibidores de la replicación, y los que actúan de forma directa sobre las polimerasas. Los primeros ya fueron tratados en el capítulo 25. Entre los segundos se encuentra el antibiótico rifampicina, que actúa sobre la ARN polimerasa, impidiendo la fase de iniciación. Una sustancia conocida como α -amanitina inhibe la síntesis de ARN en eucariontes por actuar sobre la ARN polimerasa II. Además de sus acciones terapéuticas por lo cual serían ya suficientemente importantes, estos inhibidores son de inapreciable valor en el laboratorio, pues su uso ha permitido esclarecer muchos aspectos de estos complejos procesos (Fig. 27.24).



Rifamicina B



α - Amanitina

Fig. 27.24. Inhibidores de la transcripción.

En la figura se muestra la estructura química de la rifampicina B, uno de los inhibidores de la transcripción más empleado en las investigaciones sobre este tema. La α -amanitina permite diferenciar las 3 polimerasas de eucariontes, pues la I es resistente a su acción, la III se inhibe poco, pero la II es inhibida de manera intensa por esta sustancia.

Resumen

La transcripción es el proceso central en el crecimiento y desarrollo de la célula, en la cual la información genética contenida en el ADN se copia en un ARN específico, ribosomal, de transferencia o mensajero. El desarrollo técnico alcanzado en los últimos años ha permitido obtener una visión comprensible, en principio, de este fenómeno. Los precursores de la transcripción son los nucleósidos trifosfatados que son unidos mediante enlace fosfodiéster 3'-5', por acción de la ARN polimerasa, según la secuencia de bases de una hebra del ADN.

En los procariontes -especialmente en la *E. coli*- una sola enzima es capaz de realizar todo el proceso, ésta es una proteína oligomérica a la cual se unen otras subunidades en diferentes fases del evento. Para comenzar la transcripción la polimerasa debe unirse íntimamente al promotor y lograr la apertura de la doble hebra del ADN, en este paso la subunidad σ es fundamental; luego comienza la incorporación de los ribonucleósidos trifosfatados cuyas bases son complementarias a las del ADN; la proteína NusA impide la terminación prematura de la cadena. La terminación se produce gracias a una señal específica en el ADN, aunque en ocasiones la proteína Rho determina el cese de la síntesis, sin que al parecer existan

señales para ello. Después de terminada la síntesis comienza el proceso de maduración. Los ARNm no sufren modificaciones, pero los ARNr y ARNt se sintetizan en forma de precursores de gran tamaño, que deben ser acortados hasta alcanzar su forma definitiva.

En los eucariontes existen 3 tipos de ARN polimerasa: el tipo I es del nucléolo y realiza la síntesis de los ARNr; los II y III son del nucleoplasma y llevan a cabo la síntesis de los ARNm, la primera, y de los ARNt y el ARNr de 5 S, la segunda.

Los ARNr derivan de un transcrito primario de 45 S, que es metilado en bases y ribosas de nucleótidos específicos y acortado hasta su tamaño definitivo. Es curioso que en el ARNr de 5 S, la señal que promueve la transcripción es intragénica. Los ARNt también se originan de un precursor mayor; en su procesamiento se incluyen la reducción del tamaño, la eliminación de intrones, la adición del extremo CCA-OH y la modificación de las bases nitrogenadas. Como en el caso de los ARNr de 5 S, las señales promotoras son intragénicas. Los ARNm se sintetizan por la polimerasa II a partir de una unidad de transcripción, simple o compleja. El promotor se encuentra fuera del gen y en él existen varias secuencias necesarias para la transcripción. El proceso de copia incluye tanto los exones como los intrones. La señal de terminación -si existe- no ha sido aún identificada. La maduración consiste en la modificación del extremo 5' -P por un nucleótido de guanina metilada (Cap); la transformación del extremo 3' -OH, en una larga cola de adenina -poli(A)- y en el corte y empalme de la cadena para la eliminación de los intrones. Se ha comprobado que una misma unidad de transcripción puede originar varios tipos de ARNm maduros por diferencias en la maduración.

Un hecho interesante lo constituye el hallazgo de que algunos tipos de talasemia se deben a trastornos en el proceso de maduración de los ARNm de la globina.

Ejercicios

1. Para hacer una experiencia de transcripción *in vitro* se sintetizan artificialmente 3 polidesoxinucleótidos con la siguiente estructura:

- | | | |
|-------------|----------|---------|
| a) TGTTGACA | 18 bases | AATATTG |
| b) TGTTGACA | 16 bases | TTTATAG |
| c) TGTTGACA | 17 bases | TATAAAG |

¿Puede usted determinar cuál de ellos funcionará como el promotor más fuerte y cuál como el más débil? Argumente su respuesta.

2. En una experiencia donde se pretendía investigar el proceso de transcripción, se añadió al sistema rifampicina y se vio que la iniciación quedaba bloqueada. Si se añadía estreptolidina ocurría la iniciación, pero quedaba bloqueada la elongación ¿Cuáles serían las conclusiones que este experimento aporta sobre el mecanismo molecular de la transcripción?
3. En un experimento posterior se comprobó que la rifampicina se unía fuertemente a la subunidad β' de la polimerasa y que la estreptolidina se asociaba con la subunidad β ¿Cuáles serían las conclusiones más importantes de estos experimentos con respecto al mecanismo de acción de la ARN polimerasa?
4. ¿Qué consecuencias traería para la transcripción una alteración de la proteína NusA que disminuyera su afinidad por el núcleo de la polimerasa?
5. ¿Cuál es la característica más sobresaliente de la transcripción realizada por la ARN polimerasa III?
6. La cordicepina inhibe la acción de la poli(A) polimerasa. ¿Qué consecuencias pudiera tener su acción sobre las células procariontas y eucariontas? Argumente su respuesta.

Nótese que parte de la enzima se encuentra en forma de complejo EI que no da producto, pues no puede unir al sustrato, lo que significa que existe una disminución del número de centros activos útiles y, por tanto, una menor velocidad de la reacción.

Una característica de los inhibidores competitivos es que su estructura es semejante a la del sustrato. En la figura 16.11 se muestra cómo la succinato deshidrogenasa puede ser inhibida de forma competitiva por el malonato, cuya estructura es muy similar a la del succinato, que es el sustrato natural de la enzima.

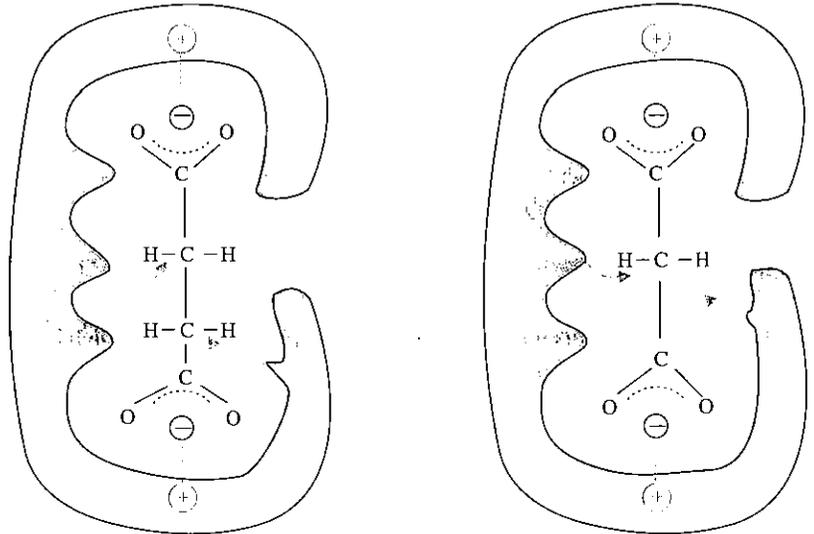


Fig. 16.11. Mecanismo de la inhibición competitiva. La similitud estructural del inhibidor con el sustrato hace que aquél pueda unirse al centro activo, pero sus diferencias le impiden la transformación. La enzima succinato-deshidrogenasa une al ácido succínico y actúa sobre los hidrógenos colocados en carbonos adyacentes. Cuando el ácido malónico, que tiene una estructura similar, se une al centro activo de la enzima produce una inhibición, pues no puede ser transformado, quedando unido al centro activo y, por tanto, impide la entrada y transformación del sustrato verdadero.

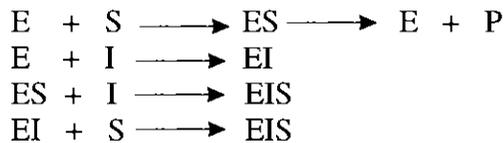
Inhibición no competitiva

En la figura 16.12 al igual que en el caso anterior se muestran además los resultados del experimento sin el inhibidor.

Los efectos de este inhibidor sobre los parámetros cinéticos son contrarios al anterior, se observa una disminución de la V_m sin alteraciones de la K_m ; ni siquiera en concentraciones elevadísimas de sustrato se logra eliminar la inhibición.

Si la K_m no se ha modificado quiere decir que no existe impedimento para la unión de la enzima con el sustrato, pero la afectación de la V_m indica que el inhibidor disminuye de alguna forma la capacidad catalítica de la enzima. Se acepta que la unión enzima-inhibidor se produce en un sitio diferente del centro activo y que esa unión modifica las propiedades catalíticas de la enzima, posiblemente modificando la conformación del centro activo de forma que no impide la unión del sustrato pero dificulta grandemente su transformación.

El esquema de la reacción con la participación de un inhibidor no competitivo será



La enzima existe en un estado libre y en forma de varios complejos (EI, ES y EIS) de los cuales sólo ES da productos. Si suponemos que la unión de S a la enzima no

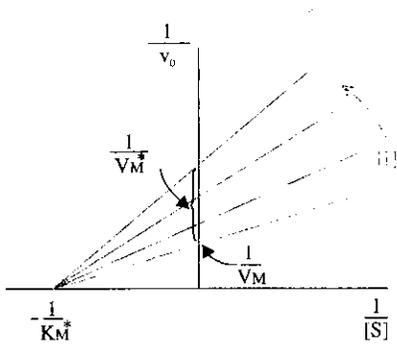


Fig. 16.12. Inhibidores no competitivos. El inhibidor no competitivo no se aloja en el centro activo y no puede impedir la entrada del sustrato, pero de alguna forma dificulta su transformación; en su presencia las curvas que se obtienen difieren en el valor de $1/V_m$, pero no alteran el valor de $-1/K_m$. Variaciones en la concentración del inhibidor dan origen a una familia de curvas que se cortan en el eje de las abscisas en el punto $-1/K_m$.

influye sobre la unión de I y viceversa, entonces la constante de disociación de EI será igual a la de ES y viene dada por cualquiera de las ecuaciones siguientes:

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

$$K_i = [ES][I]/[EIS]$$

El valor aparente de V_m^* que se obtiene en presencia del inhibidor se relaciona con la V_m de la reacción sin el inhibidor por la ecuación

$$V_m^* = V_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

En este caso también la enzima existe en forma de varios complejos de los cuales sólo ES puede dar productos, pero no existe ningún impedimento para la unión con el sustrato; la existencia de esos complejos determina una disminución del número de centros activos útiles en la preparación y, por tanto, una disminución de la velocidad de reacción.

Los inhibidores no competitivos no son análogos estructurales del sustrato; el iodoacetato es un potente inhibidor no competitivo de las enzimas que poseen grupos sulfhidrilos en, o cerca de, su centro activo.

Algunos medicamentos utilizados diariamente en la práctica médica son inhibidores enzimáticos, como el caso de las sulfamidas que se emplea en el tratamiento de infecciones bacterianas.

En general las armas químicas suelen ser también inhibidores enzimáticos que al bloquear determinadas reacciones pueden dañar un órgano o tejido específico, si la enzima que resulta inhibida está presente sólo en él, o al organismo en su totalidad si la enzima inhibida está muy distribuida en la economía.

La lucha contra la producción, almacenamiento y utilización de las armas químicas debe constituir una posición de principio de todo científico, pues es parte del comportamiento ético impedir el uso de los avances de la ciencia en perjuicio de la humanidad.

Resumen

La cinética enzimática es la parte de la enzimología que se ocupa del estudio de la velocidad de las reacciones enzimáticas y de los factores que la modifican.

En los estudios cinéticos se deben observar algunas reglas que permitan hacer una interpretación adecuada de los resultados, como son medir siempre velocidades iniciales y variar en cada experimento sólo uno de los factores que pueden alterar la velocidad. Los principales factores que influyen sobre la velocidad de la reacción son las concentraciones de enzimas, sustratos y cofactores, la temperatura, el pH y la presencia de activadores o inhibidores.

La velocidad de las reacciones enzimáticas es directamente proporcional a la concentración de enzima, lo cual constituye el fundamento de toda la cinética enzimática. La concentración de sustrato influye sobre la velocidad de forma muy característica. A medida que la concentración de sustrato aumenta se produce un aumento de la velocidad, pero en concentraciones muy elevadas de sustrato se produce un estado de saturación de la enzima que no permite mayores incrementos de velocidad. Para explicar este comportamiento se emplea la teoría de Michaelis-Menten, según la cual bastan 2 parámetros para explicarlo, uno, la K_m define la

afinidad de la enzima por el sustrato y el otro, V_m es un indicador de la capacidad catalítica de la enzima.

Cuando en la reacción intervienen 2 sustratos, uno de los aspectos más importantes que se debe determinar es el orden en que se ligan los sustratos y se liberan los productos. Atendiendo a este punto de vista se describen los mecanismos ordenados, los azarosos y el ping pong.

La influencia de la concentración de los cofactores es similar a la del sustrato.

La velocidad varía con el pH y existe una zona de pH óptimo donde la velocidad es la mayor. Variaciones del pH en ambos lados de esta zona determinan una disminución de la velocidad.

Al aumentar la temperatura la velocidad de reacción aumenta, pero pasado un límite comienza a disminuir, pues se producen alteraciones de la estructura tridimensional de la enzima.

Los activadores producen un aumento de la velocidad de la reacción, se distinguen 2 tipos principales, aquéllos que se unen a la enzima libre y los que se unen al sustrato. Por su parte los inhibidores disminuyen la velocidad de la reacción, bien porque modifican la K_m , en cuyo caso son de tipo competitivo, o por alteraciones de la V_m , que reciben el nombre de no competitivos.

Los estudios cinéticos son importantes para el conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas, con el propósito de conocerlo y modificarlo. Muchos medicamentos y algunas armas químicas suelen ser inhibidores enzimáticos específicos.

Ejercicios

1. ¿Cuáles son las razones por las que en los estudios cinéticos debe siempre medirse velocidades iniciales?
2. En una experiencia cinética se observa que al aumentar la concentración de enzima no se produce el esperado aumento proporcional de la velocidad. ¿A qué factores pueden deberse estos resultados?
3. Si 2 enzimas actúan sobre el mismo sustrato con K_m de 4×10^{-4} y 7×10^{-6} , respectivamente ¿Qué conclusiones pueden derivarse de estos valores?
4. Calcule el número de recambio de una enzima que al estar en una concentración de 10^{-4} M forma 3×10^{-2} M del producto en un segundo.
5. Una enzima cataliza la reacción:



en un experimento realizado a pH=8 y a 30 °C se obtienen los datos siguientes:

[ala]mM	V_o ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ min}^{-1}$)
4	2,50
3	2,24
2,25	1,95
1,50	1,55

Calcule la K_m para la reacción

6. En el estudio de la reacción:



se encontró que el β -hidroxi-aspártico era un inhibidor de la enzima. Al tratar de determinar qué tipo de inhibidor era se obtuvieron los datos siguientes:

[L-aspártico] mmol l ⁻¹	v _o (mmol de CO ₂ min ⁻¹) (mg de proteína) ⁻¹	
	<i>sin inhibidor</i>	<i>con inhibidor</i>
25	17	-
33,3	21,3	5,7
50	27,8	8,1
100	41,7	14,7
200	52,6	25,0

Construya una gráfica de $1/v_o$ vs $1/[S]$ y determine de qué tipo de inhibidor se trata.