

Análisis molecular del proceso de transcripción de genes en eucariontes

María Eugenia Cabrejos M.¹, Evelyn Tamayo C.¹,
Edio Maldonado M.¹

Resumen

El proceso de transcripción es altamente regulado en el que intervienen la RNA polimerasa y varios factores adicionales. La enzima RNA polimerasa II contiene entre 8 y 14 subunidades y es la enzima que transcribe los RNA que codifican para proteínas. La subunidad mayor de la RNA polimerasa II contiene en su región carboxilo terminal un dominio denominado CTD que consiste en repeticiones de un heptapéptido, el cual es fundamental para la regulación de la transcripción. El proceso de transcripción consiste de tres etapas: iniciación, elongación y terminación. A pesar que la RNA polimerasa II es una enzima multimérica, no puede reconocer los promotores e iniciar la transcripción en forma específica. Para iniciar la transcripción en forma específica requiere de factores adicionales, denominados factores generales de transcripción, los cuales se denominan TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH. Estos factores y la RNA polimerasa II se ensamblan sobre el promotor en forma secuencial, o preensamblados con la RNA polimerasa II. Los genes son activados en respuesta a señales fisiológicas, llevada a cabo por los activadores de la transcripción, los que se unen a secuencias intensificadoras que están ubicadas río arriba del sitio de iniciación. Para la activación de la transcripción, además de los activadores, se requiere de un complejo MED, el cual puede encontrarse libre o bien unido al CTD de la RNA polimerasa II. El DNA se encuentra compactado dentro del núcleo por histonas, las cuales representan un impedimento físico para que se forme un complejo de iniciación sobre el promotor. Existen enzimas que poseen la capacidad de modificar las histonas, que se denominan acetilasas, las cuales acetilan el dominio aminoterminal de las histonas, provocando una inestabilidad en el nucleosoma, lo cual permite que se forme un complejo de preiniciación de la transcripción. También existen factores que son capaces de desplazar los nucleosomas para permitir la unión de la RNA polimerasa II y sus factores al promotor.

(**Palabras clave:** transcripción, RNA polimerasa II, mRNA, regulación de la transcripción.)

Molecular analysis of genome transcription in eukaryotes

The transcription process is highly regulated and requires RNA polymerase and additional factors. The enzyme RNA polymerase II is composed of 8 to 14 subunits and transcribes the messenger RNA. The largest subunit contains in the amino terminal region a domain which is named CTD. CTD is composed of repetitions of a heptapeptide sequence which is fundamental for the regula-

Abreviaciones más usadas:

RNA	: ácido ribonucleico	PIC	: complejo de preiniciación
RNAPII	: RNA polimerasa II	MED	: complejo mediador
CTD	: carboxil terminal repeat	ATP	: adenosin trifosfato
GTFs	: factores generales de transcripción		

1. Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Este trabajo fue financiado por Proyecto FONDECYT 1010824.

tion of transcription. Although RNA polymerase is a multimeric enzyme it is not by itself able to recognize the promoters and initiate specific transcription. It requires auxiliary factors called the general transcription factors, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF and TFIIH. These factors and RNA polymerase II are assembled at the promoter site in a step by step fashion or preassembled with RNA polymerase II. The genes are activated in response to physiological signals by activators which bind to the upstream elements of the promoter site. Also for the activation of transcription the MED complex is required. This can exist in the free form or bound to the CTD of RNA polymerase II. The DNA inside the nucleus is compacted by histones to form chromatin, which restricts the access of the transcription machinery to the promoter site. Enzymes called acetylases are able to modify the chromatin structure by acetylation of the N-terminal of the histones, producing a weakening in the DNA-histone contacts, thus allowing the transcription machinery access to the promoters and initiate transcription. There exists factors which are able to displace the nucleosomes to allow RNA polymerase II and factors to form a preinitiation complex on the DNA promoter site.

(Key words: transcription, RNA polymerase II, mRNA, transcription regulation.)

El núcleo es el compartimento de una célula eucarionte que contiene la información genética necesaria para que ella se duplique, prolifere o se diferencie. Es en este compartimento donde se desencadena el dogma de la biología molecular, es decir, donde ocurren los procesos de flujo de información génica que permiten que una célula duplique en su totalidad el ácido desoxirribonucleico (proceso de replicación de DNA), sintetice una molécula intermediaria de ácido ribonucleico (proceso de transcripción de RNA), o bien, procese dicho RNA. Estos fenómenos son altamente regulados, requieren una gran variedad de proteínas para que se desarrolle cada uno de ellos y constituyen *per se* la respuesta final a vías de transducción de señales, las cuales en conjunto determinan el estado metabólico y de diferenciación de una célula en el tiempo. Estos procesos acontecen en un espacio físico que corresponde a una fracción insoluble del núcleo denominada matriz. Esta estructura proteica sirve de andamiaje para que los diversos complejos enzimáticos, polipéptidos estructurales o reguladores sean inmovilizados, hecho que determina que los diversos procesos ocurran en dominios preferenciales y bien definidos.

En el núcleo de la célula eucarionte existen tres enzimas que transcriben el RNA. Estas enzimas son denominadas RNA polimerasa I, que transcribe los RNA ribosomales, RNA polimerasa II (RNAPII) que transcribe los genes que codifican para proteínas y RNA polimerasa III que transcribe los RNA de transferencia.

En esta revisión analizaremos específicamente el proceso que ejecuta la enzima

RNAPII, enzima que está constituida por 8 a 14 polipéptidos. La subunidad de mayor tamaño molecular (Rpb1) posee una característica sorprendente que repercute en la integración de la regulación del proceso de transcripción. Rpb1 contiene en el extremo carboxilo terminal repeticiones de siete residuos aminoácidos (YSPTSPS), que varían en número de 27 en levaduras a 53 en mamíferos. Cada uno de estos segmentos contiene residuos de aminoácidos que son factibles de ser fosforilados. El dominio completo de Rpb1 es denominado CTD (carboxil terminal repeat) y posee, en general, la capacidad de asociarse a una diversidad de polipéptidos, entre los cuales encontramos proteínas que procesarán posteriormente al transcrito, proteínas reguladoras del proceso de biosíntesis de mRNA ([co]activadores, [co]represores) y proteínas que modifican la cromatina, entre otras. La unión o no unión entre ellos es regulada fundamentalmente por el grado de fosforilación de algunos residuos aminoácidos presentes en cada hepta repetición contenida en el CTD. Este tipo de modificación es reversible, de modo que la extensión de la fosforilación del CTD es un punto de regulación crucial para el proceso global de transcripción. Entre las otras subunidades encontramos algunas que se asocian a Rpb1, especialmente Rpb2, para conformar el sitio activo del complejo RNAPII, mientras que el resto de las subunidades dan fundamentalmente soporte estructural a la enzima.

RNAPII desencadena la biosíntesis de mRNA cumpliendo con tres etapas fundamentales. La primera etapa del proceso es el inicio, que se caracteriza por el reconoci-

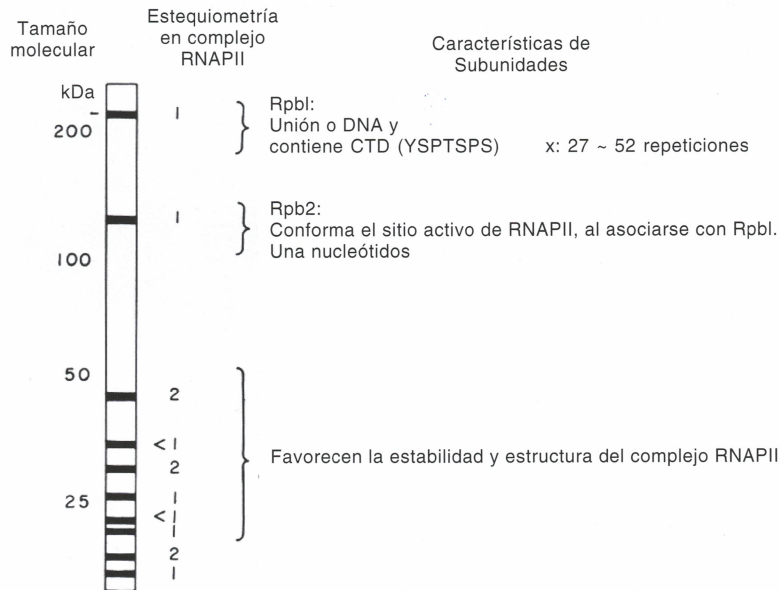


Figura 1: Configuración de la RNAPII de eucariotes. Electroforesis en gel denaturante que permite visualizar las diferentes subunidades polipeptídicas que conforman la RNAPII, según su tamaño molecular (kDa).

miento de una región específica del gen la cual se denomina promotor. La secuencia más característica de los promotores tipo II corresponde a la denominada caja TATA y se ubica a una distancia bastante regular, cercana a 30 pares de bases, río arriba del sitio de inicio de la transcripción. La segunda etapa, denominada elongación, conlleva la biosíntesis de una molécula de mRNA, la cual es acabada en la etapa de terminación que coincide con la liberación de la RNAPII del DNA molde. Este transcrito primario es procesado al interior del núcleo y, una vez maduro, es exportado al citoplasma donde será "leído" y traducido en una proteína (proceso de traducción).

A pesar de que la enzima es multimérica, carece de la capacidad de iniciar el proceso de transcripción en forma específica. En la última década se han hecho enormes esfuerzos experimentales que han permitido identificar aquellos factores proteicos requeridos por la RNAPII para que el inicio de la transcripción ocurra en un nivel basal y en forma exacta a partir del sitio de inicio del promotor. Es así como en organismos eucariotes tan diversos como humano, rata, *Drosophila melanogaster* y levadura, entre otros, se ha identificado a partir de extractos

celulares un grupo de polipéptidos conservados en estructura y función. La RNAPII al ser suplementada con estos polipéptidos da inicio específicamente a la biosíntesis de un mRNA. Estos factores son denominados específicamente según la siguiente nomenclatura: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH. Muchos de estos factores contienen varias subunidades y constituyen en total cerca de 30 polipéptidos. En forma colectiva se denominan factores generales de transcripción (GTFs) y al ser comunes para la expresión de la mayoría de los genes de tipo II, quizás de todos, se sugiere que la etapa de inicio es extraordinariamente conservada entre diversos organismos eucariotes.

La etapa de iniciación de la transcripción se caracteriza por la formación del complejo de preiniciación (PIC), que consiste en un complejo formado por RNAPII y los GTFs unidos al sitio promotor. La forma mediante la cual se forma el PIC en el sitio promotor se puede explicar mediante dos modelos: el modelo secuencial y el modelo de la "RNAPII holoenzima". El modelo convencional secuencial describe la unión paso a paso de los diversos GTFs y RNAPII de forma cooperativa, es decir, la unión de un factor de

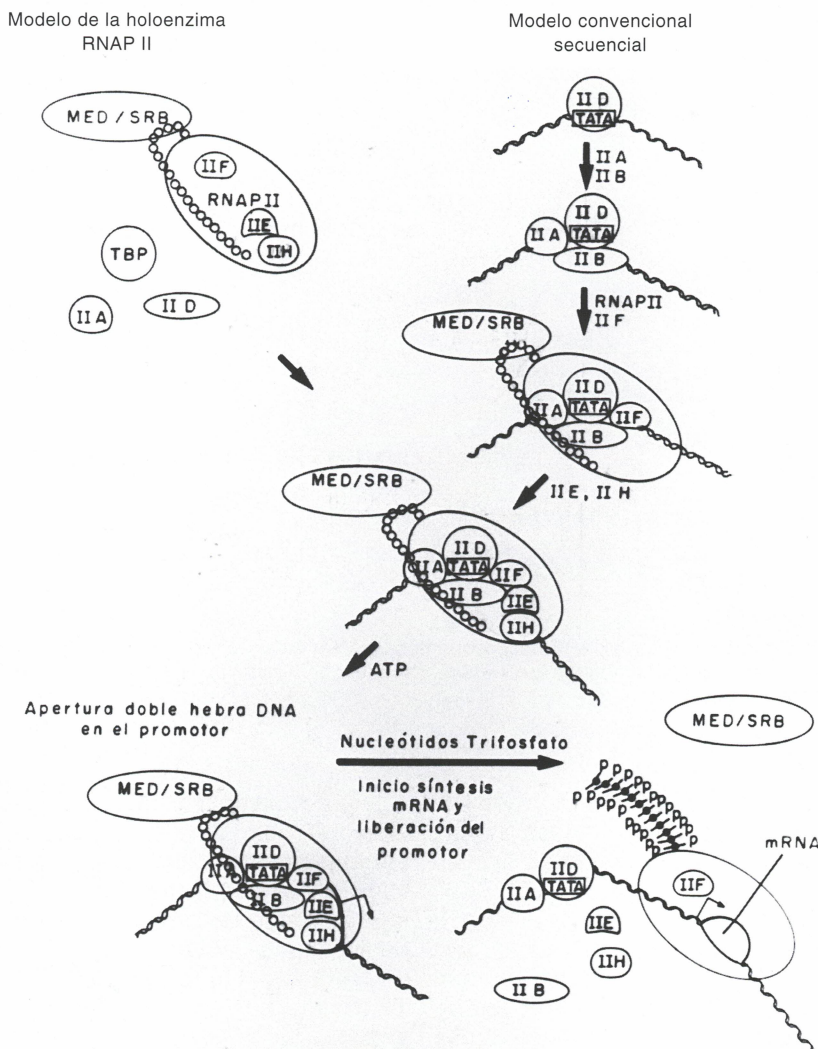


Figura 2: Modelos alternativos de la formación del complejo de preiniciación (PIC). El modelo convencional secuencial (b), que considera la asociación secuencial cooperativa de cada uno de los GTFs y de la RNAPII en el promotor, mientras el modelo de la RNAPII holoenzima (a) contempla que varios de los GTFs ya están preensamblados con la RNAPII y su unión al promotor ocurriría tan solo en un paso. Una vez formado el PIC, el TFIIF fosforilará el dominio CTD de Rpb1 a expensas de la hidrólisis de ATP, evento que coincide con la apertura de la doble hebra del DNA en el promotor. La RNAPII comenzará la biosíntesis de mRNA, si en el medio existe los sustratos nucleósidos trifosfatos y el cofactor ion magnesio. En la etapa de elongación la RNAPII se encuentra en un estado hiperfosforilado y el complejo MED es liberado junto con algunos GTFs.

transcripción favorece la asociación del siguiente. Este modelo está caracterizado por una serie de eventos ordenados, que se describen en detalle en la figura 2. Por otra parte, el segundo modelo describe que la RNAPII está asociada previamente con distintos GTFs y es capaz de unirse al promotor en un solo paso. De una u otra forma, una vez establecido el PIC en la región pro-

motora ocurre un fenómeno crucial, que consiste en la fosforilación masiva del dominio CTD de Rpb1 por el factor TFIIF, evento que coincide con la apertura de la doble hebra de DNA. Ocurre en forma concomitante el inicio a la biosíntesis de mRNA que requiere tanto de los nucleósidos trifosfatos como del cofactor magnesio (ion Mg^{+2}).

Hasta este momento hemos analizado la expresión génica en un nivel basal, pero debemos estudiar cómo ocurre el proceso cuando un gen es activado en respuesta a una señal fisiológica.

La activación de la transcripción en respuesta a una señal fisiológica es llevada a cabo por los activadores, moléculas que dirigen la regulación de la expresión de un gen específico. Este tipo de polipéptidos se une a secuencias específicas del DNA de la región promotora, las cuales se denominan secuencias intensificadoras y están localizadas río arriba o río abajo del sitio de inicio de la biosíntesis de mRNA. Los activadores están constituidos por diferentes dominios que incluyen un segmento que se une directamente a la doble hélice de DNA, el cual está separado del otro dominio que actúa estimulando la actividad del complejo de la RNAPII. Este tipo de regulador de la transcripción se clasifica de acuerdo a la composición aminoacídica, dado que existen residuos aminoacídicos predominantes en ellos, tales como: glutamina, prolina e isoleucina, entre otros. Normalmente estos segmentos, más aquellos ricos en aminoácidos de carácter hidrofóbico, permiten establecer contactos directos con la RNAPII, los GTFs y los coactivadores. Todas estas interaccio-

nes son de naturaleza dinámica, producto de las cuales ocurren cambios conformacionales en una proteína o en un conjunto de ellas. Este tipo de asociaciones reclutaría a la holoenzima RNAPII a la región del promotor presente en el molde, con la concomitante activación de la biosíntesis de un mRNA dado.

La RNAPII holoenzima, además de contener los GTFs, contiene otros polipéptidos asociados que conforman el complejo Mediador/ SRB (MED), el cual es fundamental para la respuesta de activación de un gen. Este complejo en general puede ser considerado como un panel de control transcripcional, el cual está integrado por proteínas activadoras y represoras y responden a modificaciones que determinan la regulación de la transcripción. El complejo MED representa una interfase conservada, entre las proteínas activadoras y la maquinaria de transcripción basal de genes tipo II, que ya hemos analizado. Este complejo estaría constituido por cerca de 20 polipéptidos y puede encontrarse en un estado libre, o bien, asociado a la RNAPII a través del CTD. Al estar asociado al complejo de la RNAPII ejerce su función que es fundamentalmente determinar la ocurrencia del evento de transcripción y determinar la frecuencia

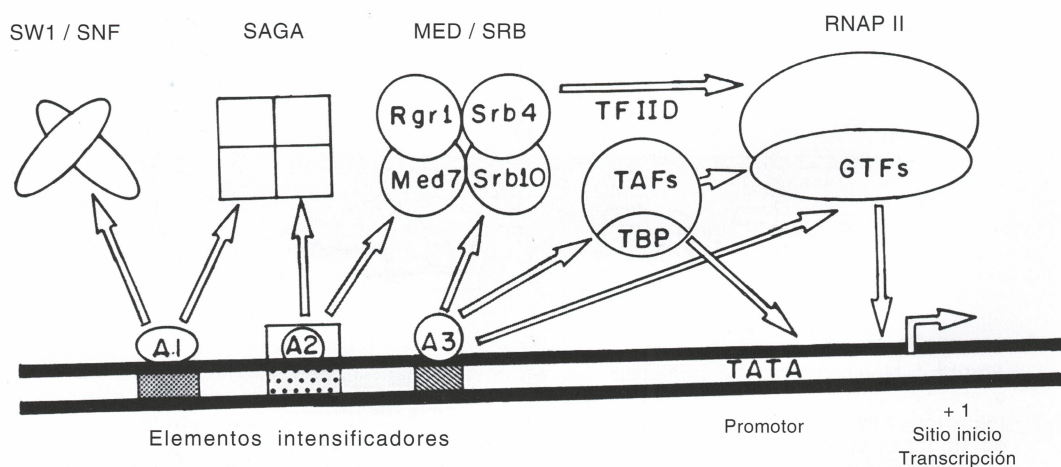


Figura 3: Modelo de la activación de la transcripción. Los activadores A1, A2 y A3 se unen directamente a través de un dominio proteico a secuencias específicas en el DNA y por un dominio diferente son capaces de contactar coactivadores (complejo MED), complejos que modifican la cromatina (SWI/SNF, SAGA), o bien, componentes de la maquinaria basal de transcripción (GTFs y RNAPII). El efecto global corresponde al sinergismo de cada uno de estos eventos por separado, lo que conlleva el aumento en la frecuencia de la etapa de inicio del proceso de transcripción. De este modo, el nivel basal de la expresión del gen específico es activado en forma regulada en el tiempo.

del proceso una vez iniciado. Con la información que se cuenta hoy en día, es posible inferir acerca de la composición del complejo MED, pudiendo ser que existan subunidades específicas para un tipo celular en particular, o bien, que existan moléculas que conformen temporalmente el complejo MED de acuerdo al estado de diferenciación de aquella célula.

Por último, existe un tipo de regulación global de la transcripción cuya actividad recae sobre otro blanco diferente a los ya mencionados. Recordemos que el DNA se encuentra compactado al interior del núcleo, es decir, se "enrolla" alrededor de proteínas denominadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) constituyendo lo que se denomina el nucleosoma.

Estas unidades se compactan con la ayuda de otras proteínas para constituir la cromatina. El nucleosoma representa un impedimento de tipo físico, por cuanto puede dificultar el acceso a la maquinaria basal de la RNAPII, del complejo MED y de los activadores o represores. Existen algunas enzimas que poseen la capacidad de modificar a las histonas mediante acetilación (acetilasas de histonas), producto de lo cual ellas pierden reversiblemente su estructuración sobre el DNA. Al hacer estas asociaciones más inestables, se cree que se establece un lapso en el cual la maquinaria basal de la RNAPII podría competir por la unión al promotor, permitiendo en forma transitoria la expresión génica. La situación se restablece mediante

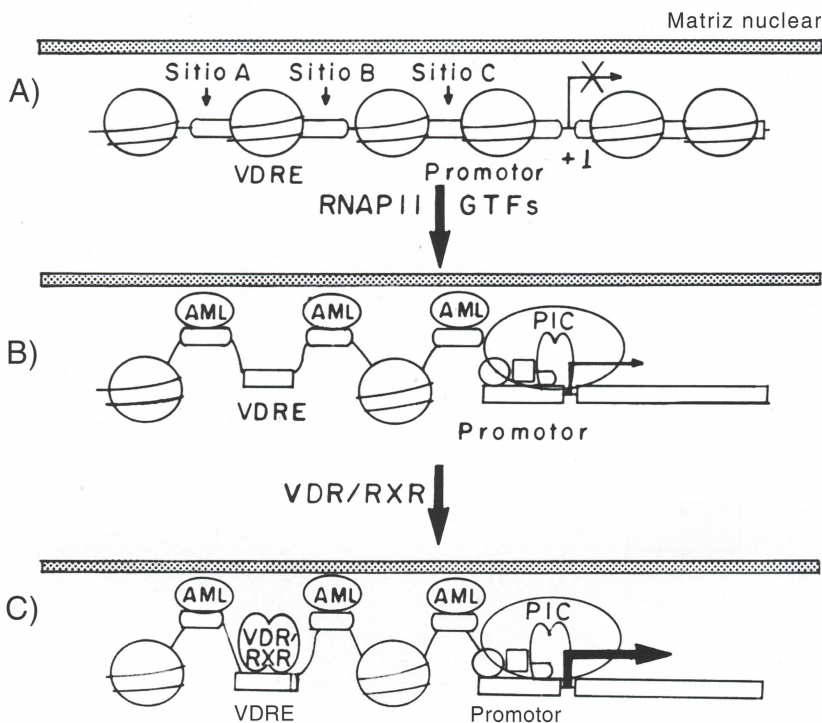


Figura 4: Modificación de la cromatina y activación de la transcripción durante el proceso de diferenciación de una célula del hueso. En la primera etapa del proceso la célula del hueso requiere proliferar, de modo que el gen que codifica para la osteocalcina se encuentra apagado. En (a) se observa el posicionamiento de un nucleosoma sobre el promotor del gen, evento que impide el acceso de la RNAPII y los GTFs. En el nivel basal de expresión génica (b) ocurre el desplazamiento del nucleosoma de la caja TATA, esta conformación es estabilizada por proteínas que se unen a la matriz (AML) y determinan que comience la biosíntesis del mRNA en un nivel basal mediante la RNAPII holoenzima. En la etapa de diferenciación se requieren niveles altos del gen de osteocalcina. La activación de la expresión génica (c) se logra mediante un evento adicional, que corresponde al posicionamiento de un activador VDR/RXR asociado a vitamina D, a una región río arriba del promotor en la secuencia blanco VDRE. Este complejo conlleva la estabilización del PIC en el promotor, evento que favorece la frecuencia de inicio de la transcripción y aumenta el contenido de mRNA en la célula.

la función de aquellas enzimas con actividad contraria (deacetilasas de histonas), las cuales modifican las histonas al estado nativo, logrando la compactación natural de ese segmento de DNA modificado inicialmente. Otro tipo de actividad radica en diversos complejos polipeptídicos que poseen la actividad de desplazar transitoriamente los nucleosomas con el objetivo de desplazar el impedimento físico y facilitar el paso a la maquinaria de inicio o de elongación de la transcripción. Estos complejos, como por ejemplo SWI/SNF, NURF, CHRAC y otros, ejercen su actividad en un modo dependiente de energía la cual proviene de la hidrólisis de ATP. Estos eventos son de naturaleza dinámica, por cuanto una vez ocurrido el proceso de transcripción la organización nativa de la cromatina se recupera.

A modo de resumen, hemos querido ejemplificar lo anteriormente expuesto, mediante un modelo de activación de la transcripción del gen de tipo II que codifica para la proteína osteocalcina en el hueso, durante los procesos de crecimiento y de diferenciación de este tipo celular.

En una primera etapa la célula crece y no requiere la expresión de este gen particular. El promotor se encuentra organizado en cromatina y para los efectos de expresión basal está bloqueado físicamente, situación que se representa en la figura 4 parte (a). En una etapa siguiente del desarrollo, se requiere de un nivel basal de la expresión del gen de osteocalcina, como se aprecia en la parte (b) de la figura 4, por lo cual la organización de la cromatina en la región del promotor se disrumpe permitiendo el acceso a la maquinaria basal de la RNAPII con la concomitante síntesis basal del mRNA. Finalmente, cuando la célula entra en la etapa de diferenciación propiamente tal, requiere de una expresión activada del gen, por cuanto la proteína determinará el estado permanente de la célula al interior del organismo. Esta regulación contempla la reorganización de la cromatina en la región intensificadora del promotor, produciéndose un desplazamiento de los nucleosomas lo que permite que un activador se una a la región promotora del molde y haga puente con la holoenzima RNAPII, favoreciendo la estabilidad del PIC. Este evento produce una mayor frecuencia de inicio de síntesis del

mRNA. Si la frecuencia de la etapa de inicio de la transcripción aumenta, la cantidad de mRNA de osteocalcina también aumentará, fenómeno que puede determinar la mayor cantidad de proteína al interior de la célula. De esta manera, se responde en forma regulada a los requerimientos cuali y cuantitativos de una proteína específica en el hueso, que debe ser expresada en una etapa tardía del proceso de diferenciación. Mediante este ejemplo podemos ilustrar que al regular la expresión concertada de genes al interior de una célula, se busca favorecer la presencia de un conjunto de proteínas que caracterizará temporalmente una célula y este conjunto permitirá sostener la homeostasis celular, fin último de todo ser vivo. Cualquier desregulación del proceso de transcripción determinará ya sea la muerte celular, o bien, la proliferación descontrolada de la célula, lo cual puede llevar a algún tipo enfermedad como, por ejemplo, el cáncer.

REFERENCIAS

1. *Hampsey M*: Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62: 465-503.
2. *Maldonado E, and Reinberg D*: News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Current Opinion in Cell Biology* 1995; 7: 352-61.
3. *Halle JP, and Meisterernst M*: Gene expression: increasing evidence for transcriptosome. *Trends in Genetics* 1996; 12: 161-3.
4. *Cramer P, Bushnell DA, and Kornberg RD*: Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 2001; 292: 1863-76.
5. *Van Driel R, Wansink DG, Van Steensel B, Grande MA, Schul W, and De Jong L*: Nuclear domains and the nuclear matrix. *International Review of Cytology* 1995; 162A: 151-89.
6. *Myers LC, and Kornberg RD*: Mediator of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry* 2000; 69: 729-49.
7. *Wu WH, and Hampsey M*: Common cofactors and cooperative recruitment. *Current Biology* 1999; 9: R606-R609.
8. *Thomas D, and Tyers M*: Transcriptional regulation: Kamikaze activators. *Current Biology* 2000; 10: R341-R343.
9. *Trizzenberg SJ*: Structure and function of transcriptional activation domains. *Current Opinion in Genetics and Development* 1995; 5: 190-6.
10. *Stein GS, Lian JB, Stein J, Van Wijnen A, and Montecino M*: Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological Reviews* 1996; 76: 593-629.