

Cronología del descubrimiento de los *riboswitches* (ARN que regula la expresión genética)

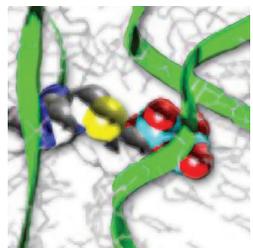
Juan Miranda-Ríos y Mario Soberón

Aunque la mayoría de las bacterias tienen la habilidad de sintetizar, a partir de moléculas sencillas, todas las moléculas complejas que requieren para su crecimiento, también pueden utilizar las moléculas que se encuentran a su disposición en su medio ambiente. En este último caso reprimen la síntesis de los genes necesarios para la producción, ahorrando energía y materiales de esta forma. A este tipo de regulación de la expresión genética se le conoce como *retro-alimentación*, en la cual el producto de una vía metabólica puede reprimir la expresión de las enzimas que forman parte de esa vía. La retro-alimentación es un mecanismo muy común en bacterias. De hecho, muchos de los descubrimientos más interesantes en biología molecular en los últimos cincuenta años se han producido al estudiar los mecanismos de regulación por retro-alimentación. Para que este mecanismo sea operativo se requiere, como mínimo, un modo de detectar la concentración del producto, asociado a un mecanismo para controlar la expresión de los genes relevantes que dependen de esa concentración.

Aunque todos los bucles retro-regulatorios tienen sus propias características, poseen mecanismos comunes. Típicamente, existe una proteína reguladora que puede detectar el nivel

del producto y entonces unirse al ADN o al ARN para modificar la expresión de las enzimas relevantes. Por ejemplo, el represor *trp* de la bacteria *Escherichia coli* sólo es capaz de unirse al ADN si está asociado al aminoácido triptofano. Concentraciones altas de triptofano incrementan la probabilidad de que el represor se una al ADN en donde apaga la expresión de los genes que se necesitan para sintetizar triptofano. Este es un ejemplo de control transcripcional donde la regulación modifica la actividad del promotor y la cantidad de ARNm que se produce. También existe una modalidad de control post-transcripcional en la cual una proteína reguladora se une a una estructura de ARN, impidiendo la traducción del ARNm y, por lo tanto, la expresión de los genes en él contenidos.

La tiamina o vitamina B₁, en su forma de pirofosfato de tiamina, es un cofactor de muchas enzimas importantes en el metabolismo celular y por esta razón es esencial para el crecimiento (**figura 1**). Algunas bacterias, hongos y plantas cuentan con las enzimas necesarias para sintetizar esta vitamina, pero si estos organismos la encuentran disponible en su medio ambiente, detienen su producción, ahorrando de esta forma energía y materiales. Los esfuerzos para identificar a una proteína reguladora represora



18

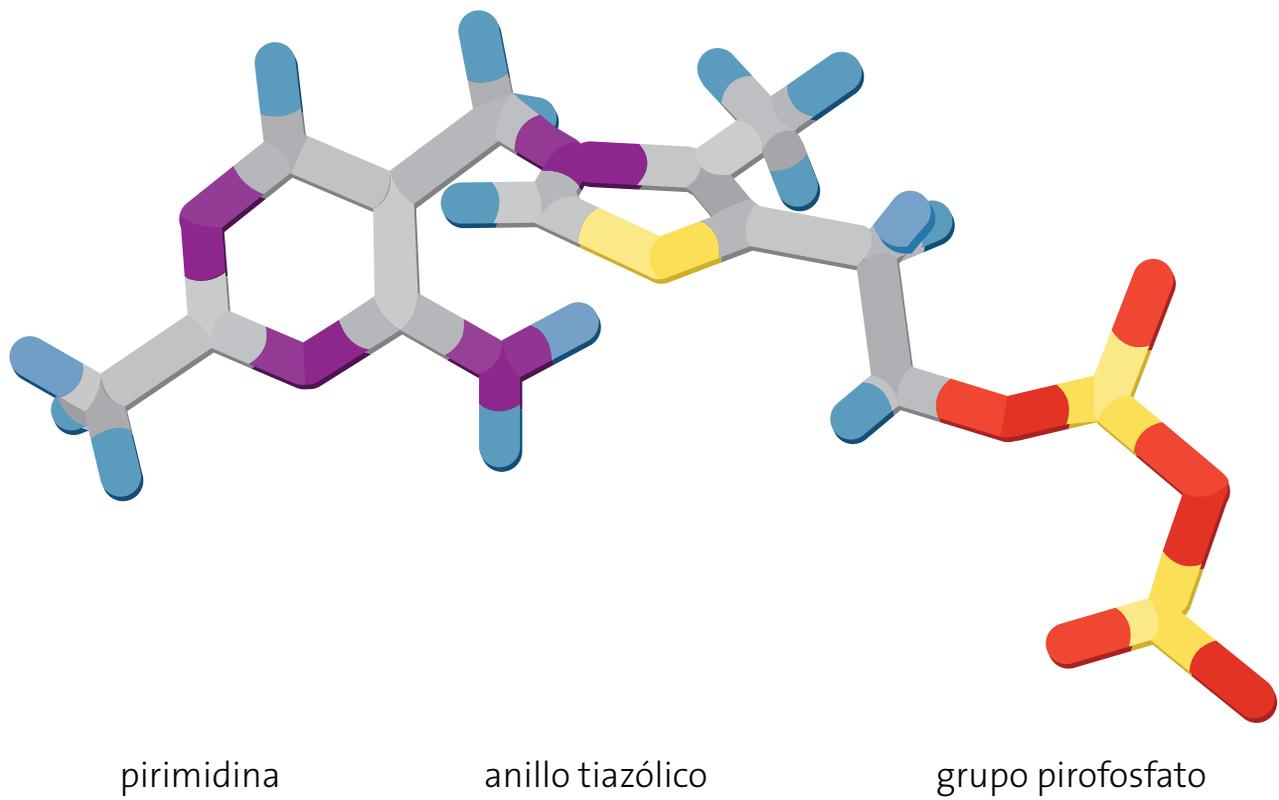


Figura 1.
Molécula de pirofosfato de tiamina en representación de esfera y bastón. Está formado por un anillo pirimidínico, un anillo tiazólico y un grupo pirofosfato. Los átomos de carbono se muestran en gris, los de nitrógeno en violeta, el azufre y el fósforo en amarillo y el oxígeno en rojo. El azul representa los átomos de hidrógeno.

que al unir pirofosfato de tiamina controlara la síntesis de las enzimas necesarias para su producción fueron infructuosos, por lo cual el mecanismo regulador implicado se convirtió en un misterio.

En nuestro grupo de investigación hemos estado estudiando la regulación de la expresión de los genes biosintéticos de tiamina en la bacteria *Rhizobium etli*, la cual es capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces del frijol. En el genoma de esta bacteria identificamos un grupo de genes contiguos cuya expresión depende de una misma región reguladora y que conforman al operón *thiCOSGE*, que codifican para enzimas biosintéticas de tiamina. Encontramos que el ARNm de este operón contiene un líder no traducido inusualmente largo de 211 bases. Dentro de él encontramos una secuencia altamente conservada a la cual se le denominó la THI-box (caja reguladora de tiamina) (Miranda-Ríos *et al.*, 1997). A diferencia del sistema clásico de regulación por una proteína que se une a una secuencia de ADN, la THI-box es un elemento genético de ARN.

La THI-box es una secuencia ampliamente distribuida en los seres vivos, ya que se encuentra presente en los grupos α -, β -, γ y ϵ de las proteobacterias, en cianobacterias, el grupo CFB, el grupo *Thermus/Deinococcus*, el grupo *Bacillus/Clostridium*, en los actinomicetos y los termotogales. También está presente en las arqueobacterias y en algunos hongos y plantas. Debido a su conservación evolutiva y a que este elemento se encuentra siempre asociado a genes biosintéticos y de transporte de tiamina, se propuso que la THI-box juega un papel fundamental en un mecanismo ancestral para la regulación de la expresión genética por tiamina.

La importancia de la THI-box en regulación fue demostrada por medio de experimentos en los cuales, al remover este elemento, los genes que normalmente dejaban de expresarse al cultivar las bacterias en un medio con tiamina adicionada, ahora continuaban expresándose aun en presencia de la vitamina. Nosotros propusimos que la THI-box podía unir al pirofos-

fato de tiamina sin la intervención de ninguna proteína, algo que en su tiempo estaba claramente en contra del dogma de que los procesos de regulación genética eran mediados única y exclusivamente por proteínas (Miranda-Ríos *et al.*, 2001, Stormo y Ji, 2001).

En años recientes ha cambiado drásticamente nuestra visión de las funciones del ARN en la célula. Aunque primero se le reconoció como una molécula que transmitía la información genética (ARN mensajero o ARNm) y como una molécula adaptadora en la síntesis de proteínas (ARN de transferencia o ARNt), ahora sabemos que es el portador de información genética en algunos virus y retrovirus, que puede funcionar como catalizador enzimático (ribozimas), que forma parte de subunidades catalíticas supra-moleculares como los ribosomas (en donde tiene funciones catalíticas) y que es el sustrato de modificación en el control epigenético. Además, algunos ARNs tienen un papel importante y decisivo como reguladores de la expresión genética, un papel que se creía exclusivo de las proteínas.

Además de sus capacidades catalíticas, algunos ARNs llamados aptámeros pueden ser seleccionados *in vitro*, por un procedimiento llamado SELEX, y son capaces de unirse a moléculas blanco. Aptámeros con alta afinidad y especificidad pueden ser seleccionados a un amplio rango de blancos, incluyendo aquellos con potencial para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Se han seleccionado aptámeros para unir a un gran número de moléculas pequeñas, incluyendo aminoácidos, nucleótidos, antibióticos y cofactores de enzimas. Entre sus atributos está su alta especificidad, representada por la habilidad de un aptámero de ARN para distinguir entre las moléculas teofilina y cafeína, que difieren entre sí por un solo grupo metilo. En general, los aptámeros para moléculas pequeñas contienen asas internas que pueden formar bolsillos de pegado al interactuar con el ligando. Es importante hacer notar que la THI-box posee varias asas internas que ahora sabemos participan en formar un bolsillo de unión para el pirofosfato de tiamina (**figura 3**).

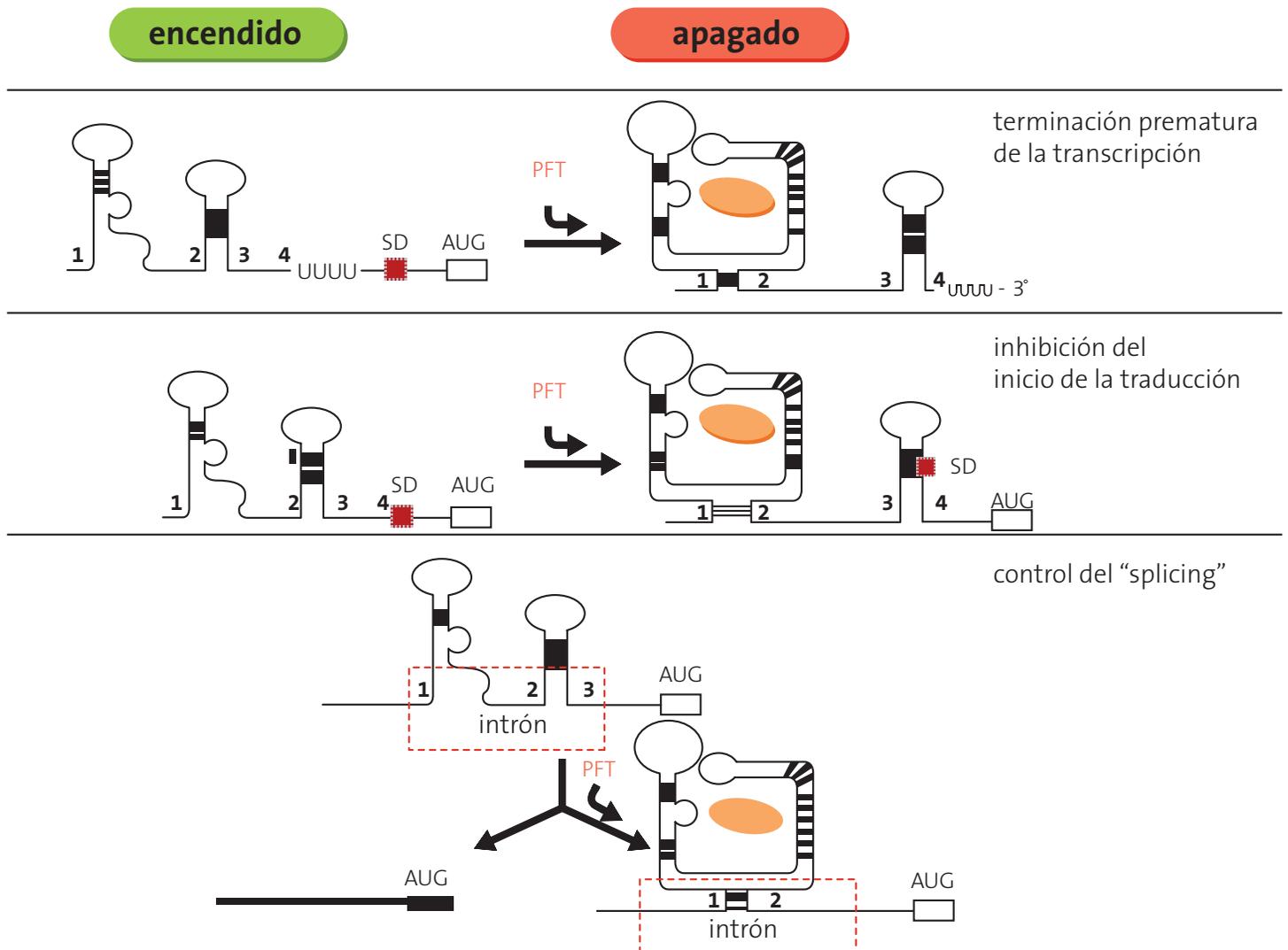


Figura 2. Mecanismos de regulación genética mediados por el riboswitch de tiamina. Si no hay suficiente PFT se expresan los genes biosintéticos de tiamina (estado encendido). La unión del PFT al riboswitch reprime la expresión (estado apagado) terminando prematuramente la transcripción (línea superior) o inhibiendo el inicio de la traducción (línea media) en bacterias. También se ha observado que la unión de PFT al riboswitch de tiamina en organismos eucarióticos ejerce control a nivel del proceso de “splicing” (línea inferior). El PFT se muestra como una elipse naranja. SD representa el sitio de unión a ribosomas.

Si se pueden seleccionar ARNs artificiales capaces de unir a casi cualquier tipo de molécula, ¿existirán ARNs naturales que al unir moléculas pequeñas tengan alguna función dentro de la célula? Pensamos posible que la THI-box representara el primer ejemplo de un aptámero natural capaz de unir al pirofosfato de tiamina. Iniciamos una serie de experimentos de tipo estructural para proveer evidencias que apoyaran la hipótesis, pero sin obtener los resultados deseados. Estos provinieron del grupo del Dr. Ronald Breaker de la Universidad de Yale, en donde demostraron que la THI-box era capaz de unir de manera específica y con alta afinidad al pirofosfato de tiamina sin la intervención de proteína alguna, confirmándose de esta manera que la THI-box es un aptámero natural.

Nos surgió entonces la pregunta de cómo el pegado del pirofosfato de tiamina a la THI-box era capaz de reprimir la expresión de los genes biosintéticos de tiamina. Nuestros estudios sobre las regiones importantes para regulación presentes en la región líder no traducida nos dieron la pista para contestar esta pregunta. En estos estudios observamos que la región donde se encuentra localizado el sitio donde los ribosomas se unen al ARNm para iniciar la traducción era importante para la represión de la expresión por tiamina. El análisis de esta región, haciendo uso de algunos programas computacionales, dio como resultado que se podía formar una estructura secundaria que impediría la traducción del ARNm al bloquear el sitio de unión a ribosomas del mismo.

El modelo de regulación que propusimos es el siguiente: si existe una cantidad suficiente de pirofosfato de tiamina dentro de la célula, la región líder no traducida de los genes de tiamina provocará que la THI-box adopte una estructura secundaria que permita la unión del pirofosfato de tiamina. Esta interacción, a su vez, provocará la formación de la estructura secundaria que enmascara al sitio de unión a ribosomas impidiendo, por lo tanto, la traducción del ARNm. Si, por el contrario, la cantidad de pirofosfato de tiamina no es suficiente, la región líder no traducida se doblará en una

conformación alternativa, en la cual el sitio de unión a ribosomas queda libre, por lo que los ribosomas pueden unirse e iniciar la traducción del ARNm (figura 2).

Algo realmente sorprendente de la THI-box es que es usada en muy diversos contextos de regulación. Además de la regulación por inhibición del inicio de la traducción, se ha encontrado que en algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, la THI-box está involucrada en un mecanismo regulador diferente. En este caso, el pegado del pirofosfato de tiamina a la THI-box provoca la formación de un terminador transcripcional, el cual finaliza de manera prematura la transcripción de los genes *thi*, impidiendo de esta manera la expresión de los mismos. Si no hay suficiente pirofosfato de tiamina, se forma una estructura alternativa que permite a la ARN polimerasa la transcripción de los genes *thi* (figura 2). También se ha observado que la THI-box regula el “splicing” de genes *thi* en hongos, y se presume que pudiera afectar el procesamiento o estabilidad de ARNm de genes *thi* en plantas (figura 2).

Estructura de la THI-box

La función de los ARNs depende de que adopten complejas estructuras tridimensionales. Ciertas regiones del ARN van a interactuar por complementariedad de bases con otras regiones, formando hélices. Estas hélices van a enmarcar regiones donde el ARN está como una cadena sencilla que, dependiendo de su posición respecto a las hélices contiguas, formará asas internas, protuberancias o asas terminales. Estos elementos determinan la estructura secundaria de una molécula de ARN. La interacción entre los elementos de estructura secundaria a su vez determinará la estructura terciaria del ARN. Por esto, para poder entender la función de una molécula de ARN, es preciso determinar sus estructuras secundaria y terciaria.

Para determinar la estructura secundaria de la THI-box, se realizó una búsqueda de todas las THI-box presentes en los genomas disponibles y, por medio de programas computacionales,

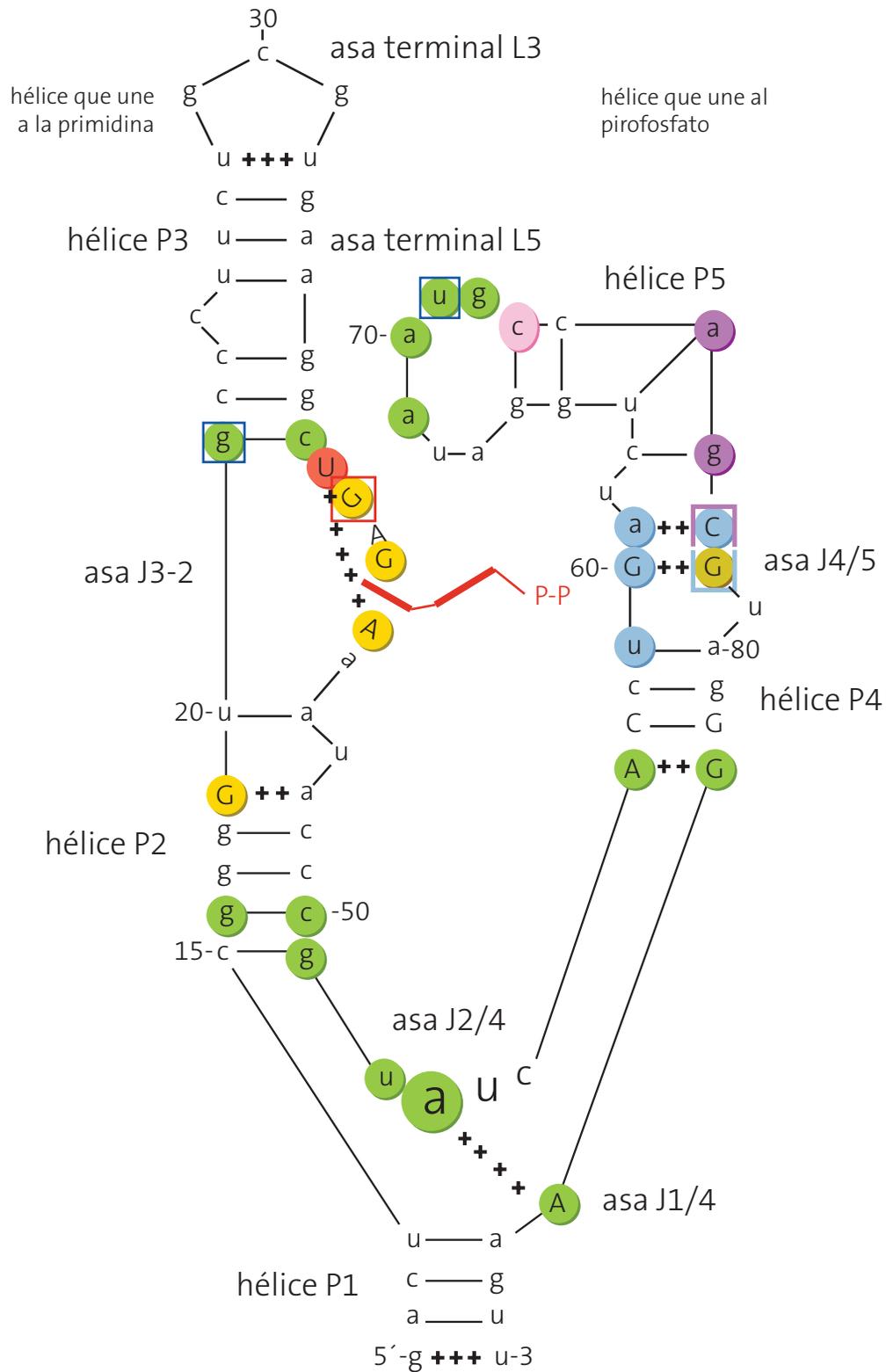


Figura 3.

Estructura secundaria e interacciones terciarias en la TH1-box localizada en la región líder no traducida del gene *thiM* de *E. coli*. Las letras mayúsculas indican bases conservadas en al menos 97% de todas las TH1-box conocidas. Los residuos que unen a la mitad pirimidina y al pirofosfato se muestran en color amarillo y naranja, respectivamente.

Los residuos que contactan a los iones Mg^{2+} (M_A , M_B , M_C y M_D) se muestran en rosa, morado, azul y mostaza, respectivamente. Los residuos involucrados en interacciones terciarias se muestran en verde. Los pares de bases no-canónicos se muestran por símbolos +. El PFT se muestra como rayas de color rojo unidas a las letras P-P.

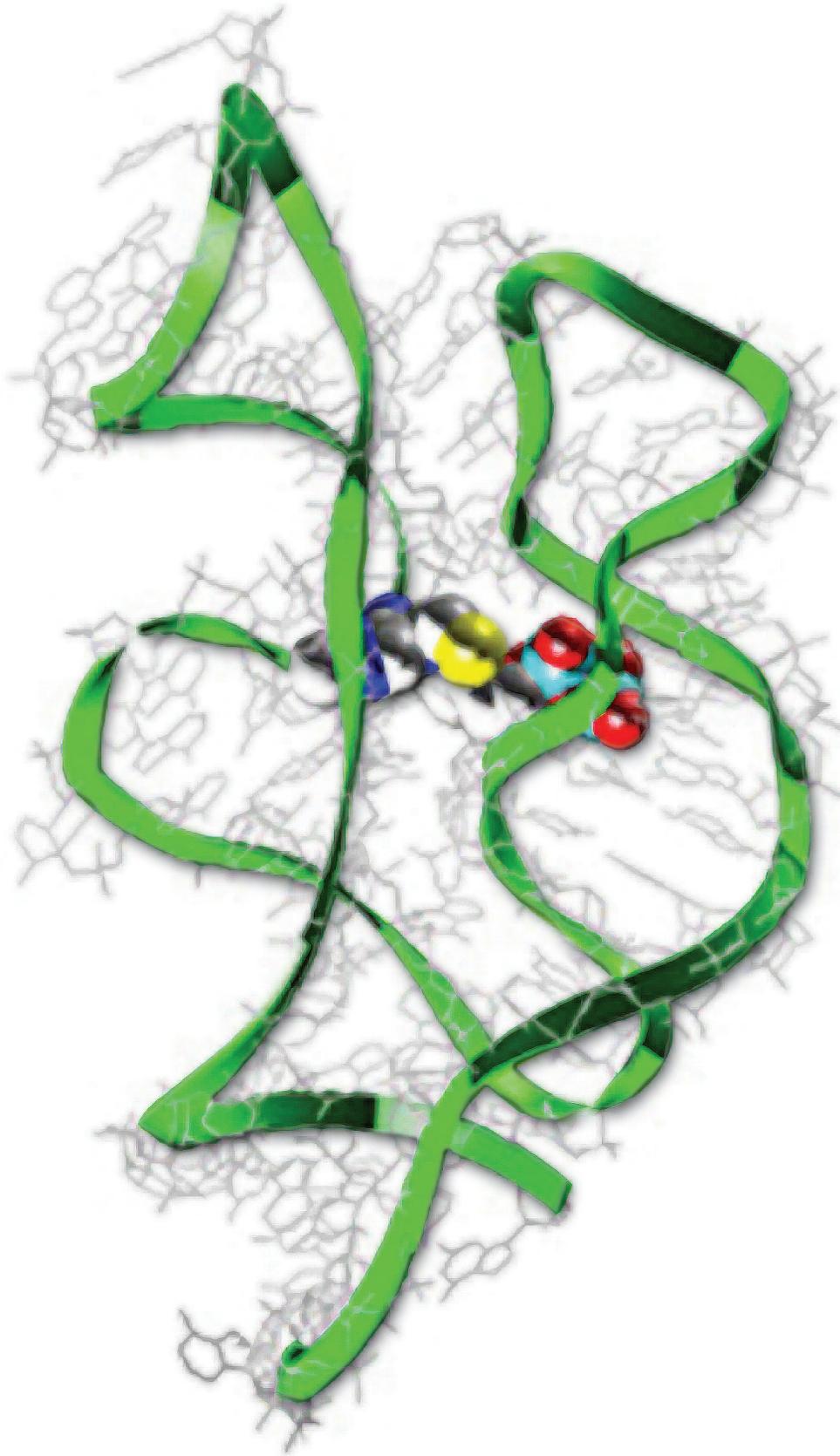


Figura 4.
Estructura tridimensional de la THI-box. El PFT se muestra en representación tipo esferas y bastones.

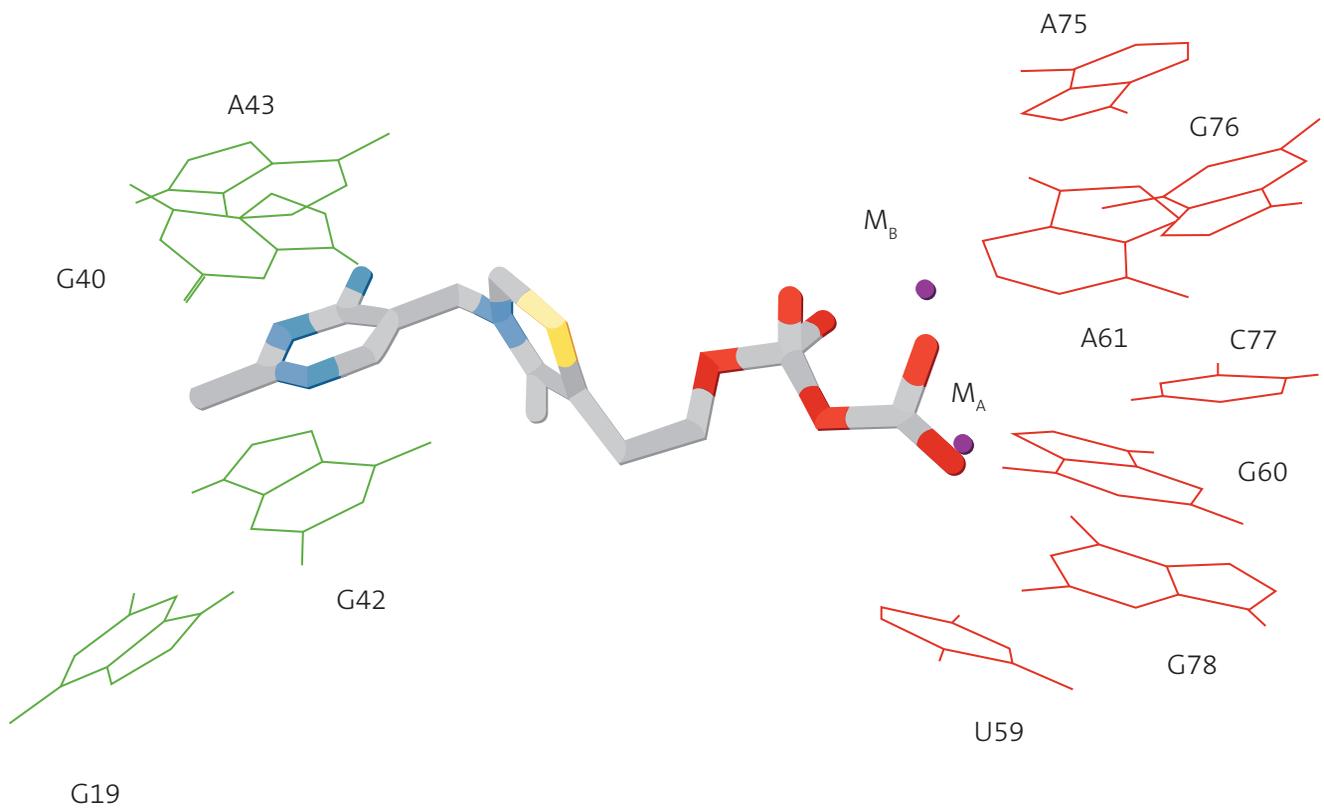


Figura 5. Modo de unión del PFT a la THI-box. Los nucleótidos involucrados en unir la pirimidina y el pirofosfato del PFT se muestran en color verde y naranja, respectivamente. Los átomos de Mg^{2+} (M_A y M_B) usados para unir el grupo pirofosfato a la THI-box se muestran como esferas moradas.

se predijo la misma. La estructura predicha de la THI-box tiene forma de un diapasón, formado por dos hélices (P2-asa J3/2-P3-asa terminal L3 y P4-asa J4/5-P5-asa terminal L5) que están unidas entre sí por una tercera (P1), como se observa en la figura 3.

La determinación de la estructura terciaria tuvo que esperar a la obtención de la estructura tridimensional de la THI-box por medio de cristalografía de rayos X. Se observó que el asa terminal L5 interacciona con la base de la hélice P3, en donde un átomo de Mg^{2+} es importante para estabilizar esta interacción. Otro átomo de Mg^{2+} participa en la formación del asa J3/2. Otra interacción es importante para la formación de la vuelta pronunciada en el asa J2/4, que permite a las dos hélices alinearse de manera casi paralela (figuras 3 y 4).

La estructura tridimensional también permitió saber cómo es que la THI-box reconoce al PFT. Una de las hélices interacciona con la parte pirimidínica, mientras que la otra hélice une al grupo pirofosfato del PFT (figuras 3 y 4). La unión del grupo pirofosfato no es un evento trivial, dado que este grupo tiene una carga negativa, la cual provocaría que el esqueleto de fosfatos del ARN lo repeliera. Para evitar esto, el grupo pirofosfato va acompañado de dos átomos de Mg^{2+} que contrarrestan las cargas negativas del mismo (figura 5).

Un punto central en el mecanismo regulador en el que la THI-box está involucrada es la formación de la hélice P1, debido al hecho de que su hebra 3' puede formar parte de estructuras secundarias alternativas. Se piensa que la unión de PFT provoca la disposición paralela de las hélices que reconocen a la pirimidina y al pirofosfato y la vuelta pronunciada en el asa J2/4. Esto permite la formación de la hélice P1 y la formación de las estructuras secundarias del estado apagado. En ausencia del PFT, la hélice P1 no se forma y el ARN adquiere una conformación alternativa, ya que la hebra 3' de la hélice P1 es libre de participar en la formación de una estructura anti-terminadora o en la liberación del sitio de unión a ribosoma para dar el estado encendido (figura 2).

En nuestro laboratorio actualmente estamos haciendo estudios sobre la importancia de las bases que unen al PFT por medio de mutagénesis.

Riboswitches por doquier

Un modelo similar se ha propuesto para la regulación de genes involucrados en la síntesis y transporte de cobalamina, un precursor de la vitamina B_{12} y de la riboflavina, también conocida como la vitamina B_2 . En ambos casos no se pudo identificar a alguna proteína que regulara su producción. Además, estos genes presentaban secuencias conservadas en las regiones no traducidas que podían formar estructuras secundarias complejas, como la THI-box. Posteriormente se determinó que estas estructuras, llamadas B_{12} -box y B_2 -box, son capaces de unir a las vitaminas B_{12} y B_2 , respectivamente, y reprimir la expresión de sus genes biosintéticos y de transporte.

A los ARNm capaces de unir a algún metabolito y de esta manera controlar la expresión de ellos mismos, se les denominó *riboswitches*. Por medio de búsquedas muy extensas en los genomas de los organismos secuenciados a la fecha, se encontró que los riboswitches son capaces de unir no sólo vitaminas como las ya mencionadas tiamina, cianocobalamina y riboflavina, sino que también pueden unir a las purinas adenina y guanina, componentes de los ácidos nucleicos; a los aminoácidos glicina y lisina; al ión magnesio; a la S-adenosil metionina; a la glucosamina-6-fosfato, un componente de los glucosaminoglicanos, los proteoglicanos y los glicolípidos. En particular este último riboswitch es muy interesante porque es el primero con actividad catalítica, es decir, es una ribozima.

Además de estos riboswitches, se han encontrado otros seis, a los cuales se les denominan riboswitches “huérfanos” pues se desconoce tanto al metabolito que unen como la vía metabólica que regulan.

Se piensa que, antes de que existiera la vida como la conocemos, basada en el ADN y las

proteínas, existió una época en la que el ARN por sí solo era el portador de la información genética y tenía funciones catalíticas. Dadas las características que muestran los *riboswitches*, se cree que estas moléculas pudieran ser unas reliquias moleculares de aquel mundo del ARN que han sobrevivido hasta nuestros días. ●

Bibliografía

- Miranda-Ríos, J. *et al.*, "Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli*", en *Journal of Bacteriology*, vol. 19, pp. 6887-93, 1997.
- Miranda-Ríos J., M. Navarro y M. Soberón, "A conserved RNA structure (*THI*-box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria", en *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 98, pp. 9736-41, 2001.
- Miranda-Ríos, J., "The *THI*-box *riboswitch*, or how RNA binds thiamin pyrophosphate structure", en *Structure*, vol. 15 pp. 259-265, 2007.
- Stormo, G. D. y Y. Ji, "Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression?", en *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 98, pp. 9465-946, 2001.