

Transcripción II

MARIA DEL PILAR MÁRQUEZ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA





Haciendo memoria!!

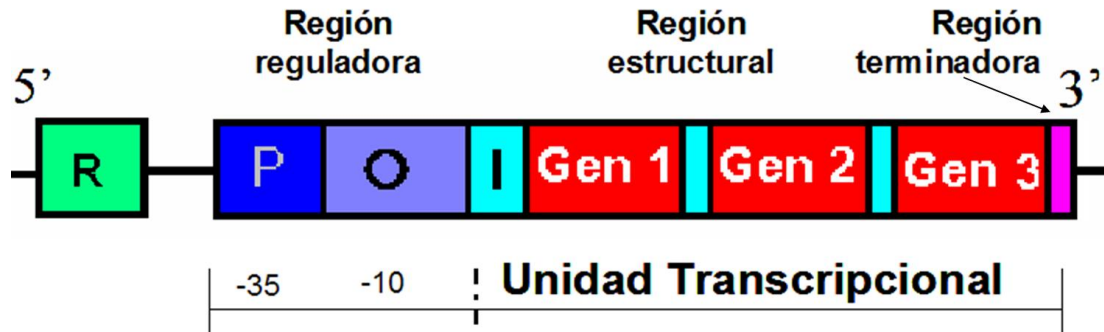
Región
reguladora

Región
estructural

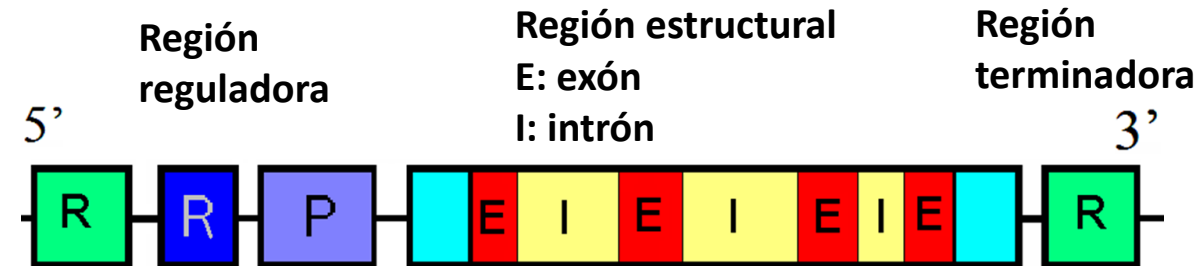
Región
terminadora



Gen Procariota

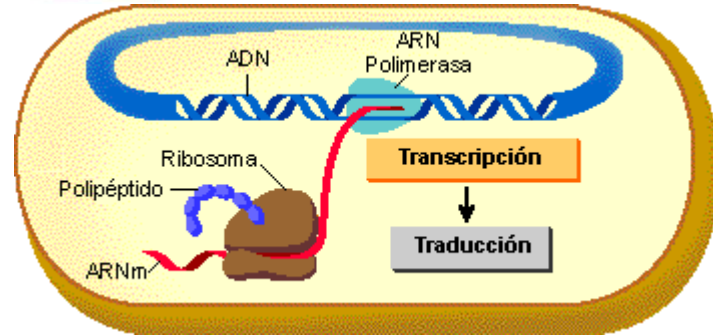


Gen Eucariota

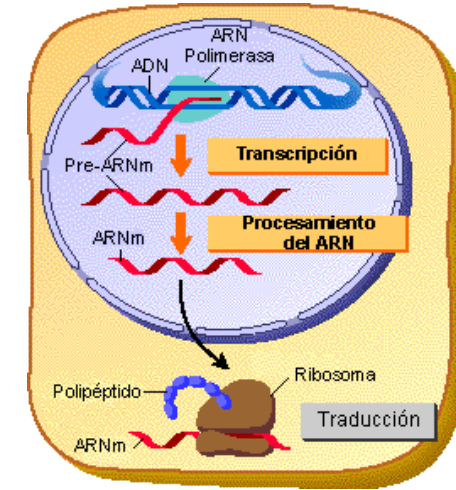
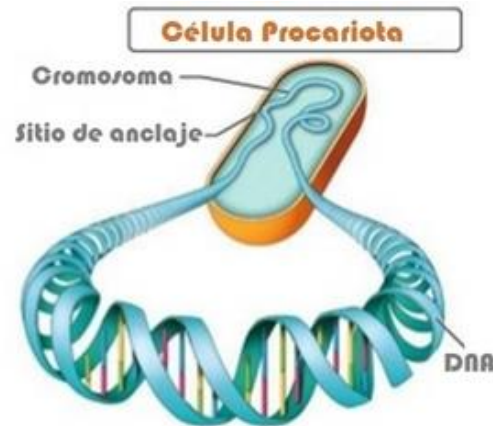




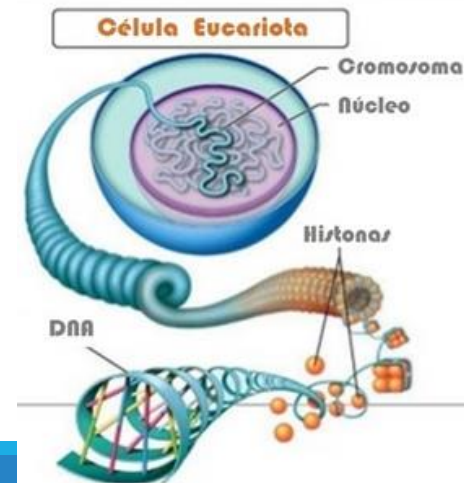
Haciendo memoria!!



Procariotas



Eucariotas



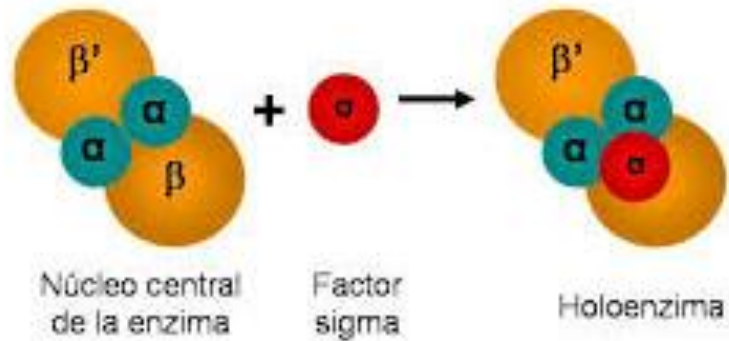


Haciendo memoria!!

RNA POLIMERASA

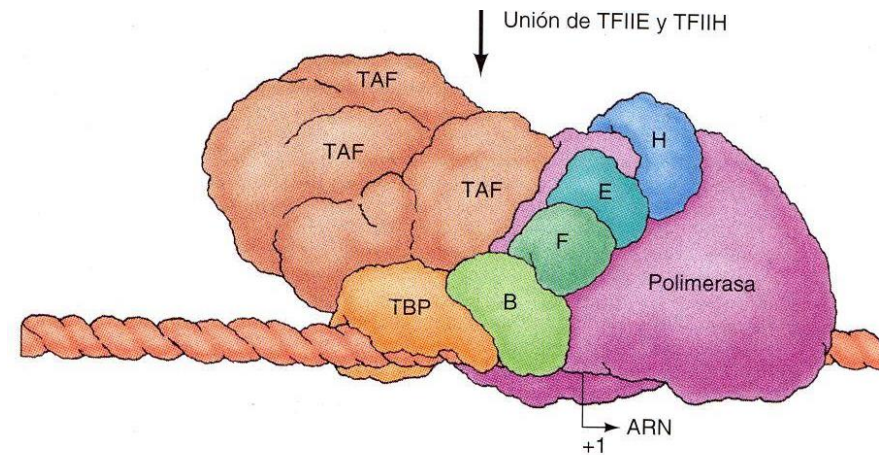
- Molde ADN 3' – 5'
- Síntesis RNA 5' – 3'
- No requiere de *primer*

Procariota



Una sola polimerasa: holoenzima

Eucariota



Varias polimerasas: una para cada tipo de genes

RNApol I: rRNA

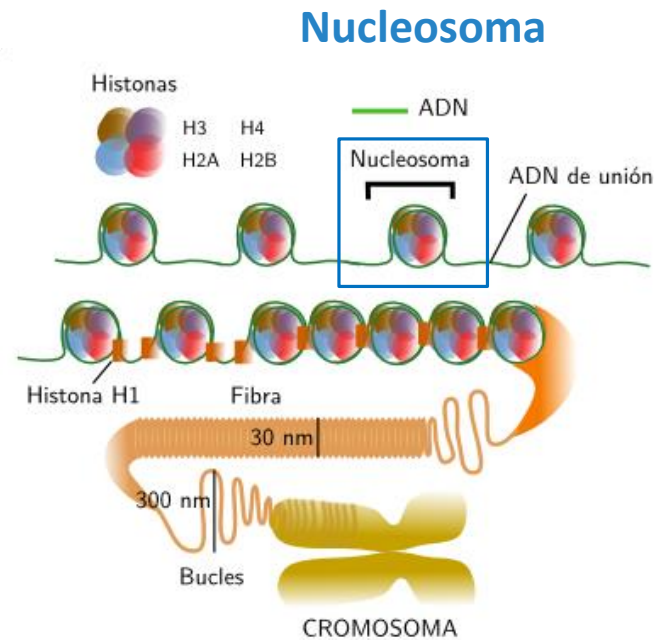
RNApol II: mRNA

RNApol III: tRNA

EUCARIOTAS



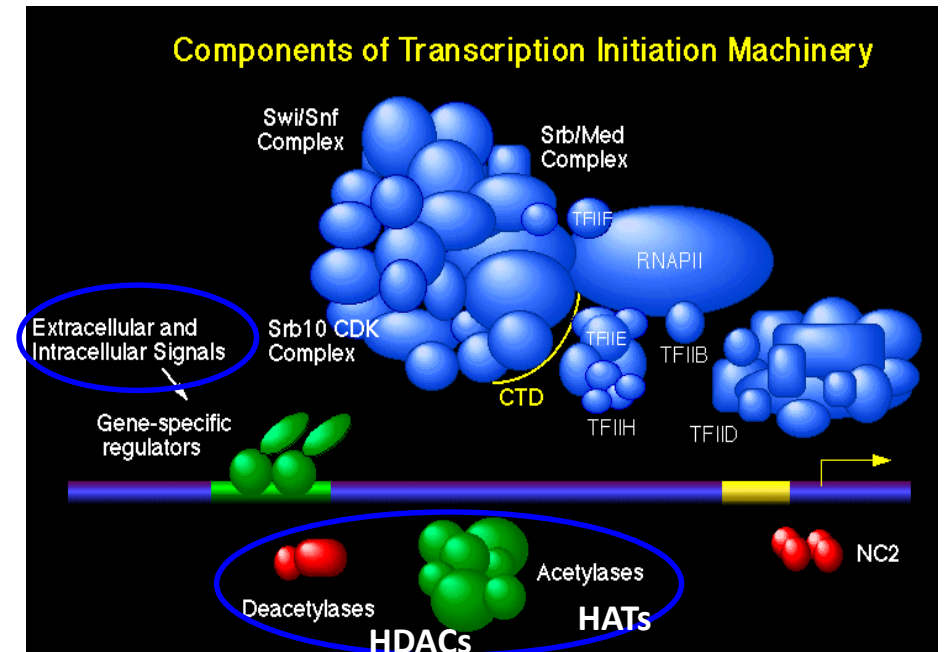
¿Cómo transcribir genes que se encuentran incorporados en los nucleosomas?



Complejo mediador

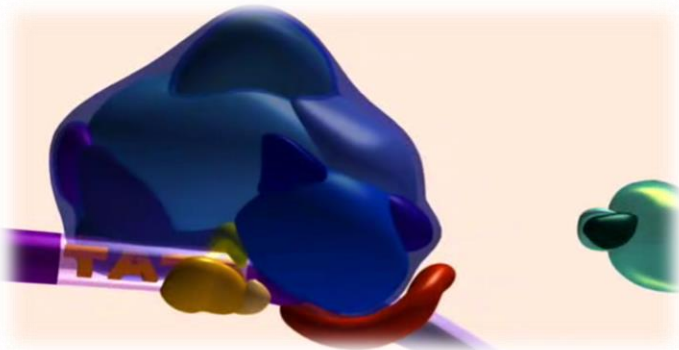
Proteínas reguladoras de unión al DNA (activadores/represores):

Enzimas modificadoras de nucleosomas



RNA polimerasas no pueden reconocer directamente el promotor: requieren de varios factores proteicos adicionales

Factores Generales de la Transcripción o GTFs



GTFs + RNA polimerasa → Promotor central

= Complejo de preiniciación

Factores Generales de la Transcripción (GTFs)

Función similar a **factor sigma** en procariotas:

- Reconocen elementos basales del promotor
- Promueven apertura de la doble hélice
- Reclutan RNA polimerasa y favorecen la transición iniciación-elongación

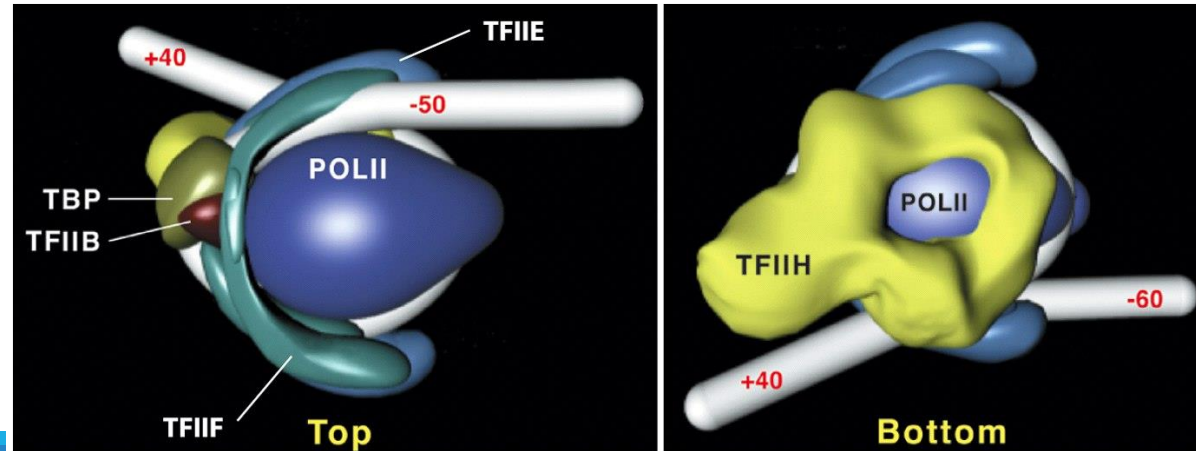


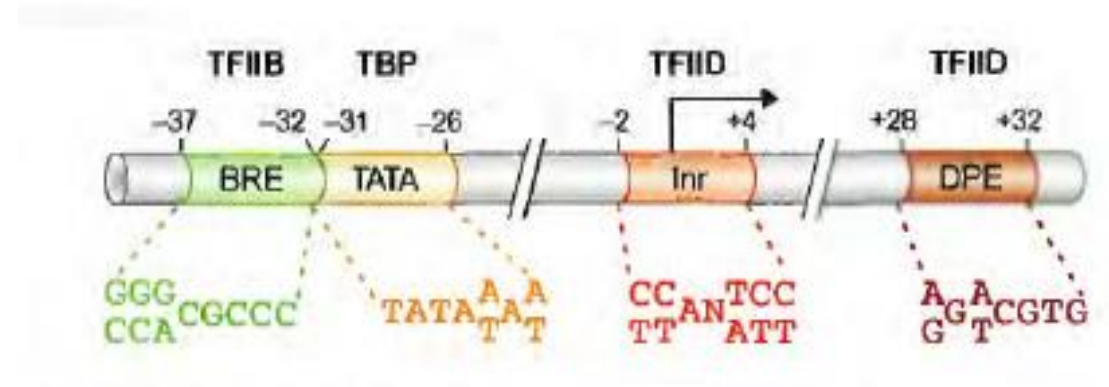
Figure 11-19b Cell and Molecular Biology, 4/e (© 2005 John Wiley & Sons)

Transcripción de genes tipo II (mRNA)

Promotor central de clase II:

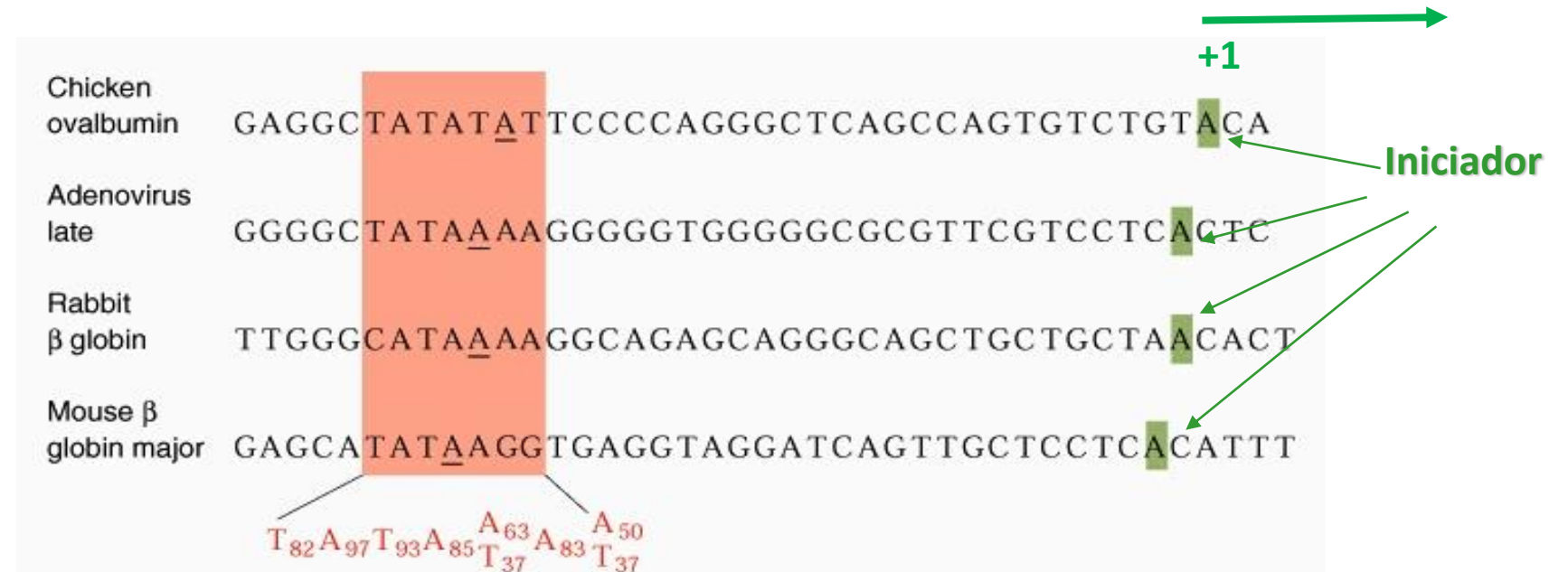
combinación de 4 elementos basales
(no siempre están los 4)

- **CAJA TATA** (-26)
- Elemento **Inr** (iniciador) (+1)
- Elemento **BRE** (TFIIB Recognition Element) (-35)
- Elemento **DPE** (Downstream Promoter Element) (+30)



Caja TATA

- Región del promotor entre 24 y 32bp corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción
- Sitio de ensamble del **complejo de preiniciación** (GTF + polimerasa)



Ensamblaje del complejo de preiniciación

- 1- **CAJA TATA**: unión del factor basal **TFIID** a través de la **TBP** (TATA Box Binding Protein)
→ Dobla la doble cadena de DNA (80°):
- 2- Reclutamiento de más factores de transcripción: **TFIIA** y **TFIIB**: plataforma lista para recibir **RNApol II**
- 3- Reclutamiento de **RNApol II**, **TFIIF** y **TFIIH** (helicasa)
- 4- **TFIIH** fosforila RNApol = inicio

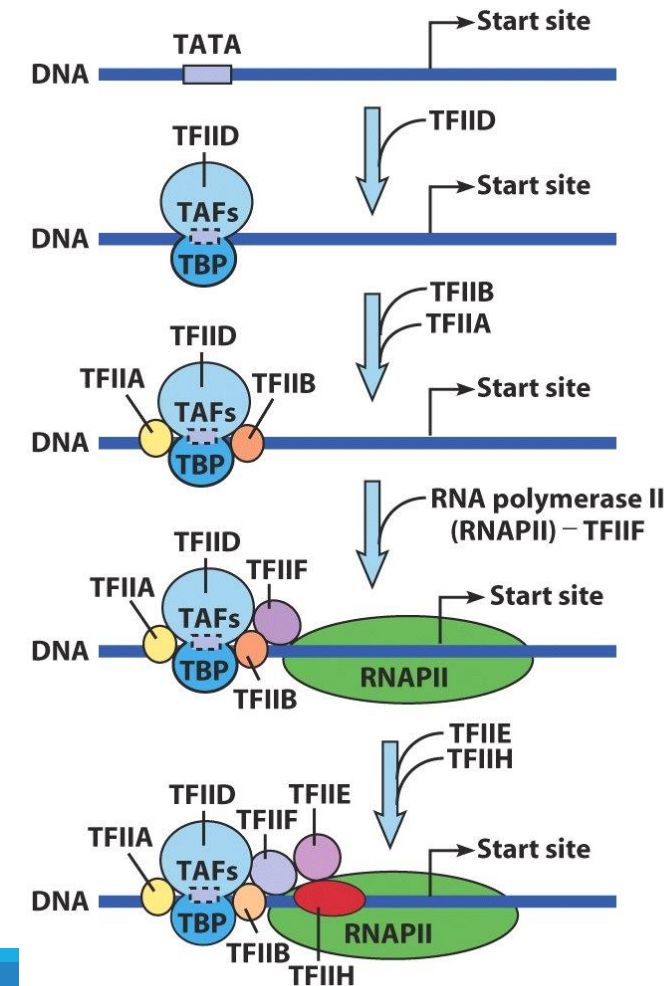


Figure 11-18b Cell and Molecular Biology, 4/e (© 2005 John Wiley & Sons)

Complejo de preiniciación

Promotor central + GTFs + RNA pol II =
complejo de preiniciación completo

- Ciclos de elongación abortivos

No es suficiente para dar inicio a
transcripción!

¿Qué permite la transición hacia
elongación?

→ Acción de **activadores** de la
transcripción reclutados en **secuencias
reguladoras**

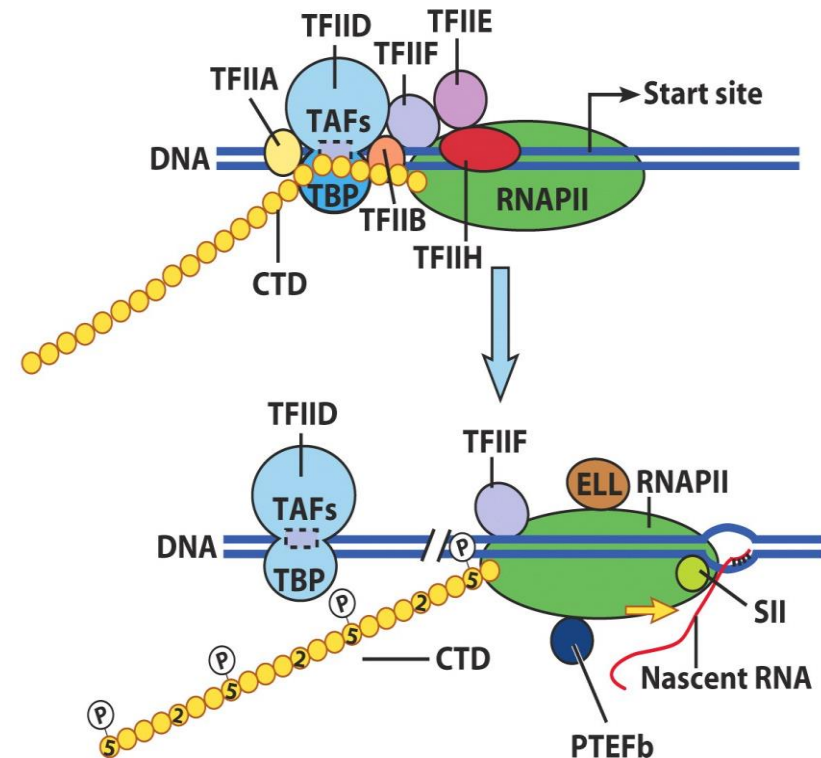


Figure 11-20 Cell and Molecular Biology, 4/e (© 2005 John Wiley & Sons)

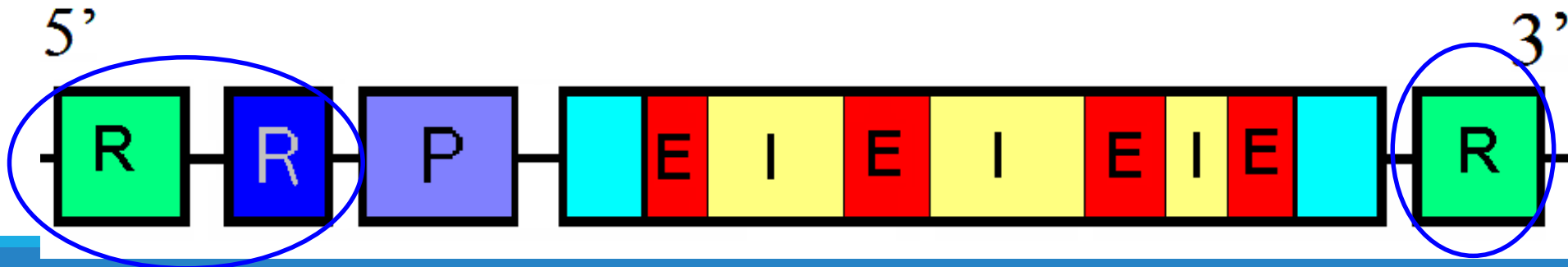
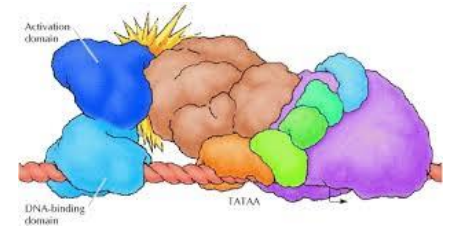
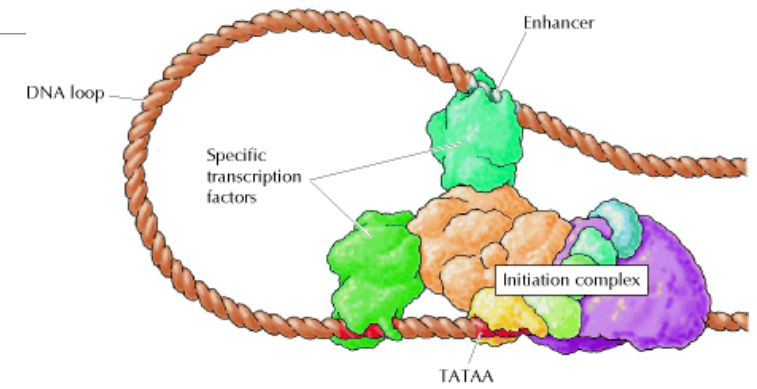
Secuencias reguladoras y activadores

- ✓ Elementos proximales (- 50 a -200 pb)
UAS (U

Upstream

 Activator Sequence)

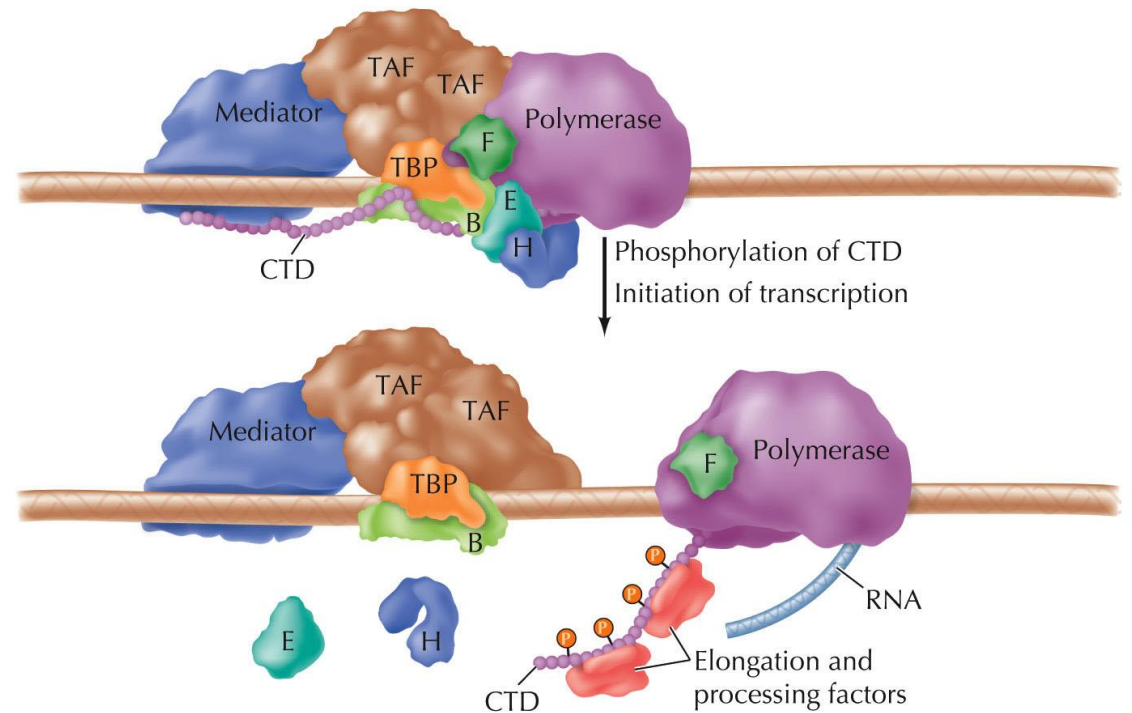
- ✓ Elementos distales:
Enhancers (intensificadores o amplificadores)



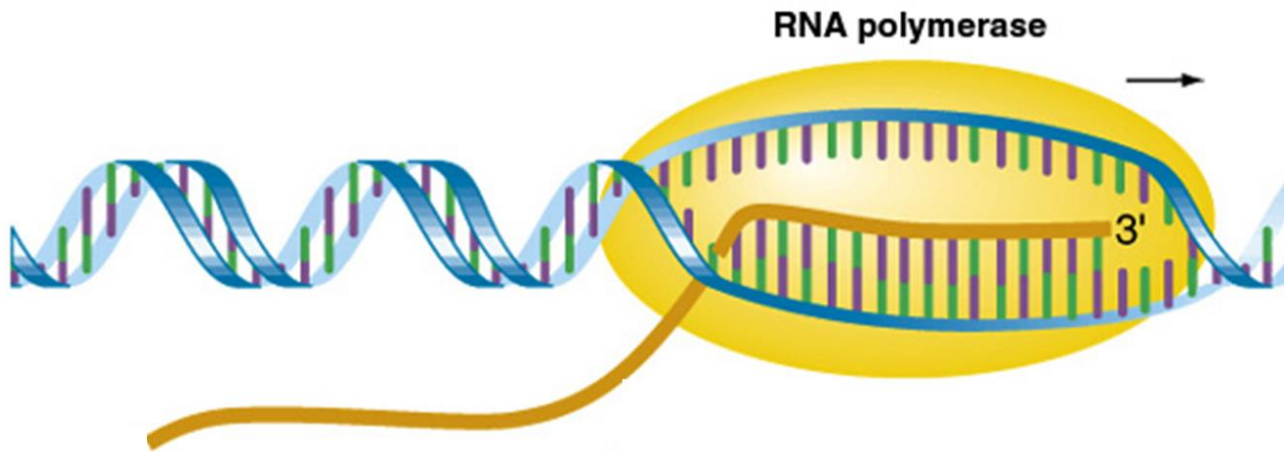
Activación de la elongación:

Activadores promueven indirectamente la Fosforilación de cola CTD (dominio carboxilo terminal) de RNAPol:

- Permite que la RNA polimerasa se desprenda de la mayoría de los GTFs
→ Transición iniciación/elongación
= **activación de la polimerización o elongación**



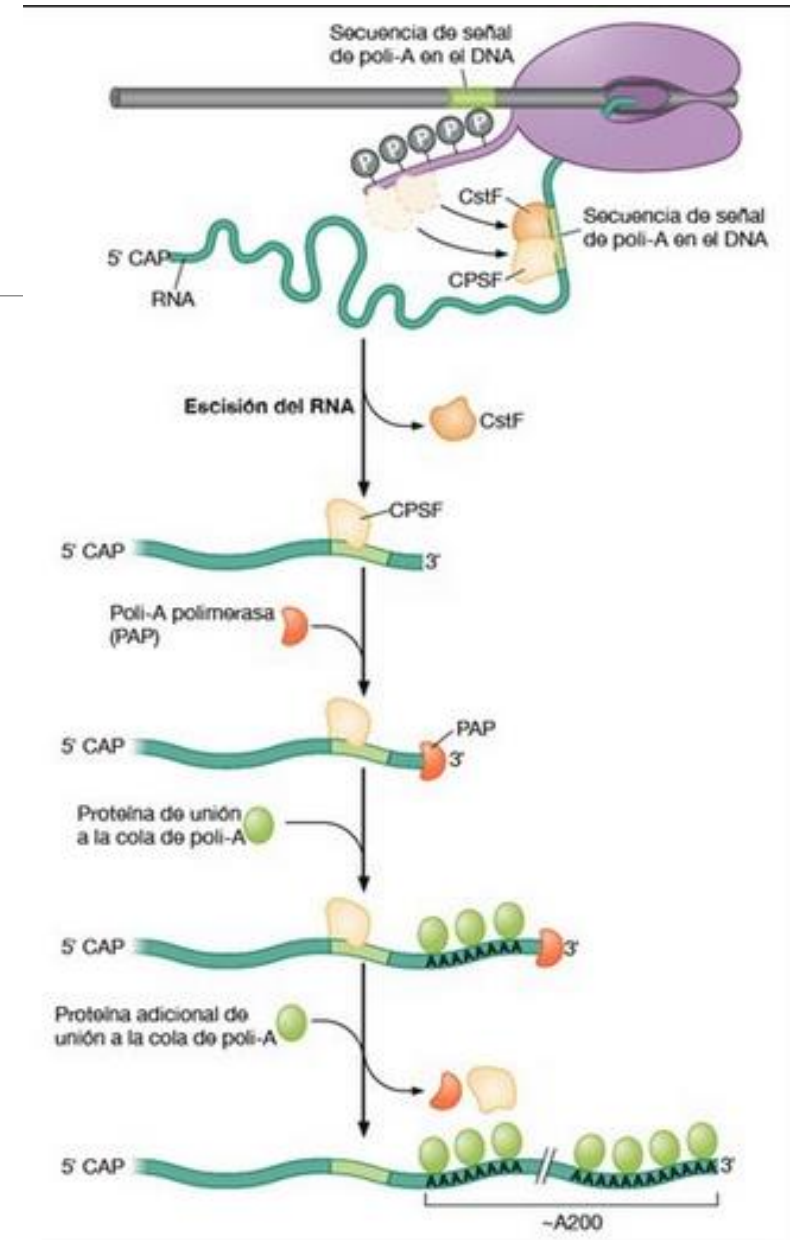
Elongación



Tras activación, la RNA polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena de DNA sobre un molde 3'→5' formando una burbuja de transcripción.

Terminación

Señales de poli-adenilación en el RNA reclutan factores proteicos: factor de especificidad de adenilación y escisión (CPSF) y factor estimulante de la escisión (CstF), que reclutan otras proteínas que inducen la escisión y la poli-adenilación del mRNA



Eventos post-transcripcionales

Maduración del RNA

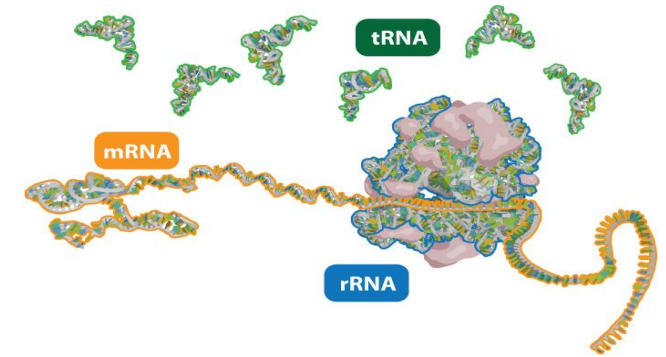


RNAs

Location and functions of different classes of RNA molecules

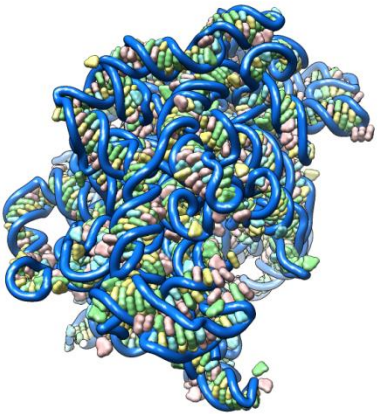
Class of RNA	Cell Type	Location of function in eukaryotic cells*	Function
Ribosomal RNA (rRNA)	Bacterial and eukaryotic	Cytoplasm	Structural and functional components of the ribosome
Messenger RNA (mRNA)	Bacterial and eukaryotic	Nucleus and cytoplasm	Carries genetic code for proteins
Transfer RNA (tRNA)	Bacterial and eukaryotic	Cytoplasm	Helps incorporate amino acids into polypeptide chain
Small nuclear RNA (snRNA)	Eukaryotic	Nucleus	Processing of pre-mRNA
Small nucleolar RNA (snoRNA)	Eukaryotic	Nucleus	Processing and assembly of rRNA
Small cytoplasmic RNA (scRNA)	Eukaryotic	Cytoplasm	Variable
MicroRNA (miRNA)	Eukaryotic	Cytoplasm	Inhibits translation of mRNA
Small interfering RNA (siRNA)	Eukaryotic	Cytoplasm	Triggers degradation of other RNA molecules

*All eukaryotic RNAs are transcribed in the nucleus.



Maduración del RNA

Proceso por el cual cualquier tipo de RNA sufre modificaciones que lo llevan a adquirir su **funcionalidad**



modificación o procesamiento post-transcripcional

Luego de este proceso los RNAs son más resistentes a la acción de nucleasas y tridimensionalmente compactos.

Eventos de maduración

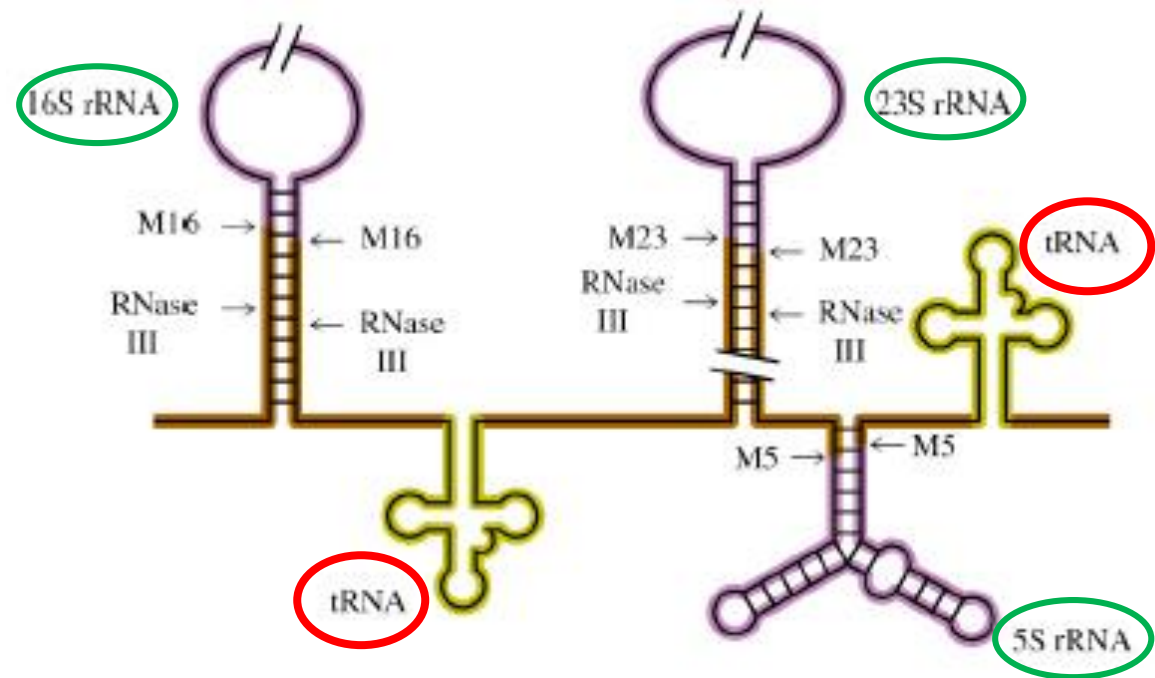
- Fraccionamiento (*cleavage*) de la molécula
- Modificación covalente de nucleótidos
- Corte o adición de nucleótidos en los extremos
- Corte y empalme (ajuste - *splicing*) de la molécula

Fraccionamiento de la molécula: tRNA y rRNA

El transcrito primario contiene varios precursores

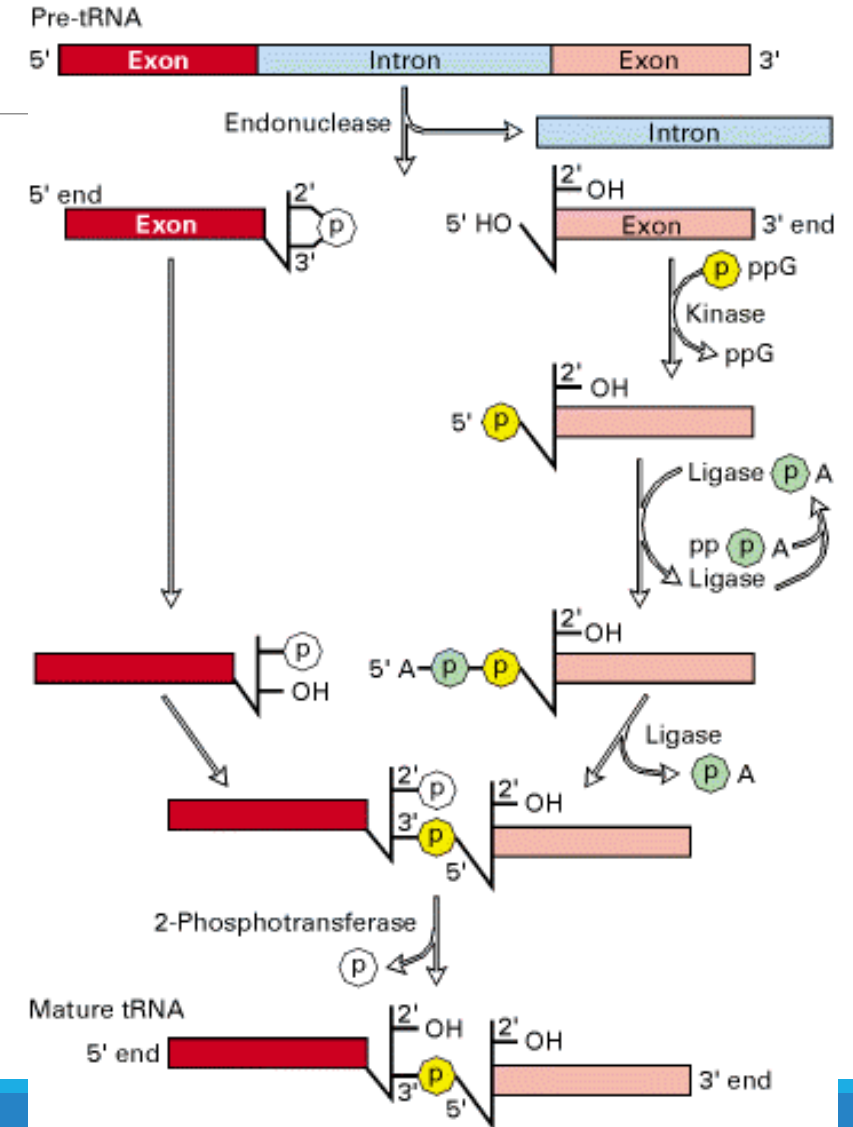
Procesamiento del pre-RNA

exonucleasas



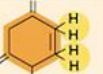
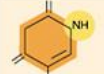


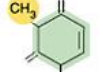











tRNA (eucariota): corte y empalme - Proceso enzimático

Proceso mediado por endonucleasas



Modificación covalente de nucleótidos

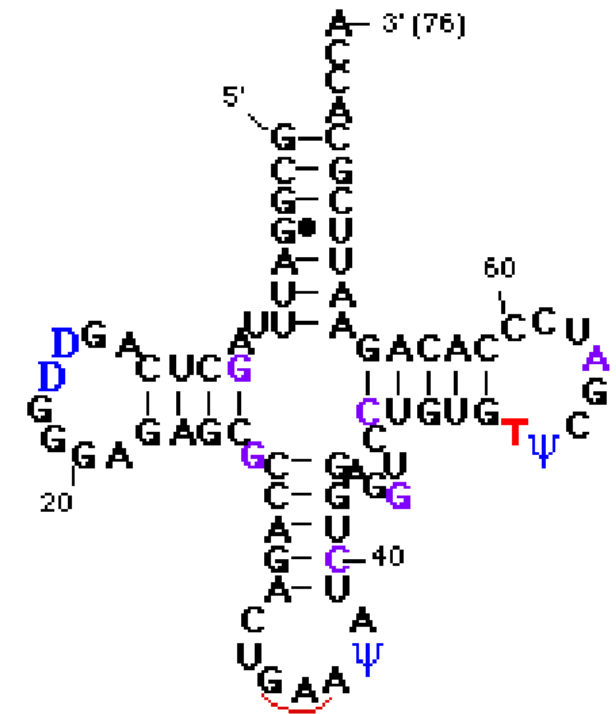
Normal bases	Modified bases			
 Uridine	 Ribothymidine (T)	 Dihydrouridine (UH ₂)	 Pseudouridine (ψ)	 4-thiouridine (S ⁴ U)
 Cytidine	 3-methylcytidine	 5-methylcytidine		
 Adenosine	 Inosine (I)	 N ⁶ methyladenosine (m ⁶ A)	 1-methylinosine (mI)	
 Guanosine	 7-methylguanosine (mG)	 Queuosine (Q)	 Dimethylguanosine (m ₂ G)	

T timina

ψ Pseudouridina

D dihidrouridina

N nucleótido metilado

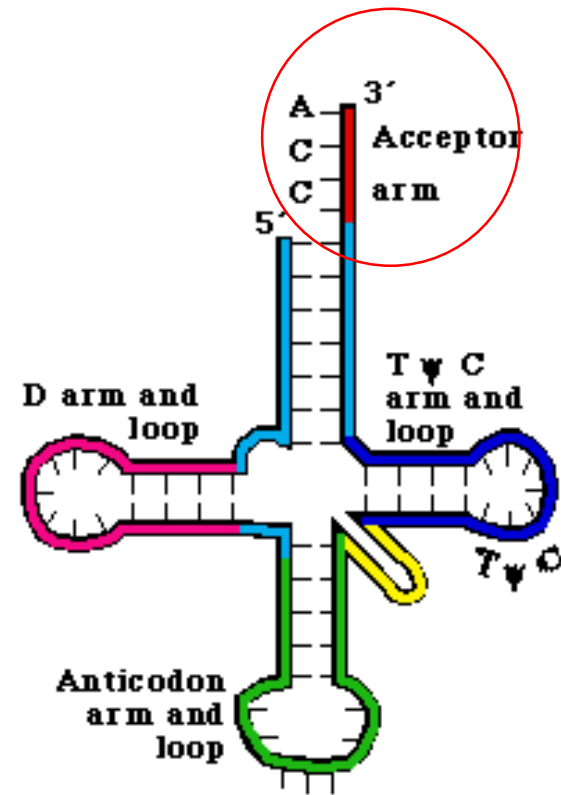


tRNA fenilalanina

Corte y/o adición de nucleótidos en los extremos

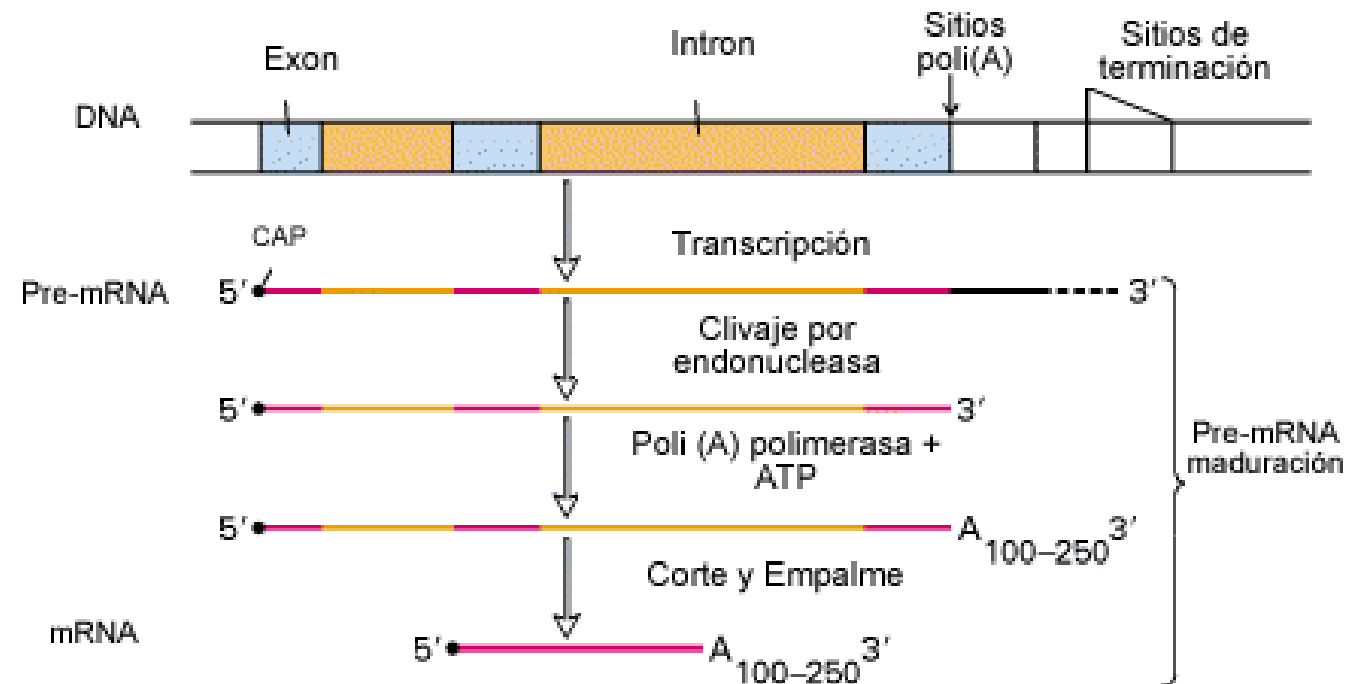
tRNA

La secuencia 5' **CCA** 3' se añade al extremo 3' (se adiciona por medio de enzimas después del procesamiento)



Maduración de un mRNA

- Corte de nucleótidos en extremo 3'
- Adición de nucleótidos en ambos extremos (5' y 3')
- Corte y empalme



Corte y/o adición de nucleótidos en los extremos

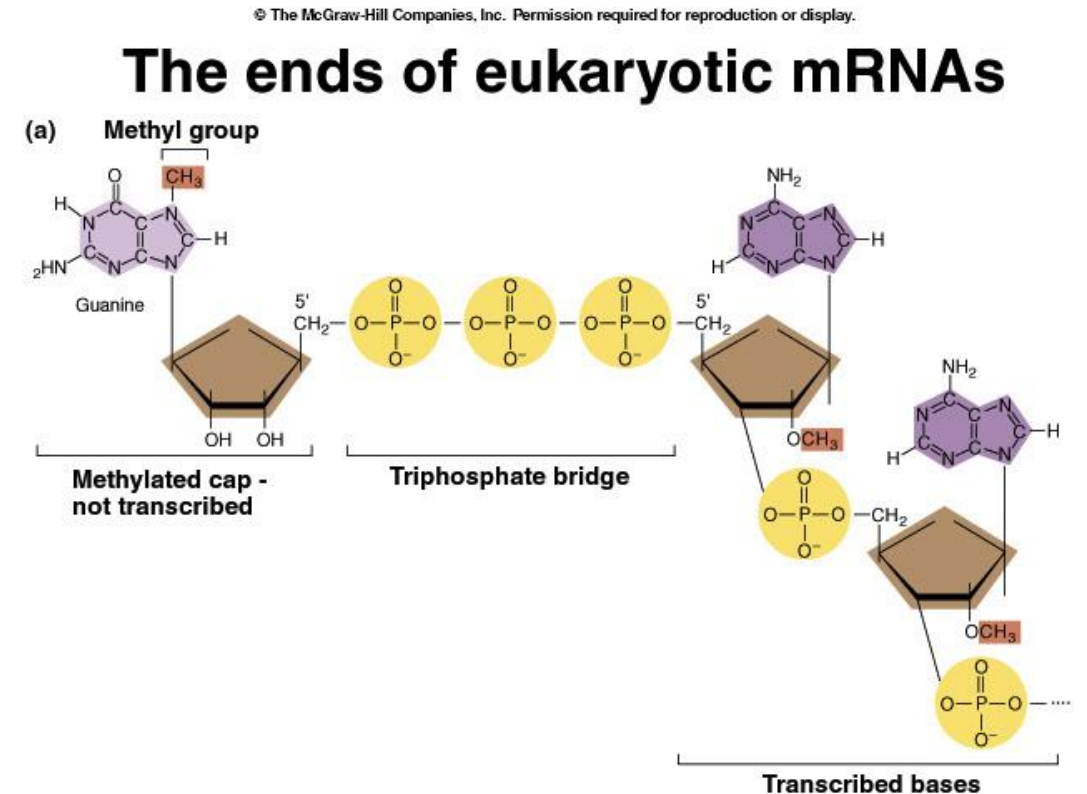
mRNA Eucariota

5' adición de caperuza de metil-guanosina en dirección reversa

- Añadida cuando el transcrito tiene pocos nucleótidos
- Esencial para la traducción aunque no codifica para ningún aminoácido

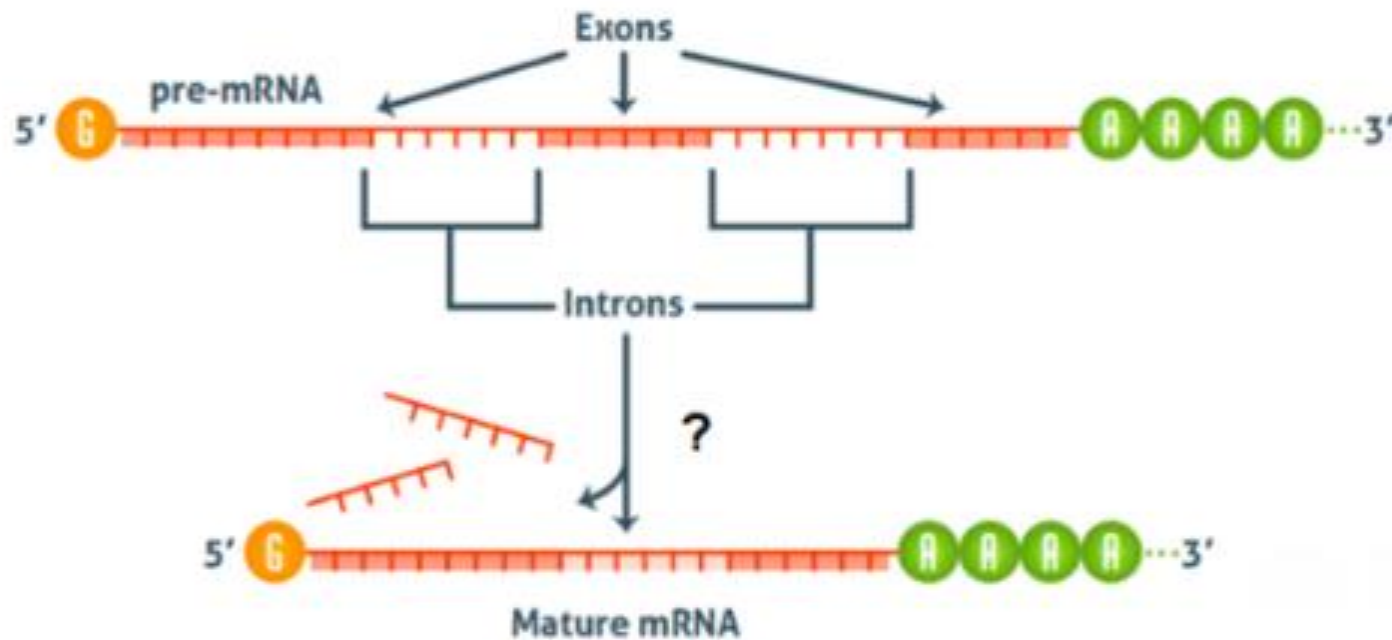
3' adición de cola poli-A

- **Corte** de la última parte de la secuencia sintetizada en el extremo 3' del mRNA
- Adición de la cola (100-200 A)



Corte y empalme (*splicing*) del mRNA

Eliminación de intrones y unión de secuencias de exones

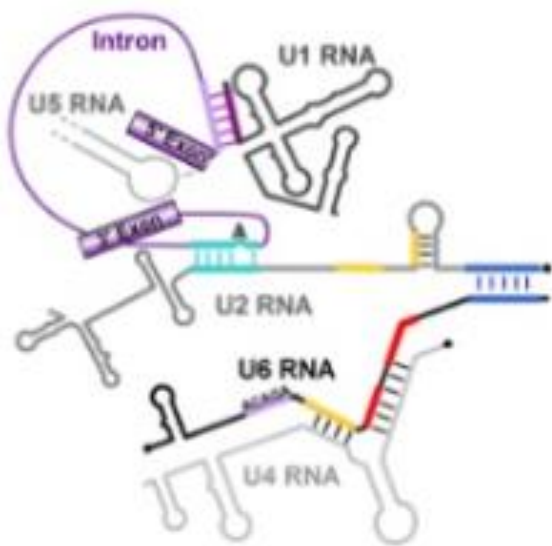


EXÓN: Secuencia del gen que se expresa

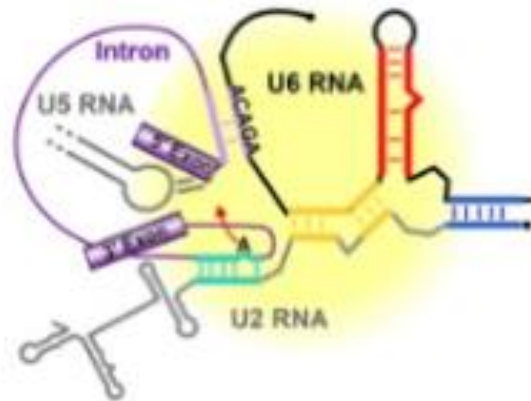
INTRÓN: secuencia del gen que se encuentra entre los intrones y no se expresa

Empalmosoma (*spliceosoma*)

Complejo ribonucleoprotéico responsable de la eliminación de los intrones del transcrito primario de **mRNA**.



pre-catalytic spliceosome

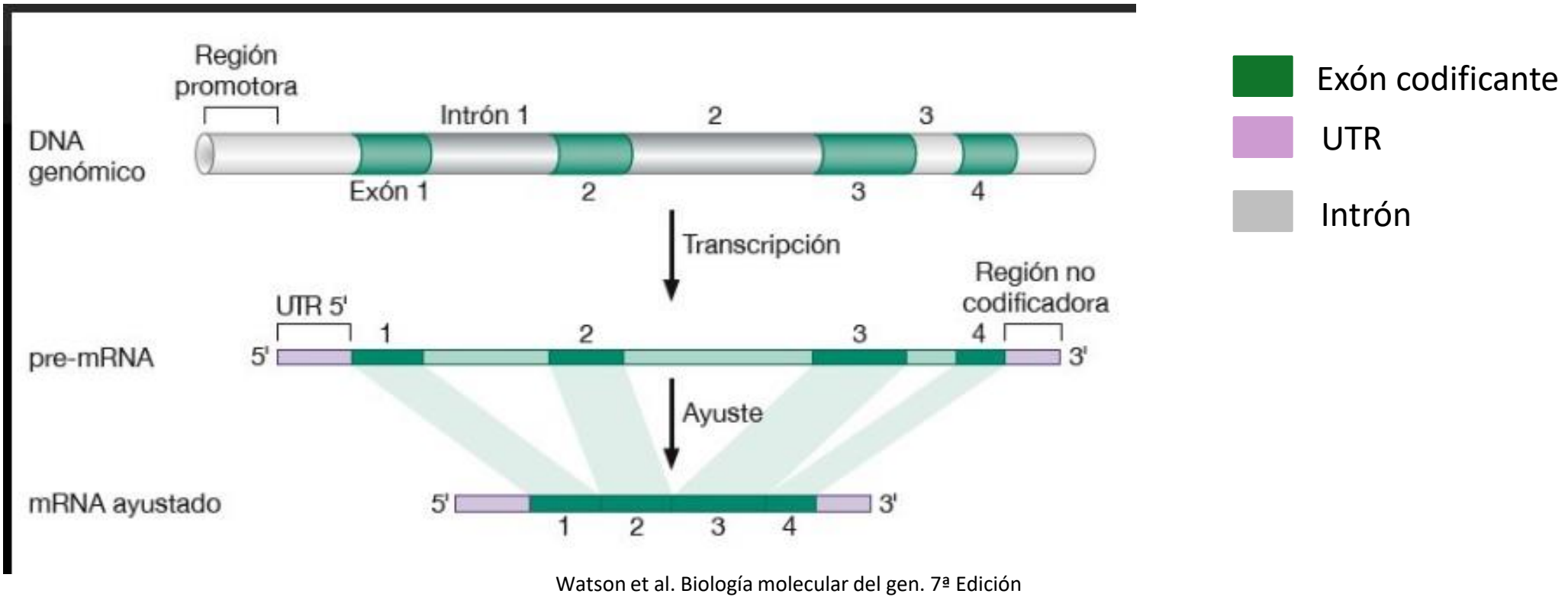


catalytically activated spliceosome

Compuestos por **snRNAs** (RNAs pequeños nucleares)

y

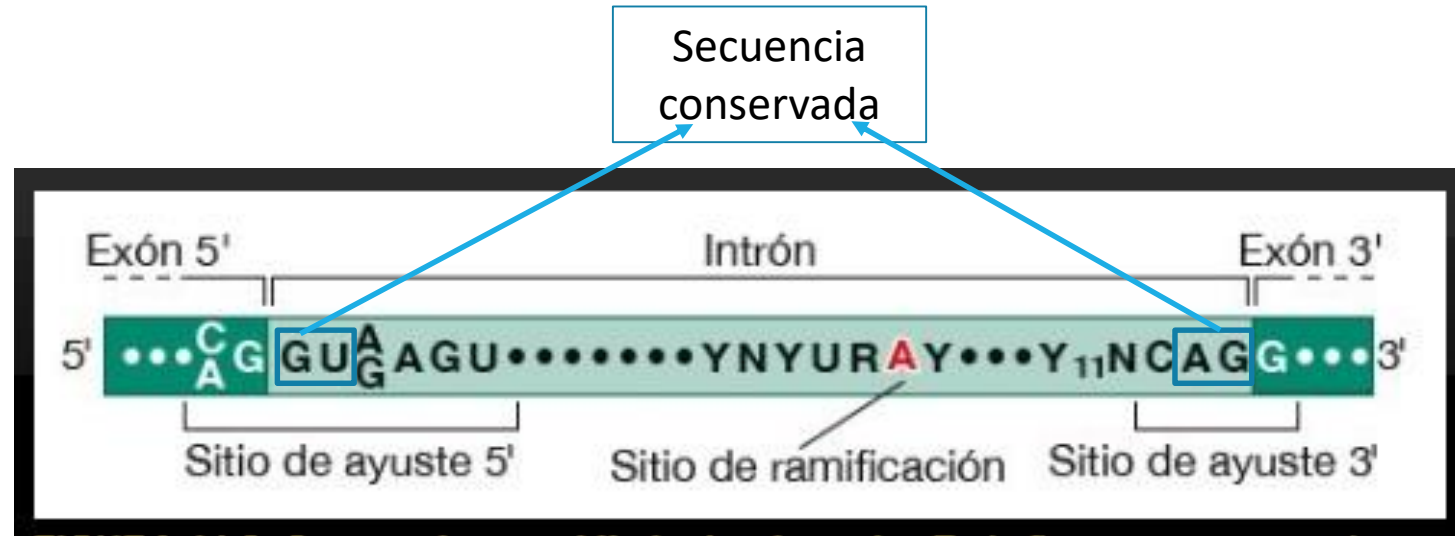
snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas)



Exón: cualquier región retenida en un mRNA maduro

Intrón: regiones eliminadas en el mRNA maduro

Cómo se distinguen los intrones de los exones?



Watson et al. Biología molecular del gen. 7ª Edición

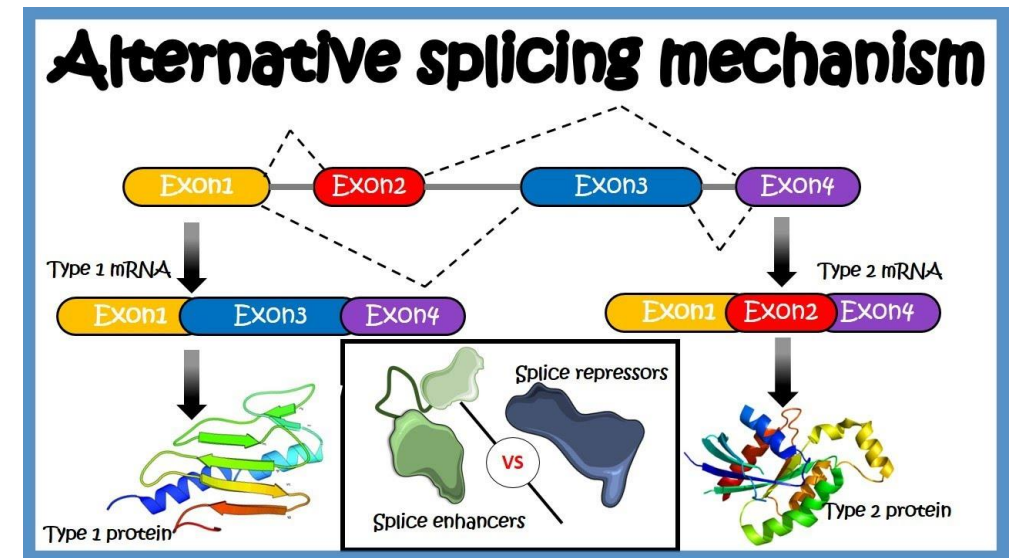
Límite en el extremo 5' del intrón

A seguida por una secuencia polipirimidínica

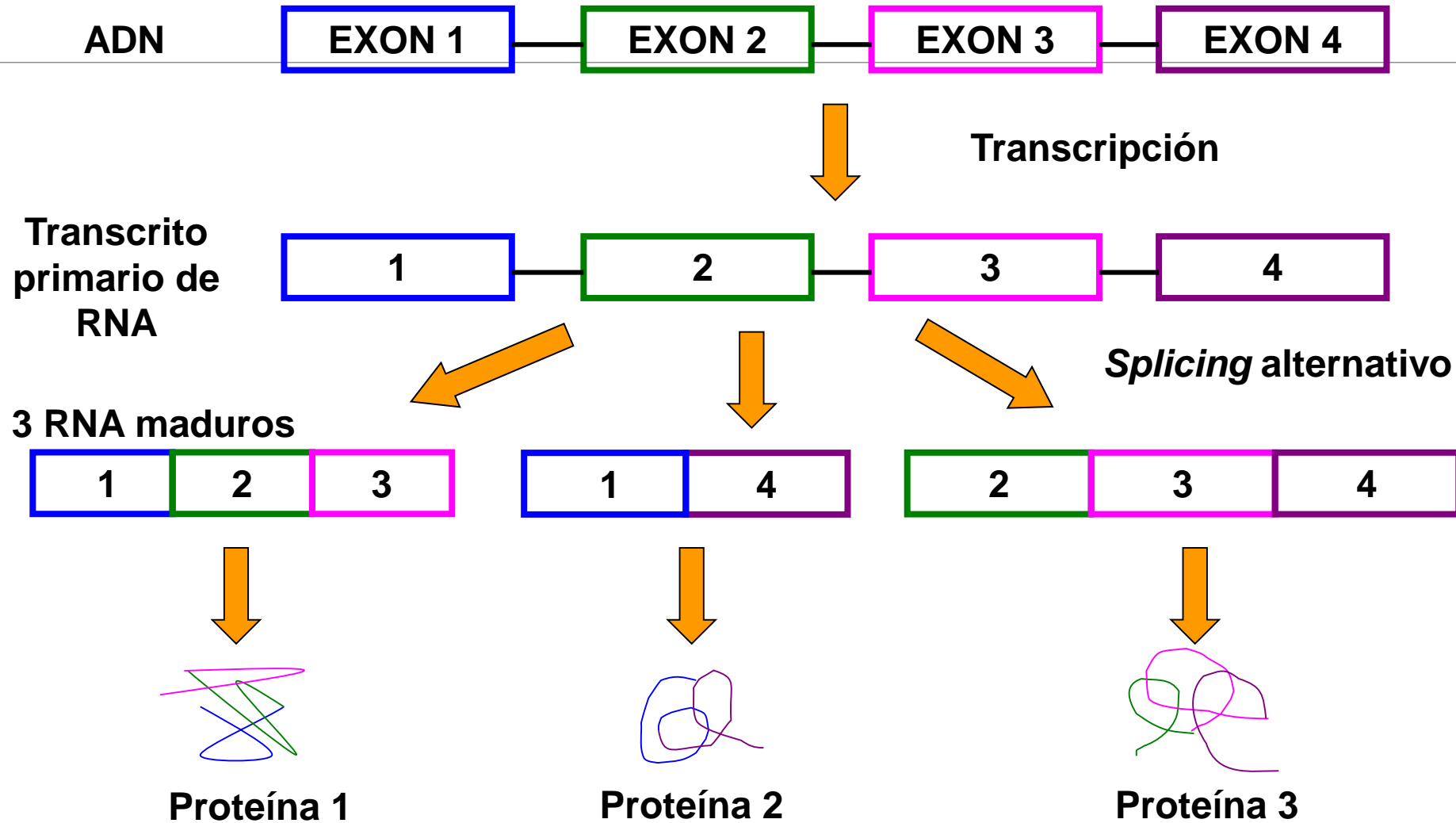
Límite intrón-exón en extremo 3' del intrón

Corte y empalme alternativo de mRNA

- Proceso de inclusión o exclusión de regiones del pre-mRNA
- Fuente importante de diversidad de proteínas eucariotas
- Regulación temporal o tejido-específica
 - Se piensa que el 90% de los genes en el genoma humano experimenta empalme alternativo, generando más de una **isoforma**
Isoforma: productos alternativos del splicing



Corte y empalme alternativo de mRNA



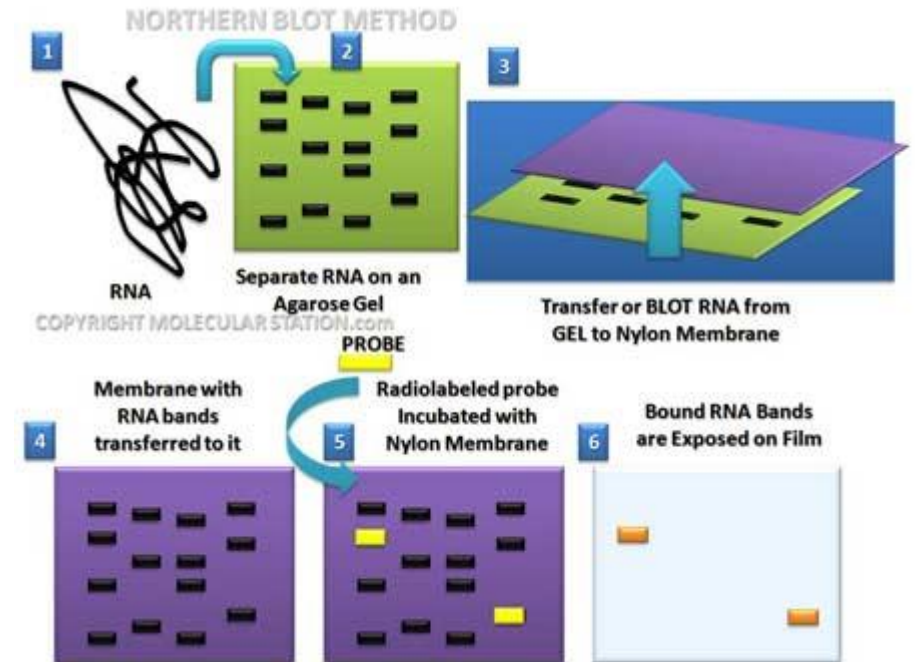
3 proteínas distintas partiendo de un solo gen!

¿Cómo saber si un gen se está expresando (se está transcribiendo)? : Northern Blot

Detección de RNA

- Separación de diferentes RNA por tamaño a través de electroforesis
- Detección del gen con una ***sonda** complementaria al gen (RNA) de interés

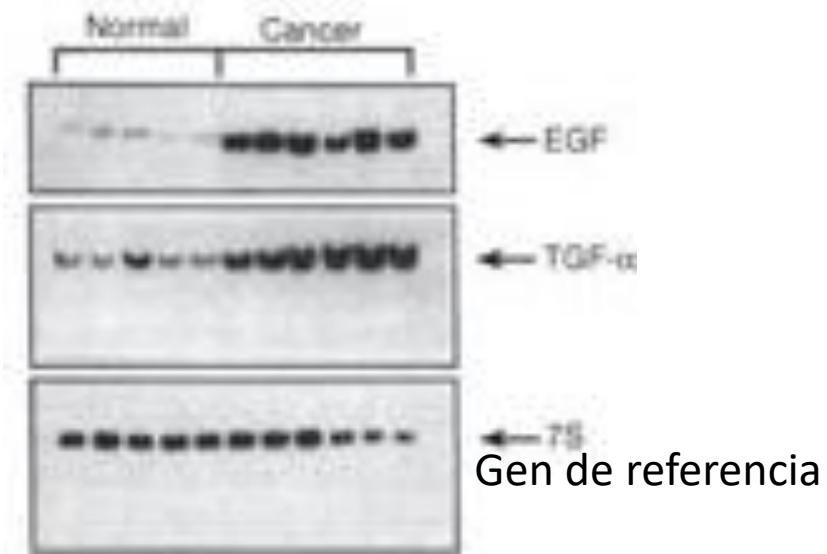
***Sonda:** Secuencia específica de ssDNA **marcada**, que se hibridará con una secuencia complementaria de ssRNA



¿Cómo saber si un gen se está expresando (se está transcribiendo)?

*Se puede determinar la expresión de un gen en una condición determinada

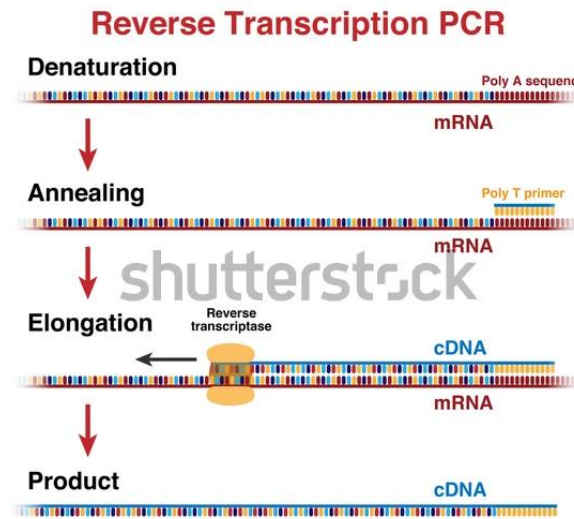
Permite observar los patrones de expresión de un gen determinado p.ej entre diferentes tejidos, órganos, estados de desarrollo, condiciones de estrés, etc.



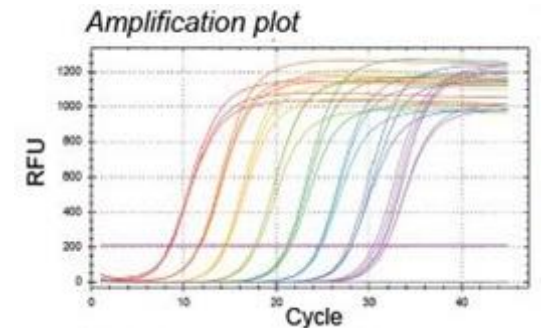
¿Cómo saber si un gen se está expresando (se está transcribiendo)?: qRT-PCR

Permite la cuantificación de la expresión de genes

El RNA es transcrito a **cDNA** (DNA complementario) con una transcriptasa reversa a partir de **mRNA** o RNA total. El cDNA se usa como molde en la reacción de la **qPCR**



www.shutterstock.com · 1727592472



PCR a partir del cDNA

Nota: repasar plenaria PCR

Los niveles de expresión de los genes son interpretados a través del cDNA

<http://vcell.ndsu.edu/animations/transcription/movie-flash.htm>



Para llevar a casa...

Estructura general de un gen



Estructura de
un gen
procariota

Estructura de
un gen
eucariota

PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
Transcripción y traducción acopladas	Transcripción y traducción compartimentalizadas
RNA polimerasa 1 sola	RNA polimerasa 3 tipos
Reconocimiento del promotor: Factor sigma:	Reconocimiento del promotor: GTFs
Promotor: caja -10 y caja -35	Promotor: diferentes cajas según el tipo de genes - TATA
	Se necesitan elementos adicionales para la transcripción: activadores, complejo mediador, enhancers, proteínas remodeladoras de la cromatina
Terminación: dependiente de rho / independiente de rho	Terminación: secuencias terminadoras / endonucleasas

RNA	MODIFICACIONES
PROCARIOTAS	
mRNA	No hay modificaciones
tRNA	Fraccionamiento del precursor, modificación de bases, modificación de extremos
rRNA	Fraccionamiento del precursor, metilación de bases
EUCARIOTAS	
mRNA	Adición de nucleótidos en los extremos (5' CAP y 3' poli A); corte y empalme
tRNA	Fraccionamiento del precursor, modificación de bases, corte y empalme, modificación de extremos
rRNA	Fraccionamiento del precursor, metilación de bases