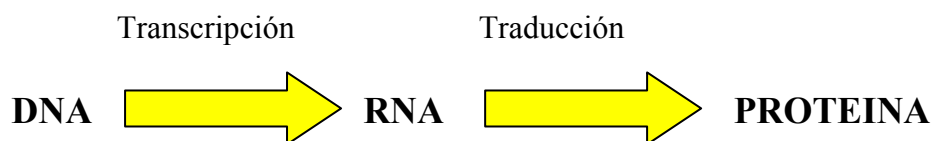


TRANSCRIPCION EN PROCARIOTAS

El “dogma central” de la biología molecular y el flujo de la información genética



Funciones del RNA

- a) Material genético: puede replicarse y retrotranscribirse a DNA. Ejemplos, virus del mosaico del tabaco y retrovirus.
- b) Funcional: RNA ribosómico (rRNA), transferente (tRNA) y otros. No se traducen y constituyen productos finales de la expresión génica; regulatoria y catálisis.
- c) Informativa: RNA mensajero (mRNA). Se traduce a proteínas.

Moléculas de RNA en E.coli

Tipo	Cantidad relativa (%)	Coefficiente de sedimentación (S)	Masa (kDa)	Número de nucleótidos
RNA ribosómico (rRNA)	80	23	1.2×10^3	3700
		16	0.55×10^3	1700
		5	3.6×10^1	120
RNA de transferencia (tRNA)	15	4	2.5×10^1	75
RNA mensajero (mRNA)	5		Heterogéneo	

COMPARACION ENTRE REPLICACION Y TRANSCRIPCION

SIMILITUDES

FENOMENO PROCESIVO

POLARIDAD 5' → 3'

SE UTILIZA COMO MOLDE UNA CADENA DE DNA

COMPLEMENTARIDAD DE BASES

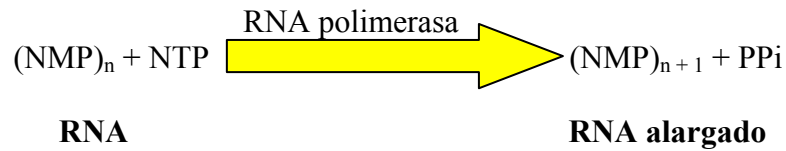
DIFERENCIAS

REPLICACION	TRANSCRIPCION
ADN POLIMERASA	ARN POLIMERASA
dATP, dGTP, dCTP y dTTP	ATP, GTP, CTP y UTP
TODO EL CROMOSOMA	UNO O POCOS GENES
UNA RONDA POR CICLO	VARIOS ARN POR GEN EN CADA CICLO
DOS CADENAS	UNA CADENA
CON CEBADOR	SIN CEBADOR
ACTIVIDAD CORRECTORA	SIN ACTIVIDAD CORRECTORA

Reacción catalizada por la RNA polimerasa

Los tres tipos de RNA celular en E.coli son sintetizados por la misma RNA polimerasa según las instrucciones dadas por un DNA molde.

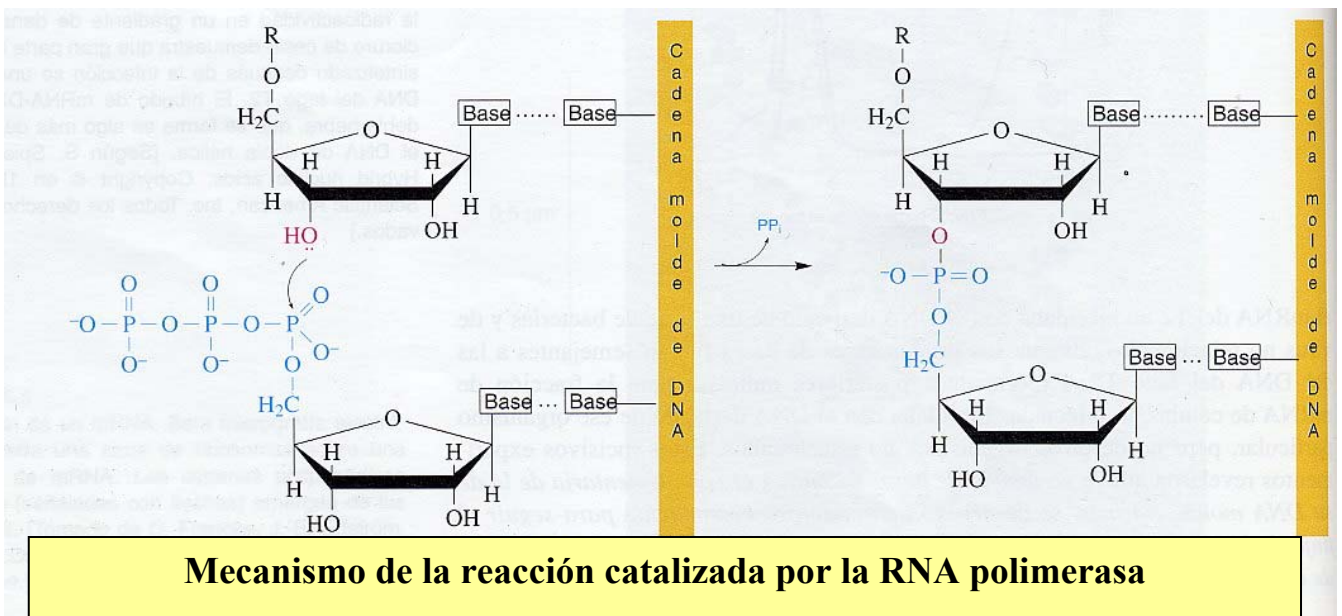
REACCION GLOBAL



La RNA polimerasa de E. coli requiere los siguientes componentes para la síntesis de RNA:

- 1) Un molde. Preferentemente es un DNA de doble cadena. También puede servir como molde un DNA monocatenario.
- 2) Precursores activados. Se requieren los cuatro nucleósidos trifosfato; ATP, GTP, CTP y UTP.
- 3) Un ión metálico divalente. Son eficaces el magnesio y el manganeso.

La RNA polimerasa cataliza la iniciación y la elongación paso a paso de las cadenas de RNA.



Composición de la RNA polimerasa

Es un enzima con un peso molecular de unos 500 kDa formado por cinco clases de subunidades. La composición subunitaria del enzima completo, llamado holoenzima, es $\alpha_2 \beta \beta' \sigma^{70}$ y ω .

Subunidades de la RNA polimerasa de E. coli

Subunidad	Gen	Número	Masa (kDa)	Función
α	Rpo A	2	37	Iniciación de la cadena, interacción con las proteínas reguladoras y elementos promotores corriente arriba
β	Rpo B	1	151	Iniciación y elongación de la cadena, forma enlaces fosfodiéster
β'	Rpo C	1	155	Unión al DNA
σ^{70}	Rpo D	1	70	Reconoce al promotor e inicia la síntesis
ω		1	11	Desconocida

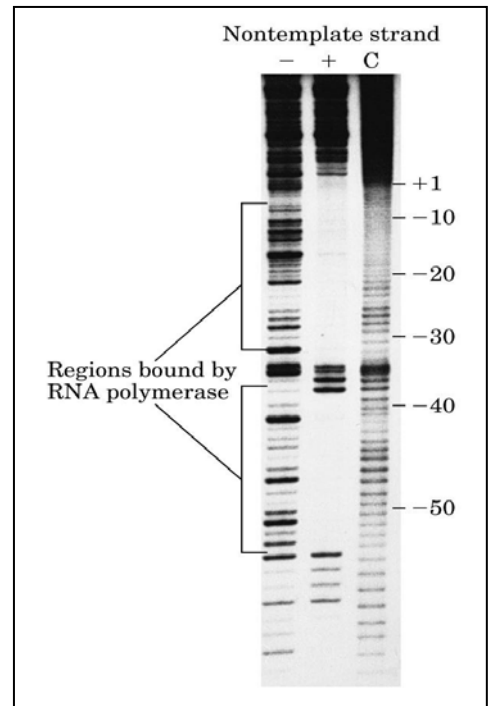
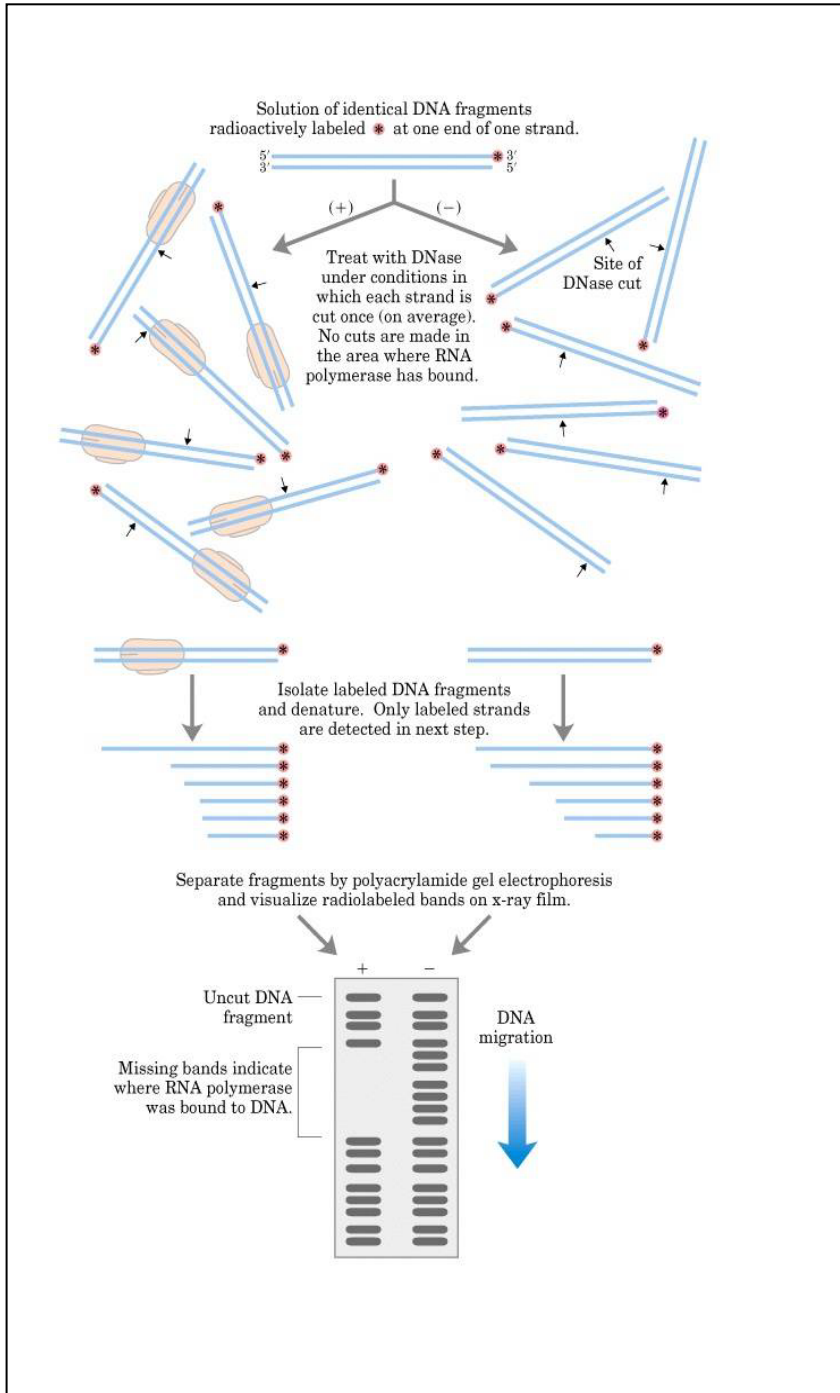
Diferentes Factores σ reconocen promotores con diferentes secuencias consenso

Gen	Masa (kDa)	Uso	Secuencia - 35	Separación	Secuencia - 10
rpoD	70	General	TTGACAT	16-18 pb	TATAAT
rpoH	32	Choque térmico	CCCTTGAA	13-15 pb	CCCGATNT
rpoN	54	Nitrógeno	CTGGNA	6 pb	TTGCA
fliA	28	Flagelar	CTAAA	15 pb	GCCGATAA

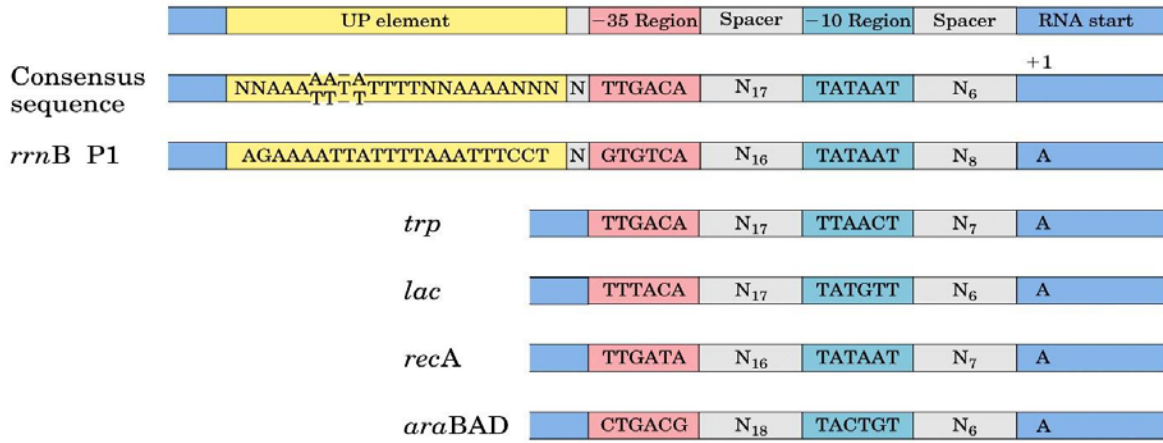
Funciones de la RNA polimerasa.

- Localiza en el DNA los centros de iniciación.
- Desenrolla un tramo corto del DNA helicoidal para producir un molde de DNA de un solo filamento, del cuál tomara instrucciones.
- Selecciona un ribonucleósido trifosfato correcto y cataliza la formación de un enlace fosfodiéster.
- Localiza las señales de terminación
- Interacciona con las proteínas activadoras y represoras que modulan la velocidad de transcripción.

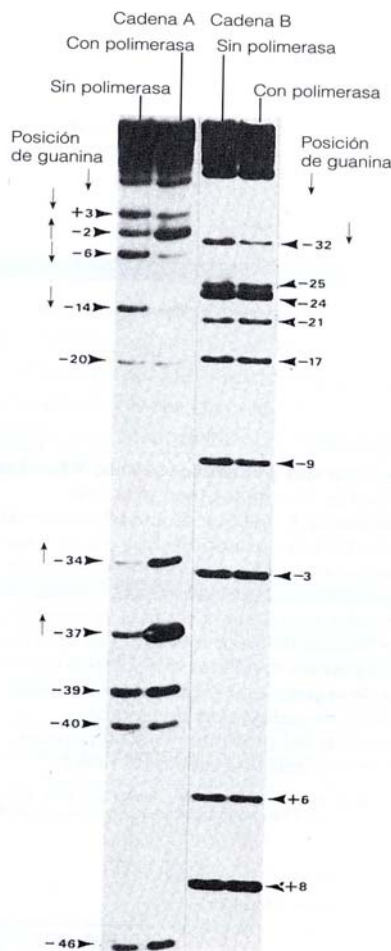
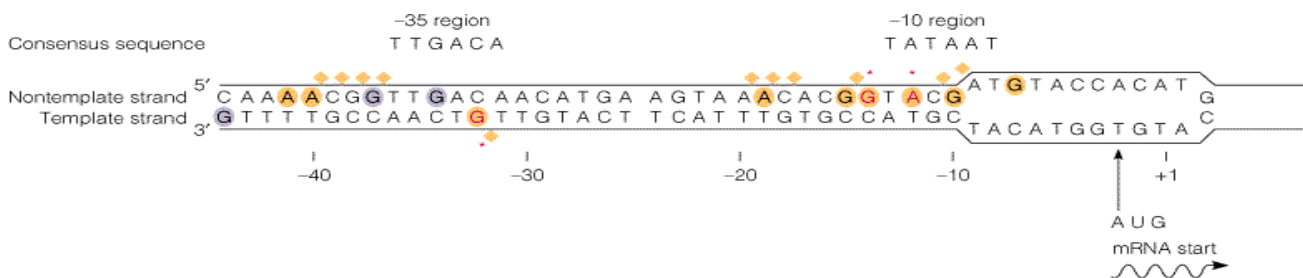
Técnica de “huellas dactilares” con DNasa I como herramienta para identificar los lugares del DNA que unen proteínas específicas.



Estudios del promotor



Promotor A3 de T7

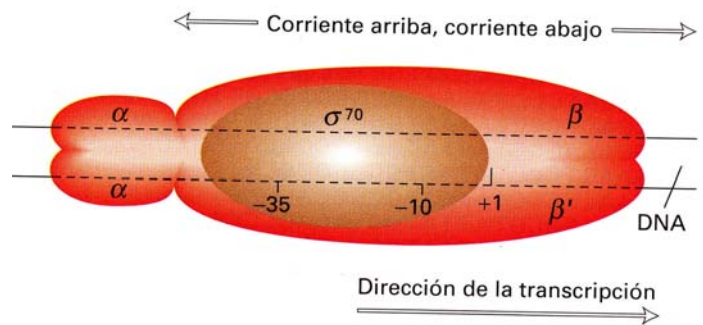


Identificación de los residuos G que contactan con la RNA polimerasa en el promotor del triptófano de E. coli

Promotor A3 de T7

- resistentes a la metilación
- más vulnerables a la metilación
- * purinas metiladas que interfieren con la unión
- ◊ contactos de fosfatos

Las dos regiones conservadas están separadas por dos vueltas de hélice

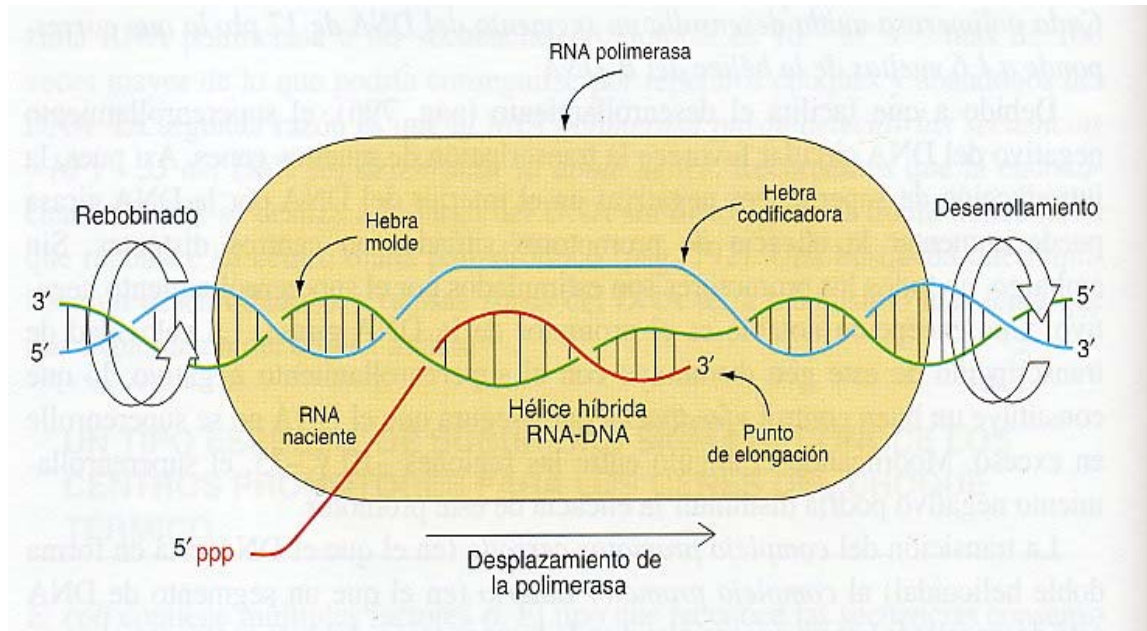


La RNAPolimerasa de E.coli unida al DNA. Por convección, el sitio de iniciación de la transcripción suele anotarse +1. Los pares de bases que se extienden en la dirección de avance de la transcripción se dice que están "corriente abajo" del sitio de inicio; los que se extienden en la dirección opuesta están "corriente arriba". La subunidad σ^{70} se une a secuencias específicas cerca de las posiciones -10 y -35 en el promotor. Las subunidades α se ubican cerca del DNA en dirección corriente arriba. Las subunidades β y β' se asocian con el sitio de inicio.

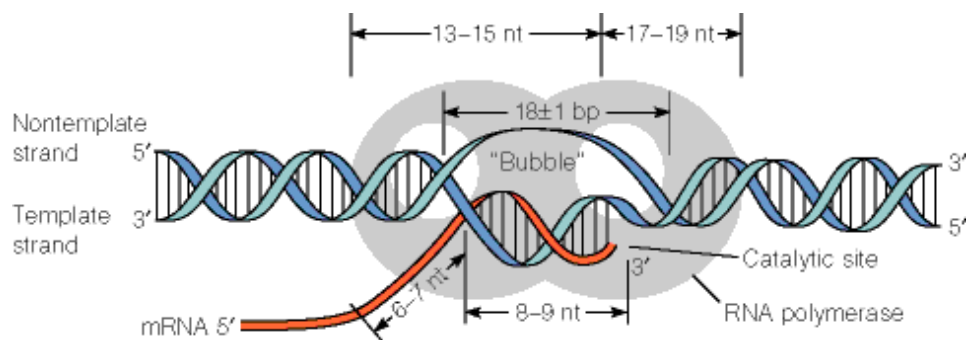
Fase de elongación

BURBUJA DE TRANSCRIPCIÓN

La fase de elongación de la transcripción comienza después de la formación de unos pocos (9-10) enlaces fosfodiéster y la eliminación de la subunidad σ .



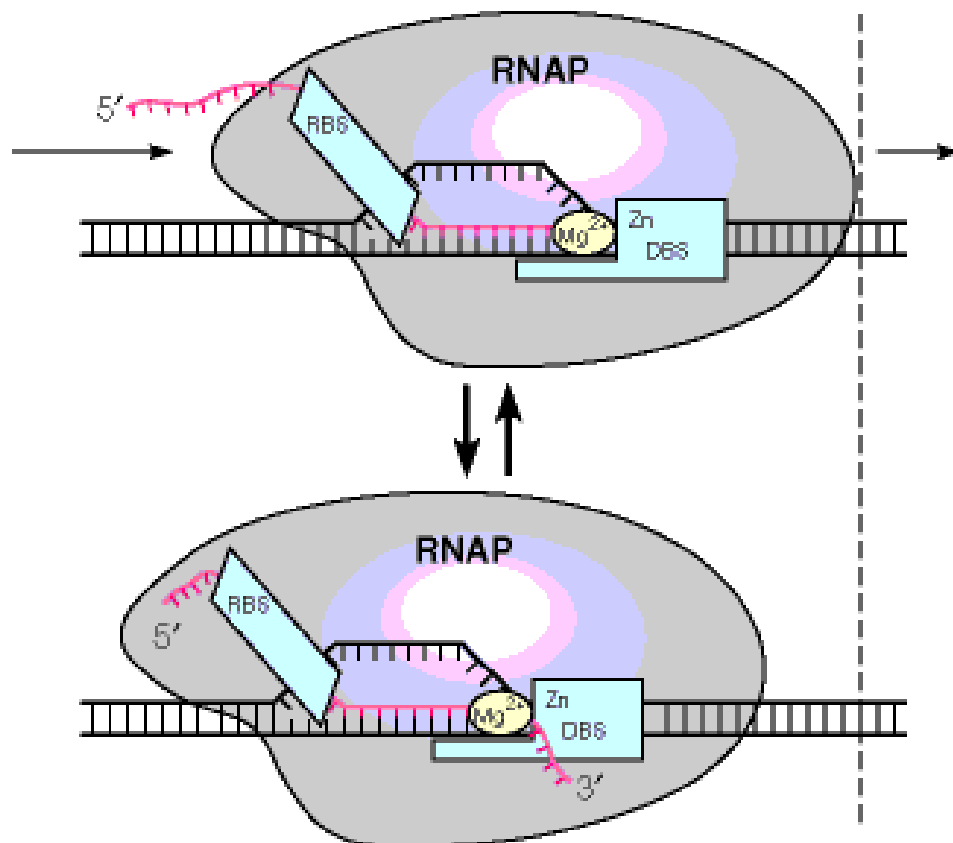
Modelo de una burbuja de transcripción durante la elongación del transcrito de RNA. El DNA dúplex se desenrolla en el extremo anterior de la RNA polimerasa y se rebobina en su extremo posterior. La hélice híbrida RNA-DNA gira sincrónicamente.



Se han calculado las longitudes del DNA desenrollado y del híbrido DNA-RNA a partir de las reactividades de los complejos de transcripción con reactivos como el KMnO_4 , que oxida las bases en los ácidos nucleicos de cadena simple. Mediante la técnica de la huella se determina la longitud del DNA en contacto con el enzima. Seis o siete nucleótidos del RNA detrás del DNA híbrido están protegidos del ataque de la ribonucleasa mediante su unión al enzima.

Retroceso de un complejo de elongación

Actividad RNasa intrínseca a la RNA pol. Proteínas GreA y GreB



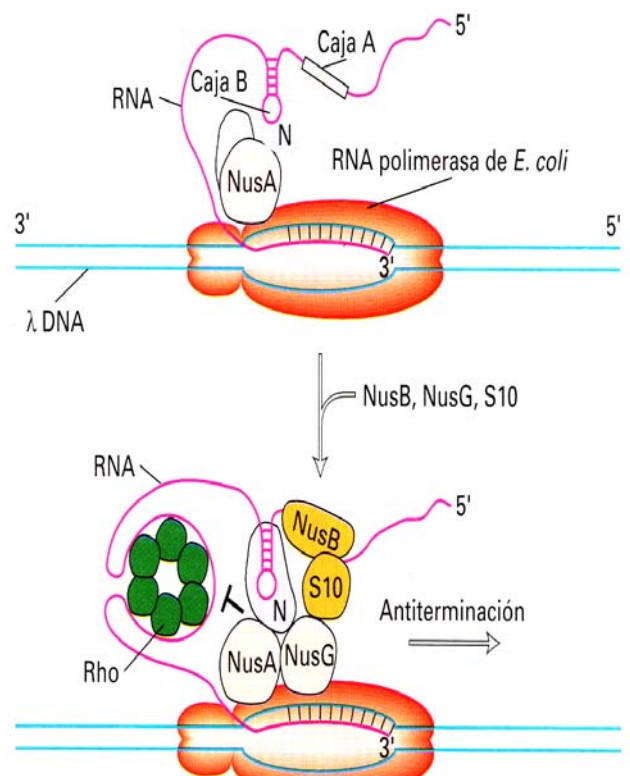
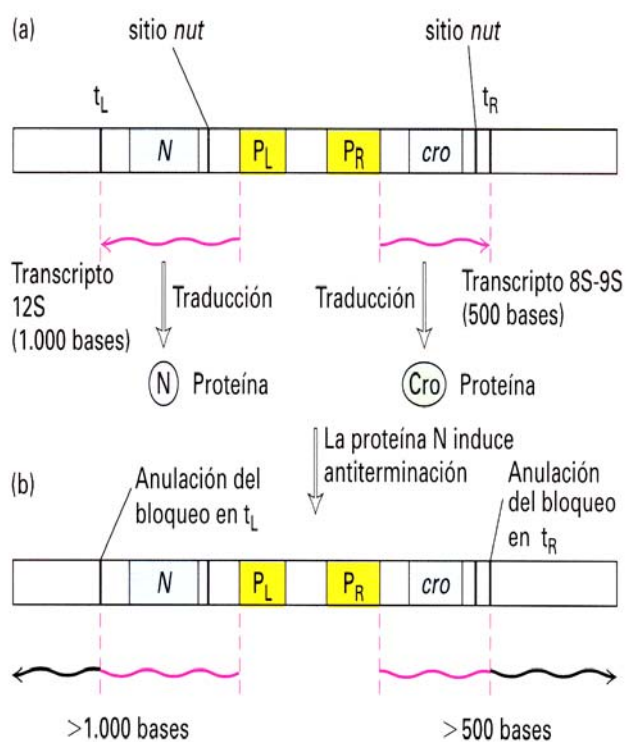
Señales antiterminación

N Proteína codificada por el fago λ que impide la terminación de la transcripción
NUT (N-utilization) secuencia específica entre el promotor y el sitio de terminación

- Un tallo asa (horquilla) llamado **caja B** que interactúa con **N**
- Una secuencia lineal de unos 12 nucleótidos llamada **caja A**, que interactúa con **Nus B y S 10**

NUS (N-utilization substances) proteínas celulares para la utilización de **N**

- NUS A** factor de elongación
- NUS B** ?
- NUS E (S 10)** proteína de la subunidad pequeña del ribosoma
- NUS G**?



Antiterminación por la proteína N del fago λ y proteínas celulares de *E. coli*. Después de que se reconoce la caja del sitio Nut y se une a ella, la proteína N interactúa con el complejo Nus A-polimerasa. La posterior fijación rápida de Nus B, Nus G y S 10 produce un complejo de antiterminación estabilizado por múltiples contactos proteína-proteína. Mientras la polimerasa se desplaza a lo largo del molde de DNA alejándose del sitio Nut, de manera que se forma un asa de RNA de tamaño cada vez mayor. El complejo impide la terminación, y la transcripción prosige. Se muestra la inhibición de la acción de terminación del factor ρ hexamérico; la antiterminación también se produce en sitios ρ independientes.

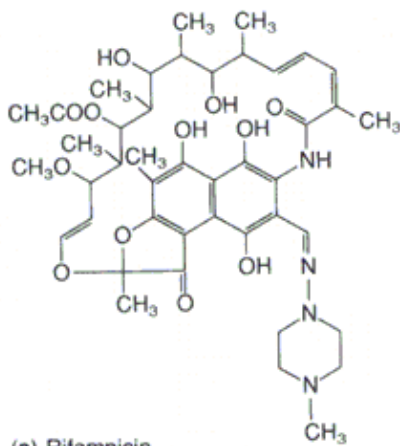
INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPCION

Rifampicina. Antibiótico que inhibe la RNA polimerasa in vitro y bloquea la síntesis de RNAr, RNAt y RNAm in vivo

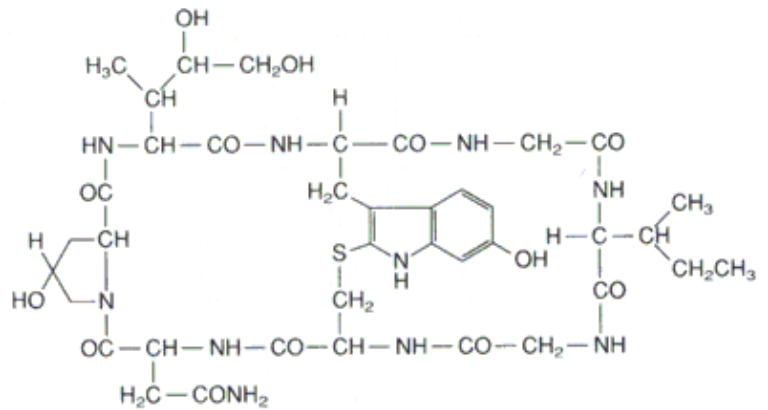
α -amanitina. Toxina contenida en la seta venenosa Amanita. Inhibe las RNA polimerasas eucariotas II y III, pero predominantemente la RNA polimerasa II

Cordicepina. Terminador de cadena de la transcripción, el nucleótido de la cordicepina se incorpora a la cadena en crecimiento y esta se para, ya que carece del grupo 3' OH a partir del cuál continuar

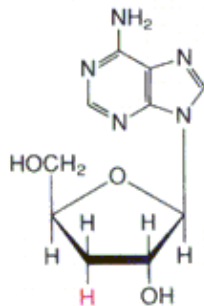
Actinomicina D. Se une al DNA intercalandose entre los pares de bases G-C adyacentes y los brazos del polipéptido cíclico llenan el surco estrecho próximo.



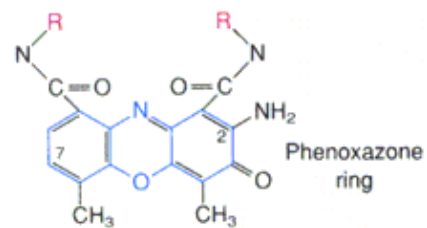
(a) Rifampicin



(b) α -Amanitin



(c) Cordycepin (3'-deoxyadenosine)

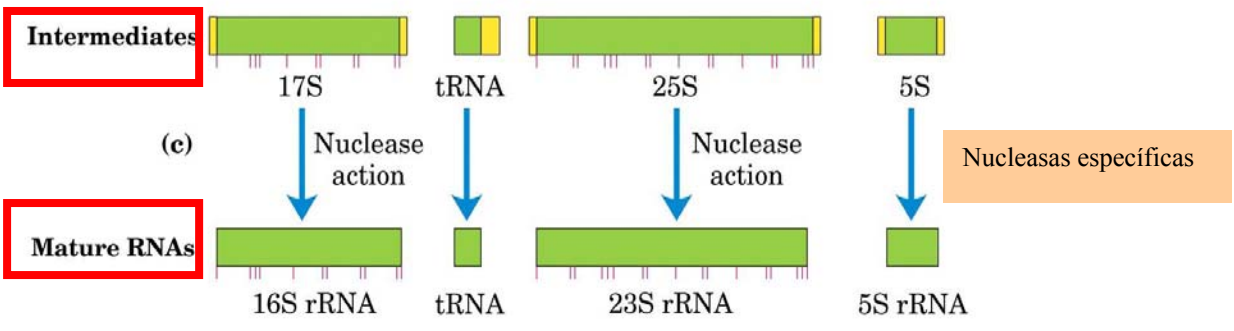
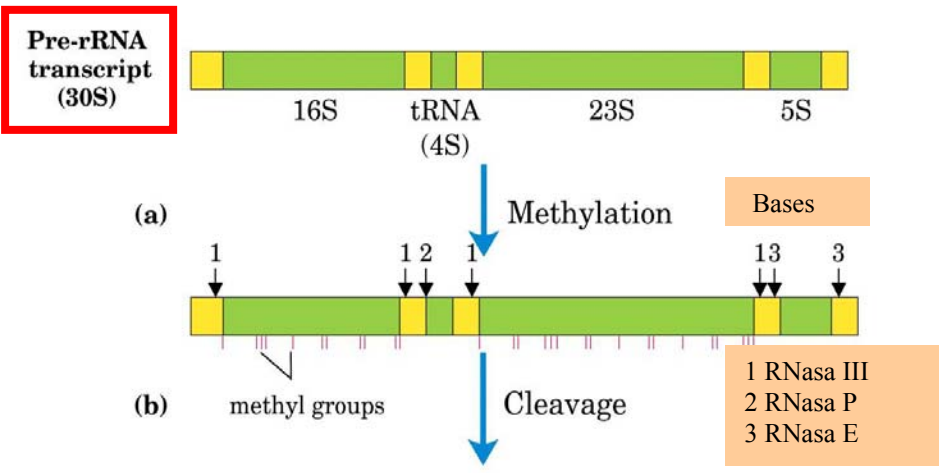
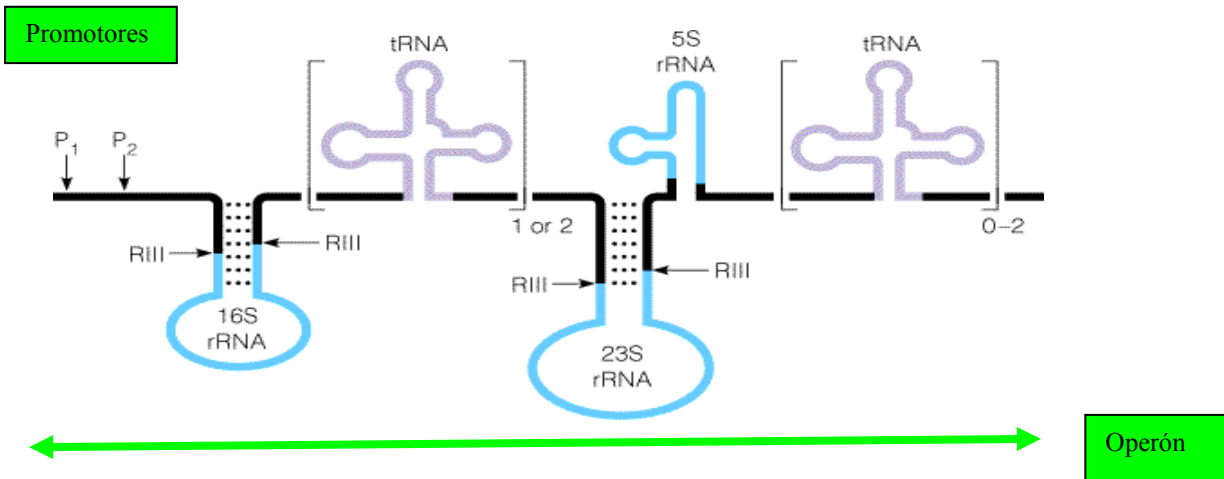


(d) Actinomycin D

Modificaciones post-transcripcionales de los RNA ribosómicos y transferentes.

Procesamiento de transcritos de pre-rRNA en bacterias

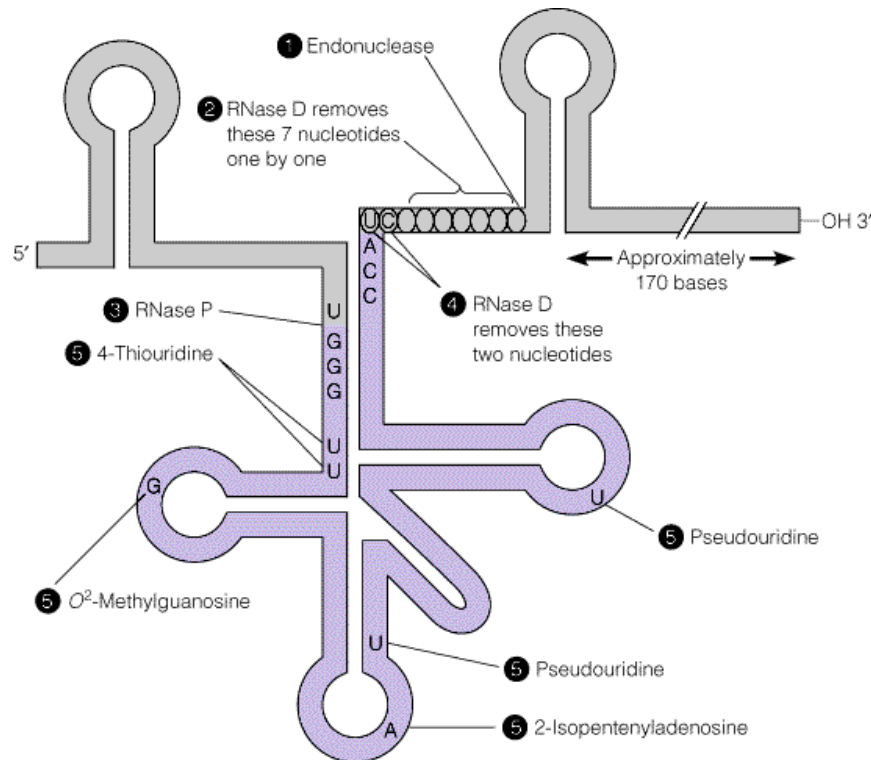
-Siete copias en el genoma de E. coli. Difieren en número, localización e identidad de los tRNA incluidos en el transcrito primario.



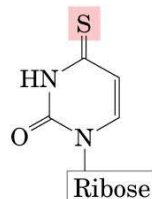
Modificaciones postranscripcionales de los tRNA en bacterias

Escisión y modificación química

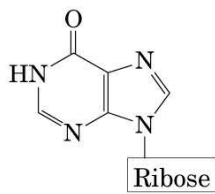
- **Precursores mayores; transcritos que poseen de uno a siete tRNA -**
- 1- **Endonucleasa** corta por el lado 3'.
- 2- **RNasa D**, exonucleasa, hasta dos nucleótidos de la secuencia CCA- 3'
- 3- **RNasa P**, genera el extremo 5'
- 4- **RNasa D**, elimina los dos nucleótidos del extremo 3', genera la secuencia CCA- 3'
- 4a- **Nucleotidil transferasa** añade el trinucleótido CCA al extremo 3', si éste está ausente
- 5- **Modificación enzimática de las bases:** pseudouridinas, 2 isopenteniladenosina, o²-metil guanosina, 4-tiouridina, etc.



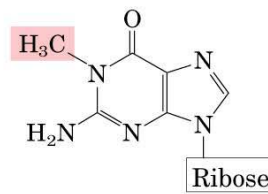
Maduración del tRNA^{tyr} de E. coli



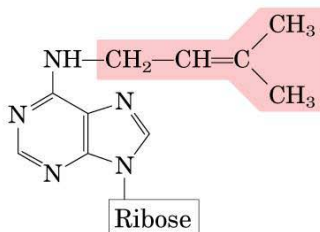
4-Thiouridine (S⁴U)



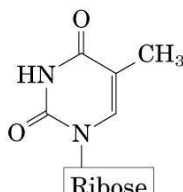
Inosine (I)



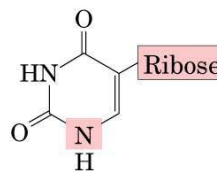
1-Methylguanidine (m¹G)



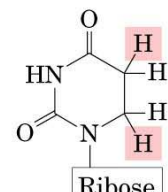
N⁶-Isopentenyladenosine (i⁶A)



Ribothymidine (T)

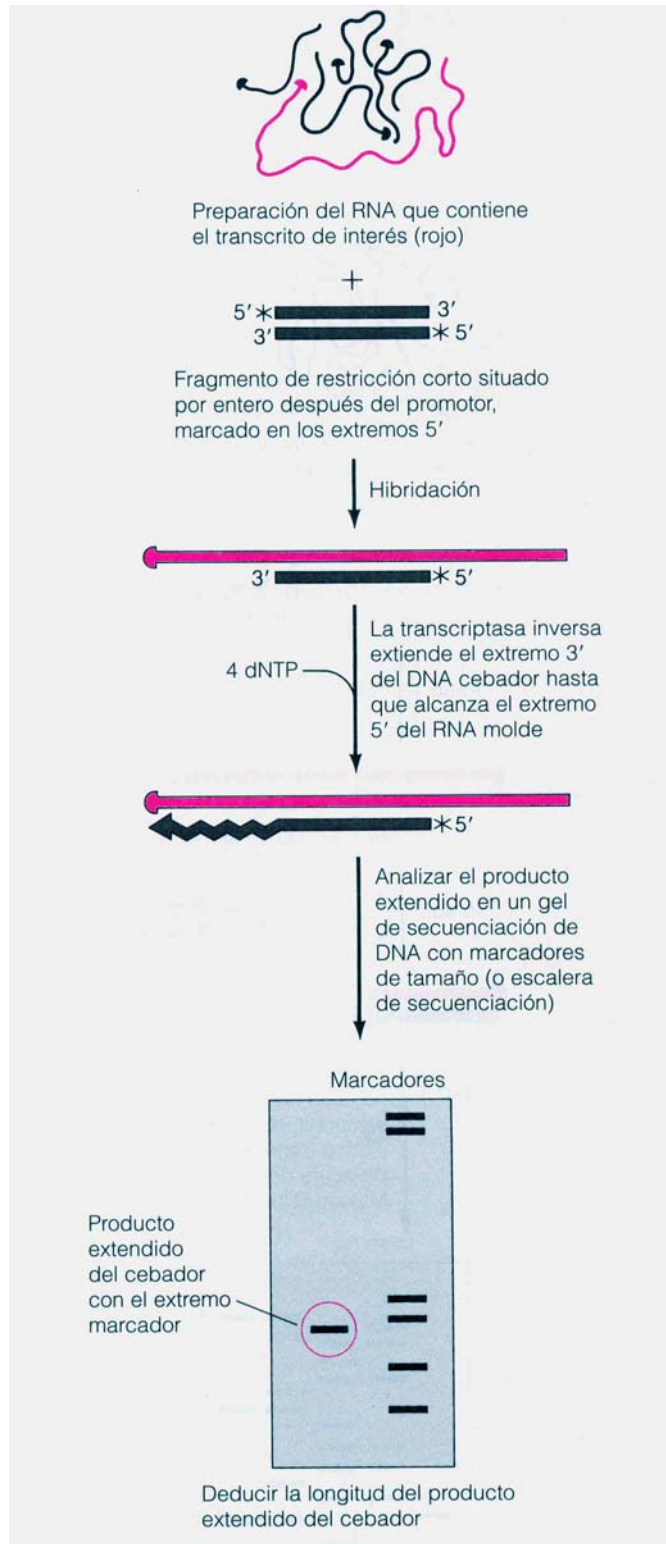


Pseudouridine (ψ)

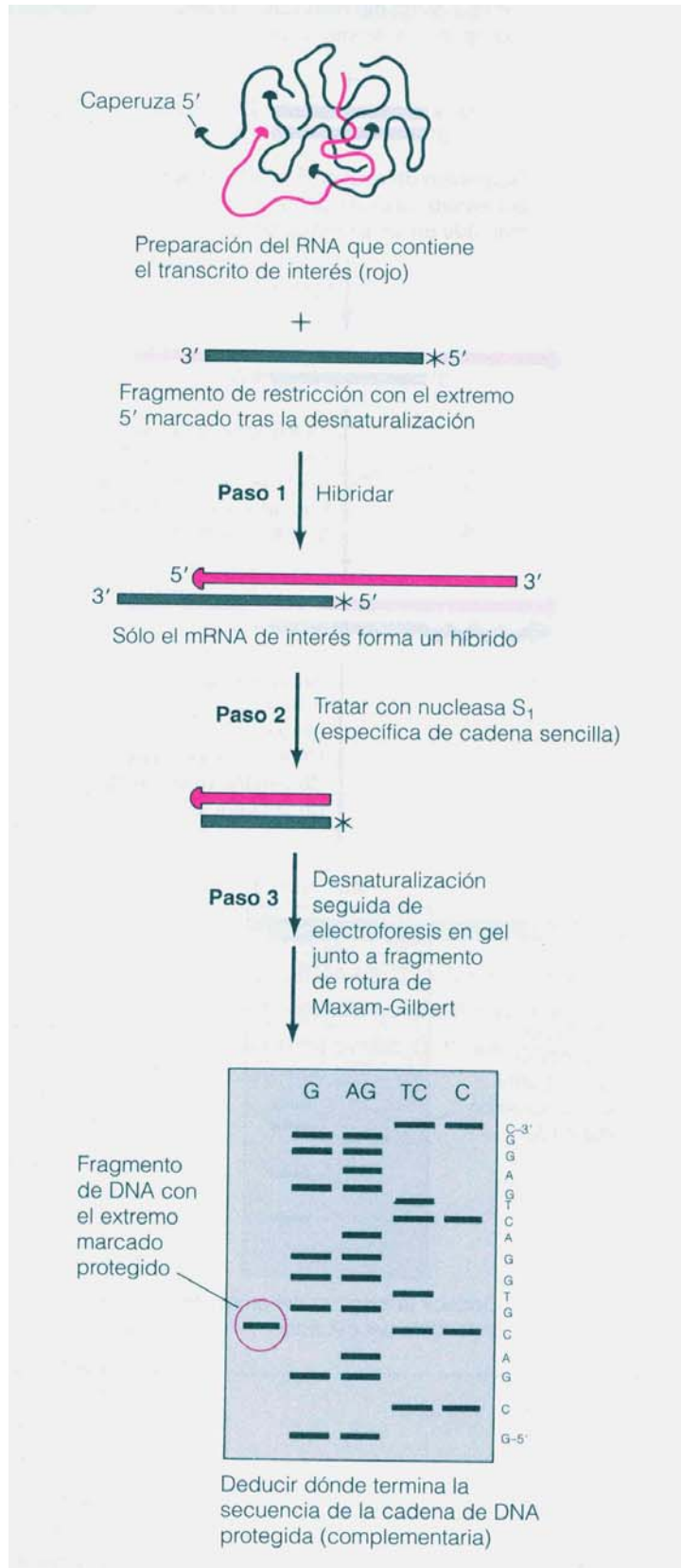


Dihydrouridine (D)

Método de extensión del cebador para localizar el extremo 5' de un transcrito



Método de cartografiado con nucleasa S1 para identificar el extremo 5' de un RNA



MAXAM – GILBERT

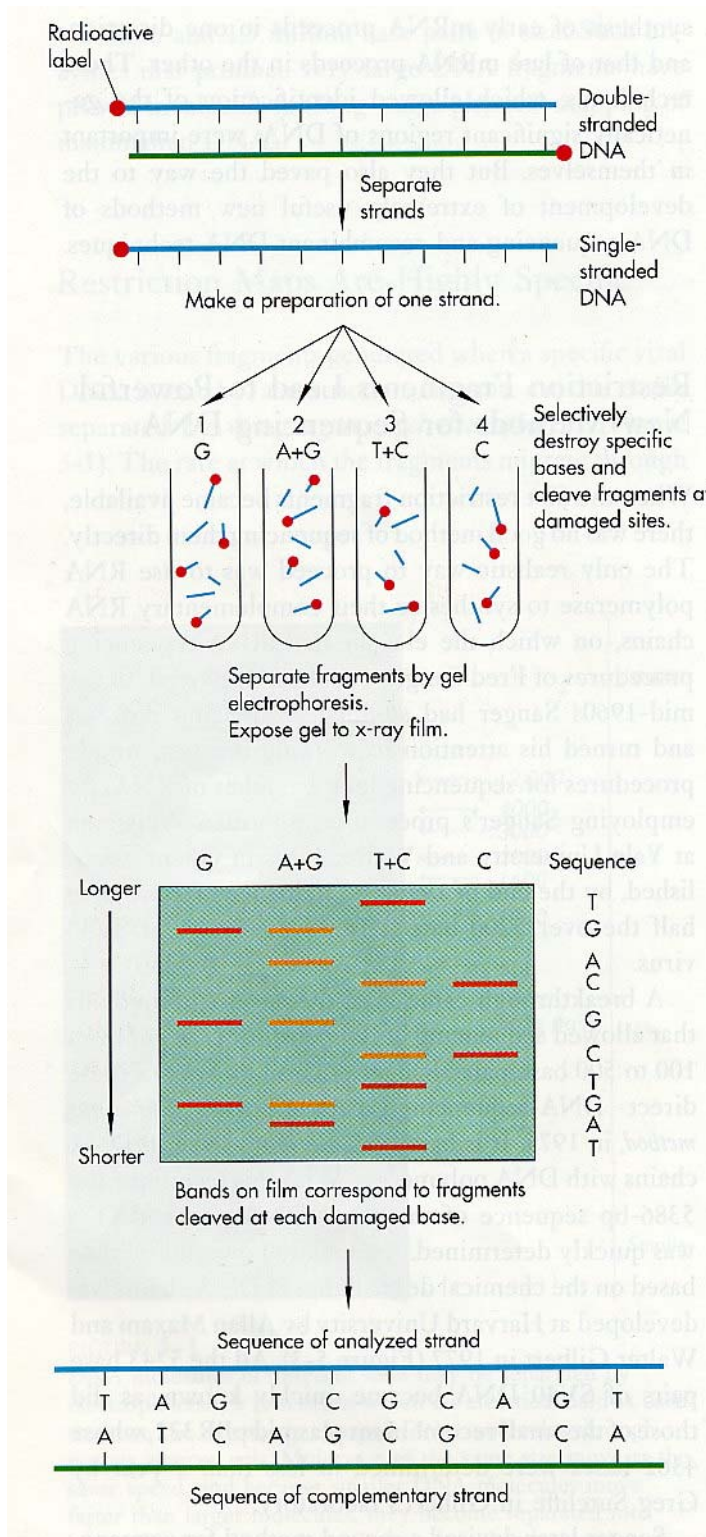


FIGURE 5-3

The Maxam and Gilbert DNA-sequencing procedure. A segment of DNA is labeled at one end with ^{32}P . The labeled DNA is divided into four samples and each sample is treated with a chemical that specifically destroys one or two of the four bases in the DNA. The conditions of the reaction are controlled so that only a few sites are nicked in any one DNA molecule. When these nicked molecules are treated with piperidine, the DNA backbone is broken at the site at which the base had been destroyed. This generates a series of labeled fragments, the lengths of which depend on the distance of the destroyed base from the labeled end of the molecule. For instance, if there are G residues 3, 6, and 9 bases away from the labeled end, then treatment of the DNA strand with chemicals that cleave at G will generate labeled fragments 2, 5, and 8 base in length. The sets of labeled fragments obtained from each of the four reactions are run side by side on an acrylamide gel that separates DNA fragments according to size, and the gel is autoradiographed. The pattern of bands on the x-ray film is read to determine the sequence of the DNA.

SANGER

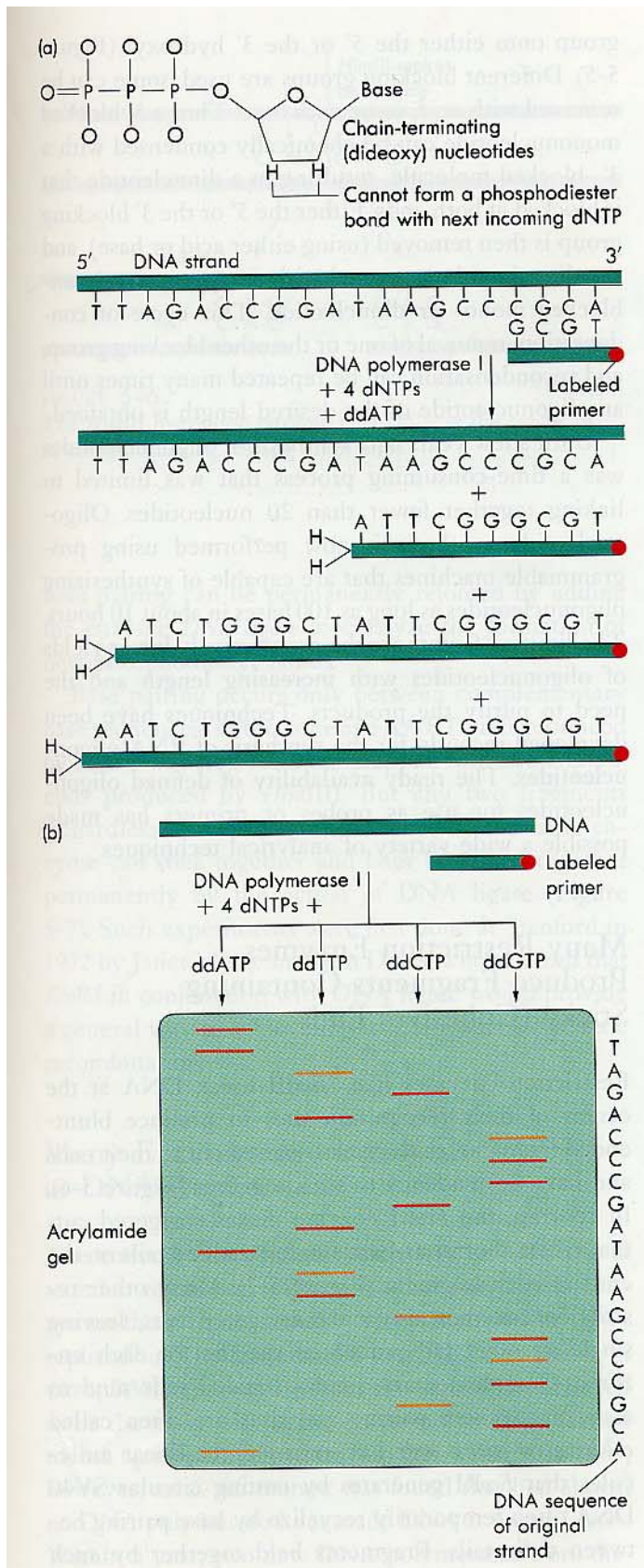


FIGURE 5-4

The Sanger DNA-sequencing procedure. (a) 2',3'-Dideoxynucleotides of each of the four bases are prepared. These molecules can be incorporated into DNA by *E. coli* DNA polymerase because they have a normal 5' triphosphate; however, once incorporated into a growing DNA strand, the dideoxynucleotide (ddNTP) cannot form a phosphodiester bond with the next incoming dNTP. Growth of that particular DNA chain stops. A Sanger sequencing reaction consists of a DNA strand to be sequenced, a short labeled piece of DNA (the primer) that is complementary to the end of that strand, a carefully controlled ratio of one particular dideoxynucleotide with its normal deoxynucleotide, and the other three dNTPs. When DNA polymerase is added, normal polymerization will begin from the primer; when a ddNTP is incorporated, the growth of that chain will stop. If the correct ratio of ddNTP:dNTP is chosen, a series of labeled strands will result, the lengths of which are dependent on the location of a particular base relative to the end of the DNA. (b) A DNA strand to be sequenced, along with labeled primer, is split into four DNA polymerase reactions, each containing one of the four ddNTPs. The resultant labeled fragments are separated by size on an acrylamide gel, and autoradiography is performed; the pattern of the fragments gives the DNA sequence.