

TEMA 16. TRANSCRIPCIÓN

- ✓ **Introducción.**
ARN: tipos y funciones.

- ✓ **Transcripción en procariotas.**

Enzimología de la transcripción: ARN polimerasa.

Fases de la transcripción:

Iniciación.

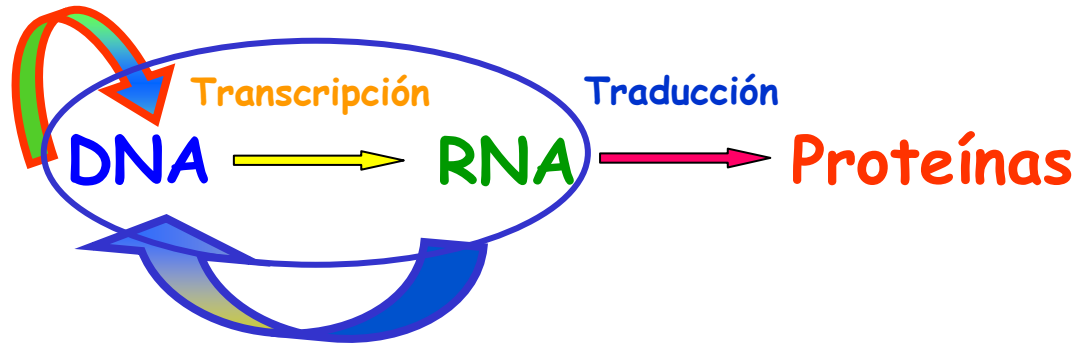
Elongación.

Terminación.

- ✓ **Transcripción en eucariotas: diferencias con procariotas.**
Tipos de ARN polimerasas: ARNpol-I, ARNpol-II. ARNpol-III.
- ✓ **Inhibidores de la transcripción.**

Introducción.

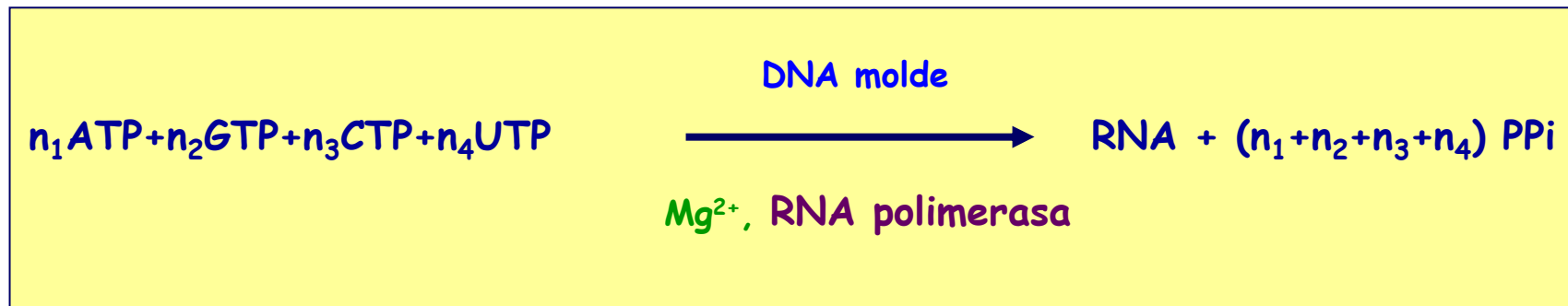
Replicación



Retrotranscripción

Transcripción:

- Mecanismo celular por el cual la información genética contenida en el **ADN** es transferida a una molécula de **ARN**.
- Ocurre mediante la **polimerización de ribonucleósidos trifosfato** a lo largo de una cadena molde de DNA.
- La síntesis de ARN está catalizada por la **ARN polimerasa**.

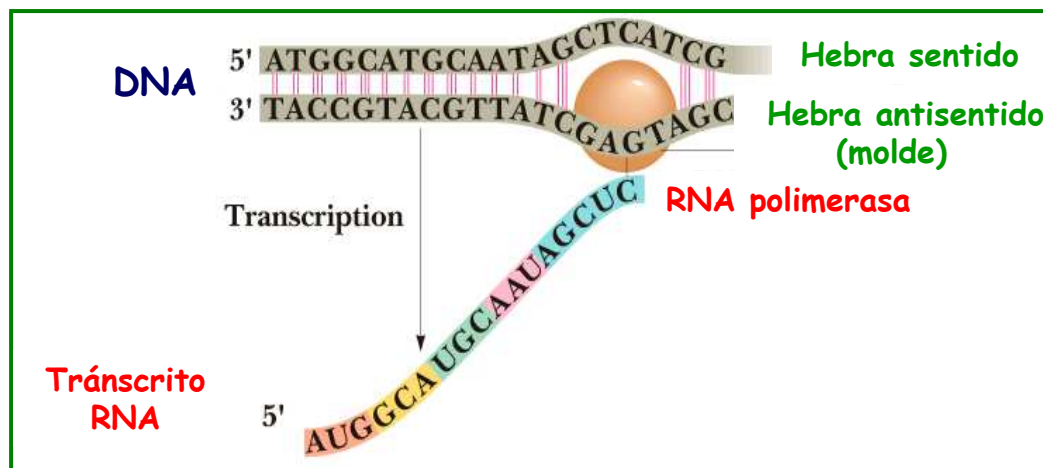


Nomenclatura transcripcional.

Gen: segmento del DNA que codifica una **proteína** (mRNA) u otro **RNA** (rRNA, tRNA)

Unidad Transcripcional: Segmento del DNA comprendido entre la iniciación y la terminación de la Transcripción. Puede ser:

- **Monocistrónica**- unidad transcripcional con un sólo gen
- **Policistrónica**- unidad transcripcional con más de un gen



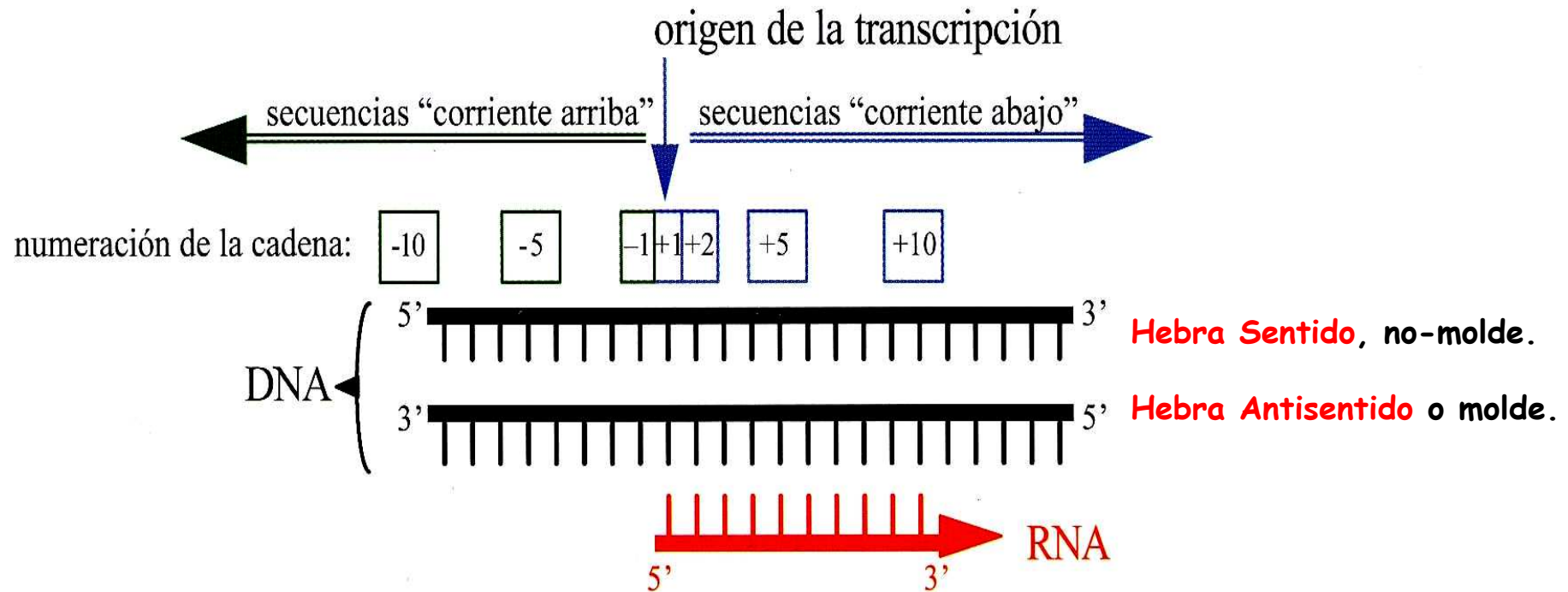
Hebra Sentido: Hebra del DNA con la misma secuencia que el RNA (**codificante, informativa, no molde, no transcrita, +**)

Hebra Antisentido: Hebra molde de la RNA polimerasa (**no codificante, transcrita, no informativa, -**)

La RNA polimerasa añade nucleótidos en **sentido 5' -3'**

Introducción.

Nomenclatura transcripcional.



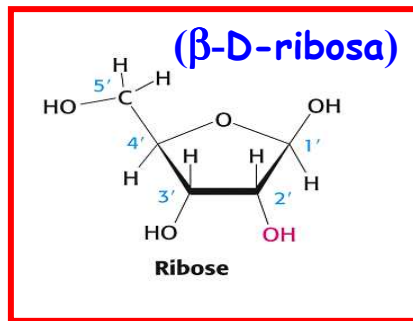
La RNA polimerasa añade nucleótidos en **sentido 5' -3'**

Introducción.

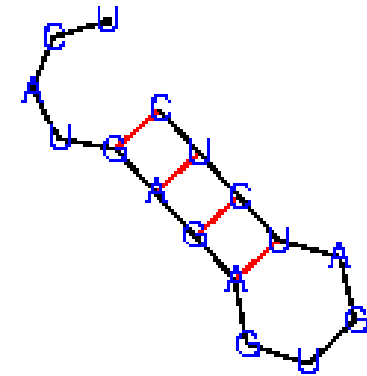
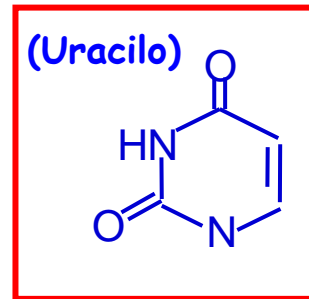
Ácido Ribonucleico

- Macromolécula sintetizada por las **RNA polimerasas** a partir del ADN (**molde**) en el proceso de transcripción. Generalmente son de **cadena sencilla**.
- Compuesto por **ribonucleótidos** unidos por **enlaces fosfodiester**.

Azúcar: ribosa.



Bases: A, U, G y C.



Niveles estructurales de los ARN

- La **estructura primaria** viene determinada por la secuencia de nucleótidos
- Pueden presentar formas variadas de **estructuras secundarias** (uniones intracatenarias).
La estructura secundaria de las **regiones de doble cadena**, se asemeja al **A-DNA**.
La forma B no puede ser adoptada debido a impedimentos estéricos del O extra en el C2' de la ribosa (ver modelo de Watson y Crick).
- También han sido observadas **estructuras terciarias** para ciertos **tRNA** y **rRNA**.

Tipos de ARN

ARN funcionales (no se traducen a proteínas)

- ARN ribosómico (rRNA).
- ARN de transferencia (tRNA).
- ARN pequeño nuclear (snRNA)
- ARN citoplasmático pequeño (scRNA)

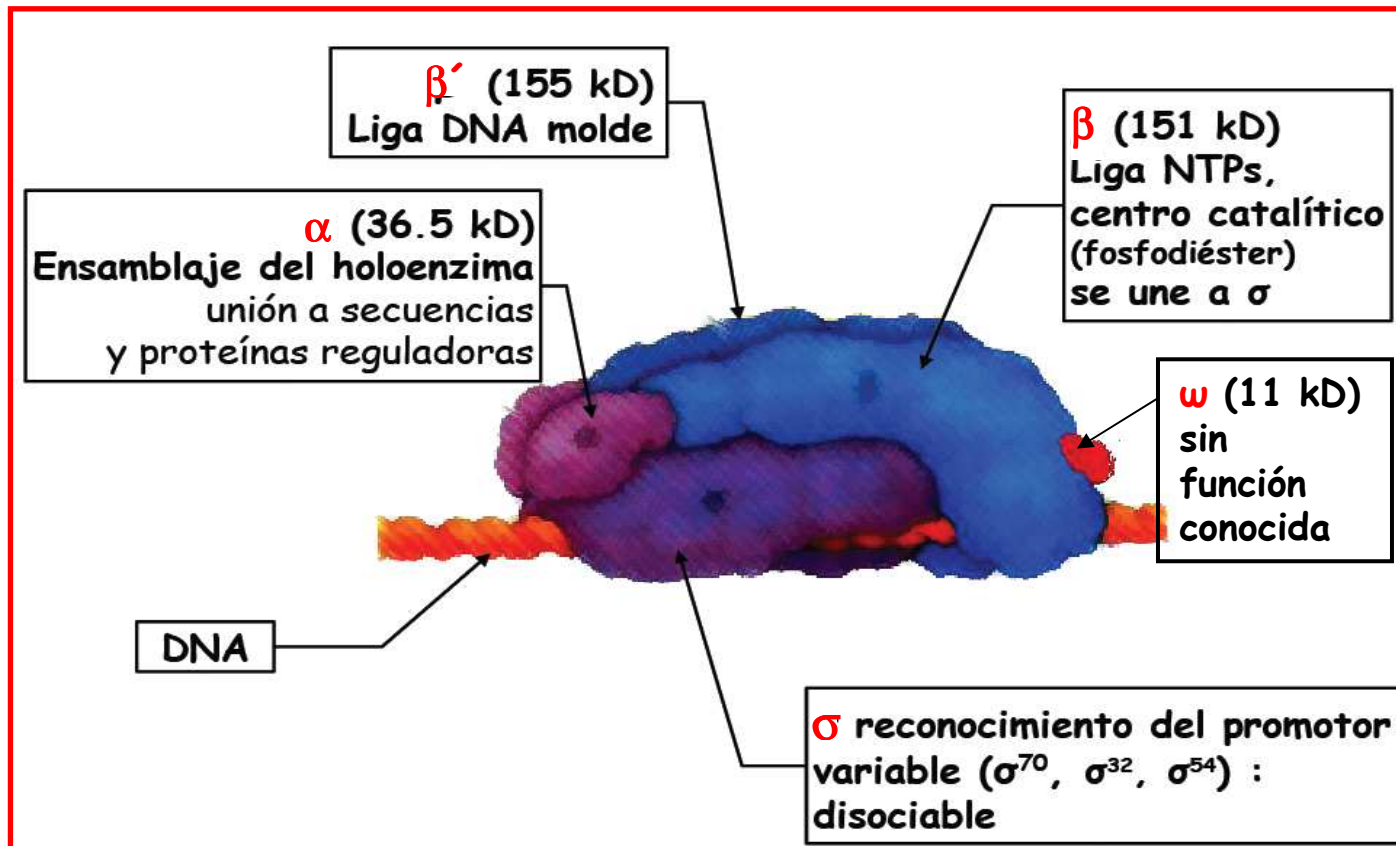
ARN informativos (se traducen a proteínas)

- ARN mensajero (mRNA).
- ARN heterogéneo nuclear (hnRNA).

Transcripción en procariotas.

La enzima clave es la **ARN polimerasa** (Descubierta por J. Hurwitz y S. Weiss independientemente)

- Holoenzima de unos 500 kDa formada por 5 clases de subunidades: $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$
- Polimeriza en sentido 5' -3'
- No tiene actividad exonucleasa (no es correctora).
- No necesitan cebadores.
- Es procesativa: no abandona el molde de ADN hasta la terminación



Transcripción en procariotas.

LA TRANSCRIPCIÓN TIENE 3 FASES:

- Iniciación:** tiene lugar en secuencias promotoras o promotores.
- Elongación:** ARN polimerasa
- Terminación:** ρ -independiente
 ρ -dependiente

INICIACIÓN

- Identificación del inicio de la **Unidad Transcripcional**
- Definición del **sentido de la transcripción**

La transcripción comienza en distintas "**secuencias promotoras**": Secuencias del DNA localizadas en el extremo 5' de la unidad transcripcional, que determinan la **localización** y el **sentido** de la transcripción. La **subunidad σ** de la **ARN polimerasa** reconoce y se une a las secuencias promotoras.

Genes	Región -35	Región -10 (caja de Pribnow)	Sitio de iniciación (+1)
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTT	TATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA	ACCCGTTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTT	TGTTACGCGTTTTTGTTCATGGCTTTGGT	CCCCGCTTTG
<i>bioA</i>	TTCCAAAACGTGTTTTTTT	TGTTGTTAATTTCGGTGTAGACTTTGTA	AACTAAATCTTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTA	AAACAAATTGAAAAGATTTAGGTTTACAAGTCT	TACACCGAAT
<i>galP2</i>	ATTTATTCATGTCACACTTTT	TTCGCATCTTTGTTATGCTATGGTTATTT	CATACCAT
<i>lac</i>	ACCCAGGCTTTACACTTTAT	GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA	ATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATGGCGCAAAACCT	TTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCG	GGAAGAGAGTC
<i>rrnA1</i>	AAAATAAATGCTTGACTCTGT	AGCGGGAAGGCGTATTATCACACC	CCCGCGCCGCTG
<i>rrnD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCAAAA	AATTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCG	TGTGAGACGA
<i>rrnE1</i>	CAATTTTTCTATTGCGGCCTG	CGGAGAACTCCCTATAATGCGCCTCC	ATCGACACGG
<i>rRNA^{Tyr}</i>	CAACGTAACTTTACAGCGGCG	CGTCATTTGATATGATGCGCCCCG	CTTCCCGATA
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAAATTA	ATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCA	AGTTCACGTA

Secuencias promotoras consenso

TTGACAT
-35

TATAAT
-10
Caja de Pribnow

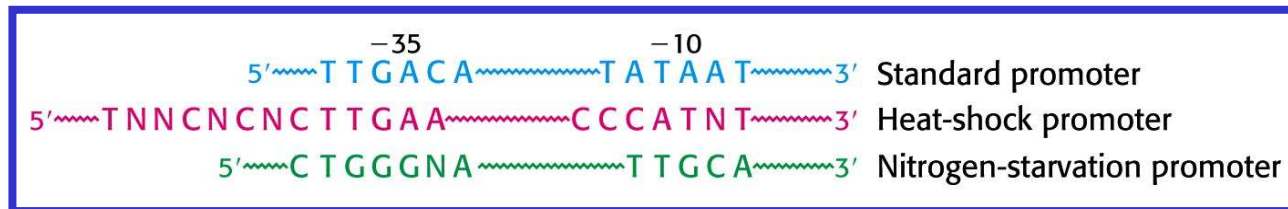
CAT
↑
1ª base transcrita

El estudio de muchas regiones promotoras de diferentes genes permite determinar secuencias que aparecen con mayor frecuencia : **Secuencias promotoras consenso**

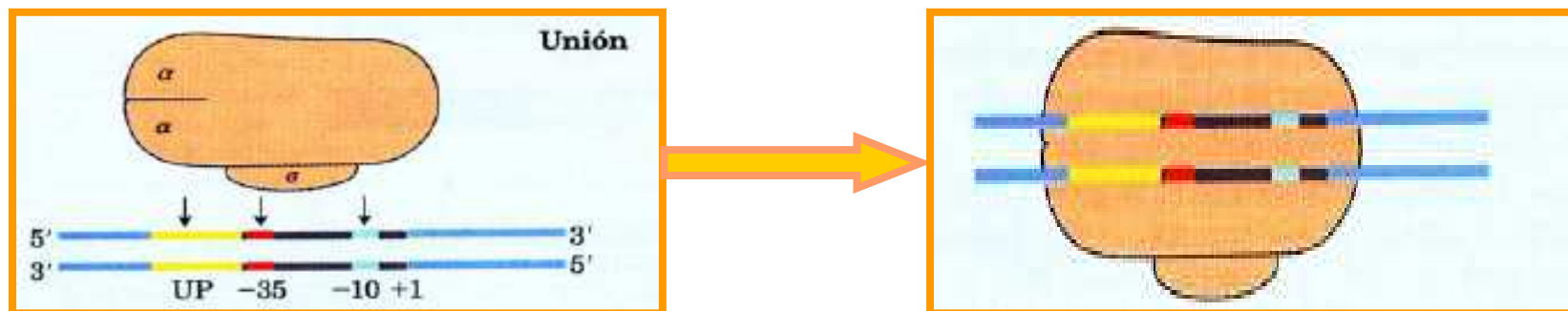
INICIACIÓN

Existen en *E. coli* **múltiples factores σ** que reconocen los diversos tipos de promotores contenidos en su ADN:

- $\sigma 70$ (70kd) reconoce las regiones -35 y -10.
- $\sigma 32$ reconoce el promotor de los **genes de choque térmico**
- $\sigma 54$ reconoce el promotor de los **genes implicados en la asimilación de N** , ...



El **factor σ** desempeña un papel crucial en la determinación del inicio de la transcripción por la RNA polimerasa.



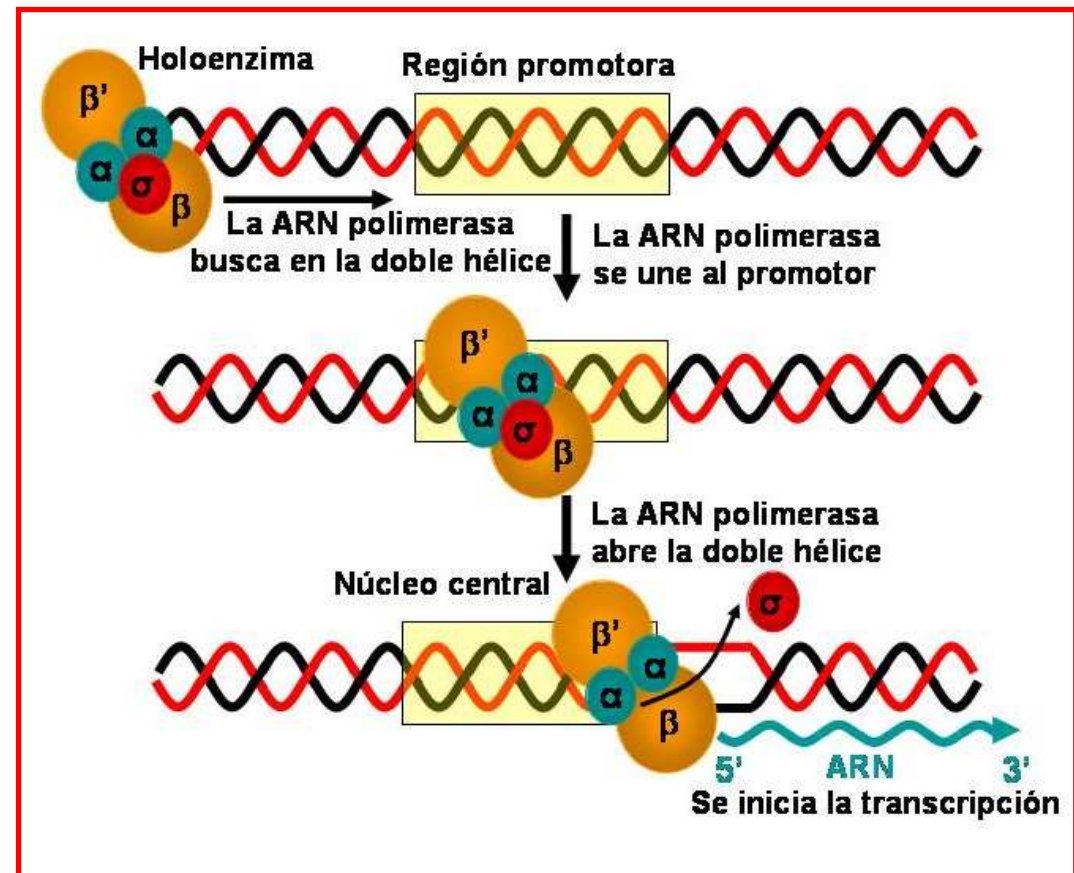
INICIACIÓN

1. **Unión débil** de la ARN polimerasa al ADN y **desplazamiento** por el ADN en **búsqueda de promotores**.

2. Detección de las secuencias -35 y -10 (subunidad σ). Proceso rápido (**complejo promotor cerrado**, ADN sin desenrollar).

3. La ARN polimerasa comienza a separar las dos hélices por la región -10 (rica en pares AT). El **desenrollamiento** implica a 17 bases.

4. Formación del **complejo promotor abierto** (muy estable) e inicio de la transcripción:



- La subunidad α se une a **secuencias reguladoras**.
- La subunidad β se une a los ribonucleótidos trifosfatos y **forma enlaces fosfodiésteres**.
2 sitios de unión de NTPs: **Sitio de iniciación** (preferentemente A,G) y **Sitio de elongación**
- La subunidad β' se une al **molde de ADN**. *Hebra sin sentido (-)*.

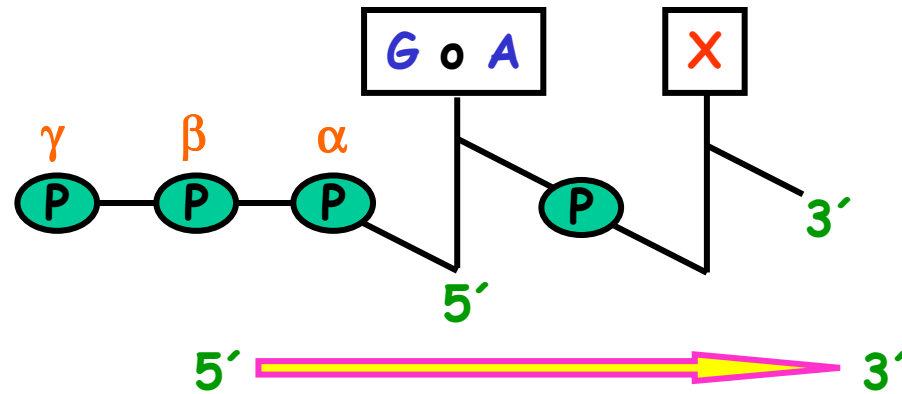
5. Tras la polimerización de 6-10 nucleótidos la **subunidad σ** se separa de la holoenzima y va en busca de nuevos promotores, mientras que el **núcleo de la polimerasa** sigue añadiendo nucleótidos.

Transcripción en procariontas.

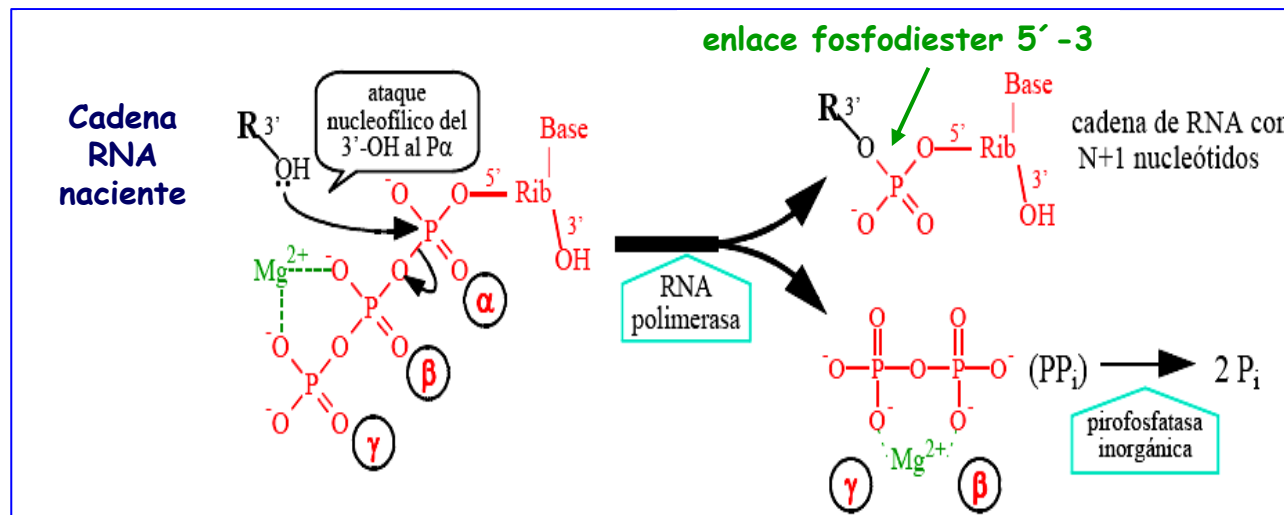
INICIACIÓN

La ARN polimerasa **no necesita un cebador** para iniciar la polimerización.

Las cadenas de RNA comienzan en el extremo 5' con una purina triP, **pppG** o **pppA**.



Mecanismo: El grupo 3'-OH de nucleótido de la cadena naciente ataca al P- α del nucleótido entrante y se forma un **enlace fosfodiéster 5'-3'**.

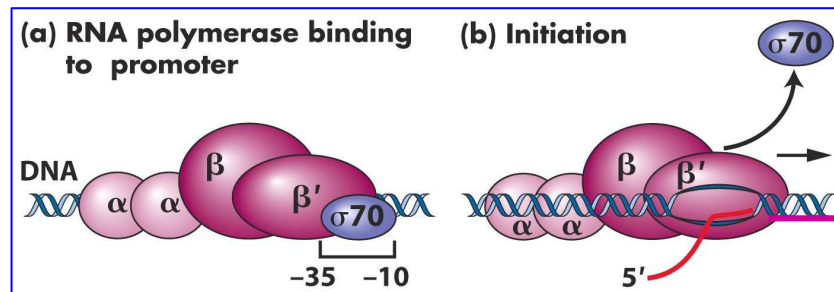


Transcripción en procariontas.

ELONGACIÓN

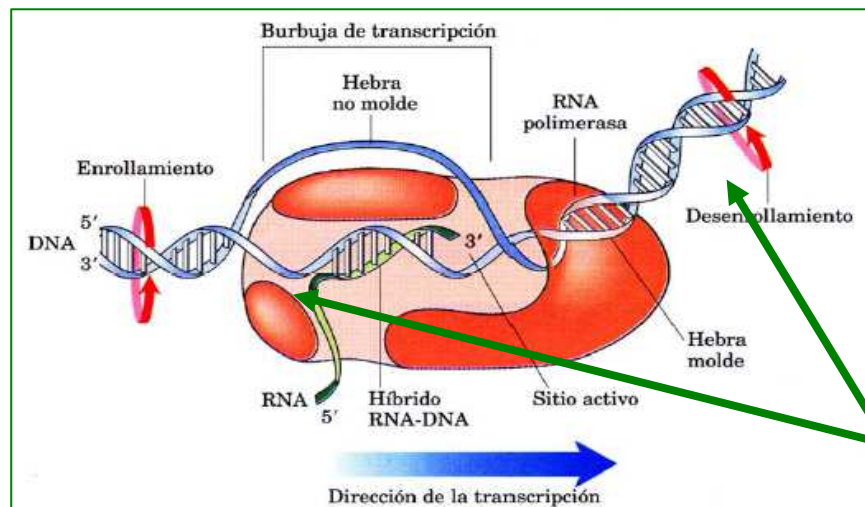
La elongación comienza tras la formación del primer enlace fosfodiéster.

Tras la polimerización de 6-10 nucleótidos la subunidad σ se separa de la holoenzima.



Despeje
del promotor

Híbrido **ADN-ARN** (8-10 pb). (Estructura de A-DNA)



La **BURBUJA DE TRANSCRIPCIÓN** (ARN polimerasa, ADN molde y ARN naciente), se desplaza a lo largo de la molécula de ADN.

La longitud del **híbrido ADN-ARN** y del **ADN desenrollado** permanecen constantes a medida que la burbuja avanza

La molécula de ADN debe de ir desenrollándose por delante de la burbuja y enrollándose por detrás. Catalizado por la **topoisomerasa II** (DNA girasa).

La ARN polimerasa tiene una **pobre actividad nucleasa** y su tasa de error es de $1/10^4$ - 10^5 bases.

TERMINACIÓN

- Se paraliza la formación de enlaces fosfodiésteres.
- Se separa el híbrido **ARN-ADN**.
- Se rebobina el ADN y se libera la ARN polimerasa.

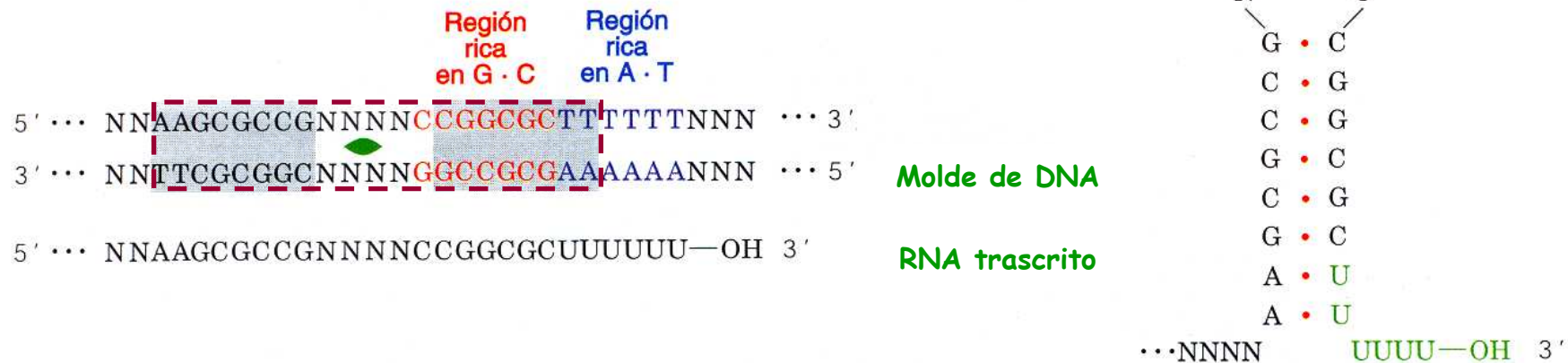
¿ Cómo ocurre la terminación de la transcripción ?

Dos formas diferentes según sea o no dependiente del **factor proteico rho (ρ)**

TERMINACIÓN

A: Terminación independiente de rho (ρ)

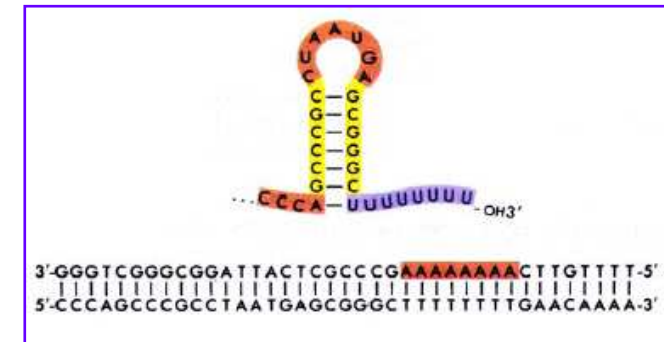
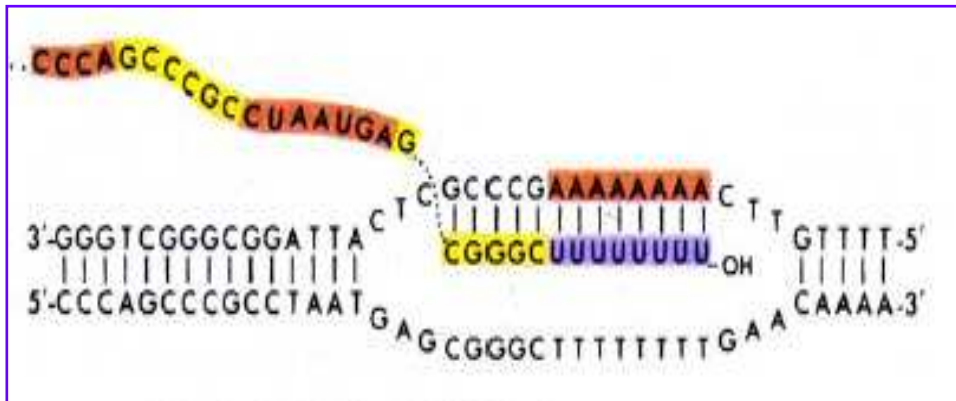
Existen **secuencias de parada** en el ADN: **Región palindrómica rica en GC** que precede a otra rica en AT.



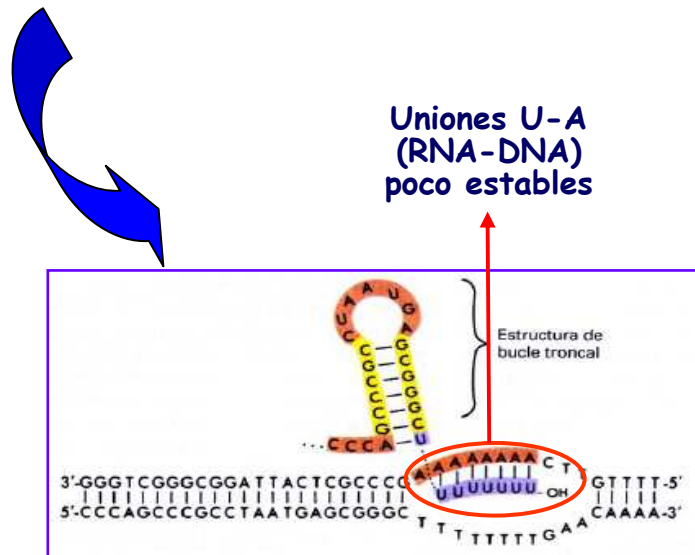
El transcrito forma una **estructura en horquilla** (debido a la complementariedad de bases en la **región palindrómica**), seguida de una **cola de poli U** \longrightarrow actúa como señal para la separación de la ARN polimerasa y terminación de la transcripción

TERMINACIÓN

A: Terminación independiente de rho (ρ)



Separación del híbrido ADN-ARN y liberación de la molécula de ARN.



El transcrito forma una estructura en horquilla, seguida de una cola de poli U

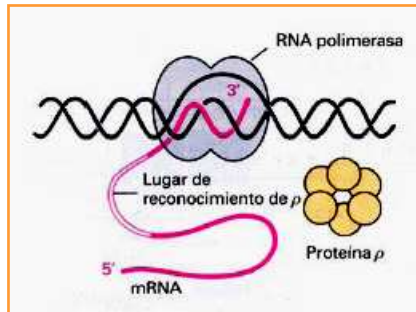
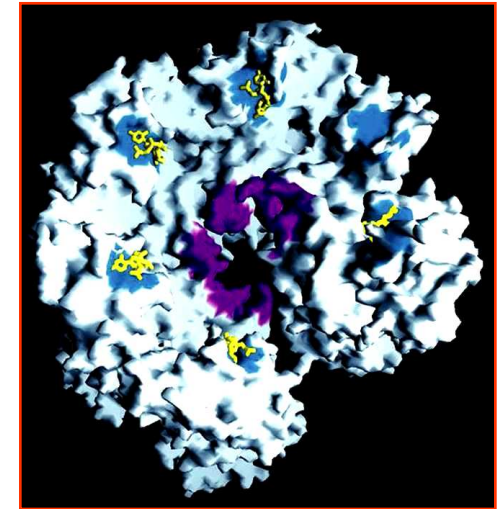
Cierre de la burbuja de transcripción.

Holoenzima sin la subunidad σ menos afinidad por el ADN bicatenario, por lo que se separa del ADN.

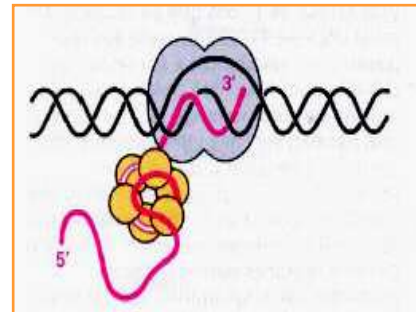
TERMINACIÓN

A: Terminación dependiente de rho (ρ)

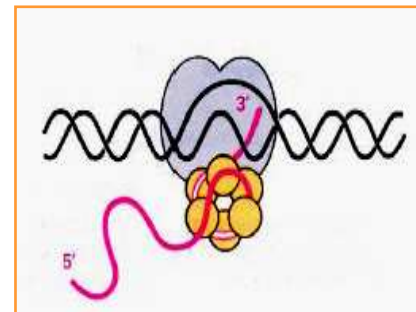
El factor rho tiene una estructura **hexamérica** y actividad **ATPasa**



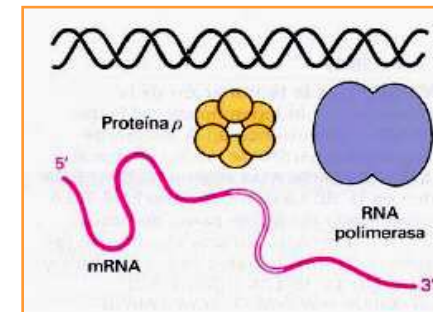
Unión de rho al ARN



Unión a una secuencia de **72 nucleótidos** (12 por subunidad) y se activa.



La actividad **ATPasa** permite su **desplazamiento** a lo largo de la hebra de ARN

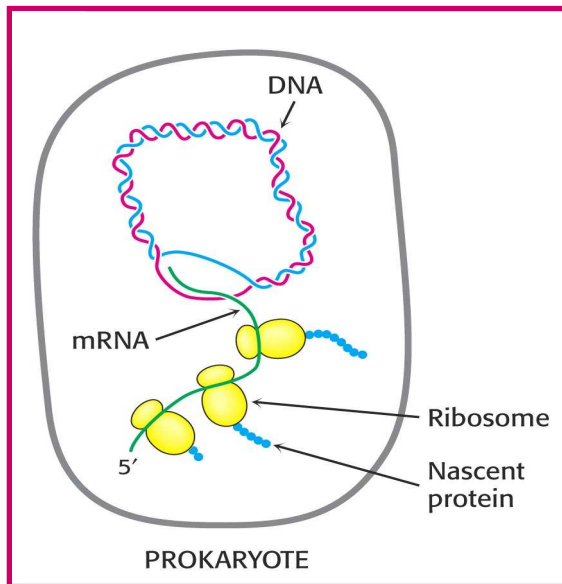


Debilita la interacción entre el molde y el transcrito provocando su separación

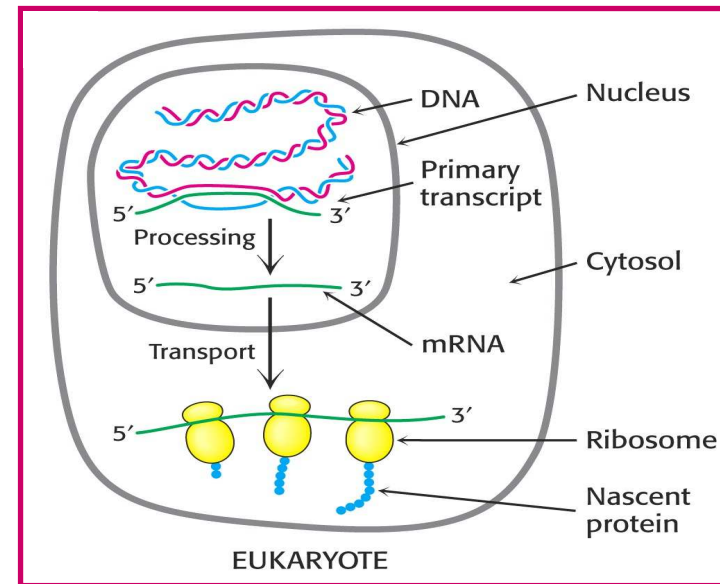
Transcripción en eucariotas

Mucho mas compleja que en procaritas:

- En la célula eucariota, la transcripción tiene lugar **en el núcleo** (membrana nuclear) y la traducción en el citoplasma.
- En eucariotas **la cromatina** que contiene la secuencia promotora tiene que ser accesible a la maquinaria de transcripción.
- En eucariotas la transcripción la realizan **3 tipos de RNA polimerasas**
- La célula eucariota tiene una **regulación de la transcripción mas compleja**, en la que participan numerosos **factores de transcripción**.
- El ARN eucariota sufre un extenso proceso de **procesamiento y maduración**.



La transcripción y la traducción son procesos simultáneos.

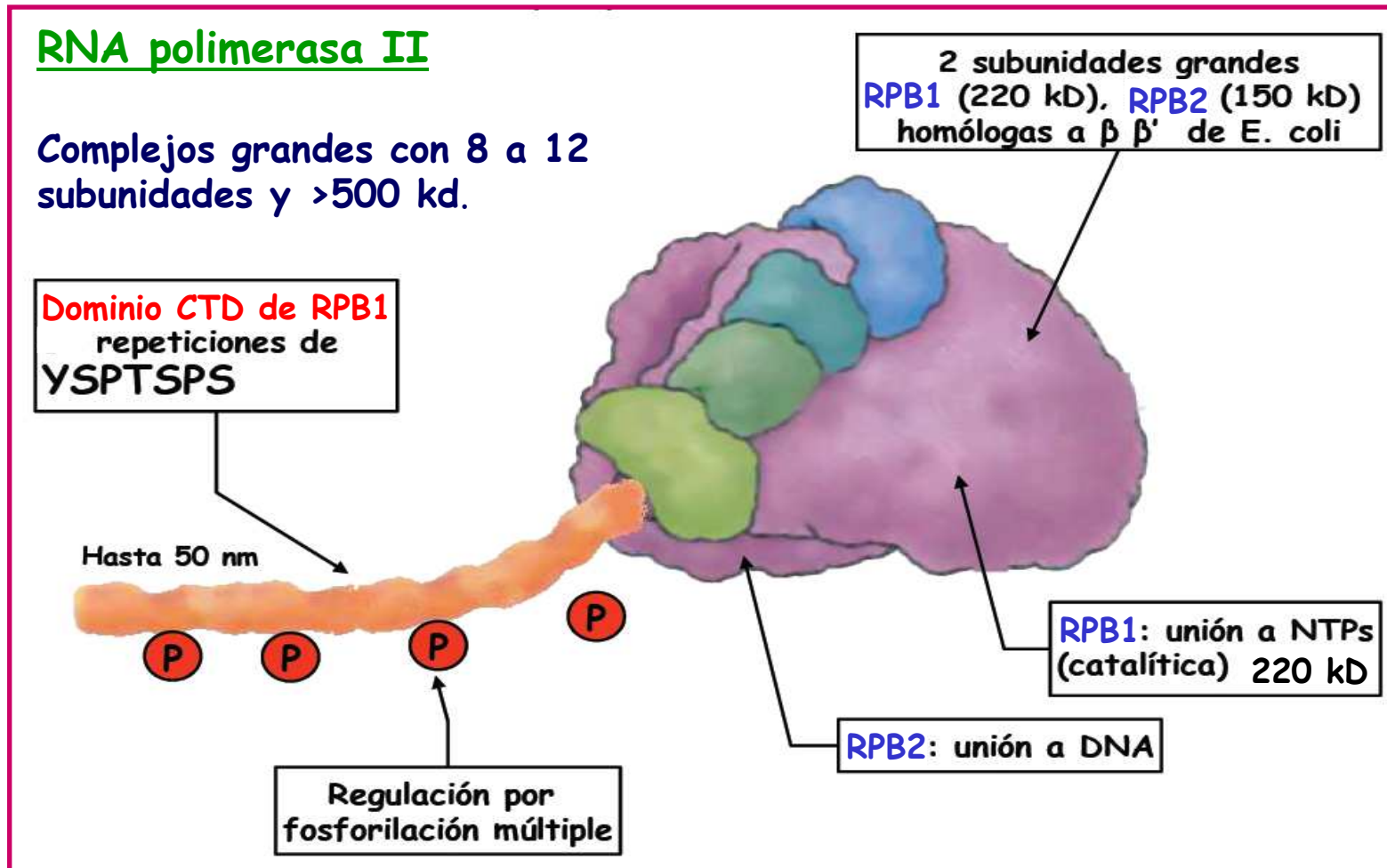


La transcripción y la traducción no son procesos simultáneos.

En eucariotas la transcripción la realizan **3 tipos de RNA polimerasas.**

* RNA polimerasa I	Nucleolo	ARNr de 18S, 5,8S y 28S
* RNA polimerasa II	Nucleoplasma	Precursores del mRNA y snRNA
* RNA polimerasa III	Nucleoplasma	ARNt y ARNr de 5S

Cada polimerasa reconoce promotores con características específicas



Dominio CTD: dominio carboxilo terminal de RPB1 con múltiples repeticiones de la secuencia YSPTSPS, regulable por fosforilación. Participan en el reconocimiento de **señales de activación** y en la **iniciación de la Transcripción**.

- CTD no fosforilado, RNAPol II **puede iniciar** la transcripción pero no puede elongar
- CTD fosforilado, RNAPol II **puede elongar** pero no iniciar

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

En eucariotas los **nucleosomas reprimen** la transcripción de todos los genes. Sólo los genes activados son transcritos

Activación de genes para la transcripción:

1. Unión del **Promotor** al Aparato Básico de Transcripción.
Intervención de **factores de transcripción**.
2. Acción de **Coactivadores**. Comunicación entre RNA Pol II y Transactivadores
3. Acción de **Transactivadores**: Unión a **Secuencias Potenciadoras (Enhancers)**

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

Promotores

Los **promotores** de la RNA poli II se localizan en el lado 5' del centro de iniciación de la transcripción:

- **TATA box** hacia el nucleótido -25. En la mayoría de los promotores de ARNm
- Otras secuencias entre las posiciones -40 y -110 (**caja GC** y **caja CAAT**)



La ARN polimerasa II **no es capaz de reconocer** a los promotores. Necesita **factores de transcripción** para la iniciación: **TFII (A, B, C, D, ..)**

Los **factores de transcripción** se unen primero a una **secuencia específica del DNA**, y luego se unen entre ellos y a **la RNA polimerasa**.

Transcripción en eucariotas

Iniciación

- La ARN polimerasa II no es capaz de reconocer a los promotores. En consecuencia necesita de factores de transcripción para la iniciación

PASOS:

Para la INICIACIÓN es necesario el ensamblaje del APARATO BÁSICO de TRANSCRIPCIÓN

APARATO BÁSICO DE TRANSCRIPCIÓN: formado por la RNAPolII y los FACTORES GENERALES DE TRANSCRIPCIÓN Estos factores se denominan *TFII....*

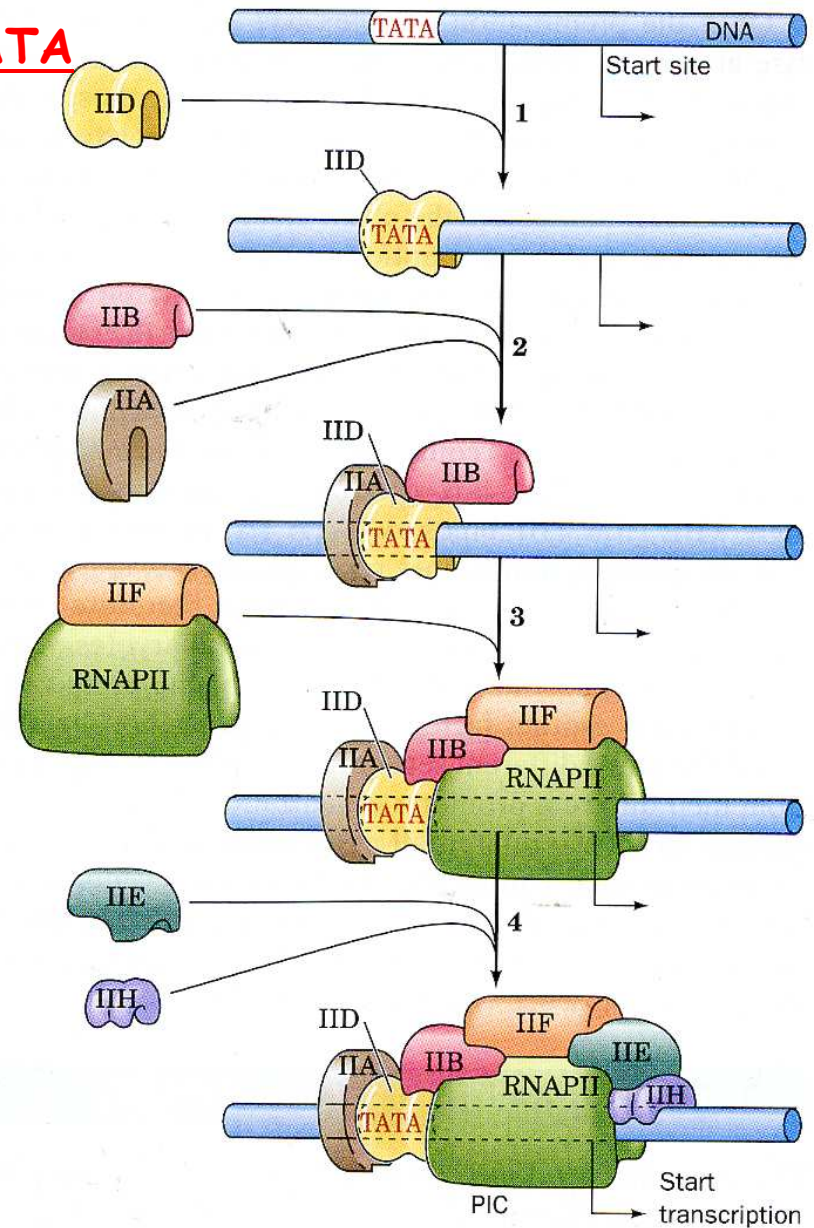
Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

Factores de transcripción e Iniciación en TATA

- Unión del factor **TFIID** al compartimento **TATA**.
- Unión consecutiva de los factores **TFIIA**, **TFIIB** al compartimento **TATA**.
- Reclutamiento de **RNAPol II** unida a **TFIIF**
- 4. Formación del **complejo cerrado de transcripción** mediante la unión de **TFIIE** y de **TFIIH**

TFIIH {

- Abre la doble hélice (**helicasa**)
- Fosforila CTD (**quinasa**)
- Promueve la separación de la RNAPol del promotor para **iniciar la transcripción**



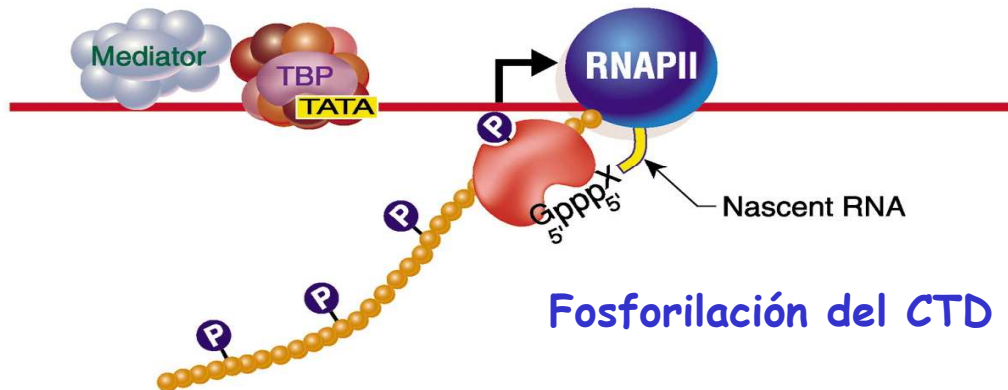
INICIACIÓN

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción



Apertura del promotor

CTD desfosforilado y unido a los mediadores y componentes del Aparato Básico de Transcripción. Tras la apertura del promotor se inicia la transcripción.



Fosforilación del CTD

La fosforilación del CTD promueve la separación de la RNAPol II del promotor. La elongación del RNA nascente continua.

El Complejo de transcripción basal no es suficiente para conseguir una alta velocidad en la síntesis de ARNm. En eucariotas, existen en el DNA **secuencias intensificadoras (enhancers)** que incrementan la expresión de un gen unas 100 veces **participando en el inicio de la transcripción**. También existen **secuencias inhibidoras (represoras)**, con efecto opuesto.

Estas secuencias pueden ejercer su efecto sobre **promotores situados a miles de pares de bases de distancia**.

Transactivadores

Proteínas Modulares que contienen;

1. Dominios de unión al DNA (**enhancers**)
2. Dominios de unión a factores Transcripcionales
Coactivadores

Coactivadores

Para el ensamblaje del Aparato básico de Transcripción son necesarios los coactivadores.

1. Interacción con RNA pol. II y transactivadores
2. Modificación de las histonas por: acetilación (histone acetyltransferases or HAT's.), metilación, fosforilación, etc.
Remodelan la cromatina

.

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

Transactivadores:

Son proteínas de unión a Secuencias Potenciadoras (Enhancers).

Aumentan la frecuencia de iniciación de Pol II via CO-ACTIVADORES

Tienen 2 dominios:

- dominio de unión a secuencia potenciadora del DNA
- Dominio de unión a factores transcripcionales Co-Activadores

Coactivadores

Son necesarios para el ensamblaje del Aparato básico de Transcripción.

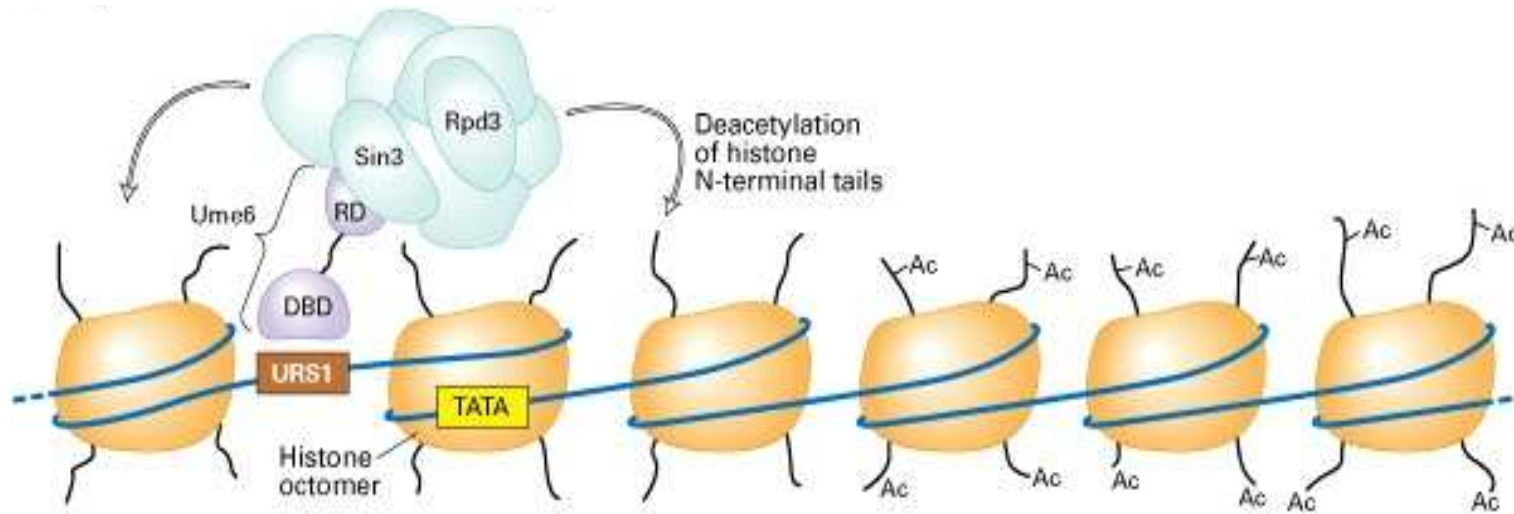
Permiten la comunicación entre RNA pol II y Transactivadores: Integran señales de los activadores y represores de la transcripción e interaccionan con los factores de transcripción basal

2 tipos:

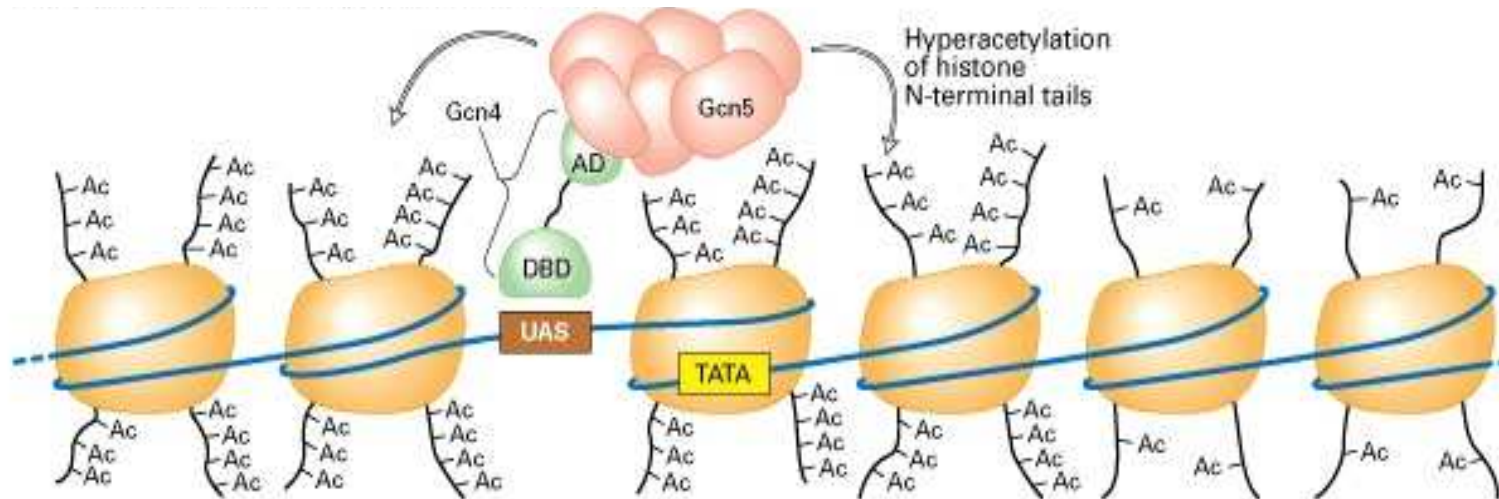
- a) Remodelan la cromatina: Modifican las histonas por acetilación (histone acetyltransferases or HAT's) , metilación, fosforilación.....
- b) Interacción con RNA pol. II.

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

Desacetilación de histonas mediada por represores



Acetilación de histonas mediada por activadores



Activación de la transcripción en eucariotas

Paso 1: DNA-binding transactivators (DBTs) se unen a las secuencias intensificadoras (enhancer sequences).



Paso 2: DBTs unen a los coactivadores con actividad HAT (Histona Acetil Transferasa) permitiendo la remodelación de la cromatina.



Paso 3: DBTs también interactúan con el TFIID permitiendo que la TBP se una a la TATA box.

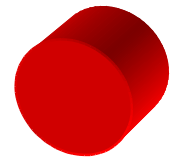


Paso 4: Unión de la RNA pol II y formación del complejo básico de transcripción

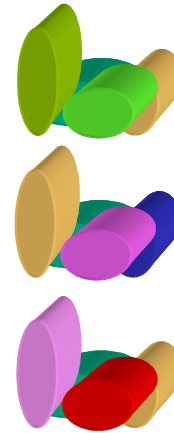


Paso 5: Iniciación de la transcripción

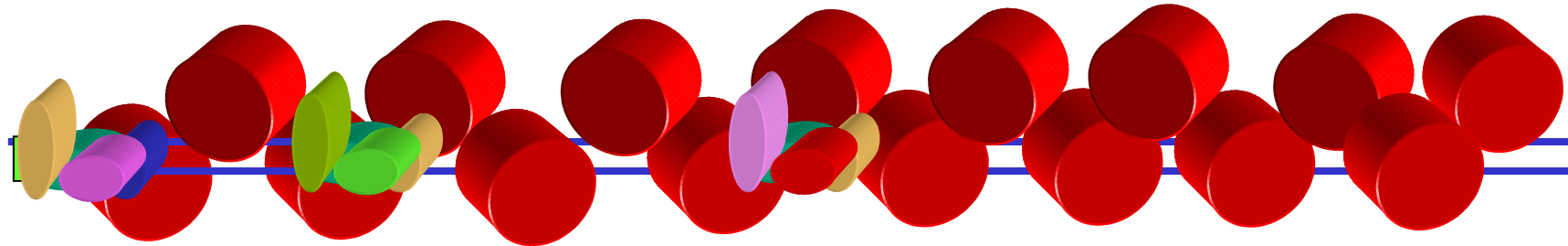
Resumen de la activación transcripcional de eucariotas

 = Histonas

 = Enhancers

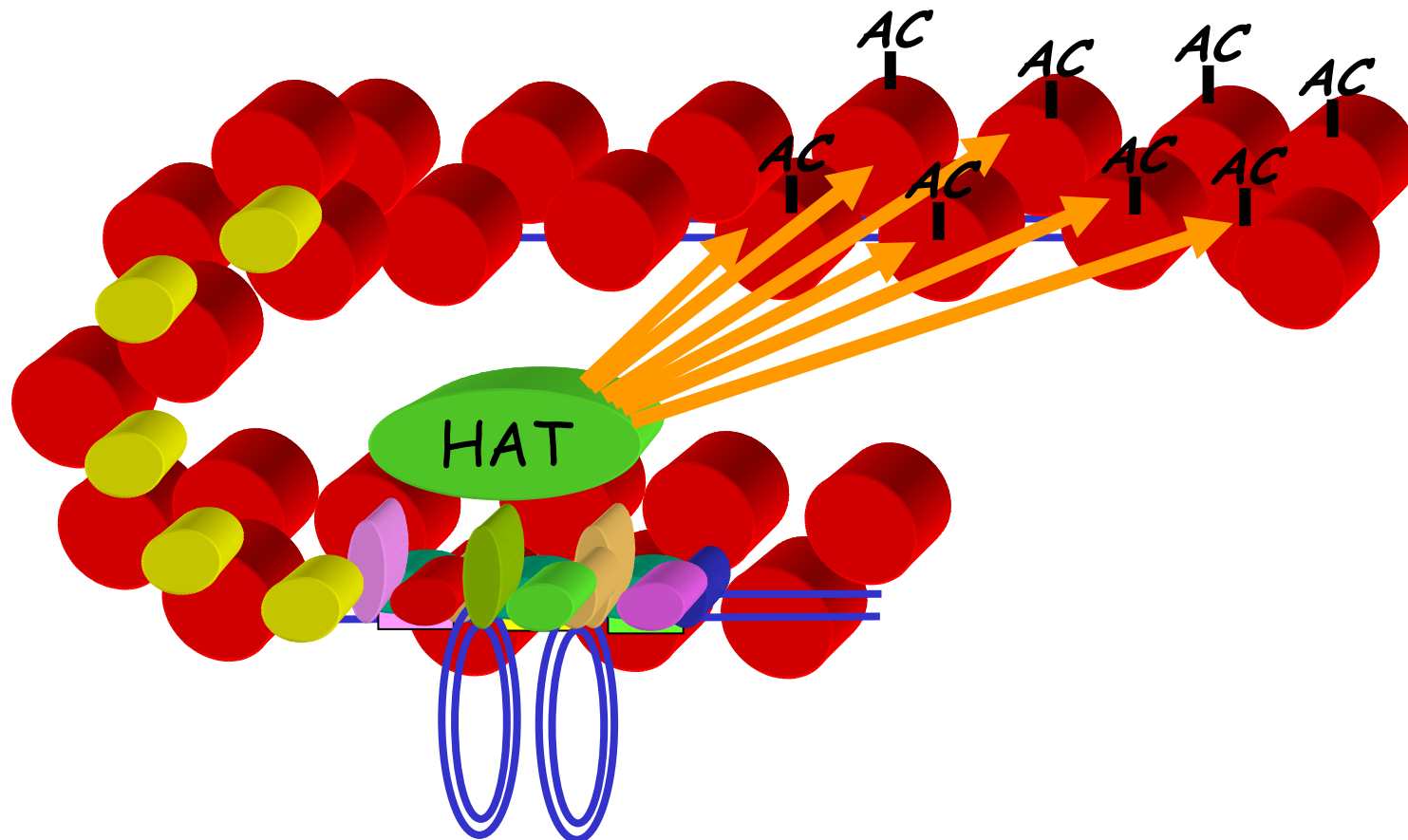


=proteinas
transactivadoras

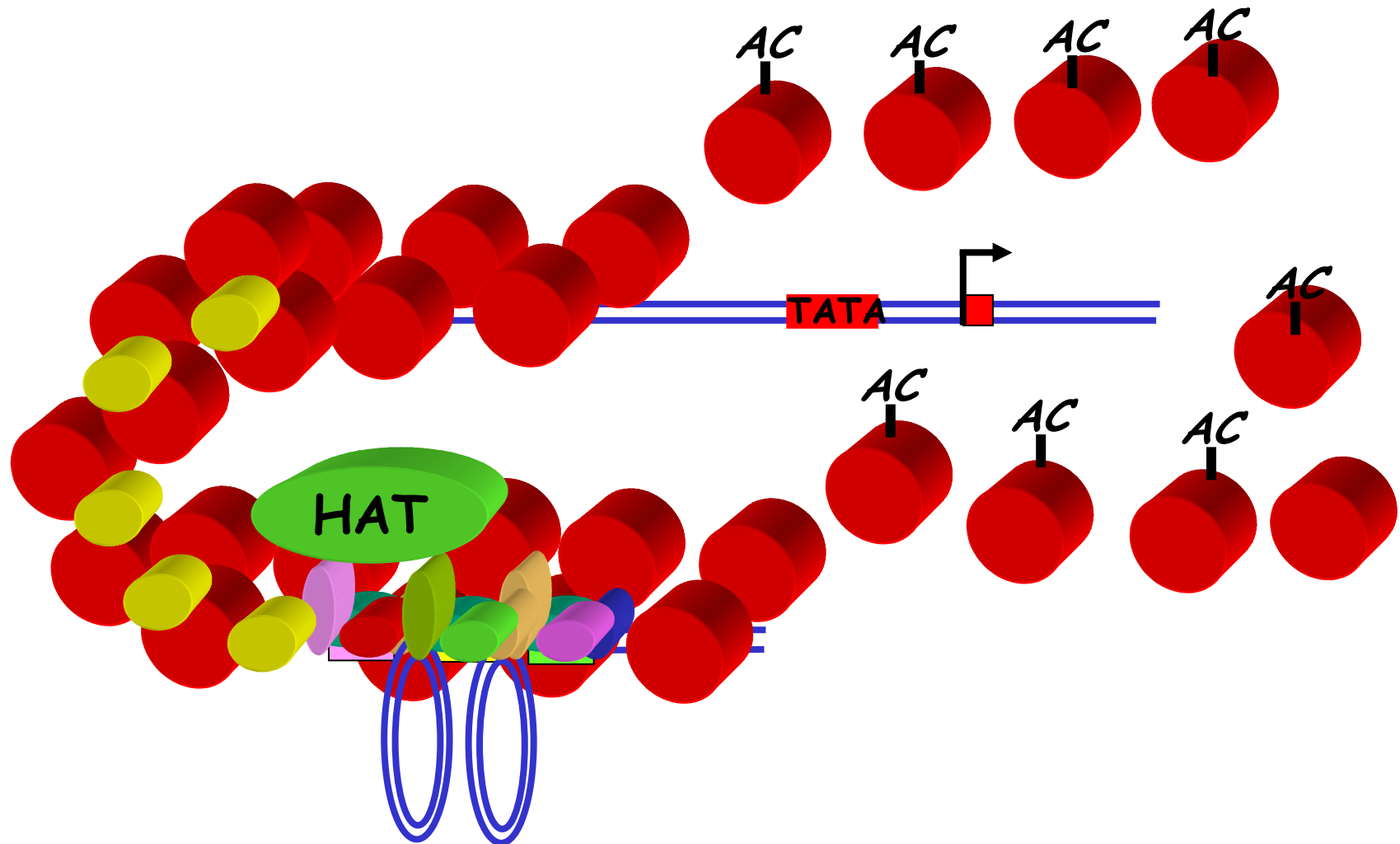


Resumen de la activación transcripcional de eucariotas

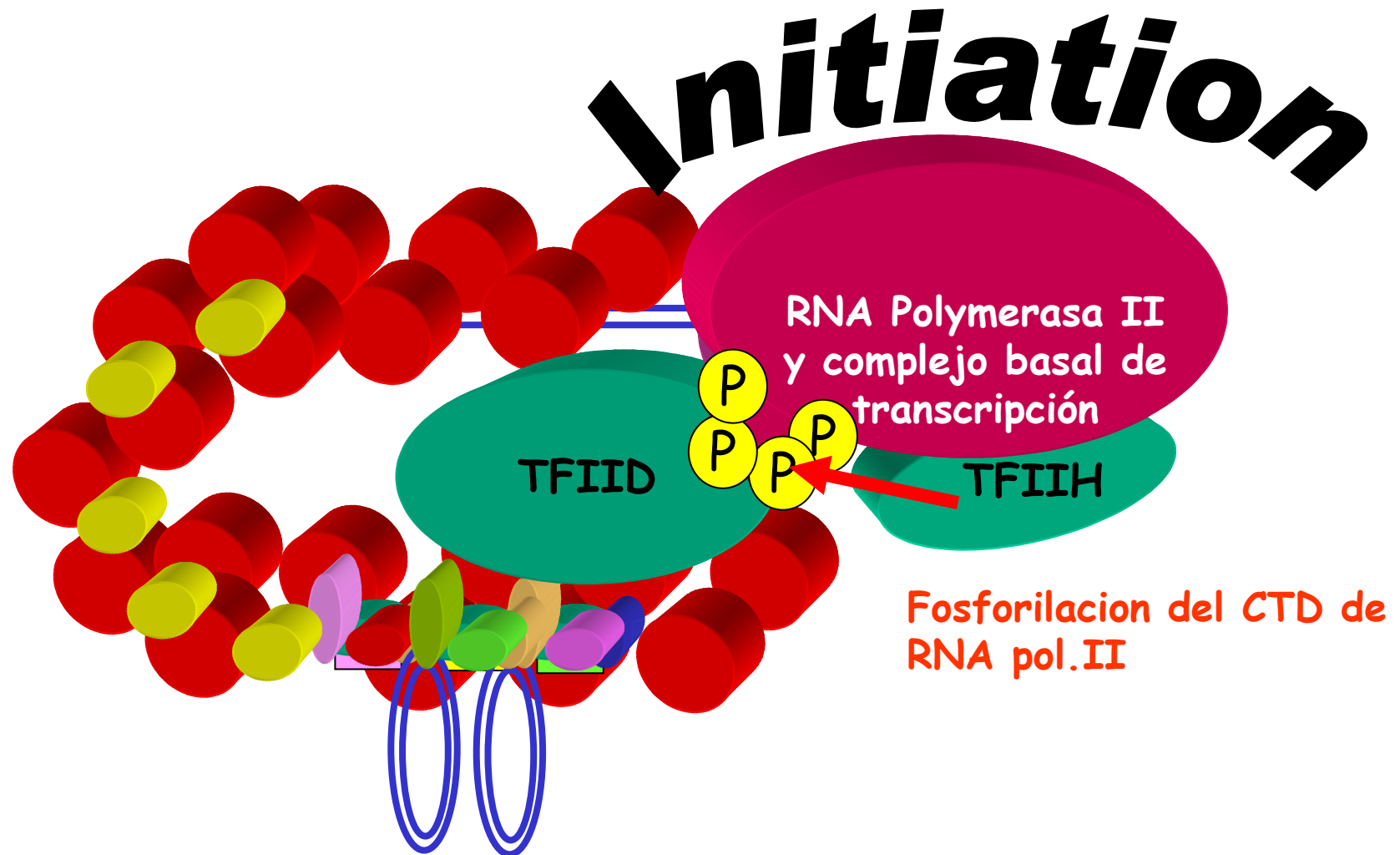
 = proteínas HGM



Resumen de la activación transcripcional de eucariotas



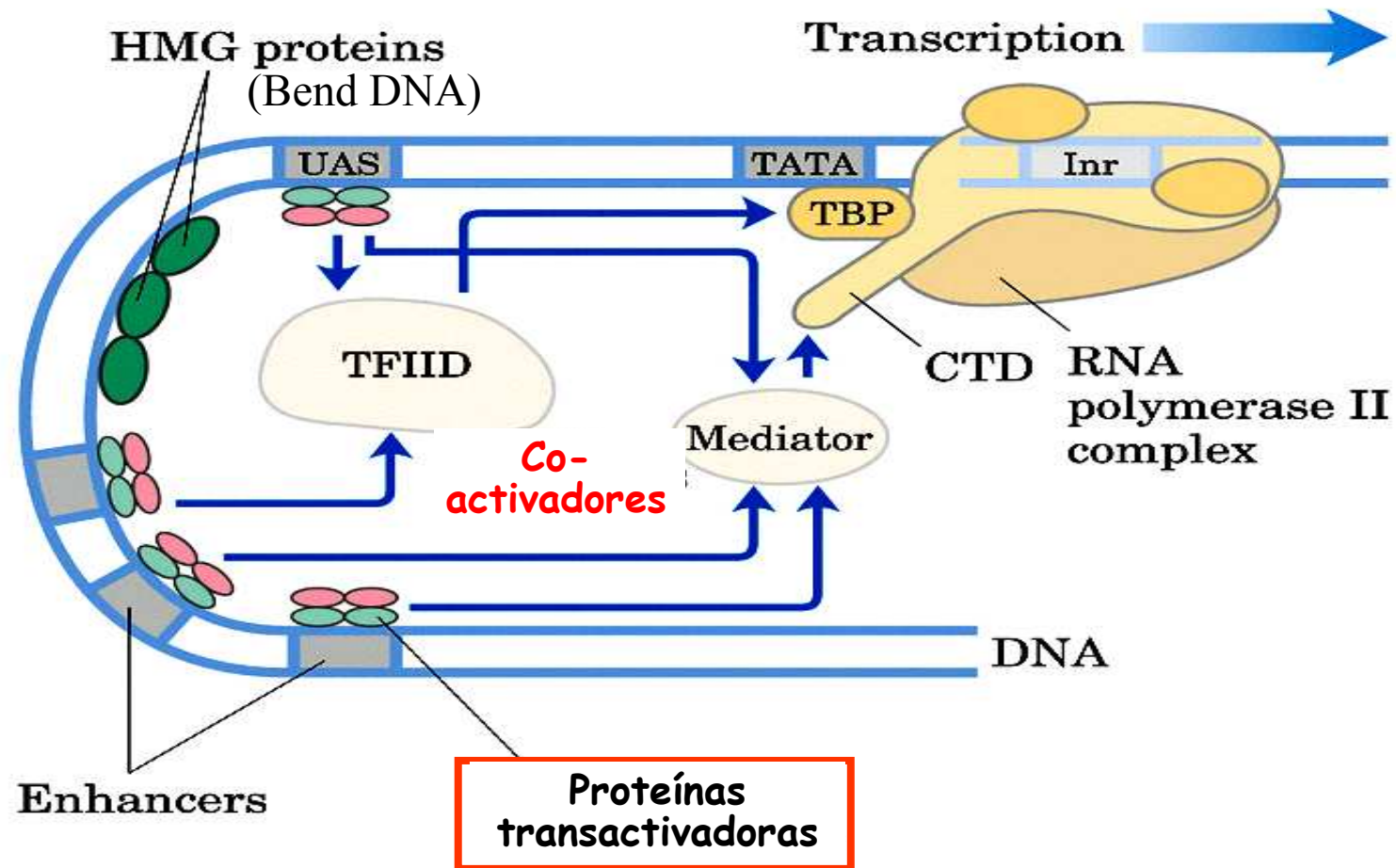
Resumen de la activación transcripcional de eucariotas



INICIACIÓN

Factores Generales de iniciación y Aparato Básico de Transcripción

El modelo mas aceptado es la **formación de un bucle** que permite que el potenciador y el Promotor se acerquen en espacio



Transcripción en Eucariotas

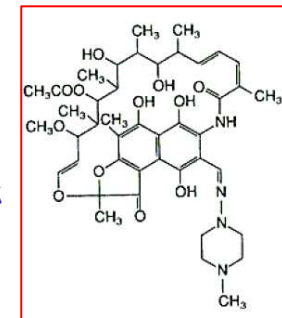
Elongación y Terminación

- * La transcripción en eucariotas también suele empezar por A o G.
- * La terminación es poco conocida en eucariotas.
- * En algunos transcritos existe la estructura en horquilla seguida de la secuencia de residuos de uracilo.
- * La mayoría de los ARN mensajeros eucariotas experimentan procesos de maduración como la adición de una cola de poli-A en el extremo 3' y otras modificaciones.

Inhibidores de la transcripción

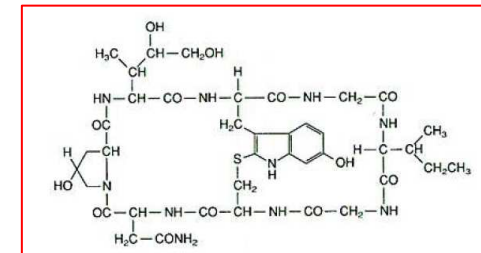
Rifamicina B (*Streptomyces mediterranei*). Rifampicina (derivado semisintético).

Antibiótico que inhibe la RNA polimerasa procariota pero no la eucariota. Bloquea la elongación por unión a la subunidad β e impide el desalojo del promotor.



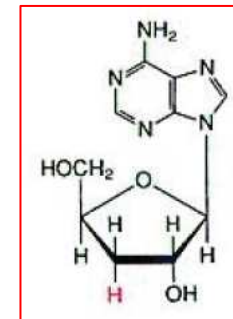
α -Amanitina.

Toxina contenida en la seta *Amanita phalloides* (octapéptido). Inhibe predominantemente la RNA polimerasa II. Forma con ella un complejo 1:1 e impide la elongación.



Cordicepina (hongo *Cordyceps*).

Antibiótico antitumoral terminador de cadena de la transcripción. Se incorpora a la cadena en crecimiento y la para, ya que carece del grupo 3'-OH a partir del cuál continuar la elongación.



Actinomicina D (*Streptomyces*).

Se une al DNA de doble hélice de forma fuerte y específica. Inhibe la transcripción y la replicación. Además de su uso como antibiótico también se usa en carcinoterapia.

