

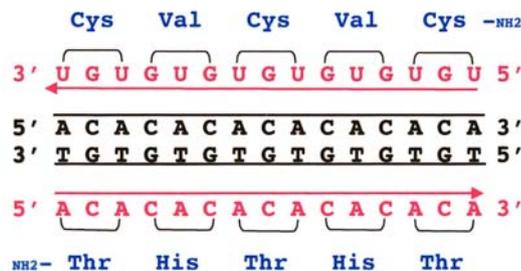
Tema 13. Síntesis y maduración del RNA.

Tipos y estructuras de RNAs. RNA polimerasas en los organismos procariontes y eucariotes. Promotores. Mecanismo de iniciación de la transcripción. Elongación. Terminación. Síntesis de RNA en seres eucariotes. Factores de transcripción. Secuencias intensificadoras. Antibióticos inhibidores de la transcripción. Procesamiento del RNA: caperuzas, colas de poliadenilato, empalme de RNA mensajero, RNA catalítico.

BIOQUÍMICA-1º de Medicina
Dpto. Biología Molecular
Isabel Andrés



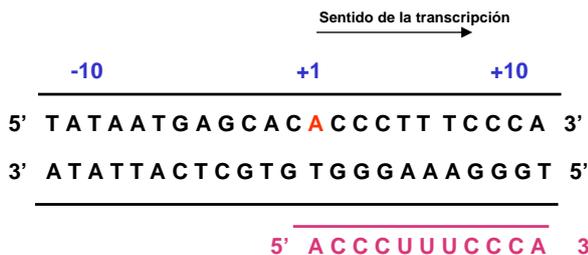
Generalidades sobre la transcripción



¿Cómo se transcribe el DNA?

Solo se transcribe una de las dos cadenas de DNA. La única excepción son algunos virus que presentan genes solapantes. Esto es relevante porque las dos cadenas de DNA de un gen no codifican la misma proteína

¿Cómo se numeran y nombran las cadenas de DNA de un gen?



cadena codificante (no es la cadena molde pero tiene idéntica composición de bases que el RNA)
cadena sin sentido (es la que usa la RNApol como molde para sintetizar el transcrito)

+1: primer nucleótido que se transcribe. Todos los transcritos comienzan con A
Los nt que están en 5' del sitio de inicio se numeran como -
Los nt que están en 3' (son los que se transcriben) se numeran como +



Generalidades sobre los transcritos

1) Tipos de transcritos



(a) Monocistrico

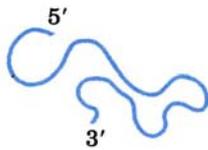
El RNA sintetizado contiene la información de un único gen
En los organismos eucariotas los genes que codifican proteínas son monocistricos



(b) Policistrico

El RNA sintetizado contiene la información de varios genes
En los organismos eucariotas los rRNAs y los tRNAs se forman a partir de transcritos policistricos
Los mRNAs, exceptuando los de las histonas,, provienen de genes monocistricos

2) Tipos de RNAs que se originan en la transcripción



mRNA
>100 nt - miles nt



rRNA
120 nt 5S
160 nt 5,8S
1900 nt 18S
4700 nt 28S



tRNA
73 - 93 nt

sRNAs {
scRNAs
snRNAs 100-200 nt
miRNAs 20-25 nt

RNA polimerasa de *E.coli*

TABLA 33-1
Subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*

Subunidad	Gen	Número	Masa (kd)	Función
$\left[\begin{array}{c} \alpha \\ \beta \\ \beta' \\ \sigma^{70} \end{array} \right]$ <small>SS DNA</small> / <small>DS DNA</small>	<i>rpoA</i>	2	37	Se une a secuencias reguladoras
	<i>rpoB</i>	1	151	Forma enlaces fosfodiéster
	<i>rpoC</i>	1	155	Se une al DNA molde
	<i>rpoD</i>	1	70	Reconoce al promotor e inicia la síntesis

“Bioquímica”. 4ª ed. Stryer, L. Ed. W.H. Reverté.1995

HOLOENZIMA

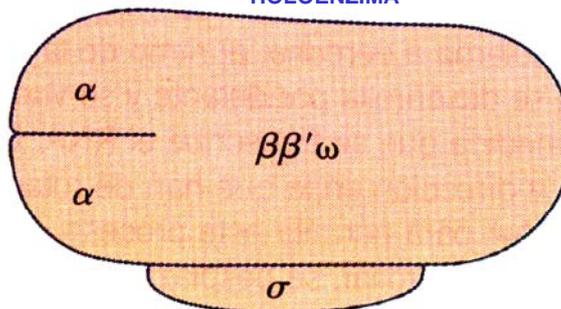


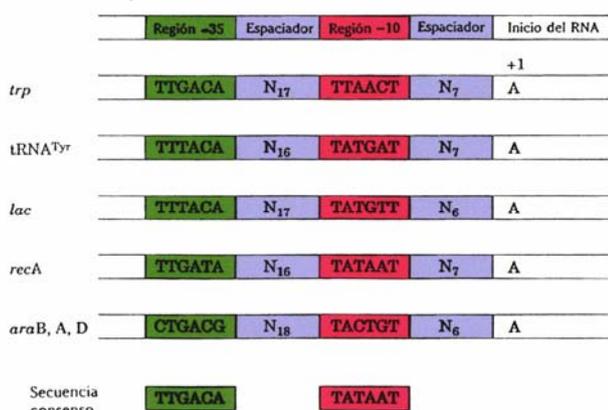
TABLA 28.3. Propiedades comparativas de las RNA polimerasas eucariotas

Polimerasa	Localización	RNA sintetizados
I	Núcleo (nucléolo)	Pre-rRNA (excepto 5S)
II	Núcleo	Pre-mRNA, algunos otros RNA nucleares pequeños
III	Núcleo	Pre-tRNA, rRNA 5S, otros RNA pequeños
Mitocondrial ^a	Mitocondria	Mitocondrial

^a muy semejante a la RNA polimerasa procariota.

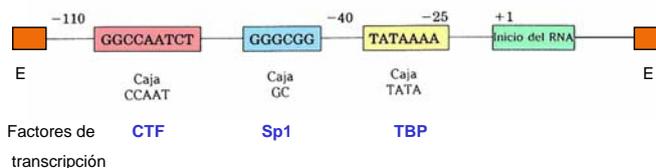
Secuencias promotoras de las RNA polimerasas

PROMOTORES PROCARIOTAS

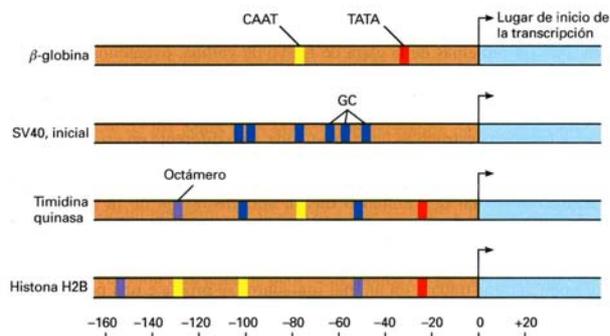


En los promotores eucariotas, que son mucho más complejos que los procariotas, se encuentran diferentes combinaciones de cajas reguladoras de la expresión. Las cajas GC son más frecuentes en genes constitutivos. Las cajas TATA lo son en genes inducibles. Todas estas cajas están situadas en una región de unos pocos cientos de bp situadas en 5' del gen.

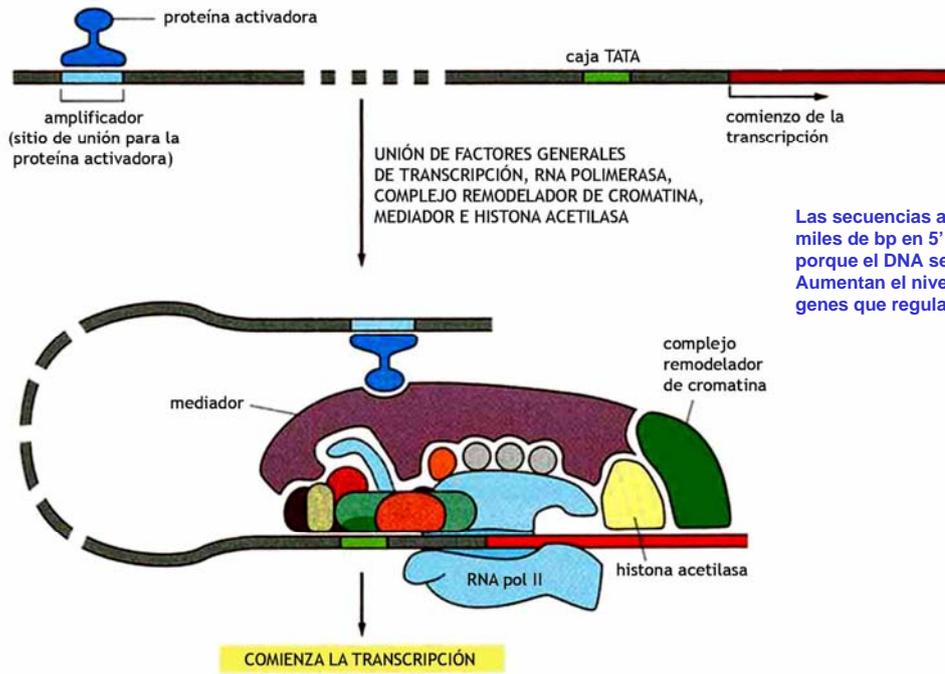
PROMOTORES EUCARIOTAS



Secuencias Intensificadoras o amplificadoras (E): aparecen en 5' y 3' del gen. Pueden estar situadas a varios miles de bp del inicio de la transcripción. Incrementan en gran medida la expresión del gen. Algunos son responsables de la expresión específica de tejido de un gen.

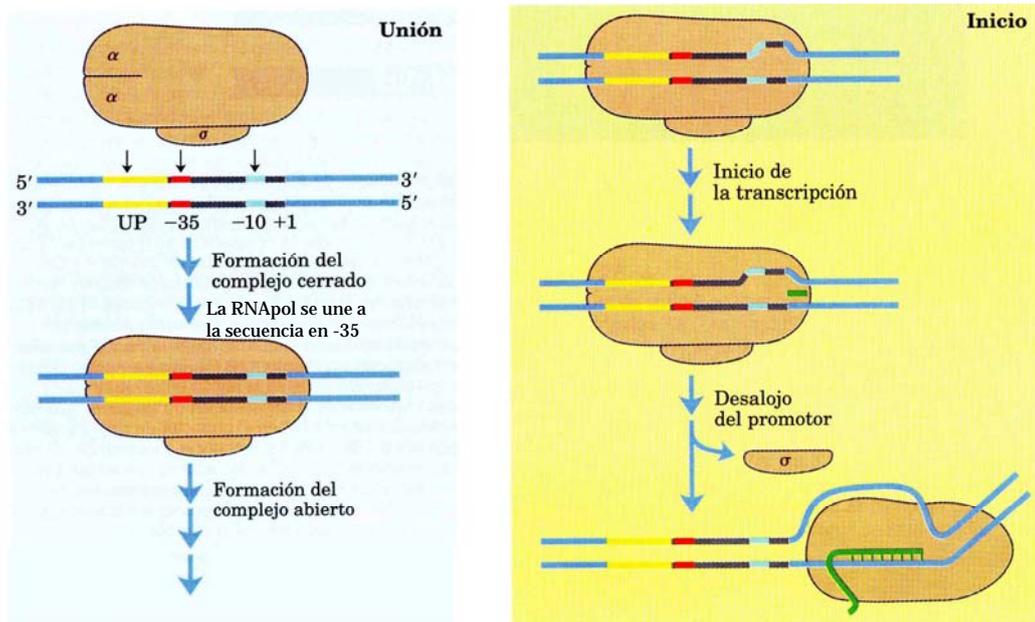


Secuencias intensificadoras o amplificadoras



Las secuencias amplificadoras actúan a miles de bp en 5' y 3' de los promotores porque el DNA se curva y se dobla. Aumentan el nivel de transcripción de los genes que regulan

Iniciación de la transcripción en organismos procariotas



La RNAPol se desliza hasta la secuencia -10 y desenrolla 17 bp para permitir la lectura de la secuencia de bases de la cadena molde y que comience la transcripción

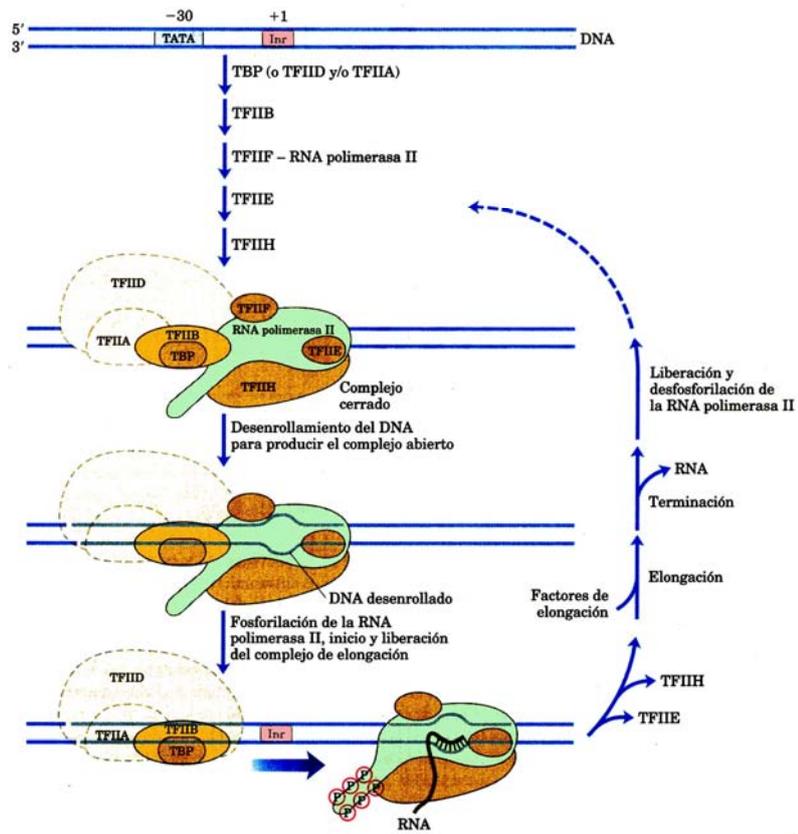
Iniciación de la transcripción en organismos eucariotas

La RNAPol II, por si sola, es incapaz de reconocer las secuencias promotoras y comenzar la transcripción. Para hacerlo necesita unirse a los factores de transcripción generales.

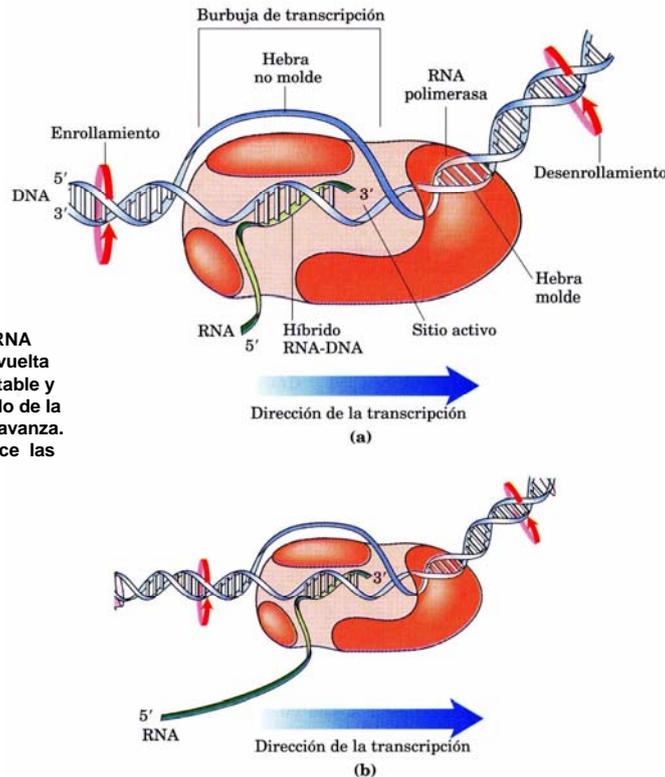
La unión a TBP y a TFIID es crucial para la formación del complejo cerrado.

La actividad helicasa de TFIIH lo transforma en el complejo abierto.

Por último la fosforilación de su extremo carboxitèrmino permite que comience a transcribir.



Elongación de la transcripción

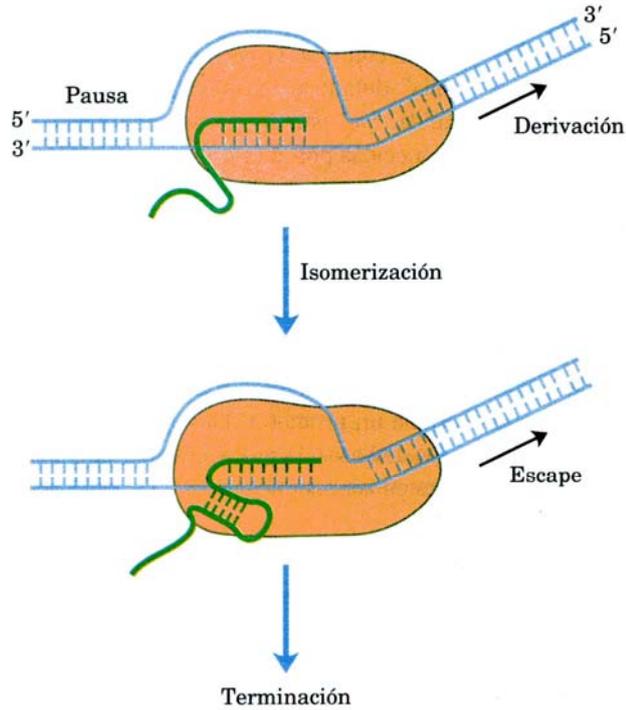


Se va formando un dúplex DNA-RNA de 12 bp (aproximadamente una vuelta de hélice). El dúplex es muy inestable y la cadena de RNA se va separando de la de DNA a medida que la RNAPol avanza. A medida que el dúplex se deshace las dos cadenas de DNA vuelven a restablecer la doble hélice



Terminación de la transcripción

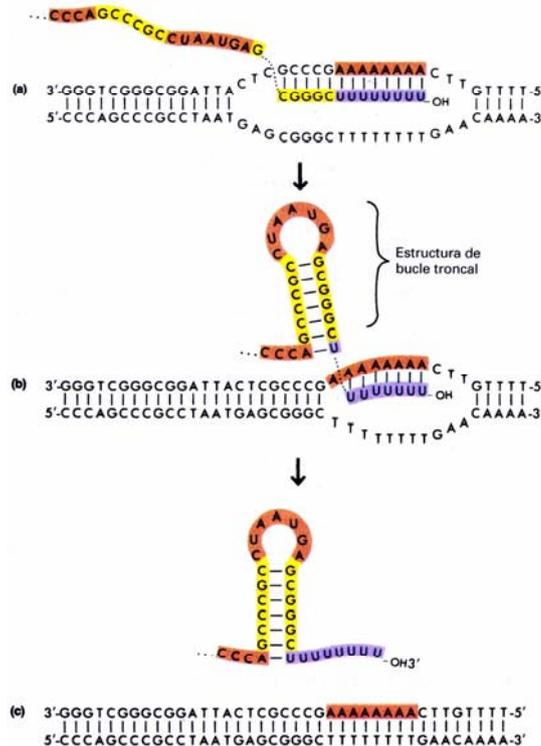
El hecho determinante para que termine la transcripción es que la RNAPol se detenga.



La detención se produce cuando en el transcrito en formación se forma una estructura de bucle con tallo por la presencia de una secuencia palindrómica en el gen.

Terminación de la transcripción

1) Terminación rho (ρ) independiente

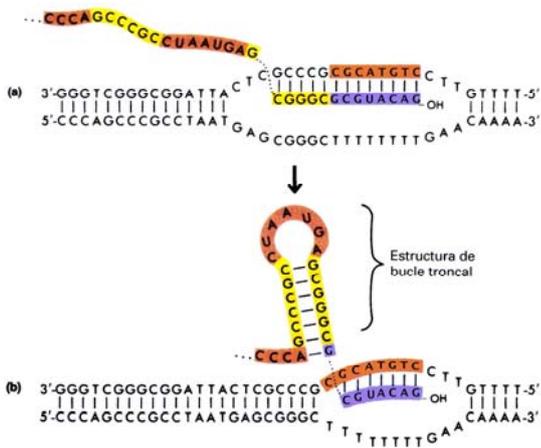


Todos Los terminadores de la transcripción son secuencias palindrómicas (en amarillo) autocomplementarias interrumpidas por una secuencia que no lo es. Esto hace que el RNA transcrito forme una estructura de bucle con tallo que hace detenerse a la RNAPol.

Los terminadores ρ independientes presentan después de la secuencia palindrómica una serie seguida de Adenosinas (por lo menos 6) que al ser transcritas originan una serie de Us. El duplex A - U es muy inestable y el transcrito de RNA se libera espontáneamente.

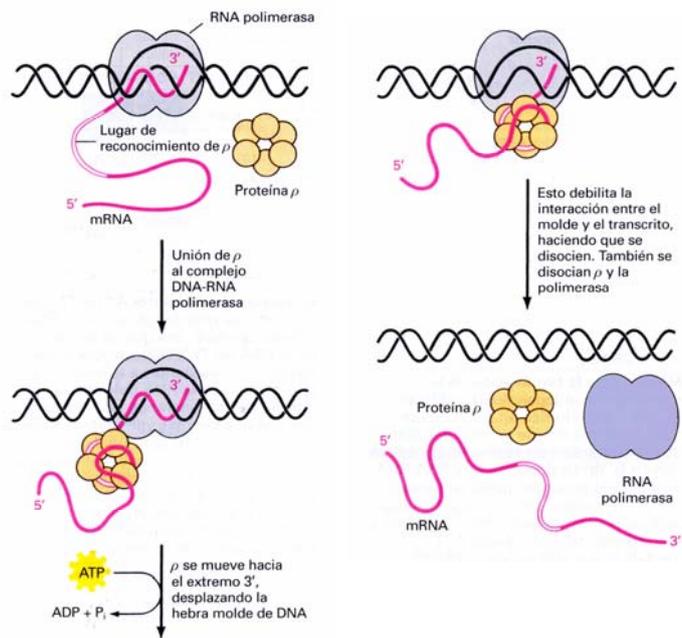
Terminación de la transcripción

2) Terminación rho (ρ) dependiente

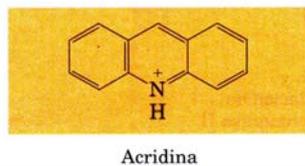
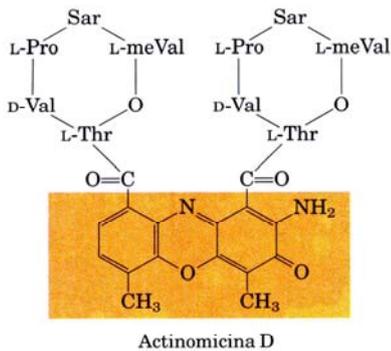


La secuencia palindrómica no está seguida de una serie de varias Adeninas, si no que tiene una región rica en CA. No se produce la liberación espontánea del transcrito y es necesaria la intervención de la proteína (rho) para deshacer el duplex DNA-RNA. ρ es una helicasa que utilizando la energía de hidrólisis del ATP se desplaza hacia el duplex de DNA-RNA y lo deshace permitiendo que el transcrito se libere

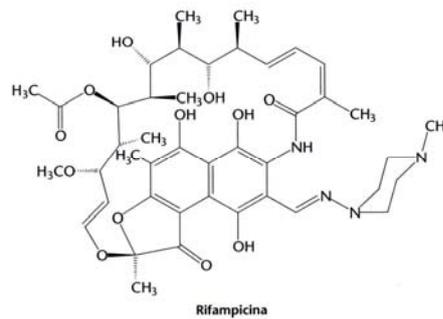
Actuación de la proteína ρ



Inhibidores de la transcripción



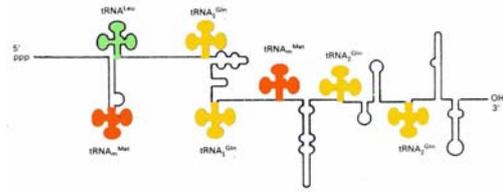
La estructura plana del anillo cíclico, semejante al de la acridina, que presenta la Actinomicina D le permite intercalarse entre pares de bases contiguas del DNA impidiendo que pueda pasar la RNAPol II de eucariotas y la RNAPol I de eucariotas. Las dos estructuras peptídicas cíclicas se unen al surco menor de la doble hélice. Este efecto lo tiene tanto en organismos procariontas como en eucariotas, por eso se utiliza como antibiótico y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer



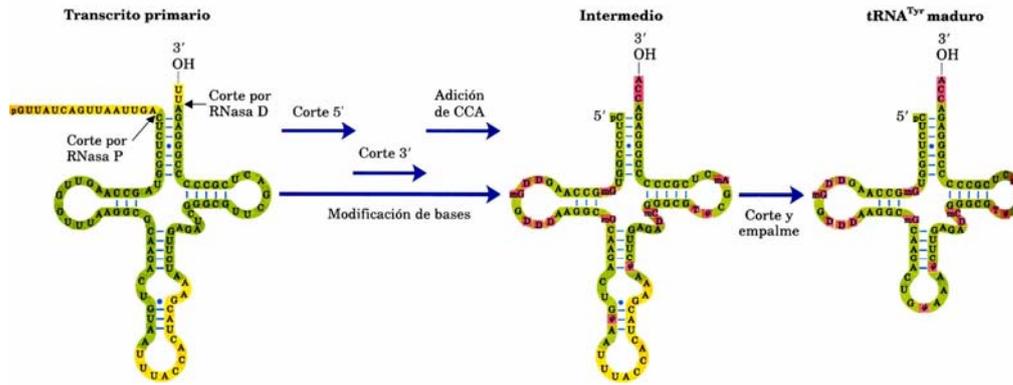
La rifampicina inhibe la iniciación de la transcripción. Interfiere con la formación de los primeros enlaces fosfodiéster al bloquear el canal por donde debe pasar el duplex DNA-RNA. Solo tiene este efecto en los organismos procariontas. Se utiliza como antibiótico.



Procesamiento de tRNAs en organismos eucariotas

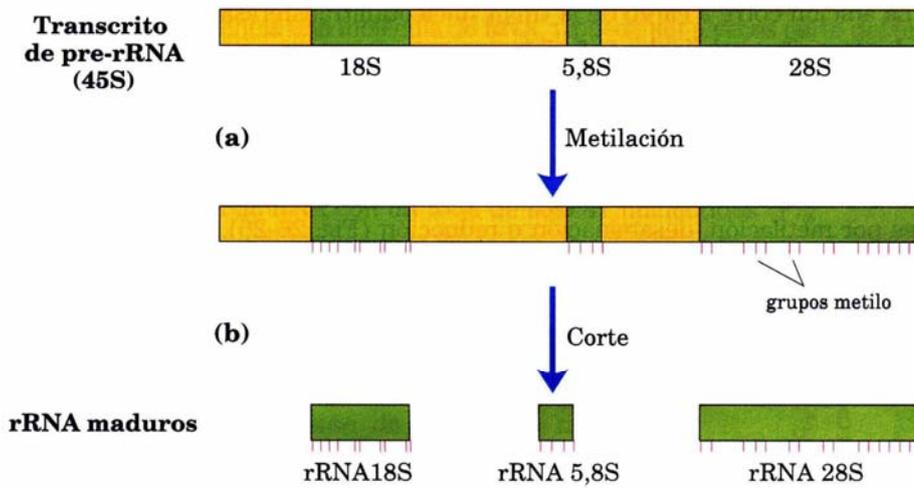


Tránsito policistrónico de tRNAs

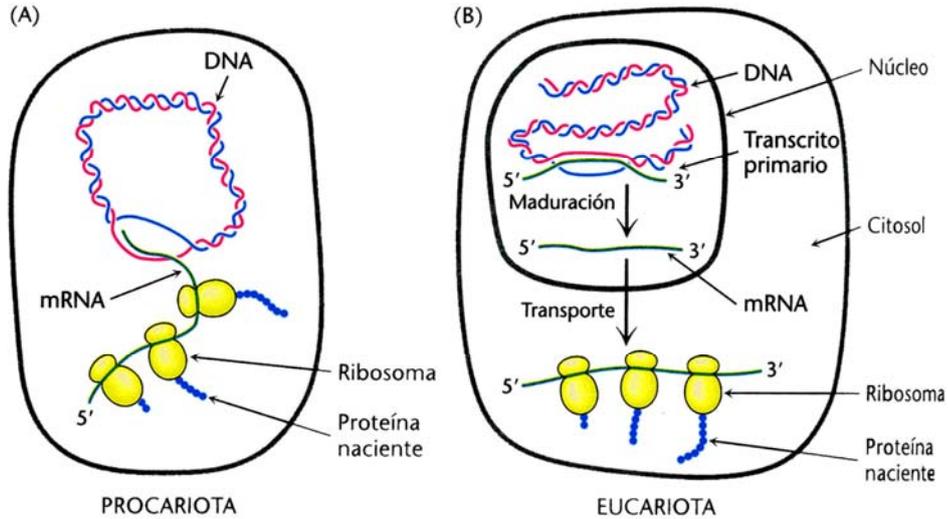


Procesamiento de rRNAs

Procesamiento en vertebrados



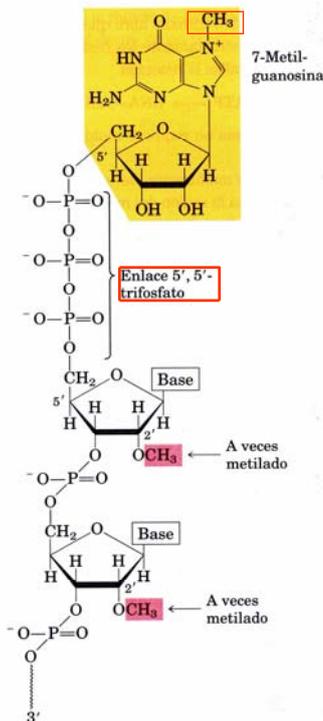
Diferencias en los procesos de transcripción y traducción entre organismos procariotas y eucariotas



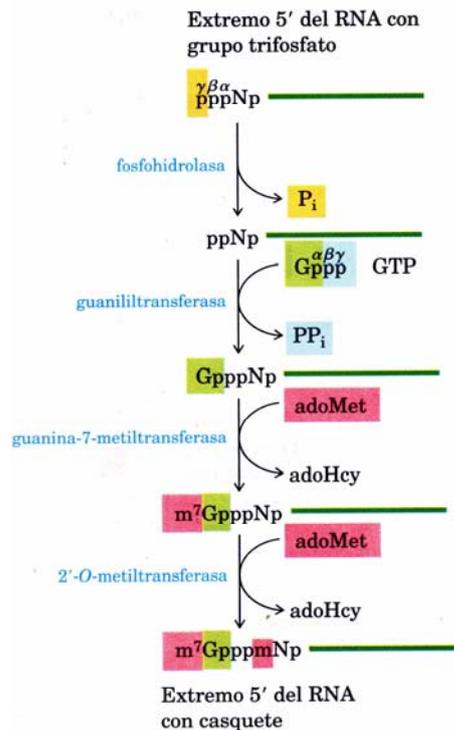
En los organismos procariotas, que carecen de membrana nuclear que separa el material genético del citoplasma, los mRNA son accesibles para los ribosomas desde el momento en que comienzan a ser sintetizados. La transcripción y la traducción son procesos simultáneos. Los mRNAs procariotas son mRNAs maduros desde que comienzan a ser sintetizados. Los mRNAs eucariotas se sintetizan en el interior del núcleo celular como hnRNAs y antes de alcanzar el citoplasma son procesados para transformarse en los mRNAs maduros.

Adición de la caperuza al mRNA

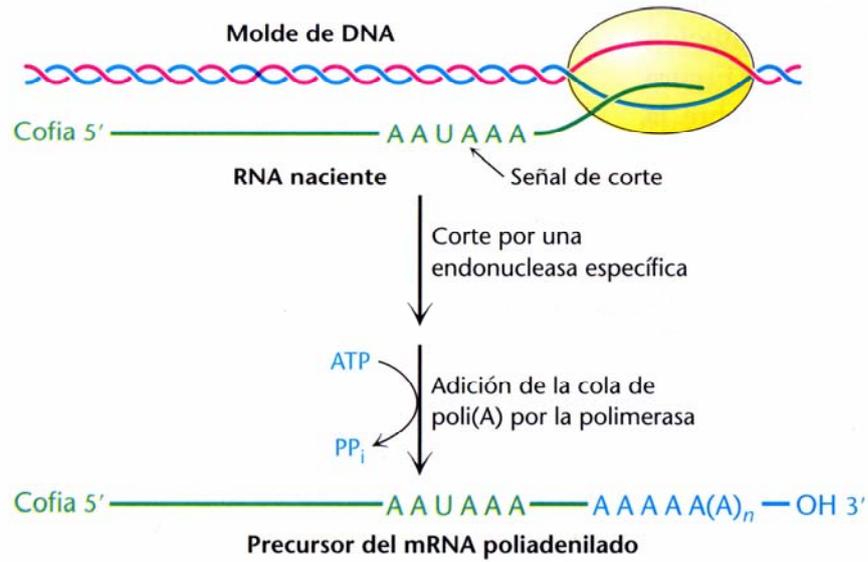
Estructura de la caperuza



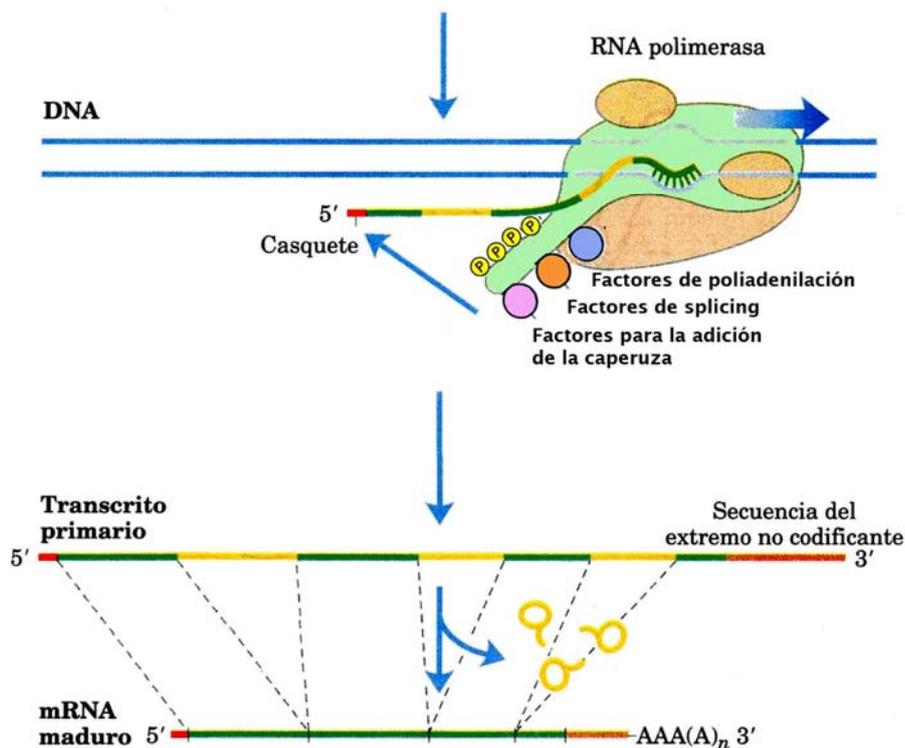
Formación de la caperuza



Adición de la cola de poli Adenosina a los mRNAs eucariotas



La RNA polimerasa II como fábrica de RNAs



Se considera así porque el procesamiento completo de los transcritos primarios de la RNApol II lo realizan proteínas que van unidas a su dominio carboxi-terminal (CTD) :

-Los tres enzimas necesarios para la formación de la caperuza en el extremo 5'

-Los componentes del espliceosoma que van a marcar los límites entre intrones y exones y que posteriormente realizarán la rotura y el empalme de los exones

-Dos proteínas auxiliares necesarias para la poliadenilación, que son transferidas desde el dominio CTD de la RNApol a las secuencias en 3' del RNA.

A estas proteínas se unen los enzimas necesarios para el corte del RNA y su poliadenilación.

Cuando la RNApol se separa del transcrito este está totalmente procesado y listo para ser transportado fuera del núcleo

Splicing de hnRNAs

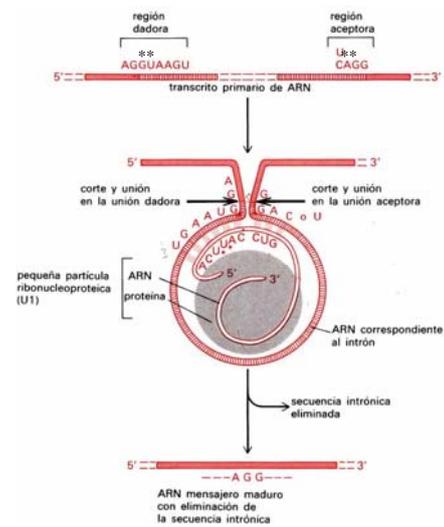
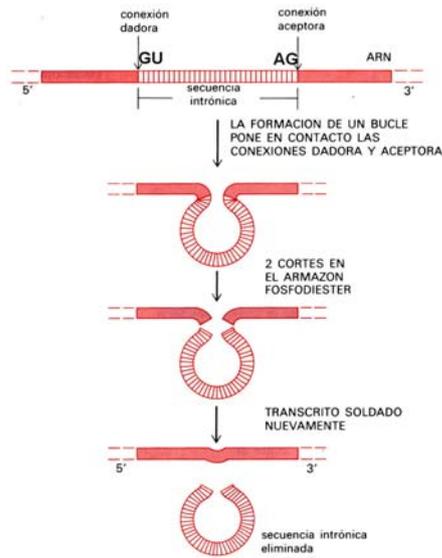
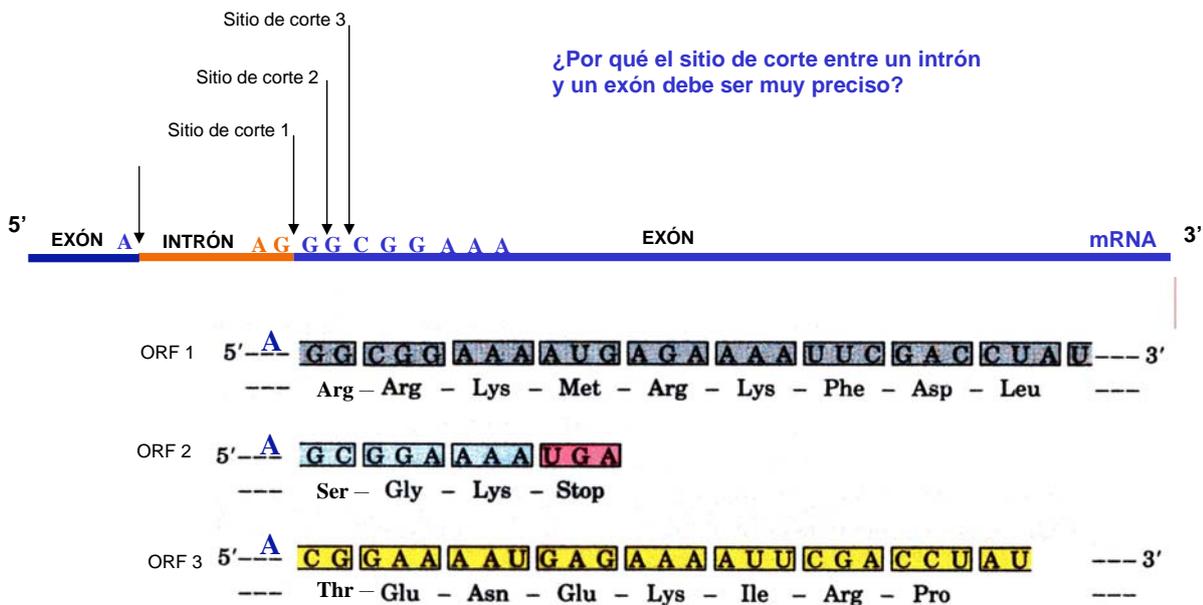


TABLA 33-3
Secuencias de bases y puntos de empalme de los transcritos que contienen intrones

Región génica	Exón	Exón
Ovoalbúmina, intrón 2	U A A G G U G A G C	U U A C A G G U U G
Ovoalbúmina, intrón 3	U C A G G U A C A G	A U U C A G U C U G
β-Globina, intrón 1	G C A G G U U G G U	C C U U A G G C U G
β-Globina, intrón 2	C A G G G U G A G U	C C A C A G U C U C
Inmunoglobulina λ ₁ , intrón 1	U C A G G U C A G C	U U G C A G G G G C
Virus SV40, antígeno T precoz	U A A G G U A A A U	U U U U A G A U U C



Fidelidad del splicing

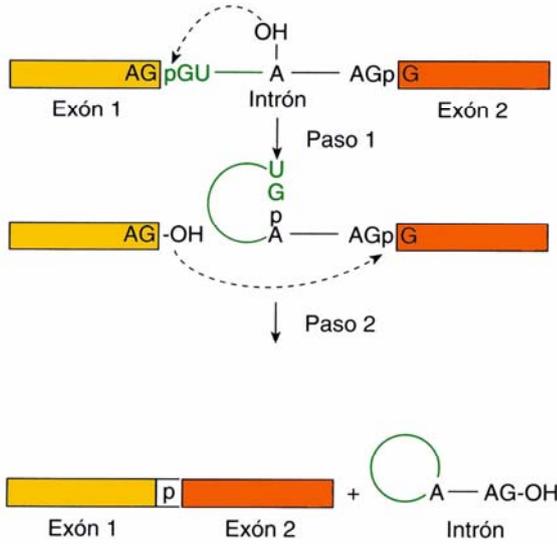


¿Por qué el sitio de corte entre un intrón y un exón debe ser muy preciso?

Si el sitio de corte elimina 1 ó 2 nucleótidos del exón cambia el marco de lectura (ORF) y desde ese punto varía la secuencia de aminoácidos de la proteína

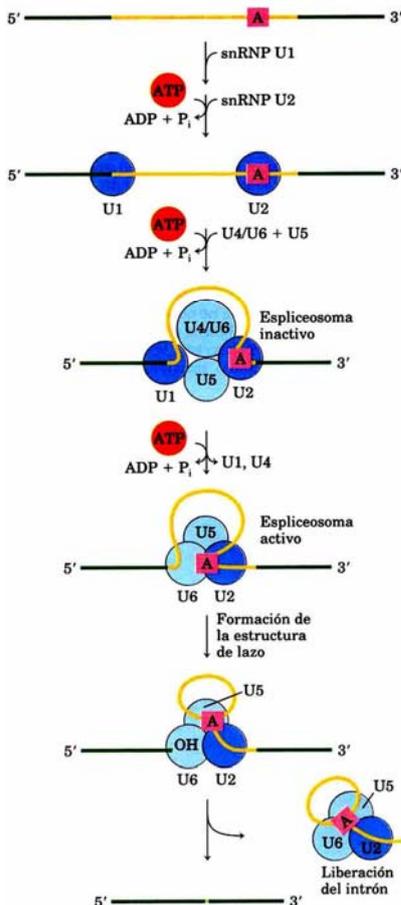


Reacción de splicing de intrones de los hnRNAs

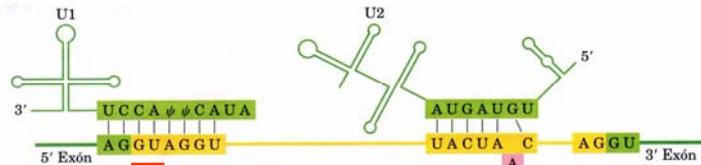


El grupo hidroxilo 2' de un nucleótido dentro del intrón ataca el enlace fosfodiéster que liga el primer exón con el intrón.

El grupo hidroxilo libre 3' del exón 1 ataca el enlace fosfodiéster entre el intrón y el exón 2.

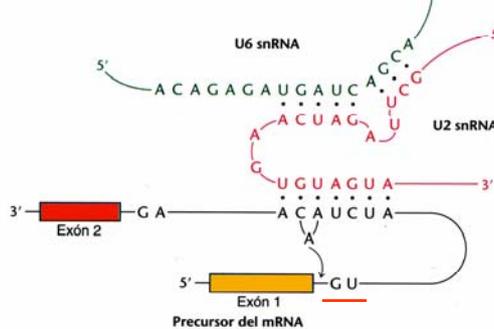


Mecanismo de splicing



U1 señala la unión del exón 1 con el extremo donador del intrón

U2 se une a la adenosina del intrón que va a iniciar el ataque nucleofílico para romper la unión entre el exón 1 y el intrón



U2 y U6 forman el centro catalítico del spliceosoma

U4 enmascara la actividad catalítica de U6 hasta que los puntos de empalme se encuentran alineados

U5 se une en 3' del exón 1, 5' del intrón cuando U1 sale del spliceosoma

Splicing alternativo del gen de las inmunoglobulinas

