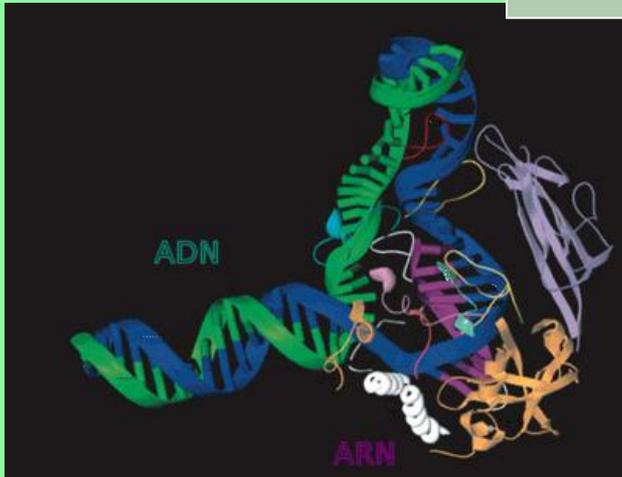


EXPRESIÓN GÉNICA (1)

TRANSCRIPCIÓN



Presentación organizada con fines didácticos por
José Antonio Pascual Trillo www.japt.es

Teoría "UN GEN - UNA ENZIMA"

EXPERIMENTOS DE BEADLE Y TATUM (1941).



George W. Beadle



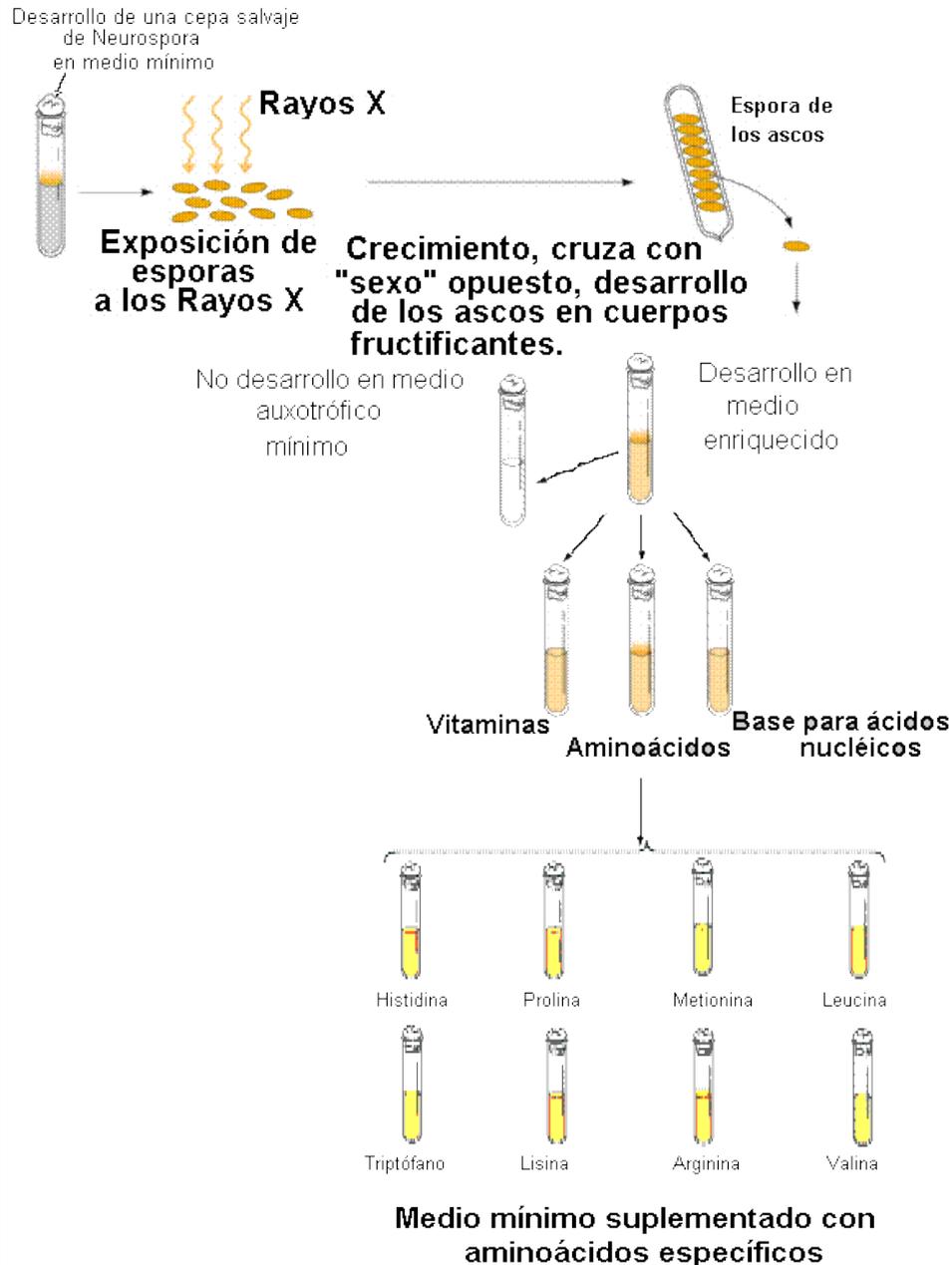
Edward L. Tatum

Beadle y Tatum recibieron el Premio Nobel en 1958 por sus trabajos con los mutantes nutricionales de Neurospora crassa y por la formulación de la Hipótesis "un gen - una enzima".

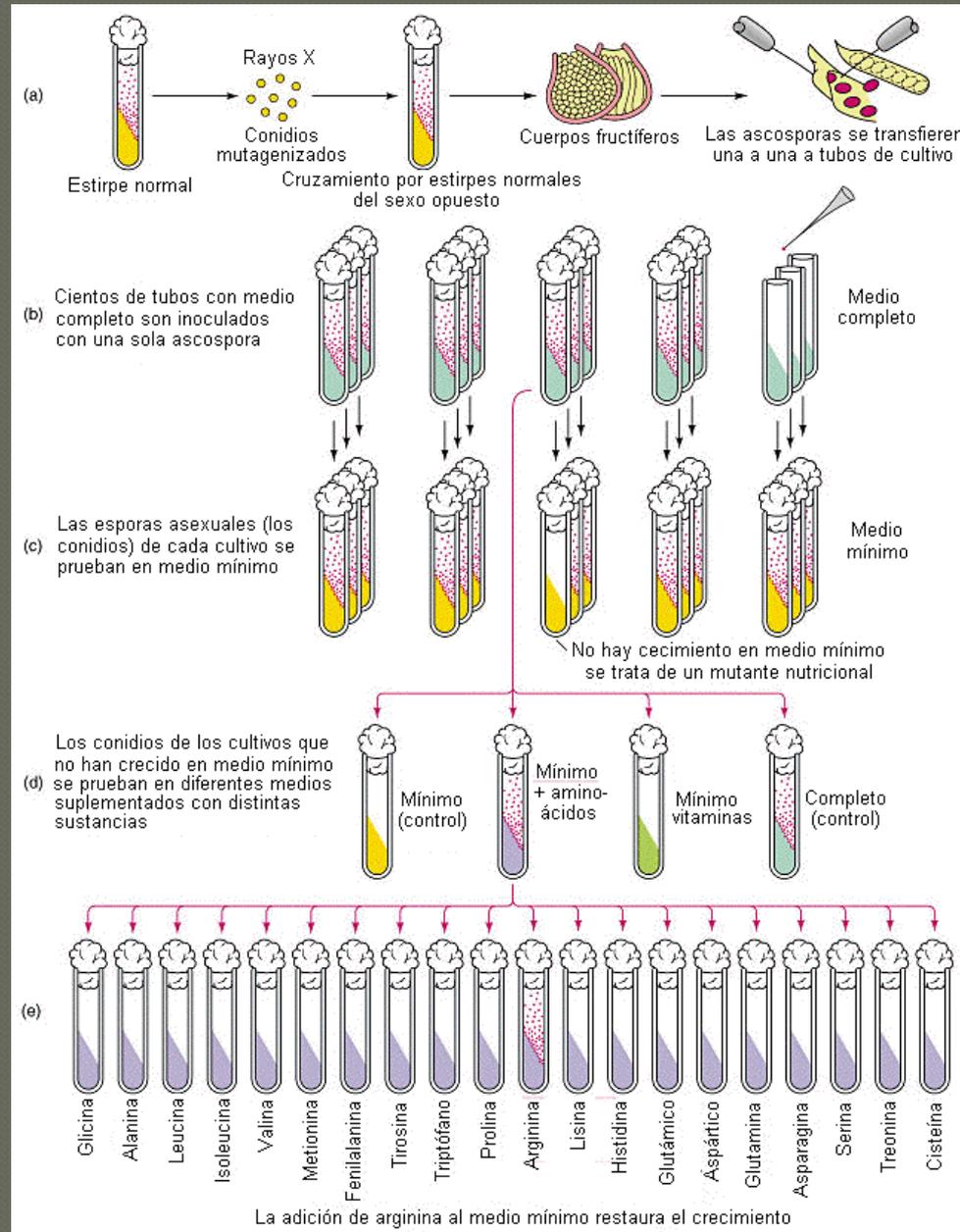


Neurospora crassa
moho anaranjado del pan

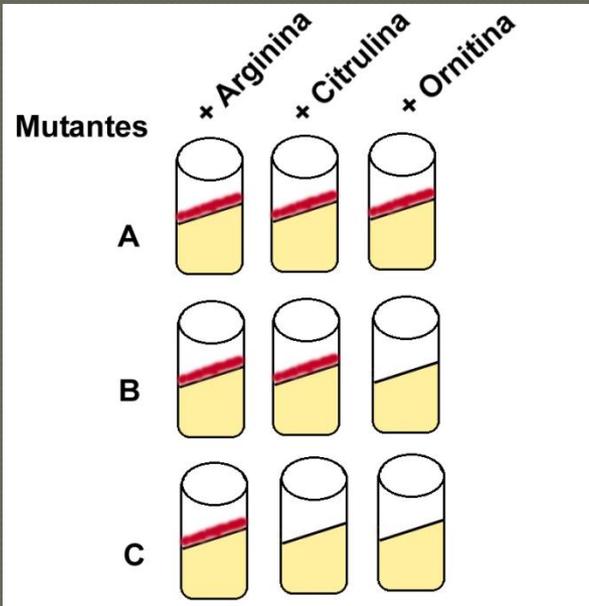




1. Las cepas normales de *Neurospora* pueden crecer en medios mínimos que contienen sustancias simples como azúcar, algunas sales y ácidos orgánicos, una fuente de nitrógeno (nitrato y tartrato amónicos) y la vitamina biotina.
2. Los mutantes nutricionales o cepas auxótrofas son incapaces de crecer en medios mínimos. Para poder vivir necesitan que se añada al medio mínimo determinadas sales, vitaminas, aminoácidos u otras sustancias.
3. Los medios mínimos a los que se les ha añadido alguna sustancia se les denomina medios suplementados.
4. Todas las cepas mutantes son capaces de crecer en medios suplementados completos que contienen todos los compuestos necesarios.



EXPERIMENTOS DE BEADLE Y TATUM (1941).



Crecimiento de las cepas mutantes en respuesta a distintas sustancias

Estirpe mutante	Suplemento: sustancia añadida al medio mínimo		
	Ornitina	Citrulina	Arginina
<i>arg1</i>	+	+	+
<i>arg2</i>	-	+	+
<i>arg3</i>	-	-	+

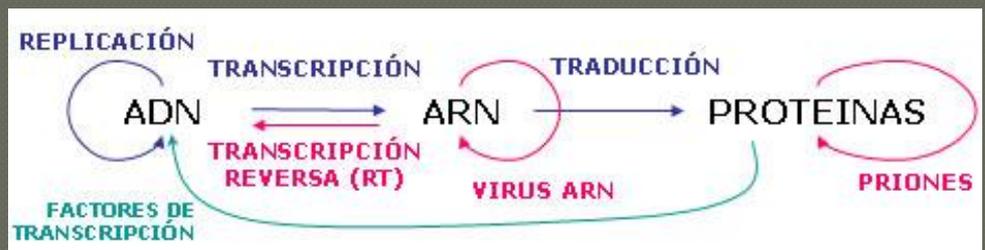
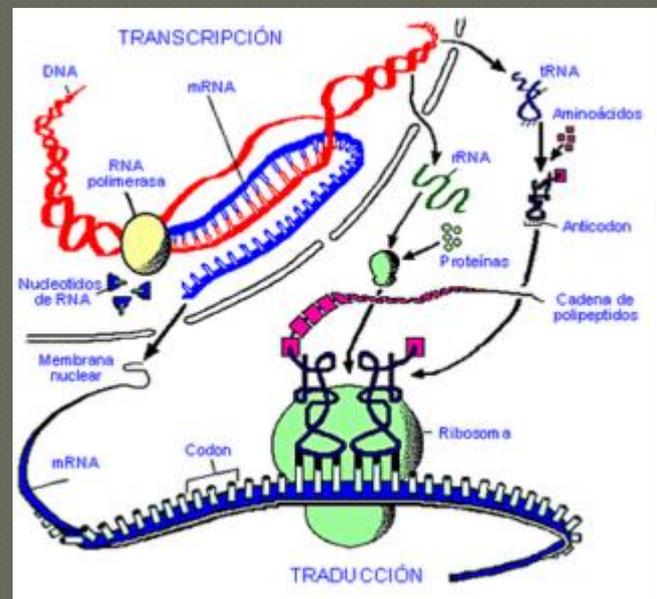
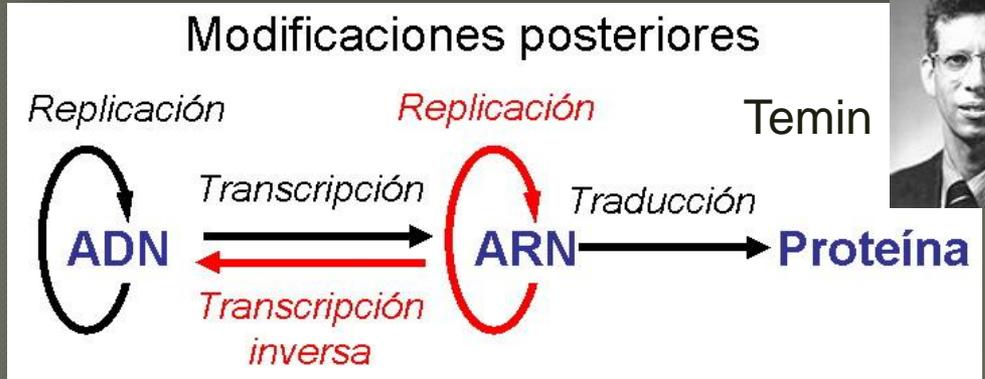
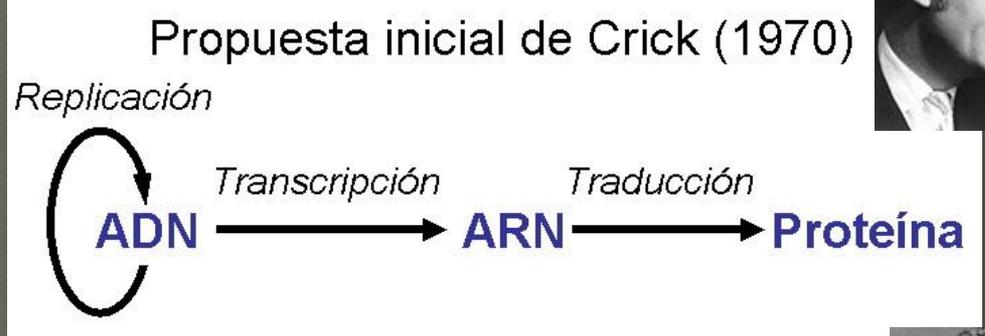
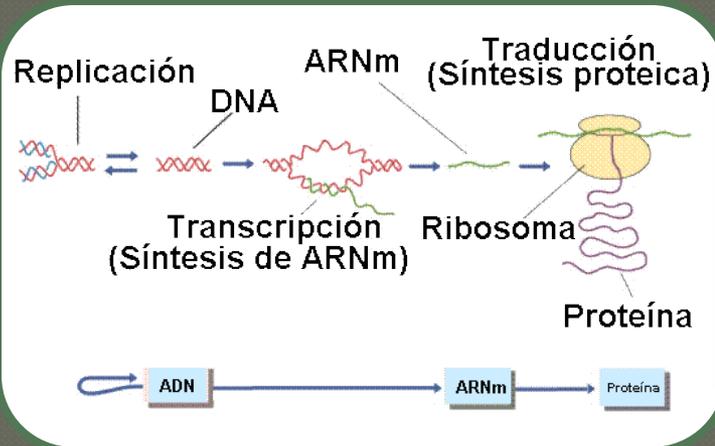
+ = crecimiento, - = no crecimiento

Deducción de la ruta metabólica y de los genes implicados:

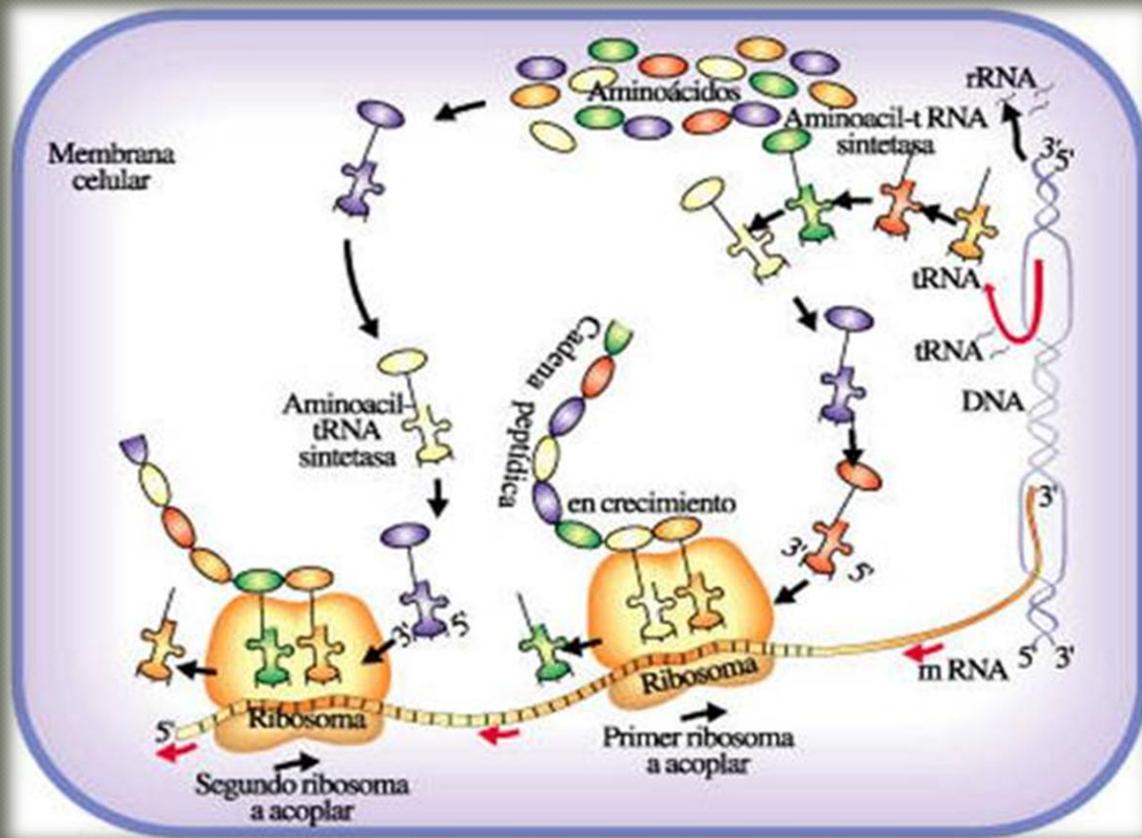


Conclusión: los mutantes (cambios en genes) perdían la capacidad de alimentarse debido a que carecían de enzimas de la ruta metabólica normal
“UN GEN – UNA ENZIMA”

"DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR"

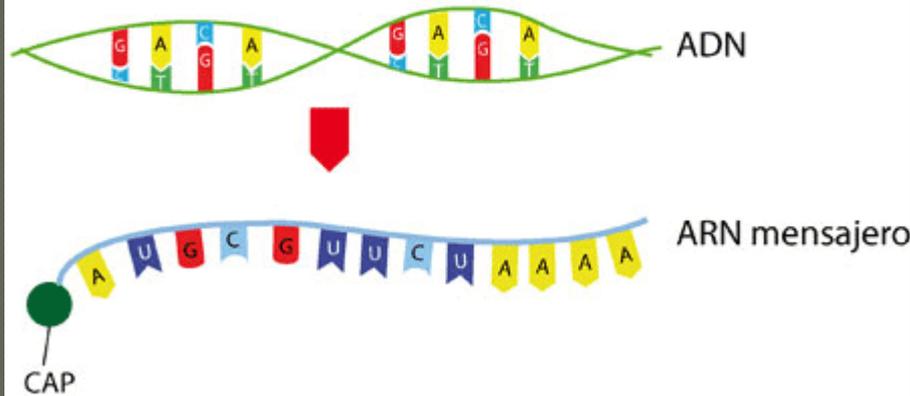


EXPRESIÓN GÉNICA: TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN



TRANSCRIPCIÓN

Transcripción



COMPLEMENTARIDAD

Hélice estabilizadora **CTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTAC**

Hélice codificadora **GACGGTAACAGTCTGTACATATGGGGCATG**

↓ *Transcripción*

ARN **CUGCCAUUGUCAGACAUGUAUACCCCGUAC**

La secuencia de bases del ARN es complementaria a la secuencia de la cadena molde o codificadora. La secuencia de bases de la hélice estabilizadora es la misma que la del ARN, cambiando T por U.

Sólo se lee una cadena de ADN

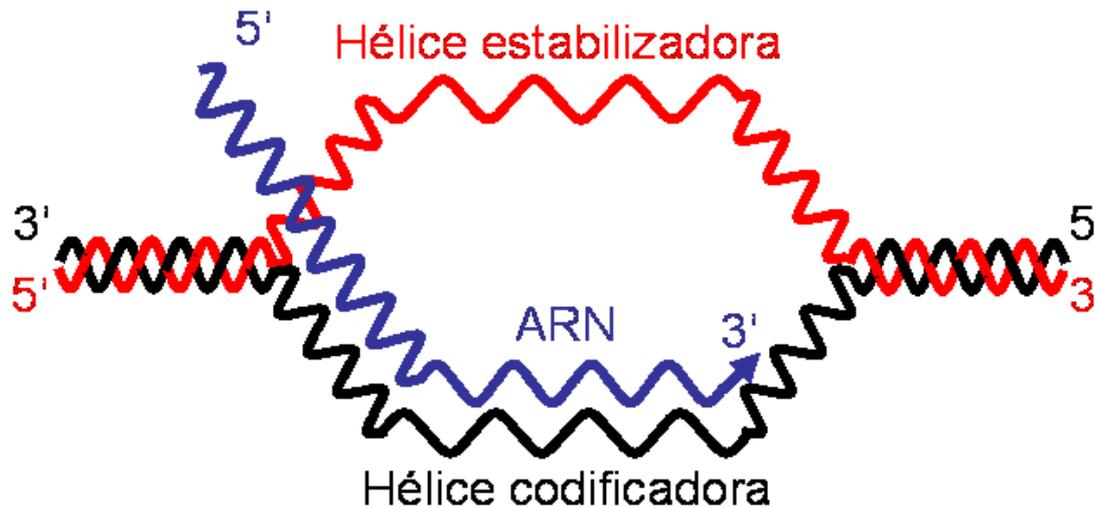
La **dirección de lectura** de la hebra codificadora de ADN es 3'-5', eso quiere decir que las ARN polimerasas sintetizan ARN en sentido 5'P→3'OH,

(La dirección en la que las ADN polimerasas sintetizan ADN es también la misma 5'P→3'OH)

TRANSCRIPCIÓN

Asimetría de la transcripción:

La asimetría de la transcripción significa que solamente se transcribe para cada gen una de las dos hélices de ADN, la hélice que se toma como molde para producir el ADN se la denomina hélice codificadora o hélice con sentido y la otra hélice de ADN, la que no se transcribe, se la denomina hélice estabilizadora o hélice sin sentido.



Hélice estabilizadora = Hélice sin sentido

Hélice codificadora = Hélice con sentido

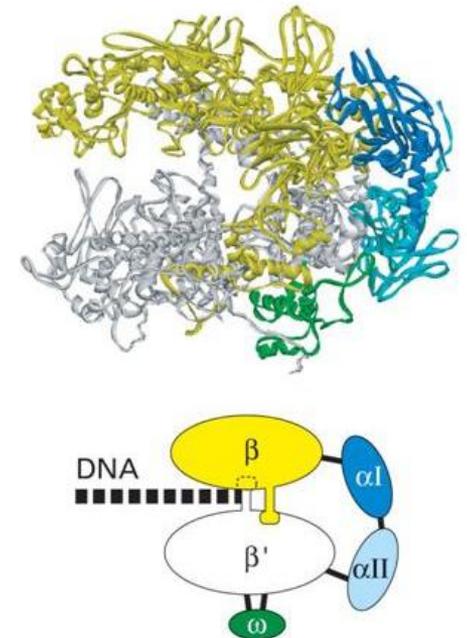
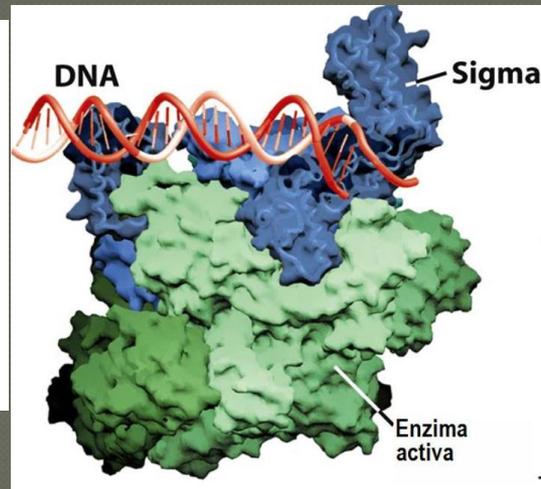
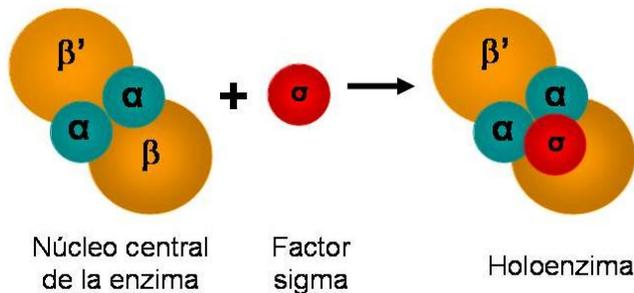
TRANSCRIPCIÓN

TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIONTES

ENZIMAS IMPLICADAS

ARN Polimerasa o transcriptasa de *E. coli*

ARN polimerasa o Transcriptasa



- En bacterias, existe **una ARN polimerasa** capaz de sintetizar todos los tipos de ARN: ARNr, ARNt y ARNm.
- La ARN polimerasa de *E. coli* está formada por varios polipéptidos: el núcleo central del enzima tiene dos cadenas de tipo α (peso molecular de 40.000), una β (peso molecular de 155.000) otra β' (peso molecular de 165.000).
- Además, la enzima completa u holoenzima tiene la subunidad o **factor σ** (peso molecular 95.000) que es necesaria para iniciar la transcripción. Una vez iniciada la transcripción se libera y el núcleo central prosigue con la elongación del ARN.

TRANSCRIPCIÓN

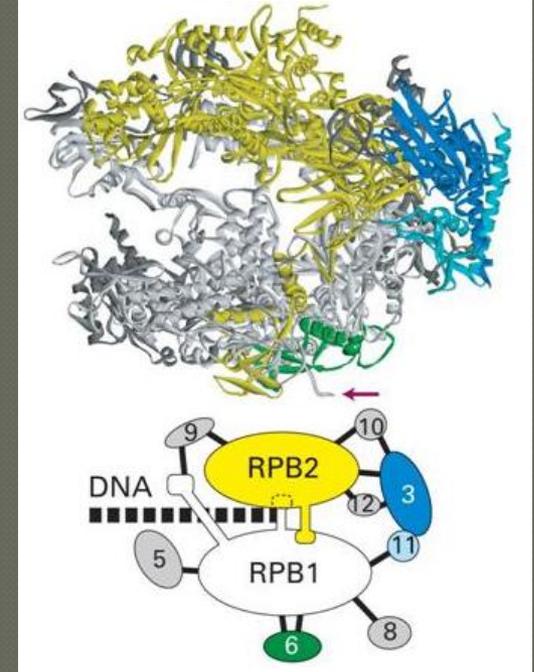
TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIOTES

En **eucariotes** hay varias polimerasas encargadas de sintetizar los distintos tipos de ARN:

- **La ARN polimerasa I** sintetiza los precursores del ARN ribosómico (ARN-r).
- **La ARN polimerasa II** produce ARN heterogéneo nuclear (ARN-hn) que tras el procesamiento da lugar a los ARN mensajeros (ARN-m), además de otros pequeños ARN.
- **La ARN polimerasa III** transcribe los precursores de los ARN transferentes (ARN-t), además del ARN 5S que forma parte de la subunidad grande de los ribosomas y otros pequeños ARN nucleares y citoplásmicos.
- **Las ARN polimerasas IV y V** realizan reparaciones.

Las ARN polimerasas eucarióticas son bastante más complejas que las de E. coli, poseen subunidades semejantes o correspondientes a las de E. coli y otras que no lo son.

ENZIMAS IMPLICADAS



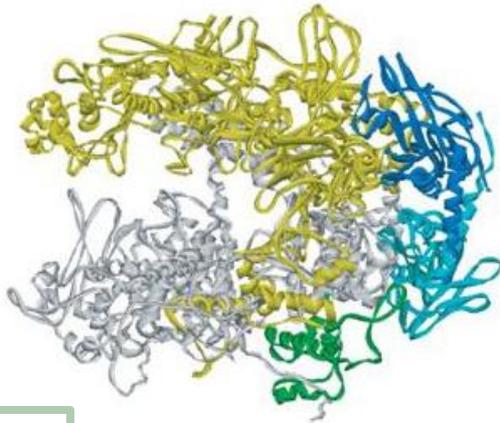
**ARN polimerasa II
(de levadura)**

TRANSCRIPCIÓN

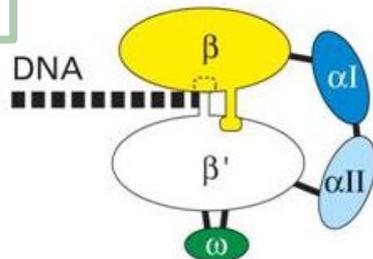
ENZIMAS IMPLICADAS

Comparación entre las ARN polimerasas de procariontas y eucariotas

ARN Polimerasas de procariontas



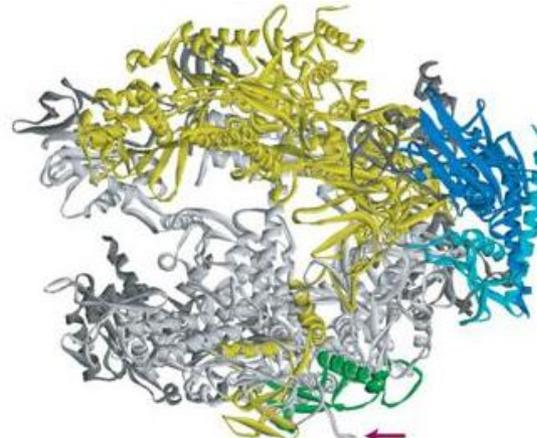
ARN pol (E. coli)



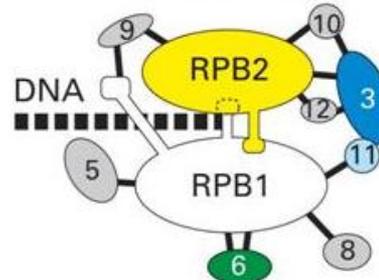
E. coli core RNA polymerase ($\alpha_2\beta\beta'\omega$)



ARN Polimerasas de eucariotas



ARN pol-II (levadura)



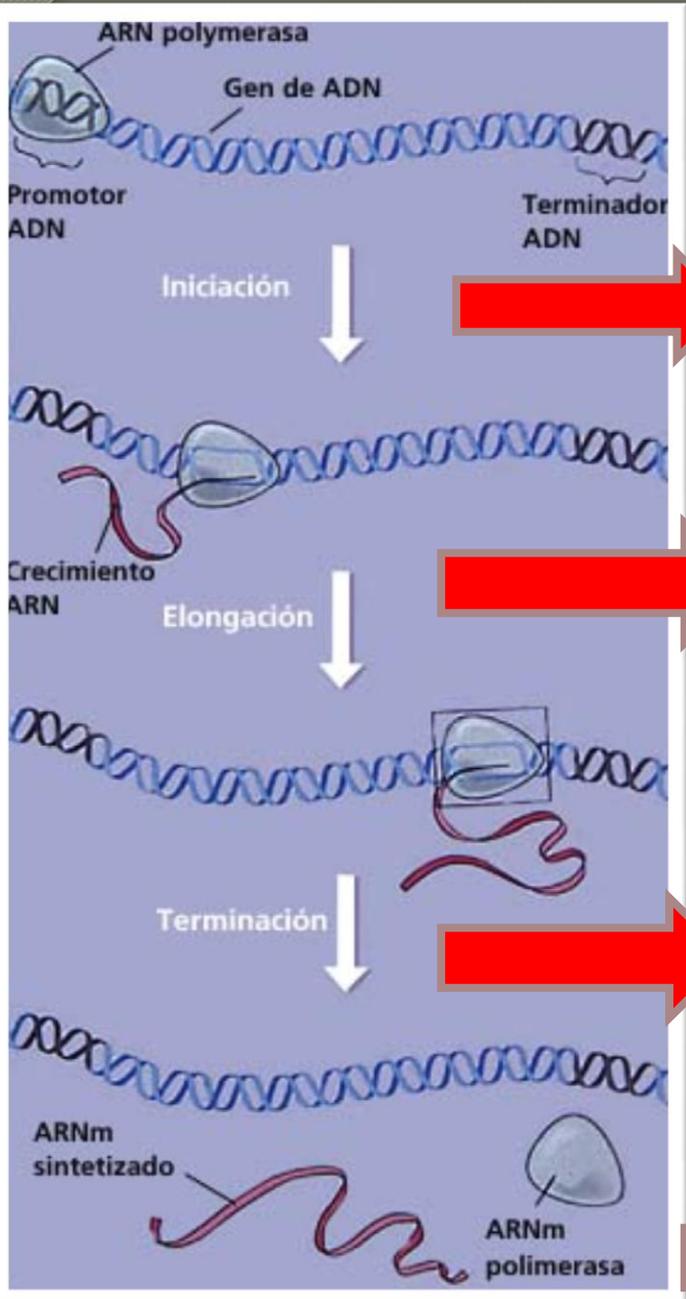
Eukaryotic RNA polymerases

	I	II	III
β' - and β -like subunits	1 2	1 2 CTD	1 2
α -like subunits	◀▶	◀▶	◀▶
ω -like subunit	●	●	●
Common subunits	◊	◊	◊
	○	○	○
	◻	◻	◻
Additional enzyme-specific subunits	+5	+3	+7

- 2 subunidades grandes similares a β y β' de *E. coli*
- 2 subunidades similares a α de *E. coli*
- 5 subunidades comunes entre I, II y III pero sin homólogas en *E. coli*
- Subunidades adicionales distintas entre I, II y III

TRANSCRIPCIÓN

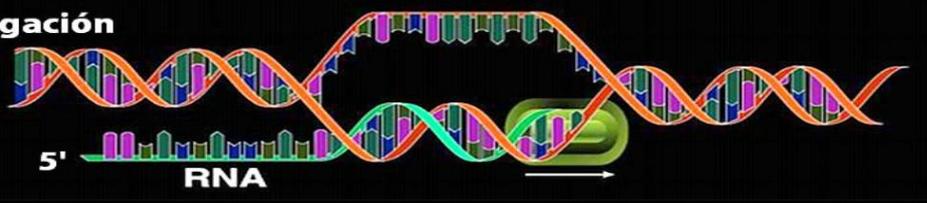
FASES



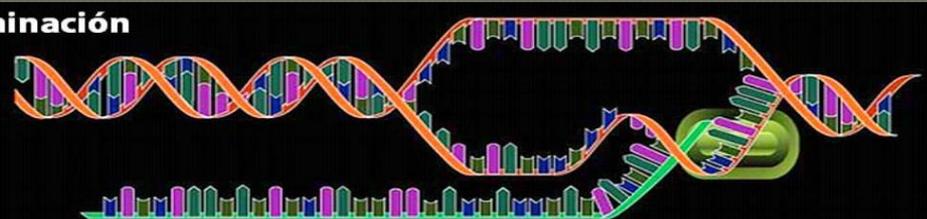
(a) Iniciación



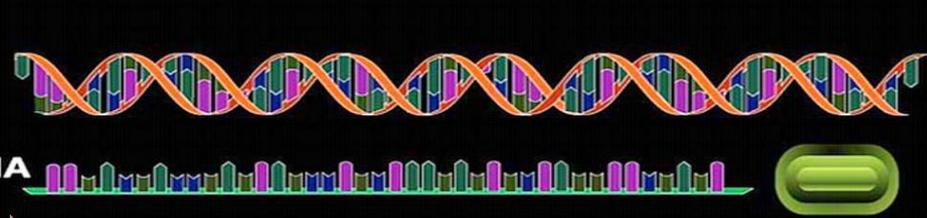
(b) Elongación



(c) Terminación



(d)

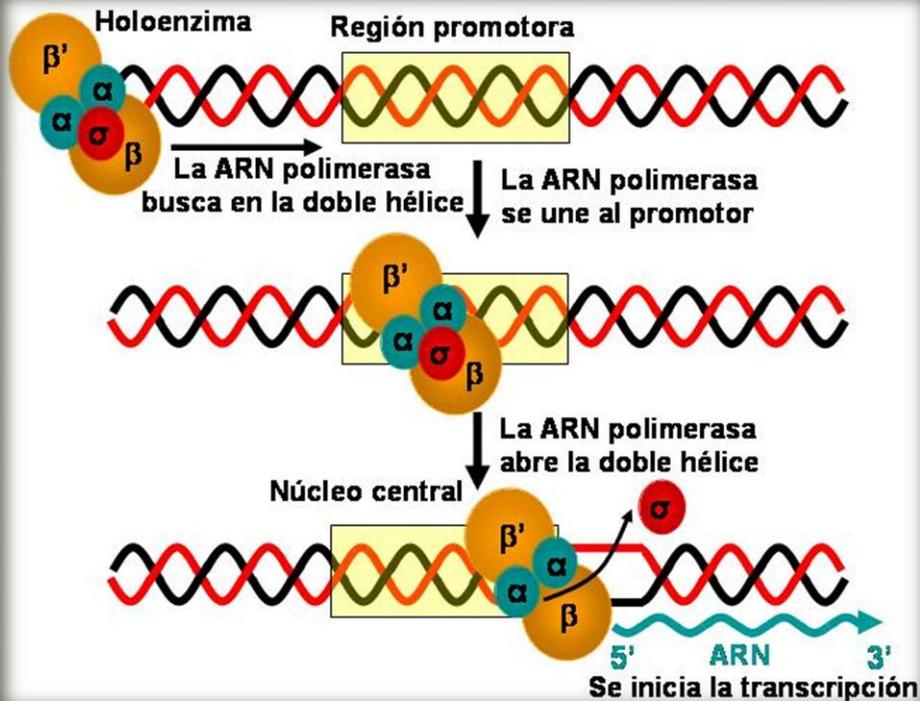


MADURACIÓN

INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

PROCARIOTAS

El inicio de la transcripción necesita que el factor σ esté unido al núcleo central de la ARN polimerasa



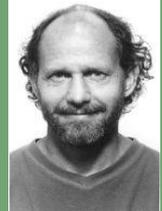
Existen unas **secuencias de ADN específicas** y necesarias para que la holoenzima reconozca el lugar de comienzo de la transcripción.

Dichas secuencias específicas se denominan secuencias promotoras o región promotora.

INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

TRANSCRIPCIÓN

PROCARIOTAS



Pribnow

SECUENCIAS CONSENSO PROMOTORAS

BACTERIAS



EUCARIONTES



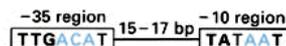
Región promotora

Pribnow (1975) aisló y secuenció las regiones de ADN que quedaban protegidas por la ARN polimerasa después de someterlas a digestión con ADNasa pancreática. Siguiendo este método se secuenciaron los primeros promotores de fagos como el T7 y 1, y del promotor del operón lactosa. Pribnow observó una secuencia de unos 7 pares de bases que se encontraba 10 bases antes de la primera que se transcribe y que aparecía en la mayoría de los fragmentos protegidos por la ARN polimerasa. Esta secuencia se la denominó **Caja de Pribnow o TATA**

Secuencias de diferentes promotores de *E. coli*

tyr tRNA	TCTCAACGTAACACTTTACAGCGGGC • CGTCATTGATATGATGC • GCCCGCTTCCCGATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAATACTTGTGCAAAAAA • TTGGATCCCATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTCCTGA • GCCGACTCCCATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA • GAGGAAAGCGTAAATAC • GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTTCTATTGCGGCCTGCG • GAGAACTCCCATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTGAGGCGG • AATAACTCCCATAATGCGCCACCCTGACACGGGAACAA
rrn A2	GCAAAAAATAATGCTTGACTCTGTAG • CGGGAAGGCGTATTATGC • ACACCCGCGCCGTGAGAA
λ Pr	TAACACCGTGCGTGTGACTATTTTA • CCTCTGGCGGTGATAATGG • TTGCATGTAAGGAGGT
λ PL	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA • CCACTGGCGGTGACTGA • GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGGTTGACAACATGA • AGTAAACACGGTACGATGT • ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT • CTAACCTATAGGATACTTA • CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGAAGTAACATGCAGTAAGATAC • AAATCGCTAGGTAACACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT • TCGCGCTTGGTATAATCG • CTGGGGTCAAAGATGAGT

Secuencia consenso de los promotores

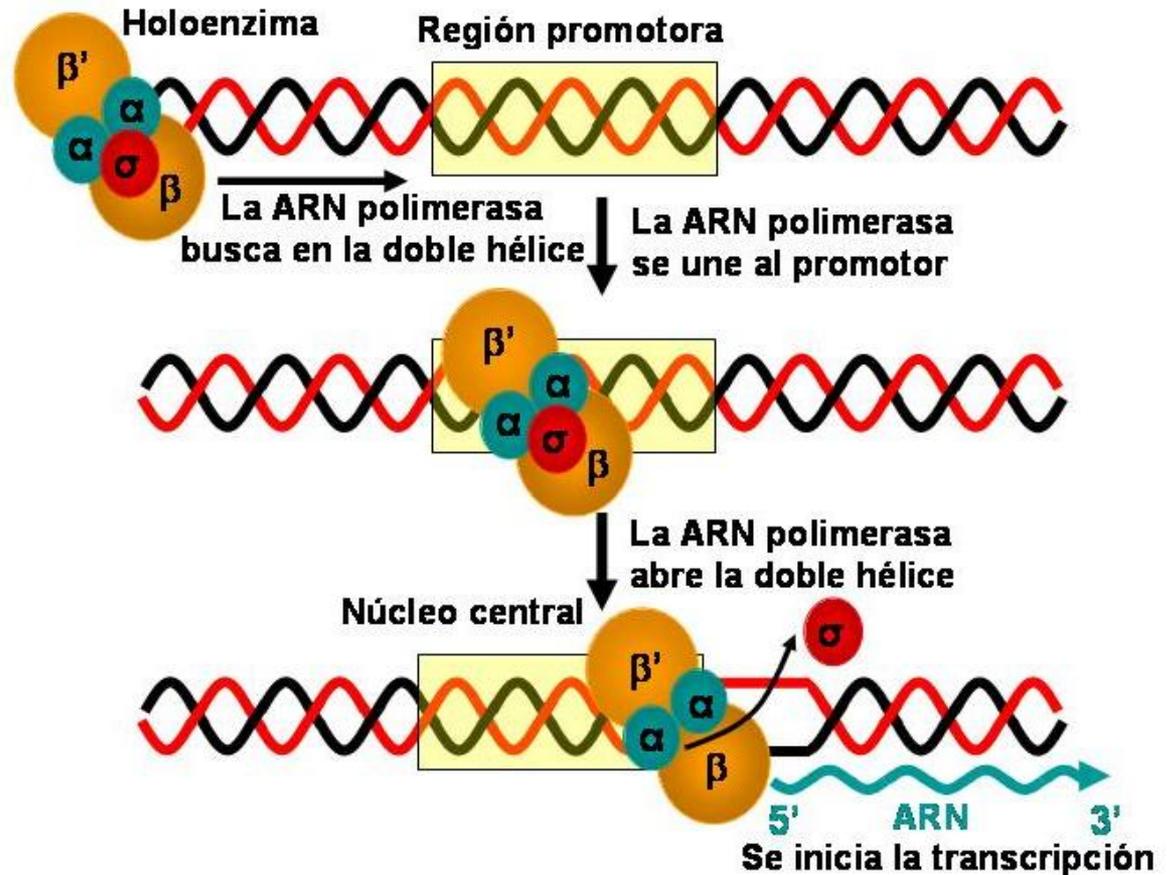


INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

PROCARIOTAS

El **factor sigma** es el responsable de que la ARN polimerasa reconozca las **secuencias promotoras** y se una a ellas.

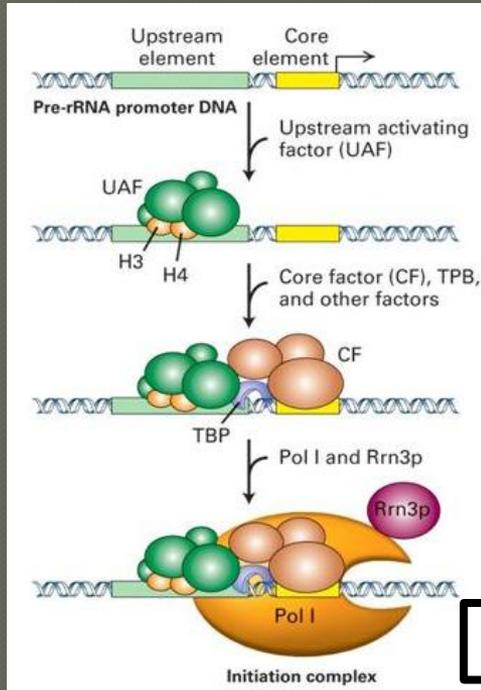
La holoenzima recorre el ADN hasta encontrar las regiones -10 y -35 (secuencias promotoras) y se une a ellas, posteriormente comienza a separar las dos hélices por la región -10 (rica en pares AT). Cuando la holoenzima ha reconocido y separado las dos hélices se forma lo que se denomina "complejo abierto con el promotor".



INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

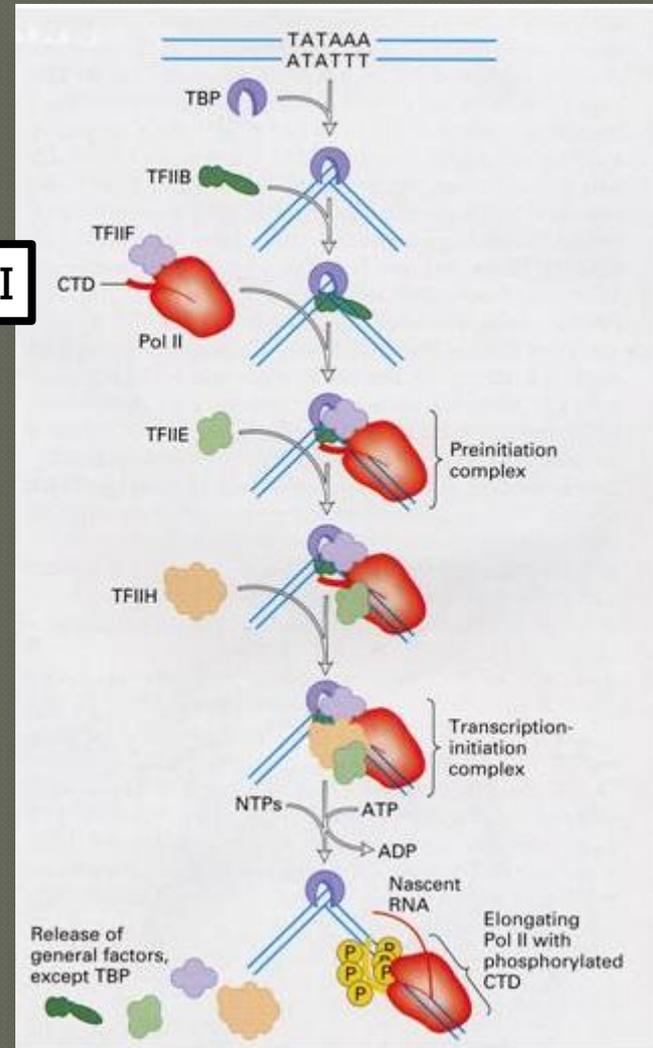
TRANSCRIPCIÓN

EUCARIOTAS



Pol-I

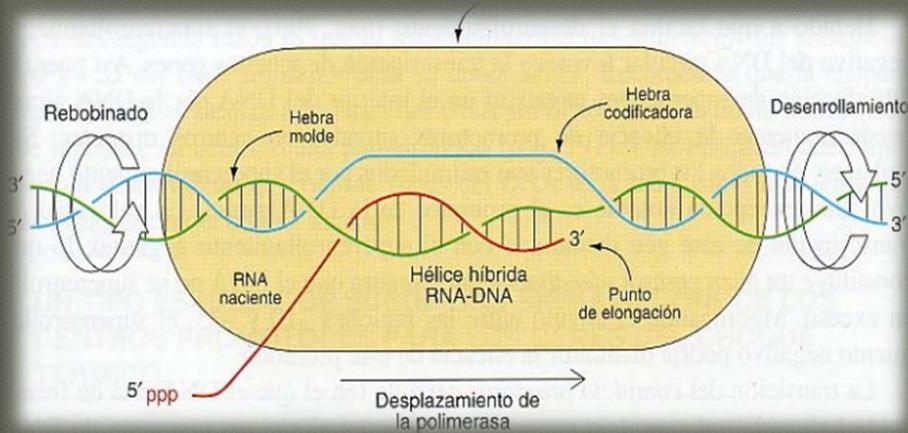
Pol-II



En eucariontes la iniciación de la transcripción es **más compleja** que la de *E. coli* y depende de la presencia de **factores proteicos de transcripción (TF)**.

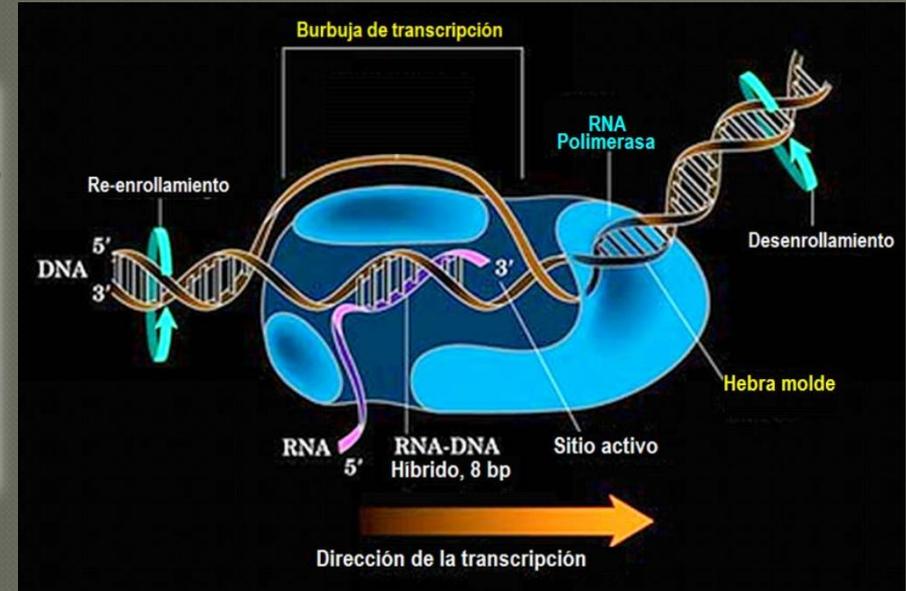
La mayoría de las secuencias promotoras eucarióticas se encuentran antes de la primera base transcrita (aunque algunos promotores de la ARN Pol III se localizan después.)

ELONGACIÓN



TRANSCRIPCIÓN

PROCARIOTAS



La elongación de la transcripción **no necesita del factor σ** .

Una vez iniciada la transcripción, el factor sigma se libera y el núcleo central de la **ARN polimerasa** comienza a sintetizar el ARN **en la dirección 5' P \rightarrow 3' OH** a partir de **ribonucleósidos trifosfato libres** que sirven de sustrato al enzima.

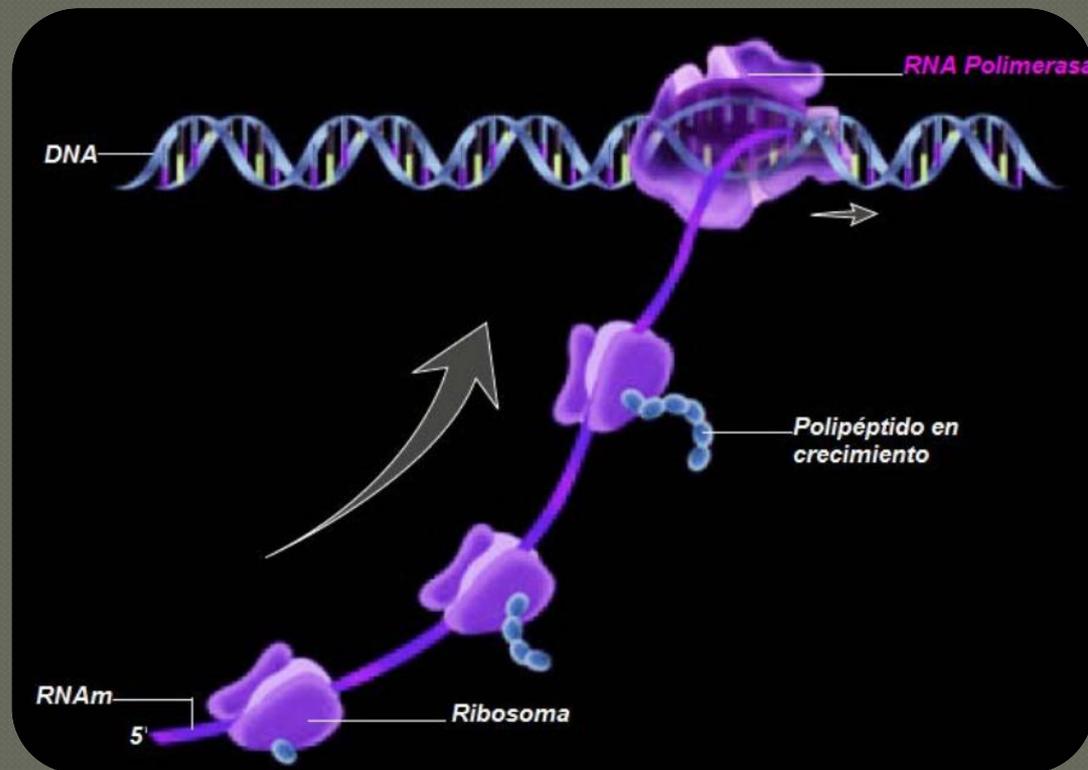
La velocidad de transcripción en *E. coli* a 37° C es de 2500 ribonucleótidos por minuto (aproximadamente 42 ribonucleótidos por segundo).

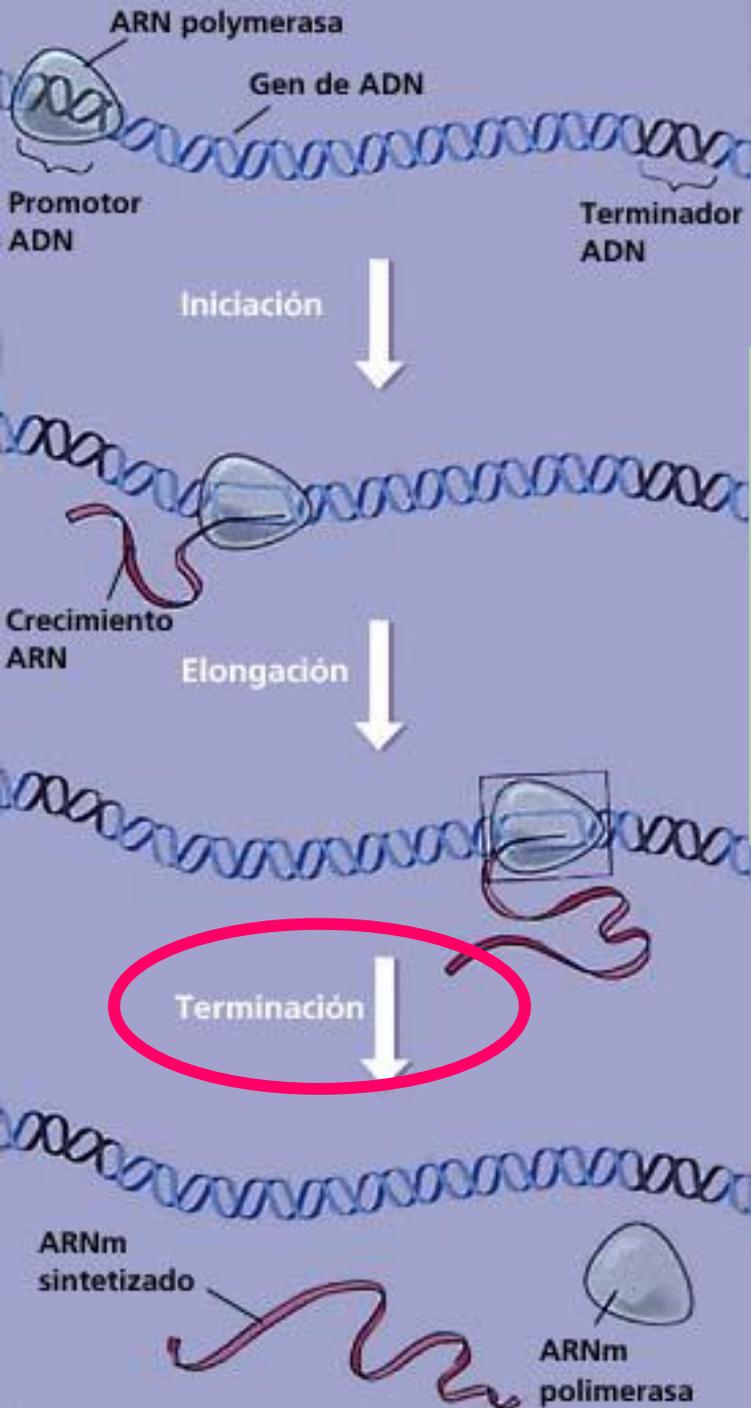
ELONGACIÓN

TRANSCRIPCIÓN

PROCARIOTAS

La elongación de la transcripción en procariotas está acoplada con la traducción, lo que acelera el proceso conjunto





TRANSCRIPCIÓN

TERMINACIÓN

PROCARIOTAS

La terminación de la transcripción en *E. coli* puede tener lugar por dos mecanismos distintos:

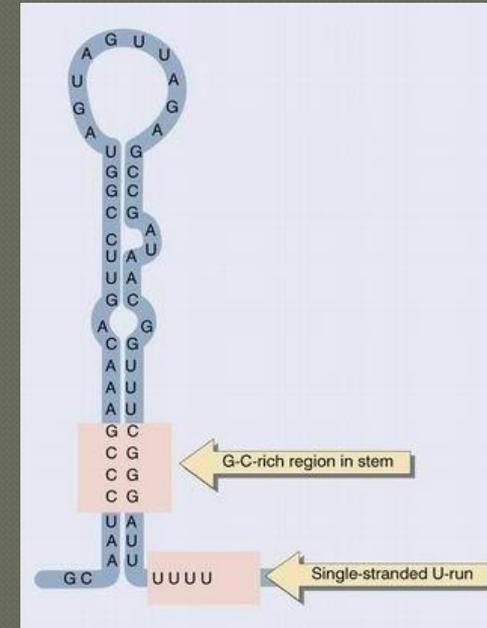
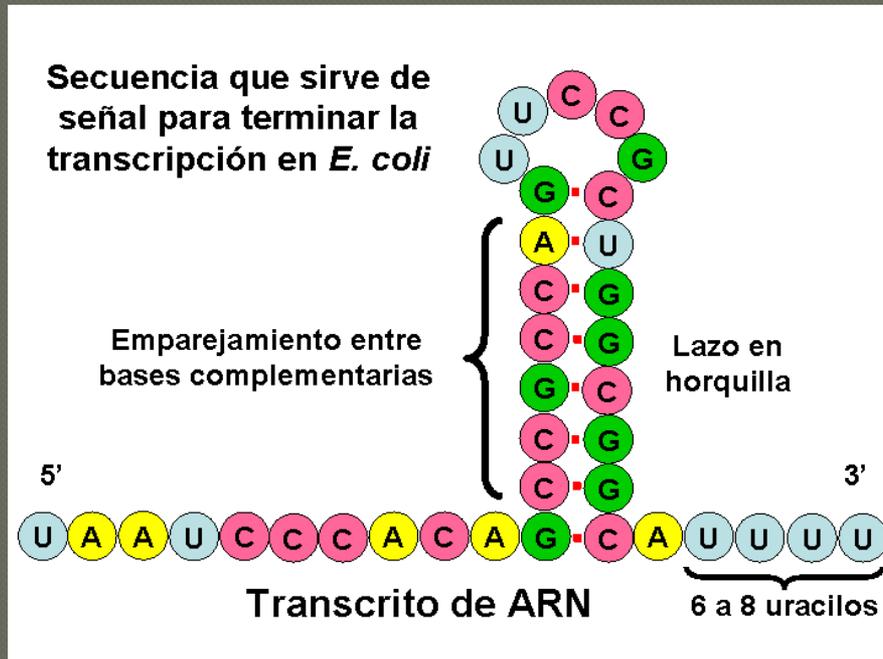
- A) Secuencias terminadoras (terminación independiente de rho)
- B) Terminación dependiente del factor proteico ρ (rho)

EUCARIOTAS

La terminación de la transcripción en eucariotas es parecida, pero más compleja

TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

a) Por secuencias terminadoras



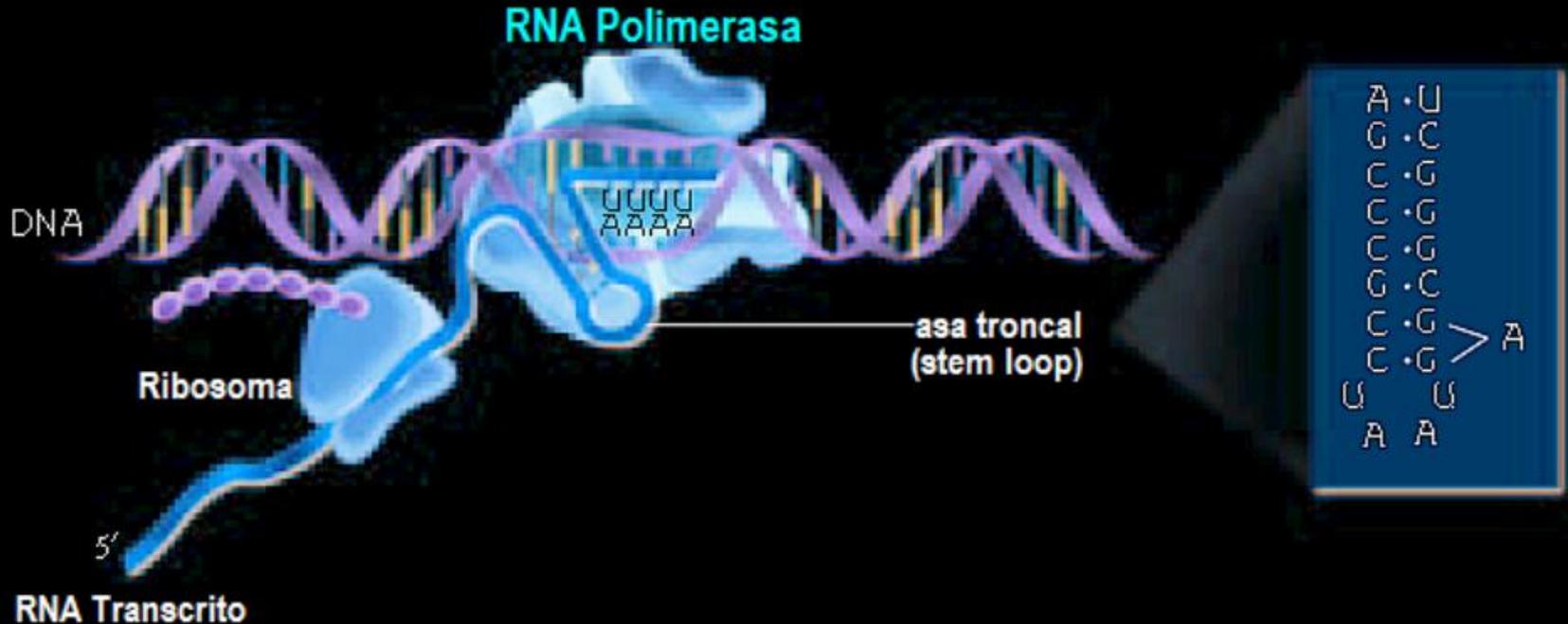
Las secuencias terminadoras tiene dos características:

- Una horquilla producida en la estructura secundaria por emparejamiento de bases
- Una secuencia de unos 6 o más Uracilos en el extremo final.

Las secuencias de terminación antes indicadas inducen la terminación espontánea de la transcripción

TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

a) Por secuencias terminadoras



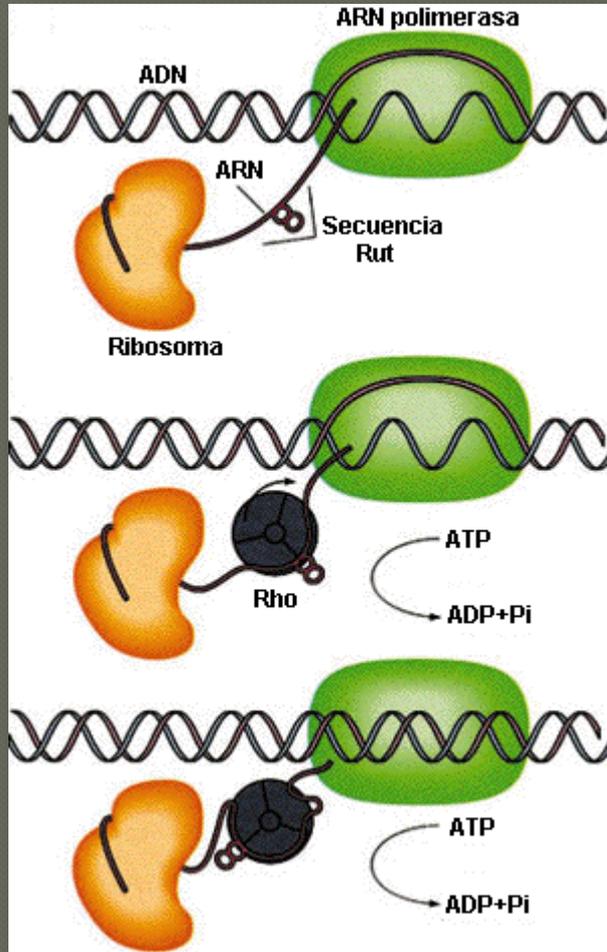
Las secuencias terminadoras tiene dos características:

- Una horquilla producida en la estructura secundaria por emparejamiento de bases
- Una secuencia de unos 6 o más Uracilos en el extremo final.

Las secuencias de terminación antes indicadas inducen la terminación espontánea de la transcripción

TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

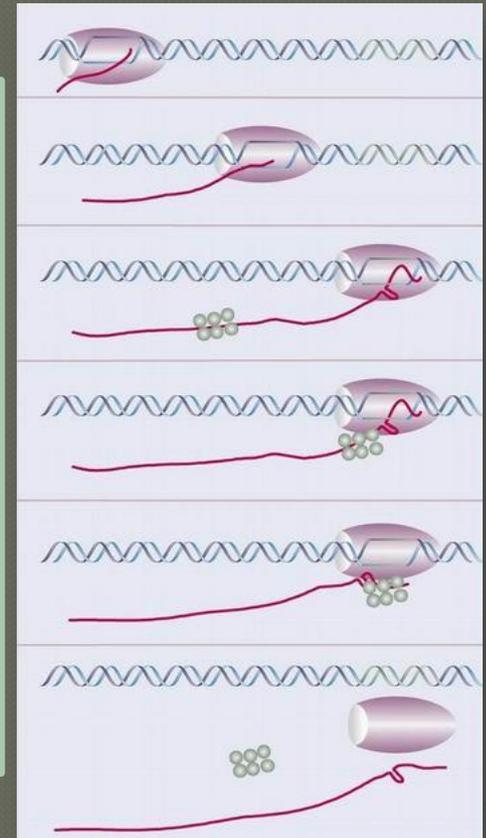
b) Por factor proteico ρ (rho)



Terminación dependiente de la actuación del **factor proteico rho** (ρ) que es un hexámero formado por 6 subunidades.

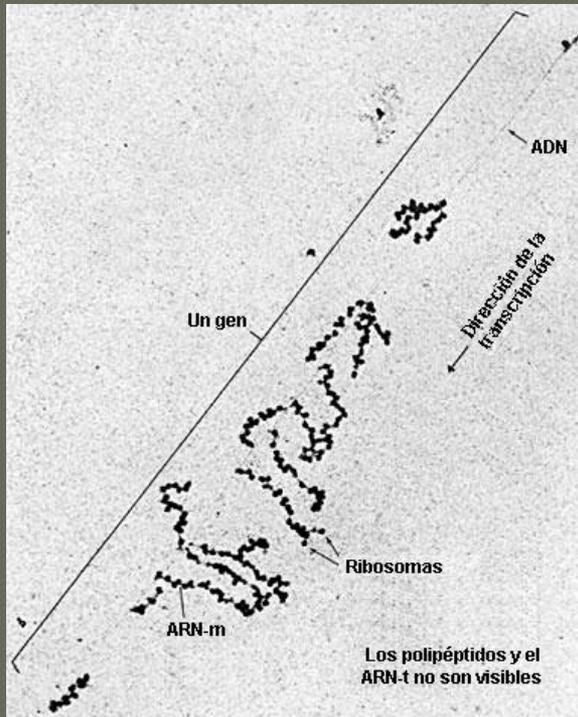
El factor rho (ρ) debe reconocer una secuencia específica del ARN denominada **sitio rut** y se une ahí para posteriormente tirar del ARN y soltarlo de la ARN polimerasa.

Las **secuencias rut** suelen estar un poco antes del lugar en el que la ARN polimerasa termina la transcripción.



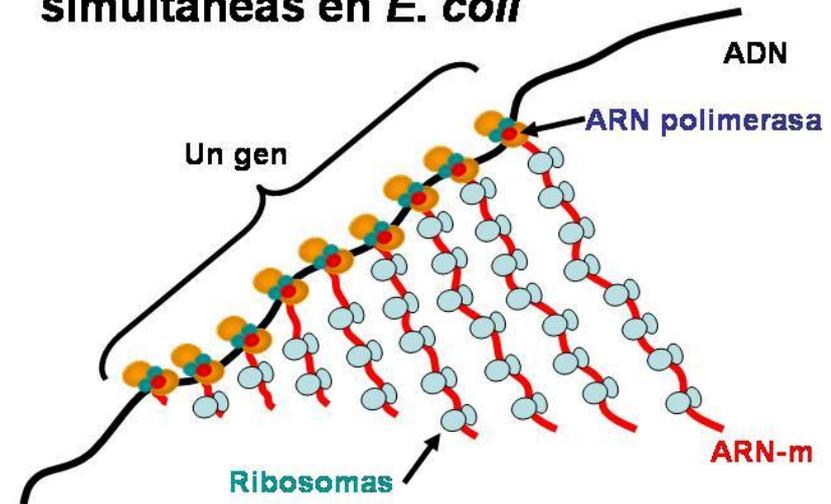
TRANSCRIPCIÓN

MADURACIÓN



PROCARIOTAS

Transcripción y Traducción simultáneas en *E. coli*



Los ARN recién sintetizados suelen sufrir un procesamiento posterior en los ARN precursores de ARN ribosómico (ARN-r) y de ARN transferentes (ARN-t), siendo de mayor tamaño: hay un acortamiento posterior (maduración).

Sin embargo, el ARN que se va a traducir a proteínas no sufre procesamiento alguno en bacterias: tal y como se sintetiza comienza a traducirse. De hecho, en bacterias la transcripción y la traducción son simultáneas: aún no ha terminado de transcribirse un ARN mensajero y ya se le han unido ribosomas que están traduciéndolo.

TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

En eucariontes sufren **procesamientos posteriores** a la transcripción, tanto los **ARN funcionales** (que dan ARN-r y ARN-t) como los **ARN informacionales (ARNm)** que van a ser traducidos a polipéptidos.

Este procesamiento del **“transcrito primario”** consta de varios pasos y tiene como **principal consecuencia la disminución del tamaño del ARN-hn (heterogéneo nuclear) recién transcrito** por pérdida de varios segmentos del interior.

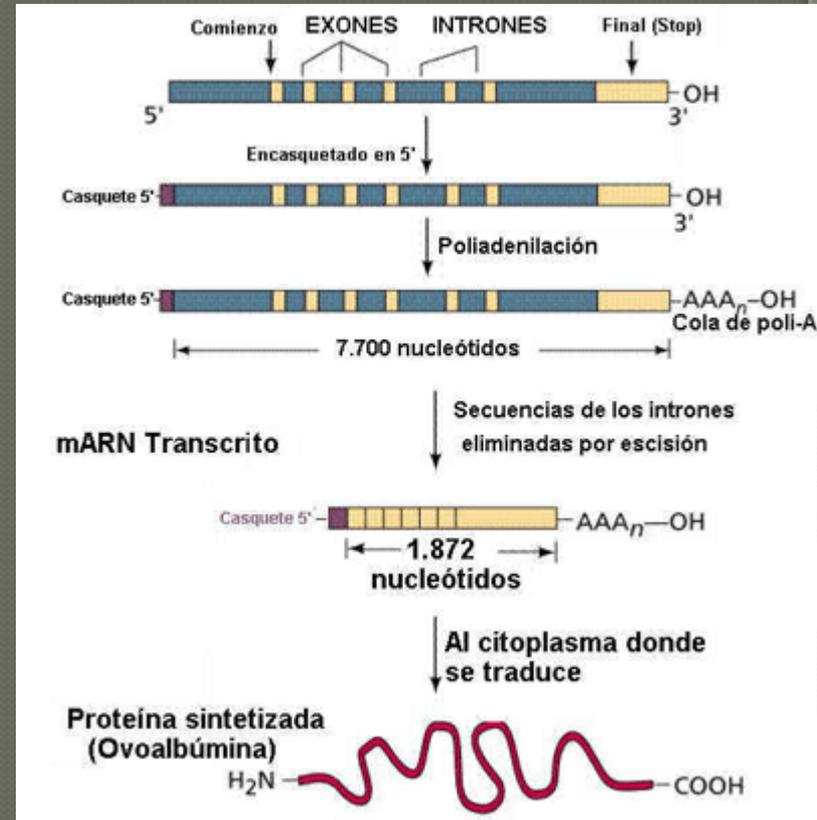
Los principales pasos del **procesamiento del ARN-hn (“heterogéneo nuclear”)** son los siguientes:

1. **Adición de una caperuza o casquete de protección** ("capping" o abreviadamente tapón o "cap": un residuo de **7-metilguanósina**) en el **extremo 5'P del ARN-hn** que lo protege de su degradación por dicho extremo.
2. **Adición por el extremo 3'OH de una cola de Poli-A** (entre 150 y 200 residuos de adenina) : Una **endonucleasa** corta el ARN y después una **Poli A polimerasa** añade la cola de Poli A. La función de la cola de Poli A es la de evitar la degradación del ARN por ese extremo e intervenir en el transporte del ARN hacia el citoplasma.
3. **Eliminación y empalme (“Splicing”) de segmentos interiores (intrones) del ARN-hn**. Los genes en eucariontes están fragmentados, con:
 - **Exones** o zonas que se traducen a aminoácidos; e
 - **Intrones** o regiones que no se traducen.

El ARN-hn recién transcrito contiene exones e Intrones, pero durante el procesamiento posterior (maduración) **se van a eliminar los Intrones** o regiones que no se traducen a aminoácidos. (de forma que el ARN m ya no los tiene)

TRANSCRIPCIÓN

MADURACIÓN

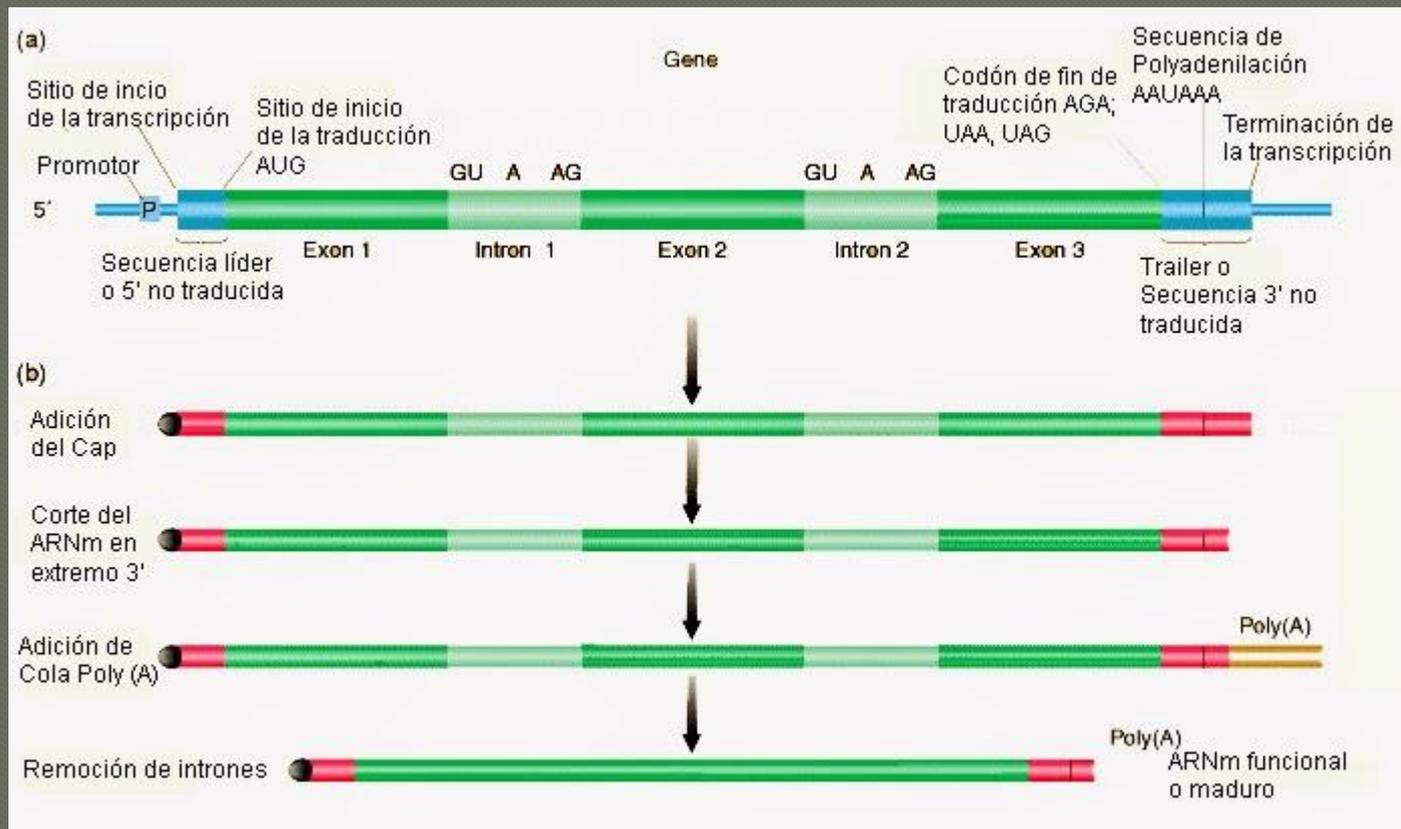


TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIOTES

TRANSCRIPCIÓN

MADURACIÓN

Maduración del transcrito primario (ARN hn, precursor del ARNm)

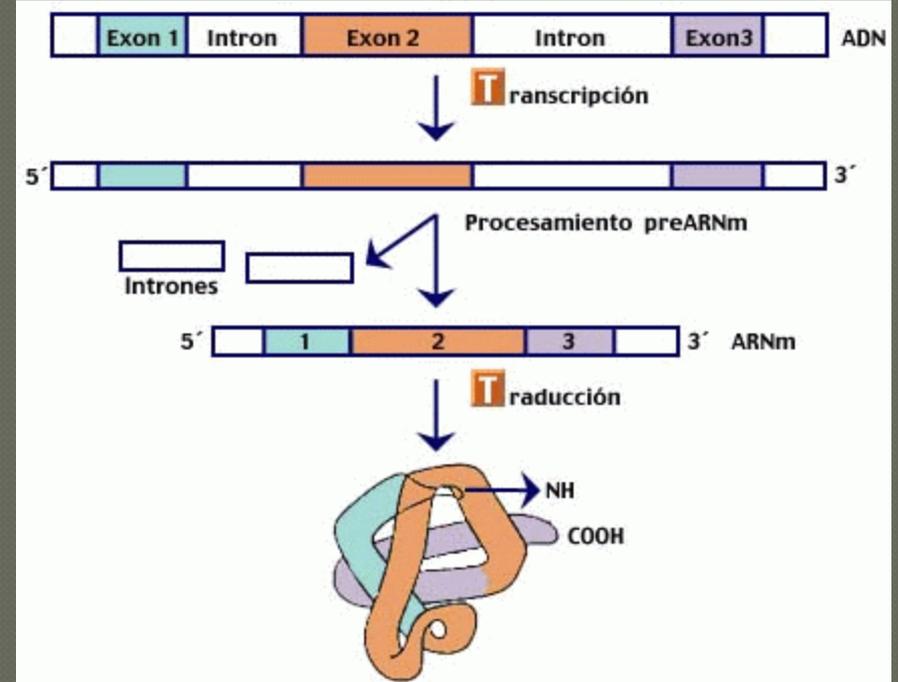
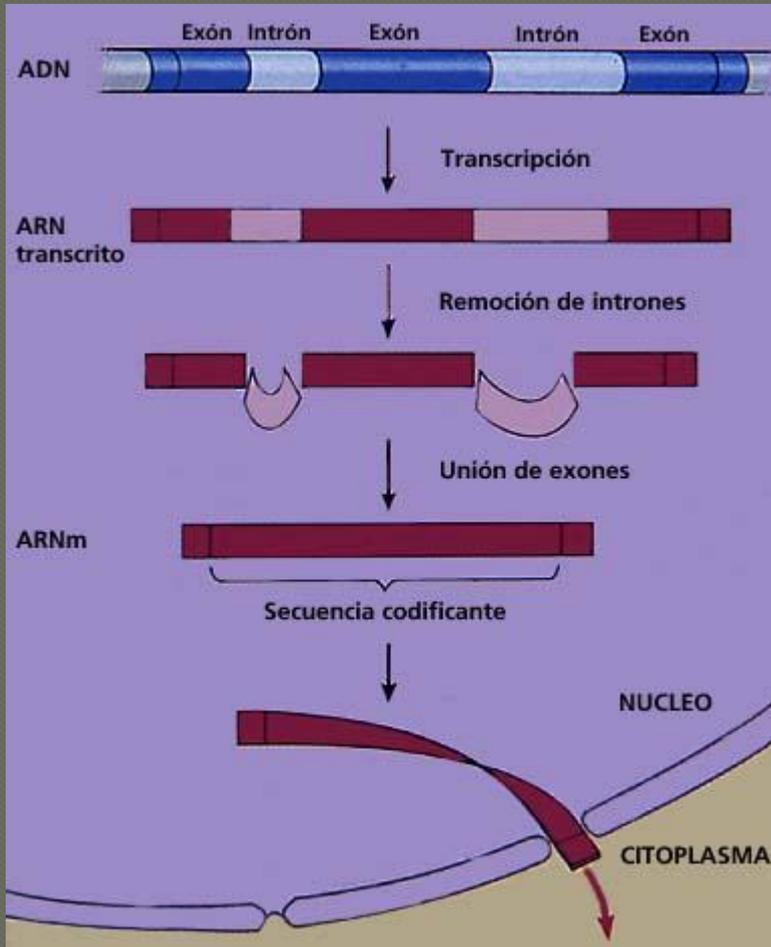


TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

TRANSCRIPCIÓN

MADURACIÓN

Splicing: eliminación y empalme de segmentos interiores (INTRONES) del ARN-hn.

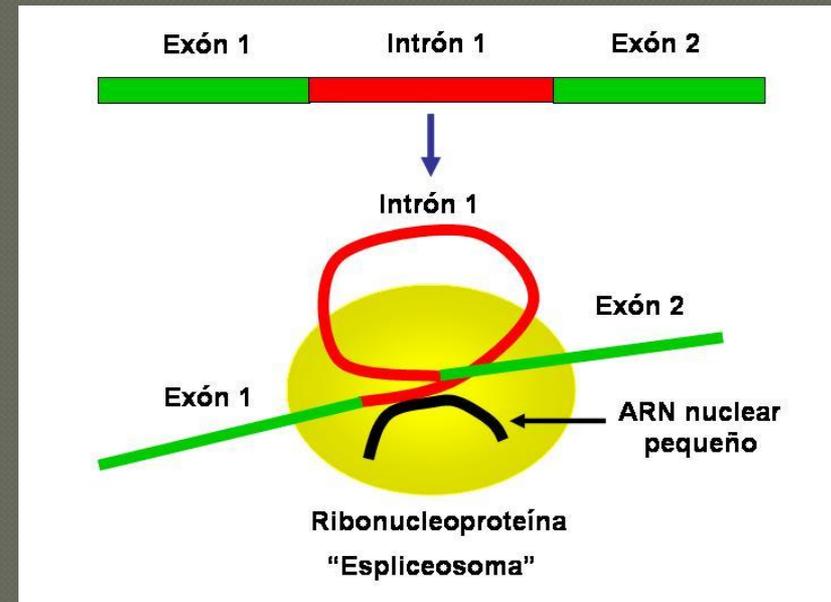
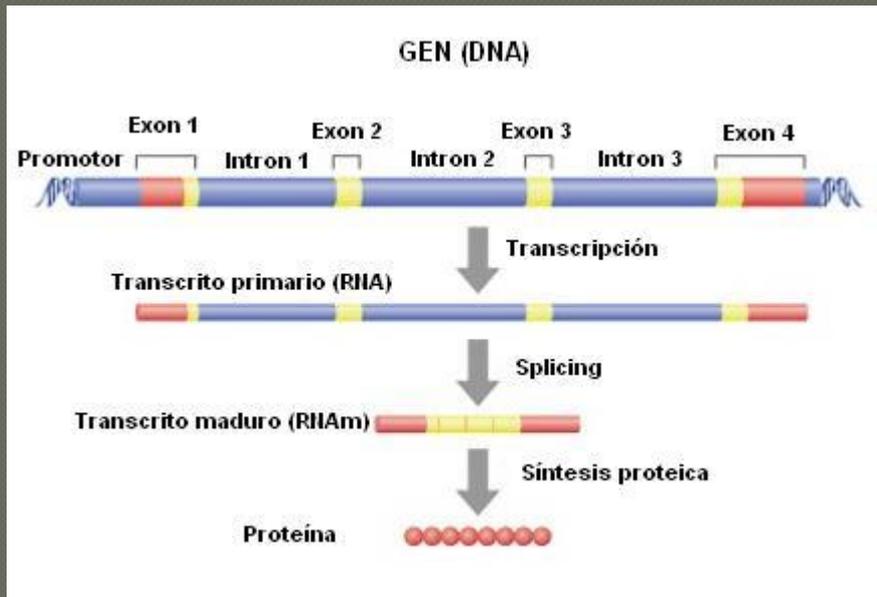


TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

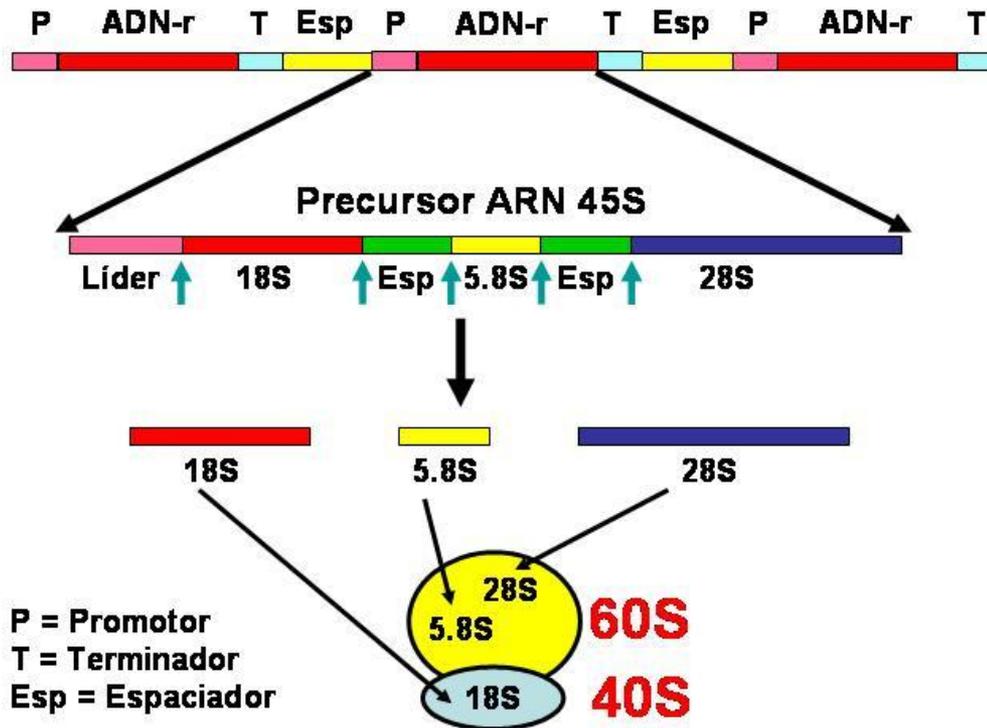
TRANSCRIPCIÓN

MADURACIÓN

Splicing: eliminación y empalme de segmentos interiores (INTRONES) del ARN-hn.



Maduración de ARN ribosómicos



TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

TRANSCRIPCIÓN

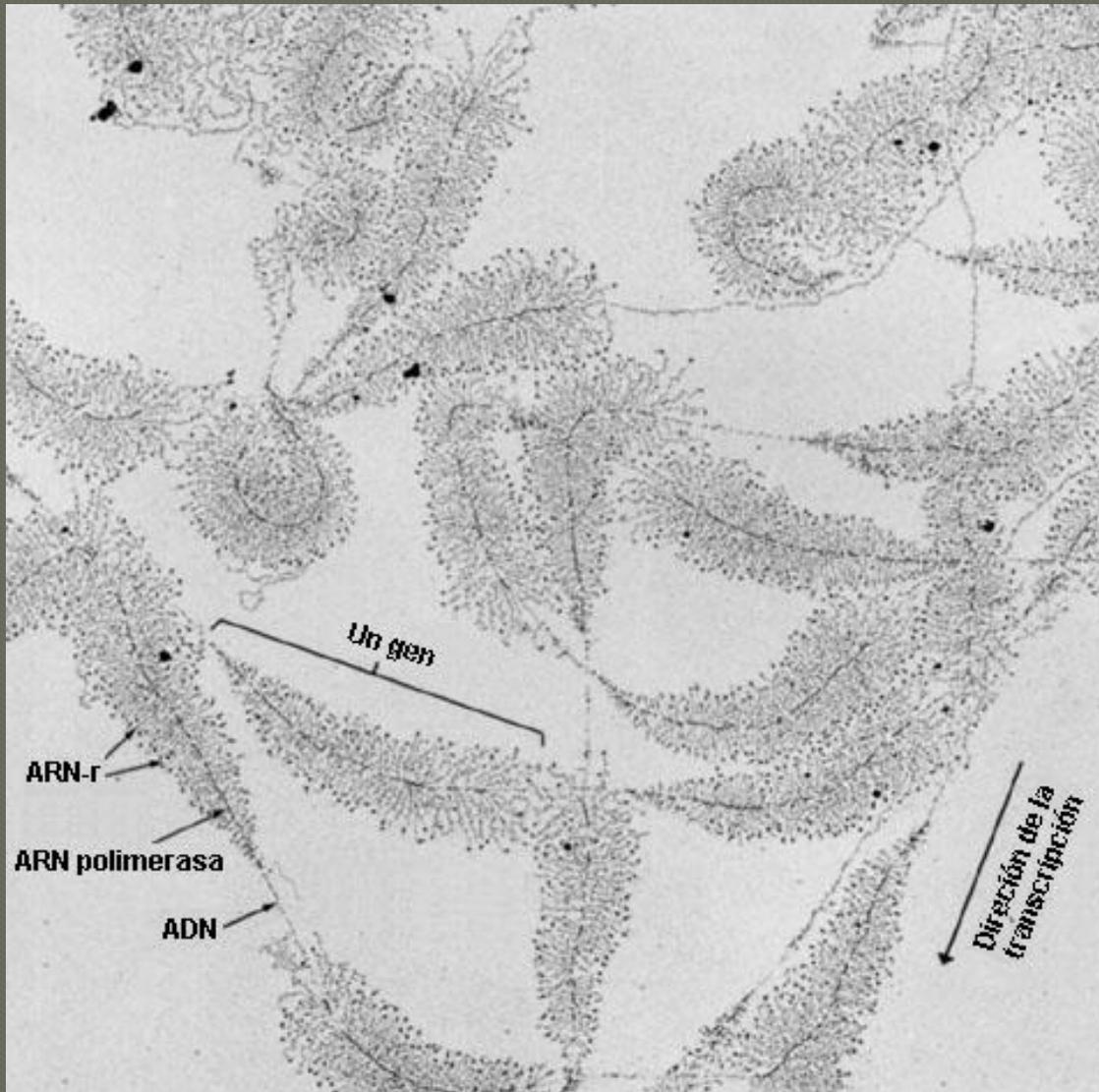


Imagen en ME

RETROTRANSCRIPCIÓN



Howard Temin y
David Baltimore

Obtuvieron el premio Nobel por el descubrimiento de la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, que cambió la idea de que el flujo genético sólo viajaba desde el ADN al ARN y desde éste a las proteínas (“dogma”).

Gracias a este enzima, todos los retrovirus (virus con ARN), pueden sintetizar ADN.

Algunos de estos virus pueden producir células cancerosas (como el virus del sarcoma de Rous o el virus del SIDA), ya que cuando el ARN vírico entra en una célula, lleva consigo su retrotranscriptasa.

La enzima sintetiza una doble hélice de ADN-ARN, que posteriormente es convertida enzimáticamente en una doble hélice de ADN-ADN que se integra en el cromosoma huésped.

Finalmente, el ADN es transcrito en copias de ARN vírico, las cuales son traducidas y empaquetadas en partículas víricas que serán liberadas al exterior celular, y así el ciclo se repite.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA

RETROTRANSCRIPCIÓN

VIH1: retrovirus del SIDA

