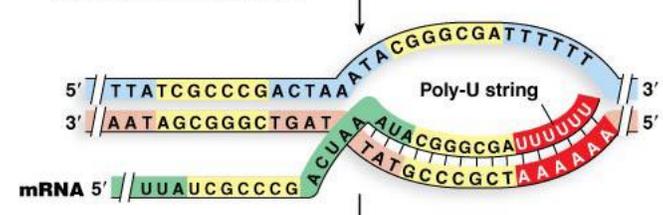
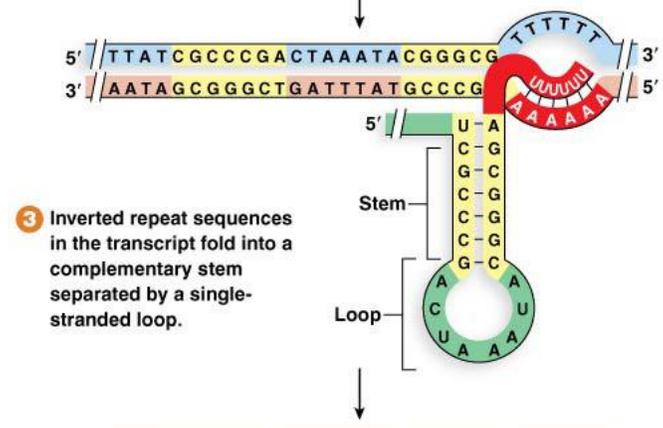


1 Intrinsic termination sequences contain inverted repeats separated by a spacer sequence and followed by a polyadenine sequence.



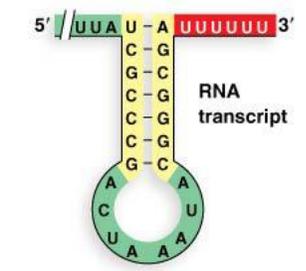
2 Transcription of the template strand forms mRNA.



3 Inverted repeat sequences in the transcript fold into a complementary stem separated by a single-stranded loop.



4 Hydrogen bonds between A-U base pairs break, releasing the transcript and terminating transcription.



TRANSCRIPCIÓN

Objetivos

Conocer la función, estructura, localización e importancia de los diferentes tipos de ARN que existen.

Conocer la estructura y función de las diferentes partes del gen.

Describir el mecanismo de transcripción del ADN que resulta en la formación del ARN y las peculiaridades de este mecanismo en Bacteria, Eukarya y Archaea.

Conocer los procesos de modificación post-transcripción del ARN y la contribución de éstos a su funcionalidad.

Elaborar explicaciones de cómo se puede afectar la transcripción en situaciones particulares.

Introducción

La existencia del ácido ribonucleico, ARN, se conocía desde el descubrimiento del ADN.

Ambas moléculas poseen una composición química similar pero su localización en las células, particularmente en las eucariotas, es diferente. El ADN es abundante en el núcleo y el ARN es abundante en el citoplasma.

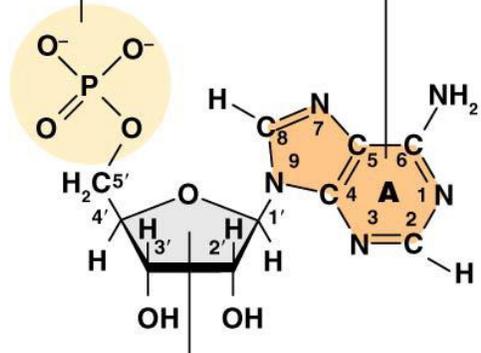
La similitud en la composición, junto a la diferencia en la localización, sugería que el ARN podía estar involucrado en la síntesis de proteínas.

Componentes y estructuras de los nucleótidos monofosfatos del ARN

Purine nucleotides

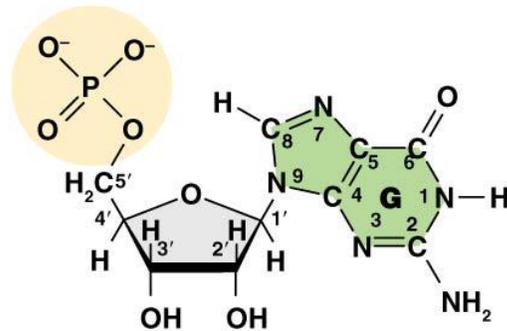
Phosphate

Nucleotide base



Ribose

Adenosine
5'-monophosphate
(AMP)

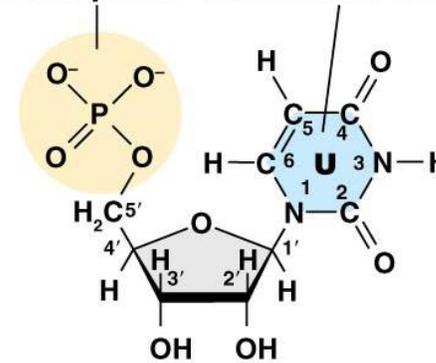


Guanosine
5'-monophosphate
(GMP)

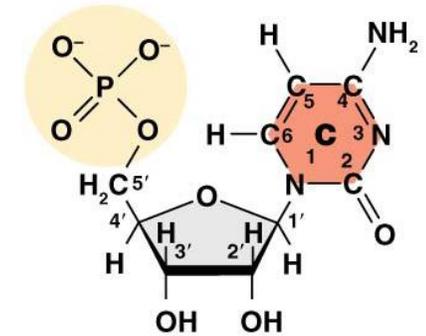
Pyrimidine nucleotides

Phosphate

Nucleotide base

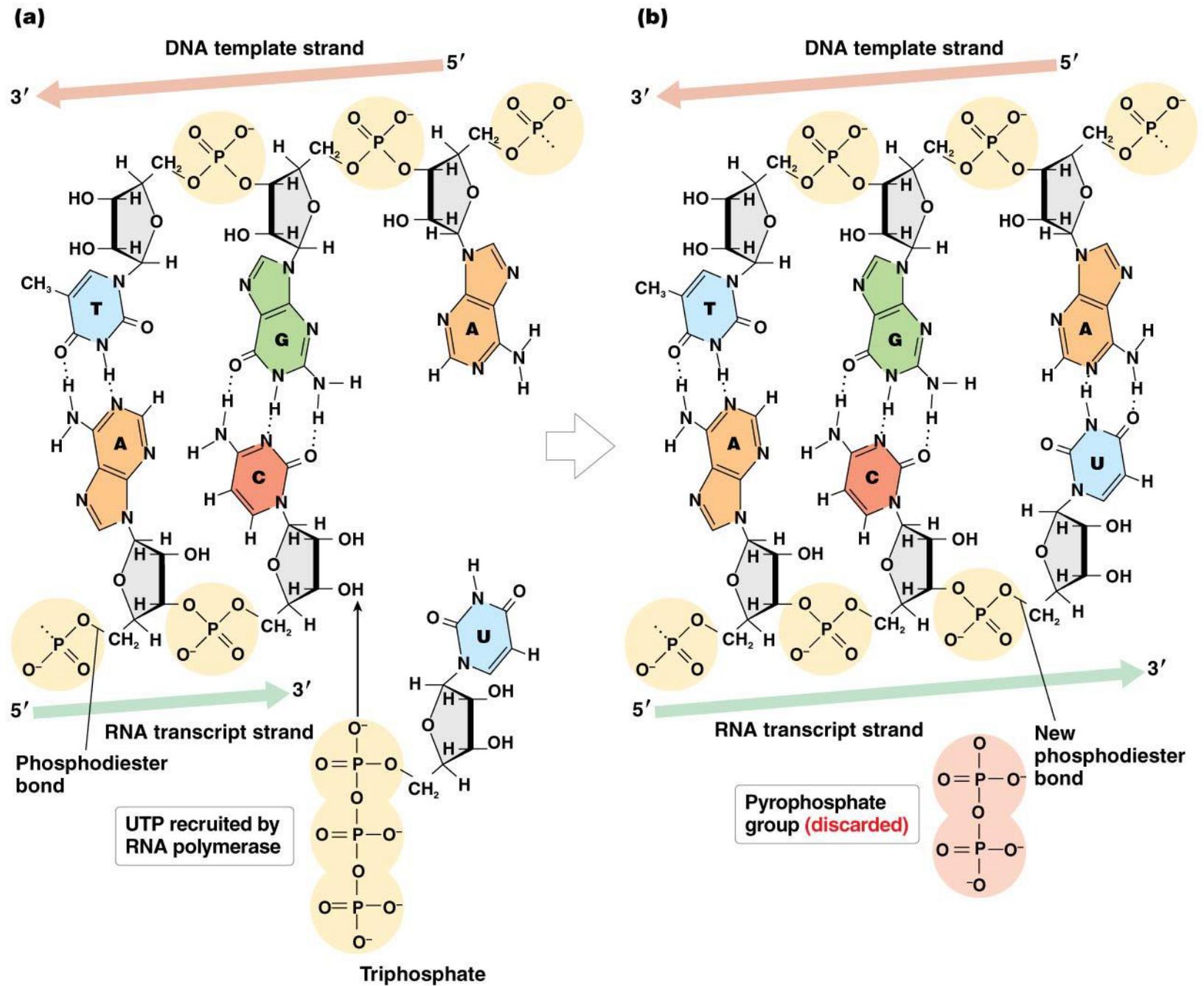


Uridine
5'-monophosphate
(UMP)



Cytidine
5'-monophosphate
(CMP)

Síntesis y estructura del ARN



Identificación del ARN mensajero

A finales de los 1950s, se utilizaron experimentos con nucleótidos marcados radiactivamente para seguir el rastro del ARN recién sintetizado en las células.

En una línea de estudio se monitoreó la transcripción en bacterias, inmediatamente después de la infección de un bacteriófago y se encontró que el ARN tenía una vida relativamente corta en la célula.

En otra línea de estudio se utilizó uracilo marcado en células eucariotas. Se observó que la radiactividad se concentraba inicialmente en el núcleo y posteriormente se desplazaba hacia el citoplasma donde se disipaba después de poco tiempo.

Se concluyó que el ARN se sintetizaba en el núcleo y transportaba la información al citoplasma para la síntesis de proteínas.

Brenner, Jacob y Meselson identificaron una forma inestable de ARN como el mensajero genético.

Ellos encontraron que en *E. coli* infectadas, el bacteriófago T2 usaba los ribosomas bacterianos y una molécula mensajera para codificar las proteínas del fago.

El ARN que dirigía la síntesis de las proteínas del fago se formaba y se degradaba rápidamente. Esta molécula fue llamada ARN mensajero.

Clasificación del ARN

El **ARN mensajero (mRNA)** es producido a partir de genes que codifican para proteínas y es un intermediario, de vida corta, entre el ADN y la proteína.

Es el único tipo de ARN que pasa por la traducción.

La transcripción del mRNA es a menudo seguida por un proceso de modificación post-transcripcional.

ARNs funcionales

Los **ARNs funcionales** no codifican para proteínas, en su lugar desempeñan un rol funcional en las células.

Los **ARNs de transferencia (tRNAs)** son codificados en muchas formas y son responsables por la unión, transportación y deposición de un aminoácido para ser incorporado en una cadena de proteína en formación.

El **ARN ribosomal (rRNA)** se combina con numerosas proteínas para formar los ribosomas.

El **ARN nuclear pequeño (snRNA)**, existen varios tipos, se encuentran en el núcleo y desempeñan un rol en el procesamiento del mRNA.

El **Micro ARN (miRNA)** y el **ARN pequeño de interferencia (siRNA)** están activos en las células de plantas y animales, y están involucrados en la regulación post-transcripcional del mRNA.

Algunos ARNs en las células eucariotas tienen actividad catalítica y son llamados **ribozimas**.

La transcripción

La transcripción es la síntesis de una molécula de una sola hebra de ARN por la ARN polimerasa.

La polimerasa usa una **hebra** de ADN como **plantilla** para ensamblar una hebra complementaria y antiparalela de ribonucleótidos.

La **hebra** de ADN **codificadora** es complementaria a la hebra que funciona como plantilla.

Estructura de un gen

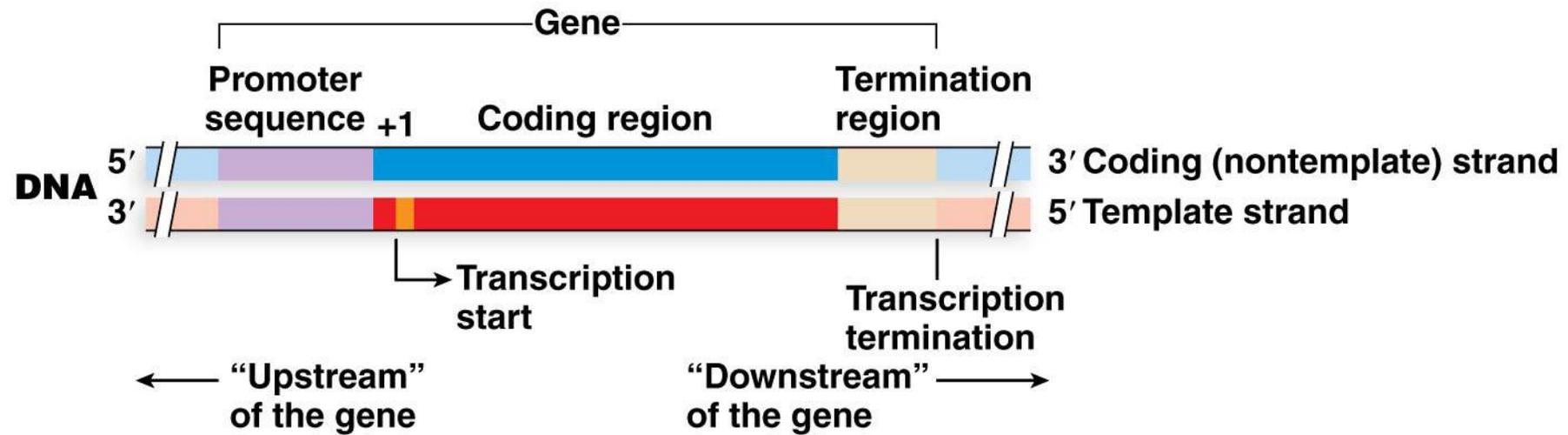
Un gen contiene varios segmentos con funciones distintas.

El **promotor** está inmediatamente en la zona de inicio de la transcripción “**upstream**” (5´) y es referido como el nucleótido +1. Su función es controlar el acceso de la polimerasa al gen.

La **región codificadora** del gen es la porción que contiene la información necesaria para sintetizar el producto proteico.

La **región de terminación** del gen regula el final de la transcripción. Este segmento se encuentra “**downstream**” (3´) inmediatamente después de la región codificadora.

Diagrama general de la estructura de un gen



Pasos esenciales de la transcripción en *E. coli*

1. Reconocimiento del promotor.
2. Iniciación de la transcripción.
3. Alargamiento de la hebra (cadena).
4. Terminación de la hebra (cadena).

Composición de la ARN polimerasa

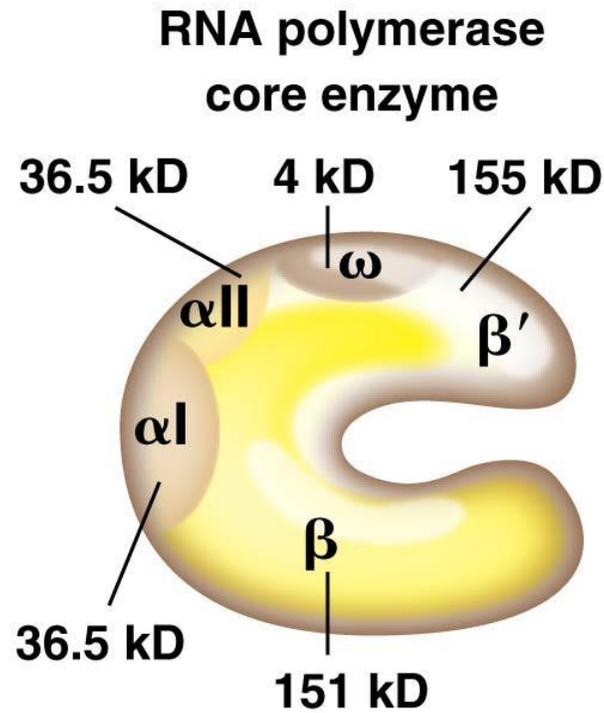
La ARN polimerasa bacteriana está compuesta por una **enzima central (core enzyme)** pentamérica que se une a una sexta subunidad llamada **subunidad sigma (σ)**.

La enzima central está compuesta por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad ω .

La enzima central puede transcribir el ARN a partir del ADN pero no puede unirse al promotor o iniciar la síntesis de ARN sin la subunidad σ .

Varios tipos de subunidades sigma, llamadas subunidades sigma alternativas, son producidas. Éstas alteran la conformación de la enzima central de maneras ligeramente distintas para facilitar la asociación con regiones promotoras diferentes.

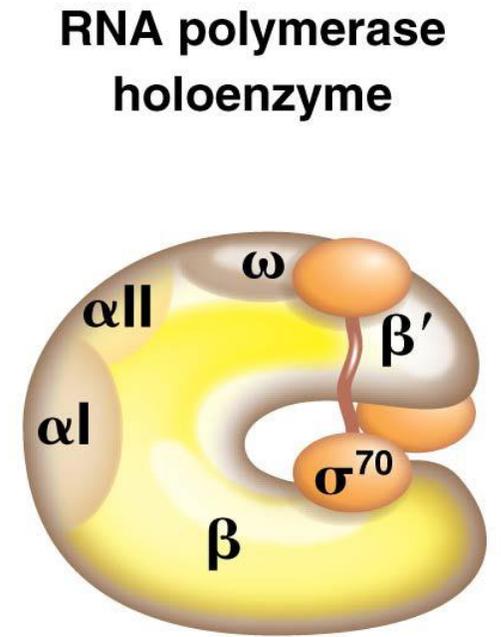
La ARN polimerasa central, junto a una subunidad sigma (σ) forma una holoenzima completamente activa.



390 kD
molecular
weight



+



One of four kinds
in *E. coli*; molecular
weights are from
27 to 70 kD.

Alternative sigma
subunits give the
holoenzyme
specificity for
different promoters.
(430 kD molecular
weight).

Promotores de la transcripción

Un promotor es una secuencia de ADN que actúa como sitio de unión para la ARN polimerasa y otras proteínas asociadas a la transcripción.

El promotor está situado a corta distancia, a unos pocos nucleótidos de +1, de la secuencia codificadora.

La ARN polimerasa es “atraída” a los promotores por la presencia de secuencias de consenso.

Secuencias de consenso en el promotor

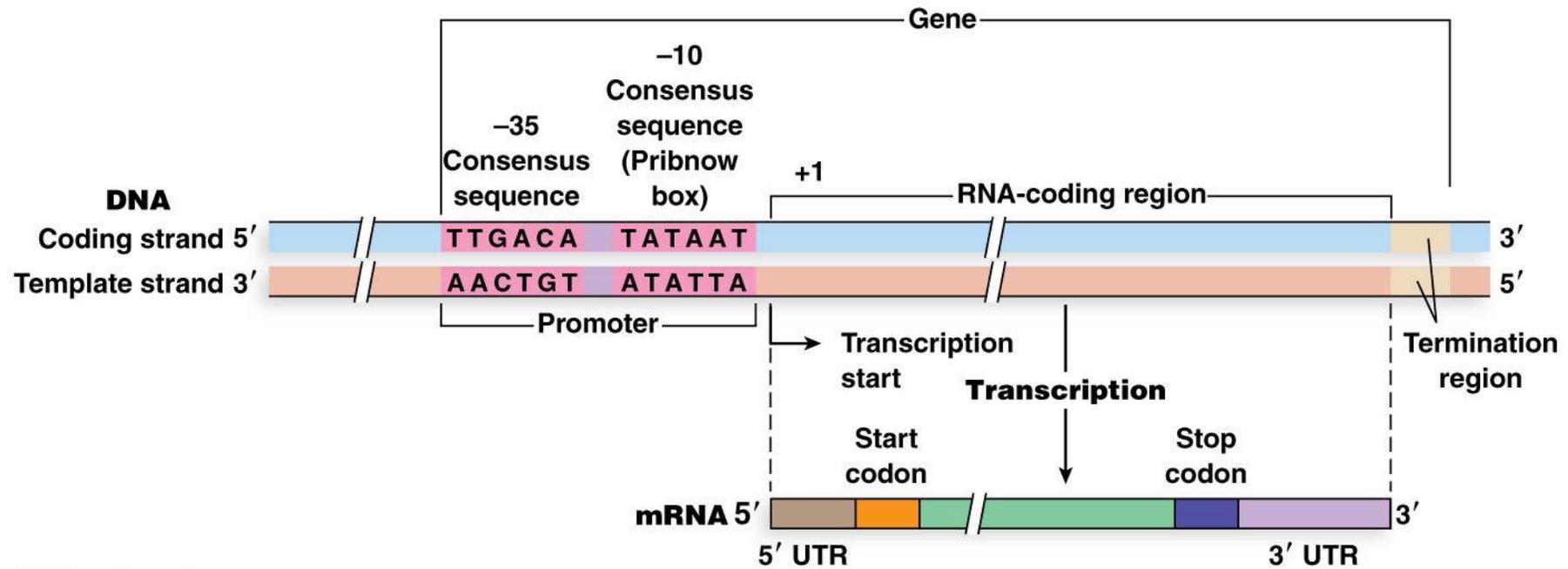
Las secuencias de consenso están escritas en una sola hebra, en dirección 5' - 3'.

En la posición -10 está la **secuencia de consenso -10** o **Pribnow box**, 5'-TATAAT-3'.

En la posición -35 está la **secuencia de consenso -35**, 5'-TTGACA-3'.

La polimerasa se une a las secuencias -10 y -35 y ocupa el espacio entre y alrededor de ellas.

Estructura de un gen y detalles del promotor en bacterias



Iniciación de la transcripción

Primero, la holoenzima se une de manera relajada a la secuencia promotora y después se une fuertemente para formar el **complejo promotor cerrado**.

A continuación la holoenzima desenrolla cerca de 18 bp de ADN alrededor de la posición -10 para formar el **complejo promotor abierto**.

Posteriormente la holoenzima avanza “downstream” para iniciar la síntesis de ARN en el sitio +1.

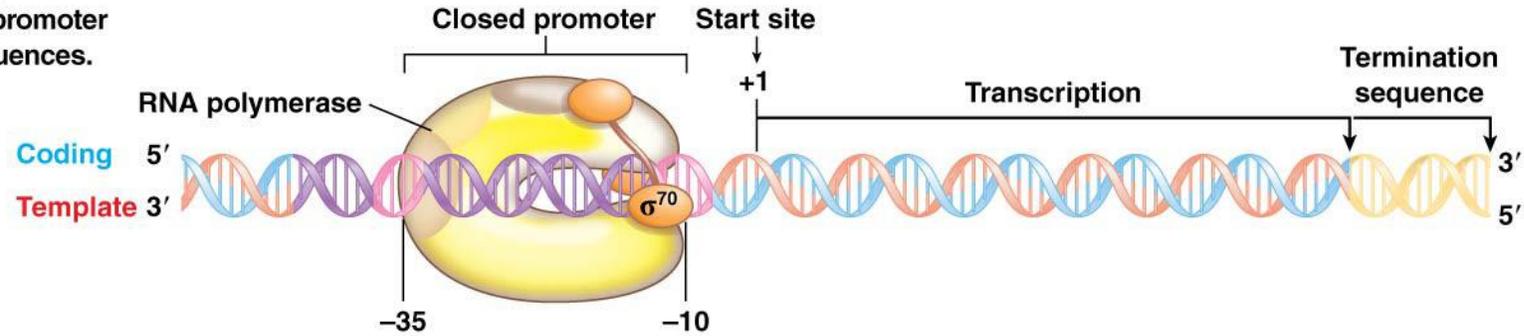
La secuencia varía considerablemente entre promotores, la presencia de sitios sigma alternativos permite la unión de la holoenzima a los mismos.

Table 8.2 *Escherichia coli* RNA Polymerase Sigma Subunits

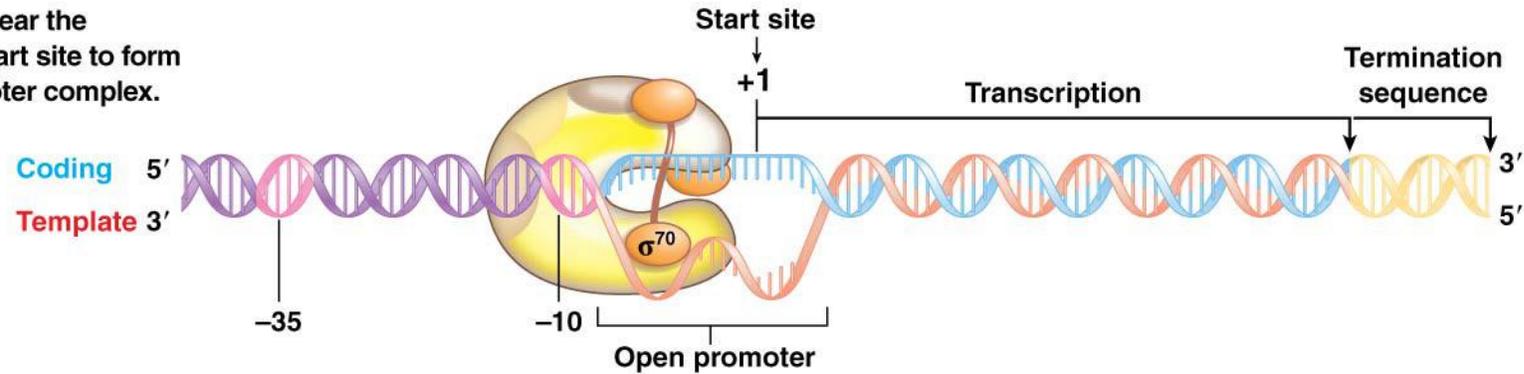
Subunit	Molecular Weight (Daltons)	Consensus Sequence		Function
		-35	-10	
σ^{28}	28	TAAA	GCCGATAA	Flagellar synthesis and chemotaxis
σ^{32}	32	CTTGAA	CCCCATTA	Heat shock genes
σ^{54}	54	CTGGPyAPyPu	TTGCA	Nitrogen metabolism
σ^{70}	70	TTGACA	TATAAT	Housekeeping genes

Transcripción en bacterias

- 1 The RNA polymerase core enzyme and sigma subunit bind to -10 and -35 promoter consensus sequences.



- 2 DNA unwinds near the transcription start site to form the open promoter complex.



Alargamiento de la transcripción

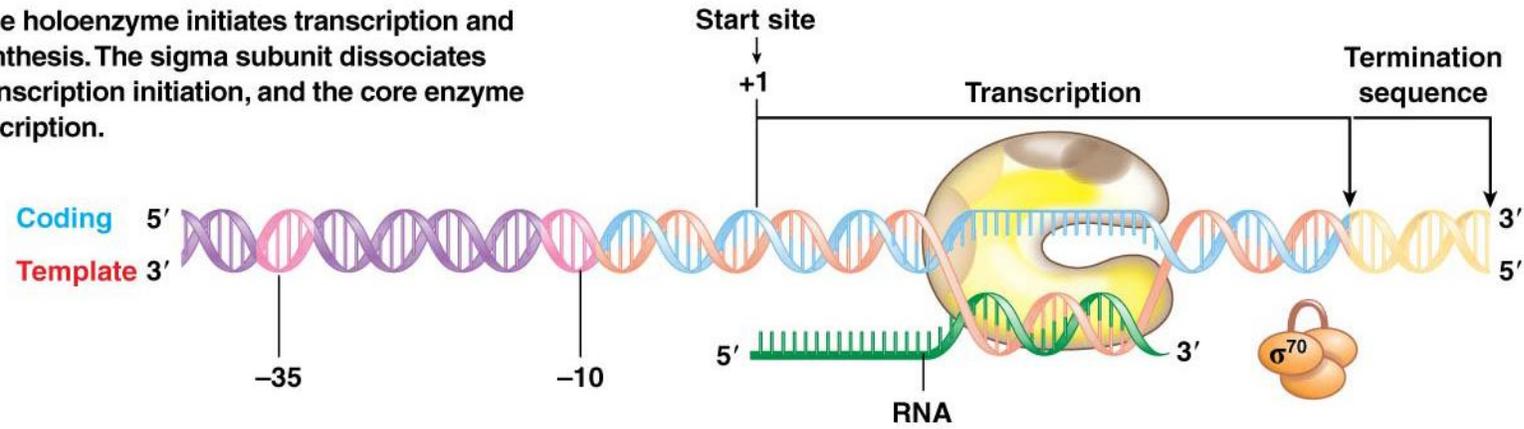
La polimerasa inicia la síntesis de ARN el sitio +1.

La holoenzima permanece intacta hasta que se han unido los primeros 8-10 nucleótidos y, en este punto, la subunidad sigma se desasocia de la enzima central.

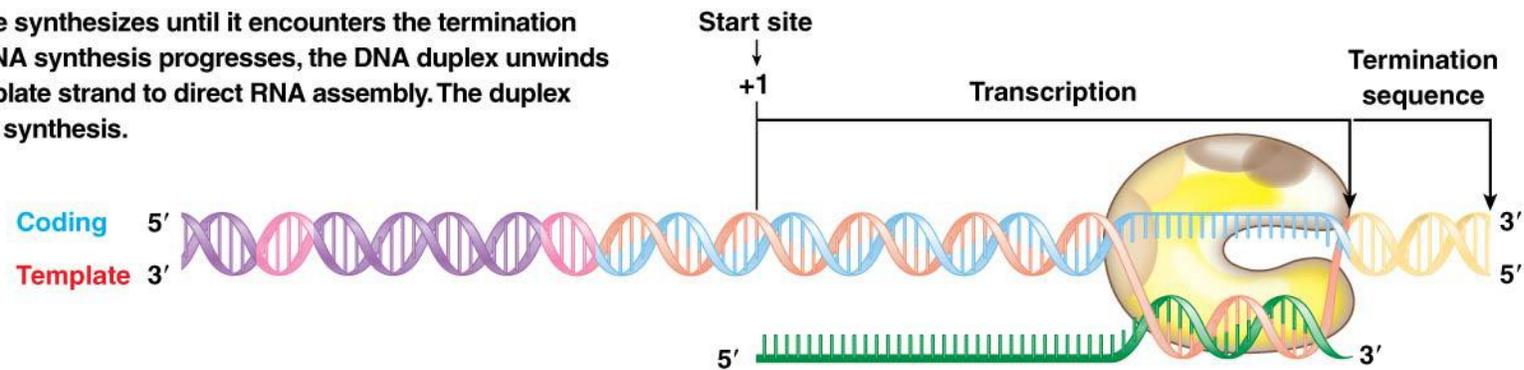
El ADN es desenrollado por delante de la polimerasa para mantener una apertura de alrededor de 18 bp. La doble hélice se reconstituye detrás de la ARN polimerasa.

Transcripción en bacterias (cont.)

- 3 RNA polymerase holoenzyme initiates transcription and begins RNA synthesis. The sigma subunit dissociates shortly after transcription initiation, and the core enzyme continues transcription.



- 4 The core enzyme synthesizes until it encounters the termination sequence. As RNA synthesis progresses, the DNA duplex unwinds to allow the template strand to direct RNA assembly. The duplex closes following synthesis.



Terminación de la transcripción

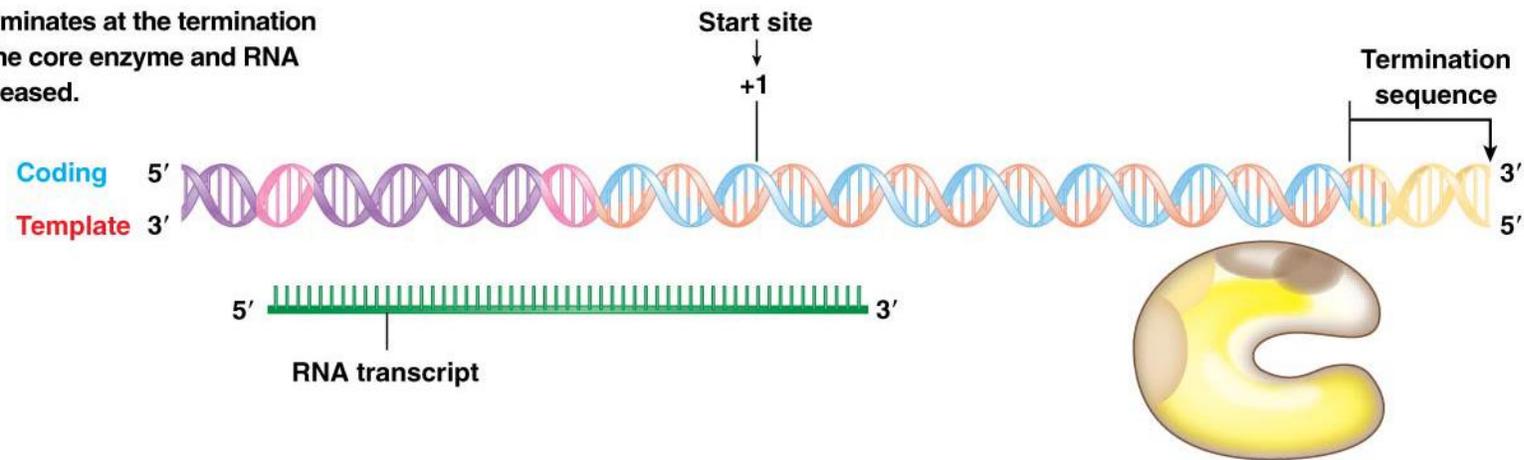
Cuando la transcripción del gen es completada, el extremo 3' del ARN se separa de la enzima central.

Posteriormente la polimerasa se desasocia del ADN.

Una segunda ronda de transcripción comienza poco tiempo después de haber terminado la primera.

Transcripción en bacterias (cont.)

- 5 Transcription terminates at the termination sequence, and the core enzyme and RNA transcript are released.



Mecanismos de terminación de la transcripción

La secuencia de terminación del ADN indica la terminación de la transcripción. Usualmente esta secuencia es altamente repetitiva.

La **terminación intrínseca**, es un mecanismo que sólo depende de la presencia de elementos repetitivos que inducen la estructura secundaria necesaria para la terminación.

La **terminación dependiente de rho**, requiere una secuencia de terminación distinta y la intervención de la **proteína rho**.

Terminación intrínseca

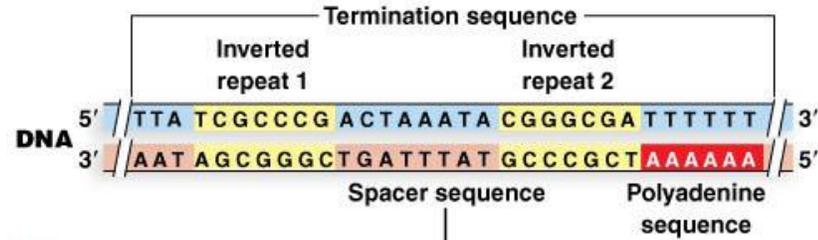
La mayoría de las terminaciones en bacteria ocurren por esta vía. La secuencia de terminación incluye un conjunto invertido de unidades repetidas, seguido por un segmento de adeninas.

El mRNA con el conjunto invertido forma una **estructura en lazo** conocida como **horquilla de pelo (hairpin)**.

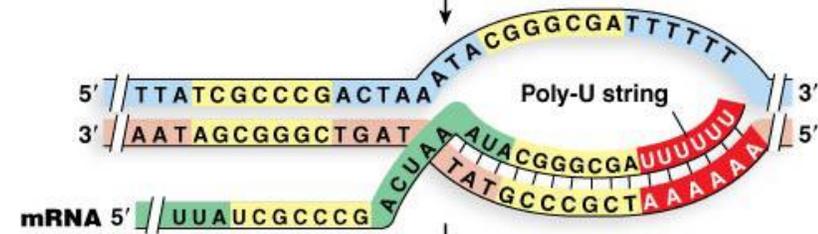
La horquilla, seguida por una serie de **Us**, provoca que la ARN polimerasa se ponga lenta y se desestabilice.

La inestabilidad causada por la lentitud de la polimerasa y los pares U-A inducen que la enzima libere el transcripto y se separe del ADN.

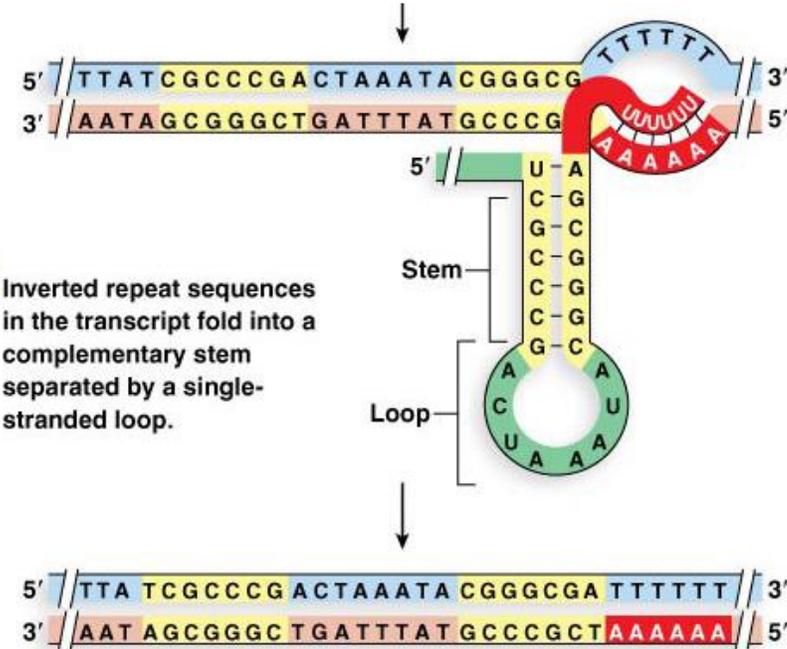
Terminación intrínseca



- 1 Intrinsic termination sequences contain inverted repeats separated by a spacer sequence and followed by a polyadenine sequence.



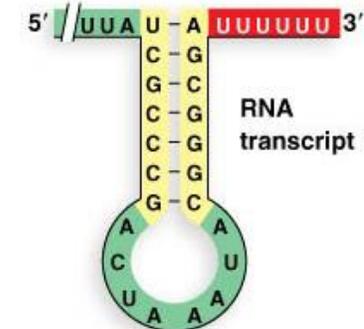
- 2 Transcription of the template strand forms mRNA.



- 3 Inverted repeat sequences in the transcript fold into a complementary stem separated by a single-stranded loop.



- 4 Hydrogen bonds between A-U base pairs break, releasing the transcript and terminating transcription.



Terminación dependiente de rho

Algunas bacterias requieren que la proteína rho se una al mRNA y catalice su separación de la ARN polimerasa.

En este caso, las secuencias de terminación no tienen un segmento rico en uracilos, en su lugar tiene un **sitio de utilización de rho (rut site)**, un fragmento de aproximadamente 50 nucleótidos rico en citosinas.

La proteína rho posee dos dominios funcionales y está compuesta por seis polipéptidos idénticos. Es activada por la unión de ATP a uno de sus dominios, facilitando la unión al sitio de utilización.

Una vez unida, la proteína se mueve a lo largo del transcripto y cataliza la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre el mRNA y la plantilla de ADN, lo que activa la separación de la polimerasa.

La transcripción en Eukarya y Archaea

En Bacteria y Archaea existe una sola ARN polimerasa pero en bacterias, la polimerasa tiene diferentes subunidades sigma.

En Eukarya existen múltiples ARN polimerasas que transcriben diferentes genes.

La ARN polimerasa usada para transcribir la mayoría de los genes en eucariotas y la ARN polimerasa de arquea poseen una estructura común que diverge de la ARN polimerasa de bacterias.

La transcripción en eucariotas y arquea es más compleja que en bacteria. Las secuencias de consenso en los promotores y el complejo iniciación son más complejos que en bacterias.

Transcripción en eucariotas

Los genes en eucariotas poseen intrones y exones, y requieren un procesamiento particular para remover los intrones.

En eucariotas el ADN está asociado con proteínas para formar la cromatina. La composición de la cromatina asociada a un gen afecta su transcripción.

La cromatina desempeña un rol importante en la regulación de los genes en eucariotas.

ARN polimerasas en eucariotas

ARN polimerasa I (RNA pol I) transcribe tres genes de rRNA.

ARN polimerasa II (RNA pol II) transcribe genes que codifican para proteínas (mRNA) y para la mayoría de los genes asociados con los snRNA.

ARN polimerasa III (RNA pol III) transcribe tRNA, un tipo de snRNA y un tipo de rRNA.

RNA pol II y RNA pol III transcriben miRNA y siRNA.

Table 8.3**RNA Polymerase Composition**

Bacteria	Archaea	Eukarya
<i>Escherichia coli</i> 5 subunits	<i>Sulfolobus solfataricus</i> 10 subunits	<i>Saccaromyces cerevisiae</i> (RNA pol II) 12 subunits
Homologous proteins:		
β'	RpoA'/A''	Rpb1
β	RpoB	Rpb2
α I	RpoD	Rpb3
ω	RpoK	Rpb6
α II	RpoL	Rpb11
Additional proteins:		
	RpoE, RpoF, RpoH,	Rpb4, Rpb5, Rpb7, Rpb8,
	RpoN and RpoP	Rpb9, Rpb10, Rpb12

Elementos promotores en eucariota

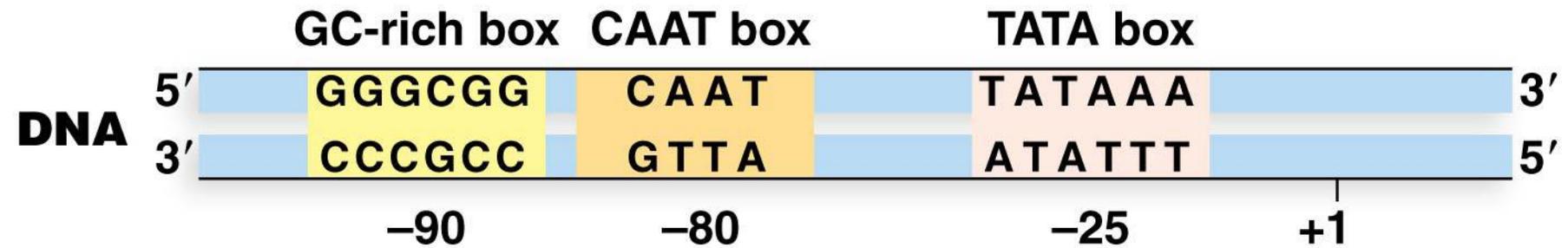
La secuencia de consenso del promotor más común en eucariotas se conoce como **TATA box**, o **Goldgerg-Hogness box**. Está localizada aproximadamente en la posición -25 y la secuencia es 5'-TATAAA-3'.

Una **CAAT box** se encuentra, a menudo, cerca de la posición -80.

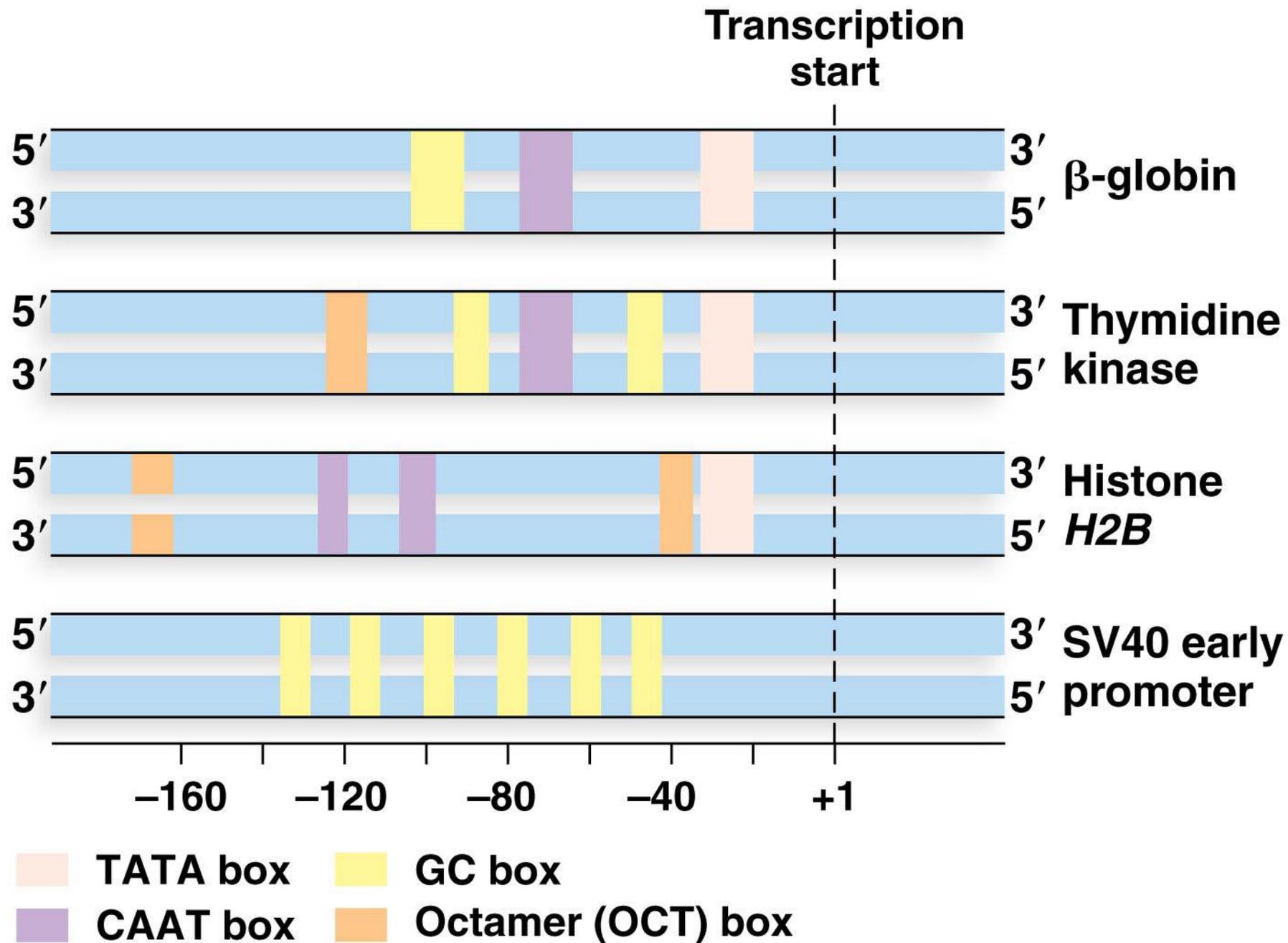
Una **GC-rich box** (consenso 5'-GGGCGG-3') está localizada en -90 o hacia adelante "upstream".

Los promotores en eucariota exhiben un alto grado de variabilidad en tipo, número y localización de las secuencias de consenso. TATA box es más común mientras que CAAT box y GC-rich box son más variables.

Secuencias de consenso en los elementos promotores en eucariotas



Ejemplo de la
variabilidad en
los elementos
promotores



Reconocimiento del promotor

RNA pol II reconoce y se une a las secuencias promotoras en eucariotas con la ayuda de proteínas llamadas **factores de transcripción (TFs)**.

Los TFs se unen a secuencias reguladoras e interactúan directamente, o indirectamente, con la polimerasa. Los que interactúan con RNA pol II son llamados factores TFII .

TATA box es el sitio principal de unión durante el reconocimiento del promotor.

En TATA box, una proteína que contiene la **proteína de unión a TATA (TBP)** y subunidades de una proteína llamada **factor de asociación a TBP (TAF)**, se une a la secuencia TATA box.

Reconocimiento del promotor

TFIID unido a TATA box forma el **complejo de compromiso inicial (initial committed complex)**.

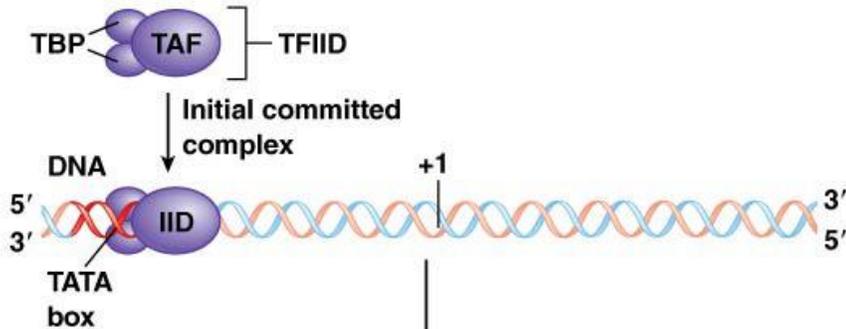
A continuación TFIIA, TFIIB, TFIIF y RNA pol II se unen al complejo para formar el **complejo de iniciación mínimo (minimal initiation complex)**.

Al complejo de iniciación mínimo se unen TFIIIE y TFIIH para formar el **complejo de preiniciación (preinitiation complex PIC)**.

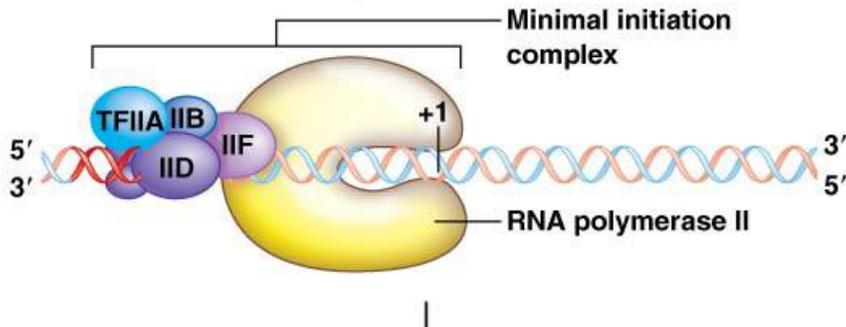
El complejo de iniciación completo contiene múltiples proteínas comúnmente llamadas factores generales de transcripción. Éste dirige a RNA pol II a la posición +1 donde comienza el ensamblaje del mRNA.

Seis factores de transcripción se unen a la región promotora y preparan el escenario para la transcripción por la ARN polimerasa II en eucariotas

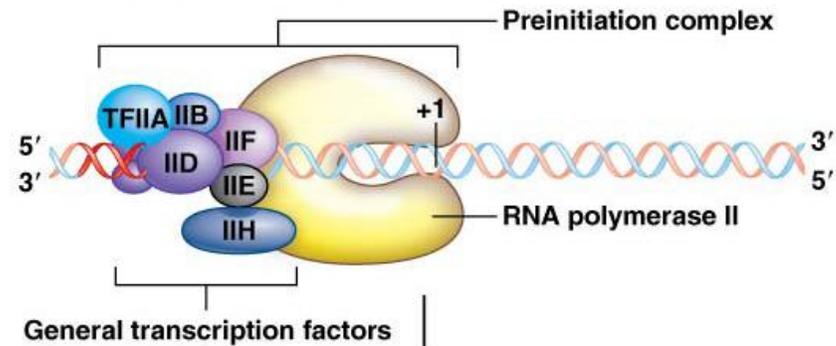
1 TAF and TBP form TFIID and bind the TATA box.



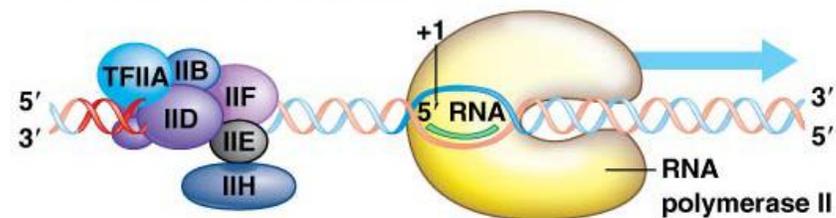
2 The addition of TFIIA, TFIIB, RNA polymerase II, and TFIIF forms the minimal initiation complex.



3 TFIIE and TFIIH join to form the preinitiation complex. RNA polymerase II is poised to begin transcription.



4 RNA polymerase II is released from the GTPs in the preinitiation complex to begin transcription.



Potenciadores y silenciadores

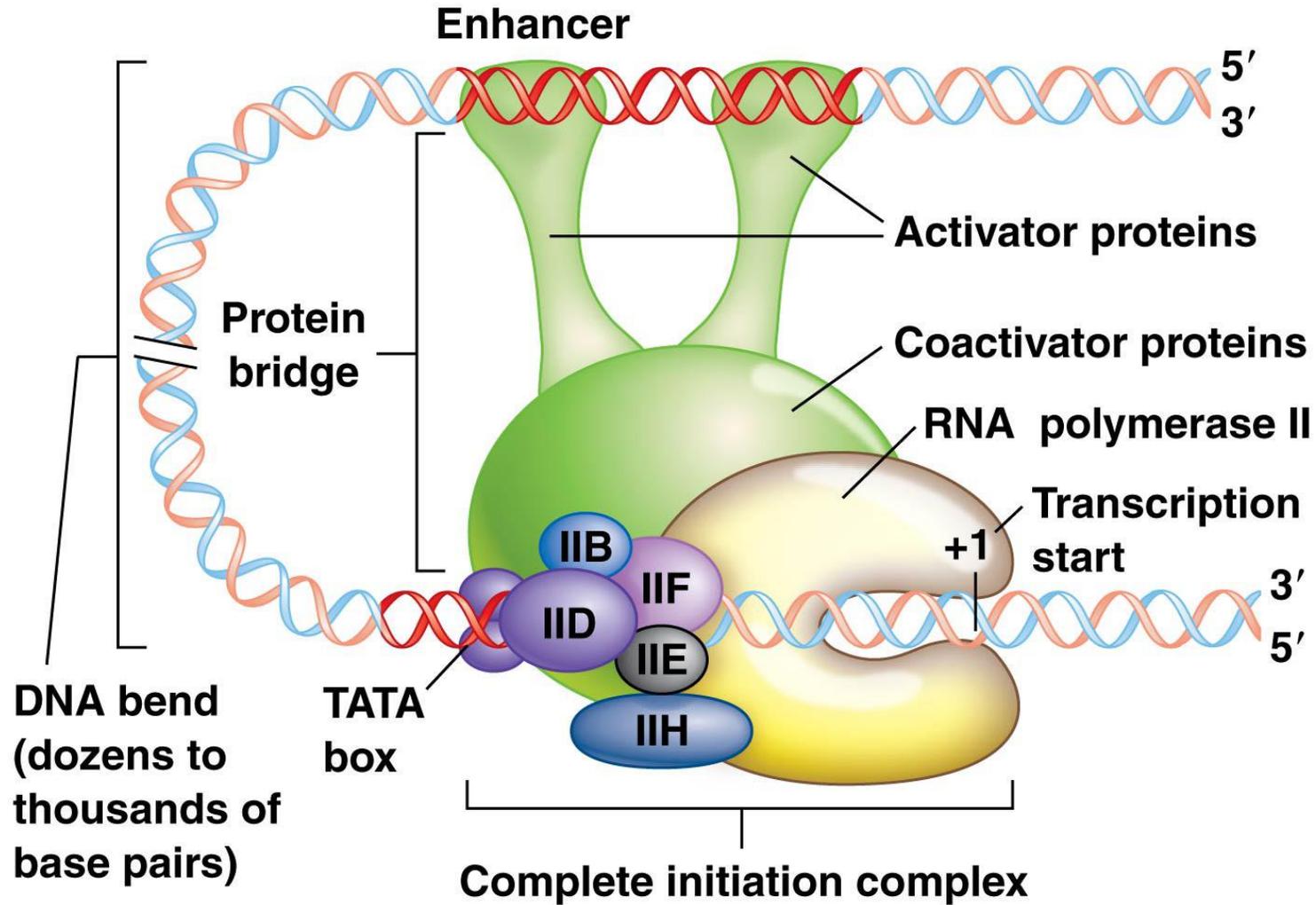
En ocasiones los promotores no son suficientes por sí mismos para iniciar la transcripción en eucariotas y se precisa la intervención de secuencias reguladoras de ADN que promueven la expresión diferencial de los genes.

Estas secuencias reguladoras son conocidas como secuencias potenciadoras y silenciadoras.

Las **secuencias potenciadoras** incrementan la expresión de determinados genes.

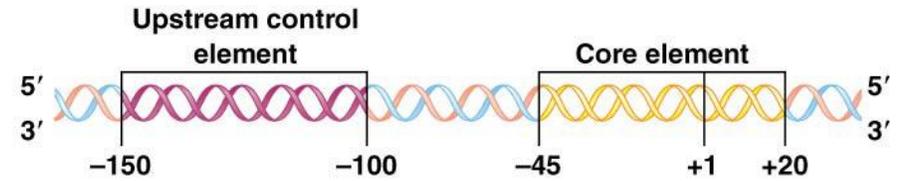
Las **secuencias silenciadoras** son elementos de ADN que actúan a distancia para reprimir la expresión de determinados genes.

Los potenciadores en conjunción con los promotores activan la transcripción

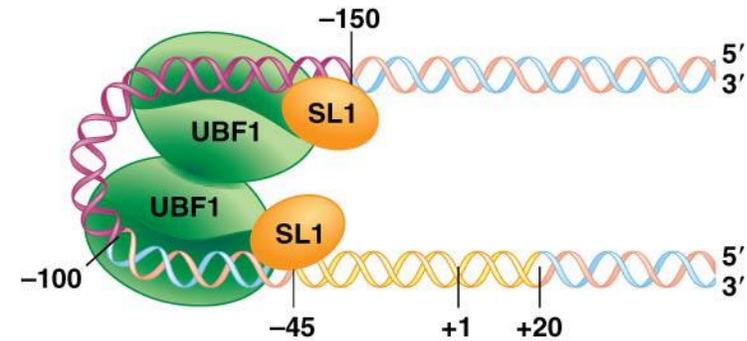


Secuencias promotoras de consenso para la iniciación de la transcripción por RNA pol I

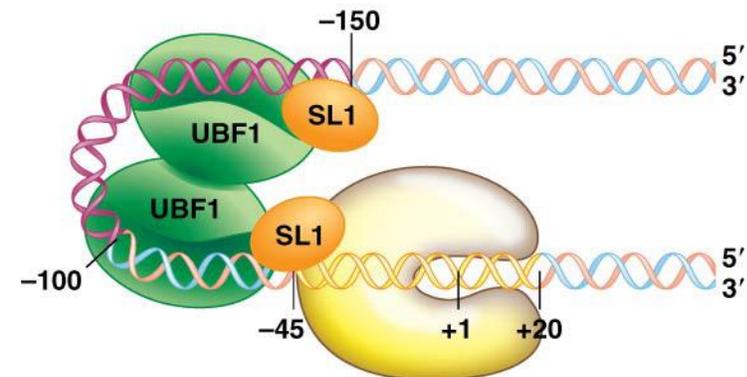
- 1 The core element initiates transcription, and the upstream control element increases transcription efficiency.



- 2 UBF1 and SL1 bind to upstream control and core elements.



- 3 RNA pol I is recruited to the core element to initiate transcription.



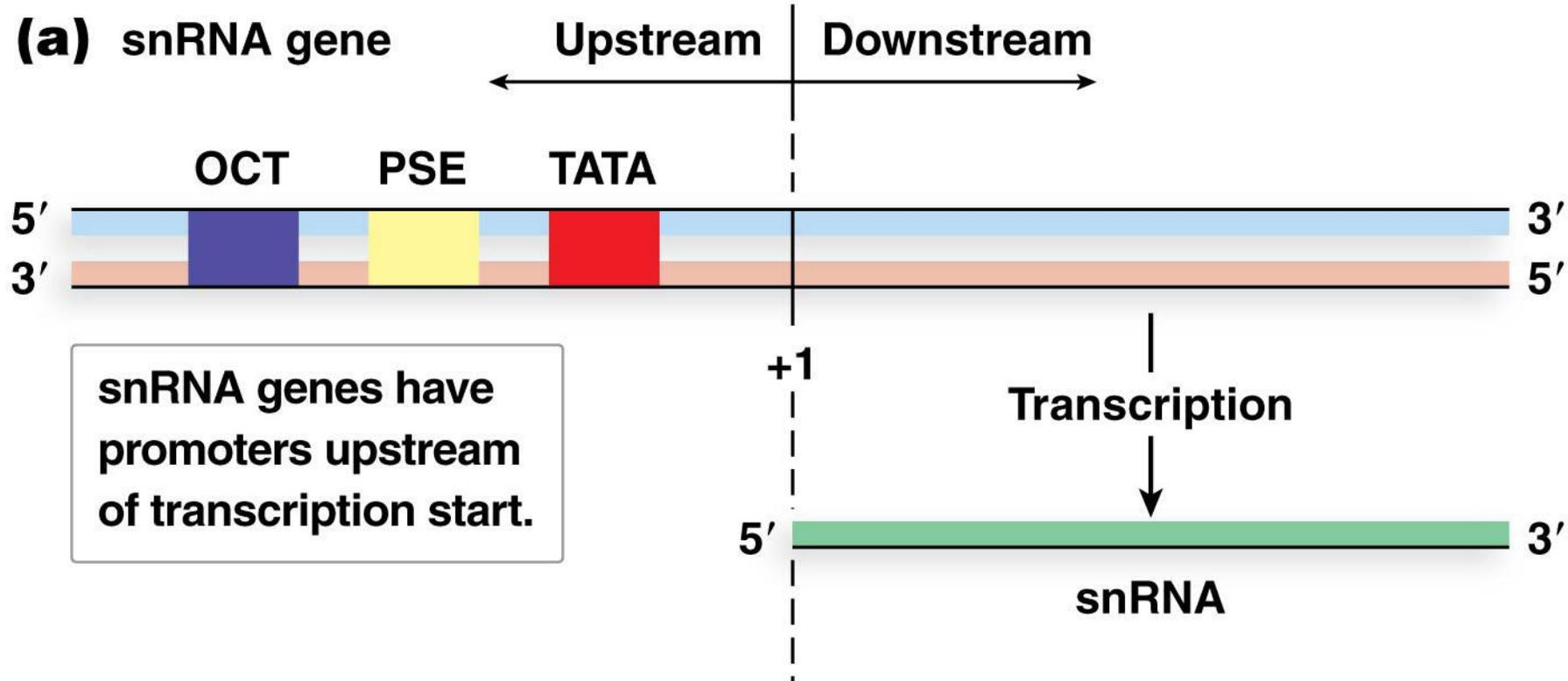
Promotores de la ARN pol III

La ARN pol III principalmente transcribe tRNA pero también puede transcribir rRNA y otros genes que codifican para RNA.

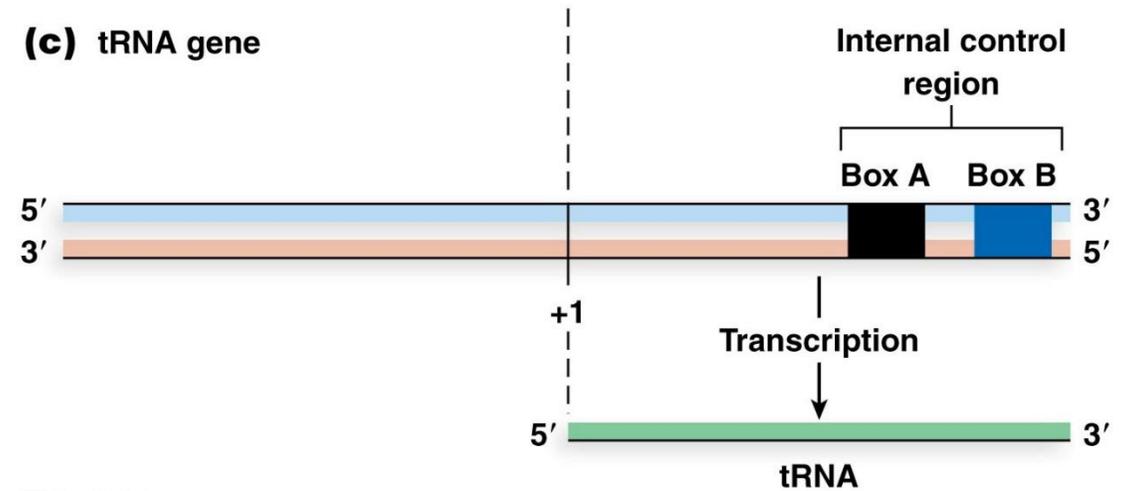
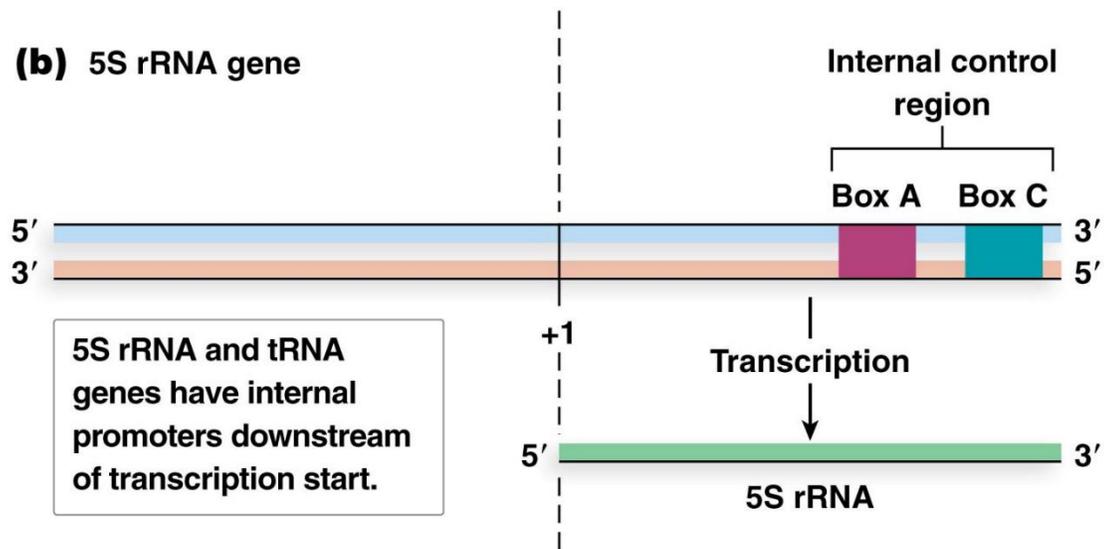
Los ARN nucleares pequeños (snRNA) tienen tres elementos “upstream”, mientras que el 5S rRNA y los tRNA tienen dos **elementos promotores internos**.

Los elementos promotores internos están “downstream”, después de +1.

Promotores de la ARN pol III para los snRNA

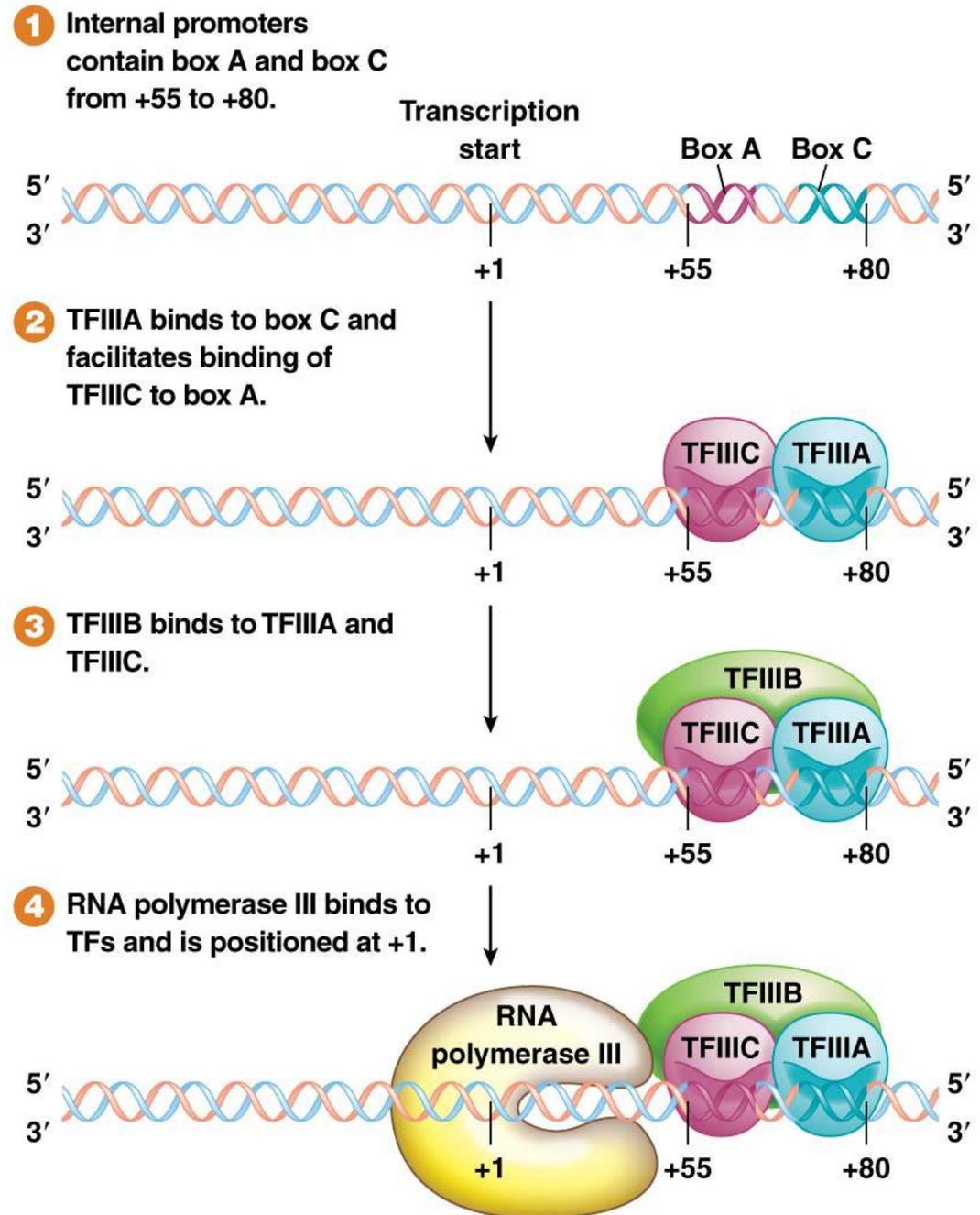


Promotores de la ARN pol III para los 5S rRNA y los tRNA



Función de los elementos promotores internos

El factor de transcripción TFIIIA se une a box B o box C lo que facilita la unión del TFIIIC a box A. Posteriormente TFIIIB se une a los otros factores de transcripción y finalmente la ARN polimerasa se une al complejo y solapa nucleótido +1 para iniciar la transcripción.



Terminación de la transcripción en la ARN pol III y la ARN pol I

Cada ARN polimerasa en eucariotas tiene un mecanismo de terminación diferente.

La ARN pol III transcribe una secuencia terminal que produce una cadena de uracilos en el transcrito lo que provoca inestabilidad y la terminación del proceso. En este caso no se forma la estructura de lazo.

La ARN pol I termina en una secuencia de consenso, de 17 bp, a la que se une el **factor de terminación de la transcripción 1 (TTF1)**.

Transcripción en Archaea

Aunque Archaea y Bacteria poseen similitudes estructurales, la transcripción ocurre de manera diferente en cada grupo.

La “maquinaria” representa una versión simplificada y ancestralmente relacionada con lo que sucede en Eukarya en la ARN pol II.

En arquea, tres proteínas homólogas a los factores de transcripción en eucariotas identifican dos regiones promotoras de consenso para facilitar la unión de la polimerasa e iniciar la transcripción.

Procesamiento post-transcripcional de la molécula de ARN

Los transcritos en eucariotas son más estables que en bacterias y arqueas.

En eucariotas la transcripción y la traducción son procesos separados en el espacio y en el tiempo.

A diferencia de los genes en bacterias y arqueas, los genes en eucariotas poseen intrones (i.e., secuencias que no codifican para un producto proteico y no son traducidas).

Procesamiento post-transcripcional de la molécula de ARN

En eucariotas, el “gen” mRNA en el inicio es llamado **pre-mRNA** y cuando ha sido completamente procesado se llama **mRNA maduro**. Las modificaciones al pre-mRNA incluyen:

1. **5' capping** (¡encaperuzamiento!).
2. **3' polyadenylation** (poliadenilación).
3. **Intron splicing** (corte y empalme de intrones).

5' capping del mRNA

La adición de guanina al extremo 5' del mRNA se conoce como 5' capping.

Después que los primeros 20 a 30 nucleótidos del mRNA se han ensamblado, la guanilil transferasa añade una guanina al extremo 5' del pre-mRNA.

Adicionalmente la enzima metila la guanina recién añadida y también puede metilar los nucleótidos adyacentes en el transcripto.

El 5' capping del pre-mRNA ocurre en tres pasos:

1. La guanilil transferasa remueve el γ fosfato del extremo 5' del pre-mRNA y deja dos fosfatos en el extremo.
2. La guanina que va a ser añadida pierde dos fosfatos y se convierte en guanina monofosfato.
3. La guanilil transferasa une la guanina monofosfato al extremo 5' del pre-mRNA mediante un ligamiento de trifosfato 5'-a-5'. La metilación ocurre con la intervención de la metil transferasa.

Funciones de la caperuza 5´

1. Protección del mRNA para que no experimente una degradación rápida.
2. Facilitar el transporte del mRNA fuera del núcleo.
3. Facilitar el proceso de corte y empalme de los intrones.
4. Potenciar la eficiencia de la traducción mediante la orientación del ribosoma respecto al mRNA.

La poliadenilación 3' de pre-mRNA

La poliadenilación se asocia con la terminación de la transcripción.

Consiste en la modificación del extremo 3' por la acción de una enzima que remueve una sección del pre-mRNA y la reemplaza con un segmento de adeninas.

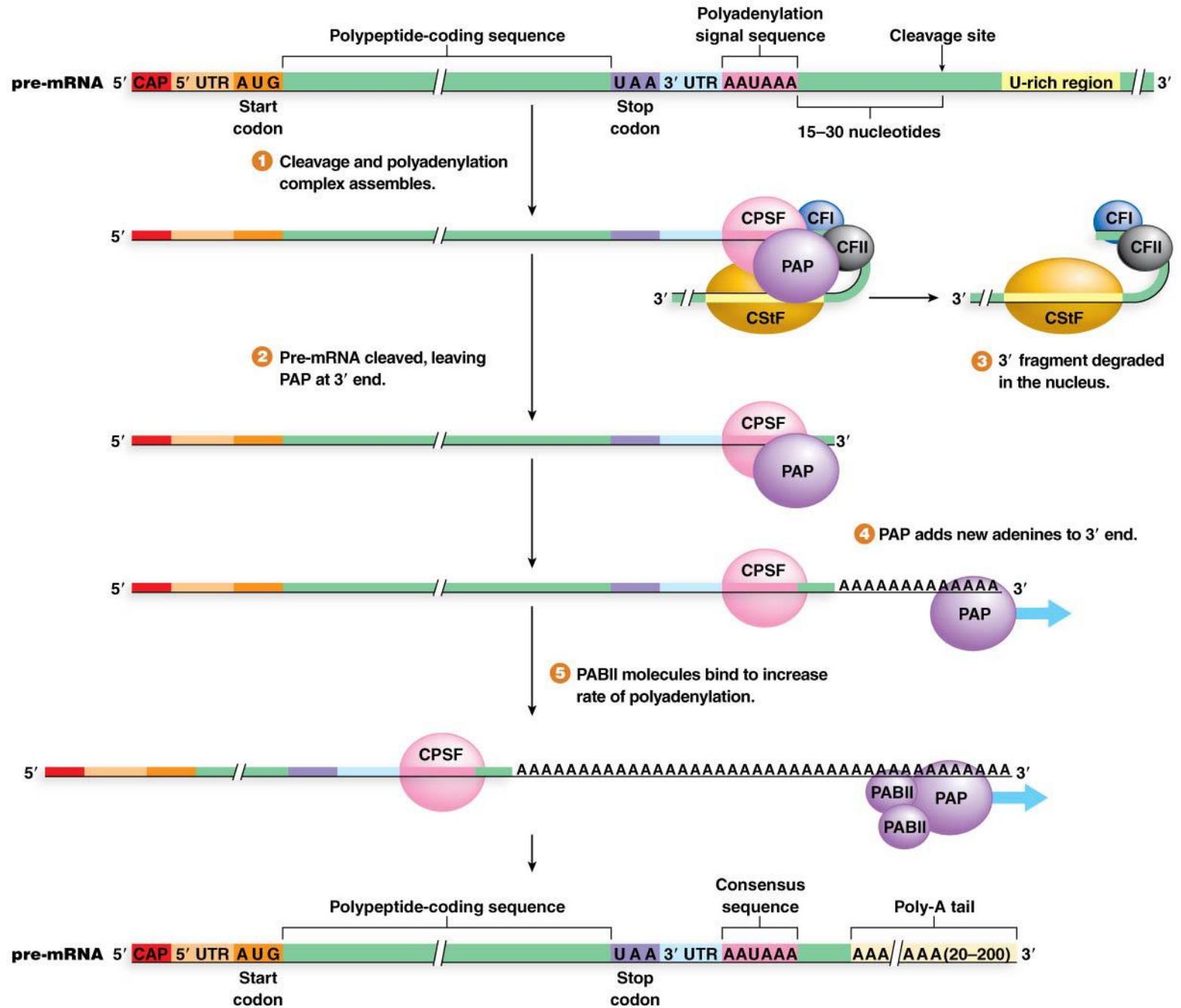
La poliadenilación ocurre en 5 pasos:

1. El factor de especificidad para ruptura y poliadenilación (CPSF) se une cerca de la **secuencia señal para poliadenilación** 5'-AAUAAA-3' que está después del codón de terminación.
 - Inmediatamente después, se produce la unión del factor de estimulación de la ruptura (CStF) a una región rica en uracilo ubicada después de la secuencia señal. Otros dos factores de ruptura (CFI y CFII) y la Poliadenilato polimerasa (PAP) también se unen.

Pasos de la poliadenilación (cont.)

2. Ruptura del pre-mRNA después de 15 o 30 de la secuencia señal de poliadenilación. .
3. La ruptura libera un fragmento de mRNA que permanece unido a CFI, CFII y CstF, el cual es posteriormente degradado.
4. El extremo 3' del pre-mRNA cortado pasa por la adición de 20 a 200 adeninas a partir de la acción del CPSF y la poliadenilato polimerasa (PAP).
5. Después de la adición de las primeras 10 adeninas, moléculas de la proteína poly-A-binding (PABII) se unen a la cola de adenina e incrementan al tasa de adición de este nucleótido.

La poliadenilación 3' de pre-mRNA



Funciones de la poliadenilación 3'

1. Protección del mRNA para que no experimente una degradación rápida.
 2. Facilitar el transporte del mRNA fuera del núcleo.
 3. Potenciar la eficiencia de la traducción permitiendo el reconocimiento del mRNA por el ribosoma.
- * Algunos transcriptos en eucariotas (e.g., los que codifican para las histonas) no experimentan modificación post-transcripcional.

Poliadenilación y terminación de la transcripción: modelo del torpedo

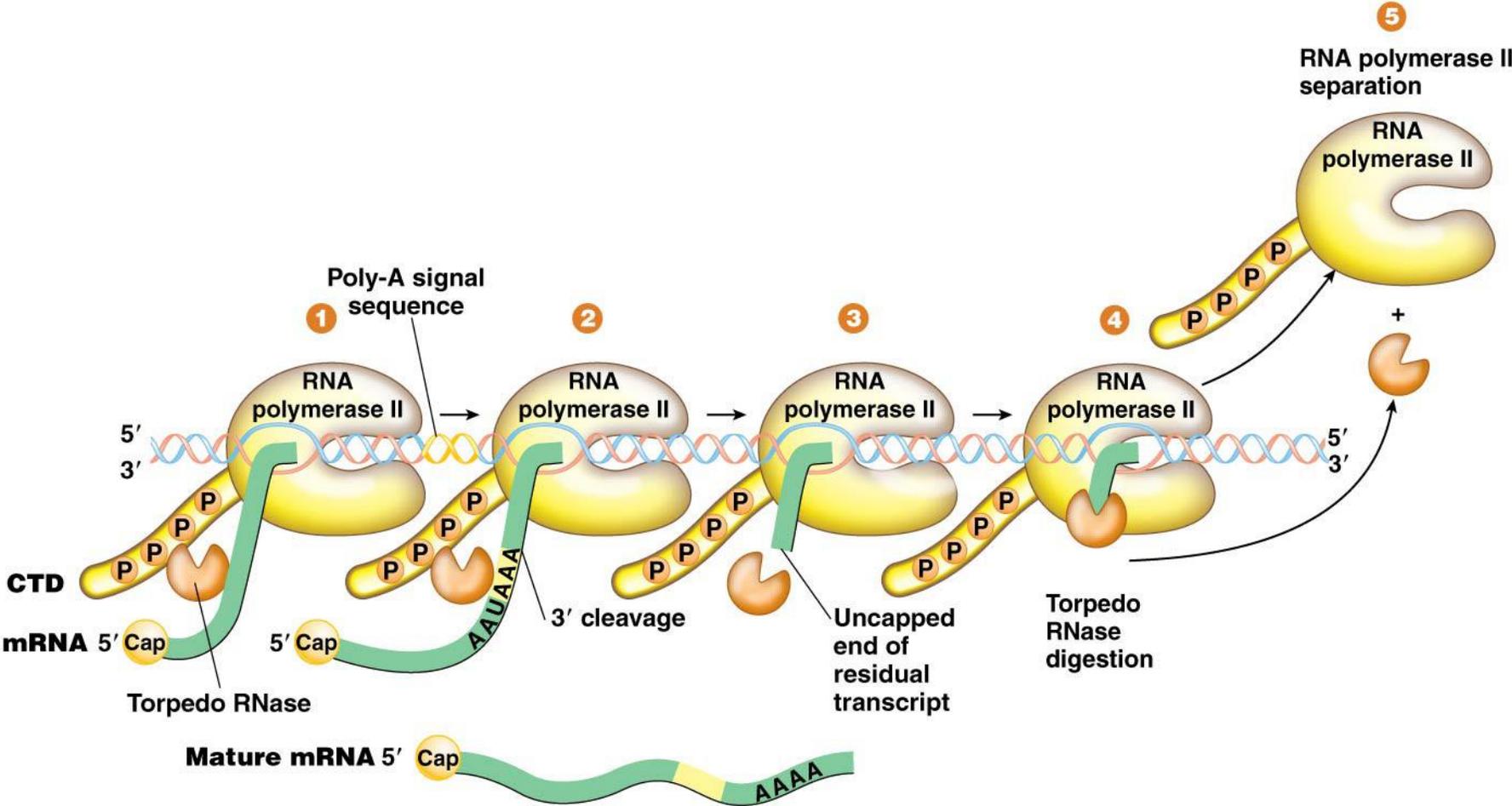
La poliadenilación y la terminación de la transcripción están conectadas por la actividad de una ARNasa especializada.

Después del corte en 3' y la poliadenilación, el transcripto residual (no cubierto) permanece unido a la RNA pol II.

La ARNasa especializada rápidamente digiere el transcripto residual.

La RNAase se encuentra con RNA pol II y activa la terminación de la transcripción con la liberación del ADN por RNA pol II.

Poliadenilación y terminación de la transcripción: modelo del torpedo



Remoción de intrones mediante el mecanismo de corte y empalme del pre-mRNA (pre-mRNA intron splicing)

La unión entre intrones y exones está señalizada por la presencia de secuencias específicas y cortas.

El **5' splice site** está en el extremo 5' del intrón y contiene una secuencia de consenso con el dinucleótido GU en la posición 5' más extrema.

El **3' splice site** está en el extremo opuesto del intrón y contiene una secuencia de consenso de 11 nucleótidos con una región rica en pirimidina y la combinación AG en la posición 3' más extrema.

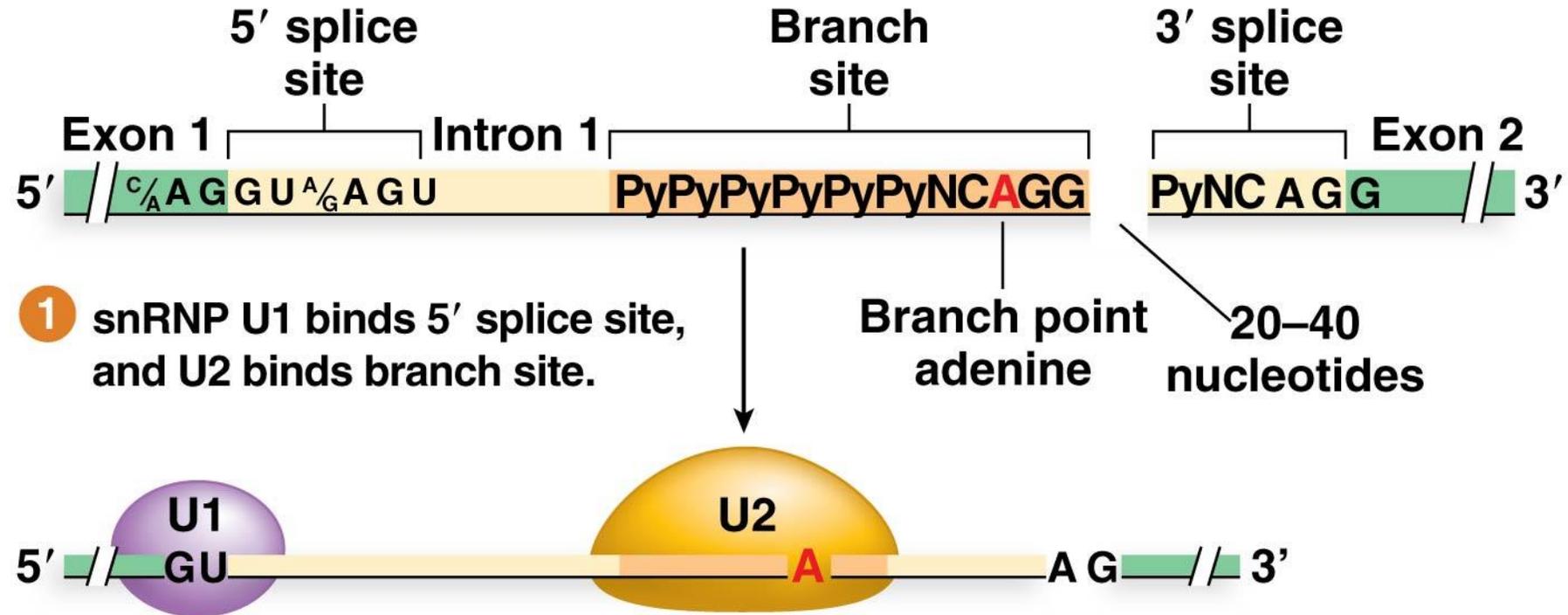
El sitio de ramificación

Existe una tercera región de consenso llamada sitio de ramificación (branch site) situada “upstream” de 20 a 40 nucleótidos del 3' splice site.

Es una región rica en pirimidinas y contiene de forma invariable una adenina, llamada adenina del punto de ramificación (**branch point adenine**), cerca del extremo 3'.

Los análisis con mutantes han demostrado que las tres secuencias de consenso son requeridas para que el splicing sea preciso.

Regiones de consenso, en el intrón, relacionadas con el splicing



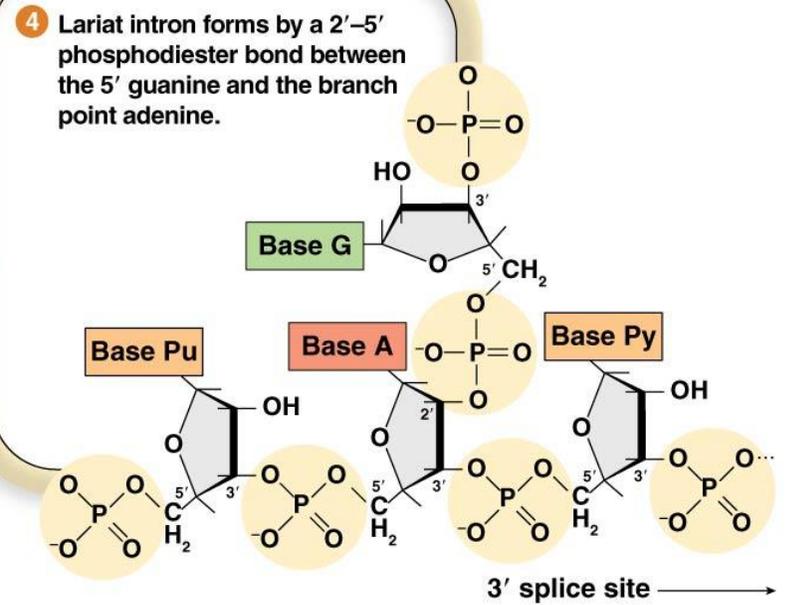
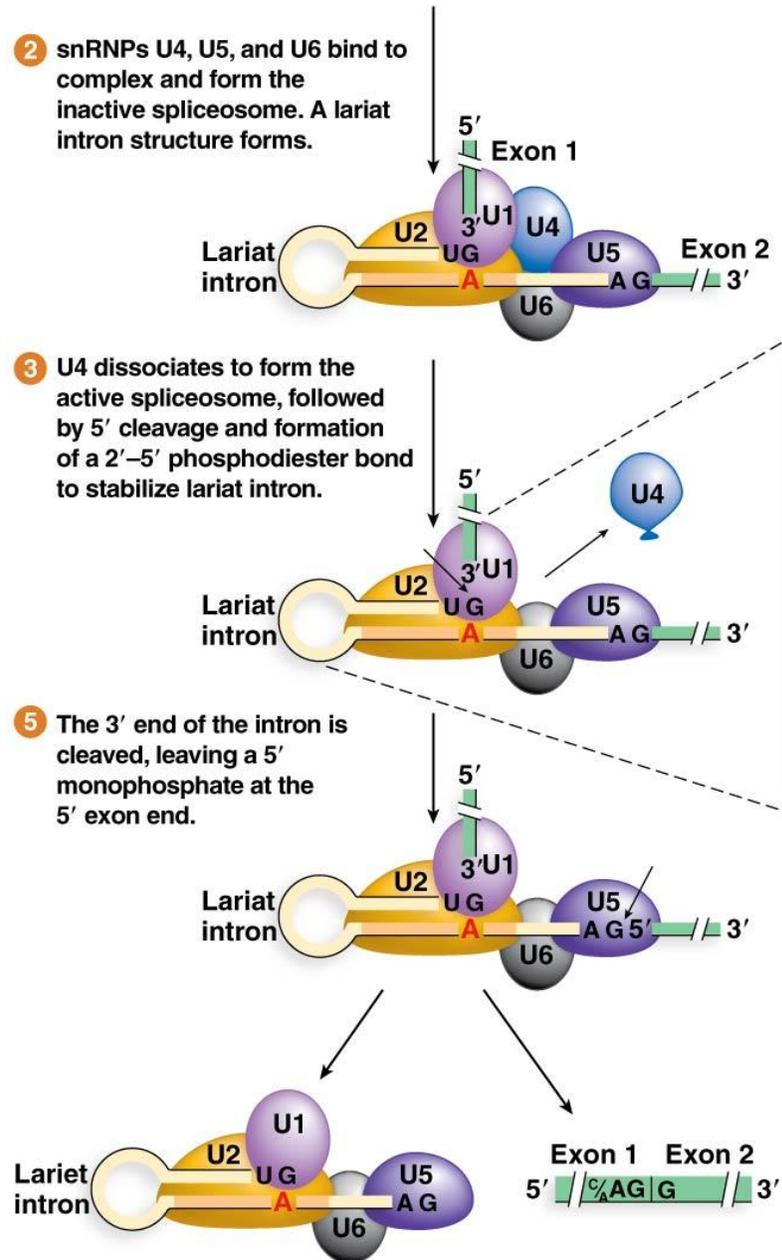
Splicing (corte y empalme)

Los intrones son removidos del pre-mRNA por un complejo de snRNA-proteínas llamado **spliceosome**. Está compuesto de múltiples snRNA (U1 a U6).

Primero del 5' splice site es cortado y el RNA forma una **estructura de lariat** cuando el extremo 5' del intrón se pliega hacia la adenina del punto de ramificación.

A continuación el 3' splice site es cortado y los extremos de los exones son unidos.

Splicing (corte y empalme) del pre-mRNA

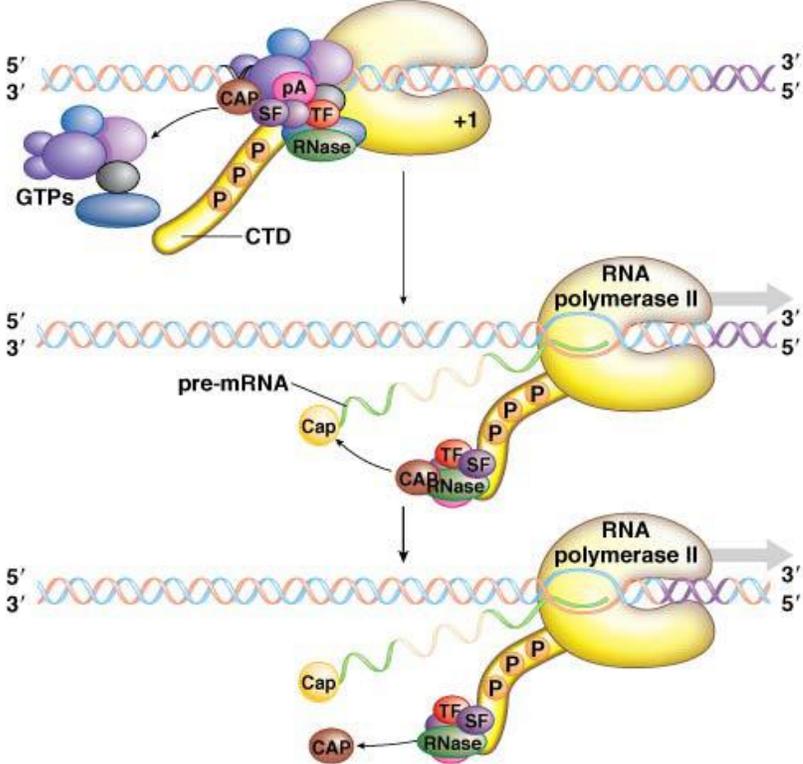


Acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA: modelo de la maquina para la expresión genética

1 At the initiation of transcription the carboxyl terminal domain (CTD) of RNA polymerase II affiliates with capping (CAP), polyadenylation (pA), splicing factor (SF), and torpedo RNase (RNase).

2 RNA pol II initiates transcription after dissociation of the general transcription factors (GTPs). The pre-mRNA processing proteins on the CTD begin their work, starting with the CAP proteins carrying out 5' capping.

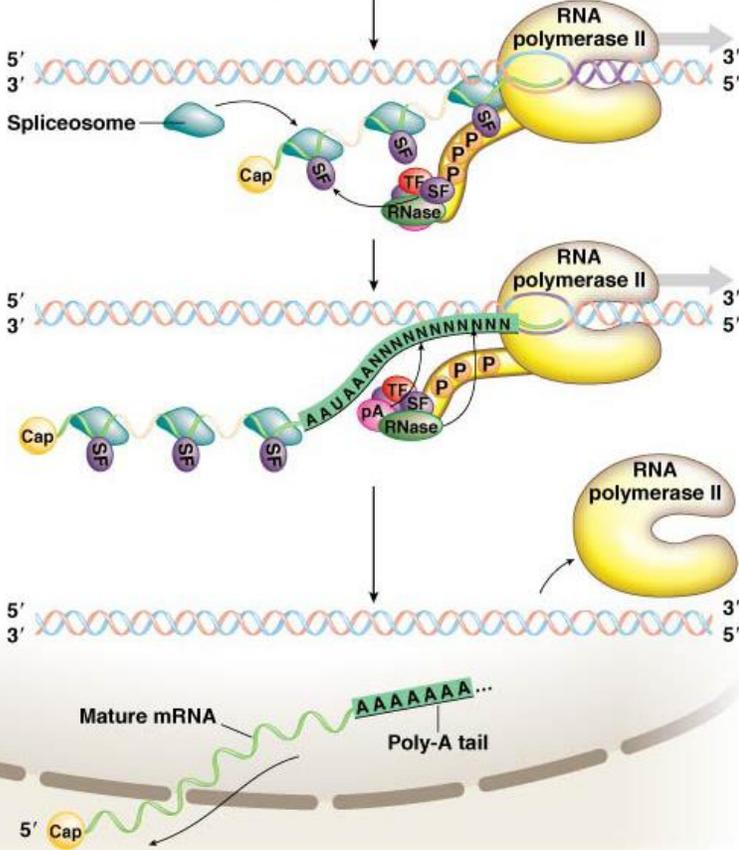
3 Capping proteins dissociate and pre-mRNA elongates.



4 Spliceosome complexes affiliate with pre-mRNA with the aid of SF proteins. Intron splicing takes place as RNA pol continues elongation of mRNA.

5 Polyadenylation proteins identify the pA signal sequence and carry out polyadenylation. Transcription terminates. Splicing continues to completion. Torpedo RNase digests the residual mRNA.

6 Fully processed mature mRNA dissociates from RNA pol II and is transported to cytoplasm for translation. The torpedo RNase digests residual transcript and triggers RNA pol II dissociation to terminate transcription.



Un gen, varios productos: los transcriptos alternativos

Es común en eucariotas con grandes genomas, producir proteínas en un número mayor que el número de genes en el genoma.

Por ejemplo, en humanos las células producen cerca de 100 000 polipéptidos pero contienen aproximadamente 22 000 genes.

Existen tres mecanismos asociados a la transcripción que pueden explicar este hecho.

Procesamiento alternativo de los pre-mRNA

1. Se producen diferentes patrones de modificación del pre-mRNA en diferentes tipos de células.
2. La presencia de promotores alternativos pueden iniciar la transcripción en diferentes sitios +1, en diferentes tipos de células.
3. La poliadenilación puede tener ubicaciones alternativas y producir diferentes tipos de mRNA maduros.

Corte y empalme (splicing) alternativos

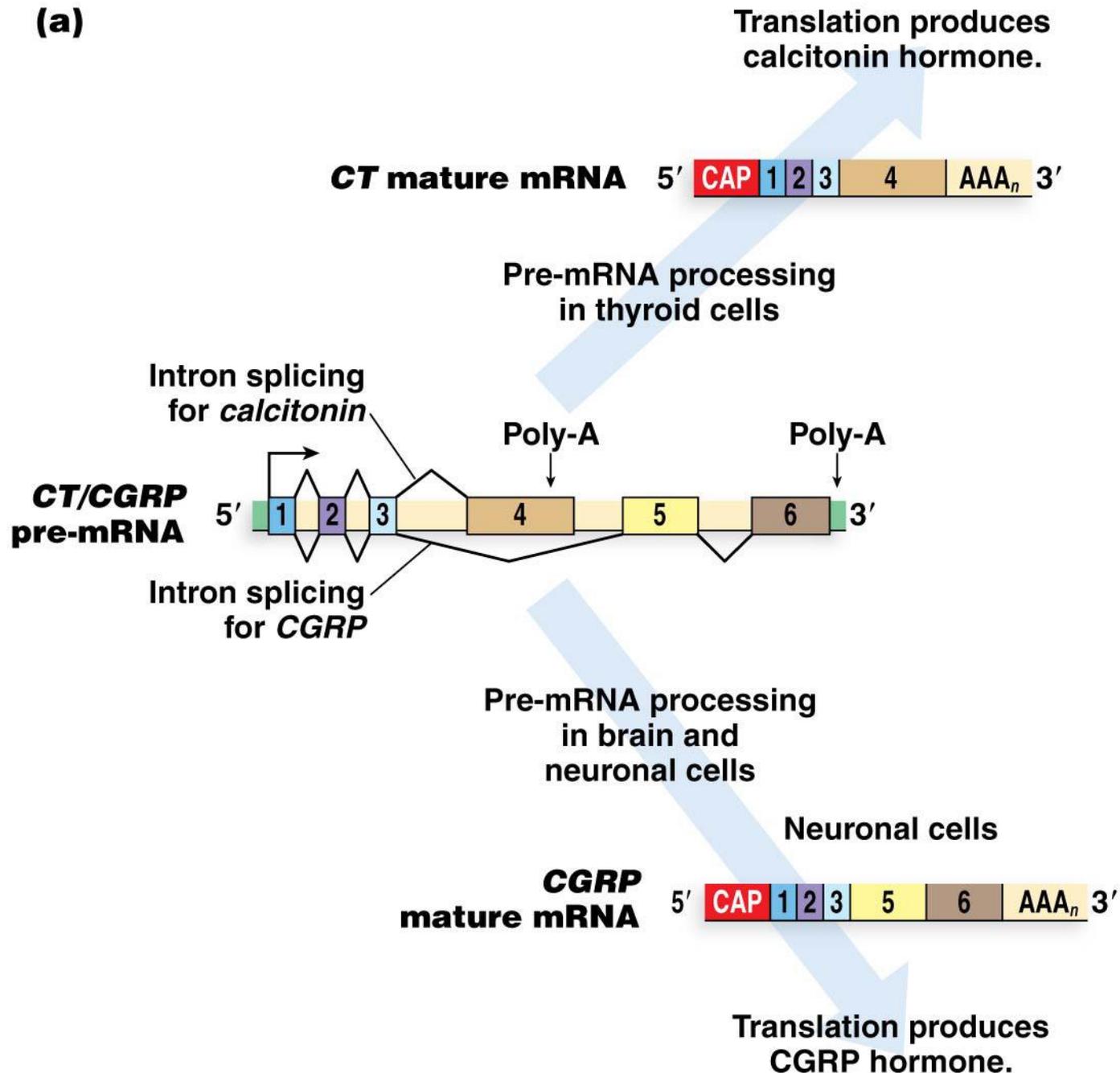
El **procesamiento alternativo de transcritos idénticos** en diferentes células produce mRNAs con diferentes combinaciones de exones y, por lo tanto, diferentes polipéptidos.

Se plantea que aproximadamente 70% de los genes humanos pasa por el procesamiento alternativo.

El proceso es menos común en otros animales y es raro en plantas.

(a)

Corte y empalme (splicing) alternativos



Procesamiento alternativo (cont.)

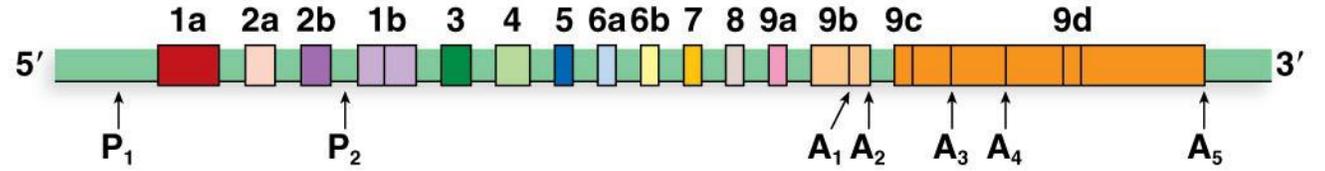
El uso de **promotores alternativos** puede ocurrir cuando más de una secuencia con ubicación “upstream” respecto al gen, puede iniciar la transcripción.

La **poliadenilación alternativa** requiere la presencia de más de una señal de poliadenilación en el gen.

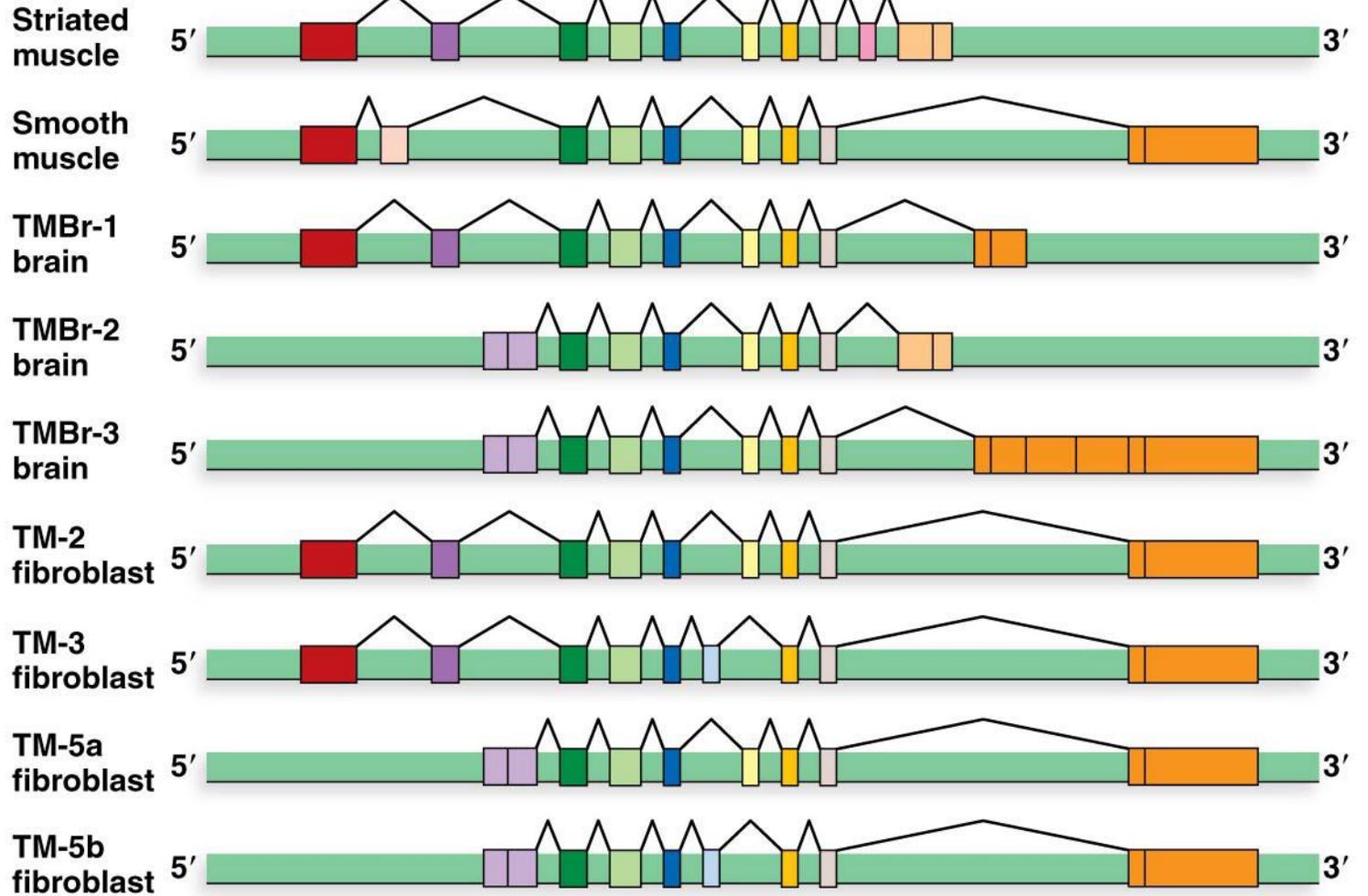
Ambos procesos están controlados por la expresión variable de proteínas reguladoras en tipos celulares específicos.

Procesamiento alternativo del pre-mRNA asociado al gen α -tropomyosin en ratas

(a)



(b)



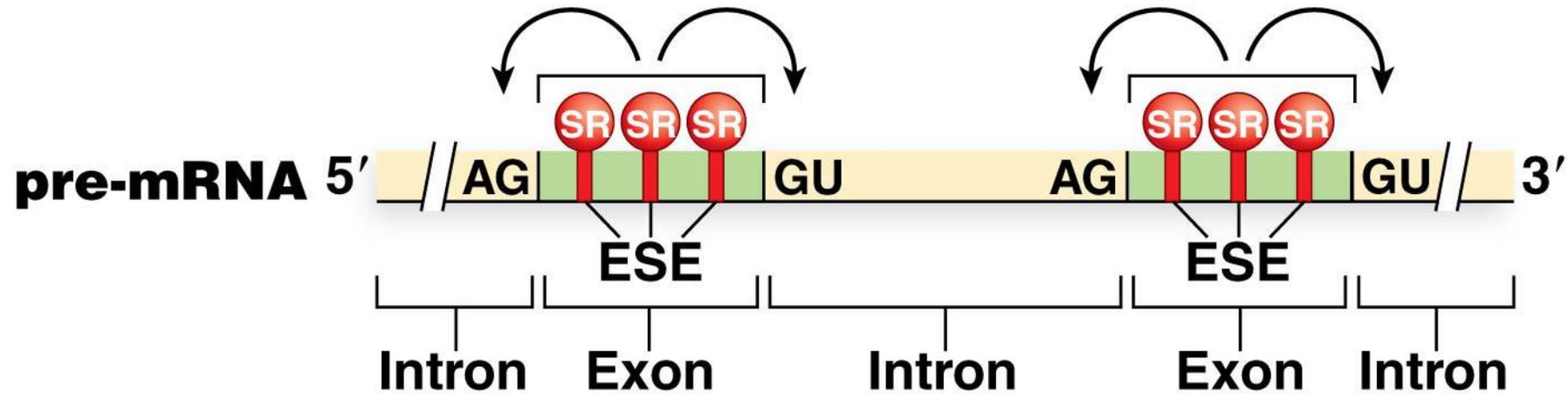
Control del corte y empalme alternativo

El corte y empalme alternativo está completamente controlado en los tipos diferentes de células.

Los **potenciadores exónicos e intrónicos del corte y empalme (ESE, ISE)** atraen proteínas ricas en serina y arginina, llamadas proteínas SR, que dirigen la actividad del spliceosome.

Los **silenciadores exónicos e intrónicos del corte y empalme (ESS, ISS)** atraen proteínas represoras que limitan el corte y empalme mediante el bloqueo de la actividad del spliceosome.

SR protein binding to ESEs facilitates recognition of 5' and 3' intron splice sites.



Auto-corte y empalme (self-splicing) de intrones

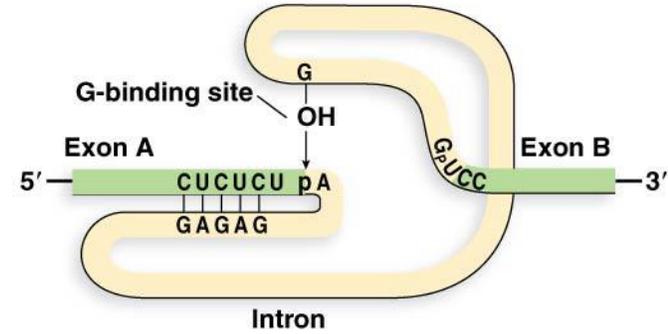
Los ARNs pueden contener intrones que catalizan su propia remoción. Hay tres categorías de estos intrones: grupo I, II y III.

El grupo I fue descubierto en 1981. Está compuesto por grandes ribosimas que catalizan su propia escisión de algunos mRNAs en eucariotas complejos y de precursores tRNA y rRNA en bacterias, eucariotas simples y plantas.

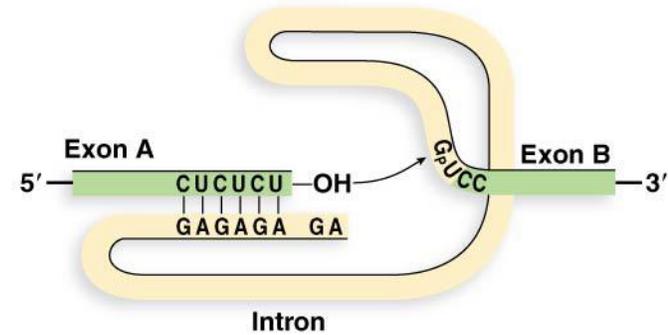
El **self-splicing de intrones** se ejecuta mediante dos reacciones de transesterificación que escinden el intrón y ligan los extremos de los exones.

Auto-corte y empalme (self-splicing) de intrones

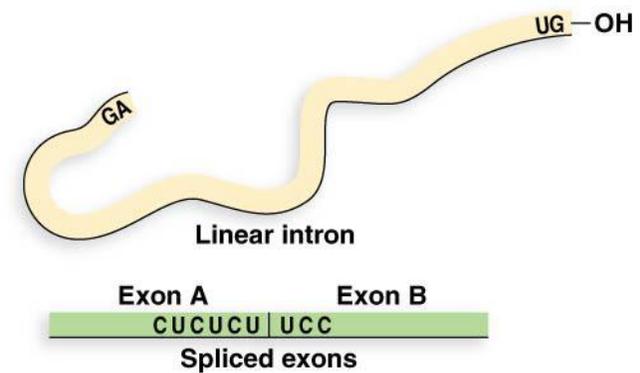
- 1 Exon-intron base pairing. The G-binding site nucleotide attacks the UpA bond, bonding to the adenine and cleaving exon A.



- 2 The 3' end of exon A attacks the G_pU bond at the intron-exon junction.



- 3 The intron is released, and exons ligate.



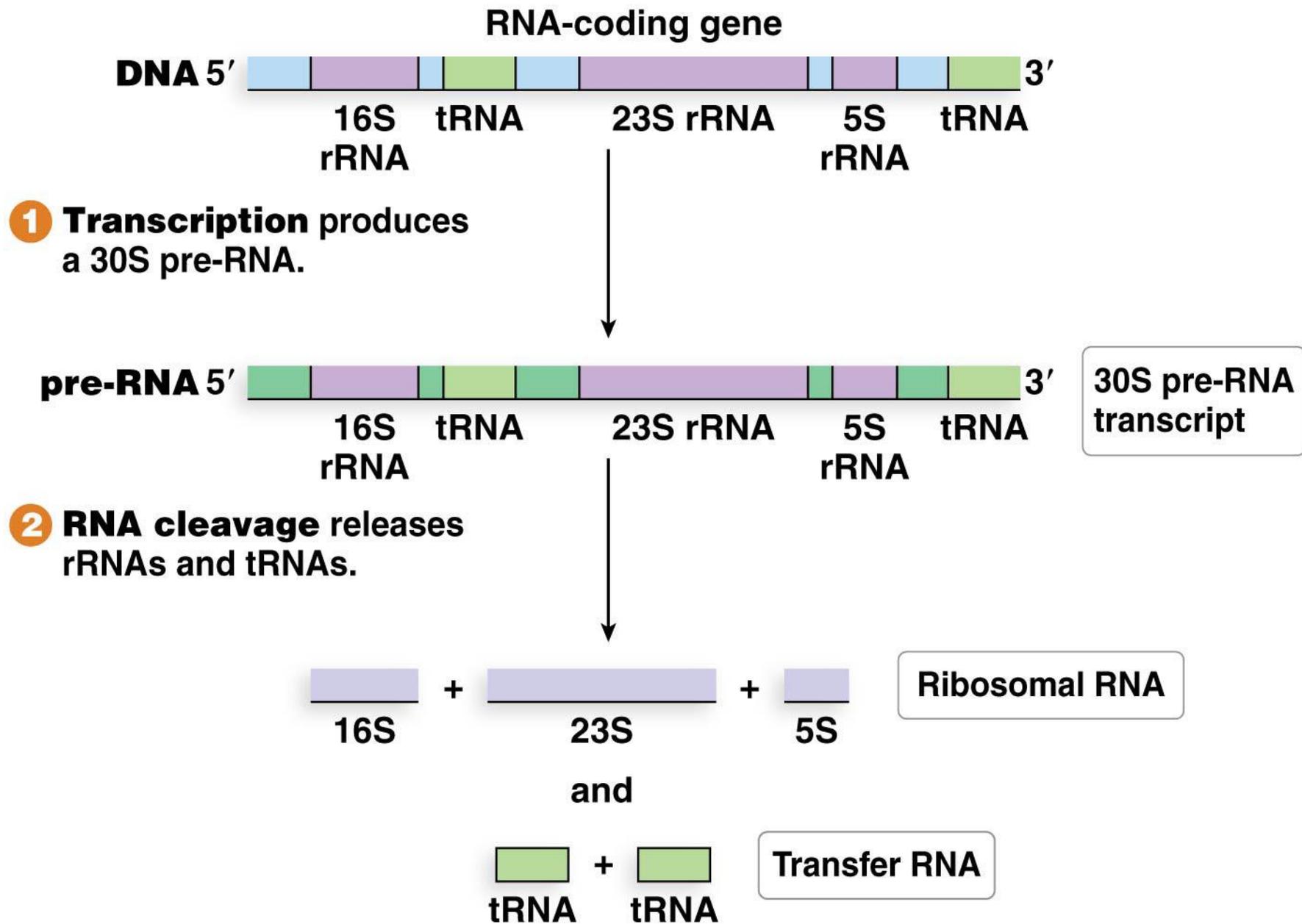
Procesamiento del ARN ribosomal

Los rRNAs son transcritos como moléculas precursoras grandes que son fragmentadas en moléculas pequeñas por la remoción de secuencias espaciadoras localizadas entre los genes rRNA.

Después del procesamiento, los rRNAs se pliegan formando estructuras secundarias complejas y se unen a proteínas formar las subunidades del ribosoma.

Algunas modificaciones químicas ocurren después que la transcripción del rRNA se ha completado (e.g., metilación).

(a) *E. coli*



Procesamiento del
ARN ribosomal y de
transferencia

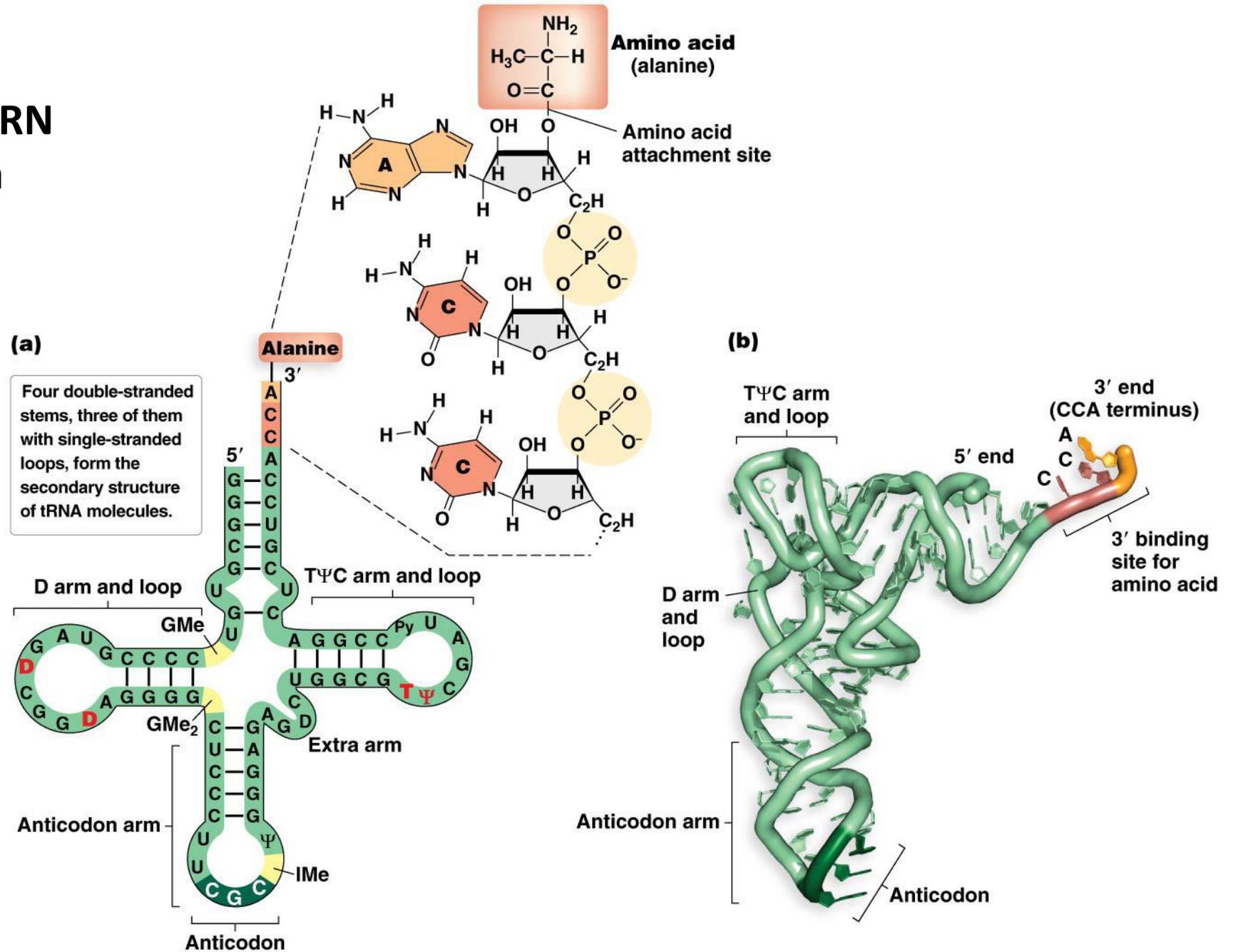
Procesamiento del ARN de transferencia

El procesamiento de los tRNAs es diferente en bacterias y eucariotas. Todos los tRNAs tienen una estructura y función similar a pesar de tener secuencias de nucleótidos diferentes.

Algunos tRNAs bacterianos son producidos simultáneamente con rRNAs, mientras que otros son producidos como parte de un gran pre-tRNA que después es escindido en moléculas de tRNA individuales.

En eucariotas cada tRNA es transcrito de forma individual.

Estructura del ARN de transferencia



La cantidad de tRNAs diferentes varía con los organismos.

La mayoría produce entre 30 y 40 tRNAs, menos de 61, debido a una relajación del principio de pareo entre bases complementarias en el tercer nucleótido del codón.

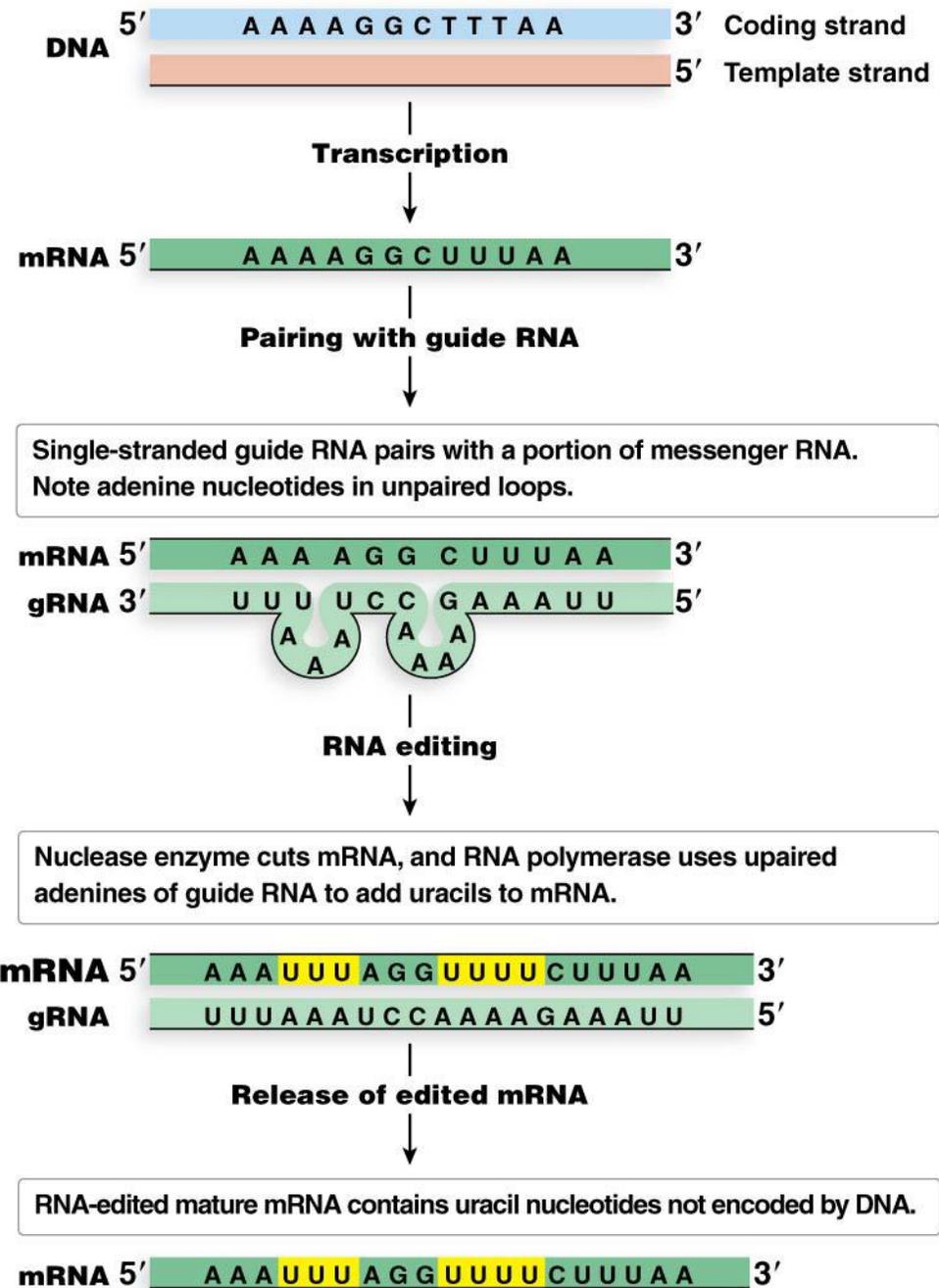
Algunos eucariotas si producen los 61 tipos posibles de tRNA, uno para cada codón.

Procesamiento de los tRNA en bacterias

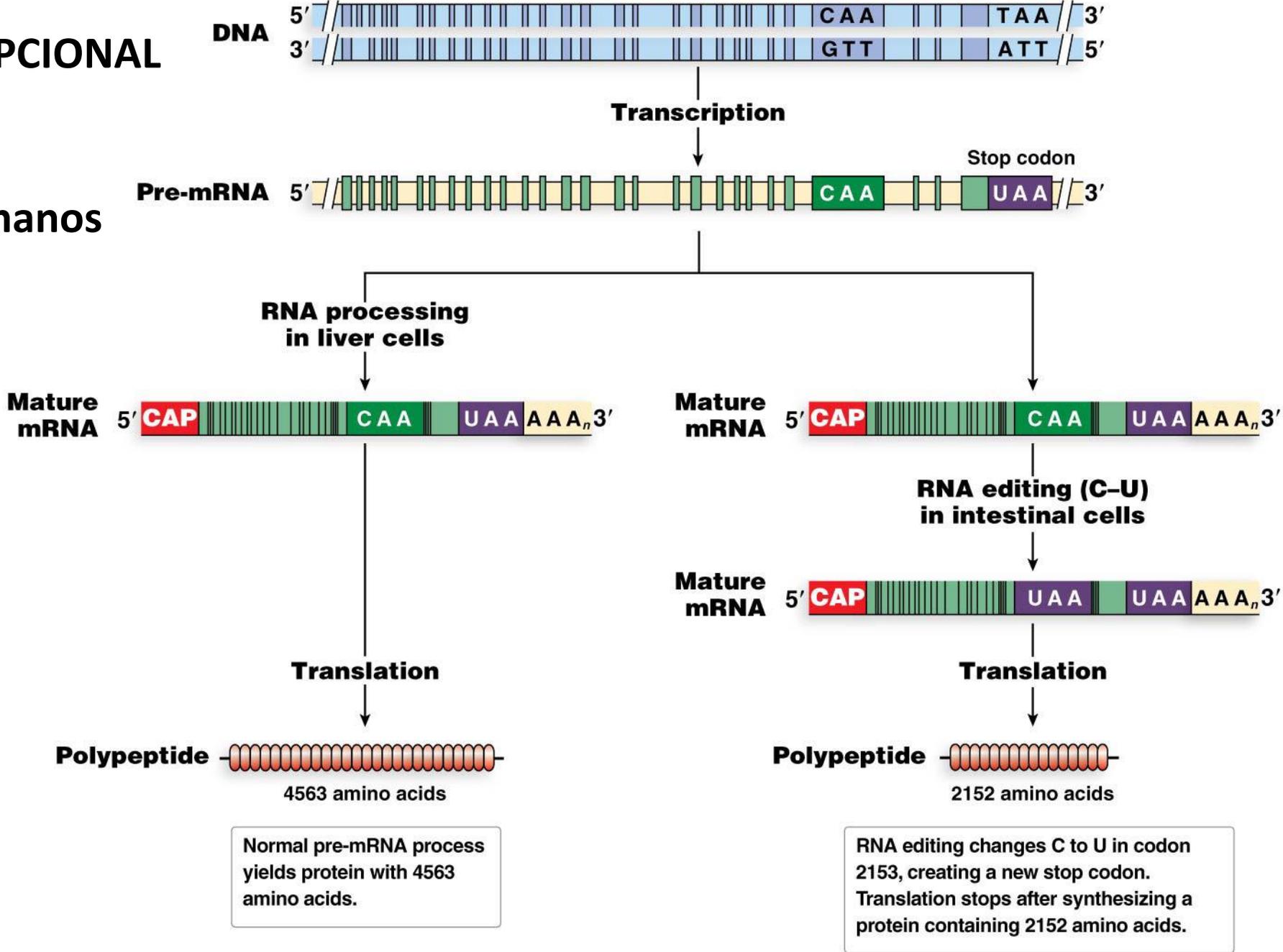
Los tRNAs en bacterias requieren ser procesados antes de que sean funcionales:

1. Muchos tRNAs son escindidos de un precursor grande para producir varias moléculas individuales.
2. Los nucleótidos son cortados en ambos extremos de la molécula (5' y 3').
3. Algunos nucleótidos son modificados químicamente.
4. Los tRNAs se pliegan en una estructura tridimensional precisa, con la presencia de porciones de doble hebra y lazos de una sola hebra.
5. Los tRNAs pasan por una adición de bases post-transcripcional, comúnmente se añaden CCA al extremo 3'.

EDICIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL (adición de bases) del RNA mediante la intervención del ARN guía (gRNA)



EDICIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL (sustitución de bases) del transcripto para el gen *apolipoproteína B* en humanos



FIN