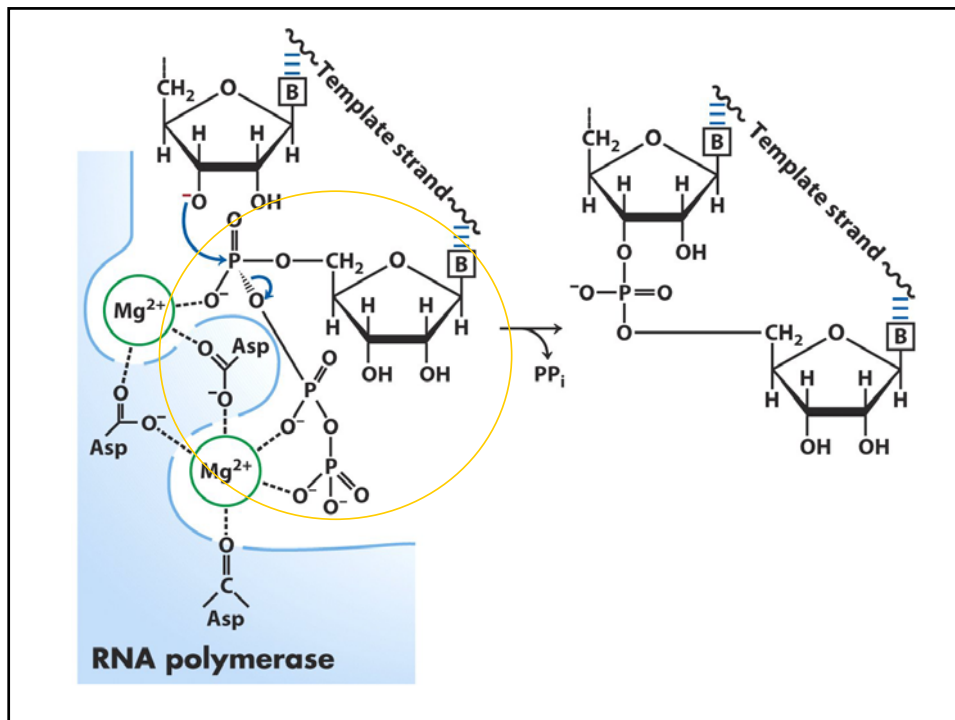
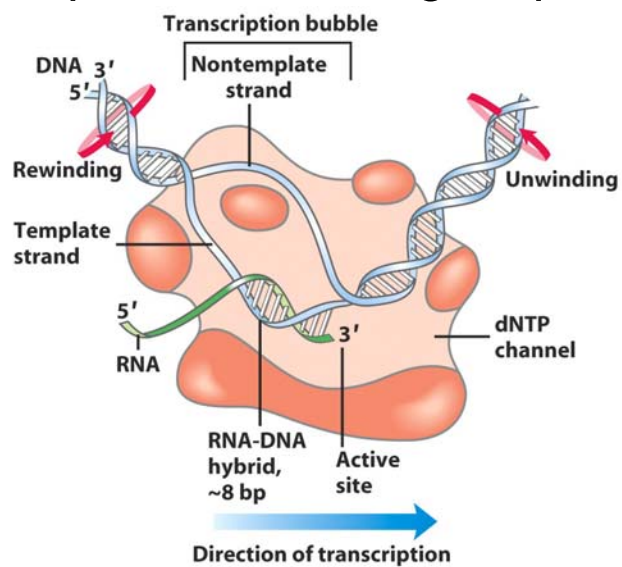


transcripción en procariotas



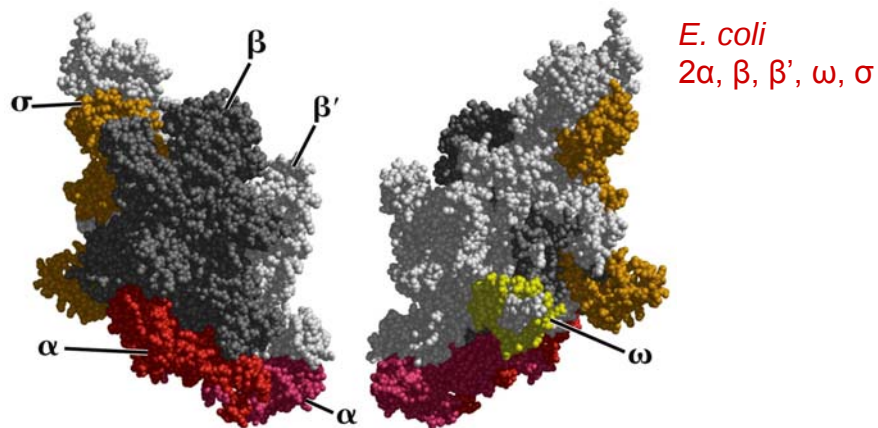


RNA polimerasa-dirigida por DNA



RNA polymerase (RNAP or RNAPol), also known as DNA-dependent RNA polymerase

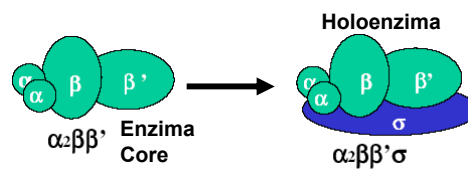
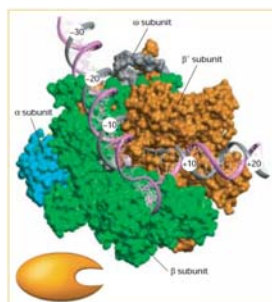
RNA polimerasa-dirigida por DNA



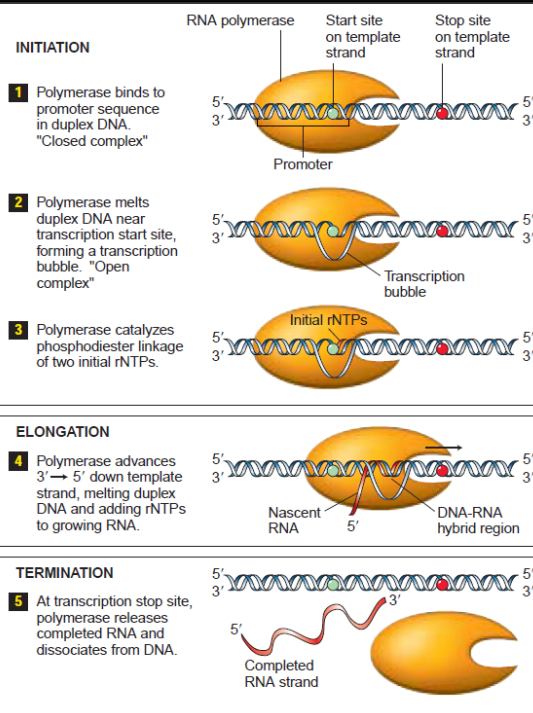
RNA polimerasa

Catalizan la síntesis de todos los tipos de RNA

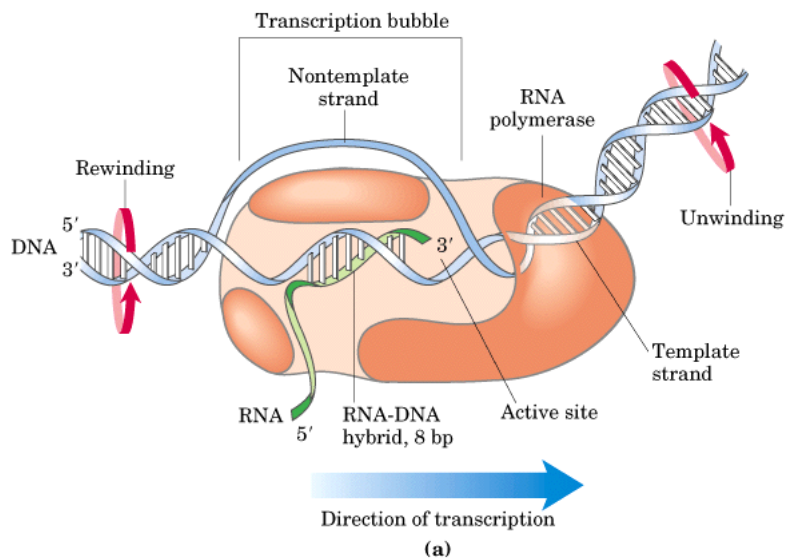
Subunit	Gene	Mass (Da)	Number	Function
α	<i>rpoA</i>	40, 000	2	Enzyme assembly
β	<i>rpoB</i>	155, 000	1	Nucleotide binding
β'	<i>rpoC</i>	160, 000	1	Template binding
σ	<i>rpoD</i>	32-92, 000	1	Promoter binding



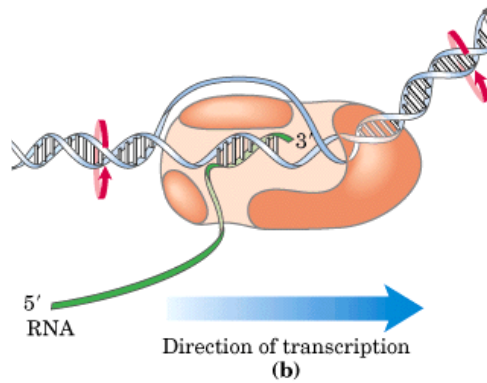
Etapas de la transcripción



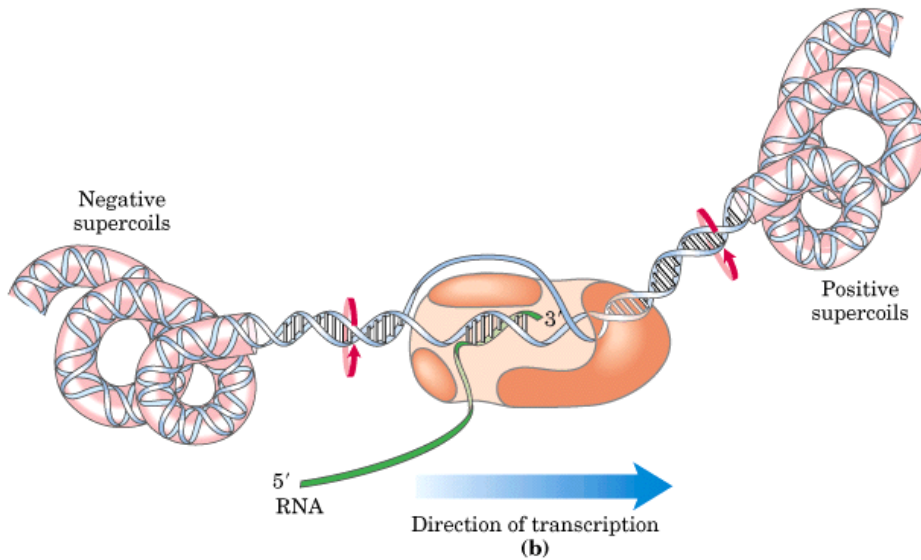
Para que ocurra transcripción se requiere del *melting* del DNA



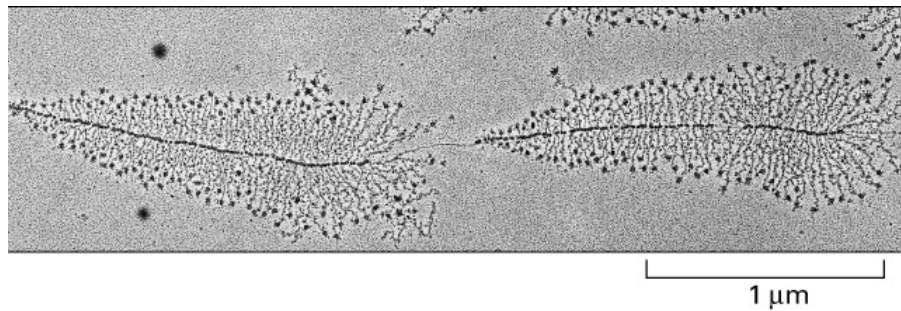
Durante la transcripción también se producen superenrollamientos positivos en la estructura del DNA



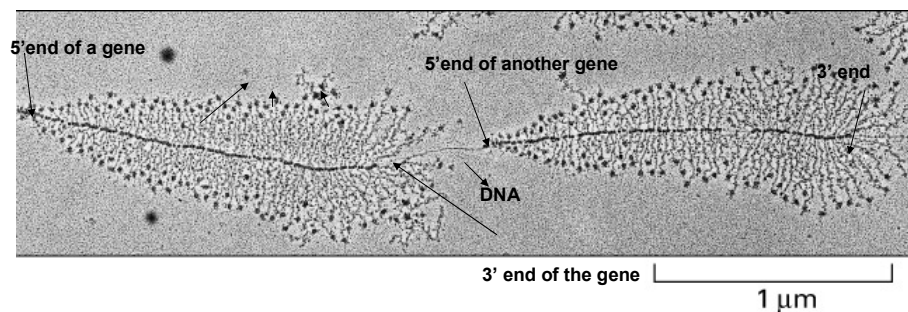
Durante la transcripción también se producen superenrollamientos positivos en la estructura del DNA



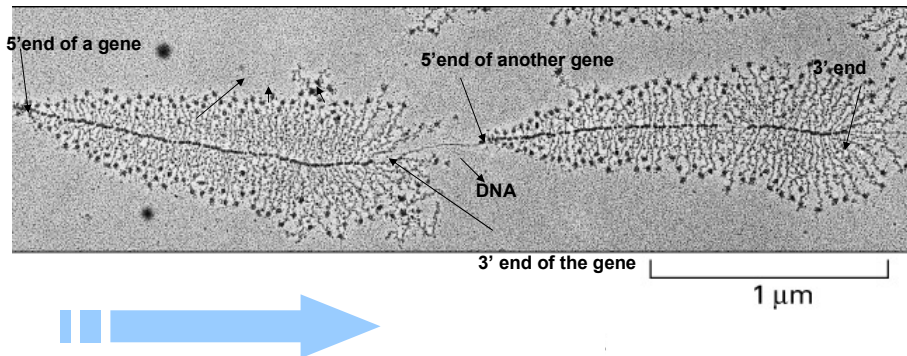
A partir de un gen pueden generarse muchas copias de RNA, ya que múltiples moléculas de RNA pol pueden unirse en forma secuencial.



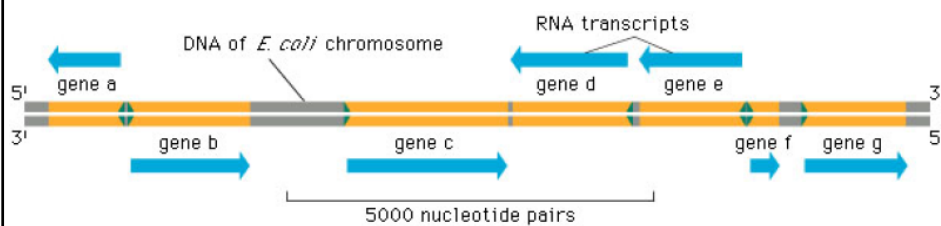
A partir de un gen pueden generarse muchas copias de RNA, ya que múltiples moléculas de RNA pol pueden unirse en forma secuencial. Los RNA sobre el 3' son más extensos porque una parte mayor del gen ha sido transcripto



A partir de un gen pueden generarse muchas copias de RNA, ya que múltiples moléculas de RNA pol pueden unirse en forma secuencial. Los RNA sobre el 3' son más extensos porque una parte mayor del gen ha sido transcripto



Organización de los genes en procariotas



¿Qué se transcribe?

Los **genes** son segmentos del genoma que se **transcriben** y sus secuencias regulatorias

Productos de transcripción = “transcriptos”

RNAs codificantes para proteínas (son traducidos) = mRNAs

Hay 35 000 genes codificantes para proteínas en un genoma de mamífero típico, incluyendo el genoma humano.

Este número es mucho menor que lo que se pensaba (> 100 000)

RNAs no codificantes = ncRNAs

rRNA: RNAs ribosomales: hay 150-200 copias de los 28S - 5.8S - 18S + 200-300 copias del 5S .

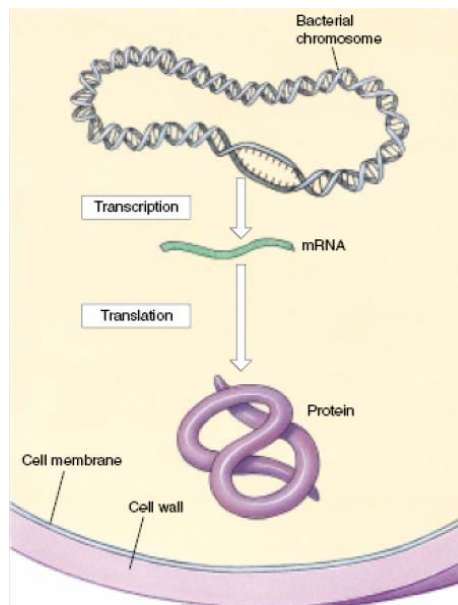
tRNA: RNAs de transferencia: >> 500 genes en el genoma humano.

snoRNA: small nucleolar RNAs; la mayor parte de los snoRNAs participan en modificación de rRNA

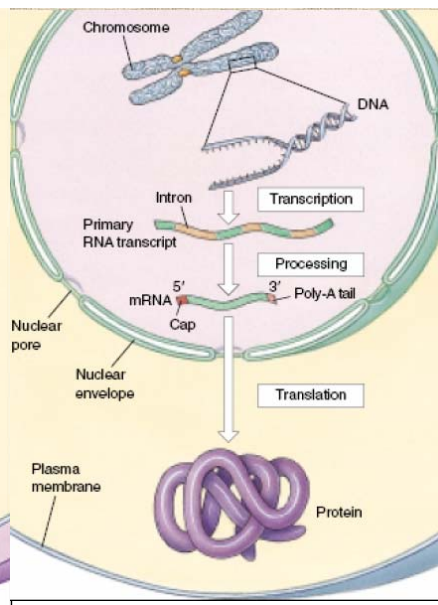
snRNAs: small nuclear RNAs: constituyen los RNA que forman el **spliceosoma**

Otros: incluyen microRNAs (**miRNAs**), pequeños de interferencia (**siRNAs**), RNA citoplasmáticos pequeños (**scRNA**), telomerasa, ribonucleasa P, SRP, etc.

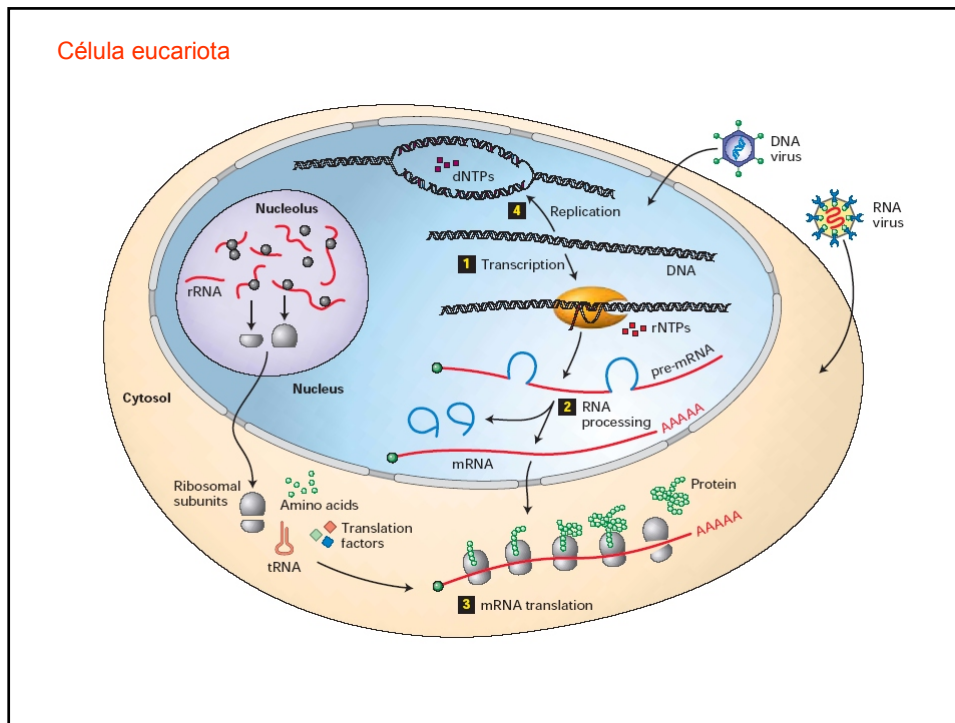
Procariotas



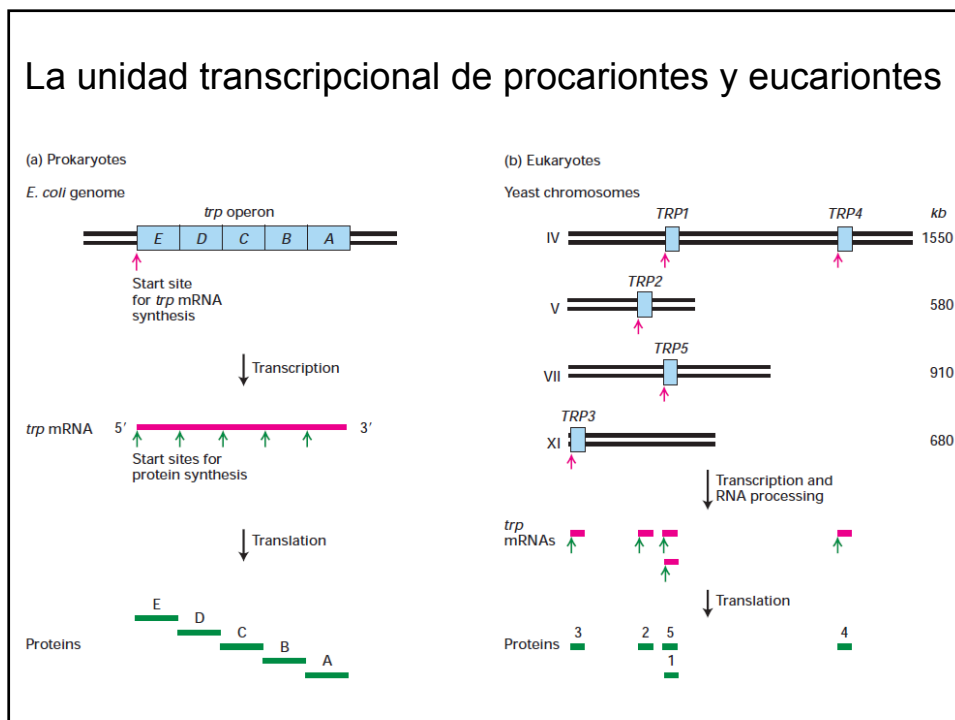
Eucariotas



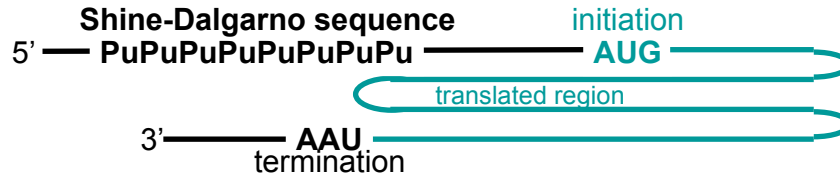
Célula eucariota



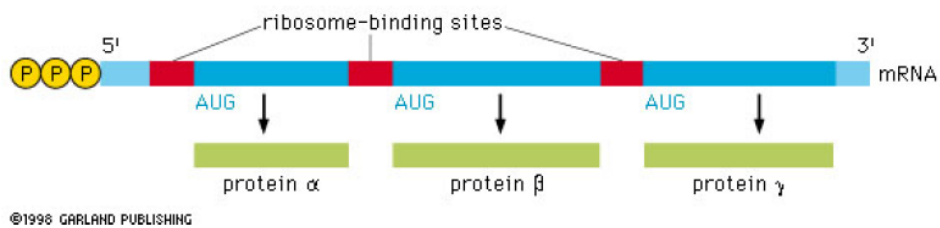
La unidad transcripcional de procariontes y eucariontes



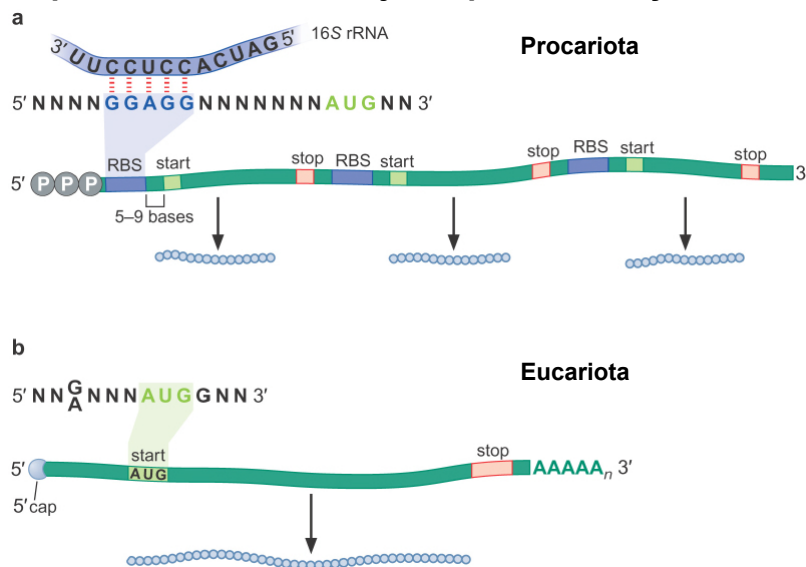
Estructura del RNA mensajero procariota



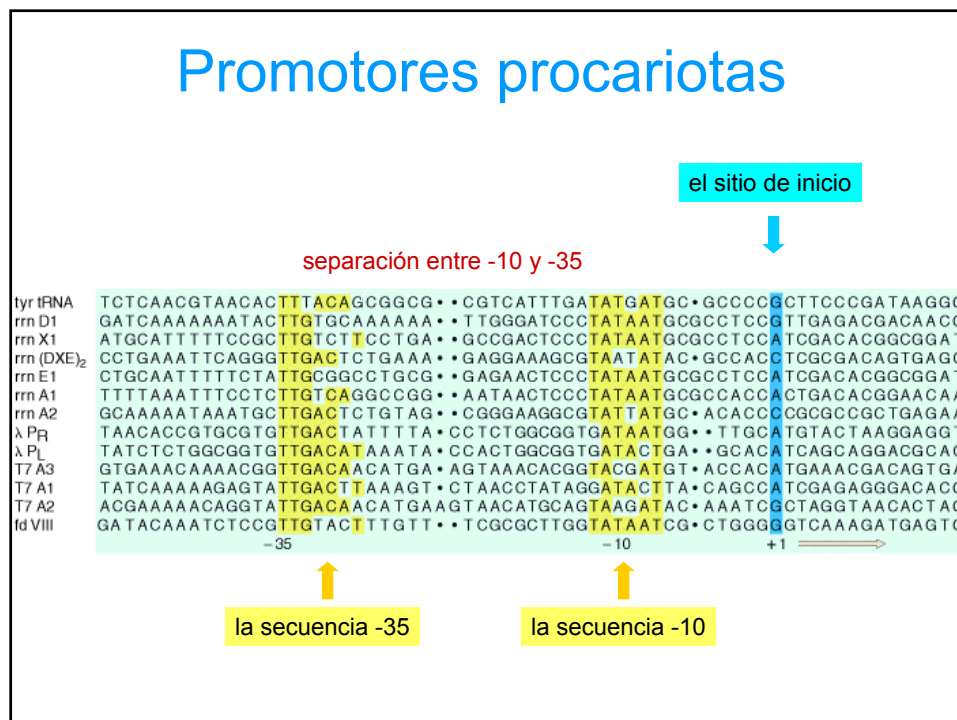
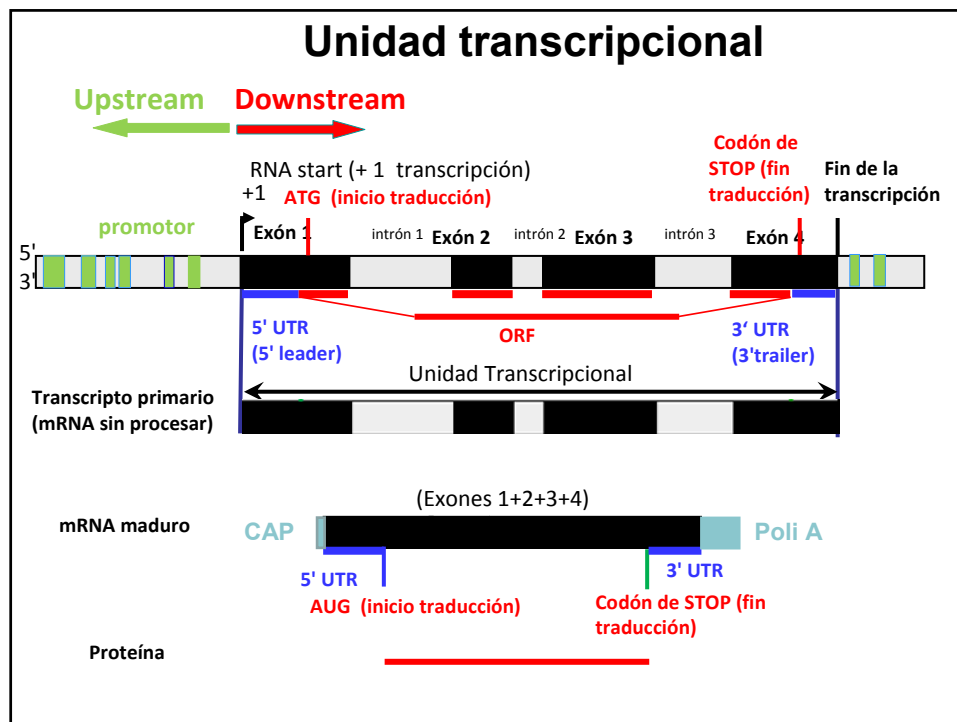
La secuencia de **Shine-Dalgarno (SD)** se aparea con una secuencia rica en pirimidinas del rRNA 16S rRNA permitiendo el inicio de la síntesis de proteínas



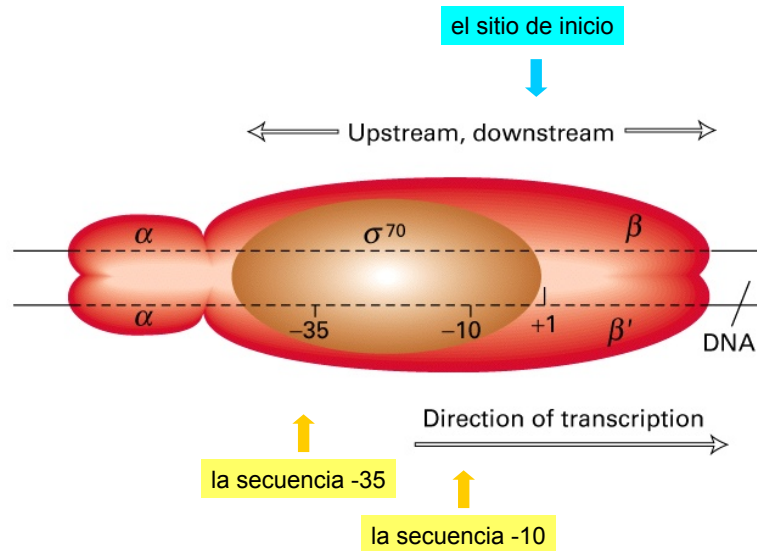
Comparación entre mensajeros procariotas y eucariotas



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings



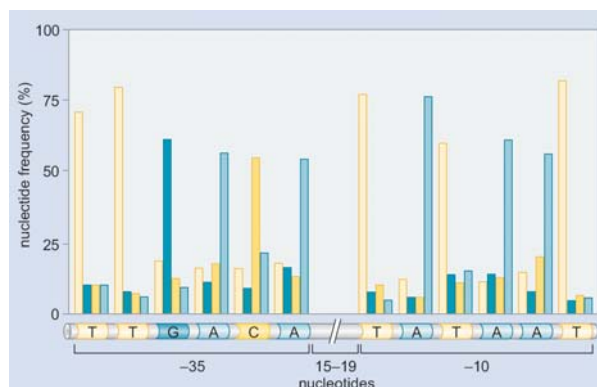
Promotores procariotas

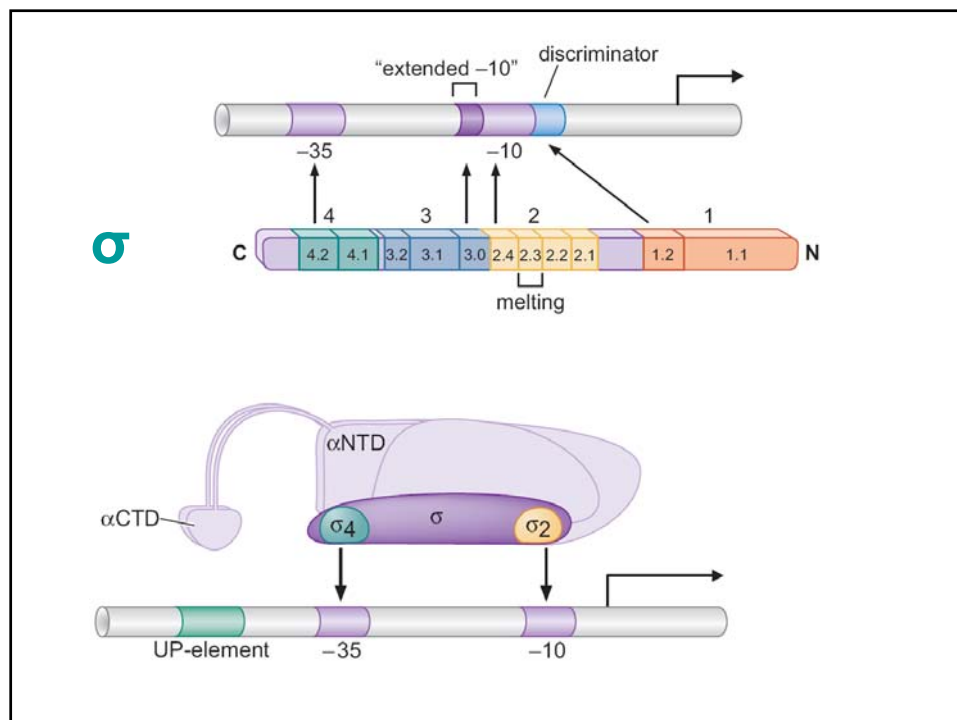
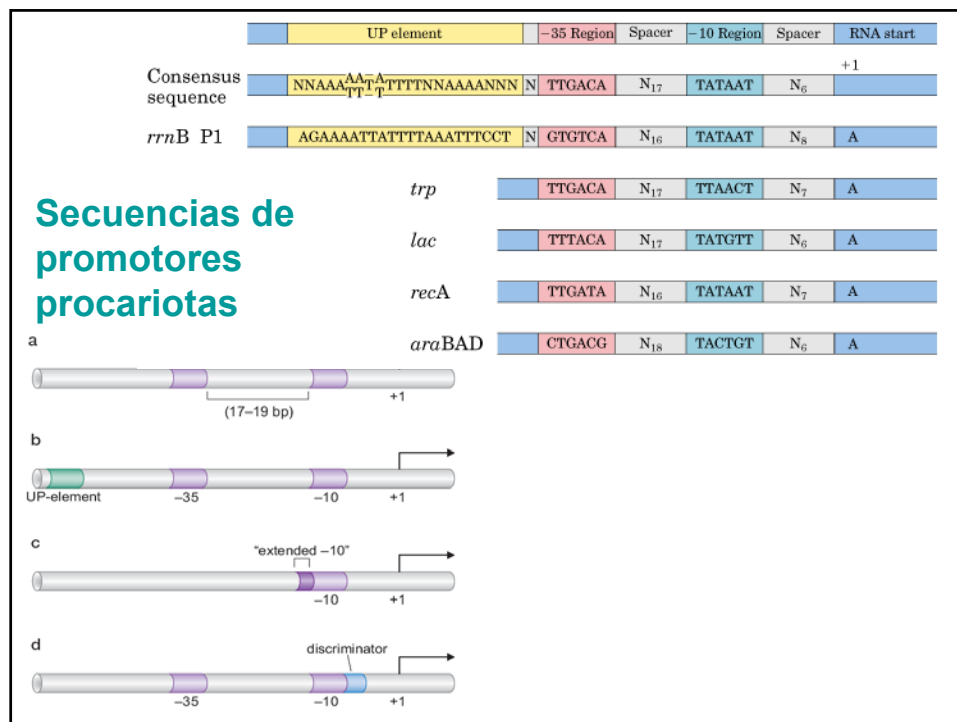


Secuencias de promotores procariotas

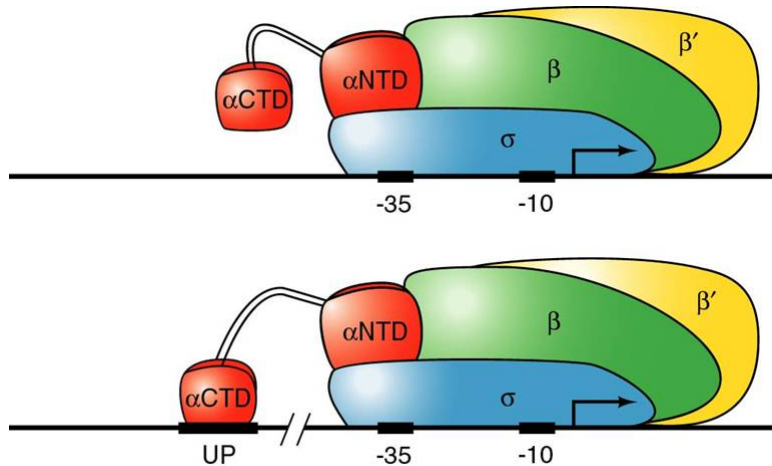
	UP element	-35 Region	Spacer	-10 Region	Spacer	RNA start
Consensus sequence	NNAA ^{AA} _{TT} TTTNNAAAANN	TTGACA	N ₁₇	TATAAT	N ₆	+1
<i>rrnB</i> P1	AGAAAATTATTTTAAATTCCT	GTGTCA	N ₁₆	TATAAT	N ₈	A
<i>trp</i>		TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
<i>lac</i>		TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>		TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A

Secuencias consenso y espaciamento





EL dominio C terminal (CTD) de la **subunidad alfa de la RNA polimerasa interactúa con el elemento UP** del promotor



El ciclo de sigma

1) La subunidad sigma ayuda a la RNA polimerasa a ubicar la zona promotora. Se forma el complejo cerrado del promotor (estable moderadamente). La subunidad sigma interactúa con la región -10

RNA polimerasa holoenzima (+ factor sigma)

2) Ocurre la fusión del DNA (complejo abierto). La interacción es muy estable. La holoenzima tiene una muy alta afinidad por las regiones promotoras debido a la presencia del factor sigma.

3) Una vez que la iniciación ocurrió, la RNA polimerasa no necesita más una alta afinidad por el promotor. El factor sigma se disocia de la polimerasa core después de unas pocas reacciones de elongación

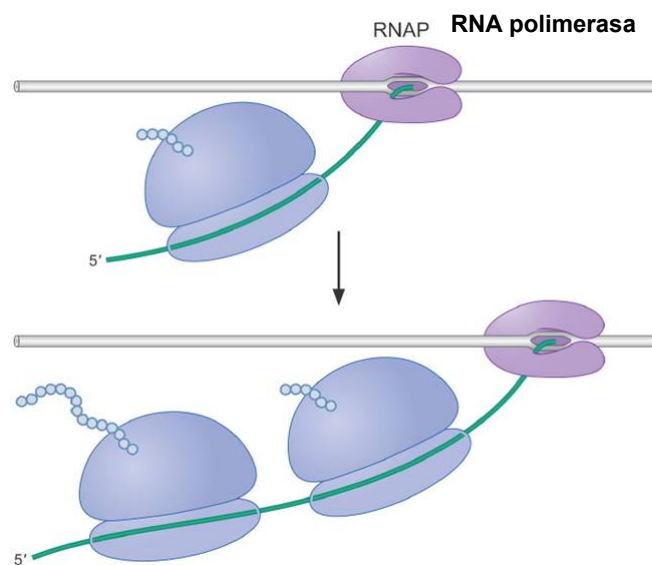
4) La RNA polimerasa core tiene menor afinidad por el promotor por lo que se aleja del promotor ocurriendo la elongación.

5) La subunidad sigma puede re-unirse a otras enzimas core

Existen **distintos** tipos de factores **sigma** (σ)
que interactúan con distintas secuencias

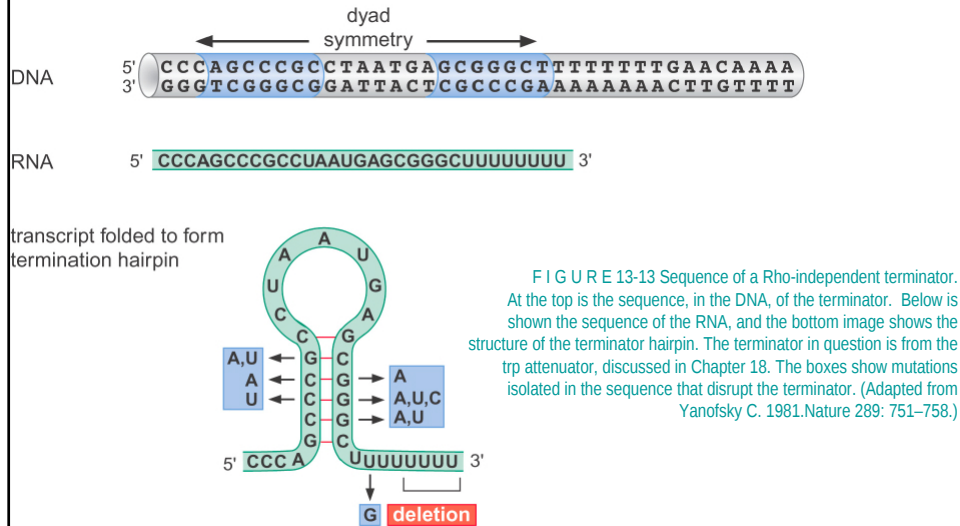
Gene	Mass (Da)	Function	-35	spacing	-10
<i>rpoD</i>	70, 000	General	TTGACA	16-18bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	32, 000	Heat Shock	CCCTTGAA	13-15bp	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	54, 000	Nitrogen	CTGGNA	6bp	TTGCA
<i>fliA</i>	28, 000	Flagellar	CTAAA	15bp	GCCGATAA

En procariotas la **traducción** ocurre
simultáneamente con la **transcripción**



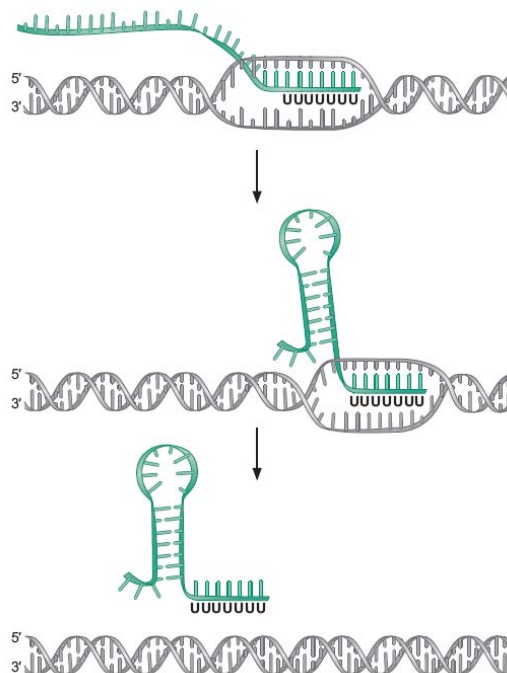
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

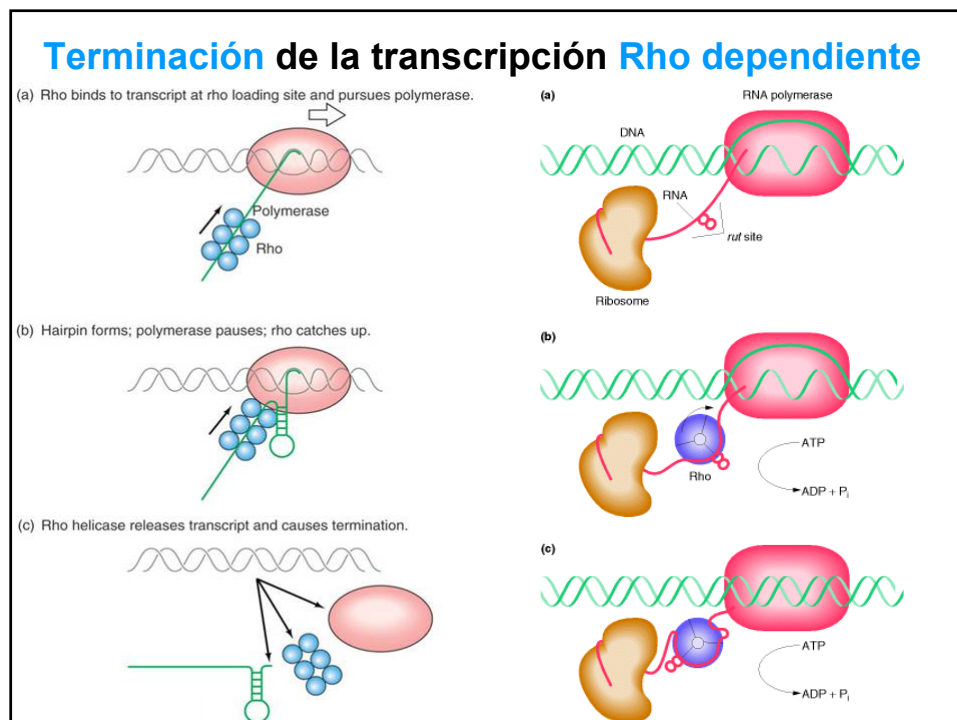
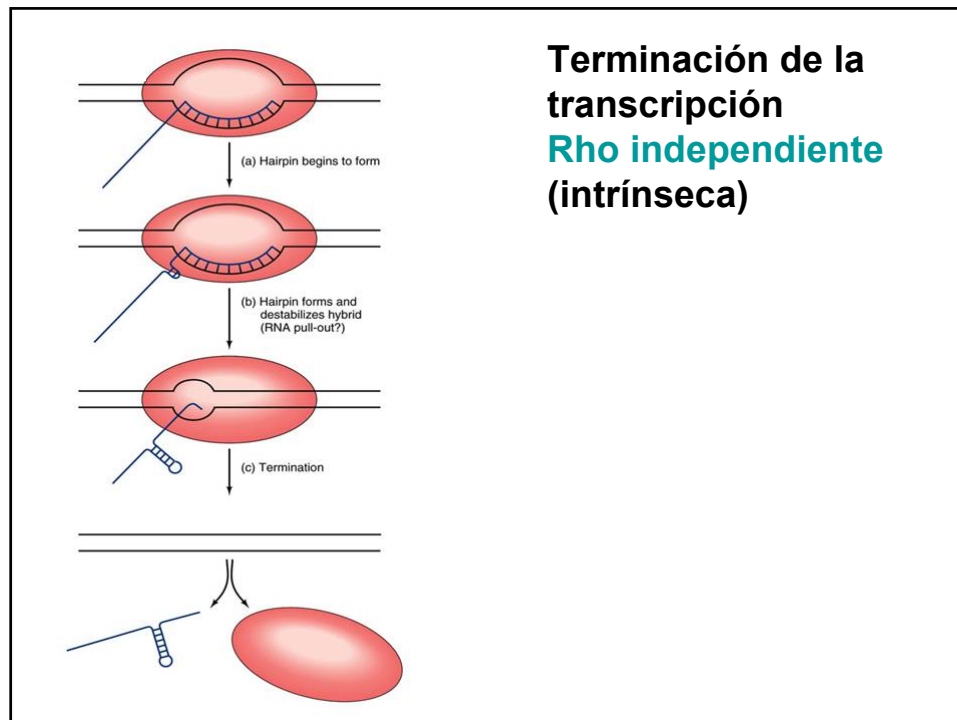
Terminación de la transcripción Rho independiente



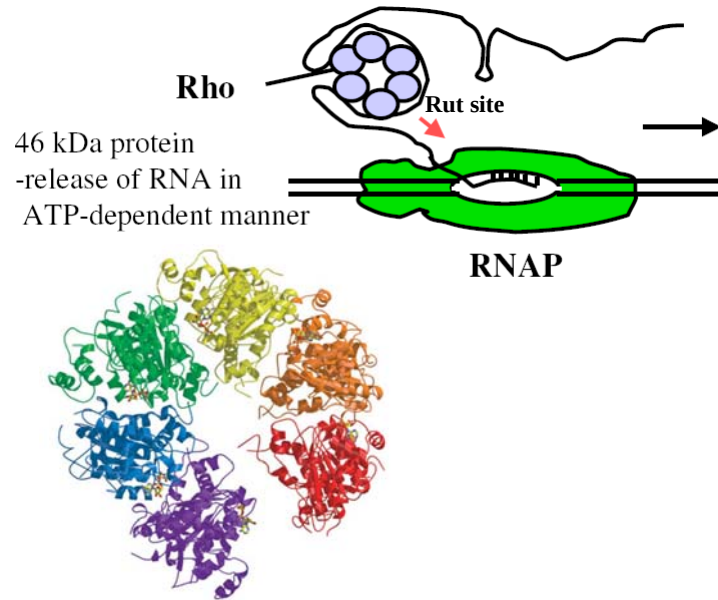
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Terminación de la transcripción Rho independiente





Terminación de la transcripción Rho dependiente



Técnicas relacionadas con la transcripción

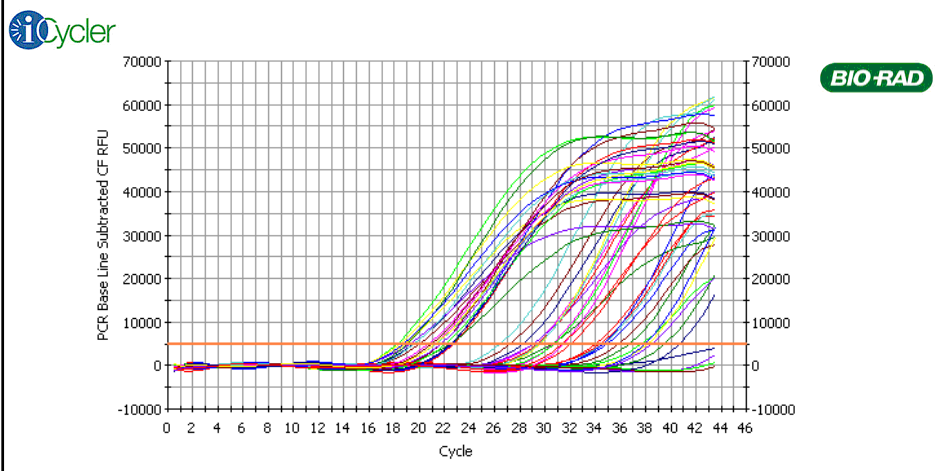
- 1- Niveles estacionarios de RNA
- 2- Síntesis de RNA
- 3- Interacciones DNA-proteína
- 4- Actividad de promotores
- 5- Inicio de la transcripción

1- Técnicas para medir niveles estacionarios de RNA

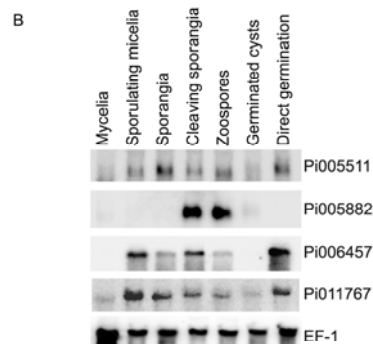
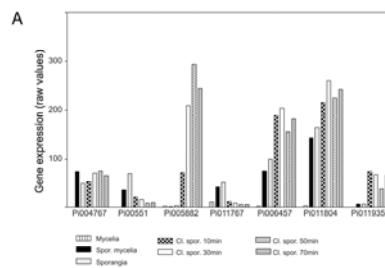
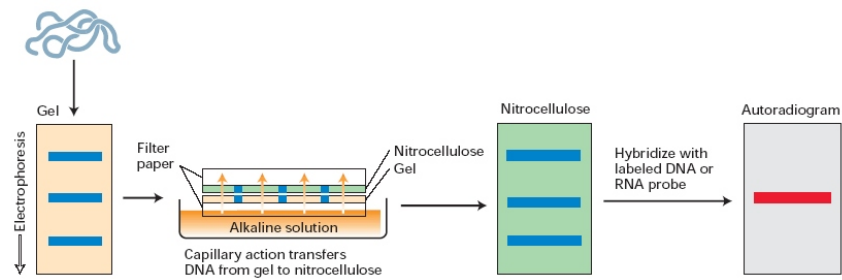
- Northern blot
- Dot blot/Macroarray (macro-arreglo)
- Microarray (micro-arreglo)
- PCR en tiempo real (real time PCR)

PCR en tiempo real (Real time PCR o qPCR)

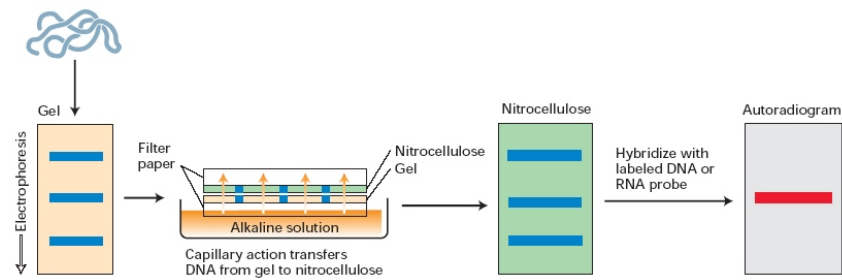
RNA → cDNA → PCR con cebadores específicos en presencia de un compuesto fluorescente



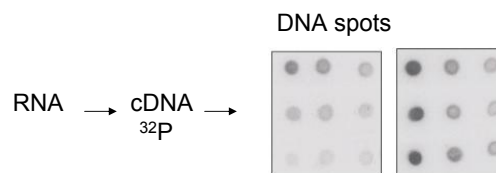
Northern blot



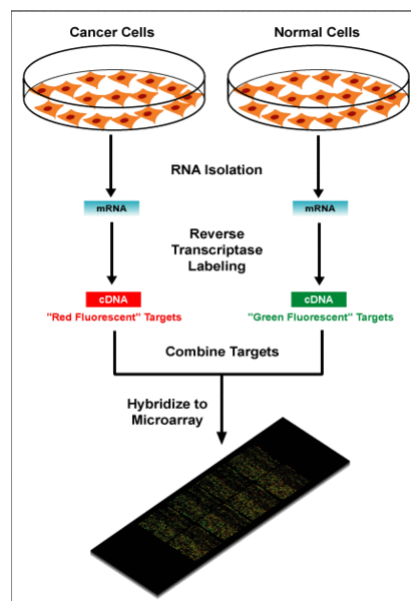
Northern blot

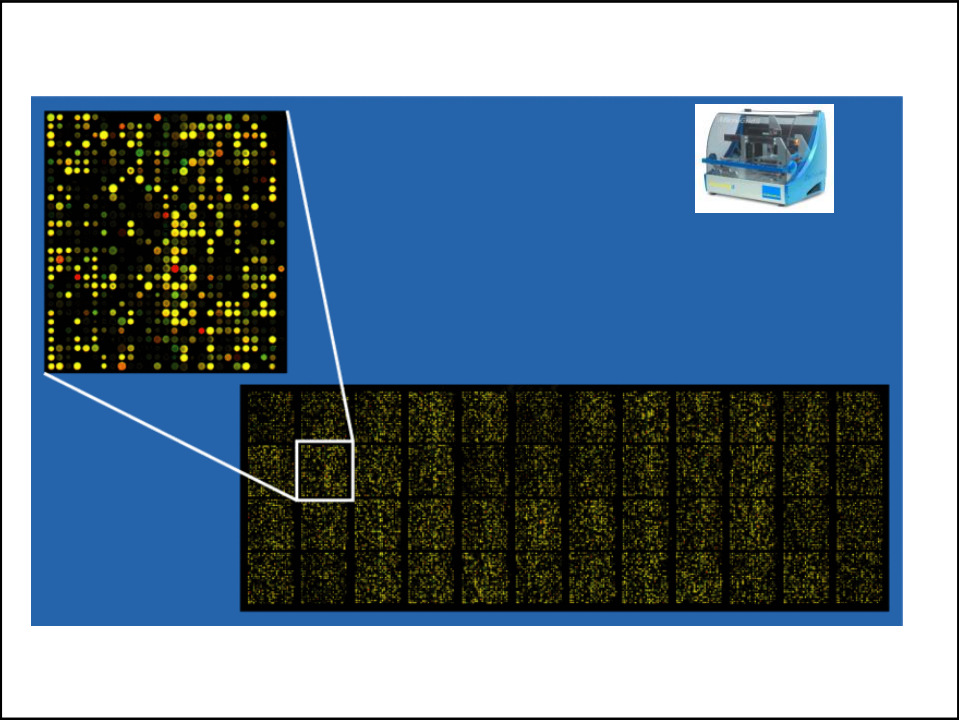


Dot blot-Macroarray



Microarray (microarreglo)





2- Síntesis de RNA

Run On

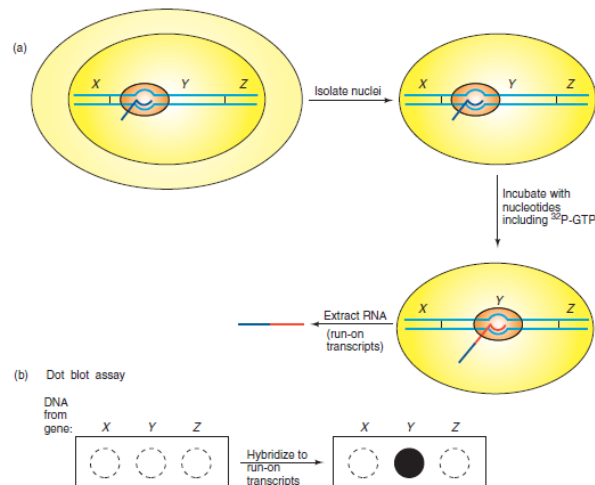


Figure 5.33 Nuclear run-on transcription. (a) The run-on reaction. Start with cells that are in the process of transcribing the Y gene, but not the X or Z genes. The RNA polymerase (orange) is making a transcript (blue) of the Y gene. Isolate nuclei from these cells and incubate them with nucleotides so transcription can continue (run-on). Also include a labeled nucleotide in the run-on reaction so the transcripts become labeled (red). Finally, extract the labeled run-on transcripts. (b) Dot blot assay. Spot single-stranded

DNA from genes X, Y, and Z on nitrocellulose or another suitable medium, and hybridize the blot to the labeled run-on transcripts. Because gene Y was transcribed in the run-on reaction, its transcript will be labeled, and the gene Y spot becomes labeled. The more active the transcription of gene Y, the more intense the labeling will be. On the other hand, because genes X and Z were not active, no labeled X and Z transcripts were made, so the X and Z spots remain unlabeled.

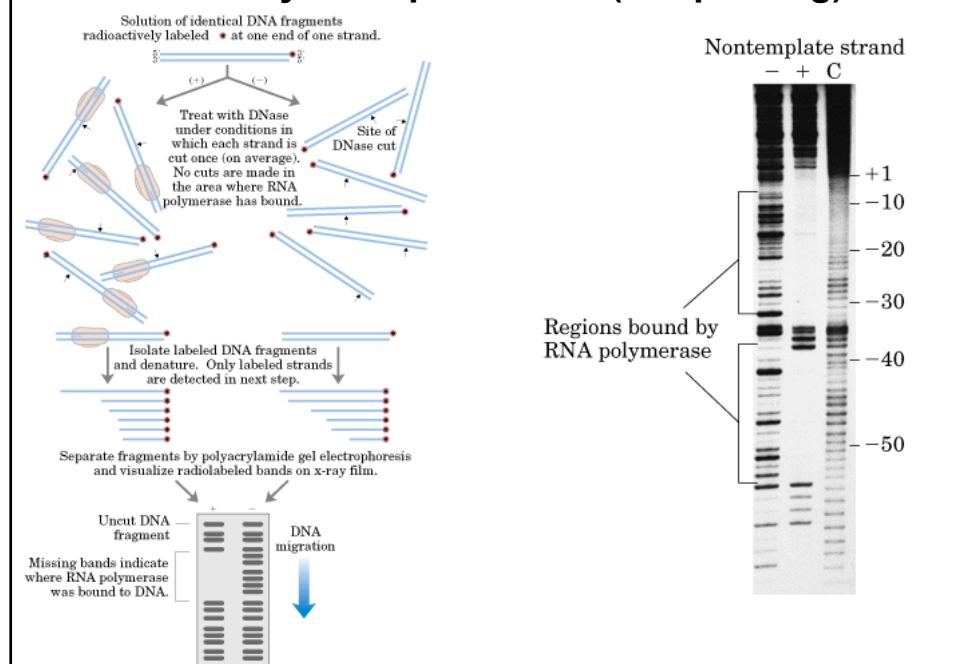
3- Técnicas para identificar interacciones DNA-proteína

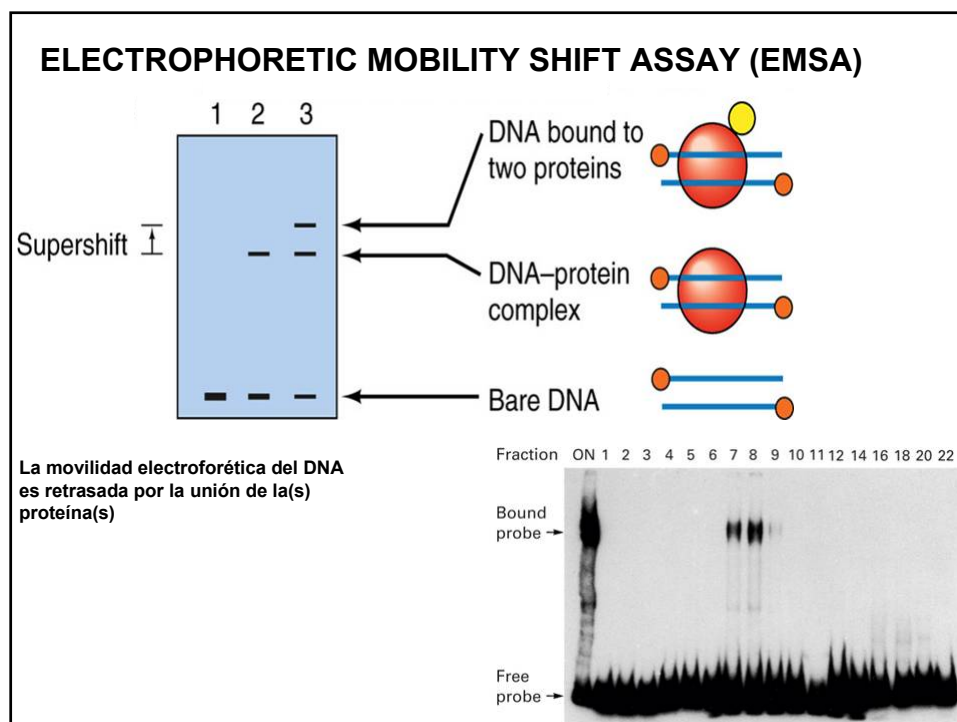
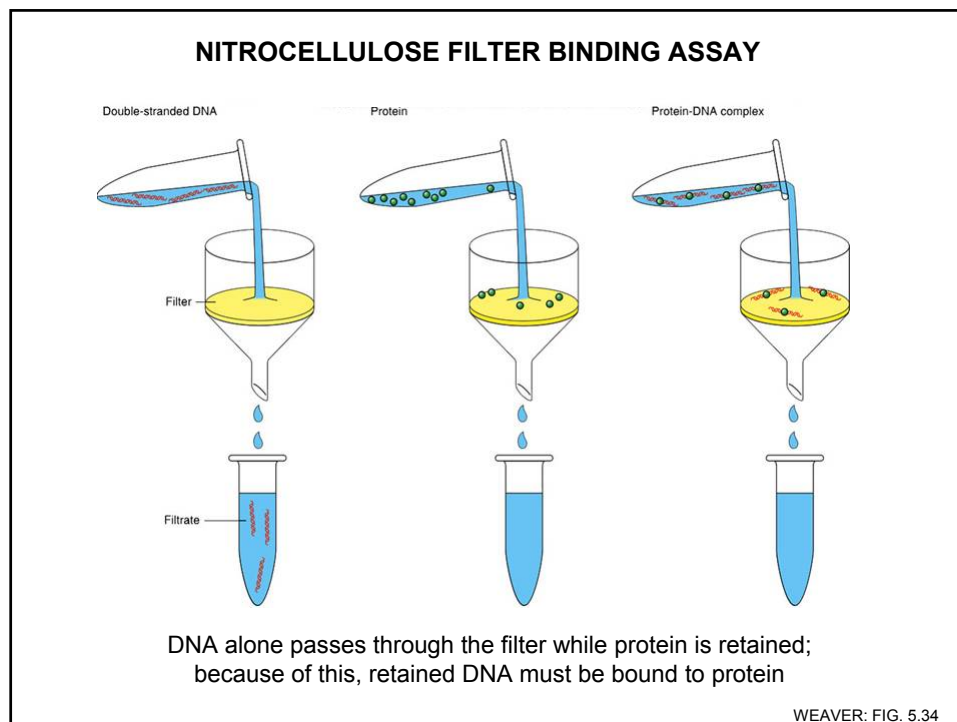
Footprinting

Unión a filtros de nitrocelulosa

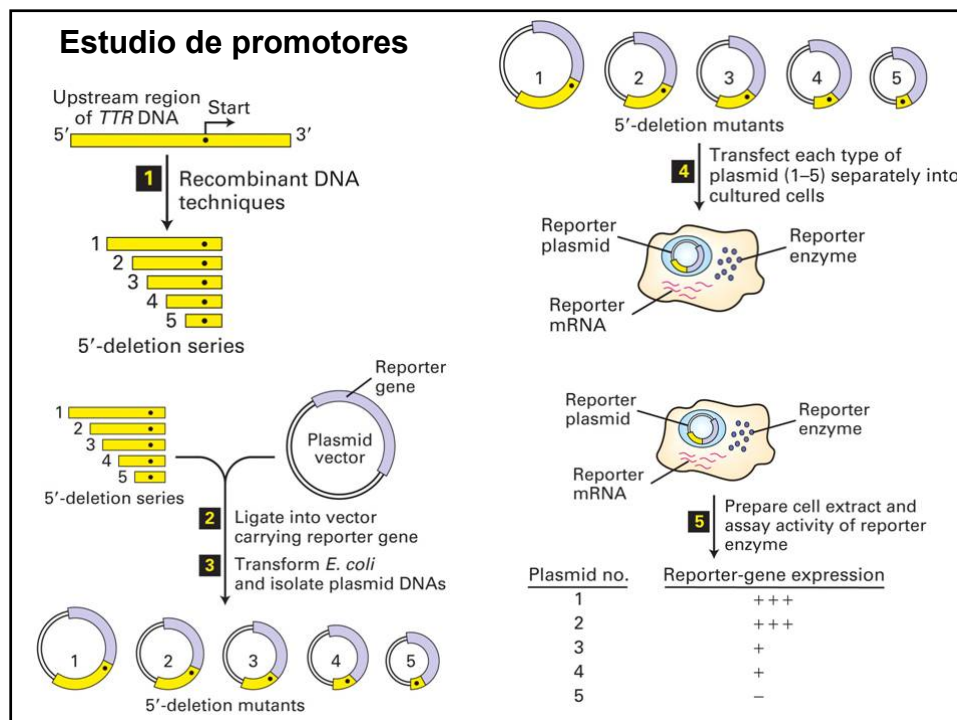
EMSA: electromobility shift assay

Ensayos de protección (footprinting)





4- Estudio de actividad de promotores



5- Identificación del inicio de la transcripción

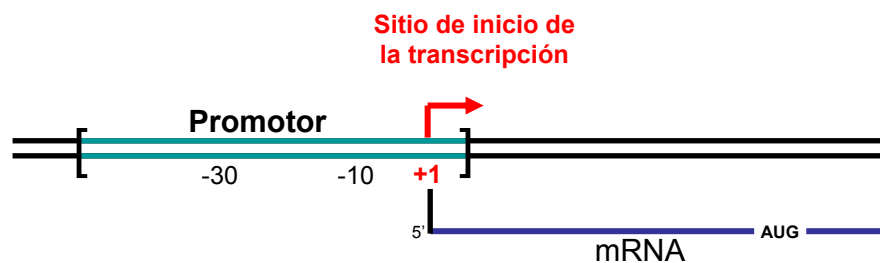
Primer extension

Race: rapid amplification of cDNA ends

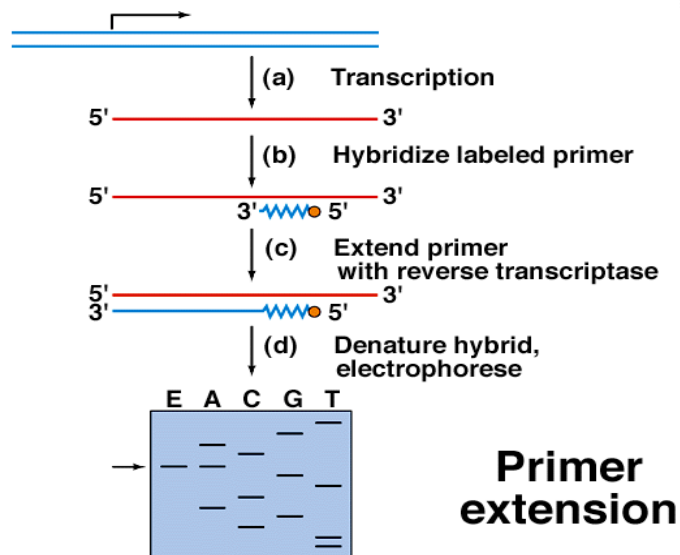
Mapeo con S1

Run off

¿Cómo se determina el sitio de inicio de la transcripción?



Determinación del sitio de inicio de la transcripción



WEAVER: FIG. 5.29

Primer Extension

GGCCGGTTGAAGTGGGCGGAGCGGCCGGGCGGCGTTCGCGTACTAGGCCTGCCCCCTGTCCGGCCAGCC -1
 CCTCGAAGCACCTACTCCACAGGTCCAGCCGGCCCGGTGAGCGCCTGGGGACCGCAGAGGTGAGAGTCGCG +70
SmaI
 CCCGGGAGTCCGCCGCCTGCGCCAGGATG +99

