

TRANSCRIÇÃO NOS EUKARIOTOS

Como já foi discutido, a transcrição nos eucariotos é realizada por RNA-polimerases muito relacionadas às RNA-polimerases encontradas nos procariotos. Isso não surpreende, pois o processo de transcrição é idêntico nos dois casos. No entanto, existem algumas diferenças na maquinaria utilizada em cada caso – uma delas já foi estudada aqui. Enquanto as bactérias possuem apenas uma RNA-polimerase, todos os eucariotos possuem pelos menos três enzimas diferentes (Pol I, II e III; e as plantas também possuem uma Pol IV e uma Pol V). Além disso, enquanto as bactérias requerem apenas um fator de início adicional (σ), nos eucariotos são necessários vários fatores para um início eficiente e promotor-específico. Esses fatores são chamados **fatores gerais de transcrição** (GTFs, *general transcription factors*).

Para iniciar a transcrição *in vitro* a partir de um molde de DNA (sem histonas), além da Pol II, são necessários apenas os fatores gerais de transcrição. *In vivo*, entretanto, o molde de DNA em células eucarióticas é incorporado nos nucleossomos, como foi visto no Capítulo 8. Sob essas circunstâncias, os fatores gerais de transcrição por si não são suficientes para ligar-se a sequências promotoras e induzir uma expressão significativa. Por isso, são necessários fatores adicionais, incluindo o chamado complexo Mediador, proteínas reguladoras de ligação ao DNA e, frequentemente, enzimas modificadoras de cromatina.

Primeiramente, será considerado o mecanismo básico pelo qual a Pol II e os fatores gerais de transcrição juntam-se no promotor para o início da transcrição *in vitro*. A seguir, serão considerados os componentes adicionais necessários para promover a transcrição *in vivo*.

Os promotores essenciais da RNA-polimerase II são formados pela combinação de diferentes classes de elementos de sequência

O **promotor essencial** eucariótico corresponde ao conjunto mínimo de elementos de sequência necessário ao início preciso da transcrição pela maquinaria da Pol II, como medido *in vitro*. Um promotor essencial normalmente tem 40 a 60 nucleotídeos de comprimento, estendendo-se a montante ou a jusante do sítio de início da transcrição. A Figura 13-15 mostra a localização, em relação ao sítio de início da transcrição, de elementos encontrados em promotores essenciais de Pol II. São eles: o elemento de reconhecimento TFIIB (BRE), o elemento ou sequência TATA (ou TATA *box*), o iniciador (Inr) e os elementos promotores a jusante (conhecidos como DPE, DCE e MTE). Normalmente, um promotor contém um subconjunto desses elementos. Assim, por exemplo, os promotores na maioria das vezes têm um elemento TATA ou

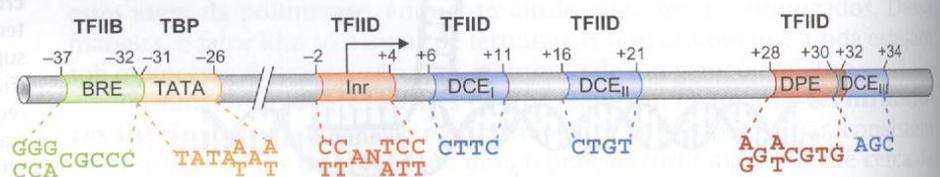


FIGURA 13-15 Promotor essencial de Pol II. A figura apresenta as posições dos vários elementos do DNA em relação ao sítio de início da transcrição (indicado pela seta acima do DNA). Esses elementos, descritos no texto, são os seguintes: o elemento de reconhecimento TFIIB (BRE), a sequência TATA (TATA), o elemento iniciador (Inr), o elemento promotor a jusante (DPE, *downstream promoter element*) e o elemento central a montante (DCE, *downstream core element*). Outro elemento, o MTE (do inglês, *motif ten element* [motivo do elemento -10]), descrito no texto, não é mostrado nesta figura, mas está localizado logo a montante de DPE. Também estão mostradas as sequências consenso para cada elemento (determinadas da mesma maneira descrita para os elementos do promotor bacteriano; ver Quadro 13-1) e (acima) o nome do fator geral de transcrição que reconhece cada elemento.

um elemento DPE, mas não ambos. Em geral, um promotor contendo TATA também possui um DCE. O Inr é o elemento mais comum, encontrado em combinação com TATA e DPEs. A sequência consenso para cada elemento e o fator geral de transcrição que se liga a ele também são mostrados, e essas características são descritas de maneira mais detalhada nas seções seguintes.

Além – e, normalmente, a montante – do promotor essencial, existem outros elementos de sequência necessários para uma transcrição *in vivo* eficiente. Em conjunto, esses elementos constituem as **sequências reguladoras** e podem ser agrupados em várias categorias conforme a sua localização, o organismo envolvido e a sua função. Esses elementos compreendem os elementos promotores proximais, as sequências ativadoras a montante (UASs, *upstream activator sequences*), os reforçadores, ou *enhancers*, e uma série de elementos repressores, chamados silenciadores, elementos de fronteira e isolantes. Todos esses elementos de DNA ligam-se a proteínas reguladoras (ativadoras e repressoras), as quais facilitam ou dificultam a transcrição do promotor essencial, objeto do Capítulo 19. Algumas dessas sequências reguladoras podem estar a mais de dezenas (ou até centenas) de quilobases de distância dos promotores essenciais sobre os quais atuam.

A RNA-polimerase II forma um complexo de pré-início com os fatores gerais de transcrição no promotor

Os fatores gerais de transcrição realizam coletivamente as funções realizadas por σ na transcrição bacteriana. Desse modo, os fatores gerais de transcrição auxiliam na ligação da polimerase ao promotor e desnaturam o DNA (equivalente à transição de complexo fechado para complexo aberto nas bactérias). Eles também auxiliam a polimerase a “escapar” do promotor e entrar na fase de alongamento. O conjunto dos fatores gerais de transcrição com a polimerase, ligados ao promotor e posicionados para o início, é denominado **complexo de pré-início**.

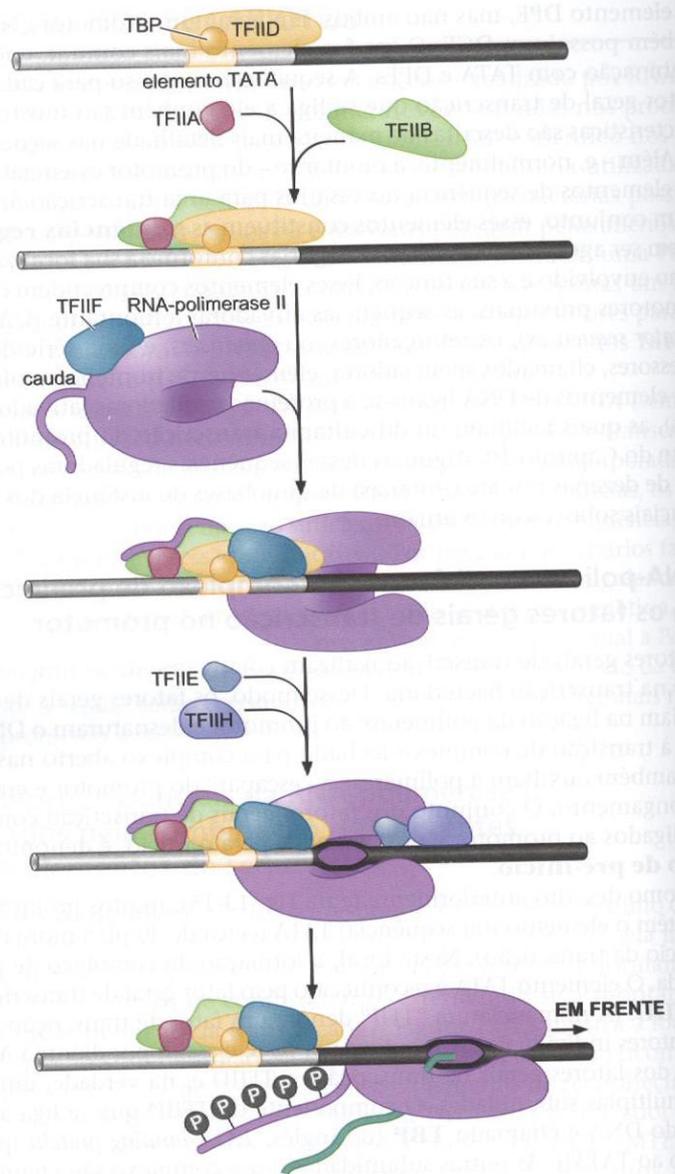
Como descrito anteriormente (e na Fig. 13-15), muitos promotores da Pol II contêm o elemento (ou sequência) TATA (cerca de 30 pb a montante do sítio de início da transcrição). Neste local, a formação do complexo de pré-início é iniciada. O elemento TATA é reconhecido pelo fator geral de transcrição chamado **TFIID**. (A nomenclatura “TFII” denota um fator de transcrição para Pol II, com fatores individuais distinguidos por A, B, e assim por diante.) Assim como vários dos fatores gerais de transcrição, o TFIID é, na verdade, um complexo com múltiplas subunidades. O componente do TFIID que se liga à sequência TATA do DNA é chamado **TBP** (do inglês, *TATA-binding protein* [proteína de ligação ao TATA]). As outras subunidades desse complexo são chamadas **TAFs** (do inglês, *TBP-associated factors* [fatores associados à TBP]). Alguns TAFs reconhecem outros elementos do promotor essencial, como Inr, DPE e DCE, embora a ligação mais forte seja entre TBP e TATA. Assim, TFIID é um fator essencial no reconhecimento do promotor e no estabelecimento do complexo de pré-início.

Ao ligar-se ao DNA, TBP distorce amplamente a sequência TATA (esse evento será discutido de maneira mais detalhada a seguir). O complexo TBP-DNA resultante fornece uma plataforma para o recrutamento de outros fatores gerais de transcrição e da própria polimerase ao promotor. *In vitro*, essas proteínas ligam-se no promotor na seguinte ordem (Fig. 13-16): TFIIA, TFIIB, TFIIF juntamente com a polimerase e, então, TFIIE e TFIIH. Após a formação do complexo de pré-início que contém todos esses componentes, ocorre a desnaturação do DNA do promotor. Ao contrário do que acontece nas bactérias, nos eucariotos a desnaturação do promotor requer a hidrólise de ATP e é mediada por TFIIH.

O escape do promotor requer a fosforilação da “cauda” da polimerase

Como visto nas bactérias, segue-se agora um período de início abortivo, até que a polimerase escape do promotor e ingresse na fase de alongamento.

FIGURA 13-16 Início da transcrição pela RNA Pol II. As etapas da formação do complexo de pré-início da Pol II estão mostradas aqui e descritas em detalhes no texto. Uma vez montada sobre o promotor, a Pol II deixa o complexo de pré-início após a adição dos nucleotídeos precursores necessários à síntese de RNA e após a fosforilação dos resíduos de serina na "cauda" da enzima. A cauda contém várias repetições da sequência heptapeptídica: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (ver Fig. 13-21).



Durante o início abortivo, a polimerase sintetiza uma série de pequenos transcritos. Em eucariotos, o escape do promotor envolve duas etapas não observadas em bactérias: uma delas é a hidrólise de ATP (além da hidrólise de ATP anterior, necessária para a desnaturação do DNA), e a outra é a fosforilação da polimerase, que será descrita agora.

A subunidade maior da Pol II possui um domínio carboxiterminal (CTD), chamado de "cauda" (ver Fig. 13-16). O CTD contém uma série de repetições da sequência heptapeptídica: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Existem 27 dessas repetições no CTD da Pol II de levedura, 32 no do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, 45 na mosca *Drosophila*, e 52 em seres humanos. De fato, o número de repetições parece estar relacionado à complexidade do genoma. Cada repetição contém sítios de fosforilação por quinases específicas, incluindo sítios para uma subunidade do TFIIH que é uma quinase.

A forma inicial da Pol II que é recrutada para o promotor contém uma cauda predominantemente não fosforilada, mas a cauda encontrada no

complexo de alongamento possui vários grupos fosfato. A adição desses fosfatos auxilia a polimerase a desconectar-se da maioria dos fatores gerais de transcrição empregados no início, que são deixados para trás pela enzima, quando esta escapa do promotor.

Como será visto, a regulação do estado de fosforilação da CTD da Pol II também controla algumas etapas seguintes – como o alongamento e mesmo o processamento do RNA. Na verdade, além da TFIIF, foram identificadas outras quinases que também atuam sobre o CTD, bem como várias fosfatases que removem os fosfatos adicionados pelas quinases.

A TBP liga-se ao DNA e provoca sua distorção pela inserção de uma folha β na fenda menor

A TBP utiliza uma grande região de folha β para reconhecer a fenda menor do elemento TATA (Fig. 13-17). Isso é incomum: em geral, as proteínas reconhecem o DNA por meio de α -hélices inseridas na fenda maior do DNA, como foi visto no Capítulo 6 e também neste capítulo, em relação ao fator σ . A razão para esse mecanismo não convencional de reconhecimento por TBP está relacionada à necessidade de provocar uma distorção na estrutura local do DNA. Mas esse modo de reconhecimento gera um problema: como a especificidade é obtida?

No Capítulo 6, viu-se que a fenda menor do DNA é mais pobre do que a fenda maior quanto à informação química que permite a identificação dos pares de bases. Por isso, para identificar a sequência TATA, a TBP depende da capacidade de essa sequência sofrer uma distorção estrutural específica, como será descrito agora.

Ao se ligar ao DNA, a TBP causa o alargamento da fenda menor a uma conformação quase plana; ela também curva o DNA em um ângulo de aproximadamente 80° . A interação entre TBP e DNA envolve apenas um número limitado de ligações de hidrogênio entre a proteína e as bordas dos pares de bases da fenda menor. Em vez disso, grande parte da especificidade é dada pelos dois pares de cadeias laterais de fenilalaninas que se intercalam entre os pares de bases em cada extremidade da sequência de reconhecimento, promovendo uma forte torção no DNA.

Assim, os pares de bases A:T são favorecidos porque eles se deformam mais facilmente, permitindo a abertura inicial da fenda menor. Também ocorrem extensas interações entre o esqueleto de fosfato e os resíduos básicos da folha β , que se somam à energia total de ligação da interação.

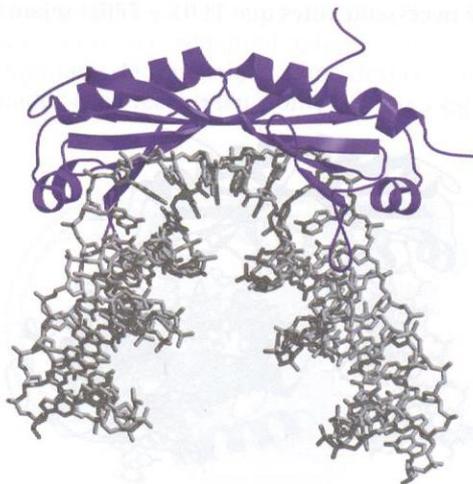


FIGURA 13-17 Complexo TBP-DNA. A proteína de ligação ao TATA (TBP) (roxo) complexada à sequência TATA do DNA (cinza) é encontrada no início de vários genes de Pol II. Os detalhes dessa interação são descritos no texto. (Reproduzida de Nikolov D.B. et al. 1995. *Nature* **377**: 119.) Imagem preparada com MolScript, BobScript e Raster3D. O DNA estendido em ambos os lados da imagem foi modelado por Leemor Joshua-Tor.

TABELA 13-2 Fatores gerais de transcrição (GTF) da RNA-polimerase II

GTFs	Número de subunidades
TBP	1
TFIIA	2
TFIIB	1
TFIIE	2
TFIIF	3
TFIIH	10
TAFs	11

Os números apresentados são para leveduras, mas são semelhantes em outros eucariotos, incluindo os seres humanos. No entanto, existem algumas diferenças – por exemplo, o TFIIF humano possui apenas duas subunidades, e seu TFIIA possui três.

Os demais fatores gerais de transcrição também têm funções específicas no início

Os detalhes das funções de todos os fatores gerais de transcrição não são conhecidos. Como foi visto, alguns desses fatores são, na verdade, complexos formados por duas ou mais subunidades (apresentados na Tab. 13-2). A seguir, algumas características estruturais e funcionais desses fatores são apresentadas.

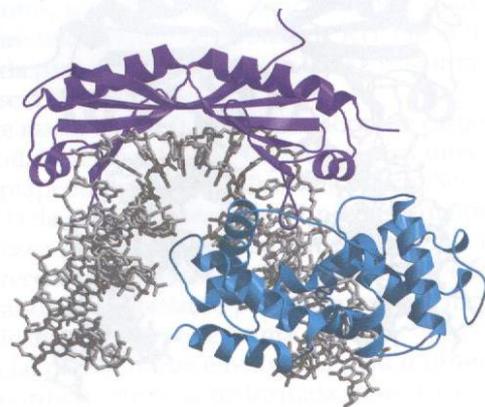
TAFs A TBP está associada a cerca de 10 TAFs. Dois deles ligam-se a elementos do DNA no promotor; por exemplo, o elemento iniciador (Inr) e os elementos promotores a jusante (ver Fig. 13-15). Vários TAFs apresentam homologia estrutural às proteínas histonas, e foi proposto que eles poderiam ligar-se ao DNA de modo semelhante, embora ainda não existam evidências para tal ligação. Foi demonstrado, por exemplo, que TAF42 e TAF62 de *Drosophila* formam uma estrutura semelhante à do tetrâmero H3·H4 (ver Cap. 8). Esses TAFs semelhantes a histonas não são encontrados apenas no complexo TFIID, mas também estão associados a algumas enzimas modificadoras de histonas, como o complexo SAGA das leveduras (ver Cap. 8, Tab. 8-7).

Outro TAF parece regular a ligação de TBP ao DNA. Ele faz isso usando um prolongamento inibidor que se liga à superfície de ligação ao DNA do TBP, outro exemplo de mimetismo molecular. Esse prolongamento precisa ser removido para que a TBP se ligue ao elemento TATA.

TFIIB Essa proteína, um polipeptídeo de cadeia única, entra no complexo de pré-início após a TBP (Fig. 13-16). A estrutura cristalográfica do complexo ternário TFIIB-TBP-DNA apresenta contatos específicos entre TFIIB-TBP e TFIIB-DNA (Fig. 13-18). Esses contatos incluem interações base-específicas, com a fenda maior a montante (para o BRE) (ver Fig. 13-15) e a fenda menor a jusante do elemento TATA. A ligação assimétrica do TFIIB ao complexo TBP-TATA contribui para a assimetria resultante na formação do complexo de pré-início e para a consequente transcrição unidirecional. O TFIIB também interage com a Pol II no complexo de pré-início. Portanto, essa proteína parece servir de ponte entre a TBP ligada à TATA e a polimerase. Estudos estruturais sugerem que segmentos do TFIIB se inserem no canal de saída do RNA e na fenda do centro ativo de Pol II de maneira análoga à região do conector 3/4 de σ em bactérias. Essas regiões de TFIIB (chamadas de **conectora** e **leitadora**) auxiliam na formação do complexo aberto, talvez pela estabilização do DNA desnaturado até que o híbrido RNA:DNA assumo esse papel.

TFIIF Esse fator, composto por duas subunidades (em seres humanos), associa-se à Pol II e é recrutado para o promotor juntamente com essa enzima (e com outros fatores). A ligação de Pol II-TFIIF estabiliza o complexo DNA-TBP-TFIIB e é necessária antes que TFIIE e TFIIH sejam recrutados para o

FIGURA 13-18 Complexo TFIIB-TBP-promotor. Esta estrutura apresenta a proteína TBP ligada à sequência TATA, exatamente como na figura anterior. Nesta, porém, foi adicionado o fator geral de transcrição TFIIB (azul-turquesa). Este complexo de três componentes constitui a plataforma para a qual são recrutados os outros fatores gerais de transcrição e a própria Pol II, durante a formação do complexo de pré-início. (Reproduzida de Nikolov D.B. et al. 1995. *Nature* 377: 119.) Imagem preparada com MolScript, BobScript e Raster3D. O DNA estendido em ambos os lados da imagem foi modelado por Leemor Joshua-Tor.



complexo de pré-início (Fig. 13-16). Em leveduras, esse fator inclui uma terceira subunidade (como mostrado na Tab. 13-2), mas a função da terceira subunidade ainda é desconhecida.

TFIIE e TFIIH O TFIIE, assim como o TFIIIF, é composto por duas subunidades, liga-se após TFIIIF e atua no recrutamento e na regulação do TFIIH. O TFIIH controla a transição ATP-dependente do complexo de pré-início para complexo aberto. Além disso, é o maior e mais complexo dos fatores gerais de transcrição – possui 10 subunidades e uma massa molecular comparável à da polimerase. Duas subunidades do TFIIH atuam como ATPases e outra é uma proteína quinase, envolvidas na desnaturação e no escape do promotor, como já foi descrito. Juntamente com outros fatores, as subunidades da ATPase também estão envolvidas no reparo por excisão de nucleotídeo (ver Cap. 10).

Como o TFIIH medeia a desnaturação do promotor? Viu-se que, no caso das bactérias, a desnaturação do elemento -10 do promotor é mediada por bases da fita de DNA não codificadora que são deslocadas e se ligam a bolsos da subunidade σ . Isso não requer a hidrólise de ATP e é simplesmente dirigido por reações de ligação que favorecem a conformação desnaturada (ver Fig. 13-8). Em eucariotos, as coisas são mais complicadas. Hoje acredita-se que uma subunidade de TFIIH atue como translocador de DNA de dupla-fita dirigido por ATP. Essa subunidade liga-se ao DNA a jusante da polimerase (como foi mostrado na Fig. 13-16) e alimenta a fenda da polimerase com DNA de dupla-fita. Essa ação leva à desnaturação do DNA porque o DNA do promotor a montante é mantido em uma posição fixa pelo TFIID e pelo restante dos GTFs.

O início da transcrição *in vivo* requer proteínas adicionais, incluindo o complexo Mediador

Até aqui, foram descritos os elementos necessários para o início da transcrição *in vitro* pela RNA Pol II a partir de um DNA-molde livre. No entanto, transcrição em níveis altos e sob regulação *in vivo* requer, ainda, a adição do complexo Mediador, de proteínas reguladoras da transcrição e, em muitos casos, de enzimas modificadoras de nucleossomos (que frequentemente fazem parte de grandes complexos proteicos) (Fig. 13-19). (Para características de vários complexos modificadores, ver Cap. 8, Tab. 8-7.)

Um motivo para esses requisitos adicionais é que, *in vivo*, o molde de DNA está compactado em cromatina, como discutido no Capítulo 8. Esta condição dificulta a ligação da polimerase e de seus fatores associados ao promotor. Proteínas reguladoras da transcrição, chamadas **ativadores**, ajudam no recrutamento da polimerase para o promotor, estabilizando sua ligação. Esse recrutamento é mediado por interações entre os ativadores ligados ao DNA, fatores modificadores da cromatina, fatores remodeladores da cromatina e partes da maquinaria de transcrição. Uma dessas interações ocorre com o complexo Mediador (que recebe seu nome devido a esta ação). O Media-

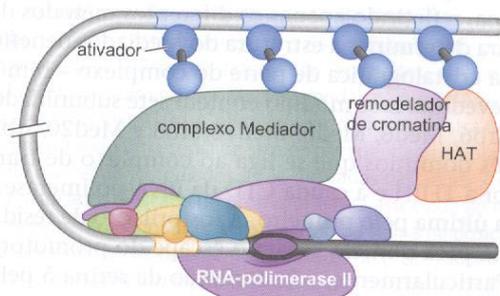


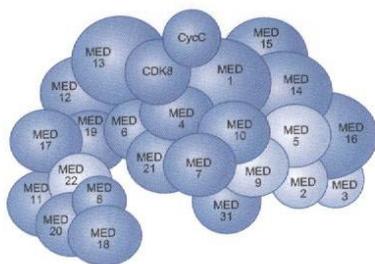
FIGURA 13-19 Formação do complexo de pré-início na presença do Mediador, dos modificadores e remodeladores de nucleossomos e de ativadores da transcrição. Além dos fatores gerais de transcrição apresentados na Figura 13-16, os ativadores transcripcionais ligados a sítios próximos ao gene recrutam os complexos que modificam e remodelam os nucleossomos e o complexo Mediador que, juntos, auxiliam na formação do complexo de pré-início.

TABELA 13-2 Parte 4
transcrição

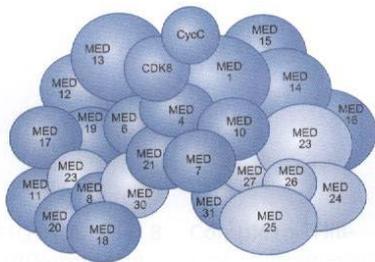
GTP

TIP

TIP



Mediador de leveduras



Mediador de seres humanos

FIGURA 13-20 Comparação entre os Mediadores de leveduras e de seres humanos. A maioria das subunidades é encontrada em ambos os casos, mas as diferenças estão indicadas por sombreadamento mais claro. (Mediador de leveduras: figura modificada de Guglielmi B. et al. 2004. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5379-5391, Fig. 8B; Mediador de seres humanos: figura modificada, com permissão, de Malik S. e Roeder R.G. 2005. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 256-263, Fig. 1a. © Elsevier.)

dor associa-se à maquinaria básica de transcrição provavelmente via contatos com a “cauda” do CTD da subunidade maior da polimerase, enquanto as outras superfícies interagem com os ativadores ligados ao DNA. Isso explica por que o Mediador é necessário para uma transcrição *in vivo* significativa.

Apesar do papel central na ativação da transcrição, a deleção de subunidades individuais do Mediador geralmente resulta na perda de expressão de apenas um pequeno subconjunto de genes, diferente para cada subunidade (ele é composto por muitas subunidades). É provável que esse resultado reflita uma interação diferencial, na qual diferentes ativadores interagem com diferentes subunidades do Mediador para recrutar a polimerase a diferentes genes. Além disso, o Mediador auxilia no início, regulando a quinase CTD de TFIID.

A necessidade de modificadores e remodeladores de nucleossomos também difere em diferentes promotores, ou para um mesmo promotor em diferentes circunstâncias. Conforme a ocasião e o local em que são necessários, esses complexos também são recrutados por ativadores ligados ao DNA ou, algumas vezes, por RNAs reguladores.

O papel do Mediador e dos modificadores no estímulo à transcrição será discutido no Capítulo 19. Agora, serão consideradas algumas propriedades estruturais e funcionais do Mediador.

O Mediador é composto por diversas subunidades, algumas conservadas de leveduras a seres humanos

Como mostrado na Figura 13-20, tanto o Mediador de leveduras como o de seres humanos contêm mais de 20 subunidades, sete delas com significativa homologia de seqüências entre os dois organismos. (Os nomes das subunidades eram inicialmente diferentes em cada caso, refletindo as abordagens experimentais que levaram à sua identificação, mas subsequentemente foi estabelecida uma convenção de que subunidades equivalentes em diferentes organismos empreguem o mesmo nome. São esses nomes que estão na Fig. 13-20.) Pouquíssimas subunidades têm sua função identificada. Apenas uma (Srb4/Med17) é essencial para a transcrição *in vivo* de praticamente todos os genes de Pol II. Comparações estruturais de baixa resolução sugerem que os dois Mediadores apresentam formato semelhante e são muito grandes, maiores do que a própria RNA-polimerase.

O Mediador de leveduras e o de seres humanos é organizado em módulos, cada um contendo um conjunto das subunidades mostradas na Figura 13-20. Esses módulos – chamados de cabeça, meio (ou braço) e cauda – podem ser dissociados um do outro sob certas condições *in vitro*. Essa observação, junto com o fato de o Mediador humano variar em composição (e tamanho), dependendo de como é isolado, levou à hipótese de que existam várias formas de Mediador (especialmente nos metazoários), cada uma contendo um subconjunto de subunidades do Mediador. Além disso, o envolvimento de diferentes formas na regulação dos diferentes grupos de genes ou na resposta a diferentes grupos de reguladores (ativadores e repressores) tem sido discutido. É igualmente possível que as variações observadas na composição das subunidades sejam artefatos de técnica, refletindo apenas os diferentes métodos de isolamento.

Tentativas para determinar a estrutura do Mediador beneficiaram-se da solução da estrutura cristalográfica de parte do complexo – o módulo da cabeça do Mediador de levedura. Esse módulo contém sete subunidades (Med17/Srb4, Med11, Med22/Srb6, Med6, Med8, Med18/Srb5 e Med20/Srb2) e forma uma estrutura com três domínios que se liga ao complexo de transcrição de maneira a se justapor a TFIID e à cauda CTD da RNA-polimerase, promovendo a fosforilação desta última pelo primeiro. A fosforilação de resíduos de serina da cauda é necessária para o início e para o escape do promotor, como será discutido adiante. Particularmente, a fosforilação da serina 5 pelo próprio TFIID leva à dissociação do Mediador da polimerase durante esse processo.

Um novo conjunto de fatores estimula o alongamento pela Pol II e a revisão de leitura do RNA

Após a polimerase ter escapado do promotor e iniciado a transcrição, ela entra na fase de alongamento, como já foi discutido. Essa transição envolve a liberação da maioria dos fatores de início da enzima Pol II – por exemplo, os fatores gerais de transcrição e o Mediador. Em seu lugar, entra outro conjunto de fatores. Alguns deles (como TFIIS e SPT5) são **fatores de alongamento** (i.e., fatores que estimulam o alongamento). Outros são necessários ao processamento do RNA. As enzimas envolvidas em todos esses processos (descritas em detalhes mais tarde) são, assim como vários dos fatores de início discutidos, recrutadas para a cauda carboxiterminal (CTD) da subunidade maior da Pol II (Fig. 13-21). Neste caso, porém, os fatores favorecem a forma fosforilada do CTD. Assim, a fosforilação do CTD resulta na troca dos fatores de início pelos fatores necessários ao alongamento e ao processamento do RNA.

Como evidenciado pela estrutura cristalográfica da Pol II de leveduras, o CTD da polimerase situa-se diretamente adjacente ao canal de saída do RNA recém-sintetizado. A cauda CTD também é muito longa (ela pode estender-se potencialmente a ~800 Å do corpo da enzima – i.e., cerca de sete vezes o comprimento do restante da enzima). Juntas, essas características permitem que a cauda se ligue a vários componentes da maquinaria de alongamento e processamento e conecte-os ao RNA emergente.

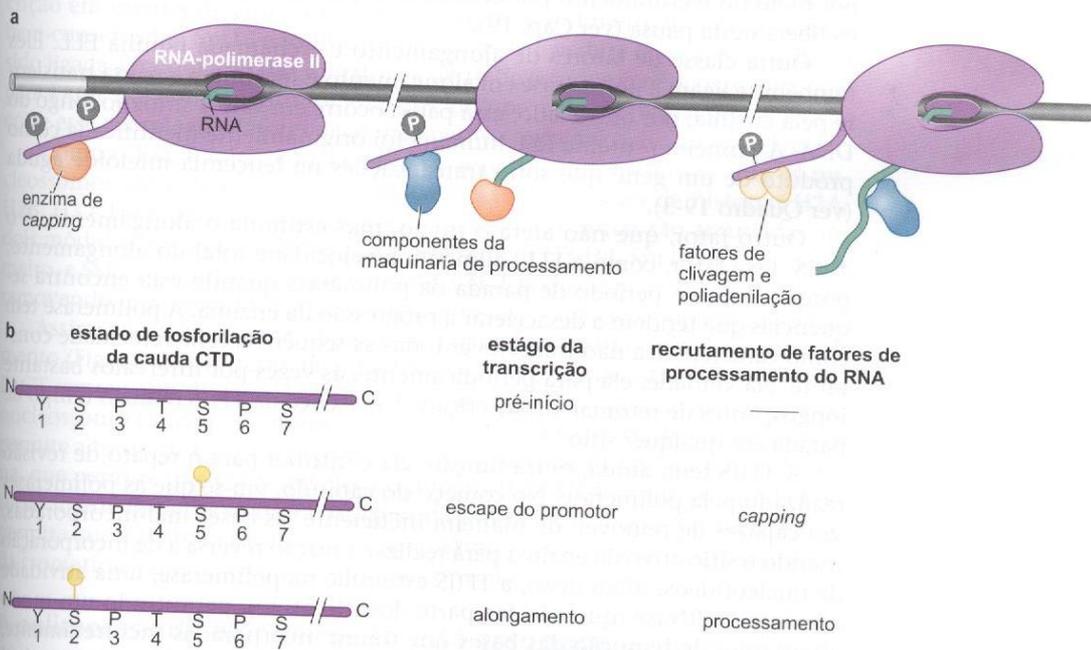


FIGURA 13-21 As enzimas de processamento do RNA são recrutadas pela cauda CTD da polimerase. (a) Vários fatores envolvidos no processamento do RNA são recrutados pela cauda CTD da polimerase. Diferentes fatores são recrutados, de acordo com o estado de fosforilação da cauda. Então, essas enzimas são transferidas para o RNA de acordo com a necessidade (ver próxima seção do texto). (b) A parte inferior da figura ilustra uma representação esquemática da cauda, mostrando uma cópia da sequência repetida do heptapeptídeo. As posições dos resíduos de serina que serão fosforilados estão indicadas nas linhas 2 e 3. A fosforilação da serina na posição 5 é vista após o escape do promotor e está associada ao recrutamento de fatores de *capping* (ou capeamento), enquanto a fosforilação da serina na posição 2 é vista durante o alongamento e está associada ao recrutamento de fatores de processamento. Os recrutamentos de fatores envolvidos no alongamento da transcrição e no processamento do RNA sobrepõem-se. Assim, o fator de alongamento hSPT5 é recrutado para a cauda fosforilada em Ser-5.

Acredita-se que várias proteínas estimulem o alongamento pela Pol II. Uma delas, a P-TEFb quinase, é recrutada à polimerase por ativadores transcricionais. Após ligar-se a Pol II, essa proteína fosforila o resíduo de serina na posição 2 das repetições CTD. Esse evento de fosforilação correlaciona-se com o alongamento (Fig. 13-21). Além disso, a P-TEFb fosforila e, assim, causa a ativação de outra proteína, chamada SPT5, a qual atua como fator de alongamento. Por fim, TAT-SF1, mais um fator de alongamento, é recrutado por P-TEFb. Portanto, P-TEFb estimula o alongamento de três modos diferentes.

SPT5 pode ser comparada ao fator de alongamento bacteriano NusG encontrado anteriormente. De fato, esse é o único fator de transcrição universalmente conservado nos três reinos da vida – desde as bactérias, passando por *Archaea*, até os eucariotos. Os fatores NusG/SPT5 ligam-se a suas respectivas RNA-polimerases na ponta do grampo, sobrepondo-se à região contactada pela região 4 de σ (em bactérias) e TFIIB (em eucariotos). Essa sobreposição – e, presumivelmente, mutuamente exclusiva – levanta a interessante possibilidade de que o deslocamento de fatores de início pode ser parte da função desses reguladores do alongamento. Isso também sugere que a regulação da taxa de alongamento é um mecanismo antigo de regulação da expressão gênica. Como será discutido no Capítulo 19, há alguns promotores em eucariotos superiores em que o complexo de pré-início é efetivamente recrutado, mas a polimerase permanece pausada logo após o início da transcrição. Esses promotores parecem estar associados a genes prontos para serem expressos rapidamente ou de maneira altamente coordenada, e sua expressão é regulada por meio do recrutamento por ativadores específicos da quinase P-TEFb que os libera desta pausa (ver Cap. 19).

Outra classe de fatores de alongamento é a chamada família ELL. Eles também se ligam à polimerase em alongamento e suprimem a pausa transitente pela enzima; por outro lado, essa pausa ocorre em vários sítios ao longo do DNA. A primeira proteína ELL humana foi originalmente identificada como produto de um gene que sofre translocações na leucemia mieloide aguda (ver Quadro 19-3).

Outro fator, que não afeta o início, mas estimula o alongamento, é o TFIIS. Esse fator, como a ELL, aumenta a velocidade total do alongamento, porque limita o período de parada da polimerase quando esta encontra sequências que tendem a desacelerar a progressão da enzima. A polimerase tem como característica não transcrever todas as sequências em velocidade constante. Na verdade, ela para periodicamente, às vezes por intervalos bastante longos, antes de retomar a transcrição. A presença da TFIIS reduz o tempo de parada em qualquer sítio.

A TFIIS tem, ainda, outra função: ela contribui para o reparo de revisão realizado pela polimerase. No começo do capítulo, viu-se que as polimerases são capazes de remover, de maneira ineficiente, as bases mal-incorporadas, usando o sítio ativo da enzima para realizar a reação reversa à de incorporação de nucleotídeos. Além disso, a TFIIS estimula, na polimerase, uma atividade inerente de RNase (que não faz parte do sítio ativo), permitindo um modo alternativo de remoção das bases que foram incorporadas incorretamente, pela degradação local e limitada do RNA. Essa característica é comparável à edição hidrolítica estimulada pelos fatores Gre, descrita para as bactérias. A Figura 13-22 mostra como TFIIS e GreB, embora estruturalmente não relacionados (e não relacionados também em sequência), ainda assim interagem com as polimerases de leveduras e bactérias, respectivamente, de maneiras equivalentes, para estimular as mesmas reações.

A RNA-polimerase em alongamento deve lidar com histonas em seu caminho

Assim como o início da transcrição, o alongamento também acontece na presença de histonas, porque o molde de DNA está incorporado em nucleossomos. Como a RNA-polimerase transcreve através dessas potenciais barreiras?

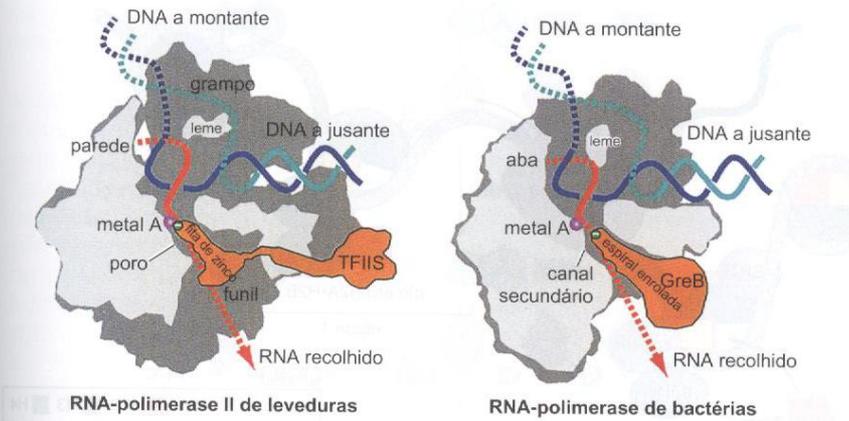


FIGURA 13-22 TFIS e GreB atuam de maneiras análogas. Visões em corte das principais características dos complexos da RNA-polimerase II estacionada e TFIS (à esquerda) e da RNA-polimerase bacteriana e GreB (à direita). TFIS (cor de laranja) é inserido no centro da RNA-polimerase II, e GreB (cor de laranja) é inserido no canal da RNA-polimerase bacteriana. Em ambos os casos, o íon catalítico primário de magnésio é designado como metal A (cor-de-rosa), e as posições dos dois resíduos ácidos conservados estão indicadas (círculos verdes). Assim, vê-se que, embora as duas proteínas sejam muito diferentes, elas atuam essencialmente da mesma maneira. (Setas pontilhadas) Localizações propostas para os RNAs recolhidos (ver também Fig. 13-11). (Reproduzida, com permissão, de Conaway R.C. et al. 2003. *Cell* 114: 272-274, Fig. 1. © Elsevier.)

Experimentos *in vitro* comparando a transcrição em DNA nu e em DNA incorporado na cromatina revelaram que a cromatina bloqueia a transcrição de maneira considerável. Esse cenário experimental forneceu o ensaio para a identificação de fatores que facilitam a transcrição na presença de cromatina. Dessa maneira, um fator chamado **FACT** (do inglês, *facilitates chromatin transcription* [facilita a transcrição de cromatina]) foi identificado em extratos de células humanas. Como seu nome sugere, esse fator torna muito mais eficiente a transcrição em moldes de cromatina. FACT é um heterodímero de duas proteínas bem-conservadas, Spt16 e SSRP1. A homóloga de levedura da primeira já havia sido ligada à modulação da cromatina a partir de estudos genéticos, e um papel para FACT no alongamento foi estabelecido por meio de interações genéticas entre esse complexo e fatores de alongamento conhecidos, incluindo TFIS.

Como o FACT funciona? Lembre-se, a partir do Capítulo 8, que os nucleossomos são octâmeros, constituídos pelas subunidades de histonas H2A, H2B, H3 e H4 e DNA (ver Cap. 8, Fig. 8-20). Essas histonas são arranjadas em dois módulos: os dímeros H2A·H2B e o tetrâmero H3·H4. Spt16 liga-se ao primeiro, e SSRP1, ao último. Notavelmente, FACT pode desmanchar as histonas, removendo um dímero H2A·H2B, e remontá-las, restabelecendo esse dímero.

Assim, montou-se uma imagem de como FACT atua durante o alongamento (Fig. 13-23). À frente de uma RNA-polimerase que está transcrevendo, FACT remove um dímero H2A·H2B. Isso permite que a polimerase passe esse nucleossomo (*in vitro*, demonstrou-se que a remoção de H2A·H2B do molde permite a transcrição). FACT também possui atividade de chaperona de histona, que permite que ela restabeleça o dímero H2A·H2B ao hexâmero de histonas imediatamente após a passagem da polimerase. Dessa maneira, FACT permite que a polimerase alongue e, ao mesmo tempo, mantém a integridade da cromatina a qual a enzima está transcrevendo.

A polimerase de alongamento está associada a um novo conjunto de fatores proteicos necessários para vários tipos de processamento de RNA

Após a sua transcrição, o RNA eucariótico precisa ser processado de várias maneiras, antes de ser exportado do núcleo para onde possa ser traduzido. Os eventos de processamento incluem: a adição do *cap* na extremidade 5' do RNA, o processamento propriamente dito (*splicing* ou retirada de íntrons) e a poliadenilação da extremidade 3' do RNA. Desses eventos, o mais complexo é o *splicing* – processo pelo qual os íntrons não codificadores são removidos do RNA para produzir mRNA maduro. Os mecanismos e a regulação desse e de outros processos, como a edição do RNA, são o tema do Capítulo 14. A seguir, consideraremos os outros dois processos: *capping* (ou capeamento) e a poliadenilação do transcrito.

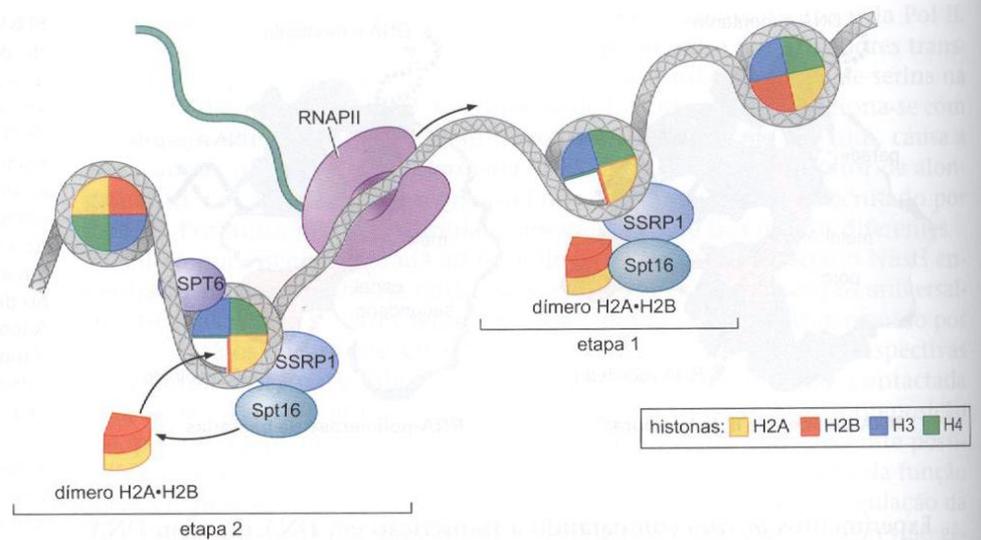


FIGURA 13-23 Modelo para o alongamento através dos nucleossomos auxiliado por FACT. Como descrito no texto, FACT, mostrado como um heterodímero de Spt16 e SSRP1, consegue desmanchar os nucleossomos à frente da RNA-polimerase em transcrição (etapa 1) e restabelecê-los atrás (etapa 2). Especificamente, ele remove o dímero H2A-H2B. SPT6 liga-se à histona H3 e acredita-se que auxilie no restabelecimento do nucleossomo. (Adaptada, com permissão, de Reinberg D. e Sims R. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**: 23297-23301, Fig. 2b. © American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

Curiosamente, há uma sobreposição entre as proteínas envolvidas no alongamento e as necessárias ao processamento do RNA. Em um caso, por exemplo, um fator de alongamento mencionado anteriormente (SPT5) também ajuda a recrutar a enzima de *capping* 5' para a cauda CTD da polimerase (fosforilada na serina da posição 5) (Fig. 13-21b). O hSPT5 estimula a atividade da enzima de *capping* 5'. Em outro caso, o fator de alongamento TAT-SF1 recruta componentes da maquinaria de processamento para a polimerase que apresenta a Ser-2 fosforilada (Fig. 13-21b). Portanto, o alongamento, o término da transcrição e o processamento do RNA estão interligados – provavelmente para assegurar uma coordenação adequada desses processos.

O primeiro evento do processamento do RNA é a **adição do cap** (*capping* ou capeamento). Isso exige a colocação de uma base guanina modificada à extremidade 5' do RNA. Especificamente, ela é uma guanina metilada, e é ligada ao transcrito de RNA em uma ligação incomum 5'-5' que envolve três fosfatos (essa estrutura é mostrada na última etapa da parte inferior da Fig. 13-24).

O *cap* de 5' é formado em três etapas enzimáticas, como detalhado na Figura 13-24 e descrito em detalhes na legenda. Na primeira etapa, um grupo fosfato é removido da extremidade 5' do transcrito de RNA. Então, na segunda etapa, o grupo GMP é adicionado. Na etapa final, esse nucleotídeo é modificado pela adição de um grupo metila. O RNA recebe o *cap* assim que emerge do canal de saída de RNA da polimerase. Isso ocorre logo que o ciclo de transcrição tenha progredido até a transição entre as fases de início e alongamento. Após a adição do *cap*, a desfosforilação da Ser-5 nas repetições da cauda causa a dissociação da maquinaria de adição do *cap*, e a fosforilação subsequente (desta vez, na Ser-2 nas repetições da cauda) determina o recrutamento da maquinaria necessária para o processamento do RNA (Cap. 14) (ver Fig. 13-21b).

O evento final do processamento do RNA, a **poliadenilação** da extremidade 3' do mRNA, está intimamente relacionado ao término da transcrição (Fig. 13-25). Assim como na adição do *cap* e na remoção dos íntrons, a cauda CTD da polimerase está envolvida no recrutamento das enzimas necessárias para a poliadenilação (Fig. 13-21). Quando a polimerase chega ao fim de um

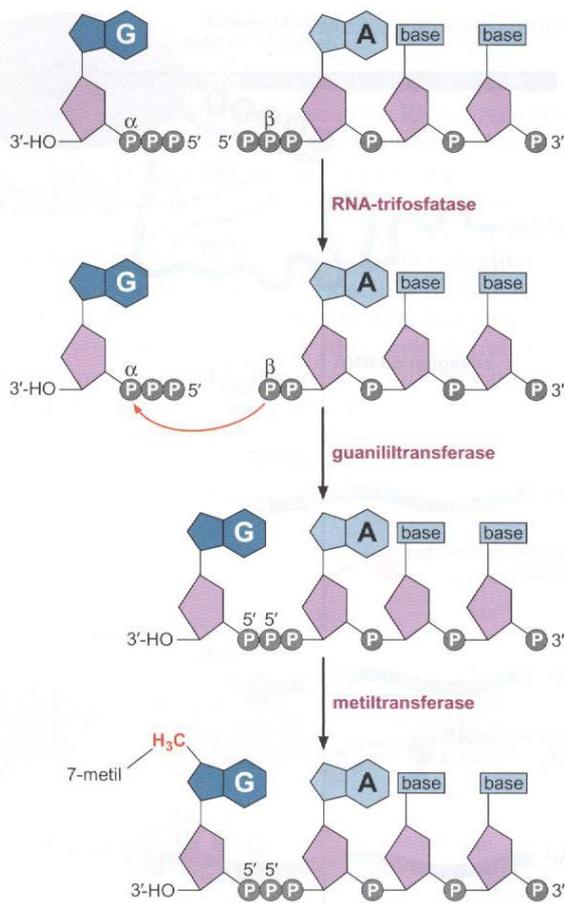


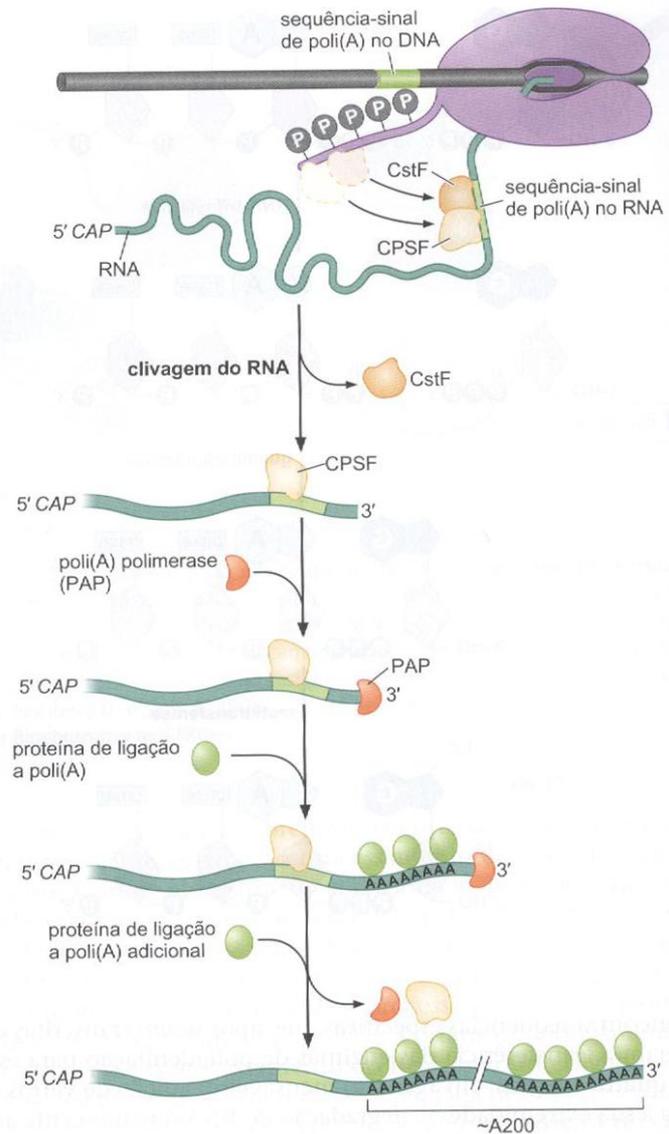
FIGURA 13-24 Estrutura e formação do cap 5' do RNA. Na primeira etapa, o fosfato γ na extremidade 5' do RNA é removido por uma enzima chamada RNA-trifosfatase (o nucleotídeo inicial de um transcrito inicialmente retém seus fosfatos α , β e γ). Na próxima etapa, a enzima guanililtransferase adiciona um grupo GMP ao fosfato β -terminal resultante. Esse é um processo de duas etapas: primeiro, um complexo enzima-GMP é gerado a partir de GTP com a liberação dos fosfatos β e γ e, então, o GMP da enzima é transferido para o fosfato β da extremidade 5' do RNA. Quando essa ligação é feita, a guanina e a purina recém-adicionadas à extremidade 5' original do mRNA são modificadas pela adição de grupos metil pela metiltransferase. A estrutura de cap 5' resultante recruta, subsequentemente, o ribossomo para o mRNA para o início da tradução (ver Cap. 15).

gene, ela encontra sequências específicas que, após serem transcritas em RNA, desencadeiam a transferência das enzimas de poliadenilação para esse RNA, levando a quatro eventos: clivagem do mensageiro; adição de vários resíduos de adenina à sua extremidade 3'; degradação do RNA remanescente associado à RNA-polimerase por uma ribonuclease 5'-3'; e, subsequentemente, término da transcrição. Essa série de eventos ocorre da maneira explicada a seguir.

Dois complexos proteicos são carregados pela CTD da polimerase quando ela se aproxima do fim de um gene: CPSF (do inglês, *cleavage and polyadenylation specificity factor* [fator de especificidade de clivagem e poliadenilação]) e CSTF (do inglês, *cleavage stimulation factor* [fator de estímulo da clivagem]). As sequências que quando transcritas em RNA desencadeiam a transferência dos fatores para o RNA são chamadas **sinais de poli(A)**, e sua operação é mostrada na Figura 13-25. Quando CPSF e CSTF estiverem ligadas ao RNA, outras proteínas também serão recrutadas, levando inicialmente à clivagem do RNA e, então, à sua poliadenilação.

A poliadenilação é mediada por uma enzima chamada poli(A) polimerase, que adiciona cerca de 200 adeninas à extremidade 3' do RNA produzida pela clivagem. Essa enzima utiliza o ATP como precursor e adiciona os nucleotídeos usando a mesma reação química que a RNA-polimerase. Mas ela faz isso sem um molde. Por isso, a longa cauda de As é encontrada no RNA, mas não no DNA. Ainda não está claro o que determina o comprimento da cauda de poli(A), mas este processo envolve outras proteínas que se ligam especificamente à sequência poli(A). O mRNA maduro é então exportado do núcleo, como será discutido no Cap. 14. É importante ressaltar que a longa cauda de As é exclusiva dos transcritos produzidos pela Pol II, uma caracte-

FIGURA 13-25 Poliadenilação e término. As várias etapas deste processo são descritas no texto.



rística que permite o isolamento experimental de mRNAs codificadores de proteínas por meio de cromatografia de afinidade.

Viu-se como o mRNA maduro é liberado da polimerase após a transcrição do gene. Mas o que termina a transcrição pela polimerase? Na verdade, a enzima não para imediatamente quando o RNA é clivado e poliadenilado. Em vez disso, ela continua a deslocar-se ao longo do molde, gerando uma segunda molécula de RNA. A polimerase pode continuar transcrevendo por vários milhares de nucleotídeos antes de terminar e dissociar-se do molde. Agora serão descritos modelos atuais para o término da transcrição.

O término da transcrição está ligado à destruição do RNA por uma RNase de alta processividade

A poliadenilação está ligada ao término, embora a maneira exata ainda não esteja determinada. Entretanto, foi identificada, recentemente, uma enzima que degrada o segundo RNA assim que ele emerge da polimerase, e essa enzi-

ma pode, por si, desencadear o término. Este é o chamado modelo de torpedo para o término (Fig. 13-26a).

A extremidade livre do segundo RNA não possui *cap* e, assim, pode ser distinguida dos transcritos genuínos. Esse novo RNA é reconhecido por uma RNase chamada Rat1 em leveduras (em seres humanos, Xrn2), a qual é carregada na extremidade da RNA-polimerase por outra proteína (Rtt103) que se liga à CTD da RNA-polimerase. A enzima Rat1 é bastante processiva e degrada rapidamente o RNA na direção 5'-3', até que alcance a polimerase que ainda está transcrevendo e da qual o RNA está sendo liberado. O término pode não necessitar de qualquer interação muito específica entre Rat1 e a polimerase, e deve, na verdade, ser desencadeado de maneira bastante similar à descrita anteriormente, na seção sobre o término Rho-dependente em bactérias – isto é, a RNase de alta processividade empurra a polimerase para a frente e/ou puxa o restante do transcrito de RNA nascente da enzima. Também é possível que, além de Rat1, outros fatores sejam necessários para desalojar a polimerase, uma vez que, *in vitro*, Rat1 não consegue, sozinha, realizar essa função, mesmo depois de ter degradado o transcrito.

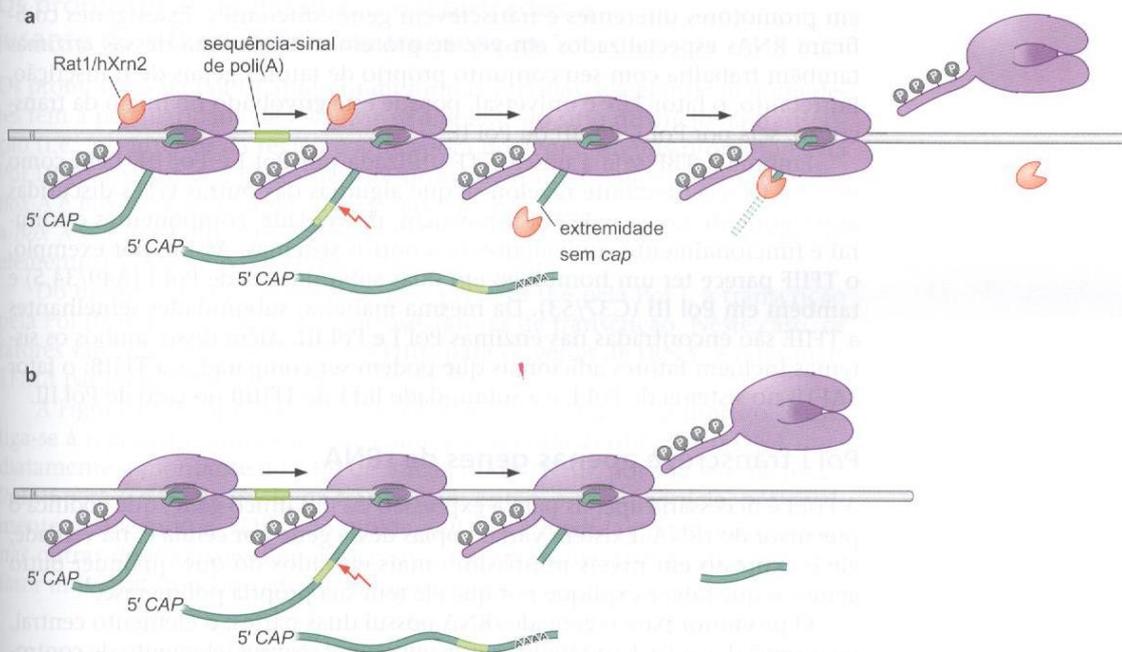


FIGURA 13-26 Modelos de término: torpedo e alostérico. Como descrito no texto, há dois modelos propostos para o término da transcrição pela RNA Pol II eucariótica após a transcrição de um gene. Na figura, o sítio de poli(A) está marcado pelo trecho em verde-claro do DNA e está localizado logo a jusante do gene. Ele também está em verde-claro no transcrito. (Linha verde pontilhada) Transcrito degradado. (a) No modelo de torpedo, o RNA transcrito a jusante do sítio de poli(A) é atacado por uma RNase 5'-3' (o torpedo), que é carregada neste transcrito pela própria polimerase. Quando a exonuclease alcança a polimerase, ela desencadeia sua dissociação do molde de DNA e o término da transcrição. (b) No modelo alostérico, a polimerase é altamente processiva no gene e, então, quando o sinal de poli(A) é ultrapassado, ela torna-se menos processiva. Essa alteração poderia ser devida a uma modificação ou uma alteração conformacional. Mesmo no modelo alostérico, o segundo RNA seria degradado pela RNase, mas esta não seria a causa do término. Neste caso, a degradação do RNA não está mostrada na figura para enfatizar os diferentes mecanismos de término nestes dois modelos. (Adaptada, com permissão, de Luo W. e Bentley D. 2004. *Cell* **119**: 911-914, Fig. 1. © Elsevier.)

Embora o modelo de torpedo para o término seja atualmente o mais provável, há uma alternativa chamada modelo alostérico (Fig. 13-26b). De acordo com esse modelo, o término depende de uma alteração conformacional na polimerase em alongamento que reduz a processividade da enzima, levando, em seguida, ao término espontâneo. Essa alteração conformacional estaria ligada à poliadenilação e poderia, por exemplo, ser desencadeada pela transferência das enzimas de processamento da extremidade 3' da cauda CTD da polimerase para o RNA ou pela ligação subsequente à cauda CTD de outros fatores que induzem uma alteração conformacional.

TRANSCRIÇÃO PELAS RNA-POLIMERASES I E III

As RNA Pol I e Pol III reconhecem promotores distintos, mas ainda requerem TBP

Já foi mencionado que, além da Pol II, os eucariotos possuem duas outras polimerases – a Pol I e a Pol III. Essas enzimas são relacionadas à Pol II e possuem várias subunidades em comum (Tab. 13-2), mas iniciam a transcrição em promotores diferentes e transcrevem genes diferentes. Esses genes codificam RNAs especializados em vez de proteínas. Cada uma dessas enzimas também trabalha com seu conjunto próprio de fatores gerais de transcrição. Entretanto, o fator TBP é universal, porque está envolvido no início da transcrição, seja por Pol I, Pol III ou Pol II.

Embora a TBP seja a única GTF utilizada por Pol I e Pol III, bem como por Pol II, recentemente revelou-se que algumas das outras GTFs discutidas anteriormente no caso de Pol II possuem, na verdade, componentes estrutural e funcionalmente equivalentes nos outros sistemas. Assim, por exemplo, o TFIIF parece ter um homólogo em duas subunidades de Pol I (A49/34.5) e também em Pol III (C37/53). Da mesma maneira, subunidades semelhantes a TFIIE são encontradas nas enzimas Pol I e Pol III. Além disso, ambos os sistemas incluem fatores adicionais que podem ser comparados a TFIIB: o fator TAF1B no sistema de Pol I, e a subunidade Brf1 de TFIIB no caso de Pol III.

Pol I transcreve apenas genes de rRNA

A Pol I é necessária apenas para a expressão de um único gene, que codifica o precursor do rRNA. Existem várias cópias desse gene por célula e, na verdade, ele é expresso em níveis muitíssimo mais elevados do que qualquer outro gene – o que talvez explique por que ele tem sua própria polimerase.

O promotor para o gene de rRNA possui duas partes: o elemento central, ou essencial, e o UCE (do inglês, *upstream control element* [elemento de controle a montante]), como ilustrado na Figura 13-27. A primeira parte está localizada próximo ao sítio de início da transcrição, e a outra, entre 100 e 150 pb

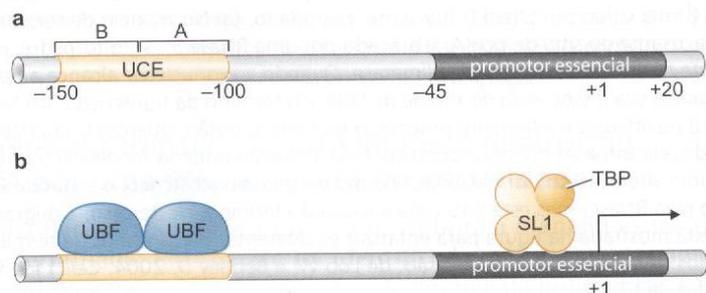


FIGURA 13-27 Região promotora de Pol I. (a) Estrutura do promotor de Pol I. (b) Fatores de transcrição de Pol I. O caso mostrado aqui aplica-se a seres humanos. O conjunto de proteínas envolvidas no auxílio à transcrição por Pol I em leveduras é um pouco diferente.