

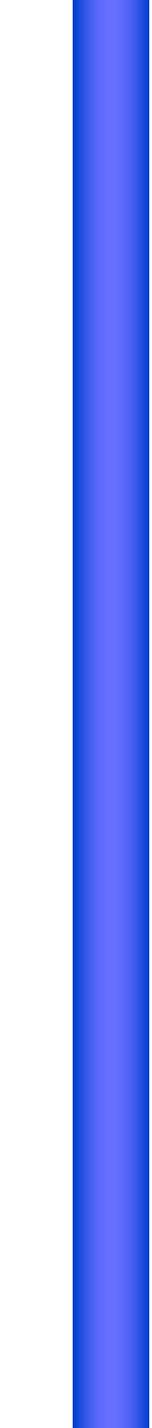


Universidade de São Paulo
Instituto de Química

QBQ0317 - 2020

Aula 10

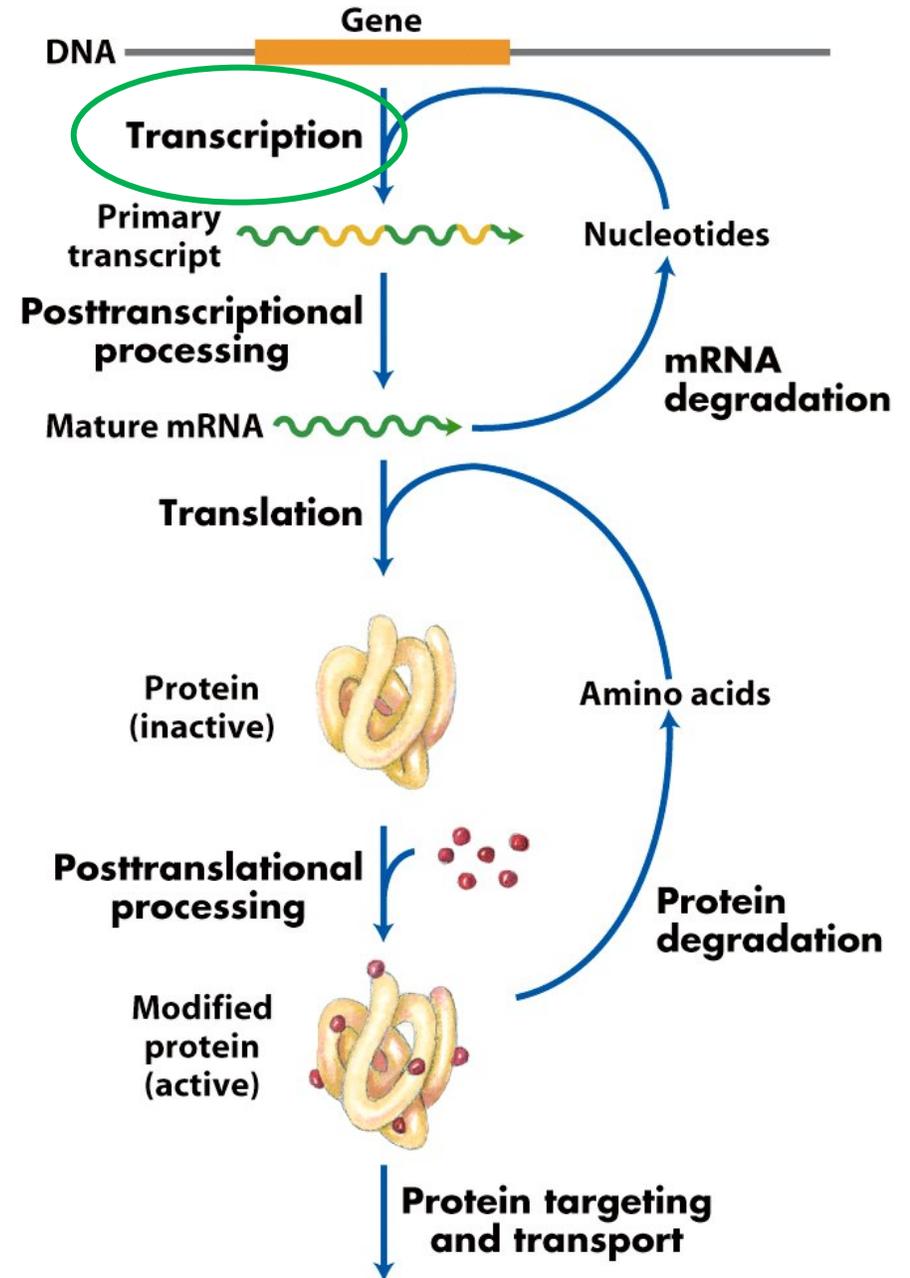
Transcrição em eucariotos



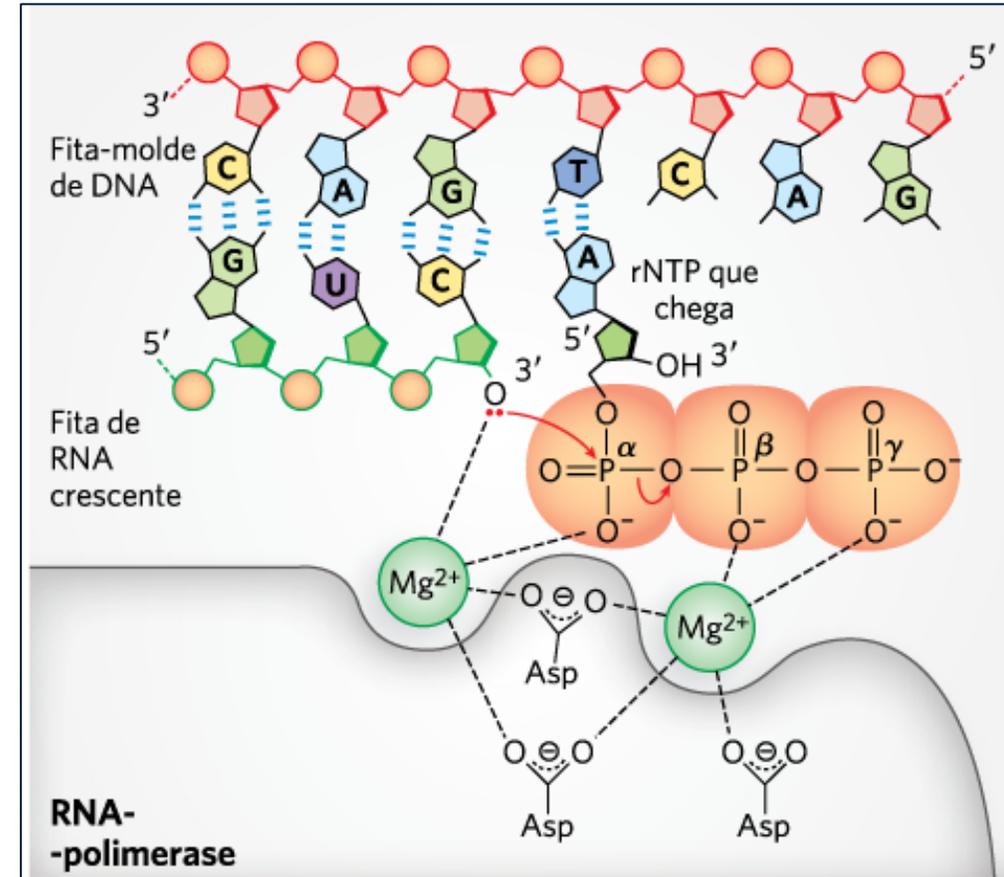
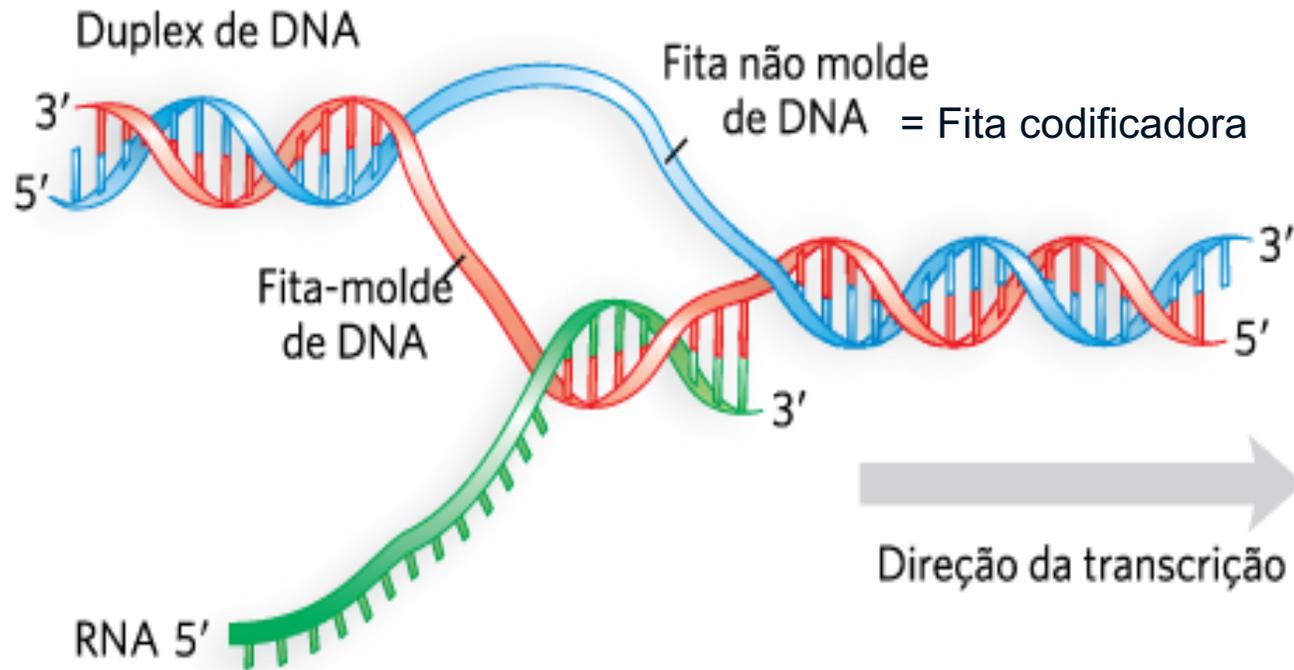
Como a informação é transferida do DNA para
constituir uma célula ou organismo?

Transcrição é essencial para o fluxo da informação gênica

É também um dos principais pontos de regulação da expressão, mas não o único.



Transcrição



A RNA polimerase adiciona nucleotídeos de 5' para 3' da fita de RNA

Eucariotos possuem várias RNA polimerases

- RNAP I (nucléolo) → rRNA
 - RNAP II (nucleoplasma) → hnRNA e snRNA
 - RNAP III (nucleoplasma) → rRNA, tRNA, snRNA

 - RNAP IV e V (específicas de plantas) → siRNA
 - RNAP mitochondrial
 - RNAP de cloroplastos
- hnRNA: RNA heterogêneo: mRNA antes do processamento e RNAs regulatórios
 - snRNA: envolvidos em *splicing* (próxima aula)
 - siRNA: small interfering RNA (regulatórios)

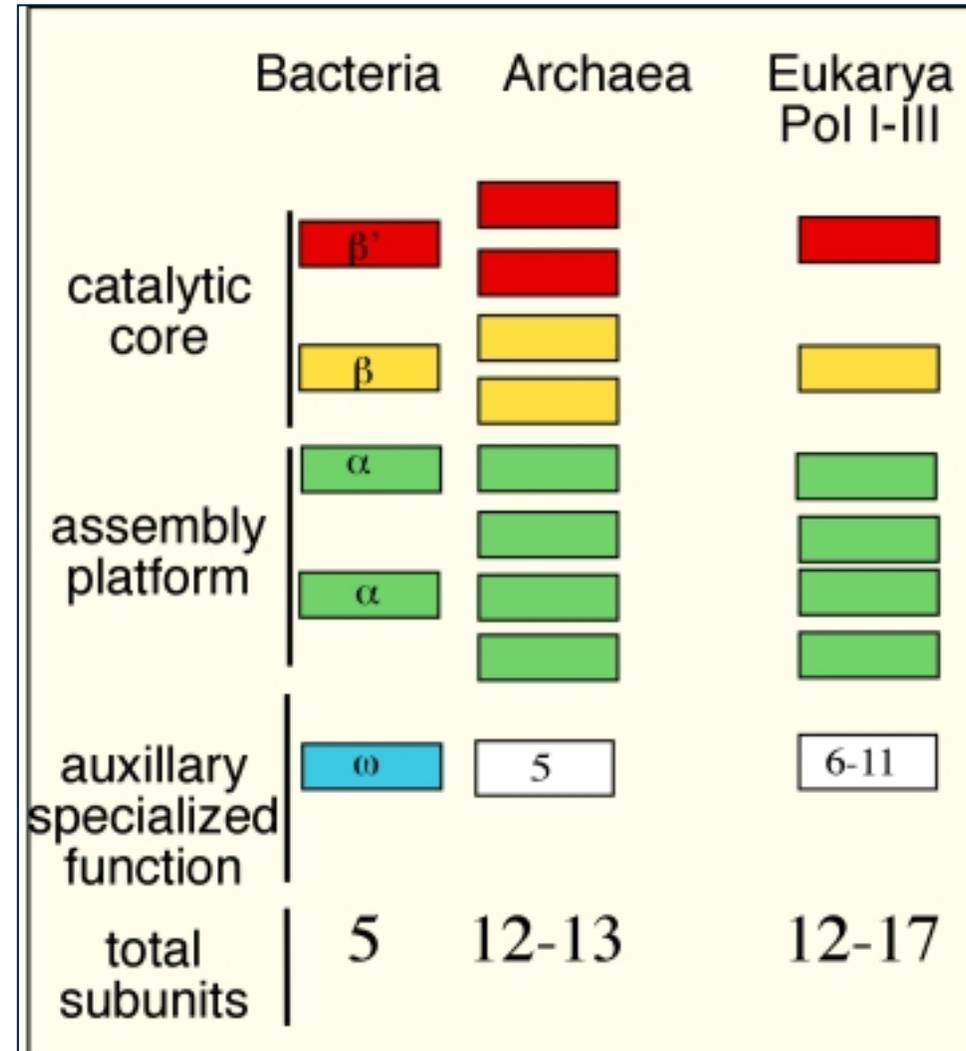
Eucariotos possuem várias RNA polimerases

Polimerase	Localização	Moléculas/célula	Produtos
RNAP I	Nucléolo	40.000	35-45S pré-rRNA (28S, 18S e 5S)
RNAP II	Nucleoplasma	40.000	hnRNA e snRNAs (U1, U2, U4, U5)
RNAP III	Nucleoplasma	20.000	5S rRNA tRNA, snRNA U6, 7S RNA, outros snRNAs
RNAPIV	Plantas (angiospermas)	–	–
RNAPV	Plantas (angiospermas)	–	–
RNAP de mitocôndria	Mitocôndria	–	RNAs Mitocondriais
RNAP Cloroplasto	Cloroplasto	–	RNAs do Cloroplasto

RNA polimerases são compostas de várias subunidades

Homologia entre as subunidades de bactérias, arqueias e eucariotos

Subunidades não se dissociam até o final da transcrição



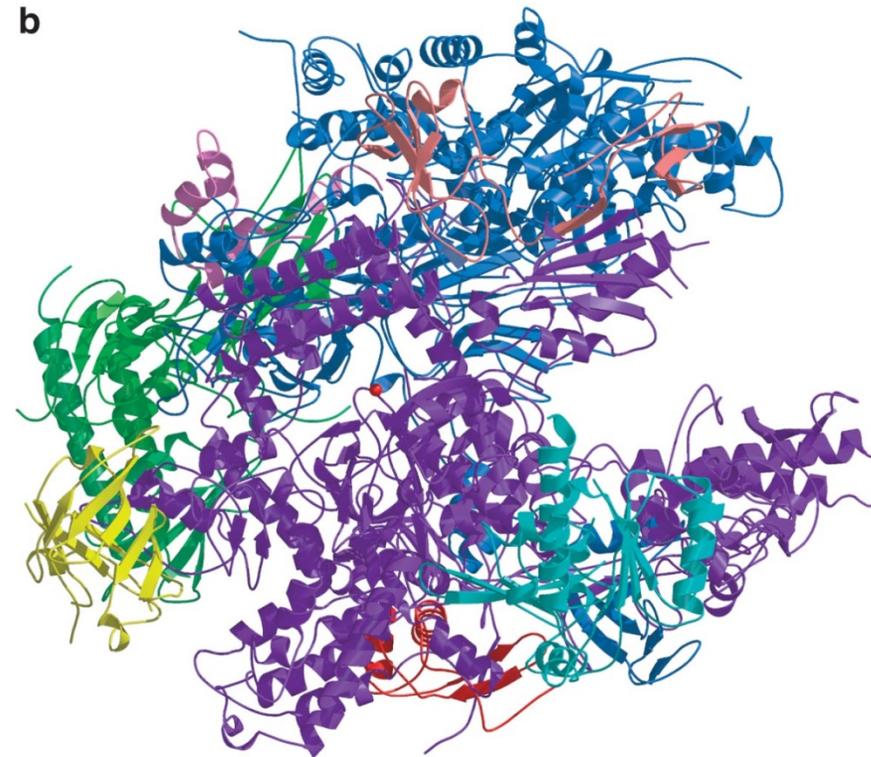
Nenhuma subunidade de arqueias e eucariotos é homóloga a fatores σ de bactéria

RNAPs têm arquiteturas similares



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

RNAP bacteriana



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

RNAPII eucariótica

Onde e como a transcrição é iniciada?

- Em eucariotos, o início da transcrição é um processo diferente e mais complexo que em bactérias

Três RNA polimerases nucleares em eucariotos

- RNA polimerase I (RNAPI)

- rRNA 5.8S, 18S e 28S
- nucléolo
- maioria da síntese (em abundância: ~70%)

- RNA polimerase II (RNAPII)

- hnRNA* (mRNA antes do processamento, miRNA e snRNA)
- nucleoplasma
- 2-5% do RNA, maior diversidade
- sensível a α -amanitina

* hnRNA = RNA heterogêneo

- RNA polimerase III (RNAPIII)

- 5S rRNA, tRNAs e outros
- nucleoplasma
- ~25% do RNA

Três RNA polimerases nucleares em eucariotos

- RNA polimerase I (RNAPI)
- rRNA 5.8S, 18S e 28S
- nucléolo
- maioria da síntese (em abundância: ~70%)
- RNA polimerase II (RNAPII)
- hnRNA* (mRNA antes do processamento, miRNA e snRNA)
- nucleoplasma
- 2-5% do RNA, maior diversidade
- sensível a α -amanitina
- RNA polimerase III (RNAPIII)
- 5S rRNA, tRNAs e outros
- nucleoplasma
- ~25% do RNA

* hnRNA = RNA heterogêneo

Início da transcrição em eucariotos

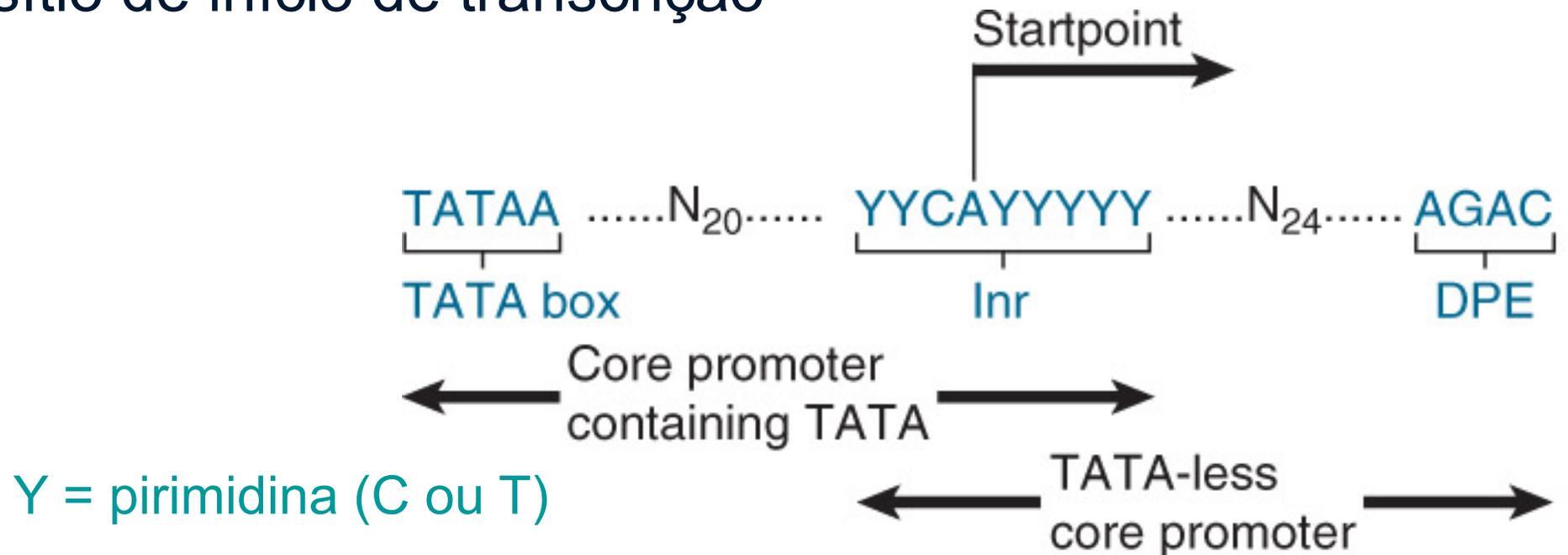
- RNA polimerases **não** têm afinidade pelo promotor
 - **sempre** necessitam de **fatores de transcrição**
- **Fatores de transcrição basal**
 - ligam-se em regiões próxima aos promotor
 - formam o complexo basal de transcrição
 - desligam-se da RNA pol após início
- **Fatores de transcrição específicos**
 - Reconhecem sequências regulatórias (enhancers, silenciadores, ativadores)
 - Podem ativar ou reprimir transcrição

Fatores de Transcrição Basal

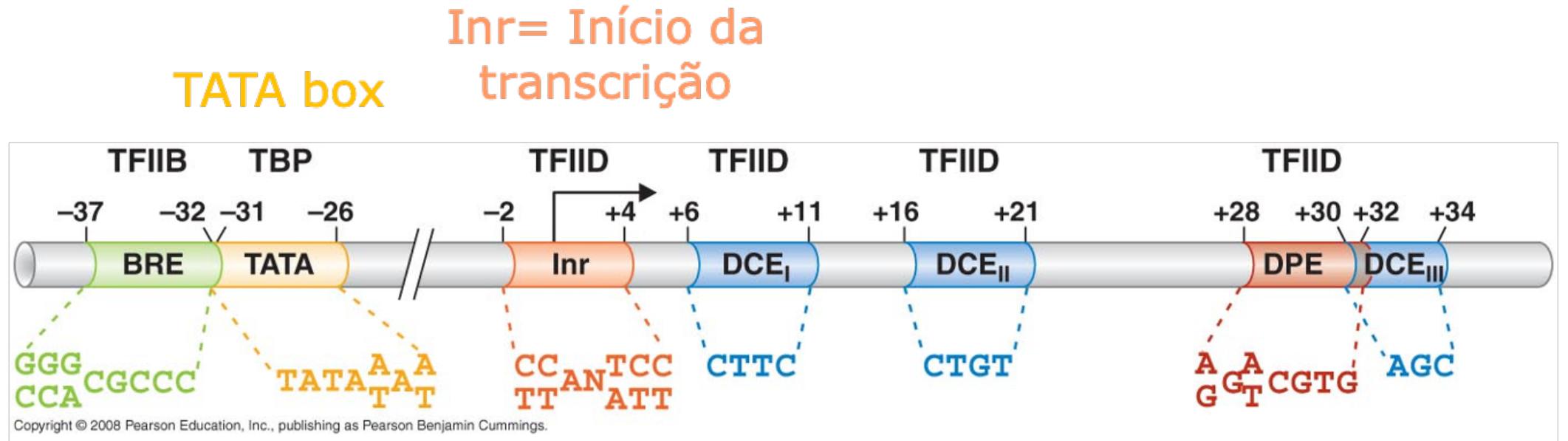
- proteínas que se **ligam ao DNA** em regiões próximas ao início de transcrição, formando o **complexo basal**
- permitem a ligação da RNA polimerase
- **não são requeridos após iniciação**
- diferentes para cada tipo de polimerase, pois reconhecem promotores de diferentes classes

RNA polimerase II (RNAPII)

- Transcreve a **maior variedade** de RNAs
- Requer fatores de transcrição basal (TF_{II})
- **Promotores mínimos**
 - TATA-box e/ou DPE (elemento downstream do promotor)
 - Inr = sítio de início de transcrição



Promotores de RNA polimerase II contêm diversos elementos



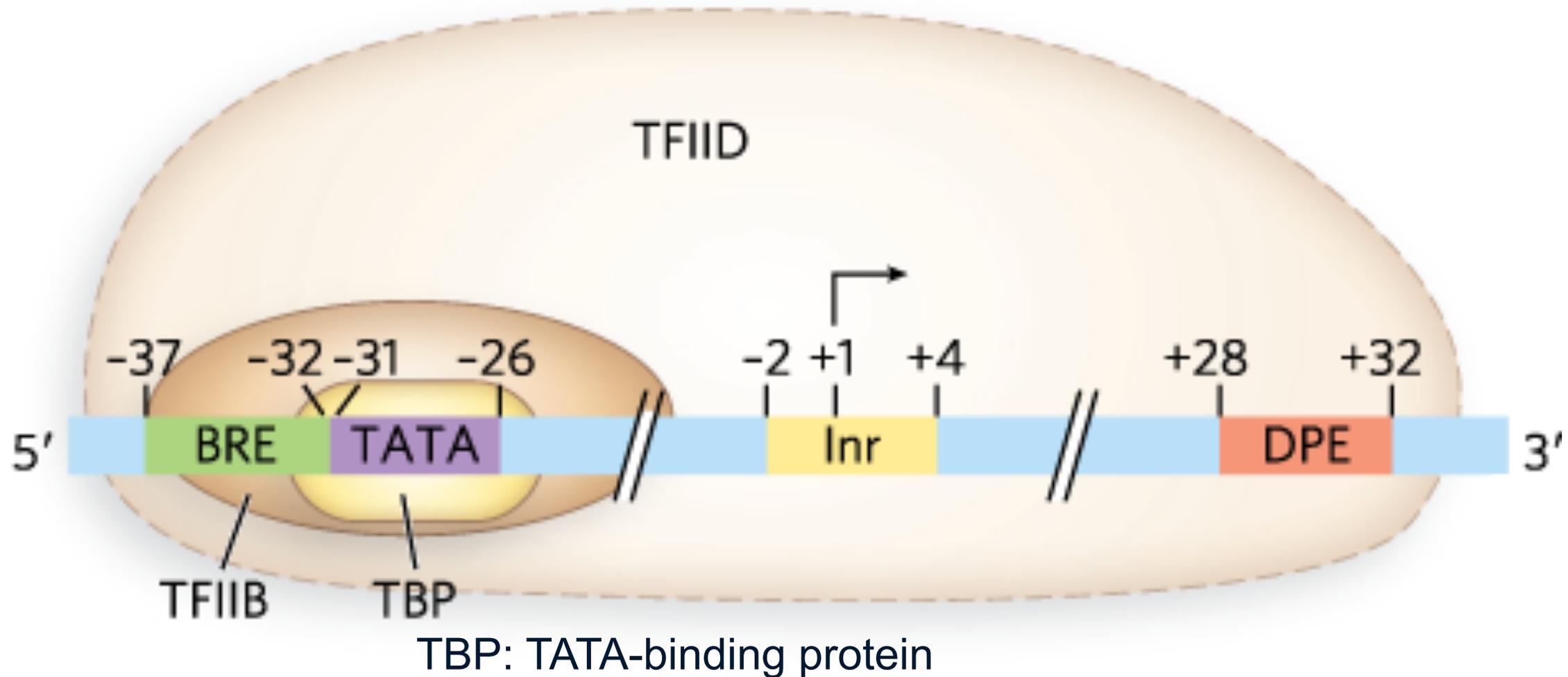
BRE= Elemento reconhecido
por TF_{II}B

DPE= Elemento downstream
do promotor

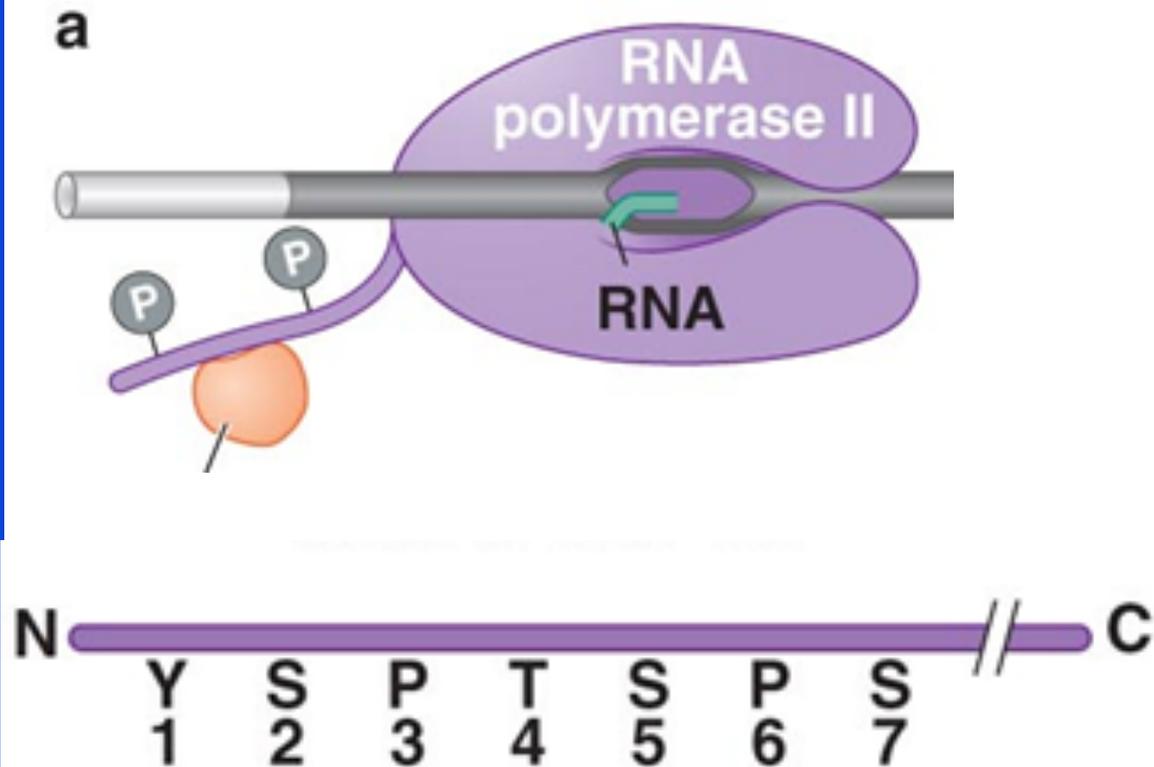
DCE= Elemento core downstream

Pequenas sequências consenso conservadas

Diferentes regiões do promotor da RNAPII ligam diferentes fatores de transcrição



CTD: sequências repetidas de 7aa na subunidade b da RNAPII



26 repetições em levedura, 50 em humanos

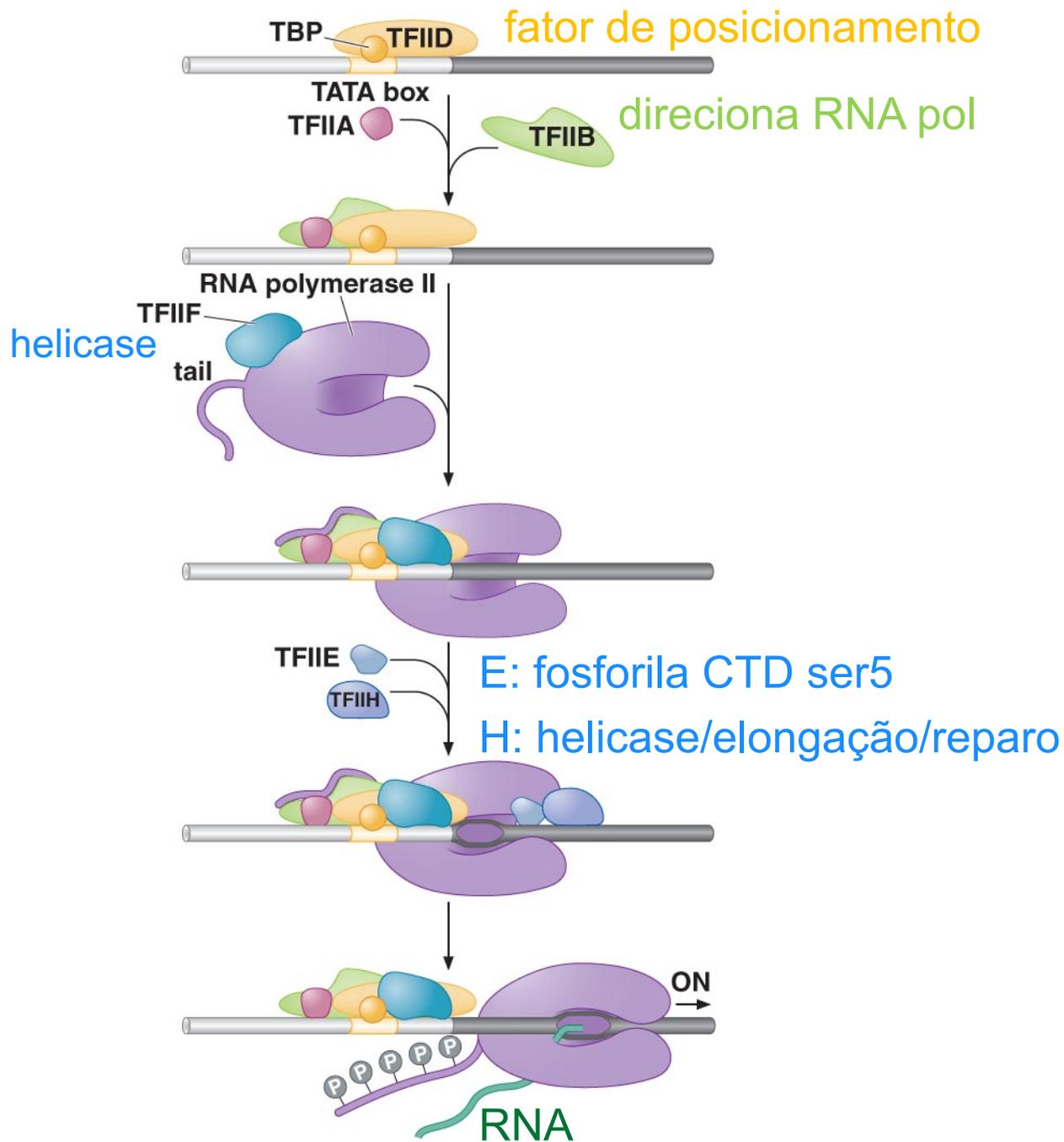
Ligação a diversos fatores de início, alongação e processamento de RNA

Sofre modificações, especialmente fosforilação em resíduos de serina e treonina

CTD = domínio carboxiterminal da subunidade catalítica da RNAPII

Início da transcrição pela RNAPII

- Sequência de eventos de ligação/desligamento de vários fatores de transcrição basal aos elementos do promotor
- Formação do Complexo de Transcrição Basal ou de Pré-Início (PIC)
- Ligação da RNA PII
- Fosforilação da cauda CTD da RNAP II
- Escape da RNAP II do promotor



Início da transcrição pela RNAPII

Formação do complexo basal (ou de pré-início)

Fosforilação (P) do domínio carboxiterminal (CTD) da RNAP

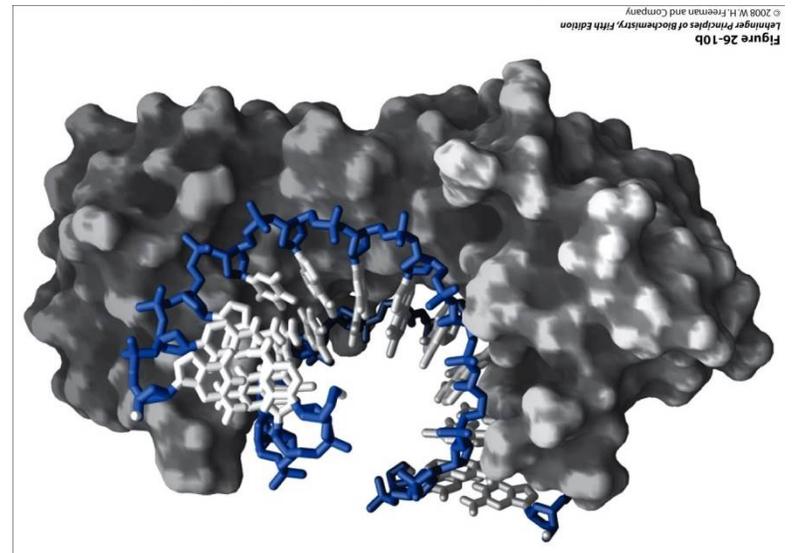
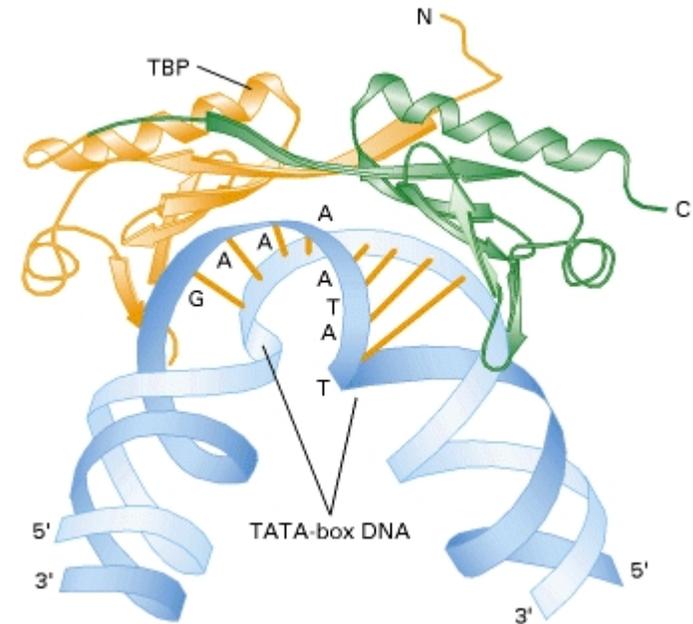
Escape do promotor e síntese do RNA

Proteínas do complexo de transcrição basal da RNAP II

Transcription protein	Number of subunits	Subunit(s) M_r	Function(s)
Initiation			
Pol II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	<ul style="list-style-type: none">• reconhecem outros elementos no promotor,• evitam ligações inespecíficas da RNAPII ao DNA• promovem interações entre si, com o DNA e com a RNAP II,• desnaturam o DNA no sítio de início da transcrição (helicase),• fosforilam o CTD da RNAP II (quinase),• liberam a RNAP II do promotor para a etapa de alongação
TFIIB	1	35,000	
TFIIE	2	34,000, 57,000	
TFIIF	2	30,000, 74,000	
TFIIH	12	35,000–89,000	
TFIID (TAFs + TBP)	13-14	800,000 (total)	

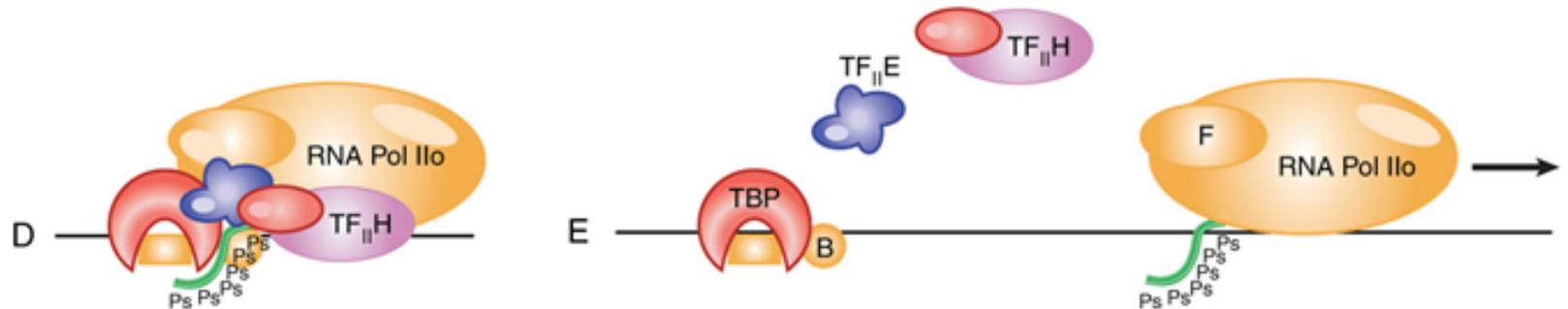
TBP (TATA-binding protein)

- Liga-se à fenda menor do DNA
- Induz curvatura de $\sim 80^\circ$
- Aproxima elementos do promotor
- Interage com outras proteínas do complexo basal



Escape do Promotor e Elongação

- TF_{II}H (parte do complexo basal)
 - Helicase
 - Quinase que **fosforila CTD** da RNAP II (ser5)
 - Liga-se também a enzimas de reparo de DNA



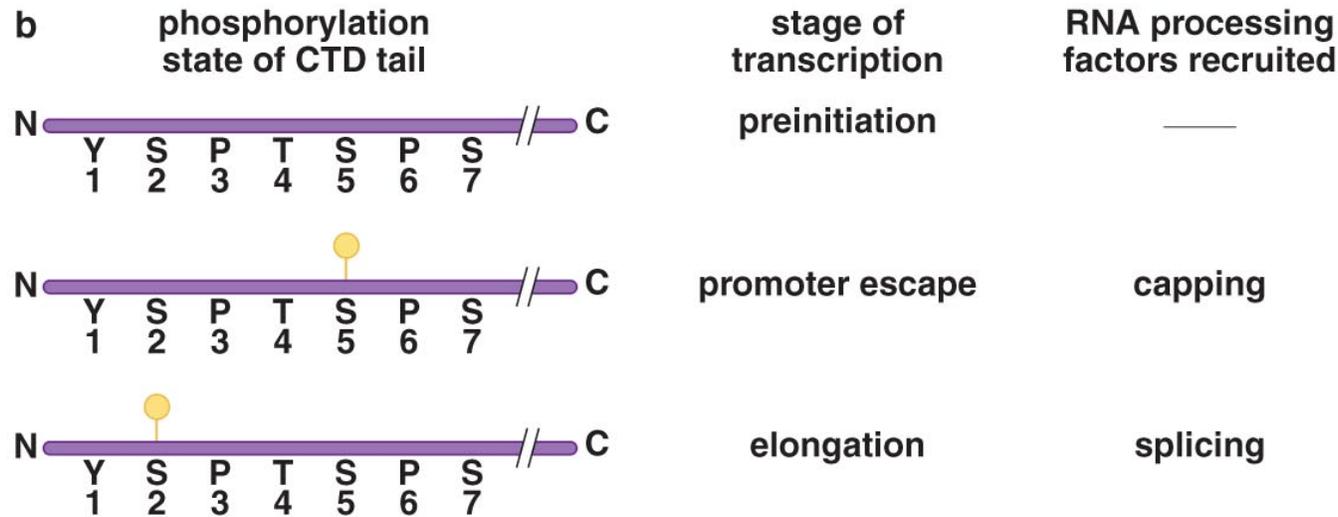
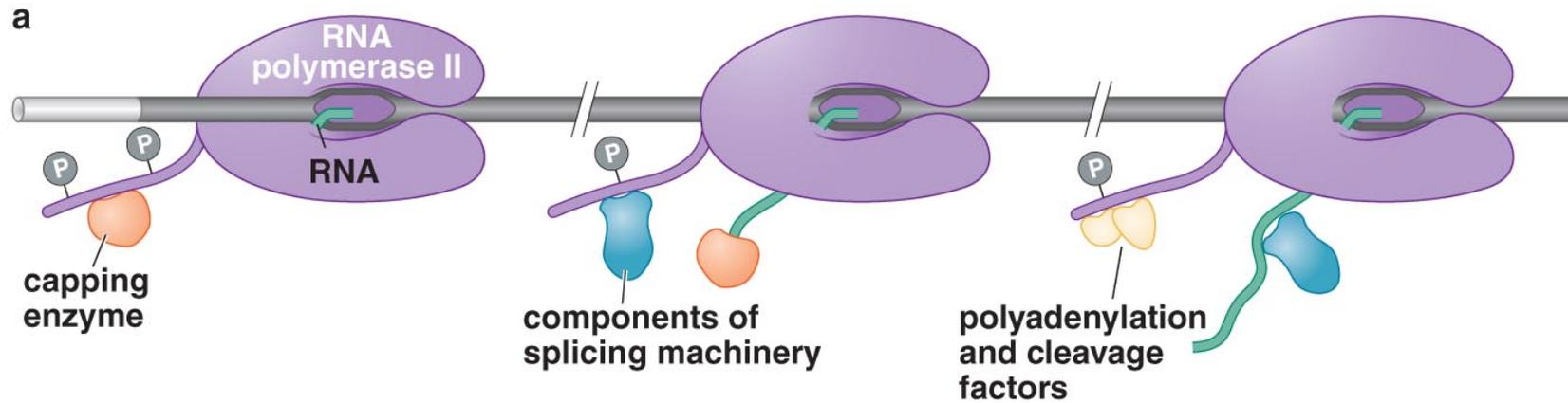
- Outros fatores
 - Quinases **alteram o estado de fosforilação** do CTD da RNAP II
 - RNAP II fosforilada engajada na elongação

Fosforilação do CTD da RNAPII

- Processo dinâmico
 - resíduos específicos fosforilados e desfosforilados durante alongação
 - ação de diferentes quinases e fosfatases
- Conecta outros processos à transcrição
 - remodelamento da cromatina
 - pausas na transcrição
 - processamento do RNA
 - terminação da transcrição



Estado de fosforilação de CTD coordena eventos da transcrição

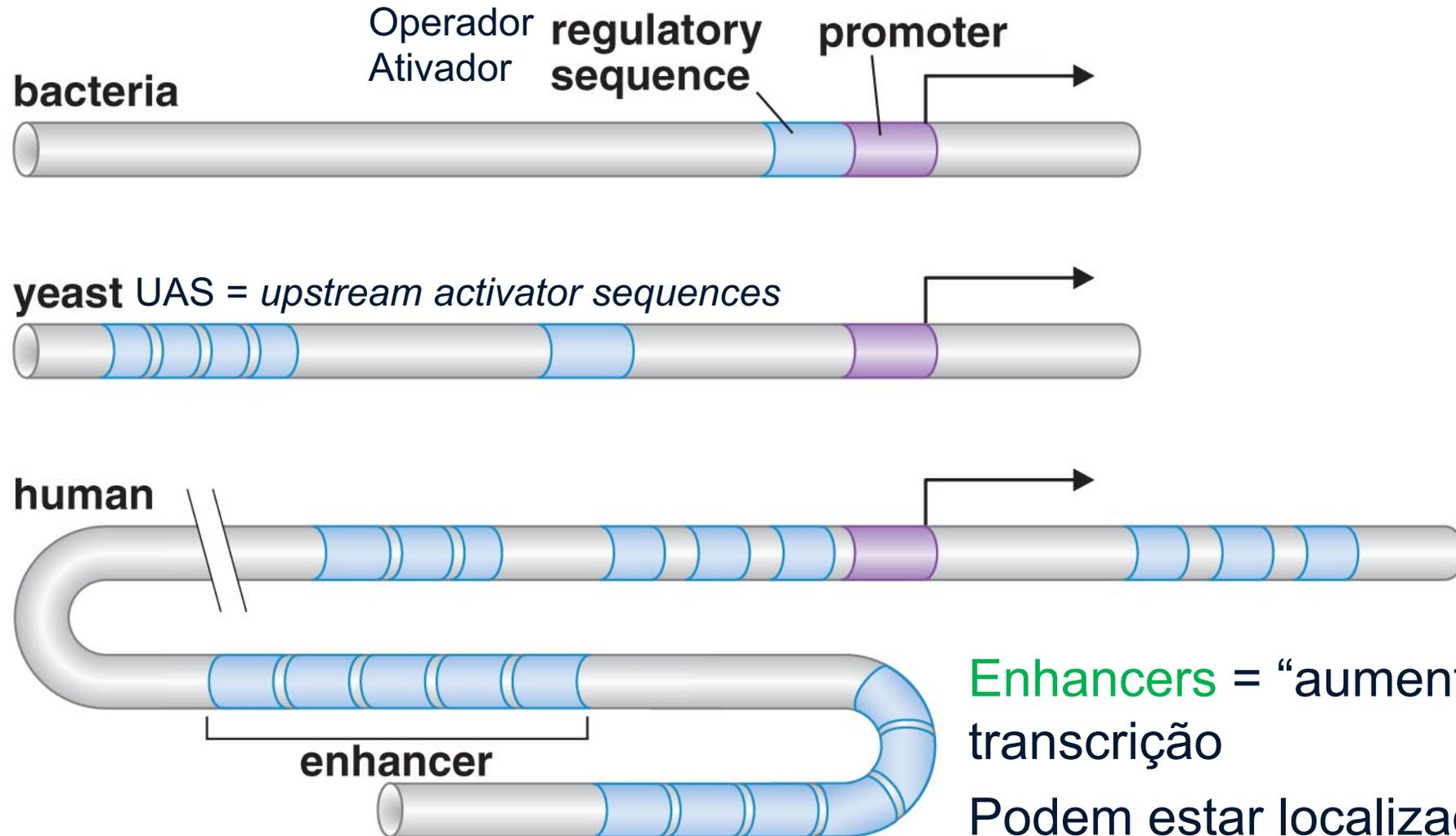


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

A transcrição em eucariotos depende obrigatoriamente de **FATORES DE ATIVAÇÃO**, além do complexo de transcrição basal

- Ligam-se a elementos regulatórios no DNA
- Promovem especificidade da transcrição
 - onde, quando, quanto e quais genes são expressos

Além do promotor, elementos regulatórios participam da regulação do início da transcrição



Enhancers = “aumentadores” da transcrição

Podem estar localizados milhares de bp distantes do promotor

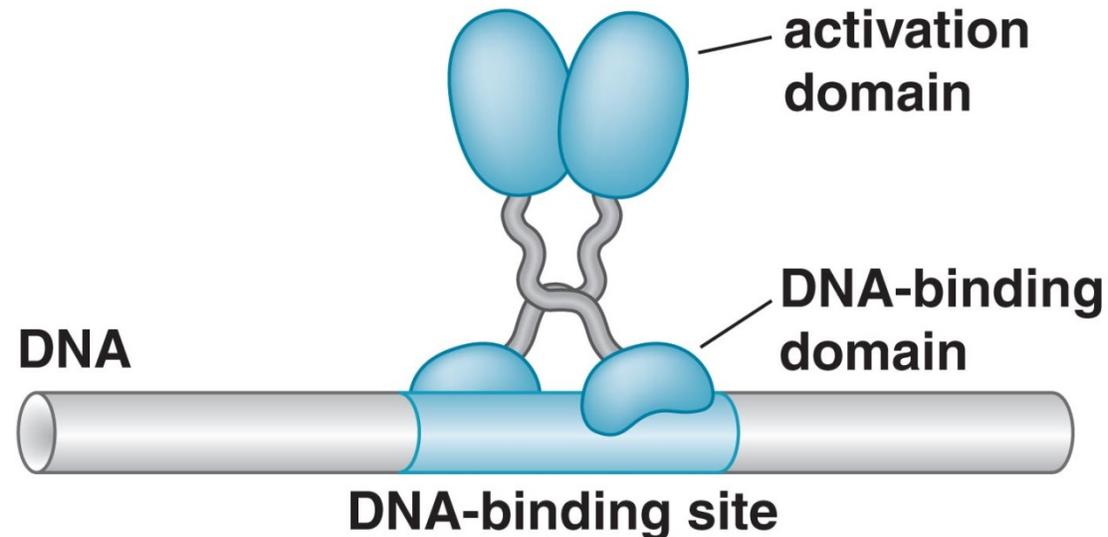
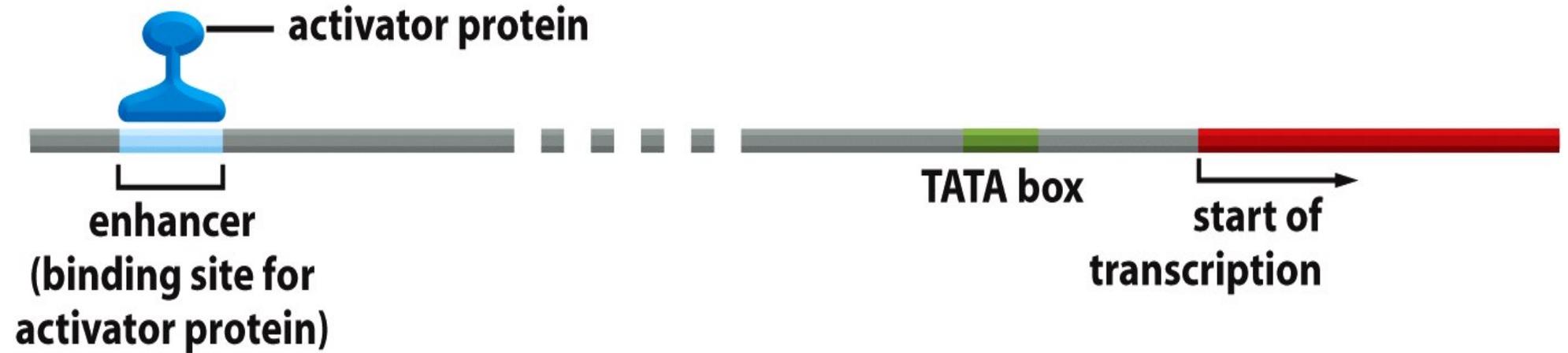
Promotores de RNAP II

- Região “core” (TATA box, Inr, DPE, outros)
- **Regiões ativadoras/ Enhancers**
 - ~100 bp *upstream* do início de transcrição ou muito mais longe
 - ligação de **ativadores de transcrição**
 - fatores que se ligam dão especificidade ao promotor
 - em qualquer orientação
- Silenciadores (silencers)
 - menos frequentes
 - ligação de proteínas repressoras

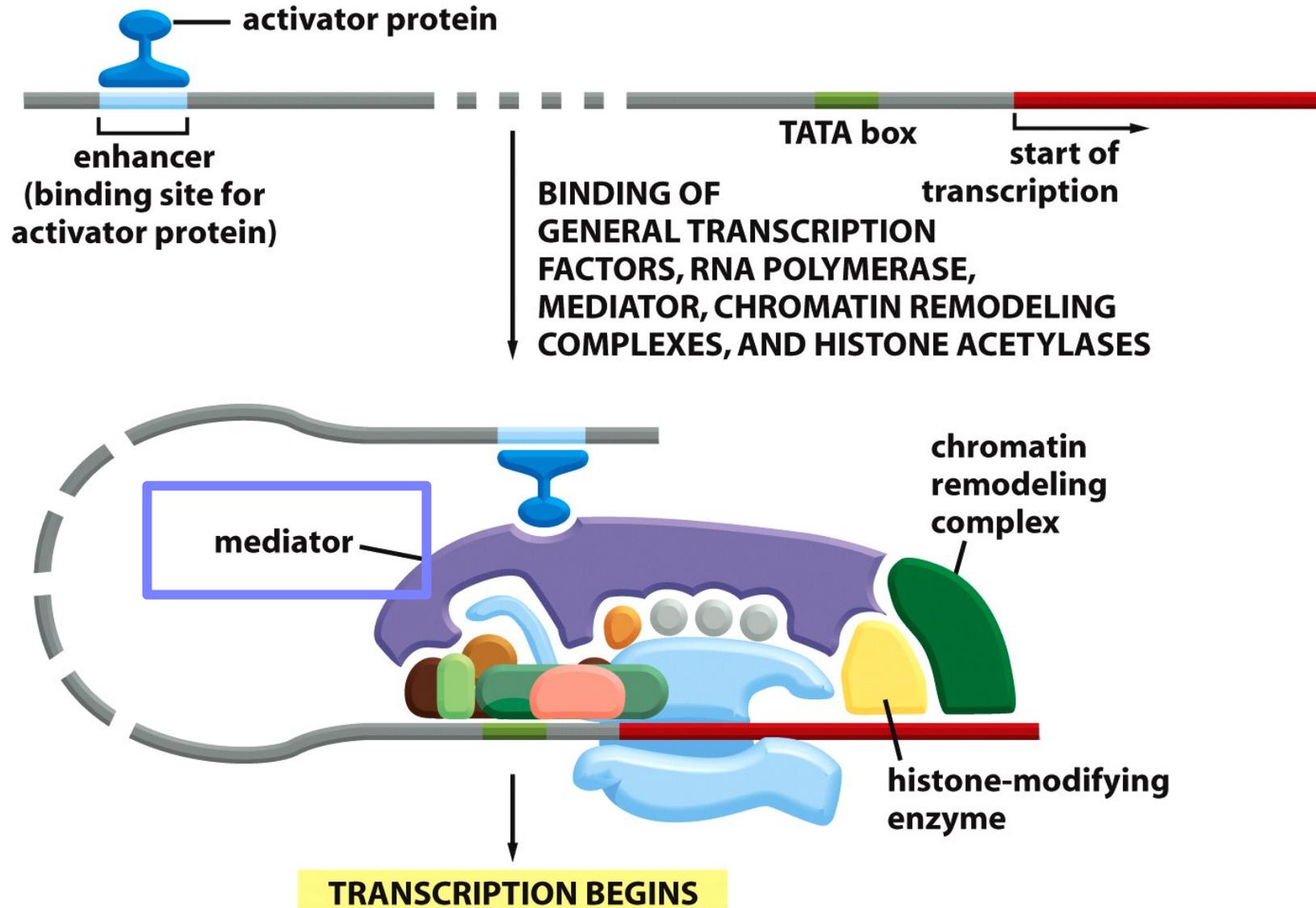
Ativadores de transcrição

- Proteínas que ligam DNA
 - nas sequências ativadoras ou enhancers
- **Transcrição só inicia quando estão presentes**
- Modulam frequência de início da transcrição
- Podem ligar moléculas sinalizadoras
- Podem sofrer modificações (ex: fosforilação)
- Estrutura modular: vários domínios

Se os enhancers estão longe do promotor, como eles ativam a transcrição?

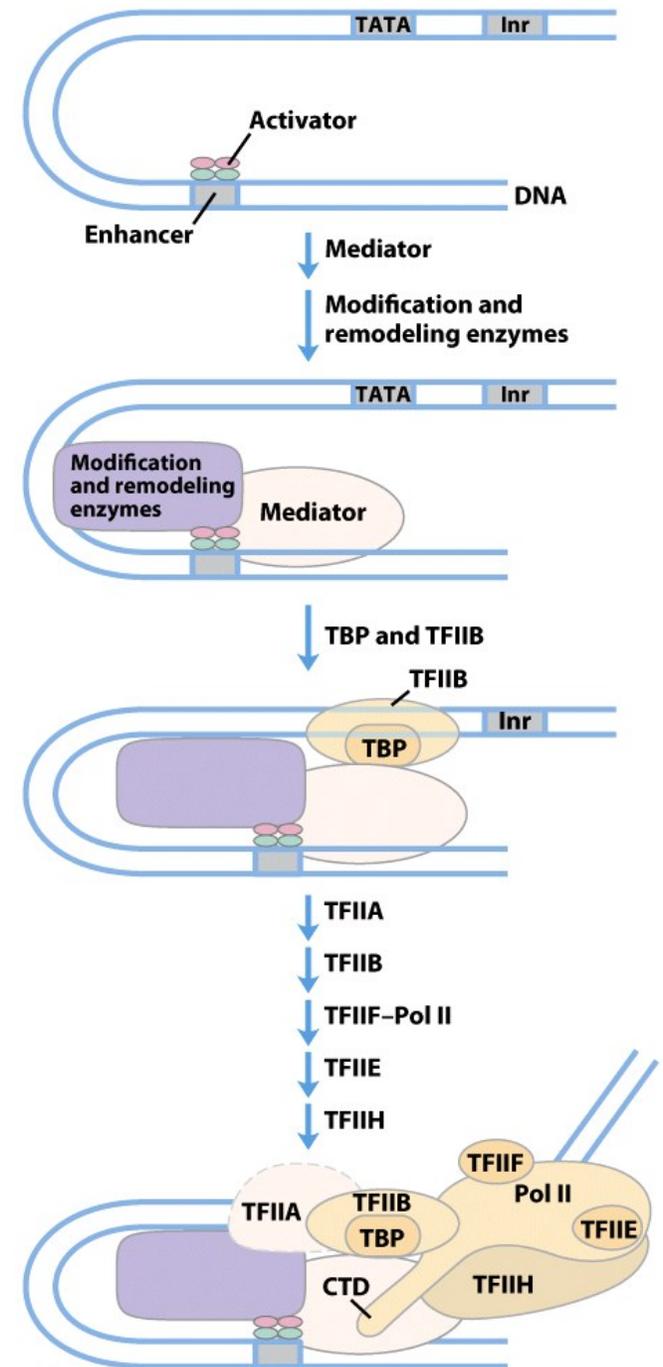


Ativadores de transcrição interagem com outras proteínas (co-ativadores)



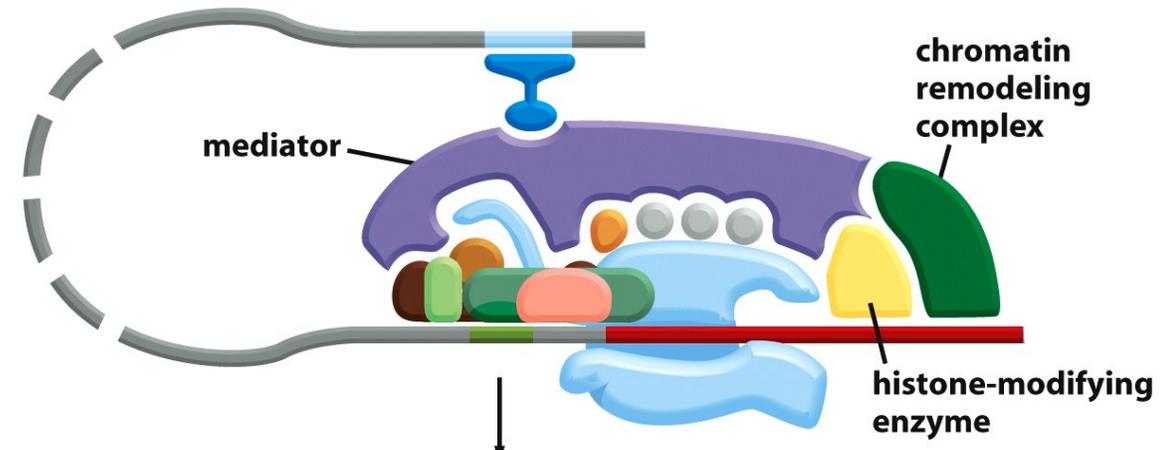
Sequência de eventos que levam à transcrição

- Ligação de **ativadores de transcrição** ao DNA
- Recrutamento do complexo **mediador** e de remodelamento de cromatina
- Formação do **complexo de transcrição basal**



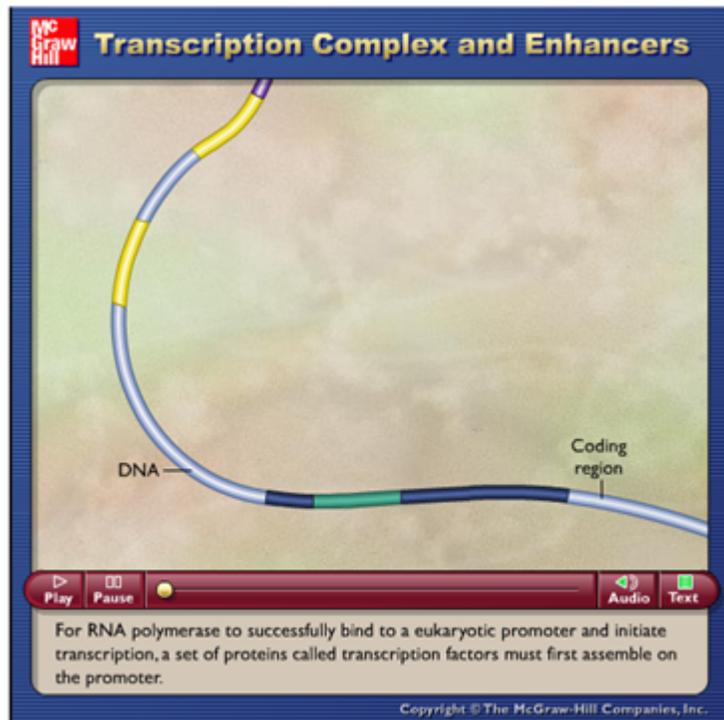
Co-ativadores – complexo mediador

- Intermediários entre ativadores e complexo de iniciação
- Não ligam DNA
- Interações proteína-proteína
- **Complexo mediador**
 - 20 a 30 polipeptídeos
- podem atuar junto a repressores de transcrição



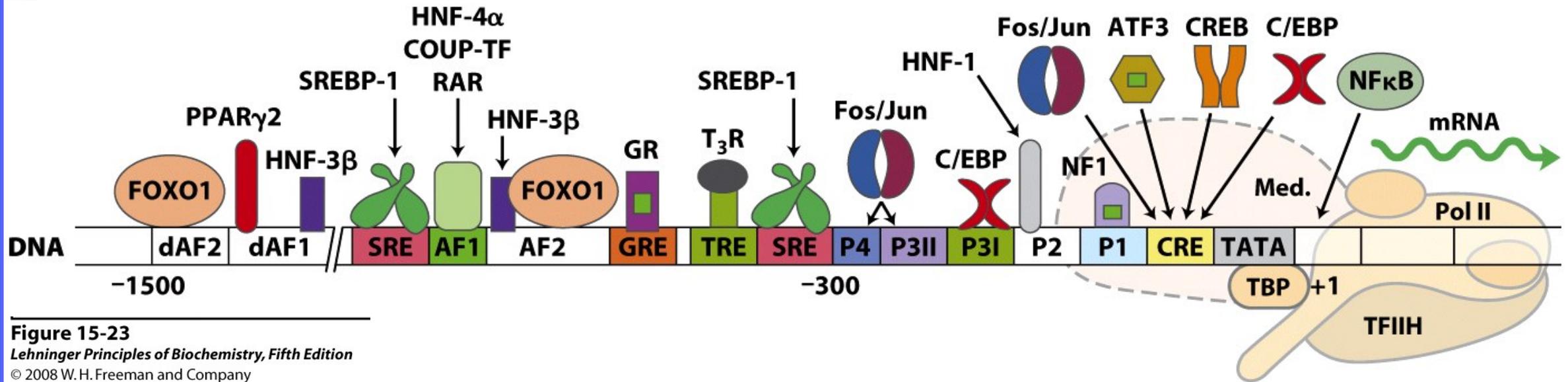
Animações complexo de transcrição e enhancers

<https://www.youtube.com/watch?v=vRBOv4RR7y8>



<http://www.dnalc.org/view/15480-Transcription-DNA-to-RNA-3D-animation-with-sound-effects-only.html>

Um gene pode estar sob o controle de diversos moduladores de transcrição



Gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase

reação da gliconeogênese



Terminação da transcrição (RNAPII)

- clivagem do transcrito numa região rica em A (complexo de poliadenilação)
- Exonuclease degrada porção 3'

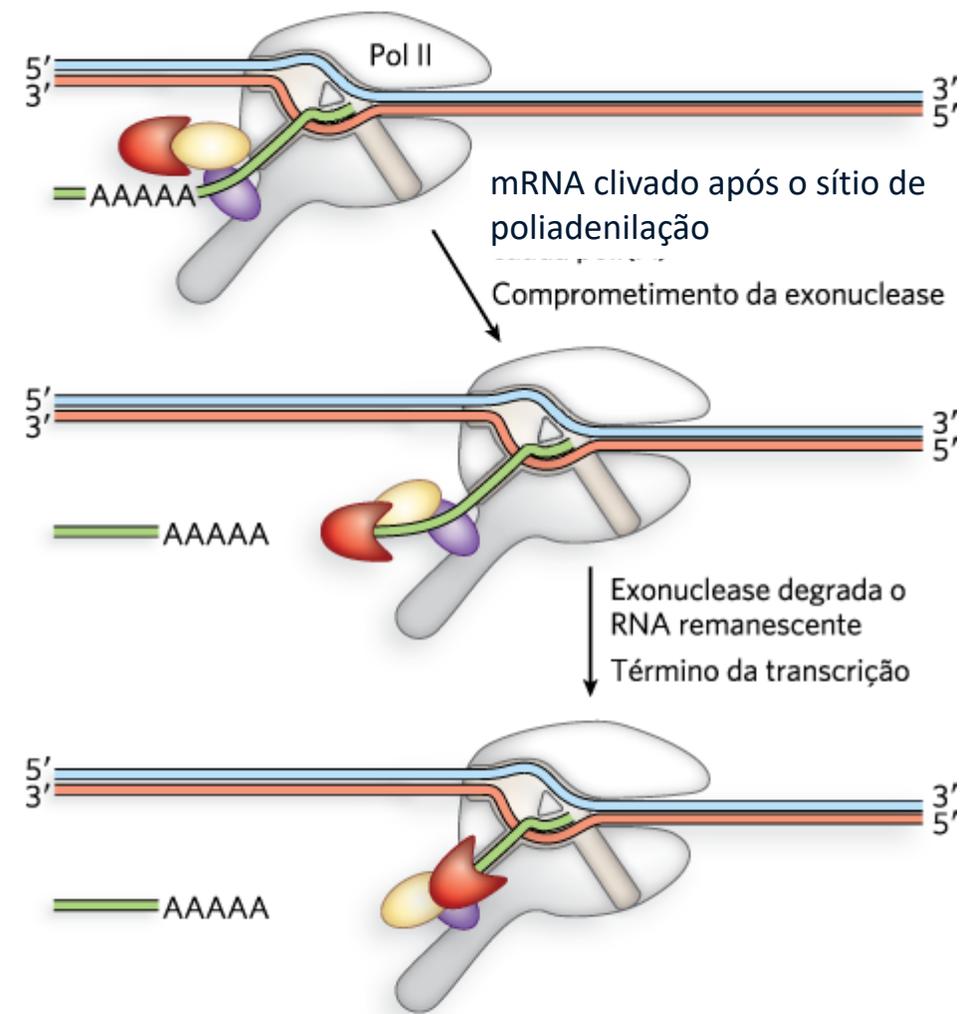


FIGURA 15-25 Modelo de torpedo da terminação da transcrição pela Pol II. A hipótese do modelo de torpedo postula que o transcrito de mRNA é clivado após o sítio poli(A). Uma exonuclease se liga ao RNA remanescente na polimerase e degrada o RNA na direção 5'→3', aproximando-se da polimerase e, por fim, fazendo com que ela libere o mRNA.

Questões para aulas futuras

- Como o complexo de transcrição tem acesso ao DNA que faz parte da cromatina?
- Como é feita a regulação da expressão dos genes?
 - como os genes são “escolhidos” para serem mais ou menos expressos numa determinada condição?

Slides Extras

Três RNA polimerases no núcleo de eucariotos, com funções especializadas

- RNA polimerase I
- RNA polimerase II
- RNA polimerase III

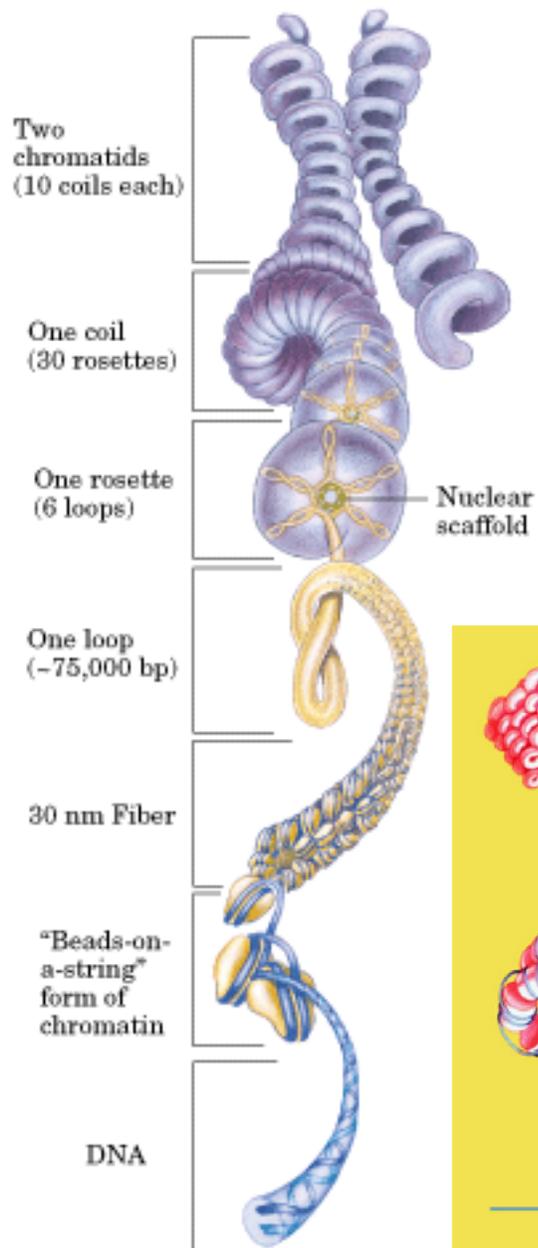
RNA polimerase mitocondrial e de cloroplastos

- mais semelhantes a bactérias
- Menor conjunto de genes
- Controle mais simples

RNAP de eucariotos são mais complexas

Bacteria	Arquea	Eucariotos			
		RNAPII	RNAPI	RNAPIII	
β'	A'	Rpb1	A190	C160	Centro catalítico
	A''				
β	B'	Rpb3	A135	C128	Montagem do complexo
	B''				
α	D	Rpb2	AC40	AC40	
	N	Rpb10	Rob10	Rpb10	
α	L	Rpb11	AC19	Ac19	
	P	Rpb12	Rob12	Rob12	
ω	H	Rpb5	Rpb5	Fpb5	
	K	Rpb6	Rpb6	Fpb6	
	F	Rpb4	A14	C17	Funções auxiliares
	E	Rpb7	A43	C25	
	TFS/X	Rpb9	A12	C11	
		Rpb8	Rpb8	Rpb8	
			A49		
			A34.5		
				C82	
				C53	
				C37	
				C31	

DNA em um cromossomo está compactado e recoberto por proteínas: CROMATINA



- para que a RNAP e os fatores de transcrição tenham acesso ao DNA, nucleossomos precisam ser temporariamente removidos ou modificados:

REMODELAMENTO

