

Transcrição em eucariotos

Departamento de Bioquímica - USP



Bibliografia:

Capítulo 13: Mechanisms of transcription

Molecular Biology of the Gene. J.D. Watson, T.A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick. CSH Press, 7th edition (2013).

Meta: Entender o processo de transcrição em células eucarióticas e as diferenças com a transcrição em bactérias.

Objetivos:

1. Entender a composição da maquinaria de transcrição eucariótica.
2. Entender como a maquinaria de transcrição eucariótica reconhece promotores.
3. Entender como se dá a transição entre iniciação e alongamento em eucariotos.
4. Entender que a transcrição em eucariotos requer fatores adicionais in vivo (na presença de nucleossomos).
5. Entender como ocorre a terminação da transcrição em eucariotos.

Transcrição em bactérias x eucariotos: Similaridades



- Ambos sintetizam uma fita de polinucleotídeos complementar a uma fita de DNA molde antiparalela
- Ambos usam nucleotídeos trifosfatados como precursores
- A química da síntese é a mesma que ocorre sempre no **sentido 5'-3'**

Transcrição em bactérias x eucariotos: Similaridades



- Os precursores são rNTPs e não dNTPs
- A reação é catalisada por uma RNA polimerase dependente de DNA
- RNA polimerases não precisam de um primer

Transcrição em bactérias x eucariotos: Similaridades



- O transcrito de RNA não permanece associado à fita molde de DNA

Transcrição em bactérias x eucariotos: Similaridades



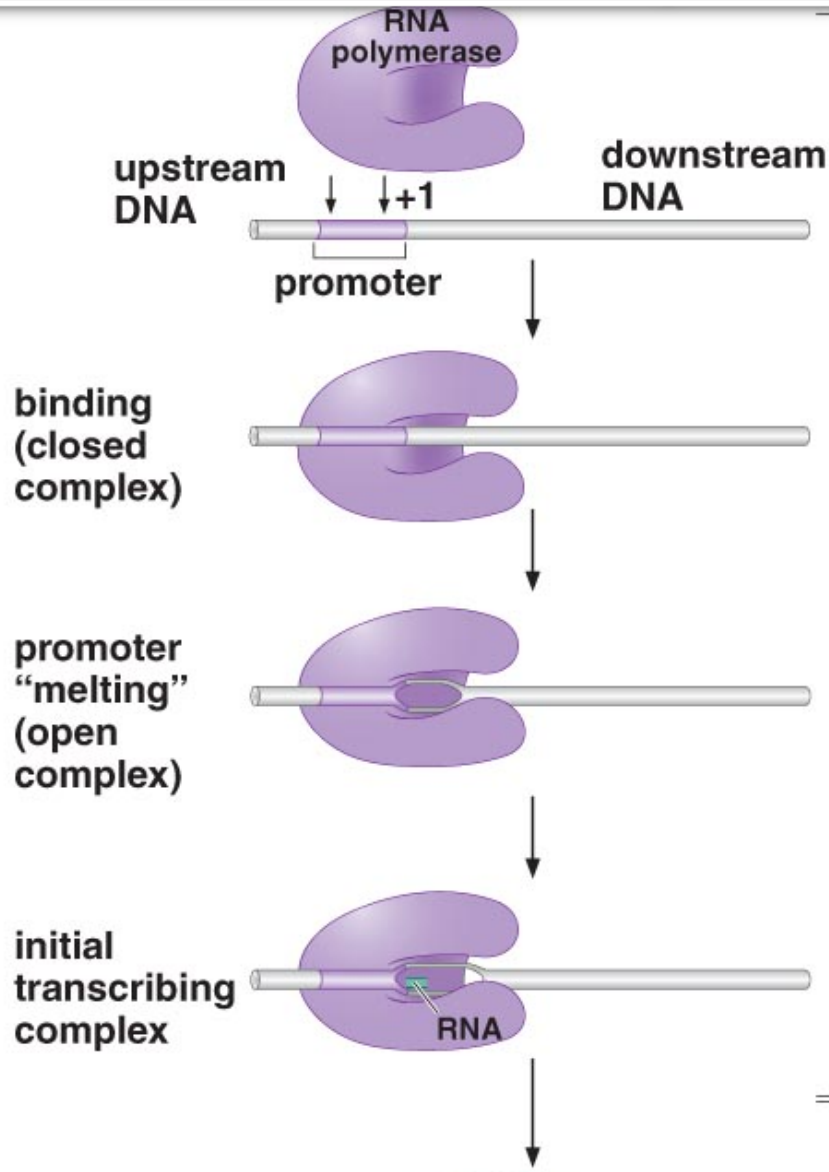
- O transcrito de RNA não permanece associado à fita molde de DNA
- Processo menos preciso que a replicação (incorporações de bases erradas = 1×10^4)
- **A transcrição é assimétrica**

Transcrição em bactérias x eucariotos: Similaridades



- O transcrito de RNA não permanece associado à fita molde de DNA
- Processo menos preciso que a replicação (incorporações de bases erradas = 1×10^4)
- A transcrição é assimétrica
- Cópia seletivamente apenas partes do genoma com número de cópias variável
 - Escolha não rãndomica e regulável

Fases da transcrição: Visão geral



Início

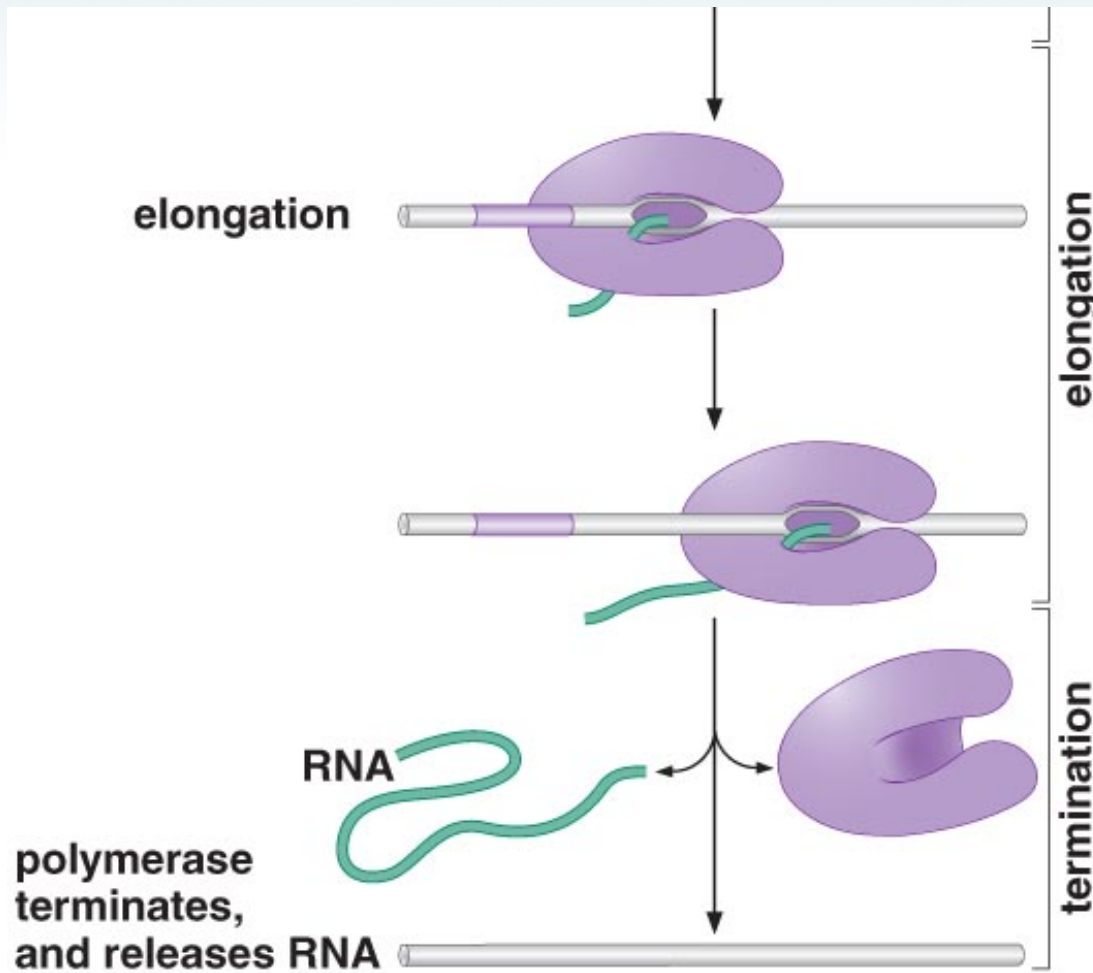
Reconhecimento do promotor

initiation

Abertura da fita dupla de DNA

Formação do complexo de início de transcrição

Fases da transcrição: Visão geral



**Alongamento
da cadeia:
escape da
RNAP**

Terminação

Transcrição em eucariotos

A transcrição em Eucariotos é mais complexa.

A sequência dos promotores é diferente.

Existem vários fatores de iniciação diferentes do fator σ .

Processo de terminação da transcrição é diferente.

Existe mais de uma RNA polimerase

Transcrição em eucariotos

Eucariotos tem 3 RNA polimerases

TABLE 12-1 The Subunits of RNA Polymerases

| Prokaryotic | | Eukaryotic | | |
|---------------|-------------|----------------|-----------------|------------------|
| Bacterial | Archaeal | RNAP I | RNAP II | RNAP III |
| Core | Core | (Pol I) | (Pol II) | (Pol III) |
| β' | A'/A'' | RPA1 | RPB1 | RPC1 |
| β | B | RPA2 | RPB2 | RPC2 |
| α^I | D | RPC5 | RPB3 | RPC5 |
| α^{II} | L | RPC9 | RPB11 | RPC9 |
| ω | K | RPB6 | RPB6 | RPB6 |
| | [+6 others] | [+9 others] | [+7 others] | [+11 others] |

Adapted, with permission, from Ebricht R.H. 2000. *J. Mol. Biol.* 304: 687–698, Fig. 1, p. 688. © Elsevier. The subunits in each column are listed in order of decreasing molecular weight.

Eucariotos tem 3 RNAs polimerases

1. A RNA pol I está localizada no nucléolo e transcreve genes de rRNAs
2. A RNA pol II está fora do nucléolo no núcleo e transcreve genes codificadores de proteínas e miRNAs
3. A RNA pol III está fora do nucléolo no núcleo e transcreve um gene de rRNA e genes de tRNAs

Como promotores são reconhecidos pela RNA pol II?

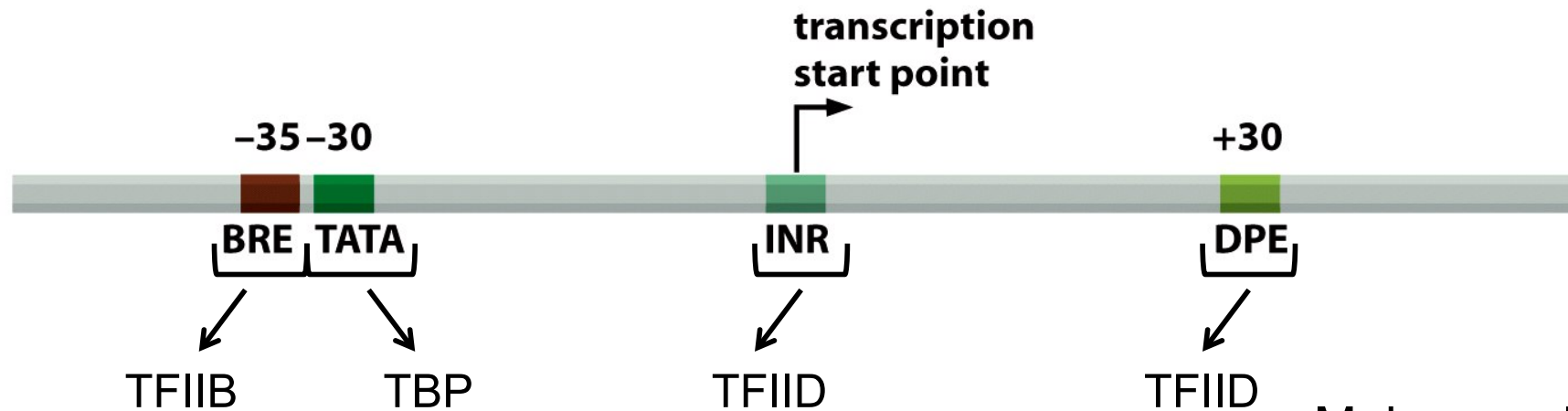
1. Ao contrário da RNA pol bacteriana, a RNA pol II não consegue reconhecer promotores sozinha
2. A RNA pol II requer proteínas adicionais chamadas **fatores de transcrição geral**

| General Transcription Factor: | # of subunits: |
|-------------------------------|----------------|
| TFIID (TBP + TAFs) | 12 |
| TFIIA | 2 |
| TFIIB | 1 |
| TFIIE | 2 |
| TFIIF | 3 |
| TFIIH | 9 |

↓ TBP associated factors
↓ Tata binding protein

Promotor da RNA polimerase II

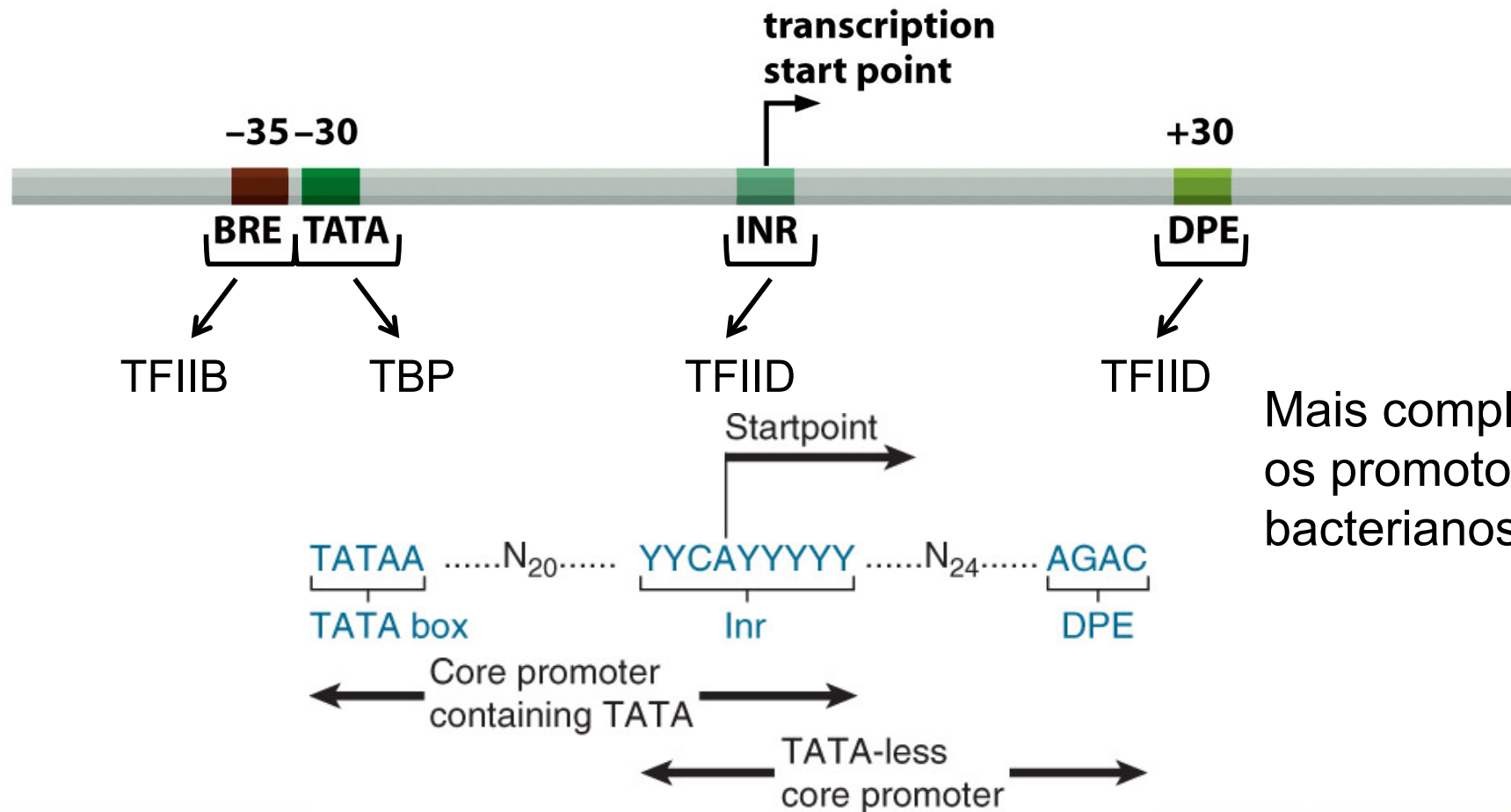
Sequências consenso encontradas na vizinhança dos sítios de início da transcrição da RNA polimerase II



Mais complexo que os promotores bacterianos.

Promotor da RNA polimerase II

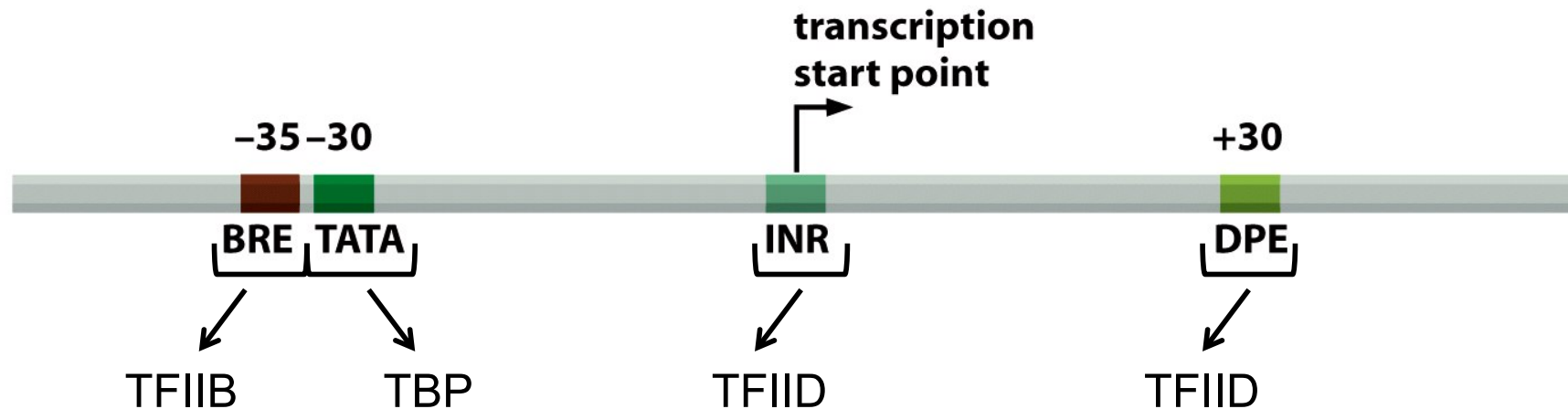
Sequências consenso encontradas na vizinhança dos sítios de início da transcrição da RNA polimerase II



Mais complexo que os promotores bacterianos.

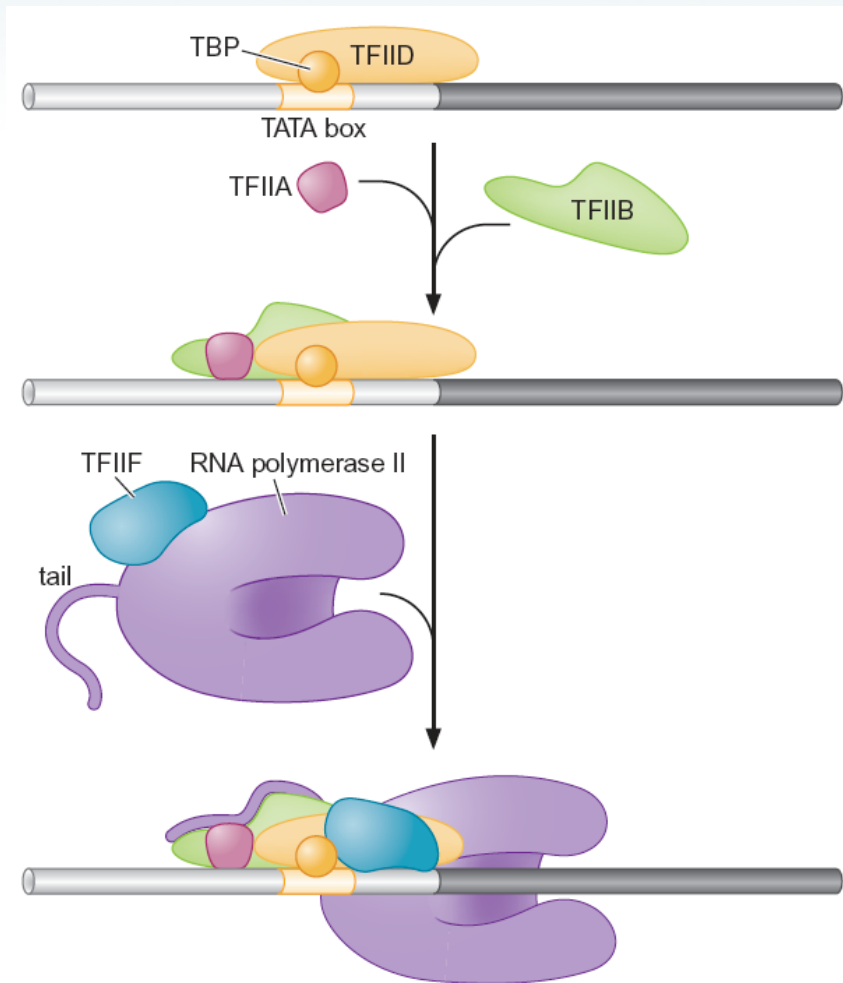
Promotor da RNA polimerase II

Sequências consenso encontradas na vizinhança dos sítios de início da transcrição da RNA polimerase II



- O TATA box é o elemento mais fundamental do promotor eucariótico. A sequência consenso é: TATAAAA
- Localizado na posição -30 a -40 do início da transcrição
- TFIID se liga ao TATA box através da **Tata binding protein** ou **TBP**

Montagem do complexo de transcrição basal

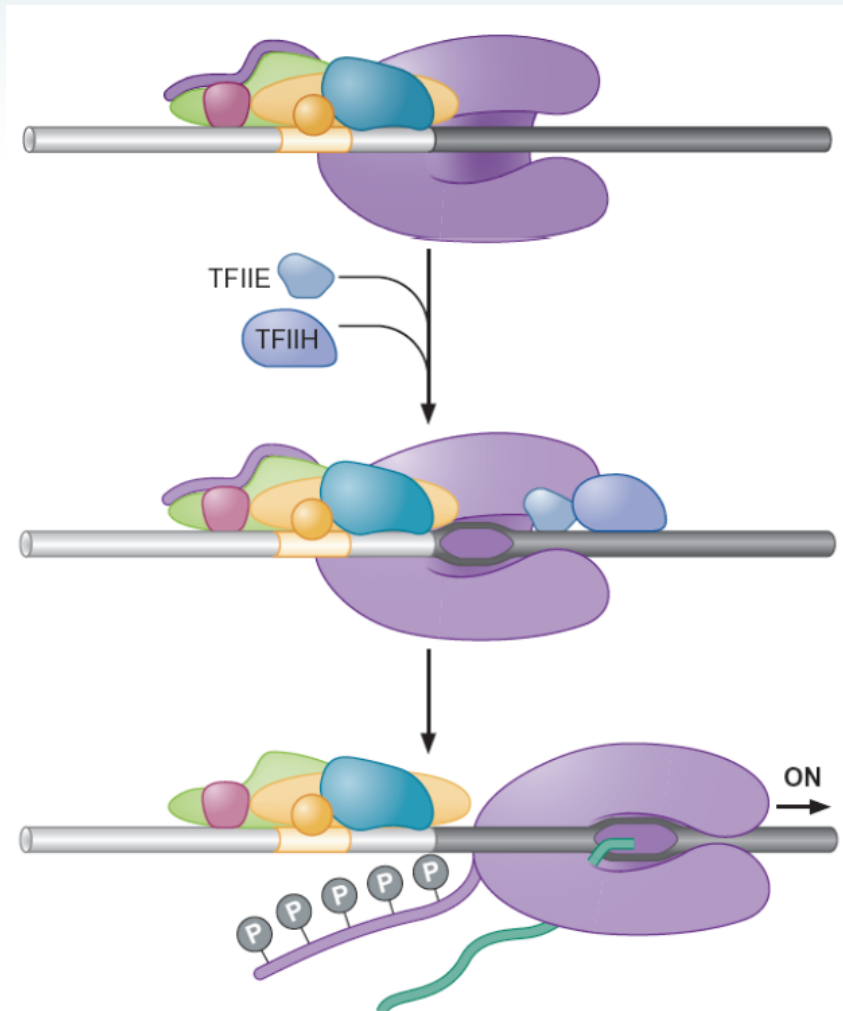


TFIID e sua subunidade TBP recrutam outros dois fatores de transcrição basais para o promotor, TFIIA e TFIIB.

Em seguida, o complexo TFIIA-TFIIB-TFIID recruta a RNAP para o promotor.

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

Montagem do complexo de transcrição basal



Em seguida **TFIIE** e **TFIIH** se ligam ao complexo.

TFIIH tem duas atividades bioquímicas importantes: helicase e quinase.

TFIIH facilita a formação do complexo de transcrição aberto.

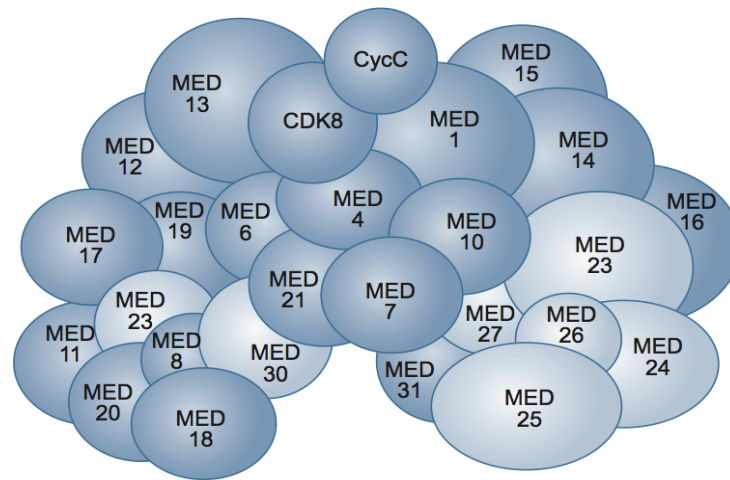
A RNA pol II se solta do complexo de iniciação após a **fosforilação** da sua cauda c-terminal

ELONGAÇÃO

Os TFs gerais são apenas a ponta do iceberg!!

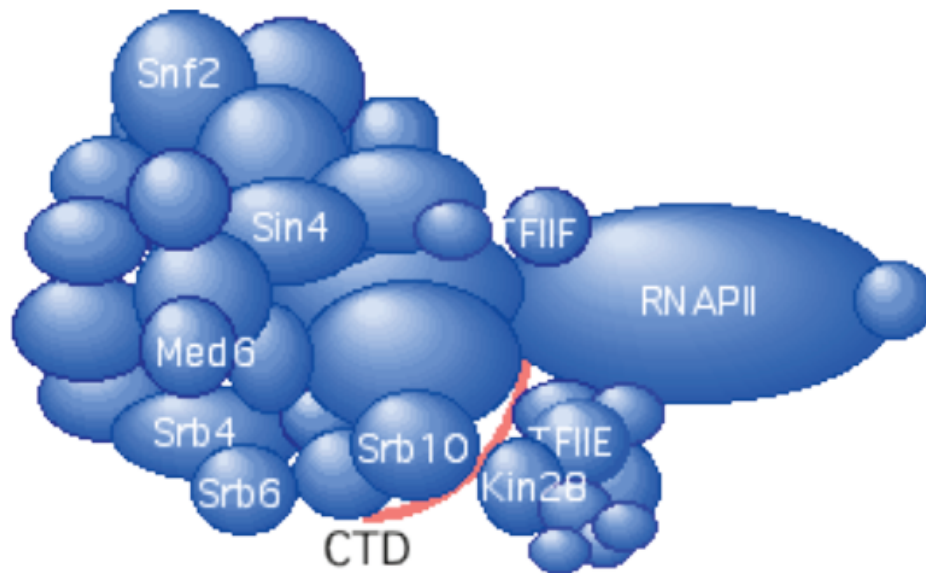
A RNA polimerase em eucariotos pertence a um complexo “holoenzimático” muito grande in vivo.

Este complexo consiste na RNA polimerase e um complexo proteico enorme chamado “mediador”.



O Complexo Mediador Humano

A maquinaria basal de transcrição eucariótica



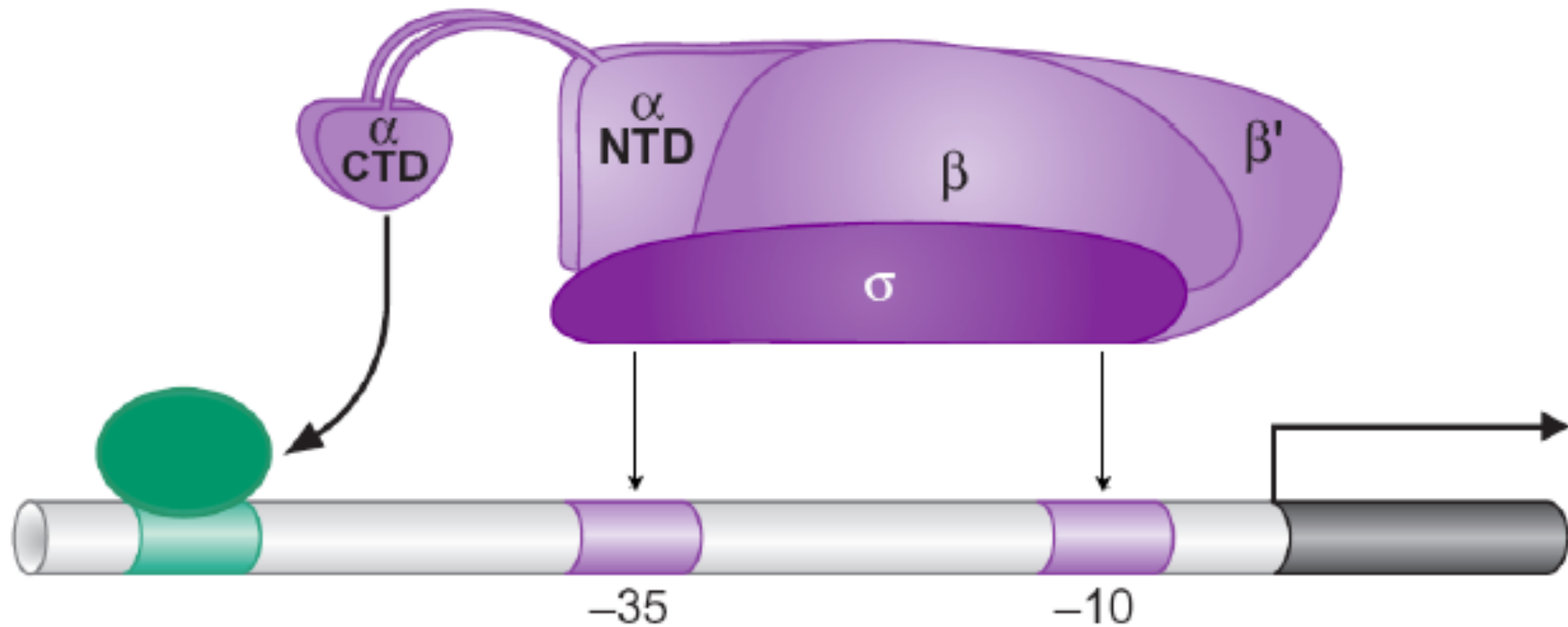
A maquinaria basal para transcrição de genes em eucariotos (holoenzima + TFs gerais) é composta de :

11 subunidades do núcleo da polimerase + **>20** subunidades do complexo mediador + **29** subunidades que compõe os fatores de transcrição gerais

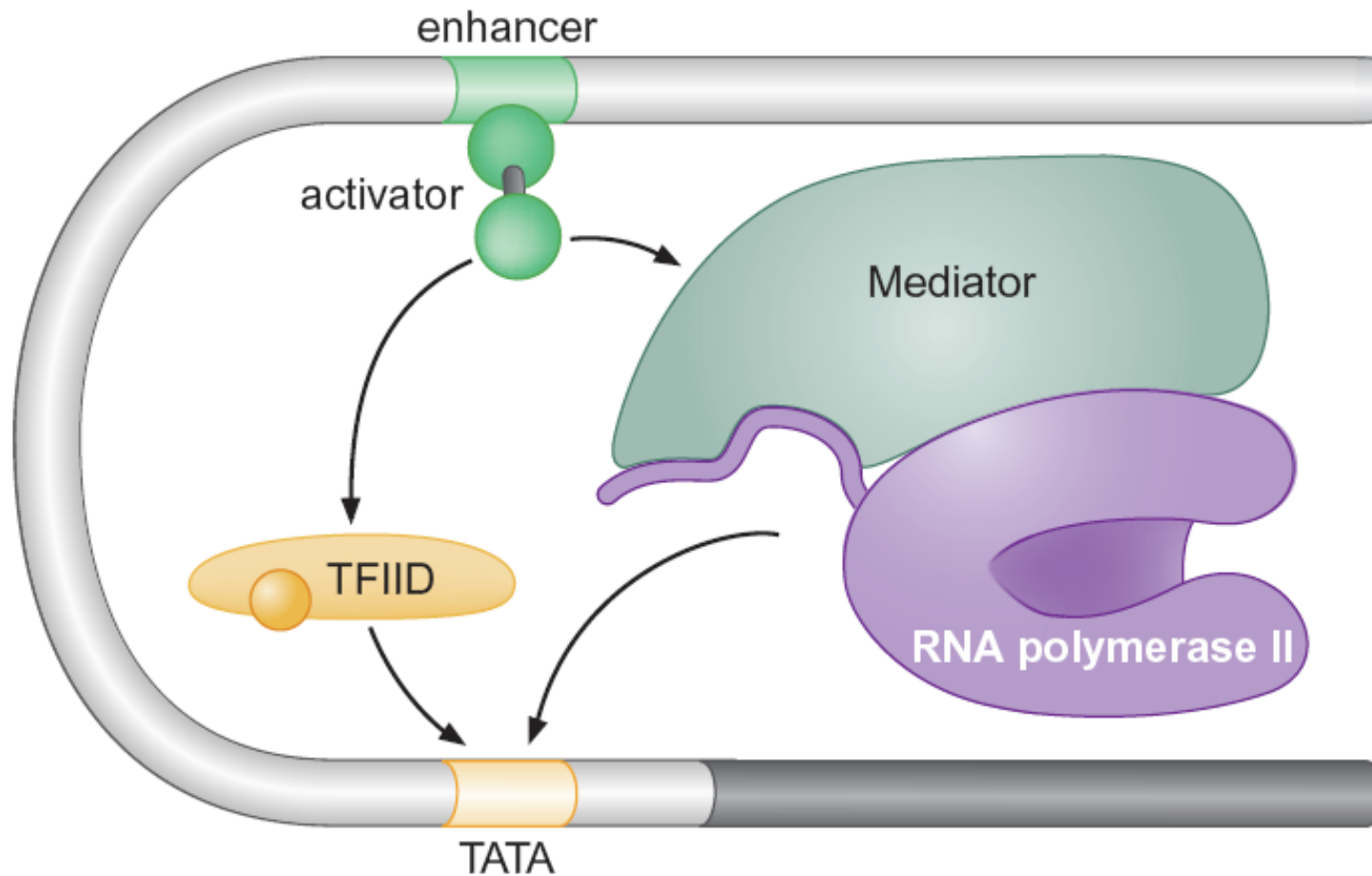
= **>60** proteínas diferentes!!!!

Como o mediador atua para promover o início da transcrição pela RNAPol II?

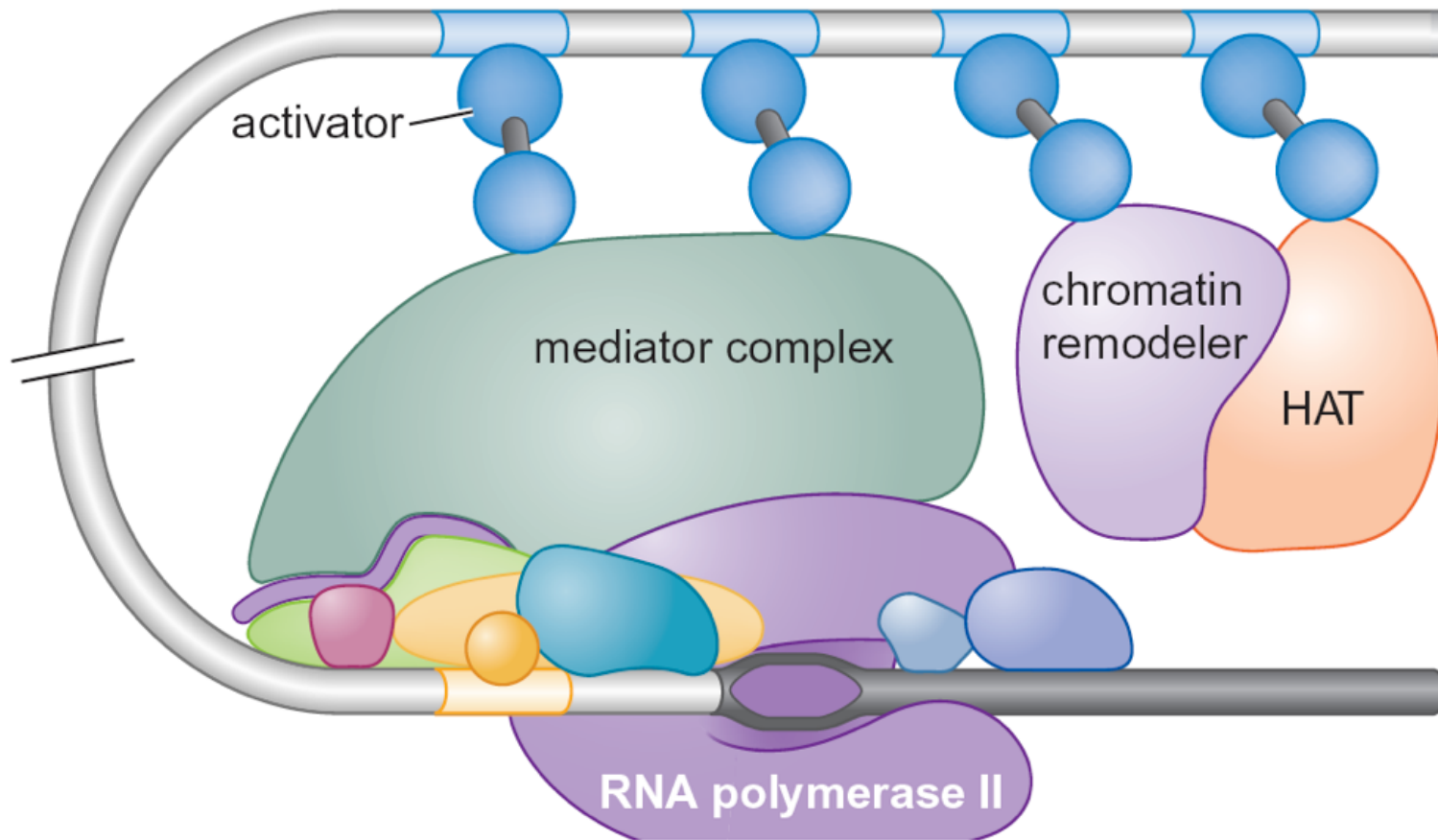
- Em procariotos os **ativadores** funcionam recrutando a **RNA polimerase** para os promotores fracos.



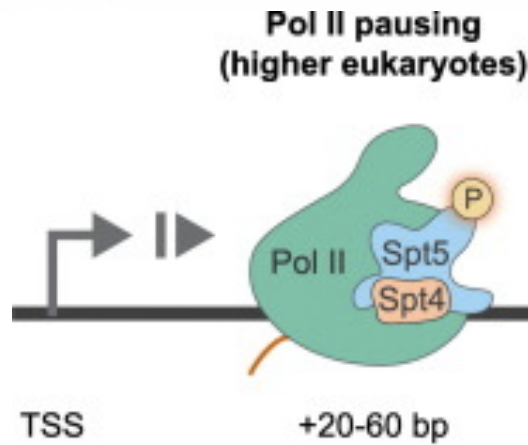
O Mediador serve de contato entre um ativador ligado ao seu sítio regulatório e a RNA polimerase.



In vivo a RNA polimerase necessita de outros fatores de transcrição (ativadores), do complexo mediador e modificadores de nucleossomos para iniciar a transcrição



Elongação



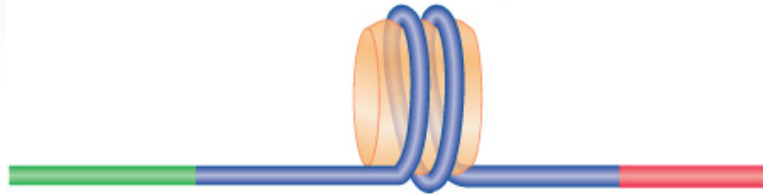
Fatores de elongação inibem as pausas e aumentam a processividade da RNA pol II (Spt5 análogo ao NusG bacteriano)

Elongação

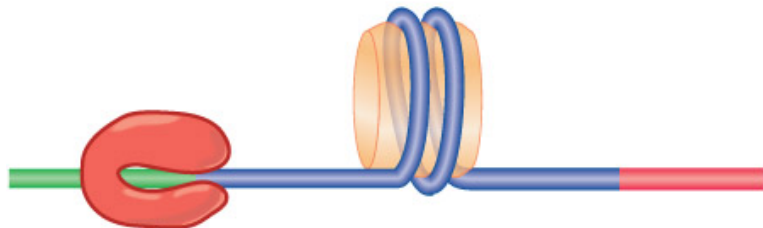
Promoter Terminator



Nucleosome assembled at specific location



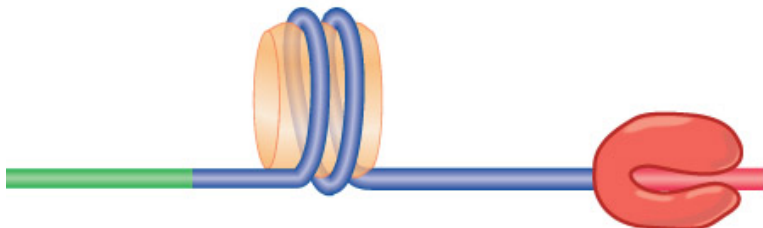
RNA polymerase binds at promoter



RNA polymerase transcribes up to terminator



Nucleosome is found at new position

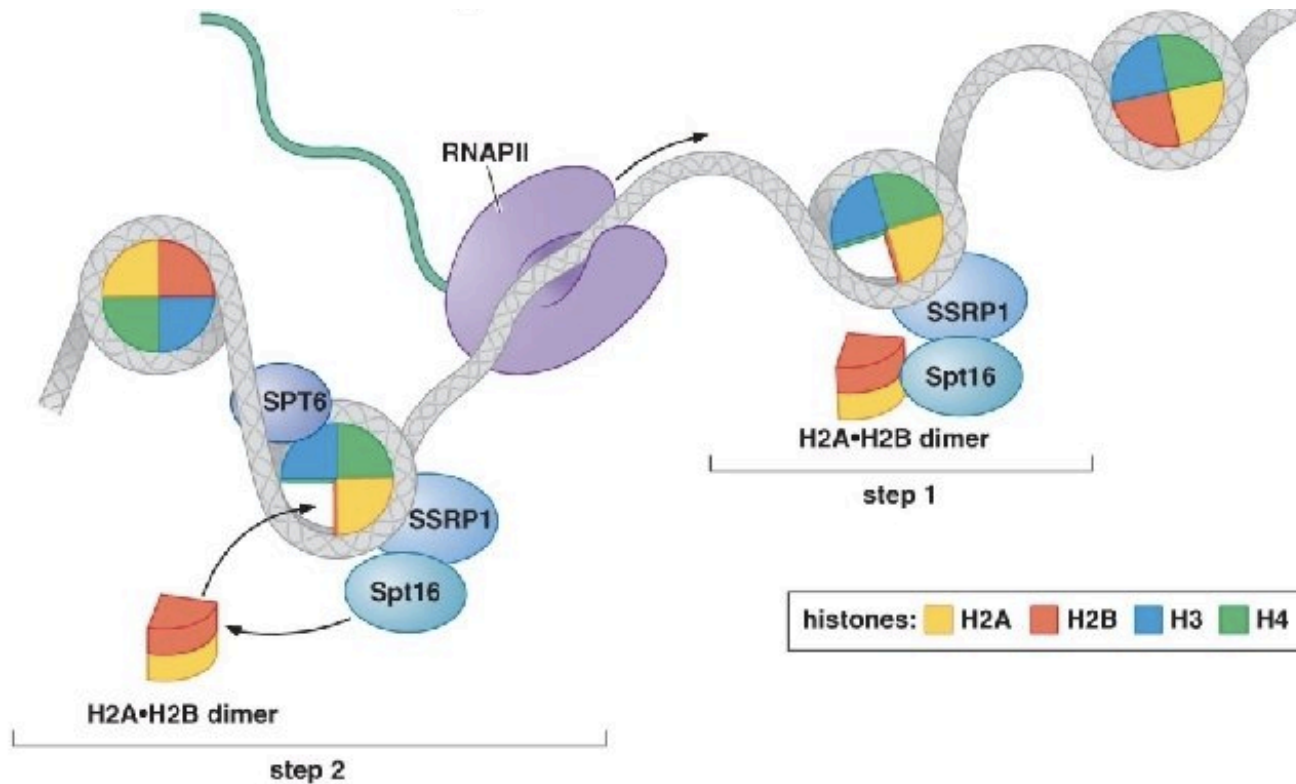


A RNA polimerase precisa lidar com os nucleossomos no seu caminho

Elongação

A RNA polimerase precisa lidar com os nucleossomos no seu caminho

- FACT (Facilitates Chromatin Transcription) - remodelador de nucleossomos recrutado por TFIIS (Fator de alongação)



Terminação da transcrição em eucariotos está ligada ao processo de poliadenilação

- O processo não é tão bem compreendido como em procariotos.
- O sinal de poliadenilação leva à clivagem do mRNA sendo transcrito

Terminação da transcrição em eucariotos



10–30 nucleotides

≤ 30 nucleotides



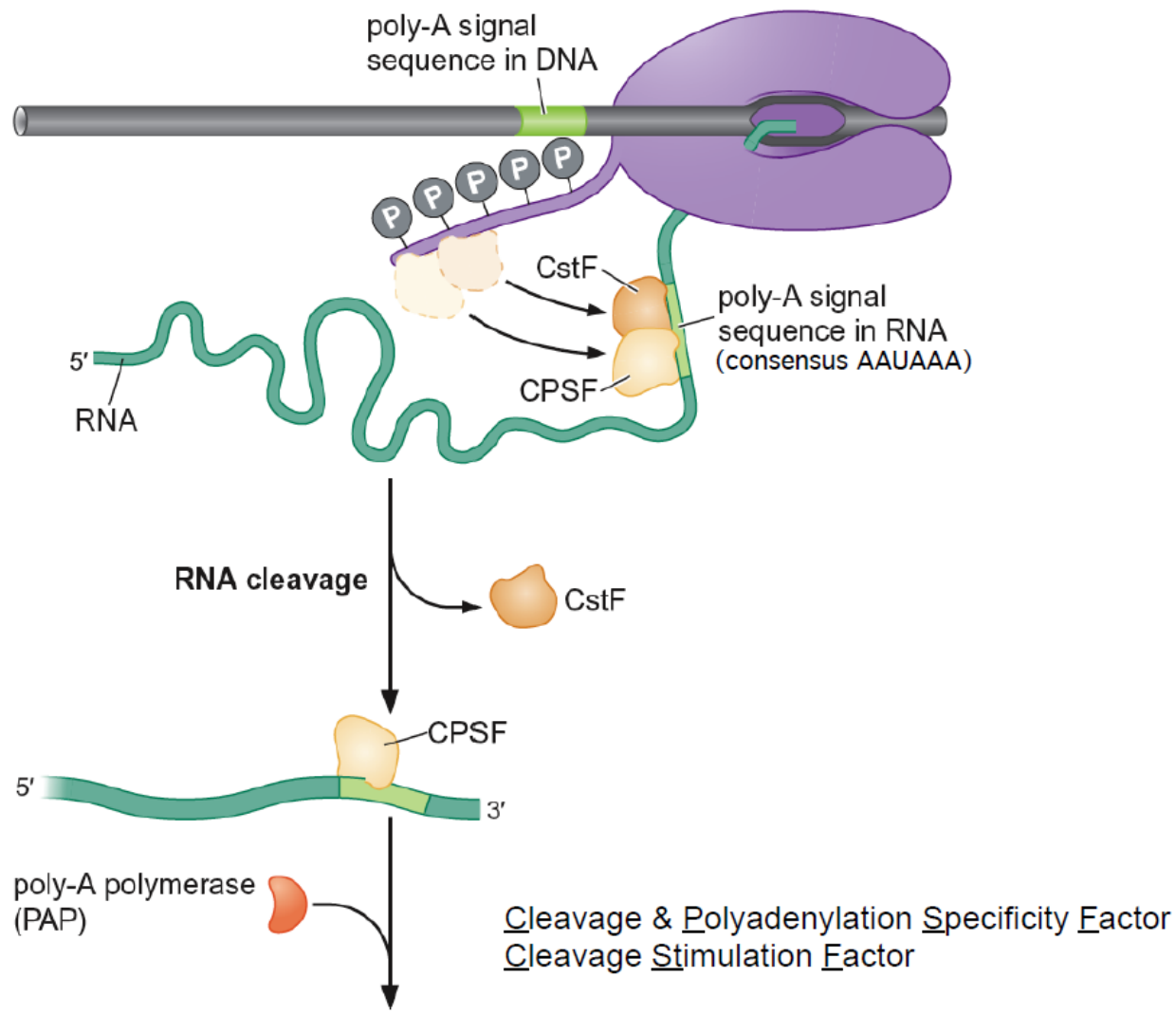
CLEAVAGE



Poly-A
ADDITION

Terminação da transcrição em eucariotos

Polyadenylation Machinery

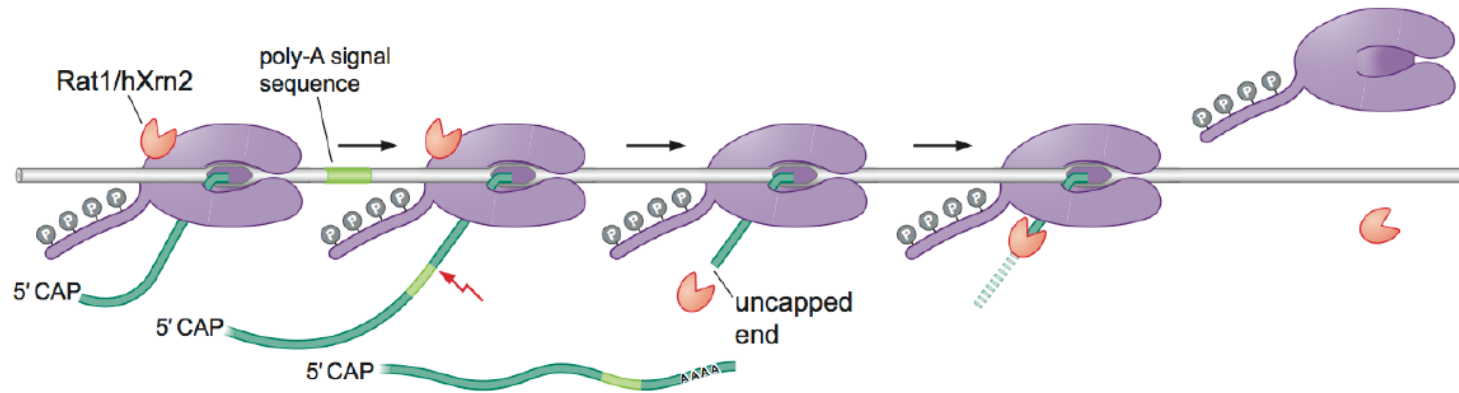


Terminação da transcrição em eucariotos está ligada ao processo de poliadenilação

- O processo não é tão bem compreendido como em procariotos.
- O sinal de poliadenilação leva à clivagem do mRNA sendo transcrito
- Após a clivagem, a RNA pol continua transcrevendo, mas eventualmente se dissocia do molde terminando a transcrição. **Mas como?**

Terminação da transcrição em eucariotos

The torpedo model:



The allosteric model:

