



Prêmio Nobel de Química 2006: Os Mecanismos Estruturais da Transcrição em Eucariotos

Bettina Malnic

O prêmio Nobel de Química de 2006 foi outorgado ao pesquisador Roger Kornberg, que revelou em detalhes moleculares como o DNA é copiado em RNA mensageiro, um processo denominado de transcrição gênica. Kornberg também identificou novos fatores protéicos que fazem parte do complexo de transcrição e que são importantes para a regulação da expressão gênica em diferentes tecidos.

► transcrição genética, RNA polimerase, mediador, eucariotos, prêmio Nobel ◀

Recebido em 20/10/06, aceito em 21/10/06

Mais uma vez a Academia Real Sueca de Ciências decidiu premiar na área de Química uma descoberta que apresenta um forte impacto para o estudo dos sistemas biológicos: o pesquisador Roger D. Kornberg foi agraciado com o prêmio Nobel de Química de 2006 pelos seus estudos sobre as bases moleculares da transcrição gênica em eucariotos. A freqüente premiação com o Nobel de Química de temas relacionados à Biologia ilustra a importância da integração interdisciplinar entre essas duas grandes áreas.

A informação genética contida no DNA é primeiramente convertida em RNA, que por sua vez é utilizado como molde para a síntese de proteínas. Roger Kornberg, um bioquímico e biólogo estrutural da Escola Médica da Universidade de Stanford, descreveu pela primeira vez como o processo de conversão de DNA em RNA mensageiro, ou transcrição, ocorre do ponto de vista estrutural. A transcrição de genes é necessária durante toda a vida de um organismo, desde a sua formação até a sua manutenção, como por exemplo durante o desen-

volvimento ou na reposição de células mortas. Compreender como a transcrição funciona também é fundamental do ponto de vista médico, já que distúrbios nos processos de transcrição estão relacionados a doenças como o câncer.

Os mecanismos de transcrição gênica em procariontes já eram bastante conhecidos nos anos 1960. A RNA polimerase de bactérias consiste de quatro subunidades centrais e uma quinta subunidade variável, denominada de fator sigma. A subunidade sigma é necessária para que a polimerase reconheça o promotor de um gene, uma seqüência específica de nucleotídeos que sinaliza o local de início da síntese de RNA. Em contraste com as bactérias, os eucariotes apresentam três tipos de RNA polimerase (I-III). Todos os genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA polimerase II, que foi o alvo de estudo de Kornberg. Durante os anos 1970, a RNA polimerase de eucariotes foi

purificada e verificou-se que ela é constituída de doze subunidades. No entanto, nenhuma subunidade similar ao fator sigma foi identificada. Hoje sabemos que outros tipos de fatores cumprem o papel do fator sigma em eucariotes. Foram identificados cinco fatores associados à RNA polimerase II que estão envolvidos na transcrição de todos os genes, denominados de fatores gerais de transcrição. Com o auxílio desses fatores gerais de transcrição (TFIIB, D, E, F e H), a RNA polimerase II em eucariotes reconhece o sítio de início de transcrição e inicia a síntese de RNA.

As contribuições de Roger Kornberg

A estrutura dos nucleossomos

Por muito tempo acreditou-se que o processo de transcrição em eucariotes ocorria de maneira muito similar ao de procariontes. Com o tempo, foi ficando claro que o processo de transcrição em eucariotes é muito mais complexo. Enquanto o DNA nas bactérias está exposto, o DNA eucariótico está organizado na forma de

A freqüente premiação com o Nobel de Química de temas relacionados à Biologia ilustra a importância da integração interdisciplinar entre essas duas grandes áreas

A seção "Atualidades em Química" procura apresentar assuntos que mostrem como a Química é uma ciência viva, seja com relação a novas descobertas, seja no que diz respeito à sempre necessária revisão de conceitos.

cromatina. Antes de iniciar seu trabalho sobre os mecanismos moleculares de transcrição, Kornberg estudou a estrutura da cromatina. Durante seu estágio de pós-doutorado, que foi realizado sob a orientação de Francis Crick e Aaron Klug, na Universidade de Cambridge, na Inglaterra, ele propôs que a unidade básica da cromatina, o nucleossomo, é constituída de um octâmero de histonas e de 200 pares-base de DNA (Figura 1).

Naquela época, não se acreditava que a estrutura da cromatina apresentasse um papel importante na regulação da transcrição gênica. Desde então se descobriu que o empacotamento do DNA em nucleossomos apresenta uma grande importância na regulação da expressão gênica. A presença de nucleossomos nas regiões promotoras dos genes inibe a transcrição destes pela RNA polimerase II. Os nucleossomos então garantem que todos os genes eucarióticos estejam inativos, exceto aqueles cuja transcrição é ativada por mecanismos regulatórios específicos. Sabe-se que fatores de ativação tecido-específicos são capazes de se ligar a seqüências regulatórias presentes nos genes eucarióticos, denominadas de *enhancers*. Esses fatores são capazes de modificar as histonas nessas regiões, fazendo com que o DNA seja descompactado de forma que possa ser transcrito pela RNA polimerase II, fazendo, por exemplo, com que este gene seja transcrito em um tecido específico e não em outro.

Experimentos recentes indicam que os nucleossomos são completamente removidos da região promotora durante a transcrição em genes ativos, de forma que a RNA polimerase II pode interagir diretamente com o DNA. Após a transcrição, os nucleossomos são novamente formados. A modulação do estado de condensação da cromatina apresenta, portanto, um papel fundamental na regulação da expressão gênica, sendo que Kornberg teve uma importante participação nessa descoberta.

A descoberta do mediador

Uma outra grande contribuição de Roger Kornberg foi a de desen-

volver um sistema para o estudo da transcrição *in vitro* que utilizava a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é um eucarioto, assim como são os mamíferos. Esse organismo-modelo versátil e de fácil manipulação facilitou imensamente o estudo da transcrição em eucariotos e permitiu que Kornberg realizasse todo o seu trabalho que culminou no prêmio Nobel.

No final dos anos 1980, Kornberg purificou o complexo de transcrição de levedura que continha a RNA polimerase II e os cinco fatores gerais de transcrição. Interessantemente, verificou que em um sistema reconstituído que continha esse complexo de transcrição, apenas níveis de transcrição basais eram observados, e que o sistema não era responsivo à adição de fatores de ativação tecido-específicos. Essa observação levou Kornberg à inesperada descoberta e purificação de um grande complexo, denominado de *mediador*, composto de cerca de 20 proteínas, cuja presença é necessária para que ocorra a regulação da transcrição pelos fatores de ativação específicos. O mediador está ausente nas bactérias, mas está presente em todos os eucariotos, desde leveduras até mamíferos.

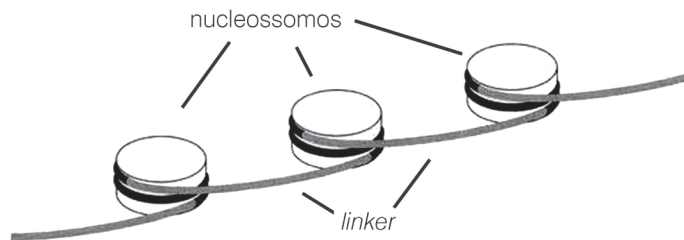


Figura 1: Representação esquemática dos nucleossomos. O octâmero de histonas está representado por um disco, o DNA associado ao octâmero de histonas está representado como uma fita escura e o DNA do *linker* (localizado entre os nucleossomos) está representado como uma fita clara.

Desta maneira, foram determinados os três componentes necessários para que ocorra a transcrição em eucariotos (Figura 2): os fatores gerais de transcrição, o mediador e a RNA polimerase II. Nas bactérias, os ativadores e repressores de transcrição contactam diretamente a RNA polimerase, afetando assim a sua ligação ao promotor. Nos eucariotos, a interação desses fatores regulatórios com a RNA polimerase ocorre através de fatores intermediários, o mediador e a cromatina, ausentes nas bactérias, permitindo um maior grau de complexidade na regulação da transcrição.

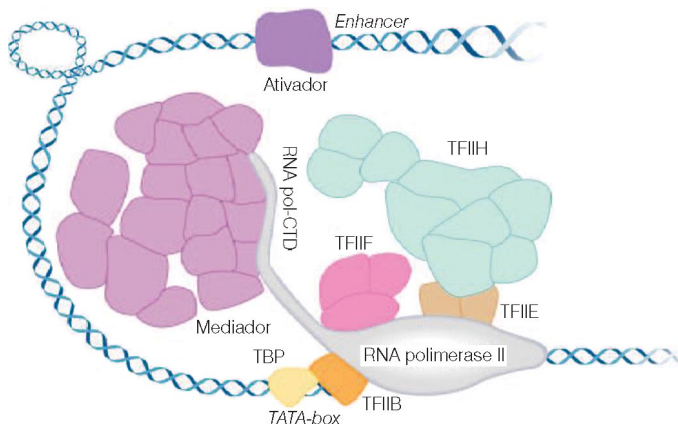


Figura 2: Representação esquemática de um complexo de início de transcrição eucariótico contendo DNA (em azul), os fatores gerais de transcrição TBP (que faz parte da TFIIID), TFIIB, E, F e H, o mediador, a RNA polimerase II e um fator de ativação específico (ativador) ligado a um *enhancer*. O TBP (*TATA binding protein*) liga-se ao *TATA-box*, seqüência presente na região promotora da maioria dos genes eucarióticos que são transcritos pela RNA polimerase II. O mediador associa-se à região C-terminal não fosforilada da RNA polimerase II (RNA pol-CTD) e é necessário para que o ativador estimule o início da transcrição. Quando a transcrição se inicia, a TFIIH fosforila a CTD e os fatores de gerais de transcrição se dissociam da RNA polimerase II.

A captura da imagem atômica da RNA polimerase II em ação

Apesar de identificados os componentes necessários à transcrição em eucariotos, pouco se sabia a respeito dos aspectos químicos estruturais envolvidos neste processo. Kornberg decidiu determinar a estrutura atômica da RNA polimerase II, que deveria representar a plataforma central do complexo de transcrição. Para cumprir esta missão precisou vencer grandes dificuldades técnicas, já que além de possuir um grande tamanho ($0,5 \times 10^6$ daltons)¹, a RNA polimerase II está presente em pequenas quantidades na célula e, quando purificada, apresenta baixa estabilidade. Após 20 anos de experimentos nos quais técnicas de microscopia eletrônica e cristalografia de raios X foram utilizadas, Kornberg determinou com sucesso a estrutura cristalográfica da RNA polimerase II com uma resolução de 2,8 Å. Uma estrutura de menor resolução (3,3 Å) onde a RNA polimerase II foi flagrada no ato da transcrição também foi determinada.

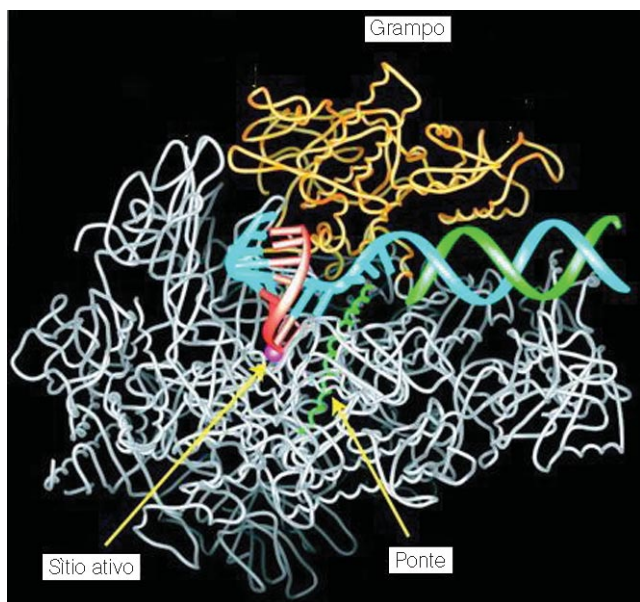
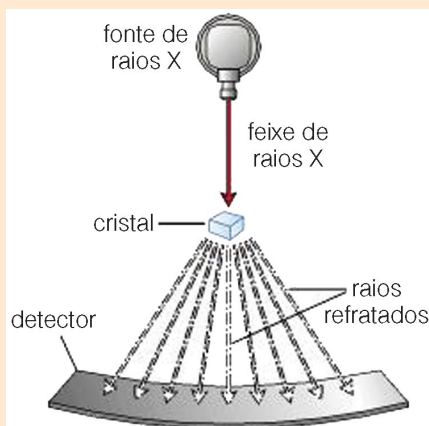


Figura 3: Estrutura da RNA polimerase II durante a transcrição. O grampo (em laranja) prende o DNA durante a transcrição. O restante da RNA polimerase II está ilustrado em cinza. O DNA e o RNA recém-sintetizado (em vermelho) ocupam uma fenda localizada acima do sítio ativo da enzima (o metal no sítio ativo está ilustrado como uma esfera cor-de-rosa). Uma alfa-hélice forma uma ponte (em verde) que funciona como uma catraca que desloca o híbrido DNA-RNA através da fenda à medida que um novo nucleotídeo é adicionado.

Cristalografia de raios X

A estrutura tridimensional de uma proteína pode ser resolvida através da difração de raios X. Usando-se essa técnica, a posição tridimensional de



praticamente todos os átomos de uma proteína pode ser determinada. O primeiro passo consiste em se obter cristais da proteína a ser analisada, onde as moléculas estejam precisamente orientadas. Em seguida, o cristal é irradiado com um feixe de raios X, que apresentam um comprimento de onda de 1 a 2 Å, semelhante ao comprimento de uma ligação covalente e, portanto, suficientemente pequeno para resolver os átomos da proteína no cristal. Os raios X são refratados pelos elétrons das moléculas no cristal e detectados por um filme de raios X ou um detector eletrônico. A partir da análise do padrão da difração e uma série de cálculos elaborados, pode-se resolver a estrutura detalhada da proteína.

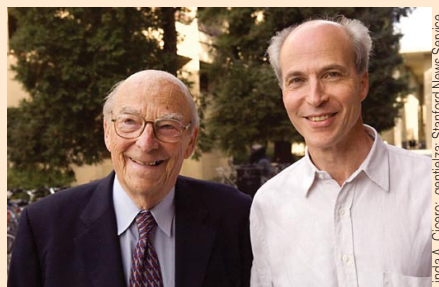
Os ácidos nucléicos ocupam uma fenda profunda formada por duas subunidades da enzima, que são conectadas por uma ponte formada por uma alfa-hélice (Figura 3). Acredita-se que essa alfa-hélice oscila entre uma forma estendida e uma forma dobrada, o que causaria o deslo-

camento do híbrido DNA-RNA através da fenda, ao longo da transcrição.

Durante a transcrição, a RNA polimerase II deve se ligar ao DNA e mover-se por longas distâncias sobre ele – milhares de nucleotídeos – sem se soltar, até alcançar o sítio de terminação

O laureado

Roger Kornberg nasceu em 1947, em St. Louis, MO, EUA. Seu pai, Arthur Kornberg, ganhou o prêmio Nobel em Medicina ou Fisiologia em 1959, pela descoberta dos mecanismos de replicação do DNA pela DNA polimerase. Roger Kornberg graduou-se em Harvard em 1967 e doutorou-se em Química pela Universidade de Stanford em 1972. Realizou seu pós-doutorado no laboratório MRC, em Cambridge, Inglaterra, sob a orientação de Francis Crick e Aaron Klug. Atualmente é professor de Medicina na Escola Médica da Universidade de Stanford, Califórnia. Seu mais próximo colaborador científico sempre foi sua esposa, a Dra. Yahli Lorch.



Roger Kornberg e seu pai, Arthur Kornberg.

de transcrição do gene. Os resultados mostram que uma região da RNA polimerase II forma uma estrutura na forma de um grampo, que se encontra na forma aberta quando a enzima está na forma livre, mas que se fecha ao redor do DNA quando a síntese de RNA inicia e o híbrido DNA-RNA se encontra no sítio ativo. Quando a síntese termina, o grampo se abre novamente, liberando a enzima.

Os estudos de Kornberg permitiram pela primeira vez a compreensão dos mecanismos estruturais que determinam o início da transcrição. O próximo grande passo será resolver a estrutura da RNA polimerase II com-

plexada aos outros vários fatores de transcrição que regulam a transcrição gênica. Desta maneira poderemos compreender como esses fatores realmente interagem com a RNA polimerase. Esses estudos estruturais poderão trazer benefícios práticos também. Se pudermos, por exemplo, identificar diferenças na maneira com a qual as polimerases humanas e as de procariontes interagem com o DNA ou aos fatores de transcrição associados, poderemos desenvolver antibióticos que inibam a transcrição especificamente em patógenos. Uma outra possibilidade seria identificar drogas que inibam a ligação de fatores de

transcrição que induzem crescimento celular à RNA polimerase II, já que esses fatores representam alvos potenciais para terapias para o tratamento de câncer.

Nota

1. Na área de Bioquímica, é bastante comum denominar de *dalton* a unidade de massa atômica (u).

Bettina Malnic (bmalnic@quim.iq.usp.br), bacharel em Ciências Biológicas e doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela USP, realizou estágio de pós-doutorado na Universidade de Harvard e é docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, em São Paulo, onde é responsável pelo Laboratório de Neurociência Molecular.

Para saber mais

BOEGER, H.; BUSHNELL, D.A.; DAVIS, R.; GRIESENBECK, J.; LORCH, Y.; STRATTAN, J.S.; WESTOVER, K.D. e KORNBERG, R.D. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters*, v. 579, p. 899-903, 2005.

CRAMER, P.; BUSHNELL, D.A. e KORNBERG, R.D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, v. 292, p. 1863-1876, 2001.

GNATT, A.L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D.A. e KORNBERG, R.D. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at a 3.3 angstrom resolution. *Science*, v. 292, p. 1876-1882, 2001.

KORNBERG, R.D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, v. 184, p. 868-871, 1974.

KORNBERG, R.D. e LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.

Cell, v. 98, p. 285-294, 1999.

KORNBERG, R.D. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 30, p. 235-239, 2005.

KURAS, L.; BORGGREFE, T. e KORNBERG, R.D. Association of the mediator complex with enhancers of active genes. *PNAS*, v. 100, p. 13887-13891, 2003.

Na Internet

<http://nobelprize.org>

Abstract: *Nobel Prize in Chemistry 2006: Structural Mechanisms of Eukaryotic Gene Transcription* – The Nobel Prize in Chemistry 2006 was awarded to Roger Kornberg for his fundamental studies concerning how the information stored in genes is copied into messenger RNA. This article describes how Kornberg solved the protein structure of the yeast RNA polymerase II as well as his other contributions towards the understanding of the transcription process in eukaryotes.

Keywords: genetic transcription, RNA polymerase, mediator, eukaryotes, Nobel prize

Nota

Química Nova na Escola lança mais um produto

Estamos lançando, no primeiro semestre de 2007, o *DVD Química Nova na Escola*. Ele faz parte de um conjunto de iniciativas que remontam ao início de 2000, quando publicamos a primeira fita de vídeo e os primeiros *Cadernos Temáticos de QNEsc*, dentro do projeto “Recursos Multimídia para o Ensino de Química e de Ciências”. Neste momento, incluímos doze programas de TV, totalizando cerca de quatro horas de produção audiovisual, que visam subsidiar a formação e a atuação dos pro-

fessores de Química e de Ciências nas salas de aula. Estão incluídos no *DVD QNEsc*, quatro programas de TV lançados em formato VHS e mais 8 programas, todos eles pautados nos temas abordados nos seis *Cadernos Temáticos de QNEsc*. A utilização de recursos audiovisuais em sala de aula está passando por uma revolução sem precedentes, em razão do fenômeno da convergência de mídia e da expansão da rede mundial de computadores e de sua capacidade de difundir dados com velocidade cada vez maior. É neste sentido que os professores de Química devem se manter atentos e moti-

vados para desenvolver técnicas de uso mais dinâmicas e atuais das produções audiovisuais em sala de aula. Neste número, *Química Nova na Escola* publica um artigo (vide p. 8) que discute e propõe formas de uso de produções audiovisuais em sala de aula, tomando como exemplo um dos programas que fará parte do *DVD QNEsc*. Comece desde já a se inteirar desta discussão e não deixe de assinar a Revista em 2007 para receber gratuitamente o *DVD Química Nova na Escola*.

(Marcelo Giordan – FE-USP)