

ELS PREMIS NOBEL

DE L'ANY 2006

SOBRE EL PREMI NOBEL DE QUÍMICA

CONCEDIT A

ROGER D. KORNBERG,

PER JORDI BERNUÉS MARTÍNEZ,

INVESTIGADOR DE L'INSTITUT DE BIOLOGIA

MOLECULAR DE BARCELONA (CSIC)

LES INTIMITATS DE LA TRANSCRIPCIÓ EUCARIOTA

RESUM

El Premi Nobel de Química 2006 ha estat concedit en solitari a Roger D. Kornberg. Els seus treballs han adreçat el problema de la transcripció des d'un enfocament estructural i han contribuït decisivament a l'esclariment dels mecanismes de la transcripció eucariota amb la RNA-polimerasa II. A més, també han portat al descobriment d'un nou factor de transcripció general.

PARAULES CLAU: transcripció eucariota, RNA-polimerasa II, estructura de complexos proteics, mecanisme d'acció, llevat.

34

ABSTRACT

The Nobel Prize in Chemistry 2006 has been awarded to Roger D. Kornberg. His work has addressed the transcription problem from a structural point of view and has decisively contributed to the clarification of the mechanisms that operate in eukaryotic transcription with RNA polymerase II. In addition, it has also led to the discovery of a new general transcription factor.

KEY WORDS: eukaryotic transcription, RNA polymerase II, structure of protein complexes, mechanism of action, yeast.

El Premi Nobel de Química 2006 ha estat concedit en solitari a Roger D. Kornberg (figura 1) per les seves aportacions al coneixement dels mecanismes de la transcripció eucariota. Ja l'any 1959, el seu pare, Arthur Kornberg, rebia el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina per la seva contribució al desxiframent

del codi genètic i l'aïllament i caracterització de la DNA-polimerasa bacteriana. És la sisena vegada que un pare i un fill han rebut, tots dos, sengles premis Nobel.

UNA BREU INTRODUCCIÓ A LA TRANSCRIPCIÓ EUCARIOTA

La transcripció és el procés pel qual la informació genètica continguda en un fragment de DNA (gen) del seu genoma es copia a RNA amb alta fidelitat. L'enzim responsable d'aquesta activitat és una RNA-polimerasa DNA dependent. Aquest RNA «primerenc» serà posteriorment processat de diverses maneres segons els casos i finalment serà emprat per a la formació de complexos ribonucleoproteics (com ara els ribosomes), o bé es farà servir com a motllo per a la seva traducció a proteïna mitjançant els ribosomes. En organismes procariotes tota la transcripció la realitza una única RNA-polimerasa. En canvi, en els eucariotes la transcripció està repartida entre tres RNA-polimerases diferents, anomenades I, II i III. Cadascuna transcriu un conjunt de gens discret sense que mai no hi hagi cap ambigüïtat. Així, la RNA-pol I només transcriu RNA ribosòmics i es localitza únicament al nucleol, la RNA-pol III només transcriu RNA de mida petita (tRNA, alguns UsnRNA i RNA

35

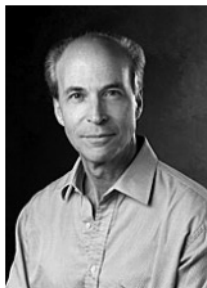


FIGURA 1. Roger D. Kornberg. Copyright © The Nobel Foundation.

vírics, etc.) que mai no donaran lloc a proteïna i, finalment, la RNA-pol II és l'única que transcriu gens que seran traduïts a proteïnes, tot i que també transcriu d'altres RNA petits que no donaran lloc a proteïnes. Deixant una mica de banda com té lloc aquest repartiment de l'especificitat de gens transcrits en cada cas, hi ha un fet que resulta sorprenent tot d'una: cap de les tres RNA-polimerases no és capaç d'identificar la regió del genoma que ha de transcriure; són «cegues» a la seqüència del DNA. De fet, aquest reconeixement es realitza a través d'un seguit de «factors de transcripció» que són essencialment entitats proteiques (que van des de polipèptids fins a grans oligòmers de proteïnes) capaces d'identificar les instruccions de transcripció que estan escrites i codificades en una certa regió de control de l'expressió gènica que anomenem *promotora*. Un factor de transcripció és aquell que és necessari perquè es doni la transcripció (a més a més de la RNA-polimerasa i el motllo de DNA). Si ho és per a tots els gens transcrits per una polimerasa, parlarem de *factor general de transcripció* (GTF). Entre aquests, n'hi ha alguns que són capaços d'identificar el lloc on ha de ser portada la RNA-polimerasa II i fins i tot de dictar a quin lloc precís ha d'iniciar-se la transcripció. Tot això és cert per a les tres RNA-polimerases eucariotes. A partir d'aquí ja considerarem només el cas de la RNA-polimerasa II i hi entrarem més en detall.

La manera com arriba la RNA-polimerasa II al promotor del gen que s'ha d'expressar en cada cas és en gran mesura encara desconeguda. Però el que succeeix un cop feta aquesta selecció ja és força més ben conegut. A la transcripció¹ podem distingir quatre fases (figura 2):

— Preiniciació: els factors de transcripció reconeixen el promotor i es carrega la RNA-pol II. La maquinària de transcripció general reconeix els senyals específics del promotor i

1. ORPHANIDES *et al.* (1996); ROEDER (1996); NIKOLOV i BURLEY (1997).

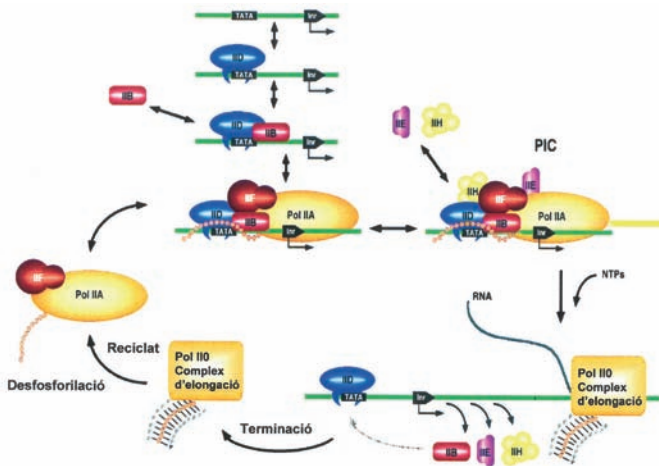


FIGURA 2. Esquema general del cicle de la transcripció amb RNA-polimerasa II segons Nikolov i Burley (1997). S'hi indiquen els diversos factors de transcripció generals. L'estructura nucleosòmica del promotor s'ha omès per a simplificar. (Reproduït amb permís de l'Acadèmia Nacional de Ciències dels Estats Units.)

s'acobla el complex de transcripció al voltant del lloc d'inici de la transcripció.

— Iniciació: s'obre la doble cadena de DNA al voltant del lloc d'inici de la transcripció i es forma la bombolla de transcripció. Tenen lloc un seguit de cicles abortius on es fan petits RNA que contenen entre 5 i 10 enllaços fosfodièster i que són rebutjats.

— Elongació: a cavall entre la fase anterior i aquesta es produeix una transició (associada a una hiperfosforilació de la RNA-pol II), de tal manera que en un cert moment l'RNA que es polimeritza supera els 10 nucleòtids i és llavors quan es dona per correcte el procés i la RNA-polimerasa pateix un seguit de canvis que la porten a alliberar-se del complex de transcripció i del seu ancoratge al promotor (*promoter clearance*).

En aquest moment, la RNA-pol II assoleix la seva capacitat catalítica màxima i copia a RNA el DNA motllo a uns 2.000 nt/min amb alta fidelitat. Si per algun motiu la RNA-pol II s'atura (per exemple, per dany en el DNA motllo), entra en joc el sistema de reparació associat a la transcripció. Si l'aturada és prolongada, llavors la RNA-pol II dóna per acabada la síntesi i es produeix una transcripció abortiva.

— Terminació: quan la RNA-pol II arriba a la fi de la unitat a transcriure, abandona el DNA de manera controlada i a través de certes modificacions (sobretot per desfosforilació) es recicla per entrar en un nou cicle de transcripció.

Aquestes fases són dutes a terme per tot un seguit de factors generals de transcripció que reconeixen el promotor, capten la RNA-pol II adient i la posicionen convenientment, seleccionen el lloc precís d'inici de la transcripció, obren el DNA en el lloc adient per a generar la bombolla de transcripció i duen a terme un seguit d'accions enzimàtiques encaminades a controlar la correcció de tot el sistema, a integrar la informació que pot venir de més enllà del punt on es forma el complex de transcripció (per exemple, els activadors, que poden actuar a una distància considerable), però també l'associada a altres processos que tenen lloc alhora (com ara el processament i la maduració de l'RNA naixent), així com la que ve del complex (si és correcta s'allibera la RNA-pol II dels factors del complex; si és incorrecta, cal tornar a començar). I tot això perquè la RNA-polimerasa II no es pot permetre errades que podrien comprometre la supervivència de la cèl·lula i, en darrera instància, de tot l'organisme. Tota aquesta complexitat sofisticada, així com el caràcter alhora robust i acurat de la transcripció, la podem entendre millor amb un exemple real: la unitat de transcripció de la distrofina humana abasta dos milions de parells de bases que, transcrits a velocitat màxima, requereixen una activitat RNA-polimerasa òptima i sostinguda durant quasi 17 hores per a fer un únic RNA transcrit complet. Que-

da clar que les conseqüències d'una maquinària feble o ineficient serien catastròfiques.

LA CONTRIBUCIÓ DE ROGER KORNBERG A LA TRANSCRIPCIÓ

A començaments dels anys vuitanta i un cop acabada la seva estada postdoctoral a Cambridge (Anglaterra), Roger Kornberg comença un estudi a fons de la transcripció eucariota a través de l'establiment d'un sistema de transcripció *in vitro* lliure de cèl·lules a partir d'extractes de llevat de pa. Aquesta va ser una tria arriscada, ja que en aquells moments ja es disposava d'un sistema similar derivat de cèl·lules humanes i considerablement caracteritzat. Kornberg aposta pel sistema de llevat perquè està convençut que hi ha d'haver una important conservació evolutiva en la maquinària de transcripció general, de manera que les conclusions que s'extreguin del llevat seran extrapolables als humans. D'altra banda, Kornberg ja té decidit que per a resoldre les qüestions pendents en aquells moments cal resoldre les estructures a escala atòmica de la RNA-polimerasa II, així com dels altres factors generals de transcripció, i per això és molt més útil un sistema com el llevat, que permet de fer grans cultius alhora que disposa d'una genètica molt ben coneguda i manipulable. A més a més, poc després el seu genoma serà seqüenciat al 100 %.

39

Així, doncs, Kornberg dedica els primers anys d'estudi a la posada al punt i caracterització del sistema de transcripció *in vitro* de llevat. En aquest temps, confirma a bastament l'existència, en llevat, d'ortòlegs dels factors generals descrits en humans.² Poc després, la reconstitució del sistema de transcripció *in vitro* a partir de proteïnes recombinants i amb l'addició de RNA-pol II altament purificada el porta a descobrir

2. FLANAGAN *et al.* (1990); FLANAGAN *et al.* (1992).

que perquè hi hagi activació *in vitro* manca un component. Mitjançant experiments clàssics de fraccionament d'extractes i complementació *in vitro* identifica l'activitat que faltava i l'anomena *Mediator* ('mediador'), perquè fa de mitjancer necessari per a l'activació.³ Poc després s'identifiquen els seus components i es troba que també existeix en mamífers, que és igualment necessari per a l'activació però que la seva conservació és únicament parcial. Mitjançant tècniques de criomicroscòpia electrònica d'alta resolució i anàlisi d'imatges dona la primera estructura a baixa resolució per al *Mediator*, tant de llevat com de ratolí i humà, on ja s'observa una certa conservació estructural.⁴ D'altra banda, mitjançant experiments d'anàlisi d'expressió gènica global per tècniques de *microarrays* de DNA, es demostra que el requeriment del *Mediator* és pràcticament general en llevats. Això es complementa amb la noció que el *Mediator* és un GTF i que, a més, el cicle de la transcripció en realitat no comença pel reconeixement de la zona més propera a l'inici de la transcripció (entre -30 i +1) sinó més amunt, en un lloc menys precís on un activador s'hi uneix, capta el *Mediator* i aquest a través d'un seguit d'interaccions amb diversos factors acobla el complex de preiniciació amb la RNA-pol II.⁵

En paral·lel, l'equip de Kornberg va treballant i progressant lentament en la producció a gran escala, purificació, cristal·lització i resolució del gran tema: la RNA-pol II. L'enzim conté dotze subunitats i una massa molecular d'uns 0,5 Mda i presenta uns problemes formidables. Finalment, després de deu anys d'intents insatisfactoris però amb petits progressos, s'aconsegueix la cristal·lització d'una RNA-pol II activa però amb només deu subunitats. Tanmateix, els cristalls no difracten els rajos X i no es pot resoldre l'estructura.

3. FLANAGAN *et al.* (1991); KELLEHER III *et al.* (1990).

4. DOTSON *et al.* (2000).

5. KURAS *et al.* (2003); TAKAGI i KORNBERG (2006).

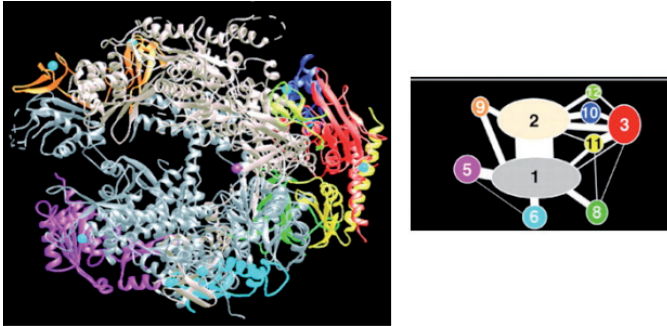


FIGURA 3. Representació de cintes de l'estructura de la RNA-polimerasa II de llevat (10 subunitats) a 2,8 Å de resolució (Cramer *et al.*, 2001). A la dreta s'indica el codi de colors corresponent a cada una de les subunitats, així com llur disposició aproximada. (Reproduït amb permís de l'American Association for the Advancement of Science [AAAS].)

Introdueixen un seguit de canvis en el disseny que van des de la purificació de l'enzim en les seves passes finals en atmosfera inerta per a evitar degradacions, fins a derivatitzacions amb clústers de fins a dotze àtoms de tungstè per a poder resoldre l'anomenat *problema de les fases* (que en una estructura tan enorme era especialment complicat). Fins i tot van haver d'introduir una tècnica d'encongiment dels cristalls primerencs en solucions de polietilenglicol. Així, a partir de cultius de prop de 10.000 litres de llevat finalment resolen a 3 Å l'estructura de la RNA-pol II.⁶ En aquesta estructura s'identifiquen més de 30.000 àtoms i es traçen per primer cop amb considerable detall les cadenes polipeptídiques de les deu subunitats. Poc després, milloren l'estructura, i arriben a una resolució de 2,8 Å (figura 3).⁷

En aquestes primeres estructures, tot i que hi ha alguns dominis que no es poden traçar encara, ja sobresurten dos ele-

6. CRAMER *et al.* (2000).

7. CRAMER *et al.* (2001).

ments estructurals importants, els *jaws* o mandíbules, que ja es va entreveure que probablement posicionarien el DNA. Al fons d'aquestes estructures i entre elles es van proposar els llocs d'unió per a l'híbrid RNA:DNA i l'RNA. Igualment es van notar diverses cavitats i porus per on podrien passar l'RNA, el DNA o l'híbrid i se'n va identificar el centre actiu. Tal com s'havia predit, contenia dos ions metàl·lics, un Mg^{2+} coordinat per tres residus aspartat invariables de la subunitat Rpb1 (D481, D483, D485), que s'identifica com el metall *A*, i un altre ió metàl·lic (l'anomenat *B*) amb una presència relativa molt menor en el cristall, situat a 5,8 Å de l'*A* i coordinat amb tres residus àcids invariables de les dues subunitats grans (D481 de Rpb1, i E836 i D837 de Rpb2). Una característica que es va observar de seguida era que hi havia zones d'estructura desordenada i que sovint els plegaments observats per a les diferents subunitats no eren independents sinó concertats. D'altra banda, una notable distribució asimètrica de la densitat de càrrega en la superfície de l'enzim generava arreu una càrrega neta molt negativa excepte en l'esclletxa per on es pressuposava que s'hi unien els àcids nucleics, on la densitat era clarament positiva. Això facilitaria la seva aproximació, però el mecanisme no podia ser tan simple, atès que els àcids nucleics havien de tenir una interacció relativament forta amb la proteïna i alhora poder «lliscar» fàcilment per a poder ser copiats a alta velocitat.

Arribats en aquest punt l'estratègia que van seguir Kornberg i el seu grup va ser incloure diverses versions més o menys simples o modificades de complexos RNA-DNA en el cristall que els permetessin resoldre les qüestions plantejades i moltes altres de pendents. Aquesta estratègia va resultar un èxit i va generar tot un seguit de «fotografies» de les diverses fases del procés catalític que han permès a Kornberg i el seu equip plantejar un mecanisme complet del procés de síntesi de l'RNA a escala atòmica.

Primerament van obtenir un nou cristall on van incorporar un heterodúplex de RNA:DNA de 9 pb dins un fragment de

DNA més llarg.⁸ Així van poder observar com l'heterodúplex de RNA:DNA s'estenia des del centre actiu i en angle recte respecte al DNA dúplex entrant, de manera que l'extrem 3' de l'RNA quedava posicionat al lloc d'addició de NTP. Aquest lloc era justament sobre un dels porus per on entren els rNTP i surt per *backtracking* (marxa enrere) l'RNA que es descarta en la iniciació abortiva. Per l'altre extrem de l'RNA el residu a 5' també es troba molt proper a una altra cova (la de sortida natural de l'RNA). A causa de la interacció amb els àcids nucleics es va notar que un domini de les mandíbules (*jaws*), l'anomenat *clamp*, es tancava sobre l'híbrid girant 30° i desplaçant-se uns 30 Å per atrapar-lo. A la base de la pinça, una sèrie de canvis s'encaminen a generar un lloc d'unió òptim per a l'híbrid. De fet, aquest híbrid adopta una estructura intermèdia entre la forma B- del DNA, de doble cadena, i la A- de l'RNA, de doble cadena, de tal manera que el fa clarament identificable. S'hi identifica un domini (*zipper*) que mantindria obertes les cadenes de DNA per a

43

permetre la polimerització i se suggereix que altres dominis també hi poden prendre part. Però sobretot en aquesta estructura s'hi observen tres característiques molt importants:

I) Els contactes es donen quasi exclusivament entre les cadenes laterals de l'enzim i l'esquelet sucre-fosfat de l'híbrid. Hi ha un ampli espai entre la polimerasa i el solc major de l'híbrid i, per tant, no hi ha cap especificitat de seqüència.

II) Diverses cadenes laterals interaccionen simultàniament amb dos grups fosfat adjacents de l'esquelet sucre-fosfat. Això redueix molt la barrera d'activació i facilita la translocació (el lliscament).

III) Fins a vint cadenes laterals carregades de l'enzim formen una segona capa al voltant de l'híbrid, a una distància d'entre 4 i 8 Å, que atreu l'híbrid sense limitar-ne la mobilitat sobre la superfície de l'enzim.

8. GNATT *et al.* (2001).

El pas següent era intentar veure la RNA-polimerasa en acció, en transcripció. Per a això, dissenyen un heterodúplex com abans, però un cop acoblat el complex donen a la RNA-polimerasa 3'-deoxiATP, un rNTP terminador (la polimerització no pot progressar més enllà d'afegir un nucleòtid per manca del $-OH$ 3'), i deixen que s'incorpori a l'híbrid RNA:DNA que fa d'encebador, ja que el primer lloc lliure conté un residu timidina en el DNA. D'aquesta manera, si el nucleòtid s'incorpora l'enzim és actiu. Però, a més, plantegen la incorporació del següent nucleòtid mitjançant la incubació del cristall o bé amb Mg-UTP (correcte) o Mg-ATP (incorrecte). Amb aquest disseny observen que la polimerasa incorpora l'NTP terminador i que per tant és en un estat actiu.⁹ Quan el nucleòtid següent és el correcte (UTP) el troben aparellat correctament i interaccionant amb el metall A pel fosfat α i, ara sí que amb claredat, amb l'ió B pels fosfats β i γ . Si és incorrecte (ATP), no es troba aparellat i només interacciona amb el metall B pels fosfats β i γ (figura 4). Això defineix els llocs A

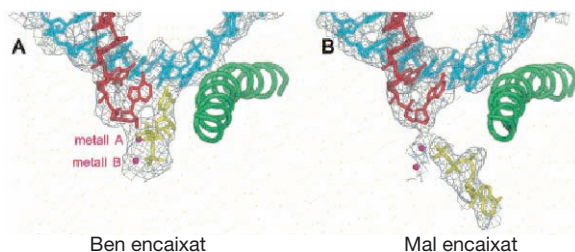
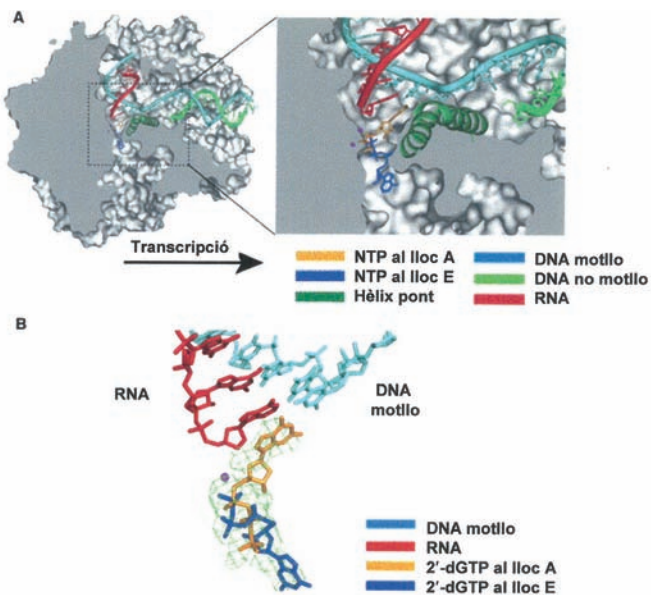


FIGURA 4. Selecció de l'NTP correcte (Westover *et al.*, 2004a). Detall de la regió on es catalitza l'addició dels NTP a l'RNA naixent en presència de l'NTP correcte (A) situat en el lloc d'addició (o A) i de l'incorrecte (B) situat en el lloc d'entrada (o E). De color blau, el DNA; vermell, l'RNA, i groc, els NTP. Els ions Mg^{2+} es representen amb esferes magenta. De color verd, la *bridge helix*.

9. WESTOVER *et al.* (2004a).

(d'addició) i *E* (d'entrada) respectivament, que en solapar-se no poden estar ocupats simultàniament. En funció d'aquesta estructura i d'altres, el mecanisme de selecció dels NTP que es proposa passa per una primera interacció al lloc *E* per a tots els NTP que després comporta una rotació amb vista a establir l'aparellament de les bases amb el DNA motllo. Si aquest és satisfactori, l'NTP passa al lloc *A* i queda en posició per a la catàlisi; si no, torna a girar i resta al lloc *E* menys estable i lluny de tota possibilitat de ser polimeritzat (figura 5). A més,



45

FIGURA 5. Els llocs d'addició (*A*) i d'entrada (*E*) dels NTP en el complex actiu de la RNA-polimerasa II (Wang *et al.*, 2006). *A*) Es mostra (a l'esquerra) un tall en l'estructura del complex RNA-pol II / DNA / RNA que localitza la regió catalítica, mentre que a la dreta es mostra una ampliació d'aquesta regió. *B*) Es mostra la superposició de les estructures que contenen l'NTP entrant en els llocs *A* i *E*. Observu el solapament dels llocs i la rotació que experimenta l'NTP correcte. (Reproduït amb permís d'Elsevier.)

es mostra que els NTP efectivament entren pel porus 1 i que els RNA abortius surten per aquest mateix porus mitjançant *backtracking*. S'identifica un domini, la *bridge helix*, que a partir de diverses observacions es proposa que oscil·laria entre un estat estès i un d'encongit, de tal manera que amb aquest moviment acompanyaria la translocació dels àcids nucleics.

En un nou co-cristall ara només van incloure un híbrid entre una sola cadena DNA de 14 nt i un RNA de 9 nt. Com en l'estructura anterior, van fer polimeritzar un residu incubant el cristall amb 3'deoxy-ATP. En aquesta ocasió el complex va aparèixer en estat translocat, deixant lliure el lloc d'addició amb la *bridge helix* encongada (figu-

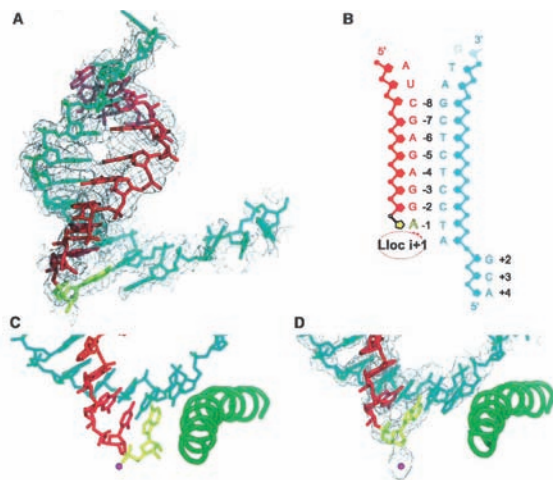
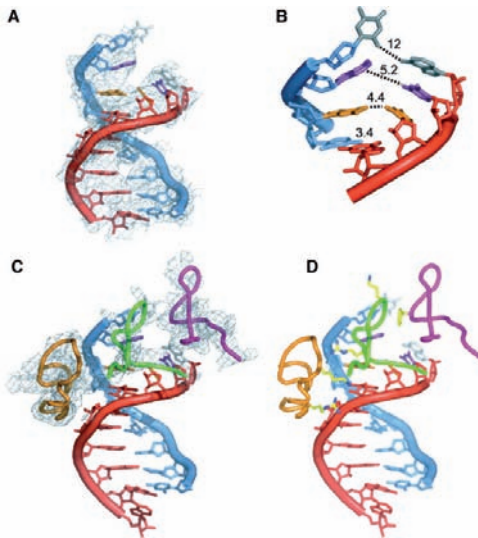


FIGURA 6. Estructura dels àcids nucleics en el complex DNA / RNA / RNA-polimerasa II actiu en transcripció (Westover *et al.*, 2004b). *A*) Estructura de l'híbrid DNA:RNA. *B*) Esquema de la composició de l'híbrid DNA:RNA emprat. *C*) i *D*) Comparació de les estructures: en el cas que el lloc d'addició es troba ocupat (*C*) i en el cas que el lloc d'addició es troba lliure (estat posttranslacional) (*D*). Observen el desplaçament de la *bridge helix*. El codi de colors és el descrit a la figura 3. (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

ra 6).¹⁰ Però el més notable era que, per primer cop, es visualitzava la separació de les cadenes de l'híbrid i que apareixien ara ben definits tres dominis nous anomenats *lid*, *rudder* i *fork loop 1*. *Lid* fa de falca entre les cadenes de RNA i DNA inserint de manera perpendicular a les bases la cadena lateral de la seva F252, de tal manera que a -10 nucleòtids de distància del centre actiu separa els àcids nucleics allhora que interacciona només amb l'RNA entre -8 i -10 (figura 7). Així estableix una barrera que manté separat l'RNA del DNA i el



47

FIGURA 7. La separació del transcrit de l'RNA del DNA motllo (Westover *et al.*, 2004b). *A*) L'híbrid DNA:RNA (de color blau, el DNA, i vermell, l'RNA). *B*) Detall de l'híbrid DNA:RNA on es pot observar com l'extrem 5' de l'RNA s'allunya progressivament de la cadena de DNA. Els nombres indiquen la distància entre bases en Å. *C*) i *D*) Com l'*A* però amb els dominis *fork loop 1* (de color taronja), *rudder* (verd) i *lid* (magenta) en representació de densitat electrònica (*C*) i d'esquelet de *C* (*D*). (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

10. WESTOVER *et al.* (2004b).

condueix cap a la sortida. Per la seva part, a través de la seva interacció només amb el DNA entre -9 i -11 *rudder* manté el DNA separat i impedeix la reassociació. Finalment, *fork loop 1* l'interacciona amb l'híbrid per tal d'impedir la separació de cadenes més enllà de la posició -8. *Lid* interacciona amb *rudder* i aquest ho fa amb *fork loop 1*, de manera que les seves interaccions i unes altres amb altres elements proteics generen una estructura en arc que es localitza a la superfície externa. Per sota d'aquest arc es dirigeix l'RNA a través de la xarxa d'interaccions que s'ha descrit, alhora que el DNA surt per sobre de l'arc i s'impedeix així definitivament la reassociació. A partir d'aquest punt, l'RNA naixent pot seguir dos camins possibles sobre la superfície de l'enzim que el protegiran de la degradació per RNAses fins als 25 nt aproximadament, però encara es desconeix quin és el preferit (figura 8).

Recentment la resolució de la catorzena estructura de la RNA-polimerasa ha revelat un aspecte encara no resolt. La RNA-polimerasa II té mil vegades més afinitat per riboNTP que per desoxiriboNTP però fins ara cap dada no ho havia justificat. Introduint un sol canvi en l'NTP, terminador que la polimerasa ha d'incorporar (ara GMPCPP, de fet), i seguint amb l'esquema anterior, va aparèixer clarament delimitat un nou domini, el *trigger loop*.¹¹ Aquest domini fa una extensa xarxa d'interaccions amb l'rNTP que fa que l'NTP correcte es posicioni de manera exquisida d'acord amb l'aparellament de bases amb el DNA motllo. A més, aquesta selecció va associada a la seva polimerització, ja que la H1056 del *trigger loop* és la que sembla que catalitza en darrer terme l'atac nucleofílic sobre el fosfat β i la pirofosforilisi de l'NTP (figura 9). Kornberg i col·laboradors observen que en presència d'un NTP incorrecte (ja sia per aparellament o perquè és de NTP) el *trigger loop* no s'estructura i no es pot traçar en el cristall. Així, doncs,

11. WANG *et al.* (2006).

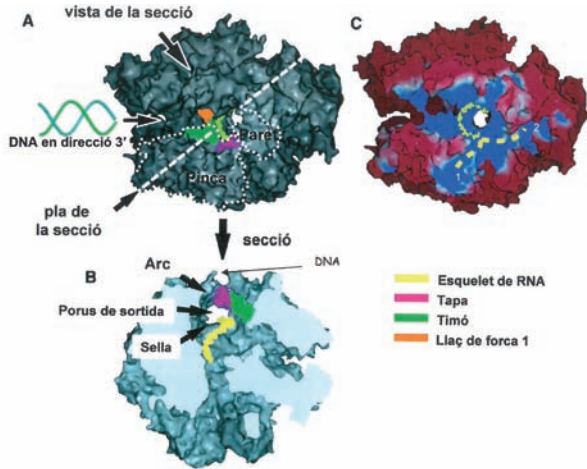


FIGURA 8. El camí de sortida de l'RNA del complex de transcripció (Westover *et al.*, 2004b). *A*) Representació de la superfície del complex de transcripció. *B*) Tall de l'estructura seguint el pla indicat en *A* per a mostrar més clarament l'arc i el porus de sortida de l'RNA. Els dominis implicats en la formació de l'arc s'indiquen a l'estructura i s'especificuen a la llegenda del codi de colors. *C*) Representació de la superfície del complex de transcripció on s'indiquen els dos possibles camins que pot recórrer l'RNA naixent (1 i 2) i les densitats de càrrega superficial negativa (de color vermell) i positiva (blau). (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

49

el procés de còpia de DNA a RNA es basa essencialment en tot un seguit d'interaccions mútues que fan que la RNA-polimerasa adopti una estructura altament sofisticada però robusta i summament eficient.

Mentre anava fonamentant sòlidament les bases de la transcripció amb la RNA-pol II a escala atòmica, Roger Kornberg no deixava de banda altres factors que també eren necessaris i fins i tot imprescindibles. En la seva configuració activa més mínima se sabia que, a part de TBP (proteïna d'unió a la caixa TATA) que reconeix el DNA (l'element TATA, seqüència de DNA freqüent als promotors, que nuclea el procés) i la

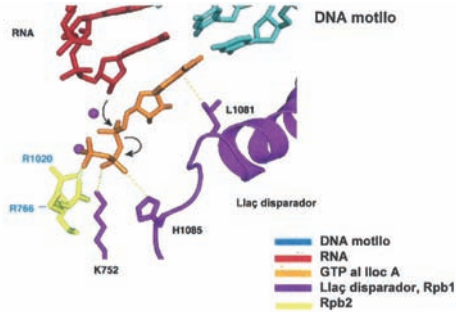


FIGURA 9. Mecanisme de catàlisi proposat i paper de la histidina 1085 en la formació de l'enllaç fosfodièster (Wang *et al.*, 2006). Les fletxes negres indiquen el mecanisme d'atac nucleofílic i el trencament de l'enllaç fosfoanhídrid. (Reproduït amb permís d'Elsevier.)

50

RNA-pol II, un altre factor, TFIIIB (factor de la transcripció per RNA-polimerasa II), era imprescindible perquè sobre un DNA amb tensió helicoidal ja hi pogués haver transcripció *in vitro*. Se sabia que TFIIIB intervenia en la selecció del lloc d'inici de transcripció i que interaccionava amb TBP i RNA-pol II. Quan Kornberg i col·laboradors cristallitzen la RNA-pol II amb TFIIIB observen que el domini N-ter (N-terminal) de TFIIIB interacciona en el camí de sortida de l'RNA naixent i que inse-reix un domini, *dit de zinc*, o *Zinkfinger*, en el mateix centre actiu de la RNA-pol II (figura 10).¹² D'aquesta manera pot estabilitzar el complex en interaccionar també amb el DNA i TBP, marcar el lloc d'inici de la transcripció i interferir en la sortida de l'RNA naixent (figura 11). Es planteja el model se-gons el qual TFIIIB és una mena de darrer control de qualitat, de tal manera que fins a 10 nt de RNA s'estableix una compe-tició entre progressar o abandonar la polimerització que inclou un moviment d'obertura dels extrems i fusió de l'híbrid inicialment per agitació tèrmica que, en cas de ser fixat per la

12. BUSHNELL *et al.* (2004).

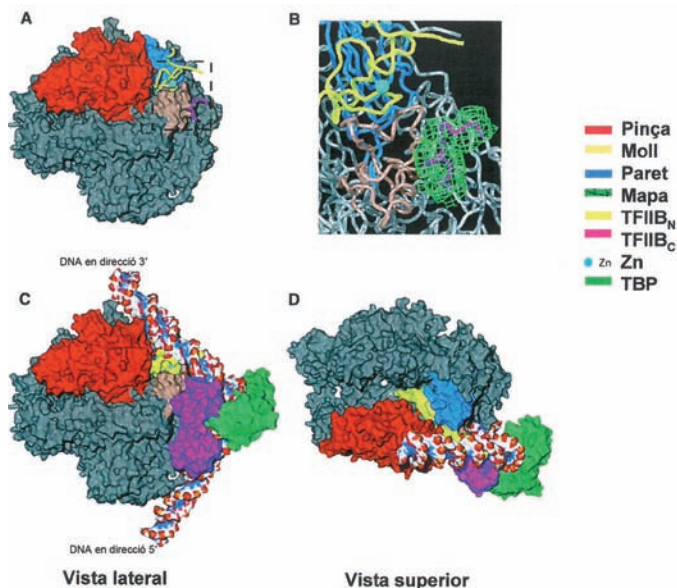


FIGURA 10. Estructura del complex TFIIIB-RNA-polimerasa II (Bushnell *et al.*, 2004). *A*) Vista lateral del complex. *B*) Detall de la part *A* emmarcat pel quadret. *C*) i *D*) Dues vistes del complex obtingut de la combinació teòrica (*docking*, 'engalzament') amb el complex TBP:TATAboxDNA resolt per d'altres. (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

xarxa d'interaccions de *rudder*, *lid* i *fork loop 1*, desplaça TFIIIB i permet seguir la polimerització més enllà de 10 nt. A partir d'aquest punt no hi ha retorn, TFIIIB perd la capacitat de bloqueig i la RNA-polimerasa passa a desfer-se del complex d'iniciació i del promotor (*promoter clearance*) per a entrar en la fase d'elongació processiva. En absència de tensió superhelicoidal, els altres factors són necessaris per a generar la bombolla de transcripció. En presència de superhelicitat negativa són dispensables perquè l'estabilitat de la doble hèlix ja està prou compromesa per a permetre la separació transitòria de les cadenes.

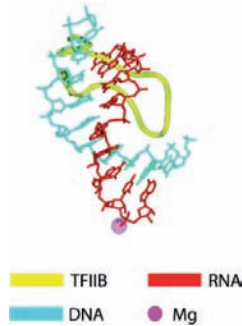


FIGURA 11. La interacció de TFIIB amb el DNA motllo i l'RNA transcrit a través del seu domini *B finger* (Bushnell *et al.*, 2004). (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

52

Kornberg i col·laboradors segueixen generant noves estructures de moment a baixa resolució dels altres GTF (TFIIF, TFIIH, etc.) sols o en complex amb la RNA-pol II amb vista a obtenir una imatge general completa i detallada dels esdeveniments que tenen lloc durant la transcripció.¹³ A la figura 12 es mostra un model estructural del complex d'iniciació que han proposat però que encara és incomplet. Per acabar, només ens resta indicar que també s'ha aconseguit la cristallització i resolució de la RNA-pol II completa (12 subunitats) de llevat.¹⁴

Ara que la via oberta per Roger Kornberg ha demostrat tot el seu potencial, cal esperar que en un futur proper surtin a la llum noves i interessants estructures que ens ajudin en la comprensió d'aquest pas tan essencial per a l'existència dels éssers vius en tota la seva complexitat que és la transcripció.

13. CHANG i KORNBERG (2000); CHUNG *et al.* (2003); DAVIS *et al.* (2002).
 14. BUSHNELL i KORNBERG (2003).

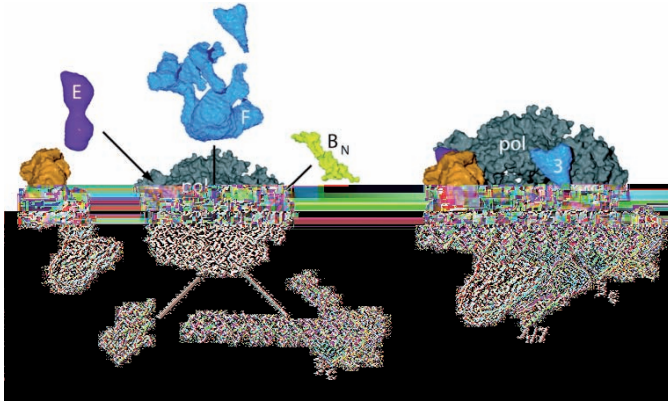


FIGURA 12. Model estructural per al complex d'iniciació de la transcripció (Bushnell *et al.*, 2004). Es combinen les estructures resoltes cristal·logràficament amb les resoltes amb microscòpia electrònica d'alta resolució en tres dimensions. (Reproduït amb permís de l'AAAS.)

BIBLIOGRAFIA

- BUSHNELL, D. A.; KORNBERG, R. D. (2003). «Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1 Å resolution: implications for the inhibition of transcription». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, p. 6969-6973.
- BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D. D.; DAVIS, R. E.; KORNBERG, R. D. (2004). «Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Ångstroms». *Science*, núm. 303, p. 983-988.
- CHANG, W.-H.; KORNBERG, R. D. (2000). «Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIID». *Cell*, vol. 102, p. 609-613.
- CHUNG, W.-H.; CRAIGHEAD, J. L.; CHANG, W.-H.; EZEOKONKWO, C.; BAREKET-SAMISH, A.; KORNBERG, R. D.; ASTURIAS, F. J. (2003). «RNA polymerase II/TFIID structure and con-

- served organization of the initiation complex». *Molecular Cell*, vol. 12, p. 1003-1013.
- CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A.; FU, M.-J.; GNATT, A. L.; MAIER-DAVIS, B.; THOMPSON, N. E.; BURGESS, R. R.; EDWARDS, A. M.; DAVID, P. R.; KORNBERG, R. D. (2000). «Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism». *Science*, vol. 288, p. 640-649.
- CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A.; KORNBERG, R. D. (2001). «Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution». *Science*, vol. 292, p. 1863-1876.
- DAVIS, J. A.; TAKAGI, Y.; KORNBERG, R. D.; ASTURIAS, F. J. (2002). «Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: mediator conformation and polymerase interaction». *Molecular Cell*, vol. 10, p. 409-415.
- DOTSON, M. R.; YUAN, C. X.; ROEDER, R. G.; MYERS, L. C.; GUSTAFSSON, C. M.; JIANG, Y. W.; LI, Y.; KORNBERG, R. D.; ASTURIAS, F. J. (2000). «Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 97, p. 14307-14310.
- FLANAGAN, P. M.; KELLEHER III, R. J.; FEAVER, W. J.; LUE, N. F.; LAPOINTE, J. W.; KORNBERG, R. D. (1990). «Resolution of factors required for the initiation of transcription by yeast RNA polymerase II». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, p. 11105-11107.
- FLANAGAN, P. M.; KELLEHER III, R. J.; SAYRE, M. H.; TSHOCHNER, H.; KORNBERG, R. D. (1991). «A mediator for activation of RNA polymerase II transcription in vitro». *Nature*, vol. 350, p. 436-438.
- (1992). «Simple derivation of TFIID-dependent RNA polymerase II transcription systems from *Schizosaccharomyces pombe* and other organisms, and factors required for transcriptional activation». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 89, p. 7659-7663.

- GNATT, A. L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D. A.; KORNBERG, R. D. (2001). «Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution». *Science*, vol. 292, p. 1876-1882.
- KELLEHER III, R. J.; FLANAGAN, P. M.; KORNBERG, R. D. (1990). «A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus». *Cell*, vol. 61, p. 1209-1215.
- KURAS, L.; BORGREFFE, T.; KORNBERG, R. D. (2003). «Association of the Mediator complex with enhancers of active genes». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 100, p. 13887-13891.
- NIKOLOV, D. B.; BURLEY, S. K. (1997). «RNA polymerase II transcription initiation: a structural view». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 15-22.
- ORPHANIDES, G.; LAGRANGE, T.; REINGERG, D. (1996). «The general transcription factors of RNA polymerase II». *Genes & Development*, vol. 10, p. 2657-2683.
- ROEDER, R. G. (1996). «The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II». *Trends in Biochemistry Science*, vol. 21, p. 327-335.
- TAKAGI, Y.; KORNBERG, R. D. (2006). «Mediator as a general transcription factor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, p. 80-89.
- WANG, D.; BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D.; KAPLAN, C. D.; KORNBERG, R. D. (2006). «Structural basis of transcription: role of trigger loop in substrate specificity and catalysis». *Cell*, vol. 127, p. 941-954.
- WESTOVER, K. D.; BUSHNELL, D. A.; KORNBERG, R. D. (2004a). «Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center». *Cell*, vol. 119, p. 481-489.
- (2004b). «Structural basis of transcription: separation of