

REPLICAÇÃO DO DNA E TRANSCRIÇÃO

META

Apresentar os processos de replicação e transcrição do material genético e fornecer as informações necessárias para o estudante compreender a base molecular da hereditariedade e da expressão gênica.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:

- saber como ocorre o processo de replicação do DNA ao nível molecular e relacionar esse evento aos mecanismos de reprodução e formação de organismos multicelulares;
- compreender como se dá a passagem da informação contida no DNA para as moléculas de RNA pelo processo de transcrição;
- entender a relação entre a transcrição e a expressão gênica;
- conhecer a base comum da replicação e da transcrição em procariotos e eucariotos, bem como entender as particularidades relacionadas a esses dois grupos.

PRÉ-REQUISITOS

Conhecimento sobre a estrutura do material genético.

INTRODUÇÃO

Prezado estudante, nas aulas da disciplina de Biologia Celular certamente você deve ter estudado as características celulares, bem como a mitose e a meiose, mecanismos de divisão celular. Também deve ter visto que existe desde organismos que são formados por uma única célula, tal como as bactérias, até organismos multicelulares, como o próprio homem. Estima-se que um homem adulto tenha cerca de 65.000.000.000.000 (sessenta e cinco trilhões) de células, sendo a maior parte delas, células somáticas que formam juntas os diversos tecidos e órgãos que compõem o organismo. Nessa aula veremos os mecanismos básicos moleculares pelos quais uma célula gera linhagens inteiras de células geneticamente idênticas, por meio de um processo de replicação altamente preciso, ou então como utiliza esse mesmo mecanismo para gerar descendentes, tanto de forma assexuada quando por mecanismos de reprodução sexuada. Entretanto, mesmo sendo geneticamente idênticas, os nossos trilhões de células somáticas não são funcionalmente, nem morfológicamente, idênticas. Então, como é possível gerar diversidade e especificidade utilizando o mesmo material genético obtido por meio da replicação? Parte dessa resposta está no processo de transcrição, que diz respeito ao modo pelo qual as células transmitem às moléculas de mRNA informações específicas que serão utilizadas em um processo posterior que dirige a produção das proteínas, mecanismos associados ao código genético e ao processo de tradução que serão abordados no próximo capítulo. Em resumo, veremos como os genomas são conservados por meio da replicação que cria novas cópias genéticas e como as informações genéticas contidas no genoma são utilizadas por meio da transcrição dos genes.

REPLICAÇÃO

A replicação do material genético, em procariontes e eucariontes, é realizada com grande precisão e velocidade. Uma bactéria consegue adicionar 30.000 nucleotídeos por minuto quando produz um novo filamento de DNA, com uma margem média de um nucleotídeo adicionado errado para cada bilhão de nucleotídeos incorporados. Desse modo, quando dizemos que gêmeos univitelinos são geneticamente idênticos, de fato eles devem ser idênticos, uma vez que a sua formação utilizou exatamente os mesmos conjuntos haploides, paterno e materno, excetuando apenas as células que poderão ter mudado devido a erros de replicação ou outras mutações (que você verá na aula 09).



Figura 1- Gêmeos univitelinos: as gêmeas idênticas Betty Richards e Jenny Pelmore numa foto de infância e, à direita, comemorando seus 101 anos de vida em Manchester, na Inglaterra. (Fonte: <http://www.telegraph.co.uk>).

Os mecanismos básicos da replicação são atualmente bem conhecidos, mas alguns detalhes ainda precisam ser elucidados, como quase tudo em Biologia. Iniciaremos essa aula, examinando como o DNA se replica, enfatizando os mecanismos que garantem a precisão desse processo.

O EXPERIMENTO DE MESELSON E STAHL (1958)

Quanto James Watson e Francis Crick publicaram seu trabalho na Nature em 1953 elucidando a estrutura do DNA, já havia nesse artigo alguma indicação de que a replicação do DNA seria semi-conservativa, onde a molécula de DNA de fita dupla seria formada por uma fita molde antiga e uma fita nova complementar mas existiam duas outras hipóteses que tratavam do modelo de replicação da molécula de DNA. No modelo conservativo a molécula antiga de fita dupla originaria uma fita dupla completamente nova e no modelo dispersivo, este menos consistente, argumentava-se sobre a possibilidade da fita dupla de DNA ser formada por segmentos de fita antiga e de fita nova intercalados em ambas as fitas que formam a dupla hélice. Esses modelos precisavam ser cientificamente testados e a comprovação de qual modelo estaria correto representou um dos principais desafios científicos imediatamente após a publicação de Watson e Crick sobre a estrutura da dupla hélice.

No ano de 1958 os pesquisadores Matthew Meselson e Franklin Stahl elucidaram a questão por meio de um dos experimentos mais elegantes ao longo da história da biologia. Inicialmente esses pesquisadores precisavam de um modo para distinguir o DNA velho do DNA novo. Para desenvolver esse experimento eles utilizaram linhagens da bactéria *E. coli* cultivadas em meio de cultura. O meio de cultura para o crescimento de bactérias possui nitrogênio como um dos componentes básicos sob a forma de ^{14}N (nitrogênio leve, normal). Meselson e Stahl então cultivaram durante muitas gerações uma linhagem de bactérias *E. coli* utilizando um tipo raro de nitrogênio pesado, o isótopo ^{15}N . Como o DNA apresenta bases ni-

trogenadas, a produção de novas moléculas de DNA durante o crescimento bacteriano em meio de cultura, utilizaria necessariamente o ^{15}N como única fonte de nitrogênio e, como consequência após muitas gerações, todo o DNA bacteriano teria ^{15}N na sua composição. Quando comparadas a moléculas de DNA normais, provenientes de bactérias cultivadas em meio contendo ^{14}N utilizando uma técnica de gradiente de densidade em cloreto de cério (CsCl_2) obtido por centrifugação em alta velocidade, com DNA bacteriano contendo ^{15}N , é possível visualizar facilmente a diferença entre as moléculas das duas linhagens em função da diferença na posição de equilíbrio dos dois tipos após a centrifugação, em que as moléculas contendo ^{15}N formam uma faixa de DNA mais próxima do fundo do tubo de ensaio em função do maior peso molecular do isótopo de nitrogênio (^{15}N), enquanto o DNA contendo nitrogênio normal (^{14}N) após a centrifugação em gradiente de CsCl_2 fica depositado em um ponto de equilíbrio superior ao do obtido pelo nitrogênio pesado. Portanto, a técnica de centrifugação em gradiente de CsCl_2 permite diferenciar facilmente as moléculas de DNA que contenham ^{14}N ou ^{15}N pela diferença de peso molecular.

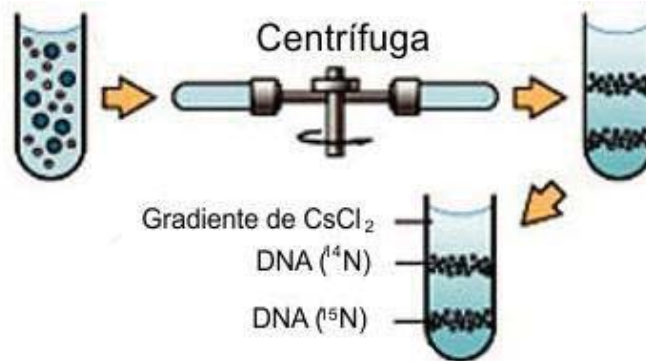
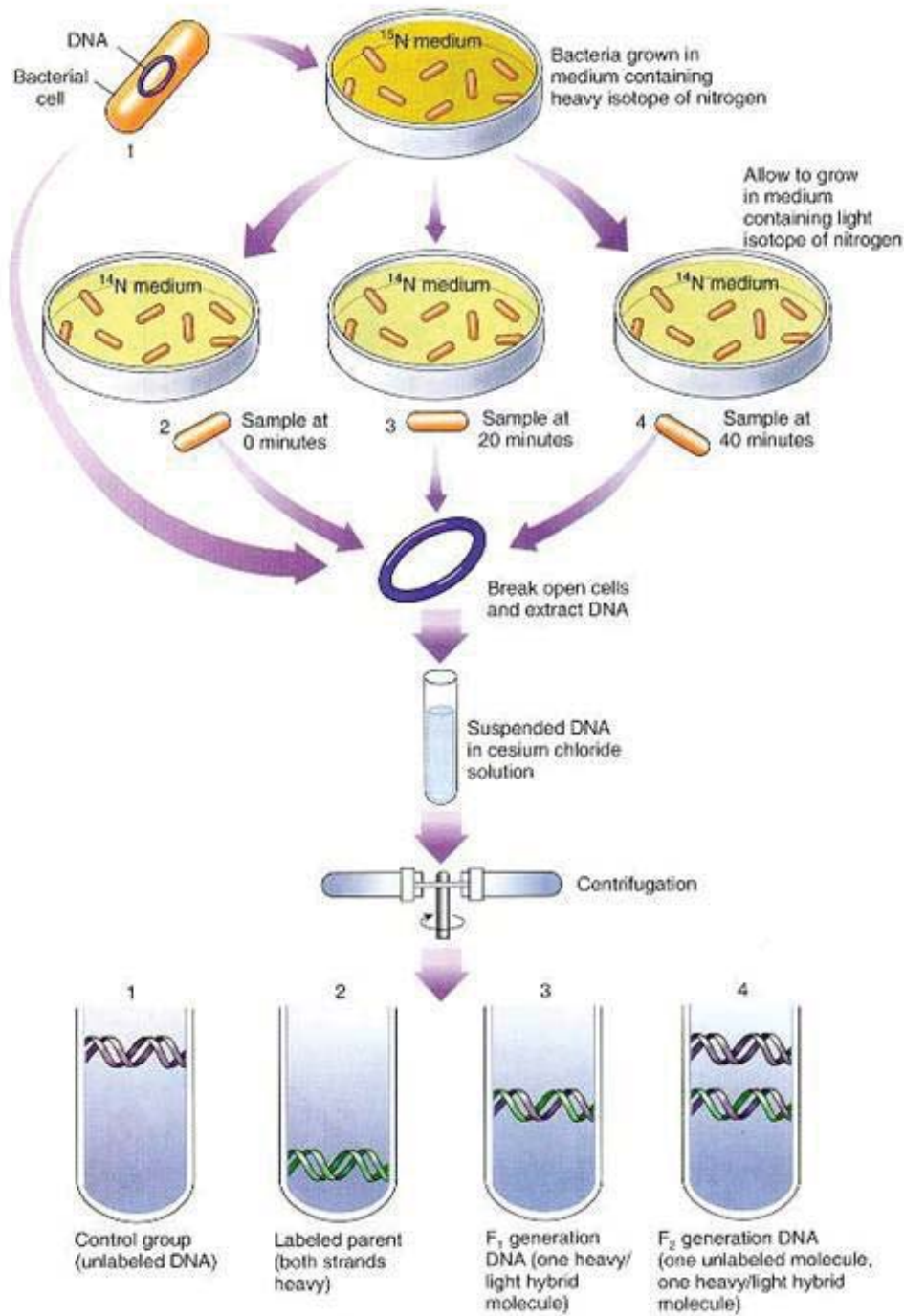


Figura 2- Centrifugação em gradiente de cloreto de cério utilizando DNA pesado e leve.

Após a obtenção da linhagem de *E. coli* com DNA contendo ^{15}N , Meselson & Stahl reservaram uma amostra dessa linhagem e transferiram o restante das bactérias do meio de cultura com ^{15}N para um meio contendo ^{14}N , e separando uma nova amostra de bactérias a cada nova geração, crescida em ^{14}N , a cada 20 minutos. As amostras controle contendo bactérias criadas em ^{14}N e as amostras obtidas do experimento (^{15}N , ^{14}N 20', ^{14}N 40', etc) foram separadas e, após a extração de DNA, as amostras foram submetidas ao gradiente de centrifugação em CsCl_2 . Como seria de se esperar as amostras controle com DNA ^{14}N apresentaram e as amostras contendo ^{15}N apresentaram faixas distintas nas posições esperadas, conforme já demonstrado na figura 2. A amostra da primeira geração nascida em meio de cultura contendo ^{14}N (20') apresentou uma faixa intermediária no gradiente de cloreto de cério e na amostra obtida após 40', existiam duas faixas, uma na posição intermediária e outra na posição referente a faixa ^{14}N , como demonstra a figura 3.



The Meselson-Stahl experiment

Bacterial cells were grown for several generations in a medium containing a heavy isotope of nitrogen (^{15}N) and then were transferred to a new medium containing the normal lighter isotope (^{14}N). At various times thereafter, samples of the bacteria were collected, and their DNA was dissolved in a solution of cesium chloride, which was spun rapidly in a centrifuge.

Figura 3- Experimento de Meselson e Stahl (1958)

O experimento de Meselson e Stahl (1958), portanto, comprovou que a replicação do DNA é semi-conservativa. Esse resultado abriu novos desafios na área de pesquisa, especialmente relacionados a elucidação dos mecanismos moleculares relacionados ao processo de replicação. Algumas perguntas ainda estavam sem resposta naquele momento: Como é iniciado o processo de replicação da fita dupla de DNA? Existe um ponto específico para a origem da replicação? Existe diferença no processo de replicação entre eucariotos e procariotos? Quais são as moléculas envolvidas nesse processo e com elas participam desse processo? Os tópicos a seguir procuram responder a cada uma dessas questões.

ORIGENS DA REPLICAÇÃO

No ano de 1963, estudos auto-radiográficos do cromossomo de *E. coli* mostraram que o cromossomo bacteriano é uma estrutura circular e que o processo de deselicoidização da molécula de DNA e a replicação semi-conservativa eram processos que ocorrem de forma acoplada, quase simultaneamente interpretação dos pesquisadores para as auto-radiografias indicaram também que a replicação tem início em um sítio específico, chamado de origem e ocorre de forma bidirecional ao redor do cromossomo circular, em um modelo denominado círculo rolante.

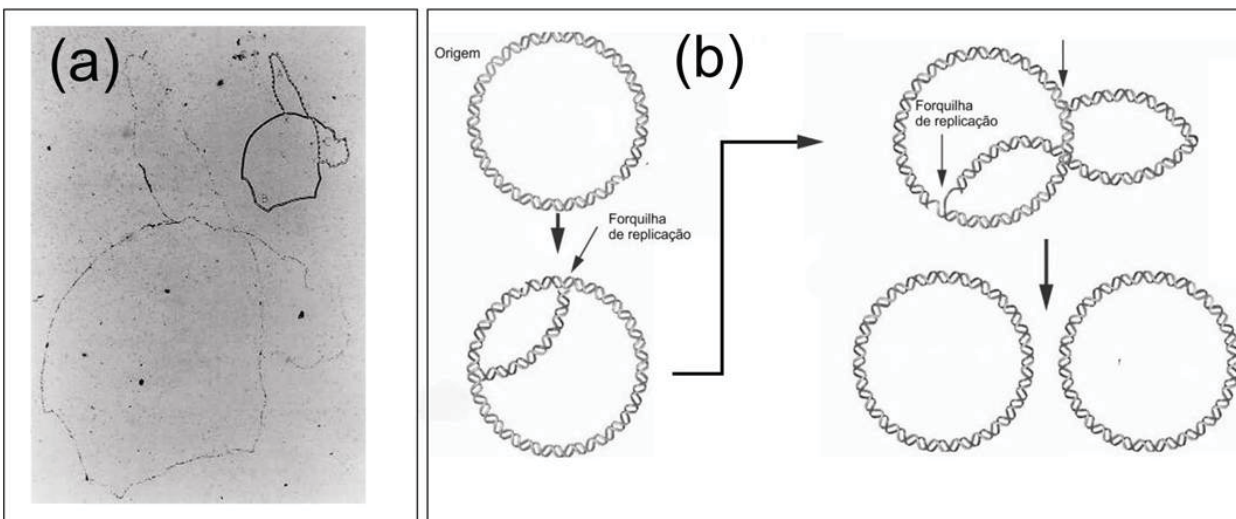


Figura 4- Auto-radiografia de um cromossomo bacteriano em processo de replicação. (a) Uma auto-radiografia do clássico trabalho de Cairns (1963), com seu diagrama interpretativo acima à direita. Os filamentos radioativos são mostrados com linhas sólidas e os filamentos novos são ilustrados como linhas tracejadas. (b) interpretação do processo de replicação bidirecional chamado círculo rolante (Fonte: <http://schaechter.asmblog.org>).

REPLICAÇÃO BIDIRECIONAL

Cairns em seus estudos considerou que a replicação teria uma única origem e formaria uma única forquilha de replicação em movimento unidirecional ao redor do cromossomo circular. No entanto sabe-se atualmente que a replicação em procariontes pode ter a formação de duas forquilhas a partir de uma única origem, com as duas forquilhas movendo-se em sentidos opostos, ou seja, a replicação realiza um movimento bidirecional.

A replicação bidirecional foi descoberta em experimentos realizados com vírus bacterianos da *E. coli*, denominados de fago lambda. O cromossomo do bacteriófago lambda apresenta regiões ricas em A:T onde ocorrem as diferenciações. Experimentos de Schnos e Inman (1960) demonstraram que a replicação do cromossomo lambda parte de uma mesma origem em movimento bidirecional.

No processo de desnaturação do DNA as pontes de hidrogênio e as ligações hidrofóbicas são quebradas quando expostas a altas temperaturas ou pH ácido por exemplo. Nessa quebra os filamentos do DNA são separados, mas os pares de A:T são rapidamente desnaturados por possuírem apenas duas pontes de hidrogênio, enquanto que os pares G:C são ligados por três pontes. As bolhas da desnaturação dos pares A:T podem ser vistas através de microscopia eletrônica e assim utilizados como marcadores. Schnos e Inman observaram as posições dessas bolhas em vários réplicons e puderam demonstrar as forquilhas em sentidos opostos ao redor do cromossomo circular. A replicação bidirecional foi comprovada em outros organismos incluindo eucariontes, mas a replicação bidirecional não se aplica a todas as espécies, apesar de ocorrer na maioria, em colifagos, por exemplo, ela é unidirecional.

Nos cromossomos eucarióticos, que apresentam vários sítios de origem de replicação existem diversos réplicons. O réplicon é, portanto, o produto da replicação gerado a partir de um sítio de origem de replicação.

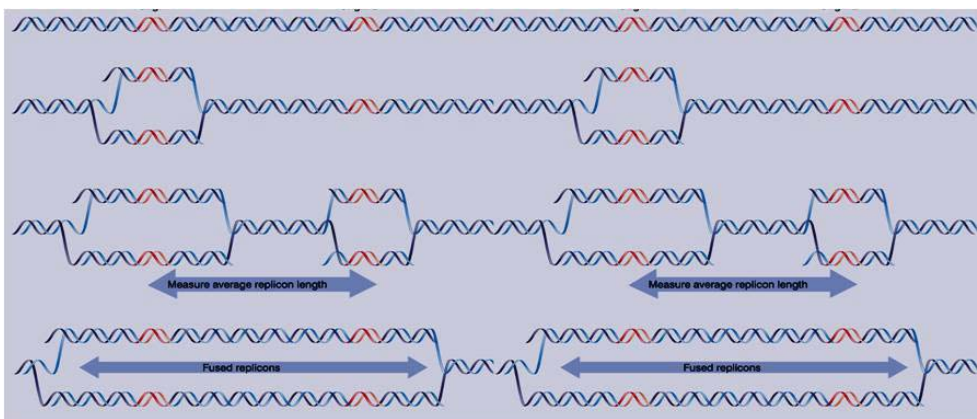


Figura 5a – Diversas origens de replicação e diversos réplicons em eucariotos

A origem da replicação em *E. coli* foi denominada de OriC. Foi observado detalhadamente que o OriC possui 245 pares de nucleotídeos em duas diferentes seqüências conservadas repetidas. Assim uma seqüência de 13pb está repetida três vezes em tandem. As repetições são ricas em pares de A:T, o que possibilita a formação da bolha de replicação, que é uma região de separação do filamento. Uma zona de desnaturação é a primeira etapa essencial para a replicação de todo DNA bifilamentar. Outro componente do OriC conservado que entra em ação agora é uma seqüência de 9pb com quatro repetições intercaladas por outras seqüências. Estas seqüências são na verdade sítios de ligação a uma proteína, denominada dna A, que dá início ao processo de formação da bolha de replicação.

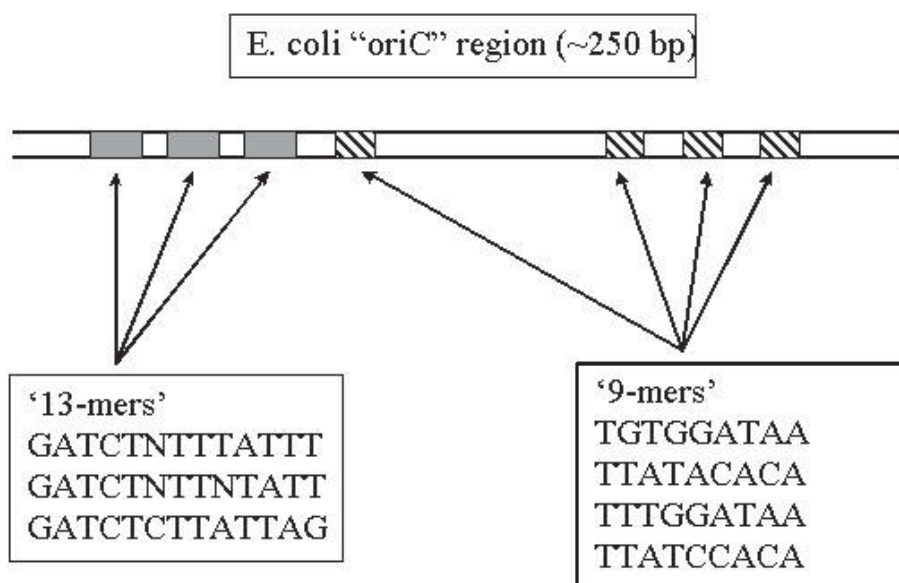


Figura 5b – Ilustração do sítio OriC em *E. coli* (ORIC)
(Fonte: www.ufrgs.br/depbiot/blaber/section2/img00004.gif).

Acredita-se que nos eucariontes as origens de replicação são seqüências específicas de DNA.

DNA POLIMERASES

A síntese *in vitro* de DNA foi realizada primeiramente em 1952 por Arthur Kornberg, que também acabou por identificar o que mais tarde seria denominada de DNA polimerase I. A enzima DNA polimerase I entra em ação somente na presença de íons Mg^{2+} e da fita molde de DNA. De modo geral as DNA polimerases são enzimas que auxiliam na síntese de qualquer fita nova de DNA, sendo os novos filamentos produzidos no sentido de $5' \rightarrow 3'$. Em bactérias, tanto a enzima DNA polimerase I quanto as DNA polimerase II e III realizam polimerização (adição de novos nucleotídeos)

e também função exonucleásica (atividade de correção de erros), embora a função a DNA polimerase I seja mais especializada na função exonucleásica, fazendo a revisão tanto no sentido 5' → 3' quando no sentido 3' → 5'. A remoção dos primers parece ser a principal função da DNA polimerase I, enquanto a síntese precisa de DNA é a principal função da DNA polimerase III. O que pode ser observado pela tabela a seguir:

Tabela. – Funções das DNA polimerases em *E. coli* (PIERCE, 2004).

DNA Polimerase	Polimerização 5'→3'	Exonuclease 3'→5'	Exonucle ase 5'→3'	Principais Funções
I	Sim	Sim	Sim	remove e substitui primers.
II	Sim	Sim	Não	reparo do DNA: reinicia a replicação em DNA danificado, parar a síntese.
III	Sim	Sim	Não	alonga o DNA

A DNA polimerase III adiciona um nucleotídeo ao grupo 3'-OH do *primer*.

REPLICAÇÃO EM EUKARIOTES

A replicação em eucariotes ainda não tem todos seus mecanismos completamente elucidados, mas sabe-se que apresentam algumas diferenças quando comparados à replicação dos procariontes. As principais diferenças são: origens múltiplas de replicação, maior número de polimerases, maior diversidade de funções para DNA polimerases, montagem de nucleossomos após a replicação.

Como visto anteriormente em leveduras, algumas seqüências de DNA (ARS) possuem a habilidade de se auto-replicar, o que possibilita a replicação de qualquer filamento de DNA, uma vez que estejam ligados a uma destas ARS. O complexo de reconhecimento de origem (ORC) liga-se a ARS desenrolando o DNA. O DNA eucariótico possui muitas origens de replicação e cada origem possui um ORC. O genoma precisa ser replicado de forma a não repetir nenhum gene nem deixar que algum gene não seja replicado. Assim em células eucarióticas o início da replicação se dá em duas fases para maior controle do processo de replicação.

Na primeira fase as origens são aceitas para replicação por meio de um fator de permissão da replicação que se liga a estas origens. Na fase seguinte as proteínas iniciadoras se ligam somente às origens “permitidas” ou ligadas a seu fator de permissão, a partir de então se tem a separação dos filamen-

tos de DNA e o início da replicação nas origens “permitidas”. Ao passo que a replicação se distancia da origem perde-se os fatores de permissão, que só serão reativados depois da mitose ter sido completada e antecede a reativação das proteínas iniciadoras, evitando assim a replicação de trechos que já foram replicados ou que se deixe de replicar algum fragmento.

Foram identificadas em células eucarióticas aproximadamente 13 tipos diferentes de DNA polimerases que atuam na replicação, recombinação e no reparo do DNA. As DNA polimerases alfa iniciam a síntese ao realizar atividade de primase, e a DNA polimerase delta atua completando os filamentos de replicação contínua e descontínua. A DNA polimerase beta está relacionada ao reparo e a recombinação de DNA nuclear. A DNA polimerase gama atua na replicação do DNA mitocondrial e também na replicação do DNA dos cloroplastos. A DNA polimerase épsilon participa do processo de replicação contínua e descontínua, mas suas funções em maiores detalhes ainda não são bem conhecidas. Ainda que seus papéis não estejam totalmente esclarecidos, acredita-se que as demais DNA polimerases possibilitem a replicação translesão, que é uma replicação que ultrapassa o DNA danificado, além de outras funções no reparo do DNA bem como nos processos de replicação como um todo.

Tabela. – Funções das DNA polimerases em eucariontes (PIERCE, 2004).

DNA Polimerase	Atividade de polimerase 5'→3'	Atividade de Exonuclease 3'→5'	Funções
Alfa	Sim	Não	Início da síntese nuclear e reparo do DNA.
Beta	Sim	Não	Reparo de DNA e Recombinação de DNA nuclear.
Gama	Sim	Sim	Replicação de DNA mitocondrial.
Delta	Sim	Sim	Síntese de filamentos <i>leading</i> e <i>lagging</i> , reparo do DNA e síntese translesão de DNA.
Épsilon	Sim	Sim	Reparo e replicação de DNA nuclear.
Zeta	Sim	Não	Síntese de DNA translesão.
Eta	Sim	Não	Síntese de DNA translesão.

Teta	Sim	Não	Reparo do DNA.
Iota	Sim	Não	Síntese de DNA translesão.
Kapa	Sim	Não	Síntese de DNA translesão.
Lambda	Sim	Não	Reparo do DNA.
Mi	Sim	Não	Reparo do DNA.
Sigma	Sim	Não	Replicação do DNA nuclear, reparo do DNA, e coesão de cromátides irmãs.

EFEITO DE OKAZAKI

É do conhecimento de vocês que a molécula de DNA é formada por uma hélice dupla, constituída de duas fitas complementares que apresentam polaridades opostas e por isso, são denominadas antiparalelas. Enquanto uma tem sentido $3' \rightarrow 5'$, a fita complementar encontra-se no sentido $5' \rightarrow 3'$. Para que um novo nucleotídeo seja adicionado durante a polimerização a DNA polimerase cliva o nucleotídeo trifosfatado (utilizado como matéria prima), liberando duas moléculas de fósforo inorgânico, o que fornece a energia necessária para a catálise da formação de uma ligação fosfodiéster entre a ligação livre, do único fosfato restante no nucleotídeo, e a extremidade $3'$ -OH livre da desoxirribose da fita nascente. Assim, cada nucleotídeo novo deixa uma extremidade $3'$ -OH livre para os próximos nucleotídeos, repetindo esse passo sucessivamente, enquanto estiverem na presença da fita molde. Como as DNA polimerases iniciam a síntese a partir do fragmento $3'$ OH livre fornecido pelo primer, a fita nova $5' \rightarrow 3'$ apresenta uma síntese contínua dando origem ao filamento denominado leading, e a fita nova no sentido $3' \rightarrow 5'$ apresenta síntese descontínua originando o filamento lagging. Quando a fita molde está no sentido $5' \rightarrow 3'$ não é possível fornecer à DNA polimerase uma extremidade livre $3'$ OH de forma simultânea ao fornecimento da fita molde, uma vez que a extremidade livre $3'$ OH encontra-se na extremidade oposta à fita molde.

A síntese do filamento lagging tem sentido contrário ao da deselicoidização, indo de encontro à forquilha de replicação, o que faz a síntese desse filamento ocorrer de forma fragmentada, já que o primer é adicionado à distância de algumas centenas de nucleotídeos da forquilha de replicação (para solucionar a falta de fita molde) e a polimerização se estende até voltar à parte já replicada, sendo necessários vários primers, sendo um para cada fragmento da fita lagging. Assim a síntese do filamento lagging se dá de forma descontínua em fragmentos curtos que são denominados de fragmentos de Okazaki. A figura a seguir ilustra a formação das fitas lagging e leading durante o processo de replicação.

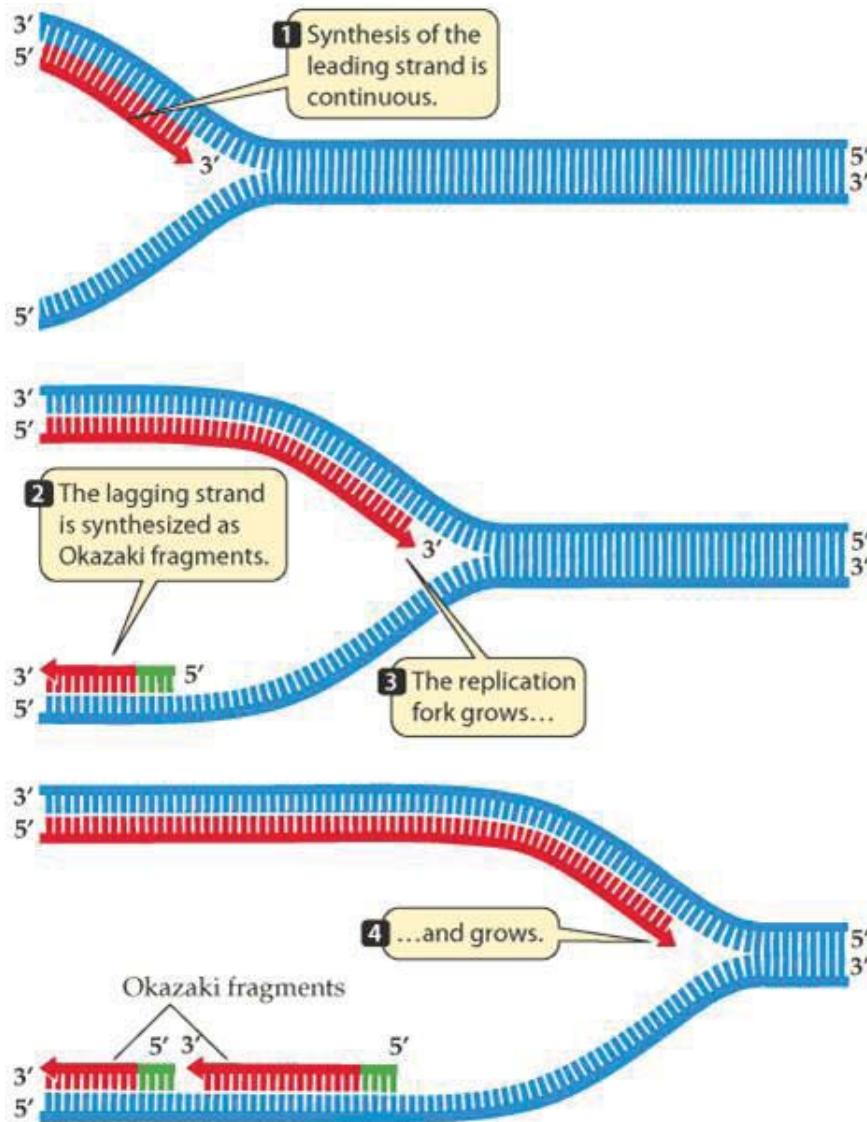


Figura 6 – Formação das fitas lagging e leading durante o processo de replicação (Fonte: [HTTP://www.peleteiro.es](http://www.peleteiro.es)).

O MECANISMO DE REPLICAÇÃO

O complexo de replicação pode ser resumido ao que ocorre durante a formação de um réplicon.

A ABERTURA DA FITA DUPLA DE DNA

O passo inicial do processo de replicação é a abertura da fita dupla de DNA para que as fitas de DNA unifilamentares fiquem expostas para que possam servir de molde para a produção das fitas complementares. No entanto, como a fita dupla de DNA está disposta em forma de hélice, a replicação do DNA requer um mecanismo de deslicoidização. A abertura da fita é catalisada por enzimas chamadas DNA helicases, sendo que a

principal helicase é decodificada pelo produto do gene *dnaB*. As helicases utilizam moléculas de ATP para catalisar a reação de quebra das pontes de hidrogênio que mantém unidas as bases nitrogenadas. Entretanto, as bases nitrogenadas tendem a refazer as pontes de hidrogênio, em função da afinidade de ligação entre elas, forçando a renaturação do DNA. Então para a manutenção da forma distendida, proteínas de ligação denominadas SSB são ligadas às fitas de DNA unifilamentar, formando diversos monômeros da proteína ligados cooperativamente ao longo da forquilha de replicação, impedindo temporariamente o fechamento da molécula de fita dupla. As proteínas SSB que revestem as fitas unifilamentares de DNA, impedindo a renaturação da molécula de DNA, são codificadas pelo gene *ssb*.

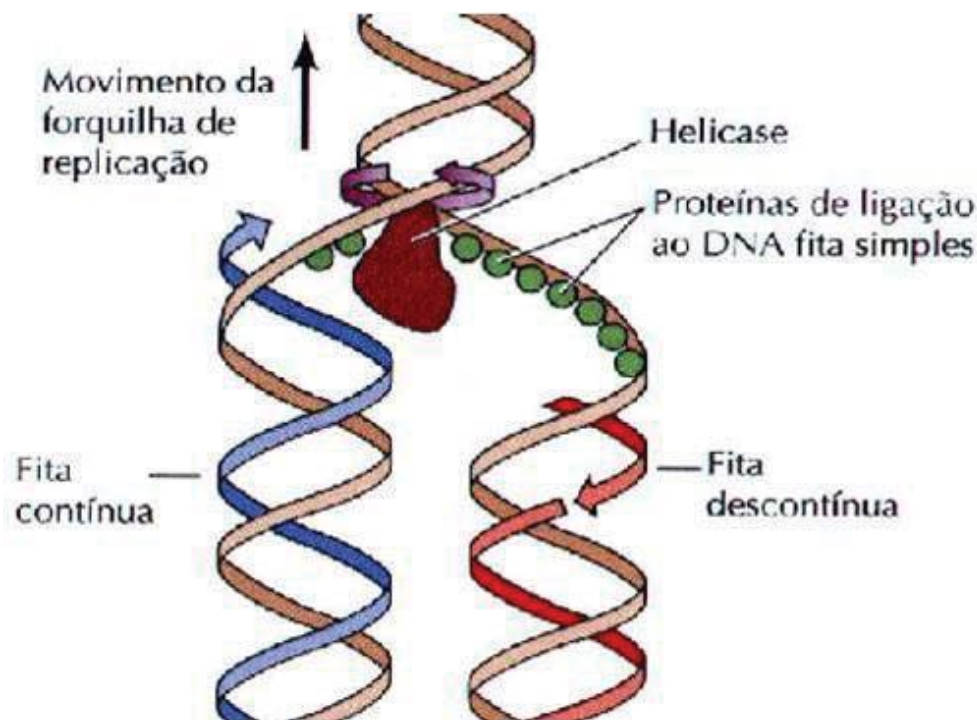


Figura 7- Esquema representativo da abertura da fita de DNA evidenciando as funções das proteínas SSB e das helicases.
(Fonte:www.ufsm.br).

Relembrando a estrutura da molécula de DNA, estudada na aula anterior, observe que trata-se de uma dupla hélice onde cada volta completa tem cerca de 10 pares de nucleotídeos de tamanho, isso faz com que durante a abertura da molécula o DNA precise realizar um giro de 360° (uma volta completa) a cada 10 nucleotídeos, sendo a velocidade de replicação em torno de 30000 nucleotídeos por minuto. Rapidamente é gerada uma superelocoidização em função da velocidade de cerca de 3000rpm, gerando uma força contrária à abertura da fita. Para impedir que a força contrária de superelocoidização impeça a abertura da molécula a enzimas, denominadas topoisomerases, catalisam quebras transitórias nas ligações fosfodiester ao longo do eixo principal da molécula de DNA. Existem duas classes de topoisomerases: tipo I e tipo II. As topoisomerases do tipo I são caracter-

izadas por clivar apenas uma das duas fitas de DNA. Essa quebra unifilar permite que a fita clivada gire em torno do eixo da molécula, desfazendo a superélice e, conseqüentemente, permitindo que a abertura da fita dupla de DNA possa continuar. A clivagem realizada pelas topoisomerases tipo I são energeticamente mais eficientes. As topoisomerases do tipo II apresentam como principal diferença a clivagem bifilar do DNA, podendo remover ou até mesmo introduzir superélices utilizando um mecanismo que requer energia. A topoisomerase do tipo II mais bem caracterizada é a enzima DNA girase.

SÍNTESE DE NOVOS FILAMENTOS DE DNA

Uma vez iniciada a formação da forquilha de replicação, a síntese de novos filamentos é imediatamente iniciada. As DNA polimerases formam o principal grupo de enzimas no processo de replicação. Como detalhado anteriormente, as DNA polimerases desempenham funções exonucleásicas (de revisão) e funções polimerásicas (geração das novas fitas complementares de DNA a partir das fitas molde). Para a realização da função de polimerização sabemos que as DNA polimerases precisam basicamente de fitas molde unifilamentares, de nucleotídeos trifosfatados (desoxirribonucleosídeo 5' trifosfato), que são as unidades básicas para a produção do polímero e, finalmente, de uma extremidade 3'OH livre para que possam adicionar novos nucleotídeos.

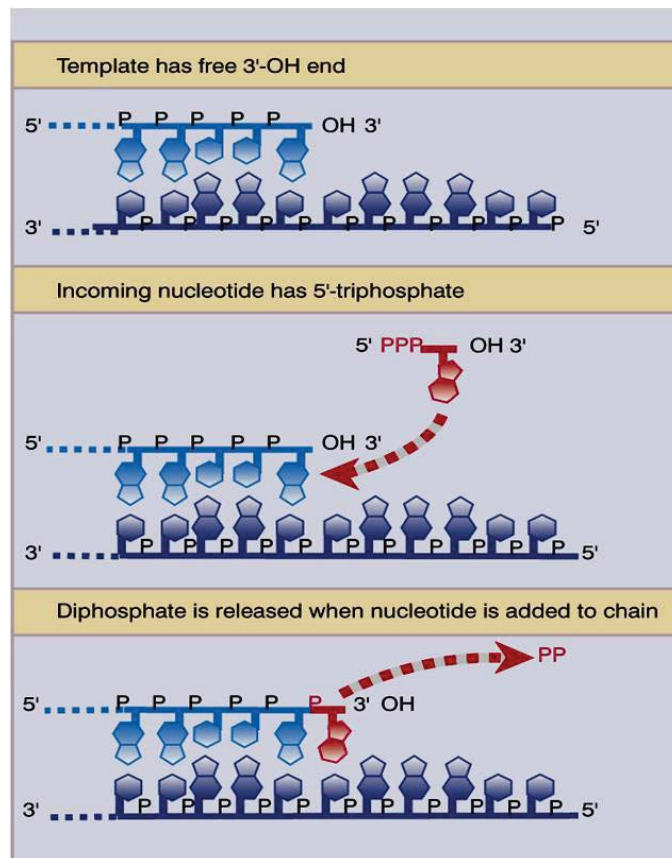


Figura 8 – Adição de novos nucleotídeos pela DNA polimerase na extremidade 3'OH livre da fita nova.

As fitas molde tornam-se disponíveis com a desnaturação da fita dupla que expõe as duas fitas unifilamentares, os nucleotídeos trifosfatados são encontrados livremente no citoplasma, mas a extremidade 3'OH livre precisa ser fornecida pela formação de uma pequena seqüência inicial complementar à fita molde, denominada primer. O primer é um pequeno segmento de RNA produzido por uma enzima da classe das RNA polimerases denominada Primase. Essa enzima liga-se às fitas molde utilizando-as para a ligação de ribonucleotídeos complementares em um curto segmento iniciador de 10 a 12 nucleotídeos de tamanho. No entanto, a polimerização ocorre de forma diferente em relação às duas fitas molde complementares, em função delas serem antiparalelas. Quando a fita molde encontra-se no sentido 3'→5', a polimerização ocorrerá de forma contínua (como anteriormente descrito), uma vez que todos os pré-requisitos para a ação da DNA polimerase são atendidos. No entanto, com relação à fita complementar, na orientação 5'→3', a extremidade 3'OH do primer está orientada no sentido contrário ao filamento molde. Para solucionar esse problema, o primer é inserido algumas centenas de nucleotídeos adiante, permitindo que tanto a extremidade 3'OH do primer, quanto um segmento da fita molde, estejam simultaneamente disponíveis à DNA polimerase, permitindo a polimerização no único sentido possível de polimerização dessa enzima, o sentido 5'→3' da fita nova. Nas bactérias a DNA polimerase III é a principal responsável pelo processo de polimerização e isso ocorre de forma simultânea nas duas fitas, ainda que a mecânica de polimerização exija da DNA polimerase a formação de alças em função da formação dos fragmentos de Okazaki na fita lagging. A DNA polimerase I, por sua vez, é a principal enzima responsável nas bactérias pela função exonucleásica, realizando essa função de revisão, tanto no sentido 5'→3' quanto no sentido 3'→5'. A DNA polimerase I substitui os fragmentos de RNA (primers) durante a revisão, substituindo-o por um filamento adequado de DNA. No entanto, as ligações fosfodiester entre os fragmentos precisam ser estabelecidas e isso é realizado pela enzima DNA ligase. Após o processo de revisão e ligação dos fragmentos, os dois réplicons produzidos de forma semi-conservativa são geneticamente idênticos.

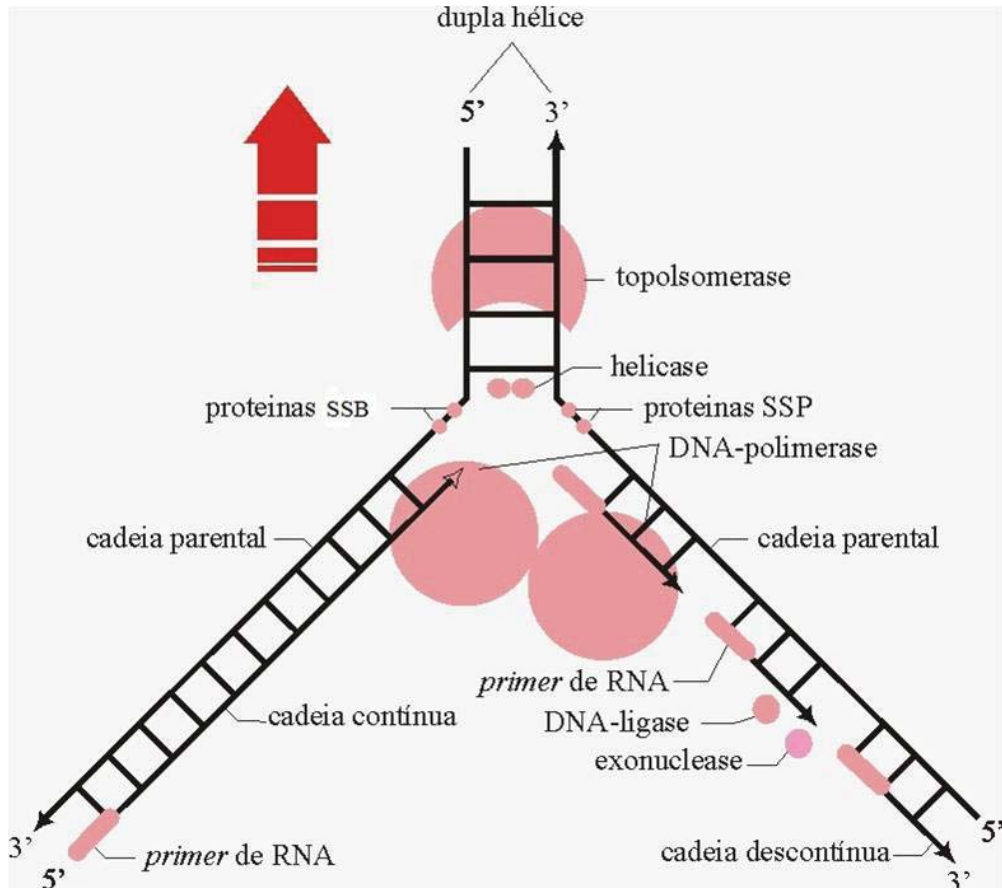


Figura 9 – Principais etapas do processo de replicação

TRANSCRIÇÃO E PROCESSAMENTO DO RNA

OS TIPOS DE RNA

Apesar da existência de diversos tipos de moléculas de RNA e da verdadeira revolução que as moléculas de RNA vem fazendo na área de genética, especialmente em função do desenvolvimento recente da epigenética, nessa aula vamos tratar das quatro classes de RNAs especialmente relacionadas à expressão gênica. 1- O RNA mensageiro (mRNA), intermediário que porta a informação genética levando-a aos ribossomos; 2- RNA de transferência (tRNA), pequenos RNAs dobrados sob a forma de trevo, cuja principal função é o transporte de um aminoácido para a síntese proteica no ribossomo, servindo de intermediário entre a informação genética do mRNA e o ribossomo; 3- RNA ribossomal (rRNA), componente estrutural dos ribossomos, a estrutura complexa formada por rRNA e proteínas e executam a tradução das proteínas e; 4- RNAs nucleares (snRNA), componentes estruturais do aparelho de processamento do mRNA, o spliceossomo.

RNA MENSAGEIRO

O RNA mensageiro ou mRNA foi descoberto na década de 1950 por François Gros em estudos com bacteriófagos da *E. coli*, por meio de um experimento conhecido como pulso-caça, nesse experimento Góis marcou a uracila radioativamente e observou seus movimentos na síntese, e percebeu que o RNA do fago tinha curta duração e estava associado aos ribossomos, interpretou que esse RNA fosse um de transferência de informações entre o DNA e os ribossomos, cunhando-o de mensageiro. O mRNA codifica e carrega as informações genéticas do DNA para os ribossomos. O mRNA divide-se em três regiões: a região 5' que não codifica a sequência de aminoácidos da proteína; a região codificante onde são encontrados os códons, formados por três nucleotídeos que, em conjunto, determinam um aminoácido a ser incluído na síntese e a região 3' não traduzida em proteína. Os RNAs heterogêneos nucleares (htRNA) são os produtos primários da transcrição em eucariotos. Vale lembrar que as células de bactérias não possuem htRNA já que nestas a transcrição ocorre simultaneamente a tradução. O RNA heterogêneo nuclear é um precursor do mRNA maduro que está restrito ao núcleo das células eucarióticas e geralmente é muito maior que o mRNA maduro, em função de ser formado por uma fita de RNA exatamente complementar à fita molde do DNA de origem, incluindo regiões codificantes (Exons) e regiões não codificantes (introns). Voltaremos a esse tema quando tratarmos do processamento do mRNA em eucariotes.

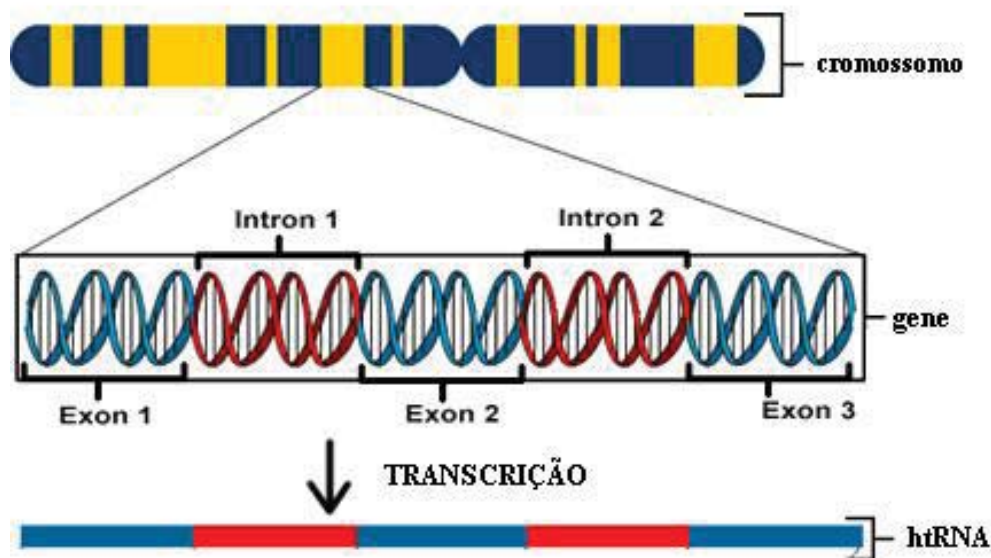


Figura 10- RNA heterogêneo Nuclear (htRNA) precursor do mRNA em eucariotos

RNA DE TRANSFERÊNCIA (tRNA)

O RNA de transferência ou tRNA tem como função fornecer aminoácidos ao ribossomo para a produção de polipeptídeos segundo a leitura das informações genéticas do mRNA. Cada tRNA possui afinidade com um único tipo de aminoácido ao qual se liga por intermédio da catálise pela enzima Aminoacil Sintetase e o transporta do citoplasma ao ribossomo. Os tRNAs apresentam sua estrutura tridimensional e em forma de trevo com pontes de hidrogênio intramoleculares contendo cerca de 70 a 90 nucleotídeos, portanto, bem menores que os mRNA's. Os tRNAs apresentam também bases modificadas como a ribotina, além das famosas (adenina, citosina, guanina e uracila). Essas bases modificadas tem origem nas bases padrão na transcrição por enzimas modificadoras de tRNA. Esses nucleotídeos diferentes são geralmente derivados metilados dos nucleotídeos comuns. Esses nucleotídeos metilados impedem a formação de pares de bases, afetando a forma tridimensional da molécula. Existem algumas características comuns na configuração tridimensional dos tRNA's. A extremidade 3' apresenta sempre uma sequência terminal CCA, que pode se ligar covalentemente a um aminoácido numa reação catalisada pela enzima aminoacil sintetase. A alça do anticódon, por sua vez, é umas das estruturas encontradas no tRNA, nela encontra-se o anticódon formado por uma trinca de nucleotídeos relacionado de forma complementar com o códon do mRNA e permite que o aminoácido correto seja adicionado a sua posição na síntese proteica.

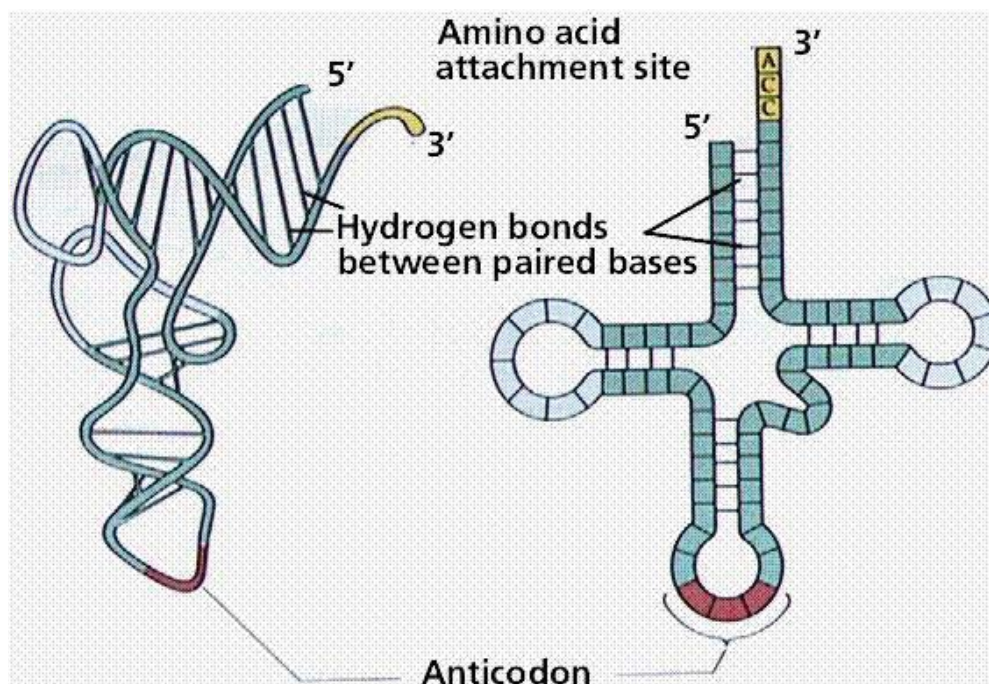


Figura 11- Modelo estrutural do RNA de transferência
(Fonte: www.emc.maricopa.edu).

RNA RIBOSSOMAL

O RNA ribossomal ou rRNA faz parte da constituição dos ribossomos compondo suas unidades e subunidades e conjunto com diversas proteínas. Nos ribossomos encontra-se aproximadamente 80% de todo o RNA contido na célula e neles é que são montadas as proteínas. Nos procariontes os rRNA's interagem com mais de 50 proteínas ribossômicas diferentes para formar a complexa estrutura tridimensional do ribossomo. As classes de rRNA procarióticas são chamadas: 5S, 16S e 23S. Essa nomenclatura se dá em função de sua densidade em gradiente de sedimentação em sucrose. Nos ribossomos eucarióticos os rRNA interagem com cerca de 80 proteínas diferentes, sendo as classes de rRNA eucarióticos designados 5S, 5,8S, 18S e 28S. O rRNA é obtido por transcrição e o produto final dos genes são moléculas de RNA.

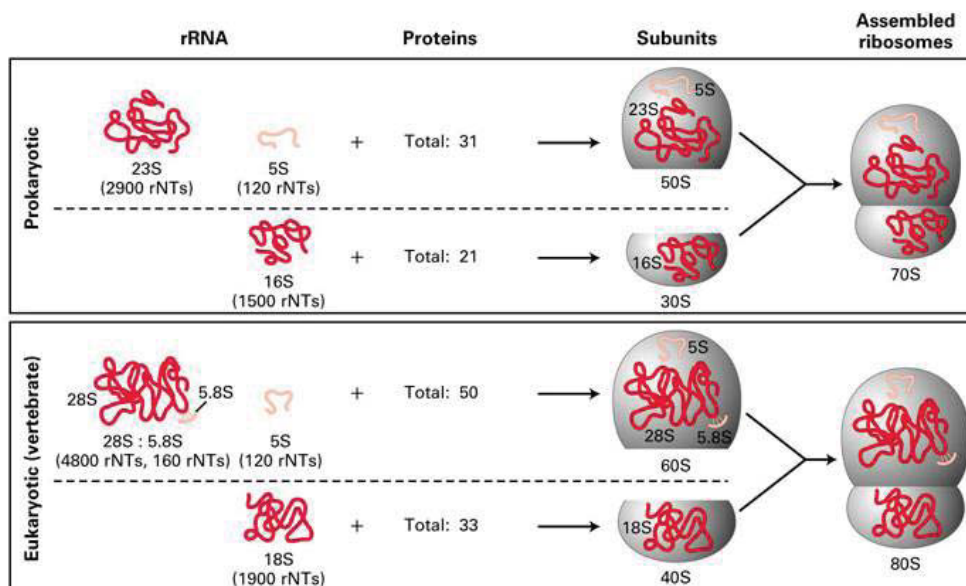


Figura 12- Moléculas de rRNA em ribossomos de procariontes e eucariontes (Fonte: www.compbio.pbworks.com).

RNA's NUCLEARES (snRNA)

Como componentes estruturais dos spliceossomos, esses pequenos RNA's excisam os introns durante o processamento dos precursores de RNA durante a fase de processamento.

RIBOZIMAS

O RNA também pode desempenhar função catalítica como as enzimas, ou seja, nem toda enzima é uma proteína como pensávamos. Esse fato foi descoberto por Thomas Cech (1981) em um estudo envolvendo RNA ribossomal de protozoários, desde então, diversas ribozimas têm sido descobertas e estudadas, com destaque para os estudos de Sidney Altman, o que levou Cech e Altman ao prêmio Nobel em 1989. A descoberta das habilidades catalisadoras de moléculas de RNA sugere que o primeiro material genético tenha sido o RNA e não o DNA.

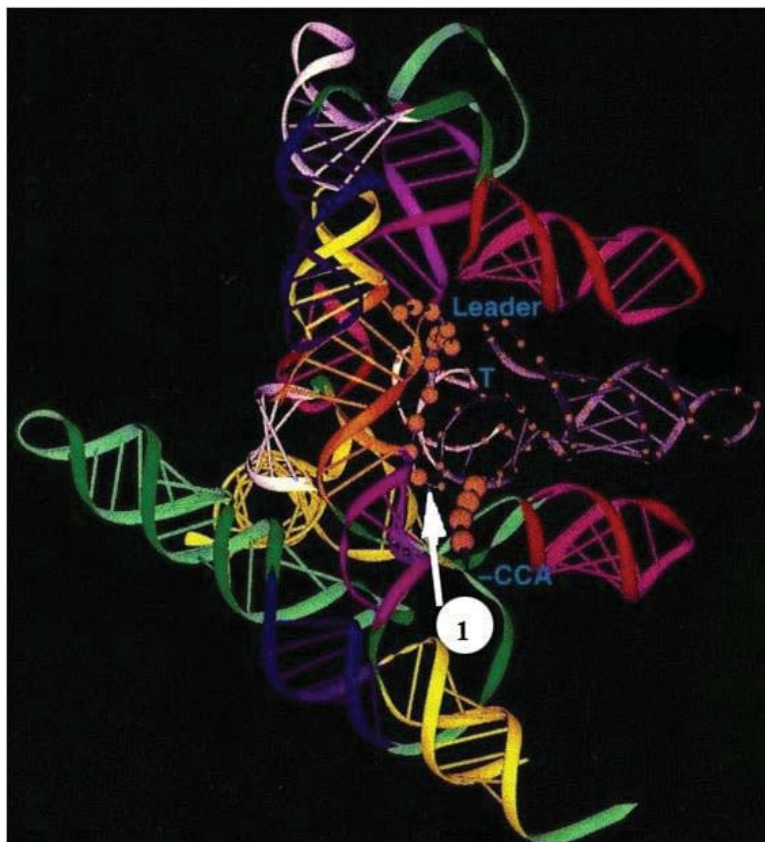


Figura 13 – Modelos tridimensional de uma molécula de RNA catalítico (ribozima), evidenciando o sítio de catálise (1)
(Fonte: www.science.ca).

SÍNTESE DE RNA

A transcrição é o mecanismo pelo qual todas as categorias de RNA, vistas anteriormente, são sintetizadas. A transcrição utiliza uma fita de DNA como molde e assemelha-se à replicação, no entanto são copiados apenas alguns trechos do DNA, como um gene ou alguns poucos genes. Pois seria demasiadamente desnecessário que a todo tempo que uma célula necessitasse de uma proteína específica tivesse que transcrever todo o genoma. Assim a transcrição proporciona à célula a oportunidade de selecionar quais proteínas serão produzidas segundo sua necessidade.

Para a transcrição são necessários três elementos básicos:

1. O filamento molde de DNA – que consiste em uma única fita de DNA, diferentemente da replicação que ocorre em ambas as fitas da dupla hélice, pois em qualquer trecho do DNA uma única fita possui a informação a ser transcrita, que é a unidade de transcrição;
2. O substrato (nucleotídeos) – o RNA é constituído de trifosfatos de ribonucleosídeos (rNTPs) que são adicionados molécula por molécula ao grupo 3'-OH somado ao fósforo orgânico, constituindo-se a como a matéria prima da transcrição ($\text{RNA}_n + \text{rNTP} \rightarrow \text{RNA}_{n+1} + \text{PPi}$, onde PPi é o fósforo);
3. O aparelho de transcrição – é constituído de por uma gama de enzimas e proteínas que auxiliam, sintetizam e regulam o processo de transcrição.

AS RNA POLIMERASES

As RNA polimerases são enzimas semelhantes as DNA polimerases da replicação. As bactérias possuem apenas um tipo de RNA polimerase.

A RNA polimerase bacteriana é uma grande enzima constituída por várias cadeias polipeptídicas, ou seja, uma enzima multimérica. A RNA polimerase bacteriana subdivide-se em quatro unidades (as cadeias polipeptídicas individuais, duas cópias da unidade alfa, uma cópia da unidade beta, e uma cópia da unidade beta-primo) que compõem o cerne da enzima. Ao cerne da enzima ligam-se outras subunidades como os fatores sigma, formando uma holoenzima, possibilitando que a RNA polimerase bacteriana atue nas diferentes etapas da transcrição.

TRANSCRIÇÃO EM PROCARIONTES

Nos procariontes uma unidade de transcrição pode conter um ou vários genes que são transcritos simultaneamente (transcrição policistrônica). O processo de transcrição pode ser dividido didaticamente em três etapas: (1) início, (2) alongamento e (3) término e liberação da molécula de RNA. Assim como na replicação, a síntese de RNA ocorre sempre no sentido

5'→3' da fita de RNA nascente. Considerando um ponto de referência e sabendo que a transcrição é unidirecional.

INÍCIO

Na iniciação primeiramente o promotor é reconhecido, depois há a formação da bolha com separação dos filamentos do DNA, o promotor determina o trecho do molde que deve ser transcrito e a frequência dessa transcrição, nessas etapas o promotor tem afinidades específicas com a RNA polimerase que varia com o tempo. O promotores bacterianos são seqüências de DNA que são identificados pelo aparelho de transcrição e que determinam o sítio onde terá início a transcrição, qual dos dois filamento de DNA são utilizados como molde, e qual o sentido da RNA polimerase. Nos promotores são encontrados seqüências comuns que são denominadas de seqüências de consenso, essas seqüências normalmente implicam em uma função importante. Alguns promotores bacterianos apresentam também um elemento antecedente (*upstream*) que seria uma seqüência de consenso a mais, estas geralmente catalisam o processo de transcrição.

Duas regiões promotoras parecem estar conservadas em todos os procariontes, denominada TATA box, que antecede a região codificante em 10 bases (-10) e outra na região -35, ou seja, localizada a cerca de 35 pares de bases acima da região codificante, caracterizada pelo sequência de consenso TTGACA e consiste numa região relativa ao local de ligação da RNA polimerase.

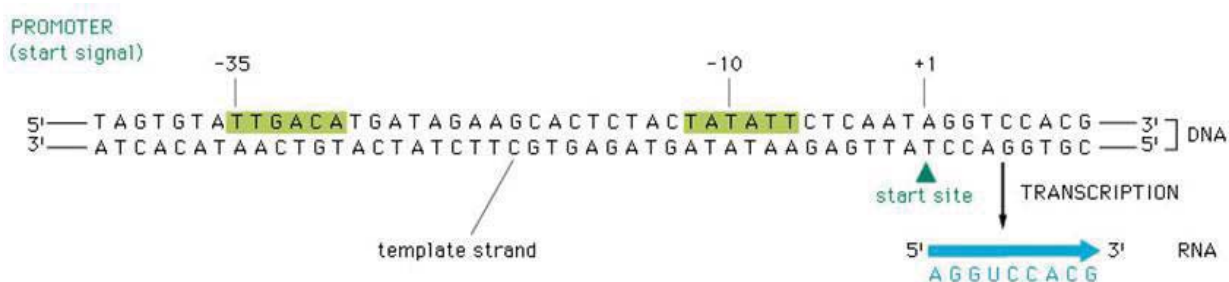


Figura 14- Região promotora em procariontes

A holoenzima RNA polimerase utiliza a subunidade Fator Sigma apenas no início da transcrição. O fator sigma não executa nenhum papel no alongamento da cadeia de RNA, sendo liberado do Cerne (complexo formado pela holoenzima RNA polimerase sem o fator sigma). A principal função desempenhada pelo fator sigma é a localização dos sítios promotores e identificação da fita molde. Sem o fator sigma a transcrição torna-se um evento aleatório. Após a identificação do promotor e da fita molde, a holoenzima é acoplada ao promotor, onde a RNA polimerase dá início a transcrição e desenrola o DNA.

ELONGAMENTO

O alongamento da cadeia de RNA é catalisado pelo cerne da enzima RNA polimerase após a liberação da subunidade sigma, dentro da bolha de transcrição, que é um segmento de RNA que permanece aberto durante a catálise da transcrição, tanto a abertura quanto o fechamento temporário da bolha é catalisado pela RNA polimerase, além da adição de ribonucleosídeos trifosfatados complementares a fita de DNA molde.

TÉRMINO E LIBERAÇÃO

O término ocorre quando a RNA polimerase transcreve um sinalizador de término ou finalizador que antecede o ponto de término. Um dos sinalizadores de término são denominado alças em grampo, em função do dobramento do transcrito sobre si mesmo em função de uma região rica em CG de cerca de 40 nucleotídeos de extensão, reconhecida pela RNA polimerase.

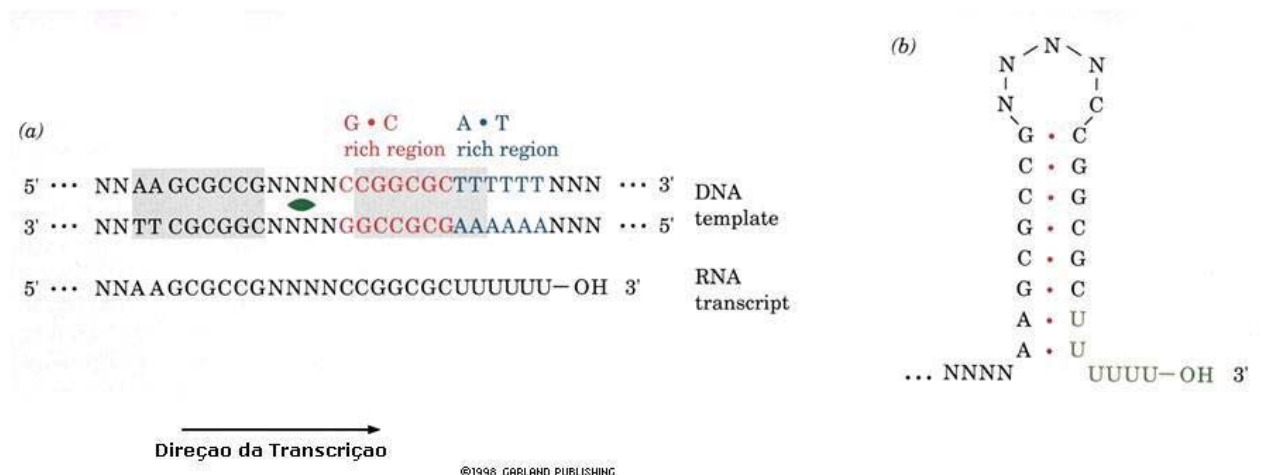


Figura 15 – Sinal de término de transcrição denominado alça em grampo

Alguns eventos ocorrem durante a transcrição na região finalizadora: a RNA polimerase paralisa a síntese de RNA, a molécula de RNA liberta-se da RNA polimerase, a molécula de RNA separa-se da fita de DNA e a RNA polimerase separa-se da fita molde de DNA. Quando a RNA polimerase para, uma proteína com atividade de helicase desenrola o híbrido RNA-DNA da bolha de transcrição dando fim ao processo de transcrição, essa proteína é conhecida como proteína rô.

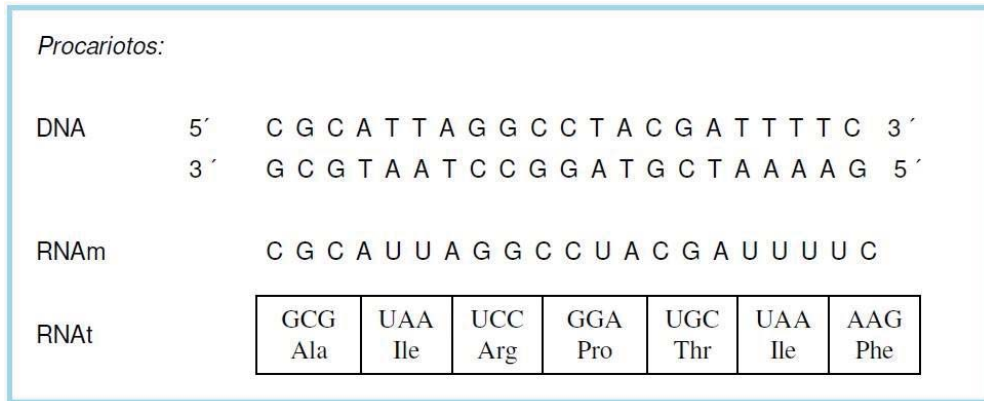


Figura 16- Processo de transcrição em procariotos

O PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS

Em linhas gerais a transcrição em eucariotos segue o mesmo padrão do processo de transcrição em procariotos, mas diversos detalhes são diferentes, como é o caso das sequências promotoras e das moléculas de RNA polimerase envolvidas. As RNA polimerases eucarióticas dividem-se em três categorias diferentes (RNA plimerases I., RNA polimerase II, e RNA plimerase III), responsáveis por transcrever categorias diferentes de RNA, como ilustrado na tabela a seguir.

Tabela 1 – Funções das RNA polimerases eucarióticas (PIERCE, 2004).

Tipo de RNA polimerase	Tipo de RNA transcrito
RNA polimerase I	Grandes rRNA
RNA polimerase II	Pré-mRNA, alguns snRNA, e snoRNA
RNA polimeras III	tRNA, pequeno rRNA, e snRNA

Ao contrário da RNA polimerase procariótica, as RNA polimerases eucarióticas não podem iniciar a transcrição de forma autônoma. Todas as três RNA polimerases necessitam de fatores proteicos de transcrição para iniciar a síntese de RNA. Esse fatores de transcrição devem se ligar de forma apropriada a sítios que se ligam a região promotora do DNA, permitindo o início da transcrição. Cada uma dos tipos de RNA polimerase eucariótica envolve diferentes fatores de transcrição. Os promotores reconhecidos pela RNA polimerase II são formados por segmentos curtos e muito conservados caracterizados pela sequência TATAAAA, denominada TATA box, localizada na posição -30pb. Esse promotor tem um importante papel no

posicionamento da RNA polimerase para o início da transcrição. A segunda região promotora conservada é o CAAT box, localizado geralmente próximo à região -80pb, possuindo uma sequência de consenso GGCCAATCT. Além dessas duas sequências promotoras, existem ainda outras regiões conservadas relacionadas ao promotor em eucariotos, envolvendo ainda diversos fatores basais de transcrição.

Complexos de transcrição envolvendo fator de transcrição e regiões promotoras também são necessários para iniciar a transcrição pelas RNA polimerases I e III. Os promotores dos genes transcritos por essas duas RNA polimerases são bastante diferentes daqueles utilizados pela RNA polimerase II.

ELONGAMENTO

Inicialmente as RNA polimerases são liberadas de seus complexos de iniciação e catalisam o alongamento da cadeia de RNA ao longo da região codificante utilizando os mesmos mecanismos já descritos para a transcrição em procariontes. No início do processo de alongamento dos precursores dos mRNA eucarióticos são modificadas pela adição de revestimentos de 7 metil guanosina, adicionados quando a cadeia de RNA está com cerca de 30 nucleotídeos de comprimento, esse revestimento é metilado e possui uma rara ligação 5'5' trifosfato. Esse caput de Guanosina metilada na extremidade 5' é importante para o início do processo de tradução e como proteção contra a degradação do RNA por nucleases.

TÉRMINO

As pontas 3' dos RNA transcritos pela RNA polimerase II são geradas por clivagem endonucleolítica dos transcritos primários e não pelo término da transcrição. Os eventos de término de transcrição ocorre em vários sítios que estão situados de 1000 a 2000 nucleotídeos após o sítio que será posteriormente pós a clivagem a ponta 3'.

PROCESSAMENTO DE RNA

Os RNAs pré-mensageiro, ou RNA heterogêneo nuclear, são os produtos da transcrição. Vale lembrar que as células de bactérias não possuem pré-mRNA já que nestas a transcrição ocorre simultaneamente a tradução.

REVISANDO O CONCEITO DE GENE

Em geral o gene é definido como um fator que determina nossas características hereditárias, mas esse conceito não é exatamente o que o gene é, e sim o que ele faz. O gene em sua estrutura é um conjunto de nucleotídeos. Como os genes codificam as proteínas, e estas são feitas de aminoácidos, o conceito de gene também pode ser definido como uma seqüência de nucleotídeos que determina uma seqüência de aminoácidos. Assim é de se esperar afinidades entre esses nucleotídeos e aminoácidos, pensando nisso Francis Crick (1958) afirmou que as proteínas e os genes seriam colineares, ou seja, o número de nucleotídeos em um gene seria proporcional ao número de aminoácidos que compõem a proteína sintetizada. A colinearidade é verdadeira para a maioria de bactérias e vírus, ainda que esses genes sejam ligeiramente maiores que as proteínas por causa das seqüências de suas extremidades que codificam o início e o término da transcrição. No entanto o mesmo não pode ser aplicado aos genes eucarióticos, inicialmente foram sido considerados colineares, mas ao passo que a estrutura do DNA foi sendo mais estudada, percebeu-se que o DNA de eucariontes era muito maior do que o necessário aparentemente.

Somente na década de 1970 foi realmente comprovado que o DNA de eucariotos é intercalado por seqüências que não codificam proteínas. Percebeu-se por microscopia eletrônica que o filamento de DNA a ser transcrito é muito maior que seu mRNA, e que o DNA apresentava seqüências de nucleotídeos em forma de alças que não são transcritas, não possuindo correspondentes no mRNA.

Assim a maioria dos genes eucarióticos e alguns genes procarióticos apresentam além das seqüências codificantes chamadas éxons, seqüências não-codificantes chamadas íntrons. Os íntrons e éxons são transcritos em RNA, mas ao final da transcrição os íntrons são removidos por um mecanismo chamado splicing e os éxons são fundidos num RNA final.

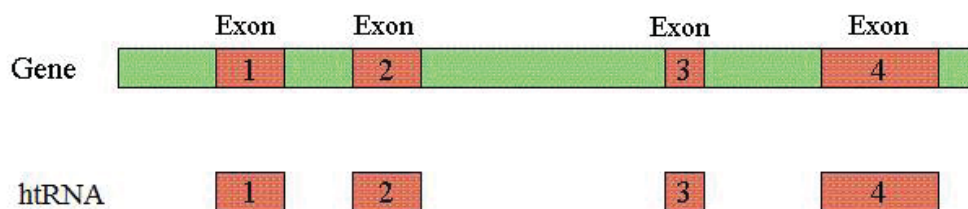


Figura 17- RNA heterogêneo nuclear o o processo de splicing para a obtenção do mRNA maduro (Fonte: <http://www.emc.maricopa.edu>).

O número e o tamanho de íntrons variam bastante de organismo para organismo e de gene para gene, e está relacionado com complexidade do organismo ou da célula. Bactérias possuem poucos e curtos íntrons enquanto os genes da maioria dos animais são intercalados por vários e longos íntrons. O íntron pode ter de 200 a 50.000 nucleotídeos. Os tipos de íntrons mais conhecidos atualmente, são:

Tabela 2. Tipos de íntrons (PIERCE, 2004).

Tipo de íntron	Localização	Tipo de recomposição
Grupo I	Alguns genes de rRNA	Auto remoção
Grupo II	Genes codificantes de proteínas em mitocôndrias e cloroplastos	Auto remoção
Pré-mRNA nuclear	Genes codificantes de proteínas no núcleo	Spliceossômico
tRNA	Genes de rRNA	Enzimático

Os íntron auto-recompostos do grupo I e II podem realizar sua própria remoção se a ajuda de enzimas ou proteínas, mas os íntrons do grupo I e II realizam sua própria remoção por mecanismos diferentes. Os íntrons do grupo I dobram-se em nove hastes em conjunto com reações de transesterificações para a recomposição. Enquanto que os íntrons do grupo II realizam reações de transesterificação formando uma estrutura em laço. Os íntrons do pré-mRNA são os mais conhecidos e possuem mecanismos de remoção semelhantes ao do grupo II, porém não conseguem se auto remover. Os íntrons tRNA são encontrados nos genes de tRNA e seu mecanismo de recomposição está relacionado a enzimas que cortam e ligam o RNA.

Após a descoberta dos íntrons e maior detalhamento da estrutura do DNA o conceito de gene já não pode ser o mesmo, visto que este não se resume a codificação de proteínas. O gene passa a ser definido como a seqüência de DNA que codifica uma molécula de RNA, e inclui toda a unidade de transcrição (como o promotor, seqüência codificante de RNA e o finalizador).

O RNA HETEROGÊNEO NUCLEAR

A transcrição em células de procariotos ocorre paralelamente à tradução, enquanto que em células de eucariotos a transcrição e a tradução ocorrem em tempo e espaço diferentes. Essa separação da transcrição e da tradução em estágios diferentes nos eucariontes dá às suas células a oportunidade de modificar o mRNA, para só depois traduzi-lo. Assim o transcrito inicial em

células eucarióticas passa por muitas modificações, e é denominado de htRNA.

A maioria dos htRNA eucarióticos sofre adições e modificações em suas extremidades. Como a adição da cap5' na extremidade 5' e a adição da cauda Poli A na extremidade 3'. Essas adições ocorrem imediatamente após a transcrição, e consiste no caso da cap 5' na adição de um nucleotídeo e metilação do nucleotídeo pela adição de um grupo metil (CH₃), o ribossomo então reconhece a cap 5' e a ela se liga dando início a tradução. O cap5' torna o mRNA mais estável, sendo a sua formação iniciada antes mesmo do término da transcrição, como descrito anteriormente. Na extremidade 3' de genes eucarióticos a RNA polimerase II transcreve seqüências depois da região codificante, para reparar esse efeito, corta-se o material codificado em excesso e adiciona-se a cauda poli A em seu lugar num mecanismo chamado de poliadenilação. A cauda poli A assim como a cap5' proporciona ao mRNA maior estabilidade durante o período em que está disponível para a tradução. Os mRNA eucarióticos que não passam pela poliadenilação e não recebem a adição da cauda poli A utilizam outra estratégia para obter maior estabilidade auxílio de uma ribonucleoproteína (snRNP) conhecida por U7.

PROCESSO DE RECOMPOSIÇÃO DE RNA

O processo de recomposição de RNA é a remoção dos íntrons vistos anteriormente quando discutimos sobre o conceito de gene. Para a recomposição são necessárias três estruturas dos íntrons:

1. Sítio de corte 5' – extremidade do íntron;
2. Sítio de corte 3' - extremidade do íntron;
3. Ponto de ramificação – é um nucleotídeo adnina localizado a 18 ou 40 nucleotídeos do sítio de corte 3'.

Para o processo de recomposição ocorrer é necessária à formação de um complexo de proteínas e moléculas de RNA (snRNPs e RNA nucleares), a esse complexo dá-se o nome de spliceossomo. Inicialmente os éxons anteriores e posteriores são separados por um íntron onde o mRNA é cortado liberando os éxons, a extremidade 5' do intron é ligada ao ponto de ramificação, dobrando o íntron em forma de laço e um nucleotídeo guanina da seqüência de consenso do sítio de corte se liga por transesterificação ao ponto de ramificação por um nucleotídeo adenina. A próxima fase consiste ligar no corte do sítio de corte 3' e uma ligação covalente entre à ponta 3' do éxon 1 e a ponta 5'. O íntro então é liberado e volta a conformação linear rompendo-se do ponto de ramificação e em seguida digerido por enzimas nucleares.

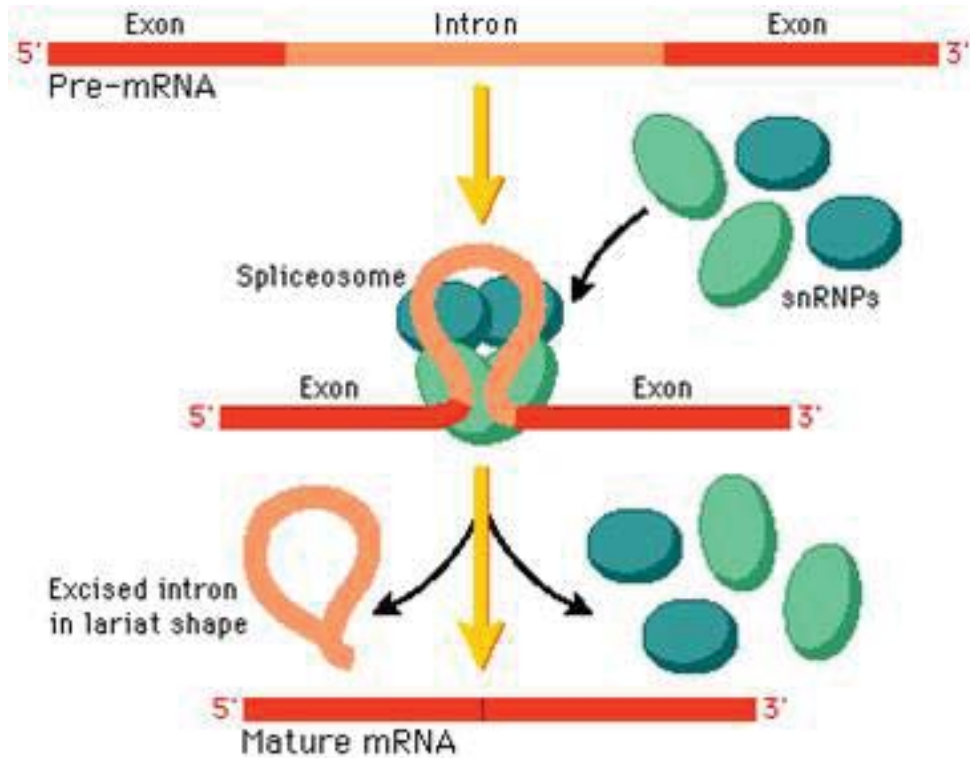


Figura 18- Spliceossomo
(Fonte http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/images/transcription).

A recomposição ocorre no núcleo celular antes que esse atinja o citoplasma. No núcleo mecanismos como a transcrição e recomposição ocorrem provavelmente nos mesmos sítios, de forma bastante ordenada. É importante ressaltar que no spliceossomo ocorrem interações que dependem do pareamento de bases entre moléculas diferentes de RNA, mRNA, snRNA imprescindíveis à recomposição.

Tabela. Tipos de interações que ocorrem no spliceossomo (PIERCE, 2004).

Interação	Ação
U1 + sítio de corte 5'	Induz íntron a remoção, sem papel direto na recomposição.
U2 + ponto de ramificação	Formação do laço.
U2 + U6	Mantém a ponta 5' do íntron próxima do ponto de ramificação.
U6 + ponto de corte 5'	Posiciona a ponta 5' do íntron próxima ao ponto de ramificação.

U5 + ponta 3' do primeiro éxon	Ancora o éxon ao spliceossomo e justapõe as pontas do éxon para a recomposição.
U5 + ponta 3' de um éxon e ponta 5' do outro	Justapõe as pontas do éxon para a recomposição.
U4 + U6	Libera U6 para o íntron, sem papel direto.

Existem ainda processos alternativos de recomposição, que possibilitam as células produzir mRNA diferentes a partir da mesma seqüência, podemos citar como exemplos: a recomposição alternativa que recompõe o pré-mRNA em mais de um modo resultando em mRNAs com seqüências diferentes; e o múltiplos sítios de corte 3', no qual dois ou mais sítios de corte e poliadenilação estão presentes produzindo mRNAs de tamanhos diferentes.

Vale ressaltar que além dos processos de recomposição o mRNA ainda pode ser alterado de edição do RNA que também ocorre após a transcrição e altera a seqüência de aminoácidos codificada pelo gene pela ação de RNA guias ou gRNAs que por possuírem similaridades com a seqüência do mRNA acabam pareando-se as suas bases, adicionando cortando ou deletando o mRNA segundo o molde do gRNA.

CONCLUSÃO

A molécula de DNA passa pelo processo de replicação para garantir a hereditariedade das células, possibilitando o desenvolvimento de organismos pluricelulares e as diversas formas de reprodução, utilizando um processo muito preciso envolvendo diversas moléculas que garantem a replicação semi-conservativa do DNA. Por outro lado, podemos concluir que é no processo de transcrição que o DNA realmente inicia a realização de sua função de fornecimento de informações genéticas que determinam as características das proteínas e, participando efetivamente do material genético na formação do organismo.

RESUMO

A estrutura do DNA proposta por Watson e Crick levou-os a propor um modelo para a replicação do DNA. Em 1958 os pesquisadores Meselson e Stahl conseguiram comprovar que a replicação ocorre realmente de forma semi-conservativa. A replicação envolve sempre um sítio inicial chamado origem de replicação, sendo o produto da replicação iniciado pelo sítio de origem denominado réplicon. Bactérias possuem geralmente apenas um sítio de origem de replicação, tendo apenas um réplicon. No entanto, em eucariotos existem diversos pontos de origem e, conseqüentemente, vários réplicons. Em termos moleculares, a abertura da fita de DNA é realizada



por enzimas que catalisam o rompimento das pontes de hidrogênio, denominadas DNA helicases. Essas enzimas iniciam, portanto, uma bolha de replicação, que é estabilizada temporariamente pela adição cooperativa de proteínas SSB nos filamentos simples, permitindo a exposição física das moléculas unifilamentares para o processo de replicação. À medida que se processa a abertura da fita, é gerada uma grande força contrária de torção em função do movimento giratório da fita, resultando em superelicoidização. As topoisomerases resolvem o problema da superelicoidização promovendo clivagens nas molécula de DNA que passa a girar livremente e elimina a tensão de torção. Diversas moléculas estão envolvidas no processo de replicação, mas as enzimas DNA-polimerases são principais moléculas envolvidas, desempenhando as funções de exonucleolítica e de polimerização. Existem diferentes tipos de DNA polimerases, no entanto, todas necessitam de uma extremidade 3'OH livre, de nucleotídeos trifosfatados como matéria prima e de uma fita molde unifilamentar de DNA para que possam desempenhar a função de polimerização no sentido 5' 3'. Para o fornecimento das extremidades iniciais 3'OH livre, uma enzima denominada primase produz uma pequena molécula de RNA iniciador denominado Primer e, em função das fitas de DNA serem antiparalelas, uma das fitas precisa de apenas um primer (Fita leading), enquanto a fita, cujo molde unifilamentar de DNA está no sentido 5' 3', é produzida de forma fragmentada, necessitando de diversos primers, formando os fragmentos de Okazaki (Fita Lagging). Após o processo de revisão da fita, os fragmentos são unidos covalentemente pela enzima DNA ligase. Esse processo garante que as fitas de DNA repliquem de forma semi-conservativa gerando moléculas de fita dupla geneticamente idênticas de forma muito precisa. A expressão gênica, por outro lado, diz respeito a função decodificador de proteínas realizadas pelos genes. Para iniciar esse processo, os genes presentes no DNA são transcritos em moléculas de RNA de diversos tipos pelas enzimas RNA polimerases. A transcrição é dirigida por regiões específicas de sinalização do DNA denominadas promotores, utilizadas pelas RNA polimerases para delimitar o início da região codificante. As etapas de transcrição são denominadas: início, alongamento e término. Nos procariontes geralmente as moléculas de RNA não são processadas e os mecanismo de transcrição e tradução são praticamente simultâneos. Nos eucariontes existe o processamento de moléculas de RNA precursoras, como é o caso do RNA heterogêneo nuclear, que recebe um caput de Guanosina metilada na extremidade 5', uma calda de poliadenina e a retirada dos introns e reunião do exons, realizada em um complexo sistema de processamento denominado splicing.



ATIVIDADES

1. A replicação do DNA é um mecanismo enzimaticamente muito rigoroso, pois um número muito pequeno de erros é condição básica da sobrevivência da espécie. Por que são adicionados erros na replicação?

- a) porque a enzima incorpora bases trocadas com baixa frequência;
- b) porque as bases são quimicamente modificadas por enzimas celulares e transformam-se assim umas nas outras logo depois do processo de replicação;
- c) porque a tautomeria de bases confunde a enzima na hora da síntese;
- d) porque o mecanismo de revisão induz mutações;
- e) porque radicais livres na célula modificam quimicamente as bases recém-incorporadas, antes que sejam metiladas.

2. Complete: Cada aminoácido é levado aos ribossomos para a síntese de polipeptídeos pelo pareamento de bases entre o _____ de uma molécula de aminoacil-RNAt e o _____ de um RNAm.

3. Com base nos eventos ocorridos na replicação do DNA, relacione a segunda coluna de acordo com a primeira:

- | | |
|-------------------------|--|
| DNA pol I | () Junta os fragmentos de Okasaki |
| Forquilha de replicação | () Curtos segmentos de RNA |
| 5'-3' | () Remove os primers e substitui por DNA |
| DNA ligase | () Desenrola o DNA |
| Primer | () Direção da replicação |
| Fragmentos de Okasaki | () Sintetiza DNA na fita contínua e descontínua |
| Helicase | () região onde está ocorrendo a replicação |
| DNA pol III | () Curtos fragmentos de DNA na fita descontínua |



AUTOAVALIAÇÃO

Após estudar esta aula, consigo:

- 1. Comparar eucariotos e procariotos em relação a organização gênica, o transcrito primário e o RNAm maduro.
- 2. Explicar porque numa família de genes a estrutura de introns e exons dos genes (como é o caso da globina) está preservada para todas as cópias funcionais. Entretanto, observa-se muito mais conservação entre seqüências de exons do que de introns ente os mesmos genes?
- 3. Explicar porque noventa e cinco por cento das proteínas humanas têm entre 150 e 800 aminoácidos, mas seus genes têm entre 10 e 100 kb?
- 4. Explicar porque as moléculas de RNAt devem ter, concomitantemente, características estruturais particulares e comuns.

PRÓXIMA AULA

Na próxima aula você vai acompanhar o mecanismo de tradução da informação contida no DNA e as propriedades do código genético.

**REFERÊNCIAS**

EMERSON A. CASTILHO MARTINS, E.A.C., MACIEL-FILHO, P.R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos, **Revista da Biologia** – www.ib.usp.br/revista – volume 4 – junho de 2010.

GRIFFITS, A. J. F. e Col – **Introdução à genética** – Editora Guanabara Koogan, 9a edição, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

SNUSTAD, D. P. – **Fundamentos à Genética** - Editora Guanabara Koogan, 6a edição, Rio de Janeiro, RJ, 2008.