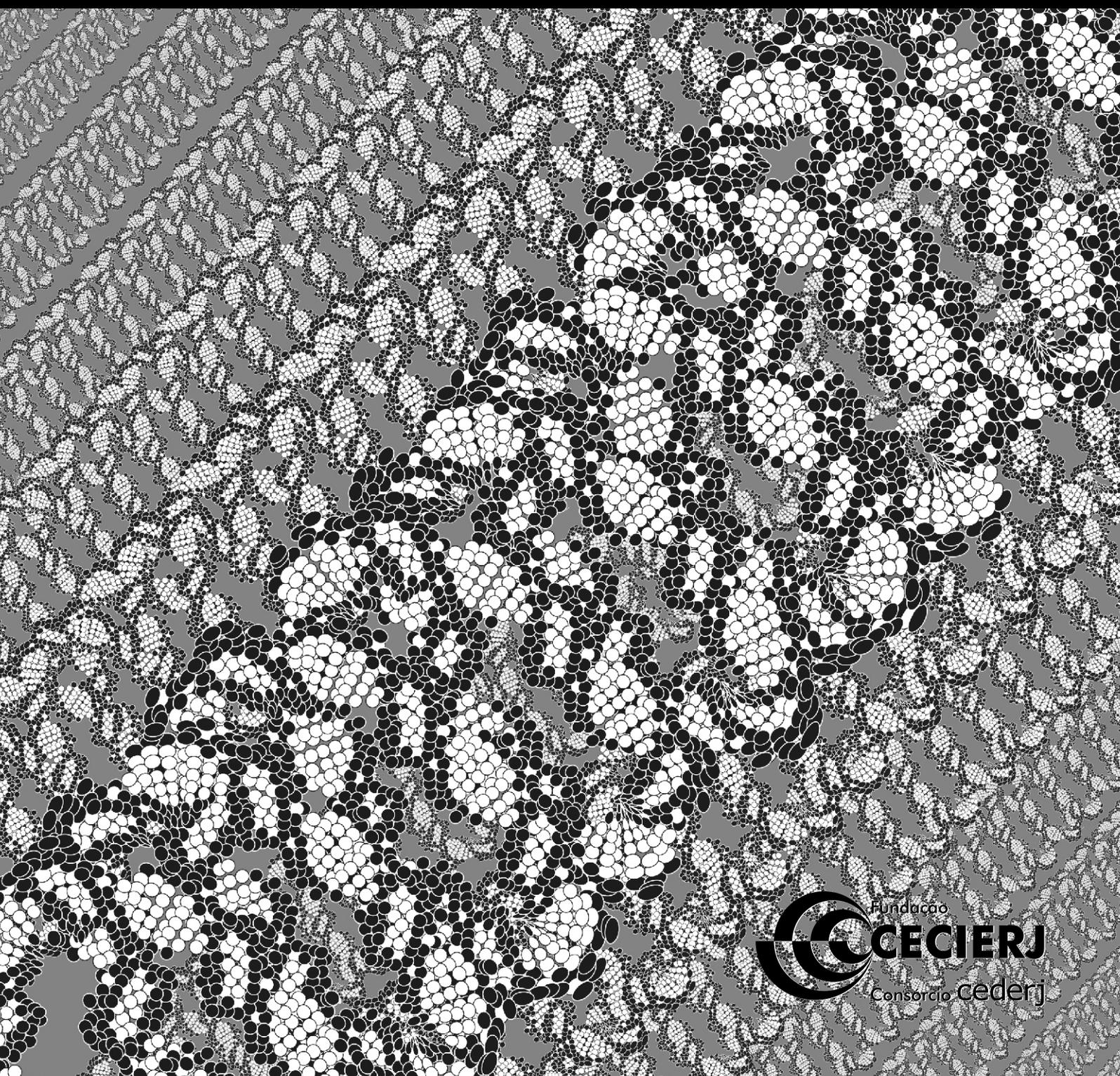


Módulos 2 e 3

Ana Beatriz Garcia  
Jacara M. B. Macedo

Volume | 2  
3ª edição

# Biologia Molecular







Fundação

**CECIERJ**

Consórcio **cederj**

Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro

## Biologia Molecular

Volume 2 - Módulos 2 e 3  
3ª edição

Ana Beatriz Garcia  
Jacyrara M. B. Macedo



SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA



Ministério  
da Educação



Apoio:



# Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Rua Visconde de Niterói, 1364 – Mangueira – Rio de Janeiro, RJ – CEP 20943-001

Tel.: (21) 2299-4565 Fax: (21) 2568-0725

## Presidente

Masako Oya Masuda

## Vice-presidente

Mirian Crapez

## Coordenação do Curso de Biologia

UENF - Milton Kanashiro

UFRJ - Ricardo Iglesias Rios

UERJ - Cibele Schwanke

## Material Didático

### ELABORAÇÃO DE CONTEÚDO

Ana Beatriz Garcia

Jacyara M. B. Macedo

### COORDENAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL

Cristine Costa Barreto

### COORDENAÇÃO DE LINGUAGEM

Maria Angélica Alves

### DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL E REVISÃO

Ana Tereza de Andrade

Anna Maria Osborne

Carmen Irene Correia de Oliveira

### REVISÃO TÉCNICA

Marta Abdala

## Departamento de Produção

### EDITORA

Tereza Queiroz

### COORDENAÇÃO EDITORIAL

Jane Castellani

### REVISÃO TIPOGRÁFICA

Ana Tereza de Andrade

Jane Castellani

Kátia Ferreira dos Santos

Marcia Pinheiro

Sandra Valéria Oliveira

### COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO

Jorge Moura

### PROGRAMAÇÃO VISUAL

Andréa Dias Fiães

Cristiane Matos Guimarães

Márcia Valéria de Almeida

Sanny Reis

### ILUSTRAÇÃO

Eduardo Bordoni

Fabiana Rocha

Jefferson Caçador

Morvan de Araújo Neto

Sami Souza

### CAPA

Fábio Muniz

### PRODUÇÃO GRÁFICA

Andréa Dias Fiães

Fábio Rapello Alencar

Copyright © 2005, Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, mecânico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, da Fundação.

G216b

Garcia, Ana Beatriz

Biologia molecular. v.2. / Ana Beatriz Garcia. – 3.ed. – Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, 2009.

262p.; 19 x 26,5 cm.

ISBN: 85-7648-060-3

1. Genética. 2. Replicação de DNA. 3. Informação gênica. 4. Procariotos. 5. Eucariotos I. Macedo, Jacyara M.B. II. Título.

CDD: 572.8

2009/1

Referências Bibliográficas e catalogação na fonte, de acordo com as normas da ABNT.

# Governo do Estado do Rio de Janeiro

**Governador**  
Sérgio Cabral Filho

**Secretário de Estado de Ciência e Tecnologia**  
Alexandre Cardoso

## Universidades Consorciadas

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
Reitor: Almy Junior Cordeiro de Carvalho

**UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Ricardo Vieiralves

**UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
Reitor: Roberto de Souza Salles

**UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Aloísio Teixeira

**UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DO RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Ricardo Motta Miranda

**UNIRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO  
DO RIO DE JANEIRO**  
Reitora: Malvina Tania Tuttman



## SUMÁRIO

### Módulo 2

**Aula 9** – Como ocorre a replicação do DNA \_\_\_\_\_ **7**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 10** – O complexo maquinário de replicação e suas enzimas \_\_\_\_\_ **19**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 11** – O funcionamento do maquinário de replicação \_\_\_\_\_ **37**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 12** – Replicação de genomas lineares e organelas \_\_\_\_\_ **55**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 13** – Mutação e reparo do DNA \_\_\_\_\_ **71**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 14** – Atividade presencial obrigatória –  
Dinâmica – DNA recombinante \_\_\_\_\_ **111**

**Aula 15** – Recombinação \_\_\_\_\_ **113**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 16 e 17** – Estudo dirigido – Atividade presencial obrigatória –  
Engenharia Genética – mitos e realidades \_\_\_\_\_ **133**

**Aula 18** – Elementos de transposição em procariotos \_\_\_\_\_ **135**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 19** – Elementos de transposição em eucariotos \_\_\_\_\_ **153**

*Ana Beatriz Garcia*

### Módulo 3

**Aula 20** – Fluxo de informação gênica - transcrição em procariotos \_\_\_\_\_ **169**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 21** – Fluxo de informação gênica - transcrição em eucariotos \_\_\_\_\_ **187**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 22** – Processamento do RNA - retirada de íntrons e emenda de éxons \_ **203**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 23** – Regulação da expressão gênica em procariotos \_\_\_\_\_ **223**

*Ana Beatriz Garcia*

**Gabarito** \_\_\_\_\_ **245**



# Como ocorre a replicação do DNA

AULA

9

## objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

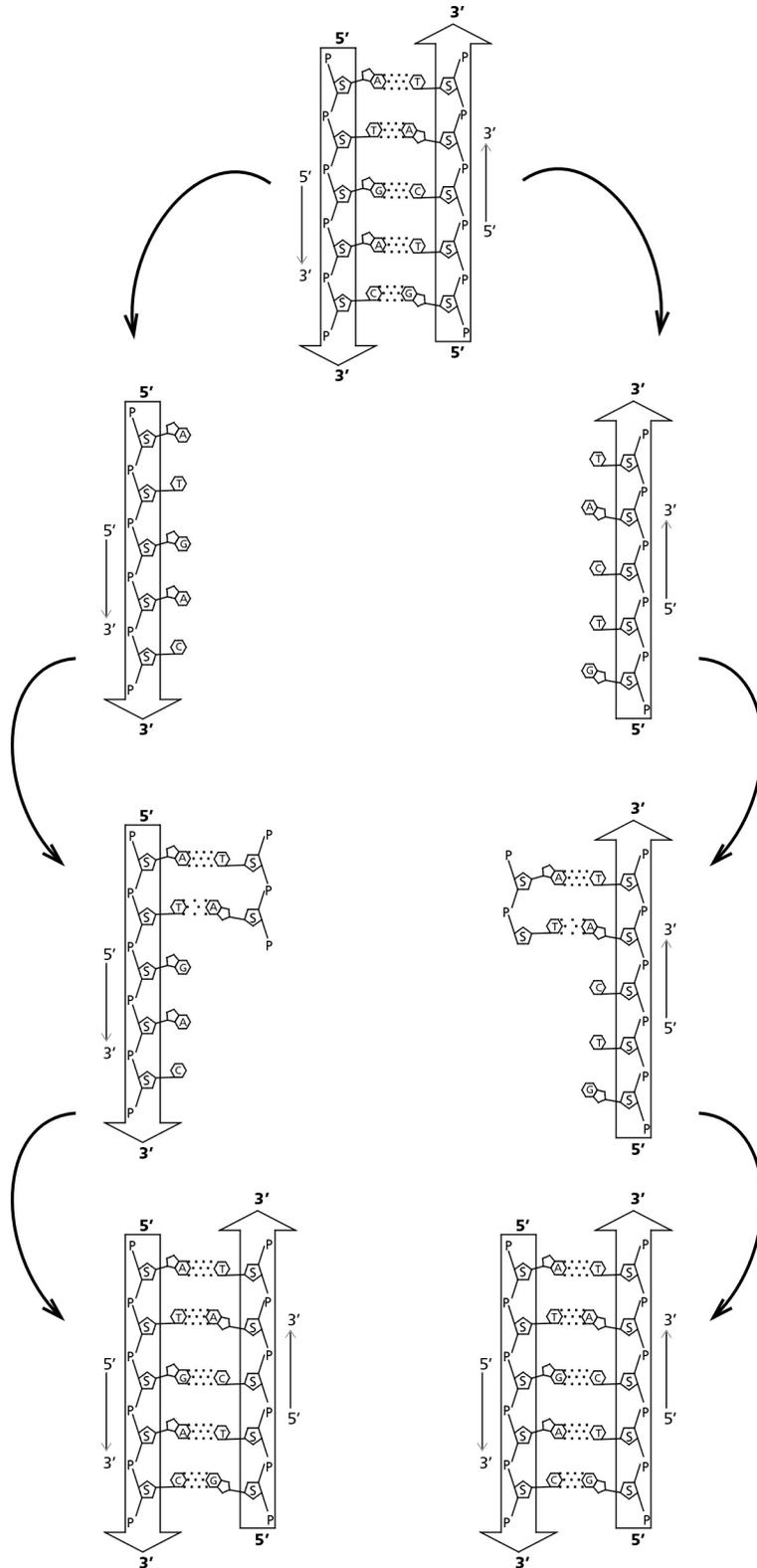
- Apresentar as importantes descobertas relacionadas ao mecanismo de duplicação do material genético, chamado replicação.
- Compreender a importância que esse mecanismo exerce sobre a perpetuação da vida de todos os seres.

### Pré-requisitos

Conhecimentos adquiridos nas aulas sobre estrutura do DNA (2 a 4 Módulo 1).

## INTRODUÇÃO

Após a comprovação da natureza do material genético, ou seja, da descoberta de que o DNA é a molécula que armazena toda a informação que será utilizada pelo organismo para manifestar as suas características fenotípicas, através da produção de proteínas, surgiu o desafio de desvendar o mecanismo pelo qual essa informação é passada de uma célula-mãe para uma célula-filha durante o processo de divisão celular. Você deve estar lembrado de que o modelo desenvolvido por Watson e Crick, em 1953, descreveu a molécula de DNA como uma dupla-hélice formada por fitas antiparalelas compostas pelos nucleotídeos A, T, G e C. Deve lembrar-se, ainda, de que as duas fitas permanecem ligadas através de ligações fracas do tipo pontes de hidrogênio formadas entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos, sendo que a Adenina forma duas pontes de hidrogênio com a Timina, e a Guanosina forma três pontes de hidrogênio com a Citosina. Esse modelo mostrou ser ideal para o armazenamento e transmissão da informação genética, mas você deve estar se perguntando o porquê desta afirmação. Vamos observar o esquema apresentado na **Figura 9.1** e acompanhar o raciocínio a seguir.



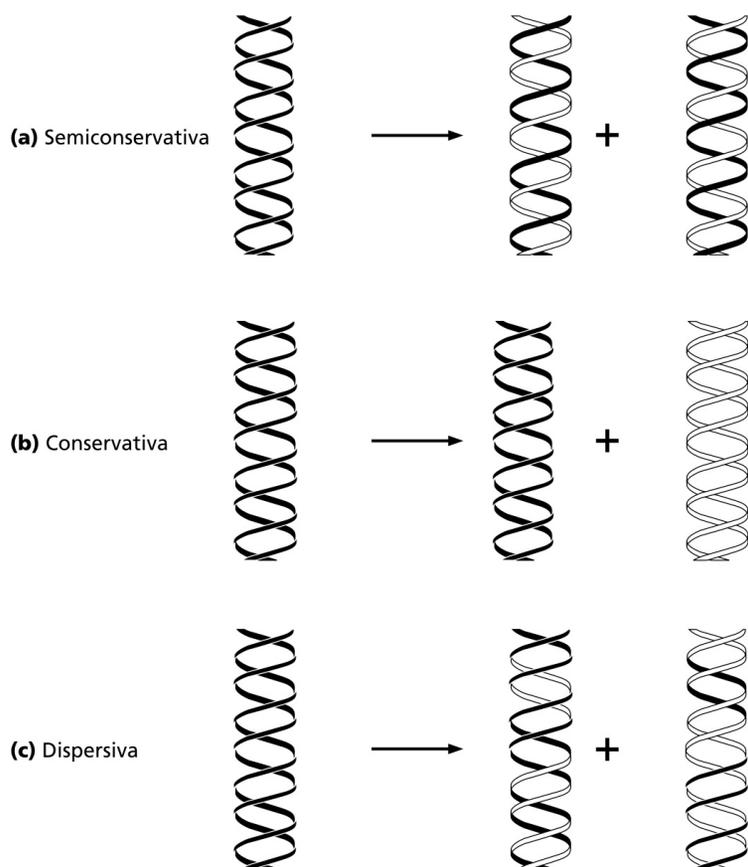
**Figura 9.1:** Quando duas fitas de DNA estão ligadas por pontes de hidrogênio, as pontes podem ser rompidas. Assim, a base nitrogenada de cada nucleotídeo presente em cada uma das fitas apresenta a capacidade de formar pontes de hidrogênio com a base nitrogenada complementar de um outro nucleotídeo.

O DNA é composto por duas fitas complementares, certo? As ligações entre as duas fitas são do tipo pontes de hidrogênio, que podem ser facilmente rompidas e restauradas conforme já estudamos na Bioquímica. Muito bem, então essa estrutura de dupla-hélice pode ser rompida com uma certa facilidade levando à formação de duas fitas simples. Pois bem, cada uma das bases nitrogenadas de cada um dos nucleotídeos presentes em cada uma das fitas separadas estão aptas a formar pontes de hidrogênio com as bases nitrogenadas de outros nucleotídeos.

Se houver uma Adenosina livre, ela poderá formar duas pontes de hidrogênio com uma Timina. Da mesma forma, se houver uma Citosina livre, ela poderá formar três pontes de hidrogênio com uma Guanosina e assim, sucessivamente, todas as bases poderão se ligar a novas bases, de modo que duas novas dupla-hélices poderão ser formadas a partir de duas fitas simples.

Parece simples, não é? Esse mecanismo foi proposto por Watson e Crick na ocasião da divulgação da estrutura do DNA, e recebeu o nome de replicação, que implica a potencialidade de se produzir infinitas réplicas de um DNA a partir de uma única dupla-hélice. Mais adiante, veremos em detalhes como esse mecanismo ocorre.

Vejam, agora, quais as possibilidades disso acontecer. Em teoria, a replicação do DNA poderia ocorrer de três diferentes maneiras, conforme ilustrado na **Figura 9.2**.



**Figura 9.2:** Os esquemas apresentam os três possíveis tipos de replicação: (a) semiconservativa; (b) conservativa e (c) dispersiva.

A replicação semiconservativa mostrada na **Figura 9.2.a** (modelo defendido por Watson e Crick) implica na síntese de duas moléculas-filhas de DNA na qual a fita original da molécula-mãe, que foi utilizada como molde, é mantida (por isso é chamada semi, que quer dizer metade!), e a segunda complementar corresponde à fita-filha sintetizada a partir do molde.

A replicação conservativa mostrada na **Figura 9.2.b** implica na síntese de duas fitas complementares, que usam a molécula-mãe como molde, mas, após a síntese, essas moléculas seriam separadas dos seus moldes e formariam uma nova molécula, de modo que a molécula-mãe manteria as duas fitas originais conservadas.

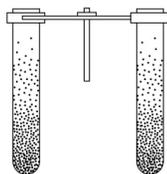
A replicação dispersiva, por sua vez, mostrada na **Figura 9.2.c**, implica na síntese de duas fitas complementares, que usam a molécula-mãe como molde, mas, após a síntese, as moléculas resultantes seriam formadas pela junção de partes da fita-mãe e partes da fita recém-sintetizada, gerando moléculas mistas.

O primeiro modelo parece o mais simples, não é mesmo? E também o mais óbvio, por isso foi defendido por Watson e Crick logo no início. A solução das dúvidas muitas vezes se encontra na realização de experimentos elegantes e inteligentes. Acompanhe o que foi feito.

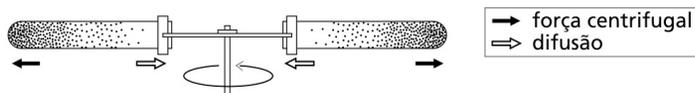
Em 1958, Matthew Meselson e Franklin Stahl utilizaram a bactéria *Escherichia coli* para desvendar o modelo. Os pesquisadores cultivaram *Escherichia coli* em meio contendo um isótopo de nitrogênio pesado,  $N^{15}$ , em substituição ao isótopo normal  $N^{14}$ . As bases nitrogenadas do DNA possuem nitrogênio. Assim, o DNA das células que foram crescidas na presença de  $N^{15}$  apresentaram uma densidade maior do que o DNA das células crescidas na ausência de  $N^{15}$ .

Você deve estar pensando: “Mas como é que eles fizeram para separar o DNA mais denso do DNA menos denso? E quem era quem?” Então, vamos tentar entender, explicando a técnica que foi utilizada. Você pode acompanhar a explicação seguindo o esquema mostrado na **Figura 9.3**.

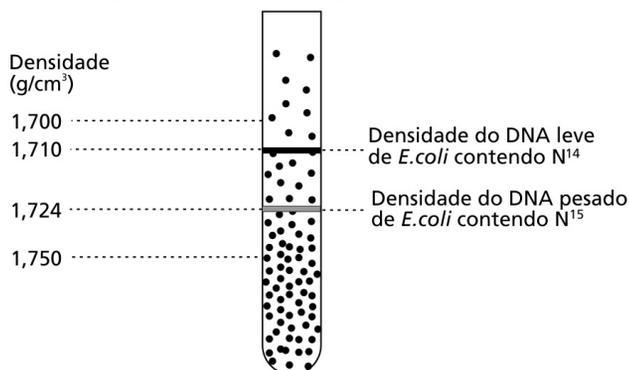
**(1)** Prepara uma solução de CsCl a 6M e adicionar a mistura de DNA contendo  $N^{14}$  e  $N^{15}$



**(2)** Centrifugar a 50.000 rpm por 48 a 72 horas



**(3)** O equilíbrio é estabelecido entre força centrífuga e difusão, gerando um gradiente de concentração de CsCl.



**Figura 9.3:** Gradiente de equilíbrio de densidade de Cloreto de Césio.

A densidade da maioria dos DNAs é semelhante à densidade de soluções concentradas de sais pesados, tais como Cloreto de Césio (CsCl). Por exemplo, a densidade do CsCl a 6M é de cerca de 1,7 g/cm<sub>3</sub> e a densidade do DNA de *Escherichia coli* contendo  $N^{14}$  é de 1,710 g/cm<sup>3</sup>. A substituição de  $N^{14}$  por  $N^{15}$  aumenta a densidade do DNA para 1,724 g/cm<sup>3</sup>. Quando uma solução de CsCl a 6M é submetida à centrifugação em alta velocidade (30.000 a 50.000 revoluções por minuto) durante 48 horas, ocorre a formação de um gradiente de equilíbrio de densidade.

A força centrífuga causada pela centrifugação em alta velocidade sedimenta o sal no fundo do tubo. Em contrapartida, a força de difusão resulta no movimento de moléculas de sais de volta para a parte superior do tubo, só que em concentração baixa. Após um tempo longo de centrifugação, o equilíbrio entre a força de centrifugação e difusão é atingido, de modo que nesse momento existe um gradiente linear crescente de concentração de sal do topo para o fundo do tubo.

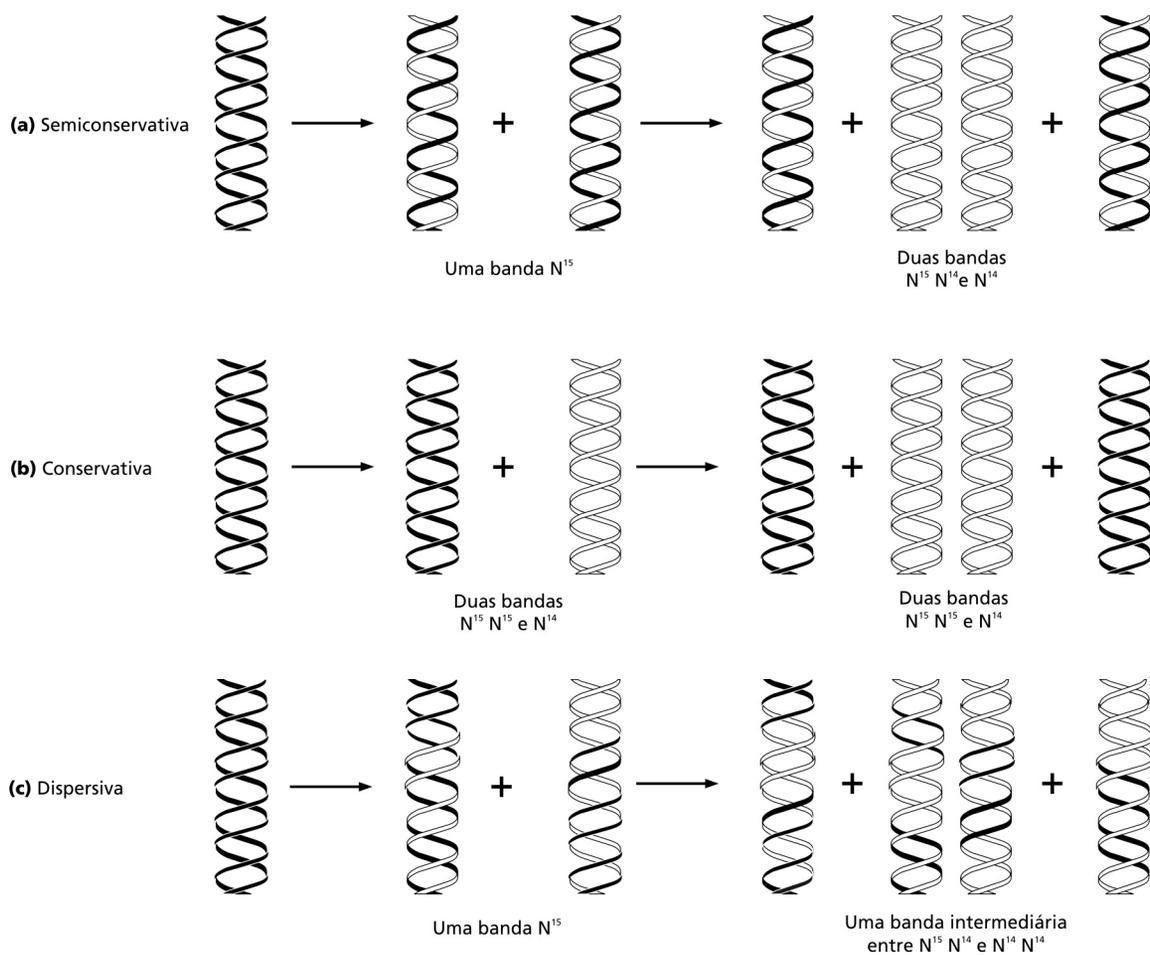
A densidade do CsCl a 6M é de cerca de  $1,7 \text{ g/cm}^3$  no equilíbrio. Após a centrifugação, o gradiente linear de densidade irá variar de  $1,65 \text{ g/cm}^3$  no topo do tubo a cerca de  $1,75 \text{ g/cm}^3$  no fundo do tubo. Se houver DNA nessa solução de CsCl e, conseqüentemente, no gradiente, o mesmo se moverá para uma posição na qual a densidade da solução de CsCl seja igual a dele.

Assim, um DNA com densidade  $1,71 \text{ g/cm}^3$  estará em uma posição diferente de um DNA com densidade  $1,724 \text{ g/cm}^3$ , o que tornará possível a separação do DNA mais denso do DNA menos denso.

Voltemos agora para o experimento de Meselson e Stahl. Após o cultivo das células durante algum tempo na presença de  $\text{N}^{15}$ , todo o DNA estava mais pesado que o normal (mais denso). O próximo passo foi retirar todo o meio de cultura contendo  $\text{N}^{15}$  e adicionar meio de cultura contendo o  $\text{N}^{14}$ .

A *Escherichia coli* se divide a cada vinte minutos, de modo que, após cada divisão, um ciclo de replicação do DNA está completo. Assim, coletando células em diferentes intervalos de tempo, extraindo seu DNA e submetendo-os ao gradiente já descrito foi possível desvendar como se dá o mecanismo de replicação.

Antes de chegarmos ao resultado final, vamos analisar que modelos de replicação poderiam ser criados de acordo com os padrões que viessem a ser obtidos após o gradiente de equilíbrio de centrifugação. Vamos acompanhar o esquema apresentado na **Figura 9.4** e as explicações a seguir.



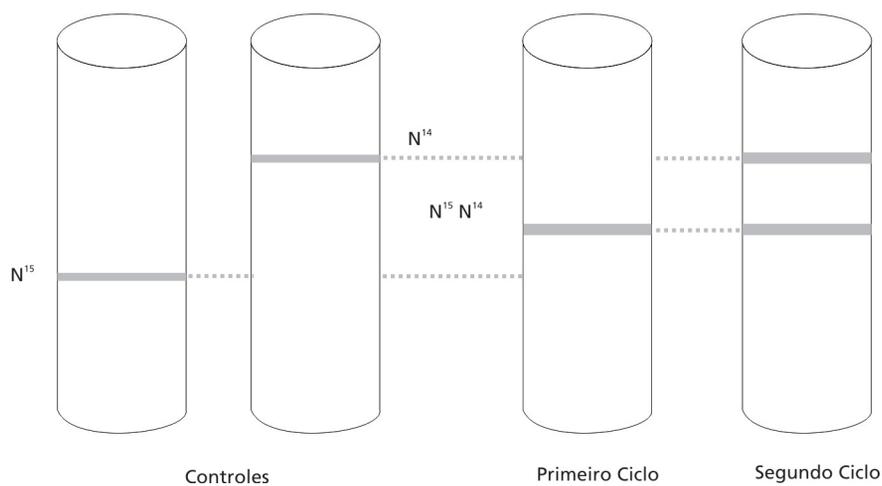
**Figura 9.4:** Padrões esperados para os diferentes tipos de replicação após o gradiente de equilíbrio de Césio.

Para a replicação semiconservativa mostrada na **Figura 9.4.a**, ao final do primeiro ciclo, todas as moléculas apresentariam um peso intermediário resultante da presença de uma fita leve e uma fita pesada. No final do segundo ciclo, metade das moléculas apresentaria um peso intermediário (uma fita leve e a outra fita pesada) e a outra metade seria leve (duas fitas leves). O padrão esperado após a separação do DNA no gradiente de Cloreto de Césio seria o seguinte: uma banda intermediária após o primeiro ciclo (intermediária, em que todas as moléculas apresentariam uma fita pesada e a outra fita leve); duas bandas após o segundo ciclo, uma leve (duas moléculas leves) e outra intermediária (duas moléculas intermediárias).

Para a replicação conservativa mostrada na **Figura 9.4.b**, no final do primeiro ciclo, metade das moléculas seria pesada (conservadas) e a outra metade seria leve (replicadas a partir do molde pesado). No final do segundo ciclo, o mesmo padrão do primeiro ciclo seria esperado, pois a molécula-mãe sempre se conserva, de modo que a molécula pesada seria a mesma usada como molde e conservada no primeiro ciclo, o mesmo se repetindo após o segundo ciclo. Dentre as moléculas leves, uma delas seria a molécula gerada no primeiro ciclo e conservada, e as outras duas leves seriam geradas a partir dos moldes (uma leve conservada e uma pesada conservada). O padrão esperado após a separação do DNA no gradiente de Cloreto de Césio seria o seguinte: duas bandas após o primeiro ciclo (uma molécula pesada e outra molécula leve); duas bandas após o segundo ciclo (três moléculas leves e uma molécula pesada).

Por último, para a replicação dispersiva mostrada na **Figura 9.4.c**, no final do primeiro ciclo, todas as moléculas seriam uma mistura entre as moléculas leves e pesadas. O mesmo seria observado após o segundo ciclo. O padrão esperado após a separação do DNA no gradiente de Cloreto de Césio seria o seguinte: uma banda intermediária após o primeiro ciclo (moléculas com partes mescladas); uma banda após o segundo ciclo (moléculas com partes mescladas).

O resultado obtido após o gradiente de equilíbrio de CsCl está ilustrado na **Figura 9.5**.



**Figura 9.5:** O esquema apresenta o resultado observado no experimento. Como controles nós podemos observar o DNA pesado contendo  $N^{15}$  e o DNA leve contendo  $N^{14}$ . Após o primeiro ciclo, houve o aparecimento de um tamanho intermediário entre  $N^{15}/N^{14}$ . Após o segundo ciclo, houve o aparecimento de um tamanho correspondente ao DNA leve, contendo  $N^{14}$  e um tamanho intermediário entre  $N^{15}/N^{14}$ .

A presença de uma banda intermediária após o primeiro ciclo de replicação indica que todas as moléculas de DNA contêm uma fita leve (recém-sintetizada) e uma fita pesada (proveniente da fita molde). Após o segundo ciclo, duas bandas foram observadas, uma leve, indicando a presença de DNA recém-sintetizado a partir do molde obtido no primeiro ciclo, e outra banda intermediária, indicando a presença de DNA na qual, uma das fitas contém nitrogênio pesado. Esses resultados comprovaram que a replicação do DNA é semiconservativa.

## RESUMO

Nesta aula, você viu que o modelo proposto por Watson e Crick sugeriu um mecanismo de transmissão da informação genética contida no DNA, através de um mecanismo conhecido como replicação. Você viu, ainda, que a replicação do DNA é semiconservativa, pois uma das fitas da nova molécula sintetizada é a mesma da molécula-mãe que serviu de molde para a sua síntese.

## EXERCÍCIOS

1. Você está convencido da importância do mecanismo de replicação do DNA? Responda por quê.
2. De que maneira o modelo de Watson e Crick indicou o possível mecanismo de duplicação da molécula do DNA?
3. O que significa replicação semiconservativa?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Você não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios propostos. Todas as respostas estão contidas no texto desta aula. O estudo desse conteúdo é muito importante para a compreensão das próximas aulas, nas quais falaremos sobre o maquinário de replicação. Por isso, bom estudo e até lá!



## O complexo maquinário de replicação e suas enzimas

AULA

# 10

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Apresentar os diferentes componentes do maquinário de replicação.
- Conhecer as diferentes enzimas envolvidas no processo de replicação e as suas respectivas funções.

### Pré-requisitos

Conhecimentos adquiridos na Aula 9.

Material didático de Bioquímica para relembrar os conceitos de enzima, reação covalente, ligação fosfodiéster, pontes de hidrogênio, entre outros.

Material didático referente às aulas sobre estrutura dos cromossomos em vírus e procariotos e superespiralamento do DNA (Módulo 1, Aulas 6, 7 e 8).

## INTRODUÇÃO

A importância do papel da replicação do DNA fica clara a partir da definição da sua função como molécula que armazena e transmite as informações que resultarão em todas as características de um organismo. Já vimos que a replicação é semiconservativa, mas como esse mecanismo, importante e vital para a sobrevivência dos seres vivos, é coordenado durante o processo de divisão celular, para garantir que todas as células-filhas tenham o mesmo DNA que a célula-mãe? Vamos partir das definições mais simples até atingirmos os detalhes.

A unidade de DNA na qual ocorre um evento individual de replicação é chamada replicon. Cada replicon é ativado uma vez, e somente uma vez, em cada ciclo celular. O replicon é definido por possuir os elementos de controle necessários à replicação. Ele possui uma origem na qual a replicação será iniciada e pode também conter uma região terminal, onde a replicação termina.

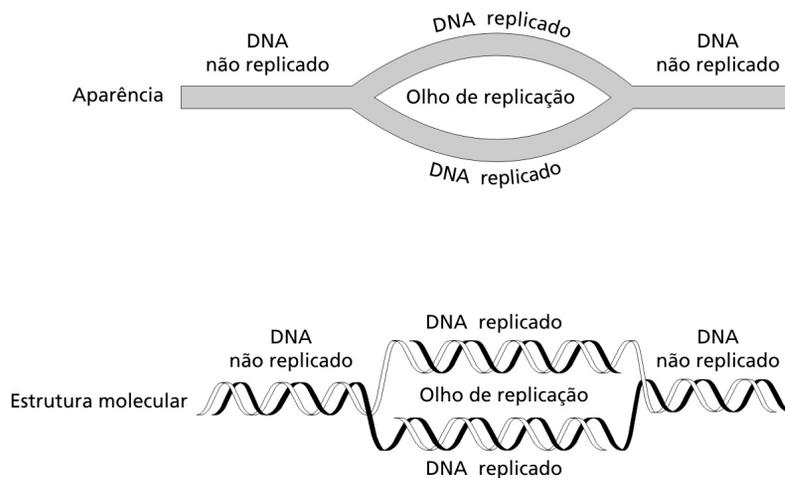
O genoma dos procariontes constitui um único replicon, responsável pela replicação de todo DNA cromossômico, sendo considerado o maior replicon existente. Mas existe um detalhe importante, as bactérias podem conter informação genética adicional na forma de plasmídios.

Um plasmídio é um genoma circular autônomo que constitui um replicon separado. Ele pode ser replicado ao mesmo tempo que o cromossomo ou não. Muitos plasmídios se apresentam em cópias múltiplas dentro de uma única bactéria. Da mesma maneira, os fagos e vírus de DNA também constituem replicons, capazes de ser ativados muitas vezes durante um ciclo de infecção.

Em contrapartida, os cromossomos de eucariotes apresentam muitos replicons, ou seja, a replicação é iniciada simultaneamente em diferentes regiões do DNA.

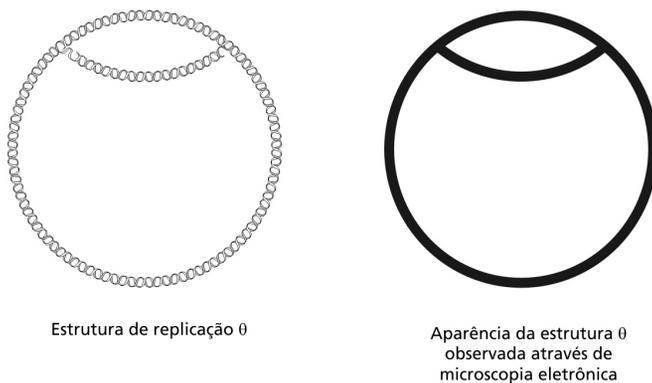
Isso nos leva a pensar nos inúmeros mecanismos envolvidos no controle de iniciação, síntese e finalização da replicação de genomas complexos da maioria dos eucariotes, incluindo o homem.

De um modo geral, uma molécula de DNA que está se replicando apresenta dois tipos de regiões, uma que já foi replicada e outra que ainda está se replicando. Se você observar a **Figura 10.1**, verá que quando o DNA está se replicando, a região replicada aparece como um olho dentro do DNA não replicado. Observe o formato da estrutura. Ela não se parece com um olho?



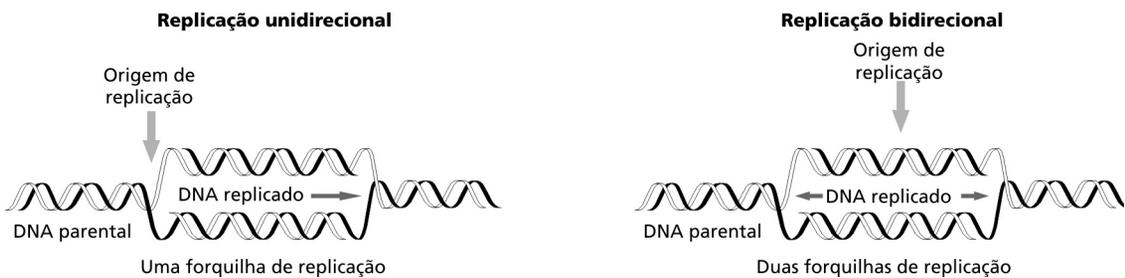
**Figura 10.1:** O DNA replicado é visto como um olho de replicação, cercado por DNA não replicado.

A região não replicada consiste em uma dupla-hélice parental, já a região aberta corresponde às duas fitas que já foram replicadas. Quando o replicon é circular, a presença de um olho forma uma estrutura  $\theta$  (letra grega teta) observada na **Figura 10.2**, pois a estrutura lembra o formato dessa letra grega. Estas estruturas puderam ser definidas através de microscopia eletrônica.



**Figura 10.2:** O olho de replicação forma uma estrutura  $\theta$  no DNA circular.

O ponto no qual cada replicação ocorre é chamado forquilha de replicação. Mais uma vez você verá que o nome da estrutura se deve ao seu formato. A forquilha de replicação se move seqüencialmente ao longo do DNA, a partir do seu ponto de origem. A replicação pode ser unidirecional ou bidirecional. A distinção entre os dois tipos se dá pela observação da formação de uma ou duas forquilhas de replicação a partir da origem, o que pode ser observado no esquema da **Figura 10.3**.



**Figura 10.3:** Os replicons podem ser unidirecionais ou bidirecionais. Isso dependerá do número de forquilhas que são formadas a partir da origem.

Usando-se técnicas de microscopia eletrônica, foi possível demonstrar que a replicação é bidirecional para a maioria dos DNAs.

Você pode estar se perguntando: “Como se faz para definir processos, o seu funcionamento e a sua regulação?” Pois muito bem! A maior parte das informações relacionadas ao mecanismo de replicação do DNA foram obtidas em estudos utilizando a bactéria *Escherichia coli* e alguns vírus que facilitam a experimentação em laboratório, bem como ao tamanho de seus genoma.

Usando esses organismos, foi possível a obtenção de mutantes, ou seja, indivíduos que sofreram alteração no seu material genético, e a posterior identificação dos genes que dão origem a proteínas específicas e, conseqüentemente, suas funções biológicas. Você terá a oportunidade de estudar os mecanismos de mutação nas próximas aulas.

Além disso, a possibilidade de reproduzir em tubos de ensaio, o que nós chamamos experimentos *in vitro*, um grande número de reações que ocorrem no organismo *in vivo* permitiu descobrir a função de diferentes enzimas envolvidas em inúmeros processos biológicos. No entanto, os pesquisadores devem tomar muito cuidado com as conclusões, pois o comportamento *in vitro* pode não ser idêntico ao que ocorre no organismo vivo.

## O MAQUINÁRIO DE REPLICAÇÃO

Nesse tópico, você estudará algumas das enzimas envolvidas no processo de replicação e poderá formar uma idéia da complexidade do maquinário. As diferentes atividades enzimáticas estão envolvidas nas etapas de iniciação, alongamento e terminação. Vamos descrever o papel de cada uma dessas enzimas para facilitar a compreensão do processo de replicação como um todo.

Vamos começar falando sobre a enzima que sintetiza o DNA. Uma enzima capaz de sintetizar uma nova fita de DNA utilizando uma outra fita como molde é chamada DNA polimerase. Lembre-se, o DNA é um polímero composto por muitos nucleotídeos e, assim, a DNA polimerase é a enzima que constrói um polímero unindo os monômeros que são os nucleotídeos.

Existem enzimas que sintetizam DNA usando um RNA como molde (transcriptase reversa encontrada em retrovírus) e, até mesmo, enzimas que fazem DNA sem usar um molde (transferase terminal). Os eucariotos e procariotos possuem muitas enzimas com atividade de DNA polimerase, no entanto, somente algumas delas são responsáveis pela replicação propriamente dita, sendo diferencialmente chamadas replicases.

As outras polimerases estão envolvidas em funções auxiliares, tais como reparo, que serão estudadas mais adiante.

## DNA POLIMERASE I DE *ESCHERICHIA COLI*

A DNA polimerase I de *Escherichia coli* foi a primeira DNA polimerase caracterizada, em 1957, pelo pesquisador Arthur Kornberg. Sabe-se que existem aproximadamente 400 moléculas/célula. A polimerase I de *Escherichia coli* é comumente chamada pol I. A enzima é monomérica com massa molecular aproximada de 103 kDa (103.000 gramas por mole). A enzima requer o cátion divalente ( $Mg^{++}$ ) como co-fator para sua atividade.

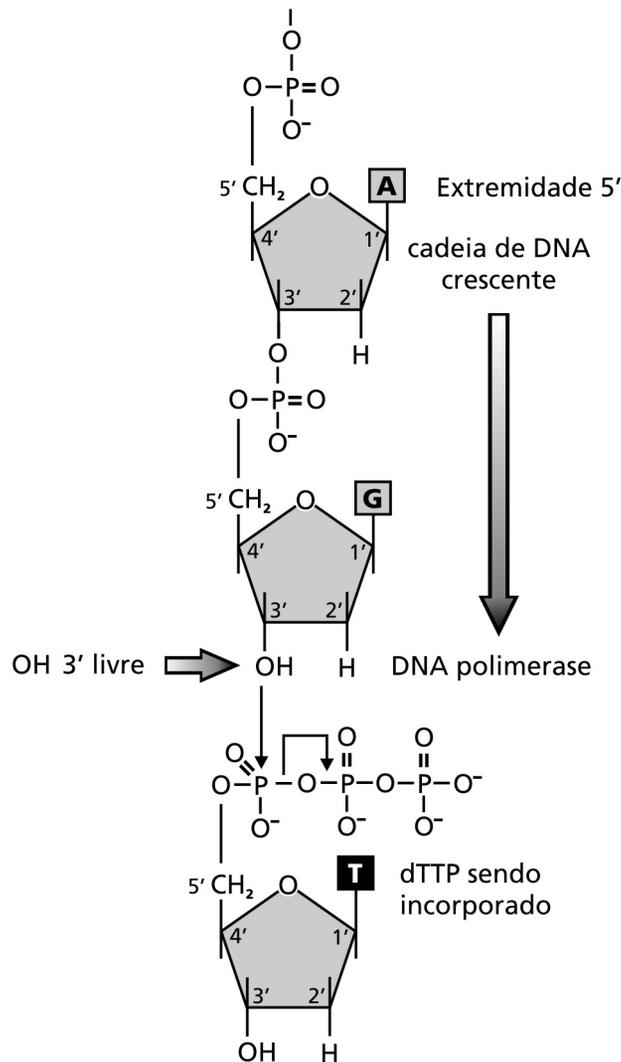
Você já deve estar se perguntando: “Como é que essa enzima sintetiza DNA, não é mesmo?” Então, vejamos a seguir. Nas aulas anteriores, você já aprendeu que os precursores do DNA são os desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), que são formados por uma pentose (açúcar contendo 5 carbonos), um grupamento fosfato (trifosfato) e uma base nitrogenada que os diferencia (A, T, G e C).

A base nitrogenada está covalentemente ligada à pentose pelo carbono 1' (primeiro carbono do açúcar no sentido horário); já o grupamento fosfato está ligado ao carbono 5' (quinto carbono do açúcar no sentido horário). Existe um grupamento hidroxila (OH) livre no carbono 3' da pentose (terceiro carbono do açúcar no sentido horário).

Na molécula do DNA, vimos que o nucleotídeo se apresenta na forma de monofosfato e que sempre existe um fosfato livre na posição 5' do açúcar, e um grupamento hidroxila livre na posição 3' do açúcar. Quando o DNA é dupla fita, o mesmo ocorre, só que na direção oposta. Por isso dizemos que a orientação do DNA é 5'- 3'.

A DNA polimerase atua justamente na incorporação de um novo nucleotídeo a um nucleotídeo já existente na molécula de DNA, a partir da hidroxila livre na posição 3'. Esta reação se dá através de um ataque nucleofílico (que você já estudou na disciplina Bioquímica) da hidroxila 3' sobre o átomo de fósforo interno presente no nucleotídeo precursor, liberando um pirofosfato, formando uma ligação fosfodiéster (também estudado na disciplina Bioquímica).

A DNA polimerase não é capaz de adicionar um novo nucleotídeo se não houver um grupamento hidroxila livre. Dessa forma, dizemos que ela é dependente de um iniciador (*primer* em inglês) que lhe forneça uma hidroxila para que a reação aconteça. A orientação da síntese é sempre 5'- 3'. A incorporação de um nucleotídeo só ocorre através de uma reação entre o fosfato 5' do precursor e a hidroxila 3'. Você pode observar a reação da DNA polimerase ilustrada na **Figura 10.4**.



**Figura 10.4:** Mecanismo de ação da DNA polimerase. O esquema ilustra uma cadeia na qual o nucleotídeo na extremidade 3' é um desoxiguanilato (visto na aula sobre estrutura do DNA). A DNA polimerase adiciona uma desoxitimidina monofosfato (a partir do precursor desoxitimidina trifosfato) à extremidade 3' da cadeia com a liberação de um pirofosfato.

Você deve ter em mente que o DNA sintetizado fica ligado covalentemente ao iniciador, mas se liga ao molde somente pelas pontes de hidrogênio. Assim, o molde determina a especificidade do pareamento de acordo com o modelo de Watson-Crick. Primeiro ocorre o pareamento de um nucleotídeo que contenha uma base complementar à base do nucleotídeo presente no molde; posteriormente, a DNA polimerase promove a ligação fosfodiéster. Somente o fosfato  $\alpha$  do dNTP é incorporado no novo DNA sintetizado. É dessa forma, então, que todas as polimerases funcionam.

Na época da descoberta da pol I, acreditava-se que ela era a responsável pela replicação do genoma de *Escherichia coli*. No entanto, experimentos desenvolvidos *in vitro* demonstraram que a velocidade da síntese de DNA mediada pela pol I é de 20 nucleotídeos/segundo, muito mais lenta do que o valor de 1.000 nucleotídeos/segundo, observado durante a replicação do DNA de *Escherichia coli*.

Em 1969, John Cairns isolou um mutante viável (*polA*) sem atividade da DNA pol I, uma indicação de que pol I não é a principal enzima usada para replicar o DNA. No entanto, os mutantes *polA* apresentaram altos índices de mutação, indicando uma deficiência no mecanismo de reparo do DNA, ou seja, embora a pol I tenha atividade de polimerase, seu principal papel está envolvido com a correção de possíveis erros ocorridos durante o processo de replicação do DNA. Você consegue compreender como é importante o estudo de mutantes?

Uma análise mais detalhada da pol I revelou que ela apresenta outras atividades. Além de polimerase, ela também apresenta atividades de exonuclease.

Uma nuclease é uma enzima que degrada ácidos nucléicos. Uma exonuclease degrada ácidos nucléicos a partir de uma das duas extremidades (5' ou 3'), enquanto uma endonuclease quebra internamente a molécula de DNA. A pol I apresenta atividade exonucleásica 5'-3', ou seja, começa na extremidade 5' do DNA e apresenta também atividade exonucleásica 3'-5', que remove nucleotídeos a partir da extremidade 3' do DNA.

Usando uma enzima chamada protease A, que corta a pol I em dois fragmentos protéicos, foi possível localizar as três atividades enzimáticas da proteína. As atividades de polimerase 5'-3' e exonuclease 3'-5' estão contidas em um fragmento maior (68 kDa), conhecido como fragmento **KLENOW**, e a atividade de exonuclease 5'-3' está em um fragmento menor (35 kDa).

A função de exonuclease 3'-5' é a edição do DNA, ou seja, a remoção de nucleotídeos polymerizados incorretamente. Este fato foi descoberto em mutantes *mutator* da DNA polimerase do fago T4; esses mutantes apresentaram atividade exonucleásica 3'-5' reduzida. Já um outro mutante *antimutator* tinha a atividade exonucleásica 3'-5' aumentada. No geral, a atividade de exonuclease 3'-5' aumenta a fidelidade na síntese do DNA em torno de 10 a 1.000 vezes. Assim, quando a enzima polimerase, sintetizando DNA na direção 5'-3' adiciona, acidentalmente, uma base errada de DNA, a atividade de verificação da exonuclease 3'-5' remove o erro imediatamente.

O número de erros durante a síntese de DNA diminui consideravelmente devido a dois sistemas de controle: o sistema da regra de pareamento das bases reconhecido pelo sítio catalítico 5'-3', e o sistema de verificação promovido pela exonuclease 3'-5'.

O mecanismo de atuação da pol I na verificação e reparo durante a síntese de DNA será visto na próxima aula.

Você deve estar pensando: “Já que a pol I não é responsável pela replicação do cromossomo de *Escherichia coli*, deve haver outra enzima responsável por isso.” Pois bem, não existe somente uma, mas duas outras DNA polimerases em *Escherichia coli*. A DNA polimerase II e a DNA polimerase III.

A DNA polimerase II, da mesma forma que a pol I, é uma enzima de reparo, embora apresente uma atividade menor do que a pol I. Ela é um polipeptídeo monomérico com atividade de polimerase 5'-3' e atividade de exonuclease 3'-5', mas não apresenta atividade de exonuclease 5'-3'.

#### **KLENOW**

Este fragmento recebeu seu nome em homenagem ao pesquisador que o descobriu. A subunidade Klenow da DNA polimerase é utilizada em laboratórios de Biologia Molecular para replicar DNA *in vitro*.

A DNA polimerase III é uma enzima multimérica formada por muitas subunidades diferentes. Apresenta atividade de polimerase 5' - 3' e atividade de exonuclease 3' - 5', mas não apresenta atividade de exonuclease 5' - 3'. A DNA polimerase III é a responsável pela replicação do cromossomo de *Escherichia coli* e por isso é diferencialmente chamada de replicase.

Você verá, nos próximos tópicos, os diferentes componentes da DNA polimerase III.

## A REPLICASE EM ESCHERICHIA COLI

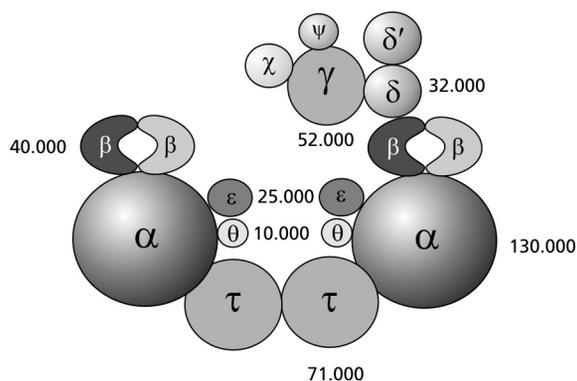
Como vimos anteriormente, a DNA polimerase III é uma enzima multimérica com uma massa molecular de 900 kDa quando encontrada na sua forma completa, também conhecida como holoenzima. Algumas subunidades apresentam função estrutural enquanto outras apresentam função catalítica.

A estrutura central mínima que apresenta atividade catalítica, demonstrada *in vitro*, contém três subunidades:  $\alpha$  (alfa, produto do gene *dnaE*);  $\epsilon$  (épsilon, produto do gene *dnaQ*) e  $\theta$  (teta, produto do gene *holE*). A adição de uma quarta subunidade,  $\tau$  (tau, produto do gene X) resulta na dimerização da estrutura central e aumenta a sua atividade catalítica.

A estrutura central só é capaz de sintetizar fitas curtas de DNA, uma vez que ela se desprende facilmente da fita molde de DNA. Uma outra subunidade,  $\beta$  (beta, produto do gene *dnaN*), da DNA polimerase III, forma uma garra dimérica que impede que a estrutura central se desprenda do DNA molde.

E a complexidade não pára por aí. Como você deve estar lembrado, no início da aula, vimos que existe a formação de uma forquilha durante a replicação de um DNA dupla fita. Na verdade, duas forquilhas, porque a replicação é bidirecional. Em cada forquilha, pelo menos 20 polipeptídeos participam do processo!!! Pois é preciso replicar as duas fitas, não é mesmo? Parece difícil de imaginar e muito pior de compreender como isso pode ser tão bem coordenado dentro da célula!

A complexidade estrutural da holoenzima DNA polimerase III está ilustrada na **Figura 10.5**.



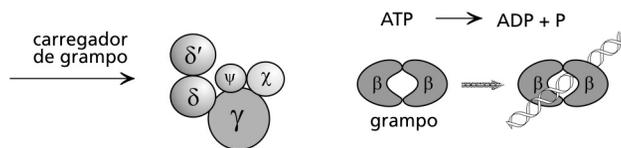
**Figura 10.5:** Estrutura da DNA polimerase III de *Escherichia coli*. Os números apresentam suas massas em daltons.  $\alpha$  – alfa,  $\beta$  – beta,  $\epsilon$  – épsilon,  $\gamma$  – gama,  $\theta$  – teta,  $\tau$  – tau e  $\delta$  – sigma.

Observando a figura, podemos encontrar os seguintes elementos:

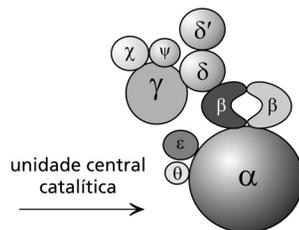
1. duas unidades centrais compostas pelas subunidades  $\alpha$  (alfa),  $\epsilon$  (épsilon) e  $\theta$  (teta) que apresentam atividade catalítica;
2. um componente dimérico  $\tau$  (tau), que liga as duas unidades centrais catalíticas;
3. dois componentes diméricos  $\beta$  (beta), cada um ligado a uma unidade central catalítica, que por sua vez as mantêm ligadas ao DNA;
4. um componente  $\gamma$  (gama), composto pelas subunidades  $\psi$ ,  $\delta$  e  $\chi$ , ligado a um componente dimérico  $\beta$  (beta).

O acoplamento do complexo holoenzima DNA polimerase III se dá em diferentes etapas para que possa ligar-se simultaneamente às duas fitas do DNA. Para compreender o modelo, você pode observar a **Figura 10.6** e acompanhar a explicação que se segue.

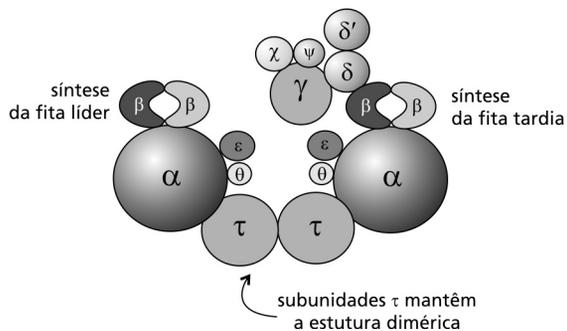
(1) O carregador de grampo ( $\delta$ ) cliva o ATP quando o grampo é ligado ao DNA



(2) Uma unidade central catalítica se liga ao grampo  $\beta$



(3) Um dímero Tau une duas unidades centrais catalíticas, mantendo-as em ambas as fitas do DNA.



**Figura 10.6:** O acoplamento da DNA polimerase III ocorre em estágios, gerando um complexo enzimático que sintetiza DNA de ambas as fitas novas.

1. Um dímero  $\beta$  e o complexo  $\gamma$ , reconhecem a região molde/iniciador no DNA molde, formando um complexo de pré-iniciação. Nesta reação, o complexo  $\gamma$  cliva ATP e transfere as subunidades  $\beta$  para o molde. O par de subunidades  $\beta$  forma uma garra em torno do DNA e garante a processividade, ou seja, garante que a região central catalítica fique presa ao DNA podendo, assim, sintetizá-lo. O complexo  $\gamma$  é chamado carregador/disparador de garra  $\beta$ , pois utiliza a hidrólise do ATP para dirigir a ligação da garra  $\beta$  ao DNA.
2. A ligação ao DNA muda a conformação no sítio da subunidade  $\beta$  ligada ao complexo  $\gamma$  que, como resultado, apresenta forte afinidade pela região central catalítica. Ocorre, então, a ligação, e é desta forma que ocorre o contato com o DNA. A região central catalítica contém subunidades  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ . A subunidade  $\alpha$  tem habilidade de sintetizar DNA; a subunidade  $\epsilon$  apresenta atividade de exonuclease 3' - 5' (verificação); a subunidade  $\theta$  está envolvida provavelmente no acoplamento do complexo.
3. Um dímero  $\tau$  se liga à região central catalítica da DNA polimerase e desempenha uma função dimerizante, ligando-se à região central catalítica de uma segunda DNA polimerase que, por sua vez, está associada a uma outra garra formada por duas subunidades  $\beta$  que, por sua vez, estará ligada à segunda fita do DNA

A holoenzima DNA polimerase III é assimétrica, pois contém somente um complexo  $\gamma$  responsável pela adição da garra  $\beta$ . Uma explicação para essa assimetria será apresentada na próxima aula.

## HELICASES, PROTEÍNAS LIGANTES DE DNA FITA SIMPLES E TOPOISOMERASES

Para que a replicação ocorra, é necessário que as duas fitas da molécula parental sejam separadas durante a síntese de uma nova fita complementar.

Você já sabe que o DNA é uma espiral dupla. Dessa forma, a única maneira de abrir a estrutura é distorcendo a molécula, giro por giro, e posteriormente rompendo as pontes de hidrogênio! Cada giro da molécula é composto de 10 pares de bases, de modo que a molécula de DNA deve dar uma volta de 360° a cada 10 pares de bases para que a replicação aconteça. Acompanhe o raciocínio que se segue. Em *Escherichia coli*, a velocidade de replicação é de cerca de 30.000 nucleotídeos por minuto, o que significa dizer que o DNA tem de ser girado 3.000 vezes por minuto para facilitar o desenrolamento da molécula de DNA! Esses números são surpreendentes, você não acha?

A enzima DNA helicase separa as fitas de DNA utilizando a hidrólise de ATP como energia. Uma helicase é geralmente multimérica, na maioria das vezes hexamérica, possuindo diferentes sítios de ligação ao DNA que permitem o seu deslocamento. É provável que exista uma conformação que se liga ao DNA dupla fita e outra que se liga ao DNA simples fita. A alternância entre essas duas conformações governa a abertura das fitas e requer a hidrólise de ATP. A principal helicase de *Escherichia coli* é a DnaB.

Após a abertura das fitas, a proteína SSB (do inglês *single-strand binding*, que significa ligante de fita simples) se liga ao DNA simples fita, impedindo que a dupla fita seja novamente formada. A SSB se liga como um monômero, mas tipicamente, de modo cooperativo, ou seja, a ligação de um monômero permite a ligação de um outro, e depois outro, até que toda a molécula de DNA fita simples esteja coberta com a SSB. A ligação dessa proteína é fundamental para o início da replicação conforme veremos mais adiante.

Você deve estar lembrado que, no início deste tópico, nós mencionamos o número de giros que a molécula de DNA deve dar para que ele possa ser aberto e replicado. Pois bem, considerando a molécula dupla-hélice girando e sendo aberta pela DNA helicase, a tendência do DNA que está mais à frente é de ficar superespiralado, pois a estrutura vai ficando mais apertada.

Para entender o que acontece, faça a experiência que se segue. Pegue um pedaço de barbante de mais ou menos um metro de comprimento. Dobre ao meio e prenda uma das extremidades com um clipe de papel. Coloque um peso sobre essa parte, apoiado em uma superfície firme, de modo que ela fique presa. Agora, comece a girar o seu barbante dobrado em um único sentido até sentir que ele vai começar a se enrolar.

Pare nesse ponto e prenda a extremidade com um outro clipe de papel. Repita o mesmo procedimento realizado com a outra ponta e coloque um peso impedindo que haja movimento. Muito bem, coloque um dedo em cada lado na parte central do seu barbante dobrado e enrolado e comece a puxar um pedaço do barbante para um lado e o outro para o lado oposto; continue puxando e observe o que acontece.

O que aconteceu? Se você conseguiu seguir as instruções, poderá verificar que, a partir do ponto de abertura dos dois barbantes, a região enrolada que está mais adiante ficou bem mais apertada. Se você continuar puxando, vai perceber que, em um determinado ponto, você não consegue mais separar os dois barbantes.

Pois é exatamente isso que acontece com o DNA no momento da replicação. Conforme as fitas vão se abrindo e sendo copiadas, o DNA que está mais à frente na forquilha de replicação vai ficando cada vez mais compactado, até chegar num ponto em que vai ocorrer a formação de superespiras e será impossível continuar rompendo as pontes de hidrogênio. É um mecanismo semelhante ao que você já estudou nas aulas sobre estrutura de cromossomos em procariotos e eucariotos.

Então, é necessário um mecanismo que coordene esse processo, de modo que a replicação possa ocorrer ao longo de toda molécula de DNA. Nessa etapa, entram em ação enzimas conhecidas como topoisomerases, as mesmas enzimas que participam do processo de superespiralamento do DNA.

O mecanismo de ação dessas enzimas já foi descrito anteriormente com detalhes. Se você não se lembra, pegue as Aulas 7 e 8 do Módulo 1.

Durante a replicação do DNA, somente um pequeno segmento de DNA em frente da forquilha de replicação precisa girar, justamente o segmento que está acima da quebra promovida pela topoisomerase.

Na replicação de *Escherichia coli*, a enzima envolvida é a DNA girase, que é um tipo de topoisomerase II, cujo mecanismo também já foi descrito.

É importante lembrar que a estrutura do genoma da bactéria é circular e se encontra superespiralado negativamente. Esse superespiralamento é promovido pela DNA girase com energia proveniente de ATP. A atividade da DNA girase apresenta uma solução para o problema da abertura das fitas do DNA. Em vez de criar superespiras positivas na frente da forquilha de replicação, através da abertura das fitas, a replicação pode produzir DNA relaxado na frente da forquilha através da abertura de DNA que apresente superespiras negativas.

Uma vez reduzida a tensão das hélices durante a separação, ou seja, a separação das fitas é favorecida energeticamente, o superespiralamento negativo atrás da forquilha pode direcionar o processo de separação das fitas. Se isso ocorrer, esse mecanismo explica a principal função da DNA girase durante o processo de replicação do DNA na bactéria.

Existem ainda outras proteínas envolvidas no processo de replicação, mas elas serão descritas na próxima aula, quando iremos estudar o mecanismo como um todo.

## RESUMO

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de estudar as estruturas que são observadas no DNA durante o processo de replicação. Vimos que os DNAs pequenos, como vírus, bactérias, plasmídios apresentam um único replicon, ou seja, uma única unidade onde a replicação se inicia, enquanto em genomas de eucariotos existem muitos replicons. Nesses replicons, ocorre a formação de duas forquilhas que garantem a replicação bidirecional do DNA. Você também aprendeu sobre a DNA polimerase, que é a enzima que sintetiza DNA. Vimos que existem vários tipos de polimerases e que cada uma delas desempenha uma função particular. A enzima responsável pela replicação, replicase, é composta por muitas subunidades cujo acoplamento permite a síntese de ambas as fitas de DNA ao mesmo tempo. Por último, você viu que outras proteínas participam do processo, como a DNA helicase, que rompe as pontes de hidrogênio, e a SSB, que se liga à DNA simples fita. Também voltamos a falar sobre as topoisomerases que são responsáveis pelo relaxamento do DNA durante a replicação.

## EXERCÍCIOS

1. Quais são as estruturas observadas na molécula de DNA durante o processo de replicação?
2. Quais são as diferentes atividades encontradas na DNA polimerase I de *Escherichia coli*?
3. Quais os componentes encontrados na holoenzima DNA polimerase III? Explique a função de cada um deles.
4. Qual a importância da DNA helicase e da SSB no mecanismo de replicação do DNA?
5. Qual o papel da topoisomerase no mecanismo de replicação do DNA?

## AUTO-AVALIAÇÃO

As respostas para os exercícios podem ser encontradas no texto. É importante que você associe as informações desta aula com as adquiridas na aula anterior. O nosso propósito é fornecer os elementos que fazem parte do maquinário e que você vá juntando as partes para compreender o mecanismo como um todo. Na próxima aula, vamos juntar as peças do quebra-cabeça; por isso, estude com carinho os conteúdos. Até a próxima aula!



# O funcionamento do maquinário de replicação

AULA

# 11

## objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Demonstrar a você como ocorre a replicação do DNA juntando os diferentes componentes descritos na aula anterior.
- Compreender a regulação do maquinário em procariotos.
- Discutir o que se conhece sobre o mecanismo de replicação em eucariotos.

### Pré-requisitos

Conteúdos abordados na aula anterior.

## INTRODUÇÃO

A estrutura antiparalela do DNA dupla hélice surge como um empecilho para o mecanismo de replicação. Conforme visto nas aulas anteriores, a forquilha de replicação é formada e a replicação ocorre bidirecionalmente e simultaneamente nas duas fitas a partir da origem de replicação.

Eis que surge o dilema! A enzima DNA polimerase só realiza a adição de um novo nucleotídeo a partir de um molde de DNA na orientação 5' - 3'. No momento em que as pontes de hidrogênio são rompidas, ocorre a formação de duas fitas simples, uma delas 5' - 3' e a outra 3' - 5', de modo que uma delas pode ser replicada. Mas o que acontece com a outra fita?

Durante muitos anos, os pesquisadores tentaram descobrir DNA polimerases que fizessem a síntese na orientação 3' - 5'. No entanto, isso não foi possível, o que levou à conclusão de que o mecanismo de replicação era ainda mais complexo do que já se imaginava anteriormente.

O paradoxo foi resolvido com a demonstração de que uma das fitas do DNA é sintetizada de forma contínua, enquanto a outra é sintetizada de forma descontínua. A replicação descontínua pôde ser monitorada através de marcação com precursores de DNA radioativos.

Uma exposição por um curto intervalo de tempo demonstrou a formação de fragmentos correspondendo a um tamanho em torno de 1.000 a 2.000 pares de bases. Após períodos mais longos, observou-se a formação de segmentos maiores de DNA. Esses fragmentos receberam o nome de Okazaki.



Fragmentos de Okazaki em homenagem aos pesquisadores Reiji e Tuneko Okazaki, que os descobriram.

A fita de DNA que é sintetizada de forma contínua recebe o nome de fita líder, enquanto a fita que é sintetizada de forma descontínua recebe o nome de fita tardia.

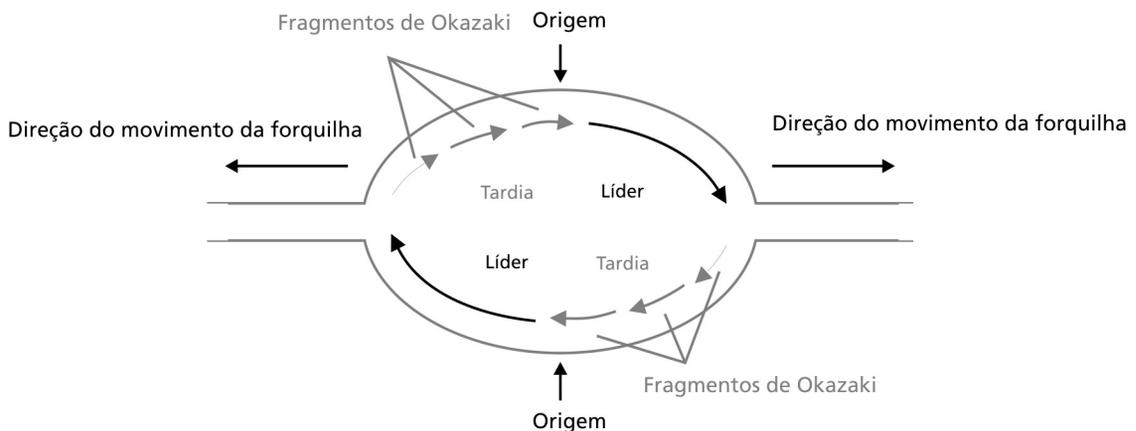
Observe a **Figura 11.1** e acompanhe a explicação.



**Figura 11.1:** A fita líder é sintetizada continuamente, enquanto a fita tardia é sintetizada descontinuamente.

Na fita líder, a síntese de DNA pode proceder continuamente na orientação 5' - 3', conforme a dupla hélice parental vai se abrindo. Na fita tardia, uma parte de DNA fita simples deve estar exposta. Um segmento é sintetizado na direção reversa (relativo à forquilha de replicação). Uma série desses fragmentos será sintetizada, cada um deles na orientação 5' - 3'. Então eles deverão ser ligados para criar uma fita tardia completa. Uma outra observação importante é que a fita líder será a fita 3' - 5', pois ela permitirá que a fita complementar seja sintetizada na orientação 5' - 3'.

O esquema ilustrado na **Figura 11.2** mostra exatamente o que ocorre a partir da origem de replicação com a formação das duas forquilhas na replicação bidirecional.

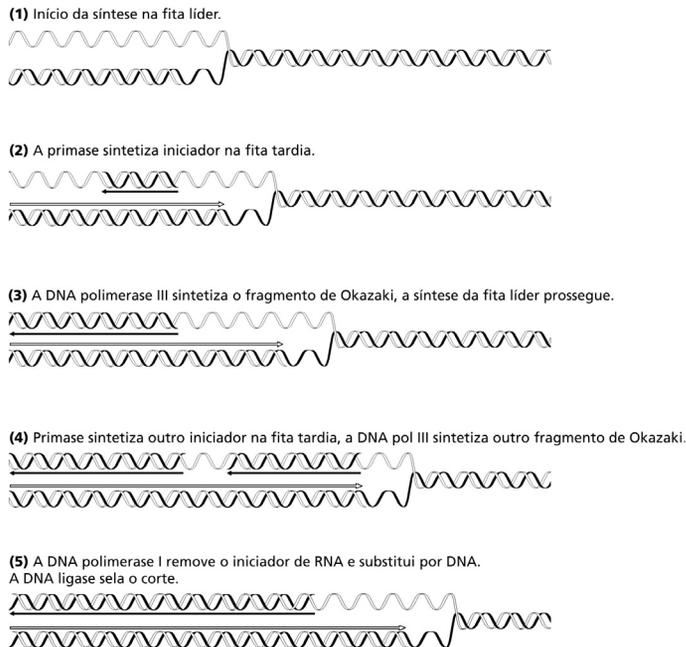


**Figura 11.2:** Esquema ilustrando a síntese em duas forquilhas de replicação formadas a partir de uma única origem. Observe que em ambas as fitas, a partir da origem, em uma direção a replicação é contínua, e na direção oposta, a replicação é descontinua.

Uma outra peculiaridade da DNA polimerase cria um novo desafio para o processo de replicação. Você deve estar lembrado que a enzima só é capaz de sintetizar DNA na presença de um iniciador, ou seja, um nucleotídeo anterior que ofereça um grupamento OH livre para que possa haver a ligação fosfodiéster com o próximo nucleotídeo.

Ora, ao romper a dupla-hélice, nenhuma das duas fitas possui um iniciador. Assim, é necessário que ocorra a síntese de um iniciador para que a DNA polimerase possa atuar. O processo é mediado por uma primase ou iniciase (primase vem do inglês, para síntese de *primer*, que significa iniciador). Essa enzima é uma RNA polimerase especial, produto de um gene chamado *dnaG*. Essa enzima é somente utilizada para sintetizar pequenos iniciadores de RNA durante o processo de replicação. A primase *dnaG* se associa ao complexo de replicação e sintetiza um iniciador de 11 a 12 bases. Em alguns casos, o iniciador é fornecido por uma proteína, como em alguns vírus, que veremos na próxima aula.

Observe a **Figura 11.3** e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 11.3:** A síntese dos fragmentos de Okazaki requer um iniciador, a síntese do DNA, a remoção do RNA, o preenchimento da região após a remoção do RNA e a ligação dos fragmentos.

Na fita líder, a primase atua uma única vez, sintetiza o iniciador e a síntese prossegue normalmente. Já na fita tardia, a primase atua em cada um dos fragmentos de Okazaki que serão sintetizados. A síntese da fita tardia deve envolver: a síntese do iniciador de RNA; a síntese do fragmento propriamente dito pela ação da DNA polimerase; a remoção dos iniciadores de RNA e a substituição por uma sequência de DNA; a ligação covalente dos fragmentos de Okazaki adjacentes.

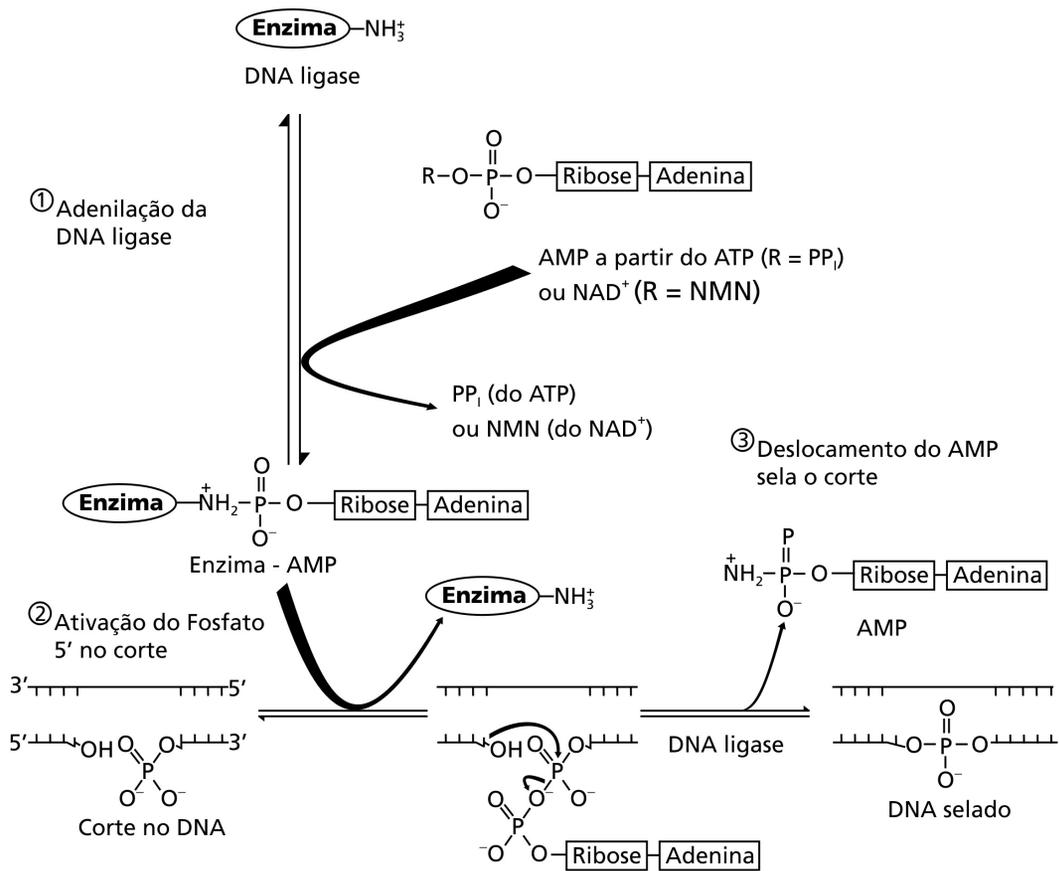
Como você pode observar, o esquema sugere que a síntese de um fragmento de Okazaki termina justamente antes do ponto onde se encontra o iniciador de RNA do fragmento anterior. A atividade de exonuclease 5' - 3' da pol I remove o iniciador de RNA enquanto, simultaneamente, preenche o espaço sintetizando DNA, utilizando o hidroxila 3' livre deixado pelo fragmento de Okazaki anterior.

Em mamíferos, a DNA polimerase não apresenta a atividade de exonuclease. Então, a remoção e o preenchimento são feitos em duas etapas independentes. Primeiro, a enzima RNase H1 (que apresenta especificidade por híbridos DNA/RNA) promove uma clivagem endonucleásica; depois, uma exonuclease 5' - 3' chamada FEN1 remove o iniciador de RNA.

Uma vez que o RNA tenha sido removido e substituído, os fragmentos de Okazaki adjacentes são unidos. O grupamento 3' hidroxila de um fragmento é ligado ao grupamento fosfato do outro fragmento através de uma enzima chamada **DNA LIGASE**. As ligases estão presentes em procariotos e eucariotos. Você pode observar na ilustração da **Figura 11.4** a reação catalisada pela DNA ligase.

#### **DNA LIGASE**

Essa enzima é muito utilizada em laboratórios de Biologia Molecular para unir fragmentos de DNA de organismos diferentes, dando origem a moléculas híbridas chamadas DNA recombinante.



**Figura 11.4:** A DNA ligase une os fragmentos de Okazaki, selando cortes existentes entre os nucleotídeos utilizando um complexo intermediário enzima-AMP.

As ligases de *Escherichia coli* e do fago T4 fazem a ligação em duas etapas, envolvendo um complexo enzima-AMP. A enzima de *Escherichia coli* utiliza NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) como co-fator, enquanto a enzima do fago T4 usa o ATP. O AMP do complexo se liga ao fosfato 5' e então uma ligação fosfodiéster é formada com a hidroxila 3', liberando a enzima e o AMP.

Você deve ter notado que as informações que discutimos até o momento conseguiram esclarecer alguns pontos obscuros com relação à síntese do DNA, principalmente aqueles provocados pelas exigências da enzima responsável pela síntese do DNA que é a DNA polimerase.

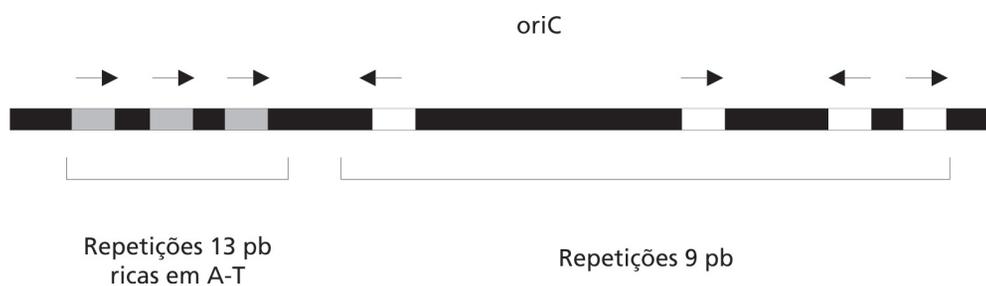
Você já deve ter notado também que existe um grande número de proteínas que participam no processo e que cada uma delas tem uma função-chave, para que o mecanismo cumpra o seu papel de copiar o DNA com fidelidade, mantendo assim as características de um determinado genoma.

Todas essas informações foram necessárias para que nós pudéssemos trabalhar o mecanismo como um todo. Agora nós vamos encaixar as peças e você verá como esse mecanismo é bonito, embora seja extremamente complexo.

Nos próximos tópicos, você verá como ocorre o início, o alongamento e o término da replicação. Usaremos o modelo estabelecido para o cromossomo circular de *Escherichia coli*, pois conforme já falamos, até o momento, é o mecanismo melhor compreendido. Posteriormente, falaremos sobre a replicação em eucariotos.

## INÍCIO DA REPLICAÇÃO

Conforme vimos na aula anterior, o cromossomo de *Escherichia coli* constitui um único replicon e, conseqüentemente, apresenta somente uma origem de replicação. A origem de replicação em *Escherichia coli* é conhecida como oriC. A oriC está representada na Figura 11.5.



**Figura 11.5:** Origem de replicação oriC de *Escherichia coli*. O esquema representa o segmento de 245 pares de bases, que contém 3 repetições de 13 pares de bases (13 pb) ricas em A = T e 4 repetições de 9 pares de bases (9 pb). As setas indicam a orientação das repetições.

A origem de replicação oriC corresponde a um segmento de DNA contendo 245 pares de bases. Algumas seqüências conservadas foram caracterizadas na origem de replicação: 4 repetições de 9 pares de bases, indicadas pelas setas na região correspondente a essas repetições e 3 repetições de 13 pares de bases também indicadas por setas na figura.

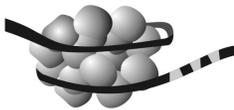
A orientação, o espaçamento e a seqüência das repetições de 9 pb são críticas para o funcionamento da oriC. As repetições de 13 pb são ricas em A = T, sendo este fato também crucial para a função da oriC.

Observe o esquema da **Figura 11.6** e acompanhe a explicação sobre os eventos que ocorrem na origem de replicação.

**(1)** Monômeros da proteína DnaA se ligam às repetições de 9 pares de bases.



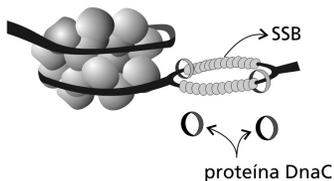
**(2)** Cerca de 20 a 40 monômeros da proteína DnaA se ligam, formando um complexo. O DNA da oriC se enrola em torno deste complexo.



**(3)** DnaA atua sobre as repetições ricas em A=T e promove a abertura das fitas.



**(4)** O complexo DnaB/DnaC deposita a helicase DnaB em ambas as fitas do DNA. A proteína SSB se liga ao DNA simples fita. A proteína DnaC é liberada.



**Figura 11.6:** A ilustração apresenta os principais eventos que ocorrem na origem de replicação.

O primeiro passo é a ligação da proteína DnaA nas repetições de 9 pb presentes na oriC. Posteriormente, cerca de 20 a 40 monômeros de proteína DnaA são ligados cooperativamente. A oriC se enrola sobre esse complexo de proteína DnaA. Neste ponto, a proteína DnaA irá atuar sobre as repetições de 13 pb situadas no lado esquerdo da oriC, rompendo a dupla fita do DNA em cada uma dessas repetições, formando um complexo aberto.

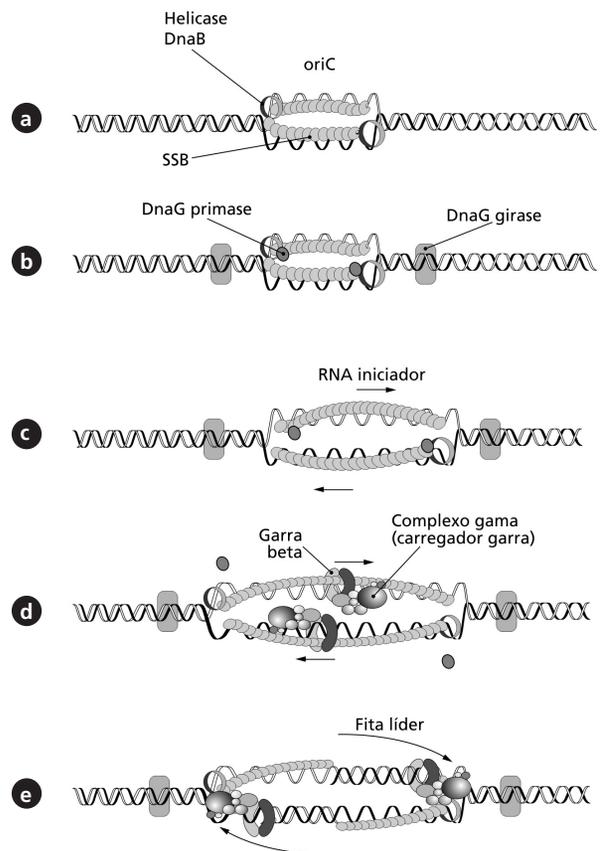
O fato de essas regiões serem ricas em A = T facilita a abertura, pois você deve estar lembrado que A se liga a T através de duas pontes de hidrogênio. Esse processo requer ATP e a proteína bacteriana HU (nós falamos dessa proteína na aula sobre estrutura dos cromossomos de procariotos, Aula 6, Módulo 1).

Duas outras proteínas chamadas DnaB e DnaC entram em ação formando um complexo no qual seis monômeros de DnaC irão se ligar a um hexâmero de DnaB. O complexo DnaB/DnaC transfere um hexâmero de DnaB, numa etapa dependente de ATP, para cada uma das fitas do DNA, formando duas forquilhas de replicação. A proteína DnaB possui atividade de helicase. Você deve estar lembrado que a helicase é uma enzima que rompe as pontes de hidrogênio do DNA dupla-hélice. Após este evento, a DnaB desloca as moléculas de proteína DnaA do DNA e inicia o processo de abertura das fitas.

## ALONGAMENTO DA REPLICAÇÃO

Observe agora a **Figura 11.7** e acompanhe a explicação.

Após a abertura das fitas pela DnaB, na origem de replicação, muitas moléculas da proteína SSB se ligam, mantendo as fitas separadas. Na frente de cada uma das forquilhas, a DNA girase (topoisomerase II) relaxa a tensão através da eliminação de superespiras negativas, permitindo assim a abertura das fitas. Se você estiver em dúvida, pode rever a parte final da Aula 10 em que falamos sobre o papel da girase.



**Figura 11.7:** (a) Após a abertura das fitas pela DnaB, a SSB se liga à fita simples de DNA. (b) A DnaG primase se liga à DnaB e sintetiza o iniciador de RNA (c). (d) O complexo  $\gamma$  (subunidade  $\gamma$ ) desloca a primase e carrega a garra  $\beta$  no DNA. (e) O núcleo catalítico inicia a síntese da fita líder.

O alongamento inclui duas operações diferentes, conforme visto anteriormente, a síntese da fita líder (contínua) e a síntese da fita tardia (descontínua).

Vejamos como isso ocorre. As duas forquilha foram formadas e a helicase DnaB permanece ligada às duas fitas, cada uma iniciando uma forquilha. A DnaB promove a abertura na orientação 5' - 3', enquanto a proteína SSB recobre o DNA fita simples. A DnaG, que é uma proteína com atividade de primase, será atraída para a forquilha através de uma interação proteína-proteína com a DnaB. A helicase DnaB se desloca no sentido 5' - 3'. A DnaG irá sintetizar uma molécula pequena de RNA (~10 nucleotídeos), que servirá de iniciador para a síntese do DNA.

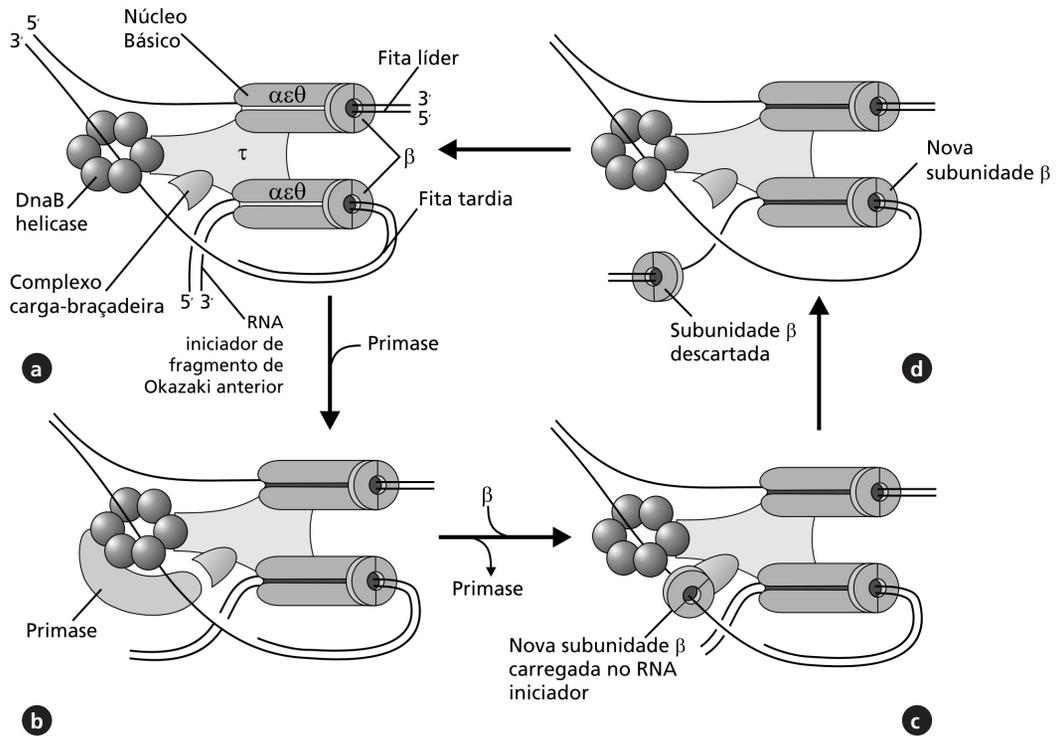
A subunidade  $\chi$  do complexo  $\gamma$  desloca a primase. A primase faz contato com a SSB da mesma forma que o complexo  $\chi$ . Então, de modo competitivo, o complexo  $\chi$  desloca a primase.

O complexo  $\gamma$ , também conhecido como carregador/disparador de garra  $\beta$ , da holoenzima DNA polimerase III, coloca um dímero  $\beta$  em torno do iniciador de RNA, formando a garra. Esse processo é dependente de ATP. O complexo  $\gamma$  também precisa reconhecer a extremidade 3' livre do iniciador. Após o acoplamento da garra  $\beta$ , o núcleo catalítico da DNA polimerase se liga e é posicionado na extremidade 3' do RNA de modo que a síntese pode ser iniciada.

Tudo estaria resolvido se não houvesse a necessidade de sintetizar a fita complementar de forma descontínua e ao mesmo tempo. Então vejamos como isso acontece.

Nesse ponto, a subunidade  $\tau$  dimérica da holoenzima DNA polimerase III se liga ao centro catalítico que está ligado na fita que será replicada de forma contínua, e permite a ligação de um outro centro catalítico.

Conforme o DNA é aberto pela helicase e replicado pelo centro catalítico da DNA polimerase III na fita contínua, a primase interage com a helicase e sintetiza um iniciador de RNA na fita descontínua. Observe a **Figura 11.8** e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 11.8:** Síntese dos fragmentos de Okazaki na fita tardia.

A subunidade  $\chi$  do complexo  $\gamma$  desloca a primase da mesma forma efetuada na fita líder e possibilita a ligação da garra  $\beta$  que por sua vez irá atrair o centro catalítico que está ligado ao dímero  $\tau$ , permitindo, assim, a síntese de um fragmento de Okazaki. O complexo  $\gamma$  é o responsável por carregar a garra  $\beta$  nas duas fitas mas devido à necessidade de iniciações contínuas na fita tardia, o complexo fica posicionado nessa fita.

Nesse ponto, ocorre uma espécie de “balé enzimático” no qual metade do complexo da holoenzima DNA polimerase III sintetiza a fita contínua e a outra metade se desloca para sintetizar os fragmentos de Okazaki da fita descontínua.

A necessidade de abertura das fitas antes do início da síntese dos fragmentos provoca um atraso na replicação e devido à presença dos dois núcleos catalíticos ligados pelo dímero tau, o DNA molde da fita descontínua deve formar uma alça, o que permitirá a sua replicação.

Quando um fragmento de Okazaki encontra outro que já foi sintetizado anteriormente, a garra  $\beta$  se desprende do centro catalítico da DNA polimerase, juntamente com o DNA sintetizado, que irá se ligar a uma outra garra  $\beta$  inserida pelo complexo  $\gamma$  junto a um novo iniciador.

A síntese prossegue dessa forma até que toda a fita tardia tenha sido sintetizada.

A presença da helicase na fita que será replicada de forma descontínua, garante a ligação com a primase, que poderá sintetizar inúmeros iniciadores, um para cada fragmento de Okazaki.

Quando a síntese de um fragmento de Okazaki é concluída pela colisão com o fragmento adjacente, o iniciador de RNA, usado pelo fragmento anterior, é removido pela atividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase I que, simultaneamente, preenche o segmento com dNTPs através da atividade de polimerase. Finalmente, os fragmentos são unidos pela enzima DNA ligase, usando NAD<sup>+</sup> como co-fator energético.

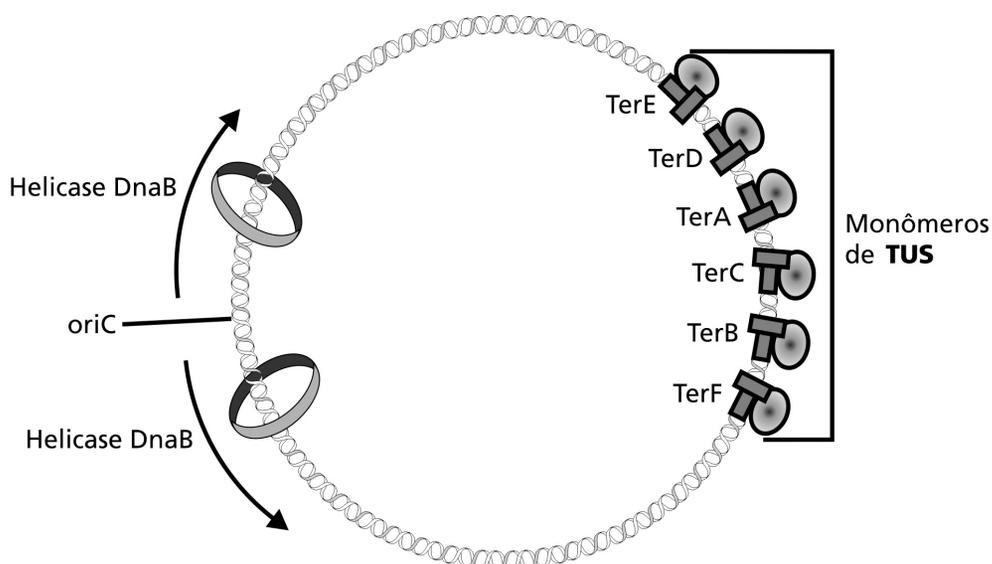
## TÉRMINO DA REPLICAÇÃO

A região terminal (TER) da replicação do DNA está localizada do lado oposto à origem de replicação no cromossomo circular de *Escherichia coli*. A região terminal TER (ilustrada na **Figura 11.9**), formada por repetições de vinte nucleotídeos, funciona como uma armadilha, pois a forquilha de replicação entra, mas não consegue sair dessa região que chega a apresentar 450 kb (1kb = 1000 pb).

Existem seis TER nessa região. Uma proteína chamada TUS (*Terminus Utilization Substance*, do inglês substância de utilização terminal) se liga ao sítio TER e essa ligação impede a passagem da helicase, DnaB, ou seja, a abertura das fitas é interrompida e, conseqüentemente, a replicação.

A síntese da fita líder termina um nucleotídeo antes do local onde a proteína TUS está ligada. Os sítios TER funcionam somente em uma direção. Para cada ciclo de replicação, somente um sítio de terminação é geralmente usado. A forquilha de replicação que encontrar um local de terminação na orientação ativa é reprimida, e espera até que outra forquilha chegue ao mesmo sítio.

A forquilha parada em um complexo de terminação na sua orientação ativa correta aparentemente forma uma barreira para a forquilha oposta, garantindo que cada segmento do cromossomo seja replicado uma única vez. Mutantes de *Escherichia coli* que não possuem a região TER, ou possuem a proteína TUS mutada, são viáveis, mas segregam um grande número de células inviáveis.



**Figura 11.9:** Organização dos sítios de iniciação e terminação da replicação no cromossomo de *E. coli*. A replicação bidirecional é iniciada na *oriC*, as duas forquilha de replicação estão representadas pelas helicase DnaB. Os sítios de terminação estão marcados de TerA a TerF. A localização dos sítios de terminação não está na escala correta, pois, de fato, comparados aos ponteiros de um relógio, os sítios TerA, TerD e TerE estão localizados entre 23 e 29 minutos; os sítios TerB e TerC, entre 33 e 36 minutos, e o sítio TerF está localizado a 48 minutos, de modo que estão espalhados em uma longa distância (1 min corresponde a aproximadamente 50.000 pb). O formato em T do sítio de terminação indica sua polaridade, as forquilha de replicação que encontram o lado reto (topo do T) são retidas. No sentido horário, a forquilha atravessa os sítios TerE, TerD e TerA, mas irá parar em TerC, TerB ou TerF. Uma proteína chamada TUS se liga aos sítios Ter, e esta ligação pára a atividade da helicase DnaB.

## SEGREGAÇÃO DE MOLÉCULAS-FILHAS DE DNA CIRCULAR

Quando a síntese do cromossomo termina, as moléculas resultantes encontram-se na forma de círculos interligados. A separação das duas moléculas-filhas, também conhecida como segregação, requer a ação de topoisomerases. Estudos com mutantes para Topoisomerase IV (*parC* e *parD*) demonstraram o aparecimento de erros na segregação: os cromossomos duplicados mantêm-se na forma de círculos interligados. O defeito na separação dos cromossomos não está associado a defeitos na replicação, consistente com as descobertas de que a replicação requer a Topoisomerase II (girase) para relaxar a estrutura do DNA.

## REPLICAÇÃO EM EUCARIOTOS

Devido à complexidade do genoma dos eucariotos, o estudo da replicação se torna mais difícil. A maior parte das informações sobre o maquinário de replicação em eucariotos foi obtida através de estudos com o vírus SV40 (simian virus 40). Este vírus, que infecta células de macaco, apresenta um genoma pequeno e, para se replicar, utiliza quase que totalmente o maquinário da célula hospedeira. Assim, por extensão, serve como um modelo para a replicação em eucariotos.

De um modo geral, a replicação do DNA é bastante semelhante à de procariotos, com algumas proteínas diferentes, mas que desempenham a mesma função. Uma diferença marcante é que a replicação do DNA em eucariotos é mais lenta do que a replicação em *Escherichia coli* (75 nucleotídeos/segundo).

Uma proteína codificada pelo vírus chamada antígeno T é encontrada na forma de um hexâmero duplo e se liga à origem de replicação do DNA do SV40 utilizando ATP e causa uma distorção estrutural no DNA. Essa distorção provoca a abertura das fitas, e o antígeno T funciona como uma DNA helicase (função semelhante a DnaB de procariotos).

Após a formação de um complexo estável (antígeno T/DNA), uma outra proteína chamada RPA (proteína de replicação A), formada por três subunidades, liga-se ao DNA fita simples (semelhante a SSB de procariotos). Essa ligação promove uma abertura maior da molécula de DNA, ou seja, a RPA estimula a atividade da helicase.

A esse complexo antígeno T/RPA irá se ligar uma polimerase  $\alpha$ /primase. Essa enzima tem atividade dupla, pois ela sintetiza o iniciador de RNA, mas em seguida também sintetiza um segmento de DNA.

Uma outra proteína, RFC (*Replication Factor C*, do inglês fator C de replicação) se liga ao extremo 3' da fita de DNA nascente, sintetizada pela  $\alpha$ /primase, e irá carregar até o molde, substituindo a subunidade  $\alpha$ , duas proteínas. Uma delas, a PCNA (*Proliferation Cellular Nuclear Antigen*, do inglês antígeno nuclear de proliferação celular), e a outra, DNA polimerase  $\delta$ , até o molde, substituindo a subunidade  $\alpha$ .

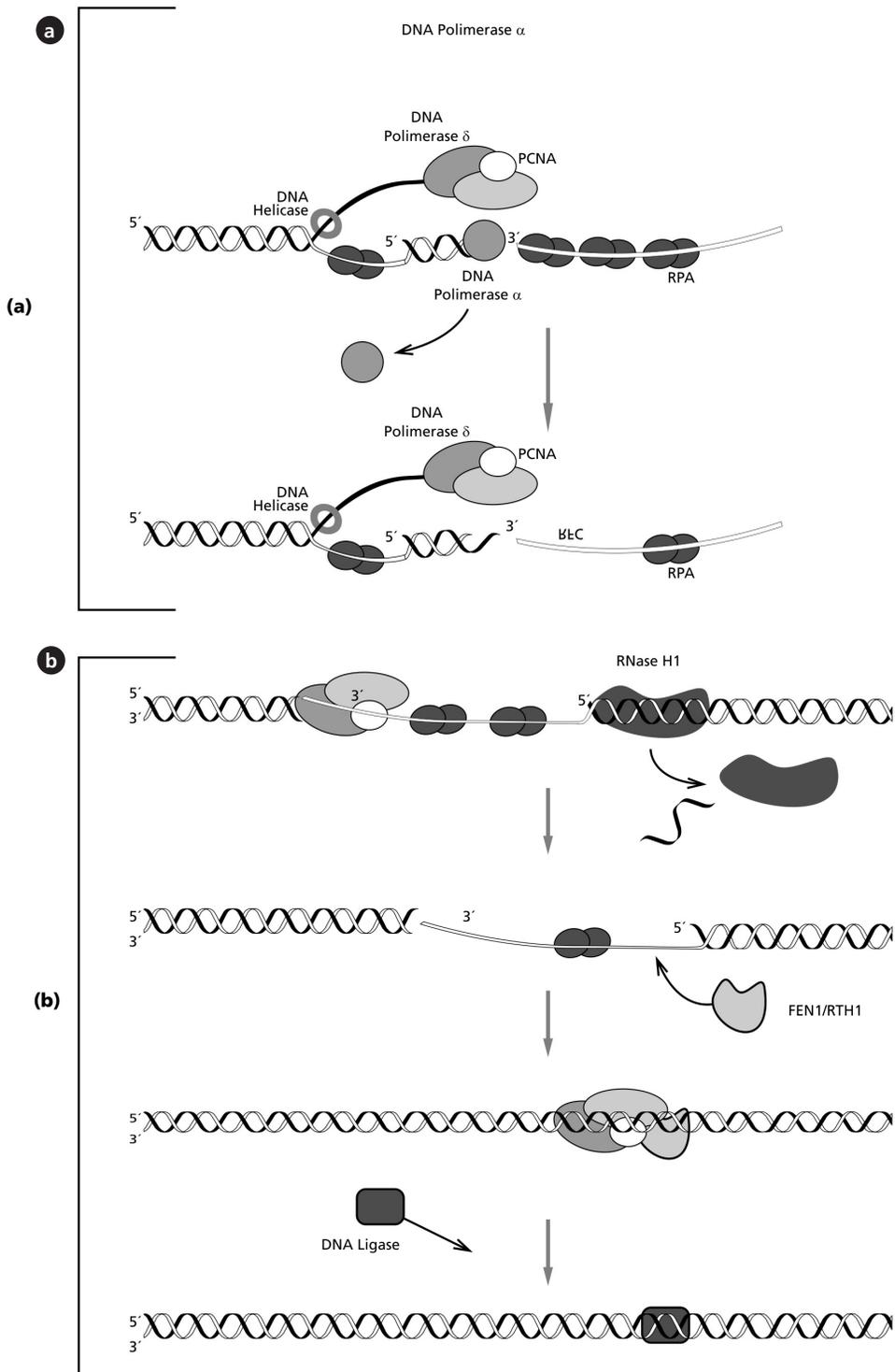
A PCNA desempenha uma função semelhante à subunidade  $\beta$  da holoenzima DNA polimerase III de procariotos. A proteína RFC apresenta uma função semelhante ao complexo  $\gamma$  disparador/carregador

de garra, presente em procariotos. O complexo processivo RFC/PCNA/pol $\delta$  alonga a fita de DNA nascente para formar o complexo de síntese contínua na fita líder.

A remoção dos iniciadores é feita por duas enzimas FEN1 (exonuclease 5' - 3') e a RNaseH1. A DNA ligase I é necessária para unir os fragmentos de Okazaki em fitas de DNA contínuas.

A proteína que atua para relaxar a tensão torcional durante a replicação do DNA de eucariotos é a Topoisomerase I. No caso do SV40, os produtos finais da replicação são moléculas circulares interligadas e fechadas covalentemente. As moléculas-filhas são separadas pela Topoisomerase IIa ou IIb.

A **Figura 11.10** ilustra a síntese do DNA, enfatizando a síntese da fita tardia.



**Figura 11.10:** (a) a helicase abre as fitas do DNA e o complexo DNA pol $\delta$ /RFC/PCNA sintetiza o DNA na fita líder. Na fita tardia, a DNA pol  $\alpha$  sintetiza o iniciador de RNA/DNA. A DNA pol  $\alpha$  é deslocada e trocada pelo complexo RFC/PCNA/DNA pol  $\delta$  que irá sintetizar o fragmento de Okazaki. (b) a RNase H1 degrada o iniciador de RNA, deixando um ribonucleotídeo que será retirado pelo complexo FEN1/RTH1. A DNA pol $\delta$  sintetiza o restante do fragmento que é unido pela DNA ligase.

Conforme já vimos, a DNA helicase promove a abertura na forquilha de replicação e o complexo DNA pol $\delta$ /RFC/PCNA sintetiza o DNA na fita líder. Na fita tardia, a DNA pol  $\alpha$  sintetiza o iniciador de RNA e alguns nucleotídeos de DNA.

Da mesma forma que na fita líder, o complexo RFC/PCNA carrega a DNA pol $\delta$  para continuar a síntese do fragmento de Okazaki. Antes que a DNA pol delta atinja um fragmento de Okazaki, previamente sintetizado, a RNase H1 promove a clivagem e remoção do iniciador de RNA, mas não é capaz de retirar o último ribonucleotídeo 5'.

Nesse ponto, um outro complexo, formado pela FEN1/RTH1, remove este ribonucleotídeo, e a DNA pol $\delta$  completa a síntese do fragmento que é posteriormente ligado pela ação da DNA ligase I.

A proteína FEN1 é uma RNase, mas ela não é capaz de remover o RNA quando um de seus nucleotídeos encontra-se na forma trifosfato, e é por isso que existe a necessidade de a RNase H1 atuar primeiro. Em algumas situações, o complexo DNA pol $\delta$ /RFC/PCNA desloca o iniciador de RNA e, dessa forma, a FEN1 é capaz de clivar o iniciador sem a ajuda da RNase H1.

Existe ainda uma outra DNA polimerase, chamada  $\epsilon$ , encontrada em eucariotos geralmente acoplada à DNA pol $\delta$ , que não é utilizada para a replicação do DNA do vírus SV40. Entretanto, em leveduras, a DNA pol $\epsilon$  é essencial para a replicação, mas sua função ainda continua desconhecida.

Conforme visto anteriormente, os cromossomos de eucariotos apresentam múltiplas origens de replicação, cada uma delas formando forquilhas bidirecionais que sintetizam o cromossomo como um todo. As extremidades dos cromossomos apresentam uma estrutura chamada telômero cuja síntese será estudada na próxima aula.

## RESUMO

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de estudar o mecanismo de replicação como um todo. Você pôde aprender que devido à impossibilidade de a DNA polimerase sintetizar DNA na orientação 3' - 5', o DNA é replicado de forma contínua em uma fita, e de forma descontínua na outra. Todo esse processo é mediado por um complexo enzimático formado pela holoenzima DNA polimerase III e muitas outras proteínas que participam do reconhecimento da origem de replicação, abertura das fitas, síntese de iniciadores, relaxamento da estrutura do DNA, entre outras atividades.

Na última parte da aula, você estudou sobre a replicação em eucariotos e pôde observar que o mecanismo é bem menos conhecido devido à sua complexidade, mas que no geral o mecanismo é bastante semelhante ao que ocorre em procariotos.

## EXERCÍCIOS

1. Por que a síntese não pode ocorrer de forma contínua nas duas fitas do DNA molde?
2. Quais eventos ocorrem na origem de replicação?
3. O que são os fragmentos de Okazaki?
4. De que forma a síntese da fita líder é coordenada com a síntese da fita tardia?
5. Qual a importância da região terminadora no cromossomo de *Escherichia coli*?
6. Quais as principais diferenças entre a replicação de procariotos e eucariotos?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você recorrer ao texto, não terá dificuldades para responder às questões. O nosso objetivo aqui é fazer com que você sintetize o conteúdo para assimilá-lo melhor. Na próxima aula, você estudará a última parte referente ao mecanismo de replicação do DNA. Nela, falaremos sobre a replicação de genomas lineares e também da replicação do DNA presente em organelas. Até lá e bom estudo!

## Replicação de genomas lineares e organelas

AULA

# 12

Ao terminar esta aula, você deverá ser capaz de:

- Entender o mecanismo de manutenção das extremidades de genomas lineares durante o processo de replicação.
- Conhecer alguns mecanismos de replicação que ocorrem em bacteriófagos e organelas celulares.

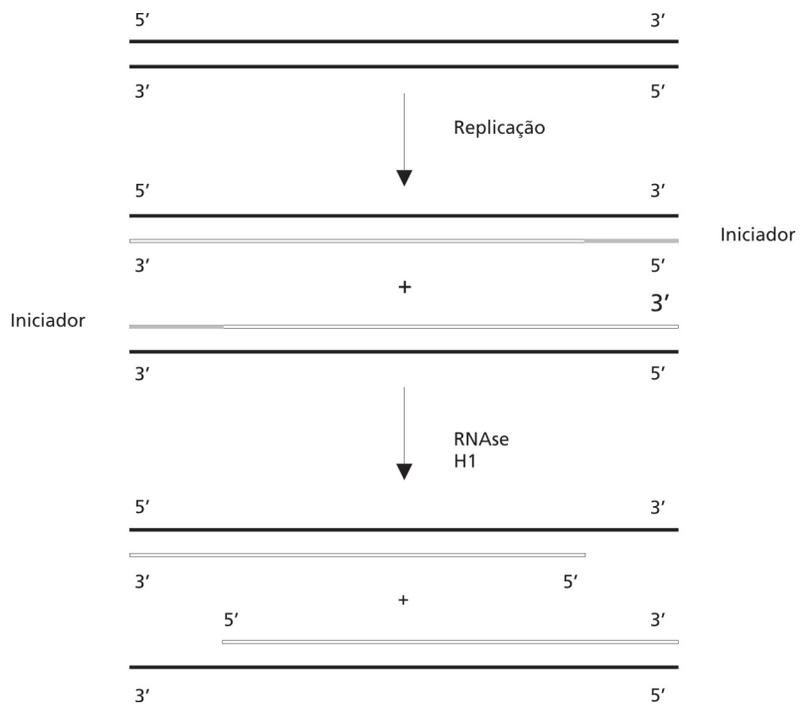
### Pré-requisitos

Compreender o conteúdo de replicação, apresentado nas Aulas 9, 10 e 11.

## INTRODUÇÃO

Você já teve a oportunidade de estudar nas aulas anteriores que a replicação do DNA é um maquinário bastante complexo e dependente de muitas proteínas e atividades enzimáticas. Já sabemos também que a DNA polimerase só sintetiza DNA na orientação 5' - 3', e que é necessária a presença de um iniciador que forneça um grupamento hidroxila livre para que um novo nucleotídeo possa ser incorporado.

Pois bem, em organismos nos quais o genoma é composto por moléculas de DNA linear, a finalização da replicação fica comprometida, uma vez que a remoção do iniciador de RNA do extremo 5' das fitas recém-sintetizadas irá resultar em uma fita filha de DNA mais curta. A cada ciclo de replicação, as moléculas serão progressivamente encurtadas. A **Figura 12.1** ilustra a situação descrita.



**Figura 12.1:** Após a replicação de um segmento linear de DNA, a retirada dos iniciadores de RNA através da atividade de uma RNase nas extremidades resulta na formação de uma fita de DNA mais curta.

Você pode concluir que esse fenômeno seria desastroso, pois a perda de pedaços do DNA a cada replicação inviabilizaria a sobrevivência das células. O problema é real, mas na verdade não ocorre perda nas extremidades de genomas lineares, o que nos leva a pensar que diferentes organismos utilizam estratégias alternativas para acomodar a síntese das extremidades.

De fato, existem vários mecanismos, dos quais podemos citar:

1. Uma proteína pode intervir de modo a tornar possível a iniciação nas extremidades. Vários vírus que possuem DNA linear apresentam proteínas que se ligam covalentemente à última base da extremidade 5'. Os exemplos melhor caracterizados são o DNA do adenovírus, o DNA do fago  $\Phi 29$ , e o RNA do poliovírus.
2. Em vez de possuir extremidades definidas, elas podem ser variáveis, como no caso dos telômeros em cromossomos eucarióticos.
3. A conversão de um replicon linear em uma molécula circular ou multimérica, observada nos fagos T4 e  $\lambda$ .
4. O DNA pode assumir uma estrutura pouco comum, como a formação de um grampo nas extremidades, de modo que não exista extremidade livre. Isso ocorre no DNA mitocondrial de *Paramecium*.

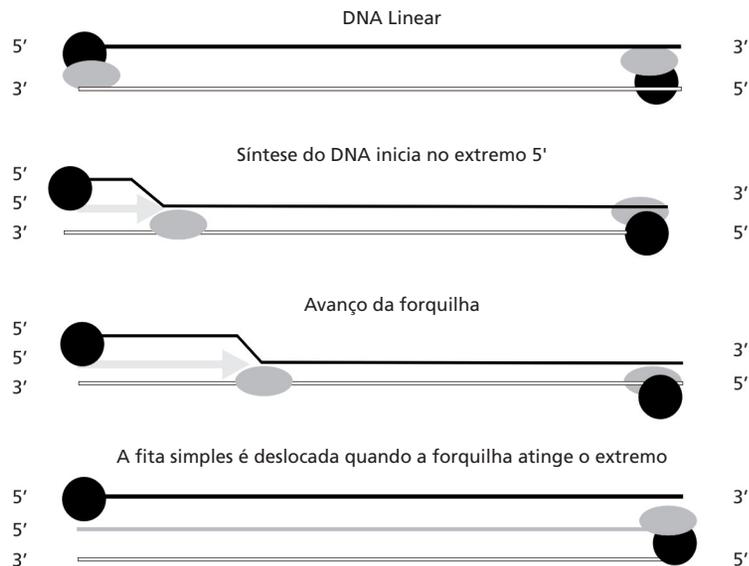
Você terá a oportunidade de estudar como ocorrem os dois primeiros mecanismos citados anteriormente.

O primeiro exemplo de iniciação em um extremo linear foi observado nos DNAs do adenovírus e do fago  $\Phi 29$ , que replicam a partir dos dois extremos, usando um mecanismo conhecido como deslocamento da fita. A síntese de uma nova fita se inicia em uma extremidade, deslocando a fita homóloga, previamente pareada.

Quando a forquilha de replicação atinge o outro extremo da molécula, a fita deslocada é liberada como uma fita simples livre, que é então replicada de modo independente.

Em muitos vírus que utilizam esse mecanismo, existe uma proteína ligada covalentemente às extremidades 5'. No caso do adenovírus, uma proteína terminal está ligada ao DNA viral através de uma ligação fosfodiéster no aminoácido serina.

A proteína terminal é uma proteína de 55 kDa que desempenha duas funções. Ela carrega um nucleotídeo citidina, que funciona como iniciador, e está associada à DNA polimerase. Na verdade, a ligação da proteína a um nucleotídeo é feita pela DNA polimerase na presença do DNA do adenovírus.



**Figura 12.2:** A replicação do adenovírus pode ser iniciada em qualquer uma das extremidades. A esfera negra indica a proteína terminal ligada à extremidade 5' do DNA. A estrutura oval cinza indica a DNA polimerase ligada na fita 3', na qual a replicação será iniciada.

O complexo da polimerase e proteína terminal carregando o nucleotídeo C iniciador se liga às extremidades do DNA do adenovírus. O grupamento hidroxila livre do nucleotídeo C é usado para iniciar a reação de alongamento pela DNA polimerase na fita complementar.

Isso gera uma nova fita cuja extremidade 5' está covalentemente ligada ao nucleotídeo iniciador C. A reação geralmente envolve o deslocamento da proteína do DNA em vez de ocorrer uma ligação de novo.

A extremidade 5' do DNA do adenovírus fica ligada à proteína terminal que foi utilizada na replicação anterior. A proteína terminal antiga é deslocada por uma nova proteína em cada novo ciclo de replicação.

A proteína terminal se liga a regiões localizadas entre 9 e 18 pares de bases da extremidade do DNA. A região adjacente, entre posição 17 e 48, é essencial para a ligação de uma proteína do hospedeiro, fator nuclear I, que é também necessária à reação de iniciação. O complexo de iniciação pode, então, ser formado entre as posições 9 e 48, numa distância fixa a partir da extremidade do DNA.

## SÍNTESE DOS TELÔMEROS

Você deve estar lembrado da Aula 8, Módulo I, sobre estrutura dos cromossomos de eucariotos, quando falamos sobre os telômeros, que são as estruturas encontradas nas extremidades dos cromossomos. Os cromossomos eucarióticos são moléculas lineares de DNA. O DNA dos telômeros consiste em repetições adjacentes de seqüências simples. Estas seqüências são geralmente curtas e ricas em resíduos G em uma das fitas. O ciliado *Tetrahymena* contém repetições 5'TTGGGG3' adjacentes, enquanto humanos e outros mamíferos contêm repetições 5'TTAGGG3'.

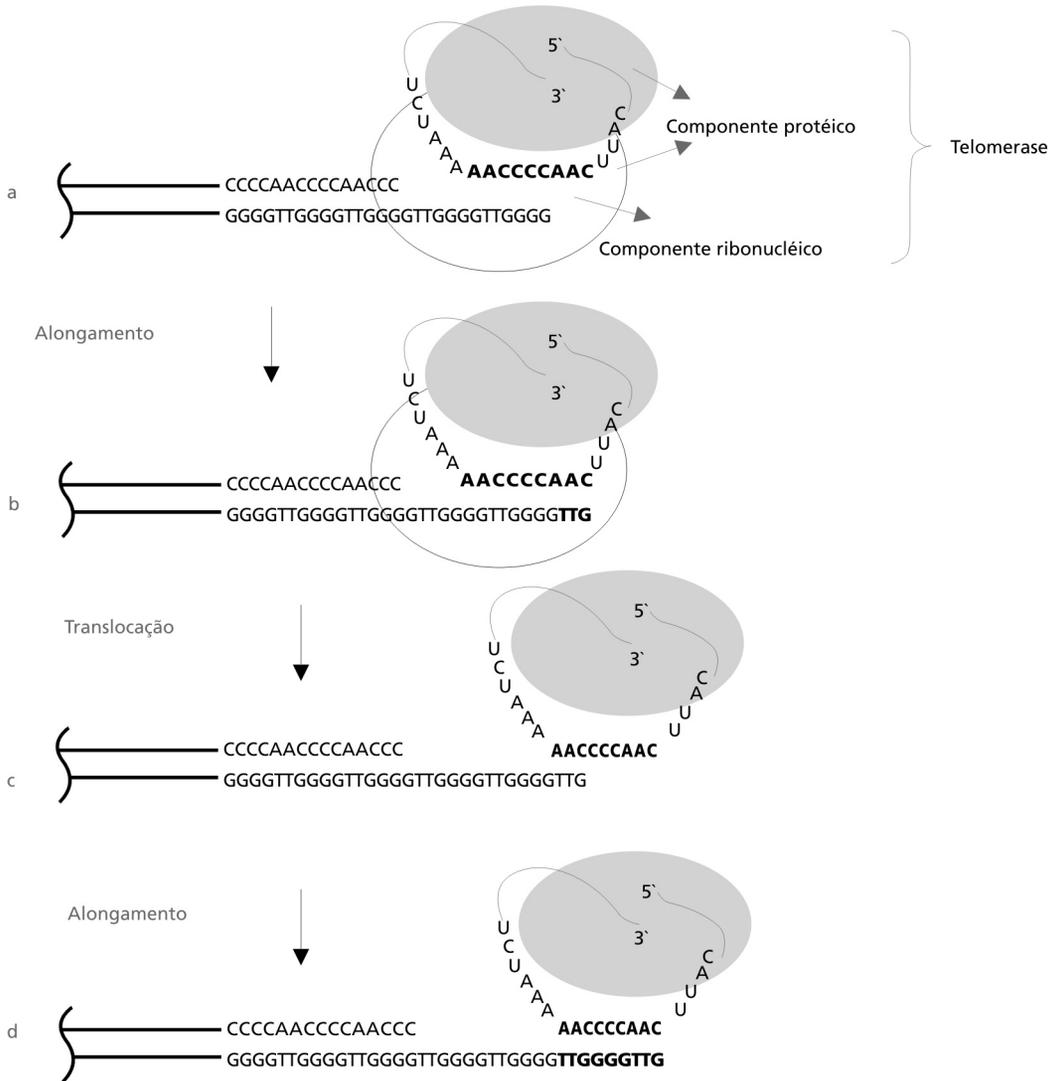
Na maioria dos organismos, o número de repetições de um extremo não é fixo, dando aos telômeros uma aparência heterogênea e confusa. O tamanho dessas seqüências repetitivas varia de 38 pares de bases em ciliados como *Oxytricha*, até dezenas de milhares de bases em células de mamíferos. Cada organismo apresenta um tamanho médio característico. O tamanho de uma repetição telomérica simples é mantido pela enzima telomerase. A telomerase é uma DNA polimerase especializada que adiciona seqüências teloméricas aos extremos dos cromossomos. Esta adição de novas seqüências equilibra a perda de repetições durante cada ciclo de replicação de moléculas lineares de DNA, pois a DNA polimerase não pode sintetizar DNA na seqüência molde muito perto do extremo 3' de cromossomos lineares, como demonstrado anteriormente.

A telomerase é uma enzima ribonucleoprotéica, pois apresenta dois componentes essenciais, uma porção protéica e uma porção ribonucléica, ou seja, um RNA. Você pode observar o mecanismo de ação da telomerase na **Figura 12.3**.

O componente de RNA provê o molde para a síntese das repetições teloméricas nos extremos dos cromossomos. A telomerase de *Tetrahymena*, por exemplo, contém um RNA de 160 nucleotídeos e apresenta 9 moldes potenciais contendo os nucleotídeos CAAACCCCAA. A redundância na região molde permite o pareamento de bases do telômero crescente com o RNA e ainda mantém uma região que pode ser usada como molde. A Tabela 12.1 apresenta a seqüência telomérica de alguns organismos, bem como o tamanho do componente de RNA da telomerase e suas seqüências.

Tabela 12.1: Componentes do RNA em telomerasas de diferentes organismos.

Componentes de RNA em Telomerasas			
Organismo	Seqüência telomérica	Seqüência RNA molde	Tamanho do RNA
Tetrahymena	TTGGGG	CAACCCCAA	160
Oxytricha	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAACC	190
Humano	TTAGGG	CUAACCCUAAC	450
Camundongo	TTAGGG	CCUAACCCU	450



**Figura 12.3:** Modelo de alongamento mediado pela telomerase. (a) A telomerase reconhece o substrato telomérico. A repetição terminal 5'TTGGGG3' é pareada com a seqüência 5'CAACCCCAA3', presente no RNA da telomerase. (b) O DNA é sintetizado utilizando o RNA como molde até atingir a extremidade; a síntese é mediada pelo componente protéico da telomerase. (c) A seqüência terminal TTGGGGTTG é liberada pela translocação da telomerase. A porção de RNA se pareia novamente, fornecendo um novo molde. (d) Outro ciclo de cópia do molde produz repetições 5'TTGGGG3' adicionais. Isso ocorre muitas vezes no processo de síntese dos telômeros. A fita complementar será posteriormente sintetizada pela DNA polimerase.

Com as informações obtidas, você já pôde perceber que os organismos desenvolveram sistemas especiais para manter a integridade da molécula de DNA e garantir que ela seja transmitida de maneira correta.

Nos próximos tópicos, você vai conhecer alguns mecanismos alternativos de replicação do DNA. Começaremos analisando um mecanismo conhecido como círculo rolante.

## MECANISMO DO CÍRCULO ROLANTE

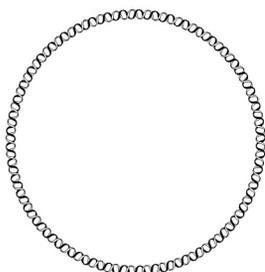
Nesse mecanismo, somente a replicação de uma das fitas é usada para gerar cópias de algumas moléculas circulares. Este tipo de estrutura é chamado círculo rolante, pois o ponto de crescimento rola em torno da molécula molde circular. Em princípio, a síntese pode continuar infinitamente. A **Figura 12.4** ilustra o mecanismo.

Em função do movimento, a forquilha de replicação alonga a fita externa e desloca a fita pareada inicialmente. O novo DNA sintetizado está ligado covalentemente ao DNA original, de modo que a fita deslocada possui sua unidade genômica no extremo 5'.

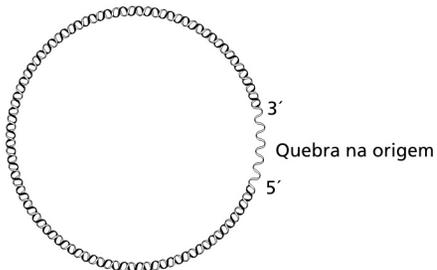
A unidade genômica original está acompanhada de uma série de unidades genômicas, que foram sintetizadas durante as voltas em torno do molde. Cada volta desloca o material sintetizado no ciclo anterior.

Observe na **Figura 12.5** as várias utilizações do círculo rolante. A cauda pode ser clivada como um monômero ou um multímero na forma linear. A forma linear multimérica pode ser mantida como fita simples ou ser convertida em fita dupla através da síntese da fita complementar, que posteriormente é clivada em monômeros dupla fita que se ligam formando moléculas fita dupla circular. A forma linear monomérica pode formar uma fita simples circular, que posteriormente será replicada, formando uma fita dupla circular.

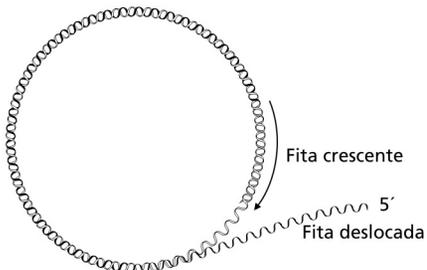
(1) O molde é uma molécula circular dupla fita



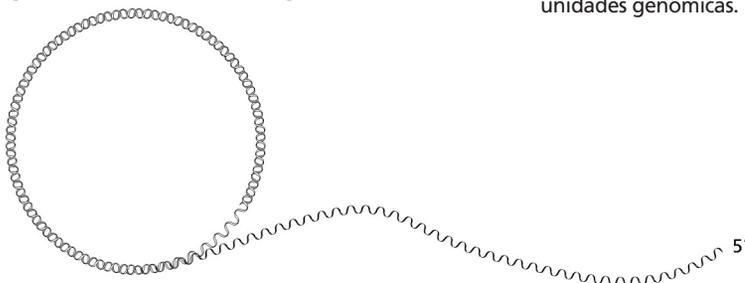
(2) O início da replicação ocorre em uma das fitas



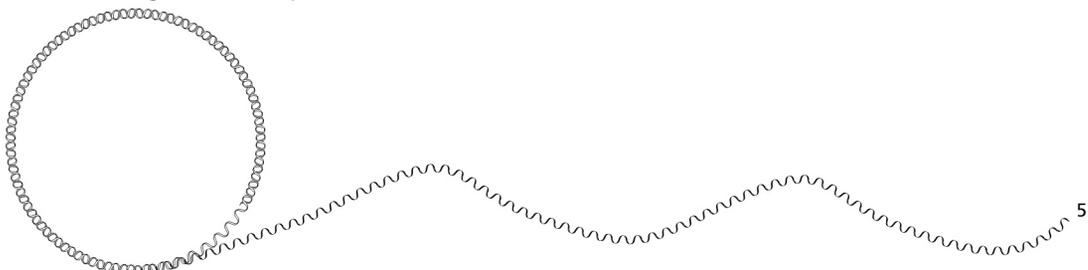
(3) O alongamento da fita crescente desloca a fita antiga



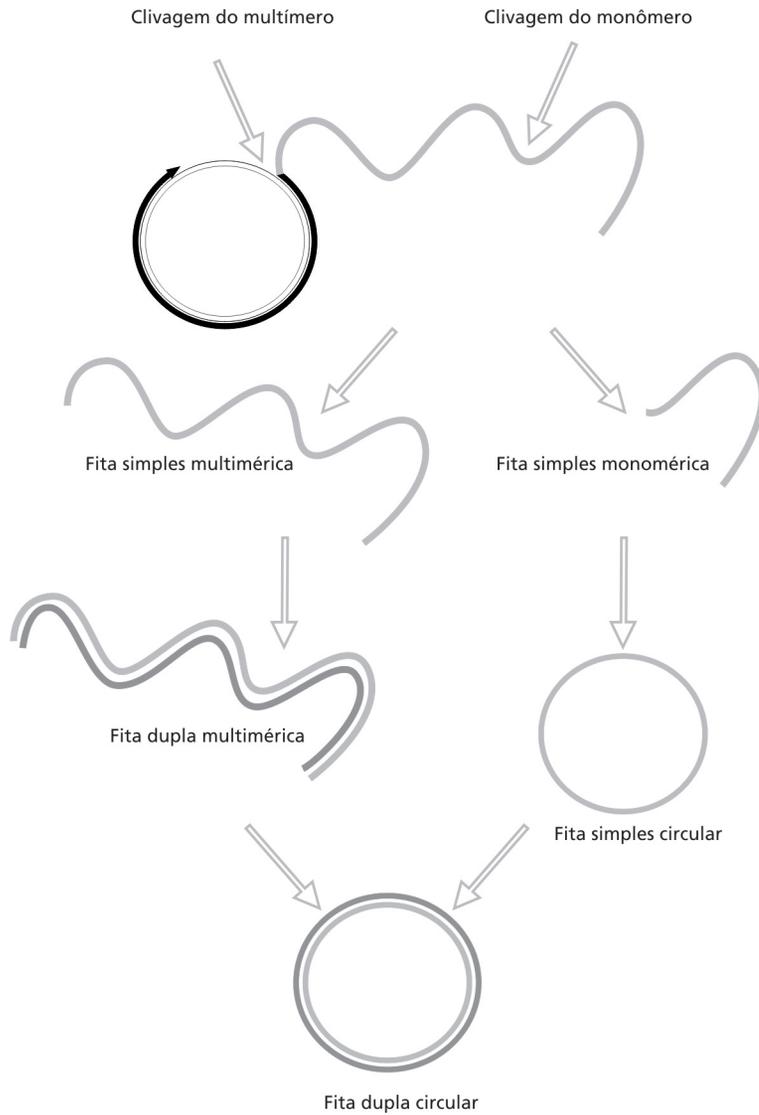
(4) Após completar uma volta, a fita deslocada atinge o tamanho de uma unidade genômica



(5) O alongamento sucessivo gera fitas deslocadas contendo unidades genômicas múltiplas



**Figura 12.4:** O círculo rolante gera uma cauda de DNA fita simples que pode conter múltiplas unidades genômicas.



**Figura 12.5:** Os círculos rolantes podem ser usados de diferentes formas. A clivagem na unidade simples, completa, gera monômeros, que podem ser convertidos em formas dúplex ou circular. A clivagem do multímero gera uma série de cópias repetidas e adjacentes que podem se duplicar e, após clivagem, dar origem a várias moléculas de forma circular.

Esse mecanismo é utilizado em ovócitos de *Xenopus* para ampliar regiões do DNAr (região do DNA que codifica o RNA ribossomal). Os genes para RNAr estão organizados em um grande número de repetições adjacentes no genoma. Uma dessas repetições é convertida em um círculo rolante.

A cauda deslocada, contendo muitas cópias da repetição, é convertida em DNA fita dupla, que é posteriormente clivada do círculo, de modo que as extremidades podem ser ligadas. Como resultado, é formada uma grande molécula circular contendo as repetições do DNAr, várias vezes ampliada.

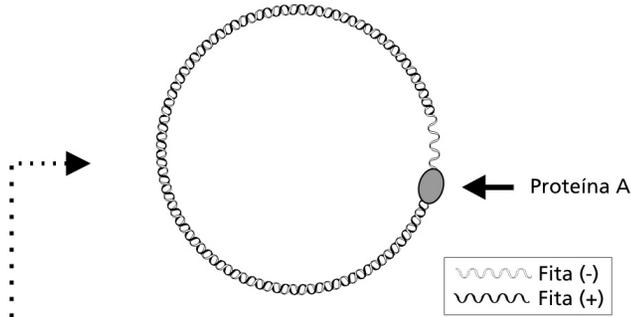
A replicação pelo mecanismo do círculo rolante é bastante comum em bacteriófagos. As unidades genômicas podem ser clivadas da cauda deslocada, gerando monômeros, que por sua vez podem ser empacotados em partículas virais ou usados em ciclos posteriores.

O círculo rolante é um mecanismo de amplificação do replicon original ou unidade genômica. A **Figura 12.6** ilustra o mecanismo de replicação do círculo rolante utilizado pelo fago  $\Phi$ X174. Esse fago possui seu genoma na forma de DNA fita simples circular, conhecida como fita positiva (+). Uma fita complementar, chamada fita menos (-), é sintetizada gerando um dúplex que é então replicado pelo mecanismo do círculo rolante.

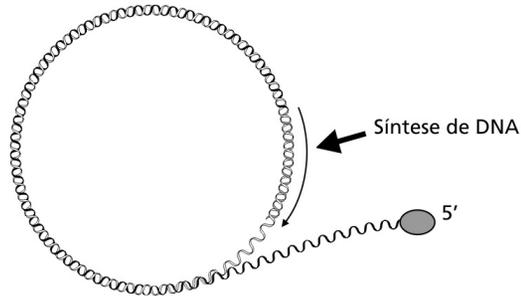
O círculo duplo é convertido para uma forma covalentemente fechada que se torna superespiralada. Uma proteína codificada pelo genoma do fago, a proteína A, corta a fita (+) do dúplex em um sítio específico que define a origem de replicação. Após o corte na origem, a proteína A permanece ligada ao extremo 5' enquanto o extremo 3' é alongado pela DNA polimerase.

A estrutura do DNA tem um papel importante na reação, uma vez que o DNA só pode ser cortado quando está superespiralado.

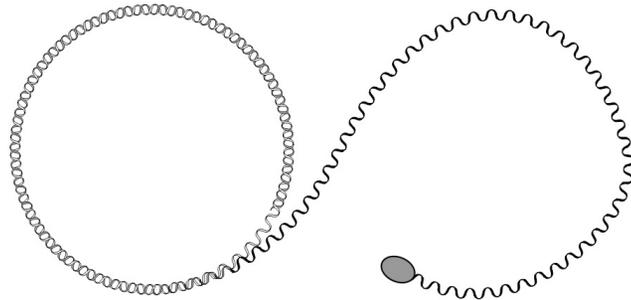
(1) A proteína A corta a origem e liga o 5'



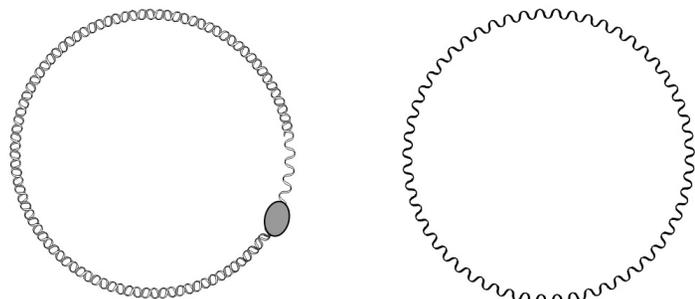
(2) O círculo rolante de replicação desloca a Fita (-)



(3) Quando a forquilha passa pela origem, a proteína A corta o DNA e se liga novamente ao extremo 5'



(4) A Fita (+) liberada forma um círculo covalente



Fita simples circular

**Figura 12.6:** Replicação do DNA simples fita do fago  $\phi$ X174. O DNA do fago (fita +) se duplica formando uma fita complementar (fita -). Esta fita será usada como molde para a replicação do genoma (fita simples +). As etapas estão descritas na ilustração.

A cadeia é alongada em torno do molde circular (-) até atingir o ponto inicial e desloca a origem. A proteína A funciona novamente. Ela permanece ligada ao círculo rolante bem como ao extremo 5' deslocado, estando na proximidade enquanto o ponto de crescimento volta para a origem. A proteína está, então, disponível para reconhecer a origem e cortá-la, ligando-se agora ao extremo gerado pelo novo corte. O ciclo pode ser repetido indefinidamente. Após o corte, a fita simples deslocada (+) é liberada como um círculo. A proteína A está envolvida na circularização onde liga um extremo 5' ao 3' no final de um ciclo e início de outro.

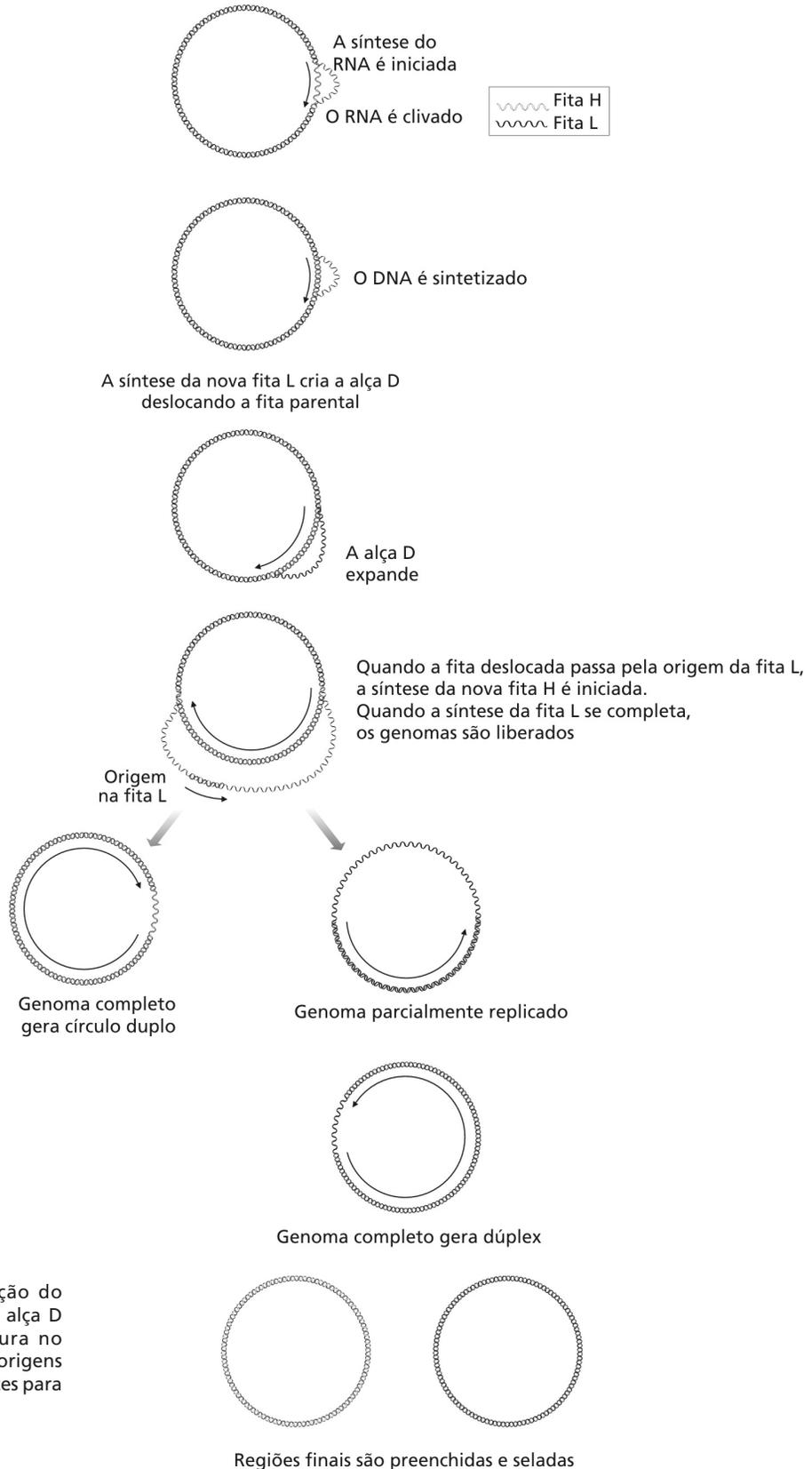
## REPLICAÇÃO DE DNA DE MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS

A replicação dos DNAs circulares de mitocôndrias e cloroplastos acontece de uma forma bem inusitada. A replicação se inicia em uma origem específica no DNA dupla fita circular, formado pelas fitas L e H. Inicialmente, somente uma das fitas parentais é usada como molde (fita H em DNA mitocondrial de mamíferos).

A RNA polimerase sintetiza um iniciador cuja extremidade 3' será gerada por uma endonuclease específica que reconhece a estrutura tripla do híbrido DNA-RNA mais o DNA fita simples deslocado. A extremidade 3' é usada para alongar o DNA pela DNA polimerase I.

A síntese é processada numa distância curta, deslocando a fita parental original (L), que permanece fita simples. O deslocamento da fita L resulta na formação de uma alça D. A **Figura 12.7** apresenta o mecanismo de replicação do DNA mitocondrial.

Uma única alça D contendo 500-600 nucleotídeos é encontrada em mitocôndrias de mamíferos. Em cloroplastos, ocorre formação de duas alças D.



**Figura 12.7:** Replicação do DNA mitocondrial. A alça D mantém uma abertura no DNA que apresenta origens de replicação diferentes para cada fita.

Conforme o DNA vai sendo replicado, o tamanho da alça D aumenta. O alongamento continua até cerca de  $2/3$  da molécula circular. Neste ponto, a origem de replicação da fita L deslocada é exposta, tendo início, então, a síntese da fita H. Uma primase sintetiza o iniciador de RNA que será alongado pela DNA polimerase usando a fita simples deslocada como molde, na direção oposta da síntese que ocorre na fita H.

Existe uma defasagem no tempo de síntese, pois quando a síntese da fita L é concluída, a síntese da fita H só ocorreu em  $1/3$  da molécula. Como resultado, ocorre a liberação de um DNA dupla fita circular completo e outro incompleto, que permanece parcialmente fita simples até que a síntese da fita H esteja completa. Finalmente, as novas fitas são seladas para se tornarem covalentemente intactas.

A existência de alças D e círculos rolantes apresenta um princípio geral. Uma origem pode ser uma seqüência de DNA que serve para iniciar a síntese de DNA de uma fita molde. A abertura do dúplice necessariamente leva à replicação na outra fita. No caso do DNA mitocondrial, as origens para replicar a fita complementar se encontram em locais diferentes.

## RESUMO

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de entender como os diferentes organismos que possuem genomas lineares superam o problema através de vários mecanismos. Você teve a oportunidade de aprender que a síntese dos telômeros, dos cromossomos de eucariotos, ocorre através de uma enzima chamada telomerase.

Na segunda parte da aula, você aprendeu como ocorre a replicação do DNA das organelas e também o mecanismo do círculo rolante, utilizado por muitos vírus e também por regiões do genoma que codificam os RNAs ribossomais.

## EXERCÍCIOS

1. Por que a síntese das extremidades dos genomas lineares pode ser comprometida?
2. Explique o mecanismo de síntese dos telômeros.
3. Por que o número de repetições encontradas nos telômeros pode variar de um cromossomo para outro, dentro do mesmo organismo?
4. Qual a vantagem do mecanismo do círculo rolante?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu o conteúdo, com certeza não teve dificuldades para responder aos exercícios. Todas as respostas podem ser encontradas no texto. Experimente responder às questões utilizando esquemas, adaptados das figuras apresentadas na aula. Isso irá ajudá-lo a compreender os mecanismos com maior facilidade. Nesta aula, encerramos o assunto de replicação de ácidos nucléicos. Nas próximas aulas, você conhecerá os mecanismos de mutação, reparo e recombinação do DNA. Até lá e bom estudo!

## objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Entender o que é mutação.
- Diferenciar as mutações espontâneas das induzidas, assim como as mutações somáticas das germinativas.
- Classificar os tipos de mutação de acordo com a mudança de aminoácido introduzida.
- Listar os principais agentes mutagênicos (que causam mutações no DNA).
- Entender como as mutações podem se estabelecer no DNA.
- Discutir a importância das mutações em diversas áreas da ciência.
- Descrever os principais mecanismos de reparo de DNA.

### Pré-requisitos

Para acompanhar mais facilmente esta aula, é importante que você reveja alguns conceitos das aulas sobre ácidos nucléicos (3, 4 e 5) e replicação (9, 10, 11 e 12) de nossa disciplina.

## INTRODUÇÃO

### CARCINOGÊNESE

Processo de desenvolvimento de câncer, doença que se origina de células mutantes que escapam dos controles normais de divisão celular, podendo invadir e colonizar diferentes tecidos do corpo.

Você viu, na Aula 4, que o papel do DNA como molécula da hereditariedade depende, em parte, de sua estabilidade. O armazenamento de informações por um longo período sem alteração é importante para a célula. Concorde? Contudo, você deve saber que as reações que alteram a estrutura do DNA podem ser fisiologicamente significantes. Processos como **carcinogênese** e envelhecimento, por exemplo, podem estar intimamente ligados ao acúmulo lento de alterações irreversíveis do DNA.

As mutações não devem ser vistas como algo totalmente ruim. Se você pensar não como um indivíduo, mas sim como uma “espécie”, com certeza concordará com o “lado bom” das alterações no DNA. As mutações que não levam à morte ou a restrições drásticas de vida de cada indivíduo de uma população podem representar uma vantagem em determinadas condições ambientais. Essas variações sutis, existentes entre os integrantes de uma população, muitas vezes asseguram a perpetuação e o processo evolutivo de uma espécie.

Também é importante que você saiba que mutação e recombinação (assunto da Aula 15) constituem as duas principais causas da variabilidade existente entre os indivíduos que integram uma população. Outro mecanismo associado a esta variabilidade envolve os elementos genéticos de transposição, que serão discutidos nas Aulas 18 e 19.

Em uma célula, que geralmente tem apenas uma ou duas cópias de DNA genômico, as proteínas e os RNAs defeituosos podem ser rapidamente substituídos usando a informação codificada no DNA. Entretanto, as moléculas de DNA são insubstituíveis e, apesar de se reconhecer a contribuição inestimável de algumas mutações, manter a integridade da informação contida no DNA é uma obrigatoriedade celular, o que é assegurado por um sofisticado conjunto de sistemas de reparo de DNA. Os danos no DNA podem ser causados por uma variedade de processos, alguns espontâneos, outros catalisados por agentes ambientais. Você verá que a própria replicação pode ocasionar danos no conteúdo de informação do DNA.

Nesta aula, não discutiremos o aspecto evolutivo das mutações, mas sim como elas ocorrem, como podem ser classificadas e sua importância em diferentes áreas, como a da saúde e a biotecnológica. Você também terá a oportunidade de conhecer como as células reparam as possíveis lesões que surgem no DNA, de forma a minimizar a transmissão desses erros para as futuras gerações de células.

Ao final da aula, serão discutidas as conseqüências para a célula de genes defeituosos que codificam proteínas que atuam nos sistemas de reparo.

Como são muitas informações, sugerimos que você leia esta aula com mais calma e atenção do que o habitual. Não é preciso se apressar! Lembre-se de que você está construindo seu conhecimento, o que requer paciência e perseverança.

Vamos começar?!?!

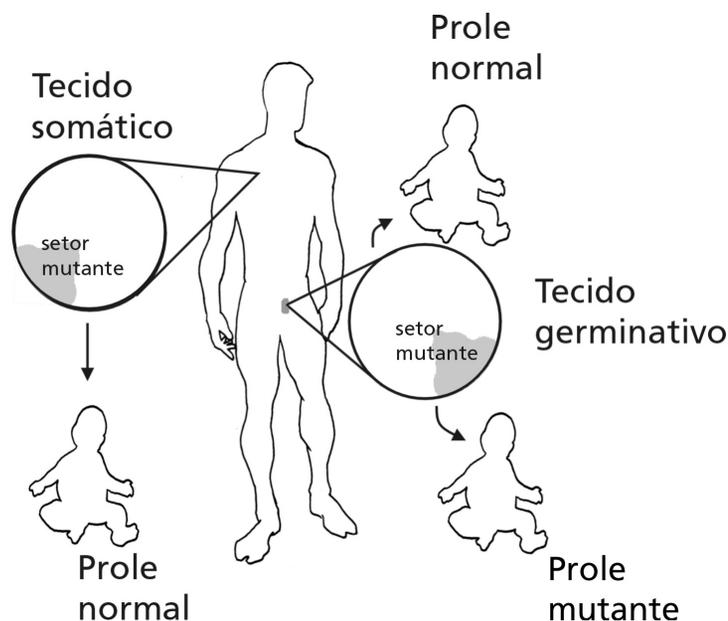
## O QUE É MUTAÇÃO?

Denominamos mutação qualquer alteração resultante de um processo pelo qual os organismos sofrem mudança de um estado hereditário para outro, sem que envolva recombinação. O que você entende por sofrer mudança de um estado hereditário para outro? Vamos pensar juntos! Nós sabemos que, ao se duplicar, é interessante que uma célula origine células-filhas idênticas a ela. Para que as características de uma célula sejam perpetuadas, é necessário que seu material genético esteja íntegro, sem alterações, ou seja, que seu estado hereditário se apresente inalterado. Caso o material genético seja modificado, o que pode ocorrer até mesmo durante a replicação (estudaremos isso mais adiante), podemos dizer que a célula sofreu uma mudança em seu estado hereditário e que as células-filhas herdarão tais modificações. Está claro?

É importante ressaltar também que um dano causado no DNA não necessariamente caracteriza uma mutação, uma vez que ele pode ser reparado antes que ocorra a divisão celular. Um dano não reparado no DNA – uma lesão – tem como conseqüência mais séria uma mudança na seqüência de bases do DNA que, se replicada e transmitida para as futuras gerações de células, torna-se permanente. Esta mudança permanente é uma mutação. Podemos dizer, então, que uma mutação se estabelece na molécula de DNA através de um processo em duas etapas. Tenha certeza de que mais adiante tudo isso ficará mais claro para você.

Os ácidos nucleicos, especialmente o DNA, que constitui o material genético das células, podem vir a apresentar uma seqüência de nucleotídeos diferente da seqüência original devido à substituição de um nucleotídeo por outro ou mesmo por adição ou remoção de um ou poucos nucleotídeos da molécula de DNA. Tais alterações são chamadas mutações gênicas e serão estudadas nesta aula. Entretanto, alterações mais “grosseiras”, ou seja, que envolvem regiões mais extensas do DNA, podem ocorrer ao nível de cromossomos, constituindo as aberrações cromossômicas, que podem ser estruturais (translocações, deleções, duplicações, inversões) ou numéricas (aneuploidias e poliploidias). As aberrações cromossômicas serão discutidas nas aulas de Genética.

A alteração da seqüência de nucleotídeos em organismos de mais alto grau de complexidade pode ocorrer em tecidos distintos, caracterizando a mutação somática e a mutação germinativa. Observe as diferenças na **Figura 13.1**, acompanhando o texto.



**Figura 13.1: Mutação somática vs mutação germinativa.** As mutações podem ocorrer tanto no tecido somático como no germinativo, entretanto, apenas as que ocorrem no tecido germinativo são transmitidas para a geração seguinte de células.

A mutação somática se caracteriza por ocorrer em tecido somático em desenvolvimento, podendo originar uma população, denominada clone, de células mutantes idênticas, todas descendentes da célula na qual ocorreu a mutação. Este tipo de mutação, em geral, não é transmitido para a prole.

A mutação germinativa, em contrapartida, ocorre em tecido associado à formação de células sexuais. A mutação é transmitida para a geração seguinte caso as células sexuais mutantes participem da fertilização. Vale lembrar que um indivíduo exibindo fenótipo normal pode produzir células sexuais mutantes.



As mutações em bactérias podem causar resistência a antibióticos. De fato, o uso excessivo ou a interrupção do tratamento aumenta a probabilidade de surgimento de linhagens de bactéria resistentes a diversos antibióticos, o que constitui um problema de saúde pública.

Os vírus sofrem mutação muito rapidamente, o que representa uma preocupação dos profissionais da saúde. Por exemplo, as vacinas contra gripe devem ser modificadas a cada ano para se adequarem às mudanças virais. Outro exemplo diz respeito à elevada taxa de mutação do HIV, o que dificulta ainda mais o tratamento da AIDS.

## MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS E INDUZIDAS

Como grande parte das mutações que afetam as células ocorre espontaneamente, vamos começar discutindo as diferenças entre as mutações espontâneas e as induzidas.

As mutações são ditas espontâneas quando resultam de uma operação celular normal ou de interações casuais com o ambiente. Ao contrário do que se possa imaginar, um número elevado de alterações no DNA poderia surgir, por exemplo, durante a replicação, caso não existissem os sistemas de reparo do DNA. Sabemos também que as mutações são, em geral, eventos raros, uma vez que aquelas que ocorrem naturalmente e que causam danos severos ao gene são, na maioria das vezes, selecionadas durante o processo evolutivo, o que dificulta a obtenção de mutantes espontâneos. Além disso, as conseqüências observáveis de uma mutação dependem de sua localização no gene, portanto, nem todas as mutações resultam em um fenótipo alterado.



Nós já definimos genótipo e fenótipo na Aula 1. Você já viu que a informação genética armazenada no DNA é transcrita sob a forma de RNA, que, então, é utilizado durante a síntese de proteínas, determinando a seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica (Aula 5). Também já foi estudado que, na maioria das vezes, apenas parte do genoma codifica alguma molécula, ou seja, está relacionada à síntese de uma molécula. Se juntarmos essas informações, é fácil entender que, se a mutação ocorre em uma região do genoma que não representa um gene, provavelmente não haverá alteração do fenótipo. Além disso, mesmo que a mutação ocorra dentro de um gene, a constatação de um fenótipo alterado dependerá do local e do tipo da mutação. Vamos entender por quê? Nas aulas do Módulo 3, você verá que o gene apresenta regiões não-codificadoras, ou seja, regiões que não são importantes para determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos em uma proteína. Você verá também, nas aulas do Módulo 4, que vários tipos de códon (a trinca de nucleotídeos no RNA que determina um aminoácido na proteína, lembra?) determinam o mesmo aminoácido na proteína. Assim, se a mutação ocorre na região não-codificadora ou modifica o códon sem que seja introduzida uma mudança de aminoácido na proteína, o fenótipo, associado à proteína, não se apresentará alterado.

Você já deve ter ouvido falar em alguns processos industriais, como, por exemplo, a produção de antibióticos, nos quais microorganismos são utilizados. Saiba que estes processos podem ser melhorados sob diversos aspectos, incluindo rendimento de produto formado, através da utilização de organismos mutantes. Se as mutações espontâneas são eventos raros, como nós já vimos, o que podemos fazer caso nosso objetivo seja produzir mutantes?

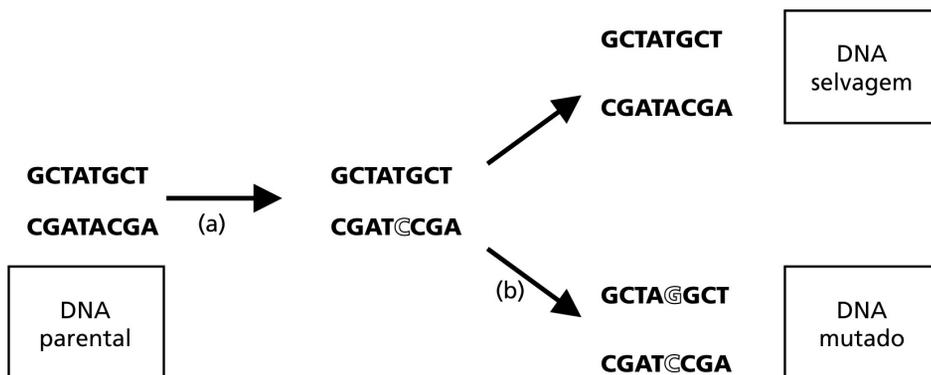
Pois saiba que a ocorrência das mutações pode ser aumentada com o uso de certos fatores, ditos agentes mutagênicos ou mutágenos, o que caracteriza as mutações induzidas. A maioria dos agentes mutagênicos atua sobre uma base específica do DNA, ou se incorpora ao ácido nucléico. Discutiremos isso mais adiante.

A essa altura, você deve estar desesperado(a) com todos os termos que estão sendo utilizados. Vamos, então, dar uma “paradinha” para rever cada um deles e introduzir alguns termos novos que serão importantes para o entendimento desta aula.

- Mutante – refere-se ao estado genético do organismo ou da célula. Um organismo ou uma célula mutante é aquele que, devido a uma mutação, apresenta um conjunto de características observáveis (fenótipo) diferente do fenótipo selvagem, que é o normalmente encontrado ou o que predomina entre os indivíduos de uma população.

- **Mutação** – qualquer alteração estrutural do DNA herdada, sem que envolva recombinação. Nem toda mutação está associada a um fenótipo mutante (já vimos isso), mas todo mutante apresenta uma alteração estrutural no DNA, que resulta em um fenótipo mutante.
- **Evento mutacional** – expressa a ocorrência de uma mutação.
- **Agente mutagênico ou mutágeno** – um agente físico ou um reagente químico que pode interagir com o DNA causando uma mutação.
- **Mutagênese** – é o processo de produção de mutantes, ou seja, de indução de mutação.

Agora que você já sabe diferenciar uma mutação espontânea de uma mutação induzida, é importante você saber que as mutações se originam de um processo que envolve duas etapas: primeiramente, um erro é introduzido em uma das fitas do DNA dupla-hélice e, então, este erro é ratificado durante a síntese de DNA. Para um melhor entendimento, observe a **Figura 13.2**. Neste caso específico, o DNA parental teve uma base A substituída por C. Caso este erro não seja corrigido, ao se replicar, a fita normal servirá de molde para a síntese de um DNA selvagem, idêntico ao parental. Em contrapartida, ao servir de molde na replicação, a fita contendo a base alterada (C) determina a síntese de uma fita contendo G em lugar de T, resultando na substituição do par T=A pelo par G=C.



**Figura 13.2: Mutação ao nível molecular.** Após a introdução de uma base errada (a), a mutação é ratificada durante a replicação do DNA (b).

## COMO É FEITA A SELEÇÃO DE MUTANTES?

Antes de iniciarmos o estudo sobre seleção de mutantes, é importante que você saiba que tipo de fenótipo mutante está sendo analisado. Isto se faz necessário porque as conseqüências fenotípicas de uma mutação podem ser sutis, necessitando de metodologias refinadas para se detectar o mutante, ou podem ser graves, produzindo defeitos morfológicos severos ou, até mesmo, a morte.

Os fenótipos mutantes podem ser separados de acordo com o tipo de mutação aos quais estão associados. A seguir, estão listados alguns tipos de mutação que originam fenótipos mutantes distintos.

- Mutações morfológicas – aquelas que levam a alterações morfológicas, tais como as modificações na forma, na cor ou no tamanho de uma célula ou de um organismo.
- Mutações bioquímicas – aquelas que resultam em perda ou alteração de alguma função bioquímica, como, por exemplo, uma via metabólica defeituosa devido a uma ou mais enzimas mutadas, e por isso não observáveis, podendo ser identificadas apenas por análise bioquímica.
- Mutações condicionais – aquelas nas quais os fenótipos só se manifestam sob determinadas condições, como, por exemplo, no caso dos mutantes sensíveis à temperatura.
- Mutações resistentes – aquelas que conferem resistência da célula ou do organismo a certos tipos de drogas, incluindo os antibióticos.
- Mutações regulatórias – aquelas nas quais os fenótipos são detectados pela incapacidade de controle de expressão de um ou vários genes.
- Mutações letais – aquelas que resultam em morte da célula ou do organismo.

Agora que você já está familiarizado com alguns fenótipos mutantes, vamos estudar como os mutantes espontâneos ou induzidos podem ser selecionados de acordo com suas características!

Vamos tomar como exemplo a seleção dos mutantes de bactéria resistentes a um antibiótico. Nesse caso, emprega-se meio de cultura adicionado de antibiótico, permitindo, assim, o crescimento apenas das células mutantes. Este método é bem simples, não é?

Para a seleção de mutantes de bactéria incapazes de utilizar lactose, pode-se utilizar um meio de cultura, conhecido como EMB ágar, contendo todos os aminoácidos, lactose e dois **CORANTES SENSÍVEIS AO pH**, eosina e azul de metileno. Vamos entender o que ocorre! As células **LAC<sup>+</sup>** consomem lactose, por um metabolismo oxidativo, havendo liberação de íon  $H^+$ . Portanto, ocorre diminuição do pH do meio ao redor das células, o que faz com que os corantes que permeiam as colônias apresentem coloração vermelha. Ao contrário, as células **LAC<sup>-</sup>** consomem glicina e liberam  $NH_3$  (amônia) que causa um aumento de pH ao redor destas células. Assim, os corantes perdem a cor, gerando colônias brancas.

## BASE MOLECULAR DAS MUTAÇÕES

Existem duas classes principais de mutações gênicas:

- substituição de bases – em que ocorre substituição de um par de bases por outro;
- inserção ou deleção de bases – em que um ou mais pares de nucleotídeos é inserido ou deletado.

O grupo de substituições de bases, por sua vez, subdivide-se em:

- a) transição – quando ocorre substituição de bases de mesmo tipo, ou seja, uma pirimidina por outra ou uma purina por outra (par A=T pelo par G≡C e vice-versa, ou o par T=A pelo par C≡G e vice-versa);
- b) transversão – quando ocorre substituição de bases de tipos diferentes, ou seja, uma purina por uma pirimidina, ou uma pirimidina por uma purina (par A=T pelos pares T=A ou C≡G e vice-versa, ou par G≡C pelos pares T=A ou C≡G e vice-versa).

### CORANTES SENSÍVEIS AO pH

Estes compostos apresentam coloração distinta de acordo com seu estado de ionização. São também conhecidos como indicadores de pH.

#### LAC<sup>+</sup>

Refere-se à bactéria selvagem, capaz de utilizar a lactose como fonte de carbono.

#### LAC<sup>-</sup>

Refere-se à bactéria mutante que, por não ser capaz de utilizar a lactose, utiliza o aminoácido glicina como fonte de carbono.

## COMO AS MUTAÇÕES GÊNICAS AFETAM AS PROTEÍNAS?

Em aulas anteriores, já foi discutida superficialmente a relação entre uma seqüência de bases no DNA e a seqüência de aminoácidos em uma proteína. Este tema será abordado mais detalhadamente nas aulas do Módulo 4. No entanto, para o entendimento das conseqüências de uma mutação, é fundamental que você saiba que as trincas adjacentes de nucleotídeos, chamadas códons, determinam a seqüência de aminoácidos em uma proteína e que qualquer alteração nestas trincas pode resultar em mudança dos aminoácidos que constituem uma cadeia polipeptídica.

Com base na mudança causada na proteína, as mutações podem ser de diferentes tipos. Leia a descrição deles acompanhando a figura. Na **Figura 13.3.a**, você encontra três possíveis substituições de bases que podem ocorrer em um gene, capazes de resultar em mutações: silenciosa, *missense* e *nonsense*. Já na **Figura 13.3.b**, é possível observar a diferença resultante de inserção e deleção de bases.

- Mutação silenciosa – não causa mudança de aminoácido, uma vez que mais de uma trinca pode codificar um mesmo aminoácido.

Exemplo: substituição do códon UAC (Tyr) → UAU (Tyr). Os dois códons especificam o aminoácido tirosina, representado dentro dos parênteses pelo símbolo de três letras.

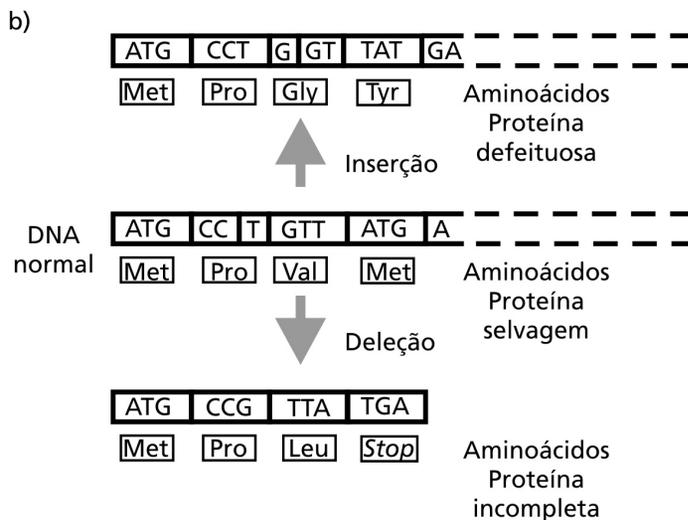
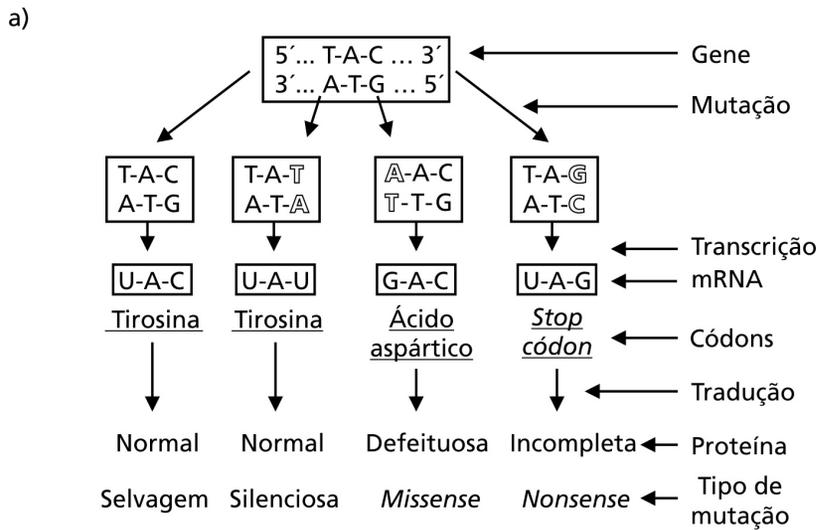
- Mutação *missense* – resulta em mudança de aminoácido. Exemplo: substituição do códon UAC (Tyr) → UUC (Phe). Os dois aminoácidos têm mesma característica química, são aminoácidos com grupamentos aromáticos, apolares ou fracamente polares. Muitas vezes é chamada mutação neutra.

Substituição do códon UAC (Tyr) → GAC (Asp). Os dois aminoácidos têm características químicas diferentes, Tyr é fracamente polar e Asp é polar carregado negativamente. Por vezes é denominada mutação de sentido trocado.

- Mutação *nonsense* (mutação sem sentido) – determina uma terminação prematura da tradução, resultando em uma proteína menor.

Exemplo: substituição do códon UAC (Tyr) → UAG (Stop).  
 O códon que especifica Tyr é substituído por um códon que determina o término da tradução, gerando, assim, uma proteína menor, incompleta.

- Mutação *frameshift* (mutação por mudança de quadro de leitura) – a adição ou deleção de pares de bases, não múltiplos de três dentro da região codificadora, resulta em mudança de todos os códons a partir do ponto onde ocorreu a alteração.



**Figura 13.3: Tipos de mutação.** a) A partir de três bases constituintes de um gene, é possível gerar algumas seqüências mutadas resultantes de substituições de cada uma das bases. Neste exemplo, tais alterações originaram mutações silenciosa, *missense* e *nonsense*, associadas a proteínas normal, defeituosa e incompleta, respectivamente. b) Inserção ou deleção de bases, envolvendo um número não múltiplo de três, resulta em mudança de quadro de leitura (*frameshift*). As conseqüências de uma mutação *frameshift* podem ser as mais diversas, incluindo proteínas defeituosas ou incompletas.



Um exemplo importante da mutação causada por substituição de bases é a anemia falciforme, doença caracterizada por hemólise (quebra de hemácias) acentuada devido à presença de hemoglobina mutante, conhecida por hemoglobina S (HbS), no interior das células vermelhas do sangue. Esta doença está associada à substituição de adenina por timina, o que resulta em troca de ácido glutâmico por valina na hemoglobina.

## COMO OCORREM AS MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS?

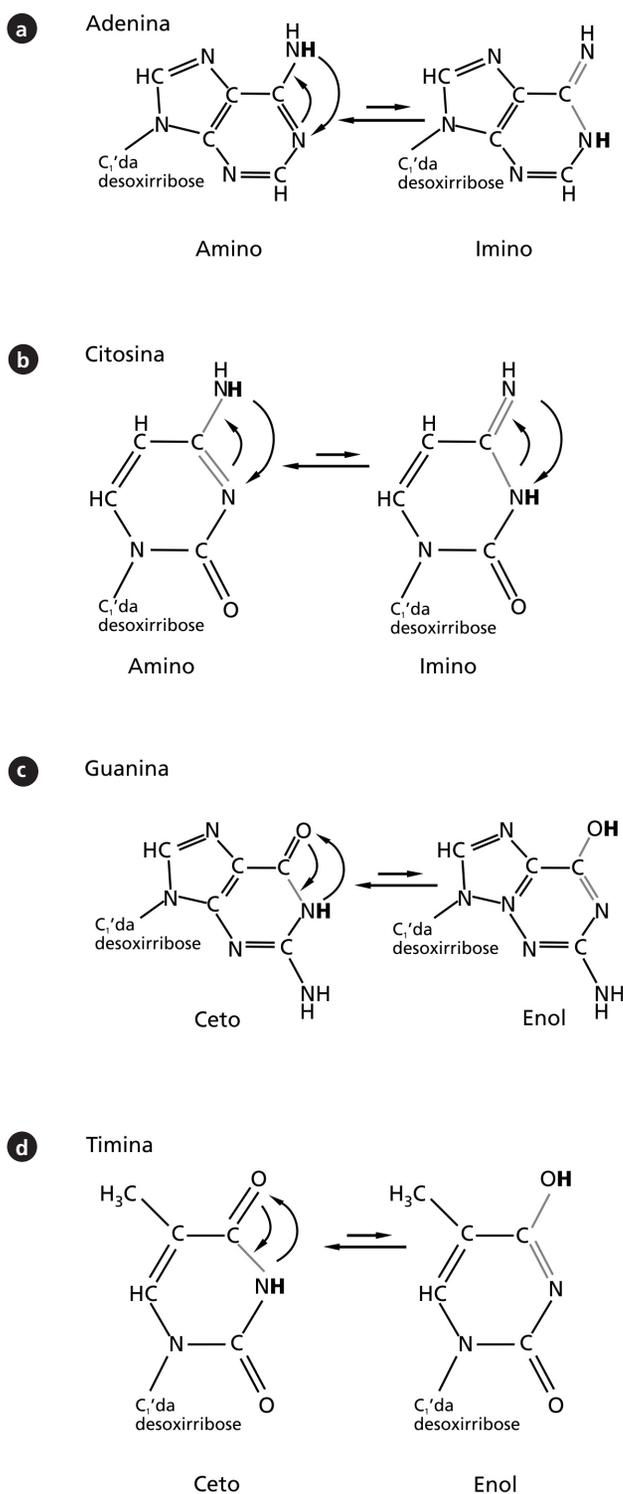
As mutações espontâneas ocorrem por erros de replicação do DNA ou por lesões espontâneas.

### Erros de replicação do DNA

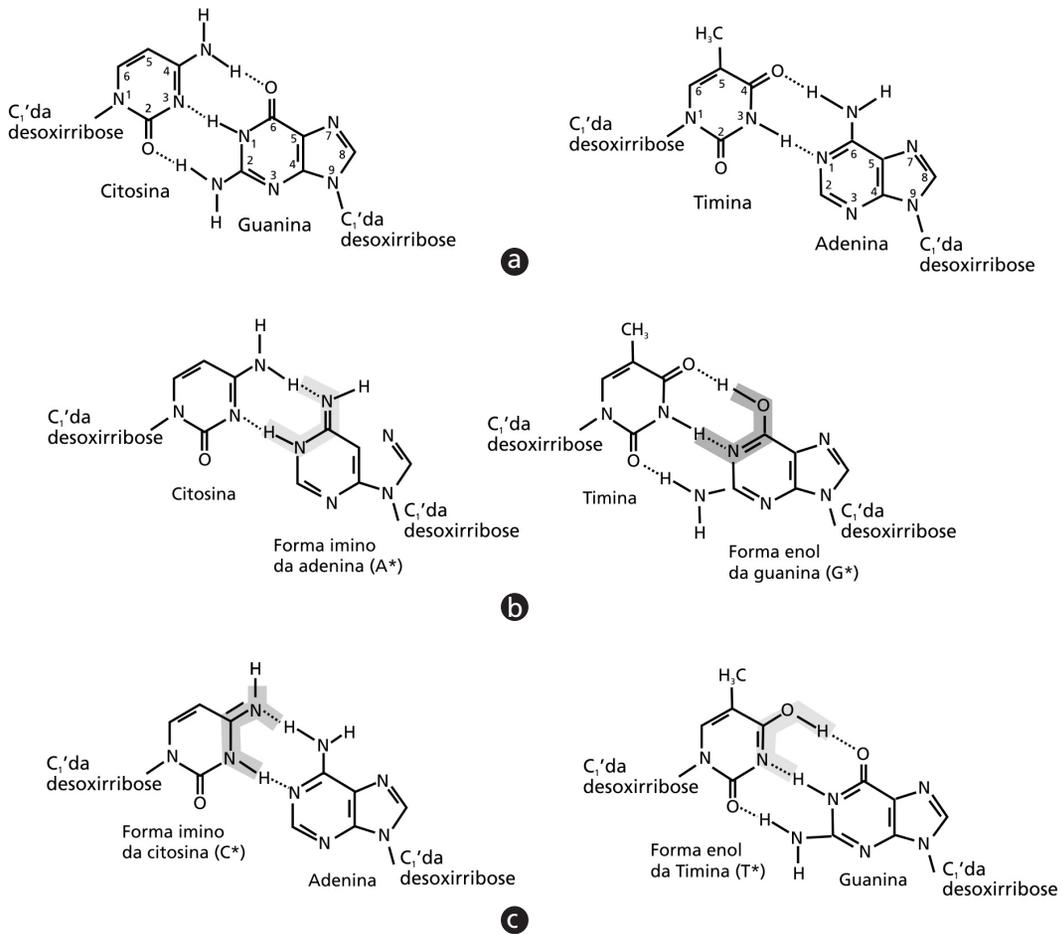
Os erros de replicação normalmente ocorrem devido ao tautomerismo de bases, à incorporação de bases erradas e à replicação incorreta de seqüências repetitivas.

Vamos entender porque o tautomerismo das bases pode promover uma mutação! Aliás, antes, vamos entender o que é tautomerismo.

Entende-se por estado tautomérico a variação da posição de um próton ( $H^+$ ) em uma molécula. Em meio aquoso, as purinas e pirimidinas possuem diferentes estados tautoméricos, sendo que um deles predomina. Observe na **Figura 13.4** que as bases nitrogenadas adenina e citosina podem se encontrar sob as forma amino ( $-NH_2$ ), estado tautomérico mais comum, e imino ( $=NH$ ), a forma transiente. Com relação à guanina e à timina, existem as formas ceto ( $-C=O$ ), o estado normal, e enol ( $=C-OH$ ), a forma transiente. Repare, também, nas **Figuras 13.5.b** e **13.5.c**, os possíveis pares de bases formados pelos estados tautoméricos transientes. A forma imino de A pareia com C e a forma imino de C pareia com A. Já a forma enol de G pareia com T e a enol de T pareia com G.



**Figura 13.4: Estados tautoméricos das bases.** Adenina (a) e citosina (b) apresentam-se sob as formas amino (estado mais comum) e imino (estado transitente). Guanina (c) e timina (d) apresentam-se sob as formas ceto (estado mais comum) e enol (estado transitente).



**Figura 13.5:** Possíveis pares de bases contendo uma das bases em seu estado tautomérico transitente. Pares de bases Watson-Crick (a) e pares de bases formados pelas formas transitentes de purinas (b), adenina e guanina, e de pirimidinas (c), citosina e timina.

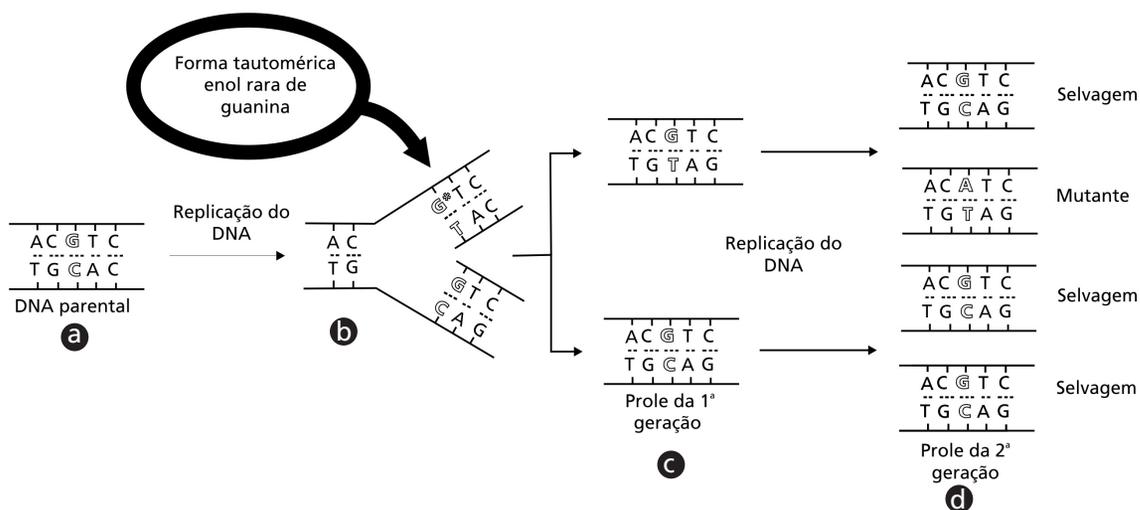


Será que você se lembra das fórmulas estruturais das bases nitrogenadas? Você sabe quais são os grupamentos envolvidos no pareamento das bases? Não se esqueça de retornar às aulas anteriores sempre que sentir necessidade. Se for necessário, não hesite em retornar às Aulas 3 e 4.

Agora chegou a hora de você entender porque algumas formas tautoméricas podem resultar em alteração do pareamento de nucleotídeos!

Vamos tomar como exemplo o par de bases  $G \equiv C$  em uma molécula de DNA durante a replicação. Para facilitar, leia o texto acompanhando a **Figura 13.6**. Durante a separação das fitas, a forma normal de G poderia originar o tautômero transitente  $G^*$ , o que resultaria na formação do par de bases  $G^* \bullet T$  em lugar de  $G \equiv C$ . No próximo ciclo de replicação, considerando a molécula de DNA contendo o par de bases  $G^* \bullet T$ , muito

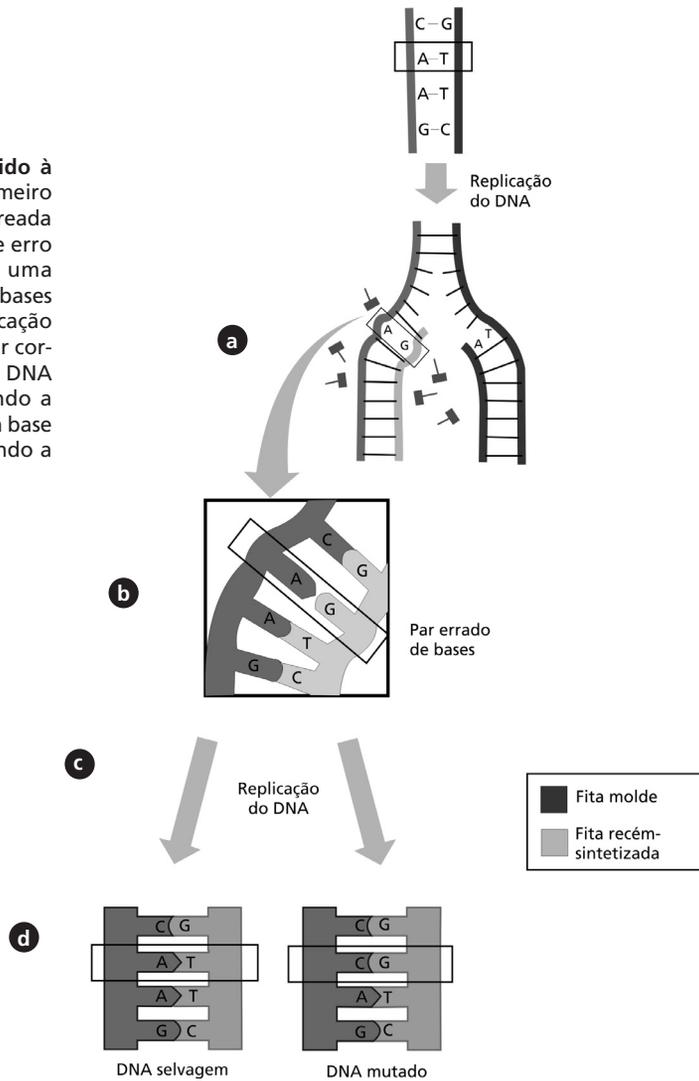
provavelmente, o tautômero G\* retornaria à forma amino e parearia normalmente com C. Entretanto, a outra fita de DNA, contendo a base T, serviria de molde para a síntese de uma molécula contendo, então, o par de bases A=T. Esta mudança do par original G=C para o par A=T caracterizaria uma mutação. Portanto, podemos concluir que tautômeros transitentes permitem pareamentos não-padrões de bases que se encaixam na dupla-hélice de DNA, causando eventuais mutações nos ciclos seguintes de replicação.



**Figura 13.6: Erro de replicação devido ao tautomerismo das bases.** a) DNA parental a ser replicado. b) No primeiro ciclo de replicação, o tautômero transitente G\* pareia com T, em lugar de C, originando o par G\*•T. c) Durante o segundo ciclo de replicação, a forma imino (transiente) é convertida para a forma amino, regenerado o estado normal G. d) A fita de DNA contendo G gera uma molécula com o par de bases G=C, enquanto a outra fita contendo T gera o par de bases A=T, ratificando a mutação de G=C para A=T.

Durante a replicação, algumas bases são erroneamente incorporadas. Entretanto, as próprias polimerases, por apresentarem a função de edição, encarregam-se de retirar as bases erradas, permitindo, assim, a incorporação da base correta. Reveja as aulas sobre replicação! Caso a função editora não seja desempenhada adequadamente, a base errada passa a constituir a molécula de DNA e, no segundo ciclo de replicação, a mutação é, então, ratificada. Para clarear o assunto, veja a **Figura 13.7**.

**Figura 13.7: Erro de replicação devido à incorporação de bases erradas.** No primeiro ciclo de replicação (a), uma base G é pareada erroneamente com uma base A e este erro não é corrigido, o que resulta em uma molécula de DNA contendo o par de bases A•G (b). Em um segundo ciclo de replicação (c), a fita contendo a base A irá parear corretamente com a base T, gerando o DNA selvagem. No entanto, a fita contendo a base G, ao parear corretamente com a base C, gera um DNA mutado (d), ratificando a mutação A=T para C≡G.

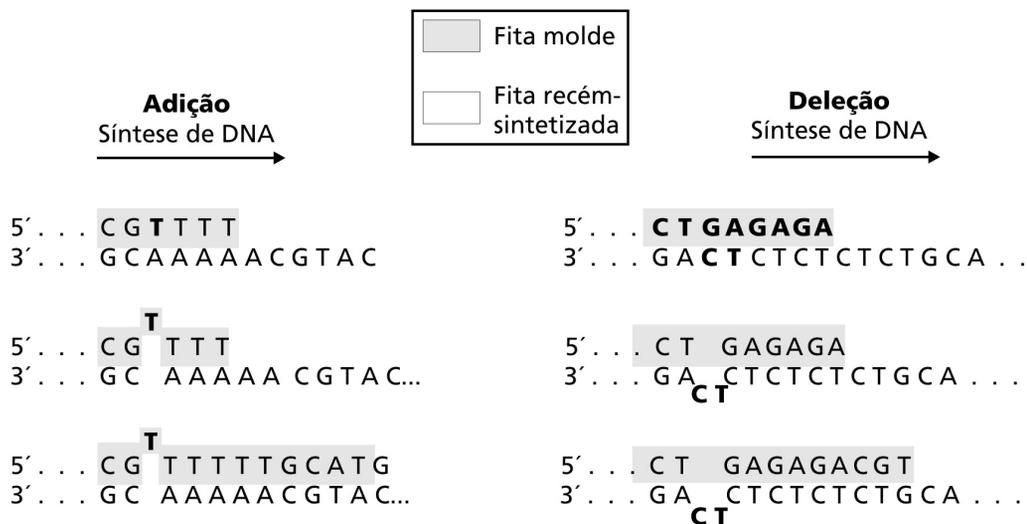


**SEQÜÊNCIA REPETITIVA (OU SEQÜÊNCIA DE REPETIÇÃO)**

As seqüências de repetição, como o nome mesmo diz, correspondem a unidades básicas de repetição que se encontram em múltiplas cópias em série no genoma dos organismos. Estas seqüências são mais comumente do tipo mono, di, tri ou tetranucleotídeos, ou seja, de um, dois, três ou quatro nucleotídeos.

Outra possibilidade de erro se origina da replicação incorreta de **SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS (OU SEQÜÊNCIAS DE REPETIÇÃO)** encontradas no genoma dos organismos. Observe, na **Figura 13.8**, que devido a um fenômeno conhecido como “derrapagem da DNA polimerase” é possível adicionar ou deletar uma ou mais bases. Na **Figura 13.8.a**, a seqüência repetitiva AAAAA propicia o desemparelhamento da base T, antes mesmo do término da síntese da nova fita. Como resultado, temos uma fita com seis, em lugar de cinco, bases do tipo T. Caso este erro não seja corrigido, em um segundo ciclo de replicação, a mutação por adição de base será ratificada. Ao contrário, na **Figura 13.8.b**, é possível observar o que ocorre durante a replicação de uma seqüência repetitiva de CT. Nesse exemplo, a fita molde não é completamente utilizada, o que resulta em

uma molécula com menos uma unidade de repetição (CT). Novamente, se este erro não for reparado, no ciclo seguinte de replicação, será ratificada a mutação por deleção de duas bases.



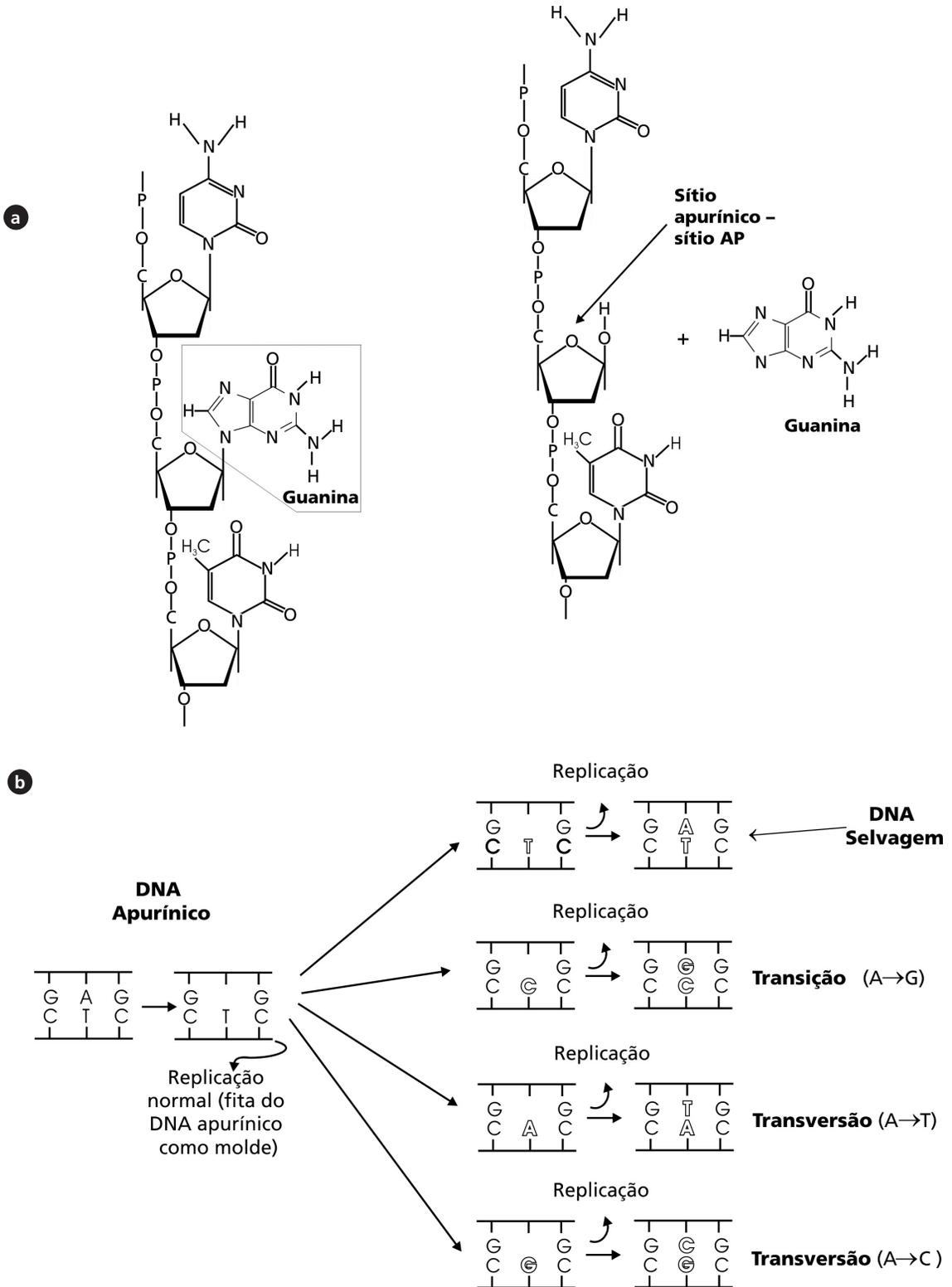
**Figura 13.8: Replicação incorreta de seqüências repetitivas.** Replicação incorreta de seqüências repetitivas, resultando em adição (a) e deleção (b) de bases.

### Lesões espontâneas

Além dos erros de replicação do DNA, lesões espontâneas, resultantes de depurinação, desaminação e danos oxidativos, também podem ocorrer.

#### Depurinação

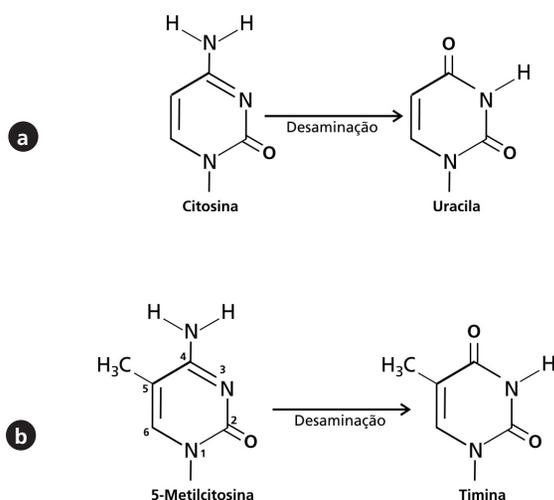
A depurinação consiste em perda de uma purina devido à quebra da ligação entre a base e a desoxirribose, gerando sítios apurínicos, conhecidos como sítios AP. Esta ausência de base na fita molde durante a replicação resulta em incorporação de qualquer uma das quatro bases, o que pode originar uma mutação, que se ratificará no segundo ciclo de replicação, caso o erro não seja reparado. Observe na **Figura 13.9.a** a perda da guanina e a conseqüente geração de um sítio AP. Já na **Figura 13.9.b**, você encontra um esquema de como a mutação pode se estabelecer no DNA, a partir de sítio apurínico. A incorporação de T resulta em transição (G→A), enquanto a incorporação de A ou G resulta em transversão (G→T ou G→C), após o segundo ciclo da replicação. É importante você saber que uma única célula perde mais de 10.000 purinas por dia, sendo que a maioria dos sítios apurínicos é devidamente reparada.



**Figura 13.9: Depurinação – perda espontânea de purinas presentes no DNA.** A perda de purina gera um sítio apurínico – sítio AP (a). Na ausência de uma base na fita molde, qualquer base pode ser incorporada durante a replicação do DNA, podendo gerar uma mutação (b).

## Desaminação

A desaminação caracteriza-se pela perda do grupamento amino ( $-NH_2$ ) de uma das bases nitrogenadas. A desaminação da citosina, por exemplo, gera uracila, conforme esquematizado na **Figura 13.10.a**, o que resulta, nos ciclos subsequentes de replicação, em conversão do par  $C \equiv G$  para o par  $T = A$ . Além disso, algumas bases se encontram metiladas, ou seja, adicionadas de um grupamento metil ( $-CH_3$ ), sendo que o estado de metilação de um gene consiste em um importante mecanismo de controle de expressão gênica. A desaminação de 5-metilcitosina produz timina, conforme a **Figura 13.10.b**, resultando na transição  $C \rightarrow T$  e na substituição do par  $C \equiv G$  pelo par  $T = A$ . Como a presença de timina não é reconhecida pela maioria dos sistemas de reparo, este mecanismo é uma causa comum de mutação.



**Figura 13.10: Desaminação – perda do grupamento amino das bases.** A perda do grupamento amino da citosina (a) e da 5-metilcitosina (b) resulta em uracila e timina, respectivamente. Essa mudança de base favorece a formação de um par de bases diferente do original, o que caracteriza uma mutação.

**RADICAIS LIVRES**

Átomos ou moléculas quimicamente reativas, devido à existência de pelo menos um elétron desemparelhado, que apresentam tempo de vida pequeno.

Na busca de uma configuração mais estável, os radicais livres podem causar danos às macromoléculas no interior das células. Os radicais livres podem ser produzidos em processos normais ou patológicos e estão associados a danos teciduais em diversas circunstâncias, incluindo: exposição à radiação, danos por poluentes ambientais e envelhecimento.

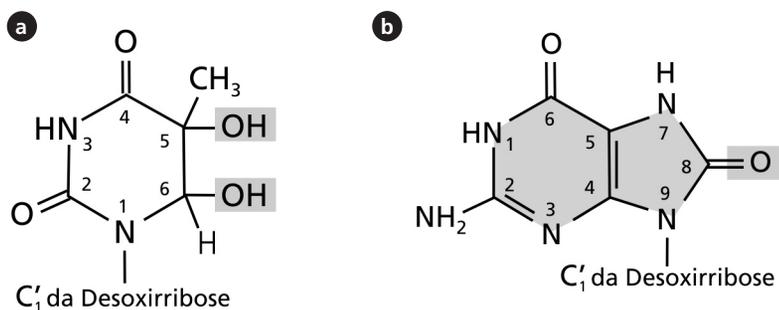
As substâncias antioxidantes, como a vitamina C, diminuem os níveis de radicais livres em nosso organismo, evitando, assim, que eles causem algum dano. Para maiores informações sobre radicais livres e sua importância, visite a página da *Virtual Free Radical School*, cujo endereço é [http://](http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Virtual.html)

[www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Virtual.html](http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Virtual.html).

**Danos oxidativos**

Os danos oxidativos podem ocorrer espontaneamente devido à ação de **RADICAIS LIVRES**, tais como superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), que são gerados durante o metabolismo aeróbico normal. Estas espécies reativas de oxigênio podem causar danos no DNA, ou até mesmo nos precursores do DNA (dGTP), resultando em mutação. Dois dos produtos formados estão representados na **Figura 13.11**. O 8-oxo-7-hidrodesoxiguanosina (8-oxodG), por exemplo, pareia frequentemente com A, estando associado a altos níveis da transversão G→T. Já a timidina glicol bloqueia a replicação.

Os danos oxidativos ocorrem naturalmente, mas sua frequência é aumentada por radiação ionizante, conforme você verá mais adiante nesta aula.



**Figura 13.11: Produtos de danos oxidativos do DNA decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio.** a) Timidina glicol, que bloqueia a replicação do DNA. b) 8-Oxo-7-hidrodesoxiguanosina (8-oxodG), que promove a transversão G→T.

**COMO OCORREM AS MUTAÇÕES INDUZIDAS?**

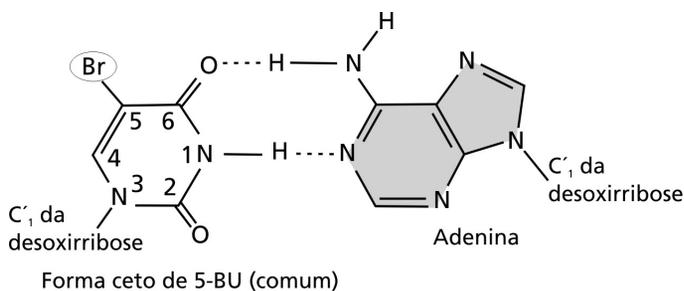
As mutações induzidas ocorrem pela ação de agentes mutagênicos químicos e físicos. Dentre os agentes mutagênicos químicos mais conhecidos, destacam-se os análogos de base, os compostos que reagem com o DNA, como o ácido nitroso e os agentes alquilantes, e os agentes intercalantes. Como exemplos de mutágenos físicos, podemos citar os raios ultra-violeta (raios UV), um tipo de radiação não-ionizante, e dois tipos de radiação ionizante, os raios  $\gamma$  e os raios X.

Como será que cada um desses agentes atua? Vamos discutir um pouquinho sobre cada um deles separadamente.

## Agentes mutagênicos químicos

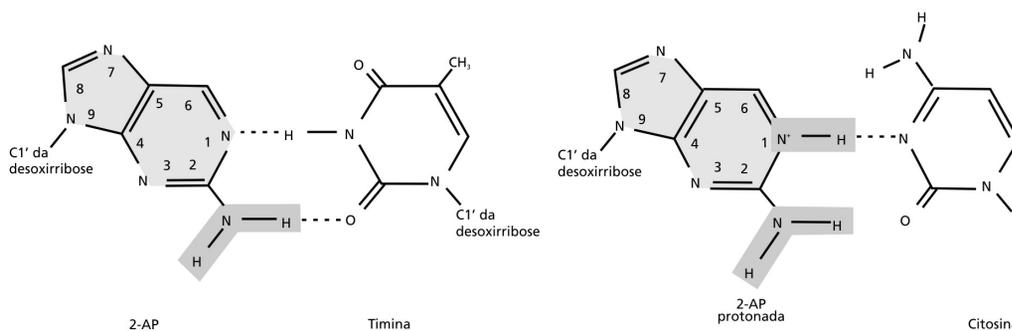
### Análogos de base

Pelo nome você já deve entender como são os compostos desse grupo. De fato, a ação mutagênica de um análogo de base resulta de sua incorporação no DNA no lugar de uma base regular. Se esse composto tautomeriza ou se permite dois modos de pareamento através de pontes de hidrogênio, ele é mutagênico. Como exemplo, podemos citar o 5-bromo uracila (5-BU), um análogo de timina. Observe sua fórmula estrutural na **Figura 13.12.a**. O caráter mutagênico do 5-BU se deve à mudança do equilíbrio ceto-enol causado pelo átomo de bromo, conforme pode ser visto na **Figura 13.12.b**. A forma enol existe por mais tempo em 5-BU do que em T, e parecia com G. Portanto, sua presença gera a transição A→G e a mudança do par T=A para o par C≡G. Como nos casos já discutidos anteriormente, são necessários dois ciclos de replicação para gerar um novo par de bases.



**Figura 13.12:** Possíveis pareamentos entre 5-bromo uracila (5-BU) e as bases nitrogenadas comuns. A presença da forma comum do 5-bromo uracila (5-BU), um análogo de timina, pareia com adenina (a), enquanto a forma ceto de 5-BU permite o pareamento com guanina (b), o que caracteriza uma mutação.

Um outro exemplo é a 2-amino purina (2-AP) (**Figura 13.13.a**), um análogo de adenina. Além de parear com T, a forma protonada de 2-AP pode formar uma ponte de hidrogênio com C (**Figura 13.13.b**). Esta possibilidade de pareamento causa uma mudança do par A=T para o par G≡C.



**Figura 13.13: Possíveis pareamentos entre 2-amino purina (2-AP) e as bases nitrogenadas comuns.** Enquanto 2-amino purina (2-AP) pareia com timina (a), a forma protonada de 2-AP permite o pareamento com citosina (b), o que em ciclos subseqüentes de replicação gera uma mutação, caso o erro não seja reparado.



Exemplos de análogos de base são algumas drogas antivirais e antitumorais. O AZT (azidotimidina), um análogo de timina, é amplamente usado no tratamento de pacientes portadores de HIV.

### Compostos que reagem com o DNA

Vários compostos químicos que reagem com o DNA são conhecidos, destacando-se o ácido nitroso, a hidroxilamina e o etil metano sulfonato, um agente alquilante.

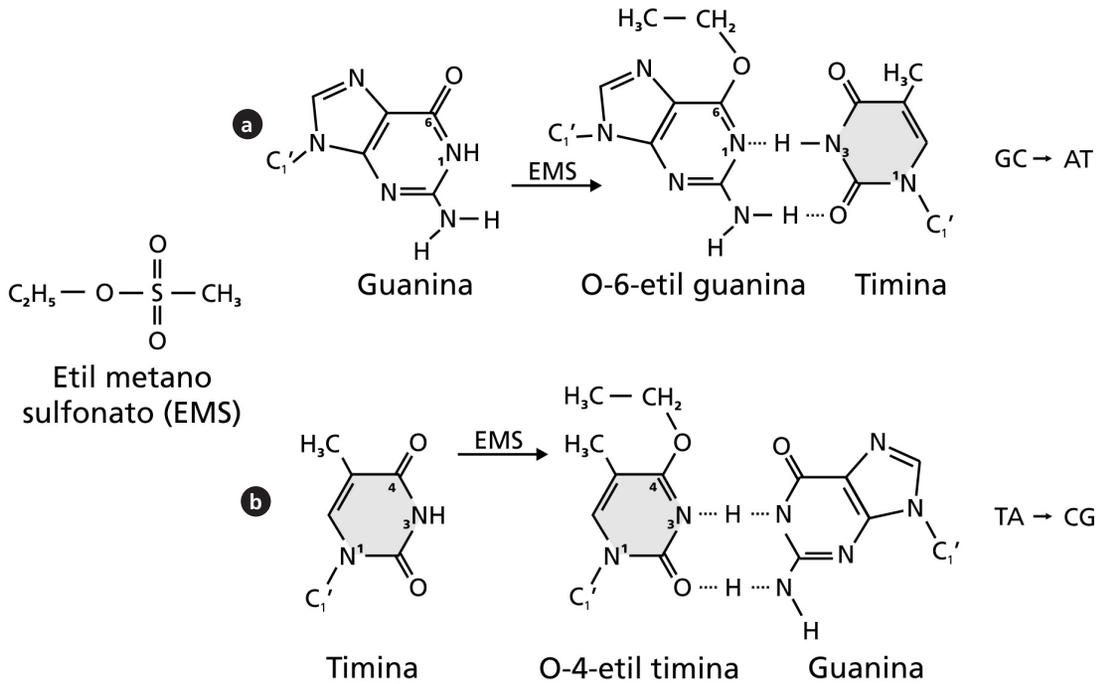
- **Ácido nitroso** – O ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) causa desaminação oxidativa convertendo o grupamento amina ( $-\text{NH}_2$ ) das bases nitrogenadas ao grupamento carbonila ( $-\text{C}=\text{O}$ ). Tal qual ocorre na desaminação espontânea, que você já estudou anteriormente (volte à **Figura 13.10**), a desaminação por ácido nitroso promove a conversão de C em U, que pareia com A, em vez de parear com G. A base A desaminada gera a base hipoxantina, que pareia com C. Já a desaminação de G resulta em xantina, que pareia também com C, não causando, portanto, mutação.



O ácido nitroso é formado a partir de precursores orgânicos, tais como as nitrosaminas, e de sais de nitrito e nitrato, que são comumente empregados como conservantes de alimentos processados para prevenir o crescimento de bactérias tóxicas. Na quantidade utilizada para este fim, estes compostos não parecem aumentar o risco de câncer, conferindo um risco muito menor para a saúde do que no caso dos alimentos estragados pelo não uso de conservantes.

- *Hidroxilamina* – A ação da hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) resulta em adição de uma hidroxila à citosina, que, dessa forma, passa a parear com A mudando o par  $\text{C}\equiv\text{G}$  para o par  $\text{T}=\text{A}$ .
- *Etil metano sulfonato* – O composto etil metano sulfonato (EMS) é um agente alquilante, ou seja, adiciona um grupamento alquila a uma base nitrogenada. O EMS é capaz de adicionar o grupamento etila a muitas posições das quatro bases, mas seu poder mutagênico está mais relacionado à adição da etila ao oxigênio na posição 6 da guanina. A O-6-etilguanina formada pareia, então, com timina (**Figura 13.14**), podendo resultar na transição  $\text{G}\equiv\text{C} \rightarrow \text{A}=\text{T}$  nos ciclos seguintes de replicação. Já a ação de EMS sobre a timina resulta em formação de O-4-etiltimina, que, ao parear com guanina, pode determinar a conversão de T para C.

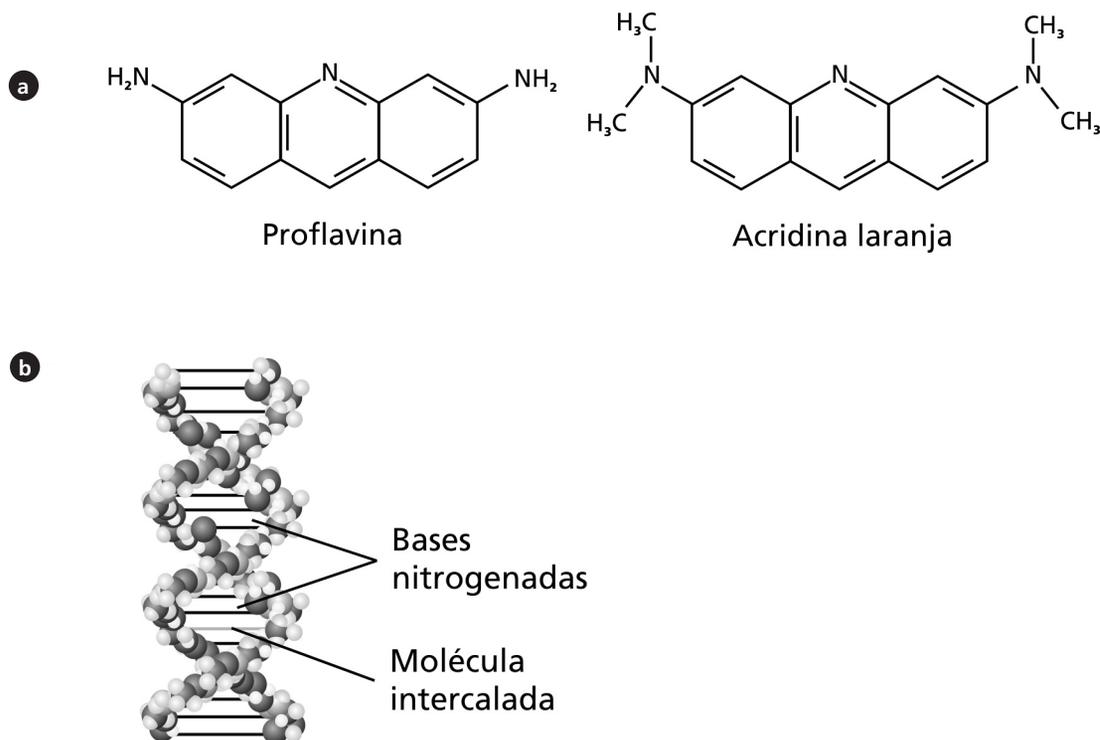
A adição de um grupo alquila também pode ocorrer no N-7 do anel purínico, formando um nitrogênio quaternário nessa posição. Este grupo quaternário estimula a ionização do anel e, na forma ionizada, a guanina alquilada pareia com T em lugar de C, resultando na transição do par  $\text{G}\equiv\text{C}$  para o par  $\text{A}=\text{T}$ . Já a adenina alquilada apresenta uma ligação N-glicosídica facilmente hidrolizável, produzindo um sítio apurínico, tal qual foi visto na **Figura 13.9.a**. Tal sítio pode ser reparado, mas se a replicação precede o reparo, qualquer base pode ser inserida, tal como ocorre na geração espontânea de sítios apurínicos que você já estudou. Como na **Figura 13.9.b**, após a segunda replicação, o par original  $\text{A}=\text{T}$  pode ser regenerado ou convertido aos pares  $\text{G}\equiv\text{C}$ ,  $\text{T}=\text{A}$  ou  $\text{C}\equiv\text{G}$ .



**Figura 13.14: Ação do etil metano sulfonato (EMS).** A ação do EMS sobre a guanina gera O-6-etil guanina que, ao parear com timina, promove a conversão do par G=C em A=T (a). A timina, sob ação do EMS, é convertida em O-4-etil timina, que pareia com guanina, resultando na mudança do par T=A em C=G (b).

### Substâncias intercalantes

As substâncias intercalantes, tais como acridina laranja (corante) e proflavina (anti-séptico de uso veterinário) (**Figura 13.15**), inserem-se entre dois pares de bases, num processo chamado intercalação. Estes compostos são moléculas planares, constituídas de três anéis, cujas dimensões são muito similares às de um par purina-pirimidina. Quando um DNA contendo acridinas intercaladas, por exemplo, se replica, bases adicionais aparecem na seqüência. Normalmente, ocorre adição de uma base, embora ocasionalmente possa ocorrer também a adição de duas bases. A deleção de bases também é possível.



**Figura 13.15: Substâncias intercalantes e seu modo de ação.** (a) Fórmula estrutural de duas substâncias intercalantes: proflavina e acridina laranja. (b) A presença de uma substância intercalante na molécula de DNA causa um estiramento da dupla-hélice, o que faz com que, durante a replicação, a DNA polimerase promova a adição ou deleção de pares de bases.



O benzopireno, encontrado na fumaça de cigarro, e aflatoxinas, produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus*, que cresce em amendoim e em diversos tipos de grãos, são exemplos de agentes mutagênicos.

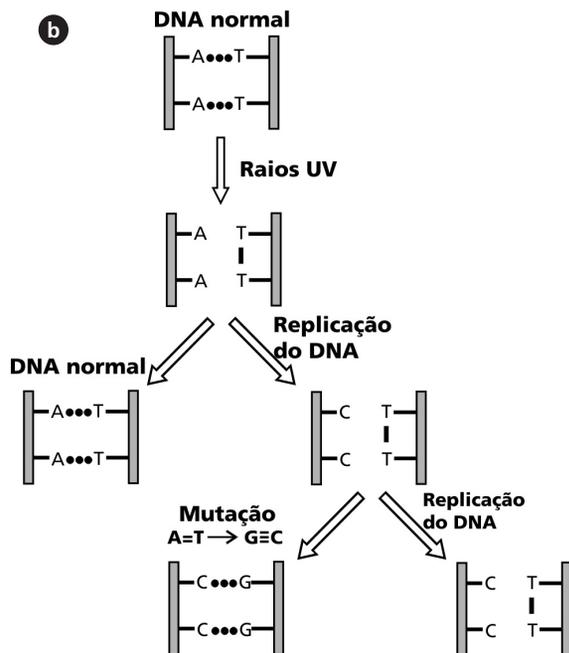
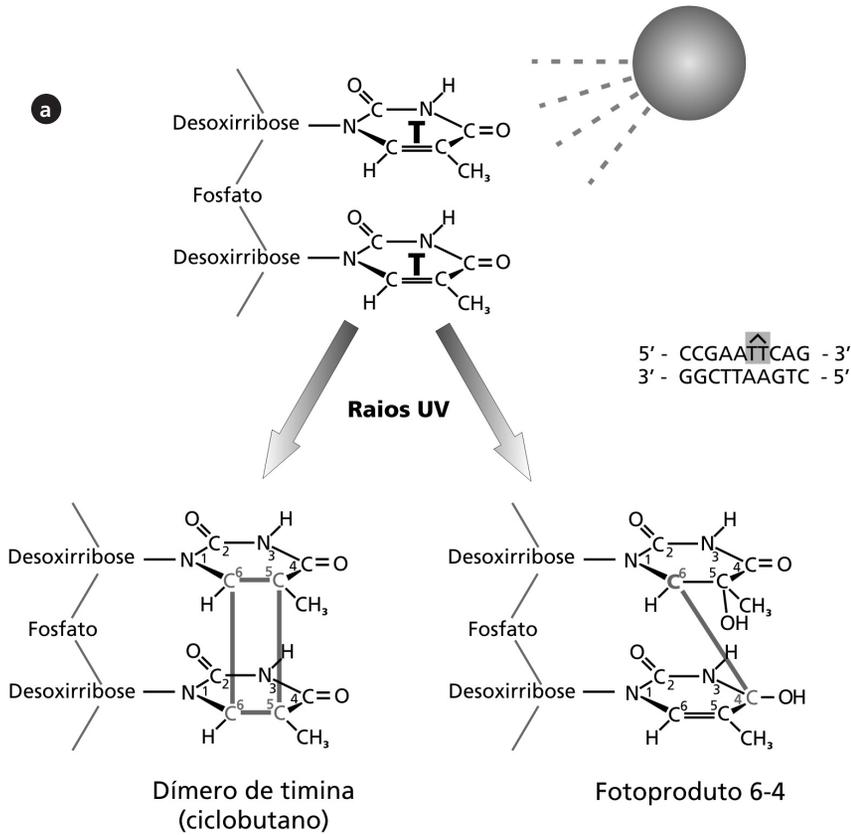
## Agentes mutagênicos físicos

### *Radiação não-ionizante – raios ultravioleta*

Os raios ultravioleta constituem um exemplo de radiação não-ionizante, sendo considerado um mutagênico potente por sua capacidade de causar dímeros de timina e outros dímeros de pirimidina. Na **Figura 13.16.a**, você pode observar os dois tipos de dímero: o dímero ciclobutano-timina, formado pela ligação de dois resíduos adjacentes de timina ligados por anéis de ciclobutano envolvendo os carbonos 5 e 6 da timina, e o fotoproduto 6-4, um outro tipo de lesão causada pelos

raios UV. As duas lesões de DNA promovem distorção da dupla-hélice, interferindo no pareamento normal das bases. A presença do dímero ciclobutano-timina bloqueia a transcrição e a replicação, sendo a forma mais letal quando não é reparada.

O fotoproduto 6-4 é a forma mais mutagênica. Um possível mecanismo de surgimento de mutação está esquematizado na **Figura 13.16.b**. Durante a replicação de uma molécula de DNA apresentando dímero de timina, ambas as fitas são usadas como moldes para síntese de novas fitas. A presença do dímero na fita molde pode direcionar a incorporação de uma base errada na fita nova, de tal forma que, no segundo ciclo de replicação, uma mutação será produzida. Embora os dímeros de pirimidinas possam eventualmente ser corrigidos, a mutação não é detectada pelo sistema de reparo de DNA. O efeito mutagênico dos raios UV parece estar relacionado aos mecanismos de reparo desses danos, como será visto mais adiante nesta aula.



**Figura 13.16: Ação de raios ultravioleta sobre o DNA.** (a) A incidência de raios UV sobre uma molécula de DNA, que apresenta dois resíduos adjacentes de timina, pode resultar em formação de dímero de timina (ciclobutano) ou em 6-4 fotoproduto. (b) Um possível mecanismo para o surgimento de uma mutação induzida por raios UV.



A recomendação de não se tomar banho de sol entre 10h e 14h é devida à maior quantidade de raios UV neste período do dia. O bronzeamento solar excessivo pode causar a formação de dímeros de pirimidina nas células epiteliais, podendo resultar em câncer de pele.

### *Radiações ionizantes (raios X e raios $\gamma$ )*

Dentre as radiações ionizantes, destacam-se os raios X e os raios  $\gamma$ , que se caracterizam pelo alto poder de penetração, sendo capazes de ionizar água e outras moléculas. Os radicais livres formados, por exemplo, o radical hidroxila  $\text{OH}^\bullet$ , são muito reativos e reagem com o DNA, promovendo quebra de fita simples, quebras do suporte açúcar-fosfato ou quebra do anel imidazol das purinas. Estas lesões geram sítios apurínicos ou apirimidínicos, o que pode resultar em deleção de nucleotídeos.

### **DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS MUTAÇÕES – *hot spots***

A distribuição espacial das mutações na molécula de DNA não é ao acaso, e certos sítios são alterados com maior frequência. As regiões nas quais as mutações estão concentradas são conhecidas como *hot spots*. Estes sítios não são idênticos para os diferentes agentes mutagênicos. A presença dessas regiões em um DNA alterado muitas vezes contribui para identificar o tipo de agente mutagênico associado à alteração.

### **REPARO DO DNA**

Antes de iniciarmos este tópico, é importante que você pense a respeito da fidelidade do processo de replicação do DNA. Para a célula, é interessante que seu DNA seja replicado de forma perfeita ou sejam introduzidos erros de sequência de bases? Pensou na forma perfeita? Será que um “errozinho” é vantajoso? Vamos discutir sobre isso!!

Parece óbvio que, se a cada ciclo de replicação fossem introduzidos erros de seqüências de bases na molécula de DNA, a frequência de doenças genéticas seria muito maior do que a observada. Além disso, como definiríamos uma espécie, já que dificilmente ela seria preservada? Em contrapartida, uma replicação perfeita, sem erros, não permitiria a criação de novas espécies e, muito menos, a seleção de organismos mais bem adaptados a certas condições ambientais, com um prejuízo inestimável ao processo evolutivo.

É importante que você saiba que a taxa de erro durante a replicação do DNA não é pequena. Entretanto, os sistemas de reparo de DNA reduzem esta taxa de erro, sendo responsáveis por manter o equilíbrio entre preservar a saúde, preservar as espécies e possibilitar a evolução. Por exemplo, a subunidade  $\alpha$  da DNA polimerase III de *Escherichia coli* introduz, aproximadamente, uma base incorreta a cada  $10^4$  pares de bases formados durante a replicação *in vitro*. Contudo, a taxa estimada de mutação em células bacterianas é muito menor, correspondendo a um erro a cada  $10^9$  nucleotídeos incorporados durante a síntese de DNA. Esta redução da taxa de mutação se deve, principalmente, à função revisora das DNA polimerases de *E. coli*. Na DNA polimerase III, esta função é exibida pela subunidade  $\epsilon$  (epsilon), de forma que, quando uma base errada é incorporada durante a síntese de DNA, a polimerase faz uma pausa, transfere a extremidade 3' da cadeia crescente para o sítio da exonuclease no qual a base malpareada é removida. A extremidade 3' é, então, transferida de volta para o sítio da polimerase, onde esta região é copiada corretamente. A função revisora é uma propriedade de quase todas as DNA polimerases de bactéria e das polimerases  $\delta$  (delta) e  $\epsilon$  (epsilon) de células animais, indicando que esta função é indispensável para reduzir o excesso de erro em todas as células.

Além dos sistemas de reparo que discutiremos nesta aula, as células também desenvolveram sistemas enzimáticos capazes de neutralizar compostos com potencial de causar danos ao DNA. Como exemplo, podemos citar um sistema que previne contra danos oxidativos e que envolve a ação da enzima superóxido dismutase sobre radicais superóxidos, convertendo-os a peróxido de hidrogênio, que é, então, convertido à água pela ação da enzima catalase.

Você já viu, na primeira parte desta aula, que os danos observados nas moléculas de DNA podem ser decorrentes não apenas de substituição de bases durante a replicação, como também da troca de bases resultante da instabilidade química, inerente às próprias bases ou às ligações N-glicosídicas e às alterações resultantes da ação de agentes químicos ou físicos.

Agora, vamos discutir um pouco sobre os principais sistemas de reparo conhecidos, lembrando que grande parte desse conhecimento foi adquirida a partir de estudos com bactéria. Muitos desses sistemas de reparo também existem em eucarioto. Entretanto, o complexo enzimático envolvido e os detalhes do processo ainda não foram inteiramente esclarecidos.

Nos próximos parágrafos, você estudará o reparo de mau pareamento de bases, os reparos de excisão de base e de nucleotídeo e dois tipos de reparo direto, nos quais participam DNA fotoliasas e alquiltransferases.

### **Reparo de mau pareamento de bases – mismatch repair**

O sistema de reparo de mau pareamento, existente em células de bactéria e de eucariotos, é responsável pela correção tanto de mau pareamento de uma única base, exceto C•C, quanto de pequenas inserções e deleções. Quando um mau pareamento, ou seja, um par de bases não usual é detectado, a base incorreta é removida e substituída pela base correta. O grande desafio deste mecanismo de reparo é discriminar entre as fitas de DNA normal e mutada, de forma a reparar a fita mutada tendo a normal como referência. Em bactéria, como você verá mais adiante, a fita nova é reconhecida por não ser metilada.

Apenas para reforçar sua importância, vale lembrar que a correção de erros pelo sistema de reparo de mau pareamento na bactéria *E. coli* aumenta de  $10^2$  a  $10^3$  a fidelidade da replicação. Para você entender o que ocorre em organismos procarióticos, leia os parágrafos seguintes acompanhando a **Figura 13.17**.

Este sistema de reparo atua logo após a replicação quando a fita recém-sintetizada ainda não sofreu metilação. O que será metilação? No DNA de *E. coli*, resíduos de adenina nas seqüências GATC são metilados, ou seja, recebem um grupamento metila ( $-\text{CH}_3$ ), na posição 6. Você já sabe que as DNA polimerases incorporam adenina, e não metil adenina, no DNA, de forma que os resíduos de adenina estarão apenas na fita recém-sintetizada. Como a metilação desta fita ocorre alguns minutos após a replicação pela ação da enzima *Dam* metil transferase (ou *Dam* metilase), o DNA replicado se apresenta, por um período de tempo, hemi-metilado, ou seja, a fita original é metilada, enquanto a fita recém-sintetizada é não-metilada, o que faz com que o sistema de reparo seja capaz de discriminar entre as duas fitas. Esse reconhecimento é fundamental para que a base incorporada erroneamente na fita recém-sintetizada (não-metilada) seja removida e que a base correta seja, então, incorporada de acordo com a seqüência da fita original (metilada).

Em bactéria, este processo engloba a participação de três proteínas. A proteína MutH, que se liga especificamente à seqüência GATC de moléculas hemimetiladas, é capaz de distinguir a fita original metilada da fita recém-sintetizada e, portanto, não-metilada. A proteína MutS, que reconhece o mau pareamento de bases, forma um complexo com uma terceira proteína, MutL. O DNA atravessa esse complexo, que se move nas duas direções ao longo da molécula de DNA. Quando o complexo encontra uma proteína MutH ligada à seqüência hemimetilada GATC, a atividade endonuclease latente da MutH é ativada, ocorrendo a clivagem específica da fita não metilada. Após esta incisão, o segmento da fita recém-sintetizada contendo a base incorporada erroneamente é retirado pela ação de uma exonuclease. Este segmento é, então, devidamente substituído pela seqüência correta em uma etapa em que se observa a participação de várias enzimas, incluindo a DNA polimerase III e a ligase. Lembra do papel dessas enzimas na replicação?

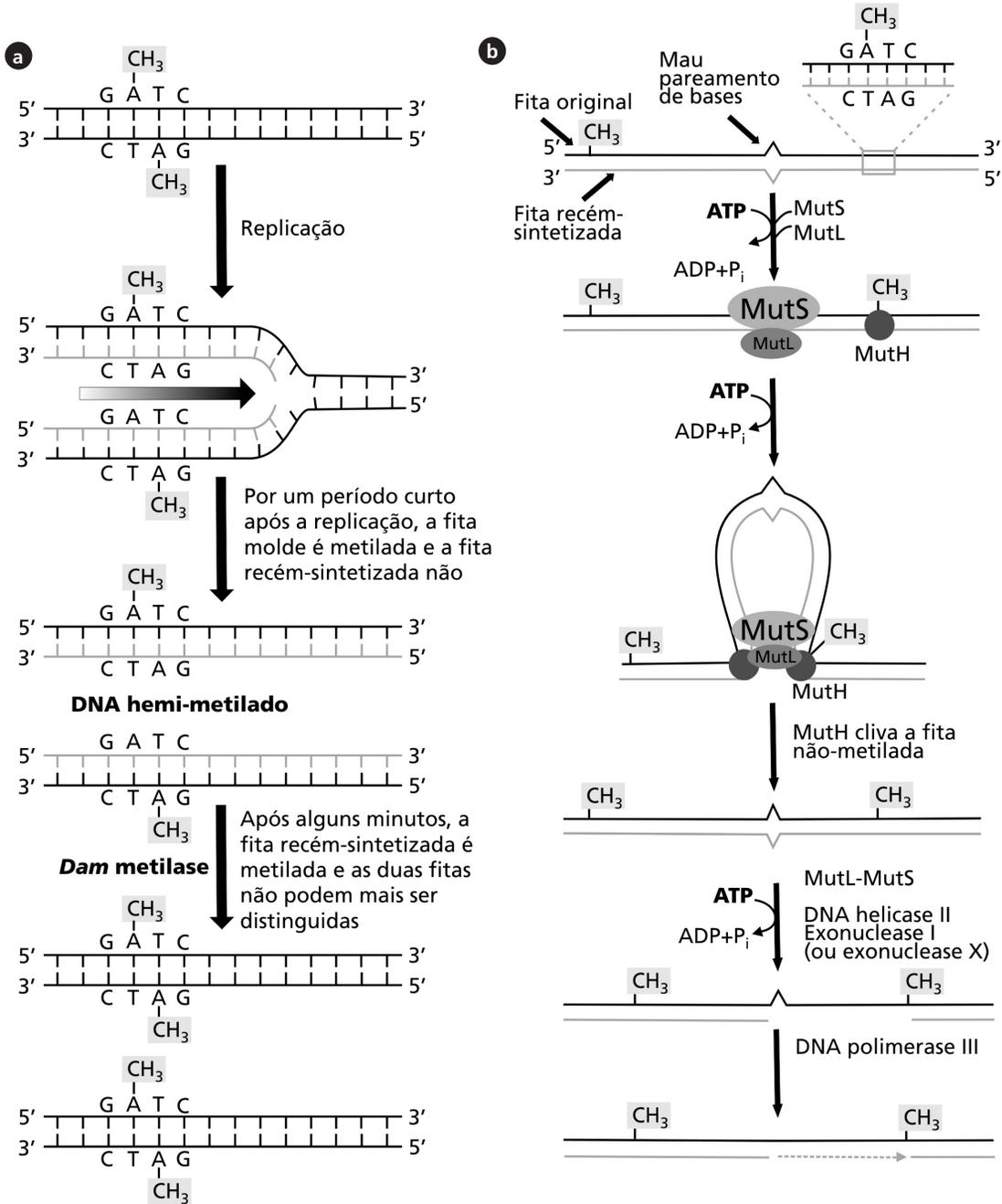


Figura 13.17: Metilação do DNA e reparo de mau pareamento de bases. (a) Etapas envolvidas na metilação do DNA. Note, durante este processo, a existência de DNAs hemimetilados, importantes para o reconhecimento da fita a ser reparada. (b) Etapas envolvidas no reparo de mau pareamento de bases. A explicação da figura encontra-se no texto.

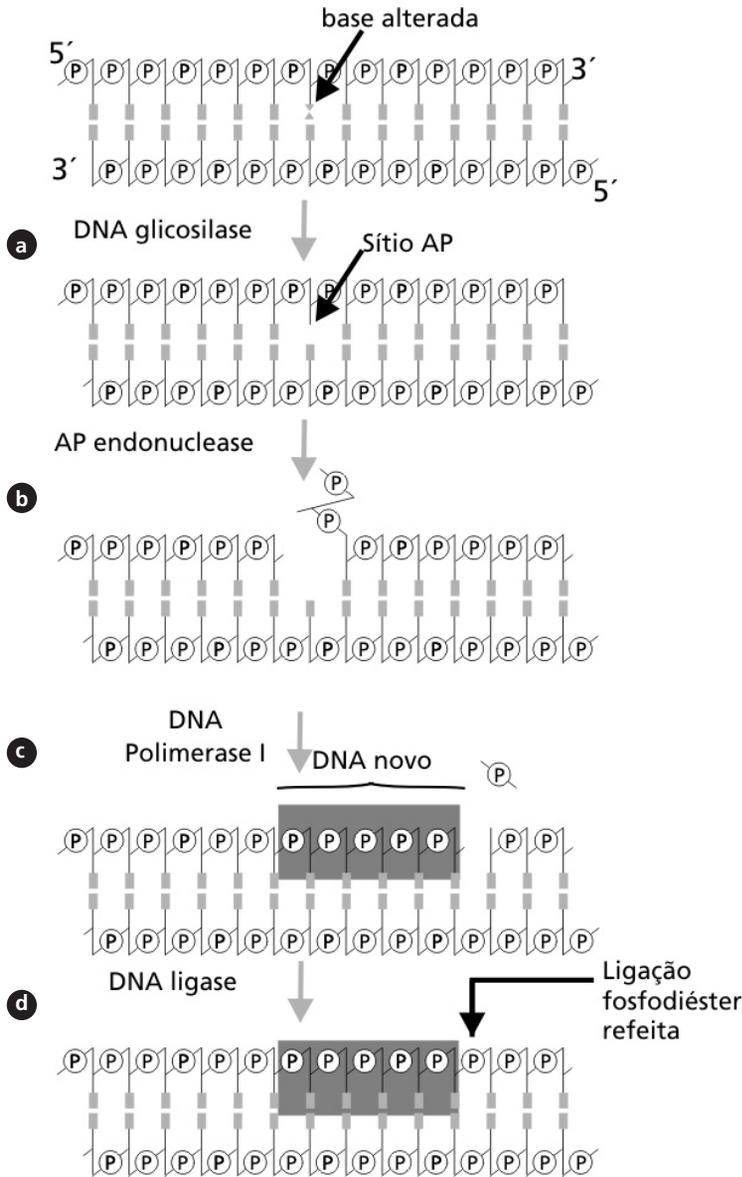
## Reparo por excisão de base – BER (*base-excision repair*)

O reparo por excisão de base reconhece qualquer lesão que crie uma distorção significativa na dupla-hélice do DNA, tais como as geradas pela desaminação de citosina e adenina. Nesse caso, a base alterada é removida por clivagem da ligação N-glicosídica pelas enzimas conhecidas como DNA glicosilases, gerando um sítio AP, já citado anteriormente. A uracil glicosilase, por exemplo, é específica para a remoção de uracila que resulta da desaminação de citosina. Esta glicosilase não remove resíduos de uracila do RNA nem resíduos de timina do DNA. Outras glicosilases são capazes de remover hipoxantina, resultante da desaminação de adenina, e bases alquiladas. Além disso, lembre que os sítios AP também podem ser gerados pela hidrólise espontânea das ligações N-glicosídicas do DNA.

O fato é que, independentemente dos eventos que antecedem sua formação, o sítio AP é reparado por um processo enzimático que consiste em quatro etapas:

- incisão – ao reconhecer a distorção da dupla-hélice, uma AP endonuclease corta a ligação fosfodiéster do suporte de açúcar-fosfato próxima ao sítio AP;
- excisão – o segmento de DNA é removido pela atividade 5'→3' exonuclease da DNA polimerase I;
- síntese – o grupamento 3'-OH é reconhecido pela DNA polimerase I, que sintetiza um novo segmento de, aproximadamente, 20 nucleotídeos, substituindo, assim, a seqüência incorreta pela correta;
- ligação – após a participação da DNA polimerase I, a ligação fosfodiéster é refeita, ou seja, a fita corrigida é selada, pela ação da DNA ligase.

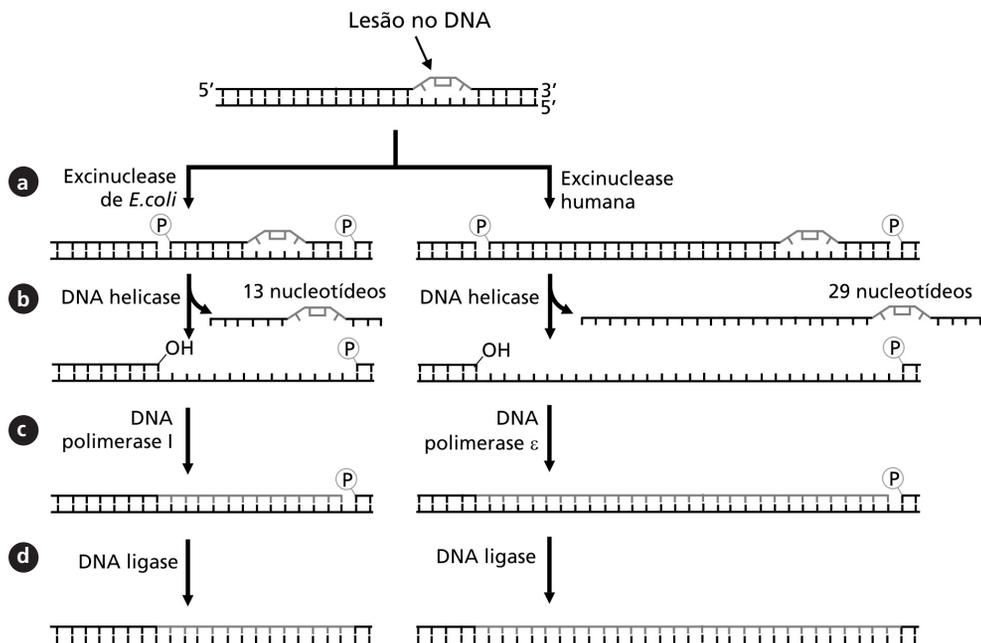
Confira se você entendeu tudo direitinho observando a **Figura 13.18**.



**Figura 13.18: Reparo por excisão de base – BER.** (a) A DNA glicosilase reconhece uma base danificada e cliva a ligação N-glicosídica formada entre esta base e a desoxirribose. (b) Uma AP endonuclease cliva a ligação fosfodiéster próxima ao sítio AP. (c) A DNA polimerase I inicia a síntese de um novo segmento de DNA, concomitantemente a sua atividade 5'→3' exonuclease remove a porção da fita danificada. (d) A fita é devidamente selada pela ação da DNA ligase.

## Reparo por excisão de nucleotídeo – NER (*nucleotide-excision repair*)

O reparo por excisão de nucleotídeos reconhece grandes distorções da dupla-hélice do DNA. Neste sistema de reparo, uma enzima hidrolisa duas ligações fosfodiéster, uma em cada lado da lesão. Em *E. coli*, em particular, o complexo enzimático que participa desse processo é denominado excinuclease ABC, sendo constituído por três subunidades, UvrA, UvrB e UvrC. Inicialmente, o complexo formado por duas UvrA e uma UvrB ( $A_2B$ ) se ligam ao sítio da lesão. O dímero UvrA ( $A_2$ ) se dissocia e UvrB e UvrC efetuam as incisões que flanqueiam a lesão. Em *E. coli* e em outros procariotos, o sistema enzimático hidrolisa a quinta ligação fosfodiéster no terminal 3' e a oitava no terminal 5', gerando um fragmento de 12 a 13 nucleotídeos (dependendo se a lesão envolve uma ou duas bases). Em seres humanos e outros eucariotos, a enzima hidrolisa a sexta ligação fosfodiéster no terminal 3' e a vigésima segunda no terminal 5', produzindo um fragmento de 27 a 29 nucleotídeos. Após a dupla incisão e liberação do oligonucleotídeo excisado, o espaço gerado é preenchido pela DNA polimerase I em *E. coli* e DNA polimerase  $\epsilon$  em humanos. A fita é, então, selada pela DNA ligase. Releia este parágrafo acompanhando a **Figura 13.19**.

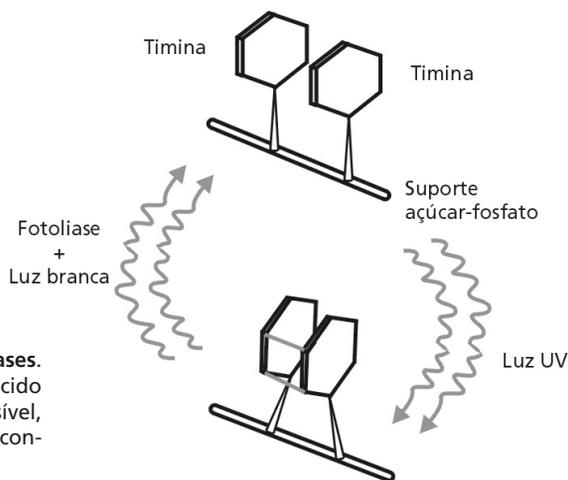


**Figura 13.19: Reparo por excisão de nucleotídeo – NER.** (a) Um complexo enzimático denominado excinuclease cliva duas ligações fosfodiéster específicas que flanqueiam a lesão no DNA. (b) O fragmento de DNA resultante, com 13 ou 29 nucleotídeos, respectivamente, em *E. coli* ou no ser humano, é removido pela DNA helicase. (c) O espaço vazio é preenchido pela DNA polimerase. (d) A fita reparada é selada pela DNA ligase.

## Reparo direto – papel das fotolases e das alquiltransferases

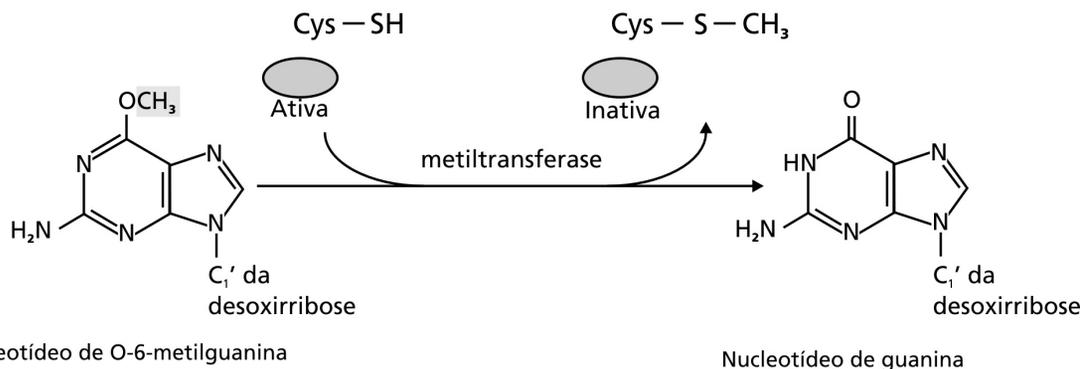
Vários tipos de sistemas de reparo atuam sem remoção de base ou nucleotídeo. Um deles é o da fotorreativação direta de dímeros de ciclobutano-pirimidina, uma reação promovida por enzimas fotorreativadoras, as chamadas DNA fotolases.

Você já viu que os dímeros de pirimidina resultam de uma reação induzida por luz ultravioleta. As fotolases também usam energia derivada de luz absorvida para reverter o dano causado. Repare na **Figura 13.20**. A diferença é que a clivagem dos dímeros de timina a monômeros de timina é catalisada pela enzima ativada pela luz visível (300-600 nm). As fotolases geralmente contêm dois cofatores que atuam como compostos que absorvem luz, os chamados cromóforos.



**Figura 13.20: Fotorreativação – papel das DNA fotolases.** O fotodímero de timina é, primeiramente, reconhecido pela fotoliase, que se liga a ele. Em presença de luz visível, a fotoliase é capaz de promover a quebra do dímero, convertendo-o aos monômeros originais.

Um outro exemplo a ser citado é o reparo da O-6-metilguanina, que se forma em presença de agentes alquilantes. O reparo direto é feito pela O-6-metilguanina-DNA metiltransferase, uma proteína que catalisa a transferência de um grupo metila de O-6-metilguanina para um dos seus resíduos de cisteína. Esta enzima se comporta de maneira peculiar, uma vez que a transferência de um único grupamento metila é suficiente para inativá-la. O consumo de uma molécula protéica para reparar uma lesão corrobora a importância de se manter a integridade do DNA celular. A proteína metilada, no entanto, não é degradada, e atua como um ativador transcricional, aumentando a expressão de seu próprio gene e dos genes de outras enzimas de reparo.



**Figura 13.21: Reparo direto – papel das alquiltransferases.** O grupamento metila é transferido para uma metiltransferase que se torna inativa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando tudo o que vimos nesta aula, vamos pensar juntos sobre o destino de um dano no DNA. Um erro na molécula de DNA pode ser tolerado, ou simplesmente ignorado, pode ser reparado, pode causar a morte da célula ou determinar que a célula se programe para morrer, através de um processo conhecido como apoptose, ou pode ser fixado, resultando em uma mutação.

As mutações se apresentam com grande utilidade não só na natureza, representando uma das causas da variabilidade genética que permitem a seleção natural e, portanto, a evolução das espécies, como também no campo da pesquisa. Nesta área, os genes mutantes são utilizados como sondas, uma vez que ajudam a desvendar os mistérios pertinentes a uma função biológica. Assim, no estudo detalhado da função de um gene, é importante que se obtenha o maior número possível de mutantes.

Muitos polimorfismos são responsáveis pela variabilidade observada entre os seres humanos. Talvez você já tenha estudado sobre isso em Genética, mas vale a pena repetir. Em geral, o termo mutação é usado para indicar uma mudança genética encontrada numa frequência baixa. Uma mutação passa a ser chamada polimorfismo quando sua frequência se torna maior que 0,01 (1%), ou seja, o termo polimorfismo é empregado quando se observam duas ou mais formas de um gene sem que nenhuma delas represente mais que 99% na população estudada. Diferentemente da mutação, o termo polimorfismo indica um variante normal de um gene. Esta normalidade é controversa, pois alguns alelos,

que inicialmente se mostram como variantes normais, podem contribuir para o desenvolvimento de certas doenças, incluindo o câncer, de maneira bastante sutil.

Com o seqüenciamento do genoma humano, foram identificados diversos polimorfismos de um único nucleotídeo, conhecidos por SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), a cada 1.000 a 2.000 bases. Com estes dados, pode-se concluir que 93% dos genes contêm pelo menos um SNP. Atualmente se acredita que o estudo de SNPs possa contribuir para o entendimento da diversidade fenotípica e da predisposição a doenças de maior complexidade.

Inúmeras doenças estão associadas a mutações em genes que desempenham papéis fundamentais nos processos celulares, podendo ser herdadas. Quando essas mutações se localizam em genes do sistema de reparo, os portadores dessas alterações apresentam uma predisposição ao câncer, o que de alguma forma contribui para a correlação mutagênese-carcinogênese. Como exemplos dessas doenças, podemos citar: câncer de colon não-polipose hereditário, por deficiência no reparo *mismatch*, e anemia de Fanconi, Xeroderma pigmentosum e Tricotiodistrofia, por deficiência no reparo por excisão.

**RESUMO**

Quanto às mutações, você estudou nesta aula que elas podem ocorrer em tecidos somáticos e germinativos de forma espontânea ou induzida. Existem regiões, chamadas *hotspots*, preferencialmente mutadas no genoma dos diferentes organismos.

Quanto ao aspecto molecular, uma mutação pode ser definida como transição, quando há substituição de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra, ou transversão, quando ocorre troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. Além disso, mutações em um gene podem ou não causar alterações na proteína codificada por este gene.

As mutações espontâneas podem ser decorrentes de erros de replicação do DNA, originados principalmente pelos pareamentos não usuais das formas tautoméricas raras das bases nitrogenadas, ou de lesões espontâneas, incluindo depurinação, desaminação e danos oxidativos.

As mutações induzidas podem ser causadas por agentes químicos e físicos. Dentre os mutagênicos químicos, destacam-se os análogos de bases, compostos que reagem diretamente com o DNA e os agentes alquilantes. As radiações ionizantes (raios-UV) e não-ionizantes (raios  $\gamma$  e os raios X) são importantes por causarem danos no DNA.

A maioria das lesões é reparada pela célula. Entretanto, a maneira com que os sistemas de reparo atuam depende do tipo do dano ou erro. Além disso, diferentes organismos variam em sua capacidade de reparar DNA. Quando ocorre falha no sistema de reparo, um número muito menor de lesões é corrigido, acarretando um aumento no número de mutações no genoma.

## EXERCÍCIOS

1. Uma mutação que ocorre em uma célula somática de um indivíduo pode ser herdada por sua prole? Explique.
2. Diferencie transição e transversão. Não esqueça de citar exemplos.
3. Quantos pares de bases teriam de ser deletados em um evento mutacional para eliminar um único aminoácido de uma proteína, sem alteração do restante da cadeia polipeptídica?
4. Descreva a ação do 5-bromo uracila (5-BU) na produção de mutantes.
5. Após a exposição de uma suspensão de células bacterianas à luz ultravioleta, duas alíquotas foram plaqueadas em meio sólido sendo que uma delas foi incubada em ausência de luz e outra em presença de luz. O número de mutantes na placa mantida no escuro foi infinitamente menor do que o obtido na placa incubada em presença de luz. Como se explica esse fato?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Como comentado anteriormente, esta aula envolve um número muito grande de informações. Portanto, optamos por exercícios que permitam você avaliar se o assunto foi devidamente assimilado. Caso você não tenha conseguido resolver algum deles, refaça a leitura da aula, insista um pouco mais nas figuras, pois temos certeza de que elas podem ajudar bastante. Se as dúvidas persistirem, vá até o pólo discutir com os tutores. Certamente, eles saberão como lhe ajudar.

## FIQUE ATENTO!

Na próxima aula, estudaremos recombinação e mais alguns sistemas de reparo. Até lá!

**Atividade presencial  
obrigatória – Dinâmica –  
DNA recombinante**

**AULA**

**14**

---



## objetivos

Nesta aula, você terá a oportunidade de:

- Entender o que é a recombinação genética e como ela ocorre.
- Discutir algumas aplicações práticas da recombinação.
- Conhecer o sistema de reparo recombinacional e a resposta SOS.

### **Pré-requisitos**

Esta aula será mais facilmente assimilada se você não tiver dúvidas em relação às aulas sobre estrutura, replicação e reparo do DNA (Aulas 4, 9, 10, 11, 14 e 13).

Conhecimento básico de divisão celular também será necessário.

## INTRODUÇÃO

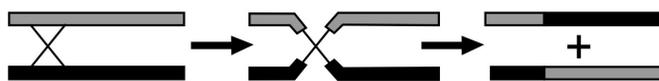
Você estudou, na Aula 13, a base molecular das mutações e os principais agentes mutagênicos e sistemas de reparo. Também já foi comentado que recombinação, juntamente com mutação, desempenha um papel importante na variabilidade genética entre indivíduos de uma população. Estes temas também serão abordados nas aulas de Genética, mas com um enfoque diferente. Nesta aula, você terá a oportunidade de estudar o que é e, mais especificamente, como ocorre a recombinação genética. Você perceberá que nossa atenção estará voltada principalmente para a recombinação homóloga, que está associada a um tipo específico de reparo.

Também incluímos nesta aula o sistema SOS, que é ativado quando os danos são de proporções maiores e a célula se encontra na seguinte situação: “se correr o bicho pega, se ficar o bicho come”.

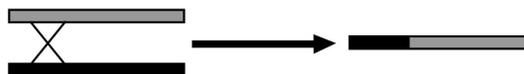
## RECOMBINAÇÃO GENÉTICA

O rearranjo da informação genética dentro de uma ou mesmo entre duas moléculas de DNA engloba inúmeros processos agrupados e reconhecidos como recombinação genética. Veja, na **Figura 15.1**, alguns exemplos de recombinação de acordo com o tipo de troca ocorrida. Na recombinação recíproca, após a troca de segmentos entre duas moléculas de DNA, observa-se a geração de duas moléculas modificadas, enquanto na recombinação não-recíproca, apenas uma das moléculas sofre modificação em sua seqüência. A recombinação pode ocorrer em mais de um ponto das moléculas de DNA envolvidas, conforme ilustrado no exemplo de *crossover* duplo. Além disso, o evento recombinacional pode ocorrer entre segmentos de uma única molécula de DNA. Esse tipo de recombinação, chamado recombinação intramolecular, pode envolver repetições diretas (na mesma direção) e invertidas (em direção contrária), que estão associadas, respectivamente, às deleções e inversões. Estes exemplos nos permitem dizer que, em linhas gerais, enquanto através de mutação ocorre a criação de novos alelos de um gene, por recombinação se observa a geração de novas combinações dos alelos já existentes. A recombinação representa, portanto, uma forma de recuperar e disseminar alelos favoráveis e, ao mesmo tempo, eliminar os alelos desfavoráveis sem que com isso haja um prejuízo de outros genes presentes no cromossomo.

a) Recíproca

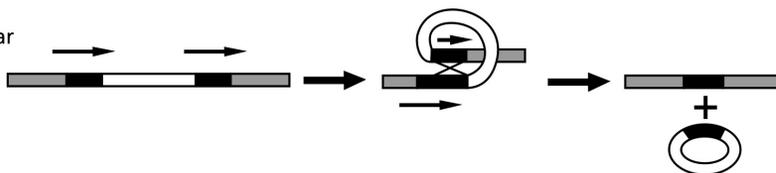


b) Não-recíproca

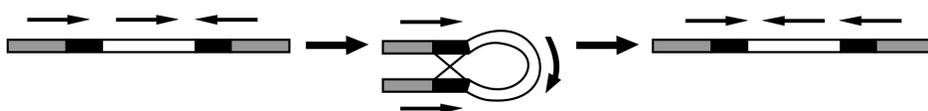


c) Intramolecular

Repetições diretas



Repetições invertidas

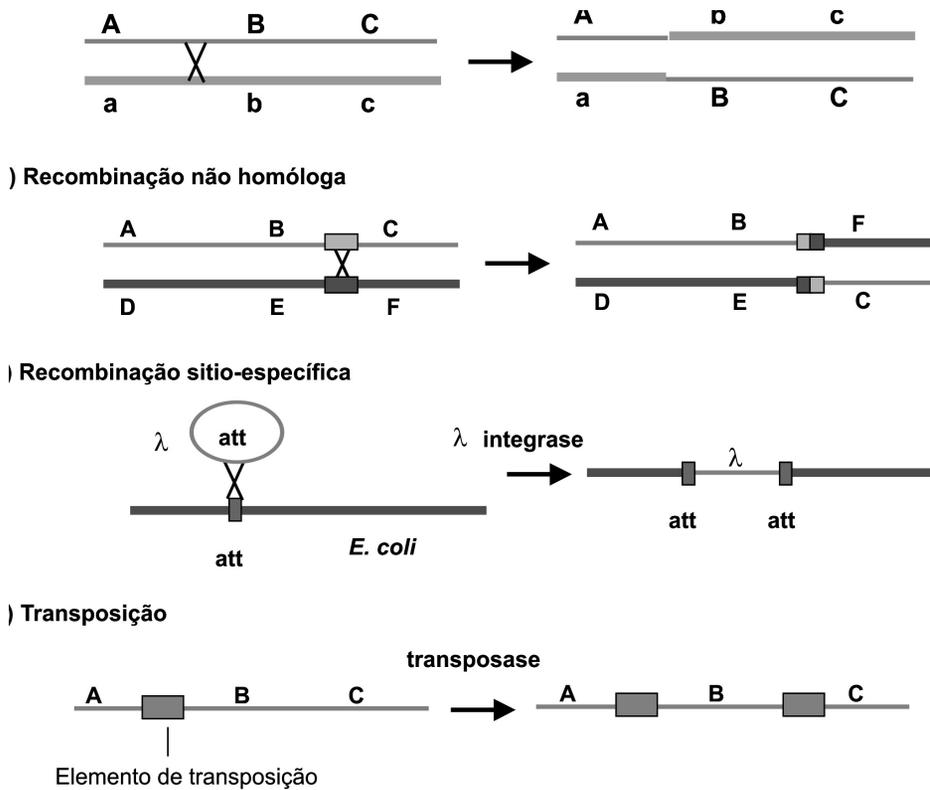


d) Crossover duplo



**Figura 15.1: Exemplos de recombinação.** a) Recíproca. b) Não-recíproca. c) Intramolecular: repetições diretas e invertidas. d) Crossover duplo. Explicação mais detalhada no texto.

Os eventos gerais de recombinação genética se dividem, de acordo com a similaridade das seqüências das moléculas de DNA, em pelo menos quatro classes principais: recombinação homóloga, recombinação não-homóloga, recombinação sítio-específica e transposição de DNA. Na **Figura 15.2**, você encontra os esquemas dos quatro tipos de recombinação.



**Figura 15.2: Tipos de recombinação.** a) Recombinação homóloga – envolve segmentos de DNA com alta homologia. b) Não-homóloga – envolve segmentos de DNA não-similares. c) Sítio-específica – ocorre em sítios específicos. d) Transposição – envolve segmentos que se movem de um local para outro.

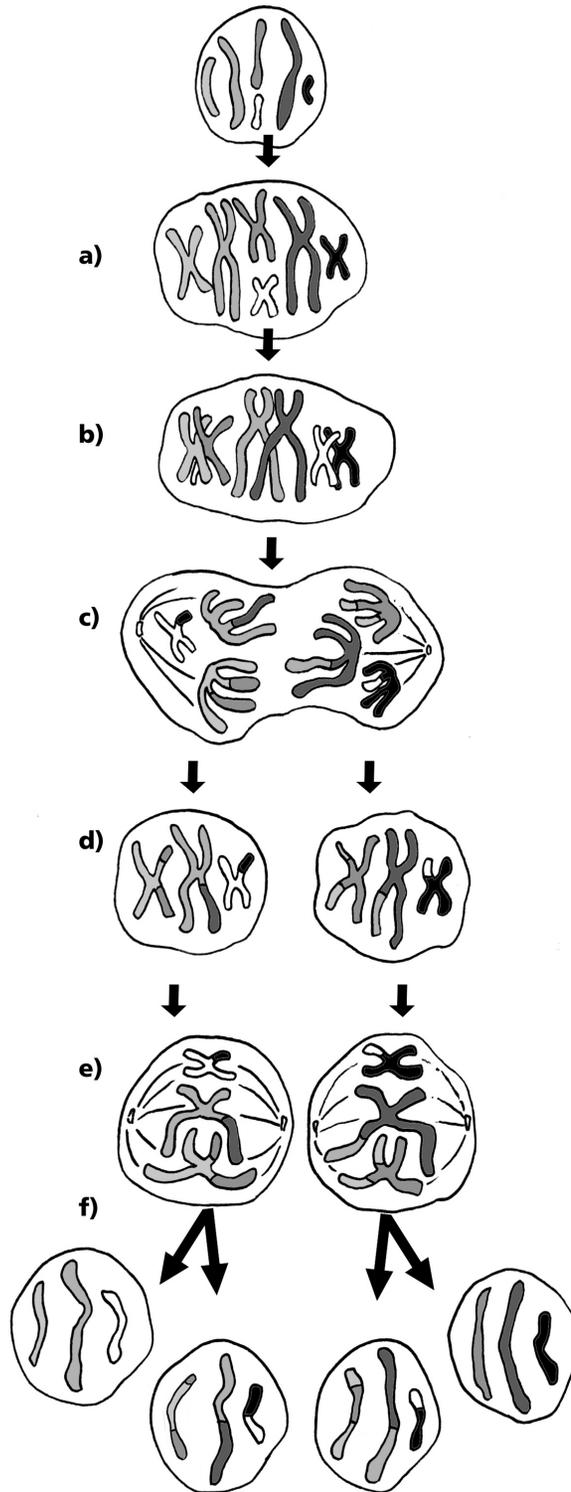
A recombinação homóloga, ou simplesmente recombinação, envolve trocas genéticas entre quaisquer duas moléculas de DNA (ou segmentos da mesma molécula) que compartilham uma região de alta similaridade, independentemente da seqüência de bases nesta região (Figura 15.2.a). Em contrapartida, a recombinação sítio-específica envolve trocas genéticas que ocorrem somente em uma seqüência específica de DNA. Na Figura 15.2.c, encontra-se esquematizada a integração do DNA do bacteriófago  $\lambda$  no cromossomo bacteriano, em um processo que conta com a participação da enzima integrase do fago  $\lambda$ . Neste exemplo, a recombinação ocorre em sítios específicos, denominados sítios *att*, presentes nos genomas da bactéria *E. coli* e do fago. A recombinação não-homóloga envolve segmentos de DNA sem qualquer similaridade entre si (Figura 15.2.b). Já a transposição de DNA (assunto das Aulas 18 e 19) é distinta das outras classes, uma vez que normalmente envolve um segmento curto de DNA com a capacidade notável de se mover de um local para outro no cromossomo, com a participação da enzima transposase (Figura 15.2.d).

É importante que você saiba que os sistemas de recombinação genética desempenham inúmeras funções biológicas. Estas incluem alguns sistemas especializados de reparo de DNA e atividades específicas na replicação do DNA, a regulação da expressão de certos genes, o favorecimento da segregação do próprio cromossomo durante a divisão celular em eucariotos, a manutenção da diversidade genética e a implementação de rearranjos genéticos programados durante o desenvolvimento embrionário. Na maioria dos casos, a recombinação genética está intimamente integrada a outros processos no metabolismo do DNA.

## RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM EUCARIOTOS

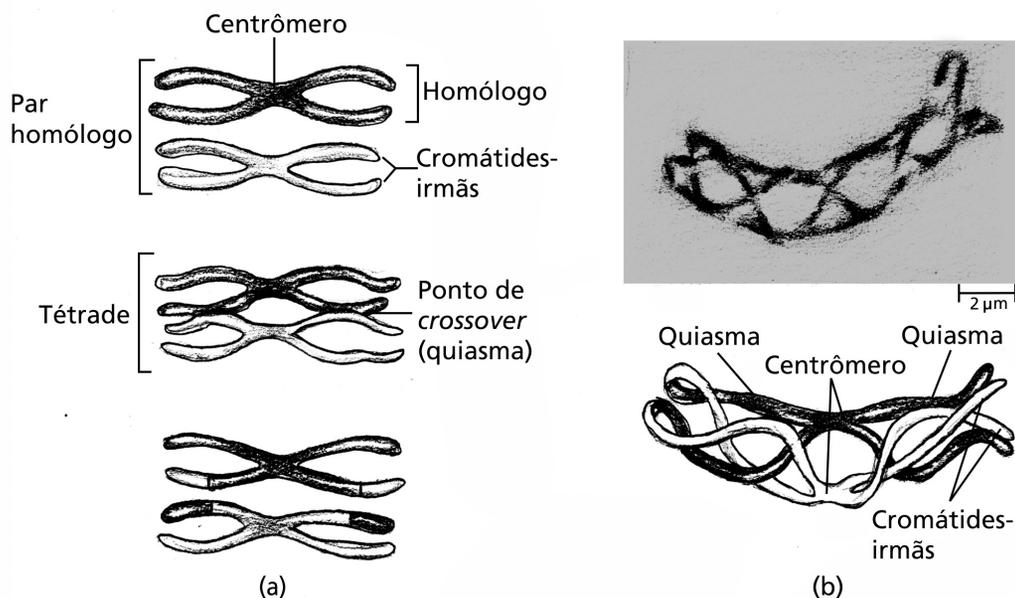
Em organismos eucarióticos, a recombinação homóloga geralmente está associada à divisão celular, apesar de também estar associada ao reparo de DNA. A recombinação ocorre com maior frequência durante a meiose, processo pelo qual as células diplóides da linhagem germinativa, com dois conjuntos de cromossomos, dividem-se para produzir os gametas haplóides – espermatozóides (em machos) ou óvulos (em fêmeas) –, com apenas um conjunto de cromossomos.

Lembra das aulas de Genética? Busque a **Figura 15.3** para refrescar sua memória. Em linhas gerais, a meiose começa com a replicação do DNA na célula da linhagem germinativa de tal forma que cada molécula de DNA está presente em quatro cópias. Durante a prófase da primeira divisão meiótica, as cópias resultantes de DNA permanecem associadas aos seus centrômeros e são denominadas cromátides-irmãs (**Figura 15.3.a**). Cada conjunto de quatro cromátides existe como dois pares de homólogos, o que permite a formação da estrutura denominada tétrade (**Figura 15.3.b**). Neste estágio, a informação genética pode ser trocada entre as cromátides homólogas por recombinação, um processo que envolve a quebra e a junção do DNA (**Figuras 15.3.b e 15.3.c**). A célula, então, prossegue em dois ciclos da divisão celular sem um ciclo intermediário de replicação de DNA, o que reduz o conteúdo de DNA para o nível haplóide em cada gameta. Na primeira divisão meiótica (**Figuras 15.3.c e 15.3.d**), os pares de homólogos se separam e migram para os pólos opostos da célula em divisão. Já na segunda divisão, as cromátides, agora chamadas cromossomos, são separadas, constituindo o material genético de cada uma das células haplóides (**Figuras 15.3.e e 15.3.f**).



**Figura 15.3: Meiose em células da linhagem germinativa de organismos eucarióticos.** (a) Os seis cromossomos (três pares de cromossomos homólogos) de uma célula hipotética são replicados e mantidos unidos através do centrômero. (b) Troca de informação genética entre as cromátides-irmãs por recombinação. (c) Separação dos homólogos. (d) Primeira divisão meiótica. (e) Separação das cromátides, que passam a ser chamadas cromossomos. (g) Segunda divisão meiótica. (Explicação mais detalhada da figura encontra-se no texto.)

A troca de informação genética representada na **Figura 15.3.b** também é chamada *crossing over*, podendo ser observada com auxílio de microscópio eletrônico (**Figura 15.4.b**). O *crossing over* junta os dois pares das cromátides-irmãs por pontos denominados quiasmas (**Figura 15.4.a**), sendo esta ligação essencial para a segregação apropriada dos cromossomos nas divisões meióticas subseqüentes.



**Figura 15.4: Crossing over.** (a) A tetrade é formada por um par de cromossomos homólogos. Como cada homólogo é formado por duas cromátides-irmãs, pode-se dizer que a tetrade é constituída por quatro cromátides. O ponto de *crossover*, que é o ponto de troca de informação genética, é chamado quiasma. (b) A observação dos cromossomos homólogos de um gafanhoto durante a prófase I da meiose, por microscopia eletrônica, permitiu a elaboração de um esquema, no qual estão em destaque alguns quiasmas que antecedem os eventos de recombinação homóloga.

Sabe-se que o *crossing over* não ocorre inteiramente ao acaso e alguns *hot spots*, sítios preferenciais de troca de informação genética, têm sido identificados em muitos cromossomos eucarióticos. Contudo, a hipótese de que o *crossing over* pode ocorrer em qualquer ponto dos cromossomos homólogos com igual probabilidade é razoável em muitos casos, o que favorece o mapeamento genético. Nesse caso, ao considerarmos que a frequência de recombinação homóloga em qualquer região separando dois pontos em um cromossomo é, aproximadamente, proporcional à distância entre estes, podemos estimar as posições relativas e as distâncias entre diferentes genes.



É importante você saber que a montagem dos genes das imunoglobulinas é feita por recombinação. Os seres humanos são capazes de produzir milhões de imunoglobulinas (anticorpos) diferentes, com especificidades distintas, mesmo que seu genoma contenha apenas aproximadamente 100.000 genes. Isto só é possível devido ao mecanismo de recombinação, que permite a produção de uma diversidade extraordinária de anticorpos a partir de um DNA com capacidade codificadora limitada.

## RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM PROCARIOTO

Em bactéria, a principal função da recombinação homóloga é no reparo do DNA, através de um processo denominado reparo de DNA recombinacional. Este, geralmente, é direcionado para a reconstrução da forquilha de replicação na qual a DNA polimerase pára devido à presença de uma lesão no DNA. Esse sistema de reparo será discutido mais adiante ainda nesta aula.

A recombinação genética homóloga também pode estar envolvida na reorganização dos genes de organismos procarióticos, dependendo apenas da entrada de um DNA contendo alelos originados de uma célula diferente. O DNA exógeno pode entrar na célula por intermédio de três mecanismos: conjugação, transformação e transdução.

Na conjugação, ocorre transferência do cromossomo de uma célula doadora para uma célula receptora, sendo considerado, portanto, um processo sexual. Na transformação, o DNA exógeno, seja de células mortas ou de outras procedências, entra na célula através da membrana celular. Este processo é amplamente usado na engenharia genética, como parte da clonagem de genes. Na transdução, um vírus pode transferir a células receptoras pequenos fragmentos de DNA oriundos de uma célula anteriormente infectada e que foram incorporados ao seu genoma. Esses três processos, de forma similar ao que ocorre em organismos superiores, envolvem troca de DNA homólogo.

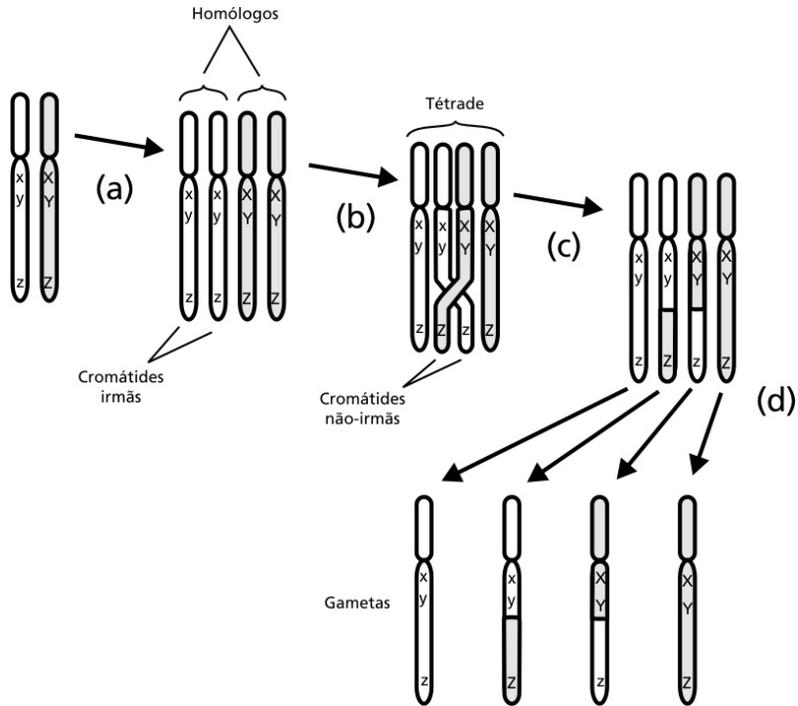


A recombinação é usada no mapeamento genético, uma vez que a frequência de recombinação é proporcional à distância entre os genes. Além disso, ela é de grande utilidade na construção de organismos transgênicos.

## MODELO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

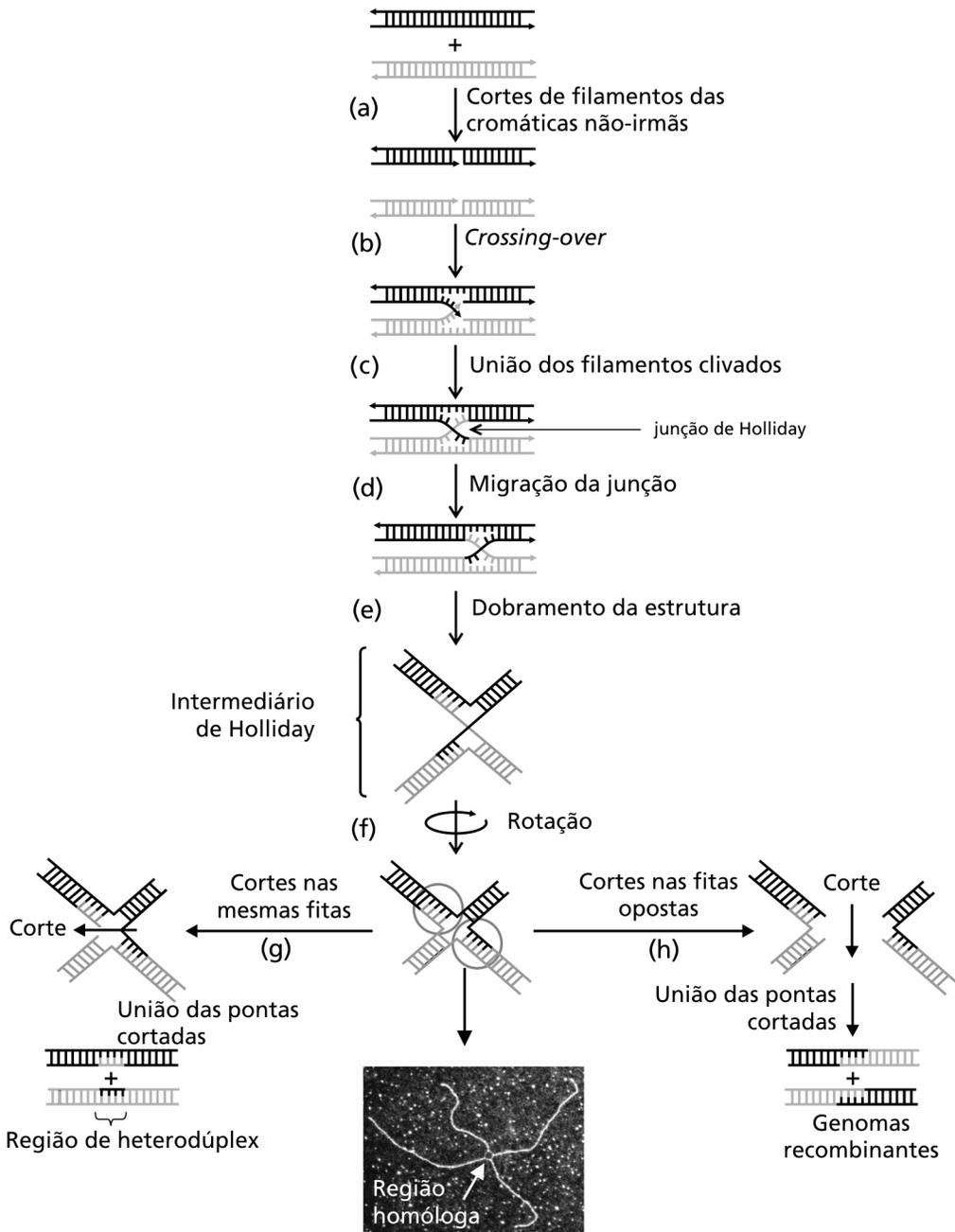
A recombinação homóloga é um processo bastante complexo com conseqüências moleculares sutis que contribuem para a diversidade genética, uma vez que os dois cromossomos, que participam da troca de segmentos de DNA, não são necessariamente idênticos. Lembre-se de que a organização linear dos genes pode ser a mesma em dois cromossomos, mas que alguns desses genes podem apresentar seqüências de bases distintas, o que chamamos alelos diferentes. A recombinação homóloga não altera a disposição dos genes, mas pode determinar os tipos de alelos que se juntam em um único cromossomo.

Na **Figura 15.5**, você observa este rearranjo dos alelos mais detalhadamente. Em um par de cromossomos, foram representadas as formas alélicas de três genes. Um cromossomo apresenta os alelos “x”, “y” e “z” e o outro apresenta os alelos “X”, “Y” e “Z”, nesta disposição. Após a replicação do DNA, pode-se observar um par de homólogos, sendo que cada um deles é representado por suas cromátides-irmãs (**Figura 15.5.a**). O pareamento desses cromossomos permite a formação da tétrade (**Figura 15.5.b**), onde se evidencia o quiasma, formado por cromátides não-irmãs, ou seja, cada cromátide pertence a um dos homólogos. Ao término do *crossing over*, ou recombinação, a disposição dos alelos nessas cromátides é alterada. Nesse caso, uma cromátide apresenta os alelos na seguinte disposição: “x”, “y” e “Z”, enquanto na outra cromátide os alelos estão dispostos como “X”, “Y” e “z”. Após a segunda divisão meiótica, essas cromátides, que passam a ser chamadas cromossomos, constituirão o material genético de cada gameta.



**Figura 15.5:** *Crossing over* e recombinação durante a meiose. (a) Replicação do DNA e formação dos pares de homólogos, constituídos cada um por duas cromátides-irmãs. (b) Com o pareamento dos homólogos, ocorre a formação da tétrade. (c) Após a recombinação, que ocorre antes da primeira divisão meiótica, originam-se duas cromátides com disposição diferente dos alelos. (d) Após a segunda divisão meiótica, cada cromátide passa a ser chamada cromossomo, constituindo o material genético dos gametas.

Os detalhes da recombinação homóloga podem variar de uma espécie para outra, mas, em geral, em qualquer organismo, a recombinação pode ocorrer de acordo com o modelo representado na **Figura 15.6**. Neste esquema, você poderá olhar mais de perto o que ocorre desde a etapa em que os dois homólogos pareiam para formar a tétrade, representada nas **Figuras 15.3.b** e **15.4**, até a troca genética entre eles. Na verdade, na **Figura 15.6**, só estão sendo mostrados os filamentos das cromátides não-irmãs envolvidas diretamente na recombinação, ou seja, as cromátides externas não aparecem em nosso modelo.



**Figura 15.6: Modelo geral de recombinação homóloga.** Este modelo consiste em quebra das fitas de cromossomos homólogos (a), troca (b) e união (c) das fitas cortadas, migração da junção (d), dobramento (e) e rotação (f) da estrutura, que pode ser visualizada por microscopia eletrônica, e um segundo corte feito na mesma fita (g) ou não (h), o que leva à formação de produtos distintos. (Maiores detalhes encontram-se no texto.)

**JUNÇÕES E INTERMEDIÁRIOS DE HOLLIDAY**

A partir de seus estudos de microscopia eletrônica, Robin Holliday, em 1964, propôs a existência de estruturas intermediárias durante o processo de recombinação.

O processo conta com a participação de uma maquinaria celular responsável pela quebra, na mesma posição relativa, de cromátides não-irmãs de homólogos (**Figura 15.6.a**), seguida de *crossing over* (**Figura 15.6.b**) e de junção dos filamentos cortados em uma disposição diferente, de forma que não há perda ou ganho de material em nenhuma das moléculas envolvidas (**Figura 15.6.c**). A estrutura formada é denominada **INTERMEDIÁRIO DE HOLLIDAY** e apresenta um ponto de ramificação chamado **JUNÇÃO DE HOLLIDAY**. Após a migração da junção (**Figura 15.6.d**), ocorre dobramento e rotação da estrutura (**Figuras 15.6.e e 15.6.f**), que pode ser visualizada por microscopia eletrônica. Outros cortes, que podem ocorrer nas mesmas fitas ou não, separam as cromátides, originando nova disposição dos alelos (**Figuras 15.6.g e 15.6.h**).

### **A RECOMBINAÇÃO TEM INÍCIO COM A QUEBRA DE DUPLA FITA**

O modelo geral de recombinação homóloga, representado na **Figura 15.6**, mostra a ocorrência de quebras sucessivas das fitas simples para que possa haver a troca genética. Contudo, a troca genética se inicia, de fato, a partir de uma quebra de dupla fita, conforme o esquema da **Figura 15.7**. Este modelo também se aplica à recombinação que ocorre durante a meiose, uma vez que a troca genética tem início a partir de uma quebra de dupla fita promovida pela ação de exonucleases. A formação de DNA heterodúplex, que consiste em uma molécula de DNA formada por um filamento de uma das cromátides e um filamento de outra cromátide não-irmã (confira na **Figura 15.5**), é uma etapa fundamental nesse processo.

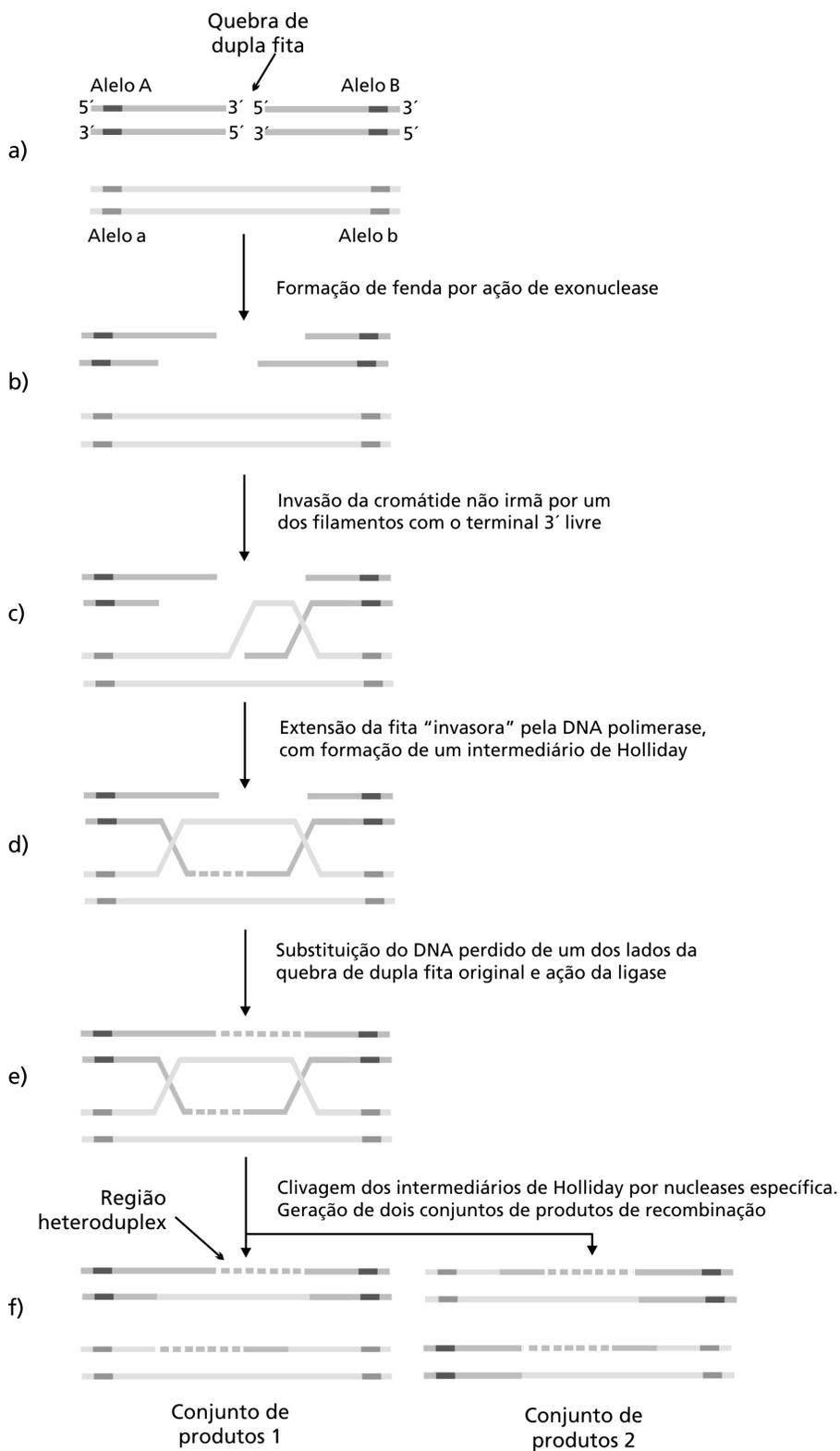


Figura 15.7: Modelo de recombinação homóloga com início a partir de quebra de dupla fita. (A explicação da figura se encontra no texto.)

A presença de uma quebra de dupla fita em uma das cromátides (Figura 15.7.a) tem por objetivo criar um ponto, a partir do qual as fitas simples possam se desenrolar para participar da troca genética. Sob a ação de exonucleases, ocorre a conversão da quebra de dupla fita em uma fenda, com extensões de fita simples com terminais 3' (Figura 15.7.b). Isso se deve ao fato de as fitas com terminais 3' serem menos degradadas que aquelas com terminais 5'. Um dos filamentos com terminal 3' livre “invade” uma cromátide não-irmã, pareando com uma região complementar e deslocando uma das fitas (Figura 15.7.c). O terminal 3' da fita “invasora” funciona como um iniciador para a DNA polimerase, que, juntamente com a migração da junção, pode gerar uma molécula de DNA com dois *crossovers*, conhecidos por junções de Holliday (Figura 15.6.d). Nesse estágio, observa-se uma região heterodúplex. Por ação da DNA polimerase, é feita a substituição do DNA perdido em um dos lados da quebra de dupla fita original, seguida de ligação das fitas por ação de DNA ligase (Figura 15.6.e). Por fim, a clivagem dos intermediários de Holliday por nucleases específicas pode gerar dois conjuntos de produtos, sendo que apenas um deles (conjuntos de produtos 2) contém produtos de recombinação (Figura 15.6.f).

## SISTEMA DE REPARO RECOMBINACIONAL

Na Aula 13, foram considerados os sistemas de reparo que geralmente atuam somente em lesões no DNA dupla fita, com a fita original fornecendo a informação genética para a correção da fita danificada. Entretanto, em certos tipos de lesões, incluindo quebras de dupla fita, ligações cruzadas da dupla fita ou lesões em DNA fita simples, a fita complementar também se encontra danificada ou mesmo ausente. As quebras de DNA dupla fita e as lesões no DNA fita simples surgem, na maioria das vezes, quando a forquilha de replicação encontra uma lesão de DNA não reparada. Tais lesões e ligações cruzadas de DNA podem também resultar da ação de radiação ionizante e reações oxidativas.

Em bactéria, por exemplo, quando a DNA polimerase pára em uma forquilha de replicação e não pode dar prosseguimento ao processo devido a uma lesão, uma das opções é ativar o sistema de reparo recombinacional. Na ausência de uma segunda fita, que sirva de referência para especificar a seqüência de bases, a informação necessária para um reparo preciso deve vir de um cromossomo homólogo, envolvendo, portanto, recombinação homóloga.

Inúmeras enzimas envolvidas na recombinação homóloga têm sido isoladas de organismos procarióticos e eucarióticos. Em *E. coli*, o complexo enzimático RecBCD apresenta atividades de helicase, de nuclease e de ATPase DNA-dependente, o qual participa do desenrolamento do DNA para gerar regiões de DNA fita simples. Já a proteína RecA promove todas as etapas fundamentais do processo, incluindo o pareamento dos dois DNAs, a formação dos intermediários de Holliday e a migração da junção. Nucleases específicas, denominadas resolvases, atuam na clivagem dos intermediários de Holliday. Não abordaremos os modelos propostos para o mecanismo de ação dessas enzimas. O mais importante é que você saiba da sua existência e que informações mais detalhadas poderão ser encontradas nos livros sugeridos.

O reparo de quebra de dupla fita por recombinação homóloga é bastante preciso, uma vez que o DNA apresentando a lesão é reparado tendo como referência o seu homólogo. Entretanto, a junção de terminais não-homólogos também pode ocorrer, por exemplo, por causa da existência de lesões nos terminais envolvidos na religação dos segmentos cortados, levando à perda de material genético. Este tipo de reparo, no qual se observa um aumento da taxa de erros, é mais freqüente em plantas e animais do que o reparo por recombinação homóloga.

Você já estudou que, com relação a danos causados por exposição à luz UV, eucariotos inferiores, plantas e bactérias têm sistemas adicionais de defesa, tais como DNA fotoliasas para monomerizar os dímeros ou DNA glicosilases ou nucleases, que especificamente cortam o DNA nos dímeros de pirimidina. Mamíferos não possuem enzimas fotorreativadoras para reverter diretamente os danos causados por radiação UV. Neste grupo, estes danos são corrigidos preferencialmente por reparo recombinacional.

## RESPOSTA SOS

Quando a extensão dos danos do DNA é maior, como no caso de a célula ter sido exposta à luz UV de alta intensidade, existe uma segunda opção de reparo, através do sistema chamado reparo com tendência a erros (*error-prone repair*). Quando esta via está ativa, o reparo do DNA é significativamente menos preciso, resultando em alta taxa de mutação, o que justifica o seu nome. Esse sistema faz parte de uma resposta celular a danos extensos do DNA, chamada apropriadamente resposta SOS. Algumas proteínas SOS, tais como UvrA e UvrB, que normalmente estão presentes na célula, são induzidas como parte da resposta SOS. Proteínas SOS adicionais participam de uma nova via de *error-prone repair*, conhecida por síntese translesão. Uma DNA polimerase especializada, a DNA polimerase V, desconhece a maioria das lesões que normalmente bloqueia a replicação normal. Dessa forma, parece lógico que o pareamento correto de bases seja praticamente impossível no local da lesão, fazendo com que esse processo resulte em uma alta taxa de erros no DNA.

Por tudo que já foi comentado sobre a importância de se manter a integridade do DNA, parece contraditória a existência de um sistema que aumenta a taxa de mutação. Contudo, devemos pensar que este sistema representa uma estratégia de “desespero”, na qual as células lançam mão de todos os recursos na luta pela sobrevivência. É certo que as mutações resultantes podem provocar a morte de inúmeras células, mas este é o preço biológico que as células pagam para superar uma condição indesejada. Acreditamos que elas apostam no fato de que pelo menos algumas poucas células mutantes possam sobreviver.



Muitas doenças hereditárias, que determinam predisposição ao câncer, têm em sua origem defeitos na capacidade de reparo do DNA.

**RESUMO**

Nesta aula você aprendeu que o rearranjo da informação genética em uma ou mesmo entre duas moléculas de DNA é chamado recombinação genética. Esse processo, diferentemente da mutação, favorece a geração de novas combinações dos alelos já existentes.

Existem pelo menos quatro classes principais de recombinação genética: a recombinação homóloga, a recombinação não-homóloga, a recombinação sítio-específica e a transposição de DNA. Além disso, os sistemas de recombinação desempenham diversas funções biológicas importantes.

Em eucariotos, a recombinação homóloga está geralmente associada à divisão celular, enquanto em procariotos sua principal função é atuar no reparo de DNA. Em linhas gerais, consiste em quebra das fitas de cromossomos homólogos, troca e união das fitas cortadas, migração da junção e dobramento, rotação e um segundo corte da estrutura de Holliday, podendo formar dois conjuntos distintos de produtos, de acordo com o sítio de corte.

Os danos mais complexos e raros de DNA só podem ser corrigidos por processos celulares não tão específicos, como os já mencionados na Aula 13, e por isso predis põem o DNA a erros. Um grande desafio consiste em reparo de lesões que bloqueiam a maquinaria normal de replicação. Nesses casos, DNA polimerases especializadas conseguem passar pela lesão, mas à custa de inserção, na maioria das vezes, de bases incorretas.

## EXERCÍCIOS

1. Nas últimas aulas, discutimos bastante sobre a importância da variabilidade genética para uma espécie. Responda.

a) A variabilidade genética é benéfica ou prejudicial? Explique.

b) De acordo com a resposta do item a, discuta por que uma célula se empenha em assegurar a fidelidade da replicação do DNA.

2. Como você diferencia:

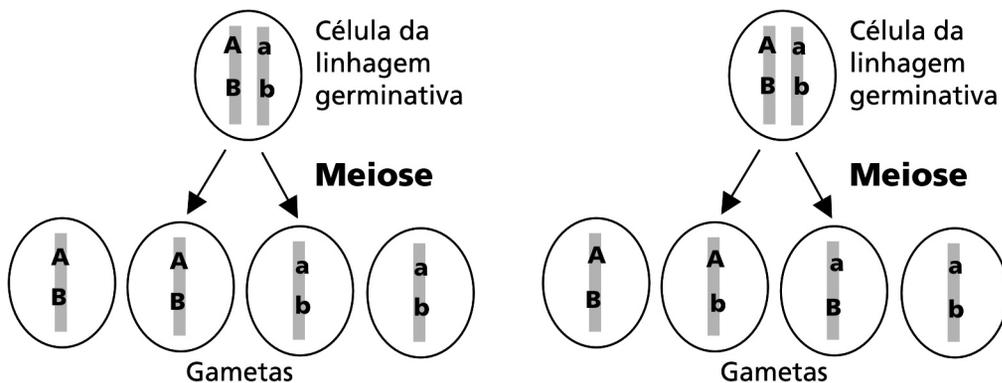
a) a recombinação recíproca da recombinação não-recíproca?

b) a recombinação intramolecular que envolve repetições diretas daquela que envolve repetições invertidas?

3. Vamos imaginar que uma linhagem de *E. coli* se caracterize pela ausência do seu sítio *att*. O que você teria a dizer sobre a infecção de uma célula dessa linhagem pelo bacteriófago  $\lambda$ ?

4. Desenhe a estrutura denominada tetrade, indicando as cromátides-irmãs e não-irmãs, os homólogos, pares de homólogos e centrômeros.

5. Compare os esquemas representados a seguir, indicando qual deles envolveu *crossing over*. Complete, então, os esquemas, com as etapas intermediárias, detalhando cada uma delas.



6. Como você explica a existência dos sistemas de reparo *error-prone*?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Você deve ter percebido que as Aulas 13 e 15 se complementam e que o conteúdo é demasiadamente grande para apenas duas aulas. Os exercícios específicos desta aula têm por objetivo avaliar o quanto você aprendeu do tema em questão. Assim, não entre em pânico se encontrar dificuldades para resolvê-los. Retorne à Aula 13, releia a Aula 15 e recorra aos tutores, que estarão sempre nos pólos dispostos a ajudar você.

## FIQUE ATENTO

O tema das próximas duas aulas é transposição. Até lá!



**Estudo dirigido –  
Atividade presencial  
obrigatória –  
Engenharia genética –  
mitos e realidades**

**AULAS**

**16/17**

---



# Elementos de transposição em procariotos

AULA

# 18

## objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Aprender sobre os segmentos de DNA que apresentam a capacidade de se mover dentro do genoma de um organismo, um mecanismo chamado transposição, no qual os segmentos de DNA envolvidos recebem o nome de elementos de transposição, ou simplesmente transposons.
- Compreender como o mecanismo de transposição ocorre em procariotos.

### **Pré-requisitos**

Entender o mecanismo de recombinação visto na Aula 15.

## INTRODUÇÃO

**BARBARA  
McCLINTOCK**

**(16/07/1902 -  
02/09/1992)**

Geneticista norte-americana que descreveu os elementos de transposição em milho.

Nas aulas anteriores, você teve a oportunidade de estudar que segmentos de uma molécula de DNA podem ser trocados num mecanismo chamado recombinação, e que esse mecanismo leva a uma maior variabilidade dos organismos, pois combinações diferentes de seqüências de DNA podem ser formadas, resultando em produtos gênicos diferentes.

Pois muito bem, as novidades não param por aí. Hoje, você terá a oportunidade de conhecer um outro mecanismo que também pode gerar variabilidade e tem muitas implicações evolutivas.

Vamos ver como essa história começou. Durante as décadas de 1940 e 1950, uma pesquisadora norte-americana, chamada **BARBARA McCLINTOCK**, utilizava a planta de milho como seu objeto de estudos de genética. Ela fazia cruzamentos e observava o comportamento das características nas gerações seguintes.

A essa altura, você já deve ter estudado em Genética Básica como são feitos os experimentos para estudar a herança dos caracteres. Caso você ainda não tenha visto esse conteúdo, você pode consultar um livro do Ensino Médio que traga algumas informações sobre esse assunto.

Barbara McClintock utilizava a microscopia para associar os seus resultados fenotípicos, obtidos nos cruzamentos, a possíveis alterações detectáveis na estrutura dos cromossomos. McClintock sugeriu a existência de elementos no genoma do milho, que se moviam de uma localidade para outra, provocando modificações. Dentre elas, a quebra de cromossomos e conseqüente perda de pedaços dos mesmos, gerando, assim, alterações fenotípicas detectáveis.

Naquela época, não existiam as técnicas de biologia molecular que permitissem o seqüenciamento do DNA e a caracterização desses elementos. O trabalho de McClintock ficou desacreditado durante anos, pois os demais geneticistas não aceitaram que o genoma pudesse apresentar qualquer mobilidade, muito menos do tipo sugerido por Barbara.

Somente nas décadas de 1960 e 1970, com o avanço das técnicas que permitiram analisar os genes ao nível molecular, o trabalho de McClintock foi reconhecido. Em 1983, ela recebeu o Prêmio Nobel pela sua contribuição à ciência através do estudo dos elementos de transposição.

Na próxima aula, você poderá entender o modelo descrito por Barbara McClintock em milho, mas, primeiro, nós vamos estudar como esses elementos foram descobertos em bactérias, fato crucial que tornou aceitável a hipótese de segmentos do DNA que apresentam a capacidade de se mover dentro do genoma de um organismo.

Então, para você ficar antenado, precisa ter em mente que um elemento de transposição, ou simplesmente transposon, é o nome que se dá a uma seqüência de DNA que tem a capacidade de se mover no genoma de uma localidade para outra.

Nesta aula, você terá a oportunidade de conhecer os diferentes tipos de transposons encontrados em bactérias e, na próxima aula, os transposons encontrados em eucariotos.

## ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO EM BACTÉRIAS

Os transposons em bactérias foram os primeiros a serem descritos molecularmente. Eles são divididos em três tipos principais: as Seqüências de Inserção (IS); os transposons compostos e os elementos TnA. A seguir, vamos analisar cada um deles.

### ELEMENTOS IS

Os elementos IS (do inglês *Insertion Sequence*, que significa Seqüência de Inserção) são os tipos mais simples de transposons. Eles receberam esse nome por serem capazes de se inserir em muitos locais diferentes no cromossomo e plasmídios da *Escherichia coli*.

Você deve estar se perguntando: “De que maneira pode-se saber que houve uma inserção de um segmento de DNA do tipo transposon?”

Muito bem, a melhor forma de se descobrir uma alteração genética é através da utilização de mutantes. Nós já falamos sobre a importância do uso de mutantes para o estudo da função de muitas proteínas no processo de replicação, você está lembrado? Você também já aprendeu, nas aulas anteriores, de que maneira pode ocorrer uma mutação em um indivíduo. Mas só para lembrar, os mutantes são indivíduos que sofreram alguma alteração no seu material genético. Como as bactérias são organismos que apresentam um genoma pequeno, a maioria das alterações genéticas resulta em alterações fenotípicas, pois existe uma grande possibilidade de a mutação atingir uma região ativa do genoma.

Assim, quando ocorre uma alteração fenotípica, por exemplo, perda de uma atividade enzimática, é possível descobrir o gene que sofreu a alteração e, muitas vezes, onde ocorreu e qual o tipo de mutação.

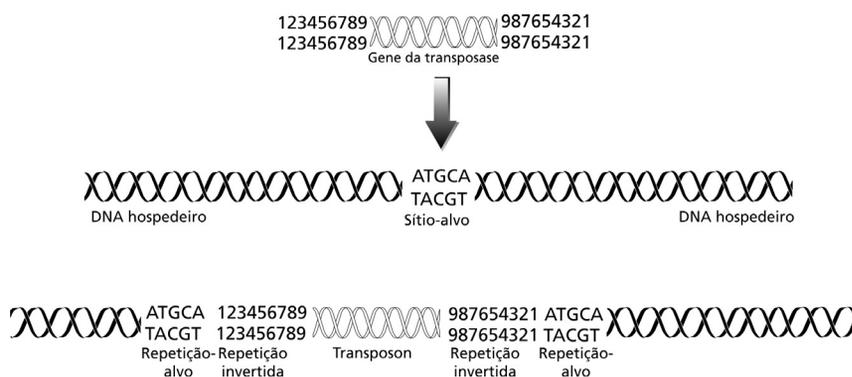
Dessa forma, a existência de mutantes foi utilizada para o isolamento dos elementos de transposição em bactérias. Os pesquisadores observaram que alguns mutantes *lac*<sup>-</sup> (mutação que impede a utilização de lactose como fonte de carbono pela bactéria) apresentavam uma capacidade anormal de reverter para o tipo selvagem, ou seja, uma outra mutação fazia com que os mutantes *lac*<sup>-</sup> recuperassem o genótipo *lac*<sup>+</sup> (capaz de utilizar lactose como fonte de carbono).

A análise molecular revelou que os mutantes *lac*<sup>-</sup> apresentavam DNA extra, dentro ou próximo ao gene *lac*, quando comparado àqueles que haviam revertido a mutação. Nesse último caso, o DNA extra havia sido perdido. Concluiu-se que a mutação era causada por um elemento que apresentava a capacidade de sair do genoma, ou seja, móvel.

## ESTRUTURA DOS ELEMENTOS IS

Os elementos IS são formados por cerca de 2.500 pares de nucleotídeos e contêm somente genes cujos produtos estão envolvidos no próprio mecanismo de transposição. Cada elemento é representado por IS acompanhado de um número: IS1, IS50, IS509 etc.

Observe a **Figura 18.1** e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 18.1:** Estrutura de um elemento de inserção. O transposon apresenta repetições terminais invertidas e gera repetições diretas no sítio-alvo. No exemplo, o alvo é uma seqüência de 5 pares de nucleotídeos. As extremidades estão representadas pelos números de 1 a 9. Cada número simboliza um nucleotídeo e ilustra o significado de repetições invertidas. A região entre as repetições codifica a transposase, enzima necessária para a ocorrência da transposição.

Os elementos IS apresentam uma pequena região idêntica ou quase idêntica nas suas extremidades. Essas regiões estão sempre dispostas em orientação invertida e por isso são chamadas repetições terminais invertidas. O tamanho dessas regiões varia de 9 a 40 nucleotídeos.

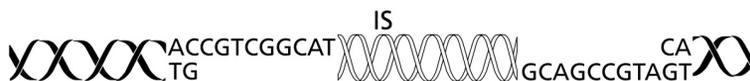
A importância dessas regiões terminais no mecanismo de transposição foi determinada através de estudos, nos quais a modificação ou eliminação dessas regiões abolia a capacidade do elemento de se transpor.

Os elementos IS codificam para uma enzima chamada transposase que é necessária à transposição. Essa proteína se liga às extremidades do transposon e corta as duas fitas. O corte do DNA, nesses locais, retira o elemento do cromossomo ou plasmídeo, tornando-o livre para ser inserido em uma outra posição, na mesma ou em outra molécula de DNA. Quando um elemento IS é inserido em cromossomos ou em plasmídios, uma duplicação de parte da seqüência do DNA é criada no local de inserção. Uma cópia da duplicação está localizada em cada extremidade do elemento. Observe a **Figura 18.2** e você compreenderá melhor por que isso ocorre.

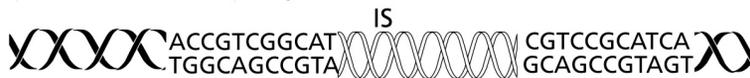
(1) As duas fitas do DNA alvo são clivadas em locais diferentes (setas).



(2) O elemento IS é inserido na fenda criada pelo corte irregular no DNA alvo.



(3) A síntese de DNA preenche a fenda em cada lado do elemento IS, produzindo uma duplicação do sítio alvo.



**Figura 18.2:** Produção da duplicação do sítio-alvo pelo elemento de inserção IS. (a) As duas fitas do DNA são cortadas em locais diferentes (indicados pelas setas). (b) O elemento IS é inserido na fenda criada pelo corte não linear do DNA-alvo. (c) A síntese do DNA preenche a fenda, de cada um dos lados do elemento IS, produzindo uma duplicação direta do sítio-alvo.

Essas seqüências repetidas, contendo de 2 a 13 nucleotídeos, são chamadas duplicação do sítio-alvo e são formadas em função do preenchimento da fenda gerada pela quebra não homogênea da molécula dupla fita de DNA.

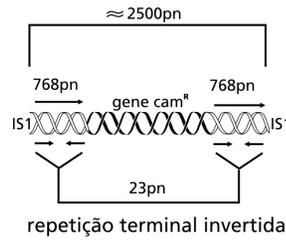
O cromossomo bacteriano pode conter várias cópias de um tipo particular de elemento IS. Por exemplo, para o elemento IS1 são encontradas de 6 a 10 cópias.

### **TRANSPOSONS COMPOSTOS**

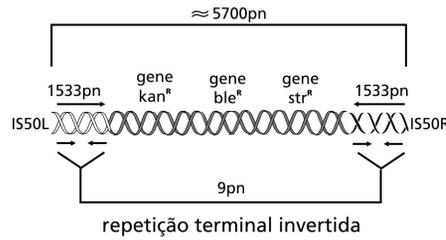
Os transposons compostos são representados pelo símbolo Tn seguido por um número. Esses transposons são formados quando dois elementos IS se inserem próximos um do outro. A região entre eles também é transposta pela ação conjunta das regiões localizadas nas extremidades de cada um dos elementos.

A orientação dos elementos IS pode variar nos diferentes transposons compostos. Observe a **Figura 18.3** e acompanhe a explicação que se segue.

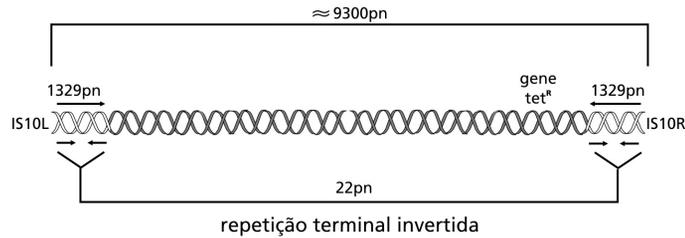
(a) Tn9



(b) Tn5



(c) Tn10



**Figura 18.3:** Organização dos transposons compostos. (a) O Tn9 é formado por dois elementos IS1 dispostos na mesma orientação. Entre os dois elementos IS1 está o gene *cam<sup>R</sup>*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. (b) O Tn5 é formado por dois elementos IS50 dispostos em orientação invertida. Entre os dois elementos, estão os genes *kan<sup>R</sup>*, *ble<sup>R</sup>* e *str<sup>R</sup>*, que conferem resistência aos antibióticos canamicina, bleomicina e estreptomicina, respectivamente. (c) O Tn10 é formado por dois elementos IS10 dispostos em orientação oposta. Entre os dois elementos, está o gene *tet<sup>R</sup>*, que confere resistência ao antibiótico tetraciclina.

No transposon Tn9, os elementos IS estão na mesma orientação. Já no Tn5 e no Tn10, a orientação é invertida. A região entre os elementos IS não está envolvida com a transposição. Nesses três transposons, a região central codifica genes que conferem resistência a antibióticos. No Tn9, resistência ao cloranfenicol, no Tn5, resistência à canamicina, à bleomicina e à estreptomicina. No Tn10, resistência à tetraciclina.

A essa altura, você pode estar pensando: “Os transposons compostos são elementos capazes de se mover no genoma, e esses transposons carregam genes de resistência a antibióticos. Então, esses genes de resistência podem passar de um cromossomo para um plasmídeo e do plasmídeo para um outro cromossomo, e quem sabe até de uma bactéria para outra!!!”

Se você pensou isso, pensou de maneira correta e, na verdade, essa situação é um grande problema para o tratamento de infecções bacterianas com antibióticos. As bactérias apresentam a capacidade de transferir DNA plasmidial de uma célula para outra, através de um mecanismo conhecido como conjugação. Você aprenderá sobre conjugação na disciplina Genética Básica.

Assim, se um transposon composto, carregando os genes de resistência a antibióticos, ocorrer em um plasmídeo que será transferido durante a conjugação, a resistência ao antibiótico será transferida para a outra célula. O mais curioso é que a conjugação pode ocorrer entre espécies diferentes de bactérias, tornando, assim, o mecanismo de transmissão da resistência extremamente versátil.

Você já deve ter ouvido falar que não se deve fazer uso indiscriminado de antibióticos, pois existe a possibilidade de seleção de bactérias resistentes. Muito bem, aí está a explicação. Uma única célula que sobreviva na presença do antibiótico é capaz de transmitir para os seus descendentes essa resistência, numa velocidade incrível, uma vez que as bactérias se dividem com muita rapidez, e o que é pior, pode transferir para outras bactérias essa resistência também. Algumas bactérias apresentam resistência a drogas múltiplas, pois foram adquirindo os genes de resistência de outros organismos. Um exemplo bem próximo é o caso da bactéria *Staphylococcus*, que se apresenta como a grande vilã das famosas infecções hospitalares. Essas bactérias apresentam resistência a muitas drogas e são muito difíceis de serem destruídas. Dá para entender por que elas ocorrem em hospitais, embora isso não devesse acontecer. Nos hospitais, existe um grande número de pacientes, com diferentes tipos de infecções, e uma ampla utilização de antibióticos. Se o organismo do paciente estiver debilitado devido a uma intervenção cirúrgica, por exemplo, torna-se um alvo fácil de infecção por essa bactéria dura de matar.

Mas vamos voltar ao assunto dos transposons compostos. Algumas vezes, os elementos IS em um transposon composto não são idênticos. No Tn5, o elemento da direita, chamado IS50R (R de *right*, no inglês, direita) é capaz de produzir uma transposase que estimula a transposição. Já o elemento da esquerda, IS50L (L de *left*, no inglês, esquerda), não é funcional. A diferença se deve a um único par de nucleotídeos diferente, que impede a produção de uma transposase funcional pelo IS50L.

Nesse ponto, temos de refletir sobre um aspecto importante. Será que os transposons ficam saltando de um lugar para outro do genoma, de maneira indiscriminada, ou existe um controle do mecanismo para limitar sua ação?

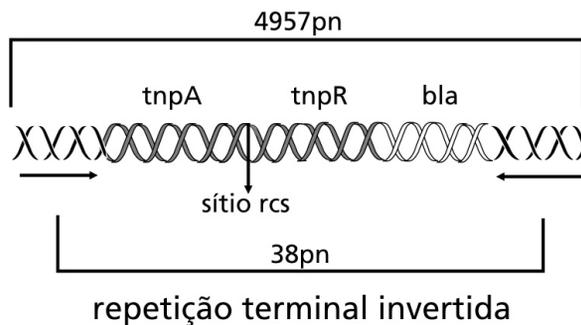
Para o transposon Tn5 foi demonstrado que existe regulação sim! Vejamos como isso foi descoberto. Quando uma bactéria é infectada com um fago que contém o transposon Tn5, a frequência de transposição será reduzida se a célula infectada já possuir uma cópia do Tn5. Essa redução indica que o transposon, já existente no cromossomo, inibe a transposição de um outro transposon, possivelmente, através da síntese de um repressor.

Os pesquisadores demonstraram que o elemento IS50R produz duas proteínas. Uma delas é a transposase normal, que efetua a transposição, e uma outra é a transposase truncada, ou seja, menor do que a original (criada a partir da tradução iniciada em um segundo códon de iniciação, presente dentro do gene da transposase) que inibe a transposição. A proteína menor é geralmente mais abundante que a proteína maior funcional, dessa forma, a transposição do Tn5 tende a ser reprimida. Esse mecanismo é mesmo incrível, você não acha? Ele impede que um grande número de transposons se insiram no genoma e, com isso, coloque em risco a sobrevivência da célula através do acúmulo de mutações.

## ELEMENTOS TNA

Os transposons TnA não possuem elementos IS nas suas extremidades. Em vez disso, apresentam repetições invertidas simples de 38 a 40 pares de nucleotídeos. Os elementos TnA também produzem duplicação no sítio-alvo quando são inseridos no DNA. O melhor exemplo de elemento TnA já caracterizado é o elemento Tn3.

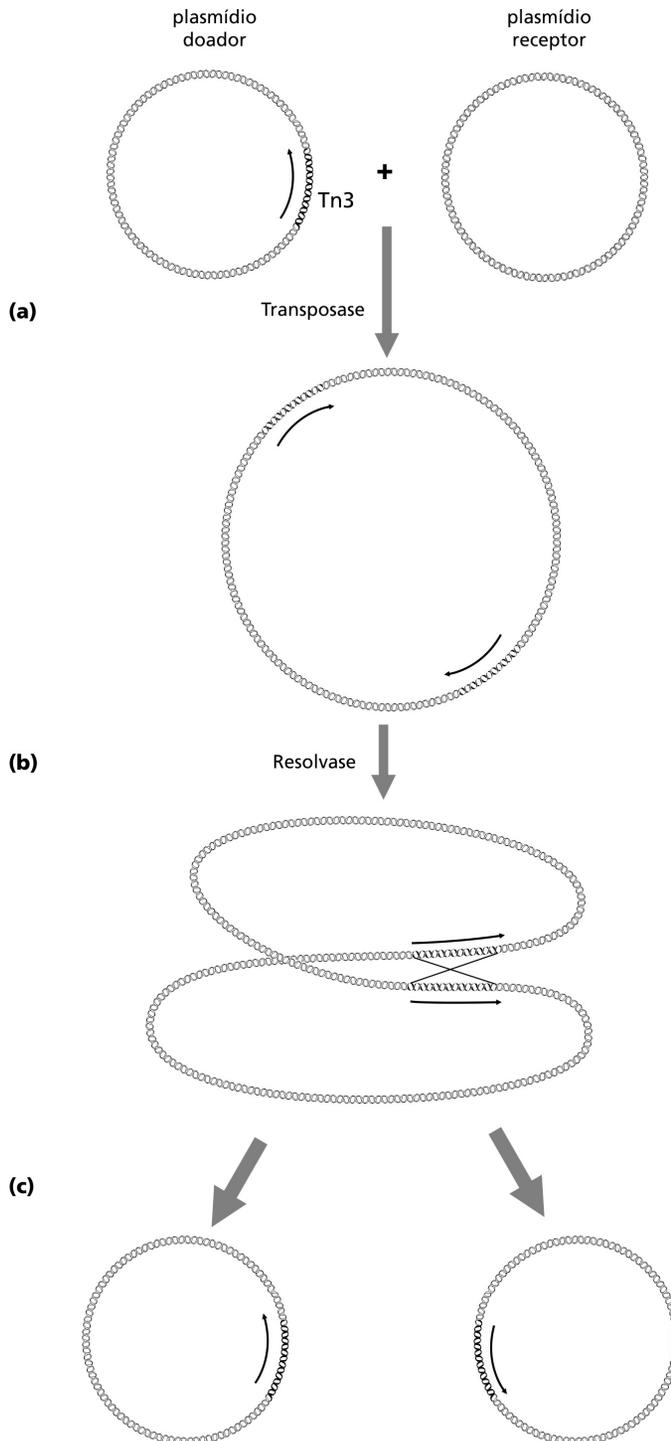
Observe a **Figura 18.4** que apresenta os componentes do elemento Tn3.



**Figura 18.4:** Organização do elemento Tn3. O tamanho das seqüências é dado em pares de nucleotídeos. O *tnpA* é o gene que codifica a transposase, o *tnpR* é o gene que codifica a resolvase e o *bla* é o gene que codifica a enzima  $\beta$ -lactamase, que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

O transposon Tn3 apresenta três genes, o *tnpA*, *tnpR* e *bla*, que codificam para as proteínas transposase, resolvase/repressora e uma enzima chamada  $\beta$ -lactamase, respectivamente. Essa última proteína confere resistência ao antibiótico ampicilina.

Observe a **Figura 18.5** que descreve a transposição do elemento Tn3 e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 18.5:** Transposição do elemento Tn3 através da formação de um co-integrado. (a) A transposase, codificada pelo *tnpA*, catalisa a formação de um co-integrado entre o plasmídeo doador e o plasmídeo receptor. Durante esse processo, o Tn3 é replicado, de modo que uma cópia do elemento é formada em cada junção do co-integrado. (b) A resolvase, codificada pelo gene *tnpR*, separa o co-integrado promovendo a recombinação entre os dois elementos Tn3. (c) Os plasmídios, doador e receptor, separados, cada um contendo uma cópia do Tn3.

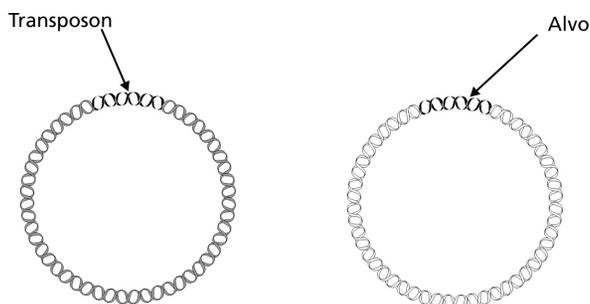
A transposição do elemento Tn3 ocorre em duas etapas. A transposase promove a fusão de duas moléculas, formando uma estrutura conhecida como co-integrado. Durante a formação dessa estrutura, o transposon é duplicado e uma cópia é inserida em cada junção no co-integrado. Os dois elementos Tn3 estão orientados na mesma direção.

Na segunda etapa da transposição, a resolvase promove uma recombinação sítio específica entre os dois elementos Tn3. Você pode rever como ocorre esse tipo de recombinação na Aula 16. Esse evento ocorre em uma seqüência do Tn3 chamada *res*, ou sítio de resolução, gerando duas moléculas, cada uma contendo uma cópia do transposon.

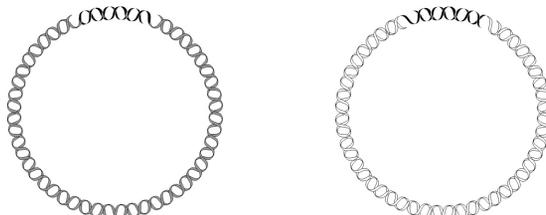
O produto do gene *tnpR* apresenta, ainda, uma outra função. Ele reprime a síntese da transposase e da resolvase. A repressão ocorre porque o sítio *res* está localizado entre os genes *tnpA* e *tnpR*. Ao se ligar a esse sítio, a proteína TnpR interfere na transcrição dos dois genes. Assim, o elemento Tn3 permanece imóvel.

De um modo geral, os mecanismos através dos quais os transposons se movem podem ser divididos em dois tipos, descritos a seguir.

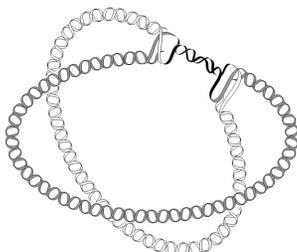
1. Transposição replicativa: ocorre quando o elemento é duplicado durante a reação. A região transposta é uma cópia do elemento original. O transposon é copiado como parte do seu movimento. Uma cópia permanece no sítio original, enquanto a outra se insere no novo sítio. A transposição replicativa envolve dois tipos de atividade enzimática: uma transposase que atua na extremidade do transposon original e uma resolvase que atua nas cópias duplicadas. Esse é o caso do elemento Tn3 que você acabou de estudar no tópico anterior. Um outro exemplo de transposição replicativa é observado no fago Mu. Você vai encontrar um esquema do mecanismo na **Figura 18.6**, seguida pela explicação do mesmo.



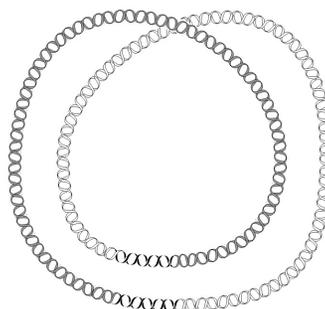
(1) Cortes simples fita geram extremidades soltas em ambos, transposon e alvo.



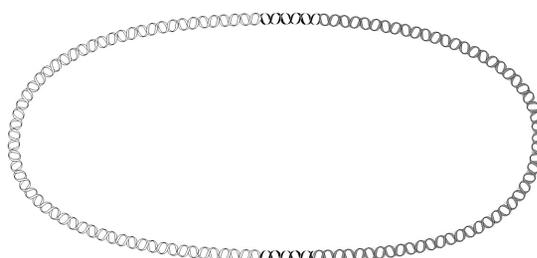
(2) Estrutura de cruz, as extremidades soltas do transposon são unidas às extremidades soltas do alvo.



(3) A replicação da extremidade 3' livre gera um as integradas. Uma única molécula possui duas cópias do transposon.



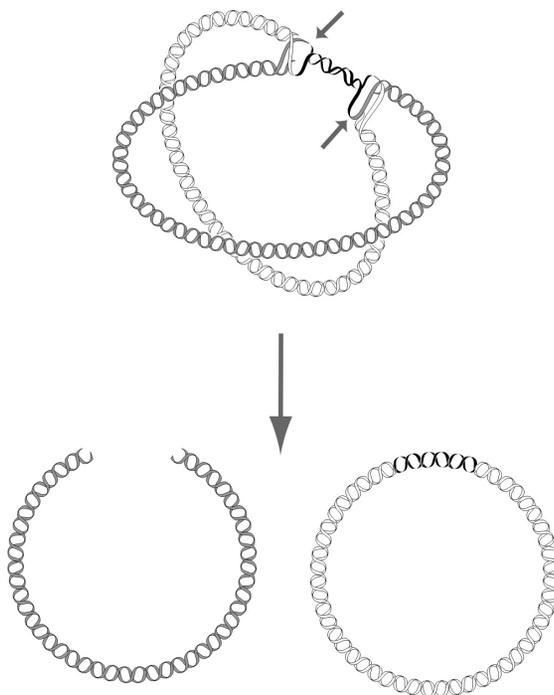
(4) O co-integrado desenrolado mostra que os transposons estão na junção entre os replicon



**Figura 18.6:** A transposição do fago Mu gera uma estrutura de cruz que é convertida em um co-integrado a partir da replicação.

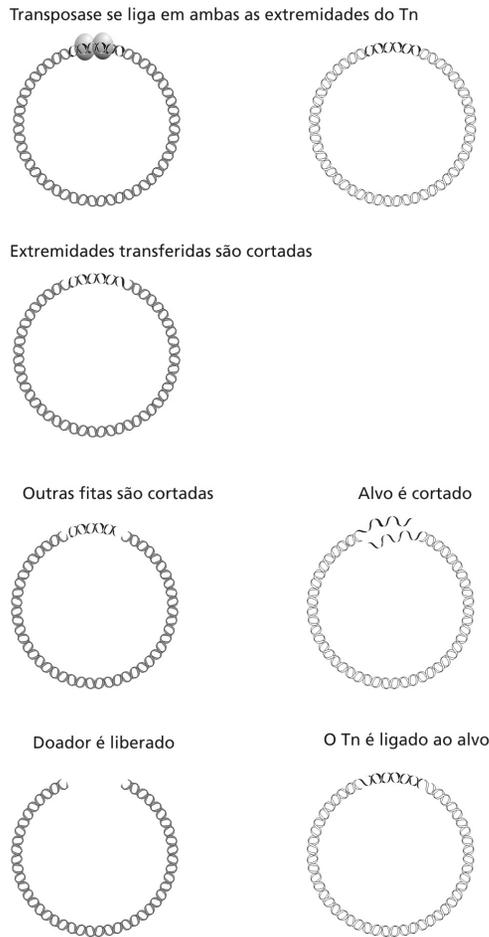
O processo se inicia com a formação de um complexo de transferência da fita (algumas vezes chamado complexo *crossover*, que significa cruz). As fitas, doadora e alvo, são ligadas de modo que cada extremidade da seqüência do transposon é unida a uma das fitas simples, geradas pela quebra no sítio-alvo. O complexo de transferência forma uma estrutura em forma de cruz unida ao transposon duplo. Essa estrutura de cruz possui uma região simples fita em cada extremidade. Essas regiões funcionam como forquilhas de replicação, as quais fornecem um molde para a replicação do DNA, que usará o OH livre proveniente da quebra das fitas. Se a replicação ocorrer em ambas as extremidades, ela passará pelo transposon, separando as duas fitas, e terminará nas suas extremidades. Após a replicação, essa estrutura terá formado um co-integrado, contendo as repetições diretas do transposon na junção entre os replicons.

2. Transposição não replicativa: ocorre quando o elemento de transposição se move, como uma entidade física, diretamente de um local para outro. Isso ocorre através de dois mecanismos. Um mecanismo utiliza a conexão das seqüências do doador e do DNA-alvo e apresenta alguns passos que são semelhantes à transposição replicativa mostrada na **Figura 18.6**, formando a estrutura de cruz. A quebra e a união das fitas permite que o alvo seja reconstruído, enquanto as fitas do doador continuam quebradas. Nesse caso, não existe a formação de um co-integrado. A **Figura 18.7** ilustra o mecanismo de transposição não replicativa, que também é utilizado pelo fago Mu. Uma vez que as fitas doadoras tenham sido cortadas, as fitas-alvo podem ser ligadas ao transposon. As fitas simples, geradas pelo corte, devem ser preenchidas pelo mecanismo de reparo (você já estudou o mecanismo de reparo na Aula 12, caso não esteja lembrado dê uma olhada no conteúdo daquela aula). O produto dessa reação é um replicon-alvo, no qual o transposon foi inserido entre as seqüências repetidas criadas pelos cortes na fita simples original. O replicon doador possui uma quebra na dupla-fita no local onde o transposon estava originalmente localizado.



**Figura 18.7:** A transposição não replicativa ocorre quando a estrutura de cruz é rompida por um corte na molécula. Isso insere o transposon no DNA, cercado pelas repetições diretas do alvo, e o doador é deixado com uma quebra na dupla-fita.

Os elementos IS e os elementos compostos Tn10 e Tn5 utilizam um segundo mecanismo que é mostrado na **Figura 18.8**. Esse mecanismo envolve a liberação do transposon do DNA doador durante a transferência. Esse tipo de mecanismo requer somente uma transposase. Ambos os mecanismos resultam na inserção de um elemento no sítio-alvo e a perda do elemento no sítio doador. O que acontece com a molécula doadora? Sua sobrevivência requer que o sistema de reparo reconheça a quebra na dupla-fita e a conserte.



**Figura 18.8:** Ambas as fitas do Tn10 são clivadas sequencialmente e, então, o transposon é ligado ao sítio-alvo que foi clivado.

Alguns transposons utilizam somente um tipo de mecanismo de transposição, enquanto outros podem utilizar mais de um. Os elementos IS1 e IS903, bem como o fago Mu, utilizam o mecanismo replicativo e o mecanismo não replicativo.

As mesmas reações são utilizadas em todas as classes de transposons. As extremidades são desconectadas do DNA doador pela quebra, que gera extremidades 3' OH livres. As extremidades expostas são unidas ao DNA-alvo por reações de transferência, envolvendo transesterificação, na qual o 3' OH ataca diretamente o DNA-alvo. Essas reações ocorrem dentro de um complexo nucleoprotéico que contém as enzimas necessárias e as duas extremidades do transposon.

A escolha do DNA-alvo é feita pela transposase, podendo ser aleatória ou apresentar especificidade para uma determinada sequência conservada, ou então apresentar especificidade por uma estrutura secundária presente no DNA, por exemplo, o superespiralamento ou a existência de dobras na molécula.

**RESUMO**

Nesta aula, você teve a oportunidade de aprender que o genoma dos organismos não é estático, ou seja, existem algumas regiões que apresentam mobilidade. Essas regiões do DNA, chamadas elementos de transposição ou transposons, foram primeiramente descritas em milho por Barbara McClintock. Porém, a sua funcionalidade só foi aceita após a comprovação da sua existência em bactérias. As bactérias apresentam vários tipos de transposons que são divididos em três grupos: elementos IS (Seqüência de Inserção), transposons compostos e TnA. Os transposons se movem através da atividade de uma enzima chamada transposase, que é codificada pelo próprio transposon. A transposição pode ser replicativa, quando uma cópia do transposon é mantida no sítio doador e uma outra cópia é gerada no sítio-alvo, ou não replicativa, quando o transposon é retirado do sítio doador e inserido no sítio-alvo.

**EXERCÍCIOS**

1. O que caracteriza um elemento de transposição IS?
2. O que é um transposon composto?
3. Por que o TnA pertence a uma classe diferente de transposons?
4. Qual a diferença entre transposição replicativa e não replicativa?

**AUTO-AVALIAÇÃO**

Se você compreendeu bem o conteúdo da aula, não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios. Todas as respostas estão contidas na aula. Gostaríamos que você exercitasse a sua imaginação para compreender a importância e as implicações da existência desses mecanismos, com os quais você acabou de ter contato. Na próxima aula, você vai saber um pouco mais sobre os transposons que ocorrem em eucariotos e vamos falar alguma coisa sobre a importância evolutiva desses DNAs saltadores. Bom estudo e até lá!



# Elementos de transposição em eucariotos

AULA

# 19

## objetivo

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Continuar o estudo dos elementos de transposição, dando ênfase aos transposons encontrados em eucariotos.

### Pré-requisitos

Estudo dos conceitos apresentados na Aula 18.

## INTRODUÇÃO

Conforme vimos na aula anterior, existem regiões do DNA que apresentam a capacidade de se mover no genoma e são chamadas transposons. Na aula de hoje, você terá a oportunidade de conhecer alguns dos elementos descritos em eucariotos, inclusive em humanos. Vamos iniciar falando sobre os elementos encontrados no milho que, como já foi dito na aula anterior, foram os primeiros transposons descritos. Em seguida, vamos falar sobre os transposons da mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, e vamos terminar estudando um tipo especial de transposon conhecido como retrotransposon e que é encontrado em leveduras, moscas, plantas e animais, incluindo os humanos.

## ELEMENTOS Ac E Ds DE MILHO

Os elementos Ac e Ds de milho foram descritos no trabalho pioneiro de Barbara McClintock, que você teve a oportunidade de conhecer no início da nossa aula anterior. Através de análise genética, ela demonstrou que esses elementos são responsáveis pelo aparecimento de listras e pontos roxo-amarronzados em sementes de milho, que normalmente são amarelas.

Muitos anos mais tarde, Nina Dederoff, Joachim Messing, Peter Starlinger, Heins Saedler, Susan Wessler e seus colaboradores isolaram os elementos e determinaram a sua estrutura molecular.

McClintock descobriu os elementos Ac e Ds durante seus estudos, nos quais a quebra de um cromossomo estava associada a um **MARCADOR GENÉTICO** que controlava a pigmentação da semente de milho. Quando um marcador era perdido, ou seja, o fenótipo não era mais percebido, ela pôde observar que o segmento do cromossomo no qual o marcador estava localizado também havia sido perdido, devido à ocorrência de uma quebra no cromossomo. Como consequência, a alteração na coloração do aleurona, a camada mais externa do endosperma triplóide do milho, indicava a perda do gene responsável pela característica, ou seja, a perda do marcador genético.

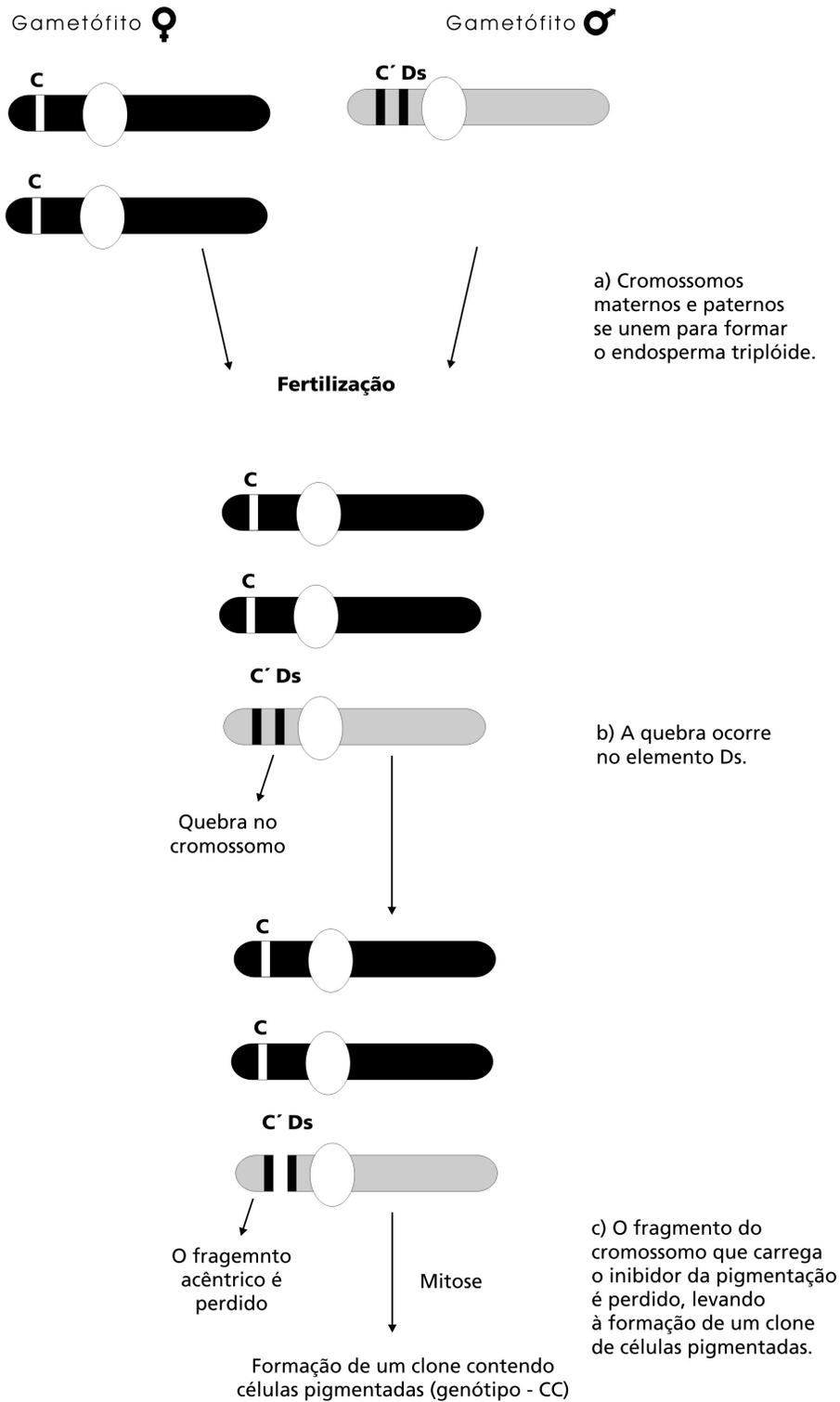
Um dos marcadores utilizados por McClintock foi um alelo do *locus C*, situado no braço curto do cromossomo 9. O alelo C' é um inibidor dominante da coloração do aleurona. Assim, qualquer indivíduo que o possua não contém pigmentos.

### MARCADOR GENÉTICO

Pode ser um gene, ou um segmento de DNA, associado a uma determinada característica fenotípica. Essa característica é utilizada para acompanhar o comportamento do marcador nas gerações seguintes, após a realização de cruzamentos.

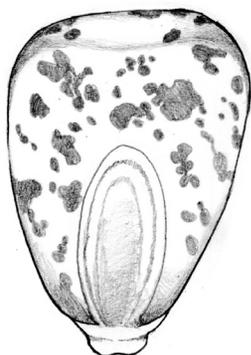
McClintock fertilizou plantas CC com pólen de plantas C'C', produzindo sementes com endosperma C'CC. Lembre-se de que o endosperma triplóide recebe dois alelos da mãe e um alelo do pai. A maioria das sementes obtidas era amarela, o que indicava ausência de pigmentação. No entanto, algumas sementes apresentaram regiões contendo o pigmento roxo-amarronzado, formando um mosaico com setores não pigmentados e setores pigmentados. McClintock sugeriu que nesses mosaicos o alelo C' inibidor havia sido perdido durante a formação do endosperma, formando um clone de tecido que era capaz de sintetizar o pigmento. O genótipo desse clone é  $\_CC$ , no qual o traço representa o alelo C' perdido.

O mecanismo que McClintock propôs está explicado na **Figura 19.1**. Observe a figura e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 19.1:** Quebra no cromossomo causada pelo elemento de transposição Ds em milho. O alelo C' no braço curto do cromossomo 9 produz pigmentação normal na aleurona. O alelo C' inibe a pigmentação. (a) Dois cromossomos maternos e um cromossomo paterno se unem para formar o endosperma triplóide. (b) A quebra ocorre no local onde existe um elemento Ds. (c) O fragmento do cromossomo que carrega o alelo inibidor da pigmentação é perdido, formando um clone de células pigmentadas.

Uma quebra, no local marcado por uma seta, faz com que um segmento do cromossomo se desprenda do seu centrômero, criando um fragmento acêntrico. Esse fragmento tende a se perder durante a divisão celular, de modo que todos os descendentes dessa célula não possuirão essa parte do cromossomo do pai, formando um clone. Uma vez que o fragmento perdido contém o alelo inibidor C', todas as células desse clone serão pigmentadas. Se qualquer uma delas produzir uma parte do aleurona, um pedaço colorido aparecerá criando um mosaico semelhante ao mostrado na **Figura 19.2**.



**Figura 19.2:** Semente de milho mostrando a perda do alelo C' que inibe a pigmentação do aleurona. Os setores pigmentados são CC, enquanto os setores não pigmentados são C'CC.

McClintock descobriu que, nessas sementes com mosaicos, havia ocorrido uma quebra em um local específico no cromossomo 9. Ela chamou fator Ds esse local que produziu a quebra, simbolizando dissociação. No entanto, sozinho, esse fator é incapaz de produzir a quebra no cromossomo, sendo necessária a estimulação por um outro fator chamado Ac, que seria o ativador (inglês *Activator*). O fator Ac estava presente em algumas linhagens de milho, mas ausente em outras. Quando diferentes linhagens são cruzadas, Ac pode ser combinado com Ds, criando uma condição que leva à quebra do cromossomo.

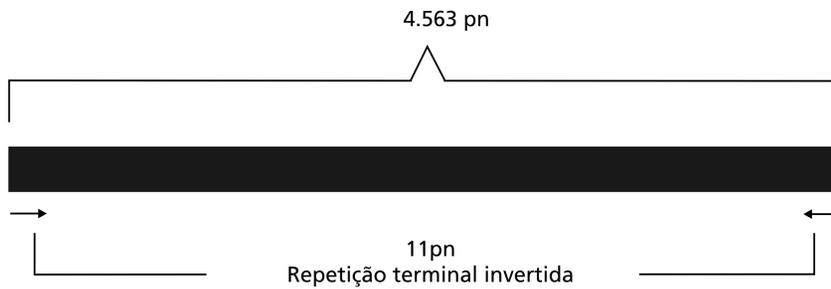
O sistema Ac/Ds era a explicação para os resultados obtidos por McClintock. Além desse resultado, ela também observou outras instabilidades no genoma do milho, associadas ao sistema Ac/Ds. Assim, ela propôs que os elementos Ds poderiam existir em muitos locais diferentes no genoma e que eles poderiam se mover de um local para outro, desde que ativados pelo Ac.

Os elementos Ac e Ds pertencem a uma família de transposons. Eles estão relacionados um ao outro e podem se inserir em muitos locais nos cromossomos. Muitas cópias dos elementos Ac e Ds são encontradas no genoma do milho.

Quando um desses elementos se insere, perto ou dentro de um gene, a função do mesmo pode ser alterada ou inibida.

Você pode estar se perguntando: “Como esses elementos funcionam molecularmente?”. Observe a **Figura 19.3** e acompanhe a explicação que se segue.

a) Elemento Ac - seqüência completa.



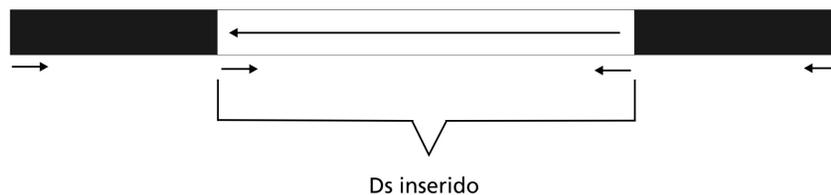
b) Elemento Ds aberrante - as seqüências internas estão ausentes.



c) Elementos Ds aberrante - as seqüências internas são diferentes das seqüências Ac.



d) Elemento Ds duplo - um elemento Ds está inserido dentro de outro elemento Ds.



**Figura 19.3:** Organização estrutural dos elementos de transposição pertencentes à família Ac/Ds de milho. As repetições terminais invertidas estão indicadas pelas setas. Os tamanhos das seqüências de DNA estão indicados em pares de nucleotídeos (pn).

O seqüenciamento do elemento Ac revelou que ele consiste em 4.563 pares de nucleotídeos cercados por repetições invertidas de 11 nucleotídeos. Cada elemento Ac também é cercado por repetições diretas de 8 pares de nucleotídeos. As repetições diretas são criadas no momento em que o elemento é inserido no cromossomo, sendo, assim, uma duplicação do sítio-alvo e não uma parte integral do elemento (semelhantes àsquelas descritas para os elementos de bactéria, e que você estudou na aula anterior).

Os elementos Ds são mais heterogêneos que os elementos Ac. Eles também possuem repetições terminais invertidas como o elemento Ac, mas a sua seqüência interna varia bastante. É provável que os elementos Ds tenham derivado dos elementos Ac a partir da perda de seqüências internas.

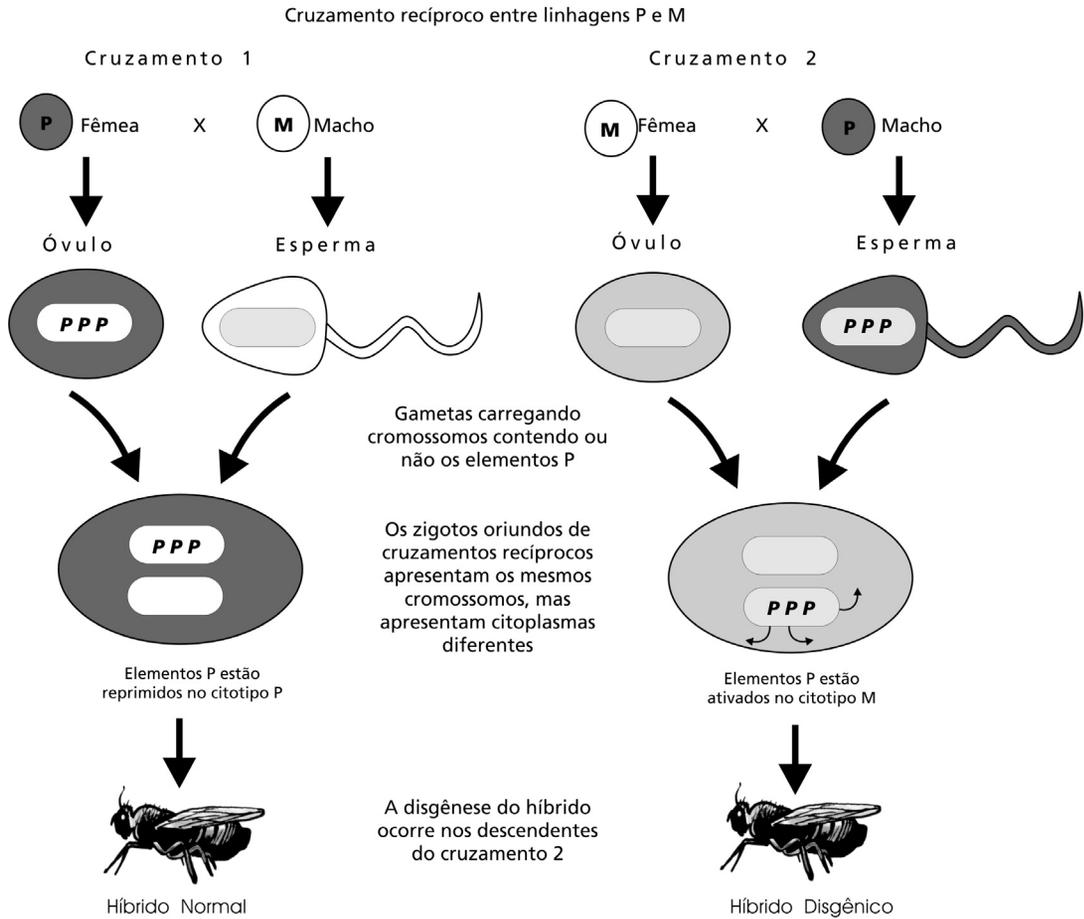
Somente o elemento Ac codifica para uma transposase funcional. Assim, a mobilidade dos elementos Ac/Ds é promovida pela transposase codificada pelo elemento Ac. A transposase interage com as seqüências dos elementos Ac e Ds, catalisando seu movimento. Os elementos Ds, uma vez que não produzem transposases, são dependentes da transposase produzida pelo elemento Ac.

## ELEMENTOS P E DISGÊNESE DO HÍBRIDO EM *DROSOPHILA*

A maior parte da pesquisa feita com transposons de eucariotos enfocou os elementos P de *Drosophila*. Na década de 1970, descobriu-se que o cruzamento entre algumas linhagens de *Drosophila* produzia híbridos com uma série de características aberrantes, incluindo alta taxa de mutação, quebra nos cromossomos e esterilidade. O termo *disgênese* do híbrido deriva do grego e significa “deterioração da qualidade”.

As linhagens de mosca foram classificadas em dois grupos, de acordo com a sua capacidade de produzir disgênese do híbrido, chamadas M e P. Somente cruzamentos entre M e P produzem disgênese do híbrido, e somente quando o macho pertence à linhagem P. A **Figura 19.4** ilustra o que foi observado.

Os pesquisadores sugeriram que os cromossomos da linhagem P carregam fatores que são ativados quando eles penetram em ovos produzidos por fêmeas M e, uma vez ativados, esses fatores induzem mutações e quebra nos cromossomos.

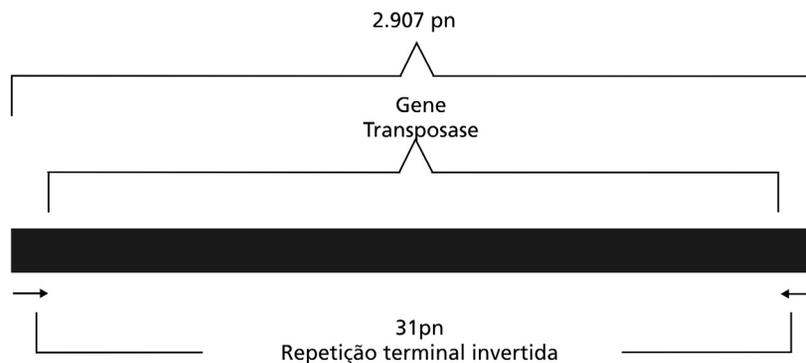


**Figura 19.4:** A disgênese do híbrido é induzida em cruzamentos entre machos P e fêmeas M, mas não em cruzamentos entre machos M e fêmeas P.

Michael Simmons e Johng Lim descobriram uma mutação no gene *white* (branco) induzida por disgnese do híbrido. Isso permitiu testar a hipótese de serem os transposons os responsáveis por essa mutação. Em 1980, os dois pesquisadores enviaram o novo mutante do gene *white* para Paul Bingham e Gerald Rubins, que haviam acabado de seqüenciar o DNA do gene *white*. Usando esse DNA como **SONDA**, eles foram capazes de comparar o DNA do mutante com o gene normal. Em cada mutante, eles descobriram um pequeno elemento que havia sido inserido na região codificadora do gene, ou seja, a região que produzirá o RNA mensageiro e que servirá de molde para a síntese da proteína.

Posteriormente, foi demonstrado que esse elemento está presente muitas vezes no genoma da linhagem P. No entanto, está ausente na linhagem M. A partir daí, esses elementos foram chamados elementos P, pois são específicos da linhagem P. Os elementos P variam no tamanho. A estrutura dos elementos P está ilustrada na **Figura 19.5**.

Elemento P completo - todas as seqüências estão presentes.



b) Elemento P incompleto - as seqüências internas estão ausentes.



**Figura 19.5:** Estrutura dos elementos P de *Drosophila*. As orientações estão representadas por setas. Os tamanhos das seqüências de DNA estão indicados em pares de nucleotídeos (pn).

### SONDA

É um segmento de DNA marcado radioativamente e que pode ser utilizado para localizar seqüências de DNA homólogas através da técnica de hibridação do DNA. O DNA investigado é geralmente fixado a uma membrana de nylon ou nitrocelulose na forma de fita simples. A sonda, também fita simples, é colocada em contato com a membrana e formará uma molécula híbrida quando encontrar uma molécula que possua uma seqüência complementar, homóloga à sonda. Posteriormente, a região híbrida pode ser revelada através de autoradiografia que consiste na exposição do material em estudo, no caso uma membrana, a um filme plástico contendo uma película gelatinosa formada por cristais de prata (brometo de prata). A energia das partículas radioativas, presentes na membrana, convertem alguns íons dos cristais de prata em átomos de prata que na presença de uma solução reveladora convertem os cristais em prata metálica. Esta precipita no filme, produzindo uma imagem escura. Assim, é possível identificar o material radioativo, nesse caso, o DNA híbrido contendo uma das fitas radioativas.

Os maiores elementos contêm 2.907 pares de nucleotídeos com inversões terminais repetidas de 31 pares de nucleotídeos. Esses elementos P completos carregam um gene que codifica uma transposase. Quando a transposase P se liga perto das extremidades de um elemento P completo, ela pode mover aquele elemento para uma outra localização no genoma. Elementos P incompletos não produzem a transposase porque algumas seqüências internas foram deletadas. Entretanto, eles possuem as seqüências terminais, o que significa que uma transposase de um outro elemento pode agir sobre essas repetições e mover o elemento.

Um fato interessante é que os descendentes de moscas (obtidos em laboratório) que foram coletadas antes de 1950 não possuem elementos P, sugerindo que os mesmos invadiram populações de *Drosophila* recentemente, provavelmente através de um vírus natural.

As populações de *Drosophila* regulam o movimento dos elementos P. Essa regulação depende do citotipo, uma condição celular que é transmitida matematicamente através do citoplasma do ovo. O citotipo P reprime os elementos P e o citotipo M permite o movimento.

O citotipo P é característico de linhagens que carregam o elemento P. Já o citotipo M é característico de linhagens que não apresentam os elementos P. Quando o citotipo M é combinado com os elementos P através de cruzamento, a transposição ocorre. A natureza celular do citotipo é desconhecida.

Os pesquisadores demonstraram que a transposição só ocorre em células germinativas. Em tecidos somáticos, nos quais os elementos P poderiam causar sérios danos ao indivíduo, a transposase não é sintetizada.

## **RETROTRANSPOSON**

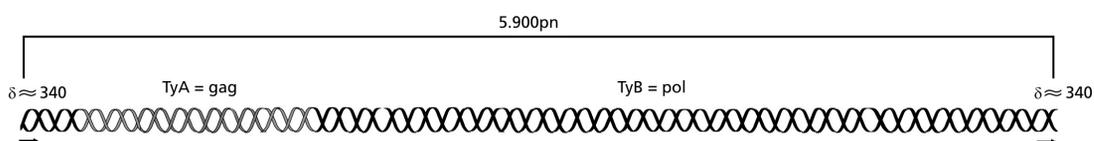
Além dos transposons, tais como Ac/Ds e P, os genomas eucarióticos contêm elementos cujo movimento se dá através da transcrição reversa do RNA em DNA. Esse mecanismo é semelhante àquele utilizado pelos vírus de RNA, chamados retrovírus. Essa reversão no fluxo da informação gênica levou os geneticistas a chamarem esses elementos retrotransposons.

Existem duas classes de retrotransposons: os elementos semelhantes aos retrovírus e os retroposons.

## ELEMENTOS SEMELHANTES AO RETROVÍRUS

Esses elementos são encontrados em diferentes organismos como levedura, plantas e animais. Todos apresentam uma estrutura básica: uma região codificadora central, cercada por uma repetição terminal longa ou LTR (do inglês *Long Terminal Region*), que são orientadas na mesma direção. As seqüências repetidas apresentam algumas centenas de nucleotídeos. Cada LTR geralmente apresenta repetições, da mesma forma que em outros tipos de transposons. Conforme dito anteriormente, esses transposons são encontrados em muitos organismos, mas o assunto sobre retrotransposons é muito vasto, de modo que nós vamos utilizar somente um exemplo para ilustrar o seu mecanismo. Outros exemplos podem ser encontrados na literatura, que está indicada no final deste módulo.

O elemento semelhante ao retrovírus melhor caracterizado é o transposon Ty1 de levedura. Seu nome é derivado de *Transposon Yeast 1*, do inglês, que significa Transposon de Levedura 1. A estrutura do elemento Ty1 está representada na **Figura 19.6**.

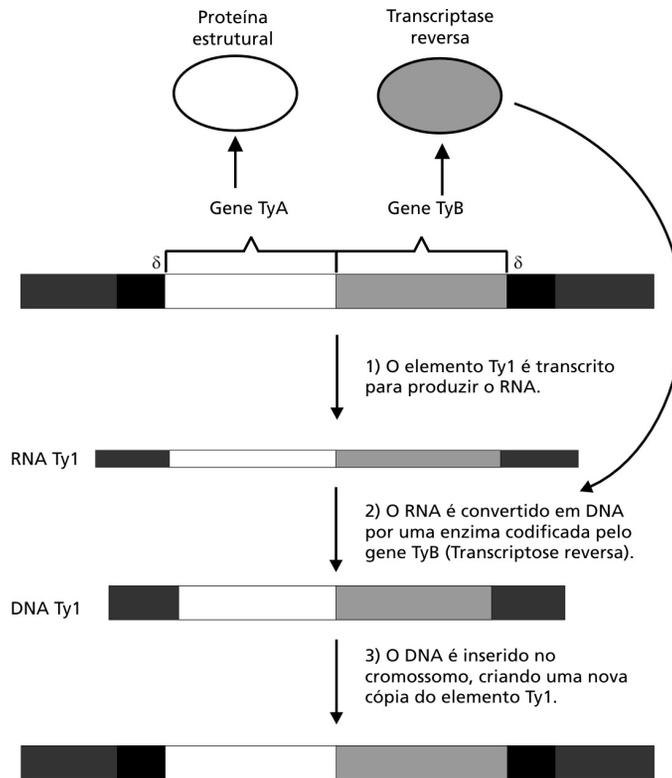


**Figura 19.6:** Estrutura do elemento Ty1 de levedura. As repetições terminais longas (LTR) estão representadas pela letra grega  $\delta$ . Os genes *TyA* e *TyB* também estão representados. Os tamanhos das seqüências estão indicados em pares de nucleotídeos (pn).

O elemento Ty1 possui cerca de 5.900 pares de nucleotídeos e seus LTRs possuem 340 pares de nucleotídeos. Após a inserção do elemento Ty1, ocorre a criação de uma duplicação do sítio-alvo de 5 pares de nucleotídeos.

Os elementos Ty1 possuem dois genes *TyA* e *TyB*, que são homólogos aos genes *gag* e *pol* de retrovírus. Estudos bioquímicos mostraram que o produto desses dois genes podem formar partículas semelhantes a um vírus dentro da célula de levedura. No entanto, essas partículas não são capazes de se transferir de uma célula para outra, não sendo, assim, infecciosas.

A Figura 19.7. ilustra o mecanismo de transposição do elemento Ty1.



**Figura 19.7:** Mecanismo de transposição do elemento Ty1. O DNA, correspondente ao elemento Ty1, localizado em algum lugar do genoma, transcreve um RNA. Esse RNA traduz uma transcriptase reversa, que converte o RNA em uma molécula de DNA dupla fita. Essa molécula de DNA dupla fita, pode então, ser inserida em um outro local do genoma, criando um novo elemento Ty1.

A transposição do elemento Ty1 envolve a transcrição reversa do DNA. Depois que o RNA é sintetizado a partir do DNA Ty1, uma transcriptase reversa codificada pelo gene *TyB* utiliza o RNA como molde para fazer um DNA dupla fita. O DNA é inserido em algum local do genoma criando um novo elemento Ty1.

## RETROPOSONS

Os retroposons ou retrotransposons sem LTR são uma classe grande e amplamente distribuída de retrotransposons, incluindo os elementos F, G e I de *Drosophila* e o LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*, do inglês elementos nucleares longos distribuídos) em mamíferos.

Esses elementos se movem através de uma molécula de RNA que é transcrita ao reverso para DNA, provavelmente por uma proteína codificada pelos próprios elementos. Apesar de criarem uma duplicação do sítio-alvo, eles não possuem repetições diretas ou invertidas nas suas extremidades. Em vez disso, eles possuem uma seqüência homogênea de bases A = T em uma extremidade. Essa seqüência é derivada de uma cauda poli A que é transcrita ao reverso e que é adicionada perto da extremidade 3' do RNA do retroposon durante a sua maturação.

## RETROPOSON HUMANO

O retroposon LINE1, conhecido como L1, é o único retroposon ativo no genoma humano. O primeiro evento de transposição do L1 foi descrito em 1988 em um gene ligado ao cromossomo X para o fator protéico VIII, um dos fatores de coagulação sanguínea. A mutação resultou em hemofilia. O elemento L1 inserido foi, aparentemente, produzido por transcrição reversa de um RNA produzido a partir de um elemento L1 presente no cromossomo 22.

Os elementos L1 apresentam tamanhos heterogêneos e a maioria contém uma extremidade 5' truncada, indicando a síntese incompleta do DNA por transcrição reversa a partir do RNA molde. Existem cerca de 50.000 a 100.000 cópias no genoma humano que correspondem a cerca de 5% do DNA. Elementos semelhantes são encontrados em genomas de outros mamíferos.

## RETROPOSONS ASSOCIADOS AO TELÔMERO EM *Drosophila*

Você já estudou na Aula 14, quando falamos sobre replicação de genomas lineares, sobre o desafio de replicar as extremidades dos mesmos. Se você achar melhor lembrar, dê uma olhadinha na Aula 14. Nessa mesma aula, nós vimos que a síntese dos telômeros nas extremidades dos cromossomos lineares é uma alternativa para evitar a possível perda de material genético durante a replicação. Você viu também que muitos organismos utilizam uma enzima chamada telomerase para sintetizar os telômeros.

A *Drosophila* utiliza um mecanismo diferente para evitar a perda das extremidades dos cromossomos. Na mosca, os telômeros são formados por dois transposons. Um deles é chamado HetA e o outro TART (*Telomere Associated Retrotransposon*, que significa retrotransposon associado ao telômero). Estudos demonstraram que esses dois transposons se inserem, preferencialmente, nas extremidades dos cromossomos, aumentando o seu tamanho em muitos kilobases (1 kilobase corresponde a 1.000 pares de bases, ou pares de nucleotídeos). Mesmo que uma parte desses elementos seja perdida durante a replicação, novos transposons são adicionados, garantindo, assim, a manutenção do cromossomo intacto.

### **IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA DOS TRANSPOSONS**

Os transposons pertencentes às diferentes classes, apresentados na aula anterior e nesta aula, estão espalhados em todos os genomas, de vírus até eucariotos superiores. Em alguns organismos, como a mosca de fruta *Drosophila*, a ocorrência de transposons chega a corresponder de 12 a 15% do DNA presente no genoma. Aos transposons, são atribuídas muitas das mutações que ocorrem nesses organismos.

Algumas regiões dos cromossomos apresentam um maior número de transposons. Em milho, por exemplo, os transposons concentram-se no DNA encontrado entre um gene e outro, e correspondem a mais da metade do genoma. Em *Drosophila*, os transposons estão concentrados na heterocromatina, mais especificamente próximo aos centrômeros. Um fato interessante é que a maioria dos transposons estudados sofreu muitas modificações ao longo do processo evolutivo, sendo, atualmente, praticamente imóveis. Isso significa que essas modificações ocorreram em locais essenciais para a ocorrência da transposição, que podem ser as extremidades, ou as regiões envolvidas com a síntese das enzimas envolvidas no processo de transferência.

A distribuição ampla dos transposons sugere que eles desempenharam um papel importante durante a evolução. A capacidade de se copiar, de se transpor e de rearranjar outras seqüências de DNA ou ainda de carregar genes de resistência a antibióticos, como vimos na aula anterior sobre os transposons compostos de bactérias, pode representar um benefício para os organismos que os carregam e uma vantagem adaptativa em situações adversas. Os transposons podem ser considerados ferramentas naturais de **ENGENHARIA GENÉTICA**, pois são capazes de introduzir novas características nos indivíduos, bem como modificar características já existentes.

### ENGENHARIA GENÉTICA

É um conjunto de técnicas que permite a manipulação do genoma dos organismos.

Utilizando-se ferramentas de Biologia Molecular, é possível retirar um segmento de DNA de um organismo responsável por uma determinada característica de interesse e introduzir esse segmento em um outro organismo.

Como resultado, temos a formação de organismos transgênicos. Um organismo transgênico pode ser um vírus, uma bactéria, uma levedura, uma planta e, ainda, um animal, o qual teve seu genoma modificado pela introdução de um gene retirado de um outro organismo.

### RESUMO

Nesta aula, você teve a oportunidade de conhecer um pouco mais sobre o trabalho de Barbara McClintock relacionado aos elementos de transposição Ac/Ds de milho. Você aprendeu que os elementos Ds são inativos, pois não são capazes de sintetizar a transposase. No entanto, se houver um elemento Ac no mesmo genoma que codifica para uma transposase ativa, o elemento Ds pode ser transposto de um local para outro. Nós vimos ainda que, em *Drosophila*, um tipo de transposon chamado elemento P é capaz de promover um grande número de modificações fenotípicas, chamado disgênese do híbrido, devido a sua inserção em diferentes locais no genoma. Por último, você teve a oportunidade de conhecer um tipo de transposon que se movimenta utilizando um mecanismo semelhante ao retrovírus de RNA e que requer a transcrição reversa de um RNA em uma molécula de DNA, para que o mesmo seja inserido no genoma. Esses transposons são encontrados em muitos organismos diferentes.

## EXERCÍCIOS

1. Como funciona o sistema de transposição Ac/Ds de milho?
2. Em que situação ocorre a ativação dos elementos P de *Drosophila*?
3. O que é um retrotransposon? Qual o mecanismo de transposição utilizado por esses transposons?
4. Qual o papel dos transposons no processo evolutivo?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu bem o conteúdo da aula de hoje, não deve ter tido dificuldades para responder aos exercícios. É importante que você tenha em mente que todos esses mecanismos, embora sejam complexos e exijam muitas informações para a sua compreensão, na essência, visam a elucidar a maneira pela qual os organismos foram se tornando mais complexos ao longo do processo evolutivo. Não se preocupe com os detalhes, o importante é que fique clara, para você, a mensagem que queremos transmitir. Nossa intenção não é que você decore todos os mecanismos, mas que tenha uma idéia geral de que existem muitos processos que contribuíram e contribuem para a complexidade e a variabilidade dos organismos. E muita coisa ainda está para ser descoberta. Nas próximas aulas, nós iniciaremos o estudo do fluxo da informação gênica, ou seja, como as informações contidas no DNA são decodificadas para dar origem à diversidade de características dos organismos. Até lá e bom estudo!

## Fluxo da informação gênica – transcrição em procariotos

AULA

# 20

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Entender o mecanismo de expressão das informações contidas no DNA através da transcrição.
- Estudar o mecanismo de transcrição em Procariotos.

### **Pré-requisitos**

Conceitos sobre a estrutura dos ácidos nucléicos.

Conceitos sobre o mecanismo de replicação do DNA.

## INTRODUÇÃO

Nas aulas dos Módulos 1 e 2, você aprendeu que as informações genéticas dos organismos vivos estão armazenadas nos ácidos nucleicos, que podem ser RNA para alguns vírus e DNA para a maioria dos organismos. Vimos, também, que o mecanismo de replicação permite a perpetuação e a transmissão das características para as células-filhas, mantendo, assim, a integridade das características herdáveis. Em contrapartida, você teve a oportunidade de conhecer alguns mecanismos que modificam as informações contidas no DNA tais como mutação, recombinação e transposição. Vimos, com isso, que o genoma dos organismos não é estático, ou seja, ele pode sofrer modificações e essas modificações podem acarretar mudanças fenotípicas.

Nesta aula, você iniciará os estudos sobre o mecanismo que garante o fluxo das informações contidas no DNA. Em outras palavras, como as informações se manifestam para produzir as características de um organismo.

Antigamente, os cientistas acreditavam que, em organismos multicelulares organizados em tecidos, órgãos e sistemas, cada célula especializada apresentava um conjunto de material genético diferente, responsável pela produção das características fenotípicas específicas de cada tipo celular. Posteriormente, foi demonstrado que todas as células de um organismo possuem o mesmo genoma.

Um fato que contribuiu bastante para a compreensão de que todas ou quase todas as células de um organismo possuem o mesmo material genético foi a cultura de células de cenoura *in vitro*. Curioso, não é mesmo? Vejamos como isso foi feito.

Antes de tudo, temos de entender como ocorre o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos em plantas. É importante lembrar que o desenvolvimento em plantas é bem mais simples do que em animais. Basicamente, o que determina a diferenciação das células em órgãos especializados, como folhas e raízes, é uma combinação de substâncias conhecidas como auxinas e citocininas, também chamadas fito-hormônios. Existem várias substâncias que compõem o grupo das auxinas, bem como das citocininas, que podem variar de uma espécie para outra. Para facilitar a compreensão, vamos nos referir a essas substâncias somente como auxinas e citocininas. Existe ainda um outro detalhe. Alguns pesquisadores não gostam do termo hormônios, pois seus mecanismos de síntese e ação são bem diferentes daqueles caracterizados para os hormônios animais. Esses dois grupos de fito-hormônios não são os únicos existentes em plantas, existem muitos outros que desempenham funções diferentes. Vocês estudarão essas substâncias, em detalhe, na disciplina Fisiologia Vegetal, um pouco mais adiante.

Pois bem, vamos ao que interessa para a compreensão do conteúdo desta aula. Durante o desenvolvimento da planta, as concentrações de auxinas e citocininas variam e, como resultado, ocorre a diferenciação dos tipos celulares que resultam na formação de órgãos especializados. Se um tecido diferenciado de cenoura, por exemplo, um pedaço de uma raiz, for colocado em um meio de cultura contendo nutrientes e uma auxina na concentração certa, as células da raiz sofrerão um processo de indiferenciação, pois ocorrerá um “desbalanço” no equilíbrio das concentrações de auxinas e citocininas que mantém a célula diferenciada, ou seja, elas perderão as características típicas das células da raiz. Essas células, quando mantidas em cultura por alguns dias, formarão uma massa de células chamada calo. Os calos são semelhantes a um pequeno tumor, onde as células se dividem com muita rapidez.

A primeira conclusão a que podemos chegar está relacionada ao efeito da auxina. De alguma forma, a sua presença desprogramou a célula diferenciada, transformando-a numa célula indiferenciada. Pois bem, se essa massa de células ou calo for transferida para um outro meio de cultura que não contenha a auxina, e mantida por alguns dias, as células indiferenciadas se diferenciam e formam tecidos e órgãos, como folhas e raízes. Agora, então, podemos concluir que as células da raiz, inicialmente colocadas em contato com a auxina e que se transformaram em uma massa de células indiferenciadas, possuíam todo o material genético necessário para produzir as características de uma planta inteira, pois, a partir do momento em que a auxina foi retirada, as células foram capazes de se diferenciar em outros tipos celulares.

A formação de uma planta inteira, a partir de células indiferenciadas mantidas em cultura, chama-se regeneração na linguagem dos pesquisadores que trabalham com cultura de tecidos vegetais. A capacidade de uma célula indiferenciada formar uma nova planta intacta recebe o nome totipotência. Em células animais, o processo recebe o nome pluripotência.

Interessante, você não achou? Com esse tipo de observação, pode-se afirmar que qualquer célula da cenoura, que é um organismo multicelular, possui um conjunto completo do seu genoma. Mais tarde, essa observação se estendeu para muitos outros organismos.

Podemos usar, ainda, um outro exemplo: a polêmica clonagem da ovelha Dolly, que foi clonada a partir de uma célula retirada da glândula mamária de uma outra ovelha. As células foram mantidas em cultura, na presença de substâncias capazes de desprogramar a expressão de características típicas das células da glândula mamária, para um tipo celular indiferenciado.

Após a inserção do núcleo dessa célula em um óvulo, o material genético contido no núcleo foi capaz de coordenar a formação de um novo indivíduo. E o que isso significa? A clonagem da Dolly só foi possível porque as células da glândula mamária, da ovelha doadora, continham todo o material genético necessário para o desenvolvimento de um indivíduo.

Partindo do princípio de que todas as células de um organismo possuem o mesmo material genético, o que as torna diferentes é a ativação ou inativação de algumas regiões do genoma, o que resulta na produção de características específicas. Em outras palavras, em células nas quais é necessária a produção de determinadas proteínas, responsáveis pela produção de características específicas que são codificadas por genes, tais genes são ativados. Já em outras células ou tecidos, a sua ativação não é necessária. Esse mecanismo recebe o nome de regulação da expressão gênica e você terá a oportunidade de entender como isso ocorre nas próximas aulas.

Veremos, mais adiante, de que maneira a informação contida no DNA é transferida para que, em seguida, ela possa ser interpretada ou traduzida na linguagem de proteínas.

## A DESCOBERTA DE UM RNA INTERMEDIÁRIO

Pois bem, experimentos feitos com fagos (vírus que infectam bactérias) demonstraram a existência de uma molécula intermediária que carrega a informação contida no DNA e que será, posteriormente, decodificada em proteínas.

Vejamos como isso foi descoberto. Os pesquisadores Elliot Volken e Lawrence Astrachan demonstraram, em 1956, que a síntese de proteínas virais, em uma bactéria hospedeira, envolvia a participação de moléculas de RNA codificadas pelo DNA viral. Eles observaram que após a infecção pelo fago T2, muitas moléculas de RNA eram sintetizadas. A marcação dos RNAs com o isótopo radioativo  $P^{32}$ , presente em um precursor do RNA, mostrou que as moléculas de RNA eram instáveis (com **MEIA-VIDA** de alguns poucos minutos). Além disso, a composição do RNA marcado mostrou-se semelhante ao DNA do fago e diferente do DNA da *Escherichia coli*.

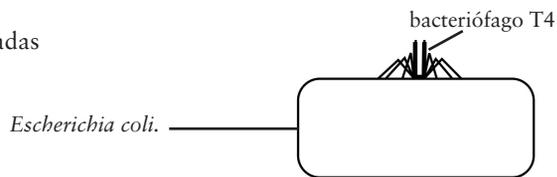
Mais tarde, em 1961, Sol Spiegelman e colaboradores demonstraram que os RNAs sintetizados em células de *Escherichia coli*, infectadas com o fago T4, formavam dúplex DNA/RNA com o DNA desnaturado do fago T4, mas não eram capazes de formar dúplex com o DNA desnaturado da bactéria.

### MEIA-VIDA

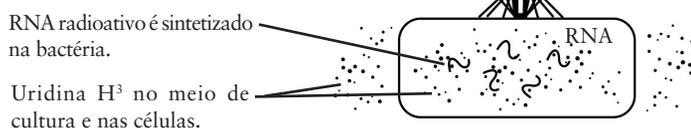
Em algumas áreas da Biologia, usamos o termo meia-vida para definir o tempo que as biomoléculas permanecem intactas, quer seja na célula (*in vivo*) ou em um tubo de ensaio (*in vitro*). A meia-vida é definida como sendo o tempo necessário para a degradação ou inativação de 50% das moléculas presentes no momento inicial da contagem.

Observe a **Figura 20.1** que descreve o experimento e acompanhe a explicação que se segue.

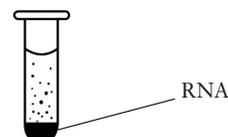
1. Células de *E. coli* infectadas com bacteriófago T4.



2. Uridina H<sup>3</sup> adicionada ao meio de cultura.

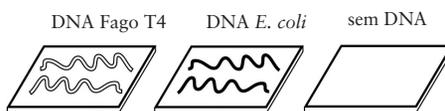


3. Células bacterianas foram rompidas e o RNA isolado.

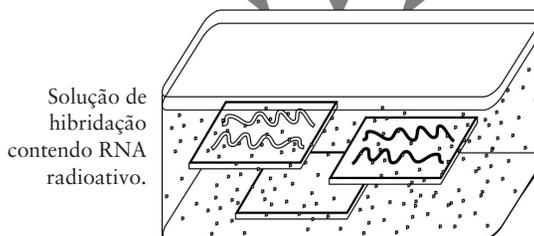


O DNA é desnaturado pelo calor

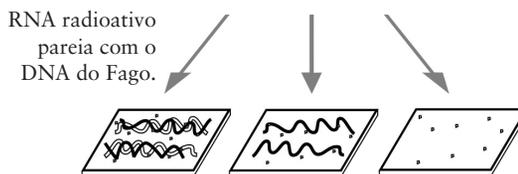
Membranas de nitrocelulose contendo:



4. Determinação do pareamento do RNA radioativo com DNA.



5. Incubar a 65°C durante 12 horas. Lavar os filtros para remover o excesso de radioatividade. Medir a radioatividade em cada membrana.



**Figura 20.1:** Experimento de Spiegelman utilizando *Escherichia coli* infectada com fago T4.

As células de *Escherichia coli* foram infectadas com o fago T4. Um isótopo de uridina, marcado com  $H^3$ , foi adicionado ao meio de cultura em tempos de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos após a infecção e mantidos por 1 minuto. A uridina marcada foi incorporada ao RNA, assim, os RNAs sintetizados pela bactéria estavam radioativos. Após a incubação, as células da bactéria foram lisadas e os RNAs foram isolados.

Três membranas de nitrocelulose foram preparadas conforme descreveremos a seguir. Uma membrana continha DNA fita simples (desnaturado) de *Escherichia coli*; outra membrana continha DNA fita simples (desnaturado) do fago T4 e uma terceira membrana, que não continha DNA, foi utilizada como controle negativo.

O RNA radioativo, previamente isolado, foi colocado em contato com as três membranas, para permitir a formação de dúplice DNA fita simples/RNA fita simples radioativo, nos locais onde existisse complementaridade dos nucleotídeos. Após retirar o excesso de RNA radioativo, foi medida a radioatividade presente nas três membranas que foi detectada somente na membrana que continha DNA do fago T4, como resultado da formação de dúplice DNA/RNA. O resultado comprovou que os RNAs radioativos, sintetizados nas células de *Escherichia coli*, foram produzidos a partir da utilização do DNA do fago como molde. Dessa forma, confirmou-se a existência de uma molécula intermediária entre o DNA, presente no genoma, e a proteína a ser produzida, e que essa molécula intermediária era um RNA.

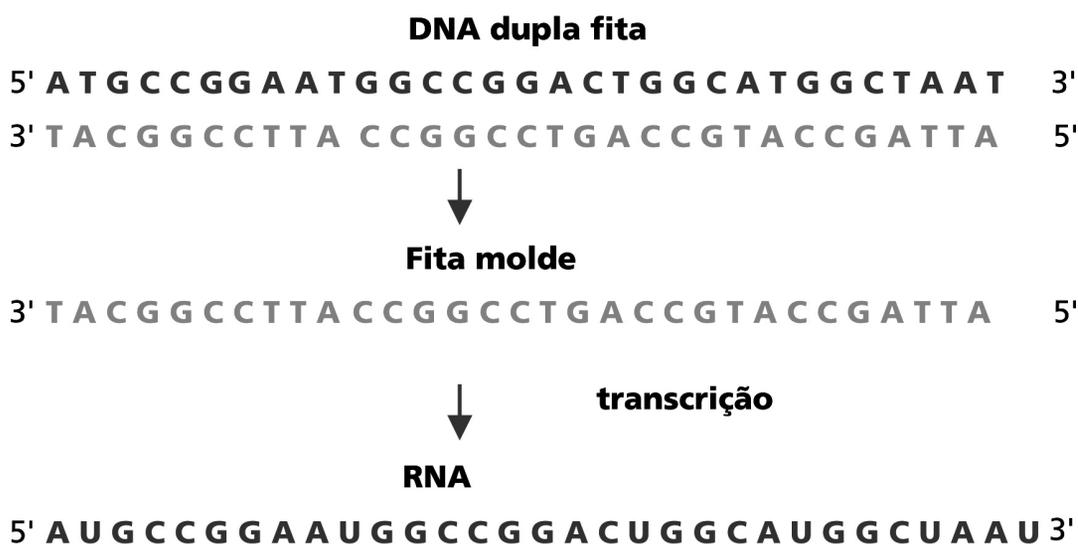
Em procariotos, a síntese do RNA intermediário e a síntese da proteína a partir dele pode ocorrer, simultaneamente, ou seja, à medida que um RNA é sintetizado, a síntese protéica pode ser iniciada nessa molécula. Já em eucariotos, a síntese do RNA intermediário ocorre no núcleo e a utilização desse RNA, como molde para a síntese protéica, ocorre no citoplasma. O RNA intermediário recebe o nome de RNA mensageiro, pois sua função é levar a informação contida no DNA para ser decodificada na forma de um polipeptídeo.

### **PRODUÇÃO DE UM RNA A PARTIR DE UM DNA MOLDE: TRANSCRIÇÃO DO DNA**

O mecanismo de produção de um RNA, a partir de um molde de DNA, chama-se transcrição. A transcrição é um mecanismo semelhante à replicação do DNA, com algumas diferenças. Dentre elas, podemos destacar: os precursores são ribonucleosídeos trifosfato; somente uma

das fitas do DNA é utilizada como molde; não existe a necessidade de um iniciador para a incorporação do primeiro nucleotídeo e o primeiro nucleotídeo é incorporado na forma de trifosfato. Os demais nucleotídeos são incorporados na forma de monofosfato.

A transcrição, da mesma forma que a replicação, ocorre na orientação 5' - 3'. Assim, a molécula produzida será complementar à fita molde, e será idêntica, exceto para a presença de Uridina no lugar da Timina, à fita complementar que não é utilizada como molde. Note que, para que a síntese ocorra na orientação 5' - 3', a fita molde deverá ser a fita 3' - 5'. Observe o exemplo ilustrado na Figura 20.2.



**Figura 20.2:** Transcrição de um segmento de DNA dupla fita. A fita 3' - 5' é utilizada como molde. O RNA produzido é idêntico (exceto para U no lugar de T) à fita 5' - 3' do DNA dupla fita.

Se esse RNA for um RNA mensageiro, ele será utilizado para decodificar uma seqüência de aminoácidos. A maneira como isso ocorre, você aprenderá nas próximas aulas, nas quais estudaremos o mecanismo de tradução. Existem, ainda, outros RNAs que são muito importantes, mas não codificam proteínas. Logo mais, falaremos sobre eles.

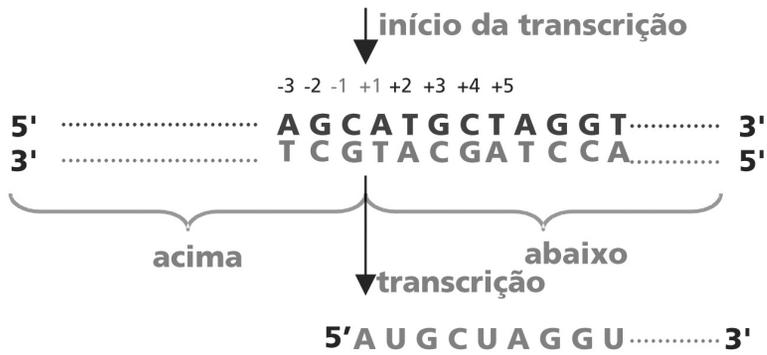
Agora, discutiremos o mecanismo de transcrição do DNA em procaríotos. Na próxima aula, estudaremos o mecanismo de transcrição em eucariotos.

## TRANSCRIÇÃO EM PROCARIOTOS

Um segmento do DNA que será transcrito para produzir uma molécula de RNA é chamado unidade transcricional. Conforme comentamos anteriormente, existem diferentes tipos de RNA. Em procariotos, foram descritos três tipos: o RNA mensageiro, cuja função é levar a informação armazenada no DNA para ser decodificada em proteína; o RNA transportador, responsável pelo transporte de aminoácidos ativados até os ribossomos, o que possibilita a síntese protéica e, por último, o RNA ribossomal, componente dos ribossomos, estrutura na qual ocorre a síntese protéica. Em procariotos, uma única enzima sintetiza todos os RNAs citados. Mais adiante, falaremos sobre ela.

Você já deve ter notado que, em Biologia Molecular, existem muitos símbolos, letras e números. Mas é preciso que você se esforce para se familiarizar com eles. Você está prestes a conhecer mais alguns!

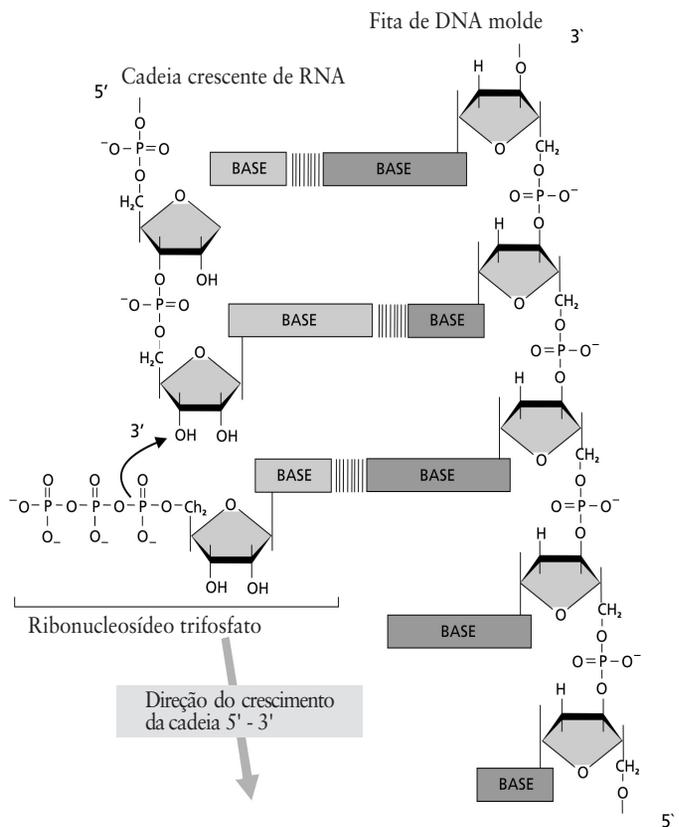
Para facilitar a localização dos elementos que formam uma unidade transcricional, utilizamos alguns termos e números. O primeiro nucleotídeo transcrito recebe o sinal positivo (+), seguido pelo número 1 (+1). Os nucleotídeos seguintes serão numerados +2 +3 +4 +n, onde n é o último nucleotídeo transcrito em uma determinada unidade transcricional. O nucleotídeo localizado antes do nucleotídeo +1 recebe o sinal negativo (-) seguido pelo número 1 (-1), os nucleotídeos seguintes serão -2 -3 -4 -n. Os nucleotídeos com a denotação (-) estão posicionados 5' com relação ao nucleotídeo +1. Em inglês, utiliza-se o termo *upstream*, cuja tradução é “rio acima”. Os nucleotídeos com a denotação (+) estão posicionados 3' com relação ao nucleotídeo +1. Em inglês, utiliza-se o termo *downstream*, cuja tradução é “rio abaixo”. Esses dois termos soam bastante esquisitos, você não acha? Então, nas nossas aulas, vamos utilizar os termos “acima”, quando se tratar de nucleotídeos localizados na posição 5' com relação ao nucleotídeo +1 e “abaixo”, quando se tratar de nucleotídeos localizados 3' com relação ao nucleotídeo +1. Observe a **Figura 20.3** para que você possa se situar.



**Figura 20.3:** Representação de um segmento de DNA, ou unidade transcrional, e o RNA transcrito a partir dele. Os nucleotídeos +1 e -1 estão destacados. A transcrição é iniciada no nucleotídeo +1. As linhas pontilhadas indicam que o DNA possui outros nucleotídeos, além dos indicados. As orientações 5' - 3' e 3'-5' das moléculas também estão indicadas.

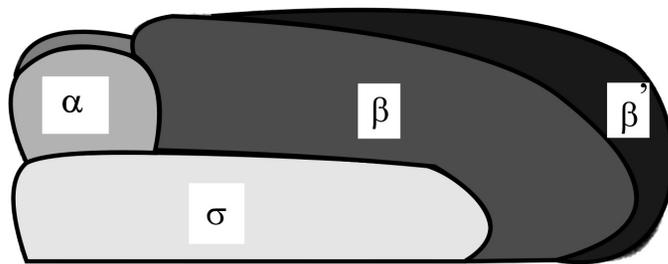
### A RNA POLIMERASE DE *ESCHERICHIA COLI*

A enzima que catalisa a transcrição do RNA é a RNA polimerase. Você já teve a oportunidade de conhecer um tipo especial de RNA polimerase, chamada primase, responsável pela síntese dos iniciadores de RNA durante a replicação. Da mesma forma que a DNA polimerase, essa enzima incorpora ribonucleotídeos ao grupamento hidroxila 3' livre. A reação envolve um ataque nucleofílico do grupamento OH sobre o átomo defósforo do ribonucleosídeo trifosfato, resultando em uma ligação fosfodiéster com a liberação de um pirofosfato. A **Figura 20.4** ilustra a reação catalisada pela RNA polimerase.



**Figura 20.4:** Reação de polimerização catalisada pela RNA polimerase. Os precursores são ribonucleosídeos trifosfato e a reação ocorre através de um ataque nucleofílico do OH sobre o fosfato presente no ribonucleotídeo, formando uma ligação fosfodiéster.

A RNA polimerase é uma **proteína multimérica** complexa que inicia a transcrição após a sua ligação a seqüências específicas de nucleotídeos, presentes em locais do DNA chamados promotores, ou regiões promotoras. A RNA polimerase de *Escherichia coli*, conhecida como holoenzima RNA pol, possui uma massa molecular de 480 kDa, e é formada por cinco polipeptídeos, sendo que dois deles são idênticos. A holoenzima é formada por 2 subunidades  $\alpha$ , 1 subunidade  $\beta$ , uma subunidade  $\beta'$  e uma subunidade  $\sigma$ . As subunidades  $\alpha$  estão envolvidas no acoplamento do complexo. A subunidade  $\beta$  contém um sítio de ligação ao ribonucleosídeo trifosfato, e a subunidade  $\beta'$  contém uma região de ligação ao molde de DNA. As subunidades  $\beta$  e  $\beta'$  catalisam a reação de polimerização. A Figura 20.5 apresenta a estrutura da holoenzima RNA pol.



**Figura 20.5:** Representação esquemática da holoenzima RNA pol, com suas diferentes subunidades. Duas subunidades  $\alpha$ , uma subunidade  $\beta$ , uma subunidade  $\beta'$  e uma subunidade  $\sigma$ . O esquema representa o modelo de acoplamento do complexo.

**PROTEÍNA MULTIMÉRICAS**

Proteína formada por várias subunidades, cada subunidade corresponde a um monômero. As subunidades de uma proteína multimérica podem ser iguais ou diferentes. Elas podem ser diméricas, quando possuem duas subunidades, triméricas, quando possuem três subunidades, e assim respectivamente. A holoenzima RNA pol é multimérica, pois possui várias subunidades.

A subunidade  $\sigma$  está envolvida com a iniciação da transcrição. O fator  $\sigma$  é liberado logo após o início da transcrição, sendo que o alongamento é catalisado pelo restante da enzima, chamado núcleo catalítico. O núcleo catalítico é formado por duas subunidades  $\alpha$ , uma subunidade  $\beta$  e uma subunidade  $\beta'$ . O fator  $\sigma$  reconhece o promotor e possibilita a ligação da holoenzima RNA pol. Experimentos realizados *in vitro* demonstraram que, na ausência do fator  $\sigma$ , a transcrição pôde ser iniciada em qualquer ponto, no entanto, quando o fator  $\sigma$  estava presente, a transcrição só ocorria a partir do promotor.

A transcrição envolve três etapas: iniciação, alongamento e terminação, semelhante ao que vimos para o mecanismo de replicação. Em seguida, você verá o que ocorre em cada uma das etapas.

## INÍCIO DA TRANSCRIÇÃO

O início da transcrição envolve três etapas: ligação da RNA pol ao promotor; abertura do DNA molde e formação das ligações fosfodiéster entre os primeiros nucleotídeos.

Antes de analisarmos o que ocorre no início da transcrição, precisamos entender o que é um promotor. O promotor é uma região do DNA localizada acima do início da transcrição (5' em relação ao nucleotídeo +1). Essa região apresenta seqüências específicas de nucleotídeos às quais se ligam proteínas envolvidas na transcrição. Vamos fazer uma comparação para você nunca mais esquecer!

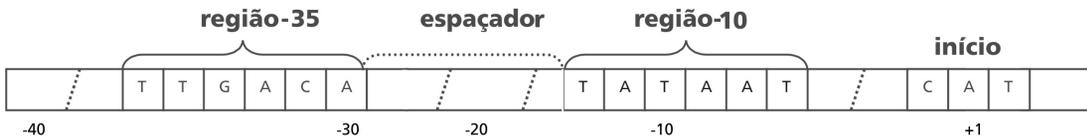
Um gene pode ser comparado ao motor de um carro. Para que o motor funcione e movimente o carro, a ignição é necessária para desencadear a queima do combustível, que por sua vez fará o motor funcionar. Pois bem, o promotor de um gene pode ser comparado à ignição, pois, sem ele, o gene não funciona. Geralmente, a menos que se faça uma ligação direta, a ignição é acionada após o encaixe da chave e o giro da mesma, quando é dada a partida no motor. As proteínas que se ligam ao promotor de um gene podem ser comparadas à chave. Normalmente, a chave de um carro só irá se encaixar a uma única caixa de ignição. De modo semelhante, a proteína só se encaixará em um promotor específico, que permitirá o funcionamento do gene através da ativação da transcrição.

As proteínas que se ligam a promotores são chamadas fatores de transcrição. Alguns genes possuem vários fatores de transcrição que o regulam, ou seja, diferentes proteínas podem se ligar a seqüências específicas, localizadas no promotor, e afetar a transcrição. Isso vale para procariotos e eucariotos. Nas aulas sobre regulação da expressão gênica, você verá que alguns fatores atuam positivamente na transcrição e, com isso, aumentam as quantidades de RNA produzidas. Outros atuam negativamente na transcrição e, com isso, diminuem as quantidades de RNA produzidas. Alguns genes apresentam somente as seqüências para a ligação da RNA pol, que também pode ser considerada um fator de transcrição. Mas isso é um assunto para mais tarde. Antes, porém, veremos os elementos mínimos necessários para o funcionamento de uma unidade transcricional em procariotos, ou seja, somente aqueles envolvidos com o acoplamento da RNA pol.

Vamos a eles! A comparação entre os promotores de vários genes revelou poucas semelhanças entre eles. Essa comparação foi feita através do alinhamento das seqüências localizadas acima do nucleotídeo onde ocorre o início da transcrição (nucleotídeo +1) em genes conhecidos. Geralmente, a seqüência de nucleotídeos do RNA é comparada à seqüência do DNA molde que originou aquele RNA, com o intuito de distinguir as regiões transcritas e as regiões promotoras.

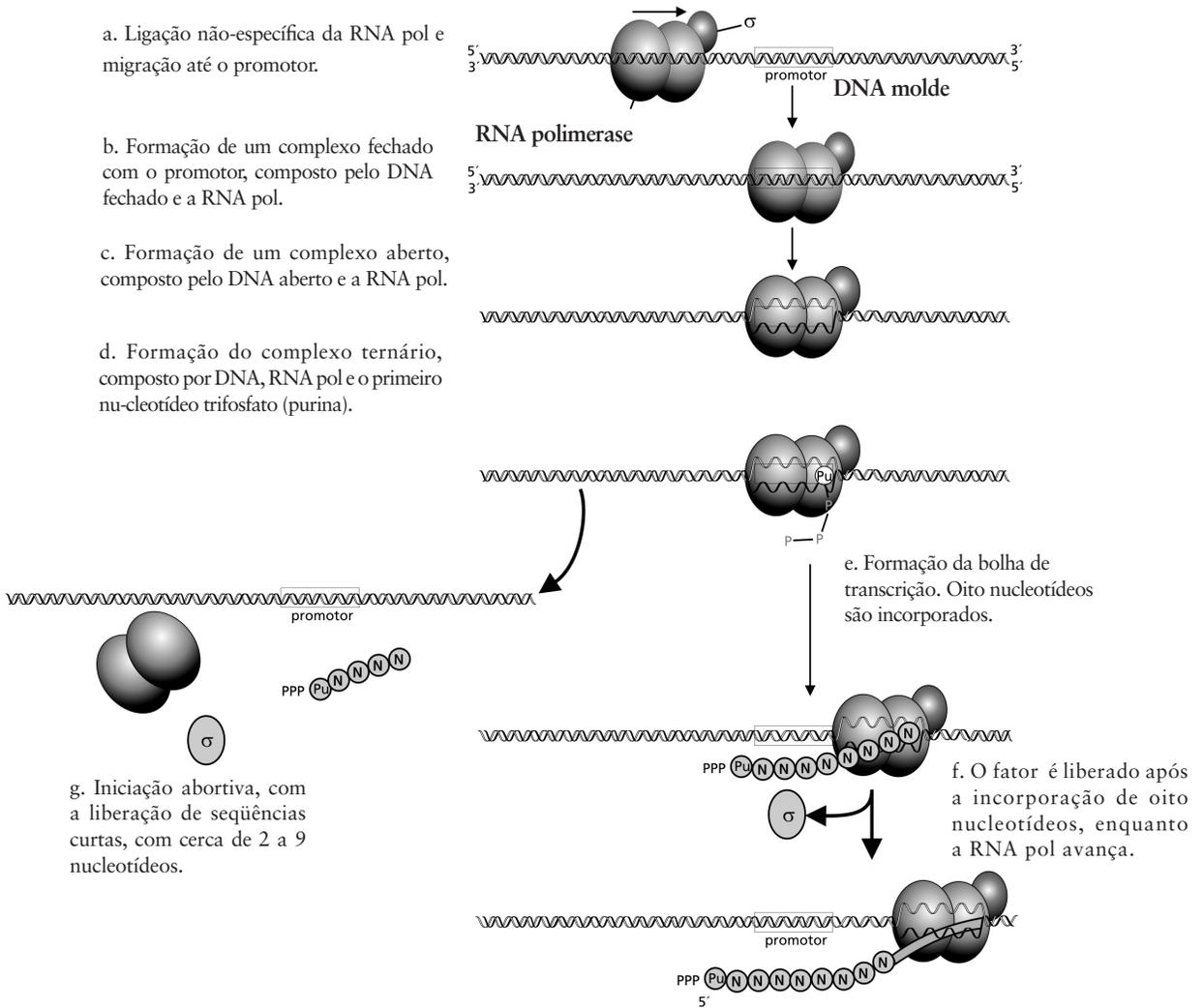
Desse modo, duas seqüências curtas foram identificadas em promotores de genes diferentes. Elas estão localizadas nas posições 10 e 35 acima do nucleotídeo +1, sendo, por isso, chamadas seqüências -10 e -35. Alguns nucleotídeos presentes nas seqüências variam de gene para gene, enquanto outros são conservados. Quando uma determinada seqüência ocorre em diferentes genes, ou regiões do DNA, e desempenha função semelhante, ela é chamada seqüência consenso. O consenso para a seqüência -10 é 5' TATAAT 3' e para a seqüência -35 é 5' TTGACA 3'. A distância entre as duas seqüências, chamada espaçador, é importante para o acoplamento da RNA pol. O espaçador nunca é menor do que 15 pares de bases ou maior do que 20 pares de bases.

O papel dessas seqüências no processo de transcrição foi determinado através de estudos com um velho conhecido nosso: os mutantes. Nesse caso, a utilização de mutantes foi crucial para mapear os nucleotídeos necessários para o funcionamento do promotor. Em mutantes que apresentaram alterações em alguns nucleotídeos dessas seqüências, houve uma diminuição na eficiência da transcrição. Em alguns casos, a transcrição foi completamente inibida. A **Figura 20.6** apresenta um esquema do arranjo das seqüências -10 e -35.



**Figura 20.6:** Representação esquemática das seqüências consenso -10 e -35 em uma região promotora. Os nucleotídeos de cada seqüência, bem como as suas posições, estão indicados. As barras pontilhadas indicam a existência de outros nucleotídeos que não estão representados. Os nucleotídeos presentes no espaçador não influenciam a transcrição, mas o tamanho do espaçador determinado pelo número de nucleotídeos é essencial para a transcrição. O nucleotídeo +1, no qual ocorre o início da transcrição, também está representado.

A **Figura 20.7** ilustra os primeiros eventos que ocorrem durante o início da transcrição de um RNA mensageiro. Observe a figura e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 20.7:** Início da transcrição: (a) a RNA pol se liga inespecificamente ao DNA; (b) a subunidade  $\sigma$  localiza o promotor, ocorre a formação do complexo fechado; (c) a RNA pol promove a abertura das fitas e estabelece a formação de um complexo aberto; (d) Adição da purina contendo três fosfatos, formação do complexo ternário; (e) síntese dos primeiros nucleotídeos, formação da bolha de transcrição; (f) liberação do fator  $\sigma$  e alongamento do transcrito pela RNA pol; (g) representação da iniciação abortiva, na qual uma seqüência curta de RNA é liberada.

A RNA pol se liga inespecificamente ao DNA. A subunidade  $\sigma$  é responsável pelo reconhecimento do promotor. A holoenzima desliza no DNA até que a subunidade  $\sigma$  encontre a sequência -35 do promotor. Nesse ponto, ocorre a formação de um complexo entre a RNA pol e o promotor, chamado complexo fechado, uma vez que o DNA do promotor permanece dupla fita.

A RNA pol promove a abertura das fitas na sequência localizada na posição -10, formando o complexo aberto, constituído pelas duas fitas de DNA e a holoenzima. A presença de vários A = T na sequência facilita a abertura das fitas. O primeiro nucleotídeo é incorporado e forma o complexo ternário, composto pelo DNA molde aberto, a holoenzima e o nucleotídeo de RNA recém-sintetizado. A holoenzima ligada ao promotor durante a síntese dos primeiros nucleotídeos forma uma estrutura chamada bolha de transcrição.

Muitas vezes, o núcleo catalítico da RNA pol sintetiza cadeias curtas, contendo dois a oito nucleotídeos. Tais cadeias são liberadas em seguida, desfazendo o complexo de iniciação. Esse processo é chamado síntese abortiva. Em seguida, ocorre novamente o acoplamento do complexo. Quando a RNA pol sintetiza uma cadeia com 10 ou mais nucleotídeos, o complexo se estabiliza e a cadeia é alongada. A função da síntese abortiva é desconhecida. Todavia, acredita-se que funcione como um mecanismo de certificação, que garante que a transcrição ocorrerá no local certo. Após a síntese de oito a nove nucleotídeos, o fator  $\sigma$  é liberado. A partir daí, ocorre o alongamento da transcrição.

## ALONGAMENTO DA TRANSCRIÇÃO

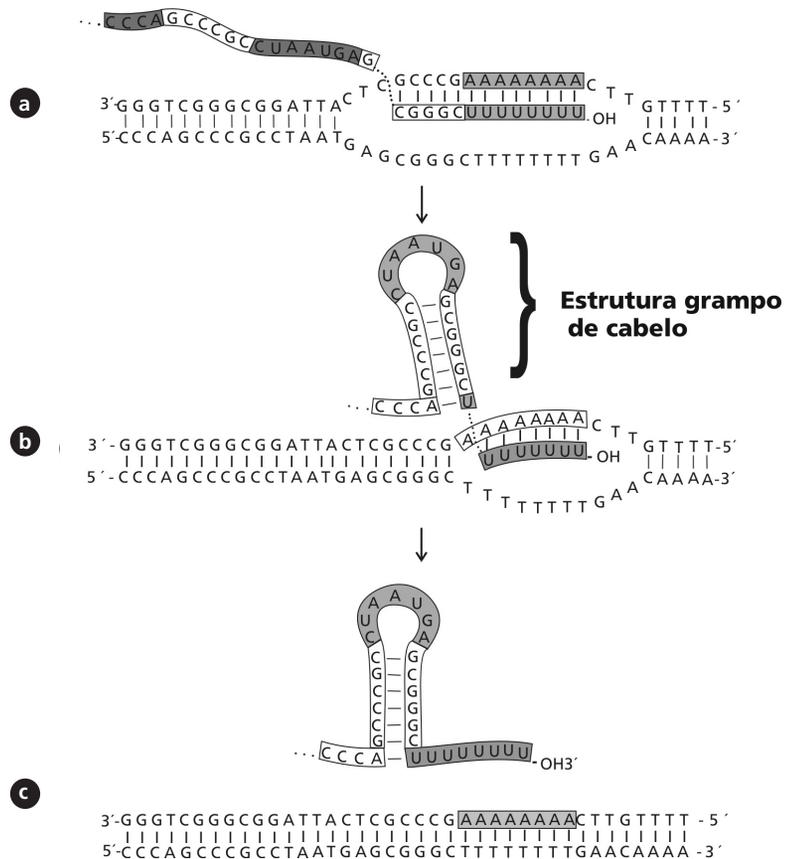
O desligamento do fator  $\sigma$  faz com que a RNA pol sintetize o RNA muito rapidamente. Pode-se dizer que o fator  $\sigma$  funciona como um freio no início da transcrição, que impede o rápido avanço da RNA pol. Possivelmente, isso funciona como um outro mecanismo de certificação, garantindo a transcrição do segmento correto do DNA. A RNA pol é capaz de desenrolar o DNA molde e romper as pontes de hidrogênio, abrindo as fitas e, também, é capaz de restaurar o pareamento das bases do DNA, logo em seguida.

A bolha de transcrição possui cerca de 18 nucleotídeos abertos e cerca de 40 nucleotídeos são incorporados por segundo. Conforme a bolha caminha, a cadeia de RNA nascente é deslocada do DNA molde, e o pareamento das fitas do DNA pode ser restaurado. A região de pareamento entre o DNA e o RNA é pequena, cerca de 3 pares de bases. Esse pareamento não é suficiente para estabilizar o complexo. Assim, a estabilidade do complexo é mantida através da ligação do DNA e da cadeia recém-sintetizada de RNA a RNA pol. Podemos concluir, então, que o alongamento consiste na incorporação dos nucleotídeos na cadeia nascente de RNA. A síntese terminará quando o complexo atingir a região terminadora, que veremos em seguida.

### TÉRMINO DA TRANSCRIÇÃO

O término da transcrição ocorre quando a RNA pol passa através do sinal de terminação. O sinal de terminação é uma propriedade intrínseca do DNA molde que propicia a formação de uma estrutura que, por sua vez, favorece o rompimento do complexo RNA pol/DNA/RNA. Dois tipos de terminadores foram descritos em *Escherichia coli*. Um deles precisa de uma proteína específica chamada rho ( $\rho$ ) e, por isso, recebe o nome terminação dependente de  $\rho$ . O outro é conhecido como terminação independente de  $\rho$ .

A terminação independente de  $\rho$  apresenta uma porção no DNA molde, rica em  $G \equiv C$ , seguida de uma região composta de seis ou mais pares de bases  $A = T$ . A transcrição da região rica em  $G \equiv C$  resulta em uma molécula de RNA fita simples que possui regiões complementares. Essas regiões podem se parear, formando uma estrutura do tipo grampo de cabelo. A formação da estrutura está esquematizada na **Figura 20.8**. A estrutura de grampo de cabelo é formada logo após a transcrição dessa região. A presença da estrutura de grampo interfere no movimento da RNA pol e causa uma pausa na síntese do RNA. A transcrição da seqüência composta por pares  $A = T$  produz um segmento de RNA formado por Us, que estão parcialmente pareados aos As. O pareamento  $A = U$  pode ser rompido com facilidade. Lembre-se de que A forma duas pontes de hidrogênio com T ou U. A presença da estrutura grampo de cabelo facilita o deslocamento da região rica em Us. Como resultado, o RNA é liberado e termina a transcrição.



**Figura 20.8:** Representação esquemática da terminação independente de  $\rho$ : (a) a região rica em  $G \equiv C$  é transcrita; (b) ocorre a formação da estrutura grampo de cabelo, seguida pela região que apresenta os pareamentos  $A = U$ ; observe a complementariedade dos nucleotídeos; (c) as pontes de hidrogênio da região pareada  $A = U$  são rompidas e o RNA é liberado do DNA molde, desfazendo o complexo.

As terminações dependentes de  $\rho$  não possuem a seqüência rica em  $A = T$  na fita molde, mas, às vezes, possuem, uma seqüência curta que é transcrita e forma um grampo. A proteína  $\rho$  se liga ao RNA em sítios de ligação específicos e migra na direção  $5' - 3'$  até alcançar o complexo de transcrição, formado pela RNA pol, que está sintetizando o RNA na região do sítio de terminação. Devido às características da região terminadora, ocorre uma pausa na transcrição. Em função desta pausa, a proteína  $\rho$  se aproxima da bolha de transcrição e promove a liberação do RNA recém-sintetizado. O mecanismo de ação da proteína  $\rho$  não é bem conhecido, mas sabe-se que ela possui atividade de helicase DNA/RNA dependente de ATP. O ATP é hidrolisado pela proteína  $\rho$  durante o processo de terminação. É provável que a atividade de helicase rompa as pontes de hidrogênio no híbrido DNA/RNA, facilitando, assim, a liberação do transcrito.

**RESUMO**

Nesta aula, vimos de que maneira a informação genética contida no DNA é utilizada para produzir as características de um indivíduo e que, apesar de todas ou quase todas as células de um organismo possuírem o mesmo DNA, somente regiões específicas são ativadas para produzir suas características. Vimos, também, os experimentos que comprovaram a existência de uma molécula de RNA como intermediária entre o DNA molde que armazena a informação e as proteínas que manifestam as características. Mais adiante, pudemos constatar que a transcrição do DNA, que é o mecanismo pelo qual o RNA é produzido, é semelhante à replicação do DNA em alguns aspectos e diferente em outros. As diferentes subunidades da holoenzima RNA polimerase de procariotos, a enzima responsável pela transcrição dos diferentes tipos de RNA, foram descritas, bem como as suas respectivas funções. Por último, vimos que a transcrição em procariotos ocorre nas etapas de iniciação, alongamento e terminação, e que cada uma dessas etapas é determinada pelas características presentes no DNA utilizado com molde. A região promotora, ou promotor, onde são encontradas seqüências específicas, define o local em que a transcrição deve ser iniciada, e é reconhecida pela subunidade  $\sigma$  da RNA pol. Já a região terminadora possui seqüências que, após a transcrição, permitem a formação de estruturas no RNA que facilitam o deslocamento do complexo e o término da síntese.

**EXERCÍCIOS**

1. Trace um paralelo entre o mecanismo de replicação e transcrição, destacando as semelhanças e diferenças entre os dois mecanismos.
2. O que é um promotor? De que maneira ele pode ser identificado?
3. Quais são os componentes da RNA polimerase de procariotos, e qual a função de cada um deles?
4. Qual a importância da terminação da transcrição?

## **AUTO-AVALIAÇÃO**

Se você compreendeu o conteúdo desta aula, não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios propostos. Procure responder aos exercícios, sempre com suas palavras, interpretando o conteúdo apresentado. Recomendamos que as respostas sejam enriquecidas com esquemas, com base na sua interpretação do que foi apresentado. Isso, certamente, o ajudará na fixação dos conceitos. Na próxima aula, estudaremos o mecanismo de transcrição em eucariotos. Por isso, é importante que você estude esta aula com carinho e responda aos exercícios. Bom estudo e até a próxima aula!

## Fluxo da informação gênica – transcrição em eucariotos

AULA

# 21

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Estudar o mecanismo de transcrição em eucariotos.
- Entender a formação do RNA mensageiro em eucariotos.

### **Pré-requisito**

Conteúdo da Aula 20.

## INTRODUÇÃO

Na aula anterior, vimos o mecanismo de transcrição em procariotos e, nesta aula, veremos como ocorre a transcrição em eucariotos. O processo de transcrição em eucariotos, embora semelhante ao de procariotos, apresenta uma complexidade maior. Você já sabe que uma das principais diferenças entre uma célula eucariótica e uma célula procariótica é a presença da carioteca, ou membrana nuclear, nos eucariotos, a qual separa os componentes do núcleo dos demais componentes do citosol. Assim, em eucariotos, quando uma unidade transcricional é ativada para produzir um RNA mensageiro, esse RNA deverá ser transportado para o citosol, que é o local onde ocorrerá a tradução do mRNA (síntese protéica). O mesmo ocorre com os RNAs transportadores que também devem ser transportados para o citosol, pois é lá que eles desempenharão suas funções na síntese protéica. Somente um tipo de RNA, chamado snRNA, é mantido no núcleo. Nós falaremos sobre a função dos snRNAs na Aula 22.

Muitos genes possuem regiões intercalares que não são traduzidas em proteínas e, portanto, são retiradas do transcrito primário para formar um RNA mensageiro maduro. Além disso, o RNA sofre outras duas modificações: a adição da cauda poliA na sua extremidade 3' e a adição de um capacete na sua extremidade 5'. Existe, ainda, a edição do RNA que consiste na alteração da composição dos nucleotídeos após a transcrição.

Você terá a oportunidade de conhecer todos esses processos em detalhe. Mas antes, veremos como ocorre a síntese dos RNAs. Vamos começar falando sobre as RNA polimerases.

## AS RNA POLIMERASES DE EUCARIOTOS

Três RNA polimerases foram descritas em eucariotos: RNA pol I, RNA pol II e RNA pol III, formadas por dez ou mais subunidades. As RNA pol não são capazes de se ligar sozinhas ao DNA e, por isso, necessitam da ajuda de outros fatores de transcrição para que ocorra o início da transcrição. Você já sabe que esses fatores são aquelas proteínas que se ligam ao promotor do gene e auxiliam na transcrição, não é mesmo? Vimos isso na Aula 20. Se estiver em dúvida, volte a ela e confira!

Vejamos qual a função de cada uma das RNA polimerases. A RNA pol I é geralmente encontrada no nucléolo, uma região especial do núcleo, na qual o RNA ribossomal, chamado rRNA, é transcrito e combinado a proteínas ribossomais. A RNA pol I sintetiza todos os rRNA, exceto o rRNA 5S. A RNA pol II transcreve genes nucleares que codificam proteínas, produzindo RNAs mensageiros, mRNA. A RNA pol III sintetiza as moléculas de RNA transportador, tRNA, o rRNA 5S e os pequenos RNAs nucleares, snRNA (do inglês *small nuclear RNA*).

## INÍCIO DA SÍNTESE DAS CADEIAS DE RNA

Como já dissemos anteriormente, as RNA polimerases de eucariotos precisam de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição reconhecem o promotor e se ligam a ele, formando um complexo de iniciação, que por sua vez, possibilita a ligação da RNA pol.

As RNA pol I, II e III reconhecem complexos de iniciação diferentes, formados por fatores de transcrição e promotores específicos. Em outras palavras, a RNA pol I, por exemplo, não se ligará a um complexo de iniciação, formado pelo acoplamento de fatores de transcrição específicos a um promotor para a RNA pol II.

Nesta aula, daremos prioridade ao mecanismo de transcrição mediado pela RNA pol II, ou seja, a transcrição de RNAs mensageiros que serão traduzidos em proteínas.

A RNA pol II é formada por 12 subunidades. Os fatores de transcrição que permitem o acoplamento da RNA pol II ao promotor são representados por TFIIx, do inglês *Transcription Factor for polimerase II*, que significa fator de transcrição para a polimerase II, e o x indica cada um dos fatores, por exemplo, TFIIA, TFIIH, entre outros. A Tabela 21.1 apresenta os diferentes fatores de transcrição e as suas funções. A RNA pol também é um fator de transcrição, pois também se liga ao DNA!

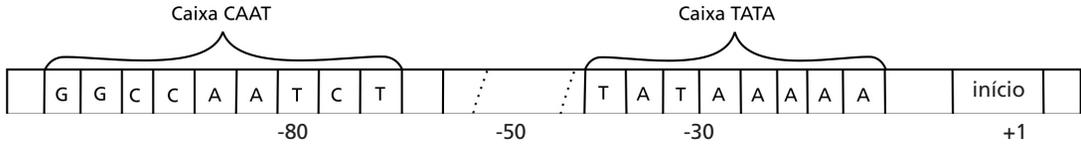
**Tabela 21.1:** Fatores de transcrição necessários para o funcionamento da RNA polimerase II e transcrição dos RNAm em eucariotos. O número de subunidades, a massa e a função de cada fator estão apresentados.

Fator de transcrição	Subunidades	Massa (kDa)	Funções
RNA pol II	12	10 – 220	Catalisa a síntese do RNA.
TBP	1	38	Reconhece especificamente a seqüência TATA.
TFIIA	3	12, 19 e 35.	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor.
TFIIB	1	35	Liga-se ao TBP, liga o TFIIF da RNA polimerase.
TFIID	12	15 – 250	Interage com proteínas reguladoras positivas e negativas.
TFIIE	2	34 e 57	Liga TFIIH; apresenta atividade de ATPase e helicase.
TFIIF	2	30 e 74	Liga RNA pol II, liga TFIIB; impede que a RNA pol II se ligue ao DNA de modo inespecífico.
TFIIH	12	35 – 89	Desenrola o promotor do DNA; fosforila a RNA pol II.

A transcrição em eucariotos pode ser dividida em várias etapas: acoplamento do complexo de iniciação, iniciação, alongamento e terminação. Vamos analisar cada uma das etapas, mas antes de tudo, vamos entender os elementos que compõem os promotores para a RNA pol II.

## PROMOTORES DE EUCARIOTOS

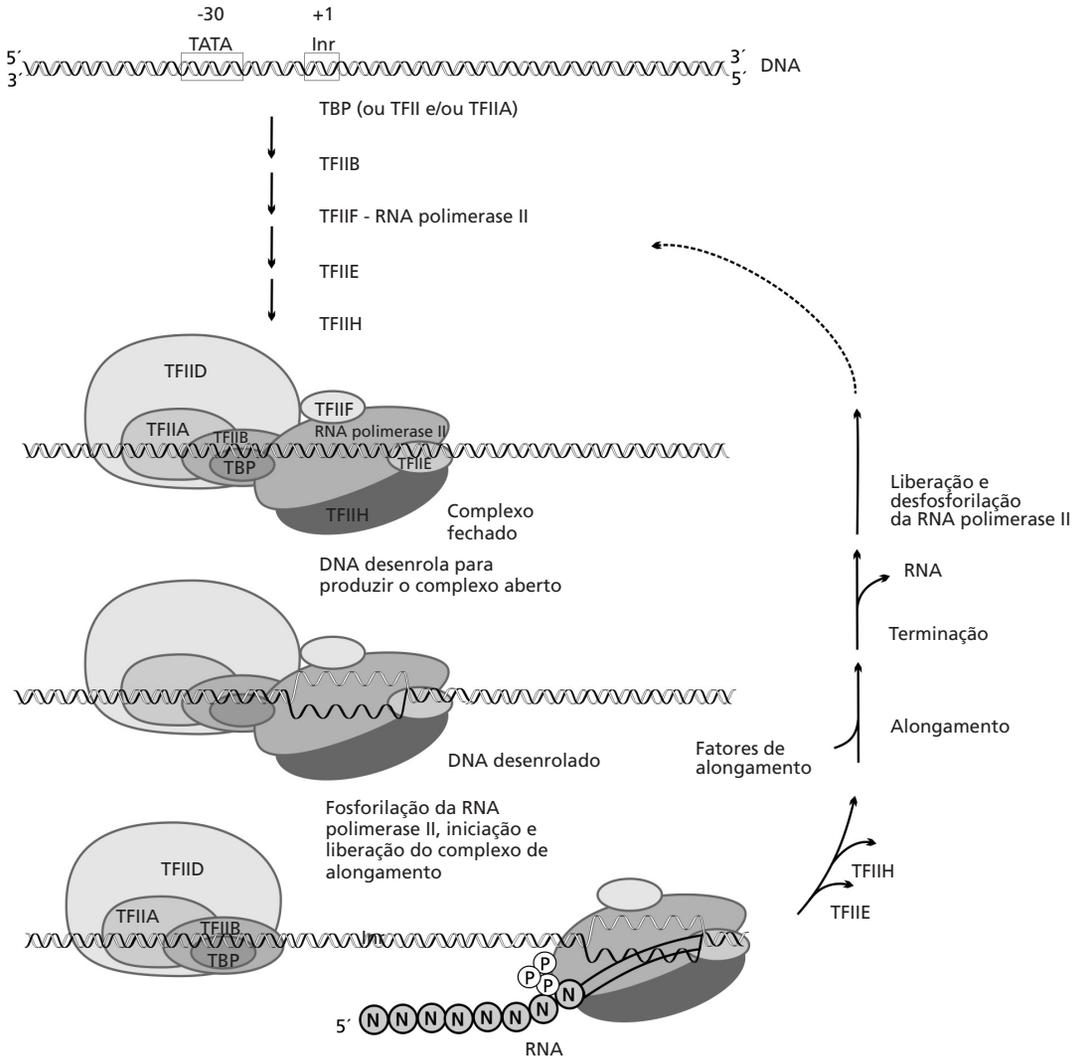
Semelhante ao que vimos para os promotores de procariotos, os promotores reconhecidos pela RNA pol II são formados por pequenas regiões conservadas, localizadas acima do nucleotídeo +1. Uma das regiões, conhecida como caixa TATA, apresenta a seqüência consenso 5'TATAAAA3' e está localizada na posição -30. A caixa TATA determina o local no qual ocorrerá a iniciação da transcrição, fundamental para a mesma. Uma outra região, chamada caixa CAAT, está localizada perto da posição -80 e apresenta a seqüência consenso 5'GGCCAATCT3' (a localização desta seqüência varia, podendo estar localizada em alguns nucleotídeos acima ou abaixo da posição -80. Por isso dizemos que está “perto” da posição -80). Duas outras regiões, a caixa GC formada pela seqüência consenso 5'GGGCGG3' e o octâmero formado pela seqüência consenso 5'ATTTGCAT3', são também encontradas nos promotores e influenciam a eficiência da iniciação. A **Figura 21.1** apresenta um esquema, ilustrando a caixa CAAT e a caixa TATA.



**Figura 21.1:** Representação esquemática de um promotor de eucarioto, reconhecido pela RNA pol II. As seqüências consenso, contendo as caixas CAAT e TATA, estão representadas. A posição +1, na qual ocorre o início da transcrição, também está indicada.

## ACOPLAMENTO DO COMPLEXO DE INICIAÇÃO AO PROMOTOR

A Figura 21.2 ilustra o complexo de iniciação e as demais etapas da transcrição. Observe a figura e acompanhe as explicações que se seguem.



**Figura 21.2:** Representação esquemática do complexo de iniciação da RNA pol II no promotor de um gene de eucarioto e as demais etapas da transcrição.

A formação do complexo de iniciação começa quando a proteína TBP (do inglês *TATA Binding Protein*, proteína ligante de TATA) se liga à caixa TATA. Em seguida, o fator TFIIB se liga ao TBP e ao DNA, nos dois lados da TBP. O próximo passo é a ligação do fator TFIIA que, aparentemente, estabiliza o complexo TFIIB e TBP. O complexo TFIIF/RNA pol II se ligará ao restante dos componentes já ligados ao DNA. O TFIIF ajuda a levar a RNA pol II até seus promotores, pois interage com o TFIIB e reduz a inespecificidade da ligação da RNA pol ao DNA. Por último, os fatores TFIIE e TFIIH se ligam e completam o complexo fechado (dê uma olhadinha na **Tabela 21.1** para rever a função de cada um dos fatores).

O TFIIH possui atividade de DNA helicase dependente de ATP, que promove a abertura do DNA localizado perto do nucleotídeo +1, formando, assim, o complexo aberto. Após a formação do complexo aberto, a transcrição é iniciada. Além da atividade de DNA helicase, o TFIIH também possui atividade cinase, em uma das suas subunidades, que fosforila a maior subunidade da RNA pol II em vários locais na região terminal carboxila. Em resposta à fosforilação, ocorre uma alteração conformacional do complexo, o que permite o início da transcrição. Durante a síntese dos 60 a 70 nucleotídeos iniciais do RNA, ocorre a liberação do fator TFIIE e o fator TFIIH é liberado em seguida. Isso permite que a RNA polimerase alongue a cadeia de RNA.

## **ALONGAMENTO E TERMINAÇÃO**

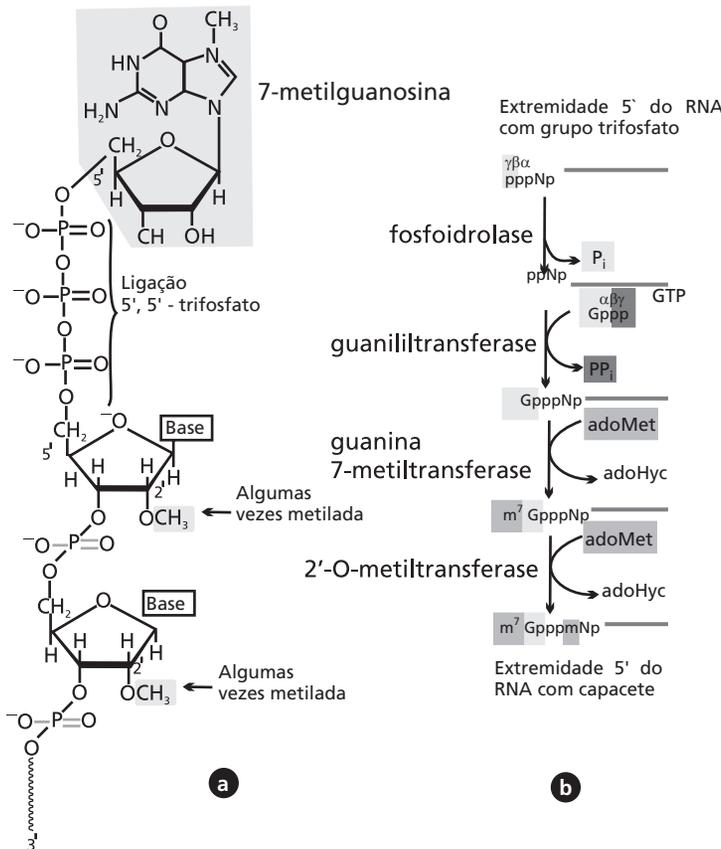
O TFIIF fica associado à RNA polimerase durante todo o alongamento. A atividade da RNA pol aumenta após o acoplamento de proteínas chamadas fatores de alongamento. Ao término da síntese, a RNA pol é desfosforilada e reciclada, podendo ser utilizada para iniciar a síntese de uma outra cadeia de RNA.

## **CAPEAMENTO DA EXTREMIDADE 5' DO RNA**

Enquanto a cadeia do RNA está sendo alongada, a extremidade 5' do pré-RNA é modificada pela adição de uma guanosina metilada. O processo é chamado capeamento da extremidade 5'.

O capeamento ocorre, geralmente, quando a cadeia crescente do RNA possui cerca de trinta nucleotídeos. O capeamento resulta de uma

ligação trifosfato 5'-5' pouco usual. A estrutura formada é chamada capacete 5'. Observe a Figura 21.3. b que ilustra as reações envolvidas no capeamento. O capacete 5' é formado pela condensação de uma molécula de GTP com o trifosfato na extremidade 5' do RNA. A enzima fosfodirolase retira o fósforo  $\gamma$  do nucleotídeo localizado na extremidade 5' do RNA. Em seguida, a enzima guaniltransferase promove a ligação fosfodiéster entre a guanosina e o nucleotídeo 5', liberando um pirofosfato. A enzima guanina 7-metiltransferase metila a guanosina, utilizando o grupamento metila da S-adenosilmetionina (adoMet). Dois grupamentos metila são adicionados às hidroxilas 2' do primeiro e do segundo nucleotídeo, adjacente ao capacete pela enzima 2'-O-metiltransferase. A Figura 21.3.a ilustra a estrutura resultante dessas reações. A presença dessa estrutura permite a ligação de fatores envolvidos na tradução, os quais veremos nas aulas do Módulo 4, e também ajudam a proteger as cadeias de RNA, que estão sendo sintetizadas da degradação pelas nucleases.



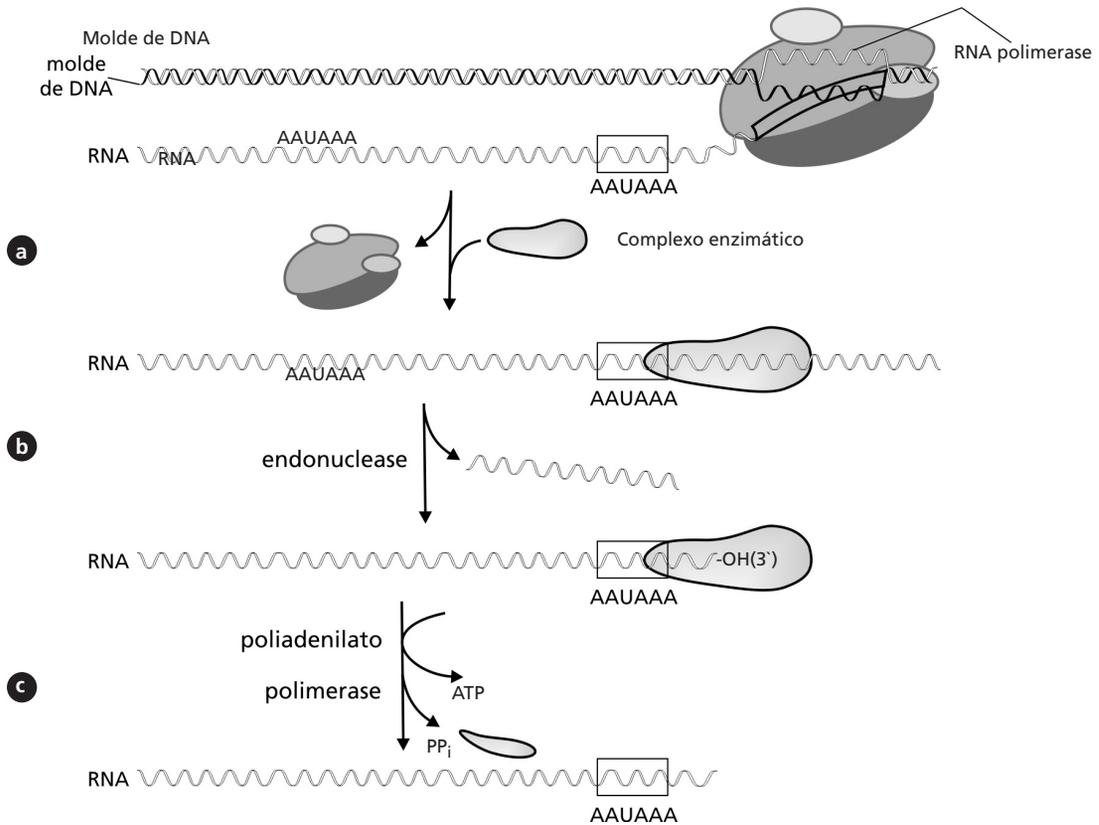
**Figura 21.3:** (a) estrutura do capacete 5', mostrando a ligação trifosfato 5'- 5', contendo a guanosina metilada, bem como os dois primeiros nucleotídeos próximos ao capacete, também metilados; (b) reações envolvidas na adição do capacete na extremidade 5' do RNA. AdoHyc é a abreviação para a S-adenosil-homocisteína.

## TERMINAÇÃO ATRAVÉS DE CLIVAGEM DA CADEIA E ADIÇÃO DA CAUDA poliA NA EXTREMIDADE 3' DO RNA

As extremidades 3' dos transcritos sintetizados pela RNA pol II, ao contrário do que ocorre em procariotos quando a RNA pol encontra a região terminadora, são produzidas por clivagem endonucleolítica dos transcritos primários. A terminação pode ocorrer em sítios múltiplos, os quais estão localizados cerca de 1.000 a 2.000 nucleotídeos de distância do local que corresponde à extremidade 3' do transcrito maduro. Ou seja, a RNA pol II transcreve um segmento de DNA bem maior do que o necessário para produzir um RNA mensageiro. A região “desnecessária” é removida por clivagem endonucleolítica e ocorre em uma região localizada 11 a 30 nucleotídeos abaixo da seqüência 5' AAUAAA 3', localizada perto do final da unidade transcricional.

Após a clivagem, uma enzima chamada poliA polimerase ou ainda poliadenilato polimerase (PAP) adiciona uma cauda poliA, formada por cerca de 200 resíduos de adenosina monofosfato, à extremidade 3' do transcrito. A adição da cauda poliA em RNAs eucarióticos é chamada poliadenilação. A formação da cauda poliA necessita de um componente de especificidade que reconhece e se liga à seqüência AAUAAA dos RNAs, dirigindo a clivagem e a reação de poliadenilação. O componente de especificidade, a endonuclease e a poliA polimerase estão presentes em um complexo multimérico que catalisa ambos, a clivagem e a poliadenilação em reações fortemente acopladas. A **Figura 21.4** ilustra as etapas de clivagem e a adição da cauda poliA. A cauda poliA dos RNAm de eucariotos aumenta a estabilidade do RNAm e desempenha um papel importante no seu transporte do núcleo para o citosol.

Ao contrário da RNA pol II, a RNA pol I e pol III respondem a sinais discretos de terminação. A RNA pol I termina a transcrição em resposta a uma seqüência de 18 nucleotídeos que é reconhecida por uma proteína terminadora associada. A RNA pol III responde a um sinal de terminação que é semelhante ao terminador independente de *Rho* de *Escherichia coli*. A maior parte do mecanismo é desconhecida.

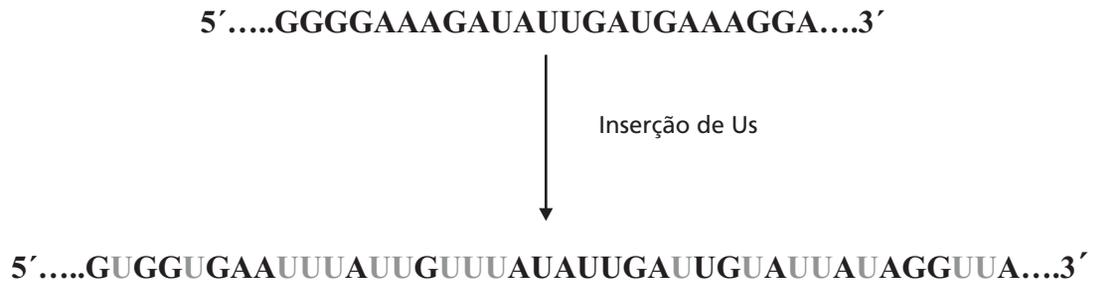


**Figura 21.4:** Adição da cauda poliA ao transcrito primário de RNA de eucariotos: (a) a seqüência sinalizadora da clivagem é ligada por um complexo enzimático que inclui uma endonuclease, uma poliadenilato polimerase e várias outras proteínas com múltiplas subunidades envolvidas no reconhecimento da seqüência, no estímulo da clivagem e na síntese da cauda poliA; (b) o RNA é clivado pela endonuclease em um local cerca de 10 a 30 nucleotídeos abaixo da seqüência AAUAAA; (c) a poliadenilato polimerase sintetiza uma cauda poliA de extensão variável, a partir do ponto de clivagem.

## EDIÇÃO DO RNA

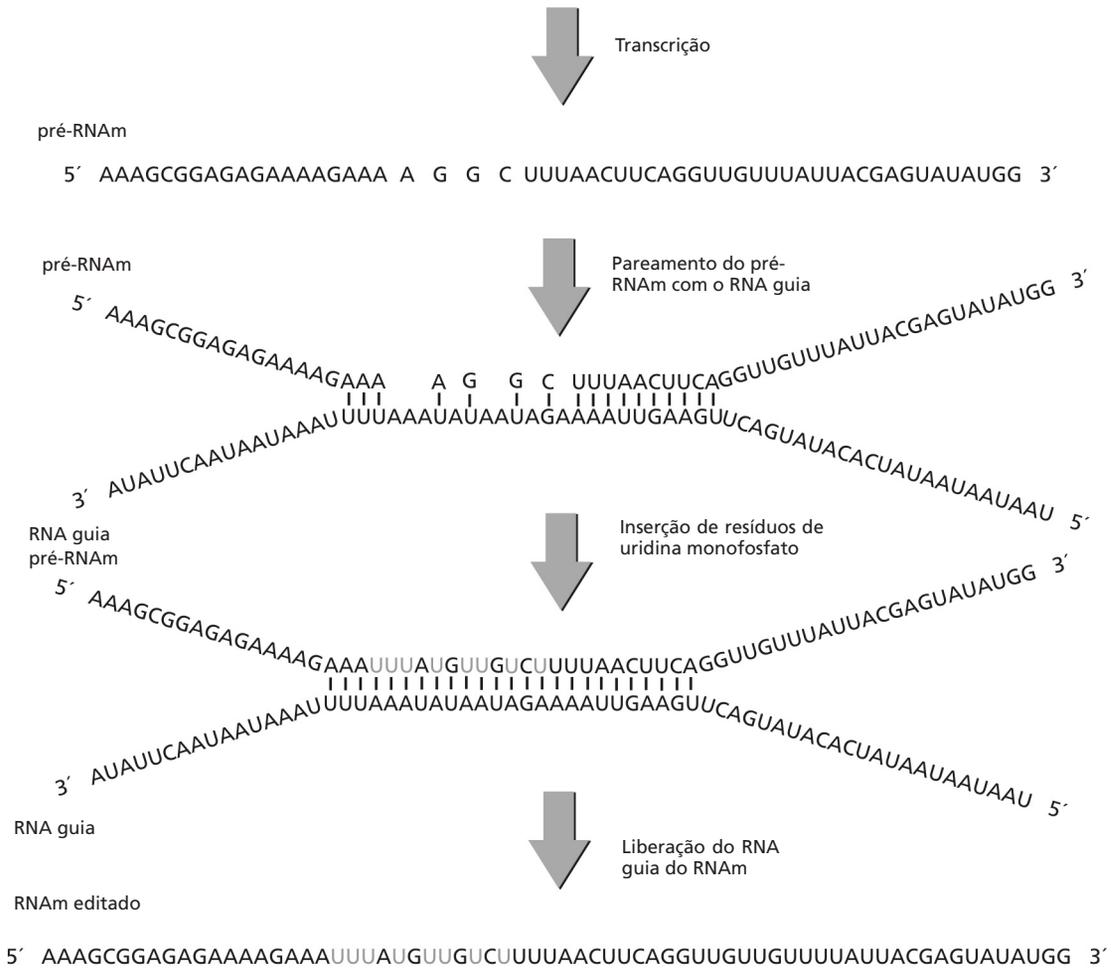
No último tópico desta aula, veremos o processo de edição do RNA. A edição consiste na alteração da seqüência de um RNA através da inserção, deleção ou modificação de nucleotídeos já existentes na molécula.

A descoberta desse fenômeno é recente, 1986, e foi possível através do estudo de genes mitocondriais do protozoário *Trypanosoma brucei*. Os RNAs sintetizados a partir desses genes apresentavam vários resíduos uracila que não estavam presentes no DNA que serviu de molde para a sua síntese. Os pesquisadores concluíram que tais resíduos foram adicionados após a transcrição. A Figura 21.5 ilustra um exemplo de edição de uma molécula de RNA.



**Figura 21.5:** Exemplo de edição do RNA em *Trypanosoma brucei*. (a) RNA produzido a partir do DNA molde; (b) RNA mensageiro após a edição, resultante da inserção de Us (mostrados em cinza).

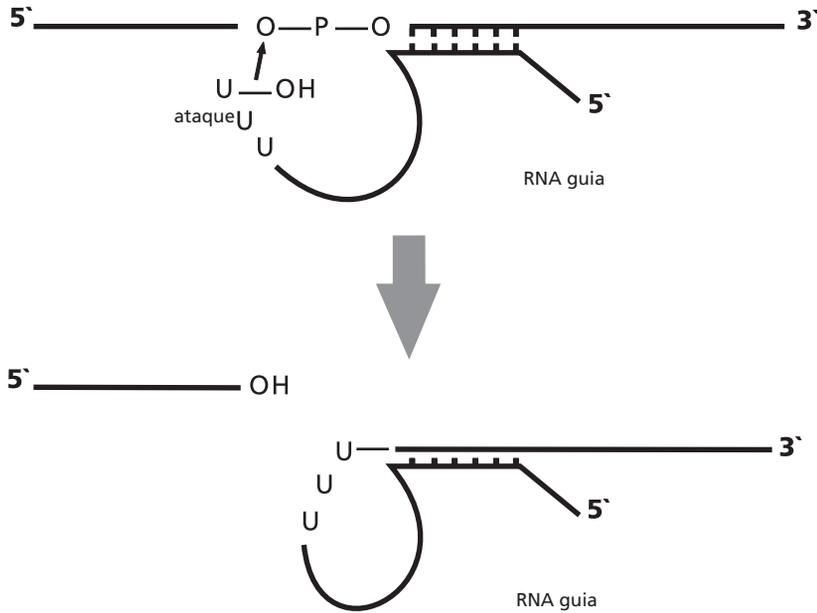
O processo de edição do RNA é mediado por RNAs guia, que são transcritos por diferentes genes mitocondriais, ou seja, o RNA guia não é produto da mesma unidade transcricional que originou o pré-RNAm. Os RNAs guias contêm seqüências que são parcialmente complementares ao pré-RNAm que será editado. O pareamento entre os RNAs guia e os pré-RNAm resulta em falhas contendo resíduos As, não pareados nos RNAs guia. Esses As servirão de molde para a inserção de Us. A Figura 21.6 ilustra, como exemplo, a edição do pré-RNAm da proteína mitocondrial citocromo b de *Leishmania tarentolae*.



**Figura 21.6:** Exemplo de edição em tripanossomos. Os resíduos de uridina monofosfato (Us) que são inseridos nas falhas do pré-RNA<sub>m</sub> durante o processo de edição estão representados na cor cinza. O pareamento entre o pré-RNA<sub>m</sub> e o RNA guia está representado por linhas verticais entre as duas moléculas.

Em alguns casos, mais de um RNA guia participa do processo de edição do pré-RNA<sub>m</sub>. Além de servir de molde para a síntese de Us, o RNA guia também fornece os resíduos Us, os quais serão adicionados durante a edição e que estão presentes em uma cauda poliU que possui 5 a 24 nucleotídeos. Esses resíduos são transferidos através do mecanismo ilustrado na **Figura 21.7**. Observe a figura e acompanhe a explicação que se segue.

1. Clivagem de uma ligação éster no pré-RNA e formação de uma ligação éster entre o RNA guia e a porção 3' do pré-RNA.



2. Clivagem de uma ligação éster entre os dois Us terminais do RNA guia resgata o pré-RNA, apresentando um U inserido ao local da clivagem mostrado na etapa 1.

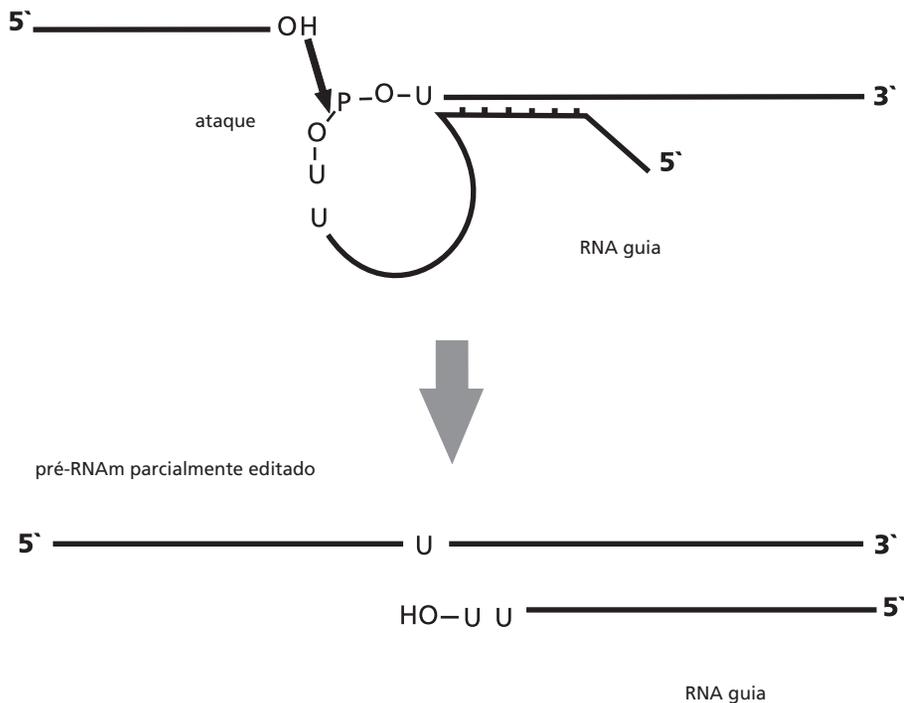
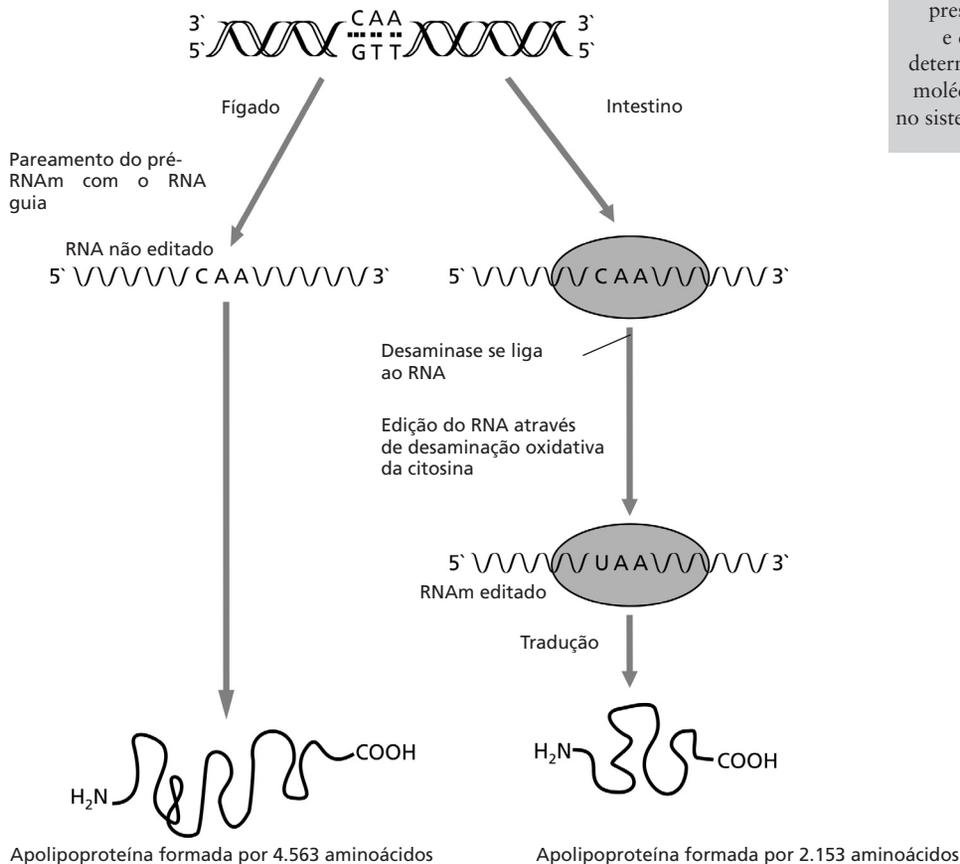


Figura 21.7: Mecanismo de inserção de resíduos de uridina monofosfato nas moléculas de pré-RNA durante o processo de edição.

Na primeira etapa, a hidroxila 3' livre do RNA guia promove um ataque nucleofílico que quebra uma ligação éster interna no pré-RNAm, formando uma ligação covalente. Em seguida, a hidroxila 3', livre na porção 5' do pré-RNAm, que foi cortado, ataca uma ligação éster entre dois resíduos Us na extremidade da cauda poliU do RNA guia, resgatando a estrutura do pré-RNAm que, agora, apresentará um resíduo U inserido no local no qual ocorreu o ataque inicial.

Um outro tipo de edição do RNA foi descrito para o gene da **APOLIPOPROTEÍNA-B** em humanos e coelhos. Observe a **Figura 21.8** e acompanhe a explicação que se segue.



**Figura 21.8:** Edição do pré-RNAm para a apolipoproteína B no intestino de mamíferos.

No fígado, o RNAm para apolipoproteína-B codifica uma proteína que contém 4.563 aminoácidos. Em contrapartida, no intestino, a mesma proteína contém somente 2.153 aminoácidos. A princípio, acreditava-se que as duas proteínas eram produtos de unidades transcricionais diferentes, mas estudos detalhados revelaram que eram produtos de um mesmo gene. Nesse caso, um resíduo C presente no pré-RNAm é

### **CÓDON DE TERMINAÇÃO UAA**

UAA é um dos três códons que determinam o término da tradução. Você estudará o mecanismo de tradução nas aulas do Módulo 4, mas é interessante saber que, ao encontrar um código de terminação, não mais haverá incorporação de aminoácidos na cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada. Daí, conclui-se que a inclusão de um códon de terminação, através da modificação de um dos nucleotídeos do RNAm, fará com que a tradução pare antes do local “apropriado”.

convertido em um resíduo U, gerando um **CÓDON DE TERMINAÇÃO UAA**, o qual irá determinar que a proteína sintetizada seja menor do que aquela originada a partir do RNA não editado. A conversão de C – U é catalisada por uma proteína que se liga a seqüências específicas de RNA e remove grupamentos amina de resíduos de citosina.

Depois de saber da existência do mecanismo de edição do RNA, você pode estar se perguntando: “Por que ocorre a edição do RNA?” Para o caso da apolipoproteína, a edição do RNA pode ser explicada como um mecanismo de produção de duas proteínas diferentes a partir de um mesmo gene, uma vez que ambos os RNAs, editado e não editado, dão origem a proteínas funcionais. Em contrapartida, no caso dos tripanossomos, os RNAs que não são editados não são capazes de sintetizar proteínas ativas. Dessa forma, a edição do pré-RNAm é um importante passo na regulação da produção dessas proteínas. O mecanismo que garante a fidelidade da edição ainda não é conhecido. Não seria mais lógico produzir RNAs que fossem uma cópia idêntica do DNA molde? A pergunta permanece sem resposta, mas sabe-se que os tripanossomos são eucariotos unicelulares primitivos que divergiram muito cedo dos demais eucariotos. Assim, alguns evolucionistas acreditam que a edição do RNA era comum em células ancestrais, nas quais muitas reações eram catalisadas por moléculas de RNA em vez de moléculas protéicas, conforme veremos na próxima aula.

**RESUMO**

Na aula de hoje, vimos que a transcrição em eucariotos é semelhante à transcrição em procariotos. No entanto, apresenta uma maior complexidade. Você teve a oportunidade de aprender que três RNA polimerases sintetizam as diferentes classes de RNA e que elas não conseguem se ligar sozinhas aos seus promotores, necessitando de fatores de transcrição adicionais. Além disso, a terminação da transcrição em eucariotos não é tão bem estabelecida quanto em procariotos. Vimos, ainda, que, após a transcrição de RNAs que servirão de molde para a síntese de proteínas (RNAs mensageiros), ocorre a adição de uma guanosina metilada na extremidade 5', que é chamada capacete, bem como a adição de uma cauda poliA na extremidade 3', após a clivagem do RNA em uma região específica. Por último, vimos que alguns RNAs podem sofrer outro tipo de modificação chamada edição do RNA, mecanismo que consiste na modificação da seqüência de nucleotídeos de um determinado RNA através da adição, deleção ou modificação de alguns nucleotídeos, e discutimos o papel evolutivo da existência de tais mecanismos.

**EXERCÍCIOS**

1. Identifique as semelhanças e diferenças entre o mecanismo de transcrição em eucariotos e procariotos.
2. O que é o capacete 5'? De que maneira ele é adicionado?
3. Como ocorre a adição da cauda poliA em RNAs mensageiros?
4. No que consiste o mecanismo de edição do RNA?
5. Qual a principal consequência da edição do RNA?
6. Na sua opinião, que implicam todas as diferenças observadas entre os mecanismos de transcrição em procariotos e eucariotos?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu o conteúdo desta aula, não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios propostos. Sabemos que os mecanismos apresentados são complexos e exigirão paciência e dedicação para a sua compreensão. Por isso, recomendamos que você estude o conteúdo da aula com calma, buscando refletir sobre as informações apresentadas, na tentativa de avaliar a sua compreensão sobre o assunto. Ao término de cada tópico, você pode fazer esquemas e resumos e voltar ao conteúdo da aula para ver se compreendeu corretamente. E mais uma vez, não hesite em contatar os tutores presenciais e a distância para as eventuais dúvidas que surgirem. Na próxima aula, estudaremos o mecanismo de retirada dos íntrons e emenda dos éxons, bem como a existência dos RNAs autocatalíticos. Por isso, é importante que você compreenda bem esta aula, pois esta compreensão é fundamental para o entendimento dos conteúdos da próxima aula. Bom estudo e até lá!

# Processamento do RNA – retirada de íntrons e emenda de éxons

AULA

# 22

## objetivos

Ao final desta aula, você deve ser capaz de:

- Estudar o mecanismo de retirada dos íntrons e emenda dos éxons em pré-RNAs mensageiros.
- Conhecer o mecanismo de ação dos íntrons autocatalíticos.

### **Pré-requisito**

Conteúdo da Aula 21.

## INTRODUÇÃO

Na aula anterior, você teve a oportunidade de estudar o mecanismo de transcrição em eucariotos e algumas das modificações que ocorrem nos transcritos que codificam proteínas. Mas as novidades não param por aí, existem ainda outras particularidades na produção dos RNAs mensageiros que você terá a oportunidade de estudar nesta aula. Vamos lá! Um fato interessante observado nos genes de eucariotos, que codificam proteínas, é que eles possuem, freqüentemente, seqüências que são transcritas, mas não são encontradas nos RNAs mensageiros presentes no citosol, os quais serão utilizados como molde para a síntese protéica. Essas seqüências são conhecidas como seqüências intercalares ou íntrons.

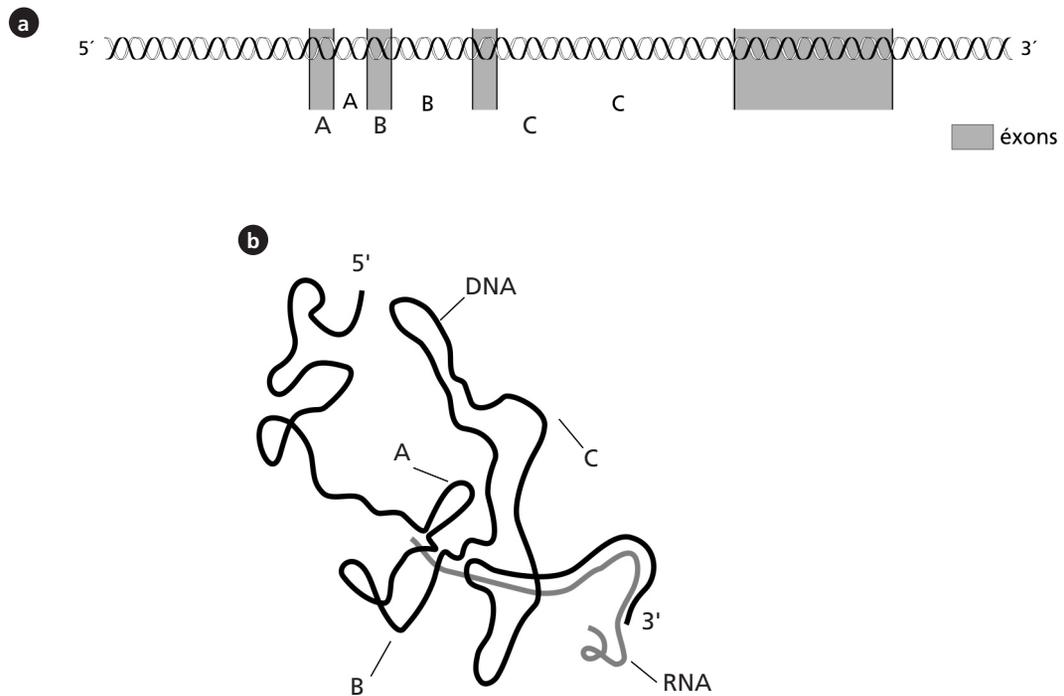
Os transcritos encontrados no núcleo, contendo íntrons, são chamados RNAs primários ou RNAs nucleares heterogêneos. Ao longo desta aula, você entenderá porque eles são chamados heterogêneos. Pois bem, somente após a retirada dos íntrons, temos a formação de um RNA mensageiro maduro. O processo pelo qual os íntrons são removidos é chamado emenda. Você vai encontrar alguns livros que utilizam o termo em inglês *splicing*, cujo significado é emenda. Nas nossas aulas, vamos utilizar o termo emenda, OK? As seqüências mantidas após a emenda são chamadas éxons. Na verdade, o nome do mecanismo se refere somente à segunda etapa, uma vez que primeiro ocorre a retirada dos íntrons e, em seguida, a emenda dos éxons.

Um fato interessante observado pelos pesquisadores é que os eucariotos superiores, quando comparados aos eucariotos inferiores, apresentam maior porcentagem de seus genes interrompidos por íntrons e estes, geralmente, apresentam um tamanho maior. O padrão do tamanho dos íntrons segue grosseiramente a árvore evolutiva, ou seja, quanto mais complexo o organismo, maior o tamanho dos íntrons encontrados em seus genes, mas isso não é uma regra geral. Alguns genes bacterianos também possuem íntrons, mas são muito raros. Falaremos sobre eles mais tarde.

## COMO A EXISTÊNCIA DE ÍNTRONS E A EMENDA DOS ÉXONS FORAM DESCOBERTAS?

A emenda do RNA foi descoberta durante a análise da síntese de RNAm de adenovírus. O RNAm que codifica a proteína do capsídeo, chamada hexon, foi isolado por eletroforese em gel, a partir de RNAs citosólicos poliadenilados (RNAs que apresentam a cauda poliA, conforme visto na Aula 21). Para mapear a região do DNA viral que é transcrita para formar o RNAm do gene hexon, os pesquisadores

hibridaram o RNAm isolado com o DNA, correspondente à unidade transcricional, desnaturado. Você já sabe que o RNA formará um híbrido com o DNA desnaturado naqueles locais onde houver homologia entre eles, não é mesmo? Pois, afinal, existe complementaridade das bases, uma vez que uma das fitas do DNA serviu de molde para a síntese do RNA. Pois bem, após a hibridação, o híbrido RNA/DNA foi visualizado através de microscopia eletrônica. A **Figura 22.1** ilustra o resultado obtido. Observe a figura e acompanhe a explicação a seguir.



**Figura 22.1:** A formação de alças após a hibridação do RNAm e o DNA viral indicou a presença de regiões no DNA, que não estavam presentes no RNAm; (a) arranjo dos éxons e íntrons (letras A, B e C) ao longo da porção do DNA do adenovírus; (b) diagrama interpretativo da estrutura observada através de microscopia eletrônica, mostrando o pareamento entre o DNA e o RNA; as alças A, B e C correspondem aos íntrons mostrados em (a).

Após a hibridação, observou-se a presença de três alças de DNA fita simples (A, B, e C). Essas alças correspondem aos três íntrons do gene hexon. Os íntrons presentes no genoma viral não estão presentes no RNAm maduro do gene hexon e, assim, eles formam alças entre as seqüências do éxon que hibridam com suas seqüências complementares no RNAm.

Análise semelhante de híbridos de RNA isolados de núcleos de células infectadas e DNA viral resultou em RNAs colineares com o DNA viral (transcrito primário) e RNAs com um ou dois dos íntrons removidos (intermediários). Daí eles serem chamados RNAs nucleares heterogêneos, pois no núcleo se encontram RNAs de diferentes tamanhos: RNAs nos quais os íntrons ainda não foram retirados; RNAs nos quais alguns íntrons foram retirados e, RNAs nos quais todos os íntrons foram retirados, formando, assim, um conjunto de RNAs diferentes, mas que, na verdade, são produtos da mesma unidade transcricional. Ficou claro para você?

Quando se trata de unidades transcricionais pequenas, formadas por poucos éxons e íntrons, a emenda ocorre logo após a clivagem e a poliadenilação da extremidade 3' do transcrito primário. Você está lembrado que vimos isso na Aula 21? Se tiver dúvidas, dê uma olhadinha nela. Já em unidades transcricionais grandes, formadas por vários éxons e íntrons, a emenda ocorre no RNA nascente, antes que a transcrição esteja completa.

### **DNAc**

DNA complementar é um DNA sintetizado a partir de um RNAm. Os RNAs mensageiros podem ser isolados, seletivamente, através da purificação de RNAs poliadenilados (que contêm a cauda poliA). Para isso, utiliza-se uma resina, na qual foram ligados oligonucleotídeos poliT. Estes vão se parear com a cauda poliA dos RNAs mensageiros, podendo posteriormente ser purificados. A enzima transcriptase reversa é utilizada para a síntese da molécula de DNA a partir do RNA poliadenilado. Através dessa técnica, é possível isolar somente as regiões funcionais de um gene, ou seja, somente as regiões que serão utilizadas para sintetizar proteínas, uma vez que as demais seqüências não estarão presentes no RNA mensageiro.

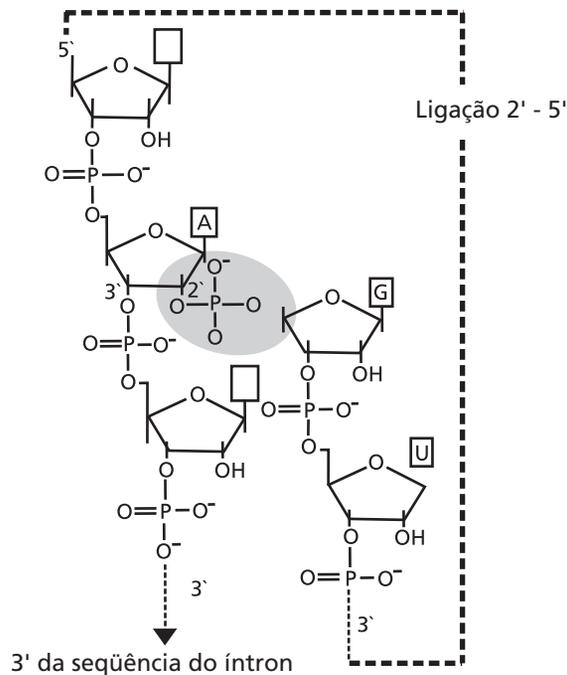
## **CARACTERIZAÇÃO DOS ÍNTRONS E SÍTIOS DE EMENDA NO PRÉ-RNAm**

A presença de íntrons, bem como a caracterização de sítios de emenda no pré-RNAm, pôde ser determinada através da comparação entre a seqüência do DNA genômico, correspondente à unidade transcricional, e a seqüência de DNAc preparado a partir do RNAm correspondente. As seqüências que estão presentes no DNA genômico, mas ausentes no DNAc, correspondem aos íntrons e permitem a análise das seqüências que circundam a junção entre o éxon e o íntron. A análise de muitos RNAs mensageiros diferentes revelou a presença de seqüências moderadamente conservadas. Observe a **Figura 22.2** e acompanhe a explicação a seguir.



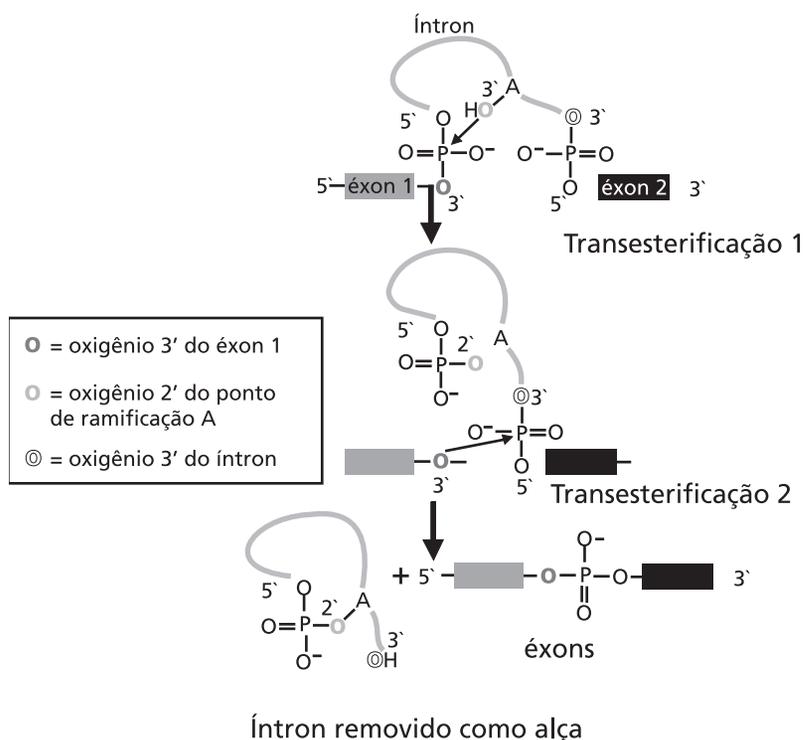
## RETIRADA DOS ÍNTRONS E EMENDA DOS ÉXONS

Experimentos *in vitro* usando extratos celulares foram decisivos para a compreensão do mecanismo de retirada dos íntrons e emenda dos éxons do RNA. A observação de moléculas intermediárias formadas durante a reação de emenda *in vitro* levou à conclusão de que os íntrons não são retirados como moléculas lineares. O íntron é removido na forma de uma alça na qual a guanosina da extremidade 5' é unida, de forma pouco usual, a uma adenosina próxima à extremidade 3' do íntron, através da ligação fosfodiéster 5' – 2' ilustrada na **Figura 22.3**. A adenosina é chamada ponto de ramificação porque nela ocorre a formação de um braço na estrutura de alça (a posição da adenosina já foi ilustrada na **Figura 22.2**).



**Figura 22.3:** Formação da alça no ponto de ramificação. O fosfato 5' da Guanosina na extremidade 5' do íntron é ligada ao grupamento hidroxila 2' da Adenosina no ponto de ramificação para formar uma ligação fosfodiéster 5' - 2'. A cadeia ramificada permanece na seqüência final do íntron que foi retirado e forma a alça. A linha pontilhada representa a seqüência do íntron.

Após a descoberta da formação da estrutura de alça, foi possível demonstrar que a emenda ocorre através de duas reações sequenciais de transesterificação mostradas na **Figura 22.4**.



**Figura 22.4:** Reações sequenciais de transesterificação durante a emenda. Na primeira reação (transesterificação 1), a ligação éster entre o fósforo 5' do íntron e o oxigênio 3' do éxon 1 é trocada por uma ligação éster com o oxigênio 2' do resíduo adenosina no ponto de ramificação. Na segunda reação (transesterificação 2), a ligação éster entre o fósforo 5' do éxon 2 e o oxigênio 3' do íntron é trocada por uma ligação éster com o oxigênio 3' do éxon 1, liberando o íntron na forma de alça e ligando os dois éxons. As setas indicam os pontos nos quais os oxigênios dos grupamentos hidroxila ativados reagem com os átomos de fósforo.

Em cada reação, uma ligação fosfato éster é trocada pela outra. Não ocorre consumo de energia, uma vez que o número de ligações fosfato éster não é alterado na reação. O resultado dessas duas transesterificações é que os dois éxons são ligados e o íntron é liberado na forma de uma estrutura de alça.

## PEQUENAS PARTÍCULAS RIBONUCLEOPROTÉICAS NUCLEARES PARTICIPAM DA EMENDA

Seis RNAs pequenos, ricos em Us, são abundantes no núcleo das células de mamíferos. Esses pequenos RNAs são chamados snRNAs (*small nuclear RNAs*, que significa RNAs nucleares pequenos) U1 a U6 e seus tamanhos variam entre 107 e 210 nucleotídeos. Mesmo antes da demonstração da emenda *in vitro*, várias observações indicaram a participação dos snRNAs no mecanismo de emenda dos éxons. A seqüência consenso encontrada na extremidade 5' dos íntrons (CAGGUAAGU) mostrou ser complementar a uma seqüência encontrada perto da extremidade 5' do snRNA U1. Além disso, snRNAs associados com RNAs heterogêneos foram encontrados em extratos nucleares.

No núcleo, os snRNAs associam-se com seis a dez proteínas para formar partículas ribonucleoprotéicas nucleares pequenas, chamadas snRNPs (do inglês, *small nuclear RiboNucleoProtein*). Algumas dessas proteínas são comuns a todos os snRNPs, enquanto outras são específicas para snRNPs individuais. Evidências para a importância do pareamento da seqüência presente na extremidade 5' do snRNA U1 e a seqüência conservada no sítio da emenda na extremidade 5' foram obtidas a partir de experimentos com genes contendo mutações na seqüência consenso 5' de um íntron. Quando os genes apresentando essas mutações foram transferidos para células, a emenda dos RNAs correspondentes foi bloqueada. Entretanto, quando um gene mutante foi co-inserido no mutante para snRNA U1, contendo uma seqüência compensatória que restaurava o pareamento com o sítio da emenda 5', a emenda ocorreu normalmente. Este resultado sugeriu que o pareamento de bases entre o sítio 5' de um pré-RNA<sub>m</sub> e a região 5' do snRNA U1 é necessária para que ocorra a emenda.

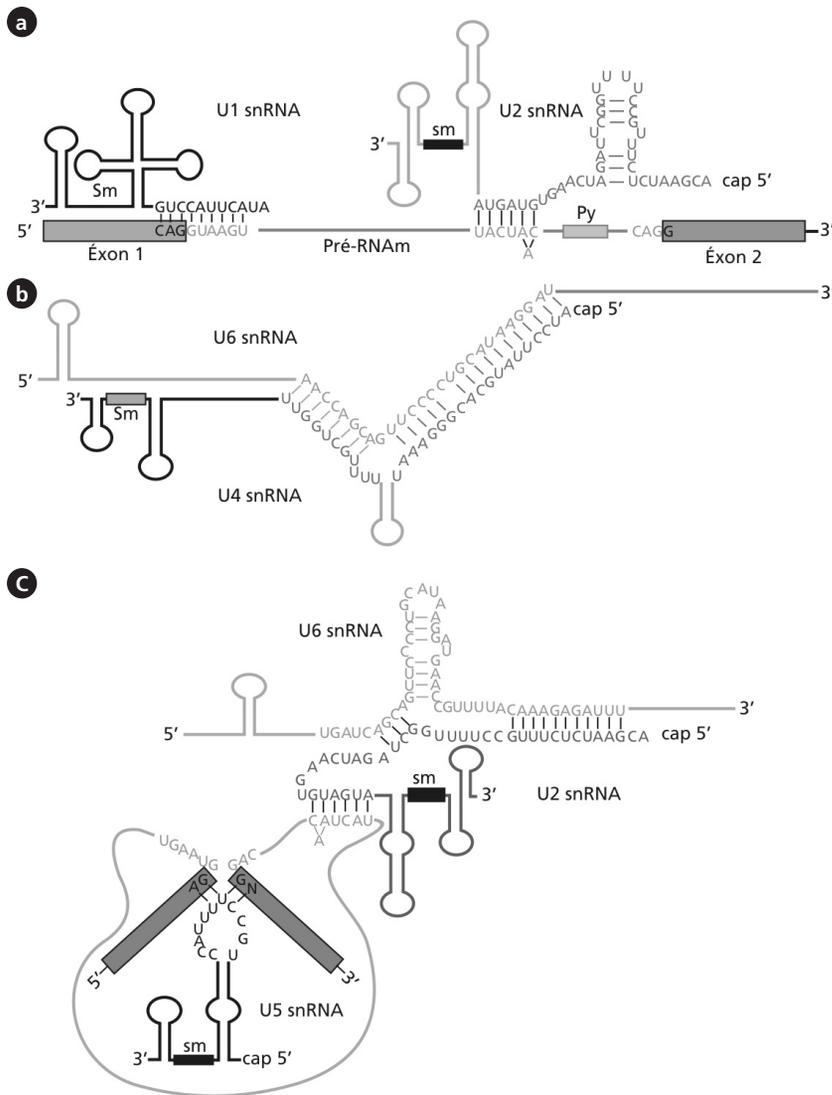
Após a descoberta da estrutura de alça formada nos íntrons que foram retirados, uma seqüência consenso foi reconhecida na região adjacente ao ponto de ramificação em pré-RNAs mensageiros. Na levedura *S. cerevisiae*, todos os íntrons possuem a seqüência UACUAAC na região do ponto de ramificação A. Exceto para o ponto de ramificação A, a seqüência da levedura é complementar a uma seqüência interna do snRNA U2. Experimentos de **MUTAÇÃO COMPENSATÓRIA**, semelhantes aos descritos para o snRNA U1 e o sítio de emenda na extremidade 5' demonstraram que o pareamento entre o snRNA da U2 e a seqüência

### MUTAÇÃO COMPENSATÓRIA

Você deve estar lembrado do que vimos nas aulas anteriores sobre o uso de mutantes para entender a função de diferentes proteínas e, assim, poder identificar os genes responsáveis pela sua síntese. Pois bem, a mutação compensatória consiste em utilizar um indivíduo que apresente uma mutação em um determinado gene ou que não possua um determinado segmento de DNA responsável por uma função específica e que, conseqüentemente, será deficiente em uma determinada etapa de um processo biológico. A introdução de um gene ou segmento de DNA que não contenha aquela alteração resgatará a função original e com isso será possível identificar os genes ou os segmentos de DNA que desempenham um papel específico naquele processo.

do sítio de ramificação no pré-RNAm é crítico para a emenda. O ponto de ramificação A, que não é pareado ao snRNA U2, fica exposto, permitindo que o seu grupamento hidroxila 2' participe da primeira reação de transesterificação durante a emenda do RNA.

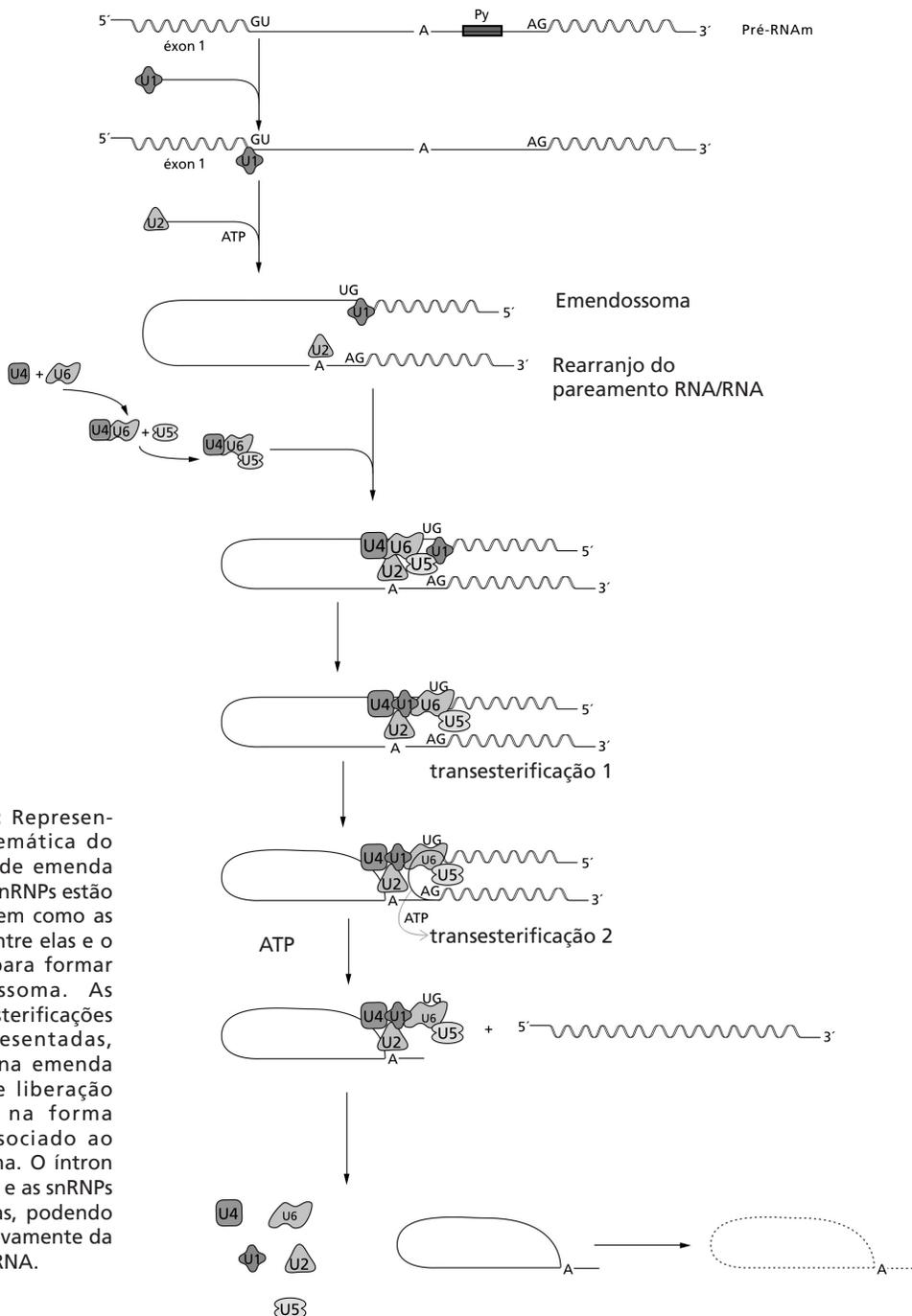
Estes resultados observados para os snRNAs U1 e U2 indicaram que, durante a emenda, eles se pareiam com o pré-RNAm. Experimentos adicionais com mutações compensatórias demonstraram que outras interações RNA-RNA também ocorrem durante a emenda. A Figura 22.5 ilustra as interações descritas anteriormente.



**Figura 22.5:** Modelo de interação entre o pré-RNAm e os snRNPs; (a) interações entre o pré-RNAm e o snRNP U1 e U2; (b) pareamento de bases entre U4 e U6. (c) U6 troca o pareamento com U4 pelo pareamento com U2. O pareamento de bases com U5 posiciona as regiões 5' e 3' do éxon favorecendo a formação da alça.

## UM MODELO PARA O MECANISMO DE EMENDA

Com base nos resultados citados anteriormente, na identificação de reações intermediárias e em outras análises bioquímicas foi possível propor um modelo para o mecanismo de emenda. Observe a **Figura 22.6** e acompanhe a explicação a seguir.



**Figura 22.6:** Representação esquemática do mecanismo de emenda do RNA. As snRNPs estão ilustradas, bem como as interações entre elas e o pré-RNA<sub>m</sub> para formar o emendossoma. As duas transesterificações estão representadas, resultando na emenda dos éxons e liberação do intron, na forma de alça, associado ao emendossoma. O intron é degradado e as snRNPs são recicladas, podendo participar novamente da emenda do RNA.

O modelo propõe que U1 e U2 pareiam com o sítio de emenda 5' e com o ponto de ramificação do íntron, respectivamente. Os snRNAs nos snRNPs U4 e U6 se pareiam em uma longa região complementar. Você pode ver a extensão do pareamento na **Figura 2.5(b)**. Este complexo se associa a U5 e em seguida ao complexo formado previamente pelo pré-RNA<sub>m</sub> pareado com U1 e U2, provavelmente através de interações proteína-proteína. O complexo ribonucleoprotéico resultante, de alto peso molecular (60S) é chamado **emendossoma**.

Após a formação do emendossoma ocorrem rearranjos no pareamento dos snRNAs e os pré-RNAs mensageiros. U4 e U6 se dissociam e, então, U6 se pareia a uma seqüência do U2 que está localizada 5' em relação à seqüência que interage com o ponto de ramificação no pré-RNA<sub>m</sub>. U1 se desliga do sítio de emenda 5' no pré-RNA<sub>m</sub> após o pareamento de U5 com seqüências próximas ao sítio de emenda. Estes rearranjos resultam nas interações mostradas, anteriormente, na **Figura 22.5**. Após o rearranjo, a porção protéica do emendossoma catalisa as duas reações de transesterificação que resultam na emenda do RNA. Após a segunda reação de transesterificação, os éxons ligados são liberados do emendossoma, enquanto a alça do íntron permanece associada às snRNPs. Este complexo final íntron-snRNP é instável e se dissocia. As snRNPs individuais liberadas podem participar de um novo ciclo de emenda. O íntron liberado é rapidamente degradado por uma enzima, que hidrolisa a ligação fosfodiéster 2' - 5' no ponto de ramificação, e outras RNases nucleares. Estima-se que, pelo menos uma centena de proteínas estejam envolvidas na emenda do RNA, o que faz com que esse mecanismo seja tão complexo quanto os mecanismos de síntese protéica e de iniciação da transcrição.

## CONSEQÜÊNCIAS DA EMENDA

O mecanismo de emenda dos RNAs apresenta implicações evolutivas. Os éxons das unidades transcricionais geralmente coincidem com os **DOMÍNIOS PROTÉICOS**.

Os éxons de diferentes genes podem ser “trocados” através do mecanismo de recombinação. Qual a possível conseqüência dessa troca? A resposta é simples: novos tipos de proteínas podem ser formados.

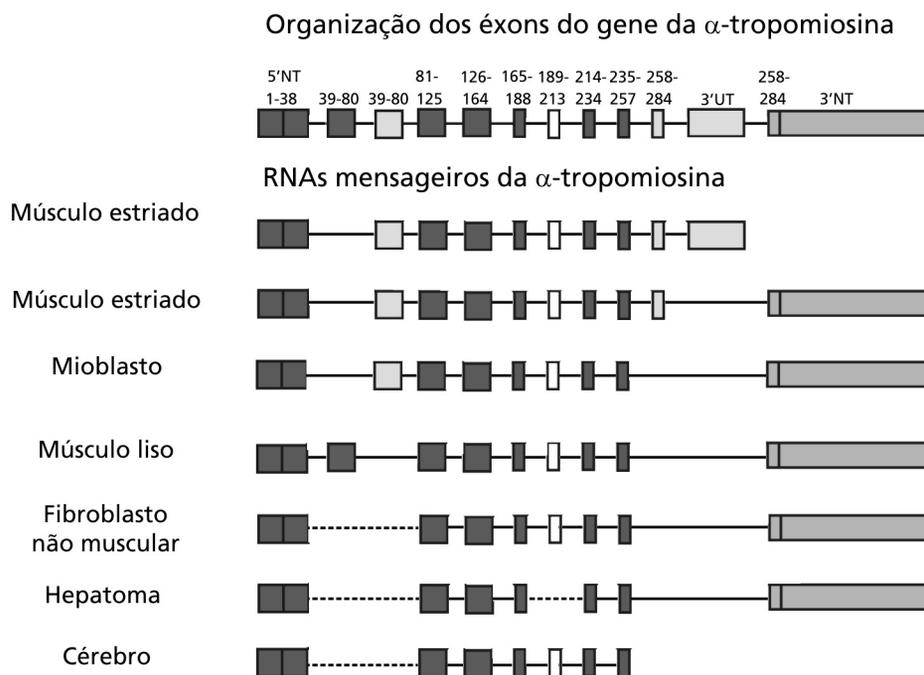
### DOMÍNIOS PROTÉICOS

Regiões na seqüência de um polipeptídeo (proteína) responsáveis pelas suas funções. No caso das enzimas, os domínios protéicos apresentam as regiões responsáveis pelas atividades catalíticas. Esses domínios são geralmente conservados em uma classe de proteínas.

E não pára por aí! A emenda também possibilita a “criação” de éxons durante a expressão gênica. Vamos entender isso melhor utilizando um exemplo.

No início do desenvolvimento, alguns pré-RNAs mensageiros podem ser emendados de uma maneira, formando um RNAm que servirá de molde para a síntese de uma determinada proteína. Mais tarde, no desenvolvimento, o mesmo pré-RNAm, poderá ser emendado de maneira diferente, formando um RNAm que servirá de molde para a síntese de uma outra proteína. Por que ocorre a formação de proteínas diferentes? Ora, a seqüência de nucleotídeos no RNAm é quem determina os aminoácidos que serão incorporados no polipeptídeo. Se a seqüência do RNAm for alterada em consequência da retirada dos íntrons e emenda dos éxons, a seqüência do polipeptídeo também será alterada. O mecanismo de emenda oferece, ainda, uma outra maneira de regulação da expressão gênica (lembre-se de que a regulação já pode ter ocorrido ao nível da iniciação da transcrição!!!), pois a eficiência do mecanismo e a forma como ele ocorre influenciam o tipo de proteína que será produzida.

Vamos utilizar o exemplo do gene que codifica a tropomiosina para ilustrar o que foi explicado anteriormente. A tropomiosina é uma proteína envolvida na contração muscular e está presente em muitos tipos celulares diferentes. A análise do RNAm da tropomiosina em diferentes tipos celulares revelou arranjos diferentes dos éxons. Observe a **Figura 22.7** e acompanhe a explicação a seguir.



**Figura 22.7:** Organização do gene da  $\alpha$ -tropomiosina de rato e os sete padrões de emenda alternativa, que ocorre nos diferentes tipos celulares apresentados. Em cinza escuro: éxons presentes em todos os RNAs; em cinza mais claro (próximo aos dois éxons representados em cinza escuro): éxon específico para células do músculo liso; em branco: éxons específicos para células do músculo estriado e em preto: éxon variável. Os éxons da musculatura lisa e estriada codificam 39 a 80 aminoácidos que são exclusivos. Éxons alternativos também ocorrem nas extremidades 3' dos diferentes RNAs mensageiros. 5'NT - região 5' não traduzida; 3'NT - região 3' não traduzida.

A utilização de diferentes éxons de um pré-RNA para formar diferentes RNAs mensageiros maduros é chamada emenda alternativa. O nome se deve ao fato de existir um grande número de possibilidades (alternativas) de se combinar os diferentes éxons para produzir os transcritos maduros. Estima-se que cerca de 5% dos pré-RNAs mensageiros de eucariotos utilizem a emenda alternativa para formar proteínas diferentes, a partir de um mesmo RNA primário. Quando ocorre a emenda alternativa, alguns íntrons passam a funcionar como éxons, pois eles não são retirados do RNA primário.

Para o gene que codifica a tropomiosina, um único pré-RNA é capaz de formar sete tipos de RNAs mensageiros. Observe que, quando comparamos o RNA produzido nas células da musculatura lisa ao RNA produzido nas células da musculatura estriada, observamos duas regiões que atuam como éxons na musculatura estriada, sendo retiradas como íntrons nas células da musculatura lisa. Do mesmo modo, uma região que atua como éxon na musculatura lisa é retirada como íntron nas células da musculatura estriada.

O mecanismo é bastante interessante, você não acha? Todavia, a sua regulação não é bem conhecida, pois é natural que nos perguntemos: “Como é que os íntrons e os éxons são ‘escolhidos?’” Uma das explicações é que proteínas ligantes de RNA podem inibir ou ativar o mecanismo de emenda, através da exposição ou não dos sítios de ligação reconhecidos pelas snRNPs. Uma outra possibilidade é a disponibilidade das snRNPs em alguns tipos celulares, ou seja, maior concentração implica em maior eficiência na retirada dos íntrons e emenda dos éxons, enquanto menor concentração implica em menor eficiência, que resulta na não retirada de alguns íntrons.

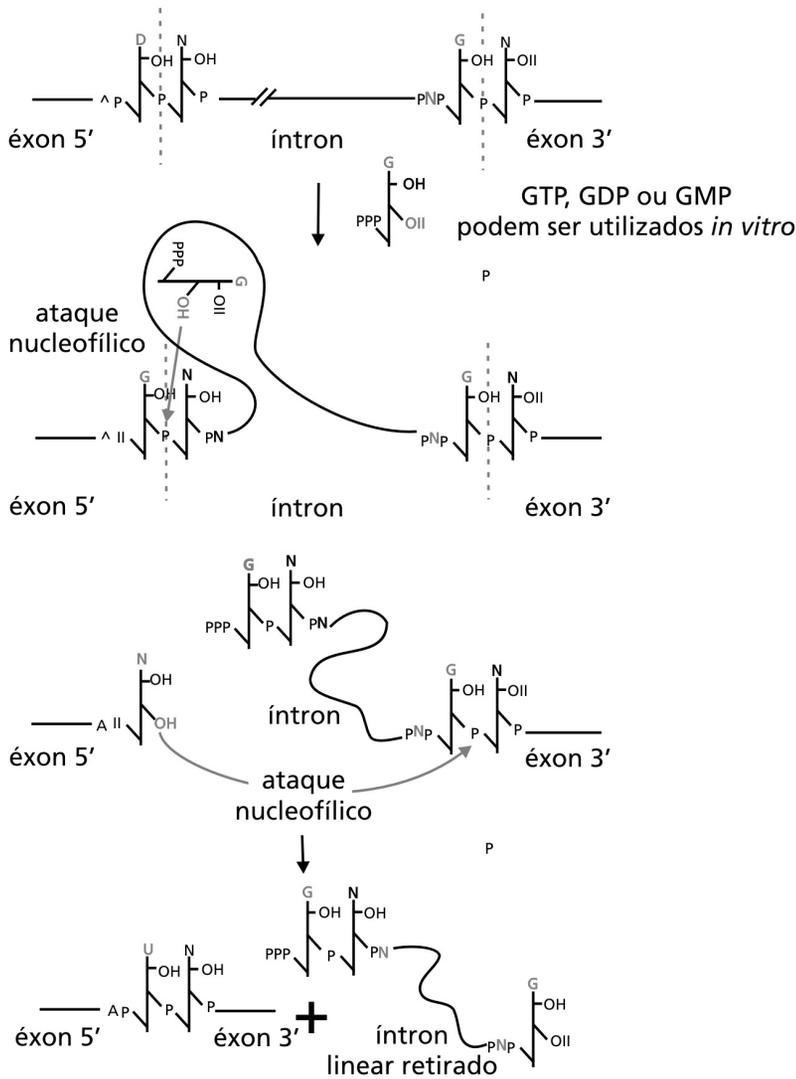
## ÍNTRONS AUTOCATALÍTICOS

Além do mecanismo de emenda descrito anteriormente, no qual participam as snRNPs e ocorre a formação do emendossoma, existem outros tipos de íntrons que não utilizam proteínas ou ribonucleoproteínas para a emenda dos éxons. A grande novidade é o fato de eles serem autocatalíticos, ou seja, o próprio RNA catalisa a reação. Isso foi demonstrado, em 1982, por Thomas Cech e colaboradores durante o estudo do RNA ribossomal do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*. Os pesquisadores sintetizaram o RNA primário (contendo íntrons) *in vitro* e observaram que o RNA ribossomal maduro podia ser produzido sem a participação de nenhuma enzima protéica. Posteriormente foi descoberto um RNA ribossomal capaz de promover a ligação peptídica entre dois aminoácidos. Essas duas descobertas reforçaram a idéia de que alguns RNAs podem apresentar atividade catalítica, sendo por isso chamados ribozimas (termo resultante da junção de Ribonucléico e Enzimas).

Os íntrons autocatalíticos foram divididos nos grupos I e II, a fim de discriminar o mecanismo de emenda. Os íntrons do grupo I são encontrados em alguns genes nucleares, mitocondriais e cloroplastiais que codificam RNAs ribossomais, RNAs mensageiros e RNAs transportadores. Já os íntrons do grupo II, são encontrados em pré-RNAs mensageiros mitocondriais e cloroplastiais de fungos, algas e plantas. Os raros íntrons descritos em genes bacterianos pertencem aos grupos I e II. Da mesma forma que ocorre com a emenda dependente de snRNPs, a retirada dos íntrons e emenda dos éxons ocorre através de duas transesterificações.

Um grupo hidroxila 2' ou 3' da ribose faz um ataque nucleofílico em um fósforo e, em cada etapa, uma nova ligação fosfodiéster é formada.

O íntron do grupo I utiliza uma guanosina, como co-fator, cujo grupamento 3' OH é utilizado como um nucleófilo na primeira etapa do corte. Esta guanosina pode ser mono, di ou trifosfato. Observe a **Figura 22.8** e acompanhe a explicação a seguir.



**Figura 22.8:** Mecanismo de autocatálise de íntrons do grupo I.

O grupamento OH forma uma ligação fosfodiéster com a extremidade 5' do íntron. A hidroxila 3' do éxon age como um nucleófilo, em uma reação semelhante na extremidade 3' do íntron. O resultado é a retirada do íntron e a emenda dos éxons. O autoprocessamento do RNA de *Tetrahymena* pertence a esse grupo. A guanosina se liga ao RNA e ataca a extremidade 5' do íntron, levando ao rompimento da fita de RNA neste local, enquanto permanece ligada ao RNA. Essa ligação resultará na exposição de uma extremidade 3' OH (da guanosina). Essa extremidade do éxon, então, ataca a extremidade 3'OH do éxon anterior, resultando na junção dos éxons e na liberação do íntron. A extremidade 3' do íntron ataca uma ligação fosfodiéster perto da extremidade 5' do próprio íntron, gerando um fragmento circular de RNA mais um fragmento de 15 nucleotídeos contendo a guanosina. O RNA circular perde 4 nucleotídeos e se abre, produzindo uma molécula linear. Este autoprocessamento requer a integridade estrutural do RNA inicial, pois o pareamento intracadeia que gera uma estrutura secundária e terciária é essencial para as etapas de corte. Isso pode ser comprovado através da utilização de agentes desnaturantes que inibiram o processamento. Algumas seqüências consenso foram caracterizadas nesta classe de íntrons. Uma região rica em pirimidina (CUCUCU) ocorre no ponto de corte 5' e seqüências ricas em purinas (GGGAGG) ocorrem dentro dos íntrons.

Nos íntrons do grupo II, o padrão é semelhante, exceto que o nucleófilo da primeira etapa, nesse caso, o grupamento hidroxila 2', é fornecido por um Adenilato presente na seqüência do íntron. A **Figura 22.9** ilustra as etapas envolvidas na retirada do íntron. Assim, ocorre a formação de uma alça como um intermediário, da mesma forma que ocorre no ponto de ramificação visto anteriormente para a emenda dependente de snRNPs.

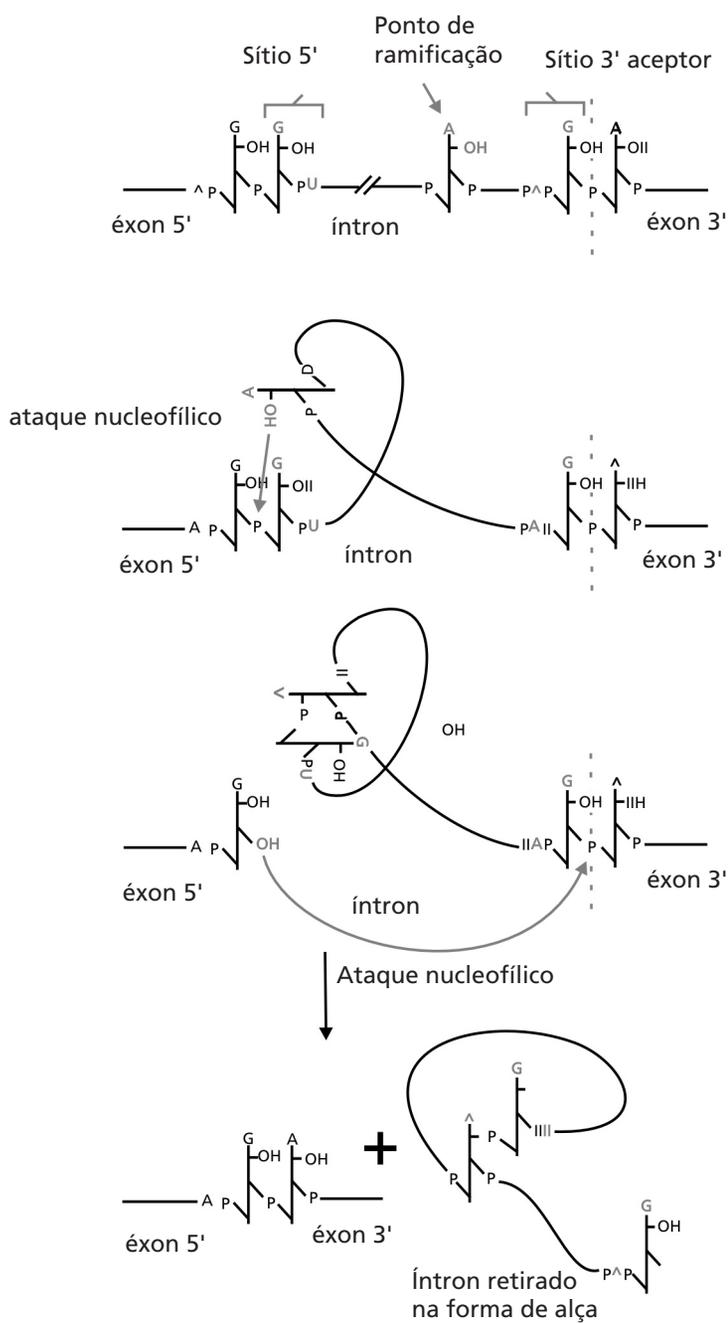


Figura 22.9: Mecanismo de autoprocessamento de íntrons do grupo II.

É importante ressaltar que esses dois tipos de autoprocessamento apresentam características também presentes no processamento catalisado pelo emendossoma. Em ambos, a etapa inicial consiste de um ataque de um grupo OH de uma ribose no ponto de corte 5'. A extremidade 3' OH, recém-formada no éxon anterior, atacará o ponto de corte 3' do éxon seguinte, formando uma ligação fosfodiéster éxon-éxon. Além disso, em ambas as reações, o grupo fosfato de cada ponto de corte é mantido nos produtos e são reações de transesterificação. Os mecanismos sugerem que o processamento mediado pelo emendossoma evoluiu a partir dos mecanismos autocatalíticos, sendo que os íntrons do grupo II seriam um intermediário entre os dois mecanismos uma vez que apresentam a formação de uma alça durante a retirada do íntron. O principal ponto de evolução, nesse caso, é o fato de que a atividade catalítica passou do RNA para moléculas protéicas, permitindo, assim, uma melhor regulação do processo.

### **AFINAL, QUAL A IMPORTÂNCIA DAS RIBOZIMAS?**

Você já deve estar convencido de que para que ocorra a vida, é necessário que muitas reações químicas aconteçam, dando origem a macromoléculas essenciais ao metabolismo. Você já estudou isso em Bioquímica e em outras disciplinas. E agora, em Biologia Molecular, você está vendo mais uma vez que as enzimas desempenham um importante papel nessas reações químicas, que vão desde antes da síntese do DNA até a produção das próprias proteínas. Você sabe ainda que as enzimas são protéicas e, por isso, devem ser codificadas por um ácido nucléico. Mas para que exista um ácido nucléico, é necessária a participação de enzimas. E agora? Quem surgiu primeiro, o ácido nucléico ou a proteína? Esta pergunta intriga muitos dos pesquisadores que trabalham na área, os quais propuseram algumas hipóteses.

Na década de 1960, Carl Woese, Francis Crick e Leslie Orgel observaram a complexidade funcional e estrutural do RNA e propuseram que essa macromolécula poderia possuir uma função catalítica além da sua função básica informacional, o que abriria um novo campo de investigação sobre os primórdios da vida. A descoberta do RNA catalítico, conforme descrito anteriormente, e de RNAs que apresentam a capacidade de catalisar a sua própria replicação permitiu formular a hipótese

de um mundo primordial formado apenas por moléculas de RNA. Nesse “mundo do RNA”, as moléculas se comportavam praticamente como organismos vivos, competindo entre si por meio de seleção natural. Aquelas que possuíam maior longevidade e estabilidade eram capazes de se replicar mais vezes e com maior fidelidade e, como consequência, aumentavam a sua população e contribuíam para a extinção de moléculas instáveis. Com o surgimento do código genético e a consequente produção de proteínas, criou-se um mecanismo mais eficiente, uma vez que estava separado do mecanismo informacional e não necessitava de uma estrutura especial para realizar as suas tarefas. É possível que, a partir daí, cada um dos sistemas pôde evoluir com maior eficiência, produzindo uma molécula melhor e mais estável, capaz de armazenar a informação, o DNA, e outra molécula mais maleável, capaz de assumir diferentes conformações que atuassem em reações diferentes, gerando uma melhor especificidade enzimática.

Assim, os RNAs autocatalíticos, ou ribozimas, seriam uma espécie de “elo perdido” para os processos conhecidos atualmente.

## RESUMO

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de conhecer sobre um mecanismo adicional de modificação de RNAs que consiste na retirada de íntrons, que são regiões não codificadoras e a emenda dos éxons, que são as regiões codificadoras. Vimos que, em eucariotos, existe um tipo de emenda que necessita da participação de um complexo formado por ribonucleoproteínas, as quais reconhecem seqüências específicas do RNA e retiram o íntron na forma de uma alça. Além disso, você teve a oportunidade de conhecer o mecanismo de emenda alternativa, que resulta na produção de diferentes RNAs mensageiros a partir de um mesmo RNA primário. Ao final da aula, você teve a oportunidade de aprender sobre outros mecanismos nos quais o próprio RNA desempenha a quebra da região do íntron e a junção dos éxons e que são, por isso, chamados íntrons autocatalíticos. Por último, discutimos a implicação evolutiva da existência de tais RNAs.

## EXERCÍCIOS

1. O que são íntrons? De que forma a sua existência pode ser comprovada?
2. Quais seqüências conservadas puderam ser caracterizadas ao se comparar íntrons de genes diferentes?
3. De que forma ocorre a retirada dos íntrons e a emenda dos éxons?
4. O que são snRNPs? Qual a sua função no mecanismo de emenda?
5. O que é emenda alternativa? Qual a sua principal consequência?
6. Como ocorre a emenda dos íntrons dos grupos I e II?
7. Qual a importância evolutiva dos RNAs autocatalíticos?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu o conteúdo desta aula, não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios propostos. Sem fugir à regra dos assuntos tratados anteriormente, nesta aula, apresentamos uma série de processos moleculares mediados por muitas enzimas em inúmeras etapas. Recomendamos, mais uma vez, que ao término de cada tópico você faça esquemas e resumos e volte ao conteúdo da aula para ver se compreendeu tudo corretamente. A partir da próxima aula, veremos os mecanismos de regulação da expressão gênica em procariotos e eucariotos. Como você já deve ter notado, os conteúdos não são independentes e, a não-compreensão de uma etapa compromete a compreensão da próxima. Por isso, é importante que você compreenda bem as aulas sobre transcrição em procariotos e eucariotos para que possa entender as aulas sobre regulação da expressão gênica. Bom estudo e até lá!

# Regulação da expressão gênica em procariotos

AULA

# 23

## objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Entender o mecanismo de regulação gênica ao nível transcricional em procariotos.
- Estudar diferentes tipos de regulação, utilizando os Operons lac, ara e trp como modelos.

### **Pré-requisitos**

Conteúdo da Aula 5 (Módulo 1).

Conteúdo da Aula 20 (Módulo 3).

## INTRODUÇÃO

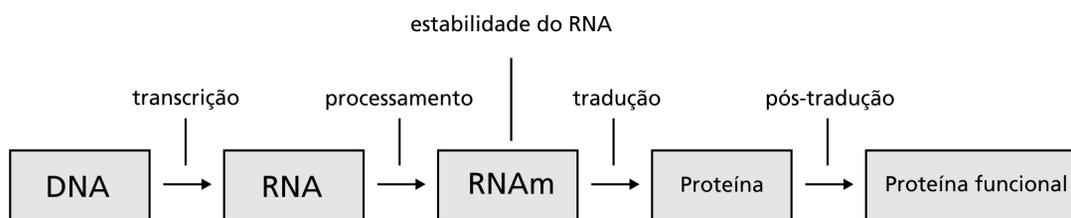
Você já teve a oportunidade de estudar na Aula 5 do Módulo I que existem muitos tipos de RNA na célula e que, muitas vezes, o próprio RNA apresenta função biológica, como é o caso dos rRNAs (RNAs ribossomais), dos tRNAs (RNAs transportadores) e de outros RNAs. Para relembrar, você pode e deve retornar àquela aula e rever esse assunto. Então, quando pensamos em expressão gênica, ou seja, na ativação de um gene para produzir uma molécula biologicamente ativa, não podemos nos esquecer desses RNAs, principalmente, porque eles também participam do mecanismo de síntese protéica e que a sua presença e funcionalidade influenciam diretamente na produção de uma proteína. Assim, quando falamos em regulação da expressão gênica, estamos nos referindo aos genes que codificam proteínas e aos genes que codificam RNAs funcionais. Nas Aulas 20 e 21 deste módulo, você teve a oportunidade de estudar como ocorre a transcrição em procariotos. Mais precisamente, o mecanismo basal de transcrição, ou seja, o maquinário envolvido na produção de um RNA com ênfase para o mecanismo de produção de mRNAs (RNAs mensageiros). No entanto, para a maioria dos genes, ocorre um mecanismo de regulação para a sua expressão.

## POR QUE REGULAR A EXPRESSÃO GÊNICA?

Alguns produtos gênicos como as moléculas de tRNA, rRNA, proteínas ribossomais, RNA polimerase e enzimas que participam de processos metabólicos essenciais são chamados moléculas de “manutenção”, pois são componentes essenciais de quase todas as células de qualquer organismo vivo. Os genes responsáveis pela produção dessas moléculas de “manutenção” são expressos continuamente e são, por isso, chamados genes constitutivos. Em contrapartida, a quantidade de genes em uma determinada célula, ou tipo celular, é muito maior do que o número de proteínas necessário para o funcionamento daquela célula. Partindo desse ponto, a expressão desnecessária de genes, e conseqüente produção de proteínas, resultaria em um gasto energético muito grande. Então, podemos concluir que é vantajoso regular a transcrição, modulando, assim, os níveis de RNAs que são produzidos em um determinado momento da vida daquela célula. Se pensarmos em termos evolutivos, a existência de um mecanismo de regulação, provavelmente, ofereceu aos organismos que o possuíam uma vantagem seletiva sobre os organismos que não o possuíam e, por isso, muitos dos organismos, tais como bactérias ancestrais e vírus, apresentam mecanismos fantásticos e altamente elaborados de regulação da expressão de seus genes.

Nesta aula, você terá a oportunidade de conhecer alguns mecanismos que permitem a regulação da expressão gênica em procariotos. Então, vamos a eles!

Os procariotos sofrem com pequenas variações do meio ambiente, o que leva à necessidade de ajuste no seu metabolismo, visando a uma melhor adaptação às variações do meio externo. Então, surge a primeira pergunta: “De que maneira algumas proteínas podem variar sua quantidade na célula em resposta ao meio no qual o organismo se encontra?”. Na verdade, a partir de um DNA molde até a produção de uma proteína funcional, existem vários pontos que podem influenciar a expressão gênica. A Figura 23.1 ilustra tais pontos.



**Figura 23.1:** Ilustração das diferentes etapas do fluxo da informação gênica e os diferentes pontos em que a produção de uma proteína funcional pode ser regulada.

A regulação pode ocorrer durante a transcrição e a consequente produção do RNA, bem como após a transcrição através do processamento. A estabilidade do transcrito também influencia a síntese da proteína. Outro ponto de regulação ocorre durante a tradução, ou síntese protéica e, também, por modificações na proteína que estarão intimamente relacionadas a sua funcionalidade (assuntos que serão tratados nas aulas do Módulo 4). De um modo geral, a regulação, durante a transcrição, é a mais comum de ocorrer, principalmente em procariotos. De certo modo, é fácil compreender o porquê disso! É mais “barato” para a célula, energeticamente falando, evitar que a transcrição ocorra quando a proteína não é necessária do que ativar os demais mecanismos, uma vez que já houve o gasto com a produção do transcrito!

#### GENE REGULADOR

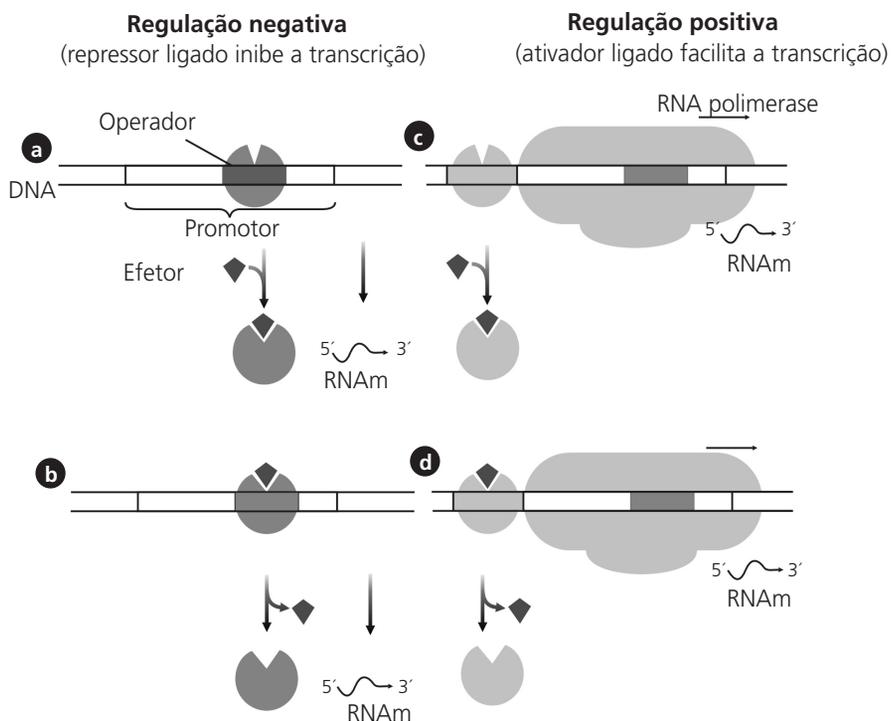
Gene responsável pela produção de um produto gênico que regula a expressão de outros genes. Muitos genes reguladores precisam de outros genes reguladores que atuam na sua ativação e assim por diante.

#### GENES ESTRUTURAIIS

Genes que codificam a seqüência de aminoácidos de proteínas estruturais. Tais genes são diferentes dos genes reguladores.

Existem dois tipos possíveis de regulação da transcrição e, em ambos, existe a participação de um **GENE REGULADOR**. Um deles é conhecido como controle positivo, no qual o produto do gene regulador é necessário para ativar a expressão de um ou mais genes estruturais. Nesse caso, o produto do gene regulador é chamado ativador. No outro, conhecido como controle negativo, o produto do gene regulador é necessário para desativar a expressão de **GENES ESTRUTURAIIS**. Nesse outro caso, o produto do gene regulador é chamado repressor.

Vimos, na Aula 20 (e também na Aula 21), que a expressão de um gene, transcrição, é iniciada quando a RNA polimerase se liga ao promotor em uma seqüência específica. O produto do gene regulador (ativador ou repressor) se liga a uma seqüência localizada próxima ao promotor. Algumas vezes, o produto do gene regulador não consegue se ligar sozinho ao gene e precisa de uma molécula, chamada efetora. As moléculas efetoras são pequenas moléculas, tais como aminoácidos, açúcares e outros metabólitos semelhantes. Quando participam em conjunto com um ativador, são chamadas moléculas indutoras (ou simplesmente indutores) e, quando participam em conjunto com um repressor, são chamadas moléculas co-repressoras (ou simplesmente co-repressores). O mecanismo de ação das moléculas efetoras (indutoras ou co-repressoras) consiste na sua ligação ao produto do gene regulador, promovendo uma mudança na sua conformação. A mudança conformacional de proteínas, geralmente, resulta em alteração na sua atividade. No caso do produto do gene regulador, essa mudança altera a sua capacidade de se ligar na região do DNA próxima ao promotor do gene que ele controla. A **Figura 23.2** ilustra alguns padrões simples de regulação da transcrição. Observe a Figura e acompanhe a explicação a seguir.



**Figura 23.2:** Exemplos de regulação negativa e positiva; (a) molécula efetora se liga ao repressor, fazendo com que ele se desligue do operador; (b) molécula efetora se desliga do repressor, fazendo com que ele se desligue do operador; (c) ativador promove a transcrição da ausência da molécula efetora; (d) ativador promove a transcrição na presença da molécula efetora.

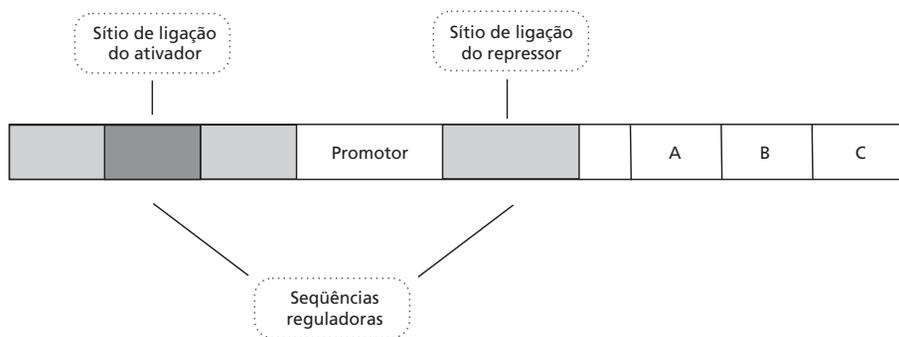
Podemos observar que, durante a regulação negativa, o repressor está ligado ao operador na ausência da molécula efetora (co-repressor). A molécula efetora provoca a dissociação do repressor para permitir a transcrição. No outro caso, o repressor está ligado na presença da molécula efetora. Quando esta é removida, o repressor libera o operador e permite a transcrição. Na regulação positiva, o ativador se liga ao operador na ausência da molécula efetora (indutor), ativando a transcrição. Na presença desta, o ativador é desligado e pára a transcrição. No outro exemplo, o ativador está ligado na presença da molécula efetora. Quando esta é removida, o ativador é desligado, e pára a transcrição. Com esses exemplos, você pode observar que existe mais de um tipo de regulação positiva e negativa.

Para facilitar a compreensão do funcionamento dessas diferentes moléculas, vamos utilizar alguns exemplos de regulação em *Escherichia coli* que utilizam um ou mais de um dos sistemas citados.

### PROMOTOR

Você já viu a função dos promotores dos genes nas Aulas 20 e 21. Se não estiver se lembrando, volte lá e confira! Naquela ocasião, falamos que um promotor ativar a expressão de uma unidade transcricional. No caso do Operon, a unidade transcricional produz um RNA que codifica mais de um produto funcional.

As bactérias possuem um mecanismo geral para a regulação coordenada de genes que codificam produtos relacionados ao funcionamento de um determinado processo bioquímico. Exemplos disso são a rota de biossíntese de aminoácidos na qual participam várias enzimas e o metabolismo de açúcares. Os genes que codificam os produtos envolvidos nos diferentes passos de uma rota estão agrupados em uma região particular do cromossomo e, geralmente, são transcritos como uma única molécula de RNA. A maioria dos mRNAs de procariotos é policistrônica, ou poligênica, o que significa que um mesmo transcrito codifica para mais de uma proteína. A produção do transcrito policistrônico é dirigida por um único **PROMOTOR**, o qual possui seqüências que são responsáveis pela sua regulação. O conjunto formado pelos genes, pelo promotor e pelas seqüências regulatórias recebe o nome Operon. A **Figura 23.3** ilustra um Operon de procariotos.



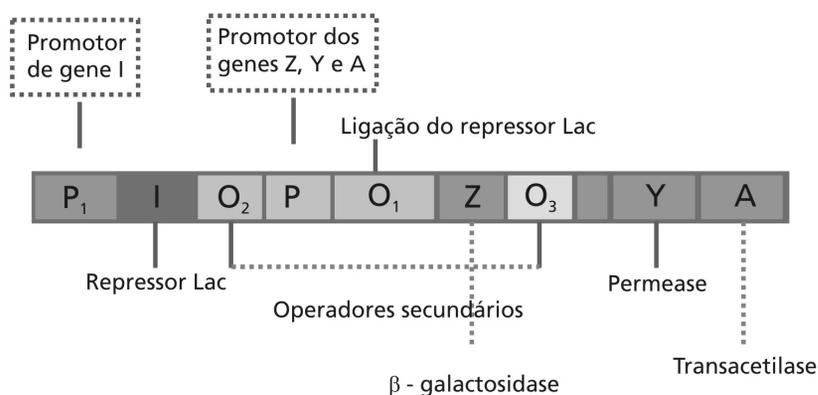
**Figura 23.3:** Esquema representativo de um Operon de procarioto. Os genes A,B e C são transcritos em um RNA policistrônico. As seqüências reguladoras incluem os sítios de ligação para proteínas que ativam ou reprimem a transcrição a partir do promotor.

### O OPERON LAC

Em 1961, os pesquisadores François Jacob e Jacques Monod apresentaram, pela primeira vez, um modelo de regulação da transcrição em *Escherichia coli* ao estudarem o mecanismo de utilização da lactose como fonte de carbono por essa bactéria. Esse trabalho, de extrema importância para a compreensão das interações entre diferentes produtos gênicos lhes rendeu um Prêmio Nobel de Medicina, em 1965. Por aí vocês podem dimensionar a importância de tais descobertas. Jacob e Monod propuseram que a transcrição de dois ou mais genes contíguos é regulada por dois elementos. Um desses elementos, o gene repressor, codifica uma proteína que, em certas circunstâncias, se liga a um segundo

elemento, o operador. O operador está sempre próximo ao gene, ou aos genes, cuja expressão é regulada por ele. É importante citar que, na época em que os dois pesquisadores fizeram seus experimentos, a função dos promotores, que vimos anteriormente, ainda era desconhecida. Quando o repressor está ligado ao operador, ele inibe a atividade da RNA polimerase. Os operadores estão geralmente localizados entre o promotor e a região codificadora do gene. Surgiu, então, pela primeira vez, o conceito de Operon, sendo formado pelo promotor, operador e unidade transcricional.

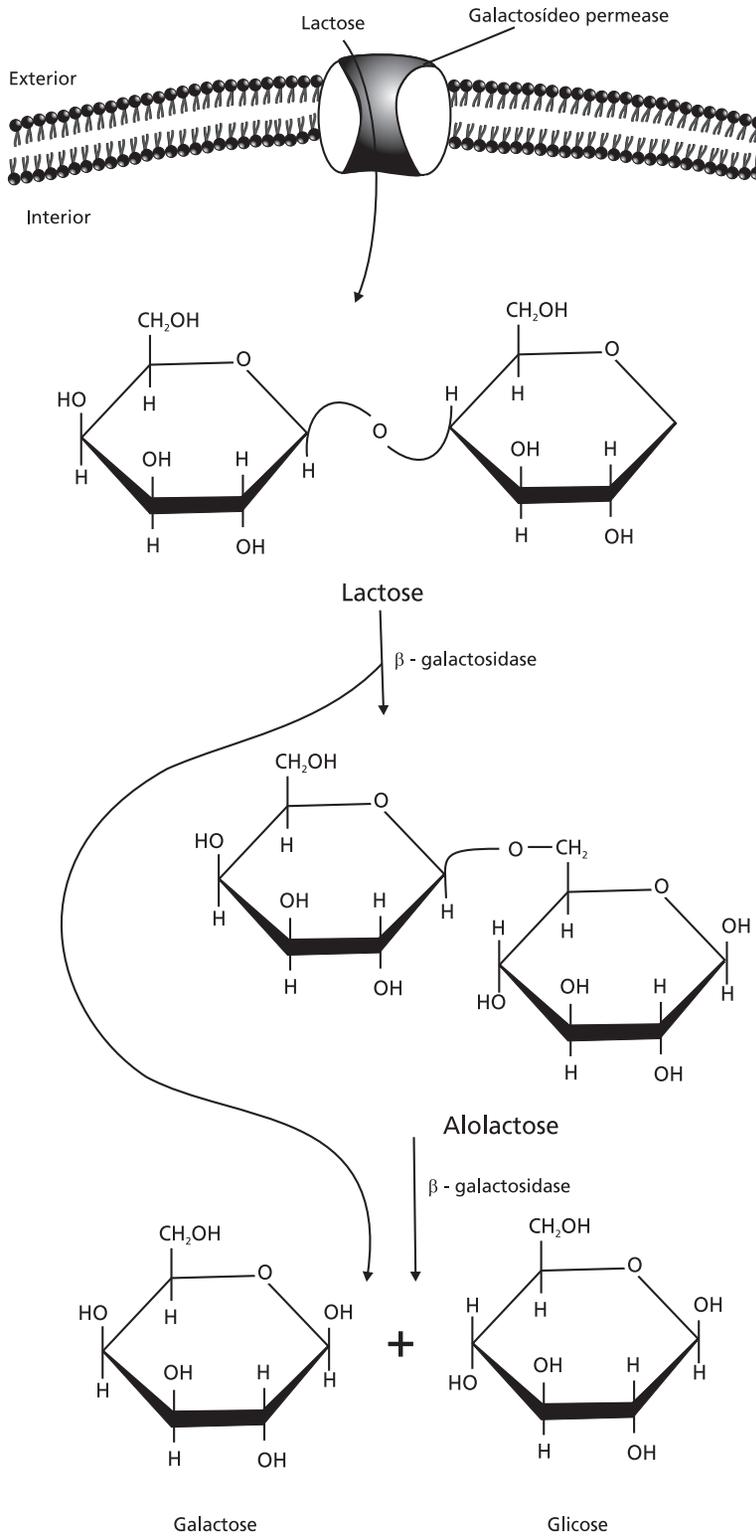
O Operon *lac* contém um promotor (P), um operador principal ( $O_1$ ), dois operadores secundários ( $O_2$  e  $O_3$ ) e três genes estruturais *lacZ*, *lacY* e *lacA* que codificam as enzimas  $\beta$ -galactosidase, permease e transacetilase. Além disso, apresentam o gene que codifica o repressor (gene I) que possui seu próprio promotor. A **Figura 23.4** ilustra o arranjo dos diferentes componentes do Operon *lac*.



**Figura 23.4:** Esquema representativo dos componentes do Operon *lac* de *Escherichia coli*. As regiões correspondentes aos promotores, operadores, genes estruturais e genes reguladores estão representadas.

A enzima  $\beta$ -galactosidase é capaz de clivar a lactose em glicose e galactose que, assim, servirão como fonte de carbono para a célula. A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima indutível, uma vez que sua produção varia de acordo com as necessidades celulares. Sua expressão será alta, caso a bactéria esteja crescendo em meio rico em lactose e será baixa, caso exista um outro carboidrato como fonte de carbono.

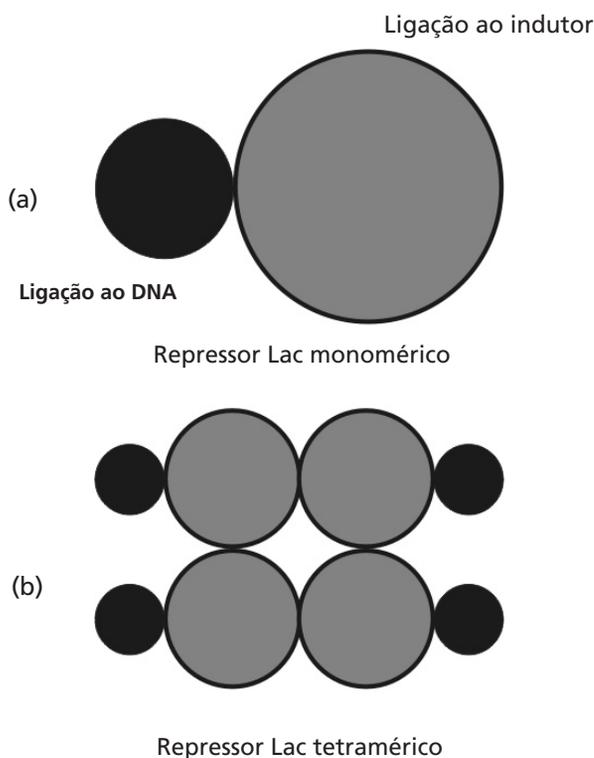
A galactosídeo permease, como seu próprio nome sugere, é a proteína responsável pelo transporte de lactose do meio extracelular para o meio intracelular através da membrana bacteriana. A lactose, como a maioria dos carboidratos, não é capaz de atravessar a bicamada lipídica sem uma proteína carreadora. O papel da transacetilase *in vivo* ainda é incerto, mas *in vitro* ela é capaz de transferir uma acetila, do acetil-CoA, para a hidroxila do carbono 6 de um tiogalactosídeo. A **Figura 23.5** ilustra o metabolismo de lactose em *Escherichia coli*, desde a sua entrada até a sua quebra, promovida pela  $\beta$ -galactosidase.



**Figura 23.5:** O metabolismo de lactose em *Escherichia coli*. A captação da lactose é feita pela galactosídeo permease. Em seguida, a  $\beta$ -galactosidase cliva a lactose em galactose e glicose. Além disso, também é capaz de produzir uma outra molécula chamada alolactose.

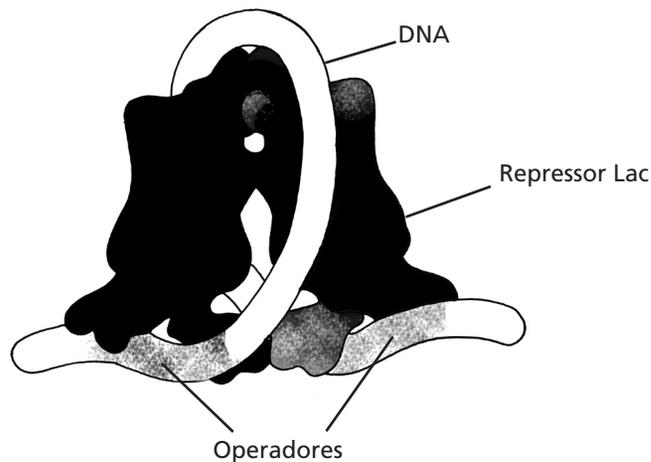
Observe que, além de clivar a lactose em galactose e glicose, a  $\beta$ -galactosidase também promove a formação de uma molécula chamada alolactose. Mais adiante voltaremos a falar sobre o papel dessa molécula na regulação do Operon *lac*.

O estudo de mutantes do Operon *lac* revelou alguns detalhes do funcionamento do sistema regulatório dos Operons. Você já notou que os mutantes estão em todos os lugares, não é mesmo! Na ausência de lactose, os genes do Operon *lac* estão reprimidos. Mutações no operador ou no gene I levam à síntese constitutiva dos produtos gênicos. Quando o gene I estiver defeituoso, a repressão pode ser restaurada introduzindo um gene funcional I na célula ou numa outra molécula de DNA, demonstrando que o gene I codifica uma molécula difusível que causa a repressão. Essa molécula é uma proteína chamada repressor Lac. O repressor *Lac* é um tetrâmero composto por monômeros idênticos, ou seja, quatro moléculas da mesma proteína se unem para formar a estrutura funcional. A Figura 23.6 ilustra o repressor *Lac*.



**Figura 23.6:** Esquema representando a molécula do repressor Lac. (a) Lac monomérica, (b) Lac tetramérica. Os sítios de ligação ao indutor e ao DNA estão indicados.

O operador, ao qual ele se liga mais fortemente (chamado  $O_1$ ), encontra-se ao lado do sítio de início da transcrição. O gene *I* é transcrito a partir do seu próprio promotor ( $P_1$ ) e é independente dos genes do Operon *lac*. O Operon *lac* possui, ainda, outros dois operadores secundários, aos quais se liga o repressor Lac. O operador  $O_2$  está localizado próximo à posição +410 (dentro do gene que codifica para a  $\beta$ -galactosidase). Já o operador  $O_3$  está localizado próximo à posição -90 (dentro do gene *I*, que codifica o repressor). O repressor Lac se liga ao operador principal  $O_1$  e a um dos operadores secundários ( $O_2$  ou  $O_3$ ). Como consequência, ocorre a formação de uma alça formada pelo DNA presente nos dois sítios de ligação. A formação da alça bloqueia o início da transcrição. Veja na Figura 23.7 a estrutura da alça descrita anteriormente.



**Figura 23.7:** O repressor Lac se liga ao operador principal ( $O_1$ ) e a um dos operadores secundários ( $O_2$  ou  $O_3$ ), formando uma alça no DNA que envolve o repressor, como mostrado. Essa estrutura “esconde” o promotor dos genes *Z*, *Y* e *A*, impedindo a sua transcrição.

A ligação do repressor Lac reduz em cerca de 1.000 vezes a velocidade de iniciação da transcrição. Se os sítios  $O_2$  e  $O_3$  forem eliminados por deleção ou mutação, a ligação do repressor no sítio  $O_1$  reduz a transcrição em cerca de 100 vezes. Apesar desse elaborado complexo de ligação, a repressão não é absoluta. Mesmo no estado reprimido, cada célula possui algumas moléculas de  $\beta$ -galactosidase e da galactosídeo permease, presumivelmente sintetizadas nas raras ocasiões em que o repressor dissocia-se temporariamente dos operadores. Esse nível de transcrição basal é essencial para a regulação do Operon.

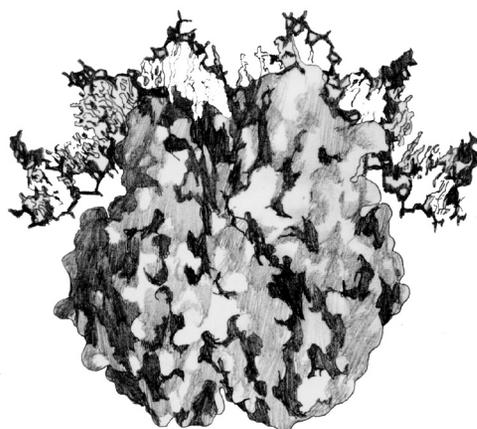
Quando a lactose está disponível, o Operon *lac* é induzido. Uma molécula indutora (sinal) se liga a um sítio específico do repressor Lac, causando uma mudança conformacional que leva à dissociação do repressor do operador. O indutor do sistema do Operon *lac* não é a própria lactose, mas sim um isômero da lactose chamado alolactose. Conforme vimos anteriormente, depois de entrar na célula, a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas de  $\beta$ -galactosidase existentes. A liberação do repressor Lac causada pela alolactose permite que os genes do Operon *lac* sejam expressos e leva a um aumento de 1.000 vezes na concentração da  $\beta$ -galactosidase.

A presença da glicose inibe a indução do Operon *lac*, bem como outros Operons que controlam a síntese de enzimas envolvidas com o catabolismo de carboidratos. Esse fenômeno, chamado repressão catabólica, assegura que a glicose será preferencialmente utilizada, quando presente, em vez de uma outra fonte de carbono.

A repressão catabólica é mediada por uma proteína regulatória chamada CRP (do inglês *cAMP receptor protein*, que significa proteína receptora de cAMP), também conhecida como CAP (do inglês *Catabolite Activator Protein*, que significa proteína ativadora por catabólito) e por uma molécula efetora pequena chamada cAMP (AMP cíclico – adenosina 3', 5'- monofosfato). A proteína CRP é um homodímero (cada subunidade possui massa de 22 kDa) que possui sítios de ligação para o DNA e o cAMP.

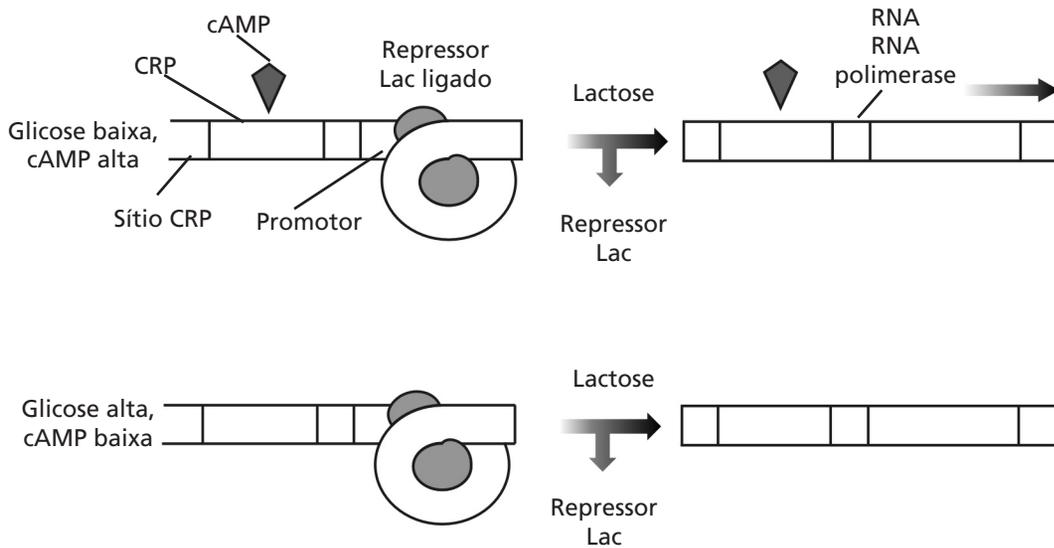
Sabe-se que o promotor *lac* contém dois sítios de ligação separados, um deles para a ligação da RNA polimerase e outro para a ligação do complexo CRP-cAMP. A Figura 23.8 ilustra a ligação do complexo CRP-cAMP no DNA.

**Figura 23.8:** Complexo proteína CRP-cAMP ligado ao DNA.



O complexo precisa estar presente no seu sítio de ligação para que o promotor do Operon *lac* seja ativado. O complexo exerce um controle positivo na transcrição do Operon *lac*, oposto ao efeito observado para a proteína repressora. Somente o complexo se liga ao promotor. Na ausência de cAMP, a proteína CRP não se liga. A concentração intracelular de cAMP é sensível à presença de glicose. A glicose inibe a atividade da enzima adenilato-ciclase, responsável pela síntese de cAMP, de modo que, na presença de glicose, os níveis de AMPc serão baixos e com isso não haverá a formação do complexo com a proteína CRP e a conseqüente ligação ao promotor, mantendo o Operon *lac* inativo.

Neste ponto, faremos uma pausa para reflexão sobre os diferentes tópicos que foram abordados até agora. Vamos tentar resumir os principais aspectos da regulação do Operon *lac* para facilitar a compreensão e darmos continuidade com os demais exemplos. A Figura 23.9 resume a regulação do Operon *lac*.



**Figura 23.9:** Resumo da regulação do Operon *lac*. Na ausência de glicose e presença de lactose, o complexo CRP-cAMP se liga ao promotor, estimulando a transcrição, ao mesmo tempo que o repressor Lac será desligado do operador pela ação da alolactose. Na presença de glicose, o complexo CRP-cAMP não se forma e, conseqüentemente, não ocorre a transcrição. Mas para que a transcrição ocorra também é necessária a presença da lactose que, através do seu derivado alolactose, irá deslocar o repressor Lac do operador.

A lactose não é a principal fonte de carbono utilizada pela bactéria *Escherichia coli*. No entanto, na falta de glicose, ela pode ser metabolizada. Para evitar um desperdício de energia durante a produção das proteínas envolvidas no metabolismo da lactose, elas somente serão produzidas quando a lactose estiver presente no ambiente. Então, na ausência de lactose, existe uma proteína repressora chamada Lac que se liga ao operador do Operon e faz com que ele fique inativo. Na presença de lactose, a enzima  $\beta$ -galactosidase produz alolactose que funciona como um agente indutor, uma vez que se liga ao repressor Lac e faz com que ele se desligue do operador. Pois bem, essa é uma das formas de regulação.

A segunda é modulada pela presença da glicose. Existe uma proteína CRP que ativa a transcrição dos genes do Operon *lac* através da sua ligação com uma região localizada no promotor do Operon. No entanto, a proteína CRP só é capaz de se ligar ao promotor caso ela esteja ligada ao cAMP que, por sua vez, só estará disponível quando a glicose estiver baixa, uma vez que a glicose inibe a enzima que produz o cAMP. Deste modo, podemos concluir que, quando existir lactose e glicose, a glicose será utilizada primeiro, e a lactose só será utilizada quando os níveis de glicose baixarem e houver produção de cAMP. Em adição, a presença da lactose é necessária para produzir a alolactose, que é a molécula que permitirá o desligamento do repressor Lac do operador. Agora podemos analisar o segundo exemplo de Operon, chamado Operon *ara*, responsável pelo metabolismo do açúcar arabinose.

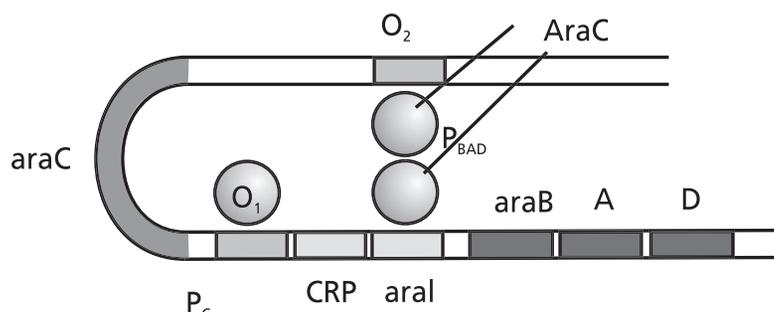
## O OPERON ARA

Um esquema regulador mais complexo é encontrado no Operon arabinose (*ara*) de *Escherichia coli*. A **Figura 23.10** ilustra o Operon *ara*. Observe a figura e acompanhe a explicação a seguir.



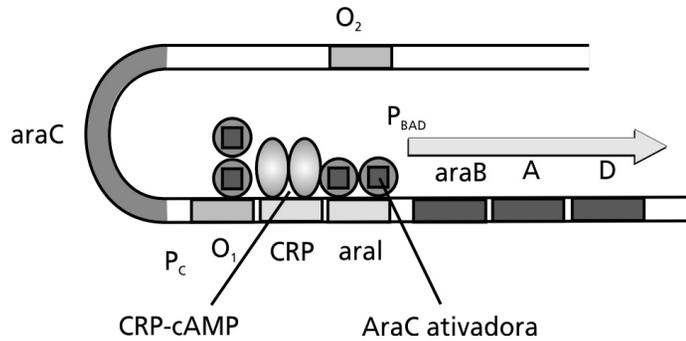
No Operon *ara*, a proteína reguladora AraC exerce um controle positivo e também um controle negativo. De que maneira isso é possível? Pois bem, a proteína reguladora se liga a uma molécula sinal (arabinose) que promove uma mudança conformacional na sua estrutura. Essa mudança faz com que a proteína mude de uma forma repressora para uma forma ativadora da transcrição. Essa mudança tem consequências drásticas no seu efeito final. Além disso, a proteína repressora, AraC, regula sua própria síntese através da inibição da transcrição do próprio gene. Esse mecanismo é chamado auto-regulação. Por último, os efeitos de algumas seqüências reguladoras podem ser exercidos a distância, ou seja, essas seqüências nem sempre estão localizadas próximas dos promotores. As seqüências de DNA distantes podem ser aproximadas pela formação de uma alça de DNA. Essa aproximação ocorre através de interações específicas proteína-proteína e proteína-DNA.

O papel da proteína AraC na regulação do Operon *ara* é complexo. Vamos tentar entender como isso funciona! Quando a concentração de AraC excede 40 cópias por célula, ela regula sua própria síntese, ligando-se ao *araO*<sub>1</sub> e reprimindo a transcrição do gene *araC*. Ela age tanto como um regulador positivo como negativo dos genes do *araBAD* e, nessa qualidade, liga-se tanto ao *araO*<sub>2</sub> quanto ao *araI*. Quando ligada ao *araO*<sub>2</sub> ela se liga simultaneamente ao *araI* e inibe a transcrição a partir do *P*<sub>BAD</sub>. Quando a arabinose está ausente, não é necessário expressar os genes estruturais que participam do seu metabolismo. A AraC se liga simultaneamente ao *araO*<sub>2</sub> e ao *araI* e, como resultado, promove a formação de uma alça que compreende o DNA localizado entre os dois sítios. A formação da alça impede o acesso da RNA polimerase ao promotor. A Figura 23.11 ilustra a estrutura da alça.

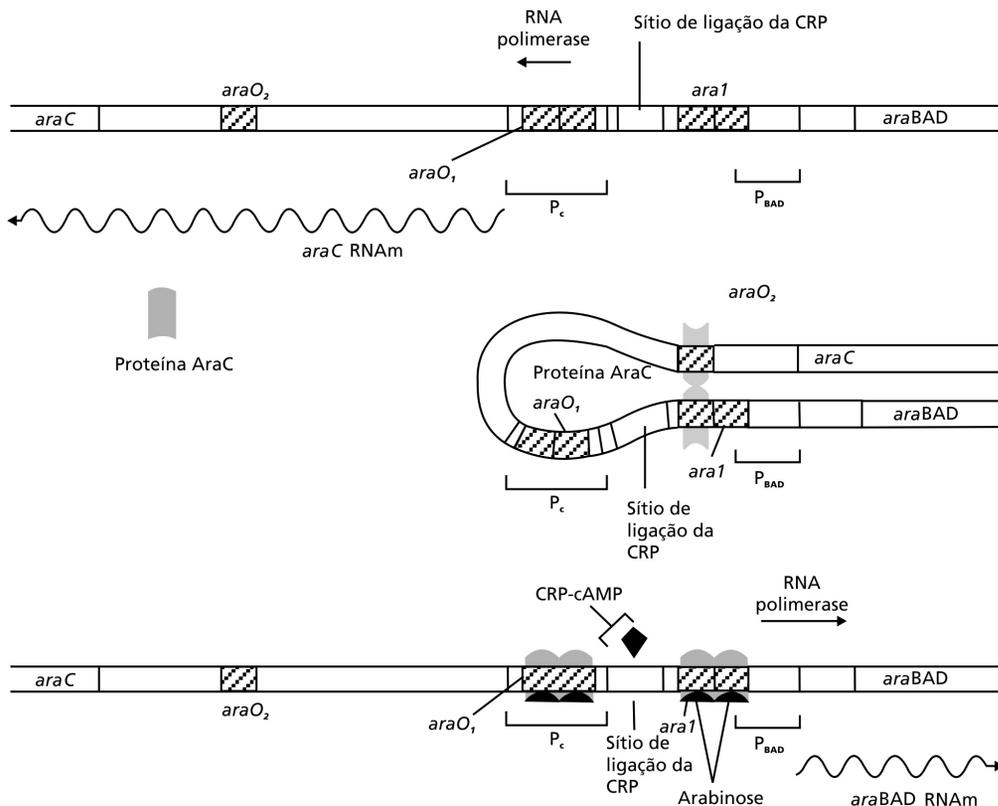


**Figura 23.11:** Esquema representativo da formação da alça de DNA em função da ligação da proteína AraC no *araO*<sub>2</sub> e no *araI*. Observe que a estrutura “esconde” o *P*<sub>BAD</sub> e impede a transcrição dos genes estruturais.

**Figura 23.12:** A ligação do complexo CRP-cAMP auxilia a ligação da AraC ativadora (após a ligação com arabinose) no *araI* e promove a abertura da alça de DNA.



Quando a arabinose está presente, ela se liga à proteína AraC e provoca uma alteração conformacional, que faz com que a AraC assuma a sua função como ativadora da transcrição. AraC se liga ao *araI*, que funciona também como um sítio ativador. Se a glicose estiver ausente, ocorre a formação do complexo CRP-cAMP, o qual se ligará ao seu sítio de ligação localizado entre o *araO<sub>2</sub>* e o *araI*. Essa ligação faz com que a alça de DNA (formada pela proteína ligada ao *araO<sub>2</sub>* e *araI*) se rompa e auxilia na ligação da AraC ao *araI*. Nesse caso, o complexo CRP-cAMP não exerce a função de auxiliar a ligação da RNA polimerase ao promotor. A **Figura 23.12** ilustra o que foi descrito e a **Figura 23.13** apresenta um resumo dos diferentes eventos.



**Figura 23.13:** Regulação do Operon *ara*.

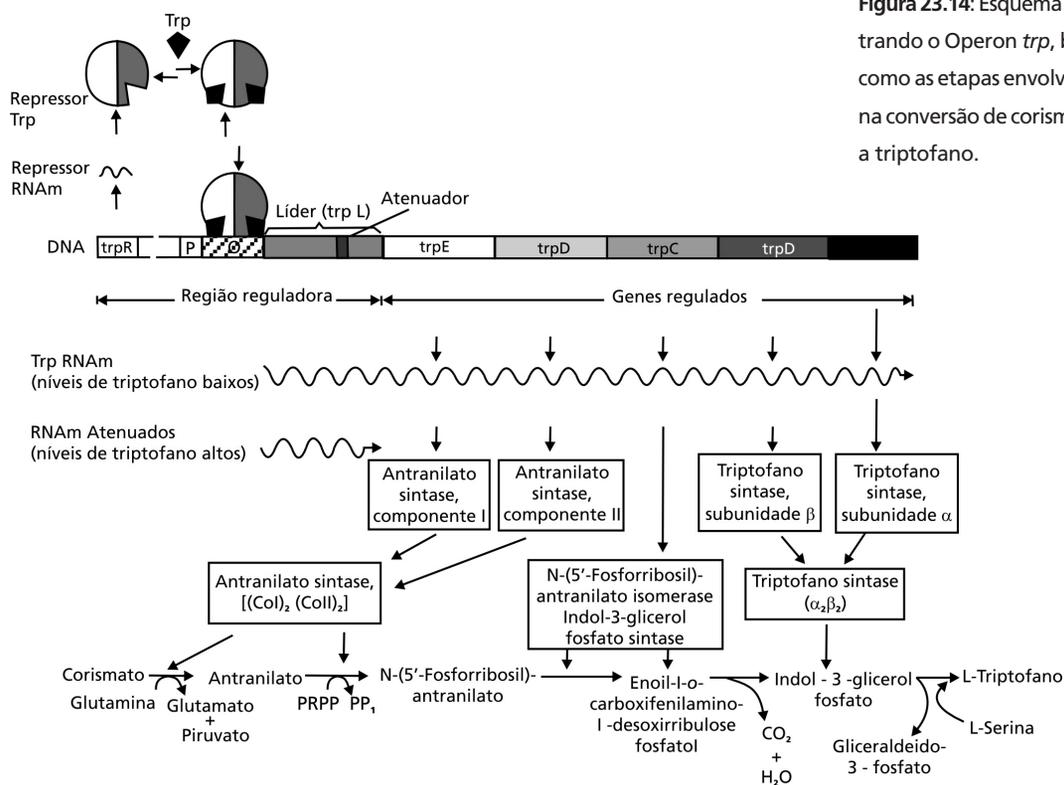
Quando tanto a arabinose quanto a glicose estão abundantes, ou ambas estão ausentes, o Operon *ara* permanece reprimido. Todavia, não se sabe, ao certo, a situação em que se encontram as proteínas reguladoras e os seus sítios de ligação nestas condições. A regulação do Operon *ara* é rápida e reversível, um exemplo de mudança de resposta, no nível de regulação gênica, à troca de condições ambientais.

Agora que você já teve contato com dois tipos de Operons que modulam o metabolismo de açúcares, veremos o terceiro exemplo de Operon desta aula que está relacionado com a biossíntese do aminoácido triptofano.

### O OPERON TRIPTOFANO

Os vinte aminoácidos-padrão são requeridos em grandes quantidades para a síntese de proteínas e a *Escherichia coli* é capaz de sintetizar todos eles. Os genes das enzimas necessárias para sintetizar um certo aminoácido estão, geralmente, agrupados num Operon e são expressos todas as vezes em que os suprimentos do aminoácido sejam inadequados para atender às necessidades celulares. Quando o aminoácido estiver abundante, as enzimas biossintetizantes não são mais necessárias e o Operon é reprimido.

O Operon triptofano (*trp*) da *Escherichia coli* inclui cinco genes estruturais que codificam as três enzimas utilizadas na conversão de corismato em triptofano. A Figura 23.14 ilustra o Operon triptofano. Observe a figura e acompanhe as explicações a seguir.



**Figura 23.14:** Esquema ilustrando o Operon *trp*, bem como as etapas envolvidas na conversão de corismato a triptofano.

O gene *trpE* codifica o componente I da antranilato sintase, enquanto o componente II é produzido pelo gene *trpD*. O gene *trpC* codifica a N- (5'-fosforribosil antranilato isomerase/ indol – 3 – glicerol fostato sintase. O gene *trpB* codifica a subunidade  $\beta$  da triptofano sintase, enquanto o gene *trpA* codifica a subunidade  $\alpha$ .

A expressão do Operon é regulada pela proteína repressora TrpR, que é produzida a partir do gene *trpR*. O gene *trpR* está localizado a uma longa distância do Operon. O repressor Trp é um homodímero, com cada subunidade contendo 107 resíduos de aminoácidos. Quando o triptofano for abundante, ele se liga ao repressor Trp, provocando uma alteração conformacional que permite ao repressor se ligar ao operador *trp* e inibir a expressão do Operon *trp*. O sítio do operador *trp* se sobrepõe ao promotor, de forma que a ligação ao repressor pode bloquear a ligação da RNA polimerase.

Novamente, esse circuito simples ligar/desligar mediado pelo repressor não nos conta toda a história regulatória. Um mecanismo muito mais intrigante foi descoberto no Operon *trp*. Quando foi descoberta a regulação negativa do operon *trp*, modulada pelos níveis de triptofano e a sua ligação à TrpR, acreditava-se que um mutante para o gene *trpR* deveria ser insensível ao triptofano. Imagine a surpresa quando descobriram que tal mutante continuava não expressando os genes estruturais após a adição de triptofano. A partir dessa observação, estabeleceu-se um segundo nível de controle pelo triptofano que envolvia dois componentes: o tRNA para o triptofano, tRNA<sup>trp</sup> e o gene *trpL*.

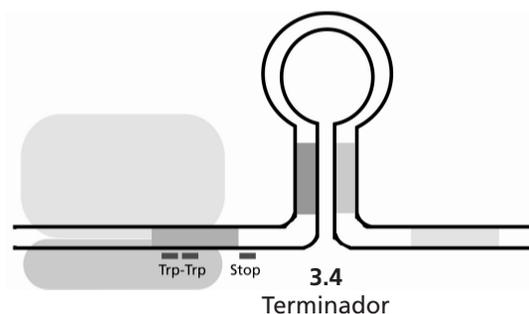
O gene *trpL* codifica um peptídeo que possui 14 aminoácidos. Na sua seqüência, ele contém dois códons para o triptofano e, dessa forma, serve como um “termômetro” que sinaliza o suprimento de *trp* na célula. Se o triptofano estiver abundante, o tRNA<sup>trp</sup> carregado com triptofano também estará disponível e com isso o peptídeo será traduzido. Se o triptofano estiver ausente, a tradução pára no ponto em que os ribossomos encontram os códons *trp*.

Você deve estar se perguntando: “E daí? O que isso tem a ver com a transcrição do Operon?”

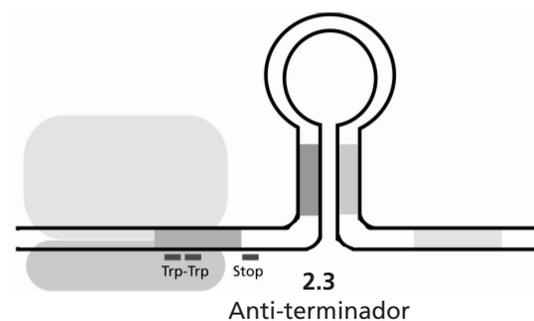
A resposta para essa pergunta foi dada a partir da observação de que o mRNA do *trpL* pode assumir diferentes conformações devido à presença de várias regiões complementares que podem formar estruturas do tipo grampo de cabelo. Uma das conformações é muito

semelhante ao terminador da transcrição típico de bactérias. Você já teve a oportunidade de conhecer essa estrutura na Aula 20. Ela é resultante do pareamento entre as regiões 3 e 4 e está ilustrada na **Figura 23.15**. Na outra conformação, o terminador não é formado porque a região 3 está agora pareada com a região 2, ilustrada na **Figura 23.16**. Essas estruturas são chamadas terminador e anti-terminador, respectivamente.

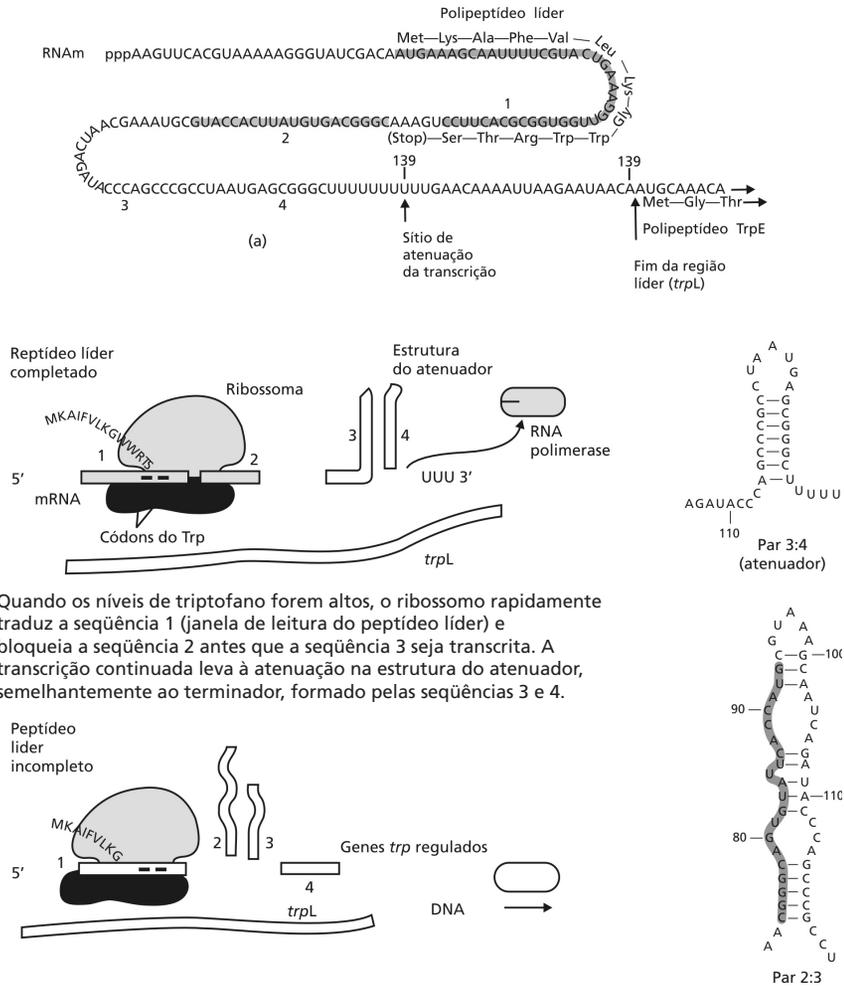
**Figura 23.15:** Estrutura do terminador formado através do pareamento das regiões 3 e 4 do gene *trpL*.



**Figura 23.16:** Estrutura do anti-terminador formado através do pareamento das regiões 2 e 3 do gene *trpL*.



O que leva à formação de uma ou de outra estrutura? Você já sabe que, em procariotos, a transcrição e a tradução podem ocorrer simultaneamente, não é mesmo? Então, os ribossomos estão ligados ao RNAm e podem influenciar a formação dessas estruturas no RNA. Se houver triptofano, o ribossomo segue logo atrás da RNA polimerase até o ponto em que é interrompido por um códon de parada, localizado na região 2 do transcrito. Nessa situação, ocorre a formação da alça através do pareamento entre as regiões 3 e 4. Se não houver triptofano, o tRNA<sup>trp</sup> não estará carregado com triptofano e o ribossomo ficará detido na região 1, esperando a chegada de um tRNA apropriado. Com isso, a região 2 está livre e pode se parear com a região 3. Essa estrutura não impede o avanço da RNA polimerase e o transcrito dos genes estruturais é produzido normalmente. A **Figura 23.17** resume os eventos que foram descritos.



Quando os níveis de triptofano forem altos, o ribossomo rapidamente traduz a seqüência 1 (janela de leitura do peptídeo líder) e bloqueia a seqüência 2 antes que a seqüência 3 seja transcrita. A transcrição continuada leva à atenuação na estrutura do atenuador, semelhantemente ao terminador, formado pelas seqüências 3 e 4.

Quando os níveis de triptofano forem baixos, o ribossomo pausa nos códons do Trp na seqüência 1. A formação da estrutura pareada entre as seqüências 2 e 3 previne a atenuação, porque a seqüência 3 não estará mais disponível para formar a estrutura do atenuador com a seqüência 4. A estrutura 2:3, ao contrário do atenuador 3:4, não impede a transcrição.

Figura 23.17: Mecanismo de regulação da transcrição por atenuação no Operon *trp*.

A seqüência regulatória 1 é crucial para o mecanismo sensível ao triptofano que determina se a seqüência 3 pareia com a seqüência 2 (permitindo que a transcrição continue) ou com a seqüência 4 (transcrição atenuada).

Com esses três exemplos estudados, você pode ter uma idéia dos diferentes mecanismos de regulação da transcrição em procariotos. Você pôde observar que, nos três casos, a presença da molécula envolvida na rota bioquímica é quem determina a expressão dos genes estruturais.

Todos esses mecanismos têm como objetivo otimizar a utilização dos recursos pela célula e minimizar o gasto desnecessário com a produção de produtos que só são utilizados em determinadas circunstâncias. É claro que existem outros mecanismos, para outros genes, mas nós vamos parar por aqui, pois, se você compreender o funcionamento destes que foram apresentados, já terá uma idéia da complexidade de outros mecanismos similares.

## RESUMO

Nesta aula, você teve a oportunidade de aprender que existem muitos mecanismos possíveis de regular a expressão de um gene, mas que o mais comum é a regulação da transcrição. Nós falamos sobre um tipo especial de regulação que é muito comum em procariotos, conhecida como Operon. Vimos que, em um Operon, existem vários genes que codificam proteínas relacionadas a um determinado processo bioquímico, e que esses genes são expressos em conjunto. No Operon, existem alguns componentes que codificam proteínas reguladoras, as quais podem ativar ou desativar a expressão dos genes. No caso do Operon lac, você viu que ele é regulado por uma proteína repressora, que se liga ao sítio operador e só será desligada na presença do indutor alolactose. Viu ainda que o complexo CRP-cAMP ativa a transcrição do Operon quando não existe glicose disponível. Mais adiante, vimos um segundo Operon, envolvido na utilização do açúcar arabinose. Neste caso, a regulação é mais complexa, pois a proteína AraC que regula o Operon atua tanto como repressor como ativador da transcrição dos genes estruturais. O complexo CRP-cAMP também participa do processo, mas não ativa a transcrição do Operon. E, por último, vimos que o Operon trp é regulado pela presença do aminoácido triptofano na célula. Este Operon responde a dois sistemas de regulação, um deles através da proteína repressora TrpR, que se liga ao operador na presença de triptofano e, também, um segundo mecanismo chamado atenuação que regula a transcrição dos genes estruturais, através da formação de estruturas tipo grampo de cabelo na molécula do RNAm. Esse tipo de regulação é possível graças à sincronia entre o processo de transcrição e tradução que ocorre em procariotos. Em síntese, podemos dizer que regulação da transcrição dos genes está intimamente relacionada às necessidades fisiológicas da célula.

## EXERCÍCIOS

1. Quais são os possíveis pontos de controle na expressão de um gene que codifica para uma proteína?
2. O que é um Operon?
3. Qual o papel da proteína CRP no mecanismo de regulação do Operon lac?
4. Como ocorre a regulação do Operon ara?
5. O mecanismo de regulação por atenuação pode ocorrer em eucariotos? Justifique sua resposta.

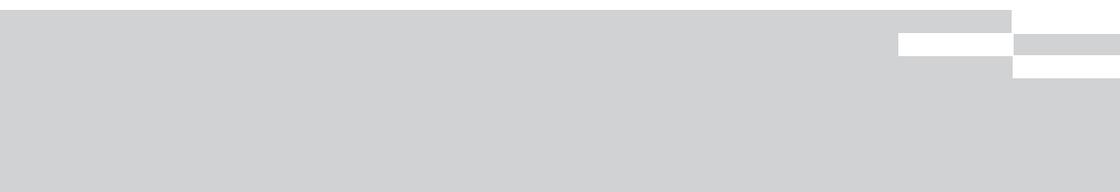
## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu bem o conteúdo desta aula, não deve ter encontrado dificuldades para fazer os exercícios. Tenha em mente que os diversos exemplos utilizados servem como modelos para compreender a complexidade envolvida em mecanismos celulares relativamente simples. Nas próximas aulas, você conhecerá alguns mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em eucariotos, que são bem mais complexos do que em procariotos. Por isso, é importante que você estude com carinho os conteúdos desta aula para que possa compreender as próximas. Bom estudo e até a próxima!

**Biologia Molecular**



Gabbarito



## Aula 9

---

1. Sim. A partir da replicação, que significa produzir uma réplica do DNA idêntico ao original, é possível perpetuar as informações genéticas que serão transmitidas para as células-filhas. Tais informações serão utilizadas para a produção de suas características. Comentário: esse exercício fará com que você reflita sobre o papel da replicação na perpetuação das informações genéticas de um indivíduo.
2. A partir da descrição do modelo da dupla hélice, composta por duas fitas complementares e antiparalelas, que são ligadas através de pontes de hidrogênio formadas entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos. As pontes de hidrogênio podem ser facilmente rompidas, gerando duas fitas simples. Outros nucleotídeos, contendo suas respectivas bases nitrogenadas, podem ligar-se através da formação de pontes de hidrogênio, permitindo, assim, a formação de duas fitas duplas a partir de duas fitas simples. Comentário: ao responder a este exercício, você poderá visualizar o modelo a partir das propriedades químicas da molécula de DNA.
3. Replicação semiconservativa significa que uma das duas fitas, que serviu de molde para a replicação, foi conservada da molécula-mãe (semi, que significa metade). A outra fita é aquela recém-sintetizada, a partir do molde (fita-filha). Comentário: esse exercício é para enfatizar o conceito sobre o modo de replicação do DNA.

## Aula 10

---

1. Durante a replicação, algumas estruturas foram observadas, através de microscopia eletrônica. Uma delas apresenta um formato semelhante a um olho, formado pelo DNA já replicado e pelo DNA ainda não replicado. Esse tipo de estrutura é encontrado na replicação de DNAs lineares. Em DNAs circulares, observou-se a formação de uma estrutura que se assemelha à letra grega  $\theta$ . Essas estruturas são formadas em função do estabelecimento das forquilhas de replicação, que representam o movimento do aparato de replicação ao longo do DNA. Comentário: esse exercício fará com que você analise as estruturas e possa, posteriormente, associá-las ao maquinário enzimático. É interessante que você esquematize as estruturas, para compreender melhor o que acontece.

2. A DNA polimerase I de *Escherichia coli* apresenta três atividades distintas: atividade de polimerase 5' - 3' ; atividade de exonuclease 5' - 3' e atividade de exonuclease 3' - 5'. Comentário: esse exercício chama a atenção para as outras funções da DNA polimerase I, enfatizando que sua principal função não está associada à replicação.

3. A polimerase III é formada por muitas subunidades. Apresenta dois núcleos catalíticos formados pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\theta$  e  $\epsilon$ . Cada núcleo catalítico é o responsável pela síntese de uma das fitas do DNA. Apresenta duas garras  $\beta$ , formadas por um dímero da subunidade  $\beta$ . Cada garra  $\beta$  está situada em uma das fitas do DNA. A garra  $\beta$  se liga ao DNA e ao núcleo catalítico, proporcionando uma maior estabilidade deste último, garantindo, assim, a síntese do DNA. Um dímero  $\tau$  liga os dois centros catalíticos, permitindo o acoplamento simultâneo nas duas fitas do DNA. Um complexo  $\gamma$  é formado pelas subunidades  $\gamma$ ,  $\chi$  e  $\delta$ . Esse complexo é conhecido como disparador/carregador de garra  $\beta$ , pois utiliza energia da quebra de ATP para prender o dímero  $\beta$  ao DNA. Comentário: esse exercício fará com que você revise os diferentes componentes da DNA polimerase III. É recomendável que você tente responder com suas próprias palavras, de preferência através de esquemas, que auxiliarão a compreensão.

4. A helicase é uma enzima que utiliza a hidrólise de ATP para romper as pontes de hidrogênio, presentes na molécula de DNA dupla fita. A abertura das fitas é fundamental para que ocorra a replicação, pois é necessário que haja a exposição dos moldes que serão replicados. A SSB é uma proteína que liga DNA fita simples; seu papel é importante para manter essas fitas separadas. Comentário: esse exercício fará com que você reflita sobre a importância dessas duas proteínas no início da replicação.

5. A topoisomerase desempenha um papel fundamental durante o mecanismo de replicação do DNA porque a abertura das fitas pela DNA helicase gera uma tensão contorcional no DNA localizado mais adiante, de modo que o DNA vai ficando mais apertado e tende a se superespiralar. A topoisomerase relaxa a tensão contorcional através de cortes provocados na molécula de DNA, que permitem que a molécula gire e assumam uma conformação mais estável. Assim, a topoisomerase atua sempre na frente da helicase, à medida que a forquilha de replicação caminha ao longo do DNA. Comentário: esse exercício fará com que você pense no mecanismo de replicação de uma forma dinâmica, no qual a participação coordenada de cada enzima é fundamental para o sucesso do mecanismo como um todo.

1. Porque a DNA polimerase só consegue sintetizar DNA na orientação 5' - 3'. A DNA polimerase utiliza um grupamento hidroxila livre do nucleotídeo anterior e promove a formação de uma ligação fosfodiéster entre os dois nucleotídeos. À medida que uma das fitas é sintetizada, a fita complementar é exposta e deve ser replicada de forma descontínua, para que ambas as fitas sejam sintetizadas simultaneamente. Caso contrário, seria necessário abrir a molécula completamente e começar a síntese contínua a partir da outra extremidade do DNA. Comentário: esse exercício fará com que você associe a atividade da DNA polimerase com a necessidade de replicar as duas fitas do DNA.
2. Várias moléculas da proteína DnaA se ligam às repetições de 9 pares de bases presentes na origem de replicação, o DNA se enrola e esse enrolamento provoca uma tensão que resulta no rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos presentes nas repetições de 13 pares de bases. O fato de essas repetições serem ricas em A = T facilita a abertura das fitas. Após a abertura das fitas, a proteína SSB se liga ao DNA simples fita, mantendo-as separadas e permitindo a ligação da DNA helicase. Comentário: este exercício fará com que você revise o assunto relacionado ao início da replicação.
3. Os fragmentos de Okazaki são os segmentos de DNA que estão sendo sintetizados de forma descontínua, permitindo a replicação da fita 5' - 3'. Comentário: esse exercício visa à fixação do conceito de que uma das fitas é sintetizada de forma descontínua.
4. A DNA primase sintetiza um iniciador de RNA na fita líder, que fornecerá o grupamento hidroxila livre para a síntese do DNA. O complexo  $\gamma$  carrega uma garra  $\beta$  até o iniciador e permite a ligação do núcleo catalítico, o dímero  $\tau$  se liga a um outro núcleo catalítico. À medida que a síntese da fita líder prossegue, a DNA primase sintetiza um iniciador na fita tardia, ao qual será ligado uma garra  $\beta$  através da atividade do complexo  $\gamma$ . Nesse ponto o segundo núcleo catalítico ligado ao dímero  $\tau$  irá se ligar a garra  $\beta$  e iniciar a síntese de um fragmento de Okazaki. A síntese de um fragmento termina quando ele encontra um outro fragmento que foi sintetizado anteriormente. A garra  $\beta$  é liberada; mais adiante, a DNA primase sintetiza um outro iniciador ao qual será ligada uma garra  $\beta$  por intermédio do complexo  $\gamma$ . O núcleo catalítico que se despreendeu do DNA após o deslocamento da garra  $\beta$  no fragmento anterior irá se ligar novamente a essa outra garra  $\beta$  e iniciar a síntese de um novo

fragmento de Okazaki. E assim sucessivamente, até que toda a fita tardia tenha sido sintetizada. Os iniciadores de RNA são retirados pela atividade exonucleásica da DNA polimerase I, que também preenche a falha, adicionando nucleotídeos. Posteriormente, os fragmentos são unidos através da atividade da enzima DNA ligase. Comentário: esse exercício fará com que você revise o assunto sobre replicação, tentando explicar com suas próprias palavras, de preferência com o auxílio de esquemas, e facilitará a compreensão do processo como um todo.

5. O fato de a região terminadora ser formada por diferentes repetições dispostas em orientações opostas, garante que a replicação do DNA irá parar em um dos pontos, impedindo que mais de uma molécula seja replicada durante um único ciclo. Comentário: esse exercício fará com que você reflita sobre o que poderia acontecer com um genoma circular caso não houvesse uma região terminadora.

6. Os mecanismos são semelhantes, contendo enzimas diferentes, que desempenham a mesma função. Em eucariotos, duas DNA polimerases participam da replicação. A primeira delas é a polimerase  $\alpha$ , que sintetiza o iniciador de RNA e também um segmento pequeno de DNA; posteriormente, essa polimerase é trocada por uma polimerase  $\delta$  que sintetizará o restante do DNA. Para a retirada dos iniciadores, duas proteínas participam do processo; primeiro, uma RNase especial reconhece regiões híbridas de DNA/RNA e degrada o RNA e, posteriormente, a proteína FEN1 retira o último ribonucleotídeo. A DNA polimerase  $\delta$  adiciona os nucleotídeos que estão faltando. Os fragmentos de Okazaki são ligados através da DNA ligase. Comentário: esse exercício fará com que você compare os mecanismos de procariotos e eucariotos de modo crítico, para poder situar as semelhanças e as diferentes entre eles.

## Aula 12

---

1. A síntese das extremidades dos genomas lineares pode ser comprometida, devido à remoção dos iniciadores de RNA localizados nas extremidades 5' das fitas recém-sintetizadas. A remoção dos iniciadores resulta na formação de uma fita mais curta do que a fita original. O tamanho da molécula pode ser seqüencialmente reduzido, após cada ciclo de replicação. Comentário: ao responder a esse exercício, você estará reforçando os conceitos sobre replicação do DNA. Além disso, facilitará a associação com os mecanismos utilizados para superar o problema dos genomas lineares.

2. Os telômeros são sintetizados através de uma enzima chamada telomerase. A telomerase é uma enzima ribonucleoprotéica, que apresenta um componente ribonucléico e um componente protéico. O componente ribonucléico apresenta uma região complementar à extremidade do cromossomo, que se pareia enquanto a porção adjacente serve de molde para a síntese de uma fita de DNA. Quando a síntese está completa, a telomerase se desloca e se pareia mais adiante com uma outra região complementar, servindo novamente de molde para a síntese do DNA. Esse processo se repete centenas de vezes, produzindo um grande número de repetições, que são complementares ao componente ribonucléico da telomerase. Posteriormente, a DNA polimerase sintetiza a fita complementar, formando uma fita dupla na região do telômero. Comentário: ao responder esse exercício, você estará revendo o conteúdo apresentado, lembrando que os telômeros desempenham um papel fundamental na estrutura dos cromossomos eucarióticos.

3. Porque em cada cromossomo, a telomerase pode servir de molde para a síntese de um número diferente de repetições teloméricas, não existindo um número crítico de repetições que devem ser adicionadas. Comentário: esse exercício fará com que você reflita que a manutenção do telômero é mais importante do que o seu tamanho.

4. O círculo rolante é um mecanismo que permite a amplificação de um replicon ou de uma unidade genômica. Isso é possível devido à replicação contínua de um único replicon, produzindo, assim, muitas moléculas. Comentário: esse exercício fará com que você pense na utilização do círculo rolante como um mecanismo que evita a perda das extremidades de genomas lineares, mas também permite a multiplicação de alguns segmentos genômicos.

## Aula 13

---

1. Não. Apenas as mutações que ocorrem em células germinativas de um indivíduo podem ser transmitidas para sua prole. Muitas doenças são herdadas e estão associadas a mutações em genes importantes para diferentes processos celulares.

2. Transição se caracteriza pela substituição de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra. Exemplos: par A=T pelo par G≡C e vice-versa, ou o par T=A pelo par C≡G e vice-versa.

Transversão consiste em troca de uma purina por uma pirimidina ou de uma pirimidina por uma purina. Exemplos: par A=T pelos pares T=A ou C≡G e vice-versa, ou par G≡C pelos pares T=A ou C≡G e vice-versa.

3. Além da substituição de bases, a mutação gênica pode ocorrer por inserção ou deleção de bases. Para eliminar um aminoácido de uma proteína, é necessário deletar a trinca de bases (códon), correspondente a este aminoácido, do gene que codifica esta proteína. Se o objetivo fosse eliminar dois aminoácidos, seis bases, correspondentes aos códons destes aminoácidos, deveriam ser deletadas. Da mesma forma, se quiséssemos inserir um aminoácido em uma proteína, o seu códon (três bases) deveria ser inserido no gene. Caso a inserção ou deleção envolva um número de bases não múltiplo de três, ocorre mudança do quadro de leitura, o que caracteriza a mutação *frameshift*.

4. O 5-BU é um análogo de timina (Figura 13.12.a) e seu caráter mutagênico se deve à mudança do equilíbrio ceto-enol causado pelo átomo de bromo (Figura 13.12.b). A forma enol existe por mais tempo em 5-BU do que em T, e pareia com G e não com A. Portanto, sua presença gera a mudança do par A=T para o par G≡C. Lembre que a troca do par de bases só é observada após dois ciclos de replicação.

5. Primeiramente, a exposição de uma cultura de bactérias à luz ultravioleta promove a formação de dímeros de timina. Um dos sistemas de reparo dessa lesão conta com a participação de DNA fotolases, enzimas que são ativadas em presença de luz visível. Portanto, as células bacterianas incubadas em presença de luz tiveram as lesões reparadas e sobreviveram, enquanto aquelas mantidas no escuro não tiveram seu DNA reparado. Como muito provavelmente a extensão do dano foi muito grande, a maioria das células incubadas no escuro não sobreviveu, o que explica o número reduzido de colônias.

## Aula 15

---

1. a) Benéfica. A variabilidade genética aumenta a capacidade de adaptação de uma espécie a diferentes condições ambientais, contribuindo para seu processo evolutivo.

b) Apesar de a variabilidade genética ser benéfica para uma espécie, a existência de um balanço entre estabilidade e mudança é fundamental para a sobrevivência. Um número elevado de mutação poderia provocar a morte de todos os indivíduos de uma população devido ao acúmulo de mutações em genes essenciais. Em contrapartida, a ausência de variabilidade genética poderia determinar a morte de todos os indivíduos de uma população em condições diferentes das habituais. Uma espécie bem-sucedida é constituída de indivíduos que dispõem de um processo de replicação com alto grau

de fidelidade, mas que permite a introdução eventual de algumas variações. As variações que resultam em melhoramento persistirão por seleção natural. Entretanto, as variações prejudiciais poderão acarretar a morte do indivíduo que a possui, mas não a extinção da espécie.

2. a) Na recombinação recíproca, observa-se a formação de duas moléculas modificadas pela troca genética. Já na recombinação não recíproca, apenas uma das moléculas sofre modificação em sua seqüência.

b) A recombinação intramolecular ocorre quando o evento recombinacional acontece entre segmentos de uma única molécula de DNA. Quando a recombinação envolve repetições diretas, observa-se a deleção de uma parte do segmento. Já na recombinação que envolve repetições invertidas, não se observa perda de nenhum segmento, mas sim inversão de parte da região envolvida.

Volte à Figura 15.1 para observar os esquemas associados a cada um dos tipos de recombinação mencionados nesta questão.

3. Não haveria infecção, pois a integração do genoma do fago  $\lambda$  ao genoma da célula hospedeira depende inteiramente da presença do sítio *att*. Este é um exemplo clássico de recombinação sítio-específica, que se diferencia dos outros tipos de recombinação por ocorrer apenas em uma seqüência específica do DNA, que você pode conferir na Figura 15.2.c.

4. Confira sua resposta voltando à Figura 15.4.

5. O esquema representado em (b) envolveu *crossing over*, uma vez que dois dos seus gametas são recombinantes. As etapas intermediárias podem ser conferidas com os esquemas das Figuras 15.3 e 15.5.

6. Esses sistemas, em geral, são ativados quando a extensão das lesões é muito grande, ultrapassando a capacidade dos sistemas de reparo mais específicos. Nestas situações, os mecanismos empregados pelas células, na tentativa emergencial de reparar os danos no DNA, favorecem uma alta taxa de erros. Entretanto, na maioria das vezes estas células morreriam pelos danos já existentes. Portanto, o reparo, mesmo introduzindo erros, pode significar a única solução, mais ou menos como apostar no fato de que, se pelo menos uma célula sobreviver, a espécie não é extinta.

1. Um elemento IS é caracterizado pela presença de repetições terminais invertidas, que cercam uma região do DNA que codifica a proteína transposase. A transposase corta o elemento IS, bem como o local onde ele será inserido. Após a inserção, ocorre uma duplicação do sítio-alvo (local onde o transposon foi inserido) em função do preenchimento da fenda causada pelo corte provocado pela transposase.

2. Um transposon composto é formado por dois elementos IS que se inseriram no genoma, próximo um do outro. Na maioria das vezes, a região entre os elementos IS carregam genes que conferem resistência a antibióticos. Esses genes não participam do mecanismo de transposição. Em alguns transposons compostos, um dos elementos IS pode ser ativo enquanto o outro é inativo, ou seja, só um deles produz uma transposase funcional capaz de mover o transposon. Em outros, ambos os elementos IS são ativos. Da mesma forma que os elementos IS, os transposons compostos produzem a duplicação do sítio-alvo após a inserção.

3. Os transposons TnA não possuem elementos IS nas suas extremidades, por isso são considerados diferentes dos transposons compostos, embora na maioria das vezes também apresentem genes, que não participam do mecanismo de transposição, e carregam resistência a antibióticos. As extremidades do TnA são formadas por repetições invertidas contendo de 38 a 40 pares de nucleotídeos. Após a inserção, também ocorre a duplicação do sítio-alvo.

4. Na transposição replicativa, o transposon é replicado antes de ser transposto para uma outra região do genoma. Dessa forma, um transposon é mantido no sítio doador e um novo transposon é inserido no sítio-alvo. Isso ocorre geralmente através da formação de uma estrutura chamada cointegrado, e exige duas atividades enzimáticas, uma transposase e uma resolvase. Na transposição replicativa, o transposon é cortado do sítio doador e inserido no sítio-alvo. Dessa forma, mantém-se o mesmo número de elementos no genoma. Para esse processo, só a transposase é necessária.

Comentário: ao responder aos quatro exercícios propostos, você estará revisando e organizando os conceitos apresentados nesta aula.

1. O elemento de transposição Ds possui as repetições na sua extremidade. No entanto, a sua região central não produz uma transposase ativa. Assim, é necessária a ação de uma transposase codificada por um outro elemento de transposição (nesse caso, o elemento Ac) para que a transposição ocorra. Uma determinada linhagem de milho pode conter muitas cópias do elemento Ds inativo. Porém, se for cruzada com uma outra linhagem que contenha o elemento Ac, poderá ocorrer um grande número de eventos de transposição nos descendentes desse cruzamento. Comentário: ao responder a esse exercício, você fixará o conteúdo sobre o mecanismo de transposição, bem como a idéia de que um elemento inativo pode ser ativado por um outro elemento presente no genoma.

2. A ativação do elemento P só vai ocorrer quando houver a combinação de um citotipo M, presente em linhagens M de *Drosophila*, com um indivíduo da linhagem P. Além disso, só ocorrerá se o macho pertencer à linhagem P e a fêmea pertencer à linhagem M. Comentário: esse exercício fará com que você reflita sobre as condições necessárias para a ocorrência da transposição.

3. Um retrotransposon é um transposon que se movimenta de maneira semelhante a um retrovírus. No caso do retrovírus, a partícula infecciosa injeta um RNA na célula hospedeira, que produzirá uma transcriptase reversa. A transcriptase reversa é uma DNA polimerase dependente de RNA como molde. Então, ela fará a síntese de um DNA dupla fita a partir do RNA do vírus que será inserido no genoma. Toda vez que aquela região do genoma for transcrita, produzirá um RNA viral, que poderá formar uma partícula infecciosa e passar para outra célula. No caso dos retrotransposons, o mecanismo é bastante semelhante. O DNA correspondente ao transposon, inserido no genoma, transcreve um RNA que produz a transcriptase reversa que, por sua vez, utilizará o RNA como molde para produzir uma molécula dupla fita de DNA, que será, então, inserido em um outro local do genoma, gerando um outro retrotransposon. A diferença principal entre o retrotransposon e o retrovírus é que o primeiro não é convertido em uma partícula capaz de invadir outras células. Ele permanece no genoma, transpondo-se de um local para outro. Comentário: esse exercício fará com que você trace um paralelo entre o mecanismo de infecção utilizado pelo retrovírus e o mecanismo de transposição utilizado pelo retrotransposon.

4. Todos os transposons descritos apresentam a capacidade de se mover no genoma. Alguns deles, como os transposons compostos de procariotos, podem ser transferidos de um organismo para outro, levando consigo características novas que

podem apresentar um alto valor adaptativo. Além disso, a inserção, ou retirada de um transposon de um determinado local do genoma, pode alterar as suas características, ou seja, pode haver a ativação de regiões inativas, e a desativação de regiões ativas. Como consequência, existe um aumento na variabilidade genética, e uma possível variabilidade nos fenótipos que podem ter sido e ainda são importantes para o processo evolutivo. Comentário: esse exercício fará com que você reflita sobre a importância dos transposons na complexidade e diversidade dos organismos.

## Aula 20

1. Ao responder a esse exercício, você revisará os conceitos estudados nas aulas sobre replicação do DNA. A comparação dos dois mecanismos facilitará a associação dos conceitos e a aprendizagem. As informações necessárias para responder ao exercício estão contidas nesta aula, bem como nas Aulas de 9 a 12 do Módulo 2.

Replicação	Transcrição
1. As duas fitas são copiadas.	1. Somente uma das fitas é copiada.
2. A função da replicação é copiar o DNA para garantir a transferência das informações genéticas para as células-filhas.	2. A função da transcrição é produzir moléculas de RNA que desempenharão diferentes funções. O RNA mensageiro será utilizado como molde para sintetizar proteínas que darão as características do indivíduo.
3. A enzima DNA polimerase requer um iniciador que forneça um grupamento OH livre. O primeiro desoxirribonucleotídeo é adicionado na forma monofosfato.	3. A enzima RNA polimerase não requer um iniciador que forneça um grupamento OH livre. O primeiro ribonucleotídeo é adicionado na forma trifosfato.
4. A DNA polimerase é uma holoenzima formada por várias subunidades.	4. A RNA polimerase é uma holoenzima formada por várias subunidades.
5. A síntese do DNA ocorre na orientação 5' - 3'.	5. A síntese do RNA ocorre na orientação 5' - 3'.
6. O início da replicação ocorre na origem de replicação.	6. O início da transcrição ocorre no promotor.
7. A replicação ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação.	7. A transcrição ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação.

2. O promotor é uma região do DNA, localizada acima do início da transcrição 5' em relação ao nucleotídeo +1. Possui seqüências de nucleotídeos específicas, às quais se ligam proteínas envolvidas na transcrição do DNA. Um promotor pode ser caracterizado comparando-se a seqüência do RNA com a seqüência do DNA utilizado como molde para a transcrição. Comentário: esse exercício tem como objetivo fixar o conceito das características e das funções do promotor. A resposta pode ser encontrada nesta aula. A compreensão do assunto é muito importante, pois, falaremos sobre promotores em todas as aulas de transcrição. Fique atento!

3. A RNA polimerase de procariotos é formada por cinco polipeptídeos de quatro subunidades diferentes. Duas subunidades  $\alpha$ , uma subunidade  $\beta$ , uma subunidade  $\beta'$  e uma subunidade  $\sigma$ . A subunidade  $\sigma$  reconhece o promotor; as subunidades  $\alpha$  estão envolvidas no acoplamento do complexo; a subunidade  $\beta$  contém um sítio de ligação ao ribonucleosídeo trifosfato e, finalmente, a subunidade  $\beta'$  contém uma região de ligação ao molde de DNA. As subunidades  $\beta$  e  $\beta'$  catalisam a incorporação dos nucleotídeos. A subunidade  $\sigma$  é desligada do complexo após o início da transcrição. O alongamento é catalisado pelo núcleo catalítico composto pelas duas subunidades  $\alpha$ , subunidade  $\beta$  e subunidade  $\beta'$ . Comentário: esse exercício visa a fixar o conceito de que a RNA polimerase é formada por várias subunidades, sendo que cada uma delas tem uma função importante para o funcionamento do mecanismo.

4. Da mesma forma que ocorre na replicação, a terminação garante que somente a região de interesse seja transcrita. Na sua ausência, em teoria, a RNA polimerase transcreverá, indiscriminadamente, todo o genoma. Comentário: ao responder a esse exercício, você refletirá sobre a importância do controle da transcrição, promovido pelas seqüências de terminação.

1. Ao responder a essa pergunta, você estará comparando o mecanismo de transcrição em procariotos com o de eucariotos e, com isso, fixando os conteúdos aprendidos nas Aulas 20 e 21.

Procariotos	Eucariotos
1. Uma única RNA polimerase sintetiza todos os tipos de RNA.	1. Três RNA polimerases sintetizam os diferentes tipos de RNA.
2. A transcrição ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação.	2. A transcrição ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação.
3. A enzima RNA polimerase se liga diretamente ao promotor do gene que será transcrito.	3. As RNA polimerases necessitam de fatores de transcrição adicionais para reconhecer o promotor do gene que será transcrito.
4. A transcrição e a tradução podem ocorrer simultaneamente.	4. A transcrição e a tradução não ocorrem simultaneamente. A transcrição ocorre no núcleo e o RNA mensageiro deve ser transportado para o citoplasma para que ocorra a tradução.
5. Não ocorre modificação do RNA mensageiro.	5. Ocorre modificação nos RNAs mensageiros com a adição do capacete 5' e da cauda poli A na extremidade 3' do transcrito.
6. A terminação é bem definida com o reconhecimento de regiões específicas.	6. A terminação não é bem definida. A extremidade do transcrito é gerada por clivagem endonucleolítica.

2. O capacete 5' consiste em uma guanosina metilada adicionada à extremidade 5' do transcrito primário. O capeamento resulta de uma ligação trifosfato 5'-5' pouco usual e ocorre em diferentes etapas. Primeiro, a enzima fosfodirolase retira o fósforo  $\gamma$  do nucleotídeo localizado na extremidade 5' do RNA. Em seguida, a enzima ganililtransferase promove a ligação fosfodiéster entre a guanosina e o nucleotídeo 5', liberando um pirofosfato. A enzima guanina 7-metiltransferase metila a guanosina, utilizando o grupamento metila da S-adenosilmetionina. Dois grupamentos metila são adicionados nas hidroxilas 2' do primeiro e do segundo nucleotídeo adjacente ao capacete pela enzima 2' O-metiltransferase. Comentário: ao responder a essa questão, você estará fixando o mecanismo de adição do capacete 5', mas o mais importante é você refletir sobre a complexidade do mecanismo e sobre a quantidade de etapas e enzimas envolvidas no processo.

3. A cauda poliA é adicionada pela ação de uma enzima chamada poliA polimerase. A região terminal do transcrito é retirada através de clivagem endonucleolítica e ocorre em uma região localizada 11 a 30 nucleotídeos abaixo da seqüência 5' AAUAAA 3' localizada perto do final da unidade transcricional. Após a clivagem, a enzima chamada poliA polimerase ou ainda poliadenilato polimerase (PAP) adiciona uma cauda poliA, formada por cerca de 200 resíduos de adenosina monofosfato, à extremidade 3' do transcrito. Comentário: ao responder a essa questão, você estará fixando o mecanismo de adição da cauda poliA à extremidade 3' dos transcritos codificados pela RNA pol II. Da mesma maneira que foi comentado para o exercício 2, o mais importante é você refletir sobre a complexidade do mecanismo e a quantidade de etapas e enzimas envolvidas no processo. A intenção é fazer com que você reflita sobre toda a complexidade de regulação e a necessidade de fidelidade nos processos.

4. A edição do RNA consiste em modificar a seqüência de nucleotídeos de uma determinada molécula através da adição, deleção ou modificação dos nucleotídeos originalmente presentes, formando, assim, uma molécula diferente da molécula sintetizada a partir de um determinado DNA molde.

5. A principal conseqüência da edição do RNA é que a produção de uma molécula de RNA diferente servirá de molde para a síntese de uma proteína diferente, uma vez que é a seqüência de nucleotídeos que irá determinar a ordem dos aminoácidos que estarão presentes em um determinado polipeptídeo. Comentário: ao fazer os exercícios 4 e 5, da mesma maneira que para os exercícios anteriores, você deverá refletir sobre o significado dessas modificações.

6. Algumas das conclusões que podem ser tiradas com base nas diferenças entre o processo de transcrição em procariotos e eucariotos é que, em eucariotos, o processo é bem mais complexo, exigindo a participação de inúmeras proteínas e enzimas. Desde a iniciação da transcrição, as RNA polimerases necessitam de fatores adicionais que auxiliam no seu acoplamento e permitem a sua funcionalidade e precisão. Na seqüência, a terminação também apresenta uma complexidade muito maior. Esses fatores, somados às demais modificações, implicam uma necessidade muito maior de regulação de cada uma das etapas, pois a ausência de qualquer um dos componentes compromete o processo como um todo. Comentário: ao responder a esta pergunta, você terá construído a idéia de que quanto mais complexo o mecanismo, maiores serão as possibilidades de erro e, conseqüentemente, maior a necessidade de haver sincronia entre as diferentes etapas, pois do sucesso de cada uma delas dependerá o sucesso do mecanismo como um todo.

1. Os íntrons, ou seqüências intercalares, são seqüências presentes no transcrito primário (produzido a partir de um DNA molde) e que, no caso dos RNAs mensageiro, não são utilizadas para a síntese de proteínas. As regiões ativas do RNA são chamadas éxons. A sua existência pode ser comprovada através de experimentos de hibridação do RNA encontrado no citoplasma com o DNA que serviu de molde para a sua síntese. A molécula híbrida resultou na formação de alças na molécula de DNA indicando que algumas regiões, presentes no DNA, não estavam presentes no transcrito maduro. Comentário: ao responder ao exercício, você fixará os conceitos que definem funcionalmente um íntron e um éxon. A resposta se encontra no conteúdo da aula.

2. As seqüências conservadas são: nas extremidades 5' e 3' do íntron existem os dinucleotídeos GU e AG, respectivamente. Uma região rica em pirimidina, localizada acima da extremidade 3'. Uma Adenosina localizada próxima à extremidade 3' do íntron, chamada ponto de ramificação. Comentário: Esse exercício reforça os conceitos de que apenas algumas poucas seqüências são importantes para o funcionamento do mecanismo, e que elas são conservadas entre genes diferentes. A resposta pode ser encontrada na primeira parte da aula.

3. Os íntrons são retirados e os éxons são emendados através de duas reações seqüenciais de transesterificação. Na primeira transesterificação, a ligação éster entre o fósforo 5' do íntron e o oxigênio 3' do éxon 1 é trocada por uma ligação éster com o oxigênio 2' da Adenosina no ponto de ramificação. Na segunda transesterificação, a ligação éster entre o fósforo 5' do éxon 2 e o oxigênio 3' do íntron é trocada por uma ligação éster com o oxigênio 3' do éxon 1, liberando o íntron na forma de alça e ligando os dois éxons. Comentário: ao responder ao exercício, você fixará o mecanismo de emenda através das trocas de ligação, na qual não ocorre gasto energético. A resposta para o exercício se encontra na Figura 22.4.

4. As snRNPs são ribonucleoproteínas, moléculas formadas pela junção de uma parte protéica e uma parte ribonucléica, oriunda de um snRNA. As snRNPs desempenham um importante papel no processo de retirada dos íntrons e emenda dos éxons através da interação entre o RNA primário e o snRNA através do pareamento e da atividade catalítica desempenhada pela porção protéica que é responsável pelas reações de transesterificação, formando um complexo chamado emendossoma. Comentário: a resposta para o exercício se encontra no texto da aula e a sua resposta visa a concluir a importância da associação das proteínas com os RNAs para o funcionamento do processo.

5. A emenda alternativa consiste na “escolha” dos íntrons e éxons que serão retirados e emendados diferencialmente a partir de um mesmo RNA primário. A principal consequência é que diferentes RNAs mensageiros podem ser produzidos a partir de um mesmo RNA primário, dependendo de quais seqüências forem mantidas como éxons e quais seqüências forem retiradas como íntrons. A partir daí, diferentes proteínas poderão ser produzidas a partir de um mesmo RNA primário, uma vez que a seqüência final do RNAm é que determina os aminoácidos de um polipeptídeo. Esse mecanismo pode implicar uma forma de regulação, uma vez que a retirada correta dos íntrons estará diretamente relacionada à produção de uma determinada proteína. Comentário: esse exercício visa a fixar o conceito de que os íntrons e éxons podem ser diferencialmente escolhidos, resultando na produção de RNAs mensageiros diferentes. É importante estar atento para o fato que o mecanismo exige sincronia dos processos e implica a regulação da produção de proteínas.

6. Os íntrons do grupo I e II são autocatalíticos, ou seja, o próprio RNA efetua a retirada dos íntrons e a emenda dos éxons sem a participação de enzimas protéicas. Os íntrons do grupo I utilizam uma guanosina externa como co-fator, cujo grupamento 3' OH é utilizado como um nucleófilo na primeira etapa do corte. A guanosina se liga ao RNA e ataca a extremidade 5' do íntron, levando ao rompimento da fita de RNA e expondo uma extremidade 3'OH. Essa extremidade ataca a extremidade 3'OH do éxon anterior, unindo os éxons e liberando o íntron. No íntron do grupo II, o grupamento OH 2', é fornecido por um Adenilato presente na seqüência do íntron. Ocorre a formação de uma alça como um intermediário, da mesma forma que ocorre no ponto de ramificação visto anteriormente para a emenda dependente de snRNPs. Ambos os tipos utilizam-se de duas reações de transesterificação, da mesma forma descrita para os íntrons que utilizam as snRNPs. Comentário: ao responder a esse exercício, você fixará o mecanismo de retirada dos íntrons e emenda dos éxons, uma vez que eles apresentam um ponto principal em comum que consiste nas duas reações de transesterificação.

7. Os RNAs autocatalíticos podem ter desempenhado um importante papel no mundo pré-biótico. Essas moléculas com capacidade de autocatálise e consequente modificação intramolecular podiam gerar novas moléculas a partir de uma molécula original (as próprias moléculas). Essa habilidade pode ter sido importante para o estabelecimento da informação na forma como hoje é conhecida, na qual os mecanismos de armazenamento da informação e catálise das reações são separados em moléculas especializadas. Comentário: esse exercício tem como objetivo discutir a parte final da aula, na qual comentamos a teoria do mundo do RNA.

1. A expressão de um gene que codifica uma proteína pode ser controlada em diferentes pontos:

- a. durante a transcrição – produção do RNA;
- b. após a transcrição – processamento do RNA, estabilidade do transcrito;
- c. durante a tradução – produção da proteína;
- d. após a tradução – modificações na proteína que garantem a sua funcionalidade.

Comentário: ao responder a esse exercício, você estará fixando a idéia de que a produção de uma proteína ativa depende de um mecanismo sincronizado de regulação. Uma vez que existem vários pontos de controle, todos devem estar funcionando bem para que a proteína funcional seja produzida.

2. O Operon é um arranjo de componentes comumente encontrado em procariotos, e que permite a regulação simultânea da expressão de genes, responsáveis pela síntese de diferentes produtos envolvidos em um mesmo processo bioquímico como, por exemplo, o metabolismo de açúcares e a biossíntese de aminoácidos. O Operon possui diversos componentes, tais como um gene regulador, uma região operadora (na qual o produto do gene regulador é ligado), um promotor e a seqüência codificadora para os genes estruturais. O RNA produzido em um Operon é, geralmente, policistrônico, ou seja, um único RNA será produzido e contém as seqüências necessárias para a expressão de mais de um produto gênico. Comentário: esse exercício tem como objetivo fixar o conceito do funcionamento de um Operon. Você encontrará a resposta no corpo do texto desta aula.

3. A proteína CRP funciona como um ativador da transcrição do Operon *lac*. A sua funcionalidade depende da presença do cAMP (sua síntese é modulada pela presença de glicose), com o qual forma um complexo capaz de se ligar a uma região do promotor do Operon. Na presença de glicose, o complexo não pode ser formado e conseqüentemente, os genes envolvidos com o metabolismo de lactose não são produzidos. Quando o nível de glicose cai, ocorre a síntese de cAMP, e este se ligará à proteína CRP, formando o complexo que ativa a transcrição dos genes estruturais. Comentário: ao responder ao exercício, você estará fixando o conceito sobre o efeito da glicose na ativação do Operon *lac*, uma vez que a proteína CRP só se ligará ao promotor quando o nível de glicose estiver baixo e permitir a produção de cAMP.

4. O Operon *ara* é regulado pela proteína AraC que atua como repressor e ativador do Operon. Na ausência de arabinose, a proteína AraC atua como repressor, ligando-se a dois sítios (*araI* e *araO<sub>2</sub>*) e promovendo a formação de uma alça de DNA que impede que a transcrição seja iniciada no promotor do operador. Na presença de arabinose, a proteína AraC se liga a ela e sofre uma alteração conformacional que a transforma na proteína ativadora. Quando a glicose estiver baixa, ocorre a formação do complexo CRP-cAMP que se liga a uma região próxima ao promotor e facilita a ligação da proteína AraC ao sítio *araI*, bem como o rompimento da alça de DNA. Com isso o promotor é exposto e a transcrição pode ser iniciada. A proteína AraC também regula sua própria síntese.

5. Não. Porque a formação do atenuador depende da sincronia do mecanismo de transcrição e tradução. Em procariotos, o mecanismo é possível, pois enquanto o transcrito está sendo produzido os ribossomos se ligam e começam a sintetizar a proteína. Em eucariotos, a síntese protéica ocorrerá no citosol, enquanto a transcrição ocorre no núcleo. Desta forma, a sincronia entre os dois mecanismos não é possível. Comentário: ao responder a esse exercício você estará, mais uma vez, discriminando as diferenças entre procariotos e eucariotos e, também, fixando o conceito que o mecanismo de regulação por atenuação só é possível quando a transcrição e a tradução ocorrem simultaneamente. A resposta para o exercício pode ser encontrada no corpo do texto desta aula.



ISBN 85-7648-060-3



9 788576 480600



**UENF**  
Universidade Estadual  
do Norte Fluminense



Universidade Federal Fluminense  
**uff**



Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

**UNIRIO**

 **FAPERJ**  
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo  
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

 **GOVERNO DO  
Rio de Janeiro**

SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

 **UAB**  
**UNIVERSIDADE  
ABERTA DO BRASIL**

Ministério  
da Educação

**BRASIL**  
UM PAÍS DE TODOS  
GOVERNO FEDERAL