

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E GENÉTICA
Março 2008**

Texto Didático (revisado em agosto 2008)

Dr^a Judith Viégas, Prof^a Adjunta

BIOLOGIA MOLECULAR – Parte II

REPLICAÇÃO DO DNA

1. INTRODUÇÃO

A própria estrutura da molécula de DNA sustenta uma das funções essenciais do gene, que é a de **ter diversidade de estrutura para regular os processos vitais, isto é, ser capaz de existir ou possuir informação para o desenvolvimento de todos os tipos de órgãos, tecidos, células e processos bioquímicos que caracterizam as espécies**. No entanto, esta molécula que é o material genético, necessita ter a **habilidade de replicar a si mesma, realizando a sua autoduplicação exata, ou seja, sintetizar a si mesma** [ver Viégas, J. (2008) *Biologia Molecular – Parte I*]

É importante lembrar que o DNA dos procariotos é circular, portanto não tem extremidades livres. O DNA dos eucariotos é linear, sendo que cada molécula possui três seqüências especiais, conforme Figura 1: (1) uma região em cada extremidade livre, chamada de **telômero**, (2) uma região especializada denominada **centrômero** e (3) vários locais de início da síntese do DNA, chamados de **pontos de origem da replicação** ou **replicons**. Os telômeros são constituídos de muitas repetições de pequenas seqüências nucleotídicas (TTCGGG em *Tetrahymena*, TTAGGG em humanos), que protegem as extremidades do DNA de digestão enzimática e as diferenciam de partes quebradas da cadeia de DNA. As partes quebradas da cadeia de DNA tendem a reunir-se com outras partes quebradas, pois não têm telômeros; diz-se que ficam coesivas. Além dos telômeros, o DNA de eucariotos possui outra região especial denominada de **centrômero**, que é constituída por um DNA especial, também repetido várias vezes, denominado de DNA α satélite.

Como colocado acima, a replicação correta do DNA (também chamada de autoduplicação, duplicação ou síntese de DNA) é essencial para transmitir a informação genética às células filhas, originadas pela divisão celular. A replicação ocorre antes da divisão celular, seja uma divisão mitótica ou meiótica.

Para a replicação do DNA, há necessidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ATP, GTP, CTP e TTP), de uma série de enzimas, entre as quais as DNA polimerases e do próprio DNA, o qual irá servir de modelo para sua própria síntese, direcionando a adição dos nucleotídeos apropriados.

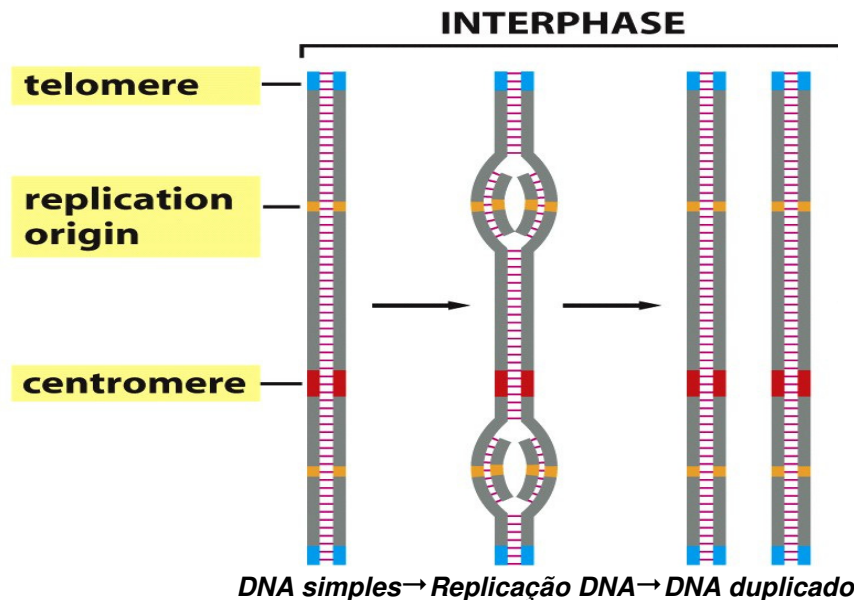


Figura 1: Esquema das três seqüências de DNA necessárias para produzir um cromossomo eucarioto que possa replicar e então segregar em mitose. Cada cromossomo deve ter várias origens de replicação, um centrômero e dois telômeros (modificado de Alberts et al, 2008).

2. REPLICAÇÃO

A molécula de DNA replica-se por rompimento das pontes H entre as bases, cada filamento servindo como modelo para a síntese de um filamento complementar. A duplicação do DNA é denominada de **semiconservativa**, pois cada dupla hélice nova (dupla hélice filha) **conserva metade** da dupla hélice antiga (dupla hélice mãe), ou seja, um filamento da dupla hélice antiga (Figura 2).

O processo de duplicação inicia por um desenrolamento parcial da dupla hélice, seguido pelo rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, o que propicia o afastamento dos filamentos do DNA (abertura da molécula do DNA), dando origem à chamada **forquilha de replicação**, local de síntese das novas moléculas de DNA (Figura 3).

Este processo de separação dos filamentos inicia em pontos específicos, os chamados **pontos de origem da replicação** ou **replicons**, a partir dos quais começa a síntese do DNA. Esta origem de replicação é única em procariotes e múltipla em eucariotes (uma célula de mamífero possui de 50.000 a 100.000 replicons). Ao ocorrer a abertura do DNA nos pontos de origem, forma-se uma **bolha de replicação**. Esta bolha

será única em procaríotes, ocorrendo a abertura da cadeia até que o processo finalize e sejam formadas duas moléculas filhas circulares de DNA. Nos eucariotes, ocorre a formação de várias bolhas de replicação sobre a cadeia de DNA, as quais vão aumentando de tamanho até coalescerem, ou seja, até se unirem em uma só (Figura 4).

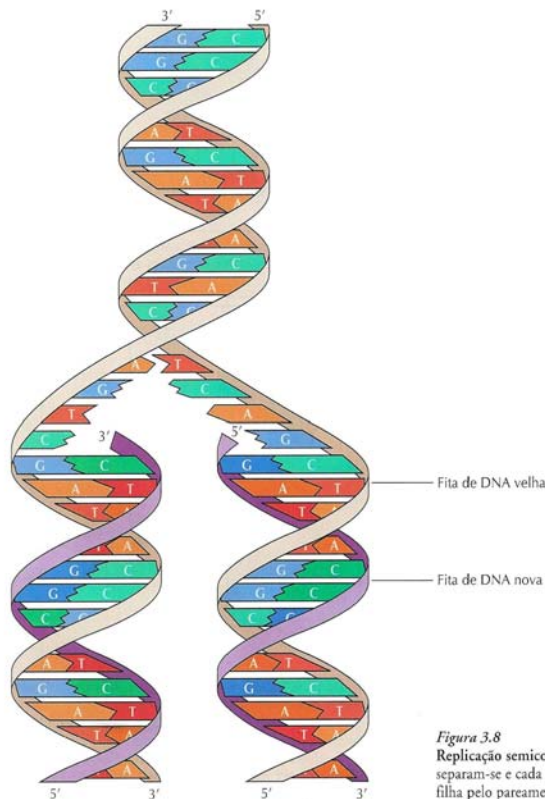


Figura 3.8
Replicação semiconservativa do DNA. As duas fitas do DNA parental separam-se e cada uma serve como molde para a síntese de uma nova fita filha pelo pareamento de bases complementares.

Figura 2: Replicação semiconservativa do DNA (filamento cinza=filamento antigo; filamento lilás=filamento novo), de acordo com Cooper (2001)

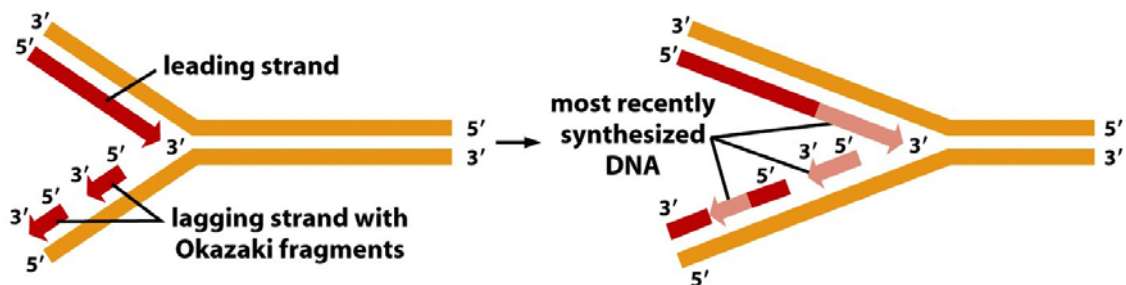


Figure 5-7 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 3: Estrutura da forquilha de replicação: observar os novos filamentos, o contínuo (*leading*) e o descontínuo (*lagging*), e a direção de crescimento destes filamentos de DNA, sempre na direção 5' → 3' (Alberts et al, 2008)

Figura 5.15
Origens de replicação em cromossomos eucarióticos. A replicação inicia em múltiplas origens (*ori*), cada uma delas produzindo duas forquilhas de replicação.

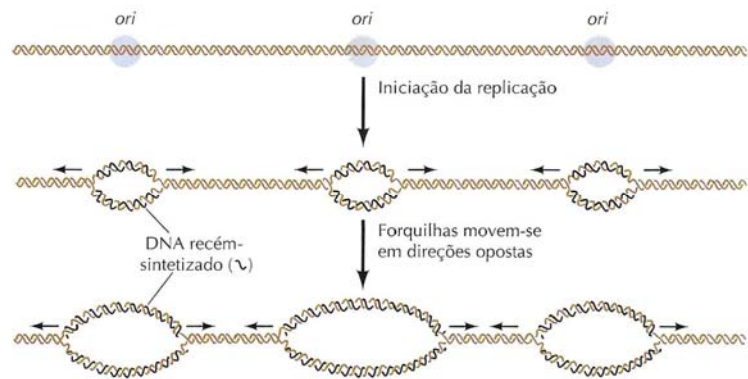


Figura 4: Origens de replicação em cromossomos eucarióticos: as diversas bolhas de replicação vão aumentando até se encontrarem e formarem uma só. Em cada bolha existem duas forquilhas de replicação, segundo Cooper (2001).

2.1. Os elementos do processo de replicação

O processo de replicação do DNA ocorre em ambas as direções na bolha de replicação é, portanto, bidirecional. Assim, em cada extremidade da bolha de replicação, forma-se uma forquilha de replicação, que são os locais onde estão ocorrendo a síntese e onde se encontram as enzimas e proteínas essenciais para este processo, entre as quais:

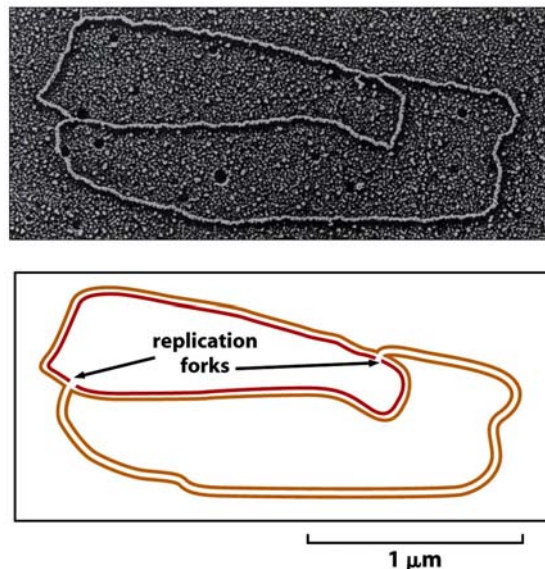


Figure 5-6 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 5: Duas forquilhas de replicação movendo para pólos opostos em um cromossomo circular: acima, fotografia de microscopia eletrônica e abaixo, desenho representativo da foto – em marrom, as fitas do DNA parental e em marrom avermelhado as fitas do DNA novo, que está sendo sintetizado (Figura de Alberts et al, 2008)

- **Helicases:** ligam-se ao redor do filamento de DNA, como uma rosca (*donut*) e rompem as pontes H entre as bases nitrogenadas complementares, separando os filamentos da dupla hélice de DNA (Figura 6);

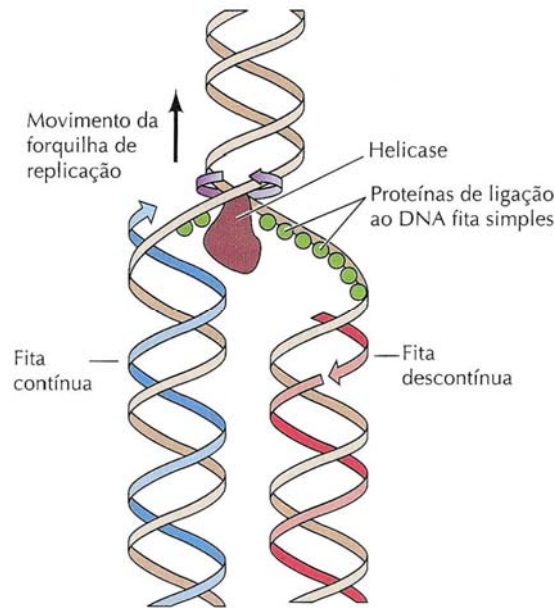


Figura 6: Ação das helicases e proteínas de ligação ao DNA de filamento simples (SSB). As helicases desenrolam as duas fitas parentais do DNA e rompem as pontes H. Os filamentos desenrolados são estabilizados pelas SSB, mantendo os filamentos da dupla hélice mãe afastados.

- **Proteínas de ligação a DNA de filamento simples** ou proteínas de ligação a um só filamento: chamadas de **SSB** (*Single Strand Binding*), em procariotes, ou de **RP-A** (proteína de replicação A), em eucariotos. Mantém afastados os dois filamentos da molécula de DNA, após ter ocorrido ruptura das pontes H que as mantinham unidas, estabilizando a separação e evitando, também a quebra dos filamentos (Figura 6);
- **Topoisomerases:** realizam o relaxamento do enrolamento da molécula de DNA, que pode fazer um super-enrolamento por ação das helicases, durante o progresso contínuo das forquilhas de replicação. A **DNA girase** é uma topoisomerase; realiza corte e posterior reunião de um dos filamentos do DNA, após o desenrolamento deste.
- **Primossomo** é o conjunto de proteínas, cujo componente central é a enzima **DNA primase** (um tipo de RNA polimerase). A DNA primase sintetiza um curto filamento de RNA, chamado **primer**, que é complementar à uma região específica do DNA, formando uma região híbrida DNA/RNA. Depois disto, a DNA primase sai fora da molécula de DNA. Este primer de RNA, que foi sintetizado, possui cerca de 8 a 12 nucleotídeos e permite à DNA

polimerase iniciar a síntese do DNA. Isto é necessário porque a DNA polimerase III não atua sobre cadeias simples, somente sobre cadeia dupla, que no caso será a porção híbrida DNA/RNA.

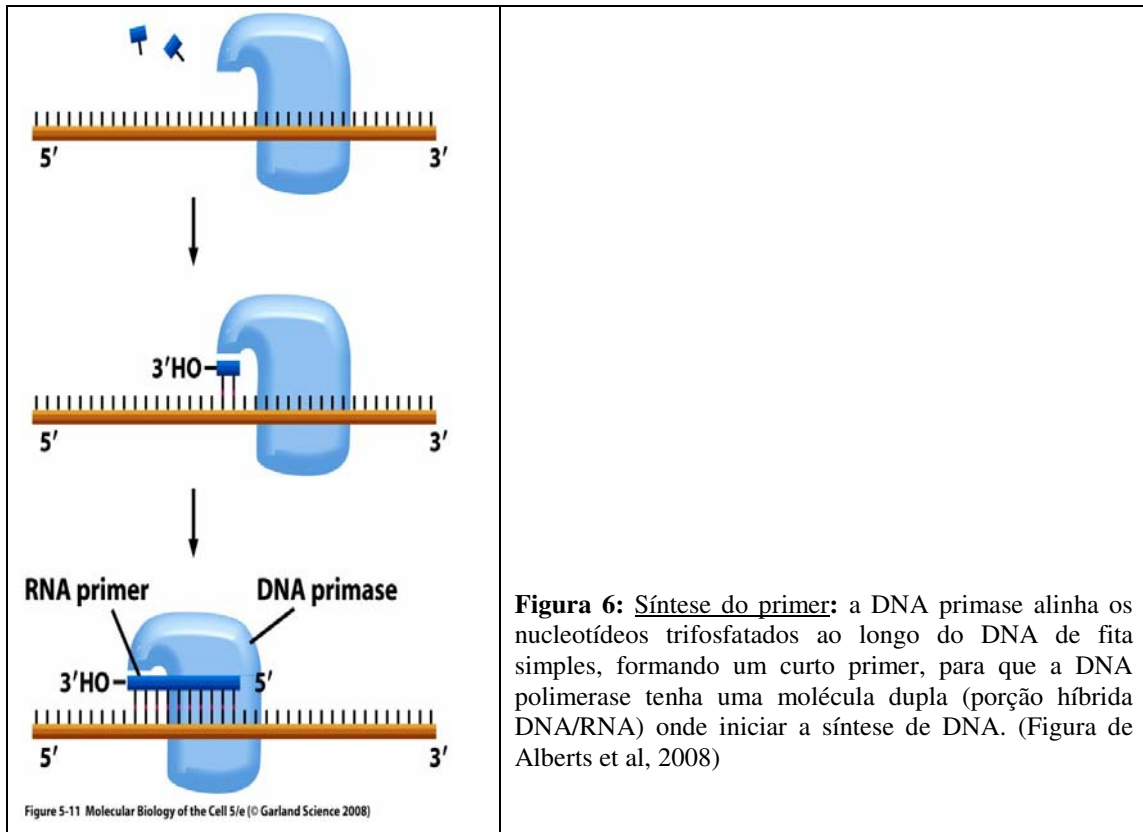


Figura 6: Síntese do primer: a DNA primase alinha os nucleotídeos trifosfatados ao longo do DNA de fita simples, formando um curto primer, para que a DNA polimerase tenha uma molécula dupla (porção híbrida DNA/RNA) onde iniciar a síntese de DNA. (Figura de Alberts et al, 2008)

- **DNA polimerase III (DNA pol III):** é um dímero, que irá coordenar o crescimento dos novos filamentos de DNA, ou seja, irá fazer o alongamento daqueles primers de RNA, alinhando os desoxirribonucleotídeos complementares aos dois filamentos da molécula de DNA. A DNA polimerase III tem uma ação unidirecional ($5' \rightarrow 3'$). Como os filamentos do DNA são antiparalelos, os nucleotídeos das cadeias, que estão sendo sintetizadas, vão sendo alinhados em direções opostas. Devido a esta característica, uma parte do dímero de DNA polimerase III atuará de maneira contínua sobre o filamento $3' \rightarrow 5'$ do DNA, sempre adicionando nucleotídeos na extremidade de crescimento $3'$, indo em direção à forquilha de replicação. O filamento novo, que está sendo sintetizado sobre este filamento $3' \rightarrow 5'$ do DNA, é chamado de **filamento de síntese contínua** (*leading strand*). Sobre o filamento $5' \rightarrow 3'$ do DNA, a DNA polimerase III sintetiza pequenas porções de filamentos, sempre no sentido ($5' \rightarrow 3'$) e

sempre adicionando nucleotídeos na extremidade de crescimento 3', indo portanto em direção contrária à abertura da cadeia de DNA. Desta maneira são formados pequenos fragmentos de DNA, sempre iniciados por um primer, os **fragmentos de Okazaki**. Esta cadeia é chamada de **filamento** ou **fita de síntese descontínua** ou **retardatária** (*lagging strand*). Em procarionotos, os fragmentos de Okazaki possuem cerca de 1.000 a 2.000 nucleotídeos de comprimento, e em eucariotos, eles têm de 100 a 200 nucleotídeos.

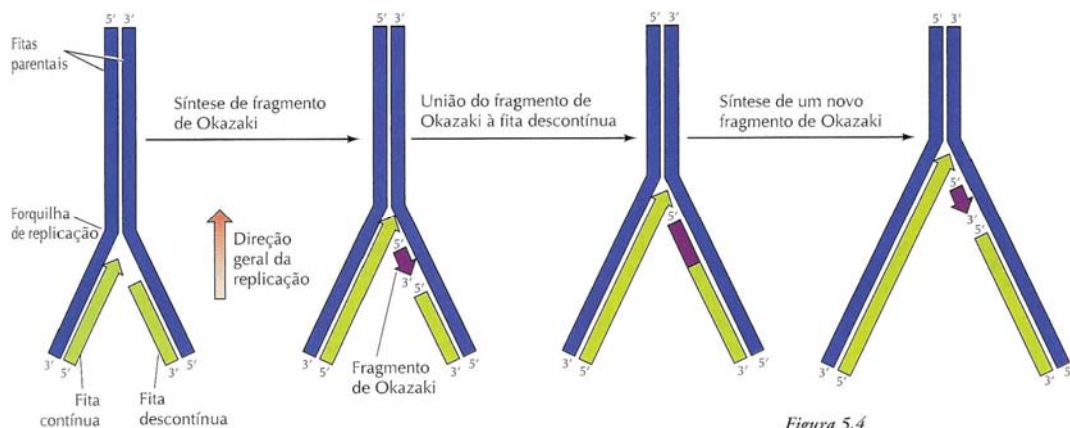


Figura 5.4 Síntese de fita contínua e descontínua do

Figura 7: Síntese dos filamentos contínuo e descontínuo de DNA. O filamento contínuo é sintetizado de maneira ininterrupta na direção do movimento da forquilha de replicação. O filamento descontínuo é sintetizado em pequenos pedaços (fragmentos de Okazaki) em direção contrária à forquilha de replicação. Os fragmentos de Okazaki são, depois, unidos pela DNA ligase (Cooper, 2001).

- **Grampo β (β clamp) ou grampo de deslizamento (*sliding clamp*):** é uma proteína auxiliar que rodeia o filamento simples de DNA, como uma rosca. Situa-se logo abaixo da subunidade da DNAPol III e a mantém aderida ao DNA, impedindo que a mesma se dissocie facilmente do filamento de DNA. Este grampo, por sua vez, é levado para o DNA pelo **grampo de carregamento (*clamp loader*)**, que o instala no filamento e depois separa-se rapidamente.
- **DNA polimerase I (DNAPol I):** retira os primers de RNA e preenche com nucleotídeos de DNA, as falhas que ficaram, nas cadeias novas, devido à inserção dos primers.
- **DNA ligase:** liga o esqueleto de desoxirribose e fosfato do DNA, unindo a extremidade 3' do espaço preenchido com DNA (pela DNAPol I) à extremidade 5' do fragmento de Okazaki.

Todas estas enzimas e proteínas são encontradas nas forquilha de replicação, como é o caso da representada na Figura 8.

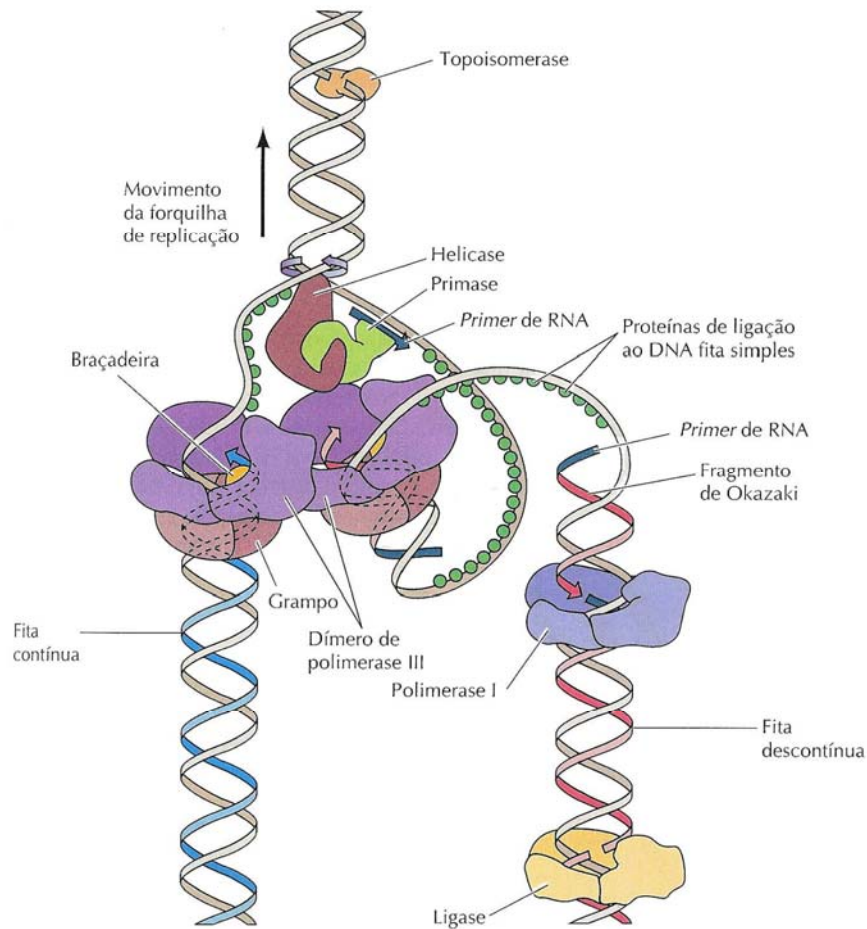


Figura 5.11
Modelo da forquilha de replicação da *E. coli*
 A helicase, a primase e duas moléculas de DNA polimerase III fazem a síntese coordenada e conjunta das fitas contínua e descontínua do DNA. O molde da fita descontínua é dobrado de maneira que a polimerase responsável por sua síntese se mova na mesma direção que aquela da forquilha de replicação. As topoisomerasas atuam como elos móveis à frente da forquilha, sendo que a DNA polimerase I remove os primers e a ligase une os fragmentos de Okazaki atrás da forquilha.

Figura 8: Algumas enzimas e proteínas encontradas na forquilha de replicação do DNA de *E.coli* (Cooper,2001)

2.2. A maquinaria de replicação: o Replissomo = rapidez + exatidão

A replicação em *Escherichia coli*, leva 40 minutos e seu genoma (= seu DNA) tem 5 milhões de pares de bases. Isto levaria a uma taxa de cópia estimada em cerca de 2.000 nucleotídeos por segundo. Em *E. coli*, forma-se apenas uma bolha de transcrição, o que é igual a duas forquilha de replicação, assim, cada forquilha tem de mover-se a uma taxa de aproximadamente 1.000 nucleotídeos por segundo. Extraordinariamente, observa-se que o processo ocorre rapidamente e com precisão, isto é, há grande exatidão de cópia.

Esta rapidez e exatidão são possíveis porque a DNA polimerase e demais proteínas, enzimáticas ou não, que atuam na forquilha de replicação, não o fazem de modo individual, mas sim como parte de uma extraordinária máquina molecular de replicação, denominada de **replissomo**. O replissomo é um grande complexo

nucleoprotéico que coordena as numerosas reações necessárias para a rápida e exata replicação do DNA. Esta máquina molecular inclui o dímero de DNA polimerase III, que comanda a síntese em cada filamento e coordena a atividade das proteínas acessórias necessárias para iniciar, separar a dupla hélice e estabilizar os filamentos simples (Figura 9).

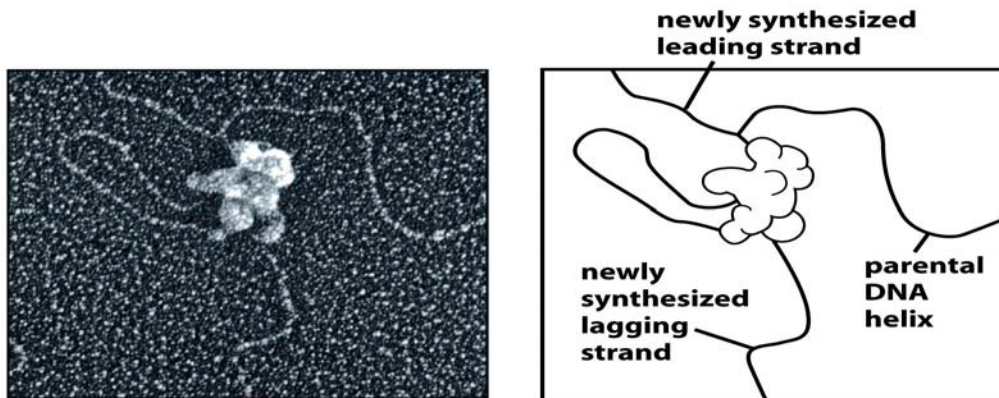


Figura 9: Replissomo: grande complexo nucleoprotéico coordenador das numerosas reações necessárias para a rápida e exata replicação do DNA. Máquina molecular, que inclui o dímero de DNA polimerase III, comanda a síntese em cada fita e coordena a atividade das proteínas acessórias necessárias para iniciar a replicação, separar a dupla hélice e estabilizar as fitas simples (modificado de Alberts et al., 2008).

2.3. Síntese das extremidades das cadeias do DNA

Uma enzima específica da replicação, a **telomerase** (Figura 10) só ocorre em eucariotos e faz a replicação das extremidades do DNA, adicionando um molde de RNA, que é componente da própria telomerase. Posteriormente, este molde de RNA é retirado e a DNA polimerase III pode aderir e sintetizar a cadeia complementar (lembrar que a DNAPol não atua sobre filamento simples).

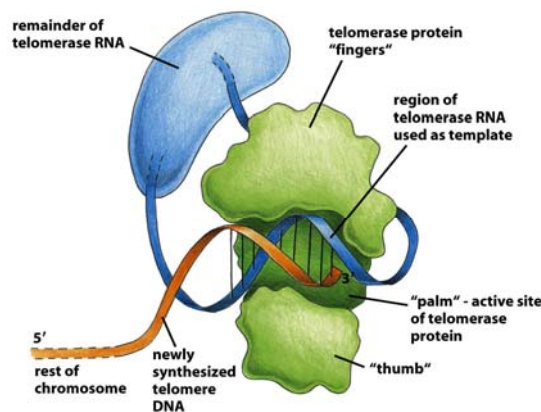


Figura 10: Telomerase: é um grande complexo proteína-RNA. O RNA (azul) contém uma seqüência modelo para sintetizar as novas seqüências repetitivas dos telômeros. A síntese é feita por uma transcriptase reversa que está na parte protéica (verde). Além destes, este complexo possui outros domínios necessários para que possa se ligar às extremidades cromossômicas propriamente ditas. (Alberts et al, 2008)

3. DNA DE VÍRUS

Alguns vírus possuem **DNA de cadeia simples**. Neste caso, para sua replicação, eles produzem uma cadeia de DNA complementar, ficando então num estado de dupla cadeia chamada de **forma replicativa (RF=replicative form)**. Esta cadeia complementar irá servir de modelo para a síntese de várias cadeias unifilamentares que são sintetizadas a partir da cadeia modelo da RF.

Outros vírus, como os retrovírus, possuem **RNA de cadeia dupla**. Estes retrovírus infectam células eucariotas integrando-se nos cromossomos do hospedeiro, somente não podem integrar-se na forma de RNA. Estes vírus contêm a enzima **transcriptase reversa**, que é utilizada para sintetizar um DNA de cadeia dupla tendo como molde o RNA viral. Esta molécula de DNA cópia (cDNA) é que se integrará no genoma da célula hospedeira.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**, Garland Science, New York, 2008, 1.268 p.
- Borges-Osório, M.R., Robinson, W.M. **Genética Médica**, Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 2001, 459 p.
- Chaves, A.L.S. **Biologia Molecular para Iniciantes**, Editora e Gráfica Universitária, Pelotas, 2006, 160 p.
- Cooper, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular**, Editora ARTMED, Porto Alegre, 2001, 712 p.
- Cooper, G.M.; Hausmann, R.E. **The Cell: A Molecular Approach**, ASM Press, Washington, 2004, 713 p.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B. **Introduction to Genetic Analysis**, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, 838 p.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. **Biologia Molecular**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 287 p.