

REPLICAÇÃO

INTRODUÇÃO

O DNA ocupa uma posição central e única entre as macromoléculas como repositório de informação genética. Suas sequências de nucleotídeos codificam as estruturas primárias de todos RNAs e proteínas, afetando, assim, a síntese de todos outros componentes celulares.

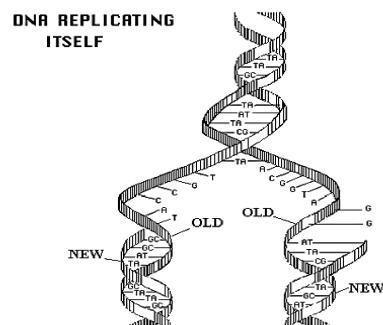
Para que ocorra a divisão celular, em algum momento do seu ciclo a célula deve ter seu DNA duplicado. Esse processo deve estar em sincronia com a necessidade do organismo.

O metabolismo do DNA envolve o processo pelo qual são feitas cópias fidedignas de moléculas de DNA (replicação) e os processos que afetam sua estrutura inerente (reparo e combinação). Nosso objetivo é revisar a replicação do DNA.

REGRAS FUNDAMENTAIS DA REPLICAÇÃO

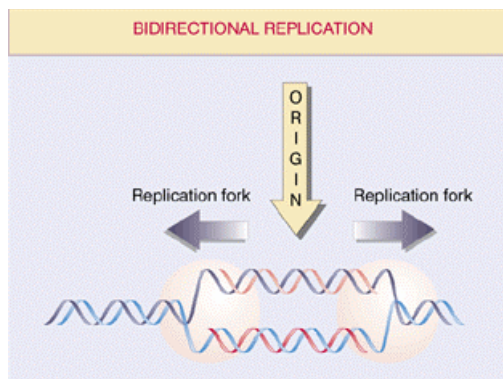
1. A replicação do DNA é um processo semi-conservativo

Ambas fitas de DNA que formam um duplex servem como molde para síntese de uma fita nova complementar. Assim, durante um evento de duplicação são produzidas duas moléculas novas de DNA, cada uma delas consistindo de uma fita “velha” (do duplex original) e uma “nova” (recém-sintetizada) . Isso é a replicação semi-conservativa.



2. A replicação tem início em uma origem e a partir dela continua bidirecionalmente

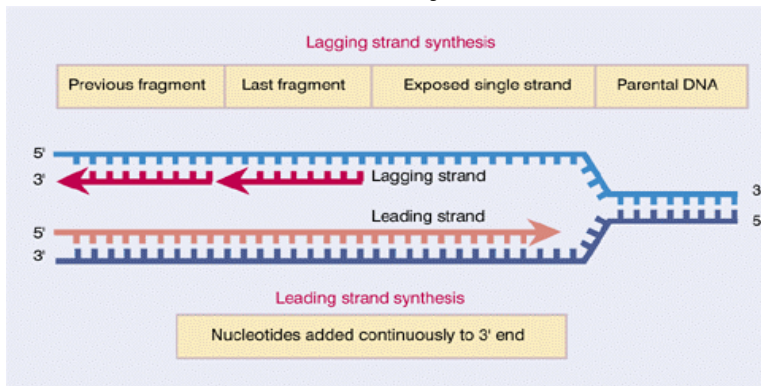
A replicação de DNA sempre tem início num ponto único na molécula , caracterizado por uma sequência de bases específicas denominado origem da replicação, a partir de onde a dupla fita se abre. As terminações destes são pontos dinâmicos, chamados de forquilha de replicação, onde as fitas de DNA são separadas e replicadas.



Como é demonstrado na figura, a partir da origem a replicação prossegue bidirecionalmente.

3. A síntese de DNA procede na direção 5' → 3' e é semi-descontínua

Uma fita nova de DNA é sintetizada na direção 5' → 3', sendo a extremidade livre OH de cada nucleotídeo o ponto em o DNA é alongado. Devido a esta propriedade e considerando-se a natureza anti-paralela do DNA, a fita utilizada como molde só pode ser lida na da extremidade 3' em direção a 5'.



Como a abertura da dupla fita é gradual a partir da forquilha de replicação e o sentido de leitura é *obrigatoriamente* na direção 5' → 3', a síntese das duas fitas ocorre em sentidos opostos, não sendo possível que elas fossem sintetizadas continuamente. Desta forma, foi descoberto que uma das fitas é sintetizada continuamente, sendo denominada de fita líder, enquanto a outra se faz em pequenos fragmentos, sendo chamada de fita tardia. Estes fragmentos são denominados de fragmentos de Okasaki.

ENZIMAS ENVOLVIDAS NA REPLICAÇÃO

As principais enzimas envolvidas na replicação são:

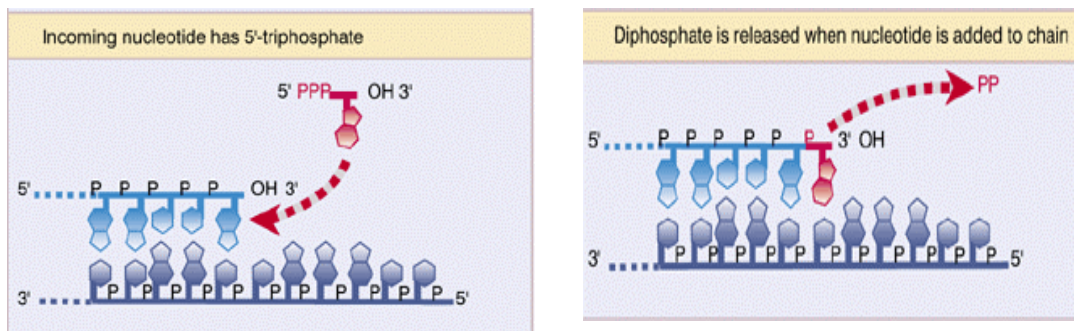
1. NUCLEASES

São enzimas que tem a capacidade de clivar (cortar) ácidos nucléicos, sendo, portanto, responsáveis pela degradação do DNA. Existem inúmeros tipos, que estão divididas em duas classes principais: Exonucleases, que degradam ácidos nucleicos a partir da extremidade da molécula e Endonucleases, que degradam a partir de qualquer sítio (local) da molécula de DNA.

2. DNA POLIMERASES

São as principais enzimas envolvidas na replicação, uma vez que adicionam nucleotídeos e participam do sistema de reparo. Na *E. coli*, utilizada como modelo para estudo da replicação, são mais de 5 enzimas conhecidas, sendo a I, II e III as principais.

A reação básica (polimerização), comum a todas e responsável pelo alongamento do DNA a partir da origem, é:



O estudo das polimerases revelou que para a polimerização ocorrer são necessários dois elementos principais: uma fita molde de DNA e um primer (iniciador). O molde, lido na direção 3' → 5', determina a sequência dos nucleotídeos da fita nova, obedecendo às leis de pareamento de Watson e Crick (A = T, G = C). Ele normalmente é representado pela fita "velha". Desta forma, as características de complementariedade e antiparalelismo são mantidas no novo duplex de DNA. O primer é necessário porque a polimerase não consegue iniciar o alongamento de uma cadeia de polinucleotídeos a partir de nucleotídeos livres; ou seja, um pedaço de fita nova já deve existir. O primer é um pequeno segmento de RNA, sintetizado pela enzima primase, que depois será substituído.

O papel específico de cada polimerase pode ser simplificado da seguinte maneira:

Polimerase I: função de reparo nos processos de replicação e recombinação.

Polimerase III: é a principal enzima envolvida no processo. Tem uma estrutura mais complexa, com várias subunidades com funções específicas. (extender)

3. HELICASES, TOPOISOMERASES, SSB

As helicases fazem a separação das duas fitas parentais para que a replicação possa ter início. Esta separação cria um estresse topológico que é aliviado pela ação das topoisomerasas, enzimas que atuam no enrolamento do duplex de DNA. Já as SSB (*single strand binding proteins* ou proteínas de ligação do DNA de fita simples) mantêm as duas fitas separadas estabilizadas.

4. PRIMASES

Sintetizam a pequena porção de RNA que servirá como primer para o início da replicação.

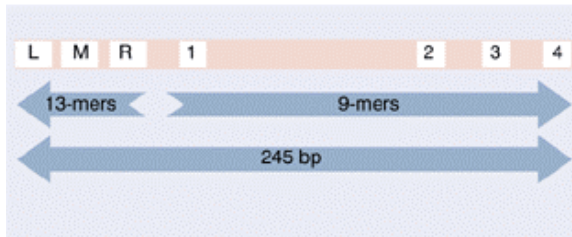
ESTÁGIOS DA REPLICAÇÃO

O processo de replicação é dividido em 3 etapas:

1. INICIAÇÃO

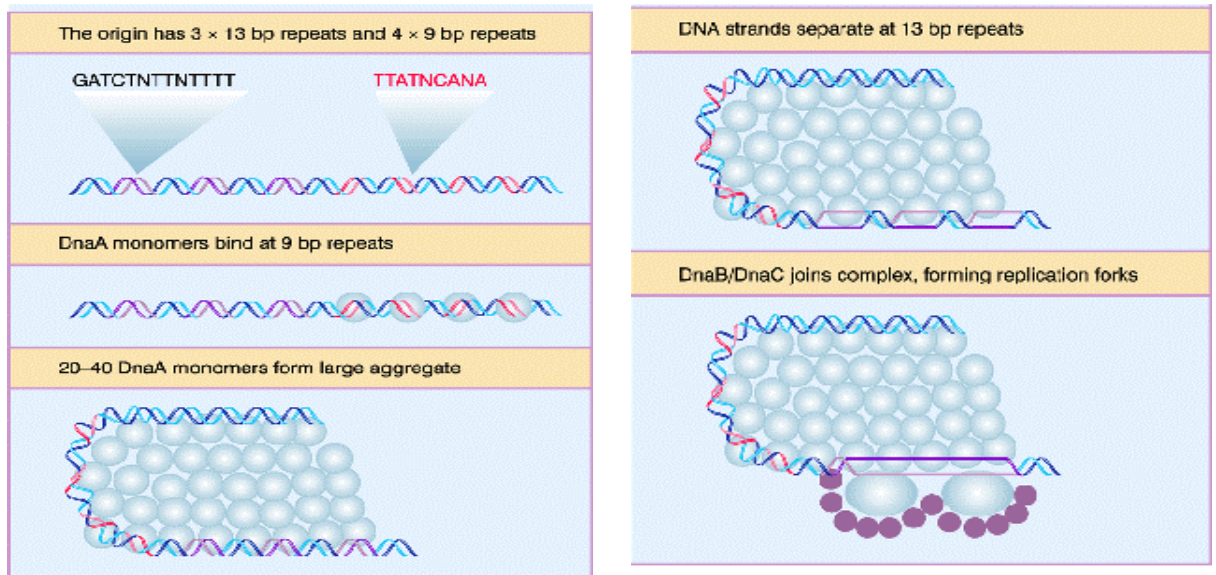
A origem da replicação da *E. coli*, chamada de OriC, consiste numa sequência de 245 pb altamente conservada (isto é, aparece em diversos organismos e manteve-se idêntica durante o processo evolutivo) entre as origens de replicação. As sequências

chave deste segmento consistem em duas séries altamente repetidas: 3 repetições de

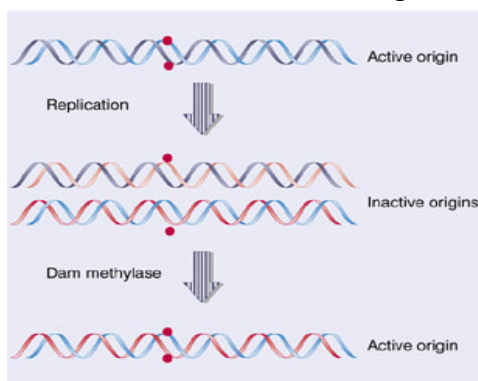


13 pb e e 4 repetições de 9 pb.

Pelo menos 6 enzimas ou proteínas participam na iniciação da replicação. Elas abrem o DNA na origem e estabilizam o complexo que se forma junto com as outras enzimas envolvidas na replicação (complexo pré-priming) para que ocorram as reações subsequentes. O componente chave para no processo é a proteína DnaA. Um complexo de 20 DnaAs se liga às 4 repetições de 9 pb na origem, depois reconhece e abre o DNA na região das três repetições de 13 pares de base. A DnaB então se liga a região aberta e funciona como uma helicase criando assim uma forquilha de replicação e separando progressivamente a dupla fita, numa reação que requer DnaC como co-fator.



A iniciação é única fase regulada da replicação, de forma que ela a replicação só ocorra uma vez por ciclo celular. O tempo de início da replicação é afetado pela metilação do DNA. Imediatamente após o término da replicação o DNA é hemimetilado; a oriC da fita parental é metilada mas da fita nova não. Enquanto a

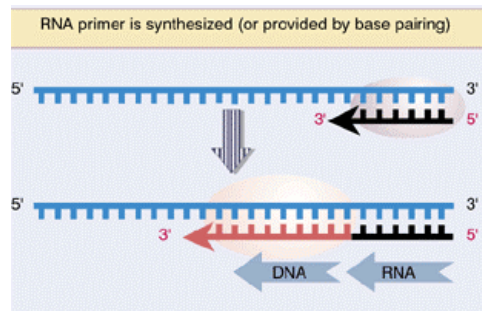


região oriC da fita nova não for metilada não pode ter início um novo processo de replicação.

2. ALONGAMENTO

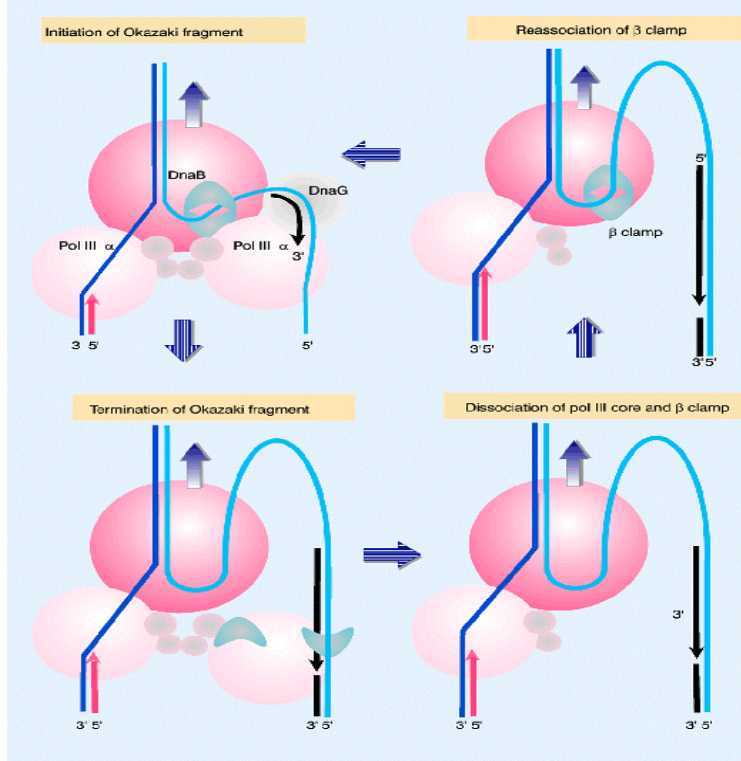
Esta fase inclui duas operações distintas mas relacionadas: a síntese da fita líder e a síntese da fita tardia .

A síntese da fita líder é um processo mais simples, iniciando com a síntese de um pequeno segmento de RNA pela primase na origem de replicação. Depois os desoxirribonucleotídeos são adicionados ao primer pela DNA polimerase III obedecendo as regras já mencionadas. A síntese da fita líder então prossegue continuamente até o final da molécula. O primer é retirado e substituído por DNA.



A síntese da fita tardia é realizada através da formação de pequenos fragmentos de Okasaki, já explicados anteriormente. Primeiro é formado um primer de RNA pela primase e, assim como na fita líder, desoxirribonucleotídeos são adicionados pela DNA polimerase III. Neste nível, o processo parece simples, mas na realidade ele é bem complexo. Sua complexidade reside coordenação entre a síntese da fita líder contínua e a da fita tardia descontínua; sendo as duas realizadas por uma *única* DNA polimerase III (em diferentes subunidades). Para tal, é criada uma alça na fita tardia, aproximando assim os dois pontos da replicação.

Como a fita tardia é sintetizada descontinuamente, isto é, através da formação de vários fragmentos, o processo de criação de um primer se repete diversas vezes, assim como o desconectamento do fragmento formado da polimerase III e a conexão de um novo fragmento. No final todos primers são retirados e os fragmentos de Okasaki unidos.



3. TERMINAÇÃO

Tomando-se como um modelo a *E. coli* e tendo em vista seu DNA circular, haverá um momento em que as duas forquilhas de replicação (que progridem direcionalmente) finalmente se encontraram em uma sequência chamada *Ter*. Para que possa dar fim a replicação, ela foi arranjada de maneira a formar uma espécie de armadilha, em que a forquilha de replicação entre e não possa sair. Isso é obtido pela ligação da proteína Tus ao região *Ter*. Como as forquilhas de replicação tem direção opostas e normalmente halt quando colidem, as sequências talvez *Ter* não fossem essenciais, mas impedem que a replicação do DNA recomece ou continue.

Nos eucariotos a terminação da replicação dos cromossomos lineares enfrenta o problema de replicar a extremidade da fita tardia, que está sendo sintetizada em sentido oposto. A solução envolve a síntese das partes terminais dos cromossomos, chamadas telômeros. Os telômeros possuem várias cópias de uma sequência consenso, as quais são adicionadas por uma enzima específica (telomerase) na fita tardia, quando a replicação estiver próxima ao final. Na fita líder, a terminação ocorre naturalmente quando ao final do molde parental.

REPLICAÇÃO NOS EUCARIOTOS

A essência do processo de replicação é a mesma entre procariontes e eucariotes. No entanto, como as moléculas de DNA são maiores e estão organizadas em uma estrutura nucleoproteica complexa, algumas adaptações são necessárias nos eucariotes.

As soluções encontradas foram criar um maquinário enzimático mais complexo e ter múltiplos pontos de origem ao longo do cromossomo. Isso permite que a replicação inicie simultaneamente em todos os cromossomos, aumentando a velocidade do processo.