

**FIGURA 8-17** Formas da estrutura da cromatina vistas no microscópio eletrônico.

(a) Micrografias eletrônicas do DNA na fase M e na interfase mostram as alterações na estrutura da cromatina. (b) Micrografias eletrônicas de diferentes formas da cromatina nas células em interfase mostram as fibras de 30 nm e 10 nm (colar de contas da cromatina). (a, Reproduzida, com permissão, de Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., Figs. 4-21 e 4-23. Garland Science/Taylor & Francis LLC. © V. Foe.)

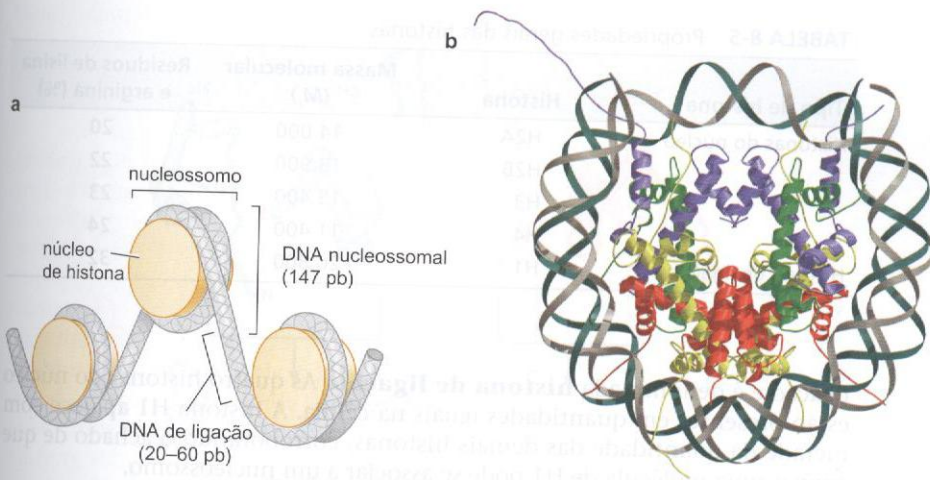
essencial na regulação da estrutura e da função dos cromossomos. No restante do capítulo, em primeiro lugar será discutida a natureza dos nucleossomos, incluindo como são formados e, depois, será descrito como as estruturas dependentes de nucleossomo são reguladas e como controlam a acessibilidade ao DNA nuclear.

## NUCLEOSSOMO

### Os nucleossomos são os blocos construtores dos cromossomos

A maioria do DNA nas células eucarióticas está empacotada em nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por um núcleo de oito proteínas histônicas com DNA enrolado em torno desse núcleo. O DNA entre cada nucleossomo (imagem de “cordão” do “colar de contas” na Fig. 8-17b) é chamado **DNA de ligação**. O DNA organizado em nucleossomos é compactado aproximadamente seis vezes. Esse fator está bem longe das 1.000 a 10.000 vezes de compactação do DNA observada nas células eucarióticas. Mesmo assim, esse primeiro estágio de empacotamento do DNA é essencial para todos os níveis subsequentes de compactação do DNA.

O DNA mais fortemente associado ao nucleossomo, o **DNA nucleossomal**, circunda a parte externa do núcleo octamérico de histonas aproximadamente 1,65 vez, como um fio ao redor de um carretel (Fig. 8-18). O comprimento do DNA associado a cada nucleossomo pode ser determinado utilizando-se o tratamento com nuclease (Quadro 8-1, A nuclease de micrococos e o DNA associado ao nucleossomo). Os aproximadamente 147 pb de comprimento desse DNA é uma característica invariável dos nucleossomos em todas as células eucarióticas. Em contrapartida, o comprimento do DNA de



**FIGURA 8-18 DNA empacotado em nucleossomos.** (a) Esquema de empacotamento e organização dos nucleossomos. (b) Estrutura obtida por cristalografia por raios X de um nucleossomo, mostrando o DNA enrolado ao redor do núcleo proteico de histonas. (Vermelho) H2A; (amarelo) H2B; (lilás) H3; (verde) H4. Nota-se que as cores das diferentes proteínas histônicas mostradas aqui e nas estruturas seguintes são as mesmas. (Luger K. et al. 1997. *Nature* 389: 251-260.) Imagem feita com MolScript, BobScript e Raster 3D.

ligação entre os nucleossomos é variável. Normalmente, essa distância é de 20 a 60 pb e cada eucarioto apresenta um tamanho médio característico de seu DNA de ligação (Tab. 8-4). A diferença no comprimento médio do DNA de ligação parece refletir as diferenças na natureza de estruturas maiores, formadas pelo DNA nucleossomal em cada organismo, em vez de diferenças nos próprios nucleossomos (ver a seção Estrutura de ordem superior da cromatina).

Em qualquer célula, existem regiões de DNA que não estão compactadas em nucleossomos. Em geral, são regiões de DNA envolvidas na expressão gênica, na replicação ou na recombinação. Embora não estejam ligados aos nucleossomos, esses sítios estão associados a proteínas não histônicas que regulam ou participam desses eventos. Os mecanismos que removem os nucleossomos do DNA e que mantêm essas regiões livres de nucleossomos serão discutidos a seguir e no Capítulo 19.

### Histonas são pequenas proteínas com carga positiva

As histonas são, sem dúvida, as proteínas mais abundantes associadas ao DNA eucariótico. As células eucarióticas contêm cinco histonas abundantes: H1, H2A, H2B, H3 e H4. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 são as **histonas do núcleo** e duas cópias de cada uma dessas histonas formam o núcleo de proteína, ao redor do qual o DNA nucleossomal é enrolado. A histona H1 não faz parte do núcleo de histonas deste nucleossomo. Em vez disso, ela liga-se ao DNA de

**TABELA 8-4** Comprimentos médios do DNA de ligação em vários organismos

Espécies	Comprimento da repetição do nucleossomo (pb)	Comprimento médio do DNA de ligação (pb)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160-165	13-18
Ouriço-do-mar (espermatozoide)	~260	~110
<i>Drosophila melanogaster</i>	~180	~33
Ser humano	185-200	38-53

TABELA 8-5 Propriedades gerais das histonas

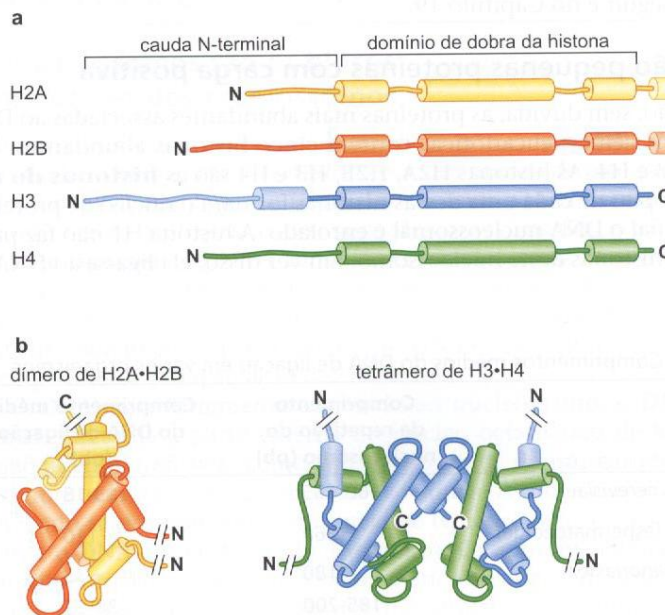
Tipo de histona	Histona	Massa molecular ( $M_r$ )	Resíduos de lisina e arginina (%)
Histonas do núcleo	H2A	14.000	20
	H2B	13.900	22
	H3	15.400	23
	H4	11.400	24
Histona de ligação	H1	20.800	32

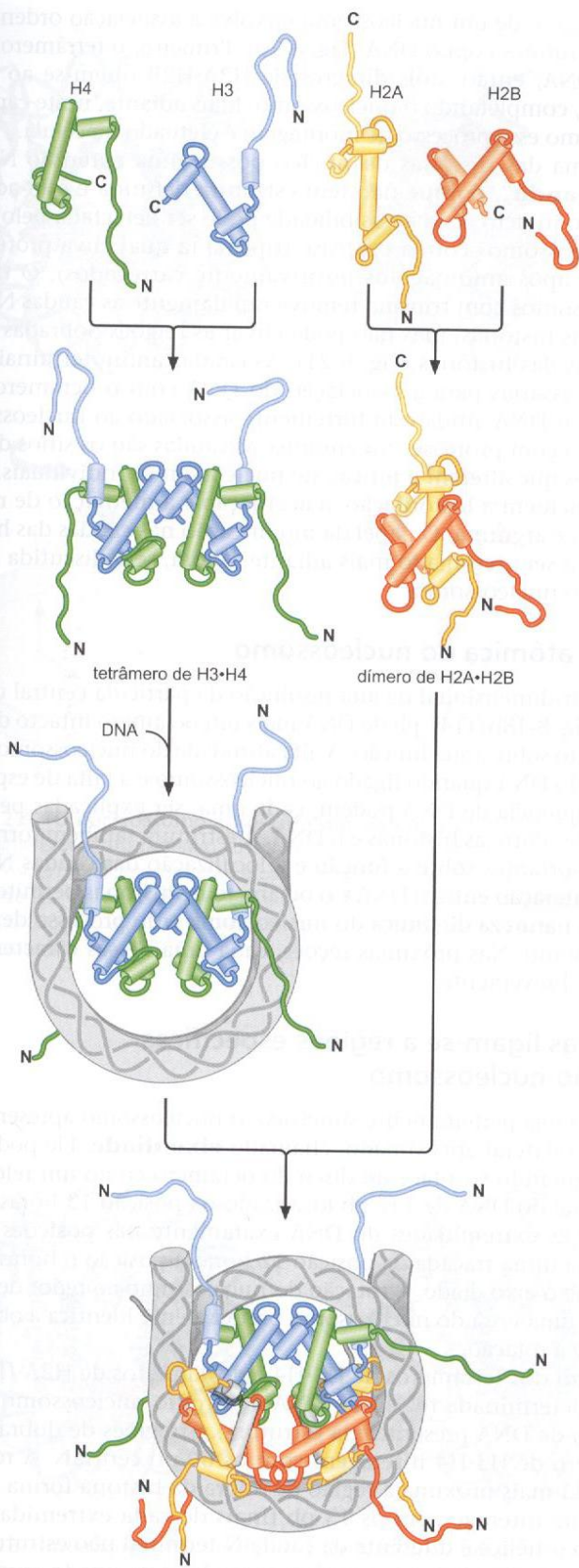
ligação e é denominada **histona de ligação**. As quatro histonas do núcleo estão presentes em quantidades iguais na célula. A histona H1 aparece com metade da quantidade das demais histonas, corroborando o achado de que apenas uma molécula de H1 pode se associar a um nucleossomo.

Consistente com sua estreita associação com a molécula de DNA de carga negativa, as histonas apresentam um elevado conteúdo de aminoácidos carregados positivamente (Tab. 8-5). Pelo menos 20% dos resíduos em cada histona são lisina ou arginina. As histonas do núcleo também são proteínas relativamente pequenas, variando de 11 a 15 quilodáltons (kDa) em seus tamanhos. A histona H1 é um pouco maior, com aproximadamente 21 kDa.

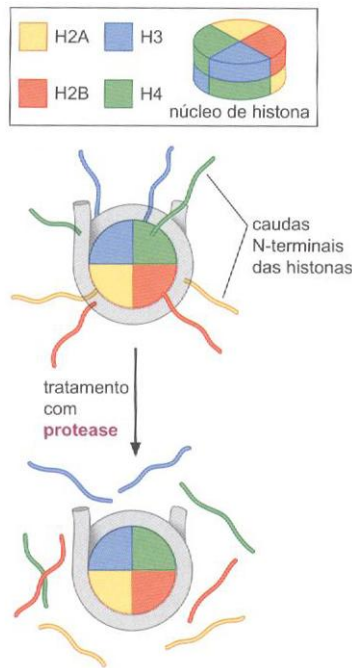
O núcleo de proteína do nucleossomo é uma estrutura em forma de disco que se organiza de maneira ordenada apenas na presença de DNA. Sem DNA, as histonas do núcleo formam estruturas intermediárias em solução. Uma região conservada, encontrada em todas as histonas, chamada **domínio de dobra da histona**, promove o arranjo dos intermediários formados apenas por histonas (Fig. 8-19). O domínio de dobra da histona é composto por três regiões de  $\alpha$ -hélices, separadas por duas alças curtas sem estrutura definida. Em cada caso, a dobra da histona promove a formação de heterodímeros cabeça-cauda de pares de histonas específicas. As histonas H3 e H4, primeiramente, formam heterodímeros que se agrupam, formando um tetrâmero com duas moléculas de H3 e duas de H4. Em contrapartida, H2A e H2B formam heterodímeros em solução, mas não tetrâmeros.

**FIGURA 8-19** As histonas do núcleo compartilham uma estrutura de dobra comum. (a) As quatro histonas estão representadas esquematicamente como moléculas lineares. As regiões do motivo de dobra da histona que formam  $\alpha$ -hélices estão indicadas como cilindros. Observa-se que existem regiões adjacentes, estruturalmente distintas, em cada histona, incluindo regiões adicionais de  $\alpha$ -hélices. (b) As regiões helicoidais de duas histonas (aqui H2A e H2B) associam-se, formando um dímero. H3 e H4 também utilizam uma interação semelhante para formar os tetrâmeros de  $H_3H_4$ . (Adaptada, com permissão, de Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., p. 209, Fig. 4-26. © Garland Science/Taylor & Francis LLC.)





**FIGURA 8-20 Montagem de um nucleossomo.** A montagem de um nucleossomo começa pela formação de um tetrâmero  $H3_2 \cdot H4_2$ , que se liga ao dsDNA. O tetrâmero  $H3_2 \cdot H4_2$  ligado ao DNA recruta duas cópias do dímero  $H2A \cdot H2B$  para completar a montagem do nucleossomo. (Adaptada, com permissão, de Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., p. 210, Fig. 4-27. Garland Science/Taylor & Francis LLC. © J. Waterborg.)



**FIGURA 8-21** As caudas N-terminais das histonas do núcleo são acessíveis às proteases. O tratamento dos nucleossomos com quantidades limitantes de proteases que clivam após aminoácidos básicos (p. ex., tripsina) remove, especificamente, as “caudas” N-terminais, deixando o núcleo de histonas intacto.

A montagem de um nucleossomo envolve a associação ordenada desses blocos construtores com o DNA (Fig. 8-20). Primeiro, o tetrâmero de H3-H4 liga-se ao DNA; então, dois dímeros de H2A-H2B unem-se ao complexo H3-H4-DNA, completando o nucleossomo. Mais adiante, neste capítulo, será discutido como esse processo de montagem é efetuado na célula.

Cada uma das histonas do núcleo possui uma extensão N-terminal, chamada “cauda”, porque não tem estrutura definida e está acessível no nucleossomo intacto. Essa acessibilidade pode ser detectada pelo tratamento dos nucleossomos com a protease tripsina (a qual cliva proteínas especificamente após aminoácidos positivamente carregados). O tratamento dos nucleossomos com tripsina remove rapidamente as caudas N-terminais acessíveis das histonas, mas não pode clivar as regiões dobradas altamente compactadas das histonas (Fig. 8-21). As caudas aminoterminais expostas não são necessárias para a associação do DNA com o octâmero de histonas, porque o DNA ainda está fortemente associado ao nucleossomo após o tratamento com protease. No entanto, as caudas são os sítios das grandes modificações que alteram a função de nucleossomos individuais. Essas modificações incluem a fosforilação, a acetilação e a metilação de resíduos de serina, lisina e arginina. O papel da modificação nas caudas das histonas no nucleossomo será retomado mais adiante. Agora, será discutida a estrutura detalhada do nucleossomo.

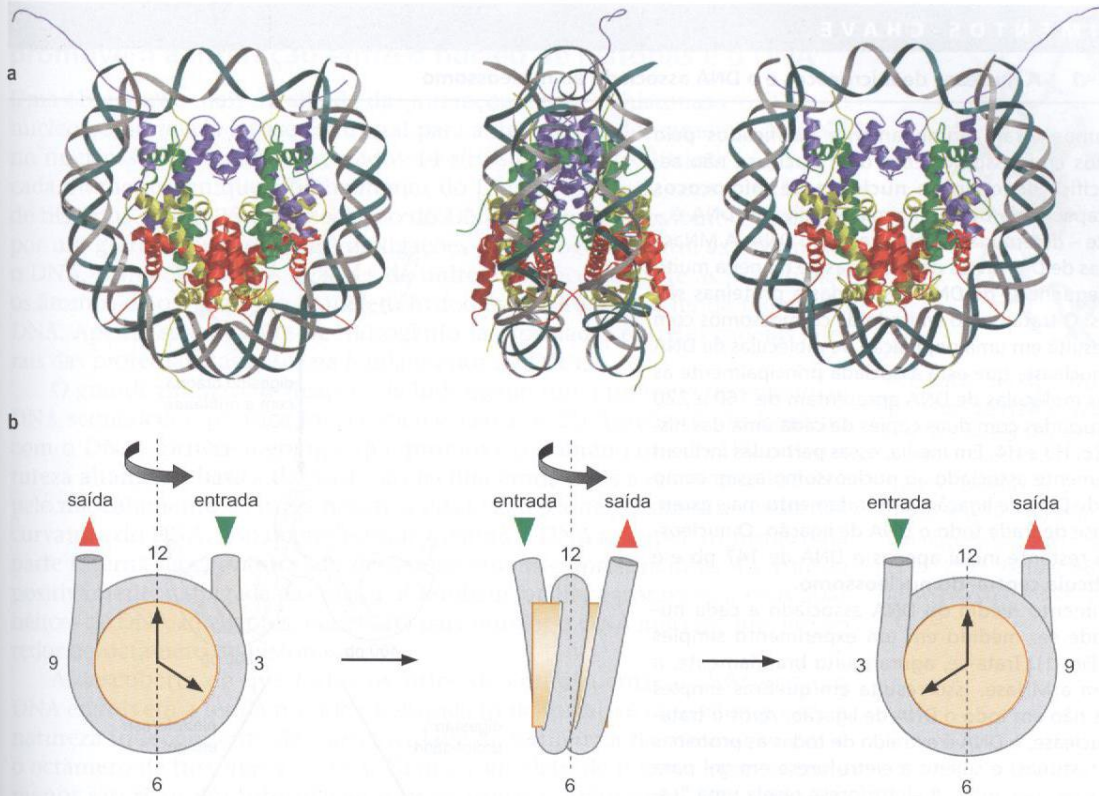
### Estrutura atômica do nucleossomo

A estrutura tridimensional de alta resolução da partícula central do nucleossomo (ver Fig. 8-18b) (147 pb de DNA mais um octâmero intacto de histonas) revelou muito sobre a sua função. A alta afinidade do nucleossomo pelo DNA, a distorção do DNA quando ligado ao nucleossomo e a falta de especificidade por uma sequência de DNA podem, cada uma, ser explicadas pela natureza das interações entre as histonas e o DNA. A estrutura também forneceu informações importantes sobre a função e a localização das caudas N-terminais. Por fim, a interação entre o DNA e o octâmero de histonas permite um entendimento da natureza dinâmica do nucleossomo e do processo de montagem do nucleossomo. Nas próximas seções, cada uma dessas características será apresentada brevemente.

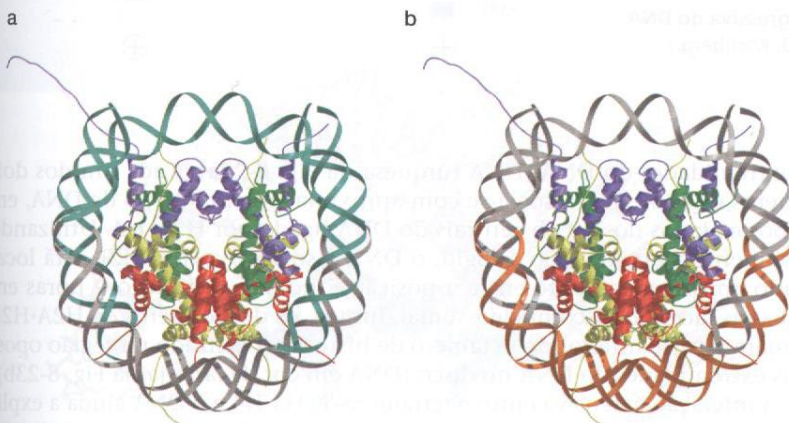
### As histonas ligam-se a regiões específicas do DNA no nucleossomo

Embora não seja perfeitamente simétrico, o nucleossomo apresenta um eixo de simetria bilateral aproximado, chamado **eixo díade**. Ele pode ser visualizado imaginando-se a face do disco do octâmero como um relógio, com o ponto central do DNA de 147 pb localizado na posição 12 horas (Fig. 8-22). Isso coloca as extremidades do DNA exatamente nas posições 11 horas e 1 hora. Uma linha traçada da posição 12 horas à posição 6 horas, através do disco, define o eixo díade. A rotação do nucleossomo ao redor desse eixo em 180° revela uma vista do nucleossomo praticamente idêntica à observada anteriormente à rotação.

Cada um dos tetrâmeros de H3-H4 e dos dímeros de H2A-H2B interage com uma determinada região do DNA dentro do nucleossomo (Fig. 8-23). Dos 147 pb de DNA presentes na estrutura, as regiões de dobra da histona do tetrâmero de H3-H4 interagem com os 60 pb centrais. A região N-terminal de H3 mais próxima à região de dobra da histona forma uma quarta  $\alpha$ -hélice, que interage com os 13 pb finais de cada extremidade do DNA ligado (essa  $\alpha$ -hélice é diferente da cauda N-terminal não estruturada de H3 descrita anteriormente). Se o nucleossomo for imaginado como a face de um relógio, como supradescrito, o tetrâmero de H3-H4 forma a metade superior do octâmero de histonas. Os tetrâmeros de histonas H3-H4 ocupam uma posição central no nucleossomo, por se ligarem no meio *e* em ambas



**FIGURA 8-22 O nucleossomo apresenta um eixo de simetria quase bilateral.** (a) Estrutura tridimensional. (b) Desenho ilustrando a analogia do nucleossomo com a “face do relógio”. Três visões do nucleossomo são mostradas em cada representação. Cada visão mostra uma rotação de 90° em torno do eixo entre as posições 12 e 6 horas, ilustradas no primeiro painel de b. (a, Luger K. et al. 1997. *Nature* **389**: 251-260.) Imagens feitas com MolScript, BobScript e Raster 3D.



**FIGURA 8-23 Interações entre histonas e DNA nucleossomal.** (a) H3-H4 liga-se no centro e nas extremidades do DNA. (b) H2A-H2B liga-se a 30 pb de DNA em um dos lados do nucleossomo (em cor de laranja). (Luger K. et al. 1997. *Nature* **389**: 251-260.) Imagens feitas com MolScript, BobScript e Raster 3D.

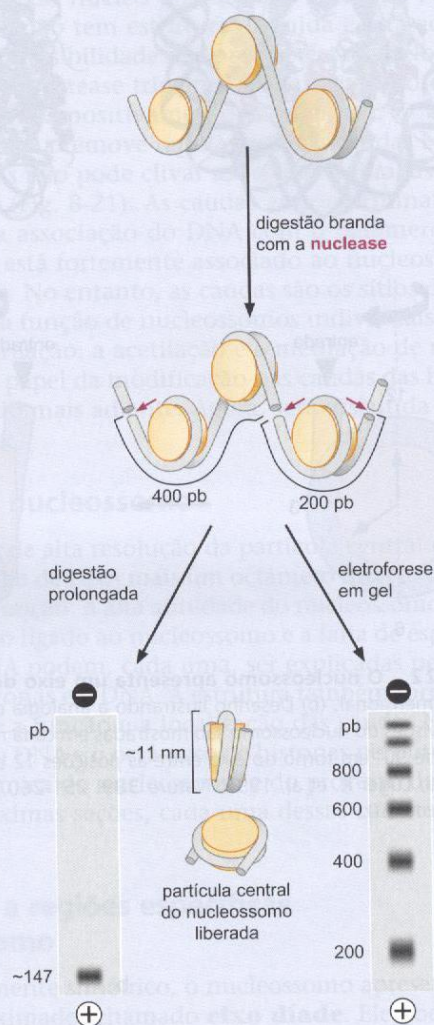
## ▶ EXPERIMENTOS - CHAVE

## Quadro 8-1 A nuclease de micrococos e o DNA associado ao nucleossomo

Os nucleossomos foram primeiramente purificados pelo tratamento dos cromossomos com uma nuclease não sequência-específica denominada **nuclease de micrococos (MNase)**. A capacidade dessa enzima em clivar o DNA é – principalmente – determinada pelo acesso ao DNA. A MNase cliva sequências de DNA livres de proteínas de maneira muito rápida, e as sequências de DNA associadas a proteínas são pouco clivadas. O tratamento limitado de cromossomos com essa enzima resulta em uma população de moléculas de DNA resistentes à nuclease, que está associada principalmente às histonas. Essas moléculas de DNA apresentam de 160 a 220 pb e estão associadas com duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Em média, essas partículas incluem um DNA fortemente associado ao nucleossomo assim como uma unidade de DNA de ligação. Um tratamento mais extenso com a MNase degrada todo o DNA de ligação. O nucleossomo mínimo restante inclui apenas o DNA de 147 pb e é chamado **partícula central do nucleossomo**.

O comprimento médio do DNA associado a cada nucleossomo pode ser medido em um experimento simples (Quadro 8-1, Fig. 1). Trata-se, agora muito brandamente, a cromatina com a MNase. Isso resulta em quebras simples em parte, mas não em todo o DNA de ligação. Após o tratamento com nuclease, o DNA é extraído de todas as proteínas (incluindo as histonas) e sujeito à eletroforese em gel para separar o DNA por tamanho. A eletroforese revela uma “escada” de fragmentos com tamanhos que são múltiplos da distância média de nucleossomo a nucleossomo. Uma escada de fragmentos é observada porque a cromatina tratada com a MNase foi parcialmente digerida. Assim, às vezes, múltiplos nucleossomos permanecerão ligados após a digestão, originando fragmentos de DNA com tamanhos equivalentes ao DNA total ligado por esses nucleossomos. Digestões adicionais resultarão na clivagem de todo o DNA de ligação e na formação de partículas centrais do nucleossomo, com um único fragmento de aproximadamente 147 pb.

QUADRO 8-1 FIGURA 1 Digestão progressiva do DNA nucleossomal com MNase. (Cortesia de R.D. Kornberg.)



as extremidades do DNA (DNA turquesa na Fig. 8-23a). Cada um dos dois dímeros de H2A·H2B associa-se com aproximadamente 30 pb de DNA, em ambos os lados dos 60 pb centrais do DNA ligado por H3 e H4. Utilizando novamente a analogia do relógio, o DNA associado a H2A·H2B está localizado aproximadamente entre a posição 5 horas e a posição 9 horas em ambas as faces do disco nucleossomal. Juntos, os dois dímeros de H2A·H2B formam a parte inferior do octâmero de histonas localizado na região oposta às extremidades do DNA no disco (DNA em cor de laranja na Fig. 8-23b).

A interação extensiva entre o tetrâmero de H3·H4 e o DNA ajuda a explicar a montagem ordenada do nucleossomo (Fig. 8-24). A associação do tetrâmero de H3·H4 com a metade e as extremidades do DNA ligado resulta no DNA sendo extensivamente dobrado e limitado, tornando a associação dos dímeros de H2A·H2B relativamente fácil. Em contrapartida, o comprimento relativamente curto do DNA ligado pelos dímeros de H2A·H2B não é suficiente para preparar o DNA para a ligação dos tetrâmeros de H3·H4.

### Muitos contatos independentes da sequência de DNA promovem a interação entre o núcleo de histonas e o DNA

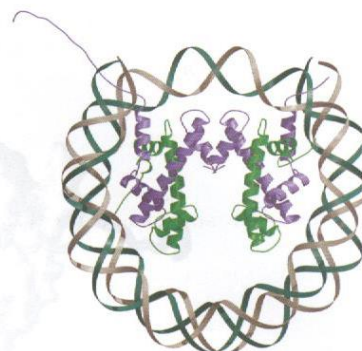
Uma observação mais detalhada das interações entre as histonas e o DNA do nucleossomo revela a base estrutural para a ligação e o dobramento do DNA no nucleossomo. Foram observados 14 sítios de contato distintos, um para cada momento em que a fenda menor do DNA defronta-se com o octâmero de histonas (Fig. 8-25). A associação do DNA com o nucleossomo é mediada por um grande número (~40) de ligações de hidrogênio entre as histonas e o DNA. A maioria dessas ligações de hidrogênio ocorre entre as proteínas e os átomos de oxigênio do esqueleto fosfodiéster, próximo à fenda menor do DNA. Apenas sete ligações de hidrogênio são formadas entre as cadeias laterais das proteínas e as bases na fenda menor do DNA.

O grande número de ligações de hidrogênio (uma proteína de ligação ao DNA sequência-específica forma apenas cerca de 20 ligações de hidrogênio com o DNA) fornece a energia que promove o dobramento do DNA. A natureza altamente básica das histonas facilita ainda mais a curvatura do DNA pelo mascaramento da carga negativa dos fosfatos, que geralmente resistem à curvatura do DNA. Isso ocorre porque quando o DNA se curva, os fosfatos da parte interna da curvatura são desfavoravelmente aproximados. A natureza positivamente carregada das histonas também facilita a justaposição das duas hélices de DNA adjacentes, necessária para enrolar o DNA mais de uma vez ao redor do octâmero de histonas.

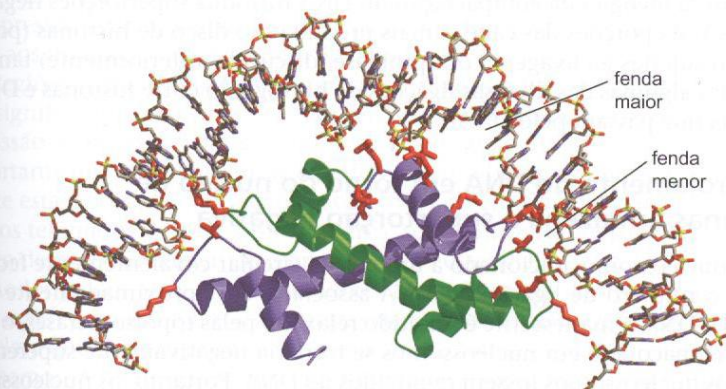
A descoberta de que todos os sítios de contato entre as histonas e o DNA envolvem a fenda menor e o esqueleto de fosfato é consistente com a natureza independente de especificidade de sequência da associação entre o octâmero de histonas e o DNA. Nem o esqueleto de fosfato, nem a fenda menor são ricos em informação base-específica. Além disso, das sete ligações de hidrogênio formadas com as bases na fenda menor, *nenhuma* ocorre com elementos que distinguem entre pares de bases G:C e A:T (ver Cap. 4, Fig. 4-10).

### As caudas N-terminais das histonas estabilizam o DNA enrolado ao redor do octâmero

A estrutura do nucleossomo também fornece informações sobre as caudas N-terminais das histonas. As quatro caudas de H2B e H3 emergem entre as duas hélices de DNA. Seus trajetos de saída são formados por duas fendas

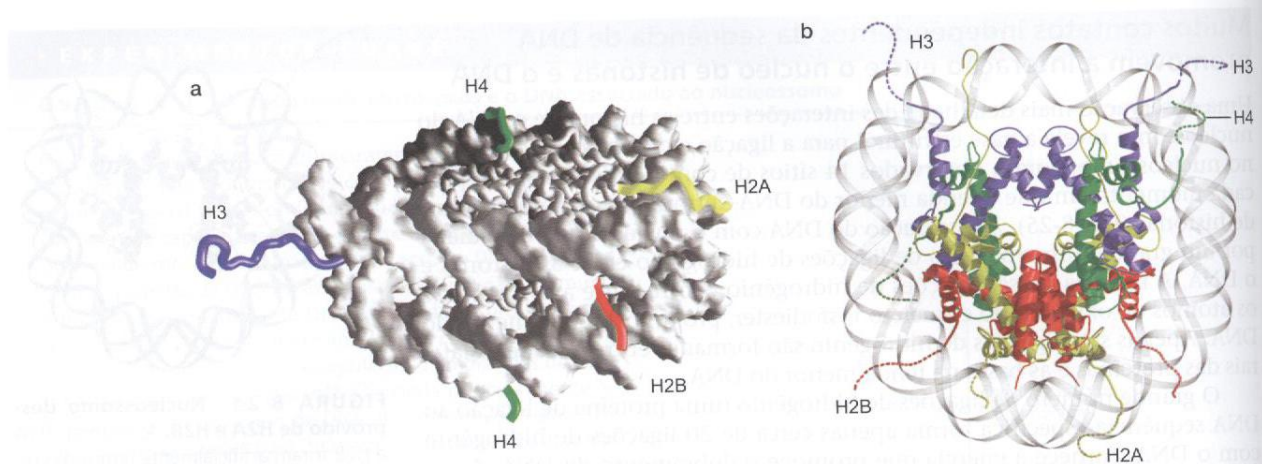


**FIGURA 8-24 Nucleossomo desprovido de H2A e H2B.** As histonas H2A e H2B foram artificialmente removidas do nucleossomo. É provável que essa estrutura se assemelhe ao tetrâmero intermediário H3<sub>2</sub>·H4<sub>2</sub> do DNA na montagem de um nucleossomo (ver Fig. 8-20). (Luger K. et al. 1997. *Nature* **389**: 251-260.) Imagem feita com MolScript, BobScript e Raster 3D.



**FIGURA 8-25 Sítios de contato entre histonas e DNA.** Por simplificação, apenas as interações entre um único dímero de H3·H4 estão mostradas. Um subconjunto de partes das histonas que interage com o DNA está indicado em vermelho. Observa-se que essas regiões se agrupam ao redor da fenda menor do DNA. (Luger K. et al. 1997. *Nature* **389**: 251-260.) Imagem feita com MolScript, BobScript e Raster 3D.





**FIGURA 8-26** As caudas das histonas emergem do núcleo do nucleossomo em posições específicas. (a) Visão lateral ilustrando como as caudas de H3 e H2B se projetam entre as duas hélices de DNA. Em contrapartida, as caudas de H4 e H2A emergem ou da parte superior ou da parte inferior de ambas as hélices de DNA. (Luger K. et al. 1997. *Nature* **389**: 251-260.) Imagem feita com GRASP. (b) Posição das caudas em relação à entrada e à saída do DNA. Esta imagem revela que as caudas das histonas emergem de várias posições em relação ao DNA. (Davey C. A. et al. 2002. *J. Mol. Biol.* **319**: 1097-1113.) Imagem feita com MolScript, BobScript e Raster 3D.

menores adjacentes, formando uma “falha” entre as duas hélices de DNA, grande o suficiente para uma cadeia polipeptídica (Fig. 8-26a). Surpreendentemente, as caudas de H2B e H3 emergem de distâncias aproximadamente iguais ao redor do disco do octâmero (~ as posições 1 hora e 11 horas para as caudas de H3 e 4 horas e 8 horas para H2B). Em vez de emergir entre as duas hélices de DNA, as caudas aminoterminais de H2A e H4 emergem de cima ou de baixo de ambas as hélices de DNA (Fig. 8-26a). Essas caudas também estão distribuídas pela face do nucleossomo, com as caudas de H2A emergindo nas posições 5 horas e 7 horas, e as caudas de H4, nas posições 3 horas e 9 horas (Fig. 8-26b). Por emergirem tanto entre quanto em ambos os lados das hélices de DNA, as caudas das histonas funcionam como os sulcos de um parafuso, direcionando o DNA para se enrolar ao redor do disco do octâmero de histonas, com orientação voltada à esquerda. Como foi discutido no Capítulo 4, a natureza levógiira da compactação do DNA introduz supertorções negativas no DNA. As porções das caudas mais próximas ao disco de histonas (portanto, não sujeitas à clivagem com protease, discutida anteriormente) também realizam algumas das diversas ligações de hidrogênio entre histonas e DNA, à medida que passam pelo DNA.

### O enrolamento do DNA em torno do núcleo de histonas armazena a supertorção negativa

Cada nucleossomo adicionado a um molde circular covalentemente fechado altera o número de ligação do DNA associado em aproximadamente  $-1,2$ . Como o DNA remanescente é mantido relaxado pelas topoisomerasas, o DNA que é empacotado em nucleossomos se tornaria negativamente superenrolado se os nucleossomos fossem removidos do DNA. Portanto, os nucleossomos podem ser vistos como armazenadores ou estabilizadores da super-helicoidização, ou supertorção, negativa. Por que a célula mantém um estoque de super-helicoidização negativa? Existem muitas situações nas quais é útil direcionar o desenrolamento do DNA na célula, incluindo o início da replicação do DNA, transcrição e recombinação. É importante observar que o DNA

negativamente supertorcido favorece o desenrolamento do DNA (ver Cap. 4, Fig. 4-17). Portanto, a remoção de um nucleossomo não apenas permite o maior acesso ao DNA, mas também facilita o desenrolamento de sequências próximas de DNA (Quadro 8-2, Nucleossomos e densidade super-helicoidal).

Se os nucleossomos estocam super-helicoidização negativa em células eucarióticas, o que faz a função equivalente em células procarióticas? A resposta para muitos organismos procarióticos é que o genoma inteiro é mantido em um estado negativamente supertorcido. Isso é realizado por uma topoisomerase especializada, chamada **girase**, que tem a capacidade de introduzir super-helicoidização negativa no DNA relaxado pela redução do número de ligação. Por exemplo, em células de *E. coli*, a atuação da girase resulta em uma densidade super-helicoidal média do genoma de aproximadamente  $-0,07$ . A adição de supertorções negativas no DNA relaxado é uma reação que requer energia. Corroborando isso, a girase necessita de ATP para introduzir supertorções negativas. Na ausência de ATP, a girase só consegue relaxar o DNA (p. ex., reduzir o número de ligação do DNA positivamente supertorcido).

Nem todas as bactérias precisam manter seu DNA em um estado negativamente supertorcido. Bactérias que preferem crescer em temperaturas muito altas ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) devem gastar energia para *evitar* que seu DNA se desenrole devido à desnaturação térmica. Esses organismos possuem uma topoisomerase diferente, chamada **girase reversa**. Como o nome sugere, a girase reversa aumenta o número de ligação do DNA relaxado na presença de ATP. Ao manter o genoma positivamente supertorcido, a girase reversa neutraliza o efeito da desnaturação térmica, que normalmente resultaria no desenrolamento de várias regiões do genoma.

## ESTRUTURA DE ORDEM SUPERIOR DA CROMATINA

### Heterocromatina e eucromatina

Desde as primeiras observações dos cromossomos no microscópio óptico, ficou claro que eles não eram estruturas uniformes. Estudos iniciais dos cromossomos dividiram as regiões cromossômicas em duas categorias: **eucromatina** e **heterocromatina**. A heterocromatina era caracterizada pela densa coloração com uma variedade de corantes e uma aparência mais condensada, enquanto a eucromatina tinha as características opostas, com fraca coloração e estrutura relativamente mais aberta. À medida que o conhecimento molecular sobre os genes e sua expressão avançou, ficou claro que as regiões heterocromáticas dos cromossomos apresentavam expressão gênica muito limitada. Ao contrário, as regiões eucromáticas possuíam altos níveis de expressão gênica, sugerindo que essas diferentes estruturas estavam conectadas aos níveis globais de expressão gênica.

Regiões heterocromáticas apresentam pouca expressão gênica, mas isso não significa que essas regiões não sejam importantes. Como será visto na discussão sobre expressão gênica, manter um gene desativado pode ser tão importante quanto ativar um gene. Além disso, a heterocromatina frequentemente está associada com regiões específicas do cromossomo, especialmente com os telômeros e com os centrômeros, sendo importante para o funcionamento destes dois elementos cromossômicos essenciais.

Ao longo dos anos, os pesquisadores adquiriram um conhecimento molecular mais completo sobre as estruturas da heterocromatina e da eucromatina. Está claro que o DNA em ambos os tipos de cromatina está empacotado em nucleossomos. A diferença entre a estrutura da heterocromatina e a estrutura da eucromatina é como os nucleossomos nessas diferentes regiões cromossômicas são (ou não são) organizados em estruturas maiores. Ficou claro que as regiões heterocromáticas são compostas por DNA nucleossomal organizado em estruturas de ordem maior que resultam em uma barreira à expressão gênica. Em contrapartida, os nucleossomos eucromáticos são encontrados em montagens

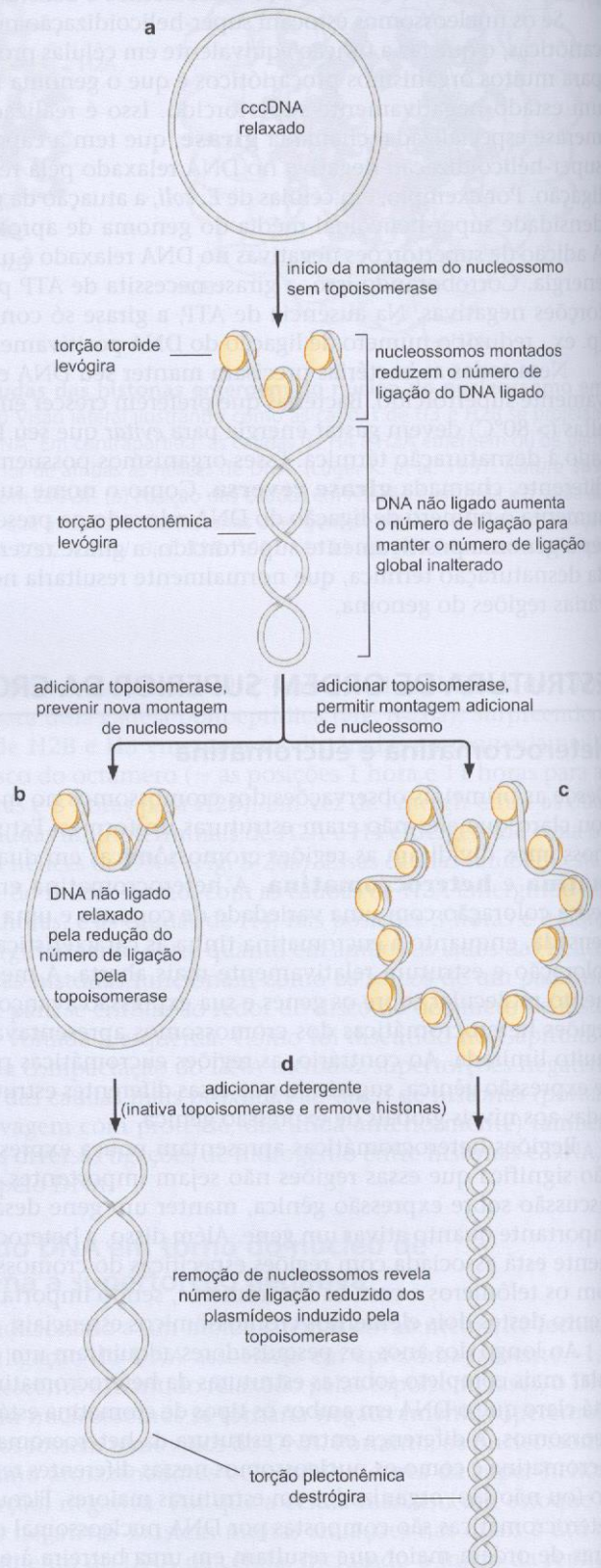
▶ EXPERIMENTOS - CHAVE

**Quadro 8-2** Nucleossomos e densidade super-helicoidal

Por que os nucleossomos alteram o estado topológico do DNA? Como descrito no Capítulo 4, há duas formas de torção que podem contribuir para a formação do DNA super-torcido: a toroide e a plectonêmica. O enrolamento do DNA em torno do octâmero de histonas é uma forma de torção toroide. A orientação da torção determina se há a introdução de supertorções positivas ou negativas (i.e., se aumenta ou diminui o número de ligação do DNA associado). Para a torção toroide, o enrolamento para a esquerda induz a super-helicoidização negativa (para a torção plectonêmica, o oposto é verdadeiro; a orientação para a direita está associada à super-helicoidização negativa). Portanto, o enrolamento toroide para a esquerda do DNA em torno do nucleossomo diminui o número de ligação do DNA associado. Por essa razão, os nucleossomos são preferencialmente formados com DNA que apresenta densidade super-helicoidal negativa. Em contrapartida, a montagem de nucleossomos no DNA que possui densidade super-helicoidal positiva é muito difícil.

A montagem de vários nucleossomos no DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) necessita da presença de uma topoisomerase para acomodar alterações no número de ligação do DNA ligado às histonas (ver Quadro 8-2, Fig. 1). Sem a presença de uma topoisomerase, para cada nucleossomo formado com o cccDNA, o DNA não ligado (não associado aos nucleossomos) teria de acomodar um aumento equivalente no número de ligação (deve-se ter em mente que o número de ligação geral de um cccDNA é fixo na ausência de uma topoisomerase). Portanto, o DNA não ligado acumularia um número de ligação aumentado e uma densidade super-helicoidal positiva. Quanto mais positivamente super-torcido for o DNA não ligado, mais difícil será a montagem de nucleossomos adicionais nesse DNA.

A adição de uma topoisomerase facilita muito a associação do nucleossomo com o cccDNA. Quando uma topoisomerase está presente durante a montagem do nucleossomo, ela não consegue agir sobre o DNA ligado ao nucleossomo. Em vez disso, a topoisomerase relaxa o DNA não incluído nos nucleossomos, reduzindo a densidade super-helicoidal positiva nestas regiões pela diminuição do número de ligação. Mantendo o DNA não ligado em um estado relaxado, as topoisomerases facilitam a ligação das histonas ao DNA e a formação de nucleossomos adicionais. É importante ob-



**QUADRO 8-2 FIGURA 1** A topoisomerase é necessária para a montagem do nucleossomo usando DNA circular covalentemente fechado (cccDNA). (a) A montagem de nucleossomos usando cccDNA na ausência de topoisomerase é limitada pelo acúmulo de super-helicoidização positiva no DNA não associado aos nucleossomos. (b) A adição de topoisomerase sem montagem de nucleossomos adicionais ilustra como a topoisomerase reduz o número de ligação para relaxar o DNA não incorporado nos nucleossomos. (c) Montagem de nucleossomos adicionais na presença de topoisomerase. (d) A simultânea remoção de histonas e inativação da topoisomerase (p. ex., pela adição de um detergente forte) revela o reduzido número de ligação associado ao DNA nucleossomal.

**Quadro 8-2 (Continuação)**

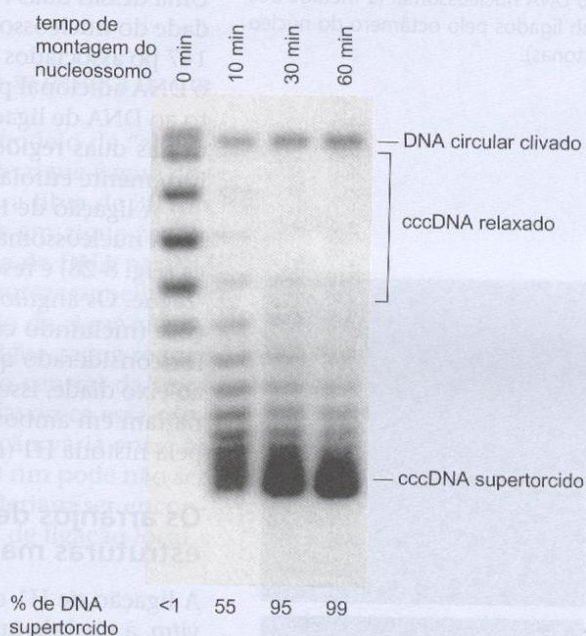
servar que o efeito global no plasmídeo é a diminuição do número de ligação à medida que mais nucleossomos são montados.

A diminuição do número de ligação causada pela topoisomerase durante a montagem de nucleossomos pode ser usada como um ensaio para este evento. O ensaio tira vantagem da habilidade da eletroforese em gel para distinguir entre moléculas de cccDNA relaxadas e supertorcidas (ver Cap. 4, Fig. 4-27). O primeiro passo é montar os nucleossomos em um cccDNA na presença de uma topoisomerase. Em momentos apropriados, um detergente forte (p. ex., SDS [dodecil sulfato de sódio]) é adicionado à reação de montagem, inativando rapidamente a topoisomerase e removendo as histonas do DNA. O DNA resultante é, então, separado por eletroforese em gel para determinar a natureza supertorcida do DNA. Como o detergente inativa a topoisomerase ao mesmo tempo em que remove as histonas do DNA, o número de ligação do DNA organizado nos nucleossomos é preservado. Em média, a topoisomerase diminui o número de ligação em  $-1,2$  para cada nucleossomo montado no cccDNA. Portanto, quanto mais nucleossomos forem montados no cccDNA, mais negativamente supertorcido será o cccDNA (Quadro 8-2, Fig. 1c,d). Isso pode ser facilmente observado pela migração mais rápida do DNA supertorcido durante a eletroforese em gel (Quadro 8-2, Fig. 2).

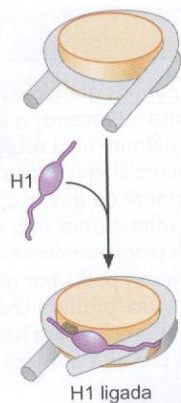
Como o DNA nucleossomal se enrola em torno da histona 1,65 vez, a formação de um único nucleossomo usando plasmídeo circular covalentemente fechado criaria uma torção de  $-1,65$  e, assim, alteraria o número de ligação em quantidade equivalente. Como supradescrito, quando a alteração do número de ligação associado a cada nucleossomo foi medida, o número foi menor: cerca de  $-1,2$  para cada nucleossomo adicionado. Esta discrepância é chamada de "paradoxo do número de ligação nucleossomal", e a solução para este enigma foi revelada quando a estrutura de cristal de alta resolução do nucleossomo foi resolvida. A análise cuidadosa do DNA associado ao núcleo de histonas mostrou que o número de bases por volta havia sido reduzido em comparação ao DNA nu (de 10,5 para 10,2 pb/volta). A redução no número de pares de bases por volta resulta em aumento no número de ligação para o DNA. Considere-se o exemplo de um cccDNA de 10.500 pb descrito no Capítulo 4. O DNA B normal terá 10,5 pb/volta, resultando em um número de ligação de +1.000 para o plasmídeo (10.500/10,5). Em contrapartida, o mesmo DNA com um valor de 10,2 pb/volta terá um número de ligação de aproximadamente +1.029 (10.500/10,2). Portanto, ao diminuir o número de pares de bases por volta da hélice, a ligação ao octâmero de histonas causa um leve aumento no número de ligação ao longo do comprimento do DNA ligado ao nucleossomo. Essa alteração reduz a mudança do número de ligação por nucleossomo montado de  $-1,65$  para  $-1,2$ . A diferença de aproximadamente +0,4 por nucleossomo pode ser calculada usando a diferença no número de pares de bases por volta e o comprimento do DNA associado a um nucleossomo.

Essas questões são relevantes para os cromossomos lineares eucarióticos? Para fragmentos lineares curtos, a super-helicoidização não é relevante porque as extremidades do DNA podem rodar para acomodar alterações no número de

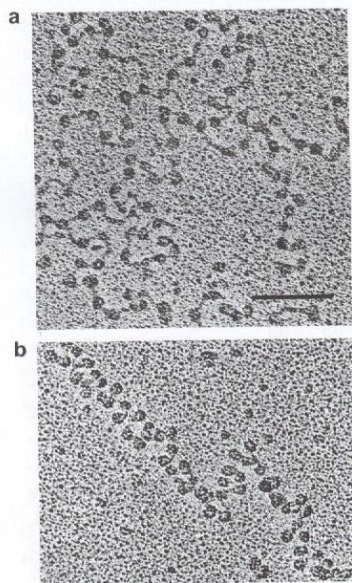
ligação. Mas isso não é verdadeiro para os grandes cromossomos lineares das células eucarióticas. Primeiro, o grande tamanho desses cromossomos não permite uma rotação rápida o suficiente para dissipar facilmente alterações na super-helicoidização do DNA. Mais importante do que isso, como será discutido posteriormente, o cromossomo não é uma simples fita linear de DNA. Cada DNA cromossômico é dobrado em uma estrutura mais compacta composta por grandes alças que são amarradas a uma estrutura proteica chamada de **arcabouço nuclear**. Essas ligações servem para isolar topologicamente uma alça da outra e prevenir a rotação livre do DNA cromossômico.



**QUADRO 8-2 FIGURA 2** Exemplo de um ensaio de montagem de nucleossomo que mede a diminuição associada do número de ligação. A montagem do nucleossomo foi realizada em um cccDNA relaxado na presença de uma topoisomerase. Antes do início da montagem (0 min), ou em vários momentos durante a reação de montagem do nucleossomo, adicionou-se detergente e o DNA foi separado em um gel de agarose não desnaturante, sendo visualizado por coloração com brometo de etídeo. Embora um gel de agarose não permita distinguir entre moléculas de cccDNA positiva ou negativamente supertorcidas, a habilidade dos intercalantes de DNA em aumentar o número de ligação e direcionar o DNA em direção ao topo do gel (e conferir um estado mais relaxado) pode ser usada para mostrar que se tratam de cccDNAs negativamente supertorcidos (não mostrados). (Reproduzida, com permissão, de Ito T. et al. 1997. *Cell* 90: 145-155, Fig. 2c. ©. Elsevier.)



**FIGURA 8-27** A histona H1 liga duas hélices de DNA. Durante a interação com o nucleossomo, a histona H1 liga-se ao DNA de ligação em uma extremidade do nucleossomo e à hélice central do DNA nucleossomal (a metade dos 147 pb ligados pelo octâmero do núcleo de histonas).



**FIGURA 8-28** A adição de H1 resulta em um DNA nucleossomal mais compacto. As duas imagens mostram uma microfotografia eletrônica do DNA nucleossomal na ausência (a) e na presença (b) da histona H1. Nota-se a estrutura mais compacta e definida do DNA na presença da histona H1. (Reproduzida, com permissão, de Thoma F. et al. 1979. *J. Cell Biol.* **83**: 403-427, Figs. 4 e 6. © Rockefeller University Press.)

bem menos organizadas. Nas seções seguintes, discute-se o que se conhece em relação à montagem dos nucleossomos em estruturas de ordem superior.

### A histona H1 liga-se ao DNA de ligação entre os nucleossomos

Uma vez que os nucleossomos estejam formados, a próxima etapa no empacotamento do DNA é a ligação da histona H1. Como as histonas do núcleo, H1 é uma proteína pequena e positivamente carregada (ver Tab. 8-5). H1 interage com o DNA de ligação entre os nucleossomos, estreitando ainda mais a associação do DNA com o nucleossomo. Essa interação pode ser detectada pela proteção aumentada do DNA nucleossomal após digestão pela nuclease de micrococos (MNase). Assim, além dos 147 pb protegidos pelo núcleo de histonas, a adição da histona H1 ao nucleossomo protege 20 pb adicionais do DNA da digestão.

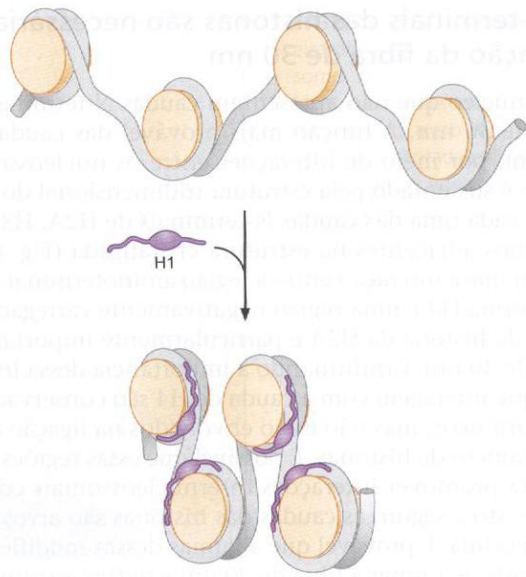
A histona H1 possui a propriedade incomum de se ligar a duas regiões distintas do DNA dupla-fita. Normalmente, essas duas regiões são parte da mesma molécula de DNA associada a um nucleossomo (Fig. 8-27). Os sítios de ligação de H1 estão localizados assimetricamente em relação ao nucleossomo. Uma dessas duas regiões ligadas pela H1 é o DNA de ligação em *uma* extremidade do nucleossomo. O segundo sítio de ligação ao DNA está na metade dos 147 pb associados (o único dúplex de DNA presente no eixo diáde). Portanto, o DNA adicional protegido da digestão pela nuclease supradescrito está restrito ao DNA de ligação em apenas *um* lado do nucleossomo. Pela aproximação dessas duas regiões do DNA, a ligação de H1 aumenta a extensão do DNA fortemente enrolado ao redor do octâmero de histonas.

A ligação de H1 produz um ângulo mais definido de entrada e saída do DNA nucleossomal. Esse efeito pode ser visualizado por microscopia eletrônica (Fig. 8-28) e resulta no DNA nucleossomal, assumindo aparência em zigue-zague. Os ângulos de entrada e saída variam muito, dependendo das condições (incluindo concentração de sal, pH e presença de outras proteínas). Se for considerado que esses ângulos estão a aproximadamente 20° em relação ao eixo diáde, isso resultaria em um padrão no qual os nucleossomos se alternariam em ambos os lados de uma região central do DNA de ligação unidos pela histona H1 (Fig. 8-29).

### Os arranjos de nucleossomos podem formar estruturas mais complexas: a fibra de 30 nm

A ligação de H1 estabiliza as estruturas de ordem superior da cromatina. *In vitro*, à medida que a concentração de sais é aumentada, a adição da histona H1 provoca a formação de uma **fibra de 30 nm** de DNA nucleossomal. Essa estrutura, que pode ser observada *in vivo*, representa o nível seguinte de compactação do DNA. É importante ressaltar que a incorporação do DNA nessa fibra o torna menos acessível a muitas enzimas dependentes de DNA (como as RNA-polimerases).

Existem dois modelos para a estrutura da fibra de 30 nm. No **modelo solenoide**, o DNA nucleossomal forma uma super-hélice contendo aproximadamente seis nucleossomos por volta (Fig. 8-30a). Essa estrutura está apoiada por estudos de microscopia eletrônica e de difração de raios X, os quais indicam que a fibra de 30 nm apresenta uma amplitude helicoidal de aproximadamente 11 nm. Este é também o diâmetro aproximado do disco do nucleossomo, sugerindo que a fibra de 30 nm é composta por discos de nucleossomos empilhados nas extremidades em formato de hélice (ver Fig. 8-30a). Neste modelo, as superfícies planas de ambas as faces do disco do octâmero de histonas estão adjacentes entre si, e a superfície do DNA dos nucleossomos forma a superfície da parte externa acessível da super-hélice. O DNA de ligação está escondido no centro da super-hélice, mas nunca passa através do eixo da fibra. Em vez disso, o DNA de ligação forma

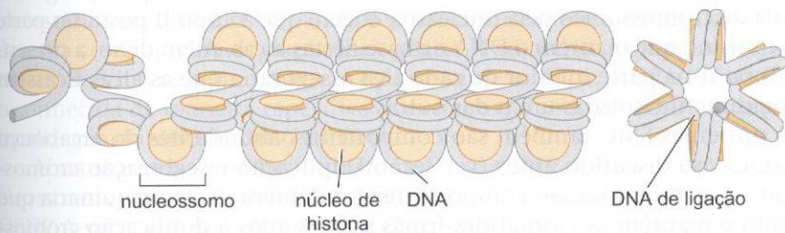


**FIGURA 8-29** A histona H1 induz uma compactação mais forte do DNA em torno do nucleossomo. As duas ilustrações mostram uma comparação do enrolamento do DNA ao redor do nucleossomo na presença e na ausência da histona H1. Uma histona H1 pode associar-se a cada nucleossomo.

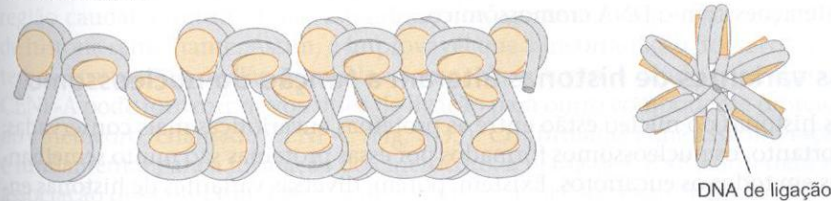
um círculo ao redor do eixo central à medida que o DNA se desloca de um nucleossomo para o outro.

Um modelo alternativo para a fibra de 30 nm é o modelo de “zigue-zague” (Fig. 8-30b). Esse modelo é baseado no padrão de zigue-zague dos nucleossomos formado após a adição de H1. Neste caso, a fibra de 30 nm é uma forma compactada dos arranjos de nucleossomos em zigue-zague. Uma estrutura recente de raios X de uma única molécula de DNA participando de quatro nucleossomos e estudos biofísicos da natureza semelhante à mola de fibras de 30 nm isoladas corroboram o modelo de zigue-zague. Ao contrário do modelo solenoide, a conformação em zigue-zague requer que o DNA de ligação passe diretamente através do eixo central da fibra (ver Fig. 8-30b). Portanto, o DNA de ligação mais longo favorece essa conformação. Como o comprimento médio do DNA de ligação varia entre as diferentes espécies (ver Tab. 8-4), o formato da fibra de 30 nm pode não ser sempre o mesmo, e ambas formas da fibra de 30 nm poderiam ser encontradas nas células, dependendo do comprimento do DNA de ligação local.

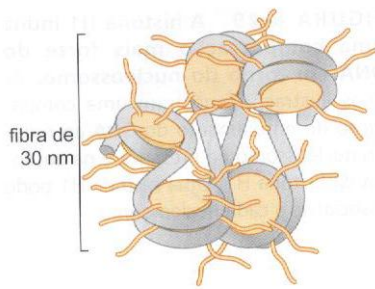
**a solenoide**



**b zigue-zague**



**FIGURA 8-30** Dois modelos para a fibra de cromatina de 30 nm. Em cada painel, a região à esquerda mostra a lateral da fibra, e à direita, vê-se a fibra a partir de seu eixo central. (a) Modelo solenoide. Observa-se que o DNA de ligação não passa através do eixo central da super-hélice e que os lados e os locais de entrada e saída dos nucleossomos são relativamente inacessíveis. (b) Modelo de “zigue-zague”. Neste modelo, o DNA de ligação frequentemente passa através do eixo central da fibra, e os lados e os pontos de entrada e saída são mais acessíveis. (Reproduzida, com permissão, de Pollard T. e Earnshaw W. 2002. *Cell biology*, 1st ed., Fig. 13-6. © Elsevier.)



**FIGURA 8-31 Modelo especulativo para a estabilização da fibra de 30 nm pelas caudas N-terminais das histonas.** Neste modelo, a fibra de 30 nm está ilustrada utilizando-se o modelo de "zigue-zague". Várias interações diferentes entre as caudas e as histonas do núcleo são possíveis. Aqui, as interações são mostradas entre histonas alternadas, mas também poderiam ocorrer com histonas adjacentes ou histonas mais distantes.

### As caudas N-terminais das histonas são necessárias para a formação da fibra de 30 nm

As histonas do núcleo que não apresentam caudas N-terminais não podem formar a fibra de 30 nm. A função mais provável das caudas é estabilizar a fibra de 30 nm, por meio de interações entre os nucleossomos adjacentes. Esse modelo é sustentado pela estrutura tridimensional do nucleossomo, que mostra que cada uma das caudas N-terminais de H2A, H3 e H4 interage com nucleossomos adjacentes na estrutura cristalizada (Fig. 8-31). Estudos recentes indicam que a interação entre a região aminoterminal positivamente carregada da histona H4 e uma região negativamente carregada do domínio de dobramento de histona da H2A é particularmente importante para a formação da fibra de 30 nm. Confirmando a importância dessa interação, os resíduos de H2A que interagem com a cauda de H4 são conservados em muitos organismos eucarióticos, mas não estão envolvidos na ligação ao DNA ou na formação do octâmero de histonas. É possível que essas regiões de H2A sejam conservadas para promover interações internucleossomais com a cauda de H4. Como será visto a seguir, as caudas das histonas são alvos frequentes de modificações na célula. É provável que algumas dessas modificações influenciem na capacidade de formar a fibra de 30 nm e outras estruturas nucleossomais de ordem superior.

### A compactação adicional do DNA envolve grandes alças de DNA nucleossomal

Juntos, o empacotamento do DNA em nucleossomos e a fibra de 30 nm resultam na compactação do comprimento linear do DNA em aproximadamente 40 vezes. Essa compactação ainda é insuficiente para acomodar de 1 a 2 metros de DNA em um núcleo de aproximadamente  $10^{-5}$  metros de diâmetro. Dobramentos adicionais da fibra de 30 nm são necessários para compactar ainda mais o DNA. Embora a natureza exata da estrutura dobrada permaneça imprecisa, um modelo popular propõe que a fibra de 30 nm forme alças de 40 a 90 kb, que são unidas em suas bases por estruturas proteicas, denominadas **arcabouço nuclear** (Fig. 8-32). Vários métodos foram desenvolvidos para identificar as proteínas que fazem parte dessa estrutura, embora a verdadeira natureza do arcabouço nuclear continue a ser um mistério.

Duas classes de proteínas que contribuem para o arcabouço nuclear foram identificadas. Uma é a topoisomerase II (Topo II), abundante tanto em preparações de arcabouço como nos cromossomos mitóticos purificados. O tratamento de células com fármacos que levam a quebras no DNA em sítios de ligação de Topo II ao DNA gera fragmentos de DNA de aproximadamente 50 kb. Esse tamanho é semelhante à variação média observada para a digestão limitada de cromossomos pela nuclease e sugere que a Topo II possa ser parte do mecanismo que mantém o DNA na base destas alças. Além disso, a presença de Topo II na parte inferior de cada alça asseguraria que as alças ficassem topologicamente isoladas umas das outras.

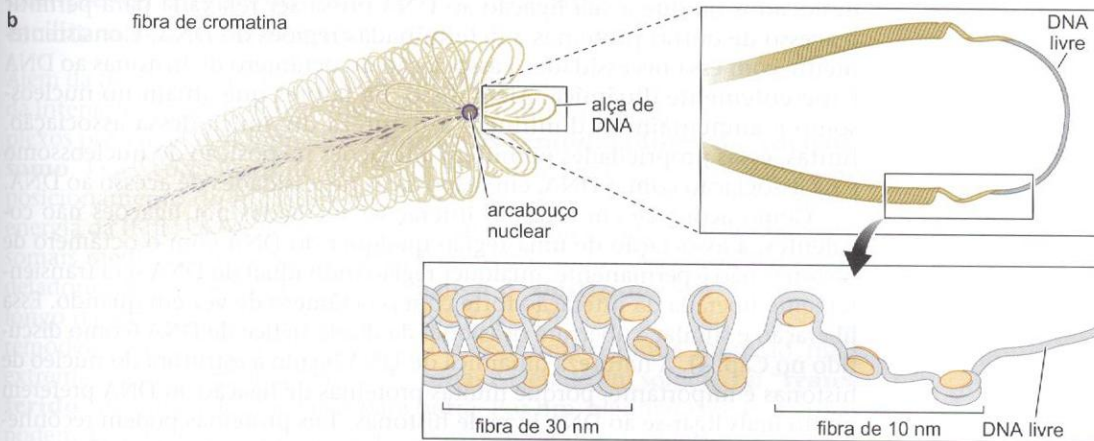
As proteínas SMC também são componentes abundantes do arcabouço nuclear. Como discutido antes (ver seção Duplicação e segregação cromossômica), essas proteínas são componentes fundamentais da maquinaria que condensa e mantém as cromátides-irmãs unidas após a duplicação cromossômica. A associação dessas proteínas com o arcabouço nuclear pode servir para reforçar suas funções, fornecendo um alicerce fundamental para as suas interações com o DNA cromossômico.

### As variantes de histonas alteram a função do nucleossomo

As histonas do núcleo estão entre as proteínas eucarióticas mais conservadas; portanto, os nucleossomos formados por essas proteínas são muito semelhantes em todos os eucariotos. Existem, porém, diversas variantes de histonas en-



**FIGURA 8-32 Estrutura de ordem superior da cromatina.** (a) Uma micrografia eletrônica de transmissão mostra a cromatina emergindo da estrutura central do cromossomo. As regiões eletrodensas correspondem ao arcabouço nuclear, que serve para organizar as enormes quantidades de DNA encontradas nos cromossomos eucarióticos. (b) Um modelo para a estrutura de um cromossomo eucariótico propõe que a maior parte do DNA esteja empacotada em grandes alças de fibras de 30 nm conectadas pela base ao arcabouço nuclear. Os sítios de manipulação de DNA ativa (p. ex., sítios de transcrição ou replicação do DNA) apresentam-se como fibras de 10 nm ou como DNA livre (também referido como "DNA nu"). (a, Cortesia de J.R. Paulson e U.K. Laemmli.)

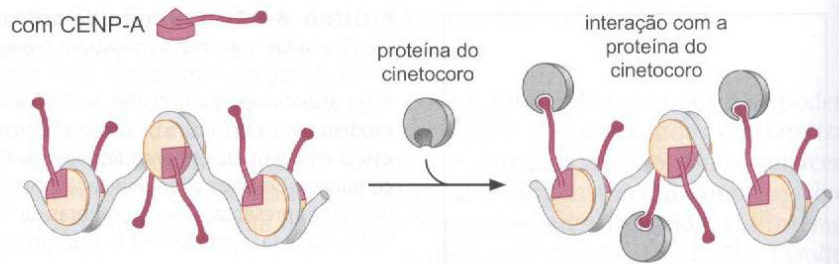


contradas nas células eucarióticas. Essas histonas incomuns podem substituir uma das quatro histonas comuns, formando nucleossomos alternativos. Tais nucleossomos podem demarcar determinadas regiões de cromossomos ou conferir funções especializadas ao nucleossomo ao qual foram incorporadas. Por exemplo, H2A.X é uma variante de H2A amplamente distribuída em nucleossomos eucarióticos. Quando o DNA cromossômico é rompido (situação descrita como quebra de dupla-fita), a H2A.X adjacente à quebra é fosforilada em um resíduo de serina que não está presente na H2A. A H2A.X fosforilada é reconhecida de maneira específica por enzimas de reparo do DNA, levando à localização do sítio de dano ao DNA.

Uma segunda variante da histona H3, a CENP-A, está associada aos nucleossomos que incluem o DNA centromérico. Nessa região cromossômica, a CENP-A substitui as subunidades da histona H3 nos nucleossomos. Esses nucleossomos são incorporados ao cinetocoro que medeia a ligação do cromossomo ao fuso mitótico (ver Fig. 8-12). Comparada à H3, a CENP-A inclui uma região caudal aminoterminal estendida, mas apresenta uma região de dobra de histona semelhante. Assim, é improvável que a incorporação de CENP-A altere a estrutura do núcleo do nucleossomo. No entanto, a cauda estendida de CENP-A pode fornecer novos sítios de ligação para outro componente proteico do cinetocoro, chamado CENP-C (Fig. 8-33). Confirmando que essa interação é fundamental para a formação do cinetocoro, a perda de CENP-A interfere na associação dos componentes do cinetocoro com o DNA centromérico.



**FIGURA 8-33** Alteração da cromatina pela incorporação de variantes de histonas. A incorporação de CENP-A no lugar da histona H3 parece atuar como um sítio de ligação para um ou mais componentes proteicos do cinetocoro.



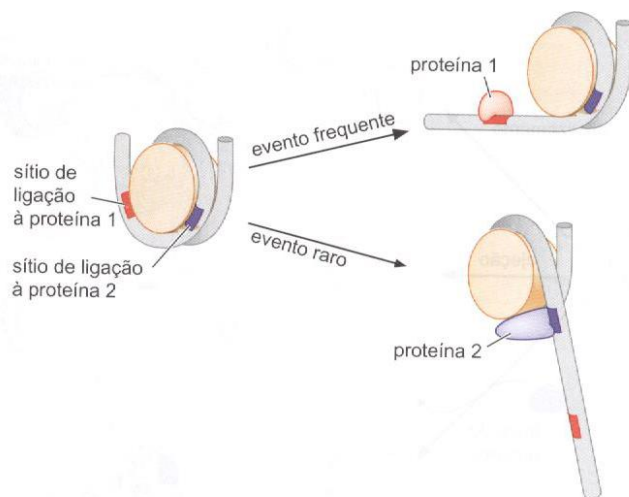
## REGULAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA

### A interação do DNA com o octâmero de histonas é dinâmica

Como será discutido de maneira detalhada no Capítulo 19, a incorporação do DNA nos nucleossomos pode causar profundo impacto na expressão do genoma. Em muitos casos, é fundamental que os nucleossomos possam ser deslocados ou que a sua ligação ao DNA possa ser relaxada para permitir o acesso de outras proteínas a determinadas regiões do DNA. Consistentemente com essa necessidade, a associação do octâmero de histonas ao DNA é inerentemente dinâmica. Além disso, há fatores que atuam no nucleossomo e aumentam ou diminuem a natureza dinâmica dessa associação. Juntas, essas propriedades permitem alterações na posição do nucleossomo e na associação com o DNA, em resposta às necessidades de acesso ao DNA.

Como acontece em todas as interações mediadas por ligações não covalentes, a associação de uma região qualquer do DNA com o octâmero de histonas não é permanente: qualquer região individual do DNA será transientemente liberada da interação forte com o octâmero de vez em quando. Essa liberação é similar à abertura ocasional da dupla-hélice de DNA (como discutido no Cap. 4). A natureza dinâmica do DNA ligado à estrutura do núcleo de histonas é importante, porque muitas proteínas de ligação ao DNA preferem muito mais ligar-se ao DNA livre de histonas. Tais proteínas podem reconhecer seus sítios de ligação apenas quando estes estão liberados do octâmero ou estão localizados no DNA de ligação ou no DNA livre de nucleossomos.

Devido ao desenrolamento intermitente e espontâneo do DNA do nucleossomo, uma proteína pode obter o acesso aos sítios de ligação ao DNA com probabilidade de 1:50 a 1:100.000, dependendo de onde o sítio de ligação se localiza no nucleossomo. Quanto mais central estiver o sítio de ligação, menos frequente será o acesso a ele. Assim, um sítio de ligação próximo à posição 73 dos 147 pb fortemente associados ao nucleossomo estará raramente acessível, enquanto os sítios de ligação próximos às extremidades (posições 1 ou 147) do DNA nucleossomal estarão mais frequentemente acessíveis. Essas descobertas indicam que o mecanismo de exposição do DNA na superfície do octâmero de histonas (Fig. 8-34). É importante observar que esses estudos foram realizados em uma população de nucleossomos isolados, em um tubo de ensaio: a capacidade do DNA de se desenrolar de um nucleossomo pode ser diferente para grandes trechos de DNA que participam de vários nucleossomos adjacentes (chamados de **arranjos nucleossomais**) presentes nas células. A associação de H1 e a incorporação dos nucleossomos na fibra de 30 nm também alterarão essas probabilidades. Ainda assim, a natureza dinâmica da estrutura do nucleossomo indica que os nucleossomos apenas se parecem com a estrutura revelada nos estudos de cristalografia por raios X por curtos períodos de tempo e que, na verdade, passam a maior parte do tempo em outras conformações.

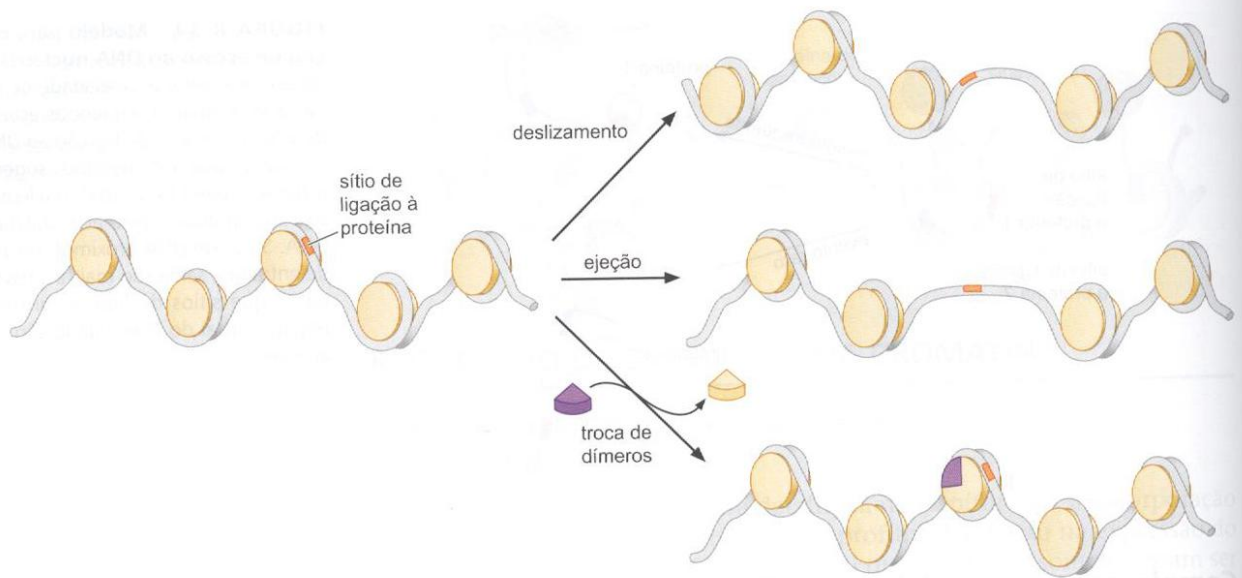


**FIGURA 8-34** Modelo para obtenção de acesso ao DNA nucleossomal. Os estudos sobre a capacidade de proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA (proteínas de ligação ao DNA) de se ligarem aos nucleossomos sugere que o desenrolamento do DNA nucleossomal seja o responsável pela acessibilidade do DNA. Sítios de DNA próximos aos pontos de entrada e saída são mais acessíveis, ao passo que sítios de ligação próximos à região central do DNA ligado são menos acessíveis.

### Complexos que remodelam o nucleossomo facilitam seu movimento

Além da dinâmica intrínseca demonstrada pelo nucleossomo, a estabilidade da interação do octâmero de histonas-DNA é influenciada por grandes complexos proteicos, denominados **complexos remodeladores do nucleossomo**. Esses complexos de múltiplas proteínas facilitam as alterações no posicionamento do nucleossomo ou a interação com o DNA, utilizando a energia da hidrólise de ATP. Existem três tipos básicos de alterações nucleossomais mediadas por essas enzimas (Fig. 8-35). Todos os complexos remodeladores do nucleossomo podem catalisar o “**deslizamento**” do DNA ao longo da superfície do octâmero de histonas. Um conjunto de complexos remodeladores do nucleossomo pode catalisar uma segunda alteração, mais extrema, na qual um octâmero de histonas é ejetado em solução ou “**transferido**” de uma hélice de DNA para outra. Por fim, algumas dessas enzimas podem facilitar a troca do dímero H2A/H2B de um nucleossomo por variantes do dímero (p. ex., H2A.X/H2B trocado por H2A/H2B em quebras de dupla-fita).

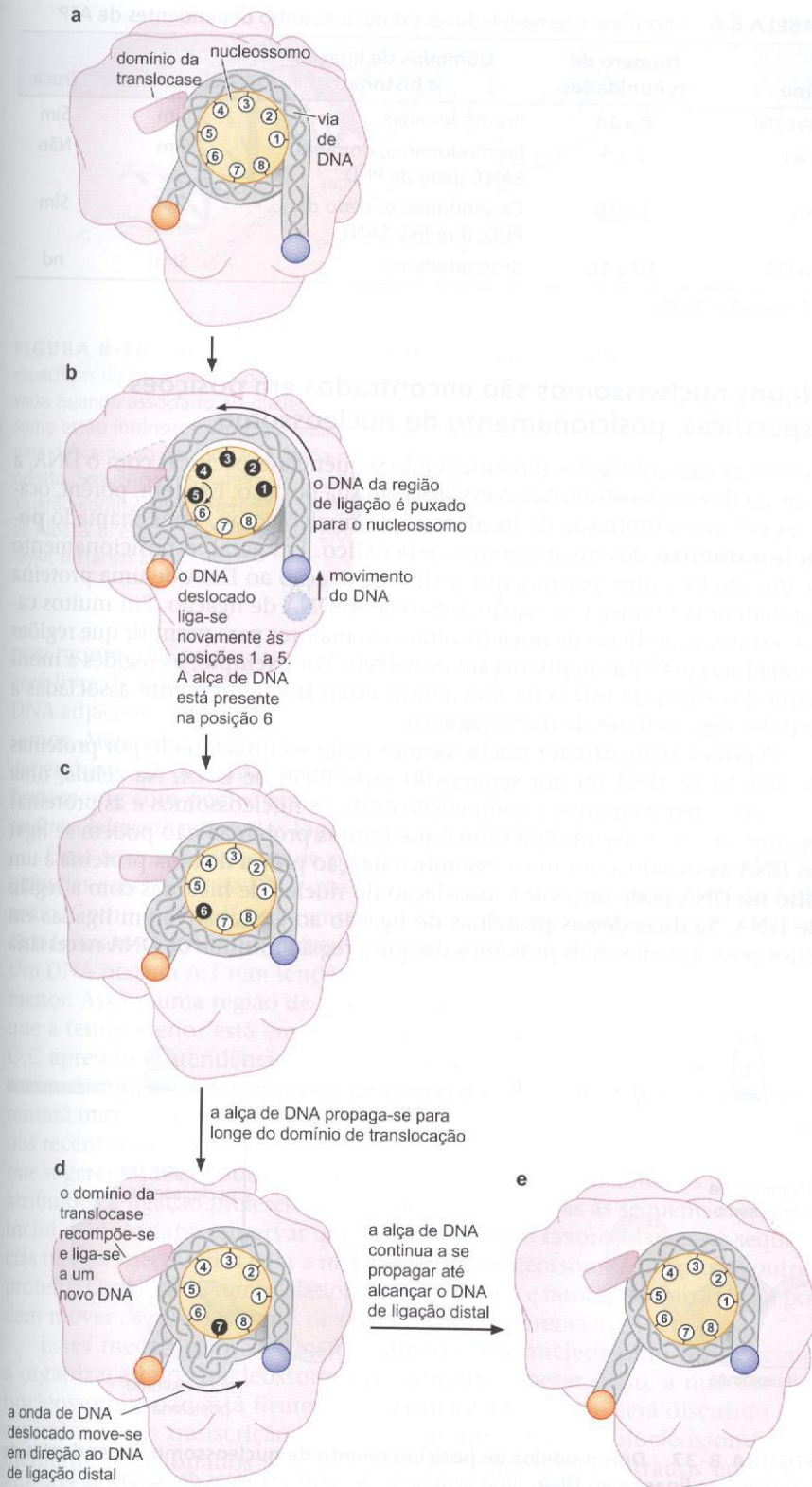
Estudos recentes começaram a revelar como os complexos remodeladores do nucleossomo movem o DNA na superfície do octâmero de histonas (Fig. 8-36). Cada uma dessas enzimas com múltiplas subunidades contém uma subunidade de DNA-translocase que hidrolisa ATP, capaz de se movimentar de maneira direcional (evento também chamado de *translocação*) sobre o DNA dupla-fita quando separada do restante do complexo remodelador do nucleossomo. Modelos atuais sugerem que os complexos remodeladores do nucleossomo se ligam fortemente ao octâmero de histonas e posicionam a subunidade de DNA-translocase adjacente ao DNA nucleossomal. Ao segurar a translocase no lugar, em relação ao octâmero de histonas, o resultado da hidrólise de ATP pelo complexo remodelador do nucleossomo é o movimento do DNA em relação à superfície do octâmero de histonas. A translocação do DNA gera uma alça de DNA que é liberada da superfície do nucleossomo próximo ao sítio de translocação. Acredita-se que essa alça se propague na superfície do octâmero de histonas até que alcance a outra extremidade do DNA nucleossomal. Embora esse movimento da alça pudesse prosseguir potencialmente em qualquer direção, acredita-se que outras interações entre o complexo remodelador do nucleossomo e o DNA nucleossomal previnam a propagação em direção ao DNA de ligação proximal (o que resultaria na ausência de alteração do posicionamento nucleossomal).



**FIGURA 8-35 Movimento nucleossomal catalisado pelas atividades do remodelamento de nucleossomo.** (Parte superior) O movimento nucleossomal pelo deslizamento ao longo de uma molécula de DNA expõe sítios de ligação de proteínas ao DNA. (Centro) Complexos remodeladores de nucleossomo também podem ejetar um nucleossomo do DNA, criando regiões maiores de DNA livre de nucleossomos. (Parte inferior) Um conjunto de complexos remodeladores do nucleossomo catalisa a troca de dímeros H2A/H2B por dímeros não modificados ou dímeros H2A/H2B variantes (p. ex., H2A-X).

É importante observar que esta abordagem não exige que todas as interações entre o octâmero de histonas e o DNA nucleossomal sejam quebradas simultaneamente. Em vez disso, um movimento semelhante ao de uma lagarta do DNA sobre a superfície do octâmero de histonas permite que a maioria das interações entre o DNA e as histonas seja mantida ao longo do processo de remodelamento. Deve-se ter em mente que diferentes sequências de DNA interagem com o octâmero de histonas com afinidades mais ou menos iguais. Portanto, uma molécula de DNA que está deslizando através do octâmero de histonas pode ser vista como ligada ao octâmero em vários diferentes estados energéticos equivalentes e o complexo remodelador do nucleossomo permite que o DNA acesse esses diferentes estados mais facilmente.

Existem diversos tipos de complexos remodeladores de nucleossomos em uma determinada célula (Tab. 8-6). Eles podem ter de duas até mais de 10 subunidades. Cada um desses complexos contém uma subunidade hidrolisadora de ATP que catalisa o movimento do DNA descrito anteriormente e na Figura 8-36. Embora a subunidade hidrolisadora de ATP seja semelhante dentre os diferentes complexos remodeladores do nucleossomo, as outras subunidades associadas a cada complexo modulam suas funções. Por exemplo, esses complexos podem incluir subunidades que os direcionem a sítios cromossômicos específicos. Em alguns casos, esse direcionamento é mediado por interações entre as subunidades do complexo de remodelamento e fatores de transcrição ligados ao DNA. Em outros casos, os complexos remodeladores do nucleossomo são localizados pelas subunidades que se ligam a modificações específicas das caudas de histonas (via cromodomínios ou bromodomínios, como será discutido adiante).



**FIGURA 8-36** Modelo para o deslizamento do DNA nucleossomal catalisado pelos complexos remodeladores do nucleossomo. (a) O modelo propõe que um domínio de translocação do DNA da subunidade hidrolisadora de ATP do complexo remodelador do nucleossomo liga-se ao DNA nucleossomal a duas voltas de hélice da díade central (p. ex., na posição 52 do total de 147 pb associados com o nucleossomo). Outras subunidades do complexo remodelador do nucleossomo ligam-se fortemente às histonas. A ilustração mostra cada um dos contatos entre o DNA e as histonas desde a díade até o DNA não ligado mais próximo (um contato por volta de hélice, sete do total de 14). (b) Usando a atividade de translocação do DNA dependente de ATP, o complexo remodelador do nucleossomo primeiramente puxa o DNA do domínio de ligação mais próximo para o nucleossomo. Isso rompe os cinco contatos histona-DNA entre a subunidade hidrolisadora de ATP e o DNA de ligação (os contatos rompidos estão representados em preto, e os intactos, em branco) e cria uma alça de DNA no lado oposto do domínio da translocase. (c) Os contatos rompidos são restabelecidos com o DNA translocado (posições 1 a 5), deixando a alça de DNA próxima à subunidade hidrolisadora de ATP (rompendo os contatos na posição 6). (d) Para remover a alça de DNA, o modelo propõe que a alça se mova como uma "onda" através da superfície das histonas, rompendo um ou dois contatos de cada vez (primeiro o contato 6, depois o 7, etc.) até que todos os contatos tenham sido restabelecidos com a quantidade apropriada de DNA entre eles, ponto no qual o DNA em excesso não estará mais presente no DNA associado às histonas e o nucleossomo terá alterado sua posição no DNA. (e) Após a propagação da alça de DNA até o DNA de ligação distal, a alteração da posição do nucleossomo no DNA está concluída. (Adaptada, com permissão, de Saha A. et al. 2006. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 437-447, Fig. 4a. © Macmillan.)

TABELA 8-6 Complexos remodeladores do nucleossomo dependentes de ATP

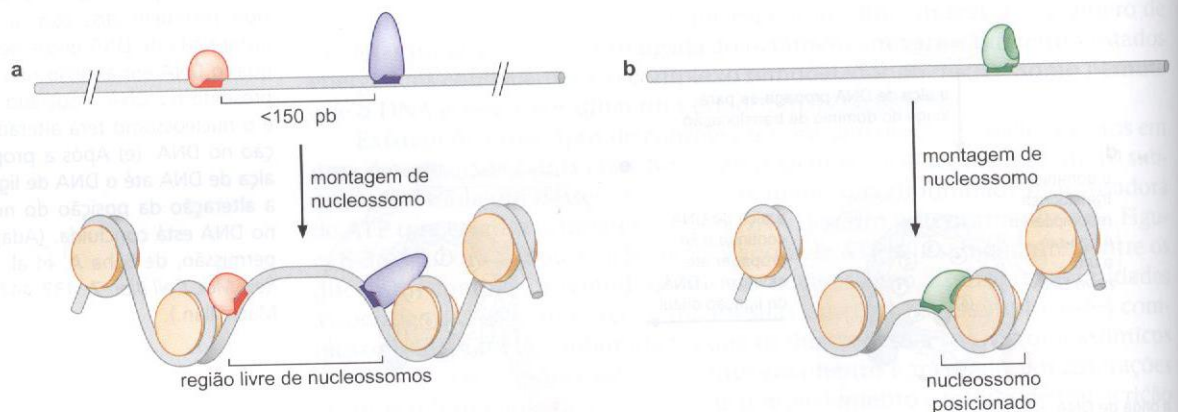
Tipo	Número de subunidades	Domínios de ligação à histona	Delizamento	Troca
SWI/SNF	8 a 14	Bromodomínio	Sim	Sim
ISWI	2 a 4	Bromodomínio, domínio SANT, dedo de PHD	Sim	Não
CHD	1 a 10	Cromodomínio, dedo de PHD, domínio SANT	Sim	Sim
INO80	10 a 16	Bromodomínio	Sim	nd

nd, não determinado.

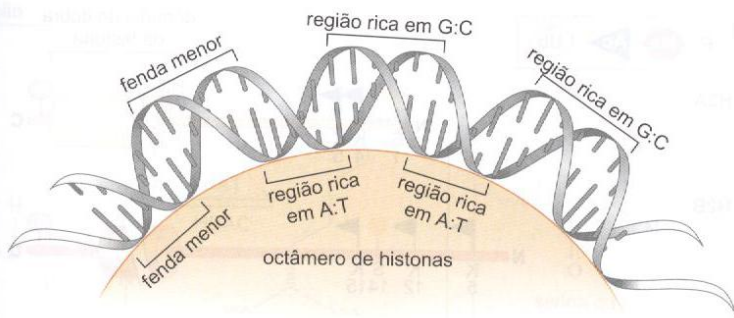
### Alguns nucleossomos são encontrados em posições específicas: posicionamento do nucleossomo

Devido às suas interações dinâmicas não sequência-específicas com o DNA, a maioria dos nucleossomos não está fixa em sua posição. Existem, porém, ocasiões em que a limitação da localização do nucleossomo, ou o chamado **posicionamento** dos nucleossomos, é benéfico. Em geral, o posicionamento de um nucleossomo permite que o sítio de ligação ao DNA de uma proteína reguladora permaneça na região acessível do DNA de ligação. Em muitos casos, essas regiões livres de nucleossomos são maiores para permitir que regiões reguladoras extensas permaneçam acessíveis. Por exemplo, as regiões a montante dos sítios de início da transcrição estão frequentemente associadas a grandes regiões livres de nucleossomos.

O posicionamento dos nucleossomos pode ser direcionado por proteínas de ligação ao DNA ou por sequências específicas de DNA. Na célula, uma forma frequente envolve a competição entre os nucleossomos e as proteínas ligantes ao DNA. Da mesma forma que muitas proteínas não podem se ligar ao DNA associado a um nucleossomo, a ligação prévia de uma proteína a um sítio no DNA pode impedir a associação do núcleo de histonas com a região de DNA. Se duas dessas proteínas de ligação ao DNA estiverem ligadas em sítios posicionados mais próximos do que a região mínima de DNA necessária



**FIGURA 8-37** Dois modelos de posicionamento de nucleossomo dependentes de proteína de ligação ao DNA. (a) A associação de várias proteínas de ligação ao DNA é incompatível com a associação do mesmo DNA ao octâmero de histonas. Como o nucleossomo necessita de um segmento maior do que 147 pb para ser formado, se dois destes fatores se ligarem ao DNA, separados por uma distância menor que 147 pb, o DNA interviniente não poderá participar de um nucleossomo. (b) Um subconjunto de proteínas de ligação ao DNA apresenta a capacidade de se ligar aos nucleossomos. Uma vez ligadas ao DNA, essas proteínas facilitarão a montagem de nucleossomos em regiões imediatamente adjacentes ao sítio de ligação das proteínas ao DNA.



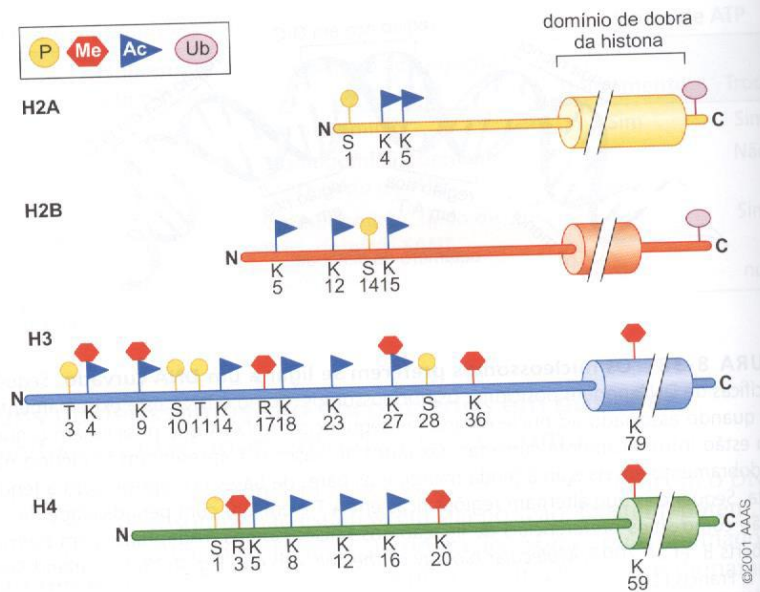
**FIGURA 8-38 Os nucleossomos preferem se ligar a um DNA curvado.** Sequências específicas de DNA podem posicionar os nucleossomos. Como o DNA está extremamente curvado quando associado ao nucleossomo, as sequências de DNA que posicionam o nucleossomo estão intrinsecamente curvadas. Os pares de bases A:T apresentam tendência natural para dobramento em direção à fenda menor, e os pares de bases G:C apresentam a tendência oposta. Sequências que alternam regiões ricas em A:T e em G:C com periodicidade de ~5 pb atuarão como sítios preferenciais de ligação aos nucleossomos. (Adaptada, com permissão, de Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., Fig. 4-28. © Garland Science/Taylor & Francis LLC.)

para montar um nucleossomo (~150 pb), o DNA entre as proteínas permanecerá livre de nucleossomos (Fig. 8-37a). A ligação de proteínas adicionais ao DNA adjacente pode, ainda, aumentar o tamanho da região livre de nucleossomos. Além desse mecanismo inibidor do posicionamento do nucleossomo dependente de proteínas, algumas proteínas de ligação ao DNA interagem firmemente com nucleossomos adjacentes, fazendo os nucleossomos serem preferencialmente montados logo após essas proteínas (Fig. 8-37b).

Uma segunda maneira de posicionamento do nucleossomo envolve sequências específicas de DNA que apresentam elevada afinidade pelo nucleossomo. Como o DNA ligado em um nucleossomo está curvado, os nucleossomos formam-se preferencialmente sobre o DNA que se dobra com facilidade. Um DNA rico em A:T tem tendência intrínseca a se curvar em direção à fenda menor. Assim, uma região de DNA rica em A:T é favorecida em posições em que a fenda menor está em face do octâmero de histonas. O DNA rico em G:C apresenta a tendência oposta e, portanto, é preferido quando a fenda menor fica oposta ao octâmero de histonas (Fig. 8-38). Cada nucleossomo tentará maximizar essa disposição de sequências ricas em A:T e em G:C. Estudos recentes sobre o posicionamento dos nucleossomos na levedura *S. cerevisiae* sugerem que 50% dos nucleossomos fortemente posicionados podem ser atribuídos à ligação preferencial do núcleo de histonas às sequências que ele inclui. É importante observar que, apesar de serem favorecidas, essas sequências não são necessárias para a montagem do nucleossomo, e a ação de outras proteínas, incluindo remodeladoras de cromatina e fatores de transcrição, podem mover os nucleossomos de tais posições preferenciais.

Esses mecanismos de posicionamento do nucleossomo influenciam a organização dos nucleossomos no genoma. Apesar disso, a maioria dos nucleossomos não está firmemente posicionada. Como será discutido nos capítulos sobre transcrição eucariótica (Caps. 13 e 19), nucleossomos firmemente posicionados são mais frequentemente encontrados em sítios que promovem a iniciação da transcrição. Embora tenha-se discutido o posicionamento primeiramente como um método para garantir que uma sequência de DNA reguladora esteja acessível, um nucleossomo posicionado pode justamente impedir o acesso a sítios específicos do DNA por estar posicionado sobreposto a esta mesma sequência. Assim, os nucleossomos posicionados podem apresentar efeitos positivos ou negativos em relação à acessibilidade de sequências de DNA. Uma abordagem para o mapeamento

**FIGURA 8-39** Modificações nas caudas N-terminais das histonas alteram o funcionamento da cromatina. Os sítios de modificações conhecidos estão ilustrados em cada histona. Apesar de novos tipos de modificações de histonas estarem sendo descritos, para fins de simplificação estão ilustrados apenas sítios de acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. A maioria dessas modificações ocorre nas regiões das caudas, mas existem algumas modificações ocasionais na dobra da histona (p. ex., metilação da lisina 79 da histona H3). (Adaptada, com permissão, de Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., Fig. 4-35. © Garland Science/Taylor & Francis LLC; e, com permissão, de Jenuwein T. e Allis C.D. 2001. *Science* 293: 1074-1080, Figs. 2 e 3. © AAAS.)



de localizações de nucleossomos é descrita no Quadro 8-3, Determinação do posicionamento do nucleossomo na célula.

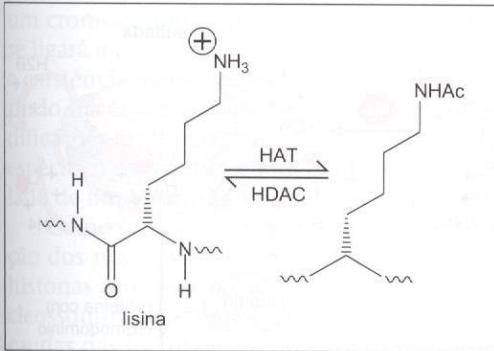
### As caudas aminoterminais das histonas são frequentemente modificadas

Quando as histonas são isoladas das células, na maioria das vezes, suas caudas aminoterminais estão modificadas por várias pequenas moléculas (Fig. 8-39). As lisinas das caudas são frequentemente modificadas por um único grupo acetil ou metil, e as argininas são modificadas com um, dois ou três grupos metil (Fig. 8-40). Da mesma maneira, serinas e treoninas (e uma tirosina) estão sujeitas à modificação com fosfato. Embora menos comuns, outras modificações com grupos maiores, incluindo ADP-ribose e as pequenas proteínas ubiquitina e sumo, são também encontradas em histonas.

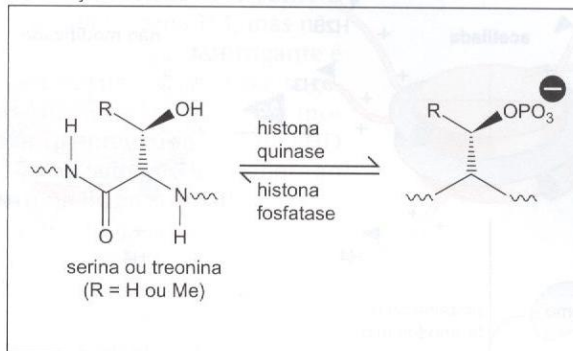
É importante observar que modificações específicas estão associadas a histonas envolvidas em diferentes eventos celulares. Por exemplo, a acetilação das lisinas nas posições 8 e 16 da cauda aminoterminal da histona H4 está associada aos sítios de início dos genes expressos, mas a acetilação das lisinas 5 e 12 não está. Em vez disso, a acetilação dessas outras lisinas (5 e 12) marca moléculas de H4 recém-sintetizadas que estão prontas para serem depositadas no DNA como parte de um novo nucleossomo. De maneira semelhante, a metilação das lisinas 4, 36 ou 79 da histona H3 normalmente está associada a genes expressos, enquanto a metilação das lisinas 9 ou 27 da mesma histona geralmente está associada à repressão transcricional. A observação de que determinadas modificações de histonas possuem alta probabilidade de ocorrer em regiões funcionais específicas da cromatina (p. ex., sítios de início da transcrição) levou à hipótese de que as modificações das caudas de histonas constituem um código biológico que pode ser escrito, lido e apagado por proteínas específicas da célula. Para uma discussão completa sobre essa hipótese, ver Quadro 19-5.

Como as modificações nas histonas alteram a função do nucleossomo? Uma alteração óbvia é que tanto a acetilação como a fosforilação atuam reduzindo a carga positiva geral das caudas das histonas; a acetilação de resíduos de lisina neutraliza suas cargas positivas (Fig. 8-41). Essa perda de carga positiva reduz a afinidade das caudas pelo esqueleto de carga negativa do DNA. Igualmente importante, a modificação das caudas das histonas afeta a capacidade dos arranjos de nucleossomos para formarem estruturas mais repressivas

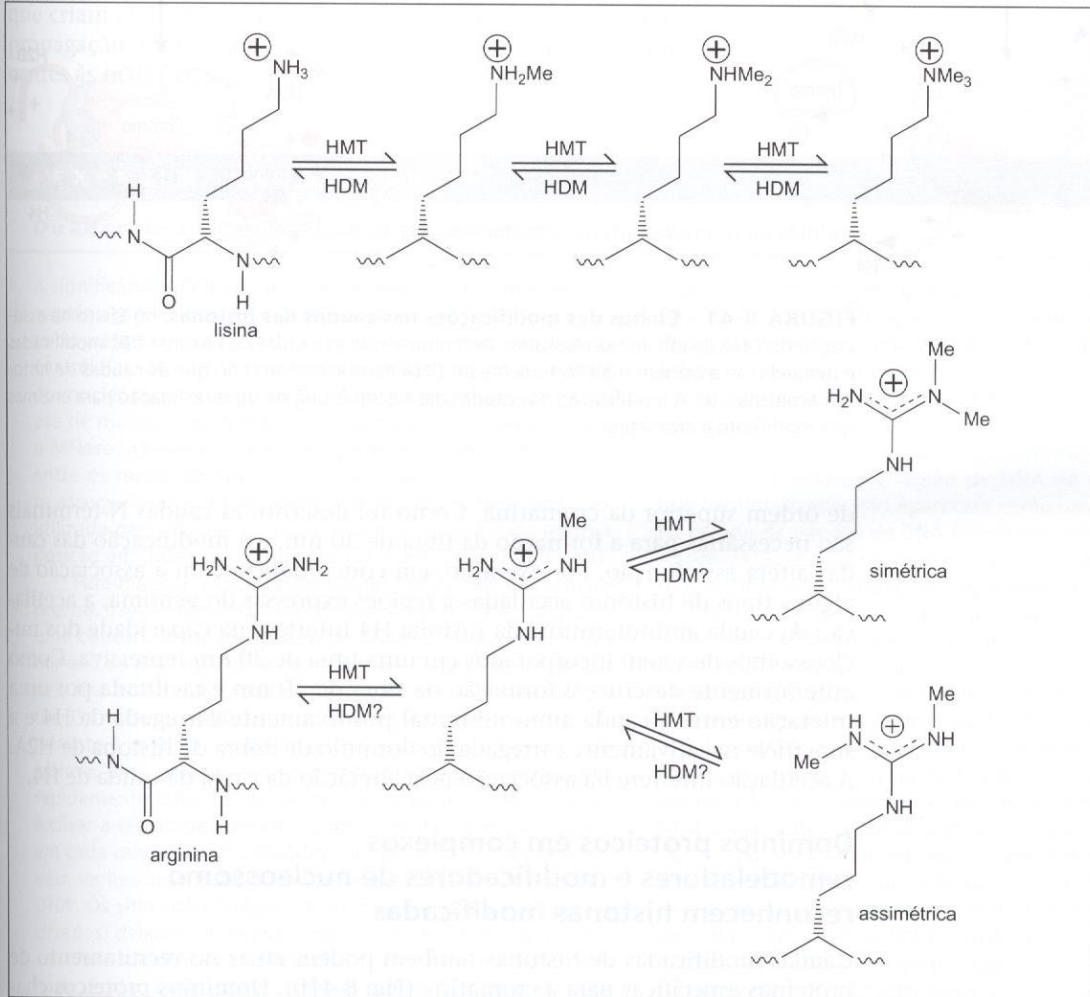
acetilação



fosforilação



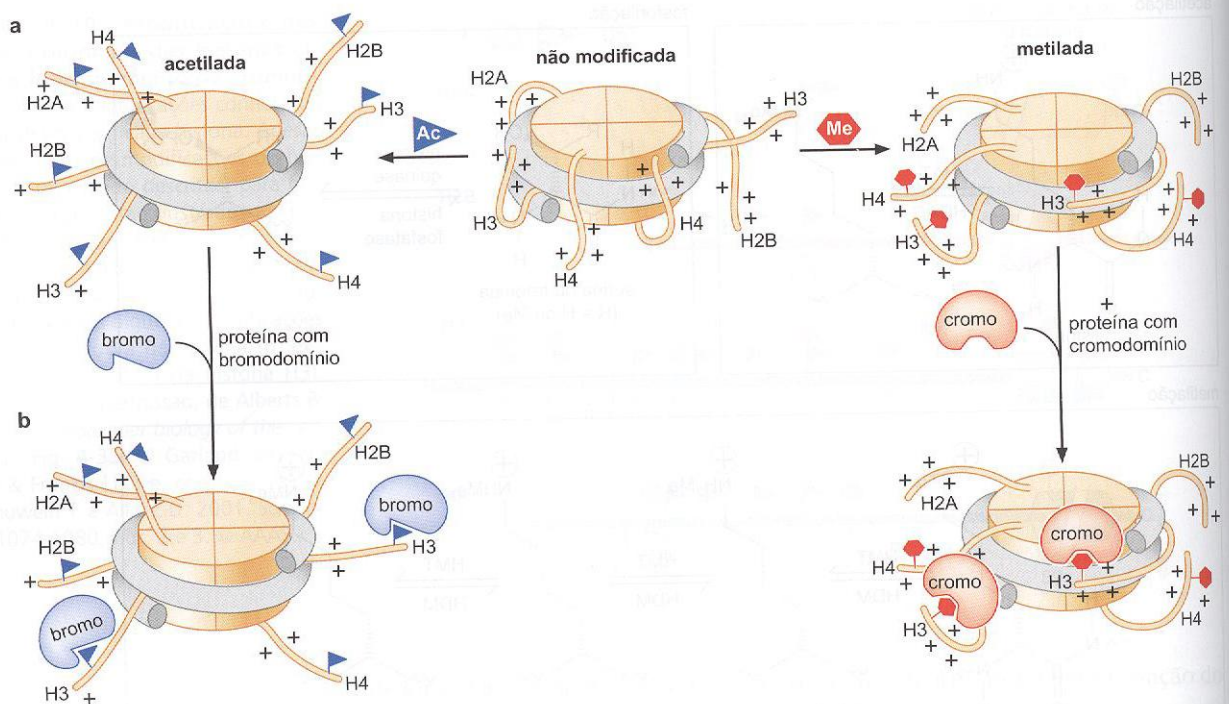
metilação



©2011 Elsevier

**FIGURA 8-40 Estrutura das modificações da cauda de histonas.** A estrutura molecular das modificações de histona por pequenas moléculas e a classe da enzima responsável estão ilustradas (acetiltransferase de histona [HAT]; desacetilase de histona [HDAC]; metiltransferase de histona [HMT]; desmetilase de histona [HDM]). Apenas o aminoácido afetado é mostrado. Atualmente, não se conhece nenhuma desmetilase de histona para a metilação da arginina, sugerindo que esta marca é perdida apenas quando a histona é removida do DNA. (Adaptada, com permissão, de Lohse B. et al. 2011. *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 3625-3636, Fig. 1. © Elsevier.)





**FIGURA 8-41** Efeitos das modificações nas caudas das histonas. (a) Efeito na associação do DNA ligado ao nucleossomo. Acredita-se que as caudas de histonas não modificadas e metiladas se associem mais fortemente ao DNA do nucleossomo do que as caudas de histonas acetiladas. (b) A modificação das caudas das histonas origina sítios de ligação para enzimas que modificam a cromatina.

de ordem superior da cromatina. Como foi descrito, as caudas N-terminais são necessárias para a formação da fibra de 30 nm, e a modificação das caudas altera essa função. Por exemplo, em concordância com a expressão de alguns tipos de histonas acetiladas a regiões expressas do genoma, a acetilação da cauda aminoterminal da histona H4 interfere na capacidade dos nucleossomos de serem incorporados em uma fibra de 30 nm repressiva. Como anteriormente descrito, a formação da fibra de 30 nm é facilitada por uma interação entre a cauda aminoterminal positivamente carregada de H4 e a superfície negativamente carregada do domínio de dobra de histona de H2A. A acetilação interfere na associação pela alteração da carga da cauda de H4.

### Domínios proteicos em complexos remodeladores e modificadores de nucleossomo reconhecem histonas modificadas

Caudas modificadas de histonas também podem atuar no recrutamento de proteínas específicas para a cromatina (Fig. 8-41b). Domínios proteicos chamados **bromodomínios**, **cromodomínios**, **domínios TUDOR** e **dedos de PHD** (homeodomínio de planta) reconhecem especificamente formas modificadas de caudas de histonas. As proteínas que contêm bromodomínios interagem com as caudas acetiladas das histonas, e as proteínas que contêm domínios TUDOR – cromodomínios e dedos de PHD interagem com as caudas metiladas das histonas. Outro domínio proteico, chamado **domínio SANT**, possui a propriedade oposta. Proteínas com o domínio SANT interagem preferencialmente com caudas não modificadas de histonas. Confirmando a importância desses domínios proteicos para a interpretação das modificações de histonas, em várias ocasiões, proteínas que contêm esses domínios reconhecem especificamente a forma modificada de apenas um dos muitos sítios

possíveis da modificação da histona. Por exemplo, a proteína HP1 contém um cromodomínio que se ligará à lisina 9 metilada da histona H3, mas não se ligará a nenhum outro sítio de metilação na histona. Um fato intrigante é a existência de proteínas que possuem mais de um domínio desse tipo, sugerindo sua especialização no reconhecimento das caudas de histonas com modificações múltiplas. Por exemplo, há proteínas que contêm um dedo de PHD específico para a lisina 4 metilada da histona H3 localizado imediatamente ao lado de um bromodomínio capaz de reconhecer uma lisina acetilada.

Como os domínios que reconhecem histonas modificadas alteram a função dos nucleossomos associados? Uma maneira importante é a em que as histonas modificadas recrutam enzimas que modificarão ainda mais os nucleossomos adjacentes. Por exemplo, muitas das enzimas que acetilam as caudas das histonas (chamadas acetiltransferases de histonas ou HATs) possuem bromodomínios que reconhecem as mesmas modificações de histona que criam (Tab. 8-7). Neste caso, o bromodomínio facilita a manutenção e a propagação das histonas acetiladas pela modificação dos nucleossomos adjacentes às histonas já acetiladas (como será discutido adiante).

## ▶ EXPERIMENTOS - CHAVE

### Quadro 8-3 Determinação do posicionamento do nucleossomo na célula

A significância da localização de nucleossomos adjacentes a sequências reguladoras importantes levou ao desenvolvimento de métodos para monitorar a localização de nucleossomos nas células. Muitos desses métodos exploram a capacidade dos nucleossomos de proteger o DNA da digestão pela nuclease de micrococcos (MNase). Como descrito no Quadro 8-1, a MNase apresenta acentuada preferência para clivar DNA entre os nucleossomos, em vez de clivar o DNA fortemente associado aos nucleossomos. Essa propriedade pode ser utilizada para mapear os nucleossomos associados à mesma posição em toda uma população celular (Quadro 8-3, Fig. 1).

Para mapear a localização dos nucleossomos de maneira precisa, é importante isolar a cromatina celular e tratá-la com uma concentração apropriada de MNase, com rompimento mínimo da estrutura geral da cromatina. Isso pode ser obtido pela lise branda das células, mantendo-se os núcleos intactos. Os núcleos, então, são rapidamente tratados (em geral, durante 1 minuto) com várias concentrações diferentes de MNase, uma proteína pequena o bastante para se difundir rapidamente para dentro do núcleo. O objetivo da titulação é clivar a região de interesse, com a MNase, apenas uma vez em cada célula. Após o DNA ter sido digerido, os núcleos podem ser lisados e todas as proteínas podem ser removidas do DNA. Os sítios de clivagem (e, principalmente, os sítios não clivados) deixam um registro das proteínas ligadas ao DNA.

Para identificar os sítios de clivagem em uma determinada região, é necessário criar um ponto final definido para todos os fragmentos clivados e explorar a especificidade da hibridização de DNA. Para criar um ponto final definido, o DNA purificado de cada amostra é clivado com uma enzima de restrição capaz de clivar os sítios adjacentes ao sítio de interesse. Após a separação por tamanho usando eletroforese em gel de agarose, o DNA é desnaturado e transferido para uma membrana de nitrocelulose, de maneira que sua posição em relação ao gel é mantida. Isso permite que uma sonda de DNA marcada e com sequência específica hibridize com o DNA ligado à nitrocelulose (método chamado de *Southern blot*, descrito de maneira detalhada no Cap. 7). Neste caso, a sonda de DNA é escolhida para hibridizar imediatamente

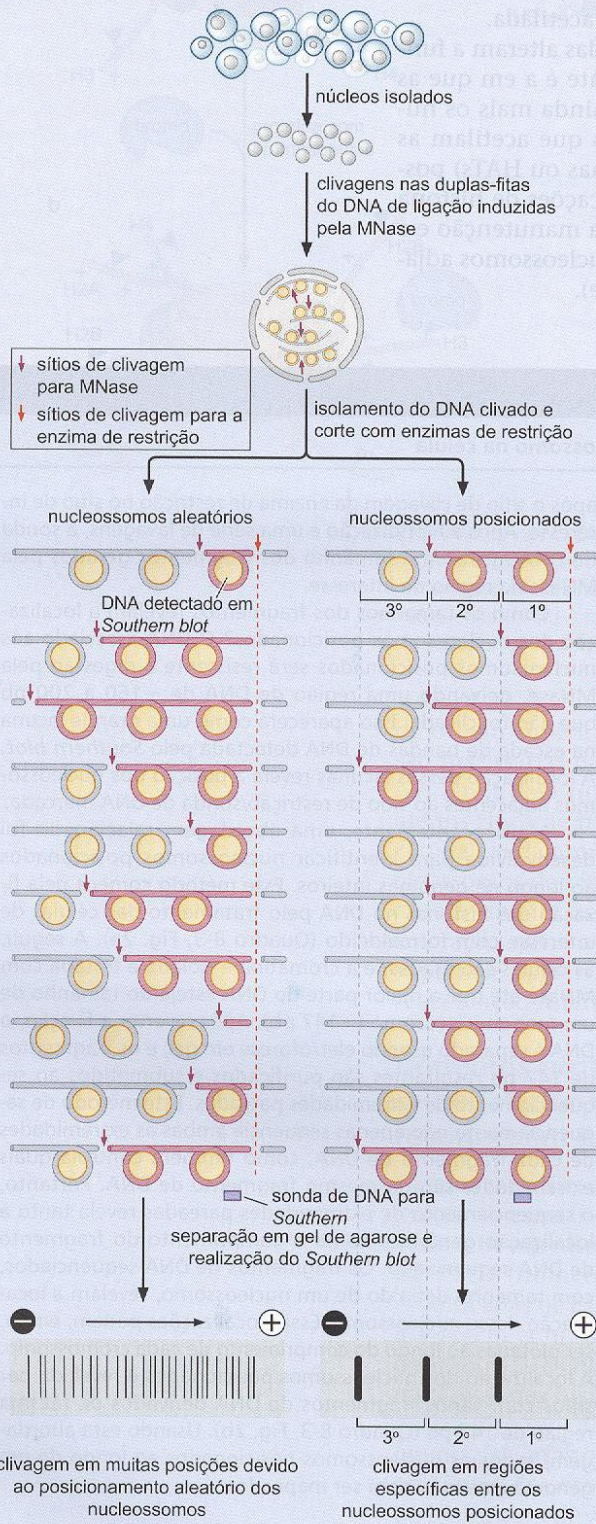
após o sítio de clivagem da enzima de restrição no sítio de interesse. Após a hibridização e uma série de lavagens, a sonda de DNA mostrará o tamanho dos fragmentos gerados pela MNase na região de interesse.

Como os tamanhos dos fragmentos revelam a localização dos nucleossomos posicionados? O DNA associado aos nucleossomos posicionados será resistente à digestão pela MNase, deixando uma região de DNA de ~160 a 200 pb que não foi clivada. Isso aparecerá como uma grande lacuna na escada de bandas de DNA detectada pelo *Southern blot*. A localização dessas lacunas revela a posição dos nucleossomos adjacentes ao sítio de restrição/sonda de DNA marcada.

Mais recentemente, uma abordagem relacionada foi desenvolvida para identificar nucleossomos posicionados ao longo de genomas inteiros. Este método começa pela fixação das histonas no DNA pelo tratamento das células de interesse com formaldeído (Quadro 8-3, Fig. 2a). A seguir, as células são lisadas, e a cromatina é isolada e tratada com MNase até que a maior parte do DNA esteja do tamanho de um mononucleossomo (~147 pb). Após reverter a fixação, o DNA é separado usando eletroforese em gel, e os fragmentos de 147 pb resultantes são purificados e submetidos ao sequenciamento de extremidades pareadas. Este método de sequenciamento não apenas sequencia ambas as extremidades de cada fragmento de DNA, como também controla quais extremidades são do mesmo fragmento de DNA. Portanto, o sequenciamento de extremidades pareadas revela tanto a localização genômica como o comprimento do fragmento de DNA sequenciado. Os fragmentos de DNA sequenciados, com tamanho definido de um nucleossomo, revelam a localização desse nucleossomo. Essas localizações podem, então, ser plotadas ao longo do comprimento de cada cromossomo. A localização dos nucleossomos posicionados é revelada por sítios com vários fragmentos de DNA derivados da mesma região de 147 pb (Quadro 8-3, Fig. 2b). Usando esta abordagem, todos os nucleossomos posicionados ao longo de um genoma inteiro podem ser mapeados.

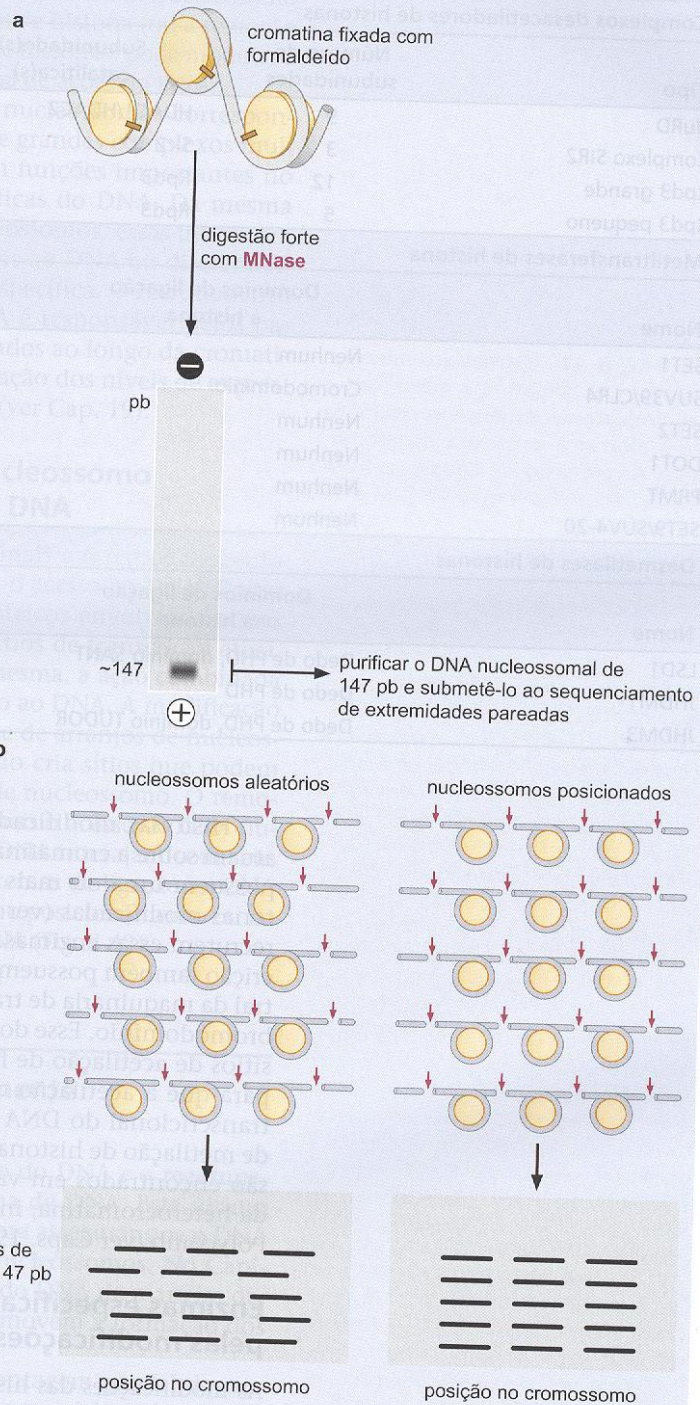
(continua)

Quadro 8-3 (Continuação)



**QUADRO 8-3 FIGURA 1** Análise do posicionamento dos nucleossomos em uma posição cromossômica definida. As etapas experimentais na determinação do posicionamento dos nucleossomos na célula estão ilustradas. Ver o texto do quadro para detalhes.

Quadro 8-3 (Continuação)



**QUADRO 8-3 FIGURA 2** Análise de genoma inteiro do posicionamento de nucleossomo. (a) Após a fixação das células com formaldeído e o isolamento da cromatina, o tratamento extensivo da cromatina fixada com MNase resulta na geração de partículas predominantemente de centro nucleossomal. Após a reversão da fixação, a banda predominante de 147 pb de DNA é isolada usando eletroforese em gel e submetida ao sequenciamento profundo de extremidades pareadas. (b) Ilustração do mapeamento cromossômico dos DNAs associados ao nucleossomo em um sítio com nucleossomos aleatórios e posicionados.

TABELA 8-7 Enzimas modificadoras de histonas

Complexos acetiltransferases de histonas				
Tipo	Número de subunidades	Subunidade(s) catalítica(s)	Domínios de ligação à histona	Histonas-alvo
SAGA	15	Gcn5	Bromodomínio, cromodomínio	H3 e H2B
PCAF	11	PCAF	Bromodomínio	H3 e H4
NuA3	5	Sas3	Dedo de PHD	H3
NuA4	6	Esa1	Cromodomínio, domínio SANT, dedo de PHD	H4 e H2A
P300/CBP	1	P300/CBP	Bromodomínio, dedo de PHD	H2A, H2B, H3 e H4
Complexos desacetiladores de histonas				
Tipo	Número de subunidades	Subunidade(s) catalítica(s)	Domínios de ligação à histona	
NuRD	9	HDAC1/HDAC2	Cromodomínio, dedo de PHD	
Complexo SIR2	3	Sir2	Nenhum	
Rpd3 grande	12	Rpd3	Dedo de PHD	
Rpd3 pequeno	5	Rpd3	Cromodomínio, dedo de PHD	
Metiltransferases de histona				
Nome	Domínios de ligação à histona		Histona-alvo	
SET1	Nenhum		H3 (lisina 4)	
SUV39/CLR4	Cromodomínio		H3 (lisina 9)	
SET2	Nenhum		H3 (lisina 36)	
DOT1	Nenhum		H3 (lisina 79)	
PRMT	Nenhum		H3 (arginina 3)	
SET9/SUV4-20	Nenhum		H4 (lisina 20)	
Desmetilases de histonas				
Nome	Domínios de ligação à histona		Histona-alvo metilada	
LSD1	Dedo de PHD, domínio SANT		H3 (lisina 4)	
JHDM1	Dedo de PHD		H3 (lisina 36)	
JHDM3	Dedo de PHD, domínio TUDOR		H3 (lisinas 9 e 36)	

Histonas modificadas também podem recrutar outras proteínas que atuam sobre a cromatina. Vários complexos remodeladores de nucleossomo possuem uma ou mais subunidades com domínios que reconhecem histonas modificadas (ver Tab. 8-6), permitindo que as histonas modificadas recrutem essas enzimas. Várias proteínas envolvidas na regulação da transcrição também possuem esses domínios. Por exemplo, um componente central da maquinaria de transcrição de eucariotos, chamado TFIID, contém um bromodomínio. Esse domínio direciona a maquinaria de transcrição para os sítios de acetilação de histonas, o que consiste em uma maneira adicional para que a acetilação da histona contribua para o aumento da atividade transcricional do DNA associado. Cromodomínios que reconhecem sítios de metilação de histonas associados a genes transcricionalmente reprimidos são encontrados em várias proteínas importantes para o estabelecimento da heterocromatina, incluindo a proteína HP1 e as proteínas do complexo Polycomb (ver Caps. 19 e 21, respectivamente).

### Enzimas específicas são responsáveis pelas modificações das histonas

As modificações das histonas recém-descritas são dinâmicas e catalisadas por enzimas específicas (Fig. 8-40). As acetiltransferases de histonas (HATs) catali-

sam a adição de grupos acetil às histonas, enquanto desacetilases de histonas (HDACs) removem essas modificações. Da mesma maneira, as metiltransferases de histonas adicionam grupos metil às histonas, e as desmetilases de histonas (HDMs) removem essas modificações. Um grande número de acetiltransferases e desacetilases de histonas diferentes foi identificado, e elas são distinguidas pela sua capacidade de modificar diferentes subgrupos de histonas ou, em alguns casos específicos, diferentes resíduos de lisina na mesma cauda de histona. As metiltransferases e desmetilases de histonas parecem ser muito mais específicas, sempre atuando em apenas uma das muitas lisinas ou argininas de uma histona específica (Tab. 8-7). Como modificações diferentes apresentam efeitos diferentes sobre a função do nucleossomo, a modificação de um nucleossomo com diferentes acetiltransferases ou metiltransferases de histona (ou a remoção de modificações pelas desacetilases ou desmetilases de histonas) pode modular a estrutura da cromatina e influenciar uma ampla gama de ações do DNA.

Assim como os complexos remodeladores de nucleossomos correspondentes, essas enzimas modificadoras fazem parte de grandes complexos multiproteicos. Subunidades adicionais desempenham funções importantes no recrutamento dessas enzimas para regiões específicas do DNA. Da mesma maneira que os complexos remodeladores de nucleossomos, essas interações podem acontecer com fatores de transcrição ligados ao DNA ou diretamente com os nucleossomos modificados de maneira específica. O recrutamento dessas enzimas para determinadas regiões de DNA é responsável pelos padrões distintos de modificações de histonas observados ao longo da cromatina e é um dos mecanismos principais para a modulação dos níveis de expressão gênica ao longo dos cromossomos eucarióticos (ver Cap. 19).

### A modificação e o remodelamento do nucleossomo atuam juntos para aumentar o acesso ao DNA

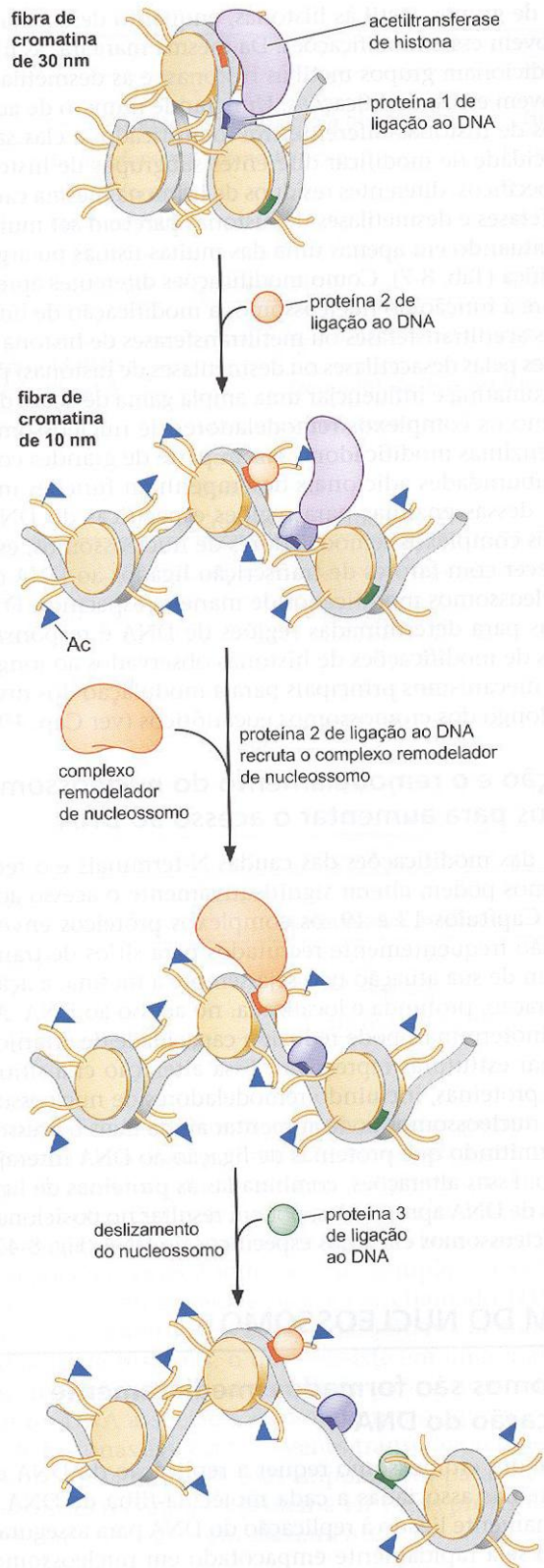
A combinação das modificações das caudas N-terminais e o remodelamento dos nucleossomos podem alterar significativamente o acesso ao DNA. Como será visto nos Capítulos 13 e 19, os complexos proteicos envolvidos nessas modificações são frequentemente recrutados para sítios de transcrição ativa. Embora a ordem de sua atuação não seja sempre a mesma, a ação combinada resulta em alteração, profunda e localizada, no acesso ao DNA. A modificação das caudas aminoterminais pode reduzir a capacidade de arranjos de nucleossomos de formar estruturas repressivas. Essa alteração cria sítios que podem recrutar outras proteínas, incluindo remodeladores de nucleossomo. O remodelamento dos nucleossomos pode aumentar ainda mais o acesso do DNA nucleossomal, permitindo que proteínas de ligação ao DNA interajam com seus sítios de ligação. Essas alterações, combinadas às proteínas de ligação ao DNA ou a sequências de DNA apropriadas, podem resultar no posicionamento ou na liberação de nucleossomos em sítios específicos do DNA (Fig. 8-42).

## MONTAGEM DO NUCLEOSSOMO

### Os nucleossomos são formados imediatamente após a replicação do DNA

A duplicação de um cromossomo requer a replicação do DNA e o reagrupamento das proteínas associadas a cada molécula-filha de DNA. Este último processo é intimamente ligado à replicação do DNA para assegurar que o DNA recém-replicado seja rapidamente empacotado em nucleossomos. No Capítulo 9, serão discutidos os mecanismos da replicação do DNA de maneira detalhada. Aqui, são discutidos os mecanismos que promovem a formação dos nucleossomos após o DNA ter sido replicado.

Embora a replicação do DNA necessite da desmontagem parcial do nucleossomo, o DNA é rapidamente recompactado em uma série ordenada de



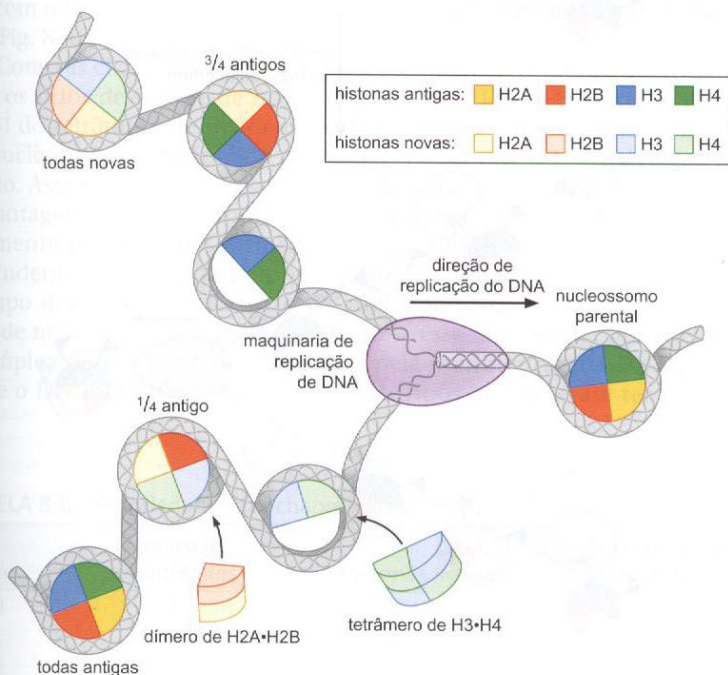
**FIGURA 8-42** Complexos remodeladores da cromatina e modificadores de histonas atuam em conjunto para alterar a estrutura da cromatina. As proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas recrutam essas enzimas para regiões específicas do cromossomo. Na ilustração, a proteína de ligação ao DNA (azul) recruta uma acetiltransferase de histona que altera os nucleossomos adjacentes, aumentando a acessibilidade ao DNA associado, pela conversão local da fibra de cromatina de 30 nm para a forma de 10 nm, que é mais acessível. Isso permite a ligação de uma segunda proteína de ligação ao DNA (cor de laranja), que recruta um complexo remodelador de nucleossomo. A localização do complexo remodelador de nucleossomo facilita o deslizamento dos nucleossomos adjacentes, o que permite a exposição de um sítio de ligação para uma terceira proteína de ligação ao DNA (verde). Por exemplo, este poderia ser o sítio de ligação para a proteína de ligação ao TATA *box* em um sítio de início da transcrição. Embora a ordem mostrada seja a de associação de um complexo de acetilação de histona e, depois, a do complexo remodelador de nucleossomo, ambas as ordens são observadas e podem ser igualmente eficientes. Também é verdade que o recrutamento de um diferente complexo modificador da histona poderia resultar na formação de uma cromatina mais compacta e inacessível.

eventos. Como já foi discutido, o primeiro passo na montagem do nucleossomo é a ligação de um tetrâmero de H3·H4 ao DNA. Após a ligação do tetrâmero, dois dímeros de H2A·H2B associam-se, formando o nucleossomo completo. H1 une-se a esse complexo por último, provavelmente durante a formação de arranjos de ordem superior da cromatina.

Para duplicar um cromossomo, pelo menos metade dos nucleossomos dos cromossomos-filhos deve ser sintetizado. Todas as histonas antigas são descartadas e apenas histonas novas são usadas nos nucleossomos? Se não, como as histonas antigas são distribuídas entre os dois cromossomos-filhos? O destino das histonas antigas é uma questão importante, devido ao efeito que a modificação das histonas pode ter sobre a acessibilidade da cromatina resultante. Se as histonas antigas fossem completamente descartadas, a duplicação dos cromossomos apagaria qualquer “memória” dos nucleossomos previamente modificados. Por outro lado, se as histonas antigas fossem retidas em um único cromossomo, esse cromossomo teria um conjunto de modificações distinto em relação à outra cópia do cromossomo.

Os experimentos utilizando marcação diferencial de histonas antigas e novas demonstraram que as histonas antigas estavam presentes em ambos os cromossomos-filhos (Fig. 8-43). Entretanto, a mistura não ocorre completamente ao acaso. Os tetrâmeros de H3·H4 e os dímeros de H2A·H2B são compostos por histonas, ou todas novas ou todas antigas. Assim, à medida que a forquilha de replicação passa, os nucleossomos são desmembrados em seus componentes parcialmente montados. Os tetrâmeros de H3·H4 parecem permanecer ligados a um dos dois dúpliques-filhos aleatoriamente, e nunca são liberados do DNA para fazer parte do estoque de histonas livres. Em contrapartida, os dímeros de H2A·H2B são liberados e juntam-se ao estoque livre de histonas disponíveis para a formação de novos nucleossomos.

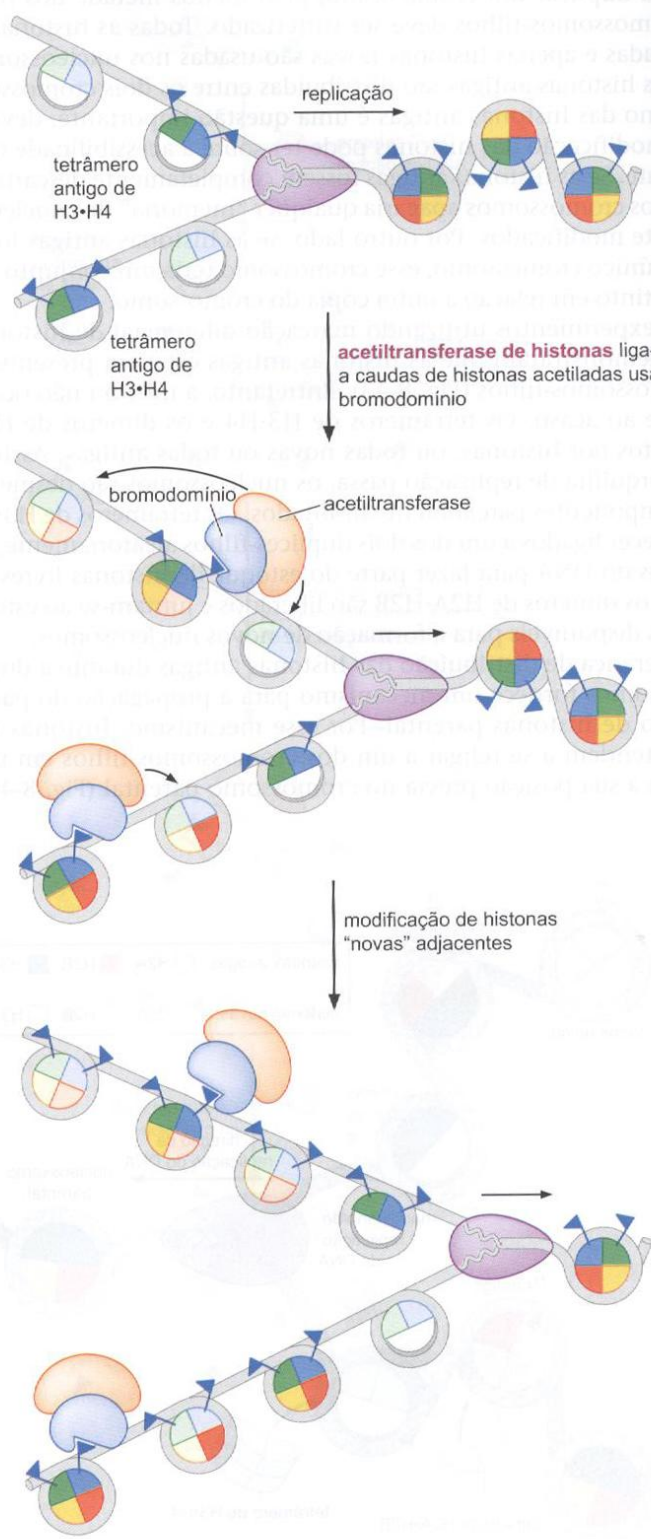
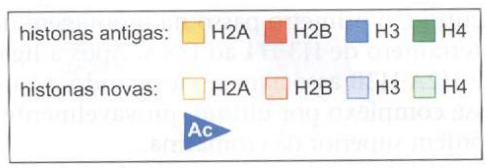
A herança de distribuição das histonas antigas durante a duplicação dos cromossomos fornece um mecanismo para a propagação do padrão de modificação de histonas parental. Por esse mecanismo, histonas modificadas antigas tendem a se religar a um dos cromossomos-filhos em uma posição próxima à sua posição prévia no cromossomo parental (Fig. 8-44). As histo-



**FIGURA 8-43** Herança das histonas após a replicação do DNA.

Conforme o cromossomo é replicado, as histonas que estavam associadas ao cromossomo parental são distribuídas de maneira diferente. Os tetrâmeros de histonas H3·H4 são transferidos de maneira aleatória para uma das duas fitas-filhas, mas não entram no conjunto solúvel de tetrâmeros de H3·H4. Os tetrâmeros de H3·H4 recém-sintetizados formam a base dos nucleossomos na fita que não herdou o tetrâmero parental. Em contrapartida, os dímeros de H2A e H2B são liberados no conjunto solúvel e competem pela associação com H3·H4 com as histonas H2A e H2B recém-sintetizadas. Como consequência desse tipo de distribuição, em média, cada segundo tetrâmero de H3·H4 sobre o DNA recém-sintetizado será derivado do cromossomo parental. Esses tetrâmeros conterão todas as modificações adicionadas aos nucleossomos parentais. É mais provável que os dímeros de H2A·H2B sejam derivados de proteínas recém-sintetizadas.





**FIGURA 8-44** A herança dos tetrâmeros parentais de H3-H4 facilita a herança dos estados da cromatina. À medida que um cromossomo é replicado, a distribuição dos tetrâmeros parentais de H3-H4 resulta no recebimento, pelo cromossomo-filho, das mesmas modificações presentes no cromossomo parental. Essas modificações são capazes de recrutar as enzimas que realizam as mesmas modificações, facilitando a propagação correta do mesmo estado de modificação para os dois cromossomos-filhos. Para simplificar, a acetilação é mostrada nas regiões do núcleo das histonas. Na verdade, essa modificação ocorre geralmente nas caudas N-terminais.

nas antigas possuem uma probabilidade igual de se ligarem a qualquer dos cromossomos-filhos. Essa herança de localização de histonas modificadas garante que um subconjunto de histonas modificadas esteja posicionado em posições similares em cada cromossomo-filho. A capacidade dessas modificações em recrutar enzimas que executam modificações semelhantes nos nucleossomos adjacentes (ver a discussão anterior a respeito de domínios de ligação a histonas modificadas) oferece um mecanismo simples para a manutenção dos estados, ou padrões, de modificação após a replicação do DNA (ver Fig. 8-44). É provável que esses mecanismos desempenhem um papel fundamental na herança dos estados da cromatina de uma geração a outra. Considerando a importância da modificação de histonas no controle da expressão gênica (ver Cap. 19), bem como outras transações no DNA, a manutenção de tais estados de modificação é fundamental para manter a identidade celular à medida que as células replicam seu DNA e se dividem.

### A montagem dos nucleossomos requer "chaperonas" de histonas

A formação dos nucleossomos não é um processo espontâneo. Os primeiros estudos demonstraram que a simples adição de histonas purificadas ao DNA resultava em pouca ou nenhuma formação de nucleossomos. Além disso, a maioria das histonas agregava em um arranjo não-funcional. Para a correta montagem dos nucleossomos, era necessário aumentar as concentrações de sais para níveis muito elevados (> 1 M de NaCl) e, então, reduzir lentamente a concentração durante muitas horas. Embora útil para os estudos sobre a formação de nucleossomos *in vitro* (como os estudos estruturais dos nucleossomos, descritos anteriormente), concentrações elevadas de sais não estão envolvidas na montagem do nucleossomo *in vivo*.

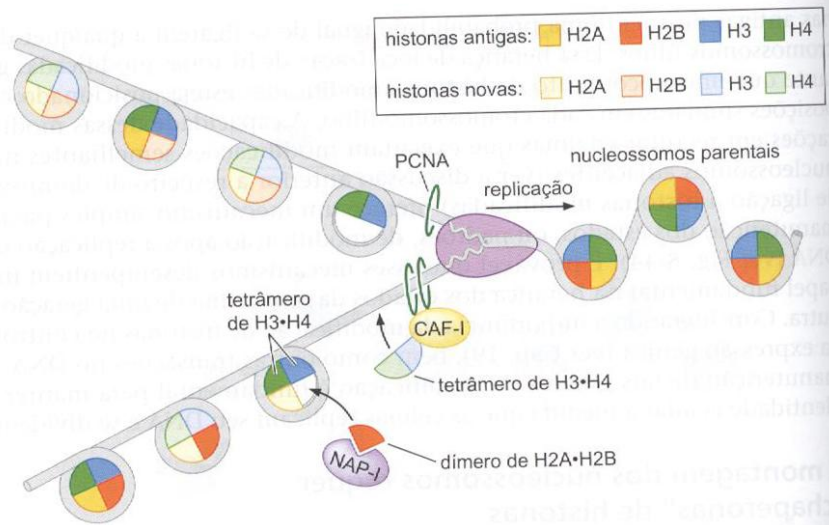
Os estudos de formação de nucleossomos sob concentrações fisiológicas de sais identificaram os fatores necessários para direcionar a montagem das histonas sobre o DNA. Esses fatores são proteínas negativamente carregadas que formam complexos ou com os tetrâmeros de H3·H4 ou com os dímeros de H2A·H2B (ver Tab. 8-8) e os direcionam para os sítios de montagem de nucleossomos. Como eles atuam impedindo a interação improdutiva das histonas com o DNA, esses fatores foram denominados **chaperonas de histonas** (ver Fig. 8-45).

Como as chaperonas de histonas direcionam a formação do nucleossomo para os sítios de síntese de novas moléculas de DNA? Estudos da chaperona CAF-I do tetrâmero de histonas H3·H4 sugerem uma resposta. A montagem do nucleossomo direcionada por CAF-I requer que o DNA-alvo esteja replicando. Assim, o DNA que está replicando é marcado de alguma maneira para a montagem de nucleossomos. É interessante notar que essa marca é gradativamente perdida após a finalização da replicação. Estudos de montagem dependente de CAF-I determinaram que a "marca" é uma proteína do tipo grampo deslizante em formato de anel, chamada PCNA. Como será discutido de maneira detalhada no Capítulo 9, esse fator forma um anel ao redor do dúplice de DNA, e é o responsável pela manutenção da DNA-polimerase sobre o DNA durante a síntese de DNA. Após a polimerase ter finalizado, a

TABELA 8-8 Propriedades das chaperonas de histonas

Nome	Número de subunidades	Histonas ligadas	Interação com o grampo deslizante
CAF-I	4	H3·H4	Sim
HIRA	4	H3·H4	Não
RCAF	1	H3·H4	Não
NAP-I	1	H2A·H2B	Não

**FIGURA 8-45 Os fatores de montagem da cromatina facilitam a formação dos nucleossomos.** Após a forquilha de replicação ter passado, os fatores (chaperonas) de montagem da cromatina conduzem os tetrâmeros de H3-H4 (p. ex., CAF-I) e os dímeros de H2A-H2B (NAP-I) para o sítio de DNA recém-replicado. Uma vez sobre o DNA recém-replicado, esses fatores transferem seu conteúdo de histonas para o DNA. Os fatores CAF-I são recrutados para o DNA recém-replicado por meio de interações com os grampos deslizantes do DNA. Esses fatores de replicação auxiliares em formato de anel circundam o DNA e são liberados da maquinaria de replicação à medida que a forquilha de replicação se desloca. Para uma descrição mais detalhada dos grampos deslizantes do DNA e sua função na replicação do DNA, ver Capítulo 9.



PCNA é liberada da DNA-polimerase, mas ainda permanece ligada ao DNA. Nesta condição, a PCNA está disponível para interagir com outras proteínas. A CAF-I associa-se à PCNA liberada e monta os tetrâmeros de H3-H4, preferencialmente, sobre o DNA ligado ao PCNA. Assim, ao se associar a um componente da maquinaria de replicação do DNA, a CAF-I é direcionada para a formação de nucleossomos em sítios de replicação do DNA recentes.

## RESUMO

Dentro da célula, o DNA está organizado em grandes estruturas, chamadas cromossomos. Embora o DNA seja a base de cada cromossomo, cerca de metade de cada cromossomo é composta por proteínas. Os cromossomos podem ser circulares ou lineares; entretanto, cada célula apresenta um número e composição cromossômica característicos. Hoje é conhecida a sequência do genoma inteiro de milhares de organismos. Essas sequências revelaram que o DNA subjacente do cromossomo de cada organismo é usado de maneira mais ou menos eficiente para codificar proteínas. Os organismos simples tendem a utilizar a maior parte do DNA para codificar proteínas; no entanto, organismos mais complexos utilizam apenas uma pequena porção de seu DNA para efetivamente codificar proteínas. A complexidade aumentada das sequências reguladoras, o surgimento dos íntrons e a presença de RNAs reguladores adicionais (p. ex., miRNAs) contribuem para a expansão das regiões não codificadoras dos genomas dos organismos mais complexos.

As células devem manter seus conjuntos de cromossomos cuidadosamente à medida que se dividem. Cada cromossomo deve ter elementos de DNA que promovam a manutenção dos cromossomos durante a divisão celular. Todos os cromossomos devem possuir uma ou mais origens de replicação. Nas células eucarióticas, os centrômeros desempenham papel fundamental na segregação cromossômica, e os telômeros auxiliam na proteção e na replicação das extremidades dos cromossomos lineares. As células eucarióticas separam cuidadosamente os eventos que duplicam e segregam os cromossomos à medida que a divisão celular prossegue. A segregação cromossômica pode ocorrer de duas maneiras. Durante a mitose, um aparato altamente especializado garante que uma cópia de cada cro-

mossomo duplicado seja distribuída para cada célula-filha. Durante a meiose, um ciclo adicional de segregação cromossômica (sem duplicação do DNA) reduz à metade o número de cromossomos nas células-filhas para gerar gametas haploides.

A combinação de DNA eucariótico e suas proteínas associadas é denominada cromatina. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, o qual é composto por duas cópias de cada histona do núcleo (H2A, H2B, H3 e H4) e por um segmento de DNA de aproximadamente 147 pb. Esse complexo de proteína e DNA desempenha duas funções importantes na célula: compacta o DNA, permitindo que ele seja alocado dentro do núcleo, e restringe o acesso ao DNA. Esta última função é extensivamente explorada pela célula para regular muitas operações diferentes no DNA, incluindo a expressão gênica.

A estrutura atômica do nucleossomo mostra que o DNA está enrolado cerca de 1,7 vez ao redor de um núcleo proteico de histonas em formato de disco. Existem muitas interações entre o DNA e as histonas, mas, invariavelmente, não são base-específicas. A natureza dessas interações explica o dobramento do DNA ao redor do octâmero de histonas, e a capacidade de praticamente todas as sequências de DNA serem incorporadas em um nucleossomo. Essa estrutura também revela a localização das caudas N-terminais das histonas e sua função no direcionamento do trajeto do DNA ao redor das histonas.

Uma vez empacotado em nucleossomos, o DNA forma estruturas mais complexas, que permitem sua compactação adicional. Esse processo é facilitado por uma quinta histona, chamada H1. Por se ligar ao DNA tanto associado ao nucleossomo quanto no DNA de ligação, H1 faz o DNA se enrolar mais firmemente ao redor do octâmero. Uma forma mais compacta de cromatina, a fibra de 30 nm origina-se de arranjos de

nucleossomos ligados pela histona H1. Essa estrutura é mais repressiva do que o DNA empacotado apenas nos nucleossomos. A incorporação do DNA nessa estrutura resulta na redução drástica do seu acesso a enzimas e proteínas envolvidas na transcrição do DNA.

A interação DNA-histonas do nucleossomo é dinâmica, permitindo um acesso intermitente das proteínas que se ligam ao DNA. Os complexos remodeladores dos nucleossomos aumentam a acessibilidade do DNA incorporado nos nucleossomos, porque aumentam a mobilidade dos nucleossomos. Duas formas de mobilidade podem ser observadas: o deslizamento do octâmero de histonas ao longo do DNA ou a liberação completa do octâmero de histonas do DNA. Além disso, esses complexos facilitam a troca de dímeros H2A/H2B. Os complexos remodeladores dos nucleossomos são recrutados para determinadas regiões do genoma, facilitando alterações no acesso à cromatina. Um subconjunto de nucleossomos está restrito a posições fixas no genoma, os chamados nucleossomos "posicionados". O posicionamento dos nucleossomos pode ser direcionado por proteínas de ligação ao DNA ou por sequências específicas de DNA.

A modificação das caudas N-terminais das histonas também altera a acessibilidade da cromatina. Os tipos de modificações incluem acetilação e metilação de resíduos de lisina,

metilação de argininas e fosforilação de serinas, treoninas e tirosinas. A acetilação das caudas N-terminais é frequentemente associada a regiões de expressão gênica ativa e inibe a formação da fibra de 30 nm. As modificações nas histonas alteram as propriedades do próprio nucleossomo e atuam como sítios de ligação para proteínas que influenciam a acessibilidade da cromatina. Além disso, essas modificações recrutam enzimas que realizam a mesma modificação, levando a uma modificação semelhante dos nucleossomos adjacentes e facilitando a propagação estável de regiões modificadas de nucleossomos/cromatina à medida que os cromossomos são duplicados.

Os nucleossomos são formados imediatamente após o DNA ter sido replicado, deixando o DNA não empacotado apenas por um breve período. Isso envolve a função de chaperonas de histonas especializadas, que acompanham os tetrâmeros de H3·H4 e os dímeros de H2A·H2B à forquilha de replicação. Durante a replicação do DNA, os nucleossomos são temporariamente desmontados. Os tetrâmeros de histonas H3·H4 e os dímeros de H2A·H2B são distribuídos de maneira aleatória entre as moléculas-filhas. Em média, cada nova molécula de DNA recebe metade das histonas antigas e metade das histonas novas. Assim, ambos os cromossomos herdam histonas modificadas, as quais atuam como "sementes" para modificações semelhantes das histonas adjacentes.

## BIBLIOGRAFIA

### Livros

- Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D., and Caparros M.-L., eds. 2007. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Brown T.A. 2007. *Genomes 3*, 2nd ed. Garland Science, New York.
- Morgan D.O. 2007. *The cell cycle: Principles of control*. New Science Press Ltd., London.

### Cromossomos

- Bendich A.J. and Drlica K. 2000. Prokaryotic and eukaryotic chromosomes: What's the difference? *Bioessays* **22**: 481–486.
- Thanbichler M., Wang S.C., and Shapiro L. 2005. The bacterial nucleoid: A highly organized and dynamic structure. *J. Cell Biochem.* **96**: 506–521.

### Nucleossomos

- Clapier C.R. and Cairns B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 273–304.

- Gardner K.E., Allis C.D., and Strahl B.D. 2011. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J. Mol. Biol.* **409**: 36–46.
- Li G. and Reinberg D. 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**: 175–186.
- Luger K., Madev A.W., and Richmond R.K. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.
- Narlikar G.J., Fan H.-Y., and Kingston R.E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475–487.
- Rando O. 2012. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: Revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**: 148–155.
- Shahbazian M.D. and Grunstein M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 75–100.
- Thiriet C. and Hayes J.J. 2005. Chromatin in need of a fix: Phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol. Cell* **18**: 617–622.

## QUESTÕES

Para respostas de questões de número par, ver Apêndice 2: Respostas.

**Questão 1.** Liste pelo menos três propriedades que diferem entre a constituição do cromossomo em *E. coli* e em células humanas.

**Questão 2.** Explique onde o DNA cromossômico está localizado em células procarióticas e em células eucarióticas.

**Questão 3.** O tamanho do genoma está diretamente relacionado à complexidade do organismo? Explique sua resposta.

**Questão 4.** Sequências intergênicas constituem > 60% do genoma humano. De onde vêm essas sequências intergênicas e quais são algumas de suas funções?

**Questão 5.** Explique por que cada cromossomo de uma célula eucariótica possui múltiplas origens de replicação mas tem apenas um único centrômero.

**Questão 6.** Como a coesão de cromátides-irmãs garante que cada célula-filha receba uma cópia de cada cromossomo?