

# TEXTO 2

## A REPLICAÇÃO DO DNA

### As Polimerases do DNA de *E. coli*

A reação de polimerização de cadeias polidesoxirribonucleotídicas

Atividade autocorretora das polimerases do DNA

Os tipos de polimerases do DNA da bactéria *E. coli*

### O Sentido da Síntese do DNA

A síntese semidescontínua do DNA

A descoberta dos fragmentos de Okazaki

### O RNA Iniciador da Síntese de DNA

A primase do DNA e a síntese do *primer* de RNA

A substituição dos *primers* por um segmento de DNA

### Outras proteínas que atuam na replicação do DNA

As enzimas que abrem a hélice do DNA: as helicases

Proteínas que impedem a renaturação do DNA

O relaxamento da hélice pela topoisomerase

### O Replissomo

#### A iniciação nas origens de replicação

O que são replicons?

A origem de replicação do cromossomo bacteriano

Etapas da formação do replissomo

#### Aspectos da replicação do DNA em eucariontes

A velocidade de replicação do DNA em eucariontes

O tamanho dos fragmentos de Okazaki em eucariontes

As polimerases do DNA em eucariontes

Origens múltiplas de replicação em eucariontes

A origem de replicação do DNA dos eucariontes

A síntese das histonas durante a replicação do DNA

O problema da replicação nas extremidades dos cromossomos

Exercícios

#### **Bloco I**

**Parte A:** Revendo Conceitos Básicos

**Parte B:** Ligando Conceitos e Fatos

**Parte C:** Aplicando Conceitos

**Parte D:** Resolvendo Problemas

#### **Bloco II**

**Parte A:** Revendo Conceitos Básicos

**Parte B:** Ligando Conceitos e Fatos

**Parte C:** Aplicando Conceitos

**Parte D:** Resolvendo Problemas

## Apresentação

Uma característica é absolutamente essencial à continuidade da vida em nosso planeta é a capacidade que os sistemas vivos têm de fazer cópias de si mesmos. Essa capacidade está tão intimamente associada ao material hereditário que, em 1953, ao proporem um modelo para o DNA, Watson e Crick já sugeriram um mecanismo para a replicação dessa molécula. Desde então, nossa compreensão do processo de replicação do DNA aumentou enormemente e hoje temos uma idéia detalhada de como a replicação acontece na intimidade das células e dos cromossomos. Descobrimos que durante esse processo acontecem erros que, quando não são corrigidos pelas polimerases, se perpetuam na forma de mutações.

Essa apostila foi organizada pelos docentes do Instituto de Biociências da USP que ministraram e ministram as disciplinas “Biologia Molecular e de Microrganismos”, “Biologia Molecular” e “Fundamentos de Biologia Molecular” para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. O texto foi adaptado e compilado de diversos livros didáticos e matérias instrucionais.

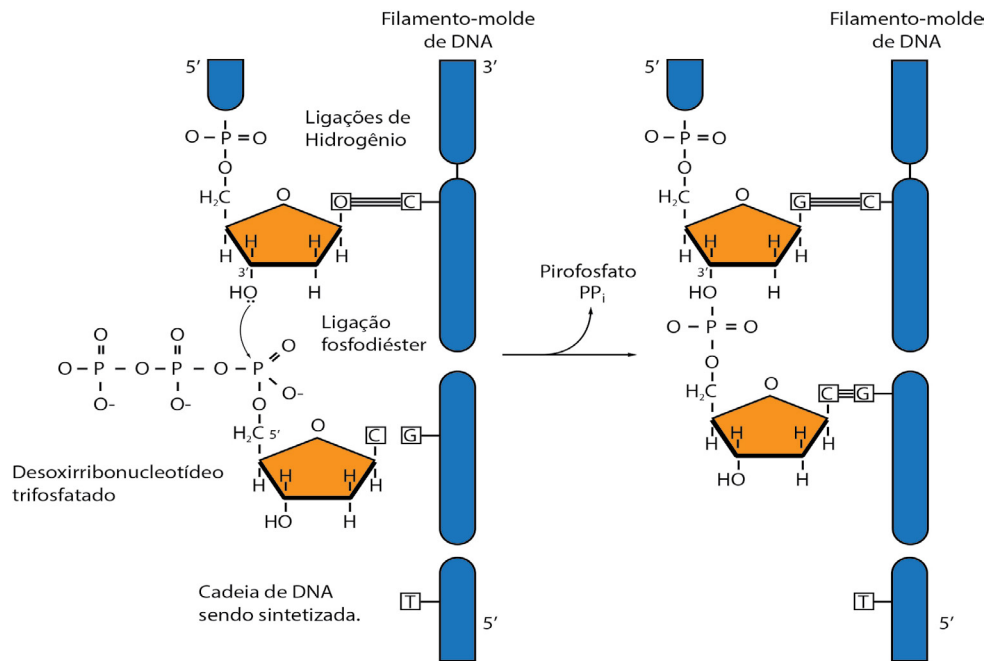
## As Polimerases do DNA de *E. coli*

A síntese semi-conservativa do DNA requer que desoxirribonucleotídeos livres sejam posicionados sobre uma cadeia polinucleotídica molde e unidos entre si, de modo a formar uma nova cadeia complementar à cadeia da molécula mãe que lhe serve de molde. Em 1957, foi extraída da bactéria *E. coli* a primeira enzima capaz de polimerizar desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) à medida que eles se ordenam sobre uma cadeia polinucleotídica. Mais tarde foram descobertas, nessa mesma bactéria, outras duas enzimas que também catalisam a síntese de DNA direcionada por um molde. As três enzimas foram denominadas **polimerases do DNA** e identificadas por numerais romanos de acordo com a ordem temporal de sua descoberta. Essas e muitas outras enzimas envolvidas na replicação do DNA foram descobertas e caracterizadas em mutantes bacterianos deficientes em replicação.

### A reação de polimerização de cadeias polidesoxirribonucleotídicas

As polimerases do DNA atuam adicionando um nucleotídeo por vez à extremidade 3'-OH livre de uma cadeia polinucleotídica em formação, a qual se encontra emparelhada a uma cadeia molde. Por isso, costuma-se dizer que a cadeia de DNA é sintetizada no sentido 5' → 3'.

O primeiro passo na adição de um novo nucleotídeo à cadeia em crescimento é seu emparelhamento ao nucleotídeo correspondente da cadeia molde. A identificação do dNTP a ser incorporado é feita por meio de um emparelhamento de bases tipo Watson - Crick entre ele e o nucleotídeo da cadeia molde, ou seja, um desoxirribonucleotídeo com timina (dT) emparelha-se com outro com adenina (dA) e um com guanina (dG) emparelha-se com outro com citosina (dC). Uma vez corretamente emparelhado o dNTP, a polimerase do DNA catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster 5' - 3' entre ele e a cadeia em formação. Essa ligação fosfodiéster ocorre como consequência de um ataque nucleofílico do grupo 3'-OH livre da cadeia em formação sobre o fosfato do dNTP sendo incorporado. A hidrólise do trifosfato de nucleotídeo fornece a energia termodinâmica para a polimerização. Após a formação da ligação fosfodiéster, a polimerase do DNA avança um resíduo de nucleotídeo na cadeia molde posicionando-se para promover a ligação de um novo dNTP à cadeia em crescimento. (Fig. 1)



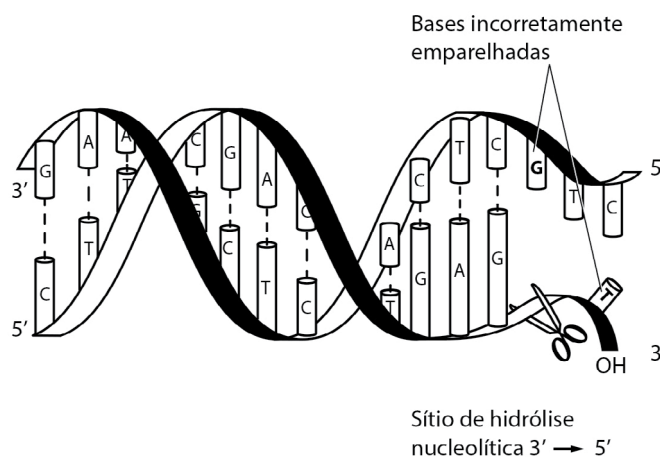
**Figura 1.** Alongamento da cadeia de DNA. Durante a síntese de DNA, a formação de um par de bases tem início quando um desoxirribonucleotídeo 5' trifosfatado forma pontes de hidrogênio com um resíduo de nucleotídeo da cadeia molde. O passo seguinte é a formação da ligação fosfodiéster entre o novo nucleotídeo e o resíduo terminal da cadeia em crescimento, com liberação de pirofosfato.

## Atividade autocorretora das polimerases do DNA

As polimerases do DNA só adicionam um novo nucleotídeo à cadeia em crescimento se o último estiver corretamente emparelhado ao nucleotídeo correspondente da cadeia molde. Caso isso não ocorra, as polimerases do DNA removem o nucleotídeo da extremidade 3'-OH livre incorretamente emparelhado. Essa propriedade das polimerases é denominada **atividade exonucleolítica 3' → 5'**; note que ela é inversa ao sentido do crescimento da cadeia.

A atividade exonucleolítica 3' → 5' das polimerases do DNA é um mecanismo autocorretor que permite a elas conferir o último nucleotídeo incorporado, corrigindo seus próprios erros de incorporação à medida que se movem ao longo do DNA molde.

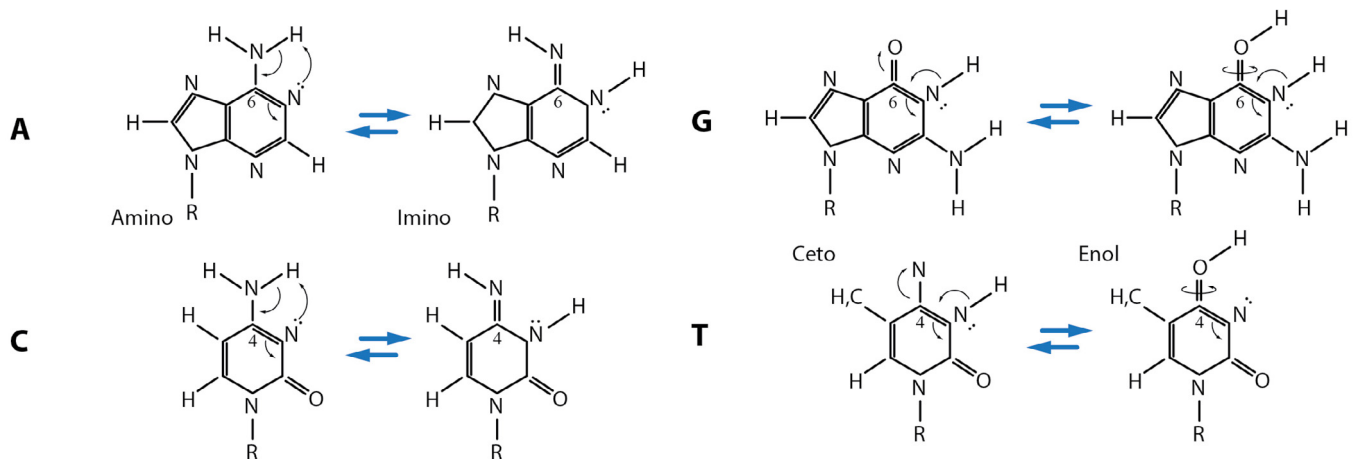
O que garante às polimerases essa atividade corretora é a necessidade de um nucleotídeo corretamente emparelhado à cadeia molde para a adição do próximo. Esse processo de autocorreção é importante, uma vez que a taxa de incorporação de nucleotídeos errados é alta, da ordem de 1 em cada 100 mil nucleotídeos incorporados (10<sup>-5</sup>). Em função da atividade autocorretora das polimerases, a taxa de erro de incorporação cai para cerca de 1 em cada 10 milhões de nucleotídeos incorporados (10<sup>-7</sup>). Essa é uma das menores taxas de erro conhecidas para enzimas. (Fig. 2)



**Figura 2.** Representação esquemática da atividade exonucleolítica 3' → 5' das polimerases do DNA, que excisa da extremidade 3' da cadeia em crescimento nucleotídeos incorretamente incorporados.

A atividade autocorretora das polimerases é essencial para garantir a alta fidelidade de replicação do DNA e, portanto, a estabilidade genética no decorrer das gerações, pois um erro de incorporação de nucleotídeo que não seja corrigido produz uma mutação. Assim, não fosse o sistema autocorretor das polimerases, a taxa de mutação seria muito maior, pois a frequência com que são incorporados nucleotídeos errados é relativamente alta.

A incorporação de nucleotídeos errados se deve ao fato de as complementaridades padrão entre as bases nitrogenadas (A com T e C com G) não serem as únicas possíveis. Com pequenas distorções na hélice do DNA podem ocorrer outros tipos de emparelhamentos, como G-T. Outra fonte de erros de incorporação é a ocorrência transitória de formas tautoméricas de bases, o que acontece com uma frequência de 1 em cada 10 mil ou 100 mil bases. Tautômero é um tipo de isômero resultante do deslocamento transitório das ligações químicas em uma molécula. Cada uma das quatro bases naturais do DNA pode assumir uma forma tautomérica rara devido à redistribuição de elétrons e prótons na molécula. (Fig. 3)



**Figura 3.** Tautomerização de bases do DNA. Por meio da troca de prótons, as bases podem se tautomerizar entre as formas amino e imino de A e C e ceto e enol de G e T. O equilíbrio dessas reações é bastante deslocado na direção das formas amino e ceto.

Na forma tautomérica, a base passa a fazer outros tipos de pontes de hidrogênio, emparelhando-se com bases diferentes de suas parceiras usuais. Por exemplo, a forma imino da adenina emparelha com a citosina e a forma enol da timina emparelha com a guanina. Assim, quando a base de um nucleotídeo assume espontaneamente sua forma tautomérica, ocorre um erro de incorporação. No entanto, ao voltar a seu estado normal, o que ocorre rapidamente, a base não consegue manter aquele tipo de emparelhamento e, aí sim, a hélice do DNA se distorce.

As polimerases do DNA só conseguem catalisar o crescimento de uma cadeia polinucleotídica no sentido 5' → 3', isto é, elas só conseguem adicionar nucleotídeos na extremidade 3'-OH livre de uma cadeia em crescimento. Isso garante que a energia necessária para a incorporação de um novo nucleotídeo seja fornecida por ele mesmo e não pela extremidade da cadeia em crescimento. Lembre-se que a energia é fornecida pela quebra das ligações entre os fosfatos ligados ao carbono 5' do nucleotídeo trifosfatado a ser incorporado. Caso existisse uma polimerase que fosse capaz de catalisar a síntese no sentido 3' → 5', a energia necessária para a incorporação de um novo nucleotídeo teria obrigatoriamente que ser fornecida pela extremidade da cadeia em crescimento. Em tal situação, o último nucleotídeo incorporado a uma cadeia em crescimento não poderia ser eliminado da cadeia sob pena de não haver mais energia disponível para a continuidade da replicação. Nesse caso, não seria possível a tal polimerase corrigir seus próprios erros de incorporação e a taxa de mutação seria altíssima, incompatível com um sistema vivo complexo. Assim, a necessidade de uma replicação com alta fidelidade provavelmente explica o porquê de a replicação ocorrer somente no sentido 5' → 3'.

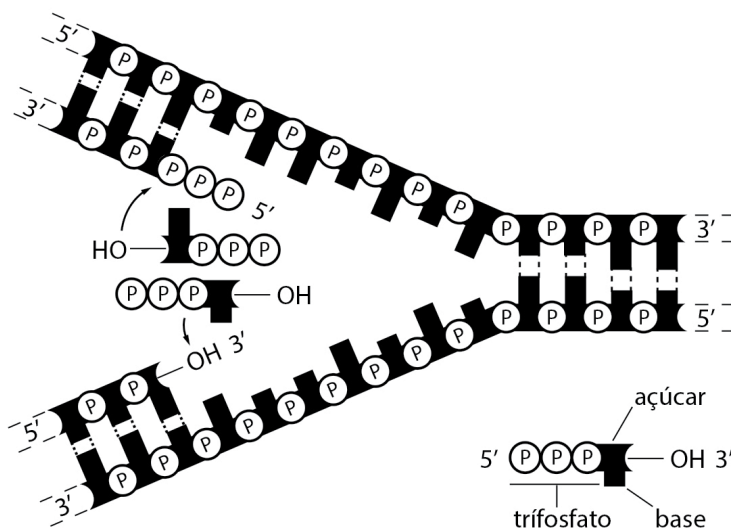
## Os tipos de polimerases do DNA da bactéria *E. coli*

Hoje é conhecido que existem cinco tipos de polimerases do DNA das bactérias, que diferem sutilmente quanto à sua função celular. A polimerase III é a principal responsável pelo crescimento das novas cadeias polinucleotídicas durante a replicação do DNA. A polimerase I é uma enzima de reparo, isto é, ela corrige lesões na molécula de DNA, mas é também muito importante porque preenche os espaços deixados pela remoção dos *primers*, como veremos a seguir. O papel das polimerases II e IV e V está relacionado ao reparo de lesões na molécula de DNA.

# O Sentido da Síntese do DNA

A replicação semi-conservativa do DNA exige que as duas cadeias polinucleotídicas que formam a hélice do DNA se separem, de modo a expor as bases que irão orientar o emparelhamento dos nucleotídeos para formação das novas cadeias complementares às cadeias moldes. A separação das duas cadeias da hélice do DNA ocorre à medida que as novas cadeias vão sendo sintetizadas. A região de separação das cadeias tem a forma de uma letra Y e é denominada **forquilha de replicação**. Podemos dizer, então, que a região da junção entre duas cadeias-molde recém-separadas para a replicação e a dupla-hélice de DNA que ainda não se separou é a forquilha de replicação.

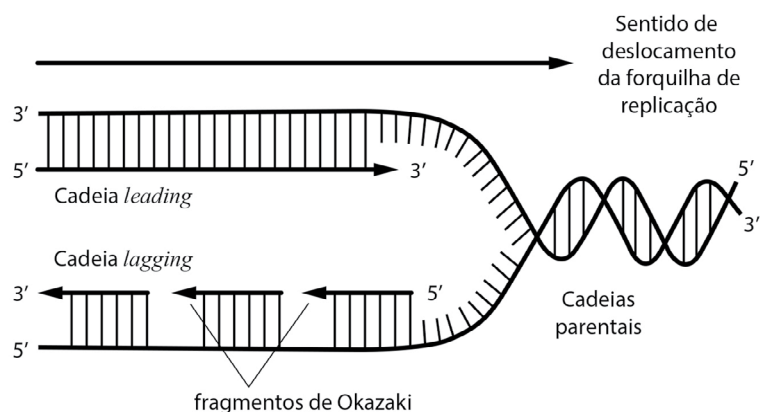
Quanto à síntese de uma nova cadeia, o mais simples seria imaginar que ela ocorra continuamente, no sentido da progressão da forquilha de replicação. (Fig. 4). No entanto, como explicado na Figura, esse seria um modelo INCORRETO, pois requereria que uma das cadeias crescesse no sentido 3' → 5'.



**Figura 4.** Modelo INCORRETO de replicação do DNA. Apesar de parecer a maneira mais simples de replicação de um DNA, o mecanismo ilustrado acima não é o utilizado pelos seres vivos. Note que nesse esquema ambas as cadeias filhas crescem continuamente. Esse tipo de mecanismo requer que uma das cadeias cresça no sentido 5' → 3' (cadeia de baixo) e que a outra (cadeia de cima) cresça no sentido 3' → 5'. No entanto, nunca foi encontrada uma enzima que catalisasse a polimerização no sentido 3' → 5'.

## A síntese semidescontínua do DNA

Os experimentos mostraram que ambas as cadeias filhas são sintetizadas na forquilha de replicação por um complexo de enzimas que inclui a polimerase III do DNA (chamado de **replissomo**). No entanto, as duas cadeias moldes são antiparalelas, em uma delas a síntese da cadeia complementar ocorre no sentido 5' → 3', acompanhando o sentido de abertura da forquilha. Mas, na outra cadeia, essa síntese teria de se dar em sentido inverso, ou seja, de 3' para 5'. No entanto, as duas cadeias são sintetizadas pela polimerase III do DNA, que só catalisa o crescimento da cadeia no sentido 5' → 3'. (Fig. 5)



**Figura 5.** Na replicação do DNA, ambas as cadeias filhas são sintetizadas no sentido 5' → 3'. A cadeia *leading* é sintetizada continuamente, enquanto a cadeia *lagging* é sintetizada descontinuamente.

A explicação para esse aparente paradoxo é que, na forquilha de replicação, uma das cadeias é sintetizada continuamente por uma polimerase que se move no mesmo sentido do deslocamento da forquilha. Já a cadeia com polaridade inversa é sintetizada, em sentido inverso ao do deslocamento da forquilha de replicação, portanto, também no sentido  $5' \rightarrow 3'$ . Isso só é possível porque, nesse último caso, a polimerase sintetiza curtos segmentos polinucleotídicos que crescem no sentido  $5' \rightarrow 3'$ , que são, posteriormente, unidos para formar a nova cadeia contínua. A cadeia que cresce no mesmo sentido que o do deslocamento da forquilha de replicação, e cuja síntese ocorre continuamente, é chamada **cadeia leading** ou **cadeia líder**. A cadeia que cresce em sentido contrário ao do deslocamento da forquilha de replicação, e cuja síntese ocorre descontinuamente, ou seja, aos pedaços, é chamada **cadeia lagging** ou **cadeia tardia**. Esse modo de replicação do DNA, em que uma das cadeias é sintetizada continuamente e a outra, descontinuamente, é chamado de **síntese semidescontínua**. Costuma-se dizer também que a síntese do DNA na forquilha de replicação é assimétrica, pois em uma das cadeias (cadeia *leading*) ela ocorre continuamente, enquanto que na outra (cadeia *lagging*) ela ocorre de modo descontínuo, em fragmentos. (Fig. 5)

## A descoberta dos fragmentos de Okazaki

A hipótese da síntese descontínua da cadeia *lagging* foi corroborada por um experimento realizado pelo pesquisador Reiji Okazaki no final da década de 1960. Okazaki forneceu a bactérias em divisão timidina tritiada, isto é, um desoxirribonucleotídeo com a base timina (= timidina) marcada com átomos de trítio (um isótopo radioativo do hidrogênio). Esse precursor do DNA, altamente radioativo, foi deixado em contato com as bactérias por apenas alguns segundos, de modo que somente o DNA recém-sintetizado, ou seja, aquele imediatamente após a forquilha de replicação, se tornasse radioativo. O DNA foi então isolado e analisado, mostrando que parte da radioatividade estava contida em fragmentos de cadeias polinucleotídicas com cerca de mil a dois mil nucleotídeos. Quanto maior fosse o tempo de contato das bactérias com o precursor radioativo maior era a quantidade de radioatividade em cadeias de DNA de grande tamanho. A conclusão foi que os nucleotídeos eram primeiramente polimerizados em fragmentos de mil a dois mil nucleotídeos, os quais eram, em seguida, reunidos para formar cadeias longas.

Esses pequenos pedaços de DNA que aparecem transitoriamente durante a síntese da cadeia *lagging* foram denominados **fragmentos de Okazaki**. Hoje sabemos que os fragmentos de Okazaki tem de 1000 a 2000 nucleotídeos em bactérias, e de 100 a 400 nucleotídeos em eucarióticos.

## O RNA Iniciador da Síntese de DNA

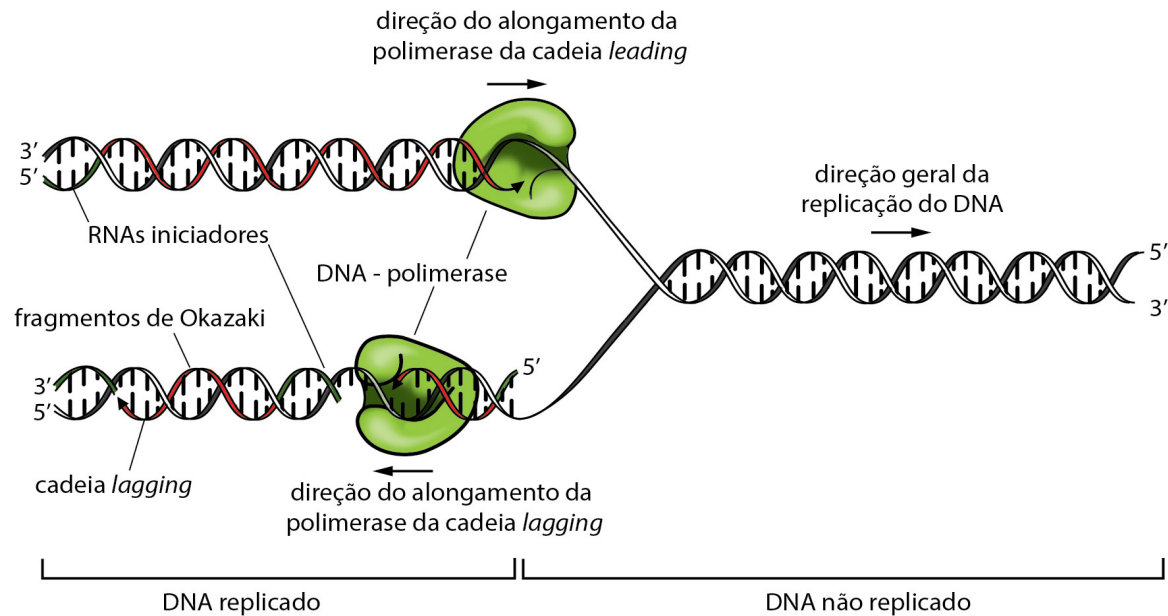
Como já mencionamos, a atividade de síntese das polimerases do DNA é adicionar nucleotídeos na extremidade  $3'$ -OH livre de uma cadeia em crescimento. Isso quer dizer que as polimerases do DNA requerem a presença de uma extremidade  $3'$ -OH livre de um nucleotídeo corretamente emparelhado à cadeia molde para poderem atuar. Assim, as polimerases do DNA não conseguem iniciar uma síntese, ou seja, adicionar um primeiro nucleotídeo sobre uma cadeia molde. Essa conclusão nos leva a fazer a seguinte pergunta: como, então, é iniciada a síntese de cada fragmento de Okazaki?

### A primase do DNA e a síntese do *primer* de RNA

Para que a polimerase III do DNA comece uma polimerização é necessário que uma outra enzima adicione os primeiros nucleotídeos. Essa enzima é uma polimerase especial que catalisa a síntese de um pequeno fragmento de RNA sobre a cadeia molde do DNA, o qual atua como iniciador para a polimerase III do DNA adicionar desoxirribonucleotídeos. O fragmento de RNA iniciador de uma cadeia de DNA, que em bactéria tem cerca de 5 a 10 nucleotídeos, é chamado de **primer de RNA** e a enzima que catalisa sua síntese é denominada **primase do DNA**.

A primase do DNA atua no início da replicação, sintetizando o *primer* necessário para começar a síntese da cadeia *leading*, e também durante todo o processo, sintetizando os *primers* necessários para o início da síntese de cada fragmento de Okazaki. Isso é necessário porque após completar um fragmento de Okazaki a polimerase do DNA da cadeia *lagging* precisa iniciar a síntese de um novo fragmento.

Os *primers* de RNA são sintetizados a intervalos regulares sobre a cadeia molde da cadeia *lagging* e são, em seguida, alongados pela polimerase III para gerar os fragmentos de Okazaki. A síntese de cada fragmento de Okazaki termina quando a polimerase do DNA atinge o *primer* de RNA ligado à extremidade 5' do fragmento sintetizado anteriormente. (Fig. 6)

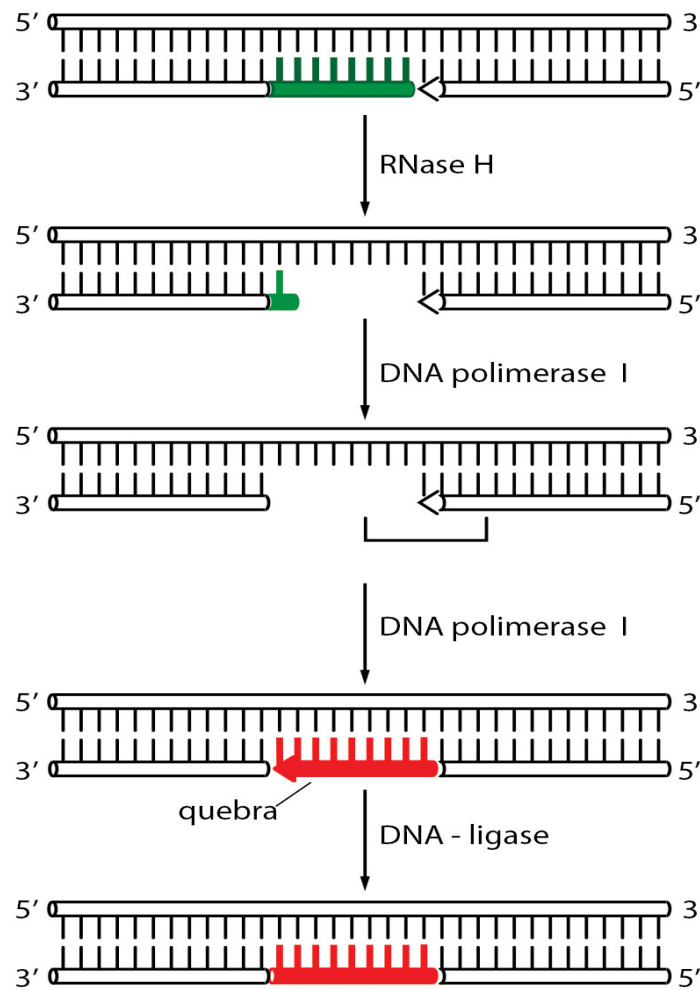


**Figura 6.** Forquilha de replicação mostrando a presença de *primers* de RNA na síntese descontínua da cadeia *lagging*. Os *primers* estão representados em verde.

## A substituição dos *primers* por um segmento de DNA

Nas proximidades da forquilha de replicação, a cadeia *lagging* é constituída, portanto, por fragmentos de Okazaki contendo, na extremidade 5', os *primers* de RNA dispostos linearmente ao longo da cadeia molde. Os *primers* de RNA precisam ser removidos e substituídos por segmentos de DNA antes de os fragmentos de Okazaki serem unidos entre si.

Para substituir os *primers* de RNA por DNA, inicialmente uma enzima chamada de **RNase H** identifica e remove cada iniciador de RNA, pois é uma enzima que degrada híbridos de DNA/RNA. A RNase H remove o iniciador de RNA. A remoção do iniciador de RNA deixa uma lacuna do DNA que é o substrato para a atividade de uma DNA polimerase I. A DNA polimerase preenche essa lacuna, deixando uma molécula de DNA completa, exceto por uma quebra (*nick*) no esqueleto fosfodiéster da cadeia *lagging*. O selamento dessa quebra é o último passo no amadurecimento da cadeia *lagging* e é realizado por uma enzima chamada **ligase do DNA**. Essa enzima catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre o grupo 3'-OH livre da extremidade de um fragmento de Okazaki e o grupo 5' fosfato de um fragmento de Okazaki adjacente. Essa reação demanda energia fornecida pela hidrólise de uma molécula de ATP. Essa sucessão de eventos de remoção dos *primers* até o selamento das quebras está representado na Figura 7. Como a DNA polimerase I bacteriana tem atividade exonucleolítica no sentido 5' → 3', é possível que nas bactérias ela sozinha consiga substituir o iniciador de RNA por DNA, sem a necessidade de RNase H.



**Figura 7.** Remoção do iniciador (*primer*, em verde) da replicação do DNA recém-sintetizado. As funções sequenciais da RNase H, da DNA polimerase I e da ligase estão representadas.

## Outras proteínas que atuam na replicação do DNA

O mecanismo de replicação semiconservativa exige que a hélice do DNA seja aberta de modo que as bases de suas cadeias fiquem expostas para o emparelhamento dos dNTPs que irão constituir as novas cadeias polinucleotídicas. A hélice do DNA é, no entanto, bastante estável. Basta dizer que para separar as duas cadeias da molécula de DNA em um tubo de ensaio, um fenômeno denominado **desnaturação**, é necessário cerca de 100°C.

### As enzimas que abrem a hélice do DNA: as helicases

O desenrolamento da hélice de DNA e a separação das cadeias polinucleotídicas durante a replicação é catalisada por enzimas denominadas helicases.

As helicases se movem ativamente sobre fitas simples de DNA em um processo que depende de energia, a qual é fornecida pela hidrólise do ATP. Se nesse seu deslocamento sobre uma cadeia de DNA a helicase encontrar uma região de hélice dupla, ela continua a se mover sobre a cadeia onde se encontra separando-a, desse modo, da outra cadeia e desfazendo a hélice. (Fig. 8)



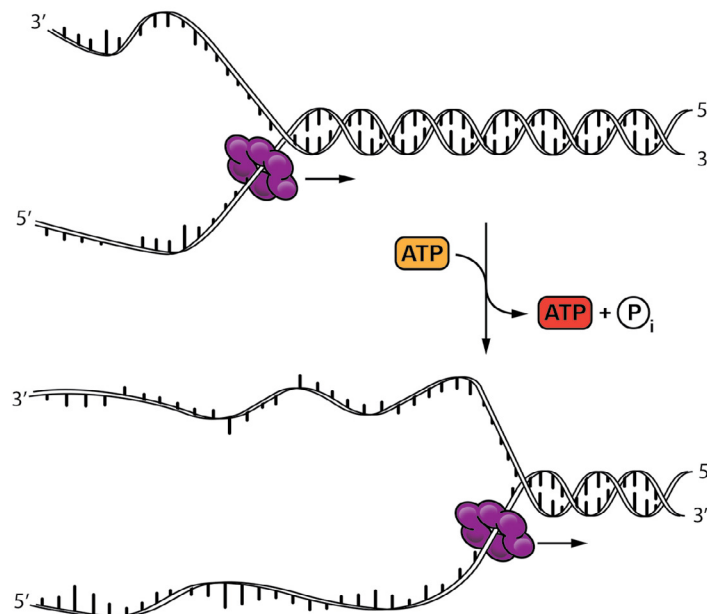


Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de ação da helicase (representada em roxo).

## Proteínas que impedem a renaturação do DNA

Duas cadeias complementares de ácidos nucleicos têm uma tendência muito grande em se associarem, tomando a configuração de hélice: um fenômeno conhecido como **hibridação**. Mesmo segmentos de uma mesma cadeia com sequências complementares de bases tendem a se unir com conseqüente dobramento da molécula e formação de estruturas em dupla-hélice, que são denominadas *hairpins* por se assemelharem a grampos de cabelo. As cadeias complementares de uma molécula de DNA mantêm-se separadas na região da forquilha de replicação e sem formarem *hairpins* graças a ação de proteínas especiais denominadas SSB (do inglês, *Single Strand DNA-Binding - proteínas ligantes a DNA de cadeia simples*).

As proteínas SSB interagem especificamente com cadeias simples de DNA sem, no entanto, cobrir suas bases, as quais ficam disponíveis para servirem de molde para a síntese da cadeia complementar. Assim, essas proteínas, apesar de não serem capazes de abrir uma hélice de DNA, são imprescindíveis para manter as duas cadeias separadas e sem se dobrar sobre elas mesmas.

As proteínas SSB atuam cooperativamente, isto é, a ligação de uma delas facilita a ligação das seguintes, de modo que a cadeia recém-aberta vai progressivamente sendo recoberta por moléculas dessa proteína. A presença de diversas moléculas de proteínas SSB sobre uma cadeia simples de DNA produz uma conformação estendida e pouco flexível, favorável à ação da polimerase III. À medida que as cadeias complementares vão sendo sintetizadas, as proteínas SSB se soltam do DNA, uma vez que elas não têm afinidade por dupla-hélice. (Fig. 9)

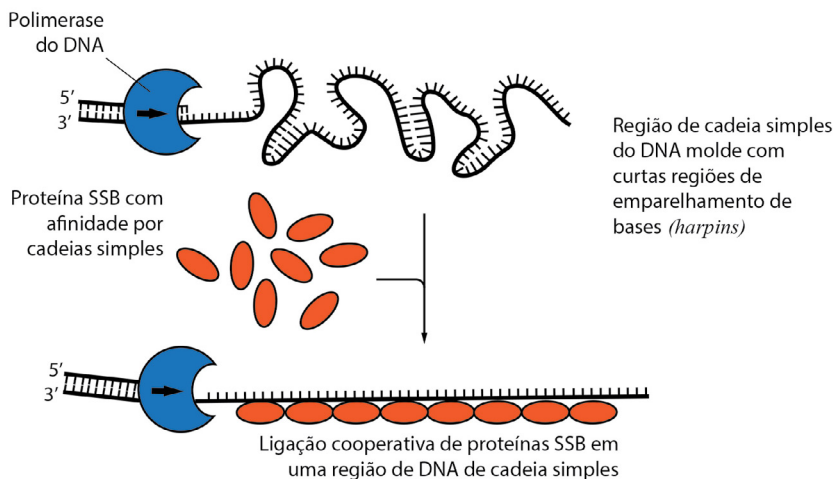
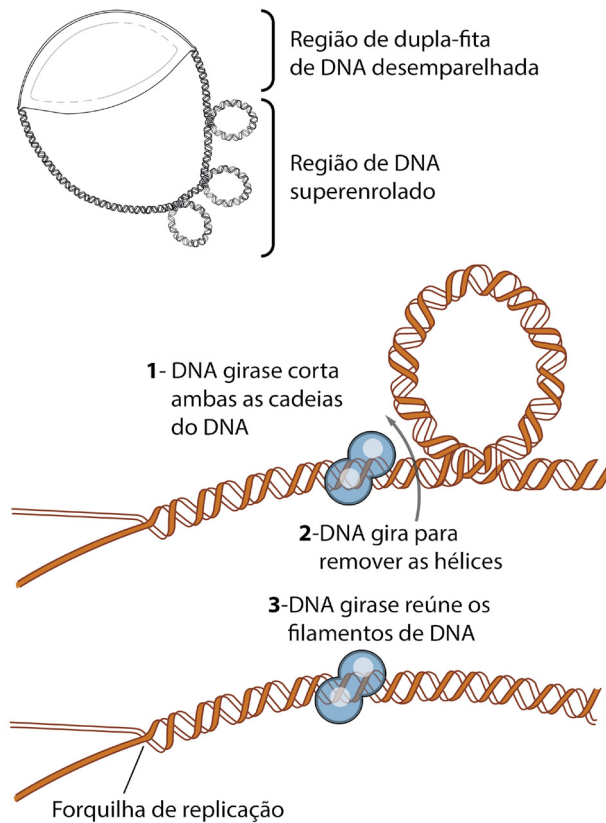


Figura 9. Efeito da ligação das proteínas SSB a uma cadeia simples de DNA. Como cada molécula da proteína SSB prefere se ligar junto a uma outra molécula SSB já unida ao DNA (ligação cooperativa), formam-se longas fileiras dessa proteína sobre uma cadeia simples de DNA. Isso distende a cadeia de DNA mantendo-a em uma configuração favorável para atuar como molde para a síntese da cadeia complementar.

## O relaxamento da hélice pela topoisomerase

A separação das duas cadeias de uma molécula de DNA provoca um superenrolamento da hélice na região imediatamente à frente da forquilha de replicação. Isso ocorre porque, para desemparelhar 10 pares de nucleotídeos, a hélice do DNA tem que sofrer um giro completo ao redor de seu eixo. Assim, à medida que a forquilha de replicação se move, todo o cromossomo à sua frente teria de girar rapidamente, na mesma velocidade em que as bases são desemparelhadas, ou seja, cerca de 100 giros por segundo, uma vez que a forquilha de replicação em bactérias se move à incrível velocidade de 1000 nucleotídeos por segundo. Como o cromossomo todo não tem condições de girar nessa velocidade, ocorre um superenrolamento positivo que bloquearia a abertura da hélice, caso não fosse removido. A estratégia usada para evitar o superenrolamento é a introdução de cortes (*nicks*) em uma das cadeias do DNA, feitos pela **topoisomerase II**. (Fig. 10)



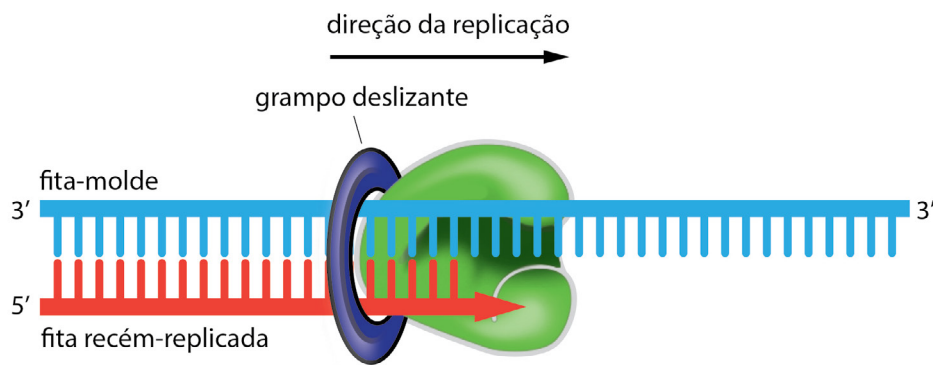
**Figura 10.** O papel da topoisomerase II na replicação do DNA. À medida que se duplica, uma molécula de DNA acumula regiões de superenrolamento positivo à frente da forquilha de replicação. A ação da topoisomerase II (girase) é requerida para relaxar essas regiões superenroladas e permitir a continuidade da replicação.

## O Replissomo

A maioria das proteínas que atuam na replicação do DNA ficam associadas formando um grande complexo multienzimático denominado replissomo, o qual se desloca com a forquilha de replicação.

Um replissomo é formado basicamente por duas polimerases III do DNA (uma que sintetiza a cadeia *leading* e outra que sintetiza a cadeia *lagging*) associadas a um subcomplexo enzimático chamado **primossomo**.

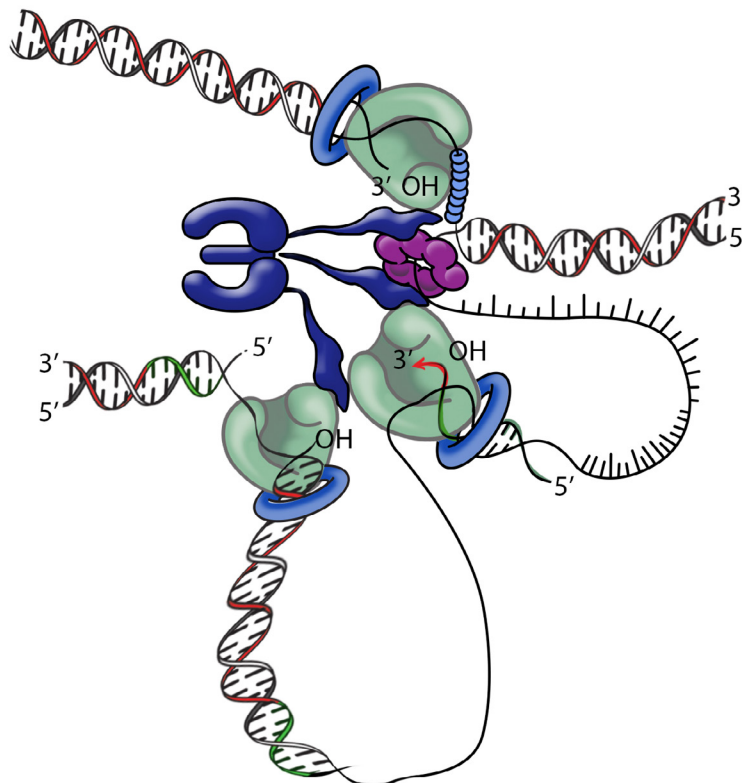
A DNA polimerase III do DNA tem alta processividade, isto é, uma vez associada à cadeia molde ela não se solta facilmente e sintetiza continuamente a nova cadeia complementar até encontrar algum bloqueio ao seu deslocamento. Nesse ponto ela difere das demais polimerases do DNA que conseguem sintetizar apenas uma curta cadeia de nucleotídeos antes de se soltar da cadeia molde. A processividade da polimerase III do DNA é explicada pelo fato de ela estar associada a uma proteína que forma um anel ao redor da cadeia molde, mantendo dessa forma a polimerase firmemente presa ao molde. Essa proteína desliza livremente sobre a cadeia molde de DNA, mas se solta dela tão logo a polimerase pare. (Fig. 11). Ela tem sido chamada de proteína do grampo deslizante.



**Figura 11.** Representação esquemática da união da polimerase III do DNA com a proteína em anel (grupo deslizante) responsável por sua alta processividade. A proteína em anel mantém a polimerase presa à cadeia molde ao mesmo tempo em que permite seu livre deslizamento sobre o molde durante a replicação.

Associada à polimerase do DNA que copia a cadeia *leading* existe uma helicase. Essa helicase desliza sobre a cadeia *leading* abrindo a hélice à sua frente. Dessa abertura participa também outra helicase, que também faz parte do primossomo, e as proteínas SSB, que se associam ao molde da cadeia *lagging*.

O termo primossomo tem sido utilizado para descrever o complexo de proteínas responsável pela colocação dos *primers*. O primossomo é constituído pela primase do DNA e por vários outros polipeptídeos, alguns dos quais formam a helicase. Ele move-se imediatamente atrás da forquilha de replicação, portanto, a uma velocidade de 1000 nucleotídeos por segundo. A cada segundo, mais ou menos, a primase sintetiza um curto *primer* com cerca de um a três nucleotídeos, o qual é alongado em um fragmento de Okazaki por ação da polimerase III associada ao molde da cadeia *lagging*. (Fig. 12)



**Figura 12.** Representação esquemática de uma forquilha de replicação, mostrando a visão atual sobre organização básica de um replissomo. Em verde estão representadas três polimerases III do DNA. Em roxo, a helicase. Em azul escuro, estão mostradas as proteínas do grupo deslizante. Na molécula de DNA a cor verde indica os primers, a cor azul o DNA que não foi replicado e a cor vermelha indica o DNA recém replicado. E estrutura em forma de "garfo" em azul-marinho representa a proteína carregadora do grupo e proteínas t, que contribuem para manter as polimerases do DNA unidas.

Acredita-se que as proteínas responsáveis pela síntese da cadeia *lagging* se mantenham na forquilha de replicação, como parte integrante do replissomo, graças a uma dobra (ou alça) que a cadeia molde da cadeia *lagging* faz para trás. Desse modo, as duas cadeias sendo sintetizadas na forquilha de replicação ficam com a mesma polaridade.

Quando a polimerase III do DNA responsável pela síntese da cadeia *lagging* encontra um *primer* de RNA ligado a um fragmento de Okazaki, ela se solta da cadeia molde e se move no sentido da forquilha de replicação até encontrar um *primer* de RNA seguinte. (Fig. 13). Nos modelos mais recentes da forquilha de replicação, são representadas três polimerases do DNA do tipo III fazendo parte do replissomo. Atualmente acredita-se que duas polimerases do DNA se revezam na síntese dos fragmentos de Okazaki da cadeia *lagging*, enquanto uma única polimerase III sintetiza continuamente a cadeia *leading*. Essa estrutura de replissomo inclui uma proteína “carregadora” da proteína do grampo deslizante e outras proteínas que fazem a articulação entre as diversas estruturas do replissomo.

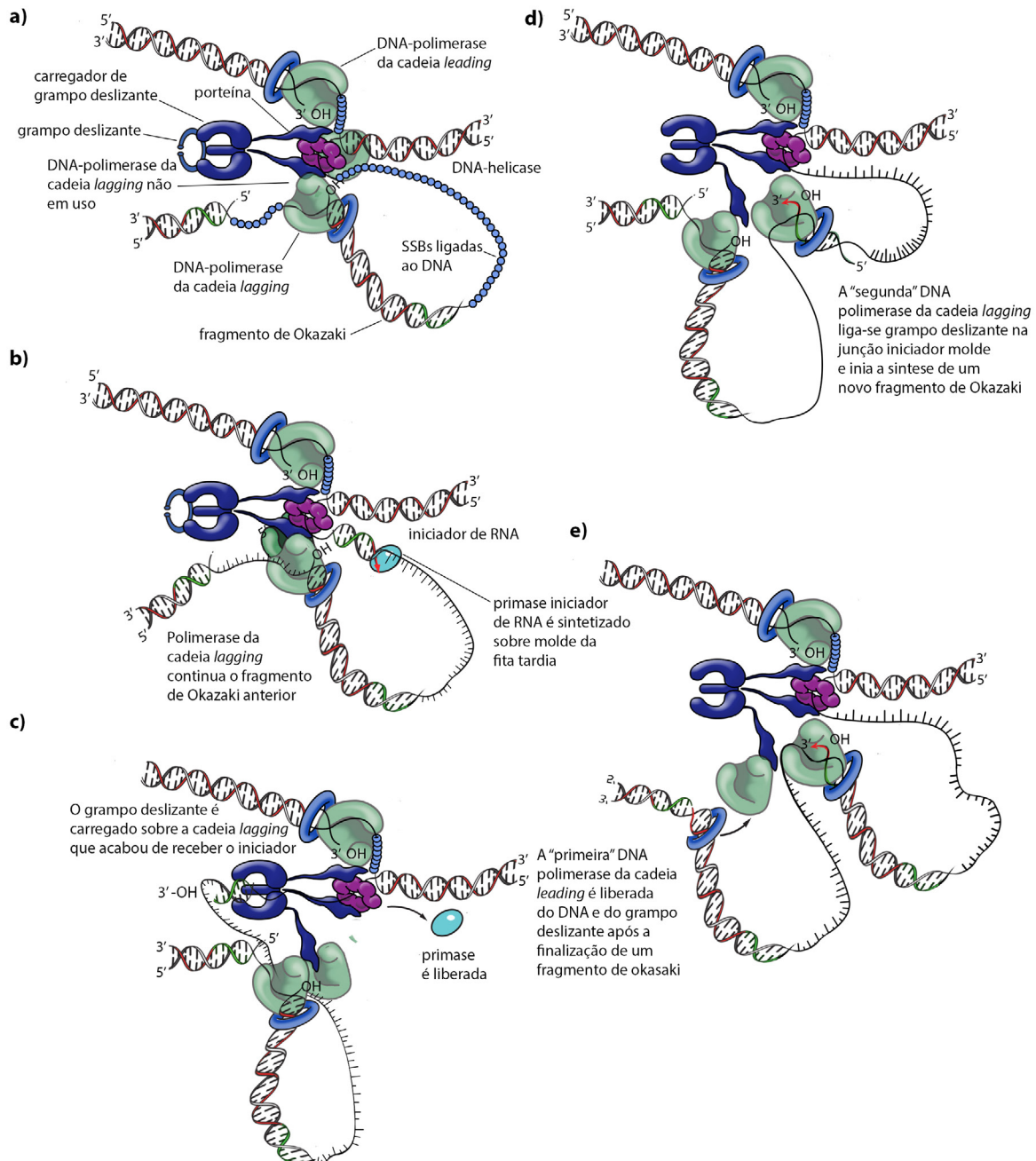


Figura 13. Representação esquemática da síntese simultânea das cadeias *leading* (líder) e *lagging* (tardia) em uma forquilha de replicação.

Assim, as polimerases III do DNA que atuam na forquilha de replicação, apesar de equivalentes, são ligeiramente diferentes: uma delas, a que sintetiza a cadeia *leading*, possui alta processividade, nunca se soltando da cadeia molde; as outras, que sintetizam a cadeia *lagging*, podem se soltar da cadeia molde quando encontram a extremidade 5' de um *primer* em seu caminho, reiniciando a síntese na extremidade 3'-OH do *primer* seguinte.

# A iniciação nas origens de replicação

## O que são replicons?

O segmento de DNA que se replica a partir de uma origem de replicação é denominado **replicon**. Assim, o cromossomo das bactérias contém um único replicon, enquanto os cromossomos dos organismos eucarióticos contêm vários.

Os sítios específicos nos quais o DNA é desenrolado e a iniciação da replicação ocorre são chamados de **origens de replicação**.

## A origem de replicação do cromossomo bacteriano

A replicação do cromossomo da bactéria *E. coli*, o qual é constituído por uma molécula circular de DNA, tem início em um único sítio denominado **origem de replicação** ou **oriC**. A partir desse sítio formam-se duas forquilhas de replicação que se movem em sentidos opostos até se encontrarem em um ponto diametralmente oposto ao da origem de replicação. (Fig. 14)

A origem de replicação da bactéria *E. coli* consiste de uma sequência de cerca de 245 nucleotídeos.

Existem dois motivos repetidos que são fundamentais para a origem **oriC**. Um motivo de 9 nucleotídeos, repetido 5 vezes, é o sítio de ligação para uma proteína iniciadora de *E. coli*, chamada de DnaA. Um motivo de 13 nucleotídeos, repetido três vezes, é o local inicial da formação de DNA em simples-fita no início da replicação.

Partes dessas sequências estão presentes nas origens de replicação de outras espécies de bactérias estudadas. O fato de as origens de replicação serem evolutivamente conservadas entre espécies bacterianas indica que a sequência de nucleotídeos que as constituem são importantes para a função biológica e que eles devem interagir com proteínas igualmente conservadas. Embora as sequências nucleotídicas sejam diferentes, as estruturas gerais das origens de replicação de alguns vírus eucarióticos e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* guardam semelhanças com a origem de replicação bacteriana.

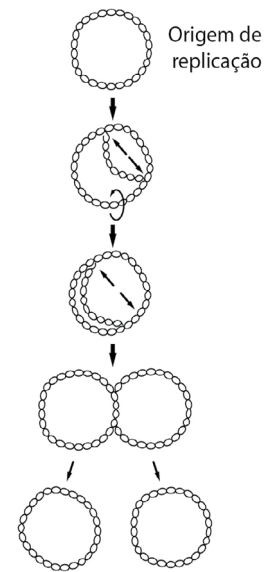


Figura 14. Esquema da replicação bidirecional de um cromossomo circular.

## Etapas da formação do replissomo

A proteína iniciadora bacteriana DnaA se liga ao DNA na região das sequências repetidas de 9 nucleotídeos mas também interagem com o DNA nas regiões repetidas de 13 nucleotídeos. O complexo formado pela interação do DNA com as proteínas DnaA faz com que a hélice de DNA se abra ligeiramente em uma região adjacente ao complexo. A exposição de cadeias simples de DNA fornece um molde para que as demais proteínas de replicação possam agir, mas isso só não é suficiente. A DnaA recruta proteínas de replicação adicionais para o DNA de fita simples, incluindo a DNA helicase (DnaB) e a proteína carregadora da helicase (Dna C). As cadeias são mantidas separadas pela interação com proteínas SSB. (Fig. 15).

Um segundo conjunto das proteínas DnaB e DnaC se liga à extremidade oposta da região aberta da hélice, dando origem a um segundo complexo de início de replicação.

As interações proteína-proteína entre a helicase e os componentes da forquilha de replicação promovem a organização do restante da maquinaria de replicação, com outras proteínas se unem então a cada um dos dois complexos. A helicase recruta a primase do DNA, que vai interagir com cada uma das cadeias do DNA e sintetizar o primer das cadeias *leadings* das forquilhas de replicação opostas. Finalmente, a cada primossomo se juntam duas polimerases III do DNA, cada uma delas interagindo com uma das cadeias moldes na forquilha de replicação. Com isso se completa a montagem dos dois replissomos que passam a se mover a partir da origem de replicação, em sentidos opostos. É o fato de a molécula de DNA se replicar nos dois sentidos a partir de uma mesma origem que faz com que o processo seja chamado de **replicação bidirecional**.

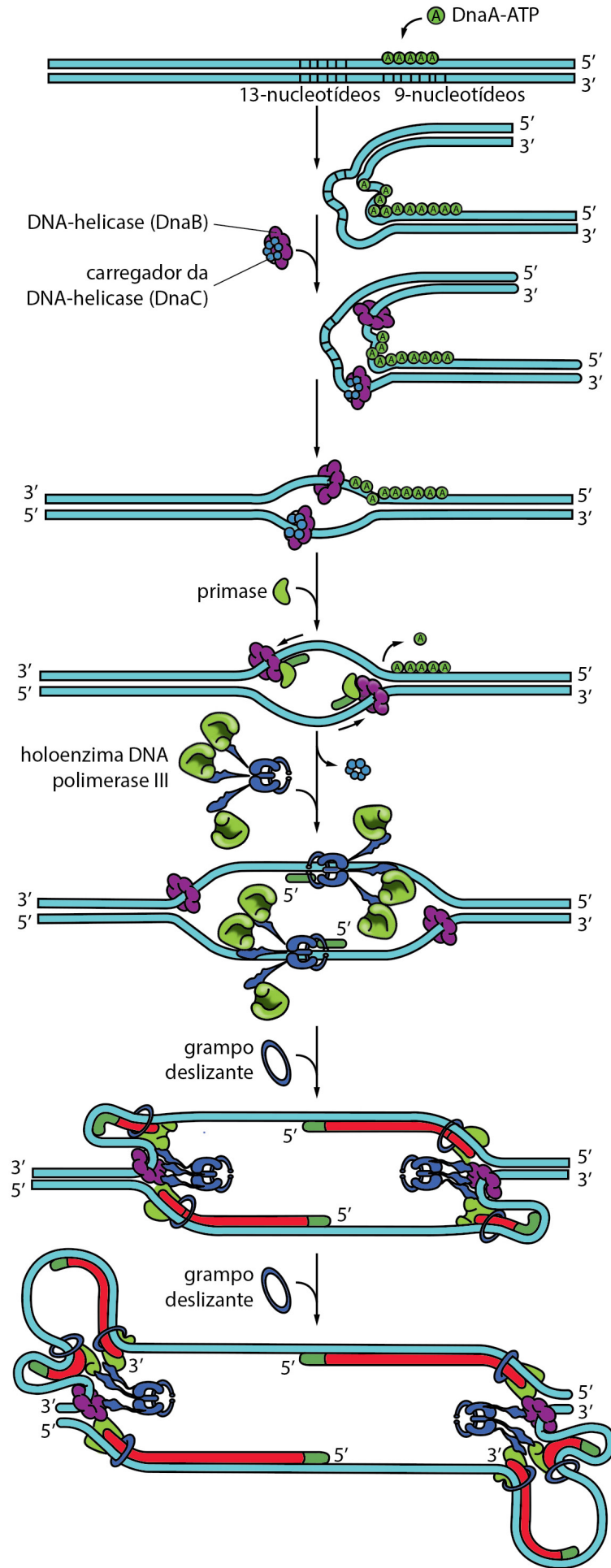


Figura 15. Representação esquemática da iniciação da replicação do DNA.

# Aspectos da replicação do DNA em eucariontes

A maior parte do conhecimento que temos sobre a replicação do DNA vem de estudos *in vitro* com sistemas multienzimáticos de bactérias e vírus. Em comparação a esses sistemas, bem menos é conhecido sobre a replicação do DNA em eucariontes. Isso decorre da dificuldade em se obterem mutantes eucariontes deficientes em replicação do DNA. Apesar disso, os dados disponíveis sobre eucariontes permitem dizer que a replicação do DNA nesses organismos é fundamentalmente semelhante à replicação em procariontes. Os mecanismos básicos de replicação do DNA, como geometria da forquilha e composição da maquinaria de replicação, são semelhantes em procariontes e eucariontes.

## A velocidade de replicação do DNA em eucariontes

As diferenças entre os mecanismos de replicação do DNA em pro e eucariontes são devidas em parte ao maior tamanho do DNA eucariótico, mas também à maneira como ele está empacotado com proteínas, na forma de nucleossomos. É, provavelmente, a necessidade de desempacotar o DNA das histonas para replicá-lo, que faz com que a forquilha de replicação no DNA eucariótico se mova com uma velocidade cerca de 10 vezes menor do que no DNA procariótico, ou seja, a cerca de 100 nucleotídeos por segundo.

## O tamanho dos fragmentos de Okazaki em eucariontes

Imagina-se que seja também a presença dos nucleossomos que faz com que os fragmentos de Okazaki dos eucariontes sejam menores do que os dos procariontes. A primase dos eucariontes também sintetiza um *primer* de RNA da cadeia *lagging* a cada segundo, mas, como a forquilha de replicação se move mais lentamente, os fragmentos de Okazaki são mais curtos. Nos eucariontes esses fragmentos têm entre 100 e 200 nucleotídeos que é aproximadamente o espaçamento entre os nucleossomos.

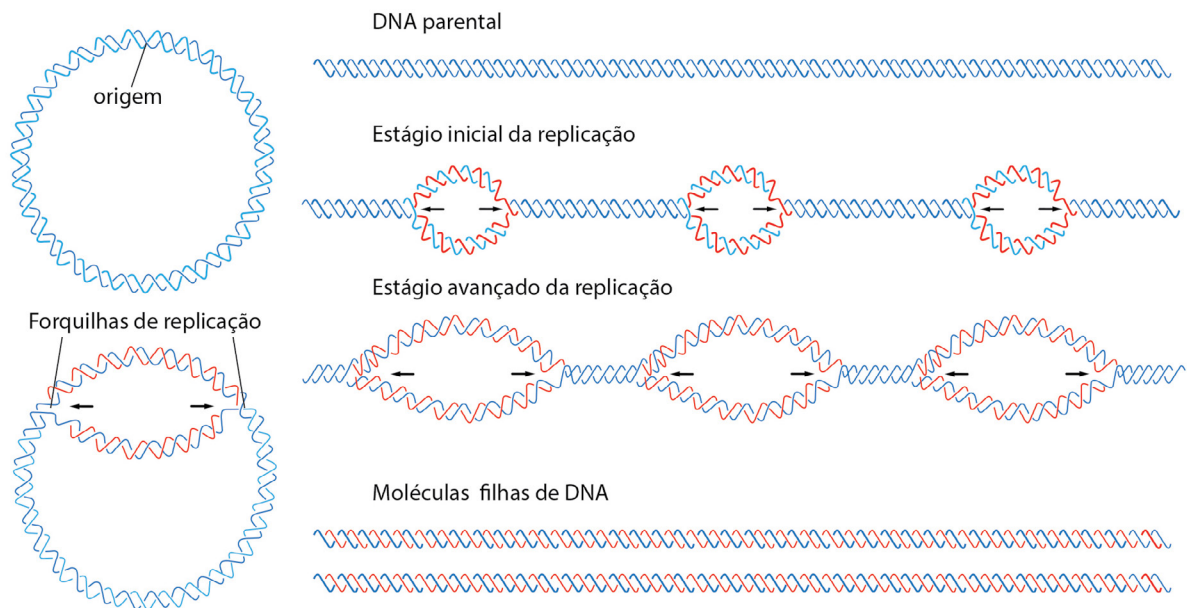
## As polimerases do DNA em eucariontes

Uma outra diferença entre a replicação do DNA em procariontes e eucariontes refere-se às polimerases do DNA. Já foram descritos treze tipos diferentes de polimerase do DNA em eucariontes, mas as mais importantes na replicação são as designadas pelas letras gregas  $\epsilon$  e  $\delta$ , que replicam as cadeias *leading* e *lagging*, respectivamente. A polimerase  $\gamma$  está presente nas mitocôndrias, sendo responsável pela replicação do DNA dessa organela citoplasmática. As demais polimerases estão relacionadas a complexos mecanismos de reparo de lesões na molécula de DNA.

## Origens múltiplas de replicação em eucariontes

A necessidade de replicar todo o DNA eucariótico apenas durante a fase S do ciclo celular representa um desafio. Por isso, os eucariontes possuem muitas origens de replicação. Estima-se que as origens de replicação estão localizadas a uma distância de 30 kb, portanto, um cromossomo eucariótico pequeno tem mais de 10 origens e um cromossomo grande tem milhares delas. Então, uma diferença importante entre os mecanismos de replicação de procariontes e eucariontes refere-se à quantidade e à natureza das origens de replicação. Enquanto as bactérias apresentam apenas uma origem de replicação em seu cromossomo, a replicação de uma molécula de DNA eucariótico inicia-se em diversos sítios. A existência de múltiplos sítios de origem de replicação é fundamental para que as enormes moléculas de DNA dos eucariontes se repliquem em períodos de tempo curtos, compatíveis com a duração do ciclo celular. Em certos casos, como durante a fase embrionária, existem tantas origens que o maior conjunto gênico eucariótico pode ser replicado em menos de 1 hora.

A partir de cada origem de replicação, as duas forquilhas movem-se em sentidos opostos até se encontrarem com as forquilhas originadas em origens vizinhas. As bolhas de replicação, que se movem em sentidos opostos, então se fundem para formar bolhas maiores. (Fig. 16)



**Figura 16.** Representação esquemática da replicação bidirecional em procariotes (à esquerda) e em eucariotes (à direita).  
 (a) Replicação do cromossomo de *E. coli*, com uma única origem de replicação; portanto, com um único replicon.  
 (b) Replicação de um cromossomo de eucariote, com três sítios de origem de replicação; portanto, com três replicons.

## A origem de replicação do DNA dos eucariotes

Sequências específicas de bases características das origens de replicação, como as existentes em bactérias, só foram caracterizadas em leveduras e em vírus de mamíferos. Nos demais eucariotes ainda se conhece muito pouco a respeito dos sítios de origem de replicação; parece que eles se localizam em pontos onde a cromatina se liga a proteínas do citoesqueleto nuclear, mas não se tem certeza disso.

## A síntese das histonas durante a replicação do DNA

Durante a replicação do DNA no núcleo de uma célula, ocorre a síntese das histonas no citoplasma. Apesar de ocorrerem por meio de mecanismos completamente diferentes e em locais diversos da célula, essas duas sínteses são sincronizadas tanto temporal quanto quantitativamente. Assim, a quantidade de histonas dobra em paralelo à duplicação da quantidade de DNA.

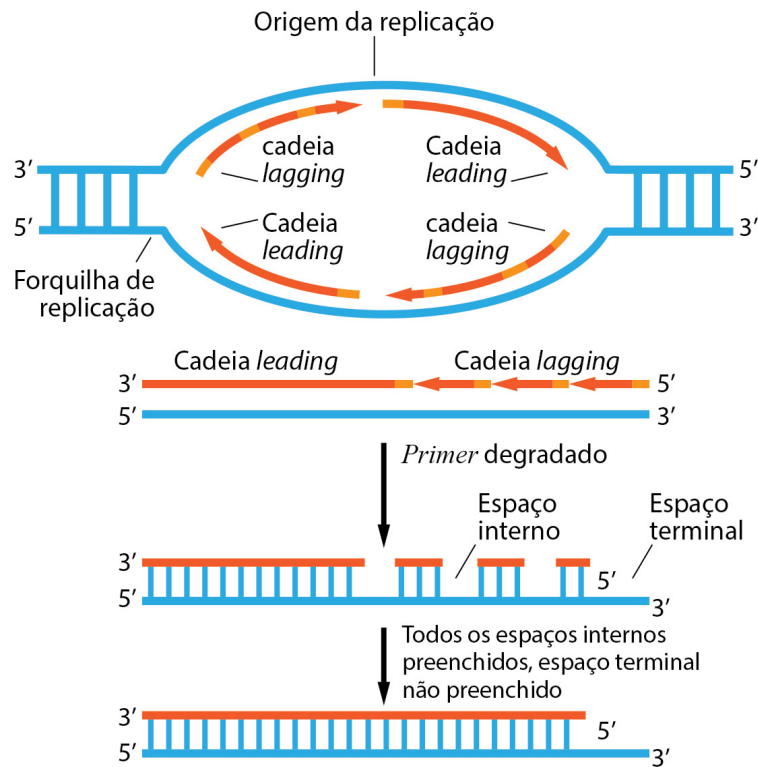
Existem evidências de que aos nucleossomos das cromátides recém-replicadas têm seus octâmeros em parte constituídos por histonas que herdaram dos cromossomos antigos e em parte constituídos por histonas recém-sintetizadas.

## O problema da replicação nas extremidades dos cromossomos

A replicação da molécula de DNA em um cromossomo eucariótico linear ocorre em ambas as direções a partir de várias origens, como mostrado na Figura 16. Esse processo replica a maior parte do DNA eucariótico, mas há um problema ao replicar as extremidades dos cromossomos, nas regiões terminais chamadas de telômeros. A síntese da cadeia *leading* pode ocorrer até a ponta do cromossomo. Mas a síntese da cadeia *lagging* requer *primers* à sua frente. Assim, quando o último *primer* é removido, resta uma ponta de DNA não replicado na extremidade do cromossomo (Figura 17) Caso esse cromossomo-filho fosse replicado novamente, o resultado seria um cromossomo com dupla-fita de DNA mais curto que o da geração celular anterior. A cada ciclo subsequente, a região telomérica do cromossomo tende a encurtar. Regiões codificadores importantes poderiam ser perdidas nesse processo se as células não tivessem um sistema especializado para compensar essa perda. Esse sistema, cujo componente principal é uma enzima chamada de **telomerase**, é capaz de adicionar múltiplas cópias de uma curta sequência nucleotídica em extremidades 3' dos cromossomos eucarióticos. Esse processo é capaz de recuperar as extremidades cromossômicas perdidas em situações especiais e em certos tipos celulares, garantindo que não haja uma erosão desastrosa dos cromossomos eucarióticos.



Conforme veremos em outra unidade do curso, a telomerase é uma enzima capaz de realizar a transcrição reversa, pois sintetiza curtos segmentos de DNA a partir de uma molécula-molde de RNA, um de seus principais componentes.



**Figura 17.** Representação esquemática do problema da replicação das extremidades dos cromossomos lineares em eucariontes. A figura indica que a remoção dos primers das extremidades dos cromossomos não pode ser seguida pelo preenchimento do espaço restante por uma polimerase do DNA, pois não há extremidade 3'OH para que ocorra o início da replicação dessa cadeia.

# EXERCÍCIOS

## BLOCO I

### Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Preencha os espaços em branco nas frases 1 a 8 usando o termo abaixo mais apropriado:

- (a) polimerase do DNA.
- (b) replicação semiconservativa.
- (c) resíduo de nucleotídeo.
- (d) polimerização.
- (e) polinucleotídeo.
- (f) mutação.
- (g) cadeia molde.
- (h) hidrólise.

1. ( ) é aquela em que cada molécula filha conserva uma das cadeias polinucleotídicas da molécula mãe.
2. A fita de DNA que orienta a formação da fita complementar é chamada ( ).
3. A enzima que catalisa a formação das ligações fosfodiéster entre desoxirribonucleotídeos é chamada ( ).
4. ( ) é uma reação em que compostos químicos semelhantes são unidos para formar macromoléculas.
5. ( ) é um polímero, cujos monômeros são constituídos por fosfato, açúcar e base nitrogenada.
6. Cada uma das unidades que formam uma molécula de DNA é chamada ( ).
7. A quebra de uma substância em decorrência de sua reação química com a água é chamada ( ).
8. Uma alteração hereditária na molécula de DNA é chamada ( ).

Preencha os espaços em branco nas frases 9 a 14 usando o termo abaixo mais apropriado:

- (a) cadeia *leading*.
  - (b) cadeia *lagging*.
  - (c) forquilha de replicação.
  - (d) fragmento de Okazaki.
  - (e) síntese descontínua.
  - (f) síntese semidescontínua.
9. O ponto onde as duas cadeias de uma hélice de DNA se separam, em decorrência da formação de novas cadeias, é chamado ( ).
  10. A polimerização de curtas seqüências de nucleotídeos, que são posteriormente unidos para formar uma cadeia de DNA, é chamada ( ).
  11. A denominação ( ) para a replicação do DNA deve-se ao fato de uma das cadeias filhas ser fabricada aos pedaços enquanto que a outra é fabricada continuamente.
  12. A cadeia polinucleotídica sintetizada continuamente na replicação do DNA é chamada ( ).

13. A cadeia polinucleotídica sintetizada aos pedaços na replicação do DNA é chamada ( ).
14. Cada uma das curtas sequências de nucleotídeos sintetizadas durante a replicação do DNA, que são posteriormente unidas para formar uma das cadeias filhas, é chamada ( ).

## Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

15. O substrato das polimerases do DNA são desoxirribonucleotídeos
- 3' monofosfatados.
  - 3' trifosfatados.
  - 5' monofosfatados.
  - 5' trifosfatados.

Indique nos parêntesis se as frases listadas nas questões de 16 a 21 são falsas (F) ou verdadeiras (V).

16. Uma molécula de DNA, ao se replicar, produz duas moléculas filhas, cada uma com uma cadeia polinucleotídica da molécula mãe e outra, recém-sintetizada. ( )
17. O processo de síntese de DNA requer que as duas fitas da dupla hélice estejam separadas, pelo menos transitoriamente, de modo que grupos doadores e receptores de pontes de hidrogênio estejam expostos para orientar o emparelhamento das bases. ( )
18. Pelo fato de cada uma das duas moléculas resultantes de uma replicação do DNA conter uma cadeia polinucleotídica nova e outra velha, diz-se que o DNA é replicado descontinuamente pela DNA polimerase. ( )
19. Durante a replicação do DNA, cada uma das cadeias polinucleotídicas serve de molde para a formação de fragmentos de Okazaki. ( )
20. A região ativa na replicação do DNA, em forma de letra Y, é chamada forquilha de duplicação. ( )
21. Na forquilha de replicação atuam duas polimerases do DNA, uma que catalisa o crescimento da cadeia polinucleotídica no sentido  $5' \rightarrow 3'$  e outra que catalisa a síntese no sentido inverso. ( )
22. Em uma forquilha de replicação
- a cadeia *leading* cresce no sentido  $5' \rightarrow 3'$  e a *lagging*, no sentido  $3' \rightarrow 5'$ .
  - a cadeia *leading* cresce no sentido  $3' \rightarrow 5'$  e a *lagging*, no sentido  $5' \rightarrow 3'$ .
  - ambas as cadeias crescem no sentido  $5' \rightarrow 3'$ .
  - ambas as cadeias crescem no sentido  $3' \rightarrow 5'$ .
23. Em uma forquilha de replicação
- a cadeia *leading* cresce descontinuamente, enquanto que a *lagging* cresce continuamente.
  - a cadeia *leading* cresce continuamente, enquanto que a *lagging* cresce descontinuamente.
  - ambas as cadeias crescem continuamente.
  - ambas as cadeias crescem descontinuamente.

## Parte C: Aplicando Conceitos

24. Por meio de que processo é obtida a energia necessária à replicação do DNA?
25. Qual seria a importância da atividade exonucleolítica  $3' \rightarrow 5'$  das polimerases do DNA?

26. Qual a função das diferentes polimerases do DNA presentes na bactéria *Escherichia coli*?
27. Comente a frase: “Uma polimerase do DNA que efetuasse a polimerização no sentido 3' → 5' não teria como autocorrigir seus erros de incorporação.”
28. Defina cadeia *leading* e cadeia *lagging* do DNA.
29. O que são fragmentos de Okazaki?

## Parte D: Resolvendo Problemas

30. Esquematize uma forquilha de replicação indicando:
  - a. a polaridade das cadeias originais, ou seja, suas extremidades 5' e 3'.
  - b. as cadeias *leading* e *lagging*, com suas respectivas polaridades.
  - c. os fragmentos de Okazaki.

## BLOCO II

### Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Preencha os espaços em branco nas frases 31 a 38 usando o termo abaixo mais apropriado:

- (a) helicase
  - (b) ligase do DNA
  - (c) primase do DNA
  - (d) *primer* de RNA
  - (e) proteína SSB
  - (f) RNase H
  - (g) topoisomerase
31. A síntese das cadeias polideoxirribonucleotídicas no processo de replicação de DNA inicia-se a partir de uma curta cadeia ribonucleotídica chamada ( ).
  32. A síntese tanto da cadeia *leading* quanto de cada fragmento de Okazaki inicia-se a partir de uma curtíssima cadeia ribonucleotídica fabricada por ação do(a) ( ).
  33. Uma enzima que catalisa a degradação de uma cadeia de RNA emparelhada a uma cadeia de DNA é chamada ( ).
  34. A enzima que catalisa a formação de ligação fosfodiéster entre as extremidades 3'OH e 5' de dois segmentos adjacentes de DNA emparelhados a uma cadeia molde é chamada ( ).
  35. A separação das duas cadeias de uma molécula de DNA é catalisada pelo(a) ( ).
  36. O termo ( ) designa moléculas que se ligam a cadeias simples de DNA impedindo o processo de renaturação com cadeias complementares e a formação de *hairpins*.
  37. A enzima que atua na replicação do DNA relaxando o superenrolamento provocado pela separação das cadeias na forquilha de replicação é chamada ( ).

Preencha os espaços em branco nas frases 38 a 43 usando o termo abaixo mais apropriado:

- (a) complexo DnaB-DnaC.
- (b) origem de replicação.
- (c) primossomo.
- (d) proteína DnaA.
- (e) replicon.
- (f) replissomo.

38. O complexo enzimático que atua em uma forquilha de replicação promovendo a síntese das duas cadeias filhas de DNA é chamado ( ).
39. O complexo enzimático que atua na forquilha de replicação promovendo a síntese dos “RNA iniciadores” é chamado ( ).
40. O local da molécula de DNA onde se formam duas forquilhas de replicação que se deslocam em sentidos opostos é chamado ( ).
41. A proteína, cuja ligação cooperativa ao DNA provoca a abertura da hélice, com formação das forquilhas de replicação, é chamada ( ).
42. O ( ) se liga à região desnaturada da hélice do DNA iniciando a formação do replissomo.
43. ( ) é o nome que se dá à unidade de replicação do DNA, ou seja, ao segmento que se replica unitariamente a partir de um ponto de origem.

## Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

Utilize as alternativas abaixo para responder as questões 44 a 47.

- a. ligase do DNA.
  - b. primase do DNA.
  - c. polimerase I do DNA.
  - d. polimerase III do DNA.
44. Na bactéria *Escherichia coli*, a substituição dos ribonucleotídeos presentes na extremidade 5' dos fragmentos de Okazaki, por desoxirribonucleotídeos, é feita pela ( ).
45. Na bactéria *Escherichia coli*, a síntese do fragmento de RNA que inicia a síntese de uma cadeia de DNA é feita pela ( ).
46. Na bactéria *Escherichia coli*, a união dos fragmentos de Okazaki entre si é feita pela ( ).
47. Na bactéria *Escherichia coli*, a síntese das cadeias *leading* e *lagging* é feita pela ( ).
48. A abertura da hélice de DNA na forquilha de replicação é feita por enzimas conhecidas como
- a. helicases.
  - b. ligases.
  - c. primases.
  - d. topoisomerasas.

49. Em bactérias e em diversos vírus, as forquilhas de replicação se formam a partir de determinada região do DNA, caracterizada por uma sequência específica de bases conhecida como
- origem de replicação.
  - primossomo.
  - replicon.
  - replissomo.

Indique nos parêntesis se as frases nas questões de 50 a 58 são falsas (F) ou verdadeiras (V).

50. A perda da atividade exonucleolítica 3' → 5' da polimerase III do DNA em *E. coli* diminuiria a velocidade de replicação mas não afetaria sua fidelidade. ( )
51. As proteínas SSB nas forquilhas de replicação mantêm as duas cadeias desemparelhadas porque cobrem as bases nitrogenadas impedindo a formação de pontes de hidrogênio. ( )
52. Na forquilha de replicação, o DNA de ambas as cadeias filhas é sintetizado por um complexo protéico que contém uma polimerase do DNA para a cadeia *leading* e outra para a cadeia *lagging*. ( )
53. A cadeia *leading* só necessita de um *primer* inicial, pois, uma vez iniciada sua síntese, uma polimerase do DNA estará sempre presente na sua extremidade 3' OH onde incorpora novos nucleotídeos. ( )
54. A polimerase da cadeia *lagging*, ao completar um fragmento de Okazaki, precisa sintetizar um fragmento completamente novo, começando de um ponto distante do recém-sintetizado, a partir de um novo *primer* de RNA. ( )
55. Por si só, uma polimerase do DNA consegue sintetizar apenas uma curta cadeia de nucleotídeos antes de se soltar da fita molde. ( )
56. A primase do DNA fica ligada diretamente à helicase formando um complexo sobre o molde da cadeia *leading* chamado primossomo. ( )
57. Toda vez que a DNA polimerase da fita *lagging* encontra um *primer* de RNA ligado ao fragmento de Okazaki seguinte, ela solta a cadeia molde e se move no sentido da forquilha de replicação até encontrar outro *primer* de RNA. ( )

## Parte C: Aplicando Conceitos

58. A taxa de incorporação de nucleotídeos errados pelas polimerases do DNA é da ordem de um em dez mil. Como se explica, então, a altíssima fidelidade da replicação?
59. Explique sucintamente o papel da helicase, da topoisomerase II e das proteínas SSB na replicação do DNA.

## Parte D: Resolvendo Problemas

60. Moléculas de DNA com a configuração mostrada no esquema abaixo foram adicionadas a um sistema *in vitro* capaz de promover síntese de DNA. Qual a configuração esperada para as moléculas resultantes após a síntese ter se completado?

5' - ATCTGCATTACGGCATTAAAG - 3'

AATGCC

61. Se a síntese em uma das forquilhas de replicação de *E. coli* ocorre a uma velocidade de 1.000 pares de bases por segundo, quanto tempo leva para o cromossomo todo se replicar? Para responder a questão considere que o cromossomo da bactéria *Escherichia coli* contém aproximadamente  $4 \times 10^6$  pares de bases.