Topologia, estrutura de cromatina e Processos de Replicação do DNA

Capítulos 3 e 10 GMB-dos genes aos genomas

Chapters 4 and 5- MBC Alberts et al

Chapter 8 and 9- MBGene, Watson et al

Super estrutura: O DNA circular não tem pontas livres e isso cria uma tensão de giro- e provoca a formação de superhélice.

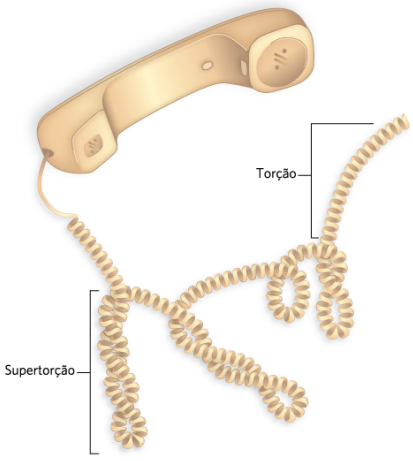


FIGURA 9-6 Supertorções. O cordão de um telefone antigo é torcido como uma hélice de DNA, e o cordão torcido pode se supertorcer.

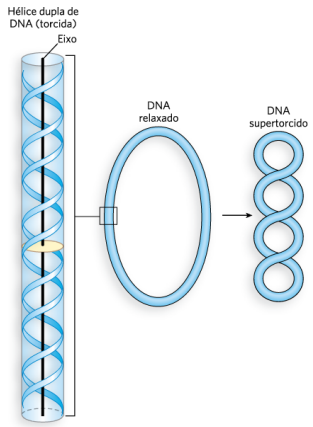


FIGURA 9-7 Supertorção do DNA. Quando se torce sobre si mesma, a fita dupla do DNA forma uma nova hélice, ou super-hélice. Normalmente, a super-hélice de DNA é chamada de supertorcida. [Fonte: Adaptada de N. R. Cozzarelli, T.C. Boles, and J. H. White, in *DNA Topology and Its Biological Effect* (N. R. Cozzarelli and J. C. Wang, eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, pp. 139-184.]

Imagine uma DNA ou RNA polimerase atuando na dupla-hélice.

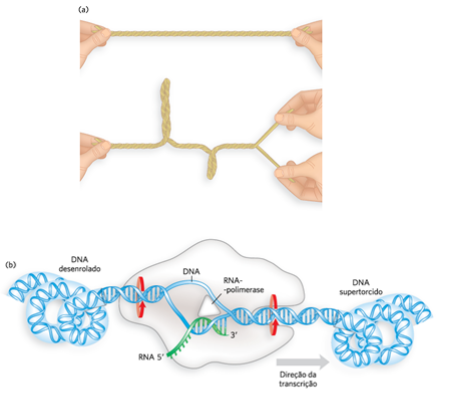


FIGURA 9-8 Os efeitos da replicação e transcrição na supertorção do DNA. Como o DNA é uma estrutura em hélice dupla, a separação das fitas leva a um estresse adicional e supertorção se o DNA estiver preso (sem liberdade para rodar) à frente da separação das fitas. (a) O efeito geral pode ser ilustrado torcendo-se duas fitas de elástico uma sobre a outra para formar uma hélice dupla. Se uma extremidade estiver presa, a separação das duas fitas na outra extremidade leva à torção. (b) Em uma molécula de DNA, a progressão da DNA-polimerase ou RNA-polimerase (como apresentado aqui) ao longo do DNA envolve a separação da fita dupla. Como resultado, o DNA fica supertorcido à frente da enzima e se desenrola atrás dela. As setas vermelhas indicam a direção da torção. [Fonte: (a) Adaptada de W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, 1984, p. 452.]

Os processos de transcrição e replicação promovem tensão na hélice, que precisa ser resolvido!!!

Um DNA circular está sujeito a essa torção.
Veja o exemplo nessa foto de microscopia eletronica.

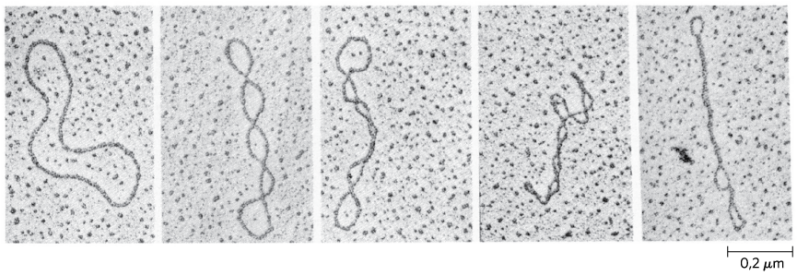


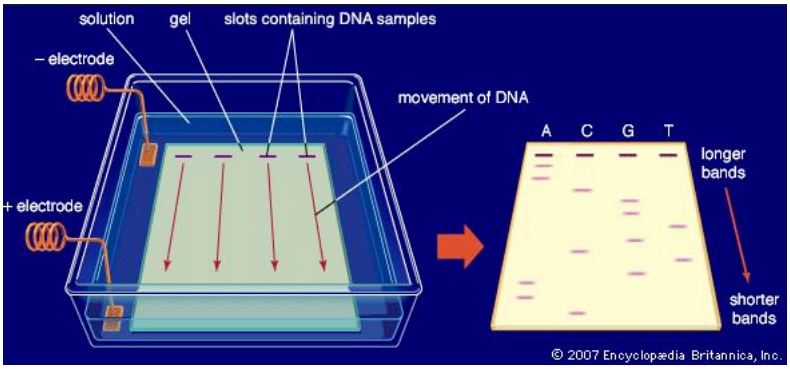
FIGURA 9-9 DNA plasmidial circular fechado relaxado e supertorcido. A micrografia eletrônica de varredura à extrema esquerda mostra o DNA relaxado. Supertorções crescentes são apresentadas da esquerda para a direita. [Fonte: Laurien Polder, de A. Kornberg, *DNA replication*, W. H. Freeman, 1980, p.29.]

Mas isso existe de fato na célula? O que isso implica para o processamento do DNA?

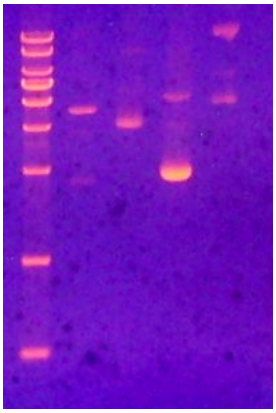
Formas circulares, lineares e supercoil migram de forma diferente em eletroforese gel de agarose,

.

gel de agarose? Aliás, o que é isso?
Para que polo migra o DNA?



Como deve migrar uma molécula de DNA supercoil (Forma 1- F1), Linear (Forma 2- F2) ou circular (Forma 3- F3)?



F2
F3
F1

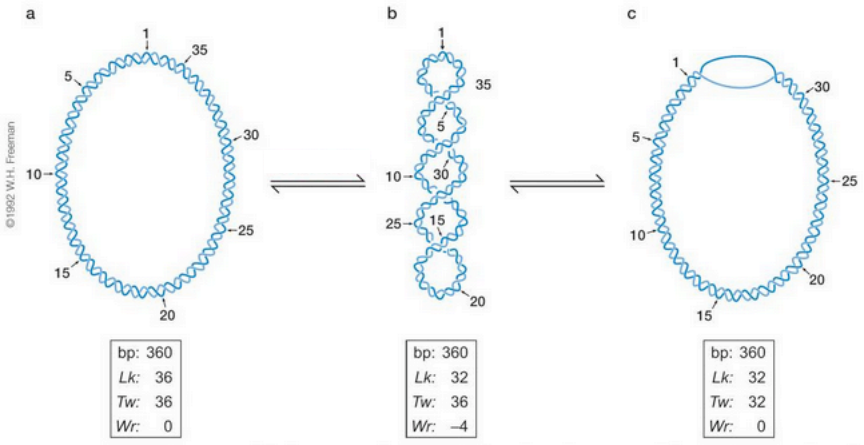


FIGURE 4-17 **Topological states of covalently closed, circular (ccc) DNA.** The figure shows conversion of the relaxed (a) to the negatively supercoiled (b) form of DNA. The strain in the supercoiled form may be taken up by supertwisting (b) or by local disruption of base pairing (c). (Adapted from a diagram provided by Dr. M. Gellert.) (Modified, with permission, from Kornberg A. and Baker T.A. 1992. *DNA replication*, 2nd ed., Fig 1.21, p. 32. © W.H. Freeman.)

Uma quebra simples no DNA faz ele perder a torção....
E desnaturação do DNA também pode reduzir a tensão.

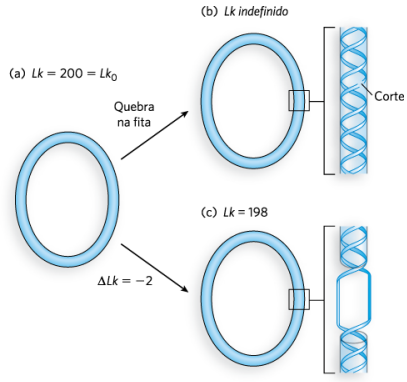


FIGURA 9-13 **Número de ligação de DNAs circulares fechados.** Uma molécula de 2.100 pb é apresentada em três formas: (a) relaxada, $Lk = 200$; (b) relaxada com uma quebra em uma fita, *Lk* indefinido; (c) destorcida em duas voltas, $Lk = 198$. A molécula distorcida geralmente é supertorcida, mas o desenrolamento também facilita a separação das fitas de DNA.

E como a célula lida com essas estruturas supercoil??

Elas existem nos cromossomos?

O Cromossomo tem a ponta livre?

A estrutura de um solenoide pode aliviar torções na molécula de DNA.

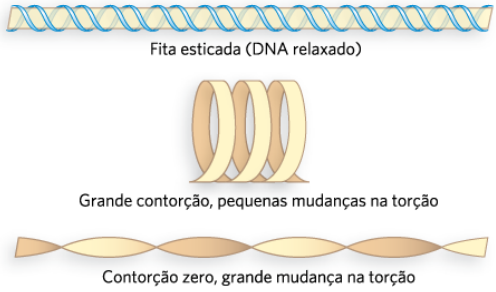


FIGURA 9-15 Contorção e torção. A fita bege representa o eixo de uma molécula de DNA relaxada. As tensões na fita destorcida podem se manifestar como contorção ou torção. Alterações topológicas no número de ligações em geral são acompanhadas por mudanças geométricas na contorção e torção.

Como isso pode ajudar na estrutura do cromossomo?

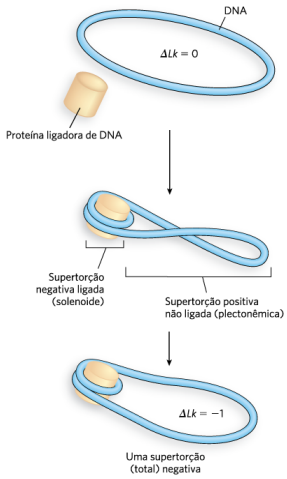


FIGURA 9-22 A origem da supertorção negativa no DNA eucariótico. Quando o DNA é firmemente enrolado ao redor da proteína ligadora de DNA ou complexo proteico, é fixada uma supertorção negativa solenoide no DNA. Em uma molécula de DNA tensionada, as supertorções positivas ocorrem em outros lugares para compensar a tensão resultante. O relaxamento de supertorções positivas não ligadas pelas topoisomerases leva ao desenvolvimento de uma super-hélice negativa no DNA.

A estrutura em cruz também pode aliviar torções na molécula de DNA.

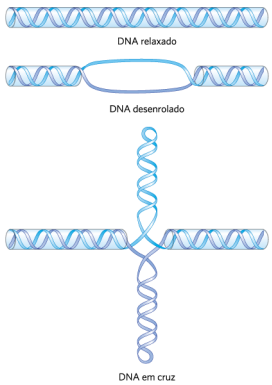


FIGURA 9-16 Promoção da estrutura em cruz pelo desenrolamento do DNA. A cruz pode se formar nas sequências palindrômicas, mas ocorrem aleatoriamente no DNA relaxado porque o DNA circular acomoda mais pares de bases do que a estrutura em cruz. O DNA desenrolado facilita a separação parcial da fita necessária para promover a formação da cruz nas sequências adequadas.

Que tipo de sequencias podem fazer essa cruciforme?

O que são sequencias palindromicas em DNA?

Além disso, as moléculas de DNA podem sofrer verdadeiros nós! Por exemplo, após a replicação de moléculas circulares.

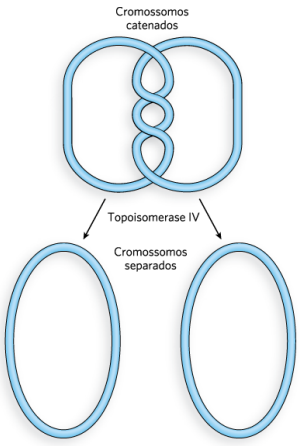


FIGURA 9-21 Resolvendo o problema topológico com topoisomerases tipo II. A topoisomerase tipo II resolve os nós e catenanos que surgem no DNA passando um duplex por uma quebra temporária da fita dupla de outro duplex.

E o DNA está sempre sem pontas livres.... Mesmo nos cromossomos existem alças fixas no arcabouço deste!!!! O que prende o DNA?

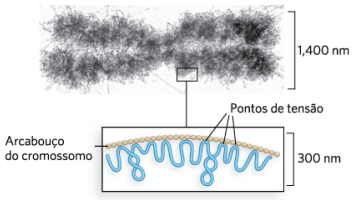
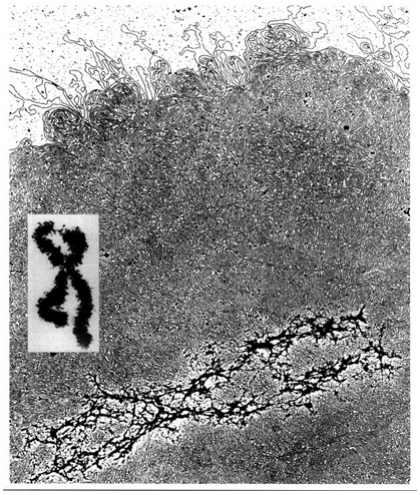
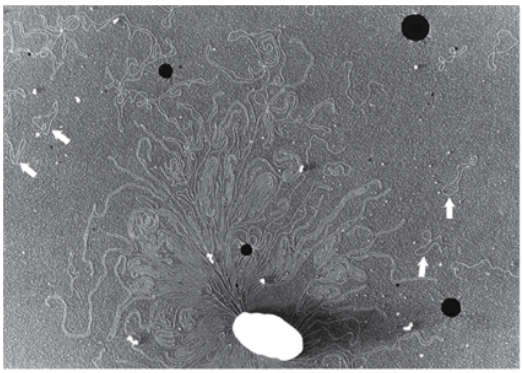


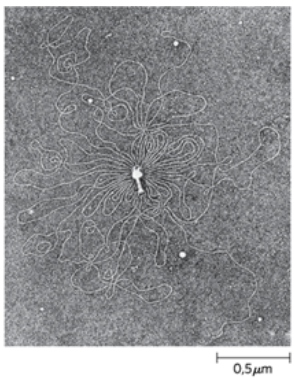
FIGURA 9-11 Alças em um cromossomo eucariótico forçadas por proteínas do arcabouço. O arcabouço da cromatina se liga ao cromossomo em intervalos, com o DNA localizado entre os pontos de ligação definindo as alças que são topologicamente tensas. [Fonte: Fotografia de G. F. Bahr/Biological Photo Service.]



Assim o problema de tensão na dupla hélice é normal em nossas células!

As alças são observadas também em genoma bacteriano, ou de bacteriófagos: vejam essas fotos abaixo





Como resolver tantos problemas gerados por questões estruturais??

Não seria possível dar uma tesoura para o DNA tirar os nós?

Essas tesouras são as topoisomerases!
Topoisomerase I, cliva uma das fitas e reduz a torção em 1 volta.

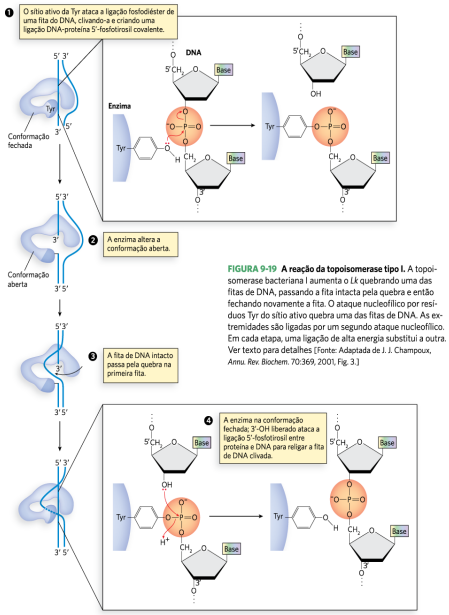


FIGURA 9-19 **A reação da topoisomerase tipo I.** A topoisomerase bacteriana I aumenta o *Lk* quebrando uma das fitas de DNA, passando a fita intacta pela quebra e então fechando novamente a fita. O ataque nucleofílico por resíduos Tyr do sítio ativo quebra uma das fitas de DNA. As extremidades são ligadas por um segundo ataque nucleofílico. Em cada etapa, uma ligação de alta energia substitui a outra. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 3.]

Topoisomerase II, cliva as duas fitas e reduz o Lk em 2.
Em procariontes temos a girase: faz hélices negativas!

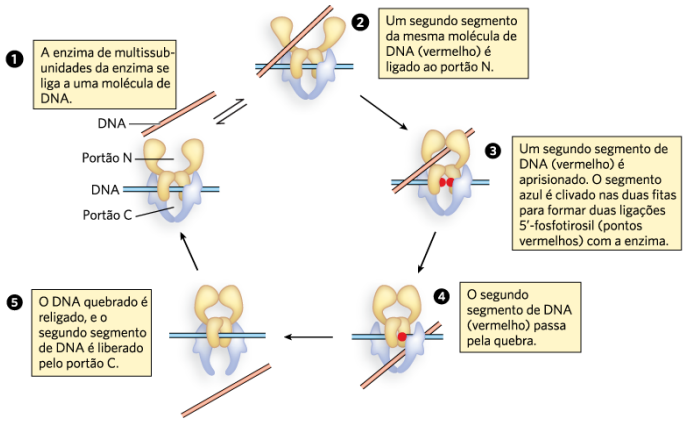


FIGURA 9-23 **Alteração do número de ligação pela topoisomerase tipo II.** O mecanismo geral é similar ao da DNA-girase bacteriana (ver Figura 9-20b), com um segmento de DNA duplex intacto que passa pela quebra transitória da fita dupla no outro segmento. A estrutura da enzima e o uso de ATP são distintos nesta reação. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 11.]

Podemos visualizar esses topoisomeros em simples géis de agarose!

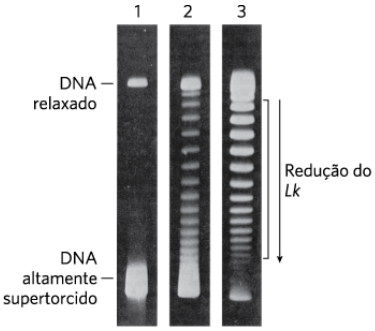
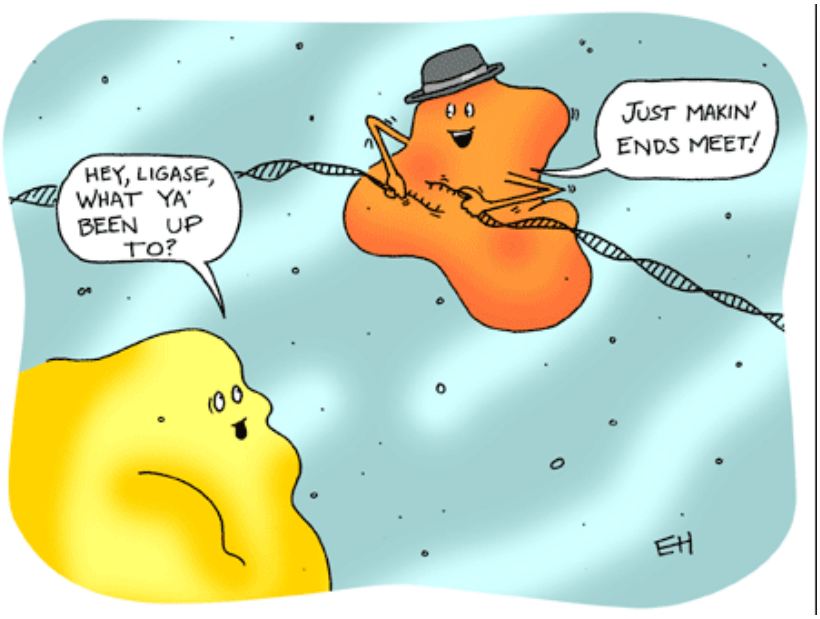
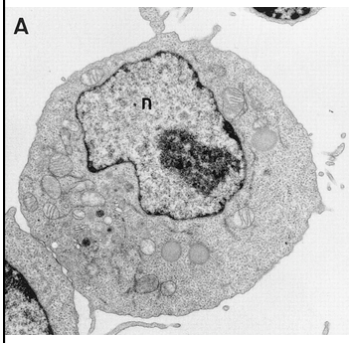
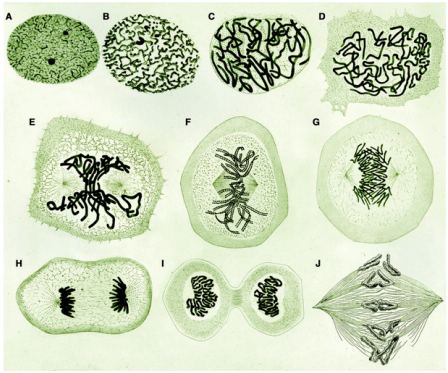


FIGURA 9-18 Visualizando os topoisômeros. Neste experimento, as moléculas de DNA (plasmídeos) possuem um número idêntico de pares de bases mas diferem no grau de supertorção. Na coluna 1, o DNA altamente supertorcido migra como uma banda única. As colunas 2 e 3 mostram o efeito do tratamento do DNA supertorcido com uma topoisomerase tipo I; o DNA na coluna 3 foi tratado por mais tempo do que o DNA da coluna 2. Cada banda da coluna 3 na região dos colchetes contém DNA plasmidial com o mesmo número de ligações; o *Lk* muda por 1 de uma banda para a outra. [Fonte: W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 72:2553, 1975.]



O Genoma está no núcleo: como? Como ele se comporta na divisão?





Células em mitose desenhado por Walther Flemming 1879!

A estrutura da cromatina observada em microscópio eletrônico!

The Fundamental Chromatin Fiber is the 10 nm Fiber (DNA Associated With Nucleosomes)

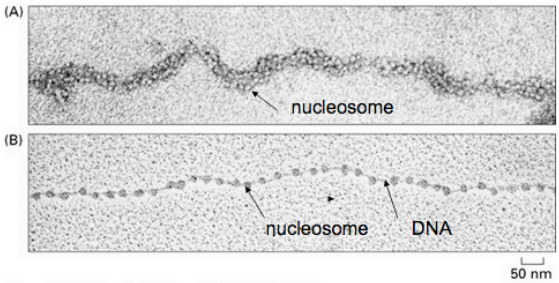


Figure 4–23. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Como um colar de contas!

Digestão de uma cromatina com nuclease revela uma estrutura regular!

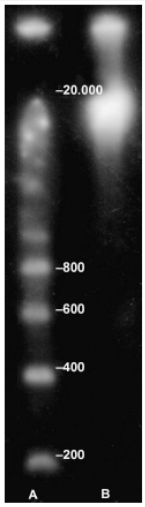


Figura 10.20 A. Núcleos de células de inseto foram digeridos com nuclease micrococal; em seguida, o DNA foi extraído e os fragmentos obtidos analisados em gel de agarose. **B.** DNA de núcleos de células de inseto que não passaram pelo tratamento com nuclease micrococal. A numeração refere-se aos tamanhos dos fragmentos de DNA expressos

O Que dá essa regularidade!

Probing the 10 nm Fiber With Nuclease

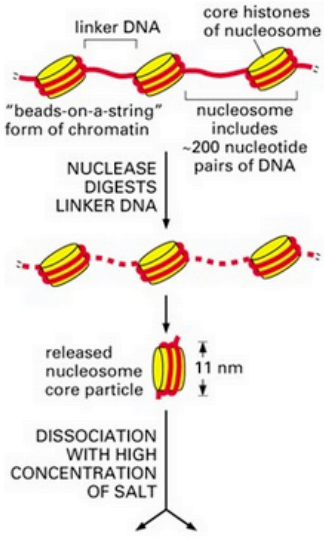


Figure 4–24 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Nucleosomes Are Composed of DNA and an Oc tamer of Four Histone Pairs + DNA

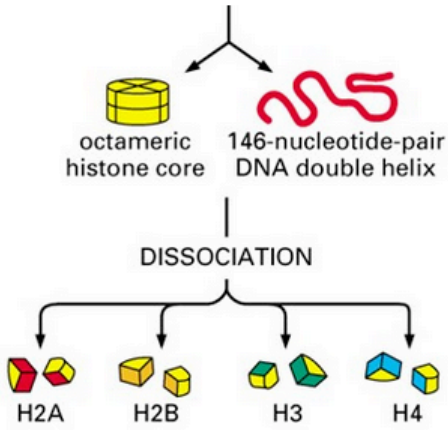
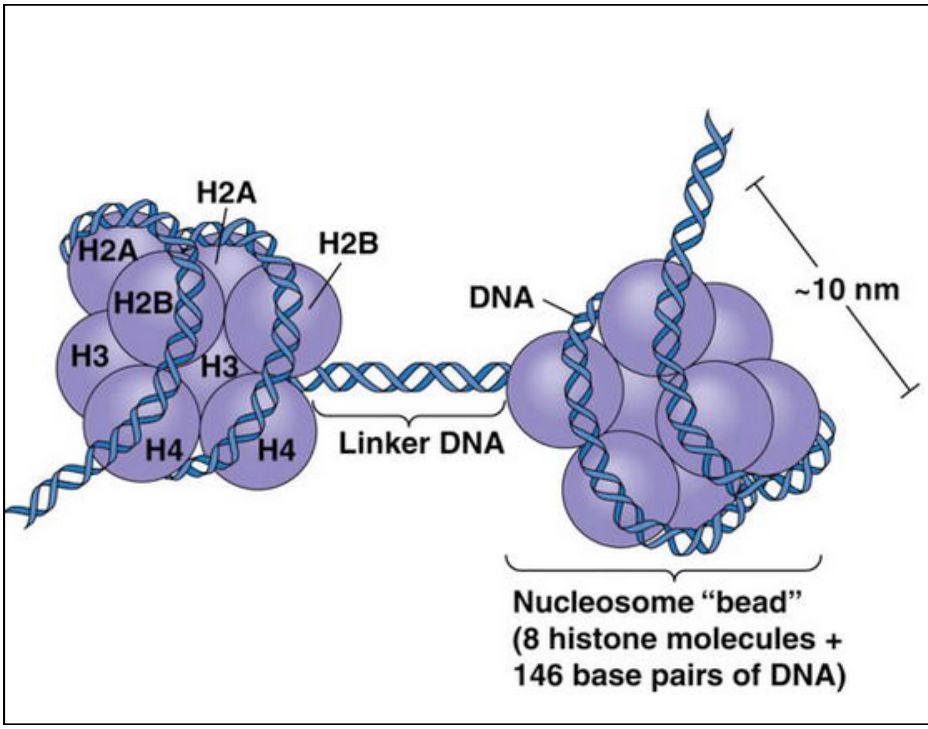


Figure 4–24 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



Nucleosome Structure

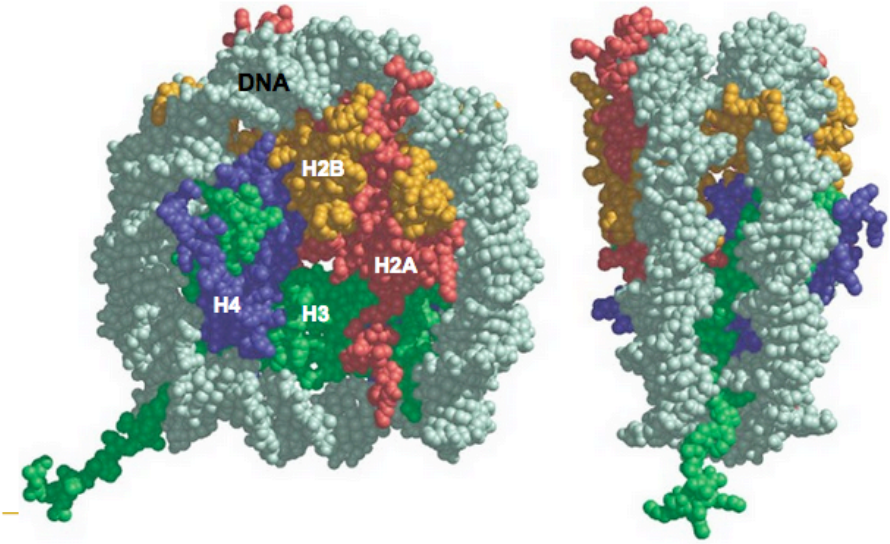
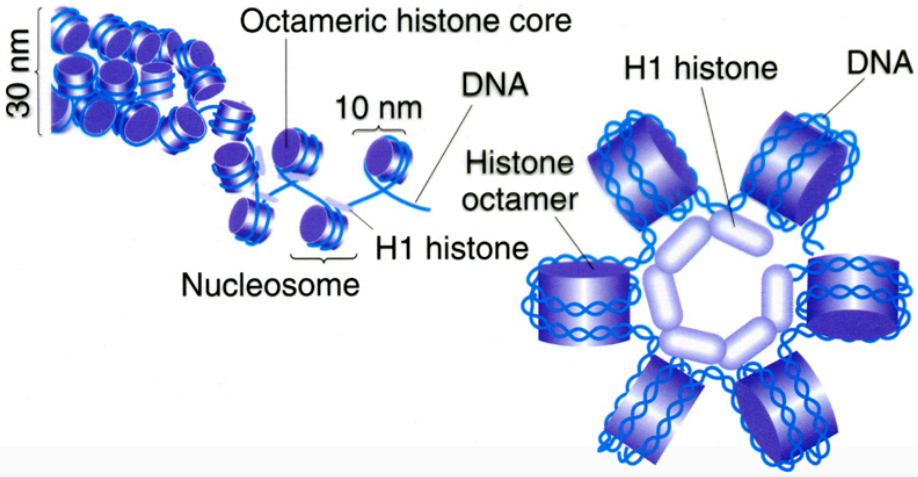


Figure 4–25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A model of chromatin structure
30 nm fibers



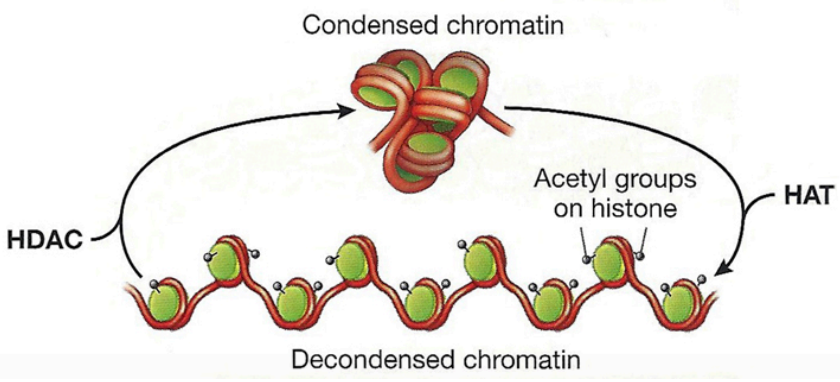
Questões importantes sobre histonas:

Qual a carga de histonas? (por que?)
Proteínas ricas em lisinas e argininas

Como a compactação da cromatina pode regular a expressão gênica?

Como isso pode ser modificado na células?

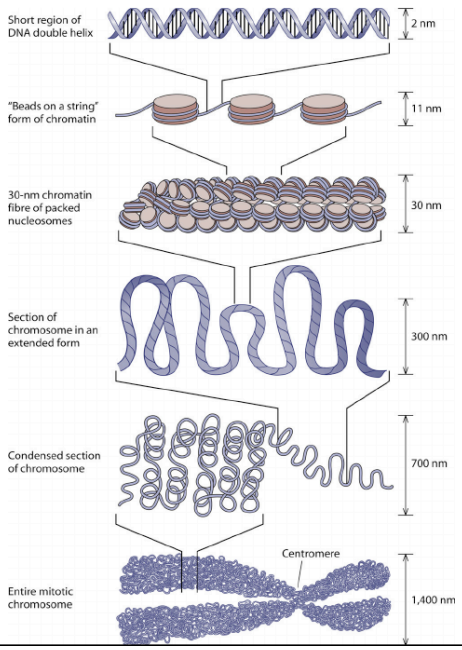
Modificações de histonas podem causar alterações (epigenéticas)
Que podem modificar a estrutura da cromatina?



Acetilações de histonas as tornam menos condensadas e metilação as tornam mais condensadas!

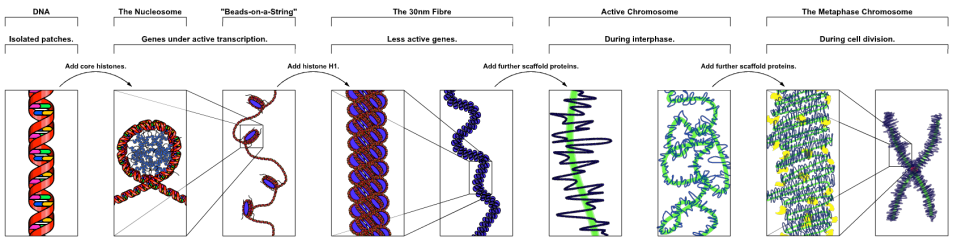
Essas modificações epigenéticas ajudam no controle de expressão gênica!

As diferentes estruturas de cromatina!



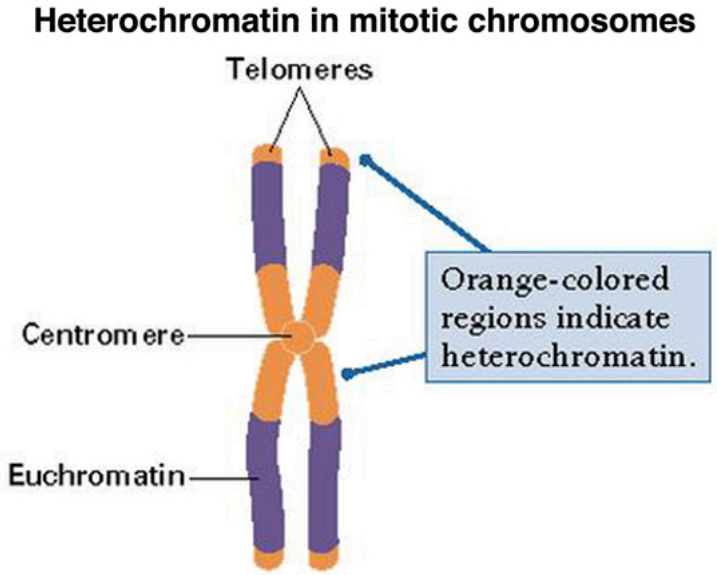
Como resultado o DNA fica 50.000 X menor em seu comprimento.

As diferentes estruturas de cromatina!

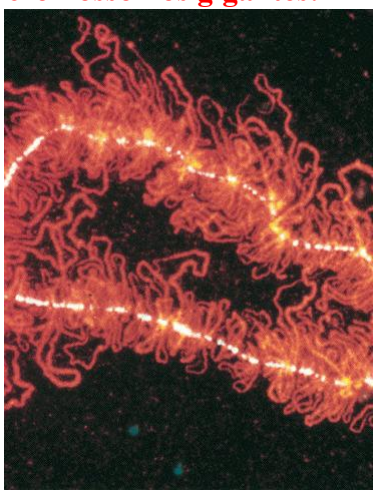


Como resultado o DNA fica 50.000 X menor em seu comprimento.

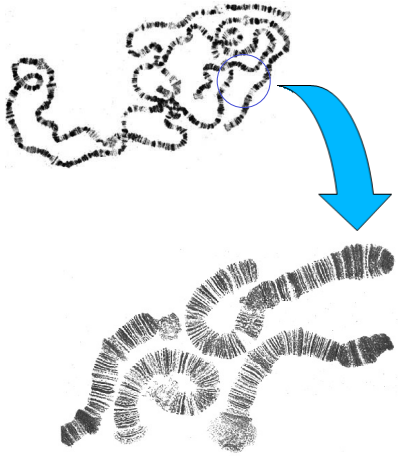
O Nível de condensamento pode ser visível na mitose!



Essa organização em alças também pode ser observada em cromossomos gigantes:



Cromossomo *lumpbrush*, que ocorre em ovócitos de anfíbios e outros animais.

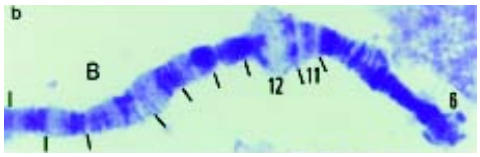


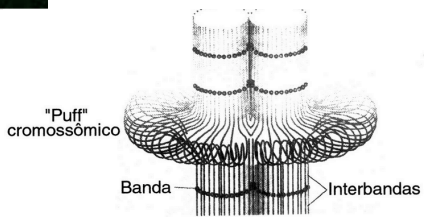
Cromossomo politênico, que ocorre em glandula salivar de insetos.

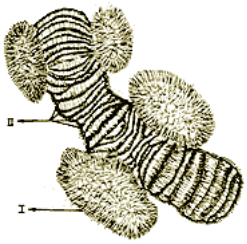
Cromossomos politênicos: impacto na ciência brasileira!

- **Experimento de Crodowaldo Pavan e Marta Breuer!**

- **O que são os puffs de cromossomos politênicos?**
- **Expressão e amplificação gênica!**







Vídeos interessantes:

histórico:

https://www.youtube.com/watch?v=fecfROFrp_c

animação:

https://www.youtube.com/watch?v=gbSIBhFwQ4s

Histórico da replicação do DNA!

A proposta de Watson e Crick sugeria que a replicação do DNA seria semiconservativa.

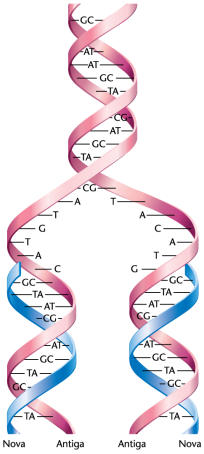


FIGURA 11-1 Modelo generalizado da replicação semiconservativa do DNA. A síntese nova é mostrada em azul.

Max Delbruck previu que isso causaria um problema de tensão na dupla-hélice e propôs o modelo dispersivo!

Modelos de replicação do DNA:.

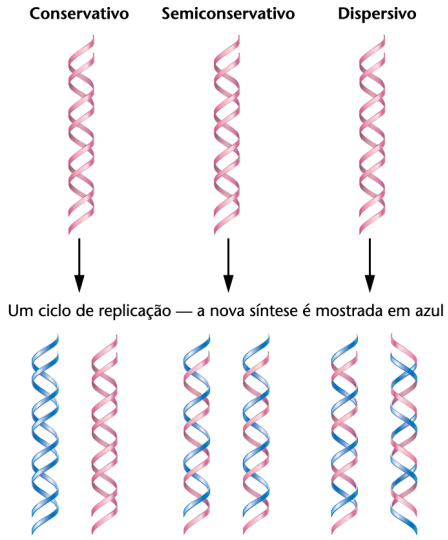


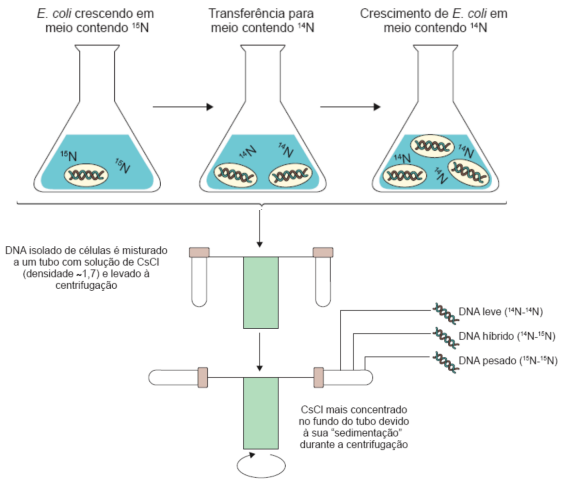
FIGURA 11-2 Resultados de um ciclo de replicação do DNA para cada um dos três modos possíveis em que a replicação poderia ser realizada.

Experimento de Mathew Meselson and Franklin Stahl, 1958.

- Que esperar de cada tipo de replicação?

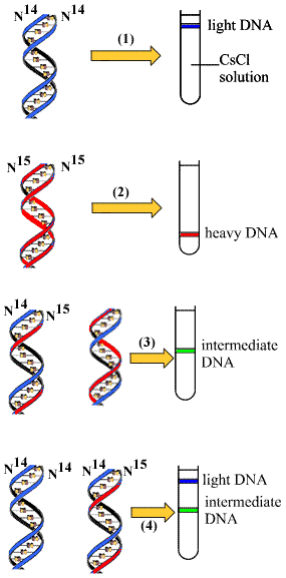
Conservativa/ Dispersiva/ Semiconservativa:

FIGURE 9-3. (Left) Matthew Meselson (b. 1930). (Right) Franklin W. Stahl (b. 1929). [Courtesy of M. Meselson.]



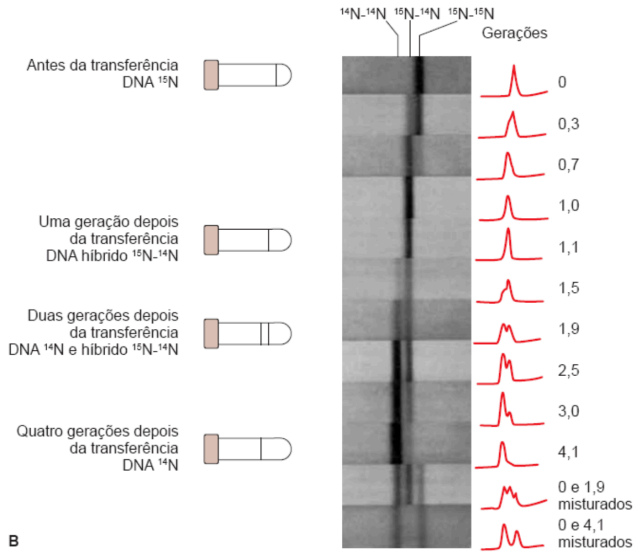
GMB:GG Menck/Sluys

Veja como o DNA é separado nessas condições... .



Como seria o resultado se a replicação fosse conservativa?
E dispersiva?

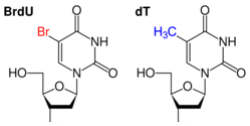
Experimento de Mathew Meselson and Franklin Stahl, 1958.



"o experimento mais bonito da biologia"

GMB:GG Menck/Sluys

A replicação semiconservativa também foi confirmada em células humanas.



Bromodesoxiuridina incorpora
no lugar da timidina, e é fluorescente

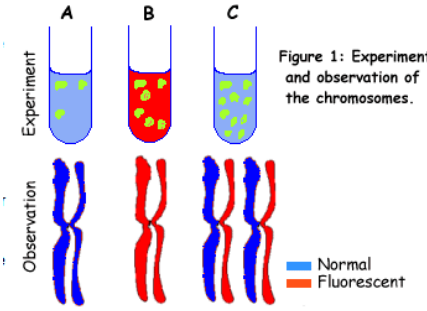
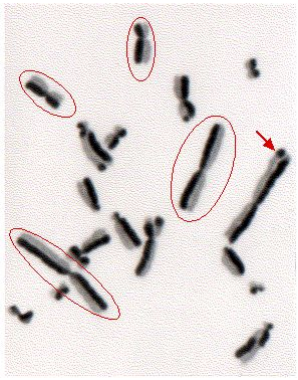


Figure 1: Experiment and observation of the chromosomes.

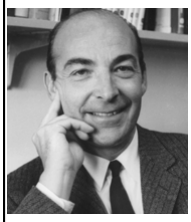


Cromossomos Arlequim!

Só dT metáfase 1 metáfase 2

Como você explica os cromossomos onde aparecem "trocas"?

Arthur Kornberg (1956) consegue síntese de DNA em tubo de ensaio com extrato de *E.coli*, dNTPs e DNA: "created life in a test tube". Premio Nobel em 1959!



DNA + dATP + extrato de E.coli = síntese de DNA!
dGTP
dCTP
dTTP + (^{3}H) dTTP

Como a incorporação de (^{3}H) dT em DNA pode ser medida?
(DNA precipita em alcool- nucleotídeo livre não)

Kornberg purifica a enzima responsável que ele chama de

DNA polimerase.

Posteriormente, uma bactéria mutante, sem essa atividade, consegue crescer normalmente!

Como isso pode acontecer?? Não é essencial?

Arthur and Roger Kornberg,
(filho foi Nobel em 2006)!

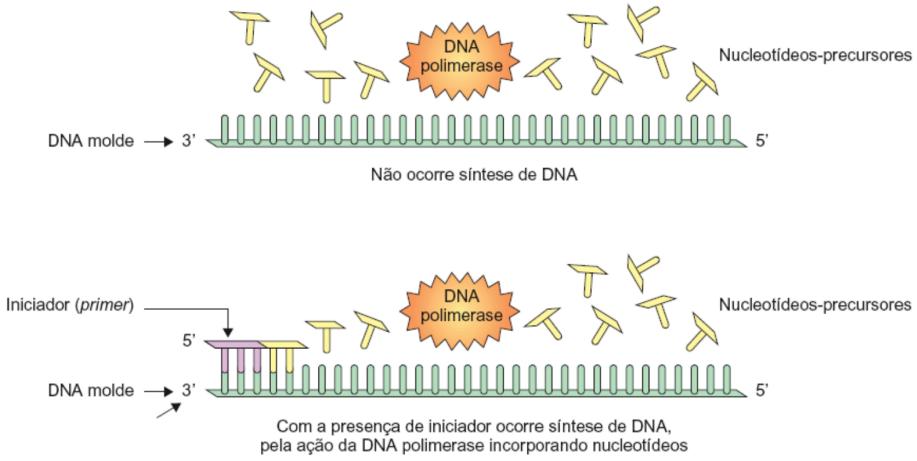
Existem outras DNA polimerases em *E.coli*:

A enzima inicial foi chamada de **DNA polimerase I**,

e não é a principal enzima de replicação de DNA

em *E.coli*- que é realizada pela **DNA polimerase III**!

A aluna de Kornberg, Tsuneko Okazaki, descobre que não ocorre Síntese de DNA em DNA simples fita e mesmo DNA dupla fita extraído cuidadosamente! Há necessidade de um primer (iniciador)!

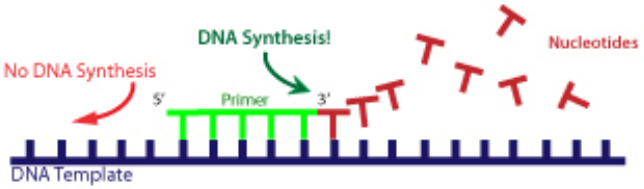


Mas, como o DNA havia funcionado para Kornberg, anteriormente?

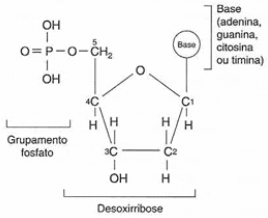
GMB:GG Menck/Sluys

E também descobre que a síntese só ocorre em uma das pontas do primer.... 3' OH

Reiji and Tsuneko Okazaki,
Arthur and Silvy Kornberg!

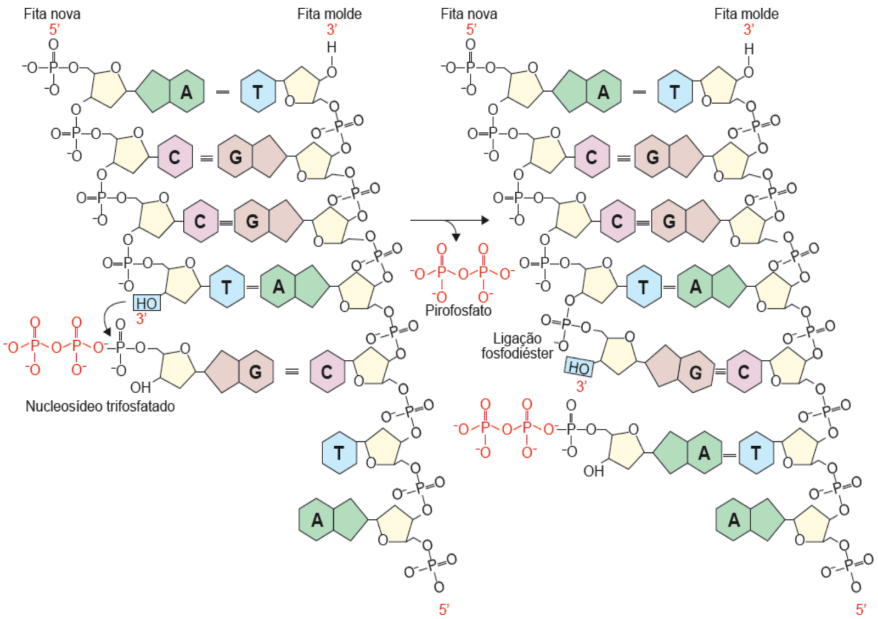


Todas polimerases precisam de primers e sintetizam DNA na direção 5'-3'!

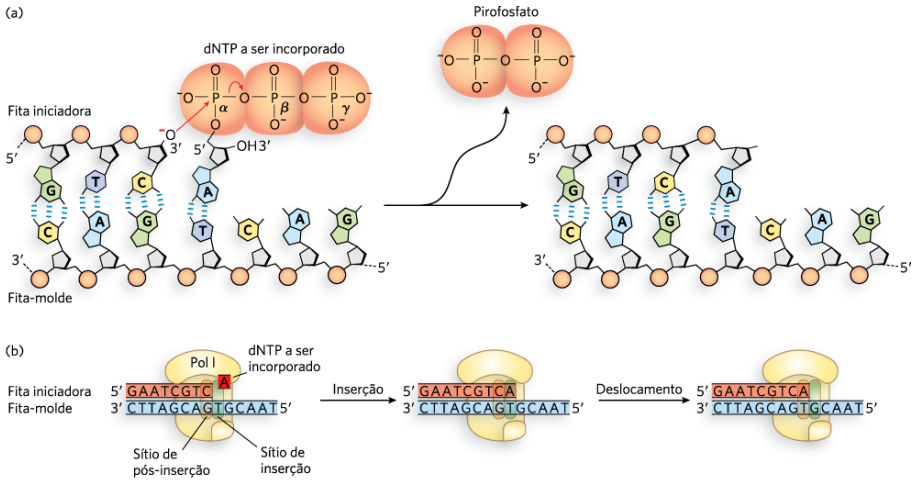


Por que precisa do primer?

A reação sempre ocorre na direção 5´-3´, a partir de uma ponta 3' OH!



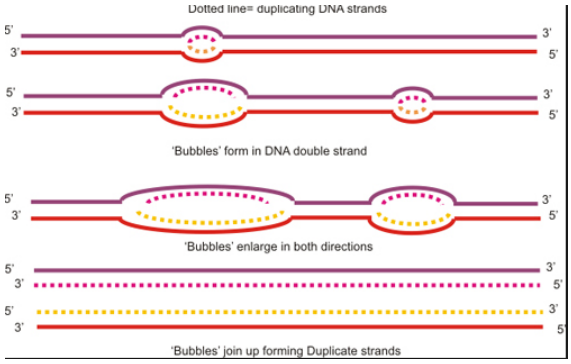
A reação sempre ocorre na direção 5´-3´, a partir de uma ponta 3' OH!



A síntese só ocorre em uma das pontas do primer.... 3' OH

Mas como ocorre o início da síntese na bactéria ou de um replicon?

Veja por exemplo uma bolha de replicação de um cromossomo eucarionte!



Por que formam-se várias bolhas? Como é o início da bolha?
Tem primer? Como é esse primer?

A síntese de DNA sempre ocorre com primers de RNA, pois a RNA polimerase não necessita de primers!

Veja uma bolha de replicação, com duas forquilhas de replicação!

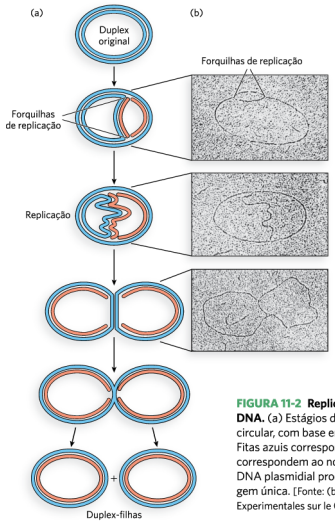
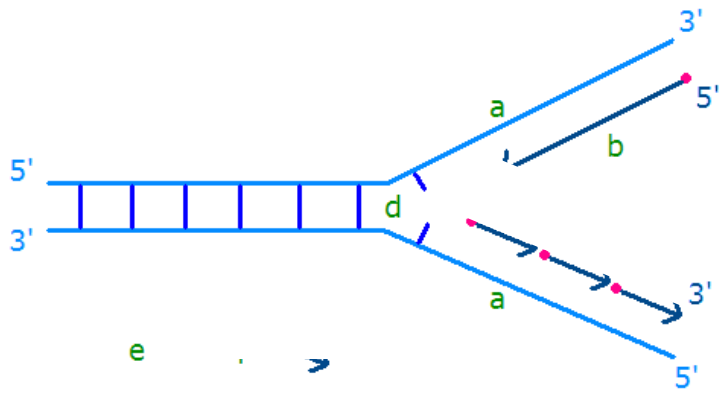


FIGURA 11-2 Replicação simultânea de ambas as fitas de DNA. (a) Estágios de replicação de um DNA de fita dupla circular, com base em observações de microscopia eletrônica. Fitas azuis correspondem ao DNA parental; fitas vermelhas correspondem ao novo DNA. (b) Micrografias eletrônicas de DNA plasmidial procedendo à replicação a partir de uma origem única. [Fonte: (b) Bernard Hirt, Institut Suisse de Recherches Experimentales sur le Cancer.]

Como pode haver síntese das duas fitas, se a direção é 5'-3'?

A forquilha e as fitas antiparalelas! Como replicar o DNA Na direção 5'-3' na mesma direção?



Reiji Okazaki, de volta ao Japão (1968), consegue resolver essa pergunta! Descreve o que ficou conhecido como fragmentos de Okazaki!

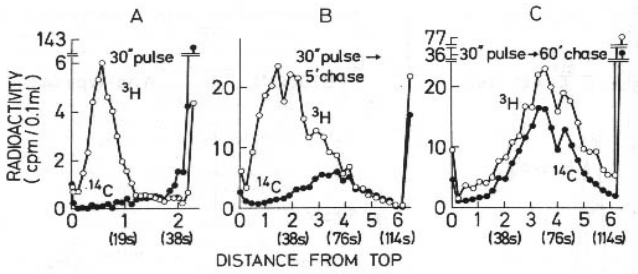
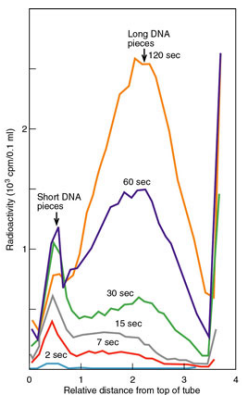


FIGURE 6. Effect of chase on the sedimentation of pulse-labeled DNA of *B. subtilis* 168 (*thy*⁻ *ind*⁻). Cells were pulse labeled with ^{3}H-thymidine as in Fig. 5 for 30 sec at 25°. The chase was performed by adding a 10^4-fold amount of unlabeled thymidine and incubating at 25° for the indicated time. Alkaline sucrose gradient sedimentation was carried out in the SW25.3 rotor at 22,500 rpm and 4° for (A) 24 hr or (B and C) 8 hr.

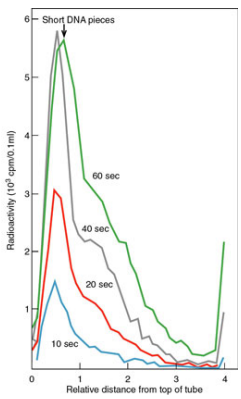
Os fragmentos de Okazaki tem cerca de 1000 bases em *E.coli*…. 100 a 200 bases em eucariontes!

Reiji Okazaki faleceu de leucemia em 1975, provavelmente devido à bomba atômica de Hiroshima em 1945!

Reiji Okazaki, posteriormente isola mutantes cuja elongação da cadeia filha é mais lento!



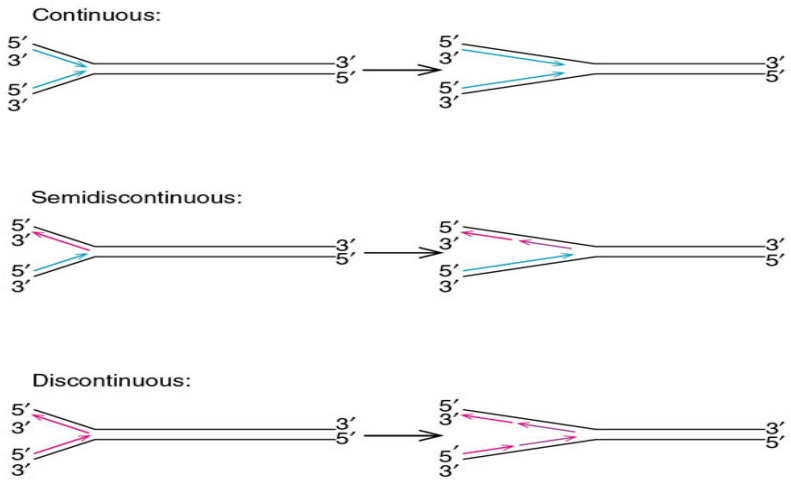
selvagem



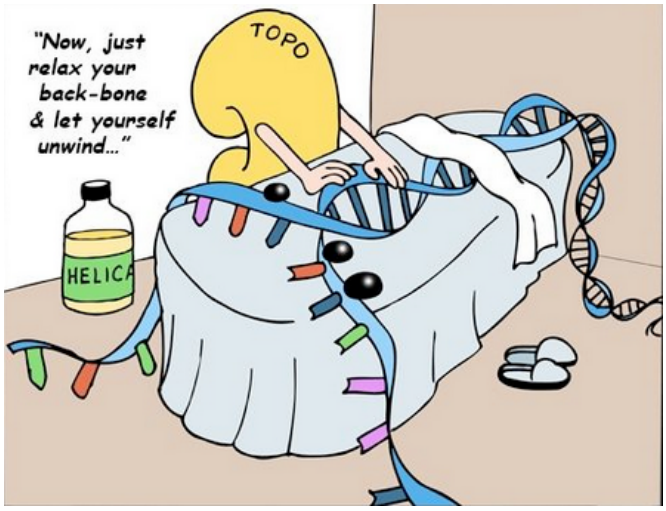
Mutante termossensível para a DNA ligase

Okazaki propõe que a síntese de DNA é semidescontínua!

Fitas *leading* e *lagging*!



Como é iniciada a cada vez uma síntese de um fragmento?



Como se iniciam os fragmentos de Okasaki, se há necessidade de primers?!

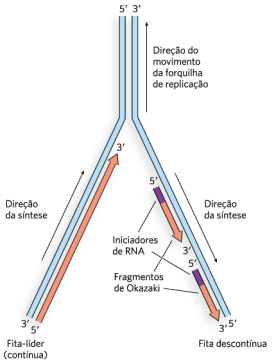


FIGURA 11-4 Estrutura da forquilha de replicação. As DNA-polimerases podem estender o DNA apenas na direção 5'→3', porém as duas fitas parentais são antiparalelas. Portanto, uma fita-filha (a fita-líder) é sintetizada continuamente, na direção de movimento da forquilha, enquanto a fita sintetizada na direção oposta (a fita descontínua) precisa ser replicada de forma descontínua como uma série de fragmentos de Okazaki.

Mas como é esse primer?

A cada passo entra em ação a primase que faz o primer de RNA….

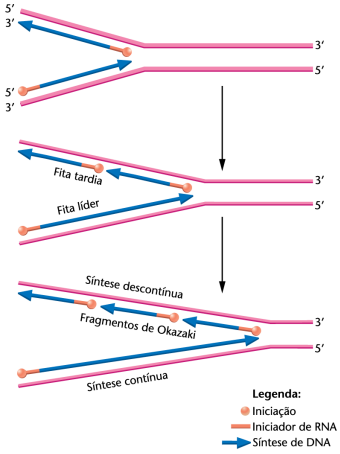
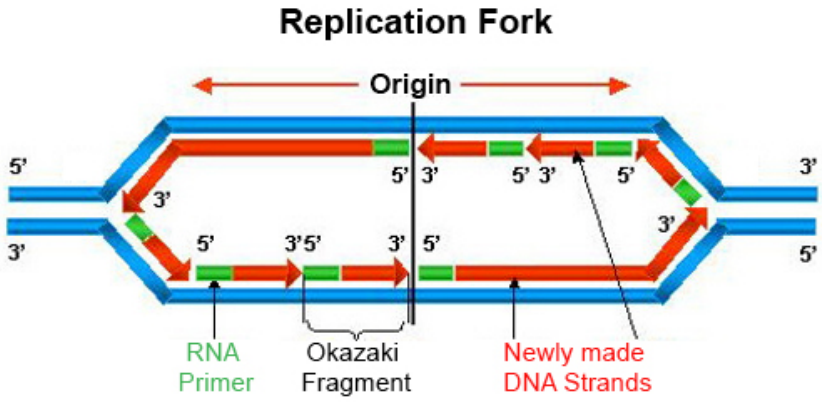


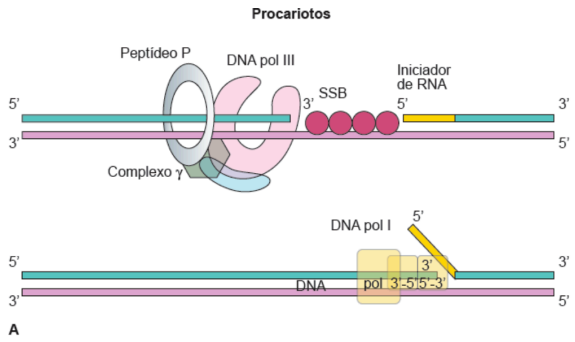
FIGURA 11-11 Progressão oposta da síntese de DNA ao longo de duas fitas, necessária porque as duas fitas de DNA correm antiparalelamente uma à outra, e a DNA-polimerase III sintetiza somente em uma direção (5′ a 3′). Na fita tardia, a síntese tem de ser descontínua, resultando na produção dos fragmentos de Okazaki. Na fita líder, a síntese é contínua. Os iniciadores de RNA são usados para iniciar a síntese em ambas as fitas.

Veja como é na bolha de replicação….

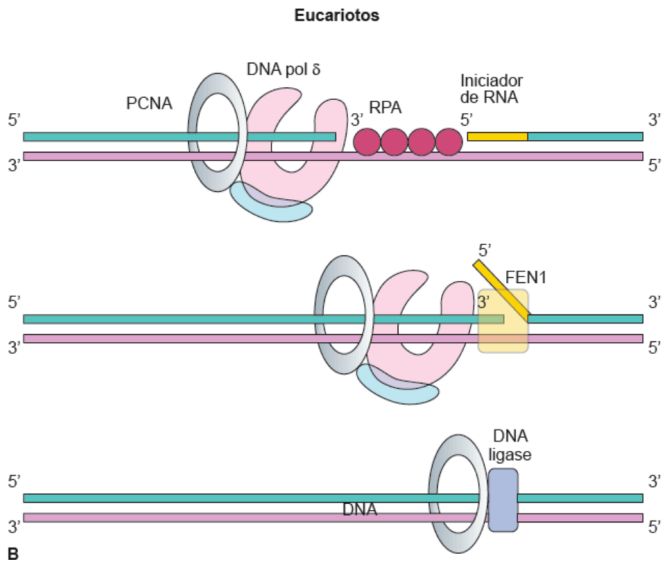


E esse RNA fica no DNA depois? Como ele é retirado?

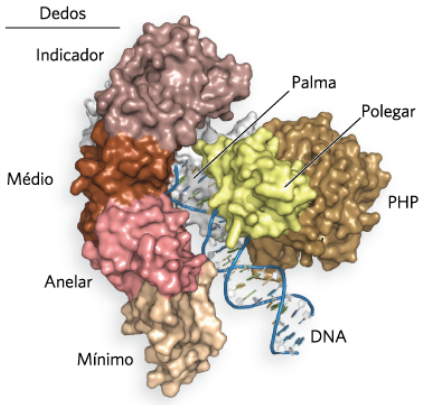
A DNA polimerase I também tem função de exonuclease 5’ -3’ .... O que é isso?
Em que momento é útil?



E em eucariontes é diferente?



A DNA polimerase tem a estrutura de uma mão….



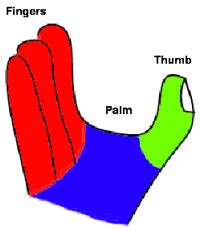
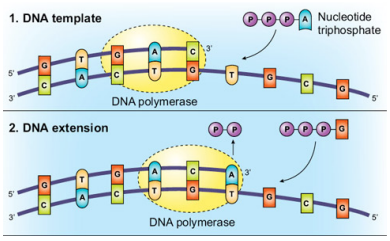
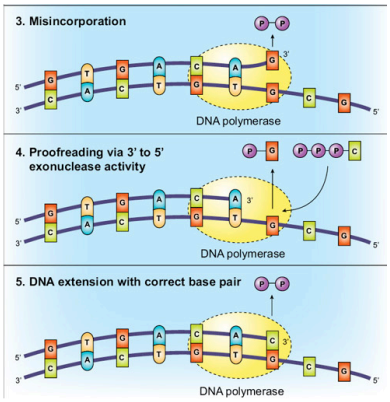


FIGURA 11-13 **A subunidade α da Pol III de *E. coli*.** Diagrama em fita da subunidade α da Pol III, indicando os domínios relativos a palma, dedos, polegar e PHP. [Fonte: PDB ID 3EOD].

A DNA polimerase tem a estrutura de uma mão….

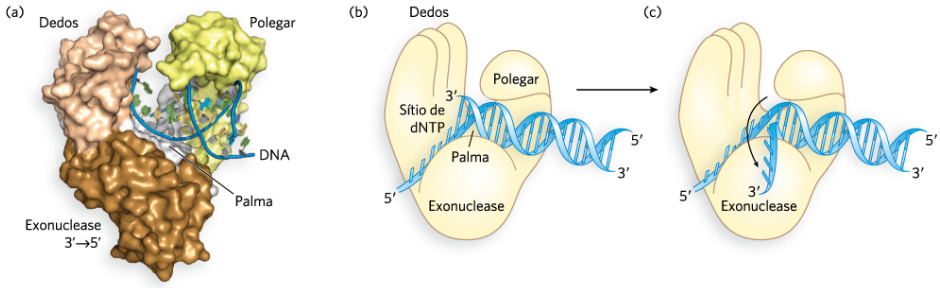
Com diferentes domínios! FUNÇÃO EDITORIAL- o que é isso?



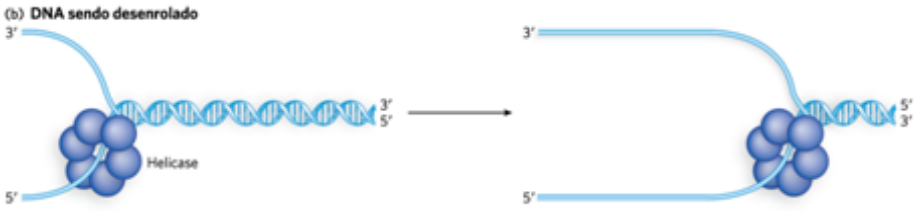


A DNA polimerase tem a estrutura de uma mão….

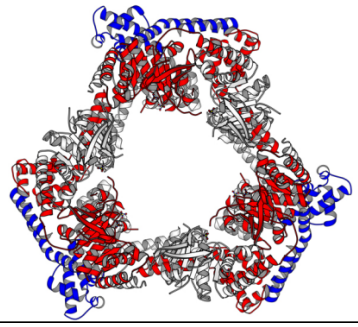
Com diferentes domínios! FUNÇÃO EDITORIAL- o que é isso?



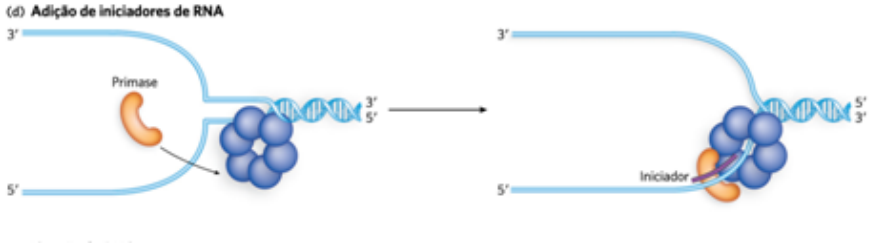
E como é aberta a hélice do DNA?



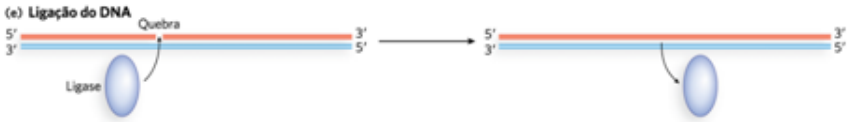
Em *E.coli*, esta proteína é a dnaB, que se liga na fita *lagging*….



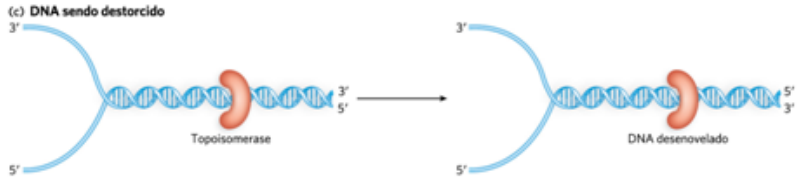
A helicase dnaB se liga à primase, para fazer o primer!



Falta ainda a DNA ligase!



E como é resolvida a torção do DNA?

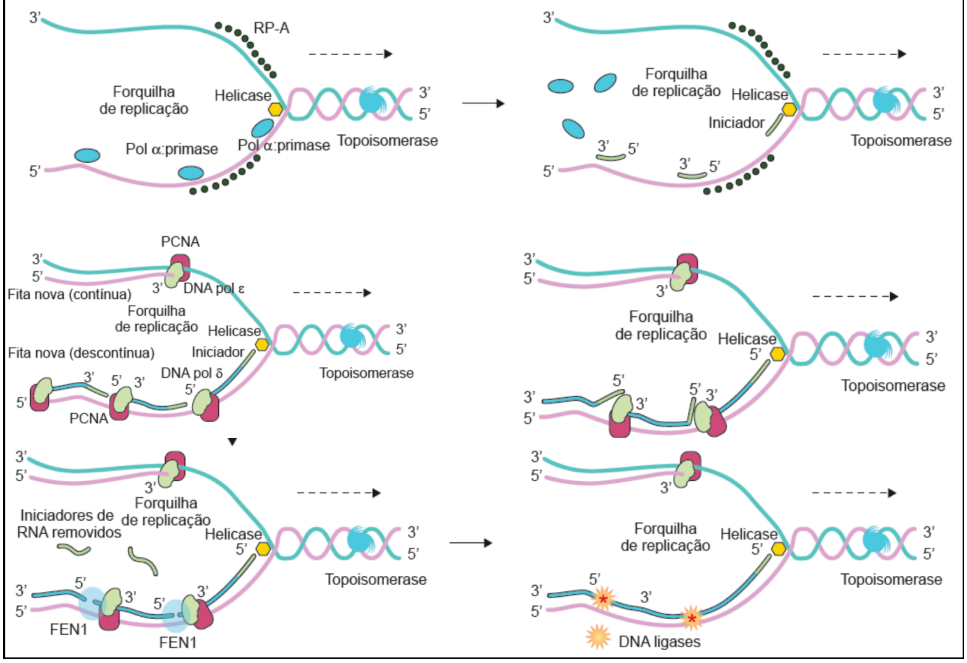


Em E.coli, esta proteína é a girase (em humanos topoisomerases I e II….)

E DNA simples fita não pode fazer estruturas do tipo grampo? (isso atrapalharia a replicação!).

Em E.coli, esta proteína é a SSB- single stranded binding
(em humanos é a RPA- Replication protein A….)

Olhando o todo!



As DNAs polimerases não são muito processivas….
a cinta deslizante (beta clamp) ajuda a DNA pol a não largar o DNA!

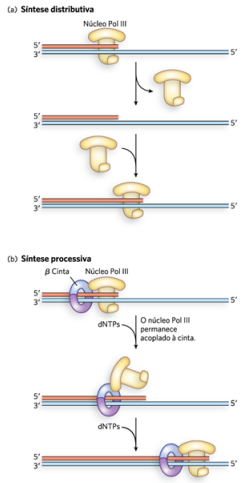
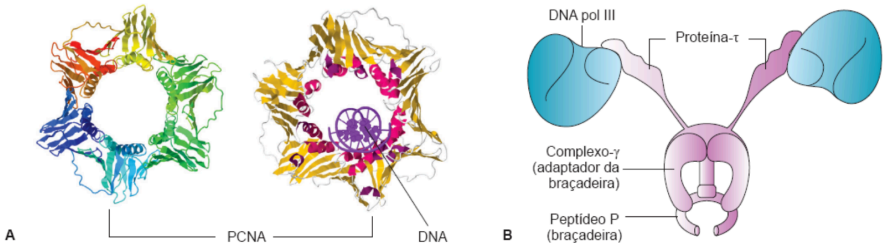


FIGURA 11-16 Processividade conferida pela cinta β. (a) Em sistemas de síntese distributivos, o núcleo Pol III estende um local contendo iniciador por poucos nucleotídeos e depois se dissocia do DNA. Este precisa religar-se ao local contendo o iniciador para a continuação da síntese. (b) A ligação do núcleo Pol III à cinta β amarra o núcleo ao DNA para síntese processiva. Quando o núcleo Pol III se desliga do DNA, permanece acoplado à cinta β e rapidamente se religa ao DNA.

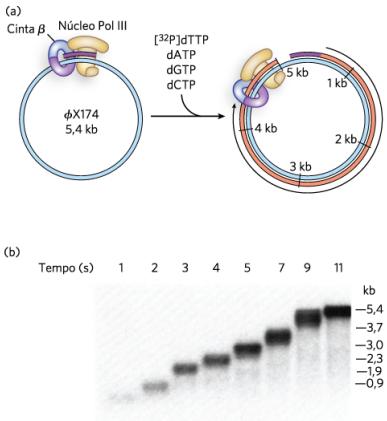
Em E.coli, esta proteína é o beta clamp
(em humanos é a PCNA – Proliferating cell nuclear antigen...)

As DNAs polimerases não são muito processivas….
a cinta deslizante (beta clamp) ajuda a DNA pol a não largar o DNA!



Em E.coli, esta proteína é o beta clamp
(em humanos é a PCNA – Proliferating cell nuclear antigen...)

Veja um exemplo de como isso é estudado!



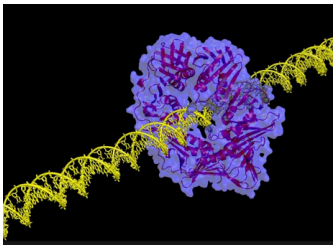
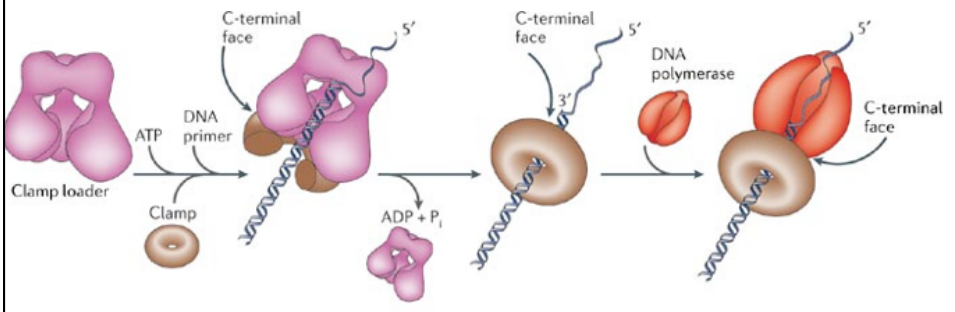


FIGURA 11-17 Síntese rápida de DNA pela Pol III de *E. coli*. A cinta deslizante β é carregada até um local contendo iniciador por um montador da cinta na holoenzima Pol III. A síntese dos 5,4 kb de DNA circular do bacteriófago ΦX174 é finalizada dentro de 11 segundos, como apresentado na autorradiografia do experimento descrito no texto. [Fonte: Fotografia de M. E. O'Donnell e A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 260:12,875, 1985, Fig. 2A.]

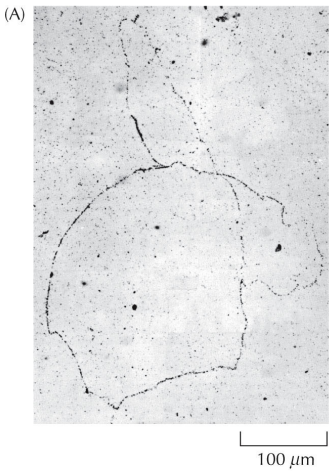
Mas como colocar a cinta deslizante na molécula de DNA?

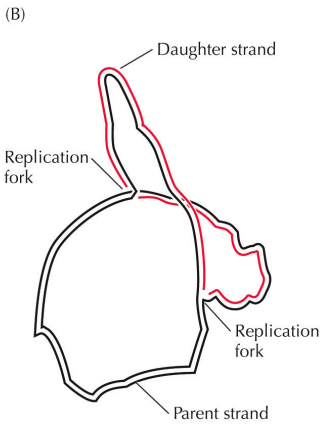
Temos ainda o montador da cinta (clamp loader)!



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

O DNA de E.coli tem uma única origem de replicação.





THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.2 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Eucariontes tem várias.

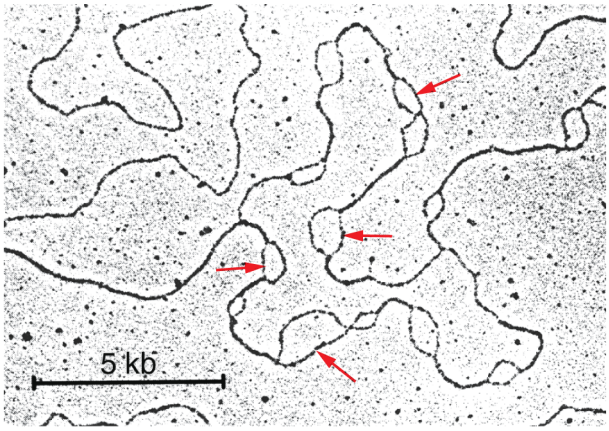
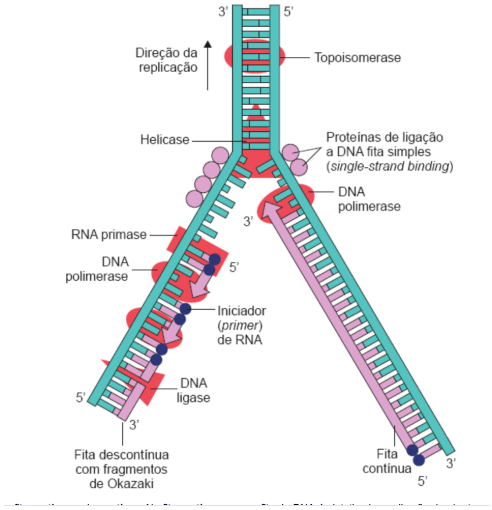


FIGURA 11-14 Fotomicrografia mostrando as origens de replicação múltiplas ao longo de um cromossomo eucariótico. Cada origem aparece como uma bolha de replicação na extensão do eixo do cromossomo. As setas identificam algumas dessas bolhas de replicação.

Mas como pode funcionar a DNA polimerase na fita *lagging*….
Ela fica pulando e vai no sentido contrário da forquilha?



https://www.youtube.com/watch?v=TNKWgcFPHqw

O modelo abaixo explica como a replicação das duas polimerases formam um dímero e seguem na mesma direção da forquilha!!!!

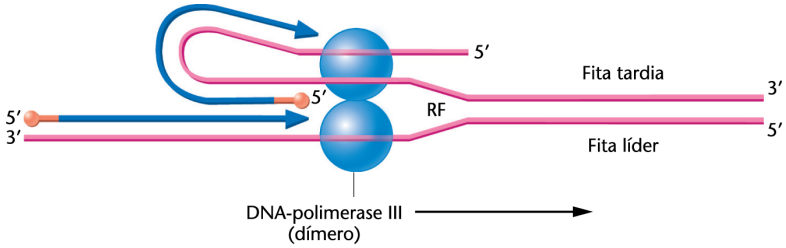
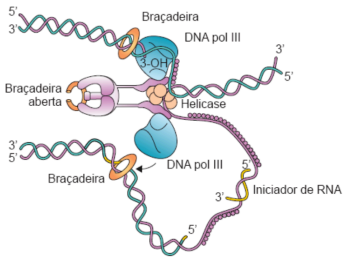
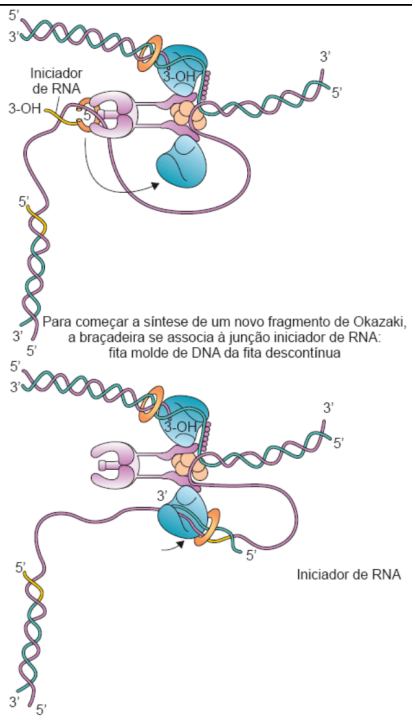


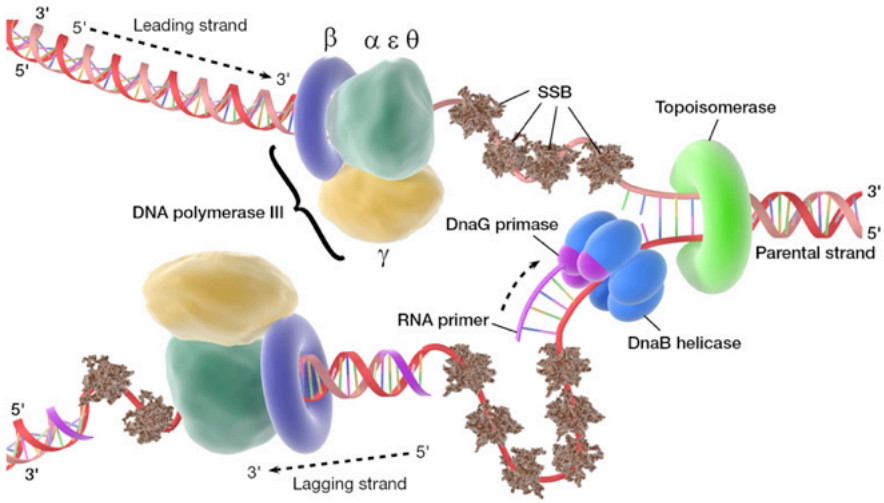
FIGURA 11-12 Ilustração de como a síntese do DNA pode ser realizada simultaneamente na fita líder e na fita tardia em uma única forquilha de replicação (RF). O molde da fita tardia forma uma "alça" para inverter a direção física da síntese, mas não sua direção bioquímica. A holoenzima contém um dímero que consiste em dois centros enzimáticos, cada um conduzindo a síntese em fitas diferentes.





ttps://www.youtube.com/watch?v=-mtLX

Mais uma com o replissomo:



Modelo de replissomo

http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/molecular_visualisations_of_dna/

E ainda tem a cromatina!!!!
A cromatina precisa ser replicada....

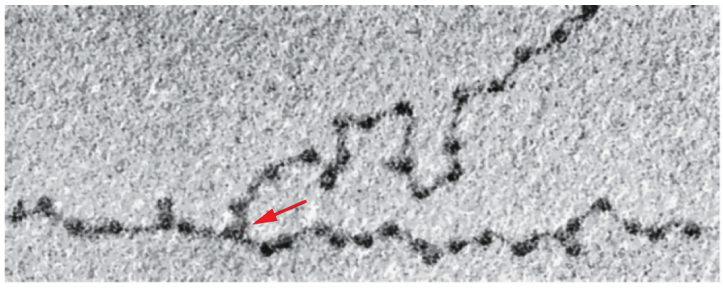
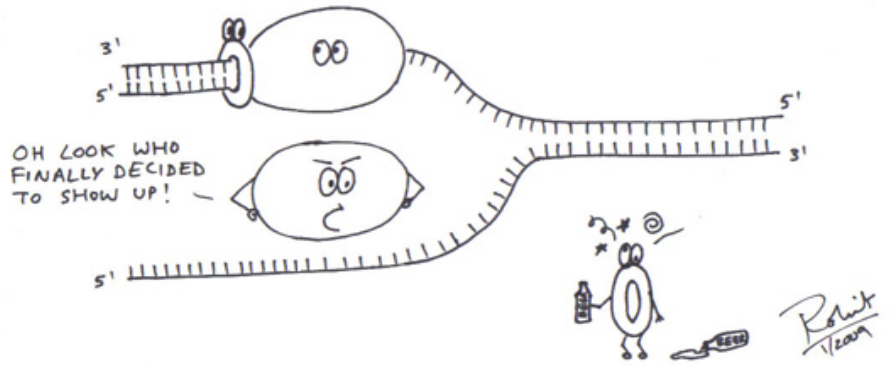


FIGURA 11-15 Fotomicrografia eletrônica de uma forquilha de replicação eucariótica, demonstrando a presença de nucleossomos com proteínas histônicas em ambas as ramificações.



O que é fidelidade de replicação????

Cada ciclo de replicação em *E.coli* pode ter um erro em cada 10^9 nucleotídeos!

Mas a pode haver pareamento errado… como a DNA polimerase consegue distinguir?

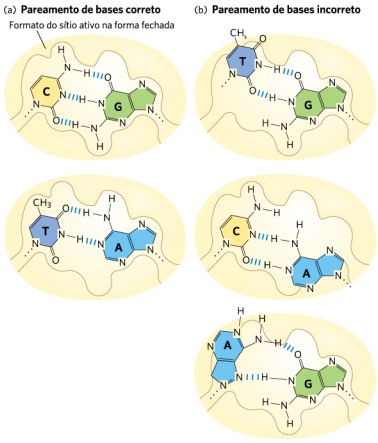


FIGURA 11-10 Pareamento de bases na cavidade do sítio ativo de Pol I. (a) O formato do sítio ativo na conformação fechada. Pares de bases corretos G≡C e A=T ajustam-se dentro do sítio ativo. (b) Pareamentos de bases incorretos não se encaixam no sítio.

Mas ainda assim a DNA polimerase insere um nucleotídeo errado a cada 10^5 a 10^6 nucleotídeos…. E a diferença?

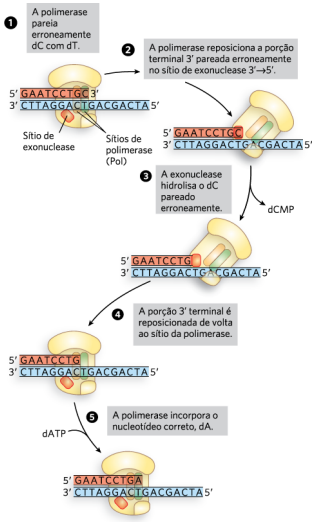


FIGURA 11-6 A atividade de exonuclease 3'→5' de correção de erro das DNA-polimerases. O sítio ativo da exonuclease 3'→5' é distinto do sítios de polimerização e revisa o produto da DNA-polimerase.

A atividade exonuclease 3'-5' faz a função "editorial" ou *Proofreading*.

o que dá uma fidelidade cerca de 100 vezes maior!

Após a replicação ainda há possibilidade de correção de erro: por um sistema de reparo de *mismatch*! Esse sistema também funciona para corrigir erros de pareamento após recombinação!

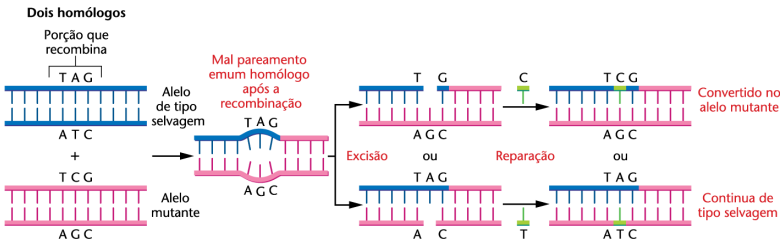


FIGURA 11-19 Proposta de um mecanismo responsável pelo fenômeno da conversão gênica durante a recombinação na meiose. Ocorre o mal pareamento de um par de bases em um homólogo recombinante (devido à presença de um alelo mutante) durante a formação do heterodúplex. Durante a reparação por excisão, uma das duas bases mal pareadas é removida, e o complemento é sintetizado. Em um caso, o par de bases mutante é preservado; quando é subsequentemente incluído em um esporo recombinante, o genótipo mutante será mantido. No outro caso, o par de bases mutante é convertido na sequência de tipo selvagem. Quando incluído em um esporo recombinante, o genótipo de tipo selvagem será expresso, causando uma proporção de troca não recíproca.

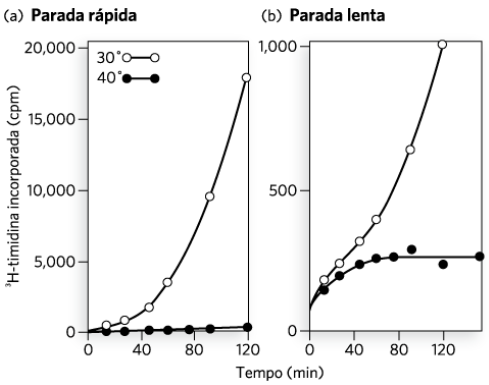


FIGURA 11-28 Dois modelos de replicação gênica revelados por estudos genéticos. Mutantes de *E. coli* sensíveis à temperatura foram analisados quanto ao tempo necessário para a parada da replicação após a exposição das células a temperaturas não toleráveis. A replicação do DNA foi verificada pela absorção de [^{3}H]timidina dentro do DNA celular (medida pela quantificação por minuto, cpm – do inglês *counts per minute*) a temperaturas toleráveis (30°C, círculos claros) e não toleráveis (40°C, círculos escuros). (a) Um gene apresentando um fenótipo de parada rápida codifica uma proteína envolvida na progressão da forquilha de replicação. (b) Um gene apresentando um fenótipo de parada lenta codifica uma proteína envolvida na iniciação da replica-