

CAPÍTULO 6

Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

A capacidade de uma célula manter a ordem em um ambiente caótico depende da duplicação precisa da enorme quantidade de material genético contido no seu DNA. Esse processo de duplicação, chamado de *replicação do DNA*, deve ocorrer antes que uma célula possa produzir duas células-filhas geneticamente idênticas. A manutenção da ordem em uma célula também exige uma vigilância contínua e reparos na sua informação genética, uma vez que o DNA está sujeito a danos causados por compostos químicos e radiações do ambiente e por moléculas reativas produzidas dentro da célula. Neste capítulo, descreveremos as maquinarias proteicas que promovem a replicação e o reparo do DNA da célula. Essas maquinarias catalisam alguns dos processos mais rápidos e precisos que ocorrem dentro das células, sendo que as suas ações refletem a elegância e a eficiência da química celular.

Embora existam sistemas para proteger a instrução genética dos erros de cópia e de lesões acidentais, alterações permanentes, ou *mutações*, ocorrem ocasionalmente. Muitas dessas mutações não afetam o organismo de maneira significativa; porém, algumas possuem consequências severas. Às vezes, essas alterações podem ser benéficas ao organismo: por exemplo, mutações que tornam uma bactéria resistente a antibióticos que seriam usados para eliminá-la. O acúmulo das alterações sofridas pelo DNA durante milhões de anos promoveu a variedade de material genético que diferencia uma espécie da outra, como discutido no Capítulo 9. As mutações também produzem as discretas variações que resultam nas diferenças entre indivíduos da mesma espécie, facilmente identificadas nos humanos e em outros animais (Figura 6-1).

Contudo, as mutações também podem ser prejudiciais: nos humanos, são responsáveis por milhares de doenças genéticas hereditárias e diversos tipos de câncer.

REPLICAÇÃO DO DNA

REPARO DE DNA

RECOMBINAÇÃO
HOMÓLOGA

ELEMENTOS GENÉTICOS
MÓVEIS E VÍRUS



Figura 6-1 A informação hereditária é transmitida fielmente de geração à geração. Entretanto, alterações no DNA podem produzir as variações que resultam nas diferenças entre indivíduos da mesma espécie – ou, com o passar do tempo, as diferenças entre uma espécie e outra. Nessa foto de família, as crianças assemelham-se entre si e aos seus pais, mais do que a outras pessoas, porque herdaram os seus genes de seus pais. Gatos e humanos possuem várias características comuns, mas durante os milhões de anos evolutivos que separaram gatos e humanos, ambos acumularam inúmeras alterações genéticas que resultaram em espécies bastante diferentes. A galinha é um parente ainda mais distante.

Portanto, a sobrevivência de uma célula ou organismo depende da capacidade de manter essas alterações no seu DNA em um nível mínimo. Na ausência de sistemas celulares que realizam continuamente o monitoramento e o reparo do DNA danificado, a existência da vida seria questionável.

Iniciaremos este capítulo apresentando uma revisão dos mecanismos responsáveis pela duplicação e pela manutenção do DNA com um mínimo de mutações. A seguir, iremos considerar algumas das curiosas vias pelas quais a informação genética pode ser alterada, incluindo a *recombinação homóloga* e o movimento de sequências de DNA especiais, presentes em nossos cromossomos, chamadas de *elementos genéticos móveis*. Finalmente, discutiremos os vírus – pouco mais do que alguns genes protegidos por uma capa proteica –, que podem mover-se de uma célula à outra.

REPLICAÇÃO DO DNA

A cada divisão celular, uma célula deve copiar seu genoma com uma precisão extraordinária. Nesta seção, discutiremos como tal precisão é alcançada, ao mesmo tempo em que a duplicação do DNA ocorre em taxas muito elevadas de até 1.000 nucleotídeos por segundo.

O pareamento de bases permite a replicação do DNA

No capítulo anterior, vimos que cada fita da dupla-hélice de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência de nucleotídeos da outra fita da hélice. Cada fita pode, portanto, servir de **molde**, ou modelo, para a síntese de uma nova fita complementar (Figura 6-2). Em outras palavras, se designarmos as duas fitas como S e S', a fita S pode servir como um molde para a síntese de uma nova fita S', e, ao mesmo tempo, a fita S' pode atuar como molde para a síntese de uma nova fita S (Figura 6-3). Portanto, a informação genética contida no DNA pode ser copiada com precisão por um processo

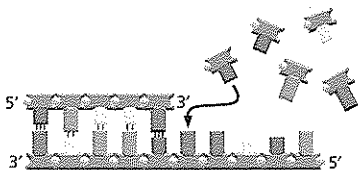


Figura 6-2 Uma fita de DNA pode atuar como um molde. A ligação preferencial ocorre entre os pares de nucleotídeos (A com T, e G com C) que podem formar pares de bases. Isso permite que cada fita sirva de molde na formação da sua fita complementar.

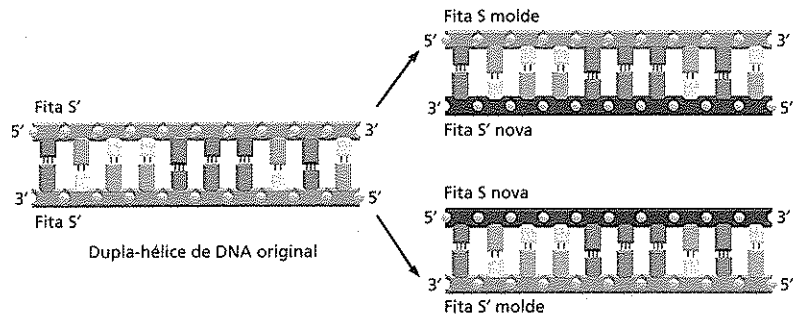


Figura 6-3 O DNA atua como um molde para sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A irá formar par apenas com T, e G apenas com C, cada fita de DNA da dupla-hélice – indicada aqui como fita S e sua fita complementar S' – atua como um molde para especificar a sequência de nucleotídeos na sua fita complementar. Dessa forma, a dupla-hélice de DNA pode ser precisamente copiada. Observe que, apesar de representadas em cores diferentes, as fitas-molde (em laranja) e as fitas novas (em vermelho) são quimicamente idênticas.

Figura 6-4 A cada ciclo de replicação, cada uma das duas fitas do DNA é usada como molde para a formação de uma fita de DNA complementar. As fitas originais, portanto, permanecem intactas por diversas gerações. A replicação do DNA é "semiconservativa", porque cada dupla-hélice filha é composta por uma fita conservada e por uma fita recém-sintetizada.

simples e elegante, no qual a fita S é separada da fita S' e cada uma atua, separadamente, como molde para a produção de uma nova fita complementar, idêntica à fita complementar original.

A capacidade de cada fita de uma molécula de DNA servir como um molde para a produção de uma fita complementar permite que a célula copie ou *replique* seus genes antes de passá-los a suas descendentes. Entretanto, a tarefa é colossal, pois envolve a duplicação de bilhões de pares de nucleotídeos cada vez que a célula se divide. O processo de cópia deve ocorrer com velocidade e precisão: em cerca de 8 horas, uma célula animal em divisão deverá ter copiado o equivalente a 1.000 livros como este e, em média, não ter mais do que uma ou duas letras erradas. Esse feito é realizado por um grupo de proteínas que juntas formam uma *máquina de replicação*.

A **replicação do DNA** produz duas duplas-hélices completas a partir da molécula original de DNA, cada hélice nova de DNA possui a sequência de nucleotídeos idêntica (exceto pelos raros erros) à dupla-hélice de DNA original (ver Figura 6-3). Como cada fita de DNA original atua com um molde para uma nova fita, cada uma das hélices-filhas de DNA é formada por uma fita original (existente) e outra completamente nova; esse modo de replicação é chamado de *semiconservativo* (Figura 6-4). Em *Como Sabemos*, p. 200-202, discutimos os experimentos iniciais que demonstraram que o DNA é replicado desse modo.

A síntese de DNA inicia nas origens de replicação

A dupla-hélice de DNA é normalmente muito estável: as duas fitas de DNA estão firmemente ligadas por um grande número de pontes de hidrogênio entre as bases presentes em ambas as fitas (ver Figura 5-2). Como resultado, apenas temperaturas próximas à temperatura de ebulição da água fornecem a energia térmica necessária para separar essas fitas. Para ser utilizada como molde, a dupla-hélice deve ser primeiramente aberta, as duas fitas separadas para expor as bases não pareadas. Como esse processo ocorre nas temperaturas fisiológicas da célula?

O processo de replicação do DNA começa com proteínas iniciadoras que se ligam ao DNA e provocam a abertura das fitas, quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases (Figura 6-5). Apesar de coletivamente formarem uma hélice bastante estável, cada ponte de hidrogênio individualmente é fraca (discutida no Capítulo 2). A separação de um pequeno segmento de DNA com poucos pares de bases por vez, portanto, não requer uma grande quantidade de energia e pode ocorrer com o auxílio dessas proteínas em temperaturas normais.

Os locais em que ocorre a abertura inicial das fitas de DNA são denominados **origens de replicação** e são geralmente caracterizados por uma sequência específica de nucleotídeos. Em células simples, como bactérias e leveduras, as origens de replicação compreendem cerca de 100 pares de bases; são compostas por sequências de DNA que atraem as proteínas iniciadoras e são segmentos de DNA particularmente fáceis de separar. Vimos no Capítulo 5 que o par de bases A-T é unido por menos pontes de hidrogênio do que o par G-C. Portanto, um segmento de DNA rico em pares de bases A-T é relativamente mais fácil de ser separado e segmentos de pares A-T são normalmente encontrados nas origens de replicação.

Um genoma bacteriano, que é normalmente contido em uma molécula circular de DNA com vários milhões de pares de nucleotídeos, possui uma única origem de replicação.

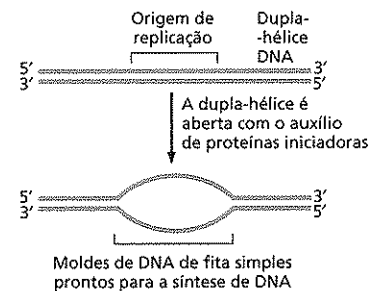
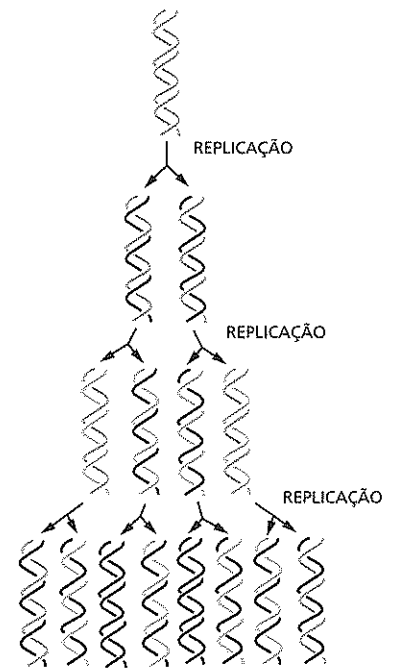


Figura 6-5 A dupla-hélice de DNA é aberta na origem de replicação. Proteínas iniciadoras da replicação reconhecem sequências de DNA nas origens de replicação e separam localmente as duas fitas da dupla-hélice. Assim, as fitas simples expostas atuam como moldes para a cópia do DNA.

COMO SABEMOS: A NATUREZA DA REPLICAÇÃO

Em 1953, James Watson e Francis Crick publicaram o famoso artigo de duas páginas descrevendo o modelo para a estrutura do DNA (ver Figura 5-2). Nesse artigo, eles propuseram que as bases complementares – adenina e timina, guanina e citosina – formavam pares entre si, voltadas para o centro de uma dupla-hélice, que mantinha as duas fitas de DNA unidas. Bem ao final dessa sucinta e bombástica revelação científica, os pesquisadores comentaram, quase como um aparte, “não escapou ao nosso conhecimento que o pareamento específico que postulamos imediatamente sugere um possível mecanismo para a cópia do material genético”.

De fato, um mês após a publicação desse clássico artigo no periódico *Nature*, Watson e Crick publicaram um segundo artigo, sugerindo como o DNA poderia ser duplicado. Nesse artigo, eles propuseram que as duas fitas da dupla-hélice são desenroladas, e cada uma atua como um molde para a síntese de uma fita-filha complementar. Nesse modelo, chamado de replicação *semiconservativa*, cada nova molécula de DNA consiste em uma fita derivada da molécula original e uma outra fita sintetizada completamente nova (Figura 6-6A).

Sabemos hoje que o modelo de Watson e Crick para a replicação do DNA estava correto – mas ele não foi totalmente aceito no início. Um respeitado médico que virou geneticista, Max Delbrück, entre outros, ficou intrigado com o que chamou de “o problema do desen-

rolamento”; isto é: como as duas fitas da dupla-hélice, enroladas uma sobre a outra tantas vezes ao longo do comprimento, poderiam ser desenroladas sem que isso causasse um grande e confuso emaranhamento? A concepção de Watson e Crick de que a hélice de DNA se abria do modo similar a um zíper parecia, a Delbrück, fisicamente improvável e simplesmente “muito deselegante para ser eficiente”.

Em vez disso, Delbrück propôs que a replicação do DNA ocorreria por meio de diversas quebras e religações, nas quais o esqueleto de DNA seria rompido e as fitas copiadas em pequenos fragmentos – talvez com apenas 10 nucleotídeos por vez – antes de serem religadas. Nesse modelo, chamado mais tarde de *dispersivo*, as cópias resultantes seriam conjuntos híbridos de DNA original e novo, cada fita contendo uma mistura dos dois (Figura 6-6B). O desenrolamento não seria necessário.

Houve ainda um terceiro grupo que propôs a ideia de que a replicação seria *conservativa*: a hélice original de alguma forma seria mantida inteiramente intacta após a duplicação, e a molécula-filha seria formada por duas fitas de DNA inteiramente novas (Figura 6-6C). Para determinar qual desses modelos estava correto, um experimento era necessário – um que pudesse revelar a composição das fitas de DNA recém-sintetizadas. Foi isso que Matt Meselson e Frank Stahl demonstraram.

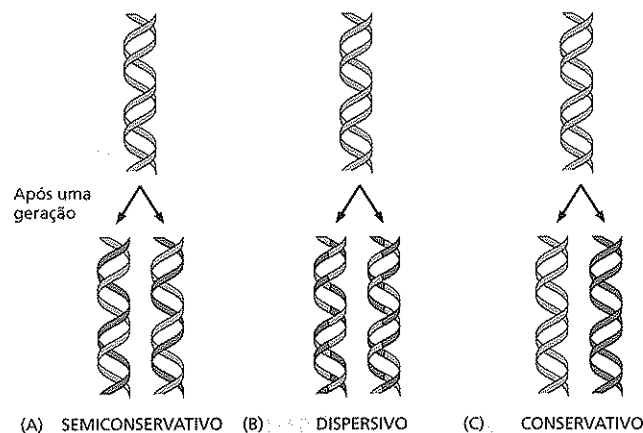


Figura 6-6 Três modelos para a replicação do DNA com diferentes resultados. (A) No modelo semiconservativo, cada fita original atua como molde para a síntese de uma nova fita-filha. O primeiro ciclo de replicação produz duas moléculas híbridas, cada uma contendo uma fita original e uma fita nova recém-sintetizada. Um próximo ciclo de replicação produz duas moléculas híbridas e duas moléculas que não contêm nenhuma fita original do DNA. (B) No modelo dispersivo, cada geração de hélices duplas de DNA contém uma mistura de fragmentos da fita original e material recém-sintetizado. (C) No modelo conservativo, a molécula original permanece intacta após ser copiada. Para cada modelo, as moléculas de DNA original estão mostradas em *laranja*, e o DNA recém-replicado, em *vermelho*. Observe que apenas um pequeno segmento de DNA é mostrado para cada modelo.

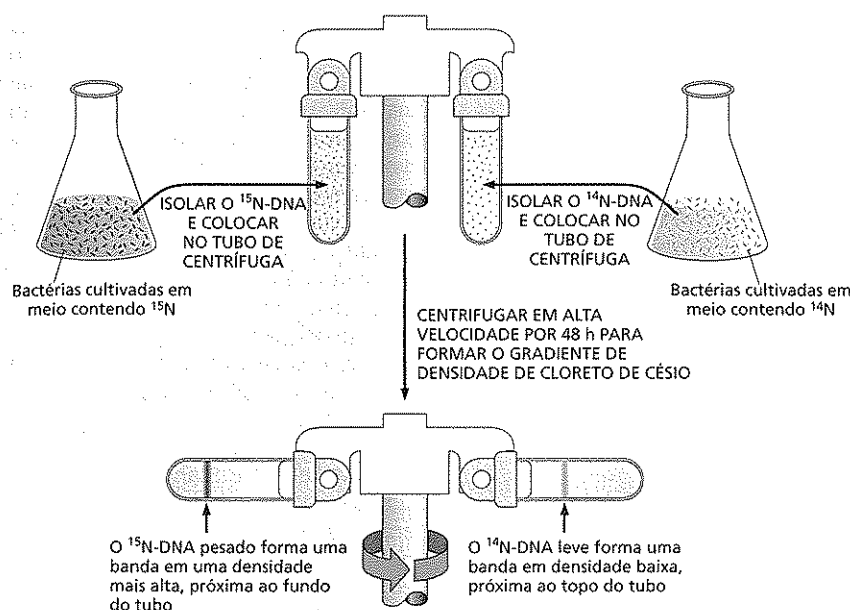


Figura 6-7 A centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο permite a separação de DNA leve e pesado. As bactérias são cultivadas por várias gerações em um meio contendo ^{15}N (o isótopo pesado) ou ^{14}N (o isótopo leve) para marcar o DNA. A seguir, as células são lisadas e o DNA é colocado em um tubo de ultracentrifuga contendo uma solução salina de cloreto de céσιο. Os tubos são centrifugados em alta velocidade por dois dias, para permitir que o DNA se acumule na região na qual sua densidade se aproxime da densidade do sal que o cerca. As moléculas de DNA leve e pesado se acumulam em diferentes posições no tubo.

Meselson era um estudante que trabalhava com Linus Pauling, aplicando um método para determinar a diferença entre proteínas novas e velhas. Após discutir com Delbrück sobre o modelo de replicação de Watson e Crick, ocorreu a Meselson que a estratégia aplicada para explorar a síntese de proteínas talvez também pudesse ser utilizada para o estudo de DNA. No verão de 1954, Meselson conheceu Stahl, na época um estudante em Rochester, NY, e eles concordaram em desenvolver um trabalho em colaboração. Foram necessários alguns anos para que tudo estivesse pronto, mas os dois finalmente realizaram o que ficou conhecido como "o experimento mais belo da biologia".

Sua abordagem, em retrospectiva, foi extremamente direta. Eles iniciaram promovendo o crescimento de duas culturas da bactéria *E. coli*, uma em um meio contendo um isótopo mais pesado do nitrogênio, ^{15}N , e o outro meio contendo o nitrogênio normal, mais leve, ^{14}N . O nitrogênio do meio nutritivo é incorporado às bases nucleotídicas e, então para o DNA do organismo. Após o cultivo das células por várias gerações em ambos meios, contendo ^{15}N e ^{14}N , os pesquisadores tinham dois frascos de bactérias, uma cujo DNA era *pesado*, e o outro cujo DNA era *leve*. Meselson e Stahl então lisaram as células e colocaram o DNA em tubos contendo uma alta concentração do sal cloreto de céσιο. Durante a centrifugação, o cloreto de céσιο forma um gradiente de densidade, e as moléculas de DNA se movem pela solução até o pon-

to em que sua densidade se iguala à densidade do sal (ver Painel 4-4, p. 164-165). Por esse método, chamado de centrifugação em gradiente de densidade, Meselson e Stahl descobriram que poderiam distinguir o DNA pesado (contendo ^{15}N) e o DNA leve (contendo ^{14}N) observando as posições do DNA no gradiente de cloreto de céσιο. Como o DNA pesado é mais denso do que o DNA leve, ele é recolhido em uma posição mais próxima do fundo do tubo de centrifuga (Figura 6-7).

Uma vez estabelecido o método para diferenciar entre o DNA pesado e o leve, Meselson e Stahl testaram as várias hipóteses propostas para a replicação. Eles transferiram uma cultura de bactérias cultivadas em meio com nitrogênio pesado e a transferiram para um frasco com meio contendo o isótopo leve. No início do experimento, todo o DNA seria pesado, porém, à medida que as bactérias se dividissem, o DNA recém-sintetizado seria leve. Assim, eles poderiam monitorar o acúmulo de DNA leve e ver qual modelo melhor explicaria os dados. Após uma geração, foi encontrado que as moléculas originais, com DNA pesado – em que as duas fitas foram produzidas com ^{15}N –, tinham desaparecido e sendo substituídas por um novo tipo de DNA que formava uma banda com densidade exatamente entre as bandas de ^{15}N -DNA e ^{14}N -DNA (Figura 6-8). Meselson e Stahl deduziram que essas hélices-filhas recém-sintetizadas eram híbridas – contendo ambos os isótopos leve e pesado.

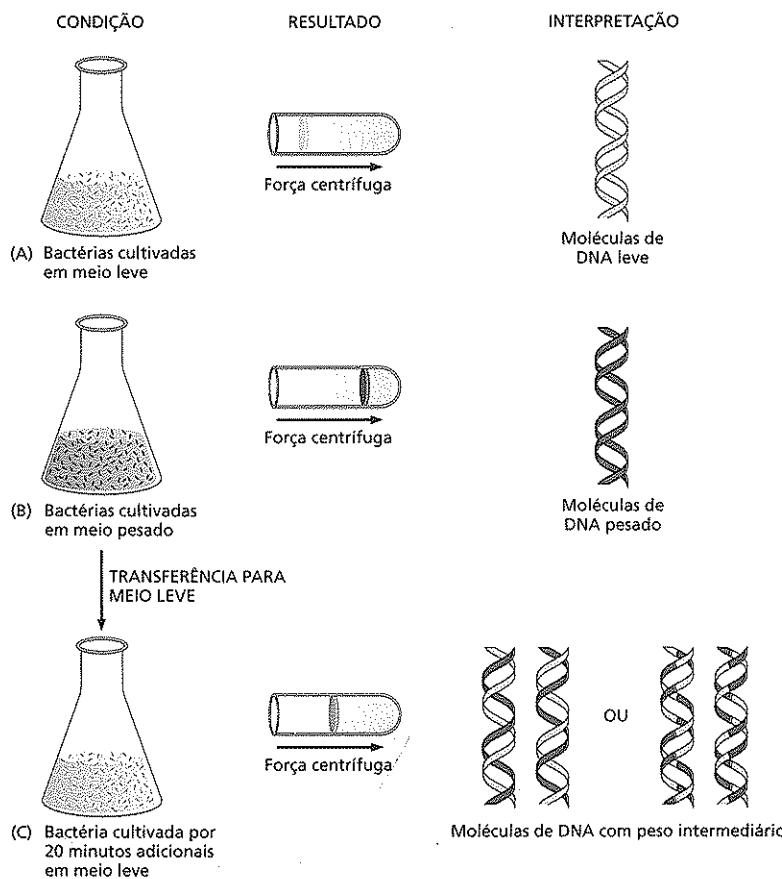


Figura 6-8 A primeira parte do experimento de Meselson-Stahl exclui o modelo conservativo de replicação do DNA. (A) Bactérias cultivadas em meio leve (contendo ^{14}N) produzem DNA que forma uma banda na porção superior do tubo de centrifuga, ao passo que bactérias cultivadas em meio pesado contendo ^{15}N (B) produzem DNA que migra mais para região inferior do tubo. Quando bactérias cultivadas no meio pesado são transferidas para um meio leve e cultivadas por algum tempo para permitir sua divisão, elas produzem uma banda com posição intermediária entre as duas bandas originais (C). Esse resultado descarta o modelo conservativo para replicação, mas não distingue o modelo dispersivo do semiconservativo, ambos preveem a formação de moléculas-filhas híbridas de DNA.

O fato de os resultados serem tão claros – com a formação de bandas compactas nas posições esperadas para as moléculas híbridas de DNA – foi um feliz acidente do protocolo experimental. Os pesquisadores utilizaram uma seringa hipodérmica para colocar as amostras de DNA nos tubos de ultracentrifuga (ver Figura 6-7). No processo, eles, sem querer, fragmentaram o cromossomo bacteriano em segmentos menores. Caso os cromossomos tivessem permanecido inteiros, moléculas de DNA parcialmente replicadas seriam isoladas, uma vez que várias células estariam no meio do processo de cópia do DNA quando coletadas. Moléculas nesse estágio intermediário de replicação não seriam separadas em bandas discretas. Como os pesquisadores estavam, então, trabalhando com fragmentos menores, a chance de estarem completamente replicados – e contendo uma fita original e uma nova – era maior, produzindo, portanto, esses resultados claros e elegantes.

Na hora, essa observação excluía o modelo conservativo de replicação do DNA, que previa que o DNA original permanecesse inteiramente pesado, ao passo que as hélices-filhas seriam 100% leves (ver Figura 6-6C). Os dados sustentavam o modelo semiconservativo, que previa a formação de moléculas híbridas contendo uma fita de DNA pesado e uma fita de DNA leve (ver Figura 6-6A). Esses resultados também eram compatíveis com o modelo dispersivo, em que moléculas híbridas conteriam uma mistura de DNA leve e pesado (ver Figura 6-6B).

Para distinguir esses dois modelos, Meselson e Stahl usaram calor. Quando o DNA é submetido a altas temperaturas, as pontes de hidrogênio que unem as duas fitas são rompidas, e a hélice é separada, resultando em várias fitas simples de DNA. Quando as moléculas híbridas foram aquecidas e depois centrifugadas, foi visto que uma fita de DNA era pesada e que outra era leve. Essa observação deu suporte ao modelo semiconservativo; se o modelo dispersivo fosse o correto, as fitas de DNA resultantes, cada uma contendo uma mistura de fragmentos leves e pesados, teriam formado bandas a uma densidade intermediária.

De acordo com o historiador Frederic Lawrence Holmes, o experimento foi tão elegante e claro que Stahl – quando entrevistado para uma posição na Universidade de Yale – foi incapaz de ocupar os 50 minutos alocados para sua palestra. “Eu terminei em 25 minutos”, disse Stahl, “porque é o tempo que leva para explicar o experimento. Ele é totalmente simples e limitado”. Stahl não conseguiu o emprego em Yale, mas seu experimento convenceu os cientistas de que Watson e Crick estavam corretos. Os resultados foram aceitos tão ampla e rapidamente que o experimento foi descrito em livros-texto antes que Meselson e Stahl publicassem os dados.

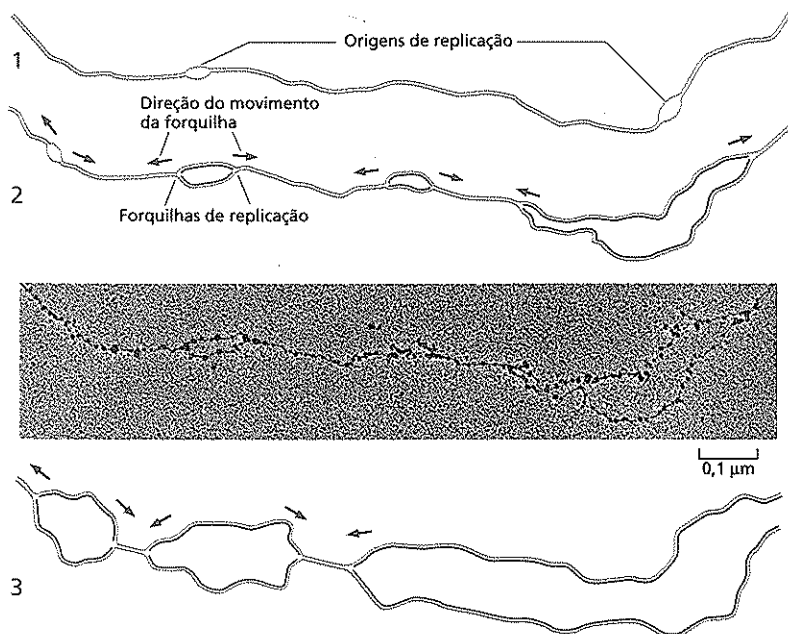
O genoma humano, que é muito maior, possui aproximadamente 10.000 dessas origens. Em humanos, o início da replicação em vários locais ao mesmo tempo reduz enormemente o tempo necessário para que uma célula copie todo seu genoma.

Uma vez que uma proteína iniciadora se liga ao DNA na origem de replicação e provoca a abertura local da dupla-hélice, um grupo de proteínas que realizam a replicação do DNA é atraído ao local. Essas proteínas formam uma máquina proteica, na qual cada membro desempenha uma função específica. Apresentaremos cada uma dessas proteínas brevemente e a seguir discutiremos o processo global de replicação do DNA.

A síntese de DNA novo ocorre nas forquilhas de replicação

Durante o processo de replicação, estruturas com forma de Y podem ser vistas nas moléculas de DNA, denominadas **forquilhas de replicação** (Figura 6-9). Nessas forquilhas, a máquina de replicação se desloca sobre o DNA, causando a abertura das duas fitas da dupla-hélice e usando cada uma das fitas como um molde para produzir uma nova fita-filha. Duas forquilhas de replicação são formadas a partir de cada origem de replicação, e essas se afastam da origem nas duas direções, separando o DNA à medida que vão se afastando. Dessa forma, a replicação do DNA nos cromossomos bacterianos e eucarióticos é dita *bidirecional*. As forquilhas se deslocam muito rapidamente – cerca de 1.000 pares de nucleotídeos por segundo em bactérias e 100 pares de nucleotídeos por segundo em humanos. A velocidade mais lenta do movimento da forquilha em humanos (e em todos os eucariotos) pode ser devida às dificuldades geradas pela presença da estrutura da cromatina, mais complexa, encontrada nos organismos superiores.

No coração da máquina de replicação está a enzima **DNA-polimerase**, que sintetiza o DNA novo utilizando uma das fitas existentes como molde. Essa enzima catalisa a adição de nucleotídeos à extremidade 3' de uma cadeia crescente de DNA pela formação da ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' e o grupo 5'-fosfato do nucleotídeo a ser incorporado (Figura 6-10). Os nucleotídeos entram na reação inicialmente como trifosfatos de nucleosídeo que fornecem energia para a polimerização. A hidrólise de uma ligação de alta energia do trifosfato de nucleosídeo fornece a energia para a reação que liga um monômero nucleotídico à cadeia e libera pirofosfato (PP_i).



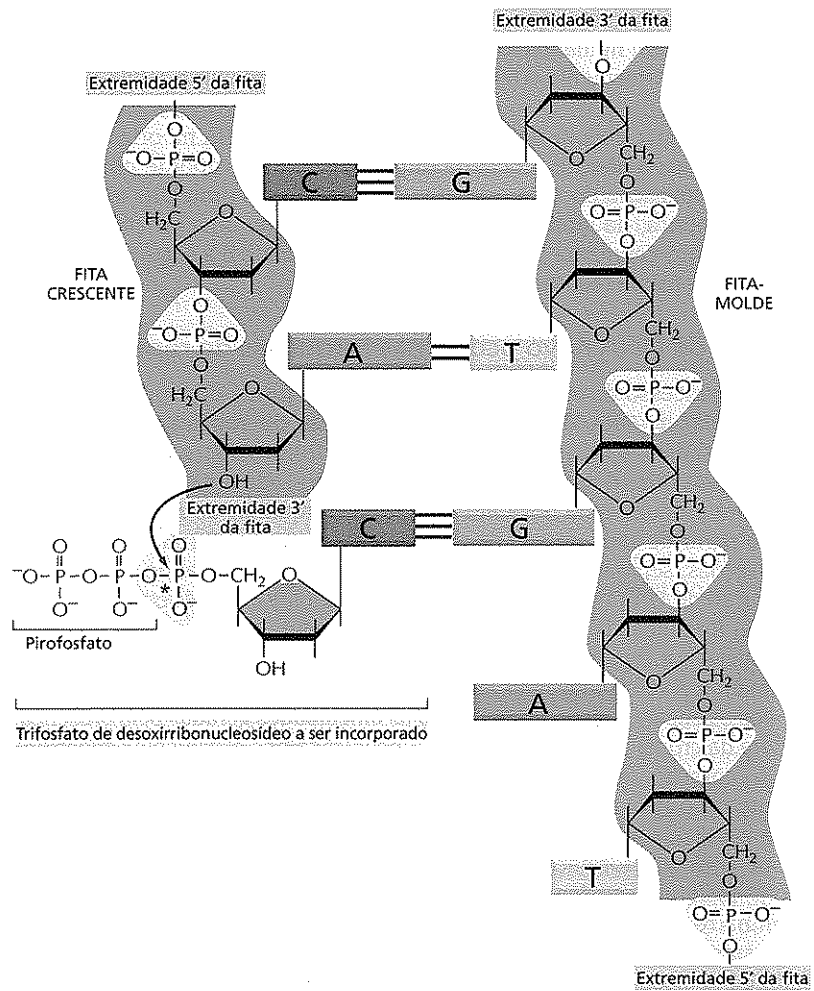
QUESTÃO 6-1

Observe atentamente a micrografia na Figura 6-9.

- A. Usando a barra de escala, estime o comprimento das fitas de DNA entre as forquilhas de replicação. Numerando as forquilhas de replicação em sequência a partir da esquerda, em quanto tempo as forquilhas 4 e 5, e 6 e 7, respectivamente, irão colidir entre si? (Lembre-se de que a distância entre as bases no DNA é 0,34 nm e que a forquilha de replicação de eucariotos se move cerca de 100 nucleotídeos por segundo.) Para essa questão, desconsidere os nucleossomos vistos na micrografia e considere que o DNA está completamente estendido.
- B. O genoma da mosca tem cerca de $1,8 \times 10^8$ nucleotídeos de comprimento. Que fração do genoma é mostrada na micrografia?

Figura 6-9 As forquilhas de replicação se movem em direções opostas, a partir de diversas origens de replicação nos cromossomos eucarióticos. A micrografia eletrônica mostra o DNA sendo replicado no embrião precoce de mosca. As partículas visíveis ao longo do DNA são os nucleossomos, estruturas formadas por DNA e complexos proteicos, sobre os quais o DNA é enrolado (ver Capítulo 5). (1), (2) e (3) são desenhos da mesma região de uma molécula de DNA, vistas em estágios sucessivos de replicação, desenhados a partir de micrografias eletrônicas. (2) é desenhado a partir da micrografia mostrada na figura. As linhas em laranja representam as fitas de DNA originais; as linhas vermelhas contínuas representam DNA recém-sintetizado. (Micrografia eletrônica cortesia de Victoria Foe.)

Figura 6-10 O DNA é sintetizado na direção 5'-3'. A adição de um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3'-OH de uma cadeia polinucleotídica é a reação fundamental para a síntese de DNA; a nova cadeia de DNA é, portanto, sintetizada na direção 5'-3'. Os nucleotídeos entram na reação como trifosfatos de nucleosídeos. O pareamento de bases entre o desoxirribonucleotídeo a ser incorporado e a fita-molde direciona a formação de uma nova fita complementar, em sequência de nucleotídeos, à cadeia molde (ver Figura 6-2). A enzima DNA-polimerase catalisa a adição de nucleotídeos à extremidade 3'-OH livre na cadeia crescente de DNA. A quebra de uma ligação anidridofosfórica (indicada por um asterisco) no trifosfato de nucleosídeo a ser incorporado libera uma grande quantidade de energia livre, fornecendo energia para a reação de polimerização.



A DNA-polimerase acopla a liberação dessa energia à reação de polimerização. O pirofosfato é ainda hidrolisado a fosfato inorgânico (P_i), tornando a reação de polimerização irreversível (ver Figura 3-41).

A DNA-polimerase não se dissocia do DNA cada vez que adiciona um novo nucleotídeo na cadeia crescente; ao contrário, permanece associada ao DNA e se desloca, a cada etapa, sobre a fita-molde por vários ciclos da reação de polimerização. A **Animação 6.1** mostra uma molécula de DNA-polimerase em ação. Veremos mais adiante, neste capítulo, que uma proteína especial mantém a polimerase acoplada ao DNA à medida que essa adiciona repetidamente novos nucleotídeos à cadeia crescente.

A forquilha de replicação é assimétrica

A direção 5'-3' do mecanismo de polimerização do DNA impõe um problema para a forquilha de replicação. Vimos, na Figura 5-2, que o esqueleto de açúcar-fosfato de cada fita da dupla-hélice de DNA possui uma única direção química, ou polaridade, determinada pelo modo como um resíduo de açúcar está ligado a outro, e que as duas fitas da dupla-hélice possuem orientações opostas. Como consequência, na forquilha de replicação, uma fita nova de DNA é sintetizada sobre um molde com uma orientação (3'-5'), e outra é sintetizada sobre um molde com orientação oposta (5'-3') (**Figura 6-11**). Portanto, a forquilha de replicação é assimétrica. À primeira vista, ambas as fitas novas de



Figura 6-11 Na forquilha de replicação, as duas fitas de DNA recém-sintetizadas possuem polaridades opostas.

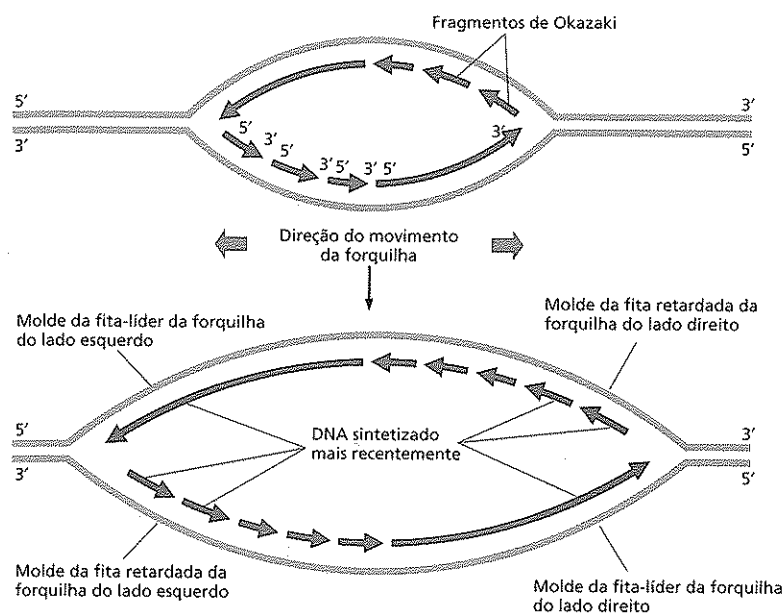


Figura 6-12 As forquilhas de replicação de DNA são assimétricas. Como ambas as fitas novas são sintetizadas na direção 5'-3', a fita retardada de DNA deve ser feita, inicialmente, como uma série de pequenos fragmentos de DNA que serão unidos mais tarde. O diagrama superior mostra duas forquilhas de replicação movendo-se em direções opostas; o diagrama inferior mostra as mesmas forquilhas de replicação um pouco mais tarde. Para sintetizar a fita retardada, a DNA-polimerase deve "costurar para trás": ela sintetiza fragmentos curtos (chamados de fragmentos de Okazaki) na direção 5'-3', e a seguir se move na direção oposta pela fita-molde (em direção à forquilha) antes de sintetizar o próximo fragmento.

DNA parecem crescer na mesma direção, isto é, na direção do movimento da forquilha. Isso sugere que uma fita é sintetizada na direção 3'-5', e a outra é sintetizada na direção 5'-3'.

A DNA-polimerase, entretanto, pode catalisar o crescimento da cadeia de DNA em uma única direção; a adição de novas subunidades só pode ocorrer na extremidade 3' da cadeia (ver Figura 6-10). Assim, uma fita nova de DNA só pode ser sintetizada na direção 5'-3'. Isso pode ser facilmente entendido para a síntese de uma das fitas na forquilha de replicação, mas não para outra. Poderia ser esperado que um segundo tipo de DNA-polimerase realizasse a síntese da outra fita de DNA – uma polimerase capaz de adicionar subunidades à extremidade 5' da cadeia. Entretanto, tal enzima não existe. Em vez disso, o problema é resolvido por uma manobra de "costurar para trás". A fita de DNA cuja extremidade 5' deve crescer é produzida de modo *descontínuo*, em pequenos segmentos sucessivos, na qual a DNA-polimerase polimeriza para trás em relação ao movimento da forquilha, na direção 5'-3' em cada novo segmento.

Esses pequenos segmentos de DNA – chamados de **fragmentos de Okazaki**, em homenagem ao cientista que os descobriu – são unidos mais tarde, formando uma fita nova contínua (Figura 6-12). A fita de DNA sintetizada de modo descontínuo é chamada de **fita retardada**; a outra fita, sintetizada de modo contínuo, é chamada de **fita-líder**.

Embora sejam diferentes em alguns detalhes, as forquilhas de replicação de todas as células, procarióticas e eucarióticas, possuem fitas-líder e retardada. Essa característica é comum porque todas as DNA-polimerases utilizadas na replicação do DNA polimerizam apenas na direção 5'-3'. Uma vantagem importante dessa manobra molecular aparentemente complicada é discutida a seguir.

A DNA-polimerase é autocorretiva

A DNA-polimerase é tão precisa que produz apenas cerca de um erro a cada 10^7 pares de nucleotídeos copiados. Essa taxa de erro é muito menor do que pode ser explicado simplesmente pela precisão do pareamento entre bases complementares. A -T e C-G são, de longe, os pares de bases mais estáveis, mas outros pares, menos estáveis – como G-T e C-A, por exemplo – podem ser formados. Esses pareamentos incorretos são formados com muito menos frequência com-

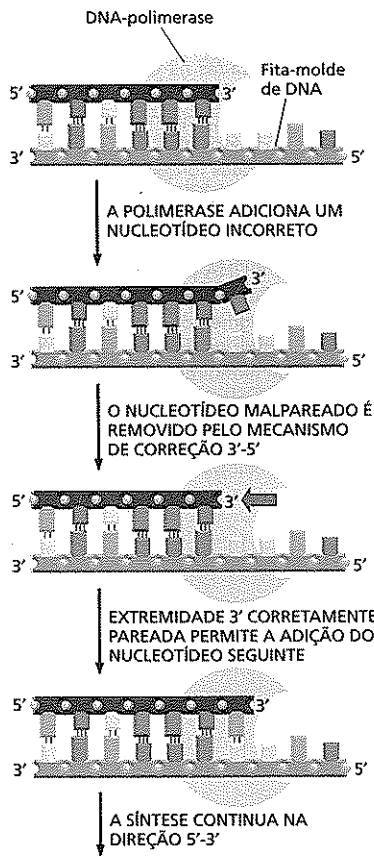


Figura 6-13 Durante a síntese de DNA, a DNA-polimerase verifica seu próprio trabalho. Se um nucleotídeo incorreto é adicionado a uma fita crescente, a DNA-polimerase irá removê-lo e substituí-lo pelo nucleotídeo correto antes de continuar a síntese.

parados aos corretos, mas, se permanecessem no DNA, matariam a célula pelo acúmulo de mutações. Essa catástrofe é evitada porque a DNA-polimerase possui duas características que aumentam enormemente a precisão da replicação do DNA. Primeiro, a enzima monitora cuidadosamente o pareamento de bases entre cada nucleotídeo a ser incorporado e a fita-molde. A DNA-polimerase catalisa a reação de adição apenas quando o pareamento está correto. Segundo, quando a DNA-polimerase produz um erro raro e adiciona um nucleotídeo incorreto, ela pode verificar o erro por uma atividade chamada de **correção de erros** (*proofreading*).

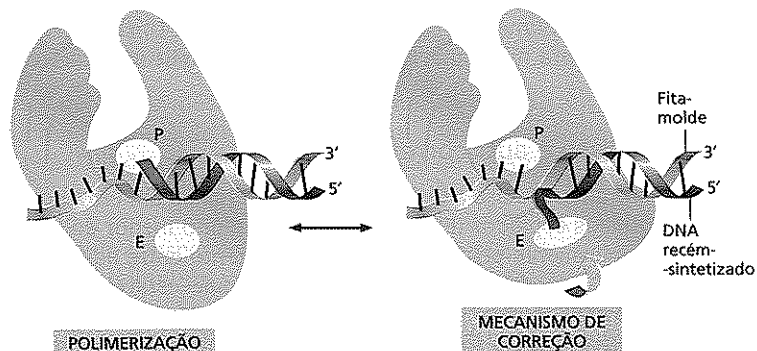
A correção de erros ocorre ao mesmo tempo em que a síntese de DNA. Antes de adicionar um próximo nucleotídeo à cadeia crescente de DNA, a enzima verifica se o nucleotídeo inserido anteriormente está pareado de forma correta à fita-molde. Se estiver, a polimerase adiciona o próximo nucleotídeo; se não, a polimerase remove o nucleotídeo malpareado e tenta novamente (Figura 6-13). Portanto, a DNA-polimerase possui uma atividade de polimerização 5'-3' altamente precisa e também uma atividade de correção de erros 3'-5'. Essa correção é realizada por uma nuclease que cliva o esqueleto fosfodiéster. A polimerização e a correção de erros são fortemente coordenadas, e ambas as reações são realizadas por diferentes domínios da molécula da polimerase (Figura 6-14).

Esse mecanismo de correção explica por que a DNA-polimerase sintetiza DNA apenas na direção 5'-3', apesar de esse modo impor um mecanismo complicado de costura para trás na forquilha de replicação. Como mostrado na Figura 6-15A, uma DNA-polimerase hipotética que sintetizasse na direção 3'-5' (e assim não necessitaria "costurar para trás") seria incapaz de autocorreção; caso um nucleotídeo incorretamente pareado fosse removido, a polimerase criaria uma extremidade de cadeia quimicamente morta, no sentido de perder sua capacidade de alongamento. Portanto, para que uma DNA-polimerase funcione como uma enzima autocorretiva, que remove seus próprios erros de polimerização à medida que se desloca pelo DNA, ela deve polimerizar apenas na direção de 5'-3' (Figura 6-15B).

Pequenos segmentos de RNA atuam como iniciadores na síntese de DNA

Vimos que a fidelidade da replicação do DNA depende da necessidade de haver uma extremidade corretamente pareada para a DNA-polimerase, antes que ela possa adicionar novos nucleotídeos. No entanto, como a polimerase somente pode ligar um nucleotídeo a um nucleotídeo pareado na dupla-hélice de DNA, ela não pode iniciar uma fita de DNA completamente nova.

Figura 6-14 A DNA-polimerase contém sítios separados para síntese e correção do DNA. O diagrama se baseia na estrutura da molécula de DNA-polimerase de *E. coli*, determinada por cristalografia por raios X. De certa forma, a enzima se assemelha a uma mão direita, que segura o DNA com a palma, dedos e polegar. A DNA-polimerase é mostrada com o DNA-molde, no modo de polimerização (à esquerda) e no modo de correção (à direita). Os sítios catalíticos para a atividade de polimerização (P) e correção de erros (E) estão indicados. Quando um nucleotídeo incorreto é adicionado, o DNA recém-sintetizado (em vermelho) temporariamente se afasta do molde (em laranja), e a polimerase sofre uma alteração conformacional (indicada por uma seta em cinza) que coloca o sítio de correção de erros na posição para permitir a remoção do nucleotídeo recém-adicionado.



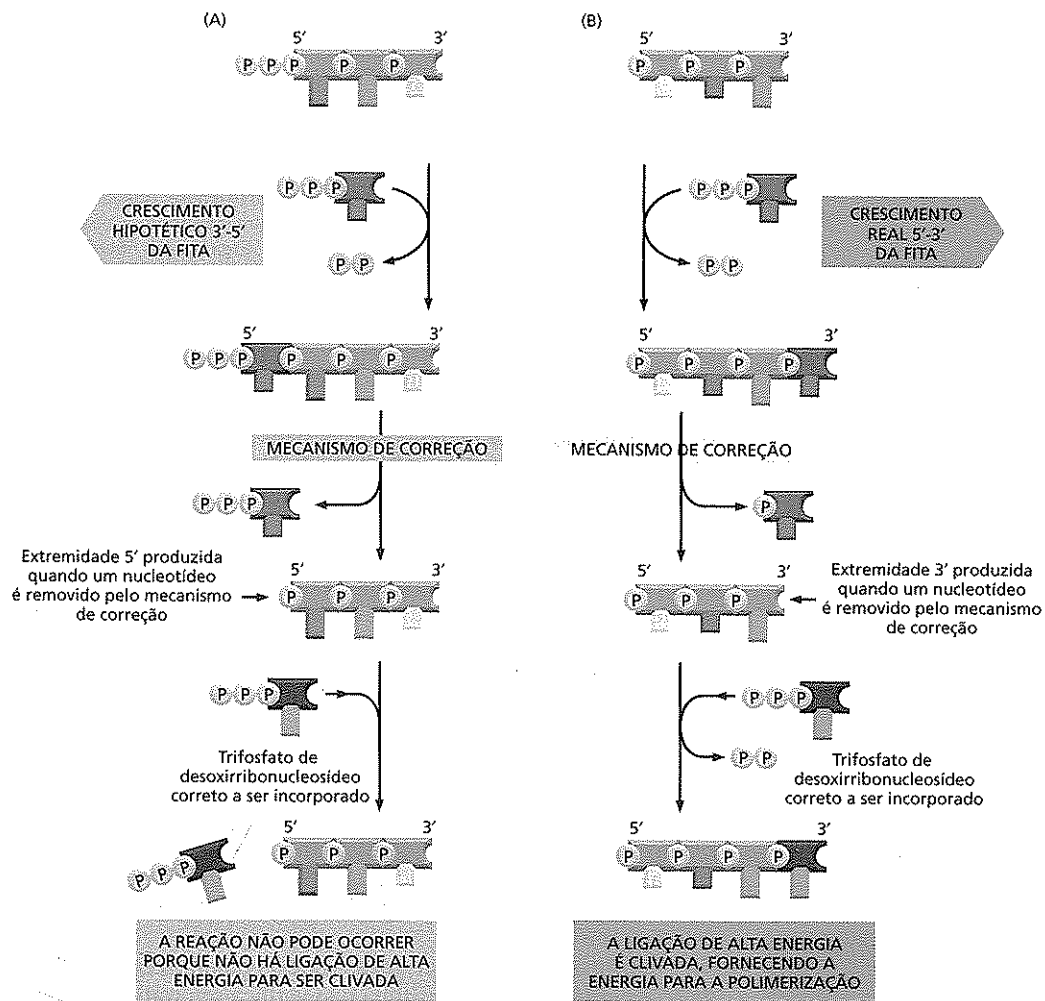


Figura 6-15 A necessidade de correção explica por que as cadeias de DNA são sintetizadas apenas na direção 5'-3'. (A) No modelo hipotético de polimerização na direção 3'-5', o mecanismo de correção permitiria a remoção de um nucleotídeo incorreto (em verde-escuro), mas bloquearia a adição do nucleotídeo correto (em vermelho), portanto impedindo o alongamento da cadeia. (B) O crescimento na direção 5'-3' permite que a cadeia seja continuamente alongada quando um nucleotídeo incorreto for adicionado e removido pelo mecanismo de correção (ver Figura 6-14).

Uma enzima diferente é necessária – uma capaz de começar uma nova cadeia polinucleotídica simplesmente pela junção de dois nucleotídeos sem a necessidade de uma extremidade pareada. Contudo, essa enzima não é capaz de sintetizar DNA. Ela produz pequenos segmentos de um tipo de ácido nucleico intimamente relacionado – **RNA (ácido ribonucleico)** – usando a fita de DNA como molde. Esse pequeno segmento de RNA, com cerca de 10 nucleotídeos, é pareado à fita-molde e fornece a extremidade 3' pareada como ponto de início para a DNA-polimerase. Portanto, atua como um *iniciador (primer)* para a síntese de DNA, e a enzima que sintetiza o iniciador de RNA é denominada *primase*.

A primase é um exemplo de *RNA-polimerase*, uma enzima que sintetiza RNA utilizando DNA como molde. Uma fita de RNA é muito semelhante quimicamente a uma fita única de DNA, com a exceção de ser formada por subunidades de ribonucleotídeos, na qual o açúcar é a ribose, e não a desoxirribose; o RNA também difere do DNA por conter a base uracila (U), em vez da timina (T) (ver Painel 2-6, p. 74-75). Entretanto, como U pode formar um par de bases com A, o iniciador de RNA é sintetizado na fita de DNA por complementaridade de pares de bases exatamente da mesma forma que o DNA.

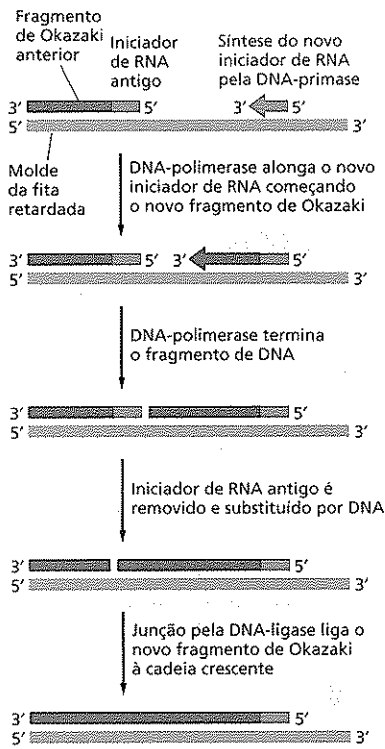


Figura 6-16 Na fita retardada, o DNA é sintetizado em fragmentos. Em eucariotos, os iniciadores de RNA são adicionados em intervalos de cerca de 200 nucleotídeos na fita retardada, e cada iniciador de RNA possui aproximadamente 10 nucleotídeos. Na bactéria *E. coli*, os iniciadores e fragmentos de Okazaki possuem cerca de 5 e 1.000 nucleotídeos, respectivamente. Os iniciadores são removidos por nucleases que reconhecem uma fita de RNA na hélice RNA/DNA e degradados, resultando em lacunas que são preenchidas por uma DNA-polimerase de reparo, com atividade de correção à medida que preenche o intervalo. Os fragmentos completados são, finalmente, unidos por uma enzima chamada DNA-ligase, que catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3'-OH de um fragmento e a extremidade 5'-fosfato do próximo, ligando seus esqueletos de açúcar-fosfato. Essa ligação necessita da energia na forma de ATP ou NADH.

Na fita-líder, apenas um iniciador de RNA é necessário para começar a replicação na origem de replicação; uma vez que a forquilha de replicação tenha se estabelecido, uma extremidade 3' pareada é continuamente apresentada à DNA-polimerase à medida que se desloca pela fita-molde. Todavia, na fita retardada, onde a síntese de DNA é descontínua, novos iniciadores são continuamente necessários (ver Figura 6-12). À medida que o movimento da forquilha de replicação expõe um novo segmento de bases não pareadas, um novo iniciador de RNA é produzido em intervalos na fita retardada. A DNA-polimerase adiciona um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3' desse iniciador para começar uma fita de DNA, e irá continuar a alongar essa fita até encontrar o próximo iniciador de RNA (Figura 6-16).

Para produzir uma fita nova contínua de DNA a partir dos vários segmentos de ácidos nucleicos produzidos na fita retardada, três enzimas adicionais são necessárias. Essas atuam rapidamente para remover o iniciador de RNA, substituí-lo por DNA e unir os fragmentos de DNA. Portanto, uma nuclease degrada o iniciador de RNA, uma DNA-polimerase chamada de *polimerase de reparo* substitui o RNA por DNA (usando as extremidades dos fragmentos de Okazaki adjacentes como iniciadores), e a enzima *DNA-ligase* une a extremidade 5'-fosfato de um fragmento novo de DNA à extremidade 3'-OH do próximo (ver Figura 6-16).

A primase pode iniciar novas cadeias polinucleotídicas, mas essa atividade só é possível porque a enzima não verifica seu trabalho. Como resultado, os iniciadores possuem uma alta frequência de erros. Como são feitos de RNA em vez de DNA, eles são como "cópias suspeitas" para serem automaticamente removidos e substituídos por DNA. Esse DNA é adicionado por enzimas de reparo de DNA, que, bem como as polimerases replicativas, verificam o pareamento à medida que sintetizam DNA. Dessa forma, a maquinaria de replicação das células é capaz de iniciar novas cadeias de DNA e, ao mesmo tempo, assegurar que todo o DNA tenha sido fielmente copiado.

QUESTÃO 6-2

Discuta a seguinte afirmação: "A primase é uma enzima imprecisa que comete vários erros. Ao final do processo, os iniciadores de RNA que ela sintetiza são removidos e substituídos por DNA, sintetizados por uma polimerase de alta fidelidade. Isso é um desperdício. Se a DNA-polimerase fizesse uma cópia precisa já no início, o processo seria mais eficiente energeticamente."

As proteínas se associam na forquilha de replicação, formando uma máquina de replicação

Como mencionado, a replicação do DNA requer uma série de proteínas que atuam em concerto. Aqui, discutiremos as proteínas que, juntamente com a DNA-polimerase e a primase, formam uma máquina proteica que empurra a forquilha de replicação para frente e sintetiza o DNA novo atrás dela.

Para que a síntese de DNA possa ocorrer, a dupla-hélice deve estar aberta à frente da forquilha de replicação, de modo que os trifosfatos de desoxirribonucleosídeo possam ser pareados com a fita-molde. Dois tipos de proteínas de replicação – DNA-helicases e proteína ligadora de fitas simples – se associam para realizar essa tarefa. Bem à frente da máquina de replicação está a *helicase*, uma proteína que utiliza energia da hidrólise do ATP para separar a dupla-hélice à medida que se desloca sobre o DNA (Figura 6-17A e Animação 6.2). A *proteína ligadora de fita simples* se liga ao DNA de fita simples exposto pela helicase, evitando temporariamente o reparamento de bases e mantendo a fita alongada para que possa atuar como molde para a DNA-polimerase.

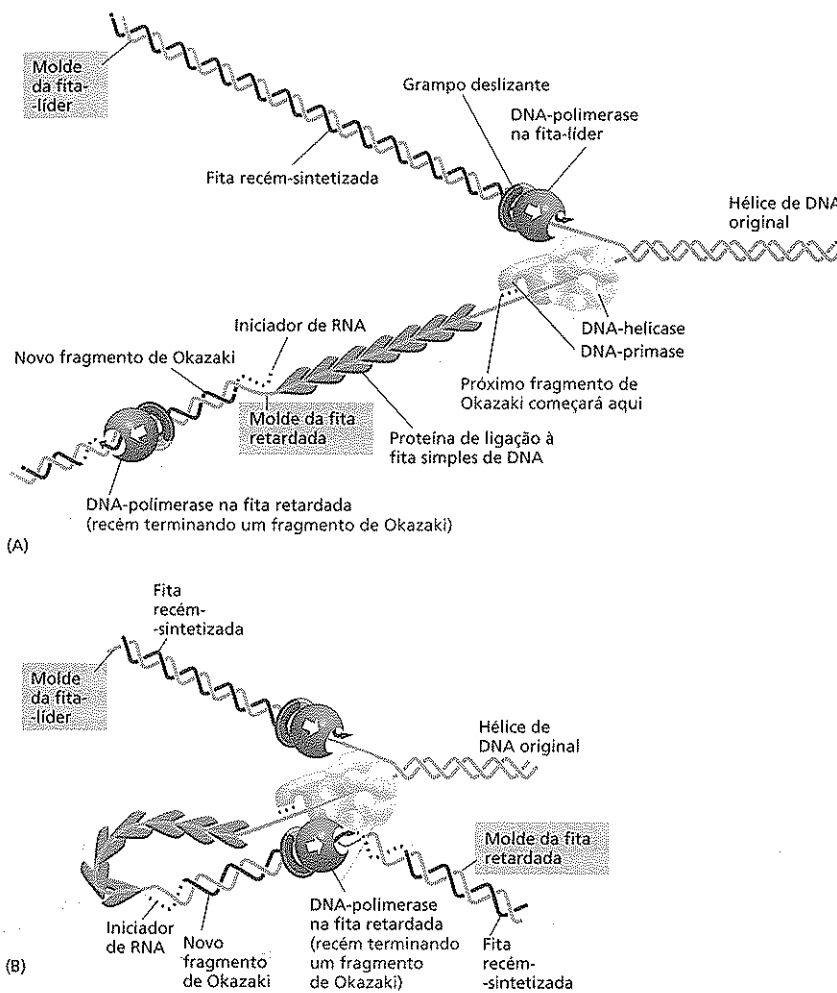


Figura 6-17 A síntese de DNA é realizada por um grupo de proteínas que atuam em conjunto como uma maquinaria de replicação. (A) Duas moléculas de DNA-polimerase são mostradas, uma na fita-líder e uma na fita retardada. Ambas são mantidas no DNA por uma proteína circular, um grampo, que permite que a polimerase deslize sobre o DNA. Um montador do grampo (não mostrado) é necessário para religar o grampo deslizante no molde da fita retardada, cada vez que um fragmento de Okazaki é iniciado. Na "cabeça" da forquilha, uma DNA-helicase utiliza energia da hidrólise do ATP para impulsionar-se para a frente, separando as fitas da dupla-hélice de DNA original. Proteínas de ligação à fita simples mantêm essas fitas separadas na forma de fitas simples, para permitir o acesso da primase e da polimerase. Para simplificar, essa figura mostra as enzimas funcionando independentemente; na célula, elas estão unidas formando uma máquina de replicação, como mostrado em (B). (B) Esse diagrama mostra um modelo atual de como as proteínas da replicação estão dispostas na forquilha de replicação quando em movimento. A estrutura em (A) foi alterada pelo dobramento do DNA sobre a fita retardada para aproximar a molécula de DNA-polimerase da fita retardada da molécula de polimerase da fita-líder. Esse dobramento também aproxima a extremidade 3' de cada fragmento de Okazaki completo do local de início do próximo fragmento de Okazaki. Como a molécula de DNA-polimerase da fita retardada é mantida pelo restante das proteínas de replicação, ela pode ser reutilizada na síntese de fragmentos de Okazaki sucessivos; nesse diagrama, ela está prestes a completar um fragmento de DNA, dissociar-se desse e deslocar-se até o iniciador de RNA que será sintetizado a seguir na fita retardada. Para assistir ao complexo de replicação em movimento, ver **Animação 6.5**.

Uma proteína adicional da replicação, chamada de *grampo deslizante*, mantém a DNA-polimerase firmemente ligada ao DNA-molde enquanto sintetiza novas fitas de DNA. Se atuassem sozinhas, a maioria das moléculas de DNA-polimerase sintetizaria apenas pequenos segmentos de nucleotídeos e então se desligariam da fita-molde de DNA. O grampo deslizante forma um anel ao redor da hélice de DNA e, como está fortemente ligado à polimerase, permite que essa se desloque sobre a fita-molde sem se desligar, à medida que sintetiza o DNA novo (ver Figura 6-17A e **Animação 6.3**).

A montagem desse grampo em volta do DNA necessita da atividade de uma proteína adicional de replicação, o *montador do grampo*, que hidrolisa ATP cada vez que prende um grampo ao redor da hélice de DNA. Essa montagem deve ocorrer apenas uma vez por ciclo de replicação na fita-líder; na fita retardada, porém, o grampo é removido e recolocado cada vez que um novo fragmento de Okazaki é produzido.

A maioria das proteínas envolvidas na replicação do DNA é mantida unida em um grande complexo multienzimático que se desloca sobre o DNA como uma unidade, permitindo que ele seja sintetizado de modo coordenado nas duas fitas. Esse complexo pode ser comparado a uma pequena máquina de costura composta por partes proteicas e impulsionada pela hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo (**Animação 6.4**). Embora as estruturas dos componentes proteicos individuais da máquina de replicação tenham sido determinadas, o modo como esses componentes atuam em concerto não é conhecido em detalhes.

Contudo, algumas ideias a respeito do aspecto geral do complexo foram propostas (Figura 6-17B).

A telomerase replica as extremidades dos cromossomos eucarióticos

Após discutirmos como a replicação do DNA inicia nas origens e como o movimento da forquilha de replicação avança, discutiremos agora um problema especial de replicação das extremidades dos cromossomos. Como apresentado anteriormente, o fato de o DNA ser sintetizado apenas na direção 5'-3' implica que a fita retardada da forquilha de replicação seja sintetizada como fragmentos descontínuos de DNA, cada um iniciado por um iniciador de RNA adicionado por uma enzima separada (ver Figura 6-16). Quando a forquilha de replicação se aproxima da extremidade de um cromossomo, a máquina de replicação encontra um grave problema: não há como colocar o iniciador de RNA necessário para iniciar um fragmento de Okazaki na extremidade de uma molécula de DNA linear. Se não houvesse uma estratégia para tratar esse problema, uma parte de DNA seria inevitavelmente perdida nas extremidades de uma molécula de DNA cada vez que ela fosse replicada.

As bactérias resolveram o problema do "final de replicação" possuindo uma molécula circular de DNA como cromossomo. Os eucariotos resolveram esse problema possuindo sequências nucleotídicas especiais nas extremidades cromossômicas incorporadas nos **telômeros**. Essas sequências de DNA telomérico atraem uma enzima chamada de **telomerase** ao cromossomo. Usando um molde de RNA que é parte da própria enzima, a telomerase recoloca os nucleotídeos perdidos cada vez que um cromossomo é duplicado, adicionando inúmeras cópias da mesma sequência de DNA às extremidades cromossômicas. Essa sequência alongada de DNA repetido atua como molde, permitindo que a replicação da fita retardada seja completada pela replicação convencional (Figura 6-18).

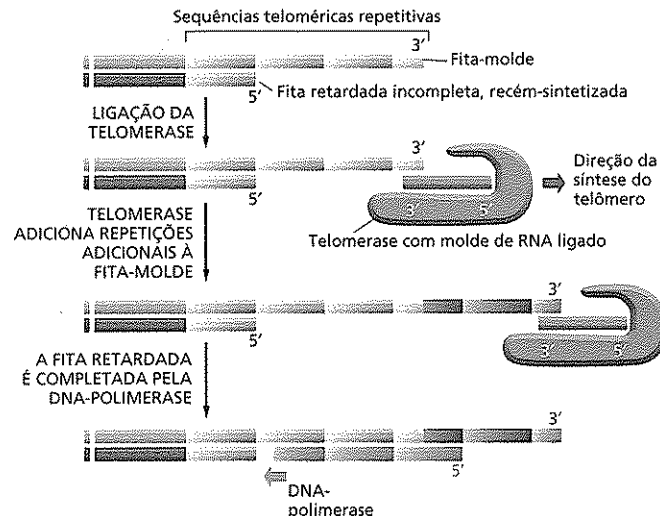
Além de permitir a replicação das extremidades cromossômicas, os telômeros realizam funções adicionais: por exemplo, as sequências repetidas do DNA telomérico, juntamente com as regiões cromossômicas adjacentes, formam estruturas que são reconhecidas pela célula como extremidades verdadeiras dos cromossomos; portanto, diferentes de quebras que ocorrem acidentalmente na porção medial dos cromossomos. Essas quebras devem ser imediatamente reparadas, como veremos a seguir.

QUESTÃO 6-3

Um gene que codifica uma das proteínas envolvidas na replicação do DNA foi inativado por uma mutação em uma célula. Na ausência dessa proteína, a célula tenta replicar o DNA pela última vez. Que produtos de DNA seriam formados se cada uma das seguintes proteínas estivesse ausente?

- A. DNA-polimerase
- B. DNA-ligase
- C. Grupo deslizante da DNA-polimerase
- D. A nuclease que remove os iniciadores de RNA
- E. DNA-helicase
- F. Primase

Figura 6-18 Os telômeros permitem que a síntese de DNA nas extremidades dos cromossomos eucarióticos seja completada. Para sintetizar a fita retardada na extremidade de um cromossomo eucariótico, a maquinaria de replicação necessita de uma porção de DNA-molde que se estenda além do DNA a ser copiado. Em uma molécula de DNA linear, a síntese da fita retardada, portanto, para um pouco antes do final do molde. A enzima telomerase adiciona uma série de repetições de uma sequência de DNA à extremidade 3' da fita-molde, que então permite que a fita retardada seja completada pela DNA-polimerase como mostrado. Em humanos, a sequência nucleotídica da repetição telomérica é GGGGTTA. A enzima telomerase contém um pequeno segmento de RNA (em azul) com sequência complementar à sequência de repetição de DNA; esse RNA atua como molde para a síntese de DNA pela telomerase. Para assistir à telomerase em ação, ver **Animação 6.6**.



REPARO DE DNA

A diversidade dos organismos vivos e o seu sucesso na colonização de quase todas as partes da superfície da Terra resultaram de alterações genéticas acumuladas gradativamente por milhões de anos. Essas alterações permitiram a adaptação de organismos às novas condições e a colonização de novos habitats. Contudo, em períodos curtos, e do ponto de vista de um organismo individual, as alterações genéticas podem ser prejudiciais – especialmente em organismos multicelulares, nos quais uma alteração pode perturbar o desenvolvimento e a fisiologia de um organismo extremamente complexo e afinado. Para sobreviver e se reproduzir, um indivíduo deve ser geneticamente estável. Essa estabilidade é alcançada não apenas pelo mecanismo extremamente preciso durante a replicação do DNA, discutido anteriormente, mas também pela atuação de uma variedade de máquinas proteicas que verificam o genoma à procura de lesões e as corrigem. De fato, a maioria dessas lesões no DNA é temporária, sendo imediatamente corrigidas por processos denominados coletivamente **reparo de DNA**.

As mutações podem originar consequências graves em uma célula ou organismo

Muito raramente, os processos celulares de replicação de DNA e reparo falham, permitindo uma alteração permanente no DNA. Tais alterações permanentes são chamadas de **mutações** e podem ter consequências severas. Uma mutação que afeta apenas um único par de nucleotídeos pode comprometer seriamente a saúde do organismo se a alteração ocorrer em uma posição vital na sequência de DNA. Como a estrutura e a atividade de cada proteína dependem da sua sequência de aminoácidos, uma proteína com uma sequência alterada pode ter sua função comprometida ou anulada. Por exemplo, os humanos utilizam a proteína hemoglobina para transportar oxigênio no sangue (ver Figura 4-20). Uma alteração permanente em um único nucleotídeo nessa sequência pode provocar a produção de uma hemoglobina com uma sequência de aminoácidos incorreta. Uma dessas mutações resulta na doença *anemia falciforme* (Figura 6-19). A hemoglobina falciforme é menos solúvel do que a hemoglobina normal e forma precipitados fibrosos, que originam a forma de foice, característica dos eritrócitos afetados. Como essas células são mais frágeis e frequentemente arrebentam na corrente sanguínea, os pacientes com essa doença potencialmente fatal possuem um número reduzido de eritrócitos do que o normal (Figura 6-19C), uma deficiência que pode provocar fraqueza, tonturas, dores de cabeça, dores e falência total de órgãos.

O exemplo da anemia falciforme, que é uma doença hereditária, ilustra a importância de proteger as células reprodutivas (*células germinativas*) contra mutações. Uma mutação em uma dessas células será transmitida a todas as cé-

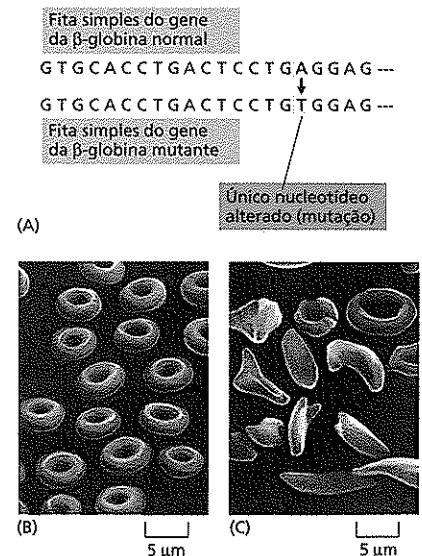


Figura 6-19 Uma única alteração nucleotídica provoca a doença anemia falciforme. (A) A β -globina é um dos dois tipos de subunidades que forma a hemoglobina (ver Figura 4-20). Uma única alteração nucleotídica (mutação) no gene da β -globina produz uma subunidade de β -globina que difere da β -globina normal somente pela alteração de um ácido glutâmico para valina na sexta posição de aminoácido. (Apenas uma pequena porção do gene é mostrada; a subunidade de β -globina tem 146 aminoácidos.) Humanos contêm duas cópias de cada gene (uma herdada de cada progenitor); a mutação da anemia falciforme em um dos dois genes da β -globina geralmente não apresenta prejuízos ao indivíduo, porque é compensada pelo gene normal. Entretanto, um indivíduo que herda as duas cópias do gene mutante da β -globina apresenta os sintomas da anemia falciforme. Eritrócitos normais são mostrados em (B), e eritrócitos de um indivíduo com anemia falciforme em (C). Embora a anemia falciforme seja uma doença potencialmente fatal, a mutação responsável pode também ser benéfica: pacientes com a doença, ou portadores heterozigotos para a mutação, são mais resistentes à malária, comparados a indivíduos normais, porque o parasita que causa malária cresce com dificuldade nos eritrócitos que contêm a forma falciforme na hemoglobina.

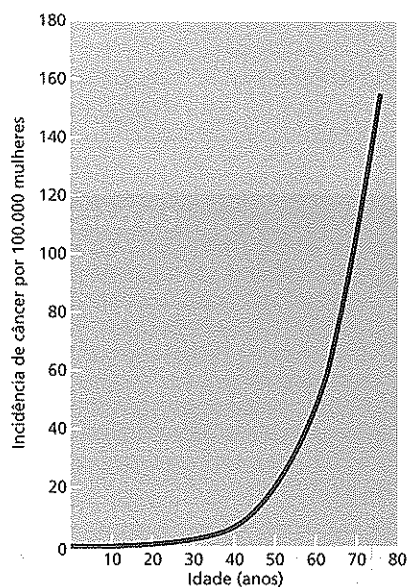


Figura 6-20 A incidência de câncer aumenta drasticamente com o aumento da idade. O número de novos casos diagnosticados de câncer de cólon em mulheres na Inglaterra e no País de Gales em um ano foi avaliado em função da idade no momento do diagnóstico. O câncer de cólon é causado pelo acúmulo de várias mutações. Como as células sofrem alterações acidentais no seu DNA continuamente, e essas são transmitidas à progênie dessas células, a chance de uma célula tornar-se cancerosa aumenta enormemente com a idade. (Dados de C. Muir et al., *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.)

lulas do corpo de um organismo multicelular que se desenvolve a partir dessa célula germinativa alterada, incluindo as células germinativas que produzirão a próxima geração.

As tantas outras células de um organismo multicelular (suas *células somáticas*) devem ser protegidas de alterações genéticas que surgem durante a vida do indivíduo. As alterações nucleotídicas que ocorrem nas células somáticas podem originar células variantes, algumas capazes de crescer e de dividir de modo descontrolado à custa de outras células do organismo. Em um caso extremo, temos como resultado uma proliferação celular descontrolada conhecida como câncer. Essa doença, responsável por cerca de 30% das mortes na Europa e na América do Norte, resulta, em grande parte, do acúmulo gradual de alterações nas sequências de DNA de células somáticas causadas por mutações aleatórias (Figura 6-20). Um aumento da frequência de mutações de duas ou três vezes provocaria uma elevação desastrosa na incidência de câncer pela aceleração da taxa de surgimento de variantes das células somáticas.

Portanto, a alta fidelidade com a qual as sequências de DNA são replicadas e mantidas é importante tanto para as células reprodutivas, que transmitem os genes para a próxima geração, como para as células somáticas, que normalmente atuam como componentes cuidadosamente regulados de uma complexa comunidade celular em um organismo multicelular. Não é de surpreender, portanto, que todas as células tenham adquirido um sofisticado conjunto de mecanismos para reduzir o número de mutações que ocorrem em seu DNA.

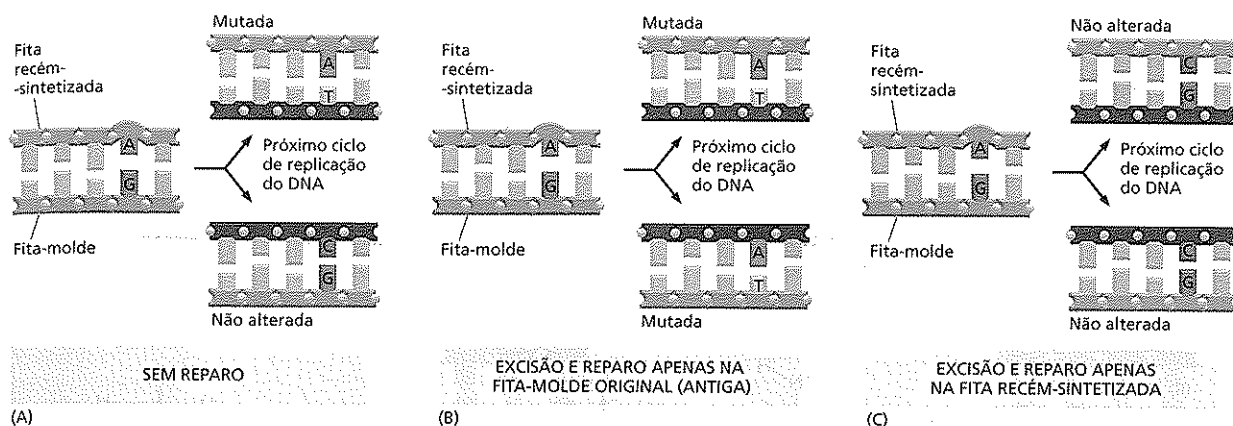
Um sistema de reparo, do malpareamento de DNA, remove erros de replicação que escapam da maquinaria de replicação

Na primeira parte deste capítulo, vimos que a alta fidelidade da maquinaria de replicação celular geralmente previne erros durante a cópia do DNA. Contudo, apesar desses mecanismos, os erros ocorrem. Felizmente, a célula possui um sistema de segurança – chamado de *reparo de malpareamento de DNA* – dedicado à correção desses erros raros. A máquina de replicação por si insere um nucleotídeo incorreto a cada 10^7 nucleotídeos copiados, e o sistema de reparo de malpareamento corrige 99% desses erros, aumentando a precisão de correção total para um erro a cada 10^9 nucleotídeos copiados. Esse nível de precisão é muito mais alto se comparado aos encontrados no mundo visível à nossa volta (Tabela 6-1).

Sempre que a máquina de replicação comete um erro de cópia, ela deixa o nucleotídeo malpareado (normalmente chamado de *malpareamento*) para trás. Se deixado sem correção, o malpareamento irá resultar em uma mutação permanente no próximo ciclo de replicação (Figura 6-21A). Um conjunto de proteínas de reparo de malpareamento reconhece esses malpareamentos no DNA, remove uma das duas fitas de DNA envolvidas no malpareamento e sintetiza novamente a fita perdida (Figura 6-22). Para ser eficiente na correção dos erros de replicação, o sistema de reparo de malpareamento deve sempre remover apenas a fita de

TABELA 6-1 Taxas de erro

Entrega com hora marcada do Serviço Postal dos EUA de correspondência local (primeira classe)	13 entregas atrasadas a cada 100
Sistema de bagagem de companhias aéreas	1 bagagem perdida a cada 200
Digitadora profissional que digita 120 palavras por minuto	1 erro a cada 250 caracteres
Dirigir um carro nos Estados Unidos	1 morte em cada 10^7 pessoas por ano
Replicação do DNA (sem reparo de malpareamento)	1 erro em cada 10^7 nucleotídeos copiados
Replicação do DNA (incluindo reparo de malpareamento)	1 erro em cada 10^9 nucleotídeos copiados



DNA recém-sintetizada: a remoção da outra fita (fita original) iria perpetuar o erro, em vez de corrigi-lo (ver Figura 6-21B e C).

Em eucariotos, não se sabe ao certo como a maquinaria de reparo de malpareamento distingue as duas fitas de DNA. No entanto, há evidências de que as novas fitas de DNA recém-replicadas – tanto a líder como a retardada – são clivadas preferencialmente, e parece que essas quebras (quebras de fita simples) fornecem o sinal que direciona o sistema de reparo de malpareamento à fita adequada (ver Figura 6-22).

O reparo de malpareamento apresenta uma função particularmente importante na prevenção do câncer. Uma predisposição hereditária a determinados cânceres (em especial, alguns tipos de câncer de colo) é provocada por uma mutação em genes que codificam proteínas de reparo de malpareamento. Os indivíduos herdam duas cópias desse gene (uma de cada progenitor), e indivíduos que herdam um gene de reparo de malpareamento alterado não apresentam sintomas até que a cópia do gene normal sofra uma mutação acidental em uma célula somática. Quando essa célula mutante sofre divisão, origina um conjunto de células somáticas que, sendo deficientes no reparo de malpareamento, acumula mutações muito mais rapidamente em comparação a células normais. Como a maioria dos cânceres se desenvolve a partir de células com múltiplas mutações (ver Figura 6-20), uma célula deficiente no reparo de malpareamento possui uma chance muito aumentada de tornar-se cancerosa. Portanto, a herança de um gene mutante para o reparo de malpareamento predispõe um indivíduo a desenvolver câncer.

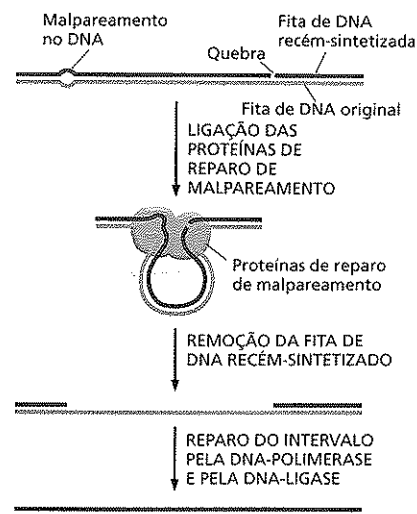
O DNA está continuamente sofrendo danos nas células

Como foi visto, os raros erros na replicação de DNA são corrigidos pelo mecanismo de reparo de malpareamento. Entretanto, o DNA pode ser danificado de várias outras maneiras, e essas requerem outros mecanismos para serem reparadas.

Assim como qualquer outra molécula na célula, o DNA está constantemente sofrendo colisões térmicas com outras moléculas. Essas frequentemente resultam nas principais alterações químicas no DNA. Por exemplo, durante o

Figura 6-21 Erros originados durante a replicação do DNA devem ser corrigidos para evitar mutações. (A) Se não corrigido, o malpareamento irá causar uma mutação permanente em uma das duas moléculas de DNA produzidas no próximo ciclo de replicação. (B) Se o malpareamento for “corrigido” usando a fita recém-sintetizada como molde, ambas as moléculas produzidas no próximo ciclo de replicação irão conter a mutação. (C) Se o malpareamento for corrigido usando a fita-molde original (antiga) como molde, a mutação é eliminada. O esquema mostrado em (C) é usado pelas células no reparo de malpareamento, como mostrado na Figura 6-22.

Figura 6-22 Proteínas de reparo de malpareamento corrigem erros que ocorrem durante a replicação de DNA. Um malpareamento de DNA, formado quando uma base incorreta é incorporada à cadeia de DNA recém-sintetizada, distorce a geometria da dupla-hélice. Essa distorção é logo reconhecida pelas proteínas de reparo de malpareamento, que removem o DNA recém-sintetizado. O intervalo nessa fita é preenchido por uma DNA-polimerase que verifica à medida que sintetiza a fita e é selado pela DNA-ligase. Como mostrado na figura, foi proposto que uma quebra no DNA atua como um sinal que permite a distinção das fitas recém-sintetizada (que contém o erro) e da fita original pelas proteínas de reparo. Essas quebras ocorrem na fita retardada (ver Figura 6-12) e também ocorrem, embora menos frequentemente, na fita líder. Essas quebras permanecem apenas por um curto intervalo de tempo, após a passagem da forquilha de replicação (ver Figura 6-16), de modo que o reparo de malpareamento deve acontecer rapidamente.



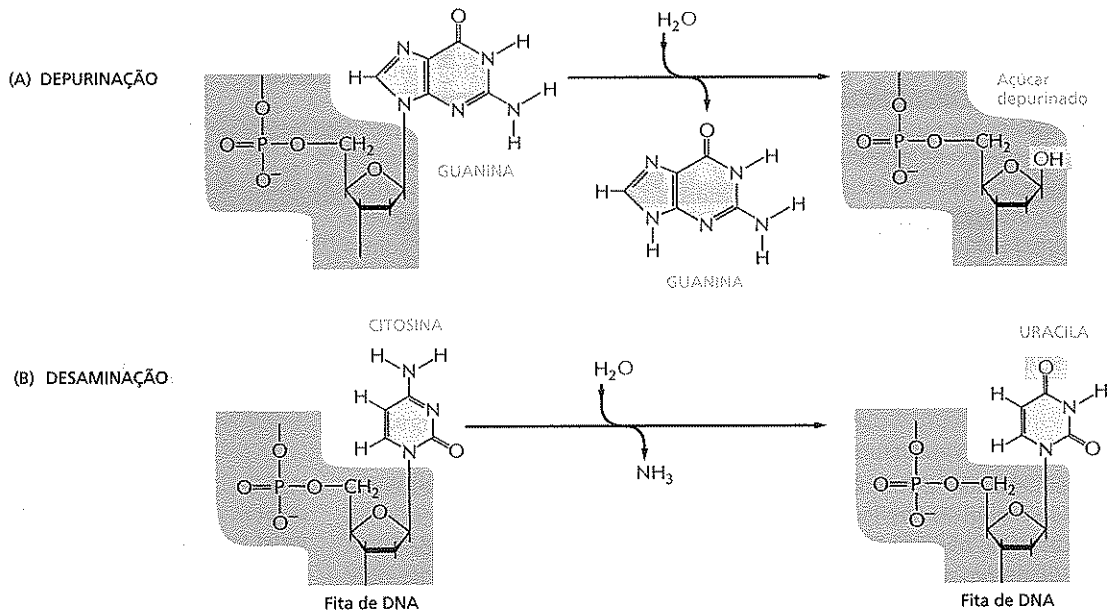


Figura 6-23 A depurinação e a desaminação são as reações químicas conhecidas mais frequentes que provocam danos graves ao DNA nas células. (A) A depurinação remove a guanina e a adenina do DNA. (B) O principal tipo de reação de desaminação converte a citosina em uma base alterada do DNA, a uracila, mas também pode ocorrer em outras bases. Ambas as reações ocorrem na dupla-hélice de DNA, mas em nenhuma há quebra do esqueleto fosfodiéster (destacado em laranja); por conveniência, apenas uma fita de DNA é mostrada.

tempo gasto para ler essa sentença, um total de aproximadamente um trilhão (10^{12}) de bases púricas (A e G) serão perdidas do DNA das células do seu corpo, por uma reação espontânea chamada de *depurinação* (Figura 6-23). A depurinação não causa quebras no esqueleto de açúcar-fosfato, mas produz lesões que se assemelham a um “dente perdido”. Uma outra alteração comum é a perda espontânea de um grupo amino (*desaminação*) de uma citosina no DNA produzindo a base uracila (ver Figura 6-23). Alguns subprodutos quimicamente reativos do metabolismo também reagem, ocasionalmente, com as bases do DNA, alterando-as de forma que suas propriedades de pareamento são modificadas. A radiação ultravioleta da luz solar também danifica o DNA; ela promove a formação de uma ligação covalente entre duas bases pirimídicas adjacentes, formando, por exemplo, os *dímeros de timina*, mostrados na Figura 6-24.

Essas são apenas algumas das várias alterações químicas que ocorrem no nosso DNA. Se não corrigidas, muitas delas resultariam na substituição de um

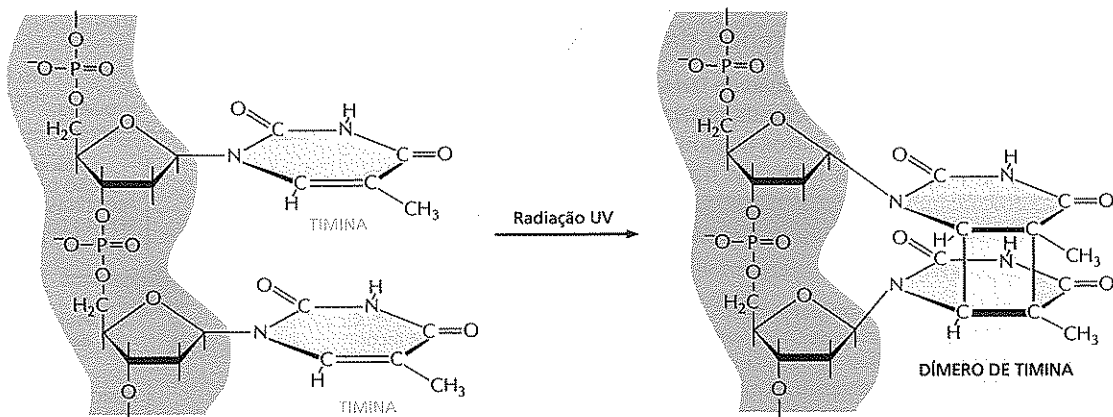


Figura 6-24 A radiação ultravioleta da luz solar provoca lesão no DNA. Duas bases timina adjacentes foram ligadas covalentemente entre si, formando um dímero de timina. As células da pele expostas à luz do sol são especialmente suscetíveis a esse tipo de lesão de DNA.

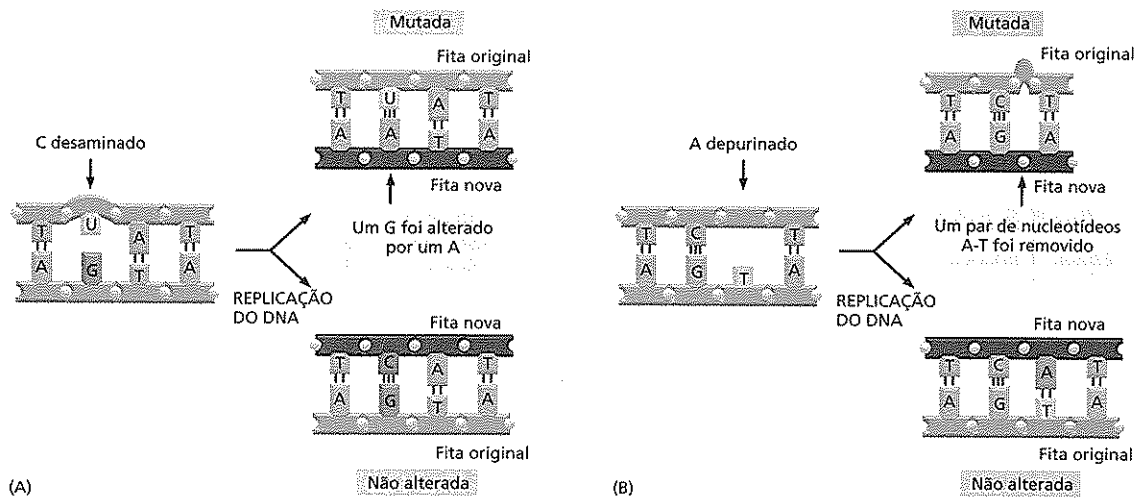


Figura 6-25 Modificações químicas de nucleotídeos, se não corrigidas, produzem mutações. (A) A desaminação da citosina, se não corrigida, resulta na substituição de uma base por outra quando o DNA é replicado. Como mostrado na Figura 6-23, a desaminação da citosina produz uracila. A uracila difere da citosina nas propriedades de pareamento, pareando-se preferencialmente com a adenina. A máquina de replicação de DNA, portanto, insere uma adenina quando encontra uma uracila na fita-molde. (B) A depurinação, se não corrigida, provoca a perda de um par de nucleotídeos. Quando a máquina de replicação encontra uma purina ausente na fita-molde, ela pula para o próximo nucleotídeo completo, como mostrado; portanto, produz uma deleção de nucleotídeos na fita recém-sintetizada. Em outros casos (não mostrado), a maquinaria de replicação adiciona um nucleotídeo incorreto transversal à base ausente, novamente resultando em mutação.

par de nucleotídeos por outro, pelo pareamento incorreto durante a replicação, ou na deleção de um ou mais pares de nucleotídeos na fita-filha de DNA após a replicação (Figura 6-25). Alguns tipos de lesões no DNA (p. ex., dímeros de timina) normalmente param a maquinaria de replicação de DNA no local da lesão. Todos esses tipos de danos, se não corrigidos, trariam consequências desastrosas a um organismo.

A estabilidade dos genes depende do reparo de DNA

Os milhares de alterações químicas aleatórias que ocorrem todos os dias no DNA de uma célula humana, devidas aos acidentes metabólicos ou à exposição a compostos químicos que danificam o DNA, são corrigidas por uma série de mecanismos, cada um catalisado por um grupo diferente de enzimas. Quase todos esses mecanismos dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada fita da dupla-hélice de DNA: se a sequência em uma das fitas for acidentalmente danificada, a informação não é totalmente perdida, porque uma versão da fita alterada permanece na sequência complementar de nucleotídeos na outra fita. A maioria das lesões produz estruturas que não são encontradas em uma fita de DNA não danificada; portanto, a fita correta pode ser facilmente distinguida da fita danificada.

O mecanismo básico para o reparo de danos no DNA está ilustrado na Figura 6-26. Como indicado, ele envolve três etapas:

1. O DNA danificado é reconhecido e removido por um de vários mecanismos diferentes. Esses mecanismos envolvem nucleases, que clivam as ligações covalentes que unem os nucleotídeos danificados ao resto da molécula de DNA, deixando um pequeno intervalo, ou lacuna, em uma das fitas da dupla-hélice de DNA nessa região.
2. Uma DNA-polimerase de reparo se liga à extremidade 3'-OH da fita de DNA clivada. A seguir, ela preenche a lacuna, sintetizando uma cópia complementar da informação contida na fita não danificada. Embora seja uma

QUESTÃO 6-4

Discuta a seguinte afirmação: "As enzimas de reparo de DNA que corrigem lesões de desaminação e depurinação devem reconhecer preferencialmente, essas lesões em fitas de DNA recém-sintetizadas."