

# FUNDAMENTOS DA BIOLOGIA CELULAR

4ª Edição

ALBERTS • BRAY • HOPKIN • JOHNSON • LEWIS • RAFF • ROBERTS • WALTER



# 6

## Replicação, reparo e recombinação de DNA

A capacidade de uma célula sobreviver e proliferar em um ambiente caótico depende da duplicação precisa da vasta quantidade de informação genética transportada no seu DNA. Esse processo de duplicação, denominado *replicação do DNA*, deve ocorrer antes que uma célula possa se dividir para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas. Para manter a ordem em uma célula, são também necessários vigilância e reparo continuados da sua informação genética, uma vez que o DNA está sujeito a danos inevitáveis por agentes químicos e radiação do ambiente e por moléculas reativas que são geradas dentro da célula. Neste capítulo, descrevemos as máquinas proteicas que replicam e reparam o DNA celular. Essas máquinas catalisam alguns dos processos mais precisos e rápidos que ocorrem dentro das células, e as estratégias desenvolvidas para alcançar essa façanha são maravilhas de elegância e eficiência.

Apesar da existência desses sistemas que protegem o DNA celular de erros de cópia e danos acidentais, mudanças permanentes – ou *mutações* – ocorrem algumas vezes. Ainda que a maioria das mutações não afete o organismo de forma perceptível, algumas têm consequências profundas. Ocasionalmente, essas mudanças podem beneficiar o organismo: por exemplo, mutações podem tornar as bactérias resistentes a antibióticos que são usados para matá-las. Além disso, mudanças na sequência de DNA podem produzir pequenas variações que são a base das diferenças entre indivíduos da mesma espécie (**Figura 6-1**); quando acumuladas ao longo de milhões de anos, tais mudanças fornecem a variedade no material genético que torna cada espécie distinta das outras, como discutimos no Capítulo 9.

Entretanto, as mutações têm uma probabilidade muito maior de serem prejudiciais do que benéficas: em humanos, elas são responsáveis por milhares de doenças genéticas, incluindo o câncer. A sobrevivência de uma célula ou organismo, portanto, depende de se manter as mudanças no seu DNA em um mínimo. Na ausência das máquinas proteicas que continuamente monitoram e reparam danos no DNA, é questionável se a vida poderia existir de algum modo.

### REPLICAÇÃO DO DNA

### REPARO DO DNA

### REPLICAÇÃO DO DNA

A cada divisão celular, uma célula deve copiar seu genoma com precisão extraordinária. Nesta seção, exploramos como a célula realiza essa façanha, enquanto duplica seu DNA a taxas tão altas quanto 1.000 nucleotídeos por segundo.



**Figura 6-1** A informação genética é passada de uma geração para a seguinte. Diferenças no DNA podem produzir as variações subjacentes às diferenças entre indivíduos da mesma espécie – ou, ao longo do tempo, às diferenças entre uma espécie e outra. Nesta foto de família, as crianças se assemelham mais uma à outra e a seus pais do que a outras pessoas, porque elas herdaram seus genes de seus pais. O gato compartilha muitas características com os humanos, mas, durante os milhões de anos de evolução que separaram humanos e gatos, ambos acumularam muitas mudanças nos seus DNAs que agora produzem duas espécies diferentes. A galinha é um parente ainda mais distante.

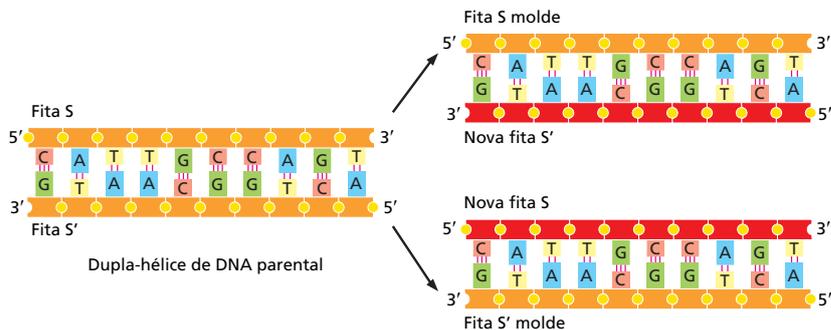
## O pareamento de bases possibilita a replicação do DNA

No capítulo anterior, vimos que cada fita de uma dupla-hélice de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência de nucleotídeos da sua fita parceira. Cada fita, portanto, pode servir como um **molde** para a síntese de uma nova fita complementar. Em outras palavras, se designarmos as duas fitas de DNA como S e S', a fita S pode servir como um molde para fazer uma nova fita S', enquanto a fita S' pode servir como um molde para fazer uma nova fita S (**Figura 6-2**). Portanto, a informação genética no DNA pode ser copiada com precisão pelo processo belamente simples no qual a fita S se separa da fita S', e cada fita separada então serve como um molde para a produção de uma nova fita parceira complementar que é idêntica à sua parceira anterior.

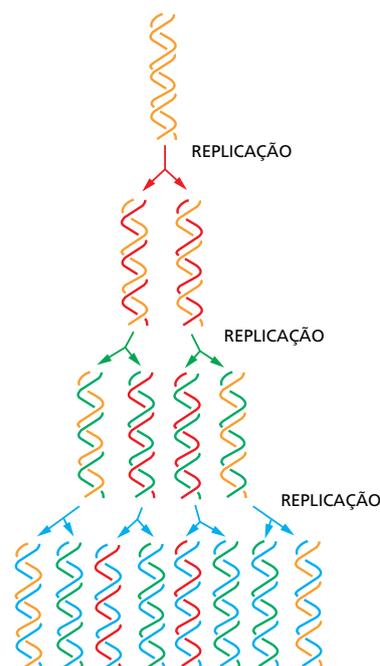
A capacidade de cada fita de uma molécula de DNA de agir como um molde para produzir uma fita complementar possibilita à célula copiar, ou *replicar*, seus genes antes de passá-los para suas descendentes. Mas a tarefa é quase inacreditável, uma vez que pode envolver a cópia de bilhões de pares de nucleotídeos a cada vez que uma célula se divide. O processo de cópia deve ser realizado com precisão e velocidade incríveis: em cerca de 8 horas, uma célula animal em divisão irá copiar o equivalente a 1.000 livros como este e, em média, não produzirá mais do que poucas letras erradas. Essa proeza impressionante é realizada por um grupo de proteínas que em conjunto formam uma *máquina de replicação*, também chamada de *maquinaria de replicação*.

A replicação do DNA produz duas duplas-hélices completas a partir da molécula de DNA original, com cada uma das novas hélices de DNA sendo idêntica em sequência nucleotídica (exceto pelos raros erros de cópia) à dupla-hélice de DNA original (ver **Figura 6-2**). Como cada fita parental serve como o molde para uma nova fita, cada uma das duplas-hélices de DNA filhas termina com uma das fitas de DNA originais (velha) e uma fita que é completamente nova; diz-se que esse estilo de replicação é *semiconservativo* (**Figura 6-3**). Em *Como Sabemos*, p. 200-202, discutimos os experimentos que pela primeira vez demonstraram que o DNA é replicado dessa maneira.

**Figura 6-2** O DNA atua como um molde para a sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A irá parear com sucesso somente com o T, e o G com o C, cada fita de uma dupla-hélice de DNA – marcadas aqui como a fita S e a sua fita S' complementar – pode servir como um molde para especificar a sequência de nucleotídeos na sua fita complementar. Dessa maneira, ambas as fitas de uma dupla-hélice de DNA podem ser copiadas com precisão.



**Figura 6-3** Em cada ciclo de replicação do DNA, cada uma das duas fitas de DNA é usada como um molde para a formação de uma fita complementar nova. A replicação do DNA é "semiconservativa", porque cada dupla-hélice de DNA filha é constituída de uma fita conservada e outra recém-sintetizada.



## A síntese de DNA inicia-se nas origens de replicação

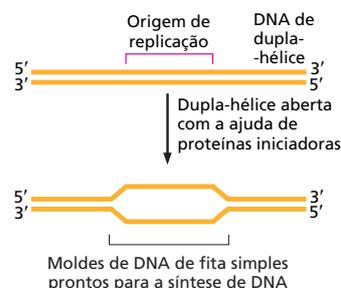
A dupla-hélice de DNA é normalmente muito estável: as duas fitas de DNA são firmemente unidas uma à outra por um grande número de ligações de hidrogênio entre as bases de ambas as fitas (ver Figura 5-2). Em consequência, somente temperaturas próximas à da água em ebulição fornecem energia térmica suficiente para separar as duas fitas. Entretanto, para ser usada como um molde, a dupla-hélice precisa primeiramente ser aberta e as duas fitas separadas para expor as bases não pareadas. Como isso ocorre nas temperaturas encontradas nas células vivas?

O processo de síntese de DNA é iniciado por *proteínas iniciadoras* que se ligam a sequências de DNA específicas denominadas **origens de replicação**. Nelas, as proteínas iniciadoras afastam as duas fitas de DNA, quebrando as ligações de hidrogênio entre as bases (Figura 6-4). Ainda que as ligações de hidrogênio coletivamente tornem a hélice de DNA muito estável, cada ligação de hidrogênio é individualmente fraca (como discutido no Cap. 2). Dessa forma, a separação de uma pequena porção de DNA de cada vez, de poucos pares de base, não requer uma grande quantidade de energia, e as proteínas iniciadoras podem prontamente abrir a dupla-hélice a temperaturas normais.

Em células simples, tais como bactérias ou leveduras, as origens de replicação compreendem aproximadamente 100 pares de nucleotídeos. Elas são compostas de sequências de DNA que atraem proteínas iniciadoras e são especialmente fáceis de serem abertas. Vimos, no Capítulo 5, que um par de bases A-T é mantido unido por um número menor de ligações de hidrogênio que um par de bases G-C. Portanto, o DNA rico em pares de bases A-T é relativamente fácil de ser separado, e segmentos de DNA ricos em A-T costumam ser encontrados nas origens de replicação.

Um genoma bacteriano, que normalmente está contido em uma molécula de DNA circular de vários milhões de pares de nucleotídeos, possui uma única origem de replicação. O genoma humano, que é muito maior, possui aproximadamente 10.000 dessas origens – uma média de 220 origens por cromossomo. Ao iniciar a replicação do DNA em muitos pontos diferentes de uma só vez, o tempo que uma célula necessita para copiar seu genoma inteiro é grandemente diminuído.

Uma vez que uma proteína iniciadora se ligue ao DNA em uma origem de replicação e localmente abra a dupla-hélice, ela atrai um grupo de proteínas que realizam a replicação do DNA. Essas proteínas formam uma máquina de replicação, na qual cada proteína desempenha uma função específica.



## Dois forquilha de replicação são formadas em cada origem de replicação

As moléculas de DNA no processo de serem replicadas contêm junções na forma de Y, denominadas **forquilha de replicação**. Duas forquilha de replicação são formadas em cada origem de replicação (Figura 6-8). Em cada forquilha, uma máquina de replicação move-se ao longo do DNA, abrindo as duas fitas da dupla-hélice e usando cada fita como um molde para produzir uma nova fita-filha. As duas forquilha afastam-se da origem em direções opostas, abrindo a dupla-hélice e replicando o DNA à medida que se movem (Figura 6-9). A replicação do DNA em cromossomos bacterianos e eucarióticos é, portanto, denominada *bidirecional*. As

**Figura 6-4** Uma dupla-hélice de DNA é aberta nas origens de replicação.

As sequências de DNA, nas origens de replicação, são reconhecidas por proteínas iniciadoras (não mostradas), que localmente afastam as duas fitas da dupla-hélice. As fitas simples expostas podem então servir como moldes para a cópia do DNA.

## A NATUREZA DA REPLICAÇÃO

Em 1953, James Watson e Francis Crick publicaram seu famoso artigo de duas páginas descrevendo um modelo para a estrutura do DNA (ver Figura 5-2). Nesse modelo, propuseram que as bases complementares – adenina e timina, guanina e citosina – pareiam umas com as outras no centro da dupla-hélice, mantendo unidas as duas fitas de DNA. Ao final desse sucinto sucesso científico, eles comentaram, quase como um detalhe, que “não nos escapou o fato de que o pareamento específico por nós postulado imediatamente sugere um possível mecanismo de cópia para o material genético.”

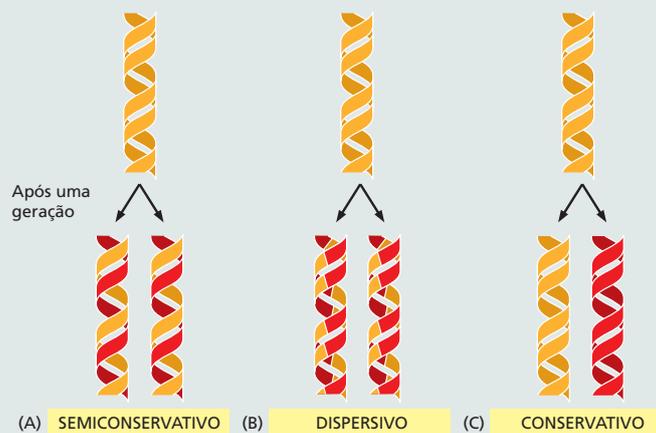
De fato, um mês após o artigo clássico ter aparecido impresso na revista *Nature*, Watson e Crick publicaram um segundo artigo, sugerindo como o DNA poderia ser duplicado. Nesse artigo, eles propuseram que as duas fitas da dupla-hélice se separam, e que cada fita atua como um molde para a síntese de uma fita-filha complementar. Em seu modelo, denominado replicação *semiconservativa*, cada molécula de DNA nova consiste em uma fita derivada da molécula parental original e uma fita recém-sintetizada (Figura 6-5A).

Sabemos hoje que o modelo de Watson e Crick para a replicação do DNA estava correto – mas não foi universalmente aceito a princípio. Por um lado, o respeitado físico que se tornou geneticista, Max Delbrück, ficou atordoado com o que denominou “o problema do desenrolamento”, ou seja: como poderiam as duas fitas de uma dupla-hélice, enroladas

uma ao redor da outra tantas vezes ao longo de sua grande extensão, ser separadas sem gerar uma grande confusão de entrelaçamentos? A proposta de Watson e Crick de uma dupla-hélice abrindo como um zíper parecia, para Delbrück, fisicamente improvável e simplesmente “muito deselegante para ser eficiente.”

Em vez disso, Delbrück propôs que a replicação do DNA ocorria por meio de uma série de quebras e reuniões, nas quais a cadeia principal do DNA era quebrada e as fitas eram copiadas em pequenos segmentos – possivelmente de apenas 10 nucleotídeos de cada vez – antes de serem reunidas. Nesse modelo, que foi posteriormente denominado *dispersivo*, as cópias resultantes seriam como coleções de remendos de DNA novo e antigo, cada fita contendo uma mistura de ambos (Figura 6-5B). Nenhum desenrolamento seria necessário.

Ainda um terceiro grupo promoveu a ideia de que a replicação do DNA poderia ser *conservativa*: que a hélice parental poderia de algum modo permanecer inteiramente intacta após o processo de cópia, e que a molécula-filha conteria duas fitas de DNA inteiramente novas (Figura 6-5C). Para determinar qual desses modelos era o correto, era necessária a realização de um experimento que revelasse a composição das fitas de DNA recém-sintetizadas. Foi aí que Matt Meselson e Frank Stahl apareceram.



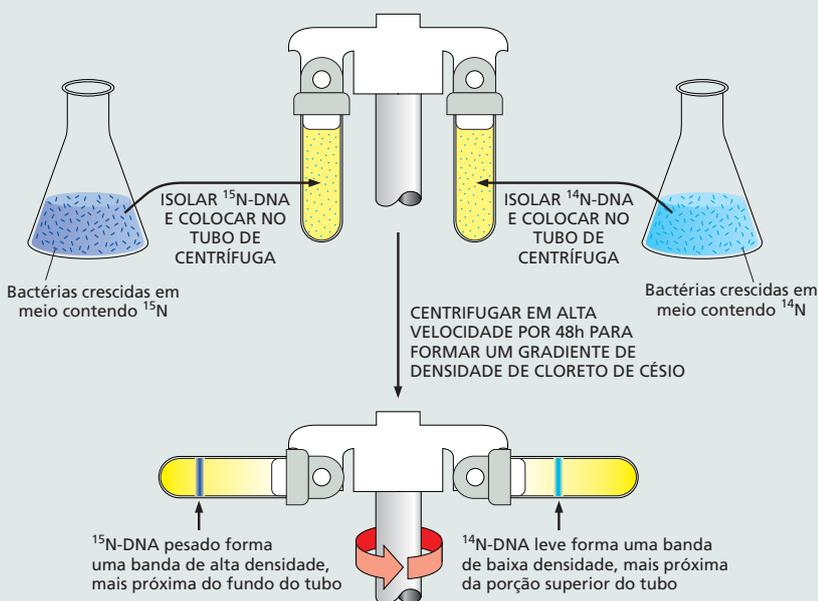
**Figura 6-5** Três modelos para a replicação do DNA produzem previsões diferentes. (A) No modelo semiconservativo, cada fita parental atua como um molde para a síntese de uma nova fita-filha. O primeiro ciclo de replicação deveria produzir duas moléculas híbridas, cada uma contendo uma fita parental original além de uma fita recém-sintetizada. Um ciclo subsequente de replicação deveria resultar em duas moléculas híbridas e duas moléculas que nada contêm do DNA parental original (ver Figura 6-3). (B) No modelo dispersivo, cada geração de DNA filho conteria uma mistura de DNA das fitas parentais e o DNA recém-sintetizado. (C) No modelo conservativo, a molécula parental permanece intacta após ser copiada. Nesse caso, o primeiro ciclo de replicação iria resultar na dupla-hélice parental intacta e em uma dupla-hélice inteiramente nova. Para cada modelo, as moléculas de DNA parentais são mostradas em *laranja*; o DNA recém-replicado é mostrado em *vermelho*. Observe que é mostrado somente um segmento muito pequeno do DNA para cada modelo.

Como estudante de pós-graduação trabalhando para Linus Pauling, Meselson estava explorando um método para conhecer a diferença entre proteínas novas e velhas. Após conversar com Delbrück sobre o modelo de replicação de Watson e Crick, ocorreu a Meselson que a abordagem que ele cogitou para explorar a síntese de proteínas poderia também funcionar para estudar o DNA. No verão de 1954, Meselson encontrou Stahl, que era então um estudante de pós-graduação em Rochester, NY, e os dois concordaram em colaborar. Levaram alguns anos para conseguir que tudo funcionasse, mas ambos finalmente realizaram aquele que ficou conhecido como “o experimento mais bonito da biologia.”

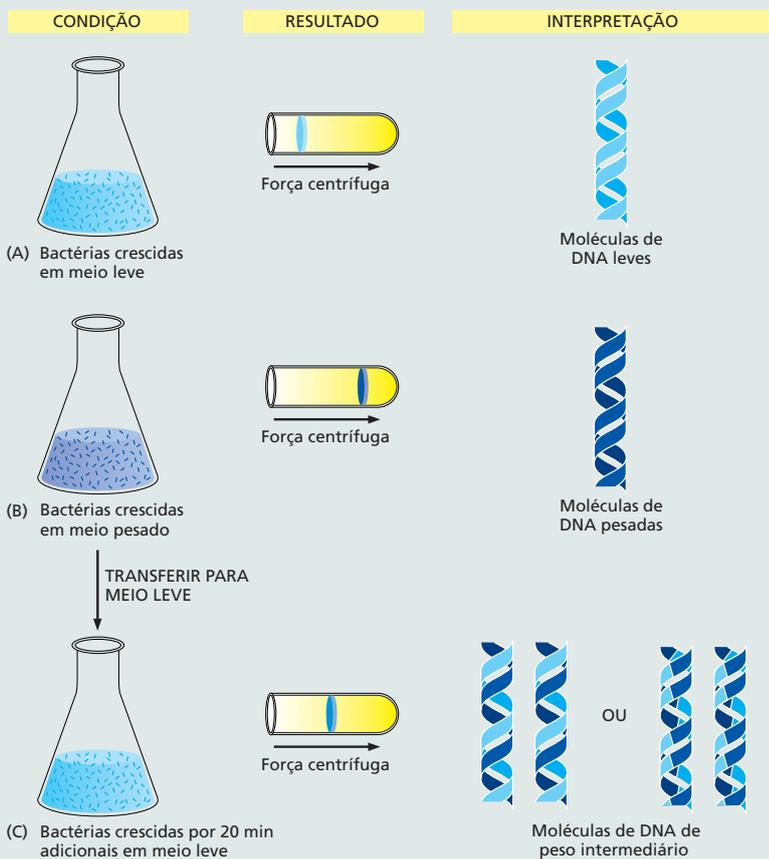
Em retrospecto, sua abordagem foi incrivelmente direta. Eles iniciaram fazendo crescer duas culturas de bactérias *E. coli*, uma em um meio contendo um isótopo pesado do nitrogênio,  $^{15}\text{N}$ , a outra em um meio contendo o isótopo normal e mais leve,  $^{14}\text{N}$ . O nitrogênio presente no meio nutritivo é incorporado às bases nucleotídicas e, a partir daí, passa para o DNA do organismo. Após o crescimento das culturas bacterianas por muitas gerações em meio contendo  $^{15}\text{N}$  ou  $^{14}\text{N}$ , os pesquisadores obtiveram dois frascos de bactérias, um cujo DNA era pesado, e outro cujo DNA era leve. Meselson e Stahl romperam então as células bacterianas e aplicaram o DNA obtido em tubos contendo uma alta concentração do sal cloreto de céσιο. Quando esses tubos são centrifugados a uma alta velocidade, o cloreto de céσιο forma um gradiente de densidade, e as moléculas de DNA flutuam ou afundam na solução até alcançarem o ponto no

qual suas densidades equivalem ao da solução salina circundante (ver Painel 4-3, p. 164-165). Usando esse método, denominado centrifugação de densidade de equilíbrio, Meselson e Stahl descobriram que podiam distinguir entre o DNA pesado (contendo  $^{15}\text{N}$ ) e o DNA leve (contendo  $^{14}\text{N}$ ), observando as posições do DNA dentro do gradiente de cloreto de céσιο. Como o DNA pesado era mais denso que o DNA leve, ele se acumulava em uma posição mais próxima do fundo do tubo de centrifuga (Figura 6-6).

Uma vez estabelecido esse método para diferenciar entre DNA leve e pesado, Meselson e Stahl começaram a testar as várias hipóteses propostas para a replicação do DNA. Para tanto, prepararam um frasco de bactérias crescidas em nitrogênio pesado e transferiram essas bactérias para um meio contendo o isótopo leve. No início do experimento, todas as moléculas de DNA seriam pesadas. Mas, à medida que as bactérias se dividiam, o DNA recém-sintetizado seria mais leve. Eles poderiam então monitorar o acúmulo de DNA leve e avaliar qual modelo, se algum deles, melhor descrevia os dados. Após uma geração de crescimento, os pesquisadores descobriram que as moléculas de DNA parentais, pesadas – aquelas constituídas por duas fitas contendo  $^{15}\text{N}$  – desapareceram e foram substituídas por uma nova espécie de DNA que gerava uma banda a uma densidade intermediária entre o  $^{15}\text{N}$ -DNA e o  $^{14}\text{N}$ -DNA (Figura 6-7). Essas hélices-filhas recém-sintetizadas, de acordo com Meselson e Stahl, deveriam ser híbridas – contendo tanto isótopos pesados quanto leves.



**Figura 6-6** A centrifugação em um gradiente de cloreto de céσιο possibilita a separação de DNA leve e pesado. Bactérias crescidas por várias gerações em um meio contendo  $^{15}\text{N}$  (o isótopo pesado) ou  $^{14}\text{N}$  (o isótopo leve) para marcar seu DNA. As células são então rompidas, e o DNA é colocado em um tubo de ultracentrifuga contendo uma solução salina de cloreto de céσιο. Esses tubos são centrifugados a altas velocidades por dois dias para que o DNA possa acumular-se em uma região na qual sua densidade corresponda à do sal que o cerca. As moléculas de DNA pesadas e leves são acumuladas em posições diferentes no tubo.



**Figura 6-7** A primeira parte do experimento de Meselson-Stahl descartou o modelo conservativo da replicação do DNA. (A) Bactérias crescidas em meio leve (contendo  $^{14}\text{N}$ ) produzem DNA que forma uma banda na porção superior do tubo de centrifuga, enquanto bactérias crescidas em meio pesado contendo  $^{15}\text{N}$  (B) produzem DNA que migra mais para baixo no tubo. Quando bactérias crescidas em um meio pesado são transferidas para um meio leve em condições que permitam que continuem se dividindo, elas produzem uma banda cuja posição é aproximadamente intermediária às posições das duas bandas parentais (C). Esses resultados descartam o modelo conservativo de replicação, mas não distinguem entre os modelos dispersivo e semiconservativo, pois ambos predizem a formação de moléculas de DNA filhas híbridas.

O fato de terem saído tão claros os resultados – com bandas separadas formando-se nas posições esperadas para as moléculas de DNA híbridas recém-sintetizadas – foi um feliz acidente do protocolo experimental. Os pesquisadores usaram uma seringa hipodérmica para colocar suas amostras de DNA nos tubos de ultracentrifuga (ver Figura 6-6). Nesse processo, eles involuntariamente romperam o grande cromossomo bacteriano em fragmentos menores. Se os cromossomos tivessem permanecido intactos, os pesquisadores poderiam ter isolado moléculas de DNA que foram replicadas apenas parcialmente, porque muitas células teriam sido apanhadas no meio do processo de cópia de suas moléculas de DNA. Moléculas em tal etapa intermediária de replicação não se teriam separado nessas bandas individuais. Mas como os pesquisadores estavam, em vez disso, trabalhando com pequenos fragmentos de DNA, a probabilidade de que um fragmento qualquer tivesse sido completamente replicado – e contivesse uma fita-filha e uma fita parental completas – era alta, produzindo, portanto, resultados claros e elegantes.

Imediatamente, essa observação descartava o modelo conservativo de replicação do DNA, que previa que o DNA parental iria permanecer inteiramente pesado, enquanto o DNA recém-sintetizado seria inteiramente leve (ver Figura 6-5C). Os dados estavam de acordo com o modelo semiconservativo, que previa a formação de moléculas híbridas contendo uma fita de DNA pesado e uma fita de DNA leve (ver Figura 6-5A). Os resultados, entretanto, também eram compatíveis com o modelo dispersivo, no qual fitas híbridas de DNA iriam conter uma mistura de DNA leve e DNA pesado (ver Figura 6-5B).

Para distinguir entre esses dois modelos, Meselson e Stahl aumentaram a temperatura. Quando o DNA é submetido a altas temperaturas, as ligações de hidrogênio que mantêm as duas fitas unidas são quebradas, e a hélice se separa, resultando em uma coleção de DNAs de fita simples. Quando os pesquisadores aqueceram suas moléculas híbridas antes de centrifugá-las, descobriram que uma fita de DNA era pesada, enquanto a outra era leve. Essa observação sustentava somente o modelo semiconservativo; se o modelo dispersivo estivesse correto, as fitas resultantes, cada uma contendo um arranjo misturado de DNA leve e pesado, iriam gerar uma única banda em uma densidade intermediária.

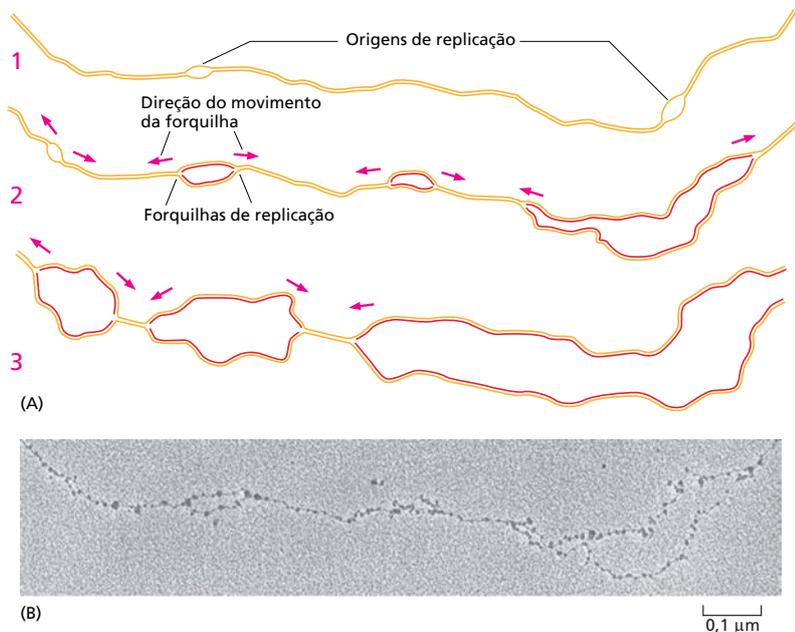
De acordo com o historiador Frederic Lawrence Holmes, o experimento foi tão elegante e os resultados tão claros que Stahl – quando entrevistado em uma seleção para um cargo na Universidade de Yale – foi incapaz de completar os 50 minutos destinados para a sua fala. “Eu terminei em 25 minutos,” disse Stahl, “porque isso era tudo o que levava para explicar aquele experimento. Ele é tão simples e autocontido.” Stahl não obteve o emprego na Universidade de Yale, mas o experimento convenceu os biólogos de que Watson e Crick estavam corretos. De fato, os resultados foram aceitos tão amplamente e com tanta rapidez, que o experimento foi descrito em um manual antes mesmo que Meselson e Stahl tivessem publicado seus dados.

forquilhas se movem muito rapidamente – a cerca de 1.000 pares de nucleotídeos por segundo em bactérias e 100 pares de nucleotídeos por segundo em humanos. A taxa mais lenta de movimento da forquilha em humanos (de fato, em todos os eucariotos) pode ser decorrente das dificuldades para replicar o DNA ao longo da estrutura mais complexa da cromatina dos cromossomos eucarióticos.

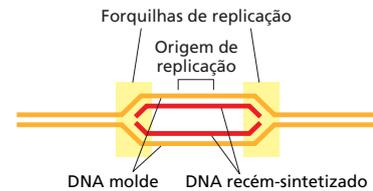
## A DNA-polimerase sintetiza DNA usando uma fita parental como molde

O movimento de uma forquilha de replicação é impulsionado pela ação da máquina de replicação, no coração da qual reside uma enzima denominada **DNA-polimerase**. Essa enzima catalisa a adição de nucleotídeos à extremidade 3' de uma fita de DNA em crescimento, usando uma das fitas de DNA parentais como um molde. O pareamento de bases entre um nucleotídeo que chega ao local de síntese e a fita molde determina qual dos quatro nucleotídeos (A, G, T ou C) será selecionado. O produto final é uma nova fita de DNA que é complementar em sequência nucleotídica ao molde (**Figura 6-10**).

A reação de polimerização envolve a formação de uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' de uma cadeia de DNA crescente e o grupo 5'-fosfato do nucleotídeo a ser incorporado, que entra na reação como um *trifosfato de desoxirribonucleosídeo*. A energia para a polimerização é fornecida pelo próprio trifosfato de desoxirribonucleosídeo: a hidrólise de uma de suas ligações de fosfato de alta energia abastece a reação que acopla os monômeros de nucleotídeos à cadeia, liberando pirofosfato (**Figura 6-11**). O pirofosfato é, por sua vez, hidrolisado a fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>), o que torna a reação de polimerização efetivamente irreversível (ver Figura 3-41).



**Figura 6-9** Duas forquilhas de replicação afastam-se de cada origem de replicação em direções opostas. (A) Estes esquemas representam a mesma porção de uma molécula de DNA como ela poderia parecer em diferentes momentos durante a replicação. As linhas em laranja representam as duas fitas de DNA parental; as linhas vermelhas representam as fitas de DNA recém-sintetizadas. (B) Uma micrografia eletrônica mostrando o DNA em replicação em um embrião inicial de mosca. As partículas visíveis ao longo do DNA são nucleossomos, estruturas formadas de DNA e complexos proteicos ao redor dos quais o DNA é enrolado (discutidos no Cap. 5). O cromossomo, nesta micrografia, é o que foi redesenhado no esquema (2) acima. (Micrografia eletrônica cortesia de Victoria Foe.)

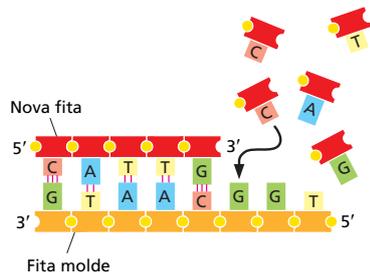


**Figura 6-8** A síntese do DNA ocorre em junções em forma de Y, denominadas **forquilhas de replicação**. Duas forquilhas de replicação são formadas em cada origem de replicação.

### QUESTÃO 6-1

Observe cuidadosamente a micrografia e o desenho 2 na Figura 6-9.

- Usando a barra de escalas, estime os tamanhos das fitas de DNA entre as forquilhas de replicação. Numerando as forquilhas de replicação sequencialmente a partir da esquerda, quanto tempo irá levar até que as forquilhas 4 e 5, e as forquilhas 7 e 8, respectivamente, colidam umas com as outras? (Lembre-se de que a distância entre as bases no DNA é de 0,34 nm, e as forquilhas de replicação eucarióticas movem-se a cerca de 100 nucleotídeos por segundo.) Para esta questão, desconsidere os nucleossomos vistos na micrografia e assuma que o DNA esteja completamente estendido.
- O genoma da mosca contém cerca de  $1,8 \times 10^8$  pares de nucleotídeos de tamanho. Qual fração do genoma é mostrada na micrografia?



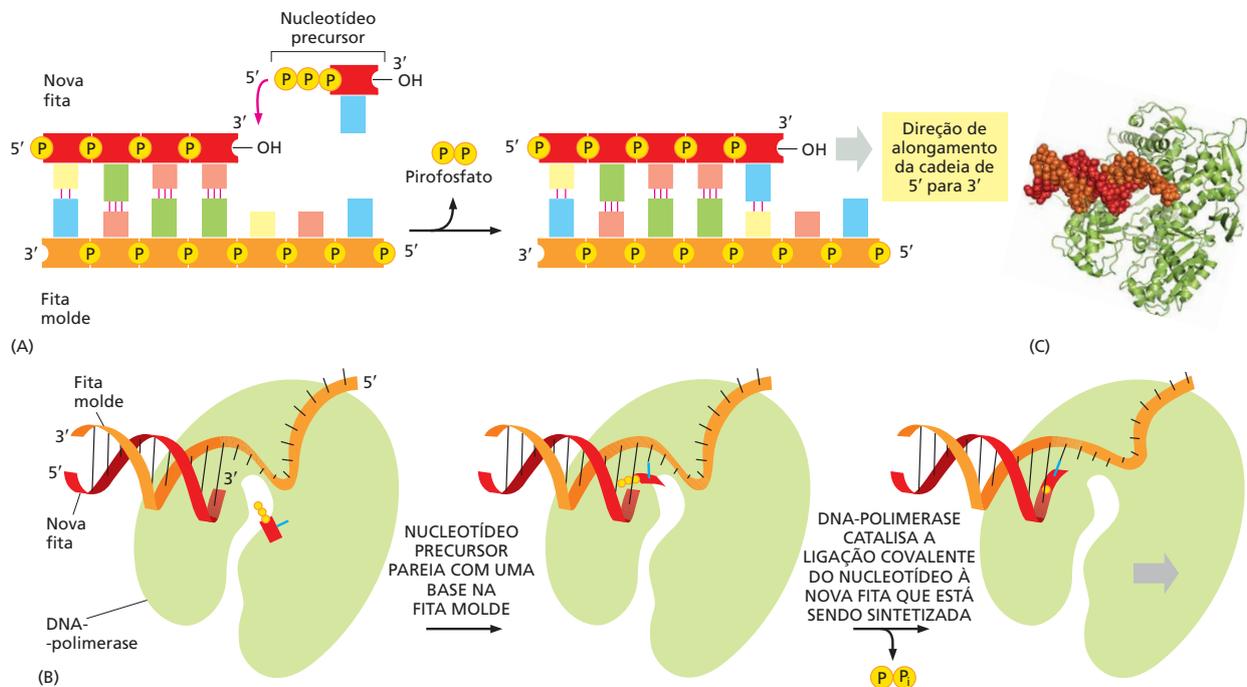
**Figura 6-10** Uma nova fita de DNA é sintetizada na direção 5'-3'. A cada passo, o nucleotídeo apropriado é selecionado por meio da formação de pares de base com o nucleotídeo seguinte da fita molde: A com T, T com A, C com G, e G com C. Cada um é adicionado à extremidade 3' da nova fita em crescimento, como indicado.

A DNA-polimerase não se dissocia do DNA a cada vez que adiciona um novo nucleotídeo à fita em crescimento; em vez disso, ela permanece associada com o DNA e se move ao longo da fita molde de modo gradual por muitos ciclos de polimerização (Animação 6.1). Veremos posteriormente que uma proteína especial mantém a polimerase associada ao DNA, à medida que ela adiciona novos nucleotídeos à fita em crescimento.

## A forquilha de replicação é assimétrica

A direção 5'-3' da reação de polimerização do DNA cria um problema na forquilha de replicação. Como ilustrado na Figura 5-2, a cadeia principal açúcar-fosfato de cada fita de uma dupla-hélice de DNA possui uma única direção química, ou polaridade, determinada pelo modo de cada resíduo de açúcar ser acoplado ao seguinte, e as duas fitas na dupla-hélice são antiparalelas; ou seja, elas seguem em direções opostas. Como consequência, em cada forquilha de replicação, uma nova fita de DNA está sendo produzida sobre um molde que segue em uma direção (3' para 5'), enquanto a outra nova fita está sendo produzida em um molde que segue na direção oposta (5' para 3') (Figura 6-12). A forquilha de replicação é, portanto, assimétrica. Ao se observar a Figura 6-9A, entretanto, parece que as duas novas fitas de DNA estão sendo sintetizadas na mesma direção; ou seja, a direção na qual a forquilha de replicação está se movendo. Essa observação sugere que uma fita esteja sendo sintetizada na direção 5'-3' e a outra na direção 3'-5'.

A célula possuirá dois tipos de DNA-polimerase, um para cada direção? A resposta é não: todas as DNA-polimerases adicionam novas subunidades somente à extremidade 3' de uma fita de DNA (ver Figura 6-11A). Consequentemen-



**Figura 6-11** A DNA-polimerase adiciona um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3' de uma cadeia de DNA em crescimento.

(A) Os nucleotídeos entram na reação como trifosfatos de desoxirribonucleosídeo. Esse nucleotídeo a ser incorporado forma um par de bases com seu parceiro da fita molde. Ele é então acoplado à hidroxila 3' livre na fita de DNA em crescimento. A nova fita de DNA é, portanto, sintetizada na direção 5'-3'. A quebra de uma ligação de fosfato de alta energia do trifosfato de nucleosídeo que está entrando – acompanhado pela liberação de pirofosfato – fornece a energia para a reação de polimerização. (B) A reação é catalisada pela enzima DNA-polimerase (verde-clara). A polimerase guia o nucleotídeo a ser incorporado para a fita molde e o posiciona de tal modo que seu fosfato 5' terminal seja capaz de reagir com o grupo hidroxila 3' na fita que está sendo sintetizada. A seta cinza indica a direção de movimento da polimerase. (C) Estrutura da DNA-polimerase, determinada por cristalografia de raios X, que mostra o posicionamento da dupla-hélice de DNA. A fita molde é a maior das duas fitas de DNA (Animação 6.1).

te, uma nova cadeia de DNA pode ser sintetizada somente na direção 5'-3'. Isso pode facilmente explicar a síntese de uma das duas fitas de DNA na forquilha de replicação, mas o que ocorre com a outra? Esse enigma foi resolvido pelo uso de um artifício de "pesponto". A fita de DNA que parece crescer na direção 3'-5' incorreta é de fato produzida *descontinuamente*, em pequenas porções, separadas e sucessivas – com a DNA-polimerase movendo-se para trás com respeito à direção do movimento da forquilha de replicação, de tal modo que cada novo fragmento de DNA possa ser polimerizado na direção 5'-3'.

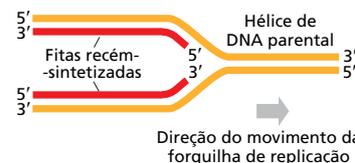
As pequenas porções de DNA resultantes – denominadas **fragmentos de Okazaki** em alusão ao bioquímico que os descobriu – são posteriormente unidas para formar uma nova fita contínua. A fita de DNA que é produzida descontinuamente desse modo é denominada **fita retardada (lagging)**, porque o pesponto resulta em um pequeno atraso na sua síntese; a outra fita, que é sintetizada continuamente, é denominada **fita líder (leading)** (Figura 6-13).

Ainda que difiram em detalhes sutis, as forquilhas de replicação de todas as células, procarióticas e eucarióticas, possuem fitas líder e retardadas. Essa característica comum é resultante do fato de que todas as DNA-polimerases funcionam somente na direção 5'-3' – uma restrição que fornece às células uma importante vantagem, como discutimos a seguir.

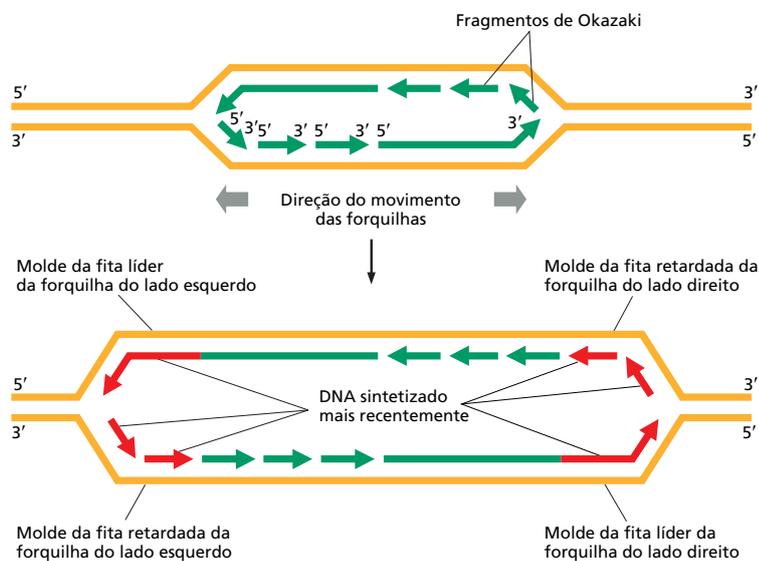
### A DNA-polimerase é autocorretiva

A DNA-polimerase é tão precisa, que produz somente cerca de um erro a cada  $10^7$  pares de nucleotídeos que ela copia. Essa taxa de erros é muito mais baixa do que aquela que poderia ser explicada simplesmente pela precisão dos pareamentos de bases complementares. Ainda que A-T e C-G sejam de longe os pares de bases mais estáveis, outros pares de bases, menos estáveis – G-T e C-A, por exemplo – também podem ser formados. Tais pares de bases incorretos são formados de modo muito menos frequente do que os corretos, mas, se mantidos, resultariam em um acúmulo de mutações. Esse desastre é evitado, porque a DNA-polimerase possui duas qualidades especiais que aumentam amplamente a precisão da replicação do DNA. Primeiro, a enzima monitora cuidadosamente o pareamento de bases entre o nucleotídeo a ser incorporado e a fita molde. Somente quando a correspondência for correta a DNA-polimerase irá catalisar a reação de adição do nucleotídeo. Segundo, quando a DNA-polimerase comete um raro engano e adiciona um nucleotídeo errado, ela pode corrigir o erro por meio de uma atividade denominada **autocorreção (proofreading)**.

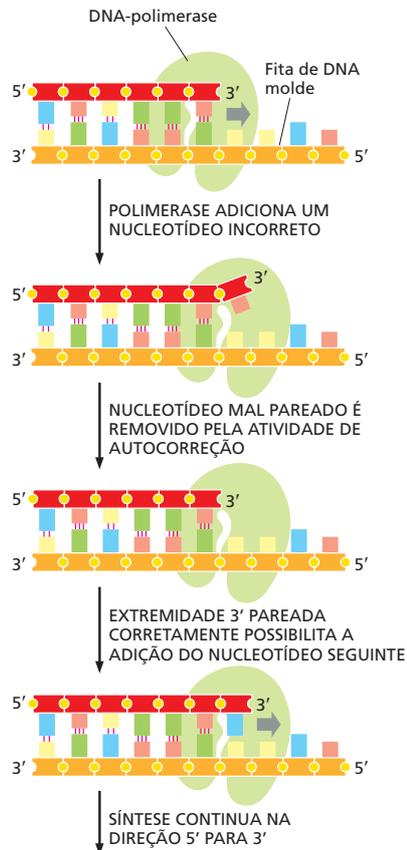
A atividade de autocorreção ocorre durante a síntese de DNA. Antes que a enzima adicione o nucleotídeo seguinte a uma fita de DNA em crescimento,



**Figura 6-12** Na forquilha de replicação, as duas fitas de DNA recém-sintetizadas são de polaridades opostas. Isso se deve ao fato de que as duas fitas molde são orientadas em direções opostas.



**Figura 6-13** Em cada forquilha de replicação, a fita de DNA retardada (*lagging*) é sintetizada em pedaços. Como ambas as fitas novas são sintetizadas na direção 5'-3', na forquilha de replicação, a fita retardada do DNA deve ser produzida inicialmente como uma série de pequenas fitas de DNA, que são posteriormente unidas. O diagrama superior mostra duas forquilhas de replicação se movendo em direções opostas; o diagrama inferior mostra as mesmas forquilhas em um curto período de tempo depois. Para replicar a fita retardada, a DNA-polimerase usa um mecanismo de pesponto: ela sintetiza pequenos pedaços de DNA (denominados fragmentos de Okazaki) na direção 5'-3' e então se move de volta ao longo da fita molde (em direção à forquilha) antes de sintetizar o fragmento seguinte.



**Figura 6-14** Durante a síntese de DNA, a DNA-polimerase realiza uma autocorreção do seu trabalho. Se um nucleotídeo incorreto é adicionado a uma fita que está em crescimento, a DNA-polimerase o remove da fita e o substitui por um nucleotídeo correto antes de continuar a síntese.

**Figura 6-15** A DNA-polimerase contém sítios separados para a síntese de DNA e a autocorreção. Os diagramas são baseados na estrutura de uma molécula da DNA-polimerase de *E. coli*, determinada por cristalografia de raios X. A DNA-polimerase é mostrada com a molécula de DNA sendo replicada e a polimerase no modo de polymerização (esquerda) e no modo de autocorreção (direita). Os sítios catalíticos para a atividade de polymerização (P) e a autocorreção (E) estão indicados. Quando a polimerase adiciona um nucleotídeo incorreto, a fita de DNA recém-sintetizada (em vermelho) transitoriamente deixa de se parear com a fita molde (em laranja), e sua extremidade 3' se move para dentro do sítio catalítico corretor de erros (E), para que o nucleotídeo incorreto seja removido.

ela confere se o nucleotídeo previamente adicionado paria corretamente com a fita molde. Caso isso ocorra, a polimerase adiciona o nucleotídeo seguinte; caso contrário, a polimerase remove o nucleotídeo mal pareado e tenta novamente (Figura 6-14). Essa autocorreção é realizada por uma nuclease que cliva a cadeia principal fosfodiéster. A polymerização e a autocorreção são rigidamente coordenadas, e as duas reações são desempenhadas por diferentes domínios catalíticos contidos na mesma molécula de polimerase (Figura 6-15).

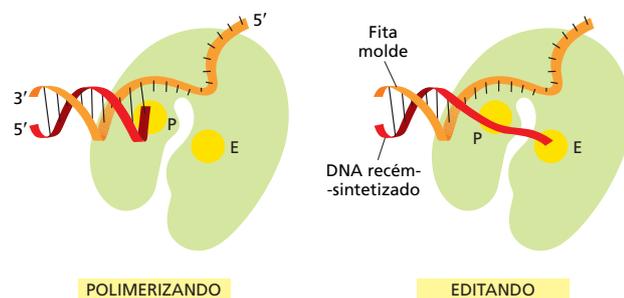
Esse mecanismo de autocorreção explica por que as DNA-polimerases sintetizam DNA somente na direção 5'-3', apesar de tal necessidade impor um mecanismo de pesponto complicado na forquilha de replicação (ver Figura 6-13). Uma DNA-polimerase hipotética que sintetize na direção 3'-5' (e iria desse modo prescindir do mecanismo de pesponto) não seria capaz de realizar a autocorreção: se removesse um nucleotídeo pareado incorretamente, a polimerase criaria um impasse químico – uma cadeia que não poderia mais ser alongada. Portanto, para uma DNA-polimerase funcionar como uma enzima autocorretiva que remove seus próprios erros de polymerização à medida que se move ao longo do DNA, ela deve seguir somente na direção 5'-3'.

## Pequenos trechos de RNA atuam como iniciadores para a síntese de DNA

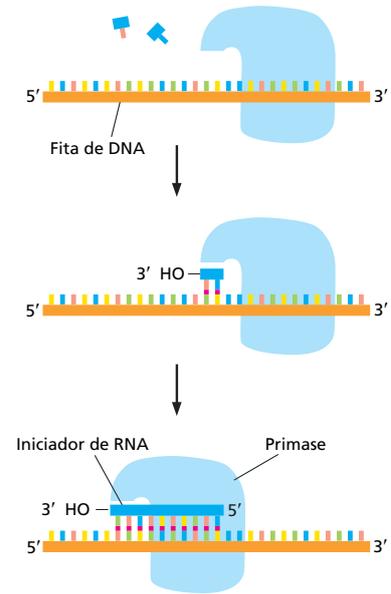
Vimos que a precisão da replicação do DNA depende da exigência da DNA-polimerase por uma extremidade 3' com pareamento correto de bases antes que ela possa adicionar mais nucleotídeos a uma fita de DNA que está sendo sintetizada. Como então a polimerase pode iniciar uma fita de DNA completamente nova? Para que o processo seja iniciado, uma enzima diferente é necessária – uma que possa iniciar uma nova fita polinucleotídica simplesmente unindo dois nucleotídeos, sem a exigência de uma extremidade com bases pareadas. Essa enzima, entretanto, não sintetiza DNA. Ela produz um pequeno fragmento de um tipo de ácido nucleico intimamente relacionado – RNA (ácido ribonucleico) –, usando a fita de DNA como um molde. Esse pequeno fragmento de RNA, de cerca de 10 nucleotídeos de tamanho, paria com a fita molde e fornece uma extremidade 3' pareada como um sítio de início para a DNA-polimerase. Desse modo, esse pequeno segmento de RNA atua como um iniciador (ou *primer*) para a síntese de DNA, e a enzima que sintetiza o iniciador de RNA é conhecida como *primase*.

A *primase* é um exemplo de uma *RNA-polimerase*, uma enzima que sintetiza RNA usando DNA como um molde. Uma fita de RNA é quimicamente muito similar a uma fita simples de DNA, exceto que é constituída por subunidades de ribonucleotídeos, nos quais o açúcar é a ribose, e não a desoxirribose; o RNA também difere do DNA no fato de que contém a base uracila (U), em vez de timina (T) (ver Painel 2-6, p. 76-77). Entretanto, como U pode formar um pareamento de bases com A, o iniciador de RNA é sintetizado na fita de DNA por pareamento de bases complementares, exatamente do mesmo modo que no DNA (Figura 6-16).

Para a fita líder, um iniciador de RNA é necessário somente para iniciar a replicação na origem de replicação; uma vez que a forquilha de replicação tenha



**Figura 6-16** Os iniciadores de RNA são sintetizados por uma RNA-polimerase denominada primase, que usa uma fita de DNA como molde. Como a DNA-polimerase, a primase trabalha na direção 5'-3'. Diferentemente da DNA-polimerase, entretanto, a primase pode iniciar uma nova cadeia polinucleotídica por meio da união de dois trifosfatos de nucleosídeos sem a necessidade de uma extremidade 3' pareada como sítio de início. (Nesse caso, são trifosfatos de ribonucleosídeos, em vez de trifosfatos de desoxirribonucleosídeos, que fornecem os nucleotídeos a serem incorporados).



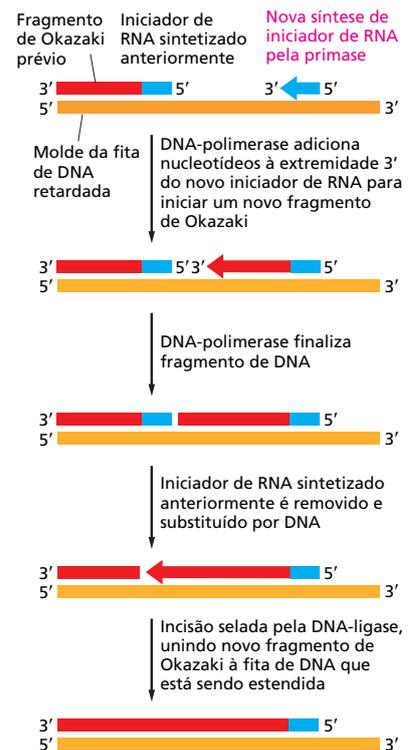
Logo estabelecida, a DNA-polimerase é continuamente apresentada a uma extremidade 3' pareada, à medida que ela se desloca ao longo da fita molde. Mas na fita retardada, na qual a síntese do DNA é descontínua, novos iniciadores são necessários para que a polimerização seja mantida (ver Figura 6-13). O movimento da forquilha de replicação continuamente expõe bases não pareadas no molde da fita retardada, e novos iniciadores de RNA são adicionados, a intervalos, ao longo do segmento de fita simples recém-exposto. A DNA-polimerase adiciona um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3' de cada iniciador para iniciar um novo fragmento de Okazaki, e ela continuará a alongar esse fragmento até encontrar o próximo iniciador de RNA (Figura 6-17).

Para produzir uma nova fita de DNA contínua, a partir de vários fragmentos separados de ácidos nucleicos produzidos na fita retardada, três enzimas adicionais são necessárias. Essas enzimas 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 denominada *polimerase de reparo* então substitui esse RNA por DNA (usando a extremidade do fragmento de Okazaki adjacente como um iniciador), e a enzima *DNA-ligase* une a extremidade 5'-fosfato de um fragmento de DNA à extremidade 3'-hidroxila adjacente do seguinte (Figura 6-18).

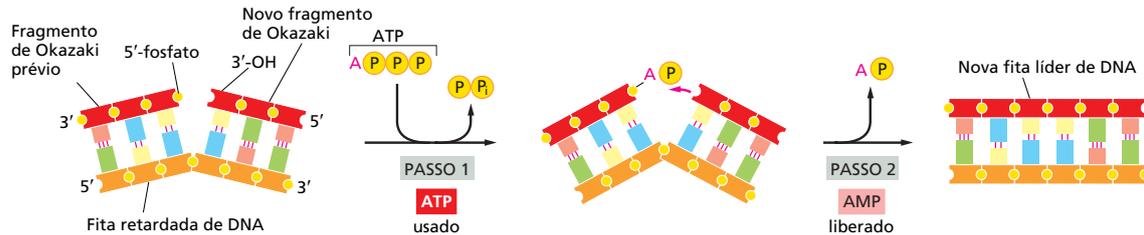
A primase pode iniciar novas cadeias polinucleotídicas, mas essa atividade é possível porque a enzima não realiza a autocorreção do seu trabalho. Como consequência, os iniciadores frequentemente contêm erros. No entanto, como esses iniciadores são feitos de RNA, em vez de DNA, eles se destacam como “cópias suspeitas”, para serem removidas automaticamente e substituídas por DNA. As DNA-polimerases de reparo que sintetizam esse DNA, assim como as polimerases replicativas, realizam a autocorreção à medida que o sintetizam. Desse modo, a maquinaria de replicação celular é capaz de iniciar novas cadeias de DNA e, ao mesmo tempo, garantir que todo o DNA seja copiado com fidelidade.

## As proteínas na forquilha de replicação cooperam para formar uma máquina de replicação

A replicação do DNA requer a cooperação de um grande número de proteínas que atuam em conjunto para abrir a dupla-hélice e sintetizar DNA novo. Essas



**Figura 6-17** Múltiplas enzimas são necessárias para sintetizar os fragmentos de Okazaki na fita de DNA retardada. Em eucariotos, os iniciadores de RNA são produzidos em intervalos de cerca de 200 nucleotídeos na fita retardada, e cada iniciador de RNA contém aproximadamente 10 nucleotídeos. Esses iniciadores são removidos por nucleases que reconhecem uma fita de RNA em uma hélice de RNA/DNA e a degradam; isso deixa espaços que são preenchidos por uma DNA-polimerase de reparo que pode realizar a autocorreção à medida que preenche os espaços. Os fragmentos completos são finalmente unidos por uma enzima denominada DNA-ligase, que catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3'-OH de um fragmento e a extremidade 5'-fosfato do seguinte, acoplado desse modo as cadeias principais açúcar-fosfato. Essa reação de “vedação dos pontos de corte” (*nick sealing*) requer o fornecimento de energia na forma de ATP (não mostrado; ver Figura 6-18).

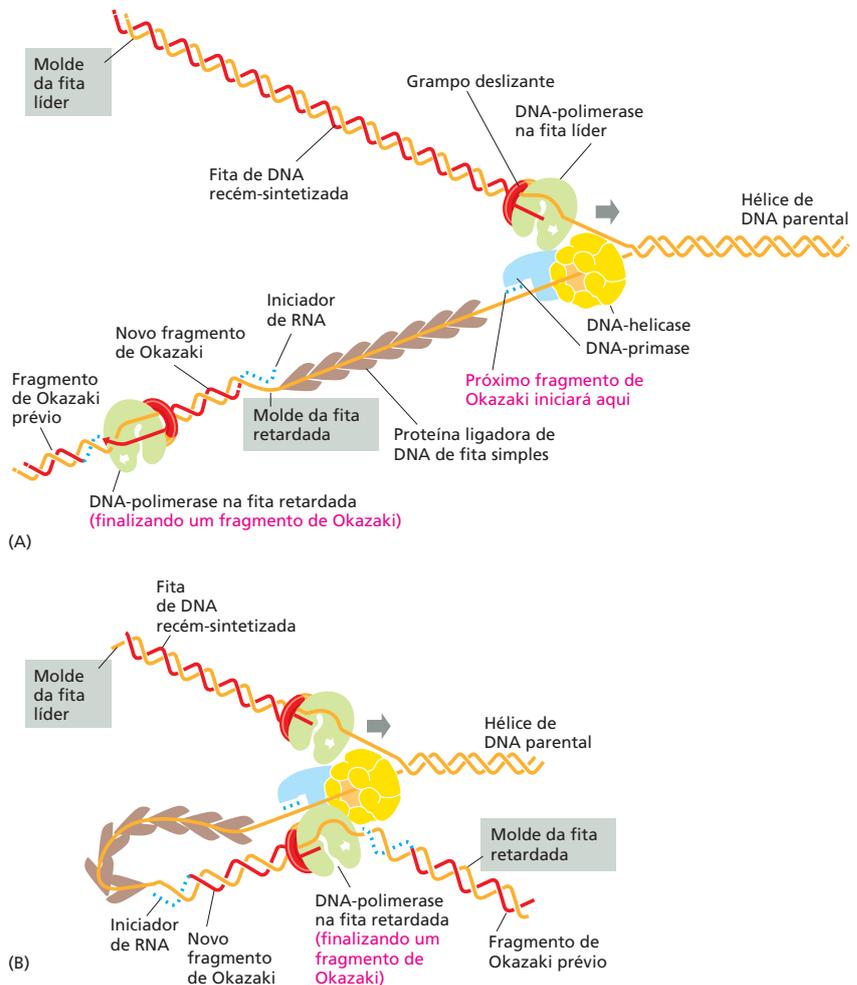


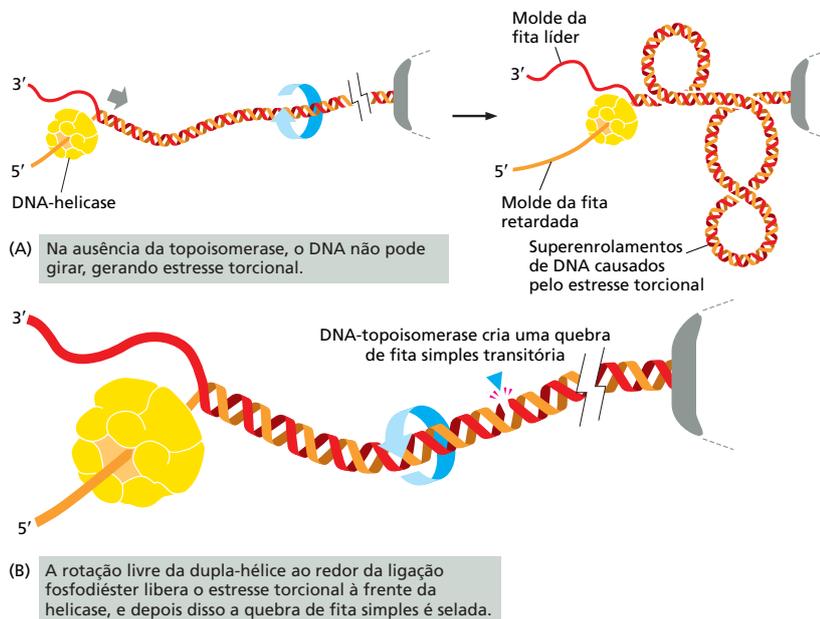
**Figura 6-18** A DNA-ligase une os fragmentos de Okazaki na fita retardada durante a síntese de DNA. A enzima liga-se usa uma molécula de ATP para ativar a extremidade 5' de um fragmento (passo 1) antes de formar uma nova ligação com a extremidade 3' de outro fragmento (passo 2).

**Figura 6-19** A síntese de DNA é realizada por um grupo de proteínas que atuam em conjunto como uma máquina de replicação. (A) As DNA-polimerases são mantidas nas fitas líder e retardadas por grampos proteicos circulares que permitem às polimerases escorregar. Na fita molde retardada, o grampo se desprende a cada vez que a polimerase completa um fragmento de Okazaki. O carregador do grampo (não mostrado) é necessário para acoplar um grampo deslizante a cada vez que a síntese de um novo fragmento de Okazaki é iniciada. À frente da forquilha, uma DNA-helicase desenrola as fitas da dupla-hélice de DNA parental. Proteínas ligadoras de DNA de fita simples mantêm as fitas de DNA afastadas para fornecer acesso para a primase e a polimerase. Por simplicidade, este diagrama mostra as proteínas trabalhando de modo independente; na célula, elas são mantidas unidas em uma grande máquina de replicação, como mostrado em (B).

(B) Este diagrama mostra uma visão atual de como as proteínas de replicação estão arranjadas quando uma forquilha de replicação se move. Para gerar essa estrutura, a fita retardada mostrada em (A) foi dobrada para possibilitar o contato da sua DNA-polimerase com a DNA-polimerase da fita líder. Esse processo de dobramento também aproxima a extremidade 3' de cada fragmento de Okazaki completado ao sítio de início do fragmento de Okazaki seguinte. Como a DNA-polimerase da fita retardada está ligada ao restante das proteínas de replicação, ela pode ser reusada para sintetizar sucessivos fragmentos de Okazaki; neste diagrama, a DNA-polimerase da fita retardada está a ponto de liberar seu fragmento de Okazaki completado e se mover para o iniciador de RNA que está sendo sintetizado pela primase que está próxima. Para assistir a esse complexo de replicação em ação, veja as Animações 6.4 e 6.5.

proteínas fazem parte de uma máquina de replicação notavelmente complexa. O primeiro problema enfrentado pela máquina de replicação está em acessar os nucleotídeos que se encontram no centro da hélice. Para que a replicação do DNA possa ocorrer, a dupla-hélice deve ser aberta à frente da forquilha de replicação, de tal modo que os nucleosídeos trifosfatados que chegam possam parear com cada uma das fitas molde. Dois tipos de proteínas de replicação – DNA-helicases e proteínas ligadoras de DNA de fita simples – cooperam para executar essa tarefa. A helicase acomoda-se bem na frente da máquina de replicação, onde usa a energia da hidrólise de ATP para se autopropelir, separando as duas fitas da dupla-hélice à medida que se desloca ao longo do DNA (Figura 6-19A e Animação 6.2). Proteínas ligadoras de DNA de fita simples se unem ao DNA de fita simples exposto pela helicase, impedindo transitoriamente que as fitas tornem a formar os pares de bases e mantendo-as em uma forma alongada, de tal modo que possam servir como moldes eficientes.





**Figura 6-20** As DNA-topoisomerases aliviam a tensão gerada na frente de uma forquilha de replicação. (A) À medida que a DNA-helicase desenrola a dupla-hélice de DNA, gera um segmento de DNA supertorcido. Gera-se tensão, porque o cromossomo é grande demais para rotar com rapidez suficiente para liberar o estresse torcional gerado. As “barras quebradas” no painel da esquerda representam aproximadamente 20 voltas de DNA. (B) DNA-topoisomerases aliviam esse estresse gerando quebras temporárias no DNA.

Esse desenrolamento localizado da dupla-hélice de DNA representa, por si só, um problema. À medida que a helicase separa o DNA dentro da forquilha de replicação, o DNA no outro lado da forquilha fica mais firmemente enrolado. Esse excesso de voltas na frente da forquilha de replicação cria uma tensão no DNA que – se deixada aumentar – torna o desenrolamento da dupla-hélice crescentemente difícil e impede o movimento para frente da maquinaria de replicação (Figura 6-20A). As células usam proteínas denominadas *DNA-topoisomerases* para aliviar essa tensão. Essas enzimas produzem quebras de cadeia simples transitórias no DNA, que liberam temporariamente a tensão; a seguir, refazem essas ligações antes de se desligar do DNA (Figura 6-20B).

Uma proteína de replicação adicional, denominada *grupo deslizante* (*sliding clamp*), mantém a DNA-polimerase firmemente presa ao molde enquanto ela sintetiza novas fitas de DNA. Deixadas por si só, a maioria das DNA-polimerases iria sintetizar somente uma pequena sequência de nucleotídeos antes de se desligar da fita molde de DNA. O grupo deslizante forma um anel ao redor da dupla-hélice de DNA recém-formada e, ao prender firmemente a polimerase, possibilita que a enzima se mova ao longo da fita molde sem se desprender da mesma, à medida que sintetiza uma nova fita de DNA (ver Figura 6-19A e Animação 6.3).

A montagem do grupo ao redor do DNA requer a atividade de outra proteína de replicação, o *carregador do grupo* (*clamp loader*), que hidrolisa ATP a cada vez que ele prende um grupo deslizante ao redor de uma dupla-hélice de DNA recém-formada. Esse carregamento deve ocorrer somente uma vez por ciclo de replicação na fita líder; entretanto, na fita retardada, o grupo é removido e então reacoplado a cada vez que um novo fragmento de Okazaki é produzido.

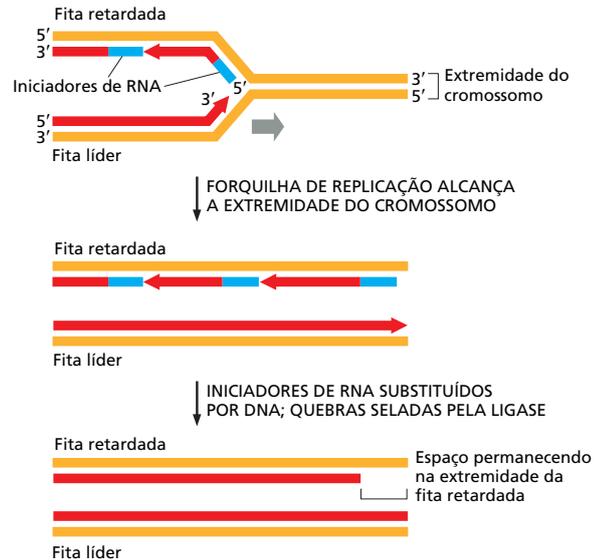
A maioria das proteínas envolvidas na replicação do DNA é mantida unida em um grande complexo multienzimático que se move como uma unidade ao longo da dupla-hélice de DNA parental, permitindo que o DNA seja sintetizado em ambas as fitas de modo coordenado. Esse complexo pode ser comparado a uma máquina de costura em miniatura, composta por partes proteicas e impulsionada pela hidrólise de nucleosídeos trifosfatados (Figura 6-19B e Animações 6.4 e 6.5).

## A telomerase replica as extremidades dos cromossomos eucarióticos

Tendo discutido como a replicação do DNA inicia-se nas origens e como o movimento de uma forquilha de replicação segue adiante, passamos agora para o

### QUESTÃO 6-2

Discuta a seguinte afirmativa: “A primase é uma enzima desleixada, que comete muitos erros. No final, os iniciadores de RNA que ela produz são removidos e substituídos por DNA sintetizado por uma polimerase com maior fidelidade. Isso é um desperdício. Seria mais eficiente energeticamente se uma DNA-polimerase fizesse uma cópia precisa em primeiro lugar.”



**Figura 6-21** Sem um mecanismo especial para replicar as extremidades dos cromossomos lineares, o DNA seria perdido em cada ciclo de divisão celular.

A síntese de DNA inicia-se nas origens de replicação e continua até a maquinaria de replicação alcançar as extremidades do cromossomo. A fita líder é reproduzida em sua íntegra. Mas as extremidades da fita retardada não podem ser completadas, porque, uma vez que o último iniciador de RNA tenha sido removido, não existe forma de substituí-lo por DNA. Essas lacunas nas extremidades da fita retardada devem ser preenchidas por um mecanismo especial, para evitar que as extremidades dos cromossomos encurtem a cada ciclo de divisão celular.

### QUESTÃO 6-3

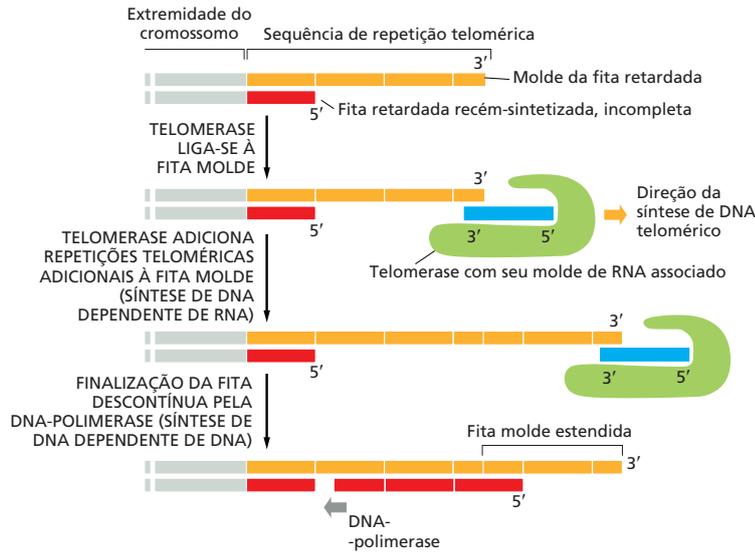
Um gene que codifica uma das proteínas envolvidas na replicação do DNA foi inativado por uma mutação em uma célula. Na ausência dessa proteína, a célula tenta replicar seu DNA. O que ocorreria durante o processo de replicação do DNA se cada uma das seguintes proteínas estivesse faltando?

- DNA-polimerase
- DNA-ligase
- Grampo deslizante (*sliding clamp*) para a DNA-polimerase
- Nuclease que remove os iniciadores de RNA
- DNA-helicase
- Primase

problema especial de replicar as verdadeiras extremidades dos cromossomos. Como discutido anteriormente, uma vez que a replicação do DNA se dá somente na direção 5'-3', a fita retardada da forquilha de replicação deve ser sintetizada na forma de fragmentos de DNA descontínuos, cada um dos quais iniciado com um iniciador de RNA adicionado por uma primase (ver Figura 6-17). Entretanto, um sério problema surge quando a forquilha de replicação se aproxima da extremidade de um cromossomo: ainda que a fita líder possa ser replicada ao longo de toda a sua extensão até a extremidade do cromossomo, a fita retardada não pode. Quando o último iniciador de RNA na fita retardada é removido, não há como substituí-lo (Figura 6-21). Sem uma estratégia para lidar com esse problema, a fita retardada se tornaria mais curta em cada ciclo de replicação do DNA; após repetidas divisões celulares, os cromossomos iriam encolher – e por fim perder informação genética valiosa.

As bactérias resolveram esse problema da “replicação das pontas” tendo moléculas de DNA circulares como cromossomos. Os eucariotos solucionaram esse problema possuindo sequências nucleotídicas longas e repetidas nas extremidades dos seus cromossomos, que são incorporadas em estruturas denominadas **telômeros**. Essas sequências de DNA teloméricas atraem uma enzima denominada **telomerase** às extremidades dos cromossomos. Usando um molde de RNA que é parte da própria enzima, a telomerase estende as extremidades da fita retardada que está sendo replicada, adicionando múltiplas cópias da mesma sequência de DNA curta à fita molde. Esse molde estendido possibilita que a replicação da fita retardada seja completada pela replicação de DNA convencional (Figura 6-22).

Além de permitirem a replicação das extremidades dos cromossomos, os telômeros formam estruturas que marcam as verdadeiras extremidades de um cromossomo. Isso possibilita que a célula possa distinguir, sem equívocos, entre as extremidades naturais dos cromossomos e as quebras em fitas duplas de DNA que



**Figura 6-22** Telômeros e telomerase impedem que os cromossomos eucarióticos lineares encurtem a cada ciclo de divisão celular. Para facilitar o entendimento, somente o DNA molde (laranja) e o DNA recém-sintetizado (vermelho) da fita retardada são mostrados (ver parte inferior da Figura 6-21). Para completar a replicação da fita retardada nas extremidades de um cromossomo, a fita molde é primeiramente estendida para além do DNA que deverá ser copiado. Para conseguir isso, a enzima telomerase adiciona mais repetições nas sequências repetidas teloméricas na extremidade 3' da fita molde, o que então possibilita que a fita retardada seja completada pela DNA-polimerase, como mostrado. A enzima telomerase porta um pequeno fragmento de RNA (azul) com uma sequência que é complementar à sequência repetida de DNA; esse RNA atua como um molde para a síntese de DNA telomérico. Após a replicação da fita retardada ser completada, um pequeno trecho de DNA de fita simples permanece nas extremidades do cromossomo, como mostrado. Para ver a telomerase em ação, assista à [Animação 6.6](#).

às vezes ocorrem acidentalmente no meio dos cromossomos. Essas quebras são perigosas, e devem ser imediatamente reparadas, como veremos na seção seguinte.

## REPARO DO DNA

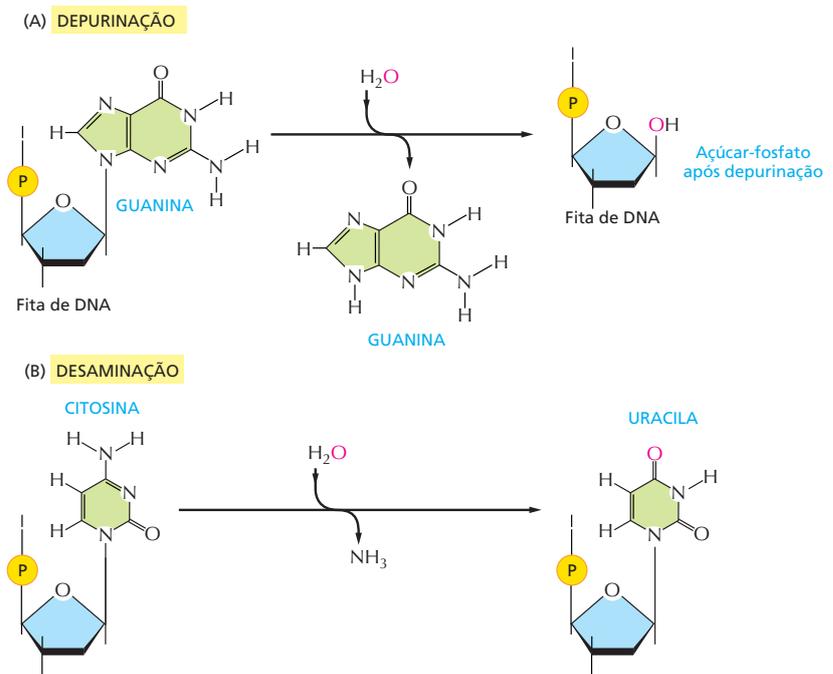
A diversidade de organismos vivos e seu sucesso em colonizar praticamente toda a superfície da Terra dependem de mudanças genéticas acumuladas gradualmente ao longo de milhões de anos. Algumas dessas mudanças possibilitam aos organismos se adaptarem a novas condições e a prosperar em novos habitats. Entretanto, em curto prazo, e a partir da perspectiva de um organismo individual, as alterações genéticas podem ser prejudiciais. Em um organismo multicelular, tais mudanças permanentes no DNA – denominadas mutações – podem perturbar o desenvolvimento e a fisiologia do organismo, que são extremamente complexos e finamente ajustados.

Para sobreviver e se reproduzir, os indivíduos devem ser geneticamente estáveis. Essa estabilidade é conseguida não somente por meio do mecanismo extremamente preciso de replicação do DNA, que recém discutimos, mas também por meio da ação de uma variedade de máquinas proteicas que continuamente examinam o genoma em busca de danos e os corrigem quando ocorrem. Ainda que algumas mudanças surjam a partir de raros equívocos no processo de replicação, a maioria dos danos ao DNA é uma consequência não intencional do vasto número de reações químicas que ocorrem no interior das células.

A maior parte dos danos ao DNA é somente temporária, porque são imediatamente corrigidos pelos processos coletivamente denominados **reparo do DNA**. A importância desses processos de reparo do DNA é evidente a partir das consequências do seu mau funcionamento. Seres humanos com a doença genética *xeroderma pigmentar*, por exemplo, não podem reparar os danos causados pela radiação ultravioleta (UV), porque herdaram um gene defeituoso para uma das proteínas envolvidas nesse processo de reparo. Tais indivíduos desenvolvem lesões de pele graves, incluindo câncer de pele, devido ao acúmulo de danos ao DNA em células que são expostas à luz solar e às consequentes mutações que surgem nessas células.

Nesta seção, descrevemos alguns dos mecanismos especializados que as células usam para reparar os danos ao DNA. A seguir, consideramos exemplos do que acontece quando esses mecanismos falham – e finalmente discutimos como a fidelidade da replicação e do reparo do DNA está refletida no nosso genoma.

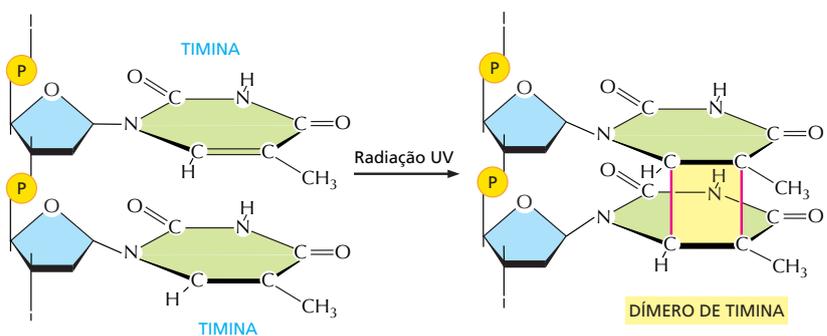
**Figura 6-23** Depurinação e desaminação são as reações químicas conhecidas mais frequentes que criam sérios danos ao DNA nas células. (A) A depurinação pode remover guaninas (ou adeninas) do DNA. (B) O principal tipo de reação de desaminação converte citosina em uma base de DNA alterada, a uracila; entretanto, a desaminação também pode ocorrer em outras bases. Tanto a depurinação quanto a desaminação ocorrem no DNA de dupla-hélice, e nenhuma delas quebra a cadeia principal de fosfodiéster.



## Danos ao DNA ocorrem continuamente nas células

Assim como qualquer outra molécula na célula, o DNA está continuamente sujeito a colisões térmicas com outras moléculas, o que em geral resulta em mudanças químicas importantes no DNA. Por exemplo, durante o tempo que leva para ler esta sentença, as moléculas de DNA nas células do seu corpo perderão um total de cerca de um trilhão ( $10^{12}$ ) de bases púricas (A e G), por uma reação espontânea denominada *depurinação* (Figura 6-23A). A depurinação não quebra a cadeia principal de fosfodiéster do DNA mas, em vez disso, remove uma base púrica de um nucleotídeo, dando origem a lesões que se assemelham a dentes perdidos (ver Figura 6-25B). Outra reação comum é a perda espontânea de um grupo amino (*desaminação*) de uma citosina no DNA para produzir a base uracila (Figura 6-23B). Alguns subprodutos quimicamente reativos do metabolismo celular também reagem ocasionalmente com as bases no DNA, alterando-as de tal modo que suas propriedades de pareamento são modificadas.

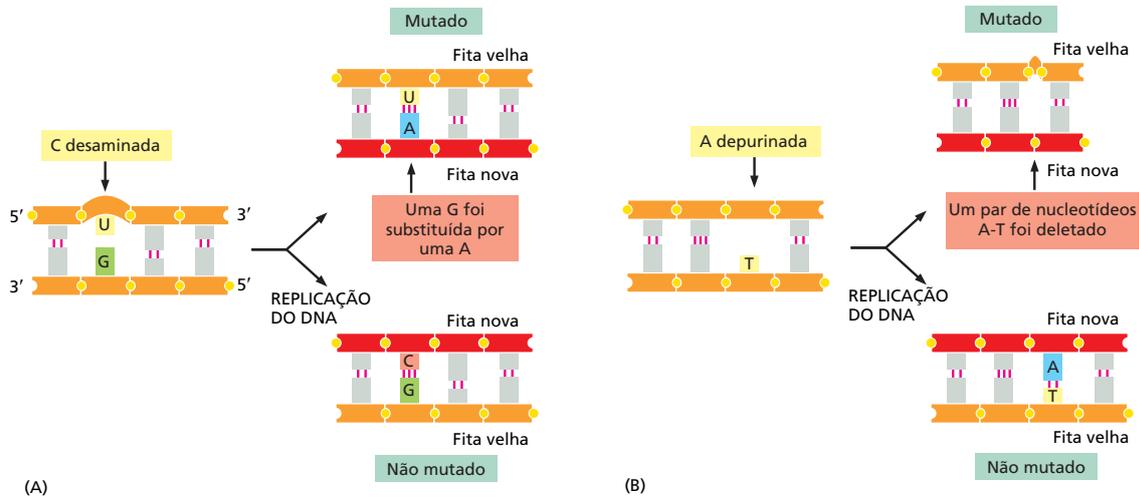
A radiação ultravioleta da luz solar é também danosa para o DNA; ela promove a ligação covalente entre duas bases pirimídicas adjacentes, formando, por exemplo, o *dímero de timina* mostrado na Figura 6-24. É a falha em reparar os dímeros de timina que se traduz em problemas para os indivíduos portadores da doença xeroderma pigmentar.



### QUESTÃO 6-4

Discuta a seguinte afirmativa: “As enzimas de reparo do DNA que reparam os danos de desaminação e depurinação devem reconhecer preferencialmente tais danos nas fitas de DNA recém-sintetizadas.”

**Figura 6-24** A radiação ultravioleta na luz solar pode causar a formação de dímeros de timina. Duas bases de timina adjacentes acabaram de se unir covalentemente, dando origem a um dímero de timina. Células da pele que são expostas à luz solar são especialmente suscetíveis a esse tipo de dano ao DNA.



**Figura 6-25** Modificações químicas de nucleotídeos, se deixadas sem reparo, 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 6-23B, a desaminação da citosina produz uracila. A uracila difere da citosina nas suas propriedades de pareamento de bases e preferencialmente pareia com adenina. A maquinaria de replicação do DNA insere, portanto, uma adenina quando ela encontra uma uracila na fita molde. (B) A depurinação, se não corrigida, pode levar à perda de um par de nucleotídeos. Quando a maquinaria de replicação encontra um sítio apurínico na fita molde, ela pode saltar para o próximo nucleotídeo completo, como mostrado, produzindo desse modo uma molécula de DNA filha que perdeu um par de nucleotídeos. Em outros casos (não mostrados), a maquinaria de replicação adiciona um nucleotídeo incorreto na posição da base faltante, novamente resultando em uma mutação.

Essas são somente algumas das muitas mudanças químicas que podem ocorrer no nosso DNA. Se deixadas sem reparo, muitas delas levariam à substituição de um par de nucleotídeos por outro como resultado do pareamento de bases incorreto durante a replicação (Figura 6-25A) ou à deleção de um ou mais pares de nucleotídeos na fita de DNA filha após a replicação do DNA (Figura 6-25B). Alguns tipos de danos ao DNA (dímeros de timina, p. ex.) podem parar a maquinaria de replicação do DNA no sítio do dano.

Além desse dano químico, o DNA também pode ser alterado pelo próprio processo de replicação. A maquinaria de replicação que copia o DNA pode, raramente, incorporar um nucleotídeo incorreto que ela não consegue corrigir pela autocorreção (ver Figura 6-14).

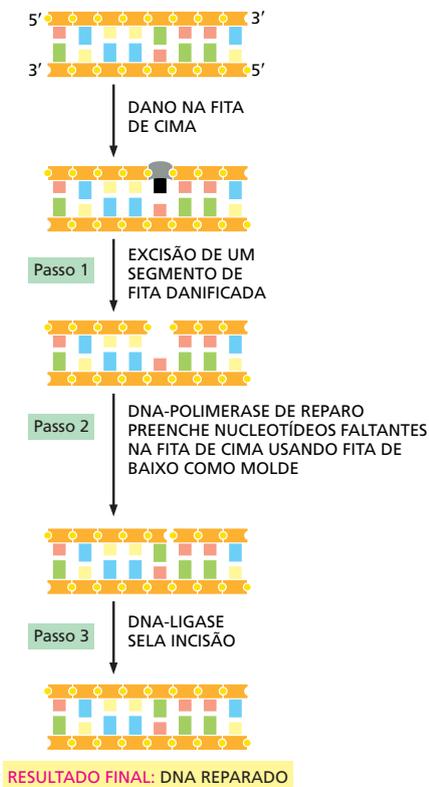
Para cada uma dessas formas de danos ao DNA, as células possuem um mecanismo de reparo, com discutimos a seguir.

## As células possuem uma variedade de mecanismos para reparar o DNA

Os milhares de mudanças químicas aleatórias que ocorrem todos os dias no DNA de uma célula humana – por meio de colisões químicas ou exposição a subprodutos metabólicos reativos, agentes químicos que causam danos ao DNA, ou radiação – são reparados por uma variedade de mecanismos, cada um catalisado por um conjunto diferente de enzimas. Praticamente todos esses mecanismos de reparo dependem da estrutura em dupla-hélice do DNA, que fornece duas cópias da informação genética – uma em cada fita da dupla-hélice. Portanto, se a sequência de uma fita é danificada acidentalmente, a informação não é perdida de modo irrecuperável, porque uma cópia de segurança da fita alterada permanece na sequência complementar de nucleotídeos da outra fita. A maioria dos danos ao DNA cria estruturas que nunca são encontradas em uma fita de DNA não danificada; portanto, a fita correta é facilmente distinguida da incorreta.

A via básica para reparar danos ao DNA, ilustrada esquematicamente na Figura 6-26, envolve três passos básicos:

1. O DNA danificado é reconhecido e removido por um de vários mecanismos. Esses envolvem nucleases, que clivam as ligações covalentes que unem os nucleotídeos danificados ao restante da fita de DNA, deixando um pequeno espaço em uma fita da dupla-hélice de DNA na região danificada.
2. Uma *DNA-polimerase de reparo* liga-se à extremidade hidroxila 3' da fita de DNA clivada. Essa polimerase de reparo então preenche o espaço, produzindo uma cópia complementar da informação armazenada na fita não danificada. Ainda que sejam diferentes da *DNA-polimerase* que replica o DNA, as



**Figura 6-26** O mecanismo básico de reparo do DNA envolve três passos.

No passo 1 (excisão), o dano é removido por uma de uma série de nucleases, cada uma especializada em um tipo de dano ao DNA. No passo 2 (ressíntese), a sequência de DNA original é restabelecida por uma DNA-polimerase de reparo, que preenche a falha criada pelos eventos de excisão. No passo 3 (ligação), a DNA-ligase veda os pontos de quebra deixados na cadeia principal de açúcar-fosfato da fita reparada. A vedação dos pontos de quebra, que requer energia proveniente da hidrólise do ATP, refaz as ligações fosfodiéster quebradas entre os nucleotídeos adjacentes (ver Figura 6-18).

DNA-polimerases de reparo sintetizam fitas de DNA do mesmo modo. Por exemplo, estendem cadeias na direção 5'-3' e têm o mesmo tipo de atividade de autocorreção para garantir que a fita molde seja copiada de modo preciso. Em muitas células, essa é a mesma enzima que preenche os espaços deixados após a remoção dos iniciadores de RNA durante o processo normal de replicação do DNA (ver Figura 6-17).

3. Após o preenchimento do espaço pela DNA-polimerase de reparo, uma quebra permanece na cadeia principal de açúcar-fosfato da fita reparada. Essa quebra na hélice é selada pela DNA-ligase, a mesma enzima que une os fragmentos de Okazaki durante a replicação da fita retardada.

Os passos 2 e 3 são praticamente idênticos para a maioria dos danos de DNA, incluindo os raros erros que surgem durante a replicação do DNA. Entretanto, o passo 1 depende de uma série de enzimas diferentes, cada uma especializada em remover diferentes tipos de danos ao DNA. Os humanos produzem centenas de proteínas diferentes que atuam no reparo de DNA.

## Um sistema de reparo do mau pareamento de bases de DNA remove erros de replicação que escapam da autocorreção

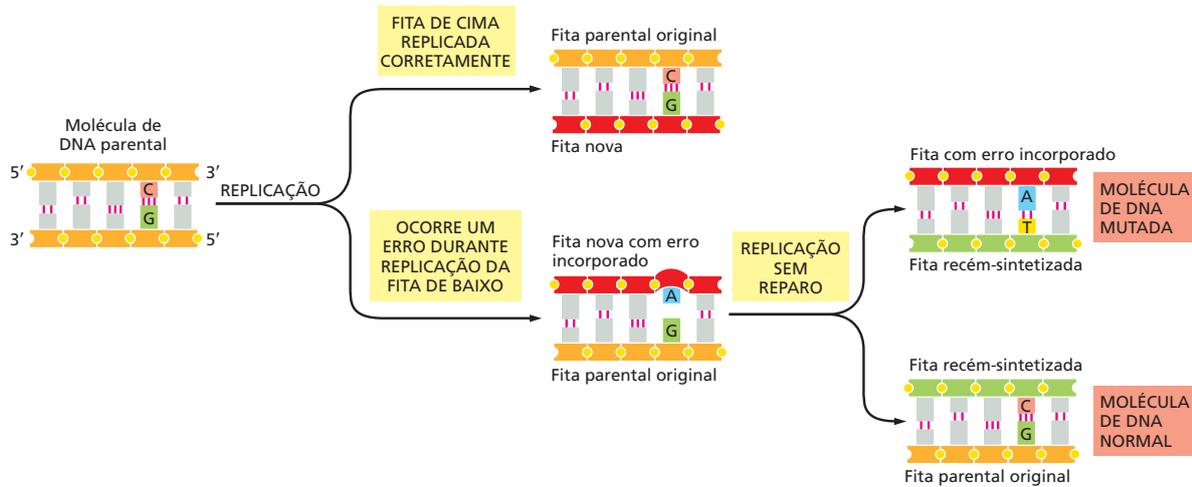
Ainda que a alta fidelidade e a autocorreção da maquinaria de replicação celular geralmente previnam a ocorrência de erros de replicação, raros erros ocorrem. Felizmente, a célula tem um sistema de cópia de segurança – denominado **reparo do mau pareamento** – que é dedicado a corrigir esses erros. A maquinaria de replicação produz aproximadamente um erro a cada  $10^7$  nucleotídeos copiados; o reparo do mau pareamento de bases corrige 99% desses erros de replicação, aumentando a acurácia geral para um erro em  $10^9$  nucleotídeos copiados. Esse nível de acurácia é muito alto, muito superior ao encontrado em nossas vidas diárias (Tabela 6-1).

Sempre que a maquinaria de replicação comete um erro de cópia, ela deixa para trás um nucleotídeo mal pareado (comumente chamado *mau pareamento*). Se deixado sem ser corrigido, o mau pareamento resultará em uma mutação permanente no próximo ciclo de replicação do DNA (Figura 6-27). Um complexo de proteínas de reparo do mau pareamento reconhece tal pareamento errado do DNA, remove o segmento da fita de DNA que contém o erro, e então ressintetiza o DNA faltante. Esse mecanismo de reparo restabelece a sequência correta (Figura 6-28).

Para ser eficiente, o sistema de reparo do mau pareamento deve ser capaz de reconhecer qual das fitas de DNA contém o erro. Se removesse um segmento da fita de DNA que contém a sequência correta, o sistema de reparo iria somente aumentar o erro. Para solucionar esse problema, o sistema de reparo do mau

**TABELA 6-1** Taxas de erro

Entrega dentro do tempo estipulado do Serviço Postal dos Estados Unidos para correspondências locais de primeira classe	13 entregas atrasadas para cada 100 pacotes
Sistema de bagagens de companhia aérea	1 bagagem perdida para cada 150
Um digitador profissional digitando 120 palavras por minuto	1 erro a cada 250 caracteres
Dirigir um carro nos Estados Unidos	1 morte a cada $10^4$ pessoas por ano
Replicação do DNA (sem autocorreção)	1 erro a cada $10^5$ nucleotídeos copiados
Replicação do DNA (com autocorreção; sem reparo do mau pareamento de bases)	1 erro a cada $10^7$ nucleotídeos copiados
Replicação do DNA (com reparo do mau pareamento de bases)	1 erro a cada $10^9$ nucleotídeos copiados



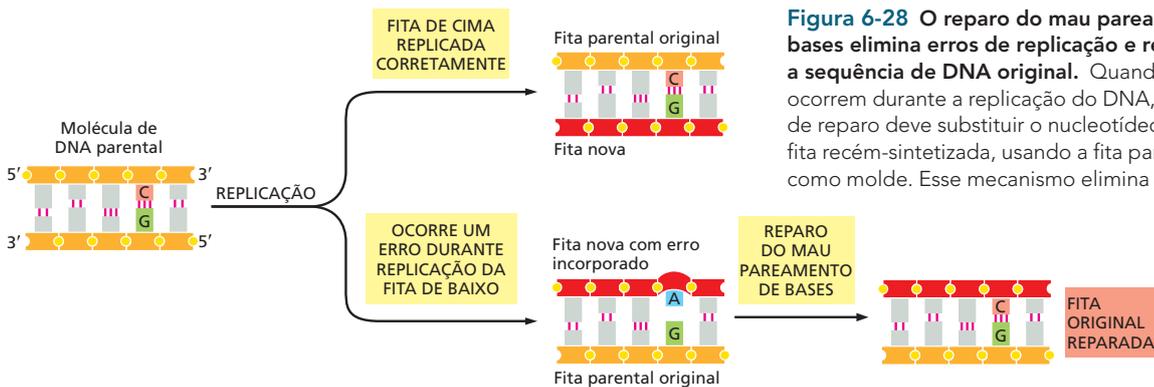
**Figura 6-27** Erros ocorridos durante a replicação do DNA devem ser corrigidos para evitar mutações. Se não corrigido, um mau pareamento de bases irá levar a uma mutação permanente em uma das duas moléculas de DNA produzidas no ciclo seguinte de replicação do DNA.

pareamento sempre remove um segmento da fita de DNA recém-sintetizada. Nas bactérias, o DNA recém-sintetizado não contém um tipo de modificação química que está presente no DNA parental preexistente. Outras células usam estratégias diferentes para distinguir seu DNA parental da fita recém-replicada.

O reparo do mau pareamento desempenha um importante papel na prevenção do câncer. Uma predisposição hereditária a certos tipos de câncer (especialmente alguns tipos de câncer de cólon) é causada por mutações em genes que codificam proteínas de reparo do mau pareamento. Os humanos herdam duas cópias desses genes (um do pai e um da mãe), e indivíduos que herdam um gene de reparo do mau pareamento de bases danificado não são afetados, até que a cópia não danificada do mesmo gene seja mutada aleatoriamente em uma célula somática. Essa célula mutante – e toda a sua progênie – são então deficientes em reparo do mau pareamento de bases; portanto, acumulam mutações mais rapidamente do que as células normais. Como o câncer surge de células que acumularam múltiplas mutações, uma célula deficiente em reparo do mau pareamento tem uma chance muito aumentada de se tornar cancerosa. Desse modo, a herança de um gene de reparo do mau pareamento de bases danificado predispõe fortemente um indivíduo a desenvolver câncer.

## Quebras do DNA de fita dupla requerem uma estratégia diferente de reparo

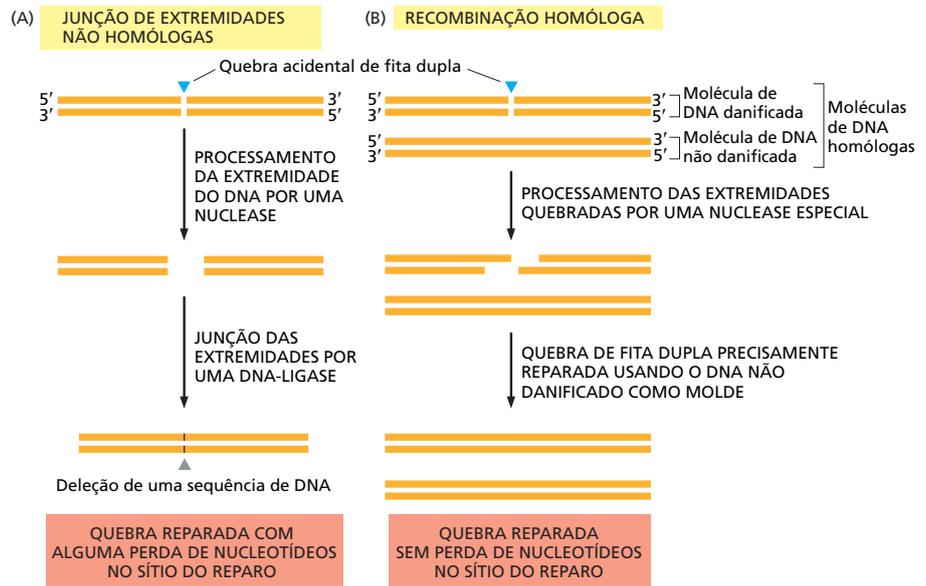
Os mecanismos de reparo discutidos até o momento se baseiam na redundância genética presente em cada dupla-hélice de DNA. Se os nucleotídeos de uma fita forem danificados, eles podem ser reparados usando a informação presente na fita complementar.



**Figura 6-28** O reparo do mau pareamento de bases elimina erros de replicação e restabelece a sequência de DNA original. Quando os erros ocorrem durante a replicação do DNA, a maquinaria de reparo deve substituir o nucleotídeo incorreto na fita recém-sintetizada, usando a fita parental original como molde. Esse mecanismo elimina a mutação.

**Figura 6-29** As células podem reparar quebras de fita dupla em duas formas diferentes. (A) Na união de extremidades não homólogas, primeiramente uma nuclease “limpa” a quebra, convertendo as extremidades quebradas em extremidades cegas. As extremidades cegas são então unidas por uma DNA-ligase. Alguns nucleotídeos são perdidos nesse processo de reparo, como indicado pelas linhas pretas no DNA reparado.

(B) Se uma quebra de fita dupla ocorrer em uma das duplas-hélices de DNA filhas após a replicação do DNA ter ocorrido, mas antes dos cromossomos-filhos terem sido separados, a dupla-hélice não danificada pode ser prontamente usada como um molde para reparar a dupla-hélice danificada, por meio de recombinação homóloga. Esse é um processo mais elaborado que a união de extremidades não homólogas, mas ele restabelece de modo preciso a sequência de DNA original no sítio da quebra. O mecanismo detalhado está apresentado na Figura 6-30.



Mas o que ocorre quando ambas as fitas da dupla-hélice são danificadas ao mesmo tempo? Radiação, problemas na forquilha de replicação e vários ataques químicos podem fraturar a cadeia principal do DNA, criando *quebras de fita dupla*. Tais lesões são particularmente perigosas, porque podem levar à fragmentação dos cromossomos e subsequente perda de genes.

Esse tipo de dano é especialmente difícil de ser reparado. Cada cromossomo contém uma informação particular; se um cromossomo sofrer uma quebra de fita dupla, e as peças quebradas vierem a se separar, a célula não possui uma cópia de reposição que possa usar para reconstruir a informação que agora está faltando.

Para lidar com esse tipo de dano potencialmente desastroso ao DNA, as células desenvolveram duas estratégias básicas. A primeira envolve unir rapidamente as extremidades quebradas, antes que os fragmentos de DNA se separem e se percam. Esse mecanismo de reparo, denominado **união de extremidades não homólogas**, ocorre em muitos tipos celulares, e é realizado por um grupo especializado de enzimas que “limpam” as extremidades quebradas e as unem novamente por ligação de DNA. Esse mecanismo “rápido e sujo” repara rapidamente o dano, mas tem um preço: ao “limpar” a quebra e prepará-la para a ligação, frequentemente se perdem nucleotídeos no sítio de reparo (**Figura 6-29A**).

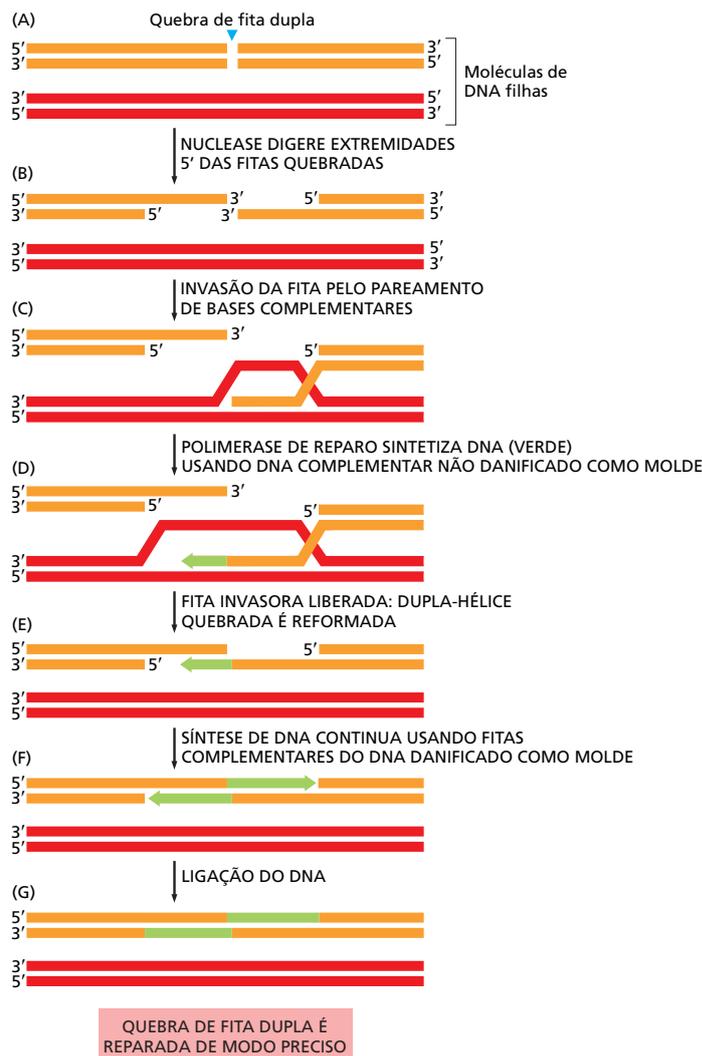
Na maioria dos casos, esse mecanismo de reparo emergencial resolve o dano sem criar problemas adicionais. Mas se o reparo imperfeito alterar a atividade de um gene, a célula poderia sofrer graves consequências. Portanto, a união de extremidades não homólogas pode ser uma estratégia arriscada para consertar cromossomos quebrados. Assim, as células possuem uma estratégia alternativa, livre de erros, para reparar quebras de fita dupla, denominada recombinação homóloga (**Figura 6-29B**), como discutimos a seguir.

## A recombinação homóloga pode reparar sem falhas as quebras de fita dupla

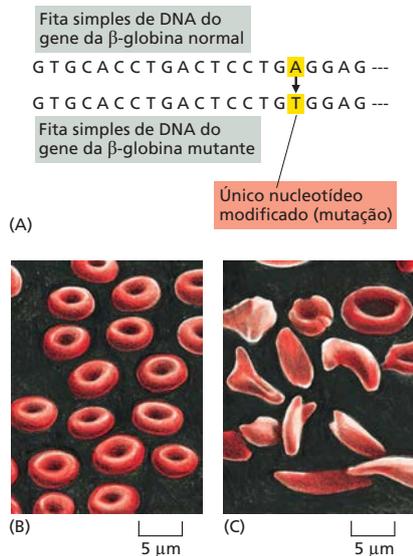
O problema de reparar uma quebra de fita dupla, como mencionamos, está em encontrar um molde intacto para guiar o reparo. Entretanto, se uma quebra de fita dupla ocorrer em uma dupla-hélice logo após um segmento de DNA ter sido replicado, a dupla-hélice não danificada pode prontamente servir de molde para guiar o reparo do DNA quebrado: a informação na fita não danificada da du-

pla-hélice intacta é usada para reparar a fita quebrada complementar na outra. Como as duas moléculas de DNA são homólogas – ou seja, possuem sequências nucleotídicas idênticas fora da região de quebra –, esse mecanismo é conhecido como **recombinação homóloga**. Ele resulta em um reparo de quebras de fita dupla livre de falhas, sem perda de informação genética (ver Figura 6-29B).

A recombinação homóloga frequentemente ocorre logo após o DNA celular ter sido replicado antes da divisão da célula, quando as hélices duplicadas ainda estão fisicamente próximas umas das outras (Figura 6-30A). Para iniciar o reparo, uma nuclease remove as extremidades 5' das duas fitas quebradas no sítio de quebra (Figura 6-30B). Então, com o auxílio de enzimas especializadas, uma das extremidades 3' quebradas “invade” o dúplex de DNA homólogo não quebrado e faz uma busca por uma sequência complementar por meio de pareamento de bases (Figura 6-30C). Uma vez que um pareamento extensivo e preciso seja encontrado, a fita invasora é alongada por uma DNA-polimerase de reparo, usando a fita complementar como um molde (Figura 6-30D). Após a polimerase de reparo ultrapassar o ponto onde a quebra ocorreu, a fita recém-reparada é unida novamente à sua parceira original, formando pareamentos de bases que mantêm unidas as duas fitas da dupla-hélice quebrada (Figura 6-30E). O reparo é então completado pela síntese de DNA adicional nas extremidades 3' de ambas as fi-



**Figura 6-30** A recombinação homóloga possibilita o reparo livre de erros de quebras de fita dupla do DNA. Esse é o método preferido para reparar quebras de fita dupla que surgem logo após o DNA ter sido replicado, mas antes de a célula ter se dividido. Ver o texto para detalhes. (Adaptada de M. McVey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15694–15699, 2004. Com permissão da Academia Nacional de Ciências.)



**Figura 6-31** Uma única mudança nucleotídica provoca a anemia falciforme.

(A) A  $\beta$ -globina é um dos dois tipos de subunidades proteicas que formam a hemoglobina (ver Figura 4-24). Uma única mudança nucleotídica (mutação) no gene da  $\beta$ -globina produz uma subunidade de  $\beta$ -globina que difere da  $\beta$ -globina normal somente por uma mudança de ácido glutâmico para valina na sexta posição da cadeia polipeptídica. (Somente uma pequena porção do gene é mostrada aqui; a subunidade da  $\beta$ -globina contém um total de 146 aminoácidos.) Os humanos portam duas cópias de cada gene (um herdado de cada um dos genitores); uma mutação causadora da anemia falciforme em somente um dos dois genes de  $\beta$ -globina geralmente não causa problemas para o indivíduo, uma vez que é compensada pelo gene normal. Entretanto, um indivíduo que herda duas cópias do gene de  $\beta$ -globina mutante irá apresentar anemia falciforme. Os eritrócitos normais são mostrados em (B), e aqueles provenientes de um indivíduo que sofre de anemia falciforme são mostrados em (C). Ainda que a anemia falciforme seja uma doença que cause risco à vida, a mutação responsável por ela pode também ser benéfica. Indivíduos que apresentam a doença, e aqueles que portam um gene normal e um mutante para a anemia falciforme, são mais resistentes à malária que indivíduos não afetados, porque os parasitas causadores da malária crescem muito pouco em eritrócitos que contêm a forma falciforme da hemoglobina.

tas da dupla-hélice quebrada (Figura 6-30F), seguida de ligação do DNA (Figura 6-30G). O resultado final são duas hélices de DNA intactas, onde a informação genética de uma foi usada como um molde para reparar a outra.

A recombinação homóloga também pode ser usada para reparar muitos outros tipos de danos do DNA, tornando-a possivelmente o mecanismo de reparo do DNA mais conveniente e disponível para a célula: é necessário unicamente um cromossomo homólogo intacto para ser usado como parceiro – uma situação que ocorre transitoriamente a cada vez que um cromossomo é duplicado. A natureza universal do reparo mediante recombinação homóloga provavelmente explica a razão de esse mecanismo e as proteínas que o realizam terem sido conservados em praticamente todas as células existentes na Terra.

A recombinação homóloga é versátil e desempenha um papel crucial na troca de informação genética durante a formação das células germinativas – espermatozoide e óvulo. Esse processo especializado, denominado *meiose*, promove a geração de diversidade genética dentro de uma espécie durante a reprodução sexuada. Discutimos a meiose quando falamos sobre sexo no Capítulo 19.

## Falhas no reparo de danos ao DNA podem ter consequências graves para uma célula ou organismo

Ocasionalmente, os processos de replicação e reparo do DNA celular falham e dão origem a uma mutação. Essa mudança permanente na sequência de DNA pode ter profundas consequências. Uma mutação que afeta somente um único par de nucleotídeos pode comprometer severamente o valor adaptativo de um organismo, caso a mudança ocorra em uma posição vital na sequência de DNA. Como a estrutura e a atividade de cada proteína dependem de sua sequência de aminoácidos, uma proteína com uma sequência alterada pode diminuir sua atividade ou deixar de funcionar completamente. Por exemplo, os seres humanos usam a proteína hemoglobina para transportar oxigênio no sangue (ver Figura 4-24). Uma mudança permanente em um único nucleotídeo em um gene que codifica a hemoglobina pode levar as células a produzirem a hemoglobina com uma sequência incorreta de aminoácidos. Uma mutação desse tipo provoca a doença *anemia falciforme* (doença das células falciformes). A hemoglobina das células falciformes é menos solúvel que a hemoglobina normal e forma precipitados intracelulares fibrosos, que produzem uma forma de foice característica de eritrócitos afetados (Figura 6-31). Como essas células são mais frágeis e frequentemente se rompem à medida que viajam pela corrente sanguínea, os pacientes portadores dessa doença, que causa risco à vida, possuem menos eritrócitos que o normal – ou seja, são anêmicos. Essa anemia pode causar fraqueza, tonturas, dores de cabeça e falta de ar. Além disso, os eritrócitos anormais podem agregar-se e bloquear vasos sanguíneos menores, causando dor e falha em órgãos. Nós sabemos sobre essa hemoglobina das células falciformes porque os indivíduos que contêm a respectiva mutação sobrevivem; tal mutação fornece até mesmo um benefício – uma resistência aumentada à malária. Ao longo do curso da evolução, muitas outras mutações no gene da hemoglobina surgiram, mas somente aquelas que não destroem completamente a proteína permanecem na população.

O exemplo da anemia falciforme, que é uma doença hereditária, ilustra a importância de proteger as células reprodutivas (*células germinativas*) das mutações. Uma mutação em uma célula germinativa será transmitida para todas as células no corpo do organismo multicelular que irá se desenvolver a partir dela, incluindo as células germinativas responsáveis pela produção da próxima geração.

As muitas outras células em um organismo multicelular (suas *células somáticas*) devem também ser protegidas das mutações – nesse caso, de mutações que surgem durante a vida de um indivíduo. Mudanças nucleotídicas que ocorrem nas células somáticas podem dar origem a células variantes, algumas das

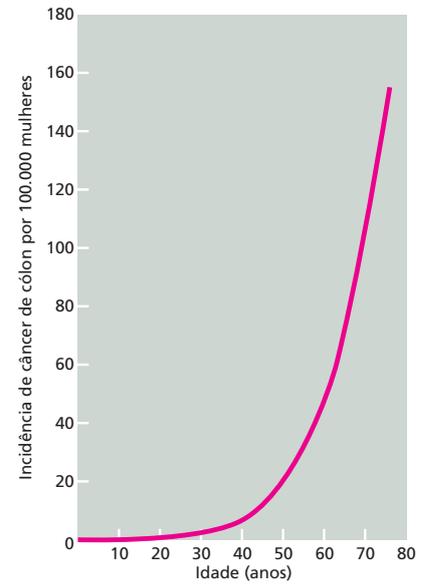
quais crescem e se dividem de forma descontrolada à custa das outras células no organismo. No caso extremo, tem-se como resultado uma proliferação celular descontrolada conhecida como **câncer**. Os diferentes tipos de câncer são responsáveis por cerca de 30% das mortes que ocorrem na Europa e América do Norte, e são causados principalmente por um acúmulo gradual de mutações aleatórias em uma célula somática e na sua progênie (Figura 6-32). O aumento da frequência de mutações em até mesmo duas ou três vezes pode causar um aumento desastroso na incidência de câncer, por acelerar a taxa de surgimento de tais variantes de células somáticas.

Desse modo, 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 geração seguinte, quanto para as células somáticas, que normalmente funcionam como membros cuidadosamente regulados da complexa comunidade de células em um organismo multicelular. Portanto, não nos devemos surpreender com o fato de todas as células possuírem um conjunto muito sofisticado de mecanismos para reduzir o número de mutações que ocorrem no seu DNA, dedicando centenas de genes a esses processos de reparo.

### Um registro da fidelidade da replicação e do reparo do DNA é preservado nas sequências dos genomas

Ainda que a maioria das mutações não prejudique nem beneficie um organismo, aquelas que apresentam consequências prejudiciais são geralmente eliminadas da população por meio da seleção natural; indivíduos que portam o DNA alterado podem morrer ou apresentar fertilidade reduzida, e nesses casos essas mudanças serão perdidas. Ao contrário, mudanças favoráveis tenderão a persistir e se espalhar.

Mas mesmo onde não houver seleção alguma – nos muitos sítios do DNA nos quais uma mudança nos nucleotídeos não tem qualquer efeito no valor adaptativo do organismo –, a mensagem genética tem sido preservada com fidelidade ao longo de dezenas de milhões de anos. Portanto, humanos e chimpanzês, após cerca de 5 milhões de anos de evolução divergente, ainda possuem sequências de DNA que têm pelo menos 98% de identidade. Mesmo humanos e baleias, após 10 ou 20 vezes essa quantidade de tempo evolutivo, possuem cromossomos que são inequivocamente similares em suas sequências de DNA, e muitas proteínas contêm sequências de aminoácidos que são praticamente idênticas (Figura 6-33). Desse modo, nosso genoma – e os dos nossos parentes – contêm uma mensagem do passado distante. Graças à fidelidade da replicação e do reparo do DNA, 100 milhões de anos de evolução pouco alteraram o seu conteúdo essencial.



**Figura 6-32** A incidência de câncer aumenta drasticamente com a idade.

O número de novos casos diagnosticados de câncer de cólon em mulheres na Inglaterra e no País de Gales em um ano é plotado como uma função da idade no momento do diagnóstico. O câncer de cólon, assim como a maioria dos cânceres humanos, é causado pelo acúmulo de múltiplas mutações. Como as células estão continuamente sofrendo mudanças acidentais no seu DNA – que se acumulam e são transmitidas para as células da progênie quando as células mutantes se dividem –, a probabilidade de que uma célula irá se tornar cancerosa aumenta muito com a idade. (Dados de C. Muir et al., *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.)



Baleia	GTGTGGTCTCGTGATCAAAGGCCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC
Humano	GTGTGGTCTCGCGATCAGAGGCCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC

**Figura 6-33** Os genes de determinação do sexo de humanos e baleias são inequivocamente similares.

Ainda que seus planos corporais sejam muito diferentes, humanos e baleias são construídos a partir das mesmas proteínas. Apesar de muitos milhões de anos terem passado desde que os humanos e as baleias divergiram, as sequências de nucleotídeos de muitos dos seus genes são bastante similares. São mostradas as sequências de DNA de uma parte do gene que determina masculinidade em humanos e em baleias, uma sobre a outra; as posições nas quais as duas sequências são idênticas estão sombreadas em verde.

## CONCEITOS ESSENCIAIS

- Antes de uma célula se dividir, ela deve replicar de modo preciso a vasta quantidade de informação genética presente no seu DNA.
- Como as duas fitas de uma dupla-hélice de DNA são complementares, cada fita pode atuar como um molde para a síntese da outra. Portanto, a replicação do DNA produz duas moléculas de DNA de dupla-hélice idênticas, possibilitando que a informação genética seja copiada e transmitida de uma célula para suas células-filhas e de um progenitor para sua prole.
- Durante a replicação, as duas fitas de uma dupla-hélice de DNA são afastadas em uma origem de replicação para formar as forquilha de replicação em forma de Y. DNA-polimerases, em cada forquilha, produzem uma nova fita de DNA complementar a partir de cada fita parental.
- A DNA-polimerase replica um molde de DNA com fidelidade impressionante, cometendo somente cerca de um erro a cada  $10^7$  nucleotídeos copiados. Essa precisão é possível, em parte, devido a um processo de autocorreção, no qual a enzima corrige seus próprios erros à medida que se move ao longo do DNA.
- Como a DNA-polimerase sintetiza um novo DNA somente em uma direção, apenas a fita líder (*leading*) na forquilha de replicação pode ser sintetizada de um modo contínuo. Na fita retardada (*lagging*), o DNA é sintetizado em um processo de “pesponto” descontínuo, produzindo pequenos fragmentos de DNA que são posteriormente unidos pela DNA-ligase.
- A DNA-polimerase é incapaz de iniciar uma nova cadeia de DNA desde o princípio. Em vez disso, a síntese de DNA é iniciada por uma RNA-polimerase denominada primase, que produz pequenos fragmentos de iniciadores de RNA que são então alongados pela DNA-polimerase. Esses iniciadores são subsequentemente removidos e substituídos por DNA.
- A replicação do DNA requer a cooperação de muitas proteínas que formam uma máquina de replicação multienzimática que copia ambas as fitas de DNA à medida que se move ao longo da dupla-hélice.
- Em eucariotos, uma enzima especial denominada telomerase replica o DNA nas extremidades dos cromossomos.
- Os raros erros no processo de cópia que escapam à autocorreção são solucionados pelas proteínas de reparo do mau pareamento, que aumentam a precisão da replicação do DNA para um erro a cada  $10^9$  nucleotídeos copiados.
- Danos a uma das duas fitas de DNA, causados por reações químicas inevitáveis, são reparados por uma variedade de enzimas de reparo do DNA que reconhecem o DNA danificado e excisam um pequeno trecho da fita danificada. O DNA faltante é então ressintetizado por uma DNA-polimerase de reparo, usando a fita não danificada como molde.
- Se ambas as fitas de DNA são quebradas, a quebra de fita dupla pode ser reparada rapidamente pelo mecanismo de união de extremidades não homólogas. Nucleotídeos são perdidos nesse processo, alterando a sequência do DNA no sítio de reparo.
- A recombinação homóloga pode reparar sem falhas as quebras de fita dupla, usando uma dupla-hélice homóloga não danificada como molde.
- Os processos de replicação e reparo do DNA altamente precisos desempenham um papel-chave em nos proteger do crescimento descontrolado de células somáticas, conhecido como câncer.

### TERMOS-CHAVE

autocorreção  
câncer  
DNA-ligase  
DNA-polimerase  
fita líder  
fita retardada  
forquilha de replicação

fragmento de Okazaki  
molde  
mutação  
origem de replicação  
primase  
recombinação homóloga  
reparo do DNA

reparo do mau pareamento  
replicação do DNA  
RNA (ácido ribonucleico)  
telomerase  
telômero  
união de extremidades não homólogas

## TESTE SEU CONHECIMENTO

### QUESTÃO 6-5

As enzimas de reparo do mau pareamento do DNA reparam preferencialmente as bases presentes na fita de DNA recém-sintetizada, usando a fita de DNA velha como molde. Se os maus pareamentos de bases fossem simplesmente reparados sem considerar qual fita se viu como molde, esse processo iria reduzir os erros de replicação? Justifique sua resposta.

### QUESTÃO 6-6

Suponha que uma mutação afete uma enzima que seja necessária para reparar os danos causados ao DNA pela perda de bases púricas. A perda de uma purina ocorre cerca de 5.000 vezes no DNA de cada uma de suas células diariamente. Como a diferença média na sequência de DNA entre humanos e chimpanzés é de cerca de 1%, quanto tempo iria levar para você se tornar um macaco? O que está errado nesse raciocínio?

### QUESTÃO 6-7

Quais das seguintes afirmativas estão corretas? Justifique suas respostas.

- Uma forquilha de replicação bacteriana é assimétrica porque contém duas moléculas de DNA-polimerase que são estruturalmente distintas.
- Os fragmentos de Okazaki são removidos por uma nuclease que degrada o RNA.
- A taxa de erro da replicação do DNA é reduzida tanto pela autocorreção feita pela DNA-polimerase quanto pelo reparo do mau pareamento do DNA.
- Na ausência de reparo do DNA, os genes são instáveis.
- Nenhuma das bases aberrantes formadas pela desaminação ocorre naturalmente no DNA.
- O câncer pode resultar do acúmulo de mutações em células somáticas.

### QUESTÃO 6-8

A velocidade da replicação do DNA na forquilha de replicação é de cerca de 100 nucleotídeos por segundo em células humanas. Qual é o número mínimo de origens de replicação que uma célula humana deve ter para replicar seu DNA a cada 24 horas? Lembre-se de que uma célula humana contém duas cópias do genoma humano, uma herdada da mãe, a outra do pai, cada uma consistindo em  $3 \times 10^9$  pares de nucleotídeos.

### QUESTÃO 6-9

Observe cuidadosamente a Figura 6-11 e as estruturas dos compostos mostrados na **Figura Q6-9**.

- O que você esperaria se ddCTP fosse adicionado a uma reação de replicação do DNA em grande excesso com relação à concentração disponível de trifosfato de desoxicitosina (dCTP), o trifosfato de desoxicitosina normal?
- O que aconteceria se ddCTP fosse adicionado a 10% da concentração de dCTP disponível?
- Que efeitos você esperaria se ddCMP fosse adicionado sob as mesmas condições?

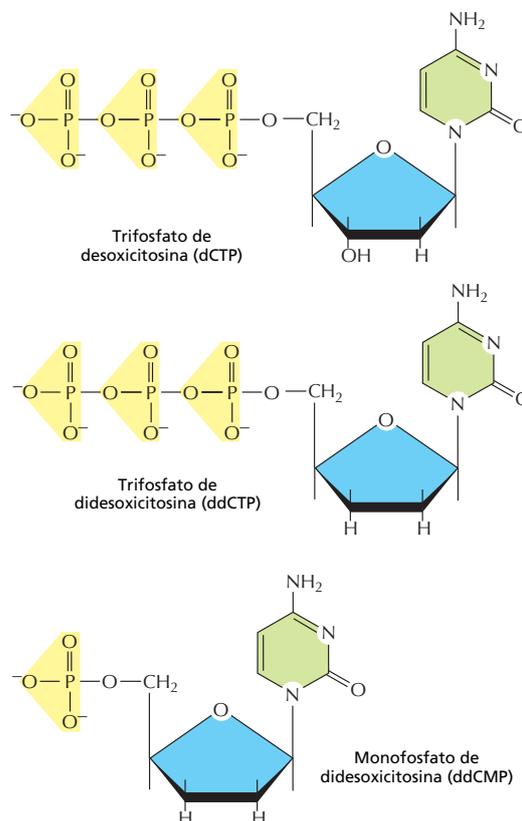
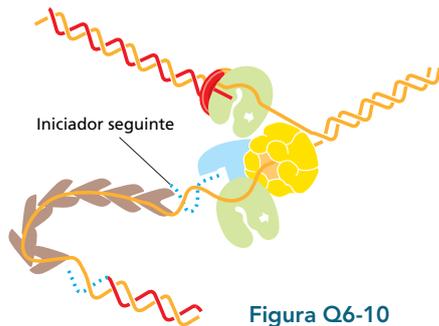


Figura Q6-9

**QUESTÃO 6-10**

A **Figura Q6-10** mostra uma fotografia de uma forquilha de replicação, na qual o iniciador de RNA foi recém-adicionado à fita retardada. Usando este diagrama como um guia, esboce o caminho do DNA à medida que o fragmento de Okazaki seguinte é sintetizado. Indique o grampo deslizante e a proteína ligadora de DNA de fita simples quando apropriado.



**Figura Q6-10**

**QUESTÃO 6-11**

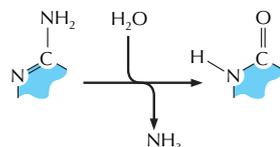
Aproximadamente quantas ligações de alta energia a DNA-polimerase usa para replicar um cromossomo bacteriano (ignorando helicase e outras enzimas associadas com a forquilha de replicação)? Comparado com seu próprio peso seco de  $10^{-12}$  g, quanto de glicose necessita uma única bactéria para fornecer energia suficiente para copiar seu DNA uma vez? O número de pares de nucleotídeos no cromossomo bacteriano é de  $3 \times 10^6$ . A oxidação de uma molécula de glicose resulta em cerca de 30 ligações de fosfato de alta energia. A massa molecular da glicose é de 180 g/mol. (Lembre da Figura 2-3: um mol consiste em  $6 \times 10^{23}$  moléculas.)

**QUESTÃO 6-12**

O que está errado, caso haja algo de errado, na afirmativa seguinte: "A estabilidade do DNA, tanto em células reprodutivas quanto em células somáticas, é essencial para a sobrevivência de uma espécie." Explique sua resposta.

**QUESTÃO 6-13**

Um tipo comum de dano químico ao DNA é produzido por uma reação espontânea denominada *desaminação*, na qual uma base nucleotídica perde um grupo amino ( $\text{NH}_2$ ). O grupo amino é substituído por um grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ), por uma reação geral mostrada na **Figura Q6-13**. Desenhe as estruturas das bases A, G, C, T e U e preveja os produtos que serão produzidos por desaminação. Observando os produtos dessa reação – e lembrando-se de que, na célula, eles deverão ser reconhecidos e reparados –, você poderia propor uma razão para o DNA não conter uracila?



**Figura Q6-13**

**QUESTÃO 6-14**

- Explique por que os telômeros e a telomerase são necessários para a replicação de cromossomos eucarióticos, mas não para a replicação de um cromossomo bacteriano circular. Desenhe um diagrama para ilustrar sua explicação.
- Seriam ainda necessários telômeros e telomerase para completar a replicação de um cromossomo eucariótico, se a primase sempre adicionasse o iniciador de RNA na

própria extremidade 3' terminal do molde para a fita retardada?

**QUESTÃO 6-15**

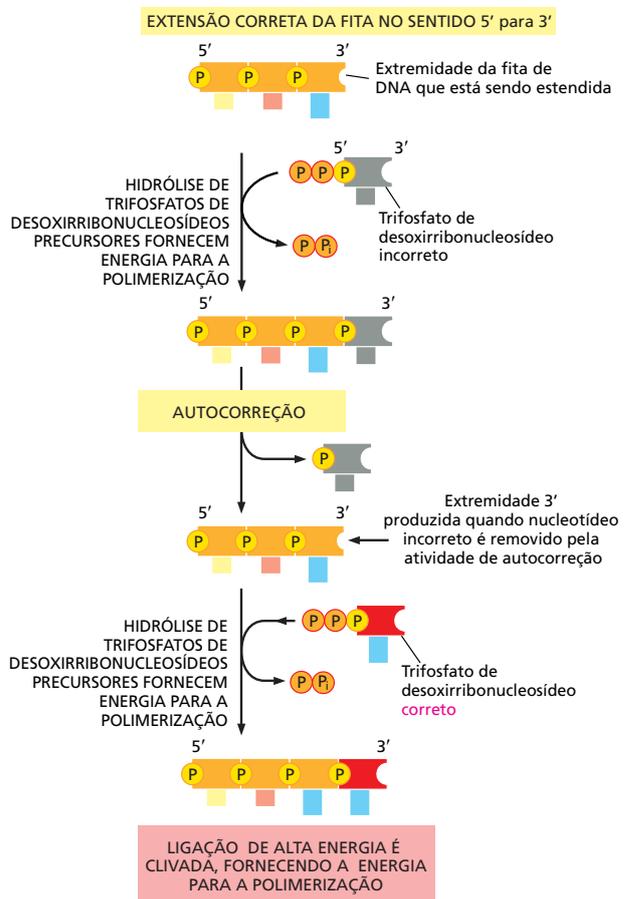
Descreva as consequências decorrentes caso um cromossomo eucariótico

- Contivesse apenas uma origem de replicação:
  - no centro exato do cromossomo
  - em uma das extremidades do cromossomo
- Não tivesse um ou ambos os telômeros
- Não tivesse um centrômero

Assuma que o cromossomo possua 150 milhões de pares de nucleotídeos em extensão, um tamanho típico para um cromossomo animal, e que a replicação do DNA em células animais ocorra a cerca de 100 nucleotídeos por segundo.

**QUESTÃO 6-16**

Como a DNA-polimerase atua somente na direção 5'-3', a enzima é capaz de corrigir seus próprios erros de polimerização à medida que se move ao longo do DNA (**Figura Q6-16**). Uma DNA-polimerase hipotética que sintetizasse na direção 3'-5' seria incapaz de realizar autocorreção. Dado o que você sabe sobre a química dos ácidos nucleicos e a síntese de DNA, desenhe um esboço similar à **Figura Q6-16** que mostre o que aconteceria se uma DNA-polimerase, operando na direção 3'-5', fosse remover um nucleotídeo incorreto de uma fita de DNA que esteja sendo sintetizada. Por que a fita editada não seria capaz de ser alongada?



**Figura Q6-16**