

## CAPÍTULO 6

# Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

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

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

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

REPLICAÇÃO DO DNA

REPARO DE DNA

RECOMBINAÇÃO  
HOMÓLOGA

ELEMENTOS GENÉTICOS  
MÓVEIS E VÍRUS



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

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

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

## REPLICAÇÃO DO DNA

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

### O pareamento de bases permite a replicação do DNA

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

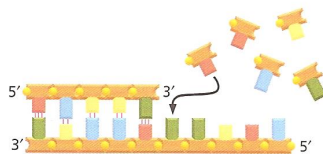


Figura 6-2 Uma fita de DNA pode atuar como um molde. A ligação preferencial ocorre entre os pares de nucleotídeos (A com T, e G com C) que podem formar pares de bases. Isso permite que cada fita sirva de molde na formação da sua fita complementar.

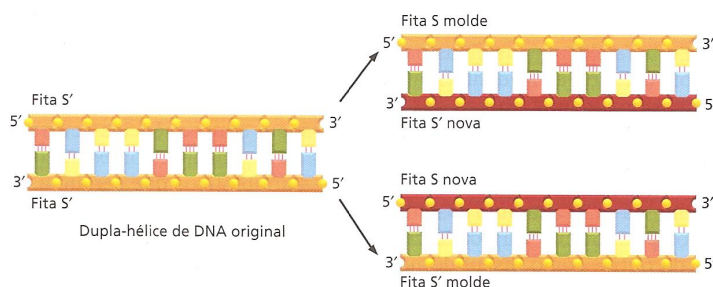


Figura 6-3 O DNA atua como um molde para sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A irá formar par apenas com T, e G apenas com C, cada fita de DNA da dupla-hélice – indicada aqui como fita S e sua fita complementar S' – atua como um molde para especificar a sequência de nucleotídeos na sua fita complementar.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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

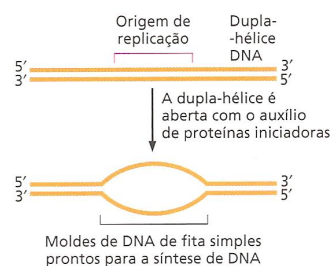
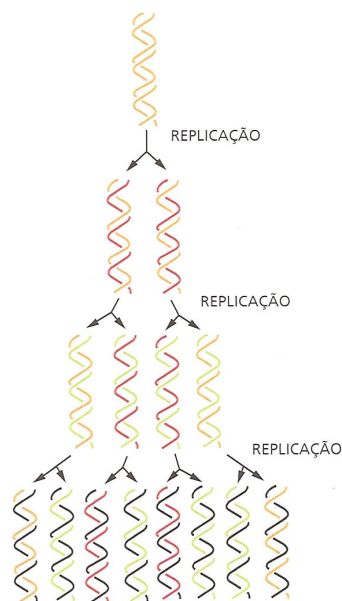


Figura 6-5 A dupla-hélice de DNA é aberta na origem de replicação. Proteínas iniciadoras da replicação reconhecem sequências de DNA nas origens de replicação e separam localmente as duas fitas da dupla-hélice. Assim, as fitas simples expostas atuam como moldes para a cópia do DNA.

## COMO SABEMOS: A NATUREZA DA REPLICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

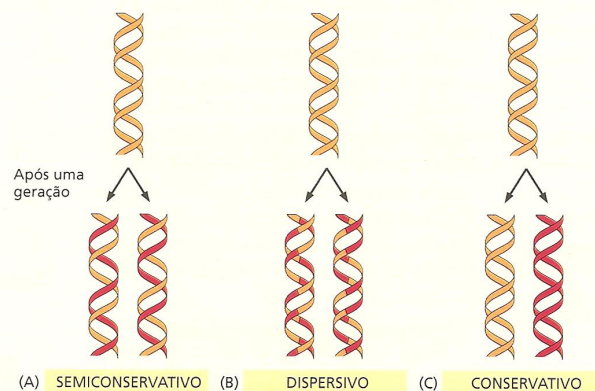


Figura 6-6 Três modelos para a replicação do DNA com diferentes resultados. (A) No modelo semiconservativo, cada fita original atua como molde para a síntese de uma nova fita-filha. O primeiro ciclo de replicação produz duas moléculas híbridas, cada uma contendo uma fita original e uma fita nova recém-sintetizada.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

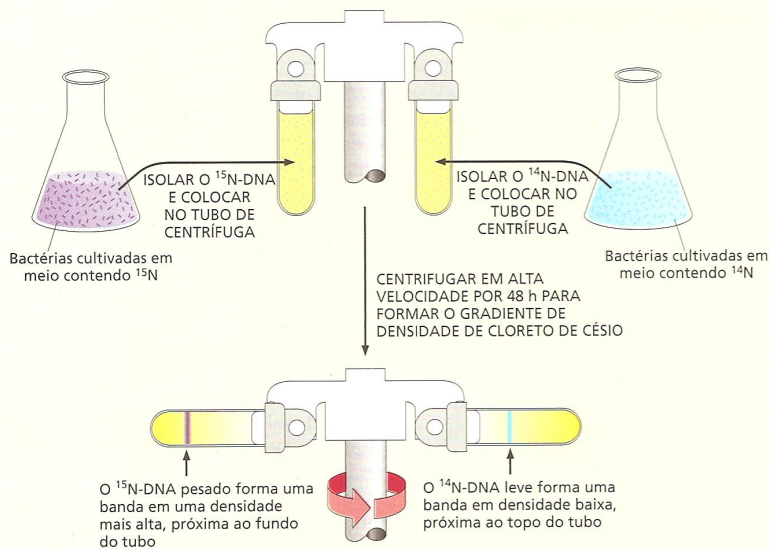


Figura 6-7 A centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο permite a separação de DNA leve e pesado. As bactérias são cultivadas por várias gerações em um meio contendo  $^{15}\text{N}$  (o isótopo pesado) ou  $^{14}\text{N}$  (o isótopo leve) para marcar o DNA. A seguir, as células são lisadas e o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

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

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

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

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

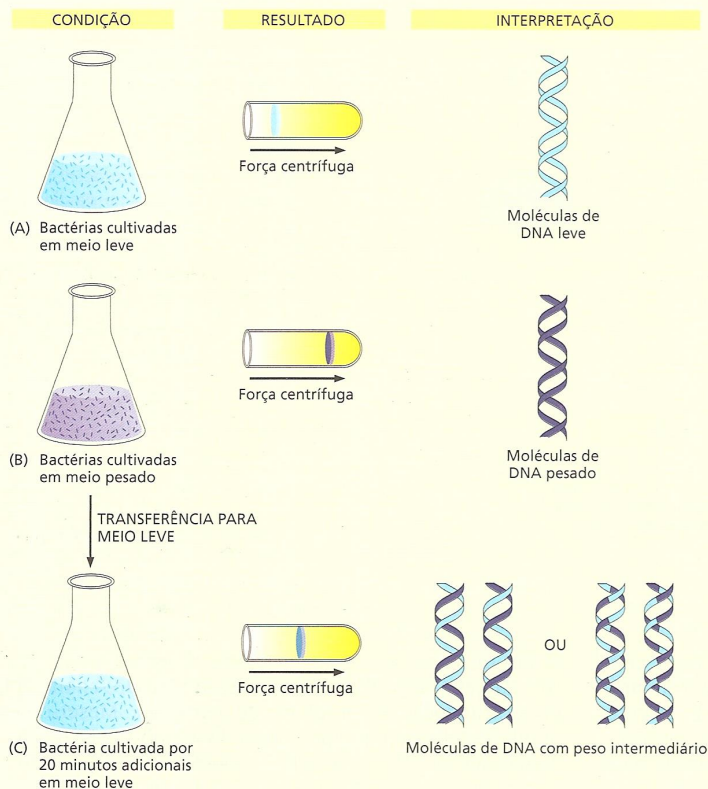


Figura 6-8 A primeira parte do experimento de Meselson-Stahl exclui o modelo conservativo de replicação do DNA. (A) Bactérias cultivadas em meio leve (contendo  $^{14}\text{N}$ ) produzem DNA que forma uma banda na porção superior do tubo de centrifuga, ao passo que bactérias cultivadas em meio pesado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

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

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

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

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

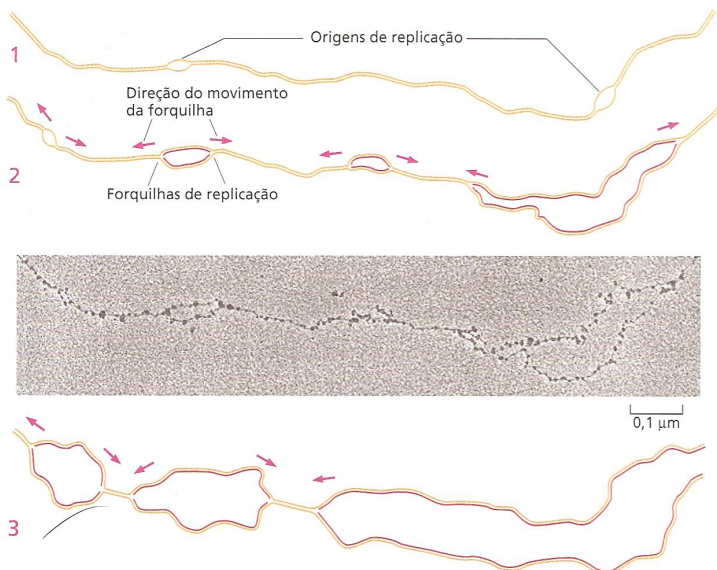
O genoma humano, que é muito maior, possui aproximadamente 10.000 dessas origens. Em humanos, o início da replicação em vários locais ao mesmo tempo reduz enormemente o tempo necessário para que uma célula copie todo seu genoma.

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

### A síntese de DNA novo ocorre nas forquilhas de replicação

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

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



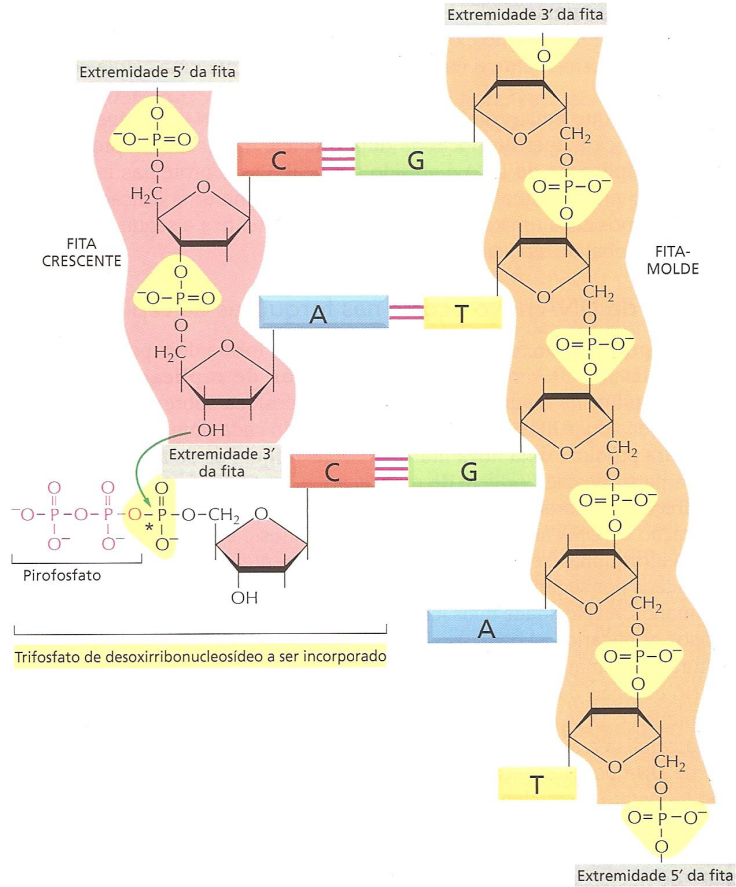
#### QUESTÃO 6-1

Observe atentamente a micrografia na Figura 6-9.

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

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

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



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

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

### A forquilha de replicação é assimétrica



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

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



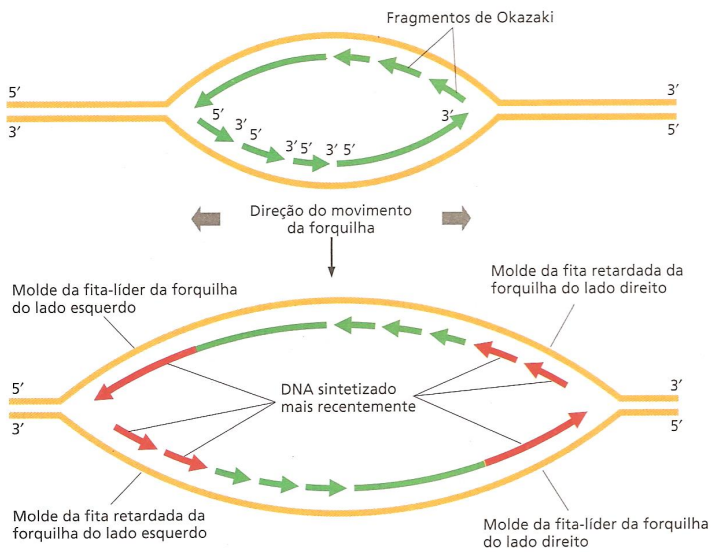


Figura 6-12 As forquilhas de replicação de DNA são assimétricas. Como ambas as fitas novas são sintetizadas na direção 5'-3', a fita retardada de DNA deve ser feita, inicialmente, como uma série de pequenos fragmentos de DNA que serão unidos mais tarde. O diagrama superior mostra duas forquilhas de replicação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

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

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

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

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

### A DNA-polimerase é autocorretiva

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

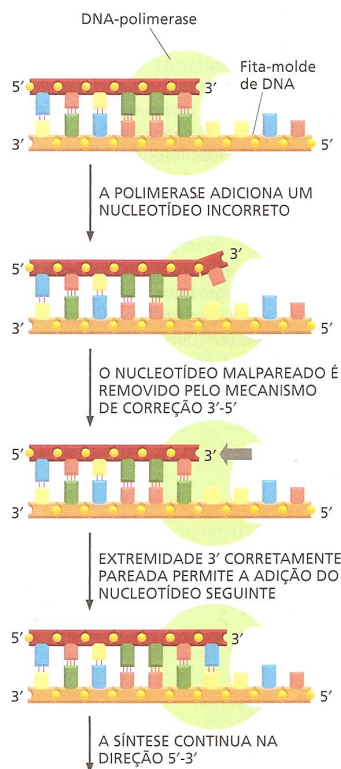


Figura 6-13 Durante a síntese de DNA, a DNA-polimerase verifica seu próprio trabalho. Se um nucleotídeo incorreto é adicionado a uma fita crescente, a DNA-polimerase irá removê-lo e substituí-lo pelo nucleotídeo correto antes de continuar a síntese.

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

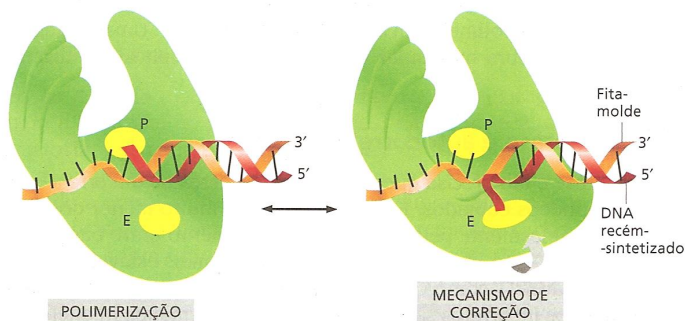
A correção de erros ocorre ao mesmo tempo em que a síntese de DNA. Antes de adicionar um próximo nucleotídeo à cadeia crescente de DNA, a enzima verifica se o nucleotídeo inserido anteriormente está pareado de forma correta à fita-molde. Se estiver, a polimerase adiciona o próximo nucleotídeo; se não,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

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

### Pequenos segmentos de RNA atuam como iniciadores na síntese de DNA

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

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



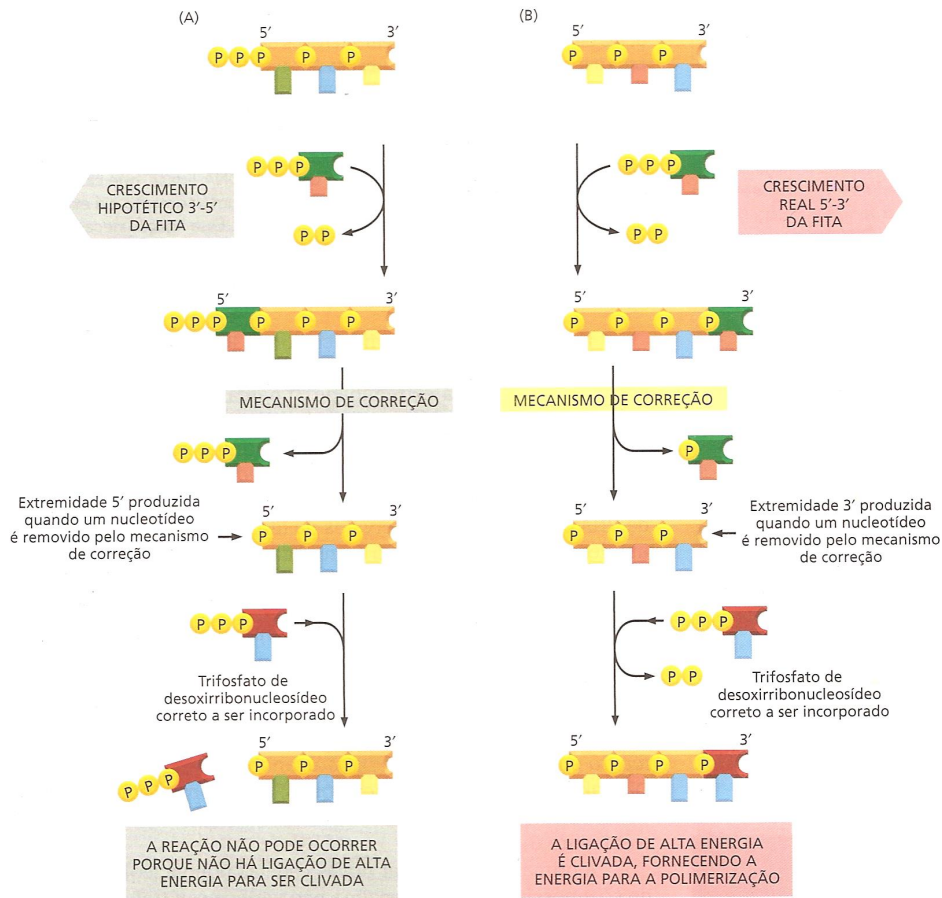


Figura 6-15 A necessidade de correção explica por que as cadeias de DNA são sintetizadas apenas na direção 5'-3'. (A) No modelo hipotético de polimerização na direção 3'-5', o mecanismo de correção permitiria a remoção de um nucleotídeo incorreto (em verde-escuro), mas bloquearia a adição do nucleotídeo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

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

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

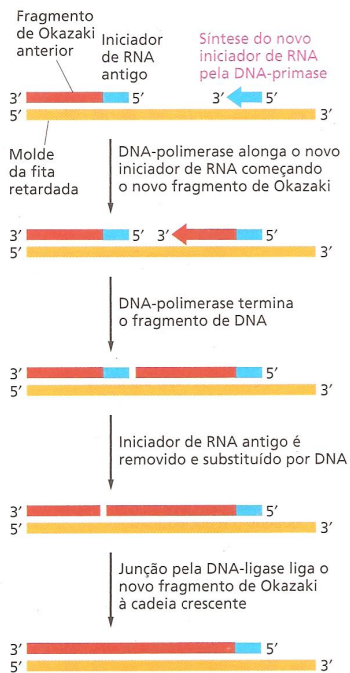


Figura 6-16 Na fita retardada, o DNA é sintetizado em fragmentos. Em eucariotos, os iniciadores de RNA são adicionados em intervalos de cerca de 200 nucleotídeos na fita retardada, e cada iniciador de RNA possui aproximadamente 10 nucleotídeos. Na bactéria *E. coli*, os iniciadores e fragmentos de Okazaki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

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

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

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

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

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

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

#### QUESTÃO 6-2

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

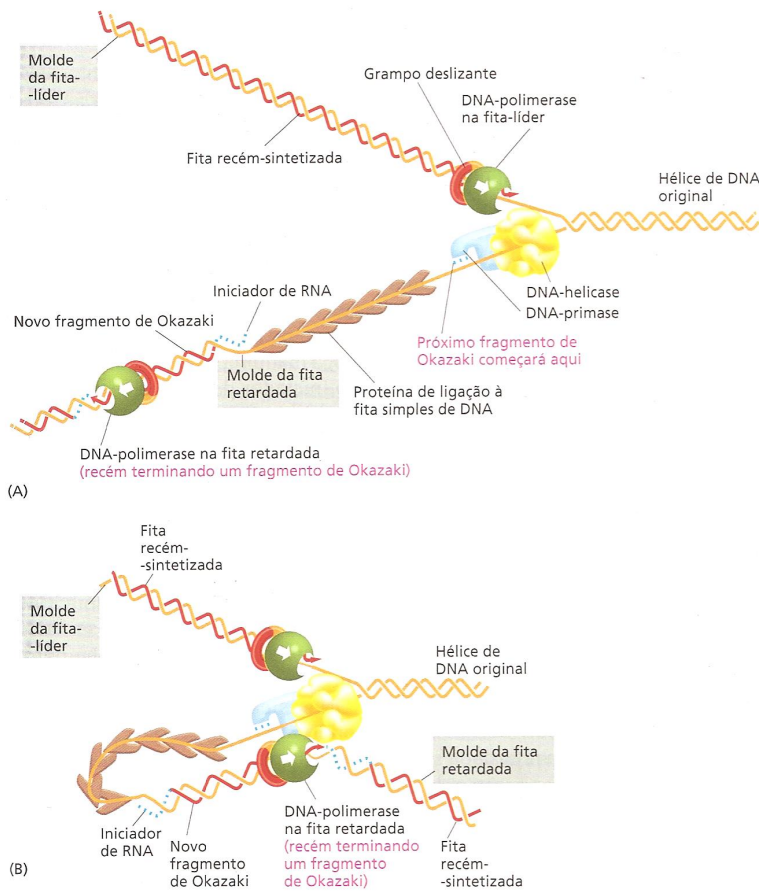


Figura 6-17 A síntese de DNA é realizada por um grupo de proteínas que atuam em conjunto como uma maquinaria de replicação. (A) Duas moléculas de DNA-polimerase são mostradas, uma na fita-líder e uma na fita retardada. Ambas são mantidas no DNA por uma proteína circular, um grampo, que permite que a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

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

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

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

**QUESTÃO 6-3**

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

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

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

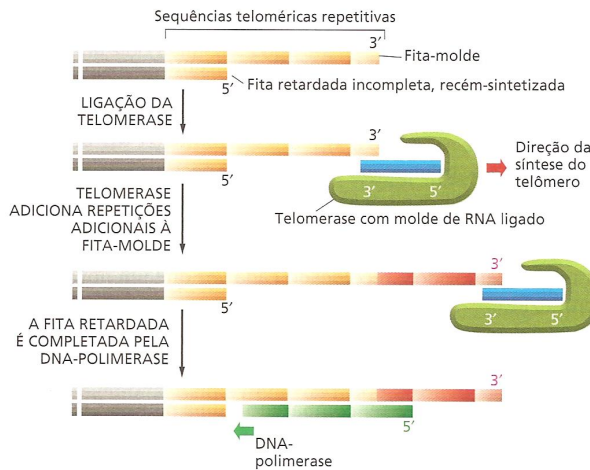
**A telomerase replica as extremidades dos cromossomos eucarióticos**

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

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

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

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



## REPARO DE DNA

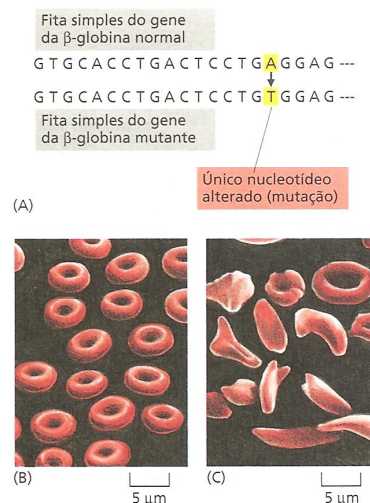
A diversidade dos organismos vivos e o seu sucesso na colonização de quase todas as partes da superfície da Terra resultaram de alterações genéticas acumuladas gradativamente por milhões de anos. Essas alterações permitiram a adaptação de organismos às novas condições e a colonização de novos habitats.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

### As mutações podem originar consequências graves em uma célula ou organismo

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

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

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



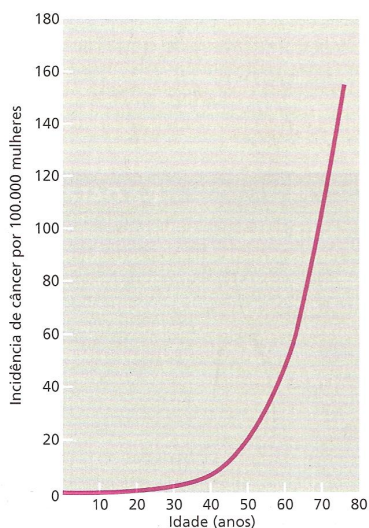


Figura 6-20 A incidência de câncer aumenta drasticamente com o aumento da idade. O número de novos casos diagnosticados de câncer de cólon em mulheres na Inglaterra e no País de Gales em um ano foi avaliado em função da idade no momento do diagnóstico. O câncer de cólon é causado pelo acúmulo de várias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

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

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

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

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

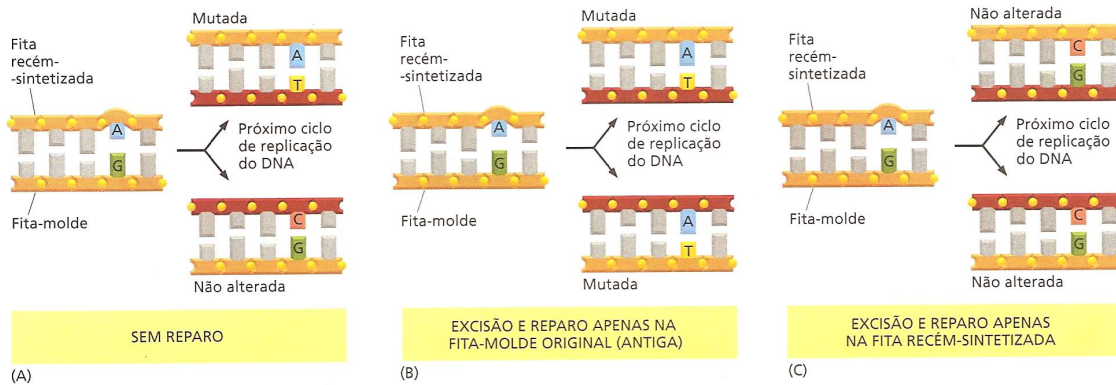
Na primeira parte deste capítulo, vimos que a alta fidelidade da maquinaria de replicação celular geralmente previne erros durante a cópia do DNA. Contudo, apesar desses mecanismos, os erros ocorrem. Felizmente, a célula possui um sistema de segurança – chamado de *reparo de malpareamento de DNA* – dedicado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

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

TABELA 6-1 Taxas de erro

Entrega com hora marcada do Serviço Postal dos EUA de correspondência local (primeira classe)	13 entregas atrasadas a cada 100
Sistema de bagagem de companhias aéreas	1 bagagem perdida a cada 200
Digitadora profissional que digita 120 palavras por minuto	1 erro a cada 250 caracteres
Dirigir um carro nos Estados Unidos	1 morte em cada $10^4$ pessoas por ano
Replicação do DNA (sem reparo de malpareamento)	1 erro em cada $10^7$ nucleotídeos copiados
Replicação do DNA (incluindo reparo de malpareamento)	1 erro em cada $10^9$ nucleotídeos copiados





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

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

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

## O DNA está continuamente sofrendo danos nas células

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

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

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

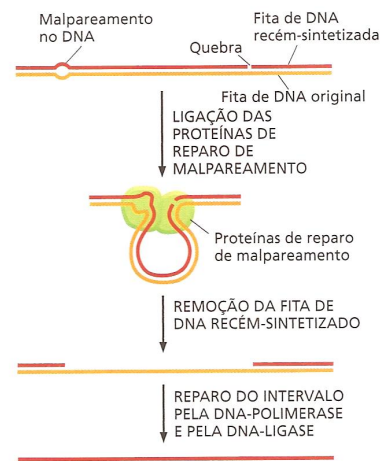
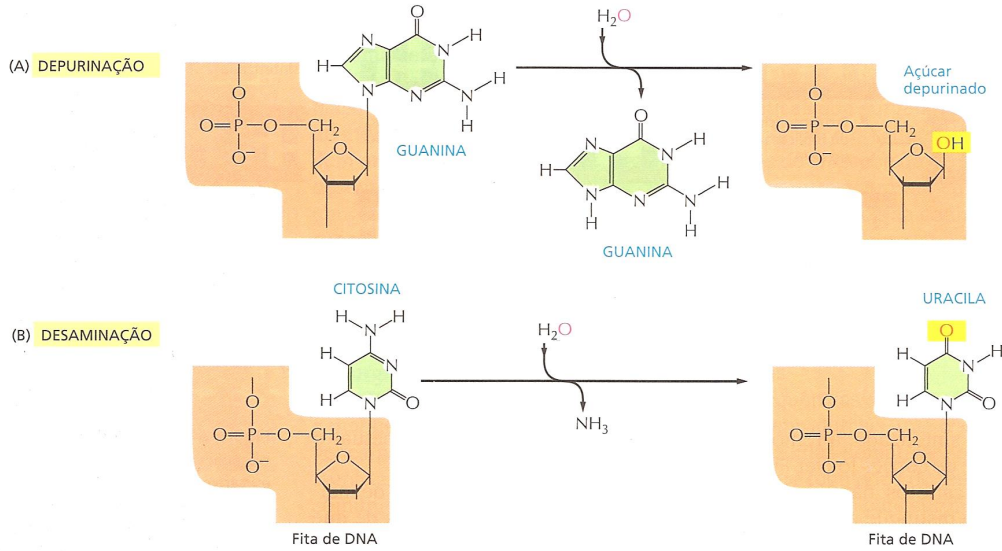


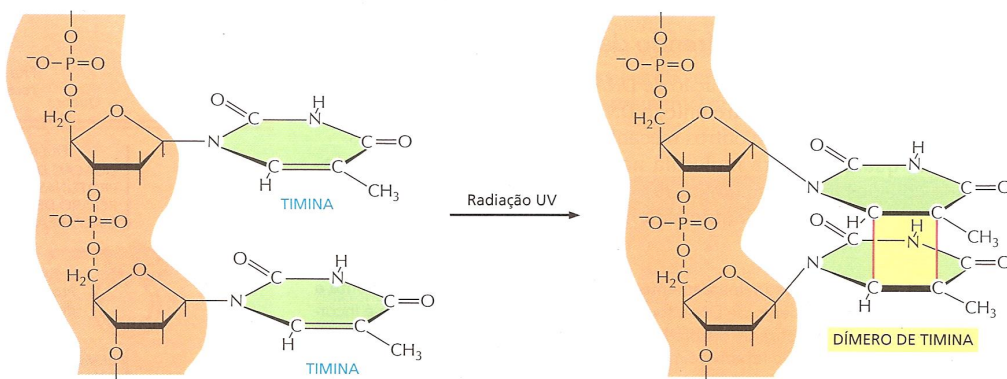
Figura 6-21 Erros originados durante a replicação do DNA devem ser corrigidos para evitar mutações. (A) Se não corrigido, o malpareamento irá causar uma mutação permanente em uma das duas moléculas de DNA produzidas no próximo ciclo de replicação. (B) Se o malpareamento for "corrigido" usando a fita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



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

tempo gasto para ler essa sentença, um total de aproximadamente um trilhão (10<sup>13</sup>) de bases púricas (A e G) serão perdidas do DNA das células do seu corpo, por uma reação espontânea chamada de *depurinação* (Figura 6-23). A depurinação não causa quebras no esqueleto de açúcar-fosfato, mas produz lesões que se assemelham a um "dente perdido". Uma outra alteração comum é a perda espontânea de um grupo amino (*desaminação*) de uma citosina no DNA produzindo a base uracila (ver Figura 6-23). Alguns subprodutos quimicamente reativos do metabolismo também reagem, ocasionalmente, com as bases do DNA, alterando-as de forma que suas propriedades de pareamento são modificadas. A radiação ultravioleta da luz solar também danifica o DNA; ela promove a formação de uma ligação covalente entre duas bases pirimídicas adjacentes, formando, por exemplo, os *dímeros de timina*, mostrados na Figura 6-24.

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



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

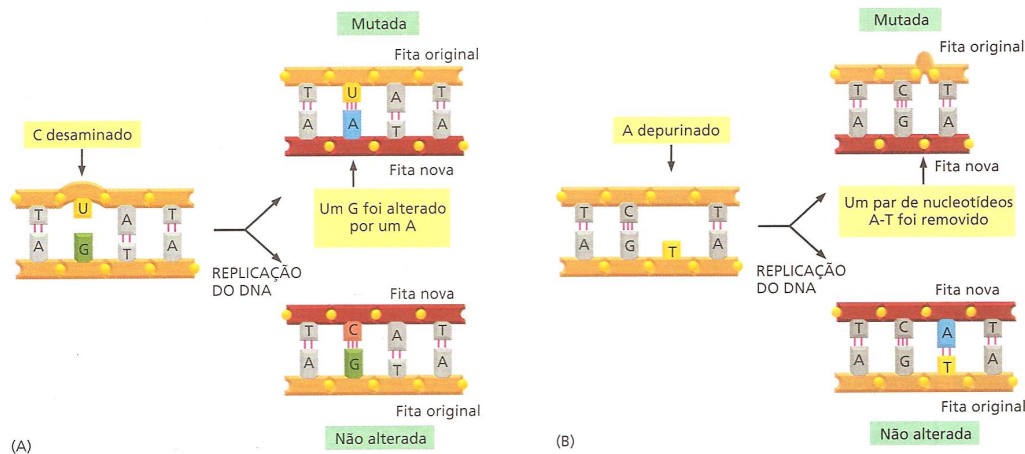


Figura 6-25 Modificações químicas de nucleotídeos, se não corrigidas, produzem mutações. (A) A desaminação da citosina, se não corrigida, resulta na substituição de uma base por outra quando o DNA é replicado. Como mostrado na Figura 6-23, a desaminação da citosina produz uracila. A uracila difere da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

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

### A estabilidade dos genes depende do reparo de DNA

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

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

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

#### QUESTÃO 6-4

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

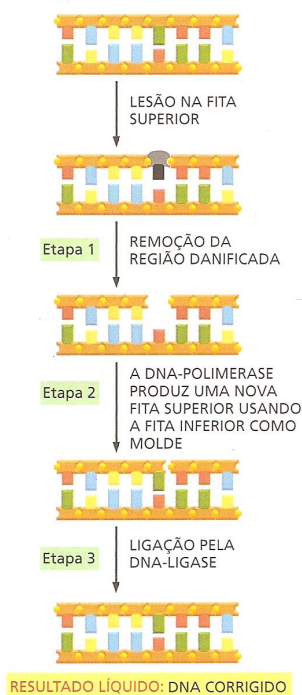


Figura 6-26 O mecanismo básico de reparo de DNA envolve três etapas: excisão, ressíntese e ligação. Na etapa 1 (excisão), a lesão é removida por uma de várias nucleases, cada uma especializada em um tipo de lesão no DNA. Na etapa 2 (ressíntese), a sequência de DNA original é restaurada pela DNA-polimerase de reparo, que preenche o intervalo produzido pela excisão. Na etapa 3 (ligação), a DNA-ligase sela a quebra existente no esqueleto de açúcar-fosfato da fita corrigida. A religação, que necessita da energia da hidrólise de ATP, restaura as ligações fosfodiéster entre nucleotídeos adjacentes. Alguns tipos de lesões no DNA (p, ex., a desaminação da citosina [Figura 6-23]) envolvem a substituição de um único nucleotídeo, como mostrado na figura. No reparo de outros tipos de lesões no DNA, como dímeros de timina (ver Figura 6-24), um segmento mais longo com 10 a 20 nucleotídeos é removido da fita danificada.

enzima DNA-polimerase diferente da polimerase que atua na replicação do DNA, a polimerase de reparo sintetiza fitas de DNA da mesma forma. Por exemplo, ela sintetiza cadeias na direção 5'-3' e possui o mesmo tipo de mecanismo de correção para assegurar que a fita-molde seja fielmente copiada. Em muitas células, essa é a mesma enzima que preenche a lacuna deixada após a remoção dos iniciadores de RNA durante o processo normal de replicação (ver Figura 6-16).

- Quando a DNA-polimerase de reparo completou a lacuna, uma quebra permanece no esqueleto de açúcar-fosfato da fita corrigida. Essa quebra na hélice é selada pela DNA-ligase, a mesma enzima que une os fragmentos de DNA na fita retardada durante a replicação de DNA.

As etapas 2 e 3 são praticamente as mesmas para a maioria dos tipos de reparo de DNA, incluindo o reparo de malpareamento. No entanto, a etapa 1 emprega uma série de enzimas diferentes, cada uma especializada na remoção de um tipo diferente de lesão no DNA.

A importância desses processos de reparo é indicada pelo grande investimento das células na produção das enzimas de reparo. Organismos unicelulares, como as leveduras, contêm mais de 50 proteínas diferentes que atuam no reparo de DNA, e as vias de reparo são ainda mais complexas em humanos. A importância dos processos de reparo de DNA também é evidenciada pelas consequências de seu mau funcionamento. Indivíduos com a doença genética *xeroderma pigmentoso*, por exemplo, são incapazes de reparar dímeros de timina (ver Figura 6-24), porque herdaram um gene defeituoso que codifica uma das proteínas desse processo de reparo. Esses indivíduos desenvolvem lesões graves na pele, incluindo câncer de pele, em virtude do acúmulo de dímeros de timina nas células que são expostas à luz solar e às consequentes mutações que surgem nessas células.

### As quebras na fita dupla podem ser corrigidas rapidamente, mas com imperfeição

Um tipo de lesão no DNA especialmente perigoso ocorre quando as duas fitas da dupla-hélice são clivadas, não havendo uma fita intacta para guiar a correção. Radiação ionizante, acidentes na forquilha de replicação, agentes oxidantes fortes e metabólitos produzidos na célula podem causar tais quebras. Se deixadas sem correção, elas produziriam a rápida fragmentação dos cromossomos e causariam a perda de genes no momento na divisão celular.

Diversos mecanismos foram desenvolvidos para corrigir esse tipo de lesão potencialmente desastrosa. Nas células somáticas humanas, o modo mais comum do reparo de quebras de fita dupla é um mecanismo conhecido como **junção de extremidades não homólogas**. Nesse processo, as duas extremidades quebradas são simplesmente aproximadas por um grupo de enzimas especializa-

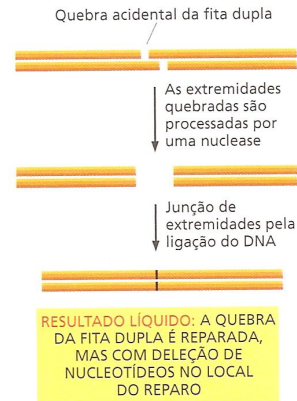
**Figura 6-27** As células podem utilizar a junção de extremidades não homólogas para corrigir quebras da fita dupla. Esse mecanismo rápido, mas imperfeito, altera a sequência original de DNA durante o processo de reparo. Normalmente, as alterações são pequenas deleções.

das e religadas pela ligação de DNA. Embora esse mecanismo conserte a quebra, normalmente há perda de nucleotídeos no local do reparo (Figura 6-27). Como apenas uma pequena porção dos genomas de mamíferos contém informação relevante, esse mecanismo “rápido e sujo” parece ser uma solução aceitável para o problema do reparo de quebras cromossômicas.

As células possuem também uma estratégia alternativa, livre de erros para consertar as quebras cromossômicas, especialmente as que ocorrem no DNA recém-replicado. Esse mecanismo, chamado de *recombinação homóloga*, é discutido a seguir na próxima seção deste capítulo.

### Um registro da fidelidade da replicação e do reparo do DNA é conservado nas sequências genômicas

Vimos neste capítulo como as sequências de DNA são replicadas e preservadas com uma fidelidade notável. Como resultado, as alterações no DNA se acumulam lentamente durante o curso da evolução. A seleção natural também atua: embora a maioria das mutações não seja nem prejudicial nem benéfica ao organismo, aquelas que produzem consequências prejudiciais são normalmente eliminadas da população pela morte ou fertilidade reduzida de indivíduos que contêm o DNA alterado. Mesmo onde a seleção não atua – nos vários sítios do DNA em que a alteração de um nucleotídeo não possui efeito na capacidade do organismo –, a mensagem genética é fielmente preservada por dezenas de milhões de anos. Assim, humanos e chimpanzés, após cerca de 5 milhões de anos de divergência evolutiva, ainda possuem sequências de DNA com 98% de identidade. Mesmo humanos e baleias, após 10 ou 20 vezes esse período, ainda possuem cromossomos com sequências de DNA similares e diversas proteínas com sequências de aminoácidos quase idênticas (Figura 6-28). Portanto, em nossos genomas, nós e nossos parentes recebemos uma mensagem de um passado muito distante. Graças à fidelidade da replicação e reparo de DNA, 100 milhões de anos resultaram em poucas mudanças no seu conteúdo essencial.



Baleia	GTGTGGTCTCGTGATCAAAGCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC
Homem	GTGTGGTCTCGCGATCAGAGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC

**Figura 6-28** Os genes de determinação do sexo em humanos e baleias são, sem dúvida, muito semelhantes. Apesar de os seus planos corporais serem bastante diferentes, homens e baleias são formados a partir das mesmas proteínas. Mesmo com tempo de divergência entre eles, as sequências nucleotídicas de vários dos seus genes são ainda muito semelhantes. As sequências de parte do gene que codifica a proteína que determina a masculinidade em humanos e em baleias estão alinhadas uma sobre a outra, e as posições em que as duas são idênticas estão sombreadas.

## RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Até aqui, discutimos como os mecanismos de replicação e reparo de DNA mantêm as sequências de nucleotídeos nas células de geração à geração com muito poucas alterações. Como enfatizamos, esses mecanismos são possíveis graças à redundância inerente da dupla-hélice de DNA, na qual cada fita forma pares de bases com uma segunda fita de sequência complementar. Se os nucleotídeos de uma fita forem danificados, eles podem ser corrigidos usando a informação contida na fita complementar.

Entretanto, o que ocorre à informação genética quando ambos os membros de um par nucleotídico são danificados simultaneamente – por exemplo, quando a fita dupla sofre uma quebra? Como vimos, uma estratégia para corrigir o dano é o uso da junção de extremidades não homólogas para rapidamente consertar a lesão. Contudo, esse mecanismo normalmente sacrifica a informação contida no local da lesão. Uma solução mais elegante é utilizar a informação genética fornecida por um conjunto totalmente separado da dupla-hélice para corrigir a quebra com precisão. Essa estratégia é realizada por um conjunto de reações chamadas coletivamente de **recombinação homóloga**. A característica principal é a troca de informação genética entre um par de moléculas de DNA homólogas: isto é, hélices duplas de DNA com sequência nucleotídica similar ou idêntica. Nesse processo, a informação presente em uma dupla-hélice intacta e não danificada é utilizada como molde para reparar com precisão uma dupla-hélice de DNA quebrada.

Além de atuar no reparo, a recombinação homóloga é também responsável pela geração da diversidade genética durante a *meiose*, uma forma especializada de divisão celular na qual os organismos com reprodução sexuada produzem células germinativas. Nesse caso, a recombinação homóloga troca, fisicamente, informação genética entre os cromossomos maternos e paternos homólogos, produzindo cromossomos com sequências de DNA novas. O benefício evolutivo em potencial desse tipo de rearranjo é que ele produz diversas novas combinações de genes, talvez benéficas, que serão transmitidas de um organismo à sua descendência.

O reparo correto de quebras na fita dupla e a troca de informação genética na *meiose* parecem – à primeira vista – dois processos não relacionados. Contudo, veremos nesta seção que os dois mecanismos são muito similares e que se baseiam em um conjunto de reações e componentes proteicos muito semelhantes.

### A recombinação homóloga requer regiões com extensa similaridade de sequência

Seja qual for o resultado, reparo de DNA ou troca de sequências nucleotídicas durante a *meiose*, a essência da recombinação homóloga é que ela ocorre somente entre cópias de DNA que contenham regiões com extensa similaridade de sequência (homologia). Um par de moléculas de DNA pode avaliar essa homologia “testando” a sequência nucleotídica uma da outra quando uma fita simples de uma cópia de DNA inicia uma busca extensiva de pareamento de bases com a fita complementar na outra cópia. A homologia não precisa ser perfeita para o sucesso da recombinação homóloga, mas perto disso.

### A recombinação homóloga pode reparar quebras na fita dupla de DNA sem erros

A recombinação homóloga é normalmente iniciada quando uma quebra de fita dupla ocorre logo após a replicação de um segmento de DNA; no momento, as hélices duplicadas estão ainda bastante próximas entre si (Figura 6-29A). Para iniciar o reparo, uma nuclease produz extremidades de fita simples no ponto de quebra, pela degradação de uma das fitas de DNA complementar (Figura

6-29B). Com o auxílio de enzimas especializadas, uma dessas fitas simples então “invade” a dupla-hélice homóloga estabelecendo pares de bases com sua fita complementar. Caso esse teste resulte em um pareamento extenso, um *ponto de ramificação* é criado onde as duas fitas de DNA – uma de cada dúplex – se cruzam (Figura 6-29C). Nesse ponto, a fita invasora é sintetizada por uma DNA-polimerase de reparo, usando a fita complementar como molde (Figura 6-29D). O ponto de ramificação então “migra” à medida que os pares de bases que unem as cópias são rompidos, e há a formação de novos pares de bases (Figura 6-29E). O reparo é finalizado pela síntese adicional de DNA, seguida pela ligação do DNA (Figura 6-29F). O resultado final consiste em duas hélices de DNA intactas, nas quais a informação genética de uma foi utilizada como molde para corrigir a outra hélice.

A recombinação homóloga pode também corrigir vários outros tipos de lesões no DNA, o que a torna, talvez, o mecanismo de reparo de DNA mais versátil disponível na célula, necessitando apenas de um cromossomo homólogo intacto.

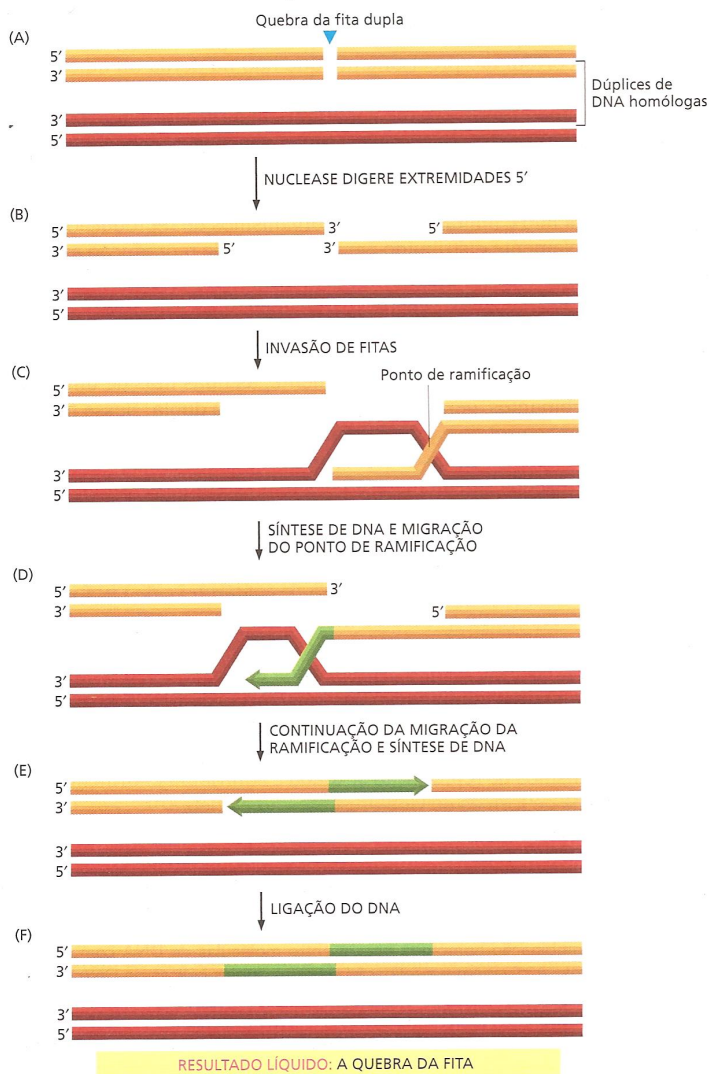


Figura 6-29 A recombinação homóloga permite o reparo correto de quebras da fita dupla. Esse é o método preferido para o reparo de quebras da fita dupla que ocorrem logo após a replicação do DNA, mas antes da divisão celular. (Adaptada de M. McVey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:15694-15699, 2004. Com permissão da National Academy of Sciences.)

to para ser usado como complemento – e cromossomos idênticos como esses pareados, são produzidos temporariamente cada vez que os cromossomos são replicados. A natureza de “serve para tudo” do reparo por recombinação provavelmente explica por que esse mecanismo e as proteínas que o realizam foram conservados em praticamente todas as células na Terra.

### A recombinação homóloga troca informação genética durante a meiose

Organismos com reprodução sexuada dependem do processo de meiose para produzir as células germinativas – óvulos e espermatozoides, no caso dos mamíferos. A recombinação homóloga é essencial para que esse processo ocorra corretamente, como será discutido em detalhes no Capítulo 19. Uma consequência especialmente importante da recombinação homóloga durante a meiose é a formação dos *crossovers* (entrecruzamentos cromossômicos). No *crossover*, dois cromossomos homólogos – um paterno e outro materno – se aproximam e sofrem uma troca genética (Figura 6-30). A troca pode ocorrer em qualquer local das sequências nucleotídicas homólogas das duas moléculas de DNA participantes do processo. Os eventos de clivagem e religação que promovem a troca ocorrem tão precisamente que não há perda ou adição de um único nucleotídeo.

Como os cromossomos paterno e materno diferem levemente nas suas sequências, o entrecruzamento origina novas combinações de sequências de DNA em cada cromossomo. Os benefícios dessa mistura de genes nos organismos da progênie são, aparentemente, tão grandes que o rearranjo de genes pela recombinação homóloga não é limitado apenas a organismos de reprodução sexuada; ele também é amplamente distribuído em organismos de reprodução assexuada, por exemplo, quando uma bactéria adquire um cromossomo homólogo de outra célula bacteriana através da *transferência horizontal de genes*, como veremos no Capítulo 9.

A recombinação homóloga durante a meiose inicia com uma ação radical: uma enzima especial cliva, deliberadamente, as duas fitas de um dos cromossomos recombinantes, gerando uma quebra de fita dupla. Nesse momento, algumas das mesmas proteínas que atuam no reparo de quebras de fita dupla convergem para a “lesão”. Essas proteínas de recombinação são agora dirigidas por proteínas específicas da meiose para realizarem suas tarefas de modo diferente, produzindo – por meio de um ou mais *crossovers* – duas moléculas com sequências de DNA novas (Figura 6-31). Esse resultado é possível porque, na meiose, a recombinação ocorre preferencialmente entre os cromossomos materno e paterno, em vez de ocorrer entre fitas idênticas de DNA recém-replicadas, como no reparo de quebra de fita dupla mediado pela recombinação homóloga.

Os *crossovers* durante a meiose asseguram que cada um dos nossos cromossomos contenha uma combinação das sequências de DNA dos nossos dois progenitores. Como discutiremos em detalhes no Capítulo 19, esse tipo de rearranjo cromossômico origina uma grande quantidade de diversidade genética na progênie de organismos de reprodução sexuada e contribuiu enormemente para a incrível variedade de formas de vida presentes no planeta.

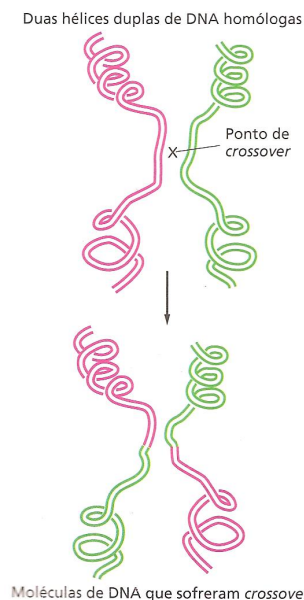


Figura 6-30 A recombinação homóloga ocorre entre moléculas de DNA com sequências nucleotídicas similares. A clivagem e a religação de duas duplas-hélices de DNA homólogas originam duas moléculas de DNA que sofreram crossover. Embora as duas moléculas originais tenham sequências semelhantes para poderem sofrer recombinação, elas não são idênticas; portanto, o crossover produz moléculas de DNA com sequências novas de nucleotídeos.



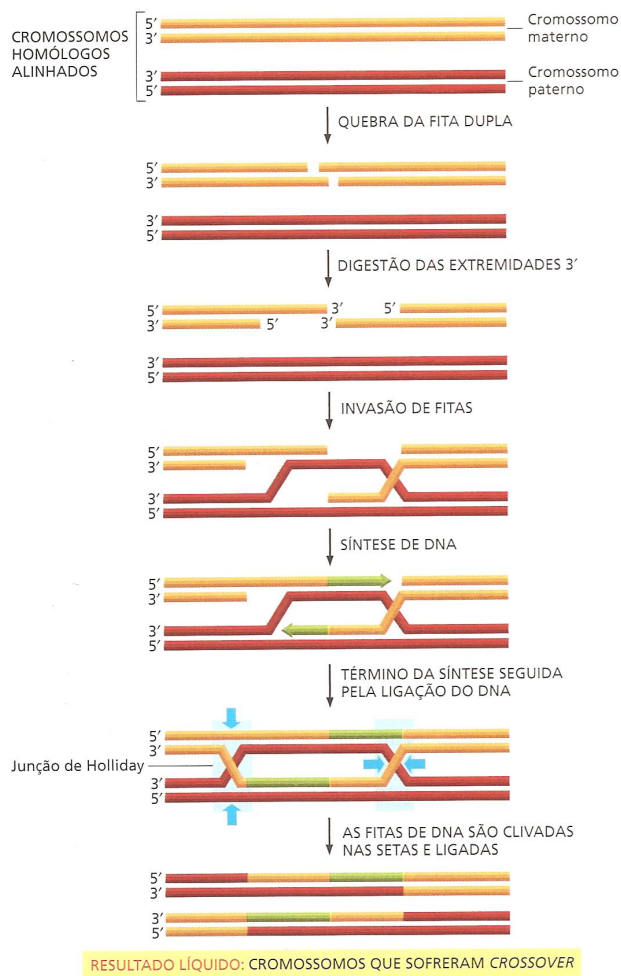


Figura 6-31 A recombinação homóloga na meiose produz *crossovers*. Uma vez que proteínas específicas da meiose tenham clivado a dupla-hélice de DNA e processado as extremidades, a recombinação homóloga ocorre através da formação da junção de Holliday (retângulos em azul) – os sítios onde os duplícies de DNA se cruzam, assim chamada em homenagem ao pesquisador que a descobriu. Para olhar essas estruturas ao microscópio eletrônico, ver **Animação 6.7**. Várias dessas etapas que produzem o *crossover* durante a meiose se assemelham às usadas no reparo de fita dupla do DNA (compare com a Figura 6-29).

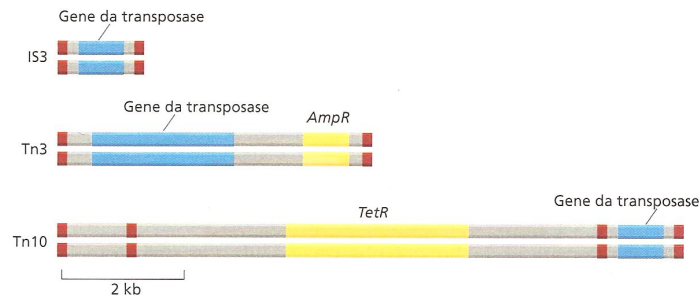
## ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS E VÍRUS

Vimos que a recombinação homóloga pode promover a troca de seqüências de DNA entre cromossomos. No entanto, essas trocas são geralmente conservativas: a ordem dos genes no cromossomo recombinante permanece a mesma, porque a recombinação homóloga ocorre apenas entre cromossomos com seqüências muito semelhantes.

Contudo, os genomas também estão sujeitos a formas mais severas de variação genética – trocas que alteram a ordem dos genes em um cromossomo ou mesmo a inserção de novas informações. A seguir, veremos essas formas mais radicais de reestruturação genética. Os agentes que promovem essas alterações genéticas drásticas são os **elementos genéticos móveis**, algumas vezes chamados informalmente de genes saltitantes. Encontrados em praticamente todas as células, esses elementos são segmentos de DNA pequenos, especializados, que se movem de um local a outro do genoma da célula. Embora possam inserir-se em qualquer seqüência dentro de um mesmo genoma, a maior parte dos elementos genéticos móveis não pode sair da célula na qual reside. Seu movimento, portanto, é limitado a uma única célula e sua descendência.

Figura 6-32 As bactérias contêm vários tipos de transpósons de DNA-only, três deles são mostrados nesta figura. Cada um destes elementos contém um gene que codifica a transposase (em azul), uma enzima que catalisa o movimento do elemento móvel. Cada transpósion também contém sequências de DNA (indicadas em vermelho) que são reconhecidas apenas pela transposase codificada por aquele elemento e necessárias ao seu deslocamento.

Alguns elementos genéticos móveis contêm, ainda, genes que codificam enzimas que inativam antibióticos, como ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*) e tetraciclina (*Tet<sup>R</sup>*). O movimento desses genes representa um sério problema na medicina, porque diversas bactérias causadoras de doenças se tornaram resistentes a muitos dos antibióticos desenvolvidos durante o século XX.



Esse não é o caso dos vírus. Os vírus, compostos essencialmente por uma sucessão de genes envolvidos por uma capa protetora, são a forma mais avançada de DNA móvel, uma vez que podem escapar de uma célula e infectar outra. Terminaremos esta seção com uma breve discussão sobre os vírus, os quais embora ocasionalmente benéficos às células, são responsáveis por algumas das doenças humanas mais devastadoras.

### Os elementos genéticos móveis codificam os componentes necessários para o seu movimento

Ao contrário da recombinação homóloga, o movimento dos elementos genéticos não necessita de similaridade entre sequências. Em vez disso, cada tipo de elemento normalmente codifica uma enzima de recombinação especial que promove seu movimento (Figura 6-32). Essas enzimas reconhecem e atuam em sequências de DNA únicas, localizadas em cada elemento genético móvel. Vários elementos contêm também outros genes. Por exemplo, os elementos genéticos móveis que possuem genes de resistência a antibióticos contribuíram grandemente para a disseminação de resistência a antibióticos em populações bacterianas.

Os elementos genéticos móveis são também chamados de **transpósions** e são normalmente classificados de acordo com o mecanismo que permite seu movimento ou *transposição*. Em bactérias, os elementos genéticos móveis mais comuns são os transpósions de *DNA-only*. O nome é derivado do fato de que durante seu movimento, o elemento permanece como DNA, em vez de ser convertido a RNA, como ocorre em outros elementos discutidos a seguir. As bactérias contêm vários transpósions diferentes de *DNA-only*. Alguns transpósions se movem ao sítio-alvo usando um mecanismo simples de corte-e-colagem, no qual os elementos são simplesmente removidos do genoma e inseridos em um sítio diferente; outros transpósions de *DNA-only* replicam seu DNA antes de inseri-lo no novo sítio cromossômico, deixando uma cópia original intacta na localização anterior (Figura 6-33).

### O genoma humano é composto por duas famílias principais de sequências transponíveis

É espantoso, mas metade do genoma humano é composto por milhares de cópias de vários elementos genéticos móveis, que formam uma grande parte do nosso DNA. Alguns elementos genéticos móveis se moveram de um lugar para outro no genoma humano usando o mecanismo de corte-e-colagem discutido anteriormente para transpósions bacterianas (ver Figura 6-33A). Entretanto, muitos outros se movem não como DNA, mas por meio de um RNA intermediário. Esses são chamados de **retrotranspósions** e são, até onde se sabe, exclusivos de eucariotos.

Um tipo de retrotranspósion humano abundante, o *elemento L1* (algumas vezes denominado *LINE-1*), é transcrito em RNA pelas RNA-polimerases da célula hospedeira. Uma cópia DNA desse RNA é sintetizada pela enzima **transcriptase**

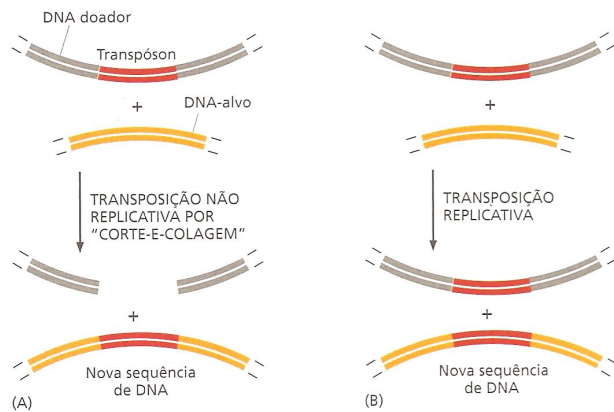


Figura 6-33 Transpósomos de DNA-only se movem por dois tipos de mecanismos. (A) Na transposição por corte-e-colagem, o transpósomo é clivado do DNA doador e inserido no DNA-alvo, deixando para trás uma molécula de DNA doador clivada. (O doador pode ser reparado de várias maneiras, mas algumas vezes pode resultar em deleções ou rearranjos na molécula doadora.) (B) Na transposição replicativa, o elemento é copiado pela replicação do DNA. Os produtos finais são uma molécula que é idêntica à doadora original e uma molécula-alvo que possui o elemento genético móvel inserido. Em geral, um tipo particular de transpósomo se move por apenas um desses dois mecanismos. Entretanto, os dois mecanismos possuem muitas semelhanças enzimáticas, e alguns poucos transpósomos podem usar ambos os mecanismos. O DNA do doador e o do alvo podem ser parte de uma mesma molécula de DNA ou pertencerem a moléculas diferentes de DNA.

**reversa**, uma DNA-polimerase incomum que utiliza RNA como molde. A transcriptase reversa é codificada pelo próprio elemento *L1*. A cópia DNA do elemento pode, então, ser integrada novamente em outro sítio no genoma (Figura 6-34).

Os elementos *L1* constituem cerca de 15% do genoma humano. Embora a maior parte das cópias seja imóvel em virtude do acúmulo de mutações deletérias, algumas poucas mantiveram a capacidade de transposição. Seu movimento pode resultar algumas vezes em doenças humanas; por exemplo, há cerca de 40 anos, o movimento de um elemento *L1* no gene que codifica o Fator VIII – uma proteína essencial para a coagulação sanguínea – provocou hemofilia em um indivíduo sem nenhuma história familiar da doença.

Um outro tipo de retrotranspósomo, a *sequência Alu*, está presente em cerca de 1 milhão de cópias no nosso genoma. Os elementos *Alu* não codificam sua própria transcriptase reversa e, portanto, dependem de enzimas já presentes na célula para promover seu movimento.

Comparações entre as sequências e a localização dos elementos *L1* e *Alu* presentes em diferentes mamíferos sugerem que essas sequências se multiplicaram nos primatas, em um passado relativamente recente em tempo evolutivo (Figura 6-35). Essas sequências altamente abundantes, espalhadas pelo nosso genoma, devem ter exercido efeitos importantes na expressão de muitos dos nossos genes. Seria talvez estarecedor imaginar quantas das qualidades exclusivamente humanas devemos a esses parasitas genéticos.

## Os vírus são elementos genéticos completamente móveis que podem escapar das células

Os **vírus** foram inicialmente identificados como agentes causadores de doenças, que, em virtude do seu tamanho diminuto, passavam através de filtros ultrafinos capazes de reter mesmo as menores células bacterianas. Sabemos agora

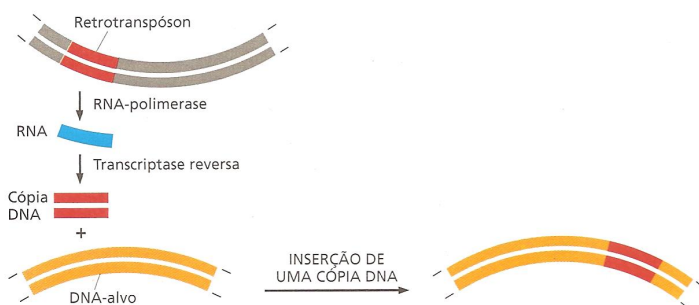
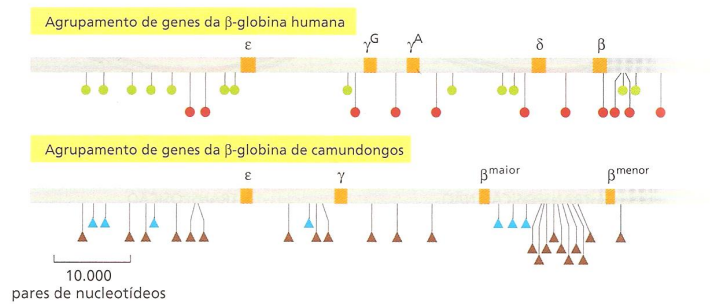


Figura 6-34 Os retrotranspósomos se movem através de um RNA intermediário. Esses elementos transponíveis são primeiramente transcritos em um RNA intermediário. Uma cópia DNA desse RNA é produzida pela enzima transcriptase reversa. A seguir, a cópia DNA do transpósomo é inserida no sítio-alvo, que pode estar na mesma molécula de DNA ou em outra molécula diferente. O retrotranspósomo doador permanece no seu sítio original, de forma que é duplicado cada vez que se transpõe. Esses elementos genéticos móveis são chamados de retrotranspósomos porque em uma etapa da sua transposição o fluxo da informação genética é revertido de RNA a DNA.

Figura 6-35 Elementos L1 e semelhantes a Alu se multiplicaram, resultando em um alto número de cópias, recentemente, na escala evolutiva. O genoma humano contém um aglomerado de cinco genes da globina (parte superior). Cada gene (mostrados em laranja e designados por letras gregas) codifica uma proteína que transporta oxigênio na corrente sanguínea. A região correspondente no genoma de camundongos (parte inferior) contém apenas quatro genes da globina. As posições das sequências Alu humanas (círculos verdes) e os elementos L1 humanos (círculos vermelhos) estão indicados. O genoma de camundongo contém elementos transponíveis diferentes: as posições dos elementos B1 (relacionados às sequências Alu humanas) estão indicadas por triângulos azuis, e as posições dos elementos L1 de camundongos (relacionados à sequência L1 em humanos) estão indicadas por triângulos marrons. Como as sequências de DNA desses elementos em humanos e camundongos são distintas, bem como suas posições nos aglomerados dos genes da globina, acredita-se que eles foram multiplicados em tempo relativamente recente na escala evolutiva. (Cortesia de Ross Hardison e Webb Miller.)



que os vírus são basicamente genes envolvidos por uma capa proteica protetora. Contudo, esses genes devem penetrar em uma célula e utilizar a maquinaria celular para expressar seus genes, formando proteínas, e para replicar seus cromossomos. A reprodução viral é normalmente letal para as células nas quais a replicação ocorre; em muitos casos, a célula infectada se rompe (lisa), liberando a progênie viral e permitindo que infectem as células vizinhas. Muitos dos sintomas da infecção viral refletem o efeito lítico dos vírus. As erupções doloridas formadas pelo vírus herpes simples e as vesículas causadas pelo vírus da varicela, por exemplo, ambas refletem a destruição local das células da pele. Apesar de os primeiros vírus descobertos infectarem células de mamíferos, hoje se sabe que existem diversos tipos de vírus. Alguns também infectam plantas, e outros utilizam bactérias como células hospedeiras.

Os genomas virais podem ser de DNA ou RNA e de fita simples ou fita dupla (Tabela 6-2). A quantidade de DNA ou RNA que pode ser empacotada dentro da capa proteica (capsídeo) é limitada e muito pequena para codificar as diversas enzimas diferentes e outras proteínas necessárias à replicação mesmo de um vírus muito simples. Por essa razão, os vírus devem sequestrar a maquinaria bioquímica da célula para se reproduzirem. Os genomas virais normalmente codificam as proteínas do capsídeo viral e as proteínas que atraem as enzimas do hospedeiro necessárias para replicar seu próprio genoma (Figura 6-36).

TABELA 6-2 Vírus que causam doenças humanas

Vírus	Tipo de genoma	Doença
Vírus herpes simples	DNA de fita dupla	herpes labial
Vírus Epstein-Barr (EBV)	DNA de fita dupla	mononucleose infecciosa
Vírus varicela-zóster	DNA de fita dupla	varicela e herpes-zóster
Vírus da varíola	DNA de fita dupla	varíola
Vírus da hepatite B	Partes de DNA de fita dupla e partes de DNA de fita simples	hepatite sorológica
Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	RNA de fita simples	síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS)
Vírus influenza tipo A	RNA de fita simples	doença respiratória (gripe)
Poliovírus	RNA de fita simples	paralisia infantil
Rinovírus	RNA de fita simples	resfriado comum
Vírus da hepatite A	RNA de fita simples	hepatite A
Vírus da hepatite C	RNA de fita simples	hepatite tipo não A, não B
Vírus da febre amarela	RNA de fita simples	febre amarela
Vírus da raiva	RNA de fita simples	raiva
Vírus da caxumba	RNA de fita simples	caxumba
Vírus do sarampo	RNA de fita simples	sarampo

Figura 6-36 Os vírus comandam a maquinaria da célula hospedeira para se replicarem. O vírus simples e hipotético, ilustrado aqui, consiste em uma molécula de DNA de fita dupla que codifica um único tipo de proteína do capsídeo viral. Para poder replicar, o genoma viral deve entrar na célula. Essa etapa é seguida pela replicação do DNA viral, formando várias cópias. Ao mesmo tempo, os genes virais são expressos formando a proteína do capsídeo através de etapas sequenciais de *transcrição* e *tradução*, descritas no Capítulo 7. A montagem dos genomas virais com as proteínas do capsídeo viral ocorre espontaneamente, formando novas partículas virais.

O vírus mais simples consiste em uma proteína do capsídeo, formada principalmente por várias cópias de uma única cadeia polipeptídica que envolve um pequeno genoma composto por apenas três genes. Vírus mais complexos possuem genomas maiores, de até centenas de genes, envolvidos por uma elaborada capa composta por várias proteínas diferentes (Figura 6-37).

### Os retrovírus reverterem o fluxo normal da informação genética

Embora existam muitas semelhanças entre vírus de bactérias e de eucariotos, uma classe importante de vírus – os **retrovírus** – é encontrada apenas em células eucarióticas. Em vários sentidos, os retrovírus se assemelham aos retrotransposons discutidos anteriormente. Uma característica-chave comum ao ciclo vital desses dois elementos genéticos é uma etapa na qual o DNA é sintetizado usando RNA como molde. O prefixo *retro* se refere ao reverso do fluxo normal da informação de DNA para RNA (ver Figura 7-2), e a enzima que catalisa essa etapa é a *transcriptase reversa*. O genoma retroviral (que é RNA de fita simples) codifica essa enzima, e algumas moléculas da enzima são empacotadas juntamente com o genoma de RNA em cada partícula viral.

O ciclo vital de um retrovírus é apresentado na Figura 6-38. Quando o genoma de RNA de fita simples do retrovírus entra na célula, a transcriptase re-

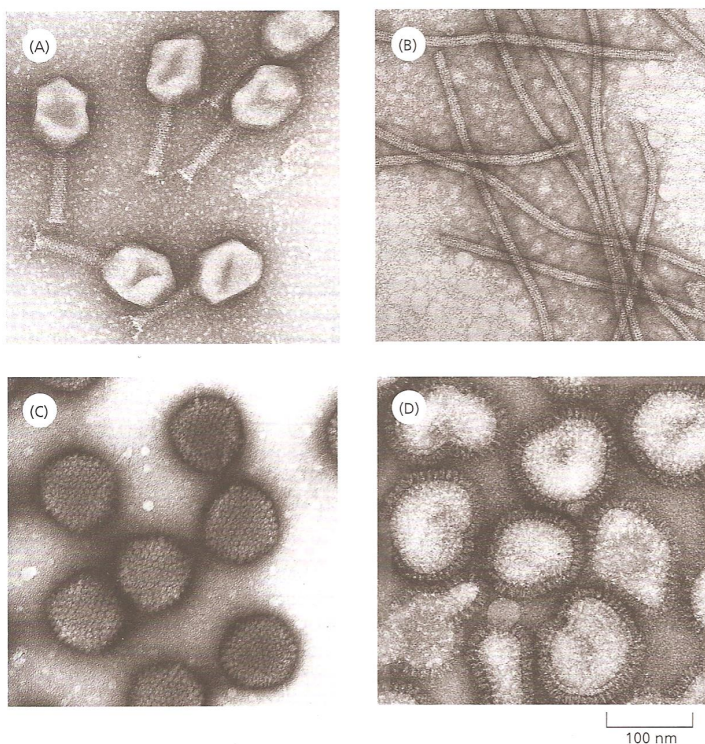
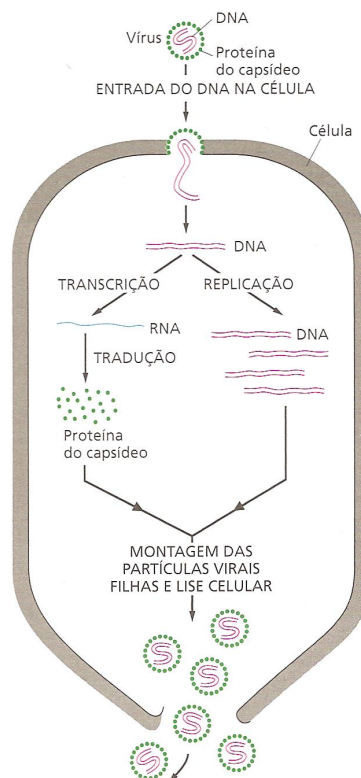


Figura 6-37 Os vírus existem em diferentes formas e tamanhos. Essas micrografias eletrônicas de partículas virais são todas mostradas na mesma escala. (A) T4, um grande vírus de DNA que infecta células de *E. coli*. O DNA é armazenado na cabeça do vírus e injetado dentro da bactéria por uma cauda cilíndrica. (B) Vírus X da batata, um vírus de plantas com genoma de RNA. (C) Adenovírus, um vírus de DNA que infecta células humanas. (D) Vírus influenza, um vírus animal grande com genoma de RNA, cujo capsídeo é ainda revestido por um envelope composto por uma bicamada lipídica. As pontas que se projetam para fora do envelope são proteínas virais inseridas na bicamada da membrana (ver Figura 6-38). (A, cortesia de James Paulson; B, cortesia de Graham Hills; C, cortesia de Mei Lie Wong; D, cortesia de R. C. Williams e H. W. Fisher.)

**QUESTÃO 6-5**

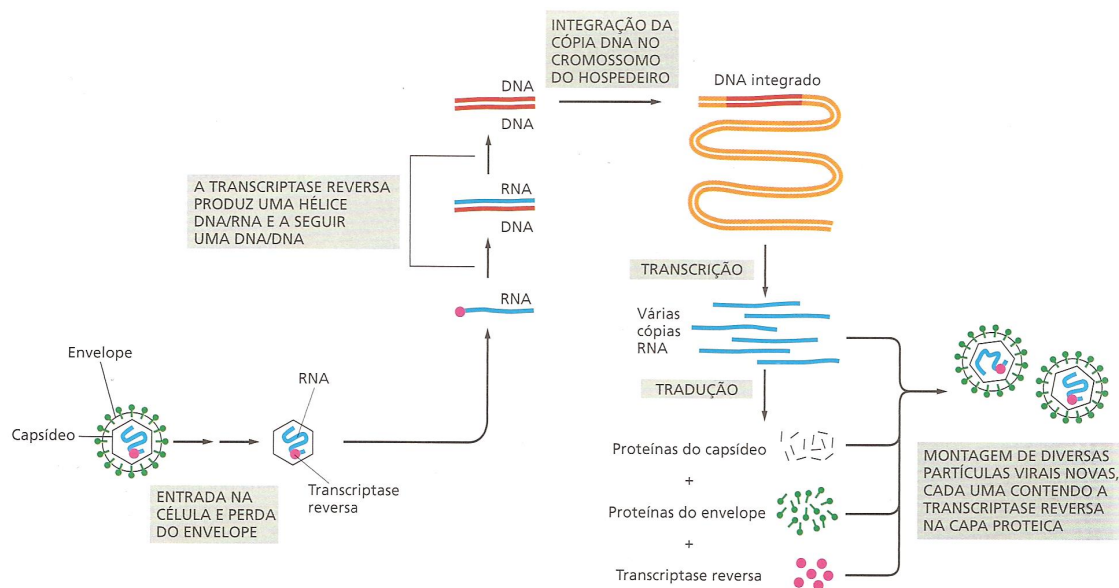
A transcriptase reversa não faz a autocorreção à medida que sintetiza DNA a partir de um RNA-molde. Quais são as consequências disso para o tratamento da AIDS?



versa trazida com ele sintetiza uma fita de DNA complementar formando uma dupla-hélice híbrida RNA/DNA. A fita de RNA é removida, e a transcriptase reversa (que pode utilizar tanto DNA como RNA como molde) agora sintetiza uma fita de DNA complementar produzindo uma dupla-hélice de DNA. A seguir, esse DNA é inserido, ou integrado, em um sítio selecionado aleatoriamente no genoma do hospedeiro, pela enzima *integrase* codificada pelo vírus. Nesse estado, o vírus está latente: cada vez que a célula se dividir, ela transmite uma cópia do genoma viral integrado, conhecido como *provírus*, às células-filhas.

A próxima etapa na replicação de um retrovírus – que pode ocorrer muito tempo após sua integração no genoma hospedeiro – é a cópia, do DNA viral integrado, em RNA por uma enzima RNA-polimerase da célula hospedeira, que produz grandes quantidades de RNA de fita simples idêntico ao seu genoma infectante original. Os genes virais são então expressos pela maquinaria celular do hospedeiro, produzindo as proteínas do capsídeo, do envelope e a transcriptase reversa – todas serão montadas junto com o genoma de RNA, formando novas partículas virais.

O vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), causador da AIDS, é um retrovírus. Assim como outros retrovírus, o genoma do HIV pode permanecer, por muito tempo no estado latente como um provírus, inserido no cromossomo de uma célula infectada. Essa capacidade do vírus de se “esconder” dentro da célula hospedeira dificulta as tentativas de tratamento com fármacos antivirais. No entanto, como a transcriptase reversa do HIV não é utilizada pelas células para nenhuma de suas funções, essa enzima se tornou um dos principais alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra a AIDS.



**Figura 6-38** O ciclo vital de um retrovírus inclui transcrição reversa e integração no genoma do hospedeiro. O genoma do retrovírus consiste em uma molécula de RNA (em azul) com cerca de 8.500 nucleotídeos. O genoma está dentro de uma capa proteica envolvida por uma camada lipídica (chamada de envelope) que contém proteínas de envelope codificadas pelo vírus (em verde). A enzima transcriptase reversa (círculo em vermelho), codificada no genoma viral e empacotada junto com seu RNA, inicialmente produz uma cópia DNA da molécula de RNA viral e depois uma segunda fita de DNA, produzindo uma cópia DNA de fita dupla do genoma de RNA. A integração dessa dupla-hélice de DNA no cromossomo hospedeiro é catalisada pela enzima *integrase* codificada pelo vírus. Essa integração é necessária para a síntese das novas moléculas de RNA viral pela RNA-polimerase da célula hospedeira.

## CONCEITOS ESSENCIAIS

- A capacidade de uma célula manter a ordem em um ambiente caótico depende da duplicação precisa da enorme quantidade de informação genética contida no seu DNA.
- Cada uma das duas fitas de DNA atua como um molde para a síntese da outra fita. Uma dupla-hélice de DNA, portanto, contém a mesma informação em cada uma de suas fitas.
- Uma molécula de DNA é duplicada (replicada) pela polimerização de novas fitas complementares usando cada uma das fitas originais (antigas) da dupla-hélice de DNA como molde. Duas moléculas idênticas de DNA são formadas, permitindo que a informação genética seja copiada e transmitida de uma célula às suas filhas e do progenitor à sua progênie.
- À medida que a molécula de DNA é replicada, suas fitas são afastadas, formando uma ou mais forquilhas de replicação em forma de Y. Enzimas DNA-polimerases, localizadas na forquilha, sintetizam as novas fitas de DNA complementar em cada fita original.
- A DNA-polimerase copia um molde de DNA com uma fidelidade excepcional, cometendo menos de um erro a cada  $10^7$  bases inseridas. Esse grau de precisão é possível, em parte, em virtude do processo de correção no qual a enzima remove seus próprios erros de polimerização à medida que se desloca pelo DNA.
- Como a DNA-polimerase pode sintetizar o DNA novo apenas em uma direção, somente uma das fitas na forquilha de replicação, a fita-líder, é replicada de modo contínuo. A fita retardada é sintetizada pela DNA-polimerase de modo descontínuo, por um processo de “costura para trás”, polimerizando pequenos segmentos de DNA que são, mais tarde, unidos pela enzima DNA-ligase, produzindo uma fita de DNA contínua.
- A DNA-polimerase é incapaz de iniciar uma nova fita de DNA. Então, a síntese de DNA é iniciada por uma RNA-polimerase denominada primase, que sintetiza pequenos segmentos de RNA (iniciadores) que são alongados pela DNA-polimerase. Os iniciadores serão subsequentemente removidos e substituídos por DNA.
- A replicação do DNA requer a cooperação de várias proteínas; essas formam uma máquina multienzimática de replicação que catalisa a síntese de DNA.
- Em eucariotos, uma enzima especial chamada de telomerase replica o DNA nas extremidades cromossômicas.
- Os raros erros de cópia que escapam à máquina de replicação de DNA são corrigidos pelas proteínas de reparo de malpareamento. A precisão global da replicação do DNA, incluindo o reparo de malpareamento, é de um erro a cada  $10^9$  nucleotídeos copiados.
- Danos no DNA causados por reações químicas inevitáveis são corrigidas por diversas enzimas que reconhecem o DNA danificado e removem um pequeno fragmento da fita de DNA que contém a lesão. O DNA perdido é ressintetizado por uma DNA-polimerase de reparo que utiliza a fita não danificada como molde.
- A junção de extremidades não homólogas permite o reparo rápido de quebras na fita dupla de DNA, e esse processo geralmente altera a sequência de DNA no local do reparo.
- A recombinação homóloga pode corrigir quebras na fita dupla de DNA com precisão usando a sequência de um cromossomo homólogo como guia. Durante a meiose, um processo de recombinação homóloga relacionado promove a mescla de informações genéticas, originando moléculas de DNA com sequências novas.

- Elementos genéticos móveis, ou transpósons, podem se mover de um lugar a outro no genoma da célula hospedeira, sendo uma fonte de variação genética.
- Mais da metade do genoma humano consiste em elementos genéticos móveis. Duas classes desses elementos se multiplicaram em números altíssimos.
- Vírus são pouco mais do que alguns genes empacotados em uma capa proteica protetora. Eles necessitam de células hospedeiras para poderem se replicar.
- Alguns vírus possuem RNA, em vez de DNA, como genoma. Um grupo de vírus de RNA – os retrovírus – deve copiar seu genoma de RNA em DNA para que possam se replicar.

**TERMOS-CHAVE**

DNA-polimerase	mecanismo de correção
reparo do DNA	forquilha de replicação
replicação do DNA	origem de replicação
recombinação homóloga	retrotranspósion
fita-líder	retrovírus
fita retardada	transcriptase reversa
elementos genéticos móveis	RNA (ácido ribonucleico)
mutação	telomerase
junção de extremidades não homólogas	molde
fragmento de Okazaki	transpósion
	vírus

**TESTE SEU CONHECIMENTO****QUESTÃO 6-6**

As enzimas de reparo de malpareamento do DNA corrigem, preferencialmente, bases em fitas de DNA recém-sintetizadas, usando as fitas originais de DNA como molde. Se os malpareamentos fossem simplesmente corrigidos sem considerar qual fita deve servir como molde, os erros de replicação seriam reduzidos? Explique sua resposta.

**QUESTÃO 6-7**

Suponha que uma mutação afete uma enzima necessária ao reparo de lesões causadas pela perda de bases púricas. Essa mutação provoca o acúmulo de 5.000 mutações no DNA de cada uma das suas células por dia. Como a diferença média entre as sequências de DNA humano e de chimpanzés é de cerca de 1%, quanto tempo levará para que você se torne um macaco? O que está errado nesse argumento?

**QUESTÃO 6-8**

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique sua resposta.

- Uma forquilha de replicação bacteriana é assimétrica porque contém duas moléculas de DNA-polimerase estruturalmente distintas.
- Os fragmentos de Okazaki são removidos por uma nuclease que degrada RNA.

C. A taxa de erros da replicação do DNA é reduzida pelo mecanismo de correção da DNA-polimerase e pelo reparo de malpareamento de DNA.

D. Na ausência de reparo de DNA, os genes são instáveis.

E. Nenhuma das bases aberrantes formadas pela desaminação ocorre no DNA naturalmente.

F. O acúmulo de mutações em células somáticas pode resultar em câncer.

**QUESTÃO 6-9**

A velocidade da replicação do DNA na forquilha é cerca de 100 nucleotídeos por segundo nas células humanas. Qual é o número mínimo de origens de replicação que uma célula humana deve ter para replicar todo seu DNA uma vez a cada 24 horas? Lembre-se de que uma célula humana contém duas cópias do genoma, uma herdada da mãe, e outra do pai, cada uma com  $3 \times 10^7$  pares de nucleotídeos.

**QUESTÃO 6-10**

Observe atentamente a estrutura dos compostos mostrados na Figura Q6-10. Um ou outro dos dois compostos é adicionado a uma reação de replicação de DNA.

- O que seria esperado se o composto A fosse adicionado em grande excesso sobre a concentração de trifosfato de didesoxicitosina (dCTP) disponível?
- O que aconteceria se ele fosse adicionado a 10% da concentração de dCTP disponível?



C. Que efeito seria esperado se o composto B fosse adicionado sob as mesmas condições?

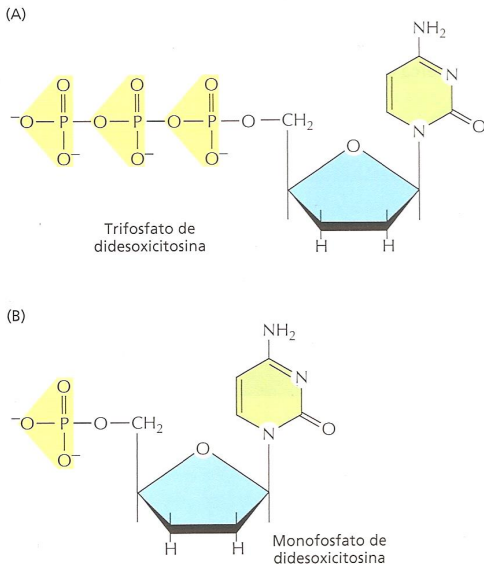


Figura Q6-10

QUESTÃO 6-11

O material genético de um organismo hipotético possui estrutura idêntica ao DNA convencional. Surpreendentemente, as análises revelaram que o DNA é sintetizado a partir de trifosfatos de nucleosídeo que contêm grupos 5'-hidroxila livre e grupos trifosfato na posição 3'. De que forma a DNA-polimerase desse organismo deve diferir das células normais? Ela ainda poderia fazer a auto-correção?

QUESTÃO 6-12

A Figura Q6-12 mostra um momento da forquilha de replicação no qual o iniciador de RNA foi recém-adicionado à fita retardada. Usando o diagrama como um guia, desenhe o caminho do DNA à medida que o próximo fragmento de Okazaki é sintetizado. Quando necessário, indique o grampo deslizante e a proteína ligadora de fita simples.

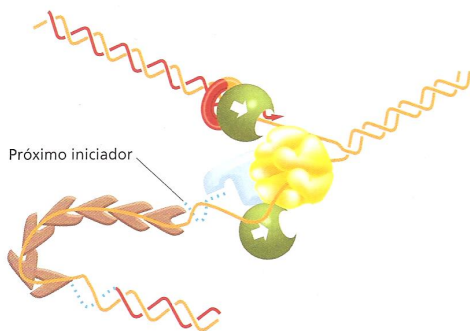


Figura Q6-12

QUESTÃO 6-13

Quantas ligações de alta energia, aproximadamente, são utilizadas para replicar um cromossomo bacteriano? Comparada ao seu peso seco de  $10^{-12}$ g, quantos gramas de glicose uma única bactéria necessita para fornecer energia suficiente para copiar todo seu DNA uma vez? O número de pares de nucleotídeos no cromossomo bacteriano é  $3 \times 10^6$ . A oxidação de uma molécula de glicose fornece cerca de 30 ligações fosfato de alta energia. O peso molecular da glicose é 180 g/mol. (Lembre-se, da Figura 2-3, de que um mol corresponde a  $6 \times 10^{23}$  moléculas.)

QUESTÃO 6-14

Discuta o que está errado na seguinte afirmação, caso esteja errada:

"A estabilidade do DNA tanto nas células reprodutivas como nas somáticas é essencial para a sobrevivência de uma espécie." Explique sua resposta.

QUESTÃO 6-15

Um tipo comum de erro no DNA é produzido por uma reação espontânea chamada de *desaminação*, na qual uma base nucleotídica perde um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) que é substituído por um grupo ceto ( $\text{C}=\text{O}$ ) de acordo com a reação geral mostrada na Figura Q6-15. Escreva a estrutura das bases A, G, C, T e U e os produtos formados pela desaminação. Observando os produtos dessas reações – e lembrando que, na célula, esses produtos devem ser reconhecidos e reparados – proponha uma explicação para o DNA não conter uracila.

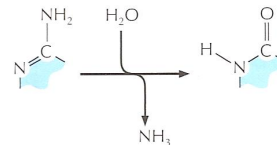


Figura Q6-15

QUESTÃO 6-16

- A. Explique por que os telômeros e a telomerase são necessários para a replicação dos cromossomos eucarióticos, mas não para a replicação de um cromossomo bacteriano circular.
- B. Os telômeros e a telomerase ainda seriam necessários para completar a replicação dos cromossomos eucarióticos se a DNA-primase adicionasse sempre o iniciador de RNA na extremidade 3' do molde da fita retardada?

QUESTÃO 6-17

Discuta a seguinte afirmação: "Os vírus existem no limiar da vida: fora das células são apenas um conjunto morto de moléculas; dentro das células, porém, estão muito vivos".

QUESTÃO 6-18

Vários transposons se movem dentro de um genoma por mecanismos replicativos (como aqueles mostrados nas Figuras 6-33 e 6-34). Contudo, eles aumentam o número de suas cópias cada vez que se transpõem. Embora os eventos de transposição individual sejam raros, diversos transposons são encontrados em

cópias múltiplas nos genomas. O que você acredita que evita que os transposons ocupem completamente o genoma de seus hospedeiros?

QUESTÃO 6-19

Descreva as consequências que surgiriam caso um cromossomo eucariótico

- A. Tivesse apenas uma origem de replicação
  - 1. Exatamente no centro do cromossomo
  - 2. Em uma das extremidades do cromossomo

B. Perdesse um ou ambos os telômeros

C. Não possuísse centrômero

Considere que o cromossomo possui 150 milhões de pares de nucleotídeos de comprimento, o tamanho típico de um cromossomo animal, e que a replicação do DNA em células animais ocorre a cerca de 100 nucleotídeos por segundo.