

Topologia, estrutura de cromatina e Processos de Replicação do DNA

Capítulos 3 e 10 GMB-dos genes aos genomas

Chapters 4 and 5- MBC Alberts et al

Chapter 8 and 9- MBGene, Watson et al

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

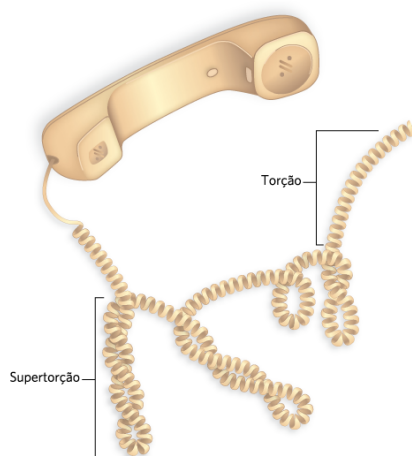


FIGURA 9-6 Supertorções. O cordão de um telefone antigo é torcido como uma hélice de DNA, e o cordão torcido pode se supertorcer.

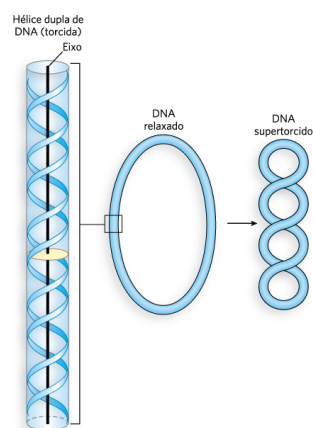


FIGURA 9-7 Supertorção do DNA. Quando se torce sobre si mesma, a fita dupla do DNA forma uma nova hélice, ou super-hélice. Normalmente, a super-hélice de DNA é chamada de supertorcida. [Fonte: Adaptada de N. R. Cozzarelli, T.C. Boles, and J. H. White, in *DNA Topology and Its Biological Effect* (N. R.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

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

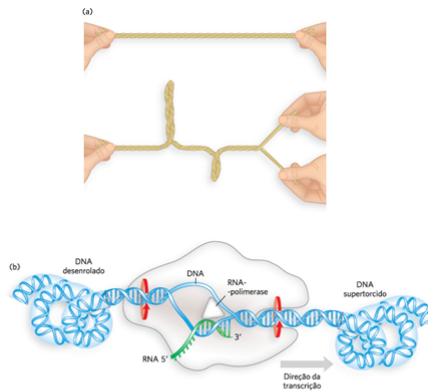


FIGURA 9-8 Os efeitos da replicação e transcrição na super-torção do DNA. Como o DNA é uma estrutura em hélice dupla, a separação das fitas leva a um estresse adicional e super-torção se o DNA estiver preso (sem liberdade para rodar) à frente da separação das fitas. (a) O efeito geral pode ser ilustrado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

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

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

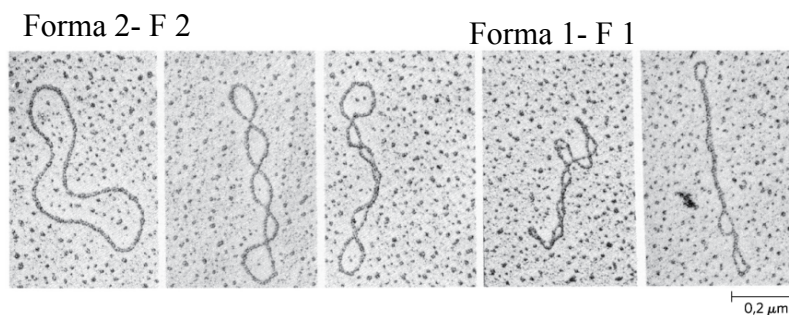
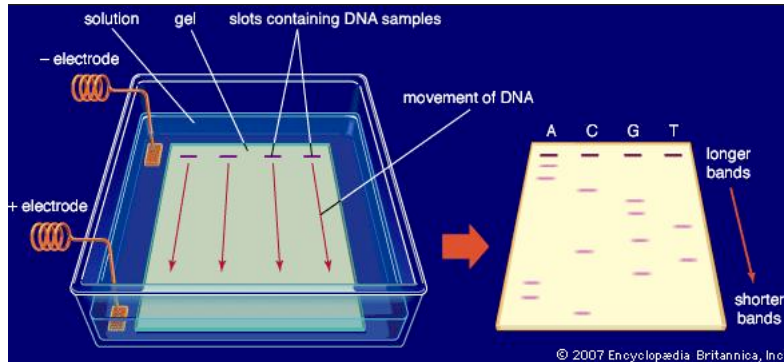


FIGURA 9-9 DNA plasmidial circular fechado relaxado e supertorcido. A micrografia eletrônica de varredura à extrema esquerda mostra o DNA relaxado. Supertorções crescentes são apresentadas da esquerda para a direita. [Fonte: Laurien Polder, de A. Kornberg, *DNA replication*, W. H. Freeman, 1980, p.29.]

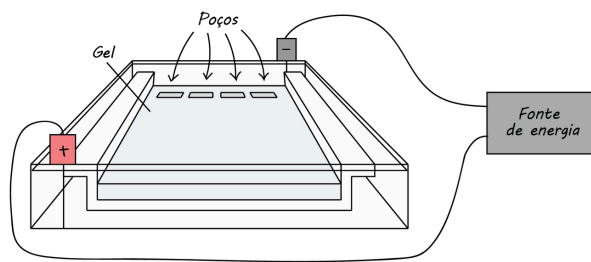
Mas isso existe de fato na célula? O que isso implica para o processamento do DNA?

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

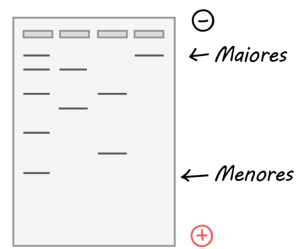
**gel de agarose? Aliás, o que é isso?
Para que polo migra o DNA?**



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

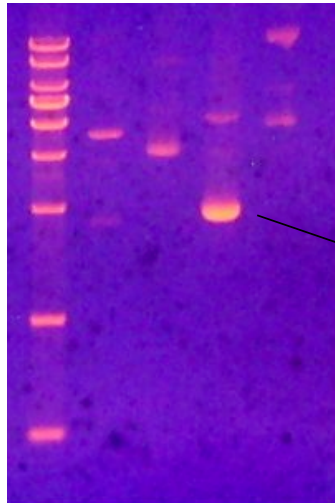


As amostras de DNA são carregadas em poços

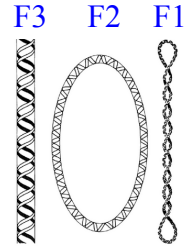


Os fragmentos ficam então separados por tamanho.

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



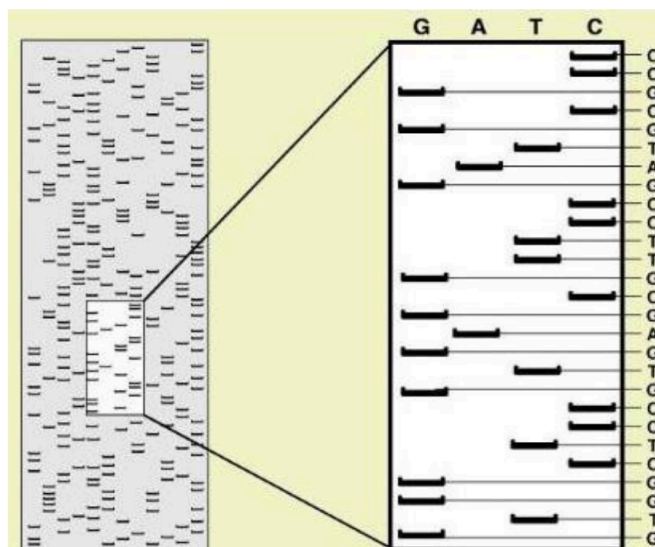
F2
F3
F1



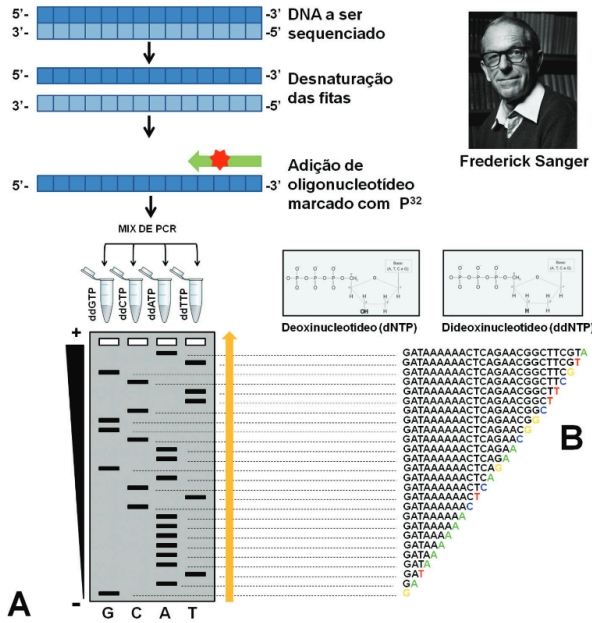
Banda corada com brometo de Etídeo!
Intercala no DNA
E é fluorescente!

Por que o DNA F1 migra mais do que o F2?

**Em gels de poliacrilamida (desnaturante) podemos distinguir moléculas diferentes apenas em um nucleotídeo:
Gel de sequenciamento de DNA**



A metodologia de Sanger em gel de poliacrilamida!



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

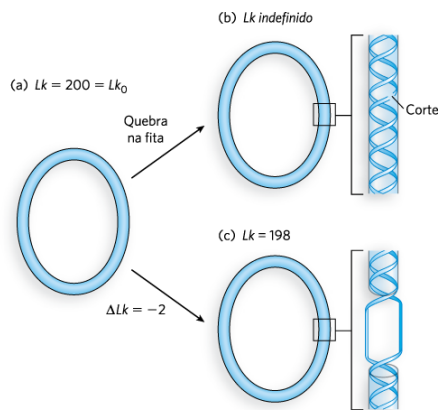


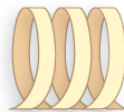
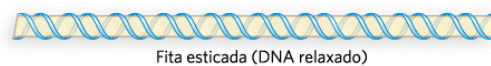
FIGURA 9-13 Número de ligação de DNAs circulares fechados. Uma molécula de 2.100 pb é apresentada em três formas: (a) relaxada, $Lk = 200$; (b) relaxada com uma quebra em uma fita, Lk indefinido; (c) distorcida em duas voltas, $Lk = 198$. A molécula distorcida geralmente é supertorcida, mas o desenrolamento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

E como a célula lida com essas estruturas supercoil??

Elas existem nos cromossomos?

O cromossomo tem a ponta livre?

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



Grande contorção, pequenas mudanças na torção



Contorção zero, grande mudança na torção

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

Como isso pode ajudar na estrutura do cromossomo?

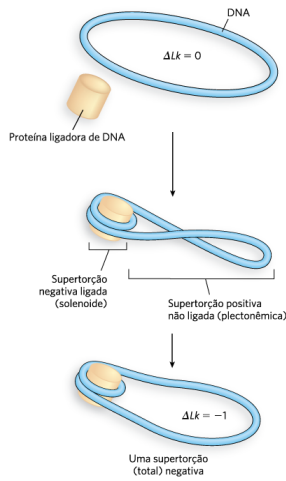


FIGURA 9-22 A origem da supertorção negativa no DNA eucariótico. Quando o DNA é firmemente enrolado ao redor da proteína ligadora de DNA ou complexo proteico, é fixada uma supertorção negativa solenoide no DNA. Em uma molécula de DNA tensionada, as supertorções positivas ocorrem em outros lugares para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

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

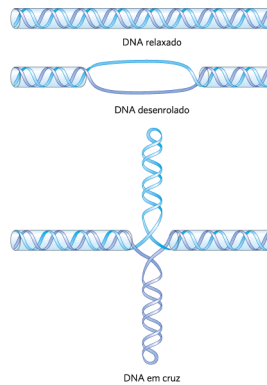


FIGURA 9-16 Promoção da estrutura em cruz pelo desenrolamento do DNA. A cruz pode se formar nas sequências palindrômicas, mas ocorrem aleatoriamente no DNA relaxado porque o DNA circular acomoda mais pares de bases do que a estrutura em cruz. O DNA desenrolado facilita a separação parcial da fita necessária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

Que tipo de sequencias podem fazer essa cruciforme?

O que são sequencias palindromicas em DNA?

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

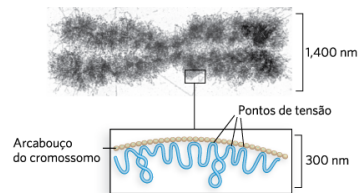
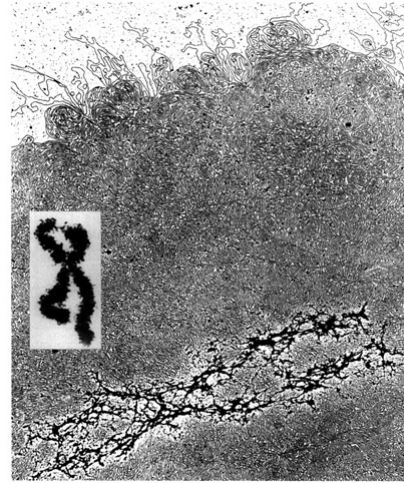
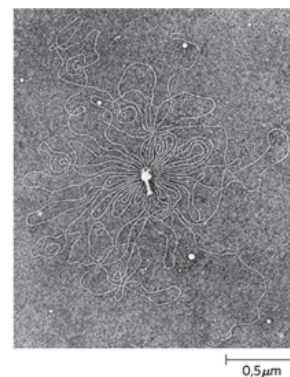
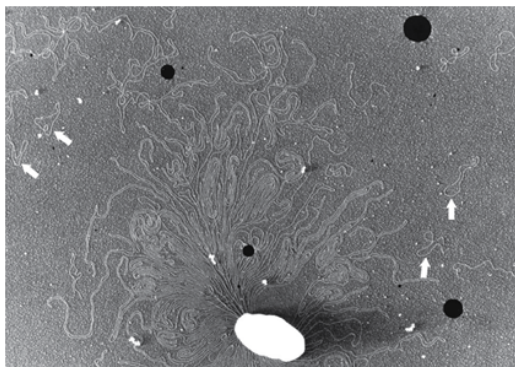


FIGURA 9-11 Alças em um cromossomo eucariótico forçadas por proteínas do arcabouço. O arcabouço da cromatina se liga ao cromossomo em intervalos, com o DNA localizado entre os pontos de ligação definindo as alças que são topologicamente tensas. [Fonte: Fotografia de G. F. Bahr/Biological Photo Service.]



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

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

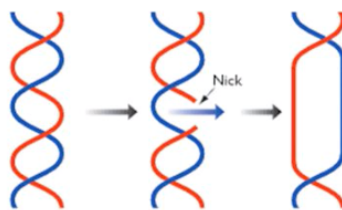


Como resolver tantos problemas gerados por questões estruturais??

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

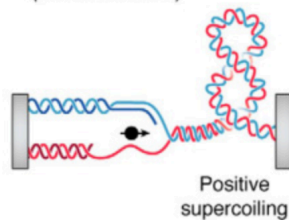
**Essas tesouras são as topoisomerases!
Topoisomerase I, cliva uma das fitas e reduz a torção em 1 volta.**

(A) Type I

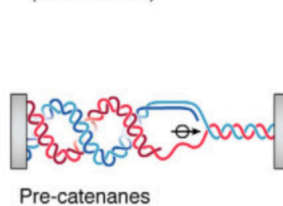


Libera a tensão após replicação (ou transcrição) por rotação!

C Replication
(No fork rotation)



D Replication
(Fork rotation)



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

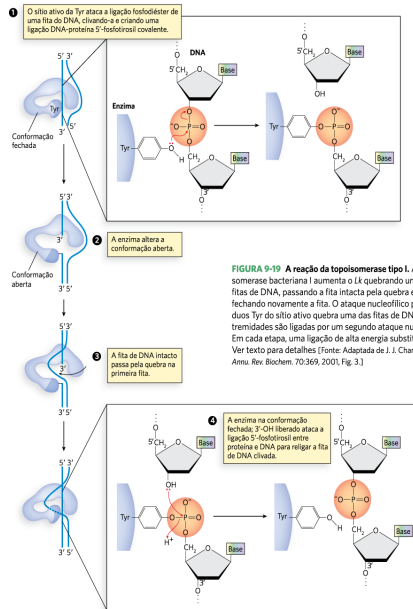


FIGURA 9-19 A reação da topoisomerase tipo I. A topoisomerase bacteriana I aumenta o Lk quebrando uma das fitas de DNA, passando a fita intacta pela quebra e então fechando novamente a fita. O ataque nucleofílico por resíduos Tyr do sítio ativo quebra uma das fitas de DNA. As extremidades são ligadas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

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

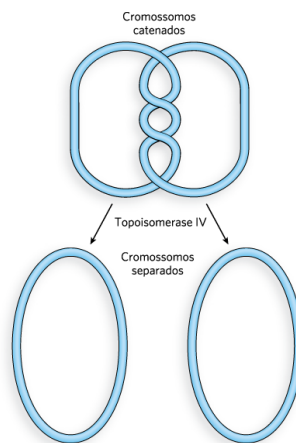
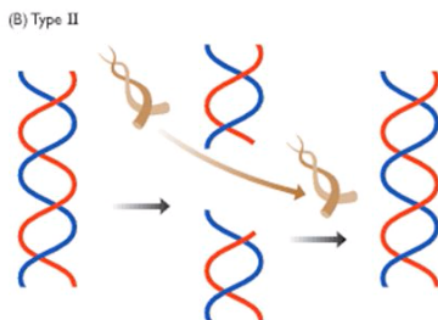


FIGURA 9-21 Resolvendo o problema topológico com topoisomerases tipo II. A topoisomerase tipo II resolve os nós e catenanos que surgem no DNA passando um duplex por uma quebra temporária da fita dupla de outro duplex.

**Topoisomerase II, cliva as duas fitas e reduz o Lk em 2.
(girases em bactérias)**



**Topoisomerase II, cliva as duas fitas e reduz o Lk em 2.
(girases em bactérias)**

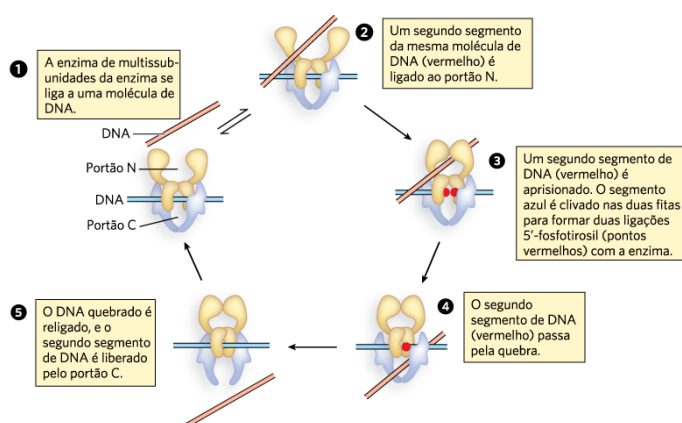


FIGURA 9-23 Alteração do número de ligação pela topoisomerase tipo II. O mecanismo geral é similar ao da DNA-girase bacteriana (ver Figura 9-20b), com um segmento de DNA duplex intacto que passa pela quebra transitória da

fitas duplas no outro segmento. A estrutura da enzima e o uso de ATP são distintos nesta reação. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 11.]

Podemos visualizar esses topoisômeros em simples géis de agarose!

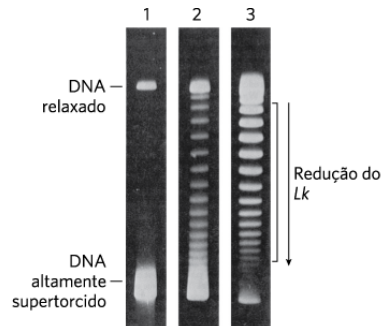
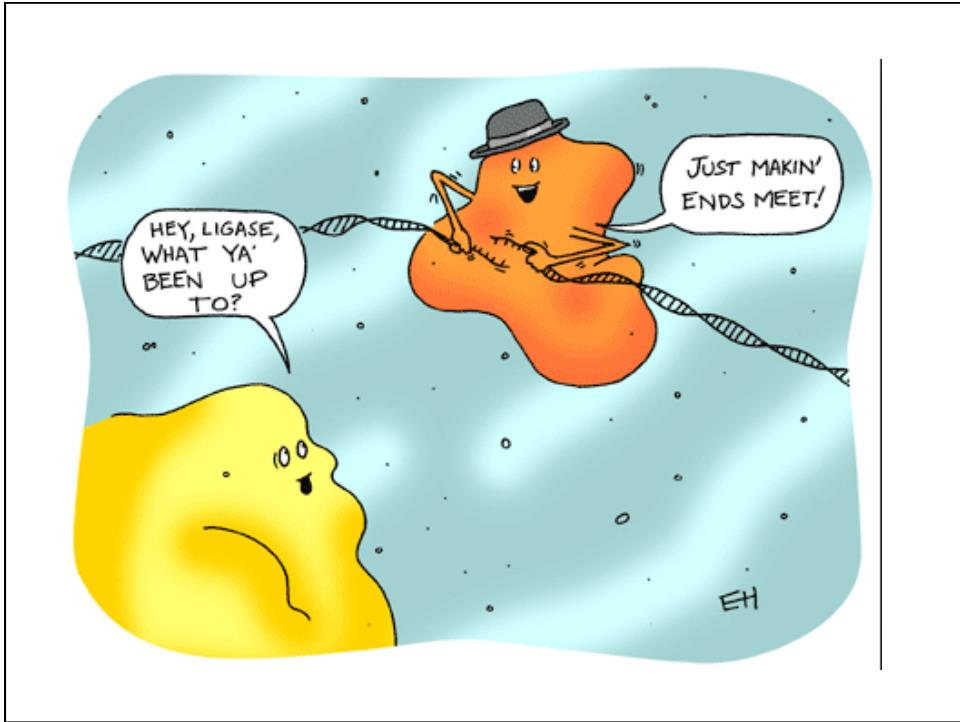


FIGURA 9-18 Visualizando os topoisômeros. Neste experimento, as moléculas de DNA (plasmídeos) possuem um número idêntico de pares de bases mas diferem no grau de supertorção. Na coluna 1, o DNA altamente supertorcido migra como uma banda única. As colunas 2 e 3 mostram o efeito do tratamento do DNA supertorcido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

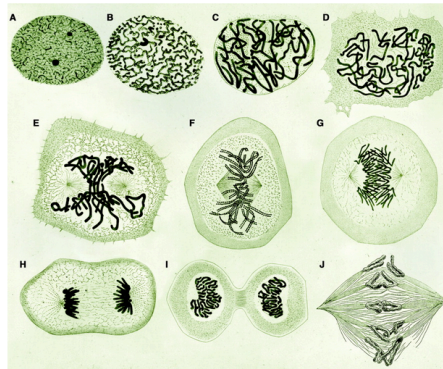
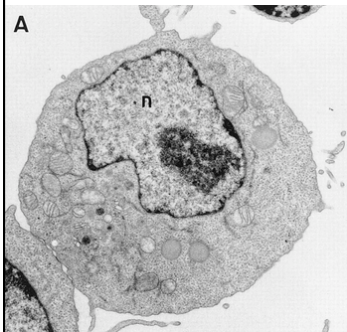
Videos para assistir:

<https://www.youtube.com/watch?v=HyP0cEbqKTc>

<https://www.youtube.com/watch?v=5hwaDamU-jo>



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



Células em mitose desenhado por Walther Flemming 1879!

A estrutura da cromatina observada em microscópio eletrônico!

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

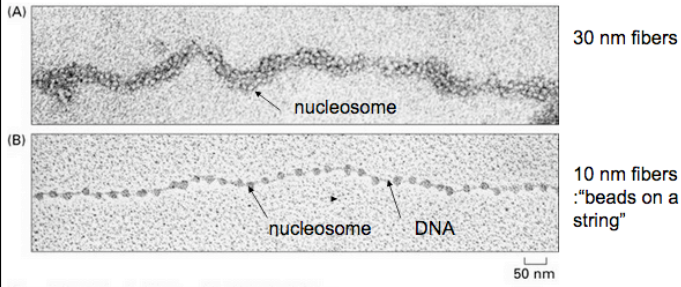
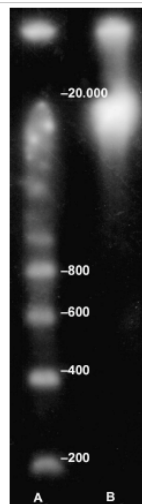


Figure 4-23. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Como um colar de contas!

Digestão de uma cromatina com nuclease revela uma estrutura regular!



O Que dá essa regularidade!

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

Probing the 10 nm Fiber With Nuclease

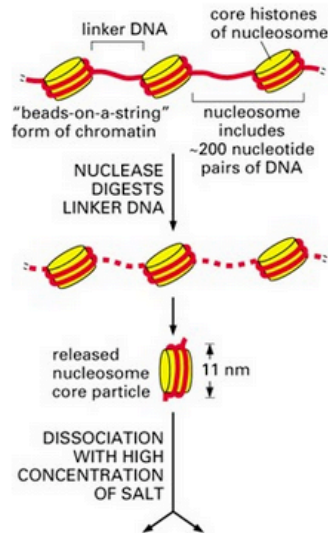


Figure 4-24 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Nucleosomes Are Composed of DNA and an Octamer of Four Histone Pairs + DNA

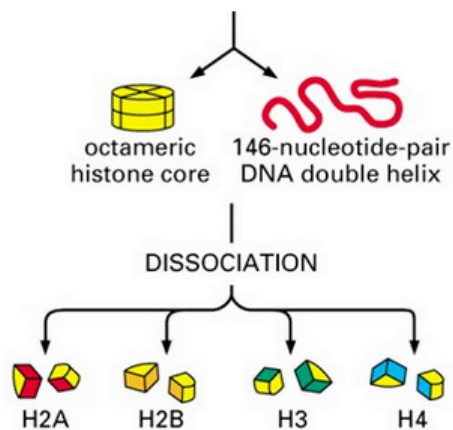
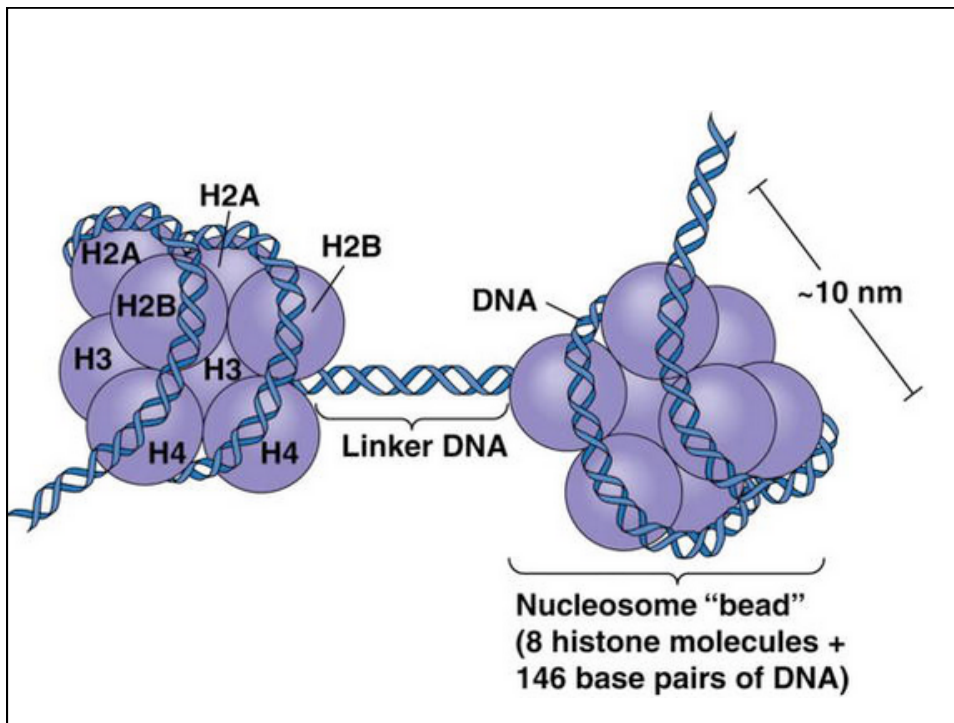


Figure 4-24 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



Nucleosome Structure

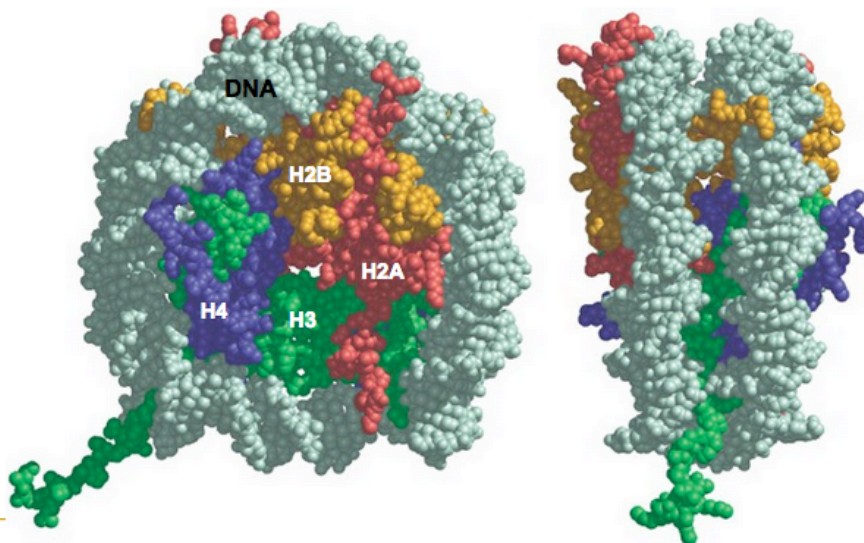
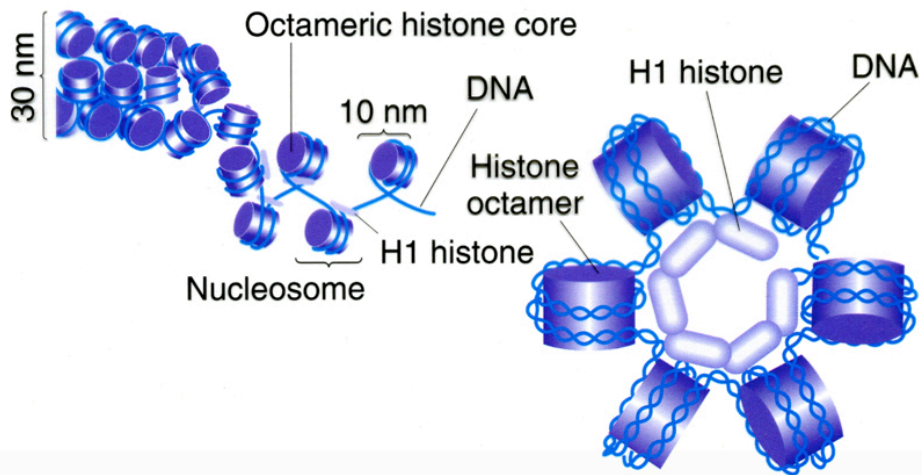


Figure 4-25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A model of chromatin structure 30 nm fibers



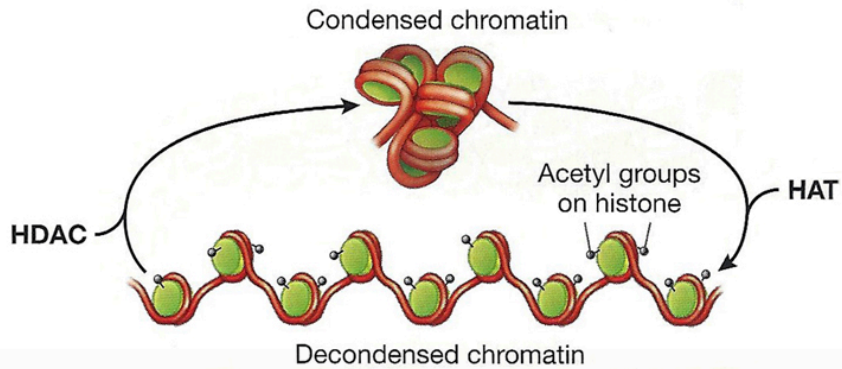
Questões importantes sobre histonas:

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

Como a compactação da cromatina pode regular a expressão gênica?

Como isso pode ser modificado na células?

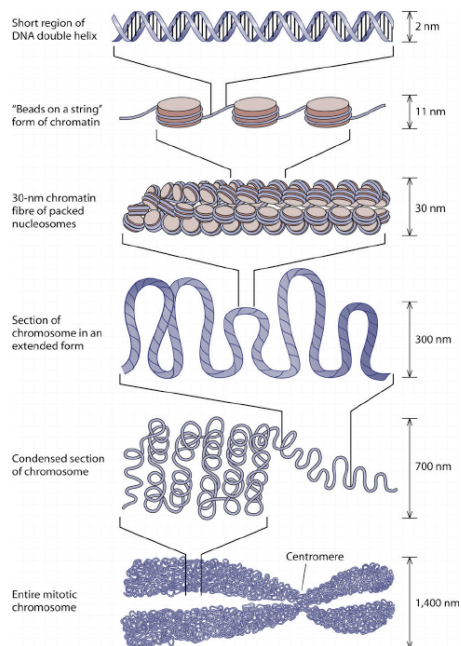
**Modificações de histonas podem causar alterações (epigenéticas)
Que podem modificar a estrutura da cromatina?**



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

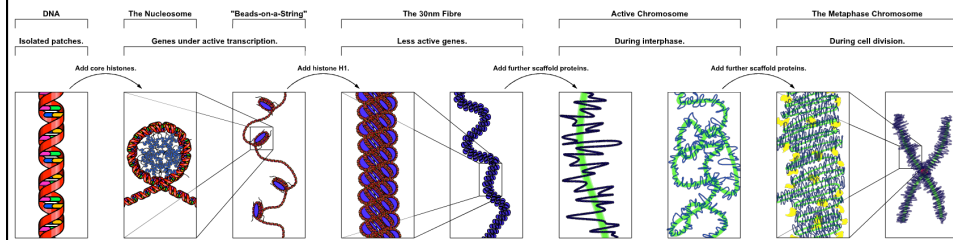
Essas modificações epigenéticas ajudam no controle de expressão gênica!

As diferentes estruturas de cromatina!



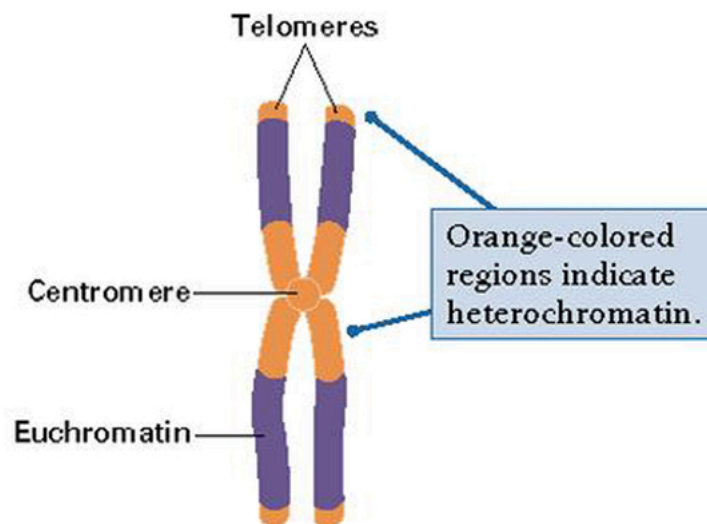
Como resultado o DNA fica 50.000 X menor em seu comprimento.

As diferentes estruturas de cromatina!



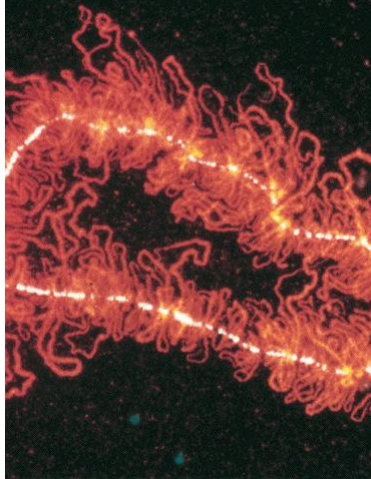
Como resultado o DNA fica 50.000 X menor em seu comprimento.

O Nível de condensamento pode ser visível na mitose!

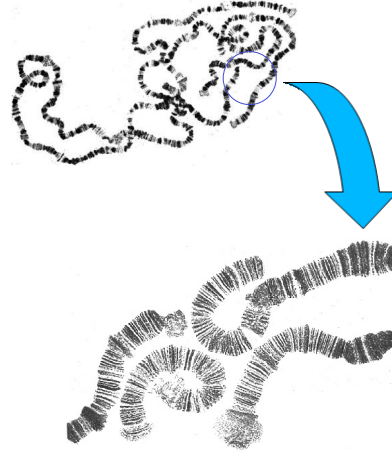


Diferencie heterocromatina e eucromatina!

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



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



Cromossomo politênico, que ocorre em glândula salivar de insetos.

Cromossomos politênicos: impacto na ciência brasileira!

- **Experimento de Crodowaldo Pavan e Marta Breuer!**
- **O que são os puffs de cromossomos politênicos?**
- **Expressão e amplificação gênica!**

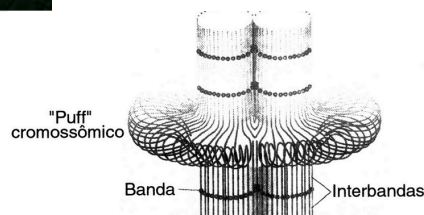
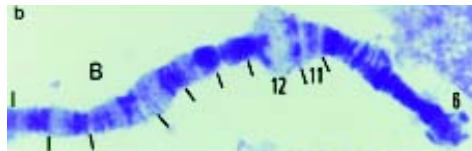
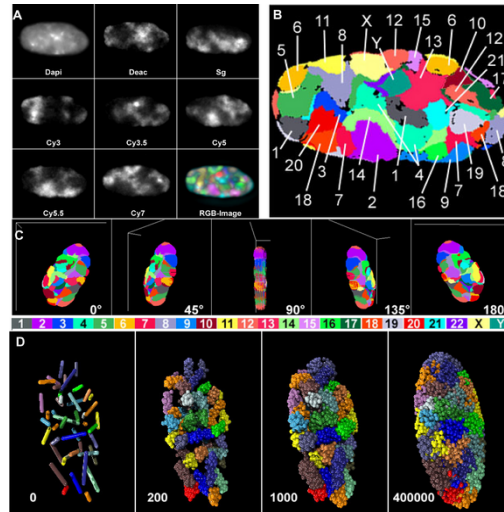


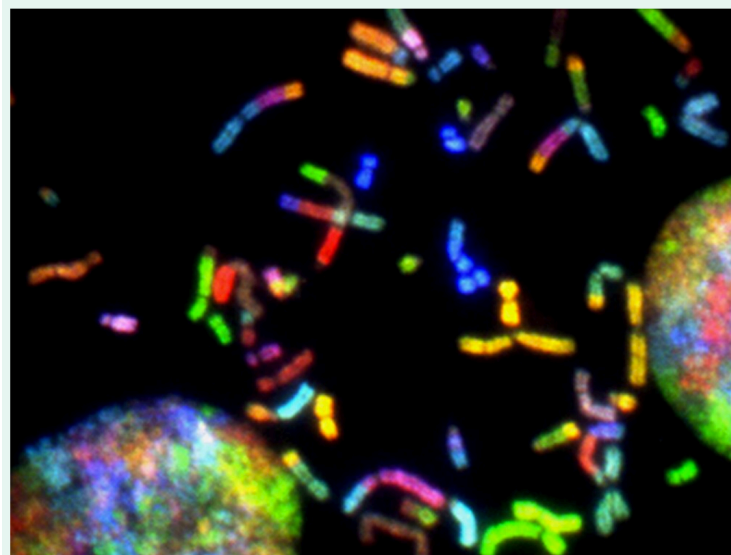
Figure 1. 24-Color 3D FISH Representation and Classification of Chromosomes in a Human G0 Fibroblast Nucleus



Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, et al. (2005) Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLOS Biology* 3(5): e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030157>

PLOS BIOLOGY

Pintando os cromossomos com FISH



EMGS meeting website!

Vídeos interessantes:

Histórico (excelente):

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

animação:

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

Histórico da replicação do DNA!

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

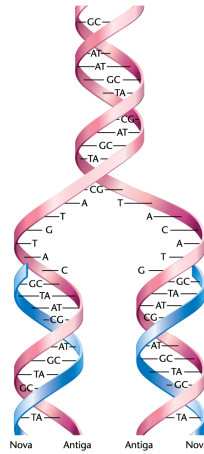


FIGURA 11-1 Modelo generalizado da replicação semiconservativa do DNA. A síntese nova é mostrada em azul.

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

Modelos de replicação do DNA:

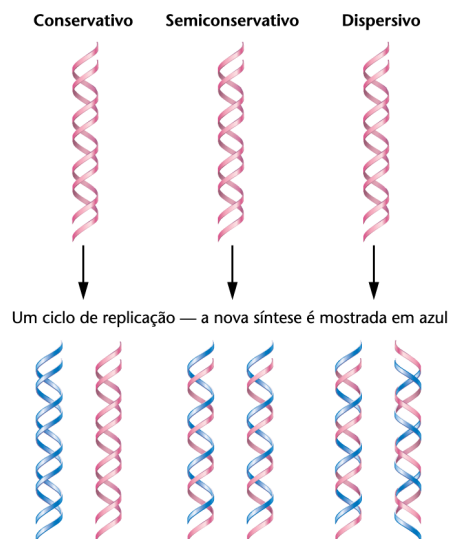


FIGURA 11-2 Resultados de um ciclo de replicação do DNA para cada um dos três modos possíveis em que a replicação poderia ser realizada.

Experimento de Mathew Meselson and Franklin Stahl, 1958.

- Que esperar de cada tipo de replicação?

Conservativa/ Dispersiva/ Semiconservativa:

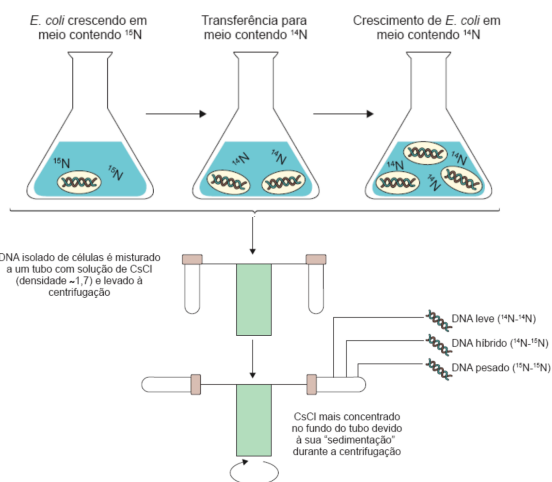
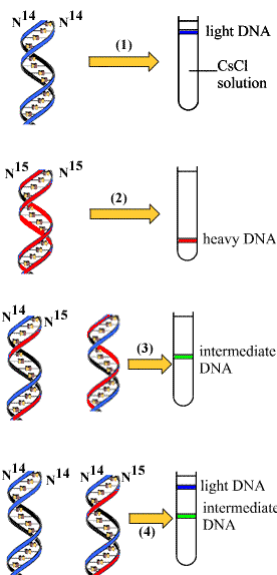


FIGURE 9-3. (Left) Matthew Meselson (b. 1930). (Right) Franklin W. Stahl (b. 1929). [Courtesy of M. Meselson.]

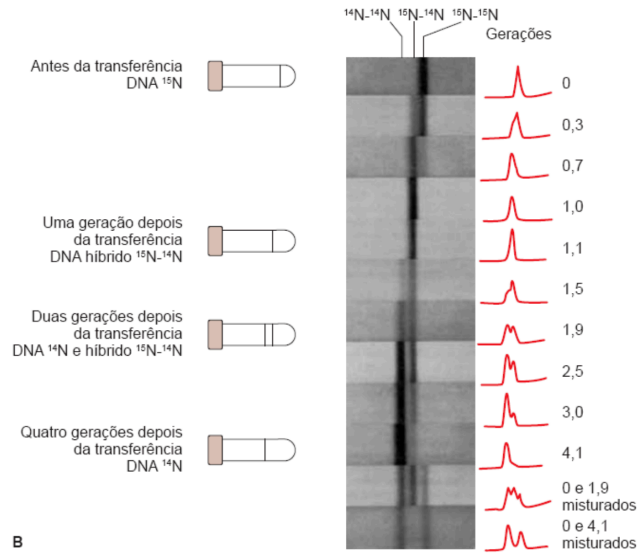
GMB:GG Menck/Sluys

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



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

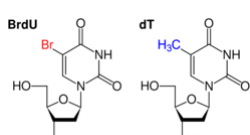
Experimento de Mathew Meselson and Franklin Stahl, 1958.



“o experimento mais bonito da biologia”

GMB:GG Menck/Sluys

A replicação semiconservativa também foi confirmada em células humanas.



Bromodesoxiuridina incorpora no lugar da timidina, e é fluorescente

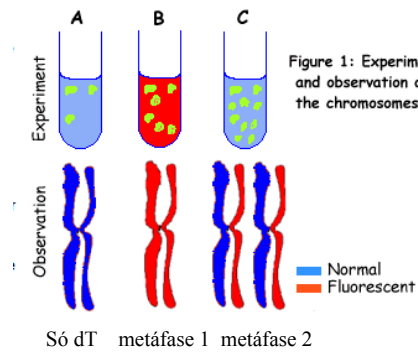
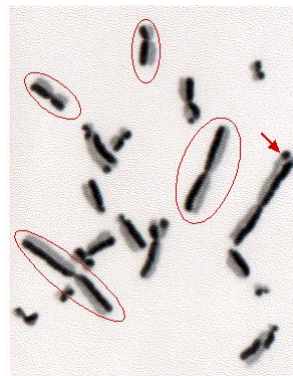


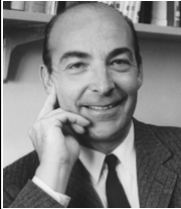
Figure 1: Experiment and observation of the chromosomes.



Cromossomos Arlequim!

Como você explica os cromossomos onde aparecem “trocas”?

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



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

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

Kornberg purifica a enzima responsável que ele chama de

DNA polimerase.

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

Como isso pode acontecer?? Não é essencial?

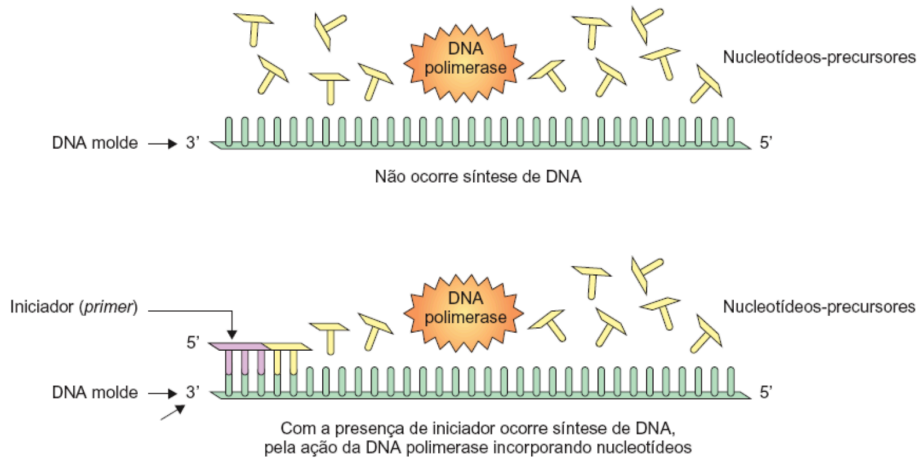


Arthur and Roger Kornberg.
(filho foi Nobel em 2006)!

Existem outras DNA polimerases em *E.coli*:

A enzima inicial foi chamada de **DNA polimerase I**,
e não é a principal enzima de replicação de DNA
em *E.coli*- que é realizada pela **DNA polimerase III!**

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



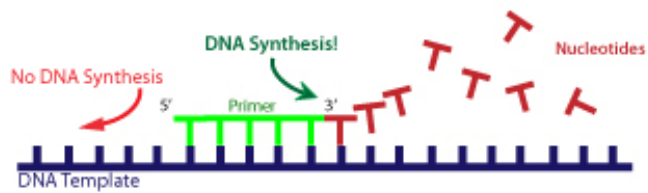
Mas, como o DNA havia funcionado para Kornberg, anteriormente?

GMB:GG Menck/Sluys

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

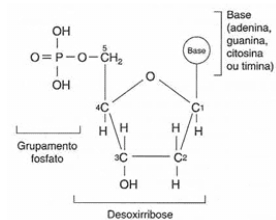


Reiji and Tsuneko Okazaki, Arthur and Silvy Kornberg!

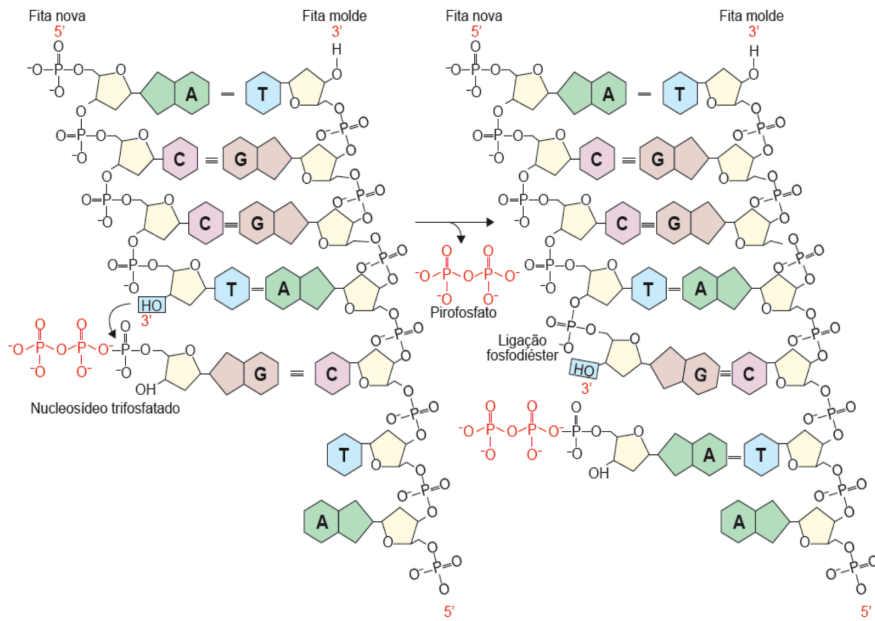


Todas polimerases precisam de primers e sintetizam DNA na direção 5' -3' !

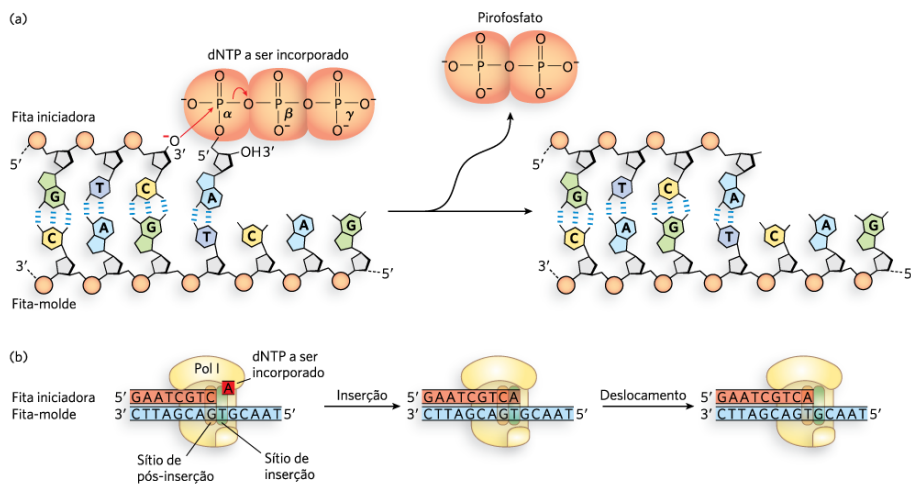
Por que precisa do primer?



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



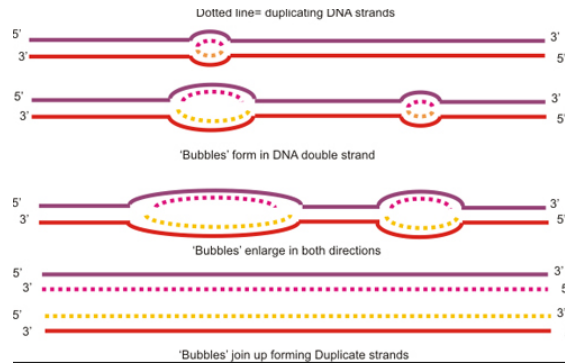
**A reação sempre ocorre na direção 5' -3' ,
a partir de uma ponta 3' OH!**



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

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

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



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

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

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

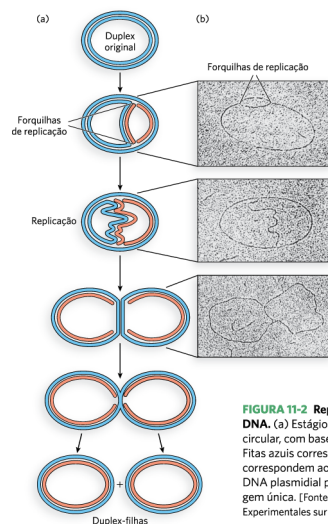
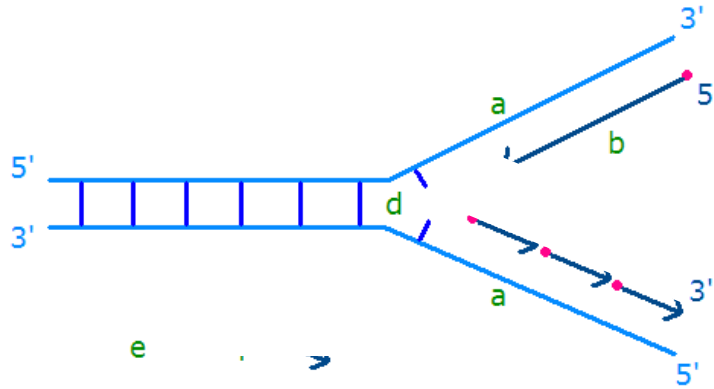


FIGURA 11-2 Replicação simultânea de ambas as fitas de DNA. (a) Estágios de replicação de um DNA de fita dupla circular, com base em observações de microscopia eletrônica. Fitas azuis correspondem ao DNA parental; fitas vermelhas correspondem ao novo DNA. (b) Micrografias eletrônicas de DNA plasmidial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

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

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



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

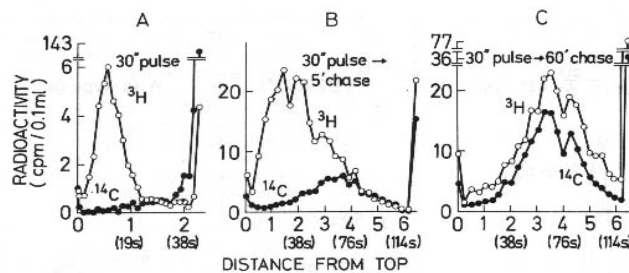
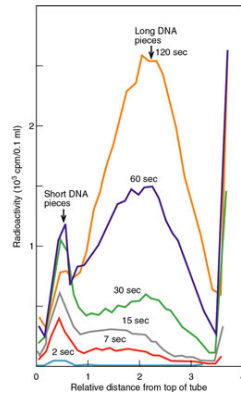


FIGURE 6. Effect of chase on the sedimentation of pulse-labeled DNA of *B. subtilis* 168 (*thy⁻ ind⁻*). Cells were pulse labeled with ³H-thymidine as in Fig. 5 for 30 sec at 25°. The chase was performed by adding a 10⁴-fold amount of unlabeled thymidine and incubating at 25° for the indicated time. Alkaline sucrose gradient sedimentation was carried out in the SW25.3 rotor at 22,500 rpm and 4° for (A) 24 hr or (B and C) 8 hr.

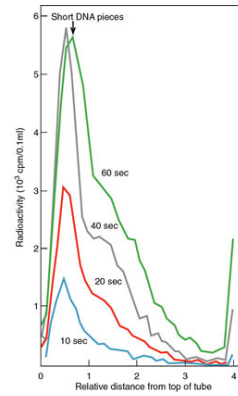
Os fragmentos de Okazaki tem cerca de 1000 bases em *E.coli*.... 100 a 200 bases em eucariontes!

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

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



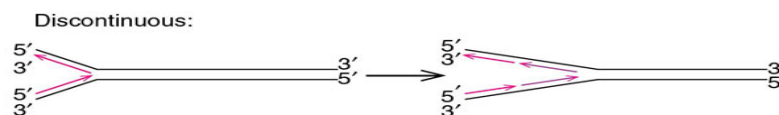
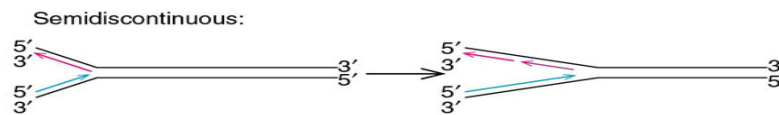
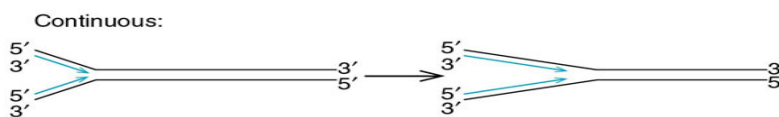
selvagem



Mutante termossensível para a DNA ligase

Okazaki propõe que a síntese de DNA é semidescontínua!

Fitas leading e lagging!



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

