

QBQ1354 - Biologia Molecular
2023

Replicação de DNA

O processo de replicação do DNA e seus desafios

Cada dupla-hélice filha é formada por uma fita derivada da mãe e uma fita nova, recém sintetizada: “replicação semi-conservativa”

Experimento que demonstrou que a replicação é semi-conservativa é considerado um dos mais elegantes da história: “Experimento de Meselson-Stahl”

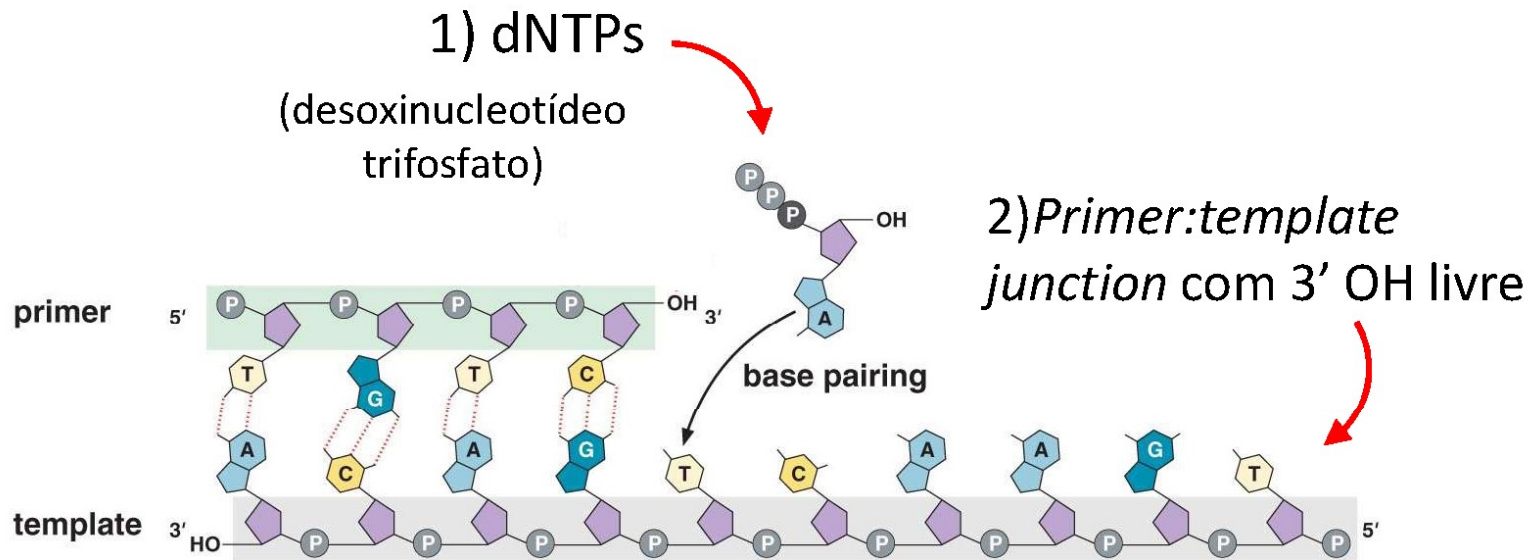


- 1) *Velocidade: rápida suficiente para duplicar 6×10^9 pb em 8 hrs (humanos) ou 4×10^6 pb em 30 min (E. coli).*
- 2) *Fidelidade: extremamente precisa (~ 1 erro a cada 10^9 nucleotídeos copiados).*
- 3) *Controle: exatamente duas cópias a cada ciclo celular, coordenação com outros eventos da mitose.*
- 4) *Substrato “cabuloso”: empacotado em cromatina, usado em outros processos (transcrição, reparo, recombinação), fitas antiparalelas*

Roteiro

- A química da síntese de DNA e a enzima que a catalisa
- Como a fidelidade da replicação é garantida?
- Como a dupla-fita de DNA é replicada? (Desafios topológicos, maquinaria de replicação)
- Como a replicação se inicia? Como termina?

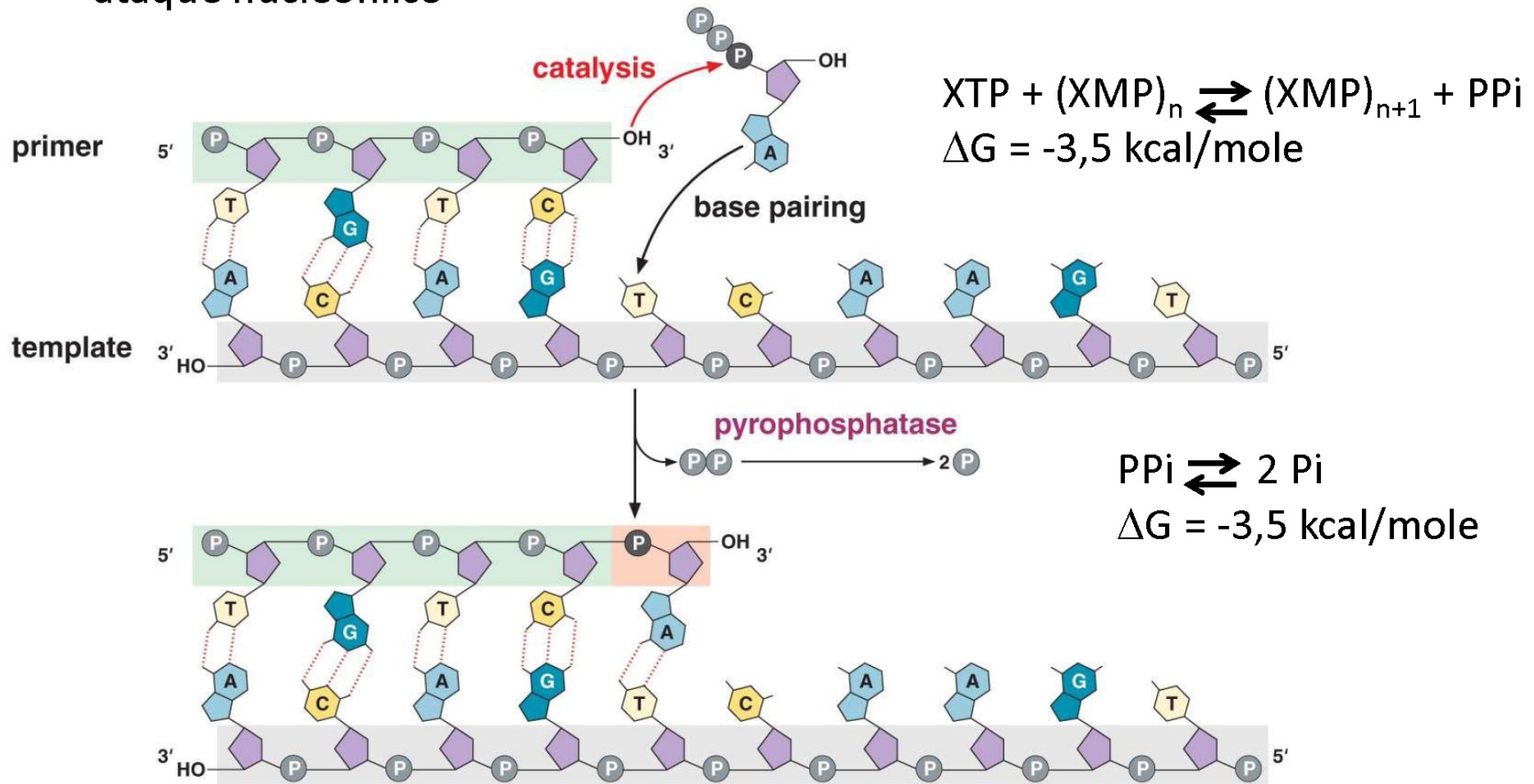
A química da replicação - substratos



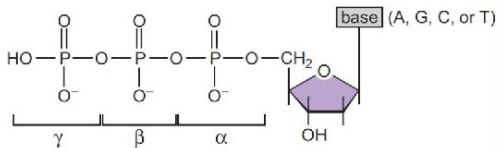
- *Primer “in vivo” é uma molécula de RNA*
- *Formação de polímeros biológicos sempre ocorre pela extensão de uma extremidade*
- *Pareamento de base com molde é que seleciona nucleotídeo a ser incorporado*

A química da replicação - a reação e sua energética

“ataque nucleofílico”

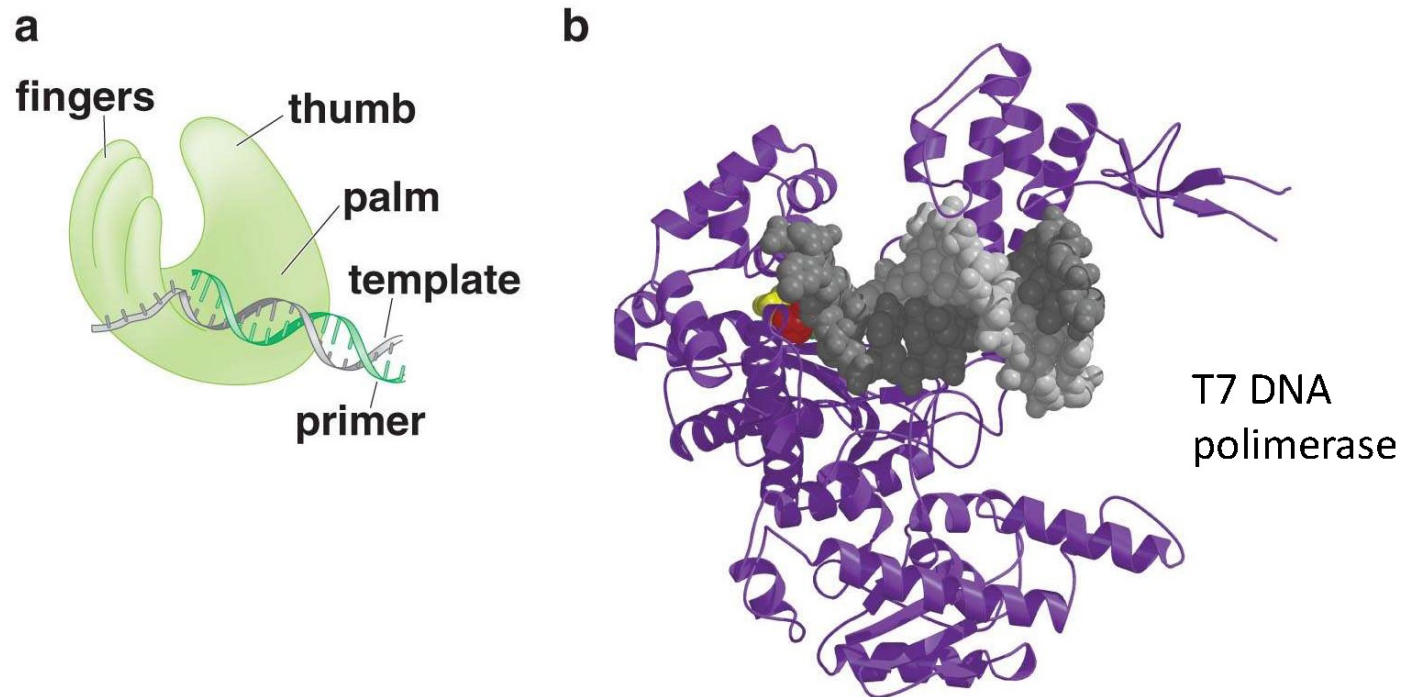


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.



Hidrólise do produto pirofosfato (PPI) torna reação irreversível

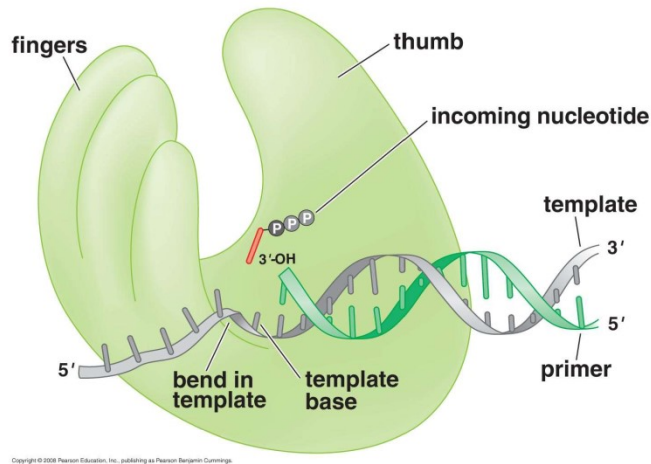
DNA polimerases: máquinas de copiar o DNA



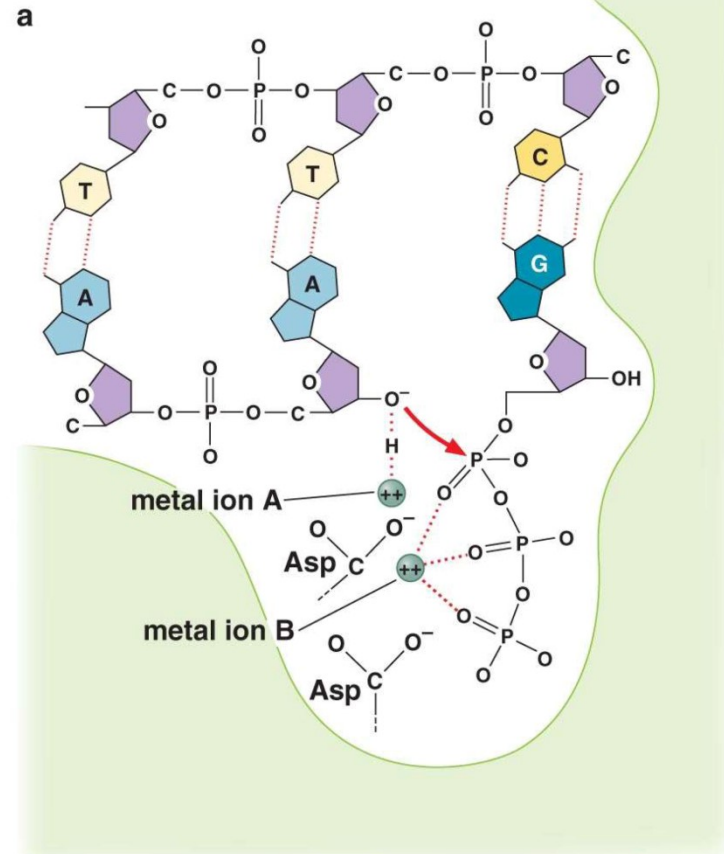
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

1. DNA polimerases dependentes de DNA
2. Requer um *primer* (iniciador) anelado a um DNA molde fita simples
3. Sentido da síntese sempre é 5' → 3'
4. Além de atividade de síntese, frequentemente também apresentam atividade exonucleásica
5. É o “coração” catalítico da maquinaria de replicação, mas não atua sozinha. Precisa da ajuda de outras proteínas com atividades diferentes

A reação no sítio ativo da polimerase

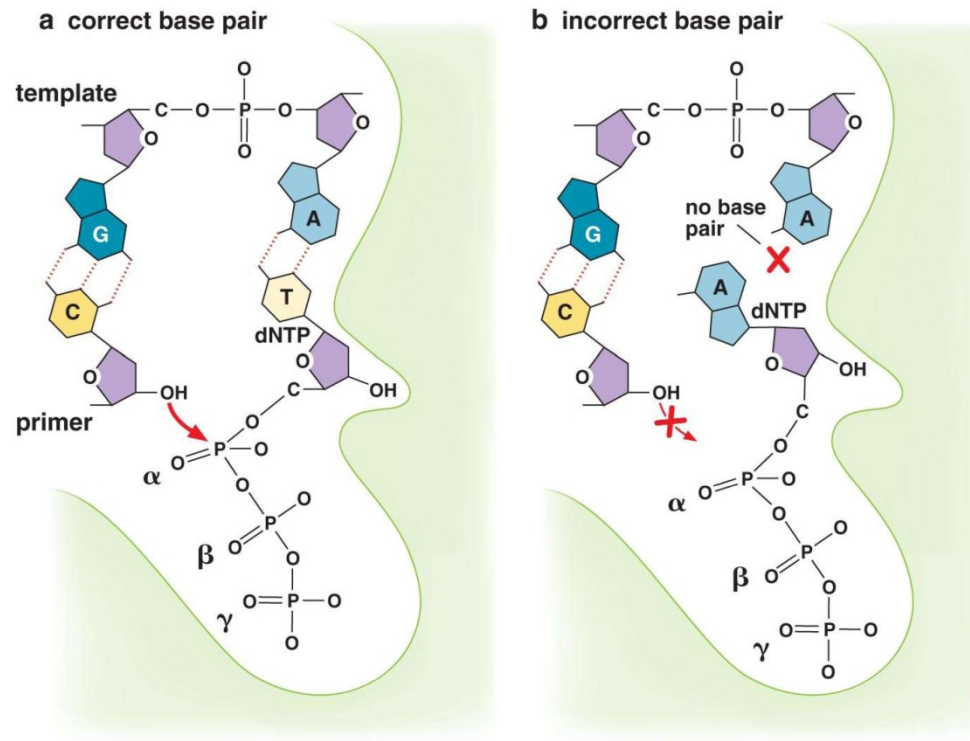


- Palm contém sítio catalítico e liga primer:template
- Fingers se fecham quando pareamento do dNTP é correto e estimulam catálise
- Fingers também dobram o template de maneira a que apenas a próxima base não pareada fique exposta no sítio ativo



- Catálise depende da presença de dois átomos de metal no sítio ativo, em geral Mg^{2+}

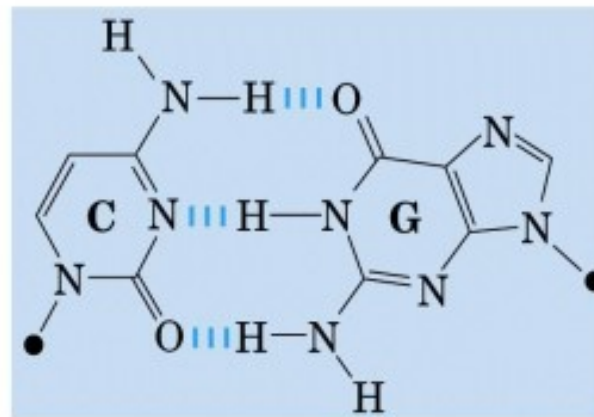
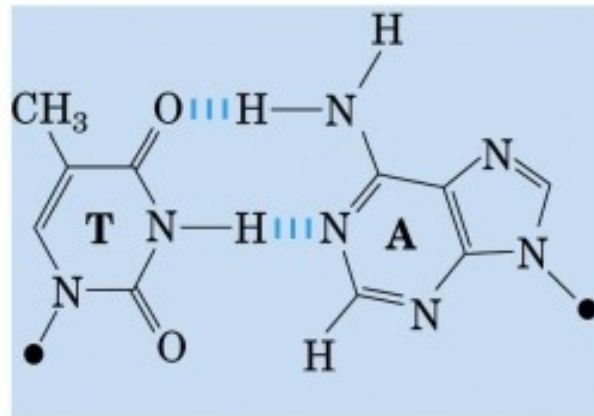
Como a polimerase sabe o nucleotídeo certo ?



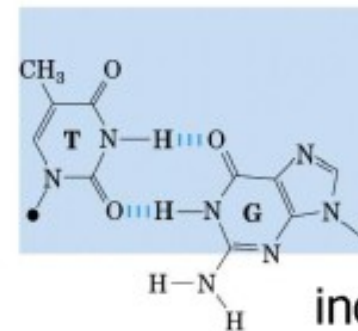
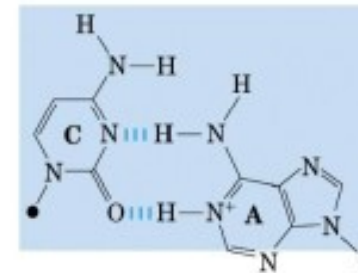
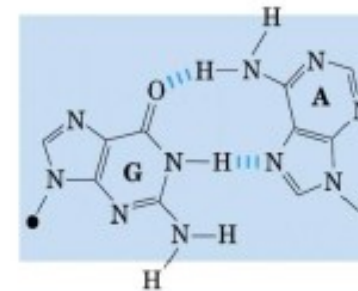
Por que a DNA polimerase não incorpora ribonucleotídeos?

- Diferentes dNTPs entram no sítio ativo aleatoriamente
- Pareamente errôneo distorce o sítio
- Orientação não ótima faz com que nucleotídeos errados sejam muito piores substratos – reação 10.000 vezes mais lenta – *discriminação cinética*
- Taxa de erro = 10^{-5} - um nucleotídeo errado a cada 100.000 adicionados

Mesmo depois de formados, pares de bases incorretos ainda podem ser percebidos pela DNA polimerase



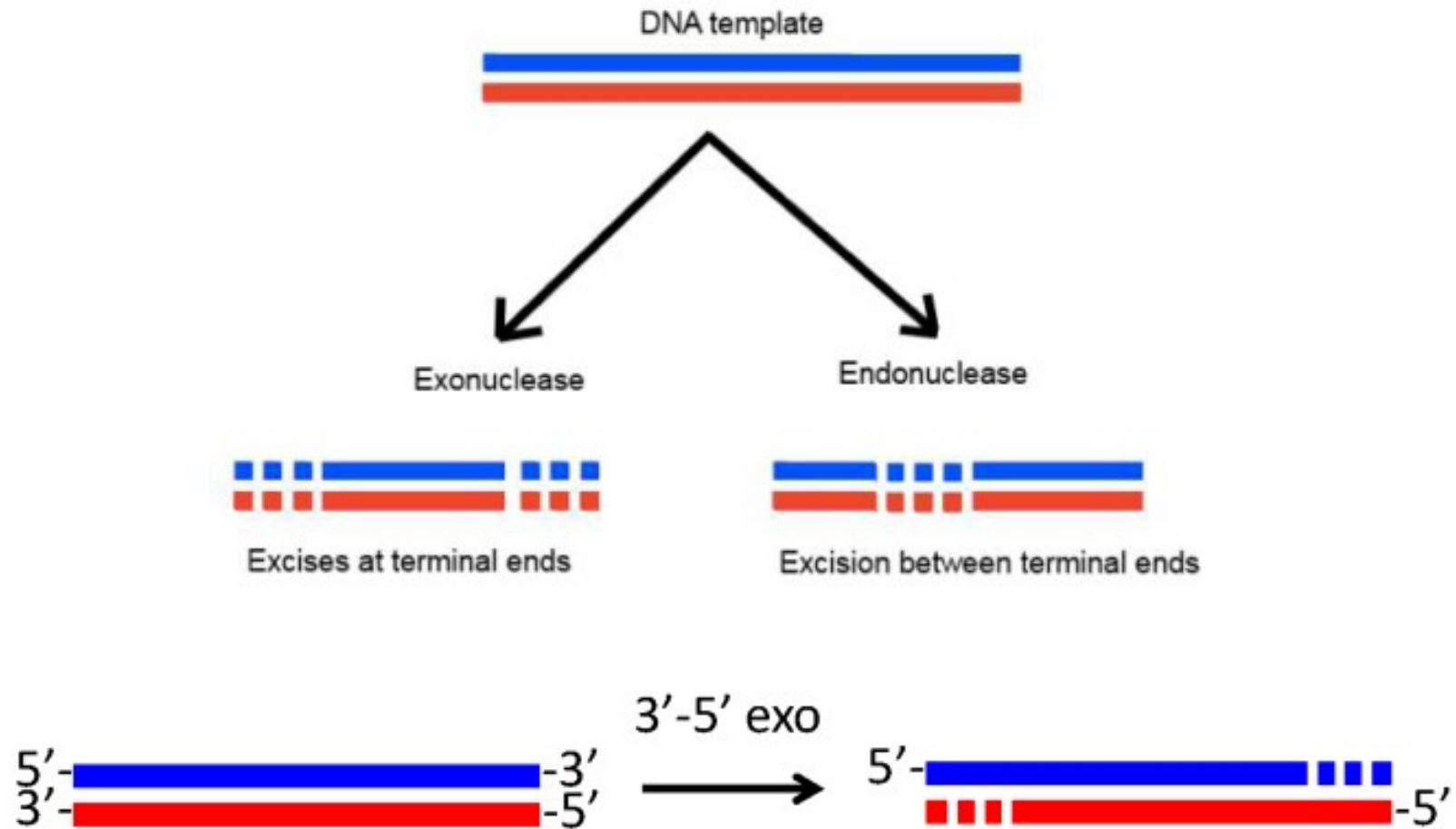
correto



incorreto

distorcem sítio ativo e dificultam continuação da síntese

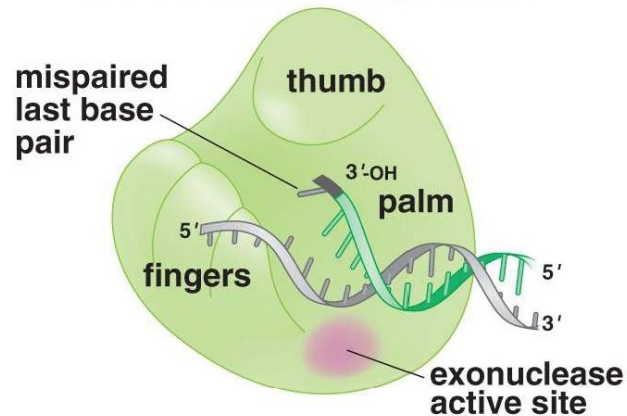
Polimerases em geral também possuem atividade 3'-5' exonuclease



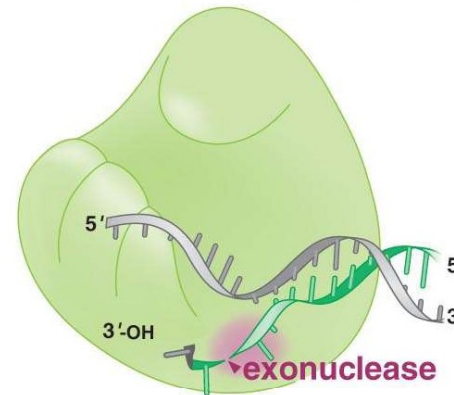
Degrada DNA no sentido oposto ao sentido da síntese

Atividade revisora (*proofreading*) da polimerase remove nucleotídeos mal pareados (mismatch)

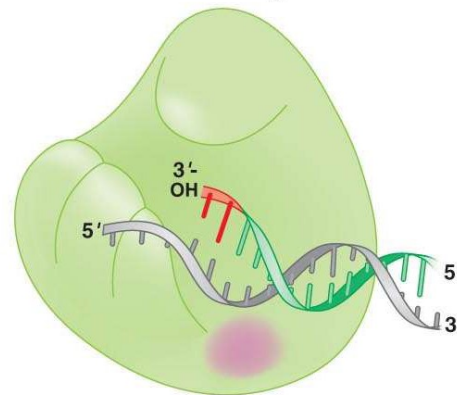
a slow or no DNA synthesis



b removal of mismatched nucleotide(s)



c resume DNA synthesis



- Exonuclease 3' - 5'
- Fica em sítio diferente da polimerase
- Responsável por reduzir a taxa de erro para 10^{-7} (remove 99 de cada 100 erros feitos no momento da polimerização)

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

<https://www.youtube.com/watch?v=6O0qD6KCOVE>

Cada organismo possui múltiplas DNA polimerases

*Especialização funcional!
Em geral uma ou poucas isoformas especializadas em replicar o genoma e outras envolvidas em reparar ou contornar danos ao DNA*

TABLE 8-2 Activities and Functions of DNA Polymerases

Prokaryotic (<i>E. coli</i>)	Number of Subunits	Function
Pol I	1	RNA primer removal, DNA repair
Pol II (Din A)	1	DNA repair
Pol III core	3	Chromosome replication
Pol III holoenzyme	9	Chromosome replication
Pol IV (Din B)	1	DNA repair, translesion synthesis (TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' ₂ C)	3	TLS

Eukaryotic	Number of Subunits	Function
Pol α	4	Primer synthesis during DNA replication
Pol β	1	Base excision repair
Pol γ	3	Mitochondrial DNA replication and repair
Pol δ	2-3	Lagging-strand DNA synthesis; nucleotide and base excision repair
Pol ϵ	4	Leading-strand DNA synthesis; nucleotide and base excision repair
Pol θ	1	DNA repair of cross-links
Pol ζ	1	TLS
Pol λ	1	Meiosis-associated DNA repair
Pol μ	1	Somatic hypermutation
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	Relatively accurate TLS past <i>cis-syn</i> cyclobutane dimers
Pol ι	1	TLS, somatic hypermutation
Rev1	1	TLS

Polimerase replicativa

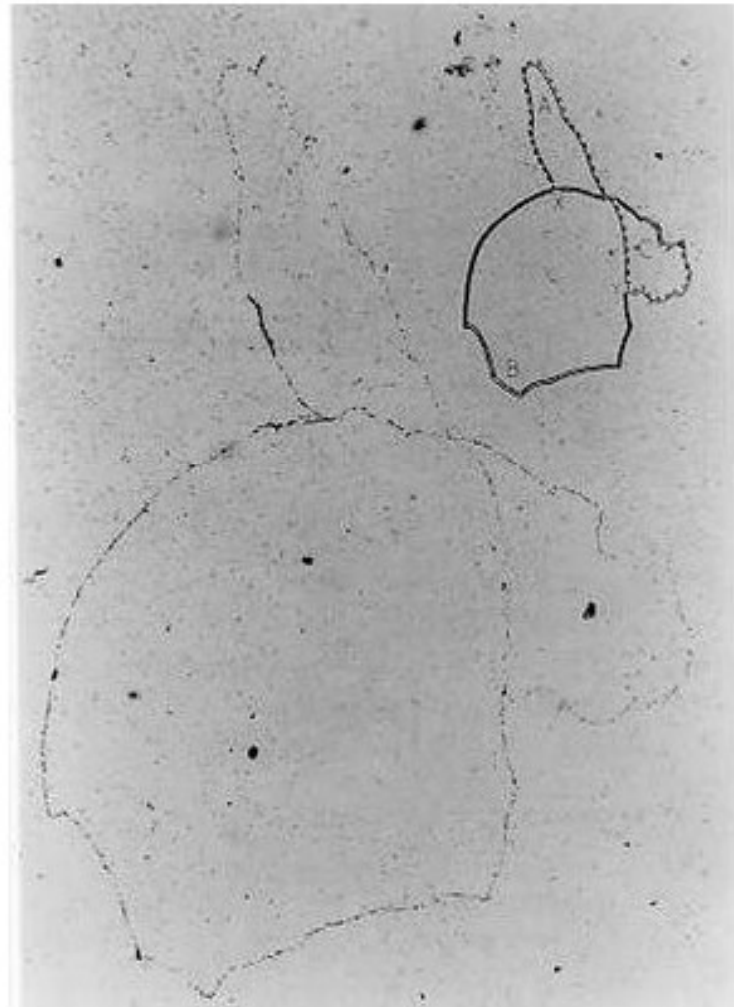
Polimerases replicativas

- Como a dupla-fita de DNA é replicada?

Questões topológicas e como elas foram resolvidas...

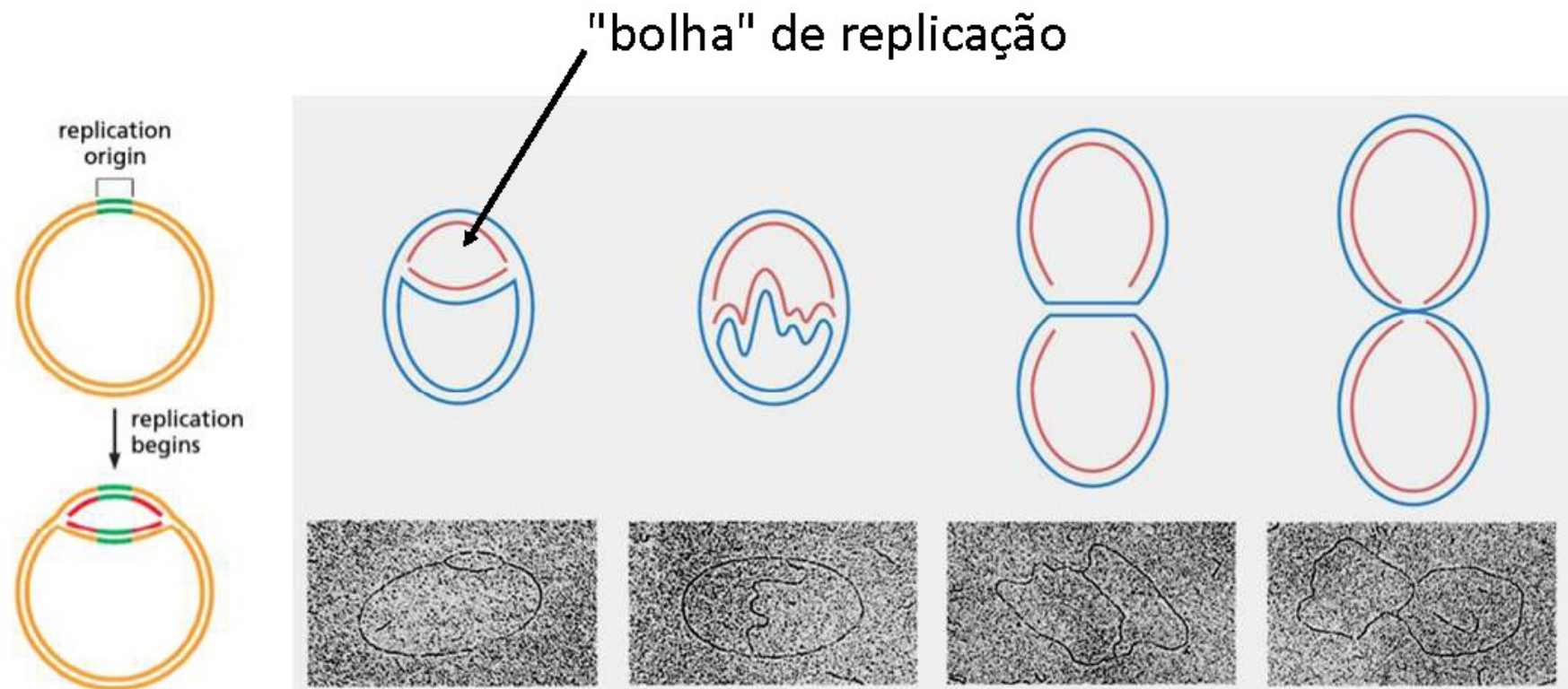
Visualização da replicação de uma molécula de DNA circular usando a técnica de auto-radiografia

*Experimento de
"autoradiografia":
bactéria
alimentada com
precursor de DNA
radioativo (^3H -
Timidina), DNA
extraído e
colocado num
substrato que
contém um
emulsão
fotográfica
sensível à
radioatividade*



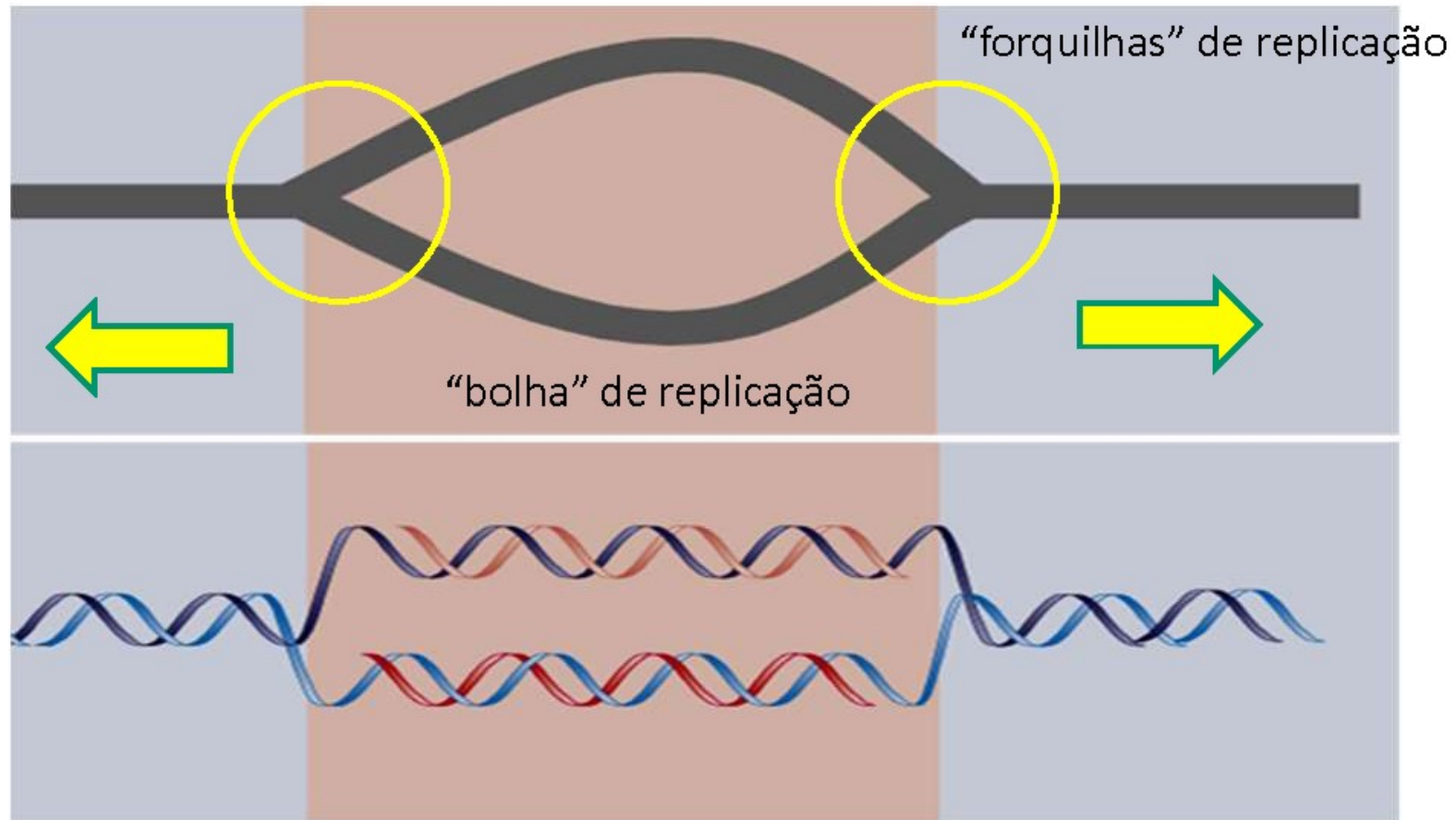
John Cairns, 1963

Replicação se inicia em ponto definido da molécula de DNA ("origem") e caminha em ambas as direções



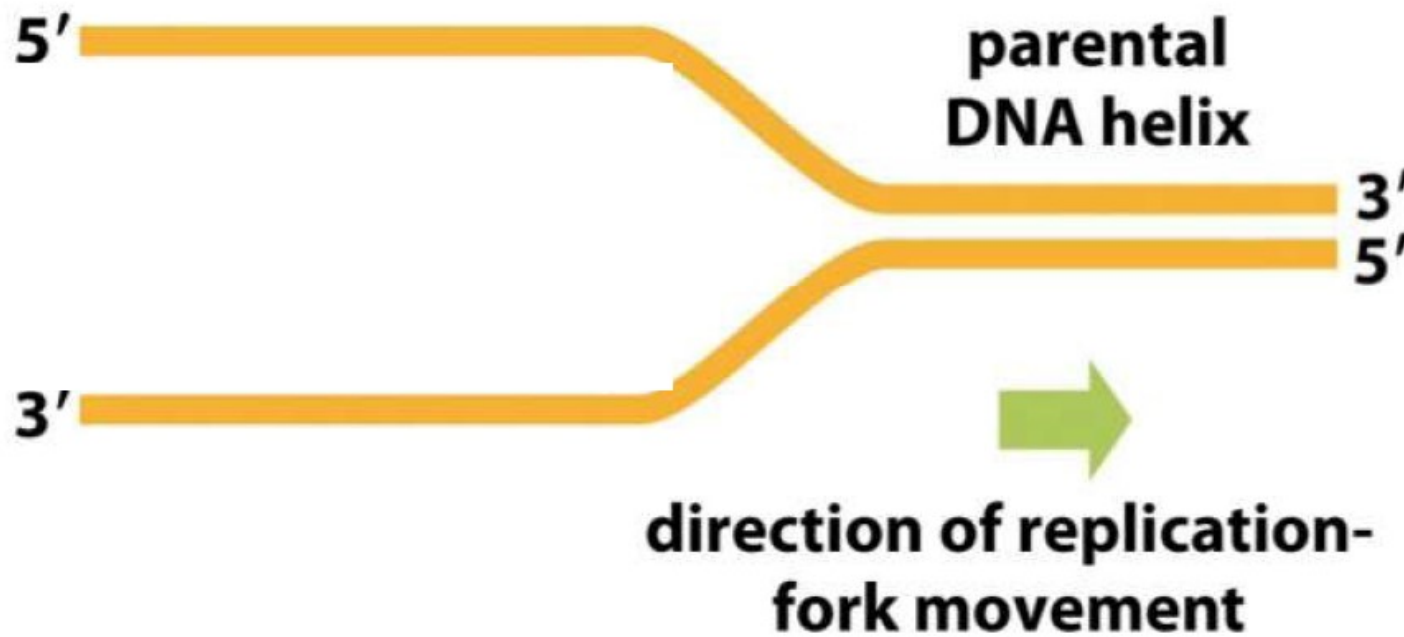
Replicação do DNA é bidirecional e ocorre simultaneamente nas duas fitas do molde

Uma visão mais detalhada de uma "bolha de replicação"



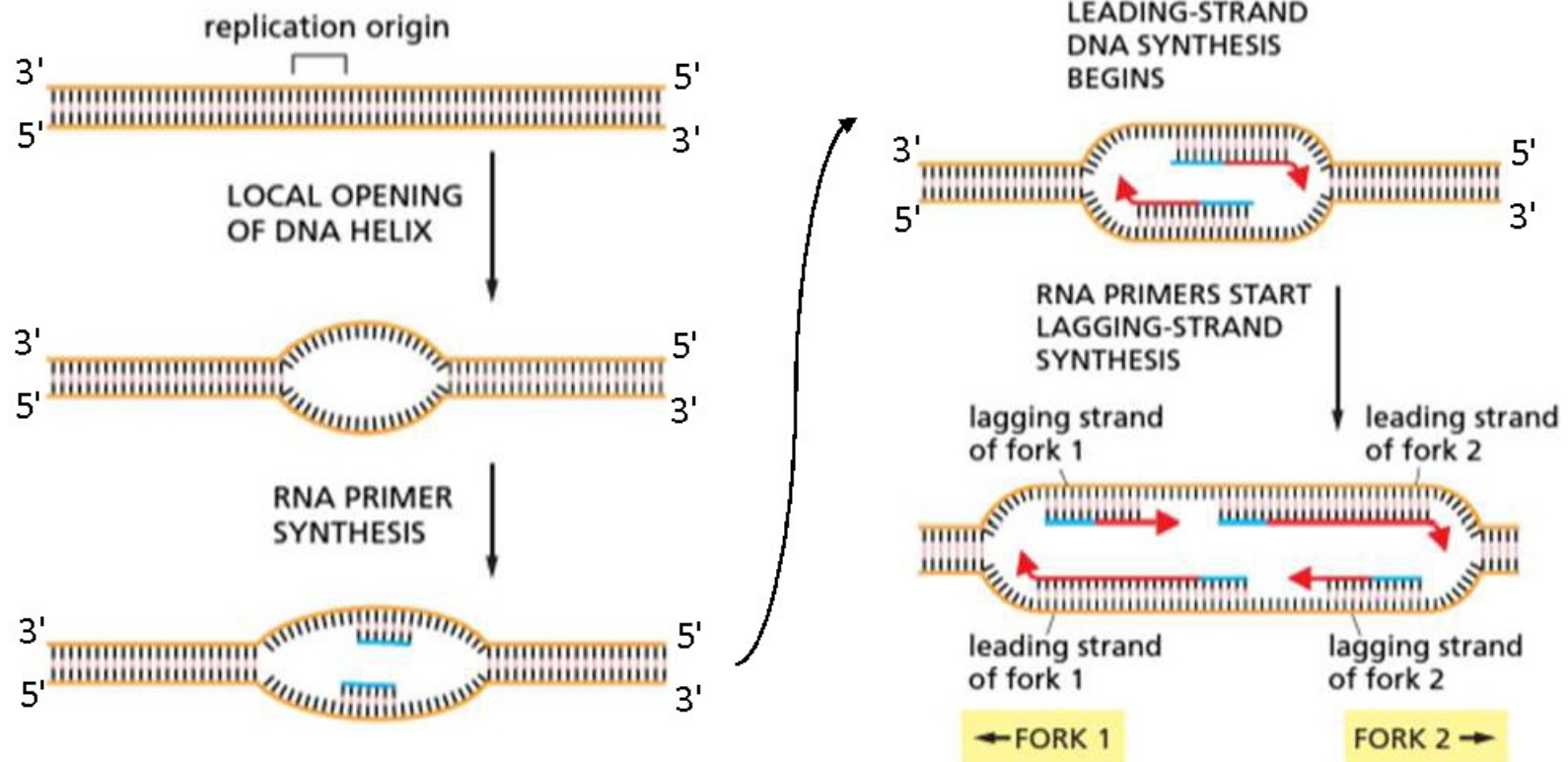
Em uma bolha há duas forquilhas de replicação, uma se movendo para a direita, outra para a esquerda

Como replicar as duas fitas simultaneamente?

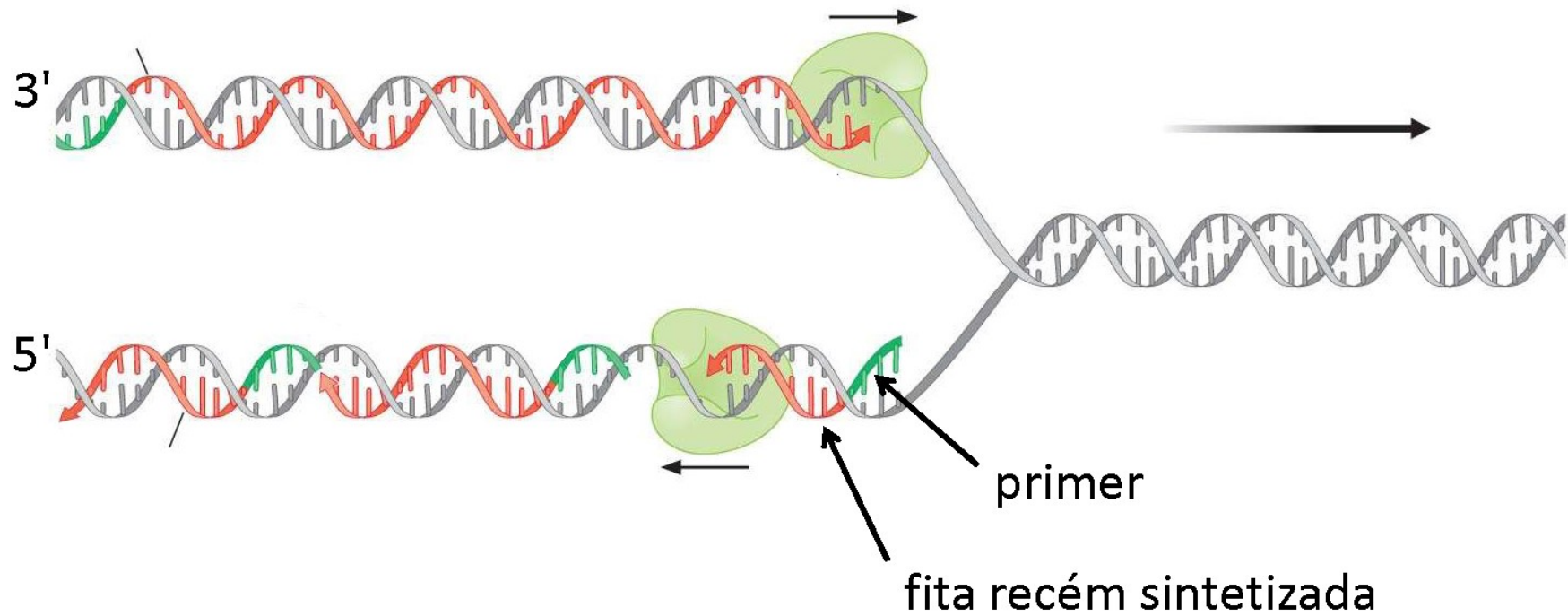


Qual o problema desta situação?

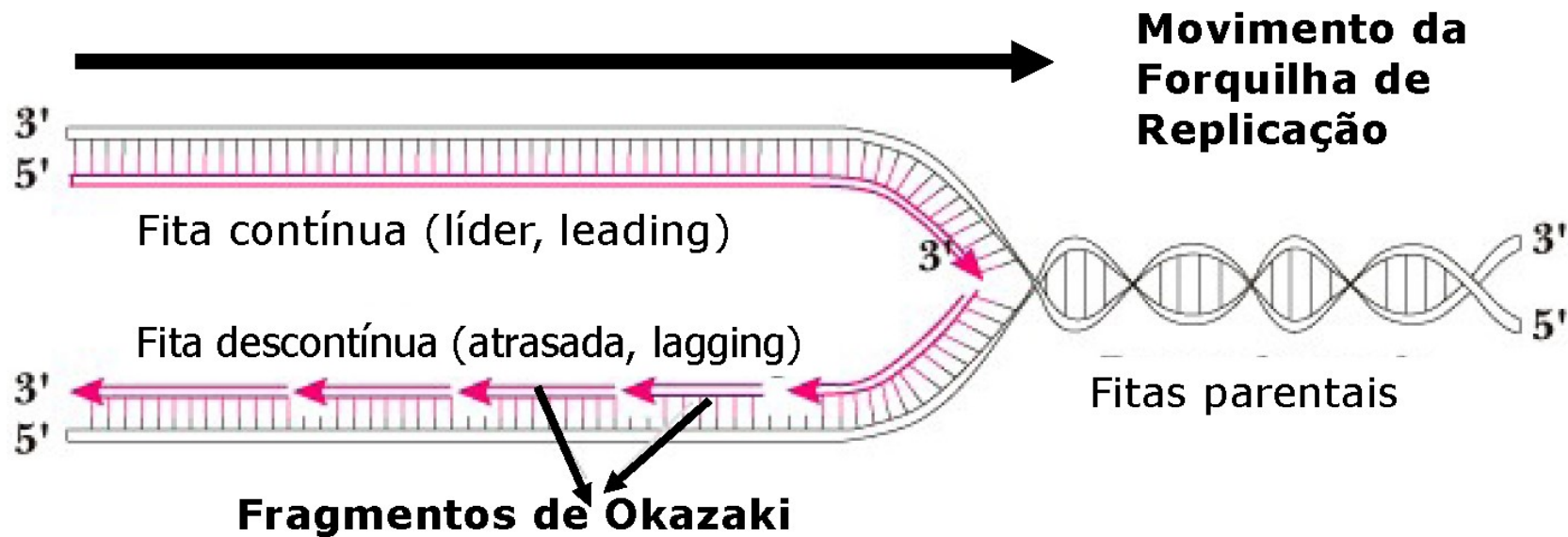
Como replicar as duas fitas simultaneamente?



Olhando da perspectiva da DNA polimerase...



A replicação de uma das fitas é descontínua!



Os pedaços que formam a fita descontínua foram batizados de Fragmentos de Okazaki, em homenagem ao cientista que os descobriu:

~1000-2000 nt em bactérias

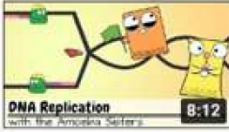





~100-200 nt em eucariotos



DNA Replication: The Process Simplified

2.485 29 NÃO GOSTEI COMPARTILHAR DOWNLOAD SALVAR ...

Todos Replicação do ADN Diagrama

-  DNA Replication (Amoeba Sisters) 3,7 mi de visualizaçõ
8:12
-  mitosis 3d anima
mitosisicell divisi
Creative Learning 6,1 mi de visualizaçõ
4:34
-  my first vlog
Technical Xyz 35 visualizações · hi
Novo 0:15
-  DNA DAMAGE AND REPAIR
TED-Ed 2,1 mi de visualizaçõ
4:59
-  Anderson .Paak & Nationals: NPR M
NPR Music 91 mi de visualizaçõ
15:38
-  CANTO DE
Hamilton de Holanda - Canto

<https://www.youtube.com/watch?v=9EwNHIMfKR8>

O padrão de fita contínua/descontínua se inverte na outra
forquilha de uma bolha de replicação

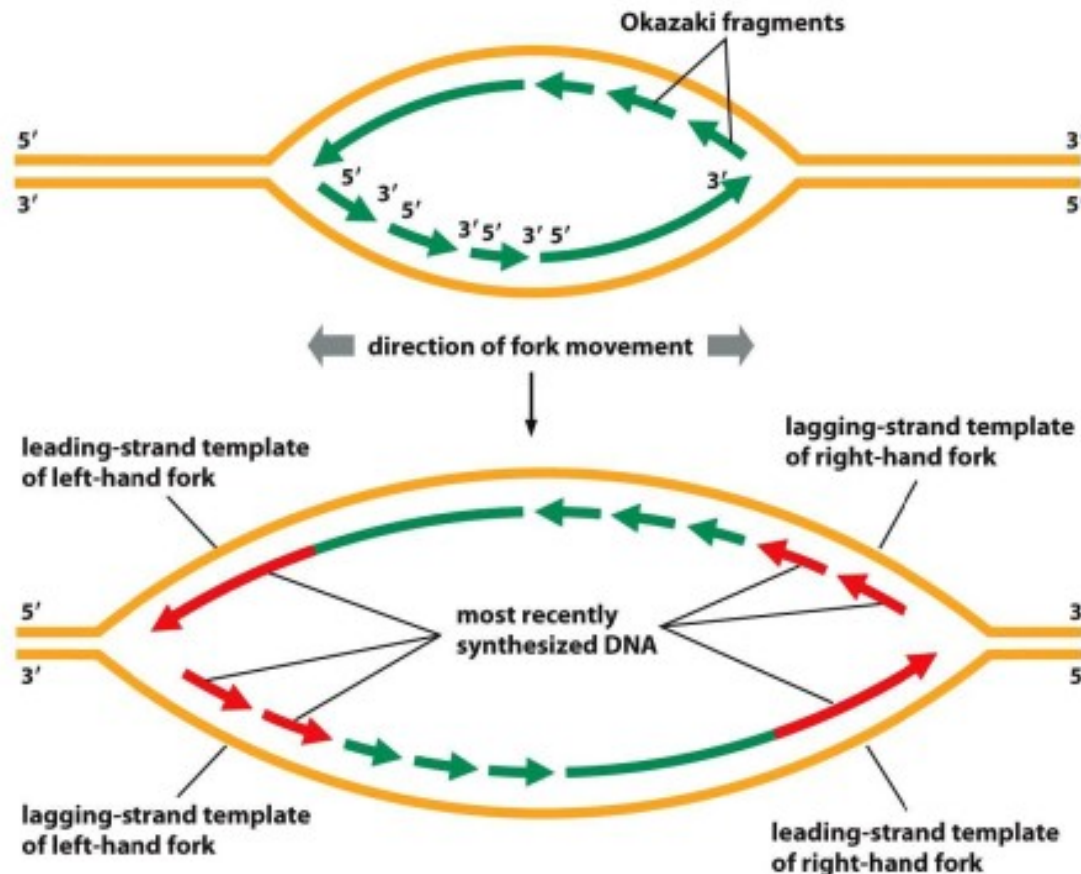
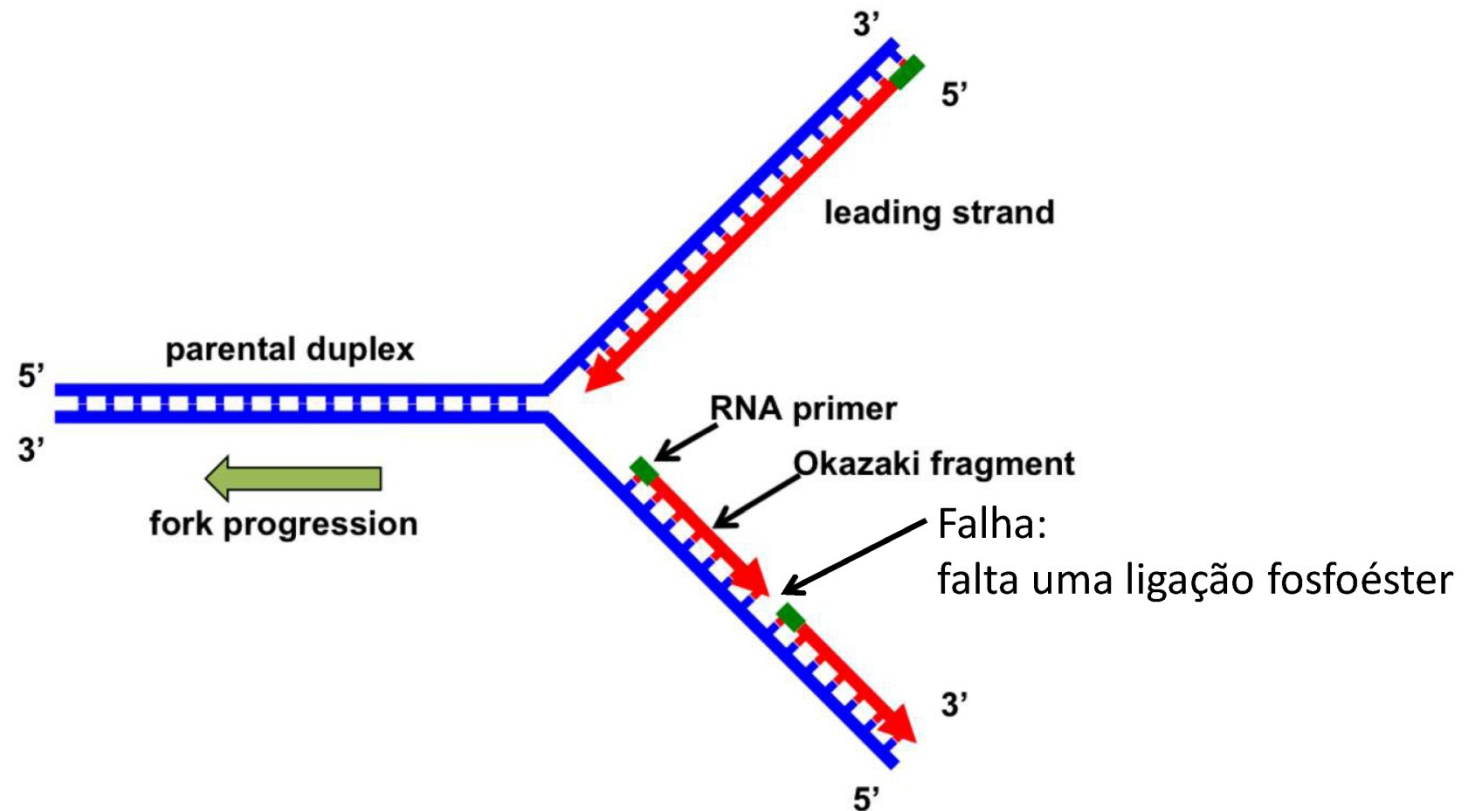


Figure 6-12 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

2 forquilhas de replicação simultâneas !

A fita descontínua ou atrasada não está pronta...



Contém pedaços de RNA (primers)

Fragmentos não estão ligados covalentemente – há falha ou "nick"

Precisa sofrer processamento para gerar fita completa e sem RNA

Etapas do processamento dos fragmentos de Okazaki

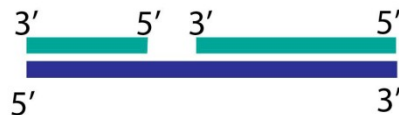
problem: there is RNA in the DNA



solution: 5'->3' exonuclease chews primers off



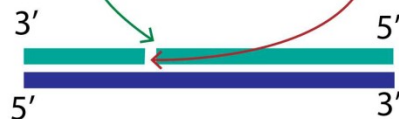
problem: there are gaps in the DNA



solution: DNA Pol fills in the gaps



problem: 3' OH meets 5' monophosphate



solution: DNA ligase comes to the rescue

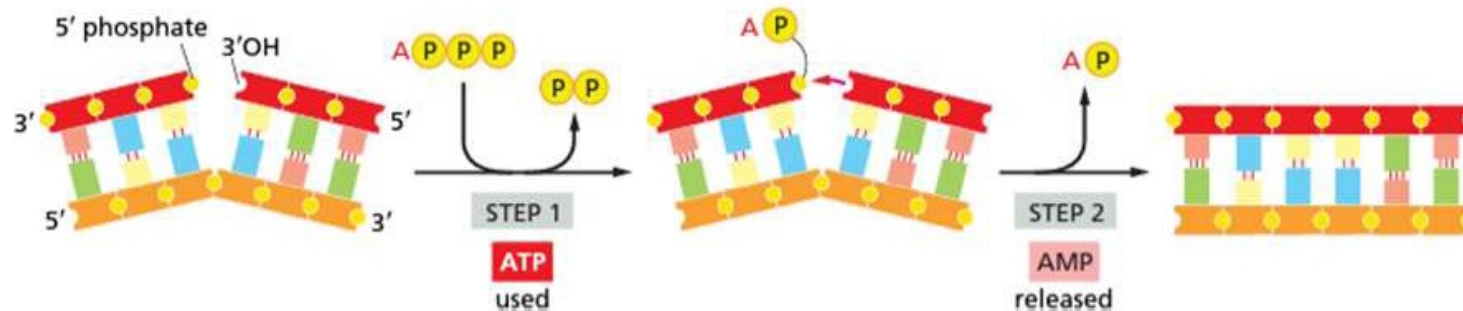


1) Remoção do primer de RNA, geralmente por uma RNase com atividade 5'-3' exo

2) Preenchimento do espaço deixado por uma DNA polimerase, usando o fragmento da direita como primer. DNA polimerase não replicativa (Poll em E. coli)

3) Fechamento da falha (formação de uma ligação fosfoéster) pela DNA ligase

Visão geral da reação catalisada pela DNA ligase

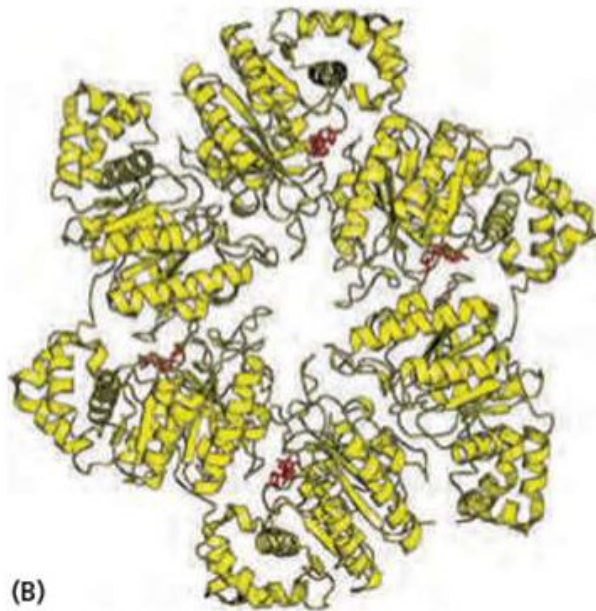
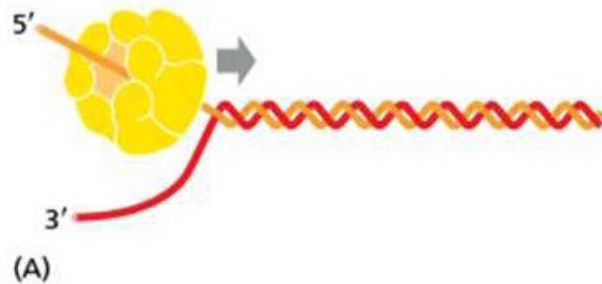


Utiliza ATP ou NAD para adenilar e, assim, ativar o grupo 5' monofosfato para que este possa reagir com o 3' OH vizinho

- Como a dupla-fita de DNA é replicada?

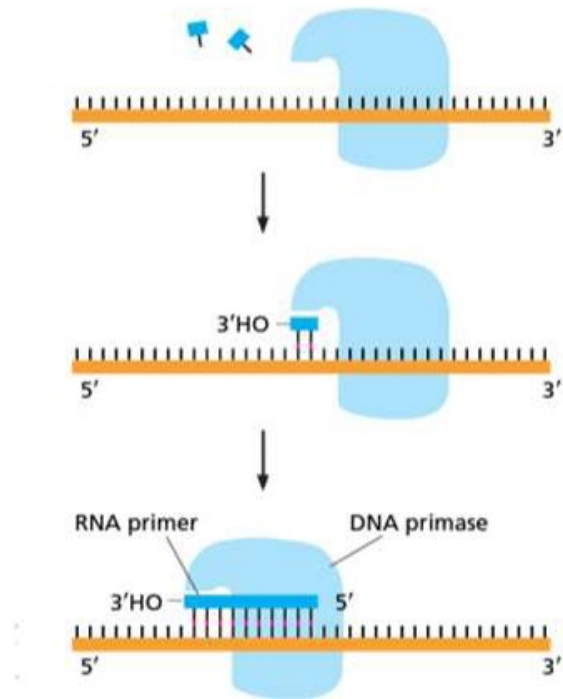
A maquinaria enzimática... A DNA polimerase não atua sozinha. Está associada a diversas outras proteínas em um complexo multi-enzimático

Helicases separam as fitas do DNA

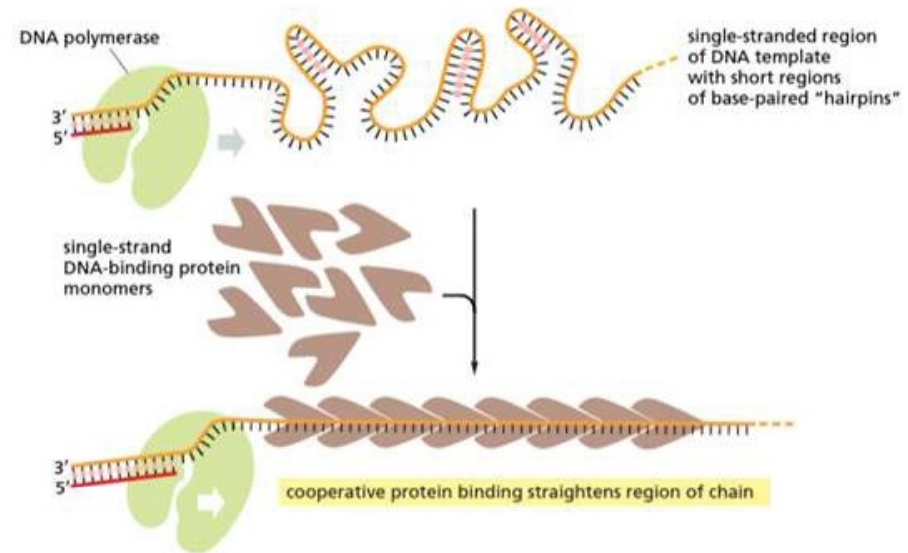


Proteína hexamérica, se associa a uma das fitas de uma dupla hélice que já foi parcialmente aberta. Utiliza hidrólise de ATP para promover a separação de fitas na medida em que a enzima caminha no sentido 5'-3' da fita a que está associada – também tem polaridade!

As atividades da Primase e SSB

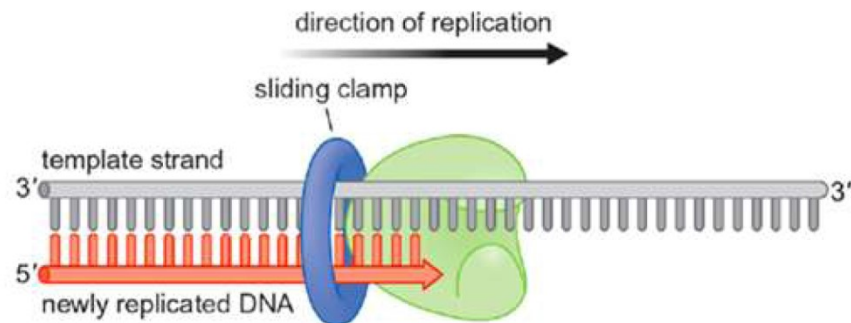


Primase é um tipo especializado de RNA polimerase encarregada de fazer os primers. Pode começar a partir de um nucleotídeo isolado (não requer primer)

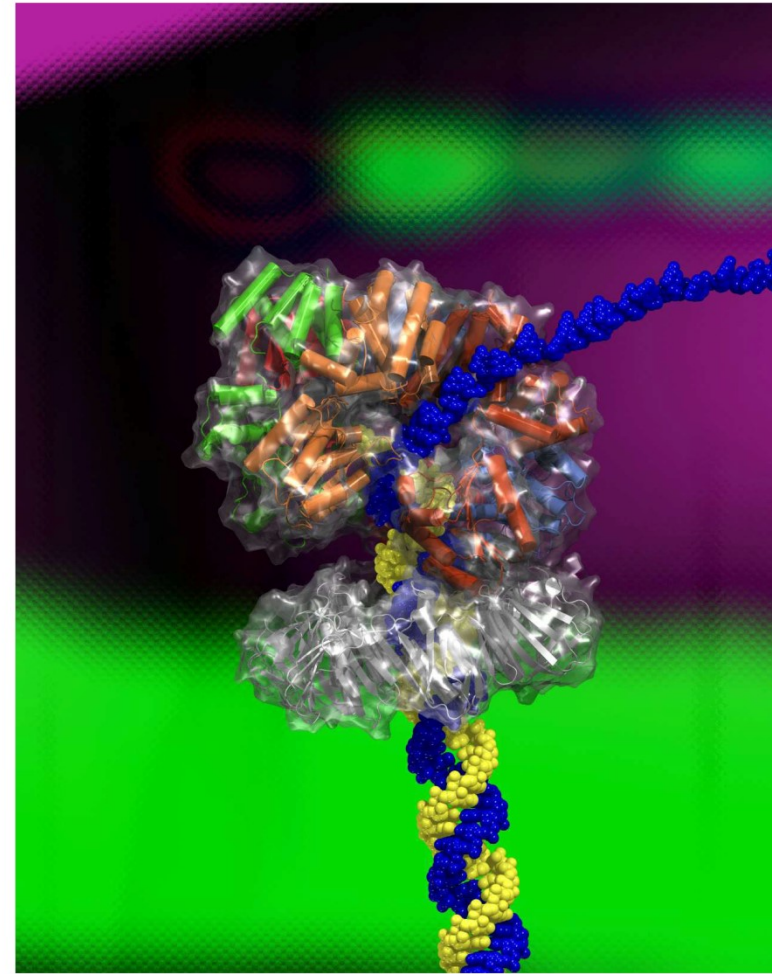


As SSB se ligam ao DNA fita simples e impedem que este forme estruturas secundárias como grampos que atrapalhariam a ação da DNA polimerase. Mantém molde "esticado" e acessível.

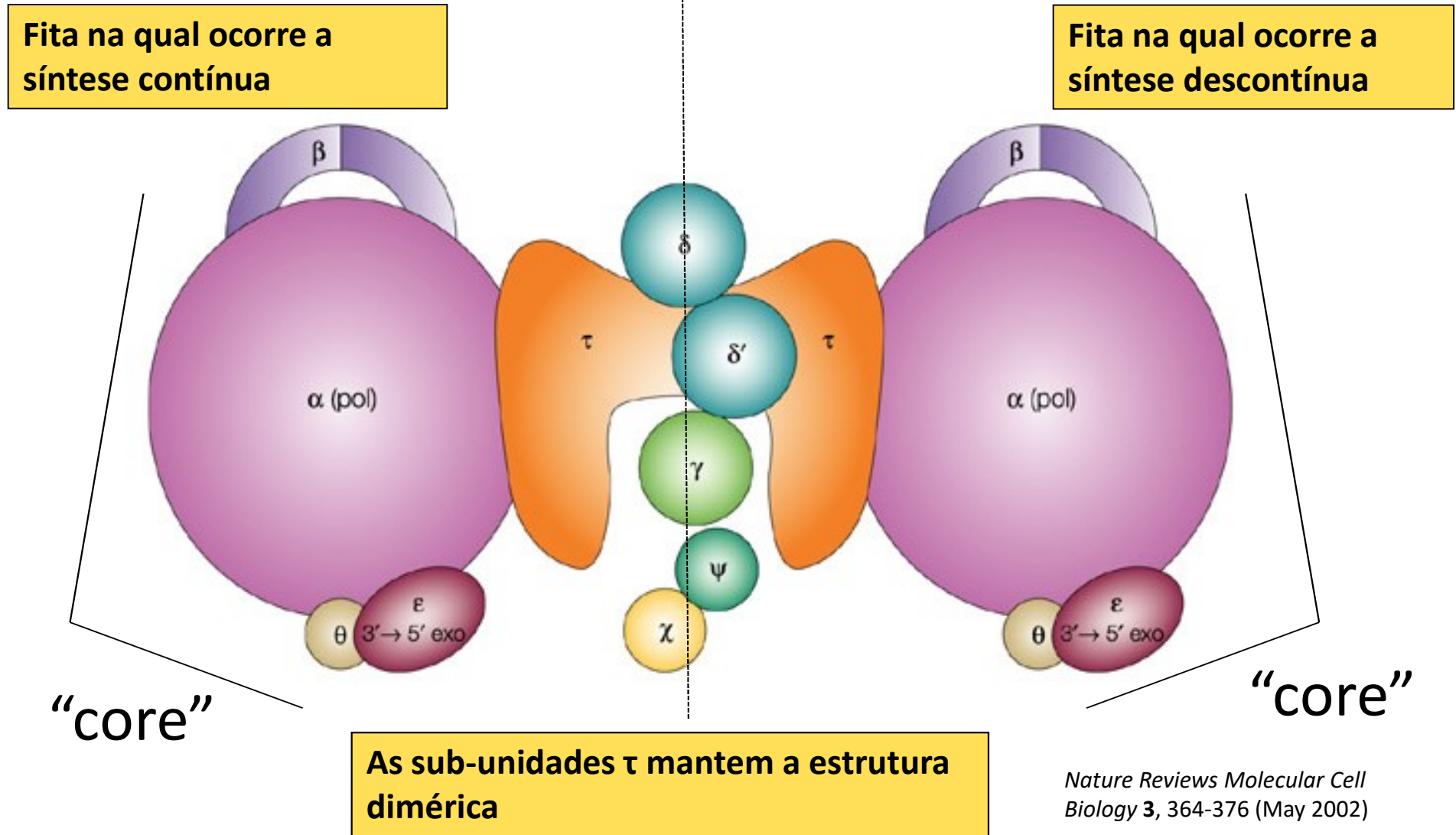
O "sliding clamp" tem como função conferir processividade à DNA polimerase



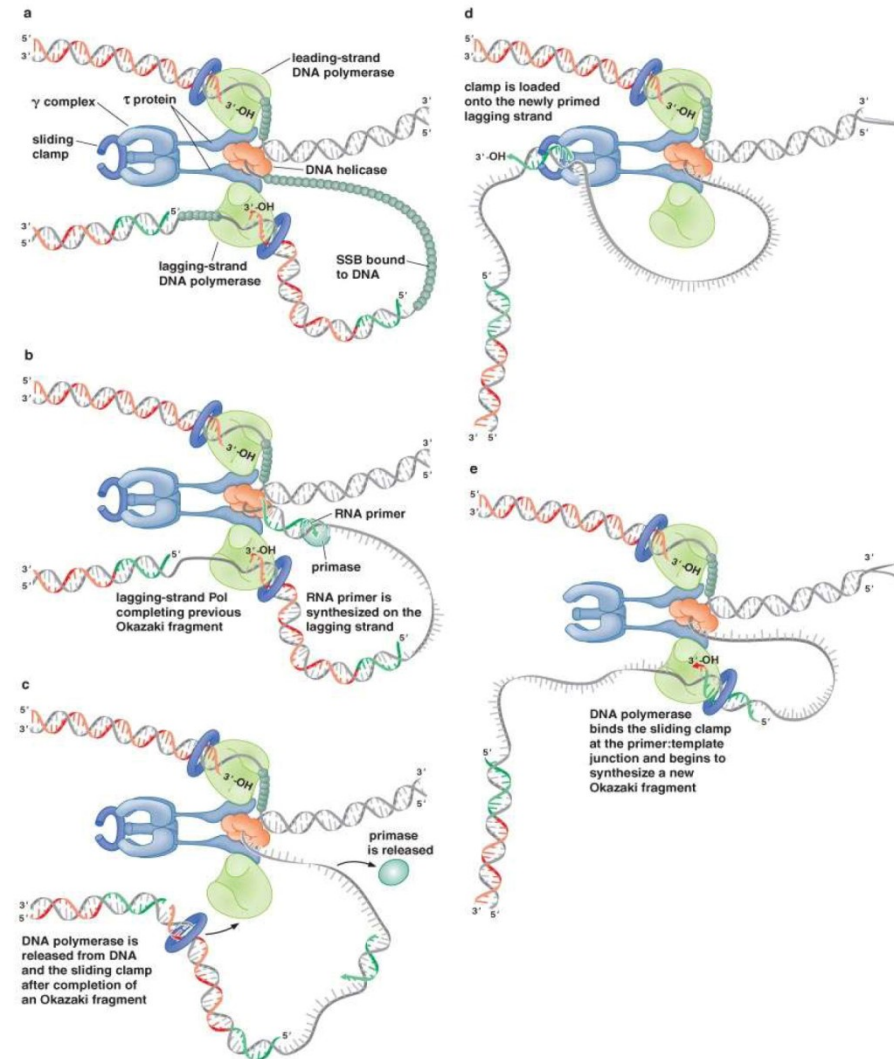
Processividade: quanto tempo a enzima fica associada ao seu molde antes que se solte espontaneamente
~500000 nt por "corrida" para a Pol III



A DNA polimerase III holoenzima é multimérica, formada por 17 cadeias polipeptídicas, com uma simetria dimérica (**Replissomo**)

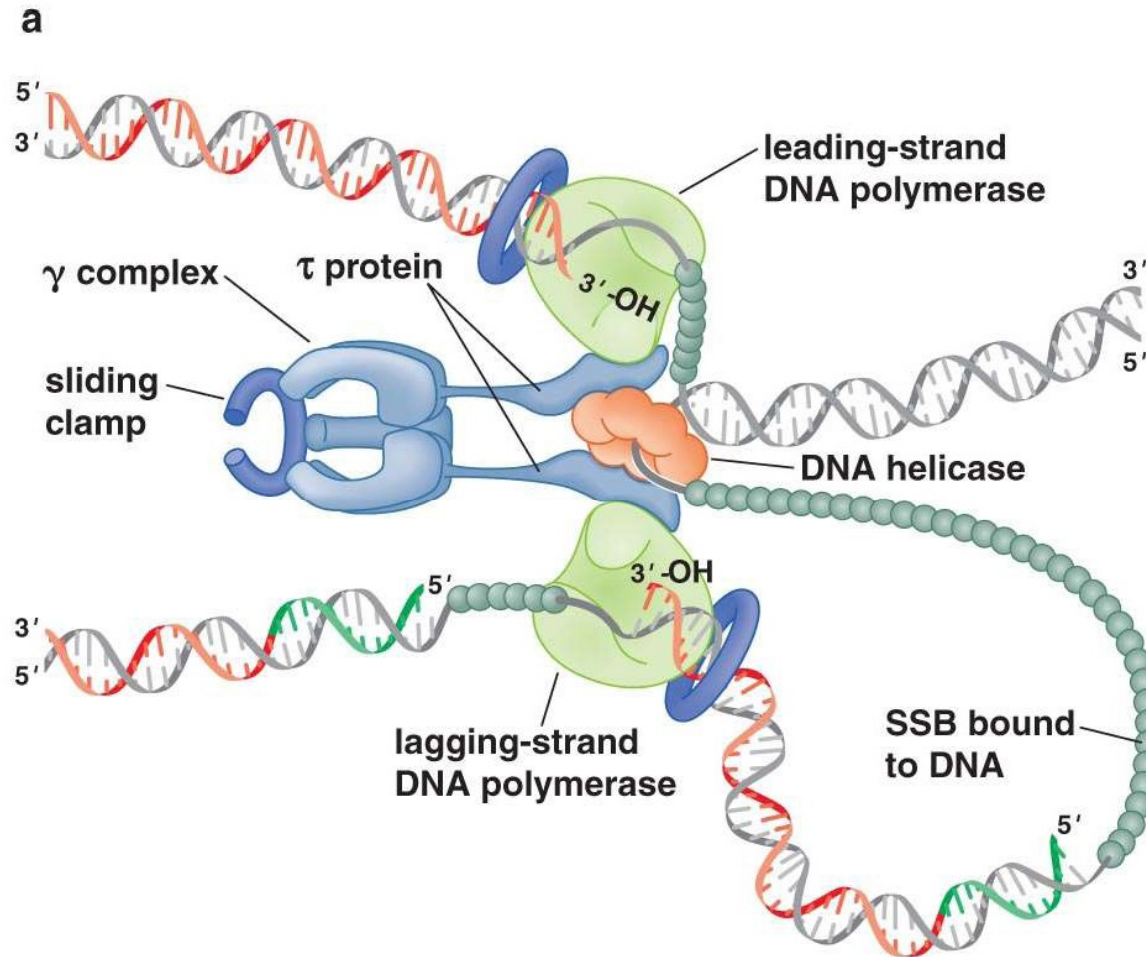


O replissomo em ação



Modelo do trombone: para explicar como a maquinaria de replicação explora a flexibilidade do DNA para sintetizar a fita contínua e descontínua na mesma direção, formando uma alça na fita descontínua

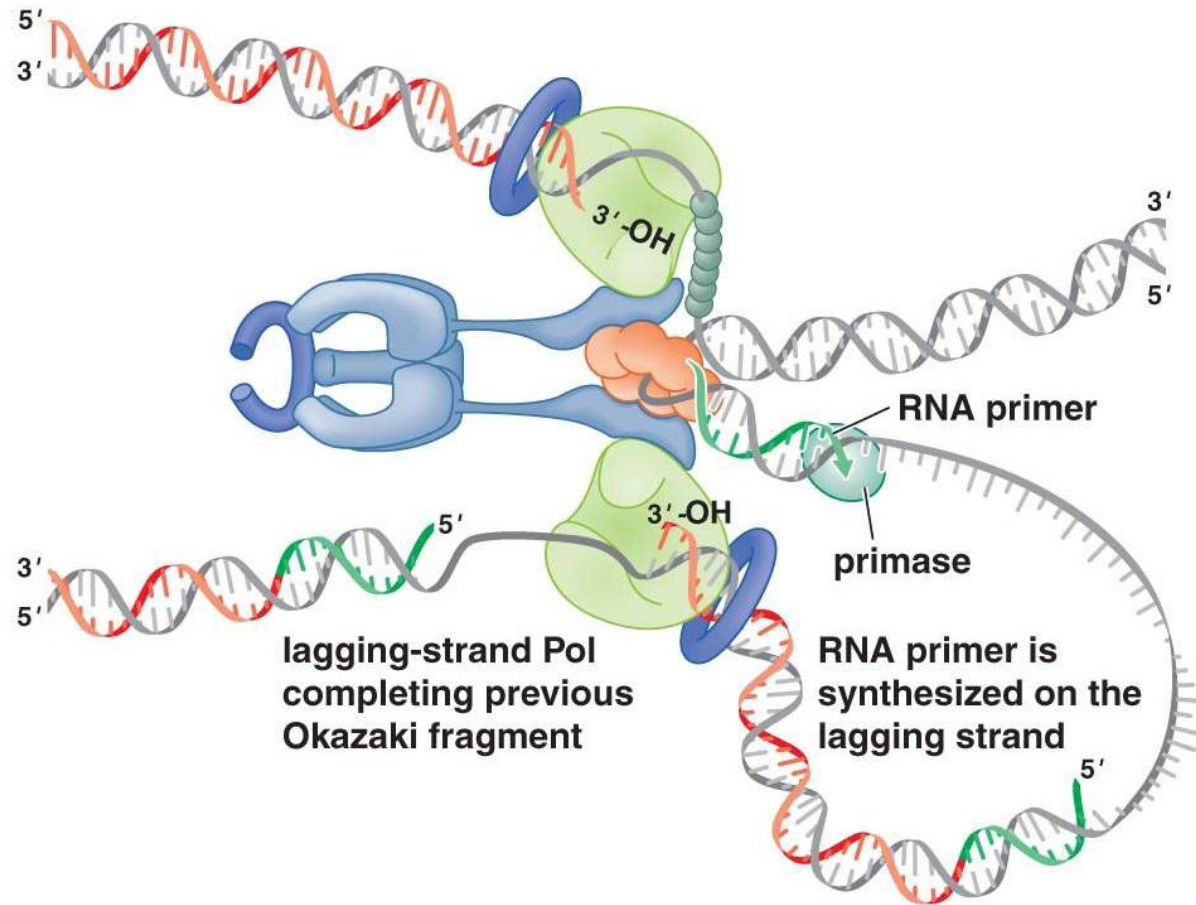
Etapas da síntese da fita descontínua (*lagging*)



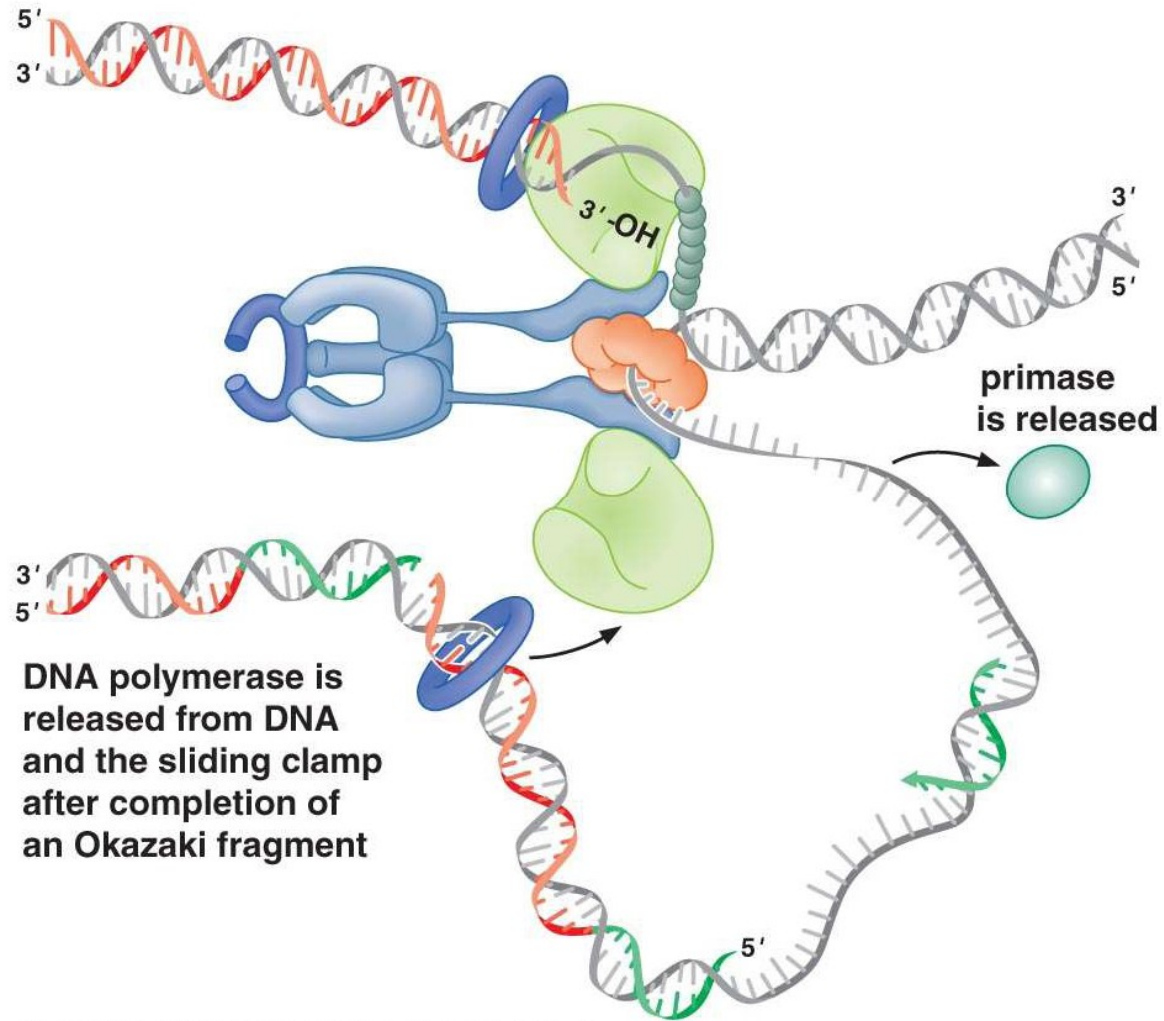
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Modelo do trombone

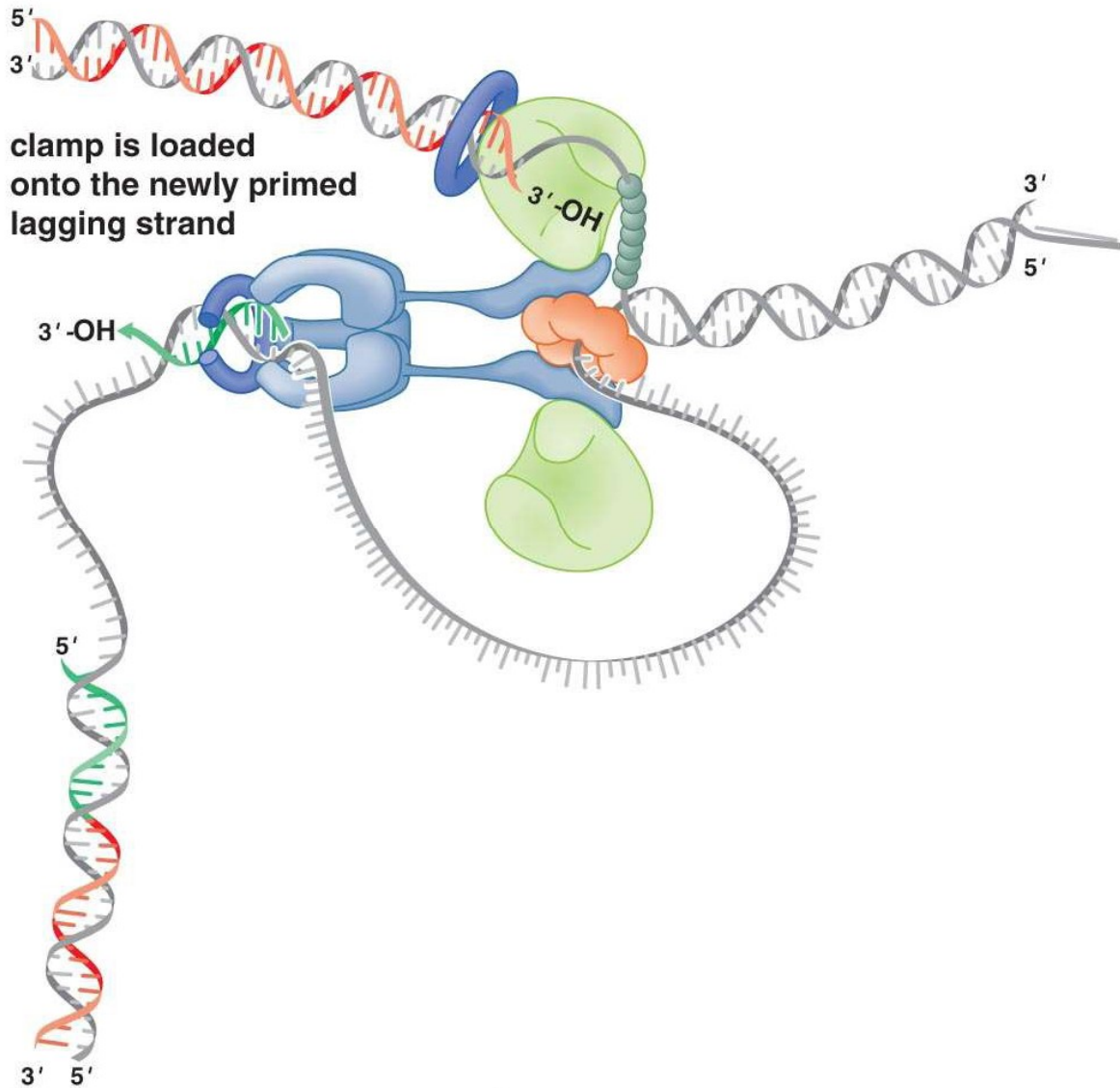
b



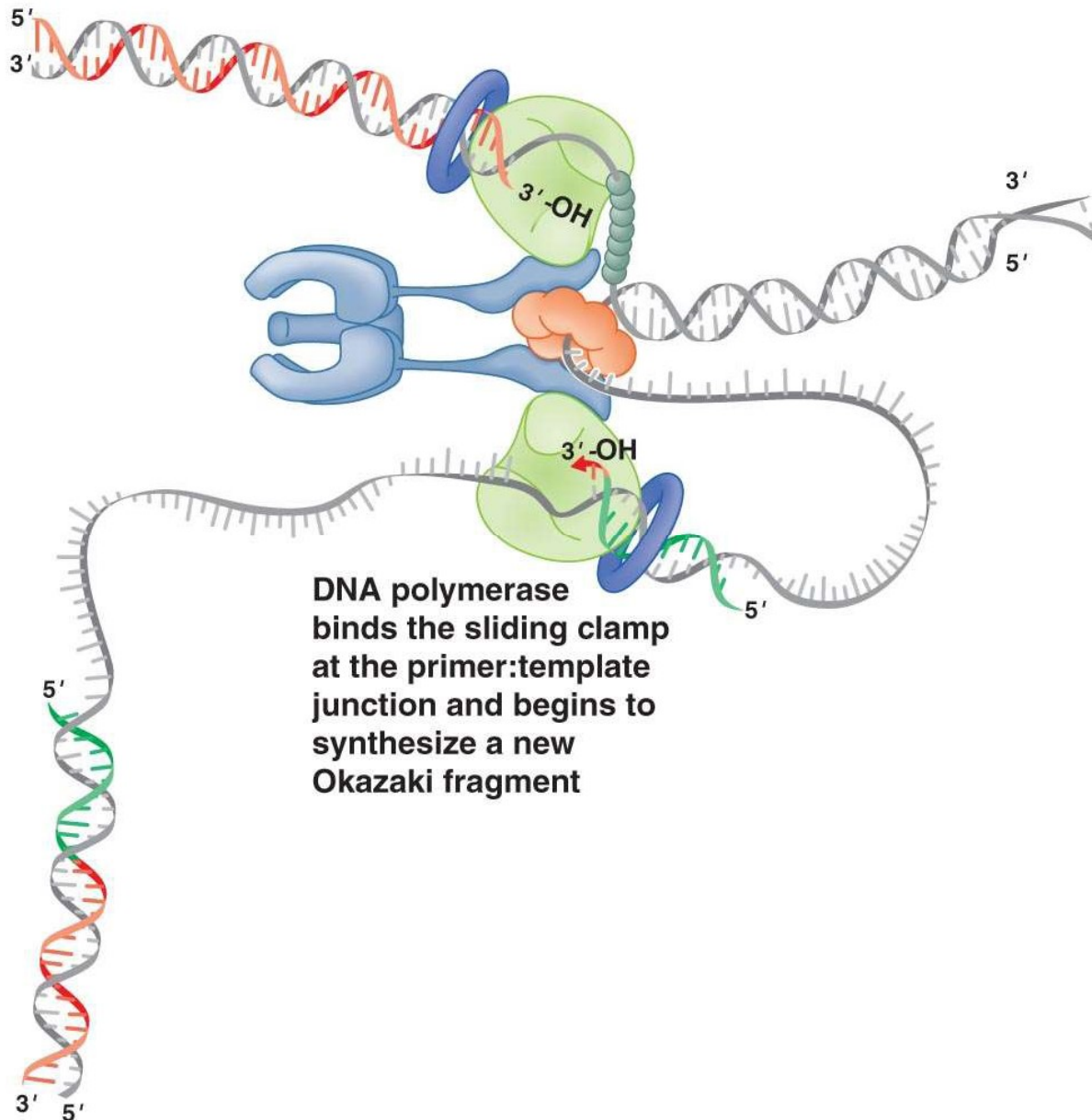
C



d



e

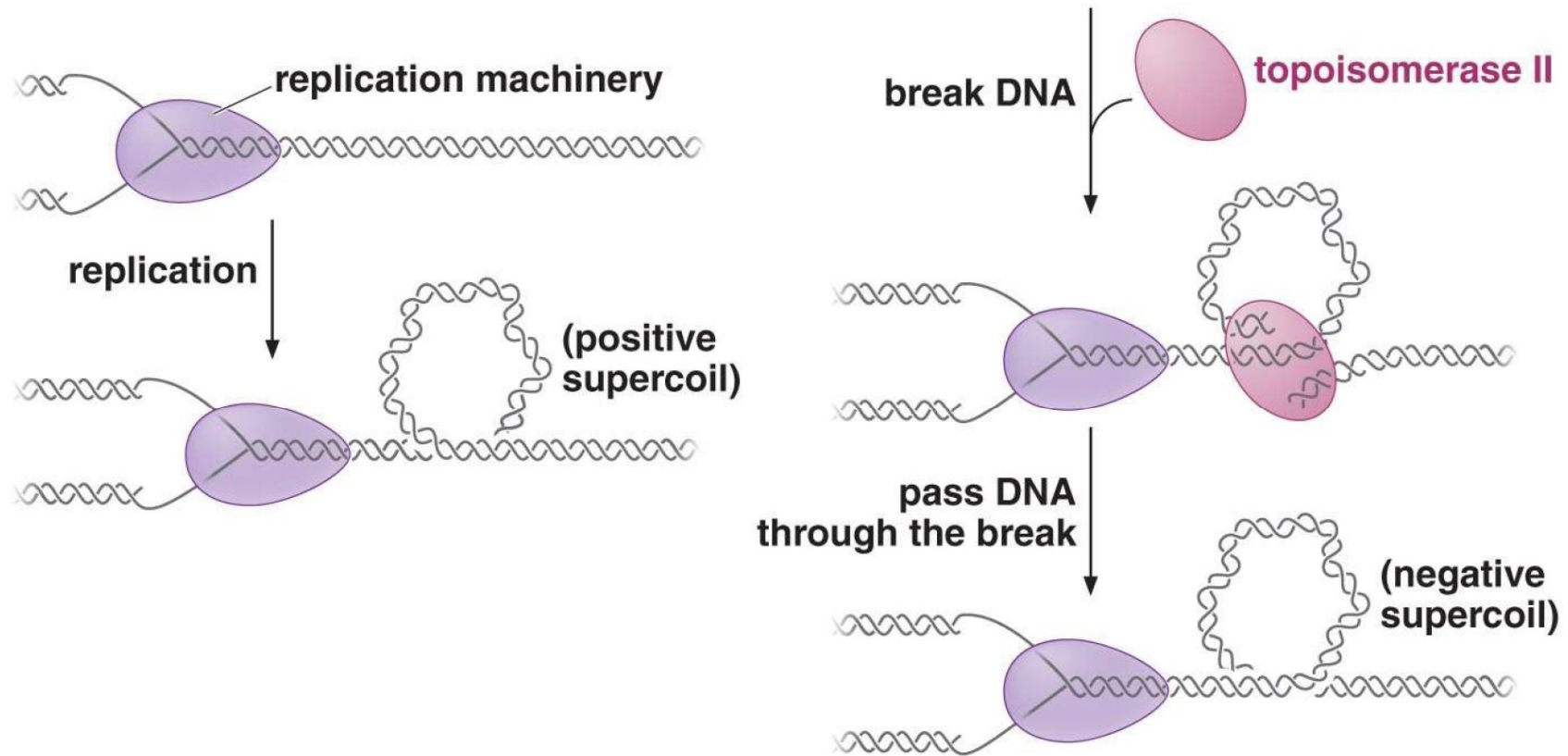


O Replissomo em ação



https://www.youtube.com/watch?v=gJzcYbt7_E4

A replicação induz a formação de supercoils positivos no DNA

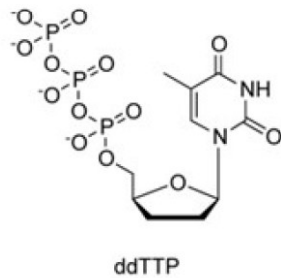
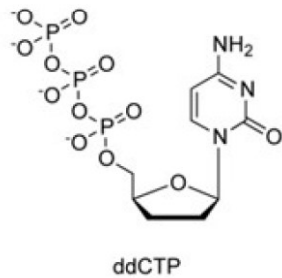
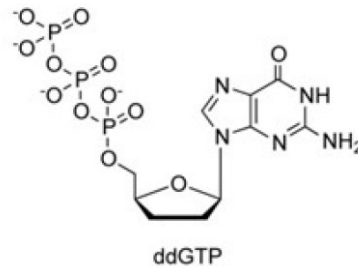
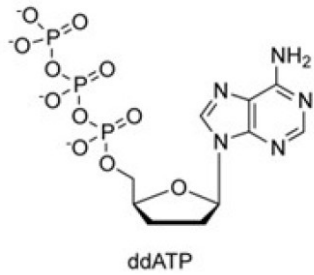


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

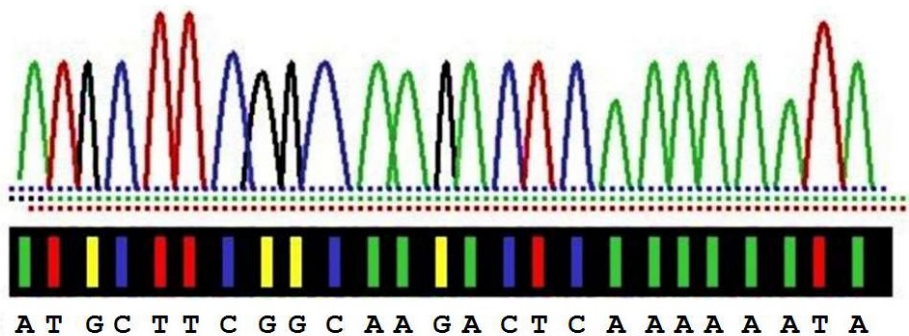
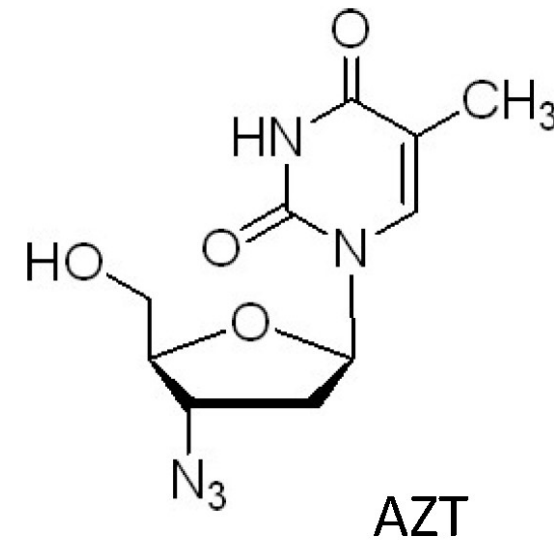
*Tensão criada precisa ser aliviada para que a replicação continue
Isso é feito por topoisomerases tipo II (girase, em E. coli)*

Conhecer a química gera...

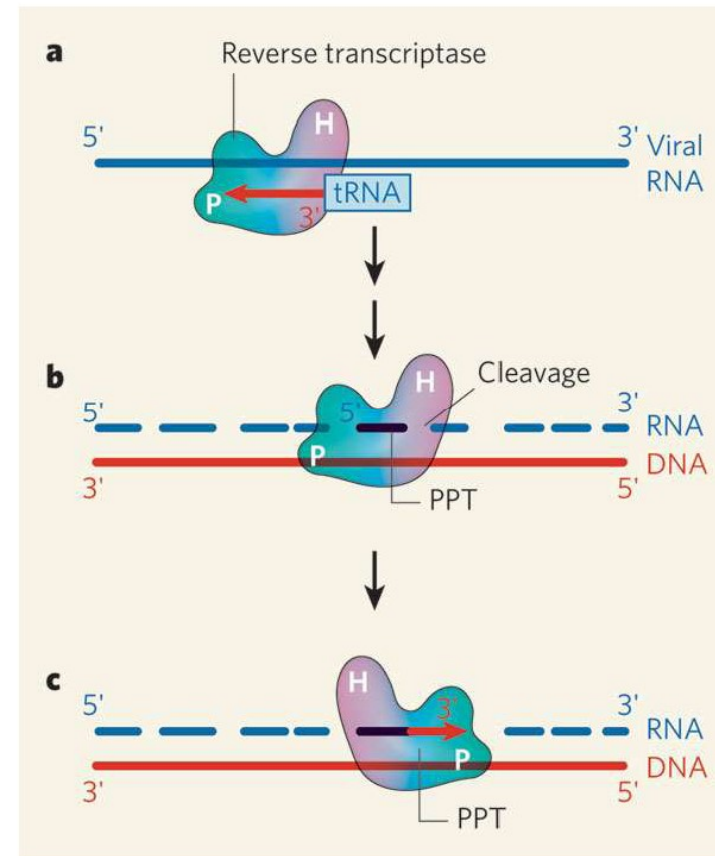
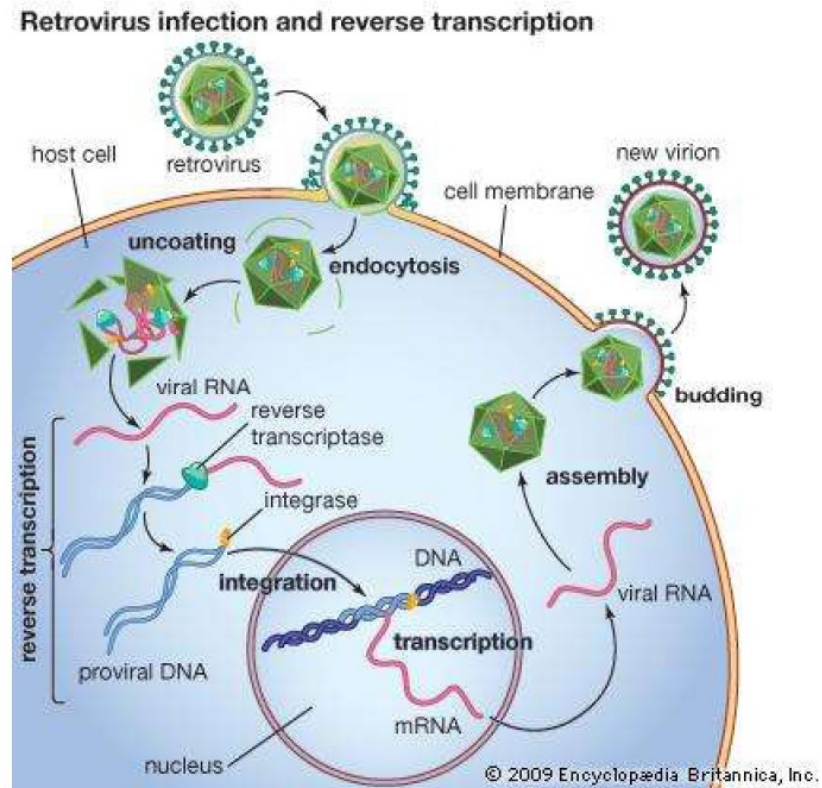
Tecnologia



Terapêutica

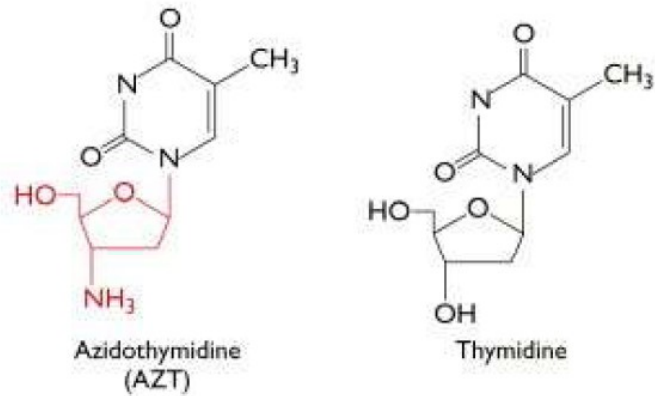


Retrovirus como o HIV possuem uma polimerase especial: Transcriptase reversa

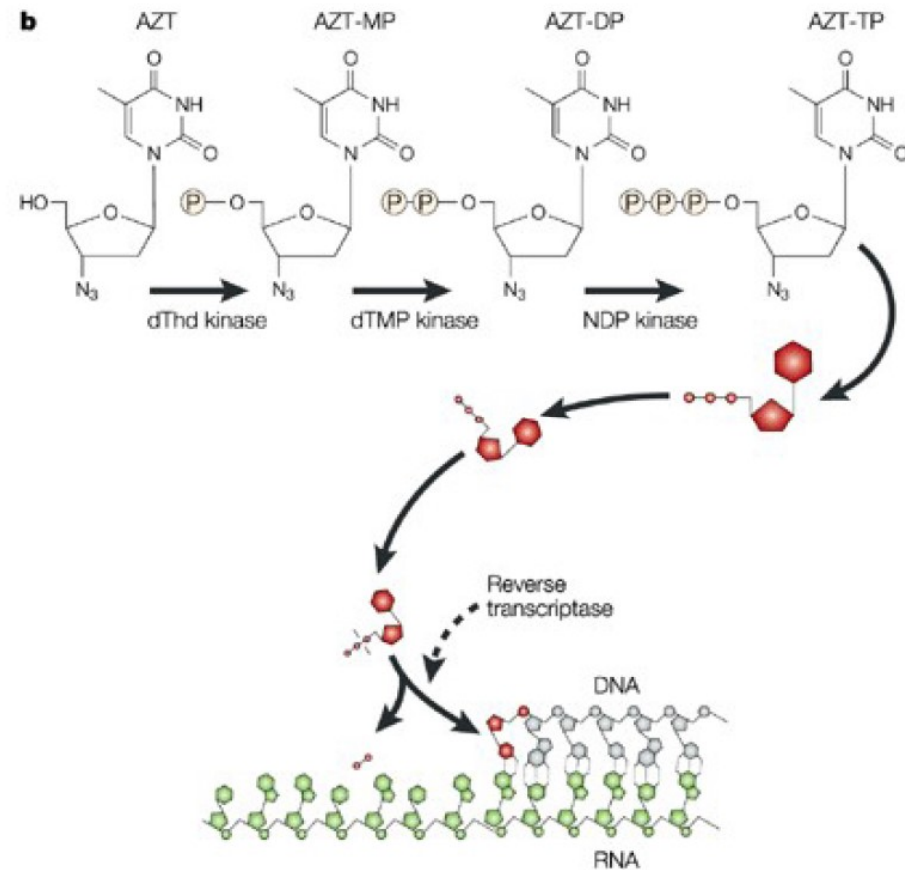


- DNA polimerase dependente de RNA
- Depende de primer com 3'OH livre (um tRNA que o próprio virus carrega!)
- Não possui atividade revisora: alta taxa de mutação!

Como funciona o AZT ?

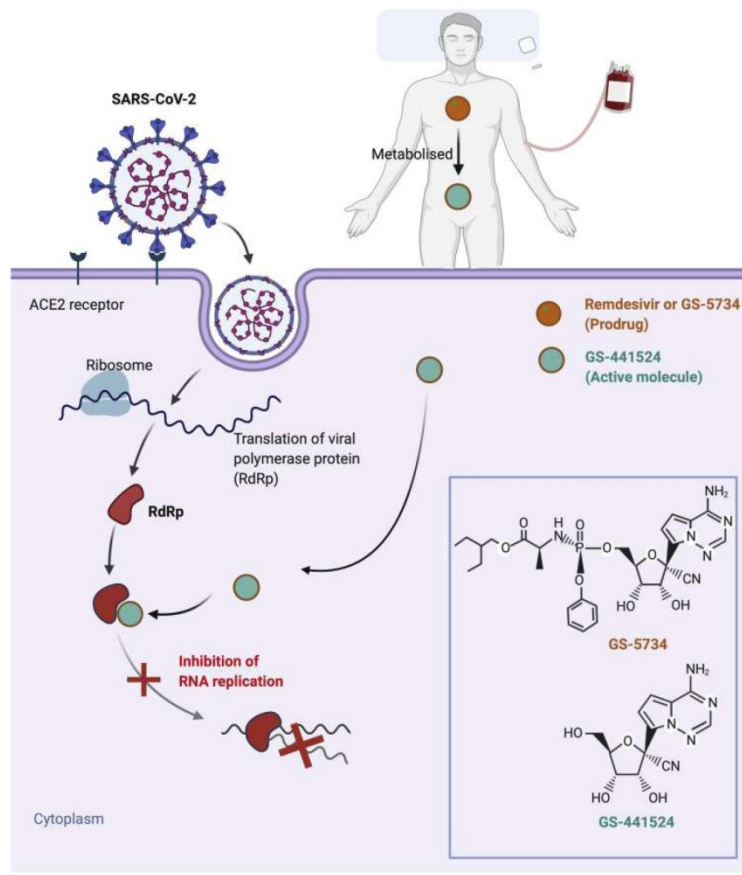
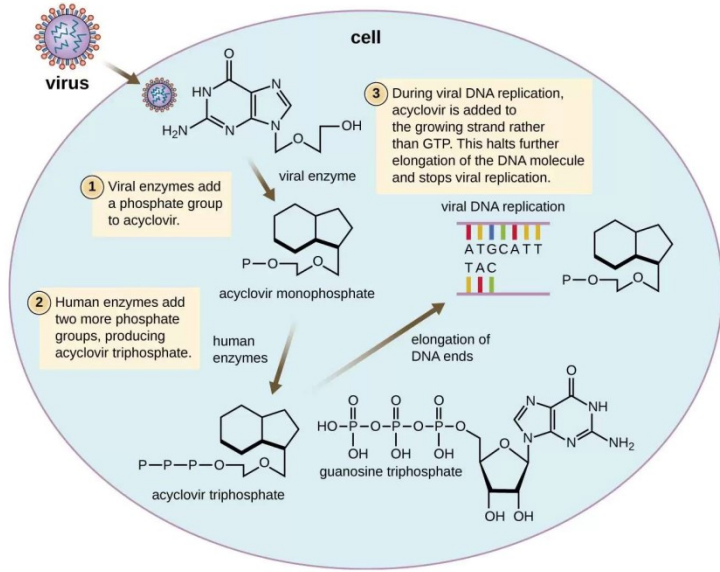
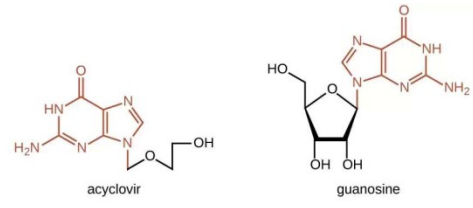


É um análogo de timidina



Bloqueia polimerização pois não possui 3'OH. É um *terminador de cadeia* !

Diversos outros antivirais são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos e inibidores da replicação viral

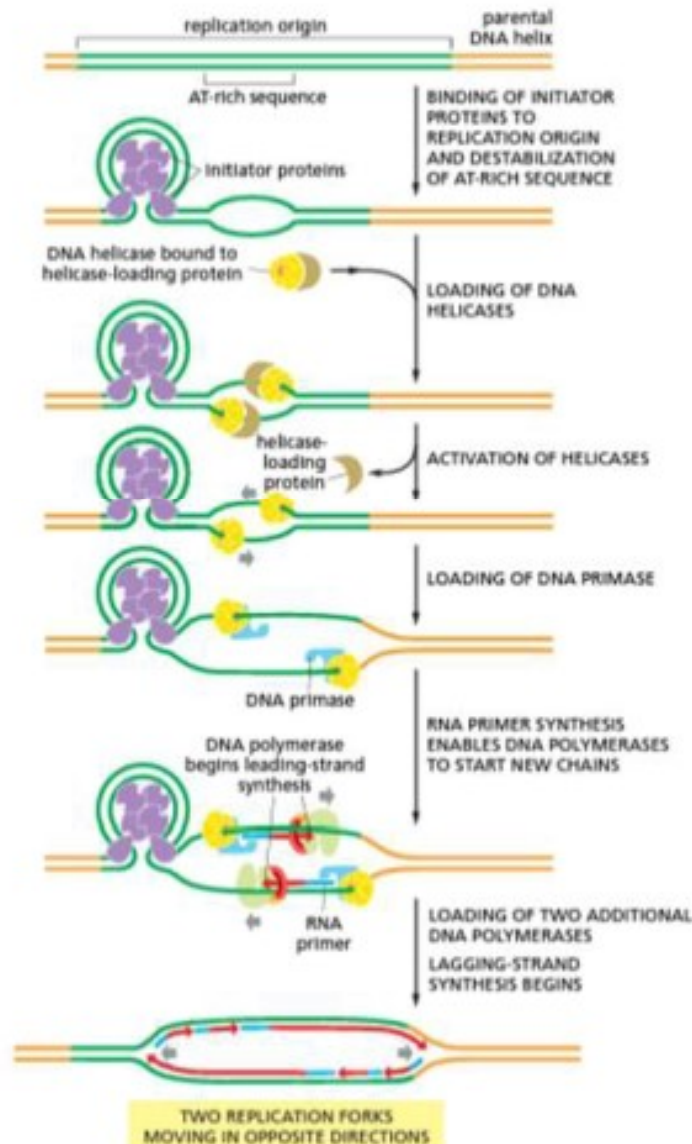


Como a replicação se inicia?
Como termina?
Problemas associados com o
término da replicação

Início (origem) e término da replicação

1. Conjunto Origem + Término = replicon
2. Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular (iniciação é altamente regulada!)
3. O genoma de uma célula procariótica em geral constitui um único replicon
4. Cada cromossomo eucariótico constitui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente

Visão geral do processo de iniciação



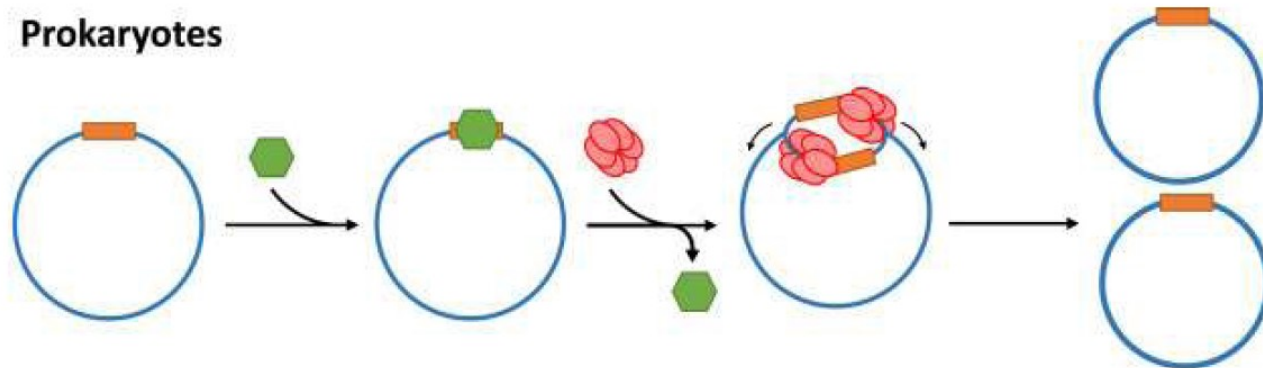
Initiator – proteína que controla a iniciação

Replication origin – sequência do DNA onde initiator se liga, também chamada de origem, ou ori

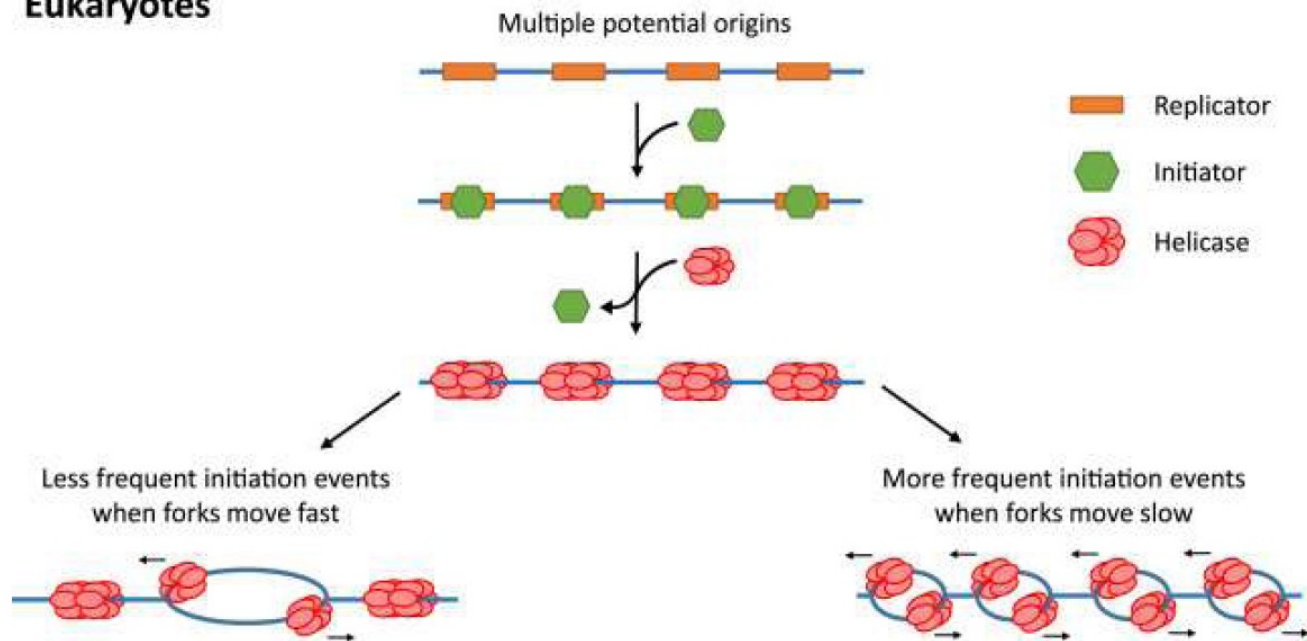
Efeito do initiator é causar a abertura das fitas e recrutar (atrair) helicases. Helicases por sua vez atraem outras proteínas do replissomo

Cromossomo bacteriano tem uma origem enquanto eucarióticos tem múltiplas

Prokaryotes



Eukaryotes



telômero

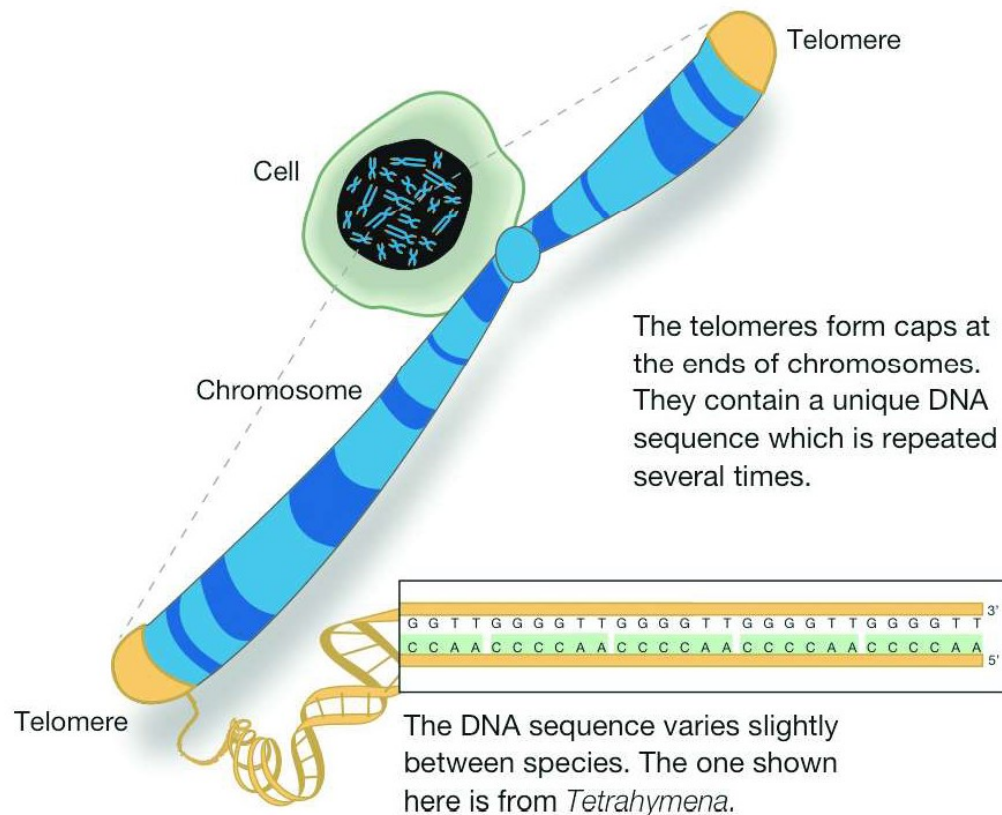
Sequências adicionadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos

Levedura: 20-100 repetições $(T_xG_x)_n$

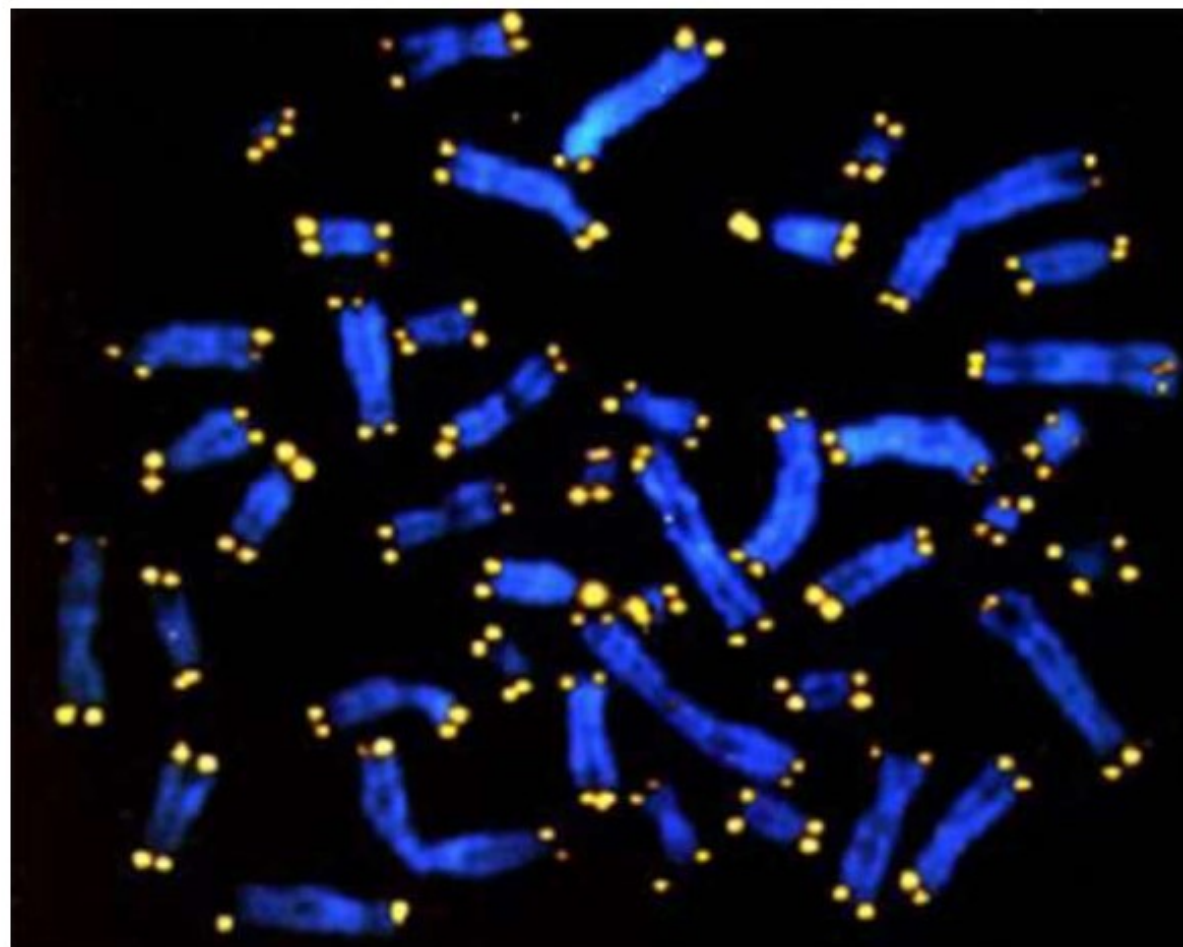
-Célula humana: 1500 repetições TTAGGG

centrômero

telômero



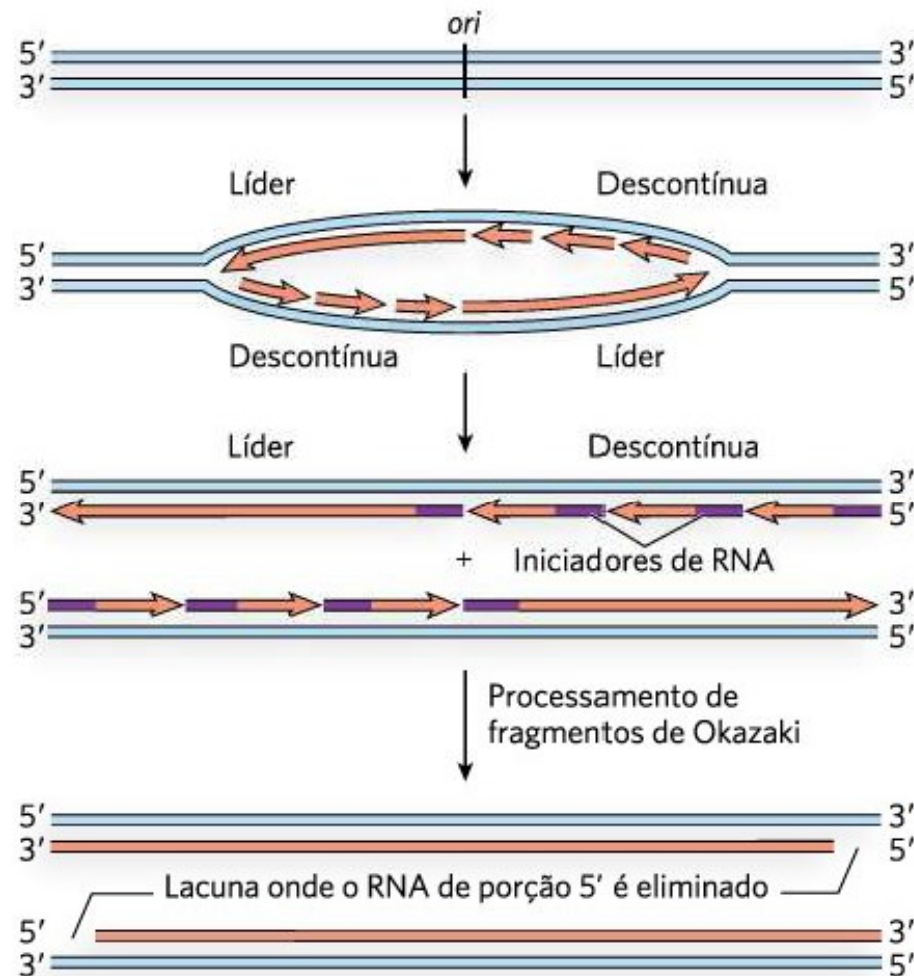
Telômeros podem ser vistos citologicamente



FISH: fluorescent in situ hybridization

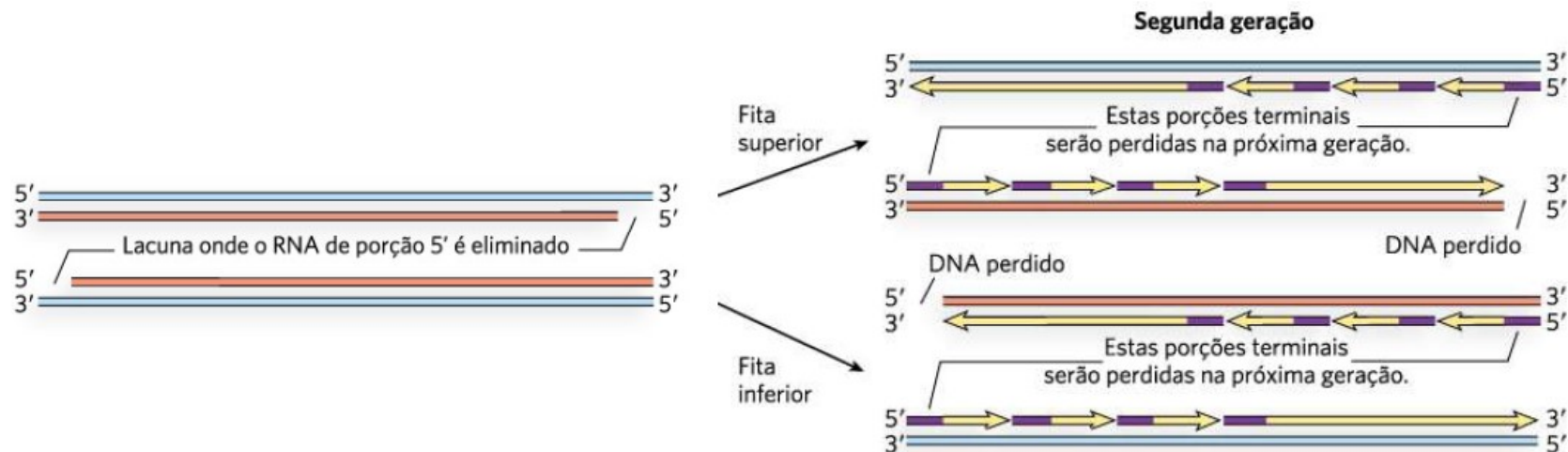
azul: DNA – amarelo: TTAGGG (repetição telomérica)

Que problema existe na terminação da replicação de um cromossomo linear ?



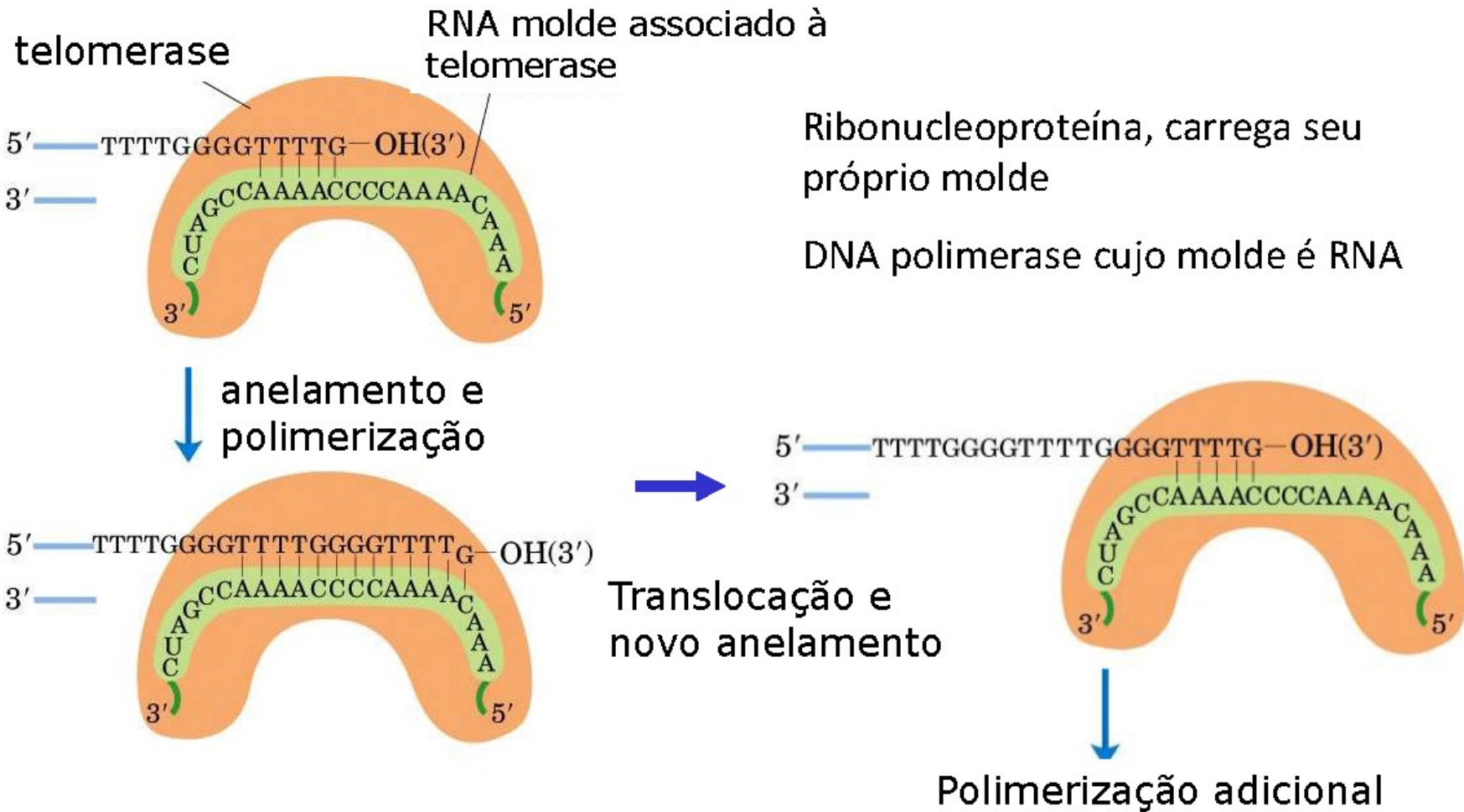
Remoção do *primer*:
encurtamento das fitas filhas!!!

Síntese descontínua da fita atrasada leva ao encurtamento progressivo das moléculas replicadas



Telômeros são sequências “especiais” na extremidade dos cromossomos que contornam o problema do encurtamento

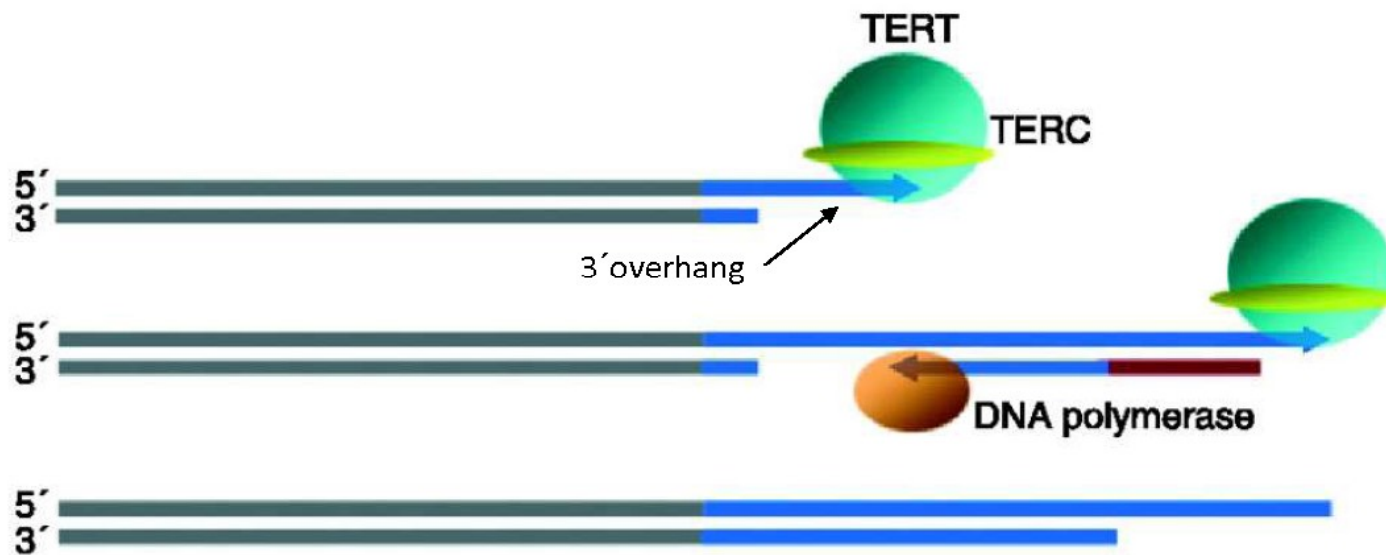
Telomerase: uma DNA polimerase atípica



Ribonucleoproteína, carrega seu próprio molde
DNA polimerase cujo molde é RNA

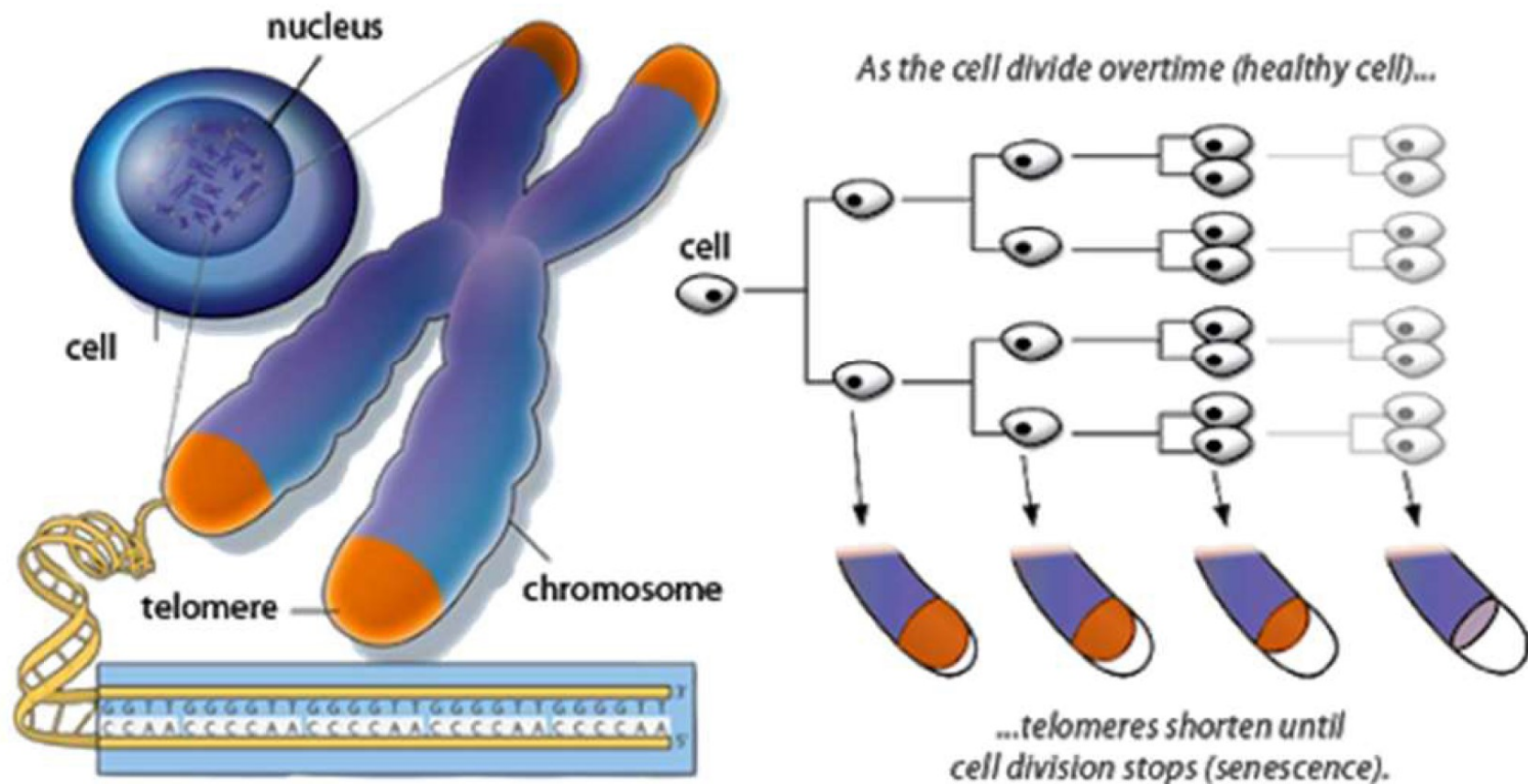
TERT – enzima
TR/TERC – RNA molde

Telomerase aumenta a região na extremidade do cromossomo que pode ser encolhida...



Mas ela não impede o encolhimento! A cada replicação a extremidade 5' dos cromossomos continua a encolher.

A maior parte de nossas células tem sua capacidade de reprodução limitada pelo comprimento de seus telômeros



Não possuem telomerase ativa, não conseguem repor os telômeros perdidos

Falta da telomerase é um mecanismo de proteção contra o câncer

