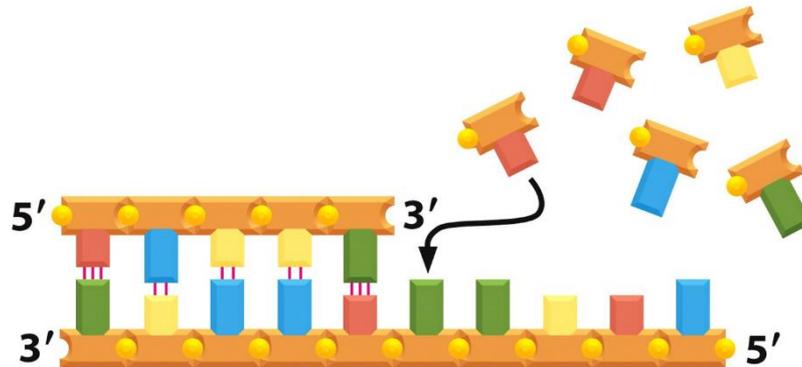


QBQ136

REPLICAÇÃO DE DNA



A química da síntese do DNA e a enzima que a catalisa

Como a dupla-fita de DNA é replicada?

Como a fidelidade da replicação é garantida?

Como a replicação se inicia e termina?

GENETICAL IMPLICATIONS OF THE STRUCTURE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID

By J. D. WATSON and F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge

THE importance of deoxyribonucleic acid (DNA) within living cells is undisputed. It is found in dividing cells, largely if not entirely in the nucleus, here it is an essential constituent of the chromosomes. Many lines of evidence indicate that it is the carrier of a part of (if not all) the genetic specificity of the chromosomes and thus of the gene itself.

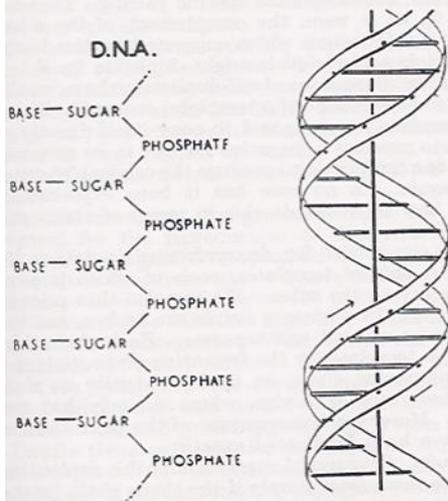


Fig. 1. Chemical formula of a single chain of deoxyribonucleic acid



Fig. 2. This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis

Reprinted with permission from *Nature*, Vol. 171, No. 4361, May 30, 1953 pp. 964-967.

Until now, however, no evidence has been presented to show how it might carry out the essential operation required of a genetic material, that of exact self-duplication.

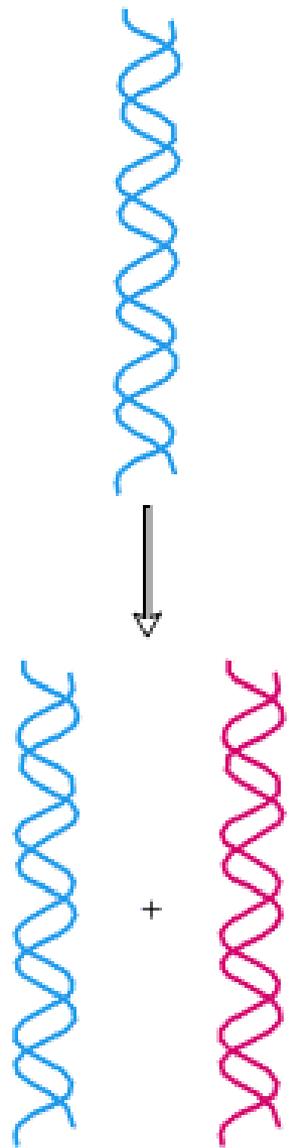
We have recently proposed a structure¹ for the salt of deoxyribonucleic acid which, if correct, immediately suggests a mechanism for its self-duplication. X-ray evidence obtained by the workers at King's College, London², and presented at the same time, gives qualitative support to our structure and is incompatible with all previously proposed structures³. Though the structure will not be completely proved until a more extensive comparison has been made with the X-ray data, we now feel sufficient confidence in its general correctness to discuss its genetical implications. In doing so we are assuming that fibres of the salt of deoxyribonucleic acid are not artefacts arising in the method of preparation, since it has been shown by Wilkins and his co-workers that similar X-ray patterns are obtained from both the isolated fibres and certain intact biological materials such as sperm head and bacteriophage particles⁴.

The chemical formula of deoxyribonucleic acid is now well established. The molecule is a very long chain, the backbone of which consists of a regular alternation of phosphate and sugar groups, as shown in Fig. 1. To each sugar group is attached a nitrogenous base, which can be considered 5-nucleotide (the bases are adenine, cytosine, guanine, thymine, and uracil). The sequence of bases in the chain is the genetic code. The monomer unit of the chain, consisting of a phosphate group, a sugar group, and a base, is known as a nucleotide. The first few nucleotides of a biological interest are but of two. The



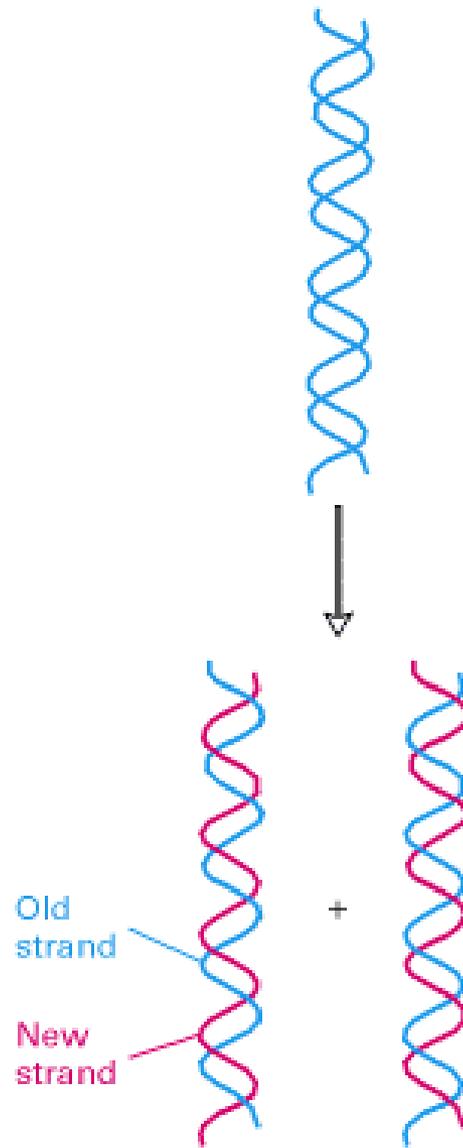
“We have recently proposed a structure for DNA which, if correct, immediately suggests a mechanism for its self-duplication”.

Conservative mechanism



Ou?

Semiconservative mechanism



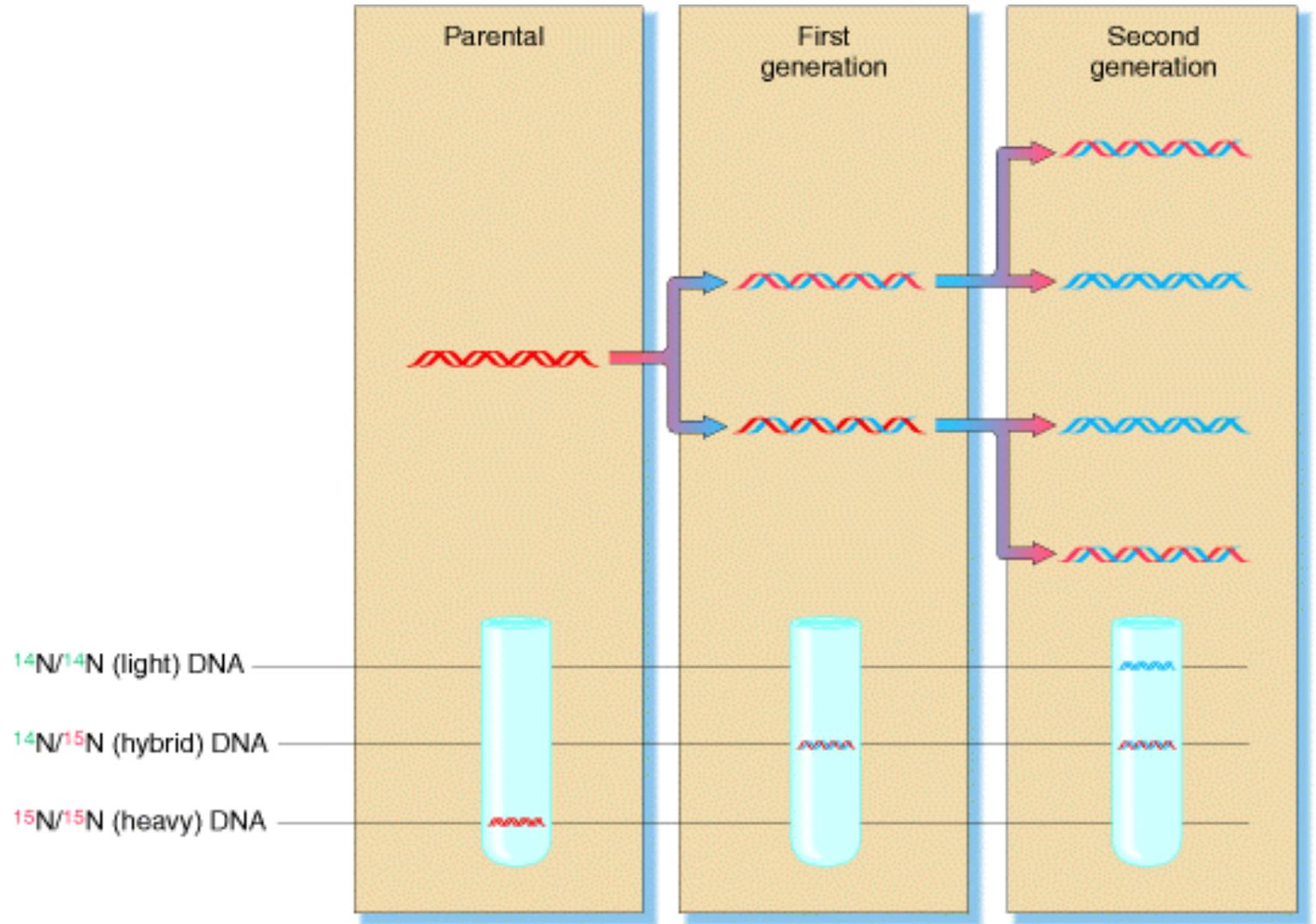
A replicação do DNA é semi-conservativa

O experimento que demonstrou que a replicação do DNA é semi-conservativa, em 1958, é considerado um dos mais elegantes da história: “Experimento de Meselson & Stahl”



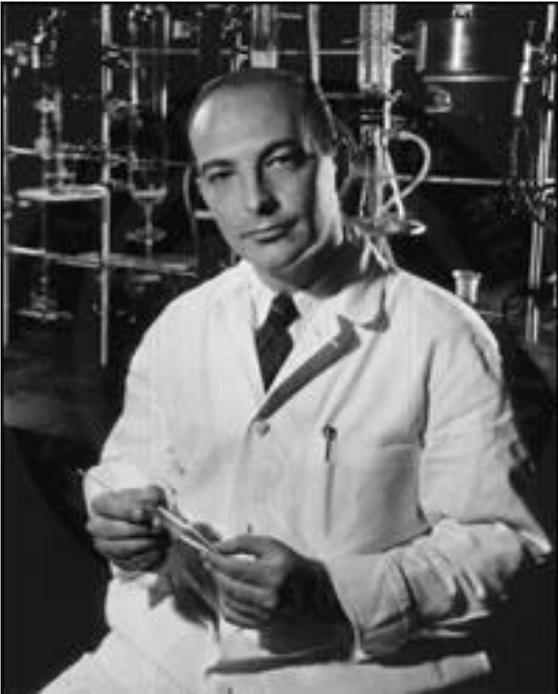
<https://www.youtube.com/watch?v=frQbfdRtzBM>

Experimento de Meselson & Stahl



Centrifugação em gradiente de densidade (CsCl_2)

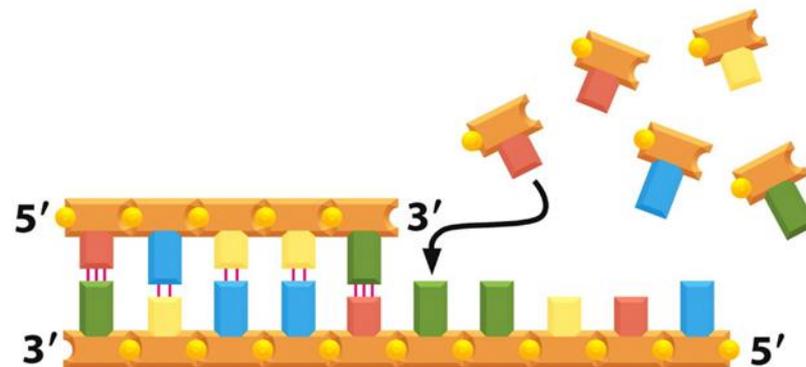
A química da replicação: enzima e substratos



Em **1958**, Arthur Kornberg revelou a descoberta da **DNA polimerase** de *E.coli*, enzima que sintetiza DNA novo usando uma das fitas como molde

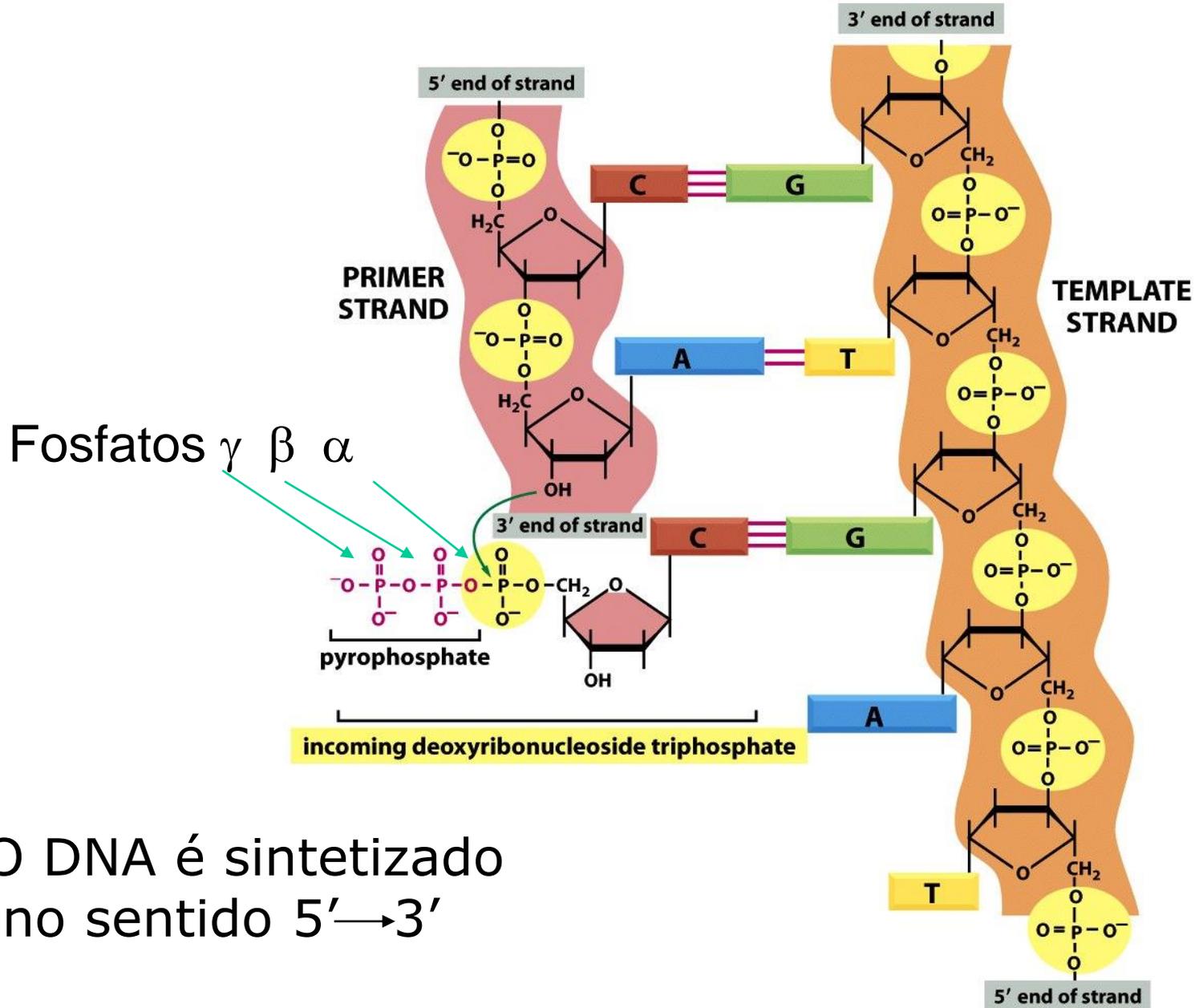
As DNA polimerases:

- Sintetizam a fita no sentido 5'-3';
- Requerem um iniciador (*primer*) com 3'OH livre;
- Utilizam como substrato dNTPs;
- Requerem uma fita molde.*
- Requerem Mg^{2+} como cofator.



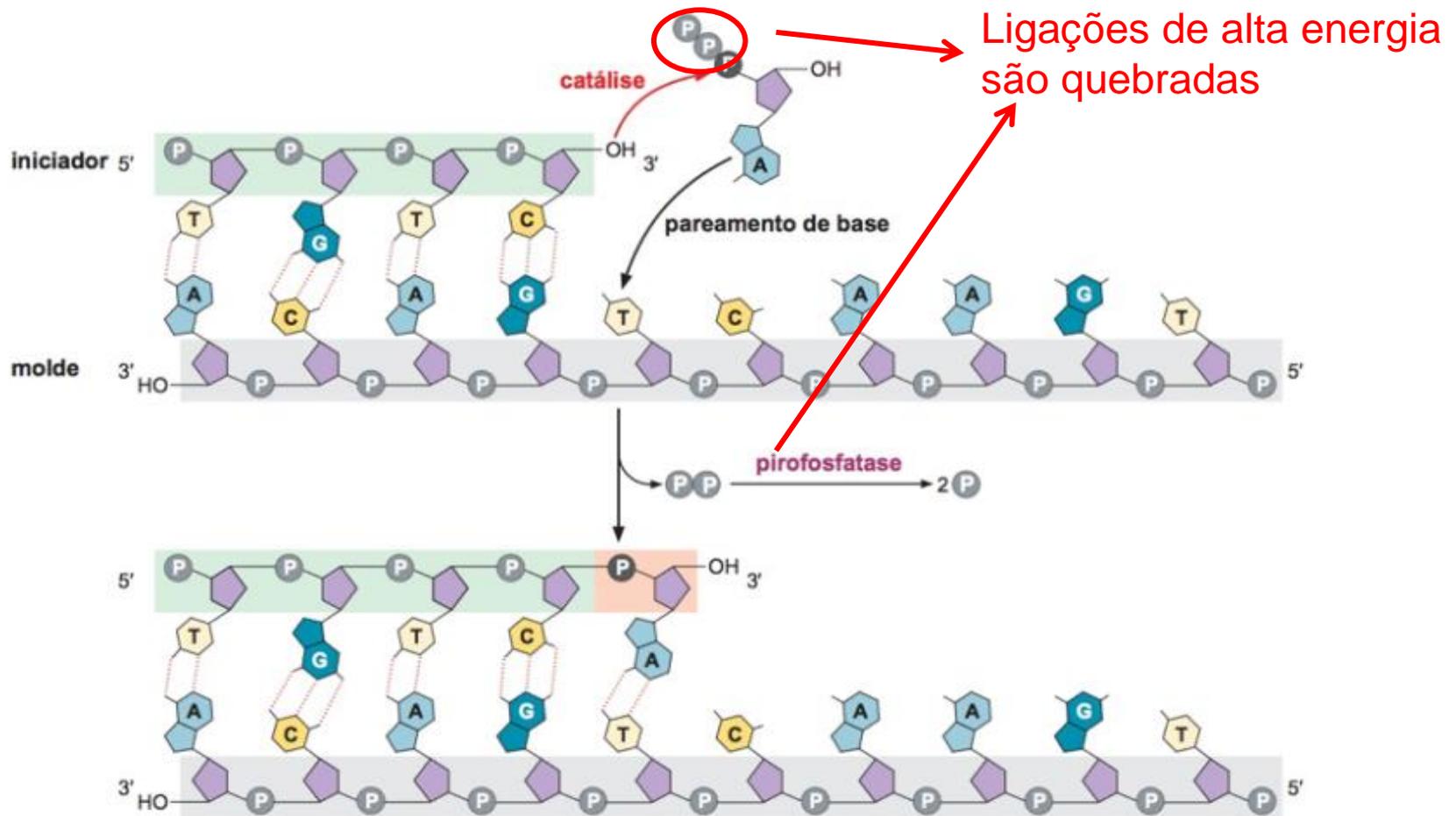
* Molde é DNA, no caso DNA polimerase dependente de DNA

Síntese de uma cadeia de DNA pela DNA polimerase



O DNA é sintetizado
no sentido 5'→3'

A química da replicação - a reação e sua energética



Propriedades das DNA polimerases de *E.coli*

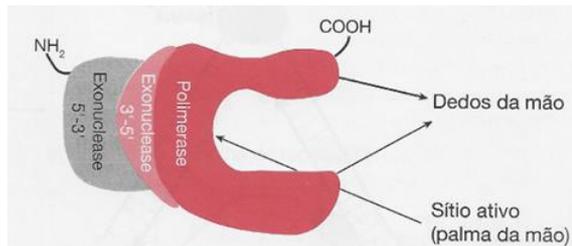
TABELA 25-1 Comparação de cinco DNA-polimerases de *E. coli*

	DNA-polimerase				
	I	II ^a	III	IV ^a	V ^a
Genes estruturais ^b	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>	<i>dinB</i>	<i>umuC</i>
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	9	1	3
M_r	103.000	88.000 ^c	1.065.400	39.100	110.000
Exonuclease 3'→5' (revisora)	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Exonuclease 5'→3'	Sim	Não	Não	Não	Não
Velocidade de polimerização (nucleotídeos/s)	10-20	40	250-1.000	2-3	1
Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie)	3-200	1.500	≥ 500.000	1	6-8

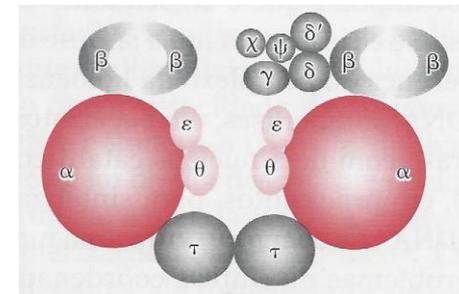
^aDNA-polimerases transgênicas (mutagênicas). Para a DNA-polimerase IV, a processividade está substancialmente aumentada pela associação com a braçadeira β . Essas polimerases são desaceleradas quando uma lesão no DNA está presente na fita-molde do DNA.

^bPara enzimas com mais de uma subunidade, o gene listado aqui codifica a subunidade com atividade de polimerização. Observe que *dnaE* é uma designação anterior para o gene agora chamado de *polC*.

^cSubunidade de polimerização apenas. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades β , δ , δ' , χ e ψ (ver Tabela 25-2).

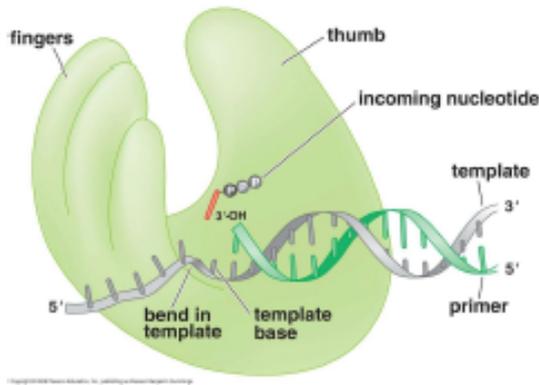


DNA pol I é composta por uma subunidade

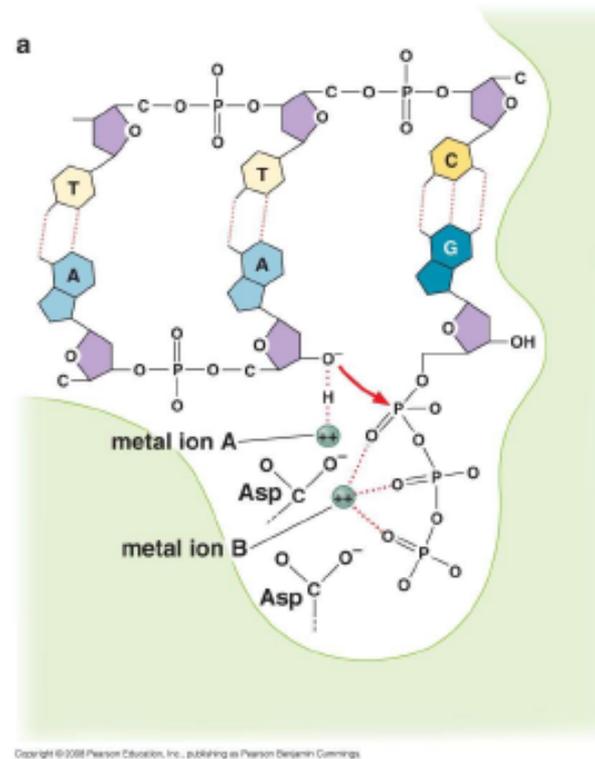


DNA pol III é uma holoenzima, composta de várias subunidades

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

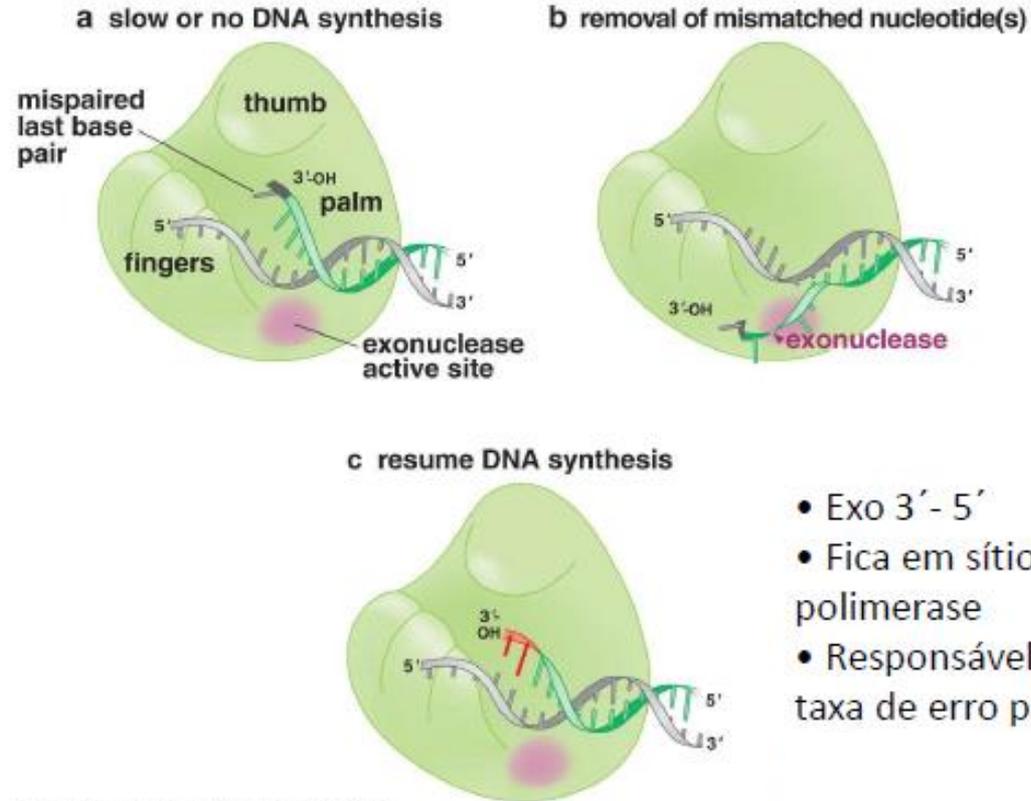


- Catálise depende da presença de dois átomos de metal no sítio ativo, em geral Mg^{2+}

- Taxa de erro = 10^{-5} - um nucleotídeo errado a cada 100.000 adicionados

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

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

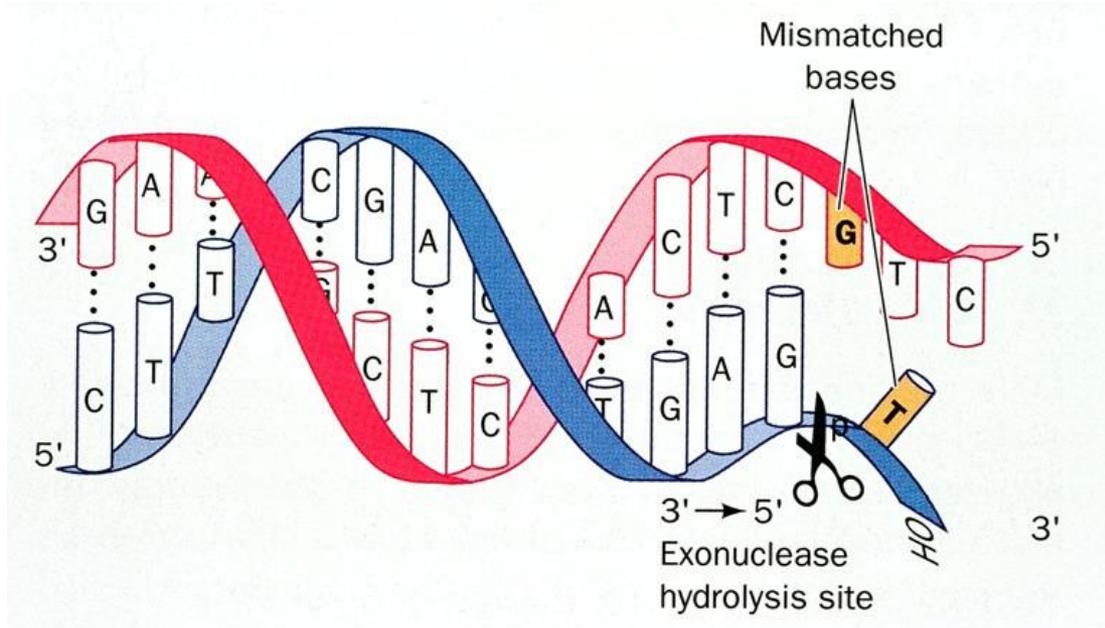


- Exo 3' - 5'
- Fica em sítio diferente da polimerase
- Responsável por reduzir a taxa de erro para 10^{-7}

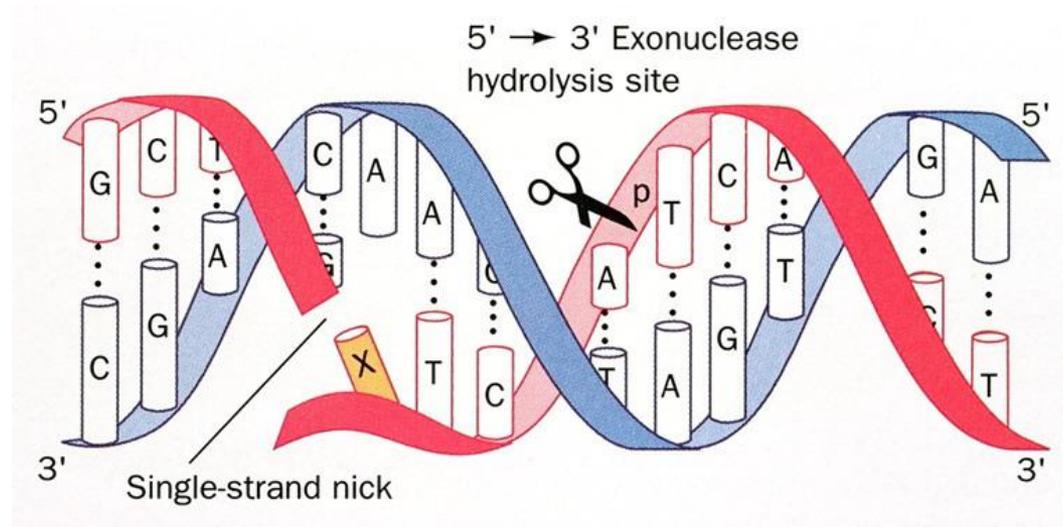
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

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

Atividades exonucleolíticas da DNA polimerase



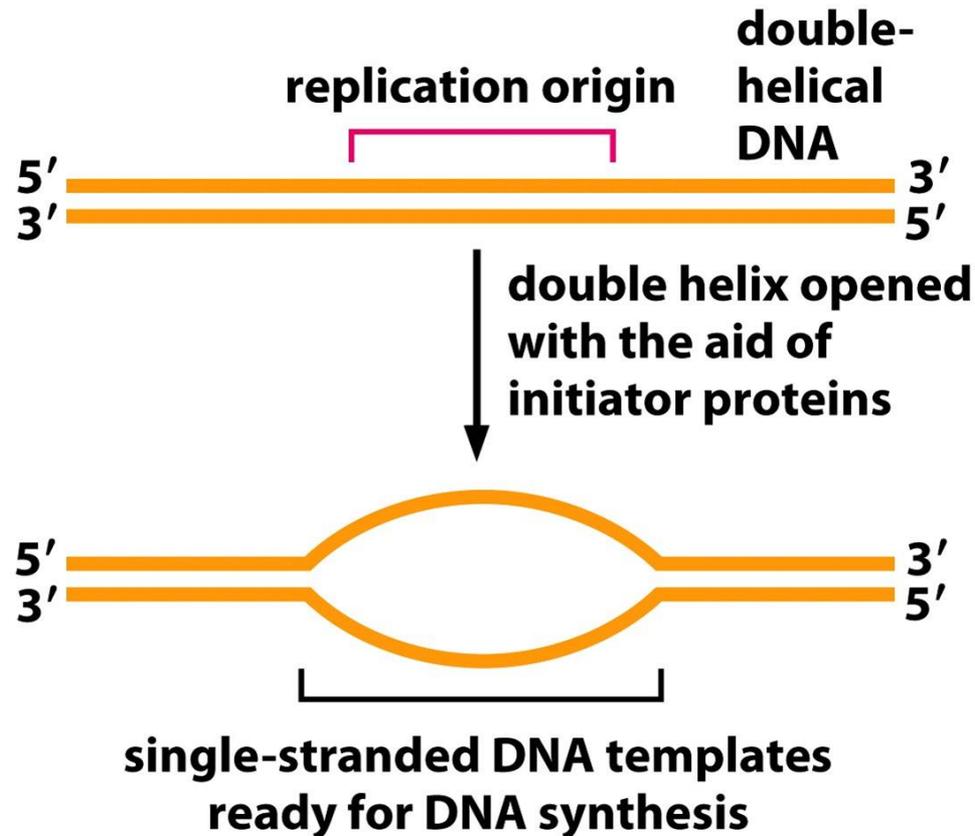
Taxa de erros:
1 em 10^7 bases



Como se inicia a replicação do DNA nas células?

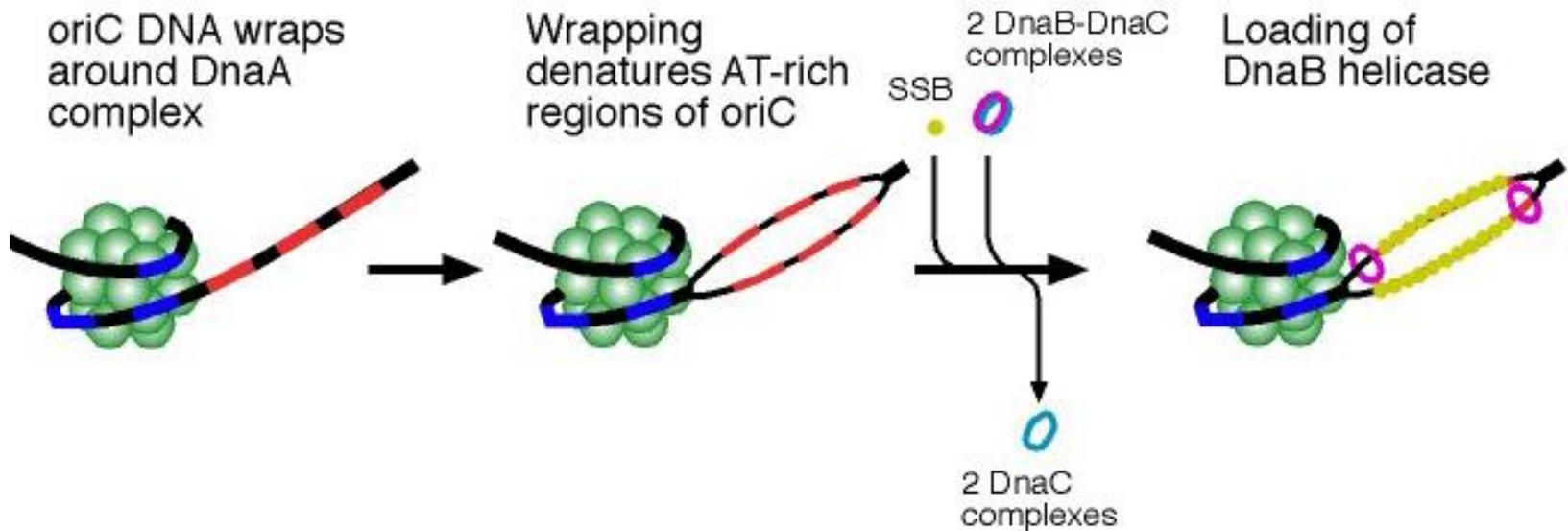
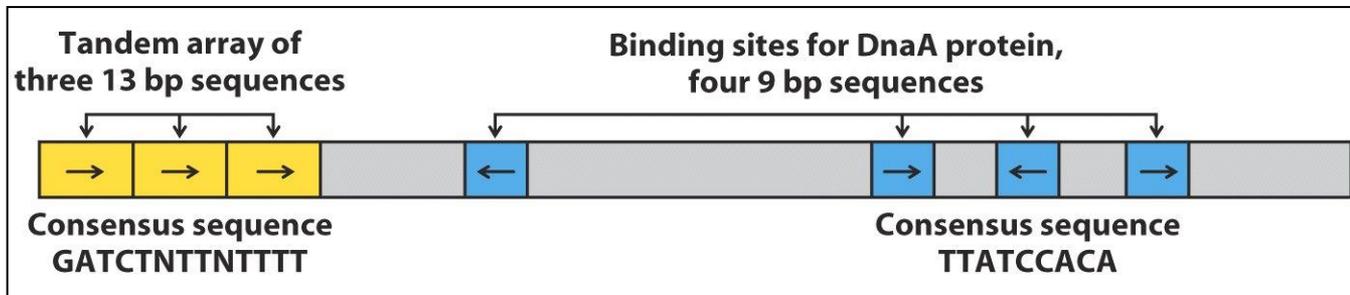
Origem de replicação

Contém sequências ricas em AT



Origem de replicação: ex. *E.coli*

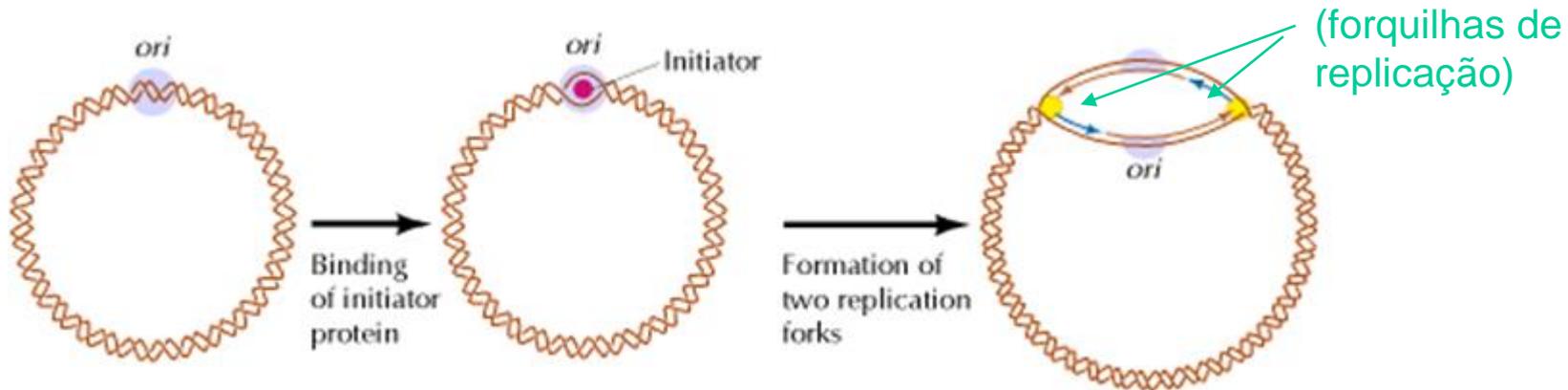
Região com sequências específicas,
que são sítios de ligação de proteínas
DnaA, DnaB e DnaC



Uma única origem de replicação em *E.coli*

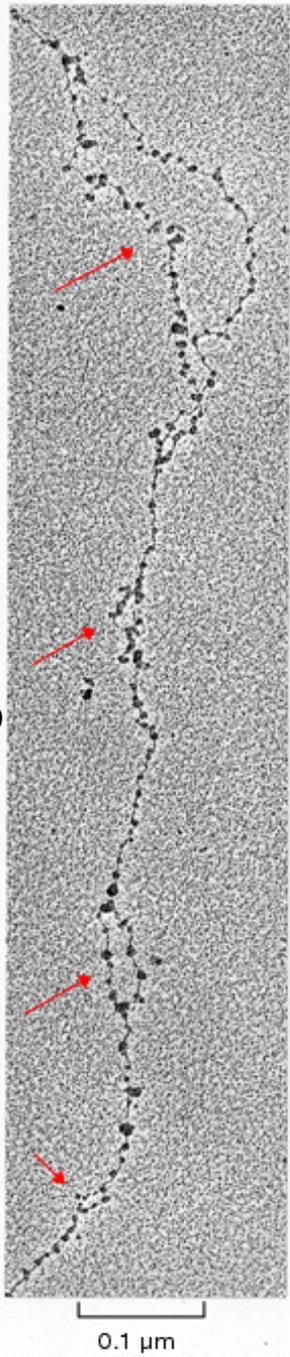
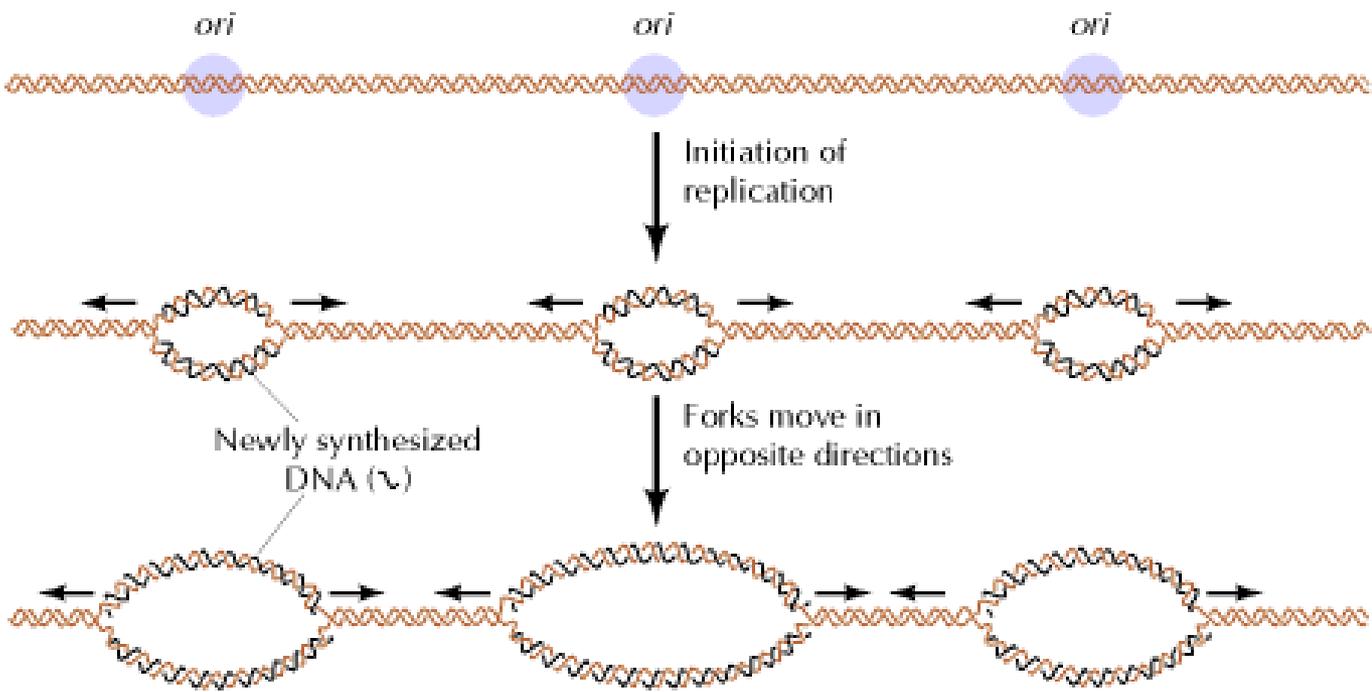


Bolha de replicação



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

Várias origens de replicação em eucariotos

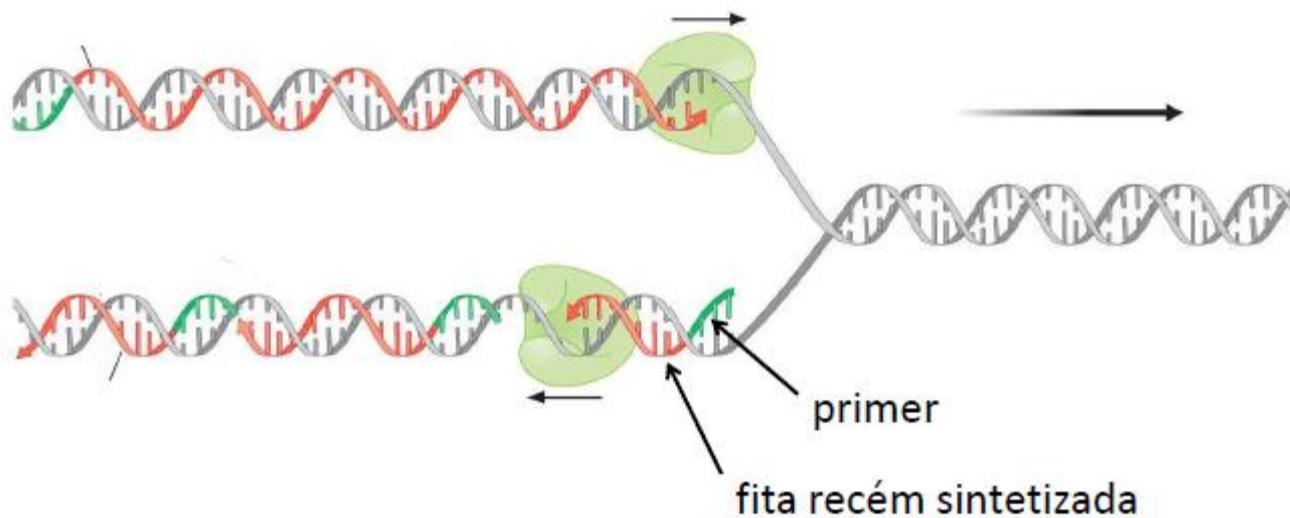


Bolhas de replicação

0.1 μm

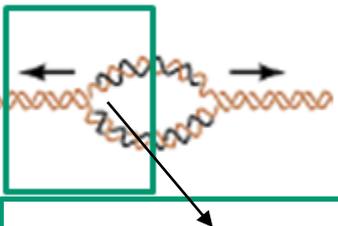
A polaridade da síntese de DNA cria um problema para a replicação

Olhando da perspectiva da DNA polimerase...

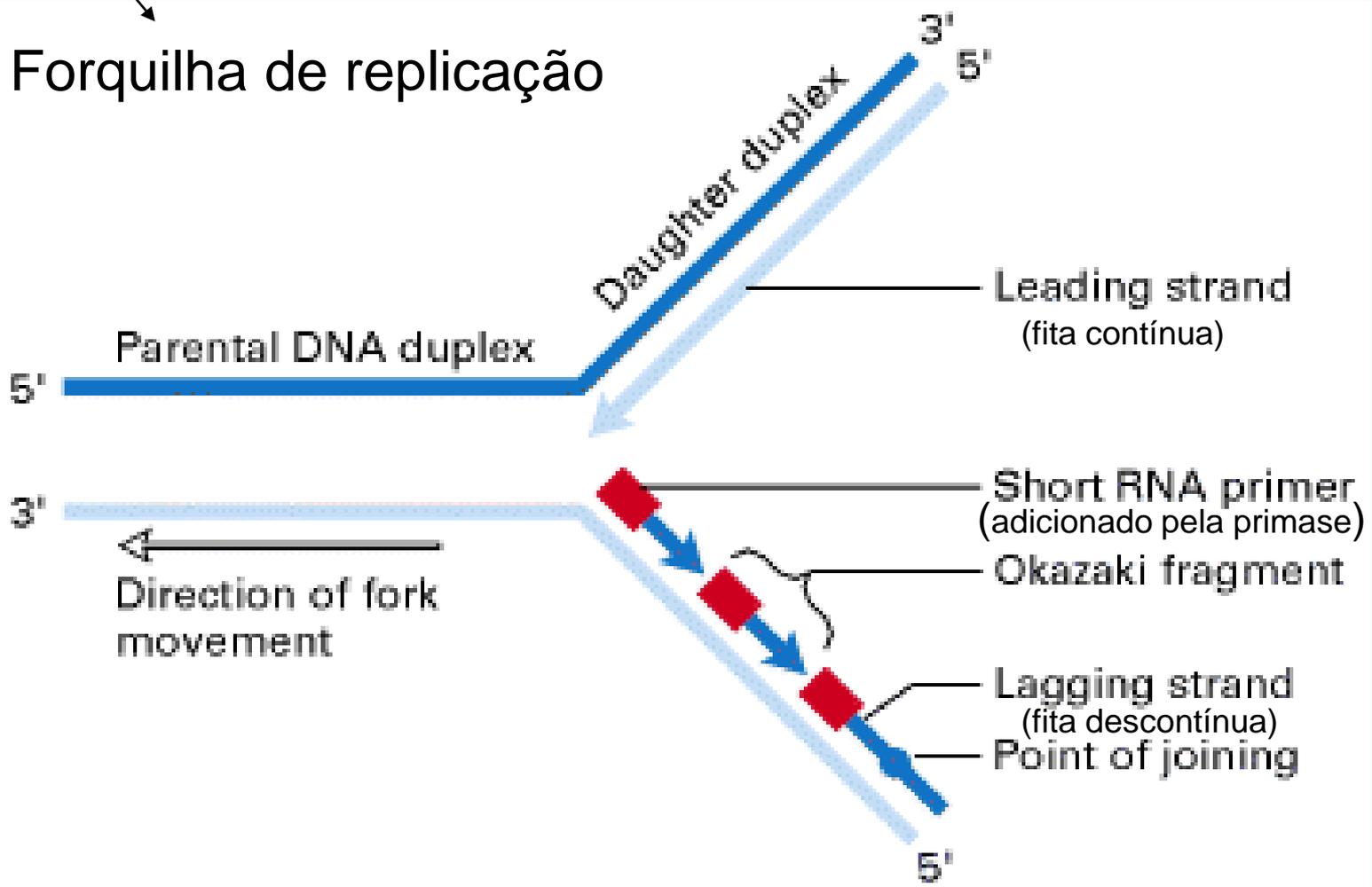


Como replicar as duas fitas simultaneamente?

O processo de replicação é semi-descontínuo



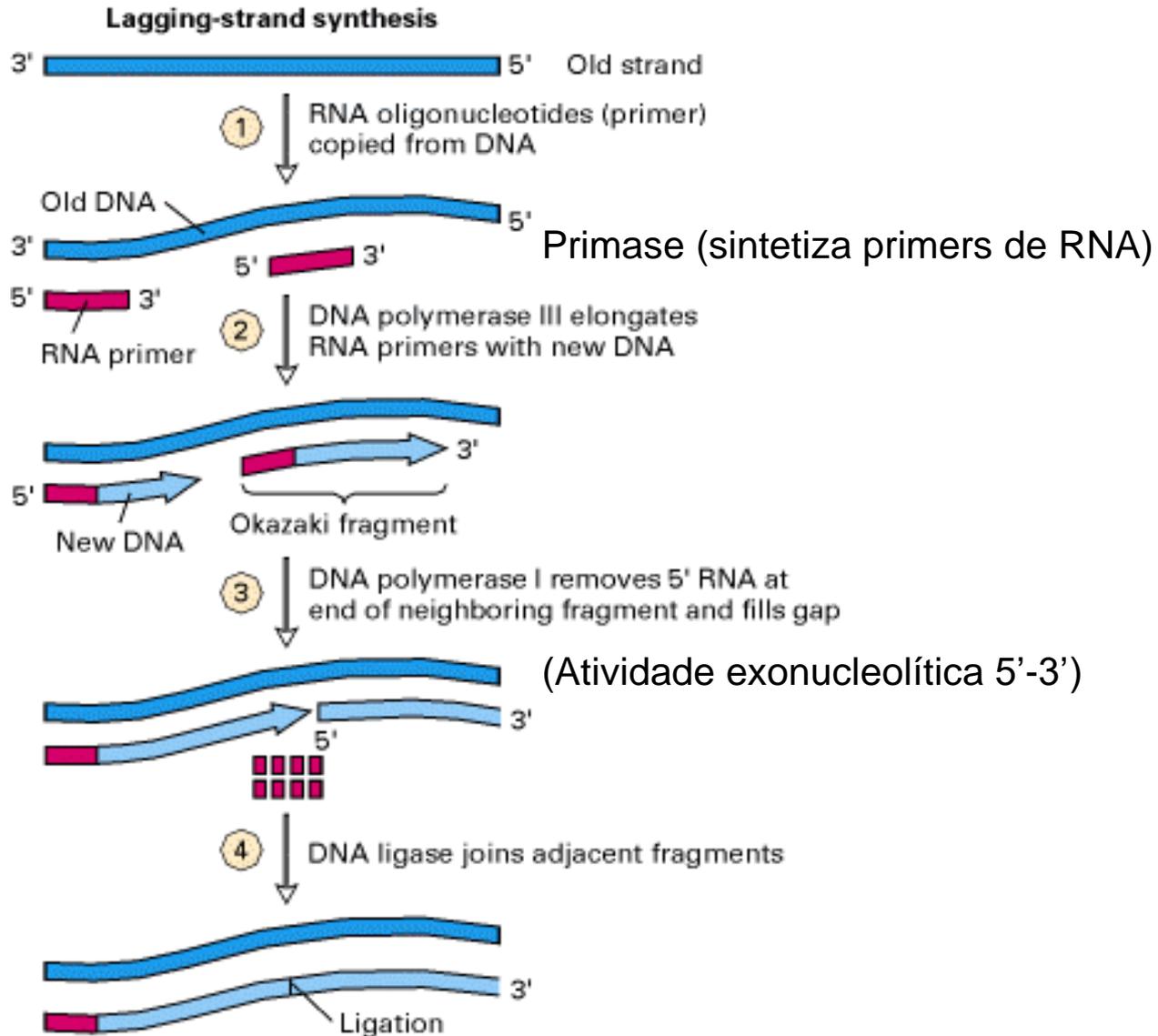
Forquilha de replicação



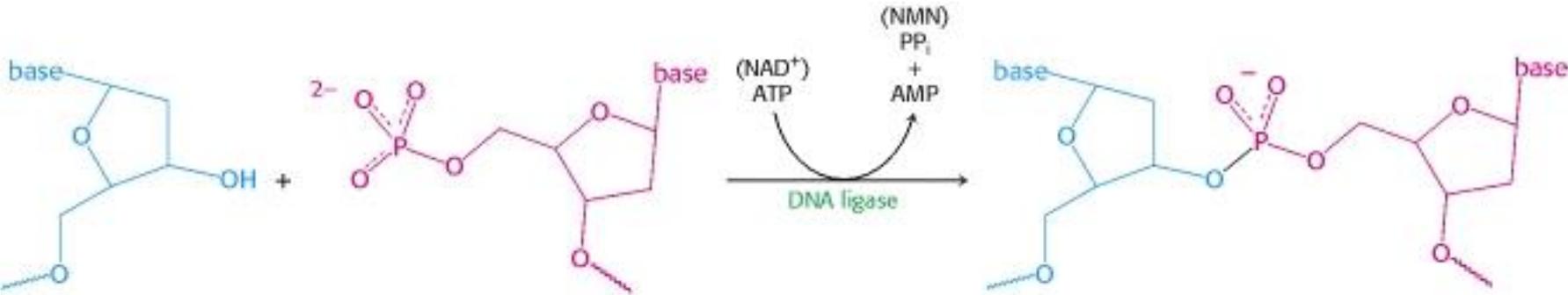
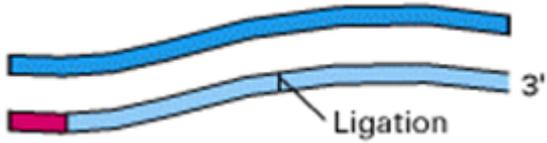
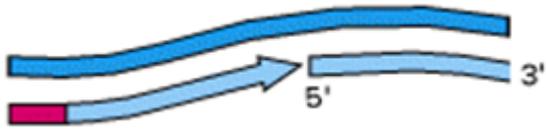
Fragmentos de Okazaki:
~1000-2000 nt em bactérias
~100-200 nt em eucariotos

A fita atrasada não está pronta...

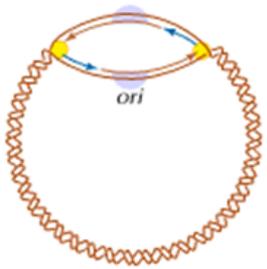
Contém pedaços de RNA (primers)
Fragmentos não estão ligados covalentemente



DNA ligase



Uma bolha de replicação, duas forquilhas de replicação



← direction of fork movement →



leading-strand template
of left-hand fork

lagging-strand template
of right-hand fork

5'

3'

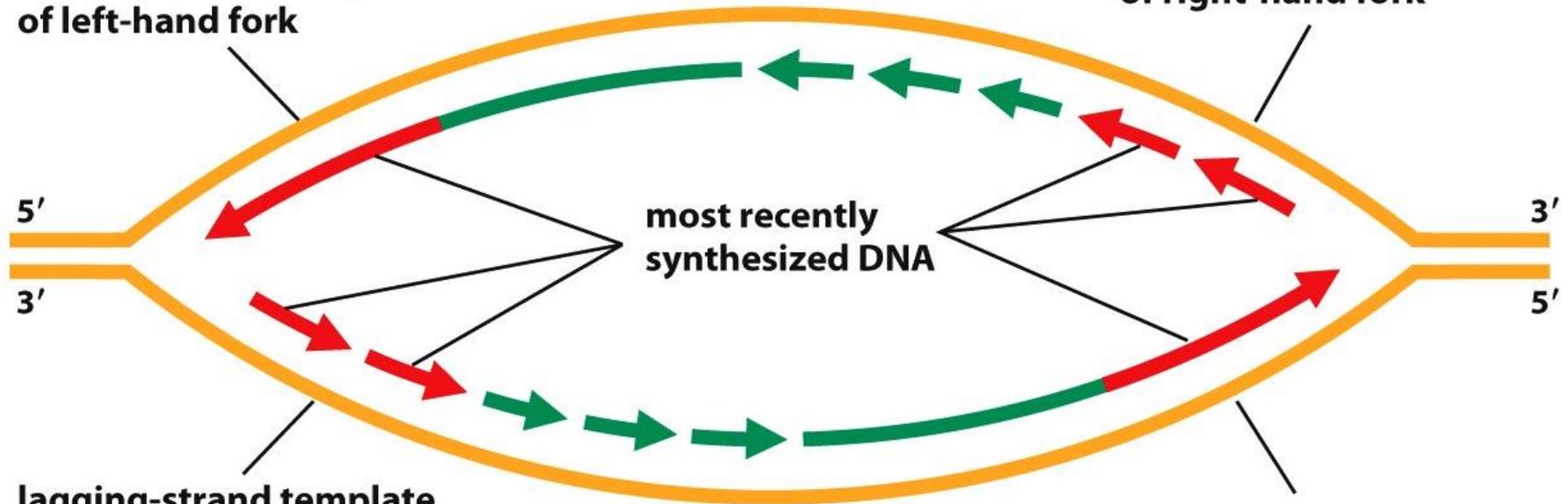
most recently
synthesized DNA

3'

5'

lagging-strand template
of left-hand fork

leading-strand template
of right-hand fork



Maquinaria de replicação: proteínas envolvidas na replicação

Principais componentes:

- Helicase (abertura da dupla fita)
- Proteínas ligantes de DNA fita simples (*single stranded DNA binding protein*, SSB)
- DNA polimerase replicativa (Pol III)
- DNA polimerase I (Pol I)
- Primase (síntese do primer de RNA)
- *Sliding clamp* (grampo deslizante, subunidades β)
- Topoisomerase (que desfaz a tensão do superenrolamento)

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

DNA polimerase III apresenta maior processividade (capacidade de ficar ligada ao DNA)

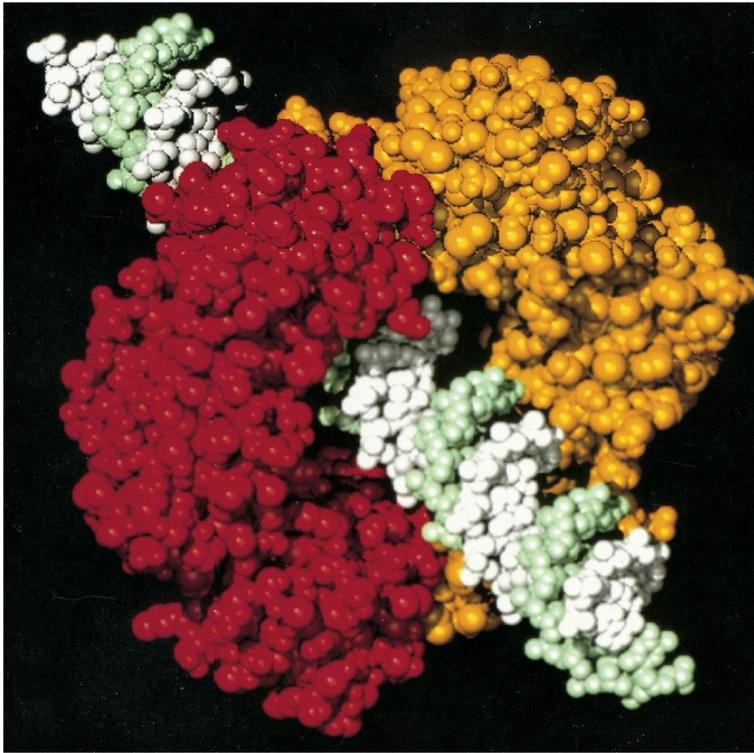
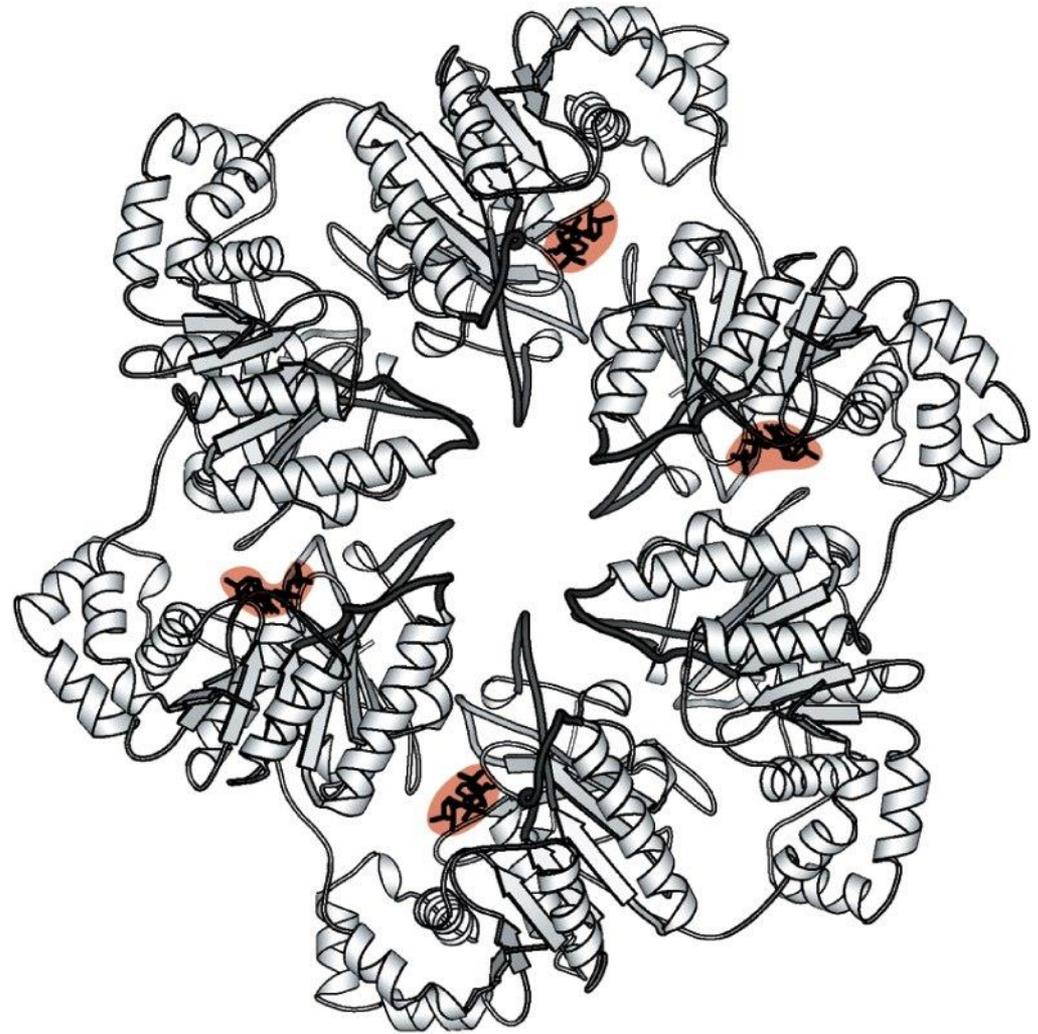
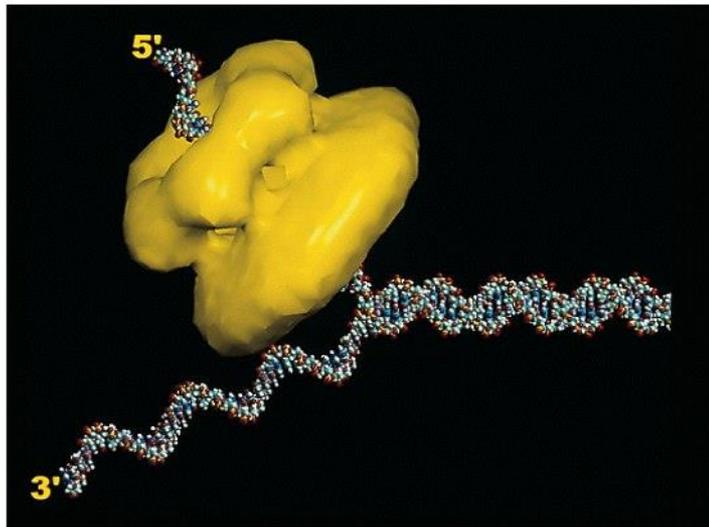
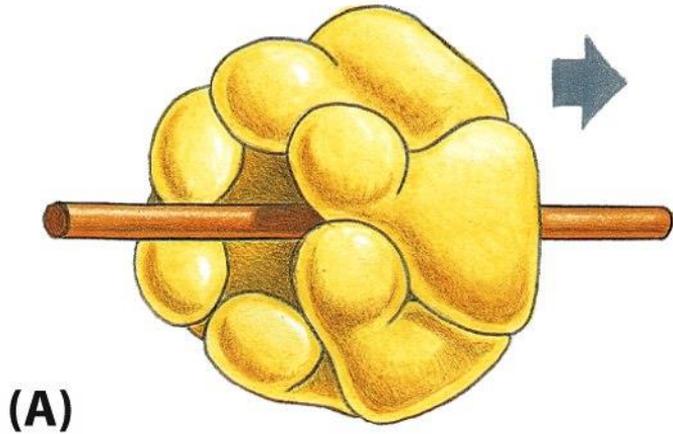


Figure 5-18a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

subunidades β
da DNA pol III

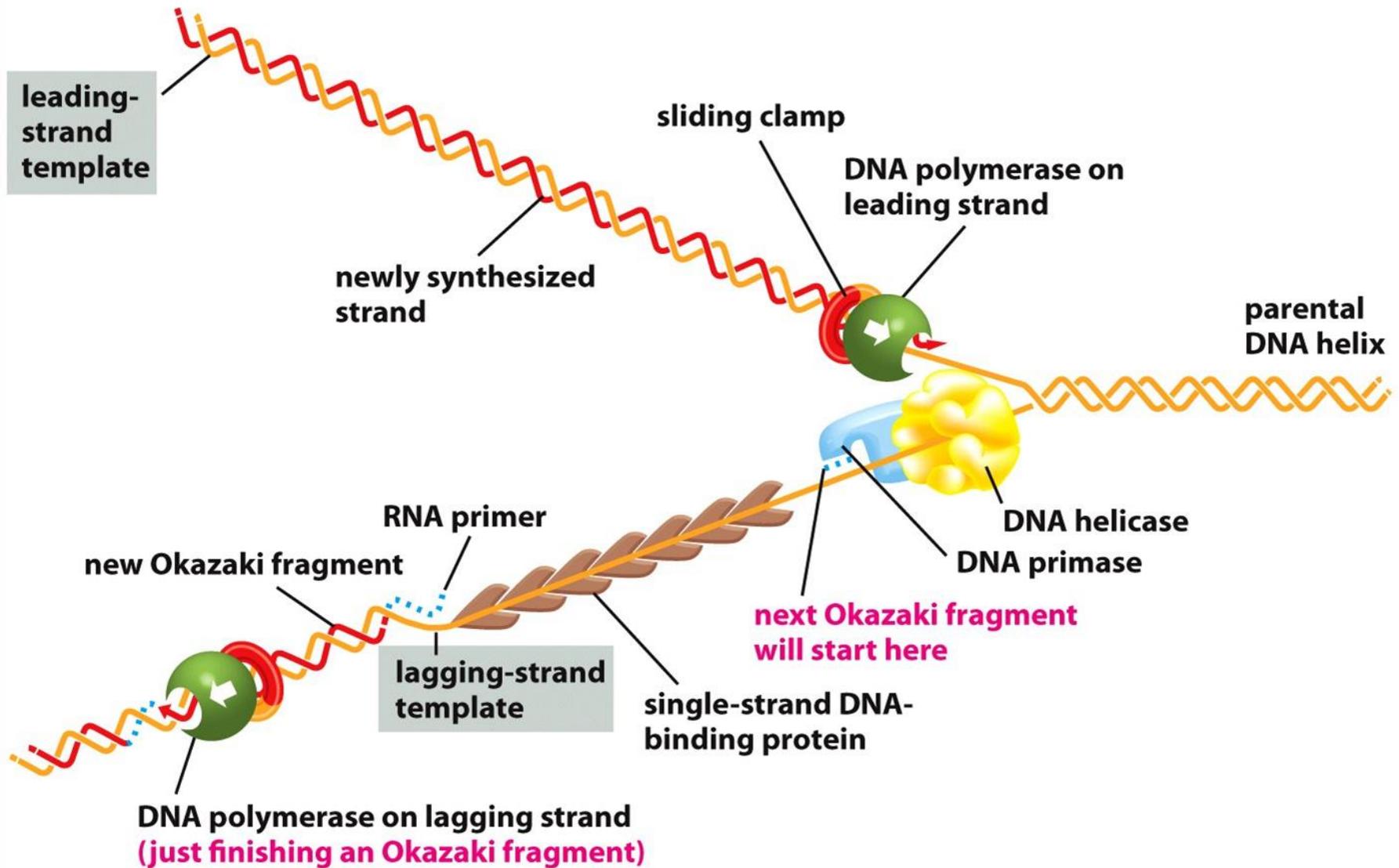
Processividade: quanto tempo a enzima fica associada ao seu molde antes que se solte espontaneamente
~500000 nt por “corrida” para a Pol III!

A ESTRUTURA DA HELICASE

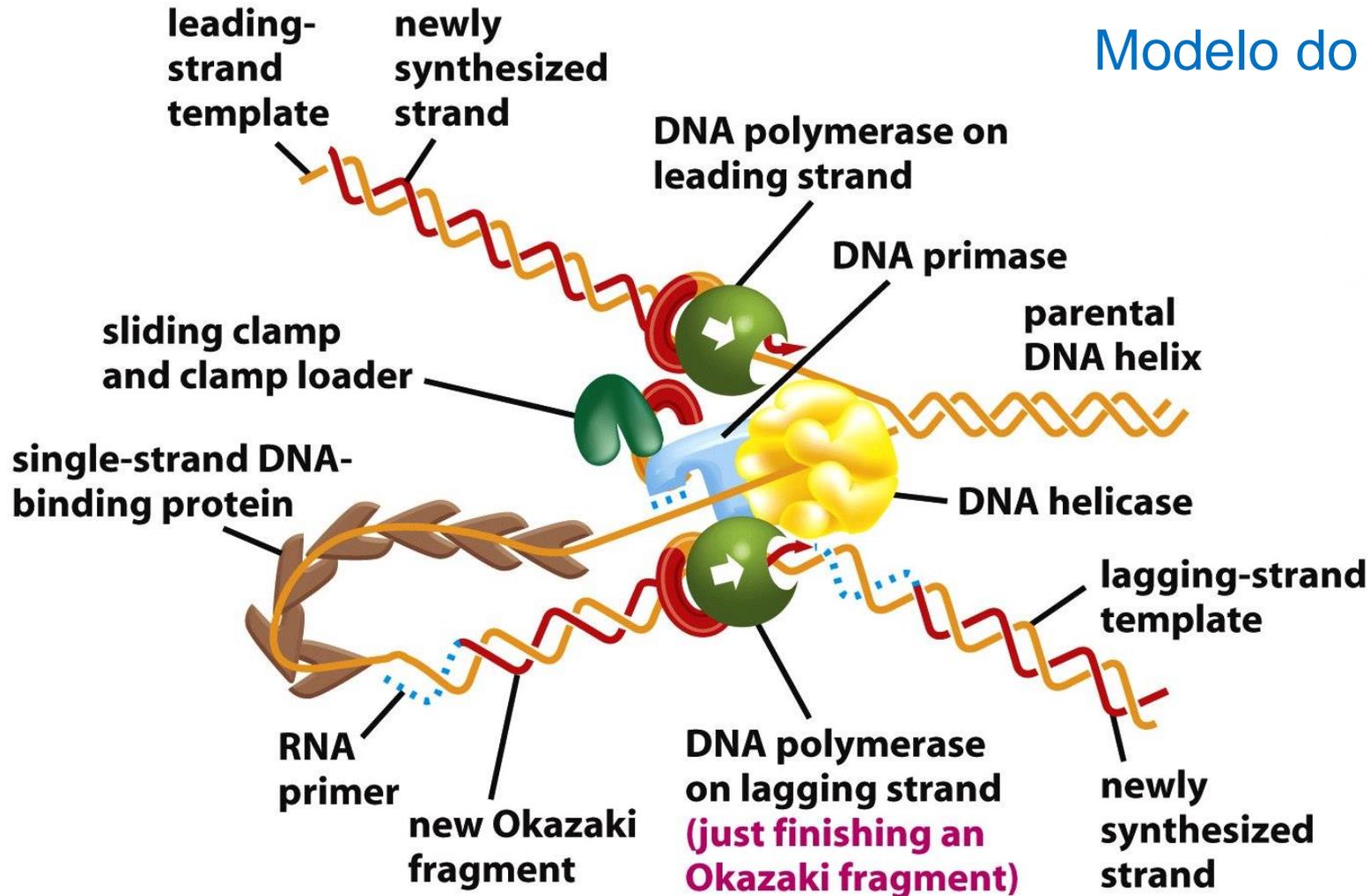


(C) https://www.youtube.com/watch?v=n6lAvjqby_4

Maquinaria de replicação



O molde da fita descontínua dá uma volta na DNA polimerase para entrar na orientação correta:



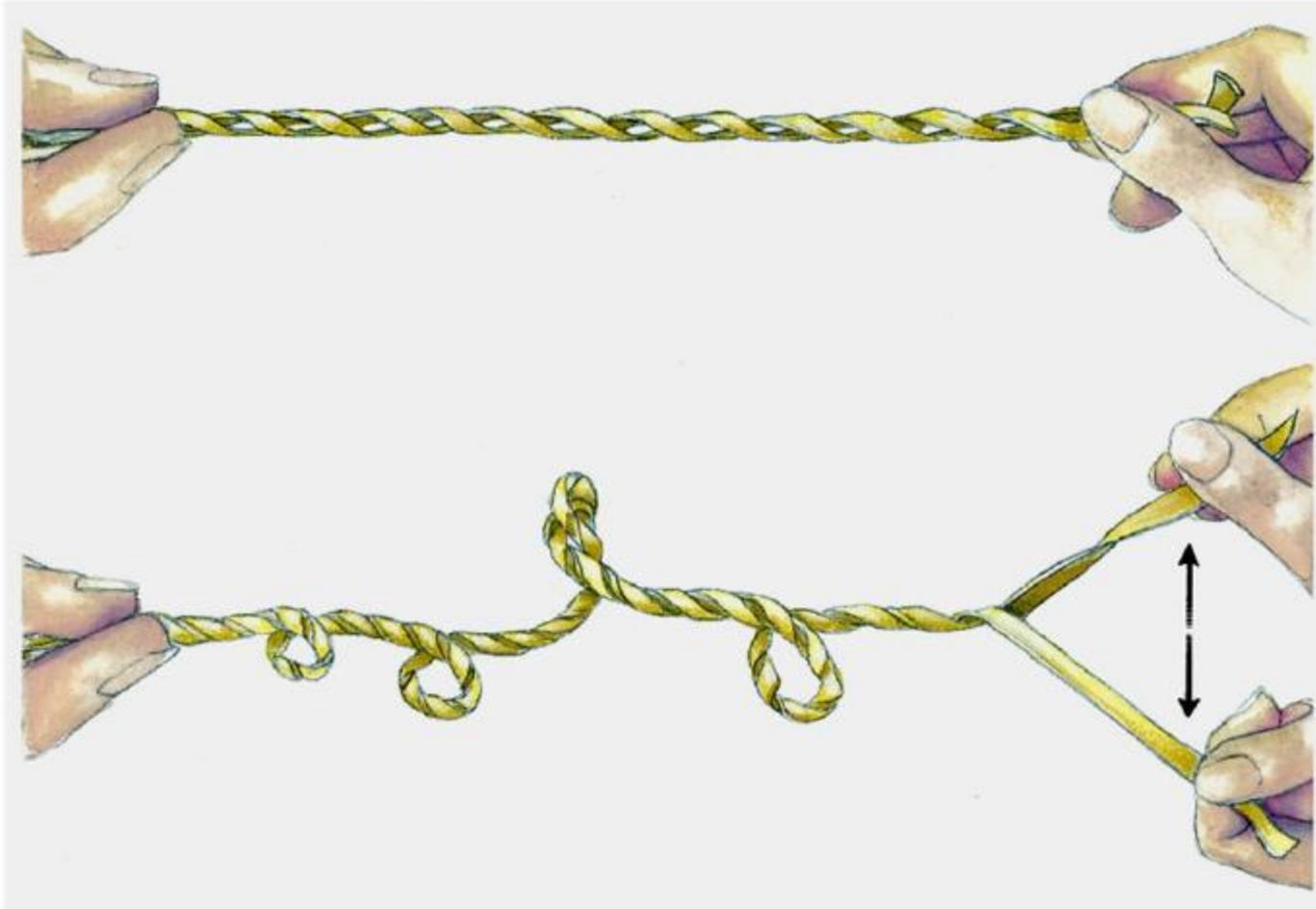
Modelo do trombone



Figure 5-19a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

<https://app.jove.com/es/science-education/v/11552/the-replisome>

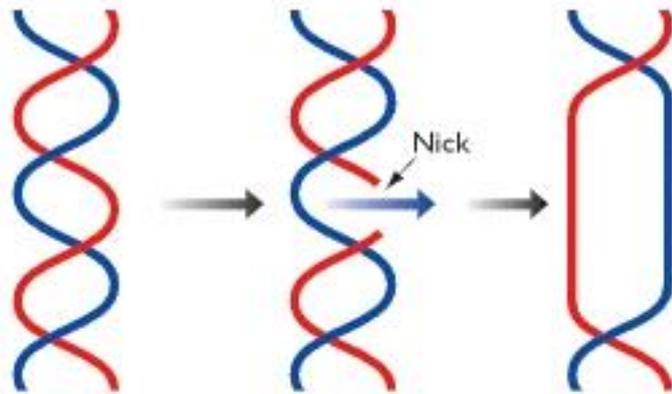
Superenrolamento para anular a tensão criada
pela abertura da hélice



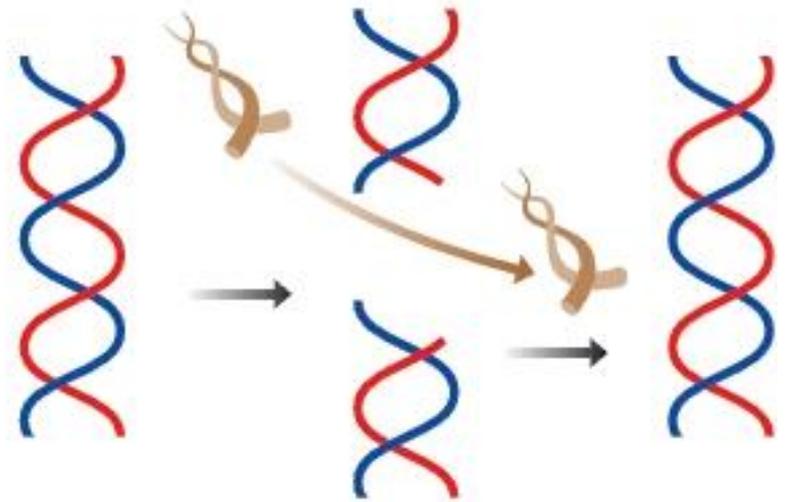
Outras proteínas envolvidas na replicação

Topoisomerases

Tipo I



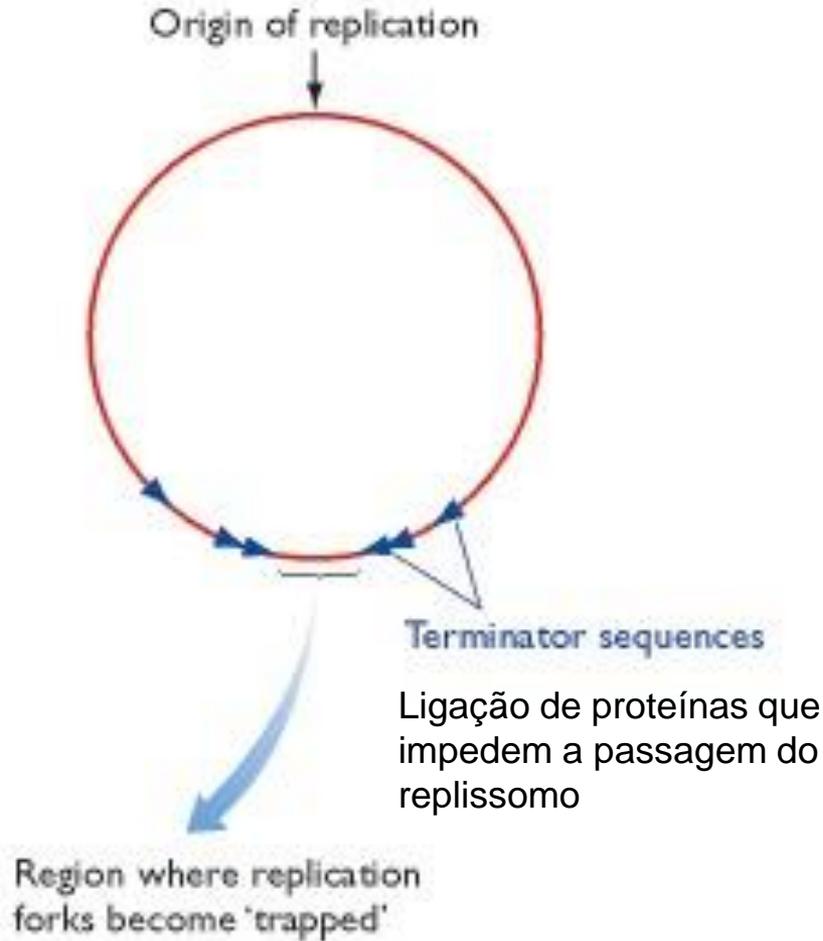
Tipo II



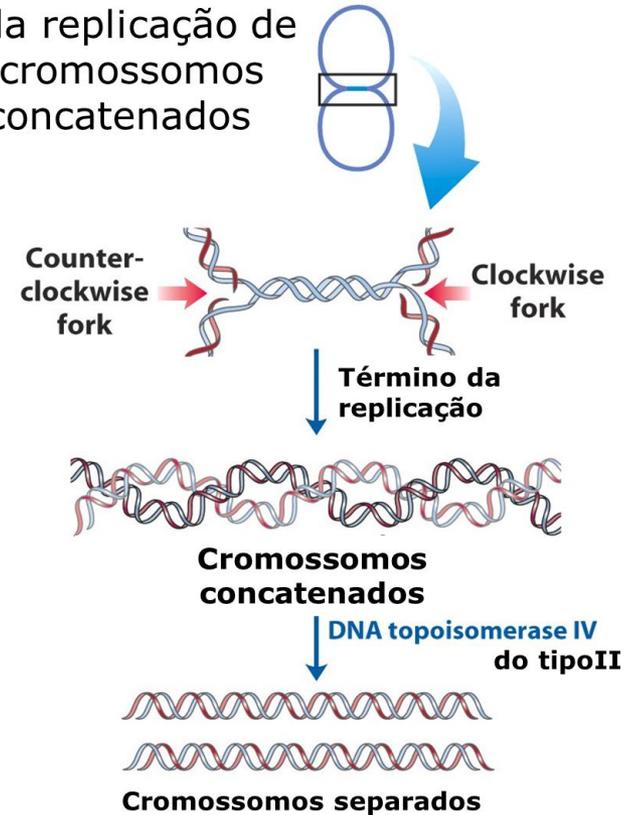
Podem relaxar super espiralamentos no DNA, remover emaranhados de DNA

Terminação da replicação do cromossomo de *E. coli*

(A) Terminator sequences in the *E. coli* genome

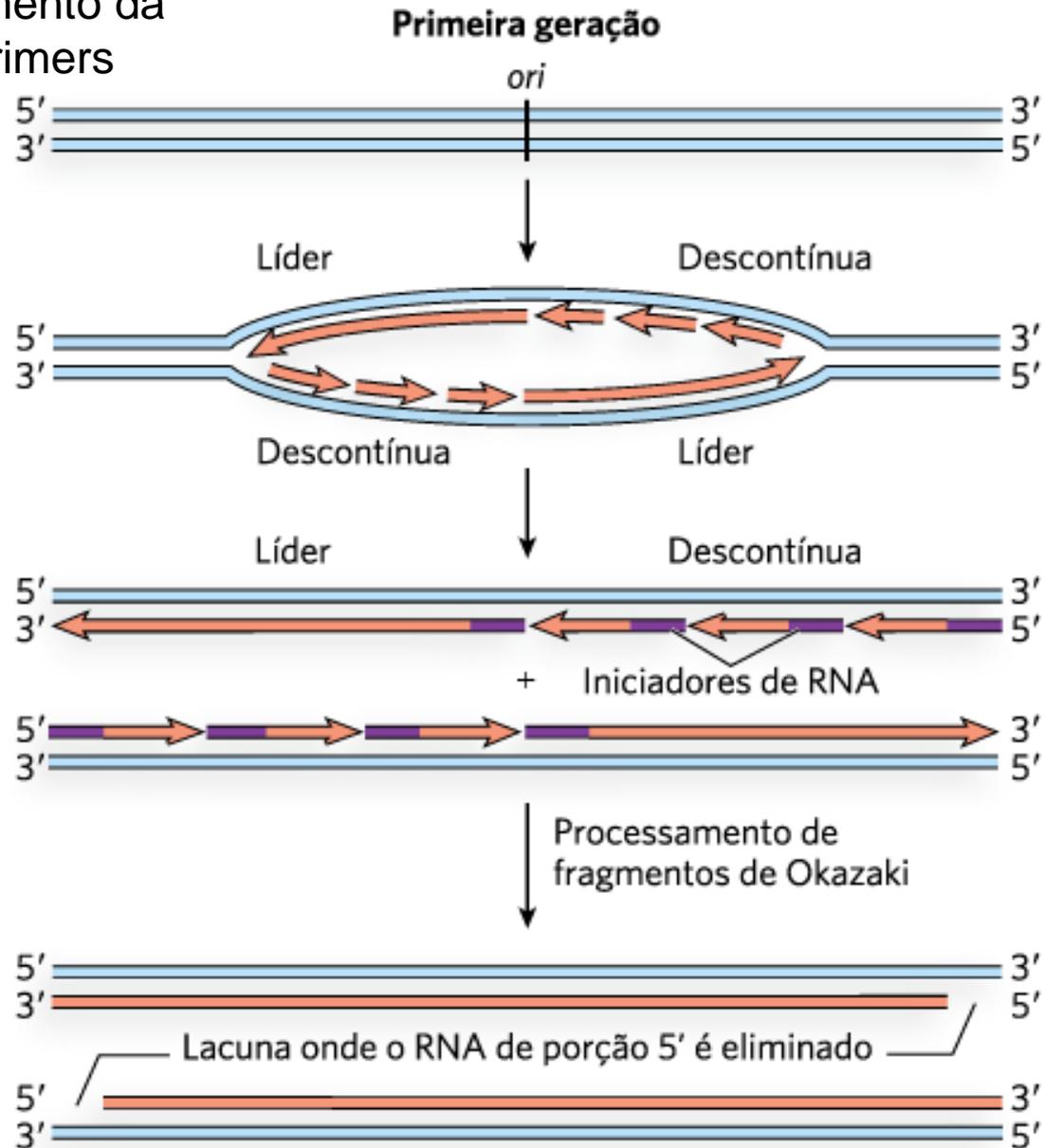


Ao final da replicação de *E. coli*, cromossomos estão concatenados



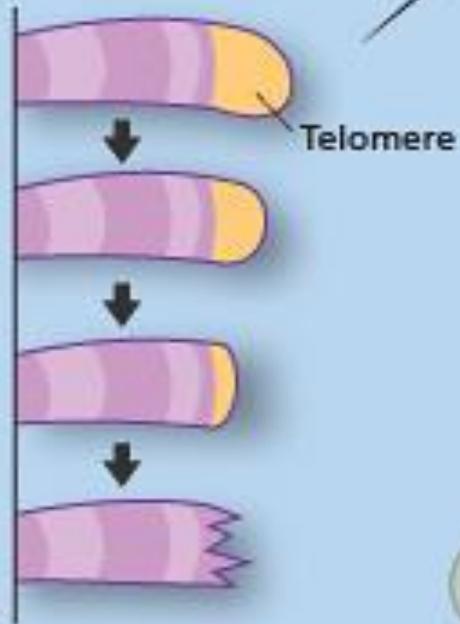
A replicação de cromossomos lineares

Problema: Como evitar o encurtamento da fita de DNA com a remoção dos primers que estão nas pontas??



A remoção dos *primers* causa encurtamento das fitas filhas!!!

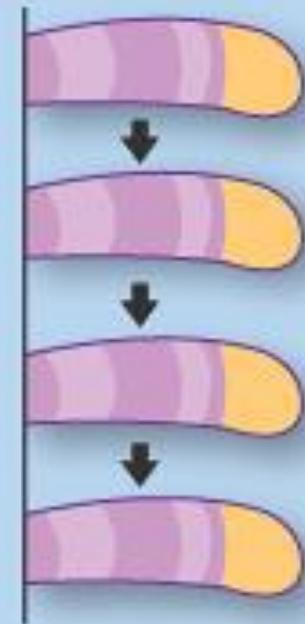
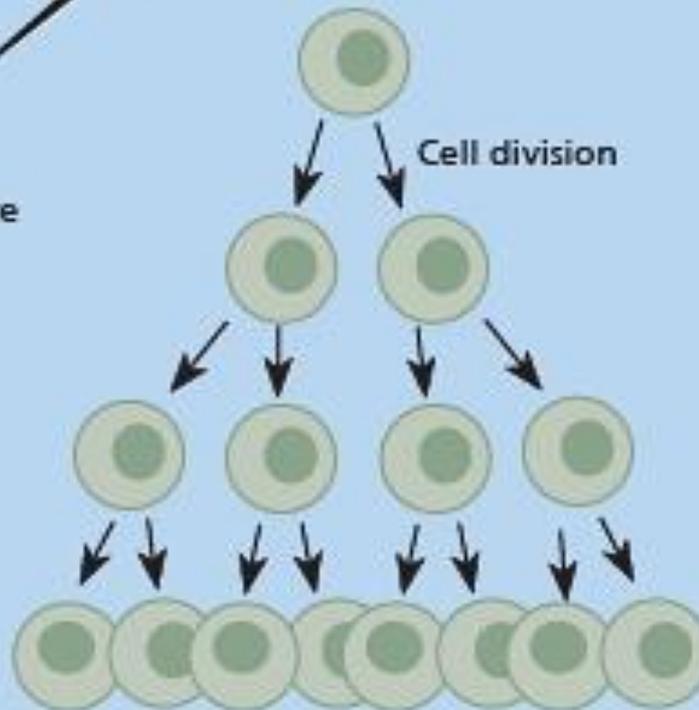
Esperado



Expected

Each time a cell divides, the chromosomes should be shortened. Finally the chromosomes should erode and be damaged.

Observado



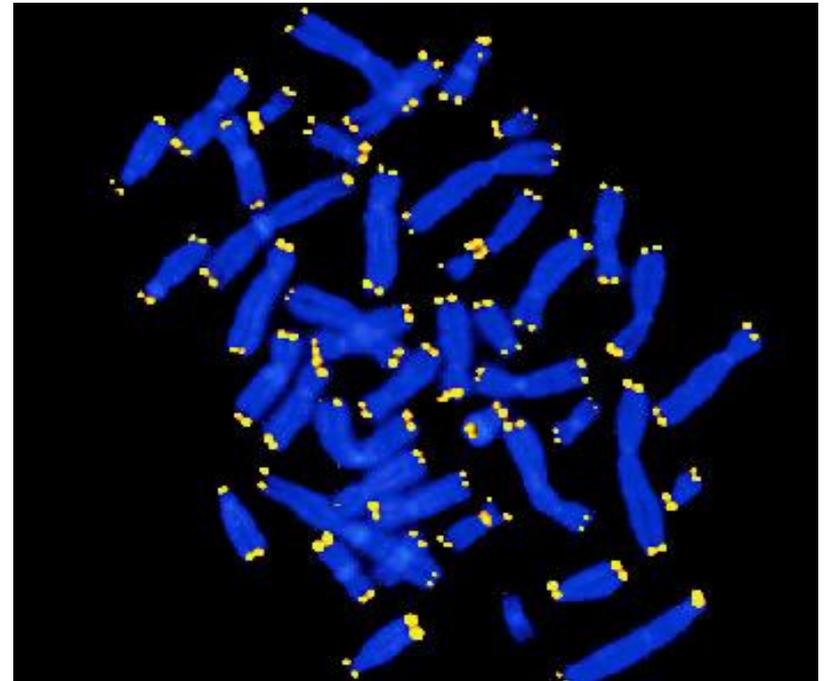
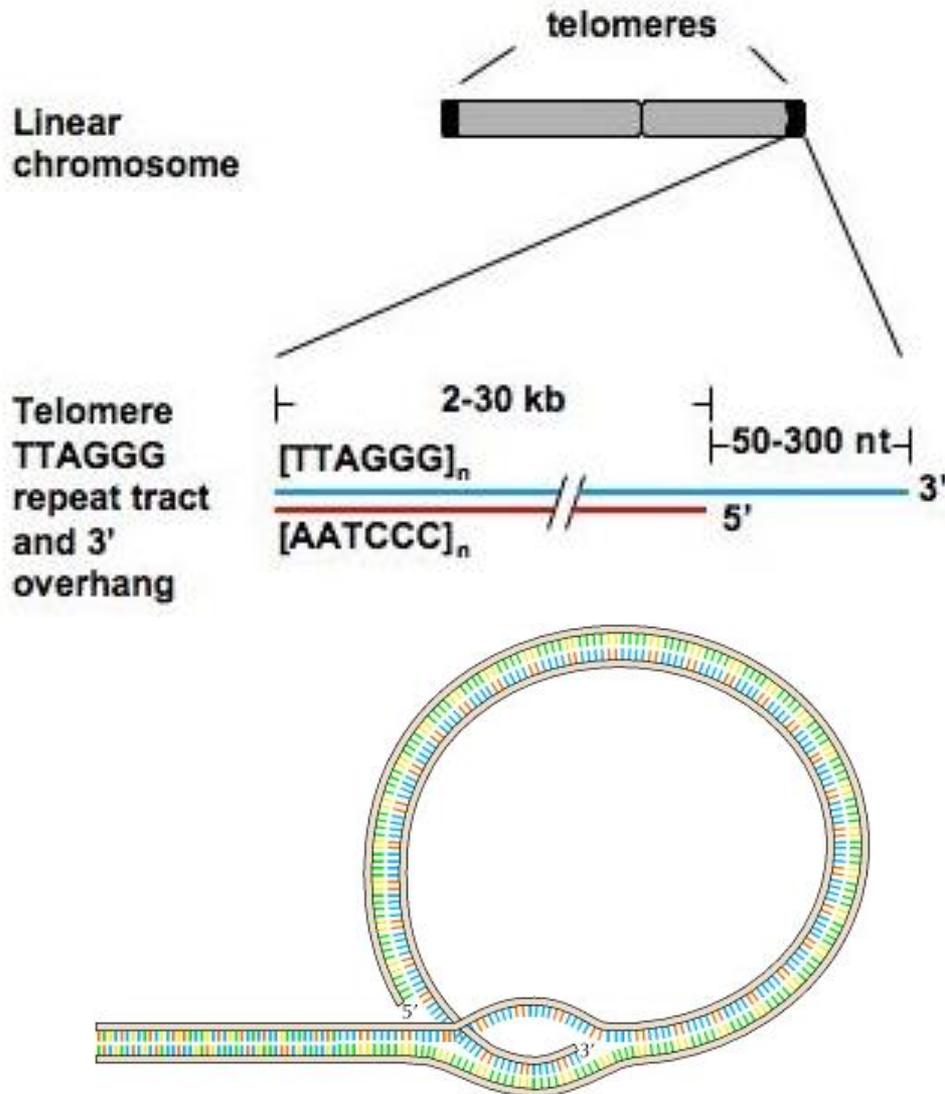
Observed

The chromosomes are protected. Their length and integrity are maintained.

Telômeros

Sequências repetidas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos: impedem o encurtamento dos cromossomos

Telomeric DNA in humans



Marcação fluorescente de Telômeros

azul: DNA

amarelo: TTAGGG (repetição telomérica)

Telomerase: adiciona os telômeros

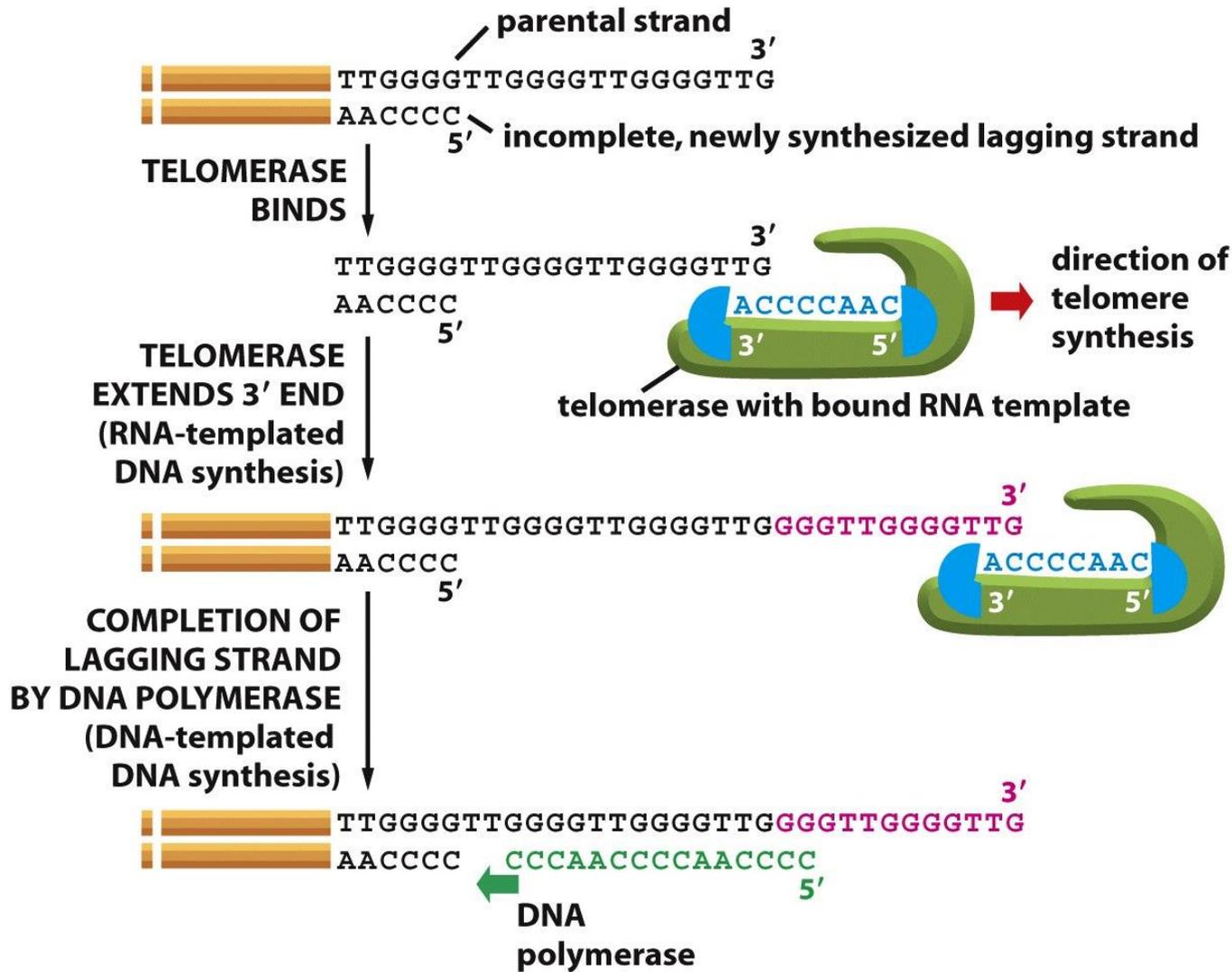
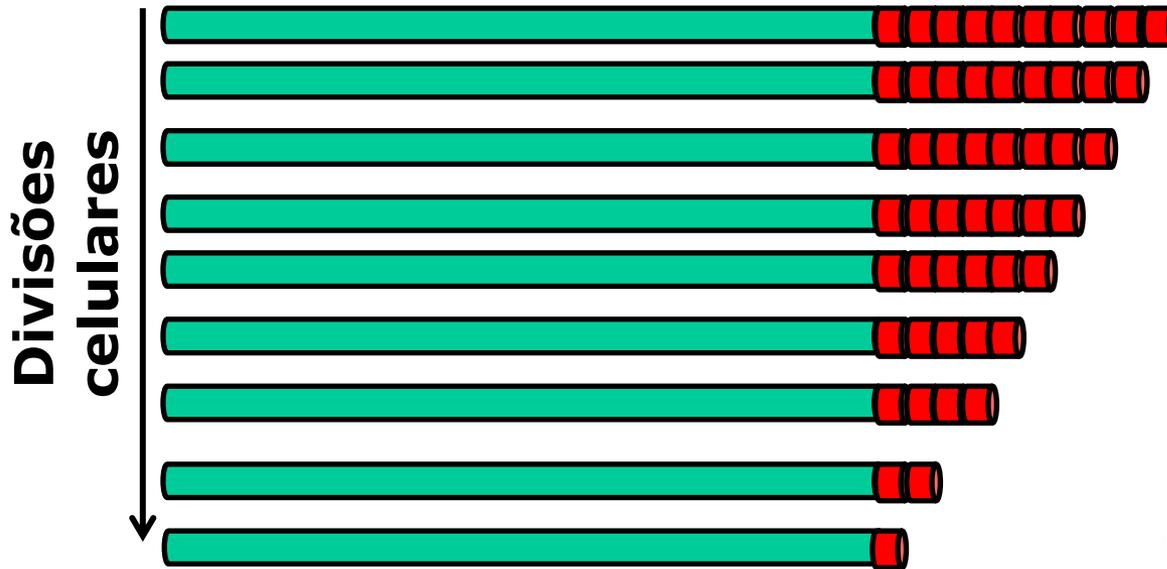


Figure 5-41 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Sucessivos eventos de replicação → telômeros
diminuem seu tamanho → **Senescência replicativa**



Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina, 2009,
pela descoberta de como os cromossomos são
protegidos pelos telômeros e pela telomerase



Elizabeth H. Blackburn



Carol W. Greider



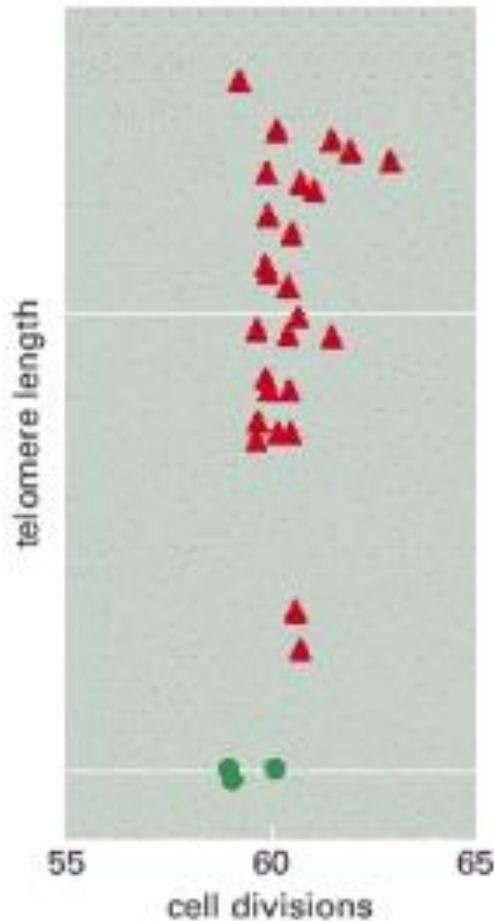
Jack W. Szostak

Limite de Hayflick

Capacidade limitada que as células têm de se dividir
Correlaciona-se com o tamanho dos telômeros

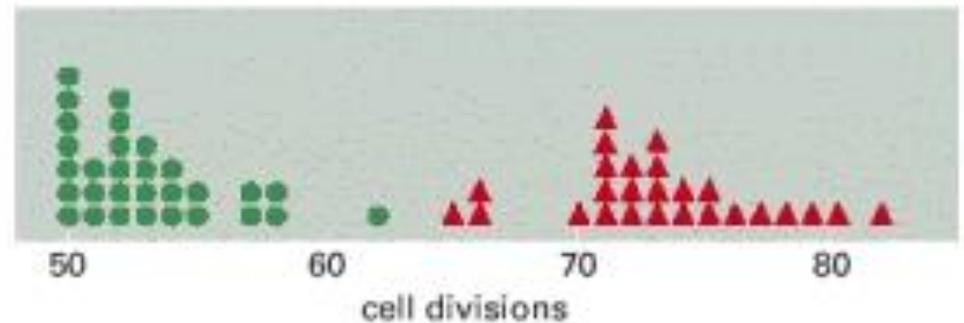
<https://www.youtube.com/watch?v=R5YiO6rKr-w>

Telomerase e senescência celular replicativa



(A) effect on telomere length

- ▲ cells expressing telomerase
- cells not expressing telomerase



(B) effect on proliferative potential