



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

QBQ0317 – 2020

Aula 5

Replicação do DNA

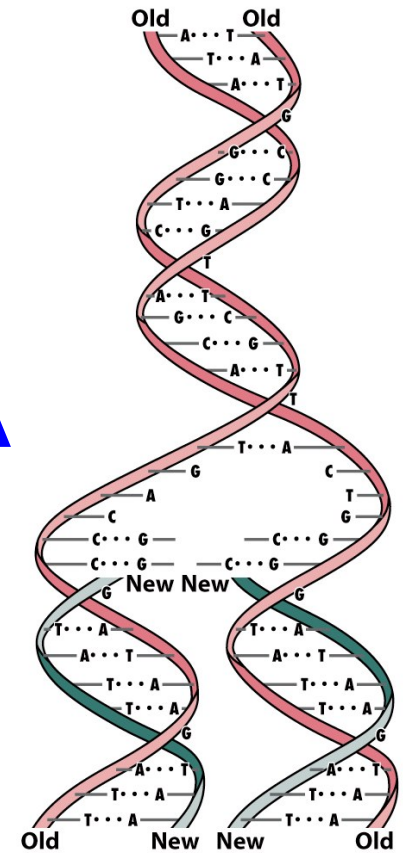


Figure 3-11 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Watson e Crick, 1953

Metabolismo do DNA

- **Replicação**

- O material genético precisa ser copiado e transferido para a geração seguinte, sem erros

- **Reparo**

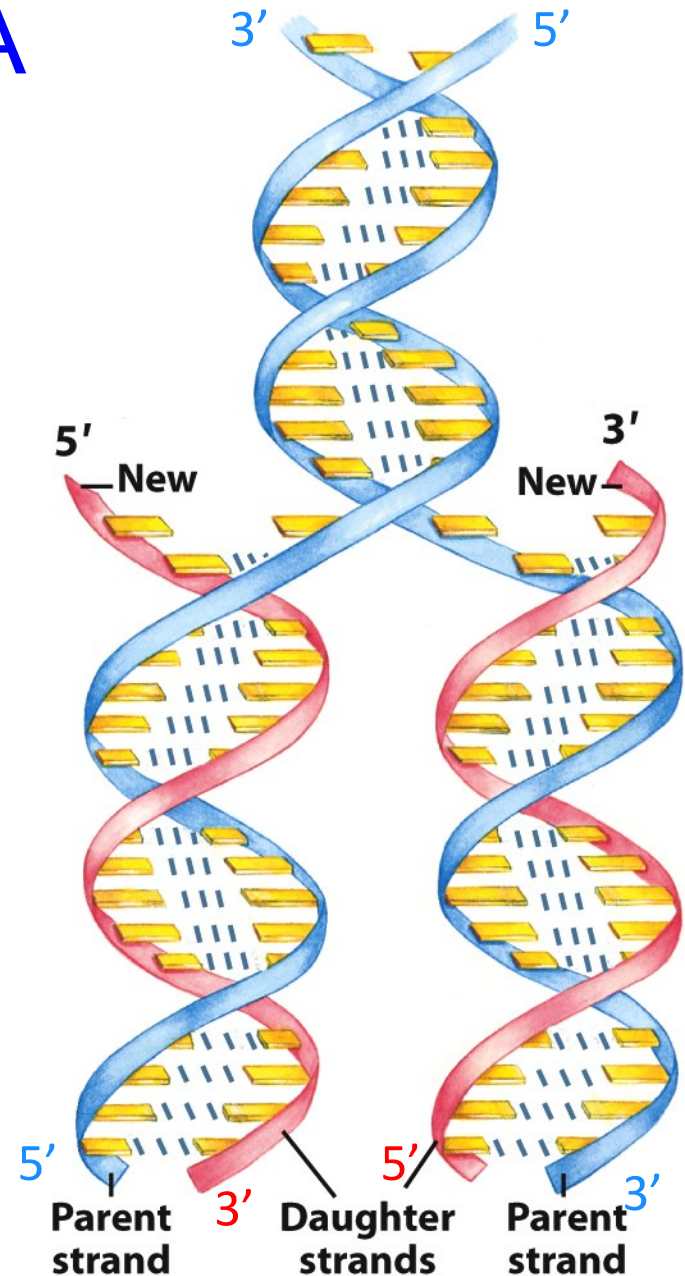
- Danos ou lesões no DNA são corrigidos, evitando mutações que podem alterar da informação genética

- **Recombinação**

- DNA é rearranjado → assegurar fidelidade ou gerar diversidade

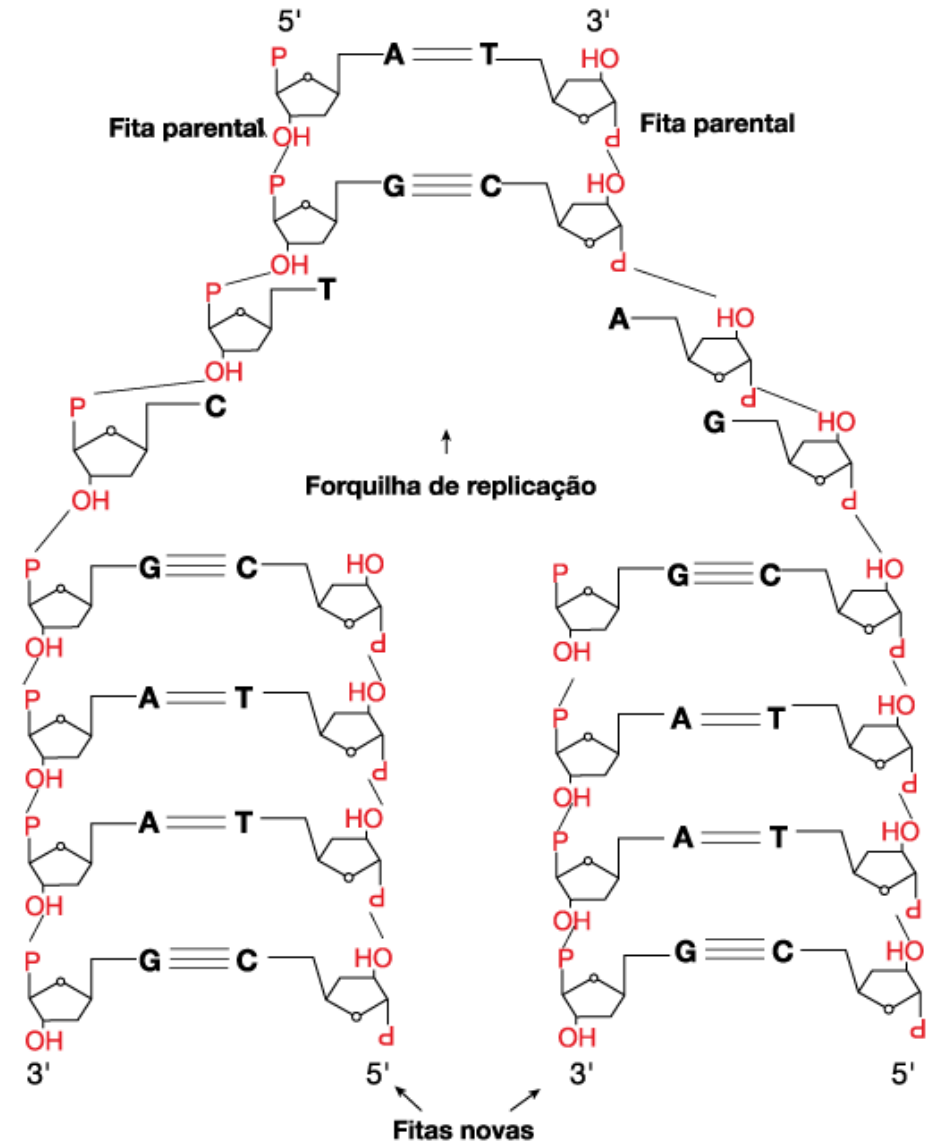
A replicação do DNA é semi-conservativa

- A fita dupla se abre e cada fita-mãe serve de molde para uma fita-filha
- Cada fita é antiparalela à fita complementar

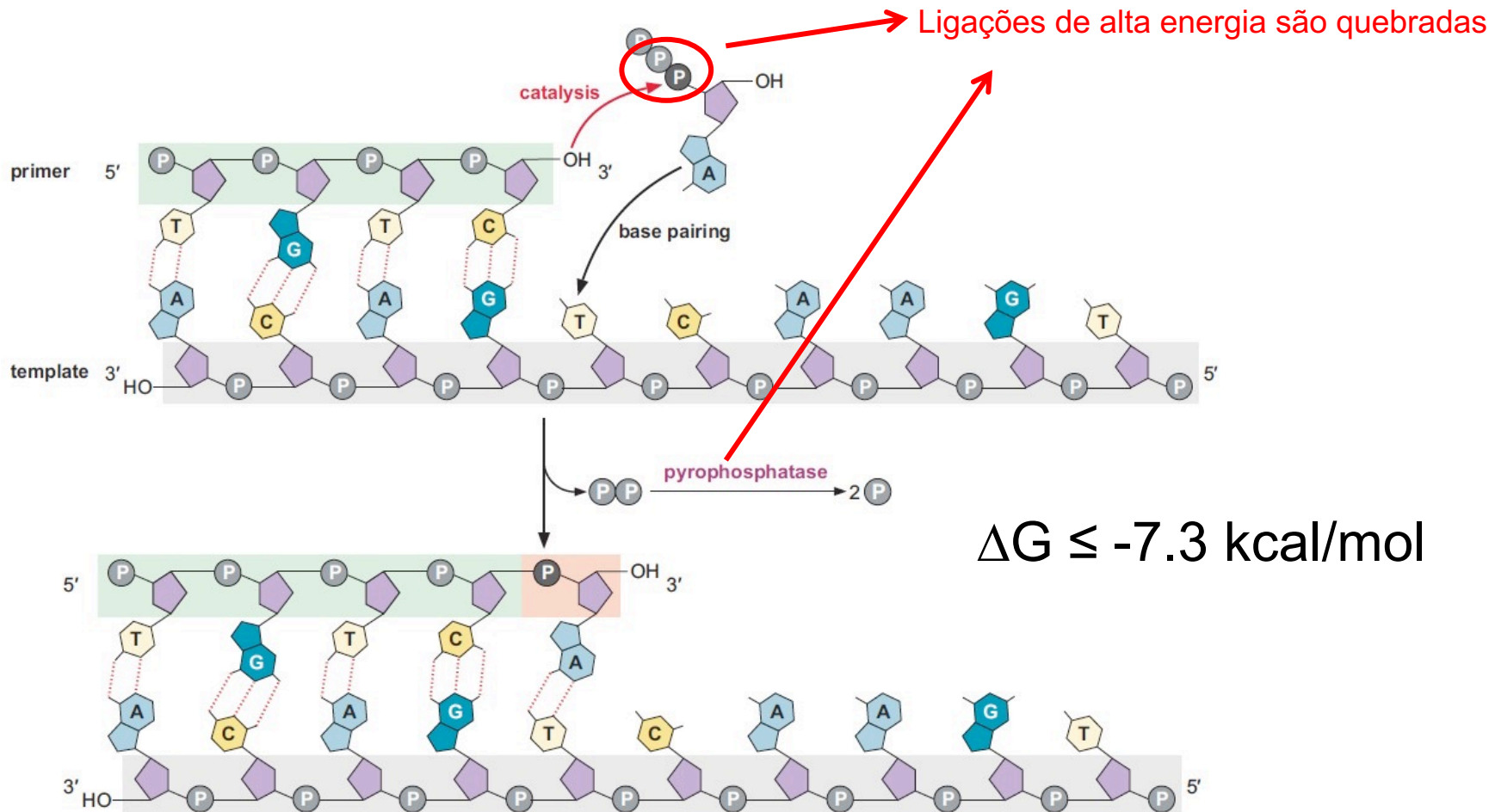


Como se dá a síntese do DNA?

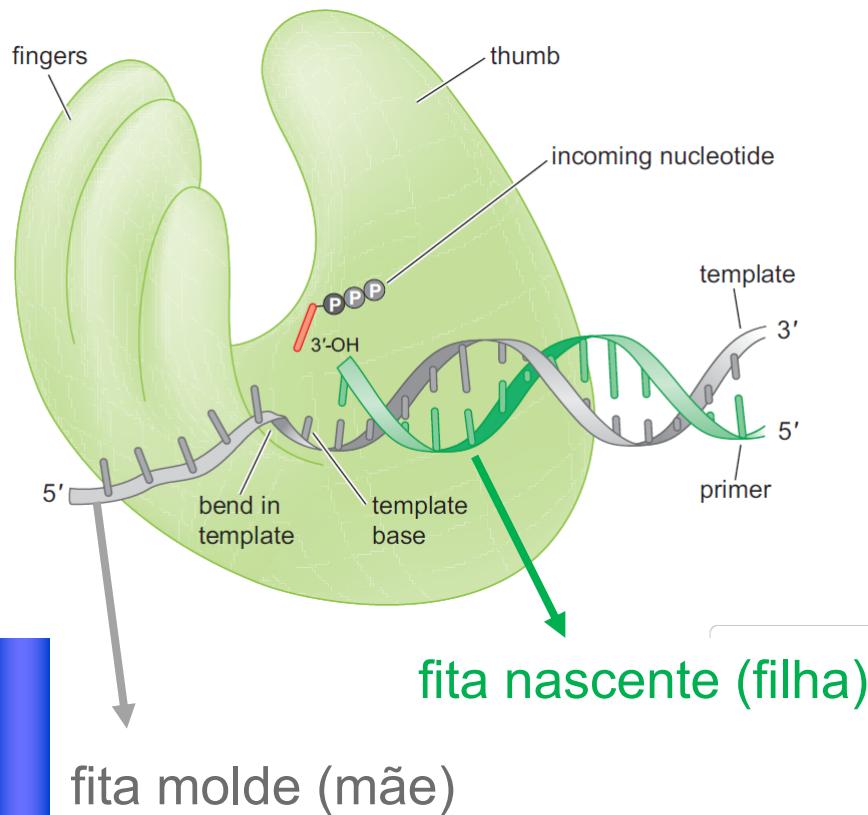
- Mecanismo baseado no pareamento de bases
- Estrutura do DNA contém a **informação** necessária para perpetuar a sequência de bases
- Mas como os nucleotídeos são adicionados?



Síntese de DNA



DNA polimerases: enzimas que sintetizam DNA



- Substrato:
 - nucleotídeos-trifosfato
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos à extremidade **3'-OH** da fita nascente
- A DNA polimerase necessita de um **iniciador** (*primer*) e de um **molde** de DNA
- Sentido: **5' → 3'** (da fita nascente)

Replicação é bidirecional

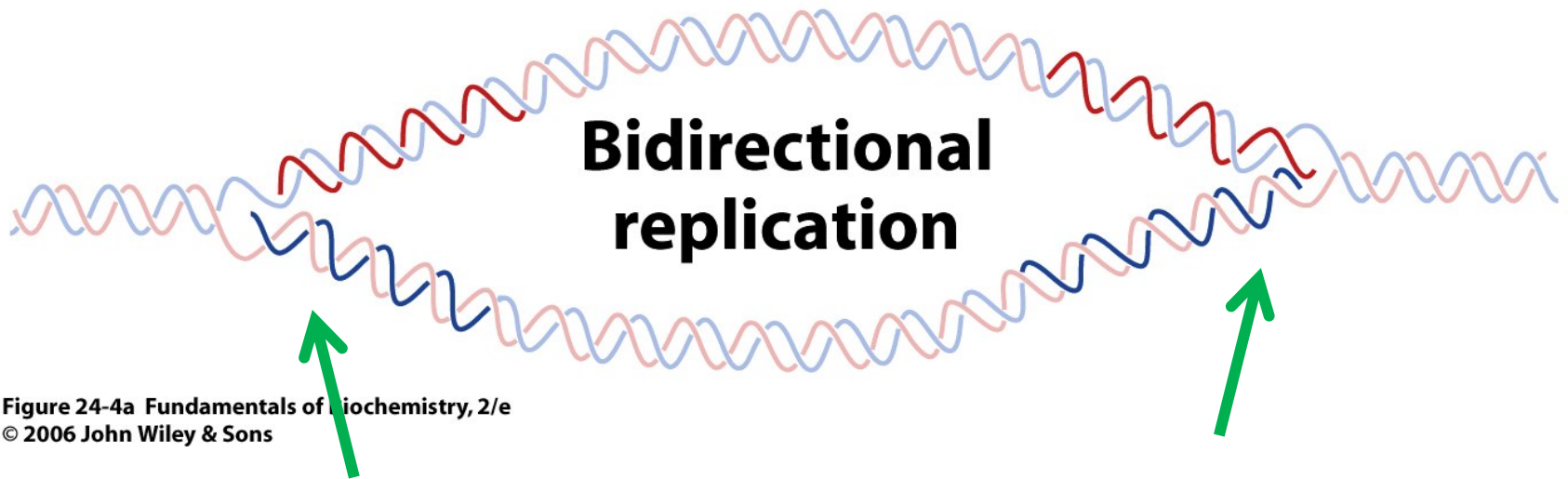


Figure 24-4a Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

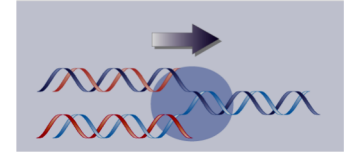
Duas forquilhas de replicação

Cada bolha tem quatro subunidades catalíticas da DNA polimerase, uma para cada fita nascente

Definições

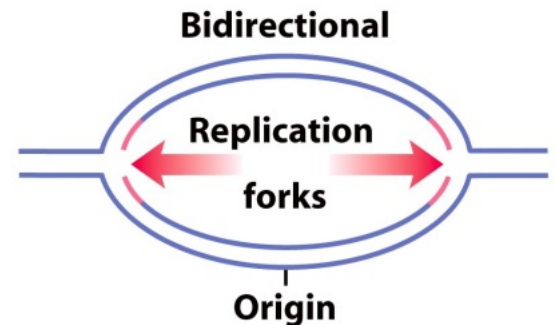
- **Forquilha de replicação** >

- região do DNA onde há a transição do DNA parental de fita dupla para as novas fitas duplas (uma parental e uma filha)
- duas forquilhas por **bolha**



- **Bolha de replicação** ○

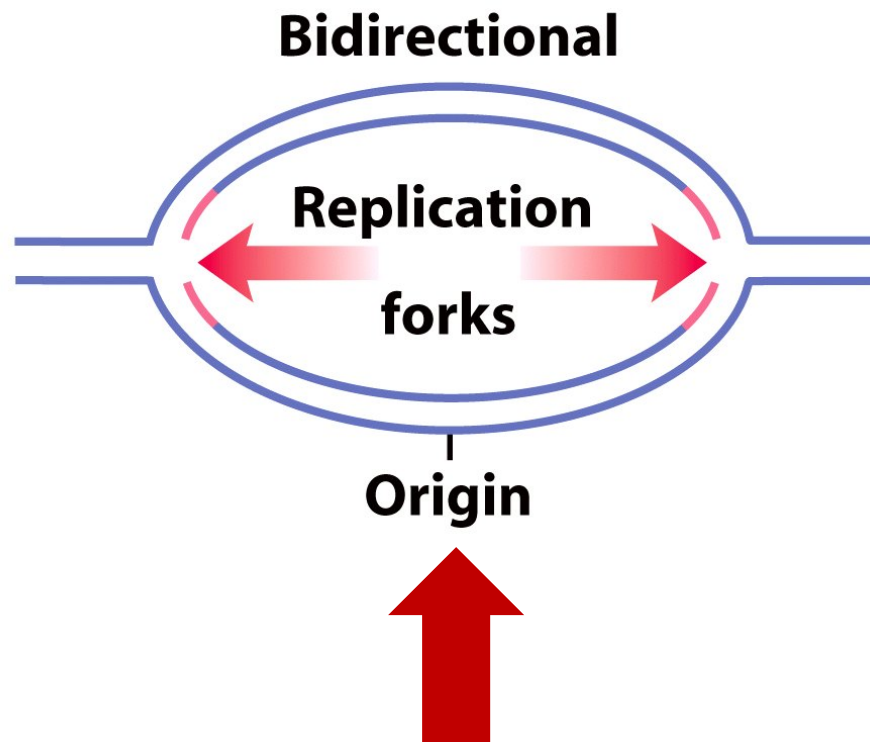
- região onde o DNA parental teve as fitas separadas a partir da **origem**
- delimitada por duas forquilhas



- **Origem de replicação (ori)** ○

- sequências específicas onde o DNA se desnatura e há a entrada da DNA polimerase

Replicação de cromossomos de eucariotos, bactérias e arqueias é BIDIRECIONAL



A replicação pode ser dividida em
três fases:

Início

Elongação

Término

Problemas

- DNA polimerases só se ligam em fita simples
 - Como a dupla fita é aberta?
- O início da replicação precisa ser regulado
 - Onde a replicação se inicia?

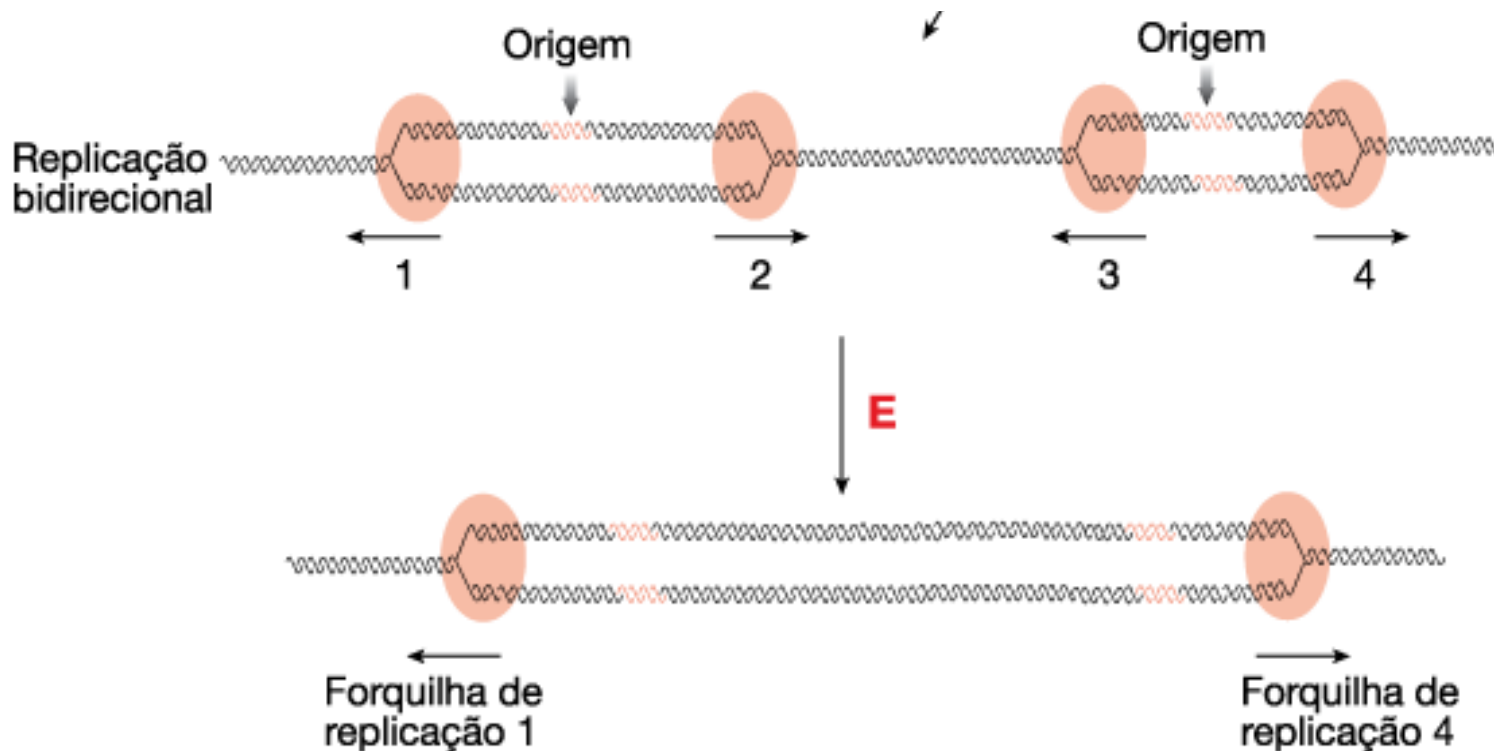


Início da replicação

Onde se inicia a replicação?

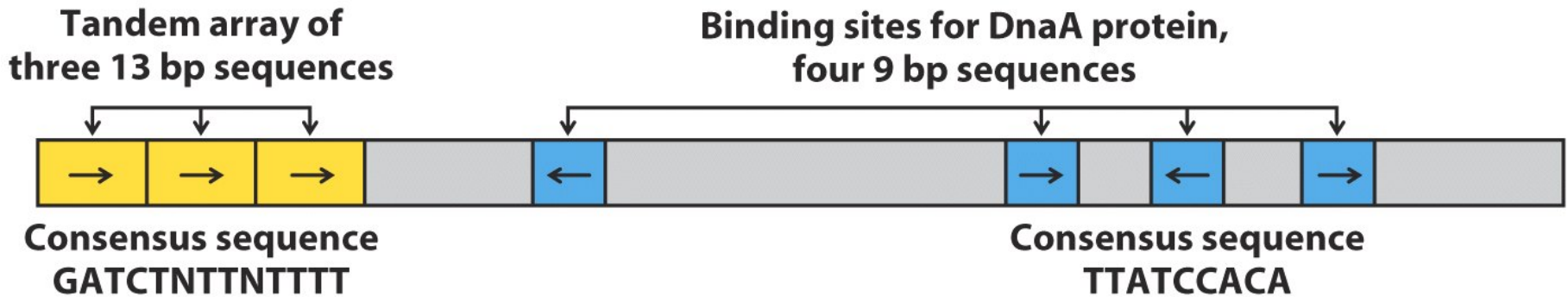
- Regiões específicas dos cromossomos
- *E. coli*: 1 origem (*oriC*)
- Eucariotos: múltiplas origens em cada cromossomo

Na replicação de cromossomos com mais de uma origem de replicação, **múltiplas origens** são **ativadas simultaneamente**



oriC

origem de replicação de *E. coli*



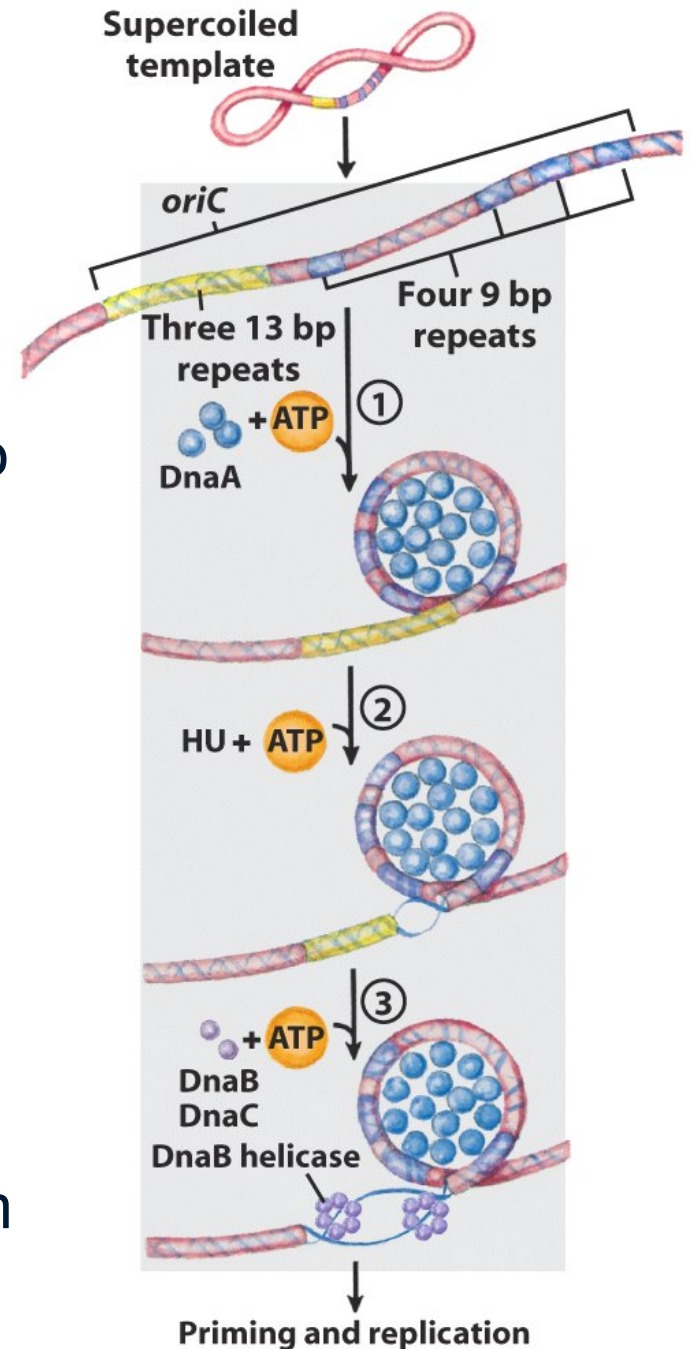
Região com **sequências específicas**, que são sítios de **ligação de proteínas**

Início da replicação na origem de *E. coli*

1. ~20 DnaA-ATP ligam-se à região de repetição de 9 bp.

2. As 3 regiões de 13 bp repetidos, ricas em A-T, são desnaturadas.

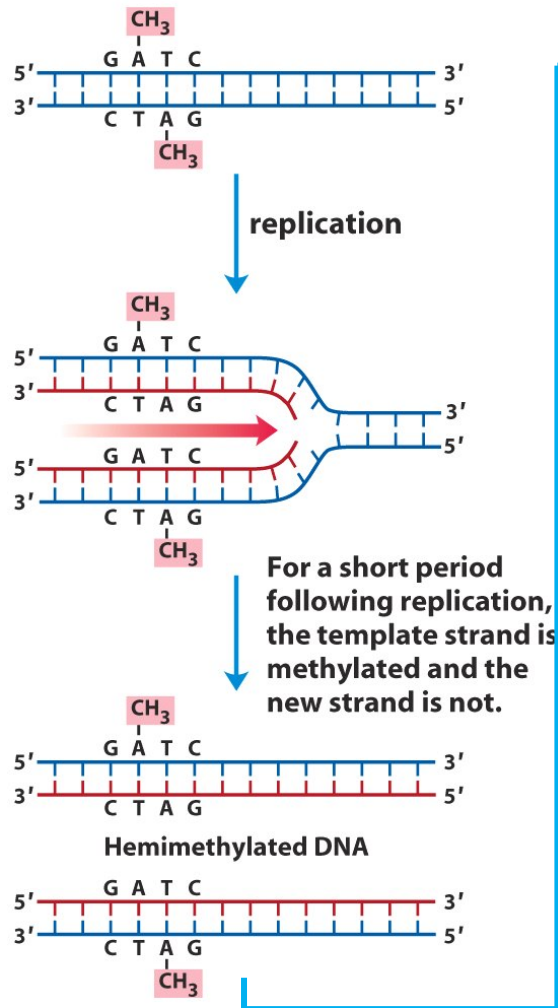
3. Hexâmeros de DnaB (helicase) ligam-se as fitas simples, junto com DnaC



Diversas proteína são necessárias para o início de replicação em *E. coli*

- DnaA
 - reconhece ori e abre fitas
- DnaB = helicase
 - quebra as ligações de hidrogênio entre as fitas
- DnaG = primase
 - sintetiza o *primer* de RNA
- Outras:
 - SSB → liga fita simples
 - DNA girase (topoisomerase II) → desfaz tensão
 - Dam metilase → metilação sítios GATC
 - Mais: RNA polimerase, HU, DnaC

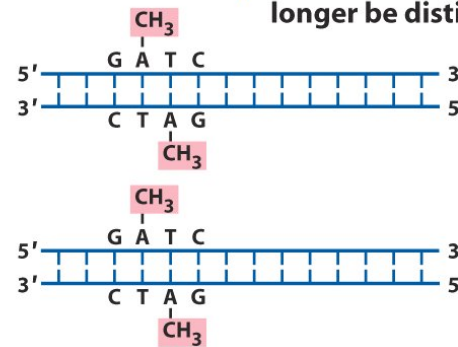
O início da replicação é controlado pela metilação do DNA na *oriC*



Origem hemimetilada:
inativa

Dam methylase

After a few minutes the new strand is methylated and the two strands can no longer be distinguished.



Origem metilada:
ativa

Apenas origens completamente metiladas nos sítios GATC podem iniciar a replicação

- Distinção da fita nova e da fita velha logo após a replicação

Elongação

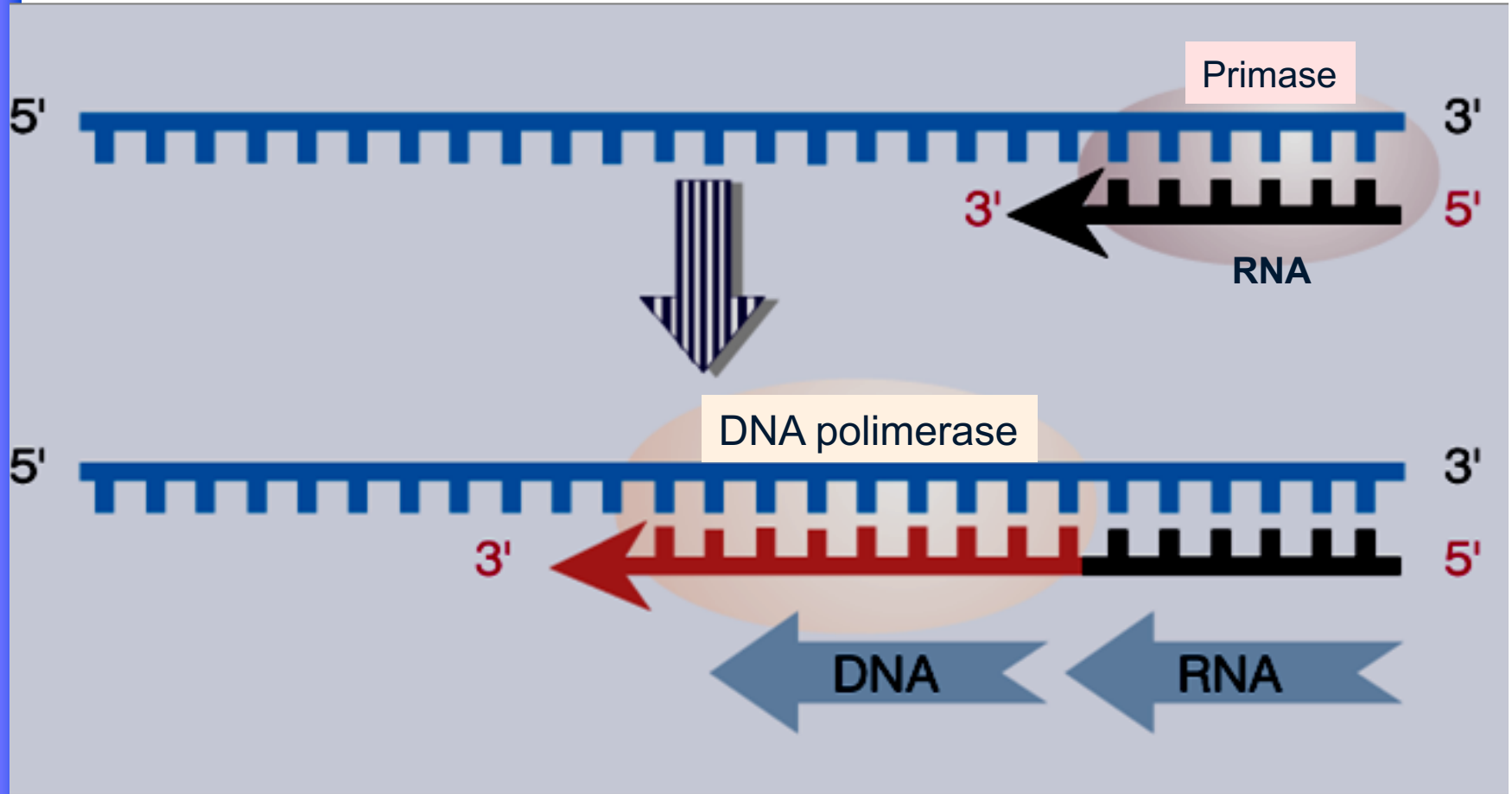
Problemas

- DNA polimerases precisam de uma extremidade **3'OH livre** para adicionar novos nucleotídeos à cadeia
 - quem coloca o **primeiro nt**?
- A replicação **SEMPRE** se dá no **sentido 5' → 3'**
 - como ocorre a síntese das **duas fitas** na forquilha?

Soluções!

- Antes da ação da DNA polimerase, um *primer* (iniciador) de RNA é adicionado
 - Primase (DnaG)
- Replicação é contínua numa fita e descontínua na outra
 - Fita líder ou contínua
 - Fita descontínua, com fragmentos de Okazaki

Primer: os primeiros nucleotídeos adicionados são RNA



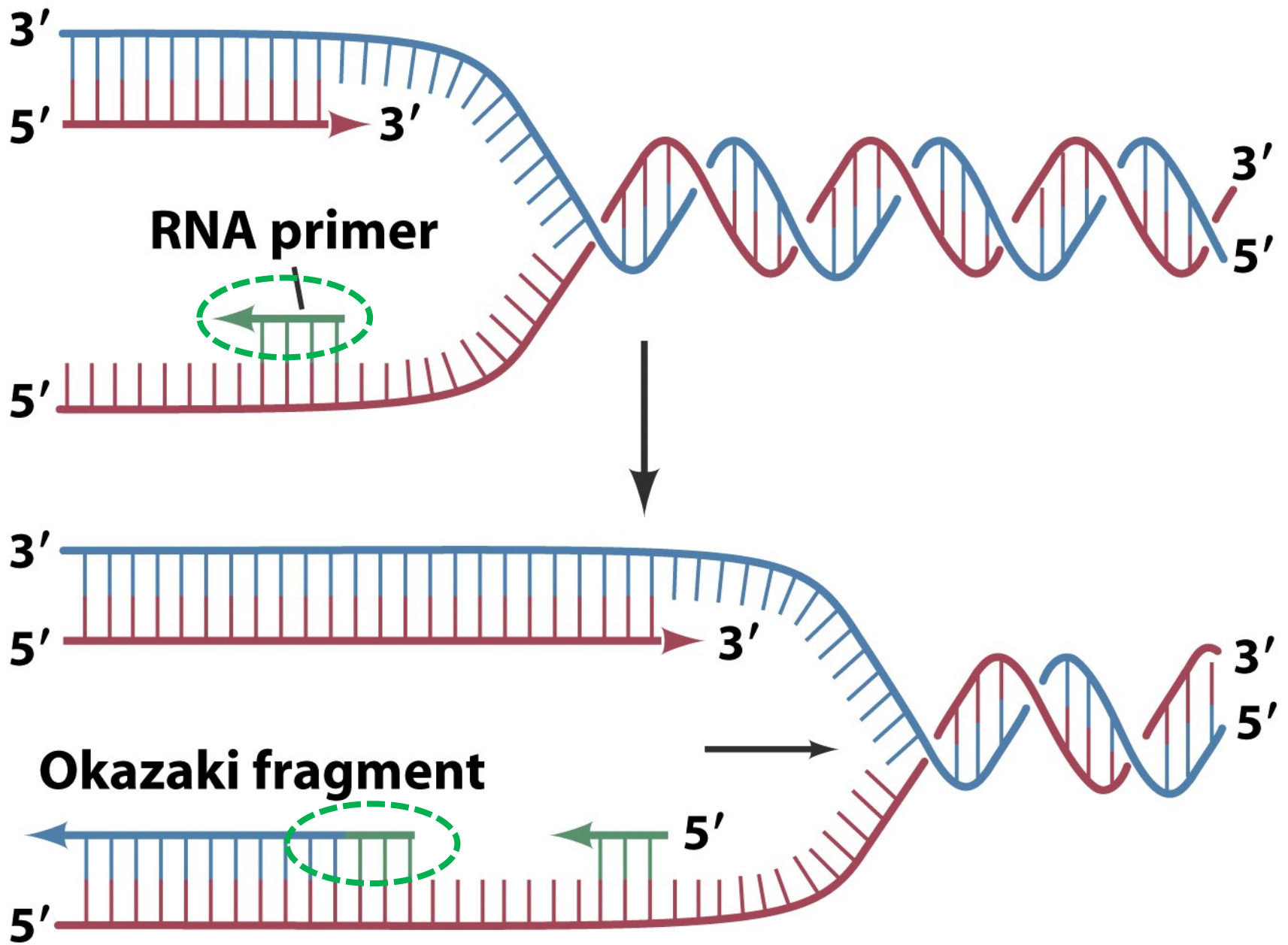


Figure 24-6 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Replissomo: conjunto de proteínas envolvidas na replicação do DNA

- **Helicase (DnaB)**

- abre as fitas de DNA
- desfaz ligações de H

- **SSB (*single strand binding*)**

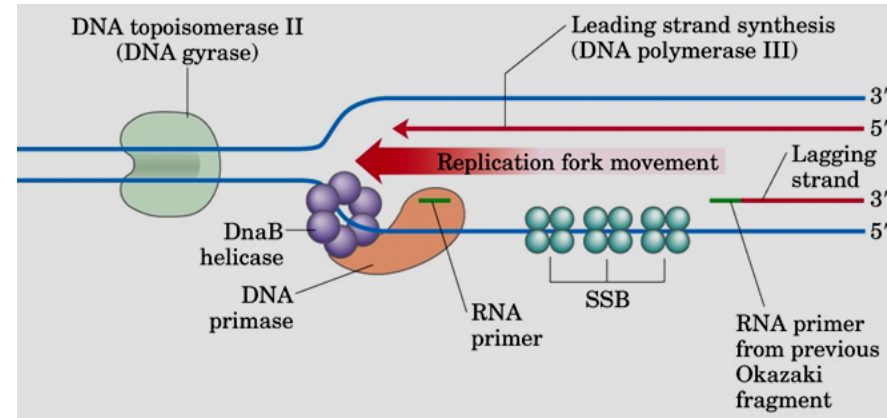
- mantém as fitas simples

- **DNA girase**

- desfaz a tensão do superenrolamento

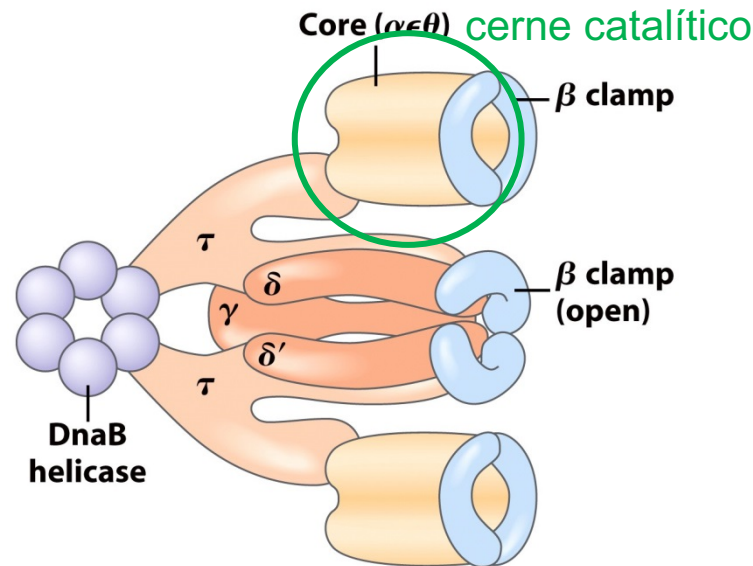
- **Primase (DnaG)**

- sintetiza o primer de RNA



Replissomo: conjunto de proteínas envolvidas na replicação do DNA

- **DNA polimerase III** – polimerase principal
 - Várias subunidades
 - **dois** cernes catalíticos, um para cada fita
 - catalisa a ligação **fosfodiéster**
 - **revisão** de erros



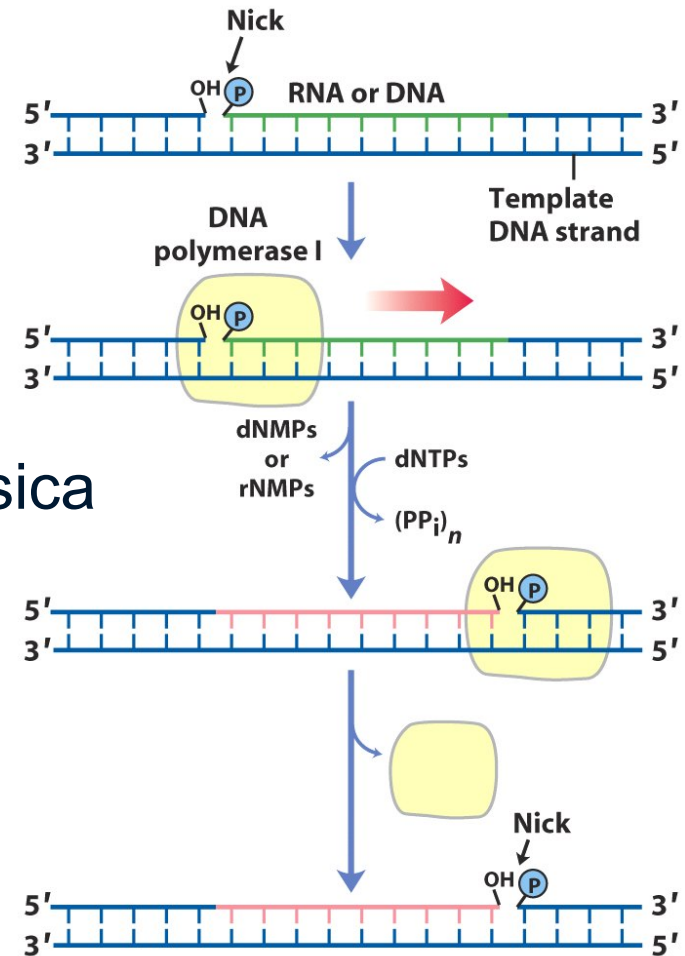
Replissomo: conjunto de proteínas envolvidas na replicação do DNA

- **DNA polimerase I**

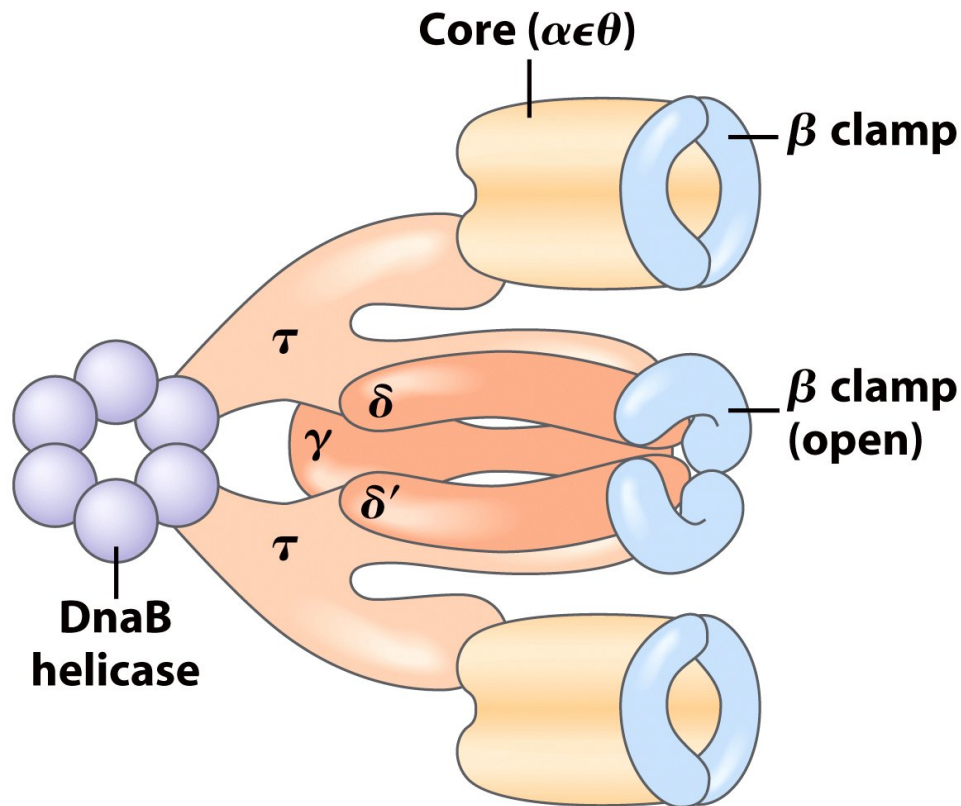
- Preenche as lacunas dos fragmentos de Okazaki
- retira os primers de RNA
 - Atividade 5' → 3' exonucleásica

- **DNA ligase**

- Liga os fragmentos de Okazaki



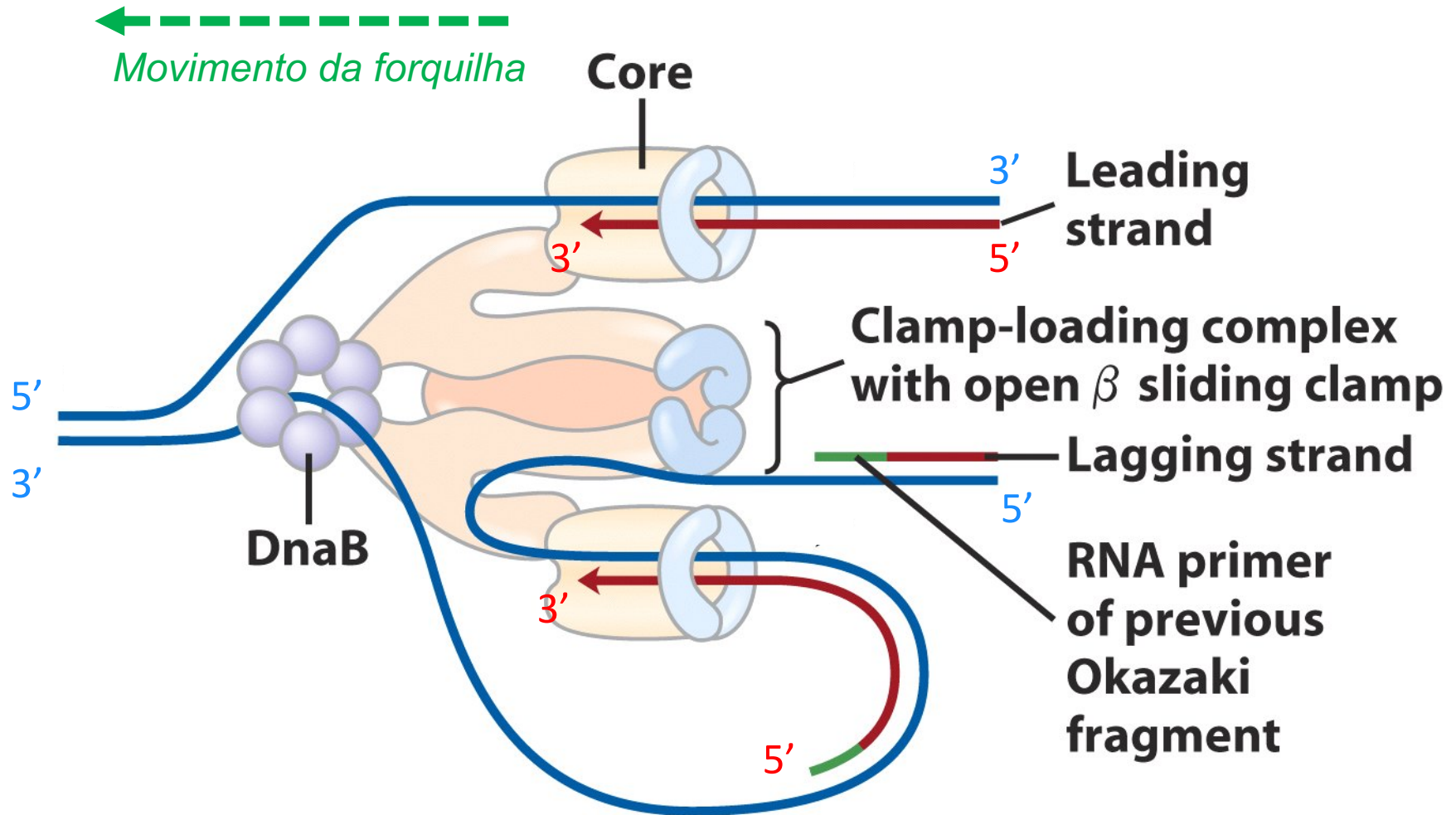
DNA polimerase III



- Enzima simétrica, com dois sítios catalíticos

Se as duas subunidades estão na mesma orientação, como as duas fitas são sintetizadas simultaneamente?

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



Modelo do Trombone - Animação

<http://www.youtube.com/watch?v=4jtmOZalvS0>

<https://www.youtube.com/watch?v=I9ArIJWYZHI>

Dinâmica da síntese da fita atrasada (descontínua)

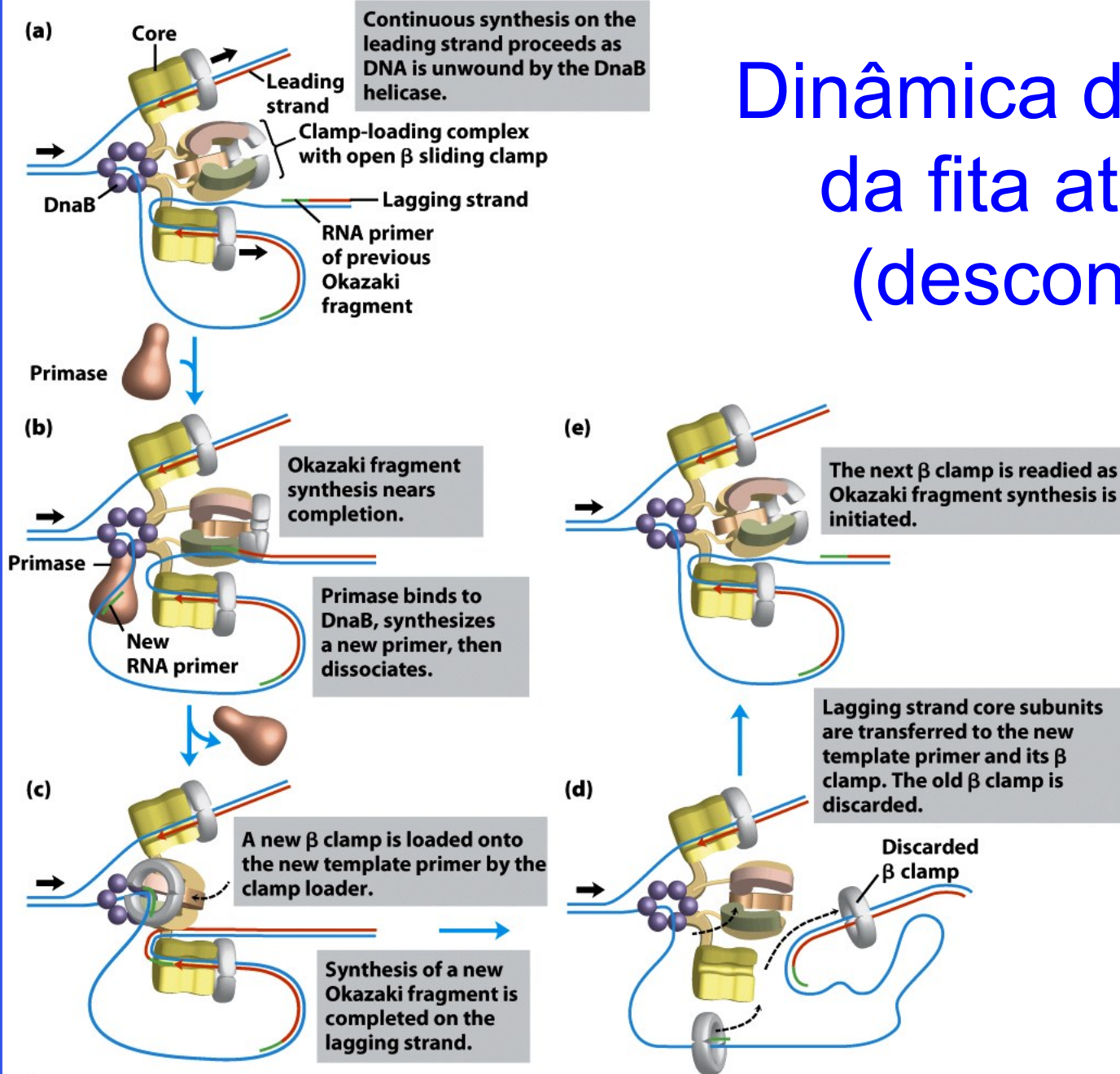


Figure 25-14

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

Resumo até aqui:

- Replicação é **semiconservativa** e **bidirecional**
- Replicação se inicia na **origem**
- **DNA polimerases:**
 - precisam de uma **OH livre** para adicionar desoxinucleotídeo
 - síntese é sempre na direção **5' → 3'** da fita nascente
- Fita **líder** tem replicação contínua
- Fita **atrasada ou descontínua** é replicada em fragmentos de Okasaki
- Diversas proteínas no **replissomo**

A replicação de DNA ocorre com enorme fidelidade

Em *E. coli*, um erro ocorre a cada 10^9 a 10^{10} nucleotídeos adicionados.

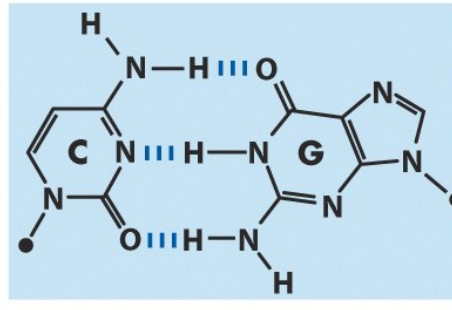
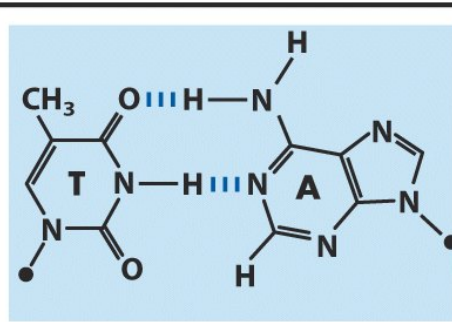
genoma de E. coli: $4,5 \times 10^6$ bp

A geometria dos pares de bases é importante para a fidelidade da replicação de DNA

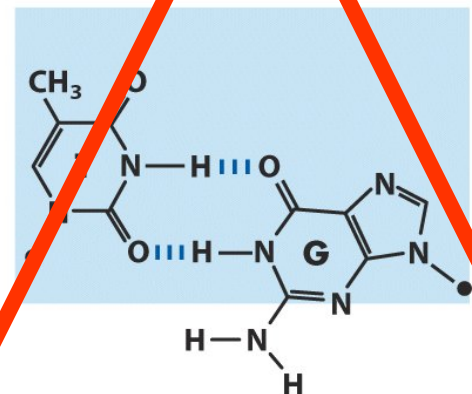
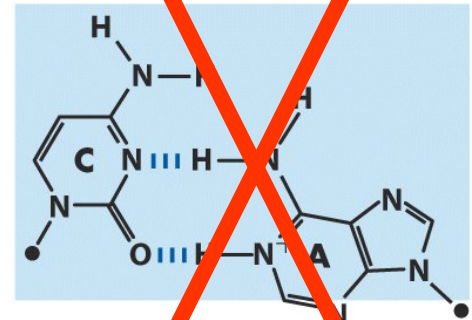
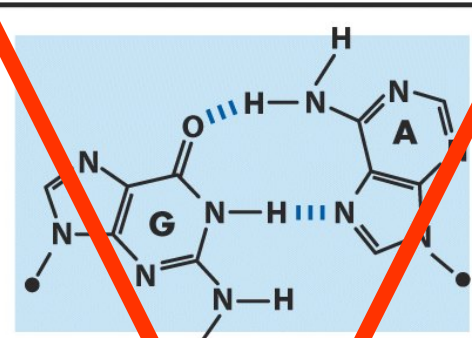
correto

incorreto

(a)

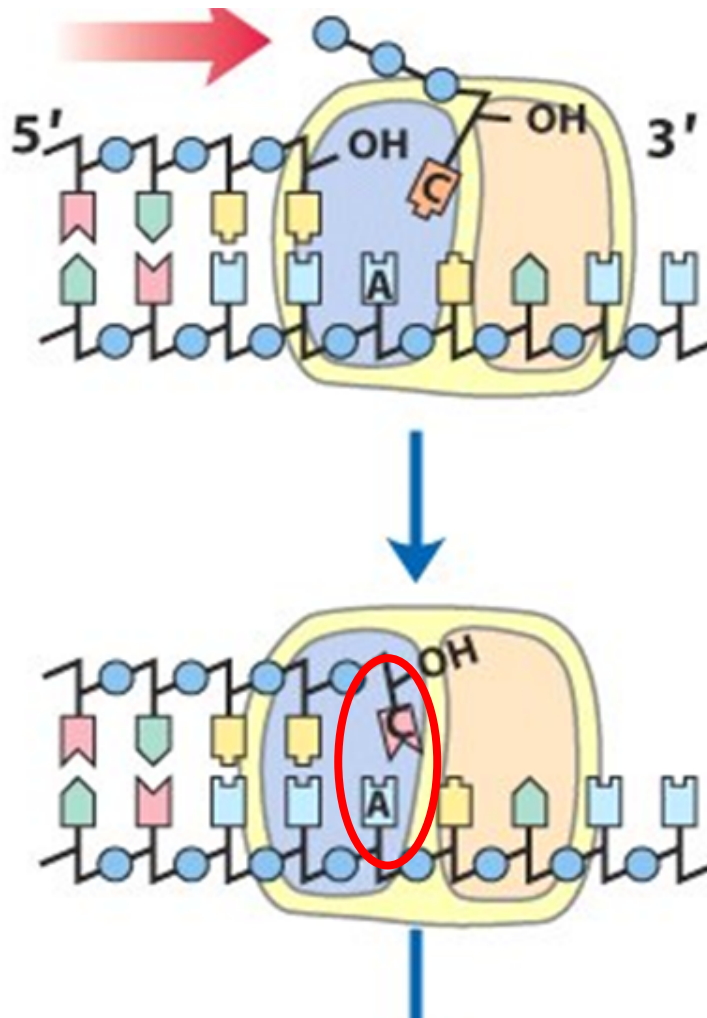


(b)

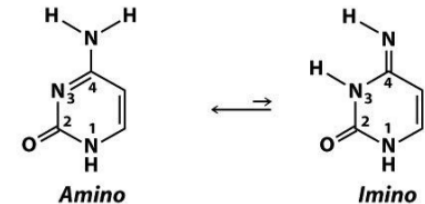


Revisão de prova (*proofreading*):

Erros de incorporação podem ser corrigidos durante a replicação pela própria DNA polimerase III

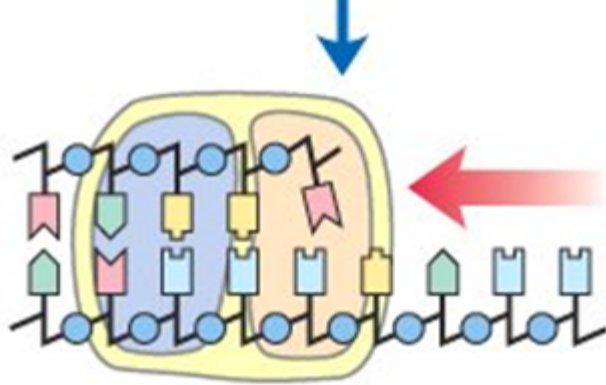


Citosina na forma imino
pareia com A

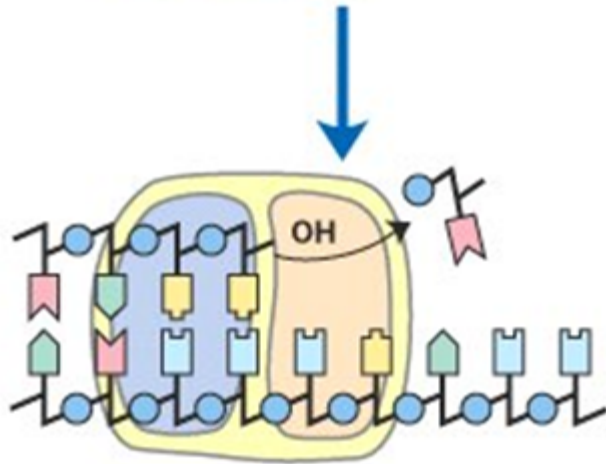


C na forma imino se
converte para forma
amino (mais comum) e
deixa de parear com A

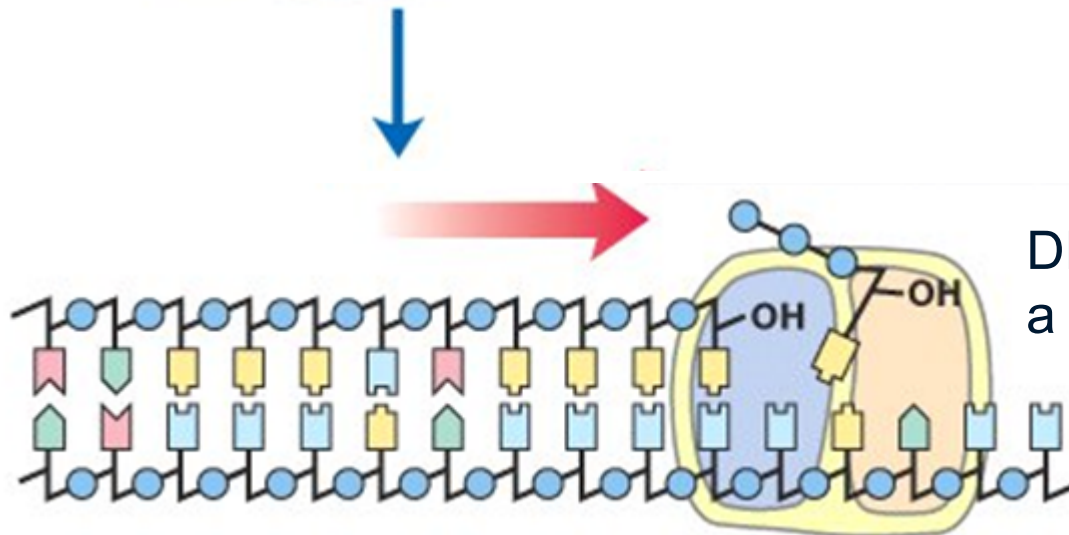




A extremidade 3'-OH não pareada impede a elongação da cadeia
DNA polimerase volta uma base



Nucleotídeo mal-pareado é removido pela subunidade épsilon

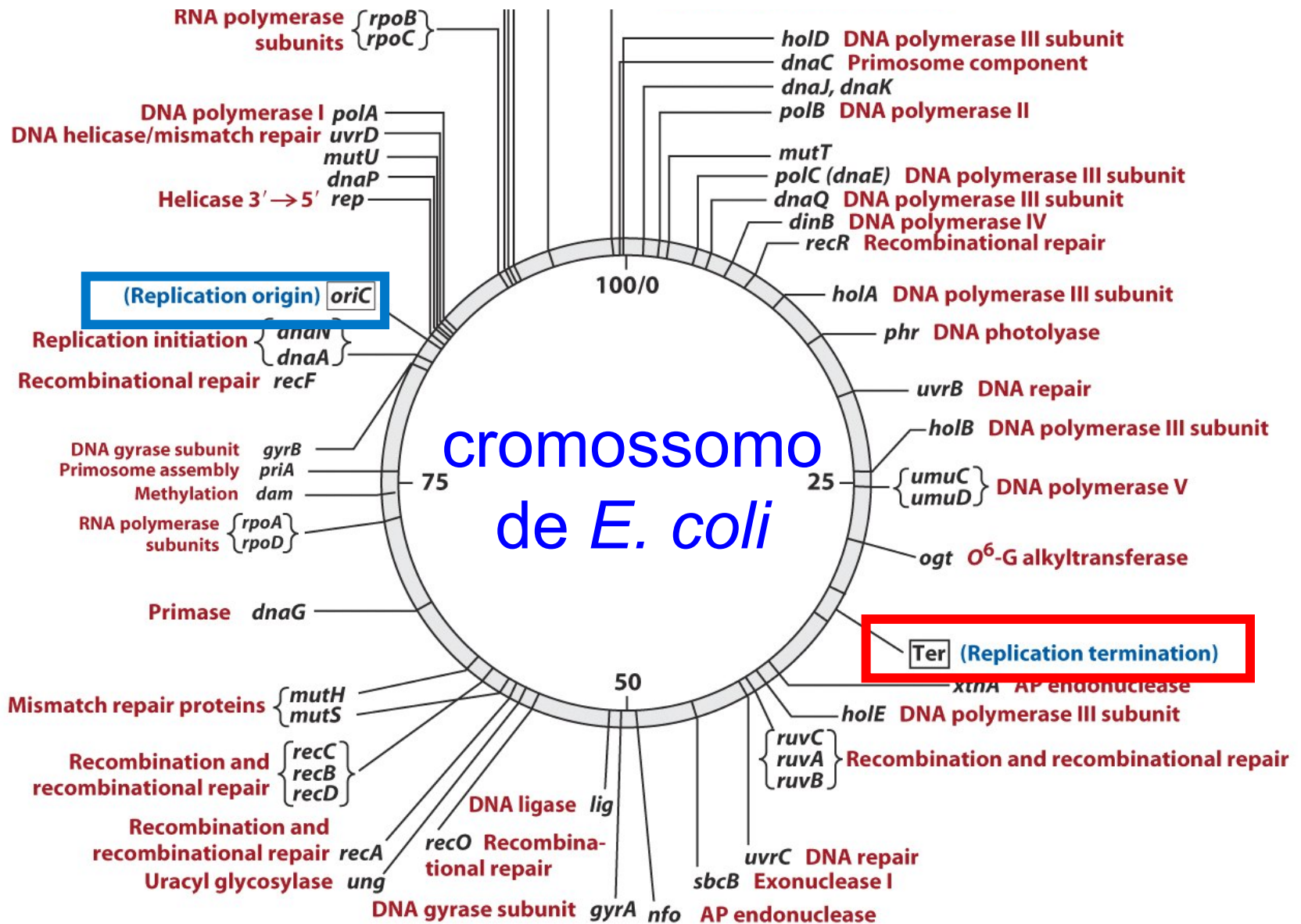


DNA polimerase continua a elongação

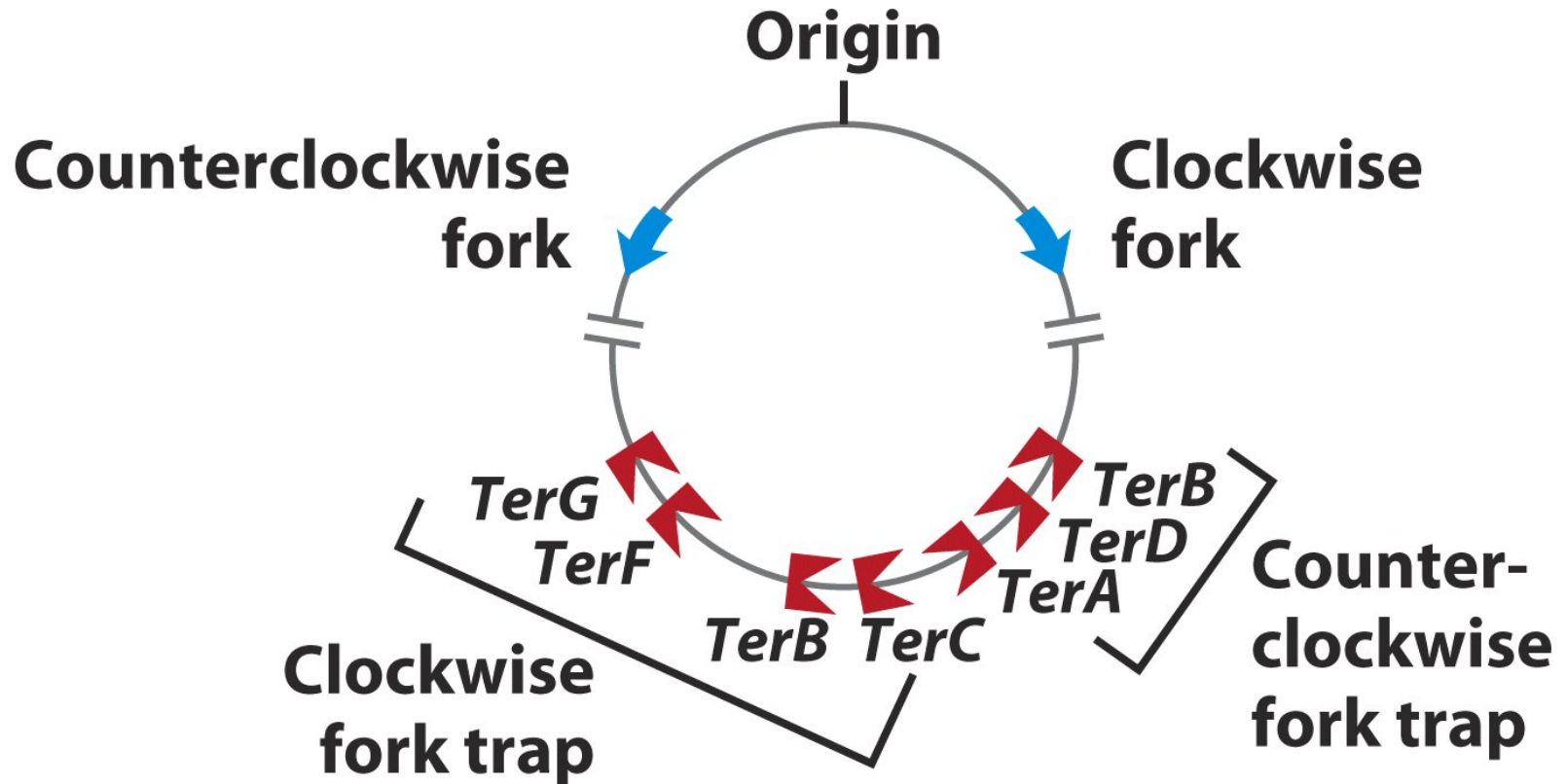


Terminação

Sítio Ter



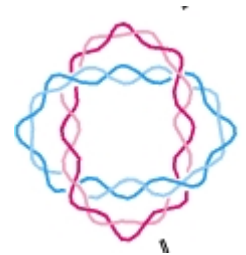
Região de terminação da replicação do cromossomo de *E. coli*

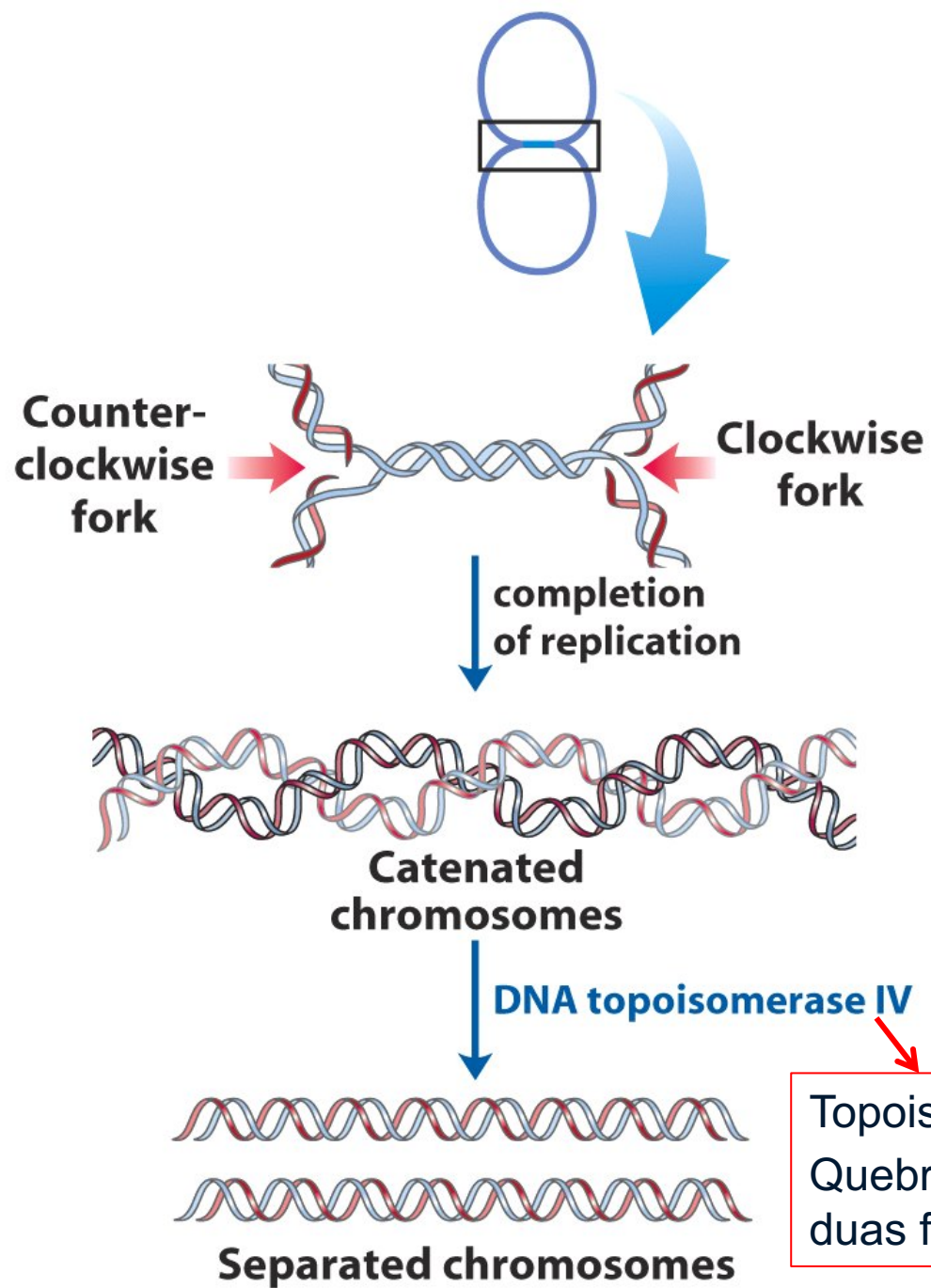


Proteínas Ter impedem a passagem do replissomo

Mais um problema...

- Ao final da replicação de *E. coli*, cromossomos estão concatenados...
 - Ação da topoisomerase IV (tipo II)



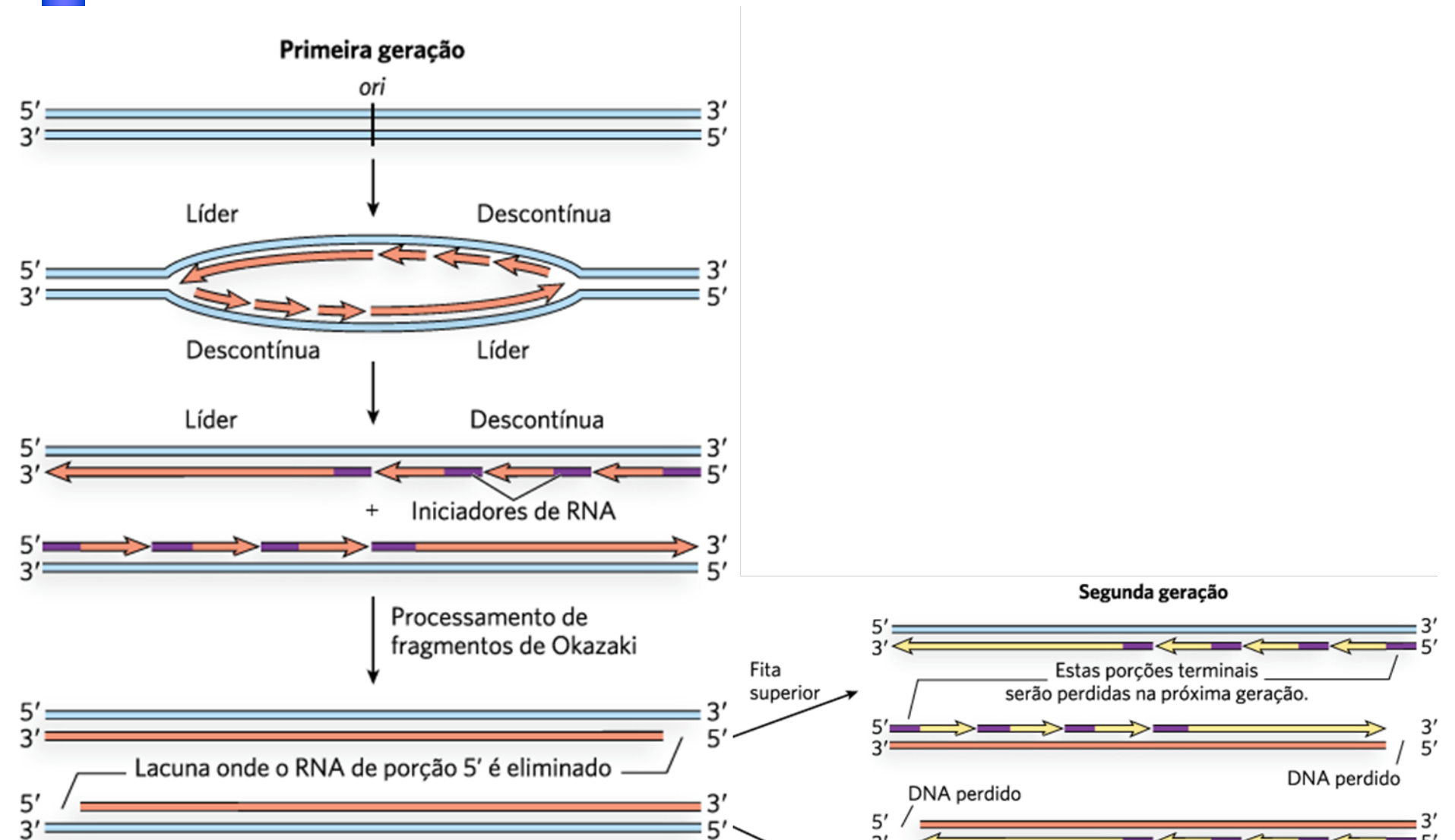


Topoisomerase tipo II:
Quebra e reunião das
duas fitas do DNA

E o final dos cromossomos lineares de eucariotos?

- como sintetizar o último fragmento de Okazaki e retirar os primers sem diminuir a extensão da fita de DNA??

Por que as extremidades deveriam encurtar, de acordo com o “previsto”?



Telômeros nas extremidades dos cromossomos eucarióticos



Telômeros: sequências repetidas nas extremidades que ajudam a estabilizar o cromossomo

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

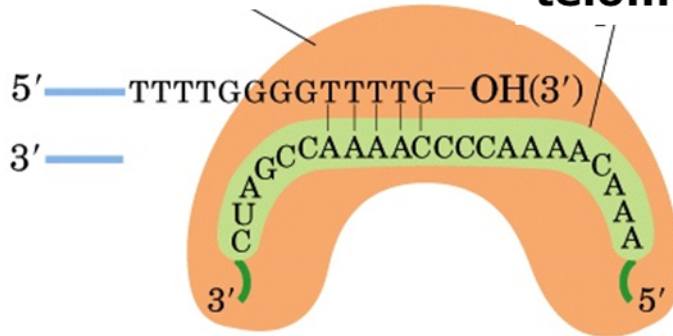
-Célula humana: 1500 repetições

Impedem o encurtamento dos cromossomos

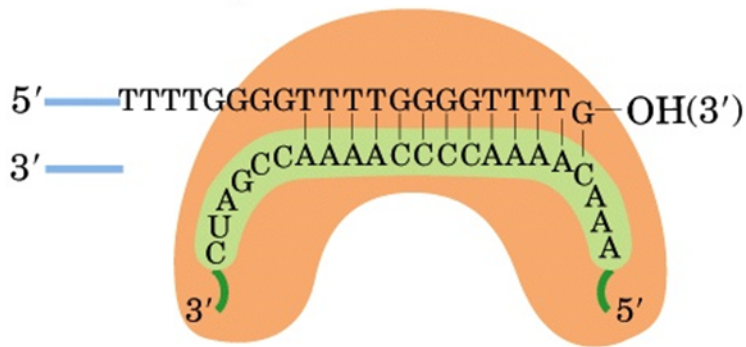
Telomerase é a enzima que replica o DNA nos telômeros, usando um RNA interno como molde

telomerase

RNA molde associado à telomerase



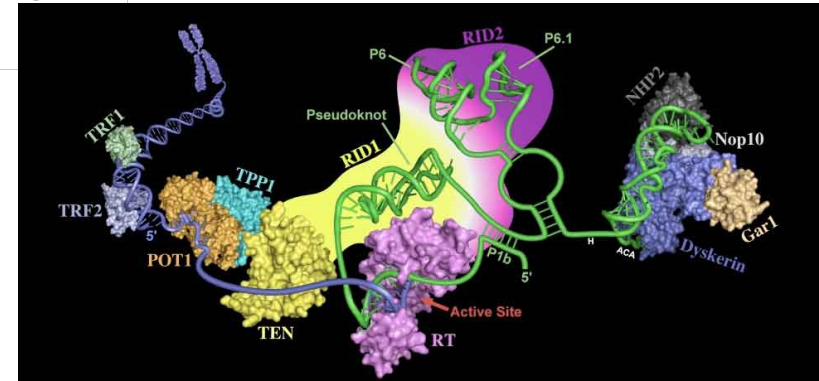
↓ Polimerização e anelamento



Translocação e novo anelamento

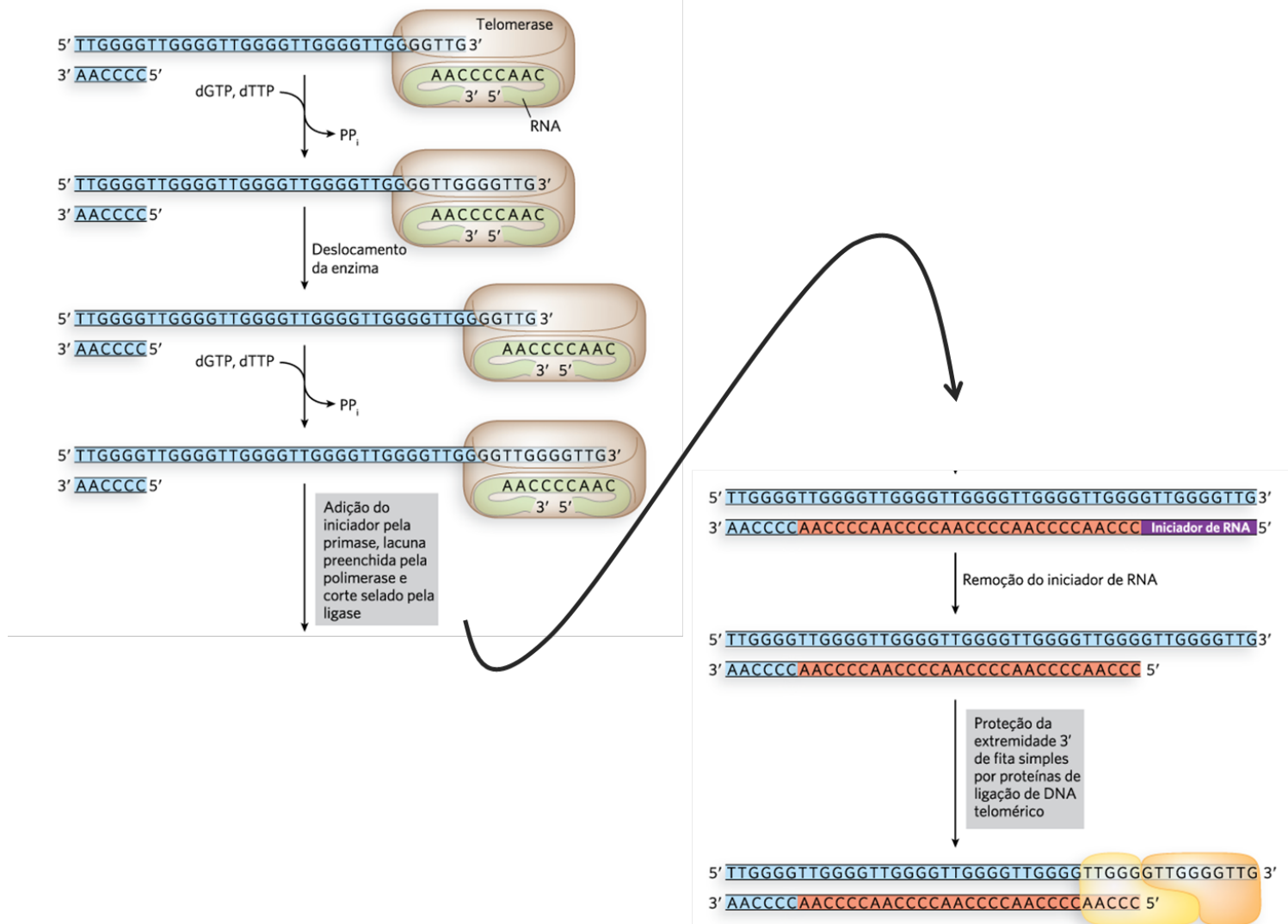


↓ Polimerização adicional

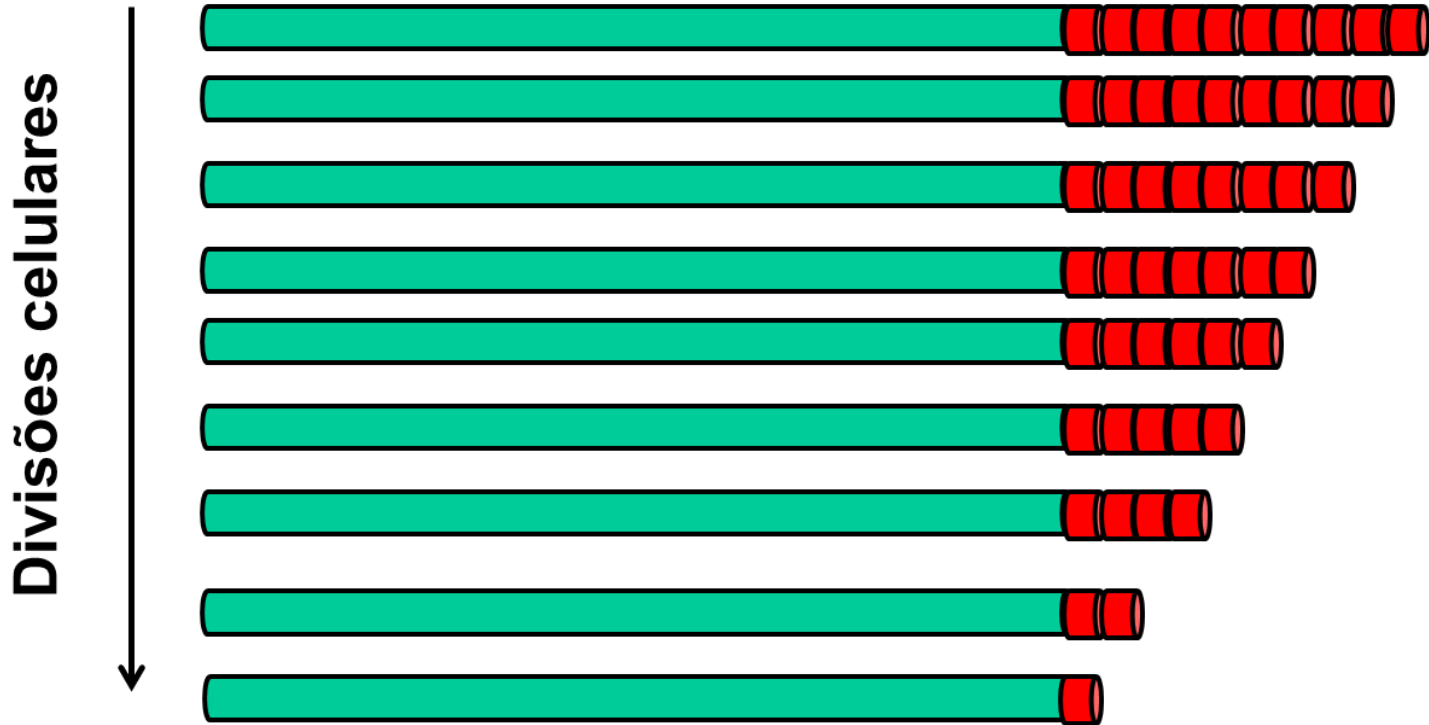


Telômeros humanos = 5 a 15kb

Último fragmento de Okazaki pode ser sintetizado



Em células somáticas, o telômero se encurta a cada geração, até que as células não se dividem mais - senescência



Envelhecimento e doenças associadas

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

Expressão da telomerase

- Telomerase se expressa em células-tronco, que se dividem rapidamente para gerar outros tipos celulares
- Células somáticas mitóticas (epiderme, fibroblastos) podem ter telômeros diminuídos a cada divisão
- Quando uma célula “não-tronco” passa a expressar altos níveis de telomerase, pode dar origem a câncer

Muitas aplicações práticas do conhecimento desta aula...

- Técnicas de Bio Mol:
 - PCR (polymerase chain reaction)
 - Sequenciamento de DNA
- Envelhecimento:
 - seria possível prevenir o encurtamento dos telômeros?
- Câncer:
 - telomerase como alvo para drogas

Resumo dos pontos mais importantes

- Replicação é **semi-conservativa**
- Início requer uma **origem** de replicação
- Síntese de DNA acontece sempre do **5' para o 3'** da **fita nova**
- **Replissomo**: DNA polimerase III e outras proteínas
- Replicação da fita atrasada é **descontínua**
- **Fidelidade** da replicação é mantida pela atividade exonucleásica $3' \rightarrow 5'$ da DNA pol
- Término da replicação: **telômeros** em eucariotos

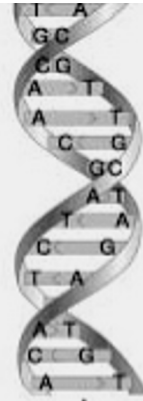
Material Extra - Replicação

Como é a replicação do DNA?

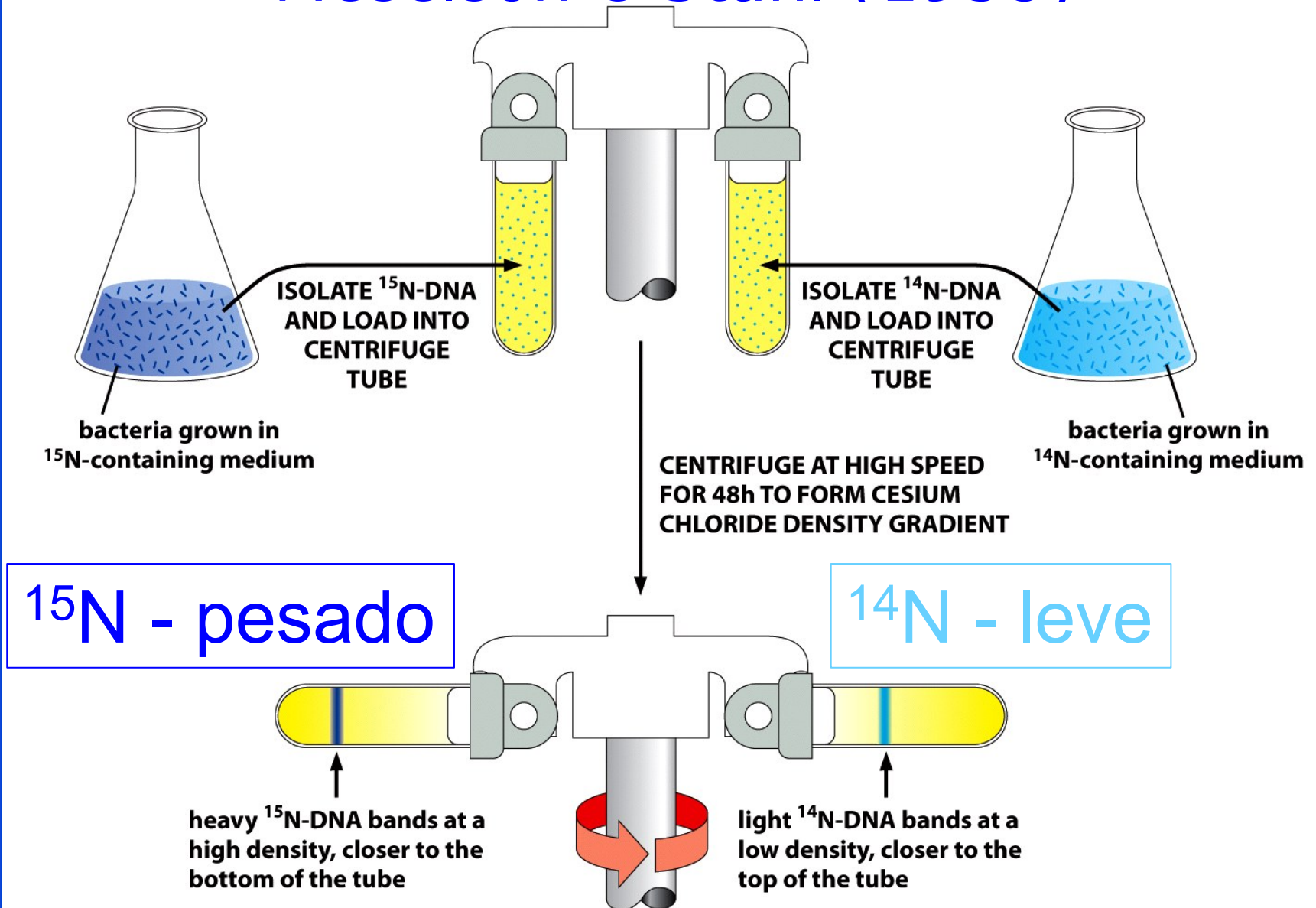
Replicação semi-conservativa?

Replicação conservativa?

Replicação dispersiva?



Metodologia do experimento de Meselson e Stahl (1958)

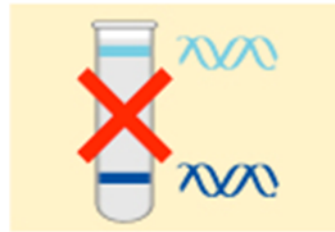


Coletar amostra (tempo 0) e isolar o DNA

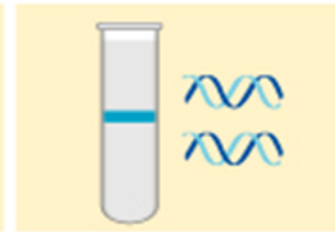


Coletar amostra após 20 minutos e isolar o DNA (1ª. Geração)

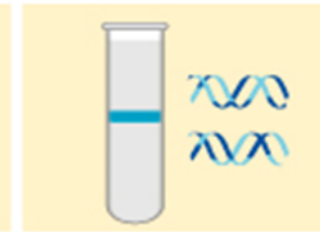
1ª. replicação



conservativa



semi-conservativa



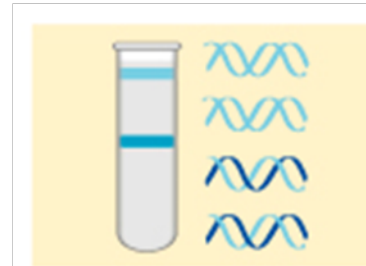
dispersiva

Cultivo das bactérias em meio contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

Bactérias transferidas para meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$

Coletar amostra após 40 minutos e isolar o DNA (2ª. Geração)

2ª. replicação

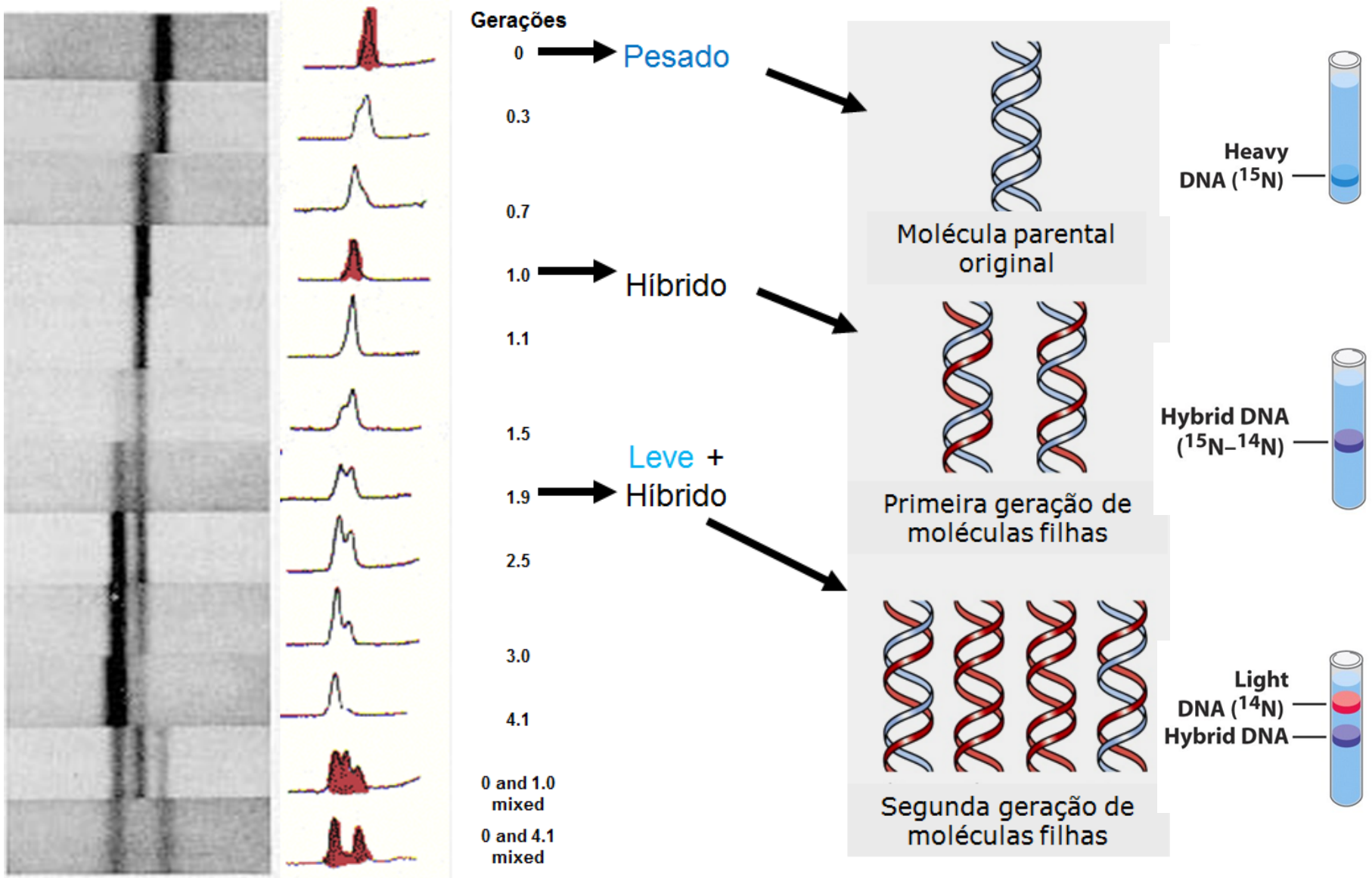


semi-conservativa



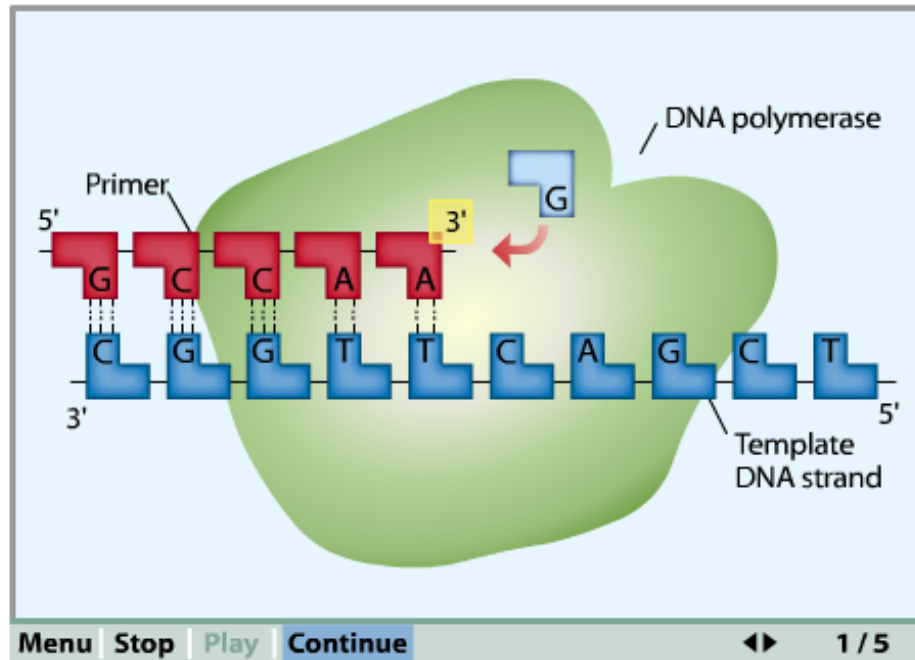
dispersiva

Resultados originais do experimento de Meselson e Stahl



Síntese de DNA - Animação

Nucleotide Polymerization by DNA Polymerase

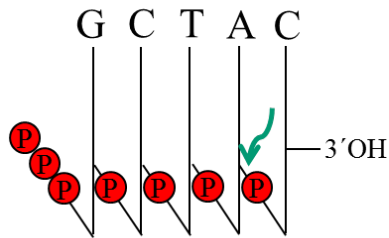
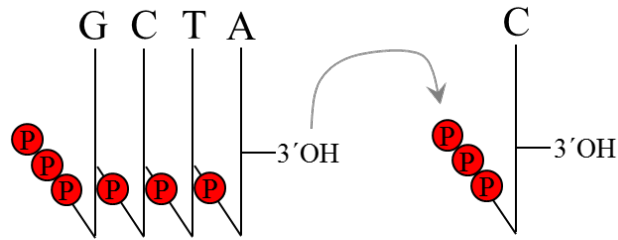


DNA polymerases catalyze the synthesis of new DNA strands from a DNA template. DNA polymerases require a pre-existing RNA or DNA strand, the primer, to initiate new DNA synthesis. These polymerases add deoxyribonucleotides only to the 3' end of a growing strand.

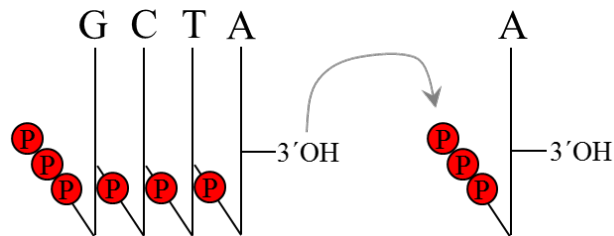
<http://bcs.whfreeman.com/lehniger5e/pages/bcs-main.asp?v=&s=25000&n=00020&i=25020.01&o=|00610|00580|00590|00510|00540|00600|00550|00570|00630|00010|00020|00030|00040|00070|00080|00090|00100|01000|02000|03000|04000|05000|06000|07000|08000|09000|10000|11000|12000|13000|14000|15000|16000|17000|18000|19000|20000|21000|22000|23000|24000|25000|26000|27000|28000|99000|>

Por que a síntese só se dá de 5' para 3'?

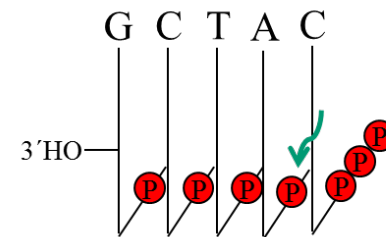
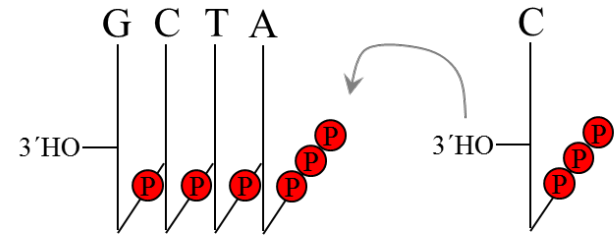
Síntese 5' → 3'



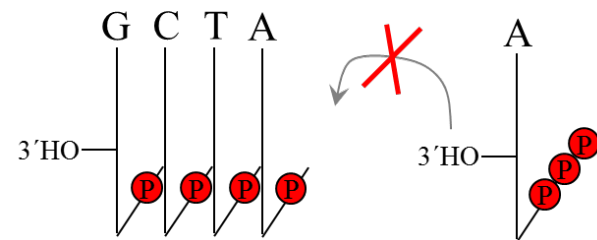
Após 3' → 5' exo (proofreading)



Síntese 3' → 5'



Após 3' → 5' exo (proofreading)



Possibilidade de revisão de erros!

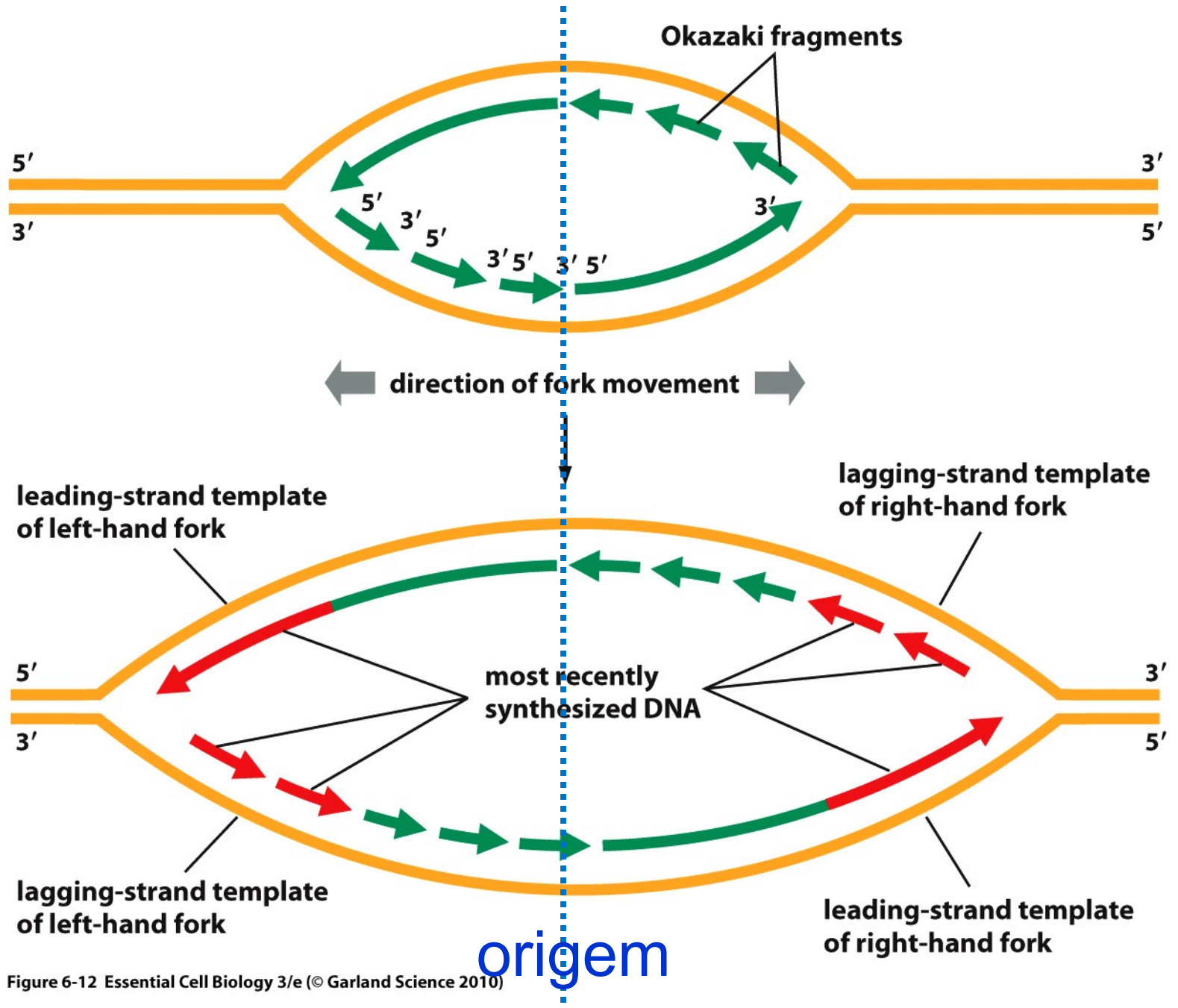
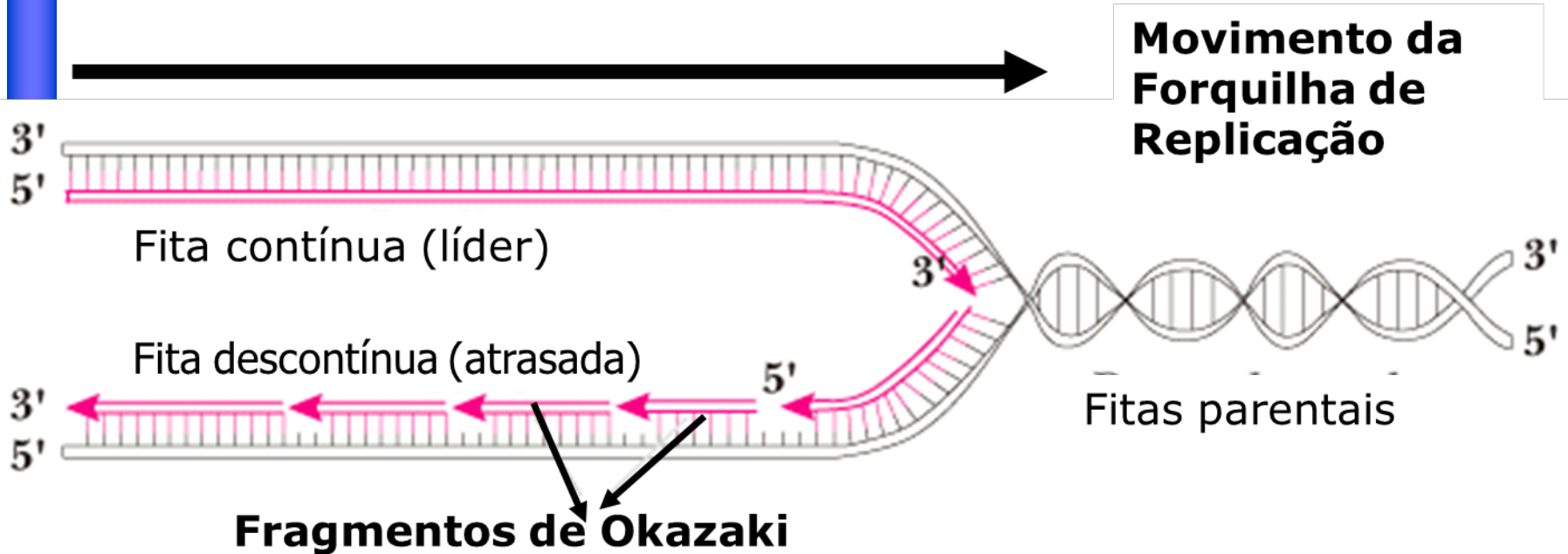


Figure 6-12 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

A forquilha de replicação



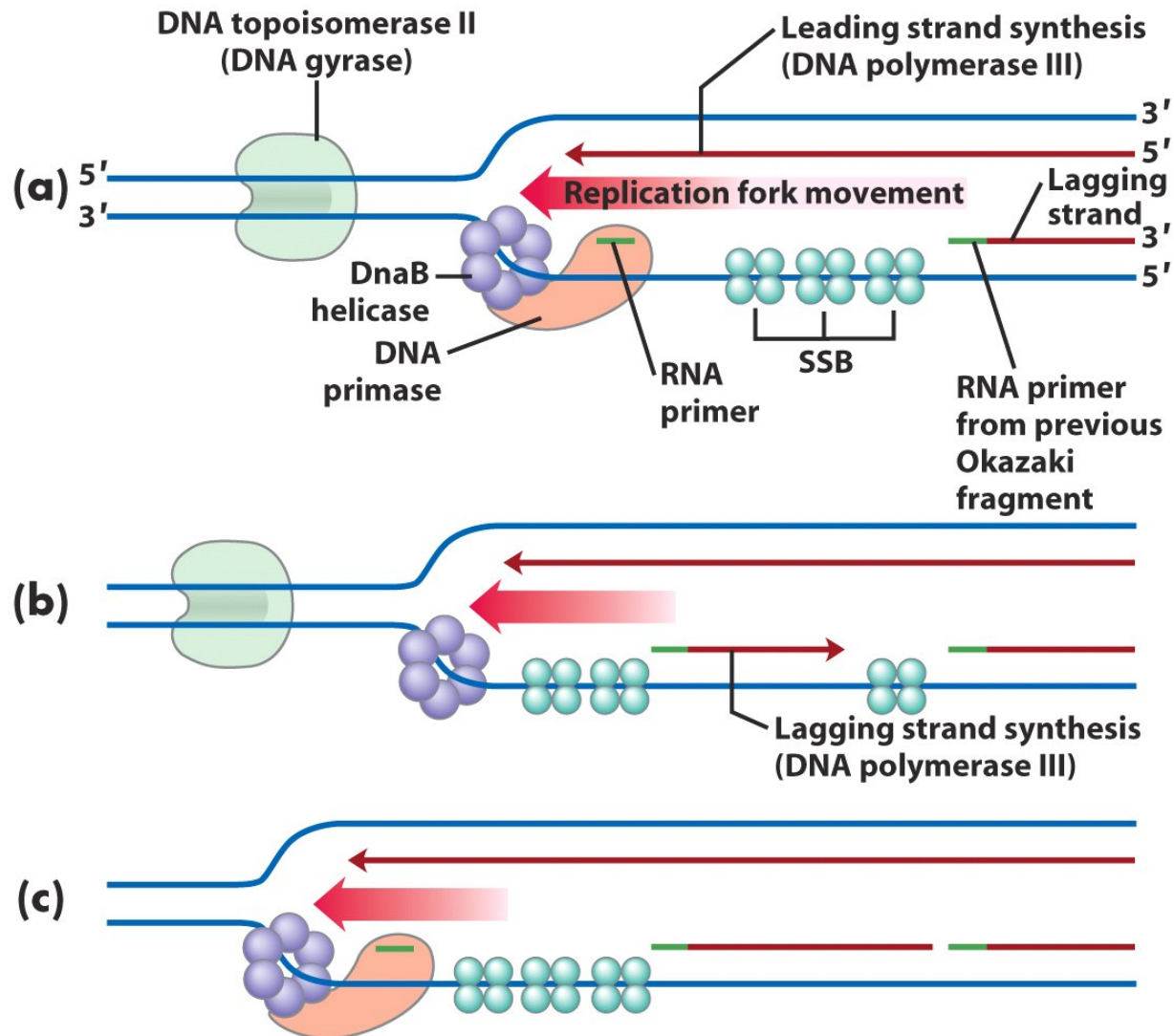
- Fragmentos de Okazaki:

- ~1000-2000 nt em bactérias

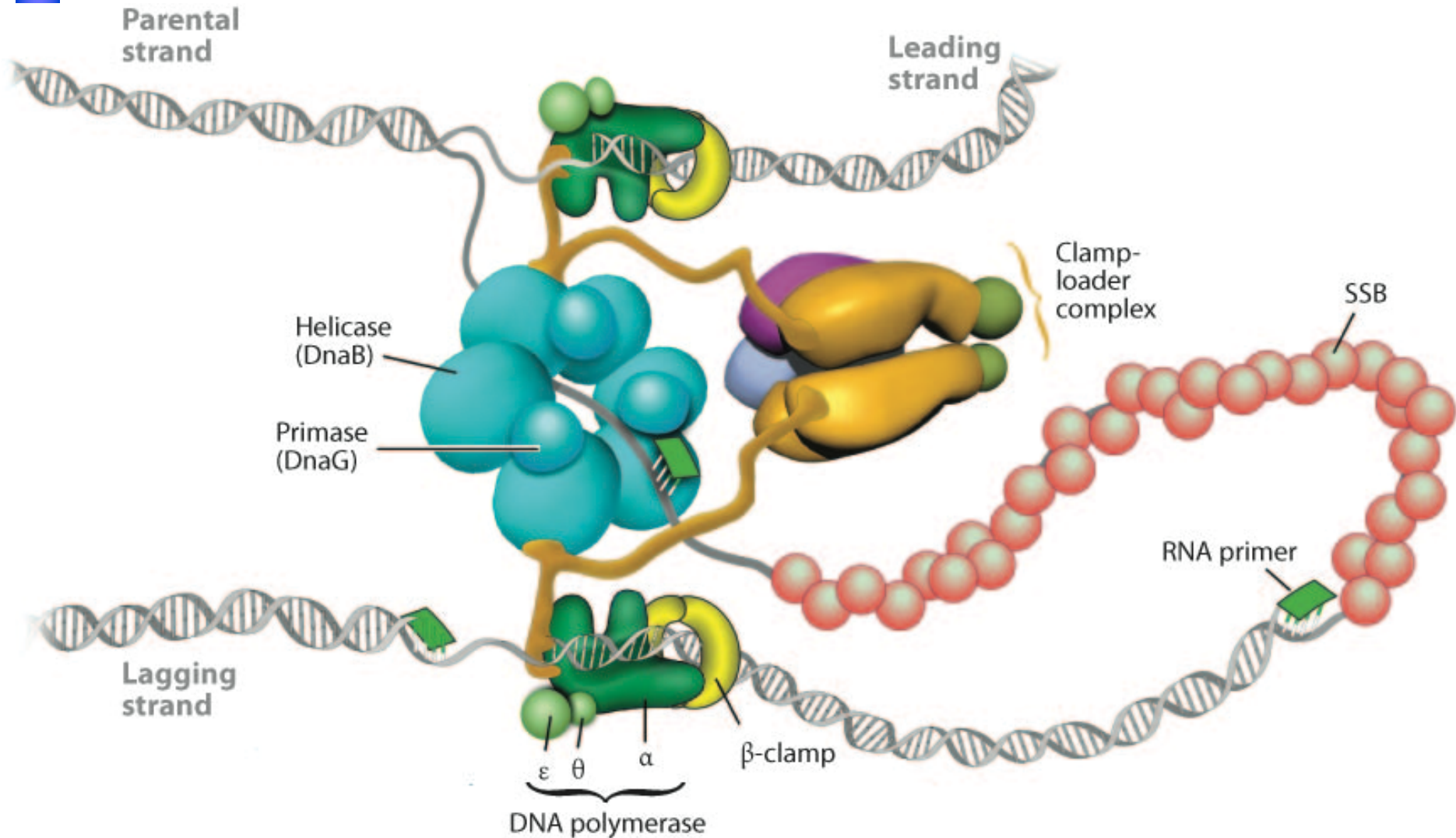
- ~100-200 nt em eucariotos

Cada fragmento tem um primer de RNA no 5'

Várias proteínas no replissomo



Replissomo de *E. coli*

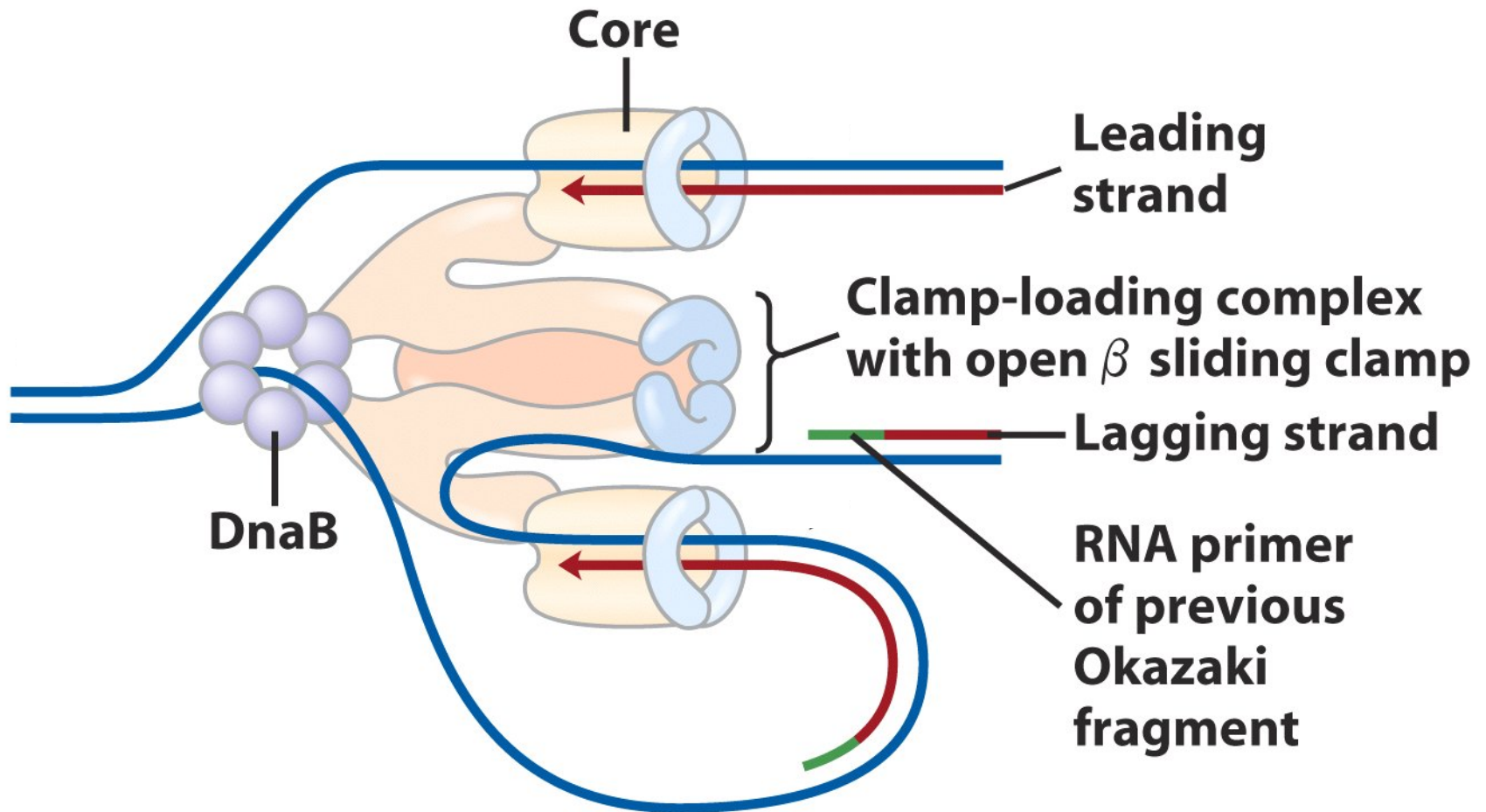


Cinta deslizante β (β -clamp)

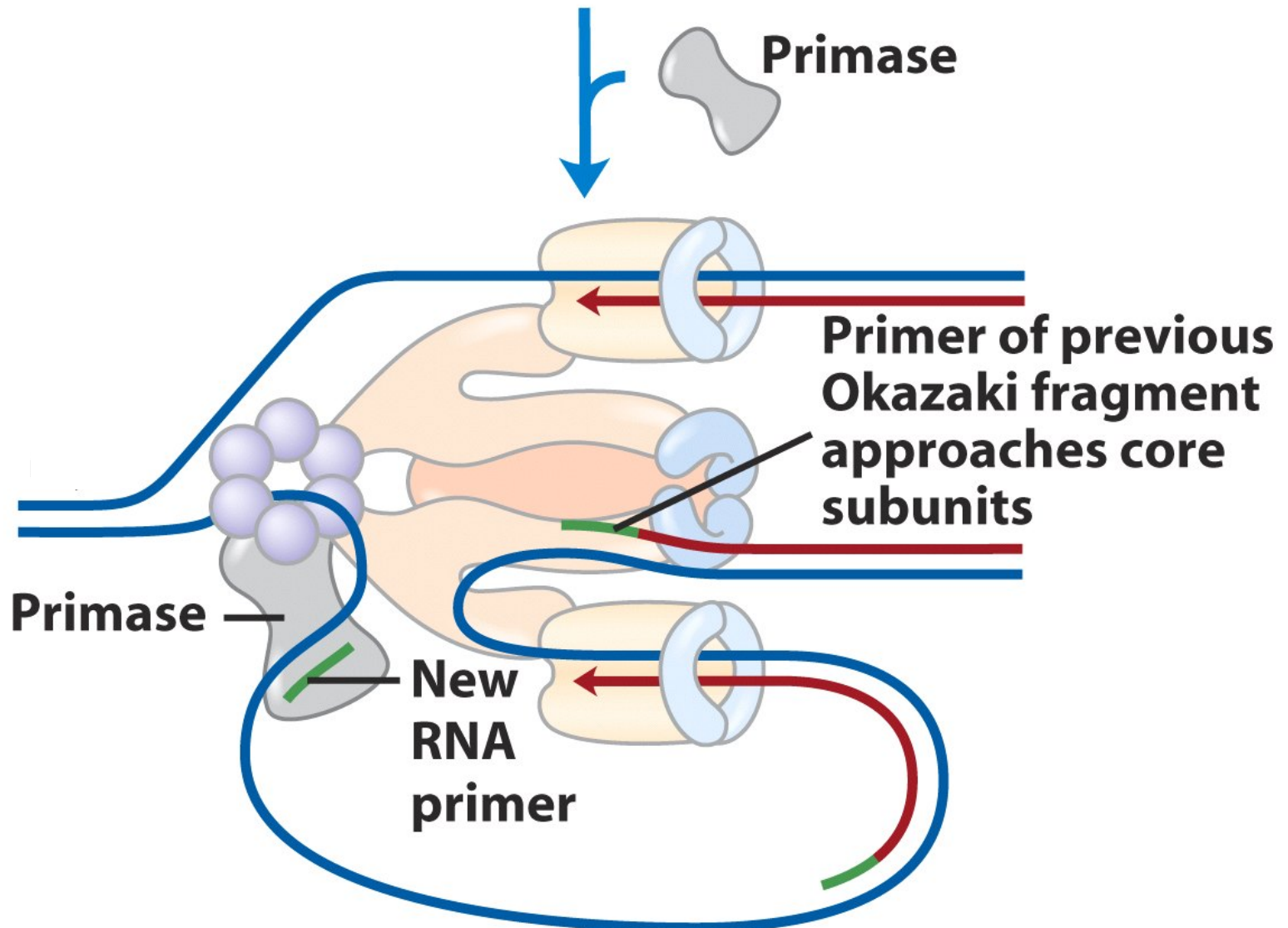


- Subunidades β da DNA-polimerase III
 - envolvem o duplex das fitas-filhas
 - impedem seu desligamento do replissomo

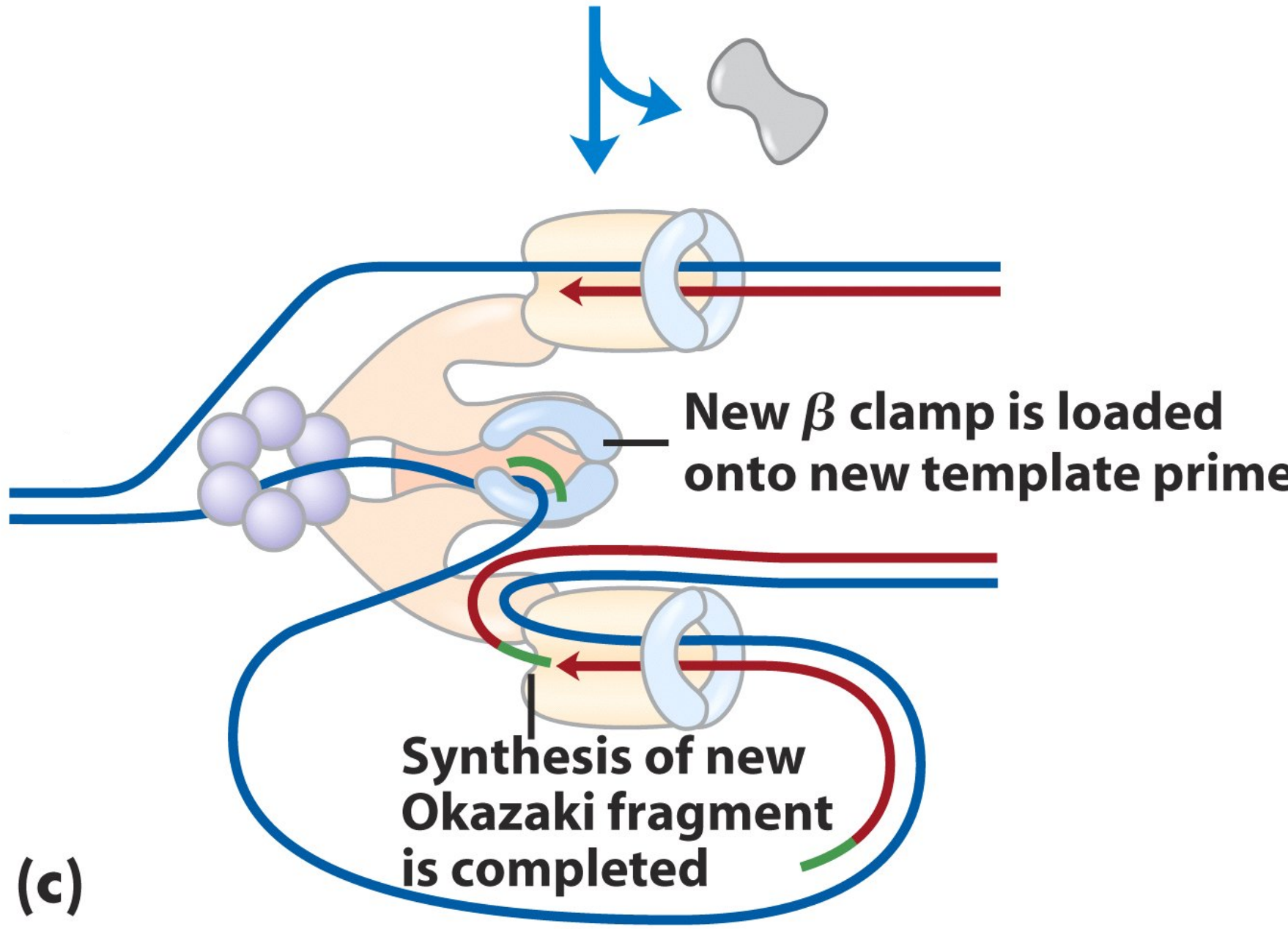
Síntese de DNA nas duas fitas

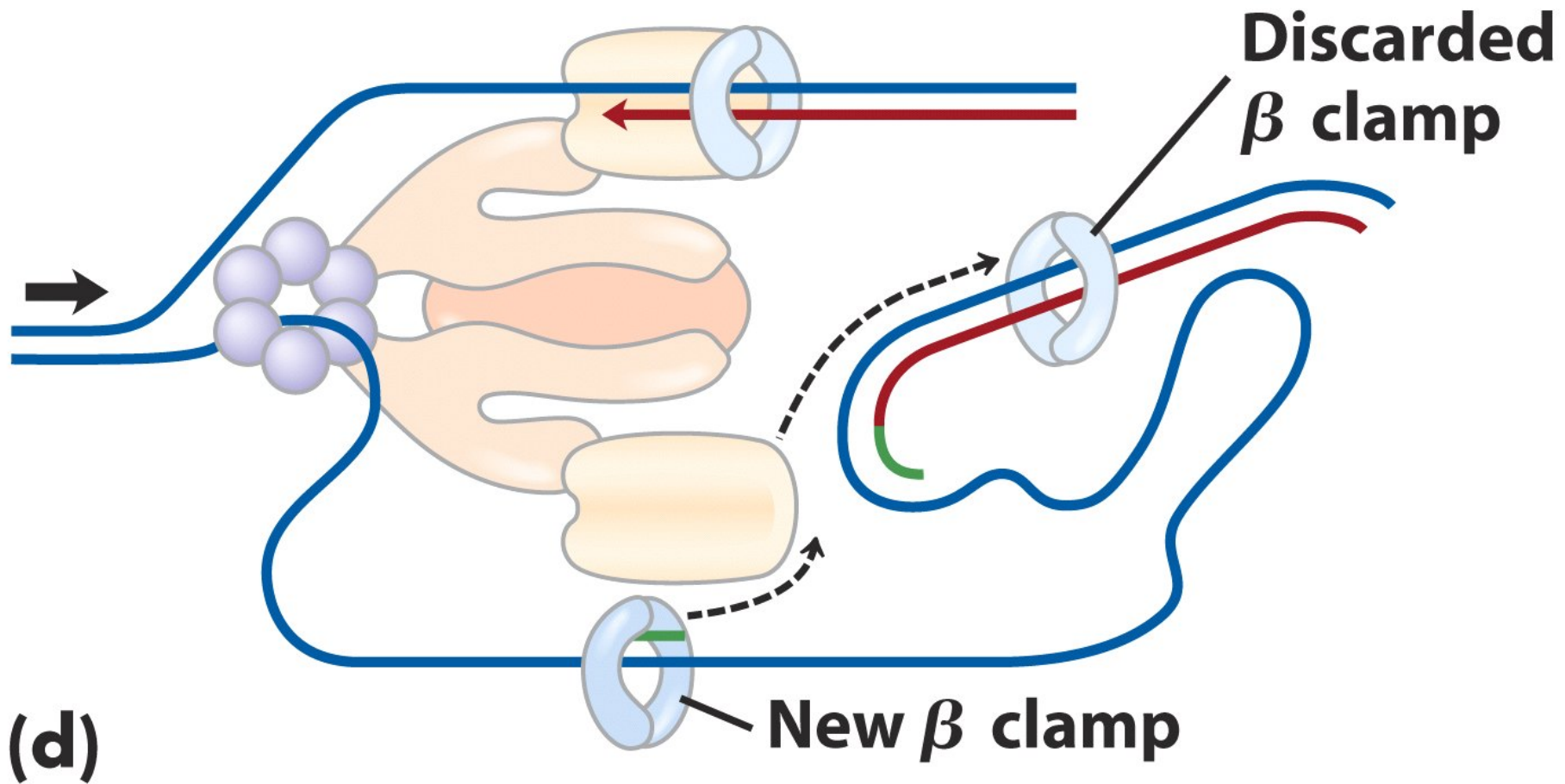


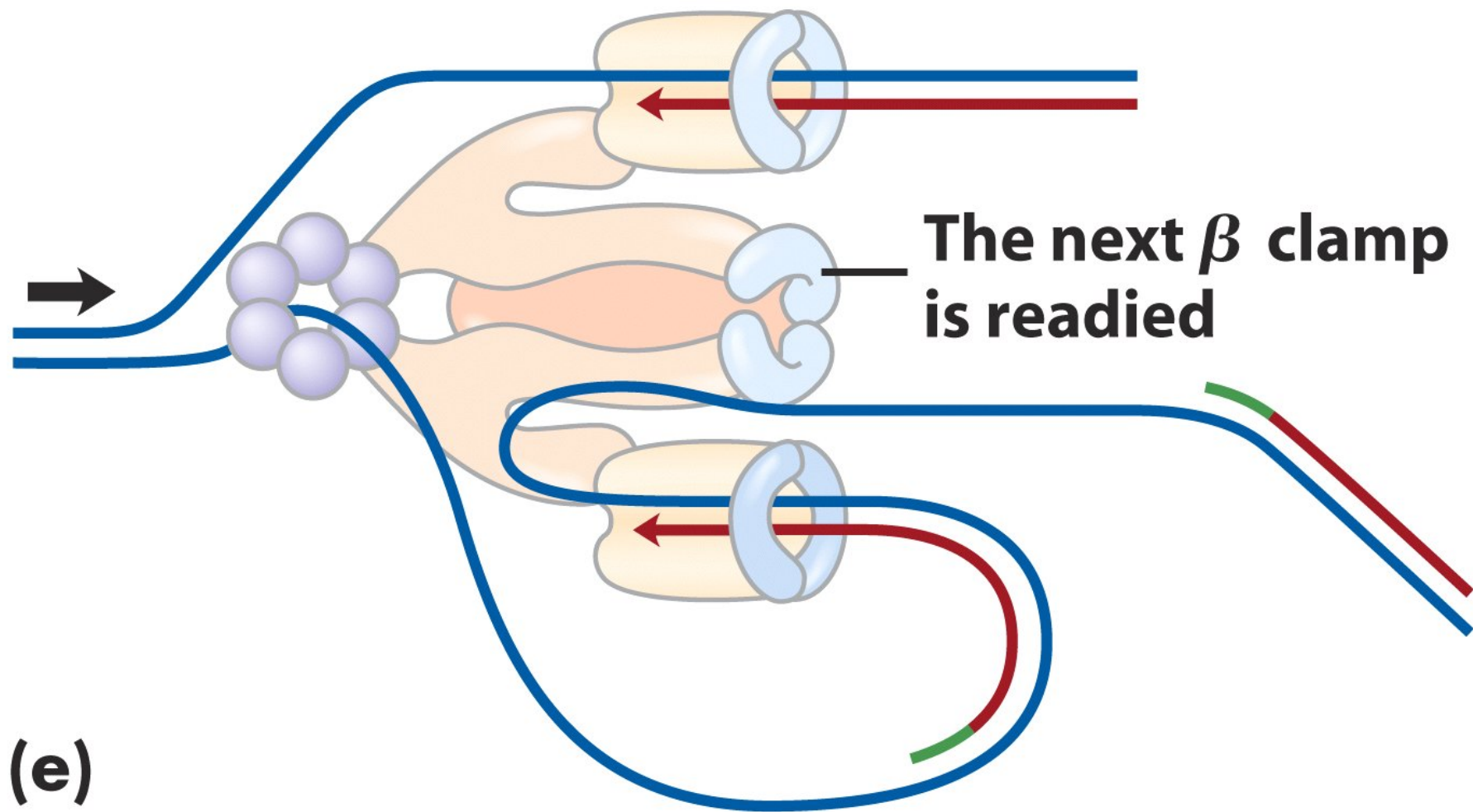
(a) Continuous synthesis on the leading strand proceeds as DNA is unwound by the DnaB helicase.



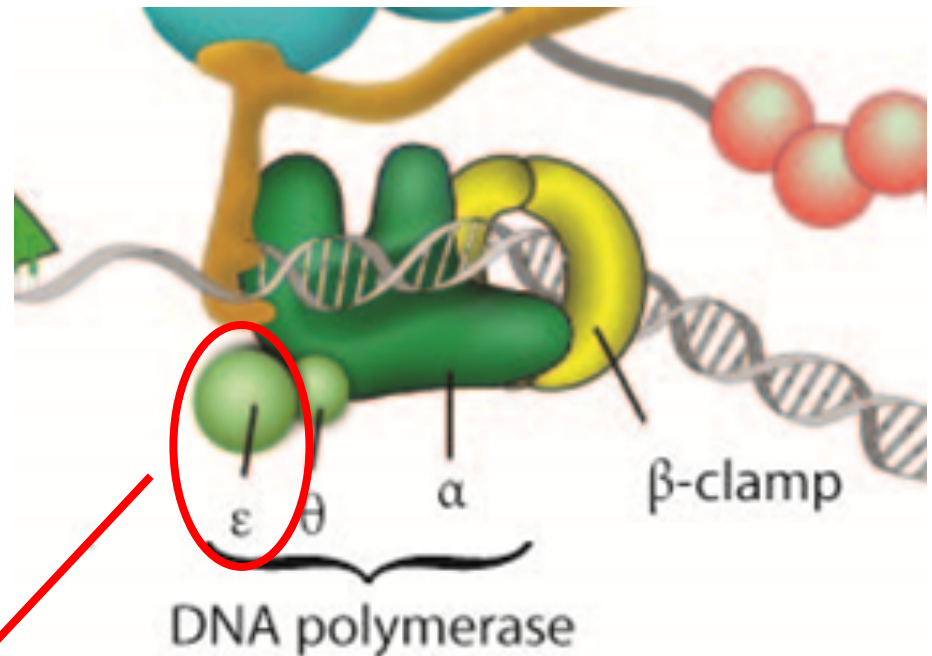
(b) DNA primase binds to DnaB, synthesizes a new primer, then dissociates.





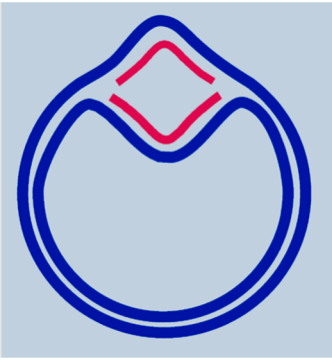


Erros de incorporação podem ser corrigidos durante a replicação pela própria DNA polimerase III



Subunidade épsilon:

Atividade de correção de prova (*proofreading*)

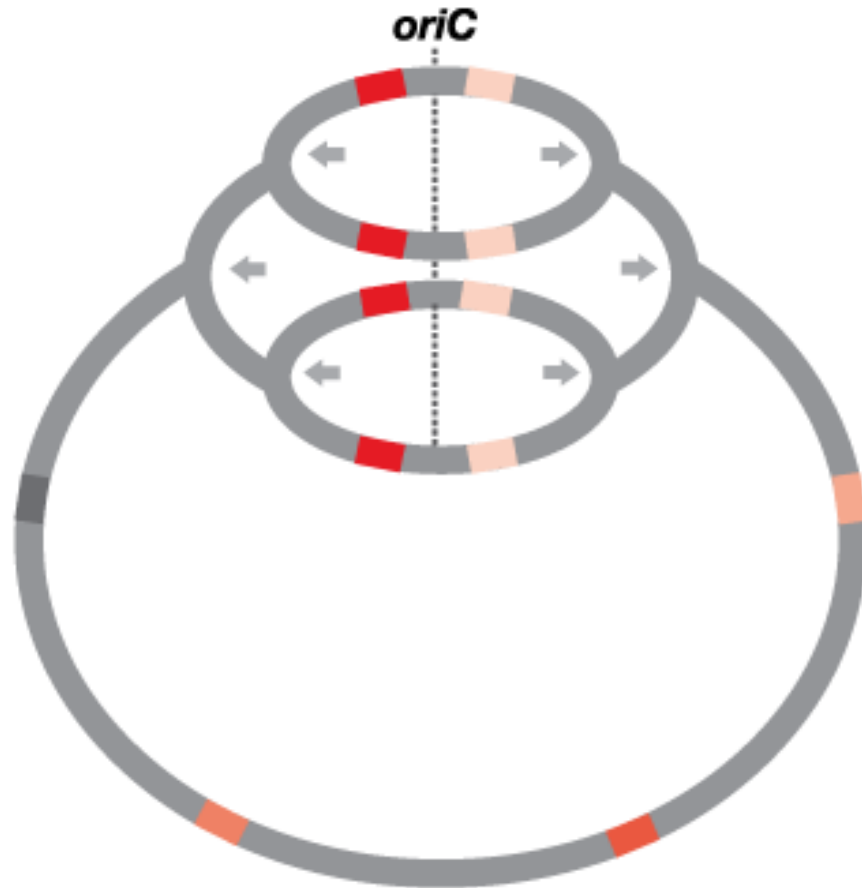


Problema - *E. coli*

- 1 única origem de replicação
- Velocidade da forquilha de replicação:
 - 5×10^4 bp/minuto
- Tamanho do DNA: $\sim 5 \times 10^6$ bp
 - Precisaria de ~ 100 minutos para replicar todo o DNA
- Ciclo celular: 20 min

Como a bactéria consegue replicar todo o cromossomo em 1 ciclo celular?

Novo início de replicação antes da replicação anterior terminar



Replicon: unidade do DNA onde ocorre um evento de replicação

- Origem + término
- Cromossomo de *E. coli*:
 - 1 replicon
- Cromossomos eucarióticos:
 - vários replicons
- Ativados (do início ao fim) uma única vez a cada ciclo celular

Cromossomos de eucariotos são constituídos por mais de um replicon

