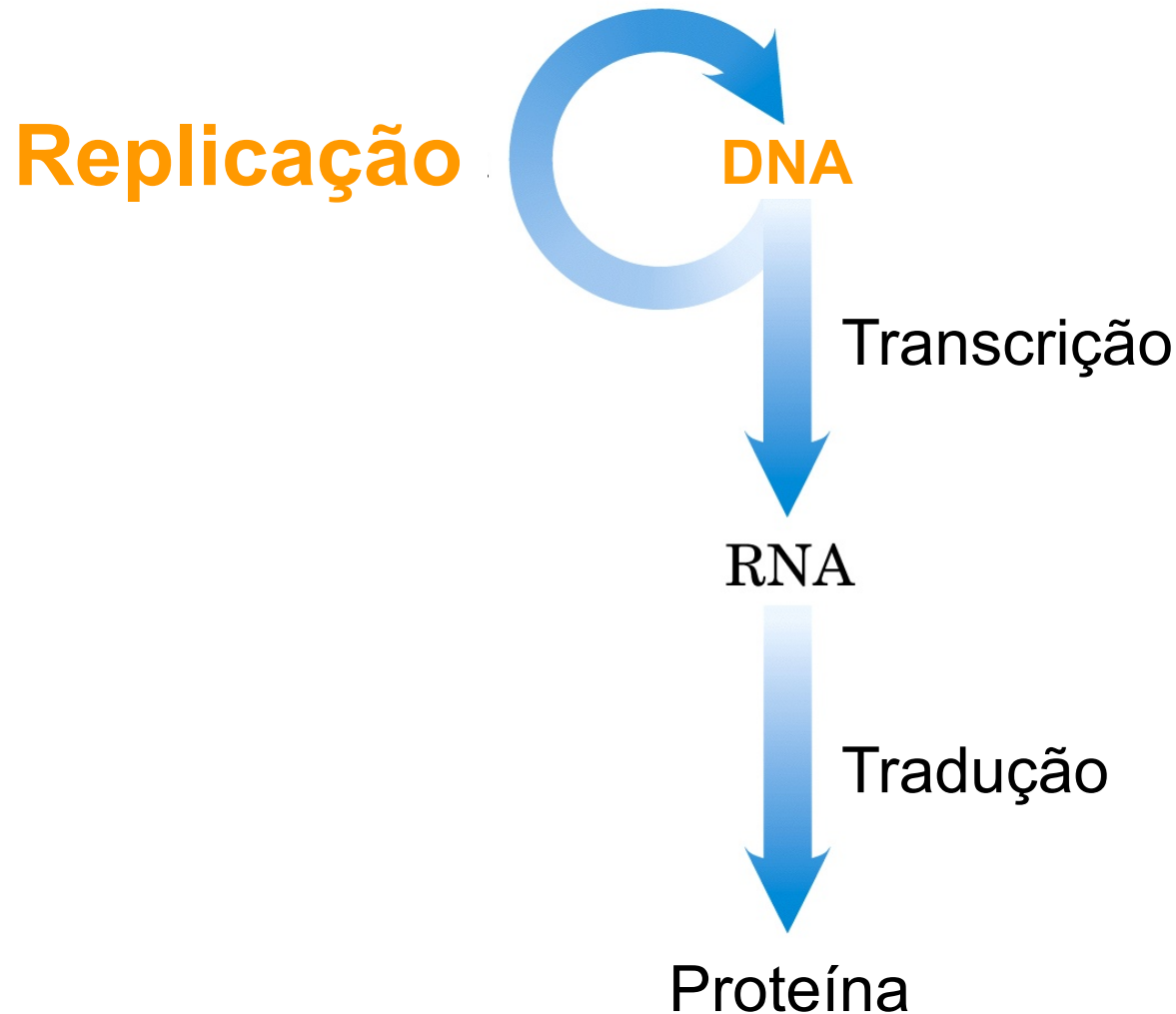


QBQ1354 - Biologia Molecular
2020

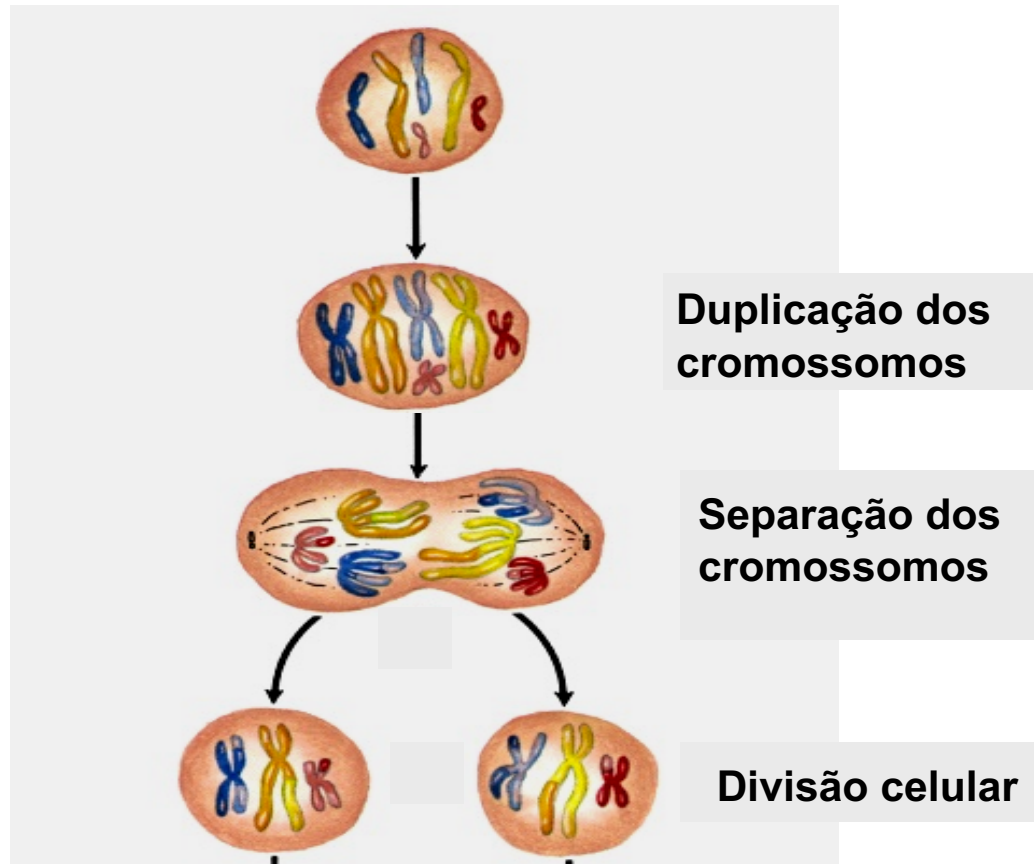
Replicação de DNA

O DNA é o repositório molecular da informação genética



Replicação do DNA

Processo que precede a divisão celular e através do qual são geradas cópias **idênticas** das moléculas de DNA presentes na célula-mãe, a seguir herdadas pelas duas células-filhas

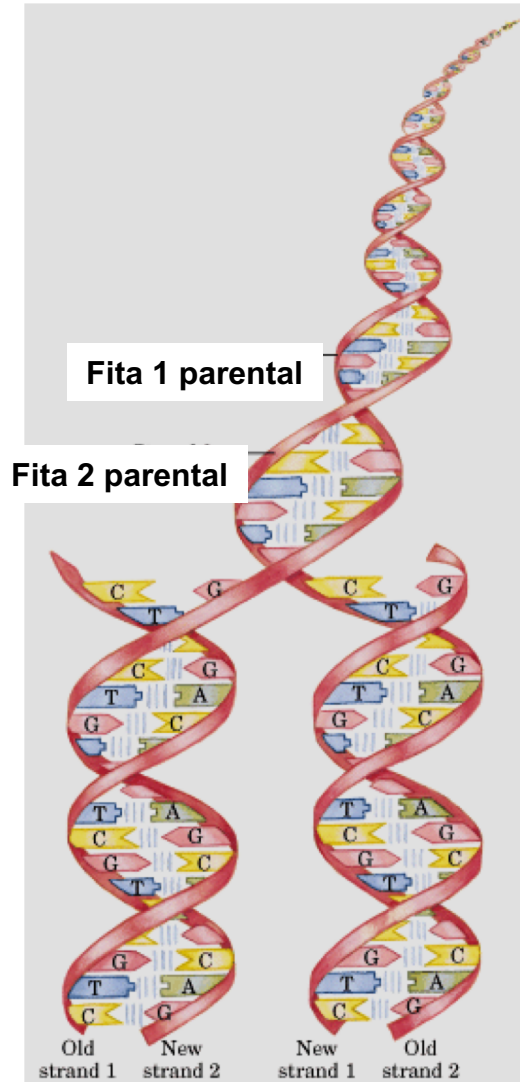


Mecanismo de replicação do DNA

“Não escapou a nossa atenção que o pareamento específico ora proposto por nós sugere imediatamente um possível mecanismo de cópia do material genético”

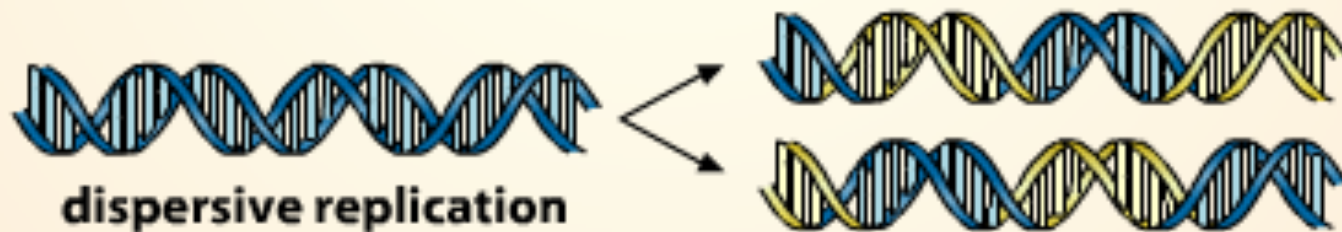
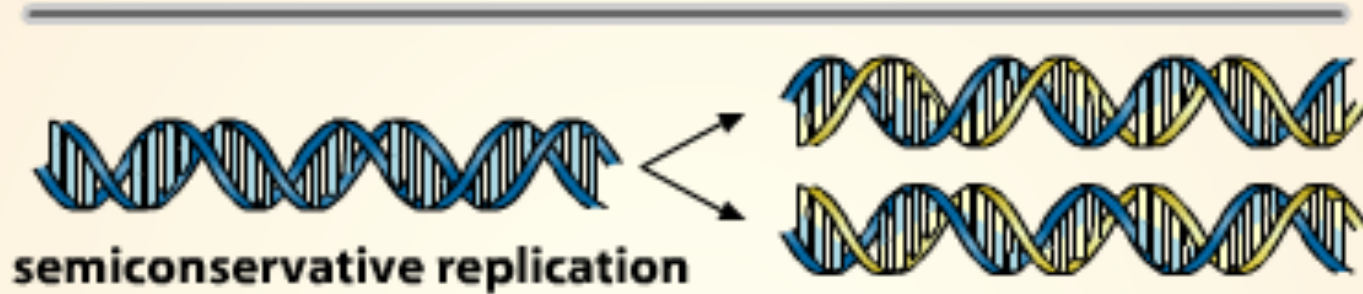
Watson & Crick, *Nature*, 1953

- O mecanismo de replicação é baseado no pareamento das bases da dupla hélice do DNA.
- A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases



Fita 1 parental Fita 2 “filha” Fita 1 “filha” Fita 2 parental

Modelos para a replicação do DNA



Estudo do mecanismo molecular de replicação utilizando incorporação de isótopo pesado de nitrogênio

Cultivo de bactérias em meio contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (isótopo pesado)



Transferência das bactérias para meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ (isótopo leve)

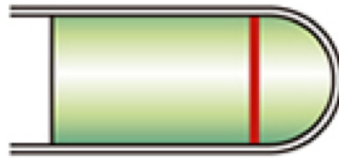


Extração e purificação do DNA

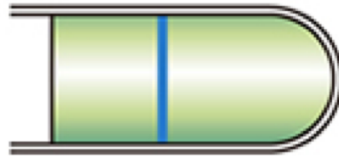


Centrifugação em gradiente de CsCl

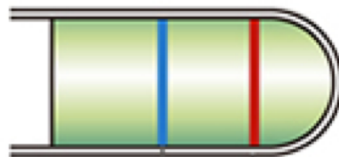
Experimento controle



DNA contendo ^{15}N pesado



DNA contendo ^{14}N leve



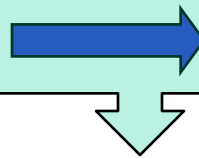
Mistura equimolar de DNA leve e pesado



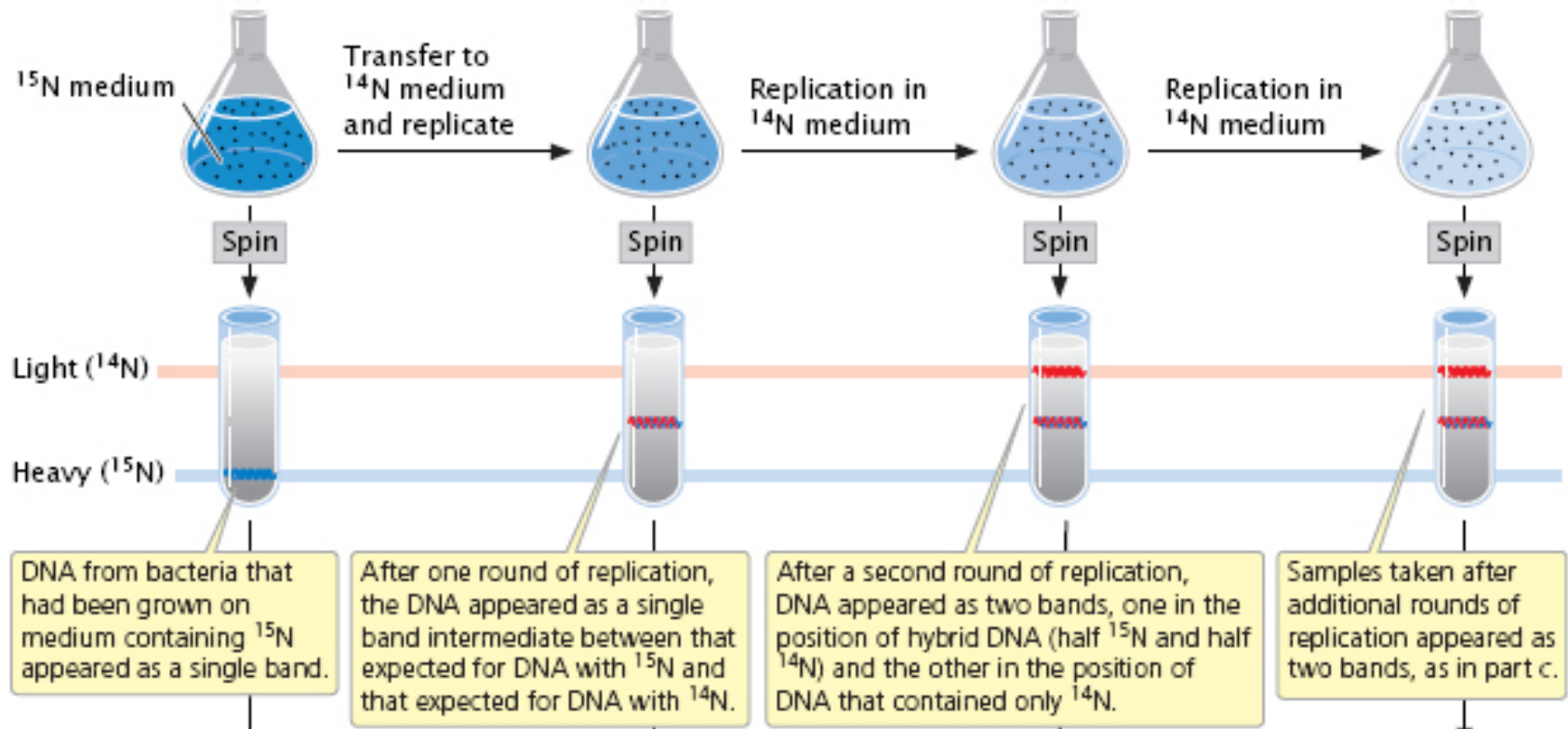
Experimento de Meselson & Stahl, 1958

Cultivo de bactérias em meio contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (isótopo pesado)

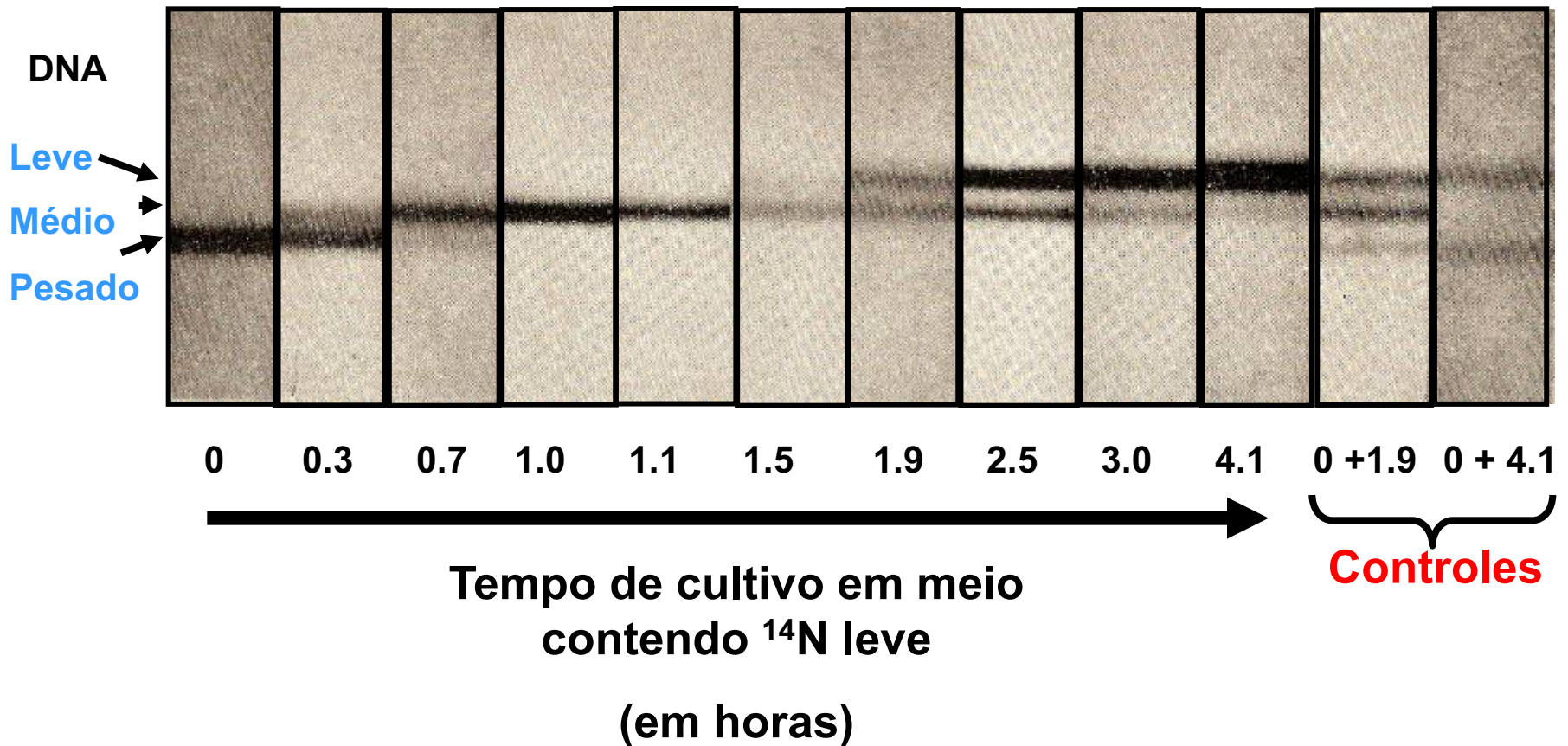
Transferência das bactérias para meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ (isótopo leve)



Extração e purificação do DNA, seguido de separação por centrifugação em gradiente de CsCl, após tempos de cultivo suficiente para **duplicação** das células

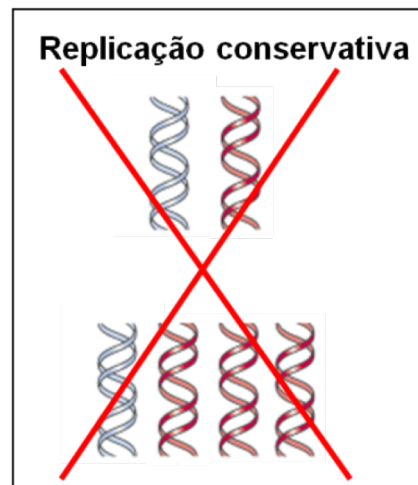
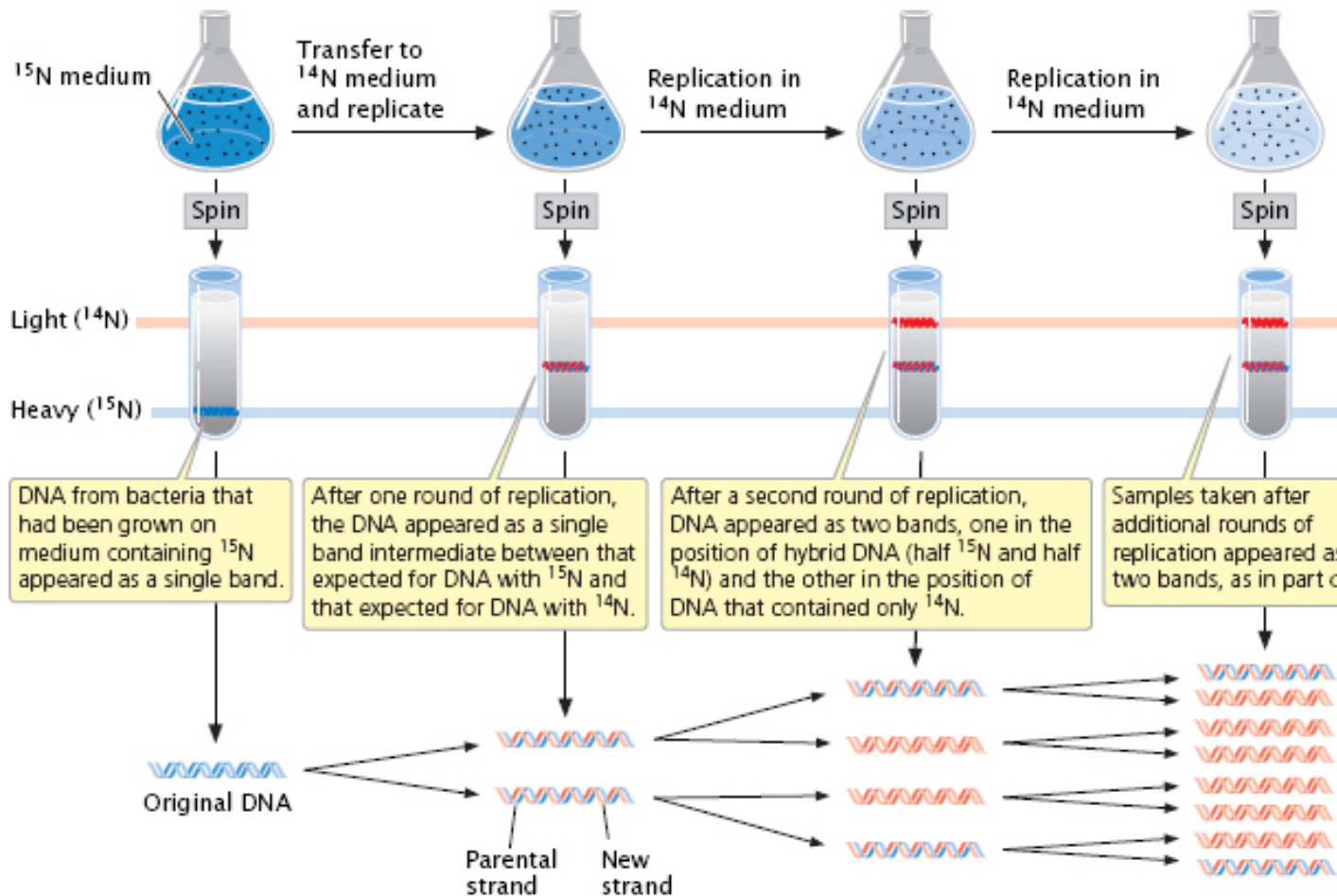


Experimento de Meselson & Stahl, 1958



Replicação do DNA é semi-conservativa

Experimento de Meselson & Stahl, 1958



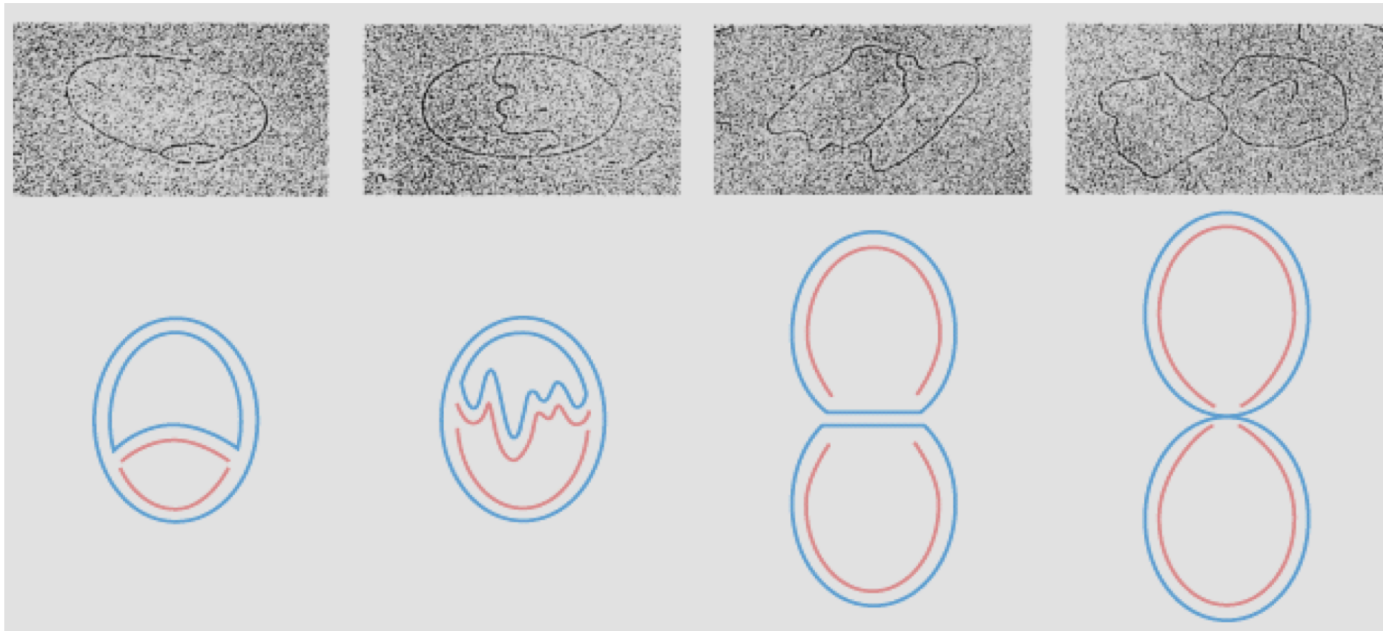
Replicação do cromossomo bacteriano

Cultivo de bactérias em meio contendo timidina marcada com trítio (^3H), **isótopo radioativo de H**

Isolamento do DNA, espalhamento em emulsão fotográfica

Experimento de J. Cairns, 1963

Observação em microscópio eletrônico

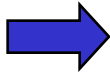


→ Confirmou que o cromossomo de e.coli é circular

→ Revelou que o desenrolamento e replicação das fitas de DNA são processos simultâneos

Replicação é bi-direcional

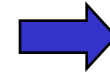
Cultivo de bactérias



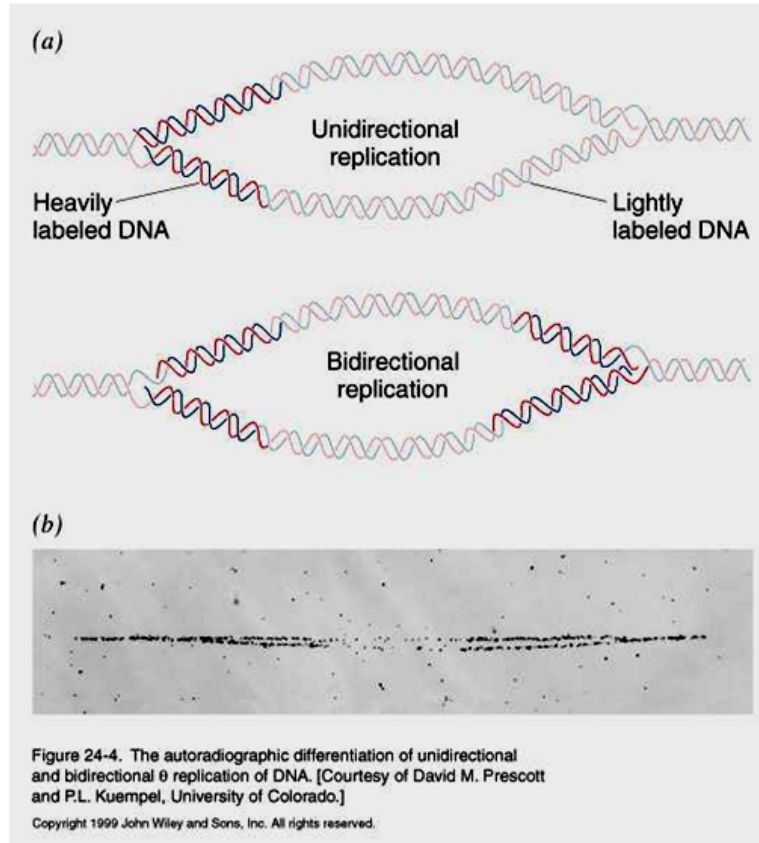
Adição de dTTP (^3H),
incubação por alguns minutos e diluição com dTTP não radioativo



Isolamento do DNA,
espalhamento em emulsão fotográfica

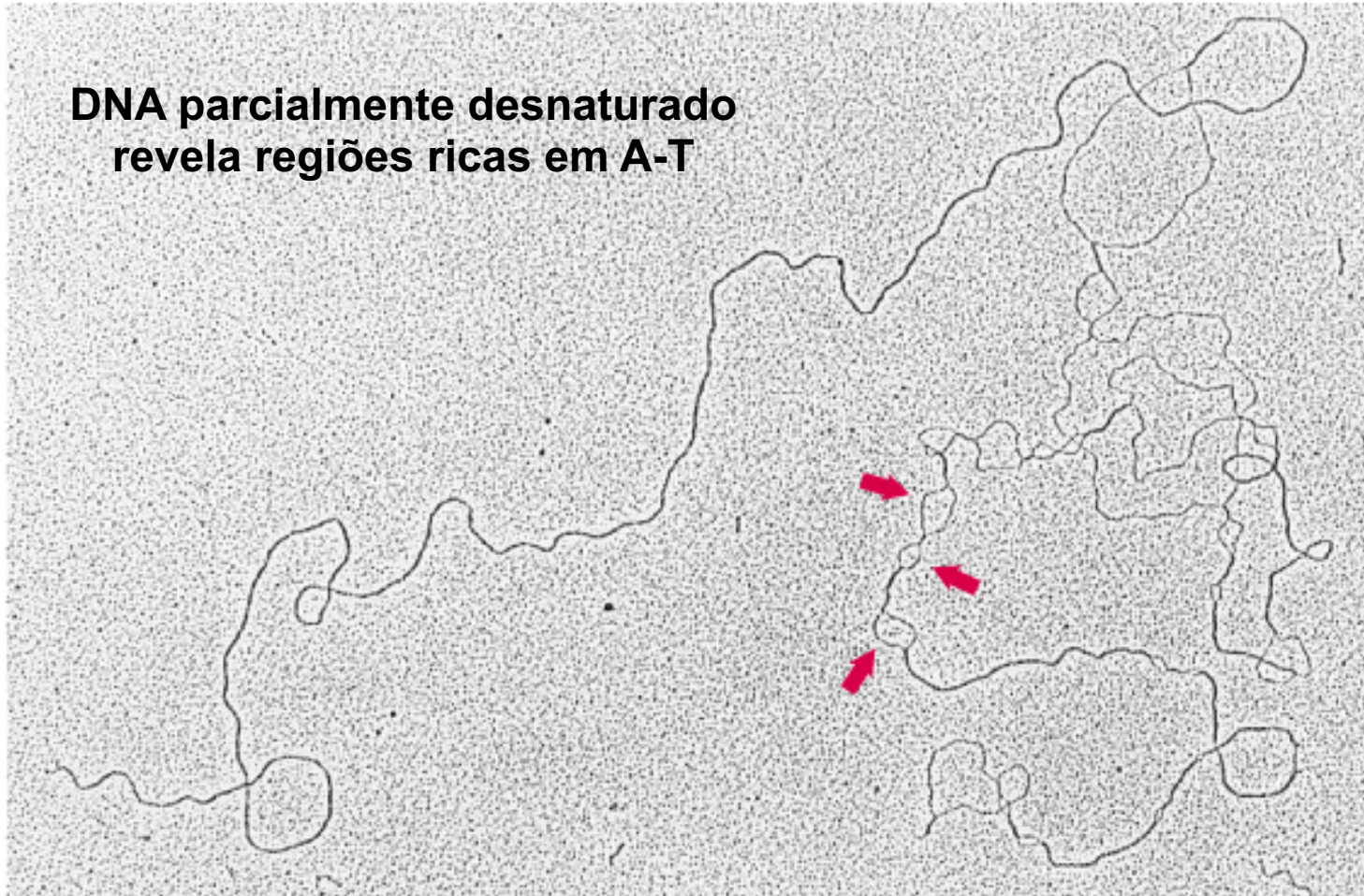


Observação em microscópio eletrônico



Replicação se inicia em um único ponto do DNA

**DNA parcialmente desnaturado
revela regiões ricas em A-T**



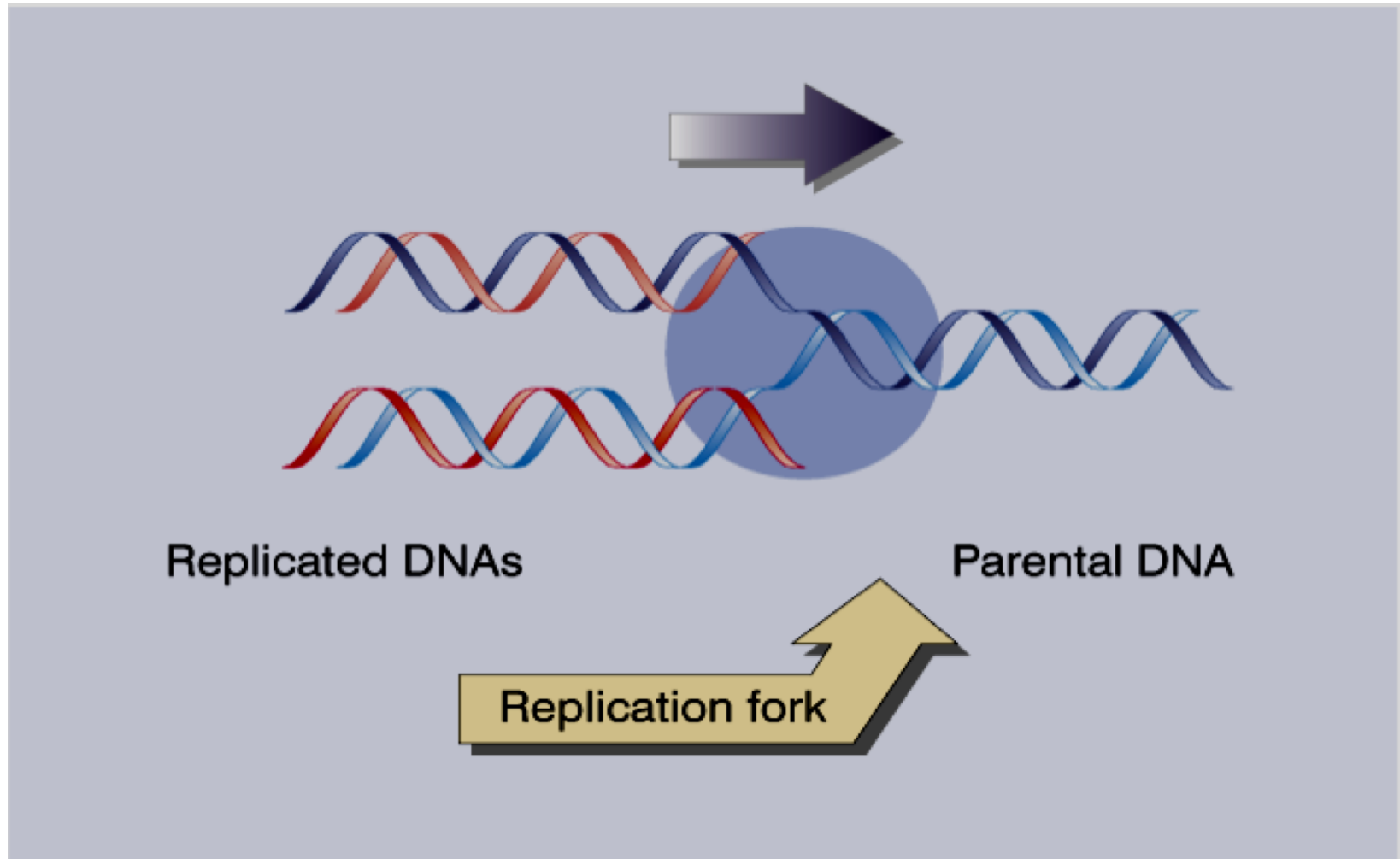
3 μm

Replicon= unidade do DNA onde está ocorrendo um evento de replicação

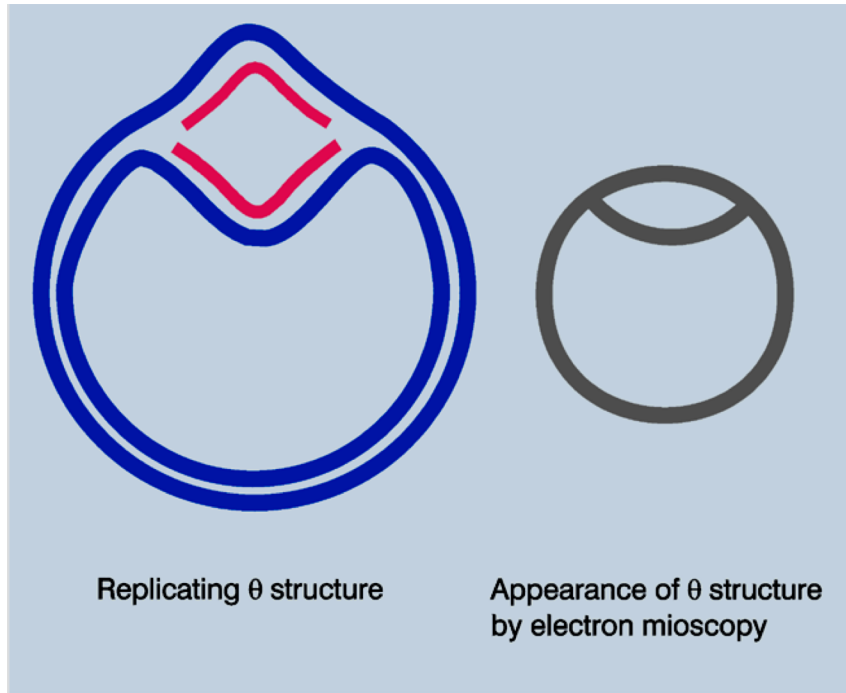
- **Origem + Término**
- **Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular**
- **O genoma de uma célula procariótica possui um único replicon**
- **Cada cromossomo eucariótico possui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente**
- **Cada replicon define duas forquilhas de replicação que avançam em sentidos opostos**

Forquilha de replicação

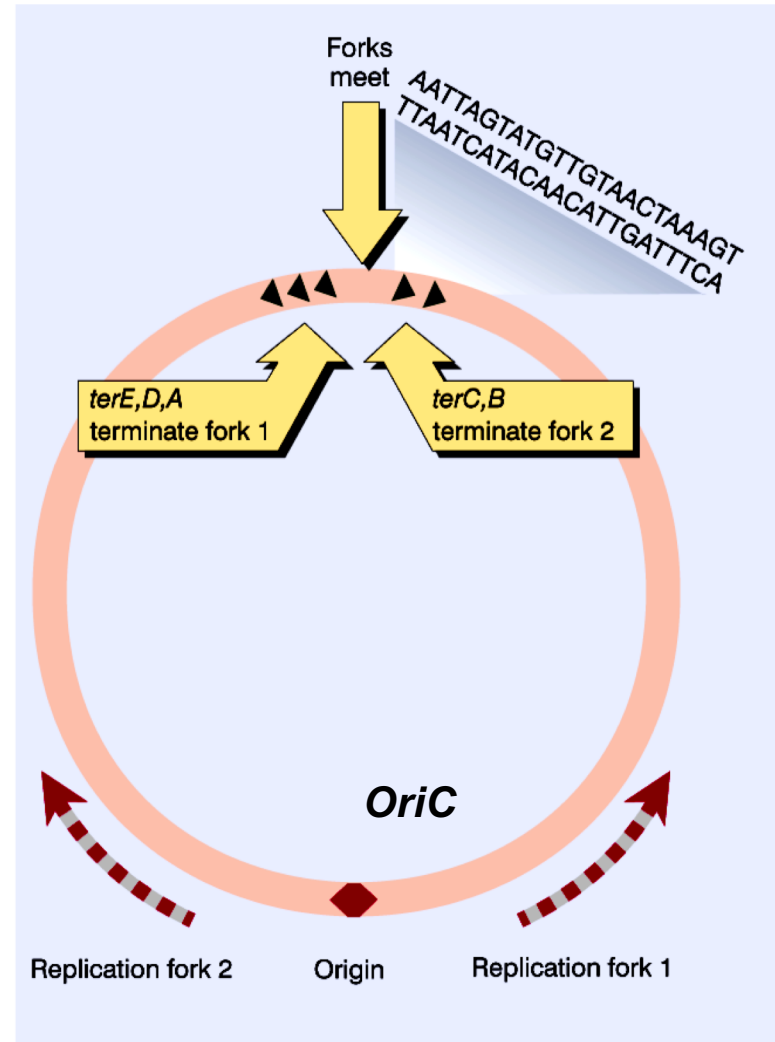
Região do DNA onde ocorre a transição do DNA parental fita dupla para as novas fitas filhas duplas



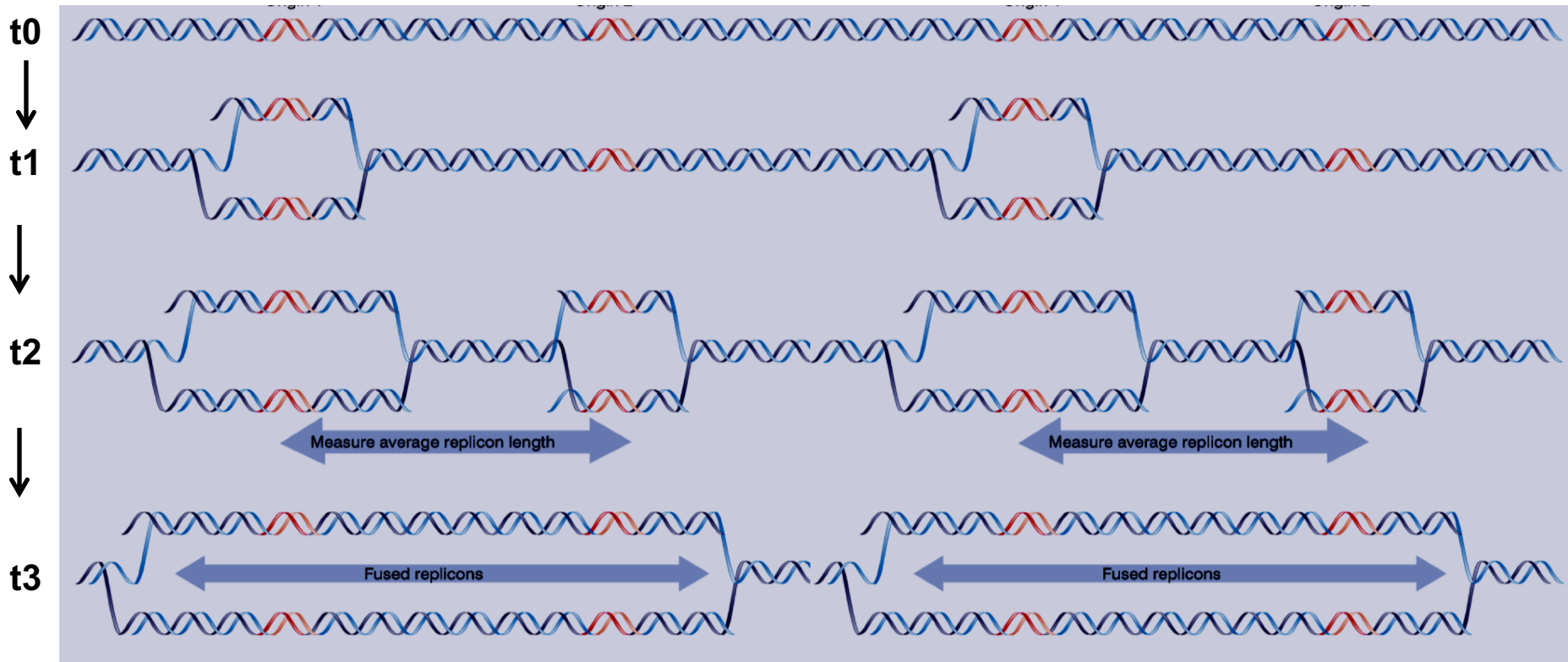
O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



- Um única origem de replicação em *E.coli* (*OriC*, 245 pb)
- A velocidade da forquilha de replicação bacteriana é 50.000 pb/min
- replicação do DNA em menos de 30 min.



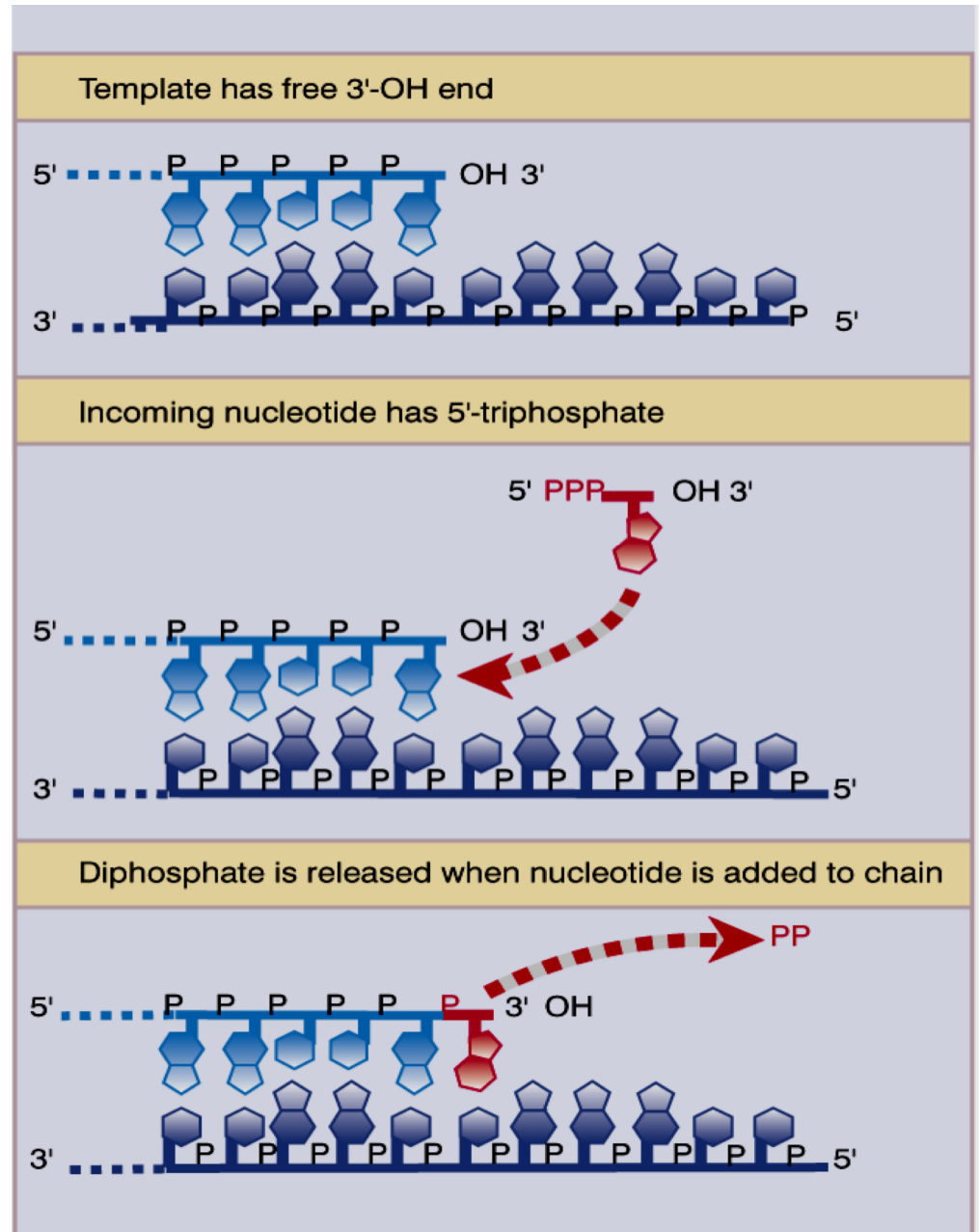
O genoma eucariótico possui vários replicons



- Os replicons eucarióticos tem 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes
- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2.000 pb/min
- Duplicação do DNA em uma célula somática demora ~ 6hrs (fase S do ciclo celular)

Na replicação o DNA é sintetizado por **DNA polimerases**

- DNA polimerase I foi isolada a partir de *E.coli* em **1955 por A. Kornberg**
- As DNA polimerases necessitam sempre de um **DNA molde** e uma **sequência iniciadora**.
- O substrato da síntese é o **desoxiribonucleosídeo 5'-trifosfato** (dNTPs)
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a **extremidade 3'OH** da cadeia em crescimento.
- Sentido da síntese **sempre é 5' → 3'**.

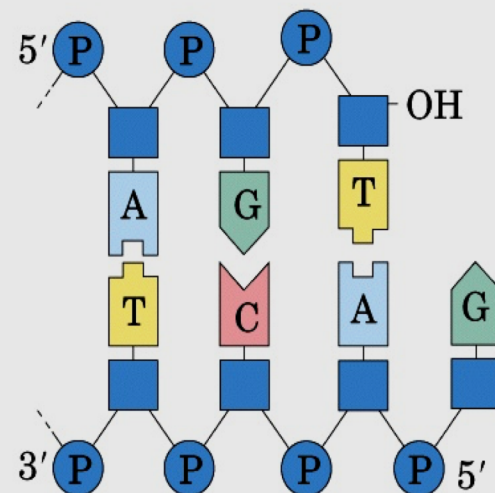
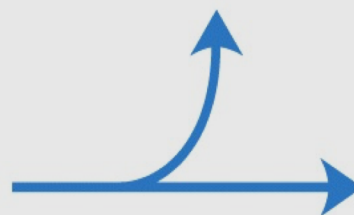
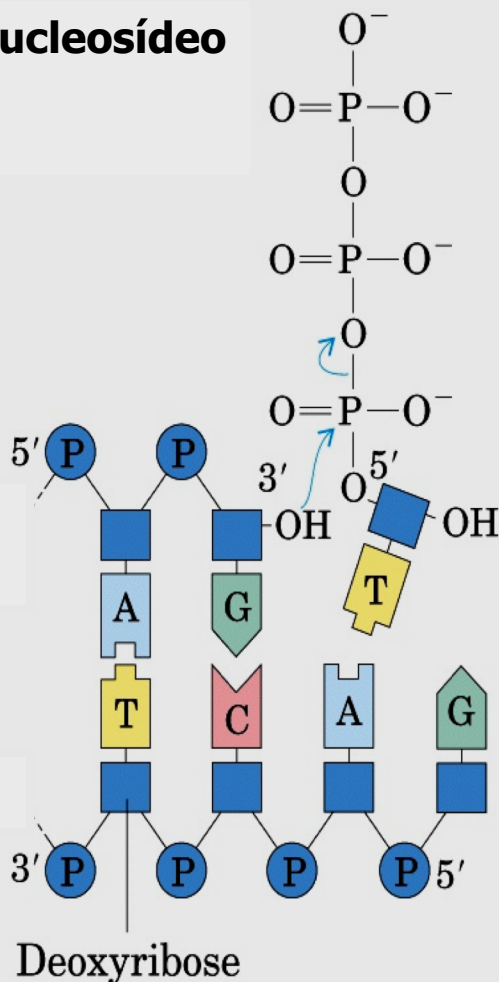


Síntese da cadeia de DNA envolve a formação de ligações covalentes do tipo fosfodiéster

**Desoxiribonucleosídeo
5' trifosfato
(substrato)**

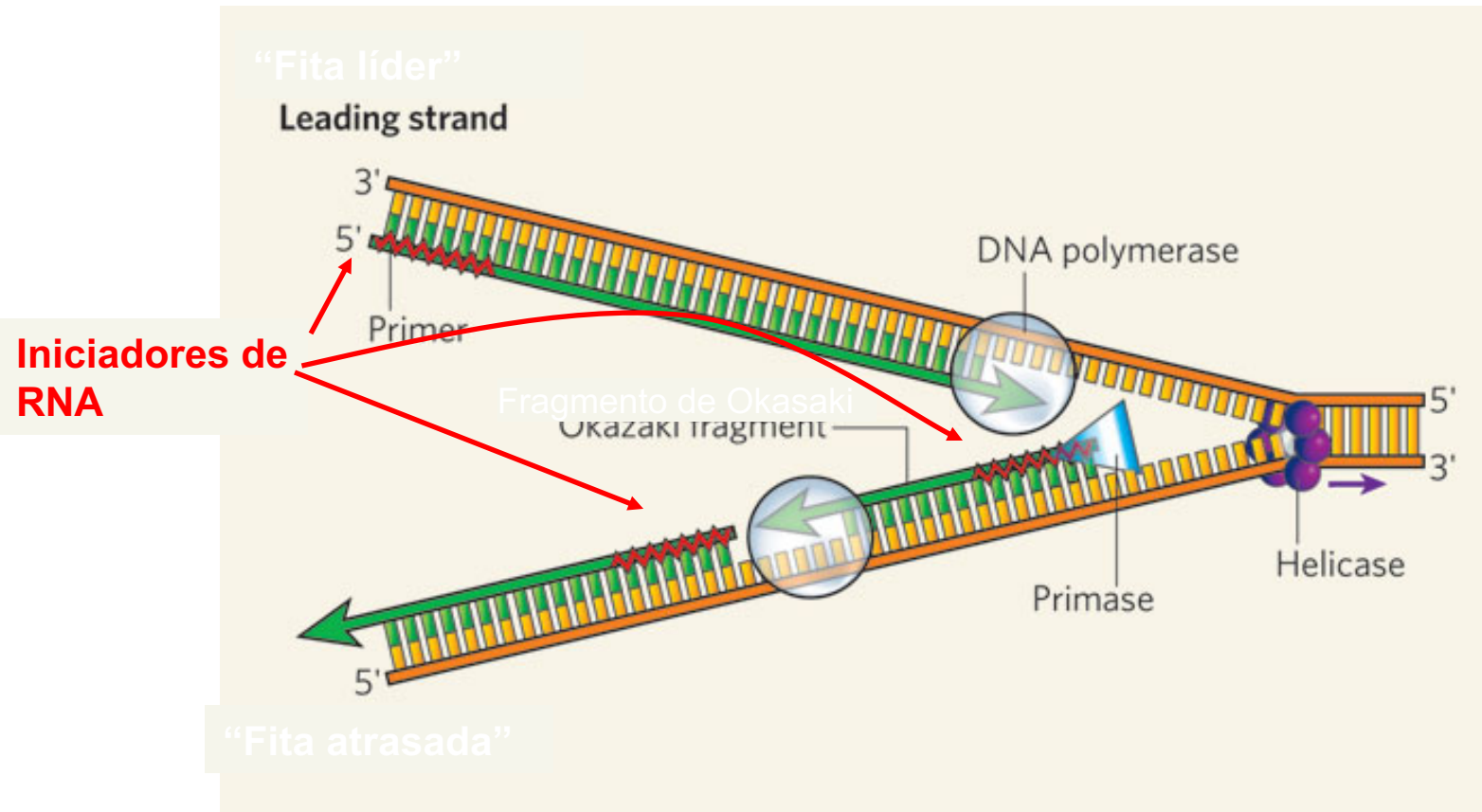
**Fita sendo
polimerizada**

Fita molde

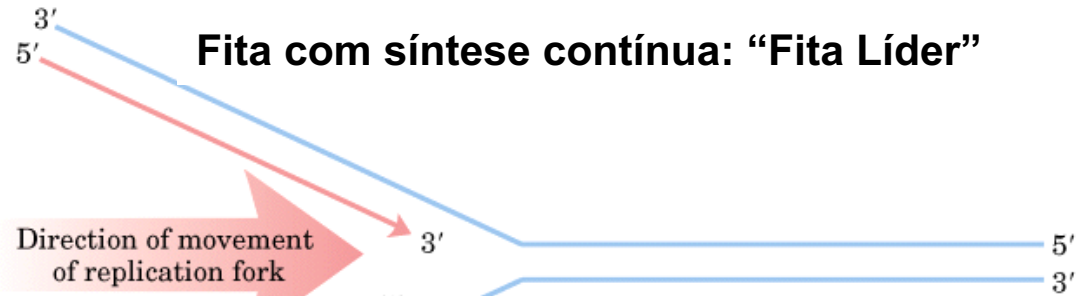
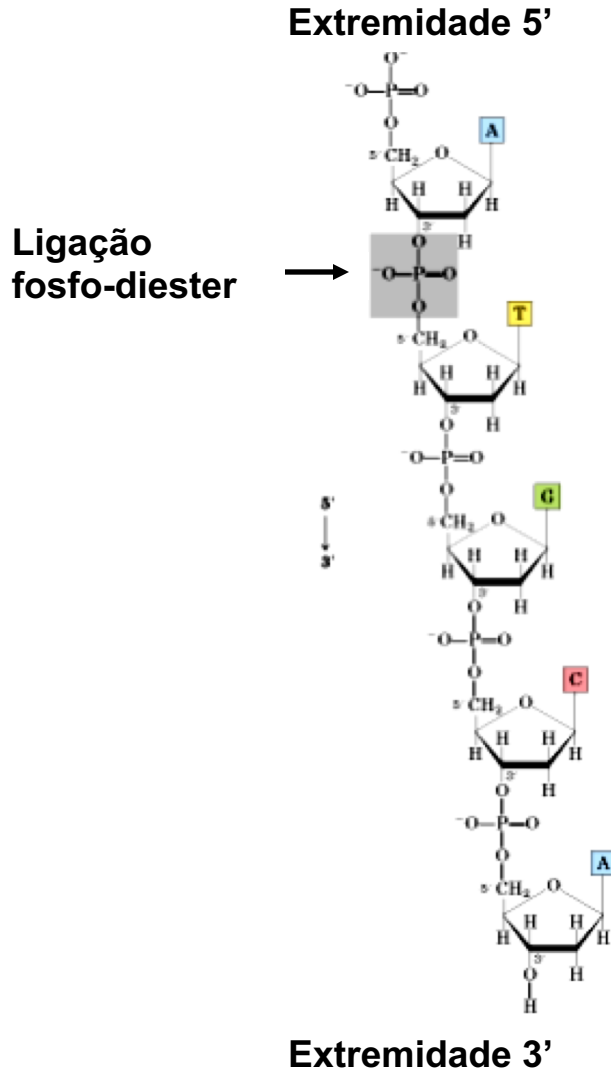


Primase

- **RNA polimerase** responsável pela síntese de **trechos de RNA iniciadores (=“primer”)** durante a replicação do DNA.
- Iniciadores de RNA têm 10 a 60 nt de tamanho.
- Provê trechos de dupla-fita com extremidade 3' livre necessários para que a DNA polimerase possa agir.
- Os iniciadores de RNA são removidos no final da replicação.



Síntese de DNA ocorre **sempre** na direção **5' → 3'** e é **semi-descontínua**



Fita com síntese descontínua: “Fita atrasada”



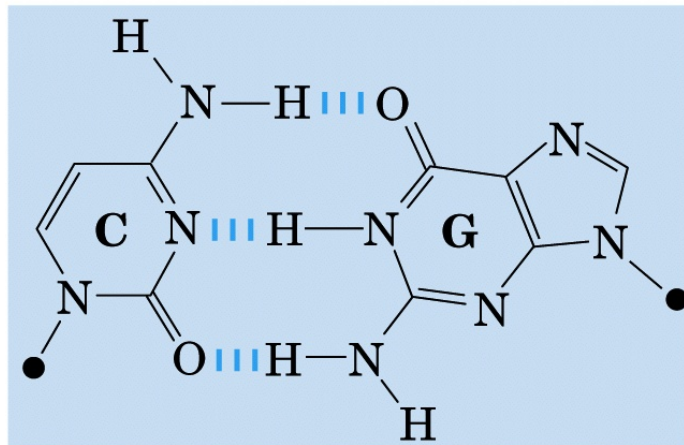
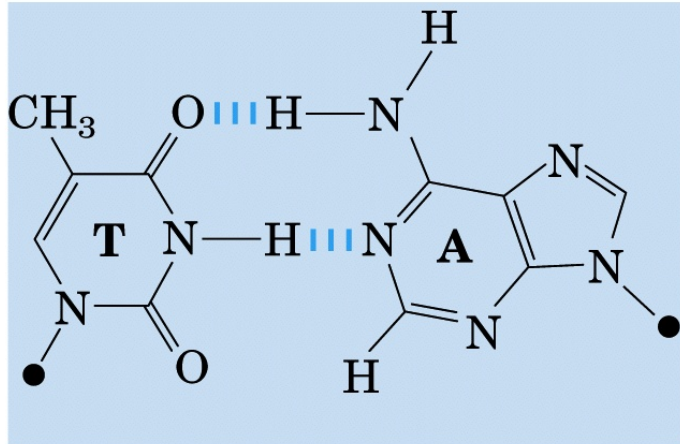
Fragmentos de Okasaki:

Bactéria: 1.000 a 2.000 pb

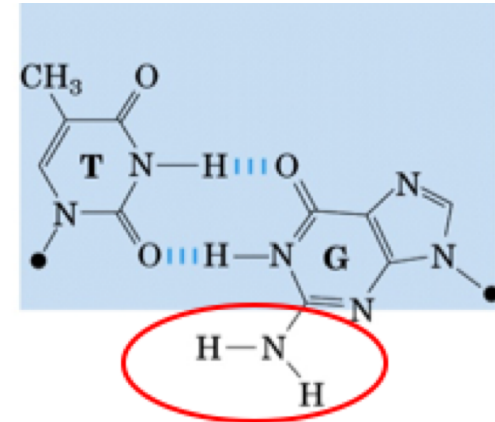
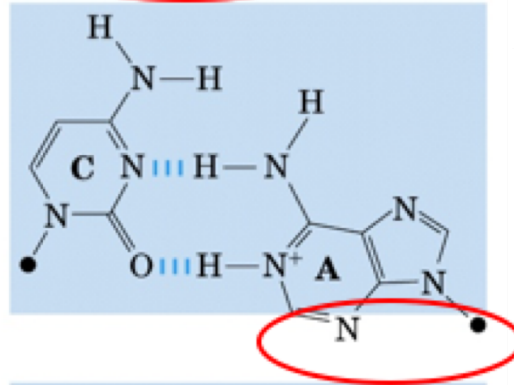
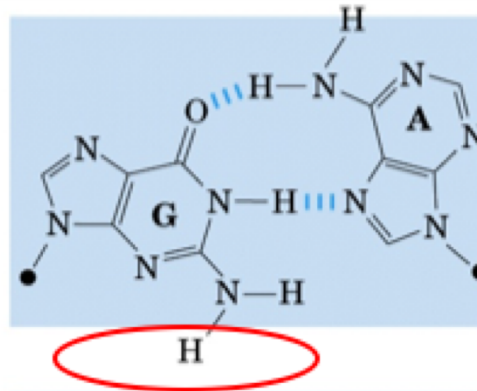
Eucariotos: 150 a 200 pb

Geometria do pareamento das bases contribui para a fidelidade da replicação do DNA

Pareamento correto

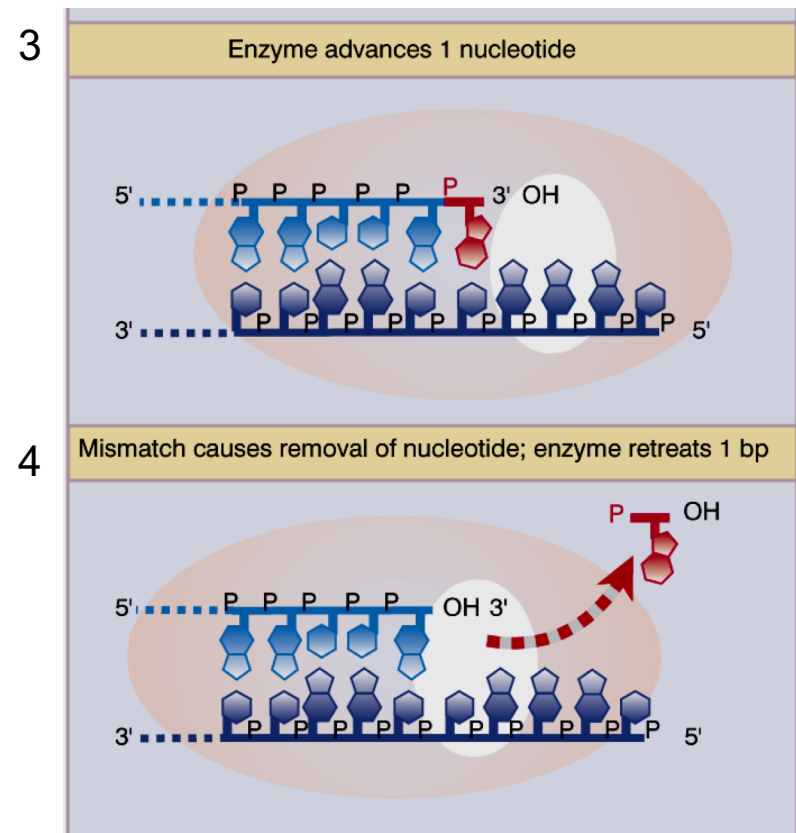
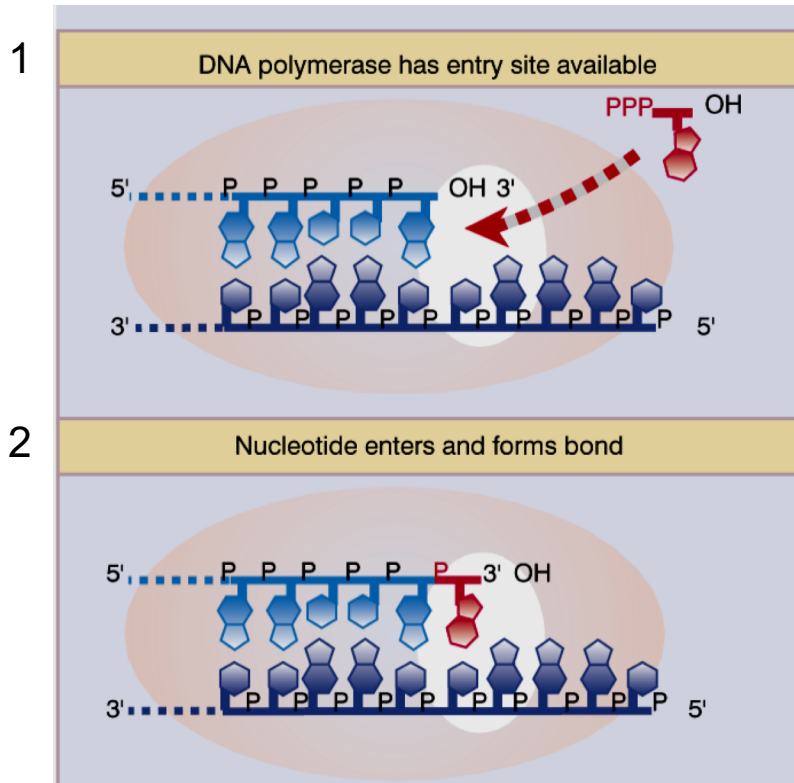


Pareamento incorreto



Como evitar que a DNA polimerase cometa erros durante a replicação?

Atividade revisora (atividade exonuclease 3' → 5') garante a fidelidade da replicação



Importante: apesar da atividade revisora da DNA polimerase ainda ocorrem erros durante a replicação (1 a cada 100.000 nucleotídeos). Aulas 6 e 7

Propriedades das DNA-polimerases bacterianas

	<u>Pol I</u>	<u>Pol II</u>	<u>Pol III</u>
Polimerização 5' → 3'	+	+	+
Exonuclease 3' → 5'	+	+	+
Exonuclease 5' → 3'	+	-	-
Número de subunidades	1	≥4	≥ 10
Velocidade de Polimerização(nt/seg)	16-20	40	250-1.000
Processividade (nt adicionados antes da dissociação da fita-molde)	3-200	1.500	≥ 500.000

↓

↓

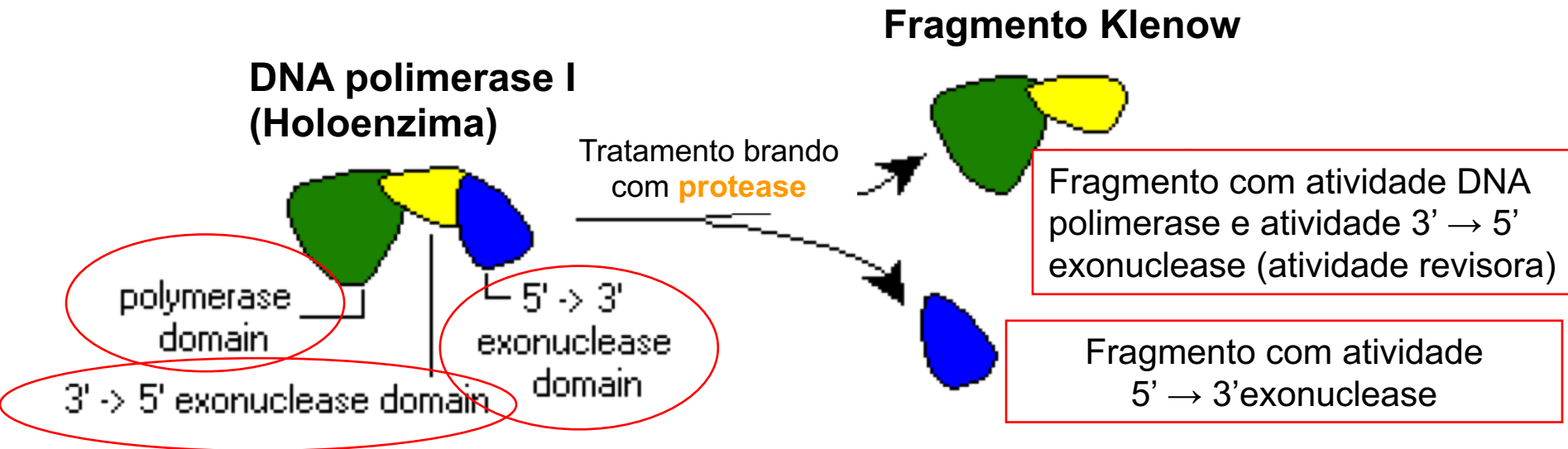
↓

Participa no Reparo do DNA

Principal enzima de replicação em E.coli

Atividade exonuclease 5' → 3'
responsável pelo processo de remoção dos iniciadores de RNA

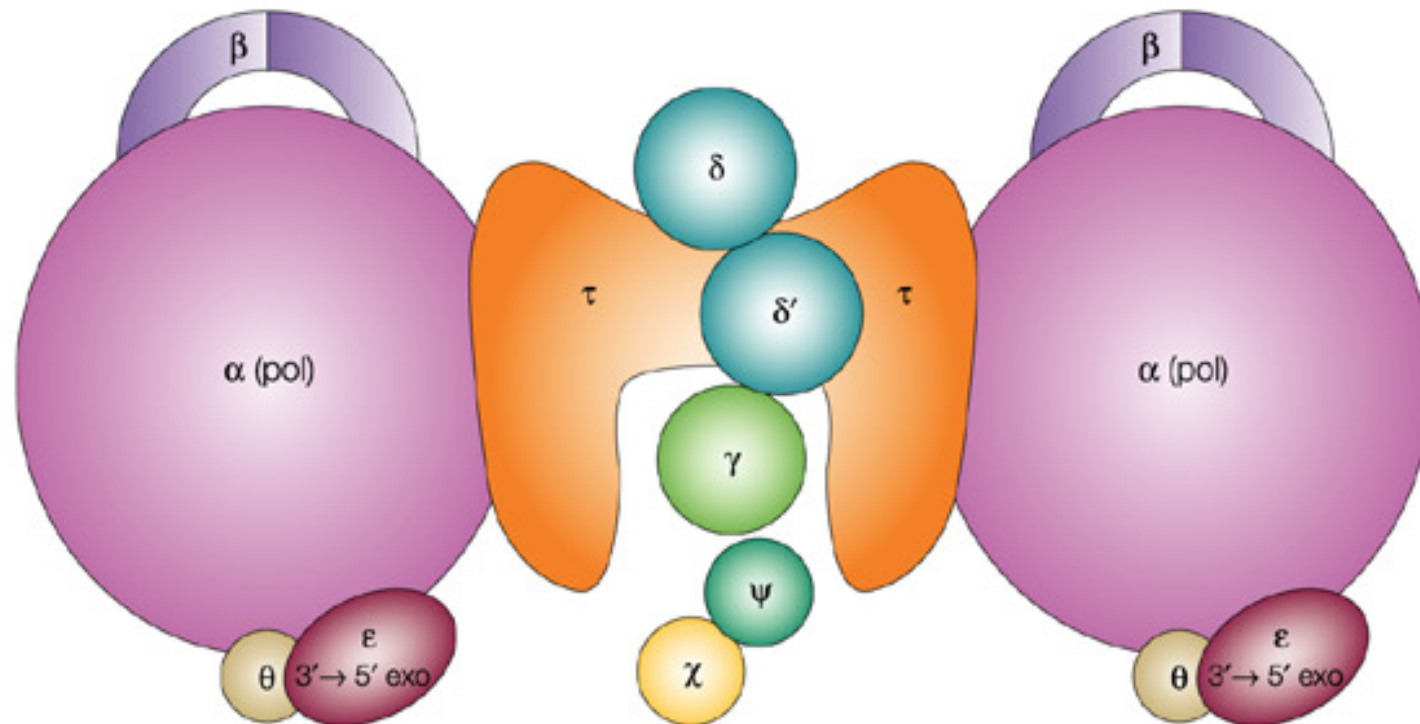
Atividade exonuclease 3'→5' (atividade revisora) e exonuclease 5'→3' (remoção de primers RNA) localizam-se em regiões distintas (domínios) da DNA Polimerase



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

Fita na qual ocorre a síntese contínua

Fita na qual ocorre a síntese descontínua



As sub-unidades τ mantem a estrutura dimérica

As **2 sub-unidades beta (β)** da DNA-polimerase III envolvem a dupla hélice formada durante a replicação e mantem o DNA associado à enzima

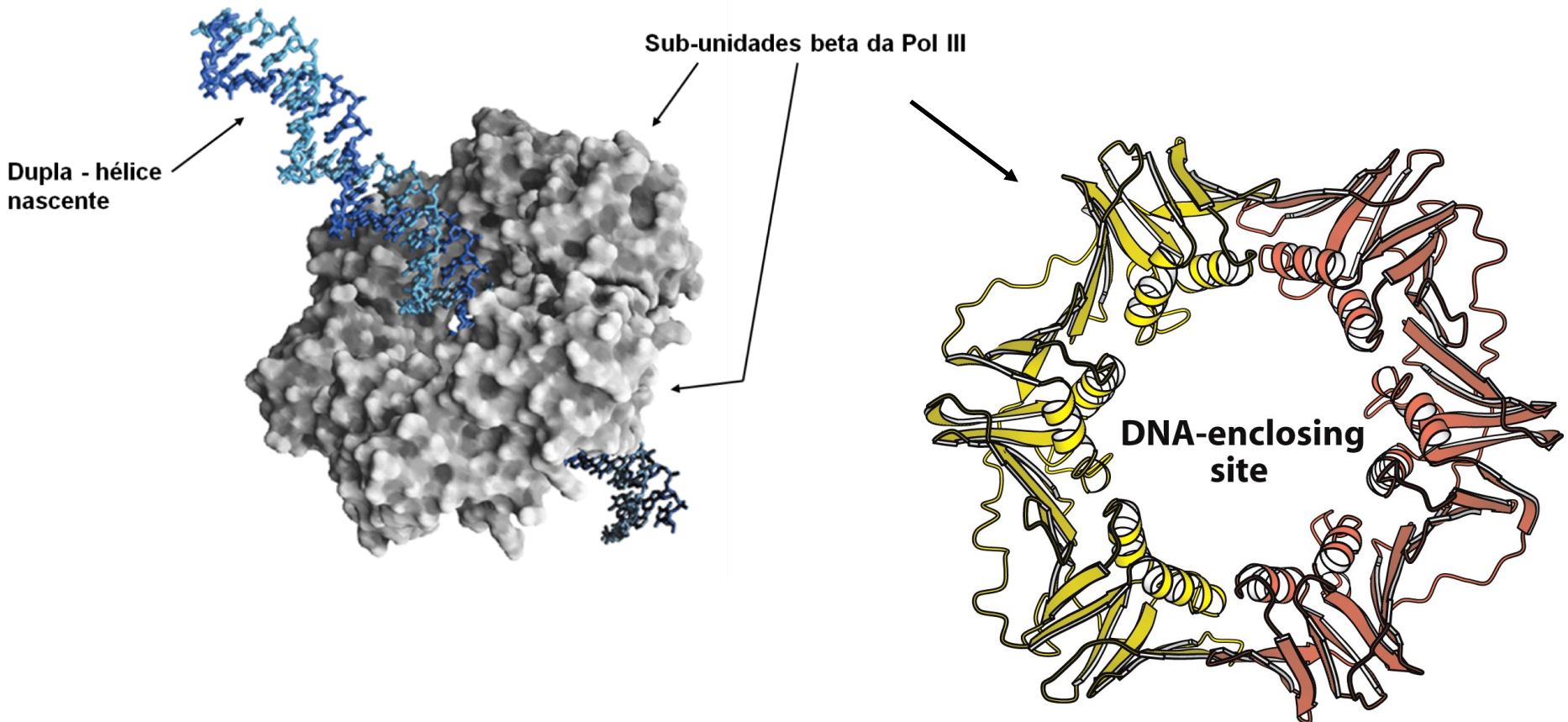
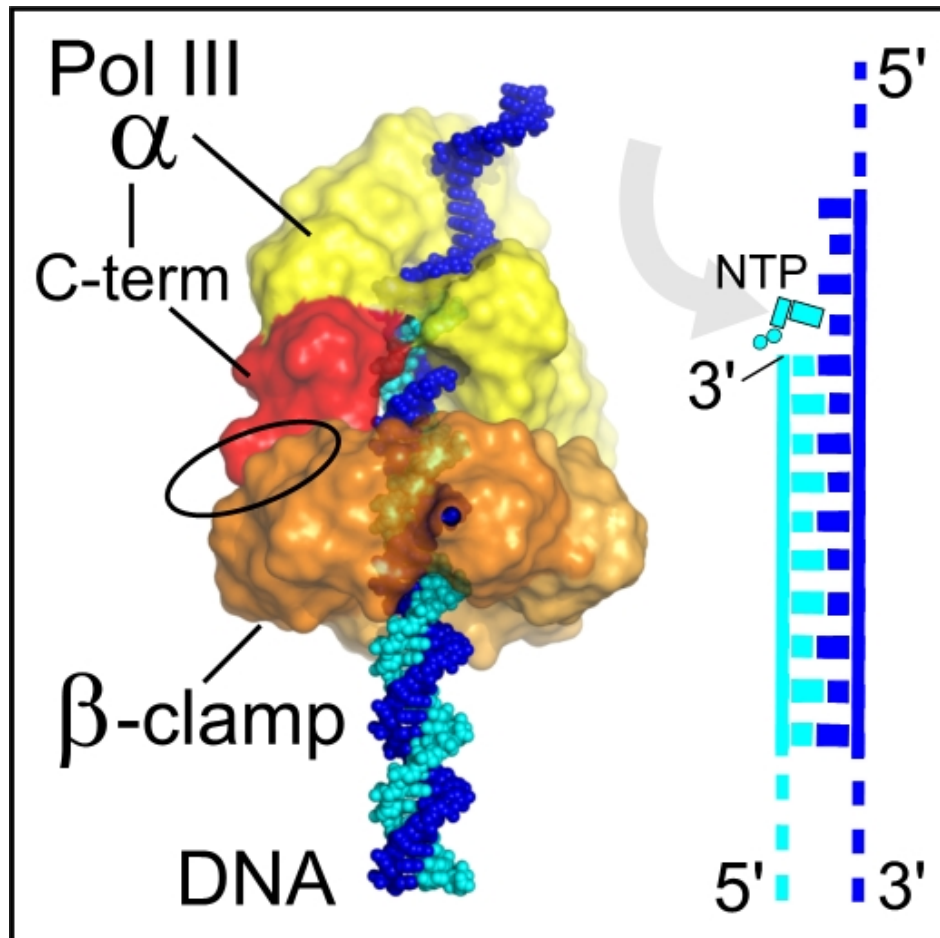
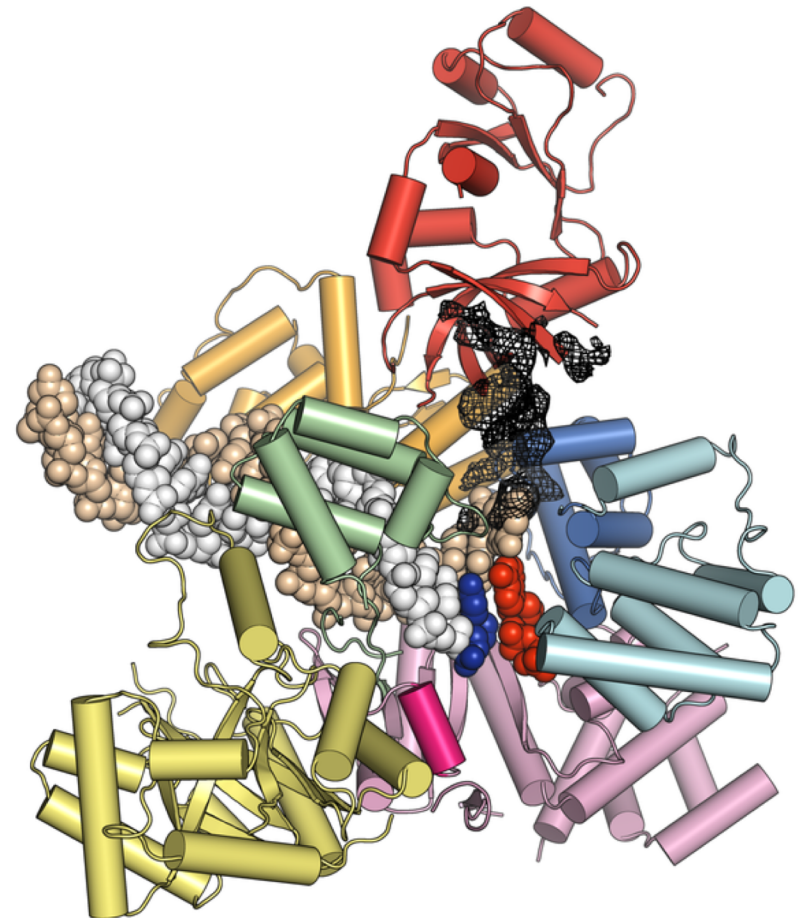


Figure 28.20
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

A incorporação de nucleotídeos é catalizada pela subunidade alfa (α), que juntamente com as subunidades epsilon (ϵ) e teta (θ) formam o núcleo ("core") da DNA polimerase III

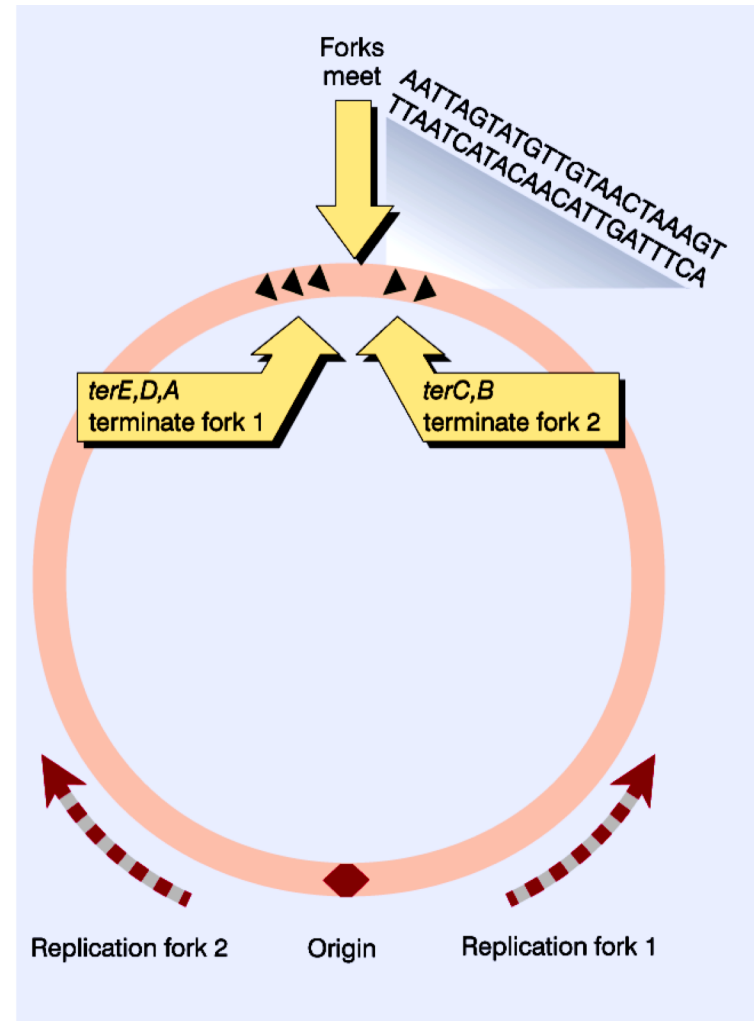


Estrutura da subunidade alfa da DNA polimerase bacteriana



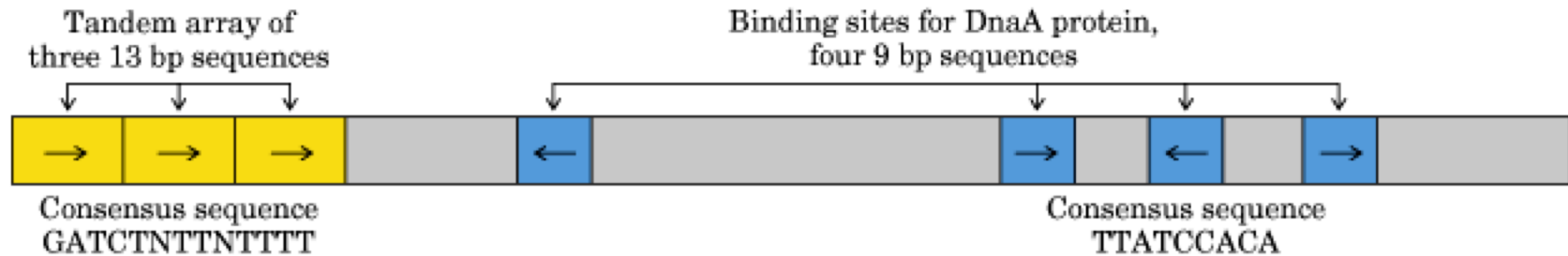
Replicação ocorre em 3 etapas

- Iniciação
- Elongação
- Terminação



Iniciação - 1º estágio da replicação (E.coli)

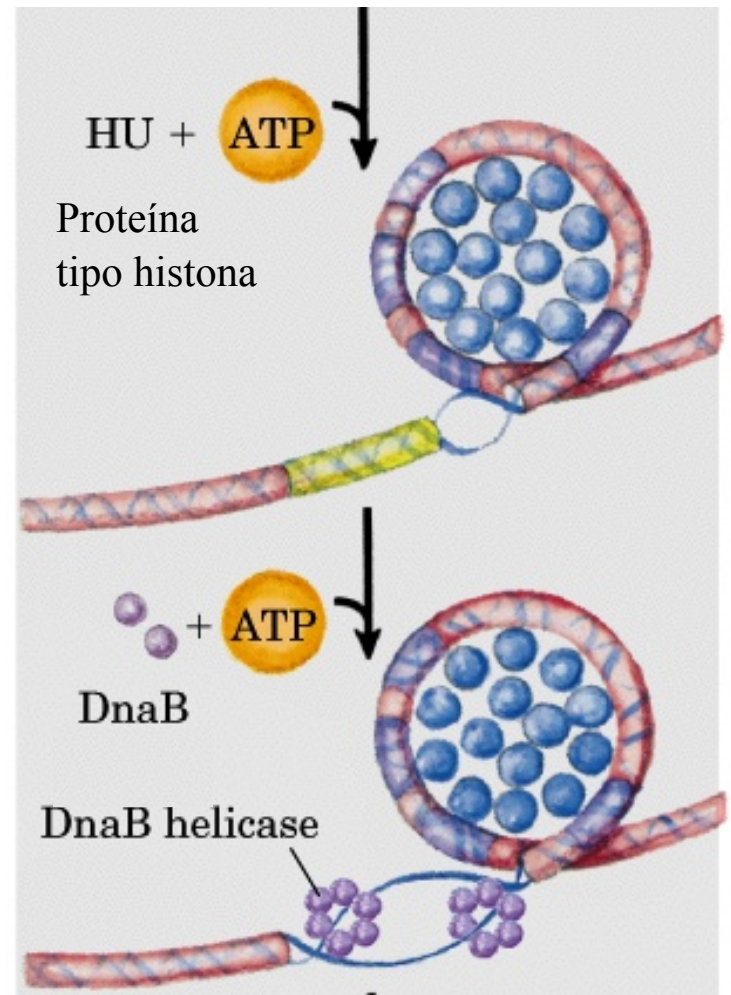
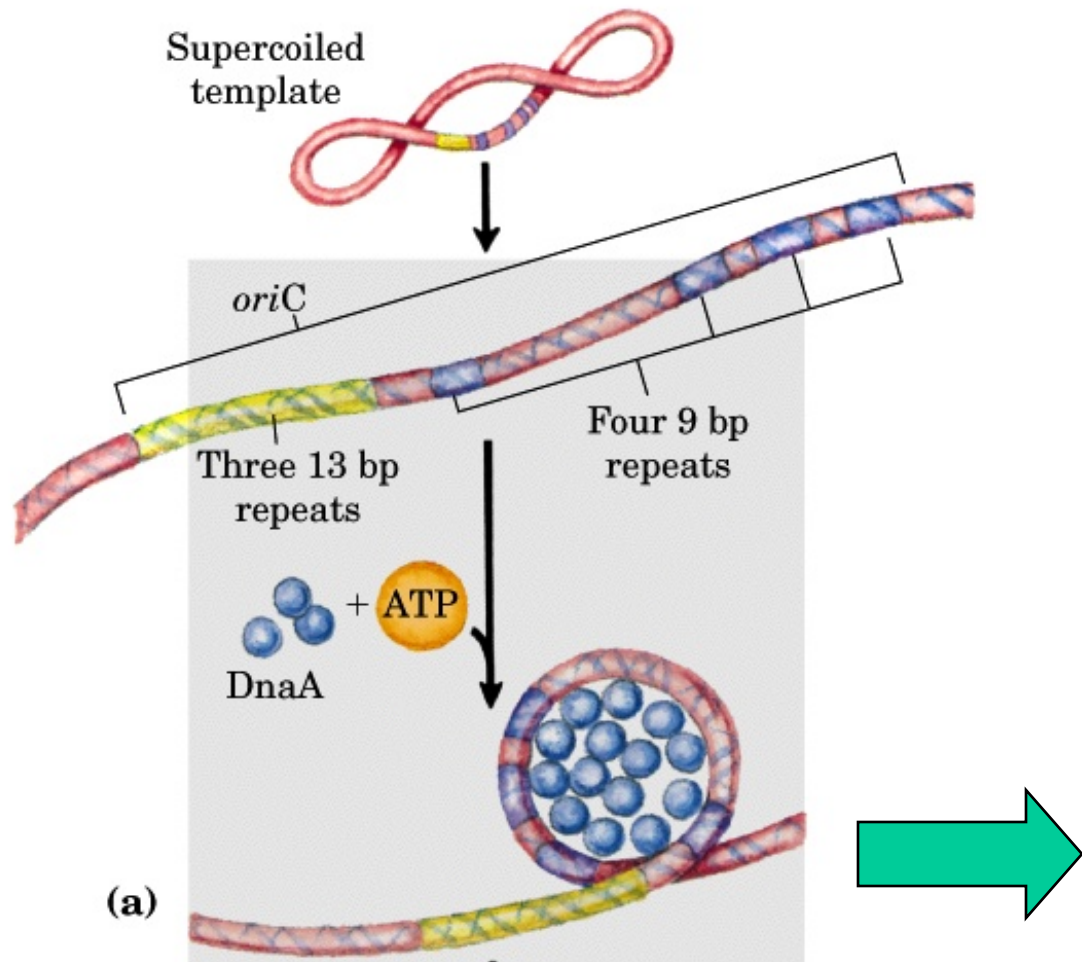
Estrutura da origem de replicação bacteriana *oriC*



- A origem de replicação *OriC* é **extremamente conservada** (=mesma sequencia em diferentes espécies).
- sequências repetidas com 9 e 13 bases, **ricas em A-T**.
- enriquecida na **sequência palindrômica GATC**, alvo de **metilação enzimática** na adenina .

Proteínas presentes na origem de Replicação de *E.coli*

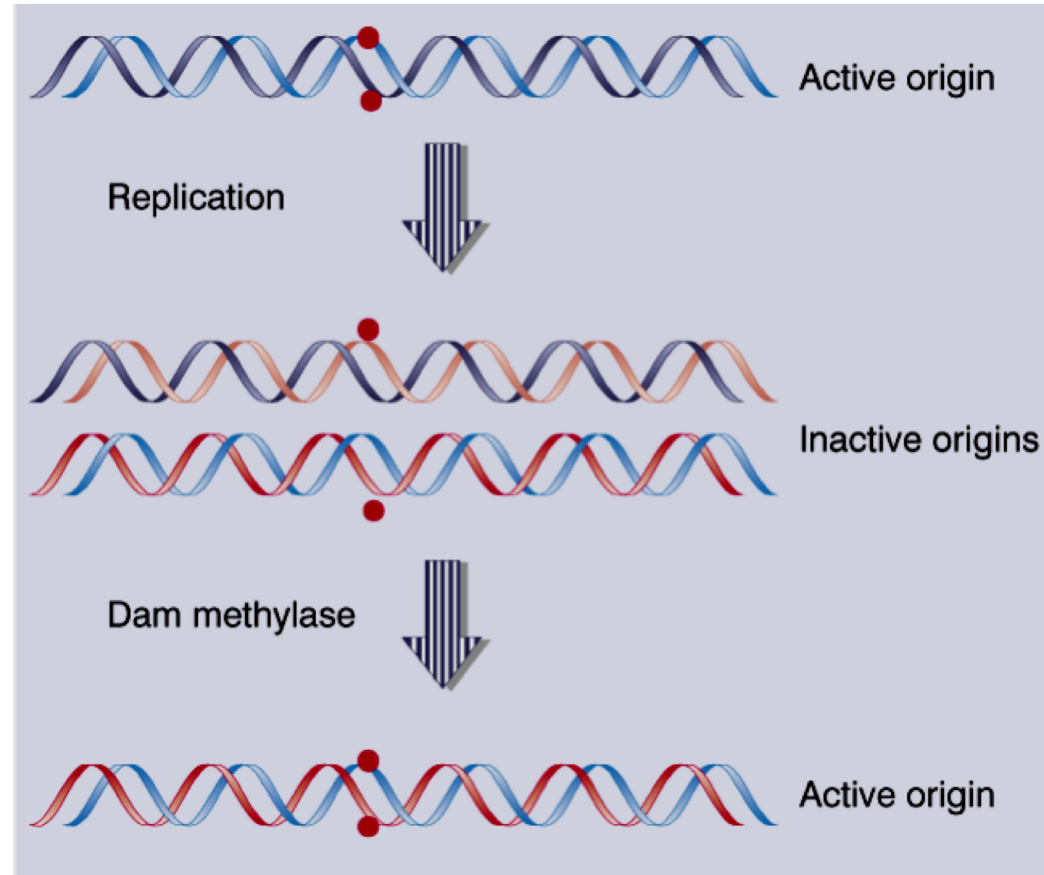
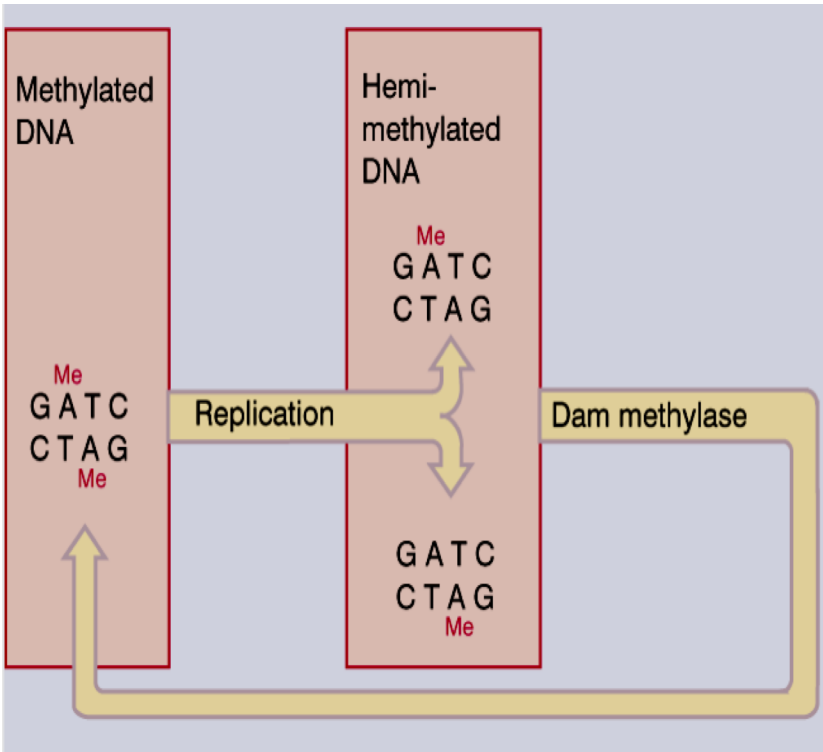
DnaA	Reconhece a origem <i>oriC</i> em sítios específicos ricos em A-T na dupla-fita
DnaB (helicase)	Desenrola o DNA (consome ATP para romper ligações de hidrogênio)
DnaC	Auxilia a ligação de DnaB na origem
HU	Proteína do tipo histona que estimula a iniciação
Primase (DnaG)	Sintetiza os iniciadores de RNA (Polimerase de RNA)
Single strand binding (SSB)	Liga a fita simples de DNA
DNA girase (topoisomerase)	Alivia a tensão torsional gerada pela abertura da dupla-fita (cliva e religa a cadeia fosfodiester)
Dam Metilase	Metila as sequências GATC na OriC



Iniciação da replicação do DNA

Origem de Replicação em bactérias

Somente origens completamente metiladas podem iniciar a replicação



A hemi-metilação (estado temporário após a replicação) permite que célula discrimine a fita parental da fita-filha. O sistema de reparo mismatch age na apenas na fita hemi-metilada. **Aula de Reparo de DNA**

Esquema da DNA polimerase III associada à DnaB helicase

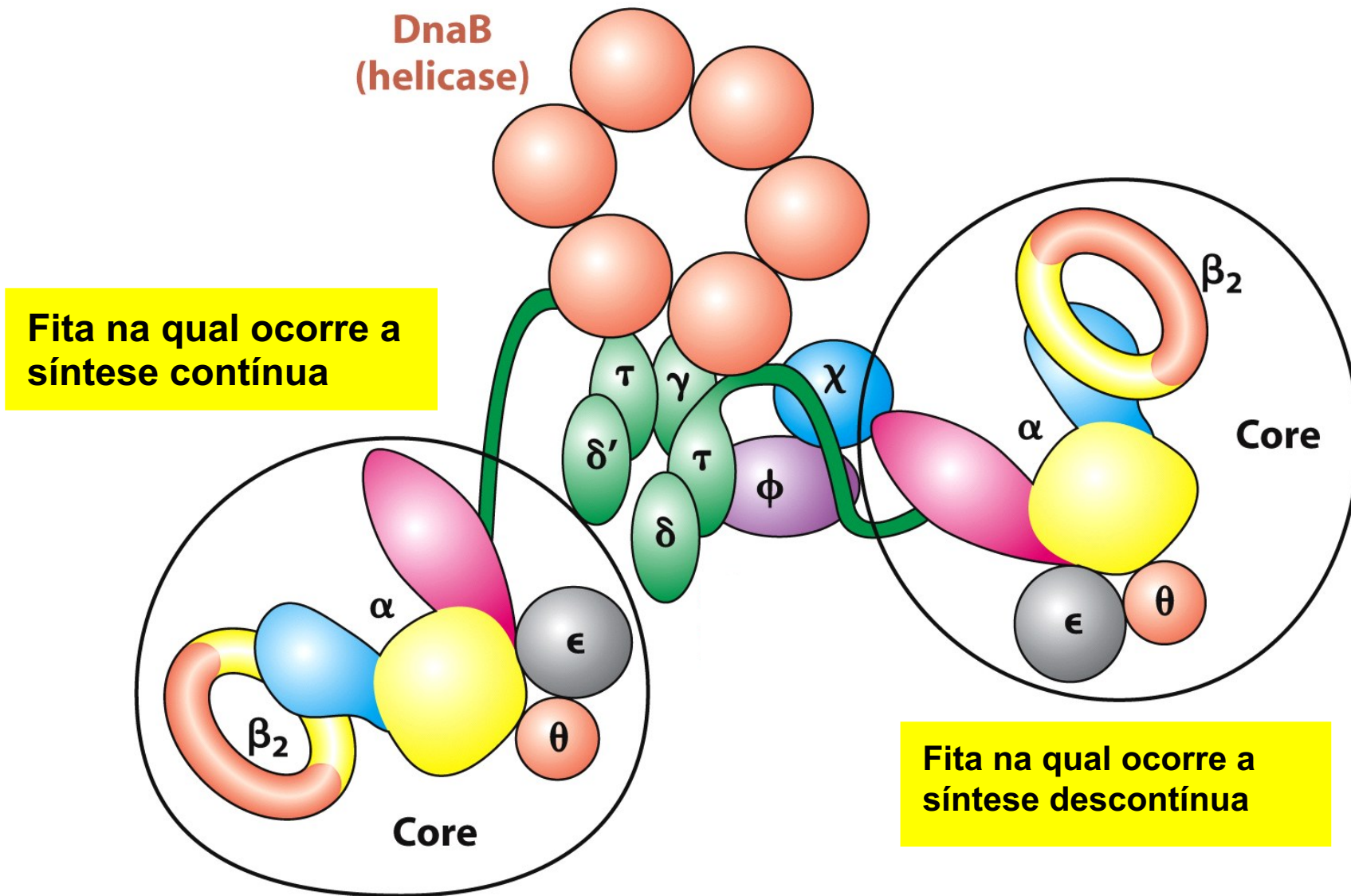
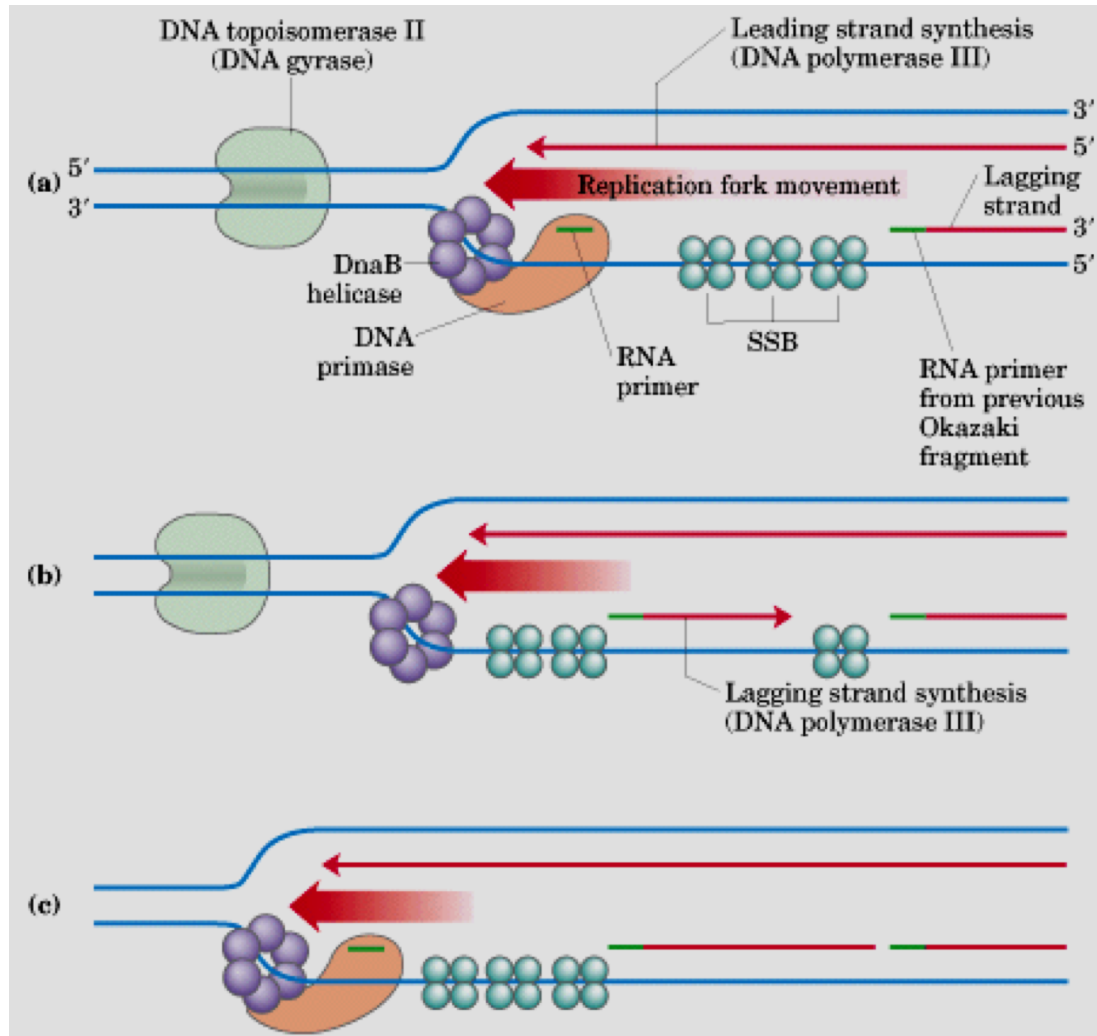


Figure 28.22
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Elongação - 2º estágio da replicação



Forquilha de replicação na etapa de alongamento

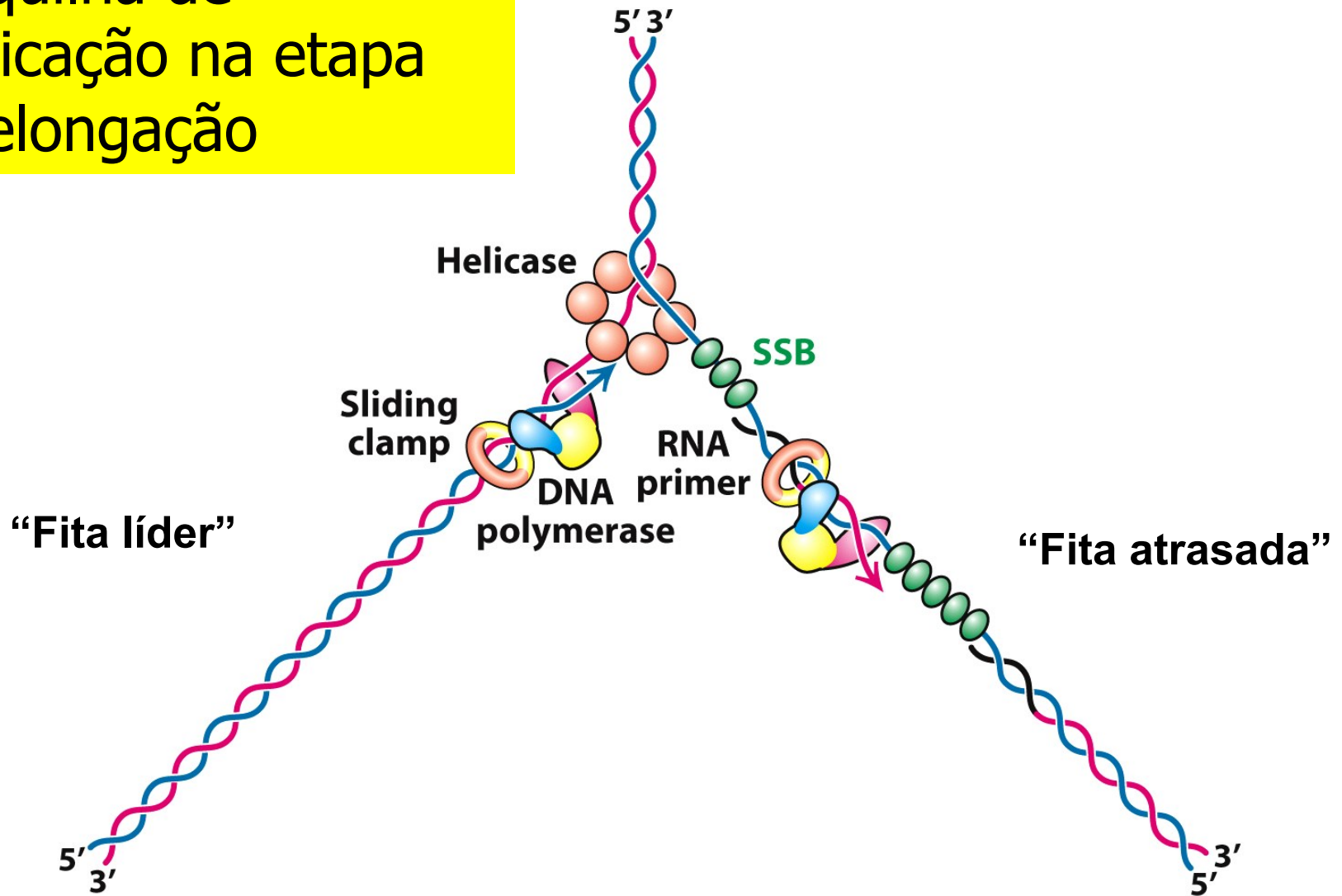
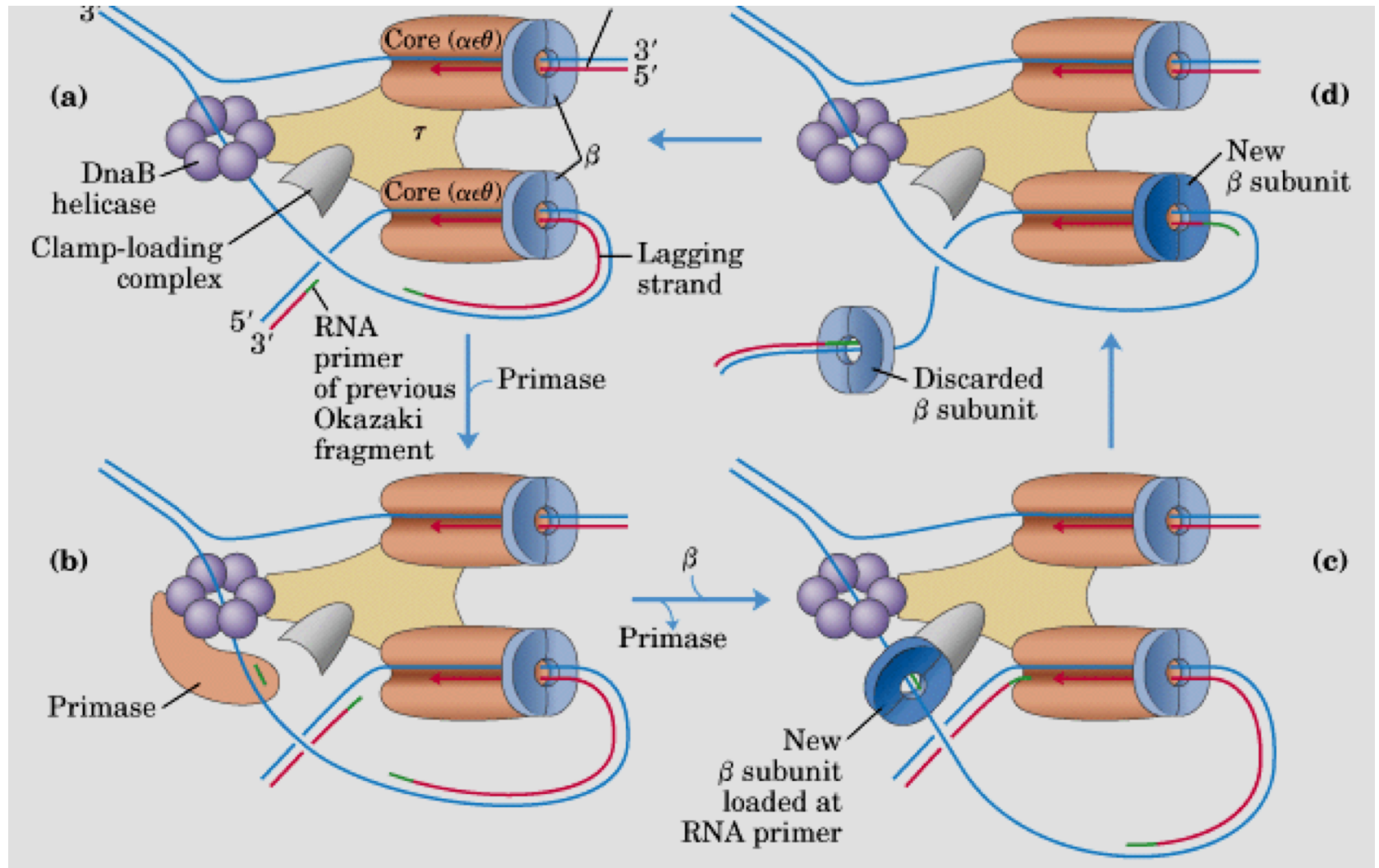


Figure 28.21
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

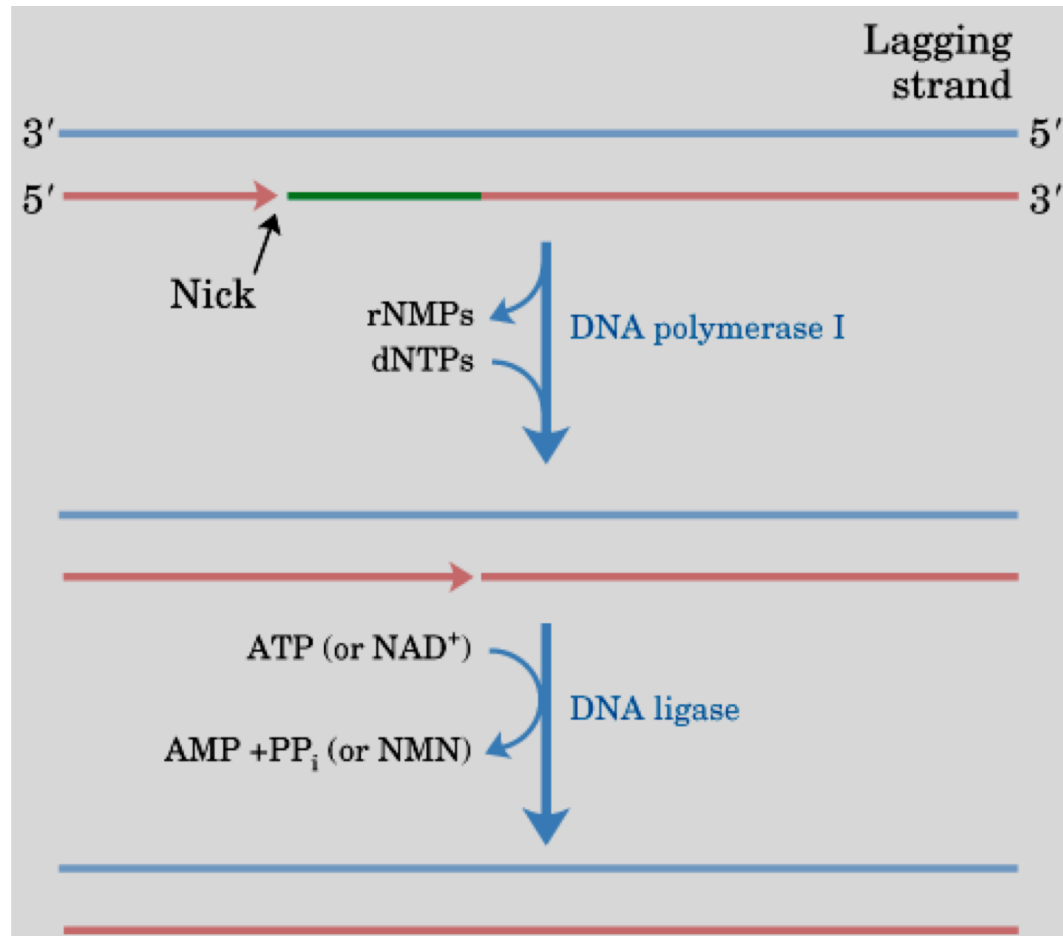
Síntese contínua e descontínua nas duas fitas é um processo altamente coordenado catalizado por uma única sub-unidade de PolIII



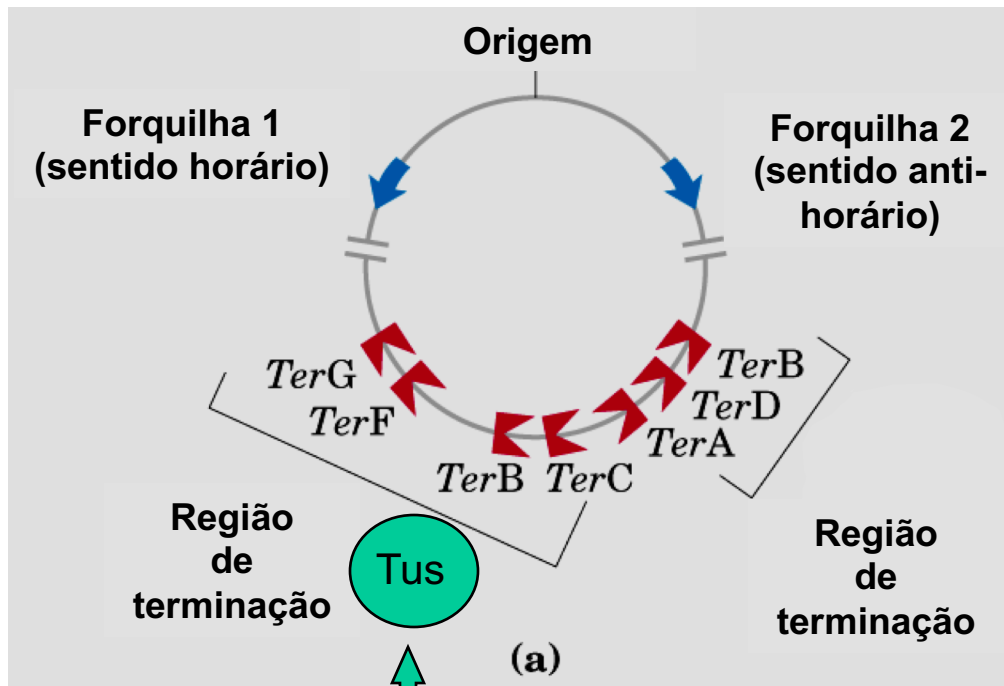
Replicação do DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=Qqe4thU-os8>

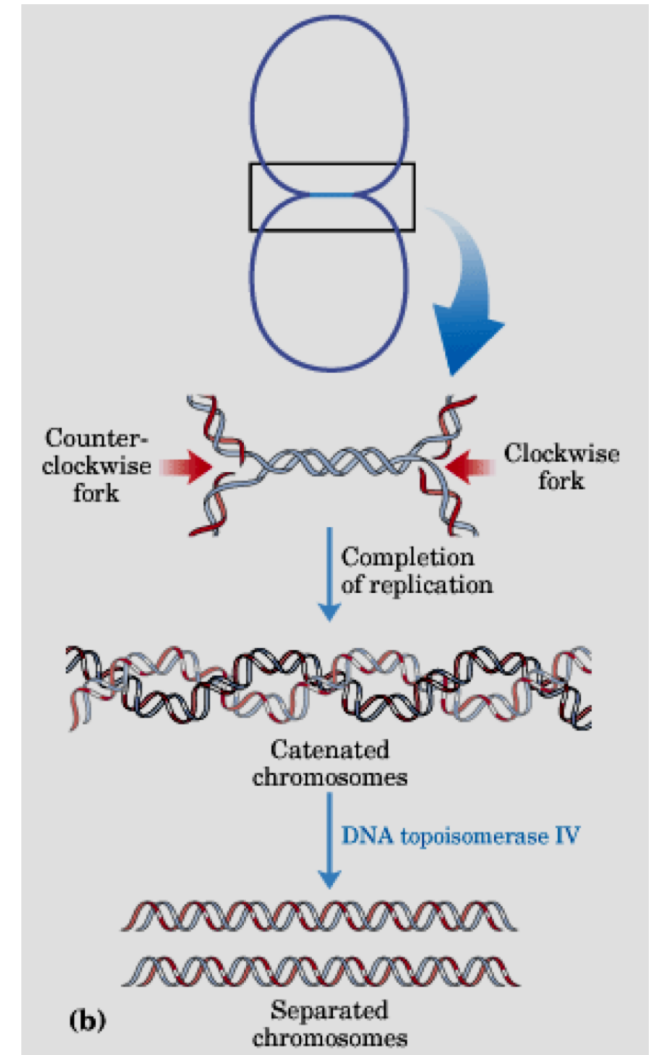
- Remoção de iniciadores de RNA pela DNA polimerase I (Atividade 5' → 3' exonuclease)
- Ligação do ponto de quebra pela DNA ligase



Terminação - 3º e último estágio da replicação



Terminus Utilization Sequence



topoisomerases: quebra e ligação de ligações fosfodiéster do DNA

Replicação em eucariotos

- **Vários replicons** em cada célula (40-100 kb comprimento espaçados de 30.000 – 300.000 pb)
- Origem da replicação em sequências de replicação autônoma (ARS).
- Iniciação **depende de complexo multi-protéico** ORC, regulado por proteínas envolvidas no **contrôle do ciclo celular** eucariótico.
- A terminação da replicação nos cromossomos eucarióticos envolve a síntese de **telômeros nas extremidades dos cromossomos** com função estabilizadora (ao contrário dos cromossomos bacterianos, os cromossomos eucariotos não são circulares).

DNA Polimerases eucarióticas:

- alfa: não possui atividade revisora, envolvida na síntese de iniciadores de RNA.
- delta: extensão das fitas “filhas”.
- epsilon: remoção de iniciadores de RNA (análoga a DNA Pol I de bactérias)

Aplicações resultantes do conhecimento dos mecanismos de replicação do DNA

- Reação em cadeia da polimerase (PCR). **semana 2**
- Sequenciamento de DNA. **semana 6**

Bibliografia

Lehninger. 6ª edição. Princípios de Bioquímica. Cap. 25.1 –
Replicação do DNA