

Estrutura dos ácidos nucleicos e replicação do DNA

QBQ0313



INSTITUTO DE QUÍMICA
USP

Bibliografia:

Capítulo 4: The structure of DNA

Capítulo 5: The structure and versatility of RNA

Capítulo 9: DNA replication

Molecular Biology of the Gene. J.D. Watson, T.A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick. CSH Press, 7th edition (2013).

Como a informação é propagada e transferida do DNA para constituir uma célula ou organismo?



Fluxo da informação genética

Fluxo da informação genética

Replicação



DNA



RNA



proteína

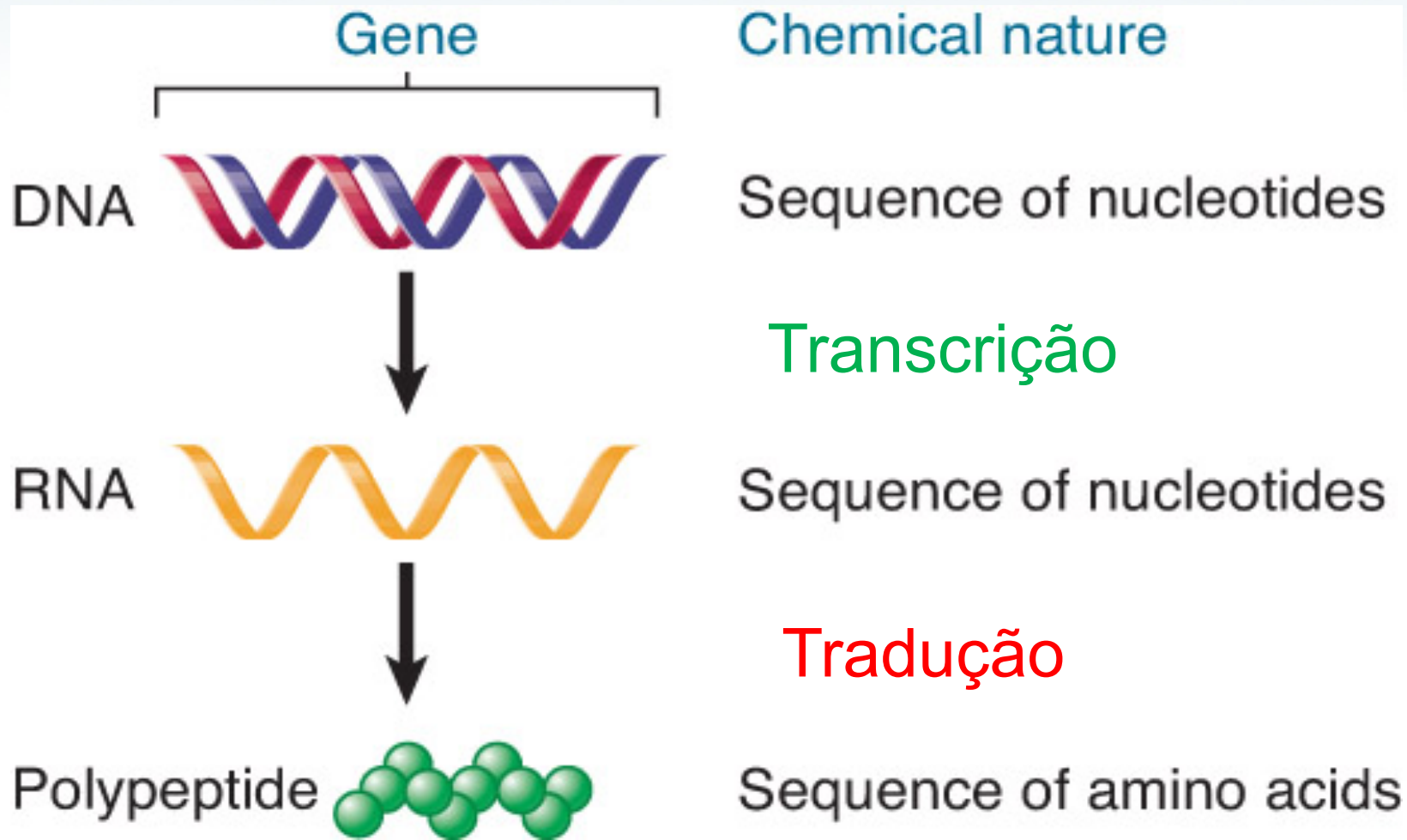
Transcrição

Tradução

Dogma Central da Biologia Molecular

Francis Crick, 1956

Fluxo da informação genética



Nem todos os RNAs codificam proteínas

Replicação



RNAs não codificadores

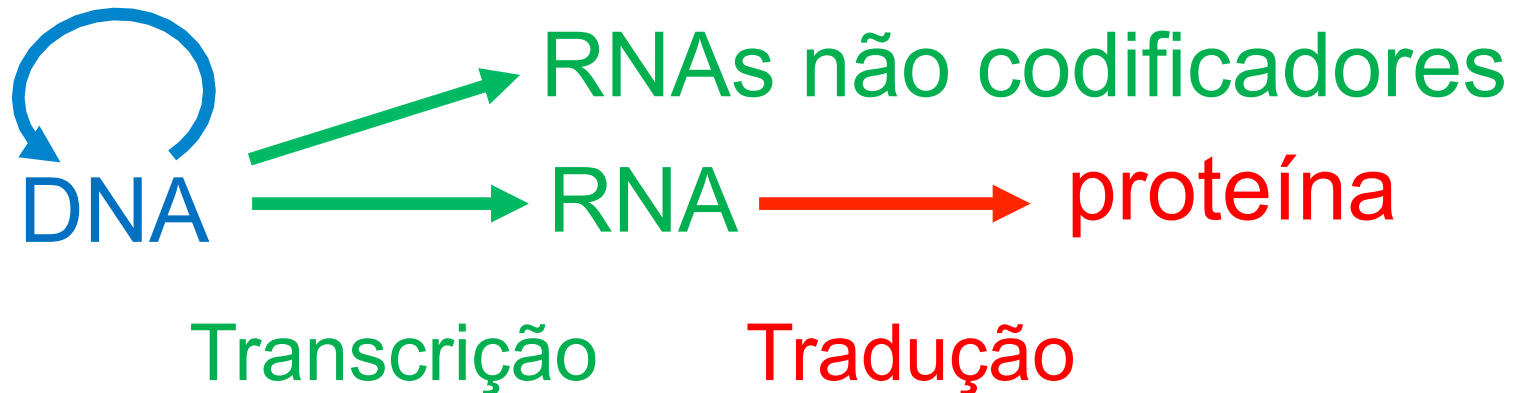
RNA → proteína

Transcrição

Tradução

Fluxo da informação genética

Replicação



- **Proteínas** fazem parte de todos os processos
 - catálise (enzimas) e funções estrutural e regulatória
- **Energia** vinda do metabolismo é necessária

Conceitos importantes

- **Replicação**

- Duplicação de DNA a partir de um molde
- Catalisada por DNA polimerases

- **Transcrição**

- Síntese de RNA a partir de um molde de DNA
- Catalisada por RNA polimerases

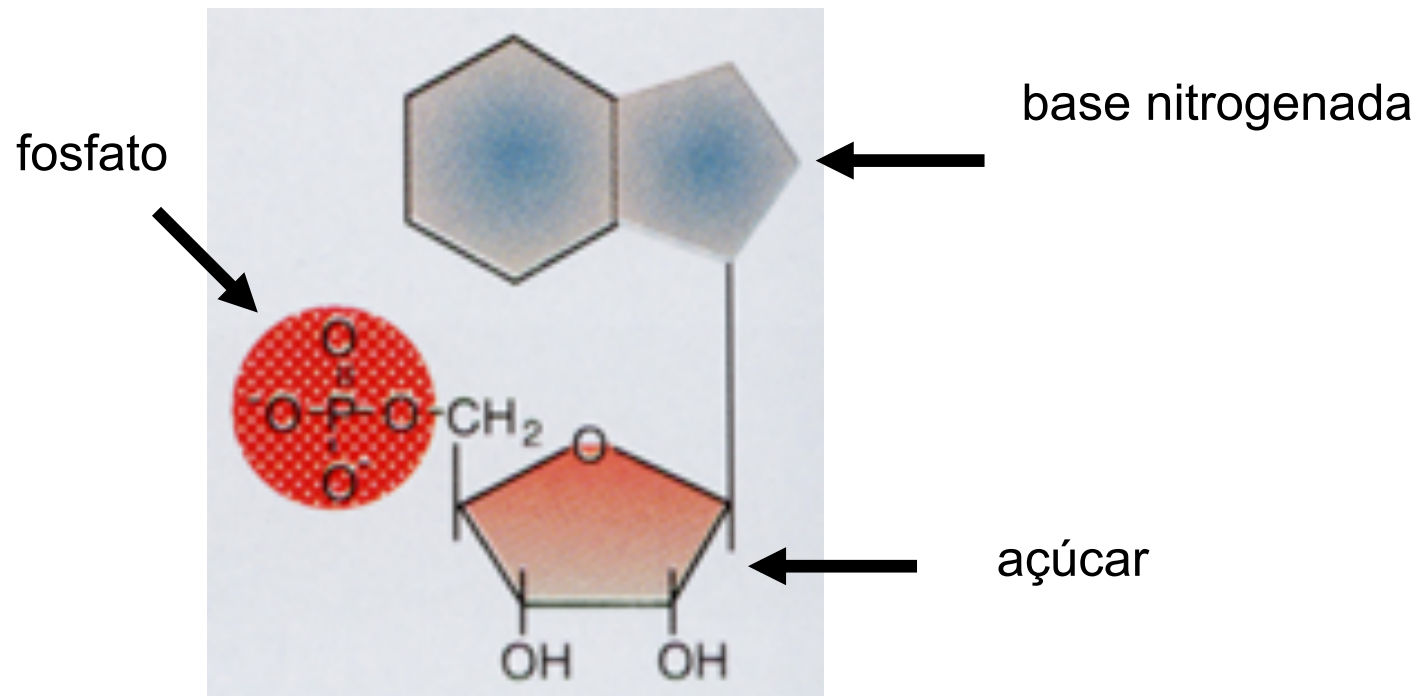
- **Tradução**

- Síntese de proteínas a partir de um código no mRNA
- Ocorre nos ribossomos

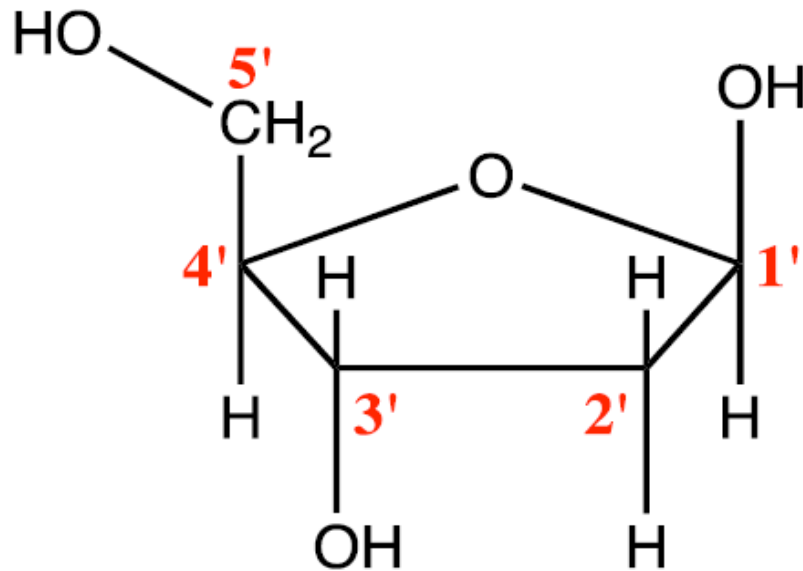
Estrutura dos ácidos nucleicos

Composição química do DNA

O DNA é composto de nucleotídeos



O açúcar do DNA



2' Deoxyribose

Os grupos fosfato se ligam às posições **5'** e **3'**

A base nitrogenada se liga a posição **1'**

Não existe grupo hidroxila na posição **2'** (desoxirribose)

As bases nitrogenadas do DNA

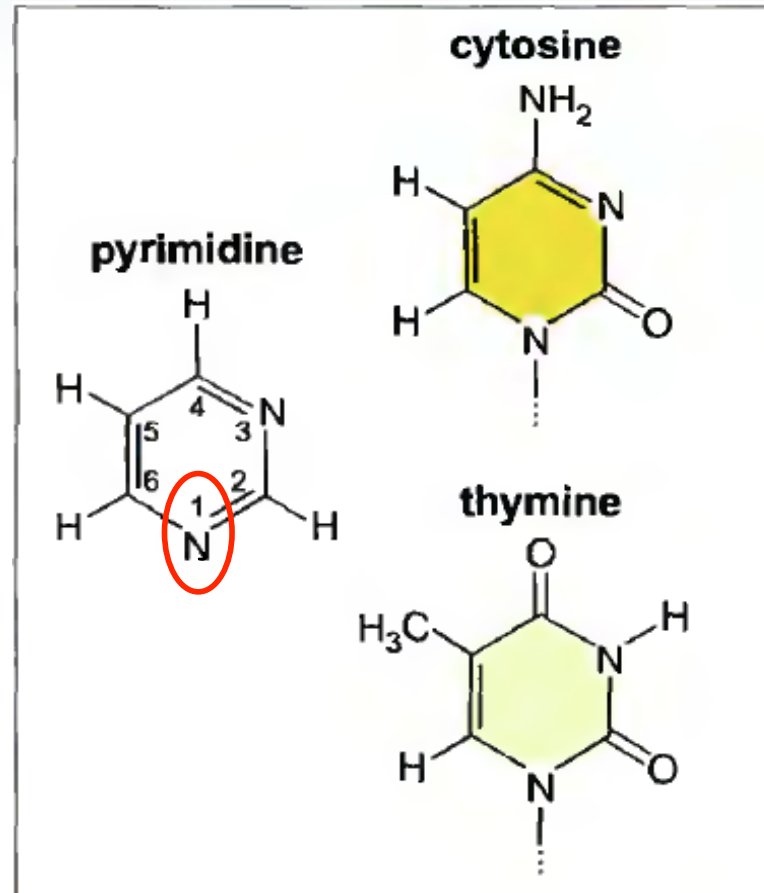
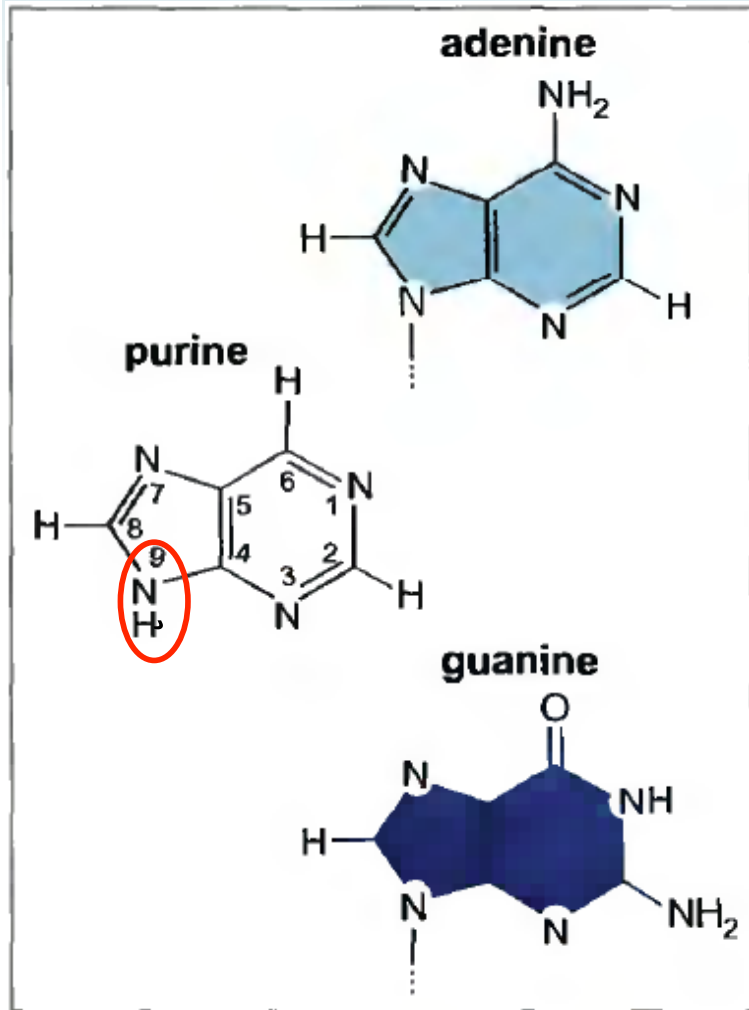
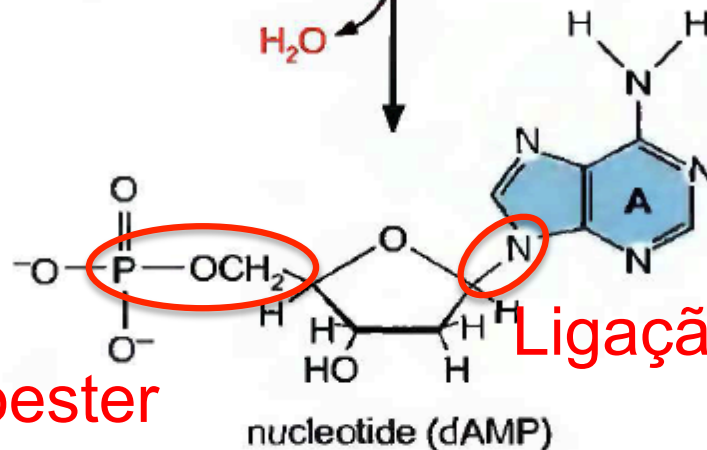
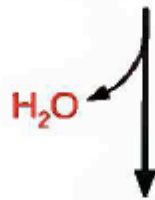
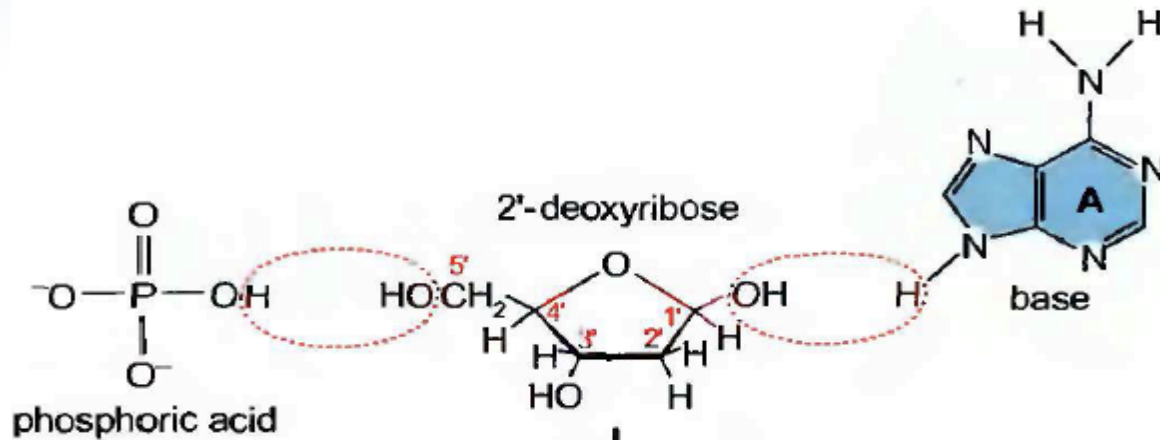


Figura 6-4. Molecular Biology of the Gene fifth edition (CSHL Press, 2004)

Composição química do DNA

O DNA é composto de nucleotídeos

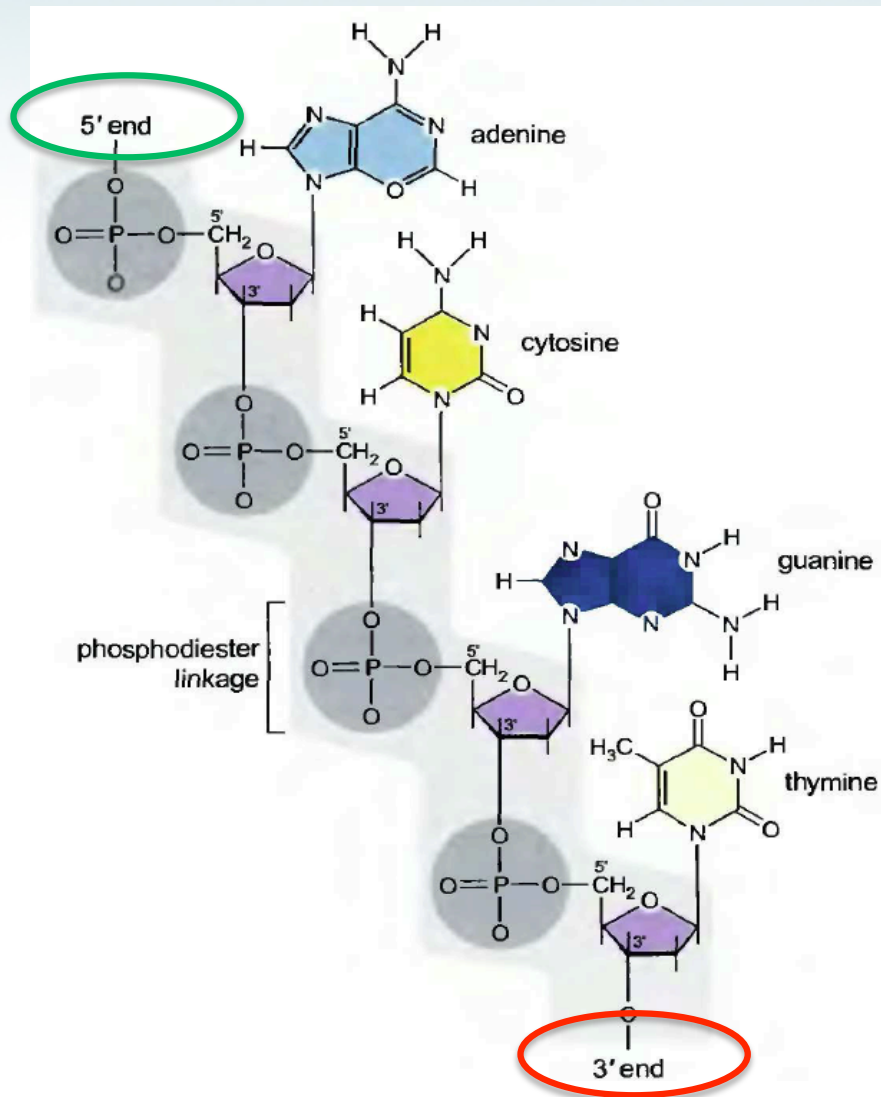


Ligação fosfoester

Ligação glicosídica

nucleotide (dAMP)

A fita de DNA



- Cadeia de polinucleotídeos
- Ligações fosfodiester
- Fita possui orientação

Figura 2-5. Molecular Biology of the Gene fifth edition (CSHL Press, 2004)

Descoberta da estrutura do DNA (1953)

- Razão entre as bases
 - regras de Chargaff
- Padrões de difração de raio X

Regras de Chargaff

- Composição de bases do DNA (%)
 - varia de uma espécie a outra
 - invariável entre indivíduos da mesma espécie
 - não muda com idade, nutrição ou ambiente
- Em **todos** os DNAs:
 - $A = T$
 - $G = C$
 - $A + G = T + C$



Erwin Chargaff, 1940's

O DNA é helicoidal (Rosalind Franklin 1952-53)

Difração de Raio X

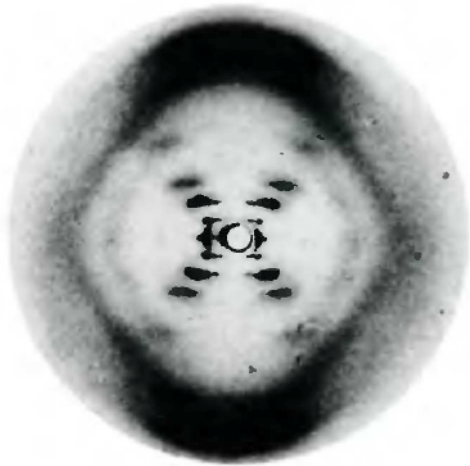
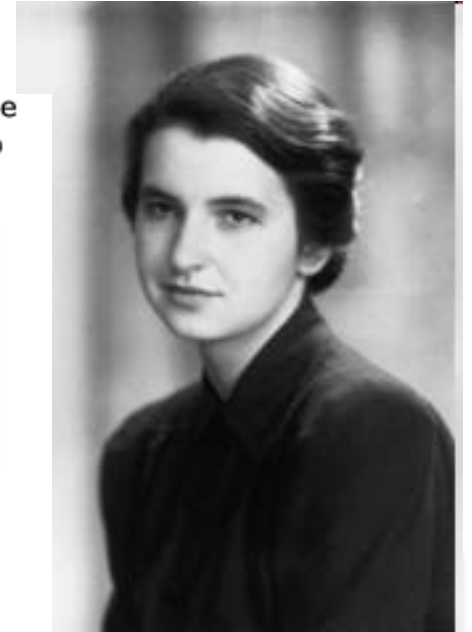
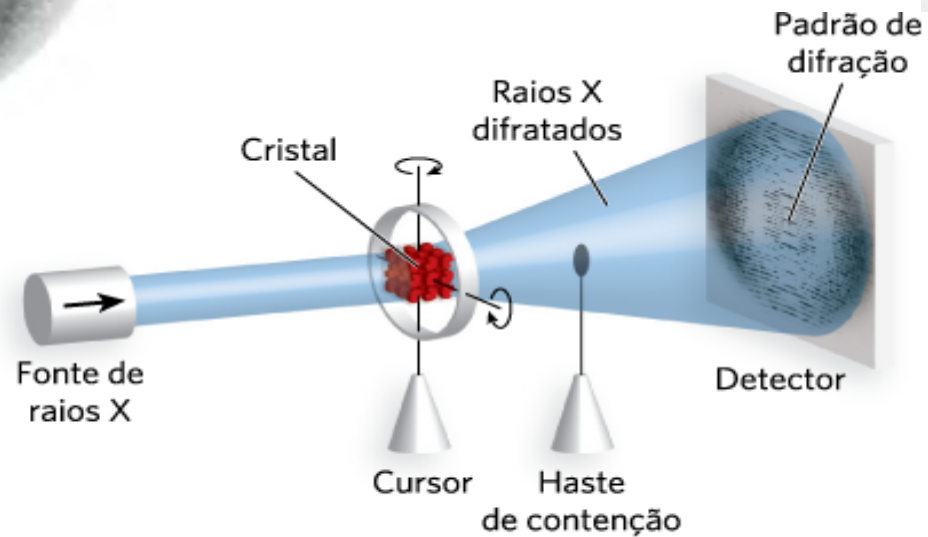


Figura 2-4. Molecular Biology of the Gene fifth edition (CSHL Press, 2004)





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962

Francis Crick, James Watson, Maurice Wilkins

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962	▼
Nobel Prize Award Ceremony	▼
Francis Crick	▼
James Watson	☑
Maurice Wilkins	▼



Francis Harry
Compton Crick



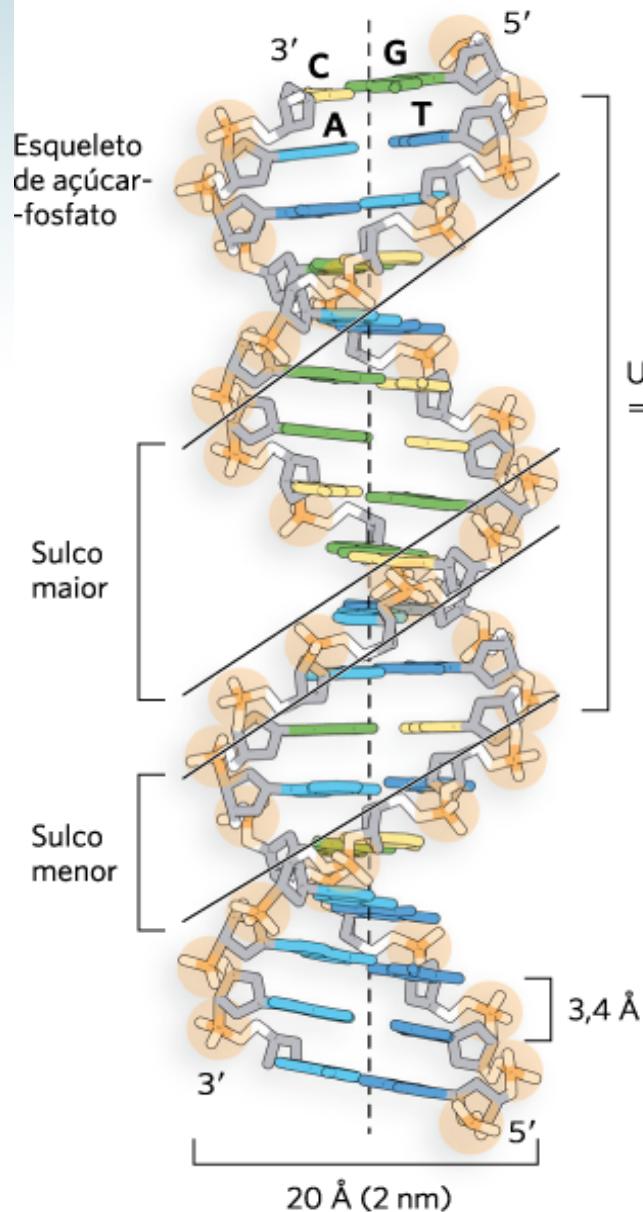
James Dewey
Watson



Maurice Hugh
Frederick Wilkins

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 was awarded jointly to Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson and Maurice Hugh Frederick Wilkins *"for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material"*.

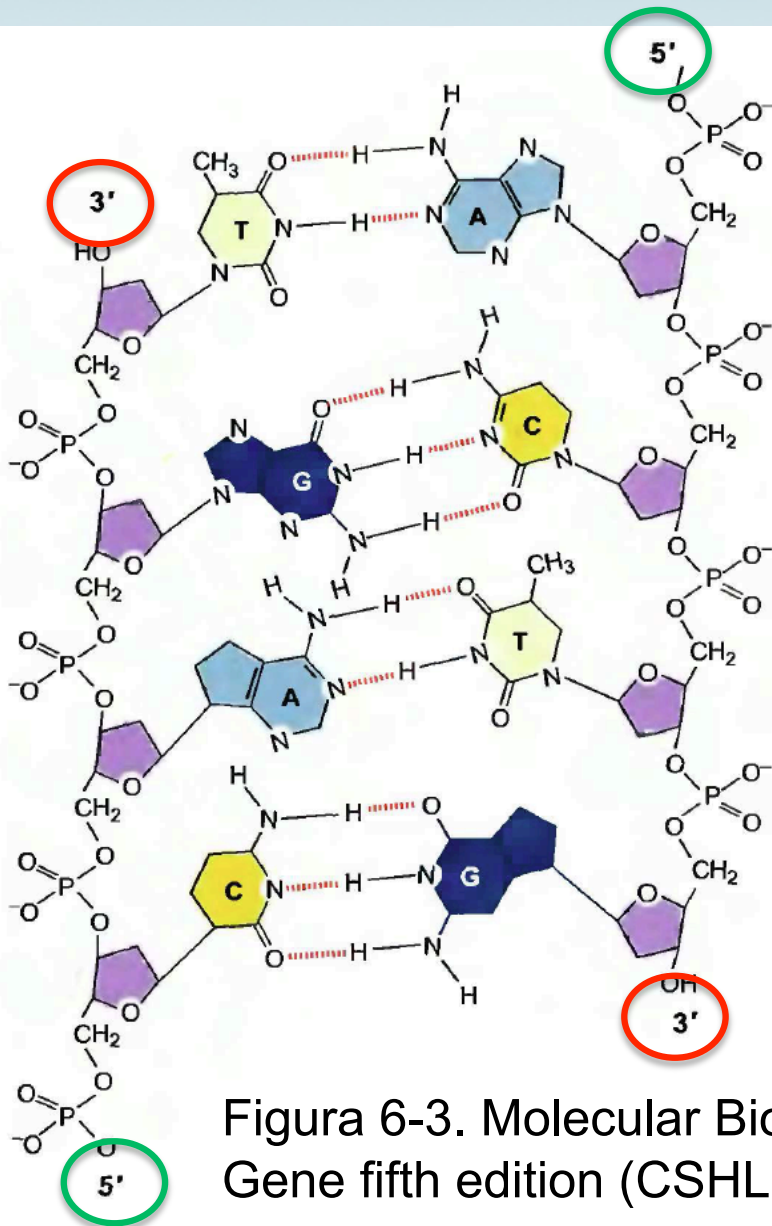
Dupla hélice de DNA: Watson-Crick, 1953



- duas cadeias antiparalelas enroladas em torno de um eixo
- esqueleto de fosfato para fora/ pares de bases para dentro da dupla hélice
- bases perpendiculares ao eixo da hélice, separadas por 3,4 angstroms
- ~10 nucleotídeos por volta
- diâmetro da hélice = 20 angstroms

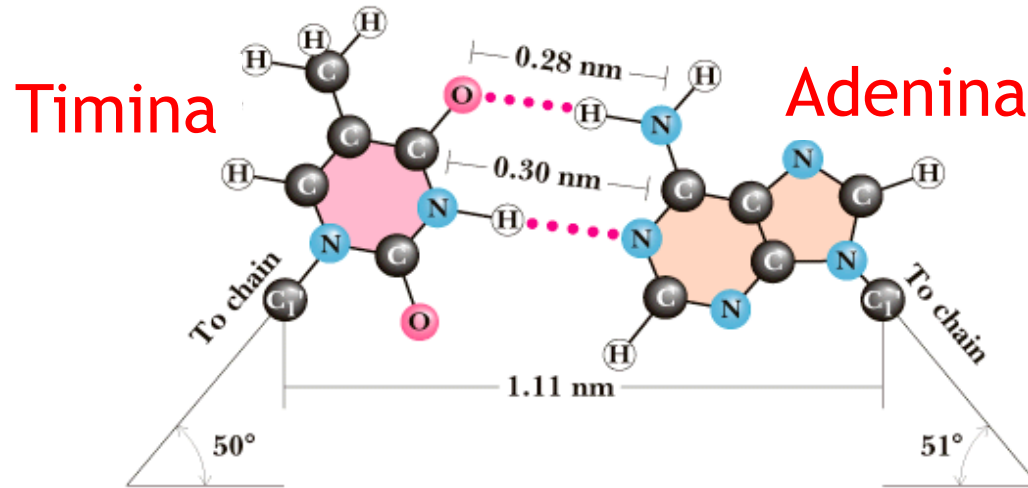
A dupla fita

- Orientação antiparalela
- Sequências complementares (pareamento de Watson-Crick)
- Pares de base A:T e C:G ocupam o mesmo espaço geométrico

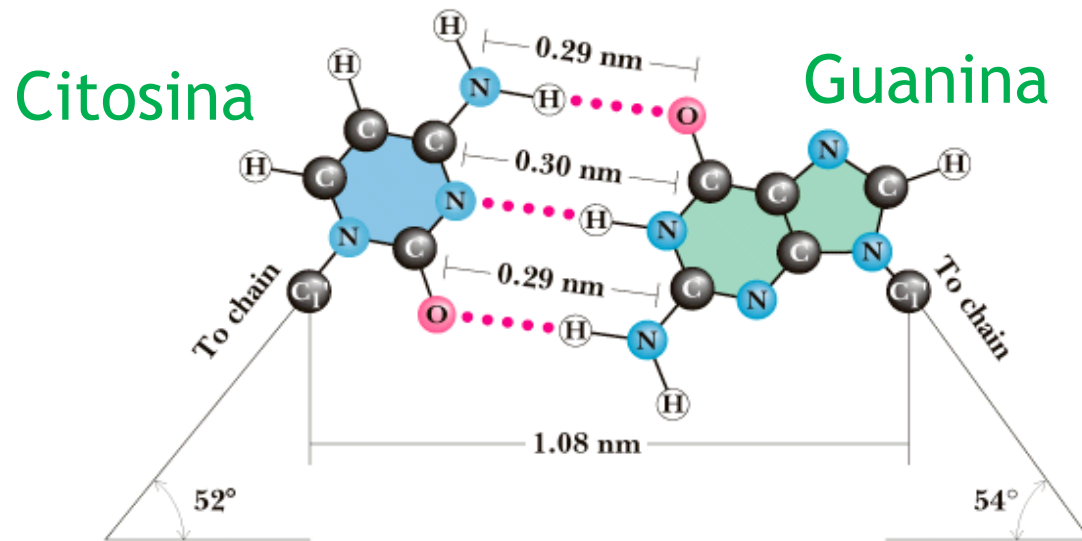


Quais são as interações que estabilizam a dupla hélice?

Pareamento entre as bases



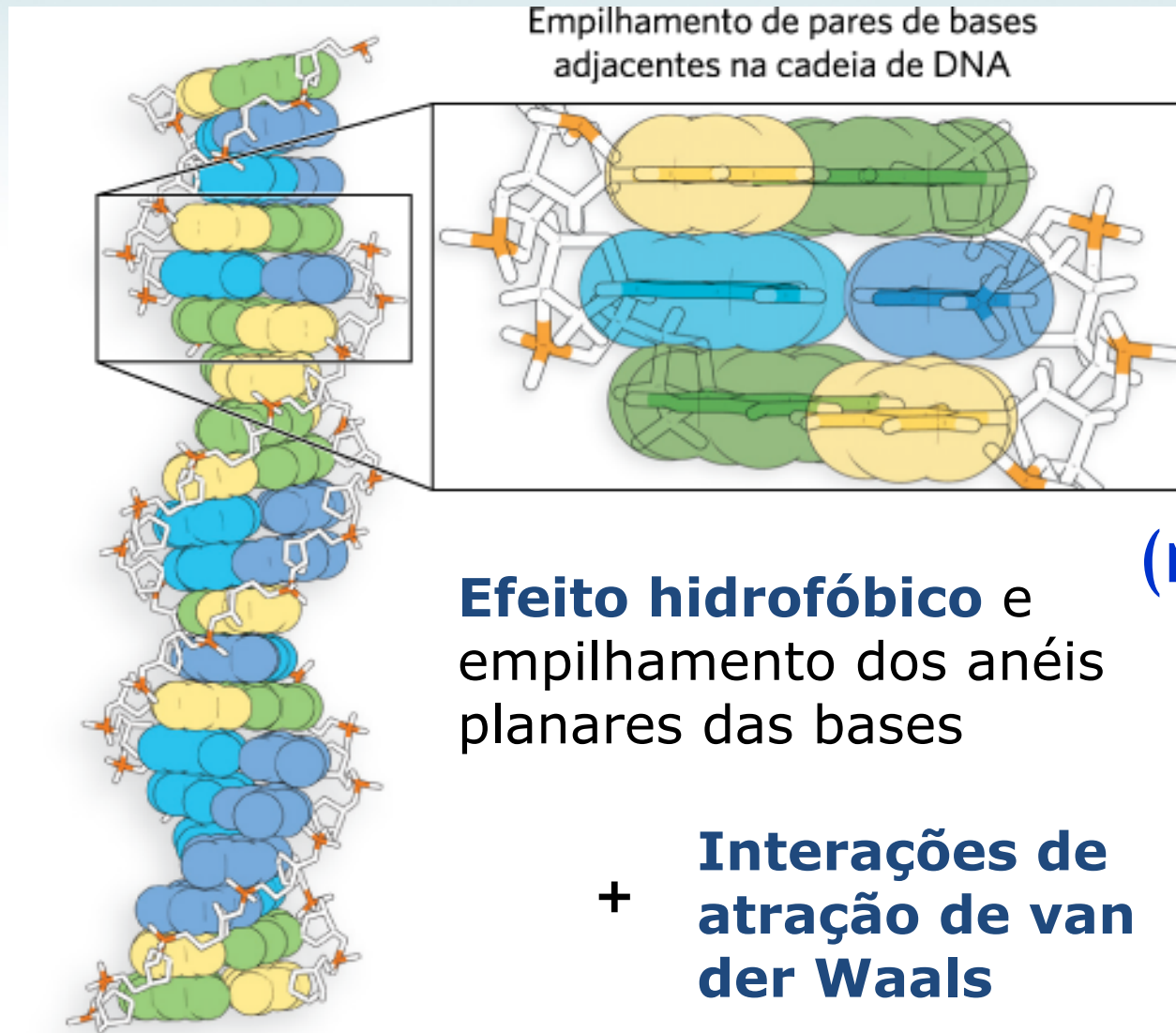
2
ligações



3
ligações

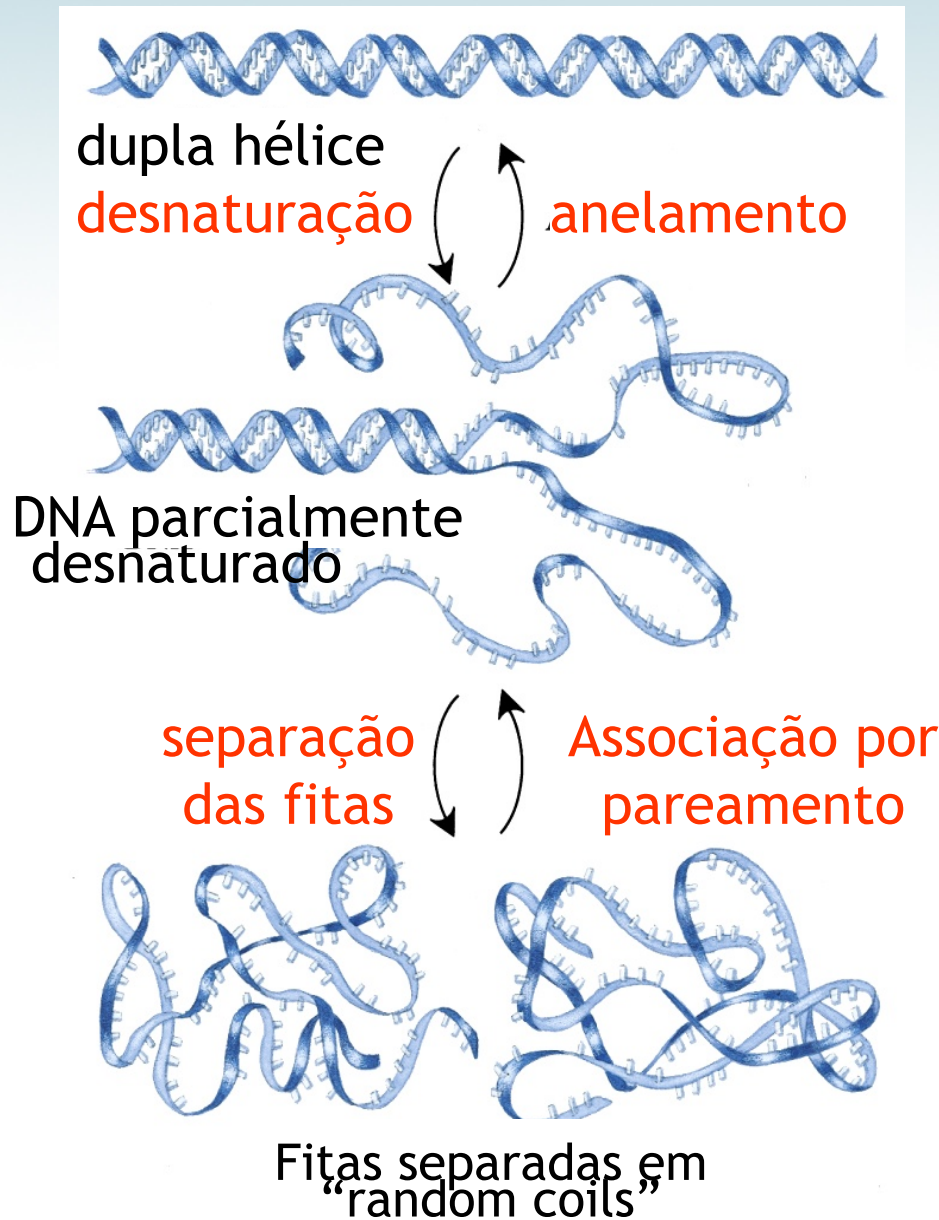
Ligações de
Hidrogênio
(não-covalentes)

Forças que estabilizam a dupla-hélice

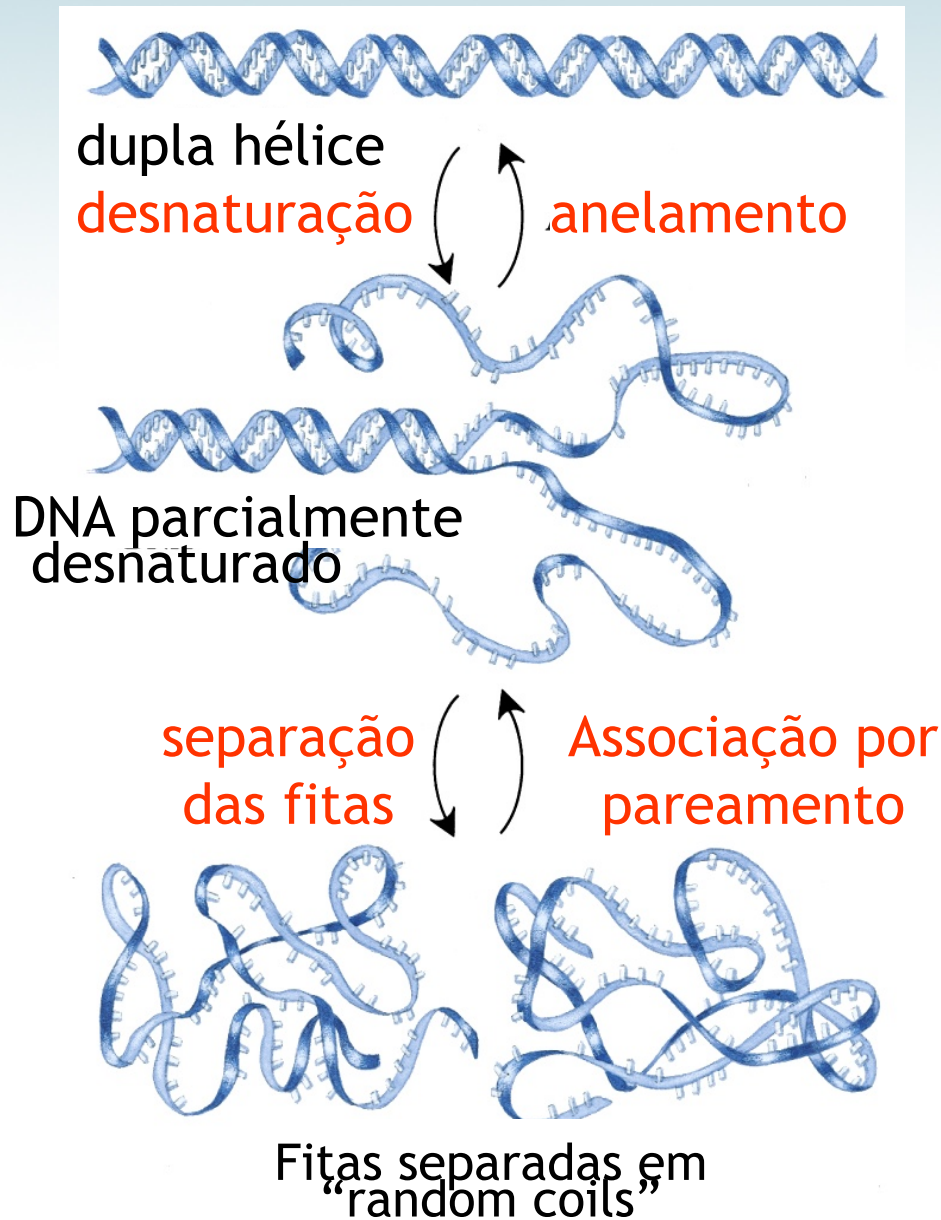


(não-covalentes)

bases nitrogenadas

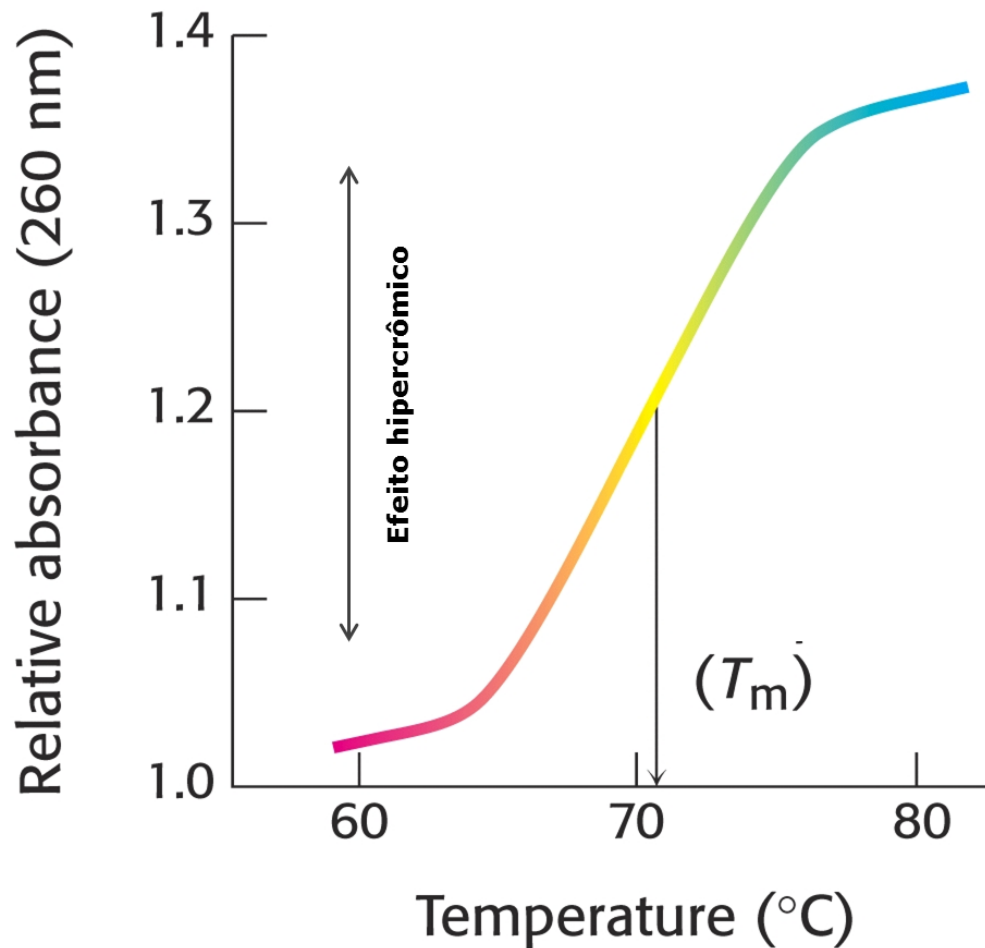


Desnaturação do DNA



Desnaturação
do DNA
=
Abertura
das fitas
Calor

Desnaturação do DNA

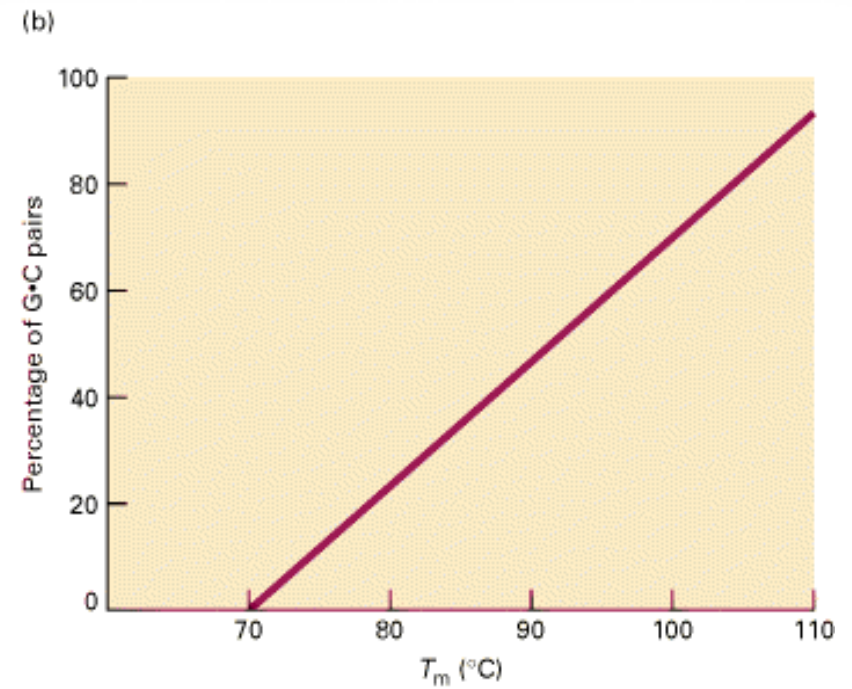
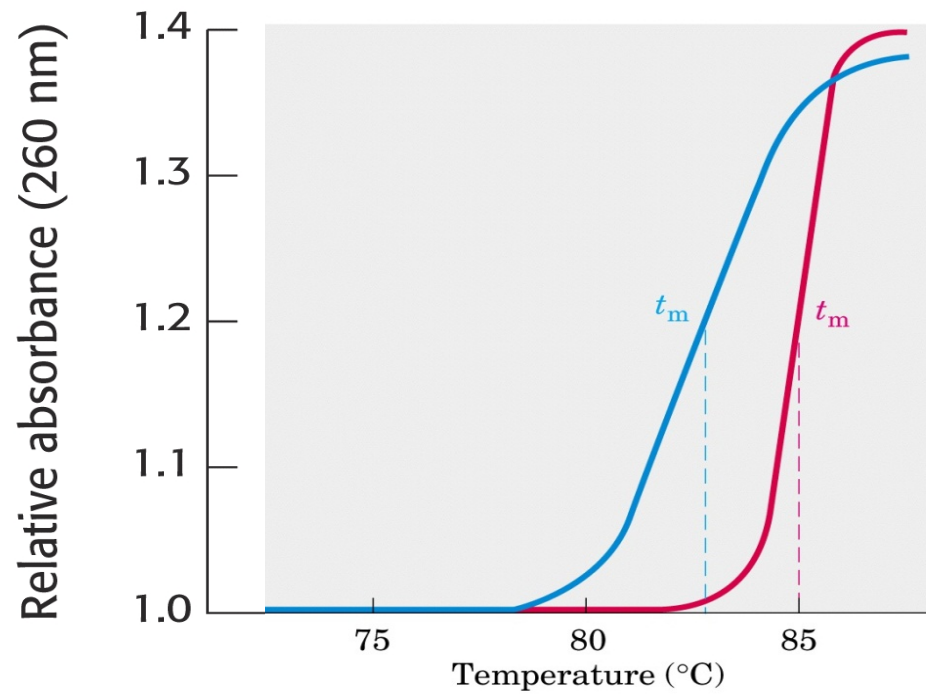


Rompimento das ligações de H entre as bases

T_m = Temperatura de fusão (50% do DNA está desnaturado)

Efeito hipercrômico (aumento da absorvância pela maior exposição dos anéis das bases)

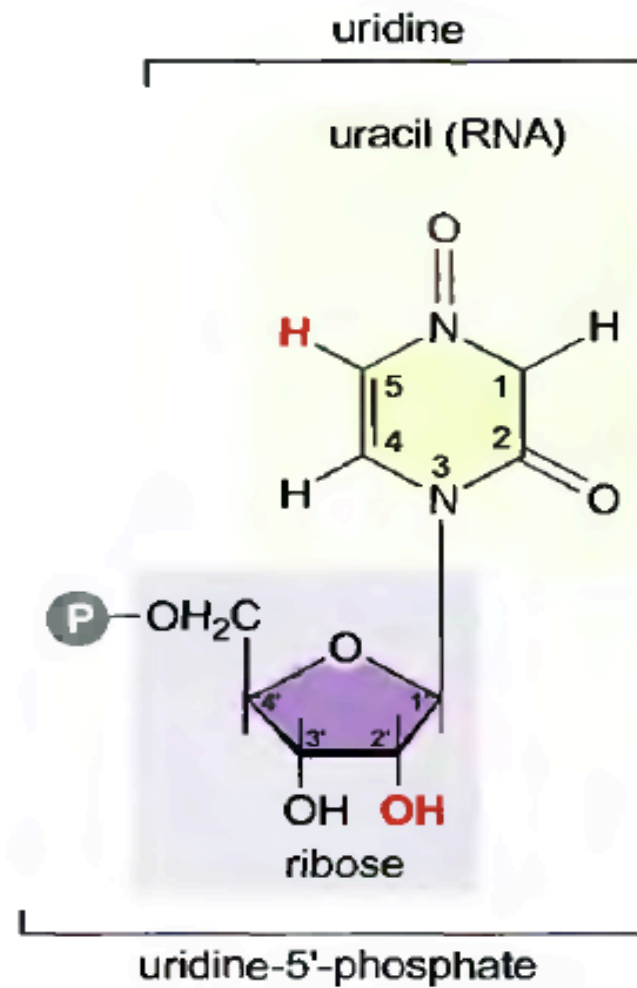
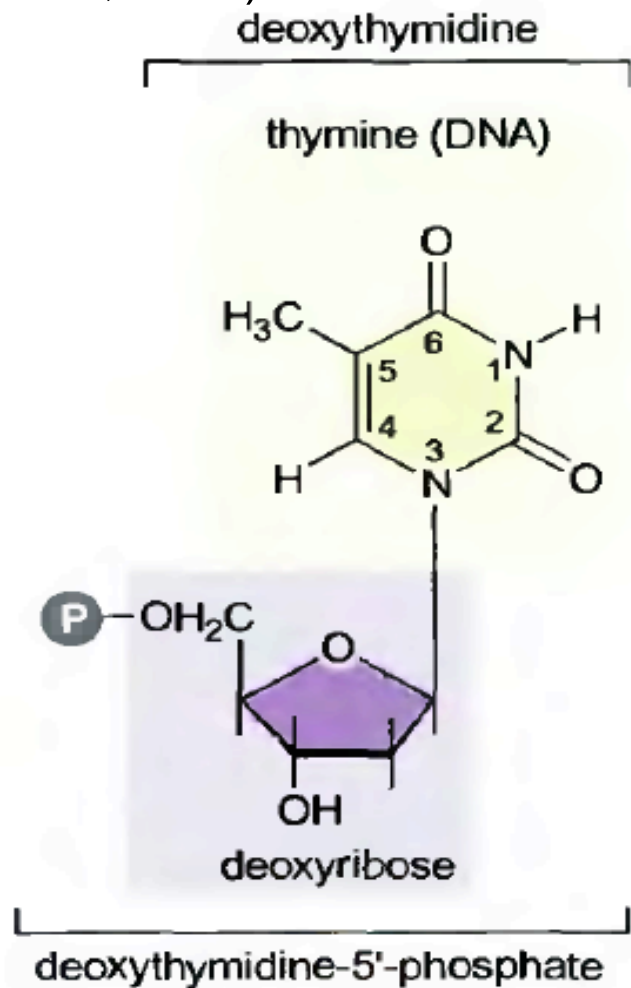
T_m varia com %G+C



Estrutura do RNA

DNA x RNA (nucleotídeos)

Figura 2-12. Molecular Biology of the Gene fifth edition (CSHL Press, 2004)



O RNA é instável em condições alcalinas

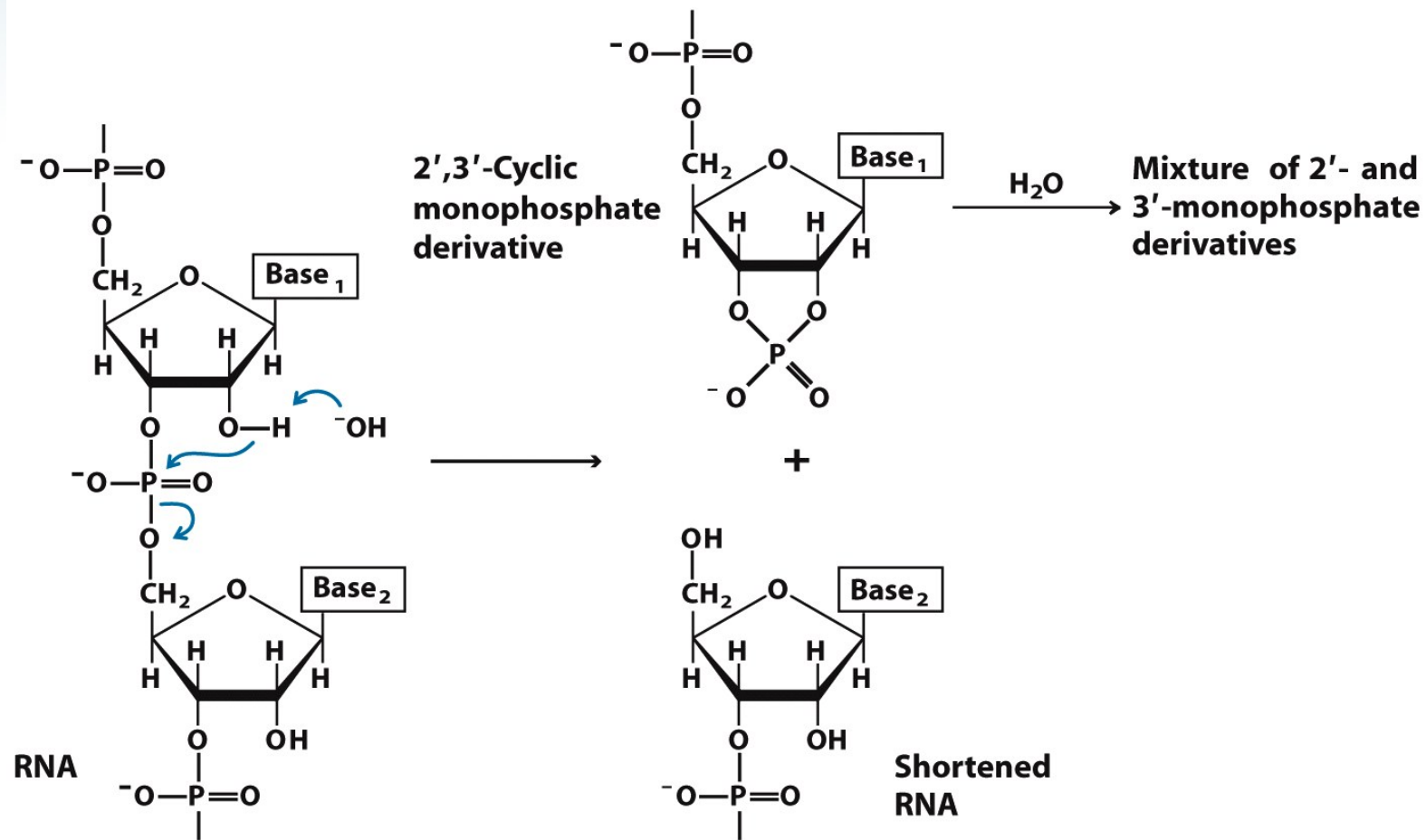
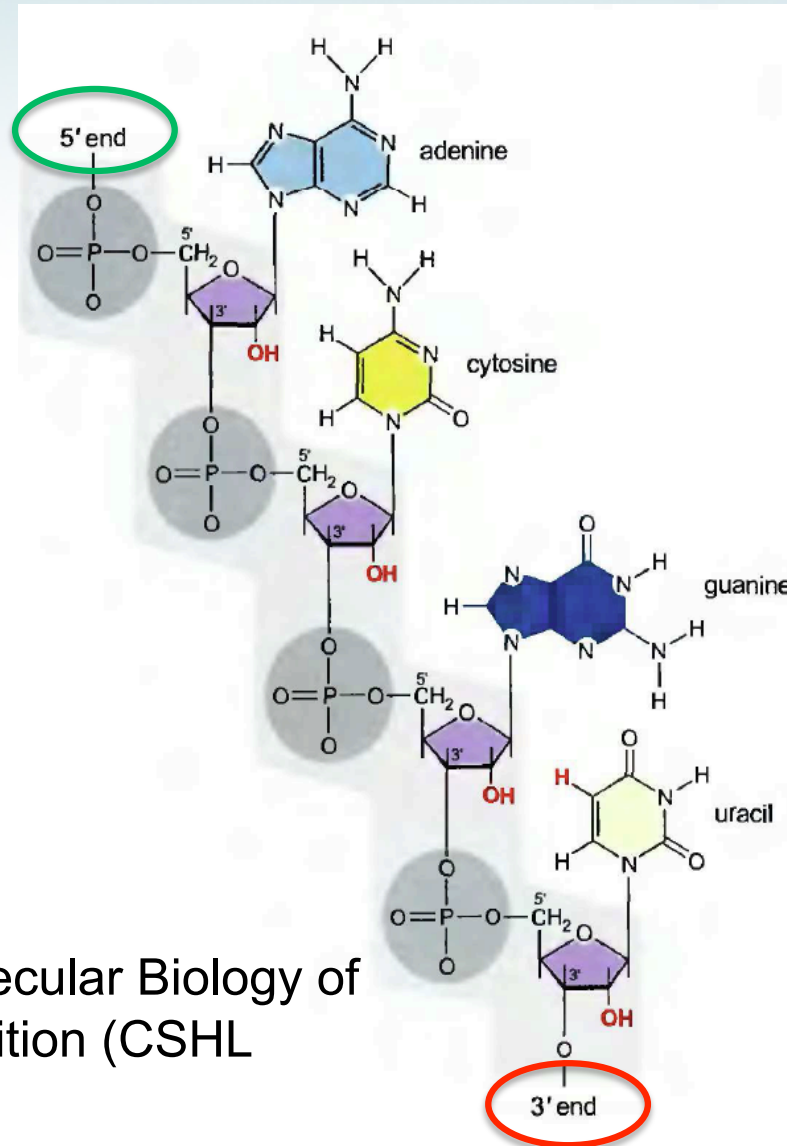


Figure 8-8
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

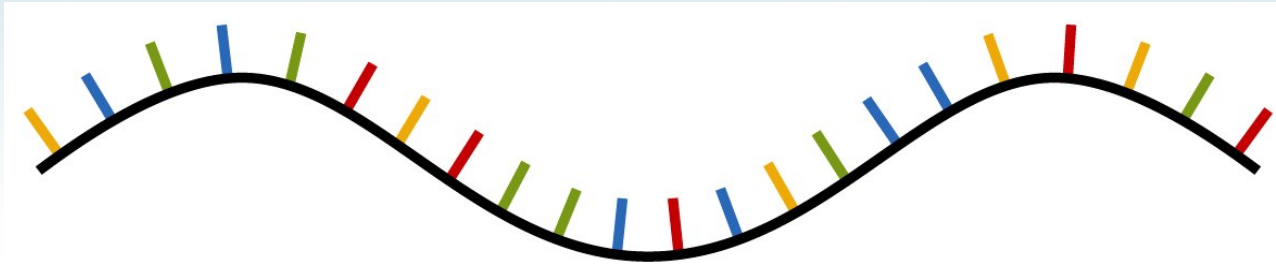
A fita de RNA também possui orientação



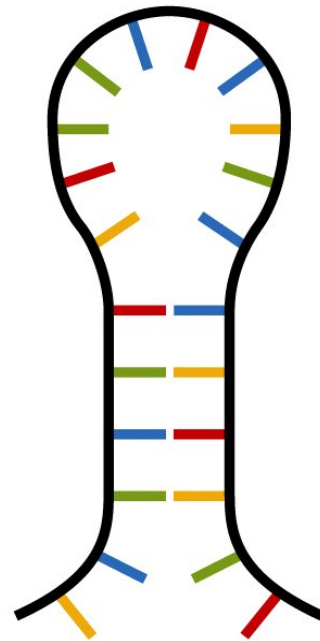
Normalmente é formado por uma fita simples

Figura 2-11. Molecular Biology of the Gene fifth edition (CSHL Press, 2004)

Estrutura de RNA

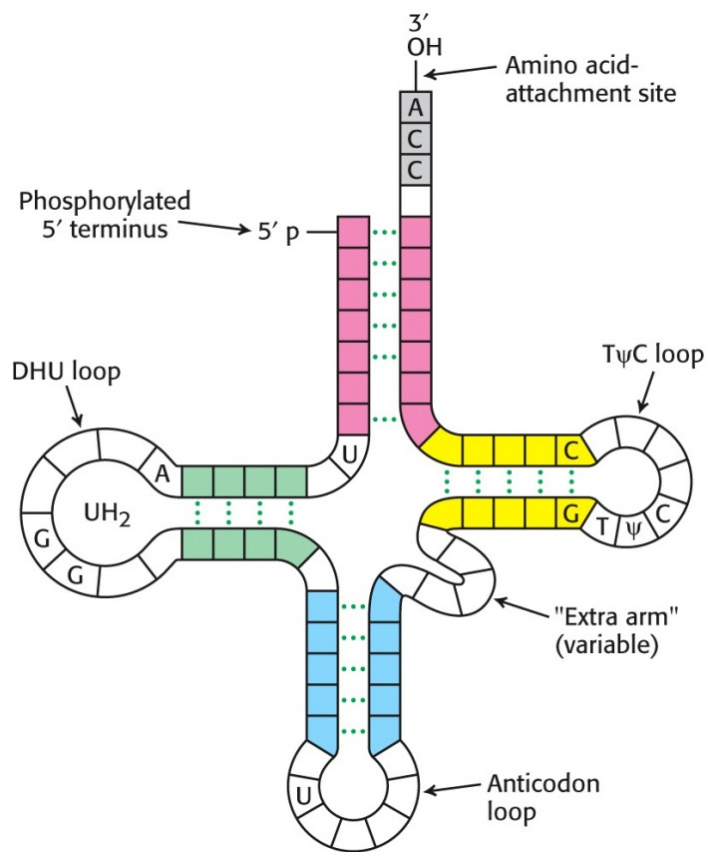


Fita simples pode se dobrar e parear entre si (pareamento intrafita)

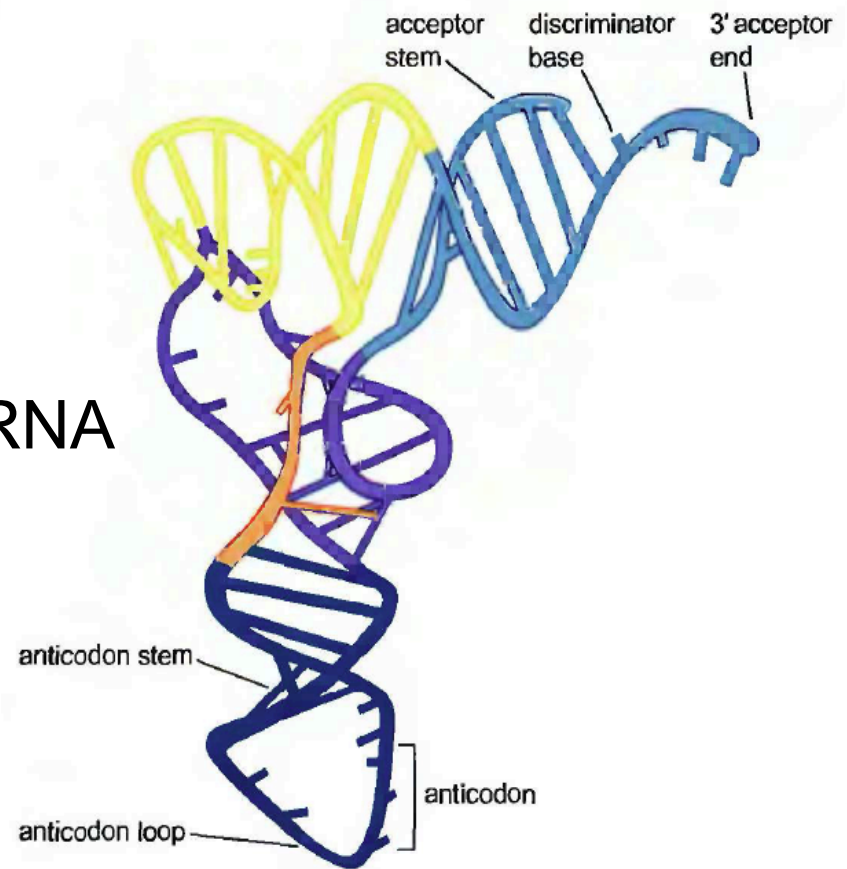


Grampo ou “hairpin”

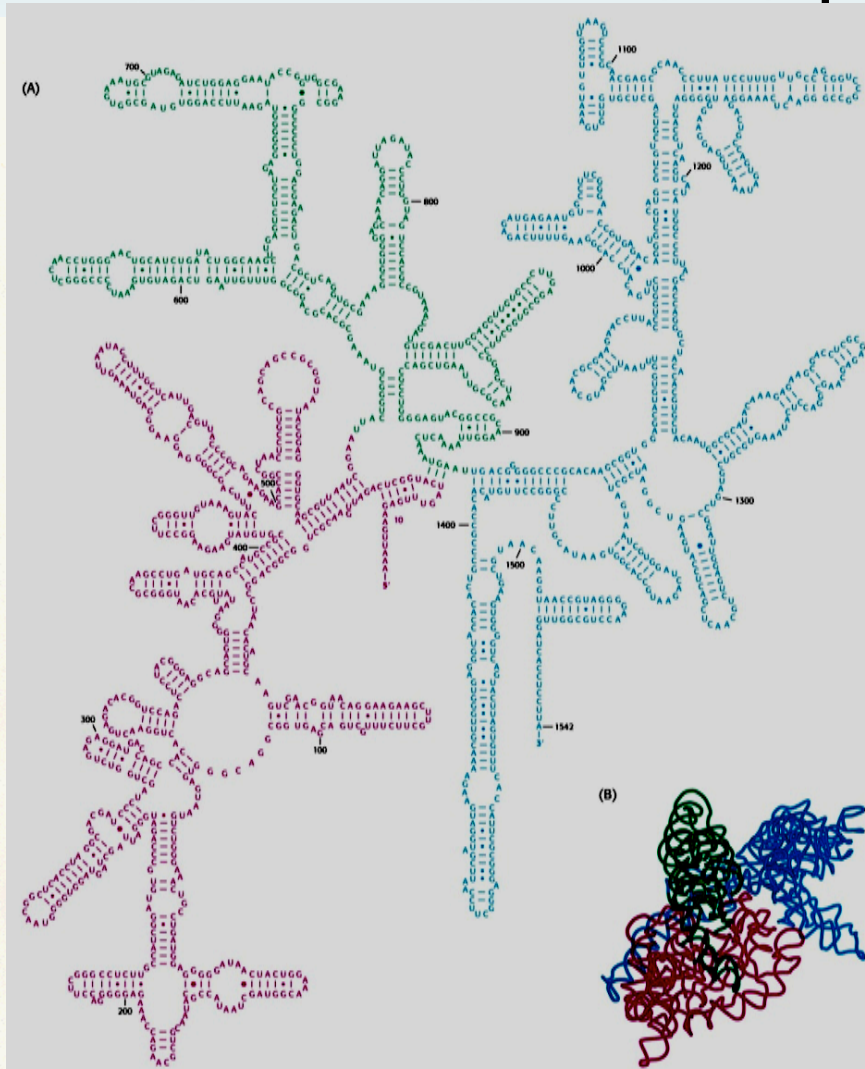
O RNA pode apresentar estrutura secundária e terciária complexa



tRNA



O RNA pode apresentar estrutura secundária e terciária complexa



16S rRNA

RNA

- Pode formar estruturas muito mais complexas do que a dupla hélice do DNA
- Estruturas dependem da sequência e do pareamento entre bases na mesma fita
- Funções diferentes para estruturas diferentes!
- É mais instável quimicamente (grupo 2'-OH) e pode catalisar reações químicas (grupo 2'-OH e estruturas complexas)

Classes de RNAs

RNAs codificadores de proteínas:

mRNA (RNA mensageiro)

RNAs não codificadores:

tRNA (RNA transportador)

rRNA (RNA ribossomal)

outros ncRNAs

Replicação do DNA

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

Replicação semi-conservativa

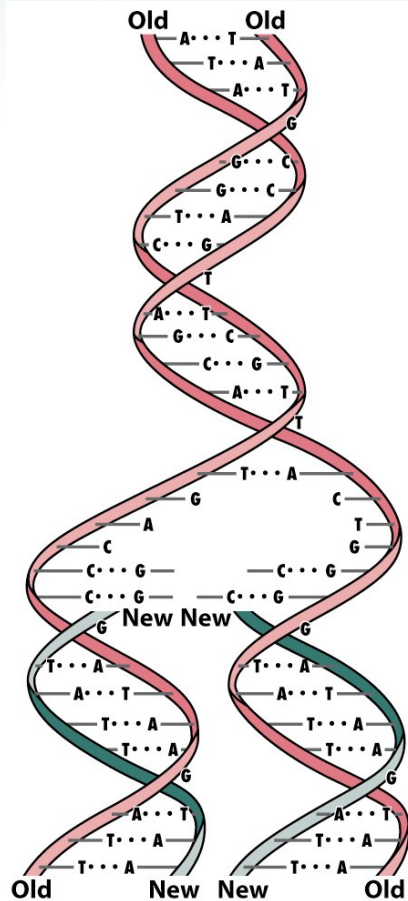
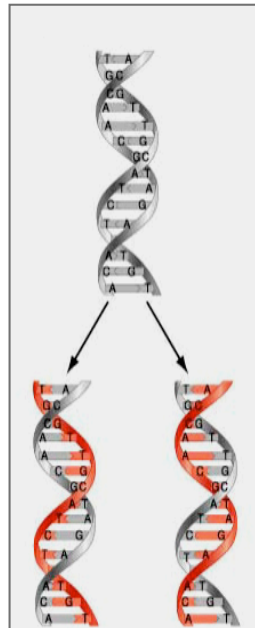


Figure 3-11 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons



- Mecanismo baseado no pareamento de bases
- Estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar a sequência de bases

Metodologia do experimento de Meselson e Stahl (1958)



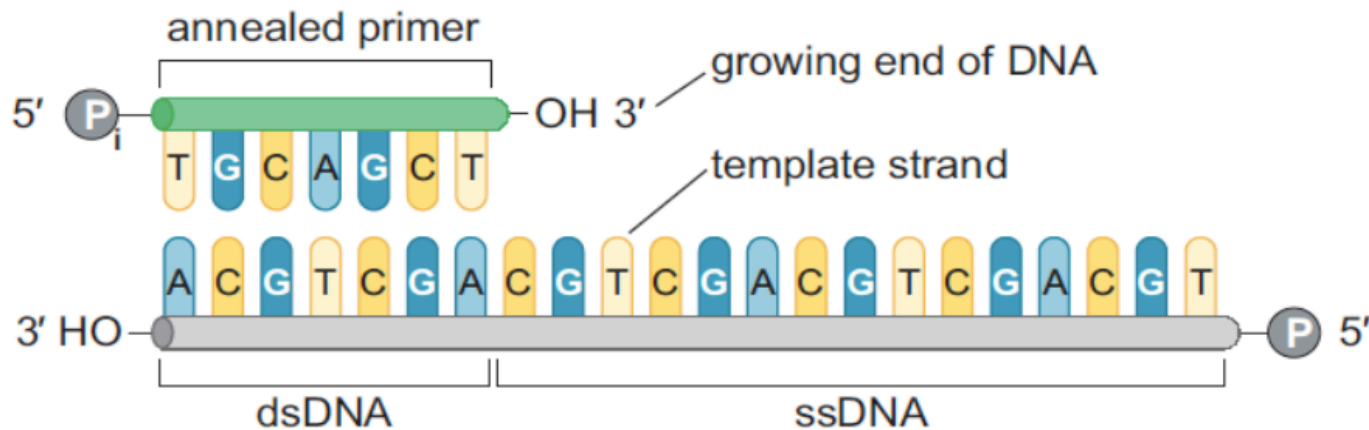
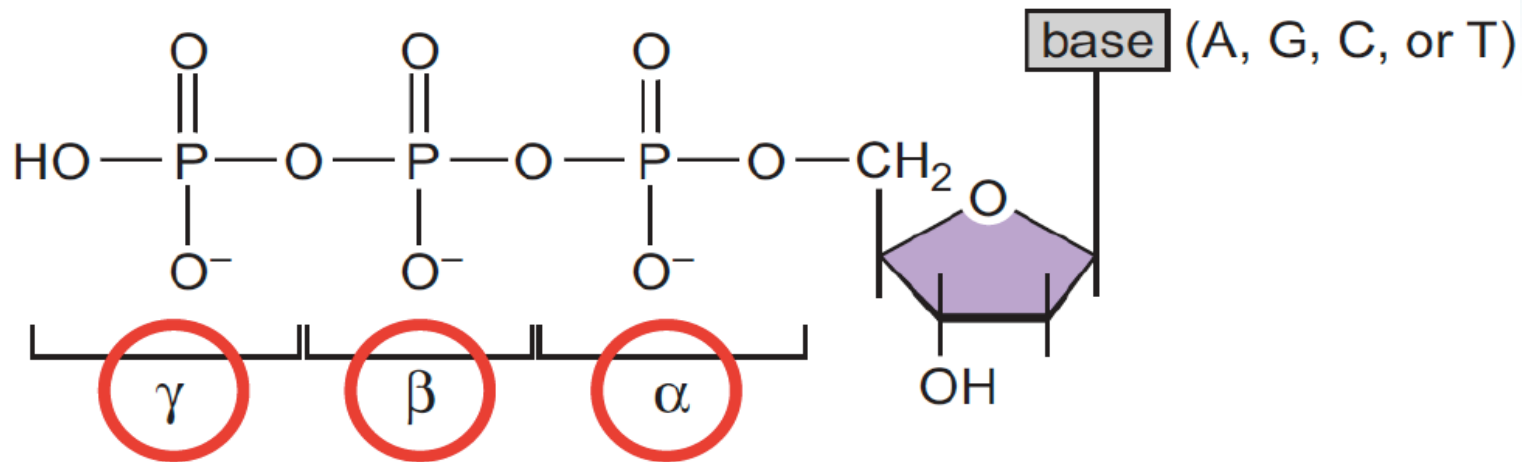
“O Experimento mais bonito da
Biologia Molecular”

<http://www.dnaftb.org/dnaftb/20/concept/index.html>

Experimento em animação

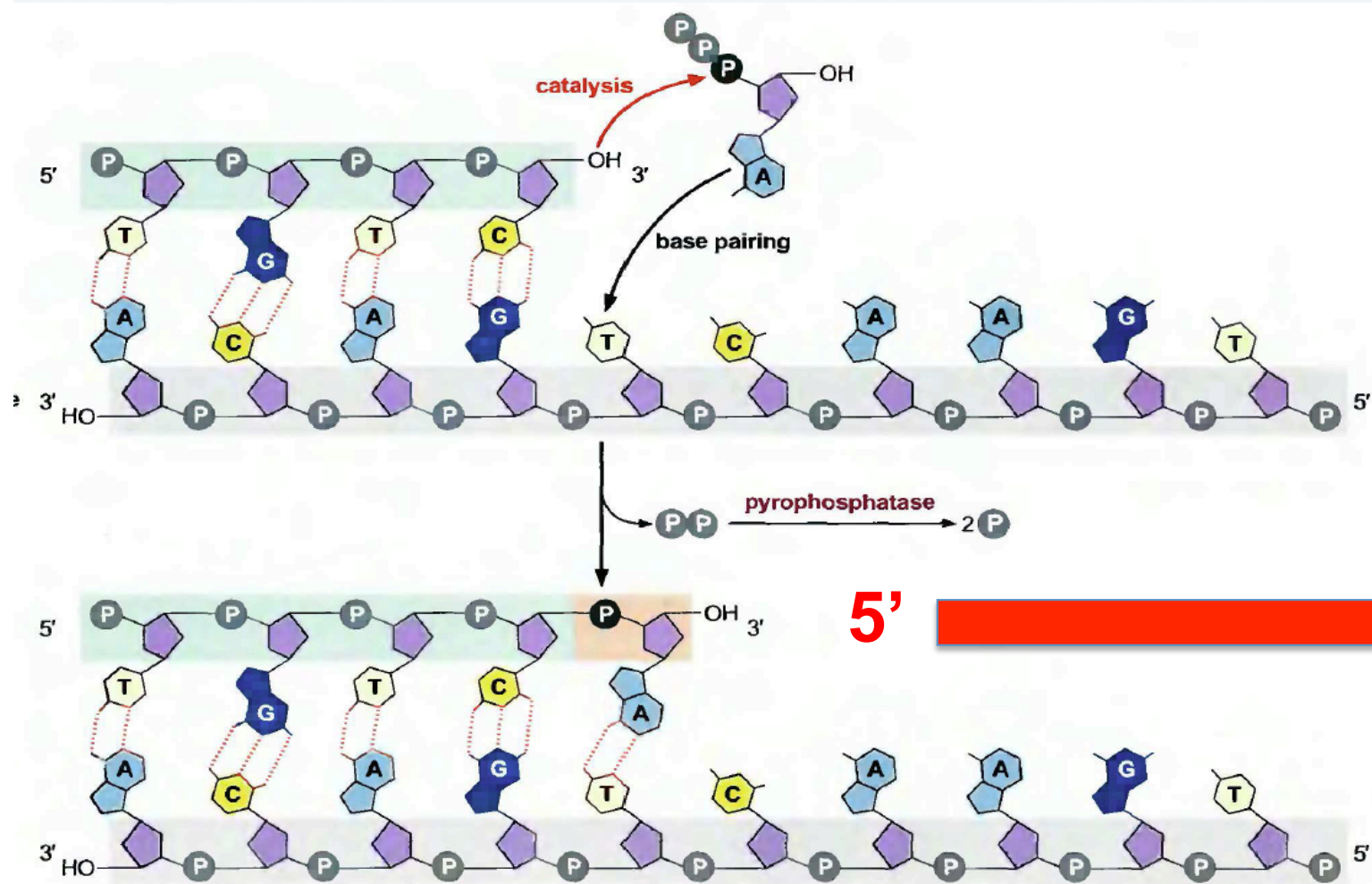
John Cairns to Horace F Judson, in *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology* (1979).
Touchstone Books, ISBN 0-671-22540-5.

Substratos para a DNA polimerase



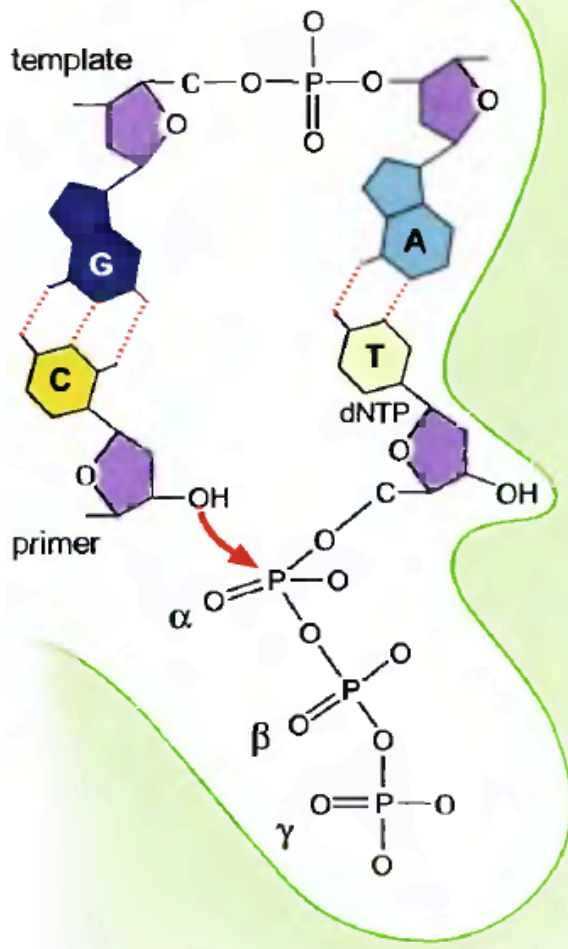
D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].

Síntese de DNA

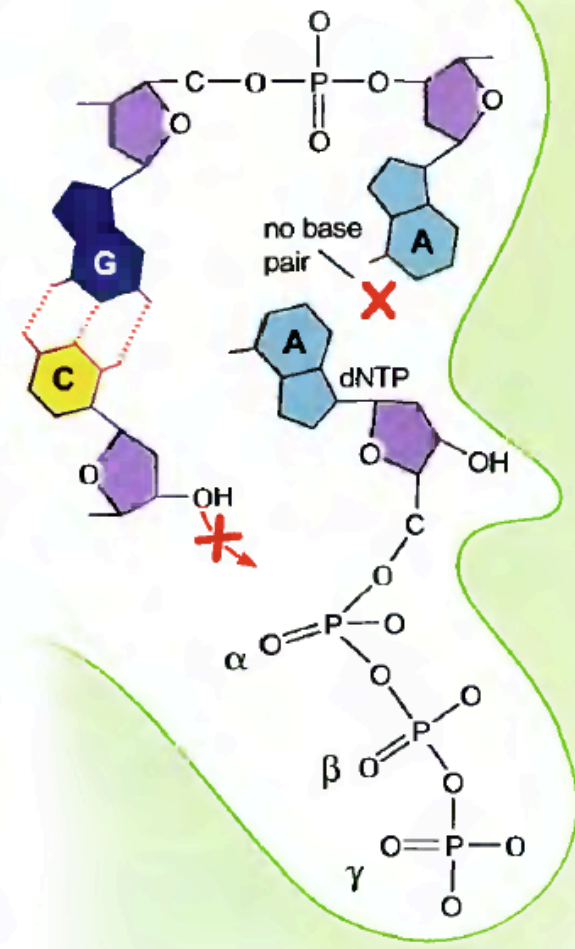


Fidelidade da DNA polimerase

a correct base pair



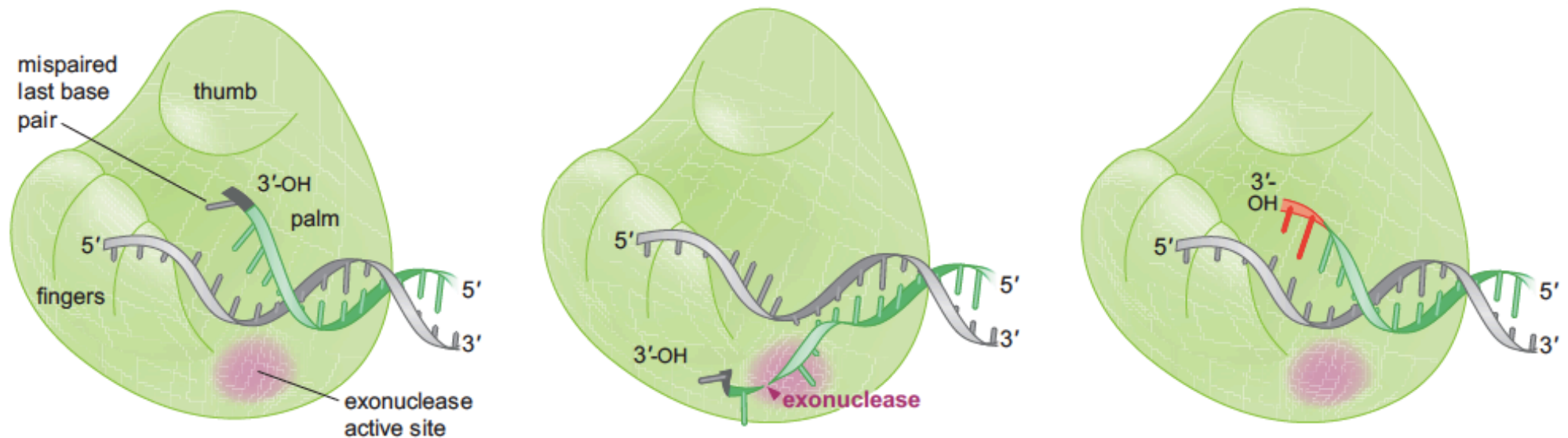
b incorrect base pair



- Diferentes dNTPs entram no sítio ativo aleatoriamente
- Pareamento 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

D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].

Atividade revisora aumenta a fidelidade



D., Watson,
James, et al.
Biologia
Molecular do
Gene. Grupo A,
2015. [USP
Minha Biblioteca].

A DNA polimerases replicativas possuem atividade de **exonuclease 3'-5'** que é usada para detectar e remover nucleotídeos incorporados incorretamente

Erros de polimerases sem proofreading: 1 in 10^5

Erros de polimerases com proofreading: 1 in 10^7

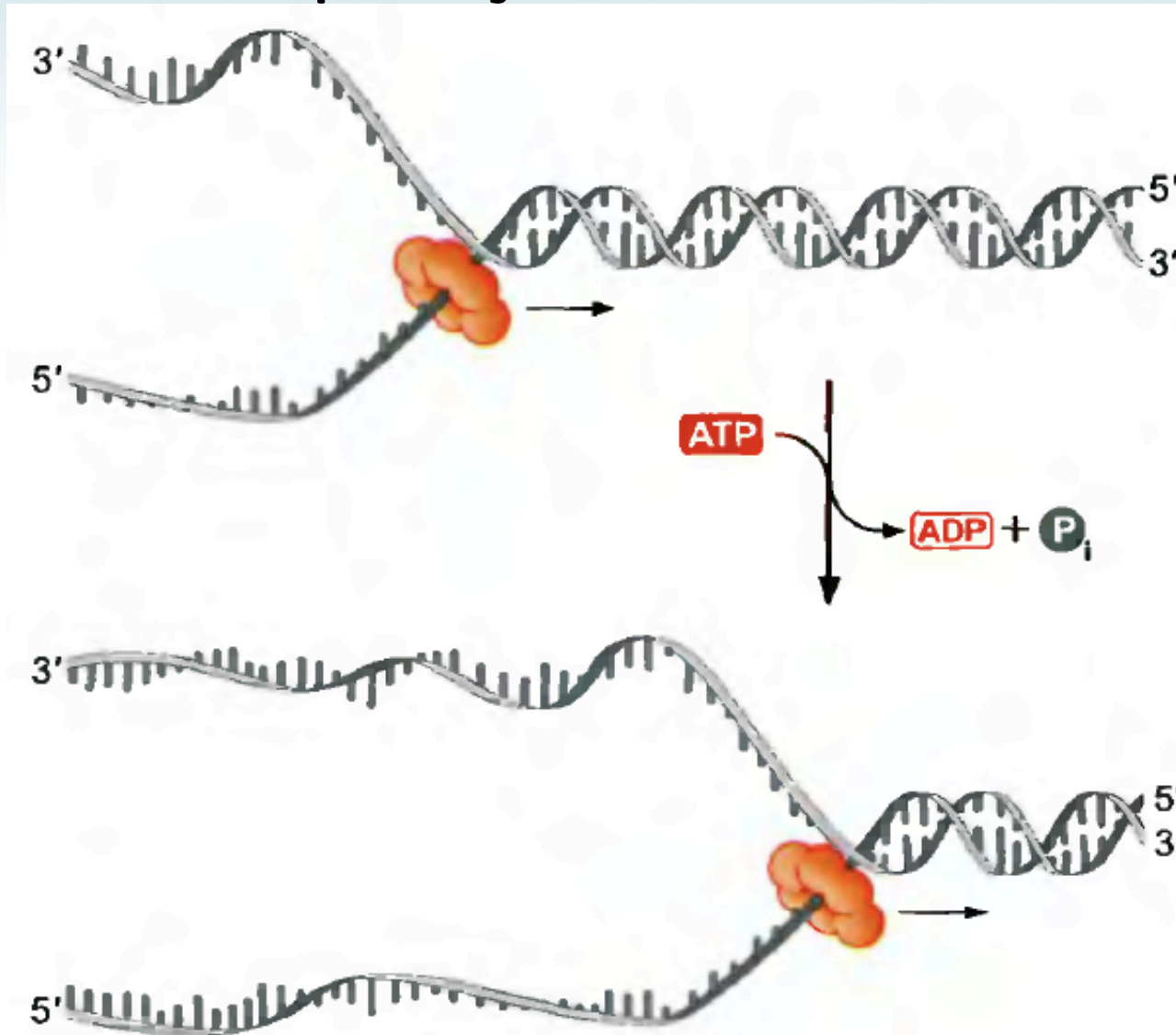
DNA polimerases bacterianas principais

	DNA Pol I	DNA Pol II	DNA Pol III
Polimerização: 5' → 3'	+	+	+
Exonuclease: 3' → 5'	+	-	+
Exonuclease: 5' → 3'	+	-	-
	Replicação Reparo	Reparo	Replicação

Onde se inicia a replicação?

- Regiões específicas dos cromossomos
 - **Origem de replicação**
- Mediada por proteínas iniciadoras
 - **DnaA em E. Coli**

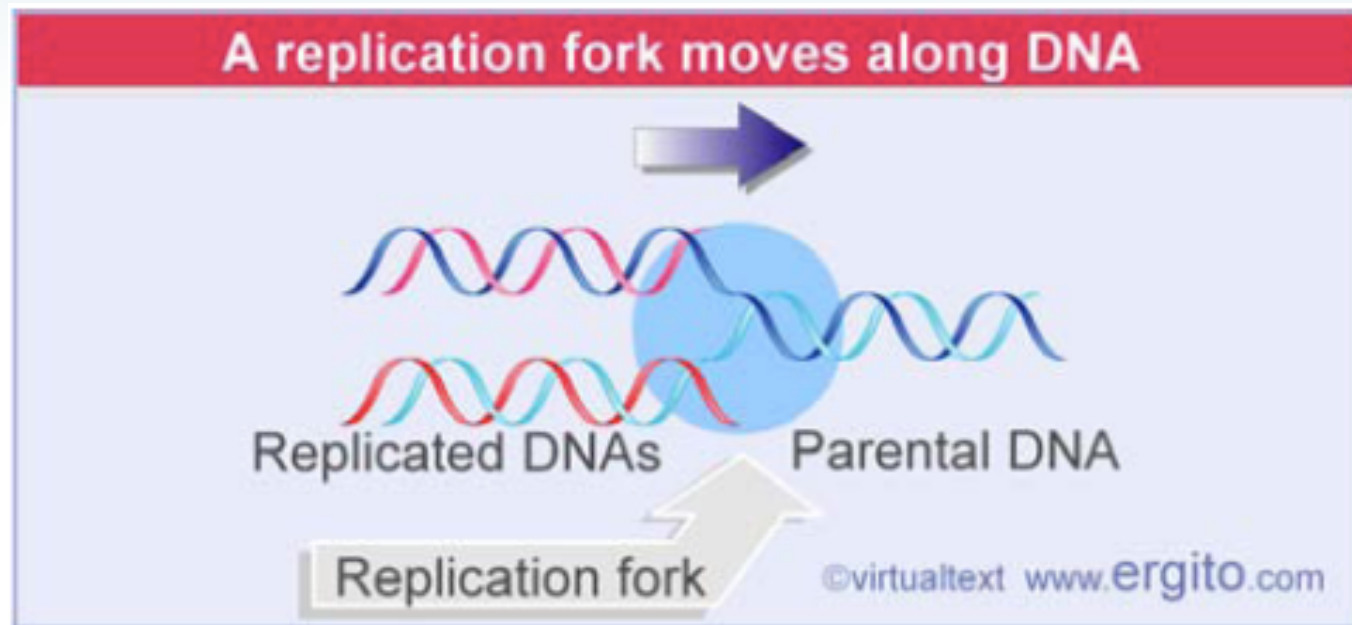
Separação das Fitas



DNA helicase

D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].

A síntese de DNA ocorre na forquilha de replicação



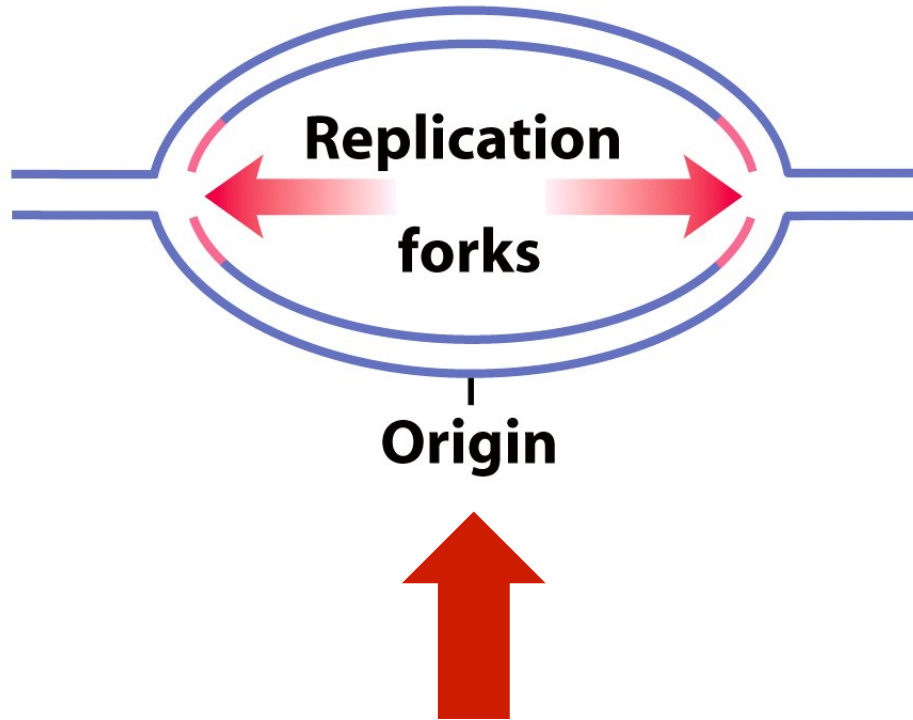
Ponto aonde as fitas parentais se separam

Região do DNA onde há a transição do DNA parental de fita dupla para as novas fitas-filhas

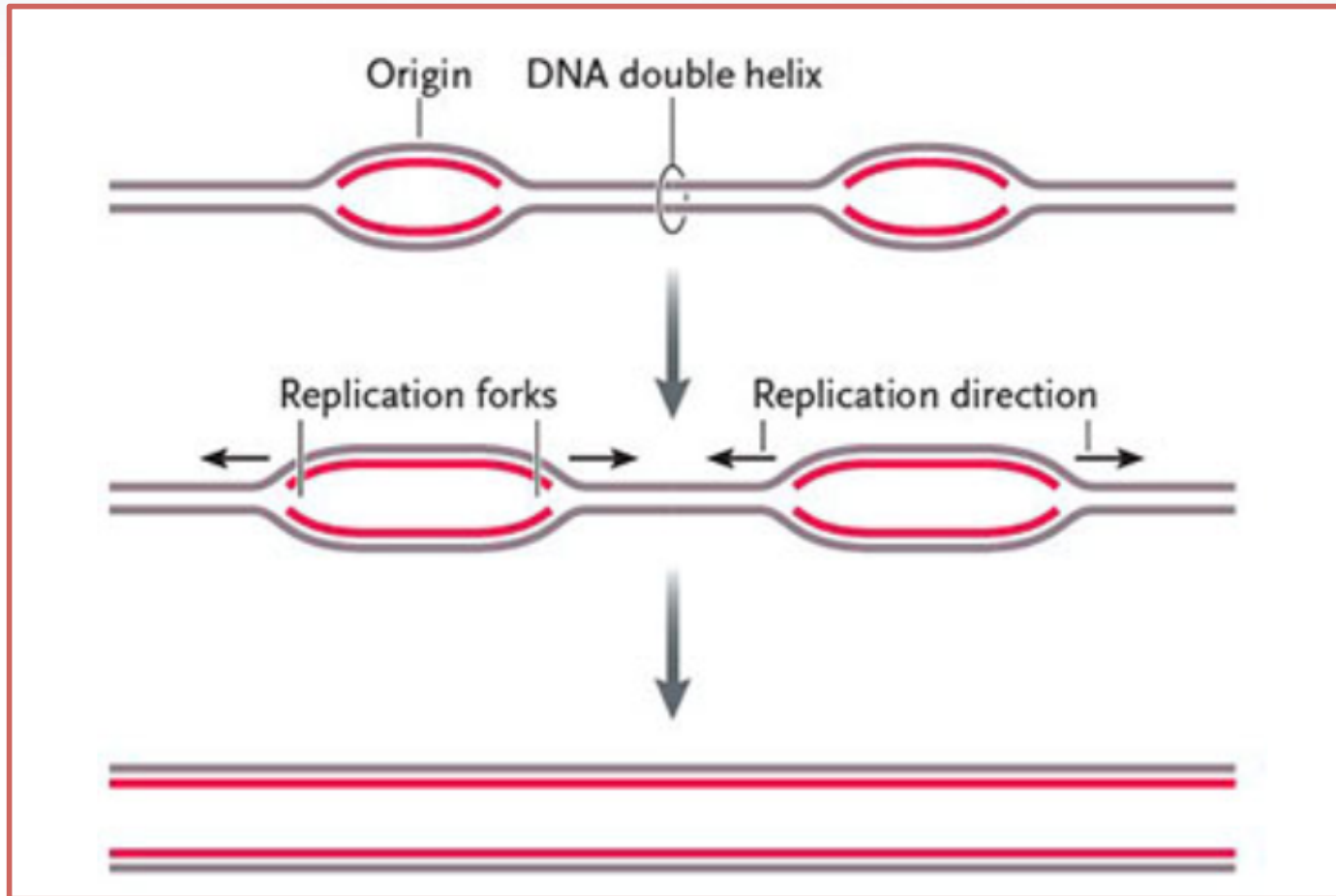
Replicação de cromossomos de eucariotos, bactérias e archaea é

BIDIRECIONAL

Bidirectional



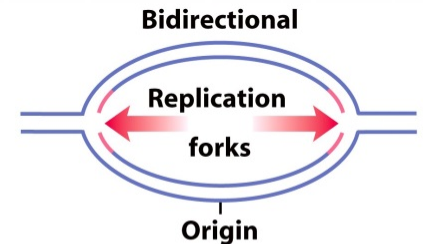
Em eucariotos a replicação se inicia em vários pontos



Definições

- **Origem de replicação**

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

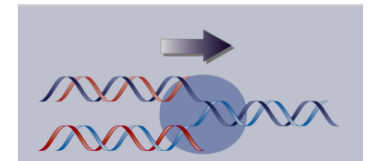


- **Bolha de replicação**

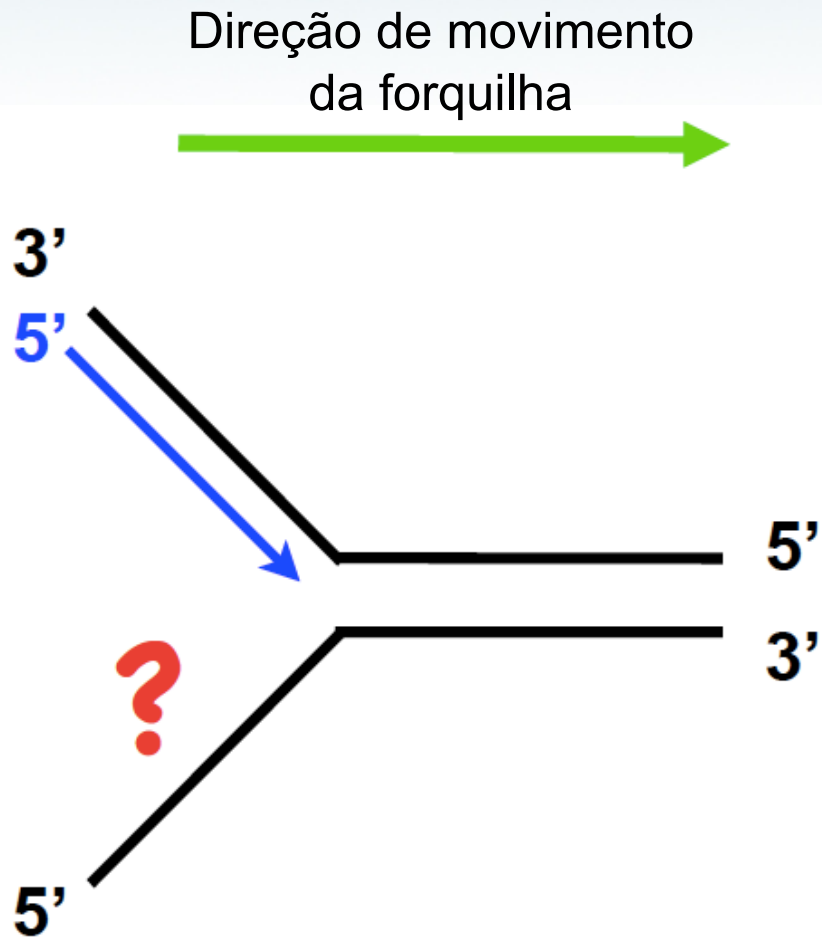
- região onde o DNA parental teve as fitas separadas a partir da origem delimitada por duas forquilhas

- **Forquilha de replicação**

- região do DNA onde há a transição do DNA parental de fita dupla para as novas fitas-filhas

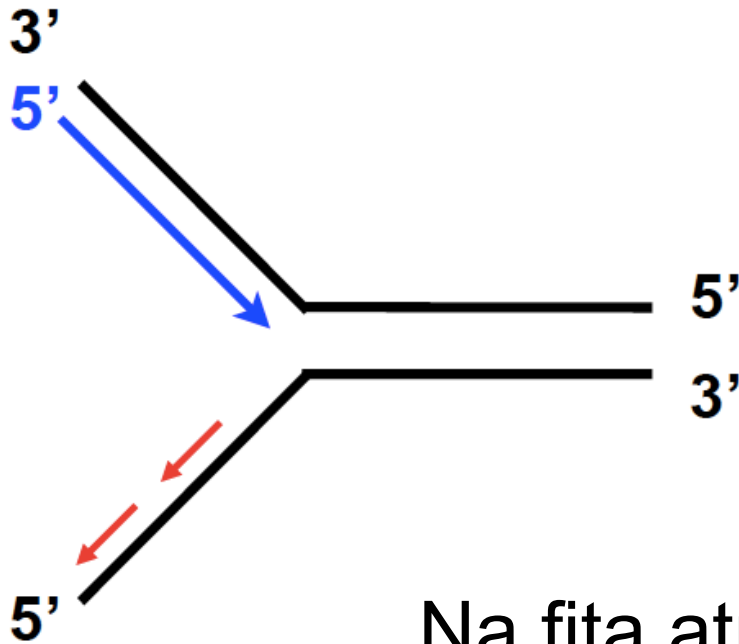


Problemas



- A replicação SEMPRE se dá no sentido $5' \rightarrow 3'$
 - como ocorre a síntese das duas fitas na forquilha?

A forquilha é assimétrica



Replicação é **contínua** numa fita (fita líder) e **descontínua** na outra (fita atrasada)

Na fita atrasada são sintetizados pequenos fragmentos

Fragmentos de Okazaki

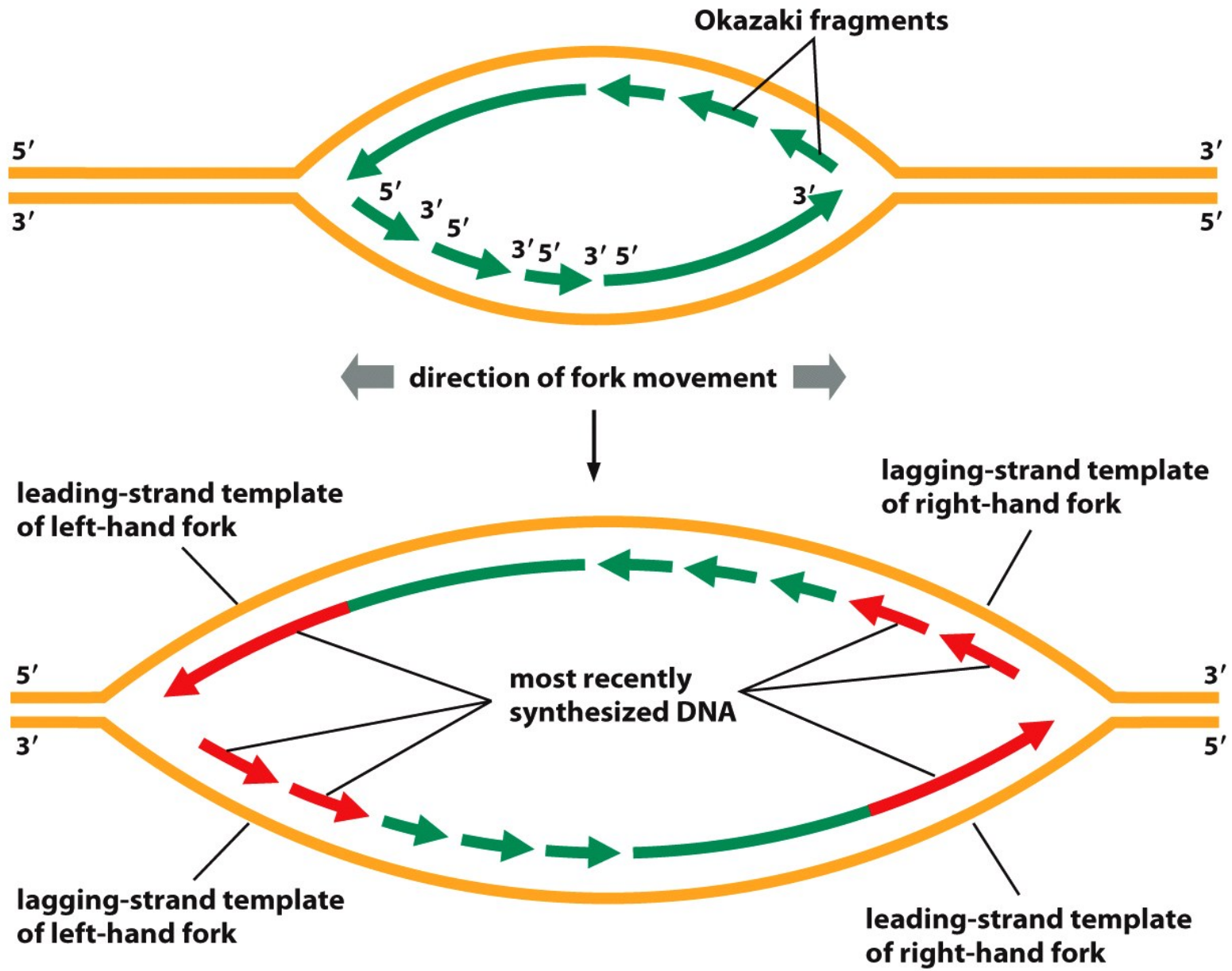
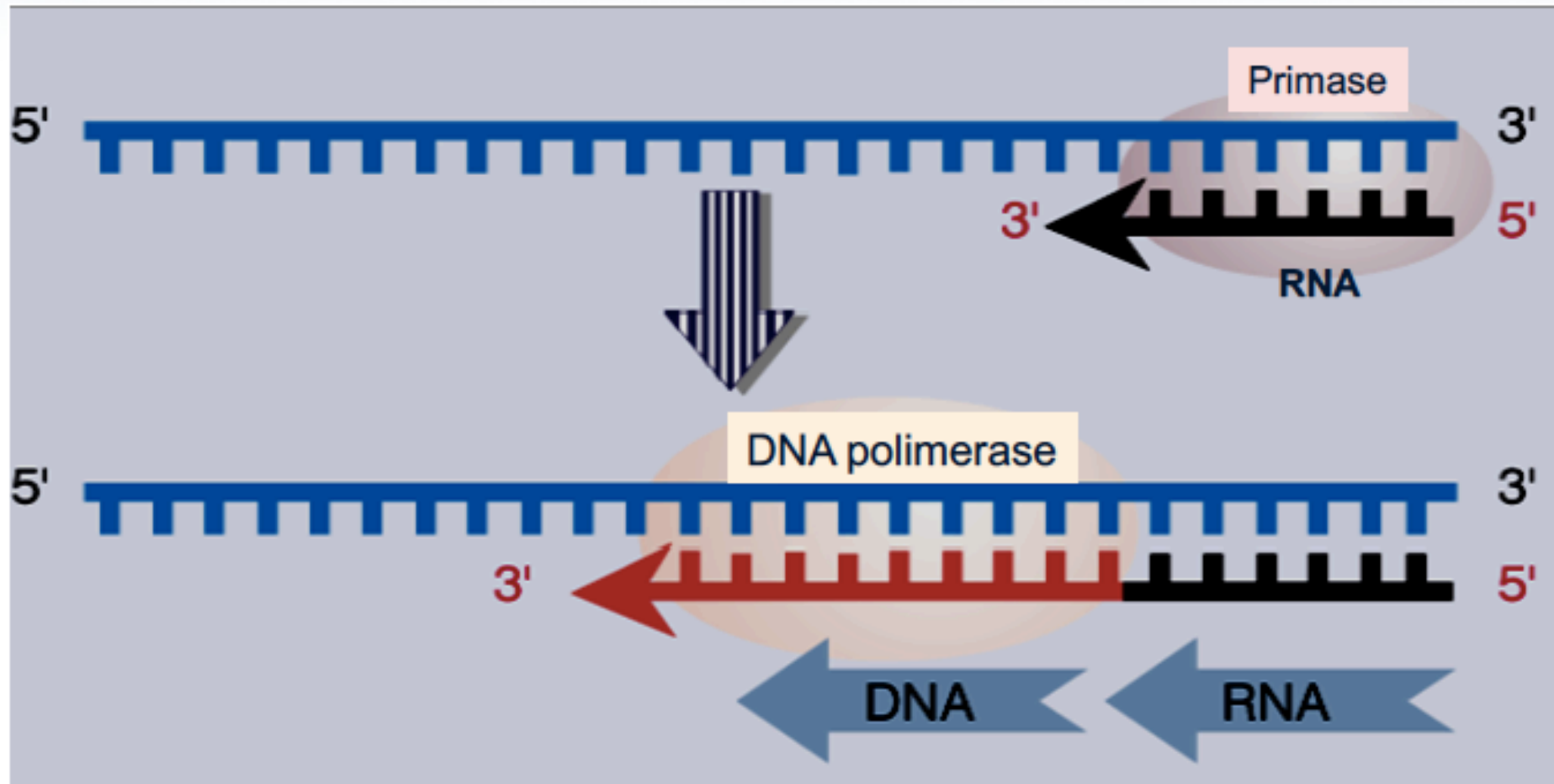


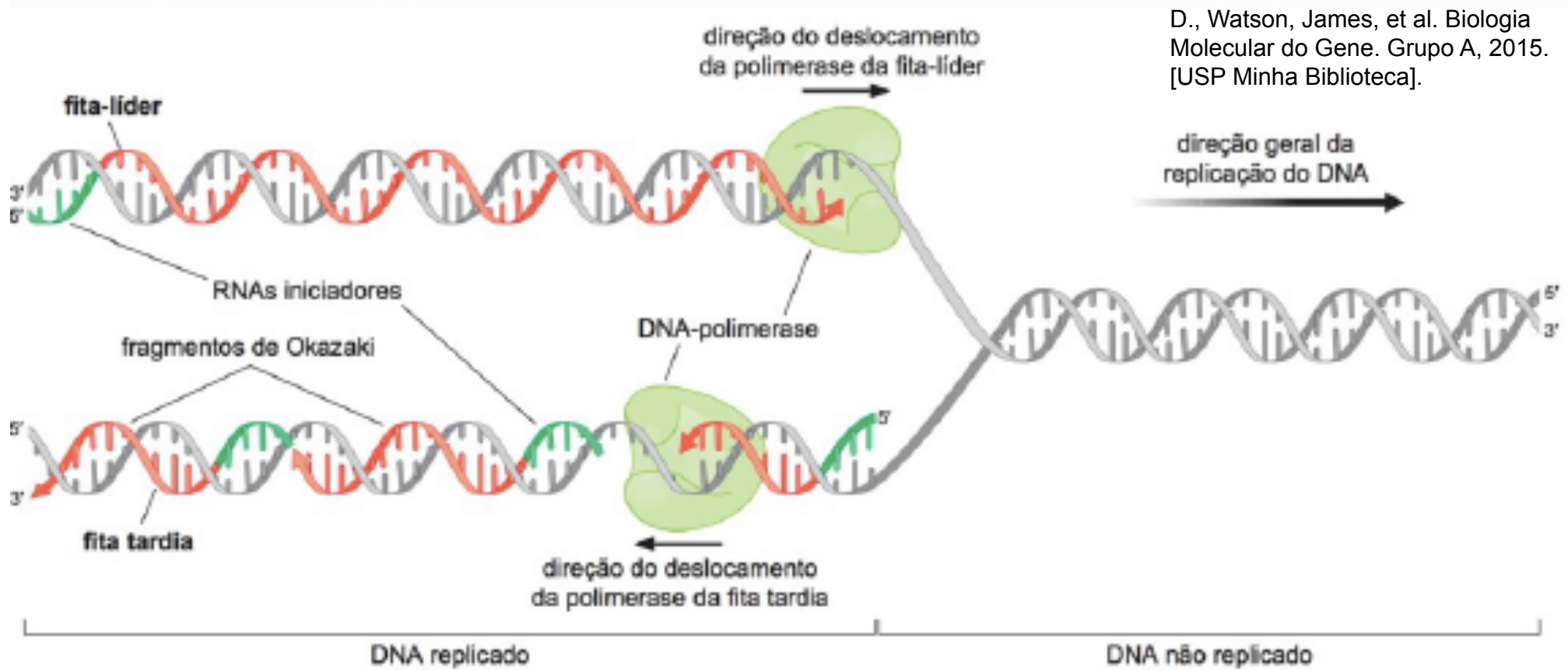
Figure 6-12 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Como é adicionado o primer?

- DNA polimerases precisam de uma extremidade 3' OH livre para adicionar novos nucleotídeos à cadeia
 - quem coloca o primeiro nt?
- Antes da ação da DNA polimerase, um *primer* (iniciador) de RNA é adicionado
 - Primase (DnaG)

Primer: os primeiros nucleotídeos adicionados são **RNA**



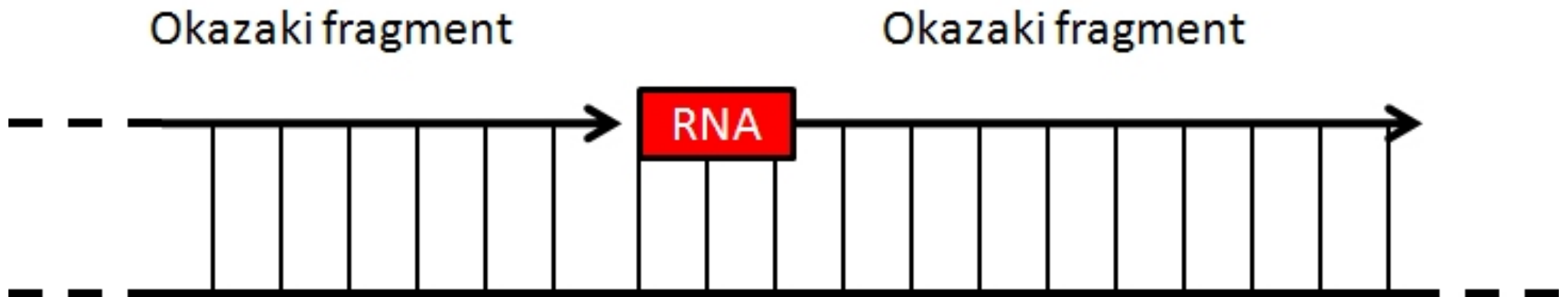


D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].

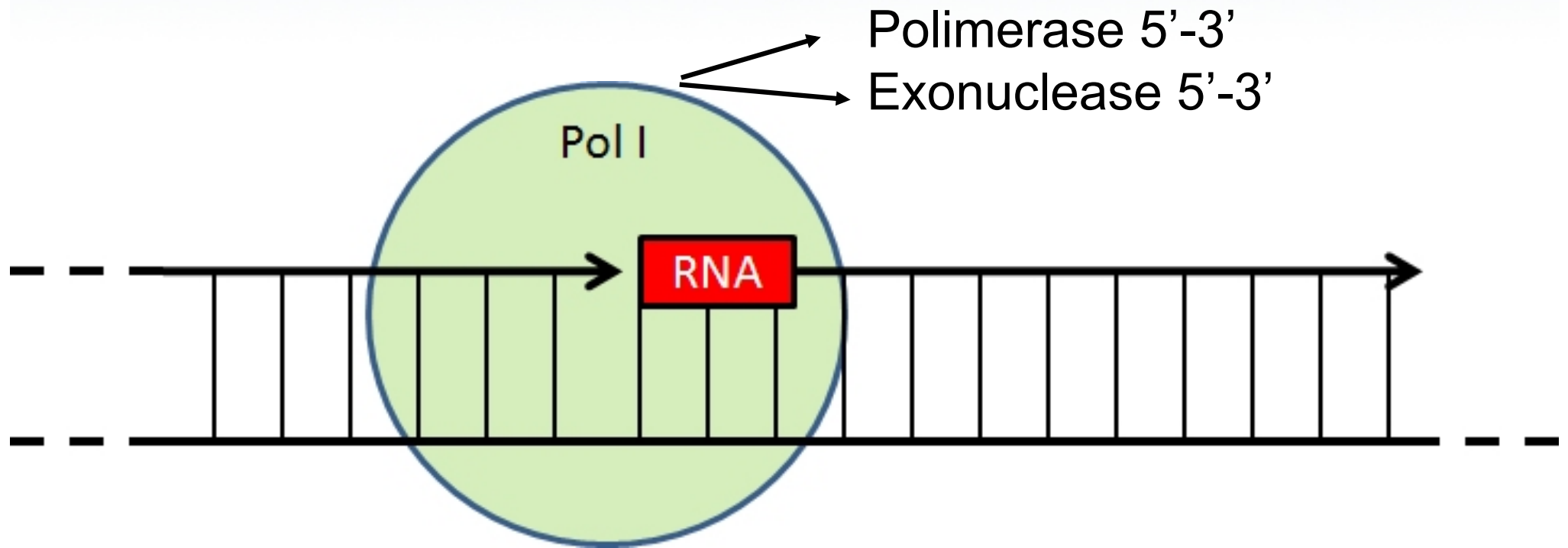
Mais questões:

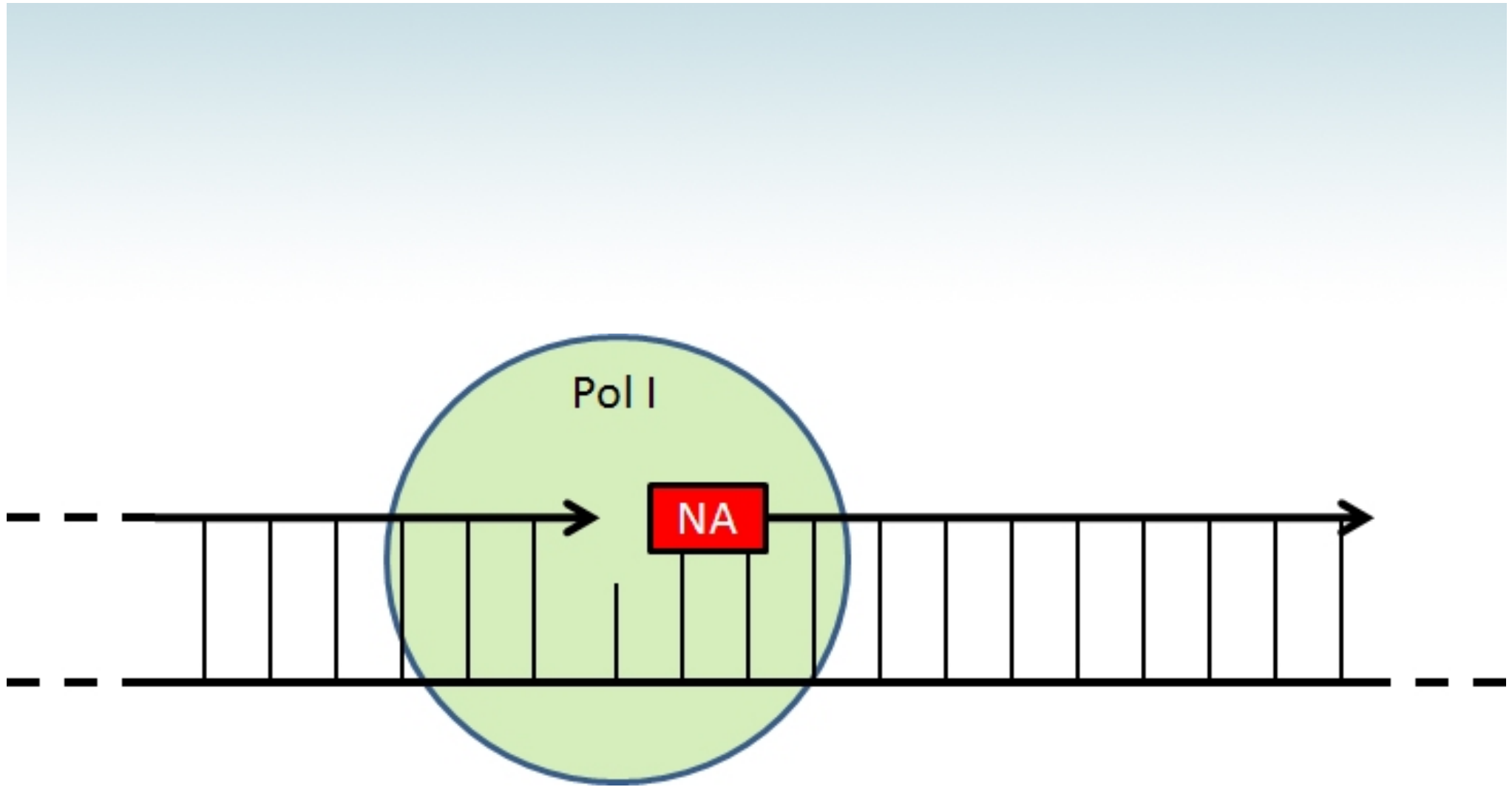
- Como os primers de RNA são retirados?
- Como os fragmentos de Okazaki se reúnem em uma única fita?

Como são removidos os primers de RNA presentes nos fragmentos de okazaki?



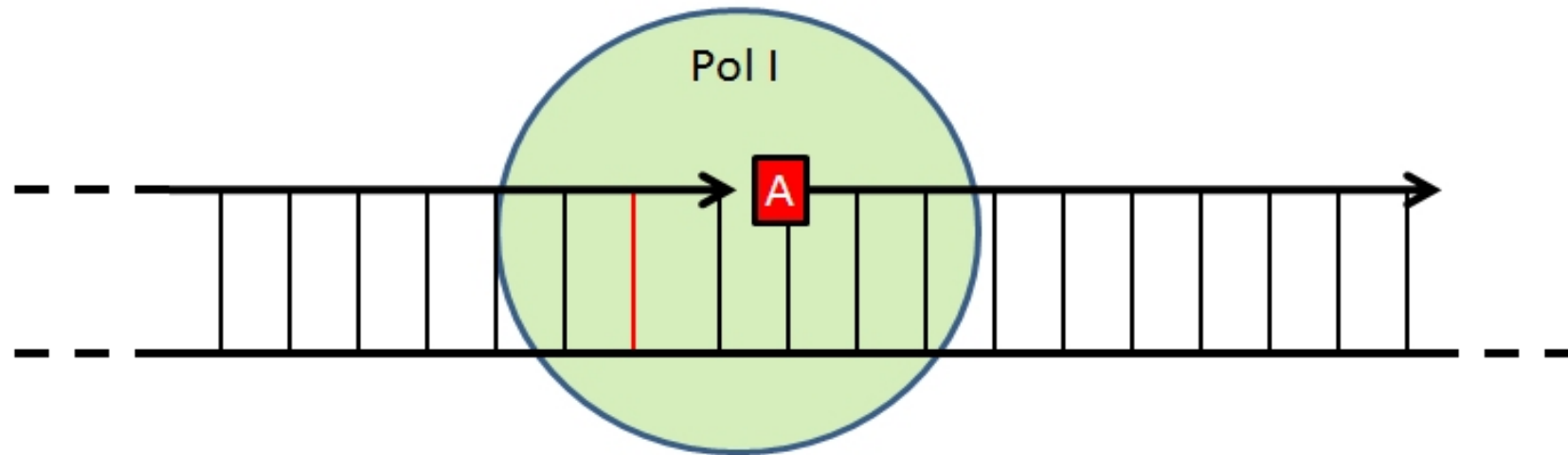
DNA polymerase I



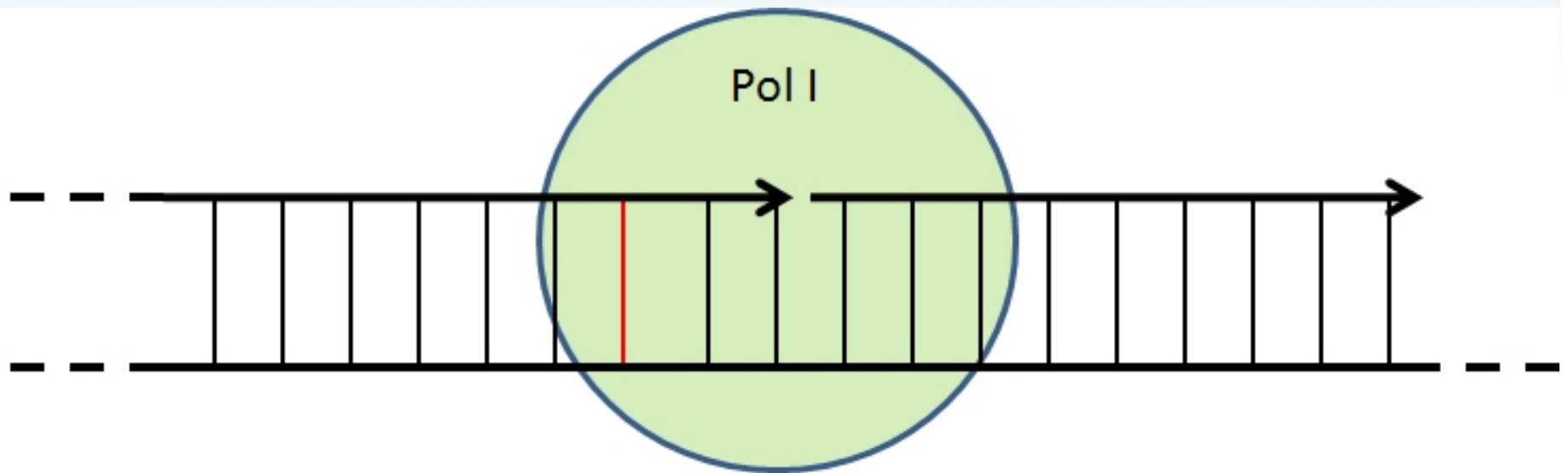


<http://www.flickr.com/photos/agathman/sets/72157617475156596>

<http://www.flickr.com/photos/agathman/sets/721576>

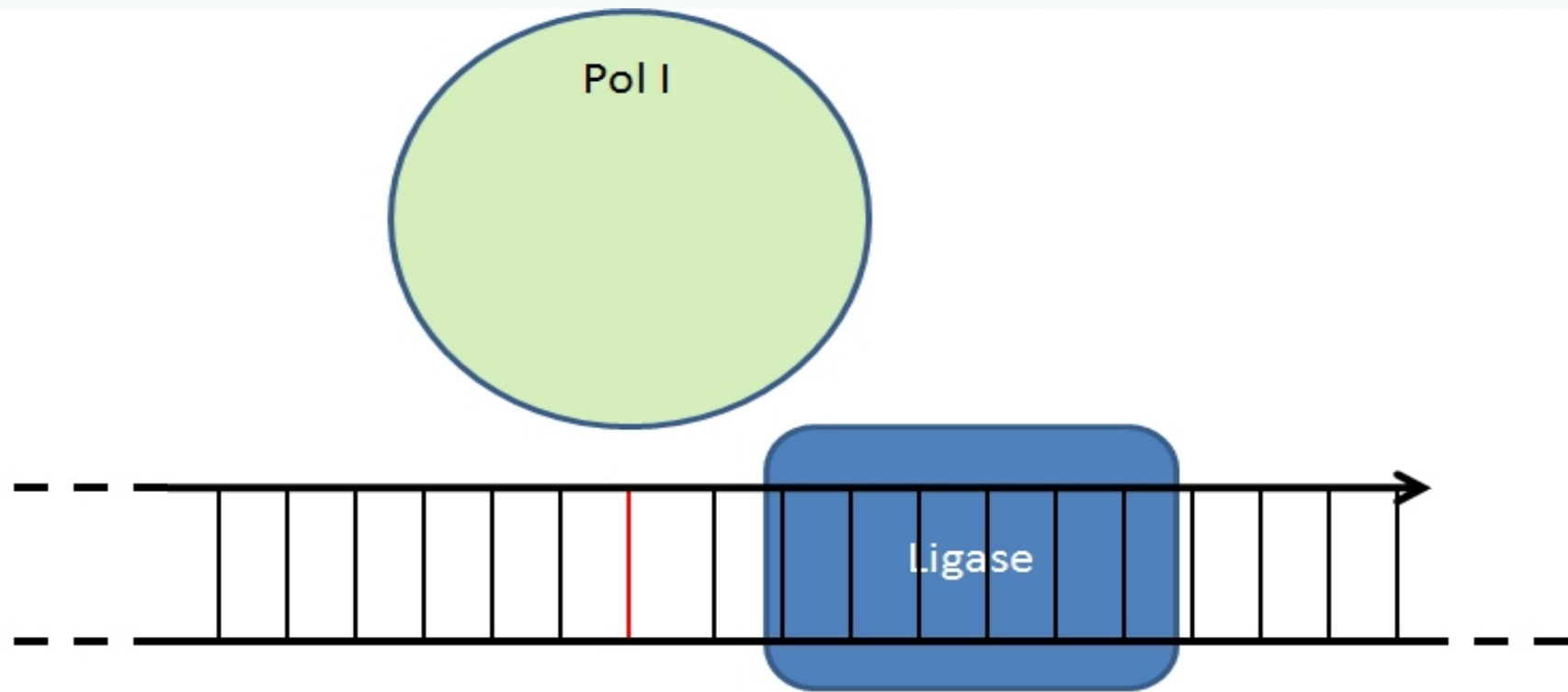


A DNA pol I continua a usar ambas as atividades para remover nucleotídeos da extremidade 5' e alongar a extremidade 3'. Os dois fragmentos continuam separados, mas o corte entre eles se desloca no sentido 3'.



A DNA pol I continua a degradar DNA de um lado do corte e a sintetizar do outro

<http://www.flickr.com/photos/agathman/sets/72157617475156596>



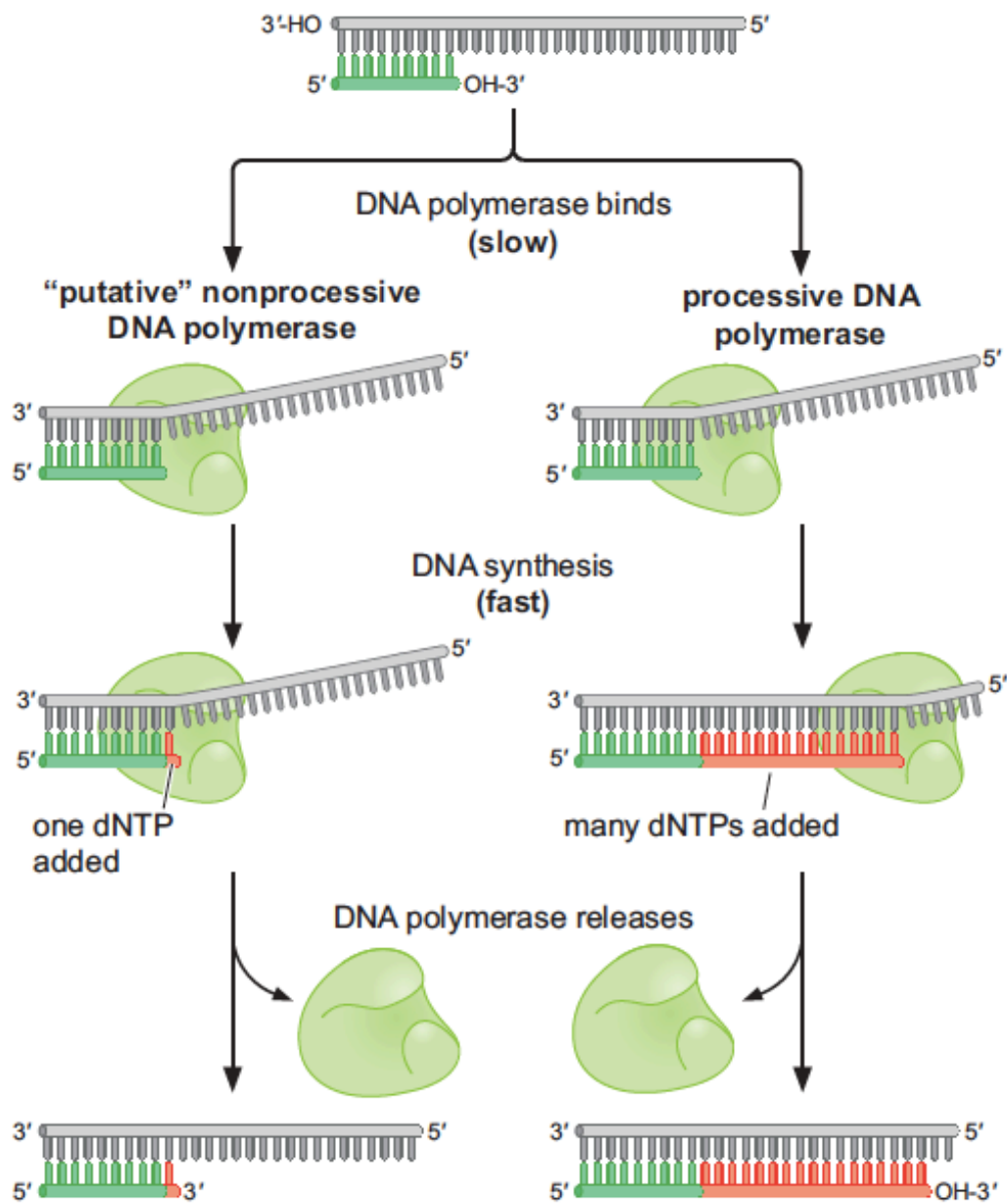
A DNA ligase catalisa a formação da ligação fosfodiéster entre os fragmentos

<http://www.flickr.com/photos/agathman/sets/72157617475156596>

Ligase catalyzes formation of a phosphodiester bond.

A síntese de DNA das duas fitas é catalisada pela DNA polimerase III

- DNA polimerase III
 - Apresenta alta **fidelidade (atividade revisora - proofreading)**
 - Enzima altamente **processiva**



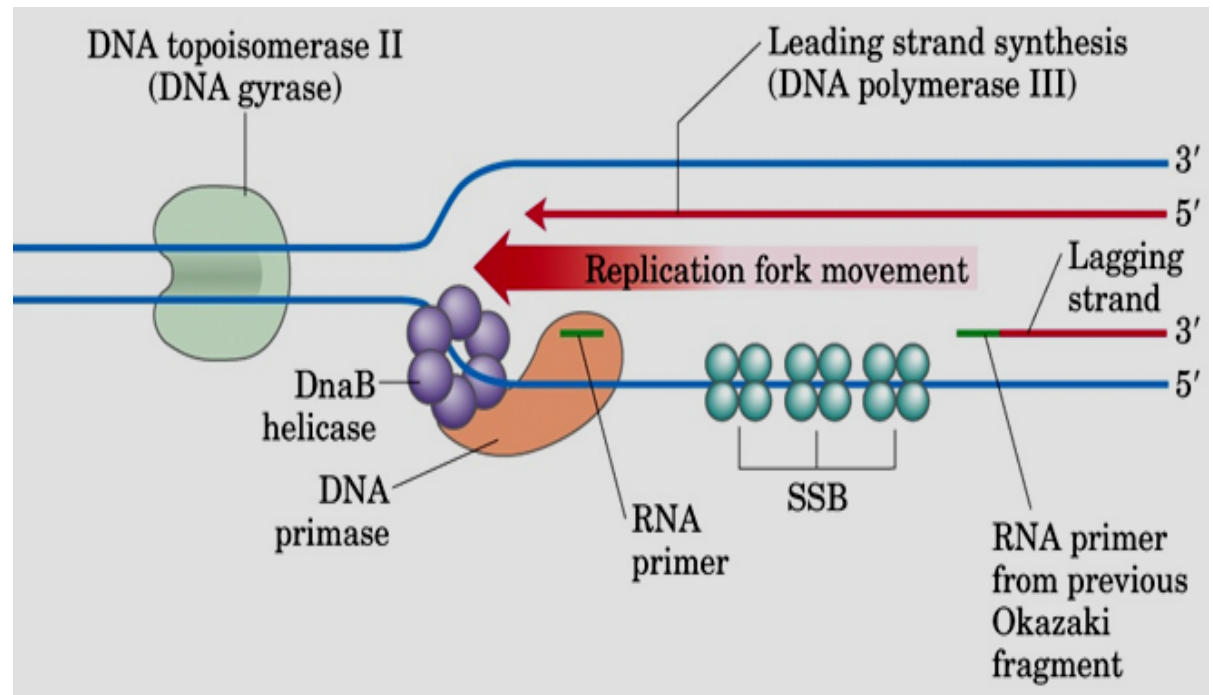
DNA polimerases tem processividade variável

D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].

Replissomo: conjunto de proteínas envolvidas na replicação do DNA

Além das DNA polimerases I e III, o replissomo contém:

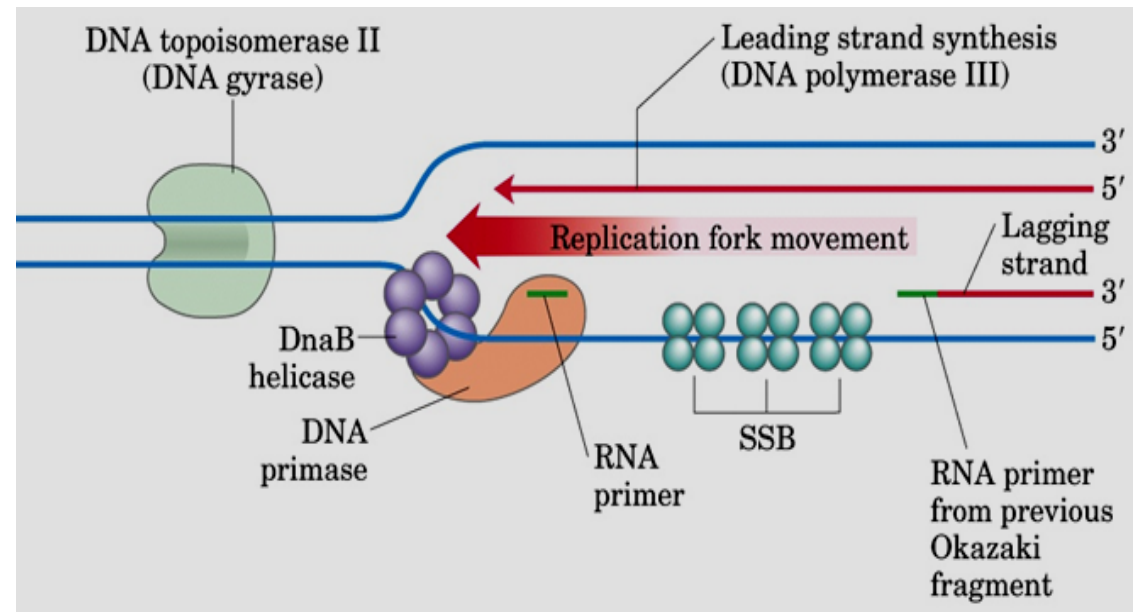
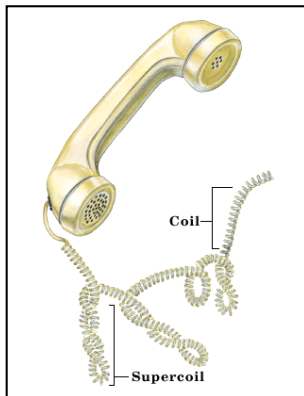
- Helicase (DnaB)
 - abre as fitas de DNA
- SSB (*single strand binding*)
 - mantém as fitas simples
- Primase (DnaG)
 - sintetiza o primer de RNA



Replissomo: conjunto de proteínas envolvidas na replicação do DNA

Além das DNA polimerases I e III, o replissomo contém:

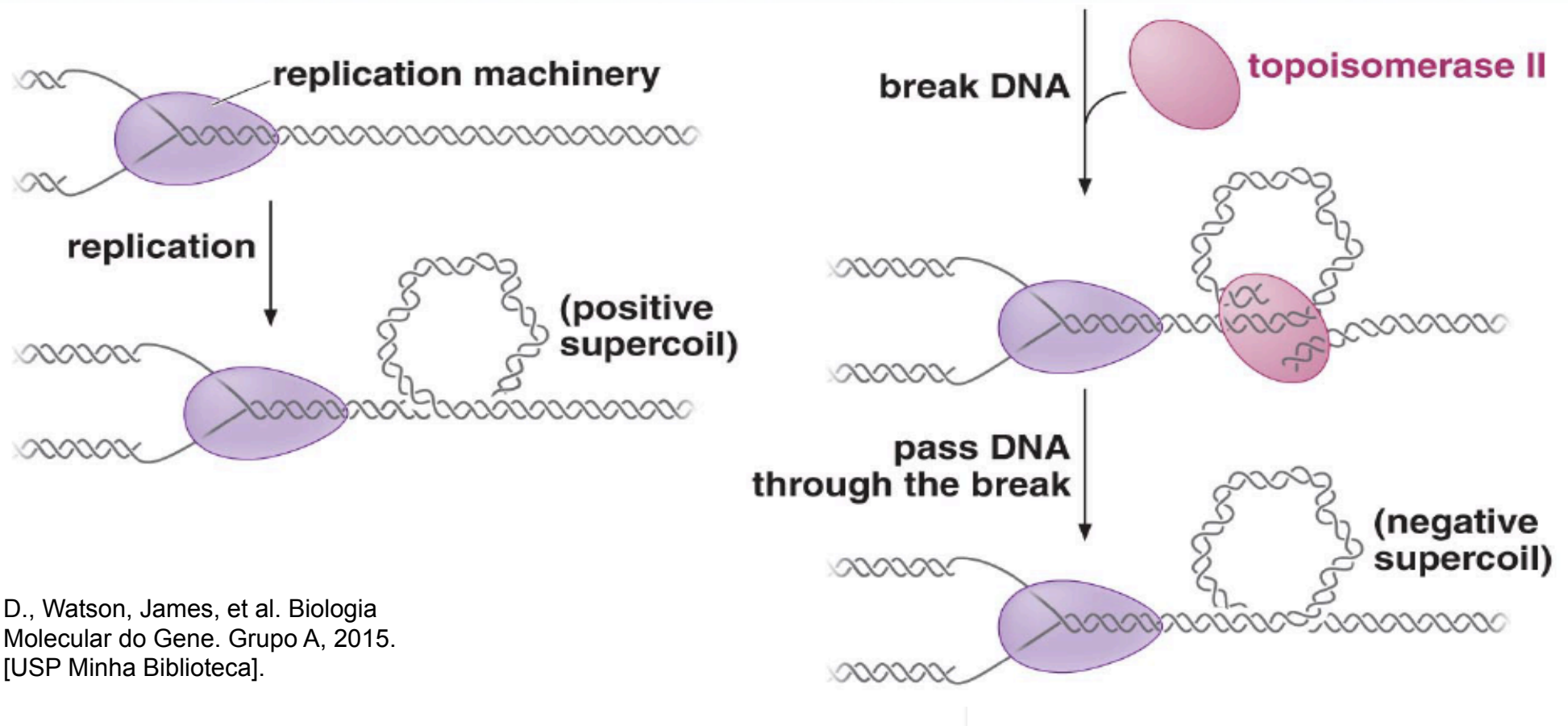
- DNA ligase
 - Liga os fragmentos de Okazaki
- Topoisomerase (girase)
 - Alivia a pressão contorcional causada pela abertura das fitas



Supercoiling induzido por separação de fitas de uma estrutura helicoidal.



As topoisomerases removem o superenovelamento criado durante a replicação



D., Watson, James, et al. Biologia Molecular do Gene. Grupo A, 2015. [USP Minha Biblioteca].