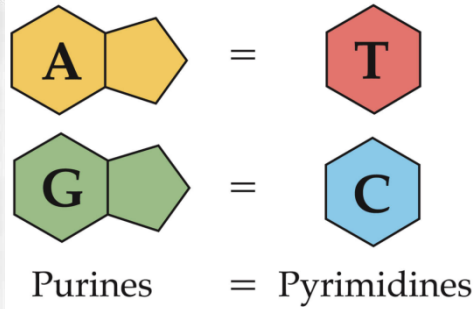


ACH4135 – Estrutura e Funcionamento da Célula



Replicação do DNA

Modelo de dupla hélice 1953: Watson & Crick.



LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Seventh Edition, Figure 11.10 Copyright © 2004 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.

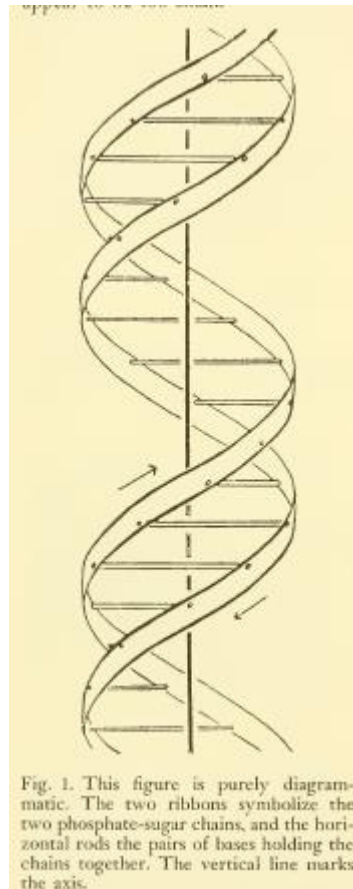
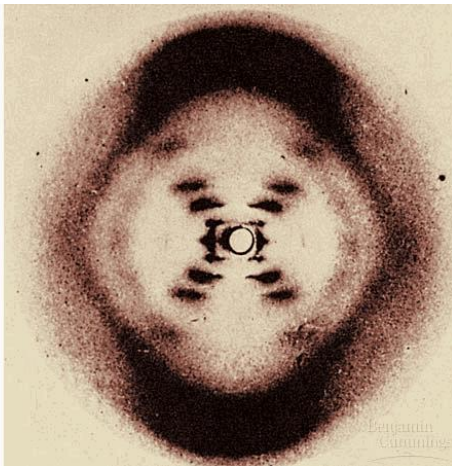
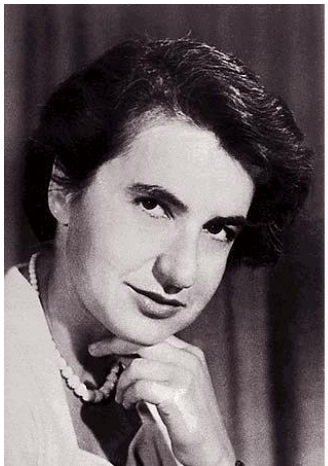
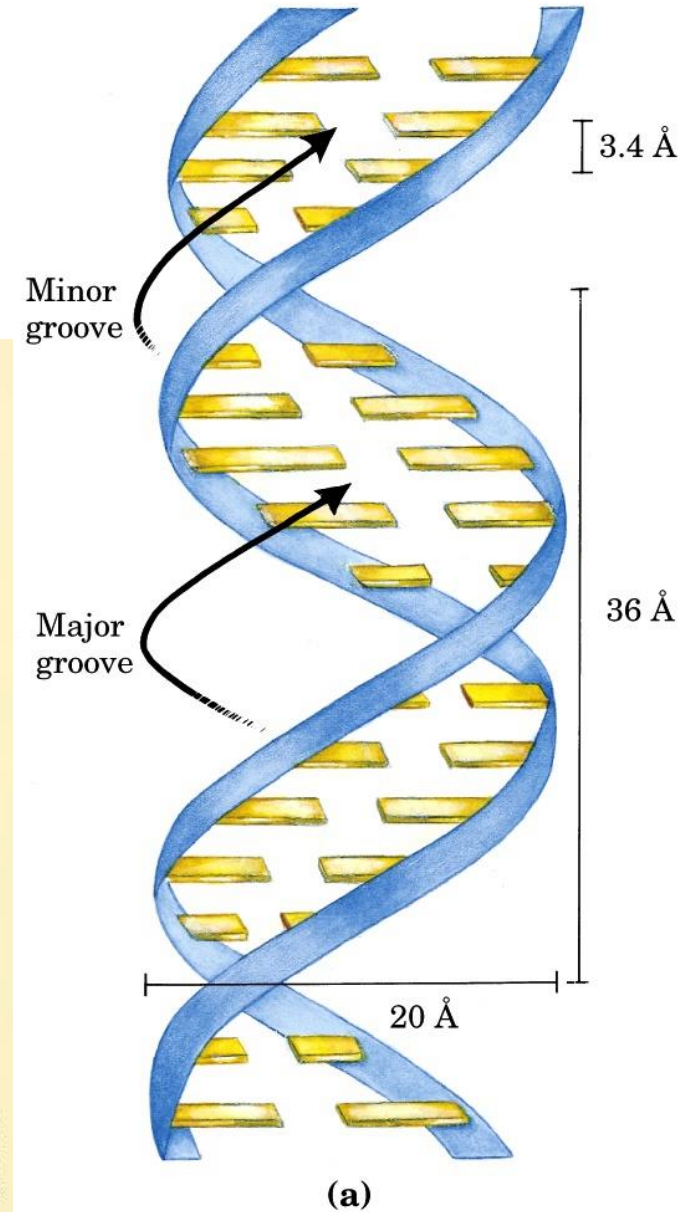
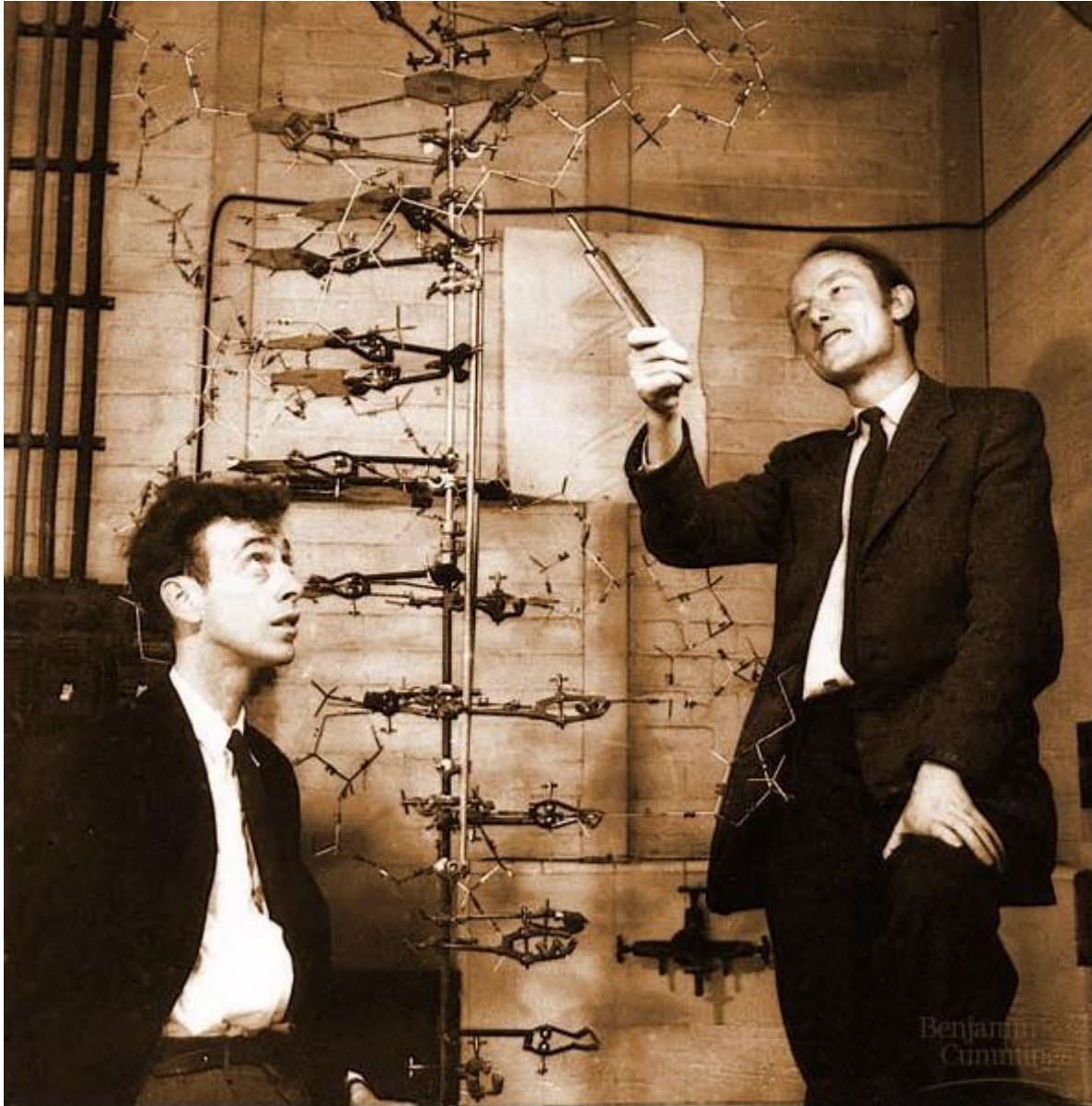


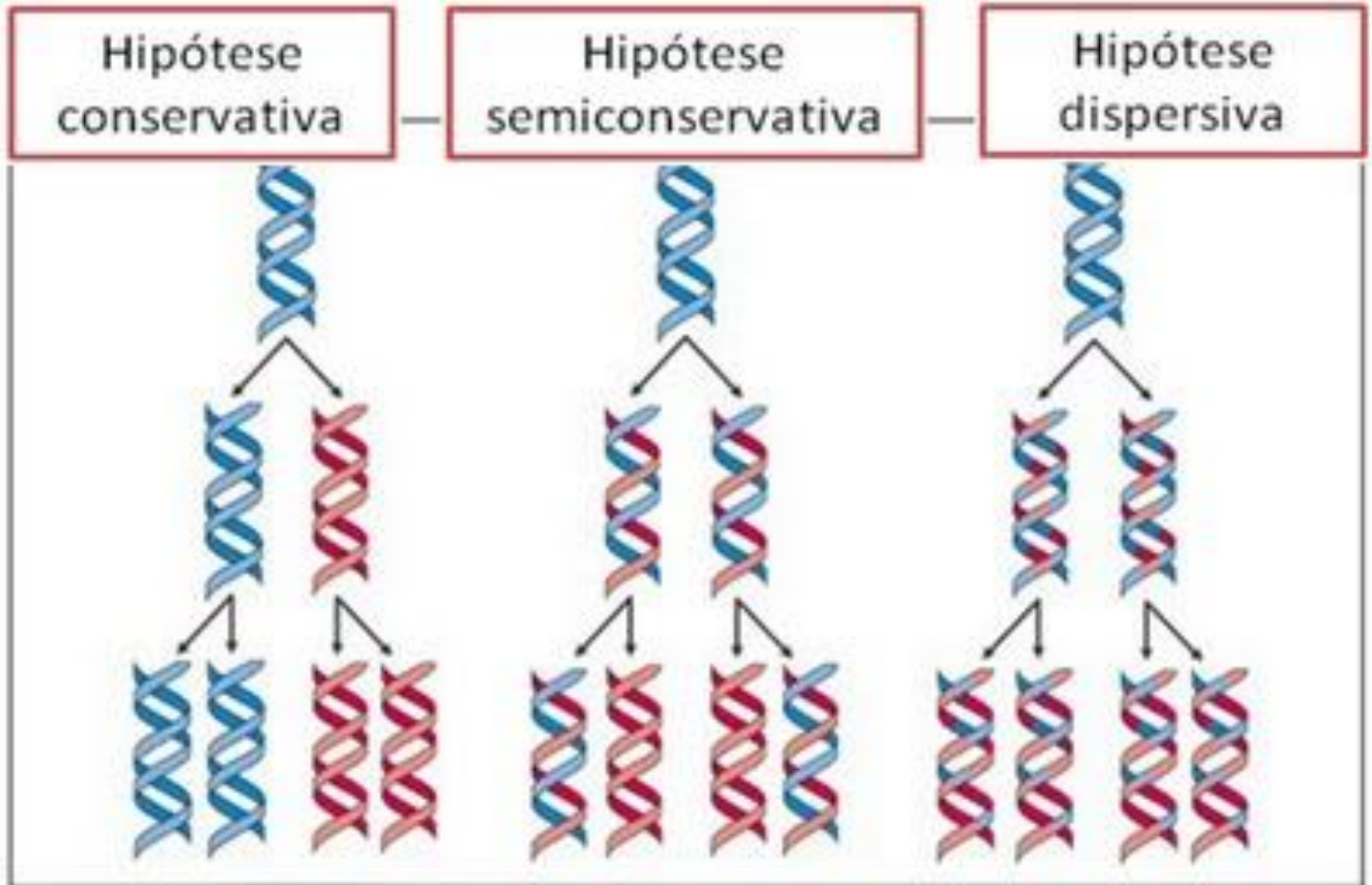
Fig. 1. This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the axis.



Watson-Crick em 1953: estrutura tridimensional do DNA



Meselson e Stahl em 1958: 3 tipos possíveis de duplicação do DNA

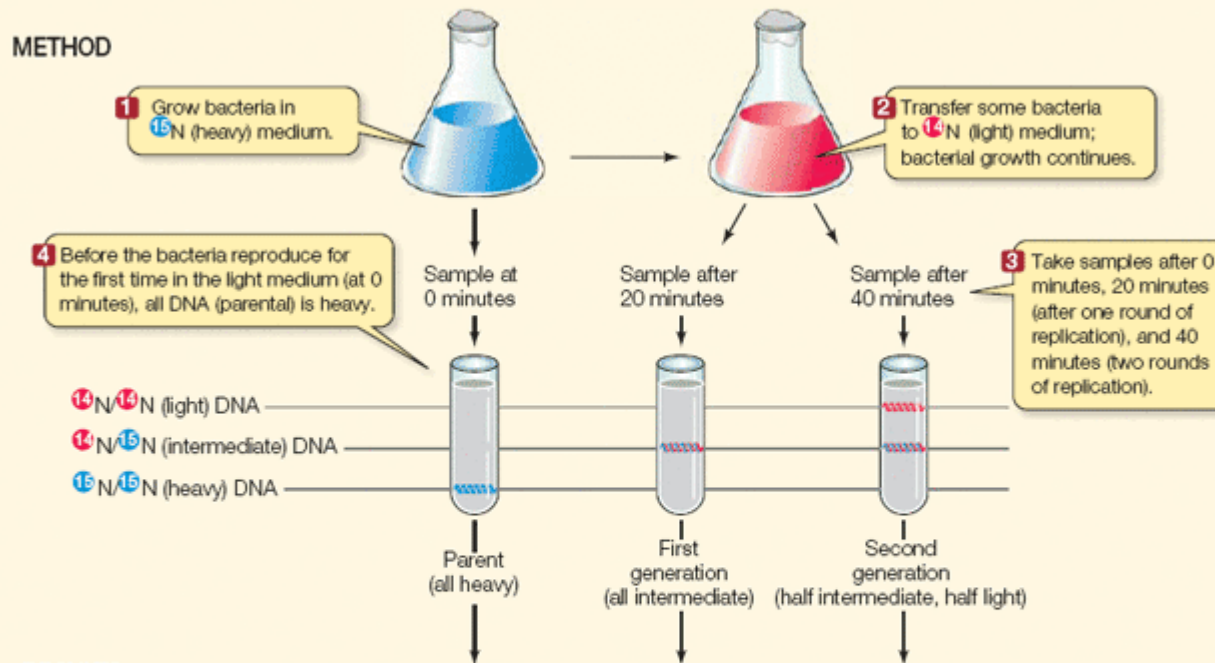


Meselson e Stahl em 1958: replicação semi-conservativa

EXPERIMENT

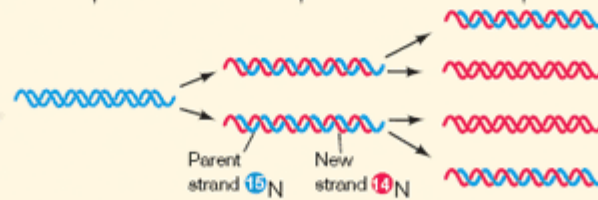
HYPOTHESIS: DNA replicates semiconservatively.

METHOD



RESULTS

After 2 generations, half the DNA was intermediate and half was light only; there was no heavy-only DNA.



CONCLUSION: This pattern could only have been observed if each DNA molecule contains a template strand from the parental DNA; thus DNA replication is semiconservative.

Mas, por que as células precisam duplicar o DNA???

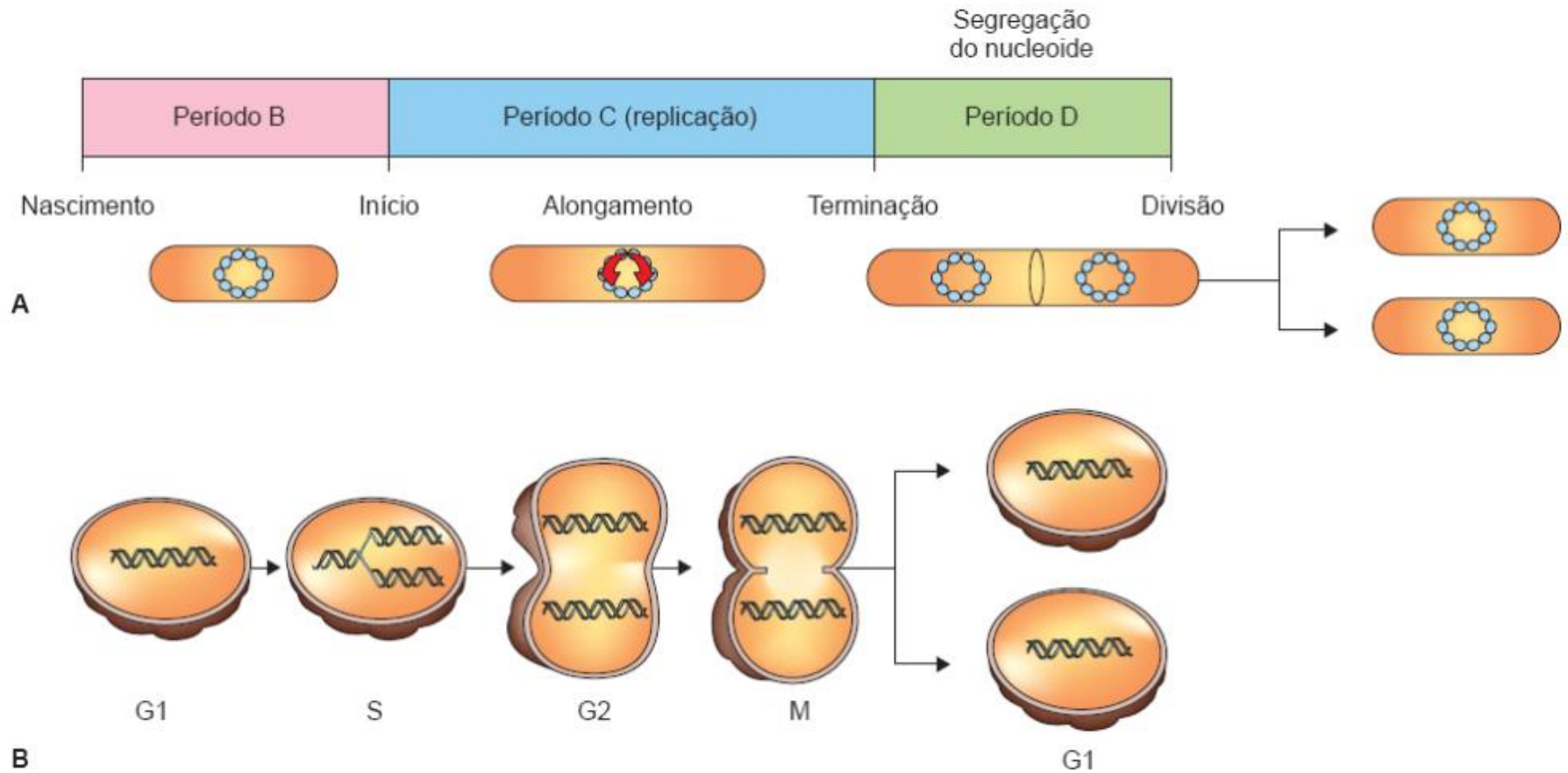
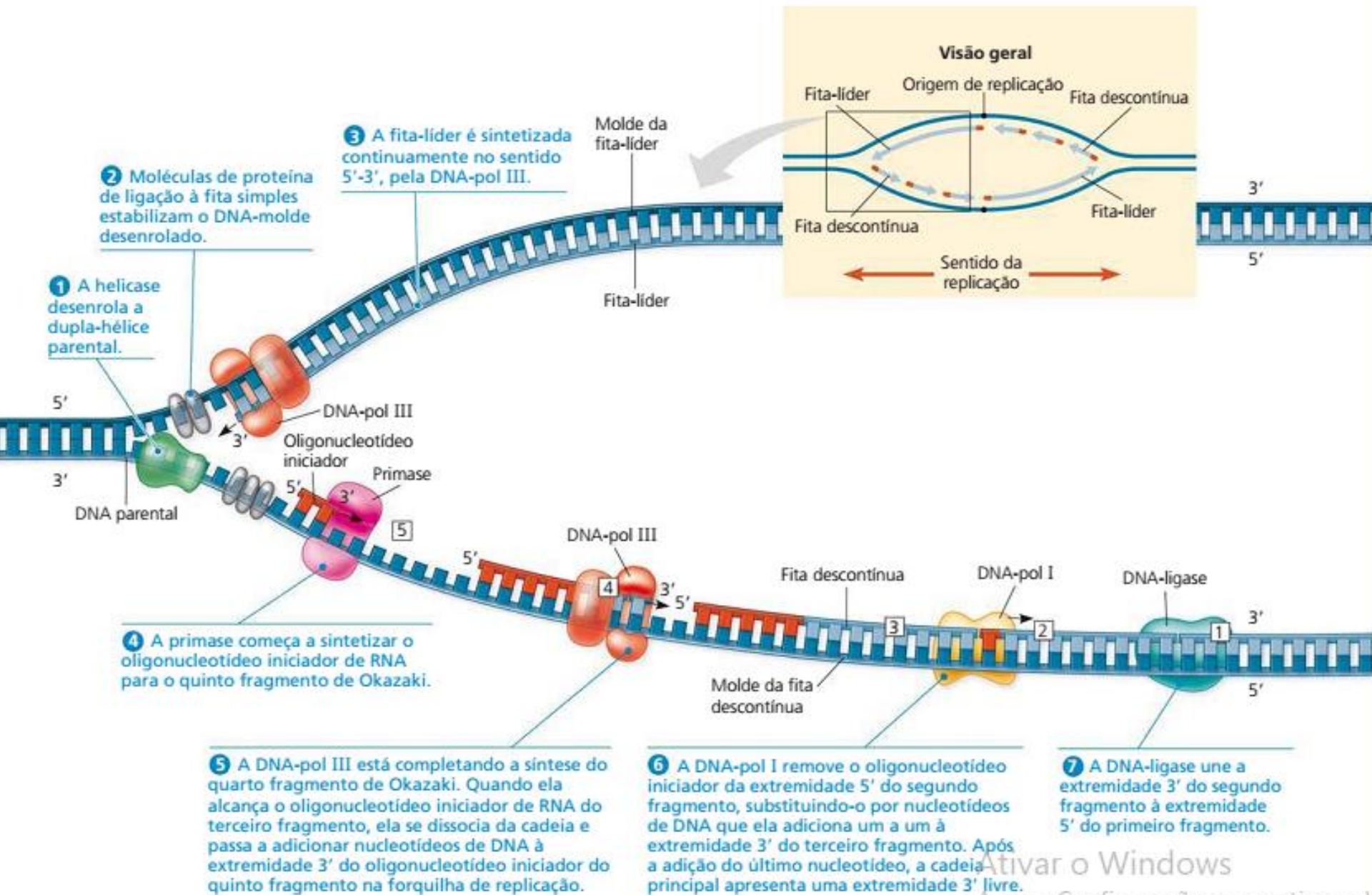
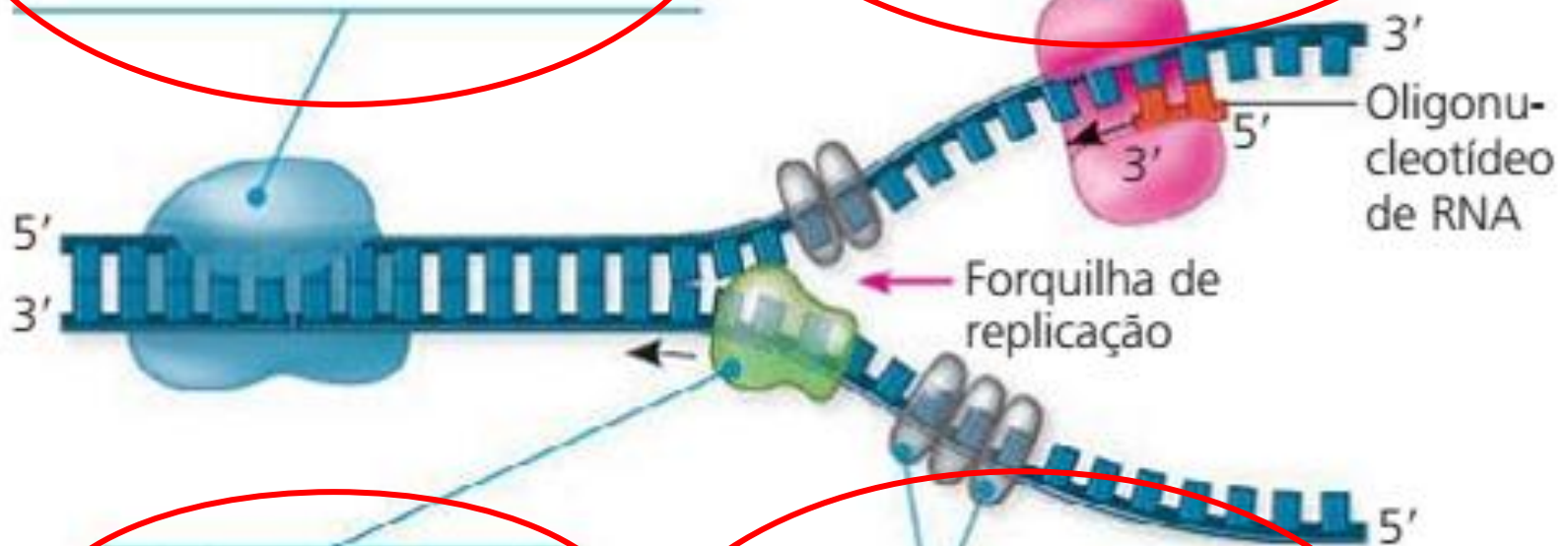


Figura 3.1 Divisão celular em células procarióticas e eucarióticas. Todo o genoma nuclear é replicado apenas uma vez a cada ciclo celular. **A.** Ciclo celular de uma bactéria de crescimento lento com três períodos bem definidos: períodos B, C e D. Adaptada de Haeusser e Levin, 2008. **B.** Ciclo celular de uma célula eucariótica dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M.



A topoisomerase cliva, gira e religa o DNA parental à frente da forquilha de replicação, aliviando a tensão causada por seu desenrolamento.

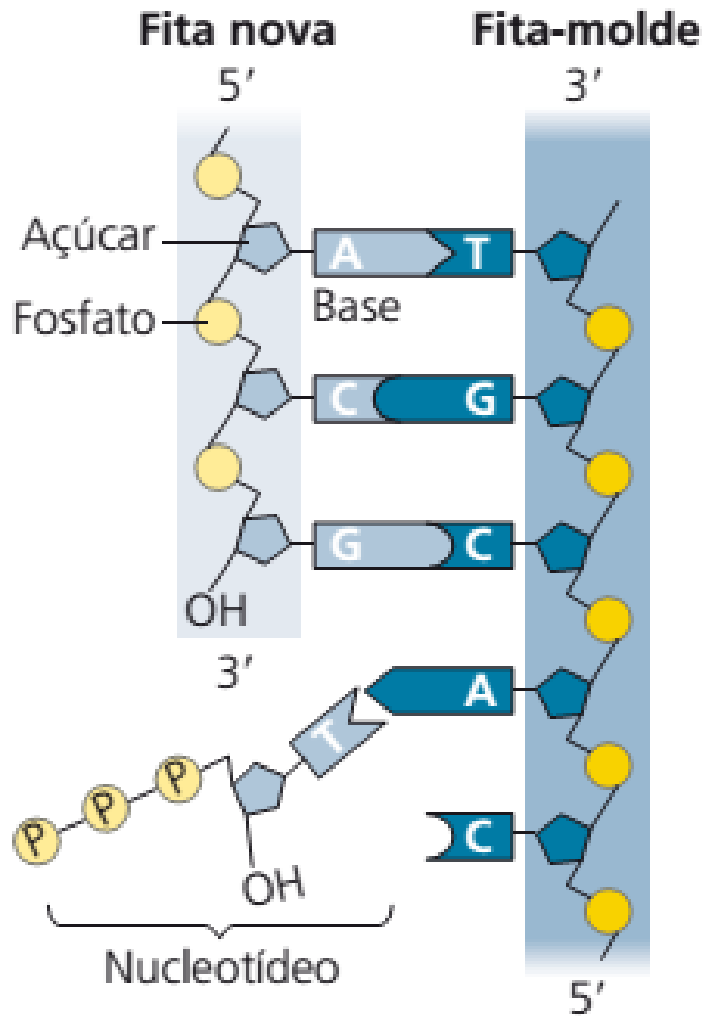
A primase sintetiza oligonucleotídeos de RNA, utilizando o DNA parental como molde.



A helicase desenrola e separa as fitas de DNA parental.

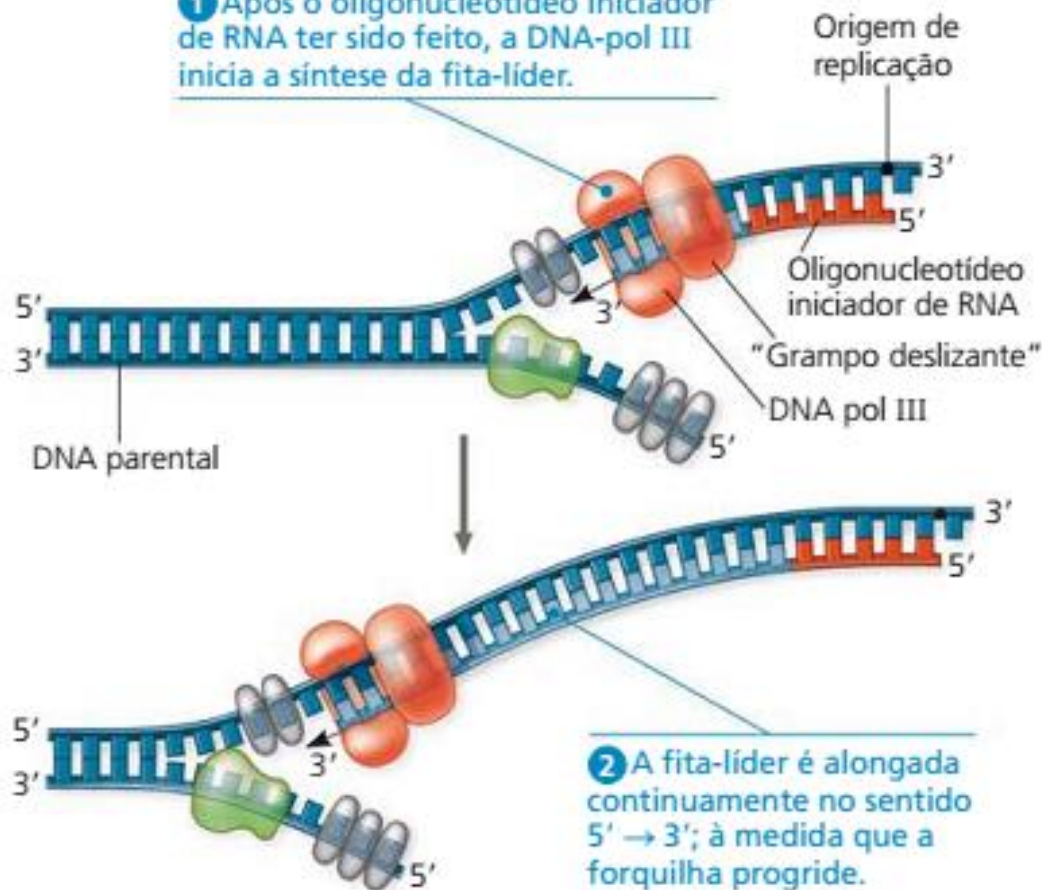
Proteínas de ligação ao DNA fita simples estabilizam as fitas parentais separadas.

Adição de novos nucleotídeos

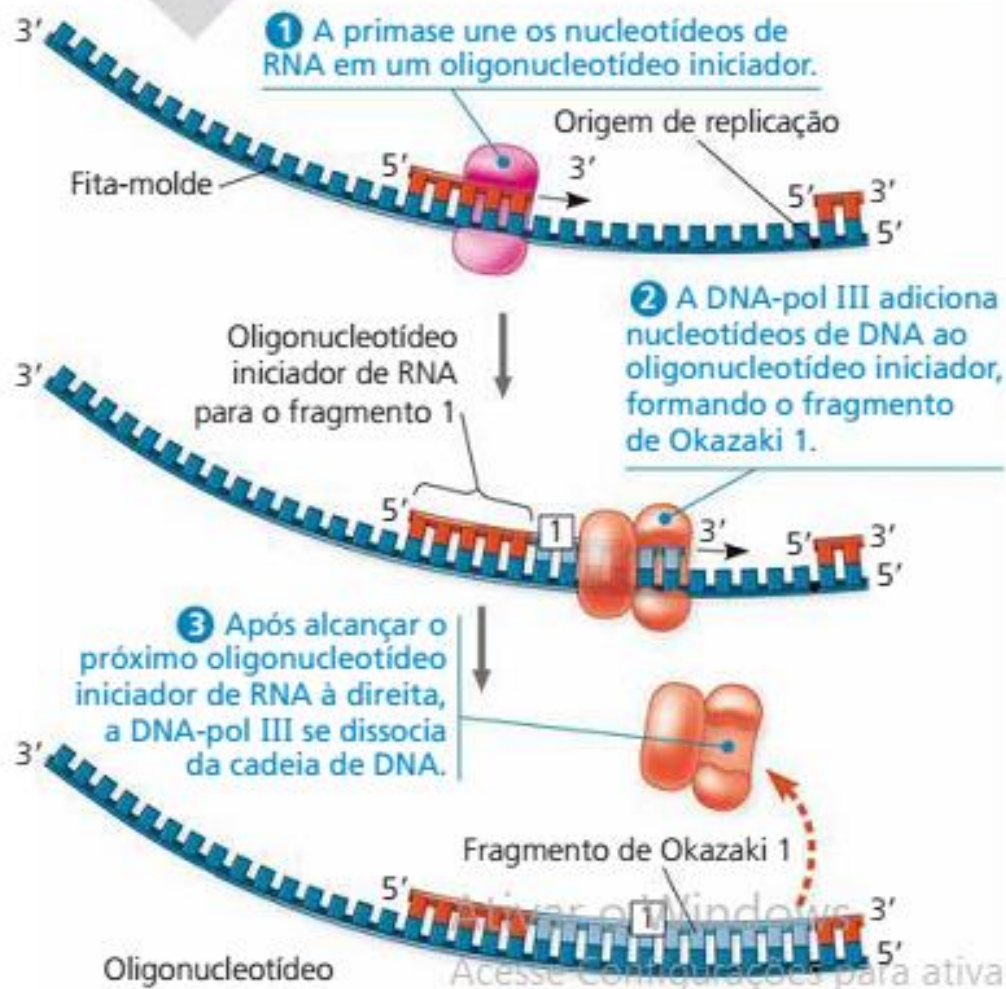
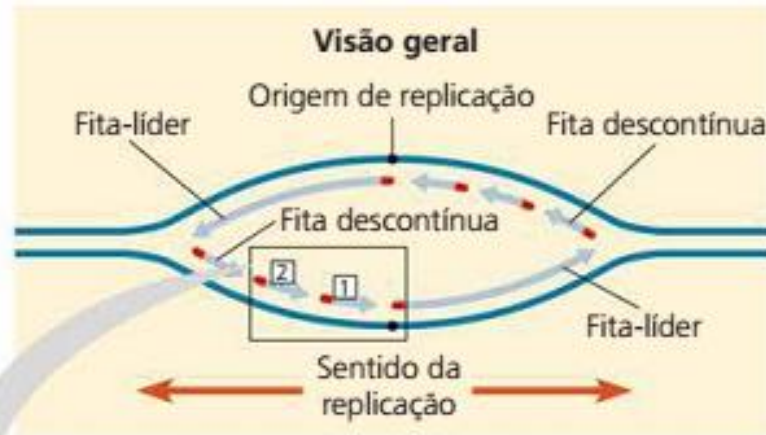


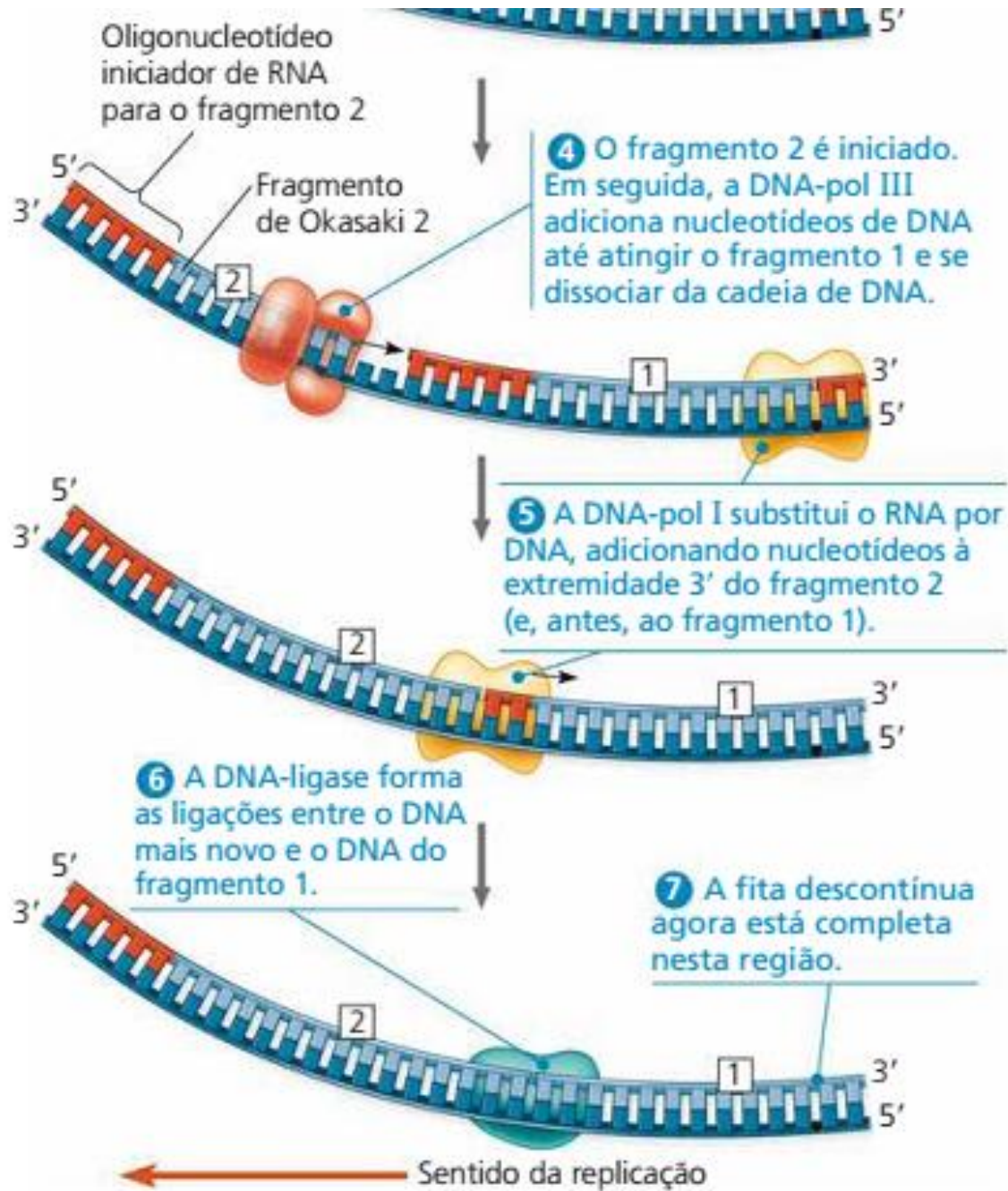


1 Após o oligonucleotídeo iniciador de RNA ter sido feito, a DNA-pol III inicia a síntese da fita-líder.

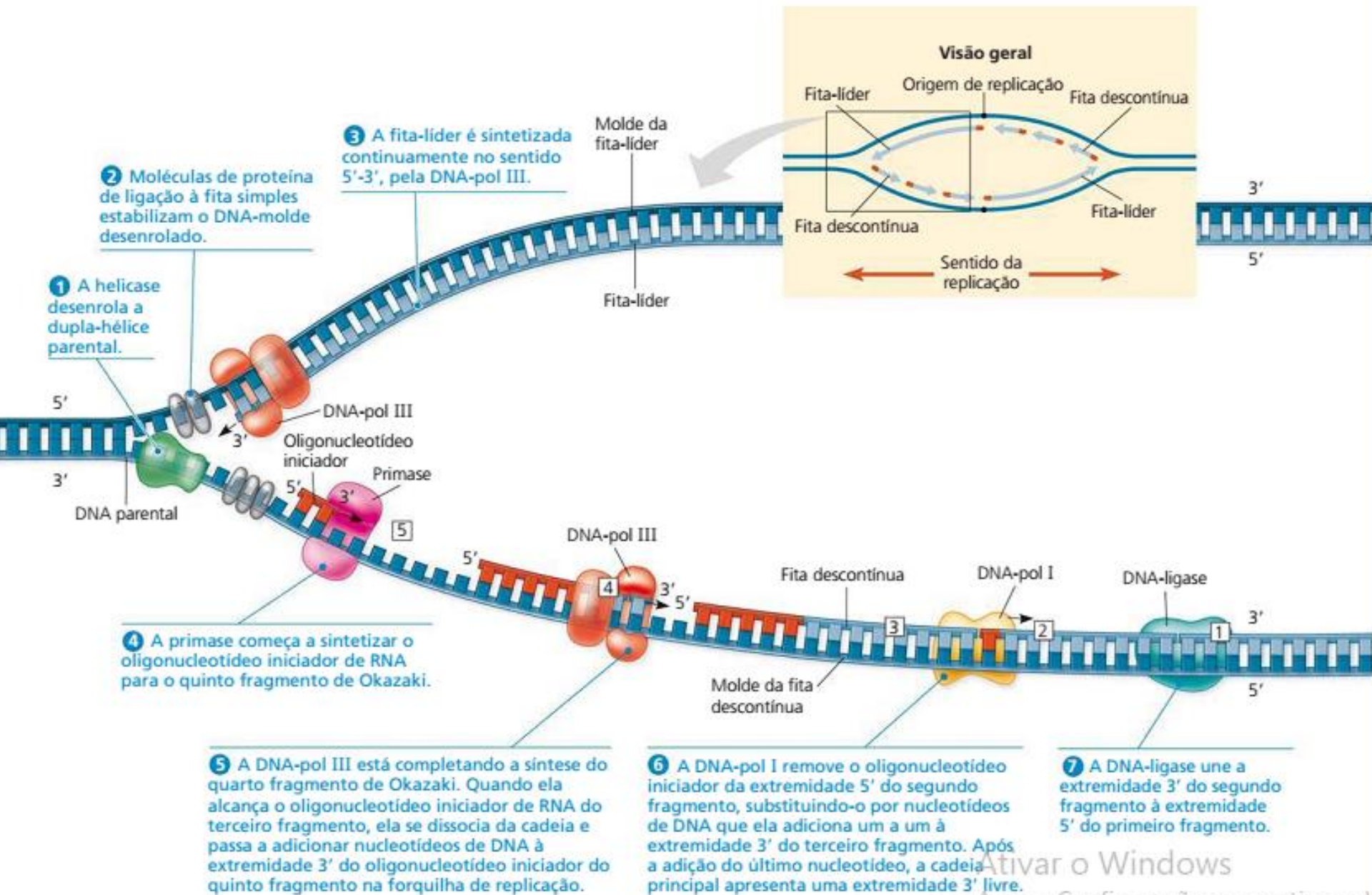


2 A fita-líder é alongada continuamente no sentido 5' → 3'; à medida que a forquilha progride.



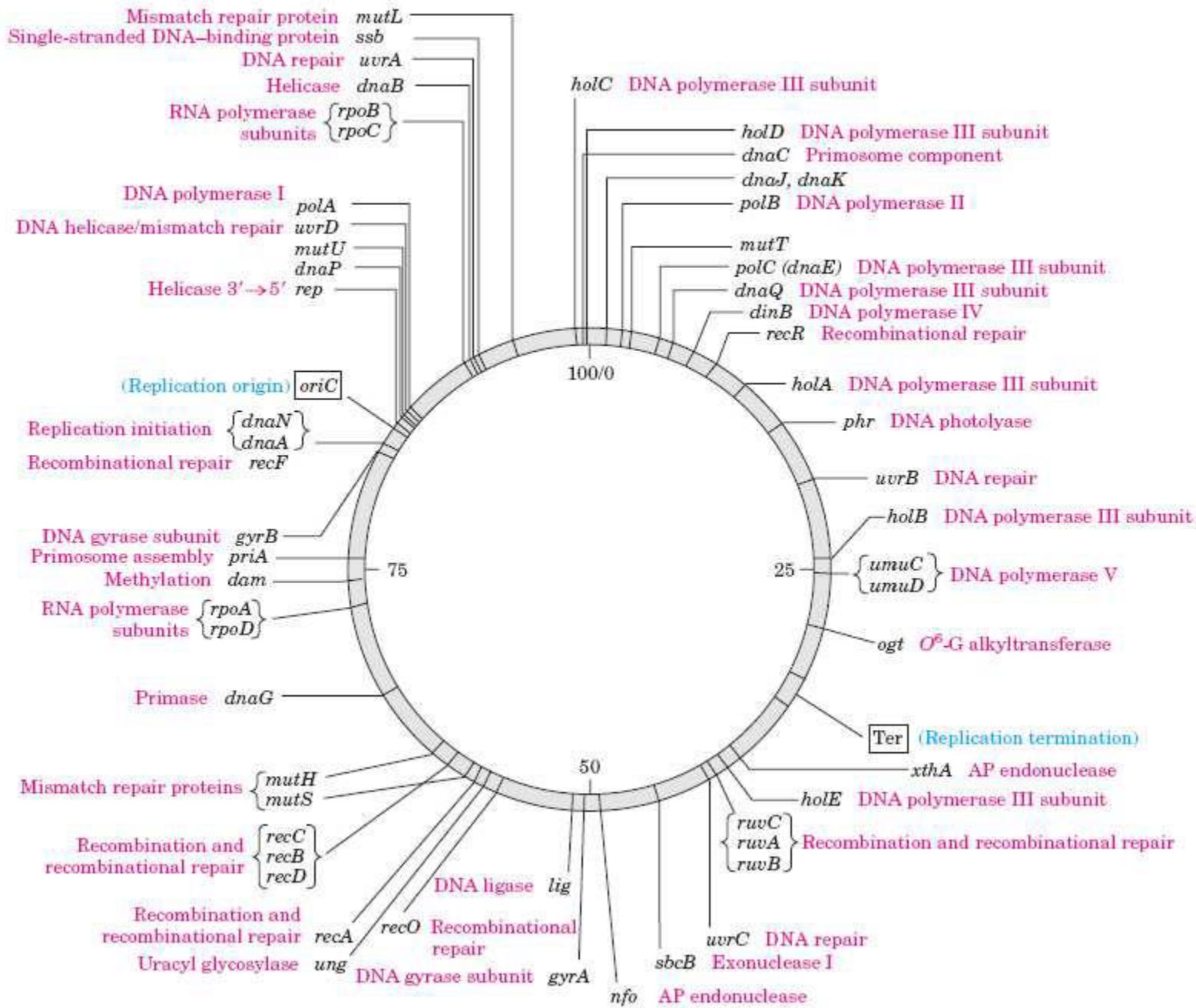


▲ **Figura 16.16** A síntese da fita descontínua.



Enzimas e proteínas envolvidas na replicação do DNA

- Topoisomerase: Alivia a tensão na molécula de DNA imediatamente a frente da forquilha de replicação;
- DNA Helicase: Desenrola e separa a dupla fita;
- Proteínas SSB: Estabilizam a fita simples de DNA;
- DNA Primase: constrói iniciadores de RNA nos moldes de DNA;
- DNA Polimerase III: Constrói a fita complementar de DNA a partir da fita molde;
- DNA Polimerase I: Substitui os iniciadores de RNA por DNA;
- DNA Ligase: liga os fragmentos de Okasaki.



Origem de replicação

- Início da síntese ocorrem em pontos específicos, chamados de “origem de replicação”;
- Todos os genomas têm pelo menos uma origem de replicação;
- Procariotos têm somente uma origem de replicação. Eucariotos apresentam uma origem de replicação a cada 10Kbp a 330Kbp;
- Quantidade de origens está diretamente relacionada com a velocidade de replicação e o tamanho do genoma dos organismos;

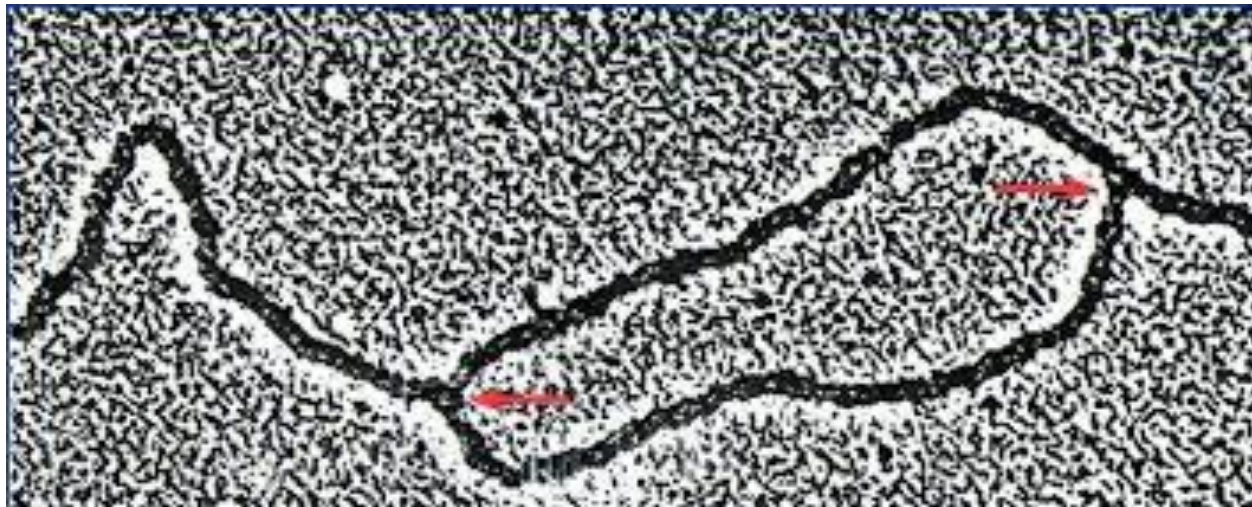
Processo de replicação

- Uma vez reconhecida a origem de replicação, é formada a forquilha de replicação, que acontece bidirecionalmente;
- DNA polimerase tem baixa capacidade de separar as duplas fitas de DNA. Necessidade de uma proteína adicional que realize essa tarefa (helicases);
- Helicases, em geral, são hexâmeros em forma de anel que circundam as moléculas de DNA.;
- Ligam-se a fitas simples de DNA e se deslocam unidirecionalmente, utilizando a energia de nucleotídeos trifosfatados (normalmente ATP) para quebrar quaisquer pontes de hidrogênio que se formem com a fita simples em que a helicase se encontra.
- Separam até 1000pb por segundo.

Funcionamento da Helicase

- Existem helicases que atuam nas duas direções 5'-3' e 3'-5'. Nos modelos de replicação mais bem compreendidos, são utilizadas helicases 5'-3'.

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



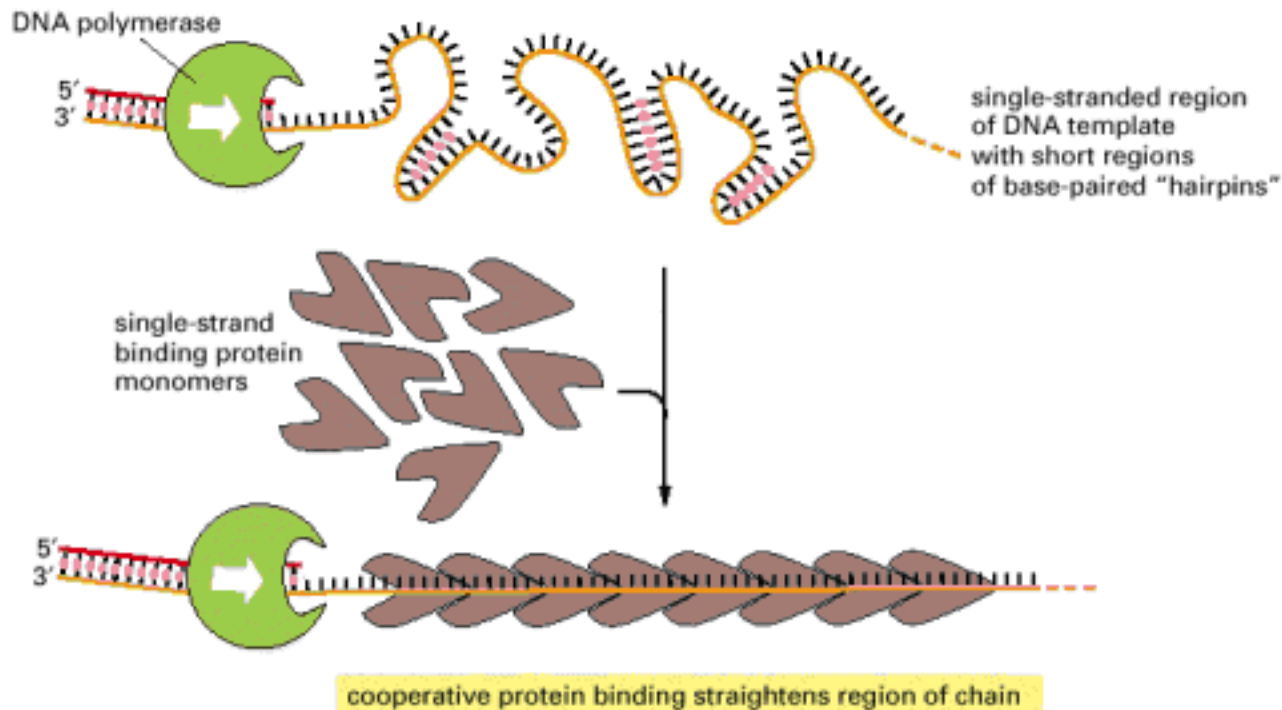
Forquilha de Replicação

Desenovelamento da molécula de DNA

- Ao mesmo tempo em que as helicases desenrolam o DNA, é gerada uma grande tensão na molécula logo à frente da forquilha, tornando a dupla fita mais “apertada”;
- Essa tensão topológica pode ser aliviada a partir da ação das topoisomerasas;
- Podem aliviar a tensão pela rápida quebra e religação de fitas simples e duplas do DNA.

Proteínas SSB ou RPA

- Logo após a passagem da helicase, proteínas desestabilizadoras de hélice se ligam às fitas simples de DNA, sem encobrir as bases nitrogenadas;
- Evita a formação de pequenos grampos de DNA, que poderiam impedir o avanço da DNA polimerase.



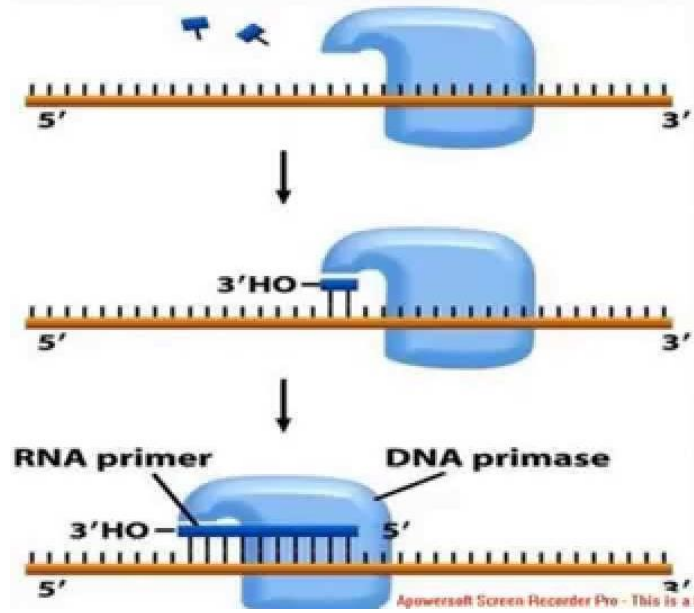
Início da replicação

Mas, como o processo começa a partir de uma fita simples?

- Uma vez estabelecida a forquilha de replicação, iniciadores de RNA são adicionados tanto na fita líder quanto na fita descontínua pela enzima primase;
- Em procariotos, a primase é sempre uma enzima livre, que atua de maneira independente da DNA polimerase. Em eucariotos, a primase atua sempre em conjunto com a DNA polimerase α .
- A DNA polimerase α /primase é composta por 4 subunidades e apresenta dois sítios ativos principais: um de ligação ao DNA e outro de adição de ribonucleotídeos.

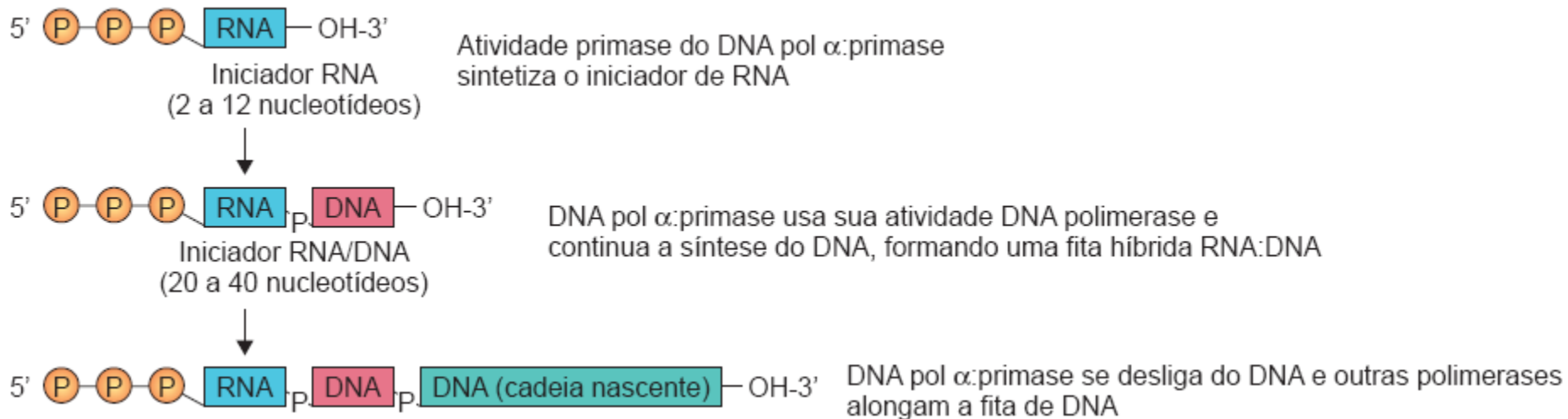
Início da replicação

- A primase se liga ao DNA na forquilha de replicação e desliza sobre ele até encontra o sítio de reconhecimento para confecção dos iniciadores de RNA;
- Não se sabe ainda quais são essas sequencias e como são reconhecidas. Regiões ricas em pirimidinas parecem estar associadas à formação de iniciadores;
- Uma vez reconhecida a sequência, iniciadores são adicionados (2 a 14 ribonucleotídeos).



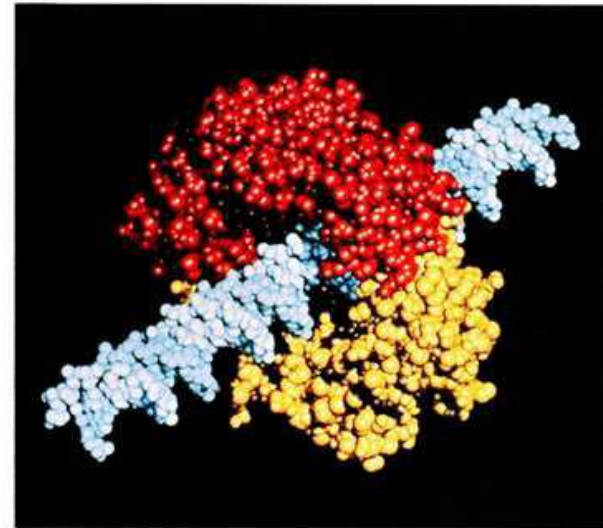
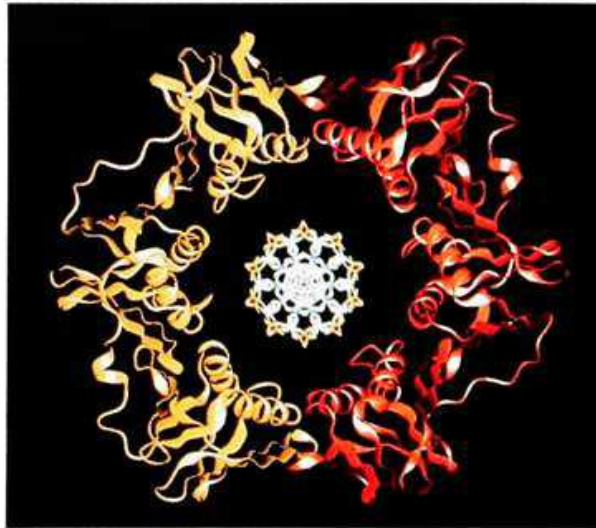
Início da replicação

- Em eucariotos, existe um passo adicional. A primase adiciona os ribonucleotídeos e a DNA polimerase α continua o alongamento da fita, adicionando mais alguns nucleotídeos e formando um iniciador híbrido;
- A fita híbrida tem entre 20-40 nucleotídeos. Somente após a adição dessa segunda parte da fita é que as DNA polimerase δ e ϵ podem se ligar à dupla fita e iniciar a duplicação.



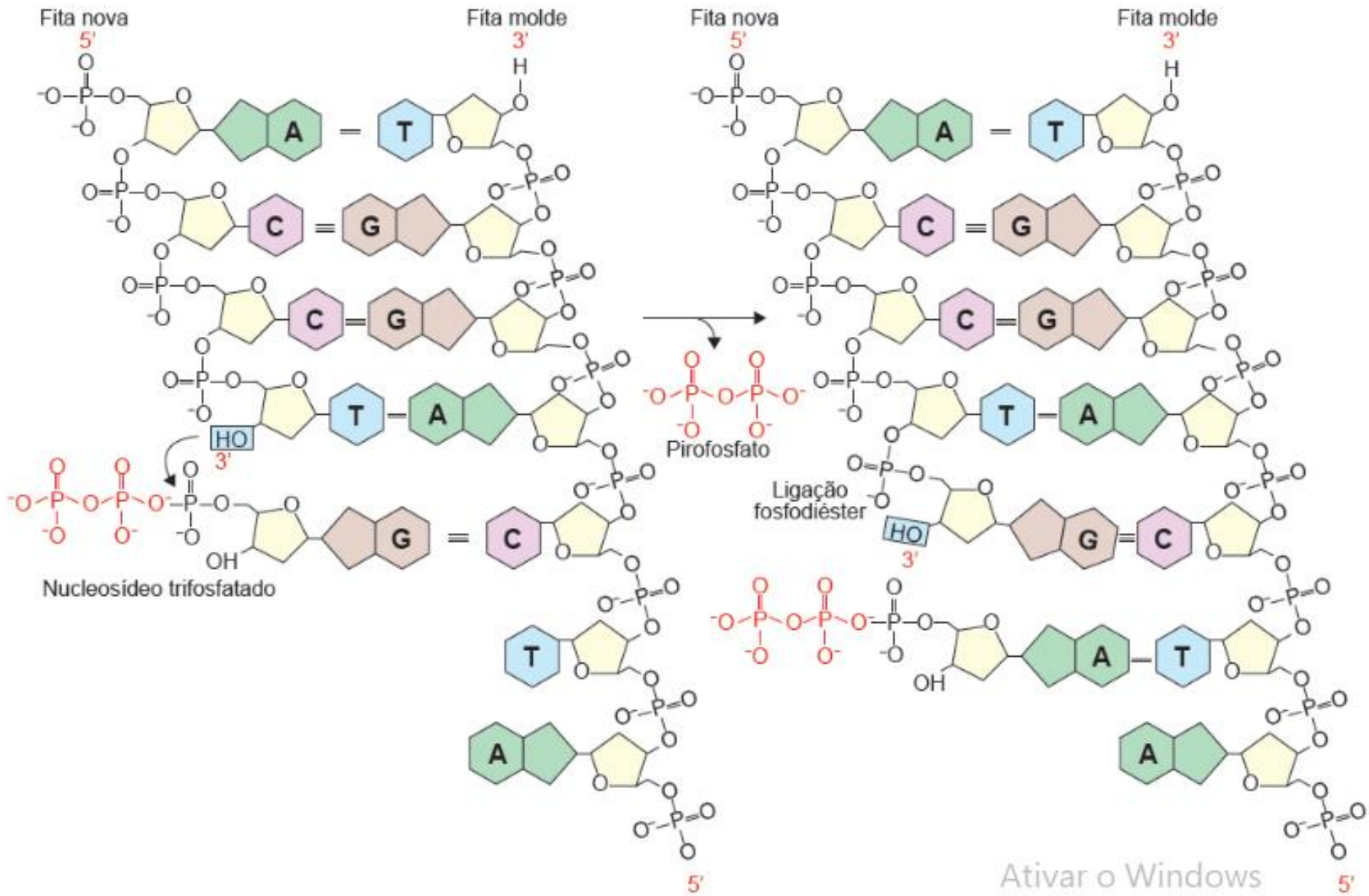
Elongamento da cadeia de DNA

- Uma vez que as extremidades 3'-OH estejam livres, a DNA polimerase pode se ligar e iniciar a duplicação do fragmento;
- Por si só, DNA polimerase sintetiza somente pequenos fragmentos de DNA, antes de se dissociar, permitindo que ela já se ligue ao próximo fragmento de Okasaki.
- Duplicação de longos fragmentos depende da associação da DNA polimerase com uma cinta reguladora deslizante. Só dissocia a polimerase do DNA quando encontram uma dupla fita.



Elongamento da cadeia de DNA

- A síntese de DNA acontece pela ação das enzimas DNA polimerases, que são capazes de estabelecer a ligação covalente entre dois nucleotídeos (ligação fosfodiéster);
- Ligação do grupo hidroxila do carbono 3' (3'OH) com o grupo fosfato do nucleotídeo seguinte da cadeia a ser anexado;



Elongamento da cadeia de DNA

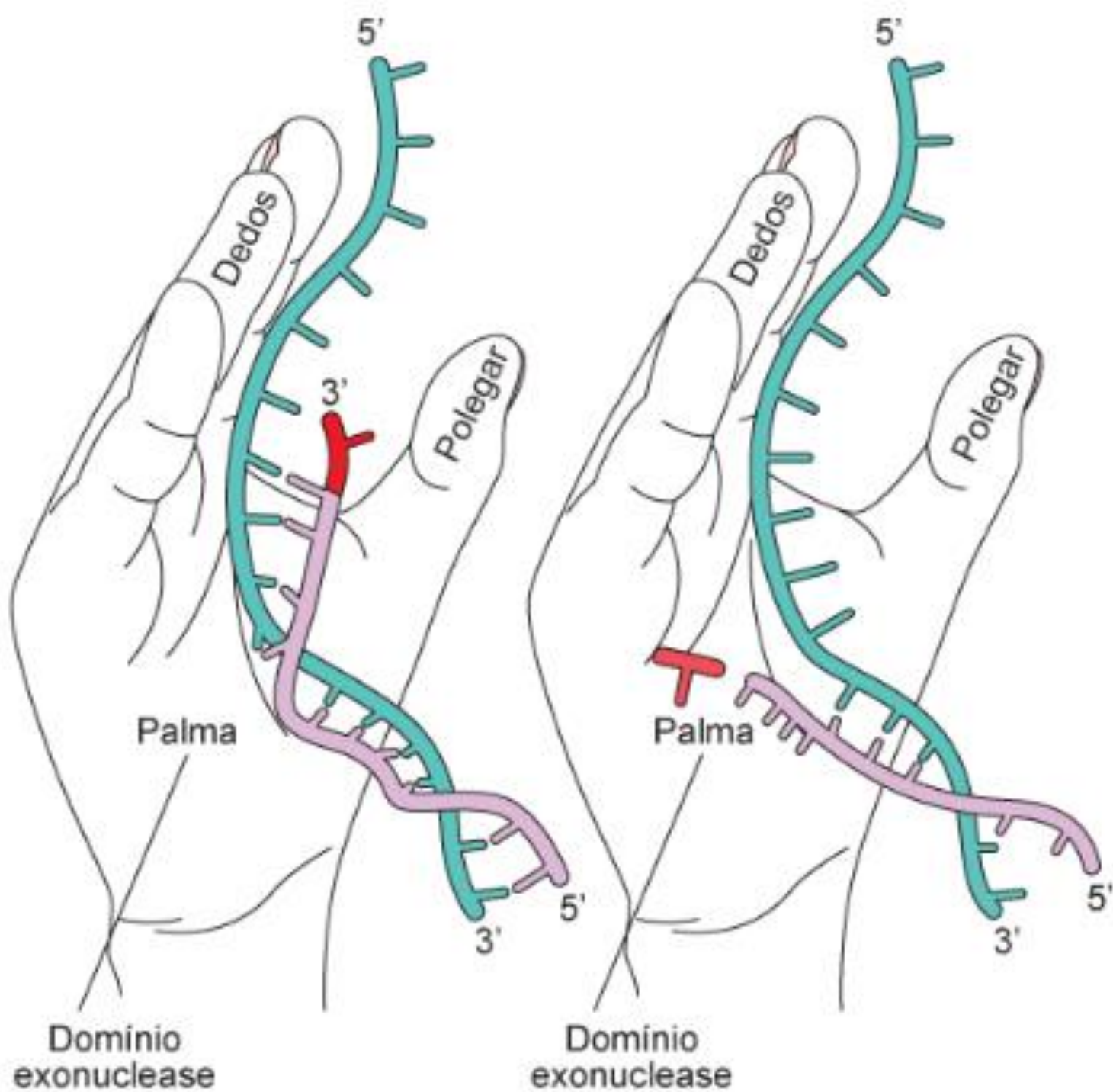
- Até o momento, foram identificadas 14 polimerases em eucariotos e 5 em procariotos.

Tabela 3.1 Características e funções das DNA polimerases de procariotos e eucariotos.

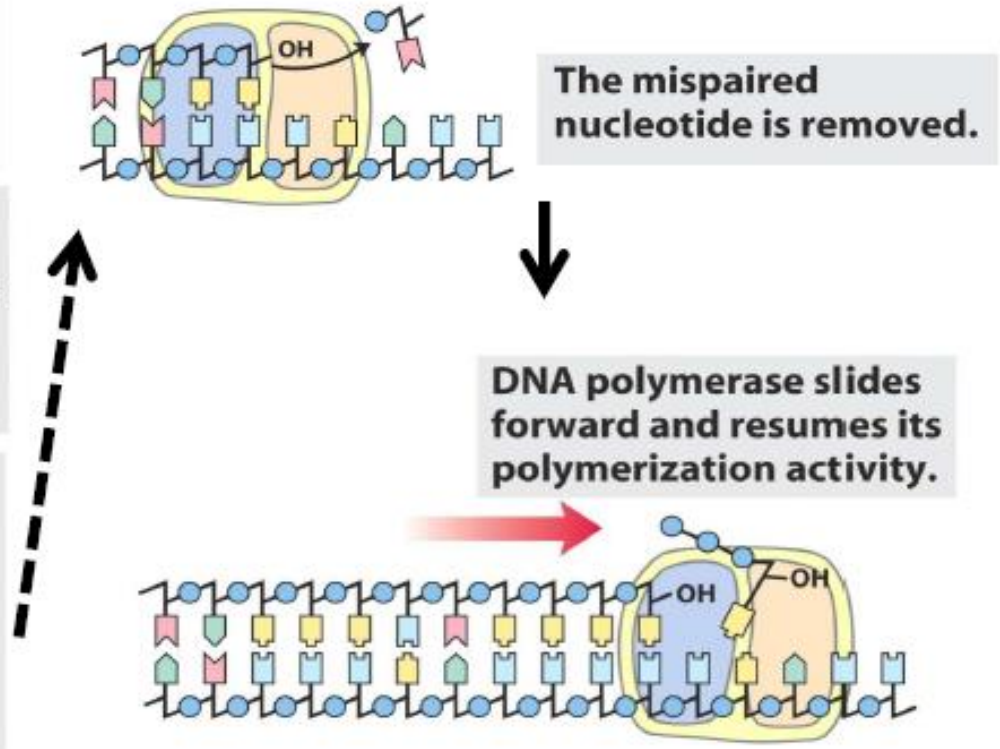
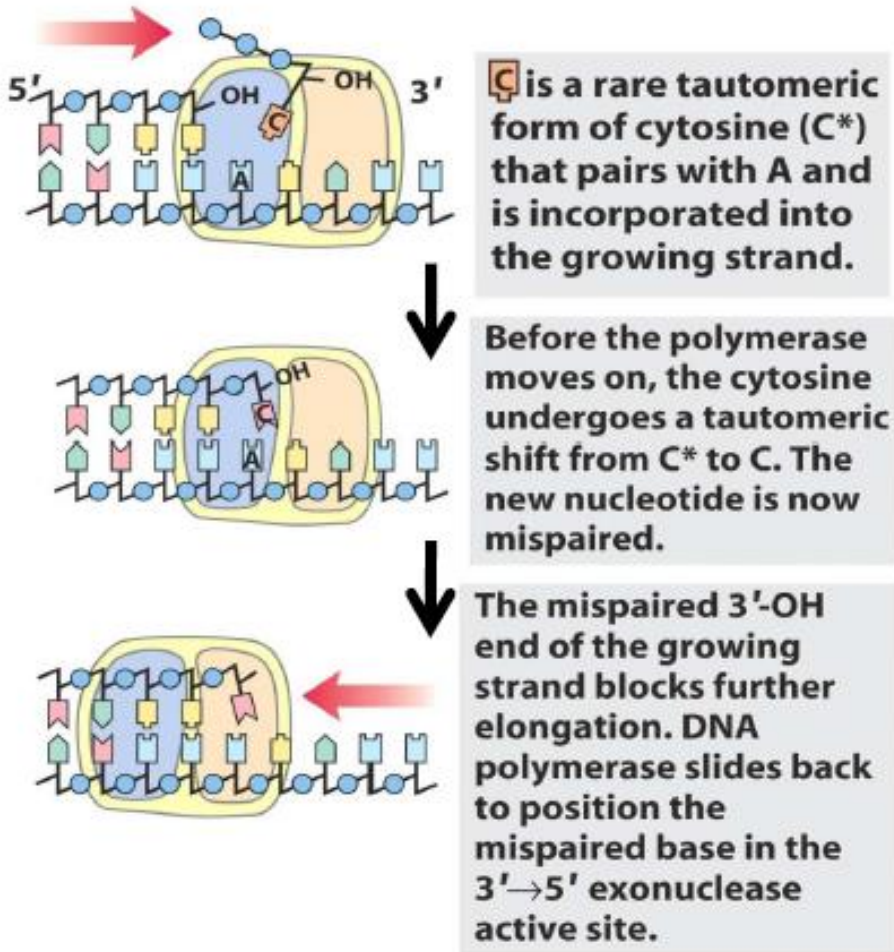
Enzima	Função	Atividade 3'-5' exonuclease	Fidelidade
Procariotos			
Pol I	Reparo de DNA e remoção do RNA iniciador	Sim	Alta
Pol II	Reparo de DNA	Sim	Moderada
Pol III	Replicação	Não	Alta
Pol IV	Reparo de DNA; síntese translesão	Não	?
Pol V	síntese translesão	Não	?
Eucariotos			
Pol α	Síntese de iniciador de RNA/DNA	Não	Média
Pol β	Reparo de DNA	Sim	Baixa
Pol γ	Replicação e reparo de DNA mitocondrial	Sim	Alta
Pol δ	Síntese da fita descontínua do DNA e reparo de DNA	Sim	Alta
Pol ϵ	Síntese da fita contínua e reparo de DNA	Sim	Alta
Pol ζ	Síntese translesão	Sim	?
Pol η	Síntese translesão	Não	?
Pol θ	Reparo de DNA	Sim	Baixa
Pol ι	Síntese translesão e hipermutação somática	Não	?
Pol κ	Síntese translesão	Não	?
Pol λ	Reparo de DNA	Não	?
Pol μ	Hipermutação somática	Não	?
Rev1 p	Síntese translesão	Sim	?

Elongamento da cadeia de DNA

- Estruturalmente, DNA polimerase são encaixadas no modelo “palma da mão”, onde o DNA se liga na palma e os dedos apresentam atividade catalítica para realização da ligação fosfodiéster;
- Interações do DNA com a palma da mão sempre posicionam o DNA de maneira correta, expondo os sítios de ligação para novos nucleotídeos;
- Palma também apresenta atividade exonuclease, para remoção de bases mal pareadas.

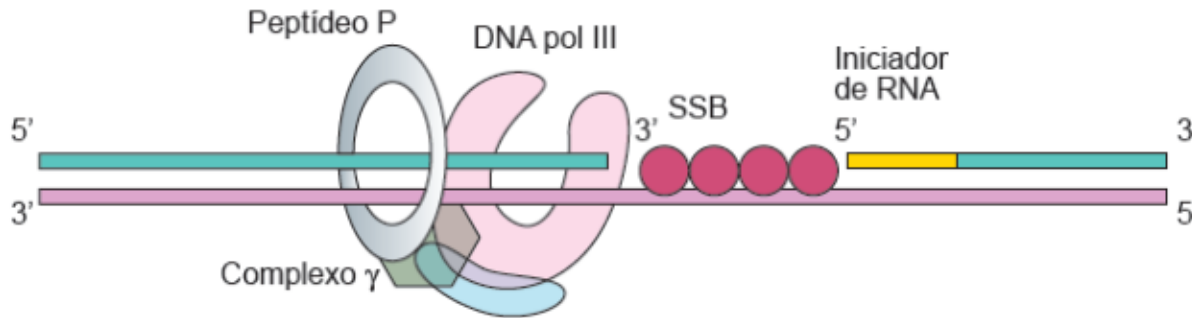


Revisão de erros

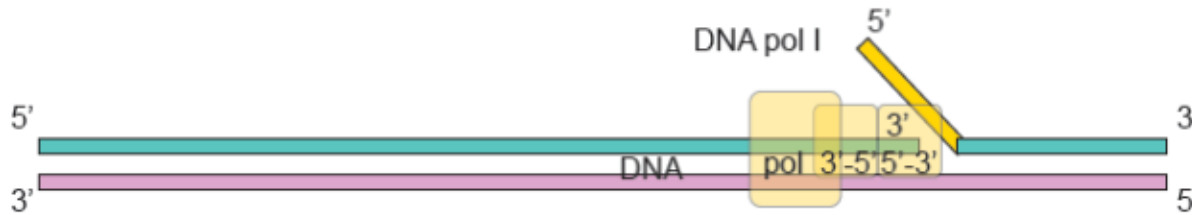


Remoção dos iniciadores de RNA e junção dos fragmentos

Procaríotos



A DNA polimerase III juntamente com a braçadeira (peptídeo P) se associa ao DNA com a ajuda dos adaptadores de braçadeira (complexo γ) e replica o DNA até o próximo fragmento de Okazaki

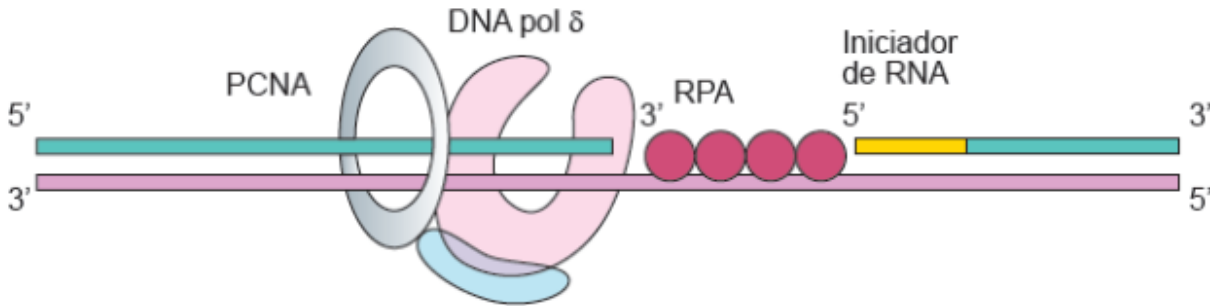


A DNA pol III é substituída pela DNA pol I que possui atividade 3'-5' exonuclease e desloca o iniciador de RNA. O iniciador de RNA deslocado é posteriormente clivado pela atividade 3'-5' exonucleásica da DNA pol I deixando uma extremidade 3' OH e formando um "nick"

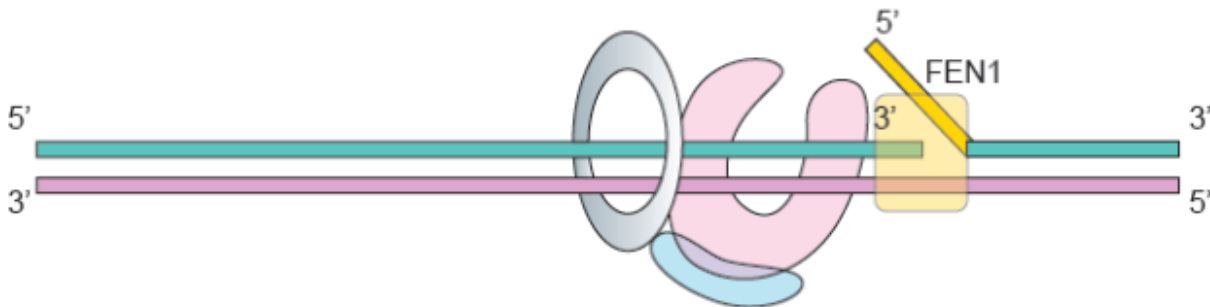
A

Remoção dos iniciadores de RNA e junção dos fragmentos

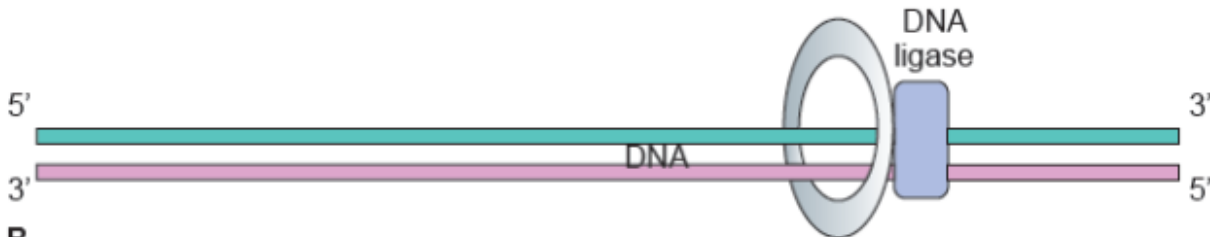
Eucariotos



A DNA pol δ , responsável pela síntese de DNA na fita descontínua, replica o DNA até o próximo fragmento de Okazaki.



A DNA pol δ possui atividade 3'-5' exonuclease e desloca o iniciador de RNA. A enzima FEN1, que tem atividade endonuclease, é recrutada para esse sítio e cliva o iniciador de RNA formando um "nick".



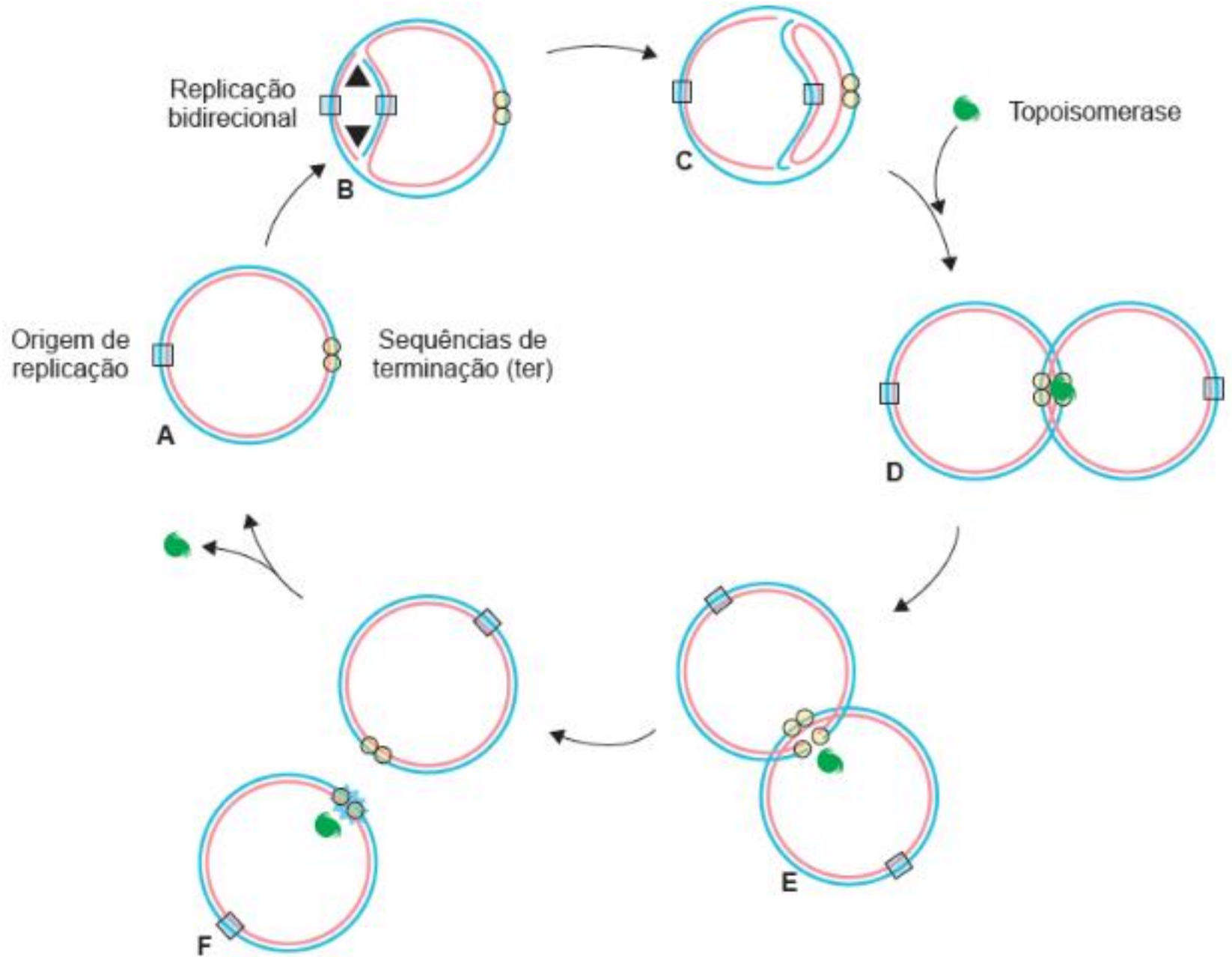
A extremidade 3'OH é posteriormente ligada ao 5' fosfato de nucleotídeo adjacente pela DNA ligase.

Ativar o Windows
Acesse Configurações para ativar o Windows.

Fim da replicação em procariotos

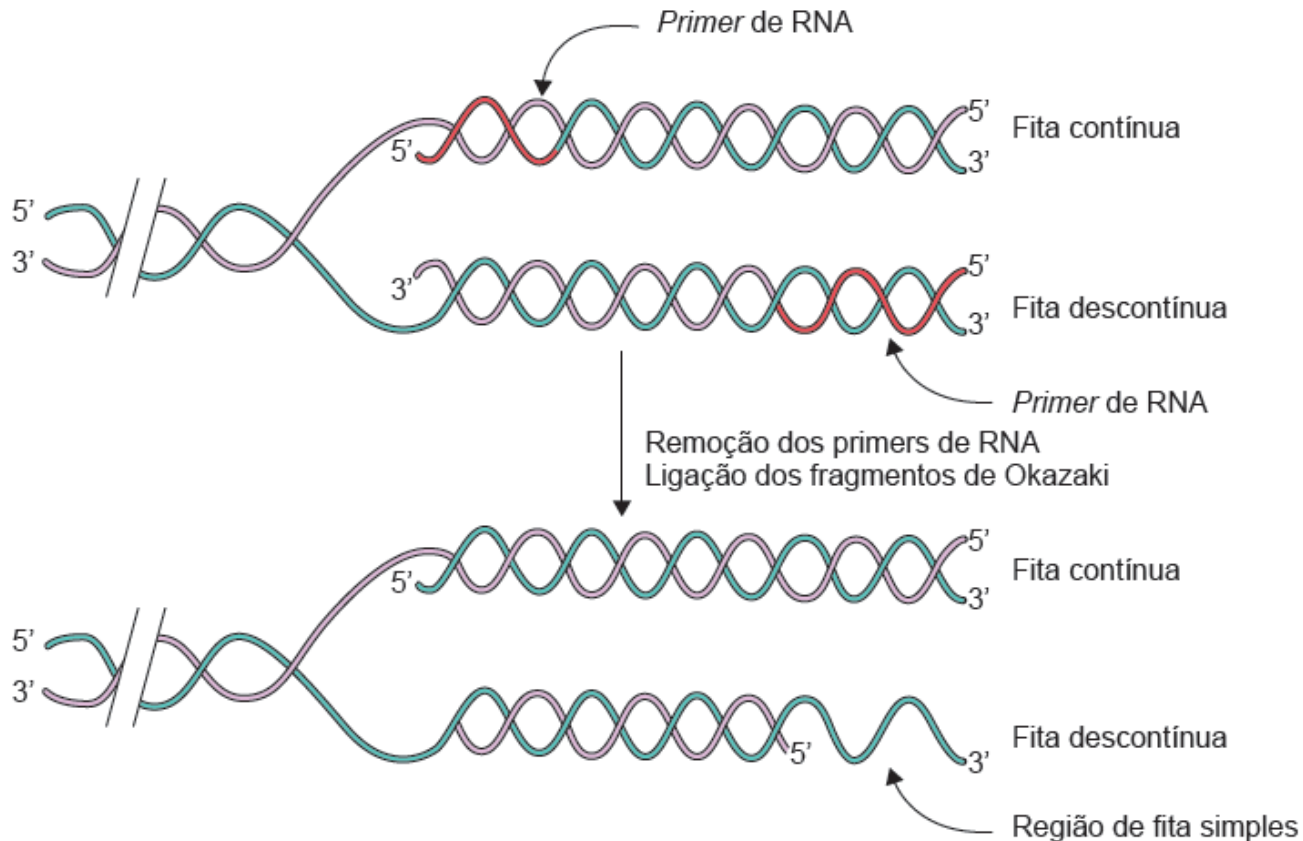
- Em bactérias, uma única origem de replicação é encontrada, de modo que somente uma forquilha será formada, com duas extremidades se deslocando em sentidos contrários;
- Presença de sítios de terminação. “Prendem a DNA polimerase até a chegada da outra extremidade da forquilha;
- Após o encontro das duas forquilhas, as duas fitas continuam entrelaçadas. Ação da topoisomerase é necessária para liberação das duas moléculas.

Fim da replicação em procariotos



Fim da replicação em eucariotos

- Até o momento, todas as polimerases encontradas realizam a síntese na direção 5'-3' a partir de um iniciador de RNA ou DNA;
- Entretanto, quando o iniciador do final do cromossomo é removido, essa parte fica sem replicação;

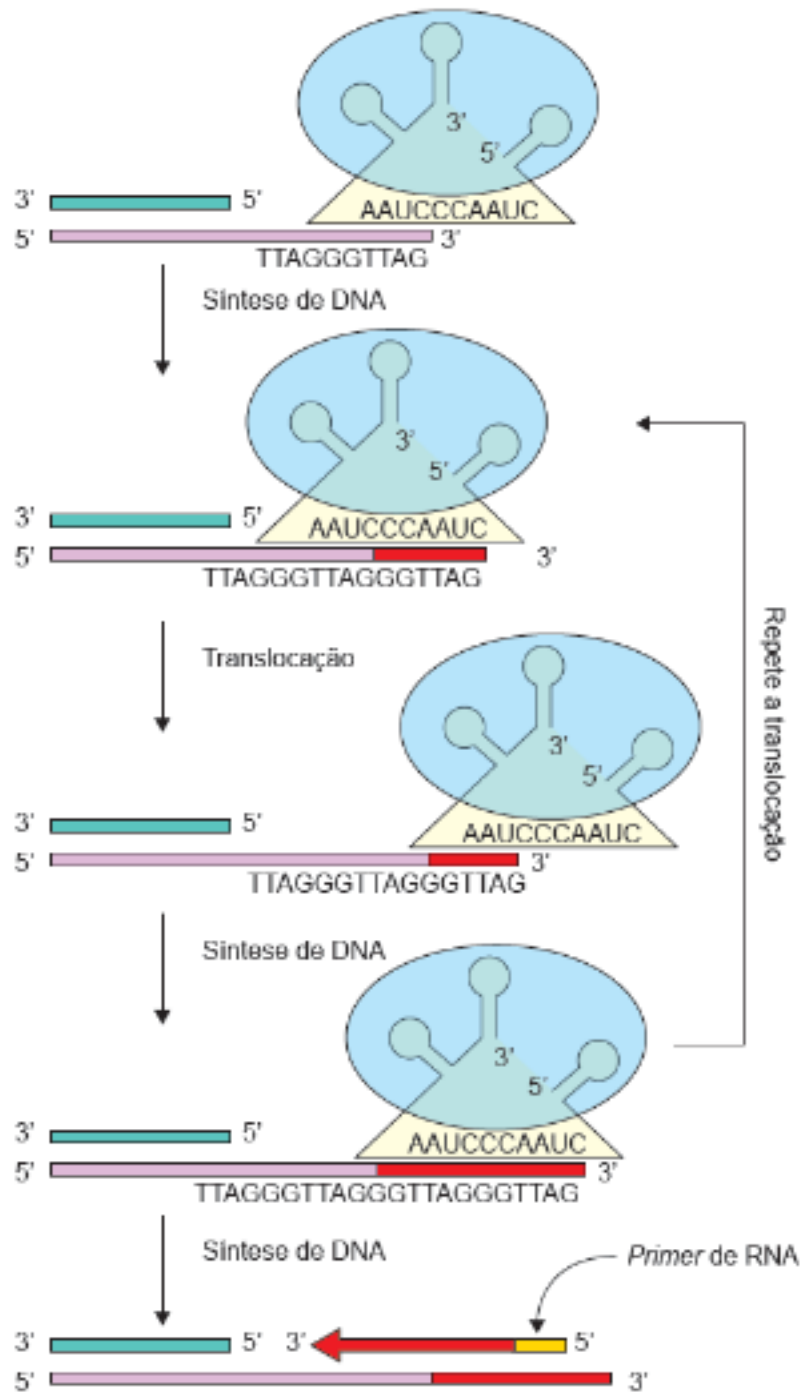


Fim da replicação em eucariotos

- Maioria das células eucariotas utiliza a telomerase como mecanismo de prevenção do encurtamento dos telômeros;
- Telômeros são regiões de DNA altamente repetitivas (TTAGGG em humanos) que formam as extremidades dos cromossomos;
- “Selam” a extremidade do cromossomo e previnem a ligação de um cromossomo em outro. Promovem a estabilidade do cromossomo;
- Possuem origens de replicação especializadas e utilizam maquinaria própria (telomerase);

Fim da replicação em eucariotos

- A telomerase é uma DNA polimerase modificada que não necessita de um molde externo para alongar a extremidade 3'-OH da fita de DNA;
- Utiliza seu próprio molde de RNA interno, que se anela ao final da extremidade do telômero e realiza transcrição reversa (RNA-DNA);
- Aumenta artificialmente o tamanho da fita simples, de modo que ultrapasse o tamanho do fragmento original;
- Maquinaria normal de replicação duplica o restante da fita simples.
- Controle do tamanho do telômero se dá por proteínas associadas.





Dúvidas???