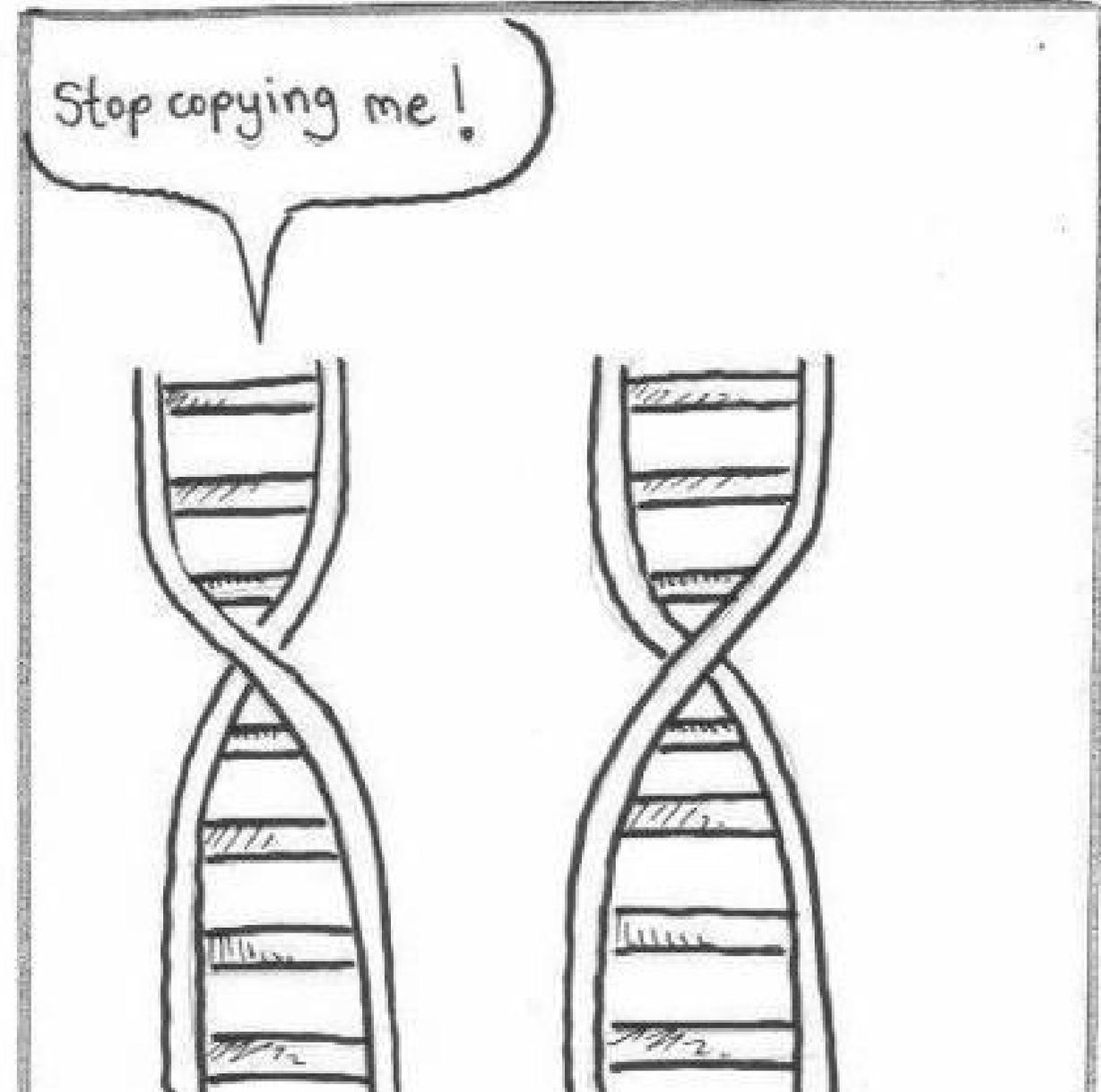


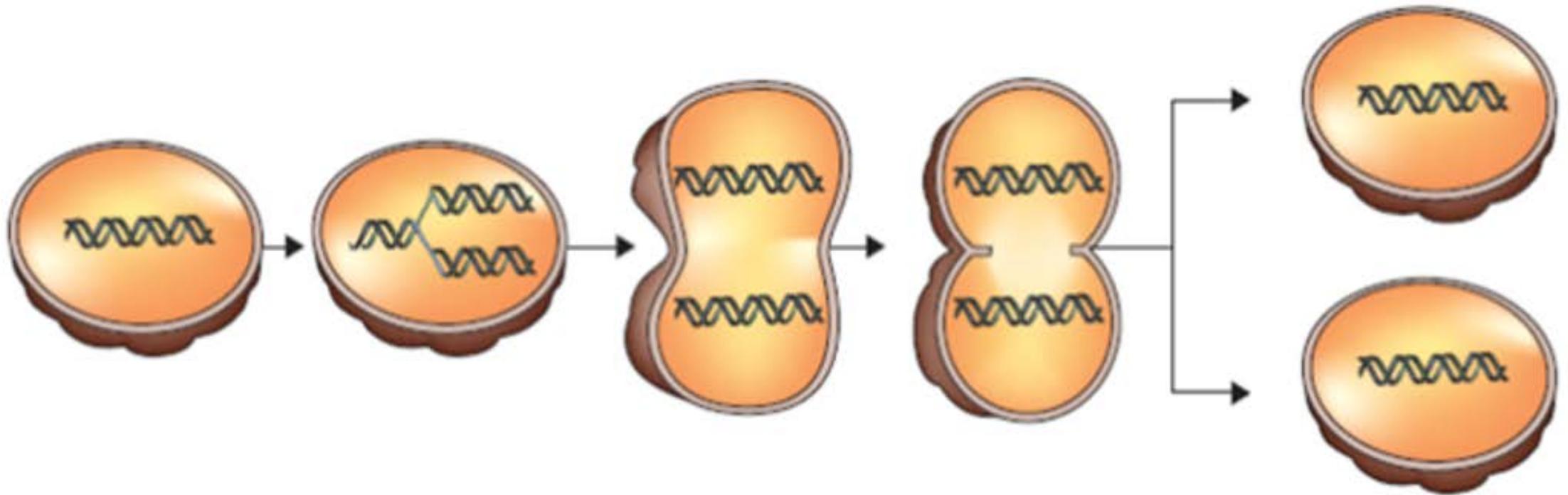
AULA\_14

REPLICAÇÃO DNA



# REPLICAÇÃO DNA

- A Reprodução (divisão) celular é um dos pilares da vida;

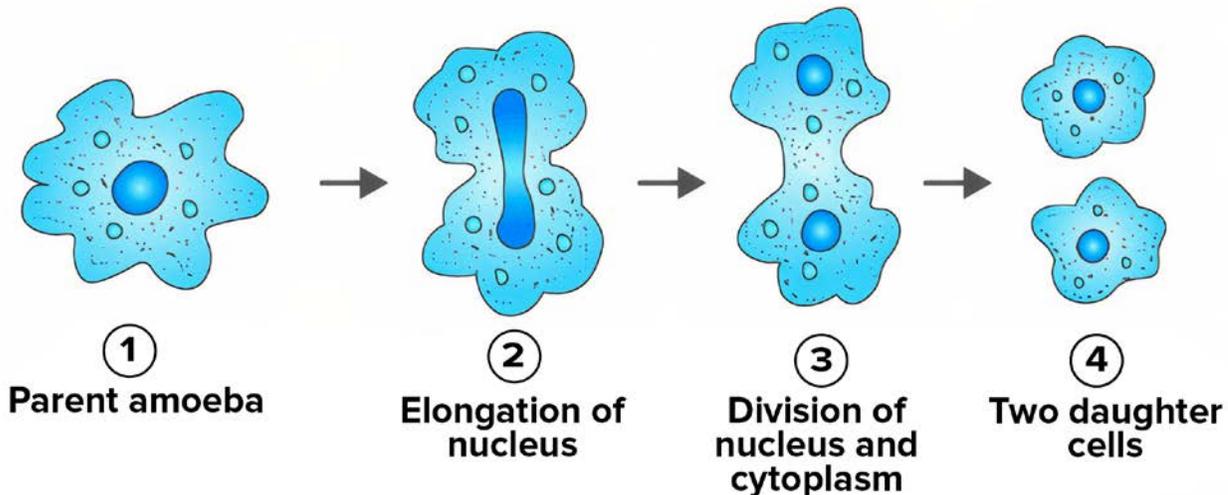


- No processo de divisão celular, uma célula origina duas células iguais a ela própria;
- O que inclui transmitir a mesma informação genética que possui para as duas células filhas.

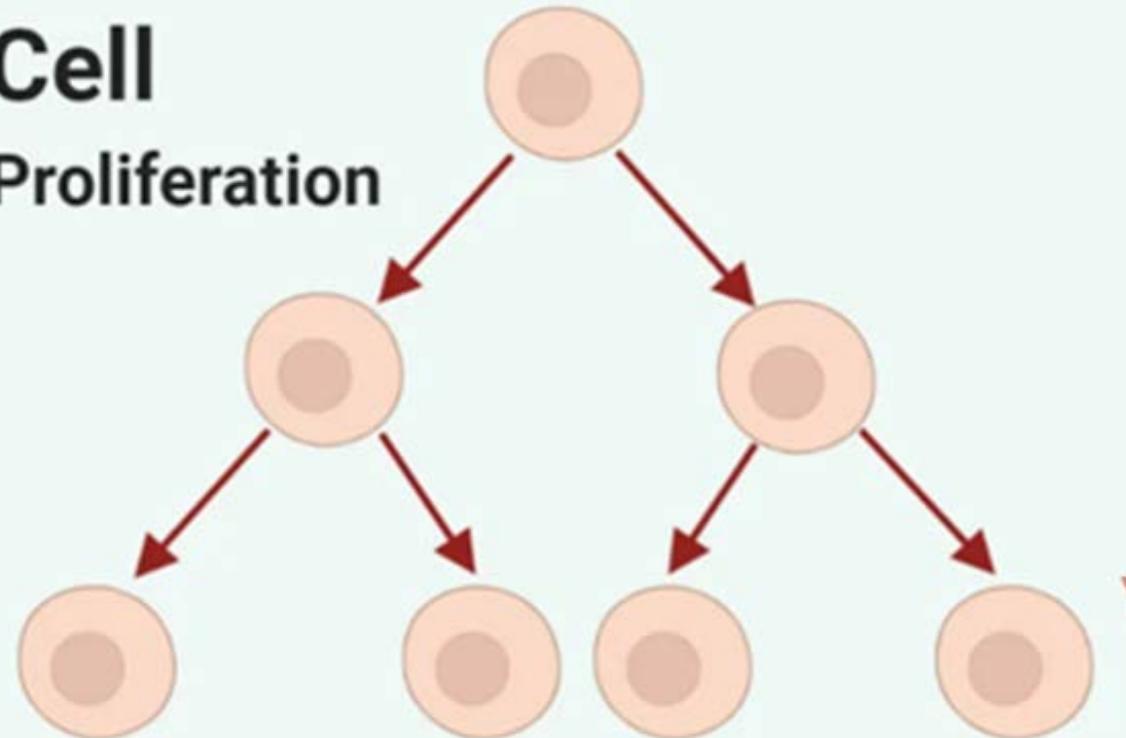
# REPLICAÇÃO DNA

- A divisão celular;
- Pode ser um processo de reprodução assexuada em espécies unicelulares;
- Ou um processo de proliferação celular em um organismo multicelular.

## BINARY FISSION IN AMOEBA



## Cell Proliferation



# REPLICAÇÃO DNA

- Duas implicações:
- Informação genética tem que ser duplicada antes da divisão celular;
- A informação genética precisa ser transmitida de forma precisa, sem erros;

- **PROCESSO RESPONSÁVEL:**

REPLICAÇÃO/ DUPLICAÇÃO/ SÍNTESE DE DNA

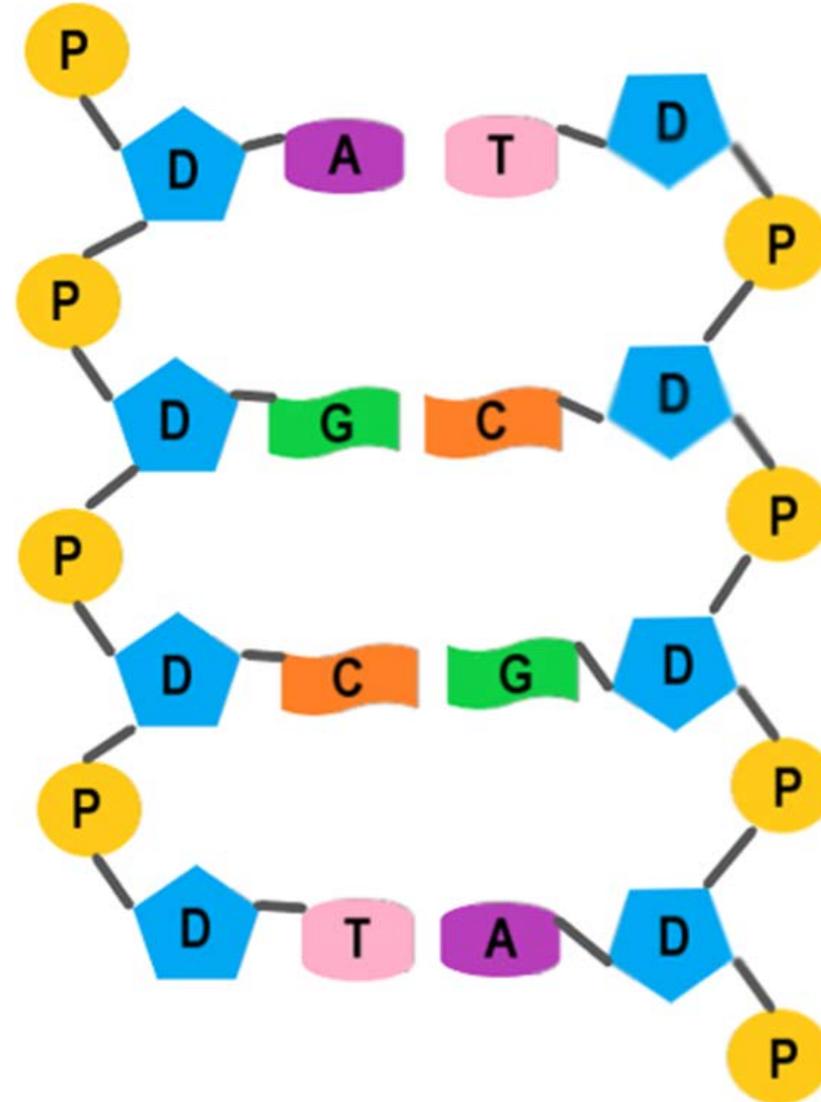
- NÃO É UM PROCESSO TRIVIAL...

# REPLICAÇÃO DNA

- Exemplo, células humanas:
- + de 3,2 bilhões de pbs ( $3,2 \times 10^9$  pbs) precisam ser duplicados;
- São incorporados 50 nucleotídeos/ segundo;
- Processo leva em torno de 8hs;
- Bactérias (*E. coli*):
- 4,6 milhões de pbs ( $4,6 \times 10^6$  pbs)/ 30 min;
- 1000 nucleotídeos/ segundo;
- Mas, não possuem nucleossomos...

# REPLICAÇÃO DNA

- A complementaridade entre as bases nitrogenadas permitiu visualizar um modelo de duplicação;



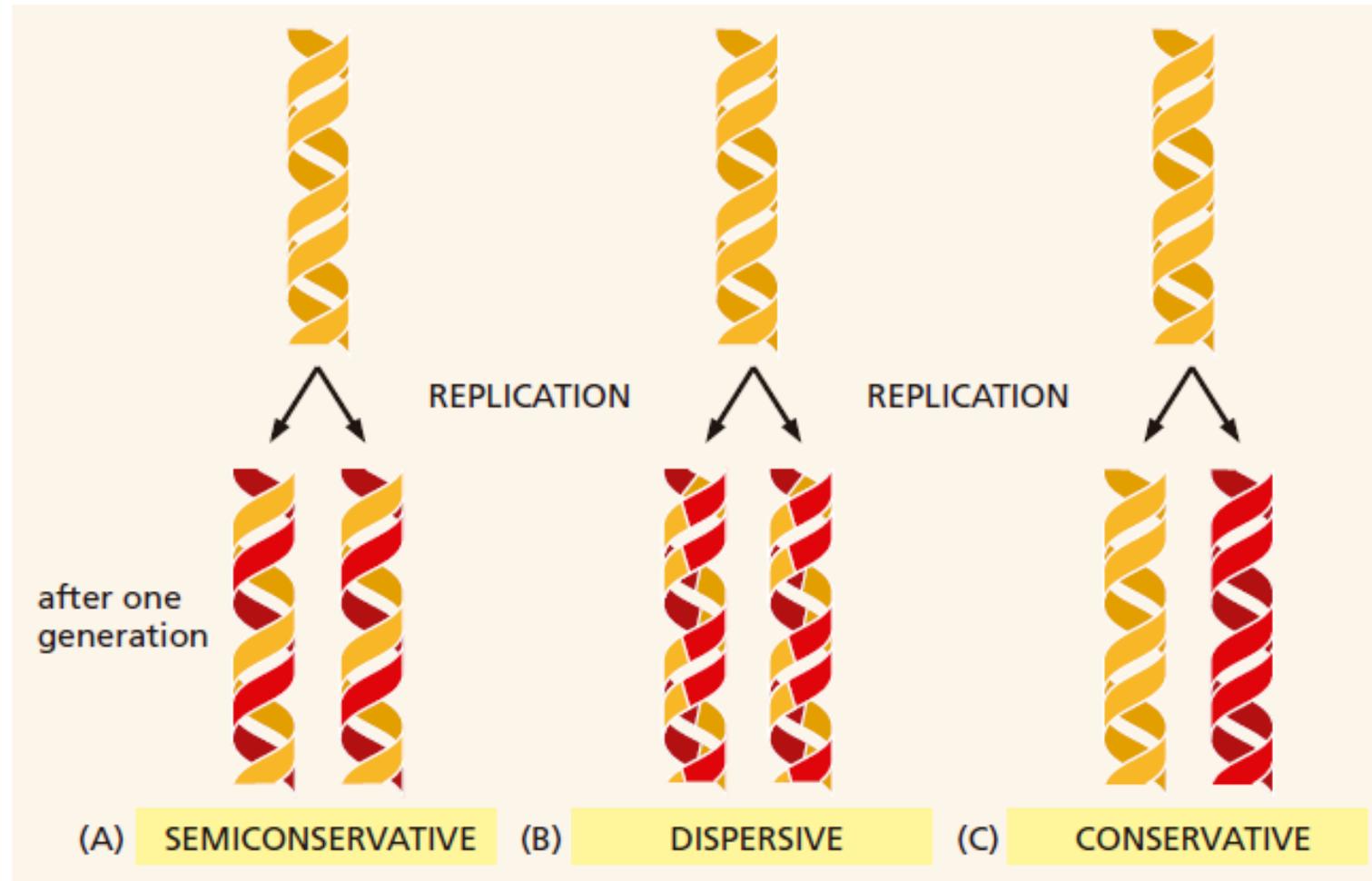
# REPLICAÇÃO DNA

- Onde cada cadeia original da molécula pudesse ser um molde para a síntese de uma cadeia complementar;
- Resultando na geração de duas novas moléculas de DNA.



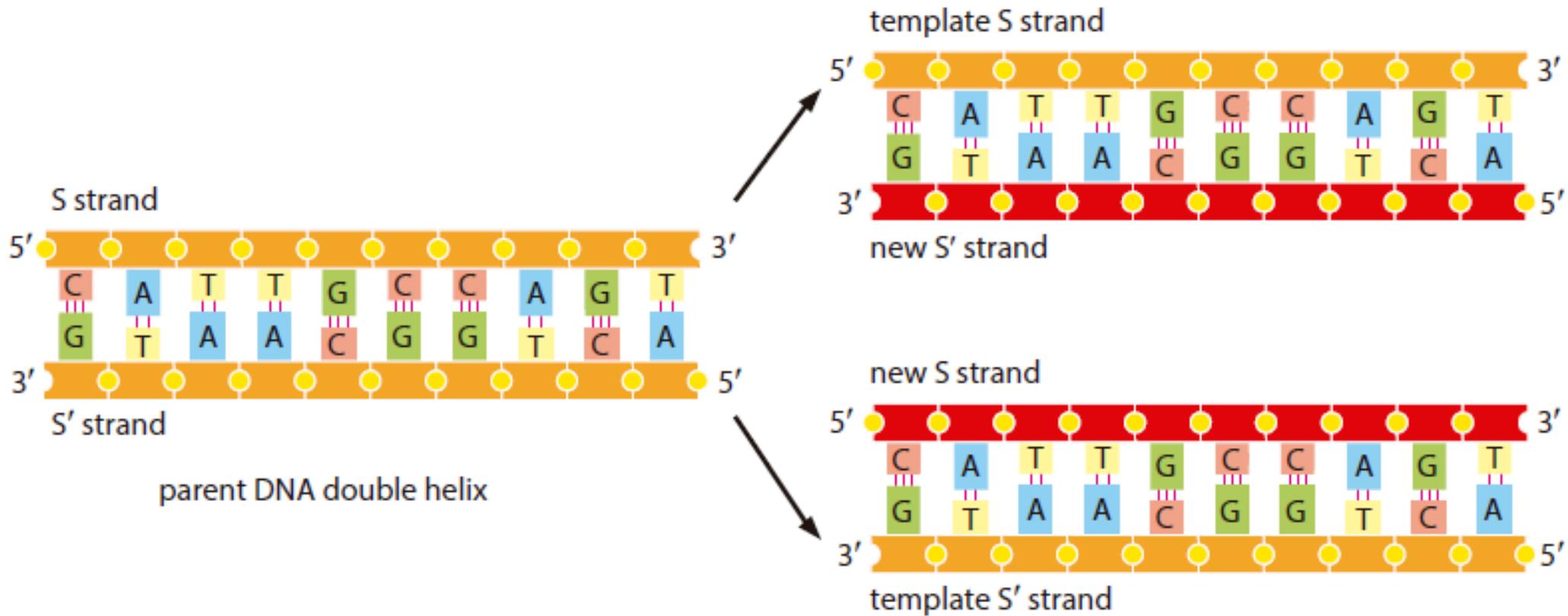
# REPLICAÇÃO DNA

- 3 hipóteses para explicar como o pareamento complementar poderia gerar uma nova molécula de DNA.



# REPLICAÇÃO DNA

- Duplicação do DNA: **semiconservativa**

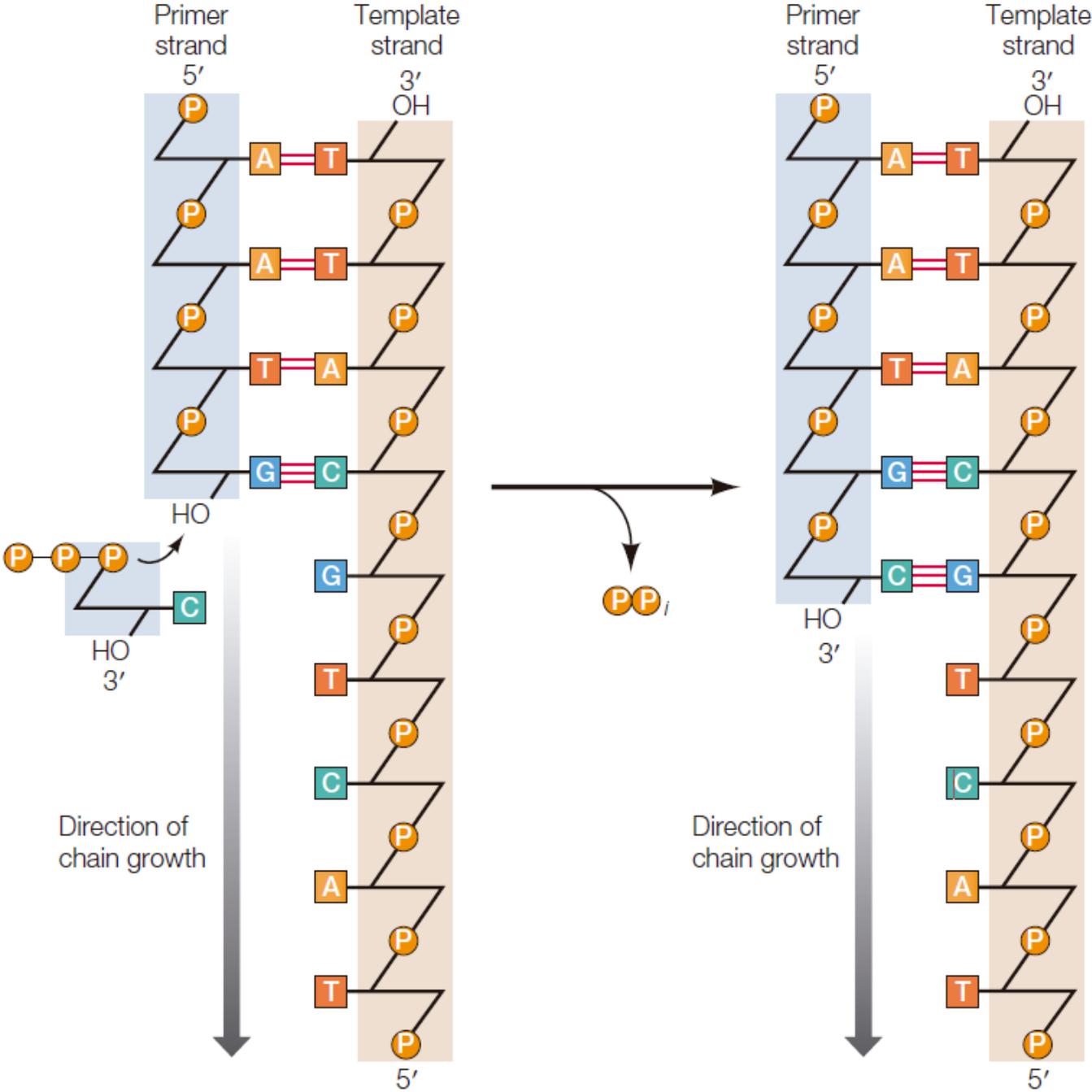


Experimentos de Meselson-Stahl, 1957

# MECANISMO de REPLICAÇÃO



# REPLICAÇÃO DNA

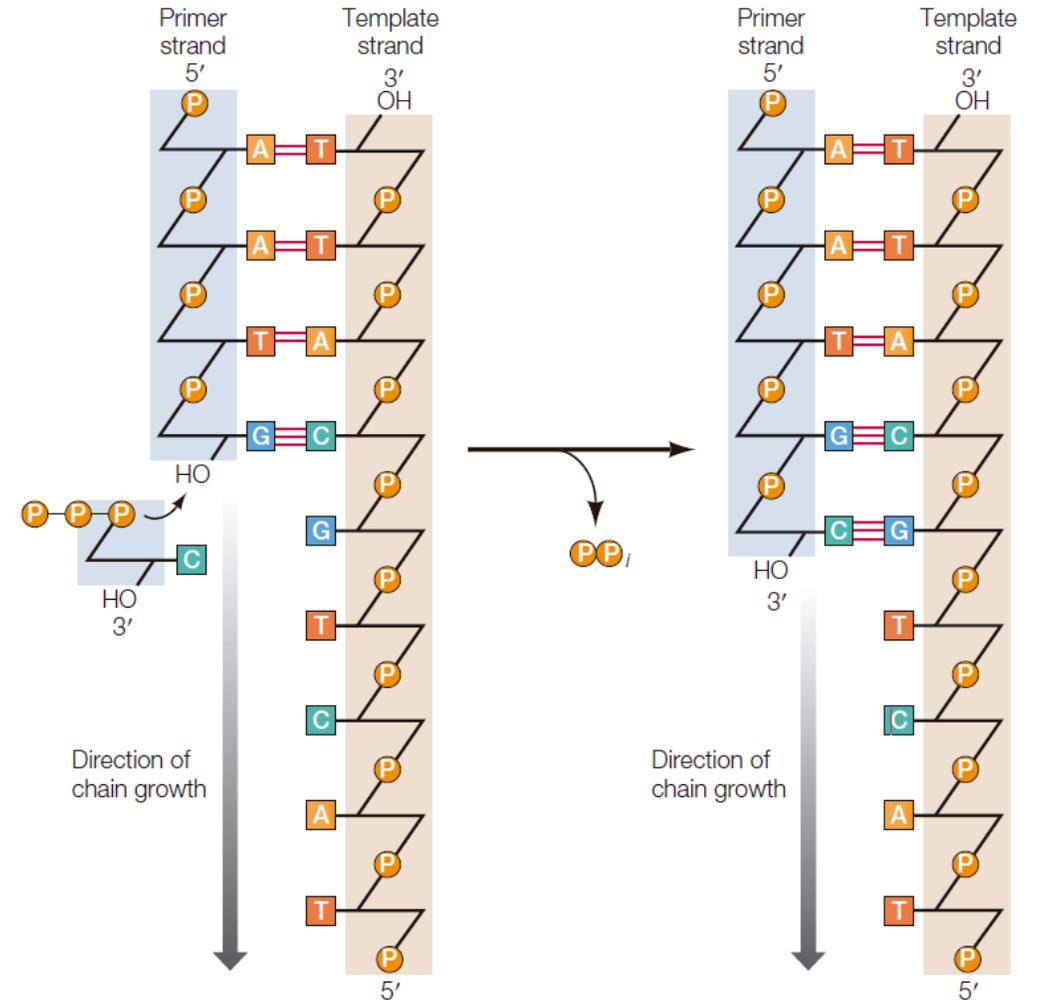


# REPLICAÇÃO DNA

• A REPLICAÇÃO EM BACTÉRIAS E EM EUKARIOTOS É SEMELHANTE

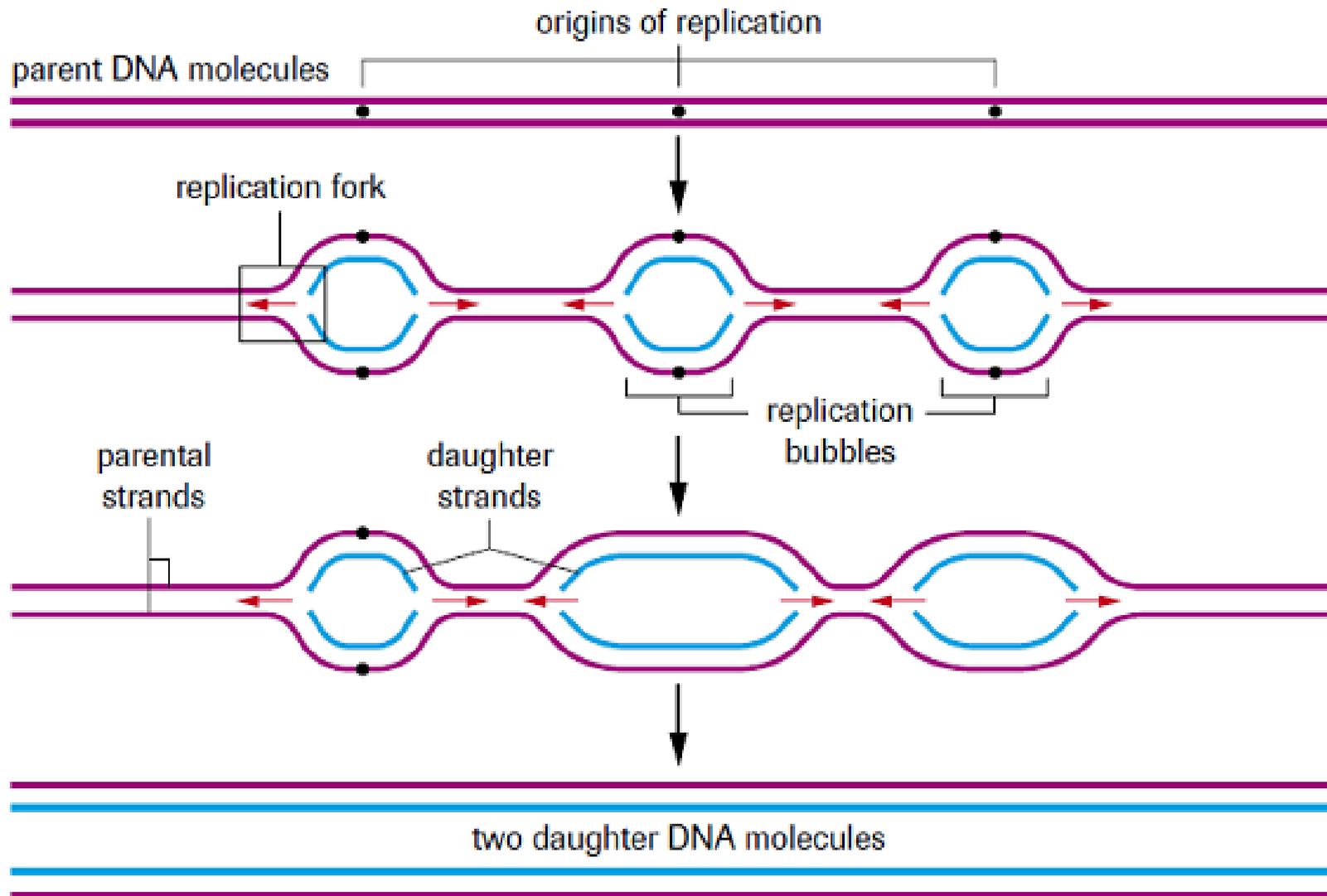
## • LINHAS GERAIS:

- Rompimento das pontes de hidrogênio;
- Cada cadeia é um molde para DNA polimerase;
- A DNA polimerase incorpora nucleotídeos livres um a um;
- O fosfato da posição 5' do nucleotídeo a ser incorporado;
- Se liga à hidroxila da posição 3' do açúcar do último nucleotídeo da cadeia;





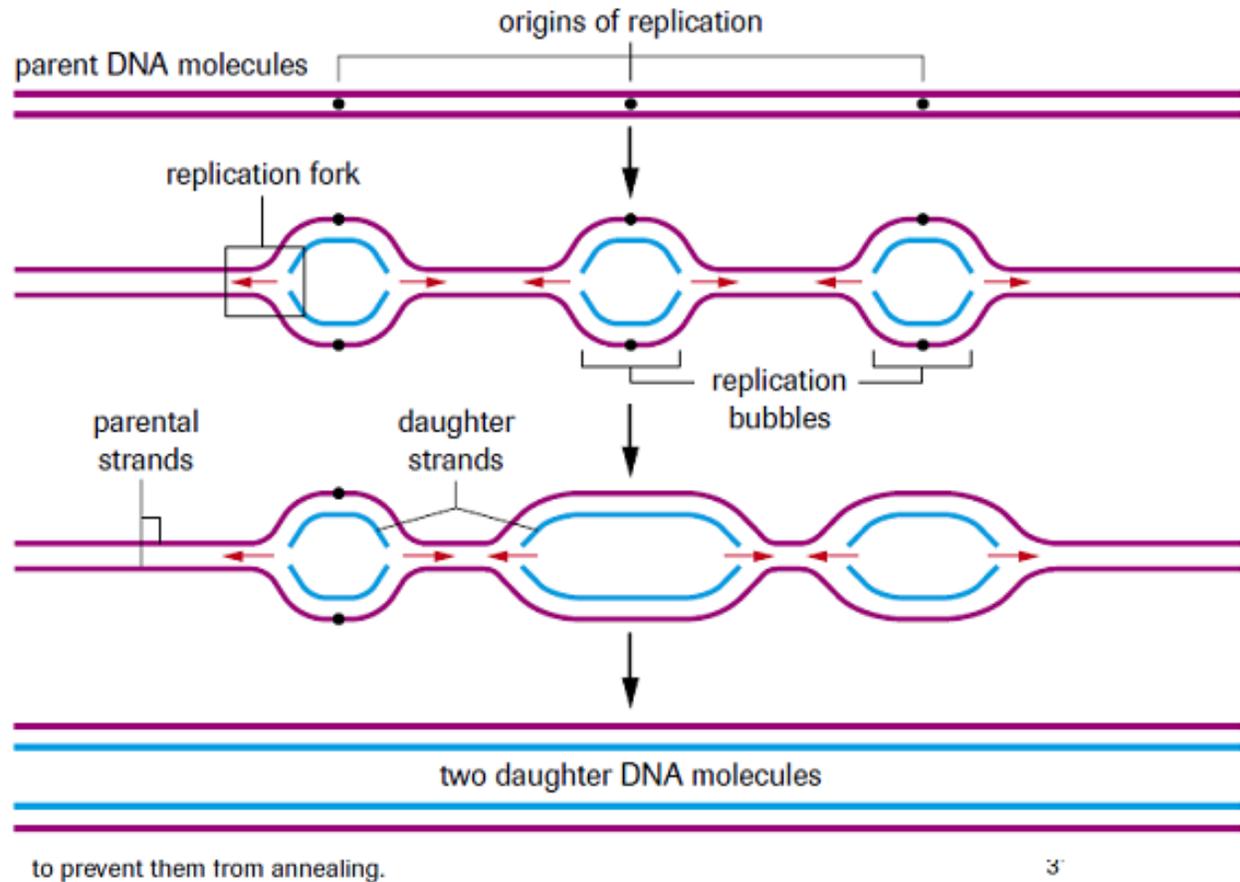
# REPLICAÇÃO DNA EUCARIOTO



to prevent them from annealing.

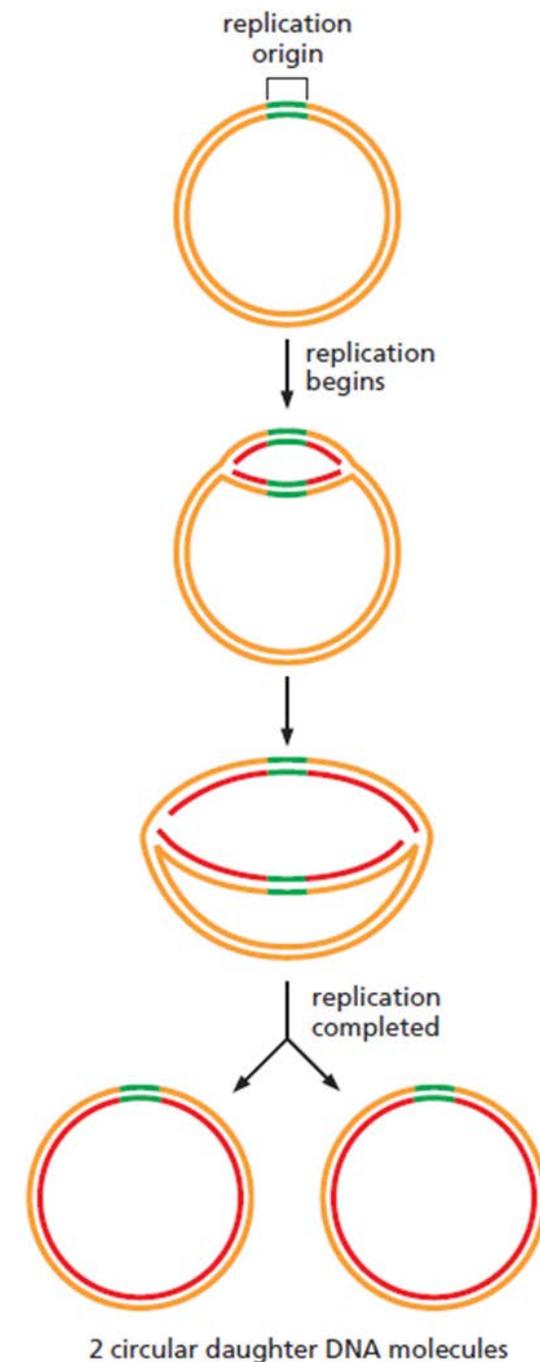
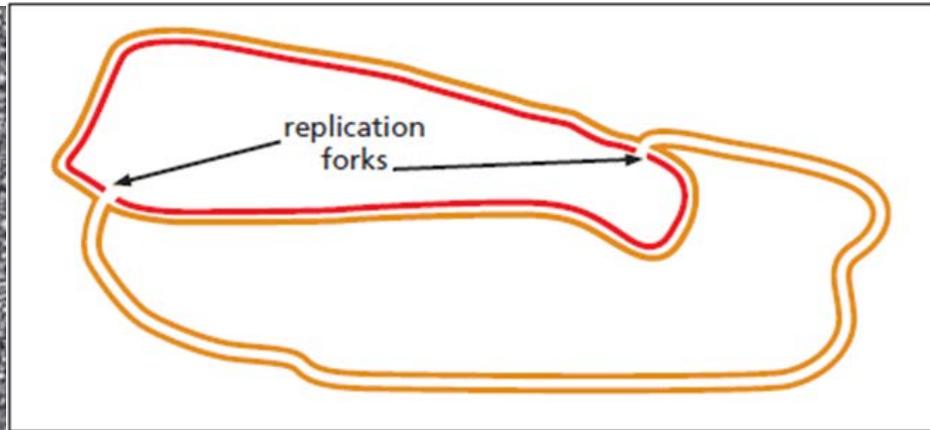
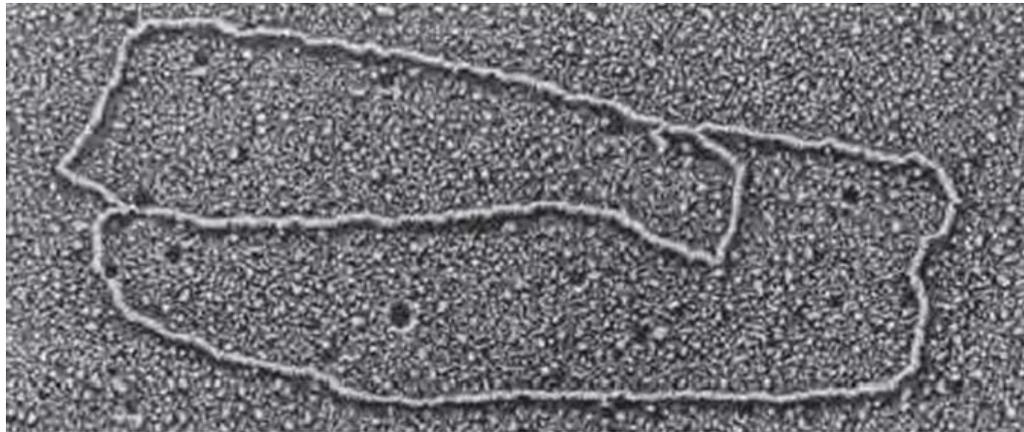
# REPLICAÇÃO DNA

- O início da replicação ocorre em regiões específicas dos cromossomos, nas **origens de replicação**;
- Na replicação bidirecional, a partir de cada origem formam-se duas **forquilhas de replicação**;
- As forquilhas afastam-se uma da outra, progredindo em direções opostas;
- A medida que as forquilhas se afastam, formam **bolhas de replicação**;
- Correspondendo as regiões onde o DNA já foi replicado.



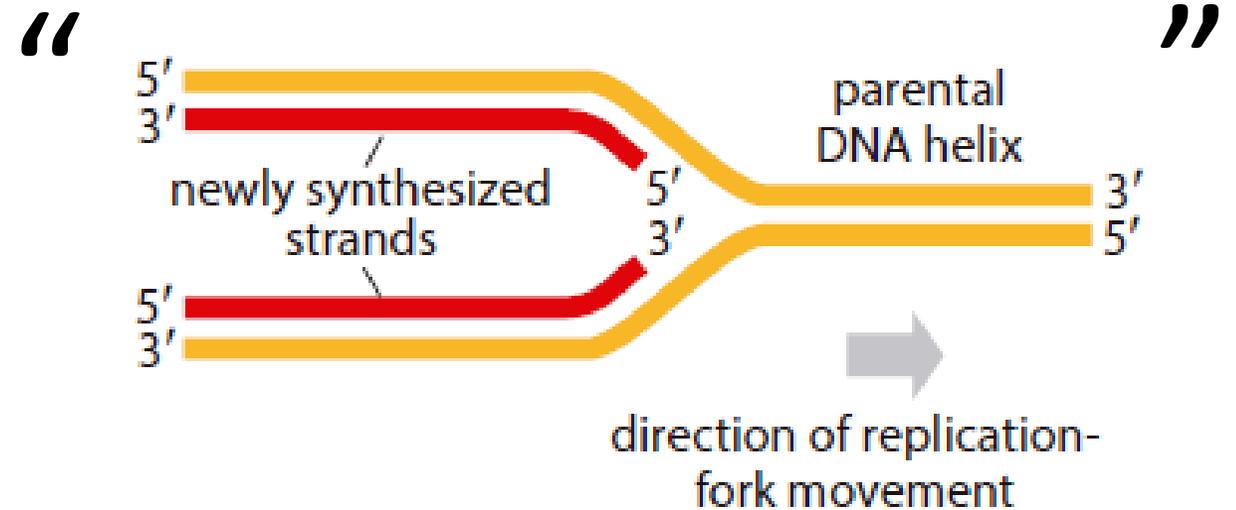
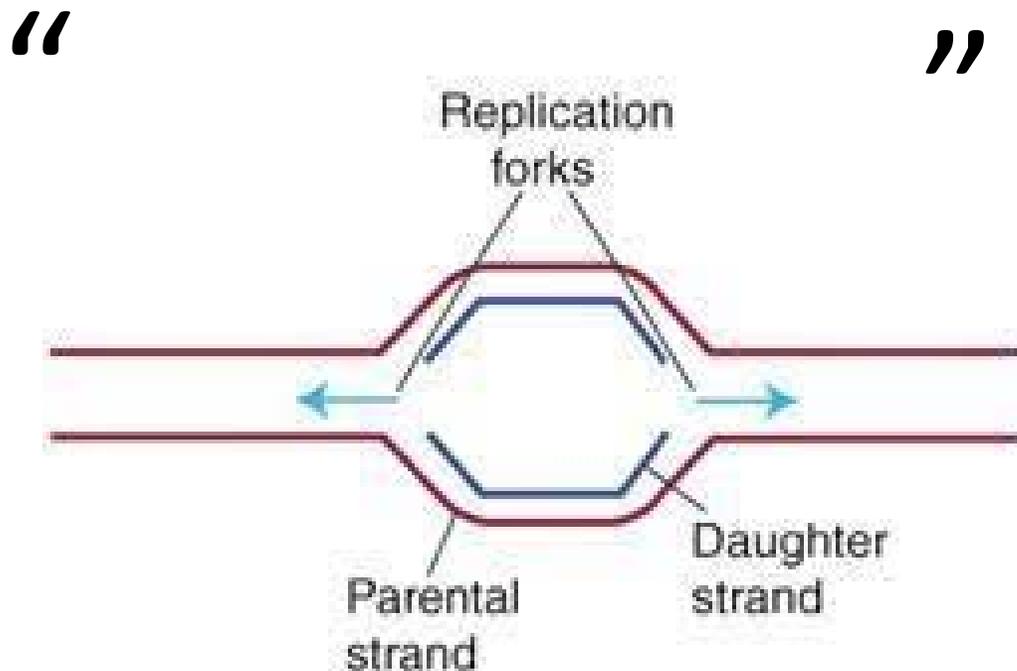
# REPLICAÇÃO DNA

- *E. coli*, como a maioria das bactérias, possui um único cromossomo = uma única molécula de DNA;
- Que é dupla-fita e circular (fechado nas extremidades);
- A replicação é bidirecional a partir de uma única origem de replicação;
- A replicação também chamada de  $\theta$ , pela figura formada no processo.



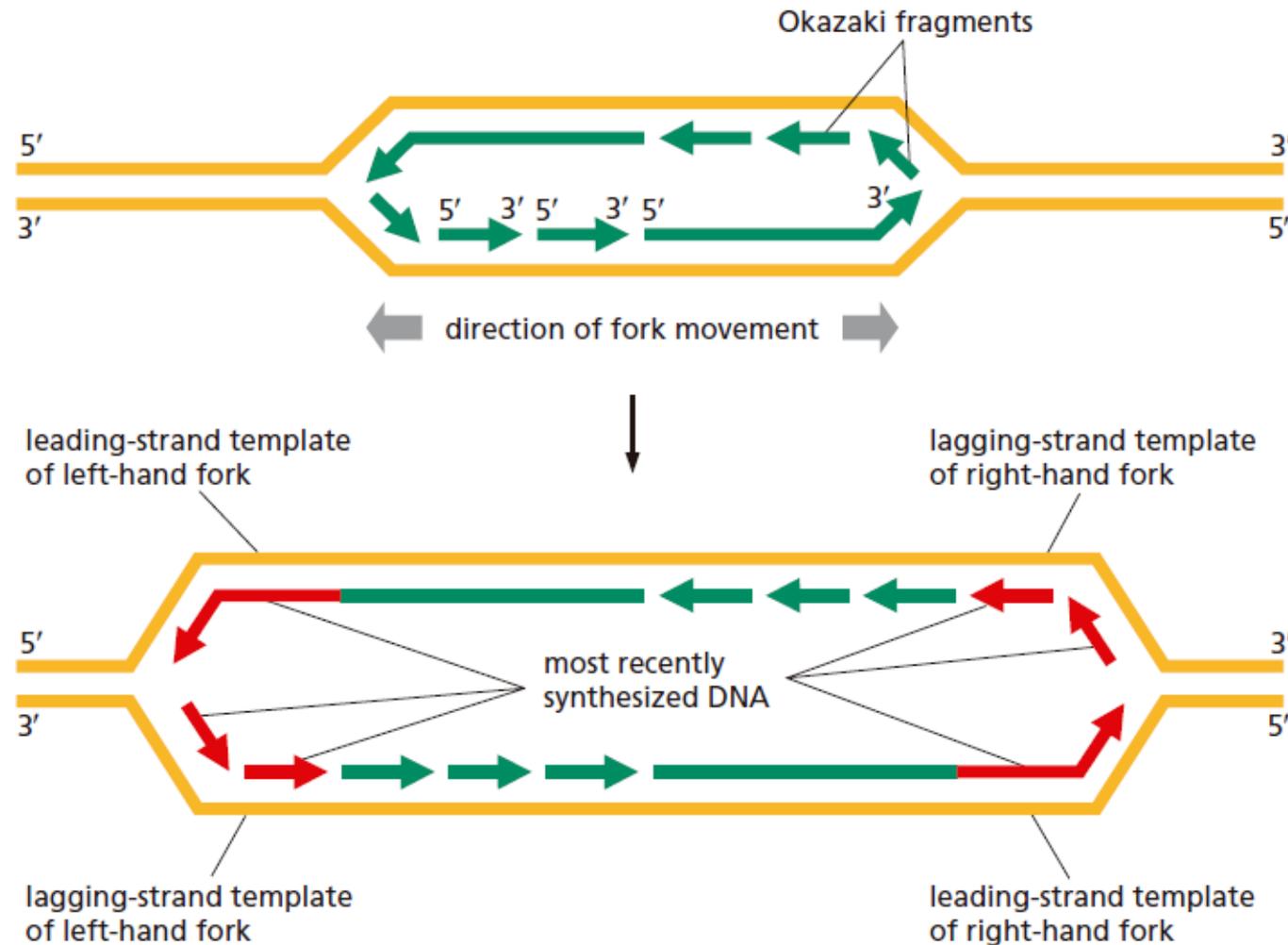
# REPLICAÇÃO DNA

- Em cada forquilha de replicação, acontece a síntese de duas novas cadeias;
- Só que a capacidade da DNA polimerase incorporar nucleotídeos apenas da direção 5' para a 3';
- Gera uma assimetria da forma como cada nova fita é sintetizada a partir da respectiva cadeia molde (*template*);



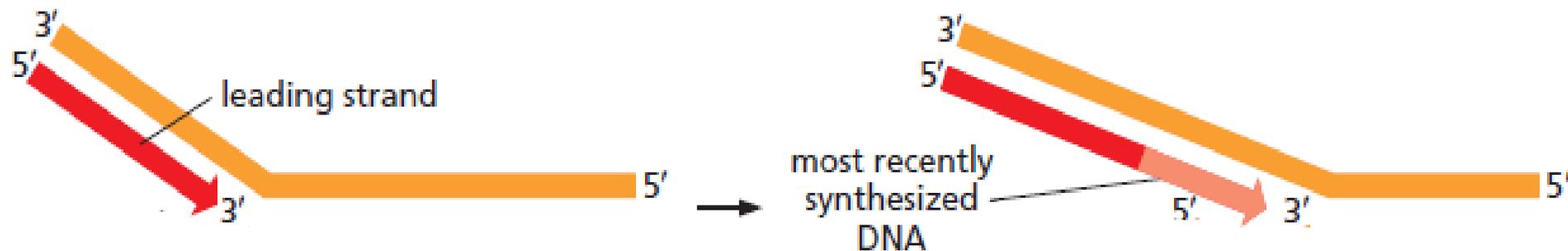
# REPLICAÇÃO DNA

- Em cada forquilha de replicação ocorrem simultaneamente a síntese contínua e a síntese descontínua.



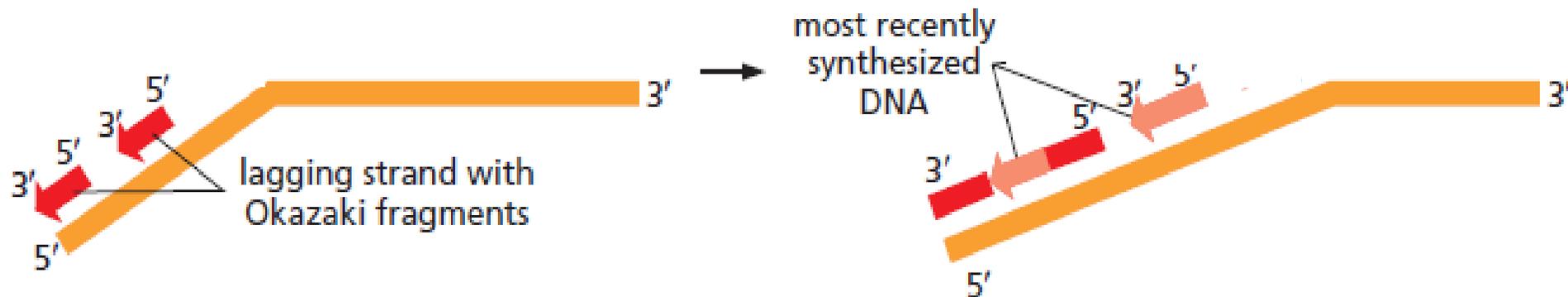
# REPLICAÇÃO DNA

- A síntese da **cadeia líder** (*leading*) avança no sentido da progressão da forquilha;
- Utiliza a cadeia molde 3' → 5';
- Nessa cadeia a síntese é **contínua**;
- Porque depois de iniciada ela não é interrompida.



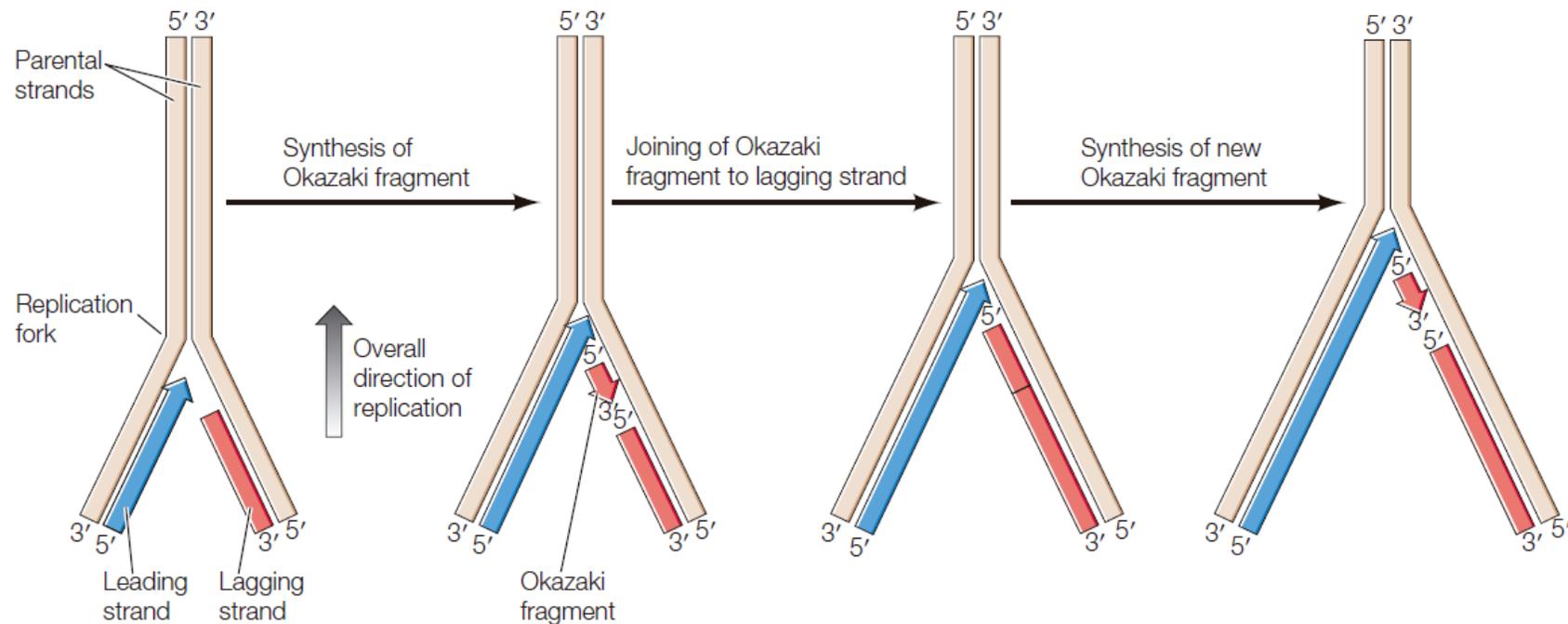
# REPLICAÇÃO DNA

- A síntese da **cadeia retardada (atrasada) (*lagging*)** avança no sentido contrário da forquilha;
- Utiliza a cadeia molde 5' → 3';
- Nessa cadeia a síntese é **descontínua**;
- Isso porque ele é realizada por pequenos trechos independentes.



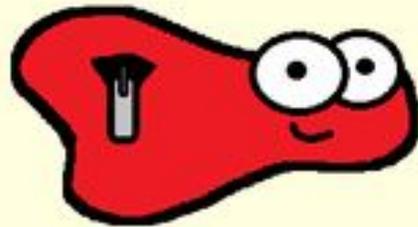
# REPLICAÇÃO DNA

- Apesar da síntese descontínua ser feita “de trás para frente”;
- O aumento da cadeia segue a direção do movimento da forquilha;
- A síntese descontínua é realizada pela síntese de fragmentos de DNA;
- **Fragmentos de Okazaki**, que depois são ligados entre si;

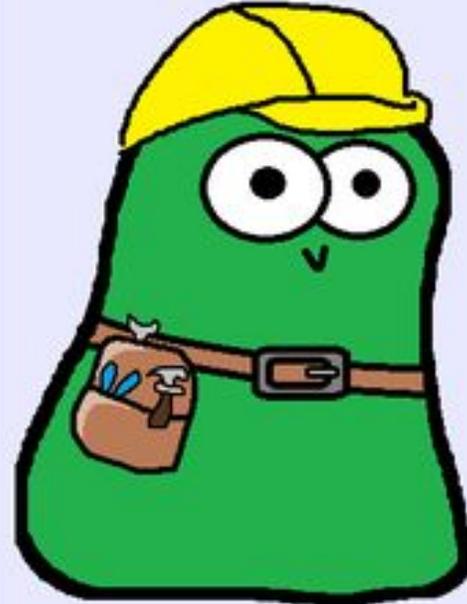


# MAQUINARIA DE REPLICAÇÃO

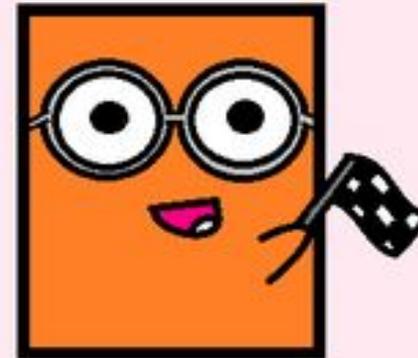
## DNA Replication Key Players



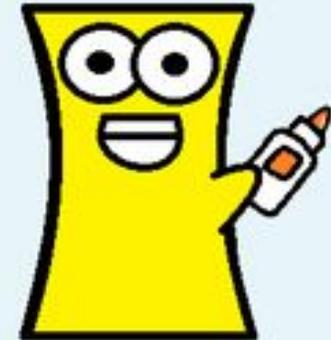
**Helicase**



**DNA Polymerase**



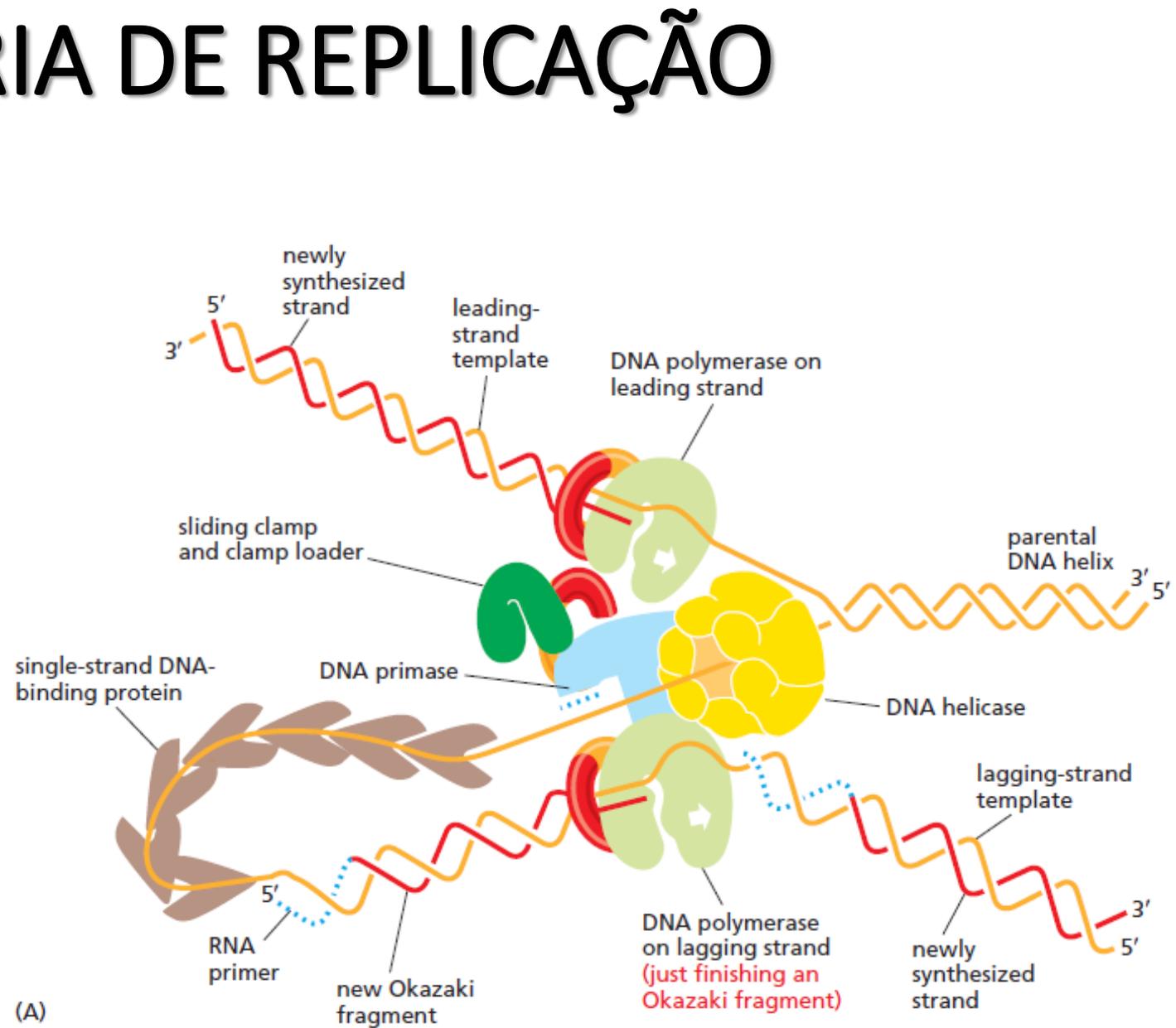
**Primase**



**Ligase**

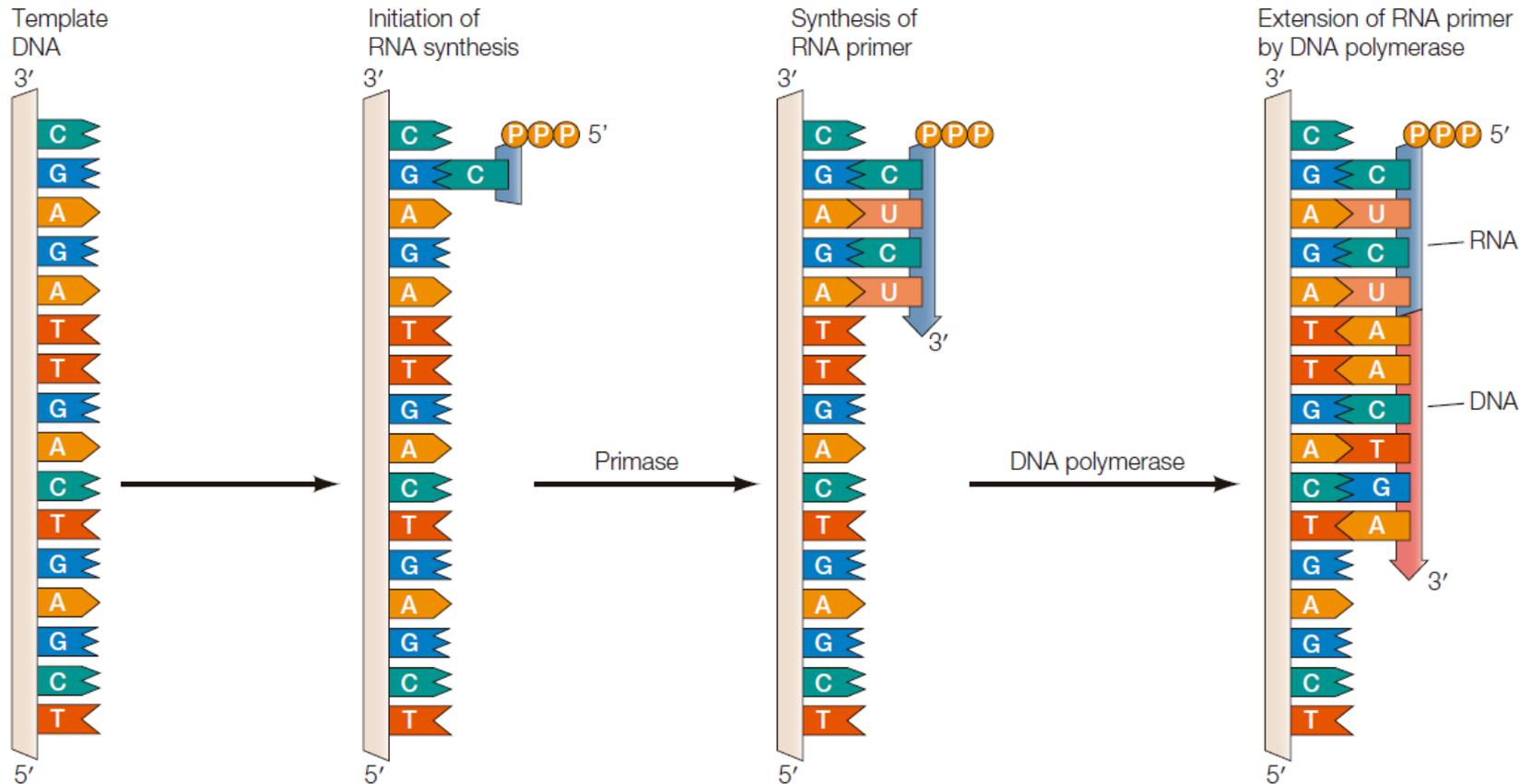
# MAQUINARIA DE REPLICAÇÃO

- A DNA polimerase é parte de um complexo multienzimático;
- A maquinaria de replicação;
- O conjunto de proteínas que atuam na replicação tb é denominado replissomo.



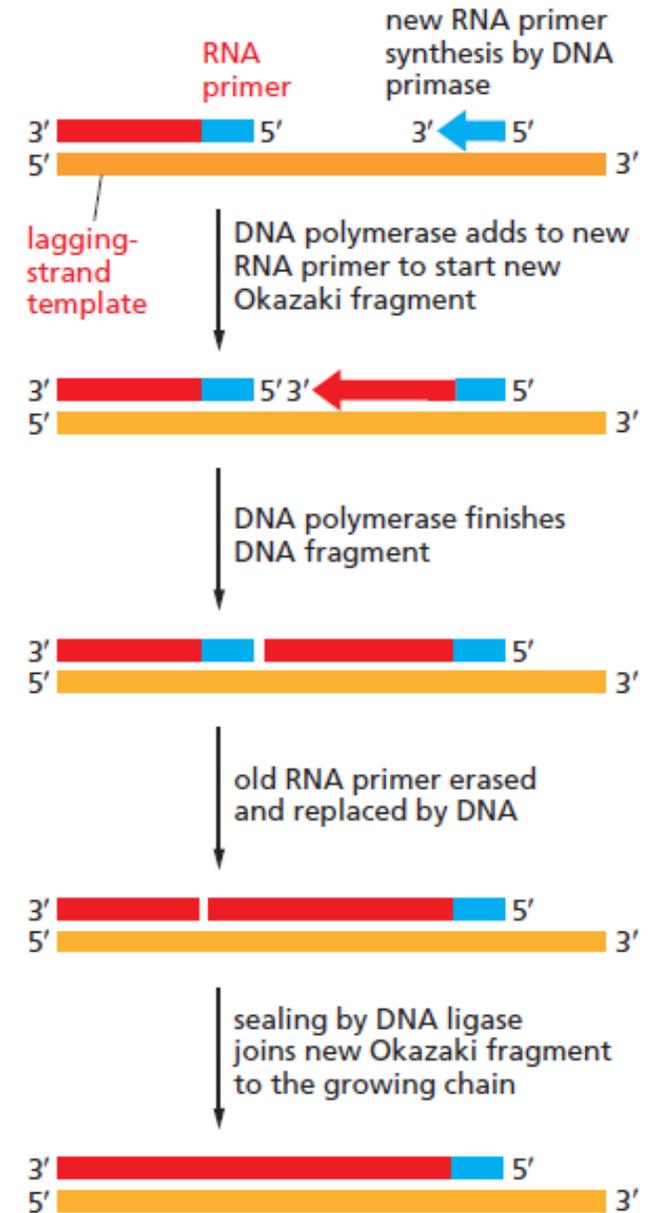
# PRIMASE

- A DNA polimerase é uma enzima que estende uma cadeia já iniciada;
- A primase é uma RNA polimerase que sintetiza uma seq de RNA contendo  $\approx 10$  nucleotídeos;
- Utilizado como *primer* iniciador dos fragmentos de Okazaki e da cadeia líder;



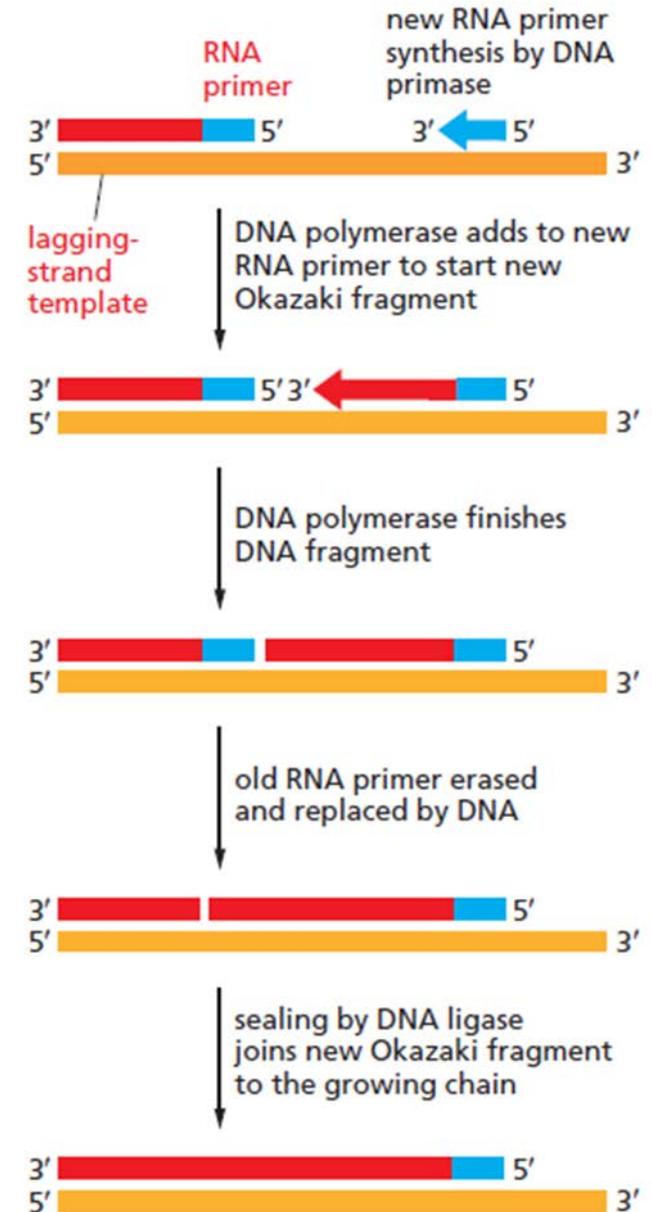
# FRAGMENTOS DE OKAZAKI

- Na bactéria *E coli*, a DNA polimerase III estende a cadeia a partir dos *primers* (RNAs iniciadores);
- Formando fragmentos de Okazaki (1000-2000 nucleotídeos);
- Ao se aproximar de um *primer*, a DNA polimerase III se desliga do DNA;
- E a DNA polimerase I reconhece a molécula híbrida DNA/RNA;
- Remove o RNA por ter atividade exonucleolítica 5' → 3';
- E repõe o trecho com desoxirribonucleotídeos;



# FRAGMENTOS DE OKAZAKI

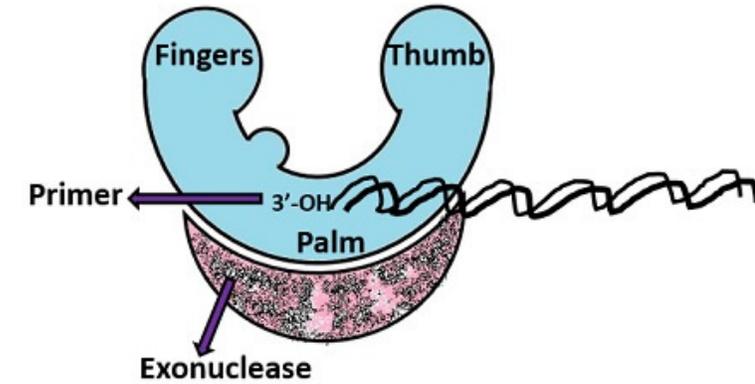
- Nos eucariotos os fragmentos de Okazaki são menores, em torno de 100 a 200 pb;
- O processo é essencialmente o mesmo, com algumas diferenças nas proteínas que realizam o processo;
- Mais proteínas, controles do processo mais refinado;
- Mais polimerases com funções diversas e participando da replicação;
- A tendência atual é considerar a DNA polimerase  $\alpha$  com atividade primase como iniciadora das duas cadeias: sintetiza em torno de 10 nucleotídeos de RNA e de 20 a 30 de DNA;
- DNA polimerase  $\epsilon$  polimeriza cadeia líder enquanto a polimerase  $\delta$  polimeriza a cadeia retardada. Uma exonuclease que reconhece dupla fita DNA/ RNA provavelmente responsável pela remoção dos fragmentos de RNA dos iniciadores.



# DNA POLIMERASE

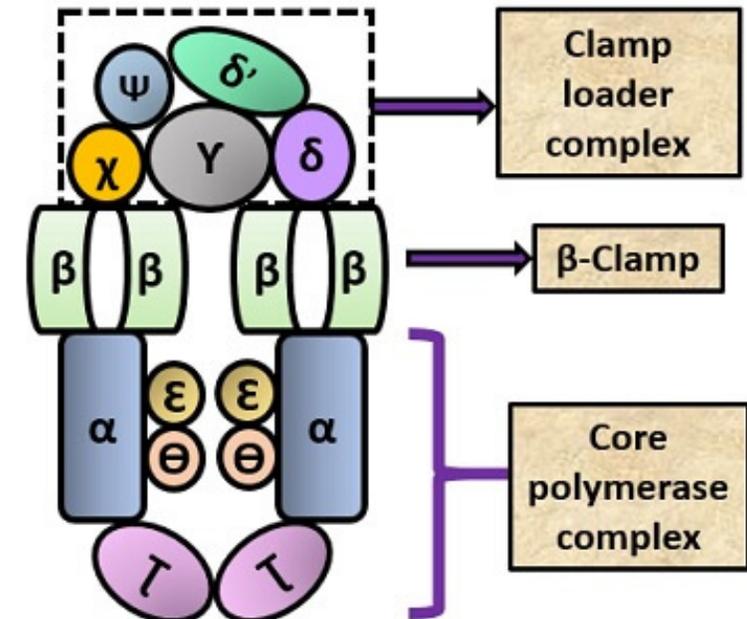
- Existem diferentes DNA polimerases em bactérias e eucariotos, distribuídas em 6 famílias;
- DNA polimerases são enzimas que atuam para replicação e/ou reparo do DNA;
- Maior parte, envolvida com mecanismos de reparo.
- Os estudos já realizados identificaram ao menos cinco DNA polimerases em *E. coli*, sendo denominadas DNA-polimerases I, II, III, IV e V;
- Existe maior quantidade de DNA polimerases nos eucariotos e ainda é controverso quais papéis fisiológicos realizados por cada uma delas.

## DNA POLIMERASE I



Right hand diagram of DNA-polymerase

## DNA POLIMERASE III

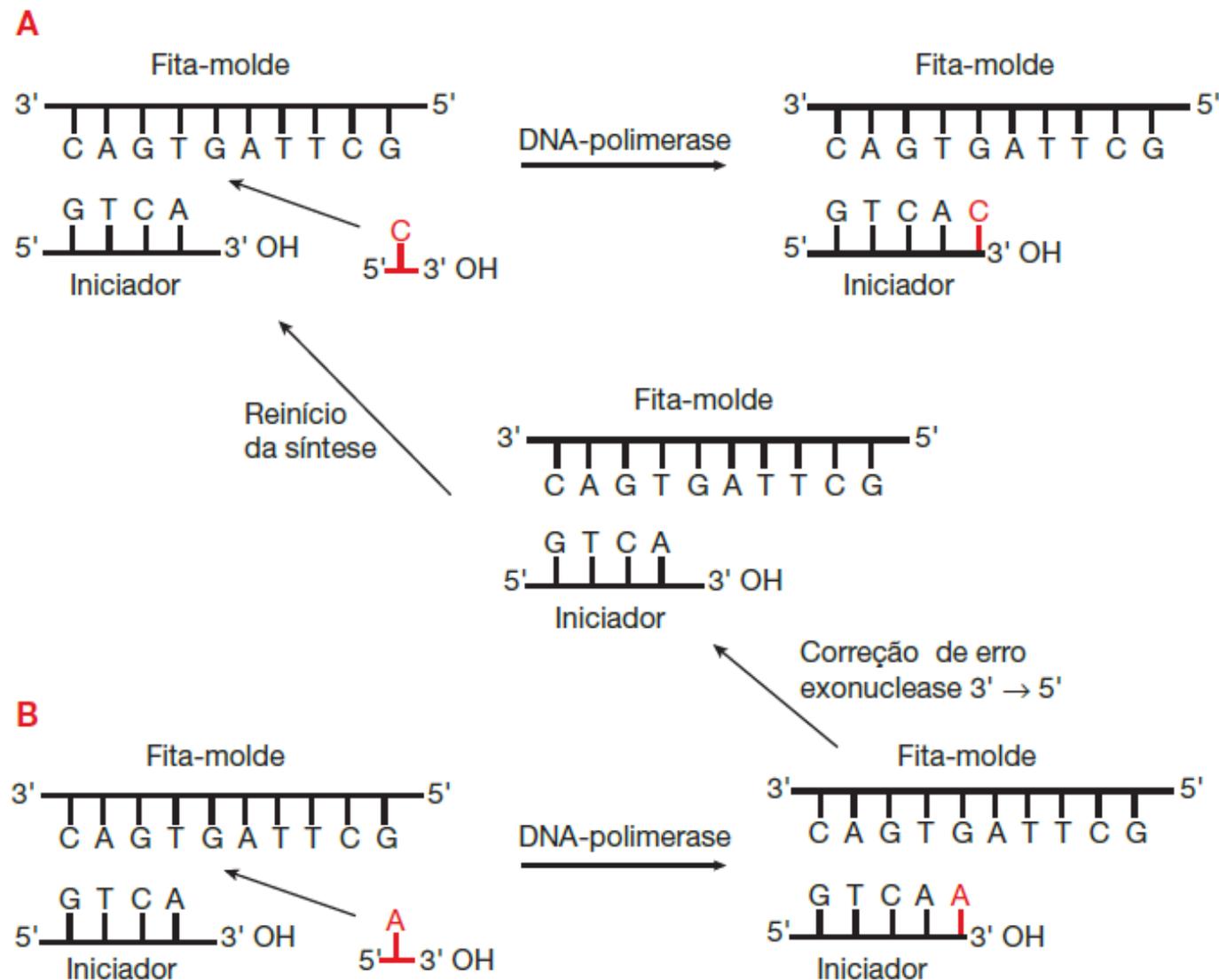


# DNA POLIMERASE

- O que todas DNA polimerases de têm em comum:
- Realizam a síntese unidirecional da cadeia 5' → 3';
- E síntese de DNA é realizada a partir da extensão de uma sequência pioneira já existente;
- Além disso, a maioria apresenta atividade de autocorreção (*proofreading*);
- Que é uma atividade exonucleolítica 3' → 5'.

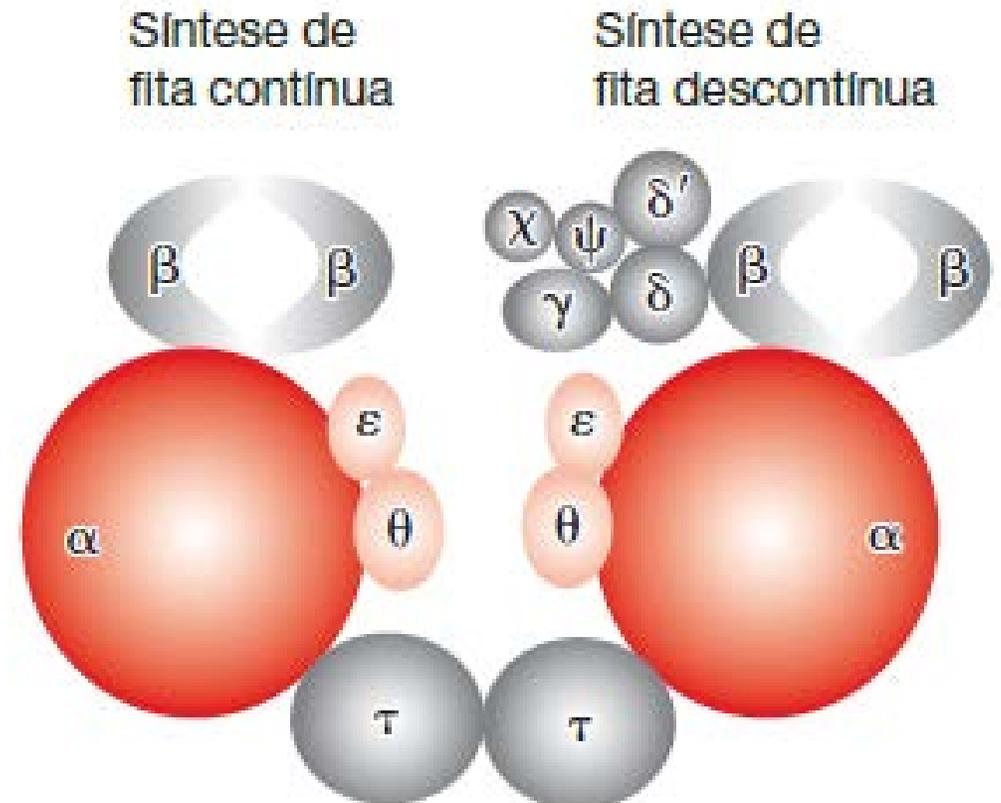
# DNA POLIMERASE

- O pareamento gera alterações conformacionais que favorecem ou não a polimerização;
- Se nucleotídeo incorreto pareia (mal-pareamento, pareamento incorreto *mismatch*);
- A polimerização é atrasada e o nucleotídeo sai do sítio catalítico;
- Se é efetivada a incorporação do nucleotídeo incorreto;
- As distorções na cadeia de DNA tb são percebidas e há uma possibilidade de correção;
- No sítio exonucleolítico é removido o último nucleotídeo incorporado de forma incorreta;
- E a polimerização é retomada com a incorporação do nucleotídeo correto.



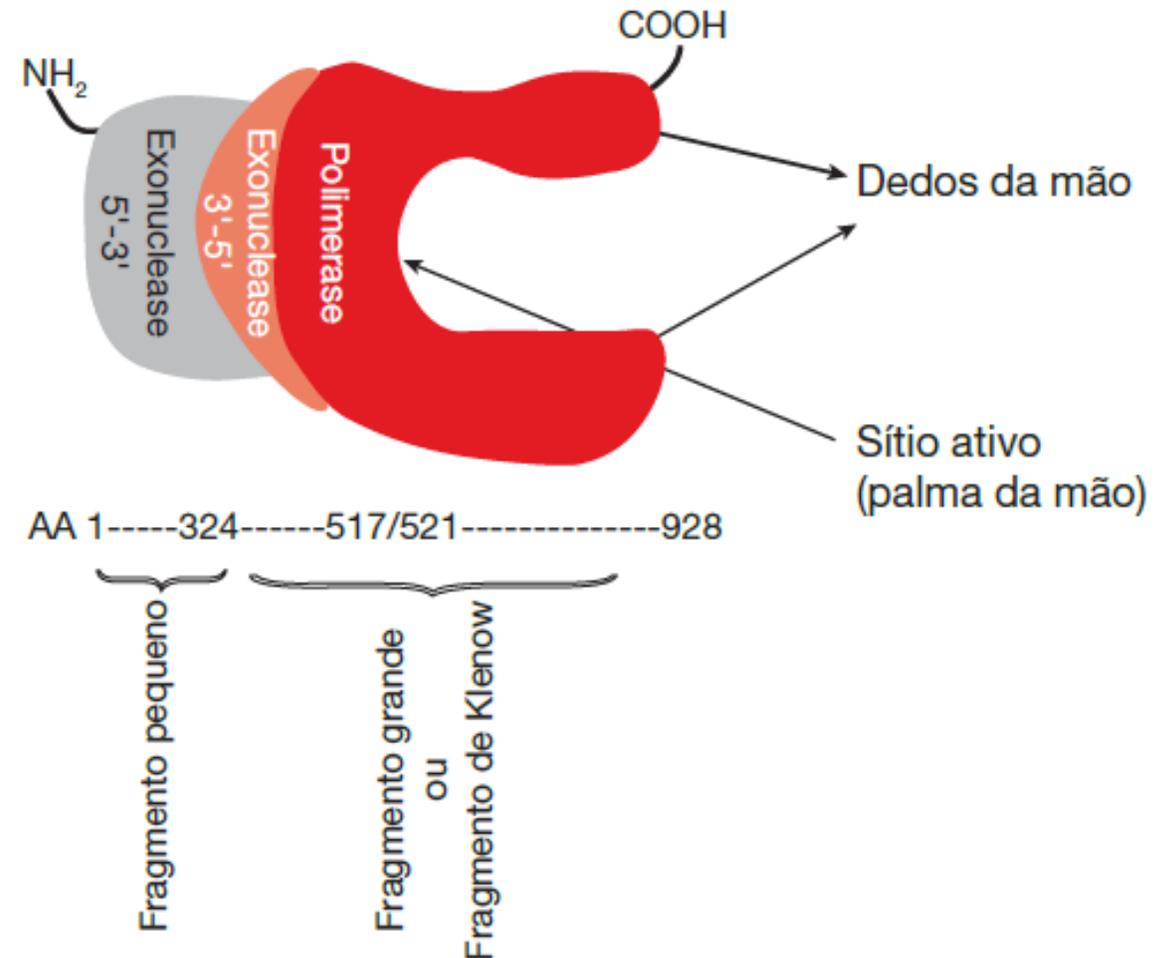
# DNA POLIMERASE

- Em *E coli* existem 5 enzimas, sendo que as DNA replicases (polimerases envolvidas na replicação) são a I e III;
- A **DNA polimerase III** é a enzima que estende as cadeias de síntese contínua e descontínua;
- A DNA polimerase III é uma holoenzima formada por várias cadeias;
- A estrutura dessa enzima apresenta dois núcleos catalíticos heterotriméricos, cada um deles formado pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ ;
- A atividade de polimerização é realizada pela subunidade  $\alpha$ , enquanto a subunidade exonucleolítica é realizada pela subunidade  $\epsilon$
- A estrutura dimérica é estabilizada pela presença de duas subunidades  $\tau$ .



# DNA POLIMERASE

- A DNA polimerase I apresenta uma única cadeia com 928 aa;
- Apresenta 3 domínios catalíticos: polimerase 5' → 3', exonuclease 3' → 5', e exonuclease 5' → 3';
- A atividade exonuclease 5' → 3';
- Remove um bloco de nucleotídeos (aproximadamente 10 nucl.);
- Na direção da polimerização.



# DNA POLIMERASE

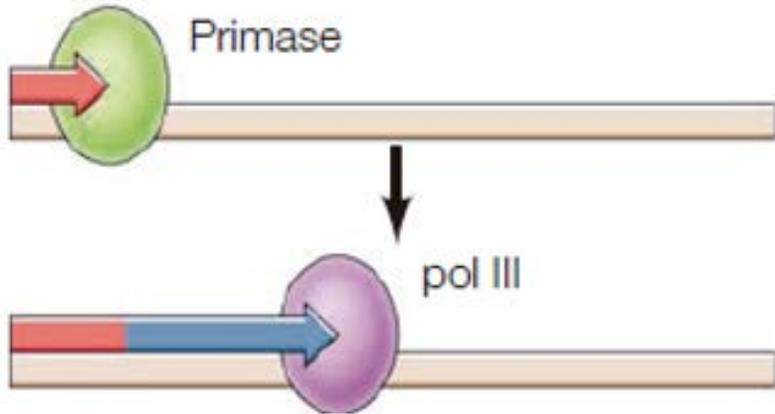
*E. coli*

Leading strand synthesis

pol III

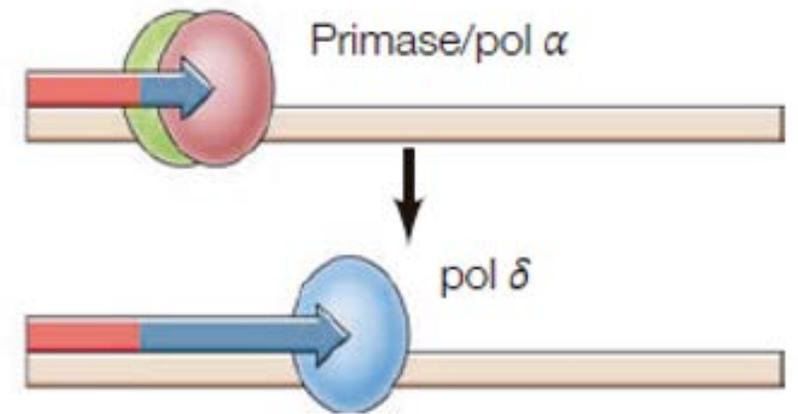


Lagging strand synthesis



Mammals

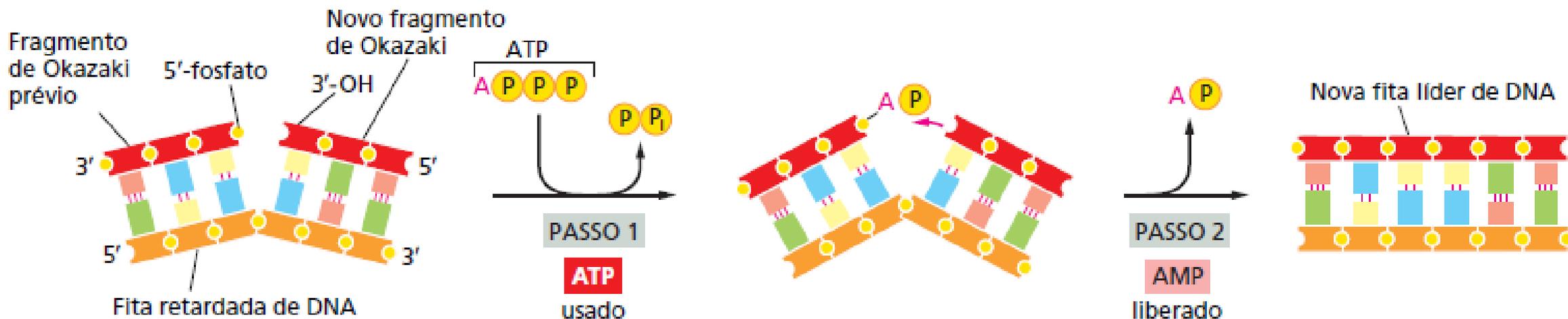
pol ε



- A DNA polimerase III assim como a DNA polimerase ε são as principais responsáveis pela extensão das cadeias líder e a DNA polimerase III provavelmente também da cadeia retardada;
- Em eucariotos, a DNA polimerase α que tem a primase como uma subunidade catalítica, e também inicia a síntese de um pequeno trecho de DNA sendo então substituída pela DNA polimerase δ, que completa os fragmentos de Okazaki;
- A RNase H é uma enzima que reconhece heteroduplexes DNA/RNA e remove o RNA;
- Enquanto que em *E coli*, a DNA polimerase I polimerase com atividade exonucleolítica 5' → 3' remove o primer e repõe com desoxirribonucleotídeos.

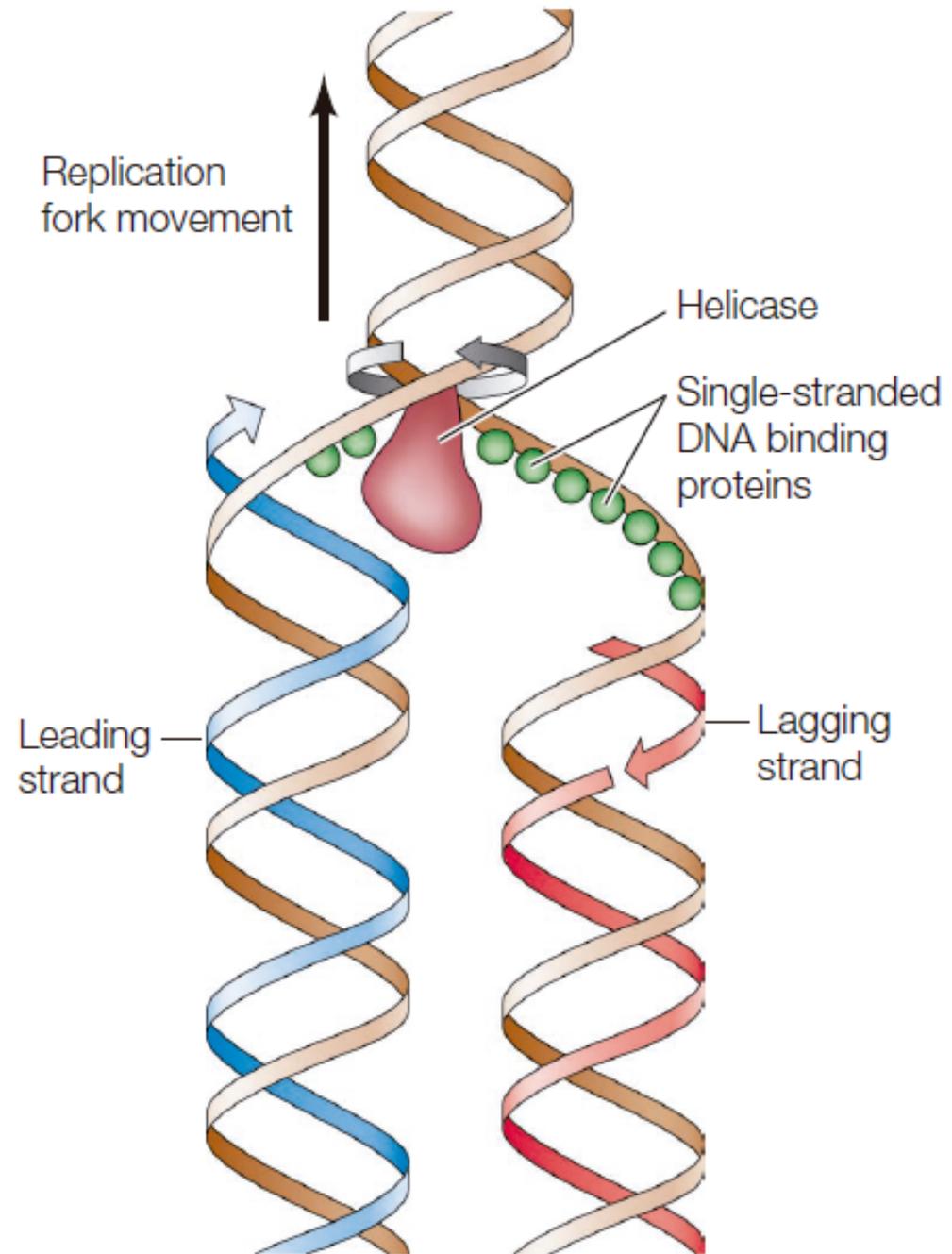
# DNA LIGASE

- A enzima DNA ligase une os fragmentos de Okazaki na fita retardada durante a síntese de DNA;
- É um processo energético e para isso a enzima liga-se a um ATP que fornece energia para unir/selar/juntar fosfato 5' com hidroxila 3' dos nucleotídeos das extremidades de cada fragmento de Okazaki.



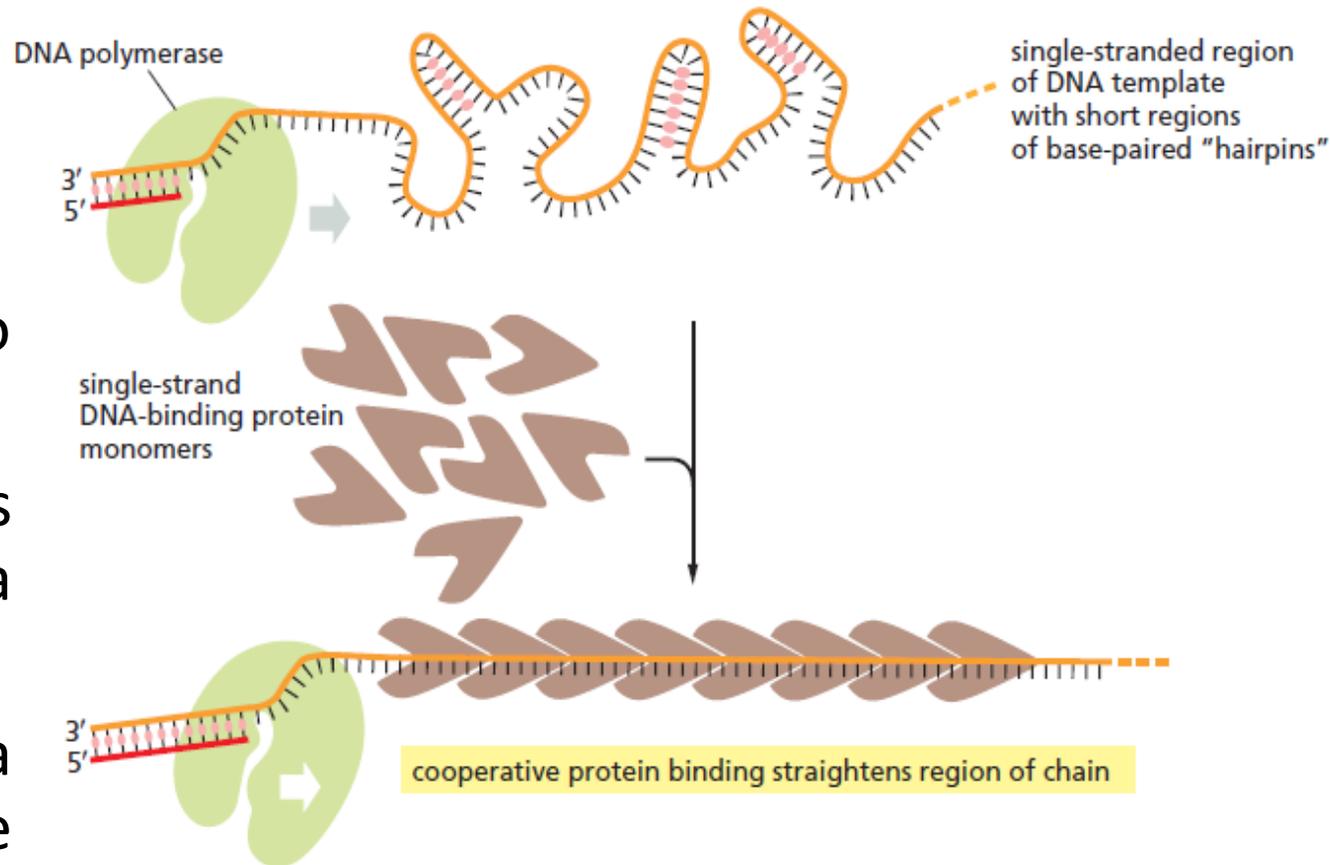
# DNA HELICASE

- Atuam para romper as pontes de hidrogênio e continuar separando as duas cadeias de DNA já abertas;
- Utilizando hidrólise de ATP como fonte de energia;
- Na formação da bolha inicial de replicação;
- E durante todo processo estão presentes à frente da maquinaria de replicação na forquilha.



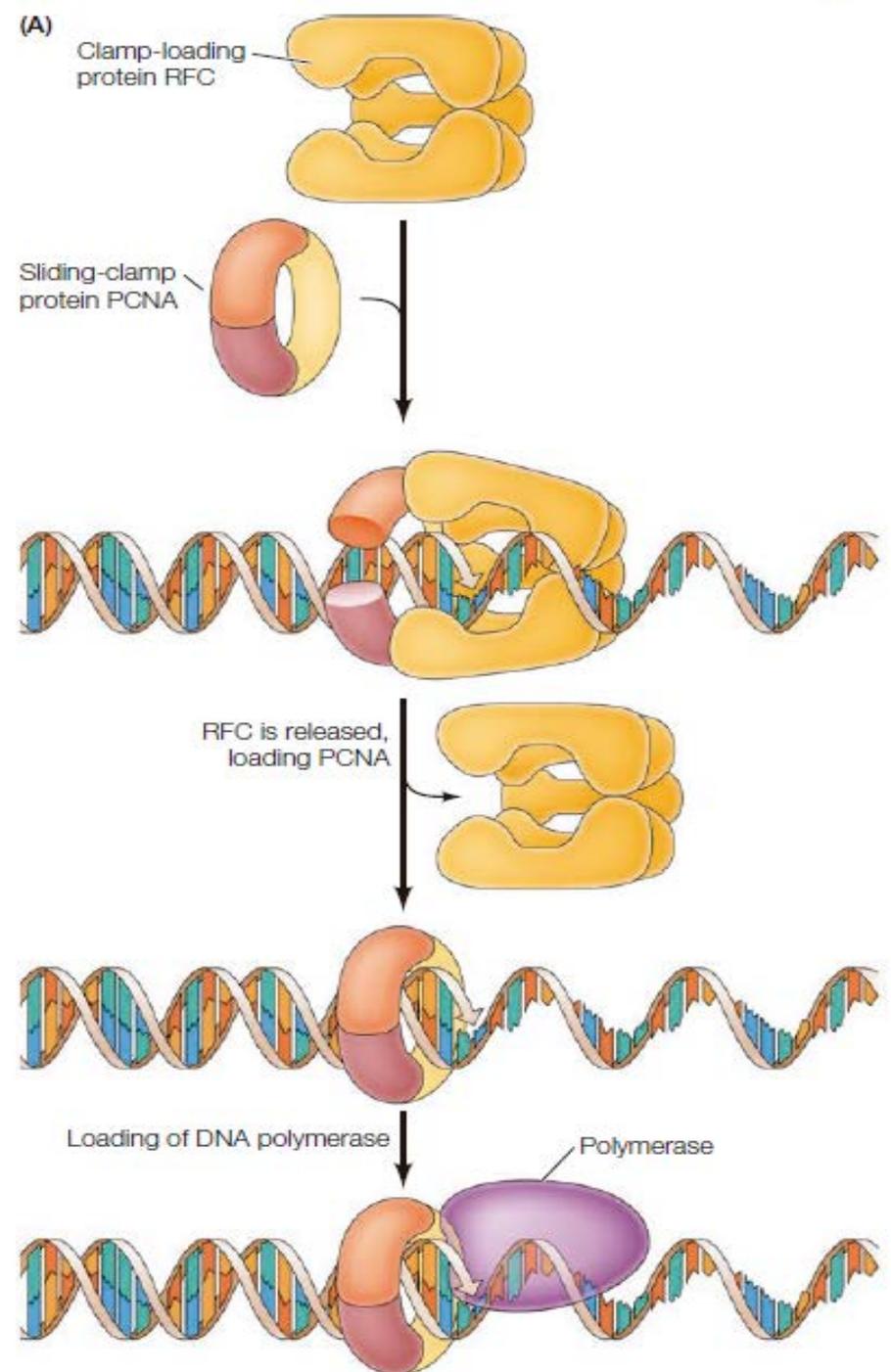
# PROTEÍNAS LIGADORAS DE DNA FITA SIMPLES

- As proteínas ligadoras de DNA fita simples estabilizam as fitas desemparelhadas;
- Atuando de forma cooperativa;
- Impedindo que as pontes de hidrogênio se refaçam entre as cadeias;
- Ou de regiões da cadeia (pareamentos entre nucleotídeos complementares da mesma cadeia (*grampos/hairpins*))
- Tb mantêm forma alongada da cadeia favorecendo o acesso da maquinaria de replicação;
- E proteção contra a ação de nucleases.



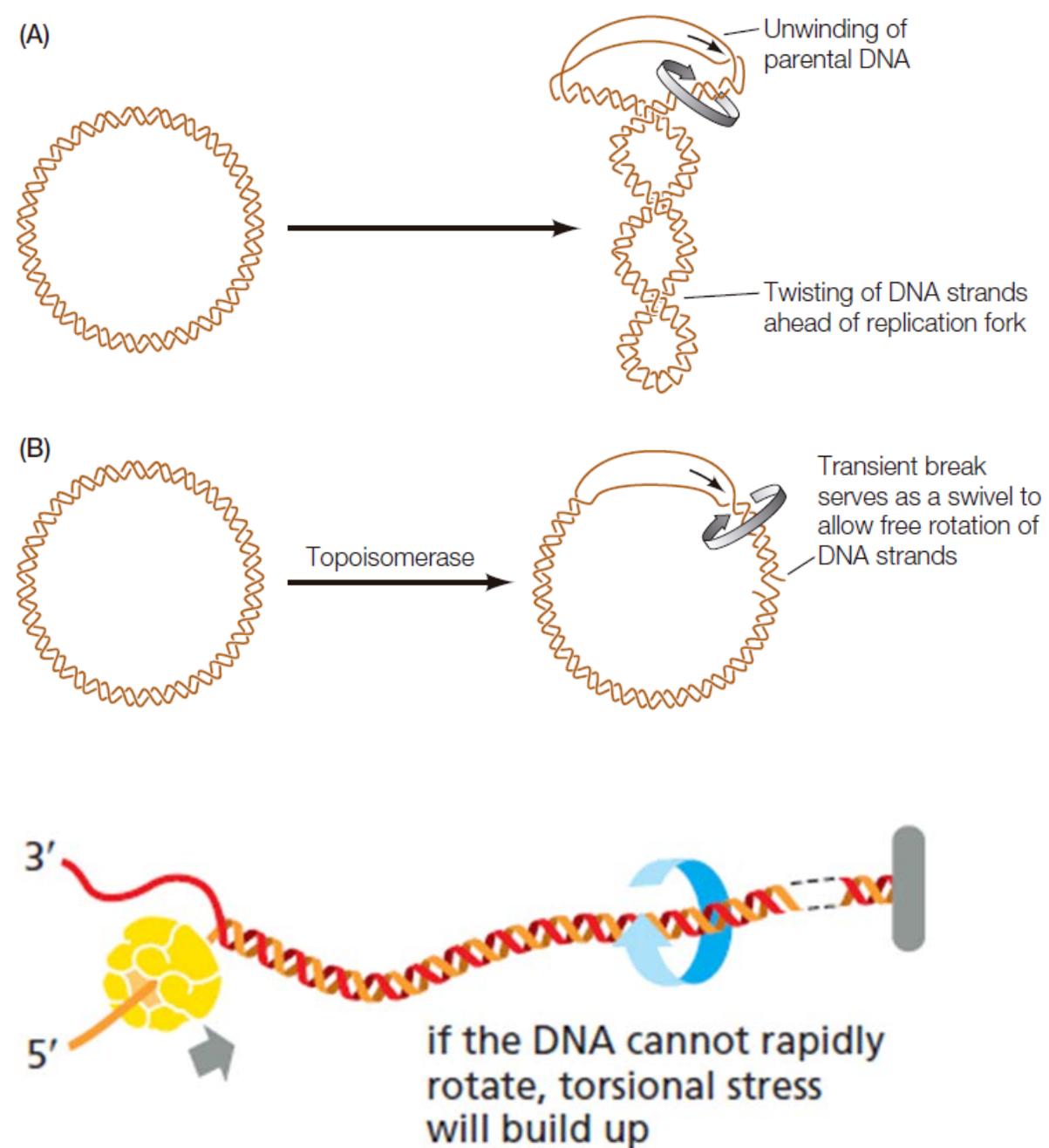
# BRAÇADEIRA DESLIZANTE

- A DNA polimerase depende da interação com uma “braçadeira” para que possa sintetizar DNA de forma contínua sem se desligar do molde;
- Essa braçadeira, grampo deslizante, forma um anel em torno do DNA;
- Para isso, uma outra proteína, carregador do grampo, recruta o grampo deslizante;
- E com gasto energético posiciona a proteína deslizante no DNA;
- Ela se desliga do complexo e agora a DNA polimerase é recrutada;
- Esse mecanismo é acionado reiteradamente na fita *lagging* (síntese descontínua).



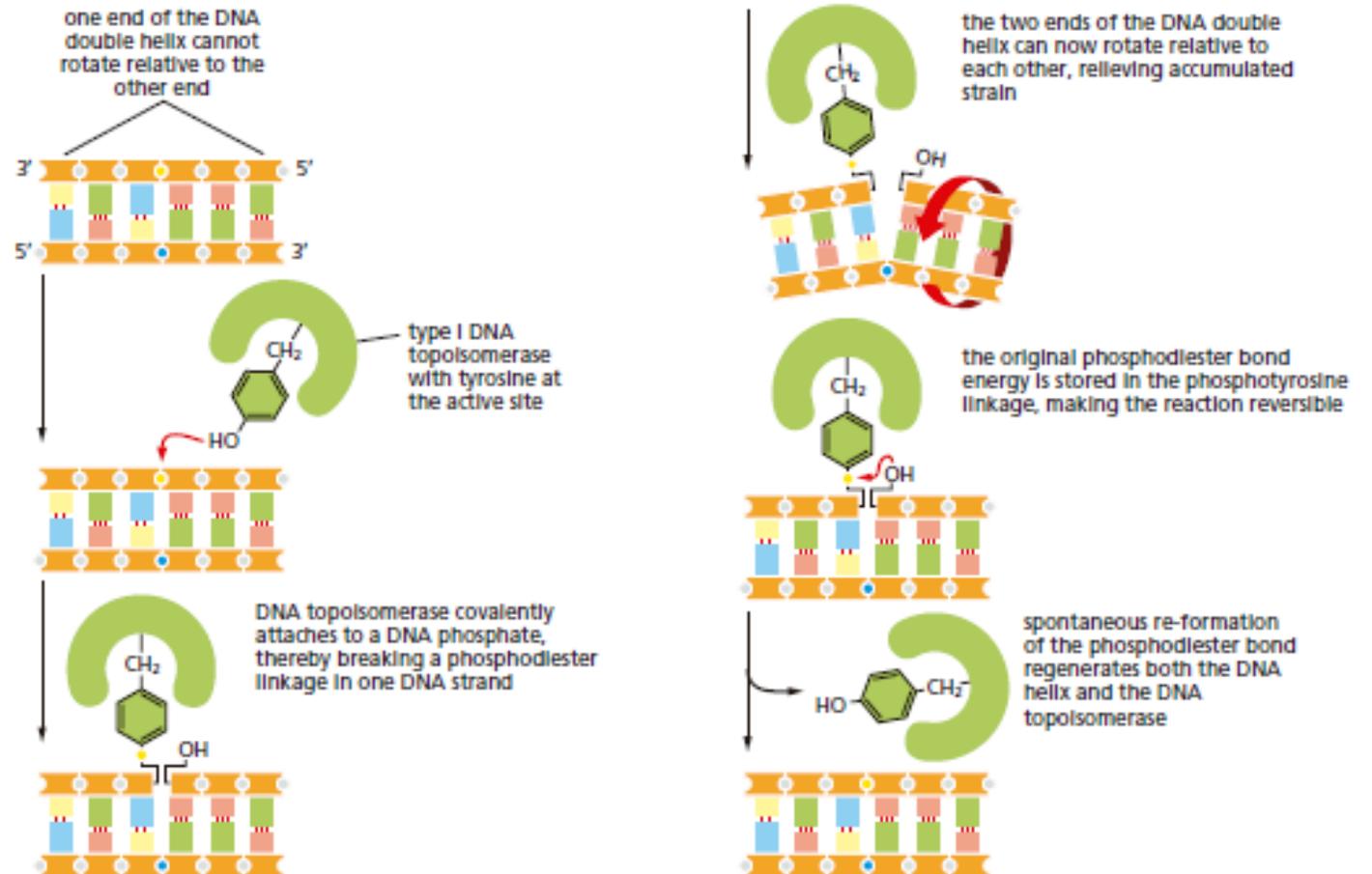
# DNA TOPOISOMERASES

- O desemparelhamento das fitas de DNA nas forquilhas gera tensões em outras regiões do DNA;
- Que poderia causar torções entre as fitas de DNA entre no cromossomo bacteriano, eventualmente bloqueando a replicação;
- Nos eucariotos, haveria a necessidade de girar a molécula de DNA no sentido contrário para aliviar essa tensão o tempo todo;
- Desenrolando todo cromossomo;
- Esses problemas são contornados pelas topoisomerases que quebram temporariamente uma fita de DNA (tipo I) ou as duas fitas (tipo II) relaxando a torção;



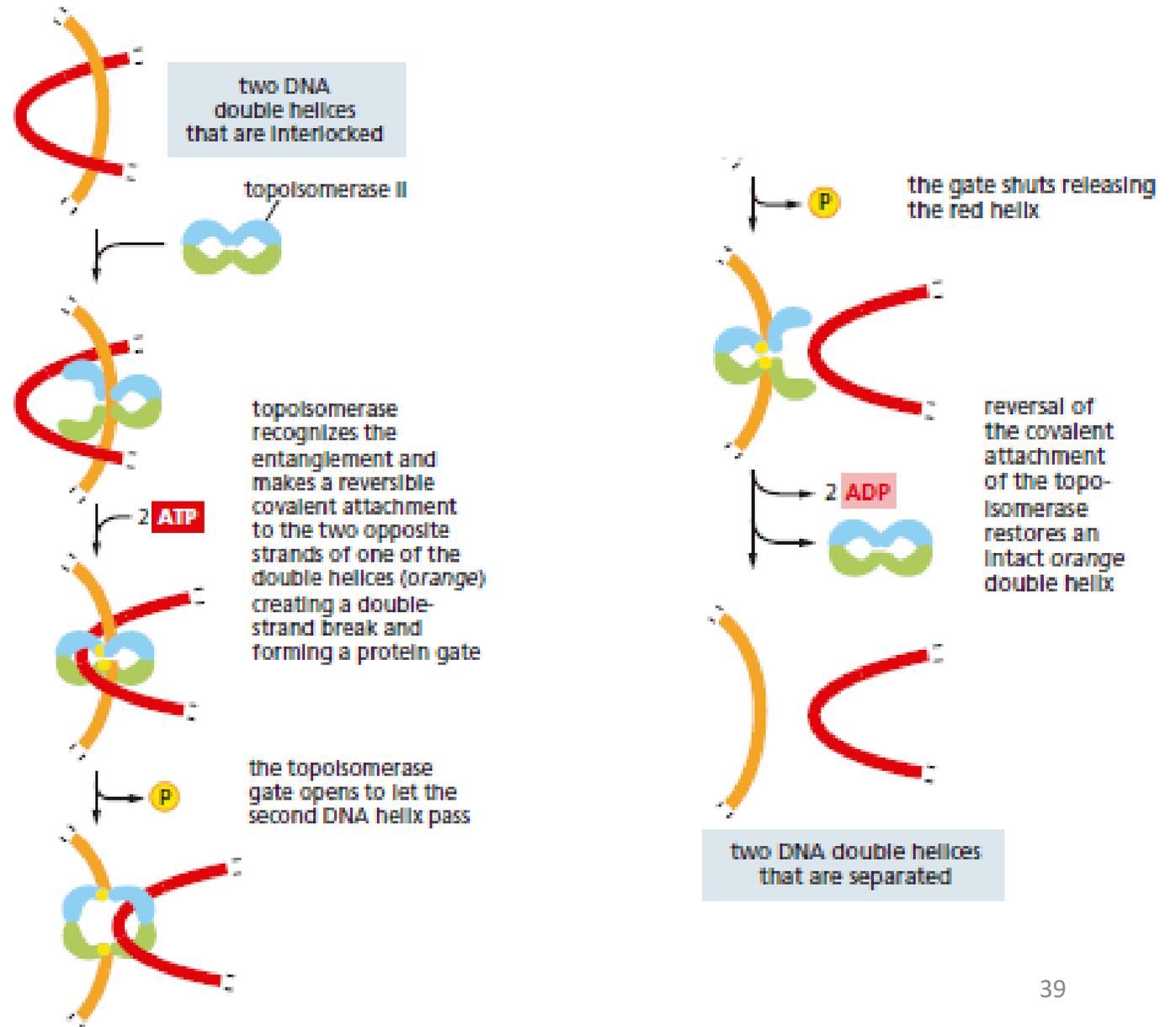
# DNA TOPOISOMERASES

- A topoisomerase I atua imediatamente antes da forquilha;
- Faz contato na ligação covalente do esqueleto de uma única cadeia;
- Gerando a quebra temporária em uma única fita (*nick*);
- Que possibilita a rotação livre das extremidades quebradas e o alívio da tensão local;
- E em seguida promove a religação.



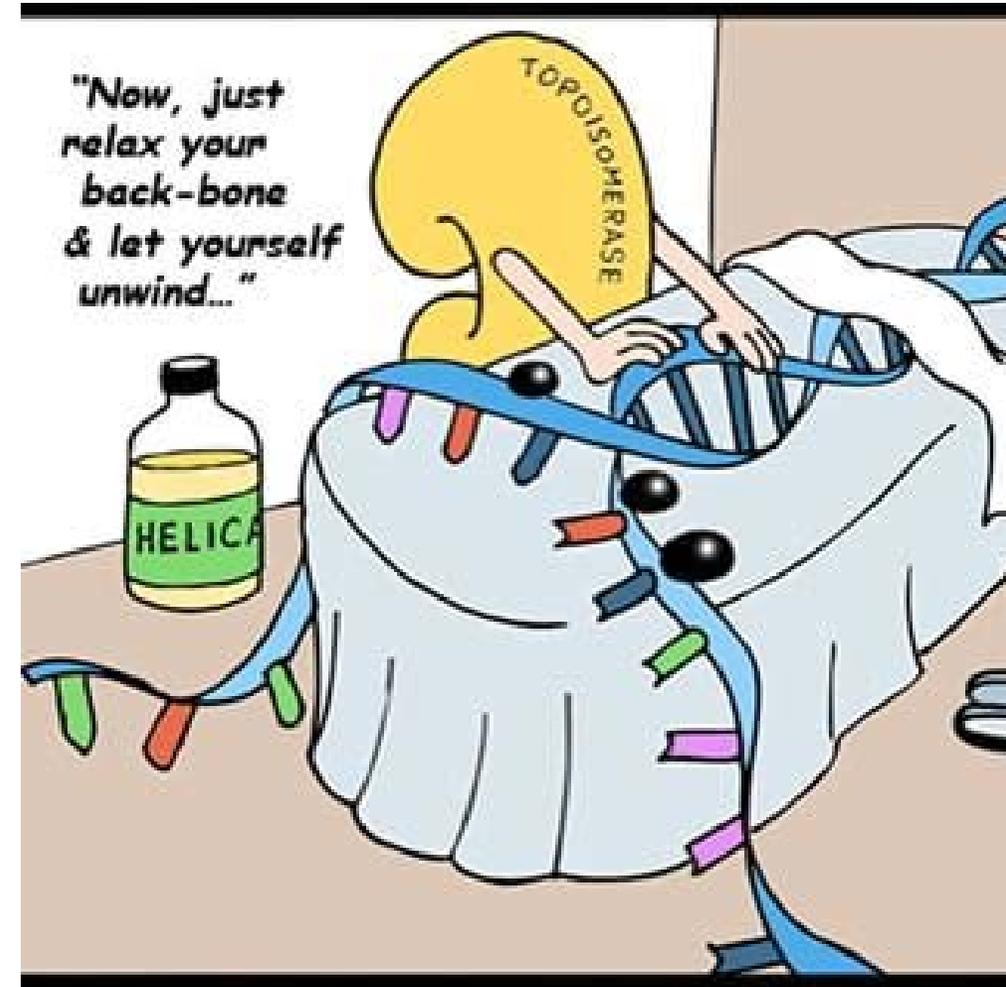
# DNA TOPOISOMERASES

- A topoisomerase II faz uma quebra provisória nas duas fitas (quebra dupla);
- E depois as religa;
- Utilizando a hidrólise de ATP no processo;
- A dupla quebra possibilita passar uma fita entre a outra;
- Separando moléculas entrelaçadas;
- Como ao término da replicação circular cromossômico das bactérias.

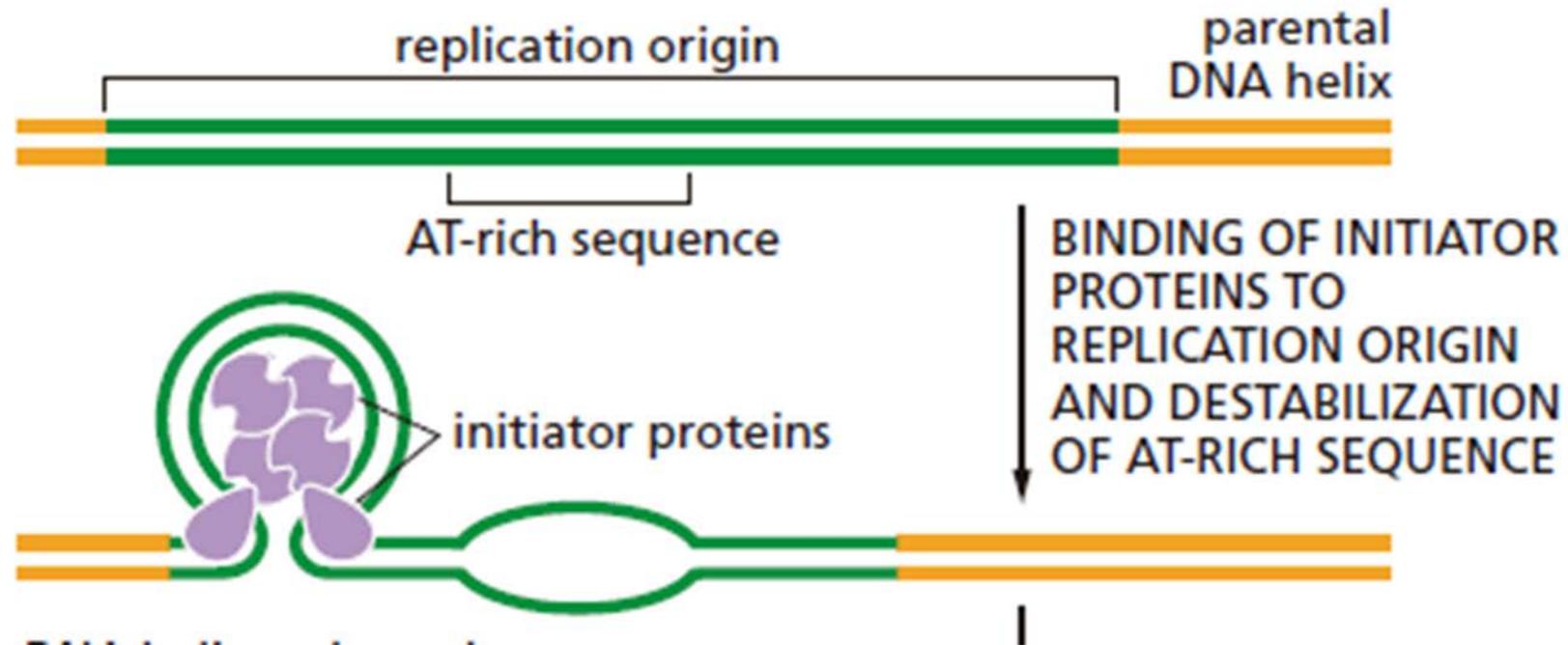


# CONTROLE DA REPLICAÇÃO

- Além da fidelidade da replicação, é necessário controlar que a replicação seja feita para todo DNA apenas uma vez por ciclo;
- Esse controle é realizado especialmente no início o processo, na origem de replicação (ORI);
- Tanto em eucariotos quanto em procariotos .



# CONTROLE DA REPLICAÇÃO



- Proteínas iniciadoras são as proteínas pioneiras na origem da replicação (*ori*);
- Tanto em eucariotos como em eucariotos;
- Promovem enrolamento do DNA em torno delas;
- Desestabilizando pontes de hidrogênio locais, em regiões ricas em AT;
- E recrutando helicases para a *ori*;

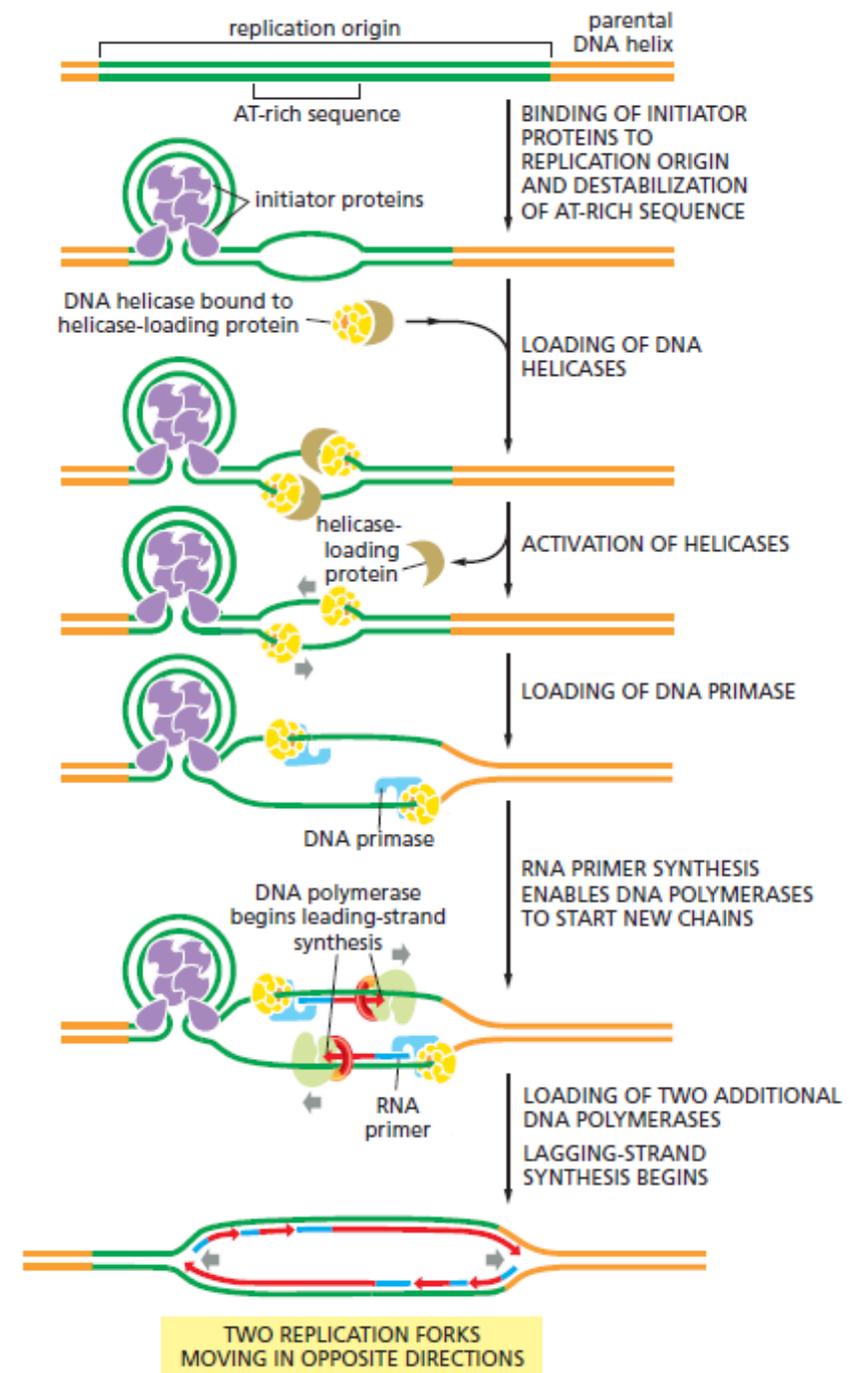
# INÍCIO DE REPLICAÇÃO

Além disso, eventos sucessivos coordenados pela hidrólise do ATP das proteínas envolvidas com o início da replicação;

Em *E. coli*, as proteínas iniciadoras (ainda com ATP), se ligam nas ORI;

Nessa condição promovem o enrolamento do DNA no seu entorno, ao mesmo tempo desestabilizando e abrindo trecho de DNA rico em AT;

Esse complexo atrai duas proteínas carregadoras de helicases e as próprias helicases ainda inativas ligadas à ATP;



# INÍCIO DE REPLICAÇÃO

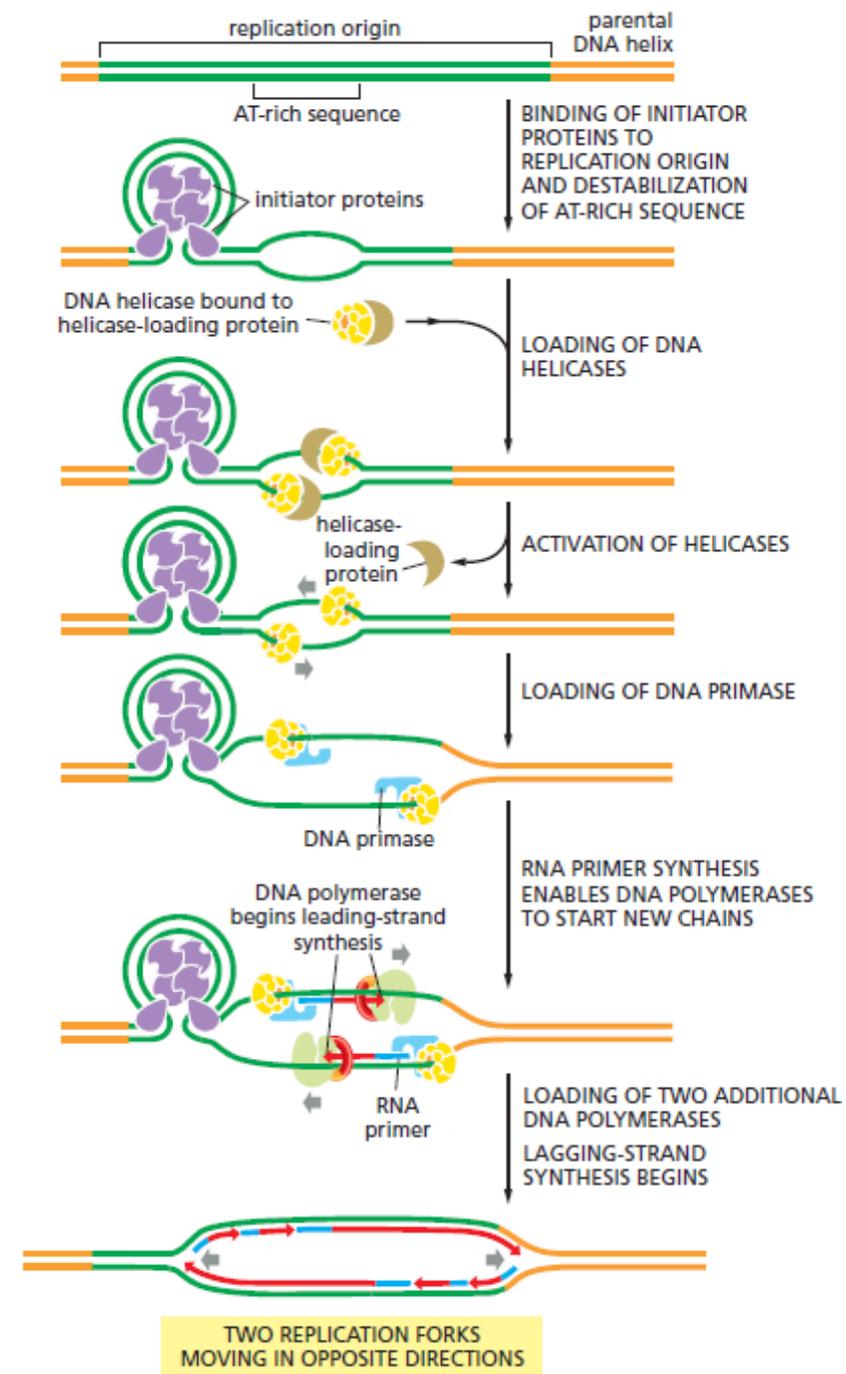
Após a fixação no DNA as helicases são ativadas por hidrólise de ATP e continuam o desemparelhamento gerado pelas proteínas iniciadoras;

Nas regiões que passam a ser as forquilhas de replicação;

Abrindo a cadeia o suficiente para as primases gerarem os primers e as DNA polimerases e demais proteínas da maquinaria de síntese de DNA formarem o complexo de iniciação;

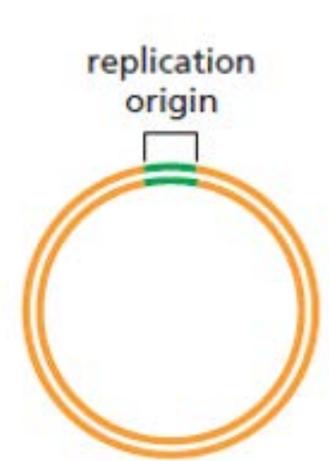
A hidrólise do ATP das proteínas iniciadoras fazem com que elas se desliguem do DNA;

E as deixam inativas.

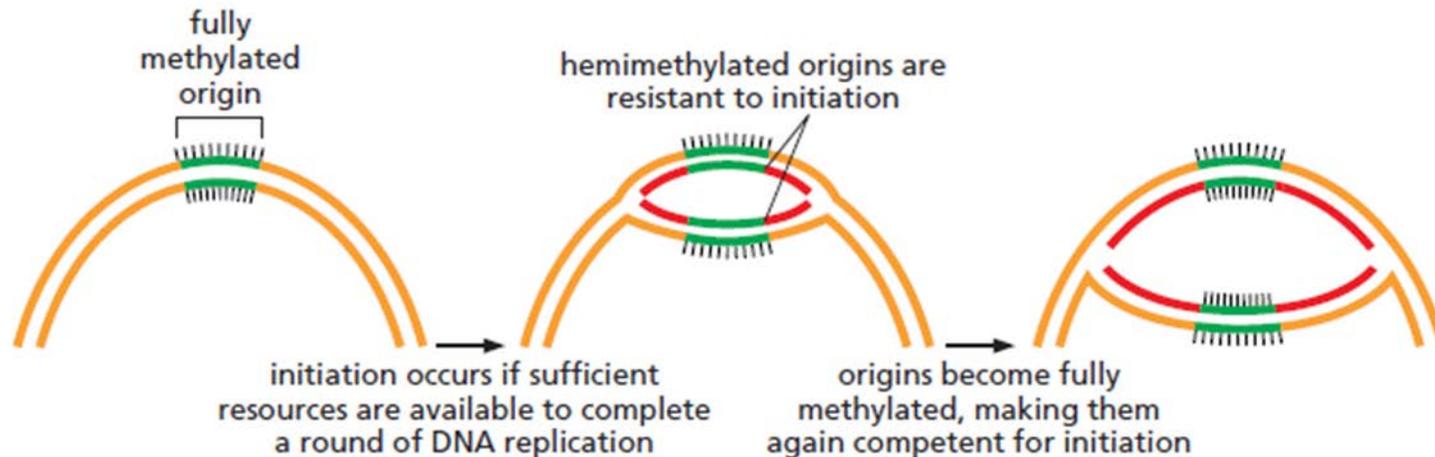
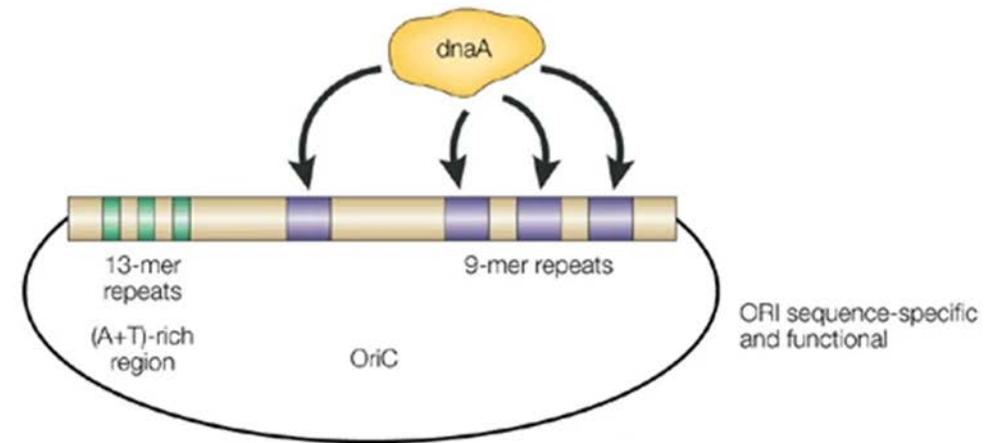


# CONTROLE DA REPLICAÇÃO

- Em *E coli*, o processo de replicação é basicamente controlado no seu início (origem de replicação única) e uma vez iniciado, tende a ser finalizado.
- A origem de replicação é composta por uma sequência de 245 pb;
- Com regiões reconhecidas pelas proteínas iniciadoras (*dnaA*) e sequências ricas em A/T;
- A hemimetilação na origem de replicação é um sinal que impede o reinício da replicação.

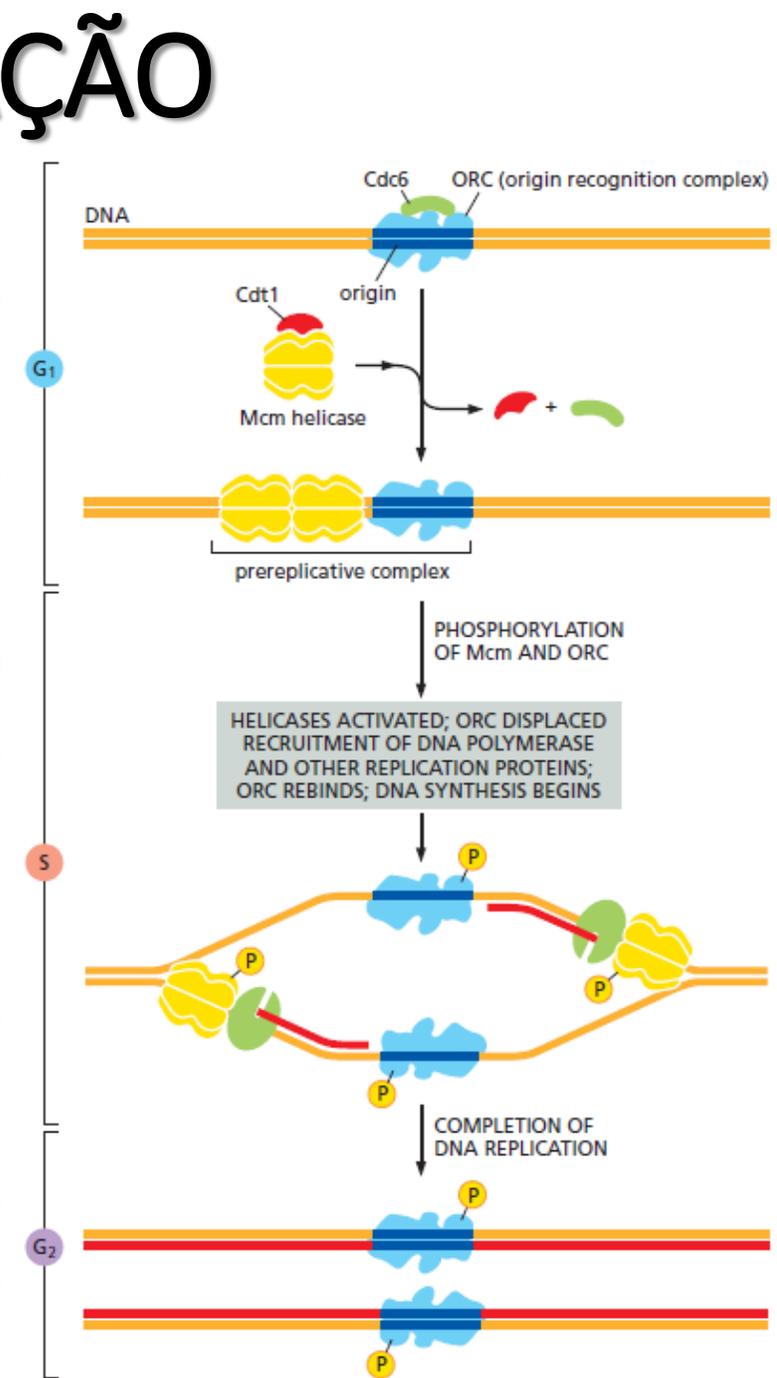


a



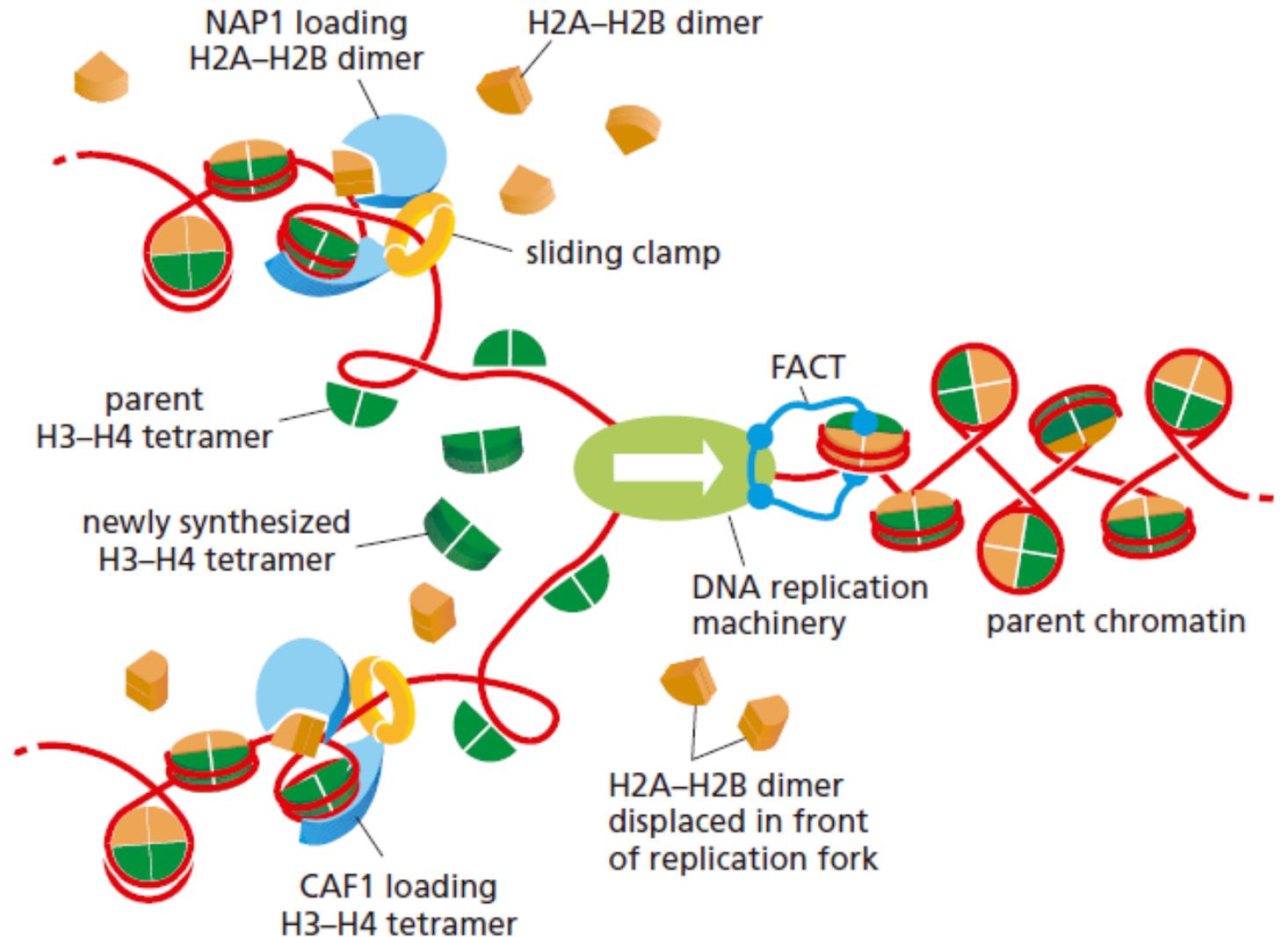
# CONTROLE DA REPLICAÇÃO

- Controle rígido também no início da replicação dos eucariotos;
- Para definir os sítios de origem, evitar nova duplicação de DNA, e sincronizar o processo;
- **Complexos reconhedores de origem de replicação (ORCs)** são complexos proteicos montados nas origens de replicação ao longo do ciclo celular, antes da etapa de síntese de DNA;
- Em levedura verificou-se que as proteínas iniciadoras são as primeiras a se ligarem nas origens de replicação;
- Fosforilação na mudança de fase dispara a ativação das helicases e inativação (desligamento) de proteínas iniciadoras de ORCs.



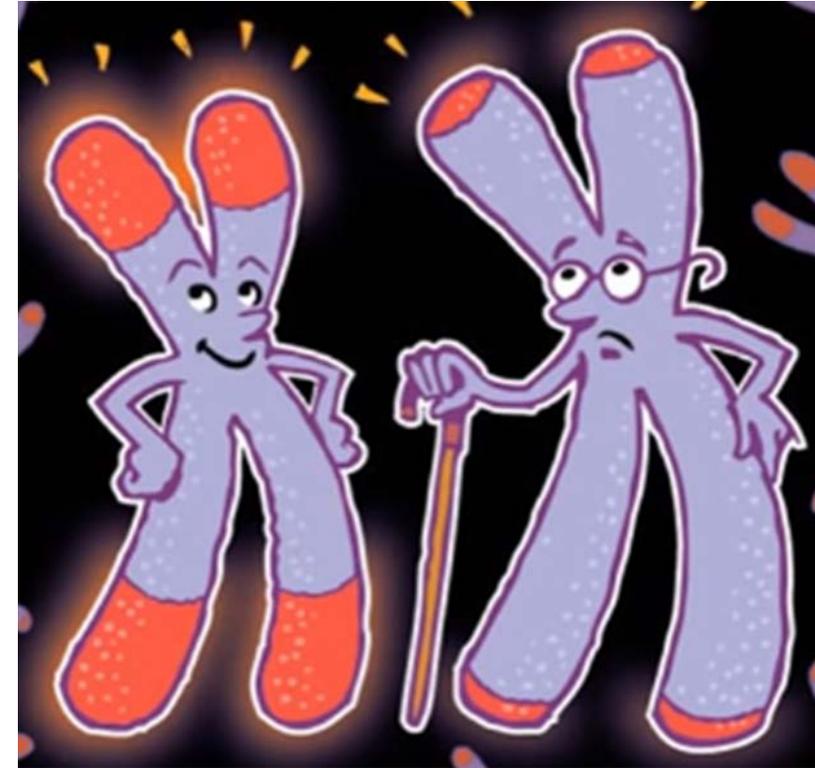
# NUCLEOSSOMOS

- Com a replicação do DNA durante a fase S, conteúdo de histonas tb tem que ser duplicado;
- Aproximadamente 20 cópias de cada gene de histona em vertebrados tem o nível de RNAm elevado 50x durante a fase S.



# TELÔMEROS

- Telômeros são estruturas que protegem as extremidades dos cromossomos de degradação;
- Ou impede que os cromossomos se liguem por essa região;
- Muitos eucariotos, como em mamíferos, apresentam centenas ou milhares de repetições de sequências ricas em G nos telômeros;
- E a extremidade 3' forma uma cadeia que se estende em fita simples;
- Em humanos, seq TTAGGG; entre 5 a 15kb;



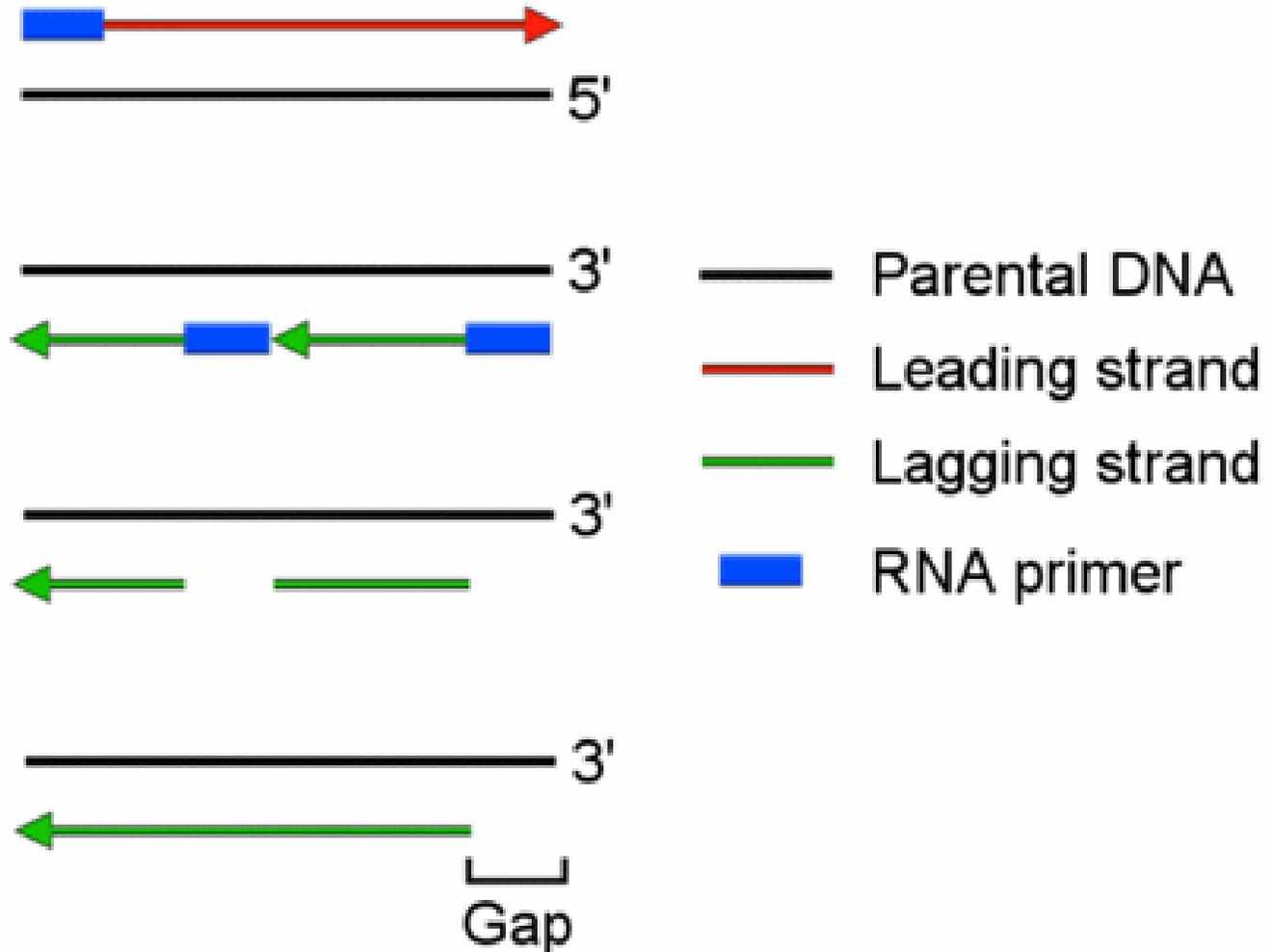
# TELÔMEROS

- As características dos telômeros são formas de contornar dificuldades que a replicação apresenta nessas regiões dos cromossomos;

- O último primer da fita retardada não vai ser repostado com uma sequência de DNA;

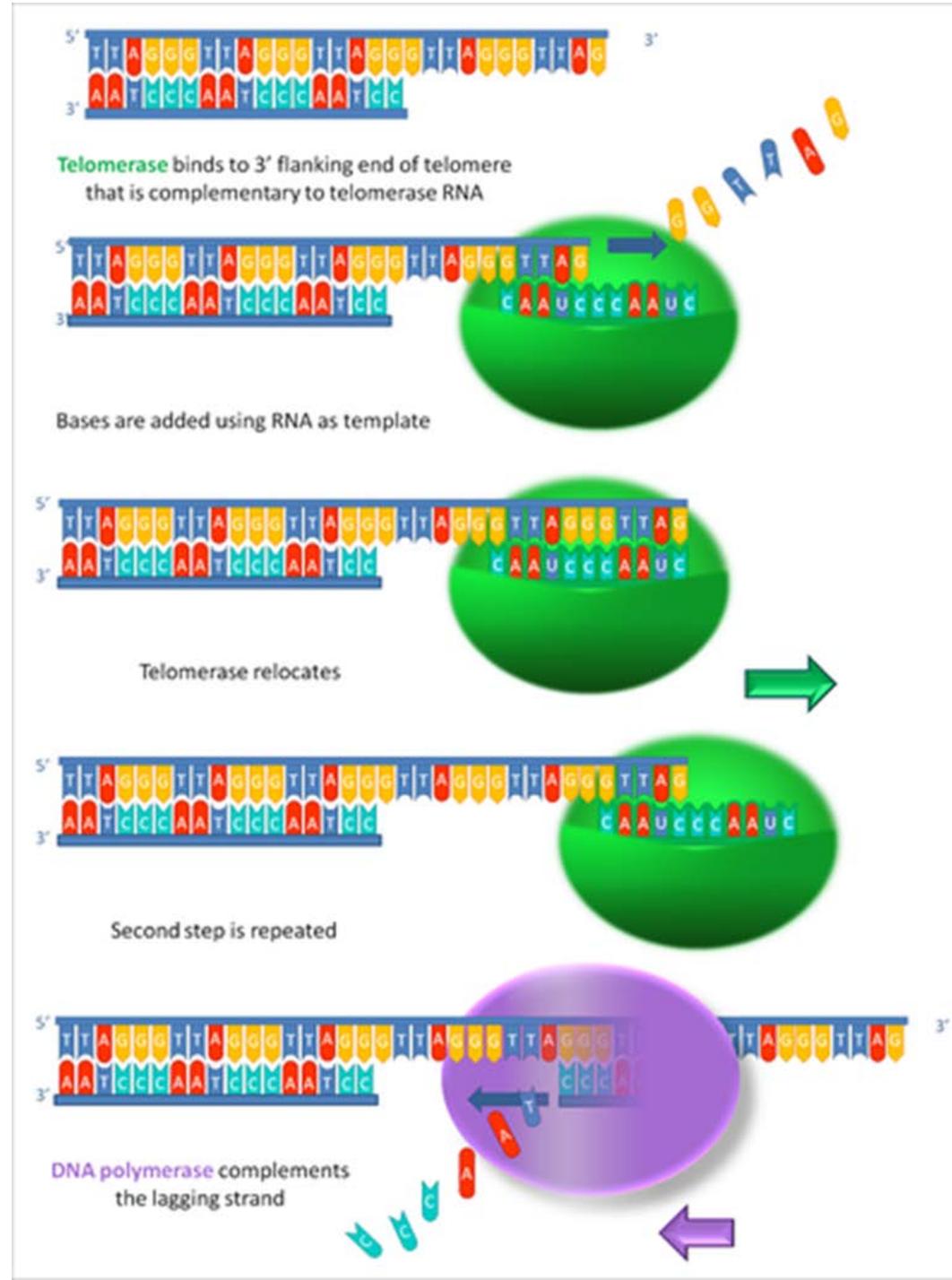
- Pois não há OH-3' para DNA polimerase estender;

- Então, a tendência seria perder DNA das extremidades a cada replicação (entre 50 -200 pb);



# TELÔMEROS

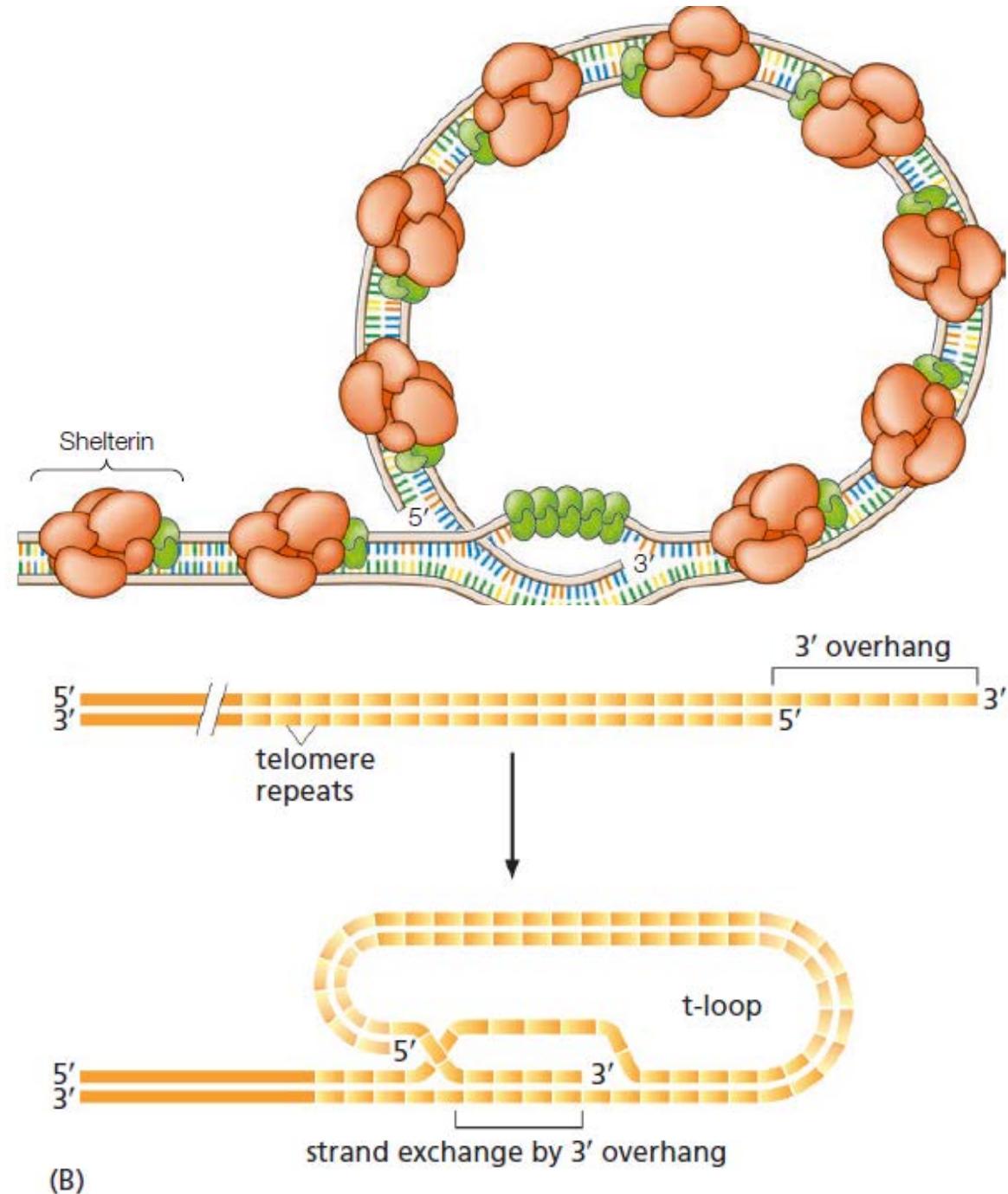
- Na replicação das extremidades, atua a enzima **telomerase**;
- A telomerase é uma enzima transcriptase reversa;
- Sintetiza DNA a partir de uma sequência de RNA;
- Diferente de outras transcriptases;
- A telomerase carrega uma sequência de RNA que utiliza como primer para sua extensão;





# TELÔMEROS

- A proteção dos telômeros é complementada com essas regiões ligando proteínas *shelterinas*;
- Essas interações promovem a formação de alças nas extremidades dos cromossomos;
- E a fita saliente interage com regiões complementares da dupla fita;
- Escondendo a extremidade vulnerável que é a fita simples.



# TELÔMEROS

- Muitas evidências indicam que os telômeros atuem como mecanismo controlador do número de vezes que uma linhagem celular pode se dividir;
- O mecanismo envolve controle do tamanho das extremidades dos cromossomos;
- Isso porque se houver uma progressiva perda das extremidades dos telômeros, as células param de se dividir!