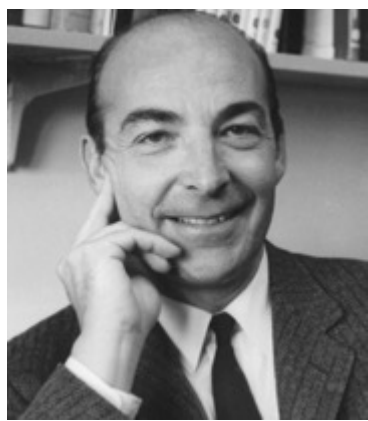


Processos de Replicação do DNA

Capítulo 3 GMB-dos genes aos genomas

Chapter 9- MBG Watson et al

Arthur Kornberg (1956) consegue síntese de DNA em tubo de ensaio com extrato de *E.coli*, dNTPs e DNA: “created life in a test tube”. Premio Nobel em 1959!



ou dNTP
↙

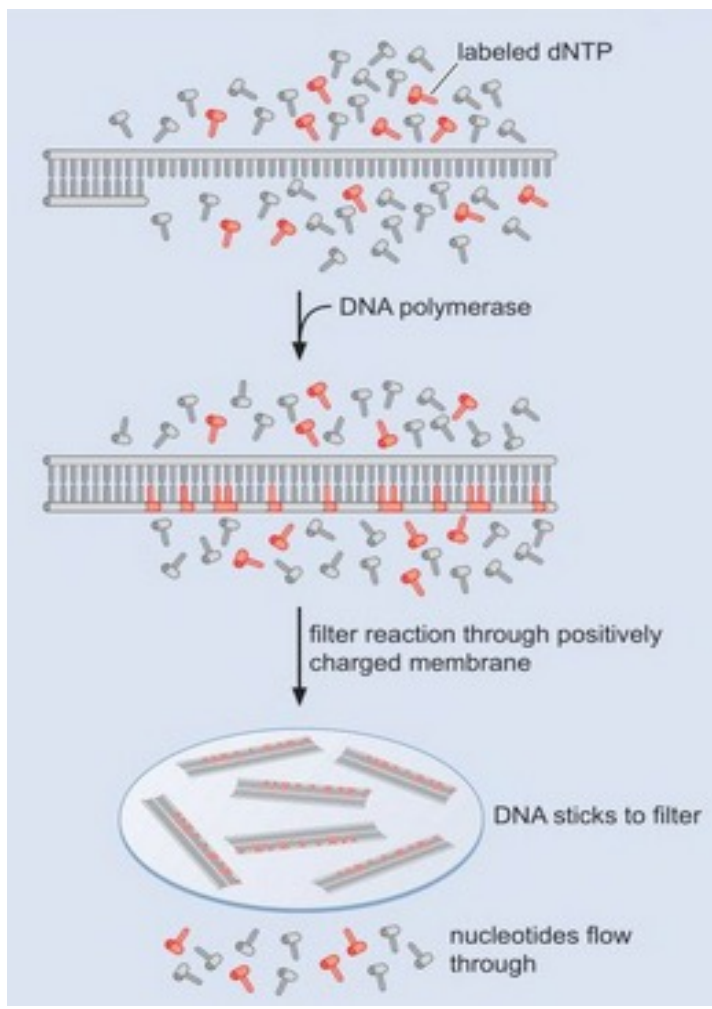
DNA + dATP + extrato de *E.coli* = síntese de DNA!
dGTP
dCTP
dTTP + (³H) dTTP

Como a incorporação de (³H) dT em DNA pode ser medida?
(DNA precipita em álcool- nucleotídeo livre não)

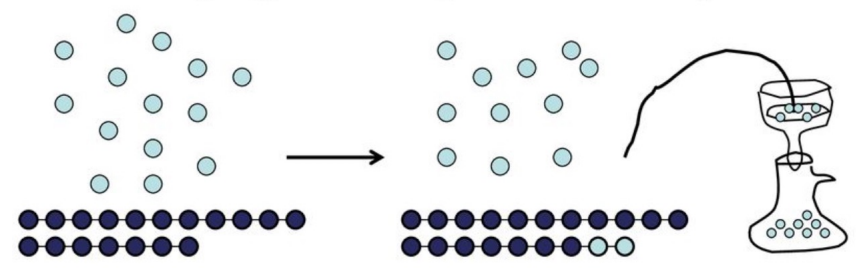
Kornberg purifica a enzima responsável, que ele chama de

DNA polimerase.

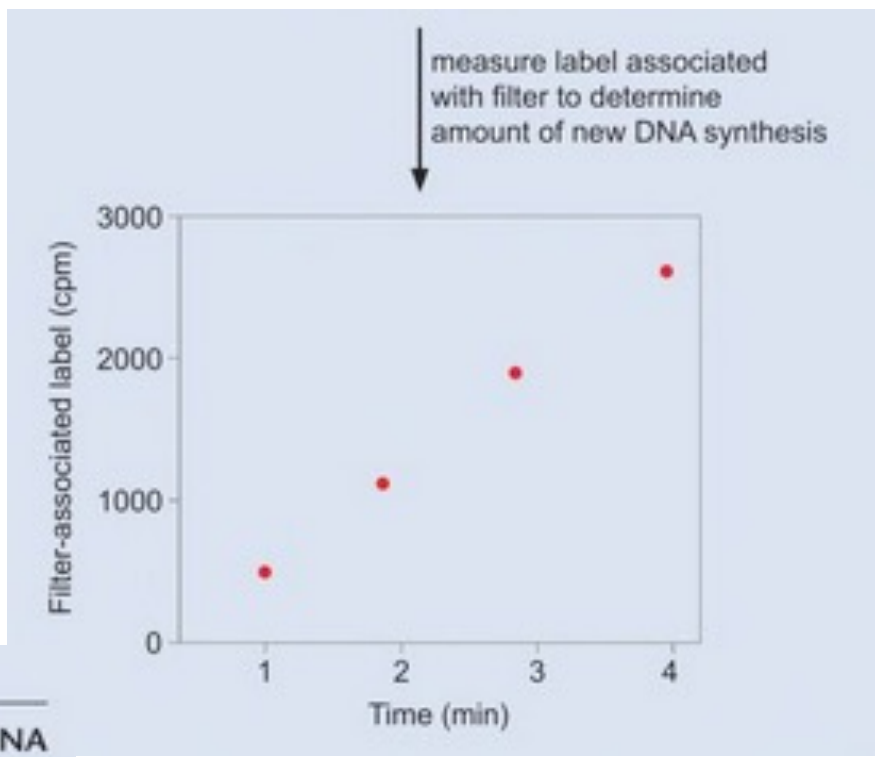
Como medir síntese de DNA através de precursores radioativos!



Assaying DNA Polymerase Activity



In principle: Monitor incorporation of radioactive nucleotide precursors (●) into acid insoluble form (physically separate product from precursor)



BOX 9-1 FIGURE 2 Incorporation assay to measure DNA synthesis. In the example shown, filter binding is used to separate unincorporated from DNA-incorporated labeled nucleotides.

Watson et al,

Posteriormente, uma bactéria mutante, sem essa atividade, consegue crescer normalmente!

Como isso pode acontecer??

Essa Polimerase replicativa não é essencial?

Como a bactéria replica seu DNA?

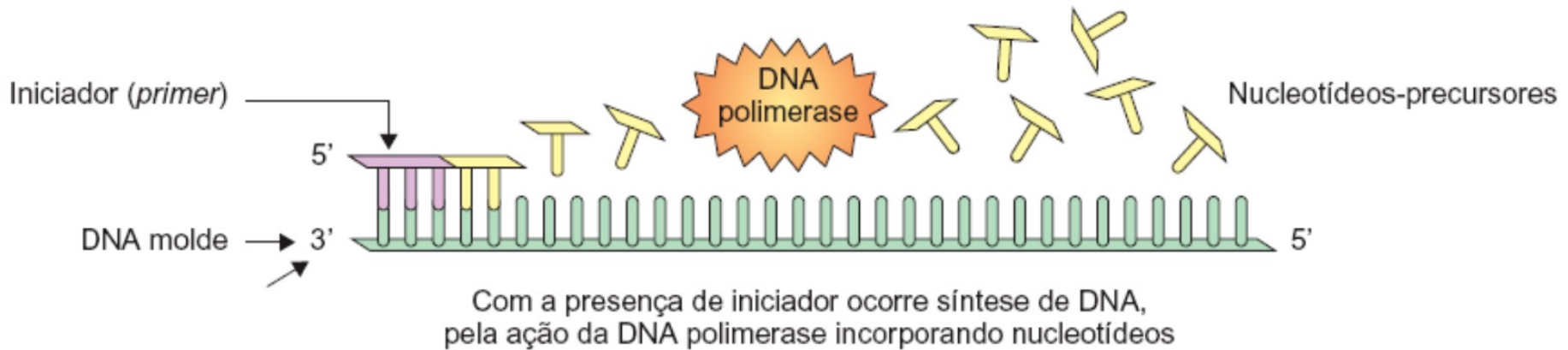
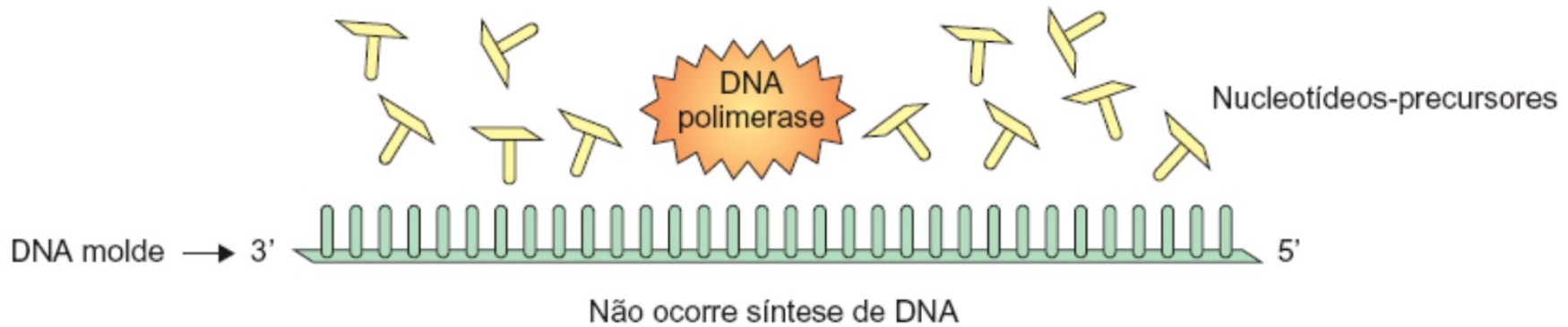
Existem outras DNA polimerases em *E.coli*:

A enzima inicial foi chamada de **DNA polimerase I**,

e não é a principal enzima de replicação de DNA

em *E.coli*- que é realizada pela **DNA polimerase III!**

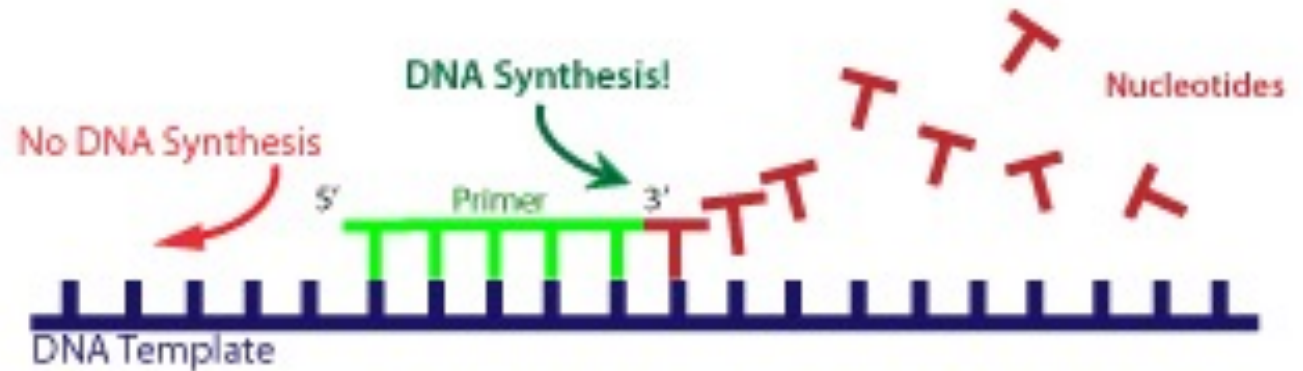
A aluna de Kornberg, Tsuneko Okazaki, descobre que não ocorre Síntese de DNA em DNA simples fita e mesmo em DNA dupla fita extraído cuidadosamente! Há necessidade de um primer (iniciador)!



E também descobre que a síntese só ocorre em uma das pontas do primer... 3' OH



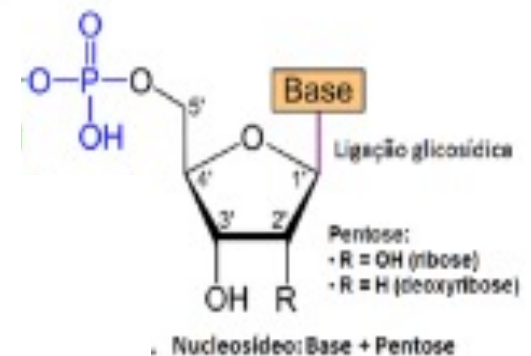
Reiji and Tsuneko Okazaki,
Arthur and Silvy Kornberg!



Todas polimerases precisam de primers e sintetizam DNA na direção 5' -3' !

Nucleotídeo no DNA

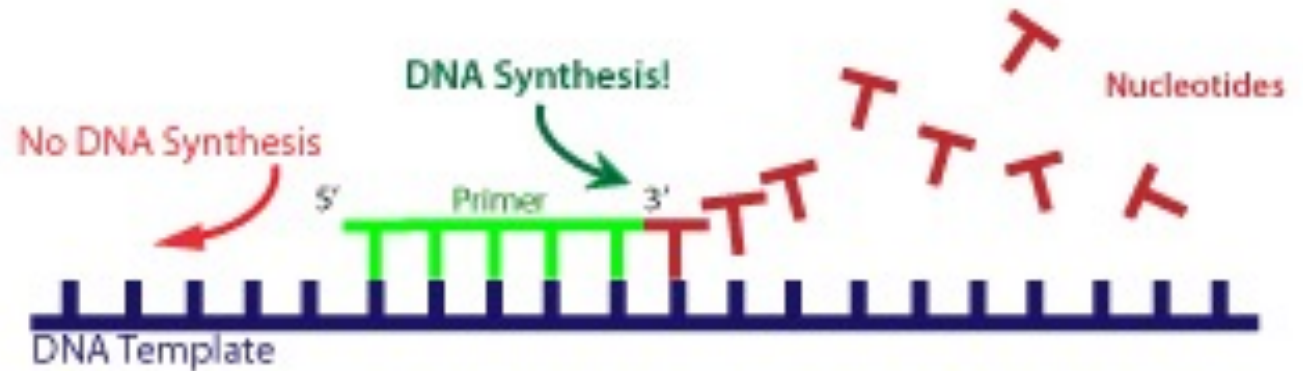
Por que precisa do primer?



E também descobre que a síntese só ocorre em uma das pontas do primer... 3' OH

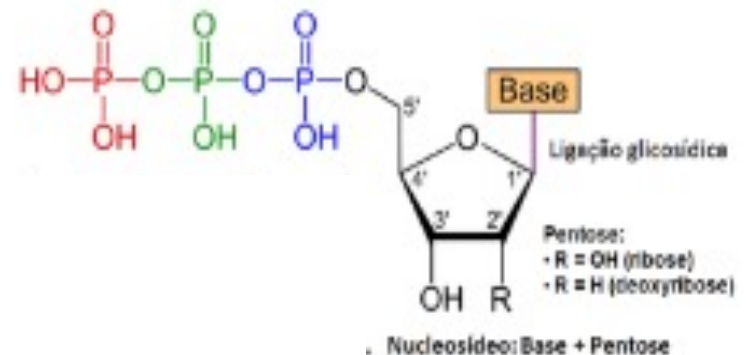


Reiji and Tsuneko Okazaki,
Arthur and Silvy Kornberg!



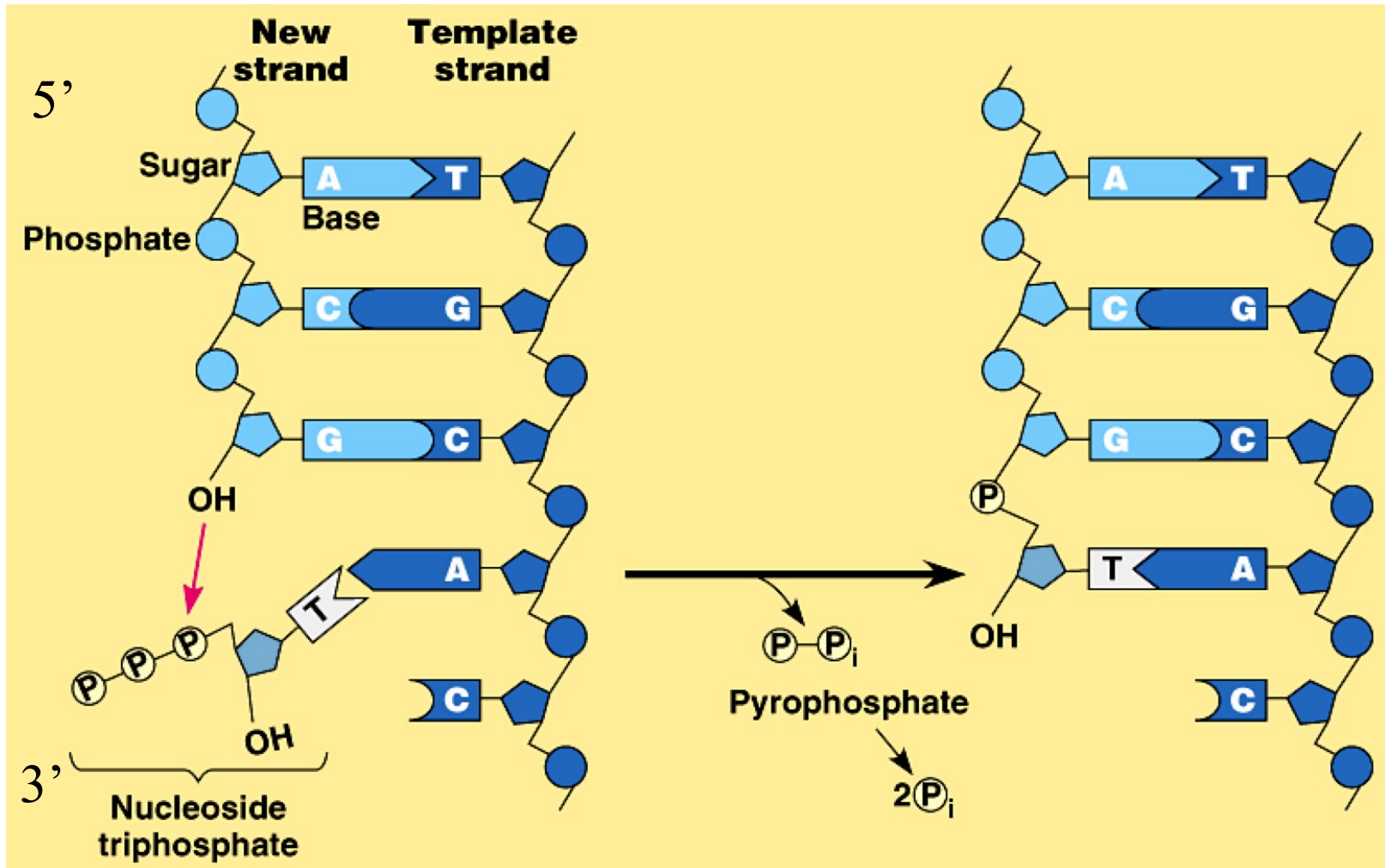
Todas polimerases precisam de primers e sintetizam DNA na direção 5' -3' !

Precursor na síntese do DNA



Por que precisa do primer?

**A reação sempre ocorre na direção 5' -3' ,
a partir de uma ponta 3' OH!**



Questão desafio:

Mas então como o DNA havia funcionado para Kornberg?

Ele só tinha usado DNA + precursores, sem primers!!!!

TODA POLIMERASE: A reação sempre ocorre na direção 5' -3', a partir de uma ponta 3' OH!

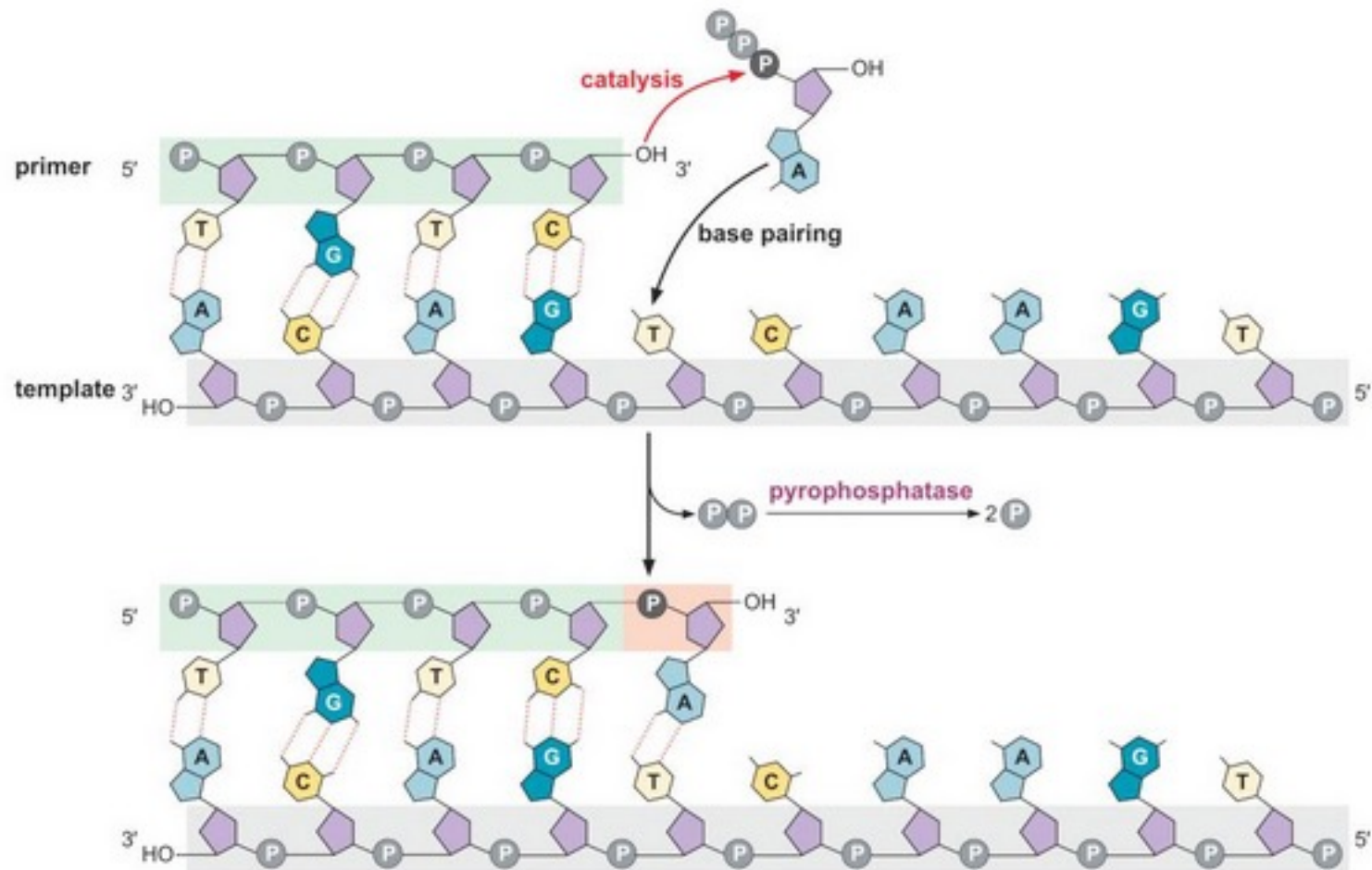


FIGURE 9-2 Diagram of the mechanism of DNA synthesis. DNA synthesis is initiated when the 3'-OH of the primer mediates the nucleophilic attack of the α -phosphate of the incoming dNTP. This results in the extension of the 3' end of the primer by one nucleotide and releases one molecule of pyrophosphate. Pyrophosphatase rapidly hydrolyzes released pyrophosphate into two phosphate molecules.

A síntese só ocorre em uma das pontas do primer... 3' OH

Mas como ocorre o início da síntese na bactéria ou de um replicon?

Veja por exemplo uma bolha de replicação de uma bactéria!

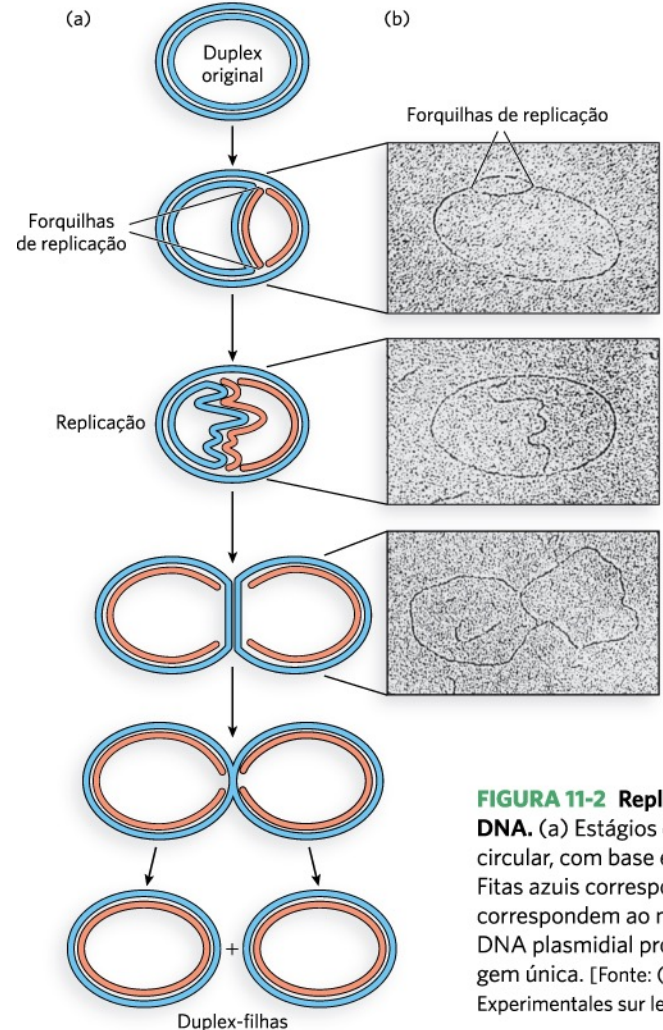
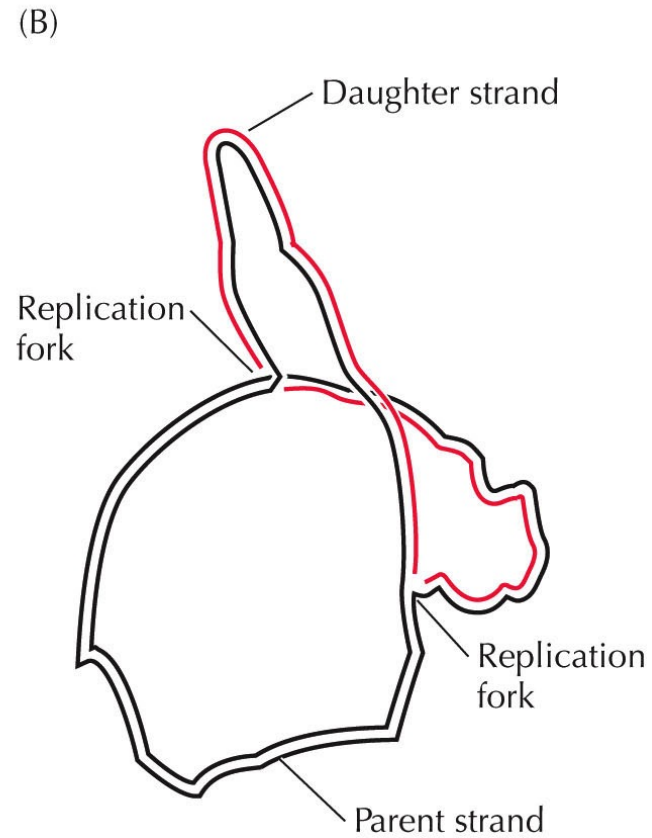
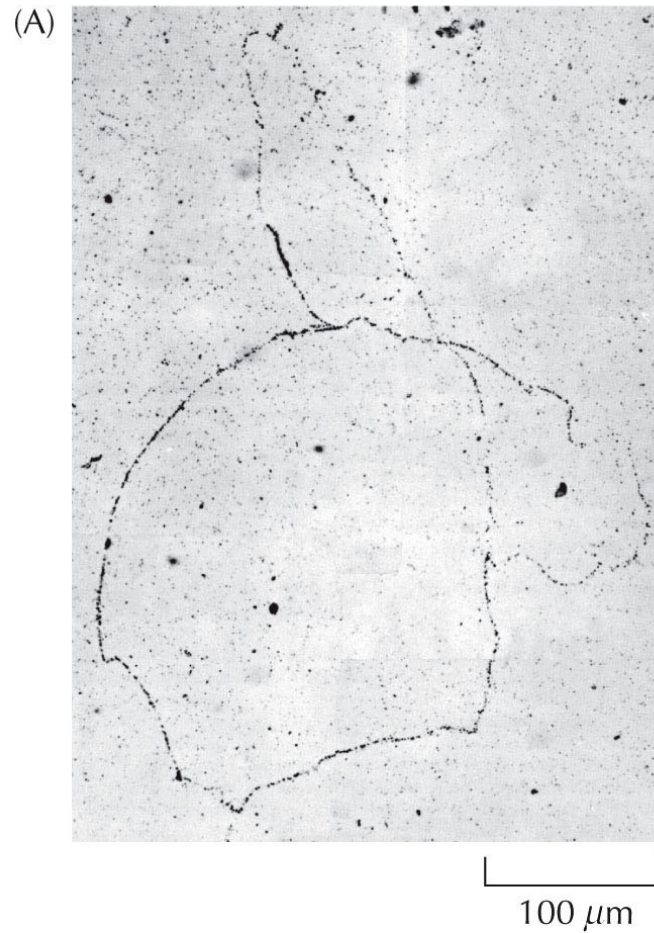
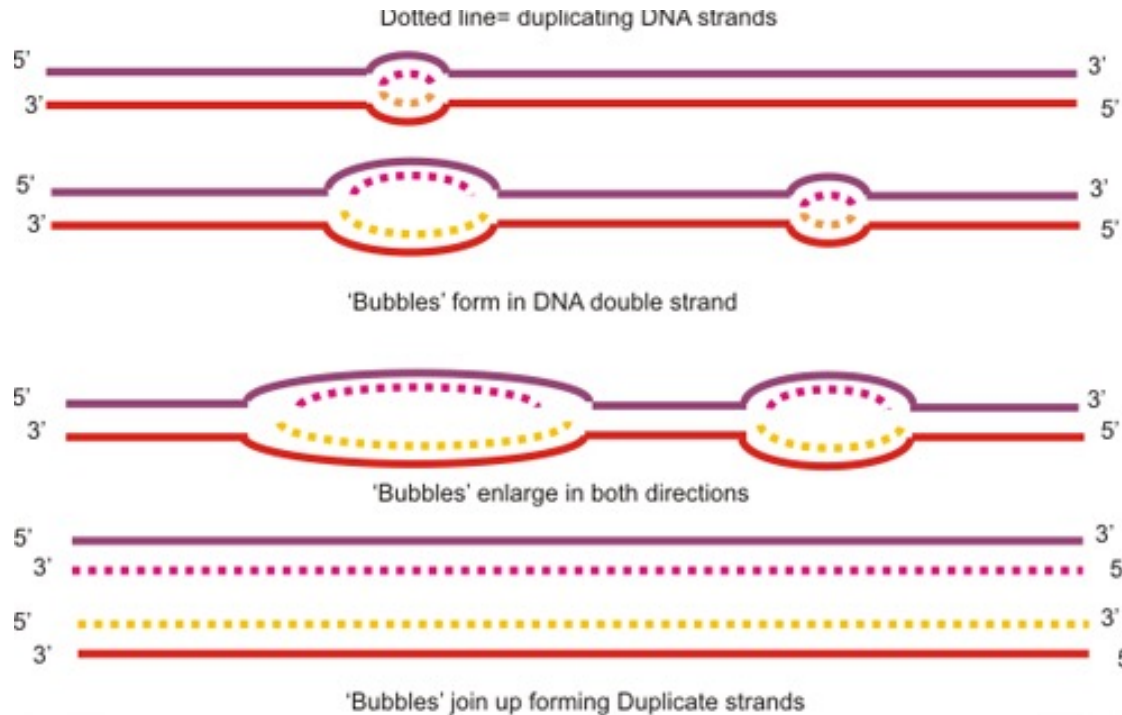


FIGURA 11-2 Replicação simultânea de ambas as fitas de DNA. (a) Estágios de replicação de um DNA de fita dupla circular, com base em observações de microscopia eletrônica. Fitas azuis correspondem ao DNA parental; fitas vermelhas correspondem ao novo DNA. (b) Micrografias eletrônicas de DNA plasmidial procedendo à replicação a partir de uma origem única. [Fonte: (b) Bernard Hirt, Institut Suisse de Recherches Experimentales sur le Cancer.]

O DNA de E.coli tem uma única origem de replicação.



Ou durante a replicação de um cromossomo eucarionte!



Como ocorre esse início de replicação, se a DNA polymerase só replica a partir de um primer com 3' OH????

Eucariontes tem várias origens de replicação. Por que?

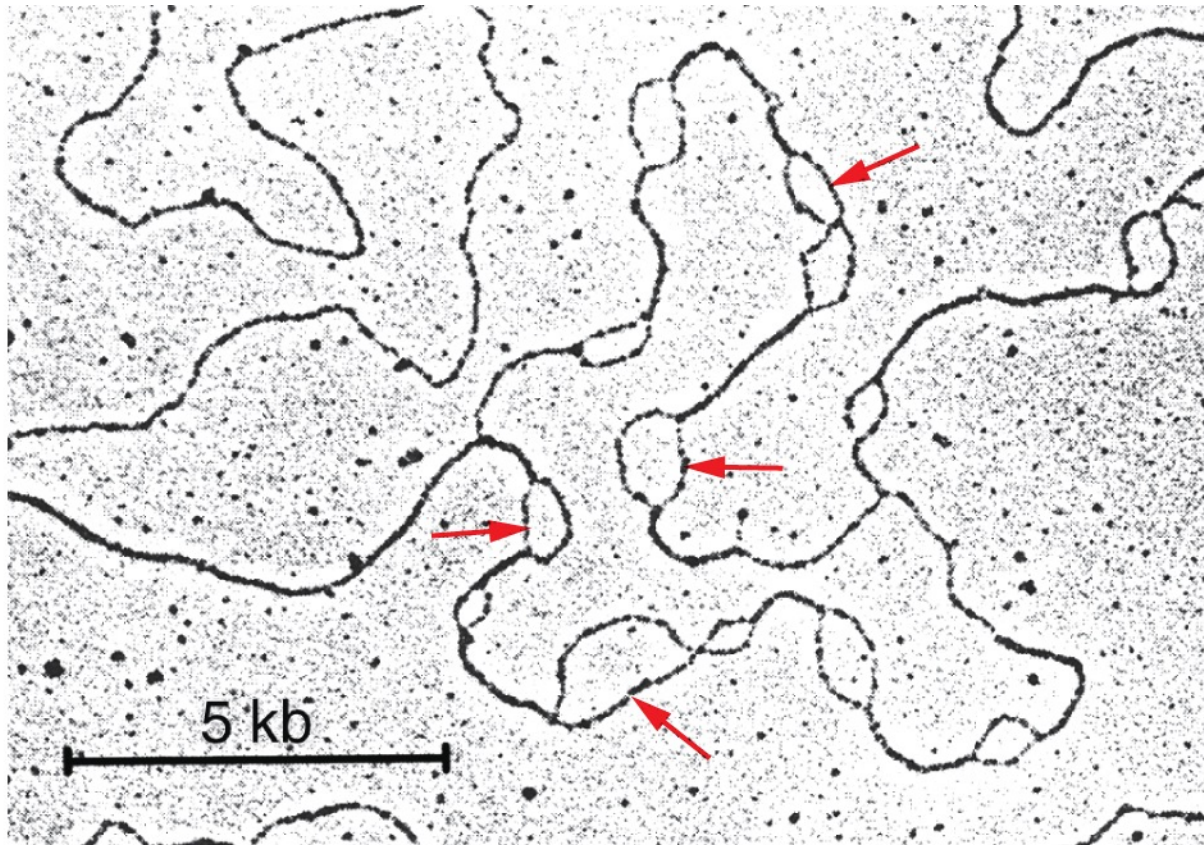


FIGURA 11-14 Fotomicrografia mostrando as origens de replicação múltiplas ao longo de um cromossomo eucariótico. Cada origem aparece como uma bolha de replicação na extensão do eixo do cromossomo. As setas identificam algumas dessas bolhas de replicação.

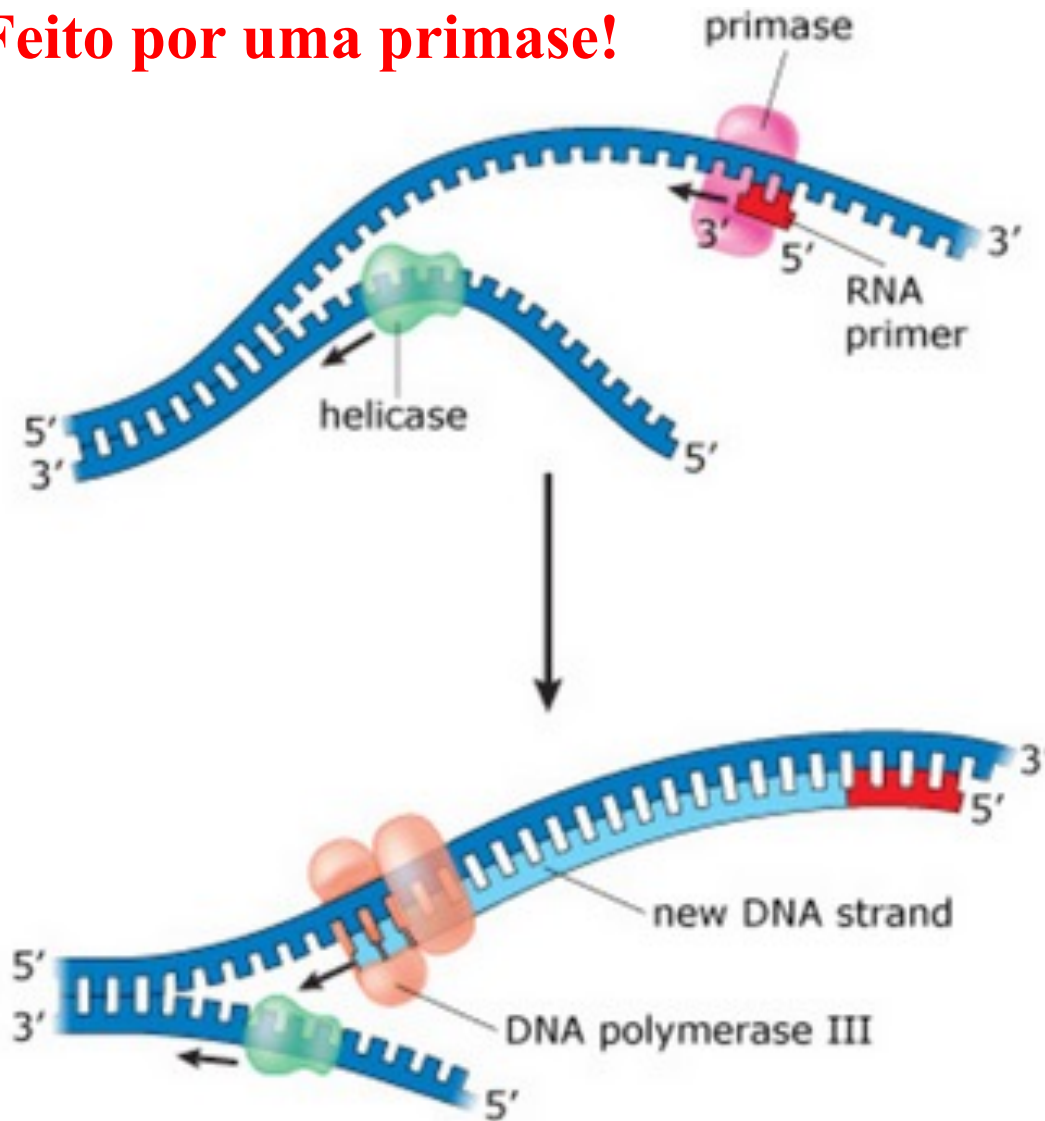
Questões desafio:

1. Por que o cromossomo eucarionte tem tantos Replicons? (Ou bolhas de replicação)

2. Como esses replicons iniciam sua replicação se precisam ter um primer?????

3. Existe primer?

**No início de uma replicação de DNA
Sempre tem um primer de RNA!
Feito por uma primase!**



Mas como seria a replicação da outra fita?

Como pode haver síntese das duas fitas, se a direção é 5'-3'
(e o DNA tem cadeias antiparalelas)?

Desenhe uma bolha de replicação e indique os primers.....

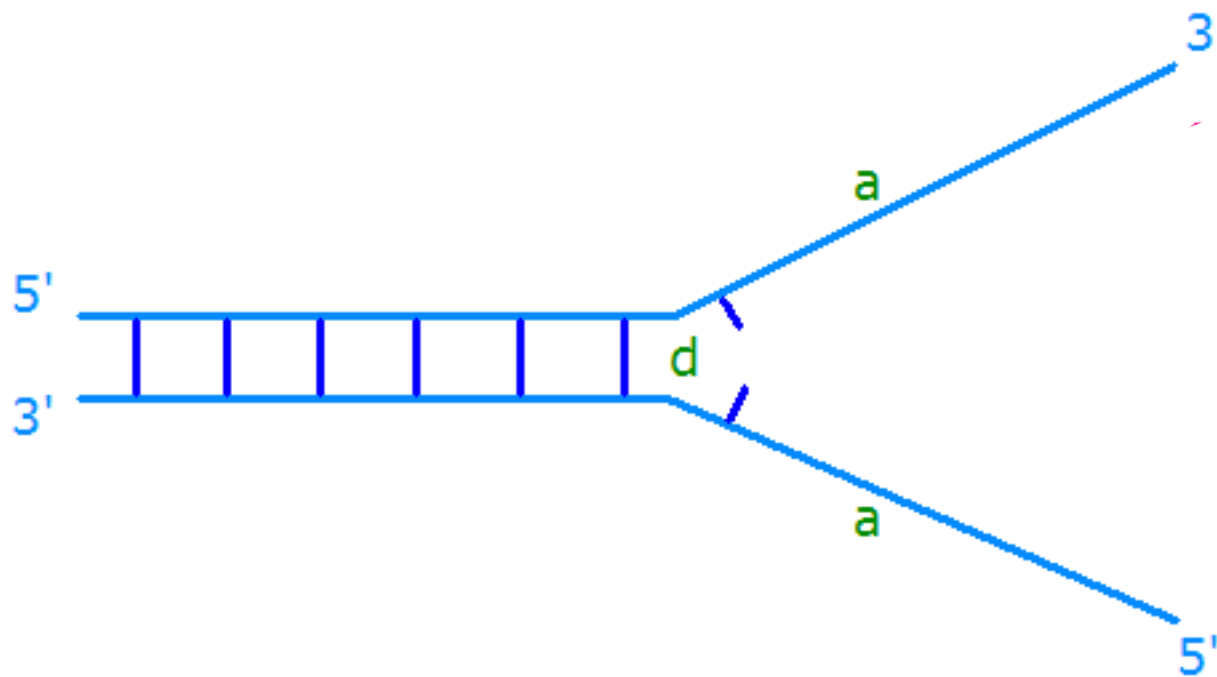
- Que significa dizer que as duas fitas replicam ao mesmo tempo?
- Como replicar a fita que teria que ser sintetizada

no sentido 3' > 5'?

- Que significa dizer que uma “bolha de replicação” é

BIDIRECIONAL?

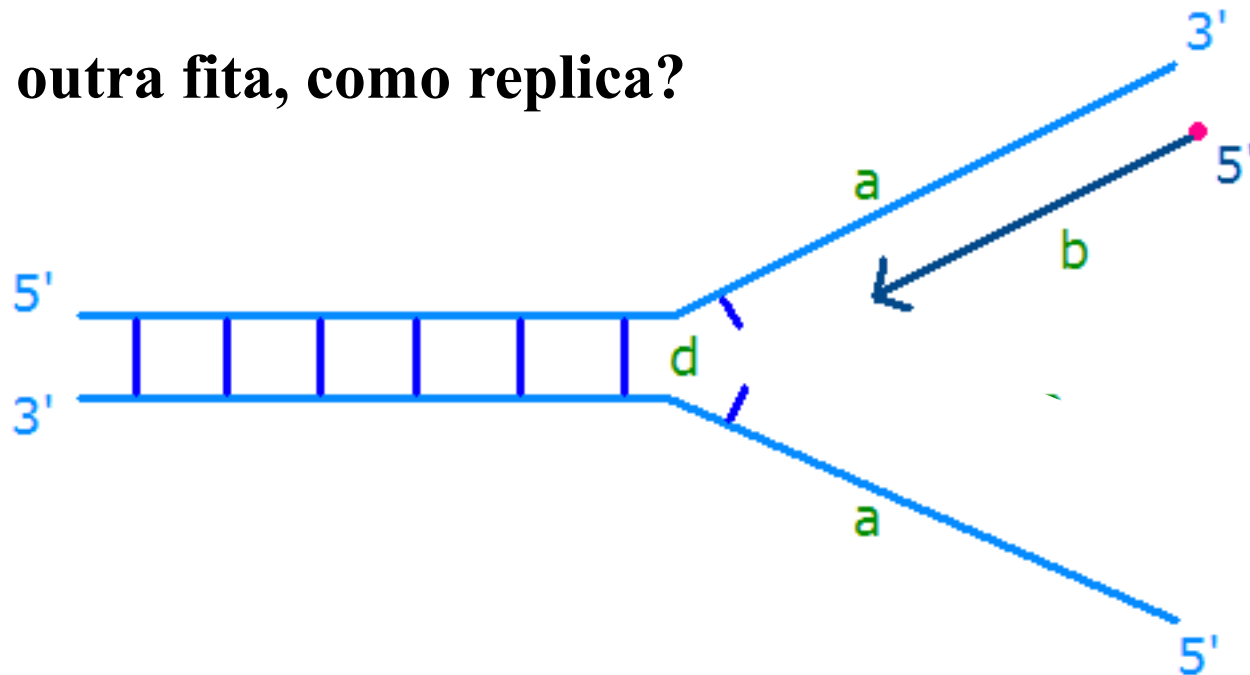
A forquilha e as fitas antiparalelas! Como replicar o DNA Na direção 5'-3' na mesma direção?



A forquilha e as fitas antiparalelas! Como replicar o DNA Na direção 5'-3' na mesma direção?

Fita *leading* (contínua)

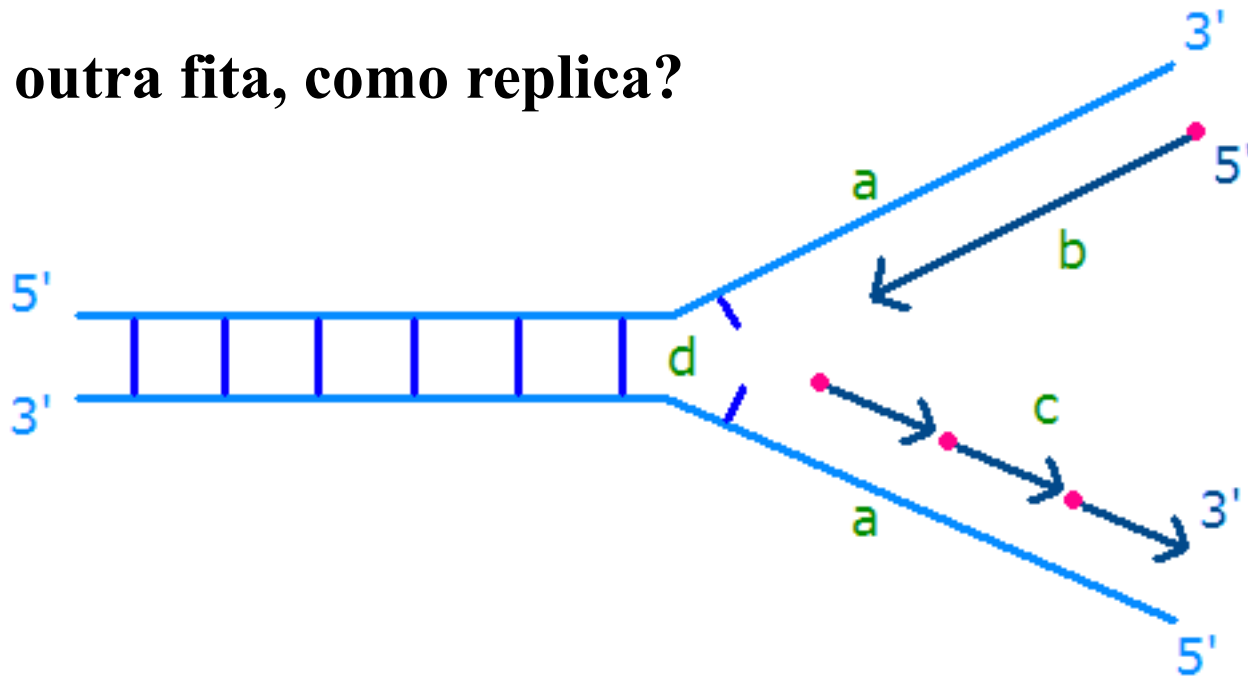
Mas e a outra fita, como replica?



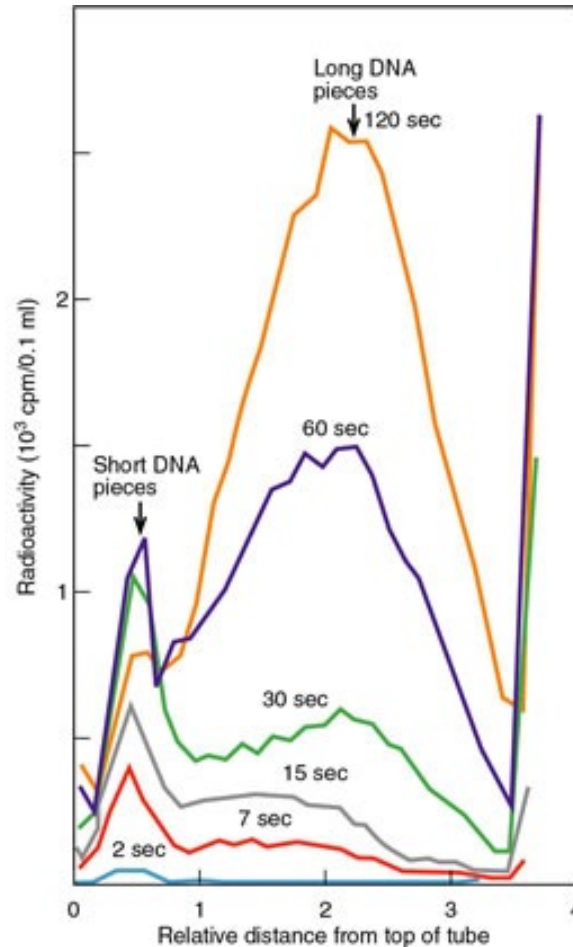
A forquilha e as fitas antiparalelas! Como replicar o DNA Na direção 5'-3' na mesma direção?

Fita *leading* (contínua)

Mas e a outra fita, como replica?



Reiji Okazaki, identifica que o DNA sintetizado inicialmente É pequeno..... Sendo sintetizado em fragmentos!

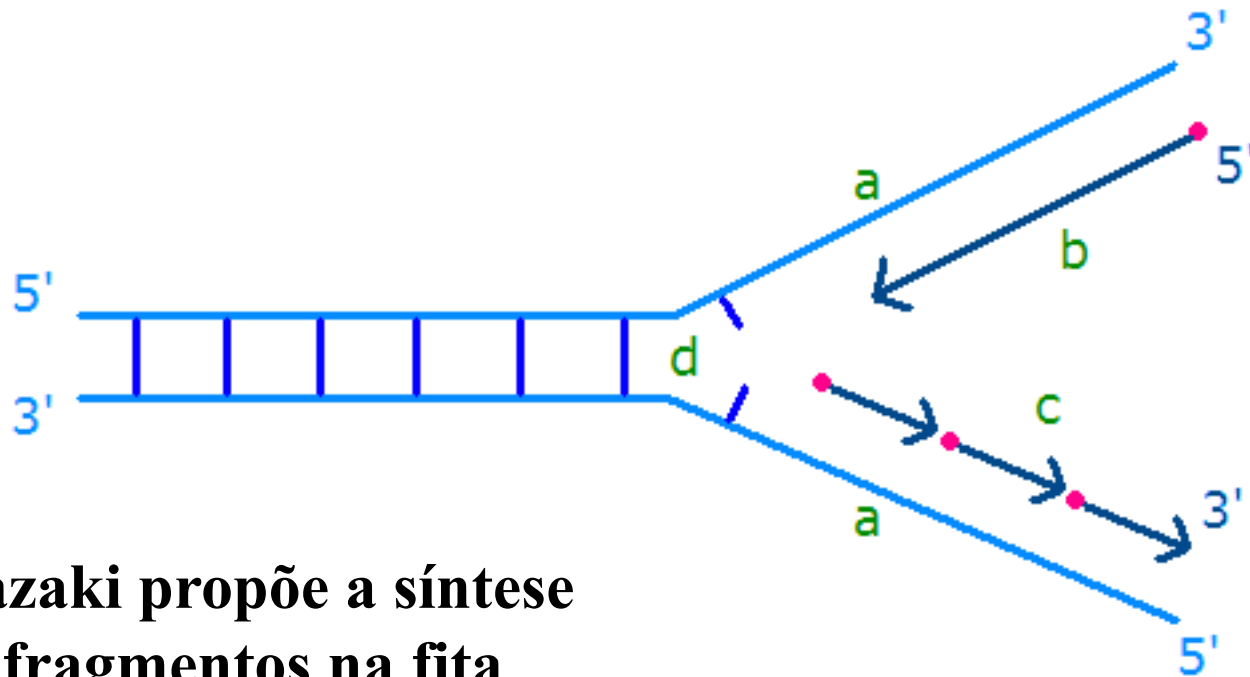


Tamanho do DNA medido em gradiente de sacarose alcalina.

Maior tamanho

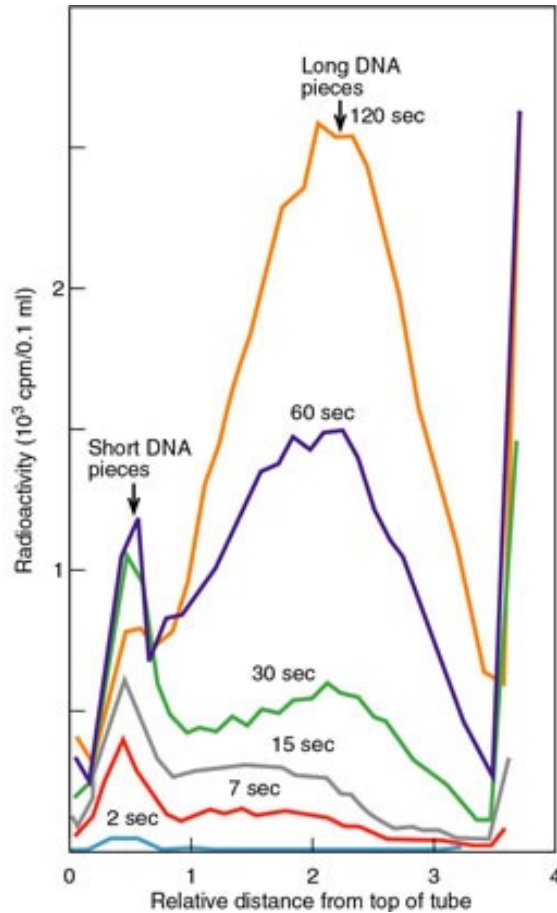
A forquilha e as fitas antiparalelas! Como replicar o DNA Na direção 5'-3' na mesma direção?

Fita *leading* (contínua)

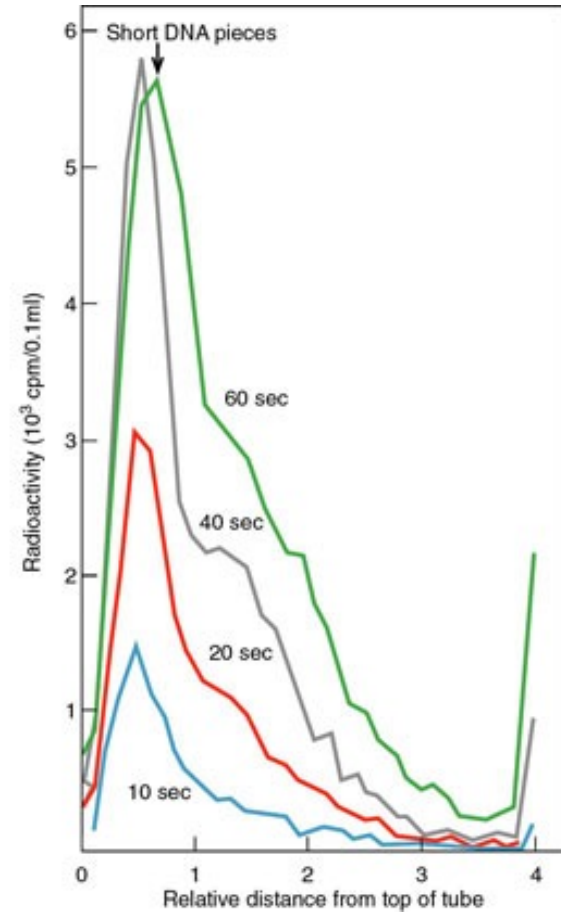


Okazaki propõe a síntese
por fragmentos na fita
lagging (descontínua)

Reiji Okazaki, posteriormente isola mutantes cuja elongação da cadeia filha é mais lento! Defeito em DNA ligase!



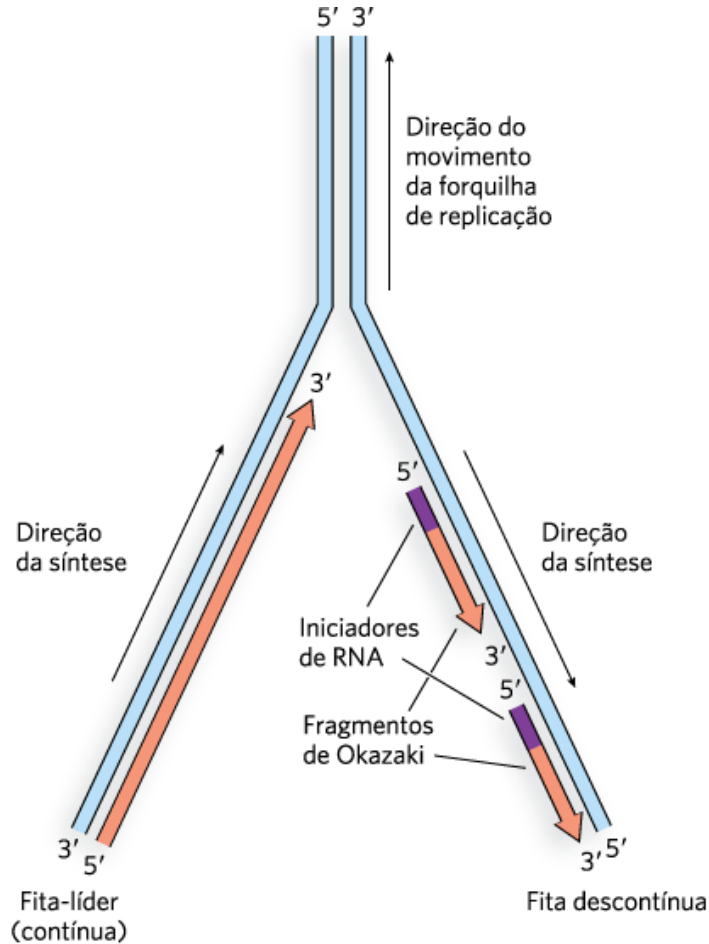
selvagem



Mutante termossensível

para a DNA ligase (a proteína não funciona só a 42°C)

Mas a fita lagging também precisa de primer... para cada fragmento!.



Mas como é esse primer?

FIGURA 11-4 Estrutura da forquilha de replicação. As DNA-polimerases podem estender o DNA apenas na direção 5'→3', porém as duas fitas parentais são antiparalelas. Portanto, uma fita-filha (a fita-líder) é sintetizada continuamente, na direção de movimento da forquilha, enquanto a fita sintetizada na direção oposta (a fita descontínua) precisa ser replicada de forma descontínua como uma série de fragmentos de Okazaki.

A cada passo entra em ação a primase que faz o primer de RNA....

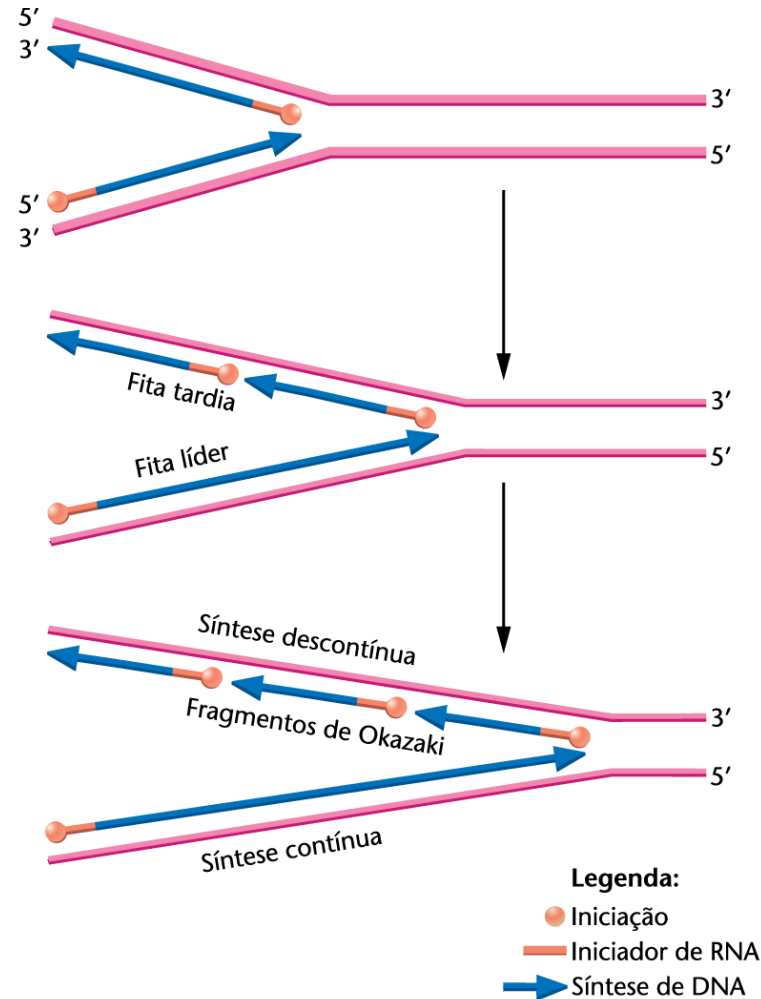
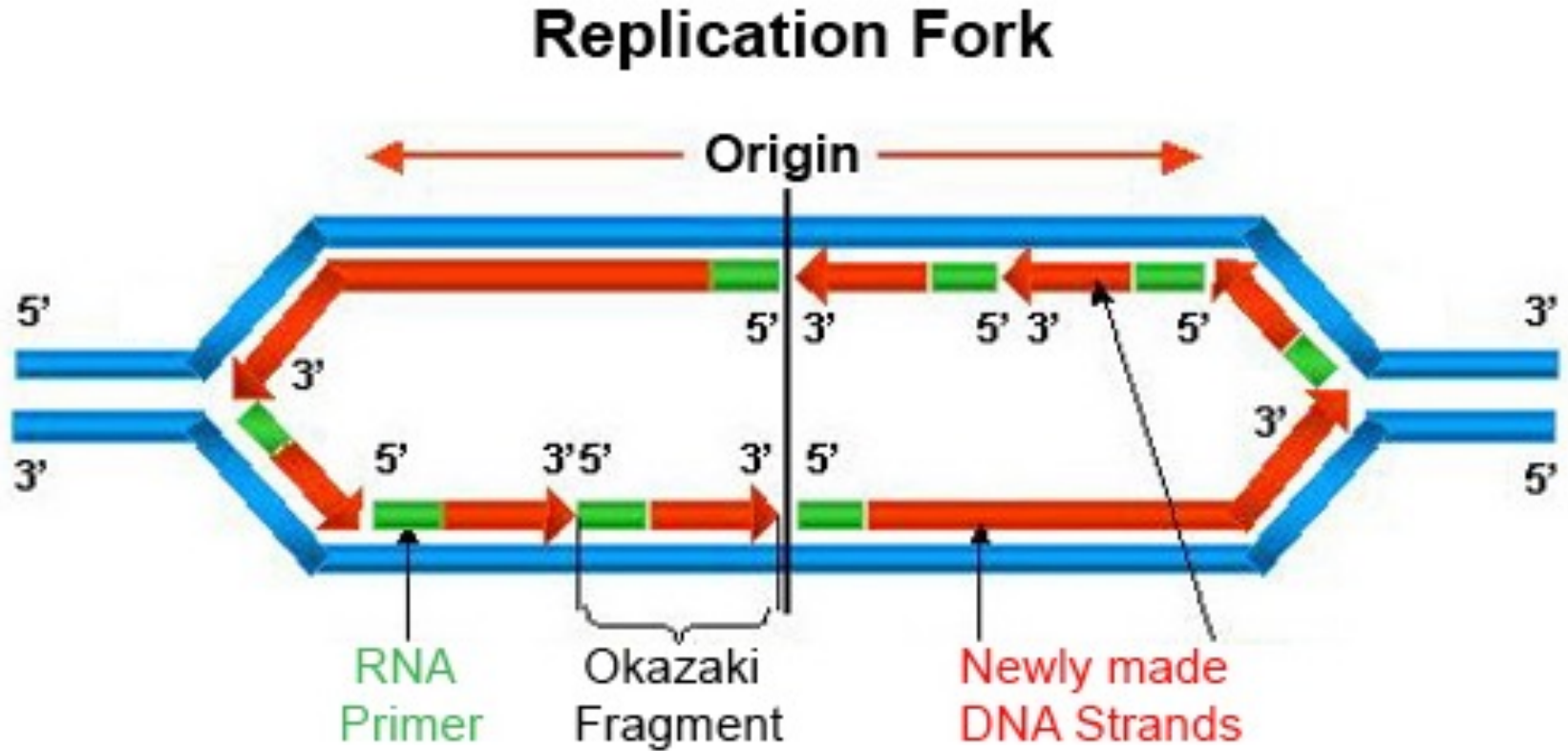


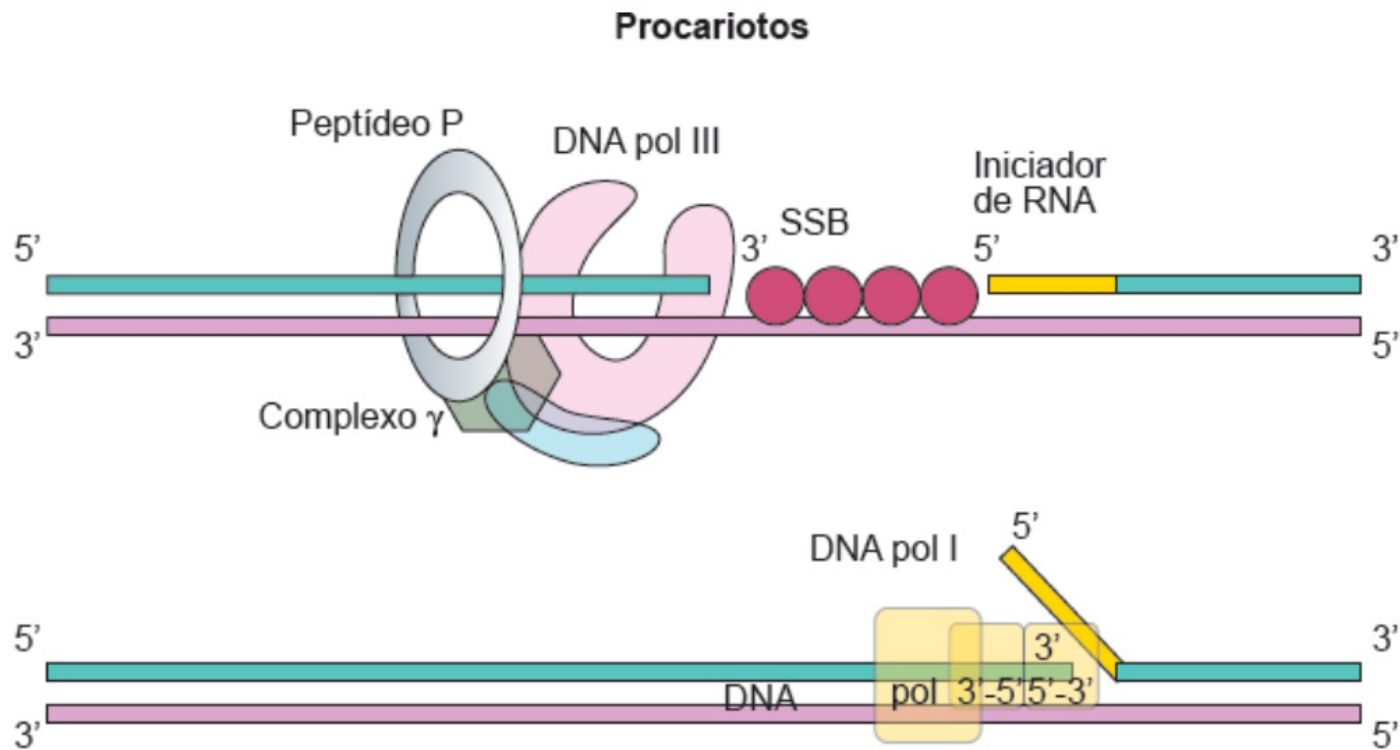
FIGURA 11-11 Progressão oposta da síntese de DNA ao longo de duas fitas, necessária porque as duas fitas de DNA correm antiparalelamente uma à outra, e a DNA-polimerase III sintetiza somente em uma direção (5' a 3'). Na fita tardia, a síntese tem de ser descontínua, resultando na produção dos fragmentos de Okazaki. Na fita líder, a síntese é contínua. Os iniciadores de RNA são usados para iniciar a síntese em ambas as fitas.

Veja como é na bolha de replicação....



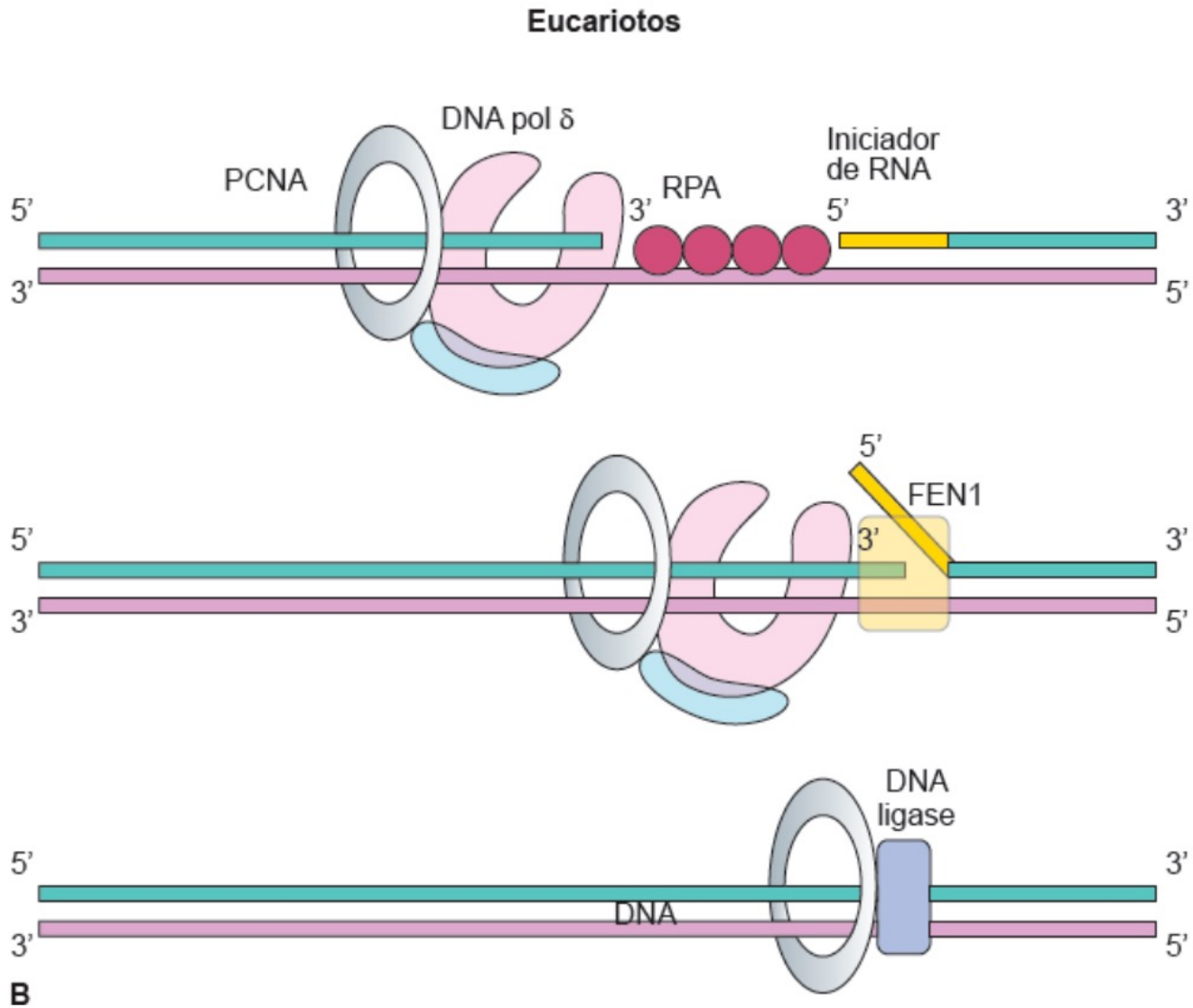
E esse RNA fica no DNA depois? Como ele é retirado?

**A DNA polimerase I também tem função de exonuclease 5' -3' O que é isso?
Em que momento é útil?**



A

E em eucariotes é diferente?



RNase H (H de híbrido) também remove primers!

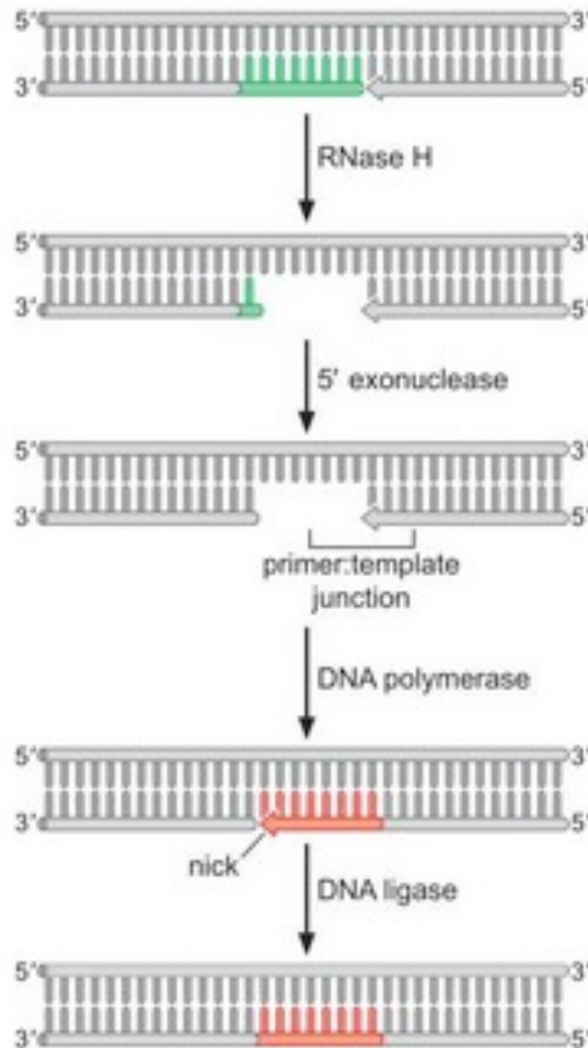


FIGURE 9-13 Removal of RNA primers from newly synthesized DNA. The sequential function of RNase H, 5' exonuclease, DNA polymerase, and DNA ligase during the

Video replicação- 4 minutos- muito bom!

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

A DNA polimerase tem a estrutura de uma mão....

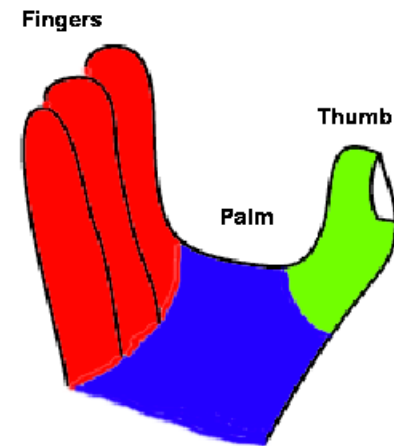
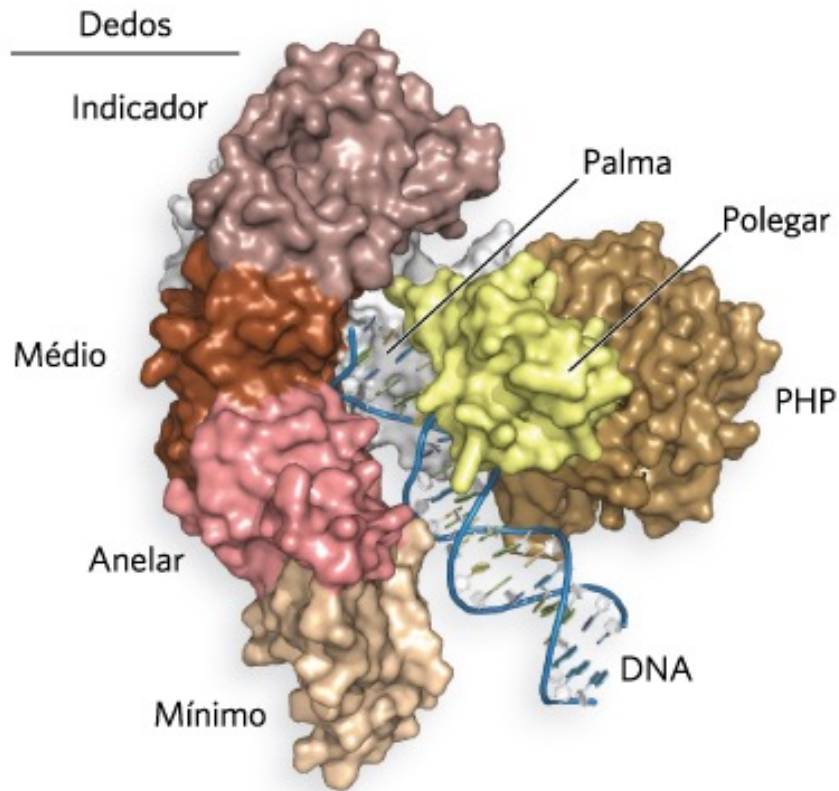
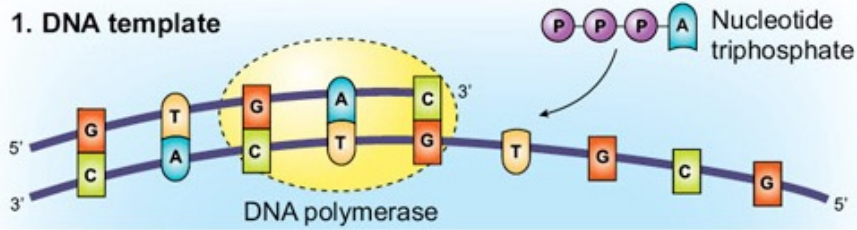


FIGURA 11-13 A subunidade α da Pol III de *E. coli*. Diagrama em fita da subunidade α da Pol III, indicando os domínios relativos a palma, dedos, polegar e PHP. [Fonte: PDB ID 3EOD].

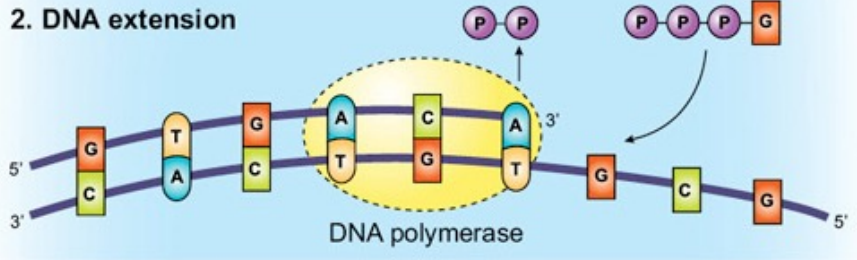
A DNA polimerase tem FUNÇÃO EDITORIAL- o que é isso?

Ela relê o “texto” e corrige! Atividade exonuclease 3’-5’.

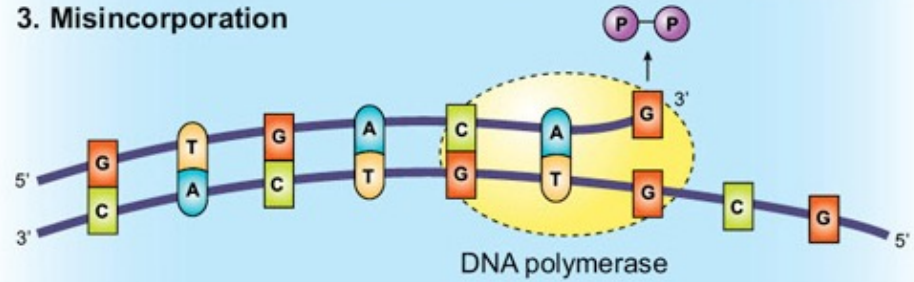
1. DNA template



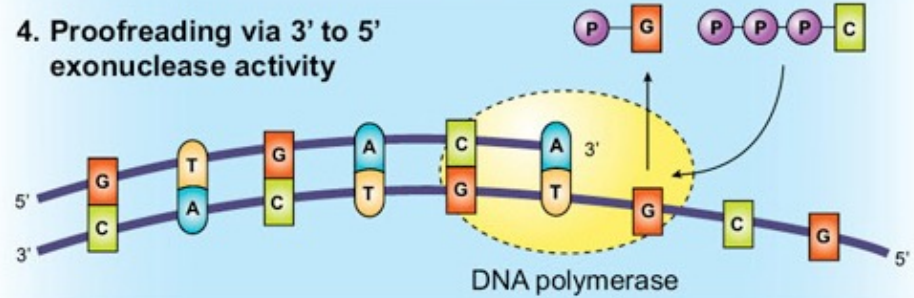
2. DNA extension



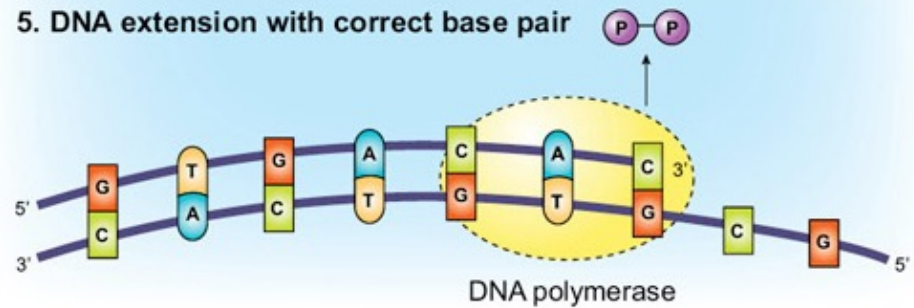
3. Misincorporation



4. Proofreading via 3' to 5' exonuclease activity

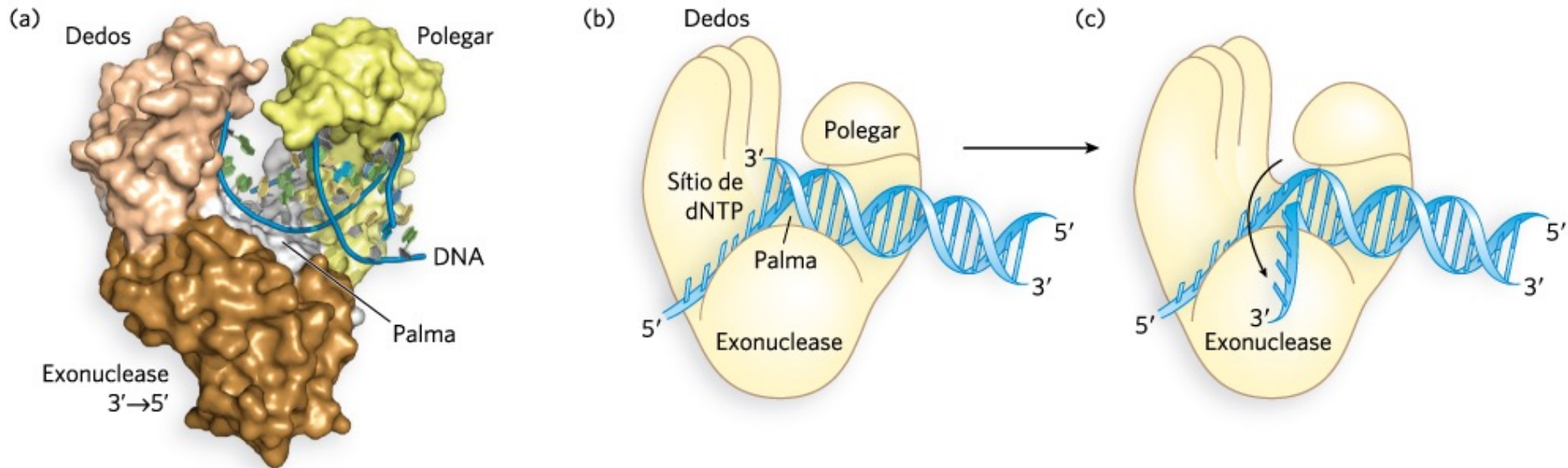


5. DNA extension with correct base pair



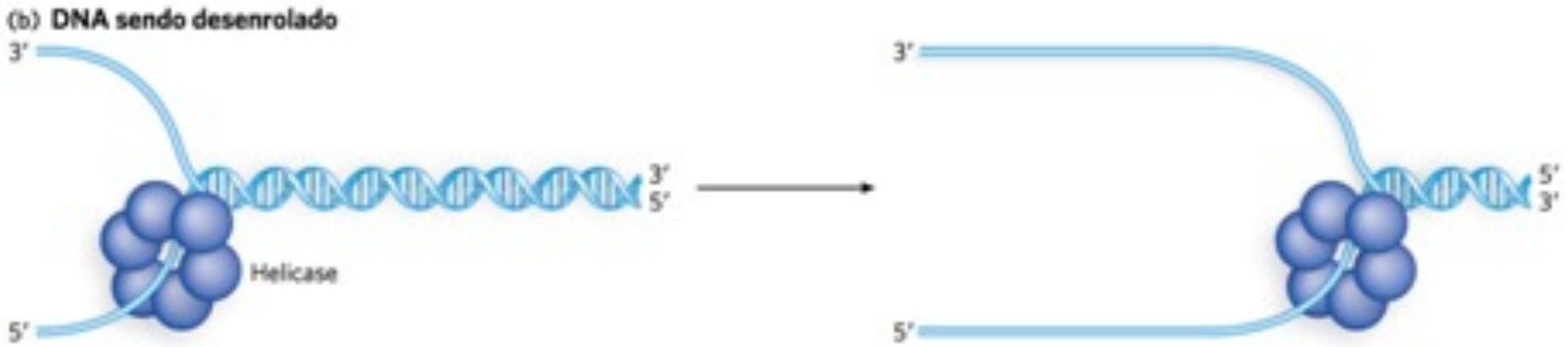
A DNA polimerase tem a estrutura de uma mão....

Com diferentes domínios!

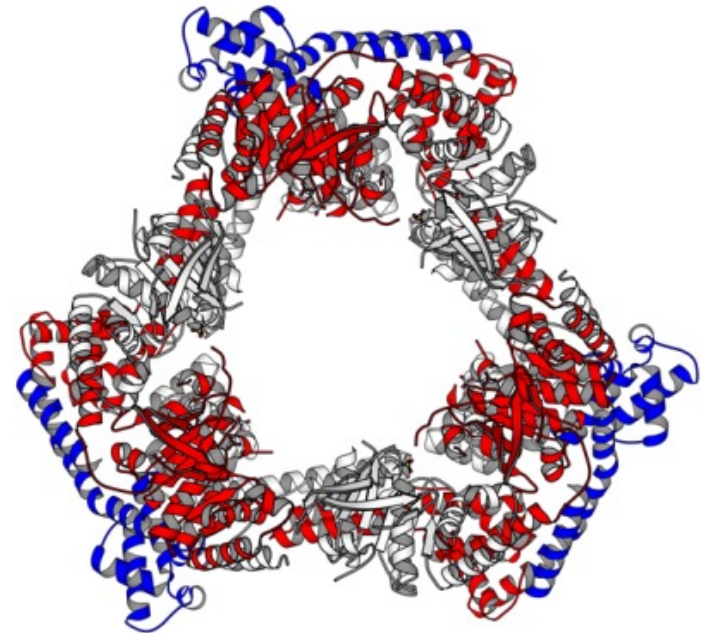


A atividade exonuclease 3'-5' está na palma da mão!

E como é aberta a hélice do DNA? *Precisa de uma helicase!*

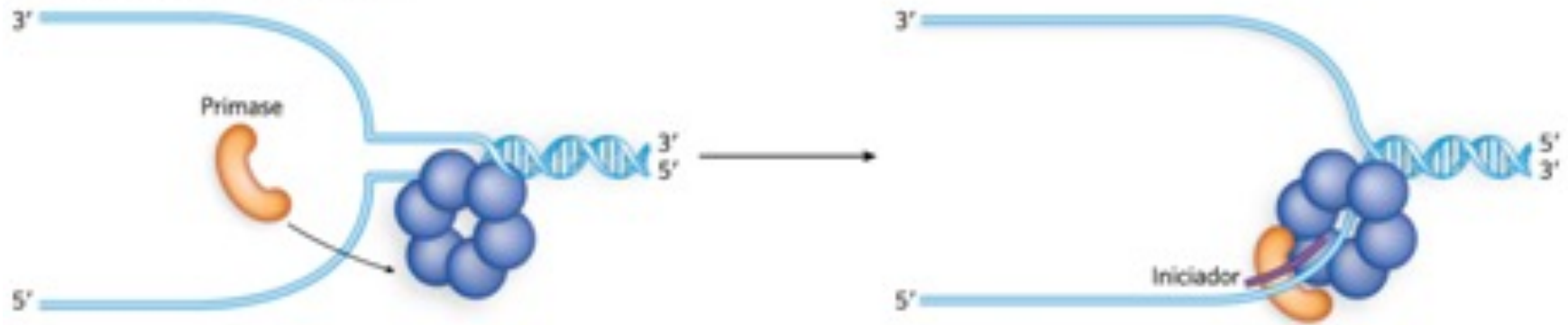


Em *E.coli*, esta proteína é a dnaB, que se liga na fita *lagging*....



**A helicase dnaB se liga à primase, para fazer o primer (*de RNA*)
*Na lagging strand!***

(d) Adição de iniciadores de RNA



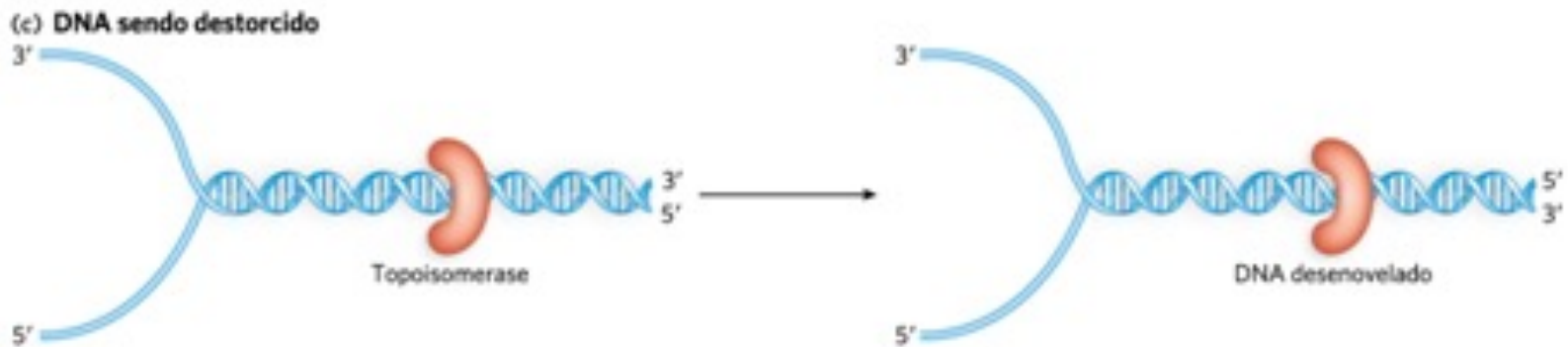
Falta ainda a DNA ligase! Qual sua principal função?

Ligar os fragmentos de Okasaki!



E como é resolvida a torção do DNA?

Enzimas topoisomerases!

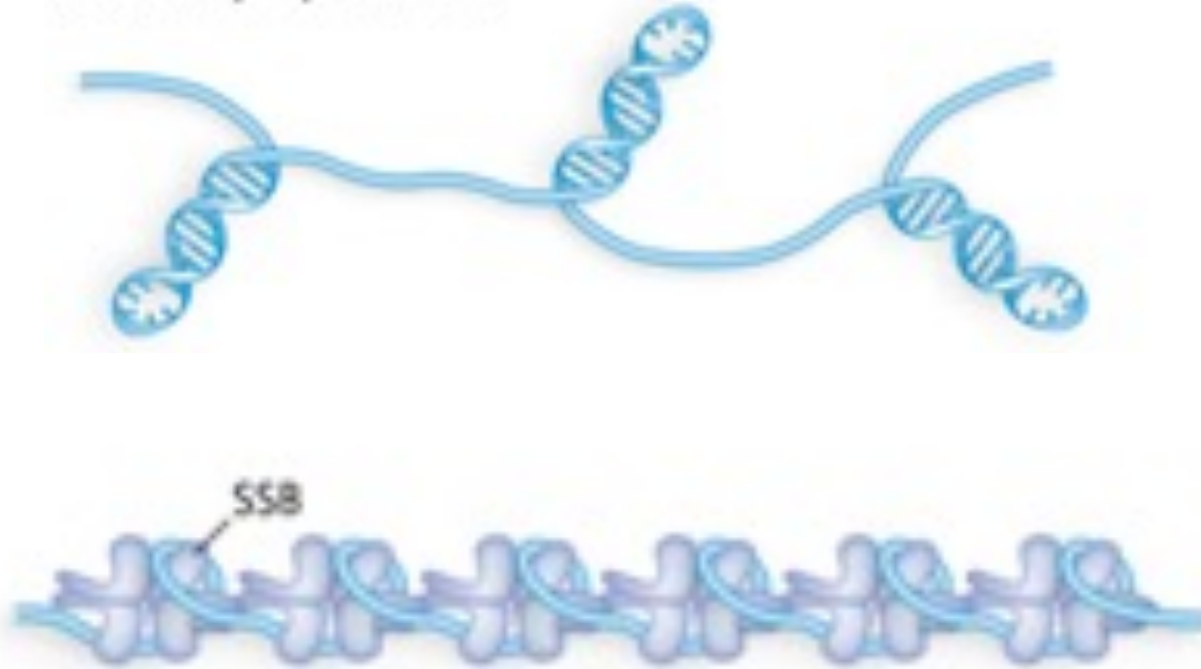


Em *E.coli*, esta proteína é a girase (em humanos topoisomerases I e II...)

E DNA simples fita não pode fazer estruturas do tipo grampo? (isso atrapalharia a replicação!).

Proteína de ligação a DNA simples fita (ssb protein).

(f) Proteção por ssDNA



Em *E.coli*, esta proteína é a SSB- single stranded binding (em humanos é a RPA- Replication protein A....)

As DNAs polimerases não são muito processivas....

a cinta deslizante (beta ou sliding clamp) ajuda a DNA pol a não largar o DNA!

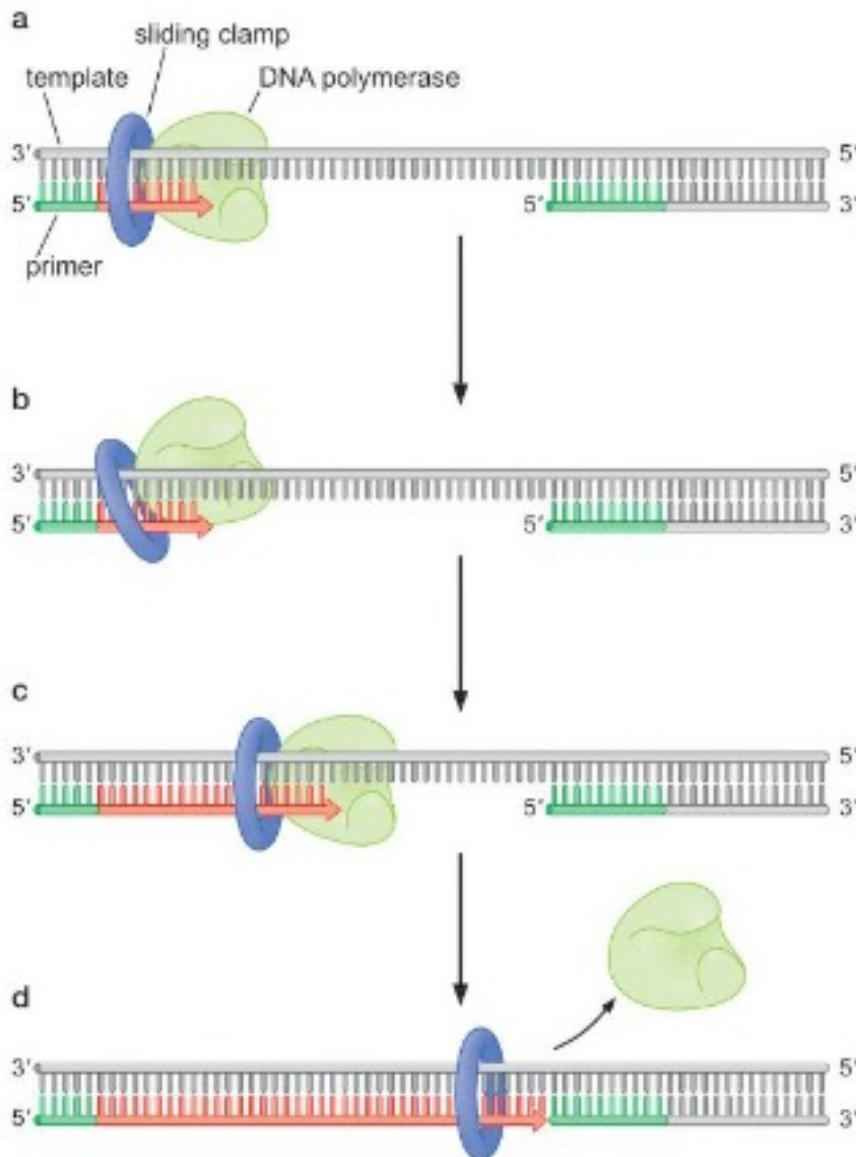
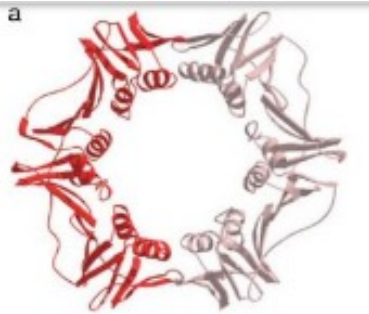


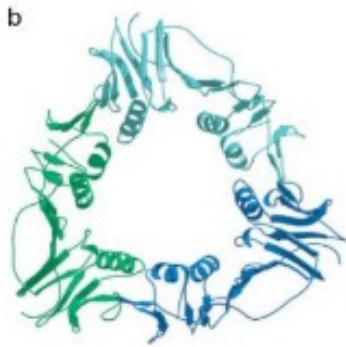
FIGURE 9-20 Sliding DNA clamps increase the processivity of associated DNA polymerases. (a) The sliding DNA clamp encircles the DNA and simultaneously binds the DNA polymerase. (b) The relatively low processivity of DNA polymerases leads to frequent release from the primer:template junction, but the association of the polymerase with the sliding clamp prevents diffusion away from the DNA. (c) The association of DNA polymerase with the sliding clamp ensures that the DNA polymerase rebinds the same primer:template junction and resumes DNA synthesis. (d) After DNA polymerase has completed synthesis of the template, the absence of a primer:template junction causes a change in the DNA polymerase that releases it from the sliding clamp.

Em E.coli, esta proteína é o beta clamp (em português –braçadeira).

As cintas deslizantes (CLAMP) são muito conservadas!



E.coli



T4-Phage



Eucariote: PCNA



(em humanos é a PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen...*)

Veja um exemplo de como isso é estudado!

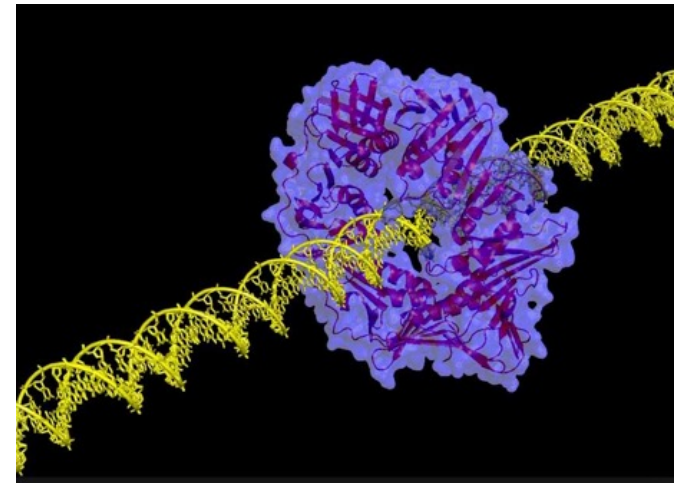
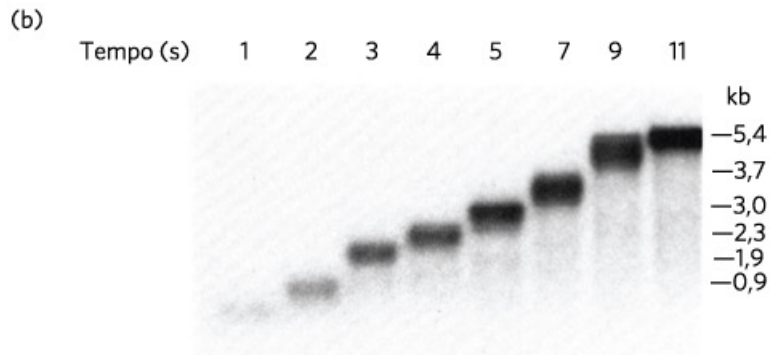
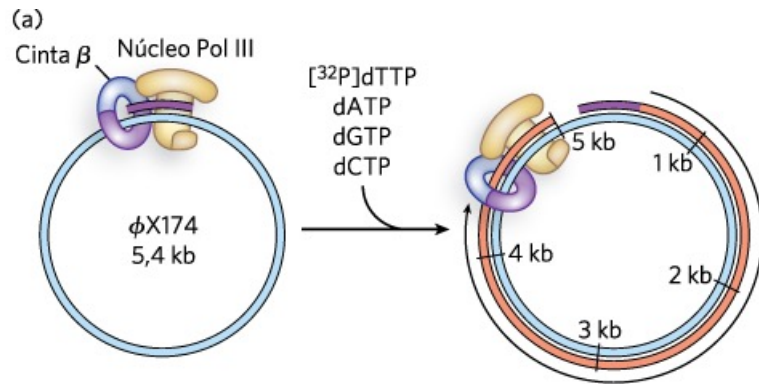
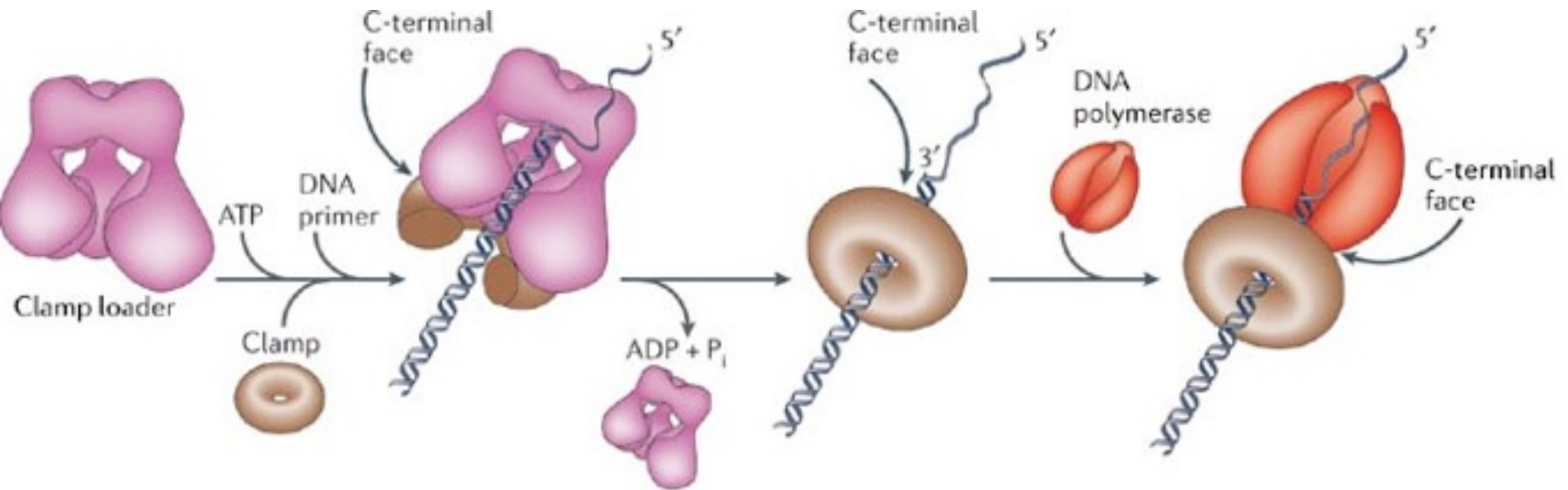


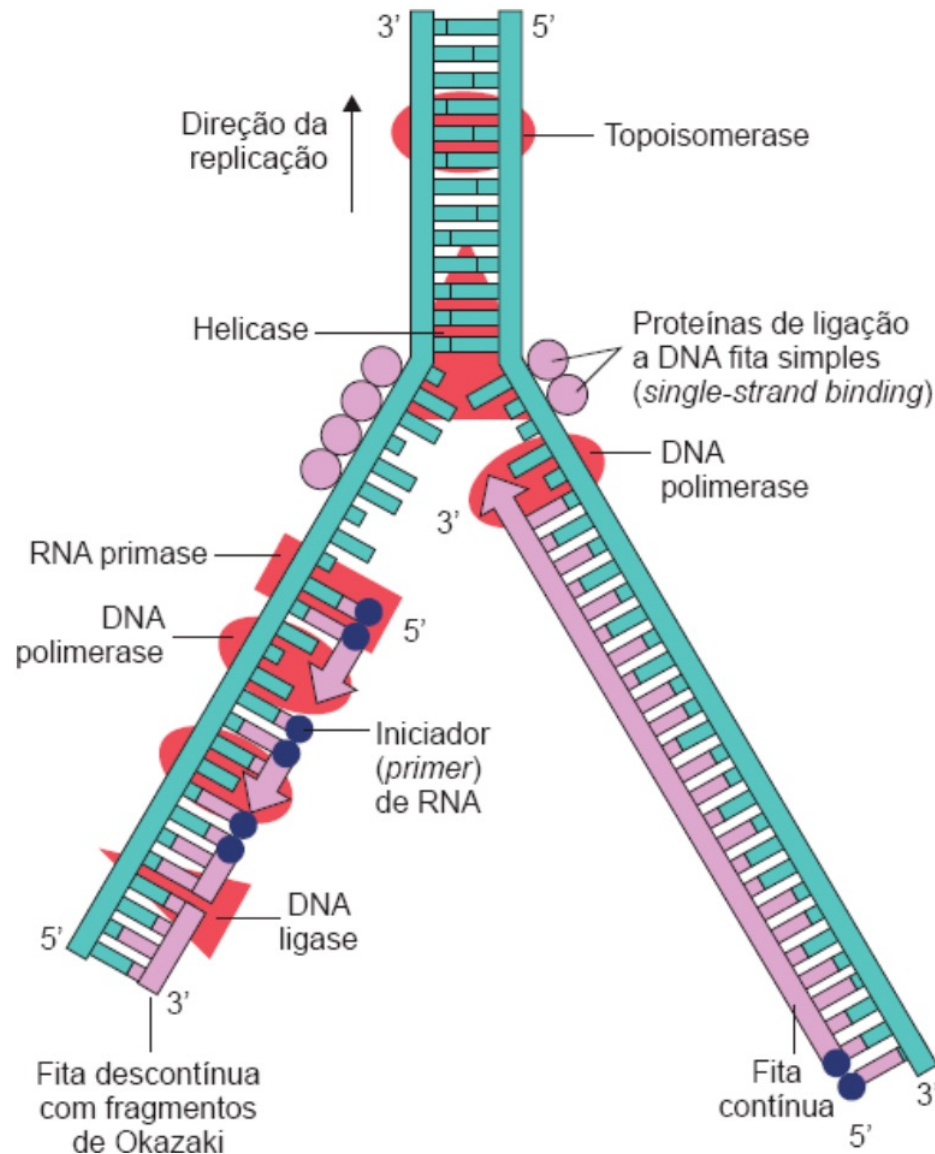
FIGURA 11-17 Síntese rápida de DNA pela Pol III de *E. coli*. A cinta deslizante β é carregada até um local contendo iniciador por um montador da cinta na holoenzima Pol III. A síntese dos 5,4 kb de DNA circular do bacteriófago ϕ X174 é finalizada dentro de 11 segundos, como apresentado na autorradiografia do experimento descrito no texto. [Fonte: Fotografia de M. E. O'Donnell e A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 260:12,875, 1985, Fig. 2A.]

Mas como colocar a cinta deslizante na molécula de DNA?

Temos ainda o montador da cinta (clamp loader)!



Mas como pode funcionar a DNA polimerase na fita *lagging*.... Ela fica pulando e vai no sentido contrário da forquilha?



O modelo abaixo explica como a replicação das duas polimerases formam um dímero e seguem na mesma direção da forquilha!!!!

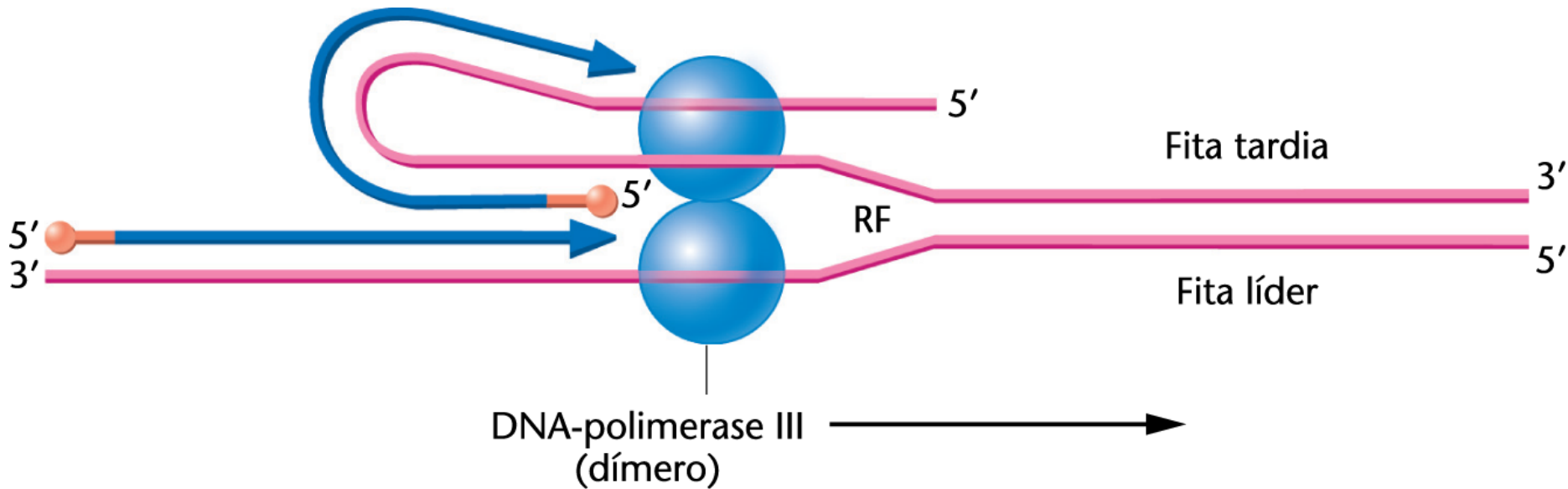
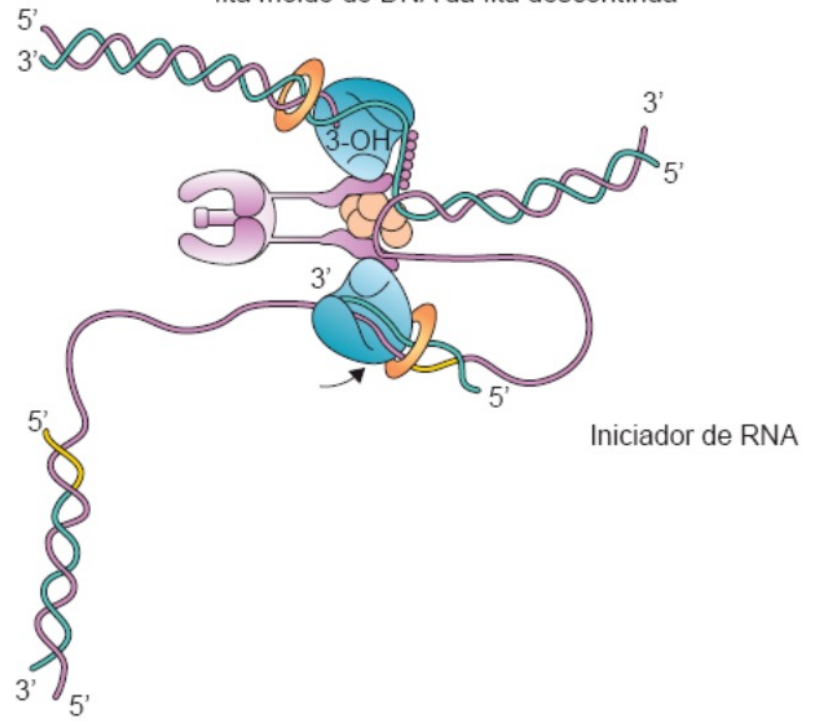
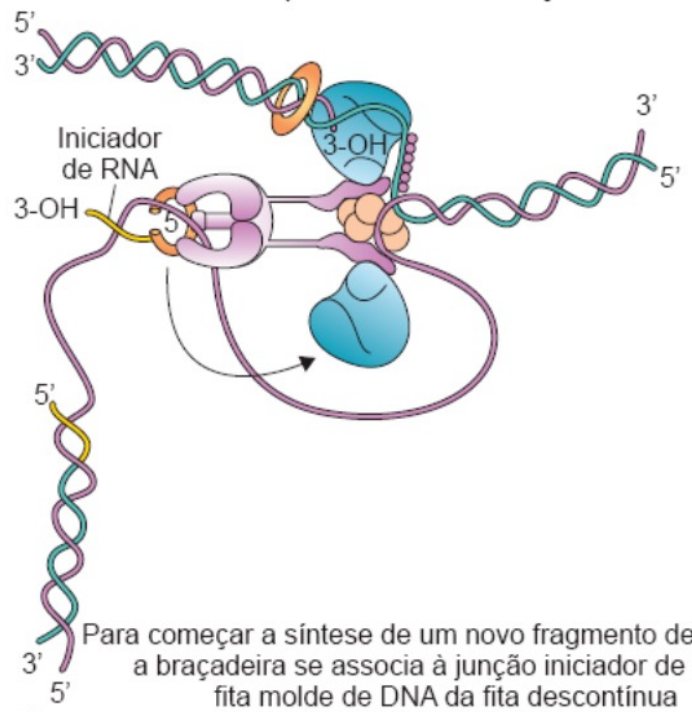
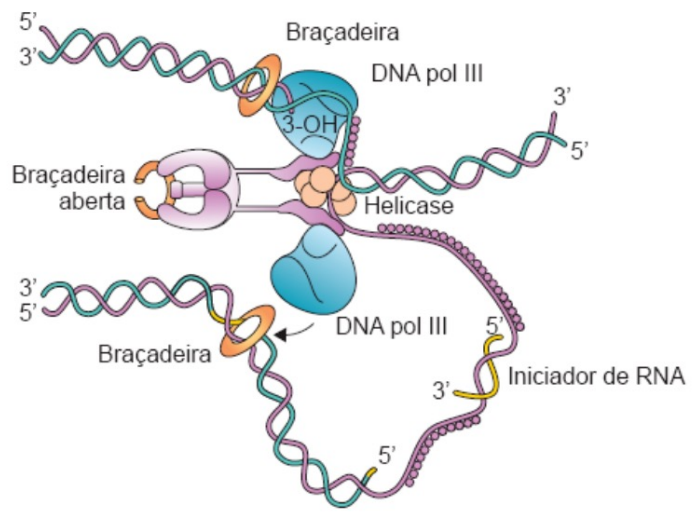


FIGURA 11-12

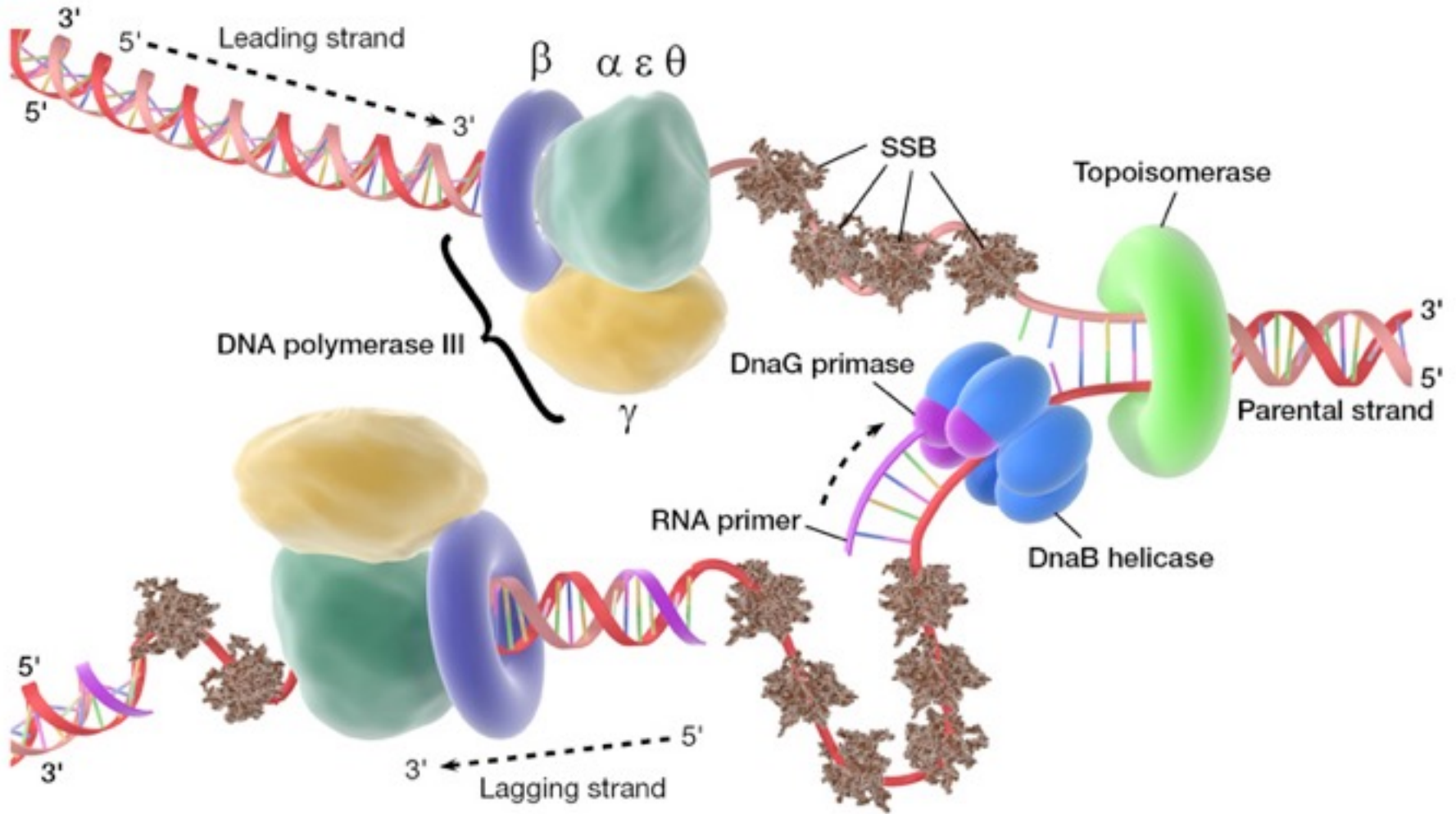
Ilustração de como a síntese do DNA pode ser realizada simultaneamente na fita líder e na fita tardia em uma única forquilha de replicação (RF). O molde da fita tardia forma uma “alça” para inverter a direção física da síntese, mas não sua direção bioquímica. A holoenzima contém um dímero que consiste em dois centros enzimáticos, cada um conduzindo a síntese em fitas diferentes.



Acoplando as polimerases de uma forquilha:

<https://www.youtube.com/watch?v=QMX7IpME7X8>

Mais uma com o replissomo:



Modelo de replissomo

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

E ainda tem a cromatina!!!!
A cromatina precisa ser replicada....

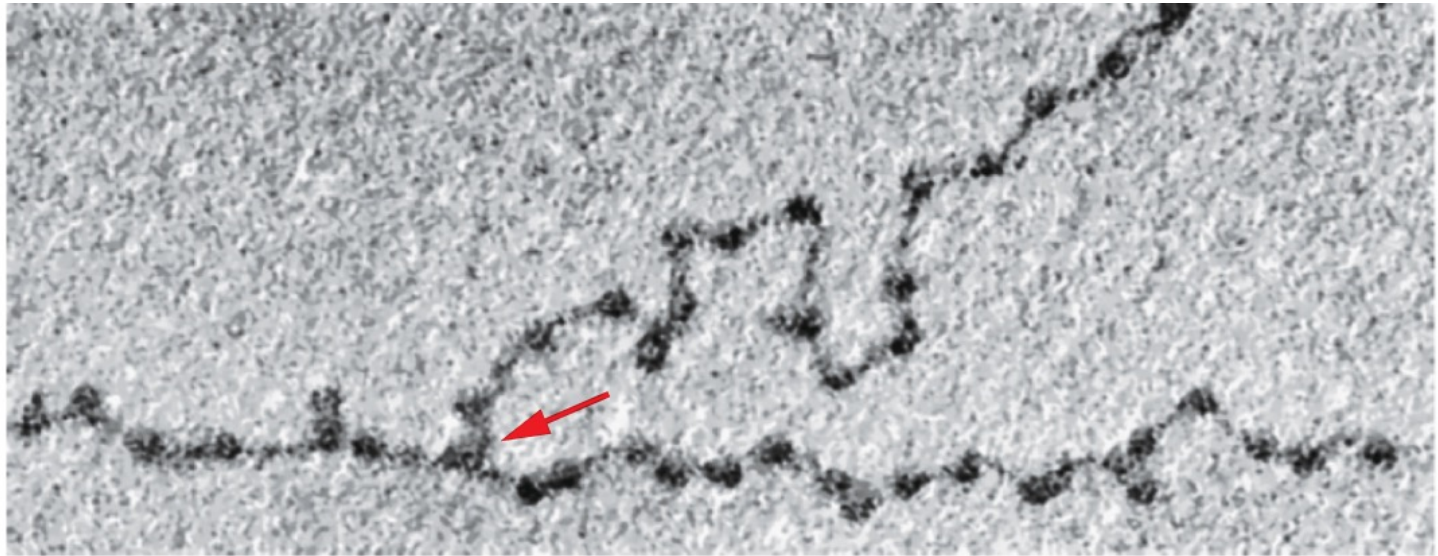
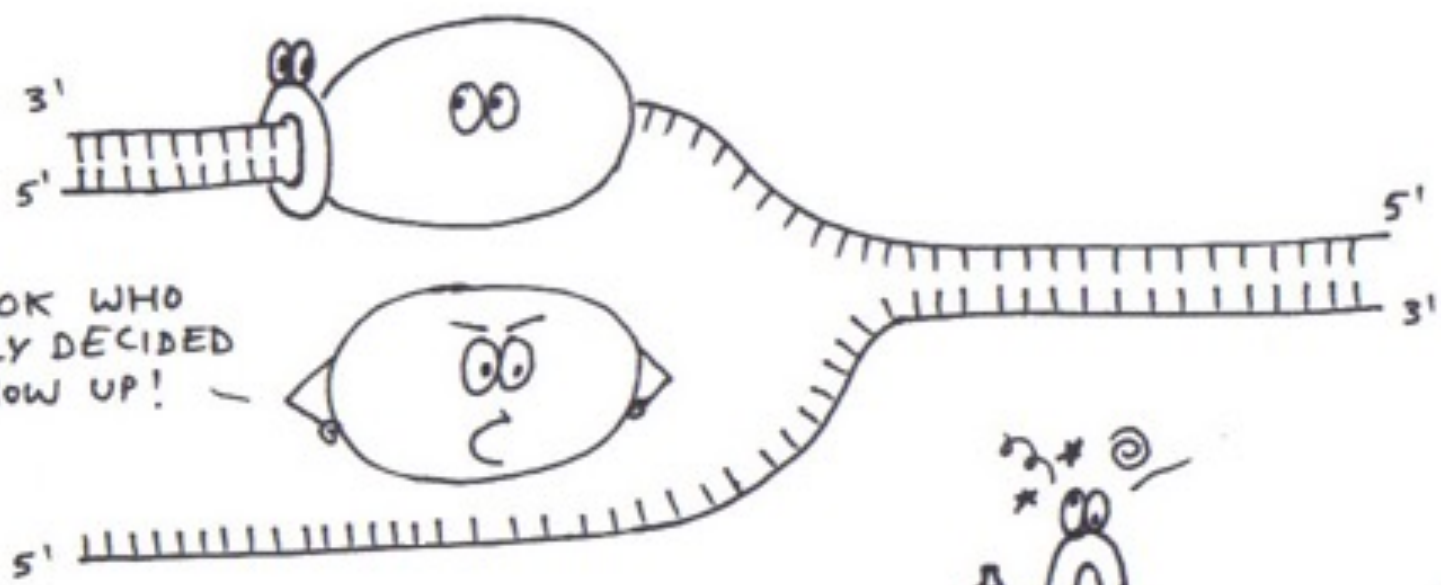


FIGURA 11-15 Fotomicrografia eletrônica de uma forquilha de replicação eucariótica, demonstrando a presença de nucleossomos com proteínas histônicas em ambas as ramificações.

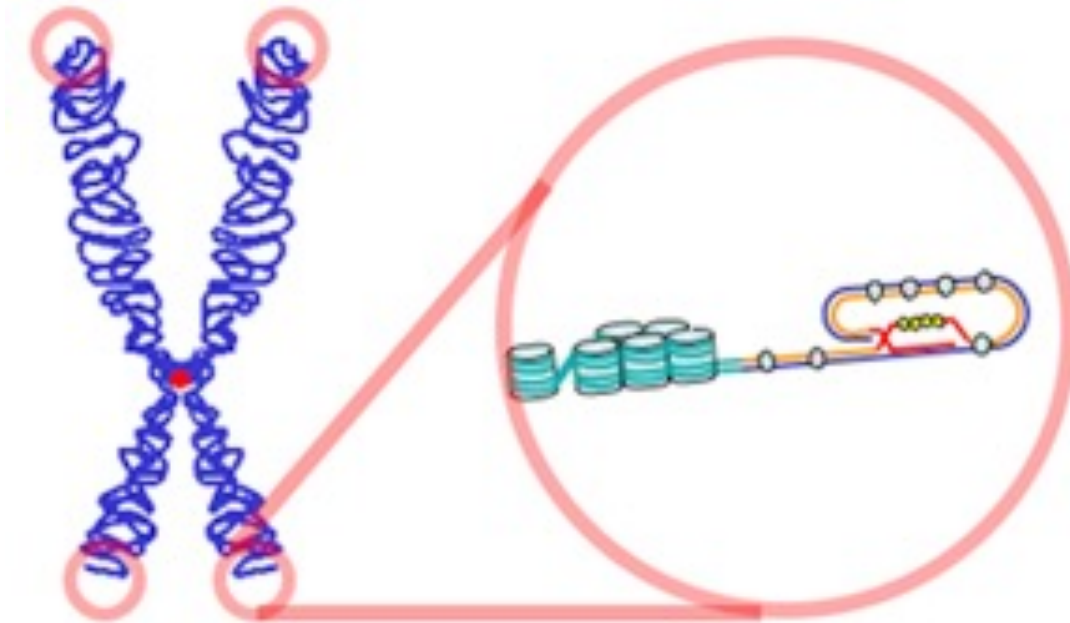


OH LOOK WHO
FINALLY DECIDED
TO SHOW UP!



Robert
1/2009

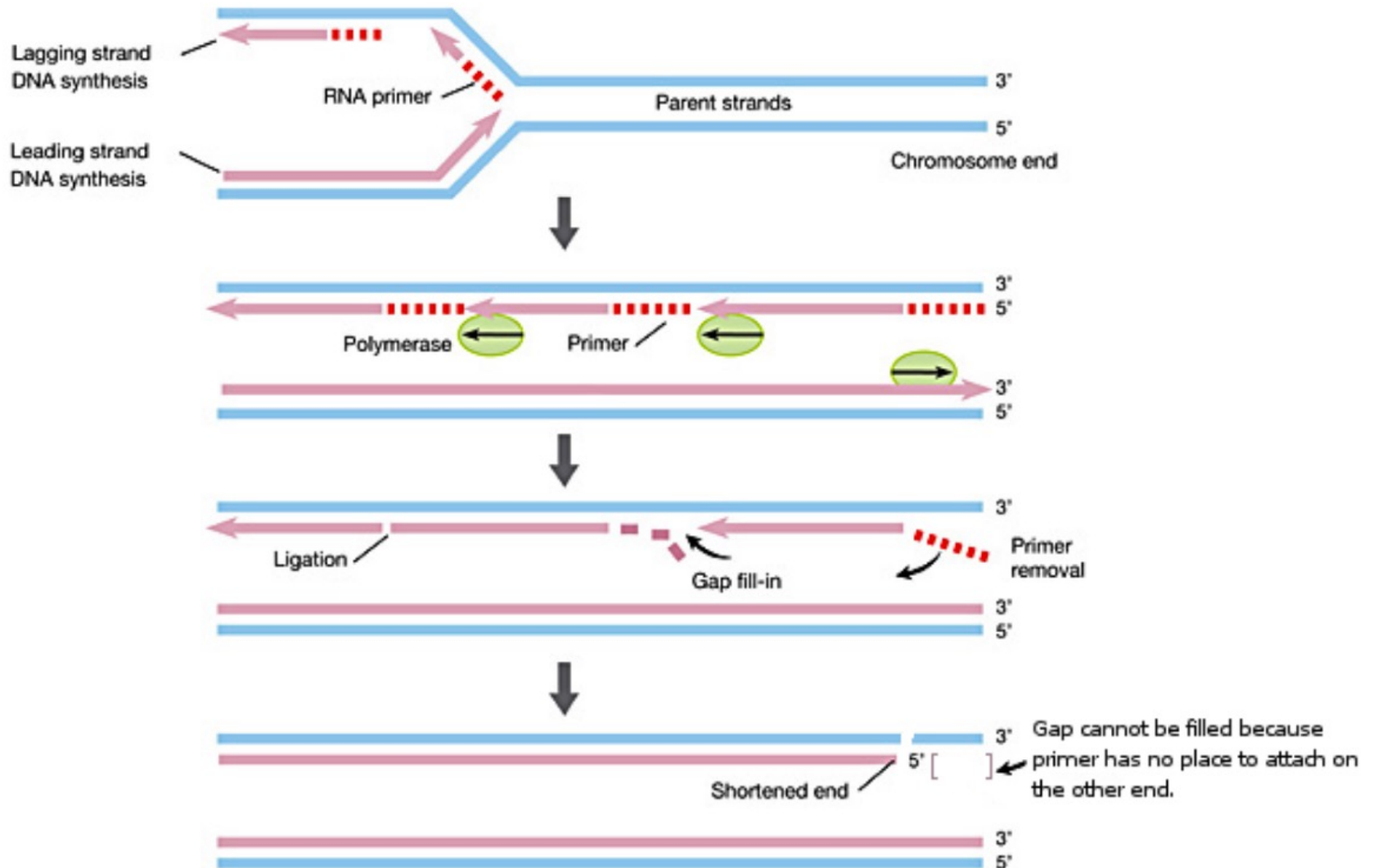
**Cromossomos lineares: como replicar as pontas?
Como manter as pontas do mesmo tamanho????**



- **telômeros**

Cromossomos lineares: como replicar as pontas?

Perdem as pontas a cada replicação por não completarem a lagging strand!



**Agora apenas uma das fitas:
Veja que ocorre perda de DNA na extremidade!**

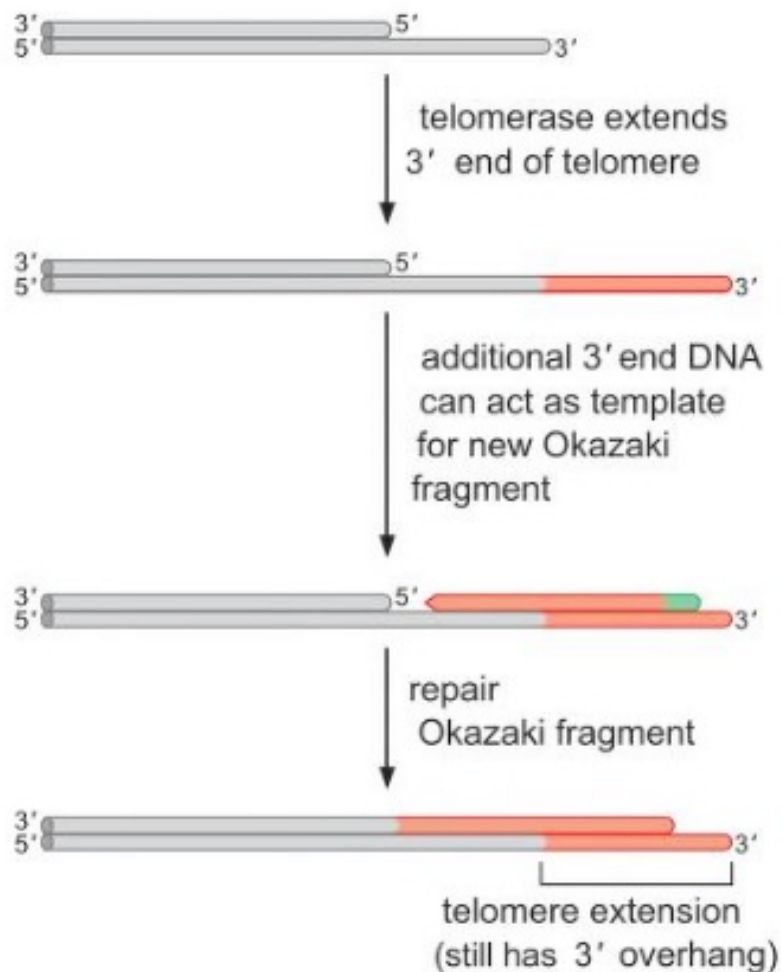
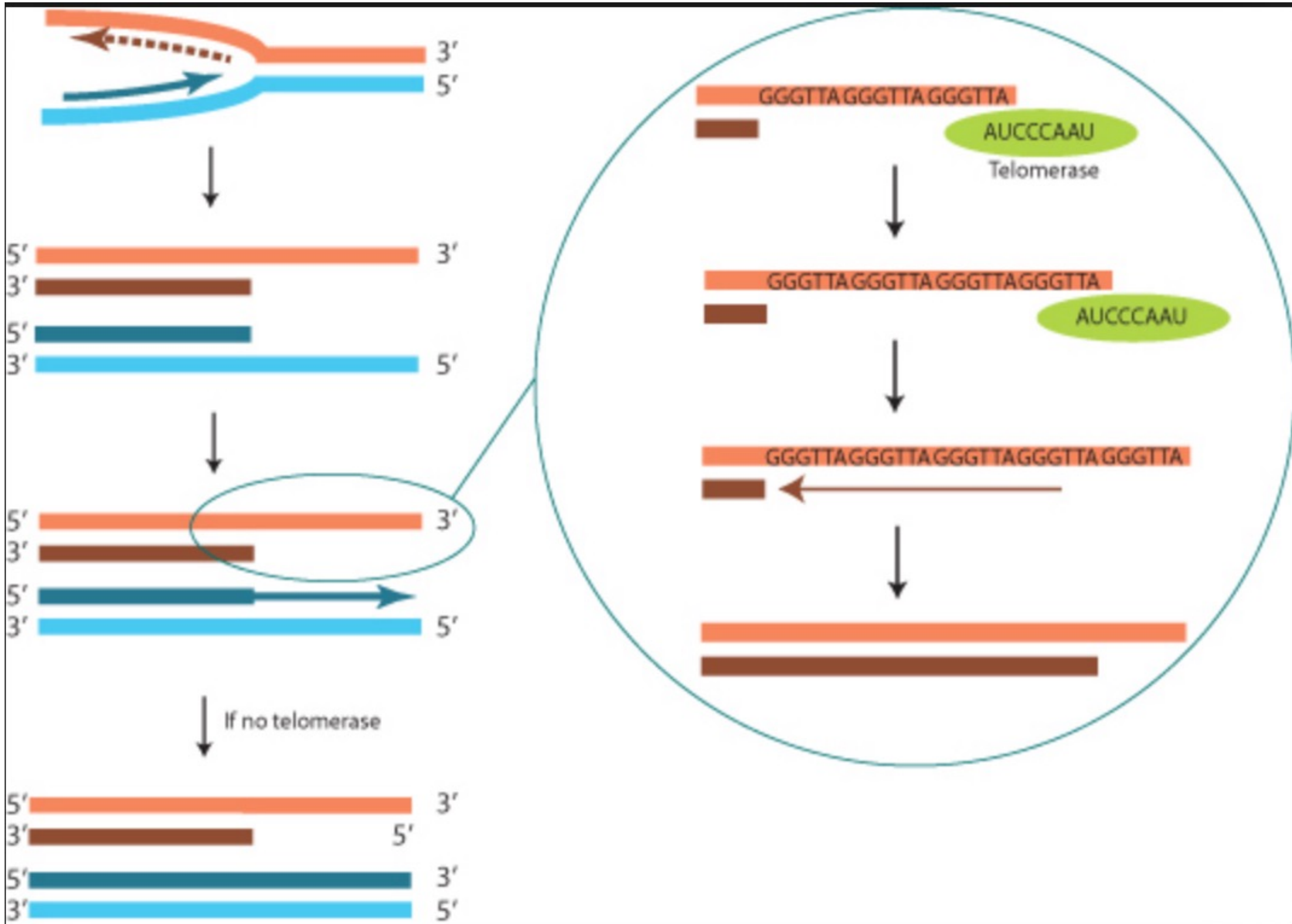
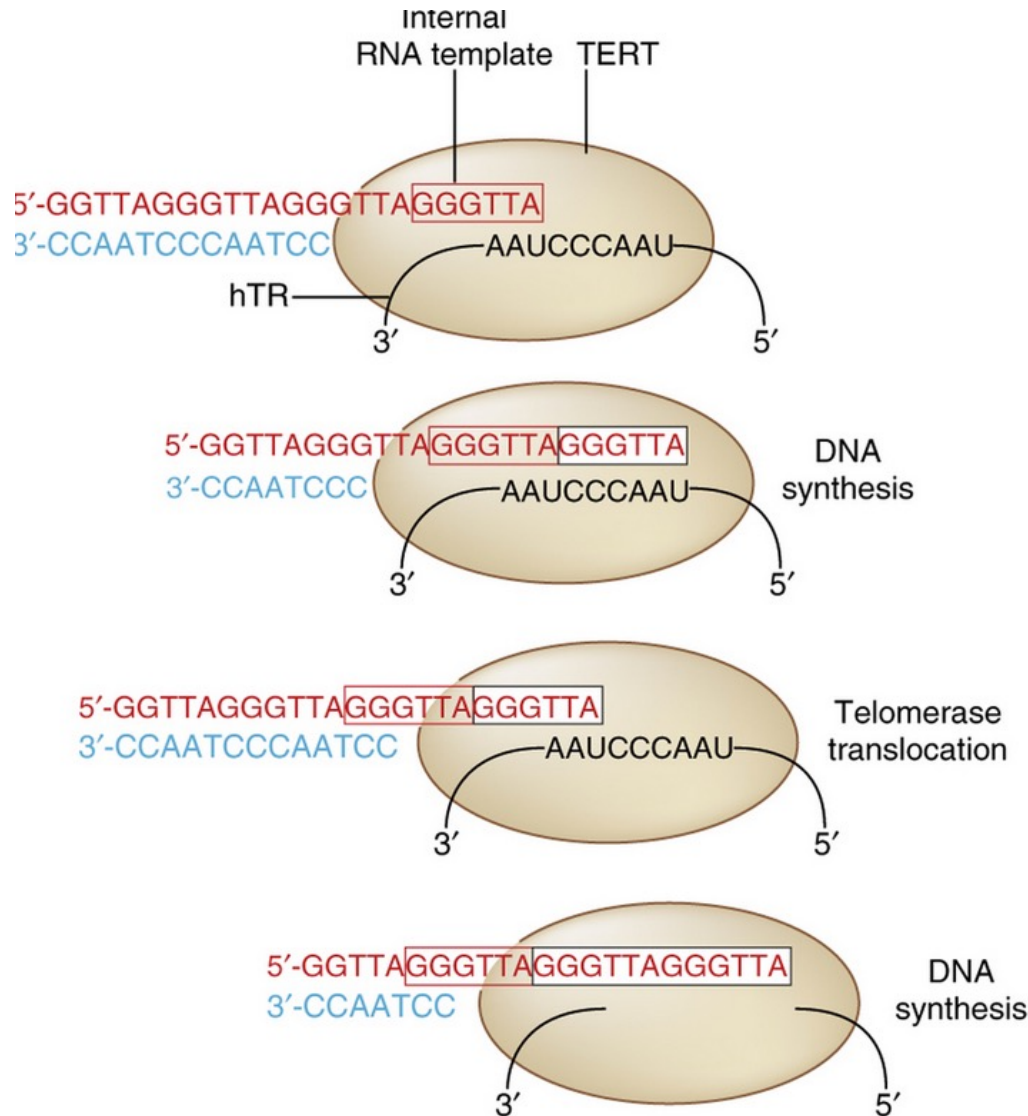


FIGURE 9-39 Extension of the 3' end of the telomere by telomerase solves the end replication problem. Although telomerase only directly extends the 3' end of the telomere, by providing an additional template for lagging-strand DNA synthesis, both ends of the chromosome are extended.

Cromossomos lineares: como replicar as pontas? Como manter as pontas do mesmo tamanho????



Telomerase (TERT) na replicação de telômeros.



A enzima telomerase sintetiza a extremidade, com um molde próprio de RNA!!!!

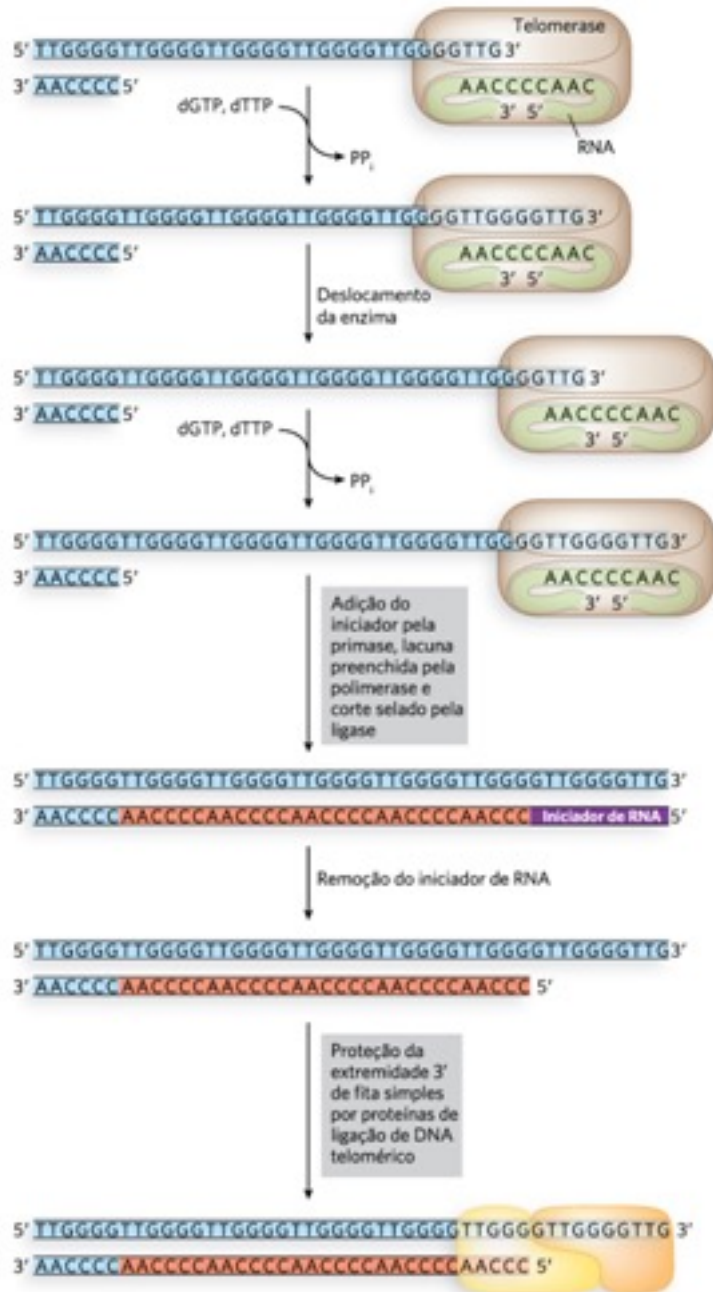


FIGURA 11-35 Extensão das extremidades de cromossomos lineares pela telomerase. Os telômeros nas extremidades dos cromossomos eucarióticos são compostos de unidades repetitivas de 6-mer de DNA. As sequências repetitivas 5'-TTGGGG-3' de *Tetrahymena* são apresentadas aqui. A telomerase estende a extremidade 3' fita simples do DNA com dNTPs, utilizando sua molécula de RNA interno como molde. A fita simples 3' do DNA estendida é preenchida com

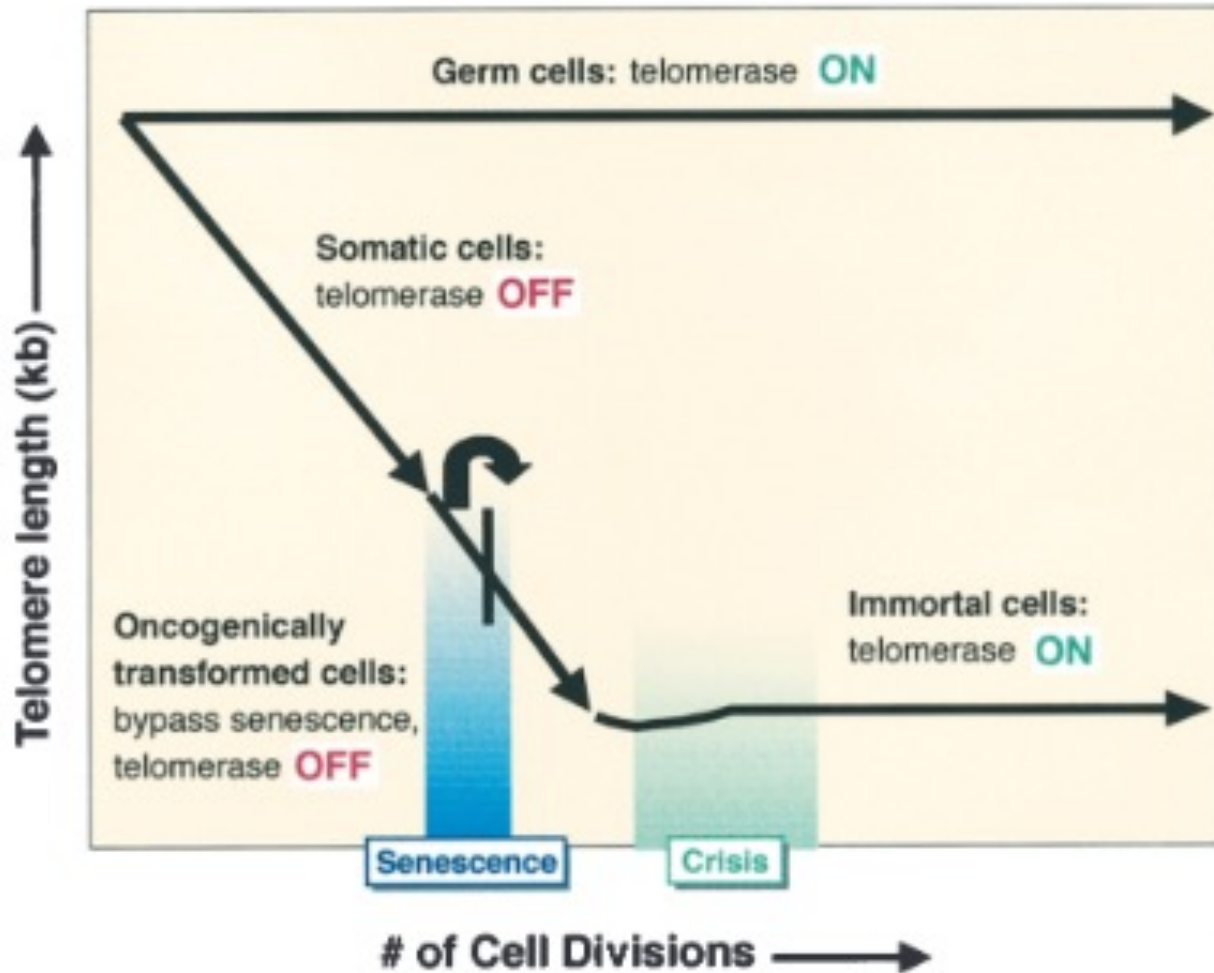
a colocação de um iniciador de RNA seguido da síntese de DNA. Ainda assim, a remoção do iniciador de RNA desta reação de preenchimento deixa uma extremidade final 3' do DNA como fita simples; tal extremidade é sequestrada pelas proteínas ligadoras de DNA telomérico. Essas proteínas impedem que as extremidades cromossômicas se transformem em substrato para a maquinaria celular de reparo por quebra de fita dupla.

A telomerase é uma ribonucleoproteína, porque é composta de RNA e proteína.

Que tipo de atividade é sintetizar DNA, a partir de RNA?

Qual a importância dessa enzima em termos de envelhecimento e em termos de cancer?

Teoria de Hayflicks - crises na cultura de células!



Telômeros e envelhecimento!

linfócitos

granulócitos

