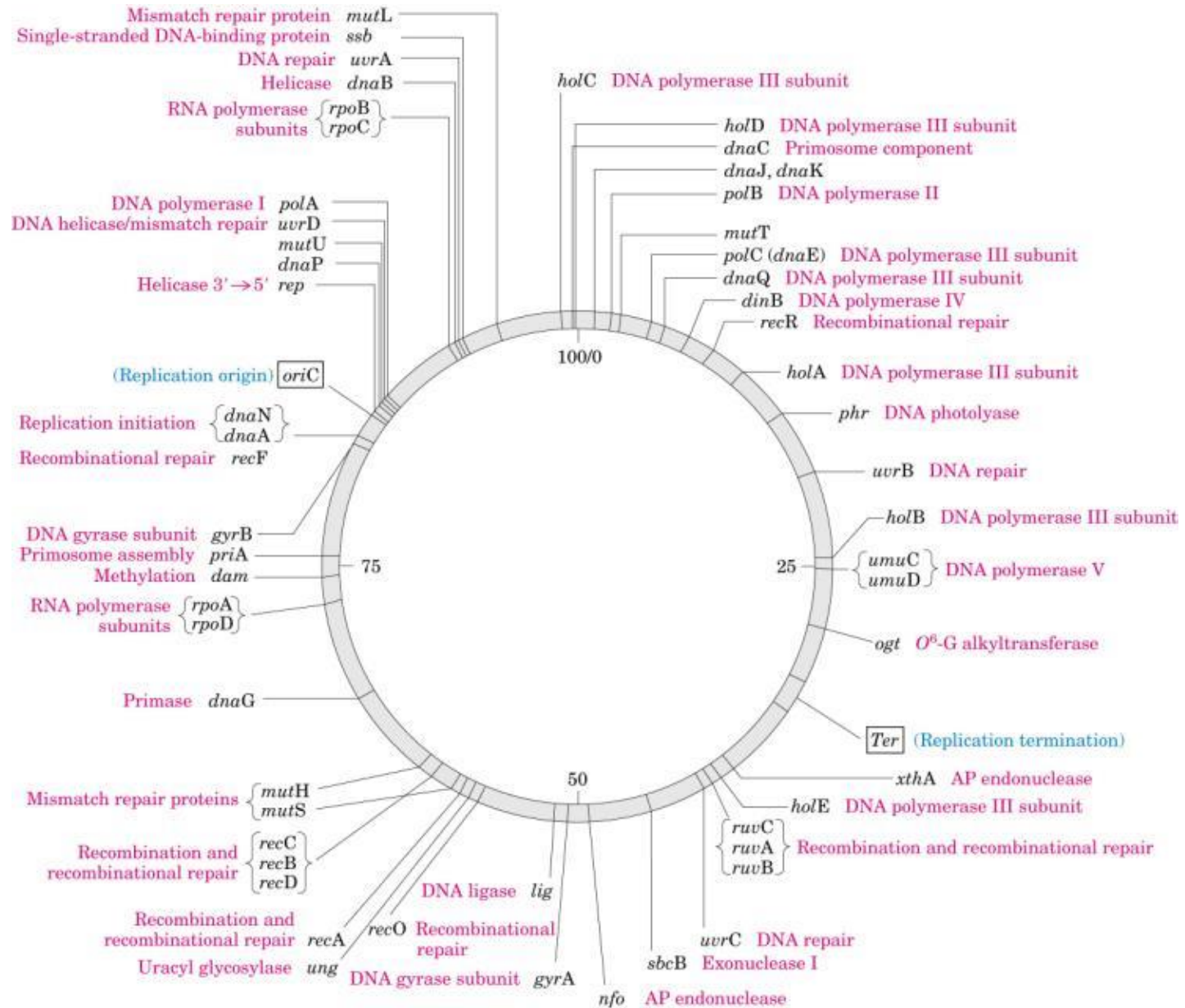


# Replicação do DNA

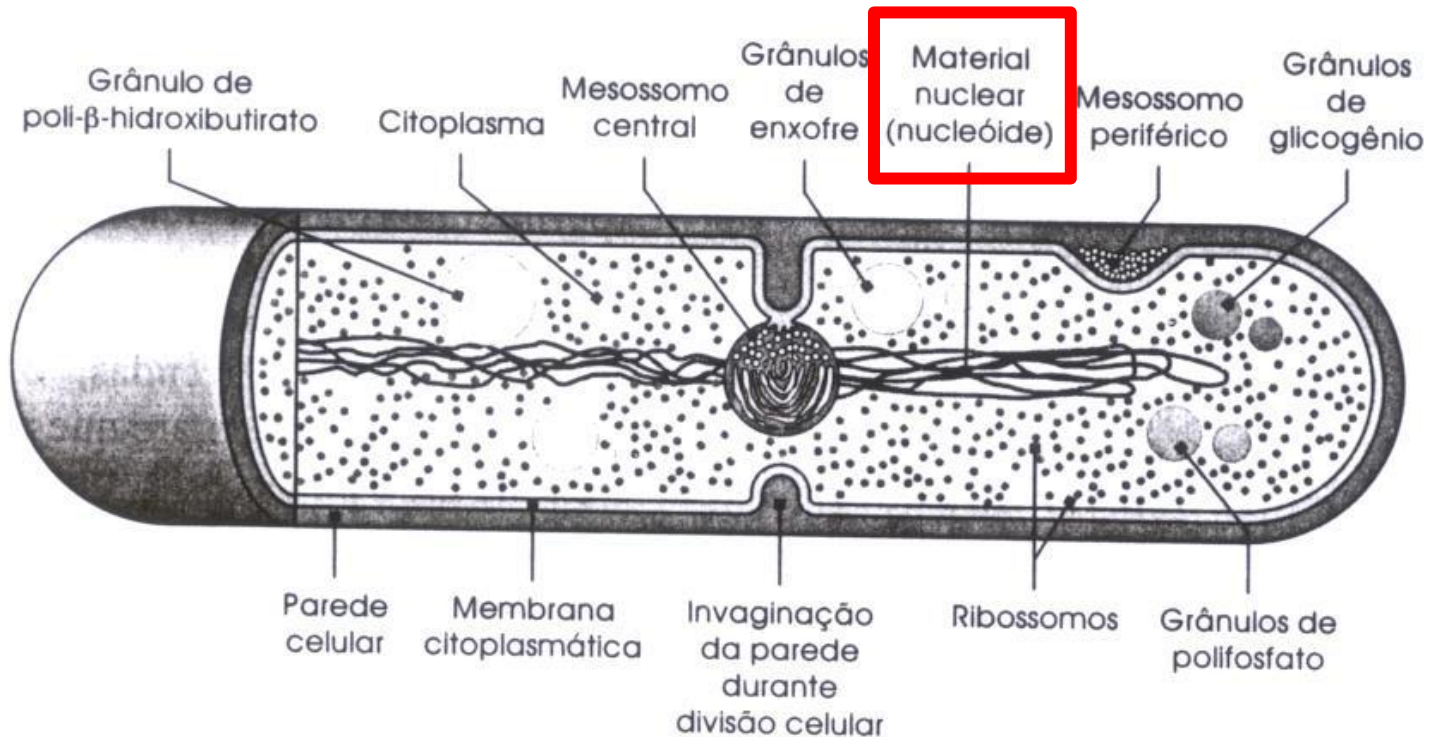


# Mapa do cromossomo de *E. coli*



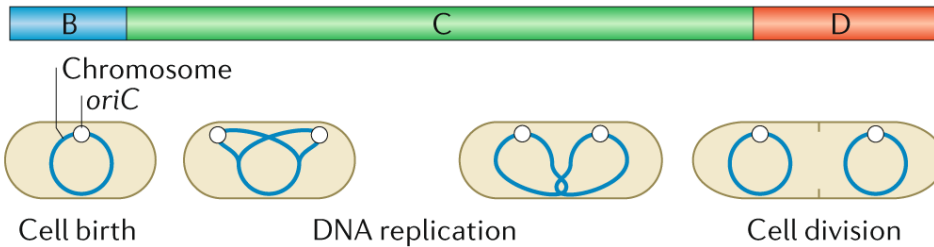
# Cromossomo bacteriano

- Tamanho 5.500 kb
- Ordem de compactação  $10^3$ ,

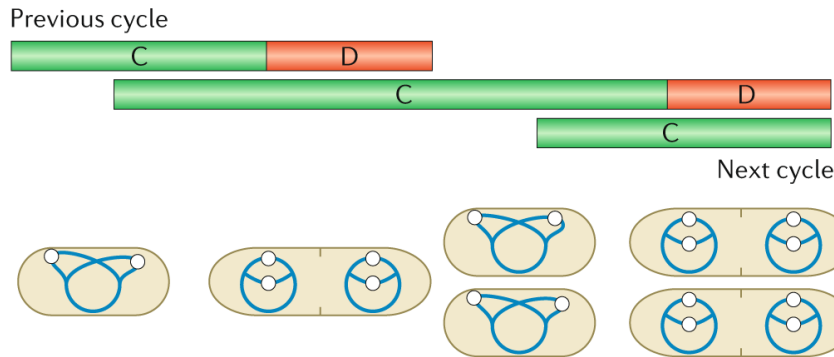


# Divisão Celular em Bactérias

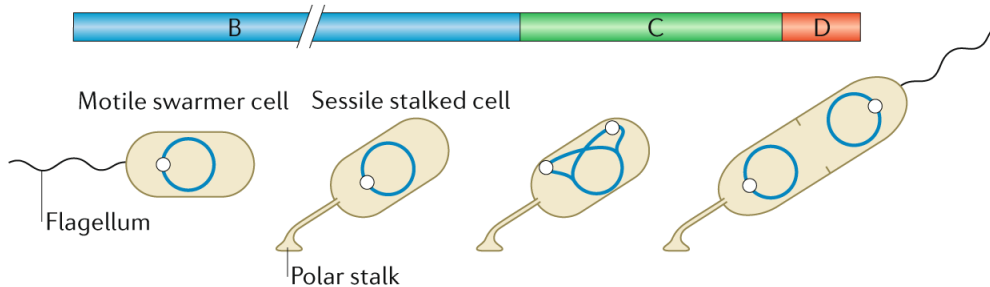
## Non-overlapping cell cycles (slow growth)



## b Overlapping cell cycles (fast growth)



## c Developmental control



Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J. The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth. *Nat Rev Microbiol* **17**, 467–478 (2019).

# Histórico

Síntese DNA: Enzimas com fidelidade e velocidade extraordinárias



Elucidação dos mecanismo de replicação em *E. coli*:

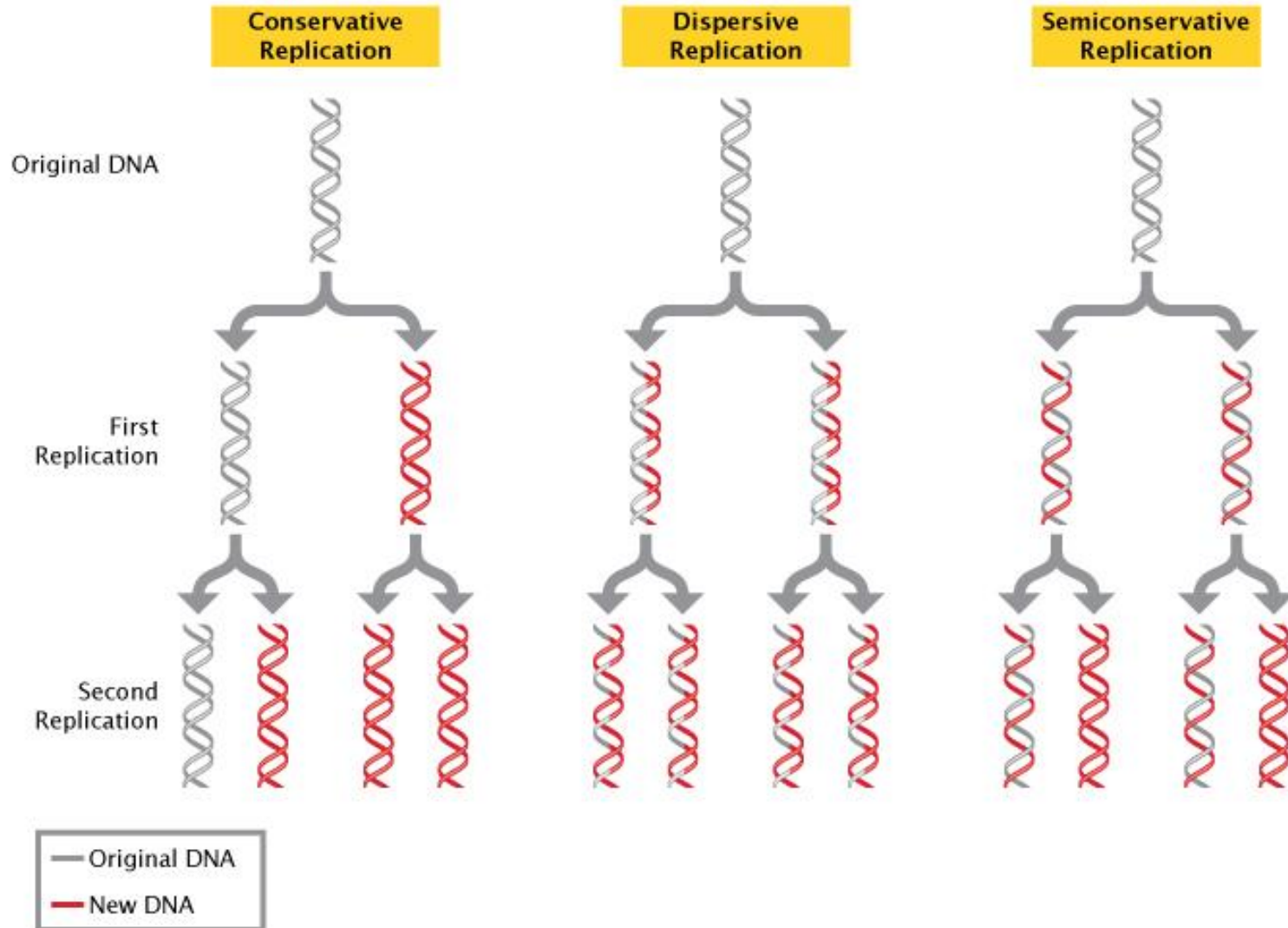
1953: Modelo estrutural de James Watson e Francis Crick;

1957: Matthew Meselson e Franklin Stahl



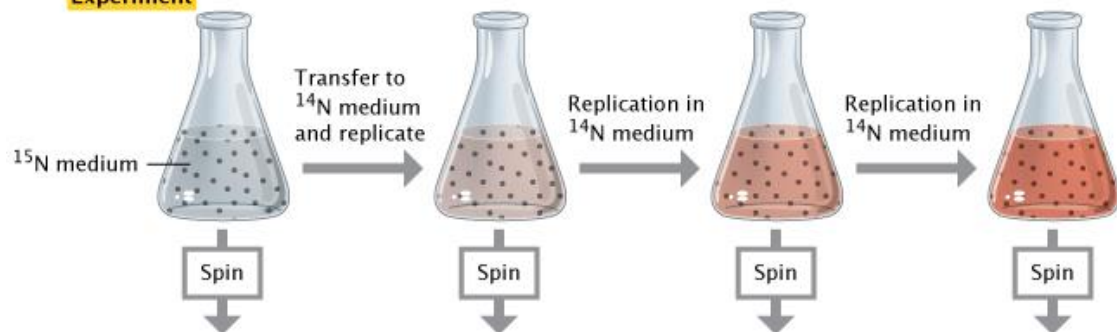
# Experimento de Meselson-Stahl

## Hipótesis

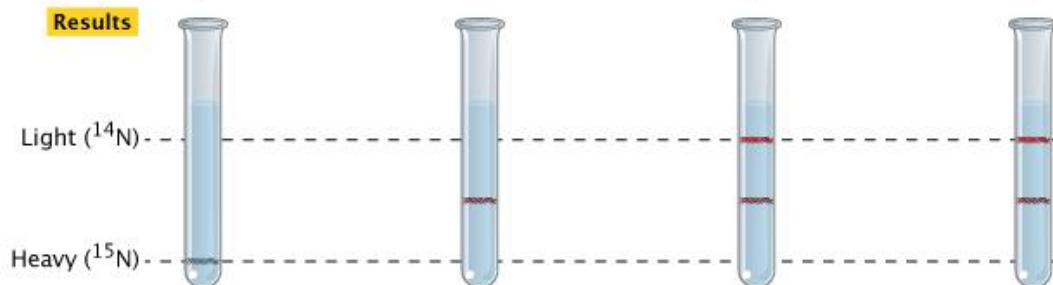


**Question** Which model of DNA replication – conservative, dispersive, or semiconservative – applies to *E. coli*?

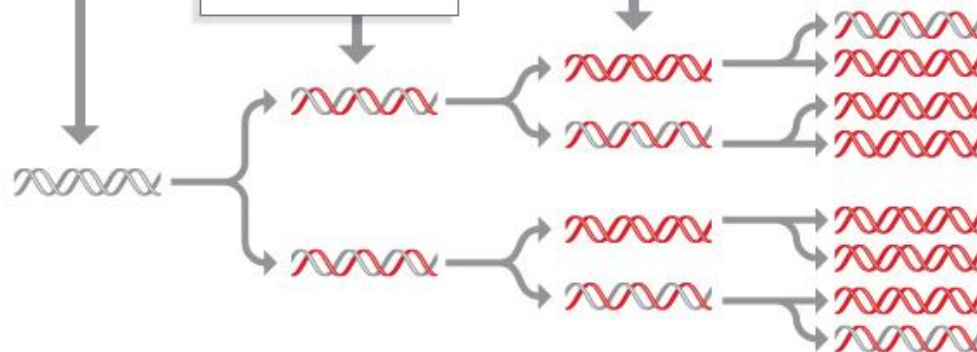
**Experiment**



**Results**



- 1 DNA from bacteria that had been grown in medium containing  $^{15}\text{N}$  appeared as a single band.
- 2 After one round of replication, the DNA appeared as a single band intermediate between that expected for DNA with  $^{15}\text{N}$  and that expected for DNA with  $^{14}\text{N}$ .
- 3 After a second round of replication, DNA appeared as two bands, one in the position of hybrid DNA (half  $^{15}\text{N}$  and half  $^{14}\text{N}$ ) and the other in the position of DNA that contained only  $^{14}\text{N}$ .
- 4 Samples taken after additional rounds of replication appeared as two bands, as in step 3.



Cultivo de *E. coli* em meio contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$

**Conclusão:**

**Replicação DNA é semiconservativa**

????

- A fita de DNA parental é totalmente desenrolada antes que cada uma seja replicada?
- Onde se inicia a replicação?
- Em que sentido ocorre a replicação?



# John Cairns (1960)

*Histórico*

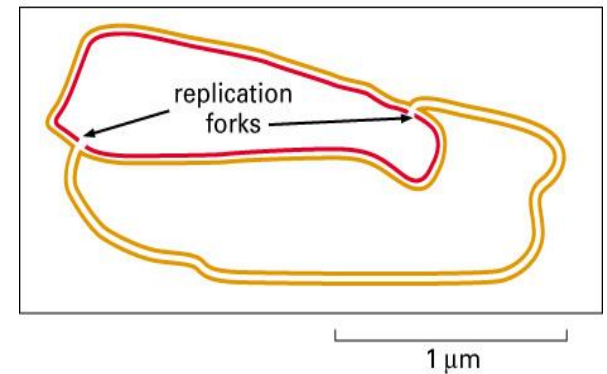
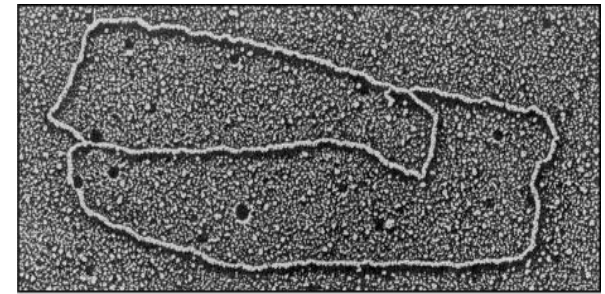
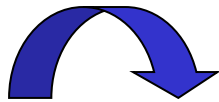
*E. coli* + Timina  $^3\text{H}$



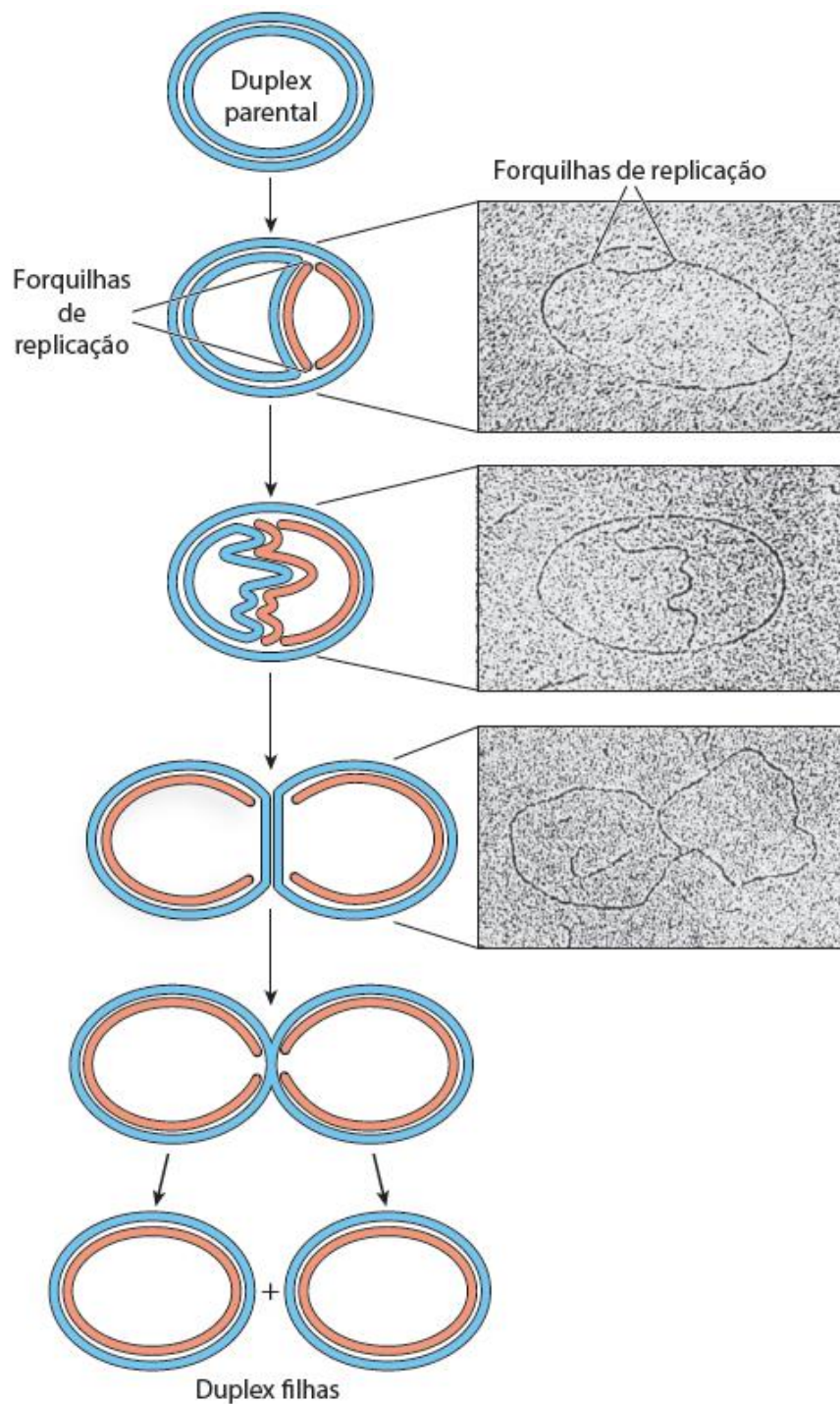
DNA



Autoradiografia



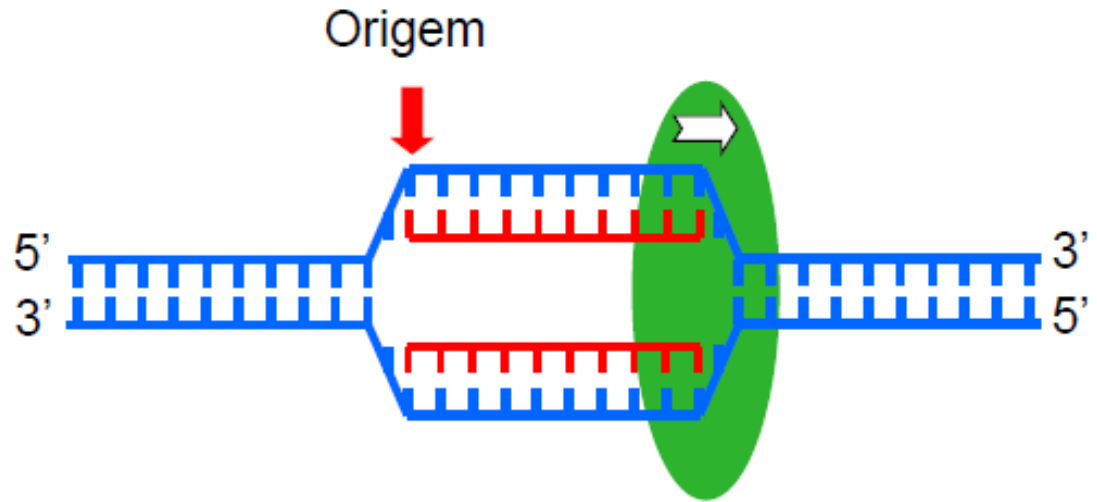
- Cromossomo: grande círculo;
- DNA com alça extra - fitas de DNA radioativas;



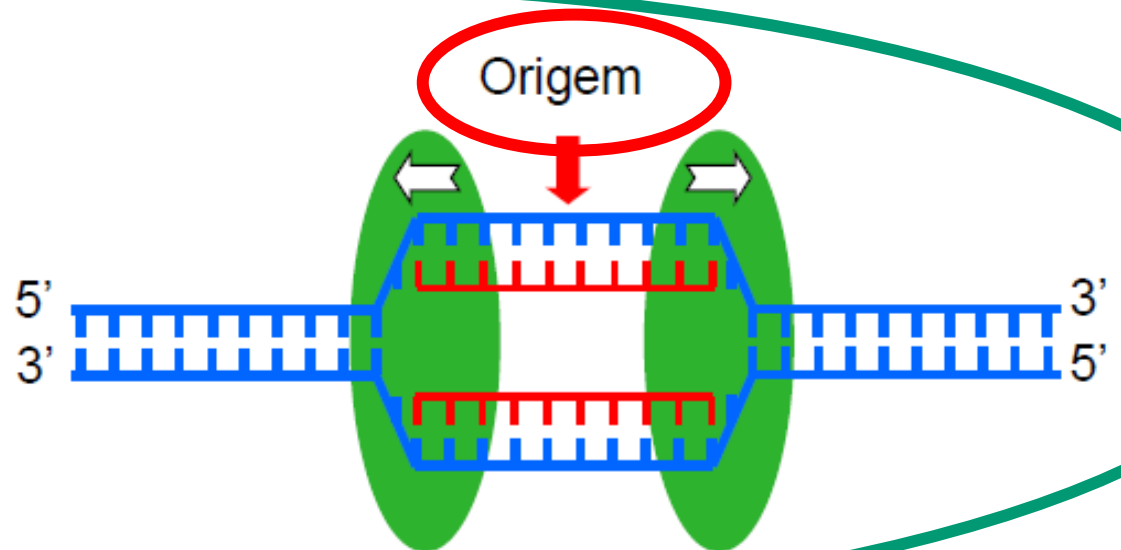
# Formação de uma Forquilha de replicação

# Como ocorre a replicação?

**Replicação  
Unidirecional**

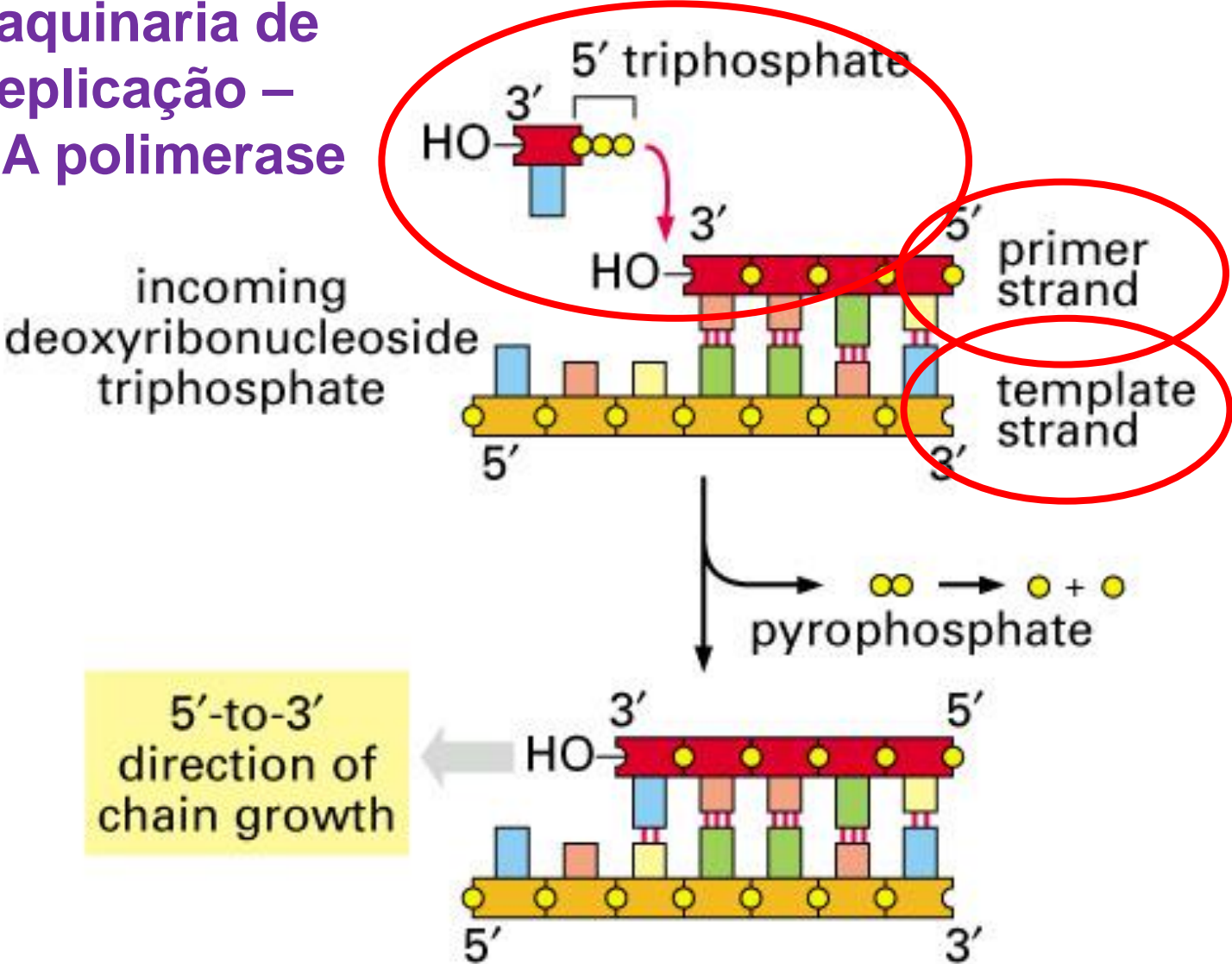


**Replicação  
Bi - direcional**



# Síntese de DNA

Maquinaria de replicação – DNA polimerase



Síntese somente no sentido 5' → 3'

# Maquinaria de replicação

- **Processo complexo;**
- ***E. coli* : pelo menos 5 DNA polimerases;**
- **Eucariotos: diversos tipos.**

# DNA polimerase

**TABELA 25-1** Comparação de três DNA-polimerases de *E. coli*

	DNA-polimerase		
	I	II	III
Gene estrutural*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	≥10
$M_r$	103.000	88.000 <sup>†</sup>	791.500
Exonuclease 3'→5' (revisão)	Sim	Sim	Sim
Exonuclease 5'→3'	Sim	Não	Não
Taxa de polimerização (nucleotídeos/s)	10-20	40	250-1.000
Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie)	3-200	1.500	≥500.000

\*Para enzimas com mais de uma subunidade, o gene listado aqui codifica a subunidade com atividade de polimerização. Observe que *dnaE* é uma designação anterior para o gene agora chamado de *polC*.

<sup>†</sup>Apenas subunidade de polimerização. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$  e  $\Psi$  (ver Tabela 25-2).

# DNA polimerase III

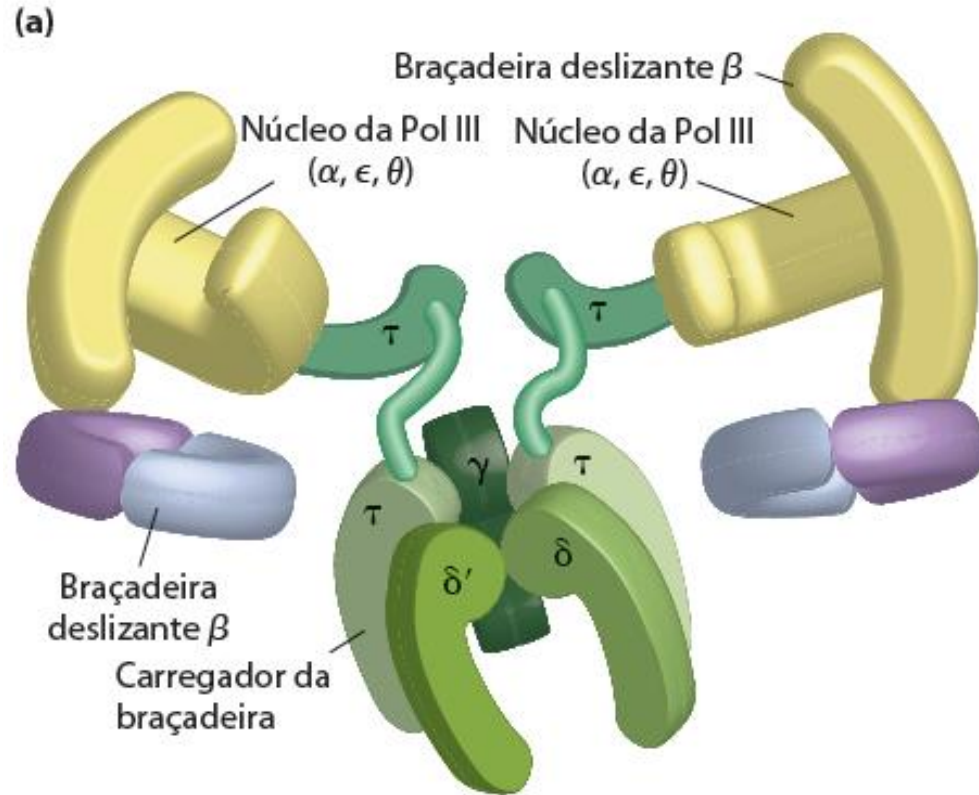
**TABELA 25-2** Subunidades da DNA-polimerase III de *E. coli*

Subunidade	Número de subunidades por holoenzima	$M_r$ da subunidade	Gene	Função da subunidade	
$\alpha$	2	129.900	<i>polC (dnaE)</i>	Atividade de polimerização	} Núcleo da polimerase
$\epsilon$	2	27.500	<i>dnaQ (mutD)</i>	Exonuclease de revisão 3'→5'	
$\theta$	2	8.600	<i>holE</i>	Estabilização da subunidade $\epsilon$	
$\tau$	2	71.100	<i>dnaX</i>	Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático	} Complexo carregador de braçadeiras ( $\gamma$ ) que carrega as subunidades $\beta$ na fita retardada em cada fragmento de Okazaki
$\gamma$	1	47.500	<i>dnaX*</i>	Carregadora de braçadeira	
$\delta$	1	38.700	<i>holA</i>	Abridor de braçadeira	
$\delta'$	1	36.900	<i>holB</i>	Carregadora de braçadeira	
$\chi$	1	16.600	<i>holC</i>	Interação com SSB	
$\psi$	1	15.200	<i>holD</i>	Interação com $\gamma$ e $\chi$	
$\beta$	4	40.600	<i>dnaN</i>	Grampo de DNA necessário para processividade ótima	

\*A subunidade  $\gamma$  é codificada por uma porção do gene para a subunidade  $\tau$ , de modo que 66% da subunidade  $\tau$ , em sua porção amino terminal, tem a mesma sequência de aminoácidos que a subunidade  $\gamma$ . A subunidade  $\gamma$  é produzida por um mecanismo de tradução por mudança de fase (p. 1111) que leva à terminação prematura da tradução.

# DNA polimerase III

## Estrutura dimérmica



Subunidade	Gene	Função da subunidade
$\alpha$	<i>polC (dnaE)</i>	Atividade de polimerização
$\epsilon$	<i>dnaQ (mutD)</i>	Exonuclease de revisão 3'→5'
$\theta$	<i>holE</i>	Estabilização da subunidade $\epsilon$
$\tau$	<i>dnaX</i>	Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático
$\gamma$	<i>dnaX*</i>	Carregadora de braçadeira
$\delta$	<i>holA</i>	Abridor de braçadeira
$\delta'$	<i>holB</i>	Carregadora de braçadeira
$\chi$	<i>holC</i>	Interação com SSB
$\psi$	<i>holD</i>	Interação com $\gamma$ e $\chi$
$\beta$	<i>dnaN</i>	Grampo de DNA necessário para processividade ótima

Núcleo da polimerase

Complexo carregador de braçadeiras ( $\gamma$ ) que carrega as subunidades  $\beta$  na fita retardada em cada fragmento de Okazaki



# REPLISSOMO

## 1- Núcleo catalítico (cerne)

- subunidade  $\alpha$ 
  - atividade DNA polimerase 5'-3'
- subunidade  $\epsilon$ 
  - atividade de revisão 3'-5'
- subunidade  $\theta$ 
  - estimula a atividade exonucleásica
  - montagem do cerne

## 2 - Subunidade $\tau$

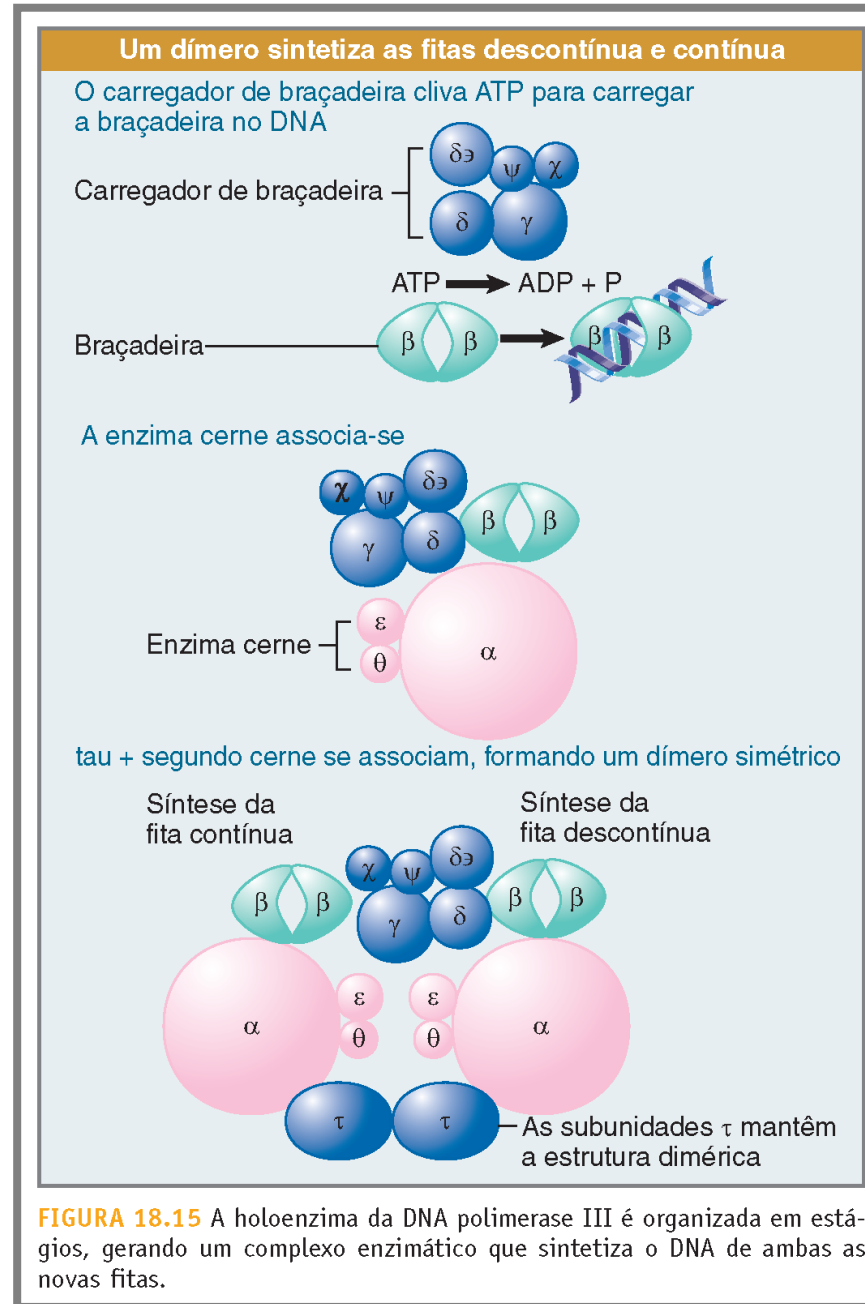
- Une os 2 núcleos catalíticos

## 3 – Braçadeira (2 subunidades $\beta$ )

- Fixa o núcleo catalítico na fita molde

## 4 - Carregador da braçadeira

- Complexo  $\gamma$ : grupo de 5 proteínas
- Posiciona a braçadeira no DNA



**FIGURA 18.15** A holoenzima da DNA polimerase III é organizada em estágios, gerando um complexo enzimático que sintetiza o DNA de ambas as novas fitas.

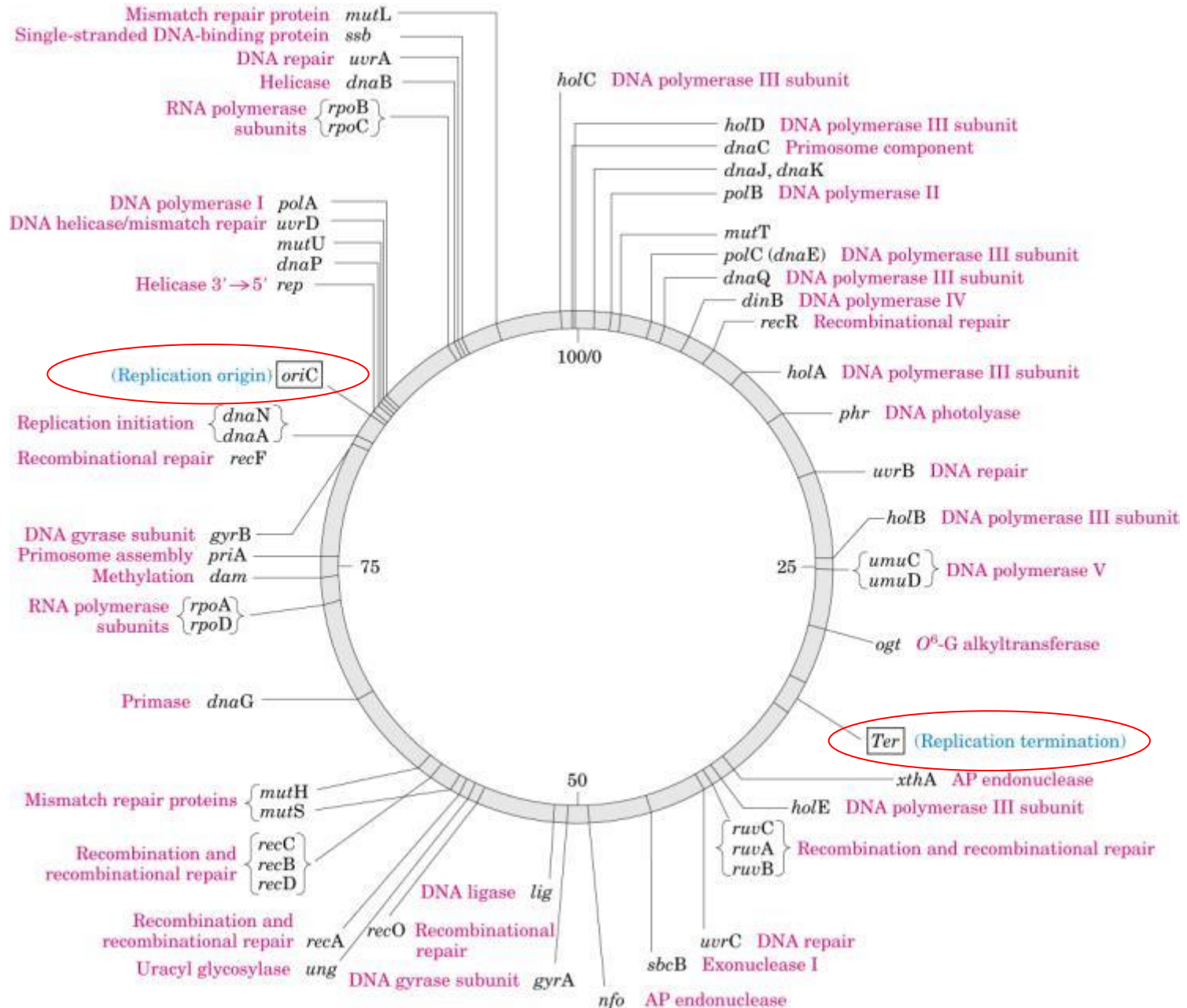
# Síntese de DNA

- Conservado em todas as espécies;

3 etapas:

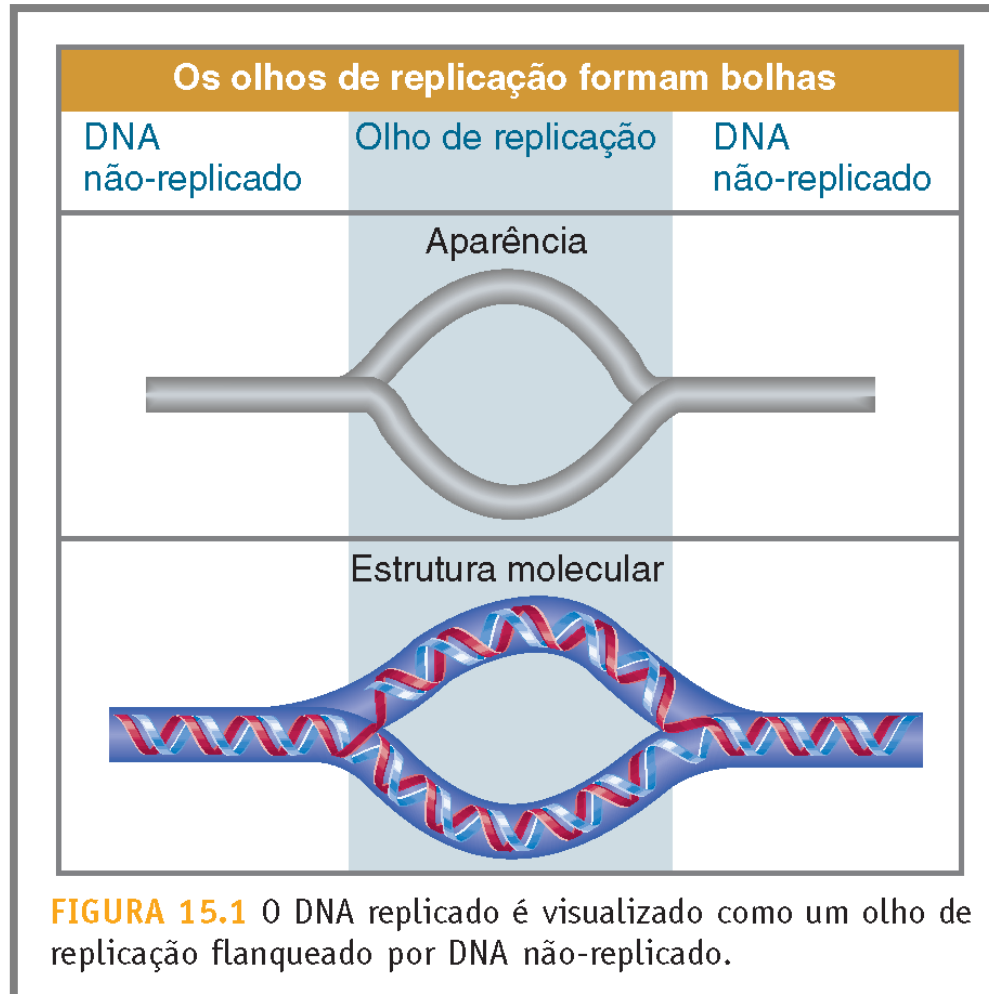
- Iniciação;
- Alongamento;
- Terminação.

# Mapa do cromossomo de *E. coli*



# Fase 1: Síntese de DNA

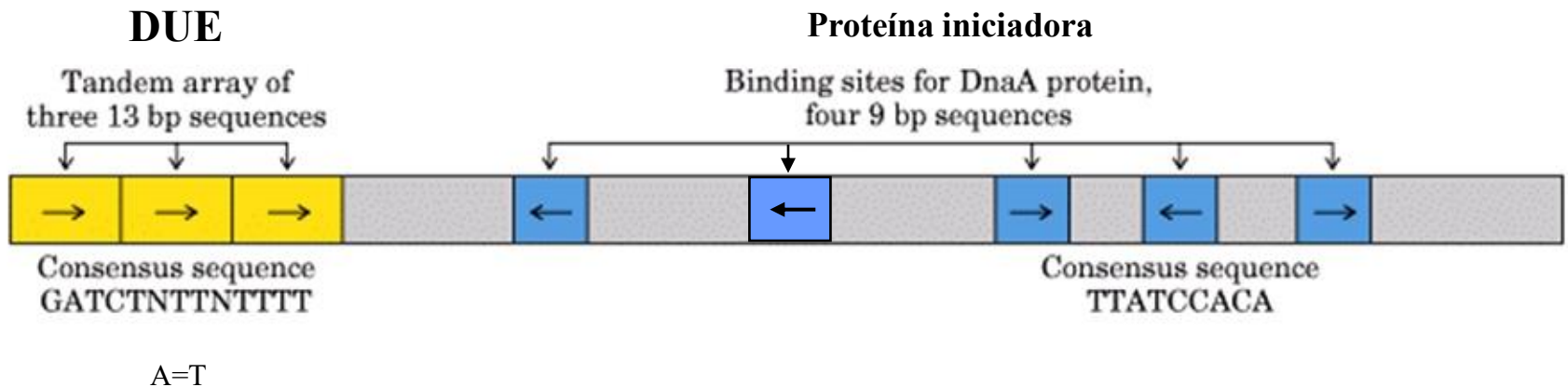
## •Iniciação: A replicação se inicia na Origem



# Fase 1: Síntese de DNA

## • Iniciação: A replicação se inicia na Origem

- 245 pb;
- 2 tipos de seq: 5 repetições 9pb (sítio R) e região rica A=T (DUE)
- sítios adicionais (I): ligação de outras proteínas.



DUE – elemento de desenrolamento do DNA.

# Síntese de DNA

## • Iniciação: Proteínas necessárias

**TABELA 25-3** Proteínas necessárias para iniciar a replicação na origem de *E. coli*

Proteína	$M_r$	Número de subunidades	Função
Proteína DnaA	52.000	1	Reconhece a sequência <i>ori</i> ; abre o duplex em sítios específicos na origem
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6*	Desenrola o DNA
Proteína DnaC	174.000	6*	Necessária para a ligação da DnaB na origem
HU	19.000	2	Proteína semelhante à histona; proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
FIS	22.500	2*	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
IHF	22.000	2	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
Primase (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza iniciadores de RNA
Proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB)	75.600	4*	Liga-se ao DNA de fita simples
DNA girase (DNA-topoisomerase II)	400.000	4	Alivia a tensão de torção gerada pelo desenrolamento do DNA
Dam metilase	32.000	1	Metila as sequências (5')GATC em <i>oriC</i>

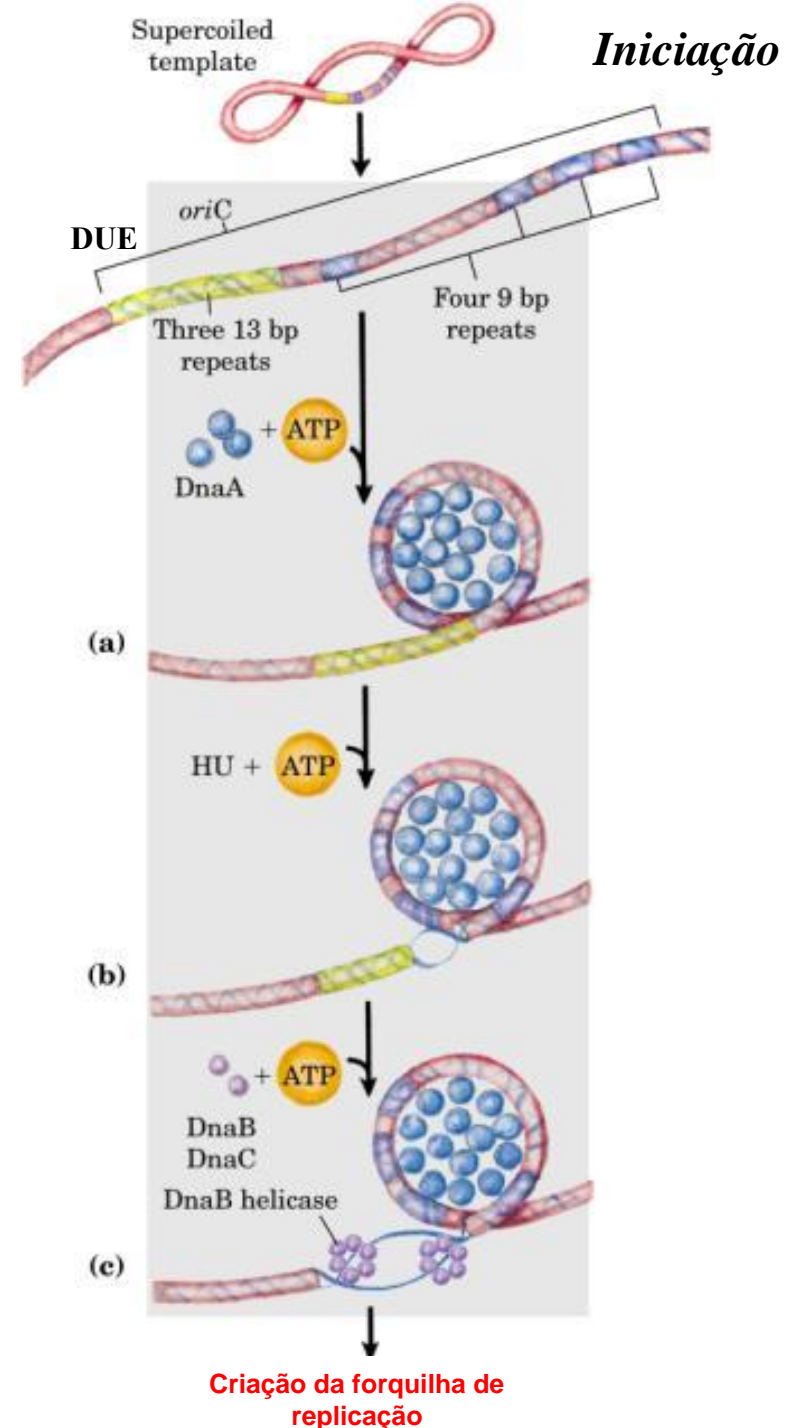
\*As subunidades nesses casos são idênticas.

# Síntese de DNA

## • Iniciação: Proteínas necessárias

Proteína	Função
Proteína DnaA	Reconhece a sequência ori; abre o duplex em sítios específicos na origem
Proteína DnaB (helicase)	Desenrola o DNA
Proteína DnaC	Necessária para a ligação da DnaB na origem
HU	Proteína semelhante à histona; proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
FIS	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
IHF	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
Primase (proteína DnaG)	Sintetiza iniciadores de RNA
Proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB)	Liga-se ao DNA de fita simples
DNA girase (DNA-topoisomerase II)	Alivia a tensão de torção gerada pelo desenrolamento do DNA
Dam metilase	Metila as sequências (5')GATC em <i>oriC</i>

\*As subunidades nesses casos são idênticas.



HU e outras pt: facilitam o dobramento do DNA.

## Regulação da replicação - Iniciação

- **ÚNICA FASE DA REPLICAÇÃO QUE É REGULADA –**  
*A replicação ocorre apenas uma vez em cada ciclo celular*

### ***Regulação***

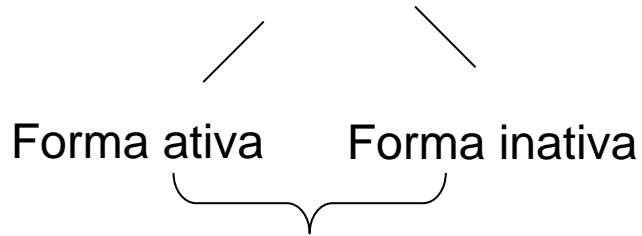
- Hidrólise ATP – DnaA;
- Regulação temporal - metilação do DNA em *oriC*– Dam metilase



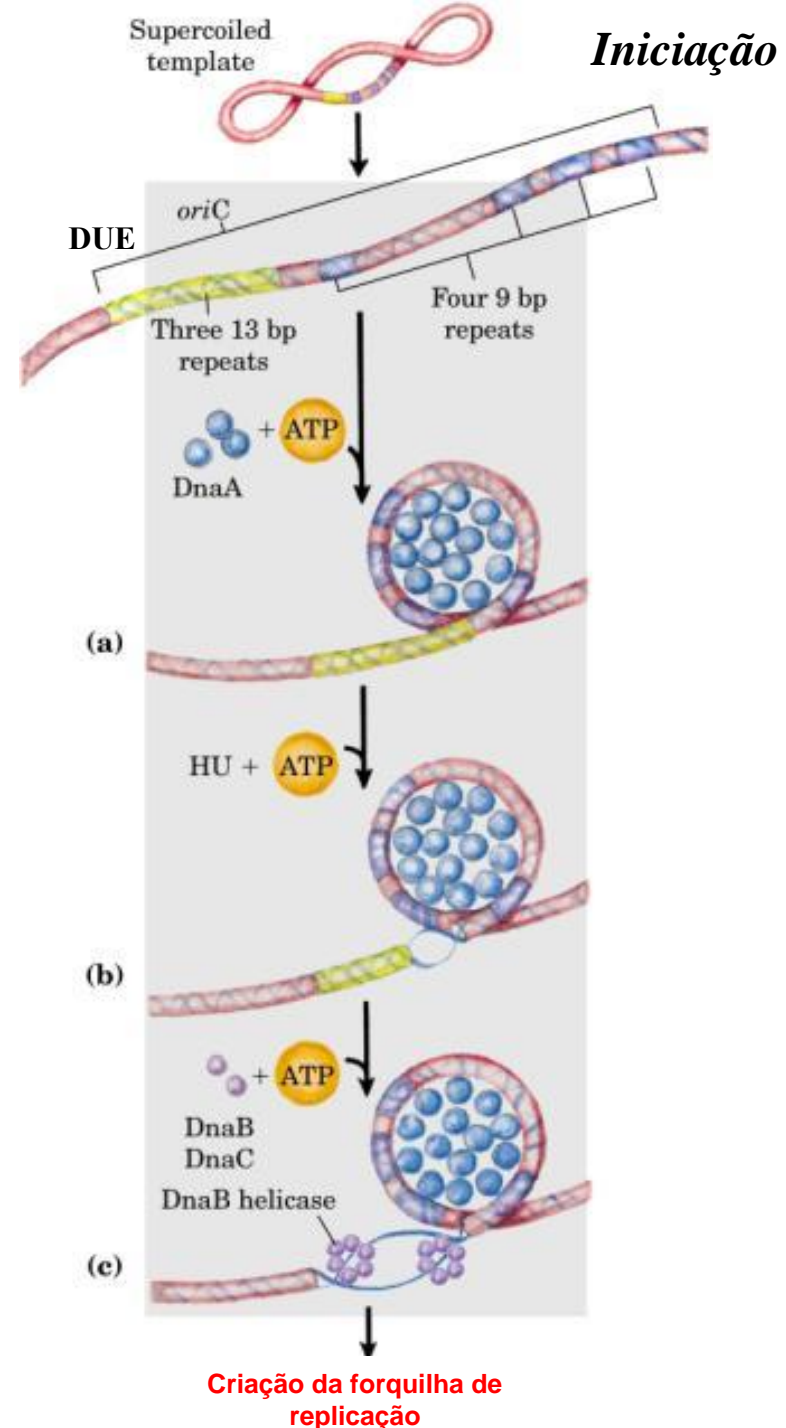
# Regulação da Replicação

## Hidrólise do ATP

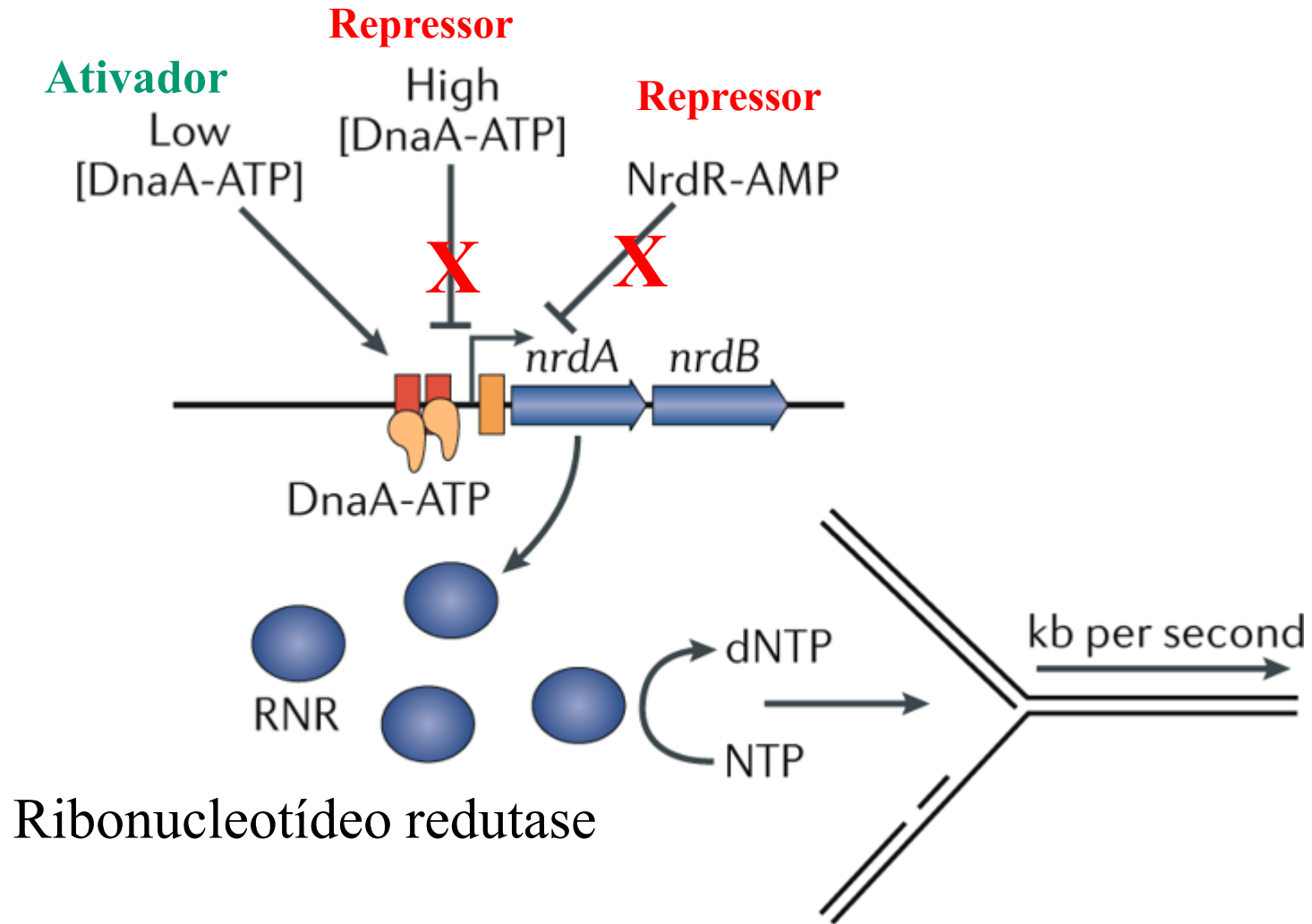
- DnaA + ATPase – hidrólise ATP



HU e outras pt: falicitam o dobramento do DNA.

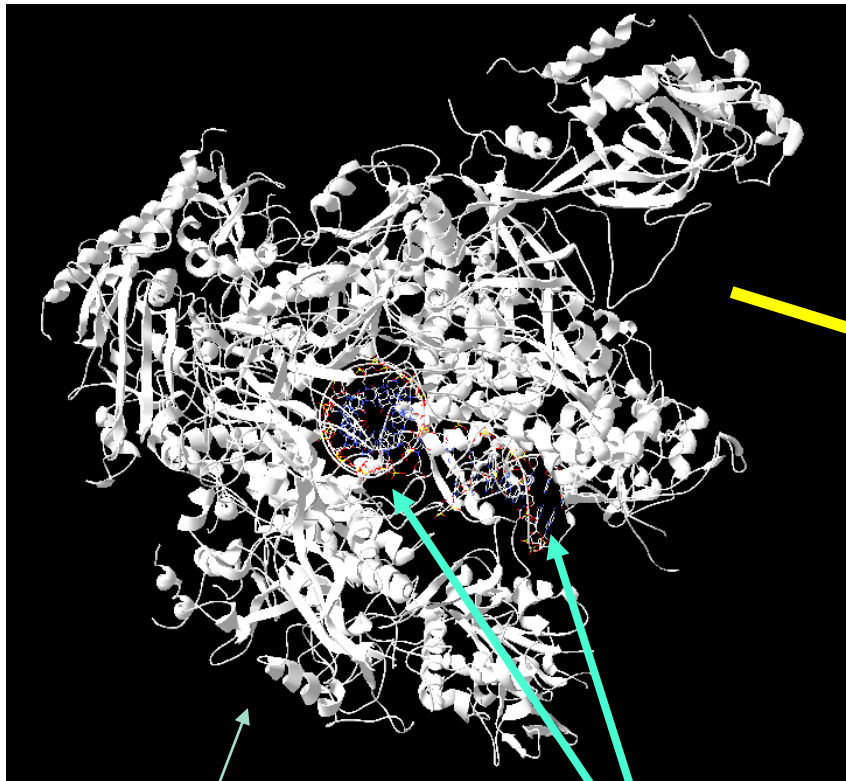


# Regulação da Replicação



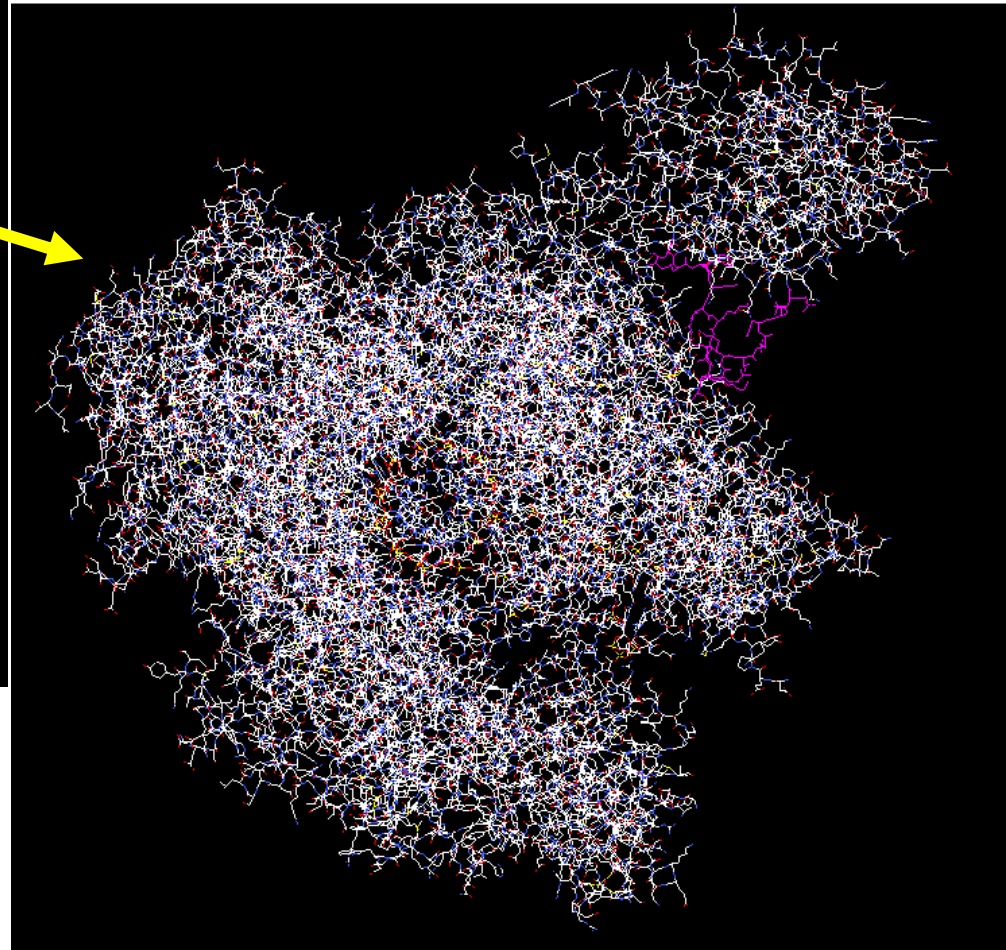
# Ligação Proteína DNA

## Estrutura RNA polimerase



Proteína  
RNAPol

DNA



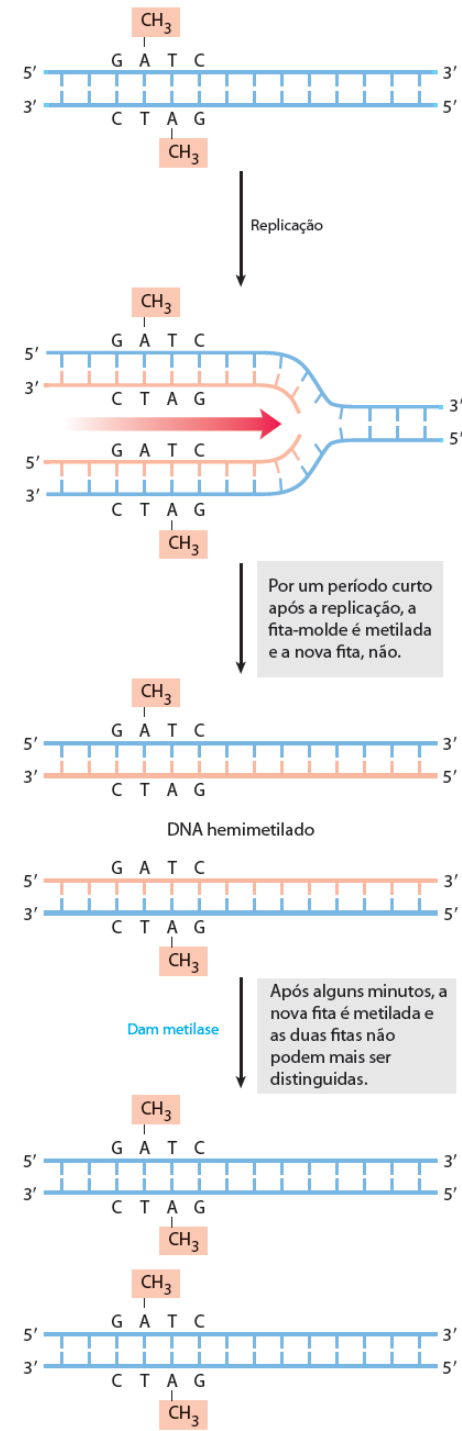
# Regulação da Replicação

## Metilação do DNA

Modificação covalente do DNA com um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) - transferido da S-adenosilmetionina pela ação de uma família de DNA metiltransferases.



Importante para o sistema de Reparo do DNA



## Fase 2: Alongamento

- Fase de alongamento apresenta duas operações: síntese fita contínua e fita descontínua;
- Formação da forquilha de replicação: **REPLISSOMO**

**TABELA 25-4** Proteínas do replissomo de *E. coli*

Proteína	$M_r$	Número de subunidades	Função
SSB	75.600	4	Ligação a um DNA de fita única
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6	Desenrolamento do DNA, constituinte do primossomo
Primase (proteína DnaG)	60.000	1	Síntese do iniciador de RNA; constituinte do primossomo
DNA-polimerase III	791.500	17	Novo alongamento da fita
DNA-polimerase I	103.000	1	Preenchimento dos intervalos; excisão dos iniciadores
DNA-ligase	74.000	1	Ligação
DNA-girase (DNA-topoisomerase II)	400.000	4	Superenrolamento

Fonte: Modificada de Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA replication*, Tabela S11-2, W.H. Freeman and Company, New York.

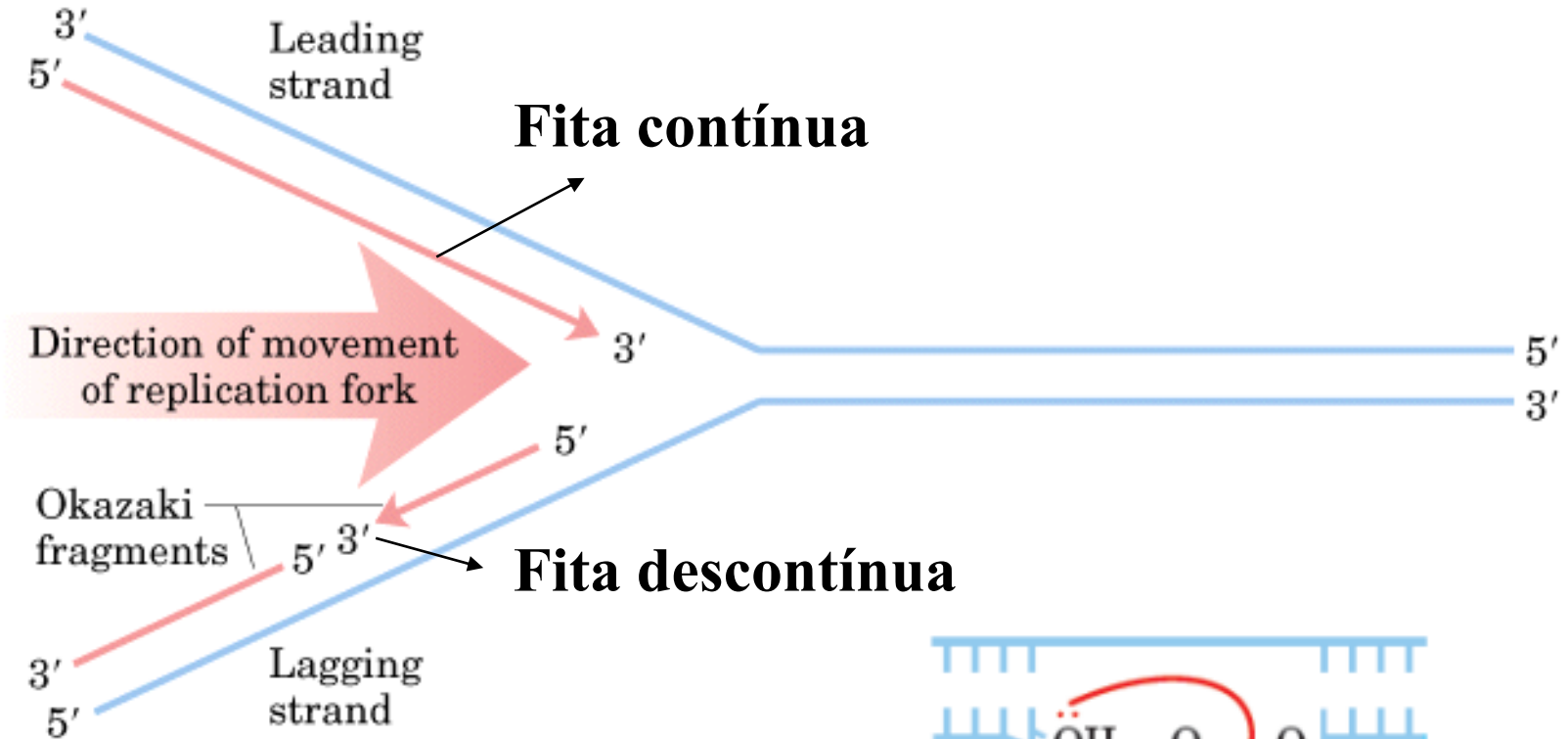
## Fase 2: Alongamento

### A replicação de DNA é semi-descontínua

- **Filamento líder (contínuo)**
  - Fita molde está no sentido 3' → 5'
  - Síntese contínua no sentido 5' → 3'
- **Filamento tardio (descontínuo)**
  - Fita molde está no sentido 5' → 3'
  - Síntese descontínua no sentido 5' → 3'
  - Para isso, ocorre a síntese no sentido 5' → 3' de **pequenos fragmentos** que são posteriormente conectados covalentemente
  - Fragmentos de **Okazaki** (1000-2000 nucleotídeos)

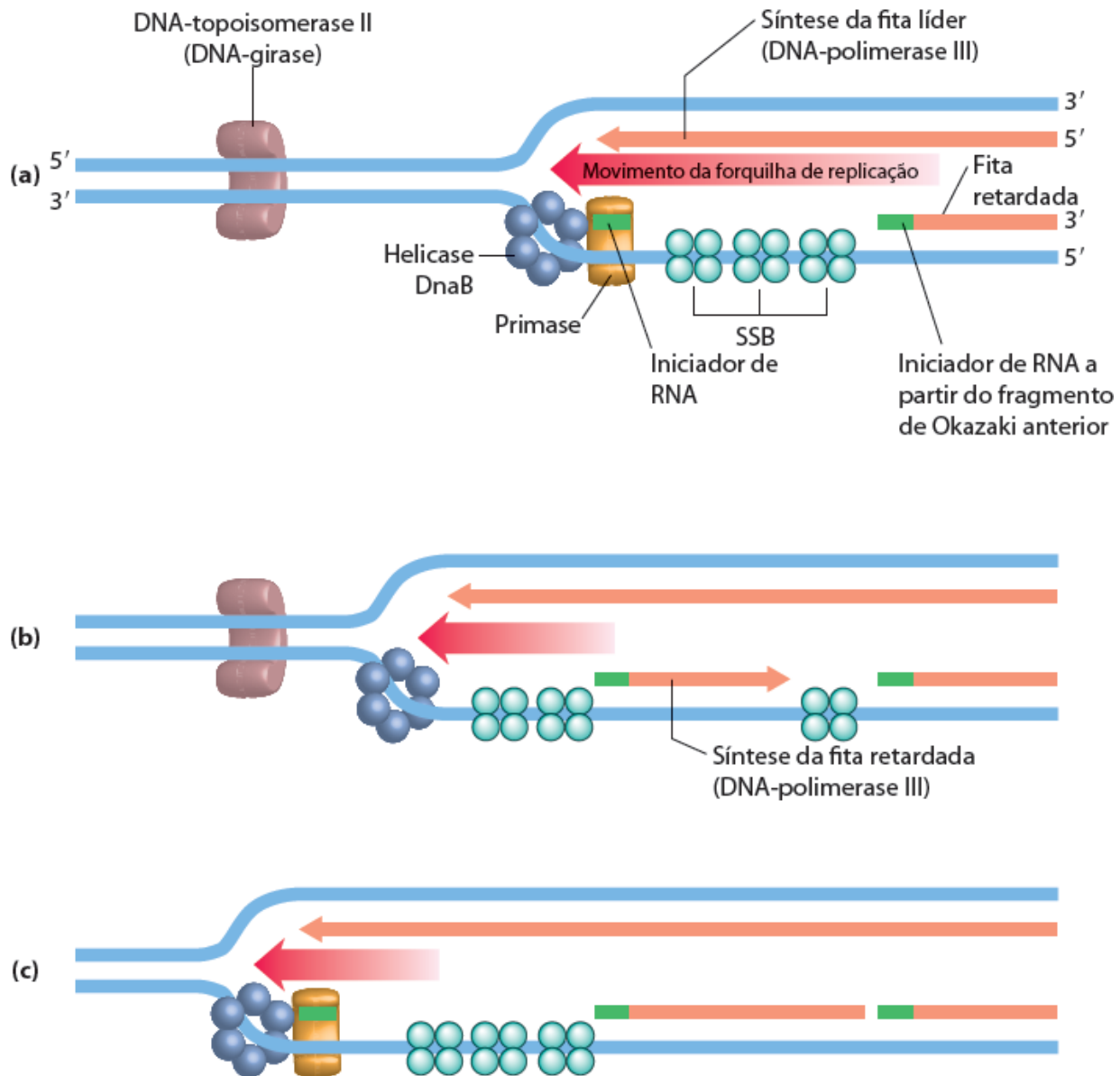
# Fase 2: Alongamento

Síntese DNA: 5' → 3'



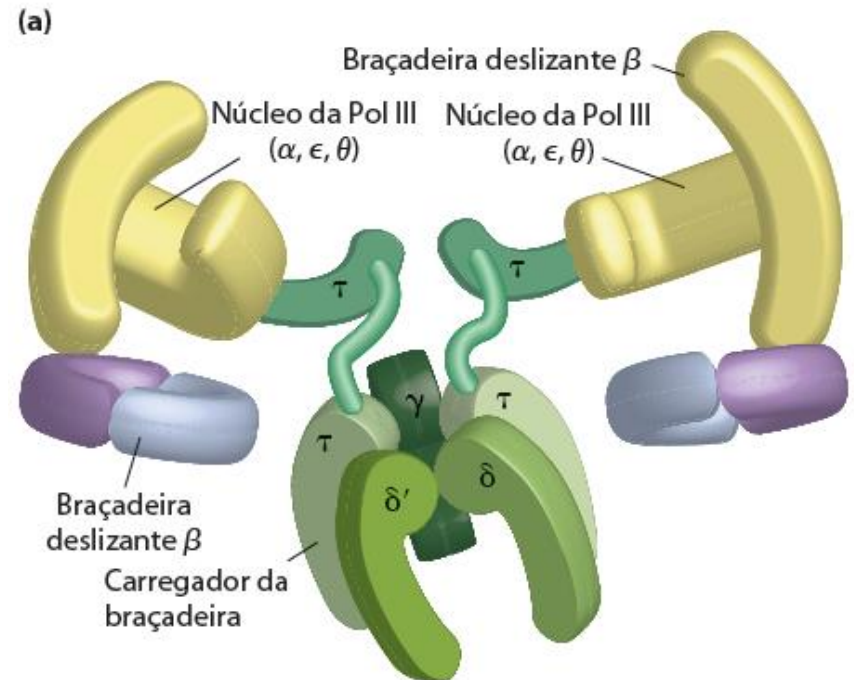
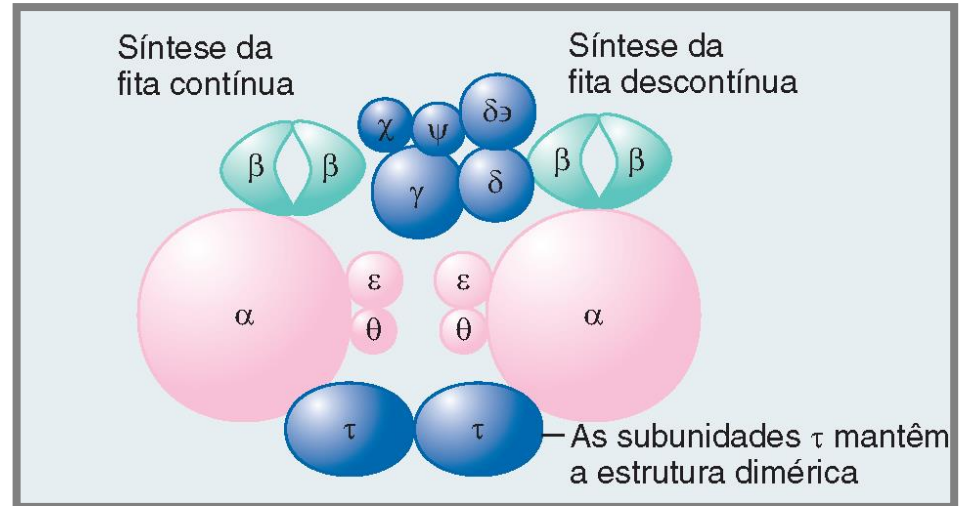
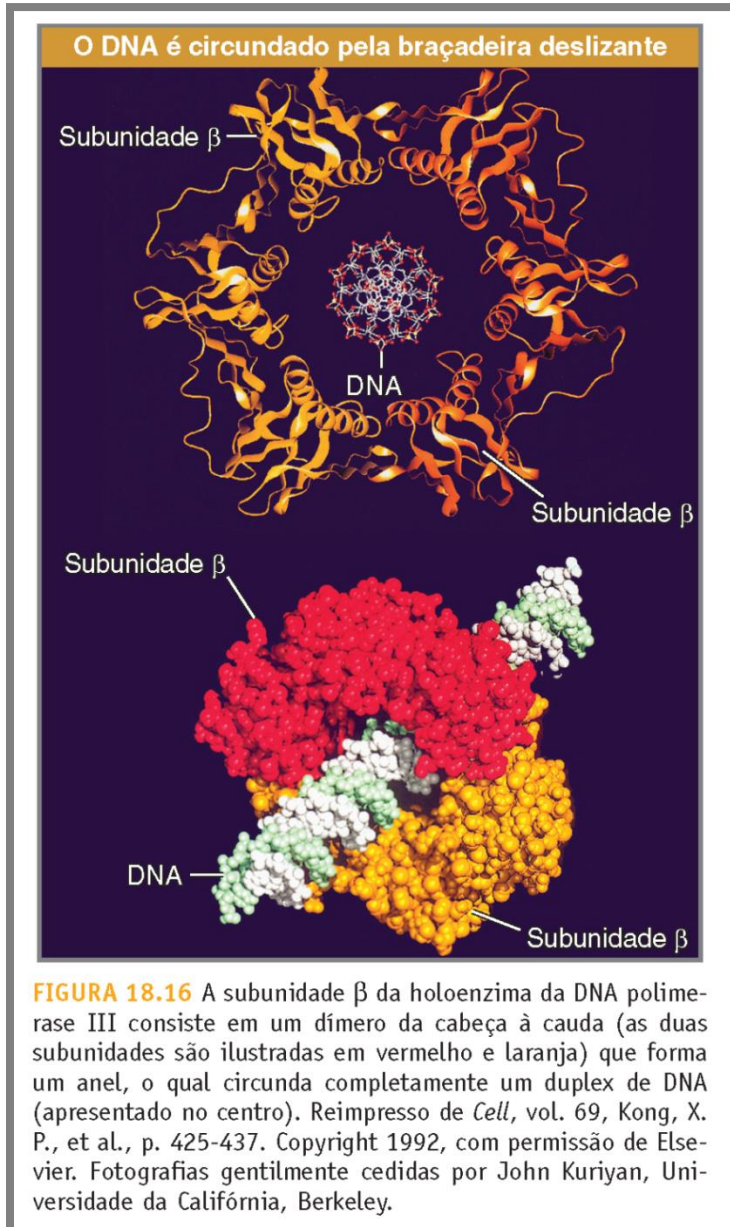
*E. coli* – 1000 a 2000 nt  
*Eucariotos* - 150 a 200 nt

# Fase 2: Alongamento

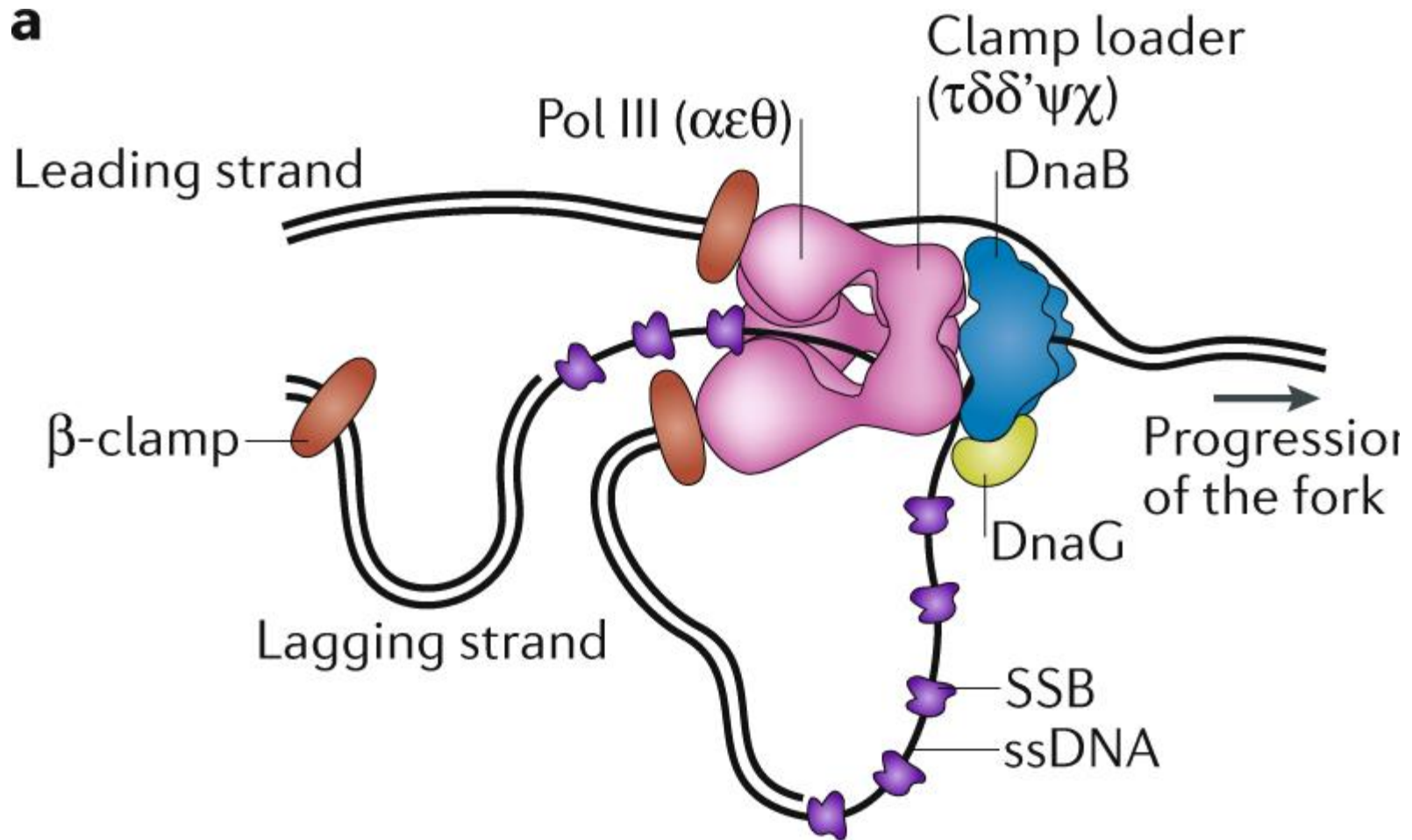




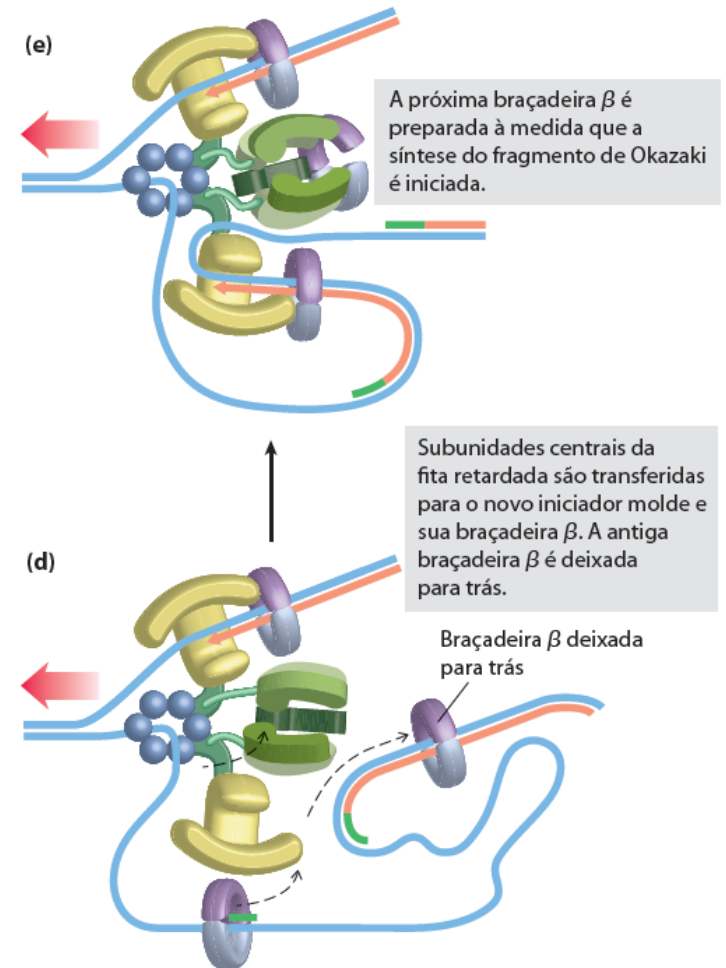
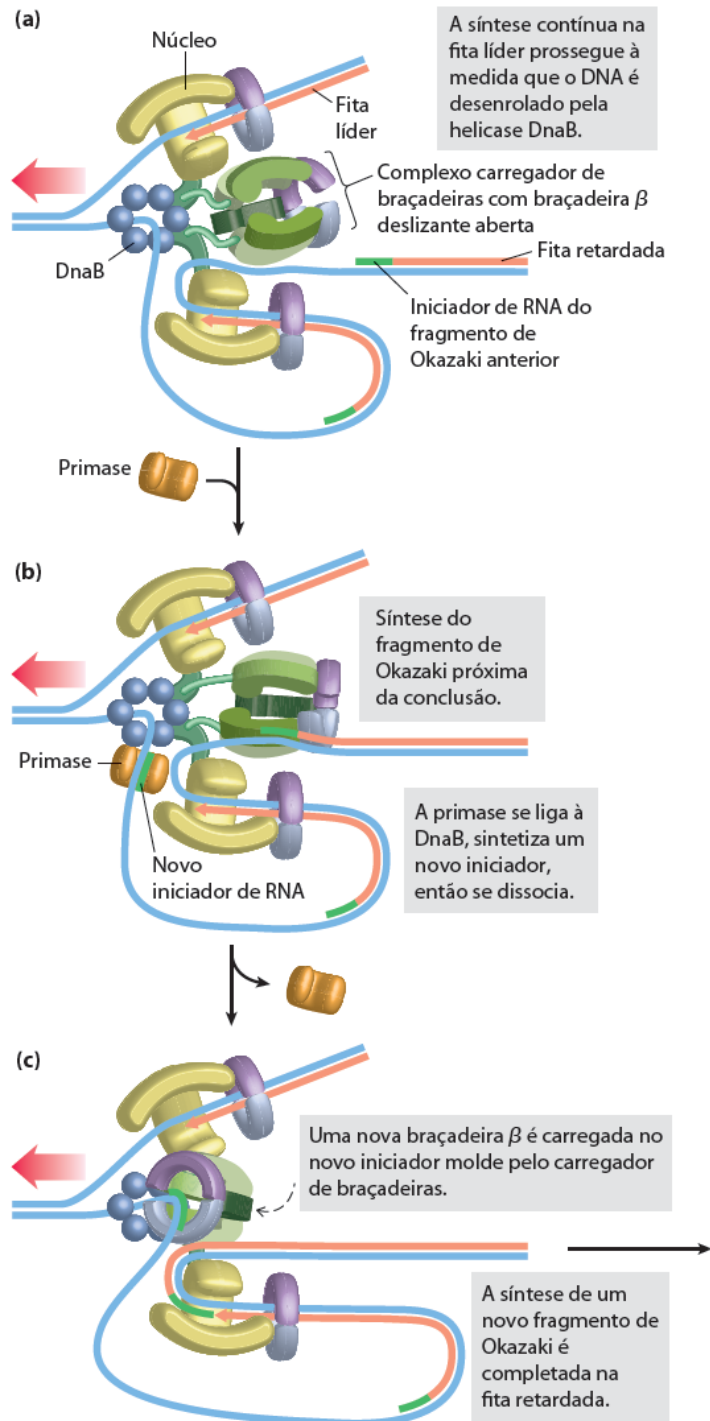
# Fase 2: Alongamento - Replissomo



# Alongamento

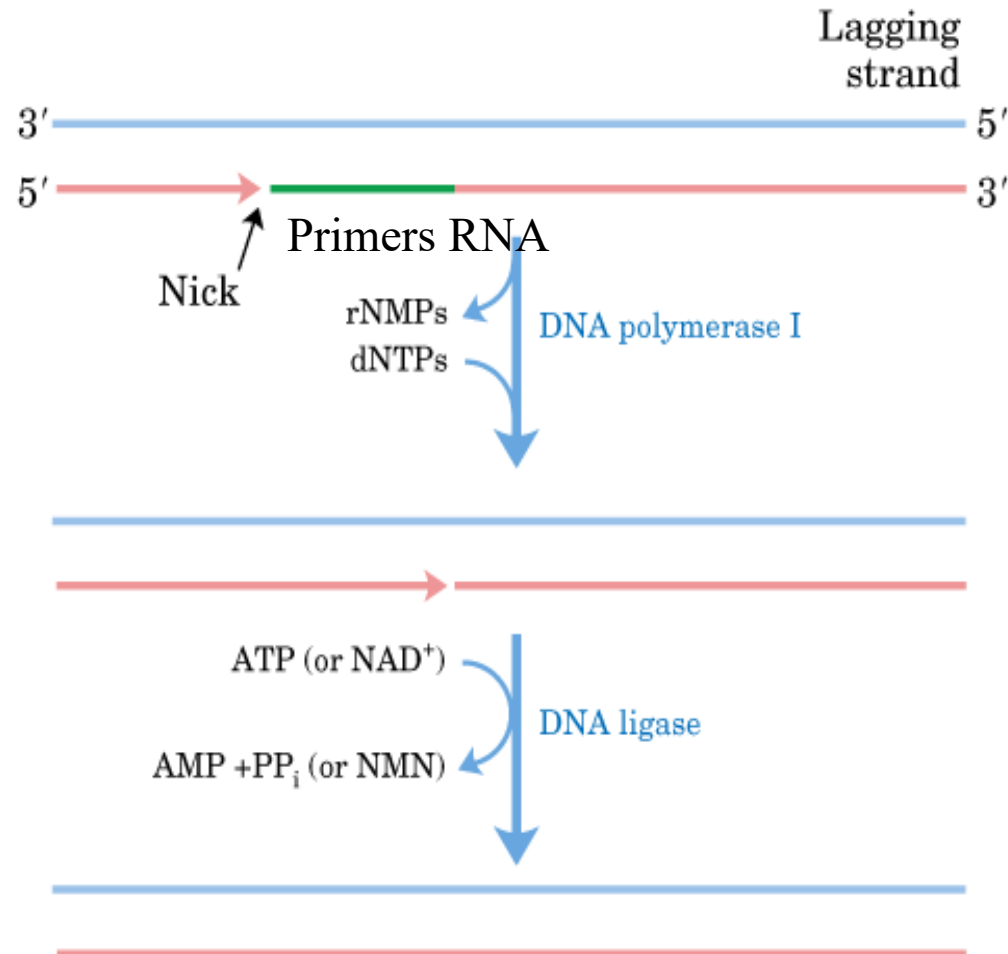


# Alongamento



# Etapas finais da síntese dos segmentos da fita descontínua

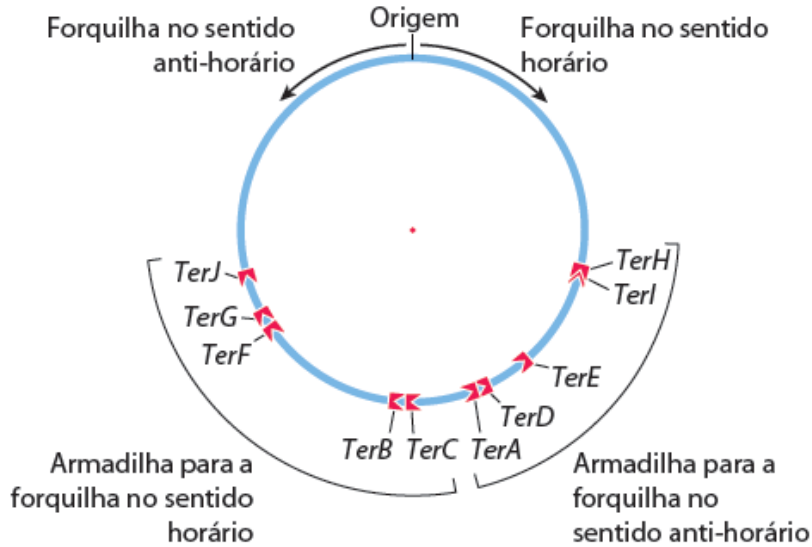
DNA-polimerase III	Novo alongamento da fita
DNA-polimerase I	Preenchimento dos intervalos; excisão dos iniciadores
DNA-ligase	Ligação



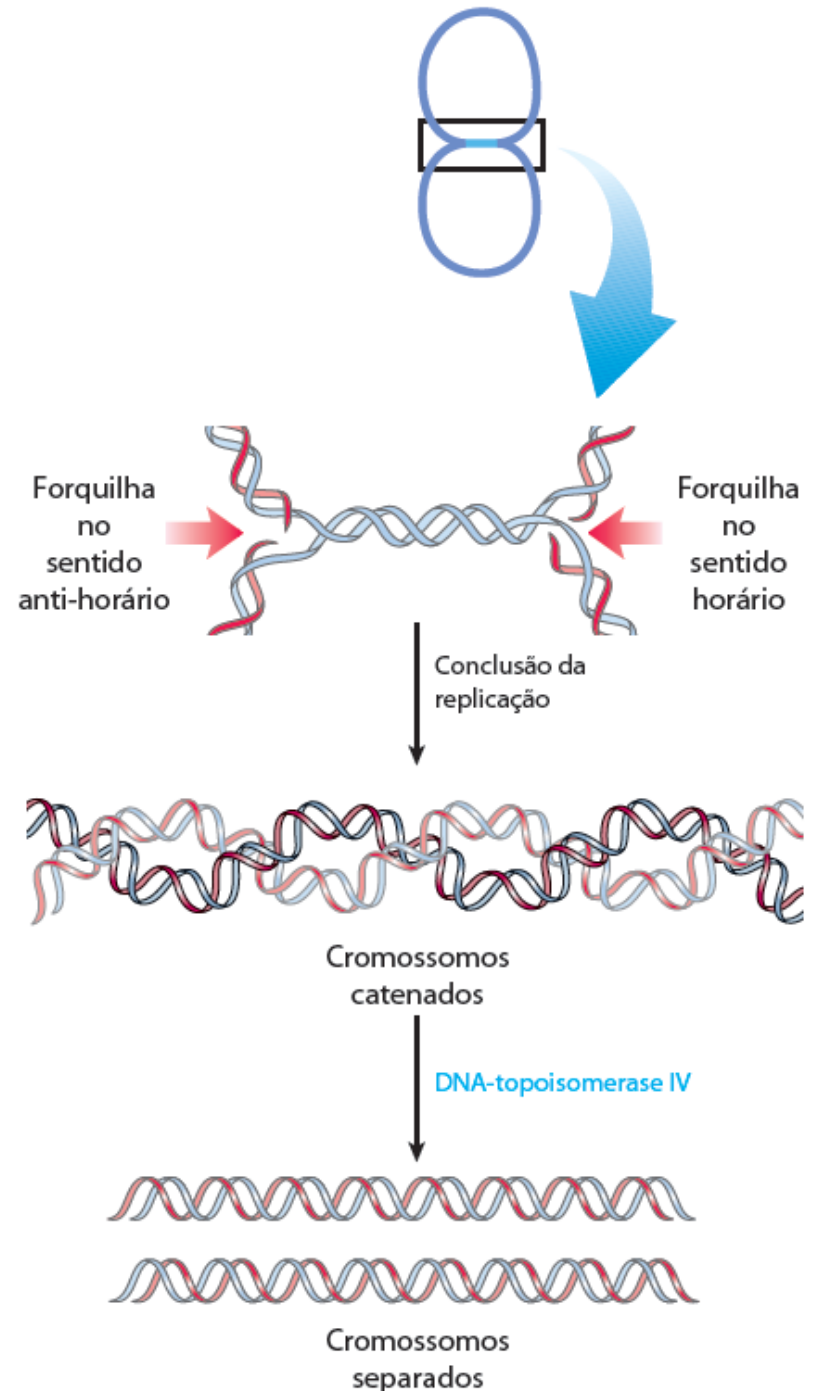
Remoção primers – DNAP I  
-atividade 5' → 3' exonucleásica

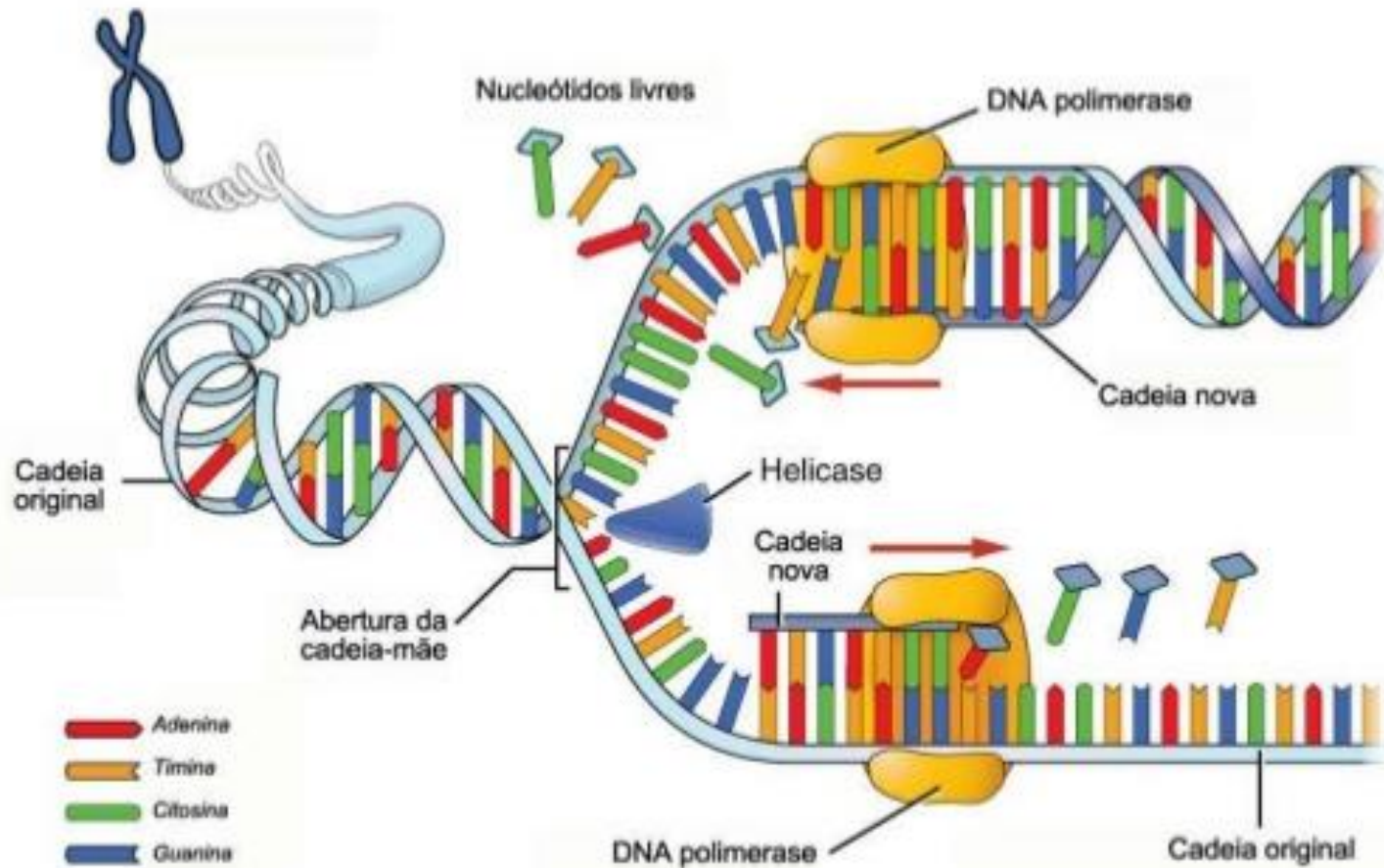
# Fase 3: Terminação

## Sequências de Terminação *Ter* (20pb)



Múltiplas cópias seq. *Ter*: **Ter-Tus** bloqueio da replicação





V1

V2