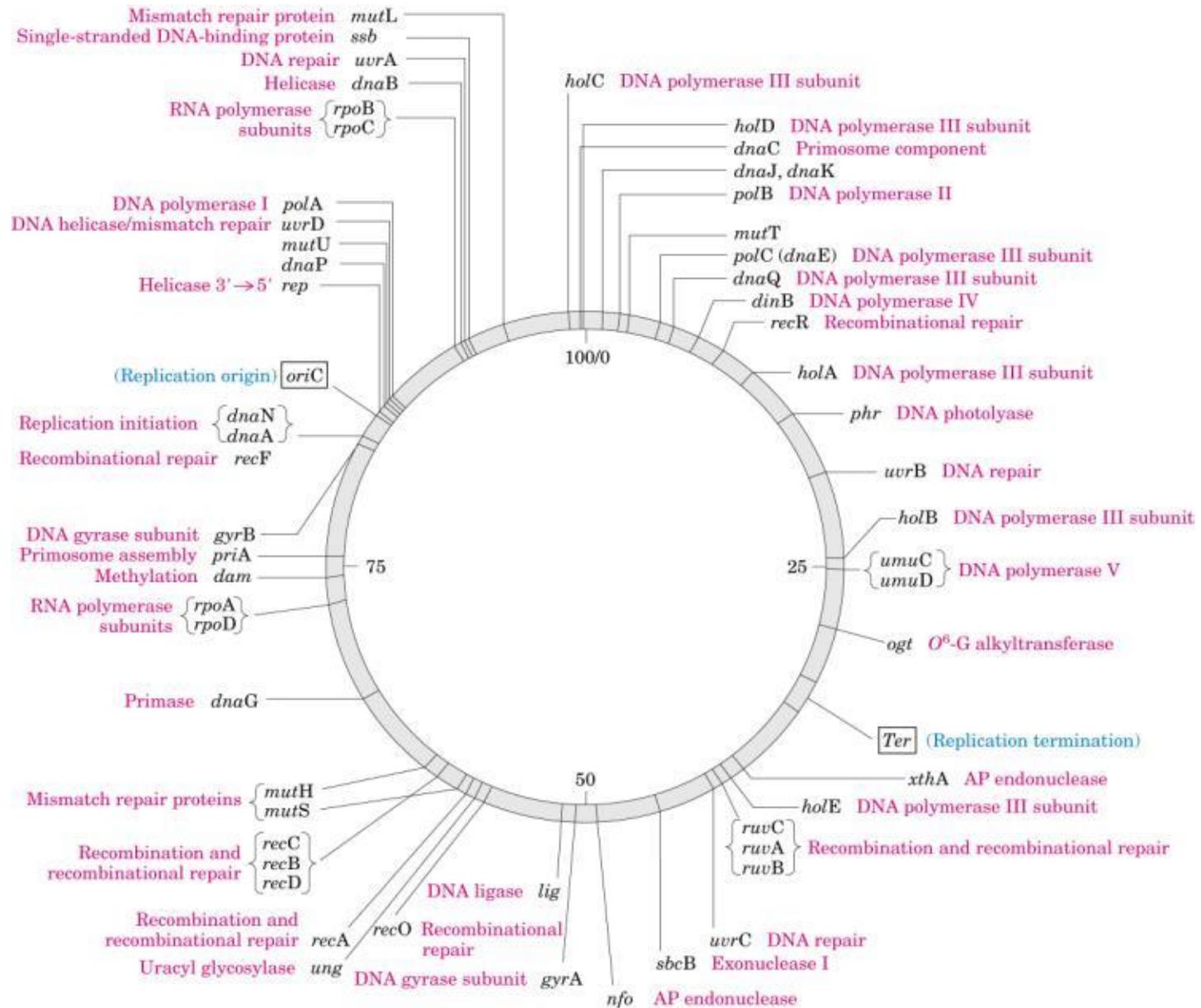


Replicação do DNA

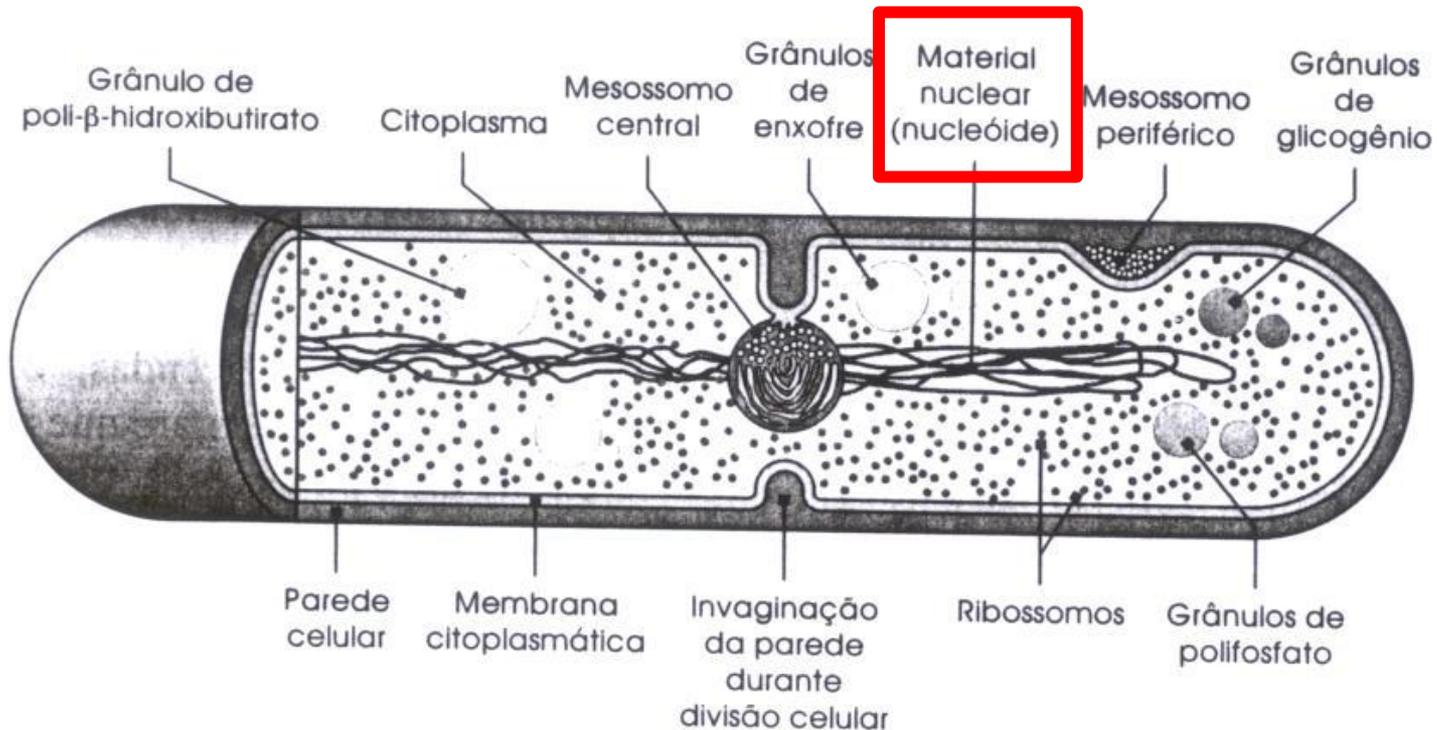


Mapa do cromossomo de *E. coli*



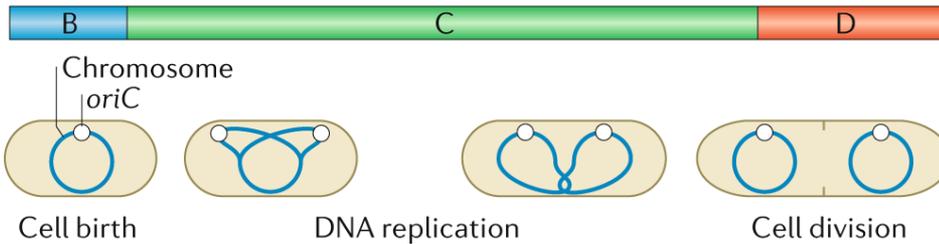
Cromossomo bacteriano

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

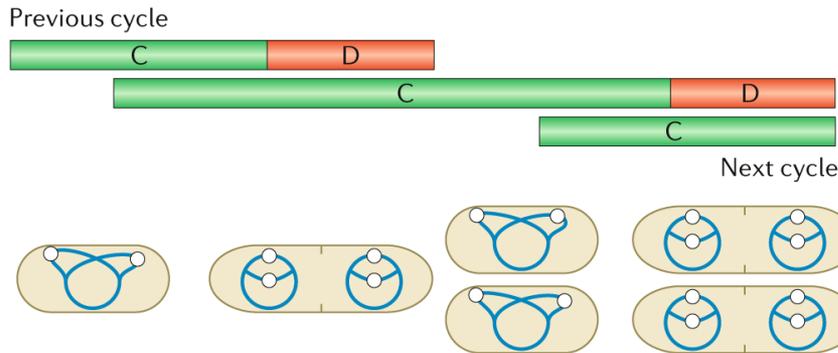


Divisão Celular em Bactérias

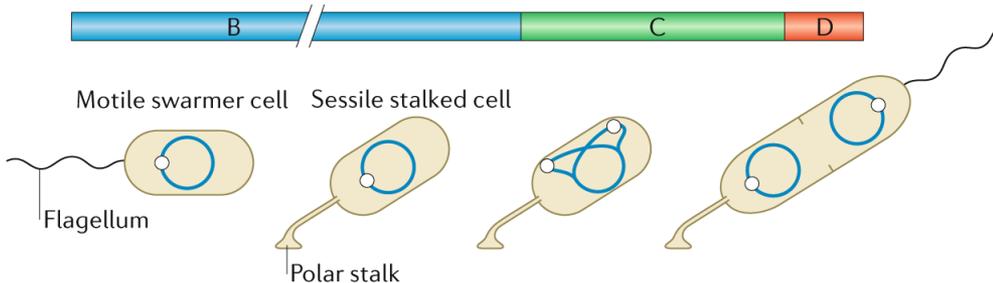
Non-overlapping cell cycles (slow growth)



b Overlapping cell cycles (fast growth)



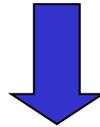
c Developmental control



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*:

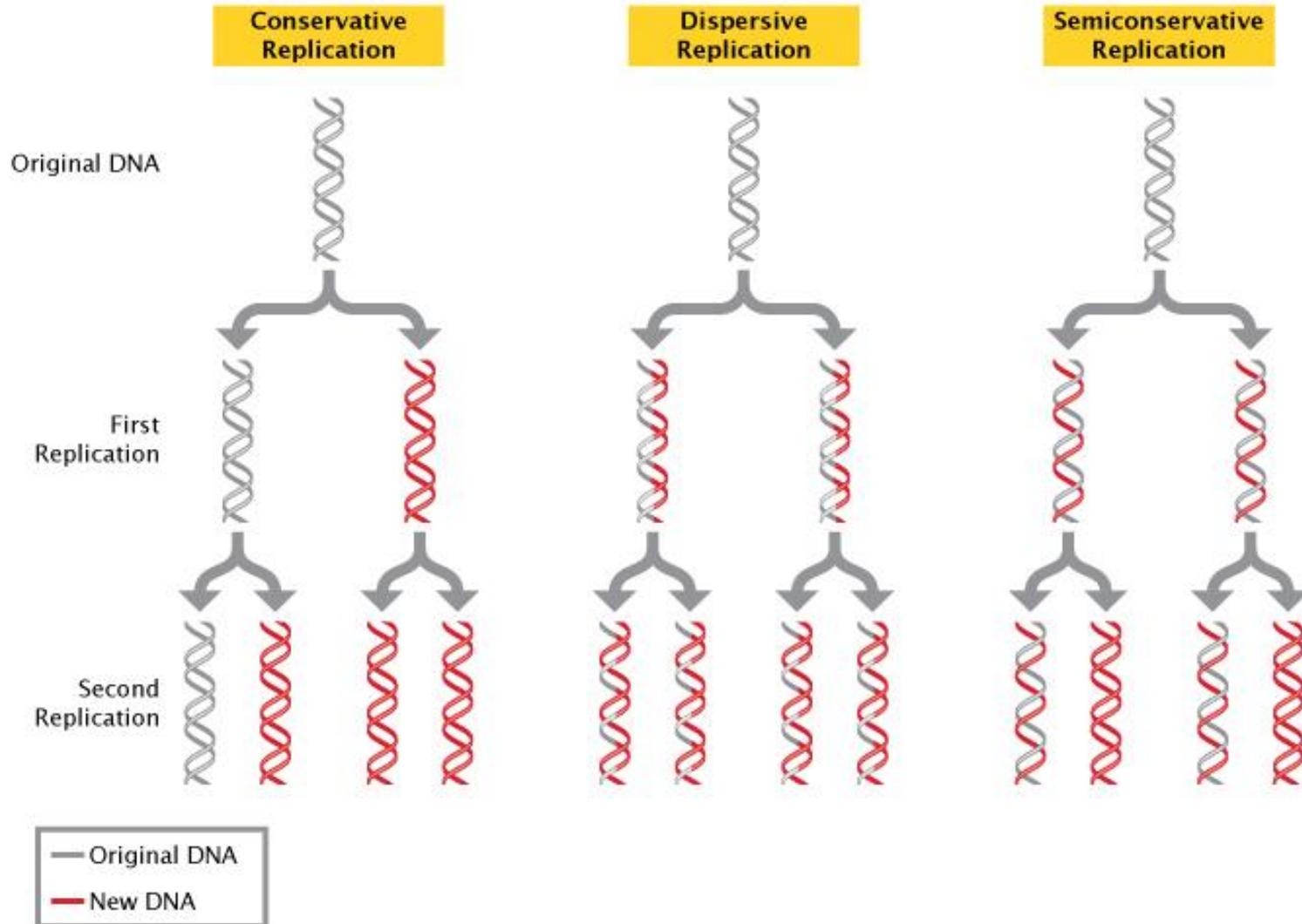
1953: Modelo estrutural de James Watson e Francis Crick;

1957: Matthew Meselson e Franklin Stahl



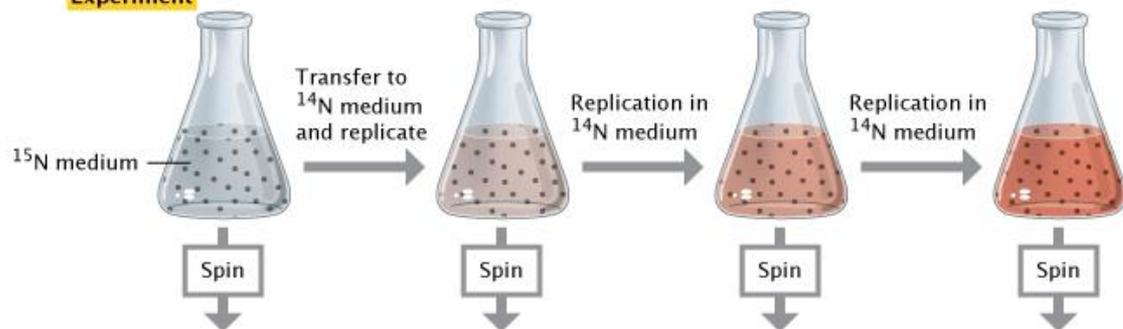
Experimento de Meselson-Stahl

Hipótesis

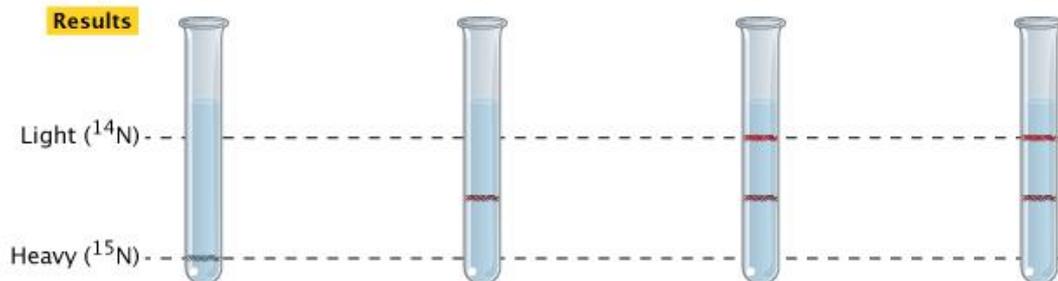


Question Which model of DNA replication – conservative, dispersive, or semiconservative – applies to *E. coli*?

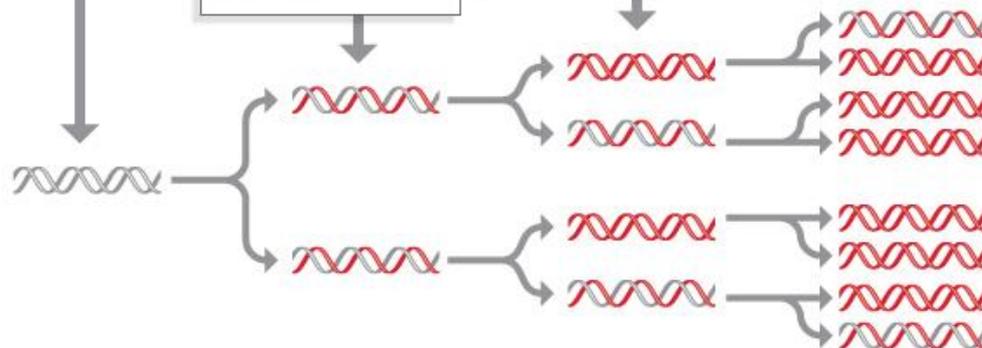
Experiment



Results



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



Cultivo de *E. coli* em meio contendo NH_4Cl

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

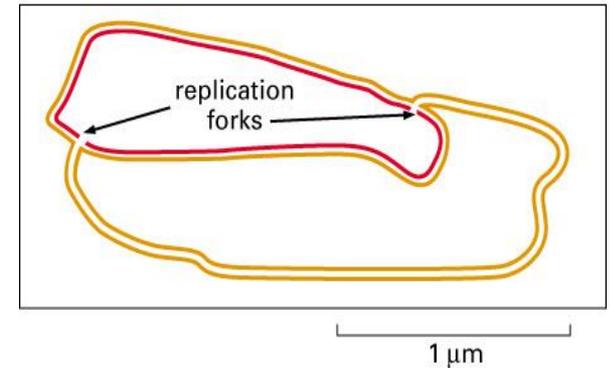
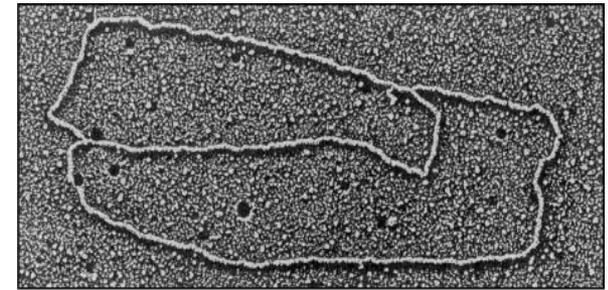
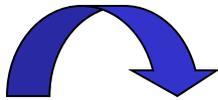
E. coli + Timina ^3H



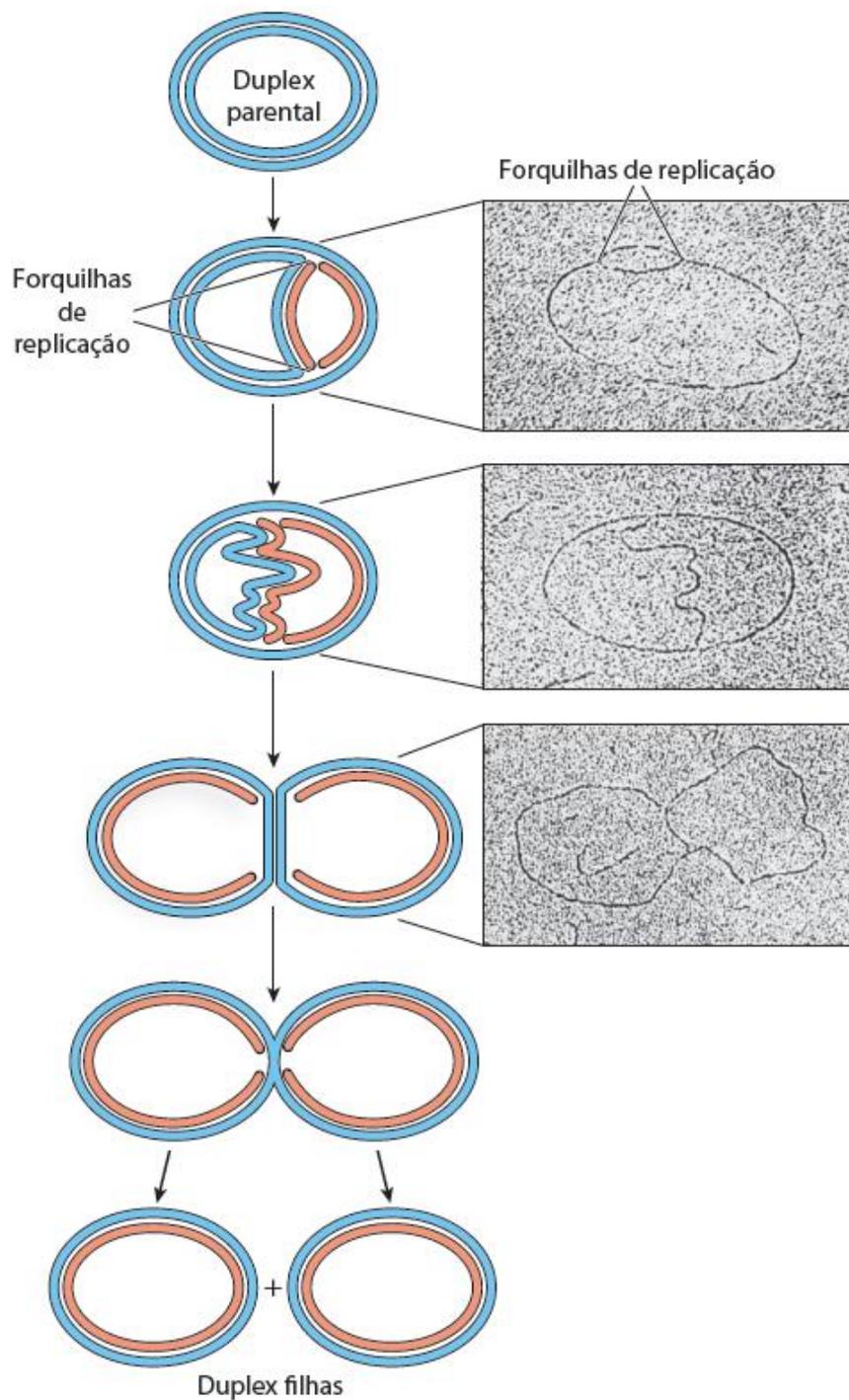
DNA



Autoradiografia



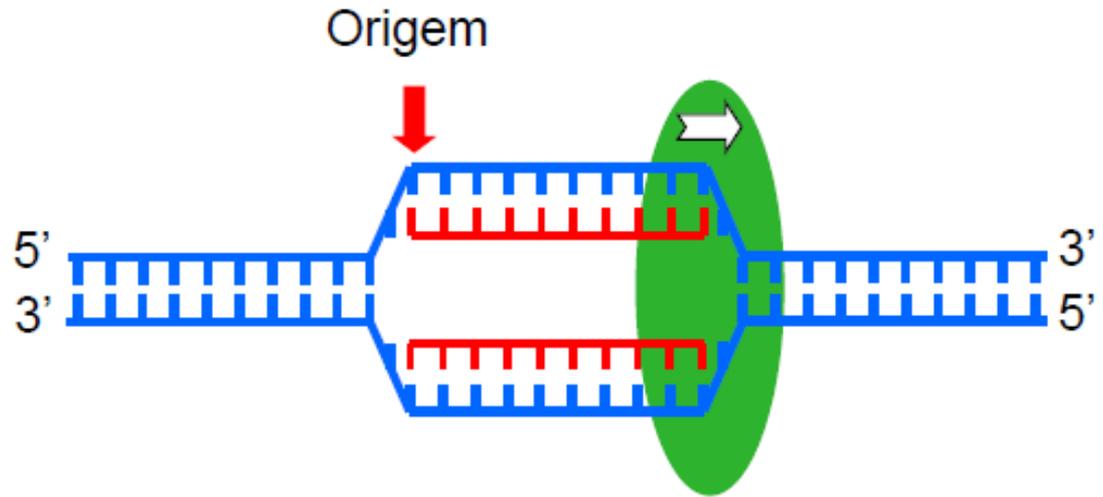
- Cromossomo: grande círculo;
- DNA com alça extra - fitas de DNA radioativas;



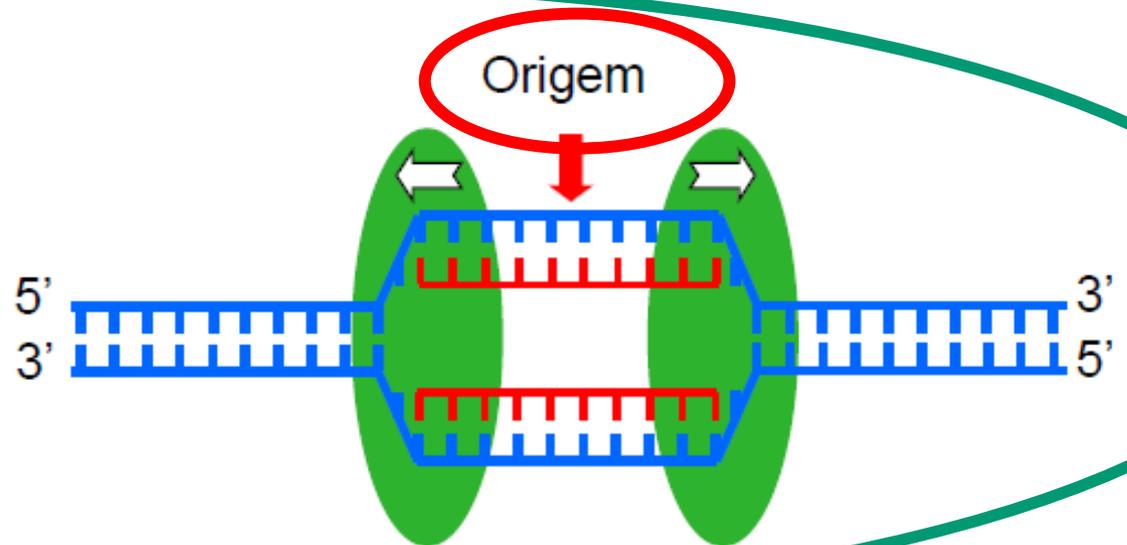
Formação de uma Forquilha de replicação

Como ocorre a replicação?

**Replicação
Unidirecional**

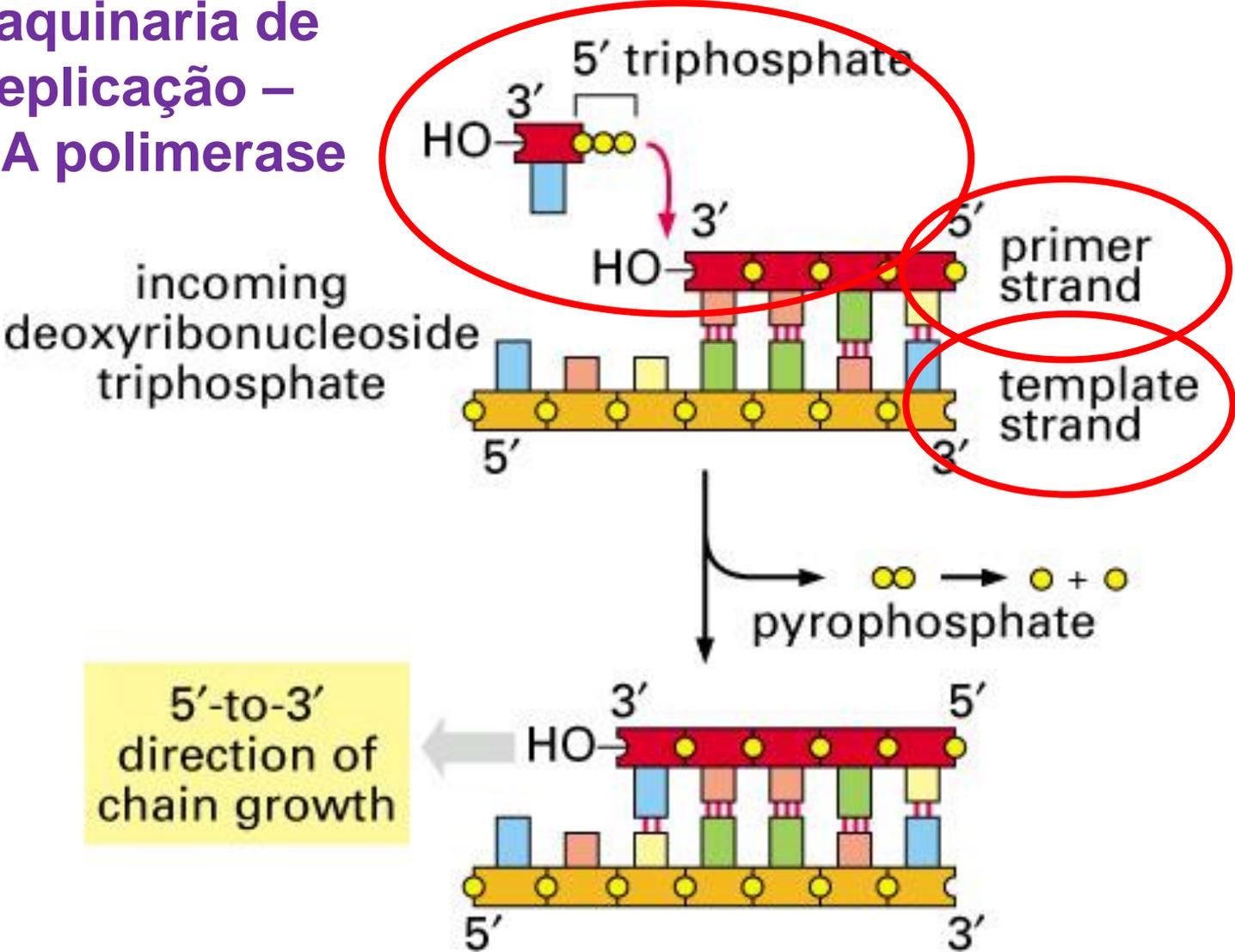


**Replicação
Bi - direcional**



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 [†]	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*.

[†]Apenas subunidade de polimerização. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades β , γ , δ , δ' , χ e Ψ (ver Tabela 25-2).

DNA polimerase III

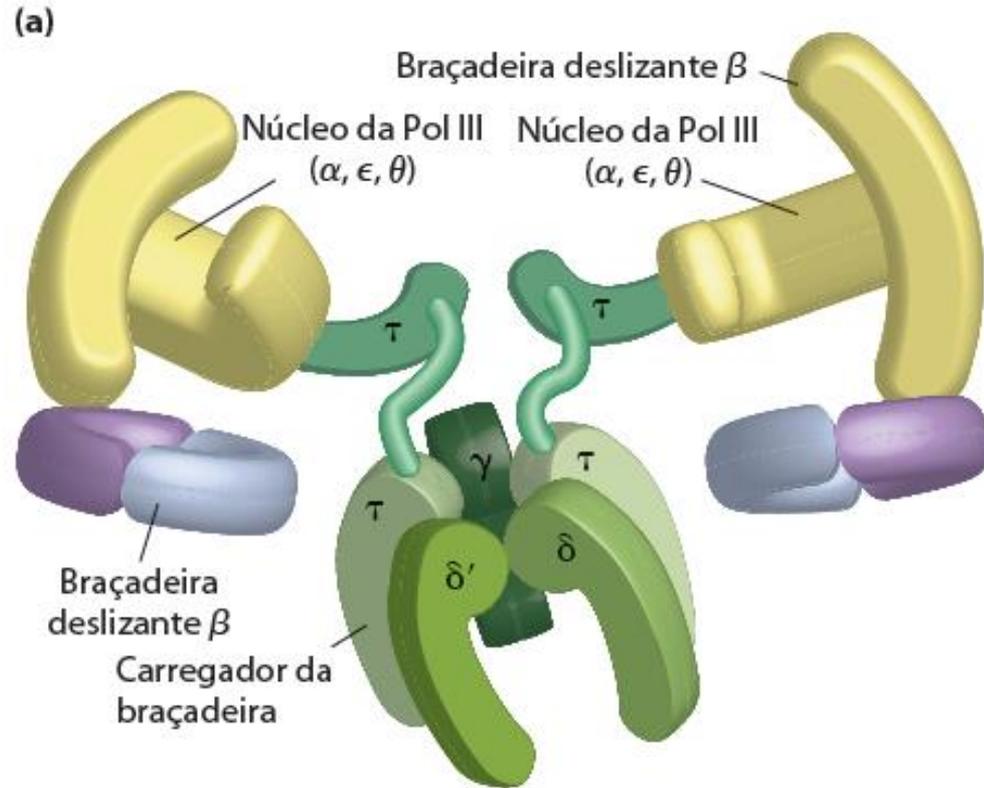
TABELA 25-2 Subunidades da DNA-polimerase III de *E. coli*

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

*A subunidade γ é codificada por uma porção do gene para a subunidade τ , de modo que 66% da subunidade τ , em sua porção amino terminal, tem a mesma sequência de aminoácidos que a subunidade γ . A subunidade γ 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
α	<i>polC (dnaE)</i>	Atividade de polimerização
ϵ	<i>dnaQ (mutD)</i>	Exonuclease de revisão 3'→5'
θ	<i>holE</i>	Estabilização da subunidade ϵ
τ	<i>dnaX</i>	Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático
γ	<i>dnaX*</i>	Carregadora de braçadeira
δ	<i>holA</i>	Abridor de braçadeira
δ'	<i>holB</i>	Carregadora de braçadeira
χ	<i>holC</i>	Interação com SSB
ψ	<i>holD</i>	Interação com γ e χ
β	<i>dnaN</i>	Grampo de DNA necessário para processividade ótima

Núcleo da polimerase

Complexo carregador de braçadeiras (γ) que carrega as subunidades β na fita retardada em cada fragmento de Okazaki

REPLISSOMO

1- Núcleo catalítico (cerne)

- subunidade α
 - atividade DNA polimerase 5'-3'
- subunidade ϵ
 - atividade de revisão 3'-5'
- subunidade θ
 - estimula a atividade exonucleásica
 - montagem do cerne

2 - Subunidade τ

- Une os 2 núcleos catalíticos

3 – Braçadeira (2 subunidades β)

- Fixa o núcleo catalítico na fita molde

4 - Carregador da braçadeira

- Complexo γ : grupo de 5 proteínas
- Posiciona a braçadeira no DNA

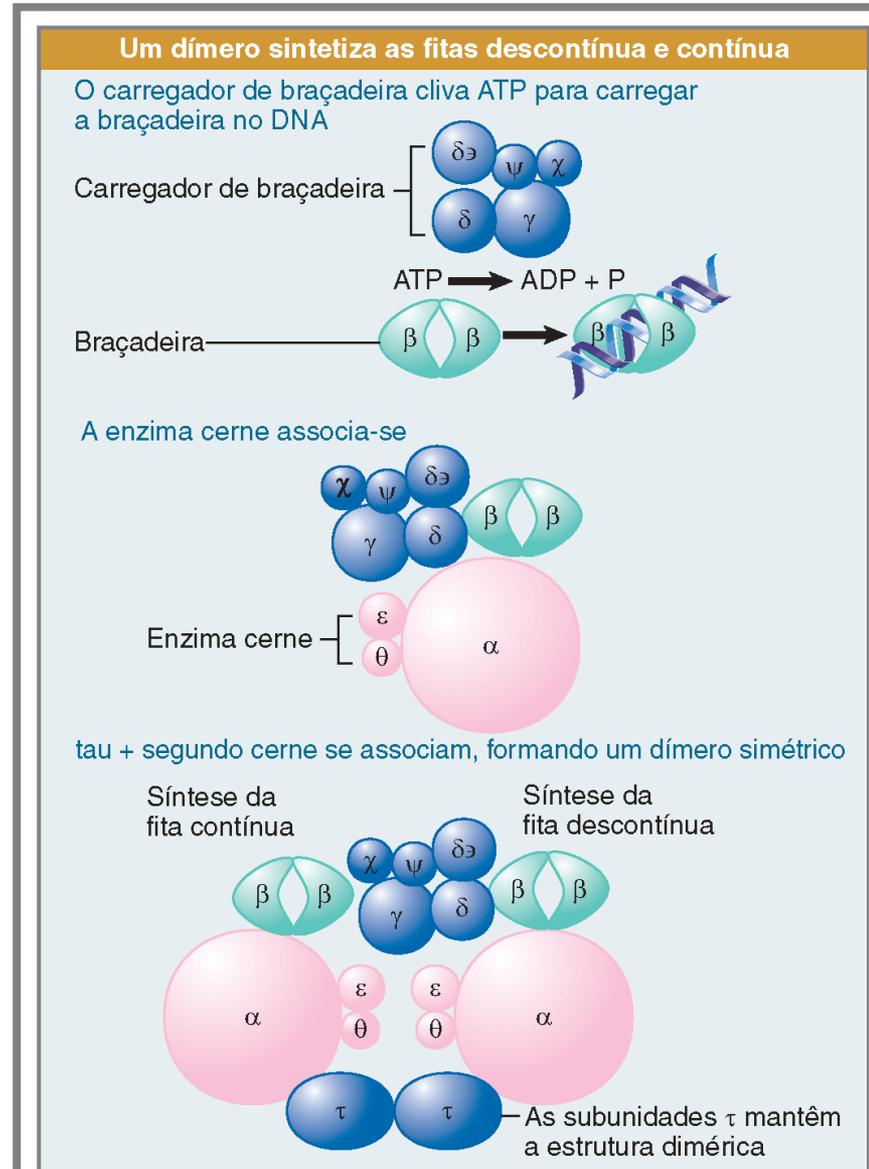


FIGURA 18.15 A holoenzima da DNA polimerase III é organizada em estágios, gerando um complexo enzimático que sintetiza o DNA de ambas as novas fitas.

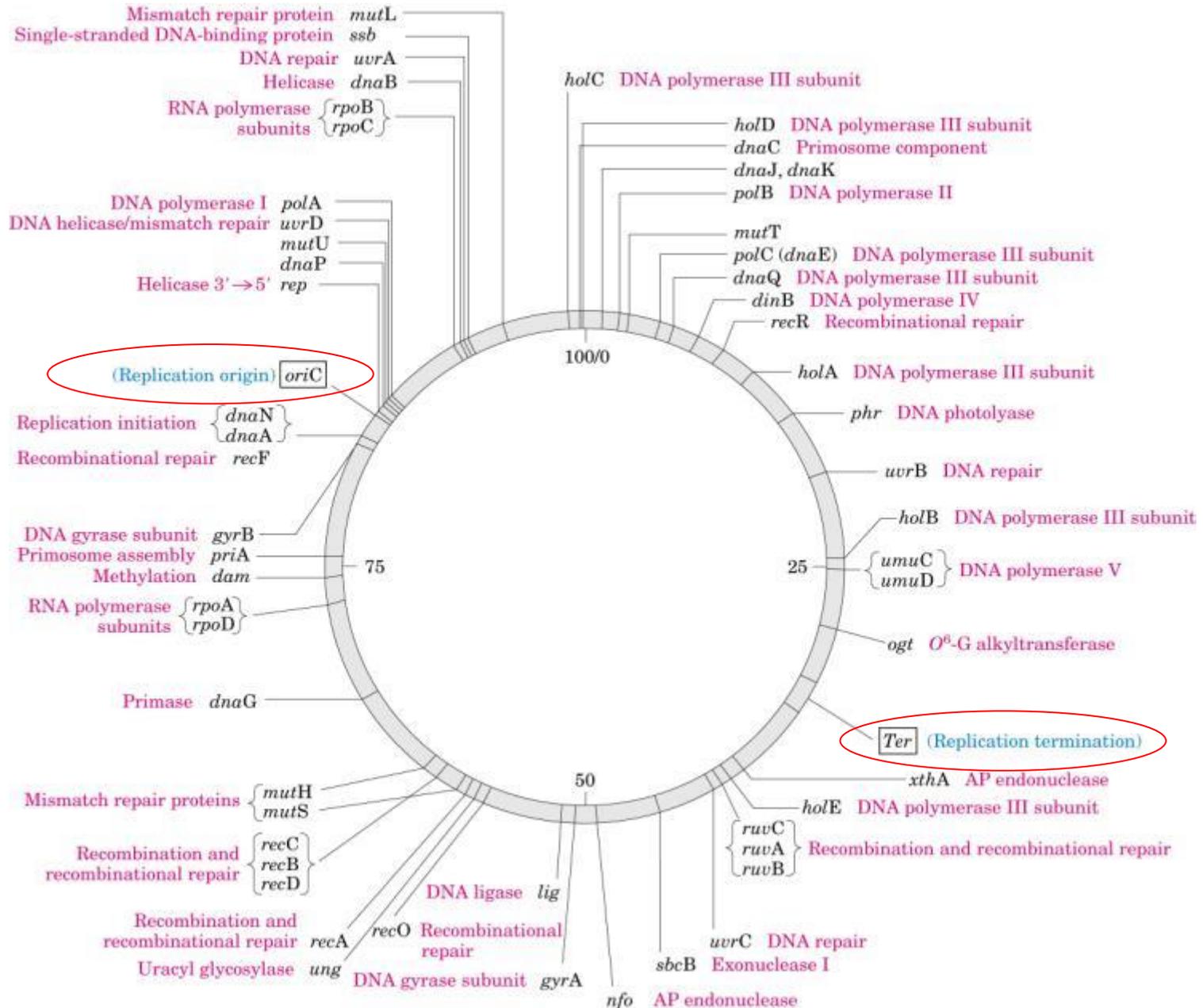
Síntese de DNA

- Conservado em todas as espécies;

3 etapas:

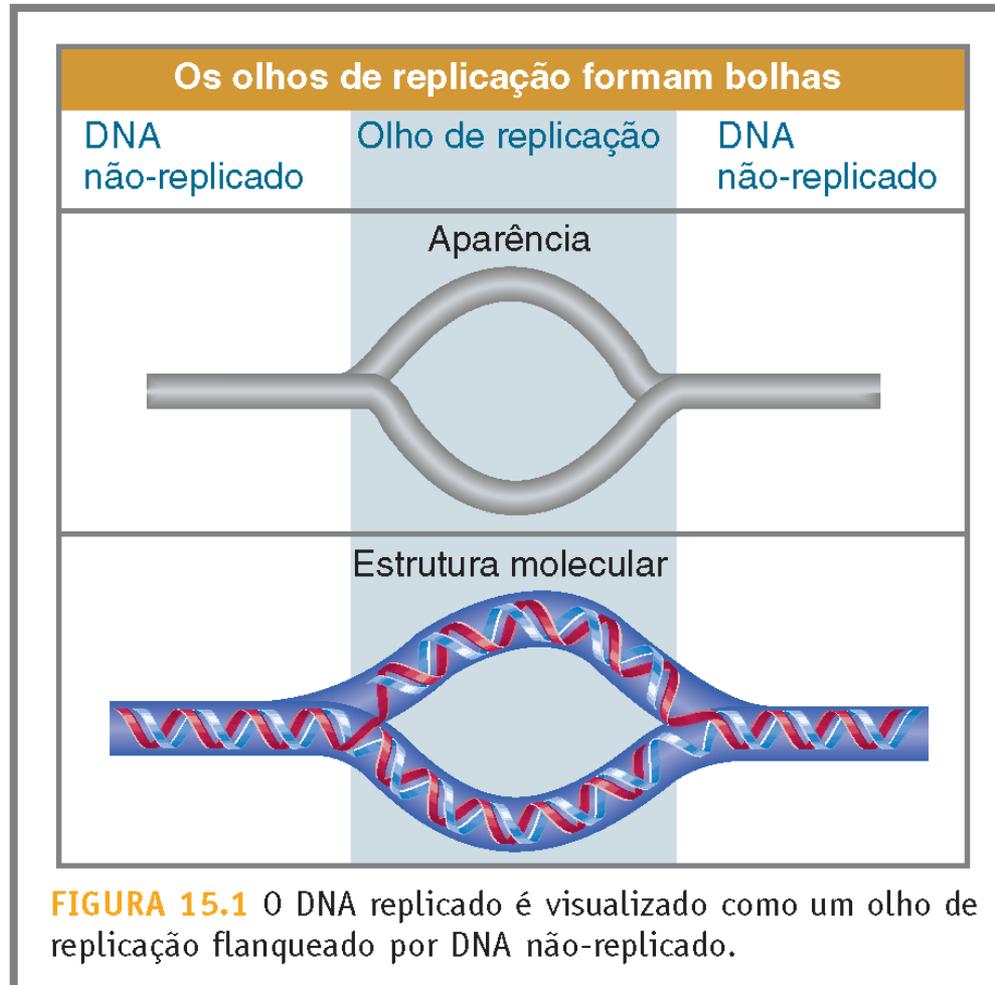
- Iniciação;
- Alongamento;
- Terminação.

Mapa do cromossomo de *E. coli*



Fase 1: Síntese de DNA

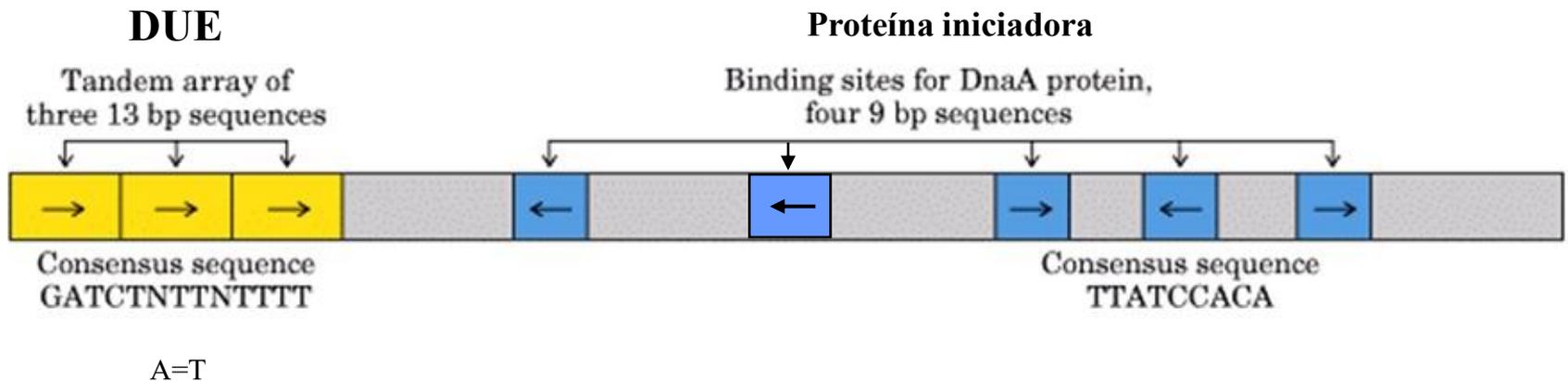
• Iniciação: A replicação se inicia na Origem



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>

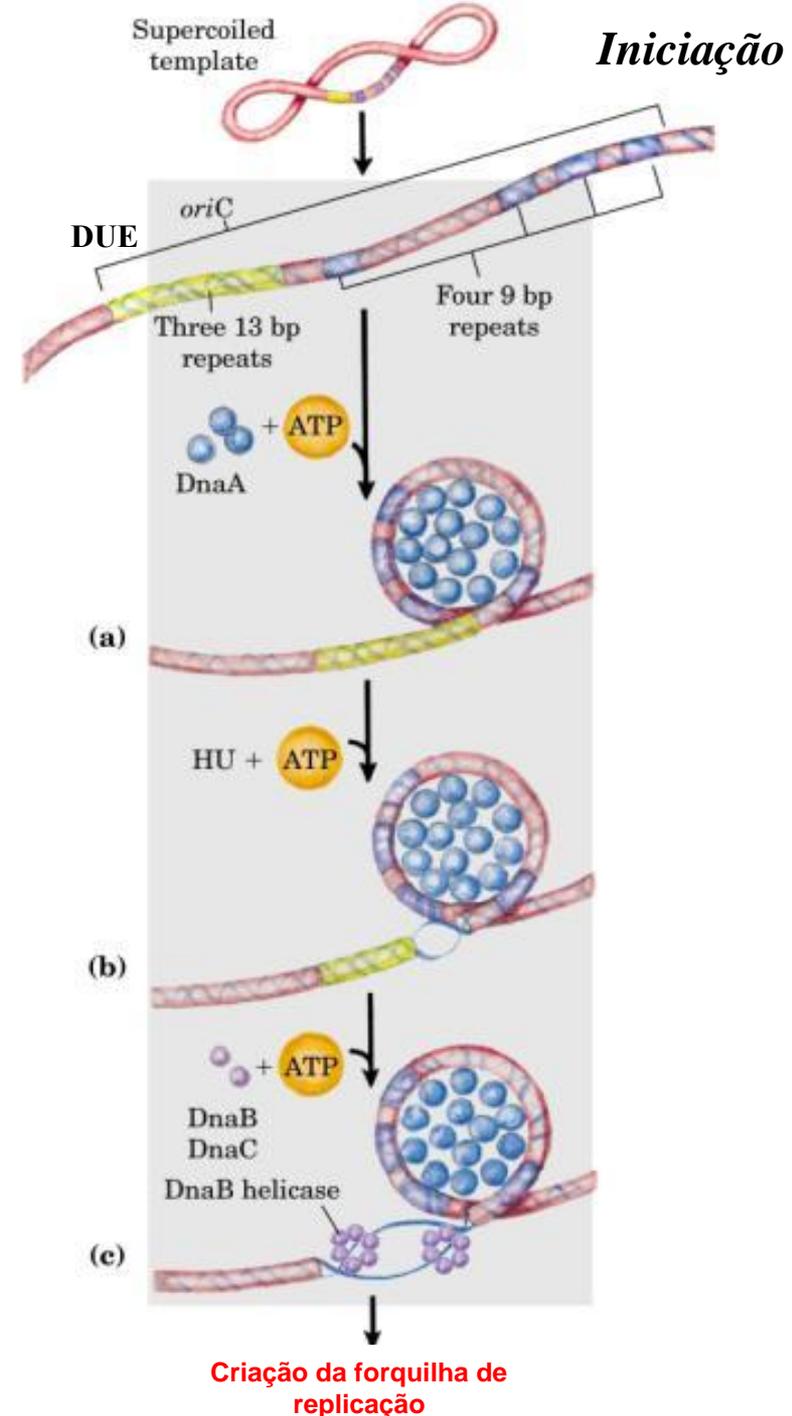
*As subunidades nesses casos são idênticas.

Síntese de DNA

• Iniciação: Proteínas necessárias

Proteína	Função
Proteína DnaA	Reconhece a sequência <i>ori</i> ; 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

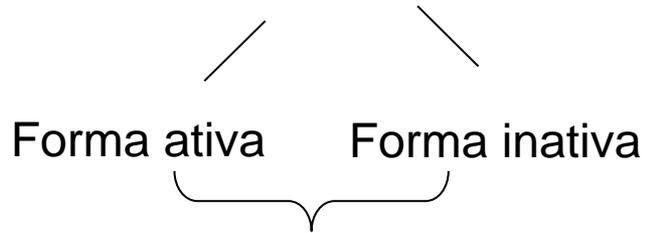
Regulação

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

Regulação da Replicação

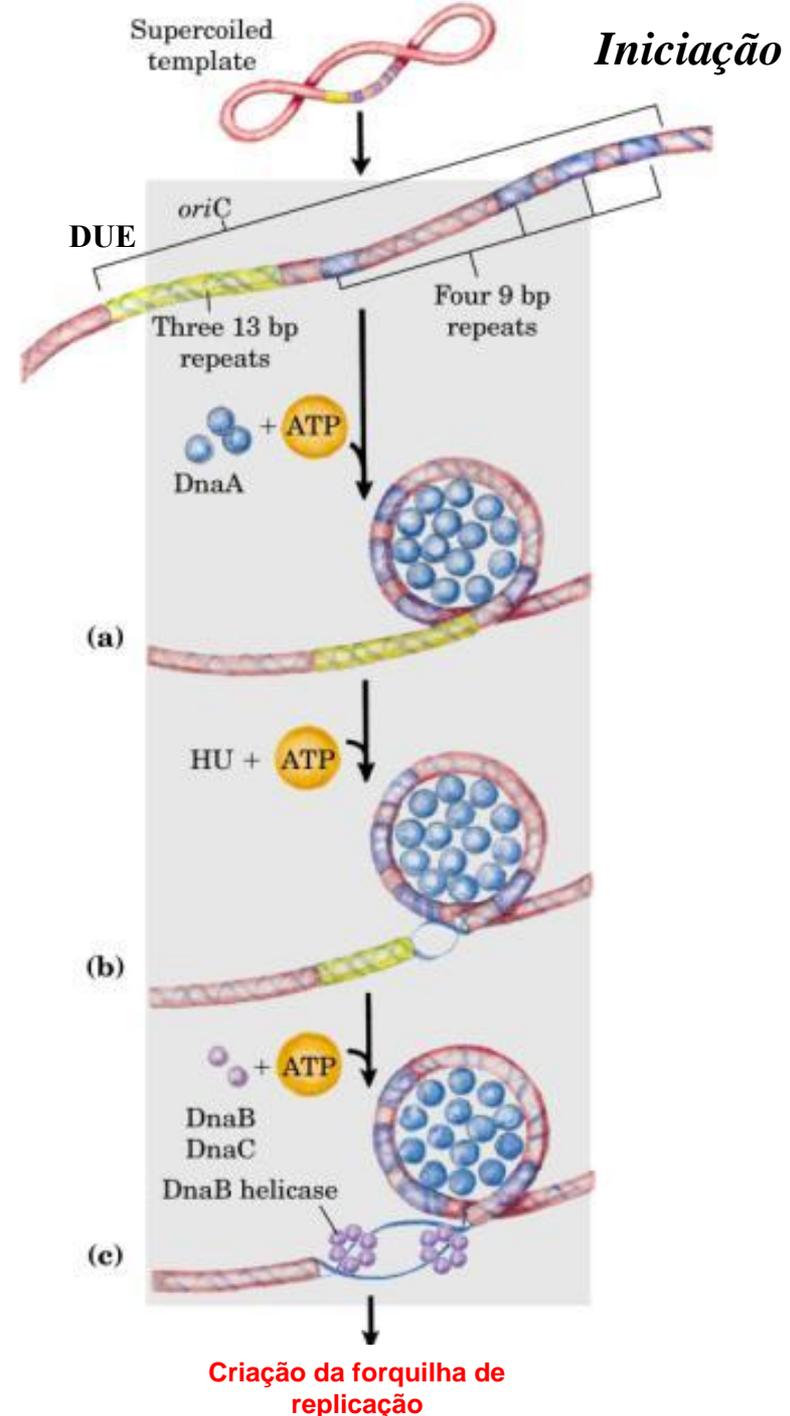
Hidrólise do ATP

- DnaA + ATPase – hidrólise ATP



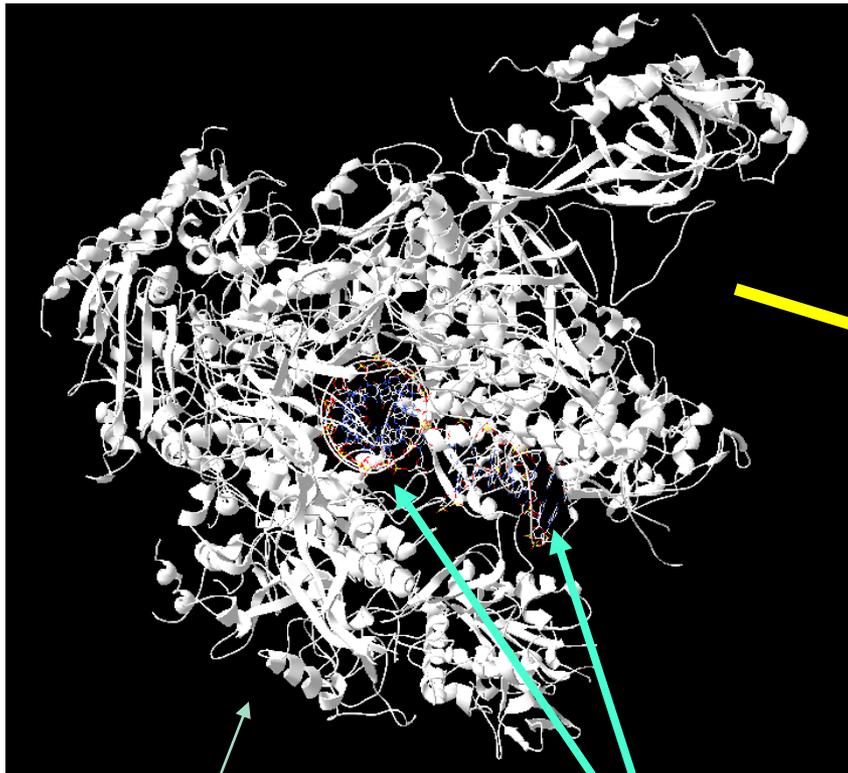
Regulação da replicação

HU e outras pt: falicitam o dobramento do DNA.



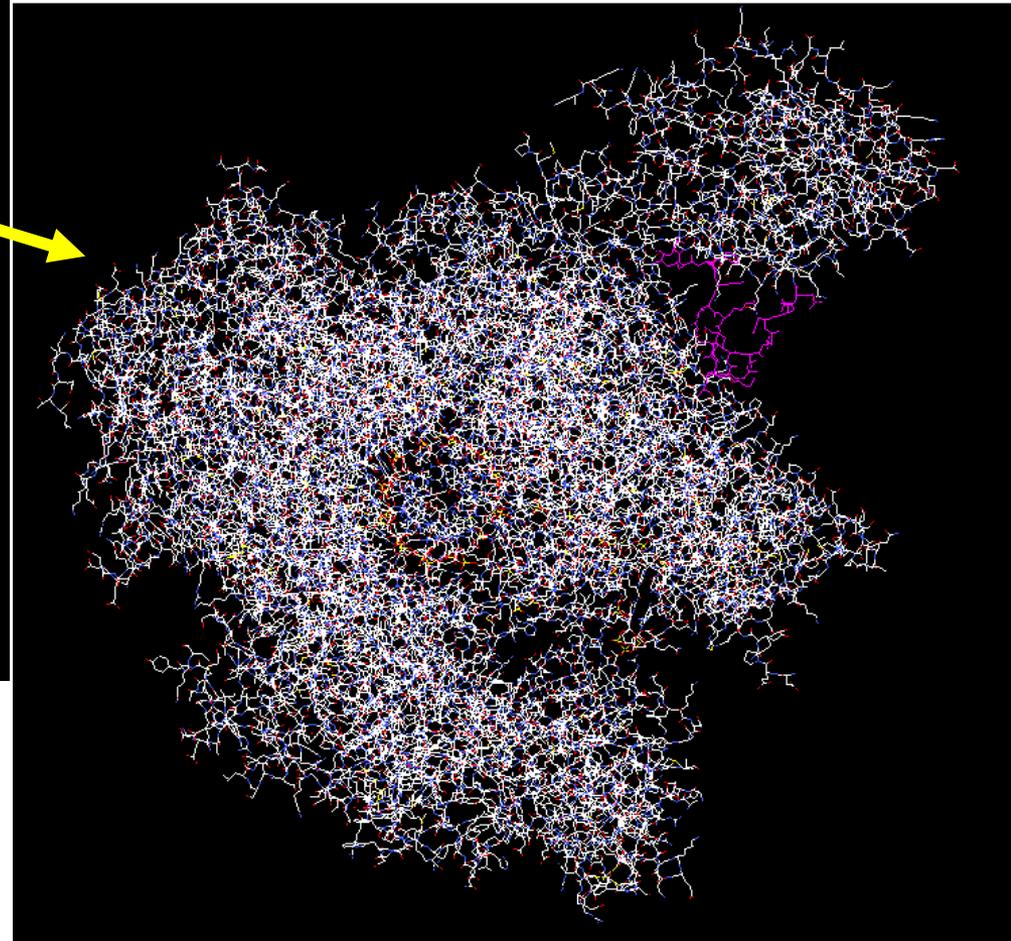
Ligação Proteína DNA

Estrutura RNA polimerase



Proteína
RNAPol

DNA



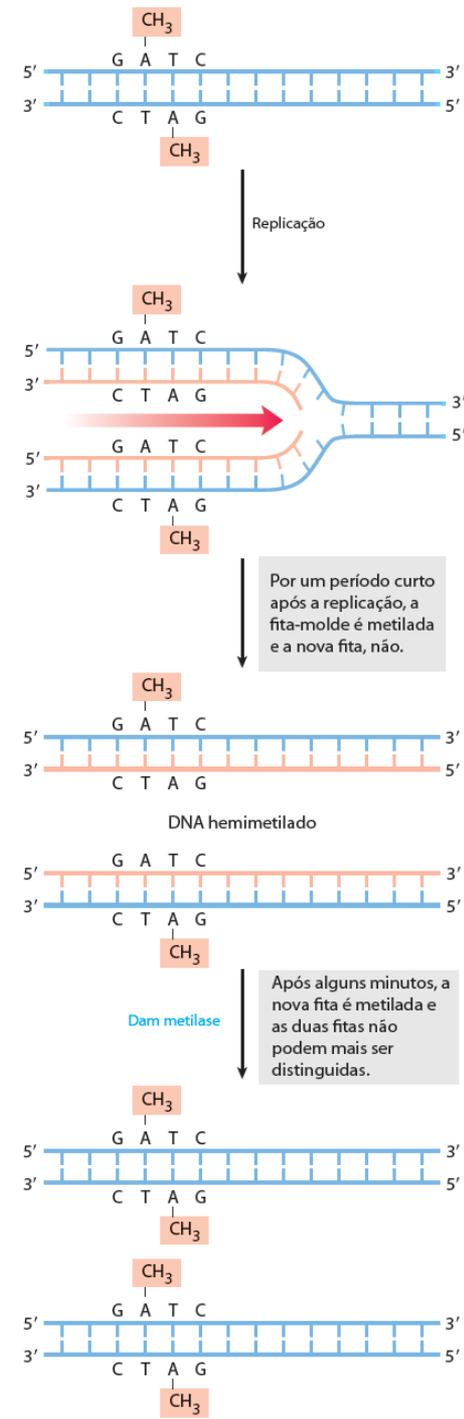
Regulação da Replicação

Metilação do DNA

Modificação covalente do DNA com um grupamento metil (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.

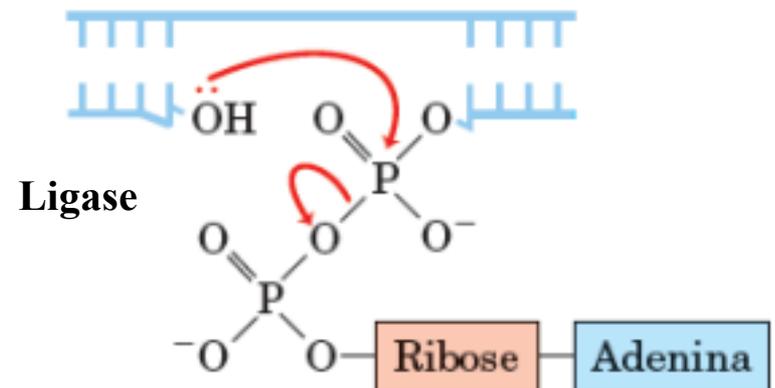
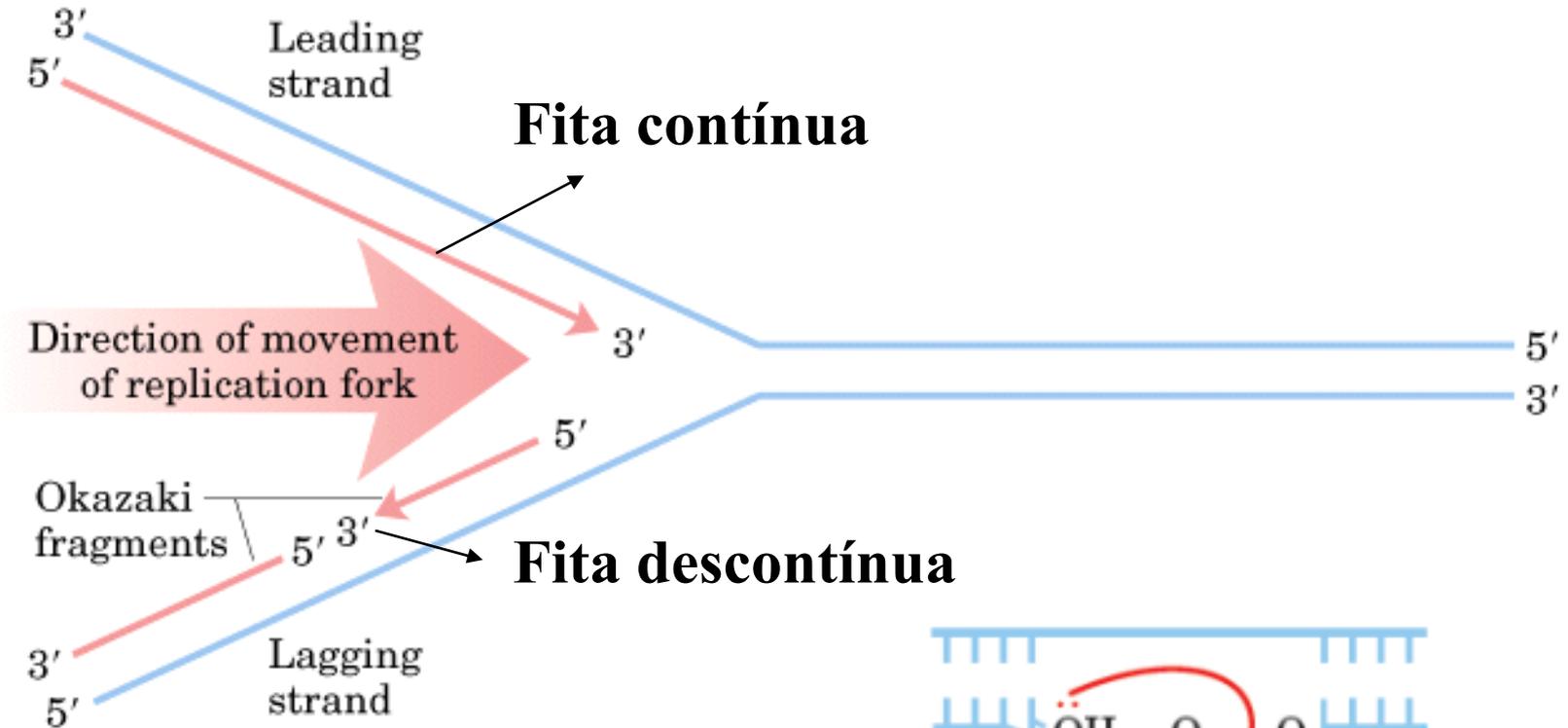
Fase 2: Alongamento

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)

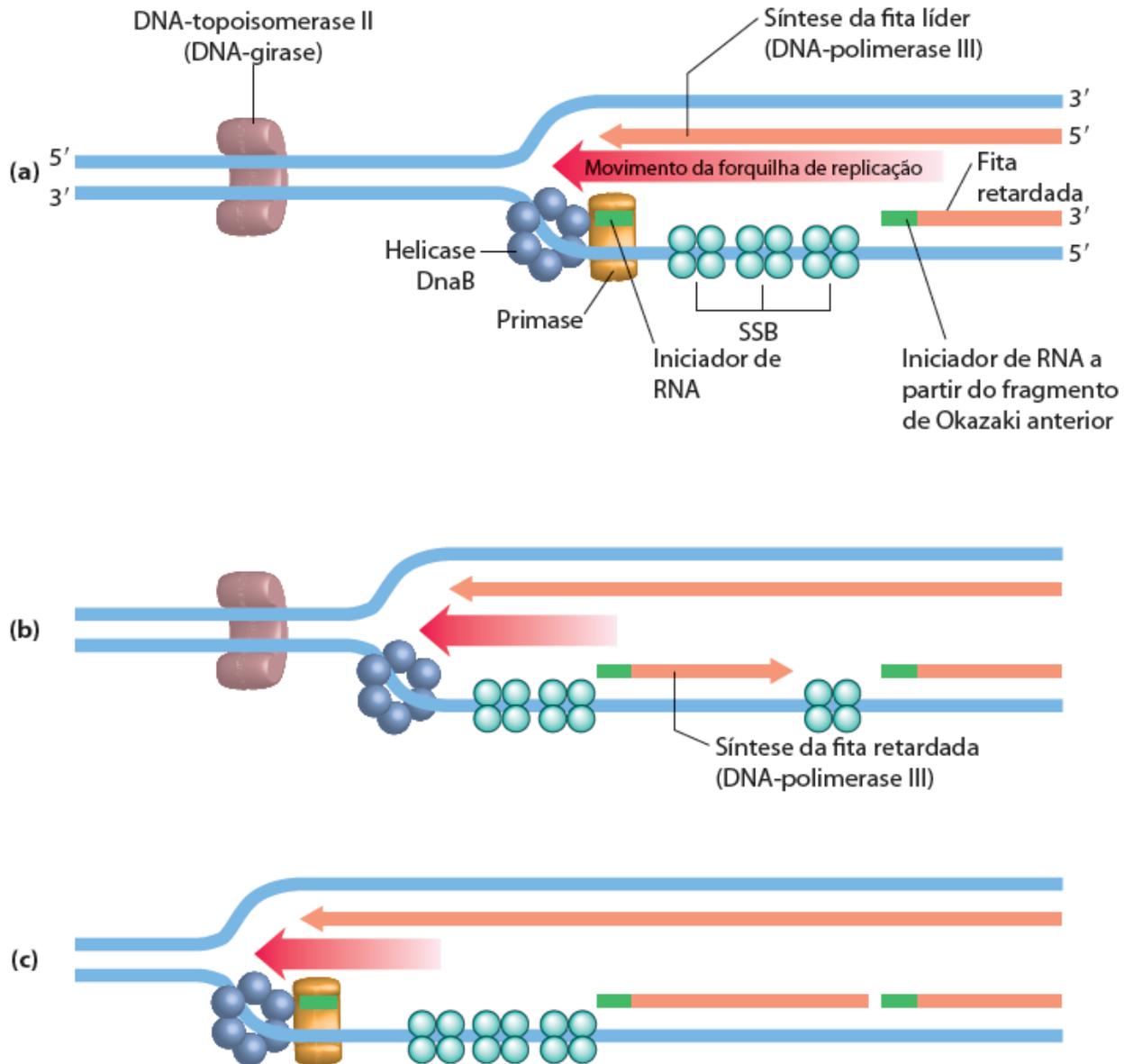
Fase 2: Alongamento

Síntese DNA: 5' → 3'

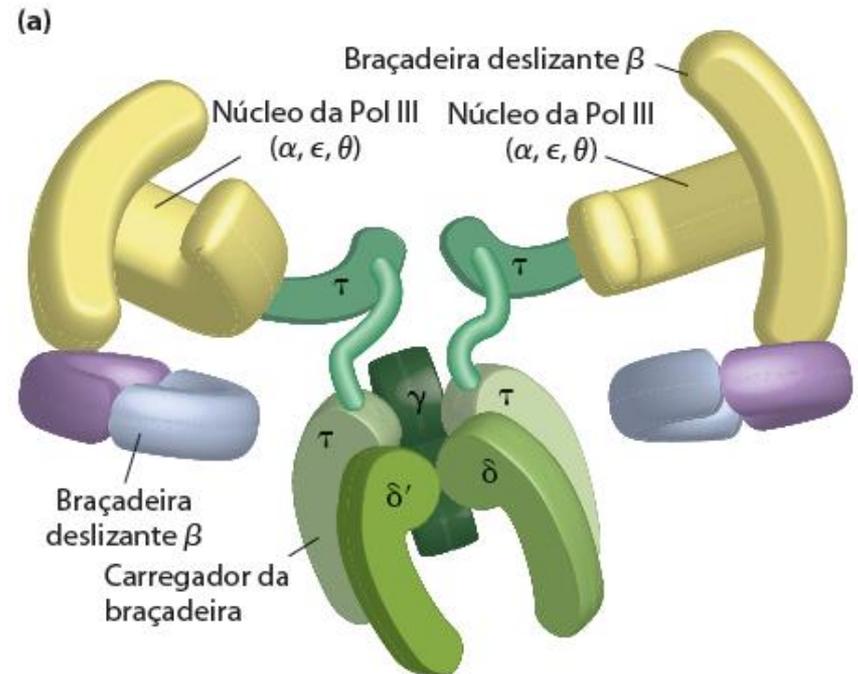
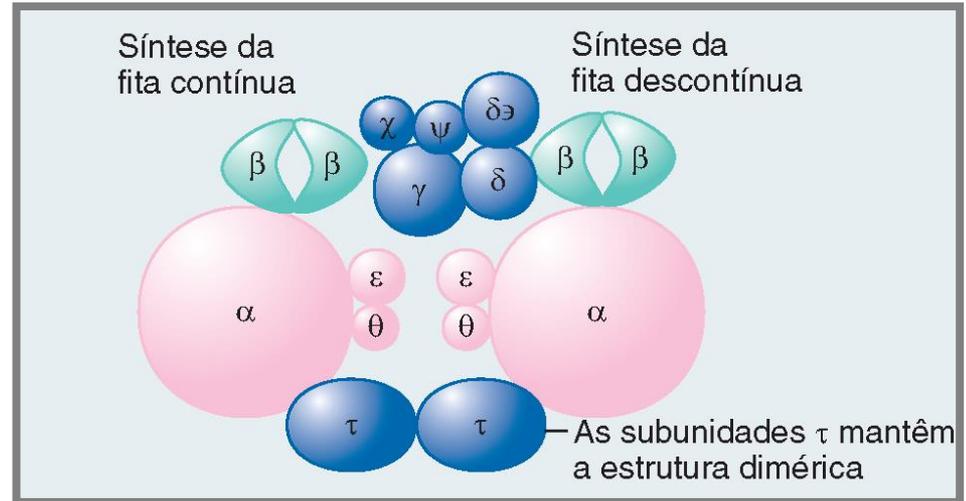
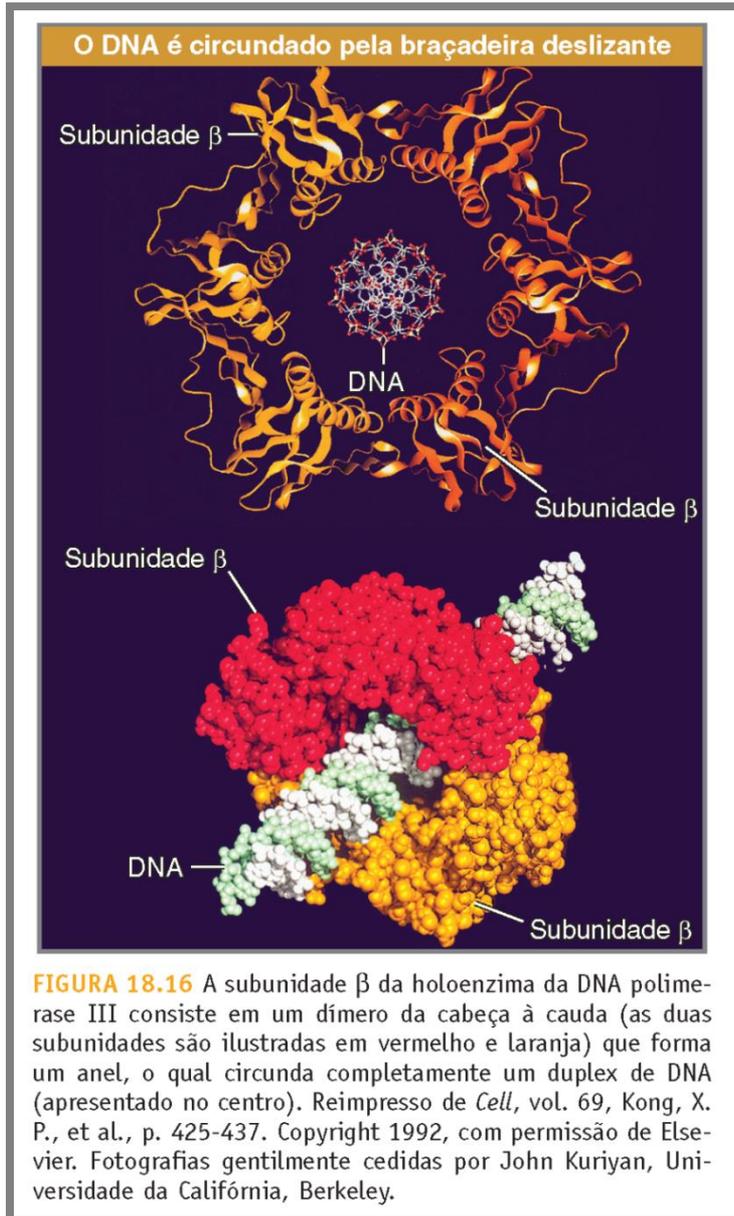


E. coli – 1000 a 2000 nt
Eucariotos - 150 a 200 nt

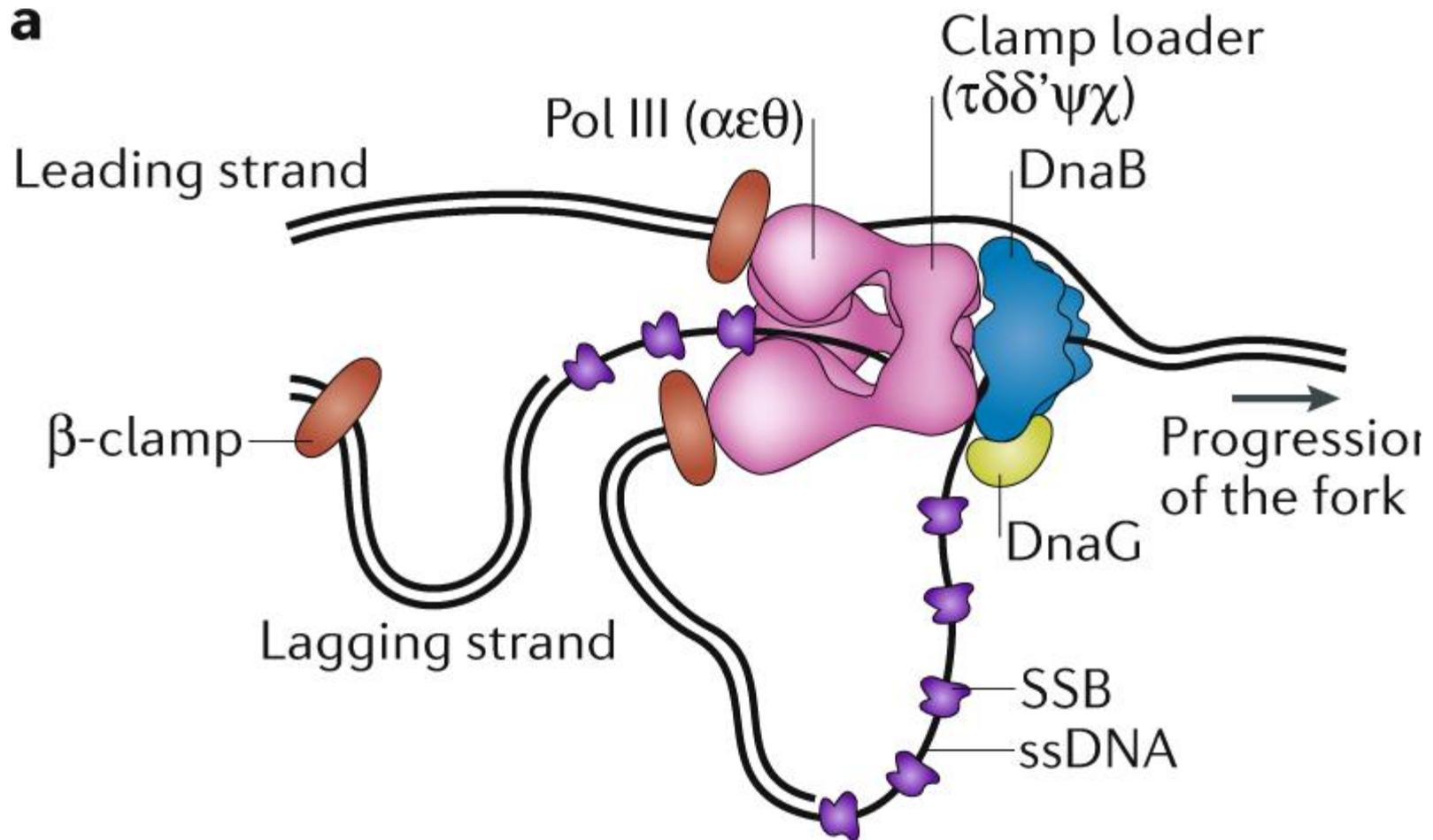
Fase 2: Alongamento



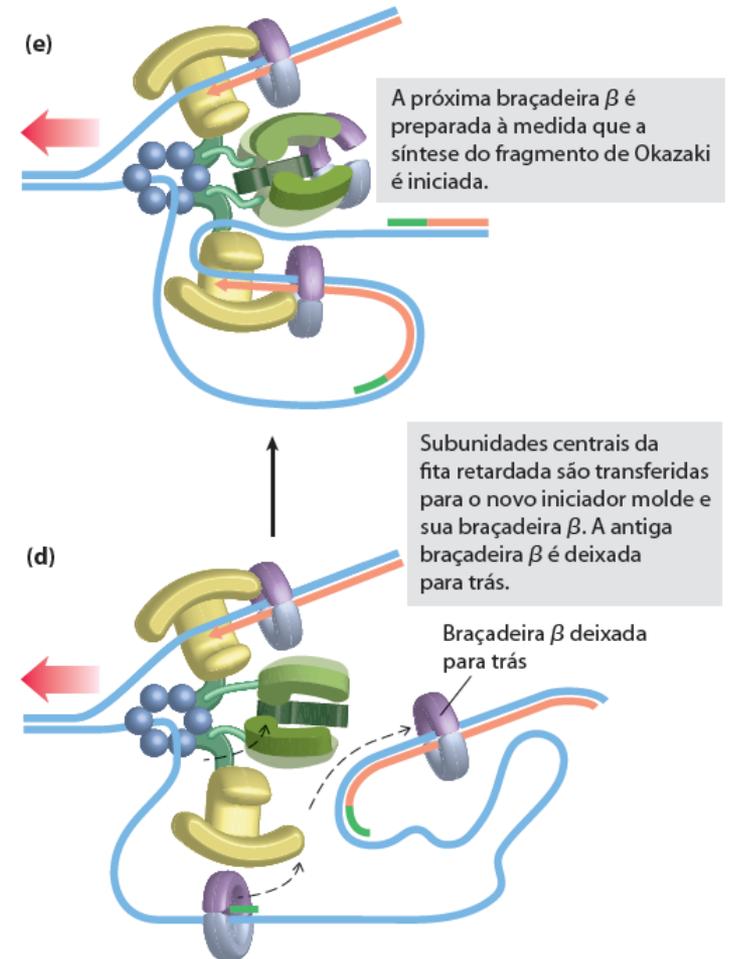
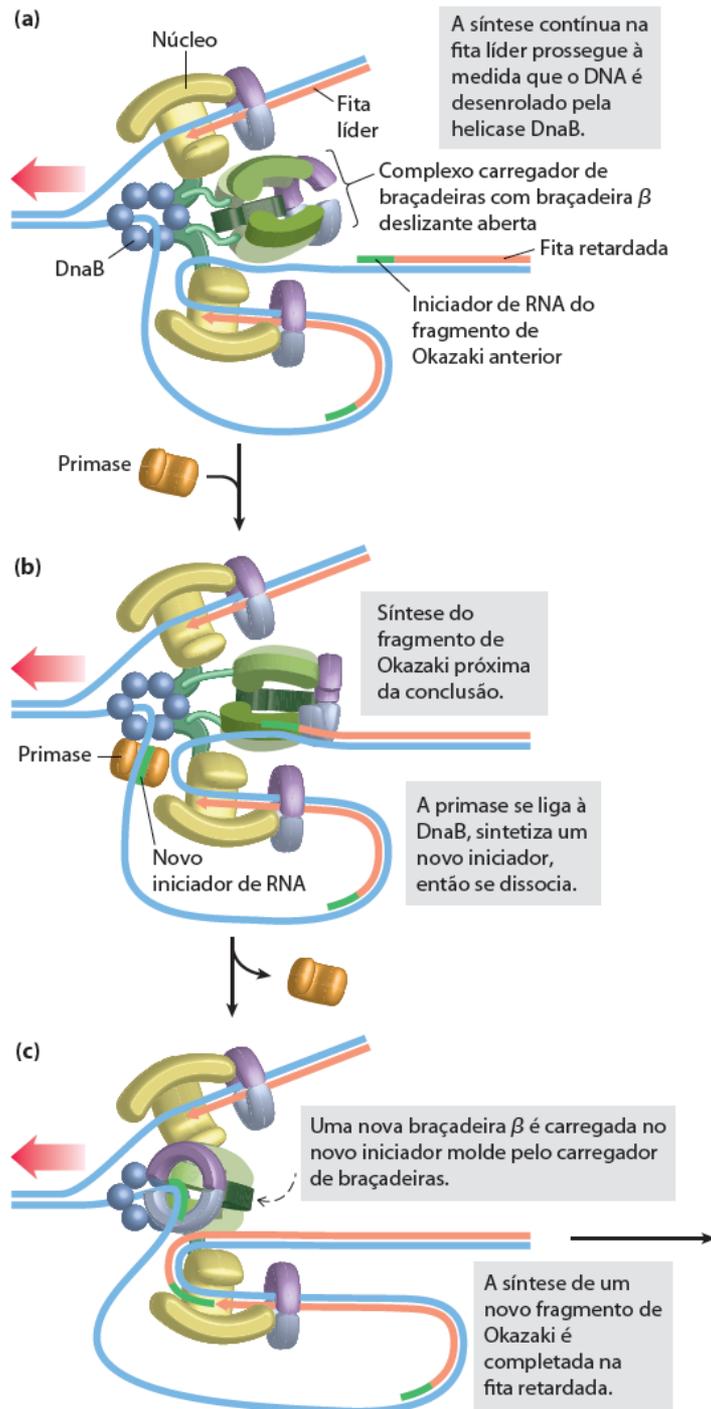
Fase 2: Alongamento - Replissomo



Alongamento

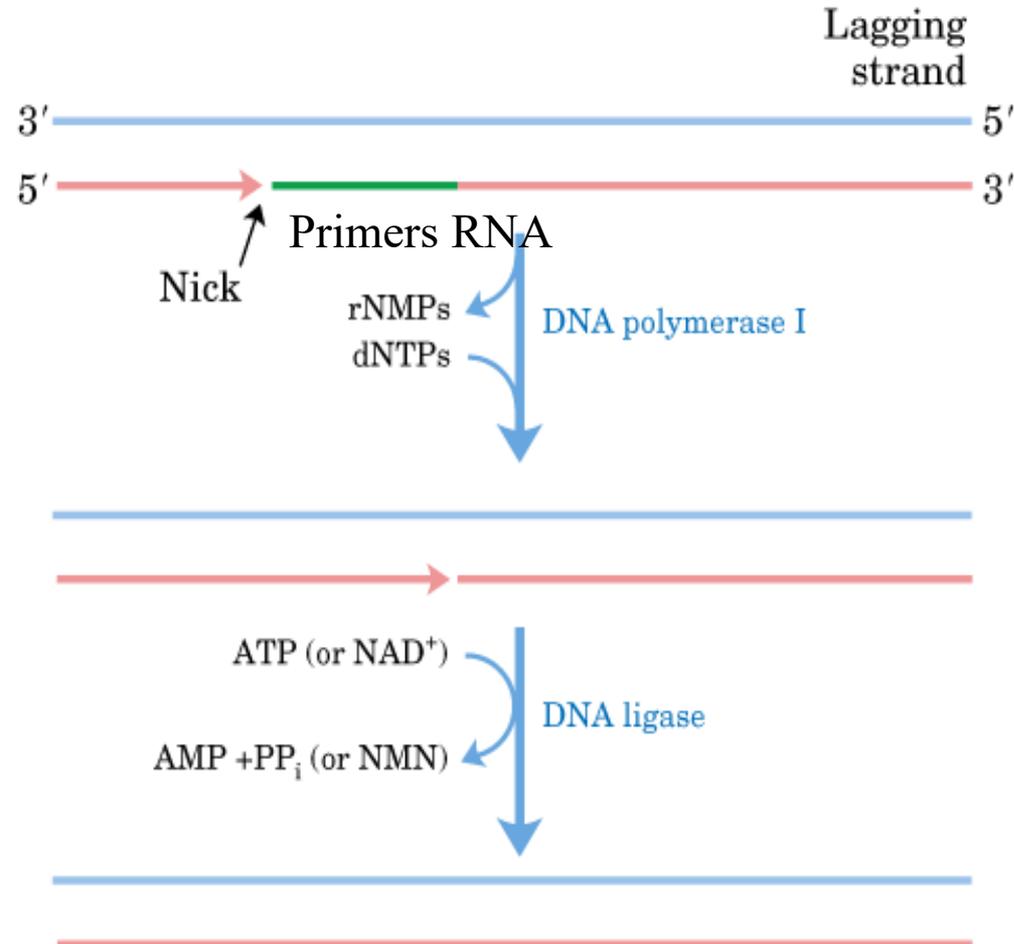


Alongamento



Etapas finais da síntese dos segmentos da fita descontínua

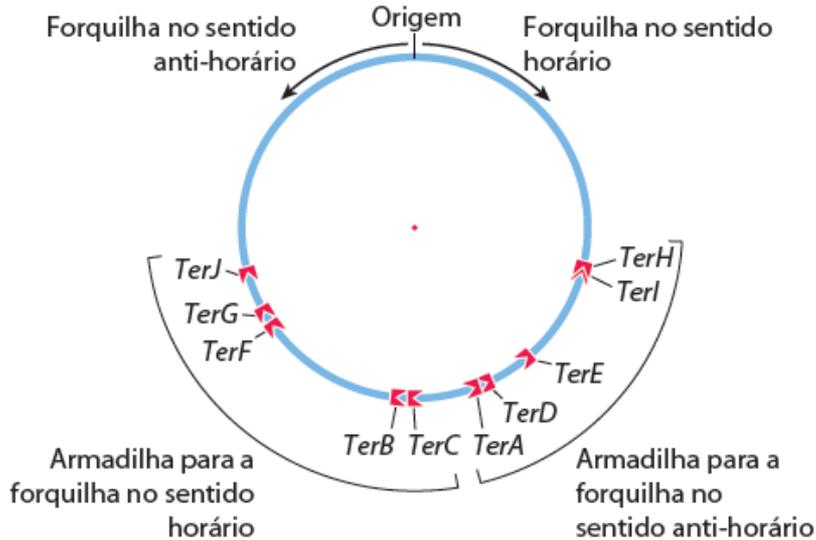
DNA-polimerase III	Novo alongamento da fita
DNA-polimerase I	Preenchimento dos intervalos; excisão dos iniciadores
DNA-ligase	Ligação



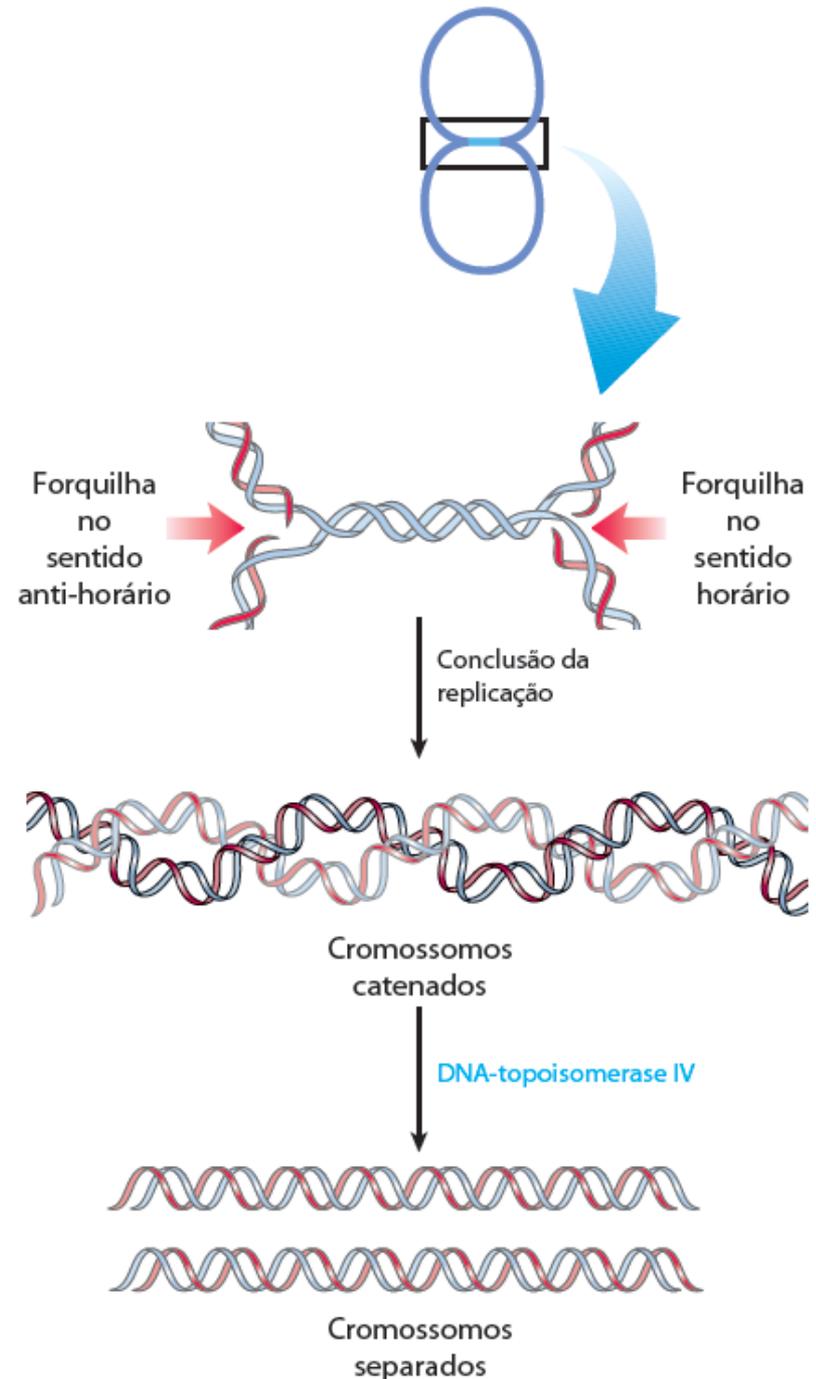
Remoção primers – DNAP I
-atividade 5'→ 3' exonucleásica

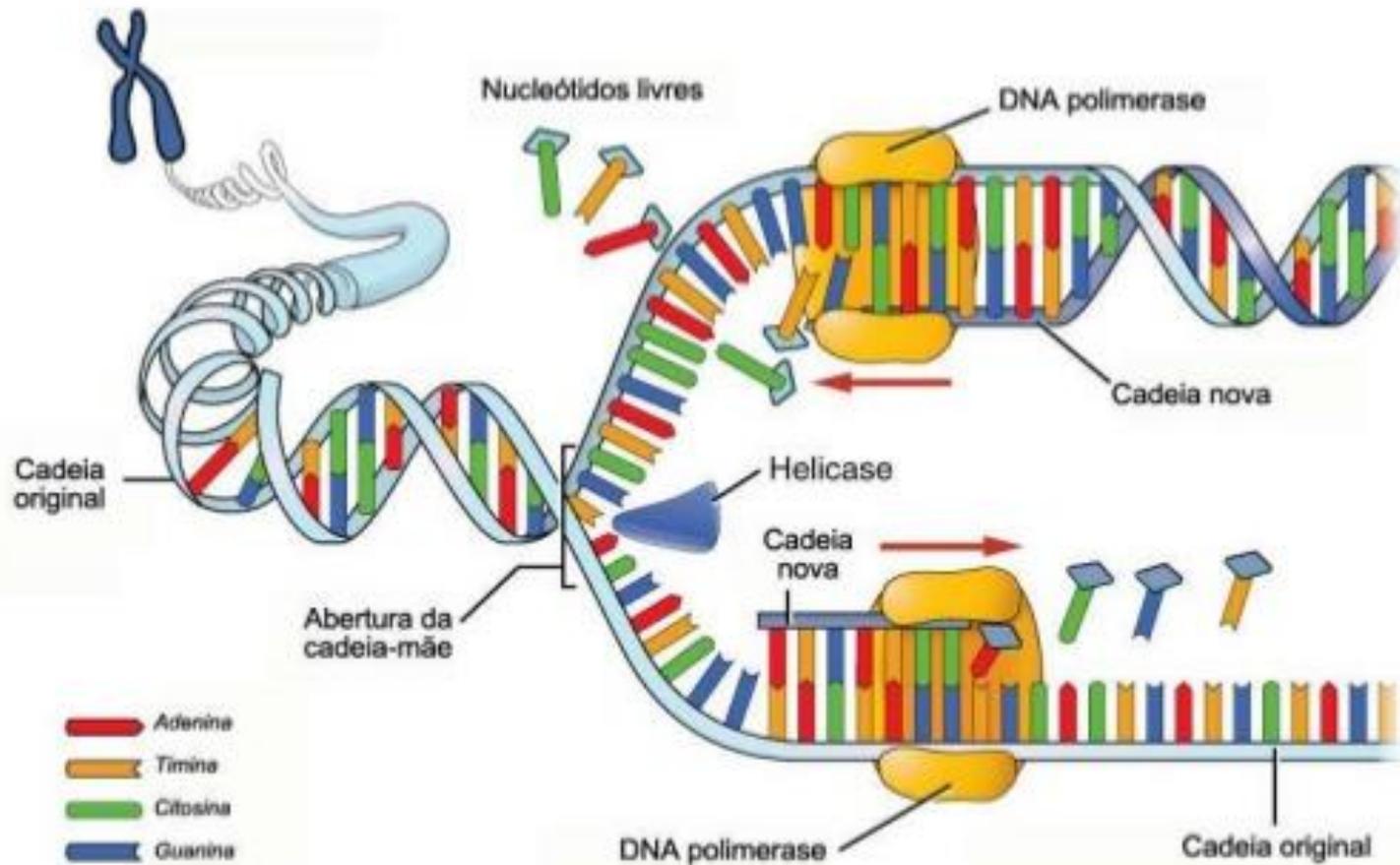
Fase 3: Terminação

Sequências de Terminação *Ter* (20pb)



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





V1

V2