

# Replicação de DNA

**QBQ 102 2017s1**

*Prof. João Carlos Setubal*



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

# Uma lei da natureza

- Os seres vivos **não são imortais**
- A vida tem um final, que chamamos de **morte**
- Então, para que “*a vida continue*”, seres vivos tem que se **reproduzir**

# Vida significa basicamente duas coisas

1. Uma entidade que “vive”

Está por aí fazendo alguma coisa,  
e não é inerte como uma pedra

2. Uma entidade que se reproduz

É capaz de, sozinha ou com parceiros, produzir  
cópias de si mesma

# Problema resolvido pela mãe natureza

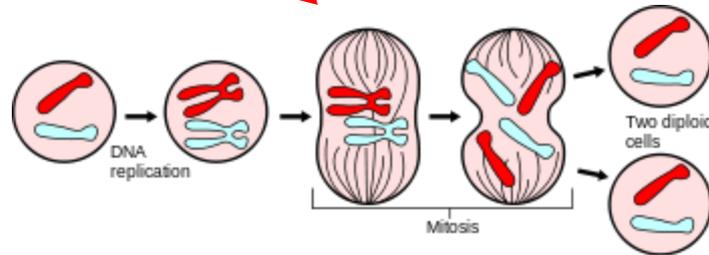
- Dotou os seres vivos de uma **substância** que permite que eles
  - Vivam
  - Se reproduzam
- **A mesma** substância desempenha **os dois papéis!**
- Que substância é essa?
- DNA

# Como DNA permite...

- A atividade da vida?
- A reprodução da vida?
- Hoje vamos ver a parte da **reprodução**

# Reprodução pode ser estudada em 3 níveis

- Macroscópico →
- Celular
- Molecular



Replicação do DNA

Como o DNA consegue se  
**reproduzir?**

Graças à **duplicidade** da hélice e à  
**complementaridade** das bases

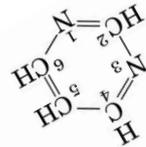
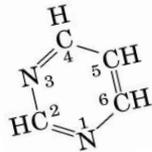
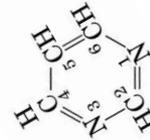
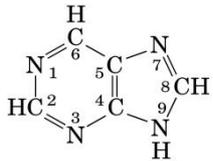
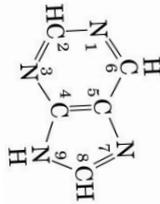
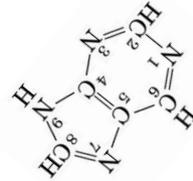
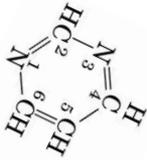
Dada uma fita, consigo saber a  
outra

# Replicação de DNA

- Informacionalmente é **simples!**
  - De **uma** molécula resultam **duas**
- Mas mecanicamente (ou molecularmente) é um processo **complicado**
  - Há diversas enzimas participantes

Filme

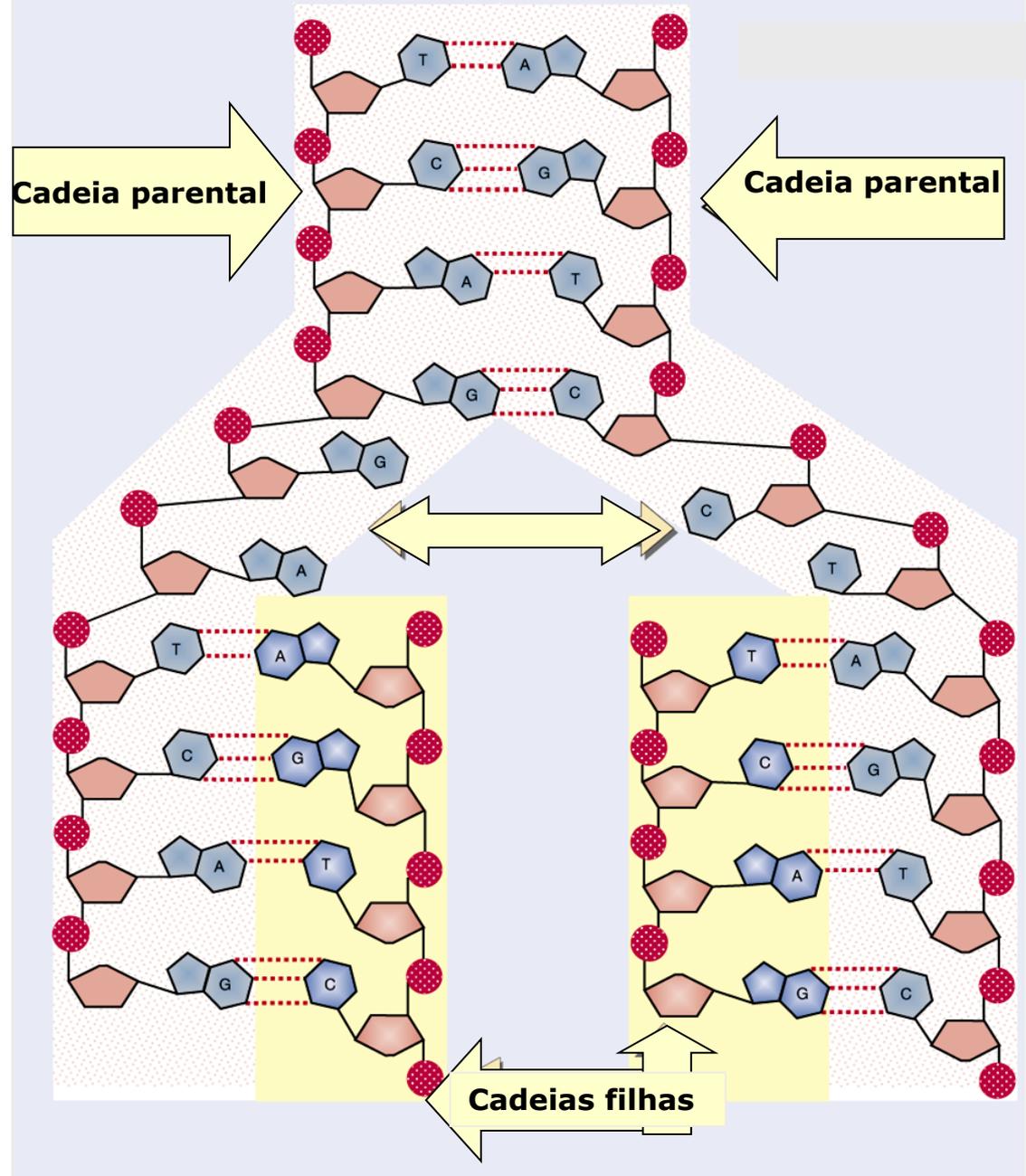
# Suprimento “infinito” de nucleotídeos dentro da célula



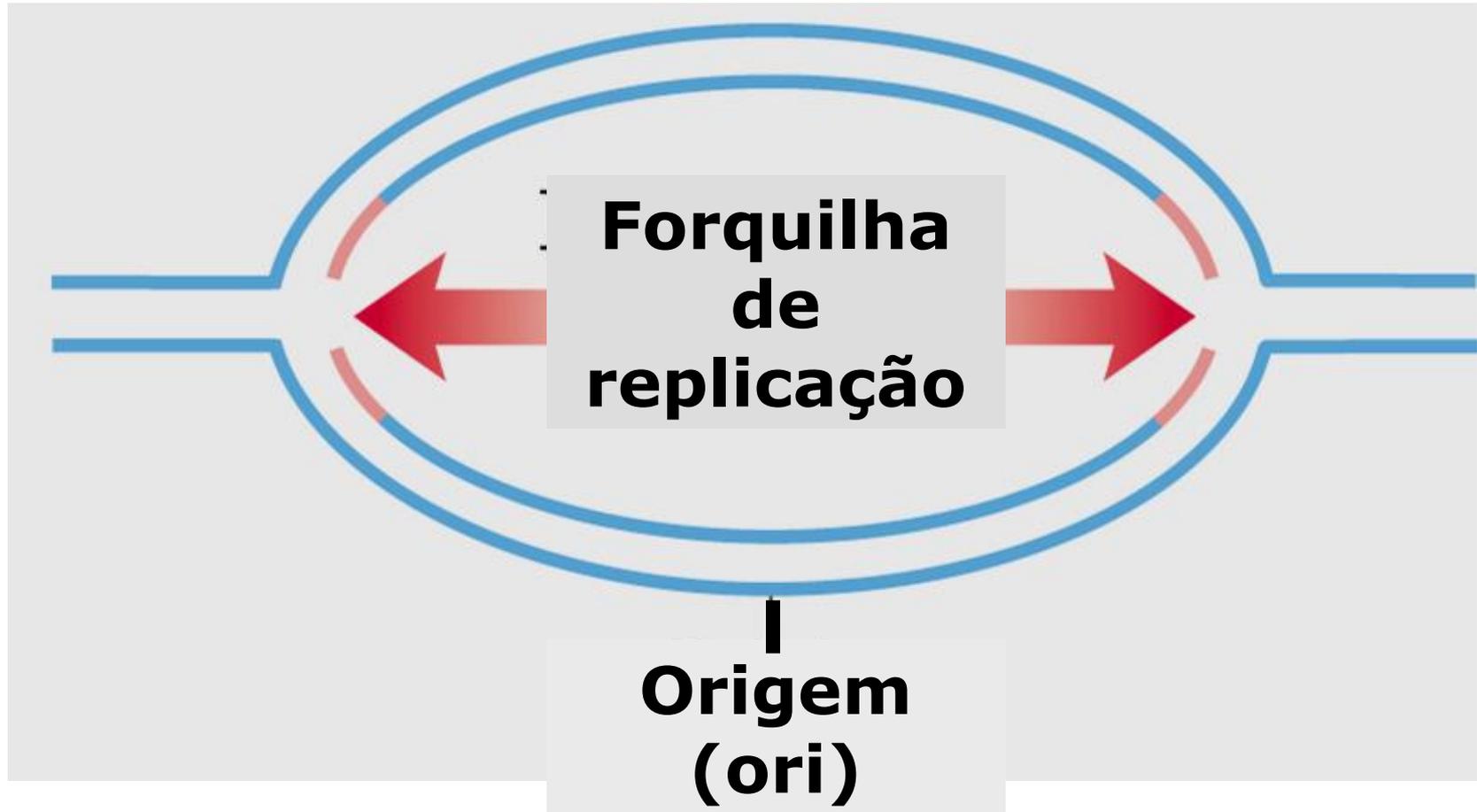
# Replicação do DNA

O mecanismo de replicação está baseado no pareamento das bases da dupla hélice do DNA.

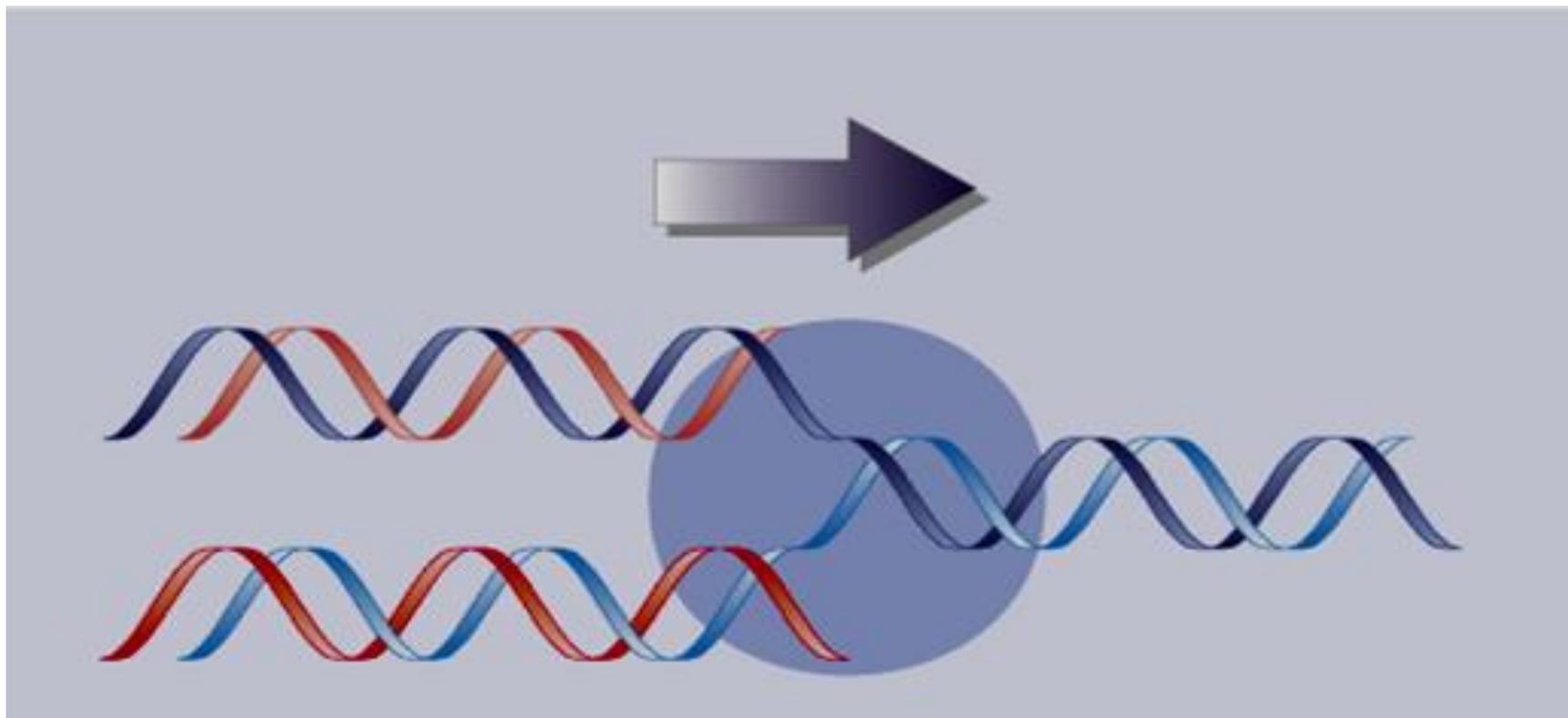
A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases



# A replicação é bidirecional



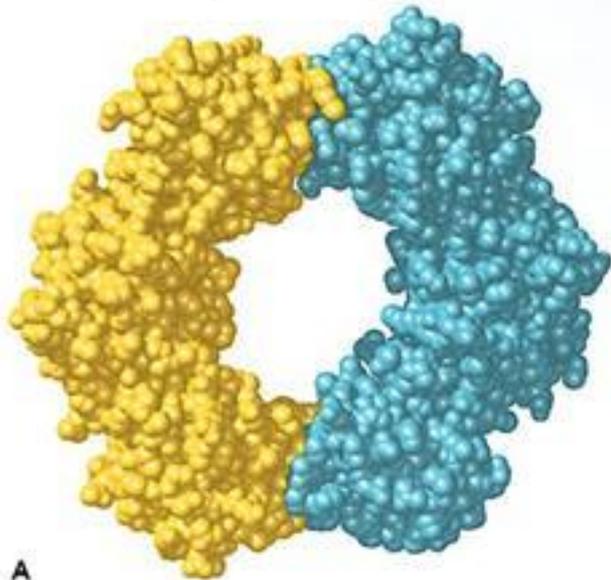
**Forquilha de replicação: Região do DNA onde ocorre a transição do DNA parental fita dupla para as novas fitas duplas filhas**



Quem é o agente principal?

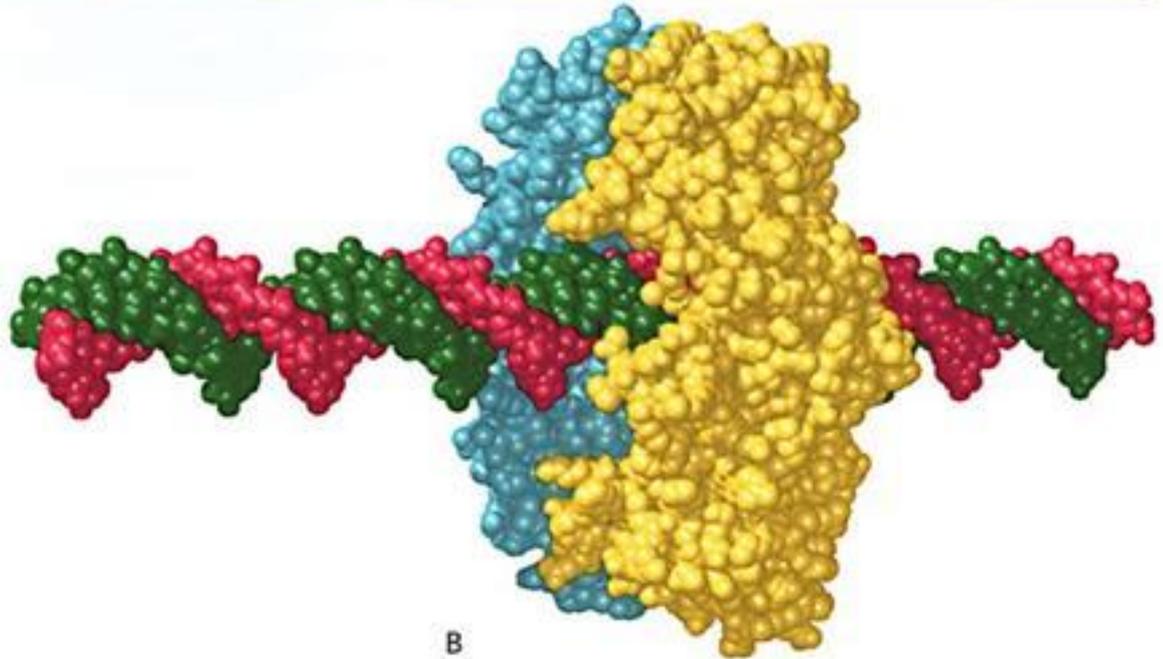
DNA polimerase III

# Pol III $\beta_2$ - dimers



A

50 Å



B

# Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

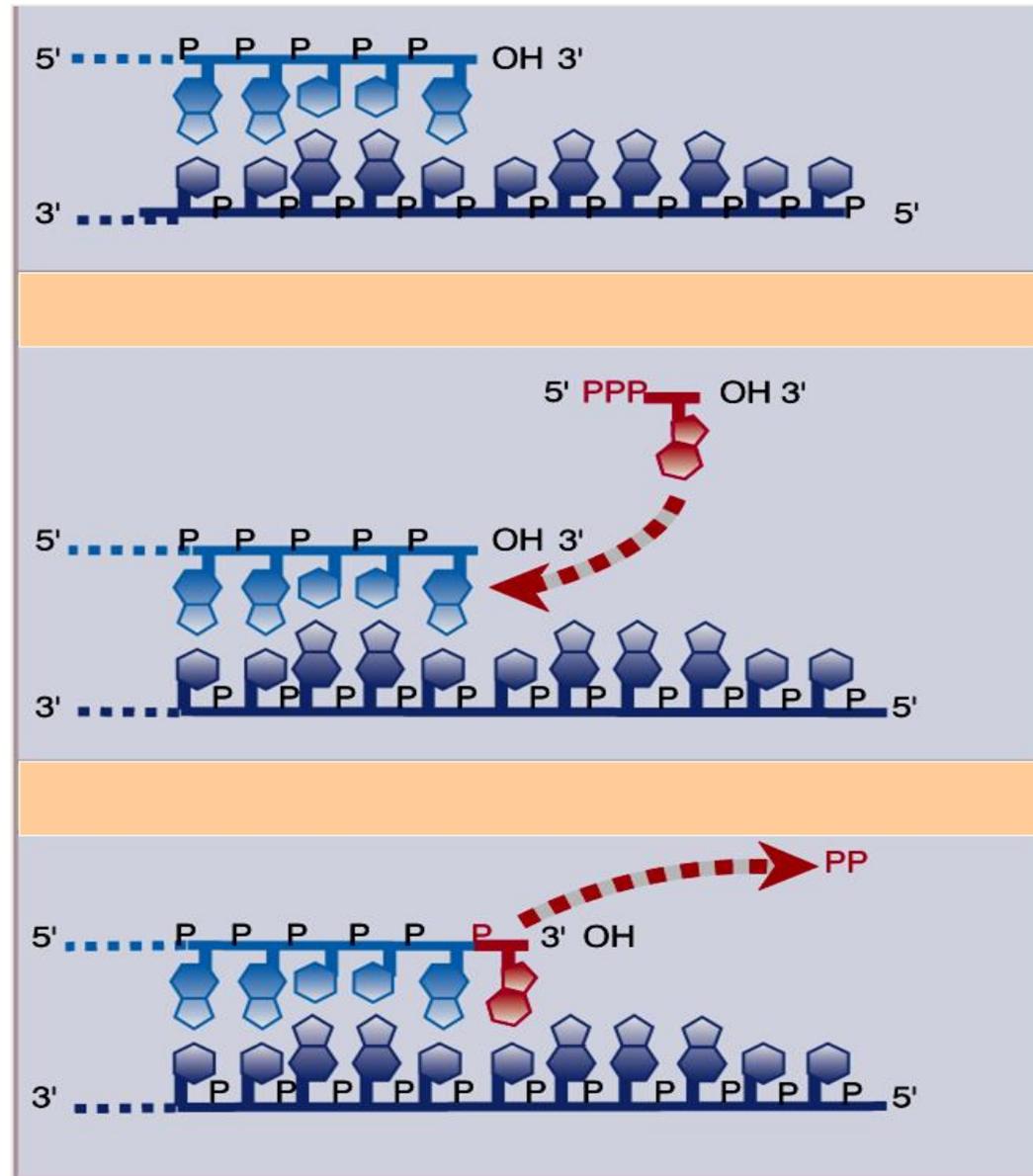
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

- A DNA polimerase requer um *primer* (iniciador) e um molde

- O precursor da síntese é desoxirribonucleosídeo 5' trifosfato

- Sentido da síntese sempre é 5' → 3'

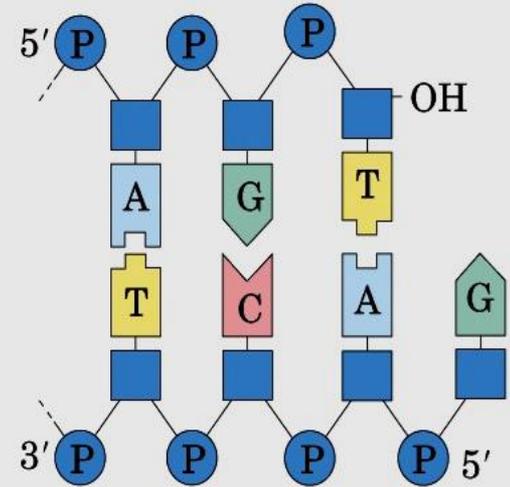
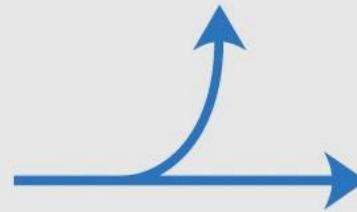
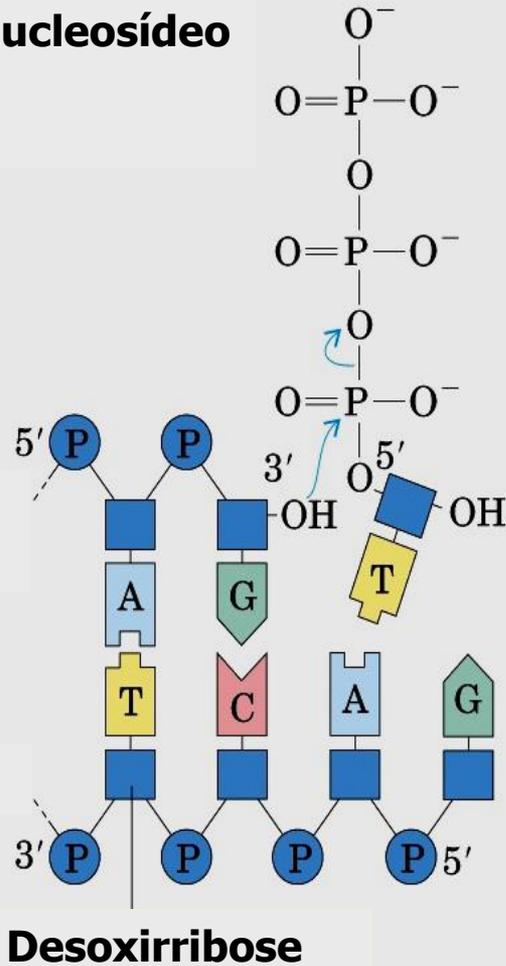
- A replicação é um processo extremamente fiel. As DNA-polimerases tem atividade revisora



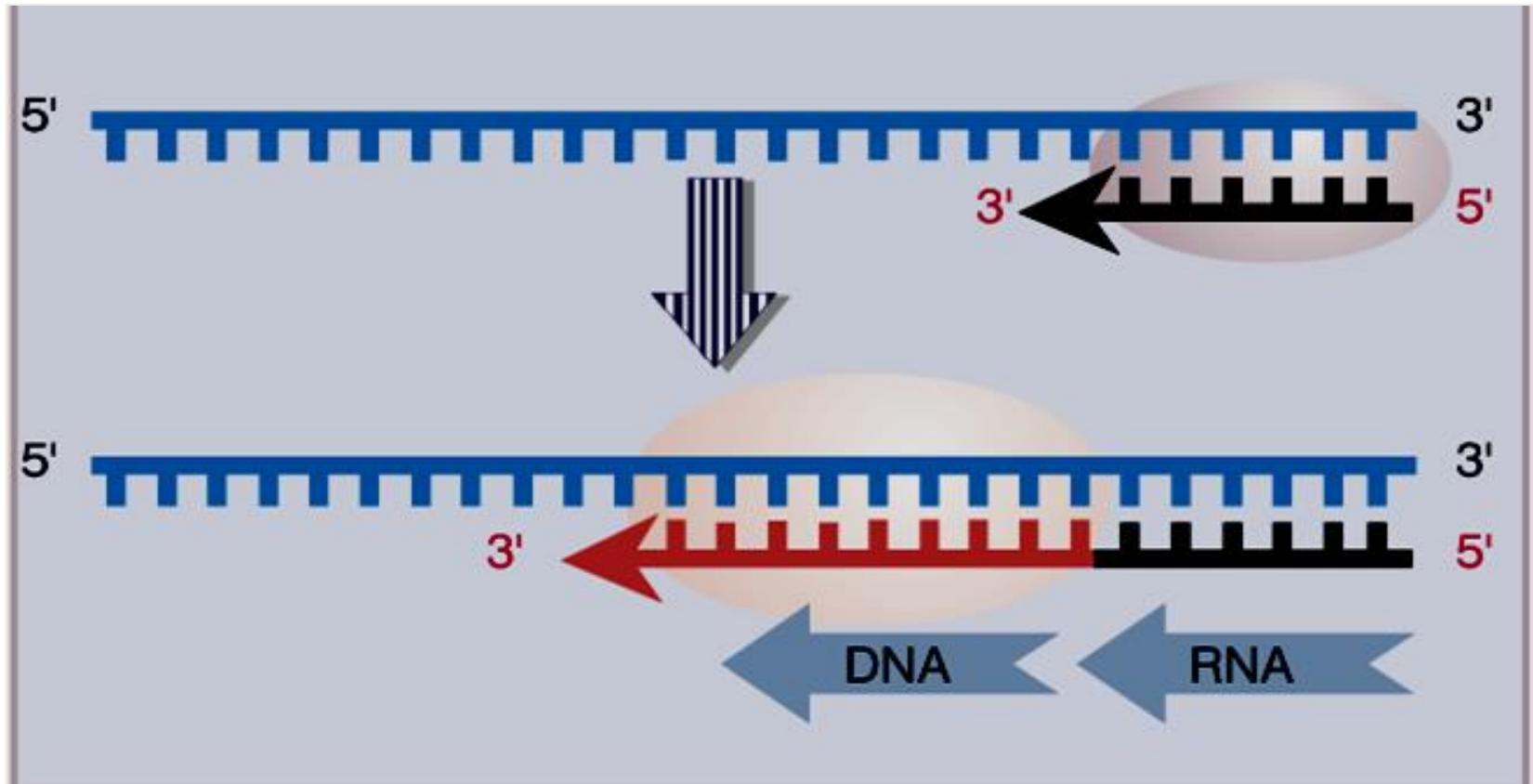
**Desoxiribonucleosídeo  
5' trifosfato  
(precursor)**

**Fita sendo  
polimerizada**

**Fita molde**

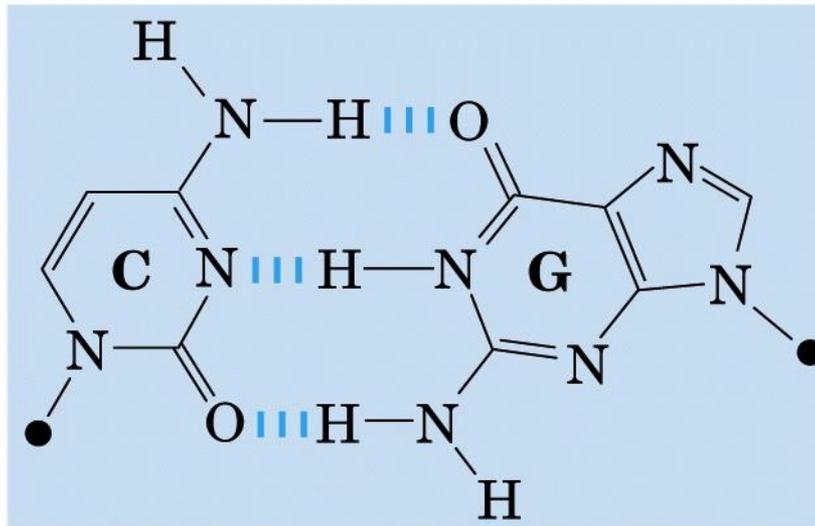
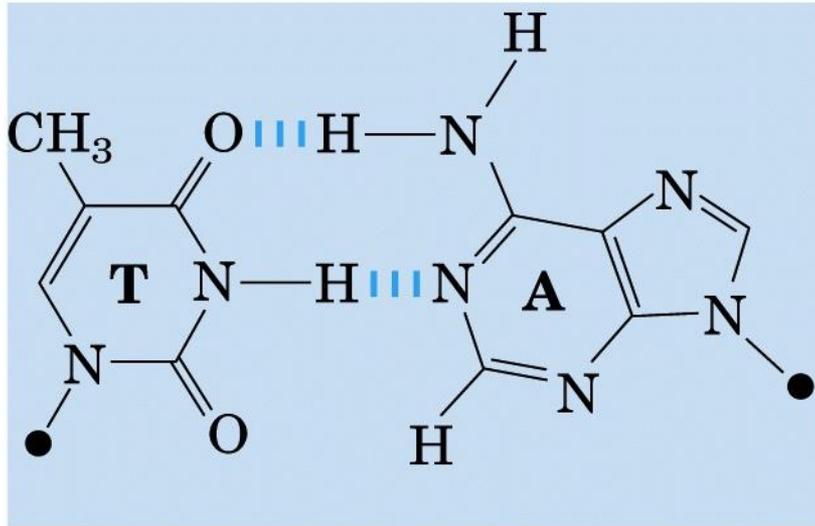


As DNA-polimerases sempre requerem um iniciador ou *primer* (segmento de DNA ou RNA) previamente pareado ao molde que será copiado

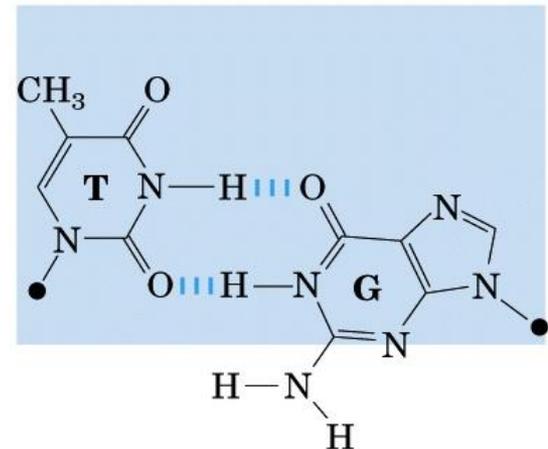
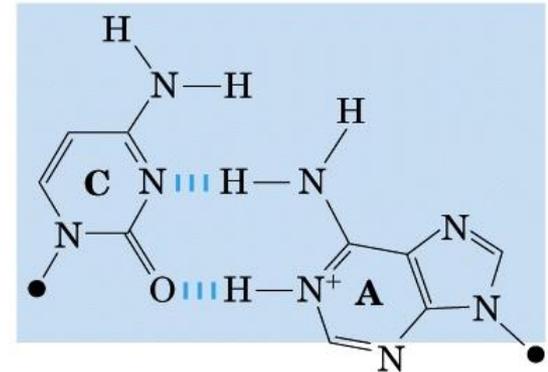
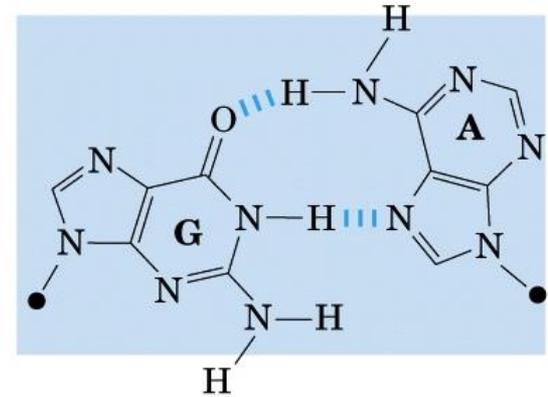


# Pareamento de bases

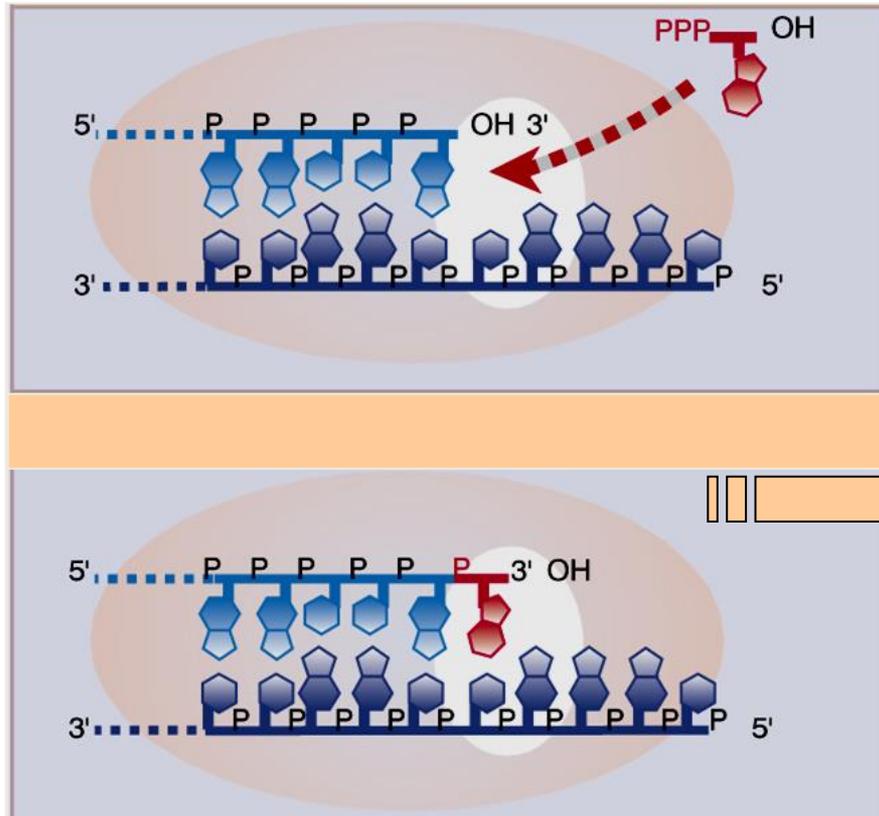
correto



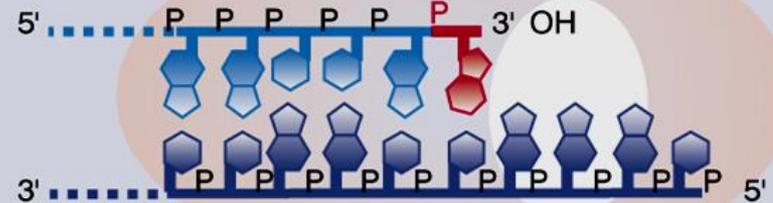
incorreto



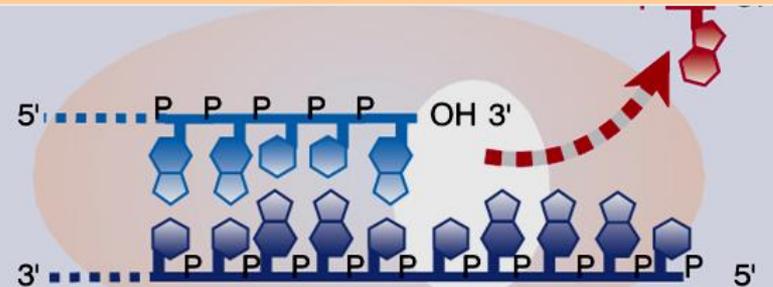
# Atividade revisora do sítio de exonuclease 3' → 5' presente nas DNA polimerases garante a fidelidade da replicação



**A enzima avança 1 nucleotídeo**

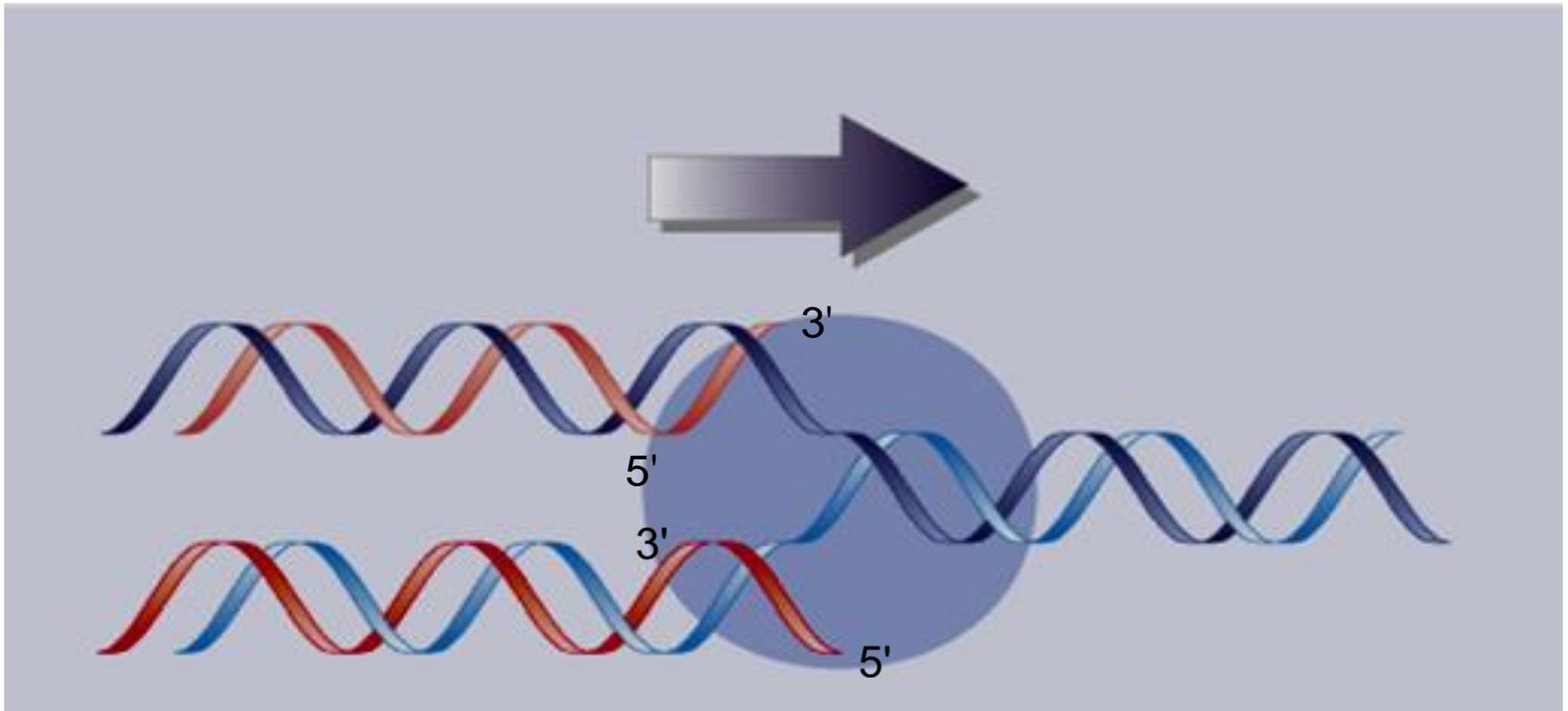


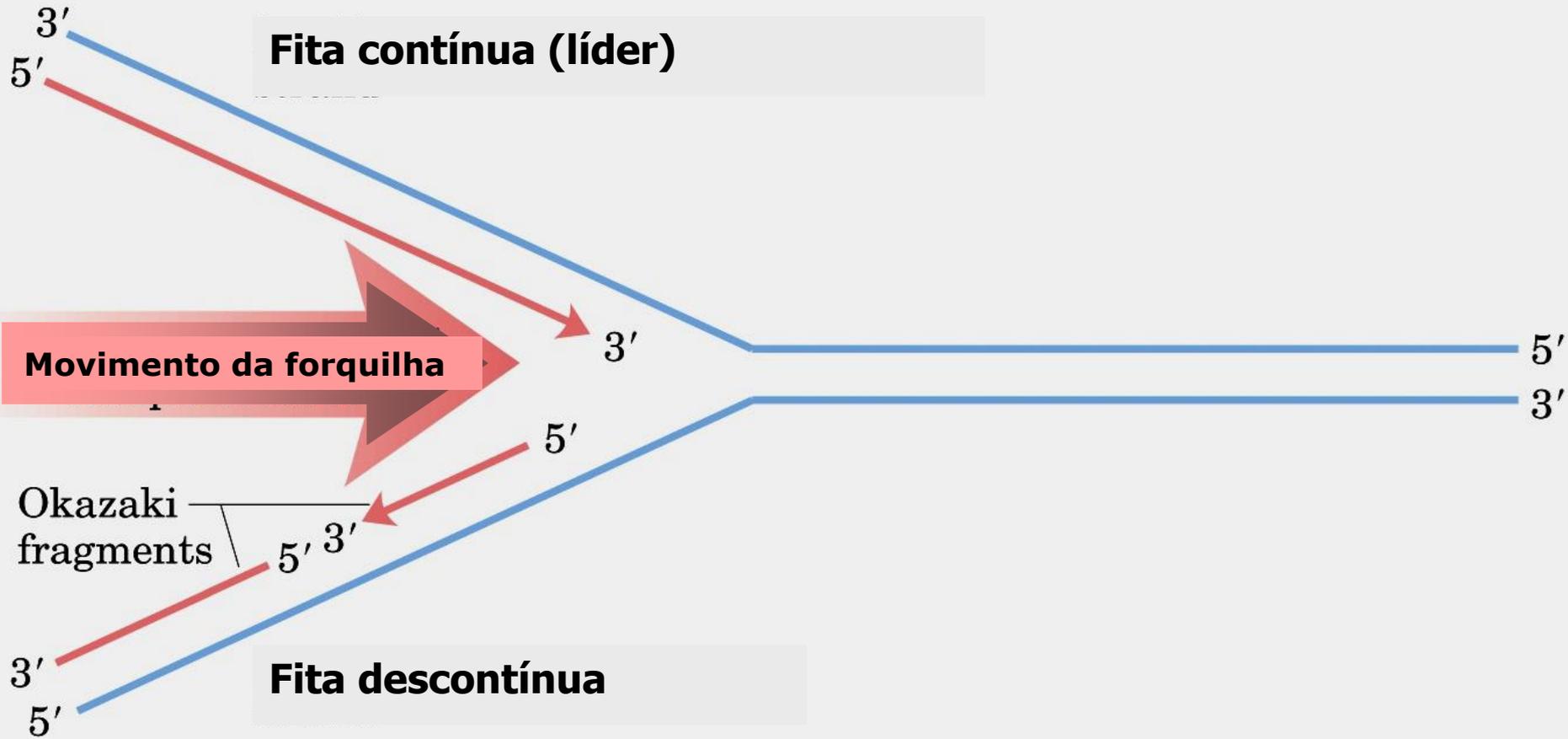
**Pareamento incorreto causa remoção do nucleotídeo**

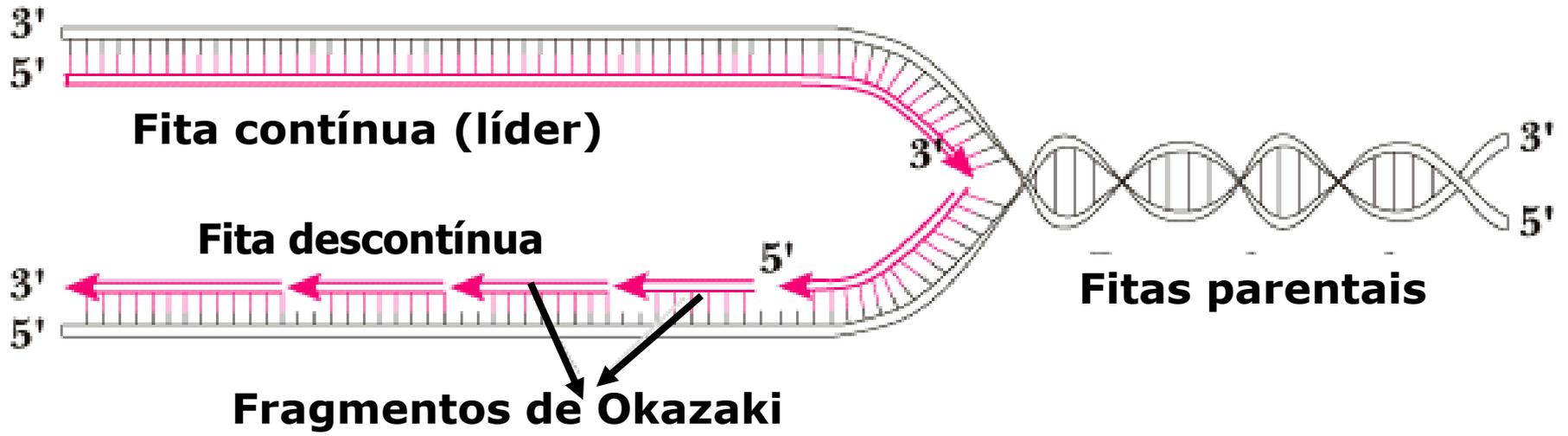


Descrever numa folha de papel  
como acontece replicação de DNA

A replicação numa das fitas apresenta um “problema”



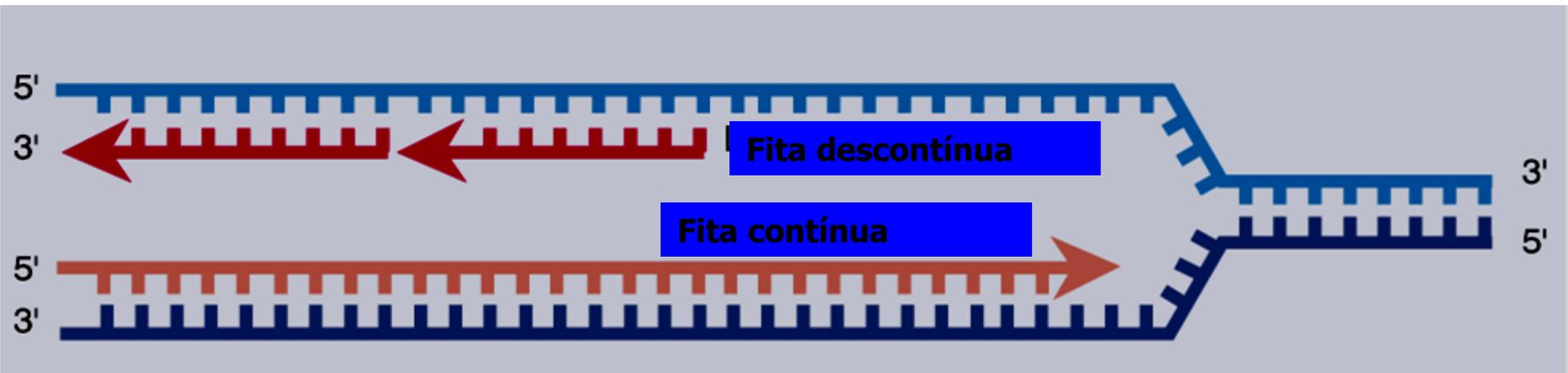




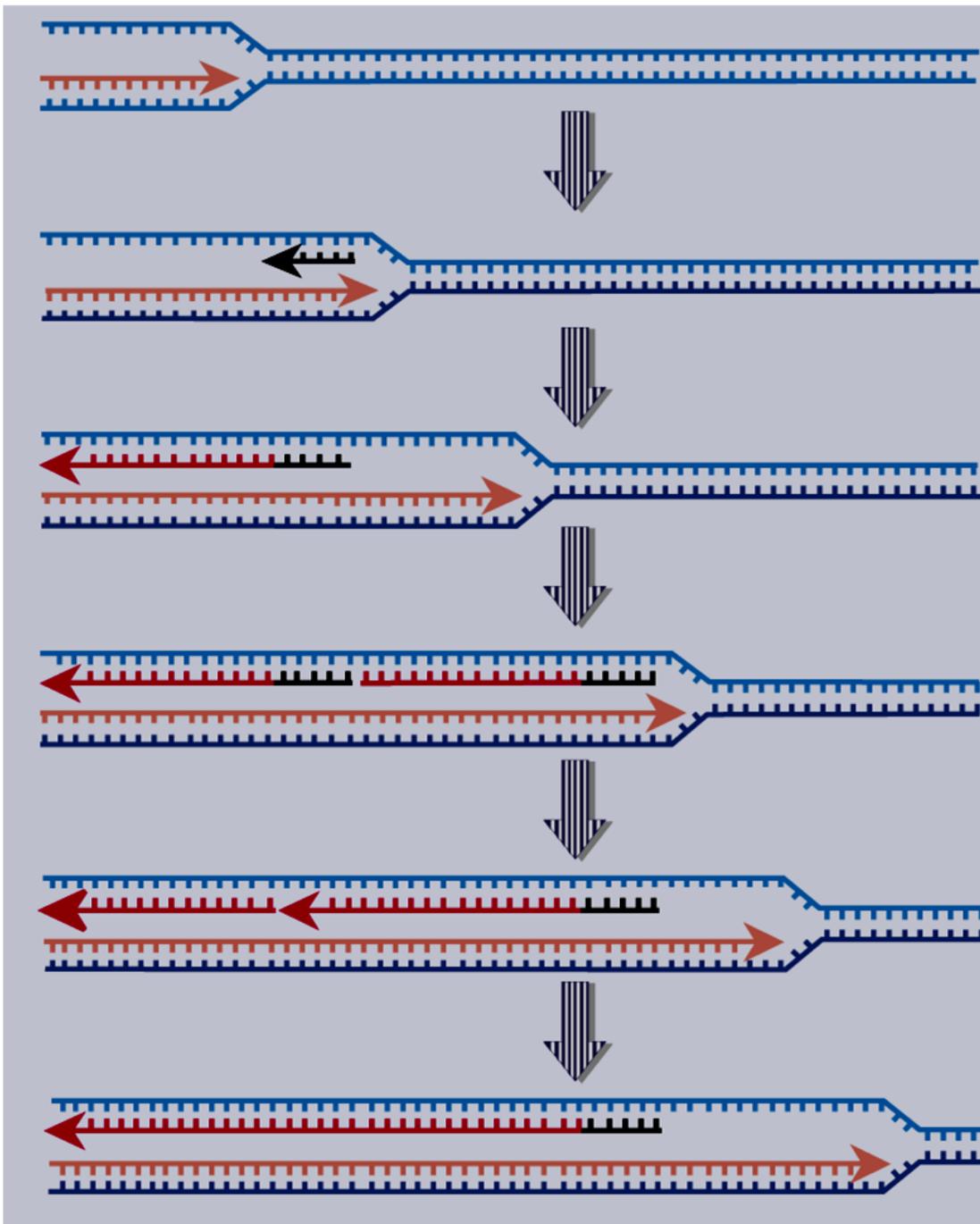
**Movimento da  
Forquilha de  
Replicação**

**A síntese do DNA é semi-descontínua e requer vários iniciadores (primers) de RNA para síntese da fita descontínua**

**Síntese da Fita descontínua**



**Síntese da Fita Contínua**



- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

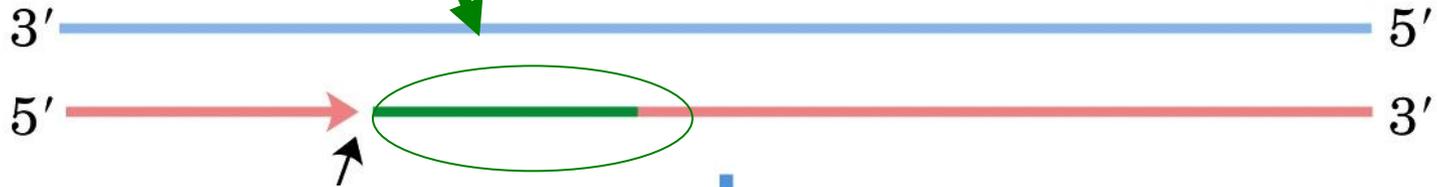
- A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

- A DNA polimerase I remove o primer de RNA e preenche as lacunas

- A DNA ligase sela as quebras

**Primer de RNA**

## Síntese da Fita descontínua



rNMPs  
dNTPs

DNA polymerase I

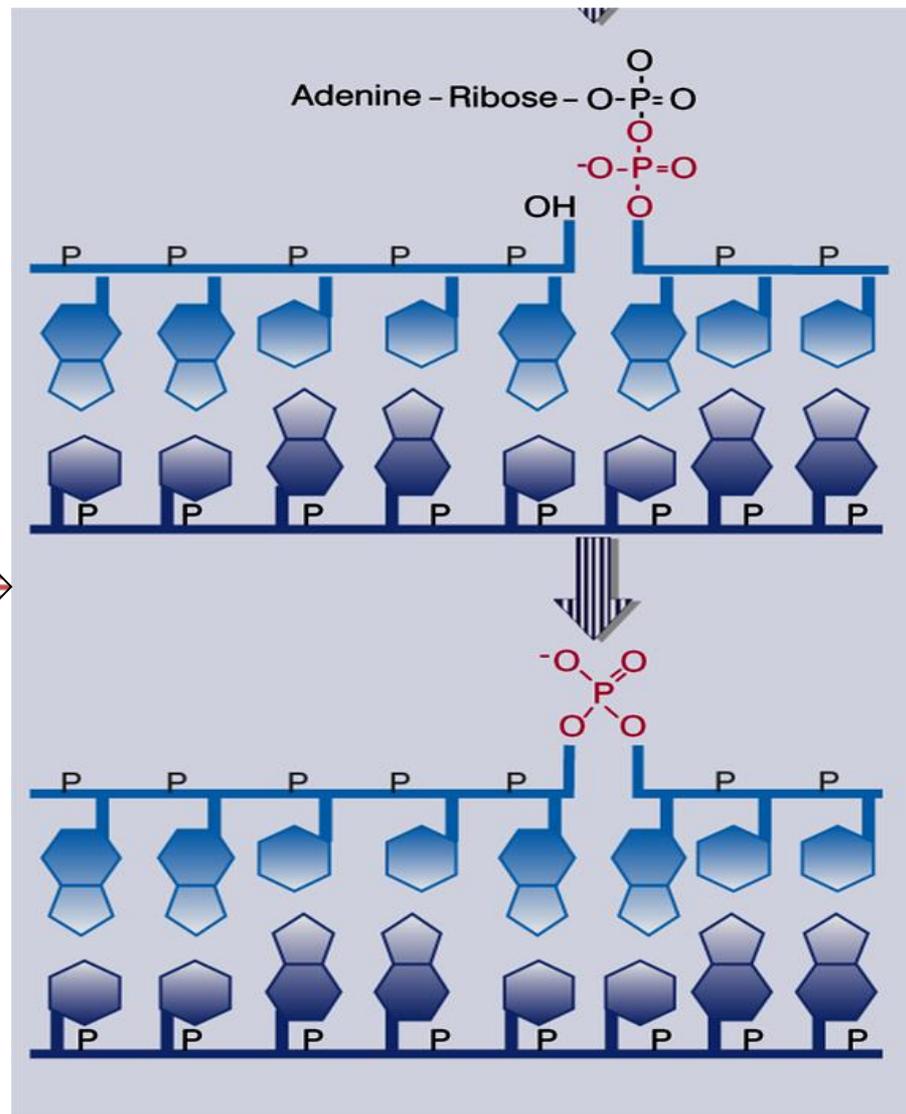
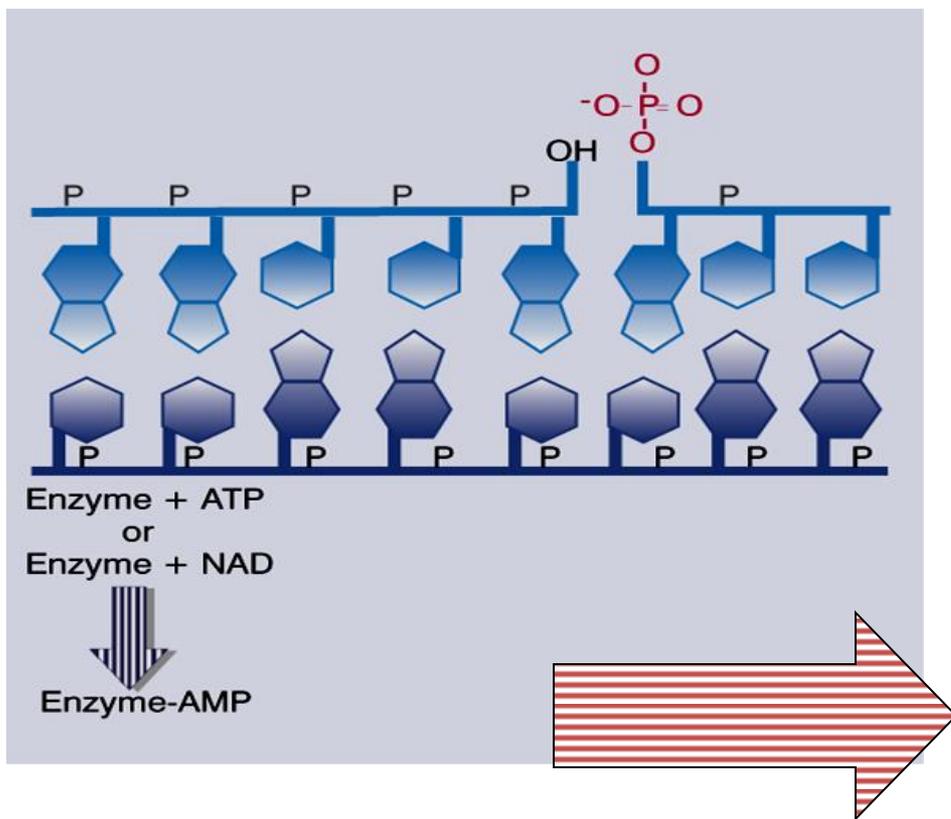
**Remoção do Primer de RNA  
Preenchimento da lacuna**

ATP (or  $\text{NAD}^+$ )  
AMP +  $\text{PP}_i$  (or NMN)

DNA ligase

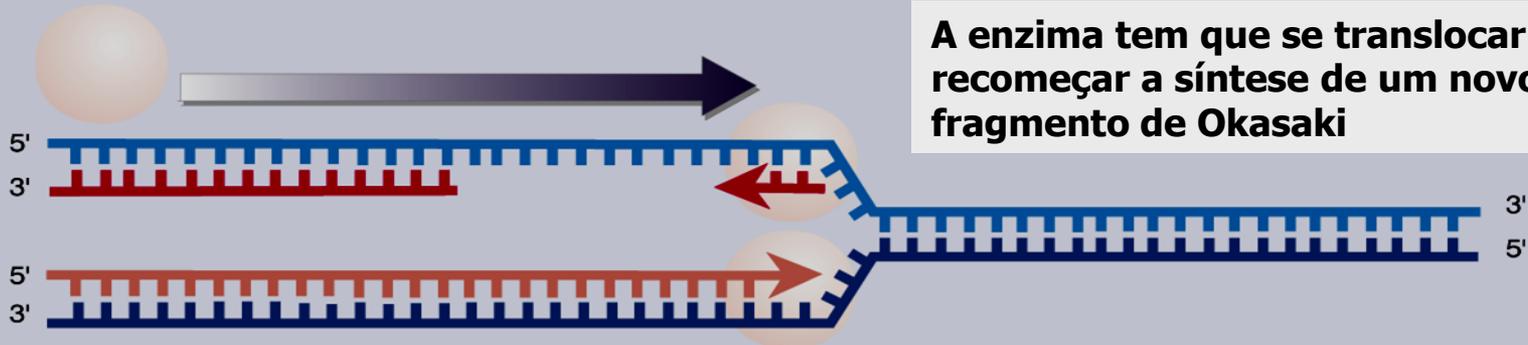
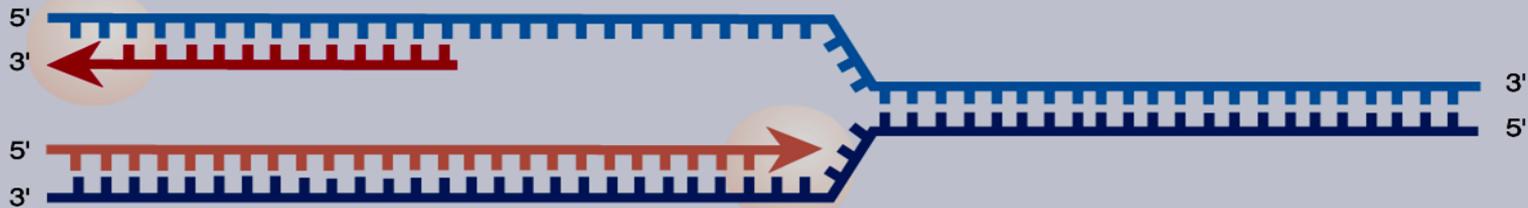
**Une os dois fragmentos de DNA**

# A DNA ligase sela as quebras



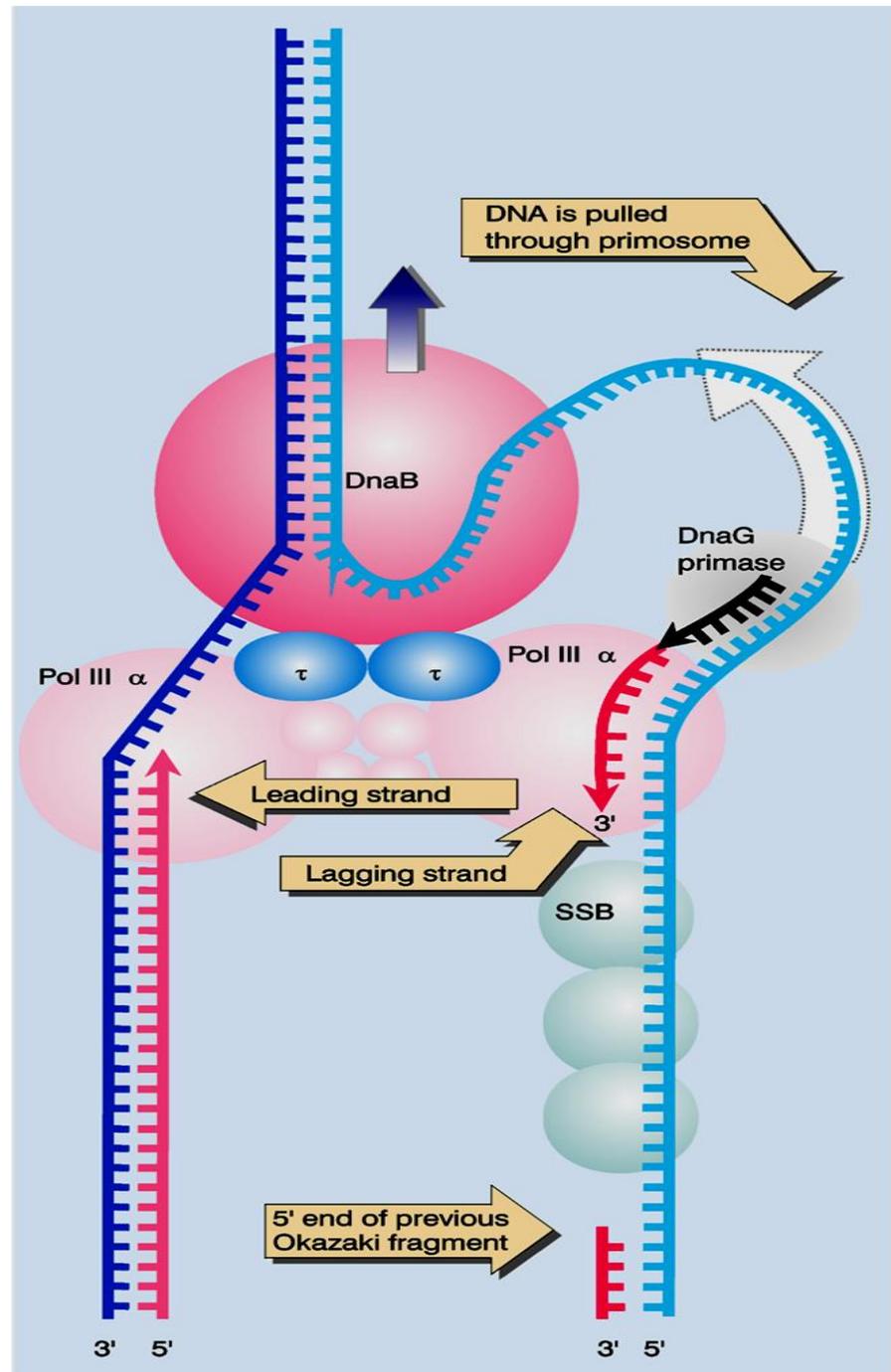
# Síntese das fitas contínua e descontínua é independente

Fita descontínua

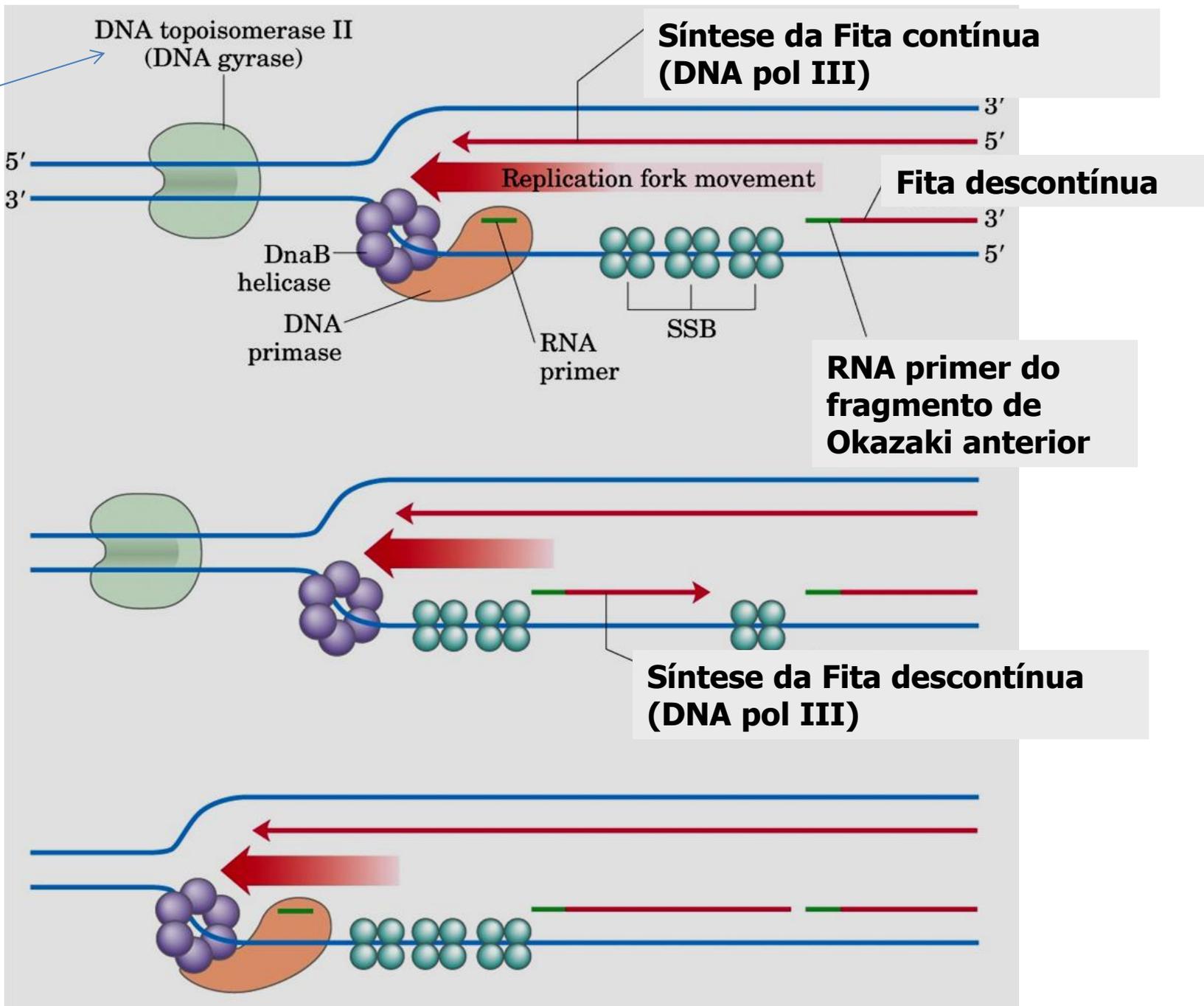


## O complexo de replicação

- A proteína DNA B (helicase) é responsável pelo movimento para frente da forquilha
- Cada cerne catalítico da DNA Pol III sintetiza uma das fitas-filhas
- Uma das fitas molde é afastada do primossomo
- Proteínas SSB mantêm as fitas parentais separadas



Prepara a dupla hélice para ser desenrolada

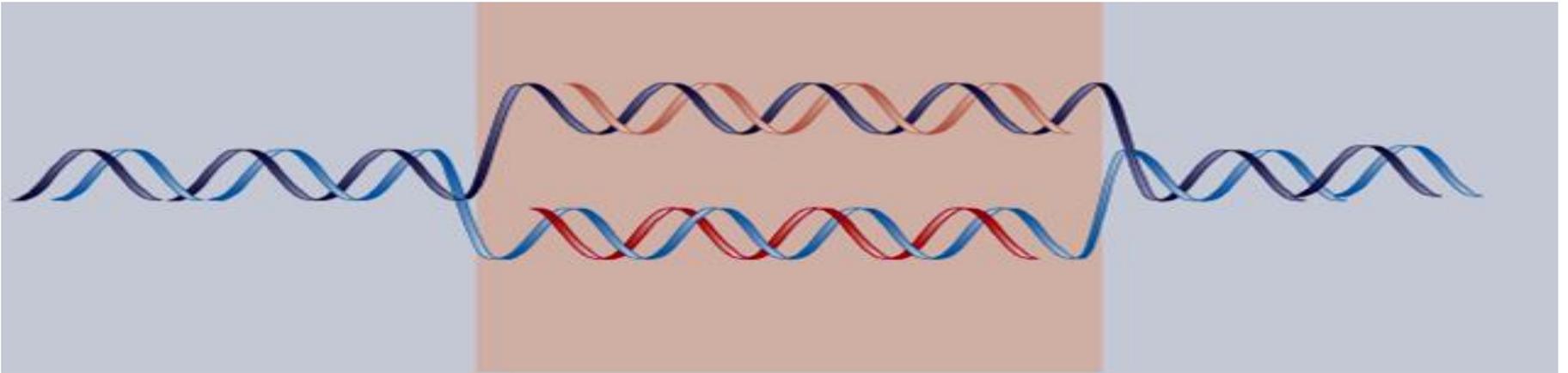
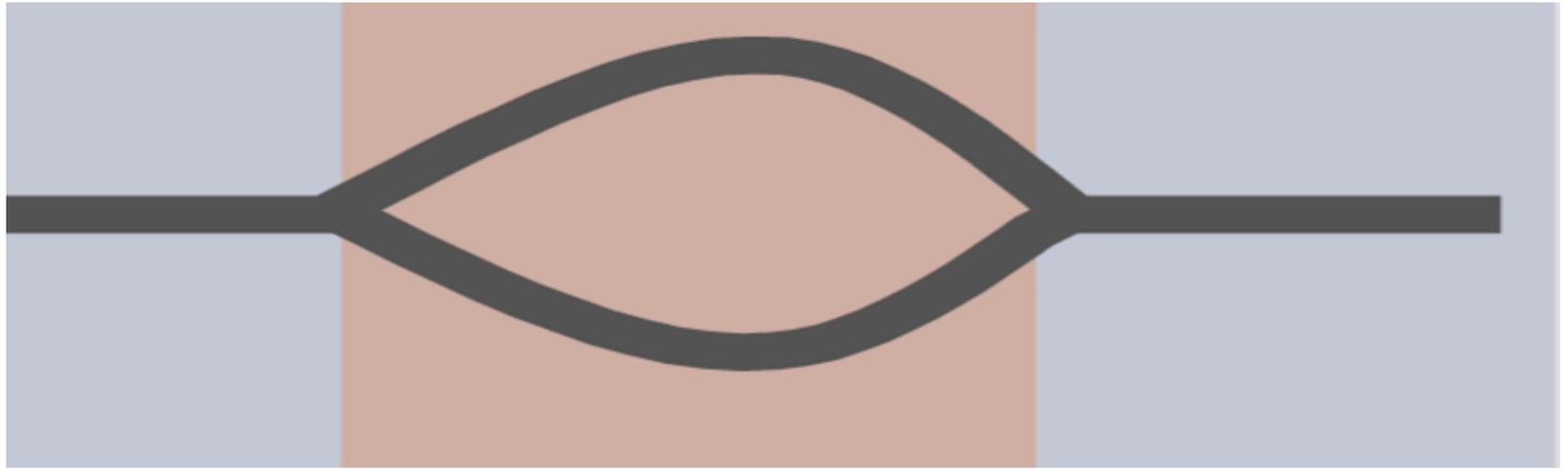


## **Proteínas presentes na forquilha de Replicação de *E.coli***

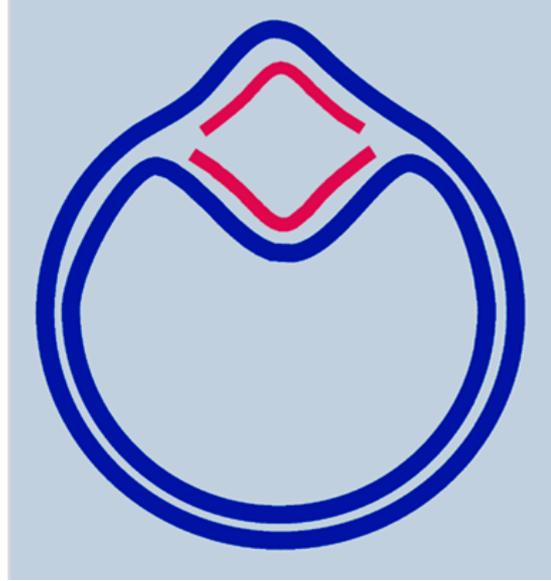
<b>SSB</b>	<b>Se liga a fita simples de DNA, mantendo a fita descontínua separada</b>
<b>DnaB (helicase)</b>	<b>Abre o DNA</b>
<b>Primase (DnaG)</b>	<b>Sintetiza os primers de RNA</b>
<b>DNA Polimerase III</b>	<b>Síntese da fita nova</b>
<b>DNA Polimerase I</b>	<b>Preenche as lacunas e excisa os primers</b>
<b>DNA Ligase</b>	<b>Liga os fragmentos</b>
<b>DNA girase</b>	<b>Prepara a hélice para a helicase (desenrola o DNA)</b>

Filme de novo?

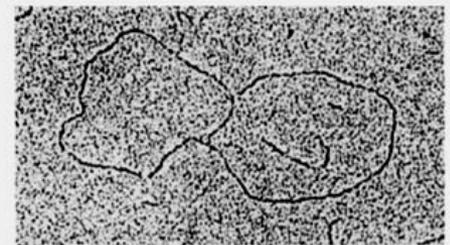
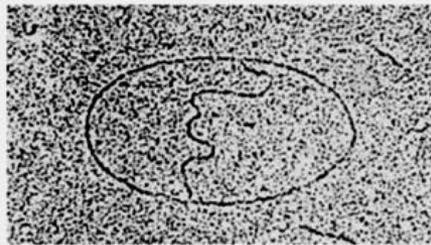
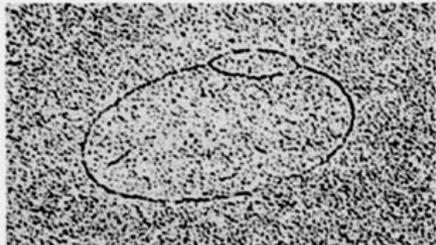
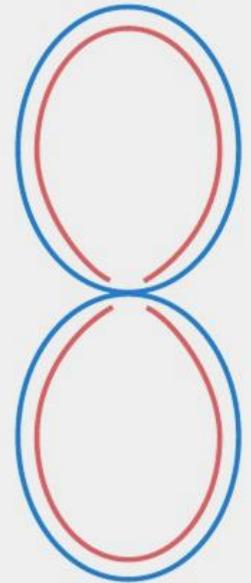
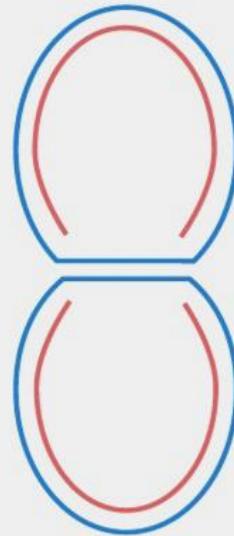
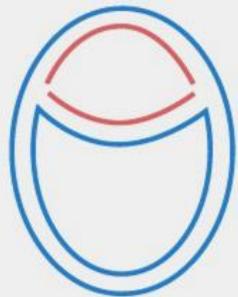
**A replicação é vista como um “olho” flanqueado por DNA não replicado**



# O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



# A replicação do cromossomo circular



# Velocidade de replicação

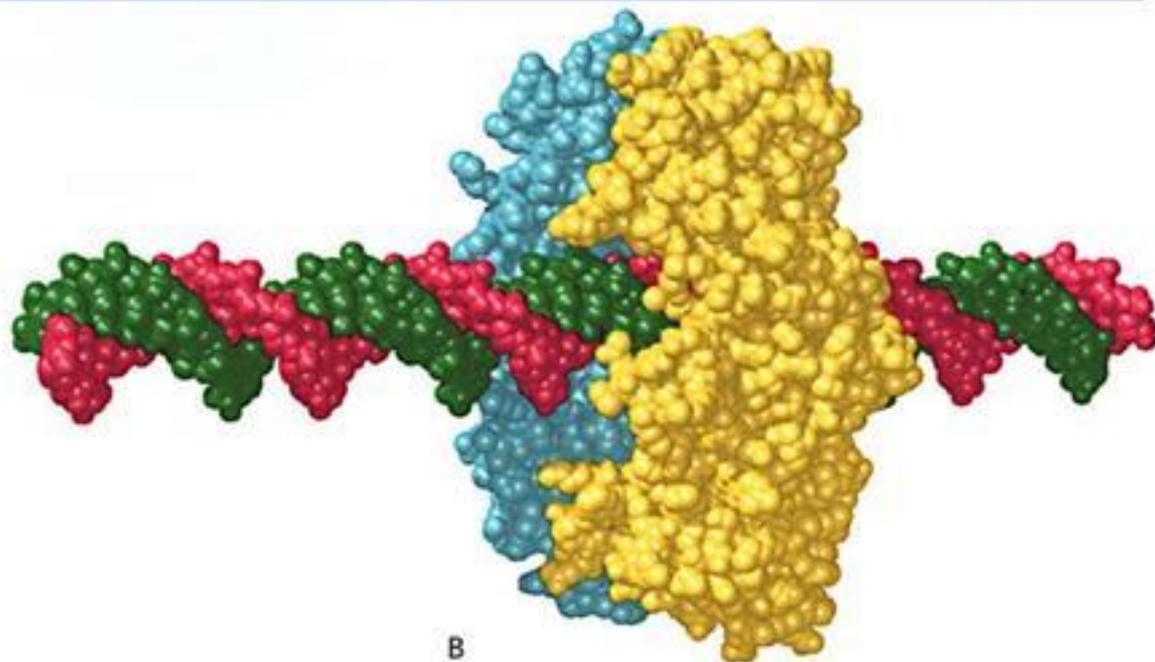
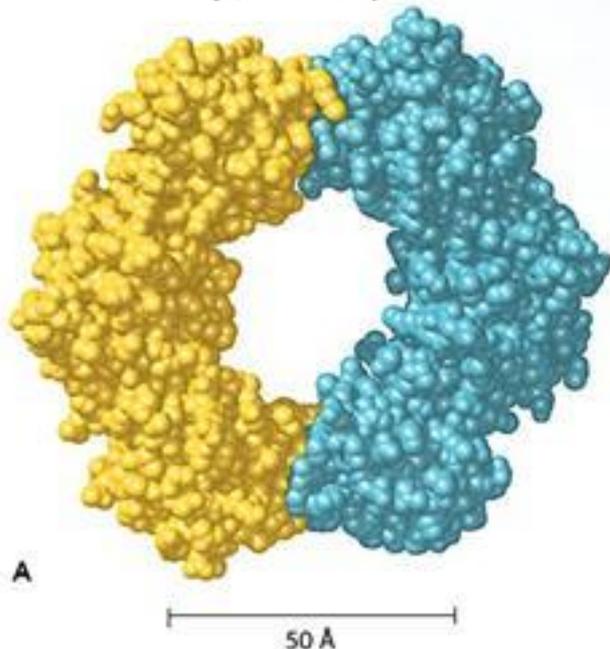
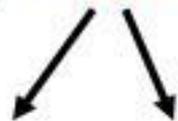
- A velocidade da forquilha de replicação em bactérias é de aprox. **1000 nucleotídeos/s**

**Pol III is processive :**

→ Adds thousands of bases

→ 1000 / sec (Pol I is 10 / sec)\*

**Pol III  
 $\beta_2$  - dimers**



**\* Pol III is 100 times as fast as Pol I**

**Question: How many minutes to replicate *E. coli* DNA?**

# Velocidade de replicação

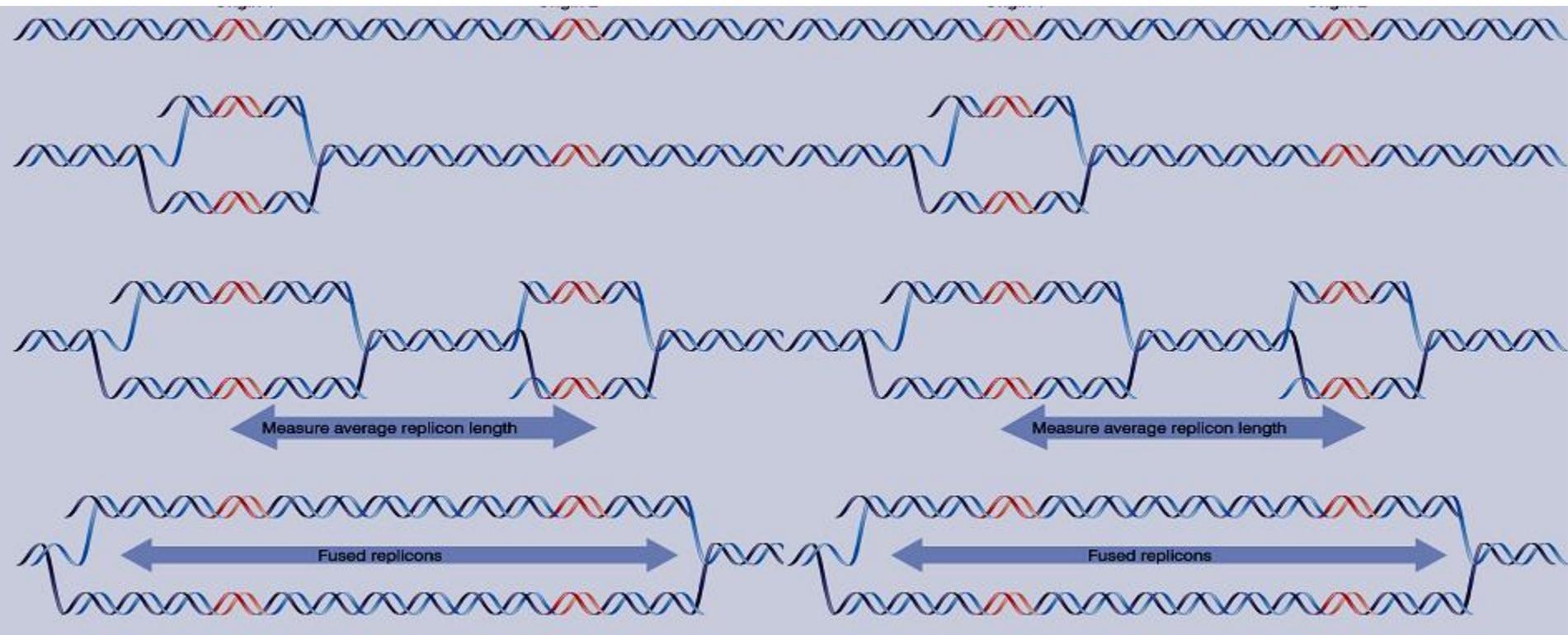
- A velocidade da forquilha de replicação em bactérias é de aprox. **1000 nucleotídeos/s**
- Genoma:  $4 \times 10^6$  pb
- $(4 \times 10^6) / 1000 = 4000 \text{ s} = \mathbf{66 \text{ min}}$
- Tempo de duplicação de um célula de *E. coli*
  - No laboratório, o tempo é de aprox. **20 min**

## **Replicon: Unidade do DNA onde está ocorrendo um evento de replicação**

### **Replicon:**

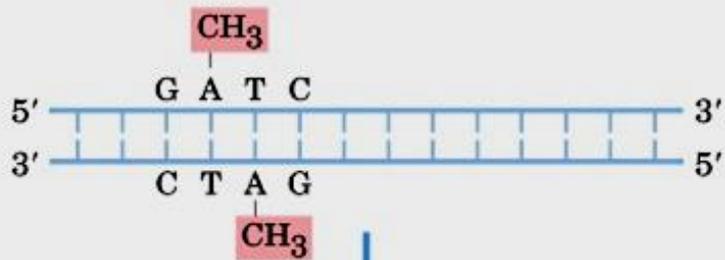
- 1. Origem + Término**
- 2. Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular**
- 3. O genoma de uma célula procariótica em geral constitui um único replicon**
- 4. Cada cromossomo eucariótico constitui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente**

# O genoma eucariótico constitui-se de vários replicons

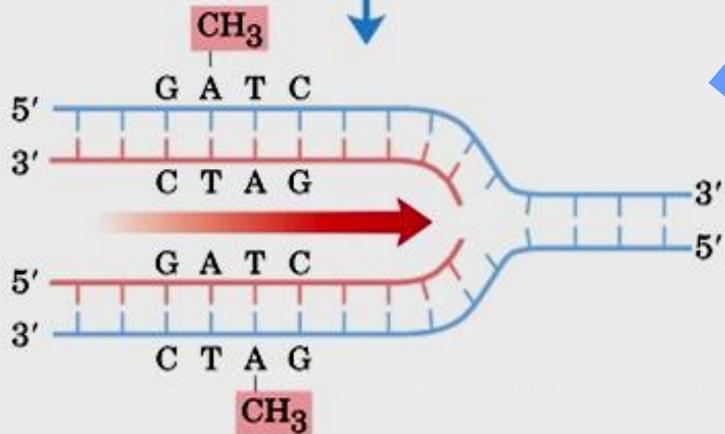


- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2.000pb/min (= 33 nt / s )
- Os replicons eucarióticos são iniciados em tempos diferentes
- Fase S demora  $\sim$  6hrs em uma célula somática

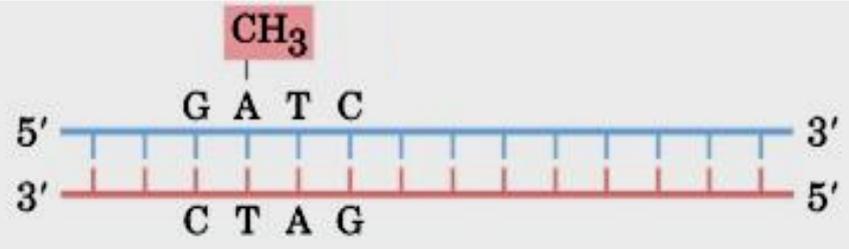
## **Reparo para correção de erro após a replicação**



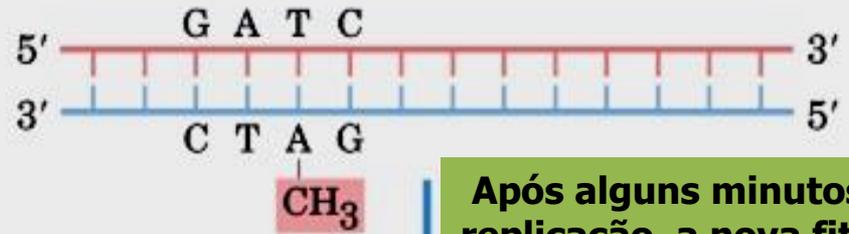
**Replicação**



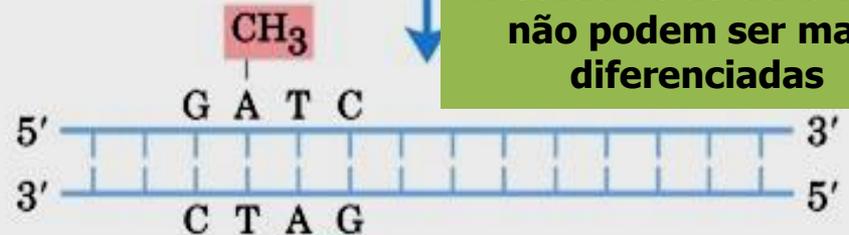
**Metilação da adenina no sítio GATC identifica qual a fita é a parental**



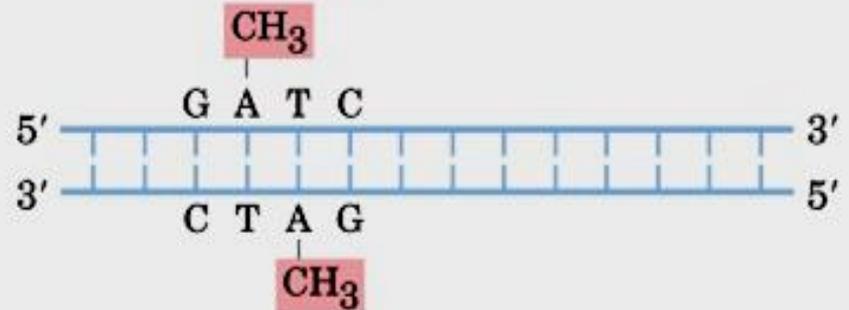
**DNA semi-metilado**



Dam methylase

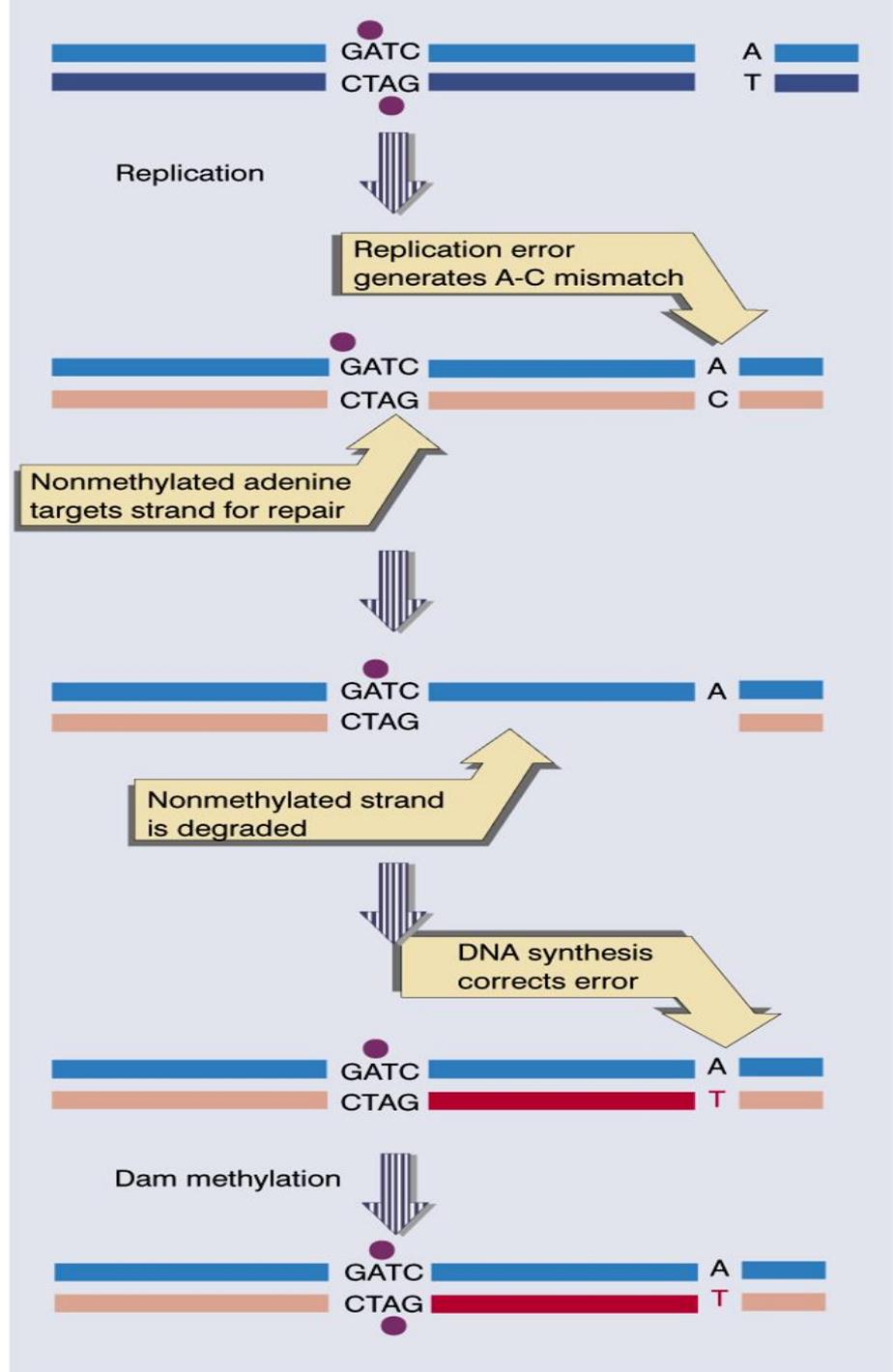


**Após alguns minutos da replicação, a nova fita de DNA sintetizada é metilada e as duas fitas não podem ser mais diferenciadas**



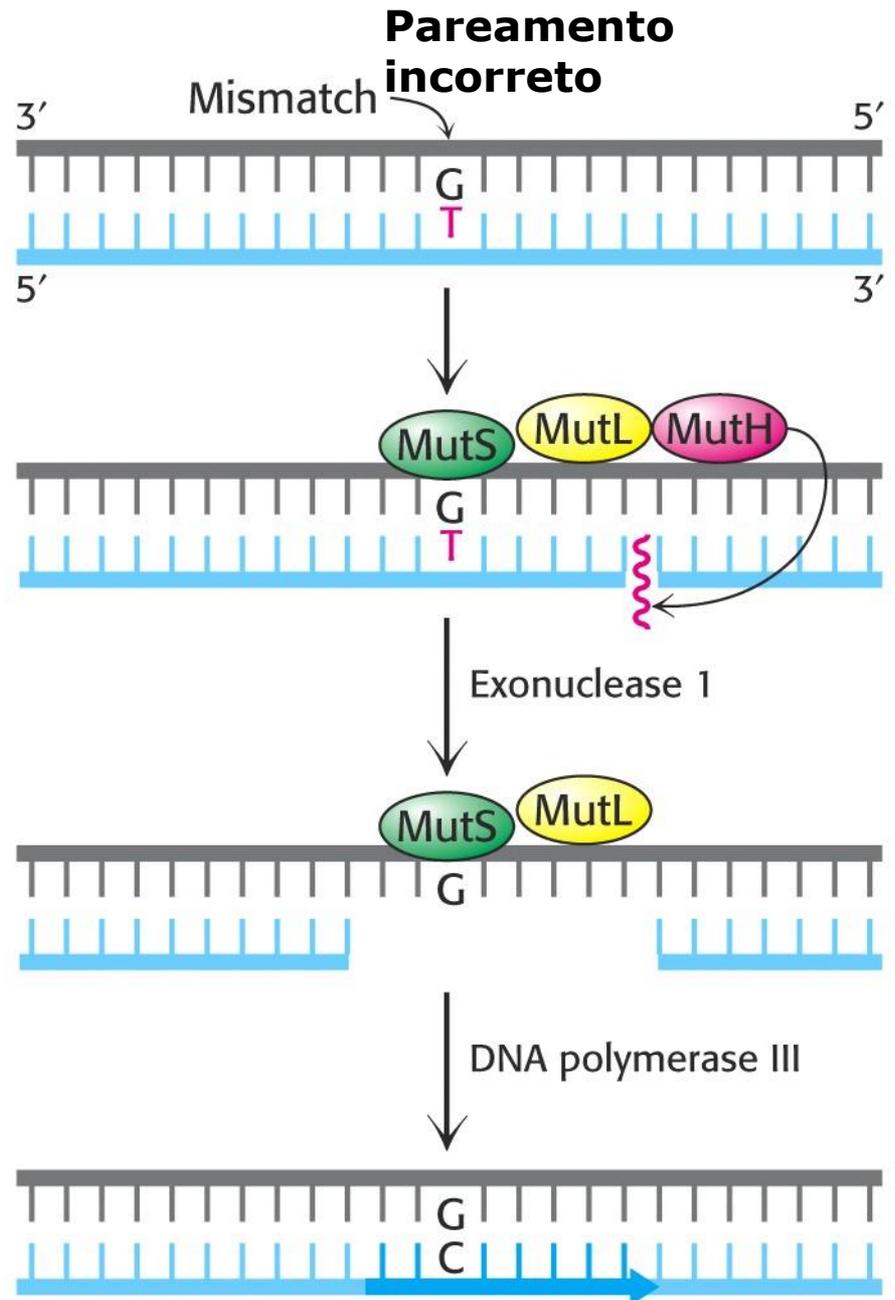
## Reparo para correção de erro

- Correção de erros que escapam da atividade revisora da DNA polimerase durante a replicação
- Metilação garante que a fita a ser reparada seja a fita filha



## Reparo para correção de erro

- **Complexo de enzimas para correção de erros:**
- **MutS reconhece o pareamento incorreto**
- **MutH cliva a fita não metilada e exonucleases degradam um trecho desta fita**



Reparo por excisão de nucleotídeos

# Quantos erros ocorrem?

- Genomas **bacterianos**
  - Aprox. 1 em cada 10.000 nt se liga erradamente
- Com **reparo**, a taxa de erro passa para
  - Aprox. 1 em cada  $10^9$  nt
- Num genoma de 5 milhões de nt
  - Aprox. 1 erro a cada 1000 replicações
  - A cada **2 semanas** pode aparecer um erro
- Erros de duplicação e câncer

# “Dogma Central” da Biologia Molecular

Replicação

DNA

Transcrição

RNA mensageiro

RNA

Tradução de mRNAs

Proteína

Usa **Uracila** ao invés de Timina

Ocorre no **ribossomo**