Replicação de DNA

QBQ 102 2018s1

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

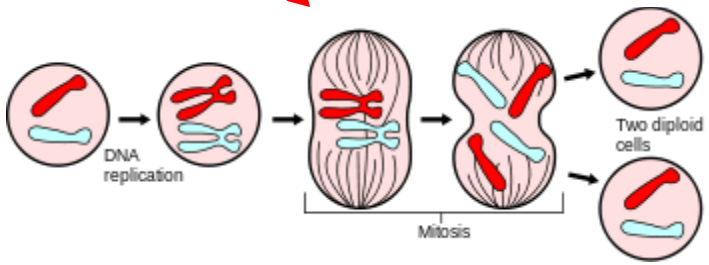
- Dotou os seres vivos de uma substância que permite que eles
  - Vivam
  - Se reproduzam
- A mesma substância desempenha os dois papéis!
- Que substância é essa?
- DNA

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?

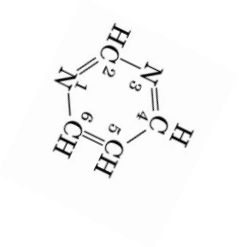
Graças à duplicidade da hélice e à complementaridade das bases

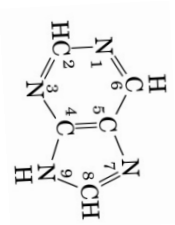
Dada uma fita, consigo saber a outra

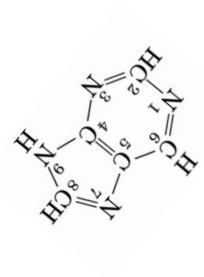
Replicação de DNA

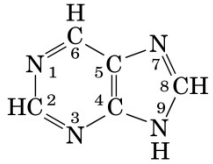
- Informacionalmente é simples!
  - De uma molécula resultam duas
- Mas mecanicamente (ou molecularmente) é um processo complicado
  - Há diversas enzimas participantes

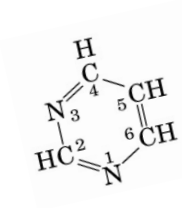
Suprimento “infinito” de nucleotídeos dentro da célula

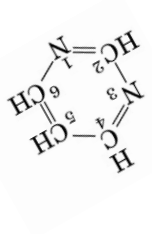








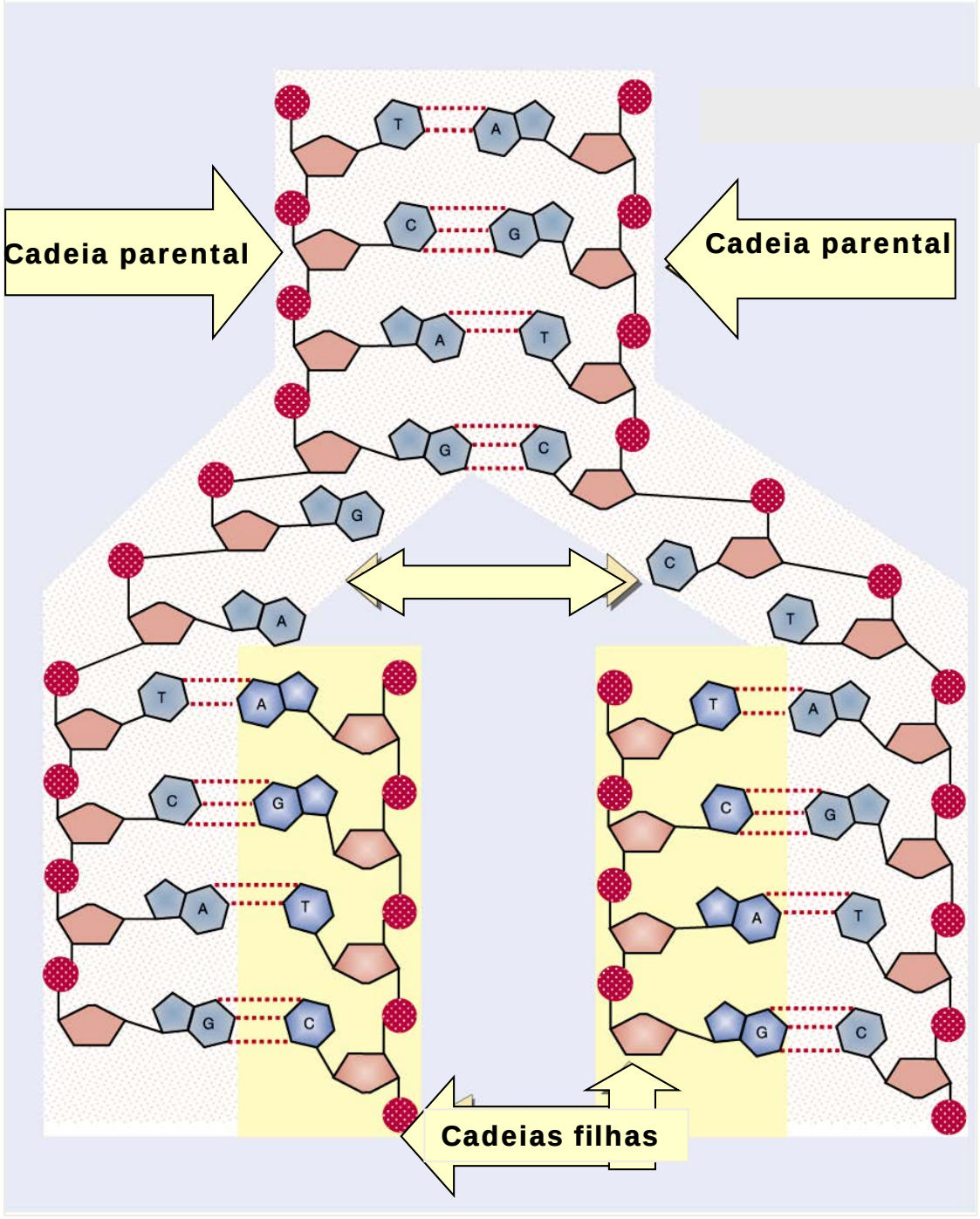




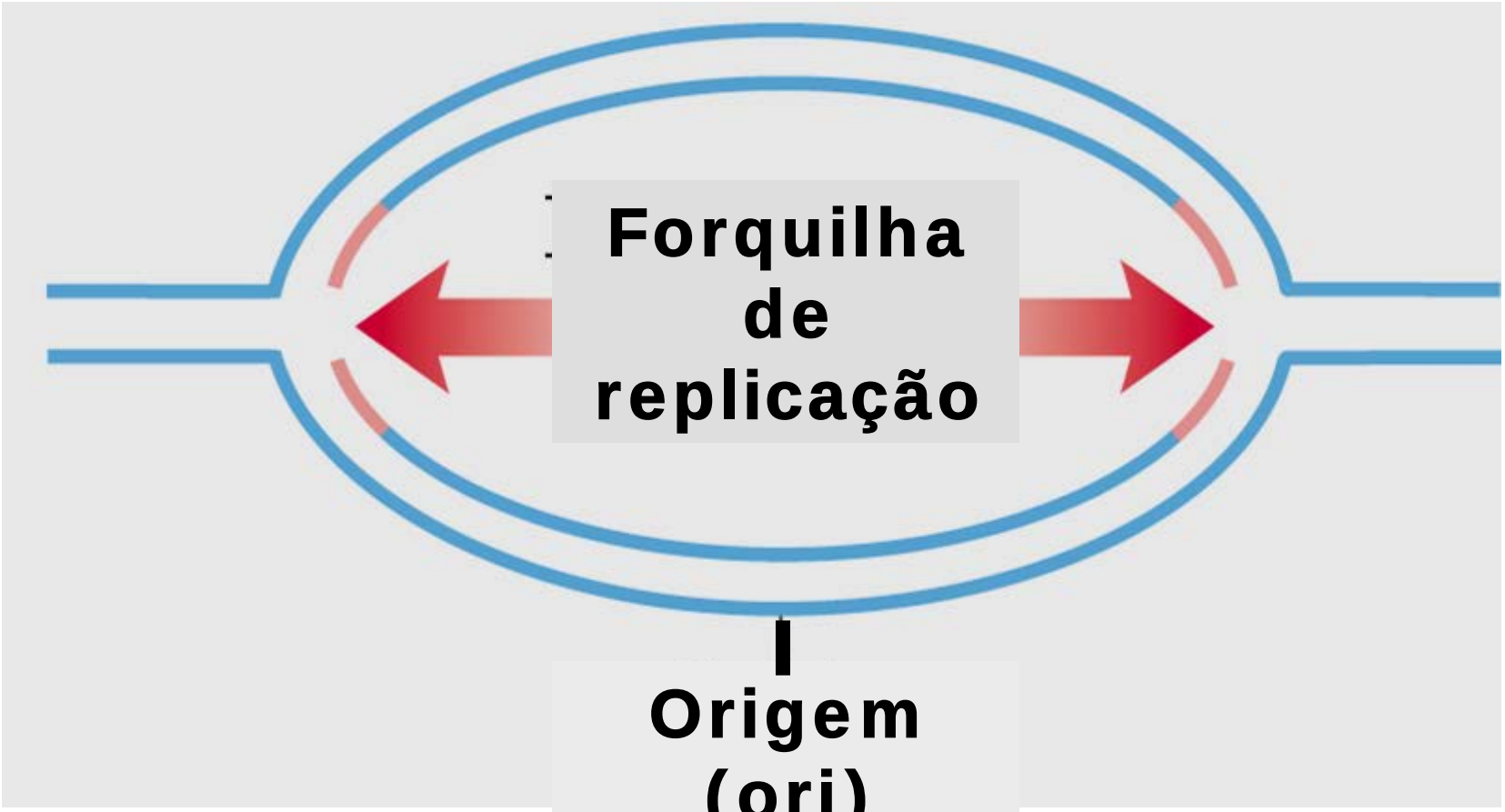
Replicação do DNA

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

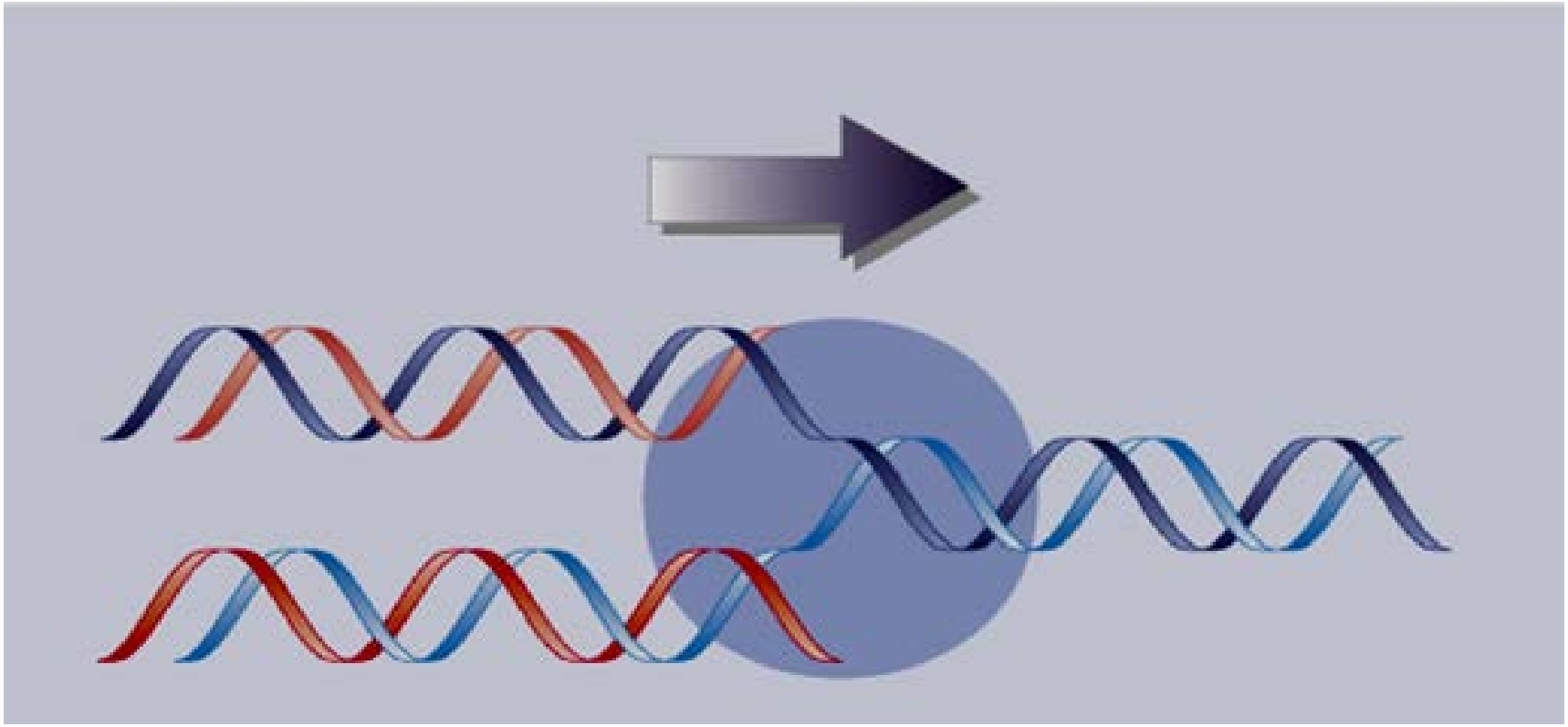
A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases



A replicação é bidirecional

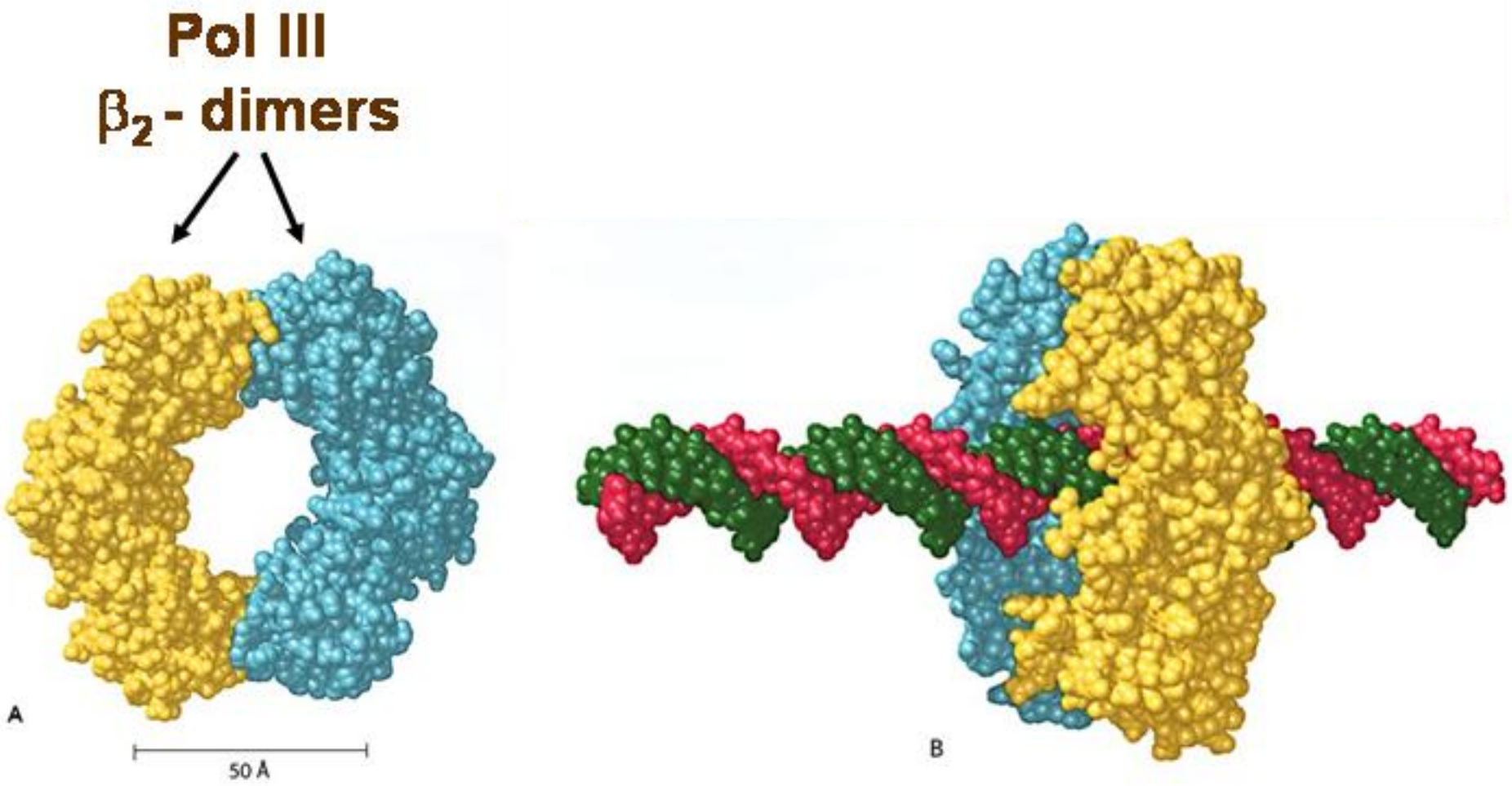


<u>Forquilha de replicação</u>: Região do DNA onde ocorre a transição do DNA parental fita dupla para as novas fitas duplas filhas



Quem é o agente principal?

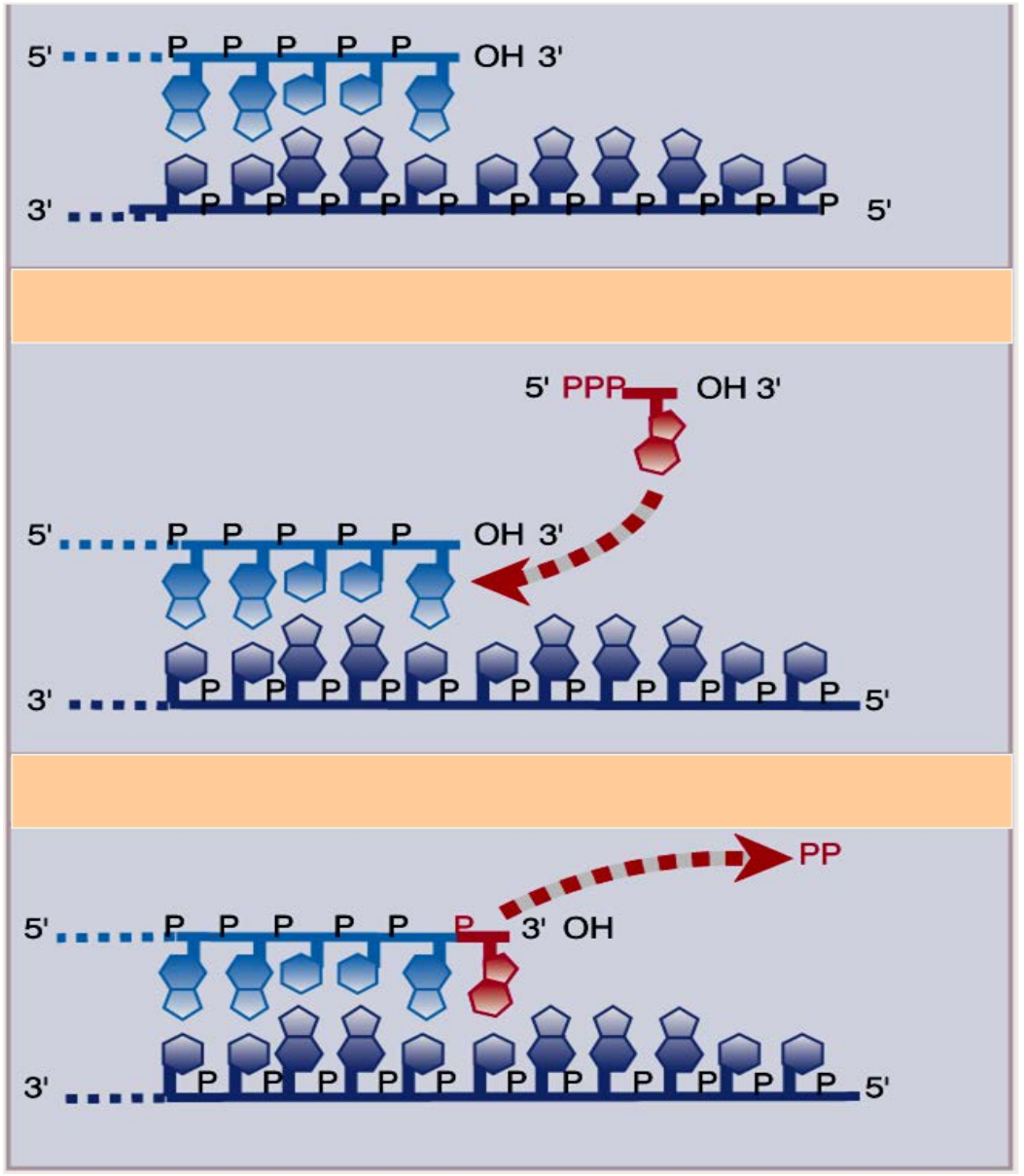
DNA polimerase III

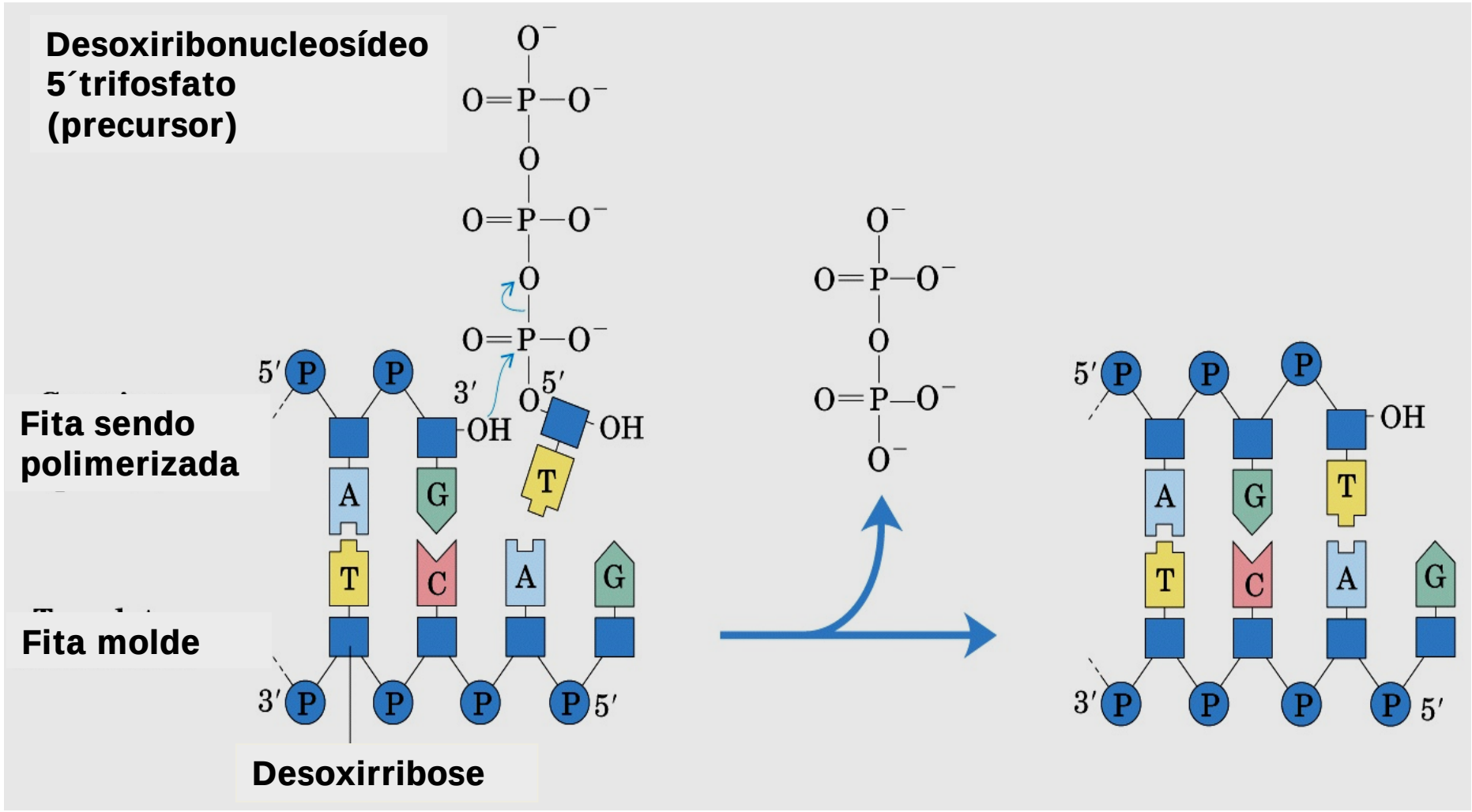


http://cbc.arizona.edu/classes/bioc461/Chapter27Notes.htm

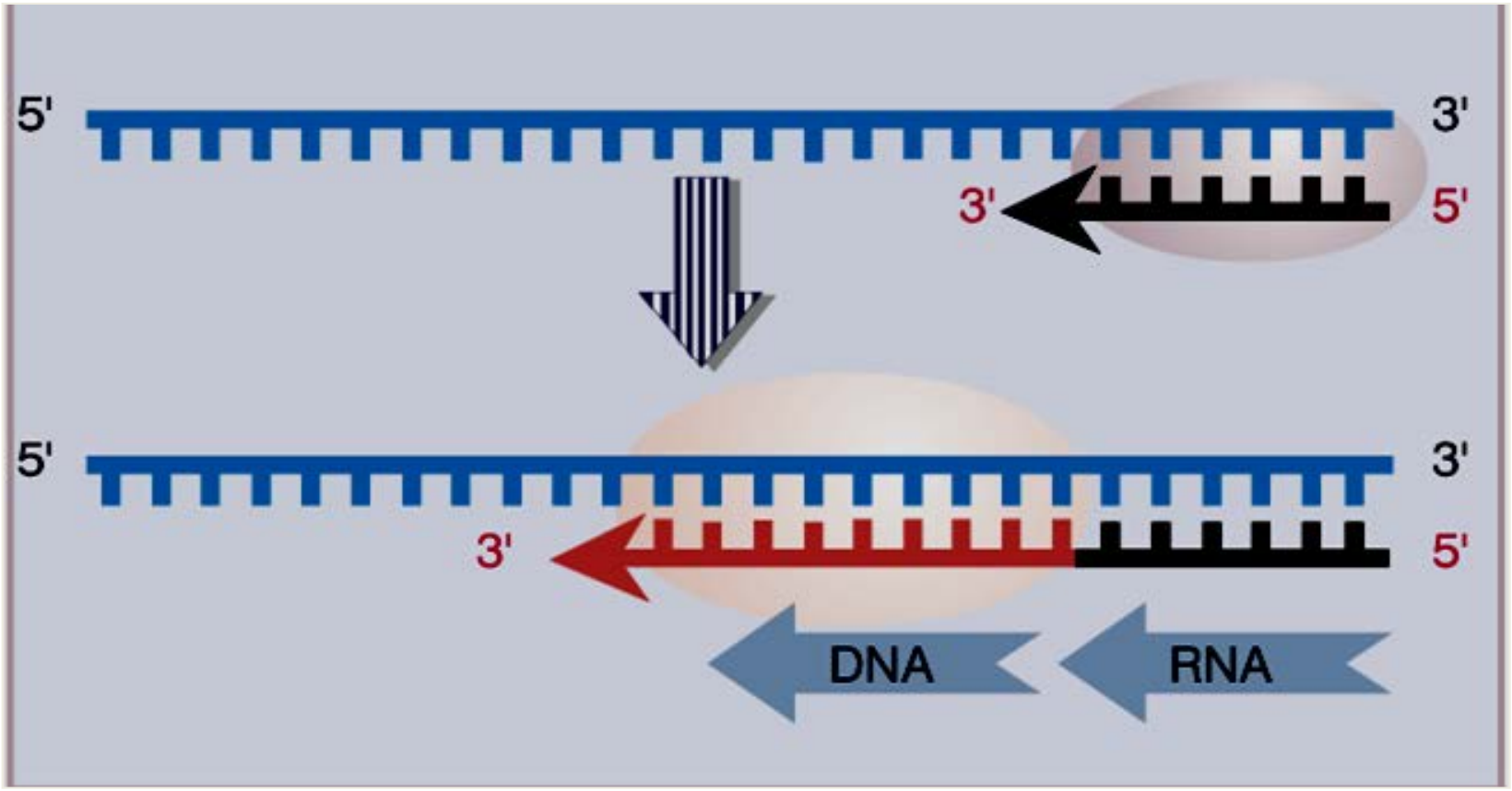
Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

- 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



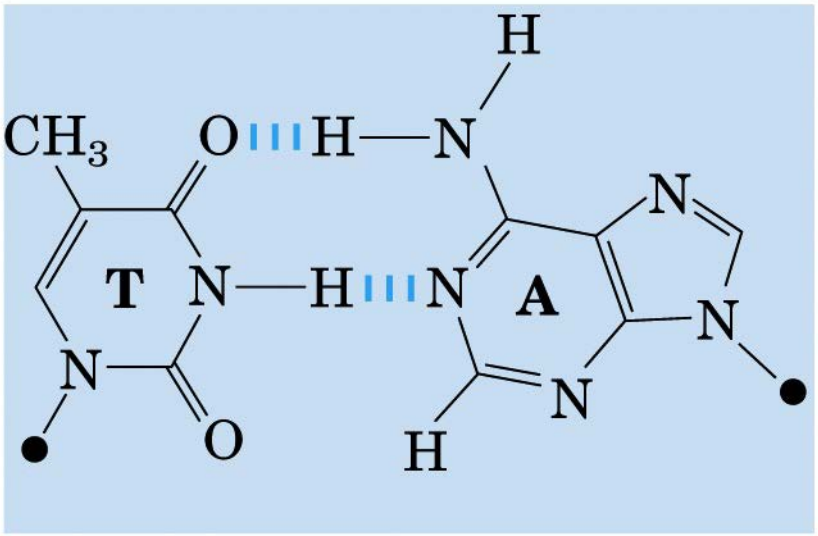

Desoxiribonucleosídeo 5´trifosfato (precursor)
Fita sendo polimerizada
Fita molde
Desoxirribose
5′
3′
OH
A
G
T
C
P

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

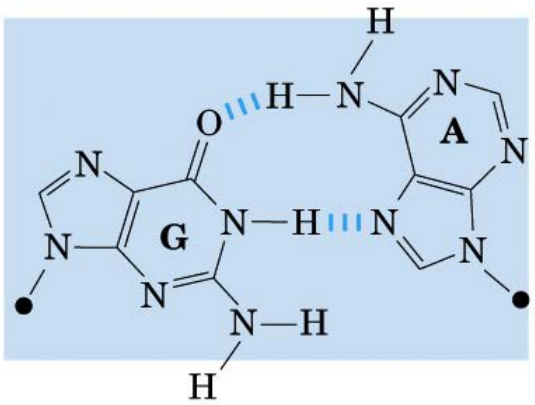


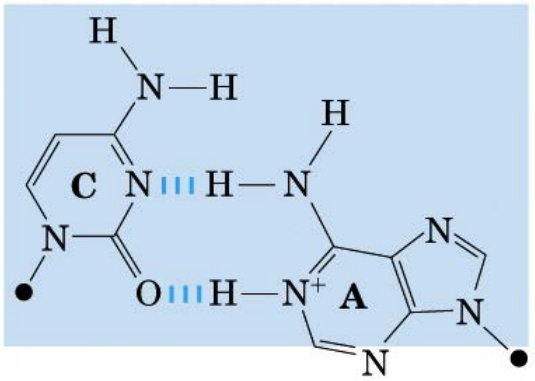
Pareamento de bases

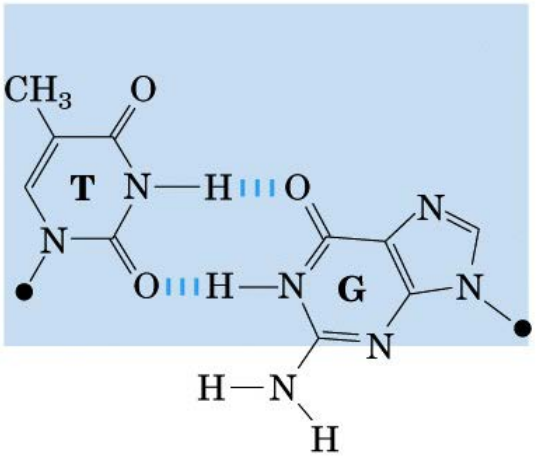
correto



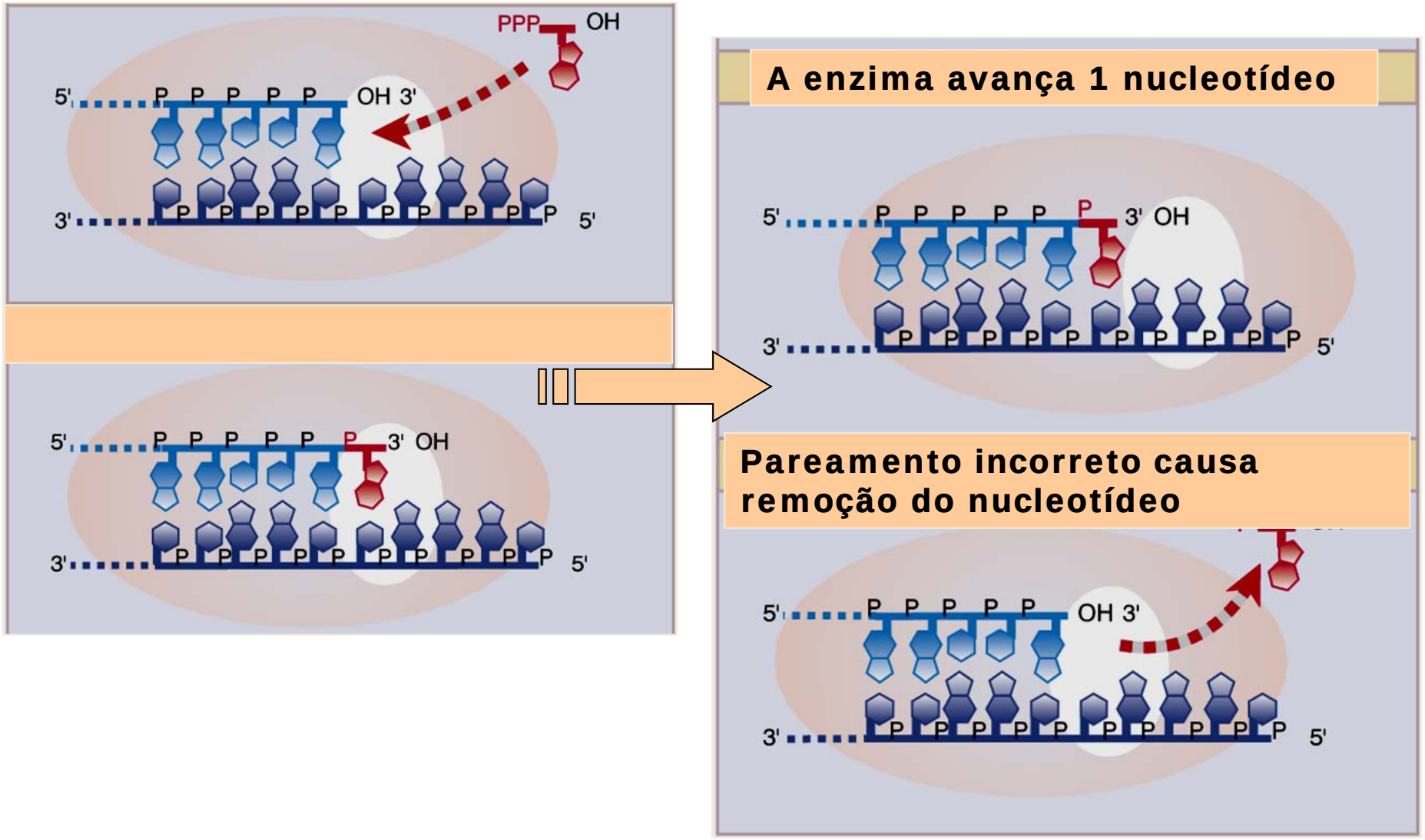
incorreto



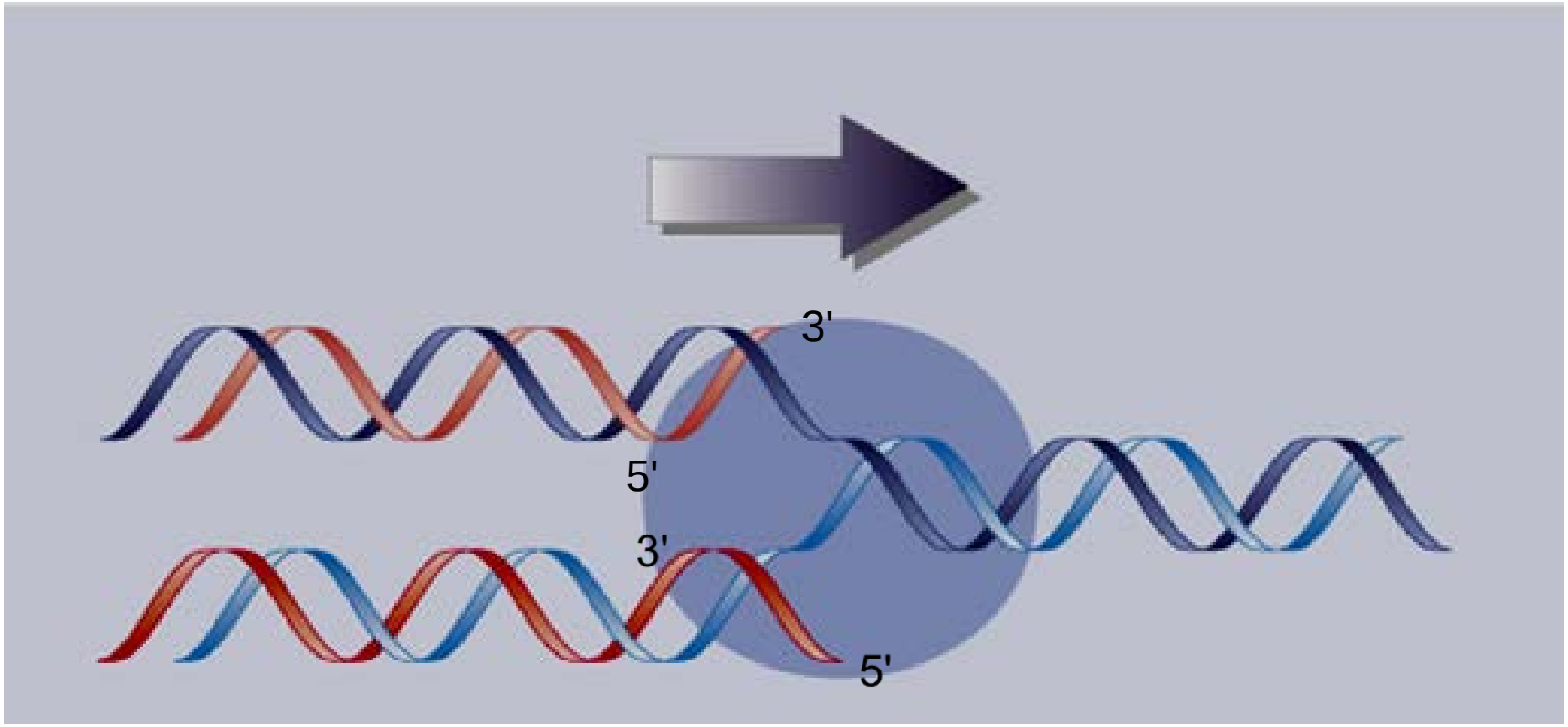


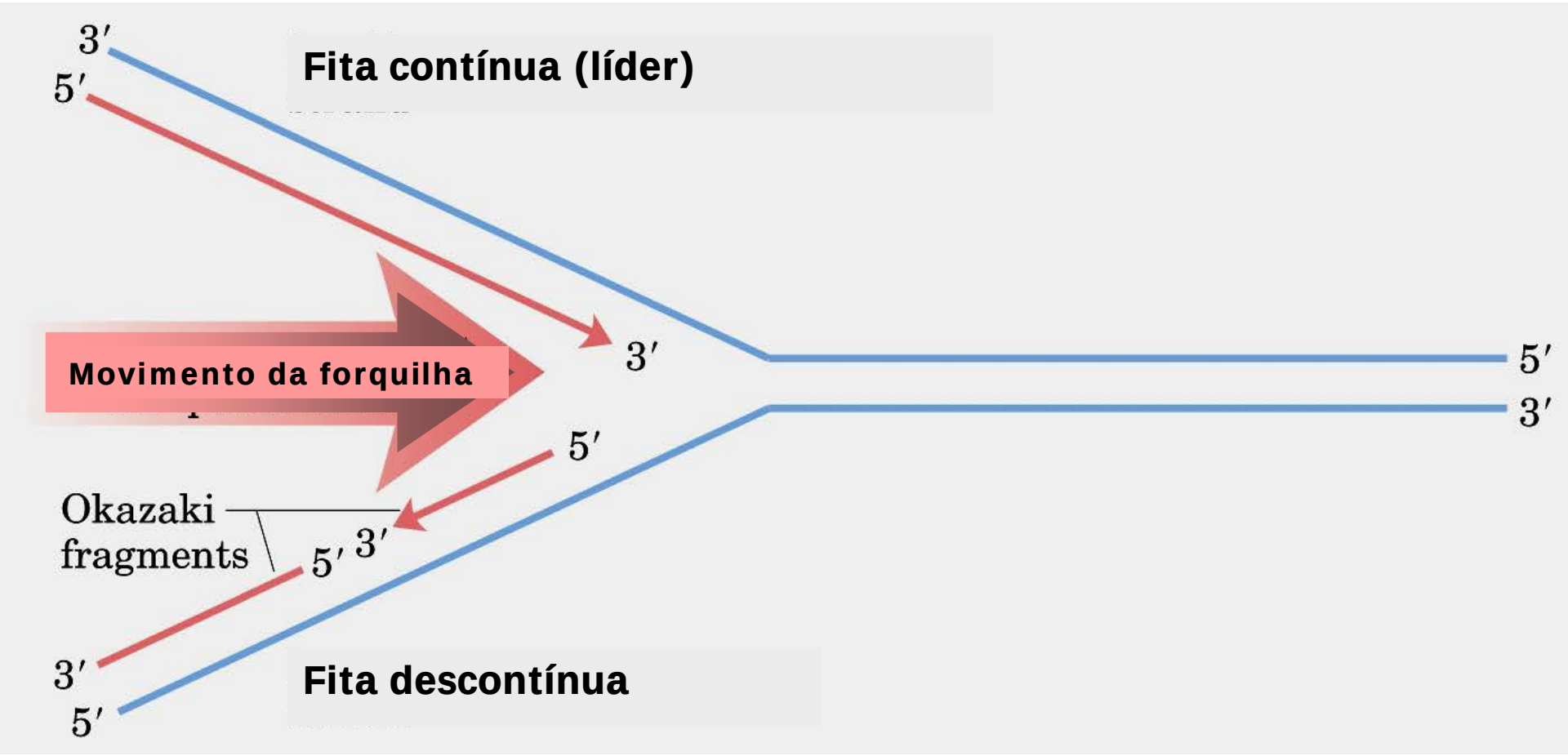


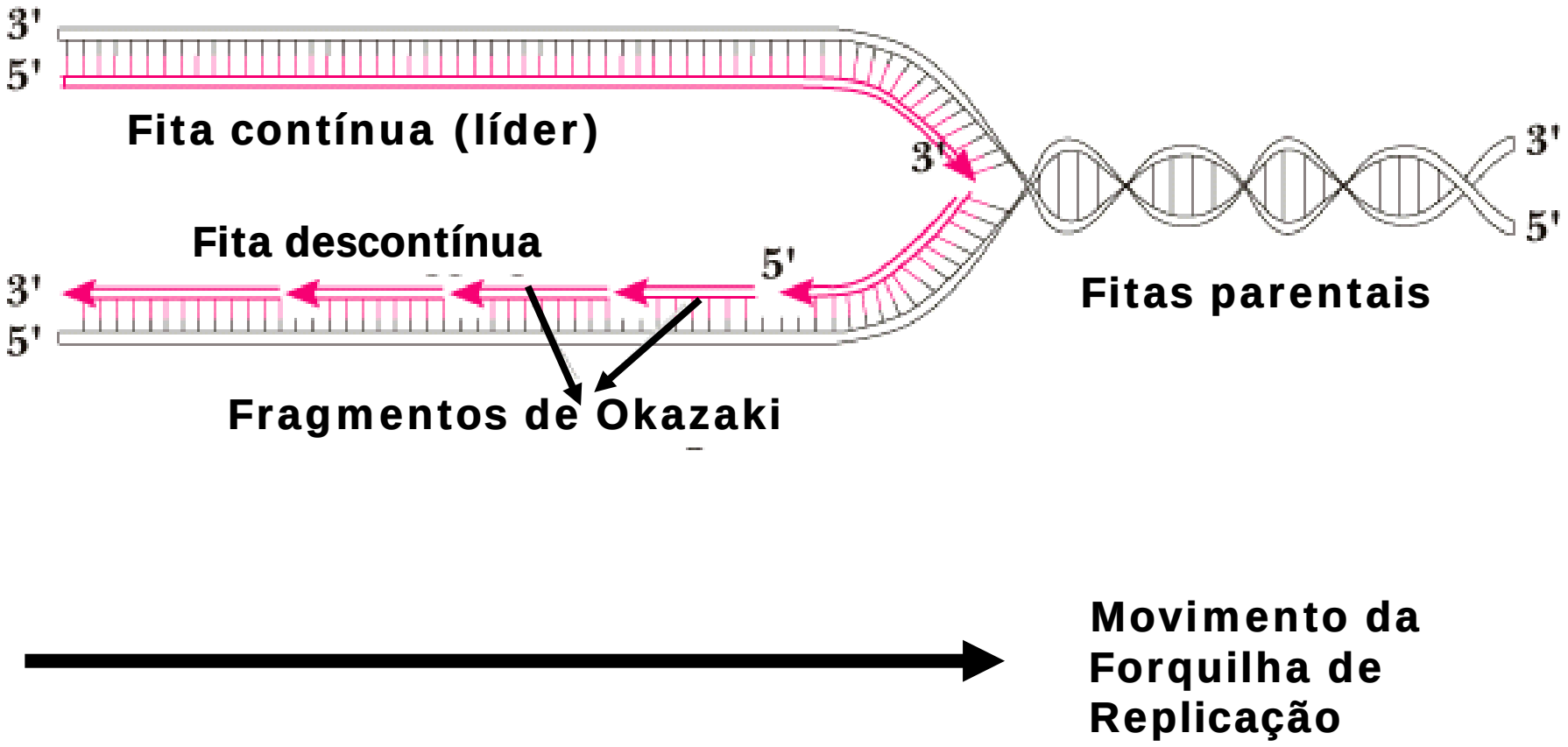
Atividade revisora do sítio de exonuclease 3’ → 5’ presente nas DNA polimerases garante a fidelidade da replicação



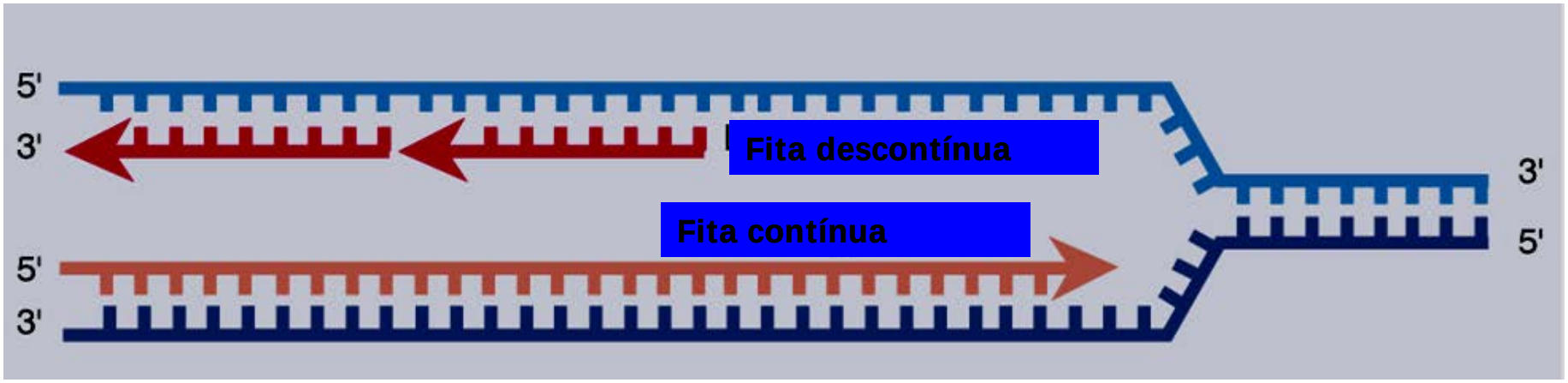
A replicação numa das fitas apresenta um "problema"

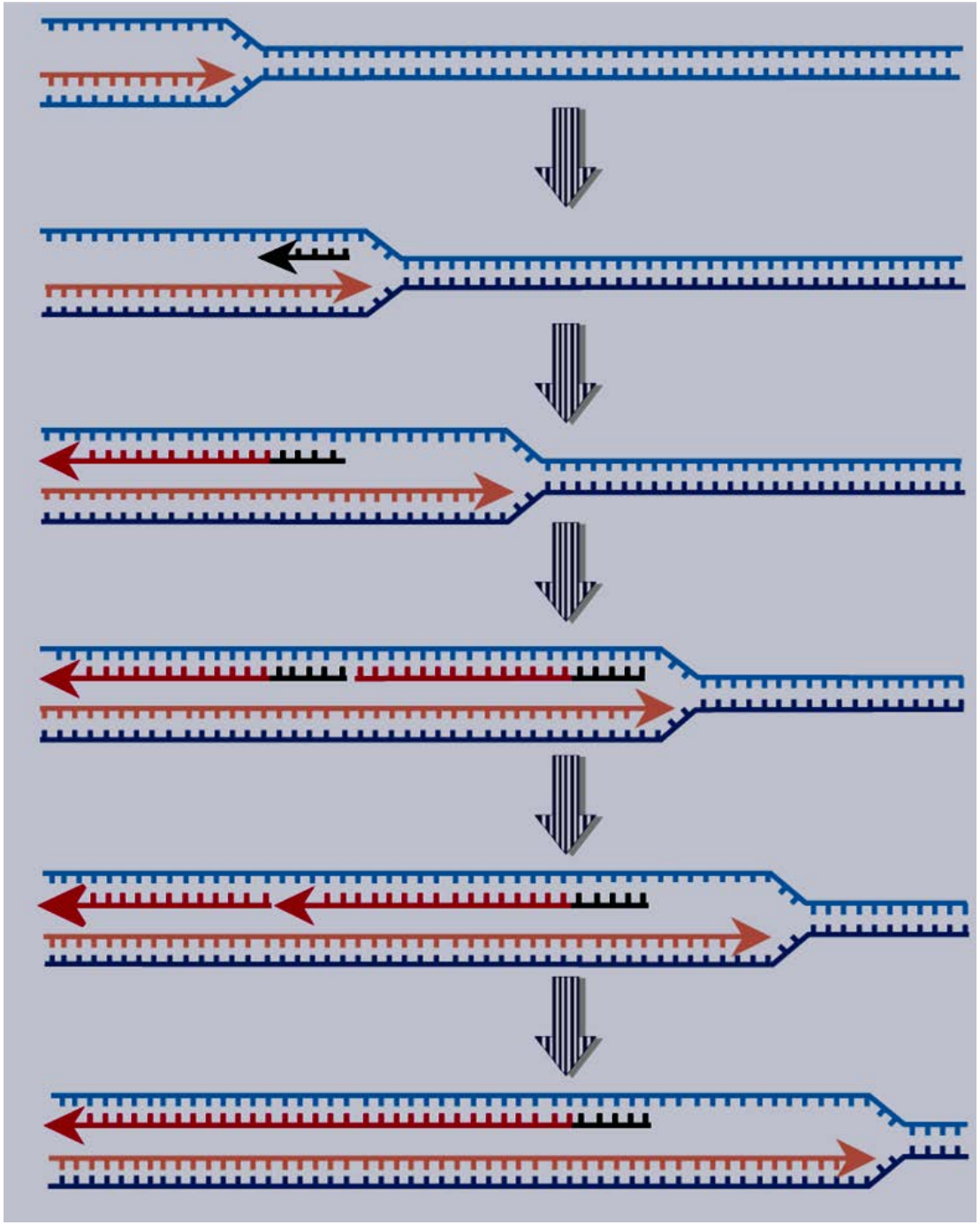



3′
5′
Fita contínua (líder)
Movimento da forquilha
3′
5′
5′
3′
Okazaki
fragments
5′
3′
3′
5′
Fita descontínua


3'
5'
Fita contínua (líder)
3'
3'
5'
Fita descontínua
5'
3'
5'
Fitas parentais
Fragmentos de Okazaki
Movimento da Forquilha de Replicação

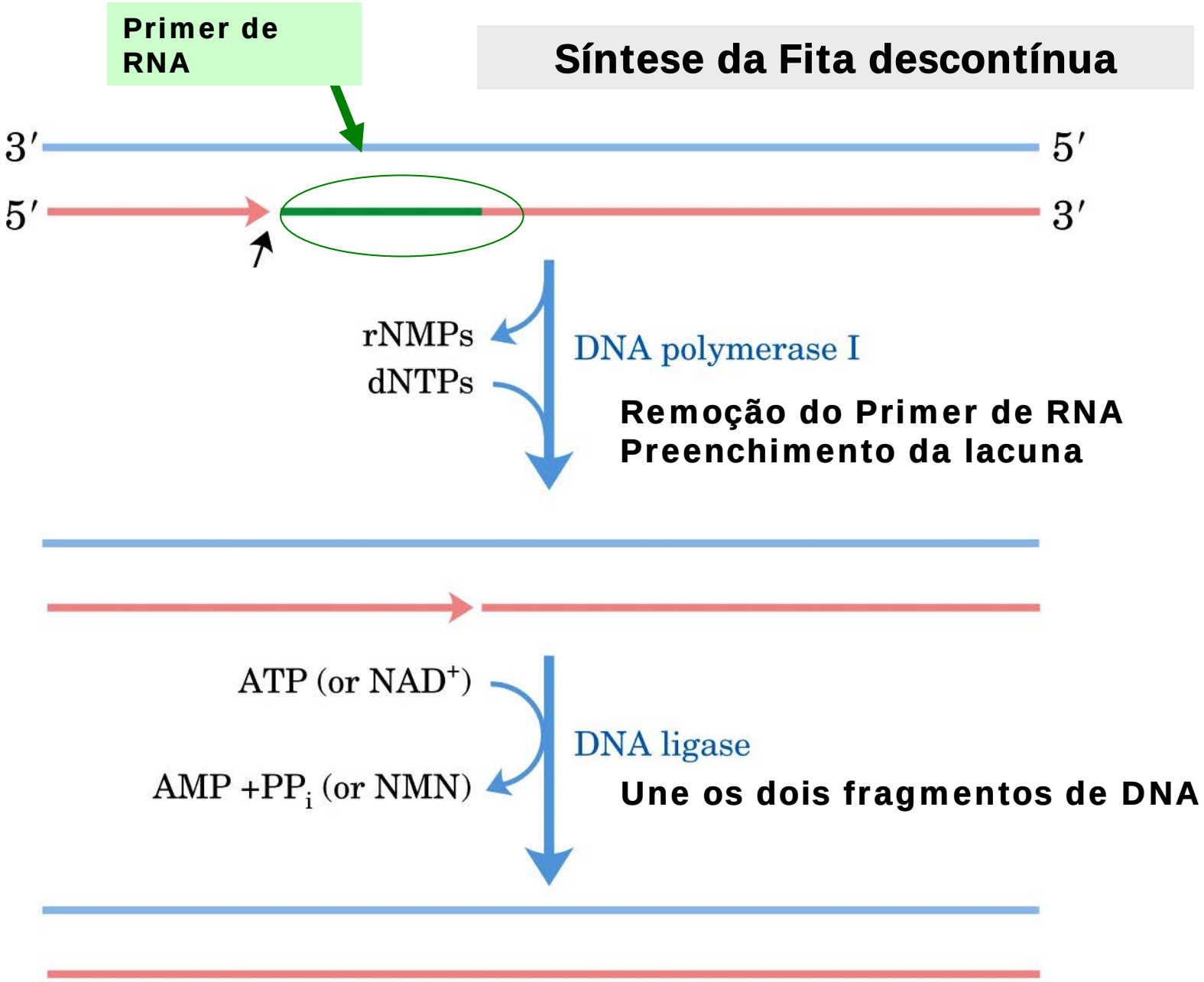
A síntese do DNA é semi-descontínua e requer vários iniciadores (primers) de RNA para síntese da fita descontínua



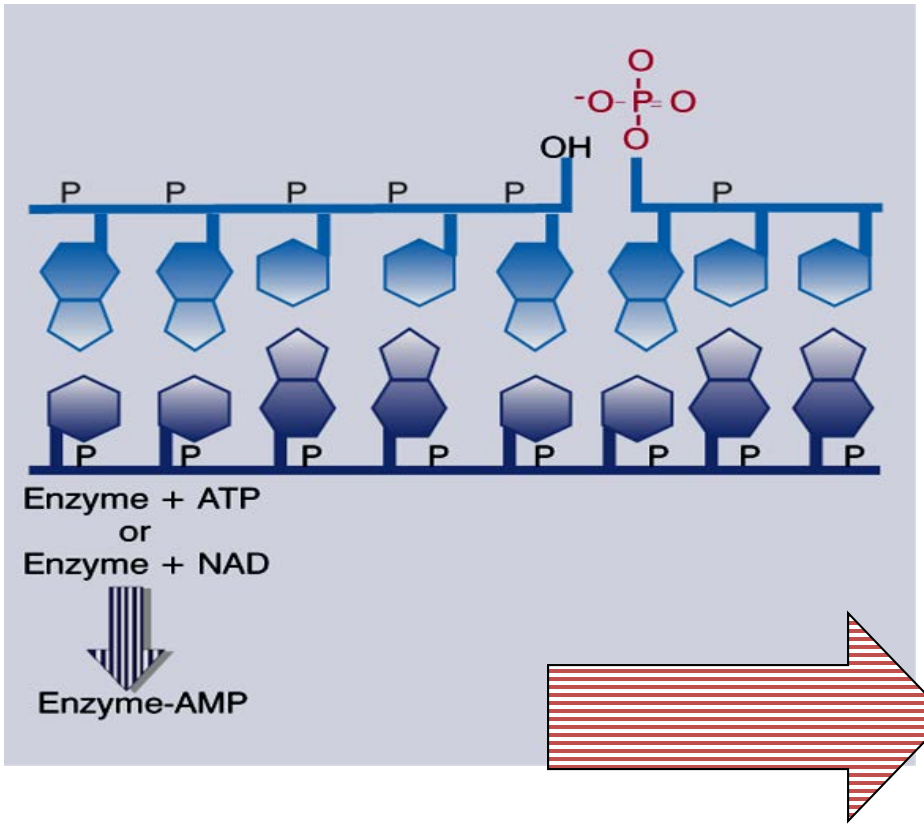


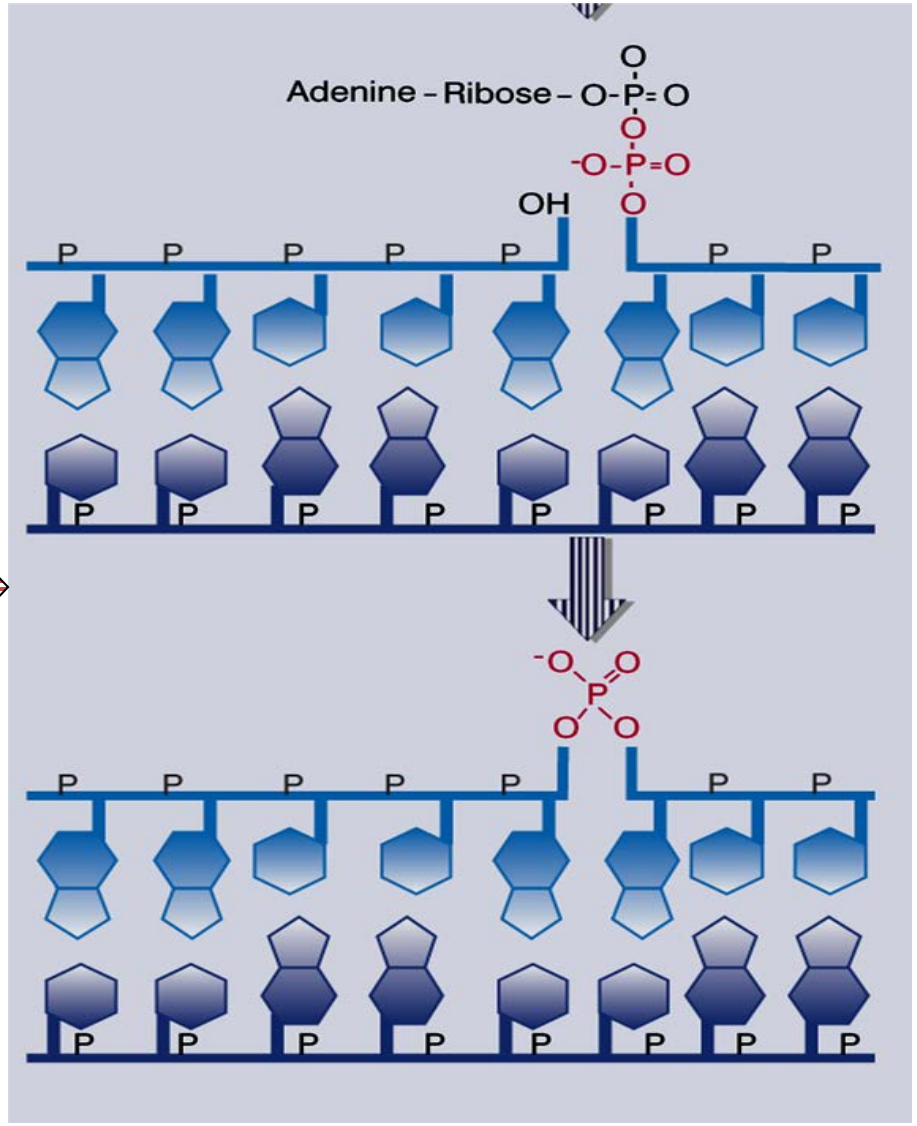
- **Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua**
- **A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA**
- **A DNA polimerase I remove o primer de RNA e preenche as lacunas**
- **A DNA ligase sela as quebras**

Síntese da Fita descontínua

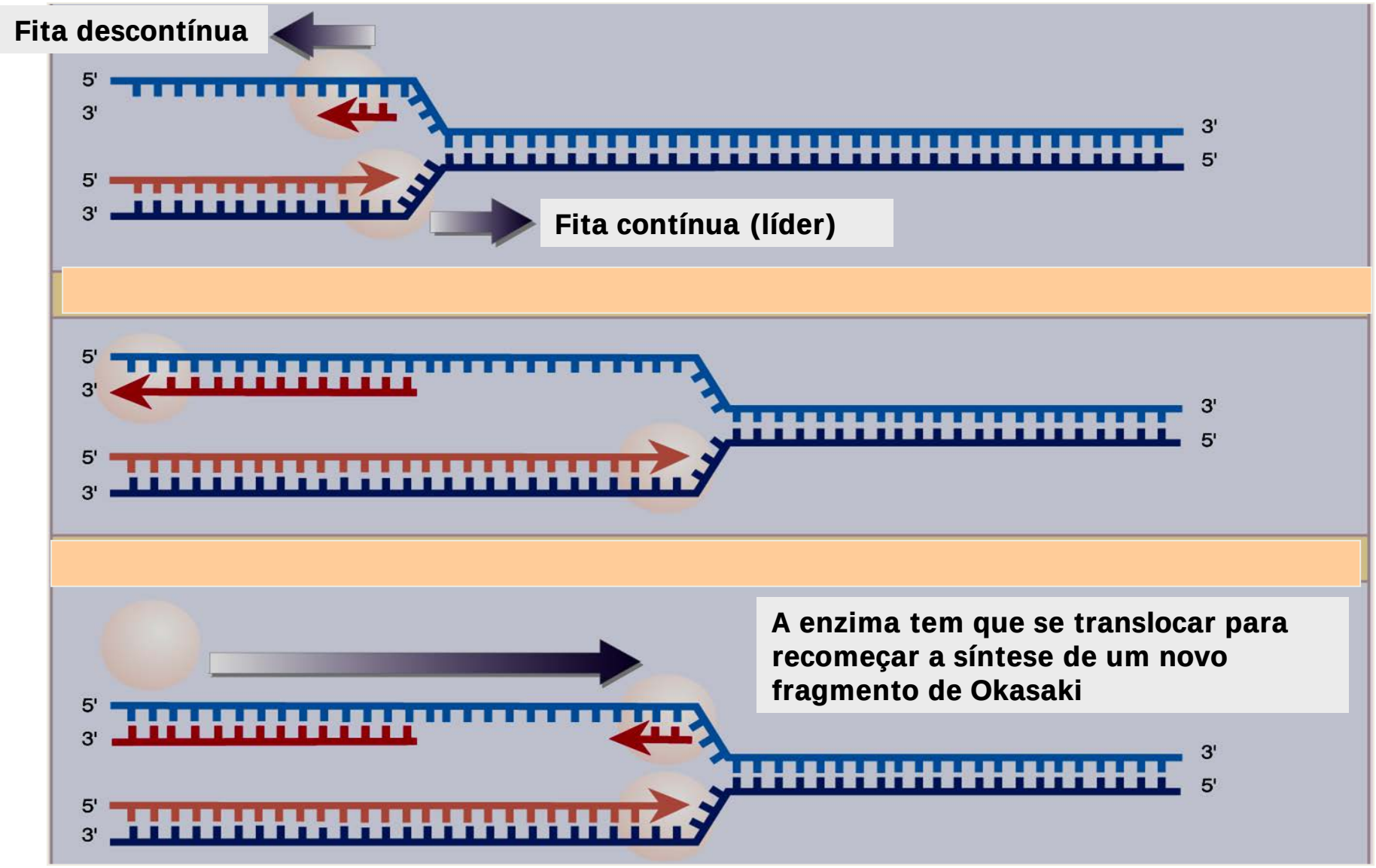


A DNA ligase sela as quebras



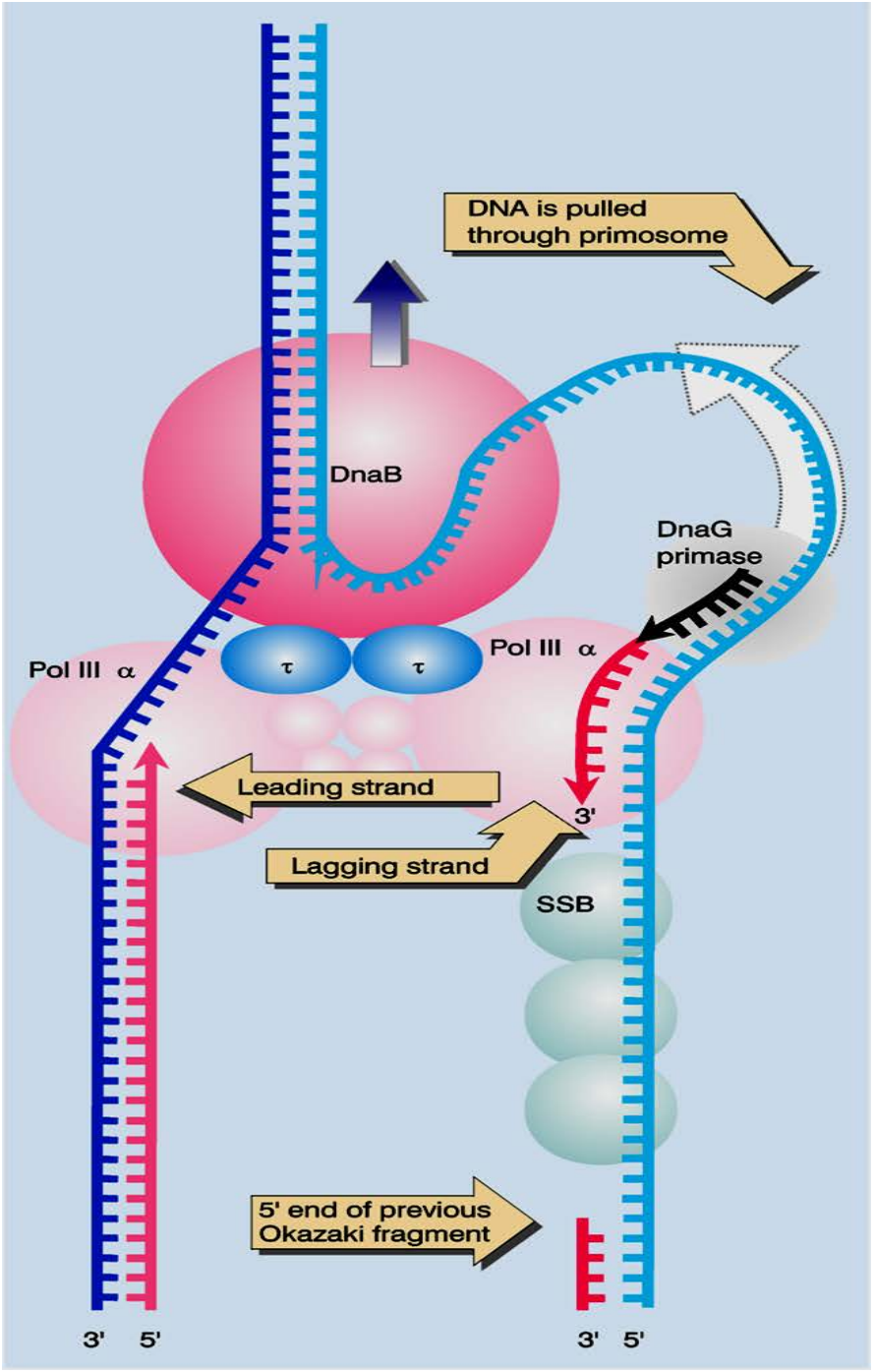


Síntese das fitas contínua e descontínua é independente

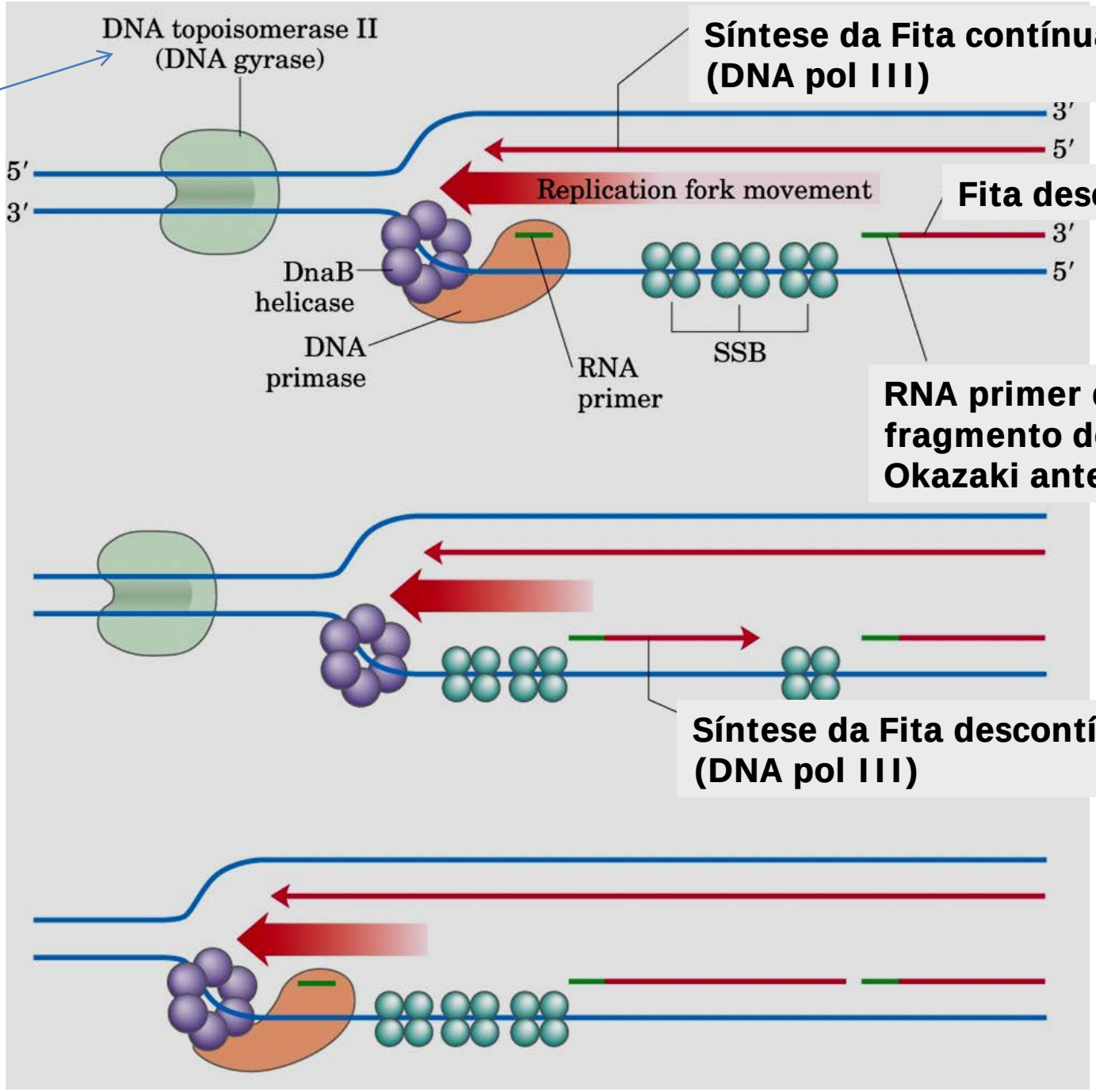


O complexo de replicação

- 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 mantém as fitas parentais separadas



Prepara a dupla hélice para ser desenrolada

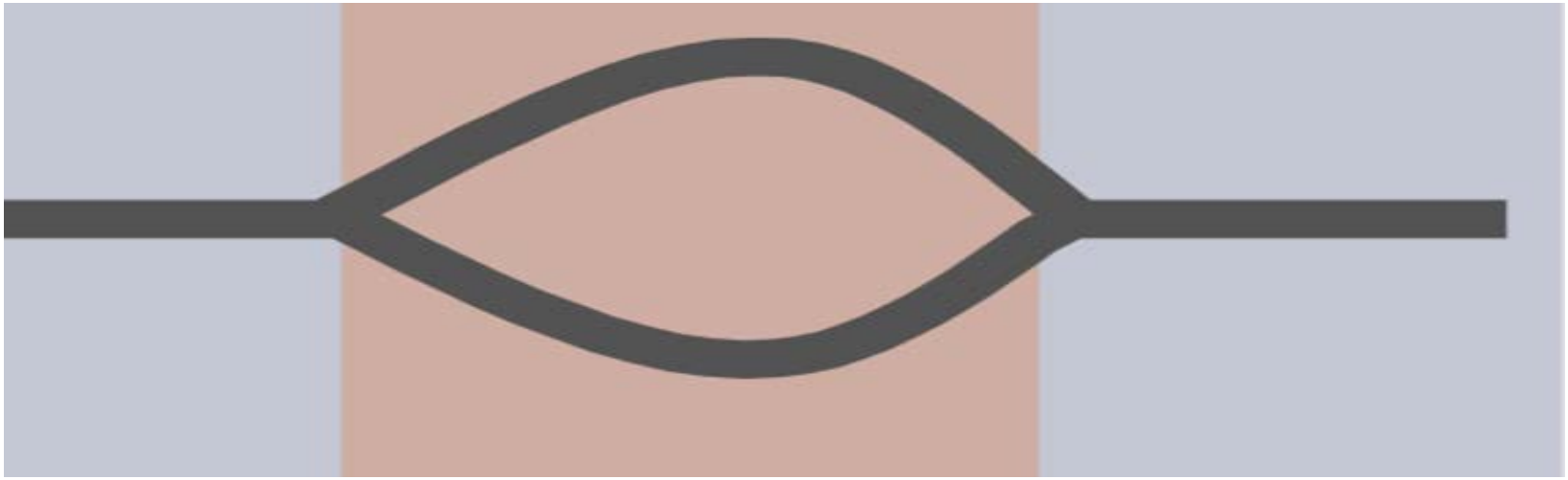


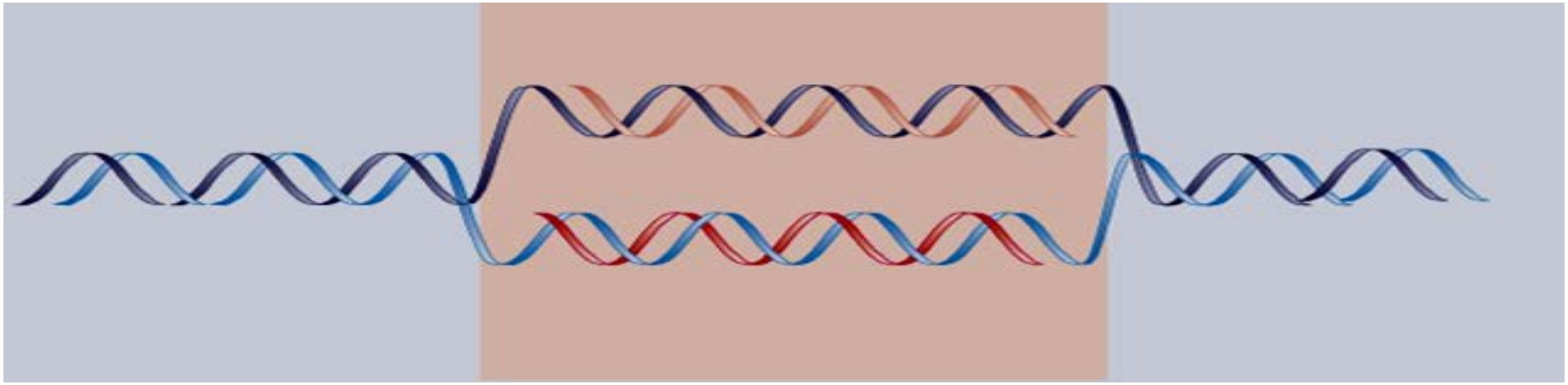
Proteínas presentes na forquilha de Replicação de *E.coli*

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

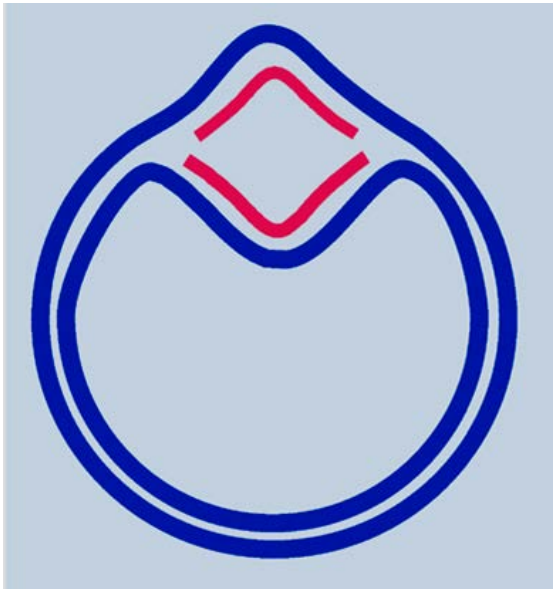
Filme

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

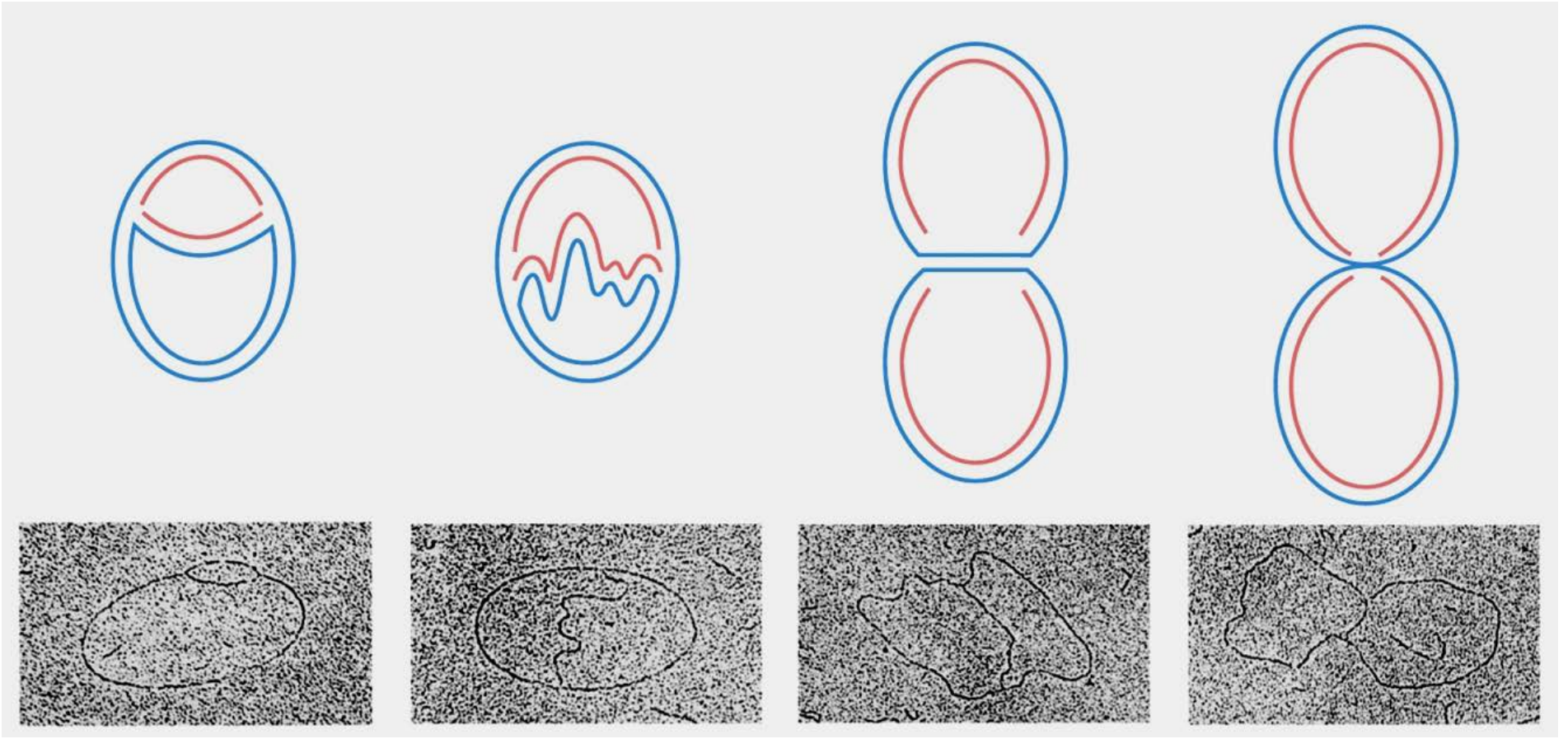




O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



A replicação do cromossomo circular



Velocidade de replicação

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

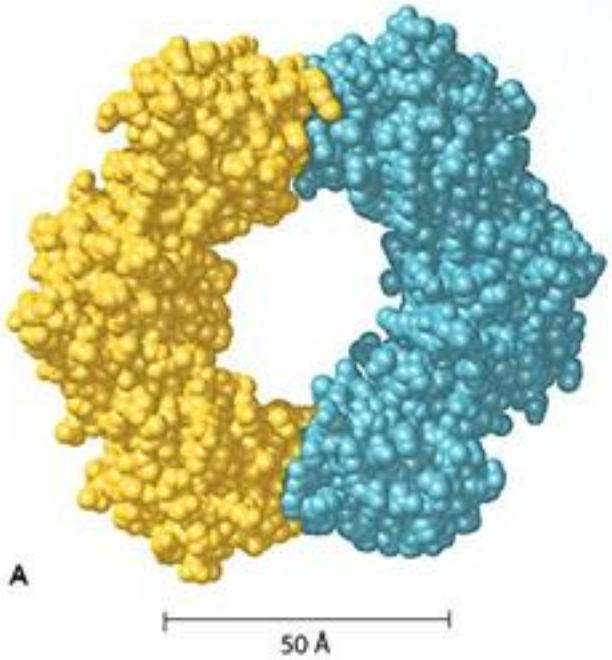
Pol III is processive :

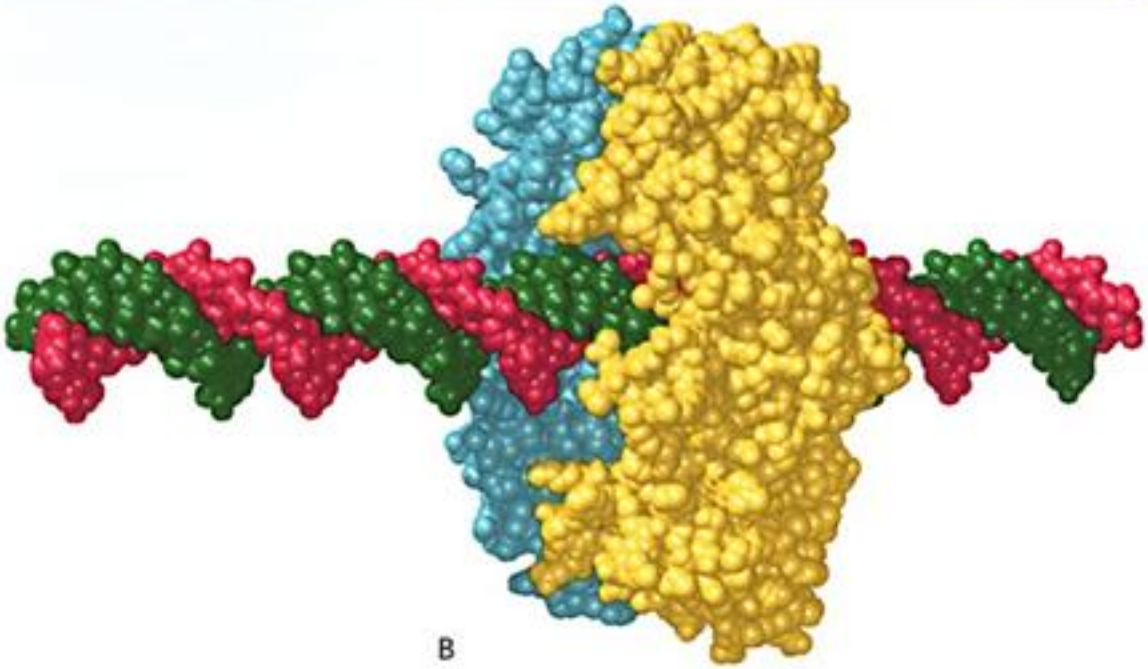
→Adds thousands of bases

→1000 / sec (Pol I is 10 / sec)*

Pol III

β_2 - dimers





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

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

Velocidade de replicação

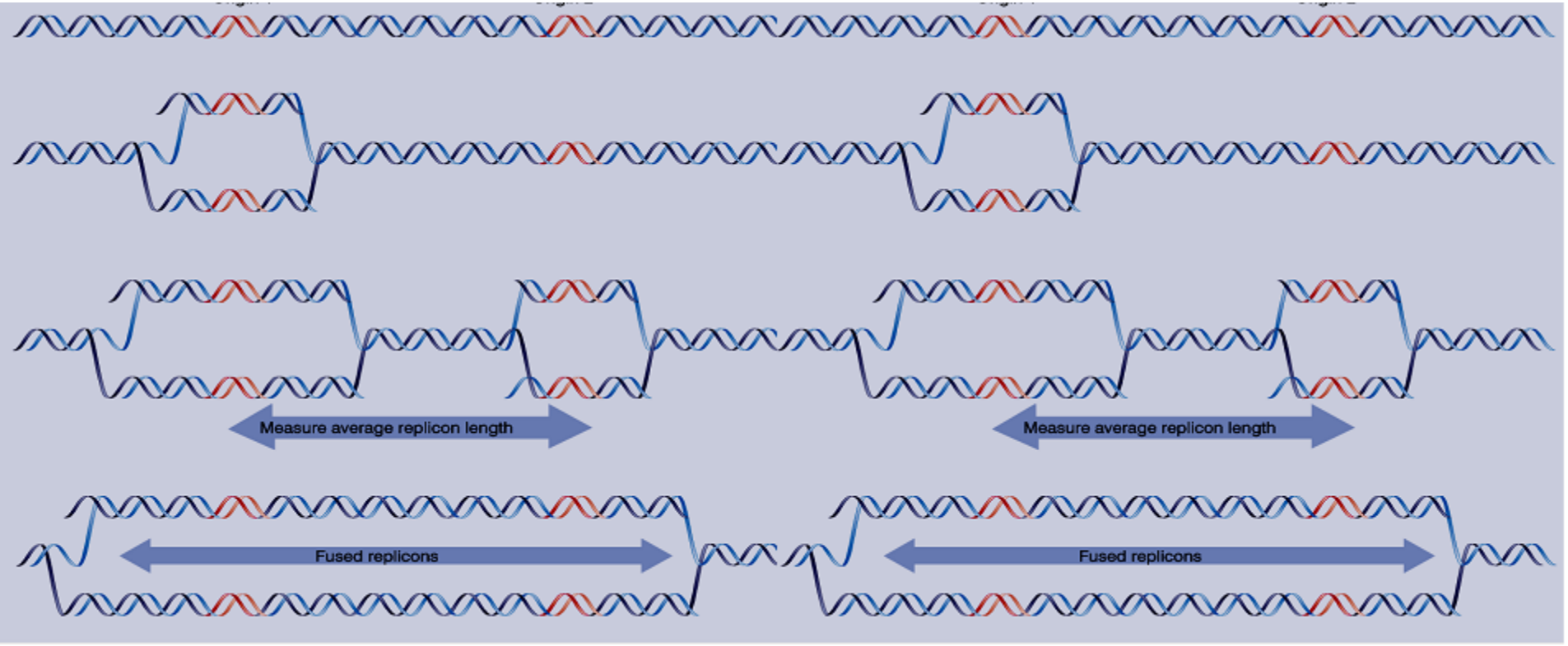
- A velocidade da forquillha de replicação em bactérias é de aprox. 1000 nucleotídeos/s
- Genoma: 4×10^6 pb
- $(4 \times 10^6) / 1000 = 4000$ s = 66 min
- Tempo de duplicação de um célula de *E. coli*
  - No laboratório, o tempo é de aprox. 20 min

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

Replicon:

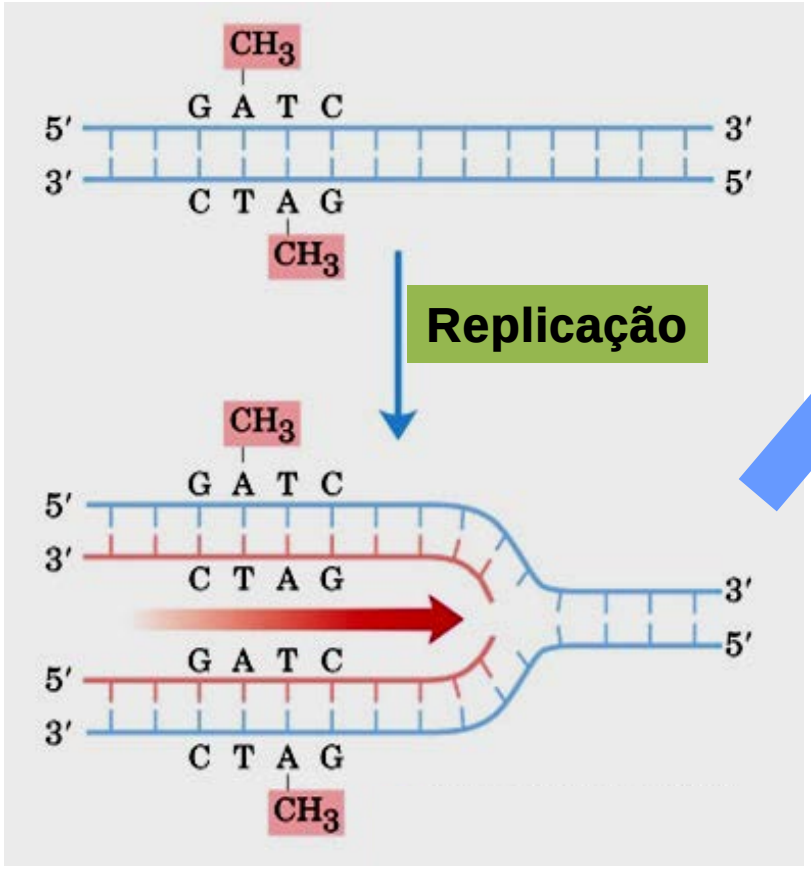
1. **Origem + Término**
2. **Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular**
3. **O genoma de uma célula procariótica em geral constitui um único replicon**
4. **Cada cromossomo eucariótico constitui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente**

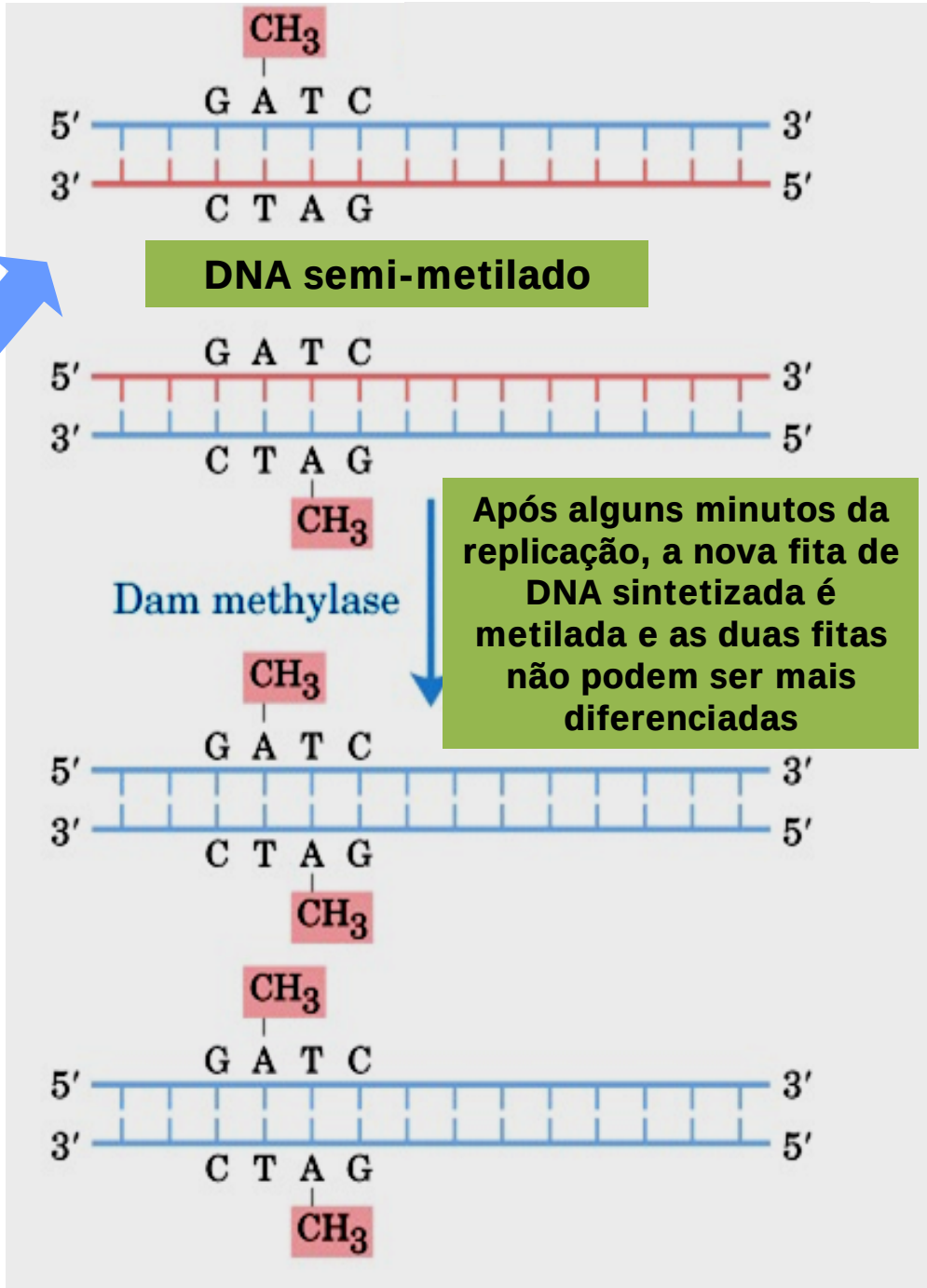
O genoma eucariótico constitui-se de vários replicons



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

Reparo para correção de erro após a replicação

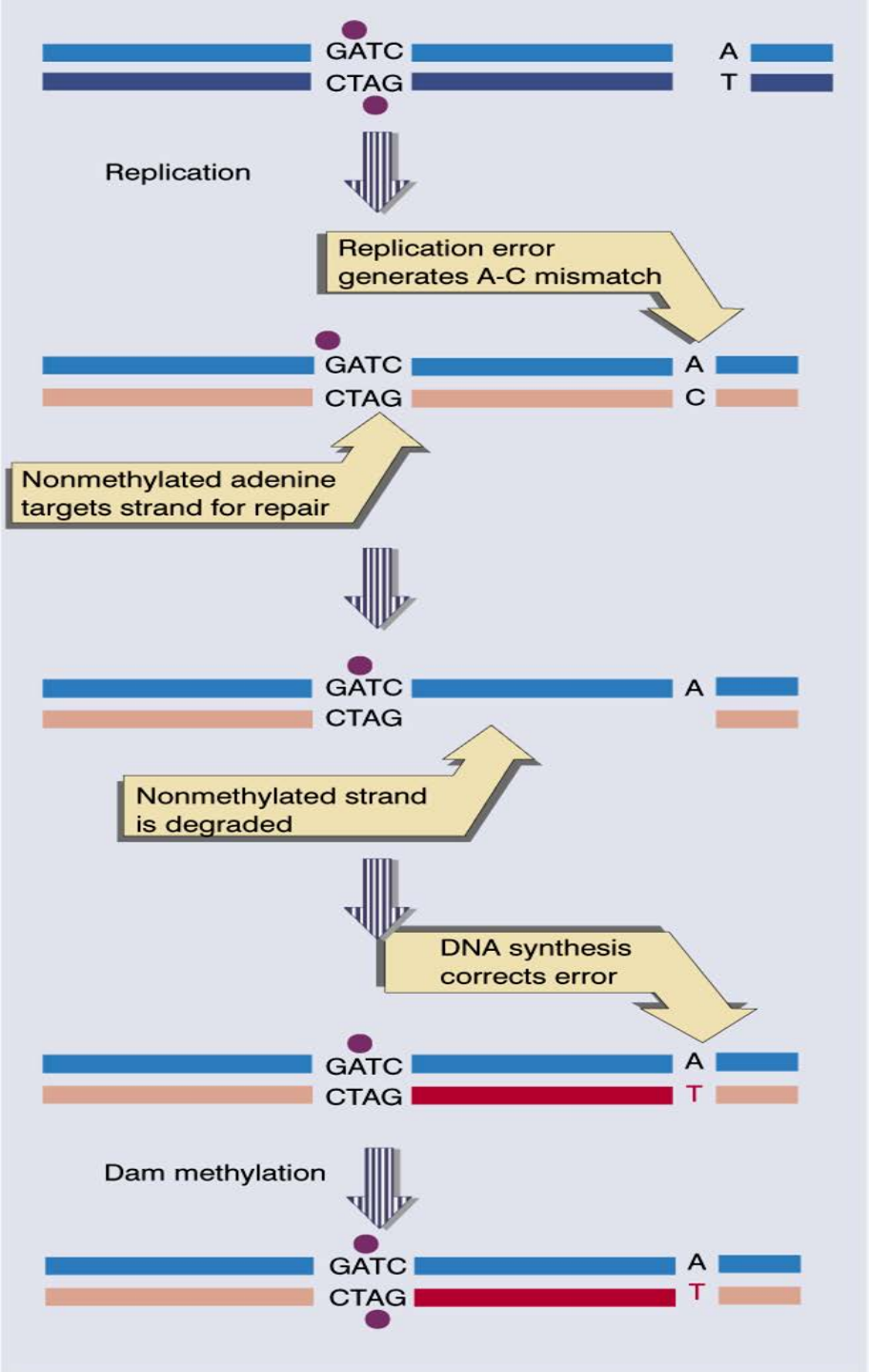




Metilação da adenina no sítio GATC identifica qual a fita é a parental

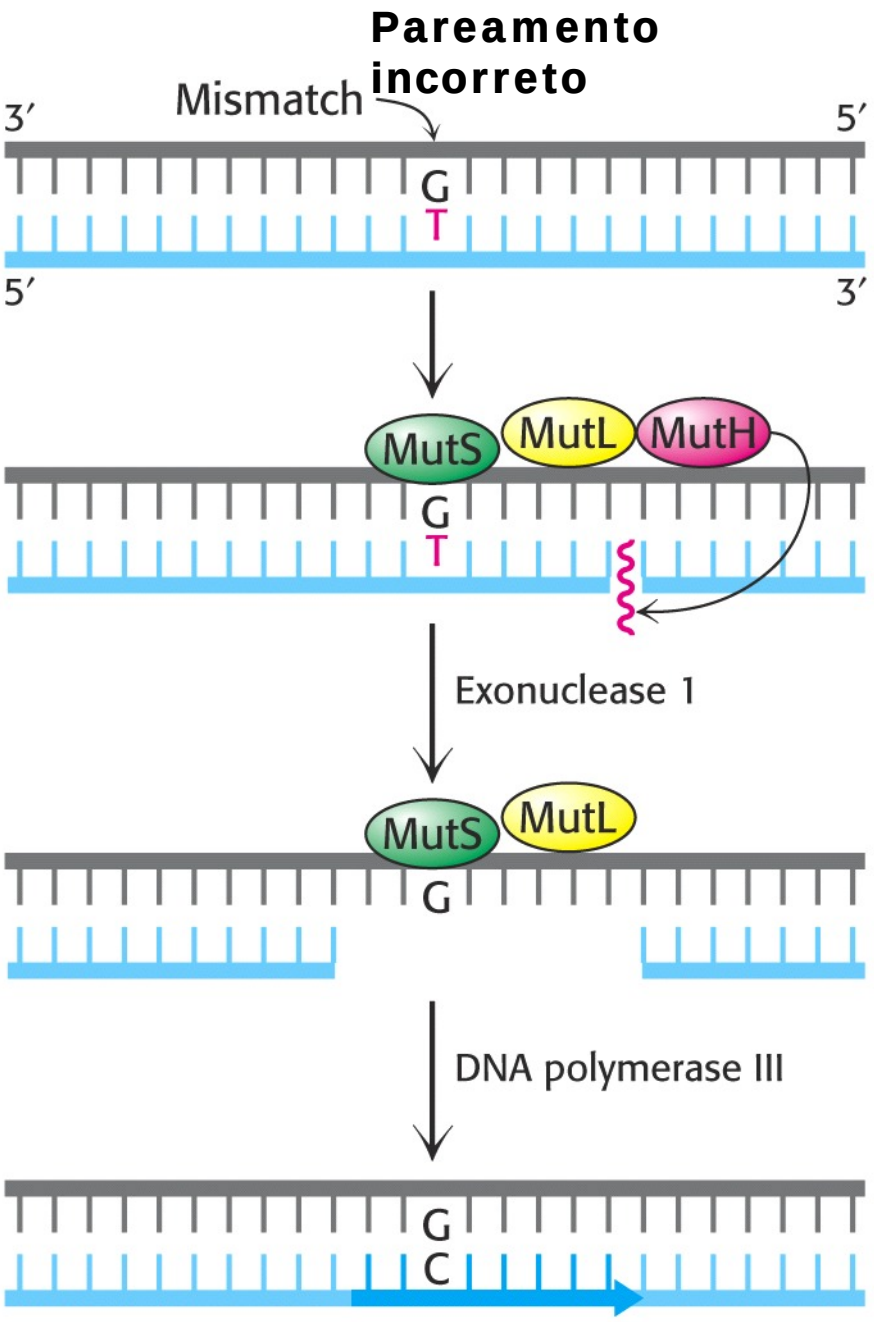
Reparo para correção de erro

- **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**



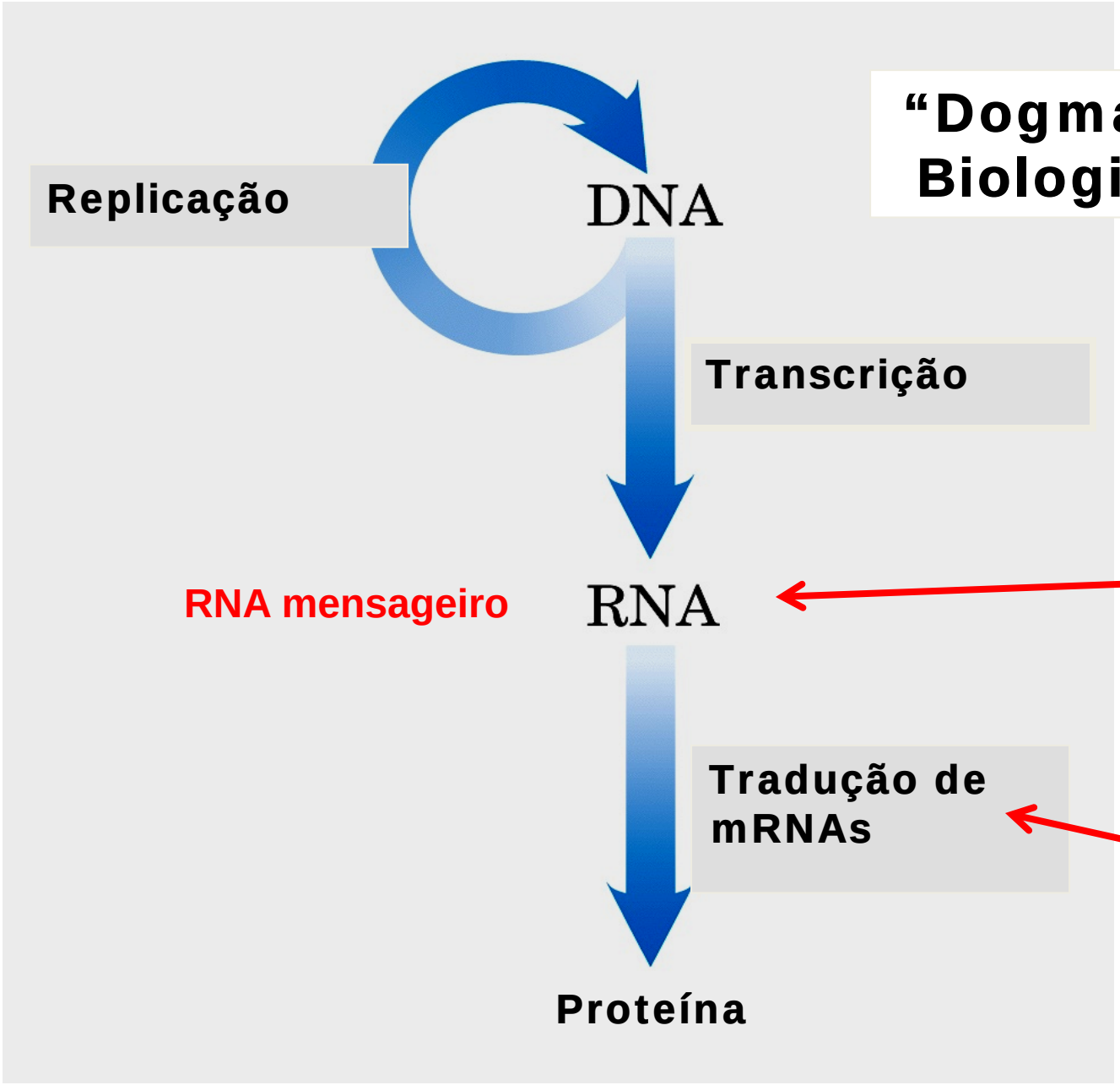
Reparo para correção de erro

- 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