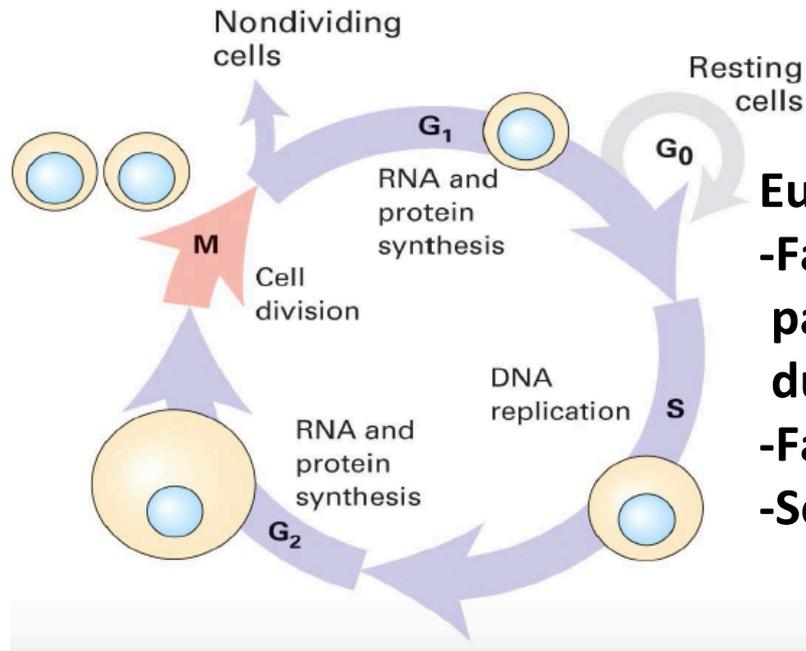


Fundamentos de Biologia Molecular

Replicação do DNA

Aula 7
2022

Duplicação do DNA: ocorre em período bem definido e uma única vez a cada ciclo celular



- Eucariotos: síntese ao longo da fase S**
- Fases preparatórias (G1 e G2, para que o DNA seja corretamente duplicado e segregado)
 - Fase de síntese (S)
 - Separação das fitas na mitose (M)

Procaríotos:

- período de replicação
- período de segregação do nucleóide
- divisão

Síntese de DNA

- **A replicação está baseada no pareamento das bases da dupla hélice do DNA**
- **Replicação é semiconservativa**
- **A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases**
- **As fitas do DNA são antiparalelas**
- **Processo básico é semelhante nos eucariontes e procariontes**

Geral: Síntese do polímeros DNA/RNA

Básico:

- Fita molde
- Complementariedade de bases nitrogenadas (G-C, etc);
- Substratos (trinucleotídeos- desoxi e/ou ribonucleotídeos)
- Polimerases (DNA polimerases, RNA polimerases adição de nucleotídeos no sentido 5'- 3'; ligações fosfodiester);
- Outras proteínas (diferentes funções).

Etapas:

- Iniciação
- Elongação
- Término

Substratos das Polimerases

Ribonucleotídios (ribose)

ATP

GTP

TPP

CTP

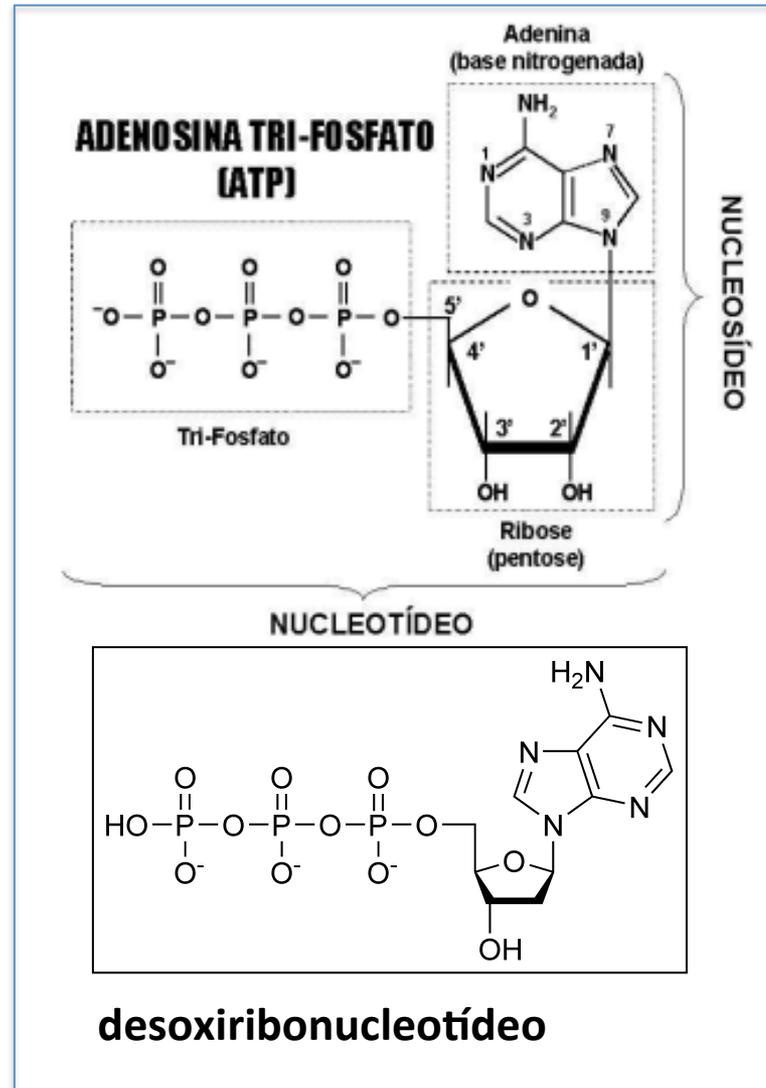
Desoxiribonucleotídios (desoxiribose)

dATP

dGTP

dTPP

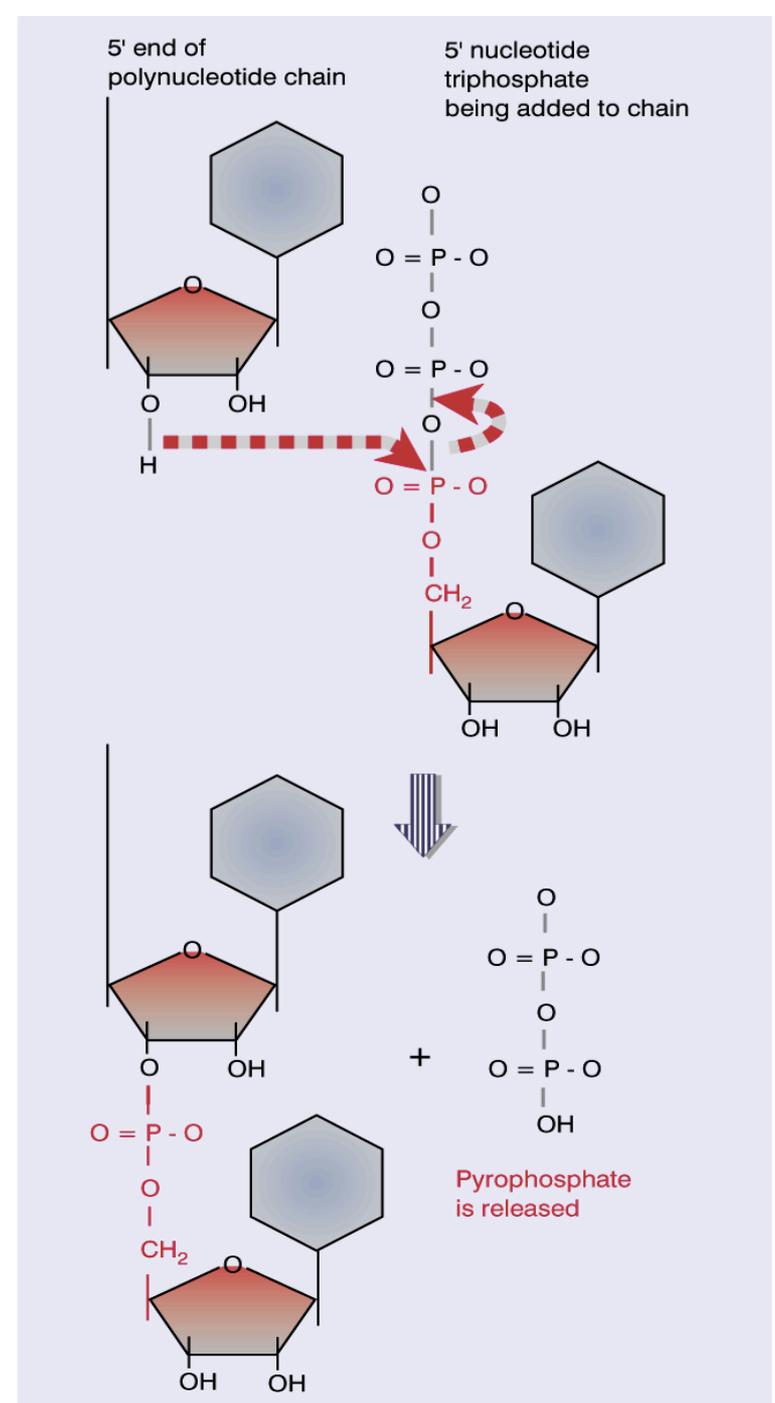
dCTP



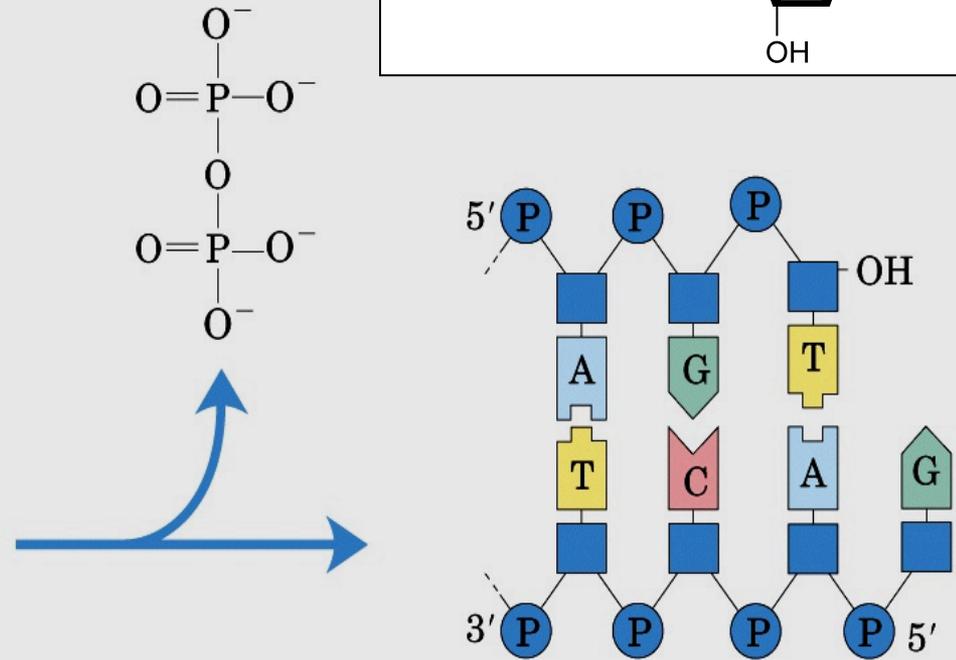
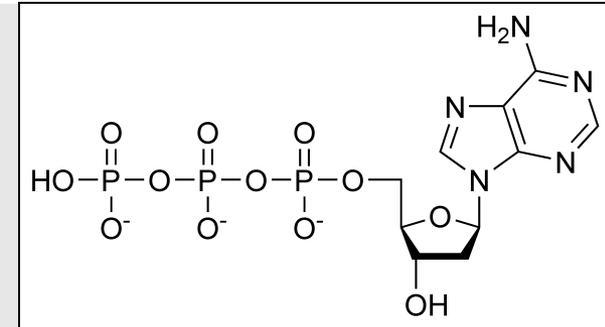
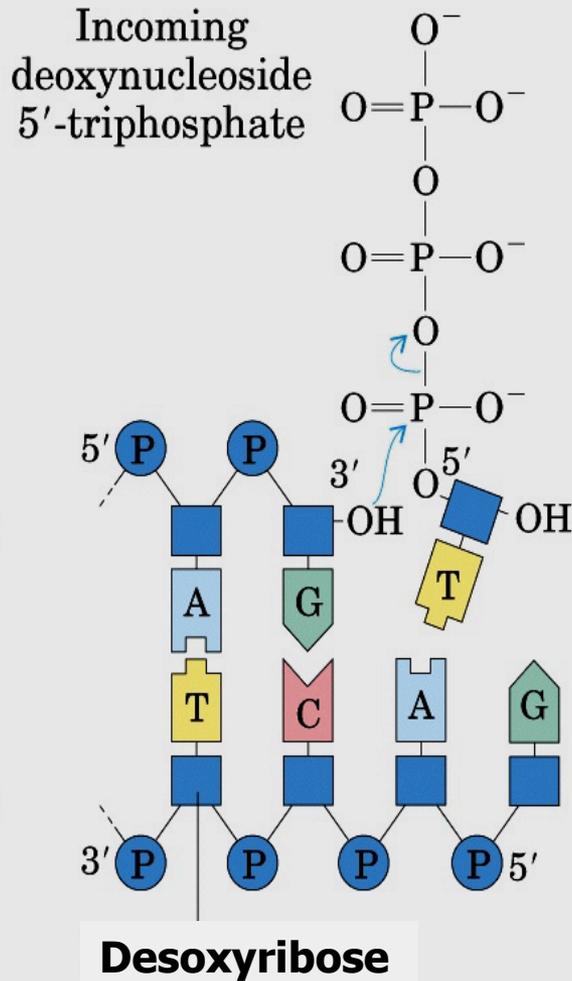
Síntese de RNA: formação da ligação fosfodiéster envolve o ataque nucleofílico do 3' OH da cadeia crescente no fosfato do carbono 5' do ribonucleosídeo trifosfatado que será incorporado

Síntese de DNA: : formação da ligação fosfodiéster envolve o ataque nucleofílico do 3' OH da cadeia crescente no fosfato do carbono 5' do desoxiribonucleosídeo trifosfatado que será incorporado

Substratos: ribonucleotídios ou desoxiribonucleotídios de acordo com a síntese



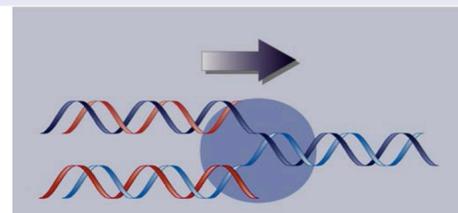
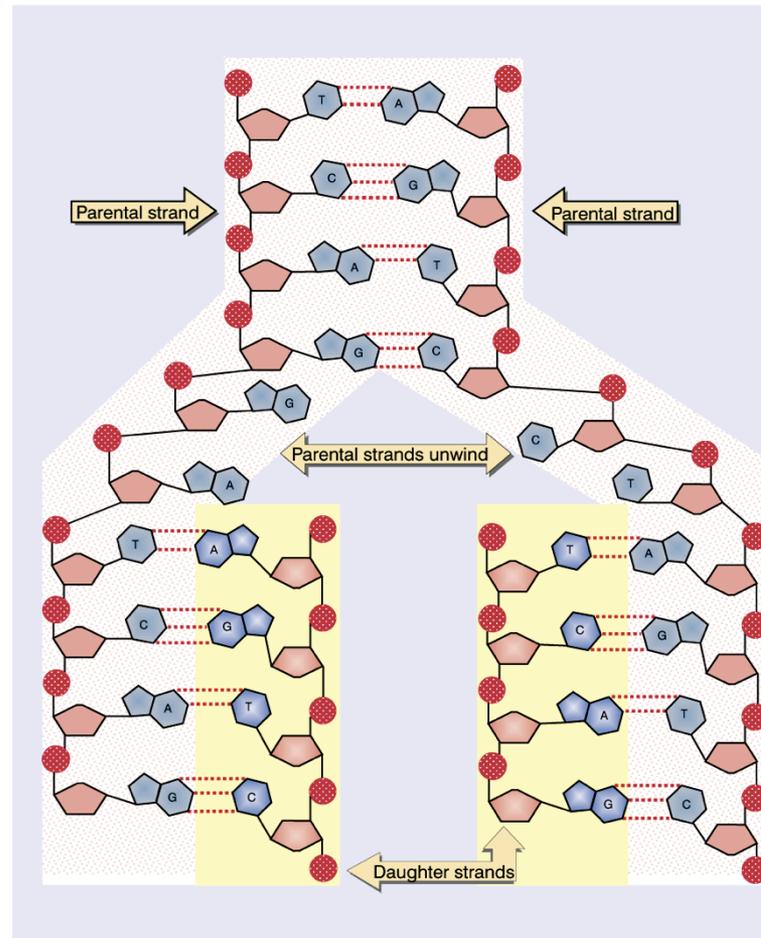
Síntese de ácidos nucleicos



A replicação está baseada no pareamento das bases da dupla hélice do DNA. A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases

Humanos- cerca de 3 bilhões de pares de bases/ célula a serem duplicadas em cada ciclo celular.

Humanos- ~ 1 trilhão de células



Forquilha de replicação

Síntese de DNA

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

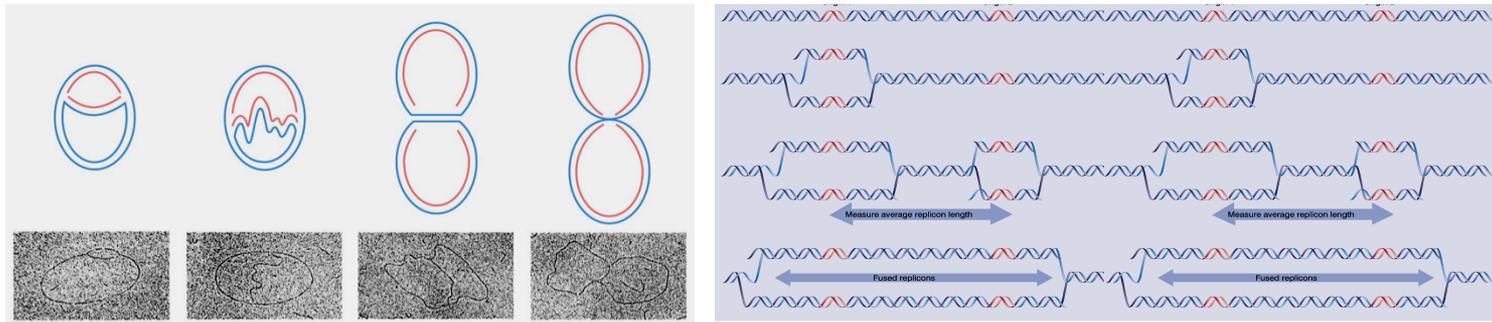
Replicon:

- 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**

Origem de replicação: Replicon

Procariotos- 1 origem de replicação

Eucariontes- várias origens de replicação



Os replicons eucarióticos são iniciados em tempos diferentes. ~400 replicons. Se fosse 1 replicon- 500 hs para duplicar o DNA de eucariotos

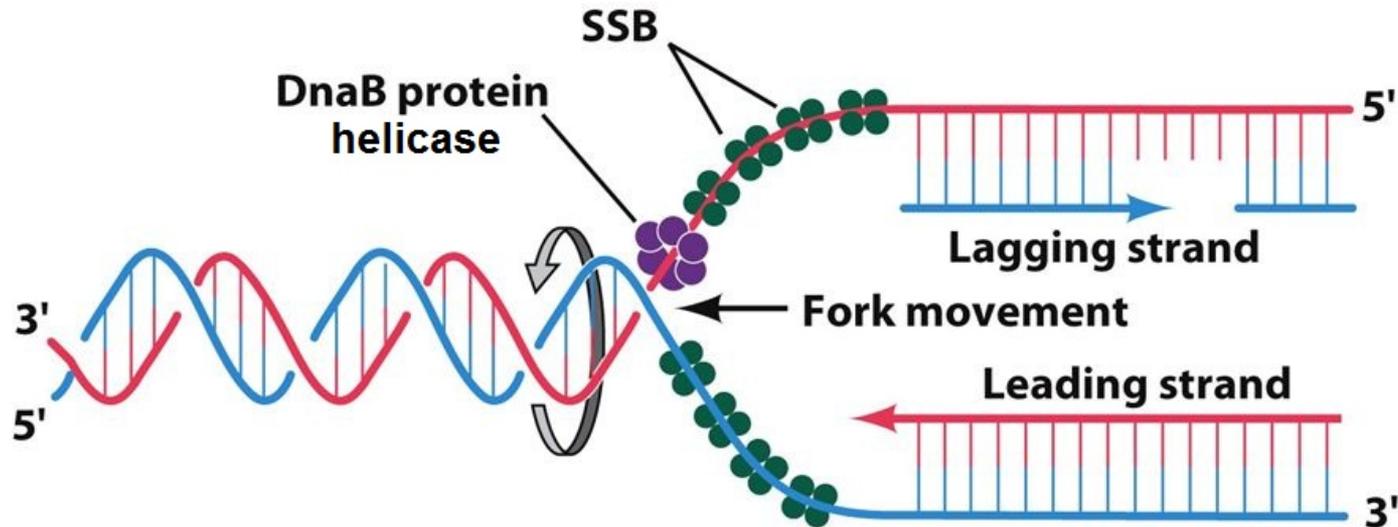
Fase S demora eucariotos ~ 6hrs em uma célula somática

A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2.000pb/min (~1/20 de *E. coli*)

Síntese de DNA

- Origem de replicação. Regiões onde as fitas se abrem para que ocorra a duplicação do DNA. Determinam quando e onde se inicia a duplicação.
- Proteínas envolvidas na replicação formam o **Replissomo** (arranjo como fábricas de síntese, com as polimerases, helicases, primases, etc)
- **Substrato de DNA e RNA polimerases:**
 - desoxiribonucleotídios
(dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
 - Ribonucleotídios. primer- RNA**
(ATP, CTP, UTP, GTP)
 - DNA polimerases: 14 em eucariotos; 5 em procariotos

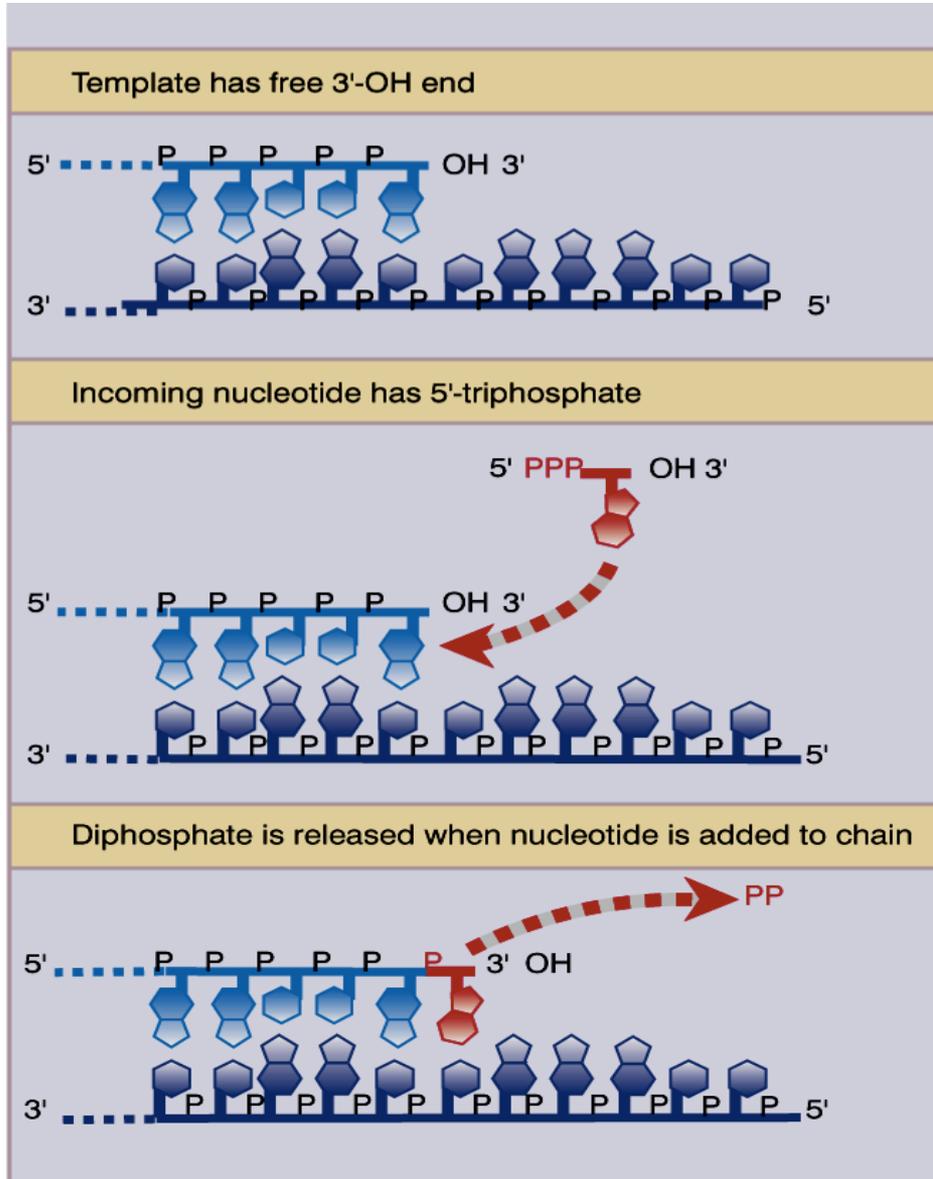
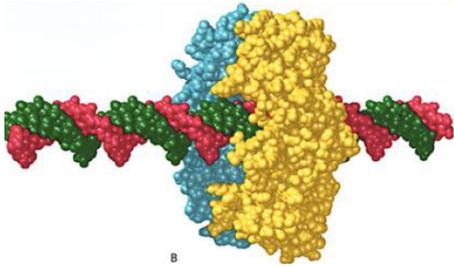
1ª etapa: a dupla-fita é desenrolada pela helicase



- Helicase (DNAB) desenrola o DNA, formando uma forquilha de replicação, com gasto de ATP
- Enzimas topoisomerases. (Topoisomerase II =DNA girase)- aliviam a tensão devido ao stress causado pela separação das fitas
- SSBs impedem a torção da fita simples, mantendo as fitas separadas

Elongação

DNA Polimerase III



Término da síntese

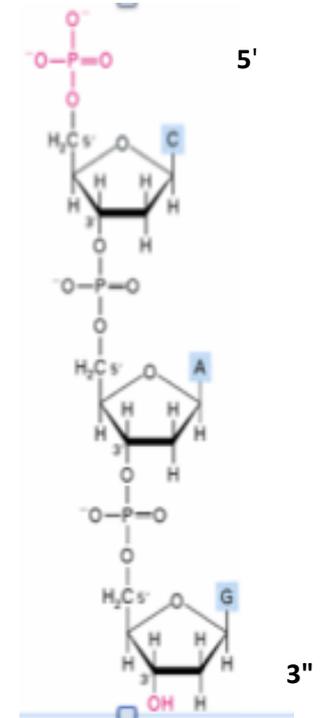
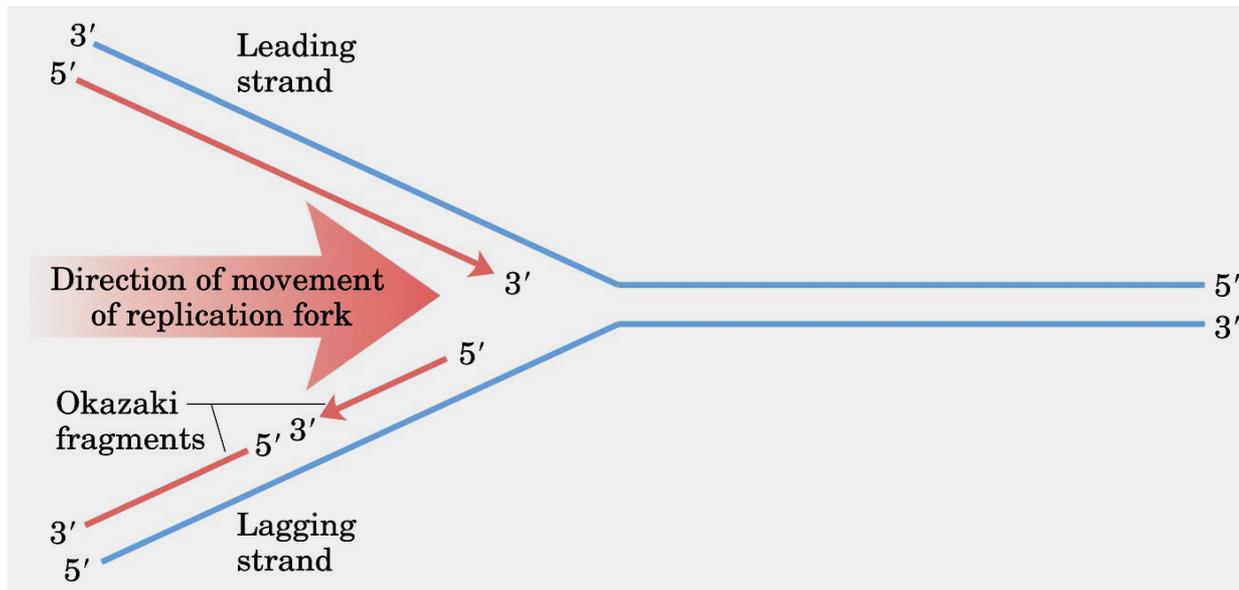
Cromossomos circulares- forquilha de duplicação é bidirecional; presença de sequências específicas de terminação (conhecidos como ter A, B, C, D e E).

Topoisomerases- para liberar a molécula de DNA entrelaçada.

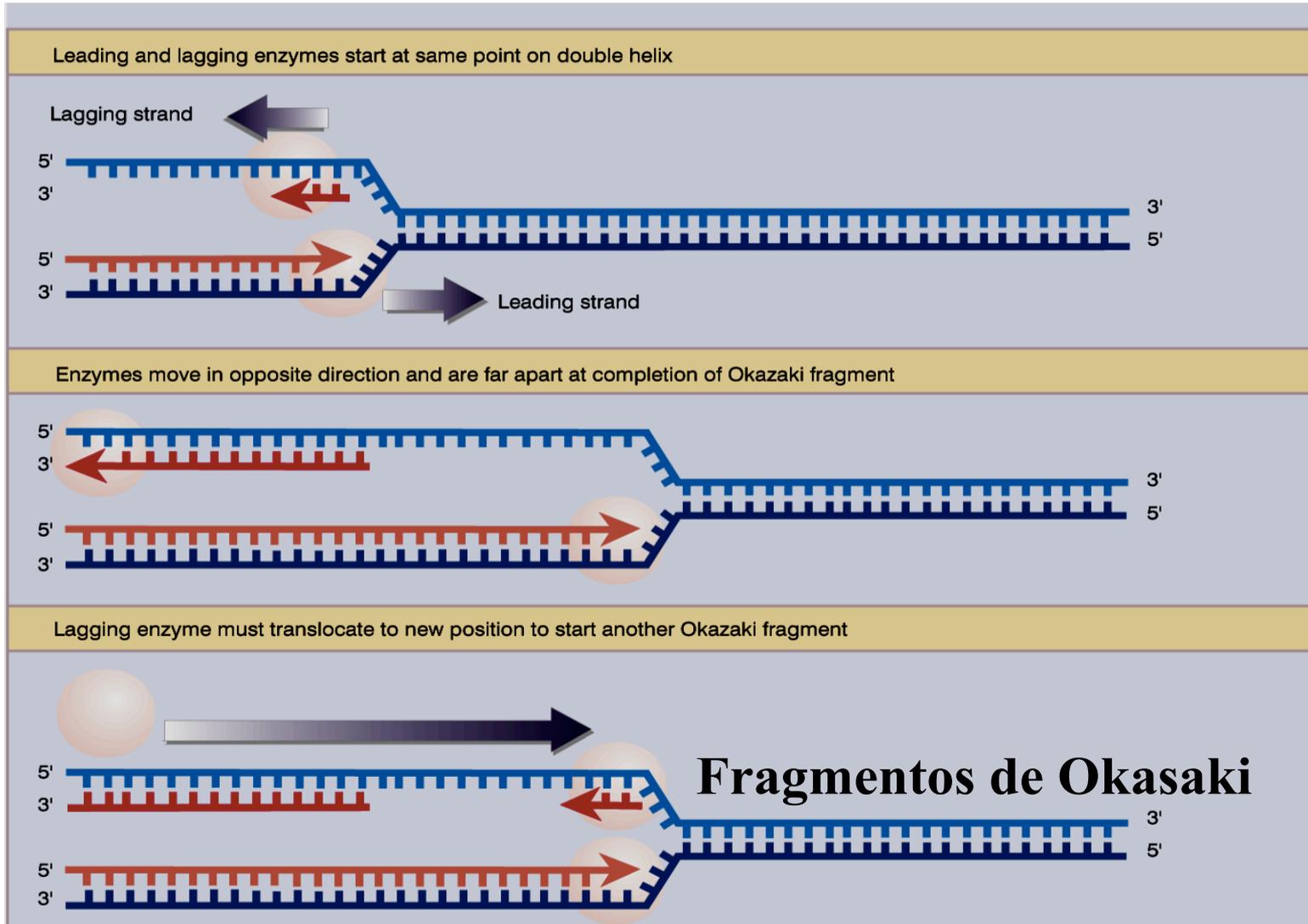
Cromossomos lineares- até encontrar nova forquilha

SÍNTESE- PROBLEMA 1:

- as duas fitas do DNA são sintetizadas ao mesmo tempo
- as fitas são antiparalelas: uma fita mãe é 5'- 3'e a outra é 3'- 5'
- a fita só cresce na direção 5'- 3'



Síntese das fitas contínua e descontínua é independente



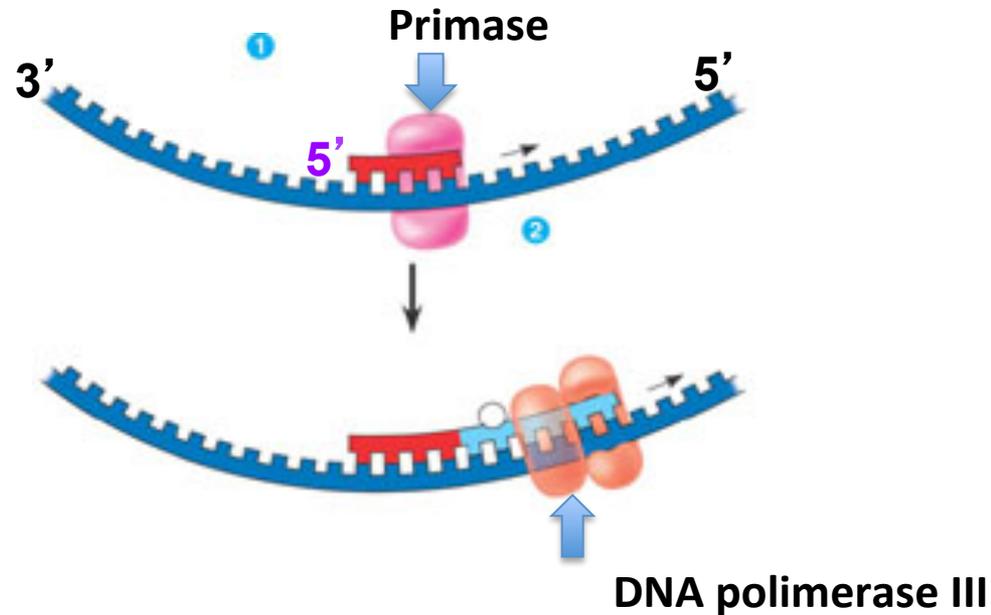
Polimerase III de DNA

Problema 2:

A DNA polimerase não consegue iniciar o polímero

PRIMASE: RNA polimerase inicia a fita.

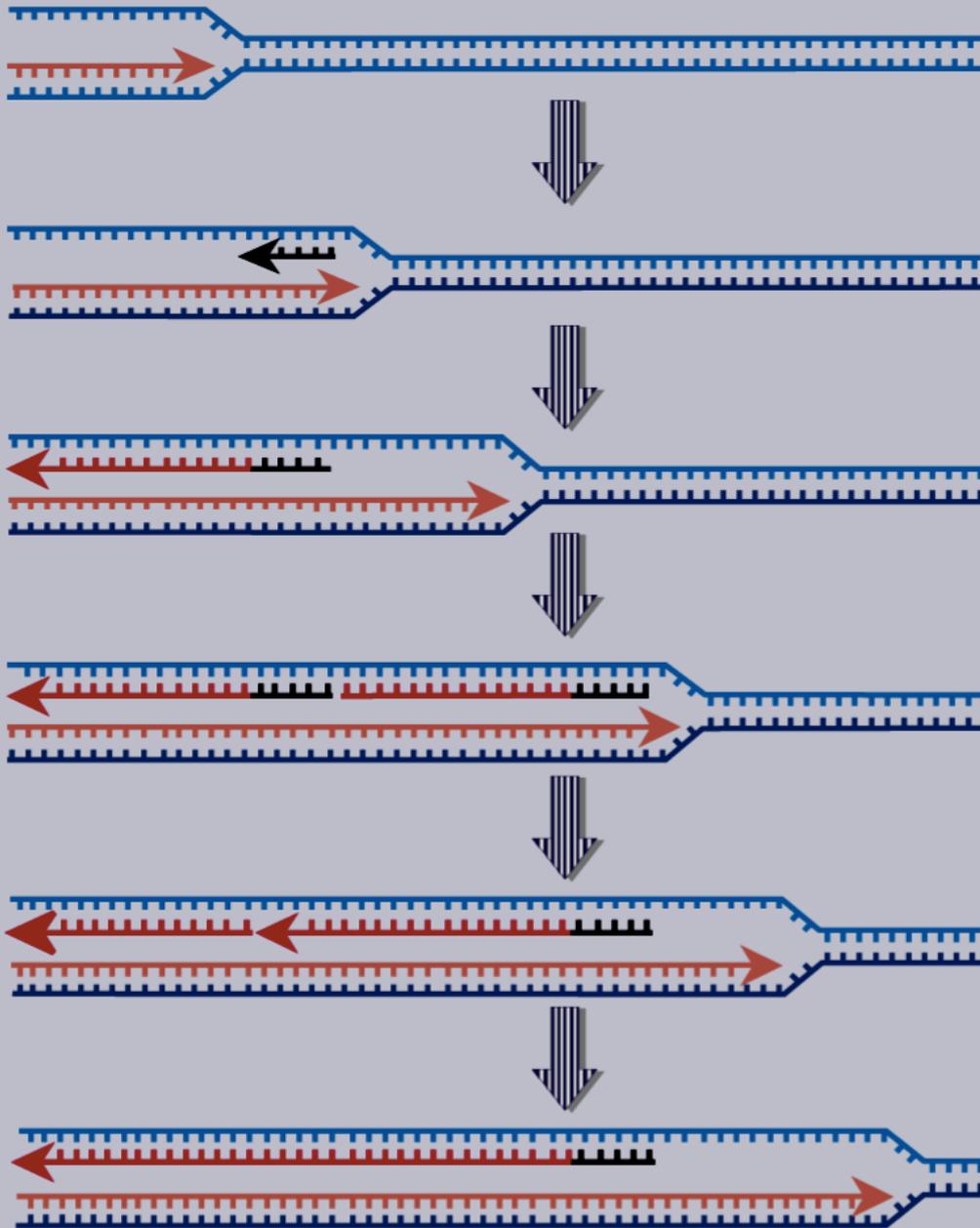
Primer de RNA pequeno (4-15 nucleotídios)



A primase forma *primers* de RNA

- na fita contínua: uma vez

- na fita descontínua: múltiplas vezes, a cada 100- 200 bases)



Primase
synthesizes RNA

DNA polymerase III
extends RNA primer
into Okazaki fragment

Next Okazaki
fragment is
synthesized

DNA polymerase I
uses nick translation
to replace RNA primer
with DNA

Ligase seals the nick

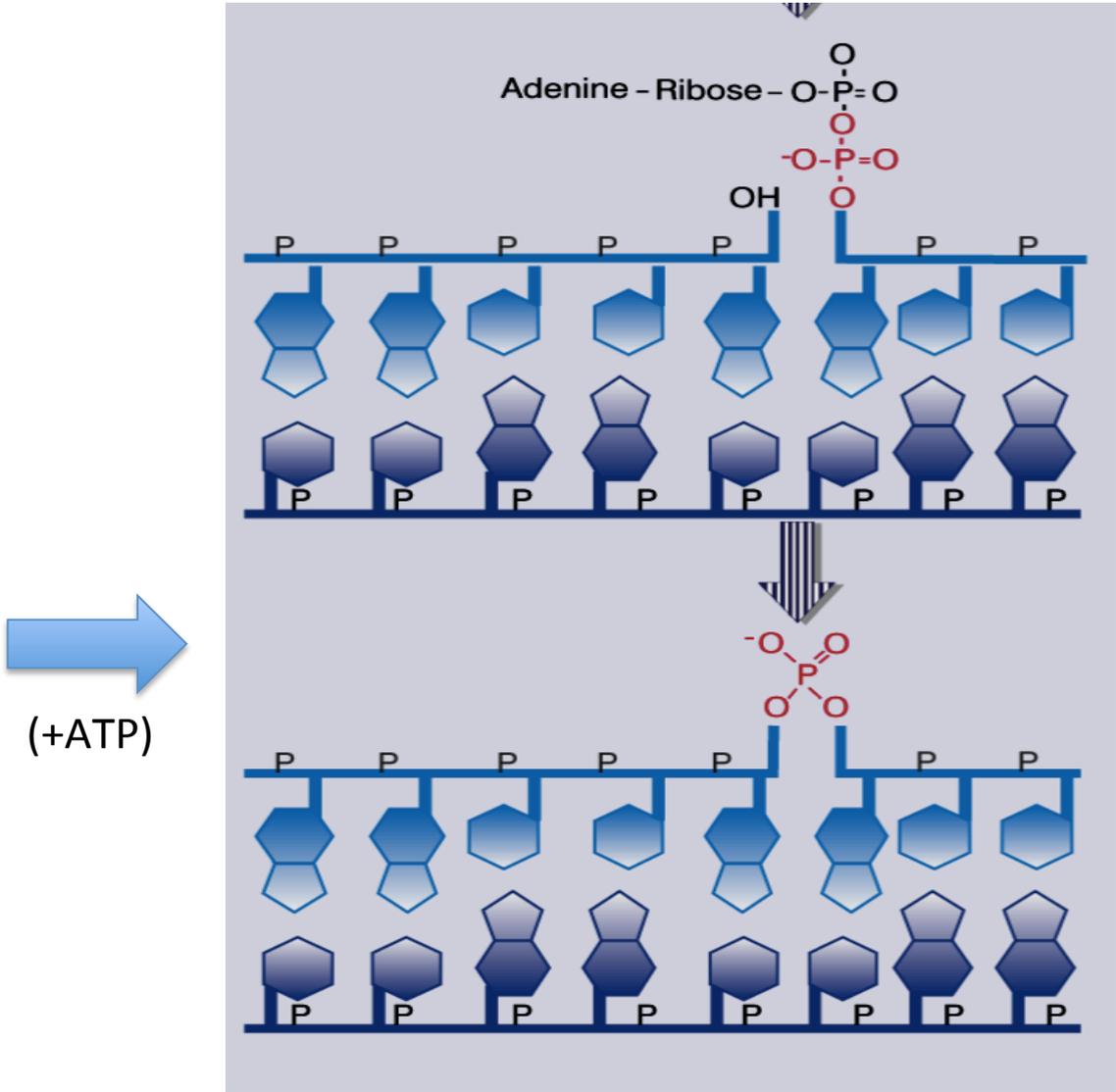
- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

- 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

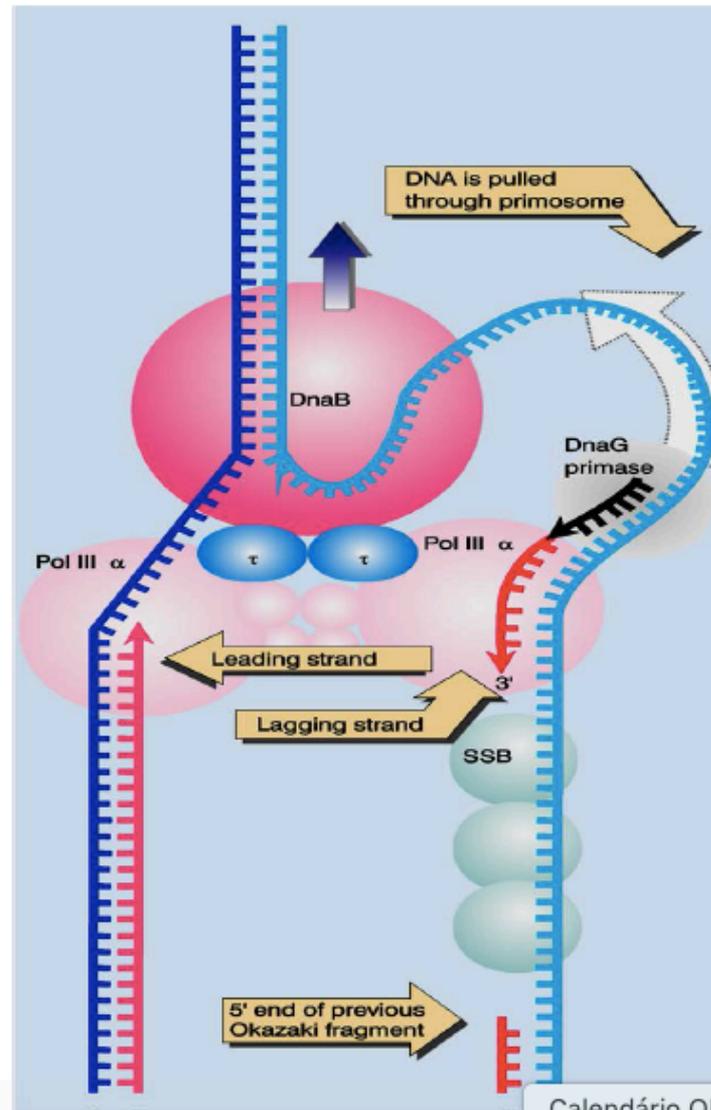
- A DNA ligase sela as quebras

A DNA ligase sela as quebras

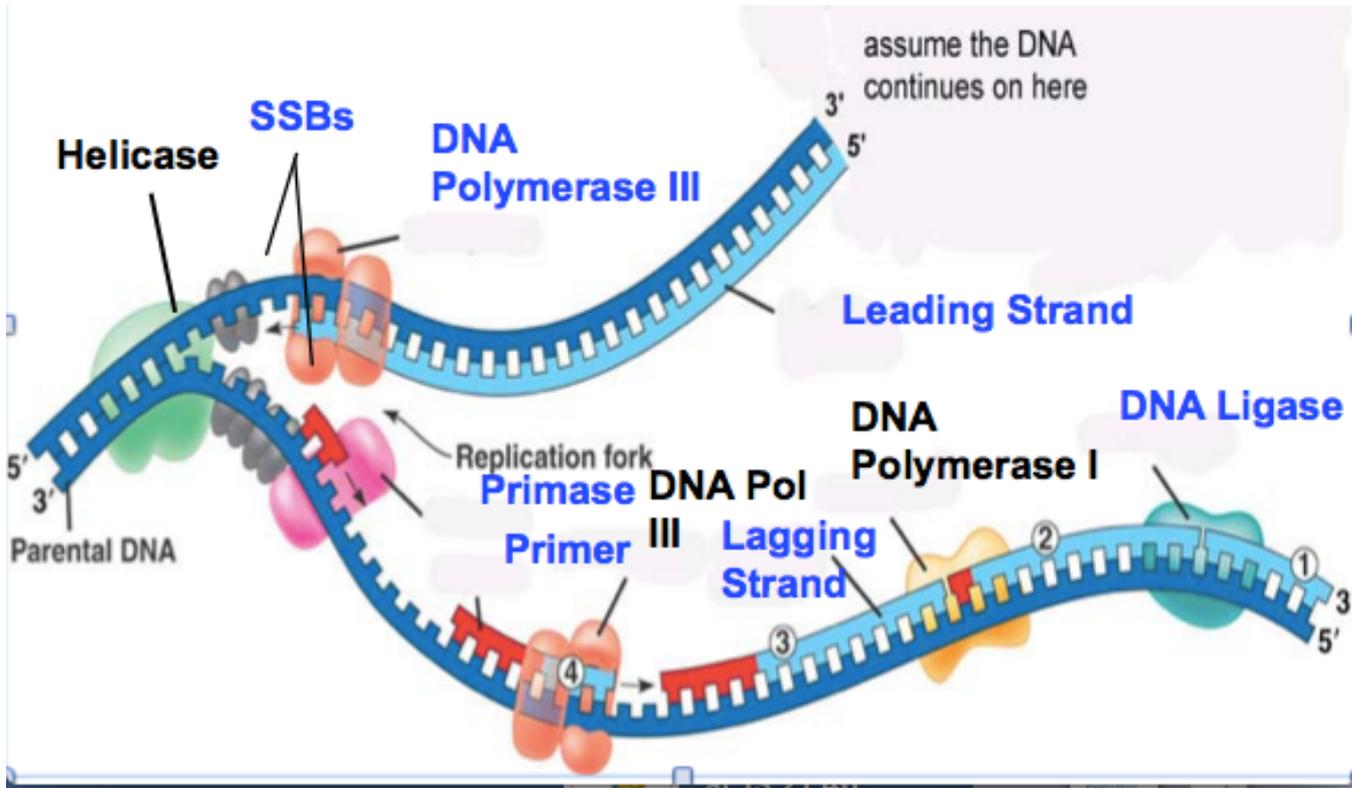


O complexo de replicação

- 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



Primossomo: complexo proteico responsável pela síntese dos primers de RNA

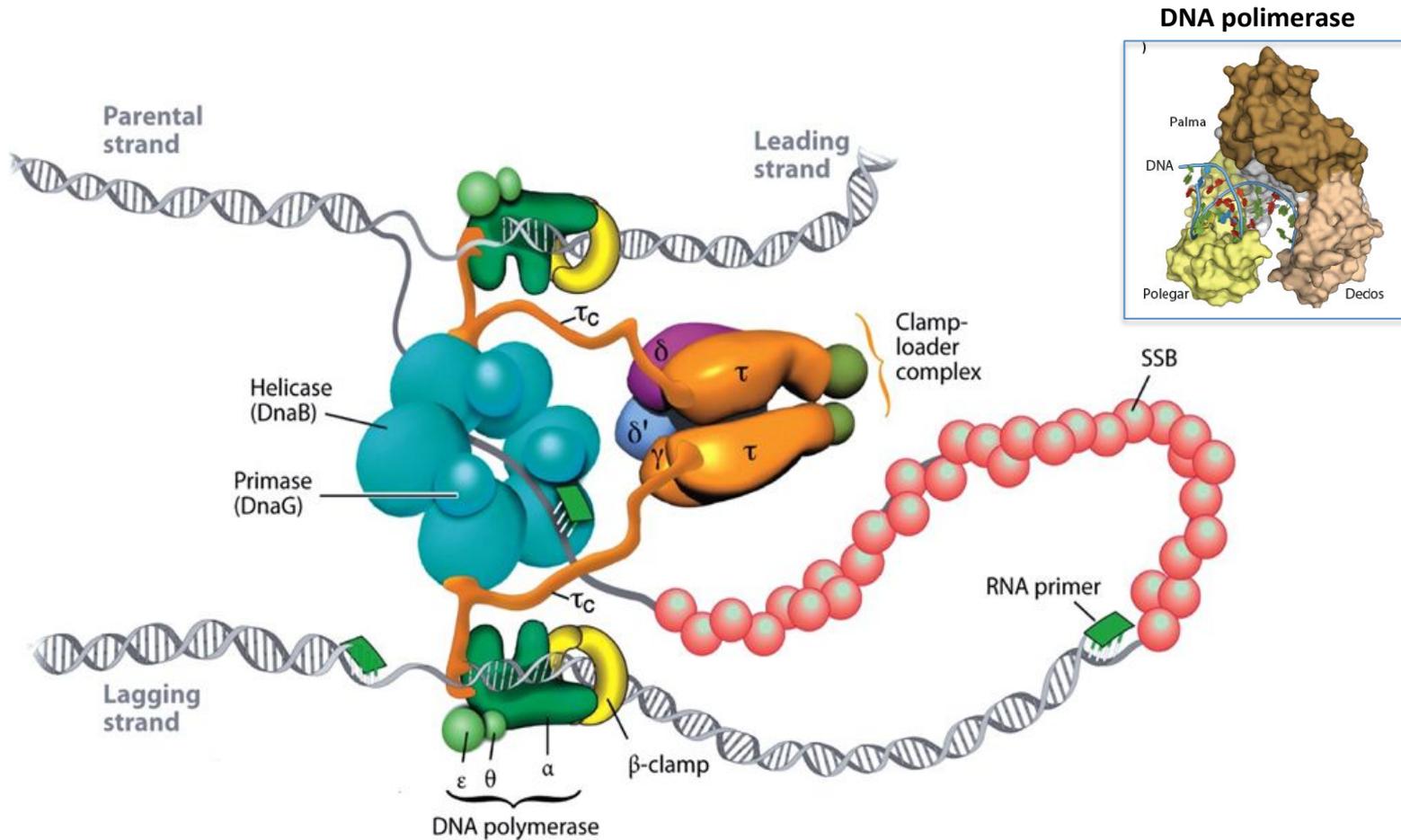


Síntese da fita líder é mais rápida

DNA polimerase I com atividade de exonuclease (3'-5' e 5'-3')

DNA polimerase III com atividade de exonuclease (3'-5')

Proteínas do replissomo

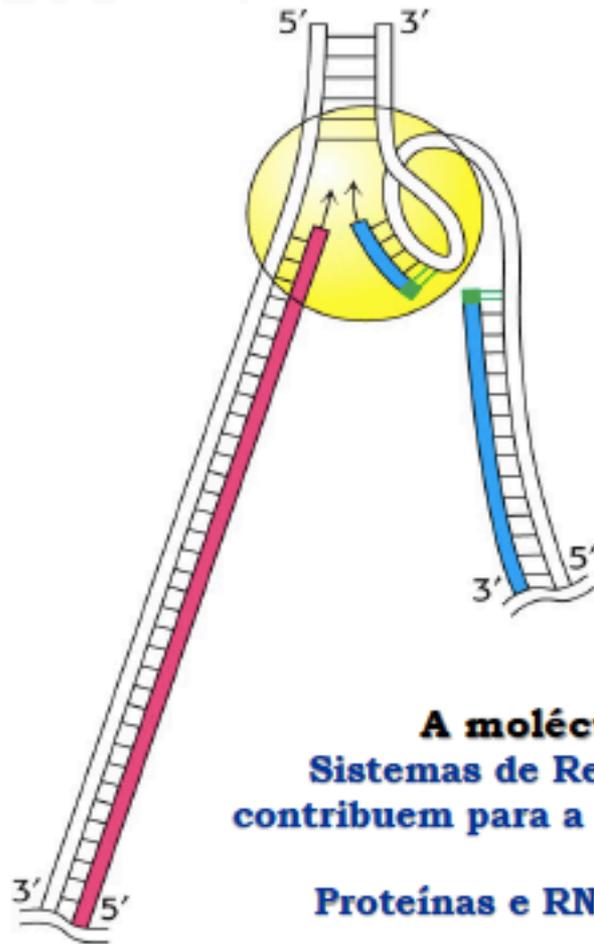


"Braçadeiras" – proteínas envolvem a dupla fita de DNA aumentando o contato entre a fita molde e a DNA polimerase

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)

Fidelidade da replicação



Vários fatores influentes

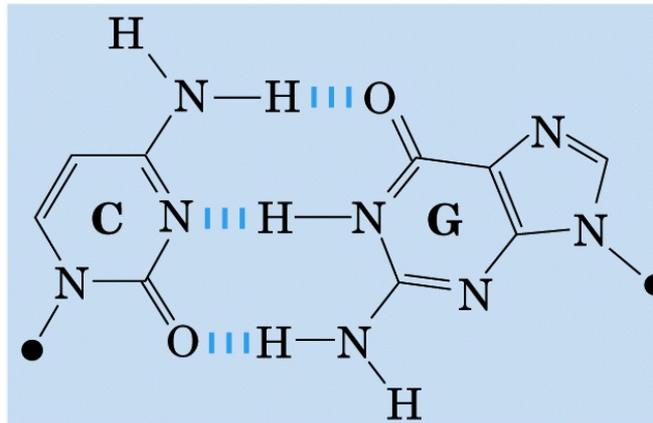
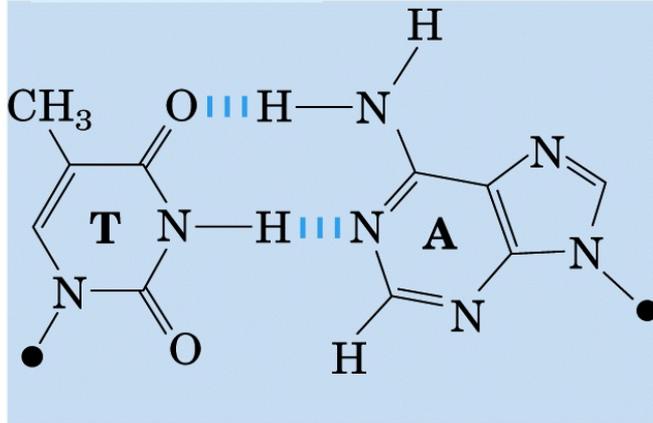
- 1) Níveis de dNTPs balanceado
- 2) DNAPol
- 3) Ação exonucleotídica
- 4) Várias enzimas adicionais
- 5) Início por primer (chance de pareamento errado no início é maior)
- 6) Presença do co-fator Mg^{2+}

A molécula de DNA é, em si, insubstituível
Sistemas de Reparo aumentam a fidelidade da replicação e contribuem para a manutenção do DNA → Imperativo para a célula

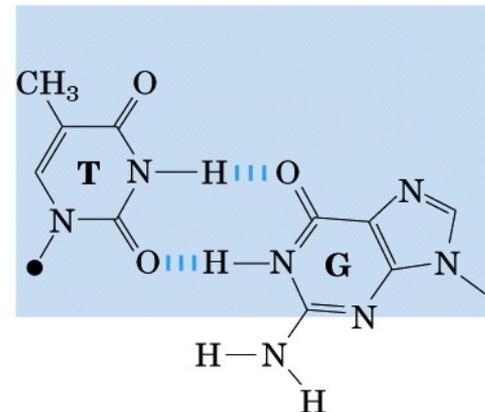
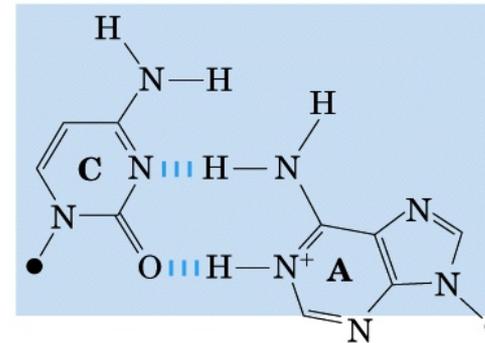
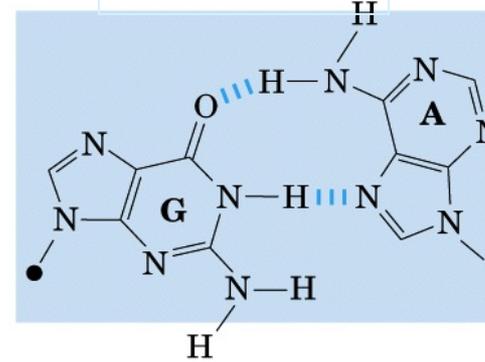
Proteínas e RNA danificados são rapidamente substituídas

Pareamento de bases

correto



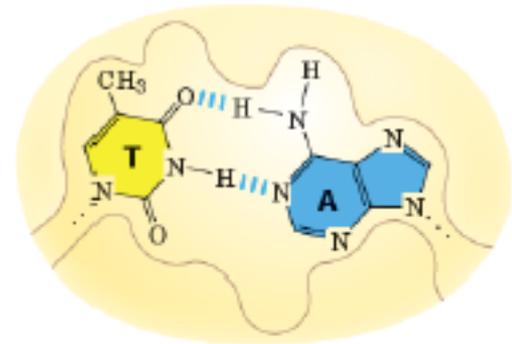
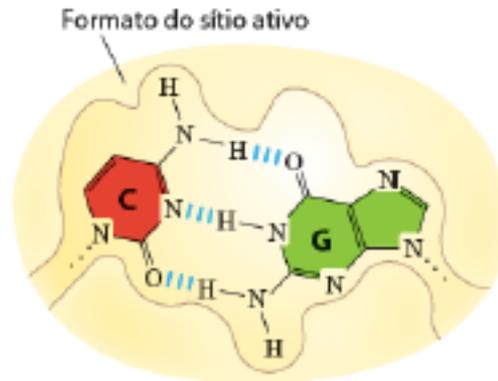
incorreto



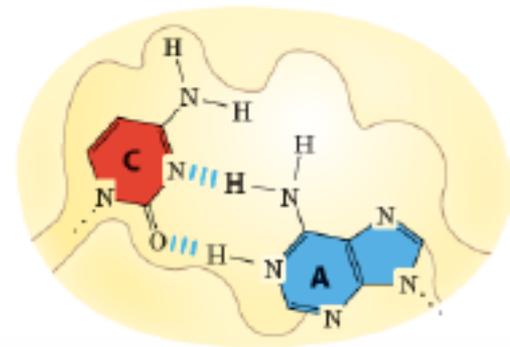
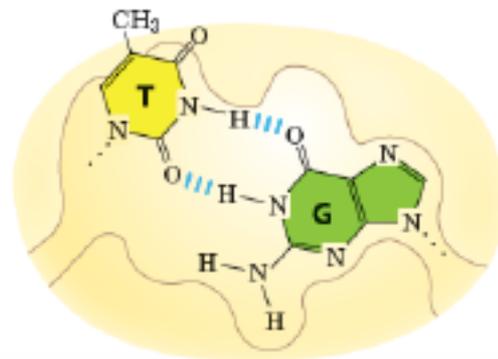
Geometria incorreta

Atividade exonuclease 3'- 5'

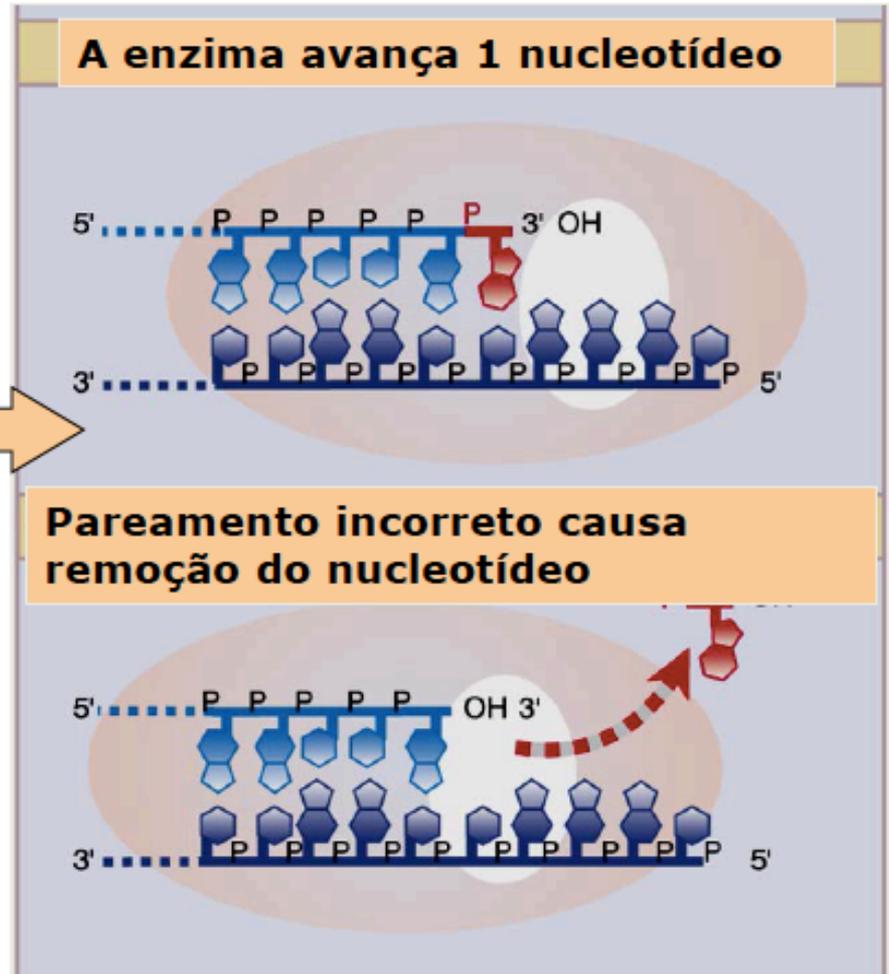
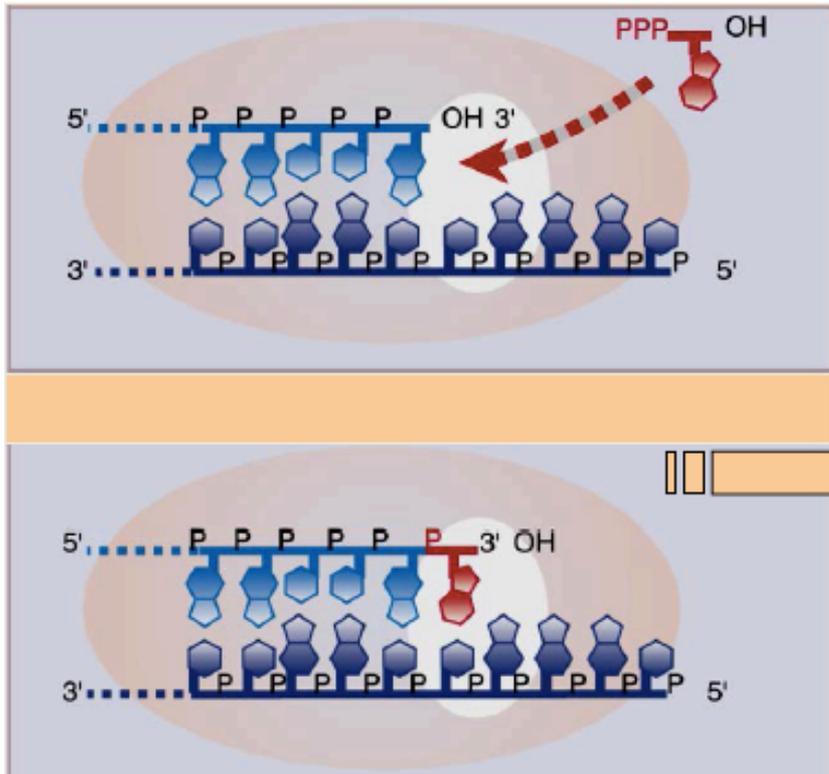
**Pareamentos
corretos →
geometria
correta**



**Pareamentos
incorretos →
geometria
incorreta**



Atividade exonuclease 3'-5' da DNA polimerase III



E.coli: erros 1 a cada 10.000
Após reparo: 1 a cada 10^9

Lesões do DNA e mutações

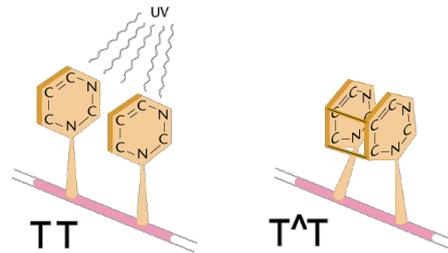
- Em células germinativas- ou células somáticas
- Modificações permanentes na sequência de bases do DNA
- Modificações deletérias ou importantes na evolução (com acertos e erros)
- Pontuais- em um único ou poucos nucleotídeos (mutação gênica); troca de base, inserção ou deleção de base. Resultado: depende se afeta uma região codificante.
- Envolvendo a estrutura de cromossomos- deleções, inversões, translocação de sequências
- Alteração na quantidade de cromossomos

Instabilidade do Genoma

- DNA não é tão estável quanto parece
- Causas intrínsecas- estabilidade química dos nucleotídios, casos de perda da base (sítiosapurínicos ou pirimidínicos)- célula humana a 37°C-cerca de 10 mil lesões por dia, etc
- Causas extrínsecas- micropoluentes, agentes biológicos, exposição a raios solares (UV), radiações ionizantes (Raio X, Raios gama)

Sistema de reparo

mutações



Mecanismos de Reparo do DNA

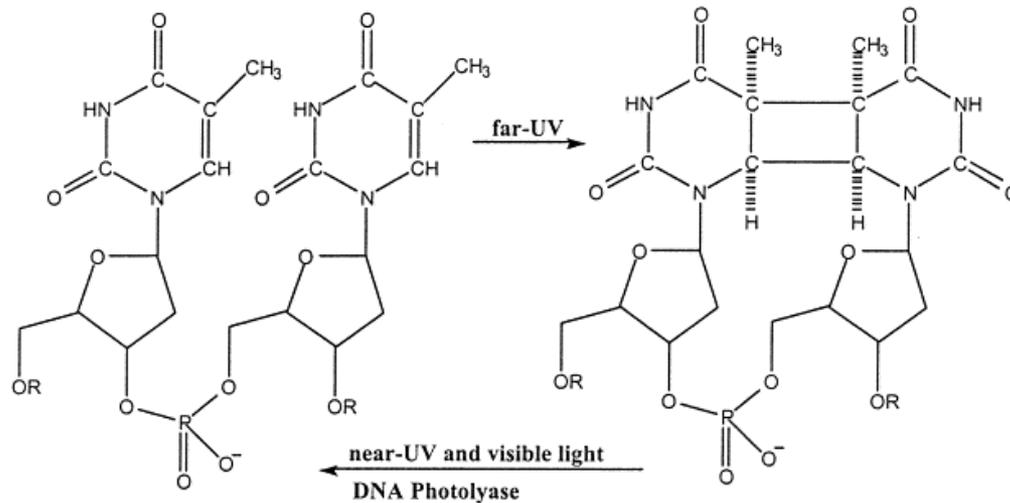
- **Fundamentais para manter a integridade do genoma (células germinativas ou somáticas)**
- **Taxa de mutações aumenta sem mecanismos de reparo (cancer)**
- **Vários processos fundamentais- somente 1 em 10^{10} não é reparado**
- **DNA- usa a fita complementar para reparo imediato**
- **Virus (DNA fita simples e RNA) mais suscetíveis a mutações, com maior sucesso evolutivo**

Mecanismos de Reparo do DNA

- **Por remoção de bases (glicosidase reconhece a base modificada e cliva a ligação glicosídica, endonuclease cliva a fosfodeoxiribose, Poli I preenche o sítio, DNA ligase reúne a fita)**
- **Por remoção de nucleotídeo (reconhecimento de mudança na estrutura, excisão, lacuna preenchida por DNA Poli I e ligase)**

Lesões do DNA e mutações

Dímeros de pirimidina adjacentes



Reconhecimento do dímero/ Fotoliase

Presença do dímero bloqueia transcrição e duplicação do DNA
Xeroderma pigmentosa, doença autossômica recessiva (luz solar)-
defeito no sistema de reparo

Sequências no DNA não traduzidas genoma humano

- **3% - Exons (codificantes)**
- **10% - sequências conservadas na evolução. Função?**
- **99% do genoma de mamífero é transcrito- além do mRNA, pequenos e longos RNA não codificantes, introns, enhancer, telômeros, etc**
- **Mutações nas regiões não codificantes- *single nucleotide polymorphism (SNP)*- marcadores de patologias (~100 associadas a estados patológicos; pessoa saudável: ~25.000 SNPs); 3.500.000 SNPs identificados**

Exercícios

1. O que se entende por genoma?
2. Esquematize a reação de adição de um novo nucleotídeo a uma fita de DNA.
3. Por que na duplicação de DNA são necessários ribonucleotídios e desoxiribonucleotídios como substratos?
4. O que se entende por replicons? Conteste a afirmação: Há somente um replicon na duplicação de DNA de eucariotos.
5. Forneça as principais etapas envolvidas na duplicação do DNA e o papel de helicases, topoisomerasas, proteínas SSB e primase no processo.
6. O que se entende por fragmentos de Okasaki? Por que são formados?
7. Como é garantida a fidelidade de duplicação do DNA?
8. Comente/ justifique a afirmação: Após a duplicação, o DNA da célula é estável.
9. Procure na literatura 2 substâncias que inibem a duplicação do DNA (eucariotos ou procariotos). Discuta sua importância.