

Replicação de DNA

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

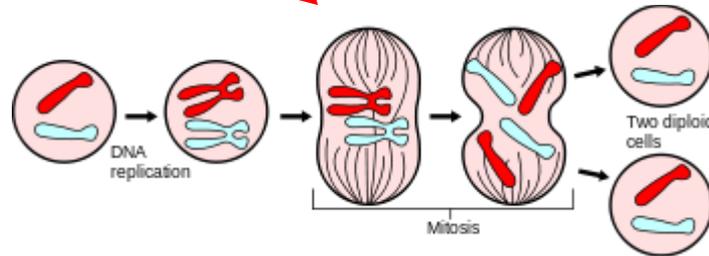
- Dotou os seres vivos de uma **substância** que permite que eles
 - Vivam
 - Se reproduzam
- **A mesma** substância desempenha **os dois papéis!**
 - mas note que a substância não age sozinha
- Que substância é essa?
- DNA

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?

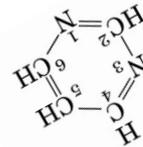
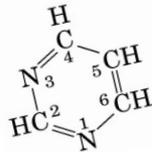
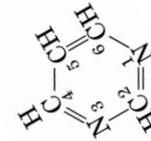
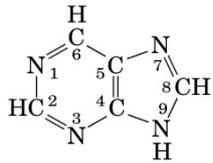
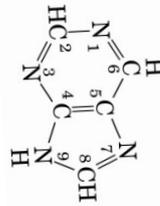
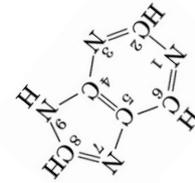
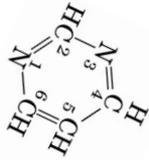
Graças à **duplicidade** da hélice e à
complementaridade das bases

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

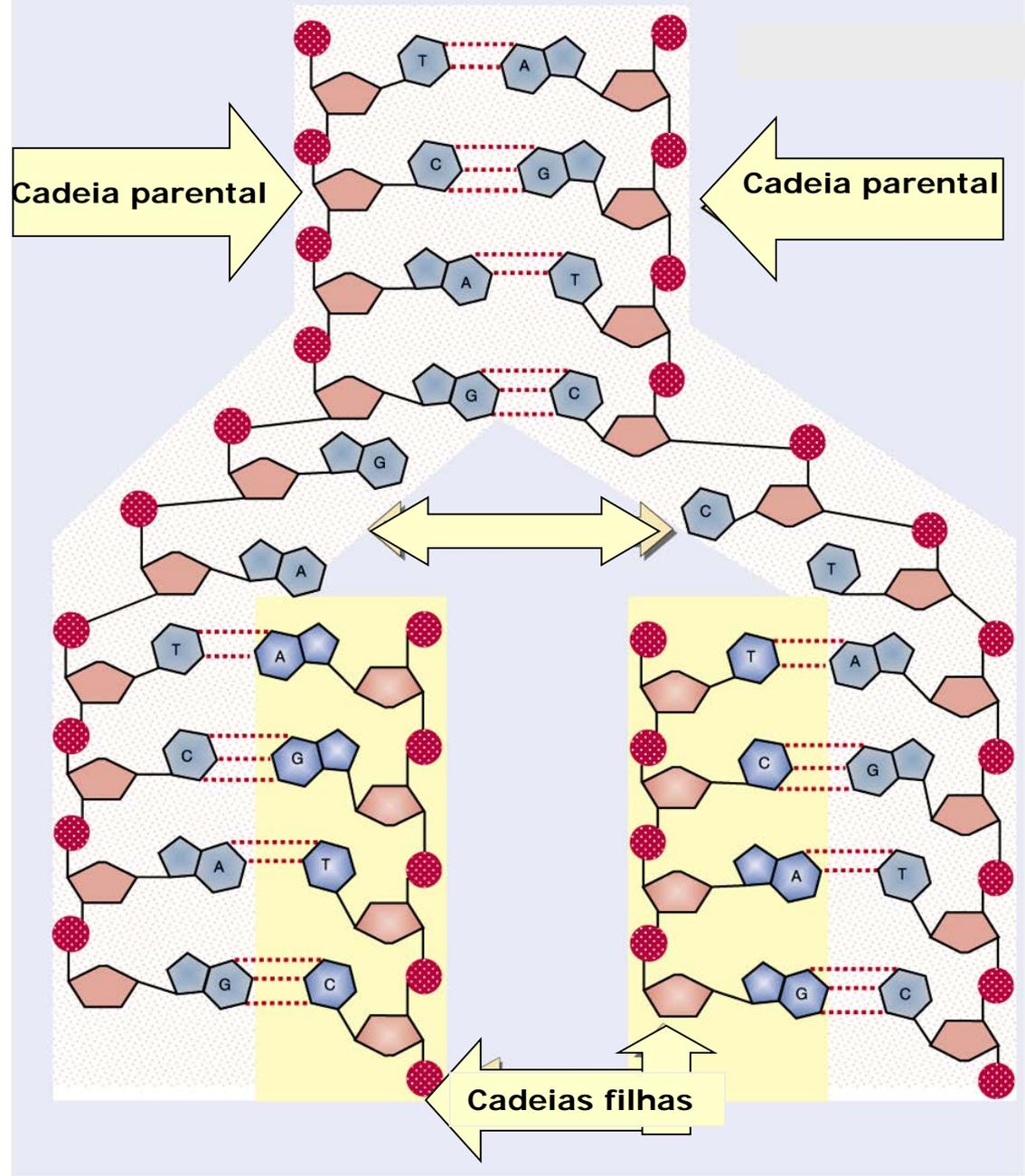
Premissa: há um suprimento “infinito” de nucleotídeos dentro da célula



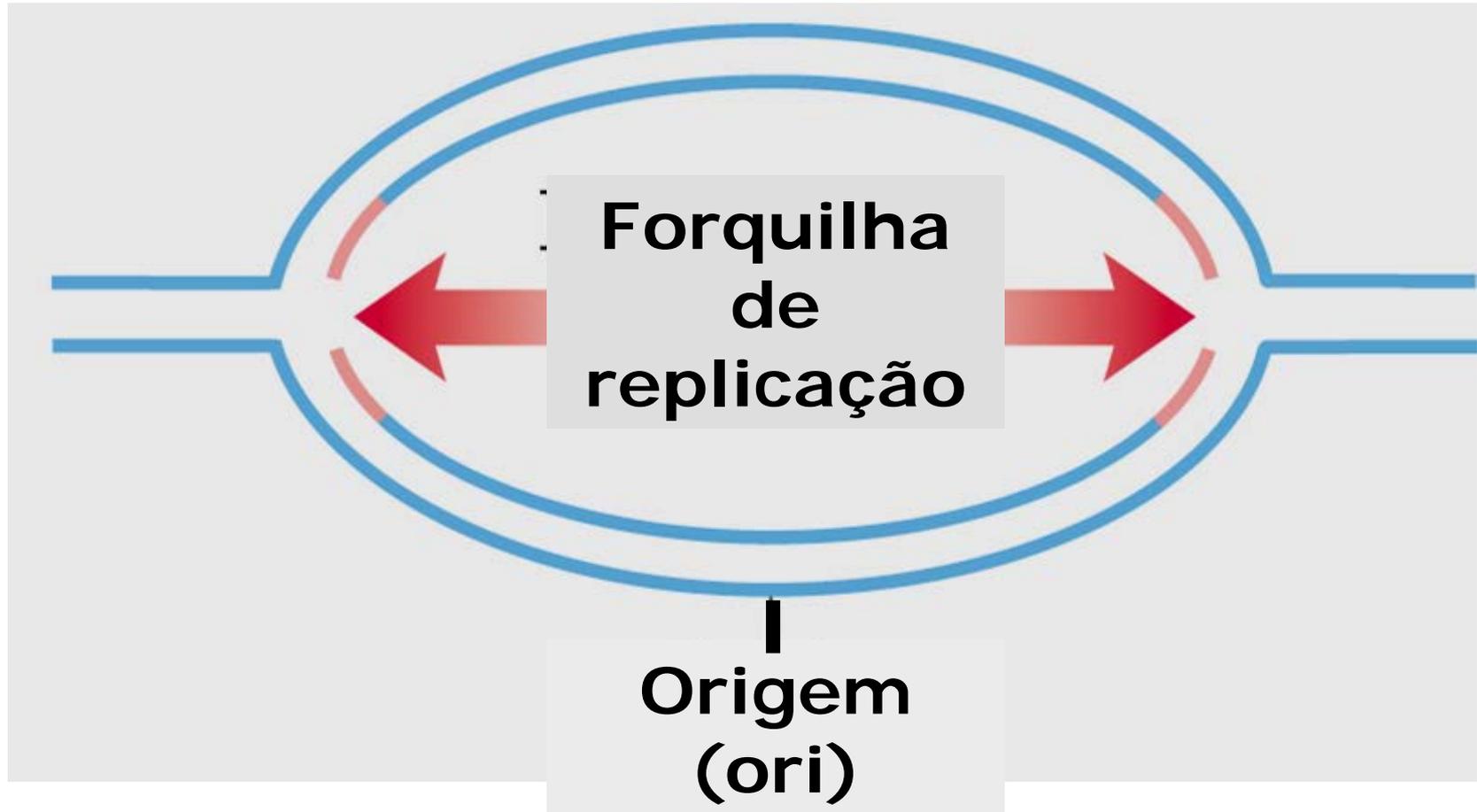
Replicação do DNA

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

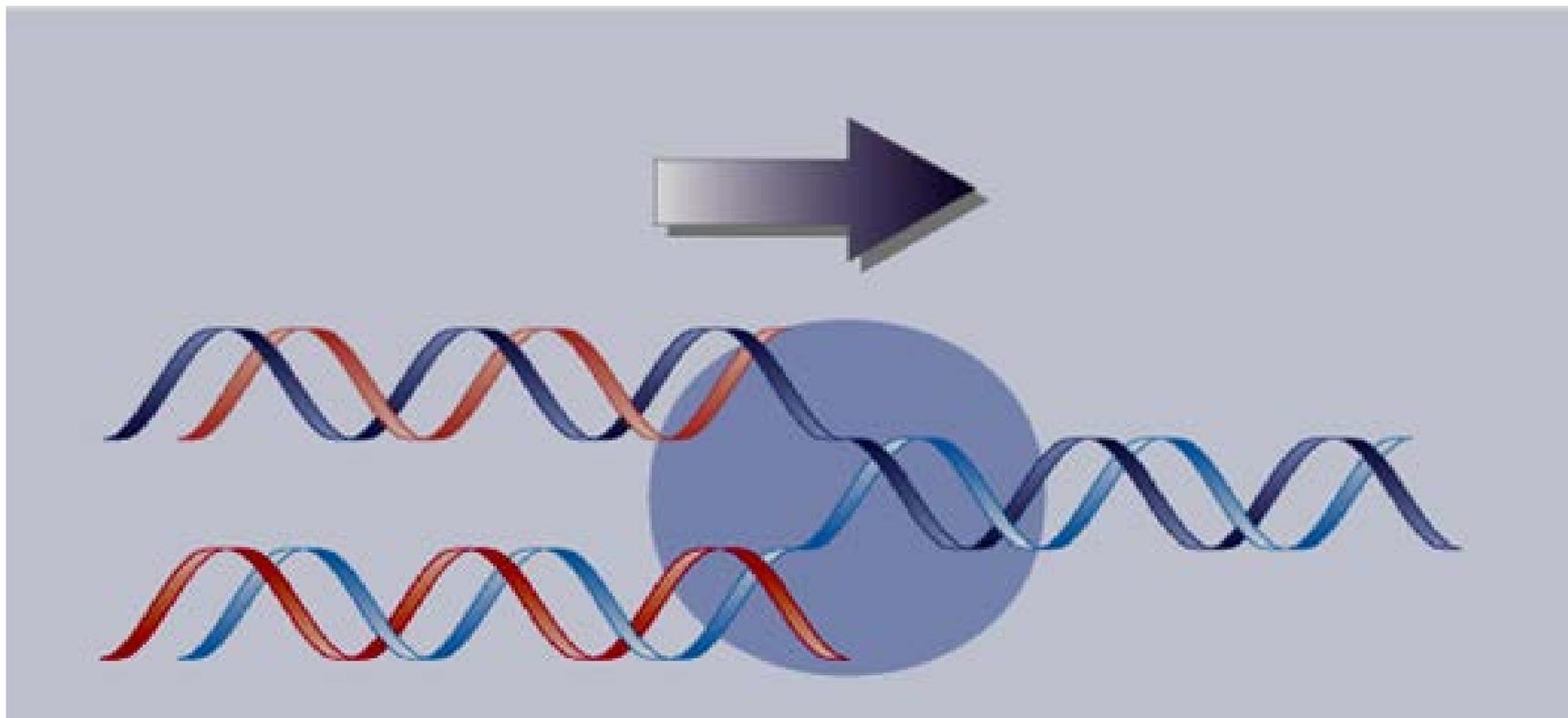
A estrutura do DNA contém a informação necessária para perpetuar sua sequência de bases



A replicação é bidirecional



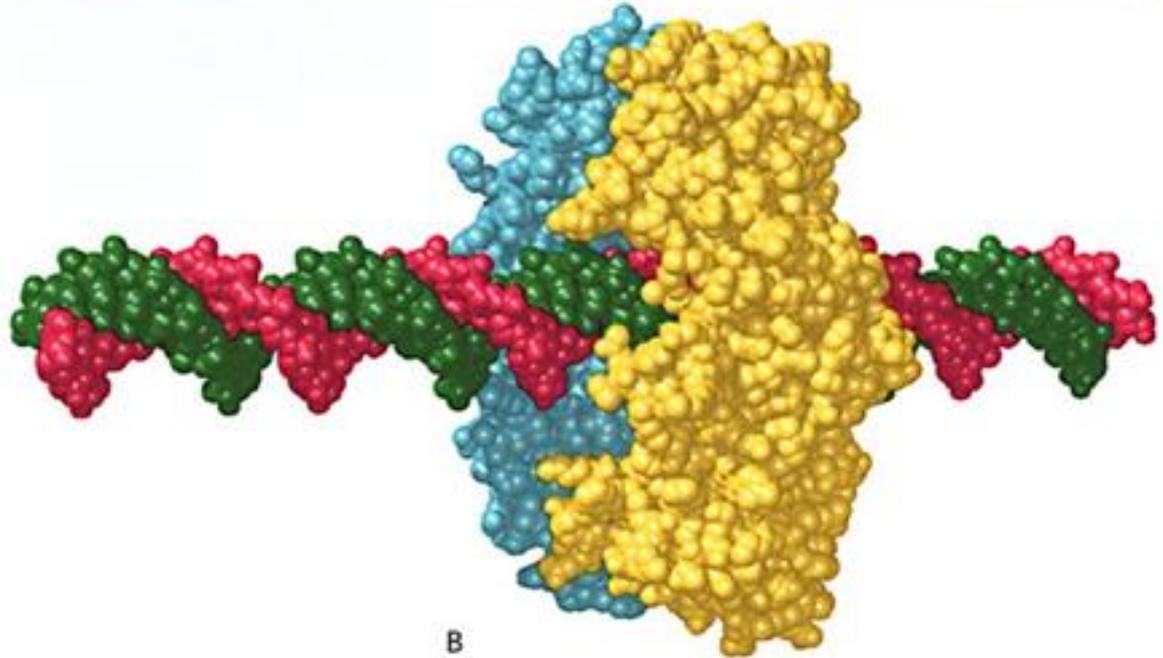
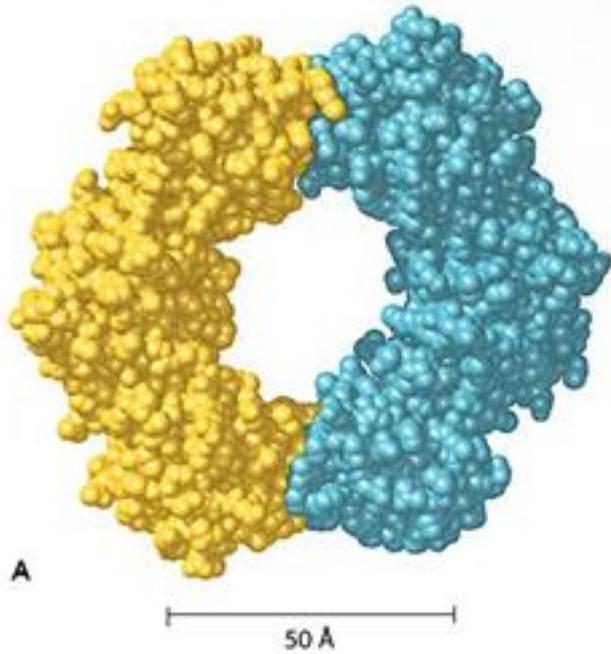
Forquilha de replicação: Região do DNA onde ocorre a transição do DNA parental fita dupla para as novas fitas duplas filhas



Quem é o agente principal?

DNA polimerase III

Pol III β_2 - dimers



Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

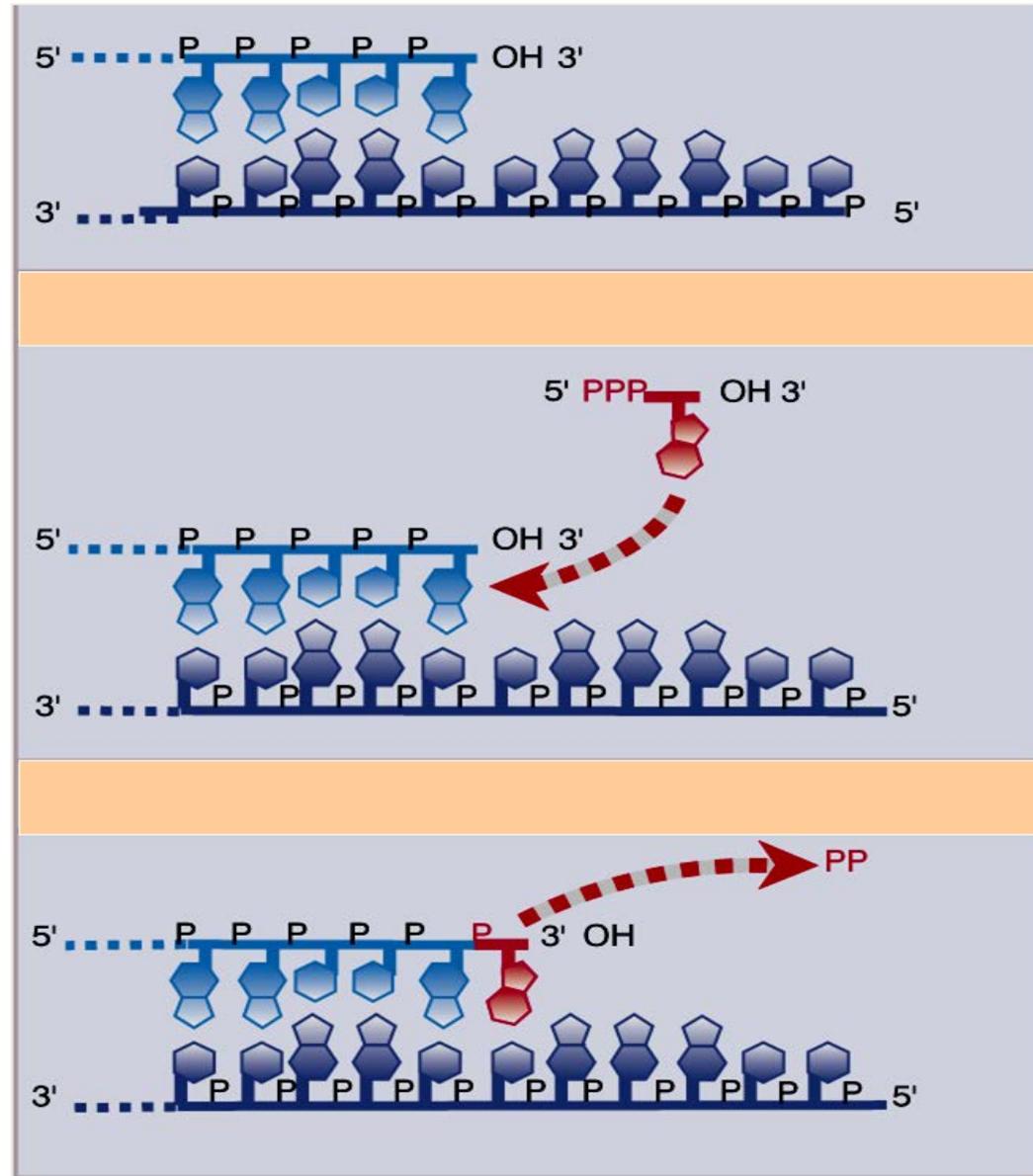
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

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

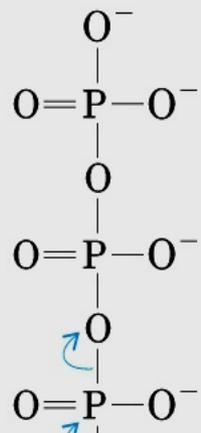
- O precursor da síntese é desoxirribonucleosídeo 5' trifosfato

- Sentido da síntese sempre é 5' → 3'

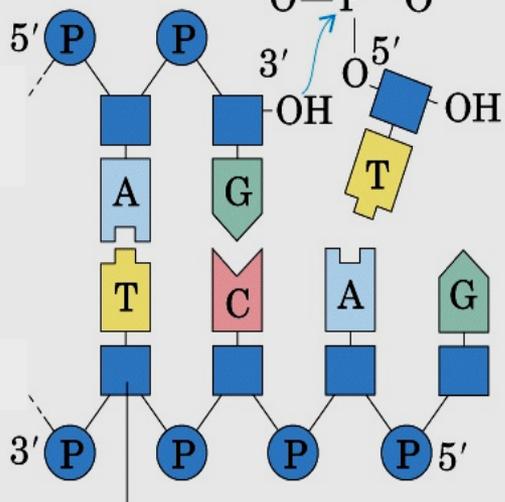
- A replicação é um processo extremamente fiel. As DNA-polimerases tem atividade revisora



Desoxiribonucleosídeo
5' trifosfato
(precursor)

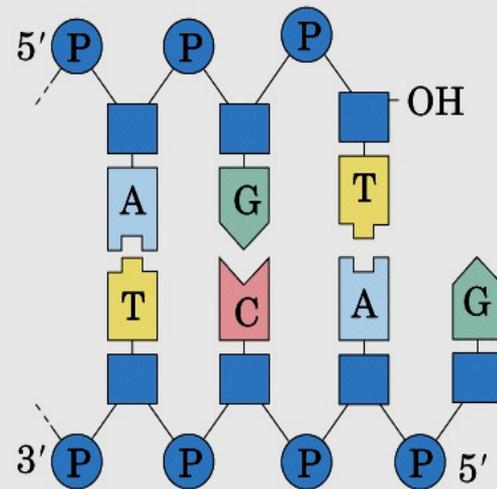
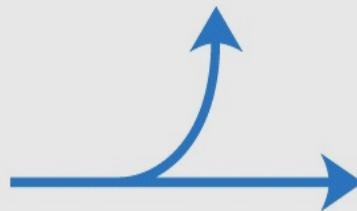
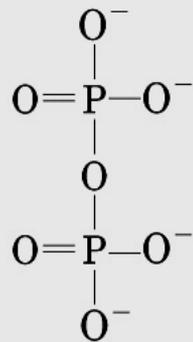


Fita sendo
polimerizada

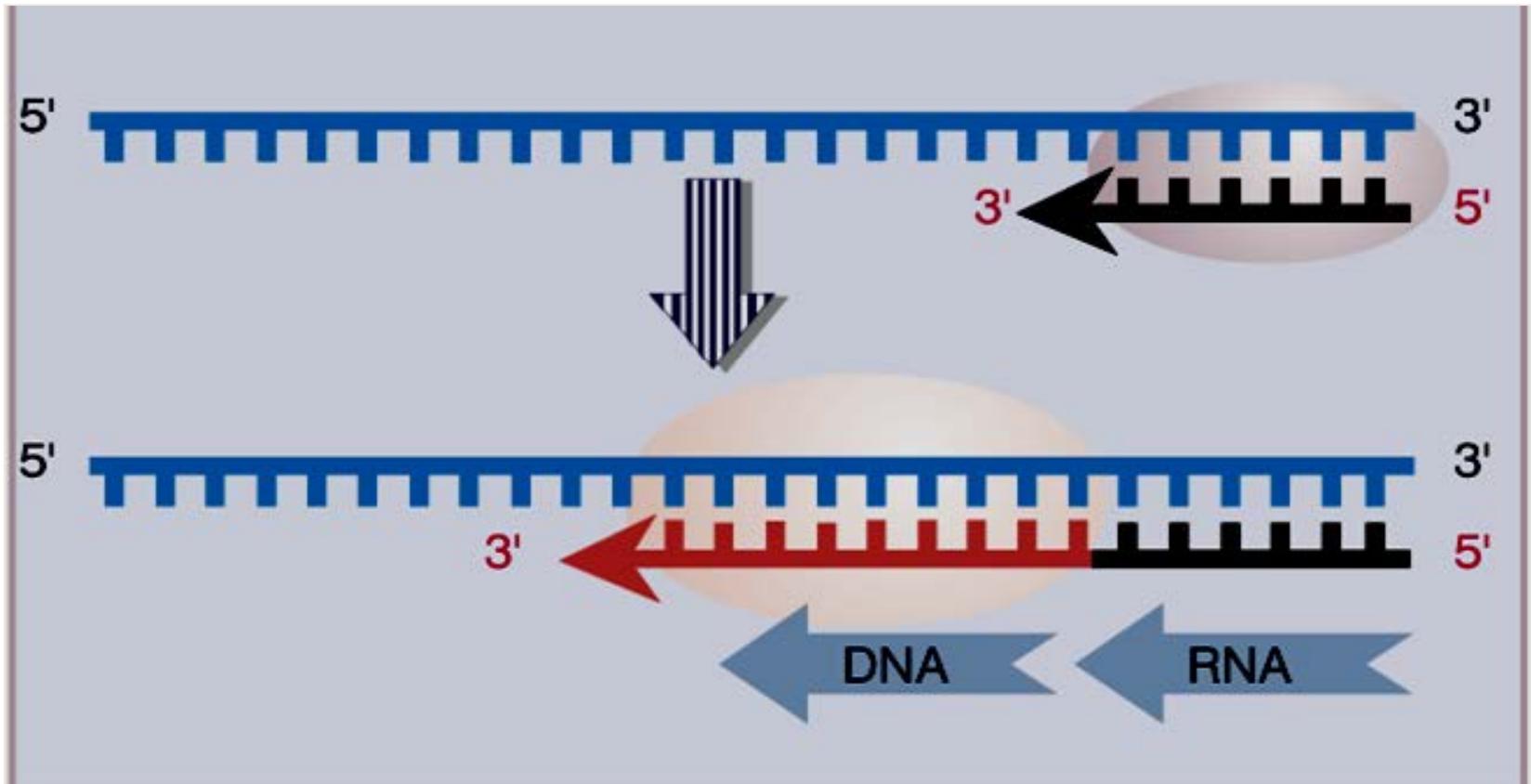


Fita molde

Desoxirribose

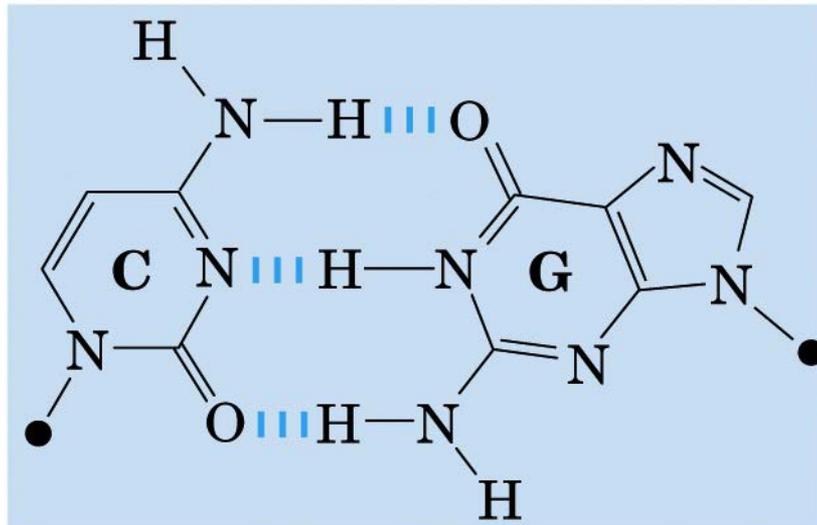
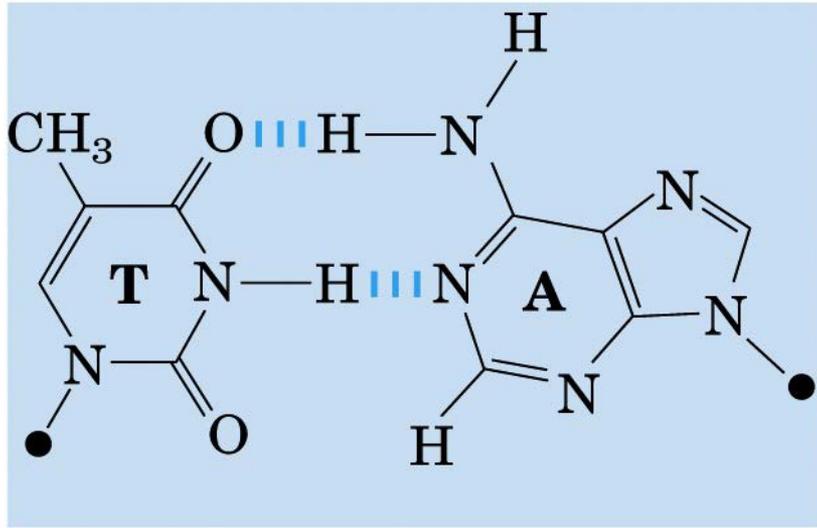


As DNA-polimerases sempre requerem um iniciador ou *primer* (segmento de DNA ou RNA) previamente pareado ao molde que será copiado

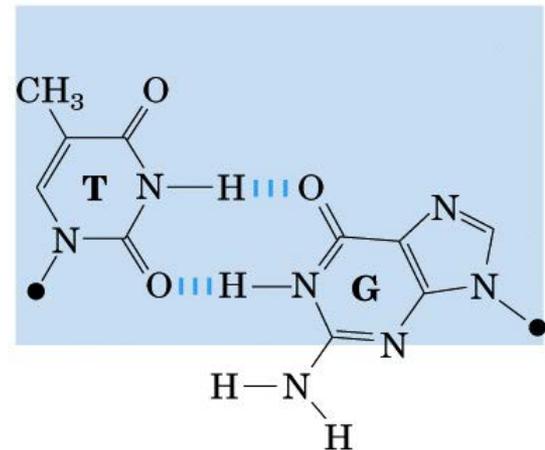
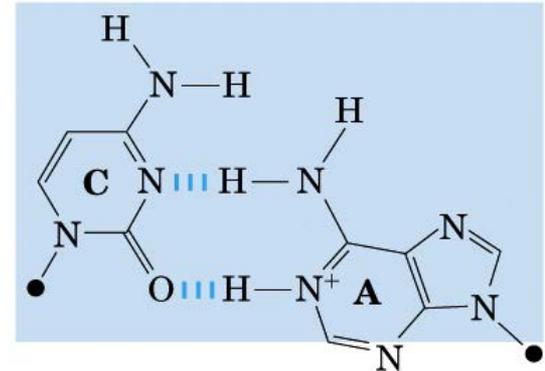
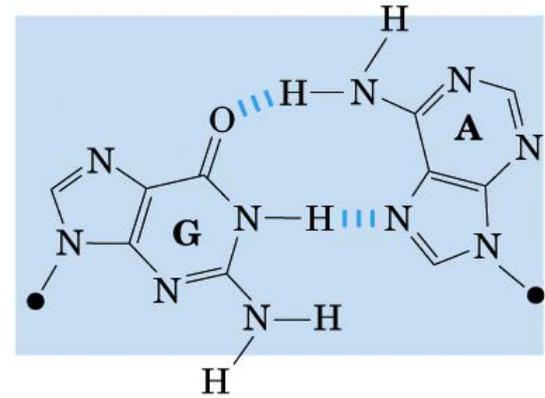


Pareamento de bases

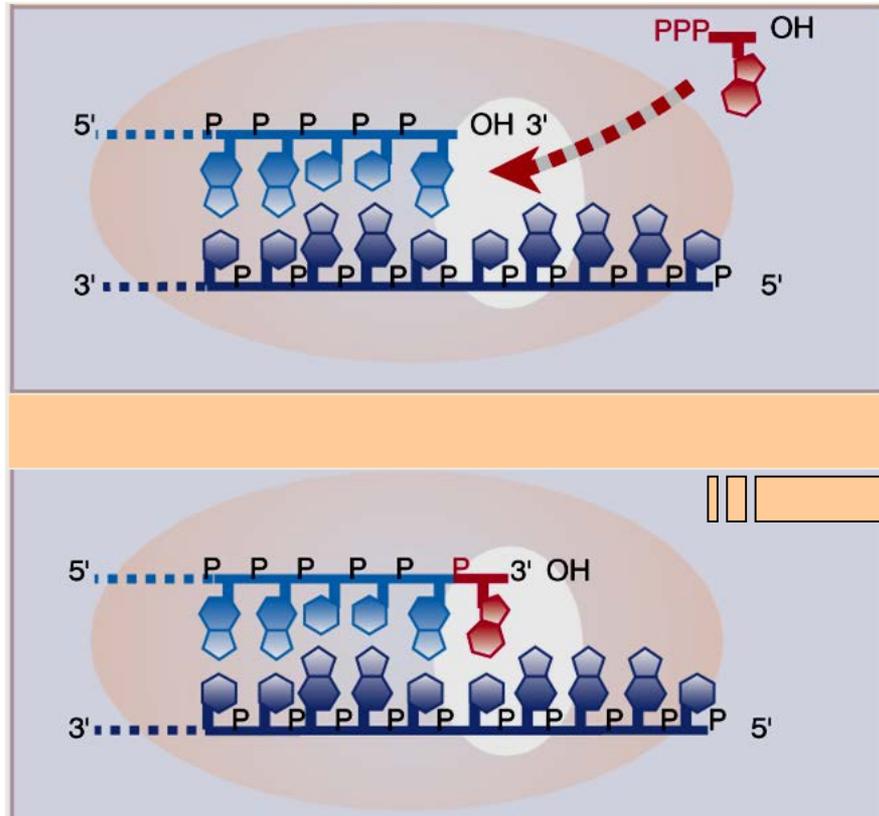
correto



incorreto

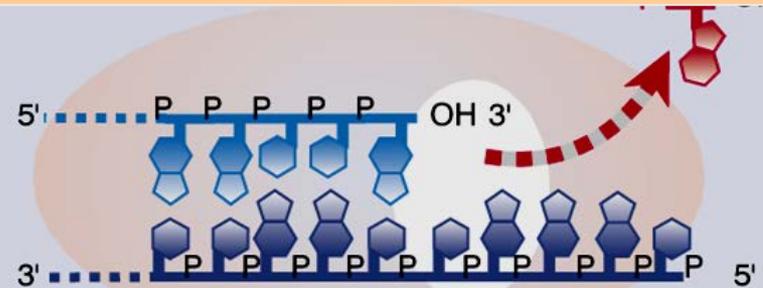


Atividade revisora do sítio de exonuclease 3' → 5' presente nas DNA polimerases garante a fidelidade da replicação

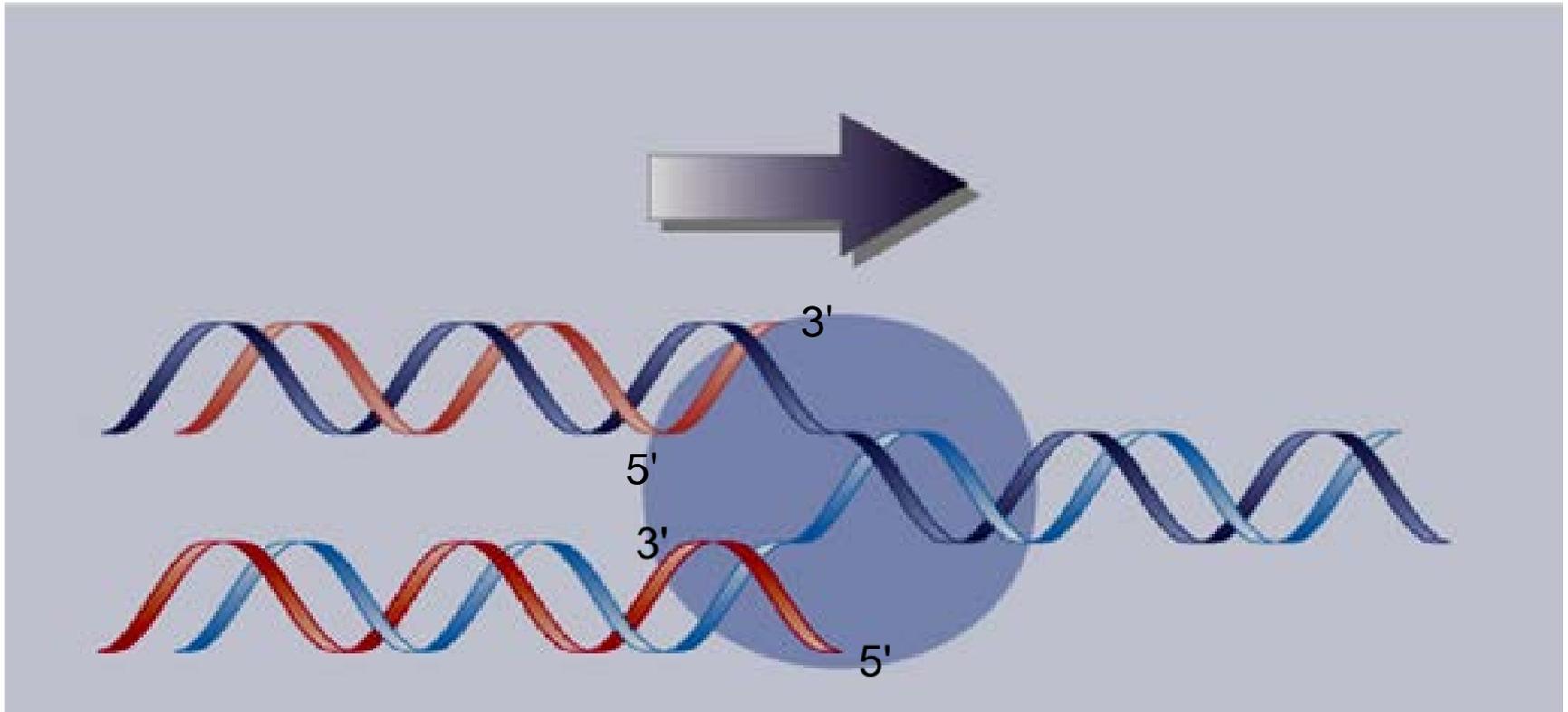


A enzima avança 1 nucleotídeo

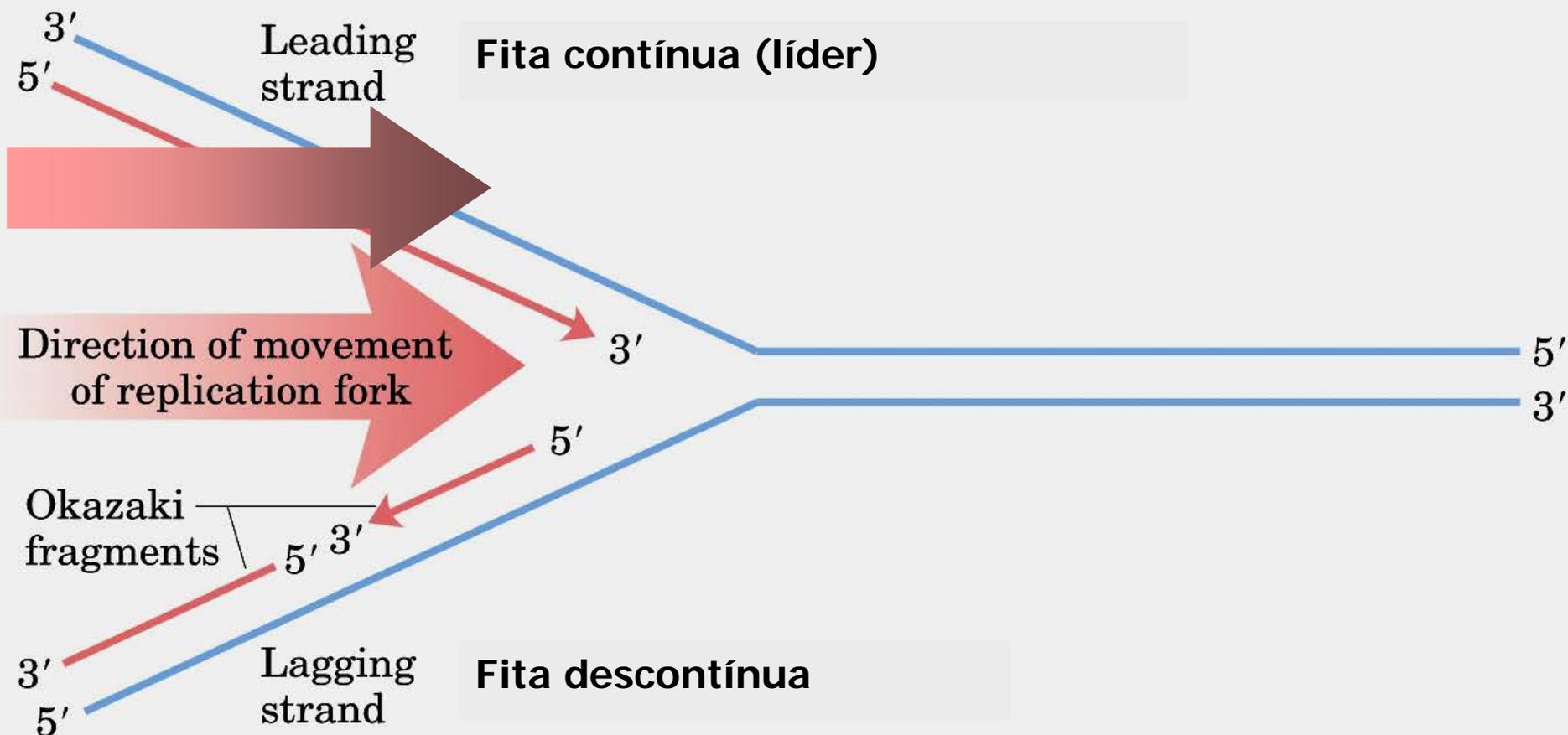
Pareamento incorreto causa remoção do nucleotídeo

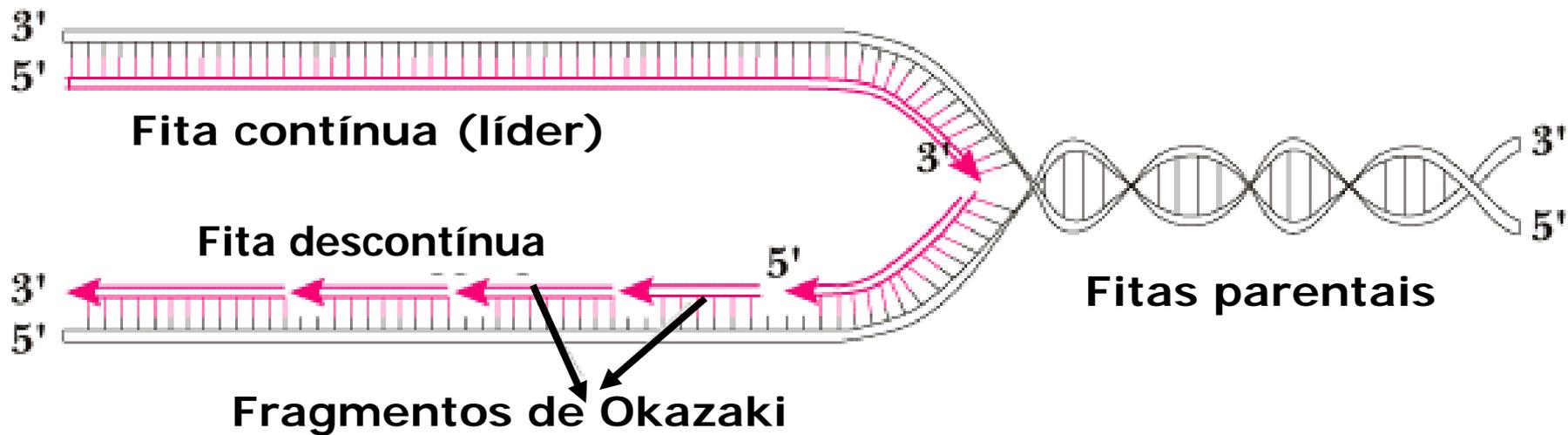


A replicação numa das fitas apresenta um “problema”



Esse problema é: a direção natural da replicação (de 5' para 3') ocorre para uma das fitas (fita contínua), mas é a contrária para o caso da outra fita (fita descontínua). Esse problema é resolvido pela célula por meio de síntese de pequenos fragmentos na fita descontínua (os fragmentos de Okasaki). Sendo pequenos, eles podem ser sintetizados na direção 5'⇒3', mesmo sendo essa direção oposta à direção da forquilha. Porém, mais tarde, eles precisam ser juntados (veja slide onde se apresenta DNA ligase mais adiante).

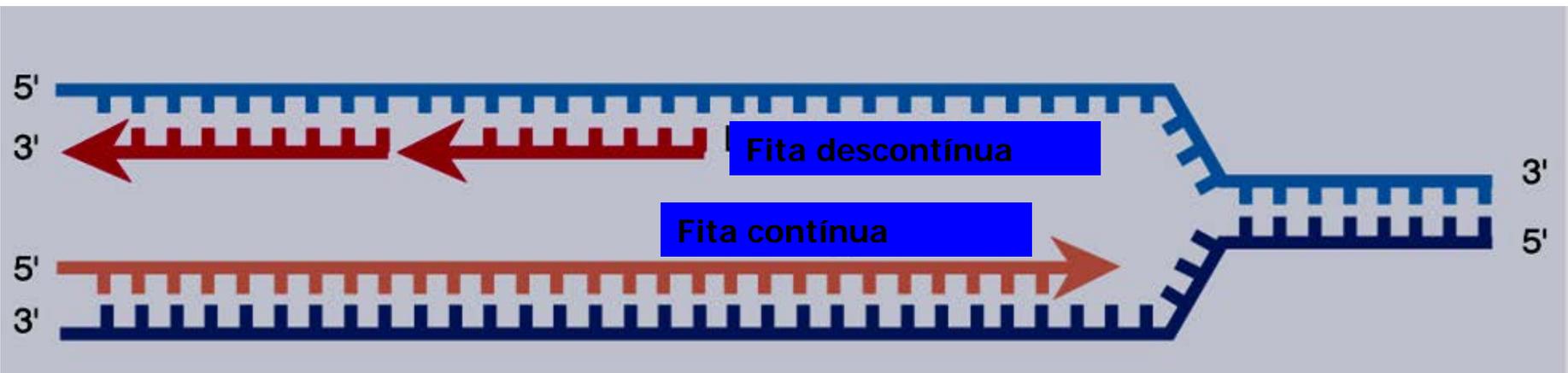




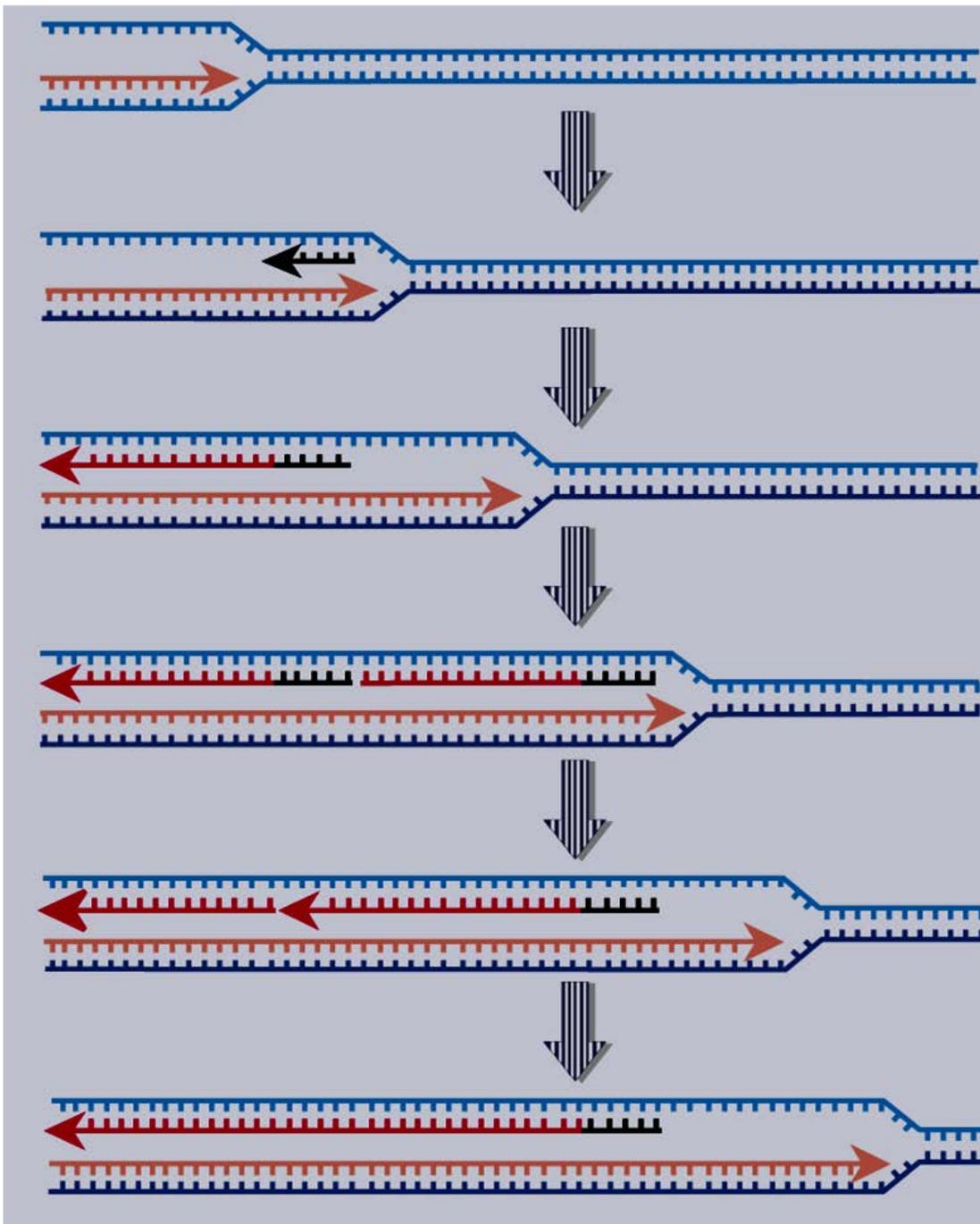
**Movimento da
Forquilha de
Replicação**

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

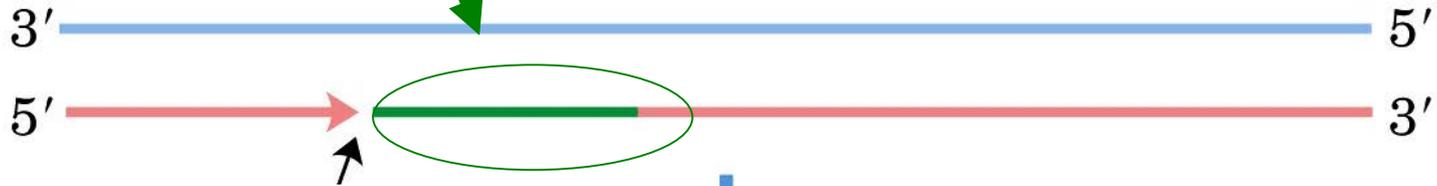
- A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

- 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

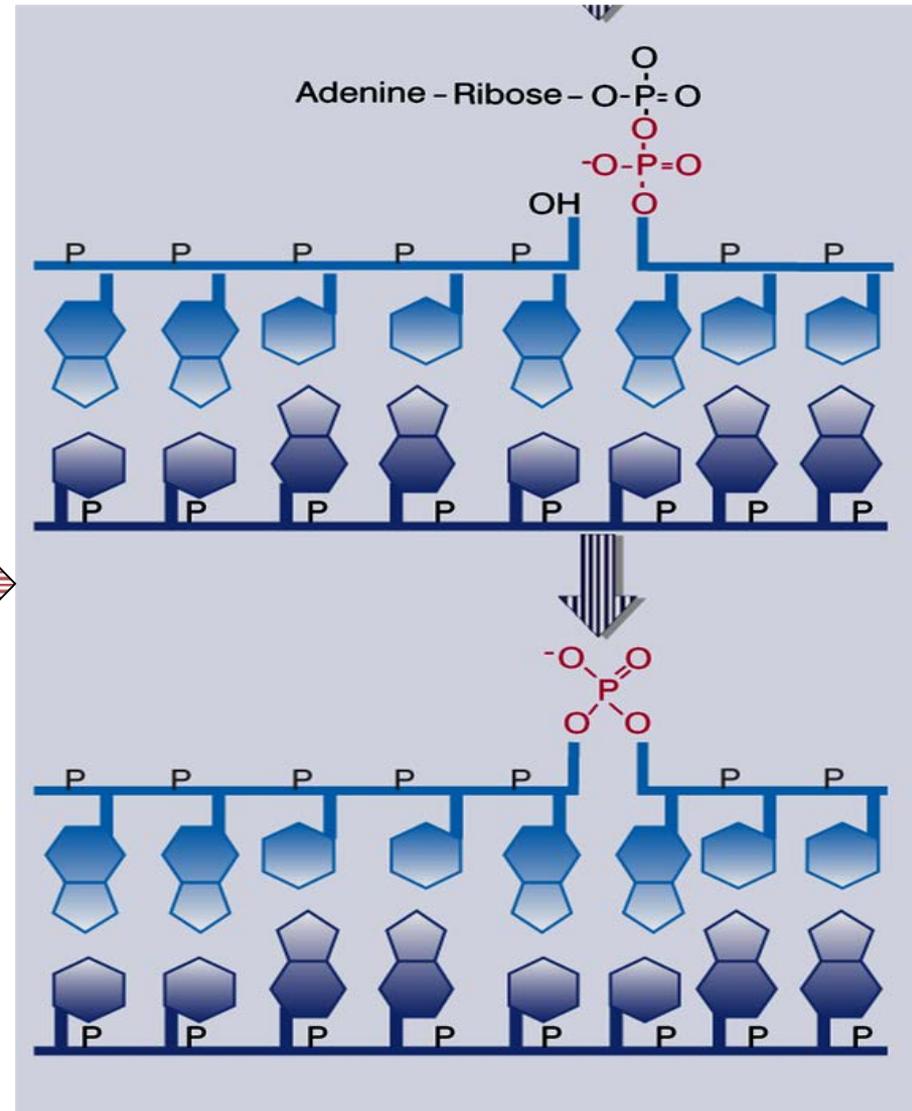
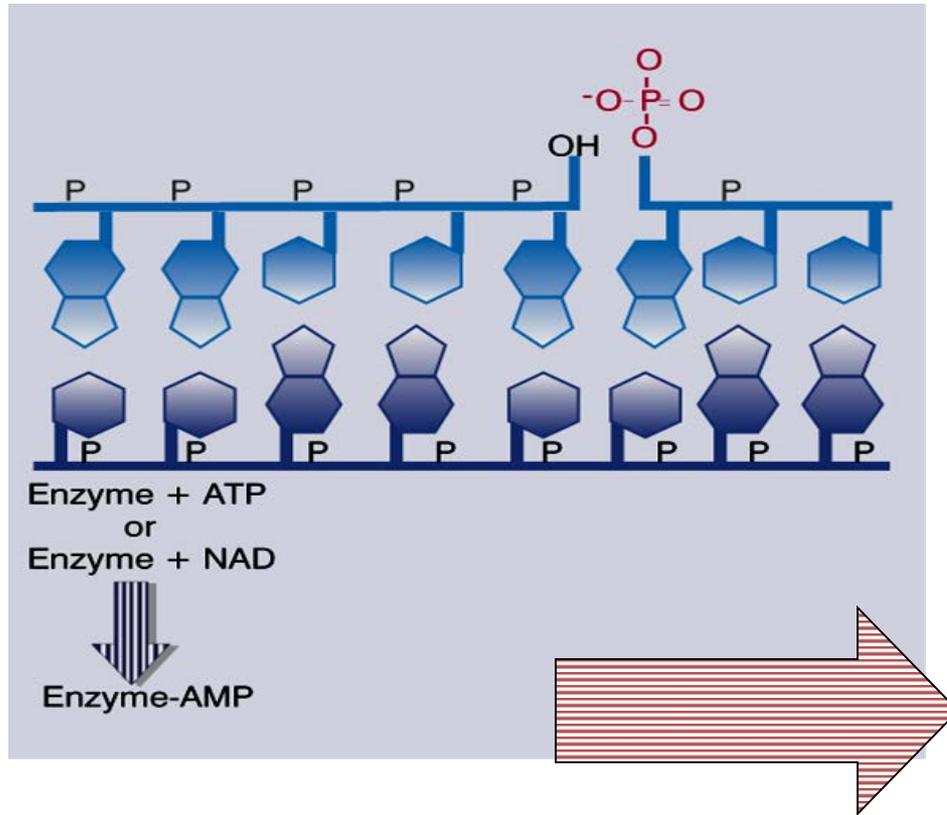
Remoção do Primer de RNA
Preenchimento da lacuna

ATP (or NAD^+)
AMP + PP_i (or NMN)

DNA ligase

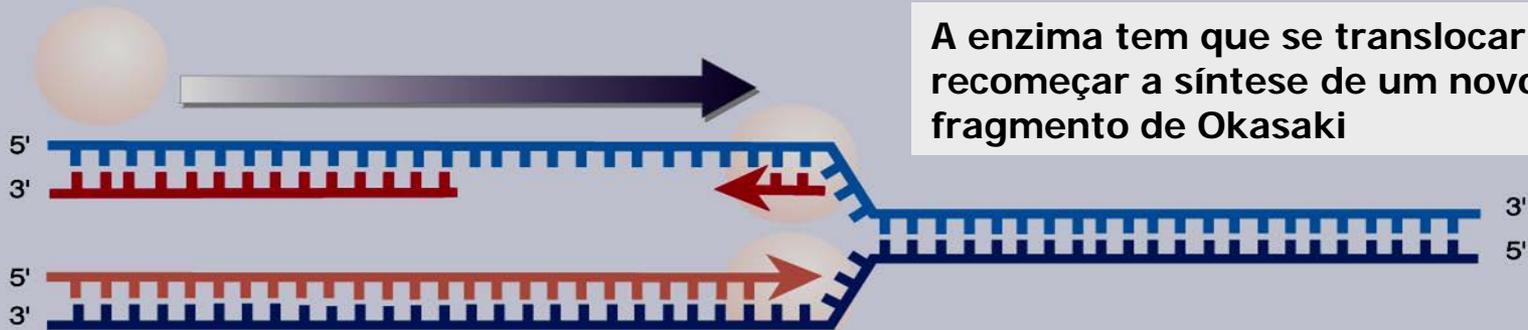
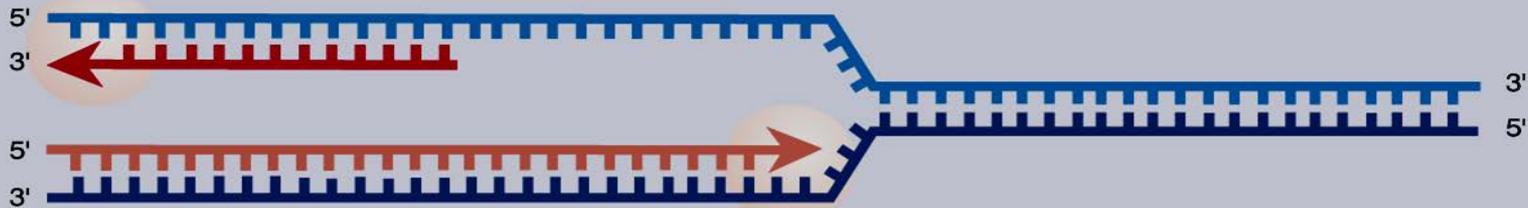
Une os dois fragmentos de DNA

A DNA ligase sela as quebras



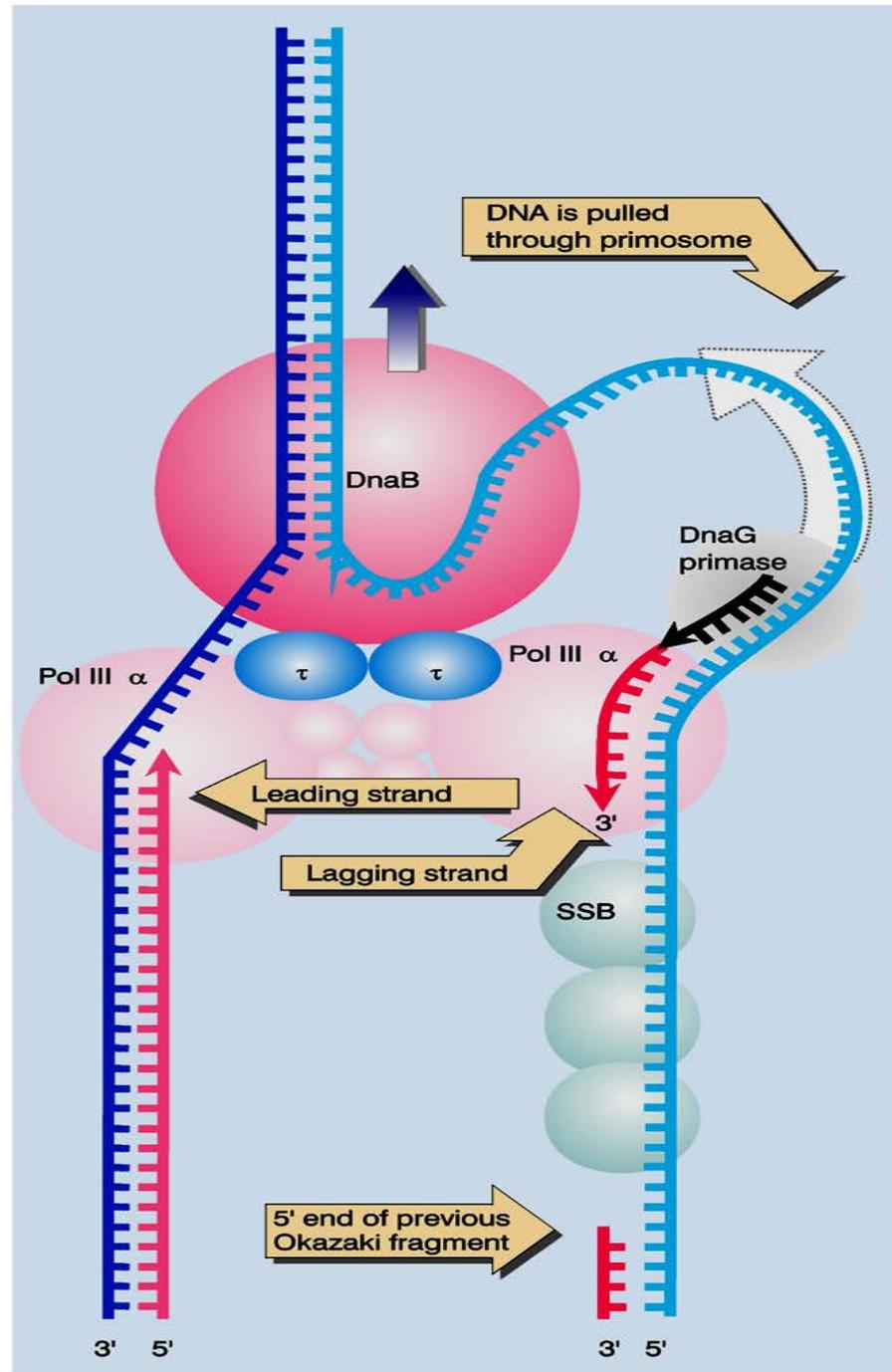
Síntese das fitas contínua e descontínua é independente

Fita descontínua

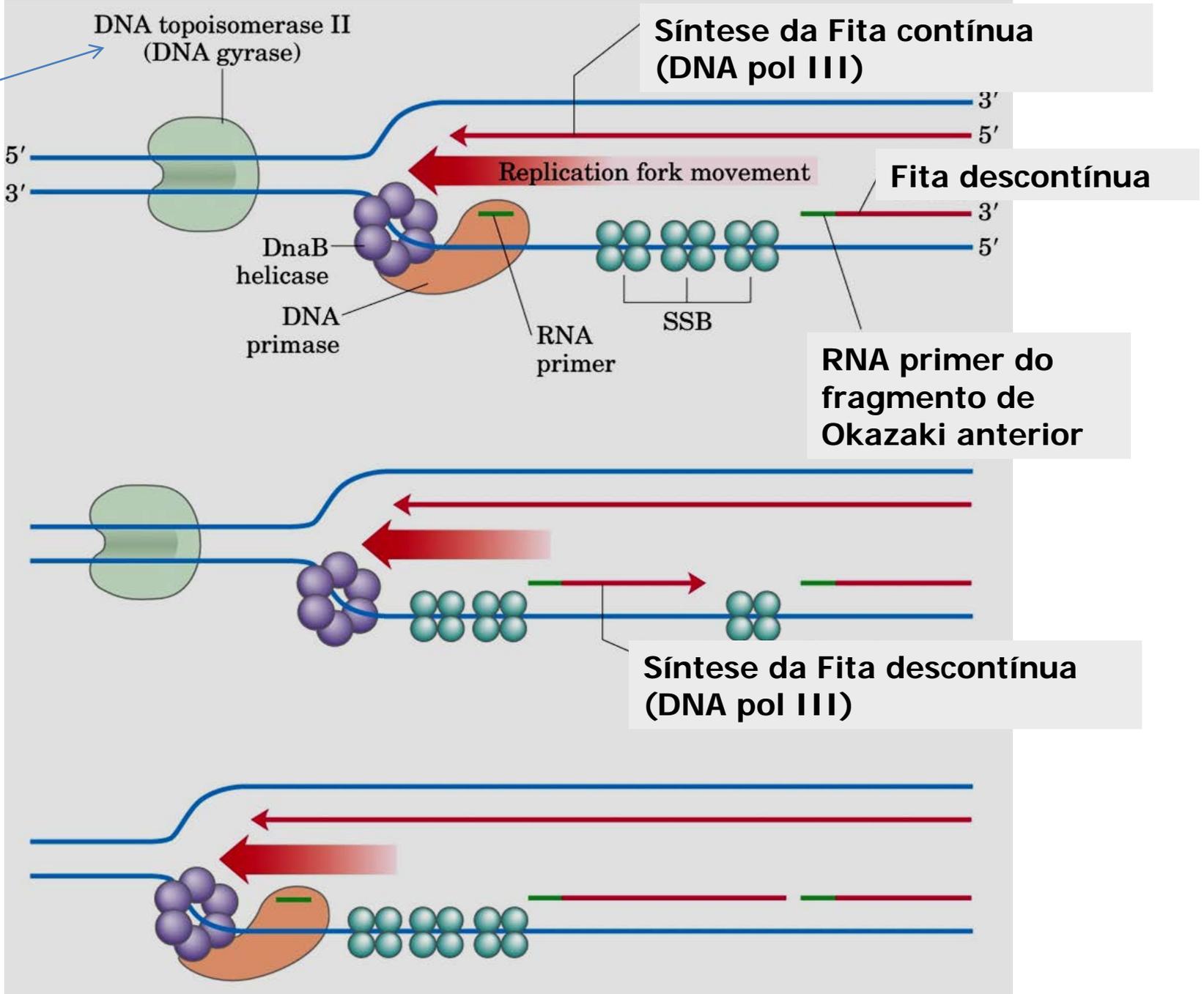


O complexo de replicação

- 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

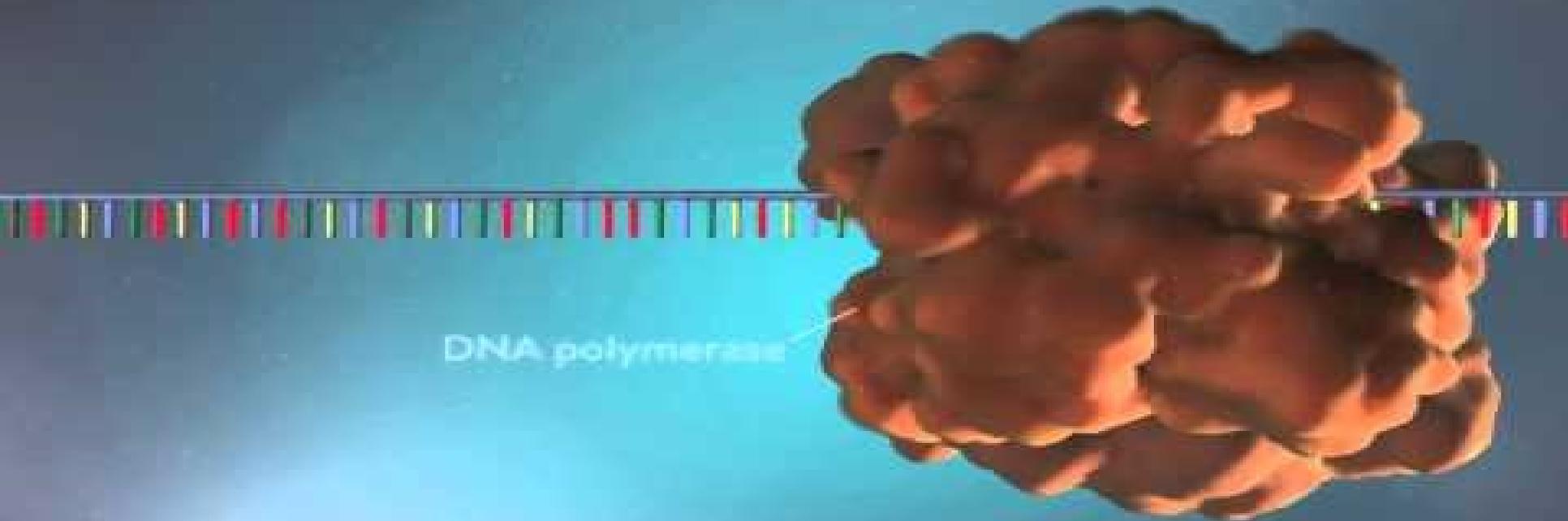


Prepara a dupla hélice para ser desenrolada



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

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)



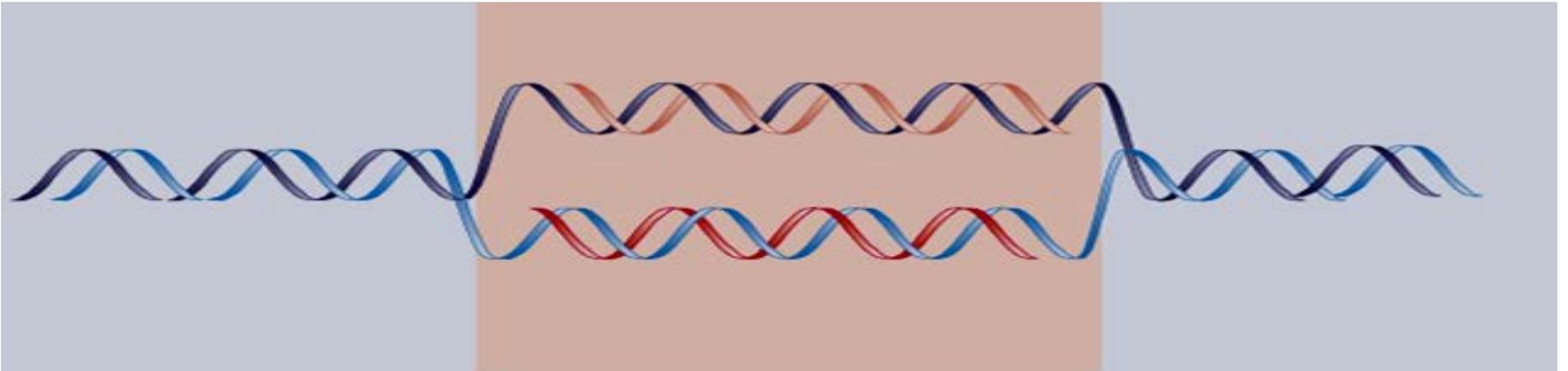
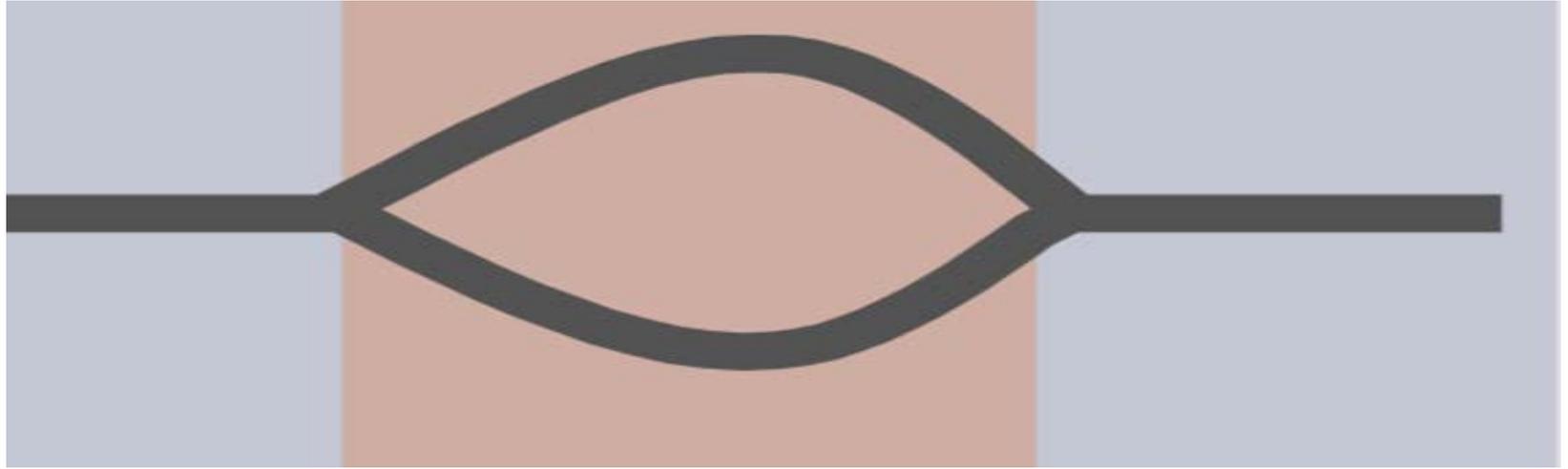
DNA polymerase

Assista agora a uma animação no YouTube sobre o processo de replicação

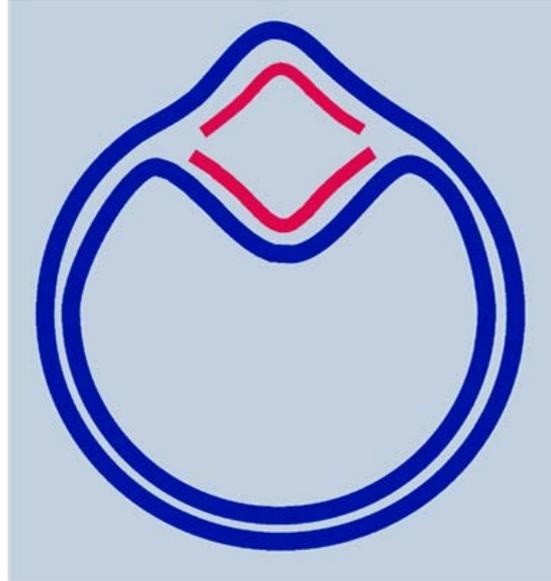
<https://youtu.be/TNKWgcFPHqw>

Procure identificar os elementos descritos nos slides anteriores nessa animação

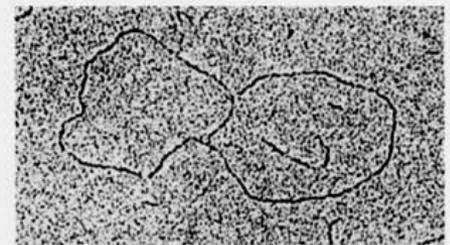
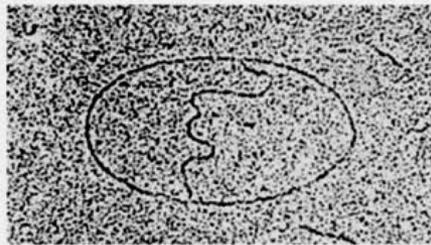
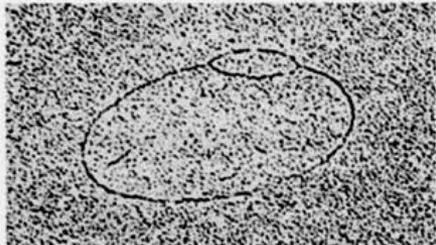
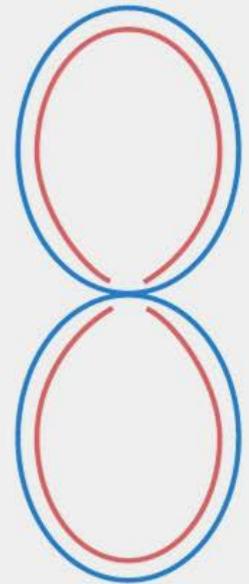
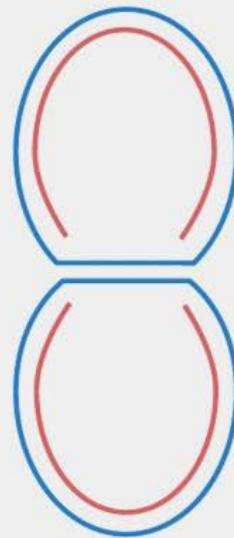
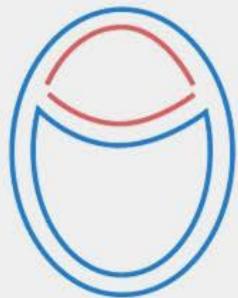
A replicação é vista como um “olho” flanqueado por DNA não replicado



O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



A replicação do cromossomo circular



Velocidade de replicação

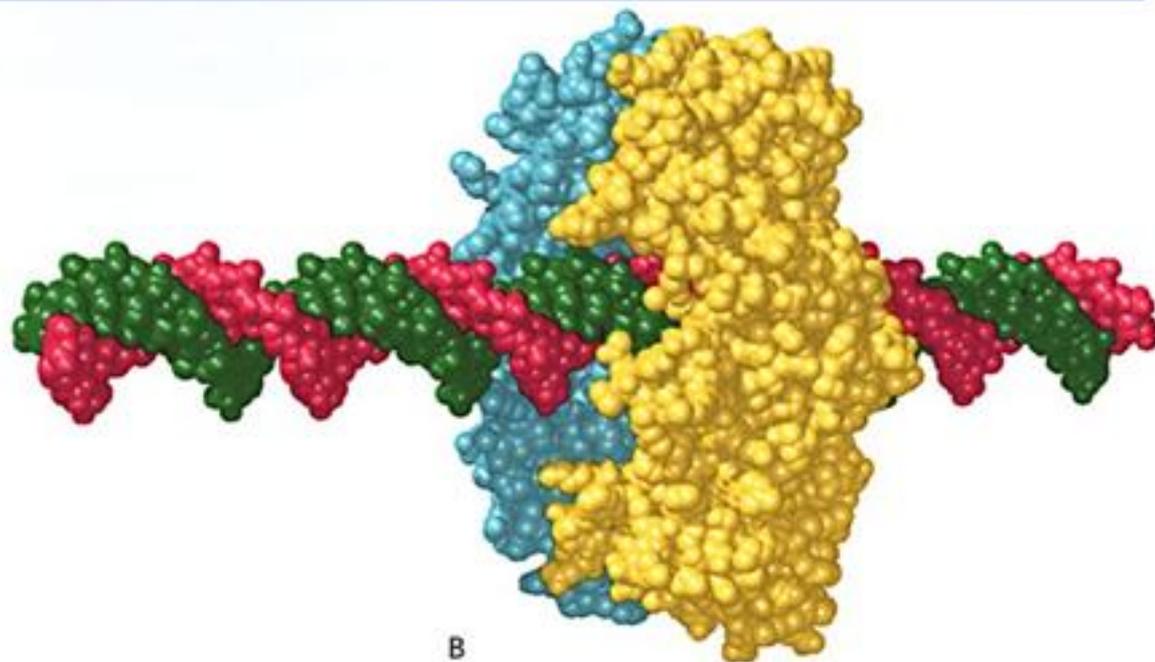
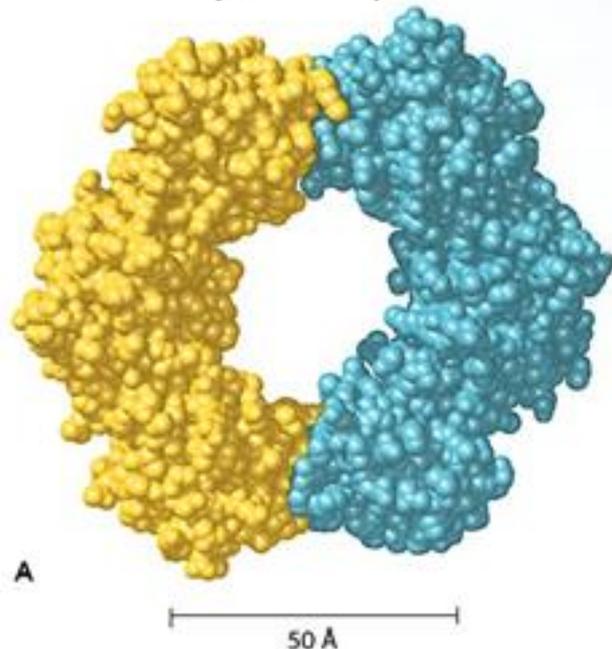
- A velocidade da forquilha de replicação em bactérias é de aprox. **1000 nucleotídeos/s**

Pol III is processive :

→ Adds thousands of bases

→ 1000 / sec (Pol I is 10 / sec)*

**Pol III
 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

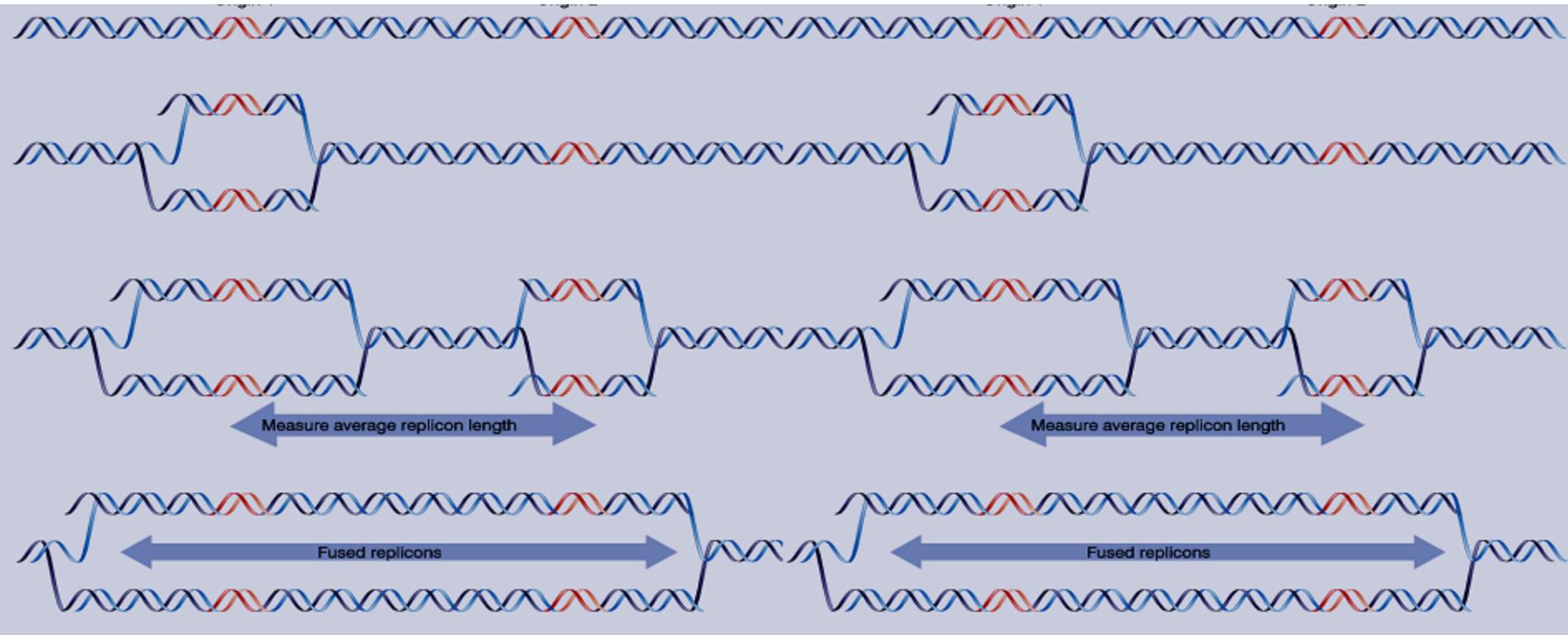
- A velocidade da forquilha de replicação em bactérias é de aprox. **1000 nucleotídeos/s**
- Genoma: 4×10^6 pb
- $(4 \times 10^6) / 1000 = 4000 \text{ s} = \mathbf{66 \text{ min}}$
- Tempo de duplicação de um célula de *E. coli*
 - No laboratório, o tempo é de aprox. **20 min**

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

Replicon:

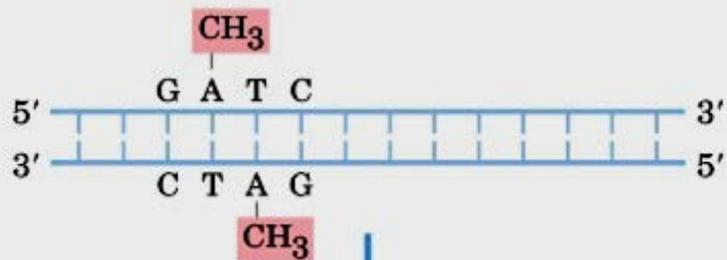
- 1. Origem + Término**
- 2. Ativados apenas uma única vez em cada ciclo celular**
- 3. O genoma de uma célula procariótica em geral constitui um único replicon**
- 4. Cada cromossomo eucariótico constitui vários replicons e todos são ativados uma única vez no ciclo celular ainda que não simultaneamente**

O genoma eucariótico constitui-se de vários replicons

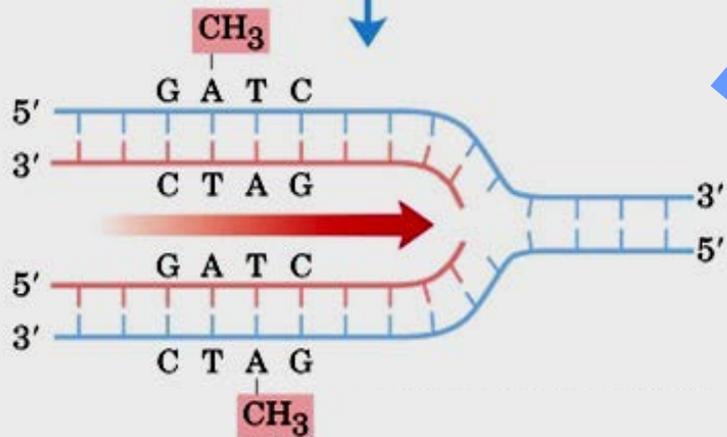


- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2.000pb/min (= 33 nt / s)
- Os replicons eucarióticos são iniciados em tempos diferentes
- Fase S demora ~ 6hrs em uma célula somática

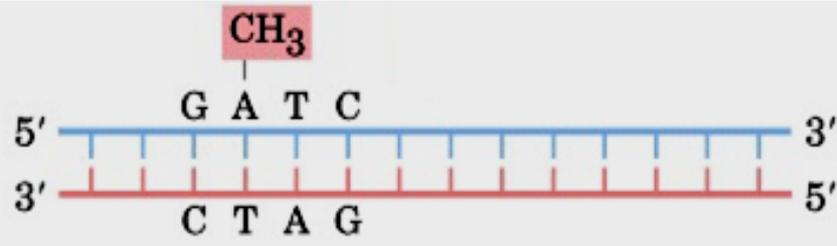
Reparo para correção de erro após a replicação



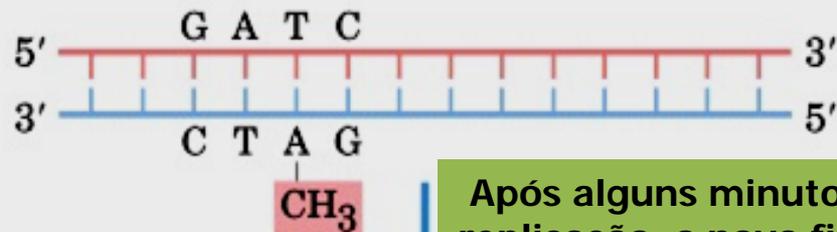
Replicação



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

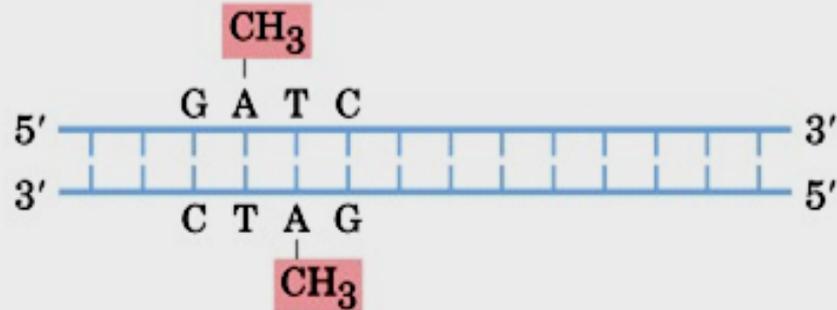
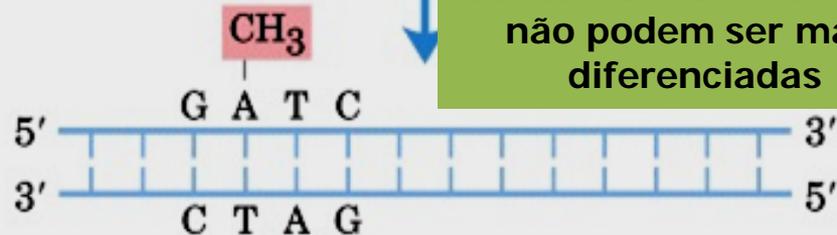


DNA semi-metilado



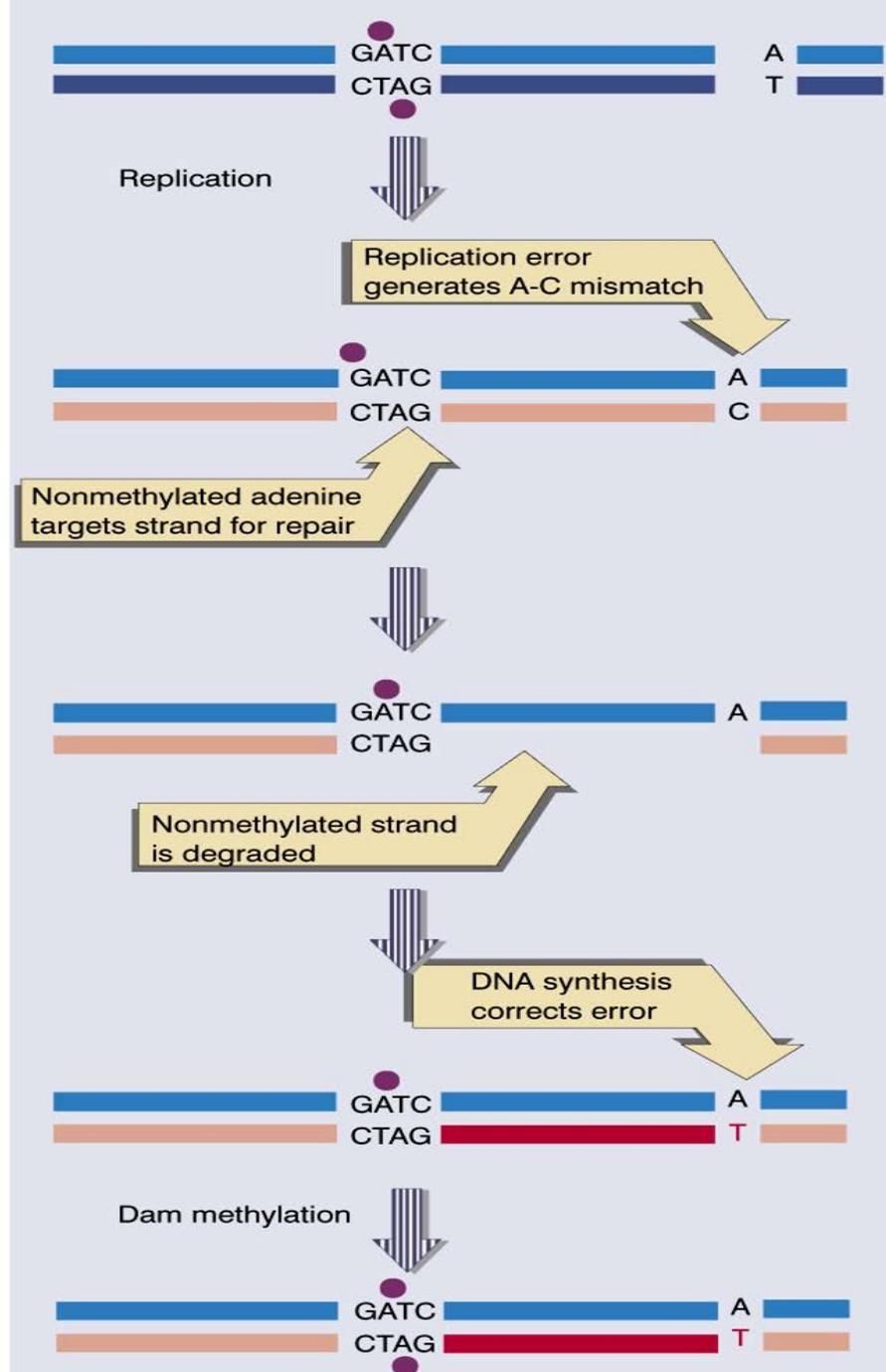
Dam methylase

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



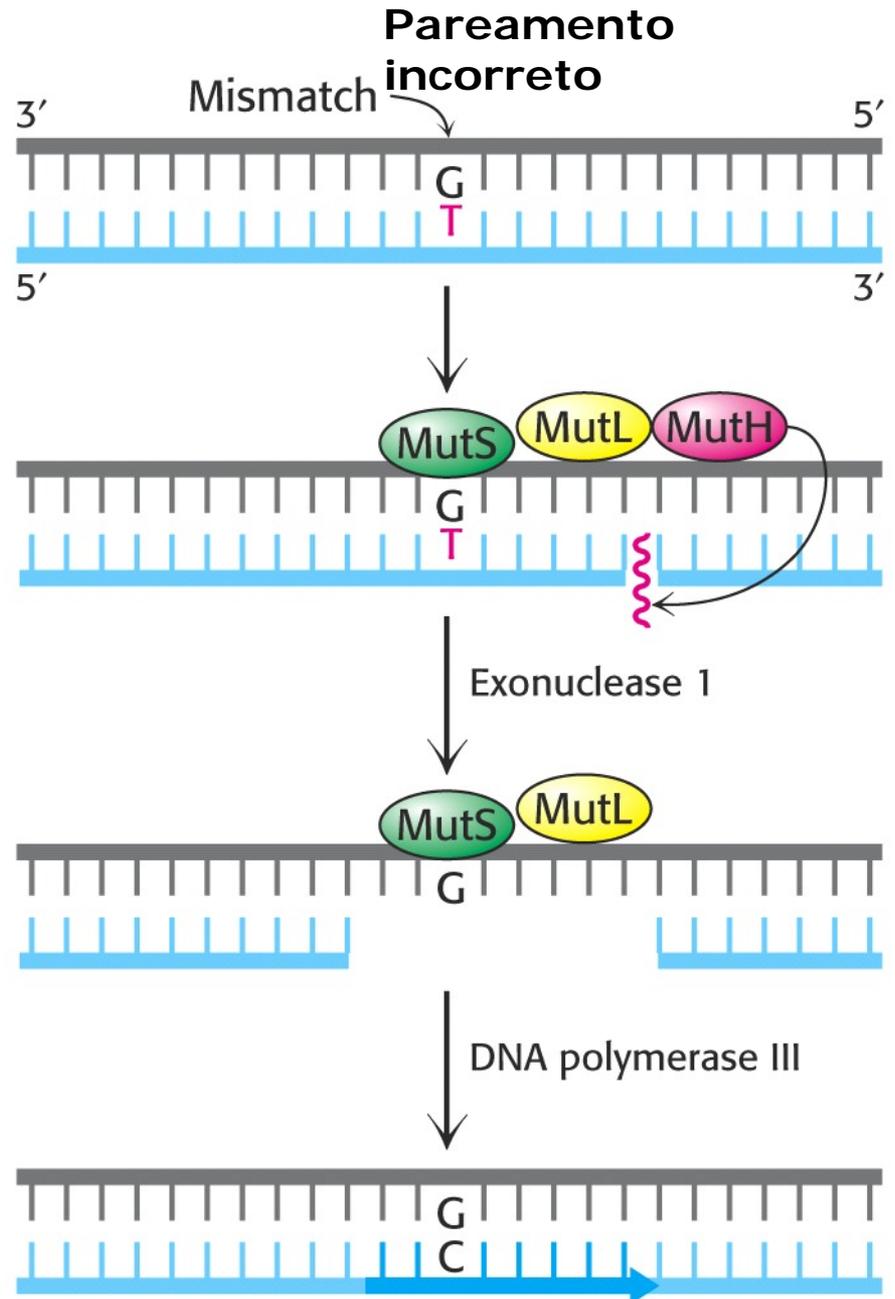
Reparo para correção de erro

- 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**