

Replicação

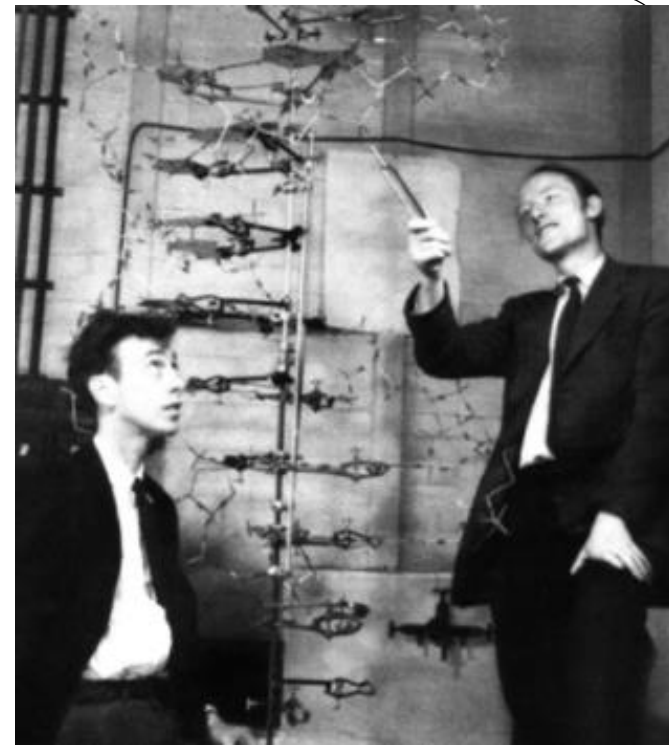
Deise Schroder Sarzi

Por que é importante compreender?

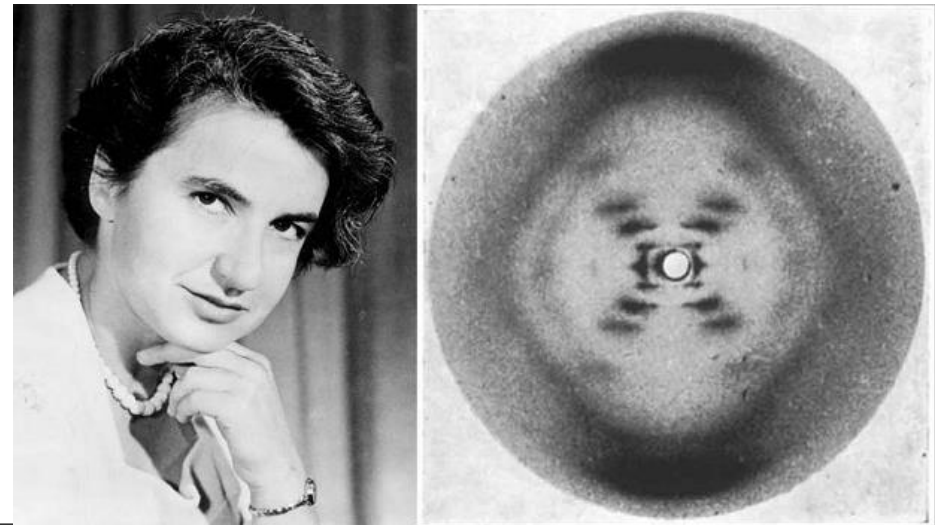
- DNA é um repositório de informação
- Armazenamento estável, mas complexo
- **Mutações são hereditárias**
- Necessário manter a integridade da informação genética = **mecanismos de reparo**
- Enzimas: importância na medicina e na utilidade diária, como reagentes em uma ampla variedade de tecnologias
- Muitos estudos foram feitos com *Escherichia coli* pois suas enzimas são bem conhecidas

Como organismos geram cópias?

- Até a década de 1940 não se sabia que o DNA era a molécula responsável pela herança (Morgan e *D. melanogaster*)
- Em 1953, Watson e Crick deduziram sua estrutura e o processo ficou claro
- Rosalind Franklin e as difrações de raioX

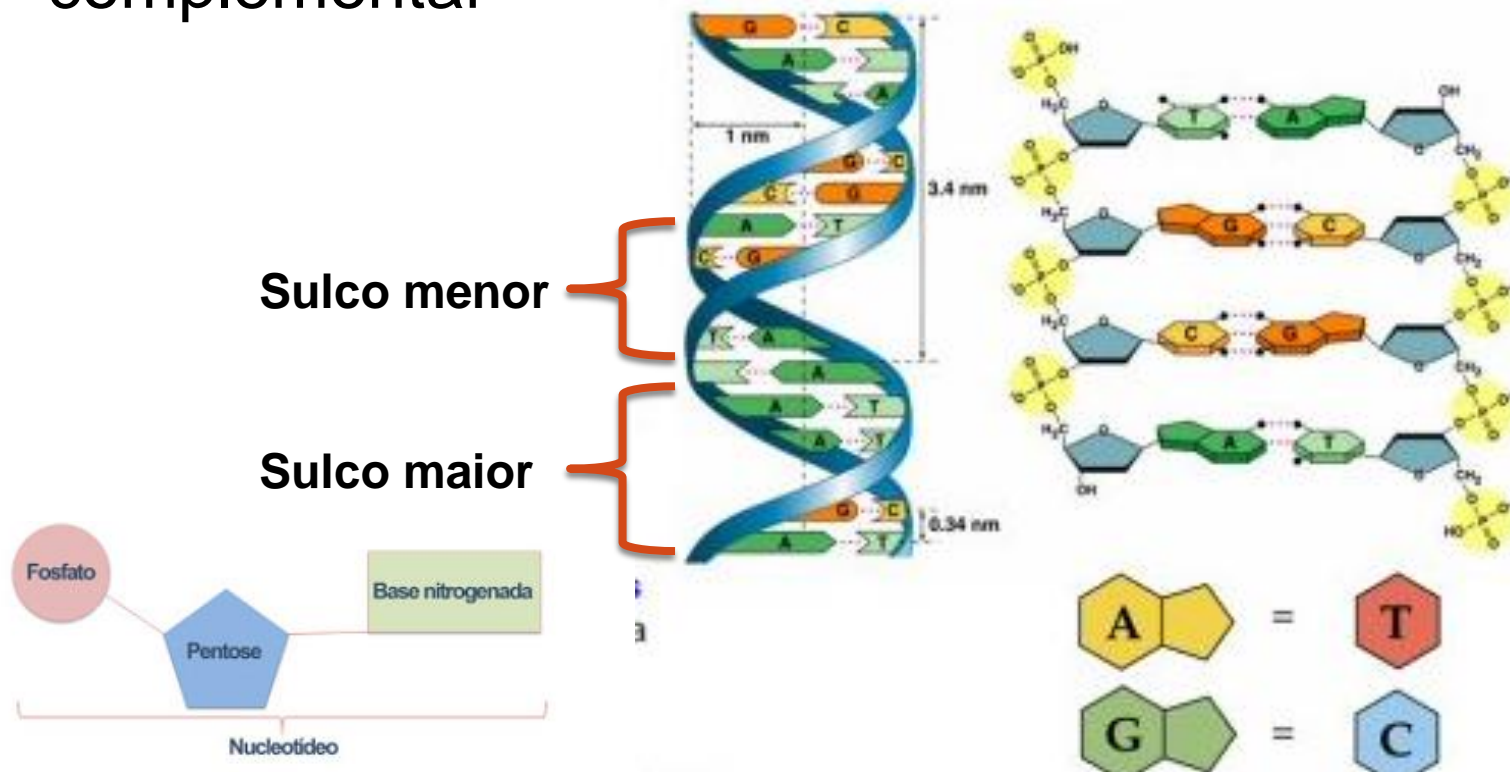


Prêmio Nobel de Medicina em 1962

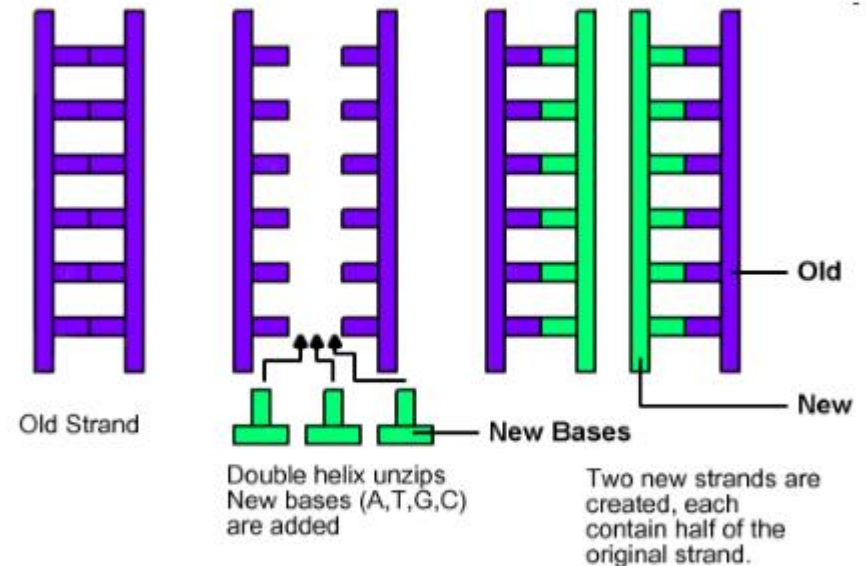
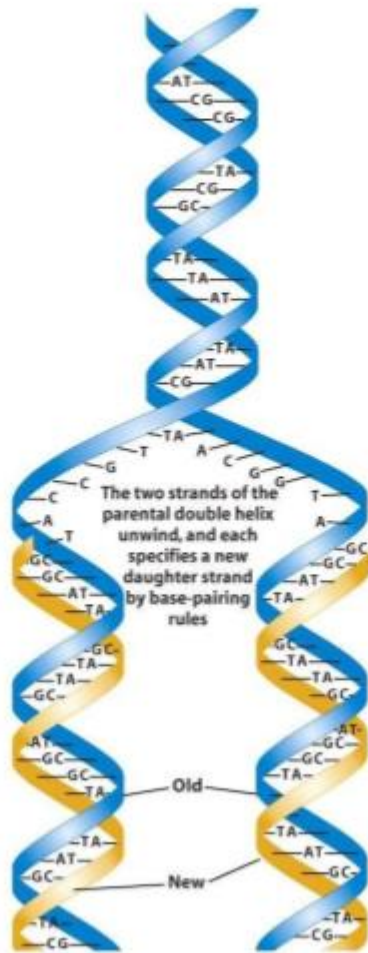


Como organismos geram cópias?

- Uma fita é o complemento da outra: as sequências previsíveis e as **regras restritas para o pareamento** de bases **fornece**m um molde para uma sequência complementar



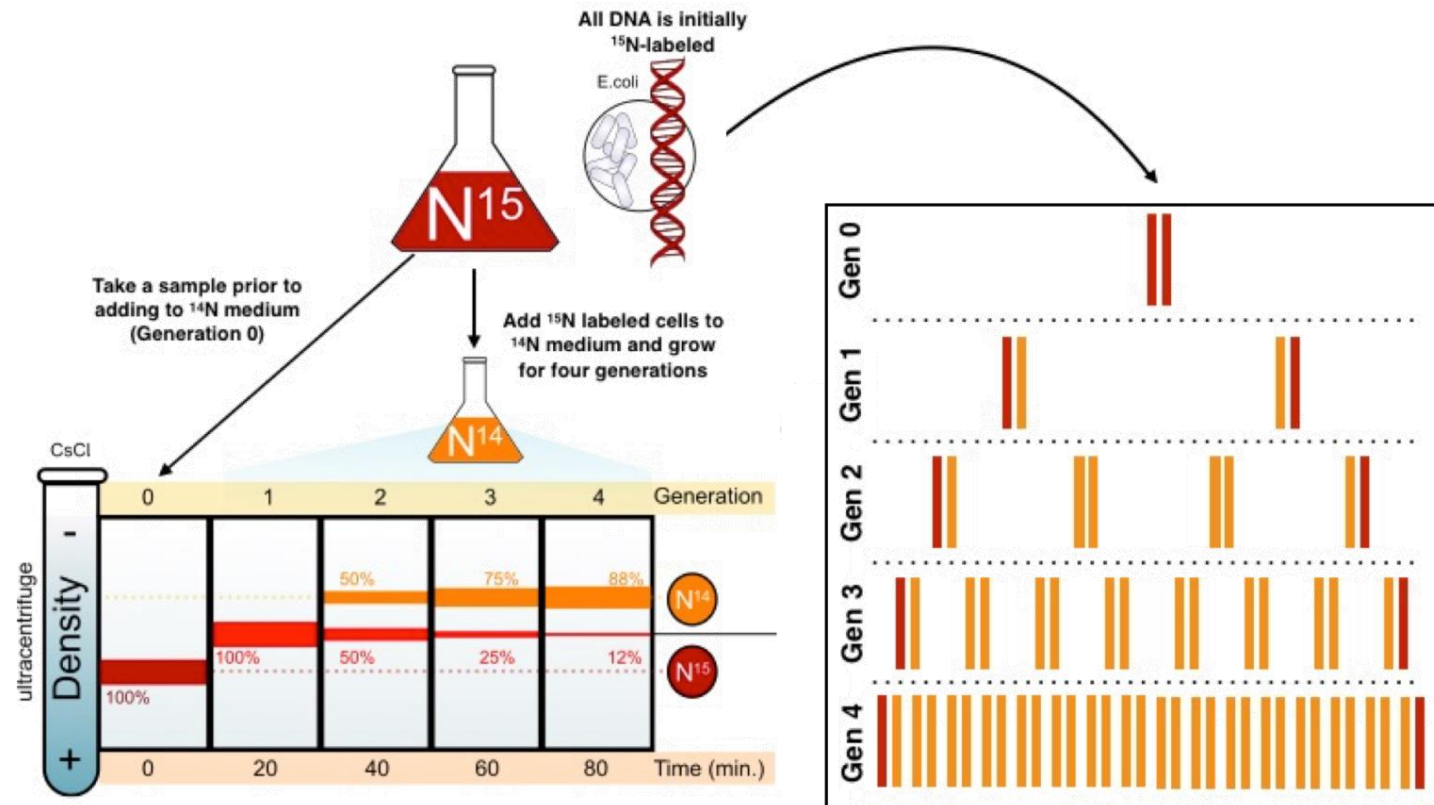
Replicação semi-conservativa



- Replicação é **semiconservativa**: cada fita serve como molde para uma nova fita, produzindo duas moléculas novas, cada qual **com uma fita nova e uma antiga**

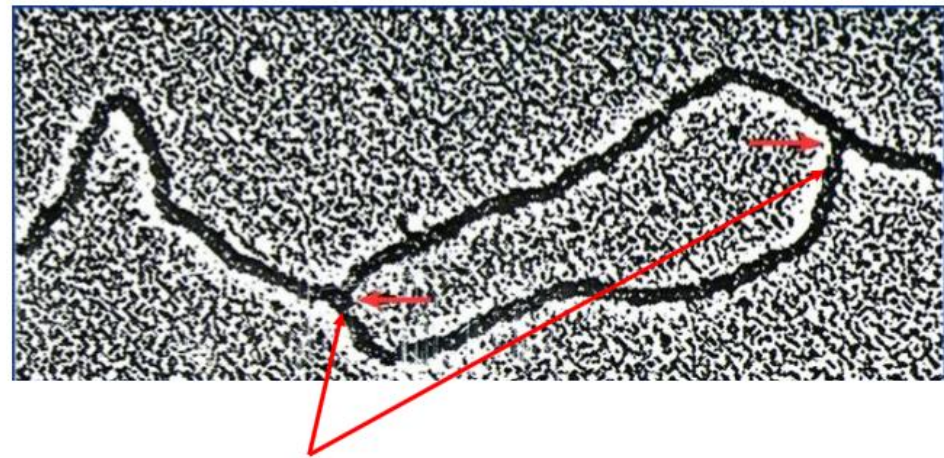
Replicação segue um conjunto de regras

- Hipótese comprovada por Meselson e Stahl



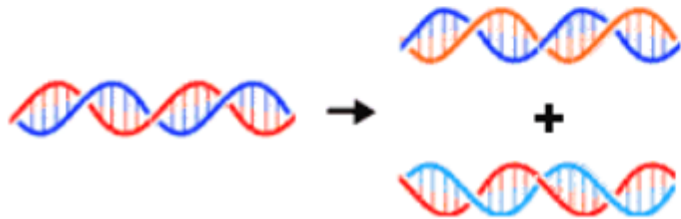
Replicação segue um conjunto de regras

- Replicação começa em uma origem e em geral segue **bidirecionalmente**
- Altamente coordenada e ocorre em **forquilhas de replicação**, onde o DNA parental está sendo desenrolado e as fitas separadas rapidamente e replicadas
- A replicação se inicia em um ponto chamado de **origem**, normalmente rico em AT

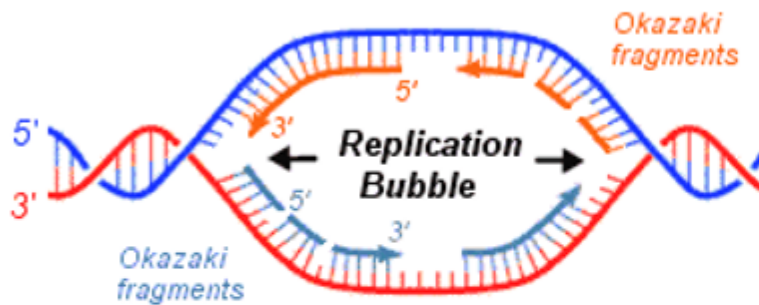


Forquilhas de replicação

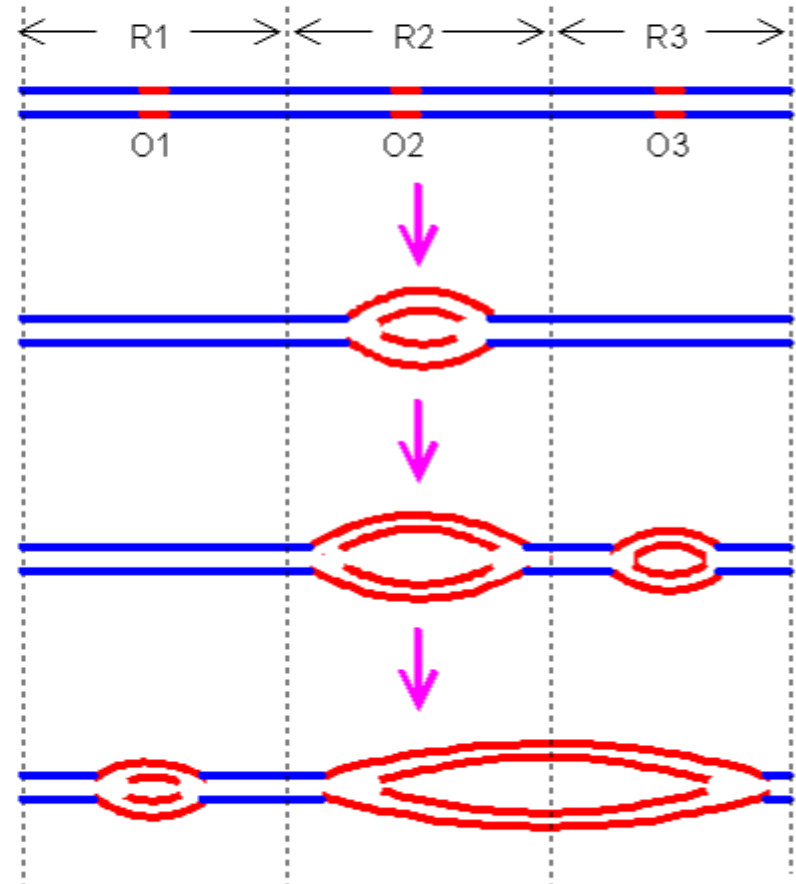
Origens de replicação



**Semi-conservative
Replication**



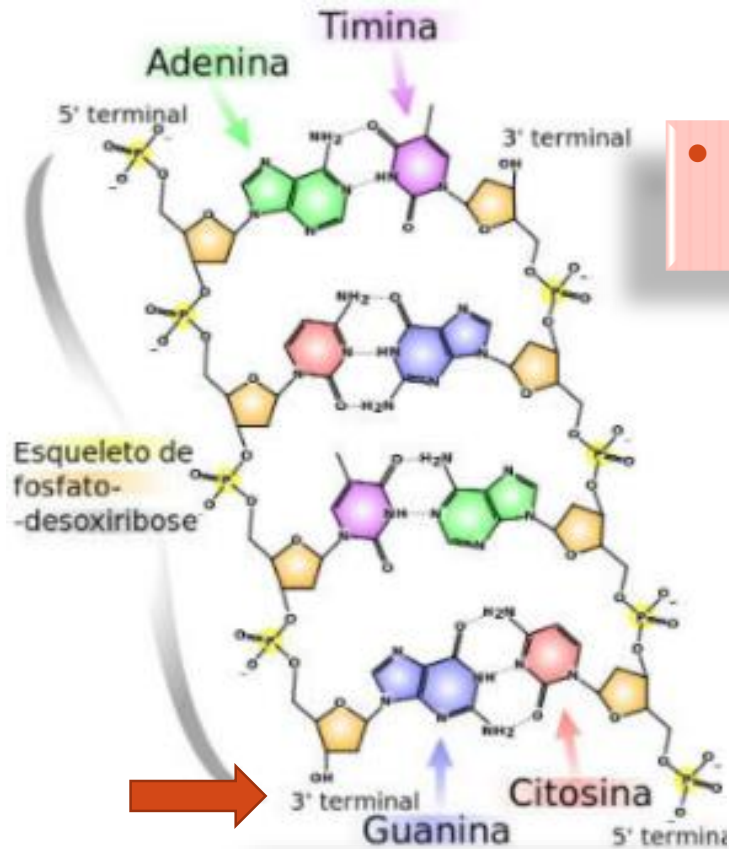
(c) 2000 Chemis





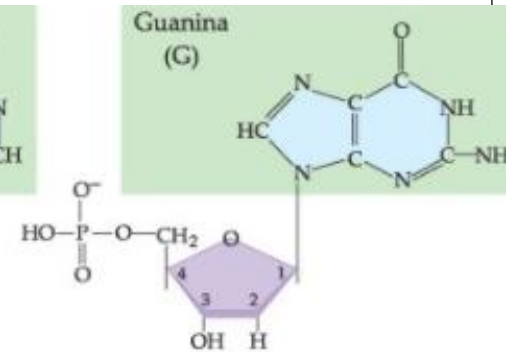
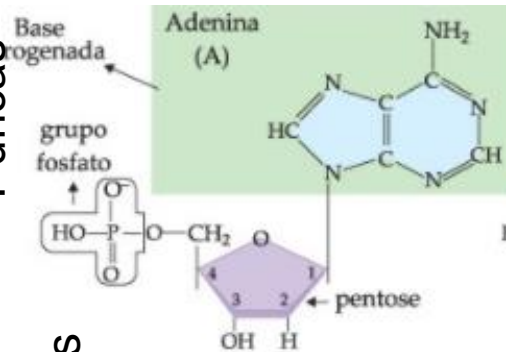
Qual o sentido da vida?

5' -> 3'!

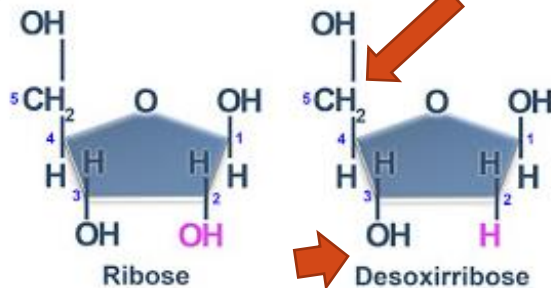
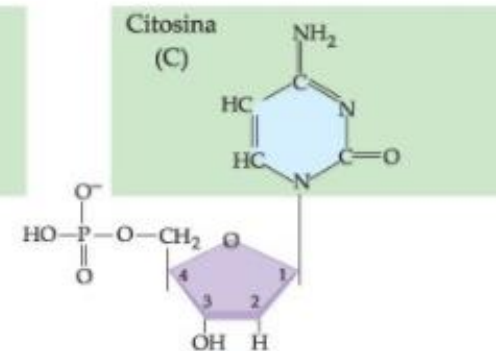
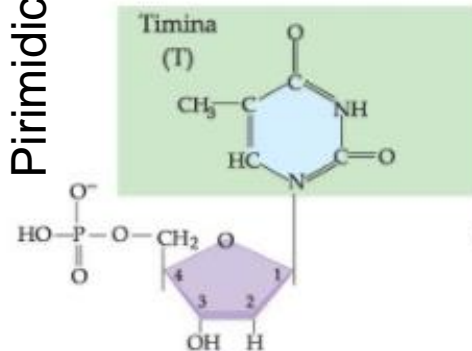


- Polimerase necessita de 3'OH livre para iniciar a síntese

Púricas



Pirimídicas



Qual o sentido da vida?

- Replicar requer energia!
- Nucleotídeos utilizados na síntese são trifosfatos (ATP, CTP, GTP e TTP, contendo desoxirribose)
- Liberação da energia contida em duas ligações entre grupos fosfatos
- Quando já estão constituindo as cadeias de DNA, os nucleotídeos são **monofosfatos**.

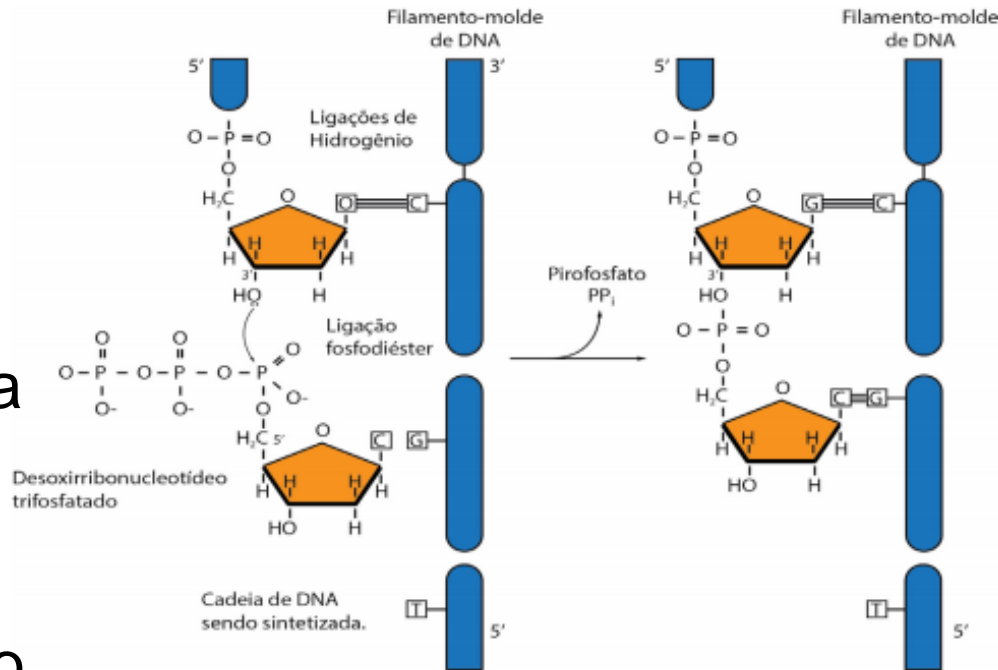
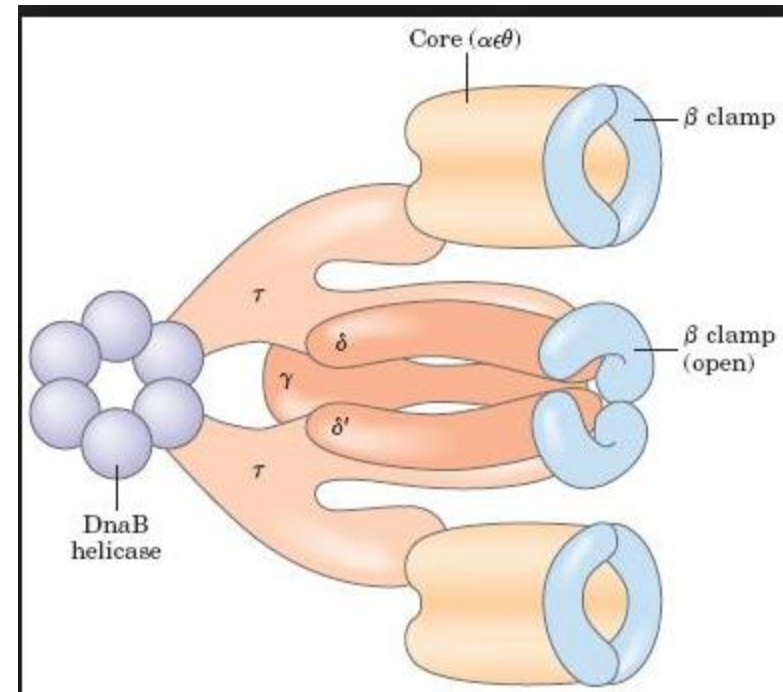


Figura 1. Alongamento da cadeia de DNA. Durante a síntese de DNA, a formação de um par de bases tem início quando um desoxirribonucleotídeo 5' trifosfatado forma pontes de hidrogênio com um resíduo de nucleotídeo da cadeia molde. O passo seguinte é a formação da ligação fosfodiéster entre o novo nucleotídeo e o resíduo terminal da cadeia em crescimento, com liberação de pirofosfato.

DNA é sintetizado por polimerases

- Duas exigências:
 - Precisam de um **molde**:
polimerização é feita de acordo com as regras de pareamento de Chargaff: A-T e C-G
 - Precisam de um **primer** ou iniciador: um segmento de fita com uma extremidade 3'-**hidroxila livre**, ao qual um nucleotídeo possa ser adicionado.



Tipos de DNA polimerase

- DNA polimerase I – Descoberta em 1969: **remove o primer de RNA** da fita descontínua nos fragmentos de Okazaki e os substitui por DNA
- DNA polimerase II – Lenta, envolvida em **reparo** do DNA
- DNA polimerase III – Descoberta em 1970– Principal enzima que realiza a **replicação** em procariotos

Replissomo – maquinaria para replicação



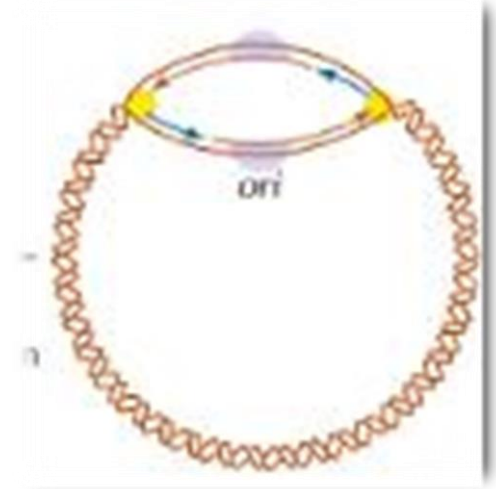
IMPORTANTE!

- **Helicase** – promove a abertura da hélice do DNA parental por meio da quebra das pontes de H (utiliza ATP)
- **Proteínas SSB** – estabiliza cada fita separada
- **Topoisomerases** – aliviam o estresse causado pelo desenovelamento inicial das helicases
- **Primases** – adicionam um iniciador curto de RNA na origem de replicação para a DNA pol III trabalhar
- **DNA polimerase III** – principal enzima da replicação (muito rápida)
- **DNA polimerase I/II** – (I).substitui o iniciador de RNA por DNA / (II).realiza reparos e correções (muito lenta)
- **DNA ligases** – ligam o DNA recém substituído ao sintetizado

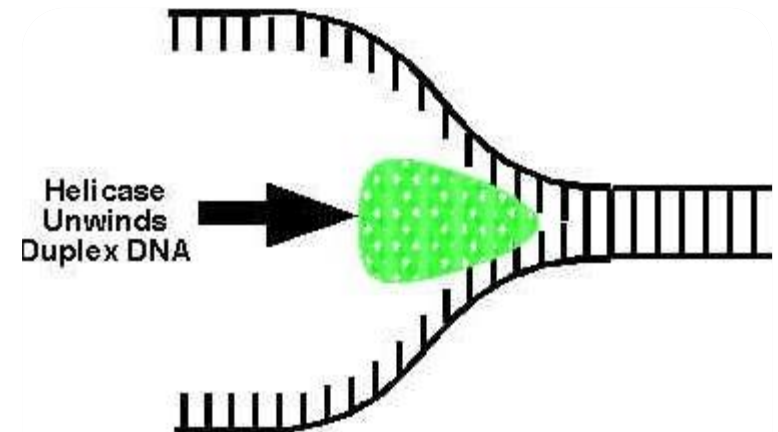
Iniciação

Como ocorre o processo?

- **Origem de replicação**
 - Procariotos: geralmente uma origem de replicação
 - Eucariotos: várias origens

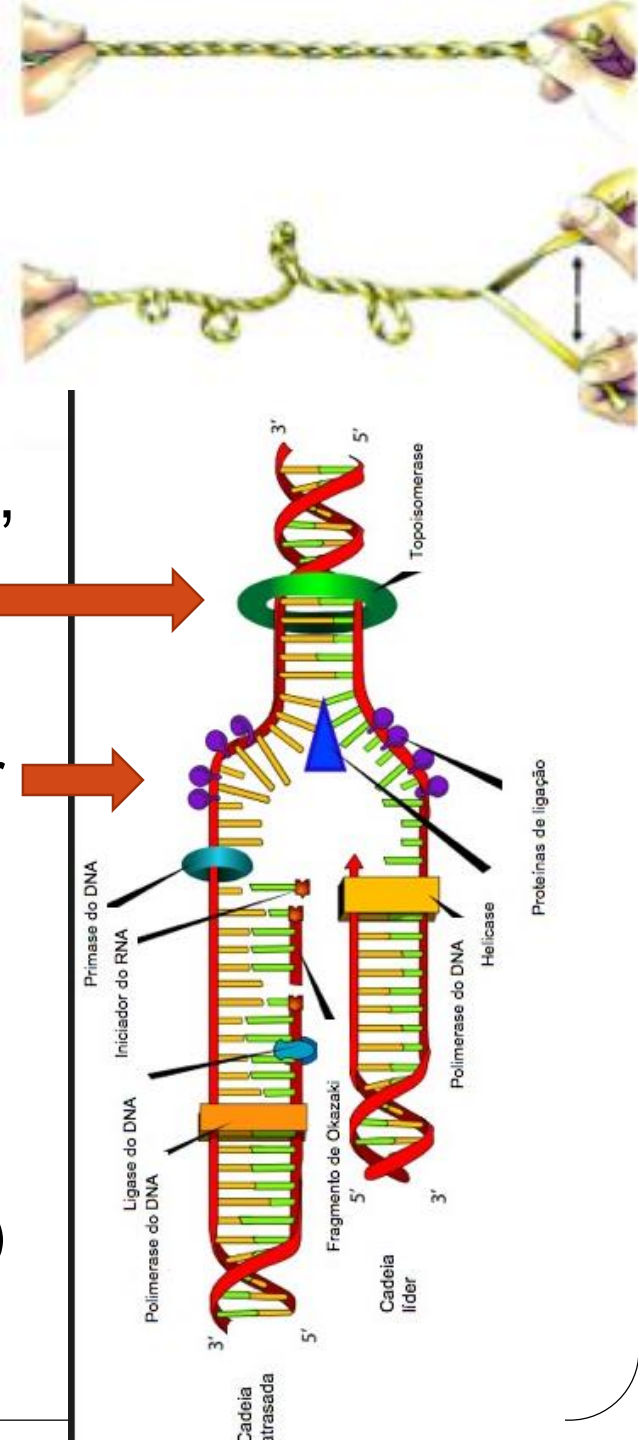


- Abertura da hélice e estabelecimento de complexo de iniciação (**helicase**)



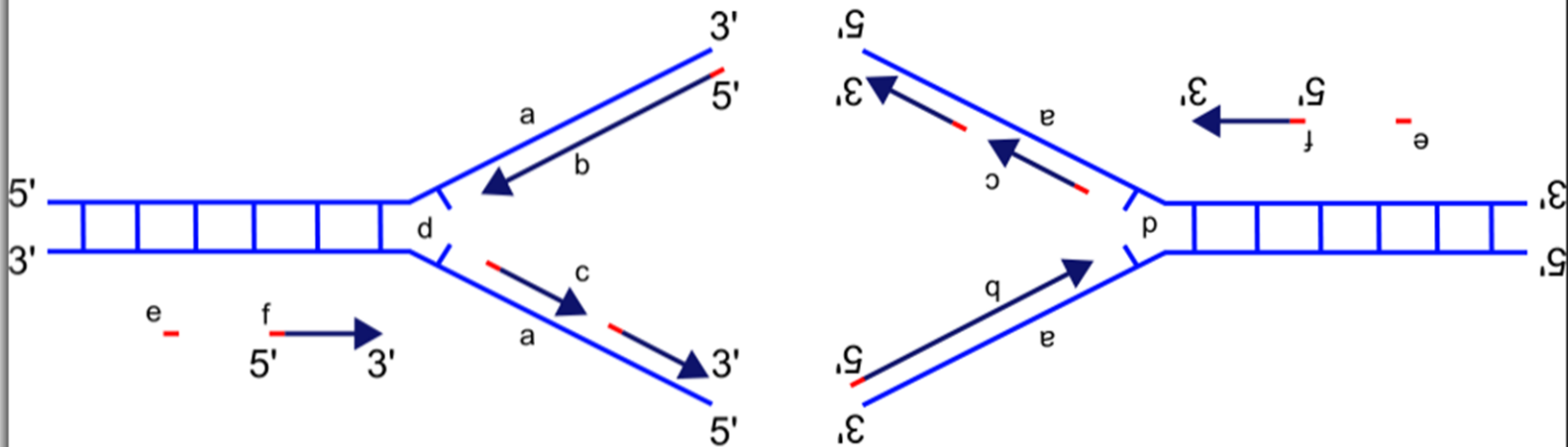
Alongamento

- Quando o DNA parental é desenrolado por **helicases**, isso causa um estresse no restante da fita, aliviado pelas **topoisomerases**
- Fitas separadas são estabilizadas por **proteínas SSB**
- Depois, duas operações distintas:
 - Síntese da fita líder (contínua)
 - Síntese da fita retardada (descontínua)



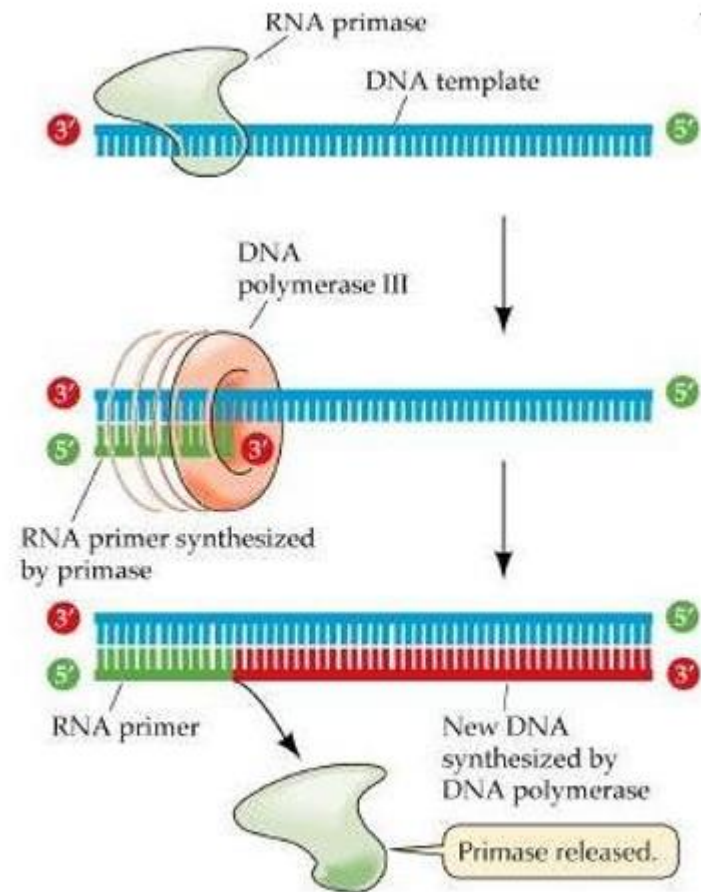
Fita líder e fita descontínua

- Fita sintetizada de forma contínua – **líder**, que segue no sentido de abertura da forquilha
- Fita sintetizada de forma descontínua – retardada, segue no sentido contrário da abertura da forquilha:
Fragmentos de Okazaki



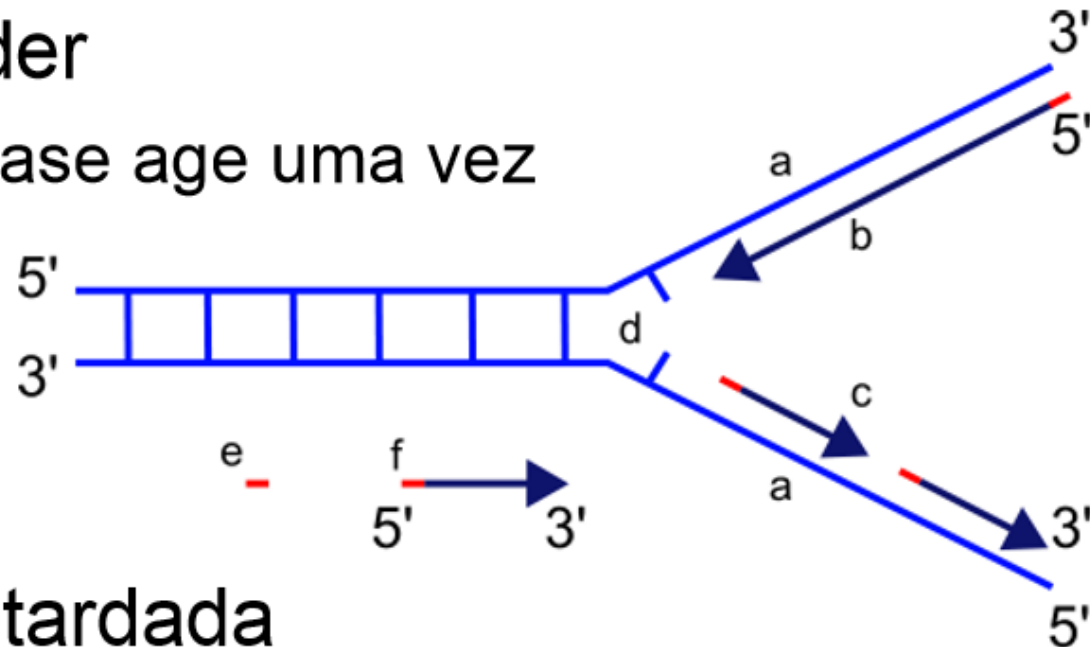
Primase

- Coloca um iniciador curto (~11 nucleotídeos) de **RNA** na origem de replicação, fornecendo extremidade 3'OH livre
- Liga-se à helicase em procariotos formando o chamado primossomo



Replicação das fitas

- Fita líder
 - Primase age uma vez

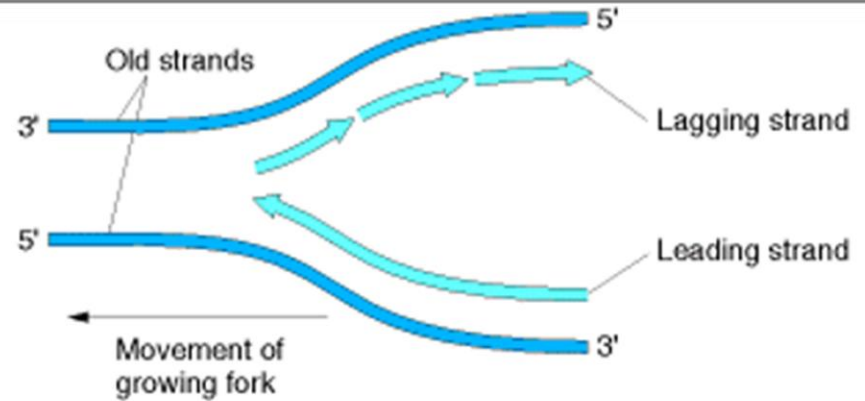


- Fita retardada
 - Primase age várias vezes
 - 1967, Fragmentos de Okasaki

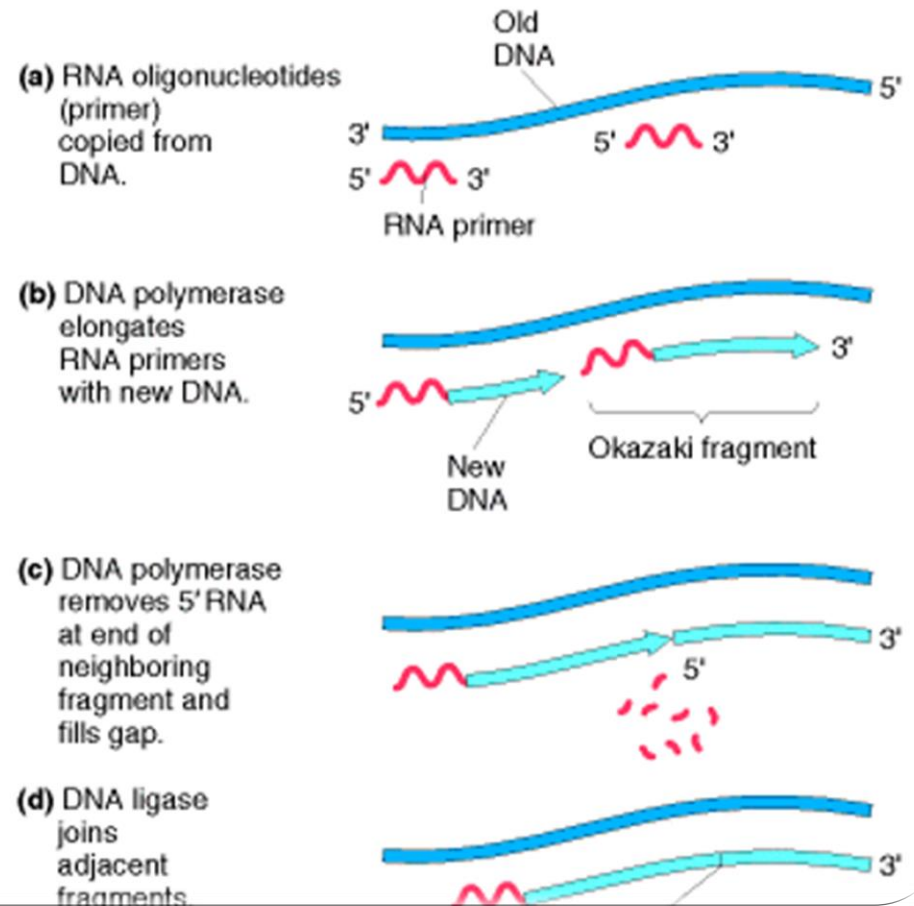
Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K. Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth. Jpn J Med Sci Biol. 1967 Jun;20(3):255-60

DNA polimerase

- Remove e substitui o iniciador de RNA do fragmento de Okazaki por DNA e o corte remanescente é selado pela **DNA-ligase**

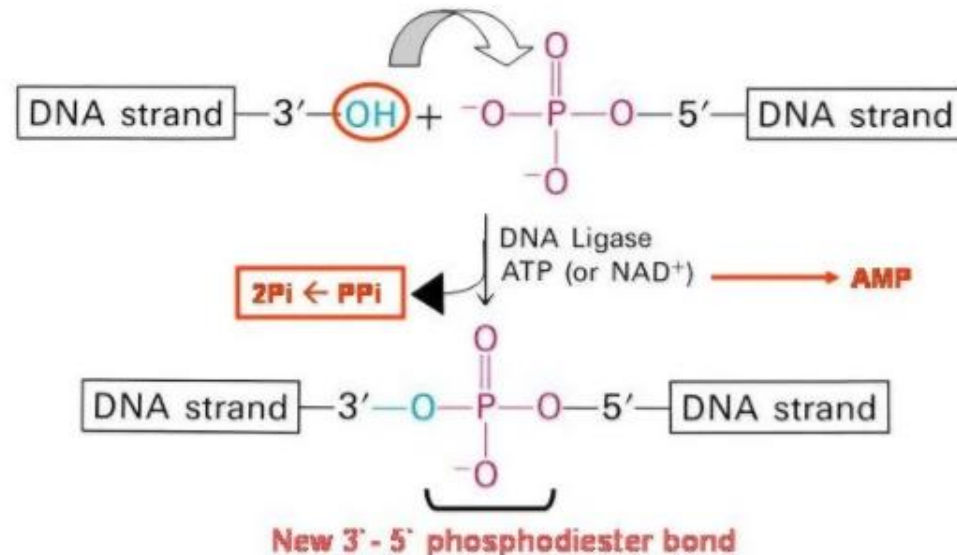


Lagging-strand synthesis



DNA Ligase

- **DNA-ligase** catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre 3' hidroxila na extremidade de uma fita de DNA e o 5' fosfato na extremidade da outra fita



Vídeo - Replicação

- 2:10 min



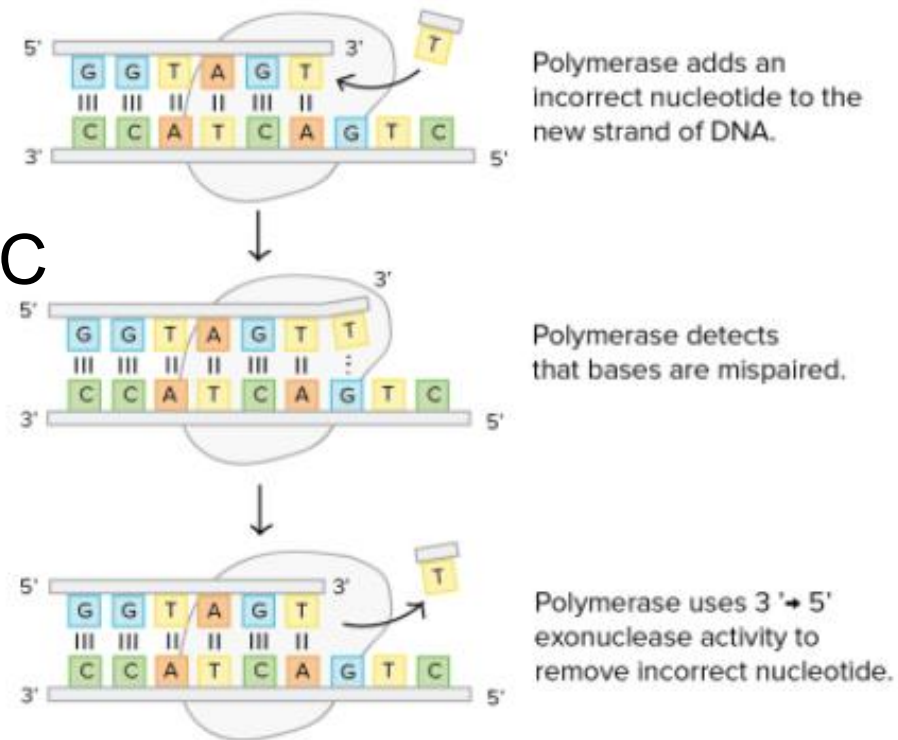
Sistema de reparo

- Manter a integridade do DNA é imprescindível !
- O reparo é possível em grande parte porque a molécula de DNA consiste em duas fitas complementares,
 - dano em uma fita pode ser removido e substituído com precisão utilizando a fita complementar não danificada como molde
- O sistema de reparo tem meios para diferenciar entre o molde e a fita sintetizada recentemente
- Fitas molde são metiladas nas adeninas das sequências GATC
- O estado transitório curto após a passagem da forquilha de replicação em que a nova fita ainda não é metilada, permite a diferenciação da nova fita



Replicação tem alto grau de precisão

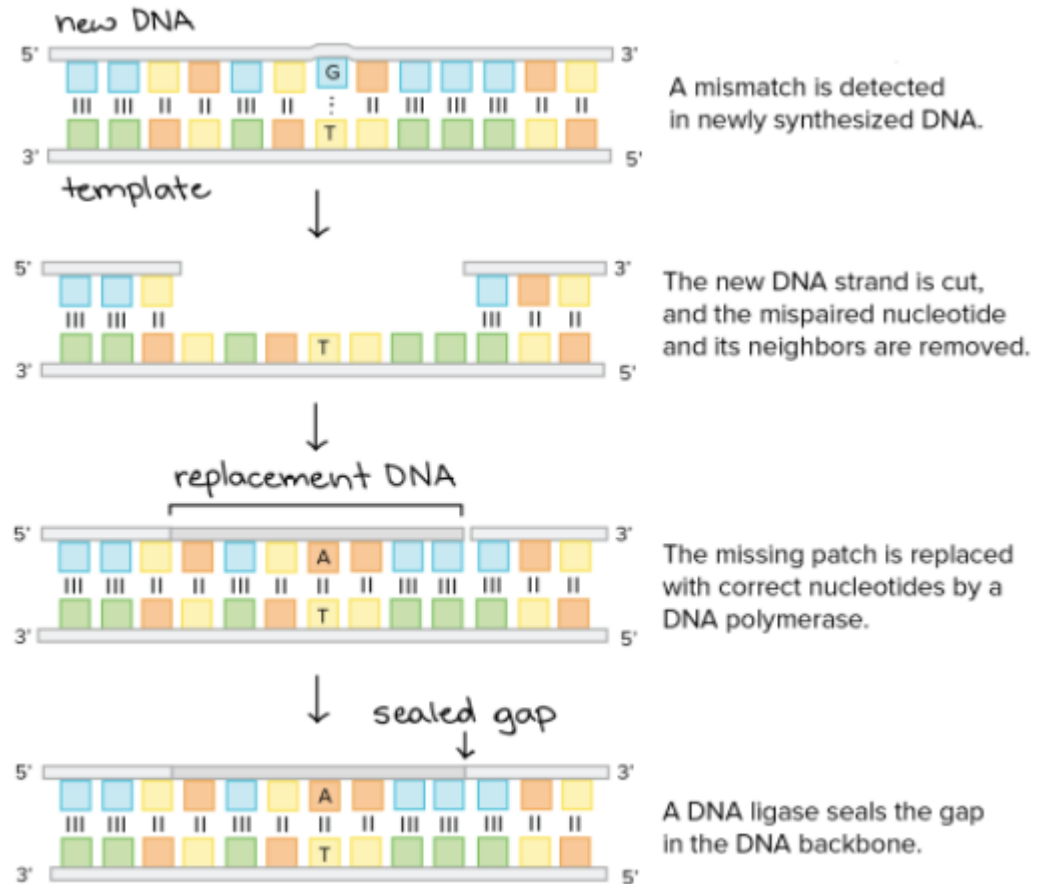
- 1 erro a cada 10^9 ou 10^{10} nucleotídeos
- Geometria dos pares A=T, G≡C
- Polimerase:
 - polimerização 5'→3'
 - exonuclease 3'→5',



Dupla verificação

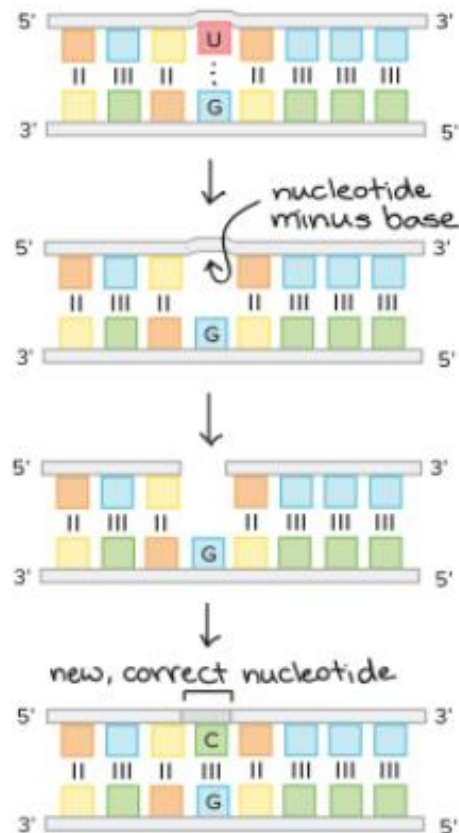
Reparo por mal pareamento

- Base mal pareada logo após a síntese
- Qual base é a correta?
- Fita antiga terá grupos metil (CH₃) ligados a algumas bases!



Reparo por excisão

- Base sofre dano (luz UV, fumaça, químicos, etc.)
- Glicosilases detectam o erro
- Falha nesse sistema de reparo está associada a alguns tipos de **câncer** e doenças



Deamination converts a cytosine base into a uracil.

The uracil is detected and removed, leaving a base-less nucleotide.

The base-less nucleotide is removed, leaving a small hole in the DNA backbone.

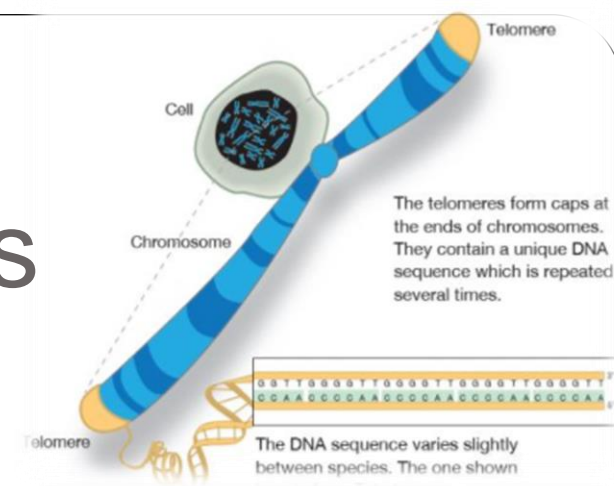
The hole is filled with the right base by a DNA polymerase, and the gap is sealed by a ligase.

Vídeo - dano ao DNA

- 1:34 min até 3:10 min



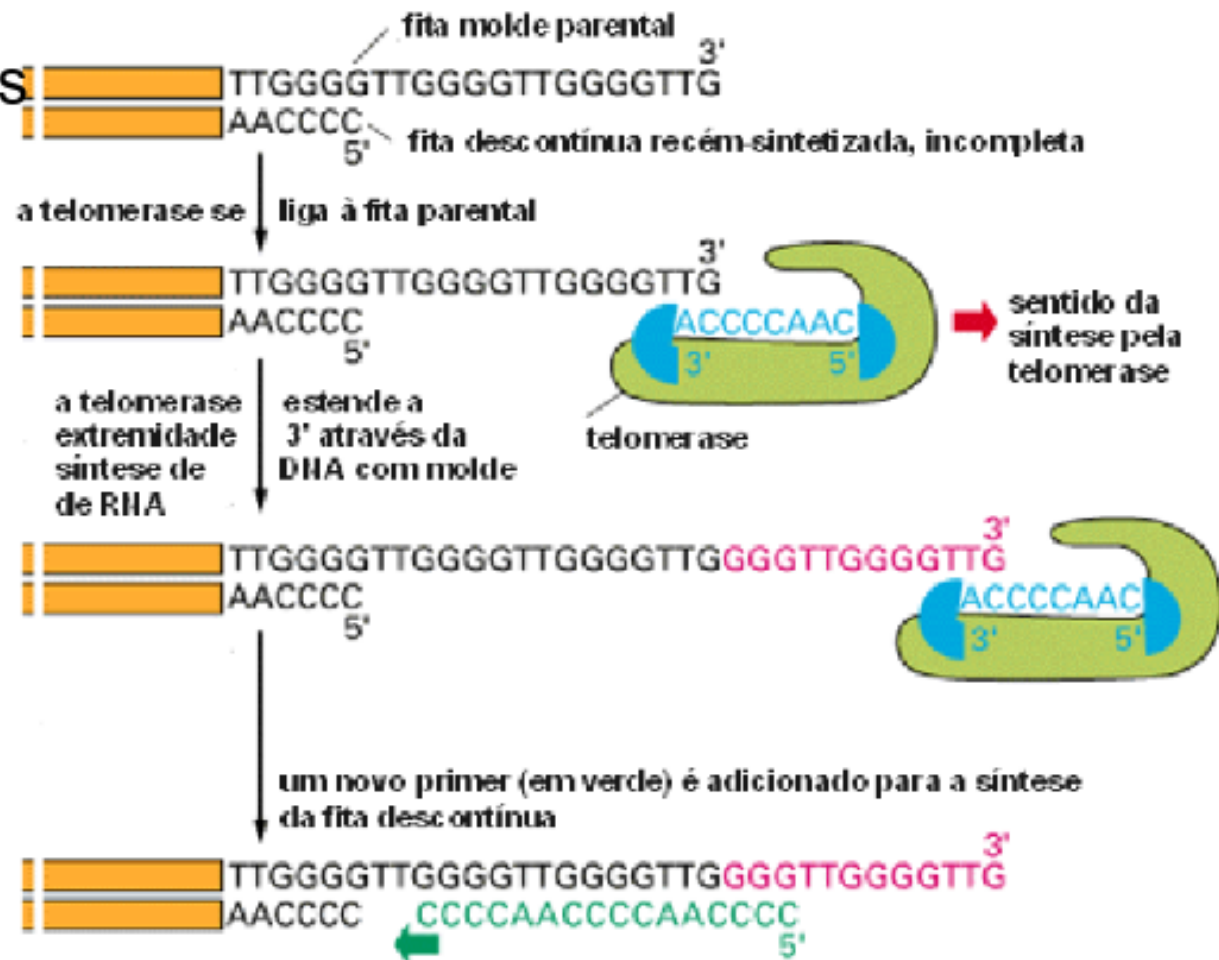
Replicação em eucariotos



- Moléculas de DNA em eucariotos são maiores e mais compactadas
- Várias origens de replicação
- As características essenciais da replicação são as mesmas em eucariotos e procariotos
- A replicação eucariótica é regulada de acordo com o ciclo celular (ocorre **na fase S** do ciclo celular – menos condensada)
- Cromossomos eucariotos são lineares, a terminação da replicação envolve estruturas denominadas **telômeros** nas extremidades de cada cromossomo

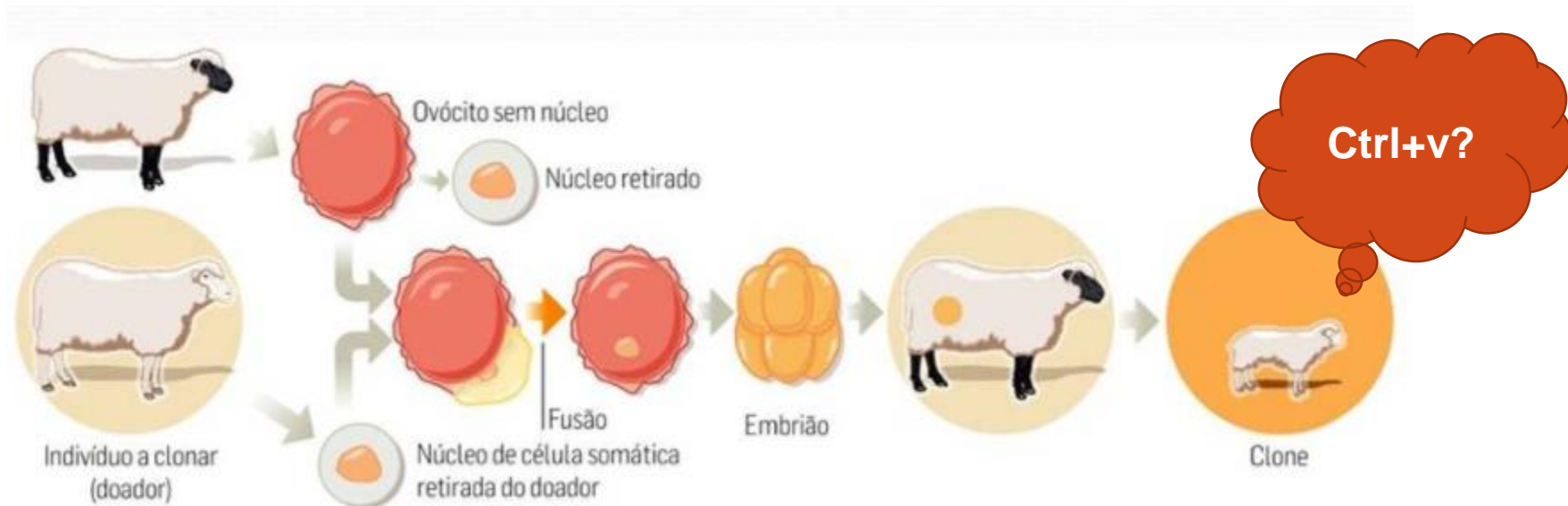
Telômeros e envelhecimento

- Telômeros vão se encurtando devido às divisões da célula
- Células com telômeros curtos morrem ou ficam mais vulneráveis
- Telomerase repõe telômeros na extremidade dos cromossomos
- Sequência repetitiva



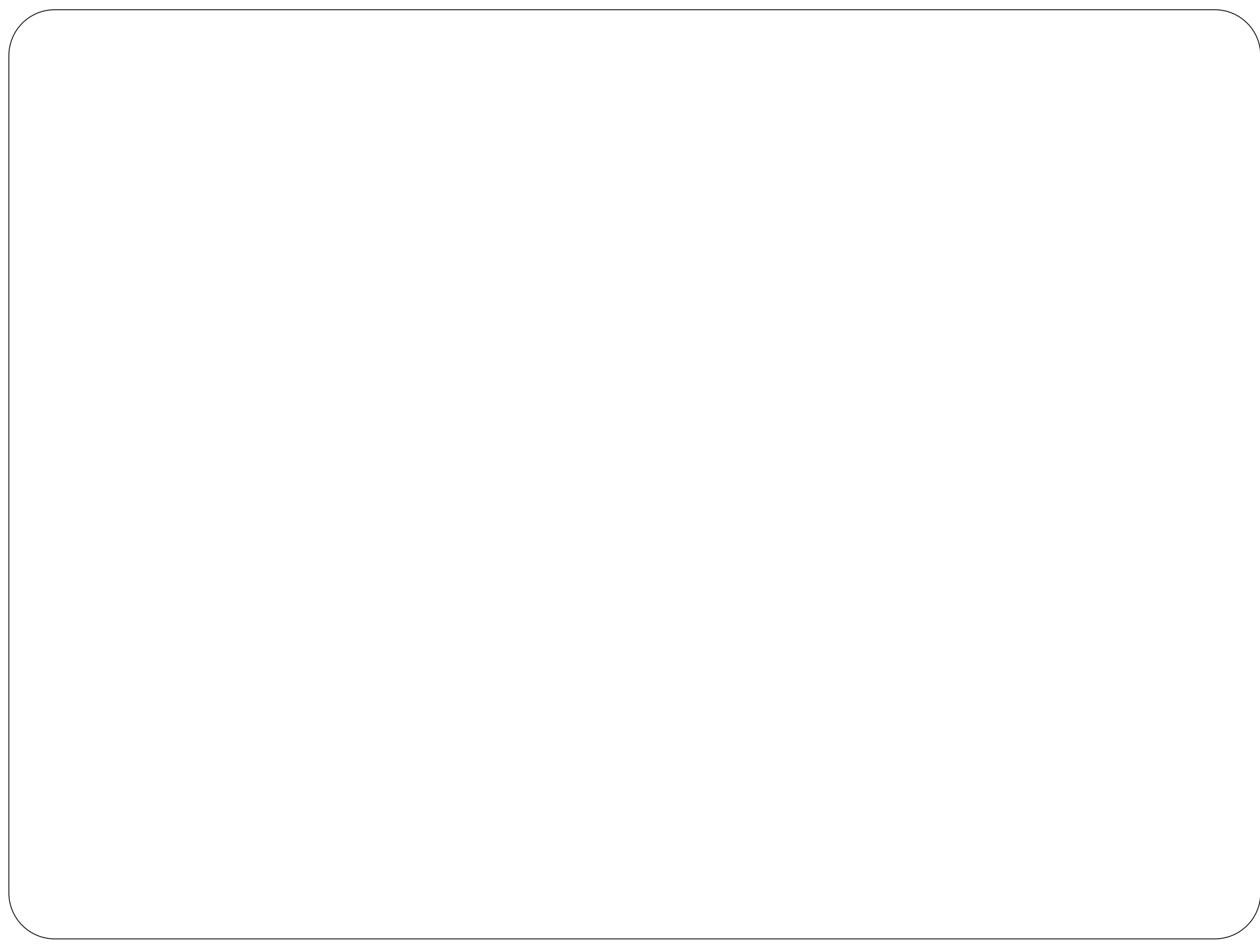
O caso da ovelha Dolly, 1996

- Procedimento foi feito a partir de células mamárias adultas
- A utilização de células adultas implica que os telômeros dessas células eram menores devido ao desgaste dos ciclos reprodutivos anteriores.
- A ovelha Dolly ao longo da sua vida, apresentou sintomas de envelhecimento precoce.



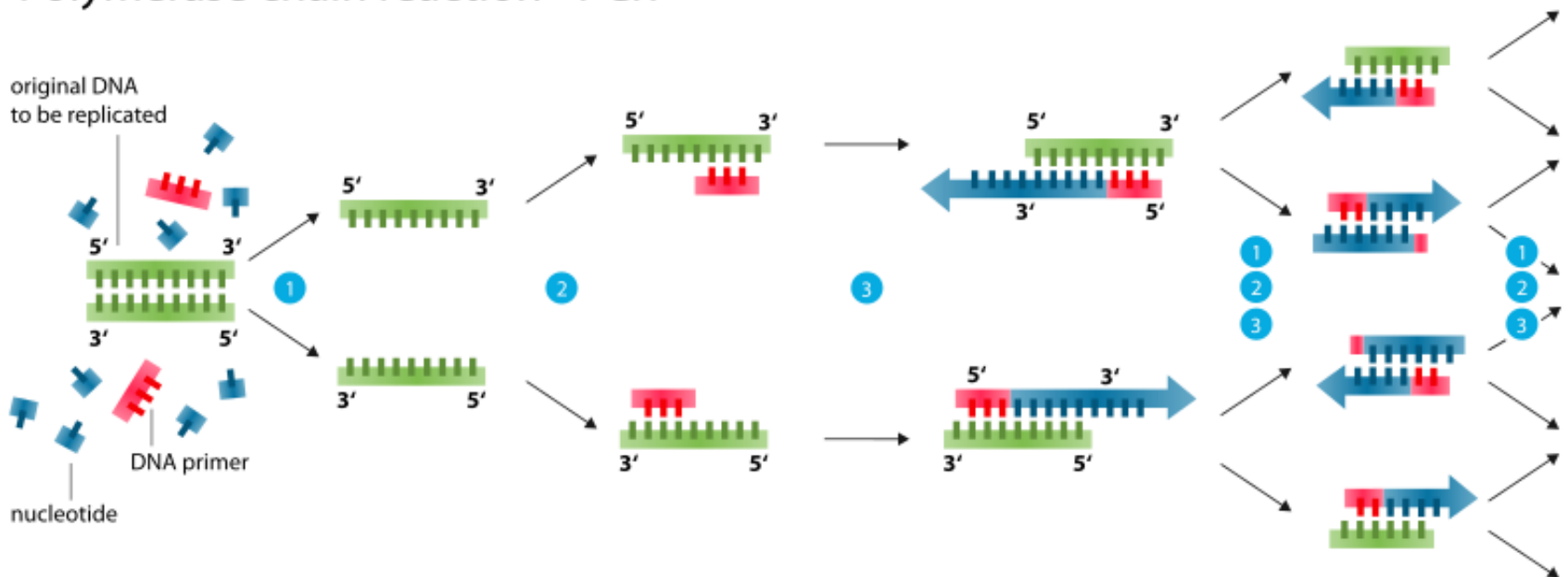
Vídeo - Telômeros





Técnica PCR

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

