

BIOLOGIA MOLECULAR

Aula 5

Prof^a Inês Rodrigues

2015/16
2^o Semestre

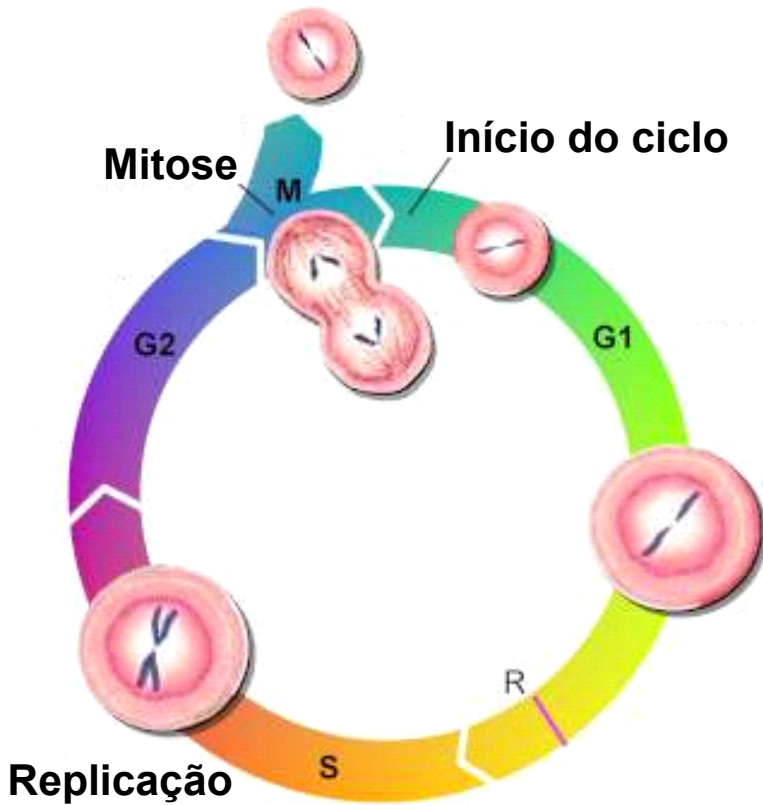
Replicação do DNA



■ general
■ special

protein

Ciclo celular



Fases:

G1 – Crescimento celular

R – Ponto de restrição
(decide-se se o ciclo continua)

S – Replicação

G2 – Preparação da divisão

M – Mitose (divisão celular)

Fase S

No início da fase S cada cromossoma é uma dupla hélice de DNA

No fim da fase S cada cromossoma contém duas duplas hélices (cromatídeos) de DNA, unidas pelo centrómero

Procariotas – cerca de 40 minutos

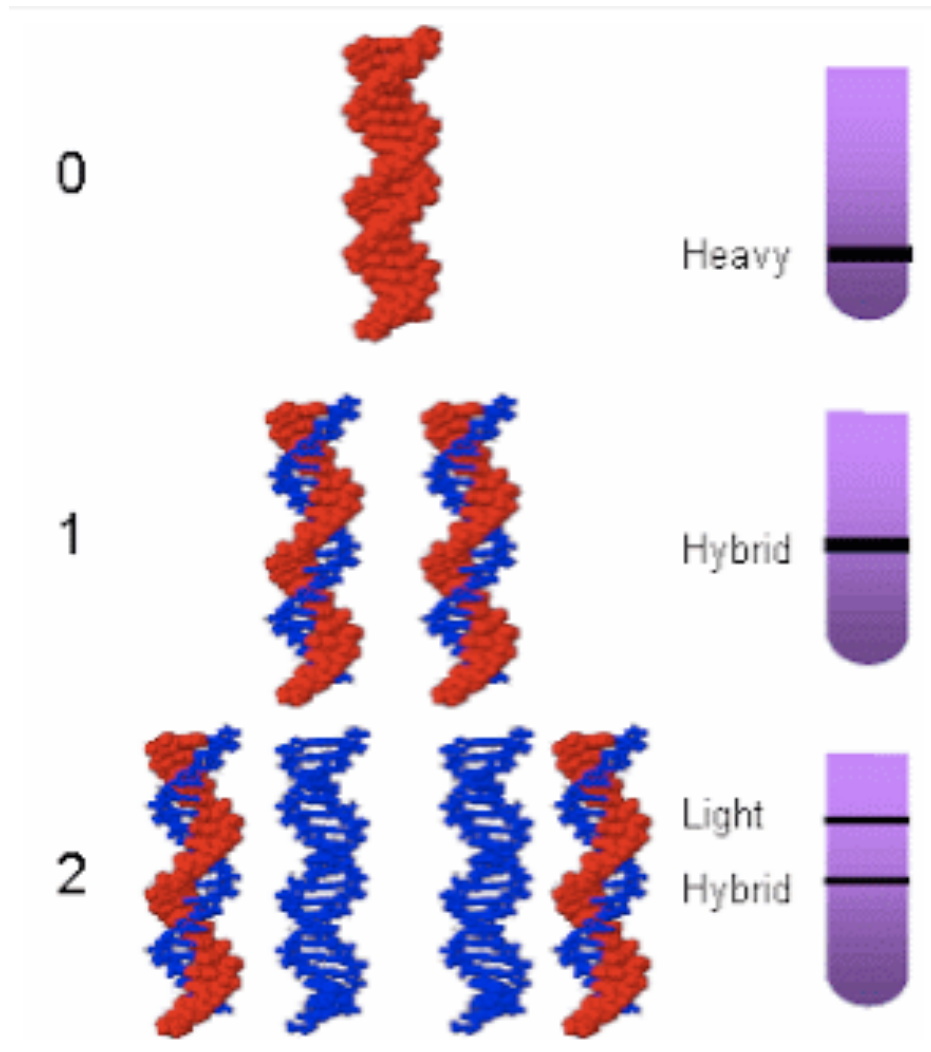
Eucariotas – Pode durar 3 minutos a 8 horas



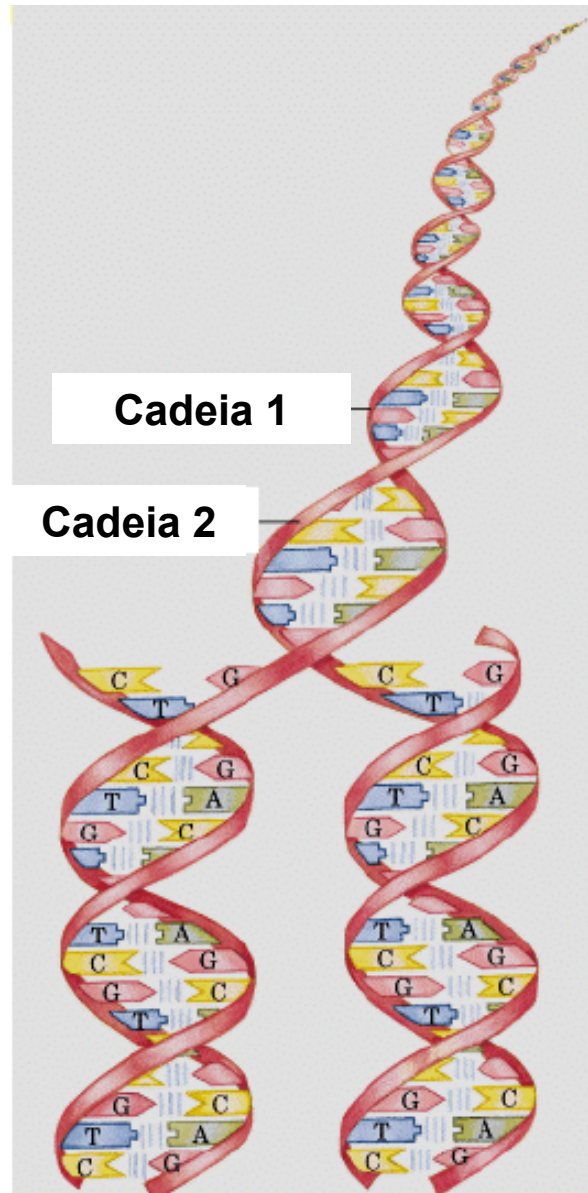
**Depende do nº de
origens de replicação**

Meselson e Stahl (1958)

Demonstrou que o processo de replicação é semiconservativo

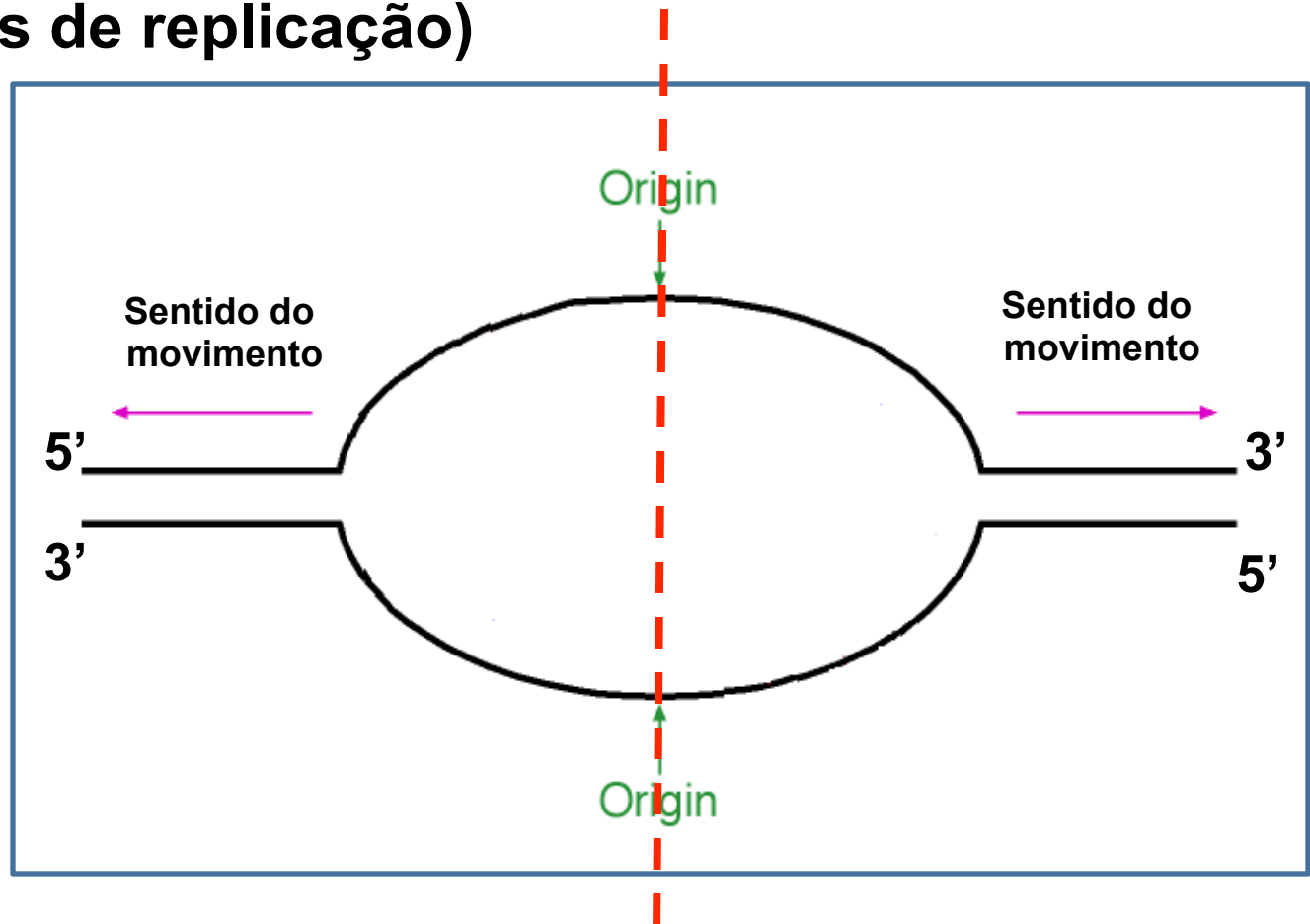


A replicação do DNA é um processo semi-conservativo



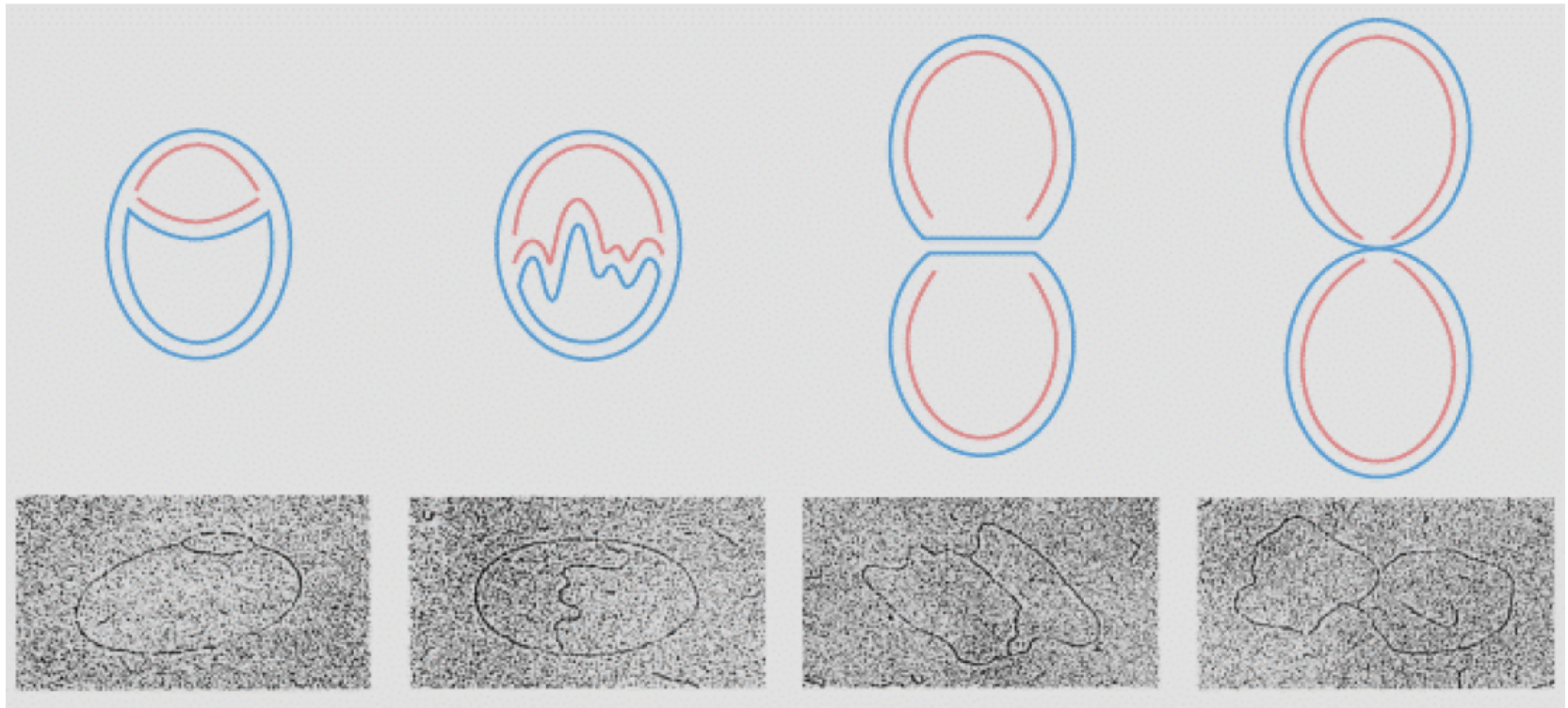
A replicação do DNA é um processo bidirecional

Origem de replicação (2 forquilhas de replicação)



Procariotas

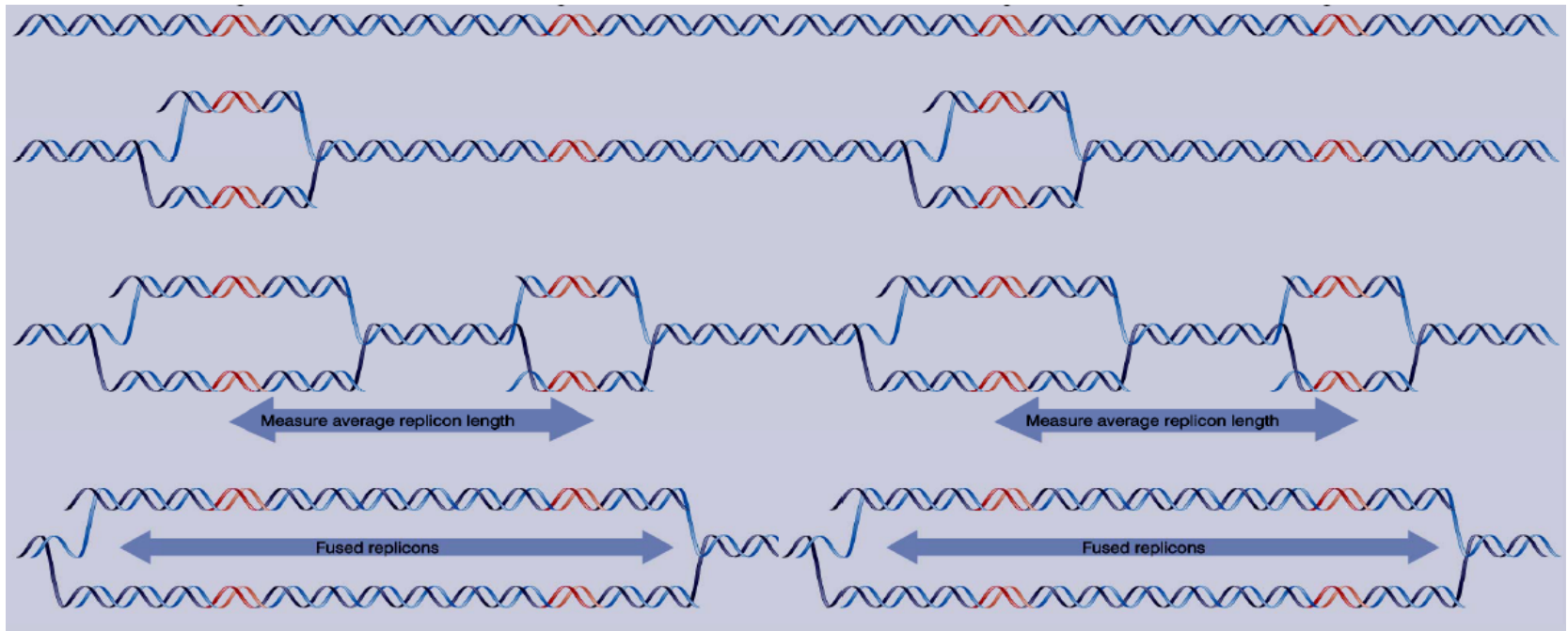
DNA circular – Só têm uma origem de replicação (Ori)



Contêm apenas uma unidade de replicação = REPLICÃO

Eucariotas

DNA linear e maior – Várias origem de replicação



Vários REPLICÕES (100-200 Kb)

Fase S dura cerca de 6 horas nas células somáticas
(no Homem, aprox. 13,2 bilhões de nt)

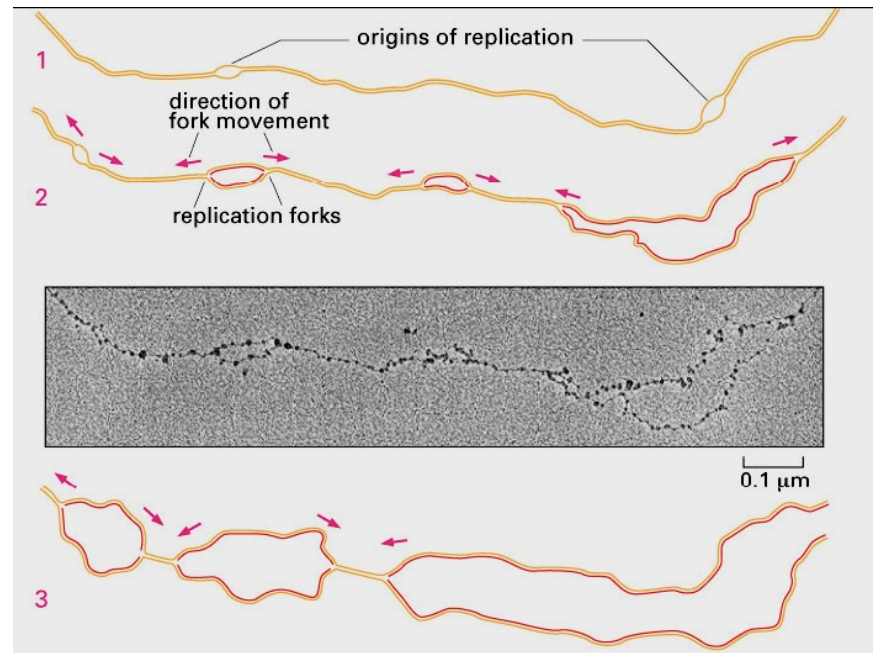
Replicação

Unidade de DNA em que ocorre um evento de replicação

Contém uma origem e um término

Ativado uma única vez em cada ciclo celular

Nos eucariotas, são também ativados uma única vez mas não em simultâneo



DNA polimerase

Procariotas

DNA polimerase I – reparação e “remendo”

DNA polimerase II - reparação

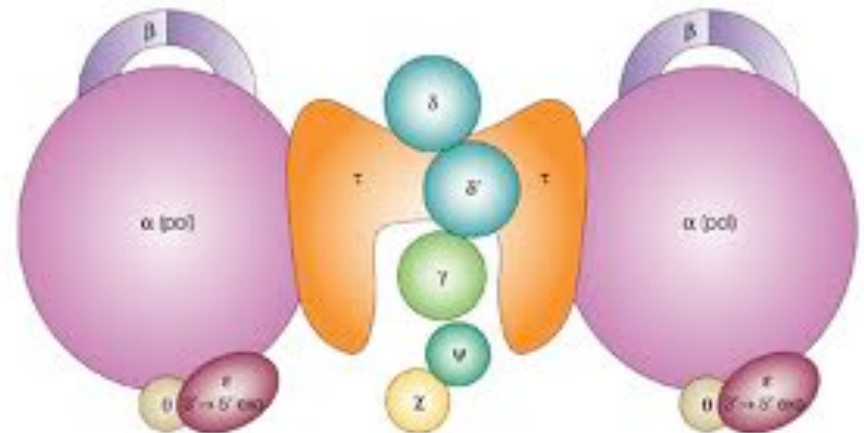
DNA polimerase III - POLIMERIZAÇÃO

DNA polimerase IV – reparação

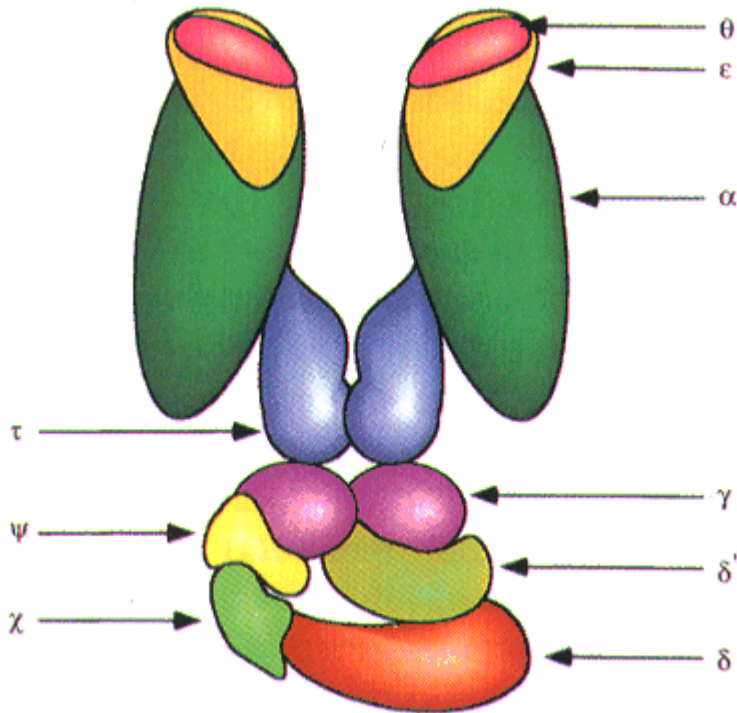
DNA polimerase V - reparação

Requer

- ✓ Molde (DNAs)
- ✓ dNTPs
- ✓ Mg^{2+}
- ✓ *Primers* (RNA)



DNA polimerase III



Subunidades com diferentes funções:

a – DNA polimerase

e – 3'→5' exonuclease

t – estimula a 3'→5' exonuclease

g – liga ATP

d – desconhecida

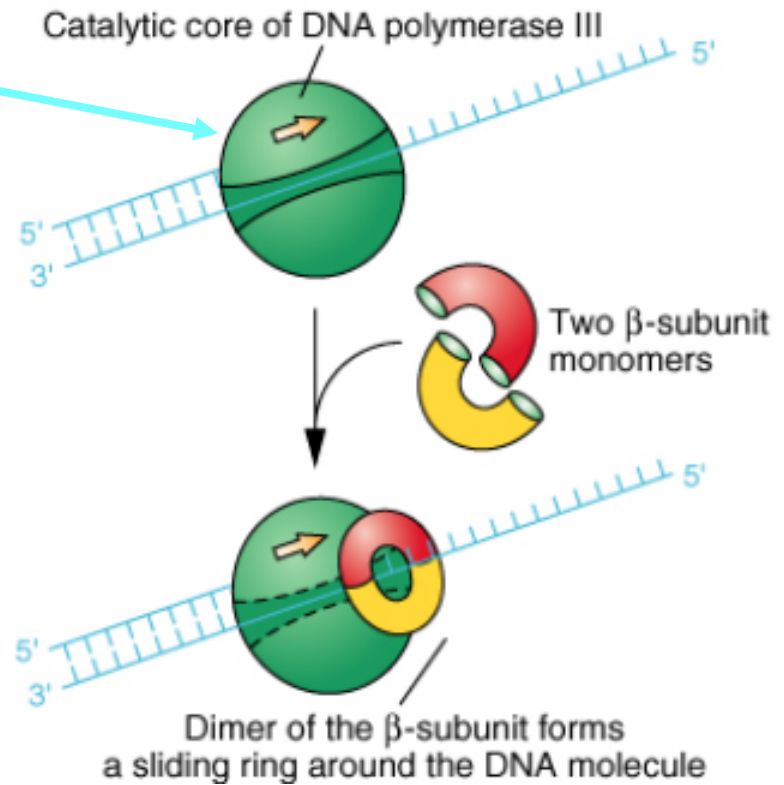
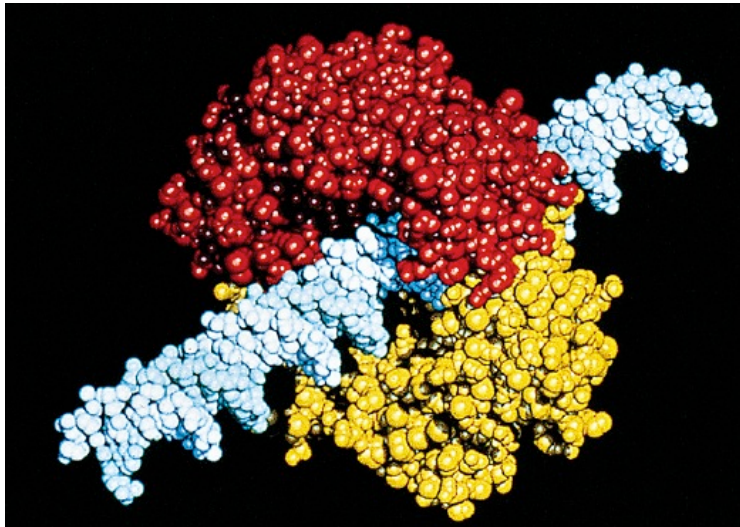
d' – estimula a ligação do “clamp”(b)

χ – interage com SSB para remover a primase

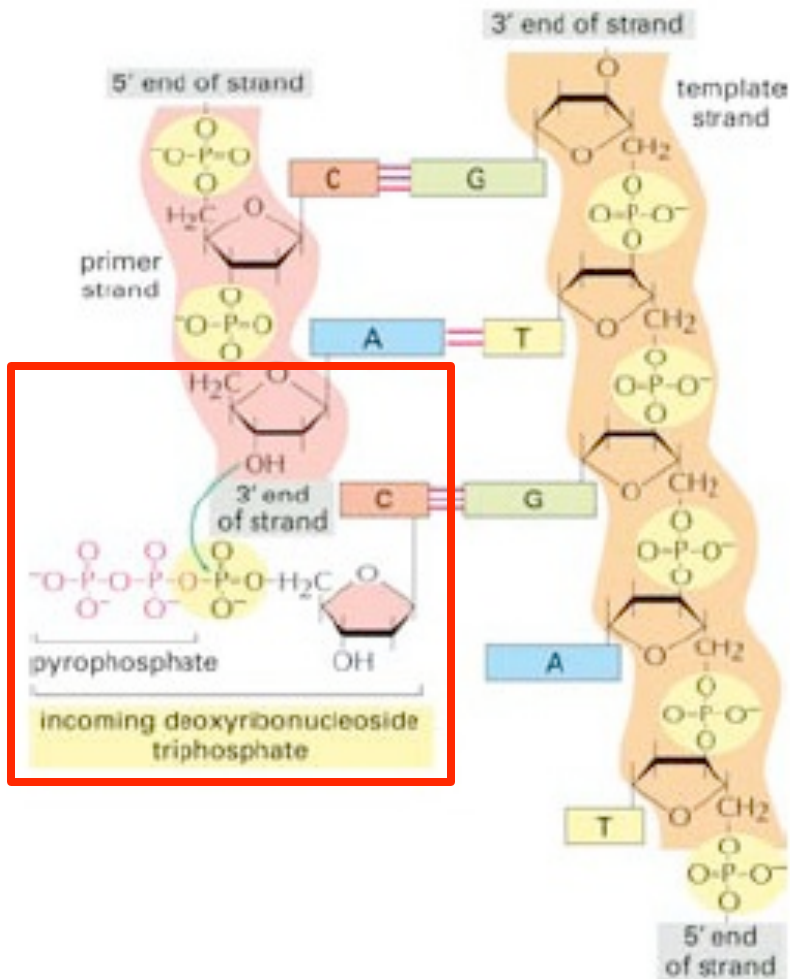
y – desconhecida

“sliding clamp” (b) – mantém a polimerase ligada ao DNA e dissocia os *primers* de RNA

Tudo menos a subunidade b



Adição sucessiva de nucleótidos na direção 5'→3' para formar AMBAS as cadeias

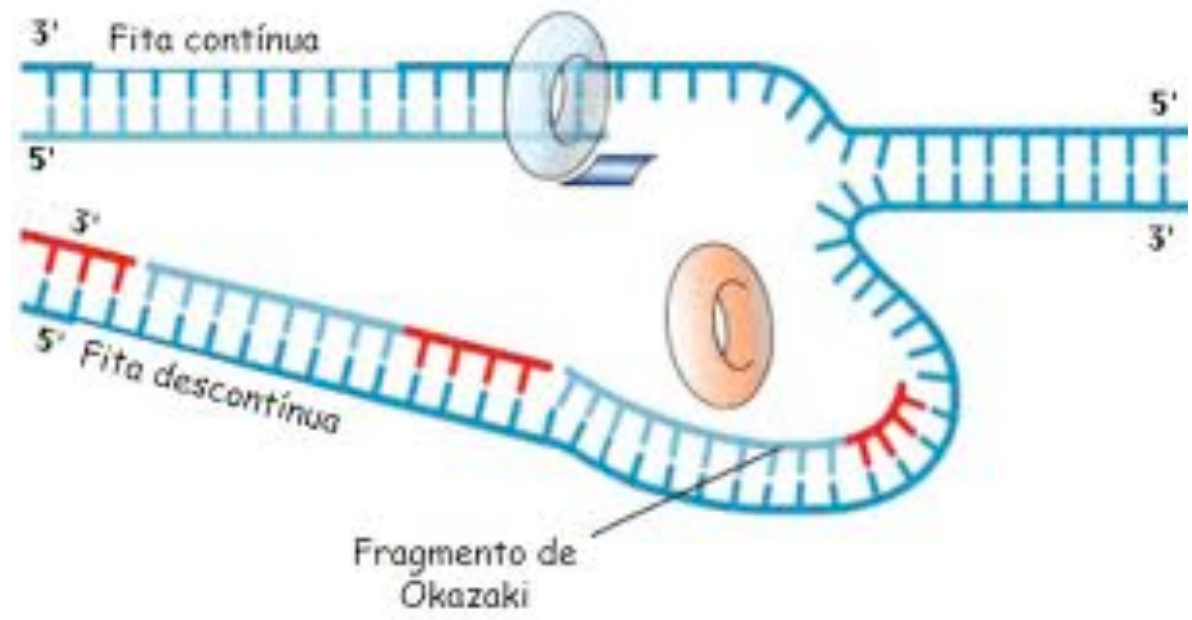
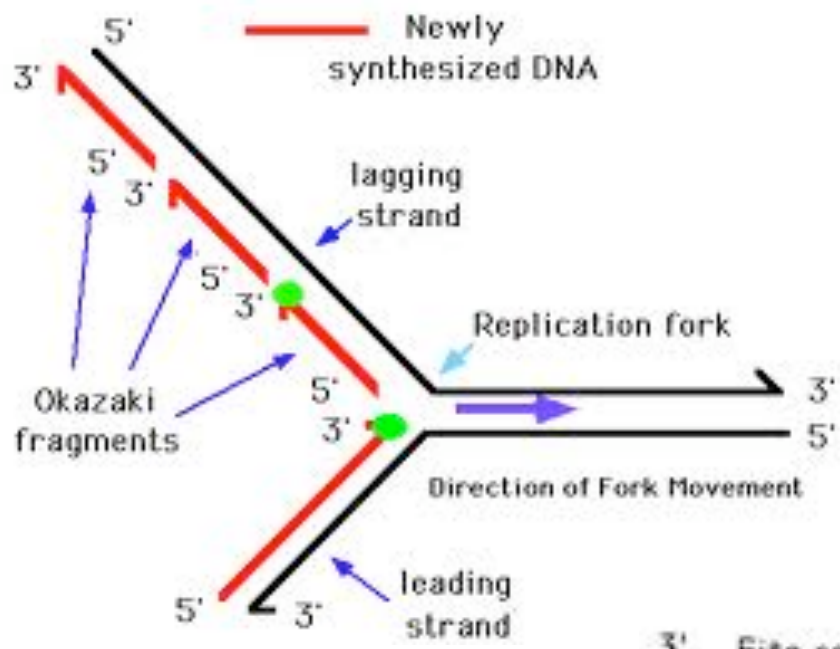


Cadeia “leader”
copiada de forma **contínua**

Cadeia “lagging” ou atrasada!
copiada de forma **descontínua**



Fragmentos de Okazaki

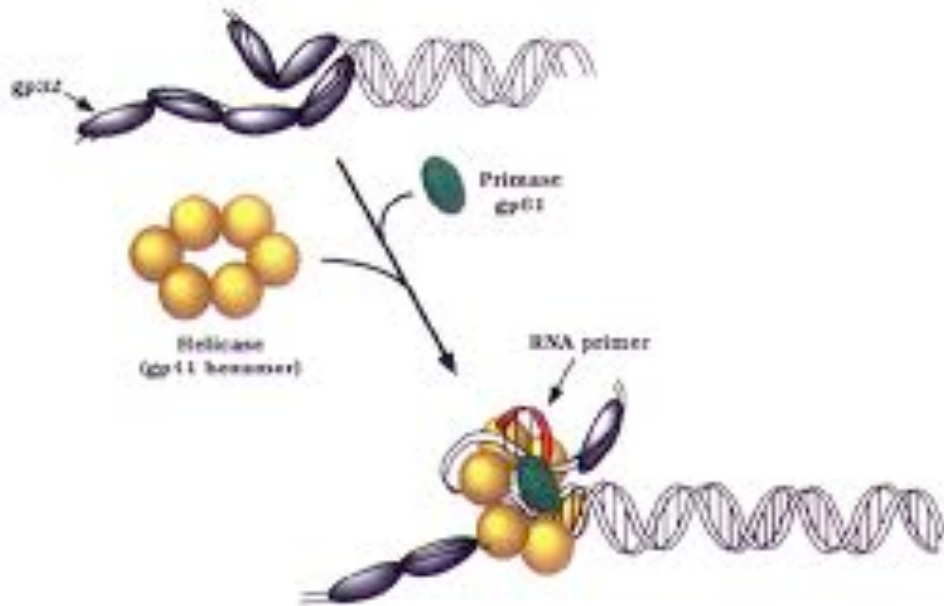


Outras enzimas necessárias à replicação

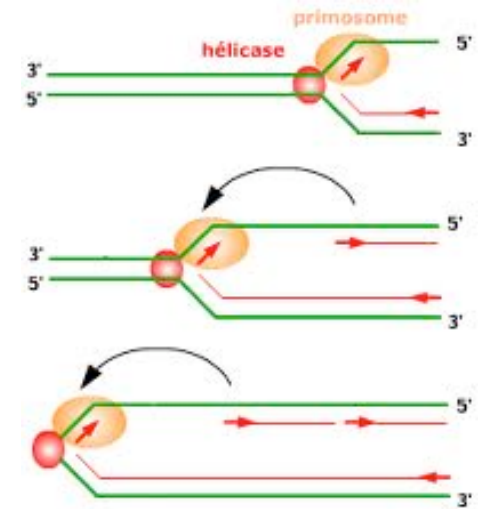
- **Girase (topoisomerase II) – evita o super enrolamento hidrolisando as 2 cadeias com imediata reconstituição após rotação das cadeias**
- **Primase– sintetiza uma cadeia iniciadora de RNA (*primer*) necessária à atividade da DNA polimerase: RNA Iniciador!**
- **Helicase – Impede a renaturação do DNA**
- **DNA polimerase I – Remove os *primers* de RNA**
- **DNA ligase – Junta os fragmentos de Okazaki, usa NAD + como cofator**

Primase sintetiza o *primer* de RNA

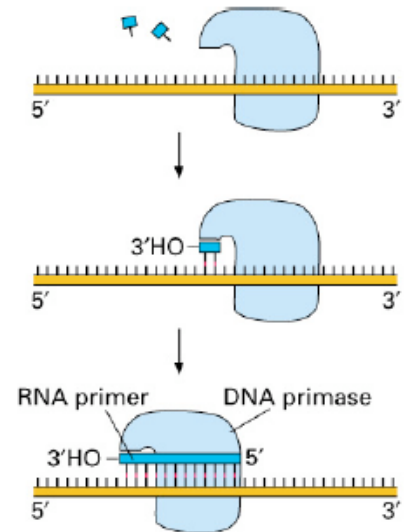
Assembly of the Primosome



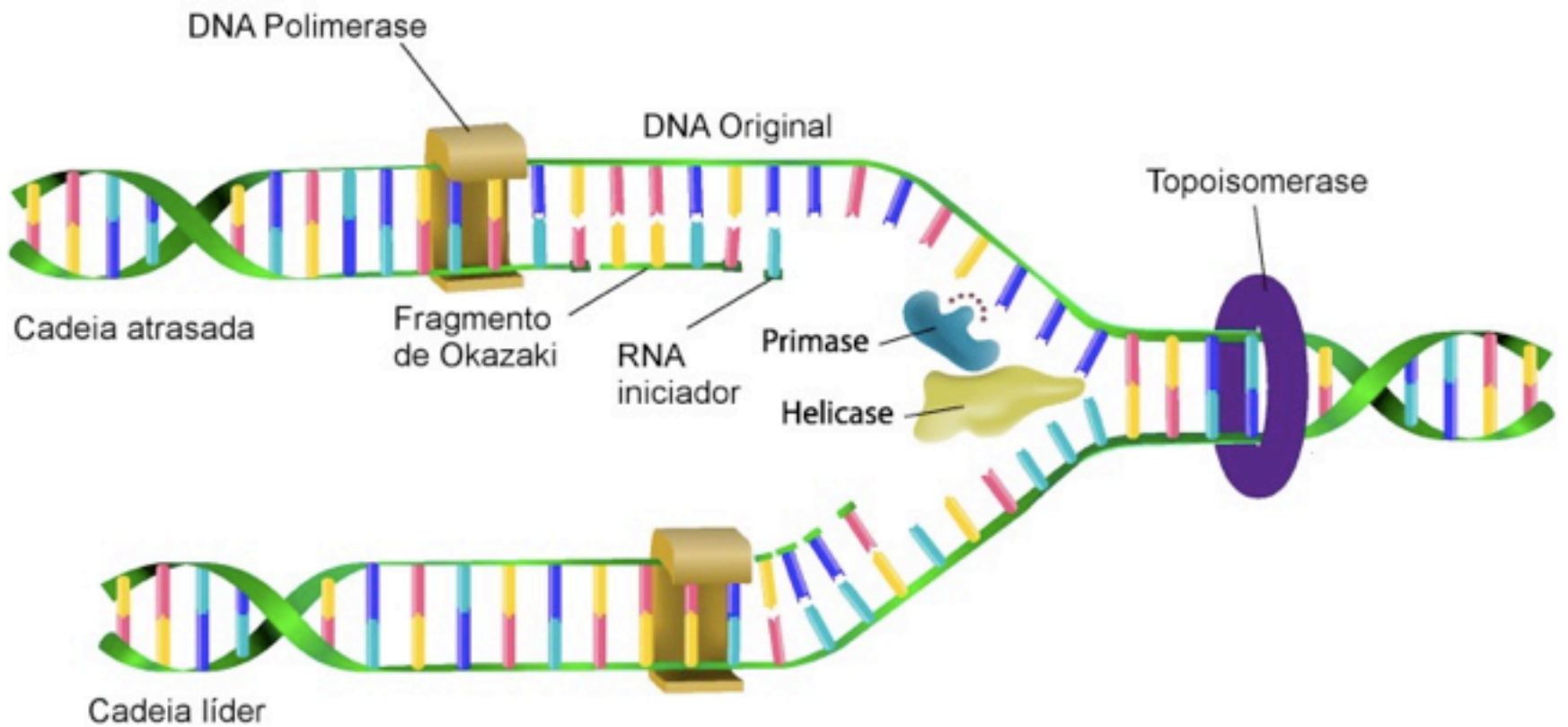
molbio.uoregon.edu



www.warpe.snvjussieu.fr



Primossoma: primase + helicase

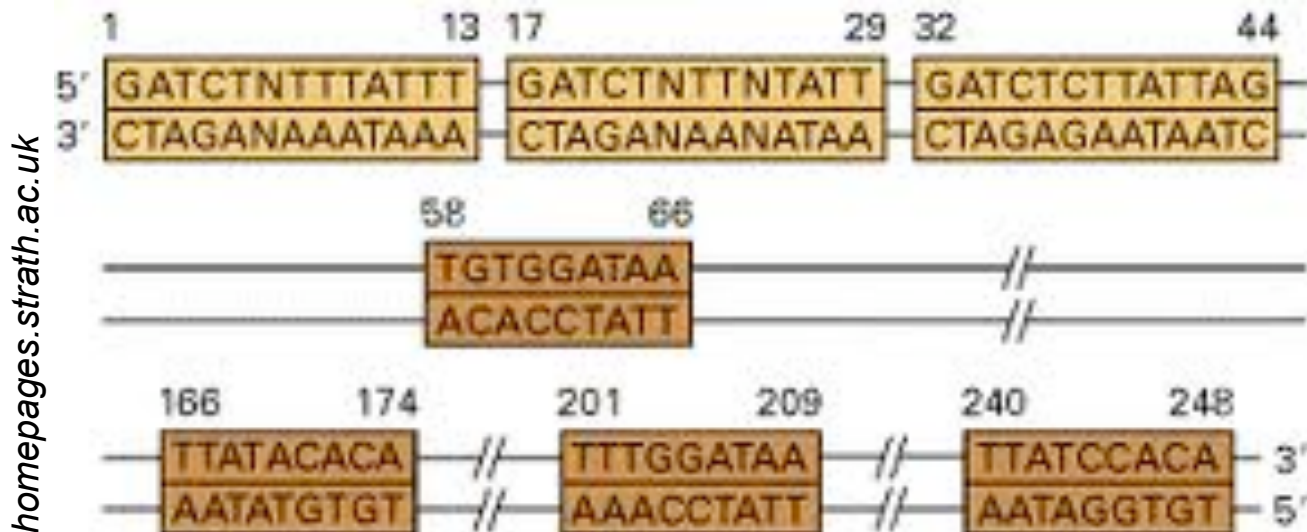


Processo de replicação de DNA. Ilustração: Designua / Shutterstock.com [adaptado]

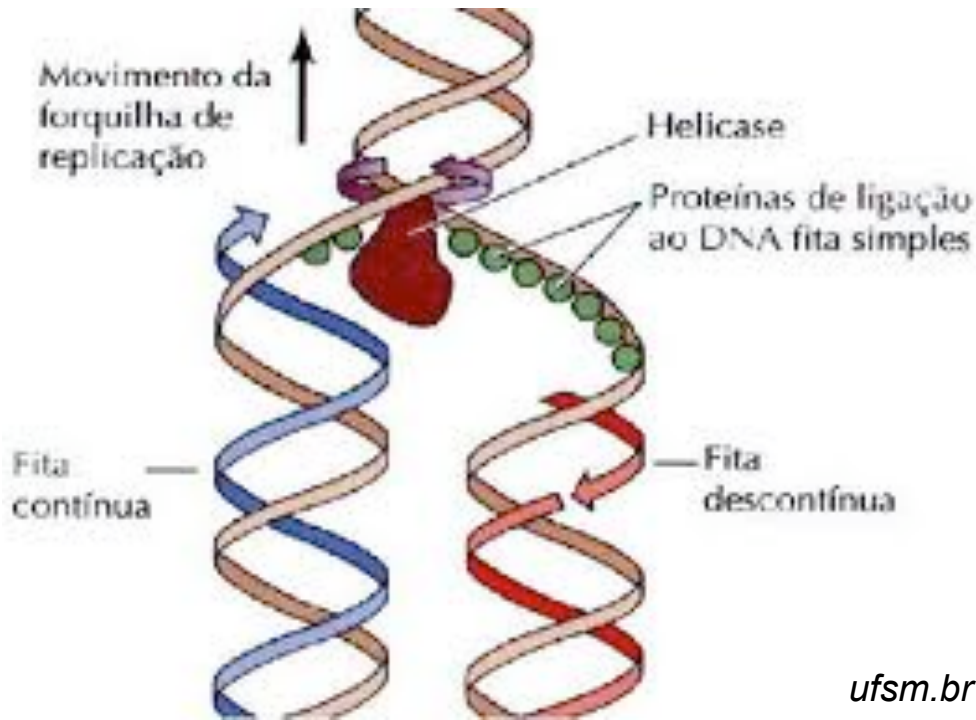
Iniciação

1. Reconhecimento de cada origem de replicação

- Origem de replicação
- Definida por sequências consenso com cerca de 11 pb (ARS – “autonomous replicating sequences”) rodeadas em ambos os lados por Adenina e Timina



2. Desnaturação localizada da molécula de DNA



FATORES DE INICIAÇÃO

DnaA

desnatura o DNA (ATP)

DnaB (helicase)

impede a renaturação

DnaC

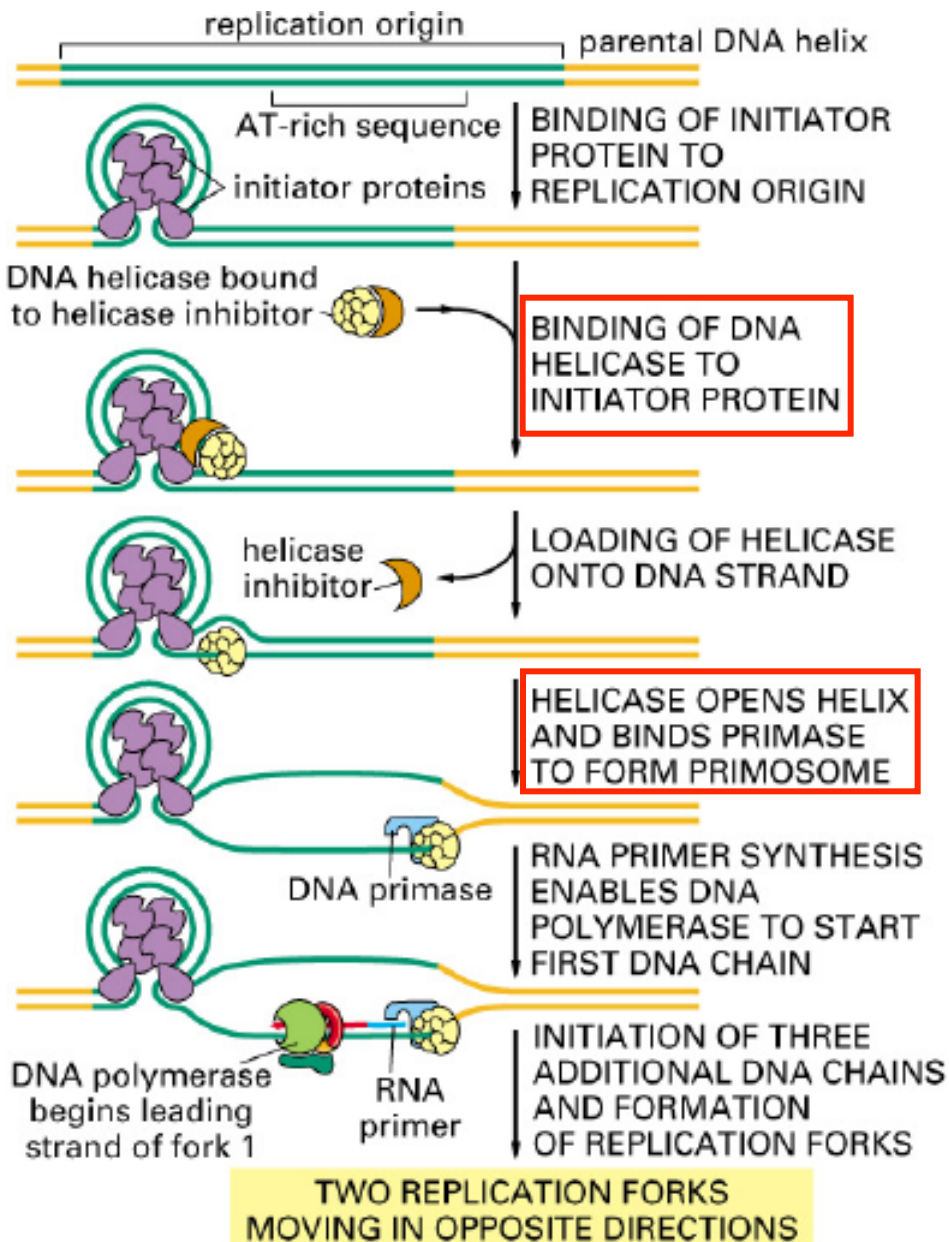
complexa com DnaB

(necessário para a sua ligação ao DNA)

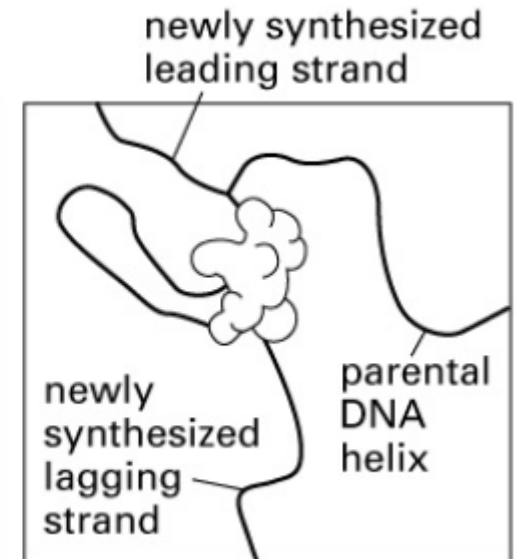
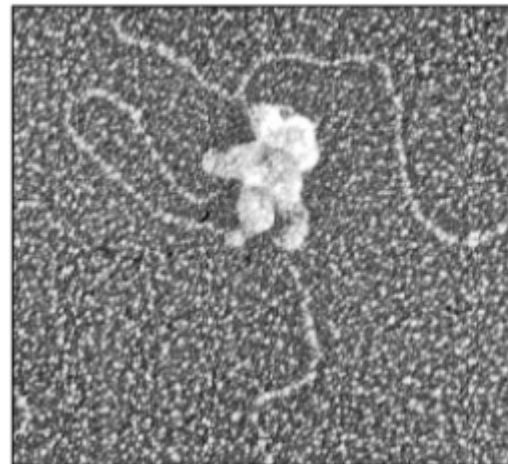
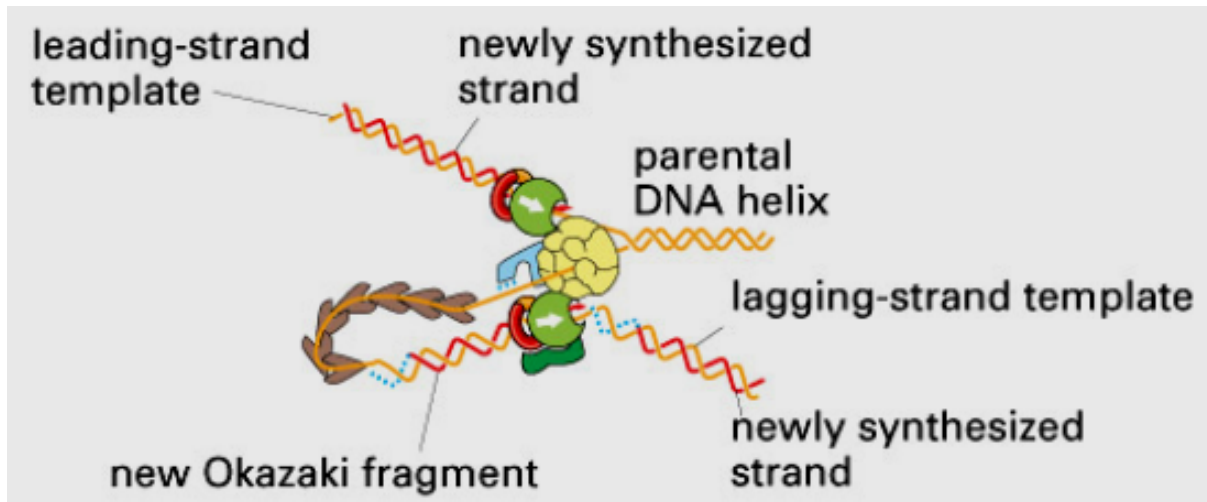
SSB

(single-strand binding protein)

estabiliza as cadeias de DNA



REPLISSOMA: primossoma + 2 DNA Pol III

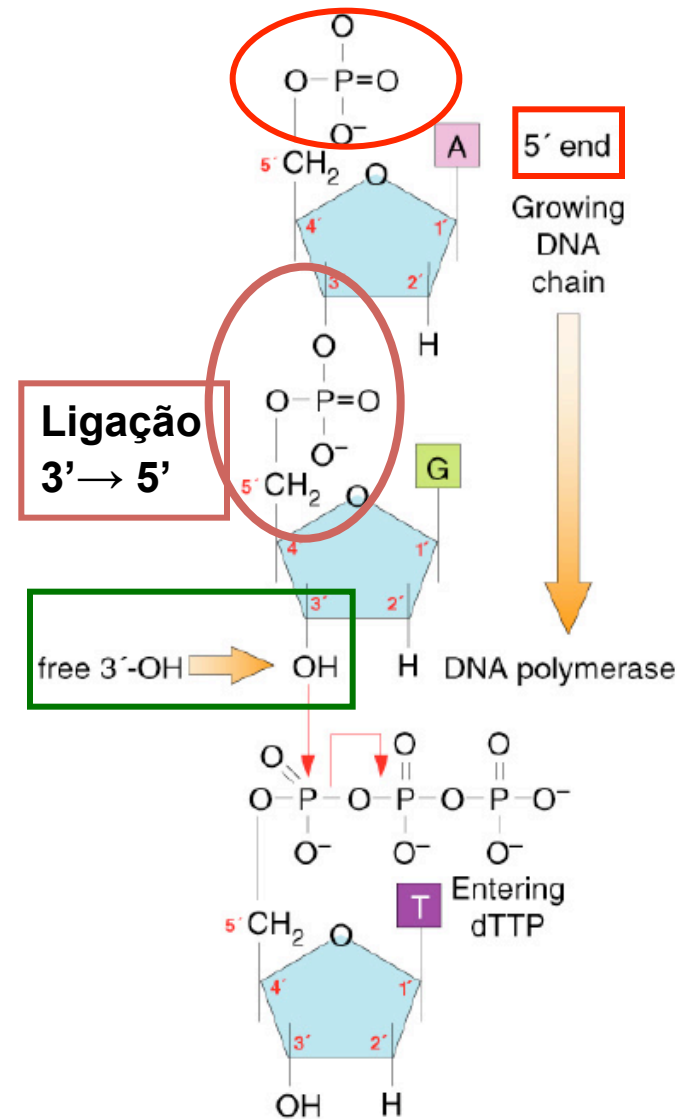


Mecanismo de ação da DNA Polimerase

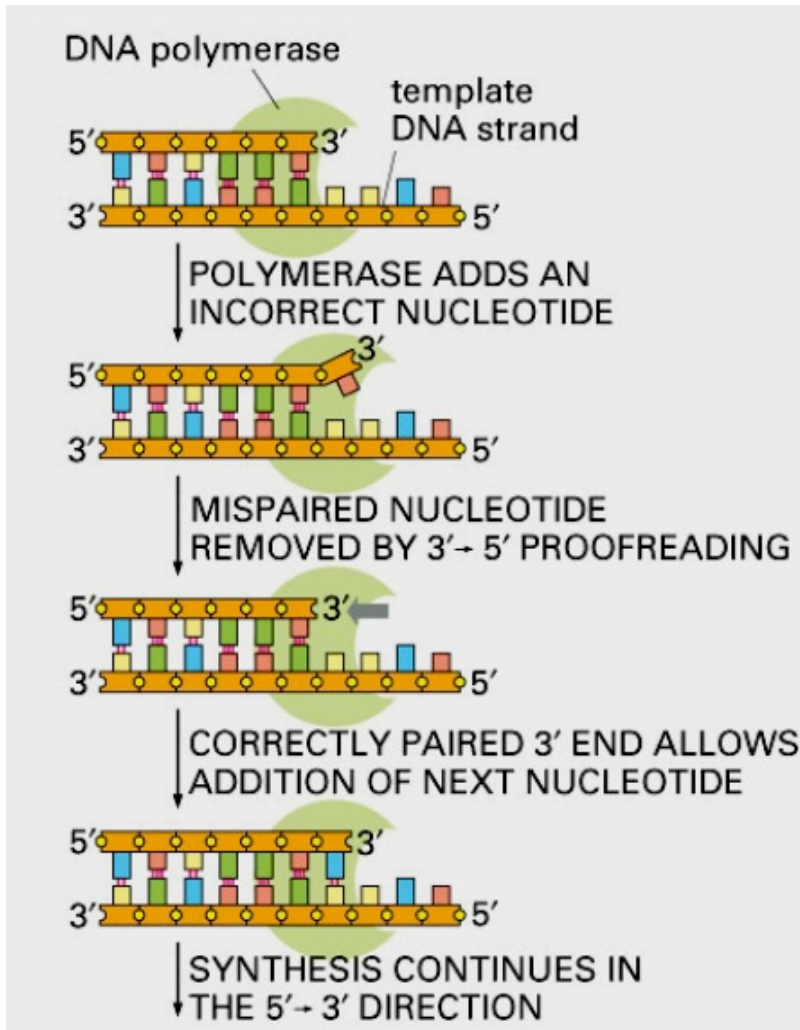
O grupo 3'OH da cadeia em formação forma uma ligação covalente com o grupo fosfato do novo dNTP

A DNA polimerase só pode adicionar nucleótidos ao terminal 3'

Liberta-se P_{Pi} (energia)



A DNA polimerase corrige os seus próprios erros (revisão; *proofreading*)

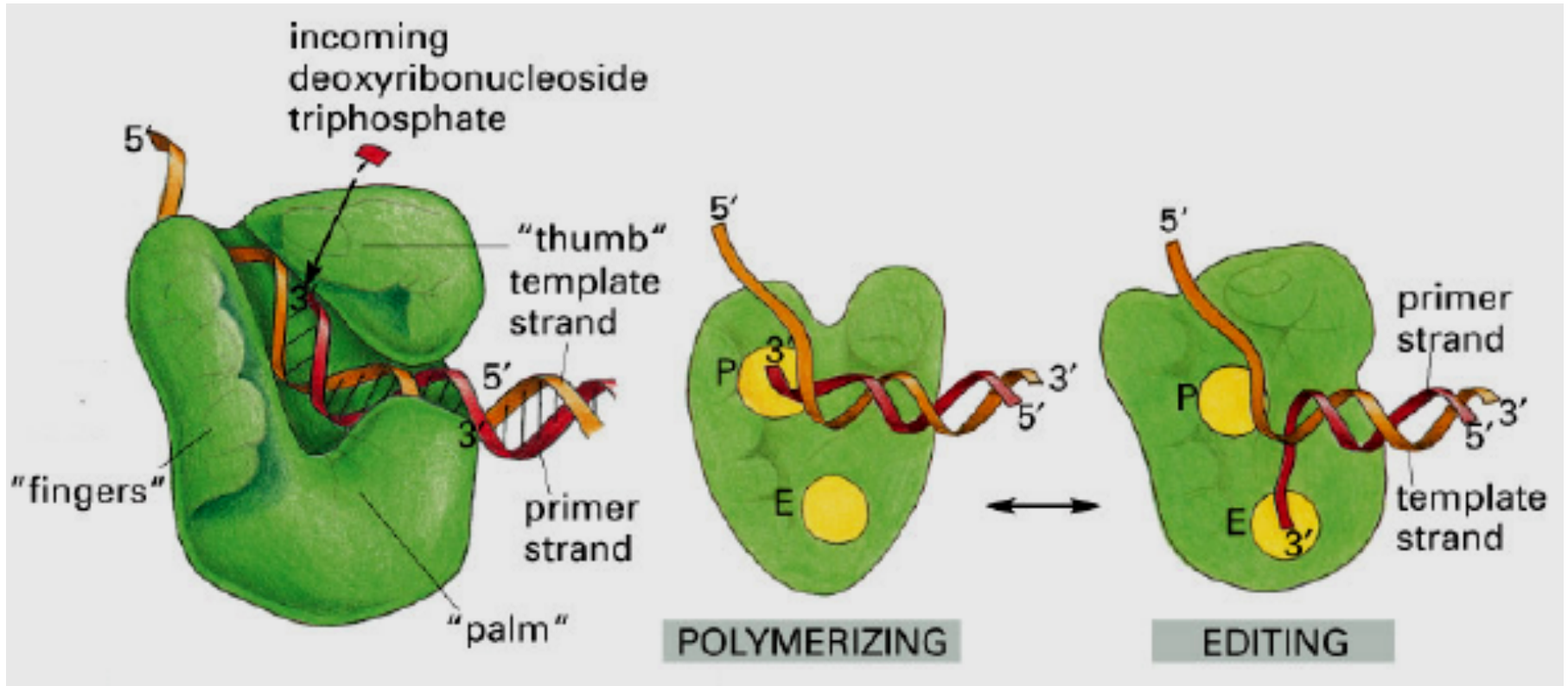


Atividade 5'→3' polimerase

Atividade 3'→5' exonuclease

**A necessidade de corrigir
erros explica porque
motivo a
síntese deve ser sempre
na direção 5'→3'**

A DNA polimerase tem regiões diferentes para a polimerização (P) e edição (E) do DNA em formação



Elongação e Terminação

Síntese de fragmentos iniciadores de RNA (50-100 nt)

Síntese das cadeias de DNA a partir do 3'OH do último resíduo do RNA

Eliminação dos fragmentos de RNA e substituição por DNA

Ligação dos fragmentos

1. Primase synthesizes short RNA oligonucleotides (primer) copied from DNA.



2. DNA polymerase III elongates RNA primers with new DNA



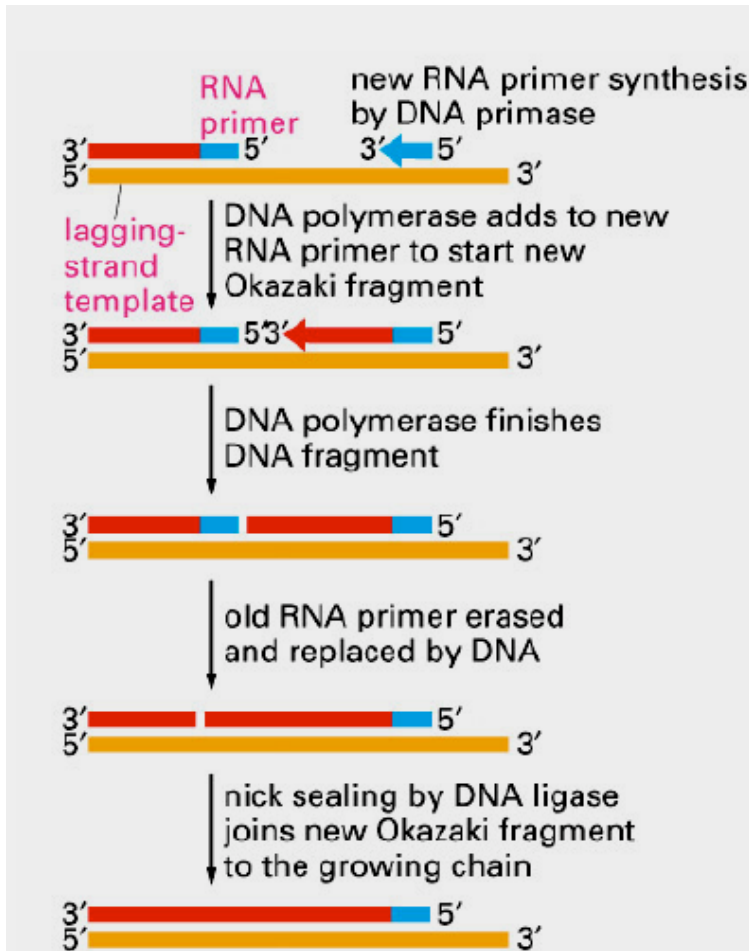
3. DNA polymerase I removes RNA at 5' end of neighboring fragment and fills gap.



4. DNA ligase connects adjacent fragments.



Fragmentos de Okazaki



Extensão 5'→3' nos fragmentos é feita pela DNA Polimerase I

Atividade exonuclease 5'→3' remove o iniciador de RNA

DNA ligase liga-se ao espaço por completar e procede à ligação dos fragmentos

Replicação em eucariotas

Processo muito mais complexo:

- ✓ **Várias origens de replicação**
- ✓ **Tempo adequado à divisão celular**
- ✓ **Muito mais proteínas e enzimas envolvidas**

Complexo de pré replicação (Pré-RC)

- 1. Proteína ORC: complexo de reconhecimento de origem**
- 2. Proteína RAP: proteína ativadora da replicação**
- 3. RLFs: fatores libertadores da replicação**

4. Pré-RC + proteínas + proteína quinases

Exemplo:

Ciclinas + proteína quinases dependentes de ciclina (CDK)



- ✓ **Ativam a replicação**
- ✓ **Fosforilam os componentes do pré-RC (dissociam)**
- ✓ **Bloqueiam a formação de novo pré-RC**

DNA polimerase

Eucariotas

DNA polimerase a – polimerização...

DNA polimerase b - reparação

DNA polimerase d - POLIMERIZAÇÃO

DNA polimerase e – ???

DNA polimerase g – replicação mitocondrial

(...)

Requer

Molde (DNAs)

dNTPs

Mg²⁺

Primers (RNA)

Nem todas são
exonucleases

Eucariotas: fase final da Replicação

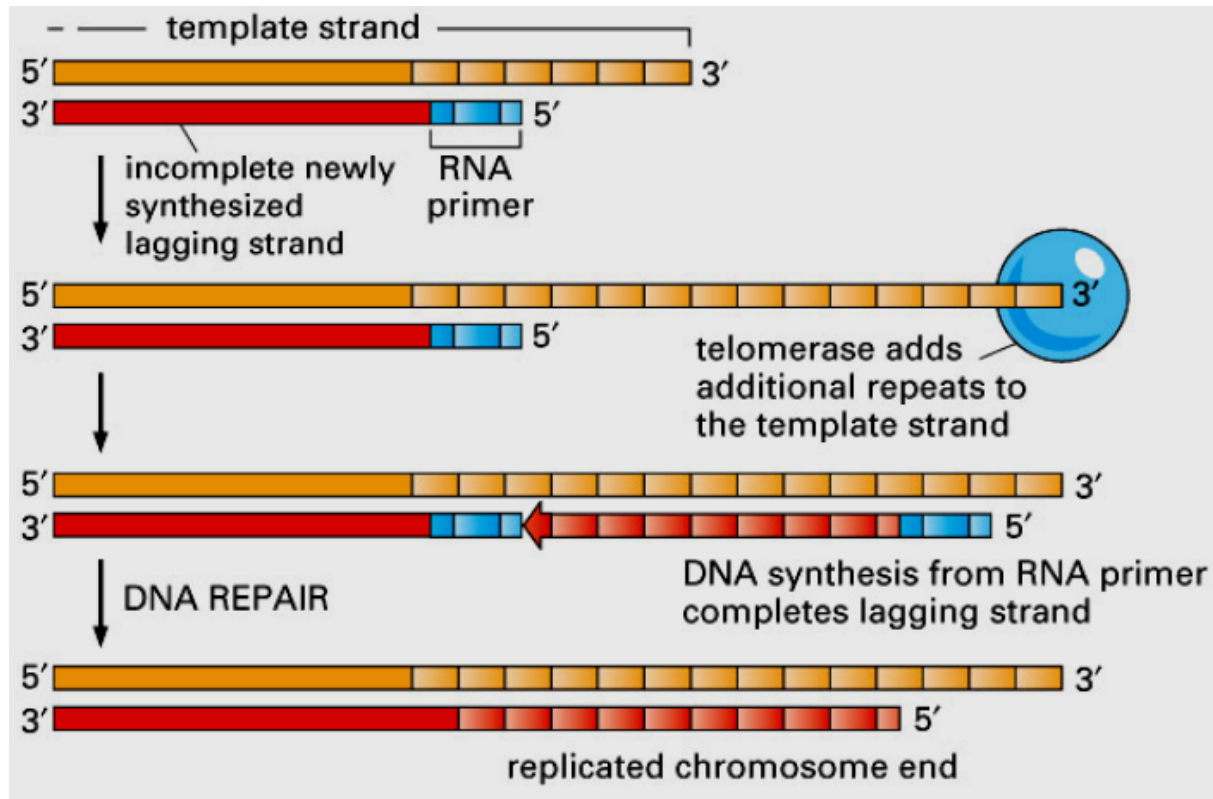
DNA linear:

A remoção do RNA iniciador parece conduzir a um encurtamento da cadeia de DNA formada relativamente à cadeia inicial



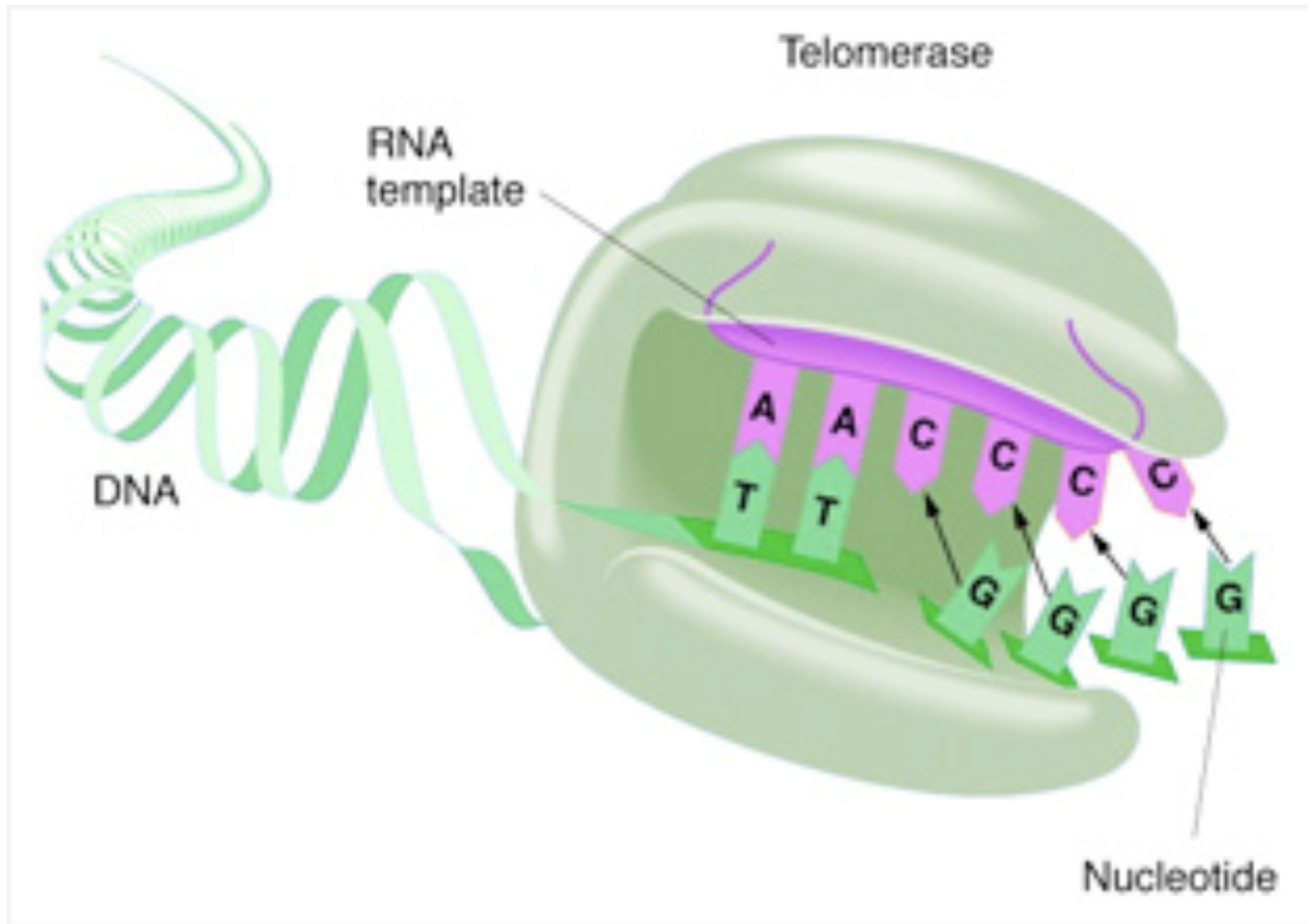
Como evitar ?

Telômeros: evitam a erosão da molécula



Telomerase – cataliza a adição de repetições da sequência final do cromossoma, usando o RNA como molde (transcrição reversa)

Telomerase



Telomerase

Em adultos

Ativa em algumas células de tecidos de crescimento rápido

(células sanguíneas, lúmen intestinal, aparelho reprodutor, etc)

Inativa nos restantes tecidos

Perda de informação genética

Envelhecimento

Cancro

Mutações e reparação do DNA

DNA

- **Corretamente copiado**
- **Informação mantida**
- **Reparado – ÚNICA molécula reparada na célula!**

Manutenção rigorosa da informação genética



Sobrevivência das espécies

Replicação

Semiconservativa
Bidireccional
Semidescontínua
Muito rigorosa!!!

Reparação

Correção rápida de
alterações acidentais na
sequência do DNA

Replicação

DNA Polimerase

Adição de nucleótidos (dNTPs)

Seleção geométrica – pares (A/T, C/G); pares incorretos não se ajustam ao local ativo

Alterações conformacionais – pares incorretos não favorecem as alterações conformacionais do local ativo (10000 x mais lentas)

ERROS POSSÍVEIS:

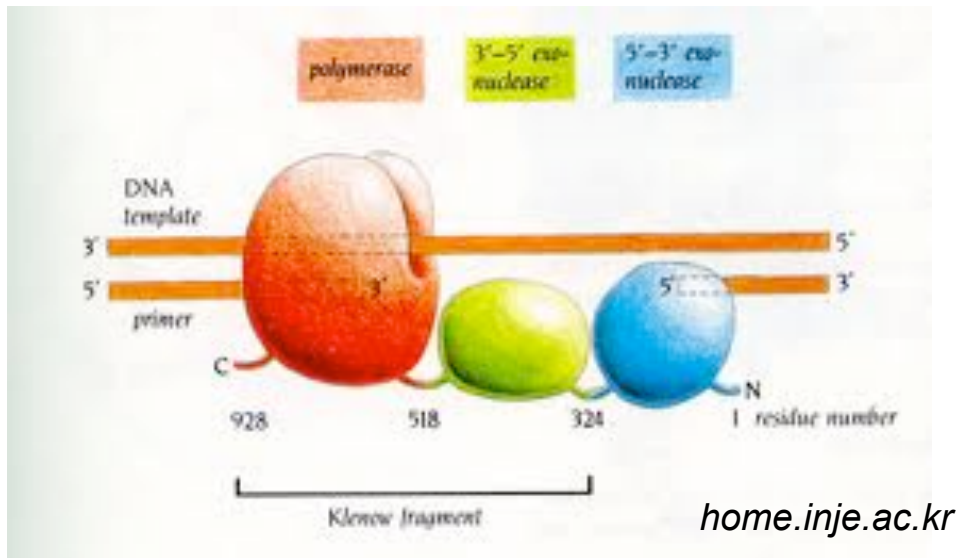
$1/10^9$ - 10^{10} emparelhamentos de bases

INACEITÁVEL!

Mecanismo de *proofreading*

Adição de base incorreta força a passagem da extremidade da cadeia em formação para o local de edição
(função 3' → 5' exonuclease)

DNA polimerase



Fragmento de Klenow

Polimerização

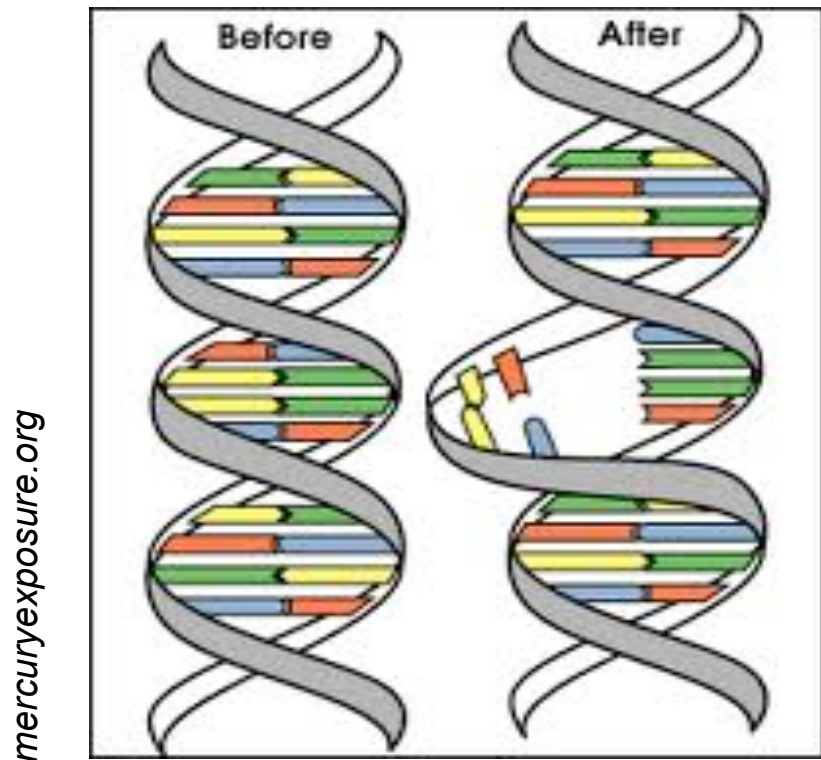
Revisão

(3' → 5' exonuclease)

Fragmento de reparação

(5' → 3')

**Inserção de base errada – ERRO é detetado por
DISTORÇÃO na molécula**



**Exemplo:
Procariotas (*E.coli*)**

Cada sequência GATC tem a adenina METILADA



REPARAÇÃO “methyl-directed mismatch”

Milhares de alterações aleatórias por dia!!!

- ✓ Espontâneas
- ✓ Calor
- ✓ Acidentes metabólicos
- ✓ Radiações
- ✓ Substâncias ambientais



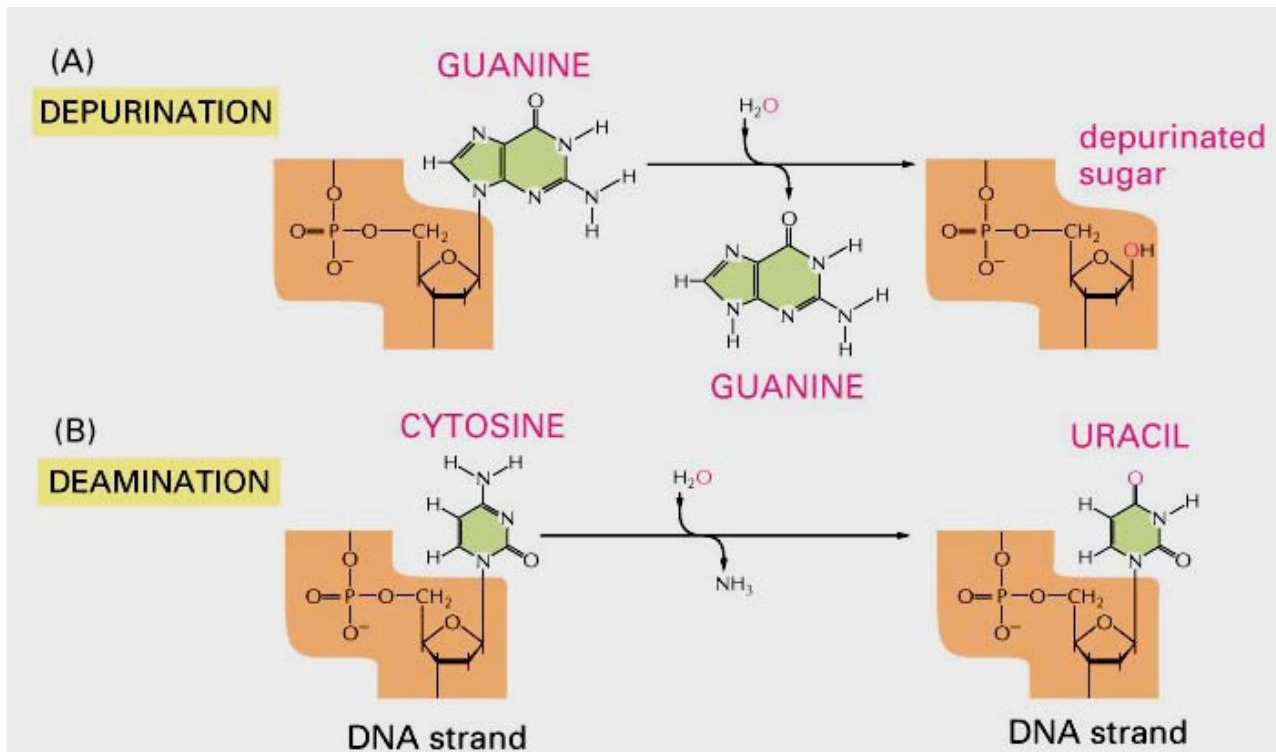
<1/1000 alterações acidentais resulta em MUTAÇÃO permanente; o efeito depende da sua localização!



Grande investimento celular em mecanismos de reparação

Alterações espontâneas mais comuns responsáveis por danos no DNA

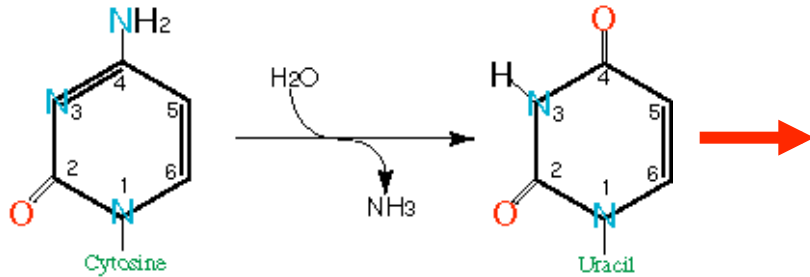
- **Depurinação** (perda de A e G, por hidrólise espontânea)
- **Depiridiminação** (menos frequente)
- **Desaminação**



Desaminação – ligação glicosídica relativamente instável

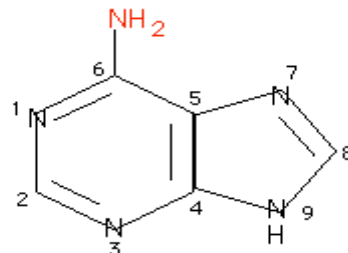
Remoção de grupos amina das bases C, G e A

A timina não possui grupos amina!

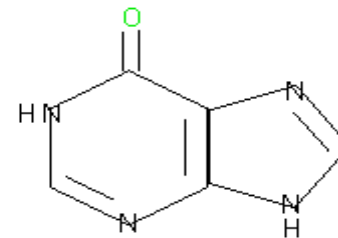


Particularmente frequente

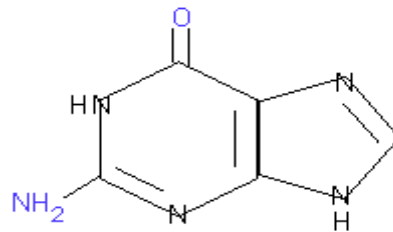
Reparação (no DNA não existe U mas T)



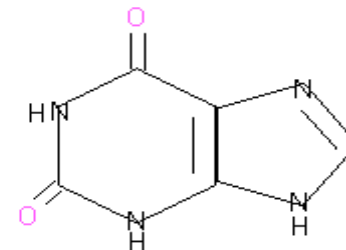
Adenine



Hypoxanthine



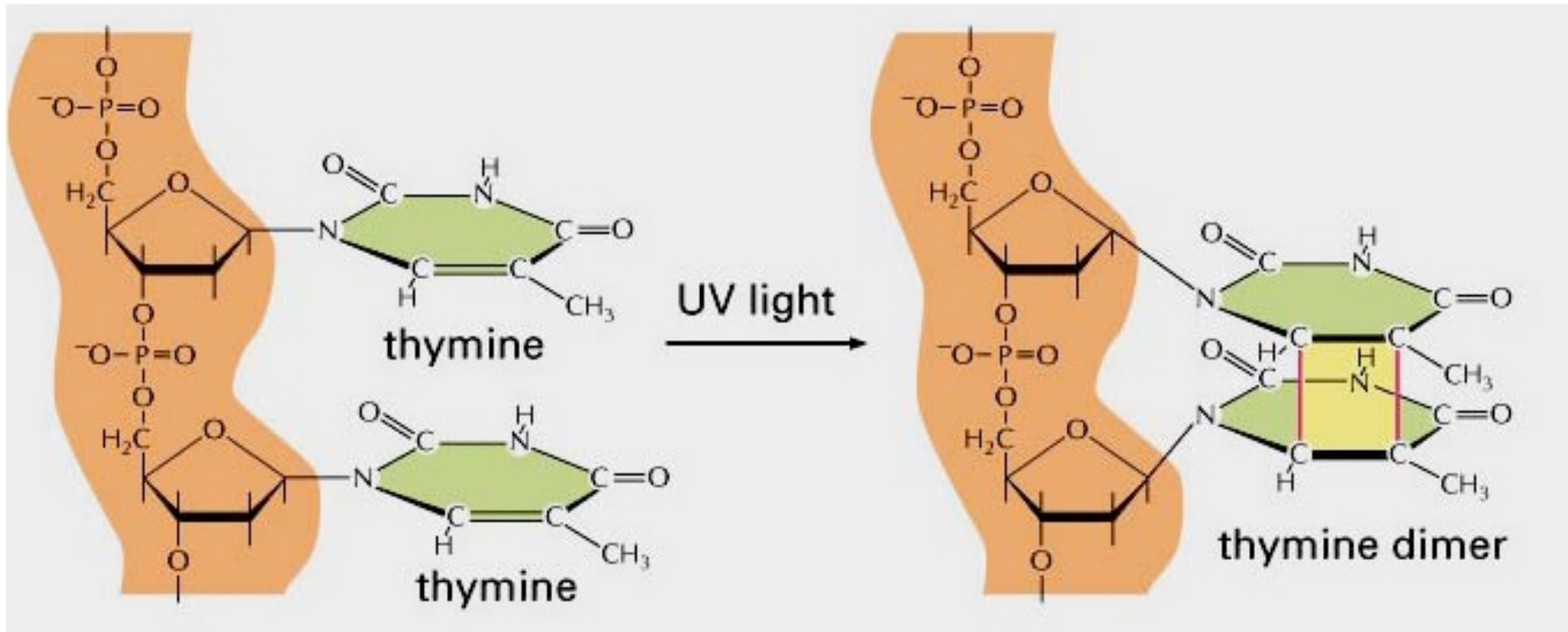
Guanine



Xanthine

Dimerização (ligação covalente entre timinas adjacentes)

Modificação induzida pela radiação UV



Outras alterações espontâneas

Substituições

Adições

Eliminações

Substituições

Transições

(Par purina-pirimidina/outro par purina-pirimidina

Ex.: GC → AT)

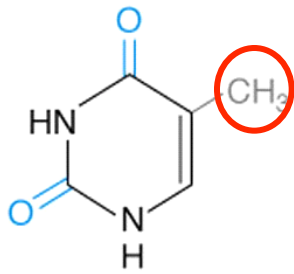
Transversões

(par purina-pirimidina/par pirimidina-purina

Ex.: GC → TA)

Deslizamento relativo da polimerase → deleções

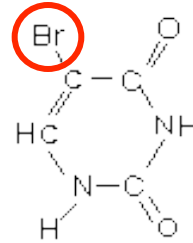
Agentes mutagénicos análogos às bases



Timina



5-Bromouracil

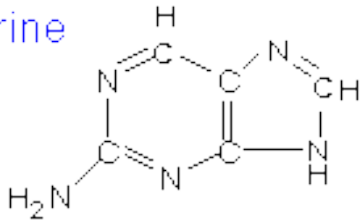


Utilizado como agente mutagénico experimental e no tratamento de neoplasmas



**Emparelha com ADENINA MAS... esta converte-se na sua forma enólica e ionizada que depois irá emparelhar com GUANINA.
Forma-se uma TRANSIÇÃO G-C → A-T**

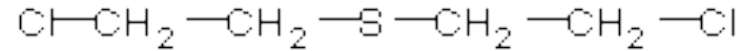
2-Aminopurine



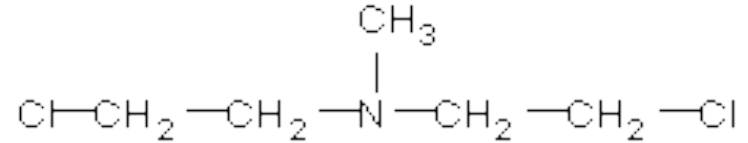
Origina uma TRANSIÇÃO A-T → G-C

Agentes alquilantes

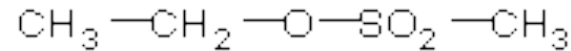
Di-(2-chloroethyl)sulfide (Sulfur mustard)



Di-(2-chloroethyl)methylamine
(Nitrogen mustard)



Ethylmethane sulfonate (EMS)



Não se incorporam na cadeia de DNA

Transferem grupos enol ou metilo para várias posições das 4 bases

Grupos removidos podem ser transferidos para aminoácidos da enzima, inativando-a

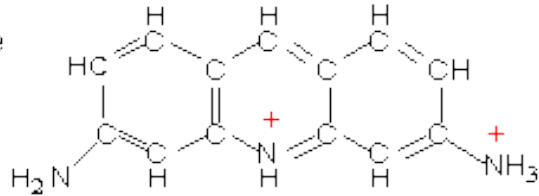


Saturação do sistema de reparação quando ocorre elevada taxa de alquilação

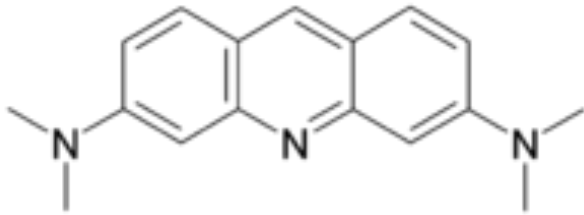


Agentes intercalantes

2,8,-Diamino acridine
(Proflavin)



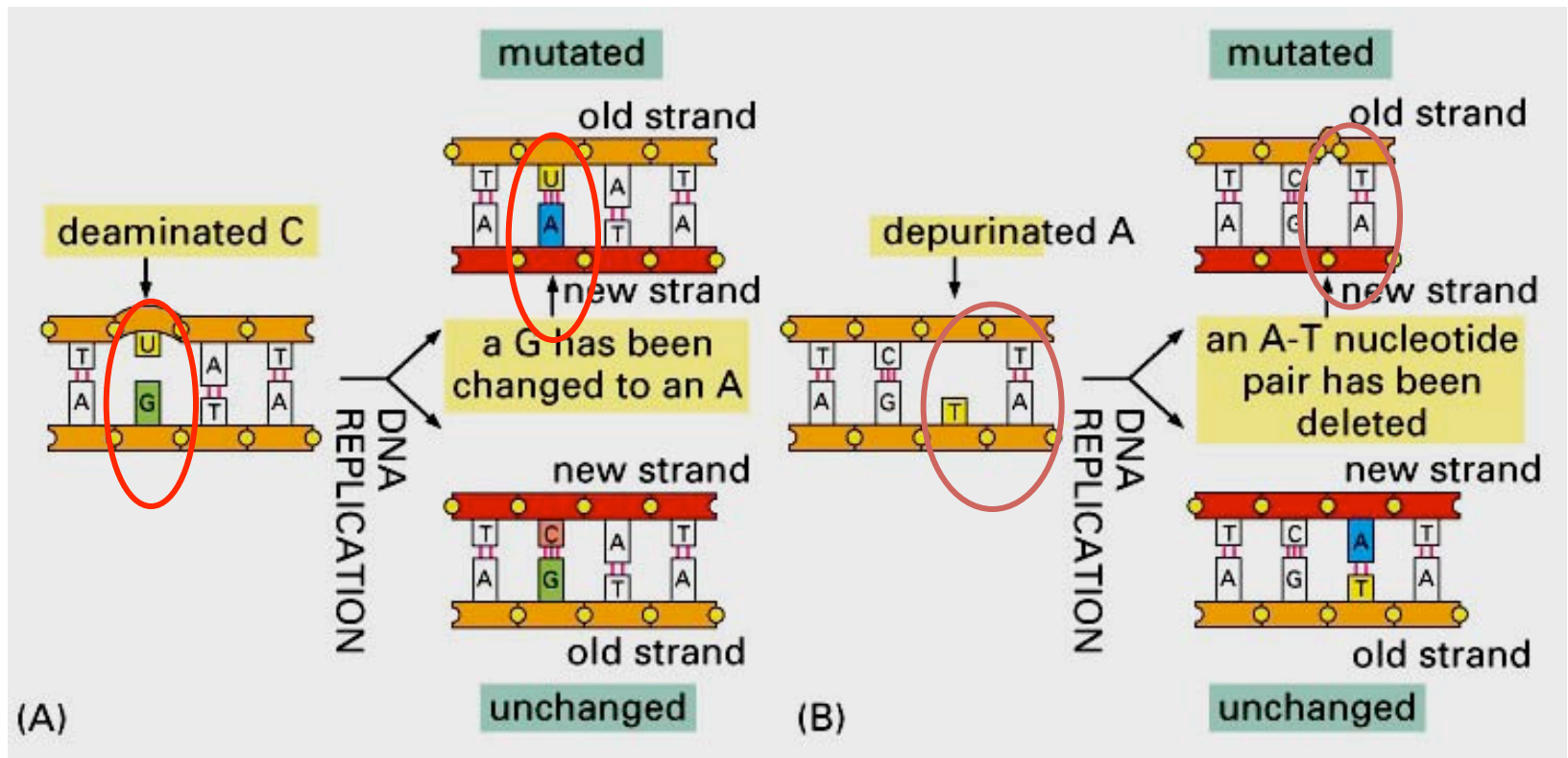
Proflavina ou diaminoacridina
Desinfetante bacteriostático
contra a maioria das bactérias
Gram (+)



Laranja de acridina
Corante catiónico fluorescente usado
em estudos celulares

Podem introduzir-se entre 2 bases na cadeia de DNA
Provocam adição ou deleção de um nucleótido

Se as alterações NÃO forem corrigidas podem resultar em mutação



Alteração do nucleótido

Perda do nucleótido

Resultados de mutações pontuais

Wildtype mRNA 5' GCU GGA GCA CCA GGA CAA GAU GGA 3'
Wildtype polypeptide N Ala Gly Ala Pro Gly Gln Asp Gly C

Silent mutation GCU GGA GCC CCA GGA CAA GAU GGA
 Ala Gly Ala Pro Gly Gln Asp Gly

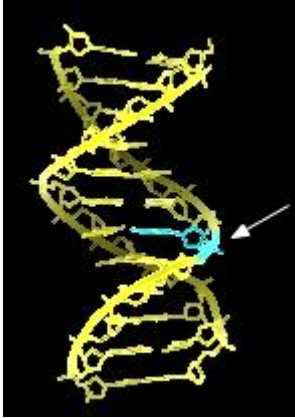
Missense mutation GCU GGA GCA CCA AGA CAA GAU GGA
 Ala Gly Ala Pro Arg Gln Asp Gly

Nonsense mutation GCU GGA GCA CCA GGA UAA GAU GGA
 Ala Gly Ala Pro Gly Stop

Frameshift mutation GCU GGA GCC ACC AGG ACA AGA UGG A
 Ala Gly Ala Thr Arg Thr Arg Trp

Adição

Mecanismos de reparação



A reparação de **uma** cadeia, após remoção da parte alterada, faz-se a partir da cadeia complementar

Mecanismos de reparação

Reversão de dano (1 etapa enzimática)

Excisão de DNA danificado

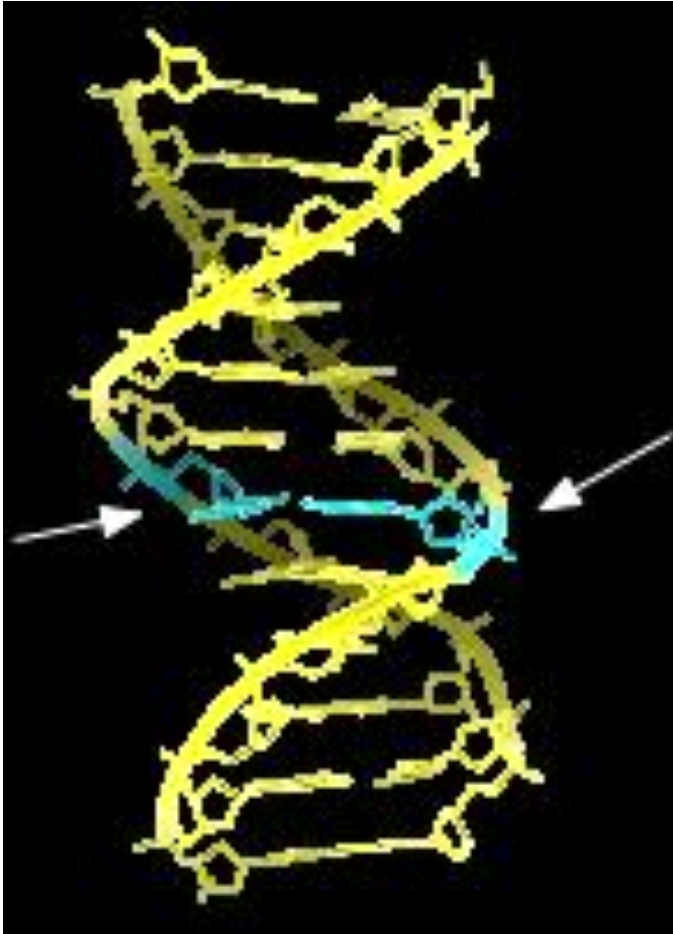
Excisão de base

Excisão de nucleótido

Reparação de erros de emparelhamento
(*mismatch repair*)

Cada célula possui múltiplos sistemas, usando diferentes enzimas, e adequados a diferentes tipos de danos

E quando o dano afeta as 2 cadeias de DNA?



Radiação ionizante
Agentes oxidantes
Erros de replicação
Certos produtos metabólicos

Não se pode usar uma cadeia para reparar a complementar!!!

E quando o dano afeta as 2 cadeias de DNA?

A reparação pode conduzir ao encurtamento da molécula de DNA

Junção de extremidades não homólogas

Recombinação

**Recorre-se ao cromossoma homólogo,
utilizando proteínas de recombinação específicas**

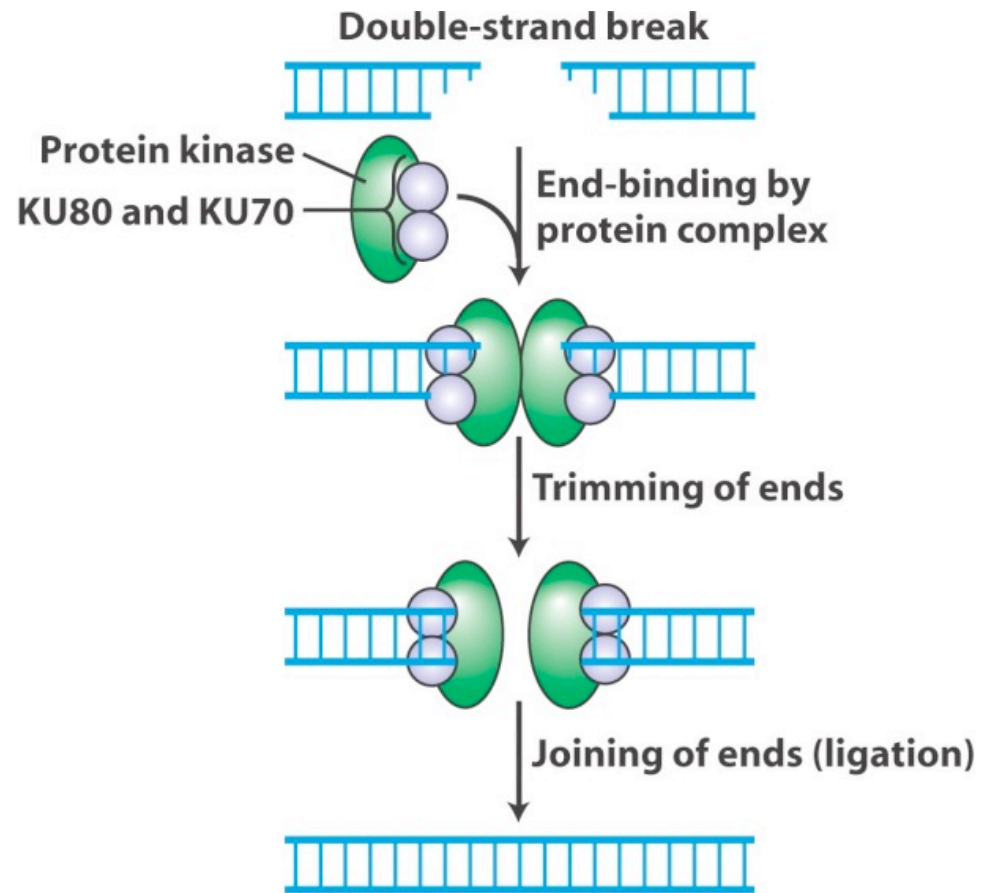
Junção de extremidades não homólogas

Duas extremidades que não deveriam estar juntas são unidas, com remoção da região danificada



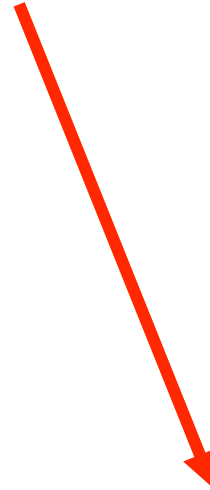
Perda de 1 ou mais nucleótidos no local de união → MUTAÇÃO

Solução de emergência mas bastante usado em mamíferos (pouco DNA codifica proteínas)



Recombinação

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA - Troca genética entre 2 sequências homólogas de DNA, geralmente localizadas em 2 cópias do mesmo cromossoma

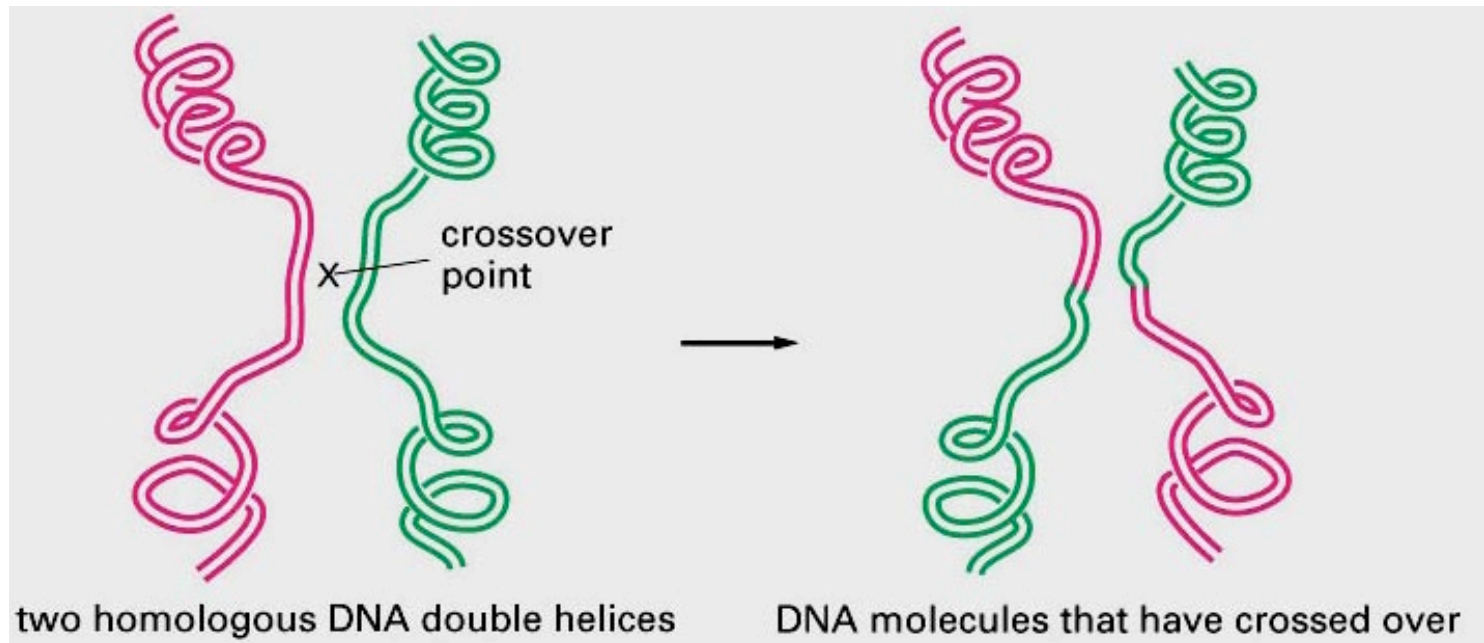


**Causa de variabilidade genética
(associada ao processo de meiose)**

OU

Mecanismo de reparação

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA



- 2 moléculas com regiões muito similares
- Pode ocorrer *crossing-over* se a dupla cadeia de DNA quebrar
- O local de *crossing-over* pode ser qualquer um desde que haja homologia
- Não há troca de nucleótidos