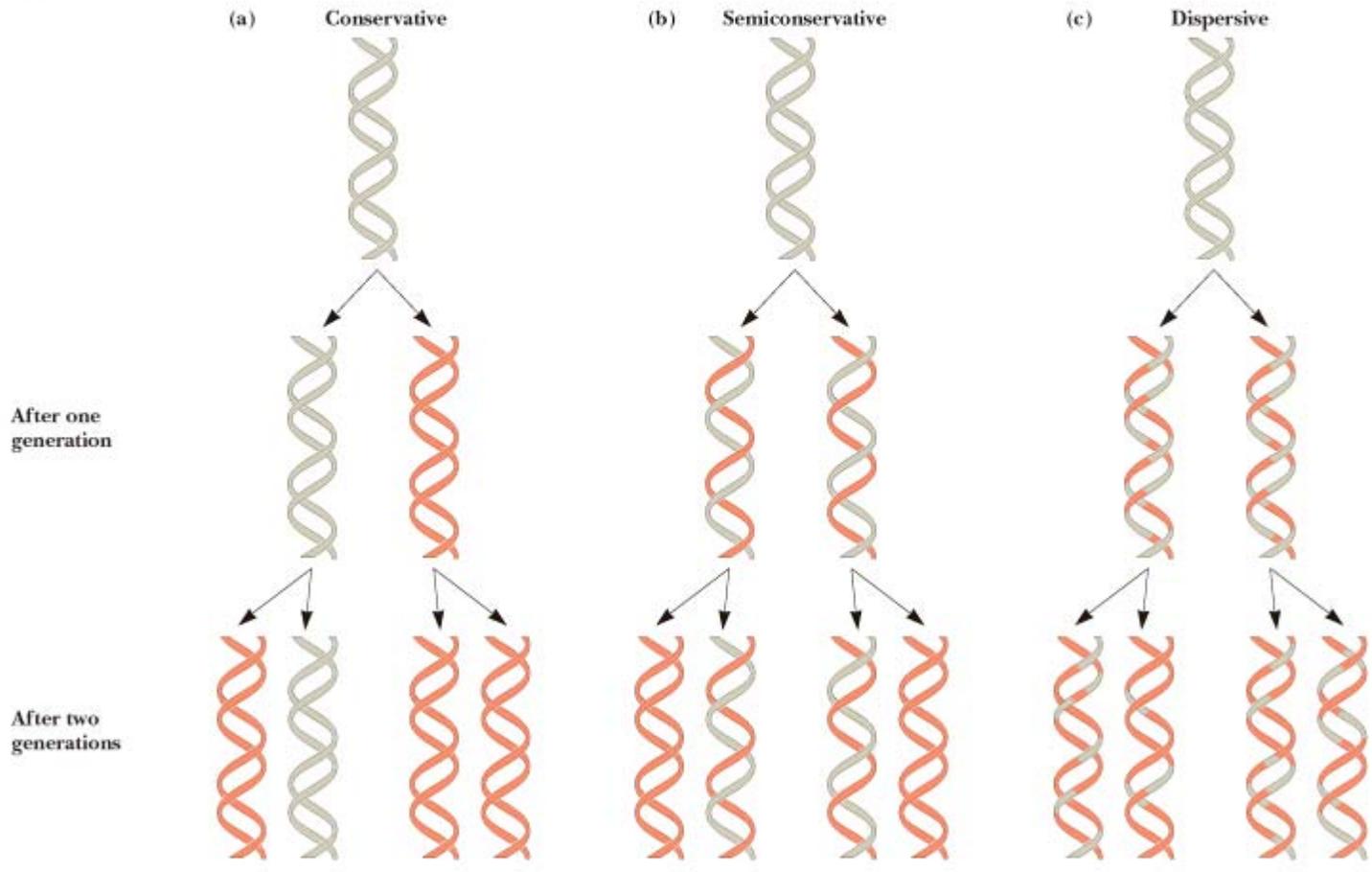


Aula - Replicação e Reparo do DNA

Watson e Crick previram a Replicação Semi-conservativa do DNA

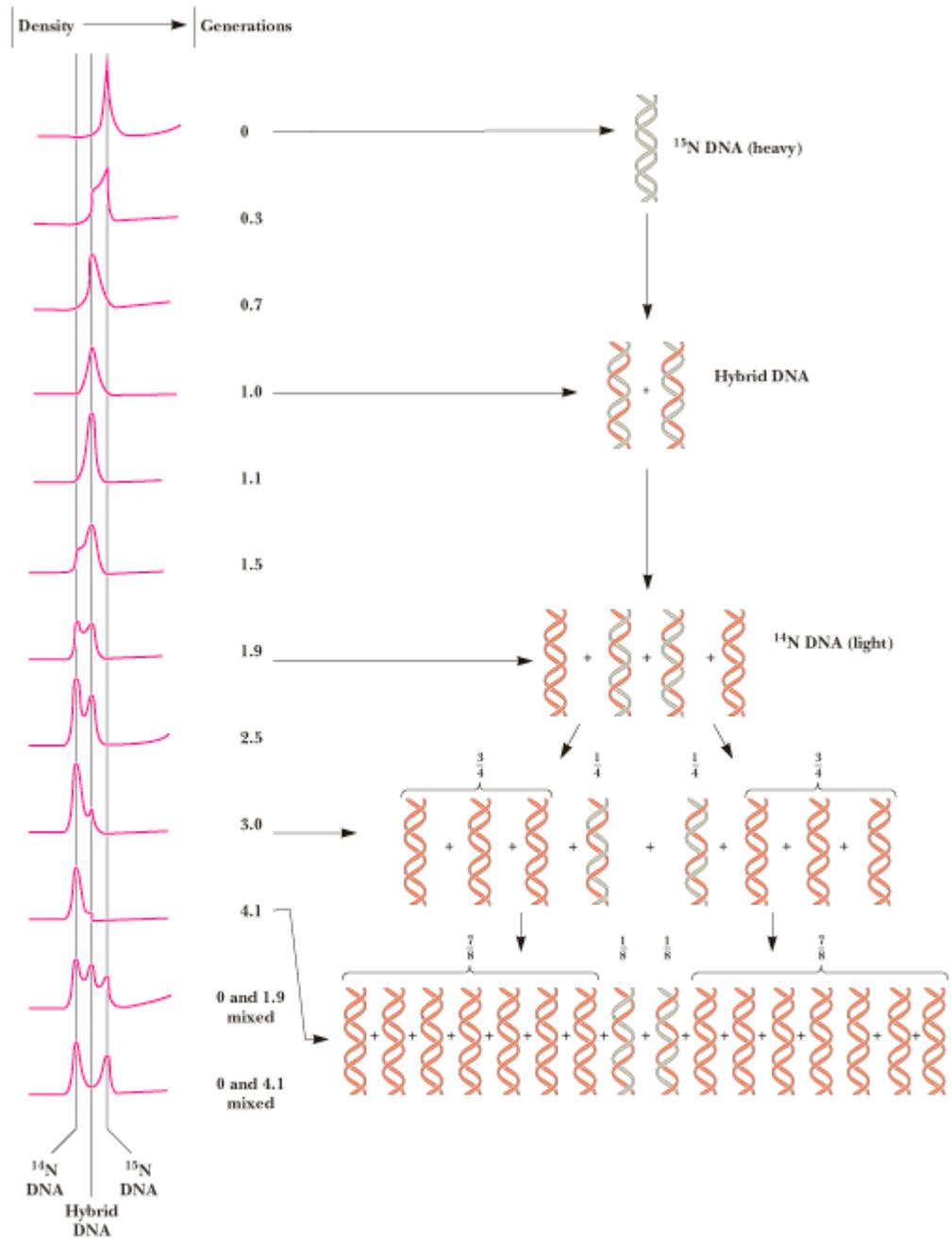
- Watson e Crick: "Não escapou a nossa observação que o pareamento específico (base) que nós postulamos sugere imediatamente um mecanismo de possível cópia p/ o material genético."
- O mecanismo: separação das fitas, seguido pela cópia de cada fita.
- Cada fita separada age como um modelo para a síntese de uma nova fita complementar.

100



O Modelo Semiconservativo

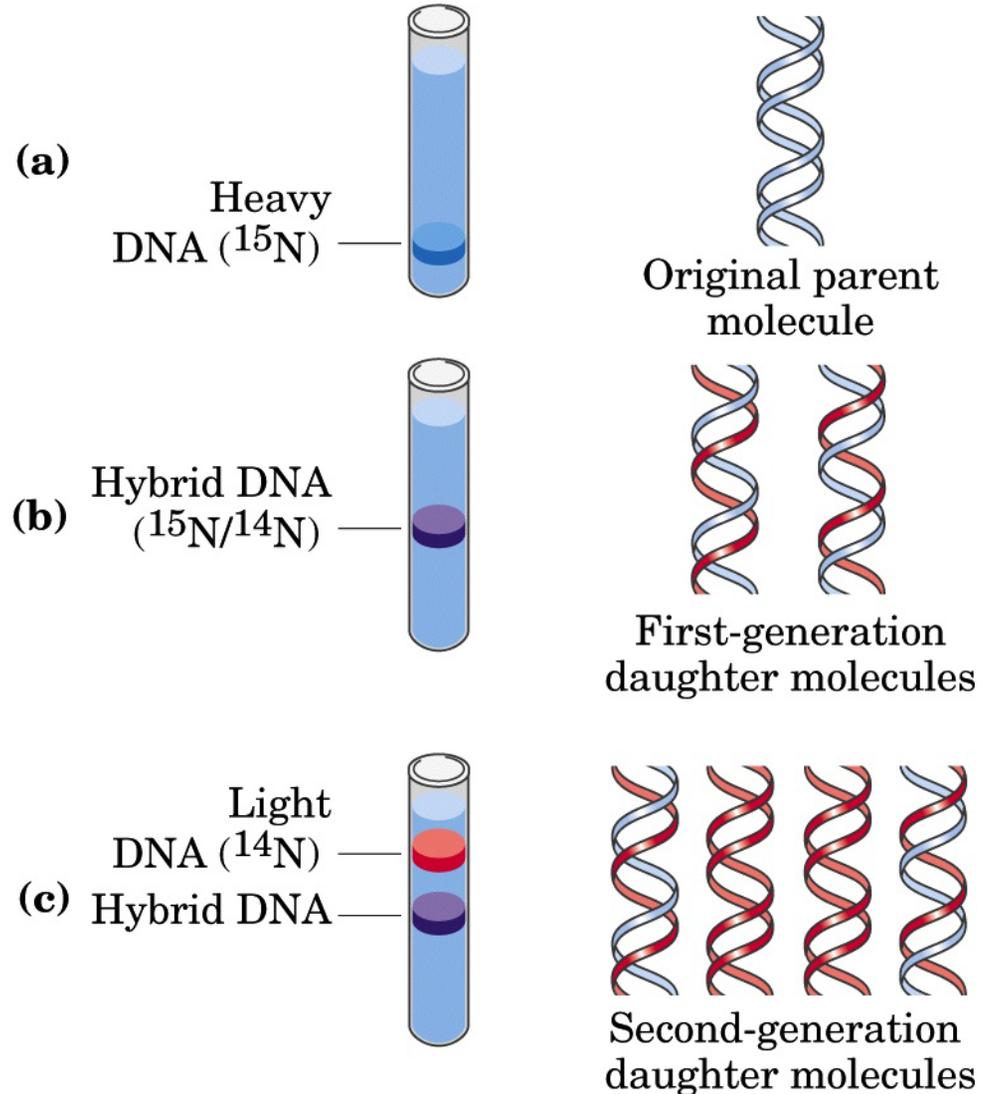
- Matthew Meselson e Franklin Stahl verificaram o modelo semi-conservativo
- Cópia de DNA com nucleotídeos contendo ^{15}N (mais denso do que o DNA normal)
- Cópia de DNA contendo nucleotídeos ^{14}N (DNA sintetizado novamente era menos denso)
- DNA isolado em diferentes tempos e fracionado em gradiente de densidade
- DNA mais denso/ mais pesado, encontrado em gradientes mais baixo.
- DNA menos denso/mais leve, encontrado em gradientes mais alto.



Experimento de Meselson-Stahl

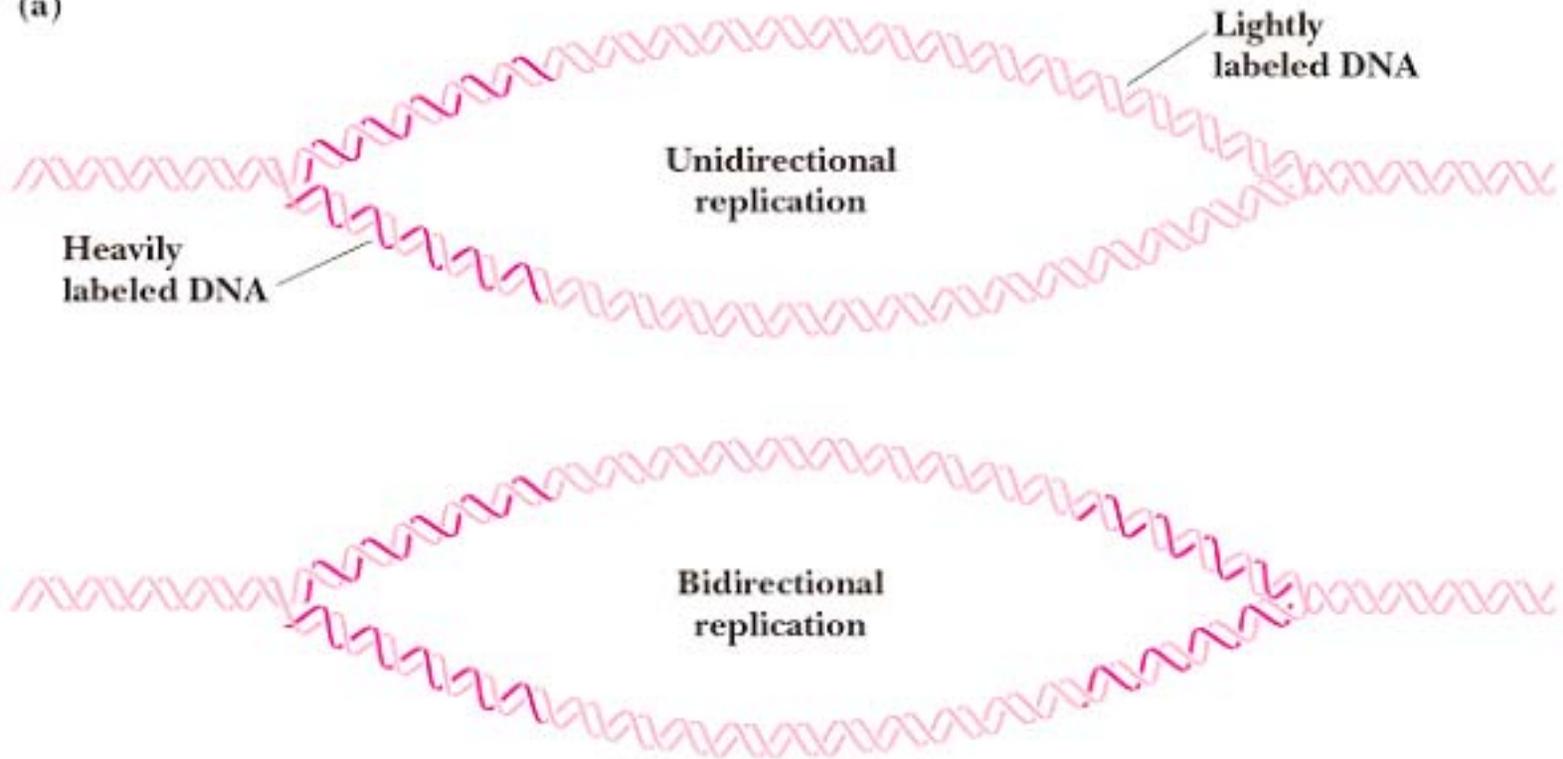
- a) Células crescidas por muitas gerações em meio contendo ^{15}N
- b) Células transferidas para meio contendo ^{14}N
- c) Replicação por uma segunda geração, produção de dois DNAs Híbridos

DNA extracted and centrifuged to equilibrium in CsCl density gradient

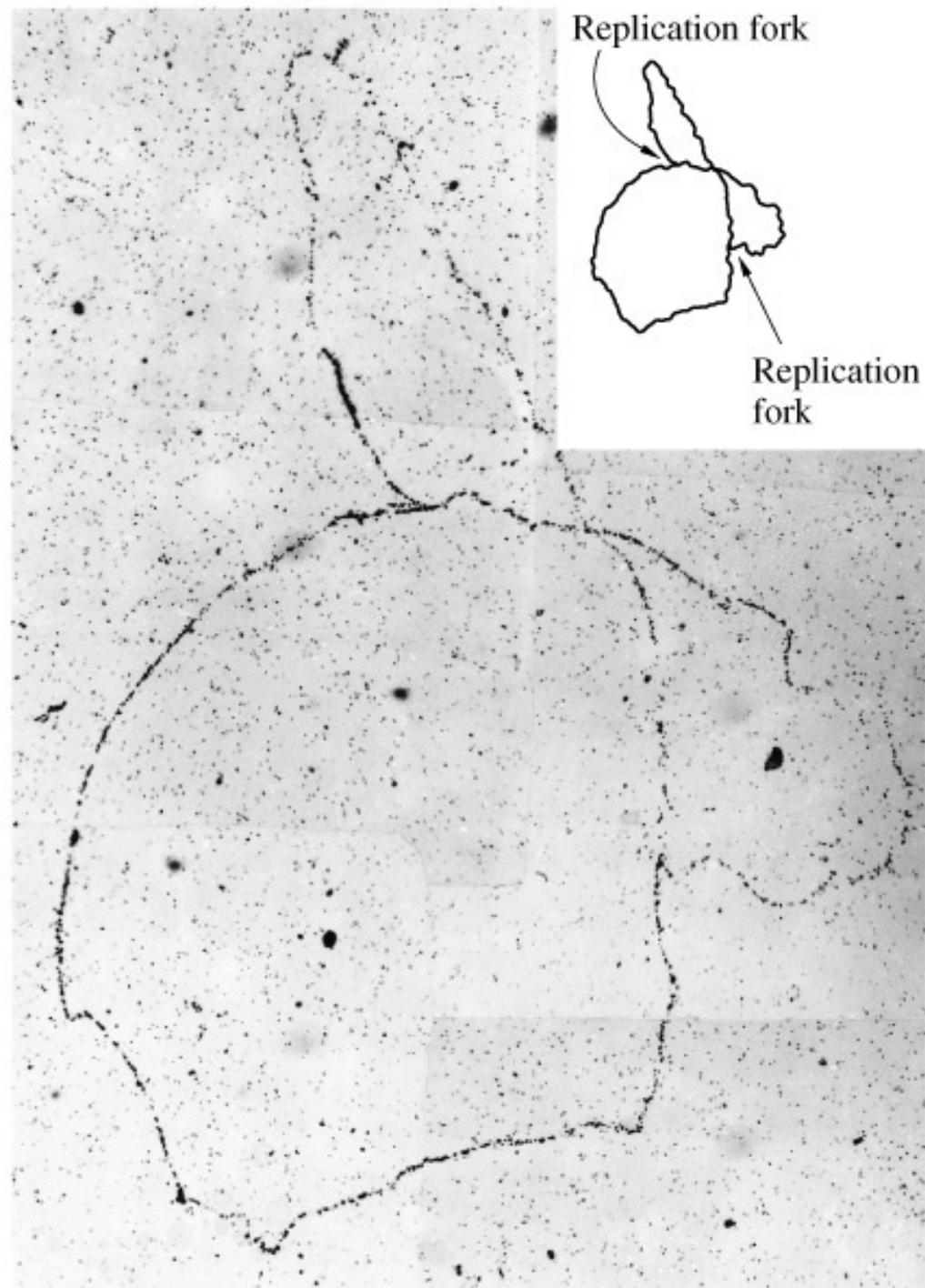


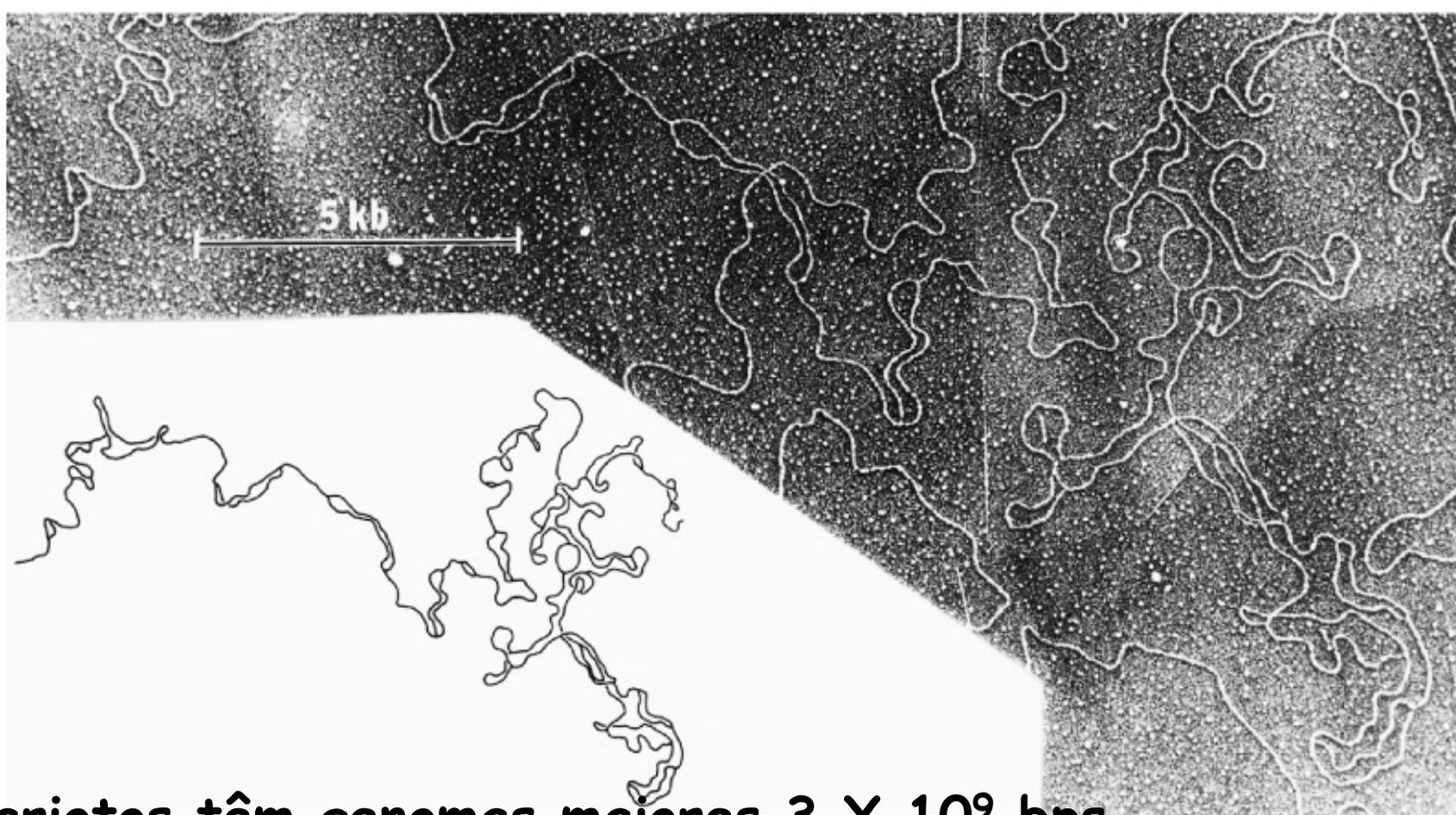
Replicação é bidirecional

(a)



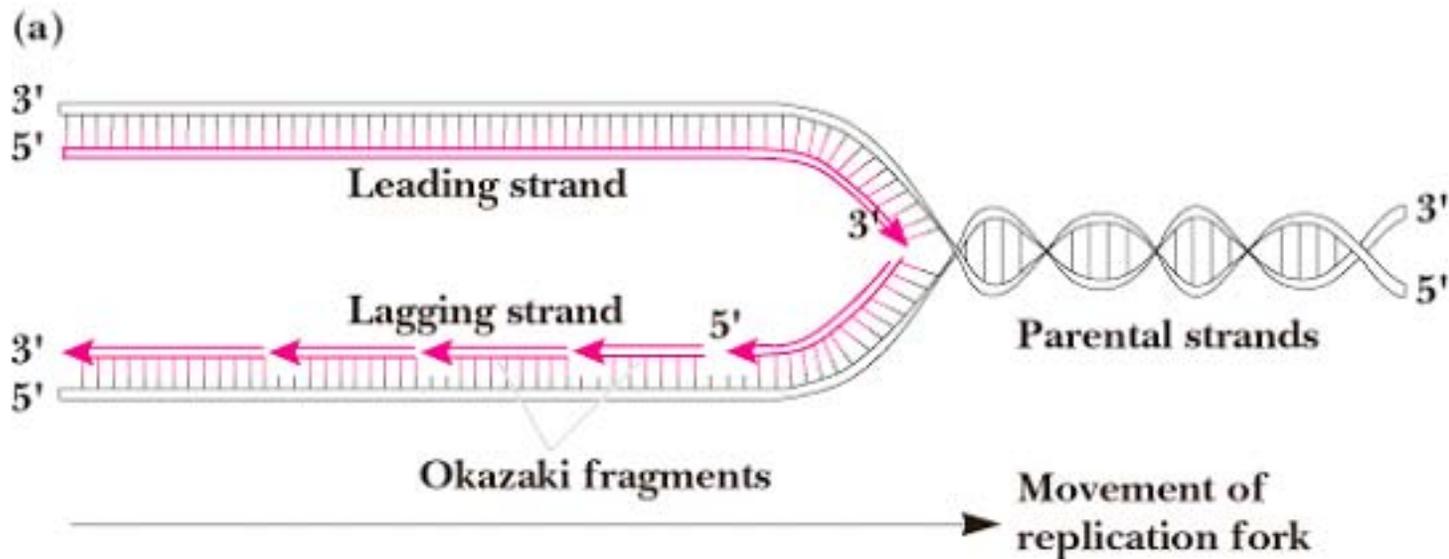
- Tamanho do genoma de *E. coli* = 4.6×10^6 bp
- Bactérias têm cromossomos circulares com uma única origem de replicação.
- Taxa de replicação ~1000 pares de base por segundo.
- Cromossomo é duplicado em 38 minutos.





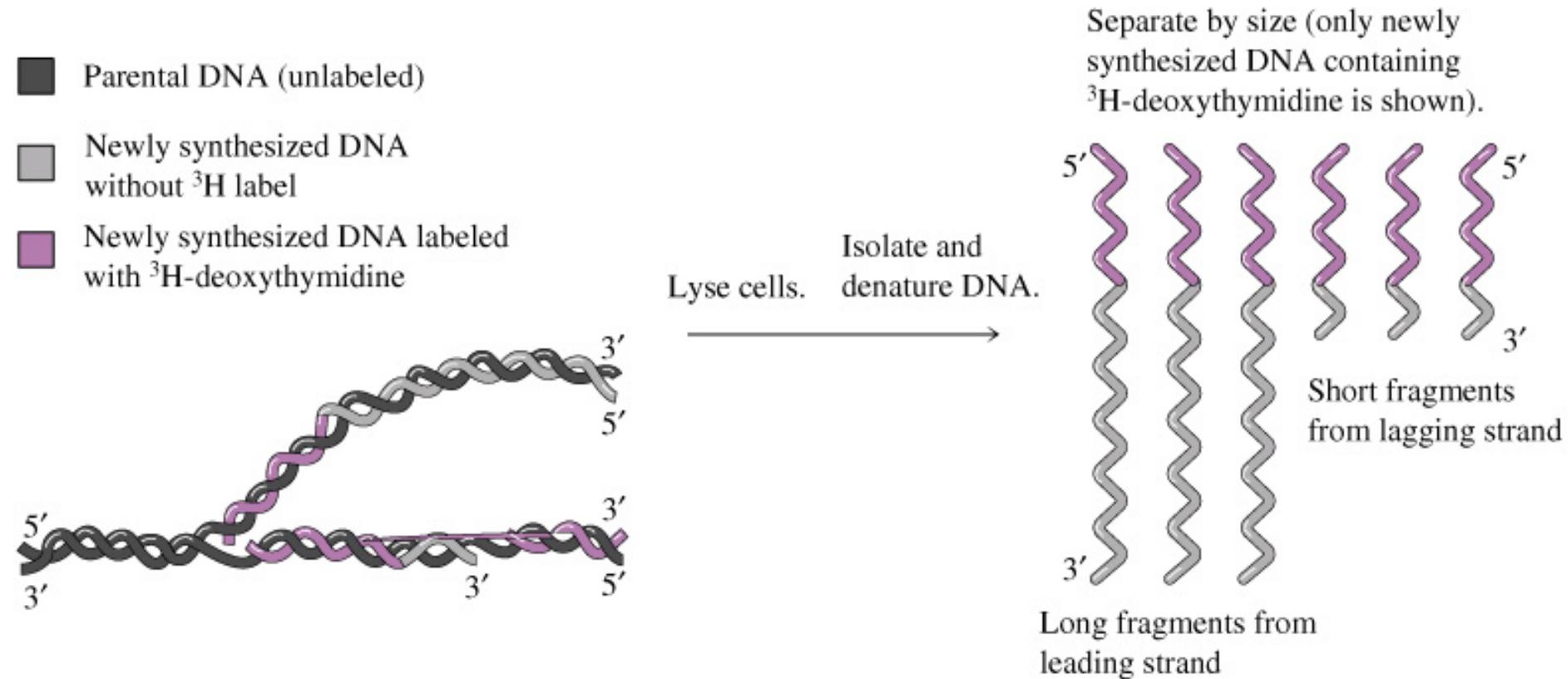
- Eucariotos têm genomas maiores 3×10^9 bps
- Taxa de replicação do cromossomo de Eucariotos é mais lenta
- Mas devido aos cromossomos de eucariotos terem múltiplas origens de replicação, isto leva o mesmo tempo para replicar o genoma completo.

Replicação do DNA é Semi-descontínua



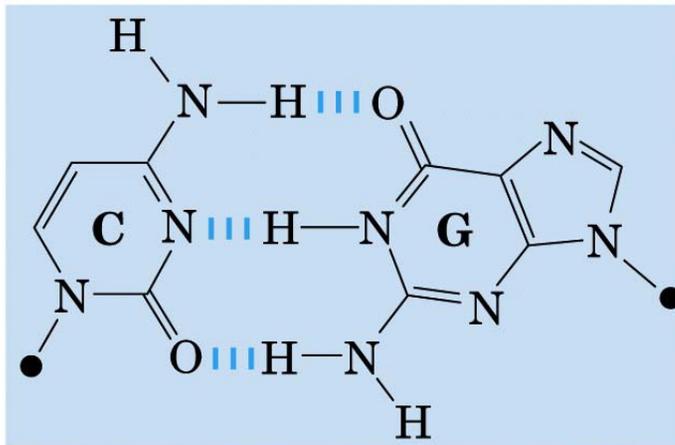
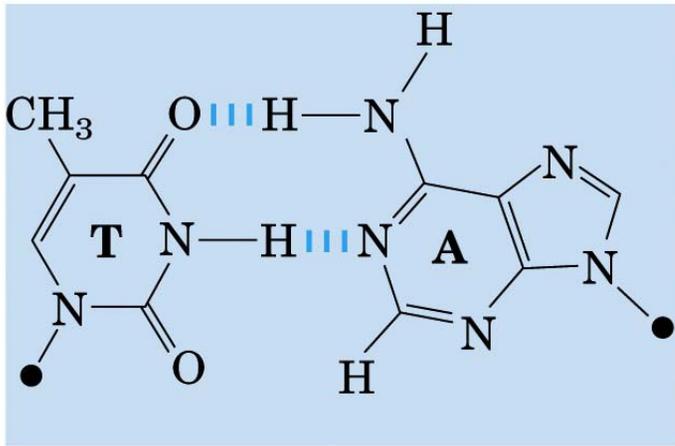
Síntese do DNA prossegue na direção $5' \rightarrow 3'$ e é semi-descontínua. A formação da fita contínua (**fita Líder**) ocorre na mesma direção do movimento da forquilha. A formação da fita descontínua (**fita atrasada**) ocorre em direção oposta ao movimento da forquilha

Fragmentos Okazaki



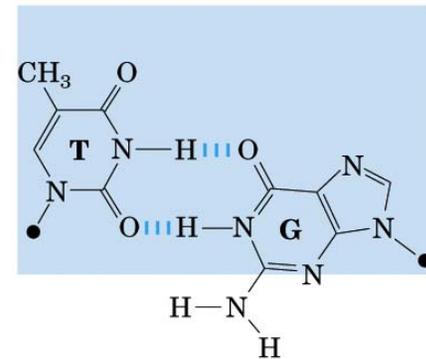
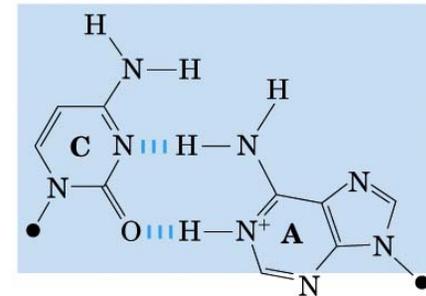
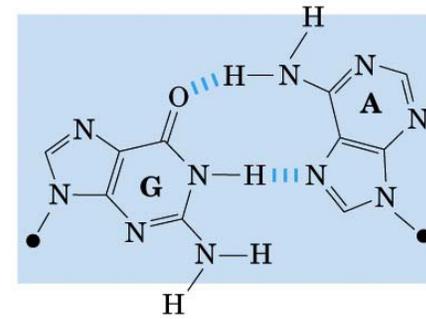
A Enzimologia da Replicação do DNA

- Se Watson e Crick estavam certos, então deveria existir uma enzima que faz cópias de DNA de um modelo de outro DNA
- Em 1957, Arthur Kornberg e colegas demonstraram a existência da DNA polimerase -
- Há 3 tipos DNA polimerases em E. coli
 - DNA polimerase I- repara o DNA e participa da síntese de filamentos tardios
 - DNA polimerase II - repara o DNA
 - DNA polimerase III - principal polimerase envolvida na replicação do DNA.



(a)

Praticamente todas DNAs polimerases possuem atividades exonucleásica 3' → 5' verificando cada nucleotídeo após adição (Atividade revisora)

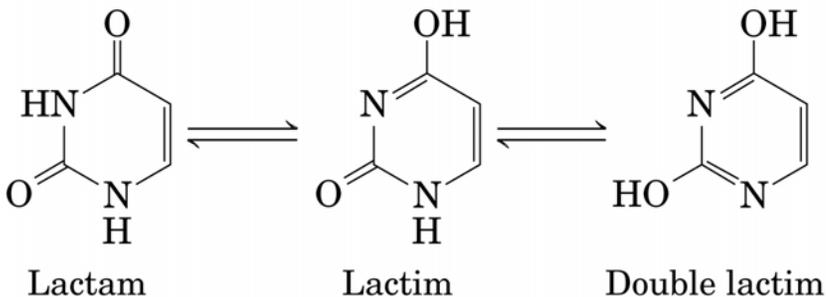


(b)

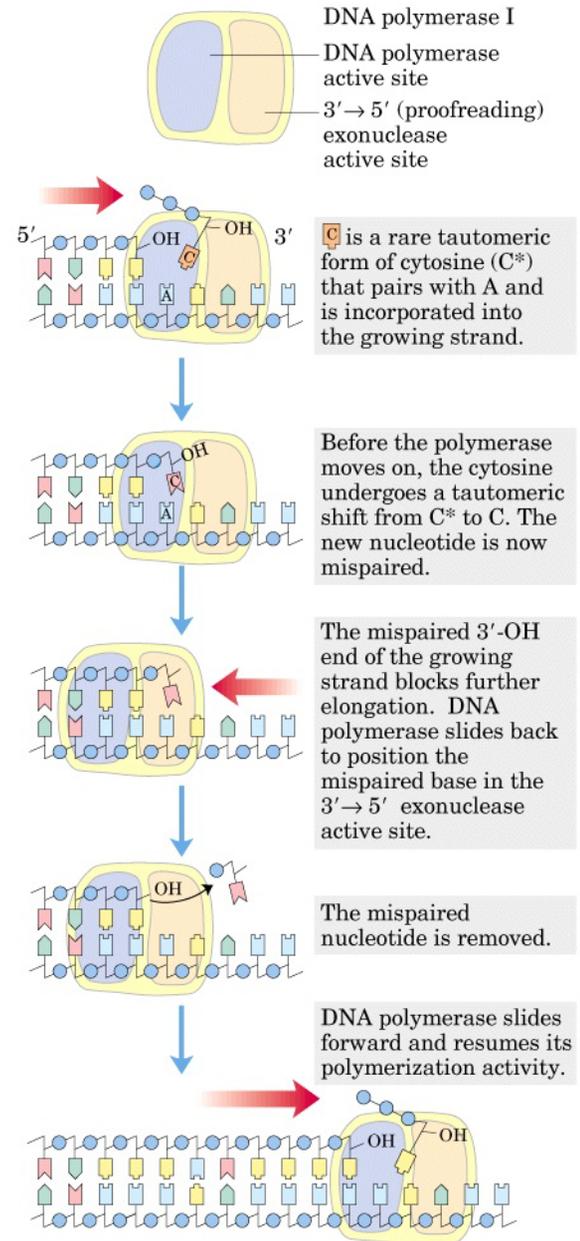
Contribuição da geometria do par de bases para a fidelidade da replicação. A) A geometria dos pares A=T e G≡C são semelhantes e um sítio ativo para acomodar uma, acomodaria a outra B) Geometria de pares incorretos podem exclu-los do sítio ativo.

Atividade exonucleásica 3' → 5' da DNA polimerase I

Base despareada (C - A) impede a translocação da DNA polimerase para o sítio seguinte. Deslizando para trás a enzima faz correção através da atividade exonucleásica 3' → 5' e após reassume atividade polimerásica na direção 5' → 3'



Formas tautoméricas da uracila



E. coli possui pelo menos cinco DNA polimerases.

DNA polimerase I realiza funções de limpeza (atividade exonucleásica $5' \rightarrow 3'$ (essa atividade pode substituir um fragmento de DNA “ nick translation”) e $3' \rightarrow 5'$ A maioria das outras DNAs polimerase não possuem atividade $5' \rightarrow 3'$

table 25–1

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	≥ 4	≥ 10
M_r	103,000	88,000 [†]	830,000
$3' \rightarrow 5'$ Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
$5' \rightarrow 3'$ Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/sec)	16–20	40	250–1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3–200	1,500	$\geq 500,000$

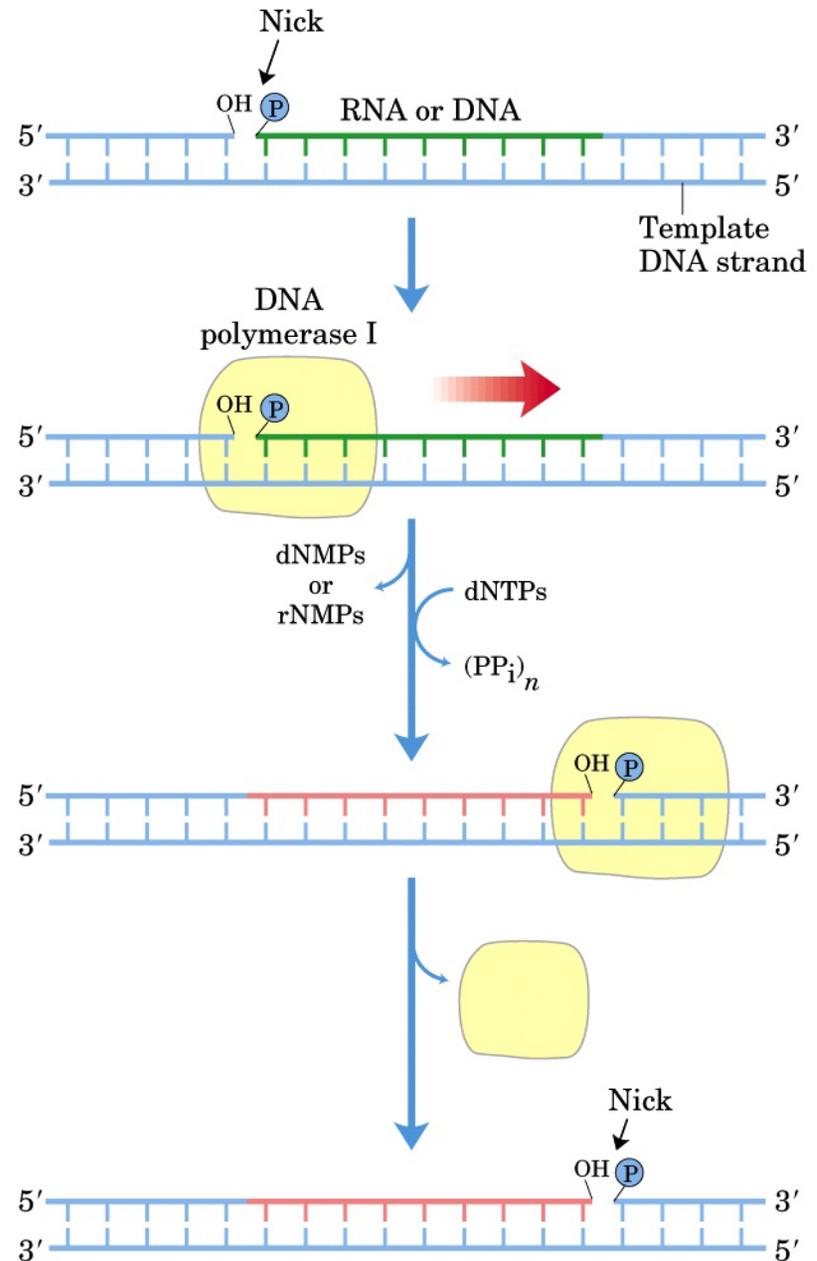
*For enzymes with more than one subunit, the gene listed here encodes the subunit with polymerization activity. Note that *dnaE* is an earlier designation of the gene now referred to as *polC*.

[†]Polymerization subunit only. DNA polymerase II shares several subunits with DNA polymerase III, including the β , γ , δ , δ' , χ , and ψ subunits (see Table 25–2).

Deslocamento do Corte (nick translation)

Fita de DNA ou RNA pareada a um molde de DNA é simultaneamente degradada pela atividade 5' → 3' e substituída pela atividade polimerásica da mesma enzima. Essas atividades possuem papel importante tanto no reparo como na remoção de RNAs iniciadores.

Um corte ocorre onde a síntese de DNA deve começar. A DNA polimerase estende a fita não molde do DNA e desloca o corte. O corte permanece onde a DNA polimerase I dissociar e será selado por outra enzima.



DNA Polimerase III é uma Enzima de Multisubunidades

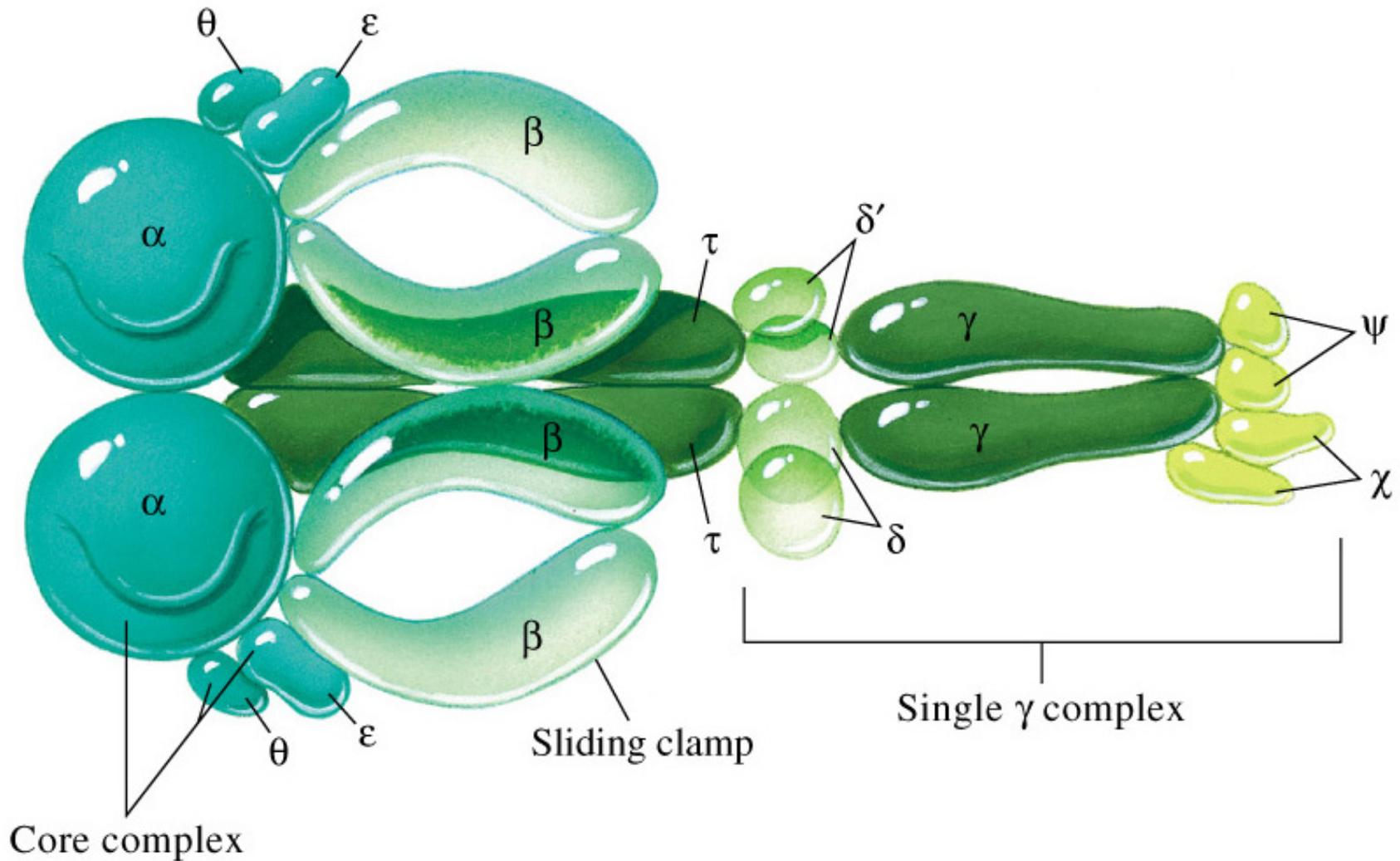
table 25-2

Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

Subunit	Number of subunits per holoenzyme	M_r of subunit	Gene	Function of subunit	
α	2	132,000	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity	} Core polymerase
ϵ	2	27,000	<i>dnaQ (mutD)</i>	3'→5' Proofreading exonuclease	
θ	2	10,000	<i>holE</i>		
τ	2	71,000	<i>dnaX</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization	
γ	2	52,000	<i>dnaX*</i>	} Clamp-loading complex that loads β subunits on lagging strand at each Okazaki fragment	
δ	1	35,000	<i>holA</i>		
δ'	1	33,000	<i>holB</i>		
χ	1	15,000	<i>holC</i>		
ψ	1	12,000	<i>holD</i>		
β	4	37,000	<i>dnaN</i>	DNA clamp required for optimal processivity	

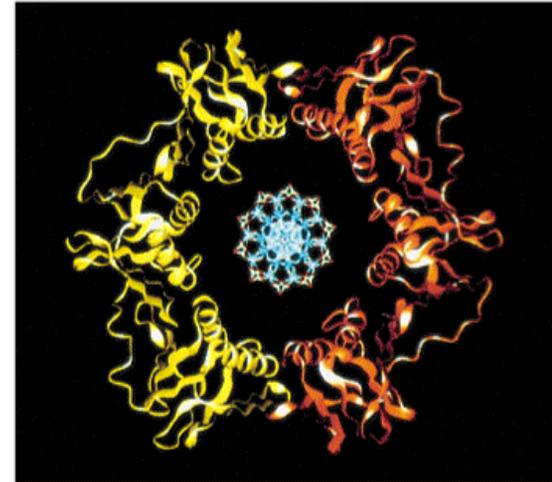
*The γ subunit is encoded by a portion of the gene for the τ subunit, such that the amino-terminal 80% of the τ subunit has the same amino acid sequence as the γ subunit. The γ subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (see Box 28-1) that leads to premature translational termination.

Organização da subunidade da DNA Polimerase III

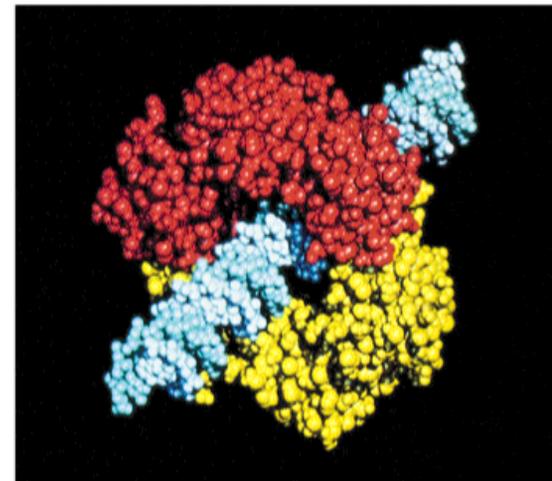


Replicação de DNA é um Processo Processivo.

- DNA Polimerase permanece ligada a forquilha de replicação
- Dímero de β -subunidades formam estrutura de anel em torno das cadeias de DNA crescentes.



(a)



(b)

DNA Polimerase também tem função à prova de leitura

- As reações de polimerização tem uma taxa de erro de 1 para 100,000 pares de base incorporados (1×10^{-5} erros por base)
- DNA polimerase tem função 3' a 5' exonuclease (subunidade epsilon) que reconhece pares de base colocados errôneamente e os remove.
- Por isso a função de prova de leitura ajuda eliminar erros que poderiam conduzir a mutações deletérias.
- Entretanto a prova de leitura realizada pela exonuclease tem taxa de erro 1 para 100 pares de bases (1×10^{-2} erros por base)
- No total a taxa de erro é 1×10^{-7} erros por base.

Estágios da Replicação de DNA

- Iniciação
- Elongação
- Terminação

Início da Replicação

Em E. coli

- A replissomo (complexo envolvendo sistema de replicação, chamado sistema da DNA replicase) consiste de: DNA-desenrolando proteínas, o complexo ini-ciador (primosomo) e 2 equivalentes de DNA
- polimerase III - holoenzima
- Iniciação: proteína DnaA (componente chave no processo) liga-se em repetições (quatro repetições de 9 pares de bases na origem) em oriC (origem da replicação em E. coli), iniciando a separação das fitas e DnaB, a helicase enviada pela DnaC, posteriormente desenrola. Primase então liga-se e constrói o primer de RNA

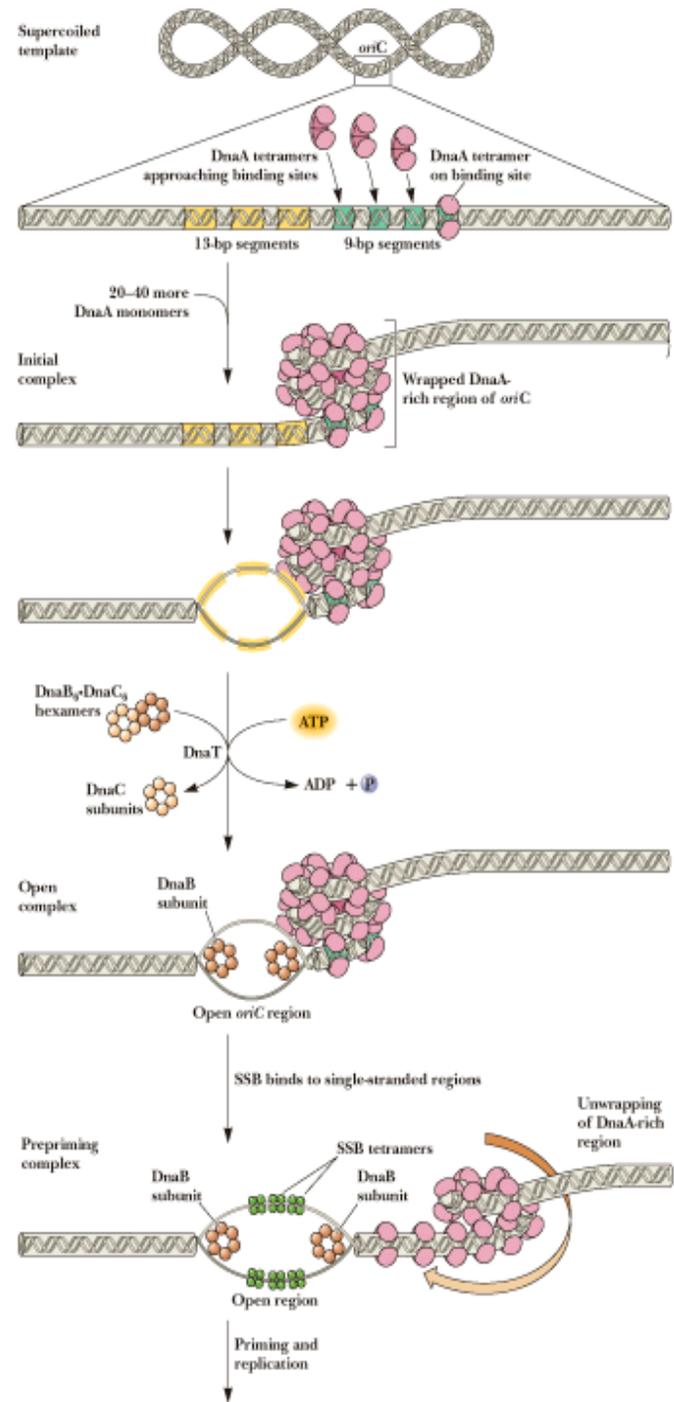
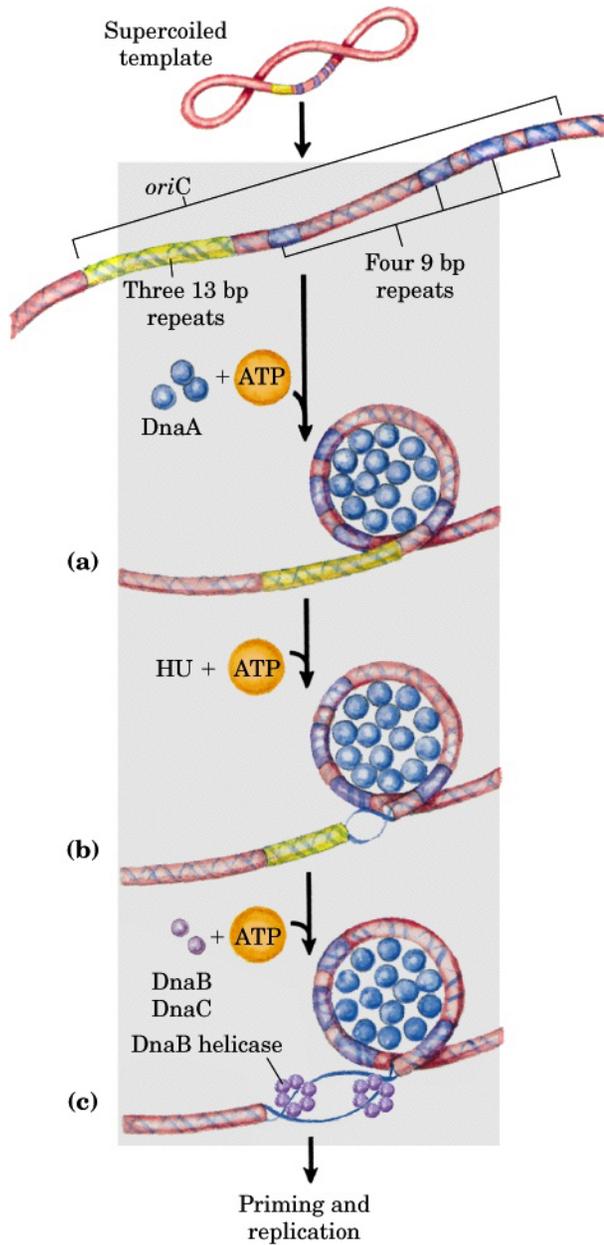
Proteínas necessárias para iniciar a replicação em *E. coli*

table 25-3

Proteins Required to Initiate Replication at the *E. coli* Origin

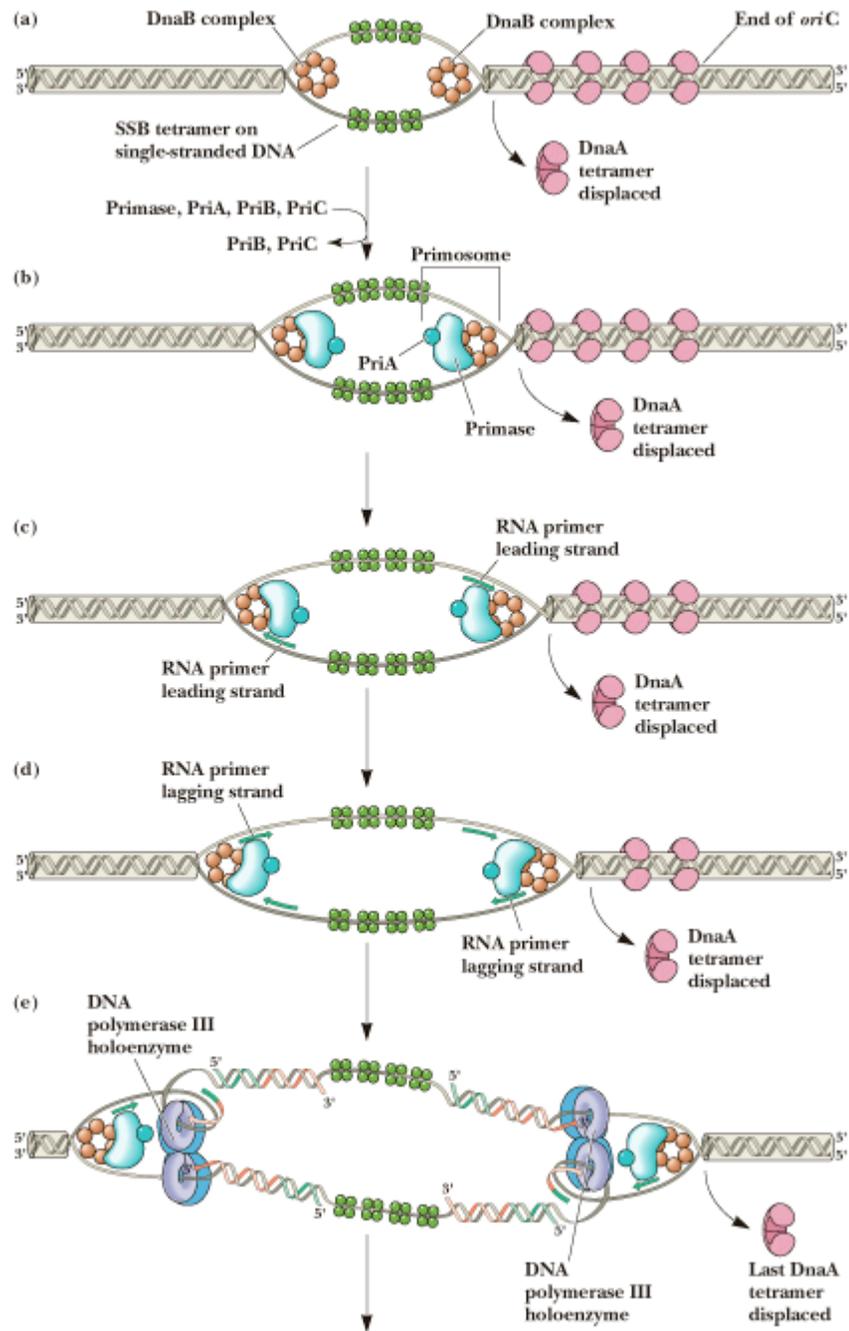
Protein	M_r	Number of subunits	Function
DnaA protein	52,000	1	Recognizes origin sequence; opens duplex at specific sites in origin
DnaB protein (helicase)	300,000	6*	Unwinds DNA
DnaC protein	29,000	1	Required for DnaB binding at origin
HU	19,000	2	Histonelike protein; DNA bending protein; stimulates initiation
Primase (DnaG protein)	60,000	1	Synthesizes RNA primers
Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	75,600	4*	Binds single-stranded DNA
RNA polymerase	454,000	5	Facilitates DnaA activity
DNA gyrase (DNA topoisomerase II)	400,000	4	Relieves torsional strain generated by DNA unwinding
Dam methylase	32,000	1	Methylates (5')GATC sequences at <i>oriC</i>

*Subunits in these cases are identical.



Estágio de Elongamento da Replicação

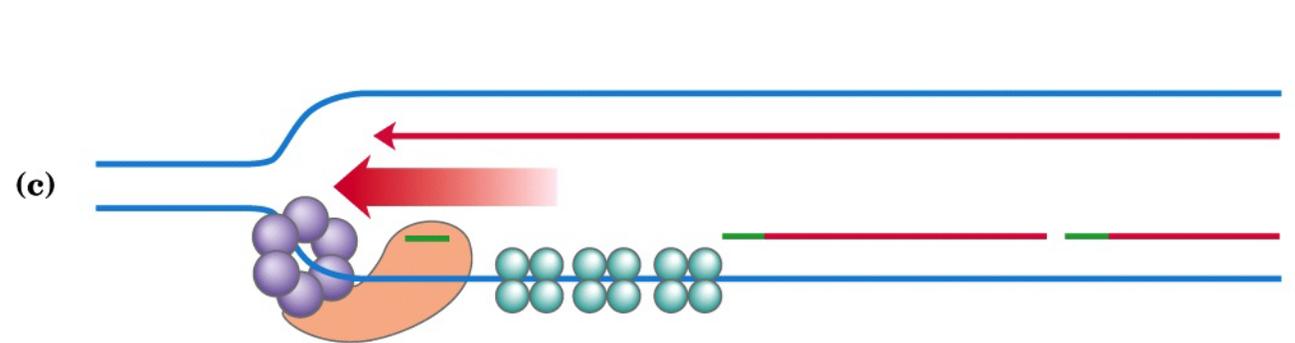
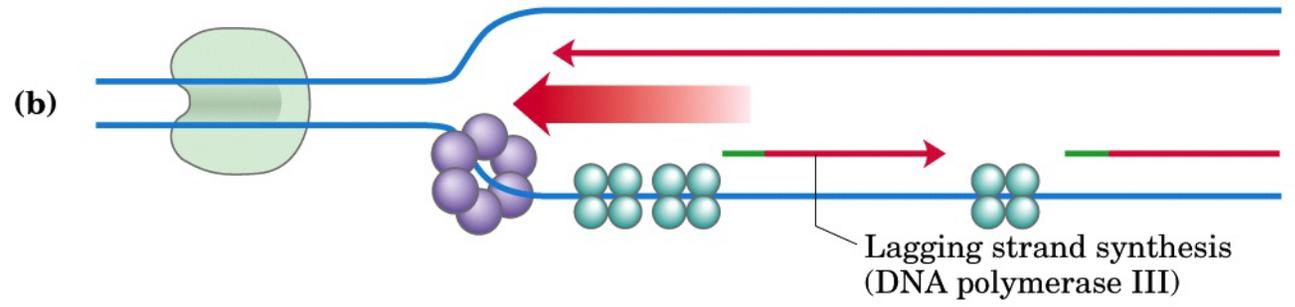
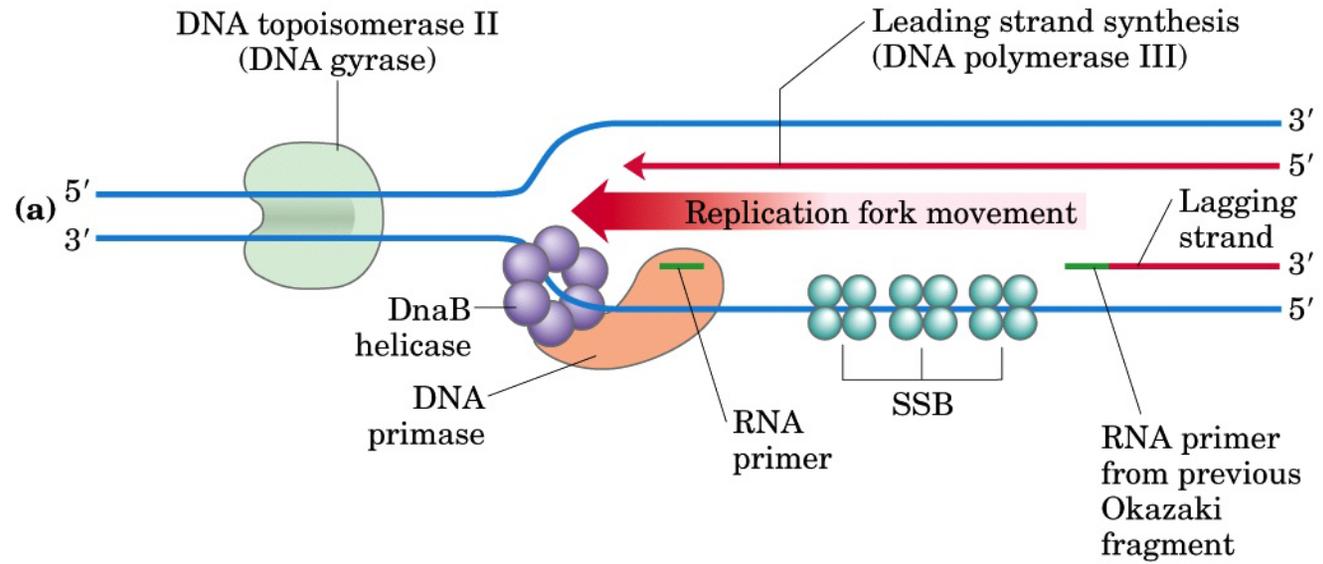
- Envolve duas fases: síntese da fita líder e da fita atrasada
- Elongação envolve DnaB helicase desenrolando, ligação da SSB p/ manter separadas as fitas.
- Complexo Primase sintetiza pequenos primers de RNA.
- DNA polimerase trabalha sempre em ambas as fitas
- Topoisomerase II (DNA girase) produz um superespiralamento que permanece



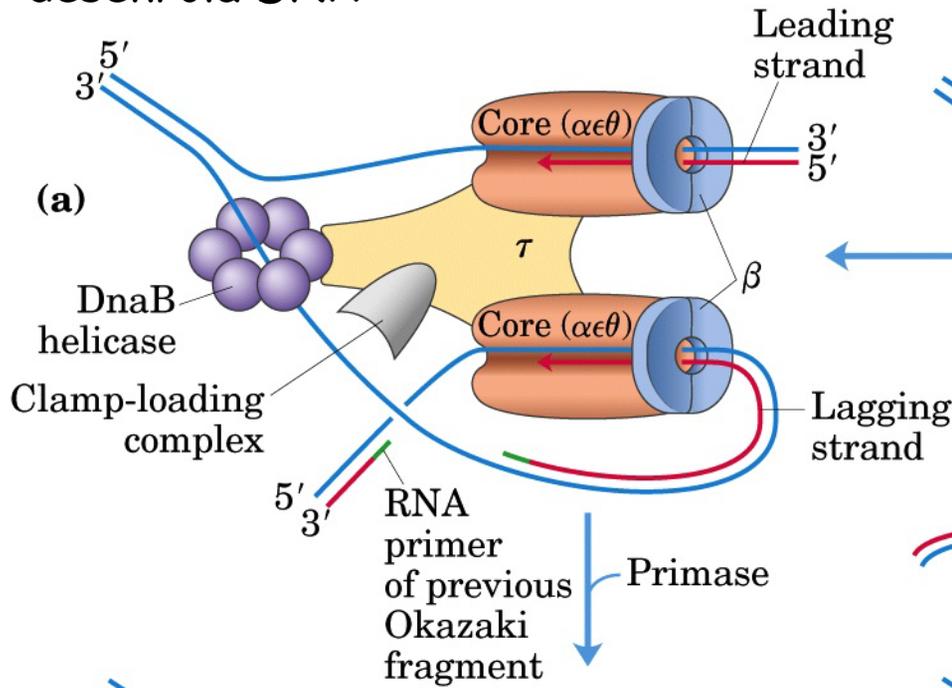
•Primer (RNA) iniciador é produzido pela iniciase.

•DNA olicerase III se liga e adiciona nucleotídeos

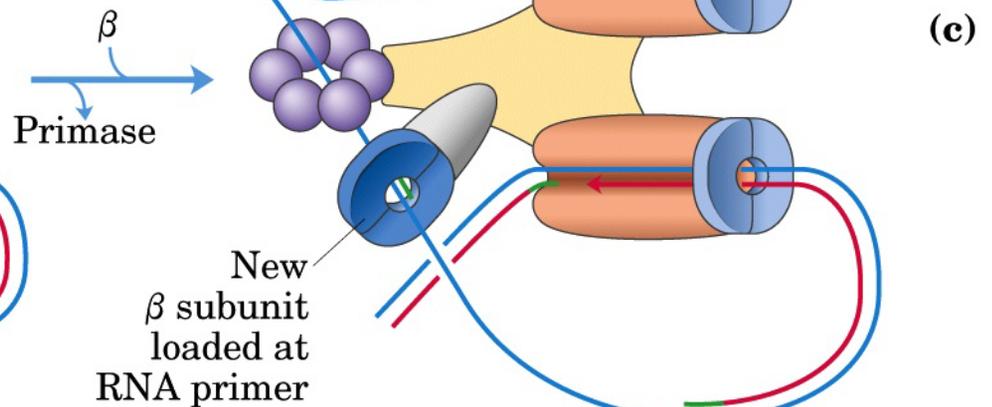
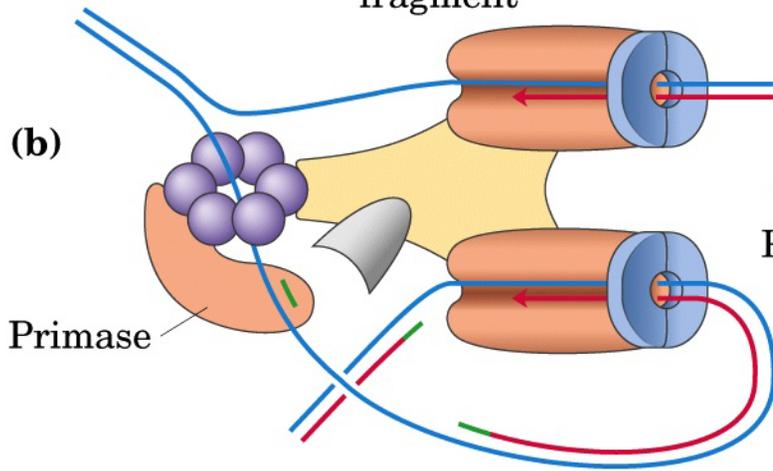
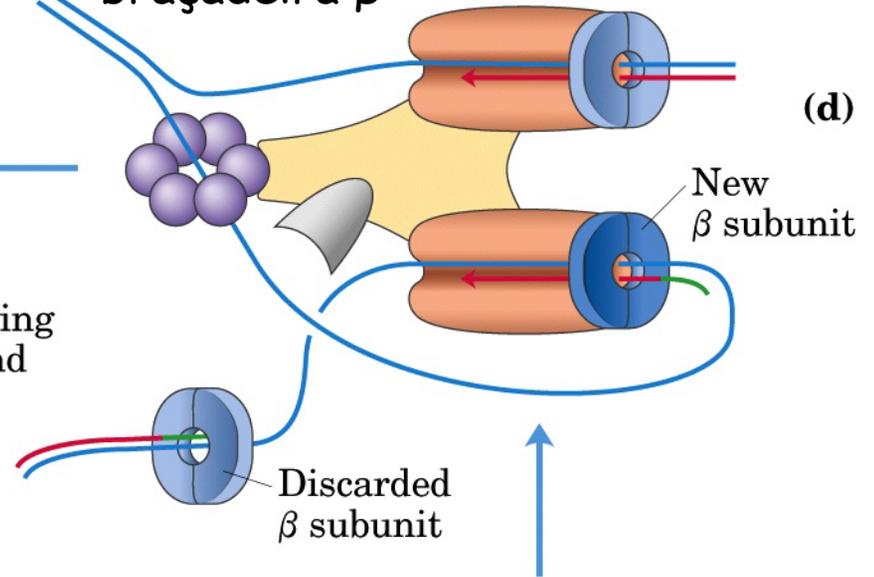
•Ambas as fitas são produzidas por um único dímero assímétrico da DNA polimerase III (alça do DNA da fita atrasada)



DnaB helicase desenrola DNA



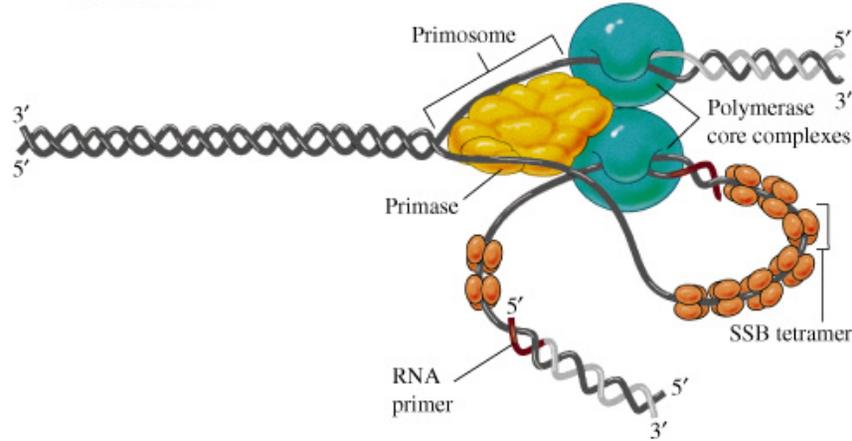
Síntese completa as subunidades da DNA polimerase III dissociam-se da braçadeira β



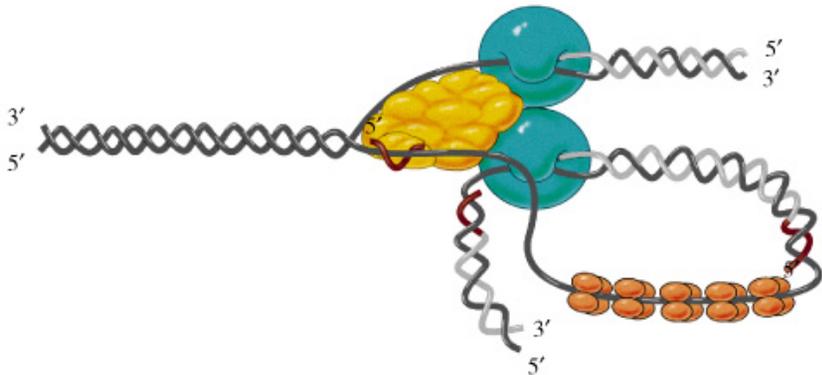
DNA iniciase se associa com DnaB helicase e forma um RNA iniciador

Nova braçadeira β é posicionada

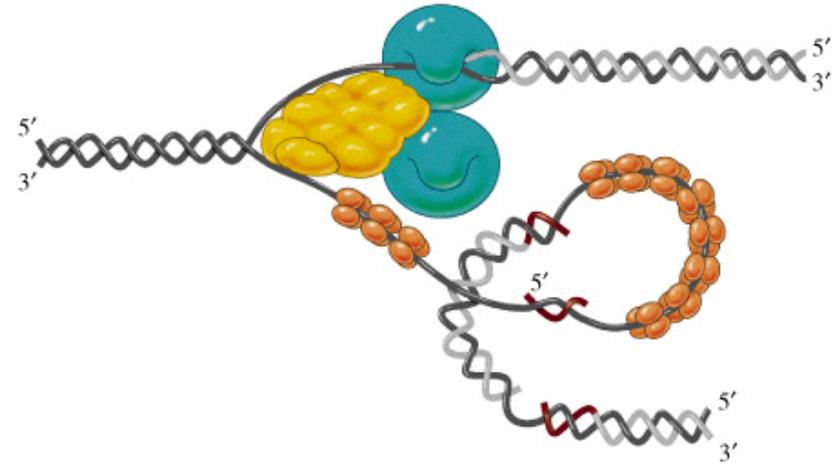
(a) The lagging-strand template loops back through the replisome so that the leading and lagging strands are synthesized in the same direction. SSB binds to single-stranded DNA.



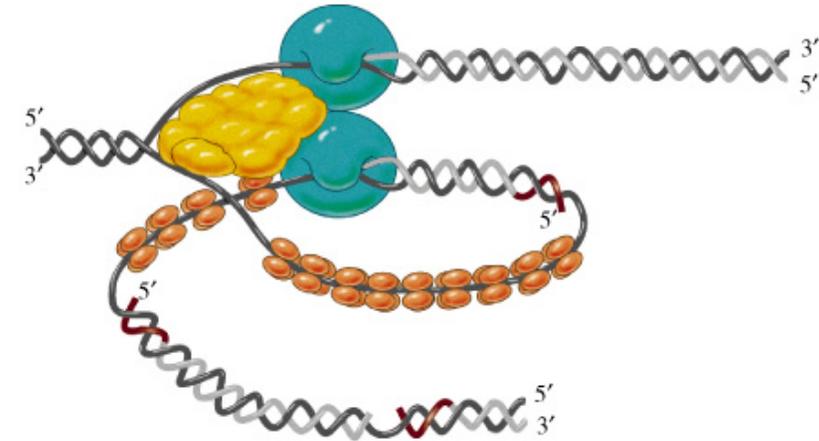
(b) As helicase unwinds the DNA template, primase synthesizes an RNA primer. The lagging-strand polymerase completes an Okazaki fragment.



(c) When the lagging-strand polymerase encounters the preceding Okazaki fragment, it releases the lagging strand.



(d) The lagging-strand polymerase binds to a newly synthesized primer and begins synthesizing another Okazaki fragment.

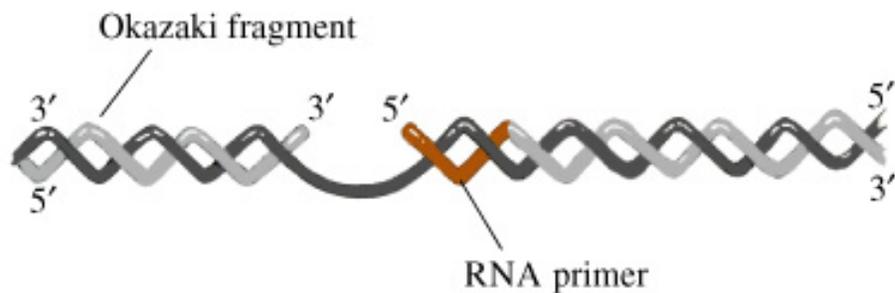


DNA Polimerase I/ Ligase

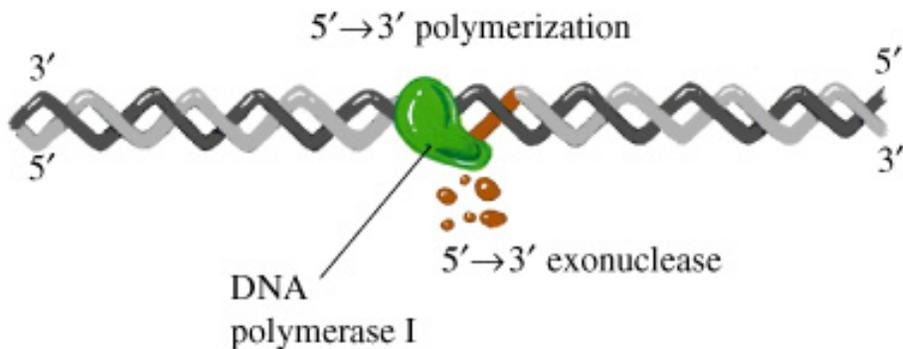
Requerida para ligar fragmentos Okazaki

- DNA polimerase I tem atividade exonuclease $5' \rightarrow 3'$ que remove primer de RNA.
- Também tem atividade DNA polimerase de $5' \rightarrow 3'$ para preencher espaços. (atividade de prova de leitura de exonuclease $3' \rightarrow 5'$)
- Ligase conecta-se a terminais soltos. Usa NAD^+ em uma reação de transferência de grupos fosforilas, não há reação de redox

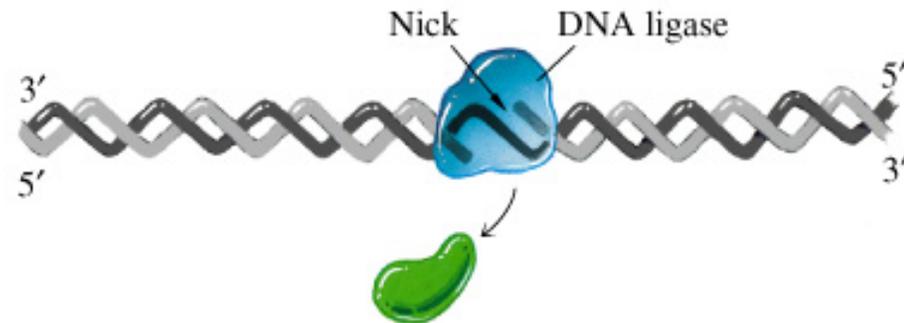
(a) Completion of Okazaki fragment synthesis leaves a nick between the Okazaki fragment and the preceding RNA primer on the lagging strand.



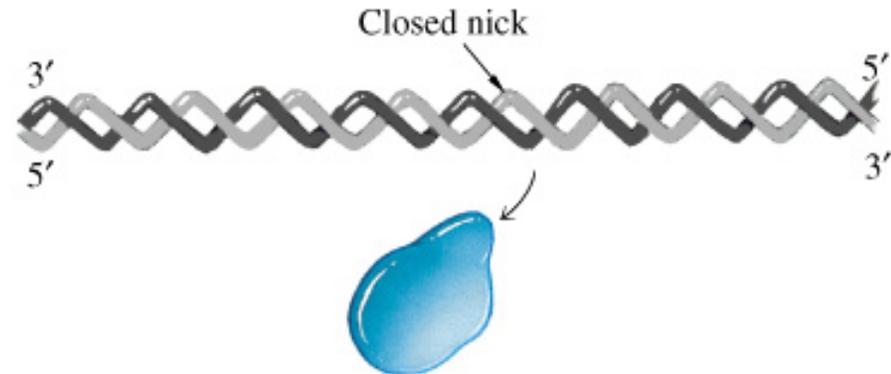
(b) DNA polymerase I extends the Okazaki fragment while its 5'→3' exonuclease activity removes the RNA primer. This process, called nick translation, results in movement of the nick along the lagging strand.

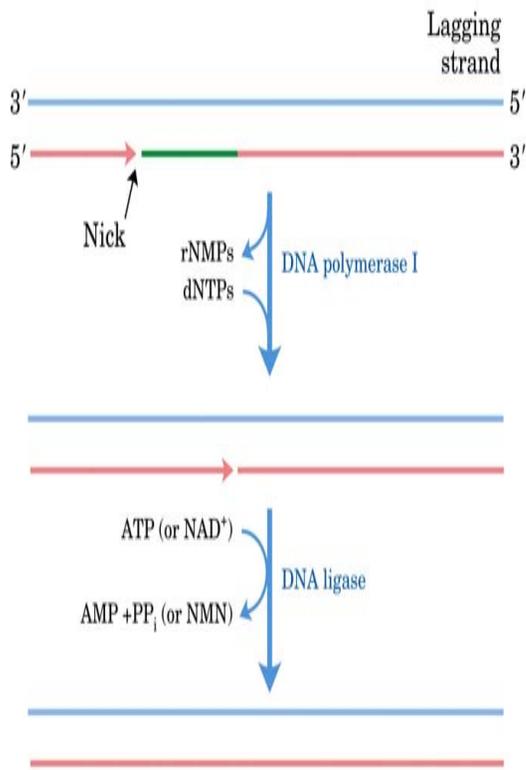


(c) DNA polymerase I dissociates after extending the Okazaki fragment 10–12 nucleotides. DNA ligase binds to the nick.

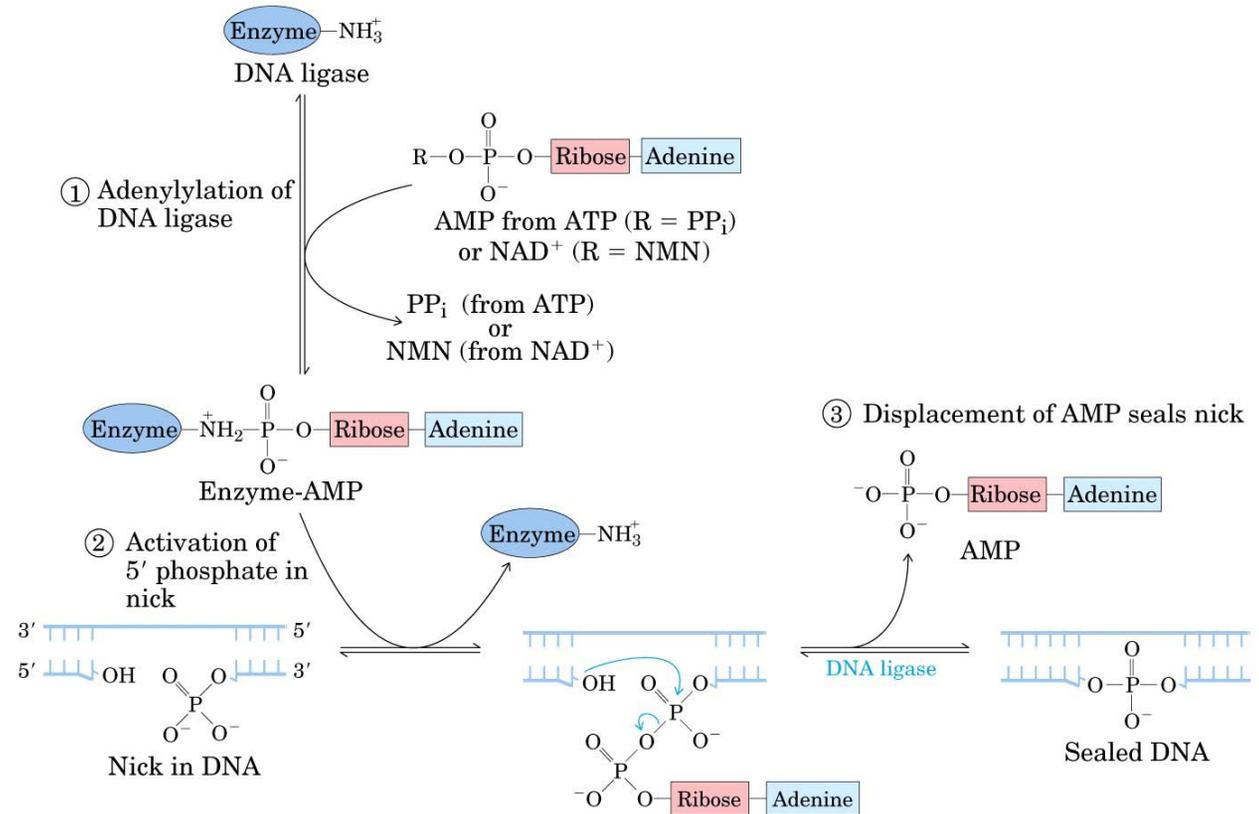


(d) DNA ligase catalyzes formation of a phosphodiester linkage, which seals the nick, creating a continuous lagging strand. The enzyme then dissociates from the DNA.





A



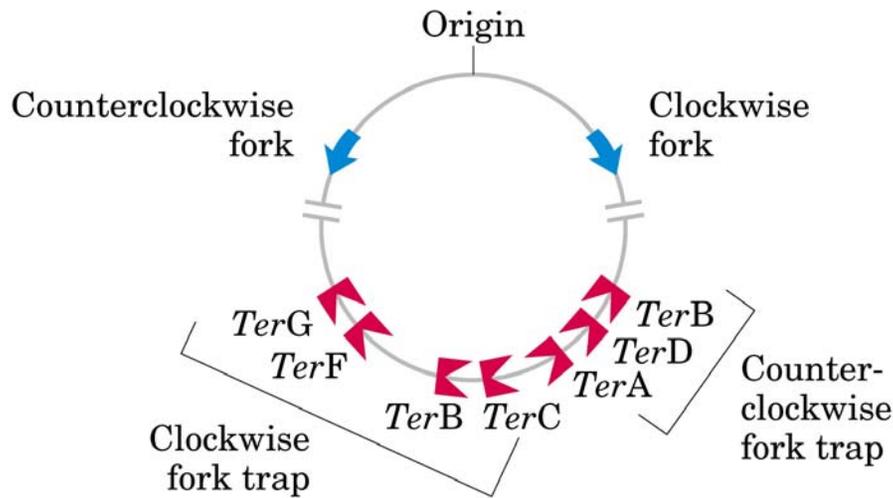
B

A) Remoção dos RNA iniciadores através da atividade exonucleásica (5' → 3') da DNA polimerase I

B) Envolvimento do NAD⁺ e ATP no mecanismo da DNA ligase

Término da Replicação

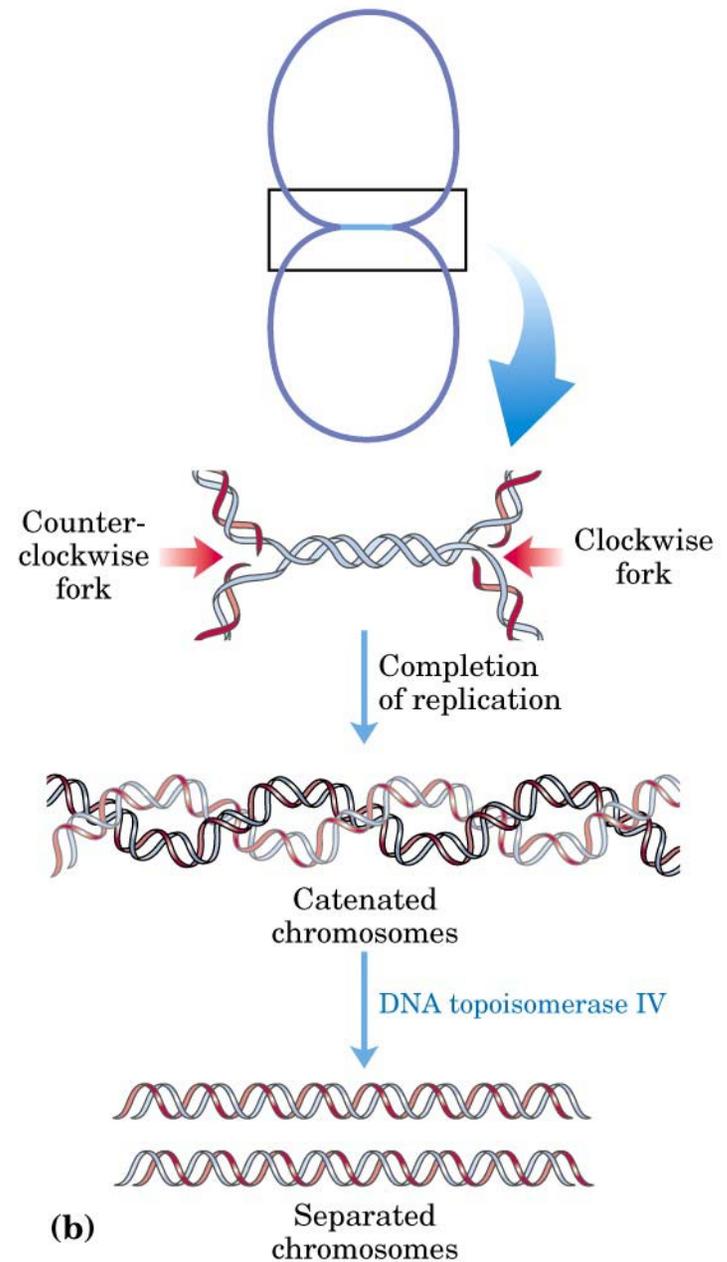
- Terminação ocorre na região *ter* do cromossomo de *E. coli*.
- Região *ter* rica em Gs e Ts, sinaliza o fim da replicação.
- Substância de utilização de terminação (Tus) liga-se à região *ter*.
- Tus previne forquilha de replicação através da inibição da atividade de helicase.



(a)

Término da replicação

- Sequência Ter são posicionadas no cromossomo em dois agregados com orientações diferentes
- Círculos catenados (interligados topologicamente, somente separados pela ação das topoisomerases)



Replicação de DNA em Eucariotos

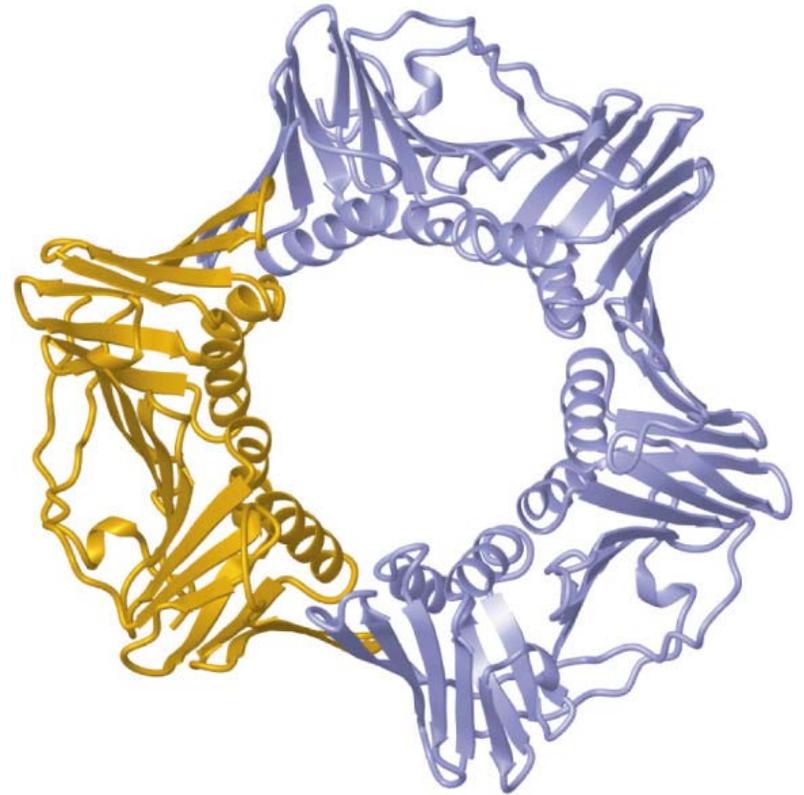
- Ocorre similarmente ao que ocorre em procariotos.
- Múltiplas origens da replicação (sequência de replicação autônoma -ARS)
- Replicação é mais lenta que em procariotos.
- 5 diferentes DNA polimerases em Eucariotos.

DNA Polimerases Eucariótica

- Alpha (α) - síntese de Primer e reparo do DNA
- Beta (β) - repara o DNA
- Gamma (γ) - replicação de DNA Mitochondrial
- Delta (δ) - Leva e sintetiza fita atrasada, e repara o DNA
- Epsilon (ϵ) - Repara e preenche os espaços em fitas atrasadas.

PCNA análogas à subunidade- β da DNA polimerase de *E. coli*

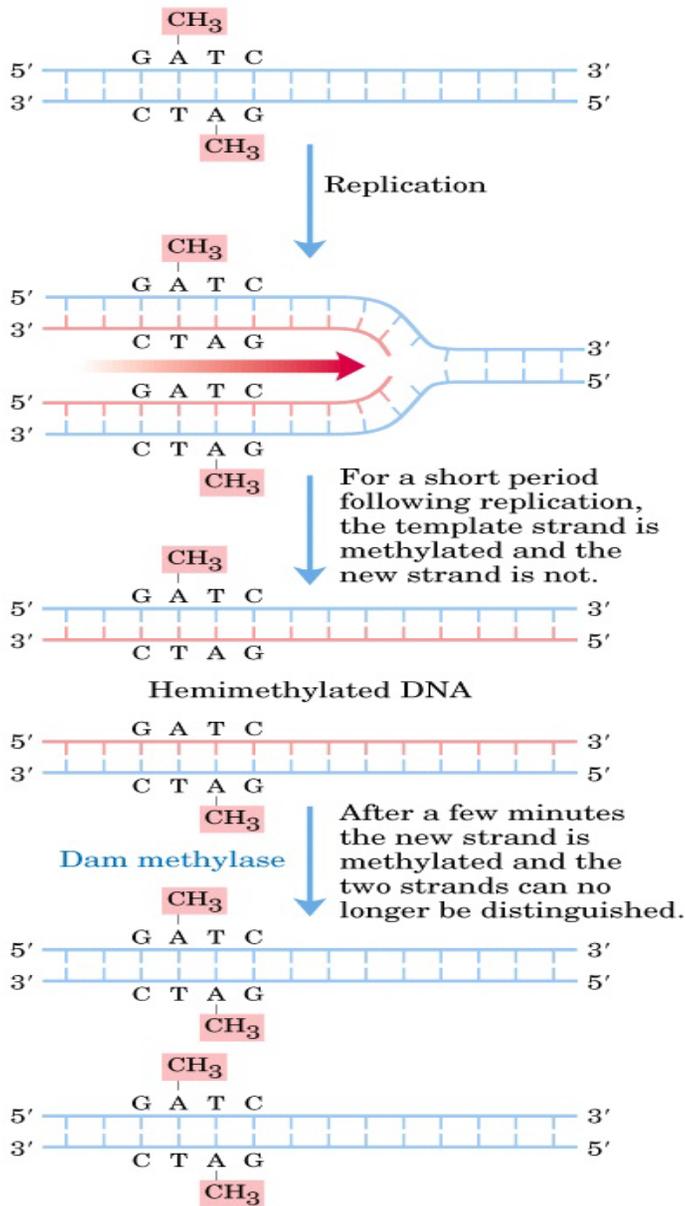
- Proliferação de antígeno nuclear celular
- Proteína Trimérica
- Deslizamento da estrutura grampo liga-se ao novo filamento de DNA sintetizado



Reparo do DNA

- Uma diferença fundamental do RNA, proteína, lipídeo, etc.
- Em todos estes outros pode ocorrer substituição, mas DNA deve ser preservado
- Células requerem um meio p/ reparar perdas, bases alteradas ou incorretas, protuberâncias devido a inserção ou deleção, dímeros de pirimidina induzidos por UV, quebras de fitas ou crosslinks (lig. cruzada)
- 2 mecanismos principais: métodos p/ danos químicos reversíveis e reparo de excisão.

table 25-5



Types of DNA Repair Systems in *E. coli*

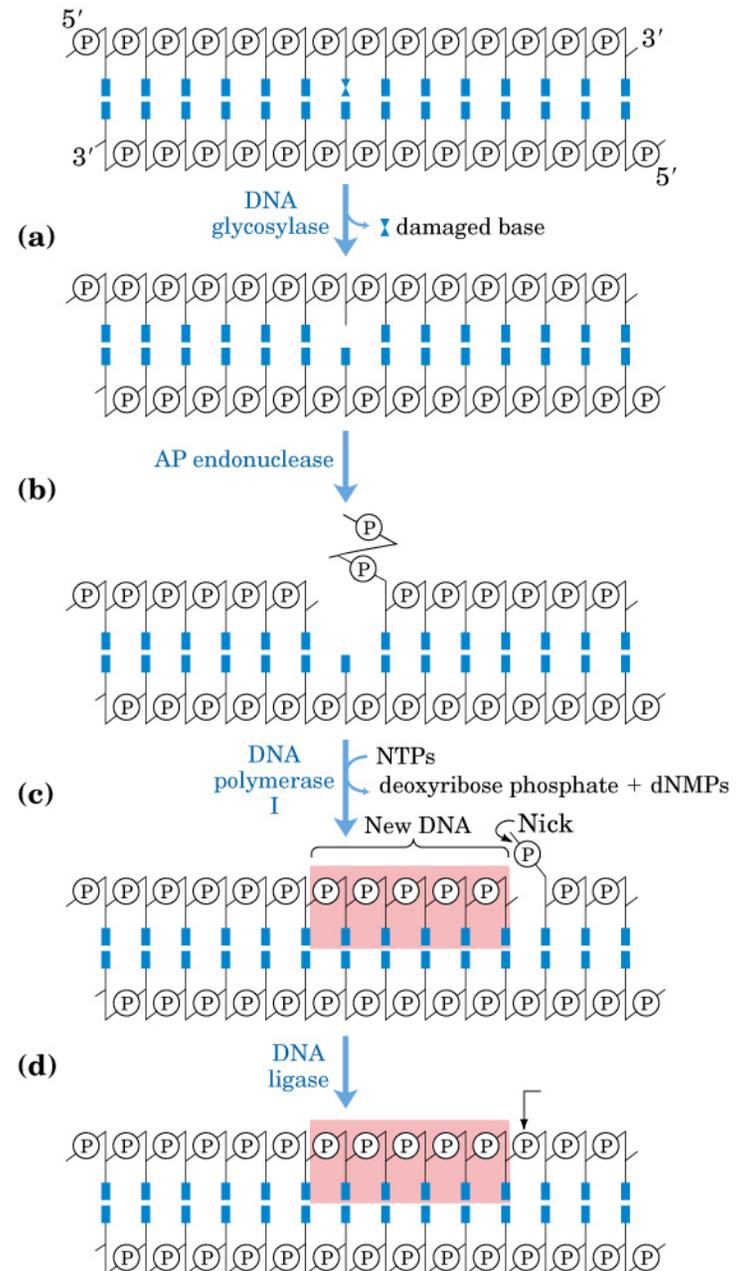
Enzymes/proteins	Type of damage
Mismatch repair Dam methylase MutH, MutL, MutS proteins DNA helicase II SSB DNA polymerase III Exonuclease I Exonuclease VII RecJ nuclease Exonuclease X DNA ligase	Mismatches
Base-excision repair DNA glycosylases AP endonucleases DNA polymerase I DNA ligase	Abnormal bases (uracil, hypoxanthine, xanthine); alkylated bases; pyrimidine dimers in some other organisms
Nucleotide-excision repair ABC excinuclease DNA polymerase I DNA ligase	DNA lesions that cause large structural changes (e.g., pyrimidine dimers)
Direct repair DNA photolyases O ⁶ -Methylguanine-DNA methyltransferase	Pyrimidine dimers O ⁶ -Methylguanine

Despareamento

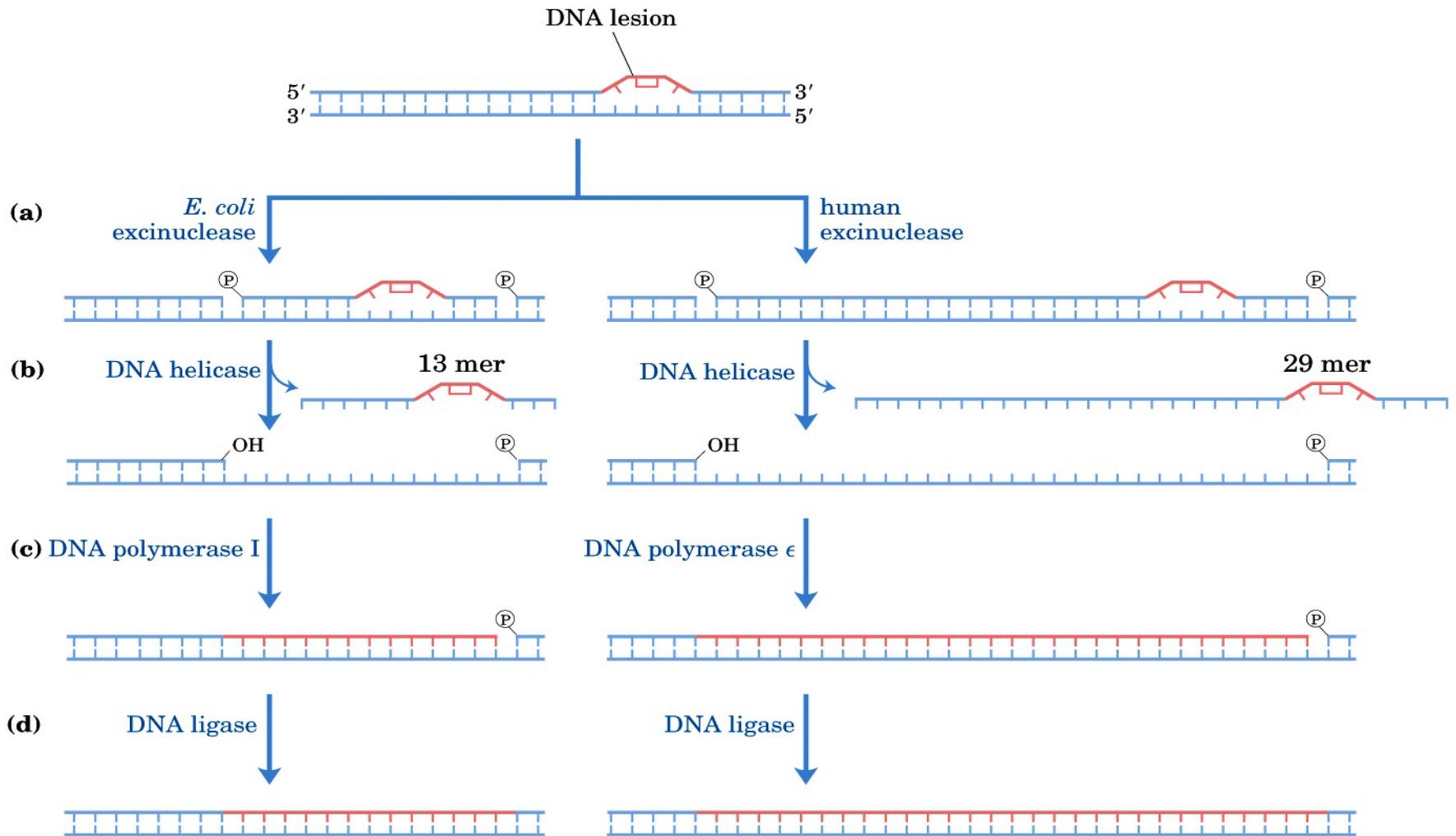
Despareamento - DNA velho é marcado por metilação (Dam metilase) para ser distinguido do novo. Dam metila o DNA na posição N⁶ de todas as adeninas que ocorrem nas seqüências (5')GATC

Reparo por excisão de base

- DNA glicosilase reconhece uma base lesada e cliva entre a base e o esqueleto da desoxirribose
- Uma AP endonuclease cliva o esqueleto fosfodiéster perto do sítio AP (sítio apurínico ou apirimidinico no DNA)
- DNA polimerase I inicia o reparo sintetizando a partir da extremidade 3' OH do corte, removendo uma porção da fita lesada (atividade nucleásica 5' → 3') e substituindo o DNA não lesado
- DNA ligase faz a ligação

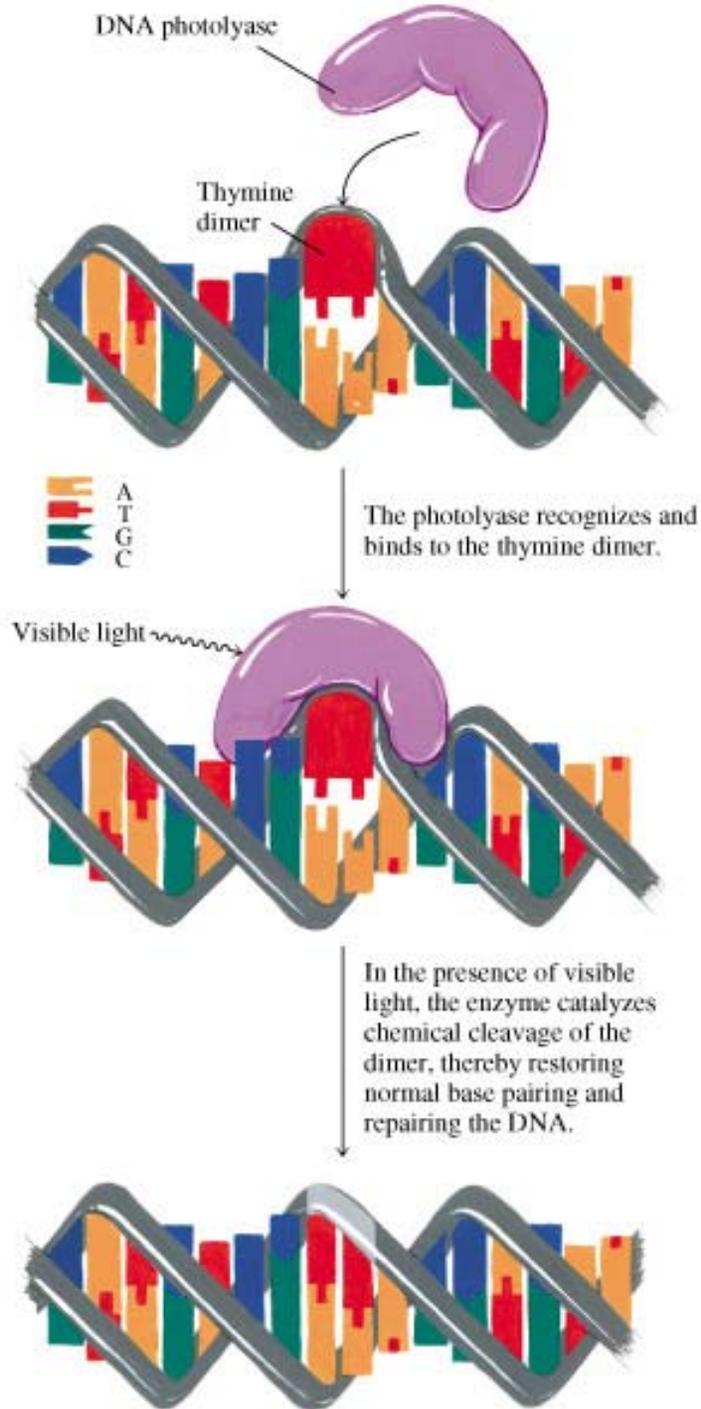
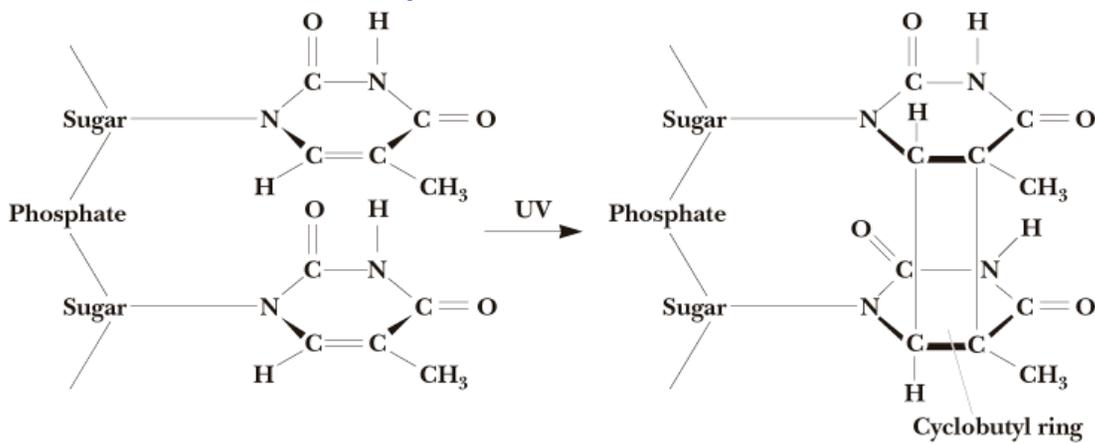


Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos na *E. coli* e humanos



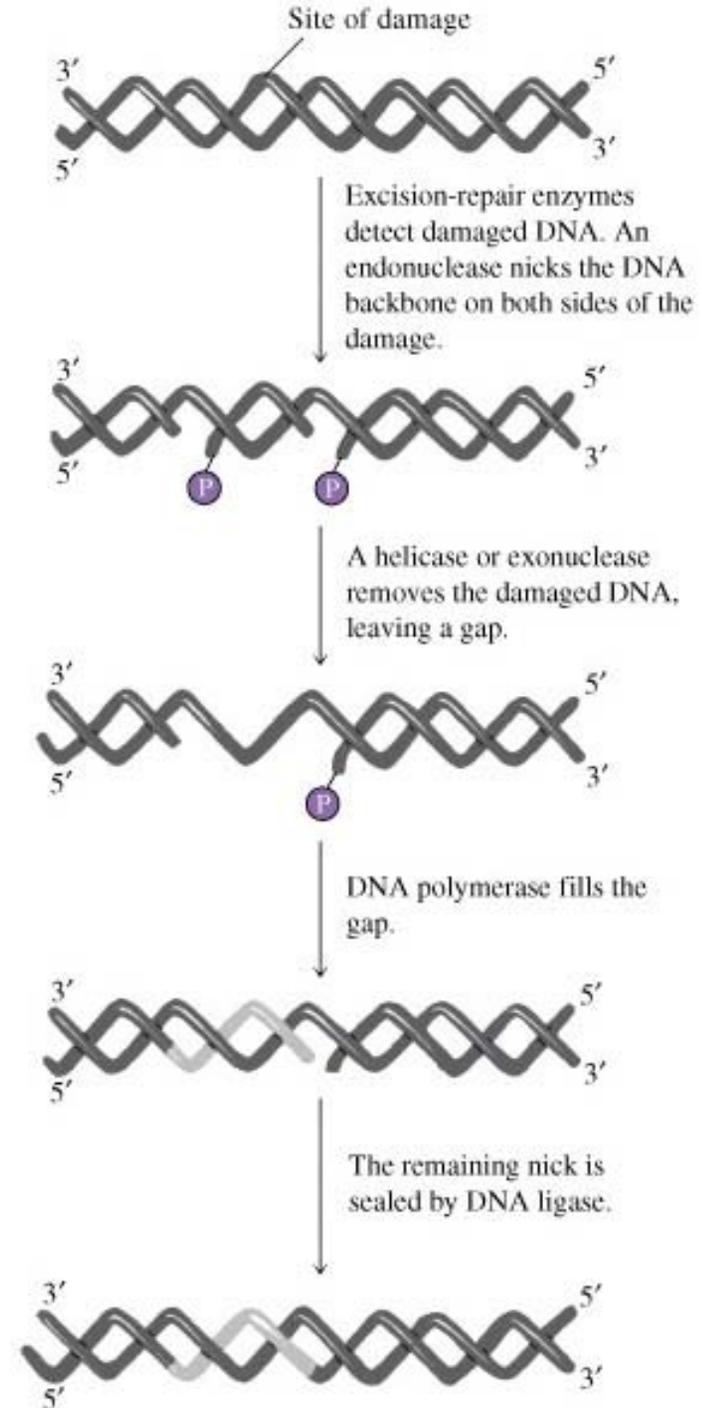
Excinuclease cliva, Helicase ajuda na remoção, DNA polimerase preenche a lacuna e DNA ligase sela o corte remanescente

Reparo de Dímeros de Timina inducidos por UV



Via de excisão-reparo geral

• Sistemas de reparo por excisão procuram DNAs duplex p/ bases incorretamente pareada, faz a excisão da região pareada erroneamente e a repõe



Reparo de danos resultantes da desaminação da citosina

- Desaminação de citosina a uracil é um das formas mais comuns de danos ao DNA
- DNA glicosilases cliva bases nas ligações N-glicosídicas, deixando esqueleto de açúcar-fosfato.
- Endonuclease identifica base ausente e açúcar fosfato.
- O espaço então é preenchido pela DNA polimerase e ligase.

