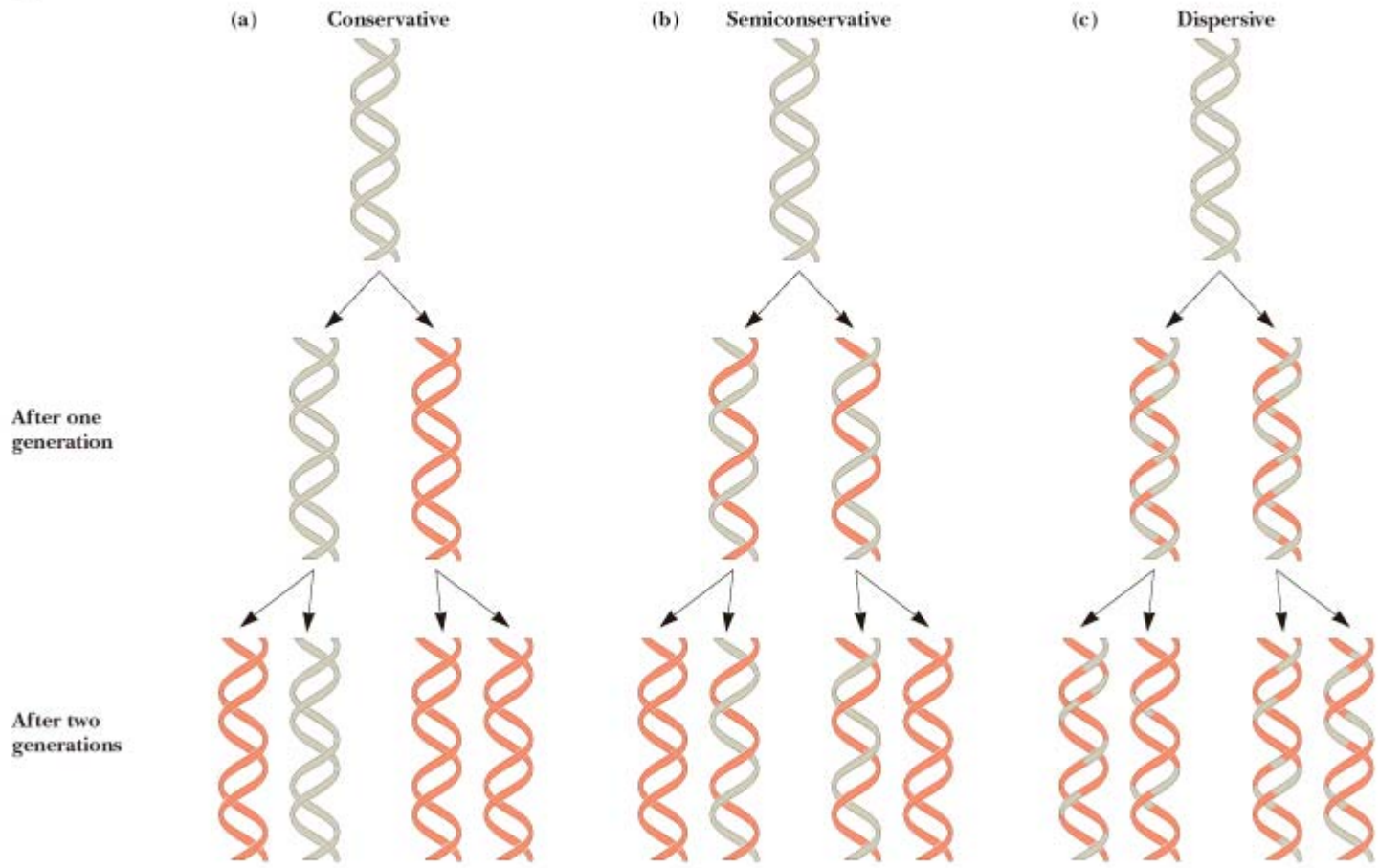


# Aula - Replicação e Reparo do DNA

# Watson e Crick previram a Replicação Semi-conservativa do DNA

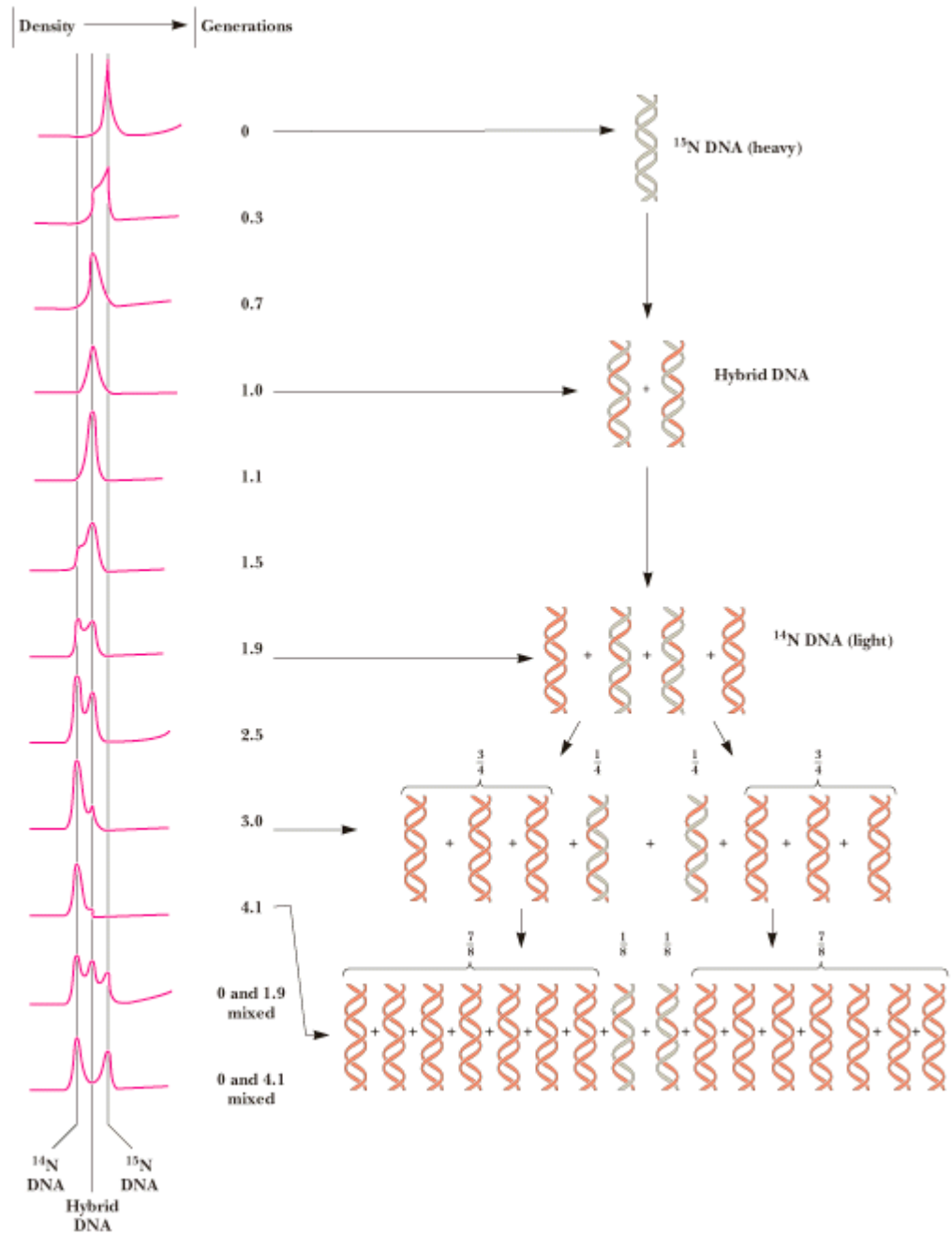
- Watson e Crick: "Não escapou a nossa observação que o pareamento específico (base) que nós postulamos sugere imediatamente um mecanismo de possível cópia p/ o material genético."
- O mecanismo: separação das fitas, seguido pela cópia de cada fita.
- Cada fita separada age como um modelo para a síntese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

1000



# O Modelo Semiconservativo

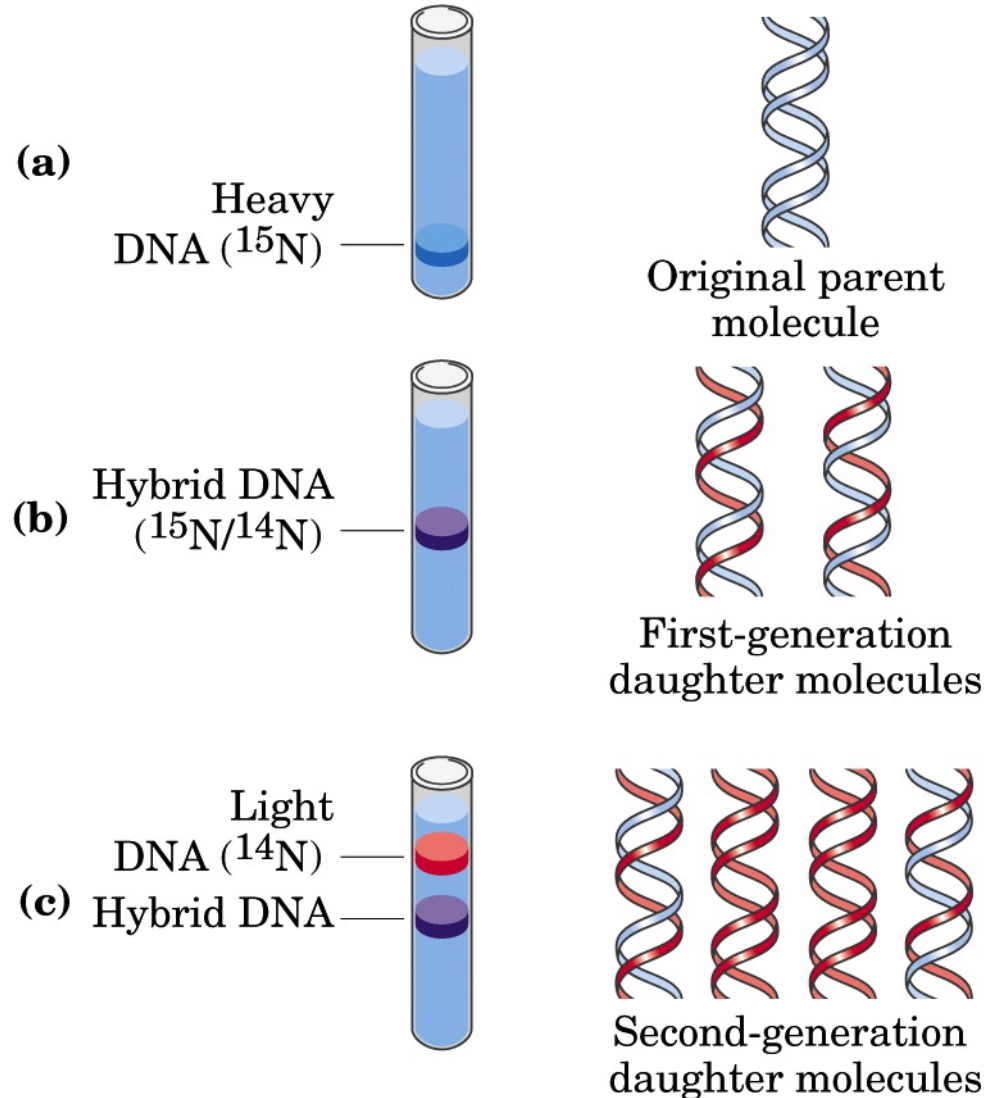
- Matthew Meselson e Franklin Stahl verificaram o modelo semi-conservativo
- Cópia de DNA com nucleotídeos contendo  $^{15}\text{N}$  (mais denso do que o DNA normal)
- Cópia de DNA contendo nucleotídeos  $^{14}\text{N}$  (DNA sintetizado novamente era menos denso)
- DNA isolado em diferentes tempos 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

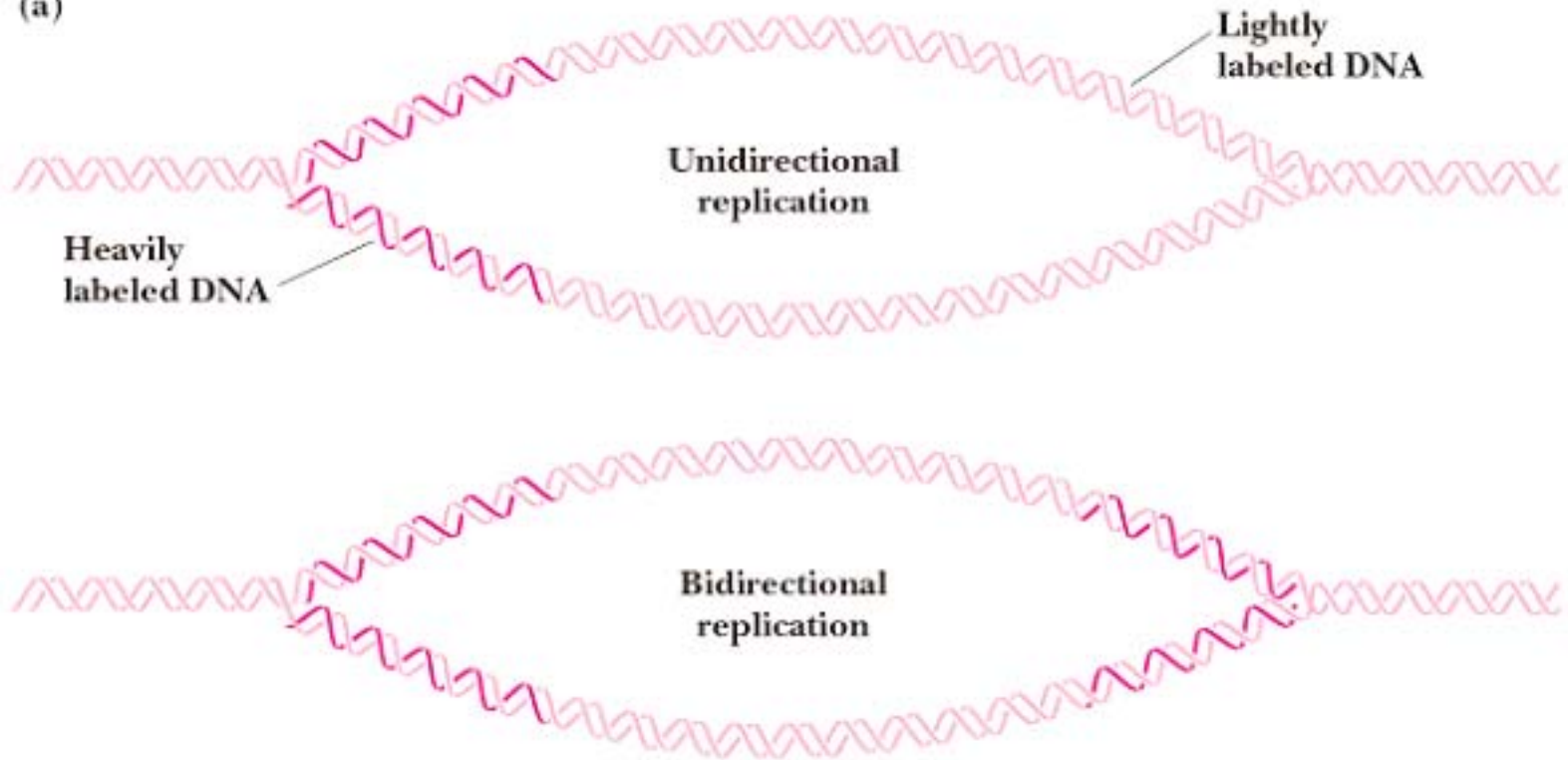
- a) Células crescidas por muitas gerações em meio contendo  $^{15}\text{N}$
- b) Células transferidas para meio contendo  $^{14}\text{N}$
- c) Replicação por uma segunda geração, produção de dois DNAs Híbridos

DNA extracted and centrifuged to equilibrium in CsCl density gradient

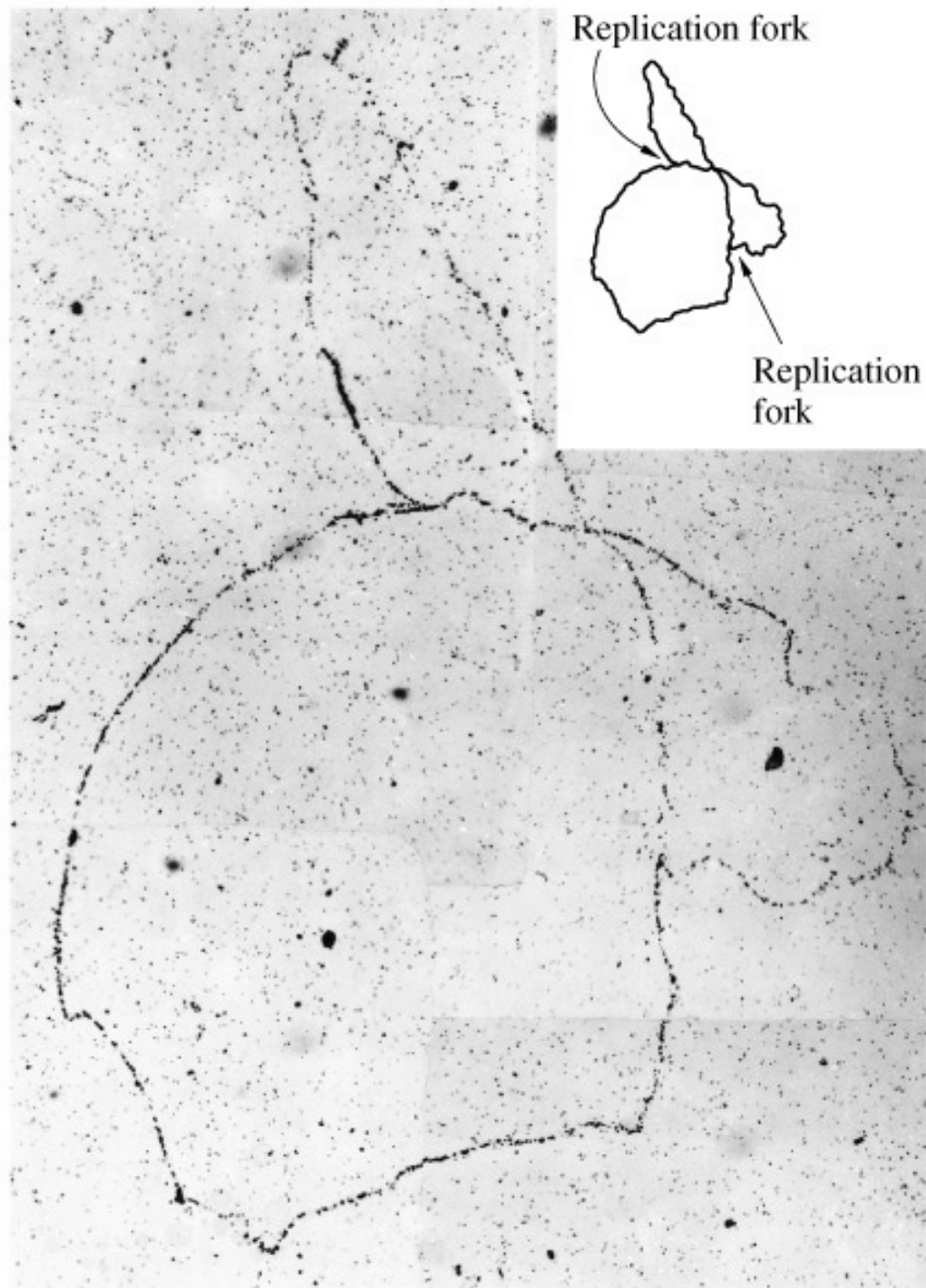


# Replicação é bidirecional

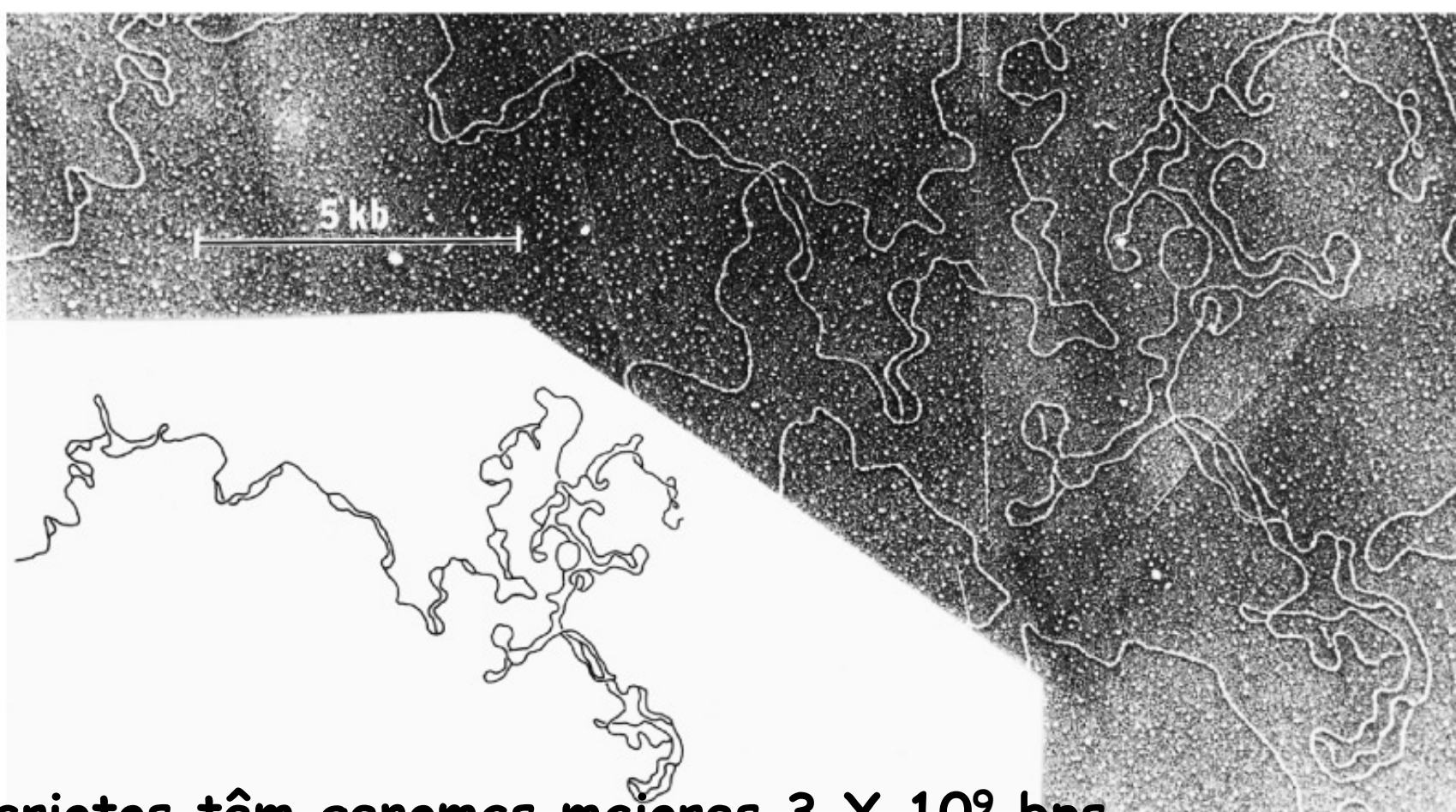
(a)



- Tamanho do genoma de *E. coli* =  $4.6 \times 10^6$  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.

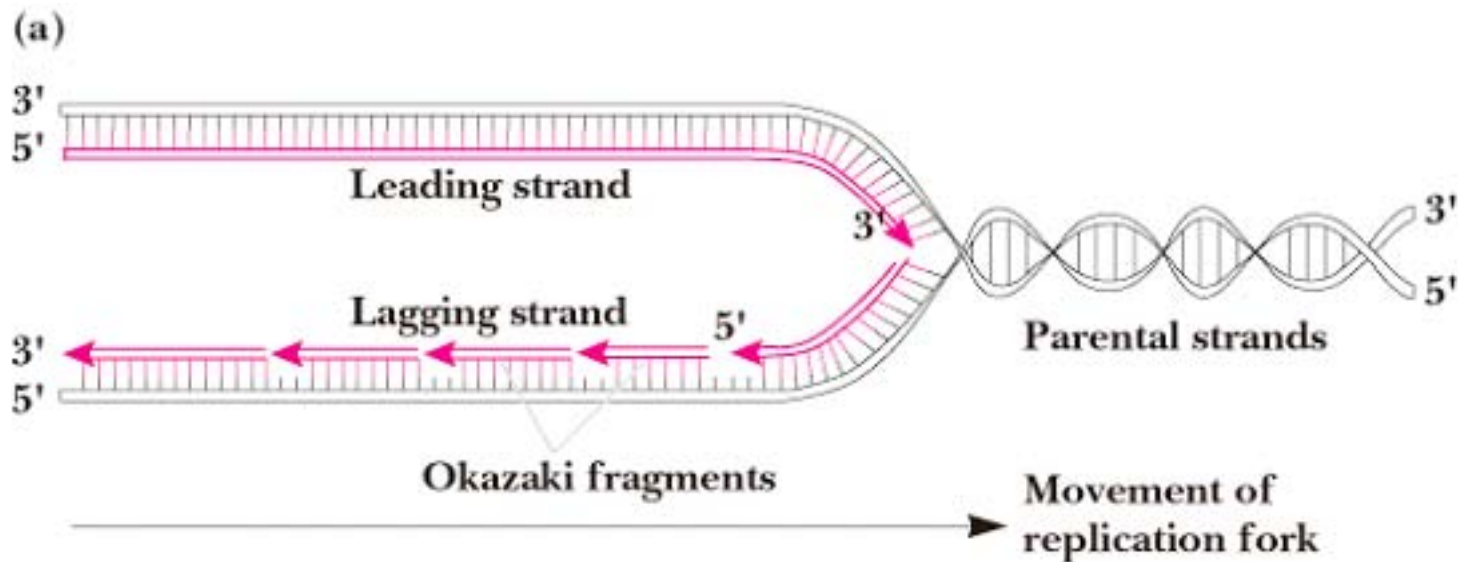






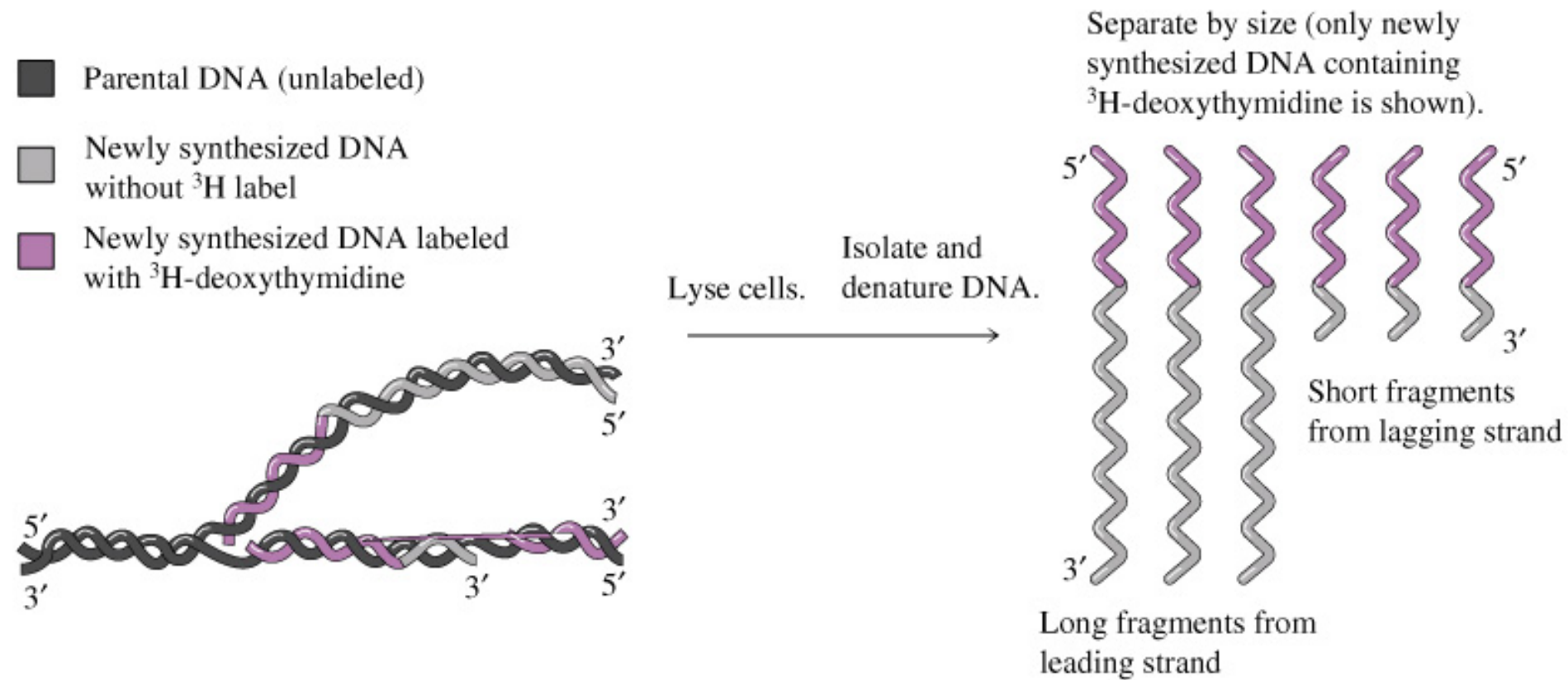
- Eucariotos têm genomas maiores  $3 \times 10^9$  bps
- Taxa de replicação do cromossomo de Eucariotos é mais lenta
- Mas devido aos cromossomos de eucariotos terem múltiplas origens de replicação, isto leva o mesmo tempo para replicar o genoma completo.

# 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

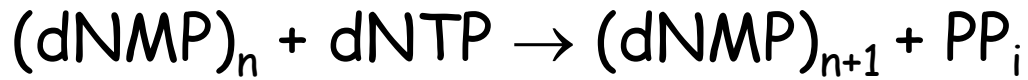
# Fragmentos Okazaki



# 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.

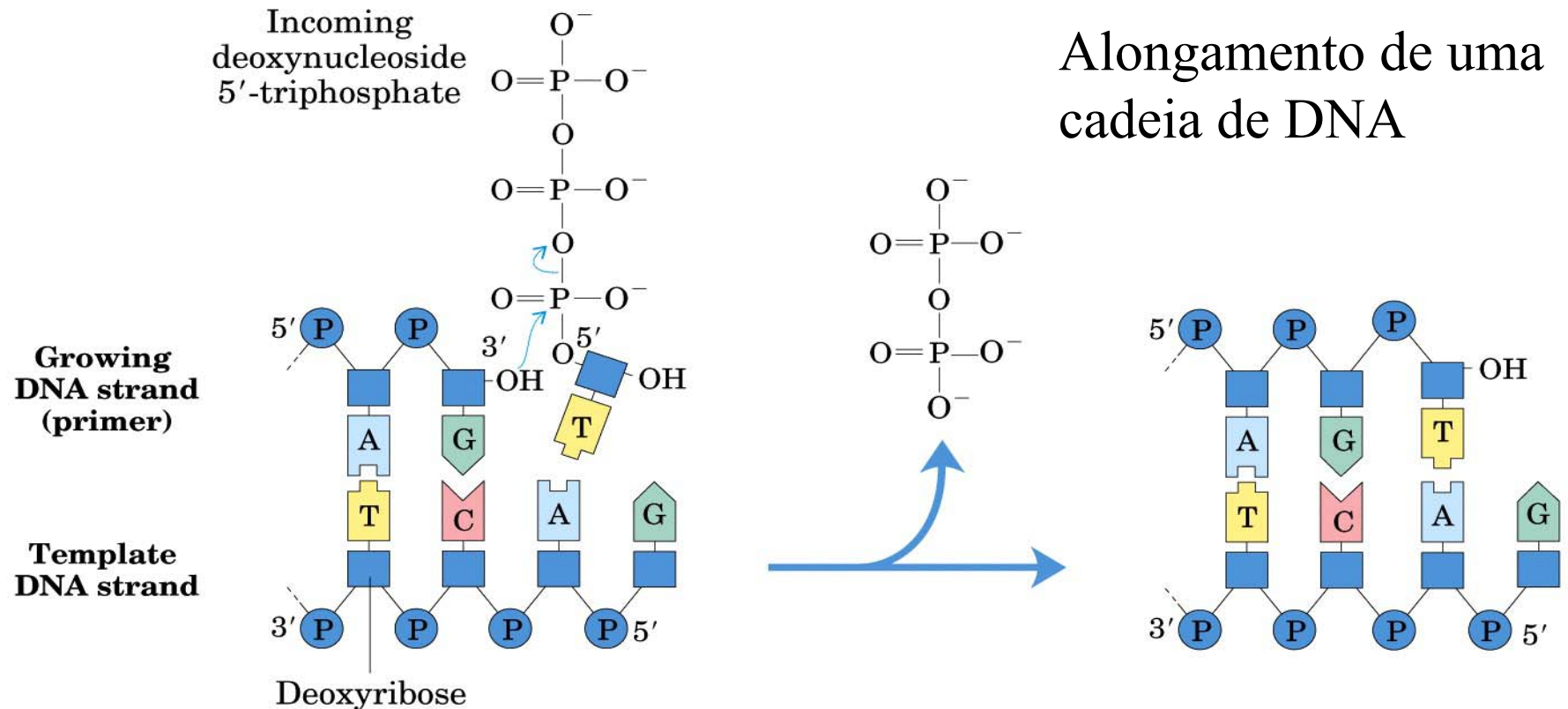
# Equação geral da reação:

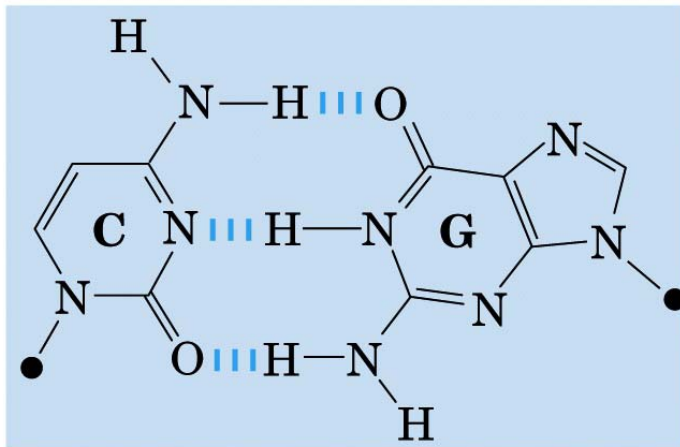
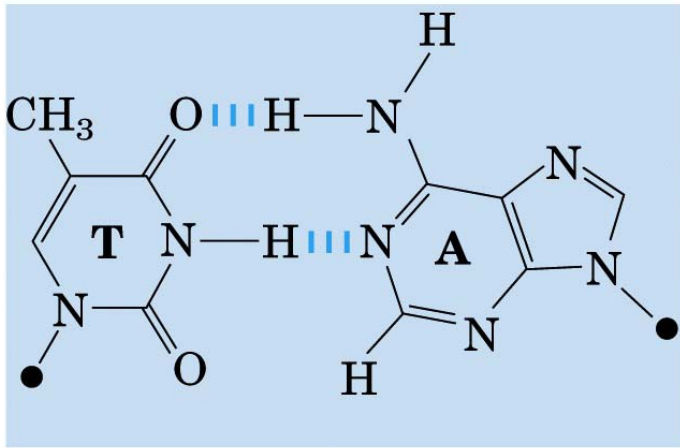


DNA

DNA alongado

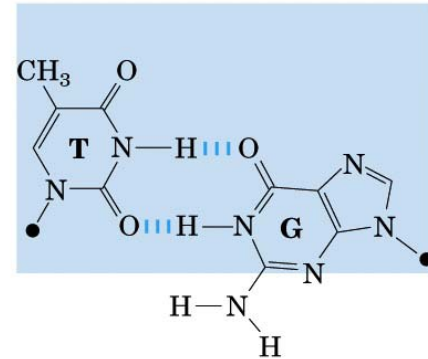
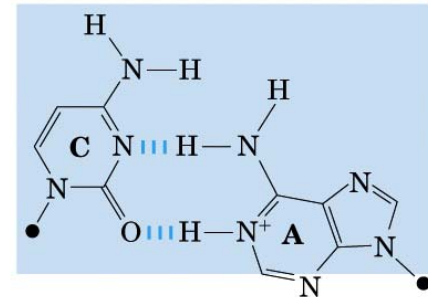
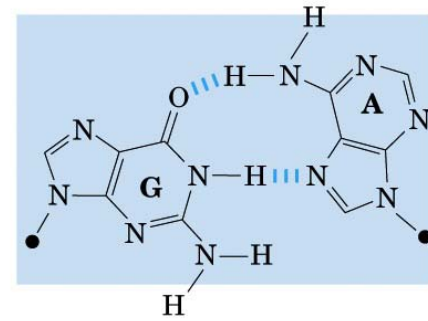
dNMP e dNTP são os desoxinucleosídeos 5' monofosfato e 5' trifosfato respectivamente





(a)

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

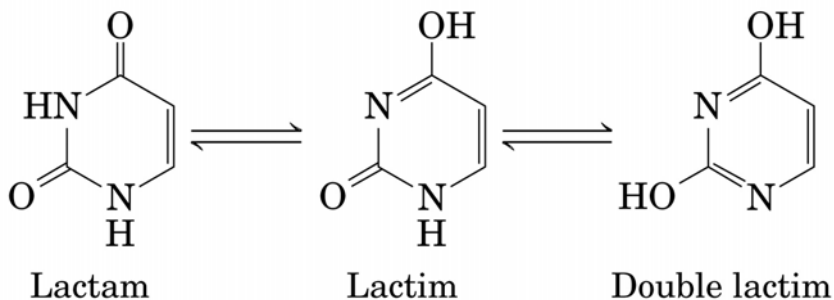


(b)

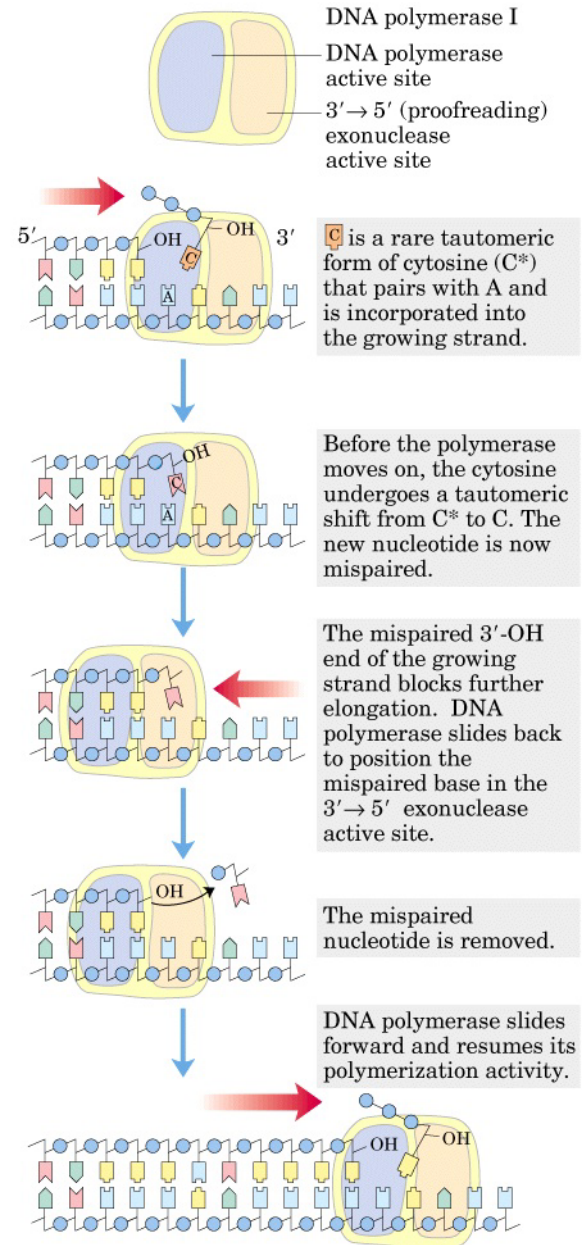
Contribuição da geometria do par de bases para a fidelidade da replicação. A) A geometria dos pares A=T e G≡C são semelhantes e um sítio ativo para acomodar uma, acomodaria a outra B) Geometria de pares incorretos podem exclu-los do sítio ativo.

# 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	$\geq 4$	$\geq 10$
$M_r$	103,000	88,000 <sup>†</sup>	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*.

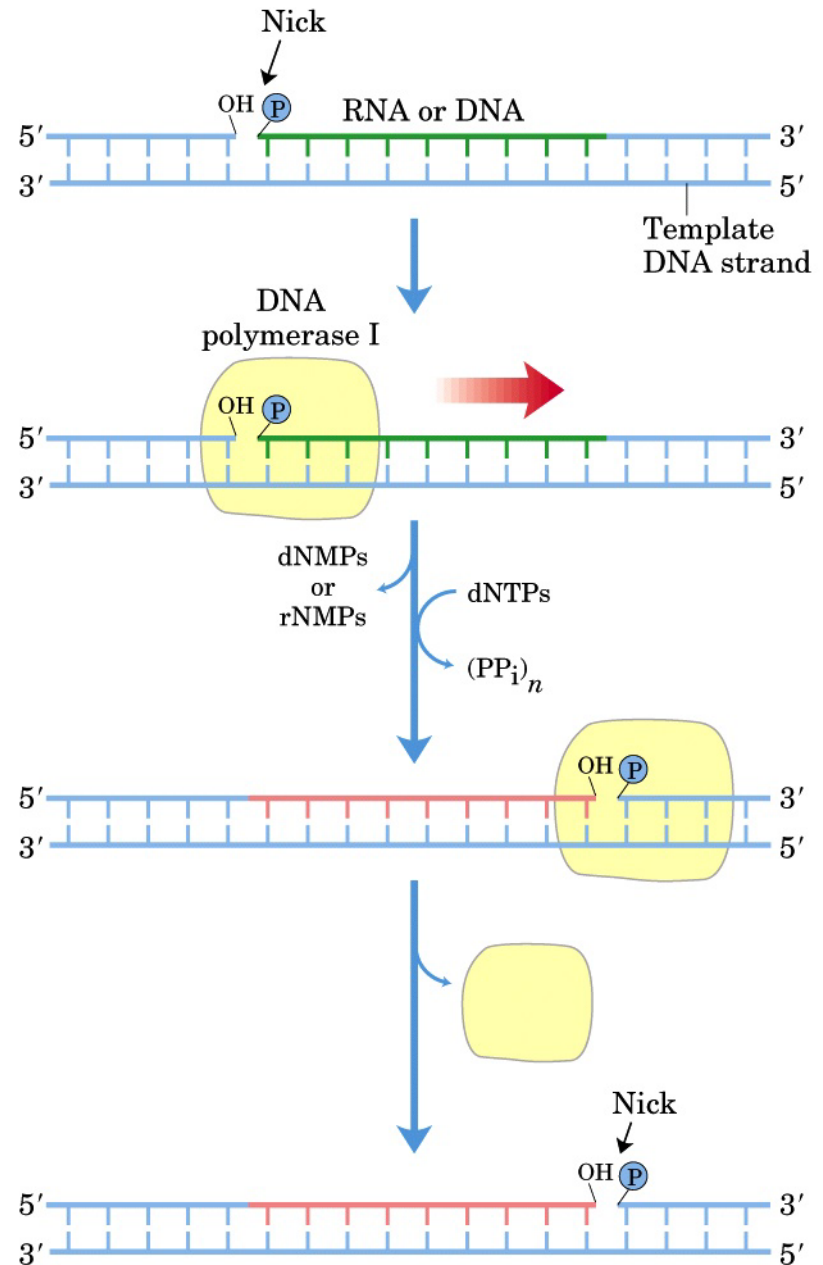
<sup>†</sup>Polymerization subunit only. DNA polymerase II shares several subunits with DNA polymerase III, including the  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$ , and  $\psi$  subunits (see Table 25–2).



## 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

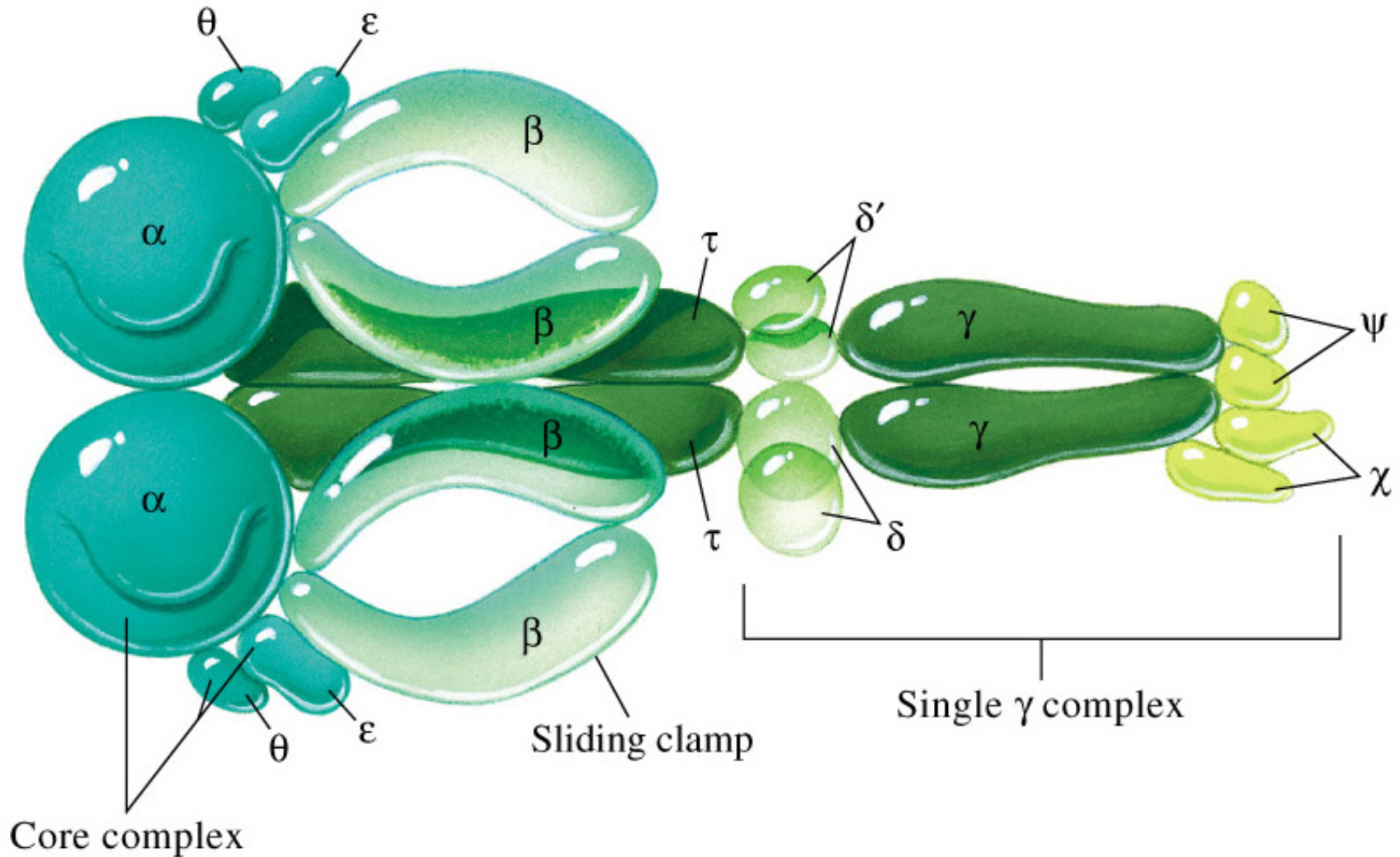
table 25-2

Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

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

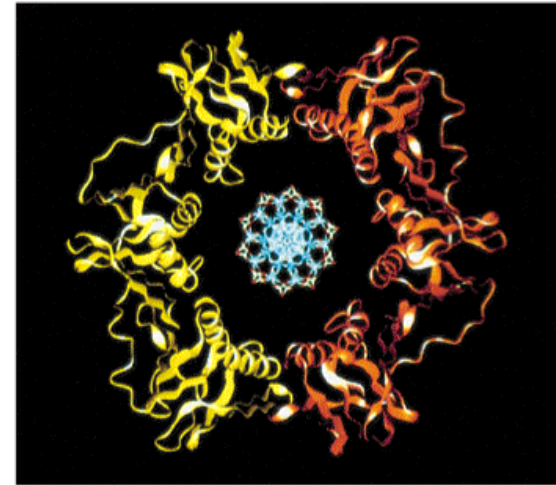
\*The  $\gamma$  subunit is encoded by a portion of the gene for the  $\tau$  subunit, such that the amino-terminal 80% of the  $\tau$  subunit has the same amino acid sequence as the  $\gamma$  subunit. The  $\gamma$  subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (see Box 28-1) that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

# Organização da subunidade da DNA Polimerase III

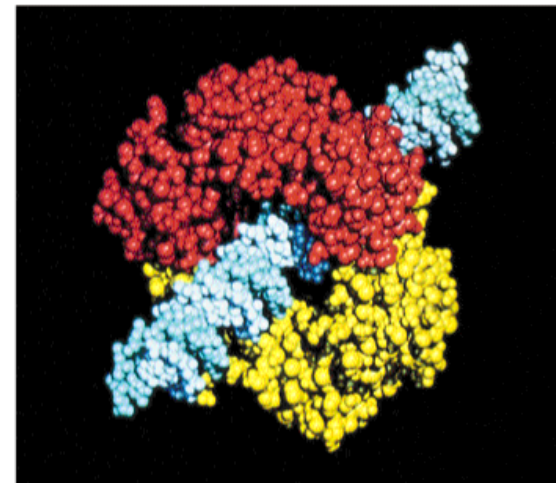


# Replicação de DNA é um Processo Processivo.

- DNA Polimerase permanece ligada a forquilha de replicação
- Dímero de  $\beta$ -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 ( $1 \times 10^{-5}$  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 detrimmentais.
- Entretanto a prova de leitura realizada pela exonuclease tem taxa de erro 1 para 100 pares de bases ( $1 \times 10^{-2}$  erros por base)
- No total a taxa de erro é  $1 \times 10^{-7}$  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*

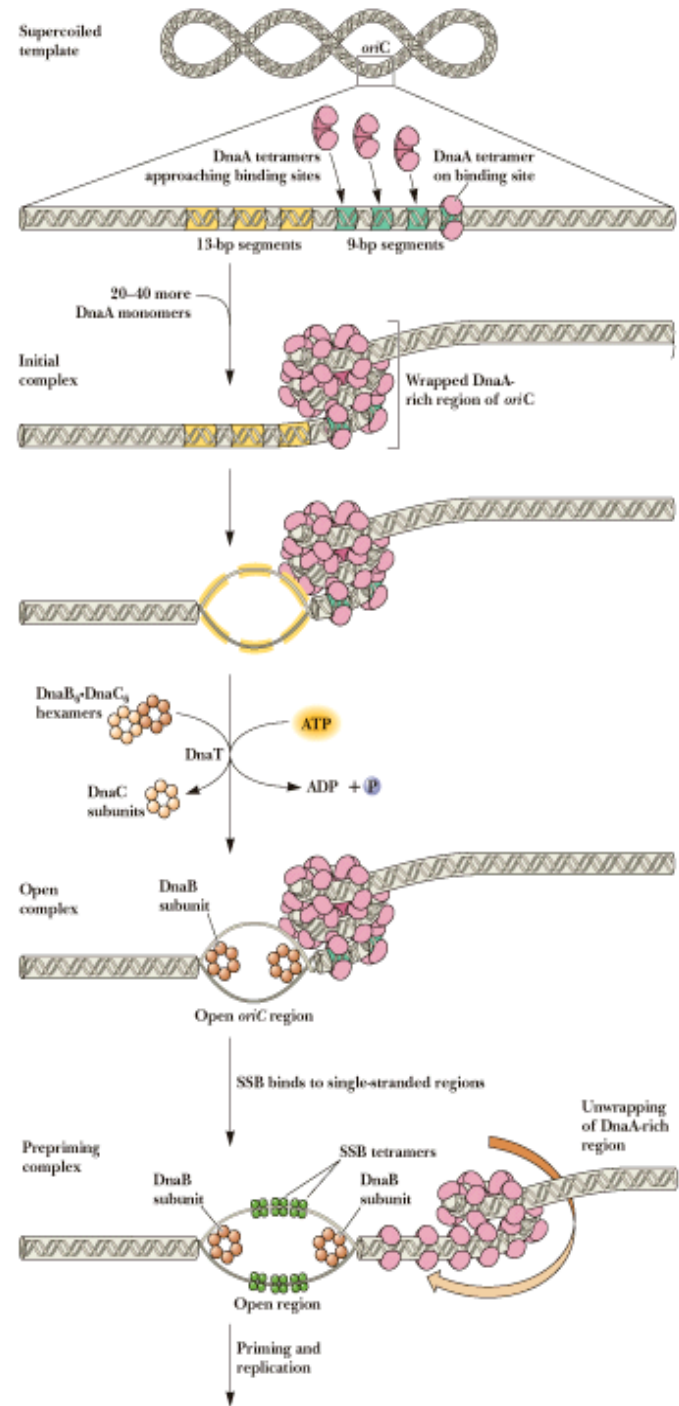
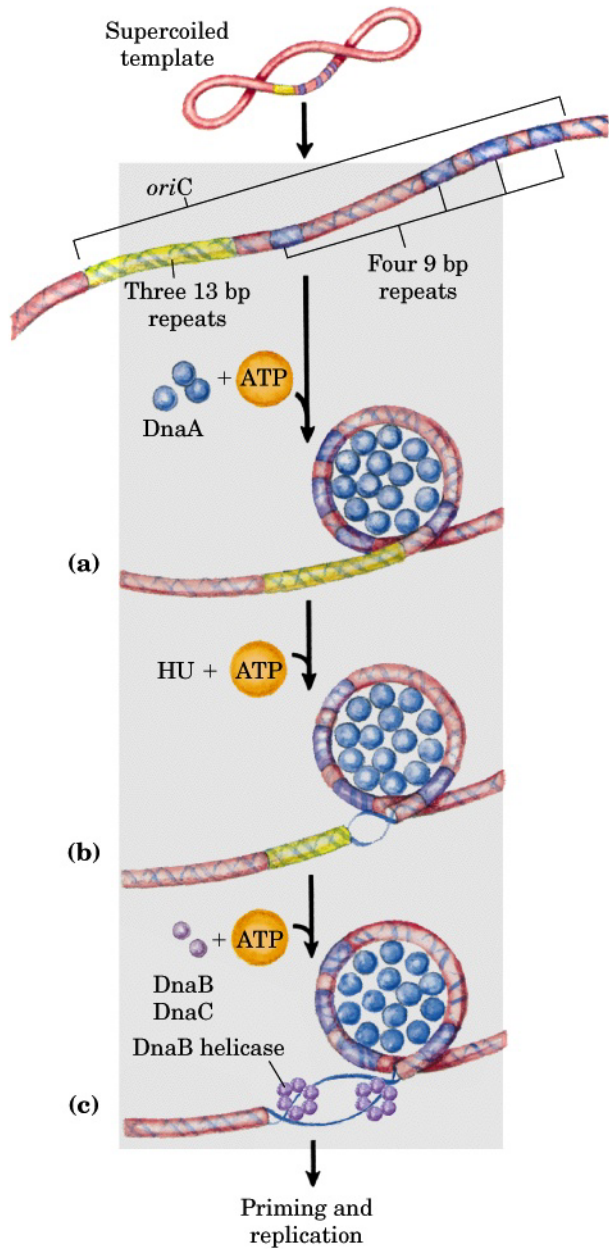
table 25-3

## 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>

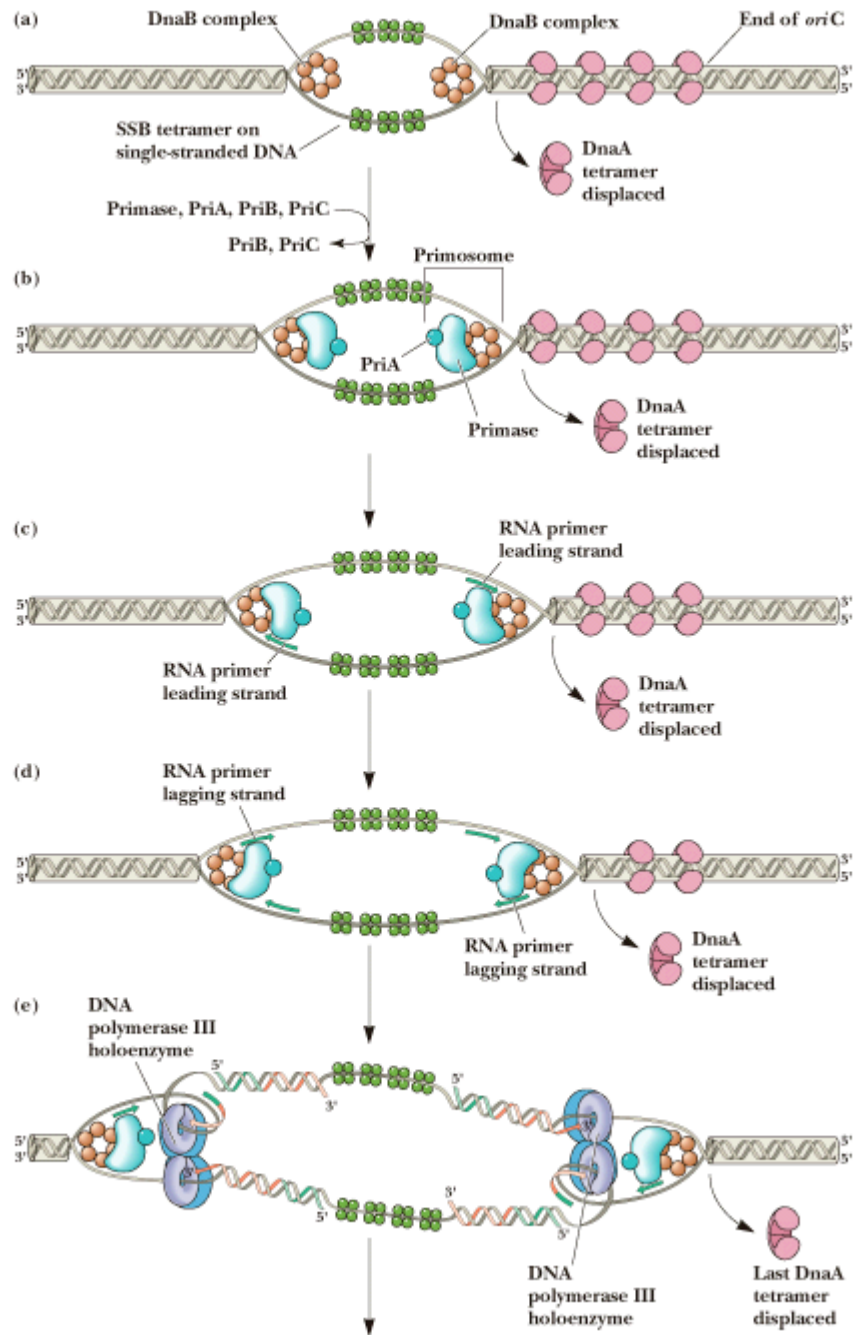
\*Subunits in these cases are identical.





# Estágio de Elongamento da Replicação

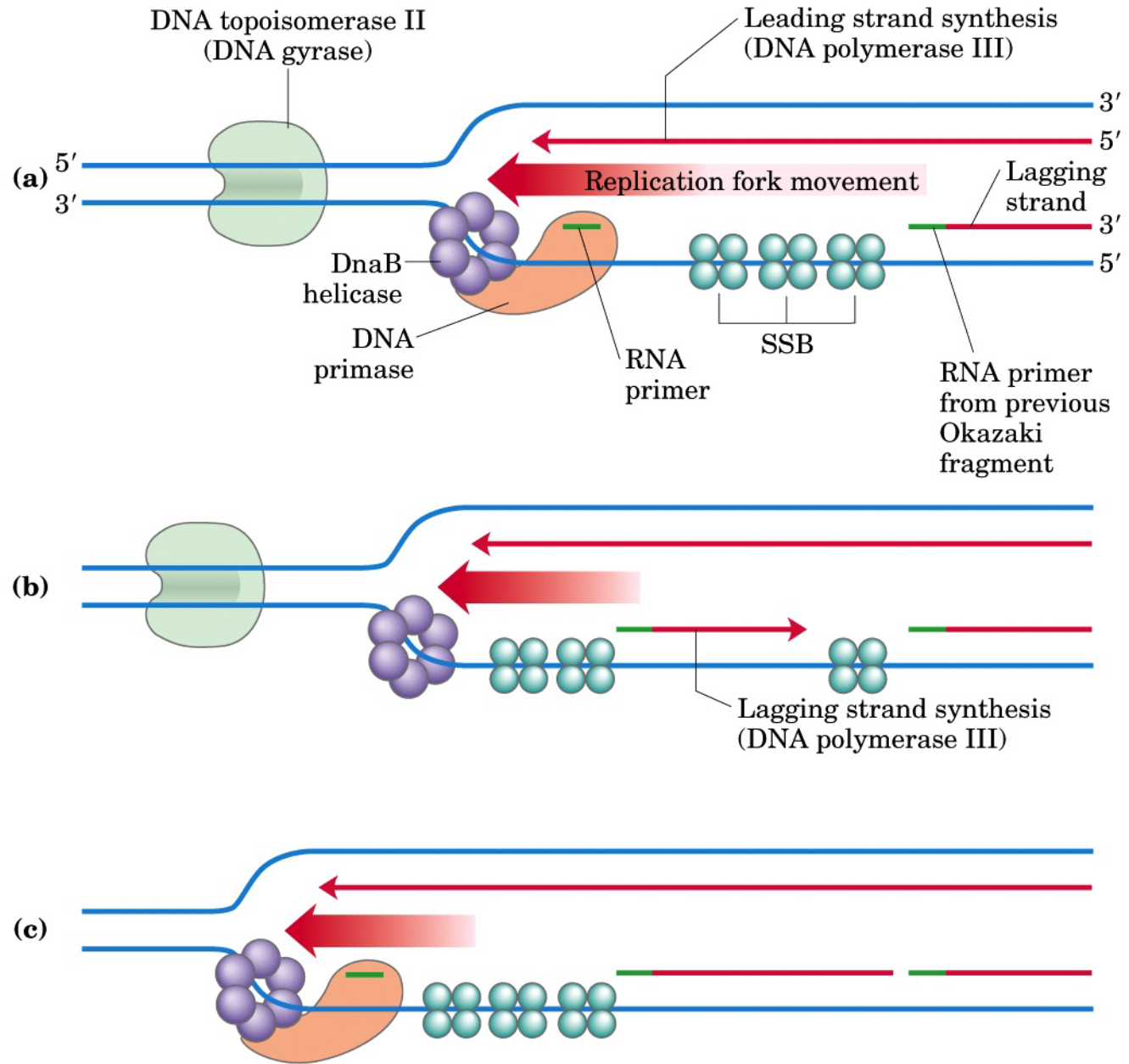
- Envolve duas fases: síntese da fita líder e da fita atrasada
- Elongação envolve DnaB helicase desenrolando, ligação da SSB p/ manter separadas as fitas.
- Complexo Primase sintetiza pequenos primers de RNA.
- DNA polimerase trabalha sempre em ambas as fitas
- Topoisomerase II (DNA girase) produz um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



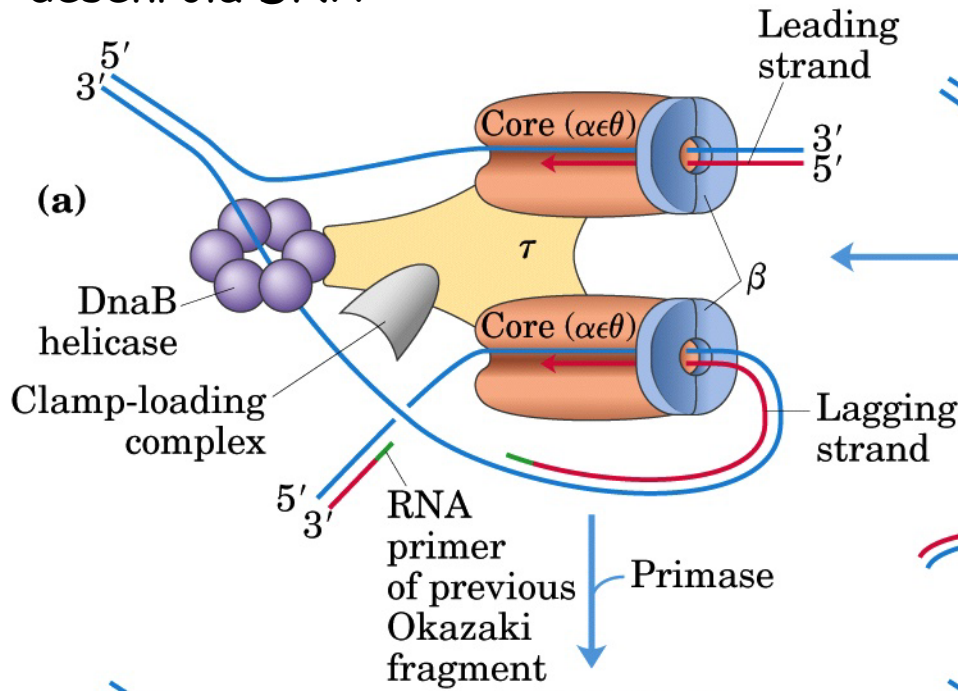
•Primer (RNA) iniciador é produzido pela iniciase.

•DNA olicerase III se liga e adiciona nucleotídeos

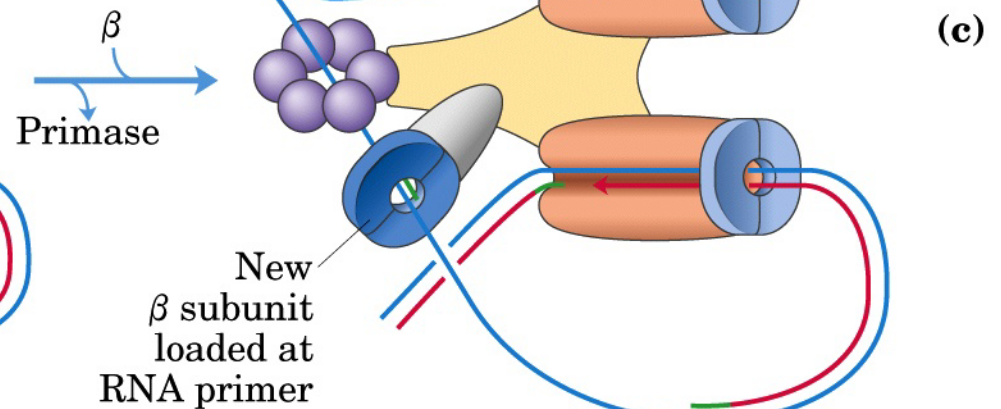
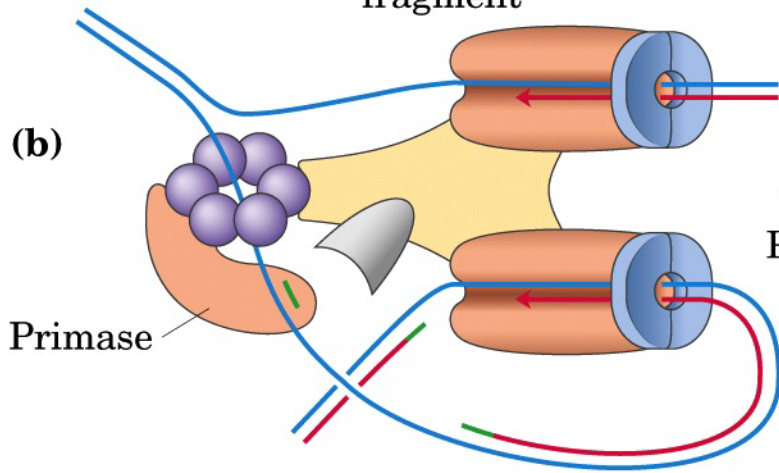
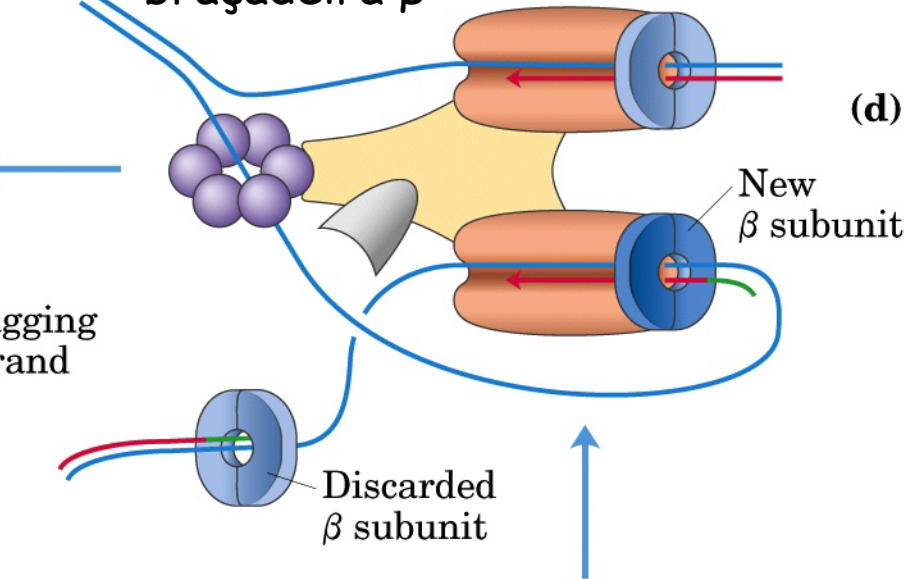
•Ambas as fitas são produzidas por um único dímero assímétrico da DNA polimerase III (alça do DNA da fita atrasada)



# DnaB helicase desenrola DNA



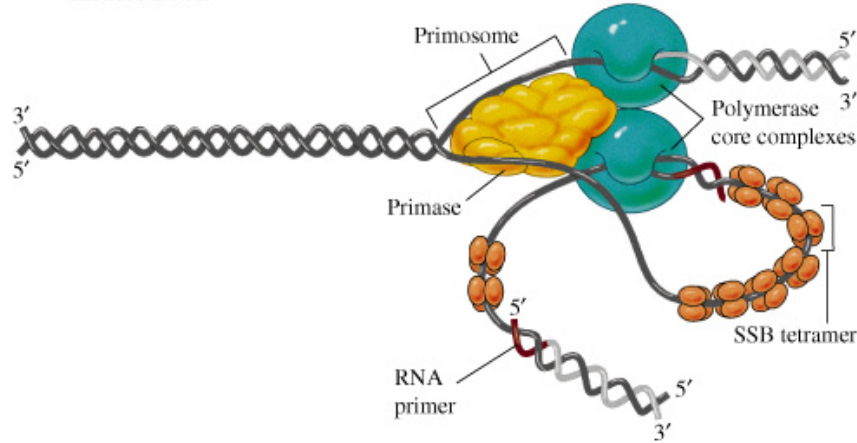
# Síntese completa as subunidades da DNA polimerase III dissociam-se da braçadeira $\beta$



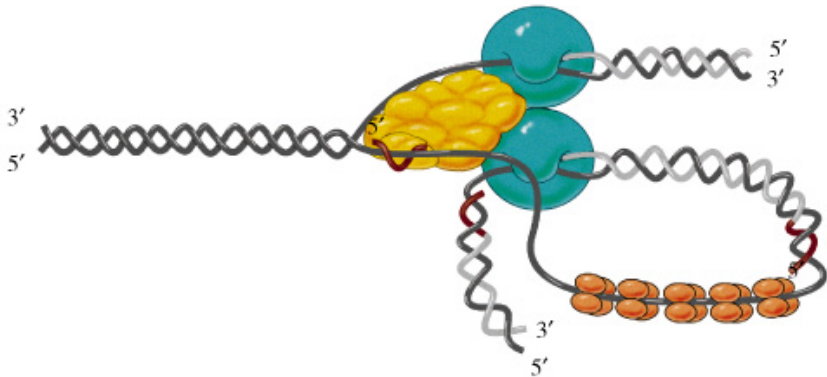
DNA iniciase se associa com DnaB helicase e forma um RNA iniciador

Nova braçadeira  $\beta$  é posicionada

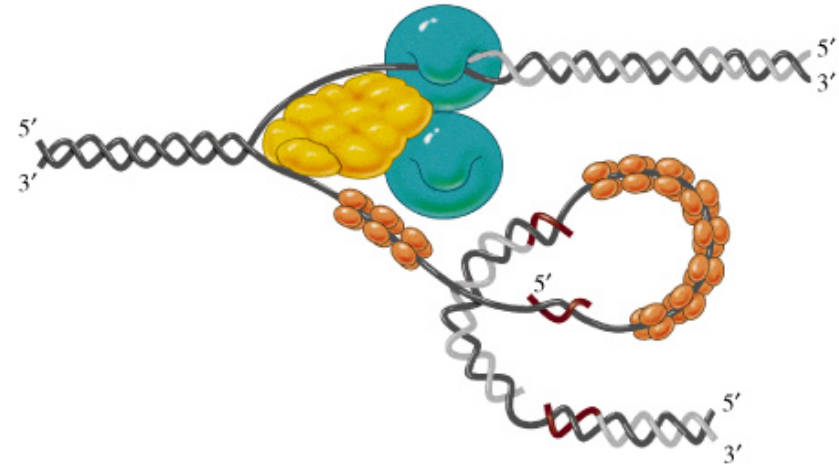
(a) The lagging-strand template loops back through the replisome so that the leading and lagging strands are synthesized in the same direction. SSB binds to single-stranded DNA.



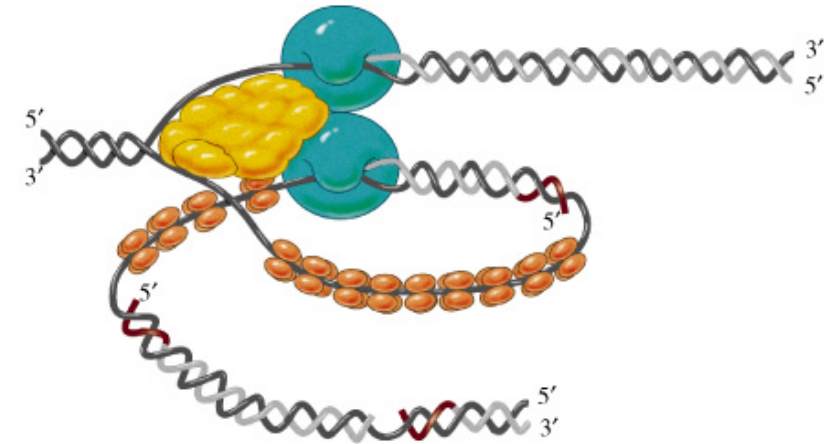
(b) As helicase unwinds the DNA template, primase synthesizes an RNA primer. The lagging-strand polymerase completes an Okazaki fragment.



(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.

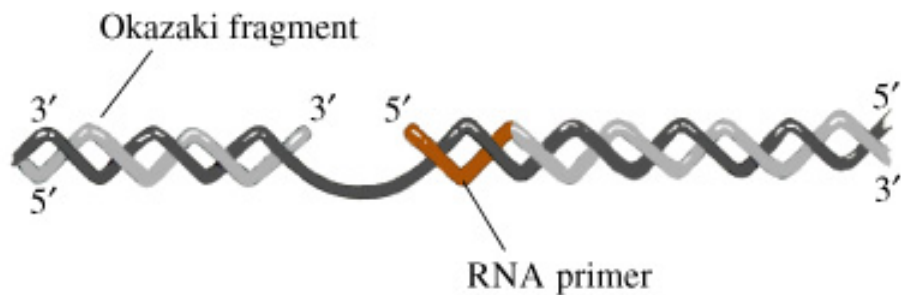


# DNA Polimerase I/ Ligase

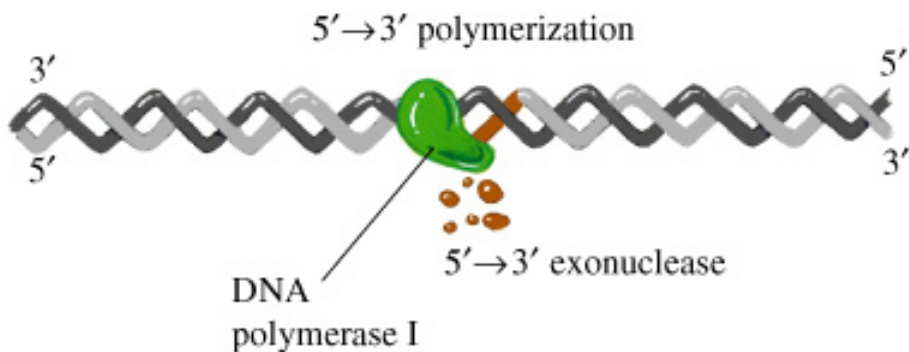
## Requerida para ligar fragmentos Okazaki

- 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  $\text{NAD}^+$  em uma reação de transferência de grupos fosforilas, não há reação de redox

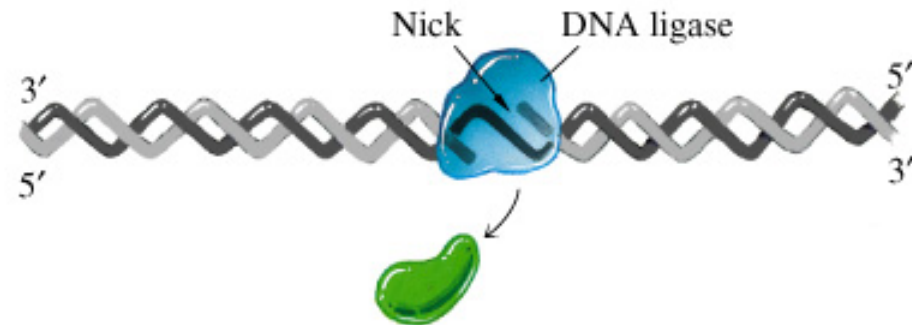
(a) Completion of Okazaki fragment synthesis leaves a nick between the Okazaki fragment and the preceding RNA primer on the lagging strand.



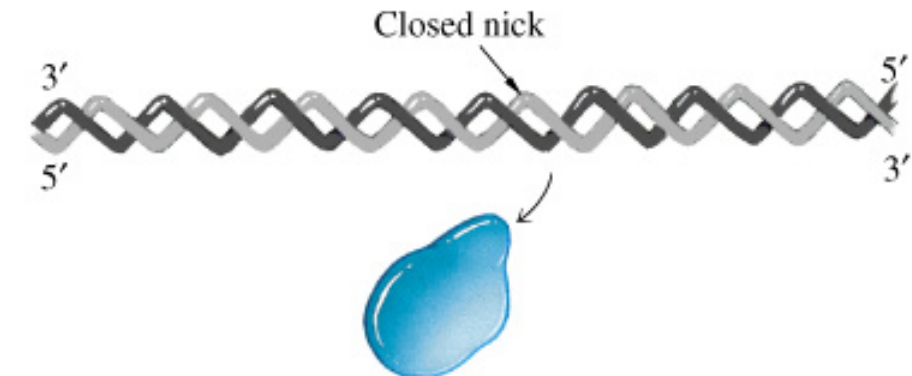
(b) DNA polymerase I extends the Okazaki fragment while its 5'→3' exonuclease activity removes the RNA primer. This process, called nick translation, results in movement of the nick along the lagging strand.



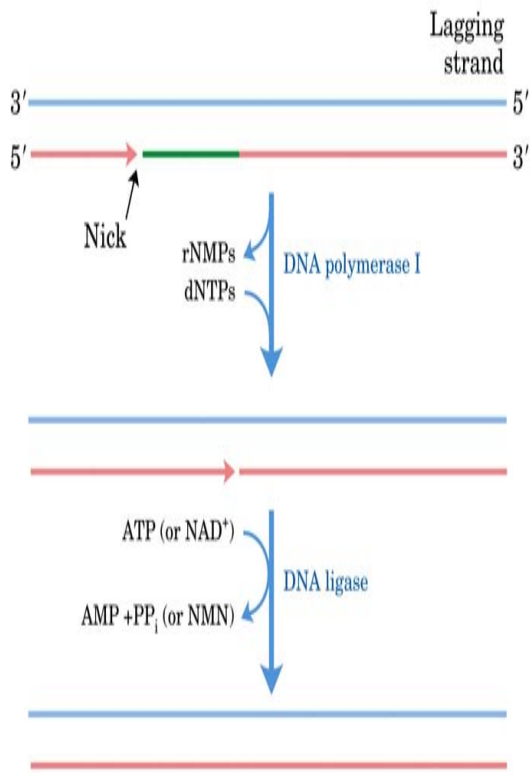
(c) DNA polymerase I dissociates after extending the Okazaki fragment 10–12 nucleotides. DNA ligase binds to the nick.



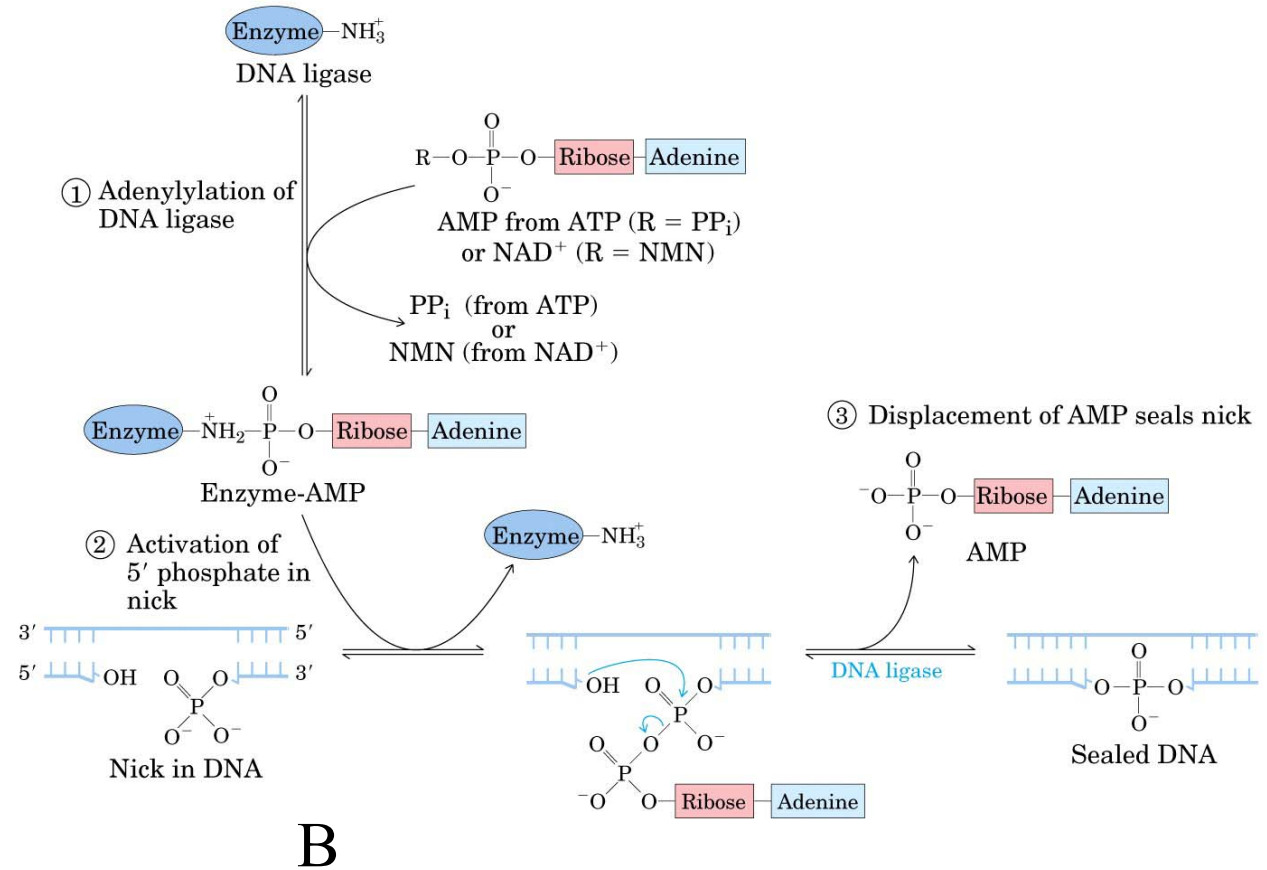
(d) DNA ligase catalyzes formation of a phosphodiester linkage, which seals the nick, creating a continuous lagging strand. The enzyme then dissociates from the DNA.







A



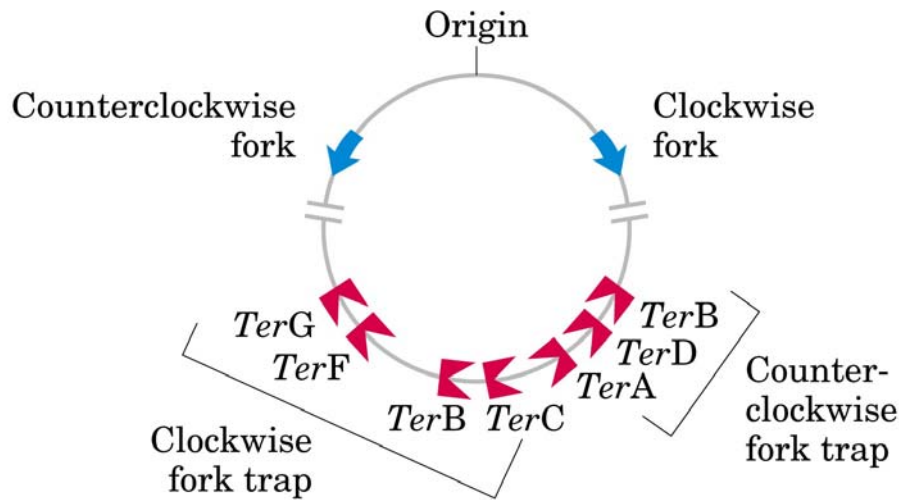
B

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

B) Envolvimento do NAD<sup>+</sup> e ATP no mecanismo da DNA ligase

# Término da Replicação

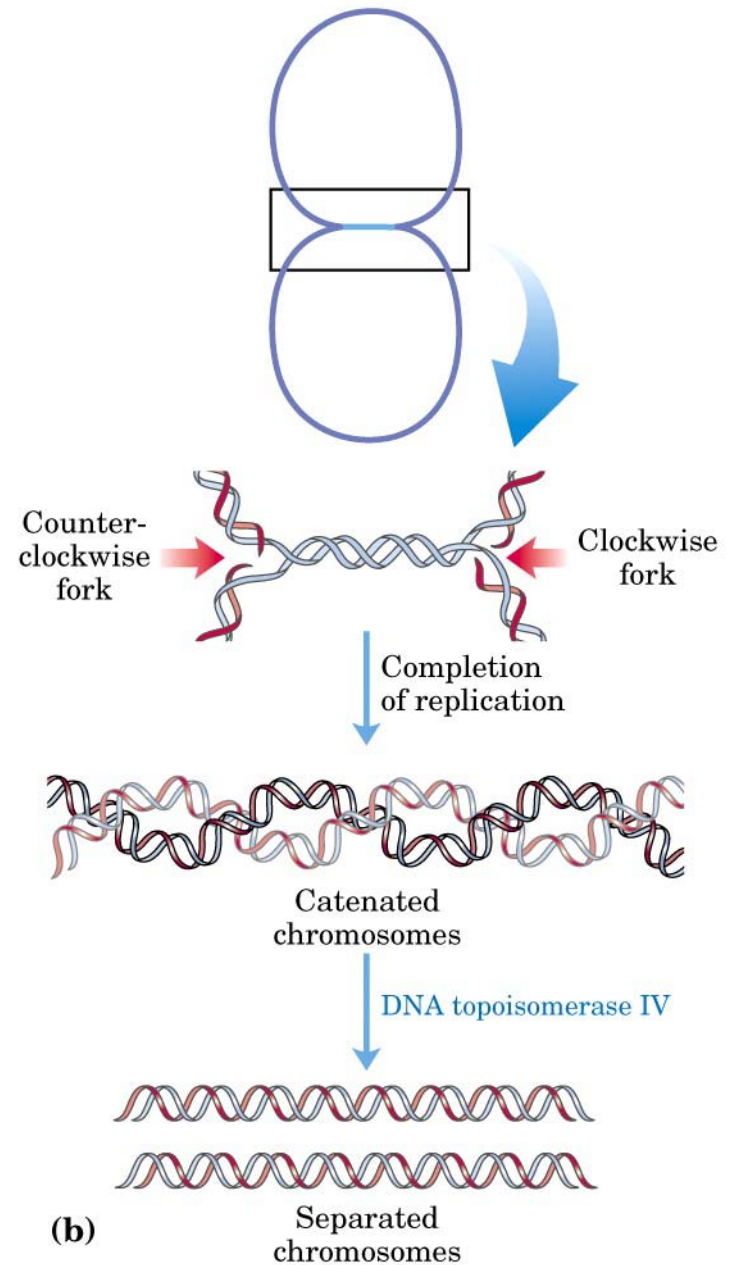
- Terminação ocorre na região *ter* do cromossomo de *E. coli*.
- Região *ter* rica em Gs e Ts, sinaliza o fim da replicação.
- Substância de utilização de terminação (Tus) liga-se à região *ter*.
- Tus previne forquilha de replicação através da inibição da atividade de helicase.



(a)

## Término da replicação

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



(b)

# Replicação de DNA em Eucariotos

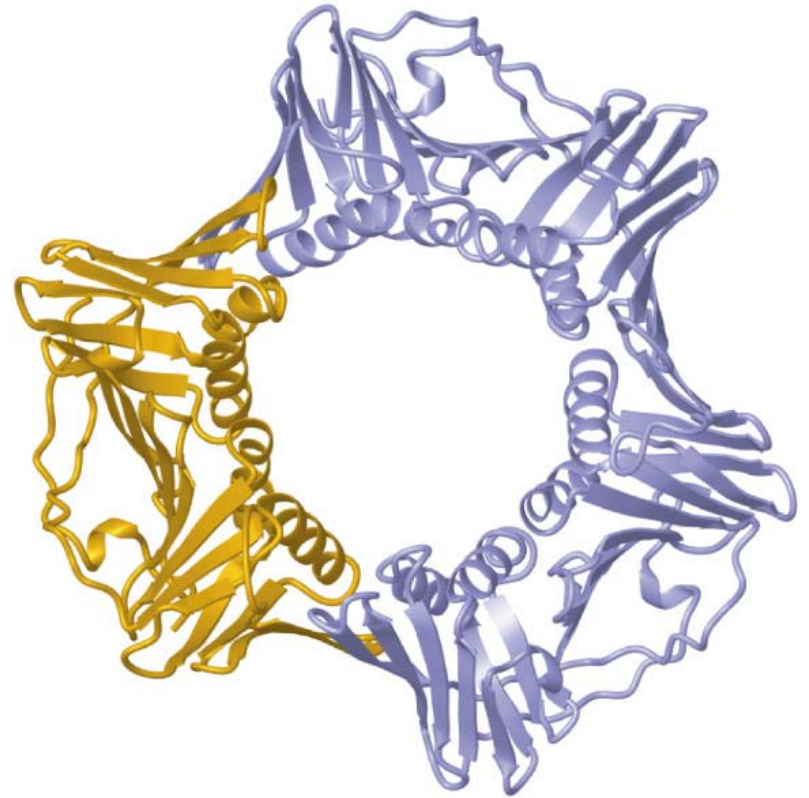
- Ocorre similarmente ao que ocorre em procariotos.
- Múltiplas origens da replicação (sequência de replicação autônoma -ARS)
- Replicação é mais lenta que em procariotos.
- 5 diferentes DNA polimerases em Eucariotos.

# DNA Polimerases Eucariótica

- Alpha ( $\alpha$ ) - síntese de Primer e reparo do DNA
- Beta ( $\beta$ ) - repara o DNA
- Gamma ( $\gamma$ ) - replicação de DNA Mitochondrial
- Delta ( $\delta$ ) - Leva e sintetiza fita atrasada, e repara o DNA
- Epsilon ( $\epsilon$ ) - Repara e preenche os espaços em fitas atrasadas.

# PCNA análogas à subunidade- $\beta$ da DNA polimerase de *E. coli*

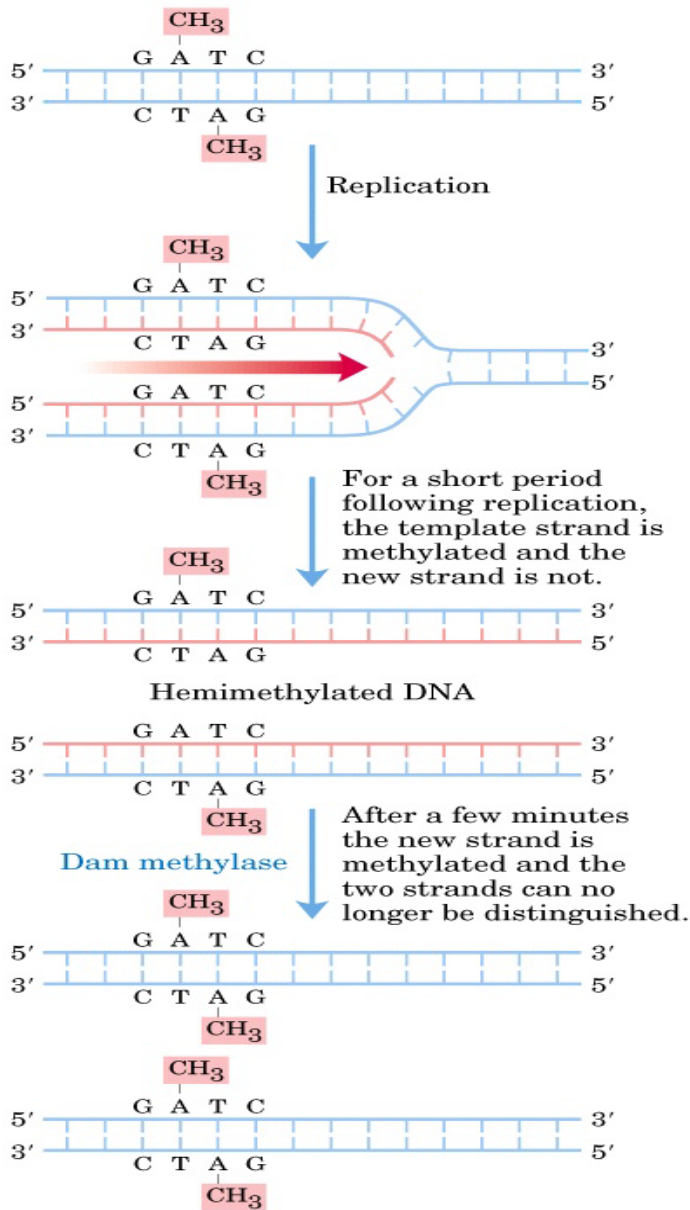
- Proliferação de antígeno nuclear celular
- Proteína Trimérica
- Deslizamento da estrutura grampo liga-se ao novo filamento de DNA sintetizado



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

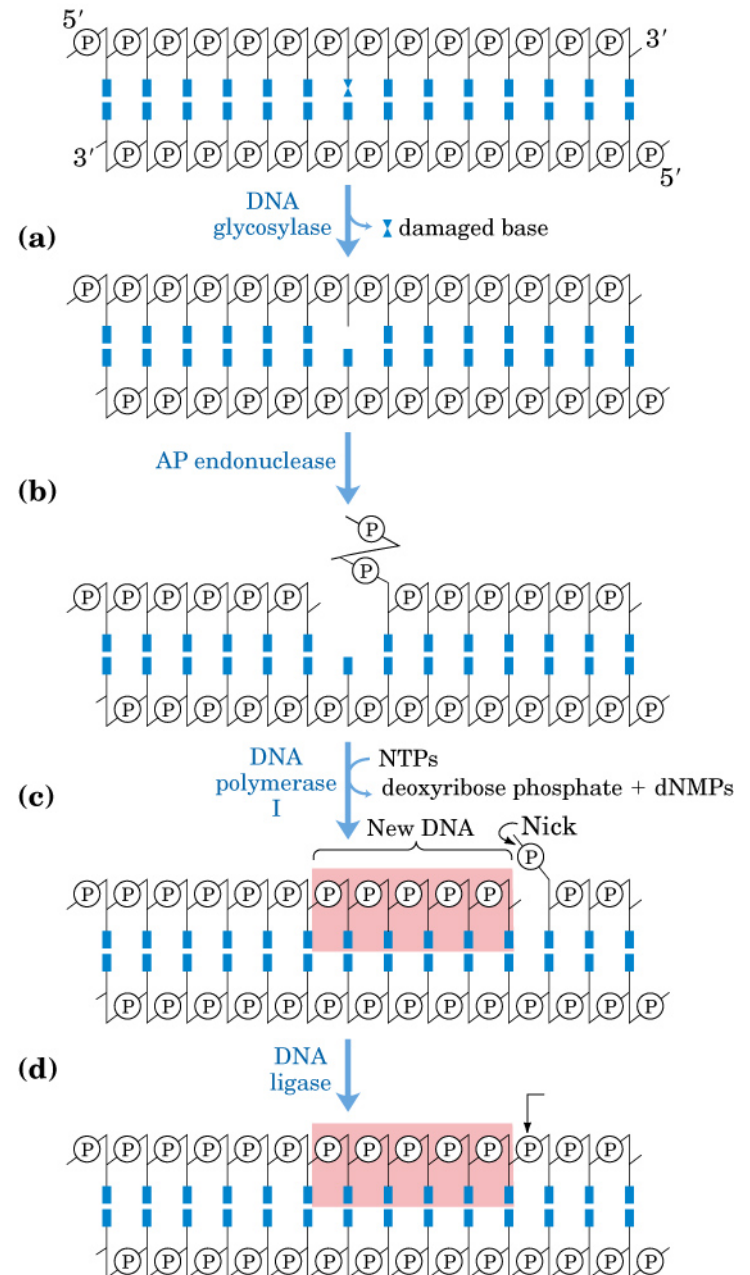
## Despareamento

Despareamento - DNA velho é marcado por metilação (Dam metilase) para ser distinguido do novo. Dam metila o DNA na posição N<sup>6</sup> de todas as adeninas que ocorrem nas seqüências (5')GATC

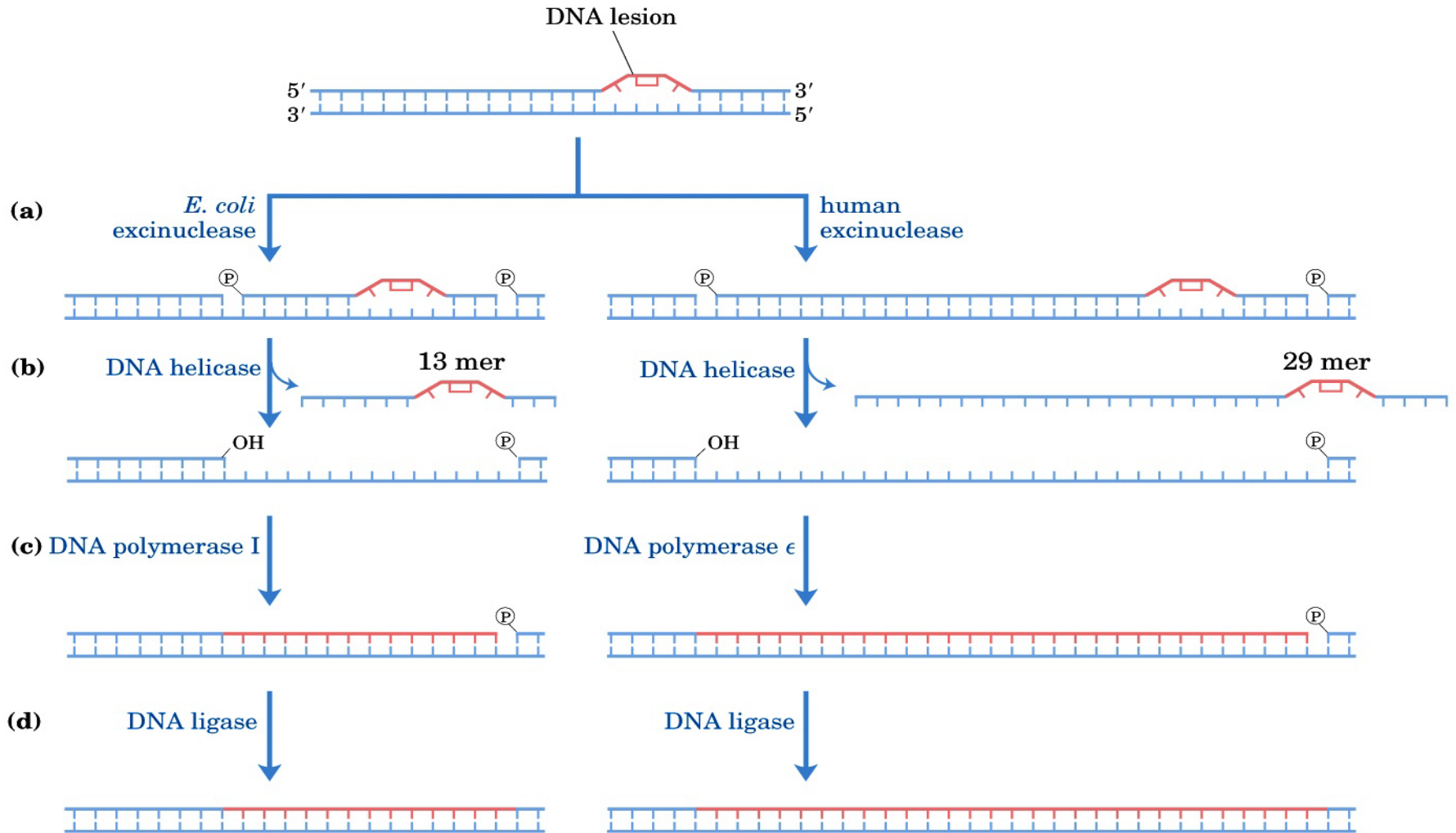


# Reparo por excisão de base

- 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

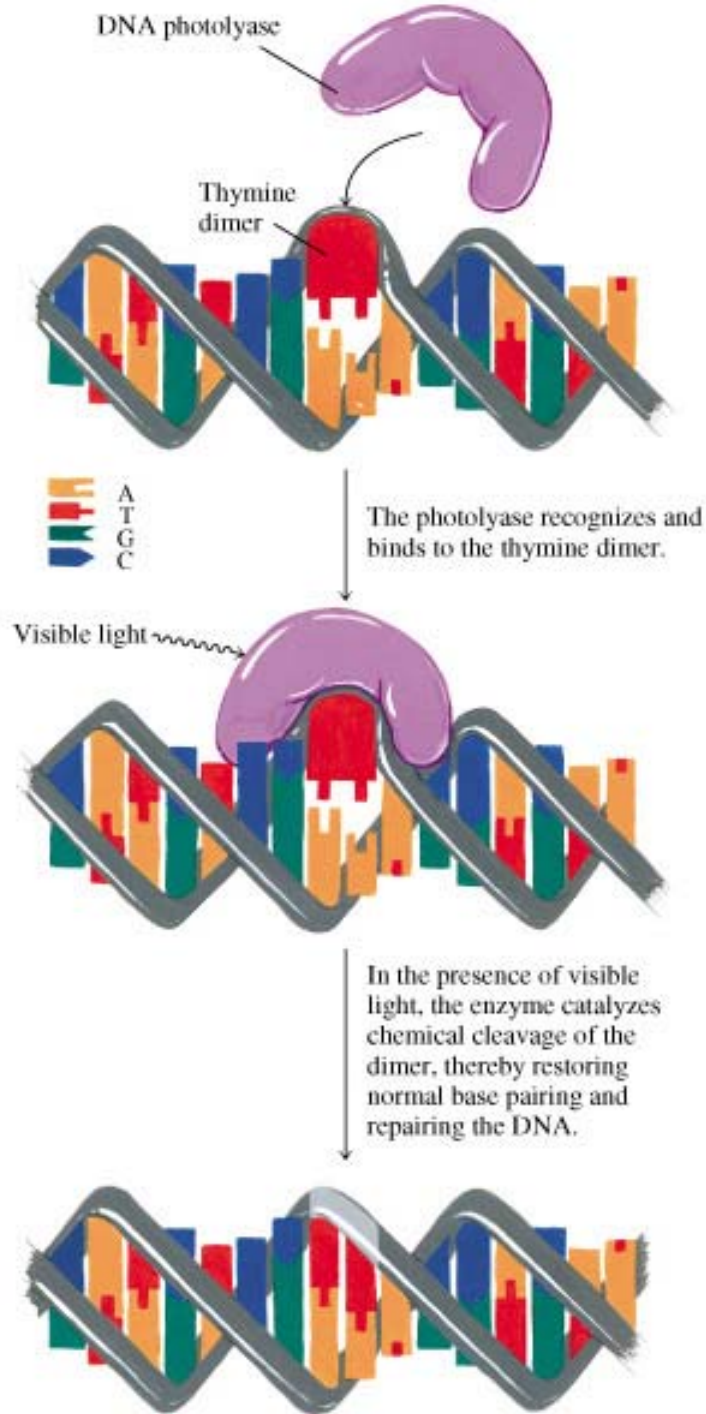
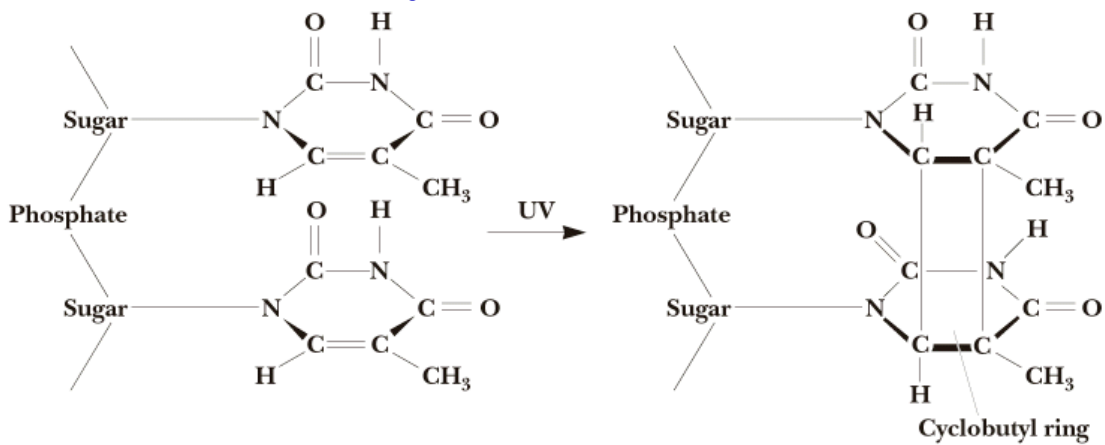


# Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos na *E. coli* e humanos



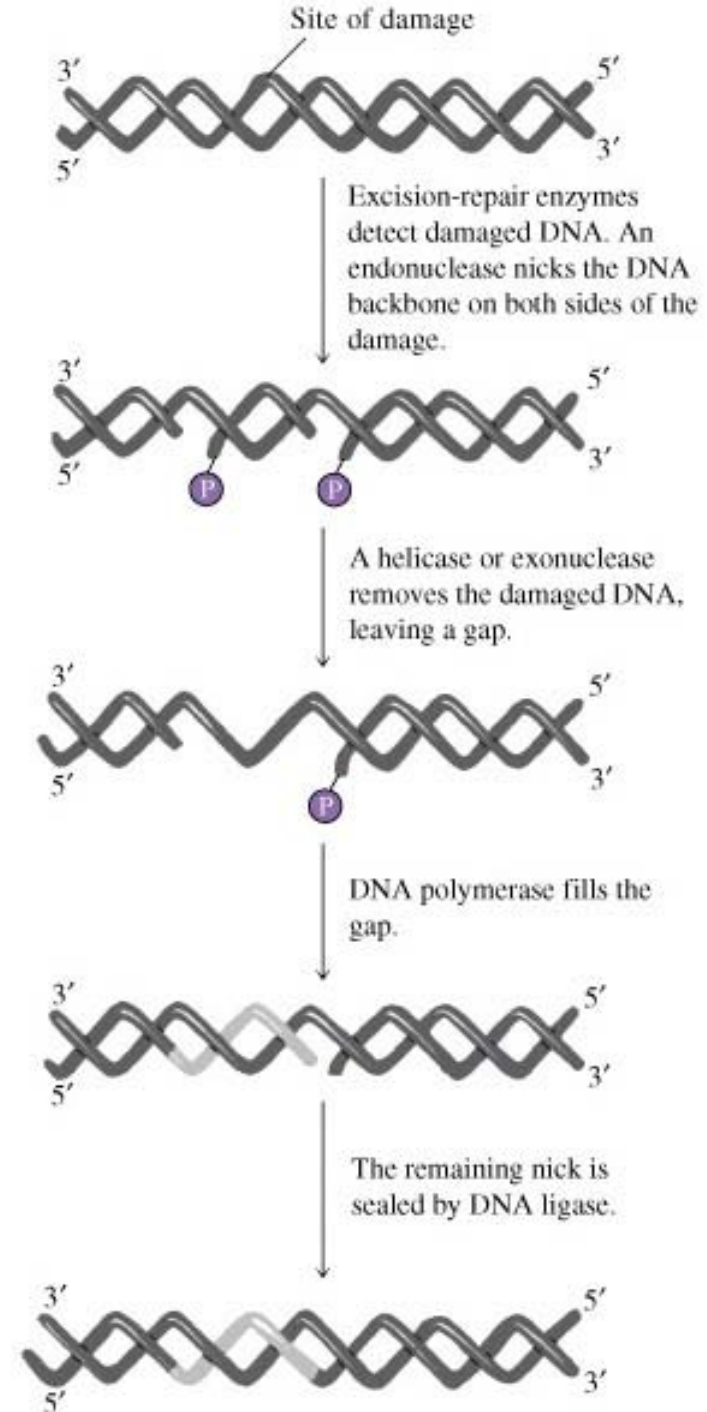
Excinuclease cliva, Helicase ajuda na remoção, DNA polimerase preenche a lacuna e DNA ligase sela o corte remanescente

# 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.

