

Aula de **Bioquímica II**

Tema:

DNA:

Replicação, Reparo e Recombinação

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

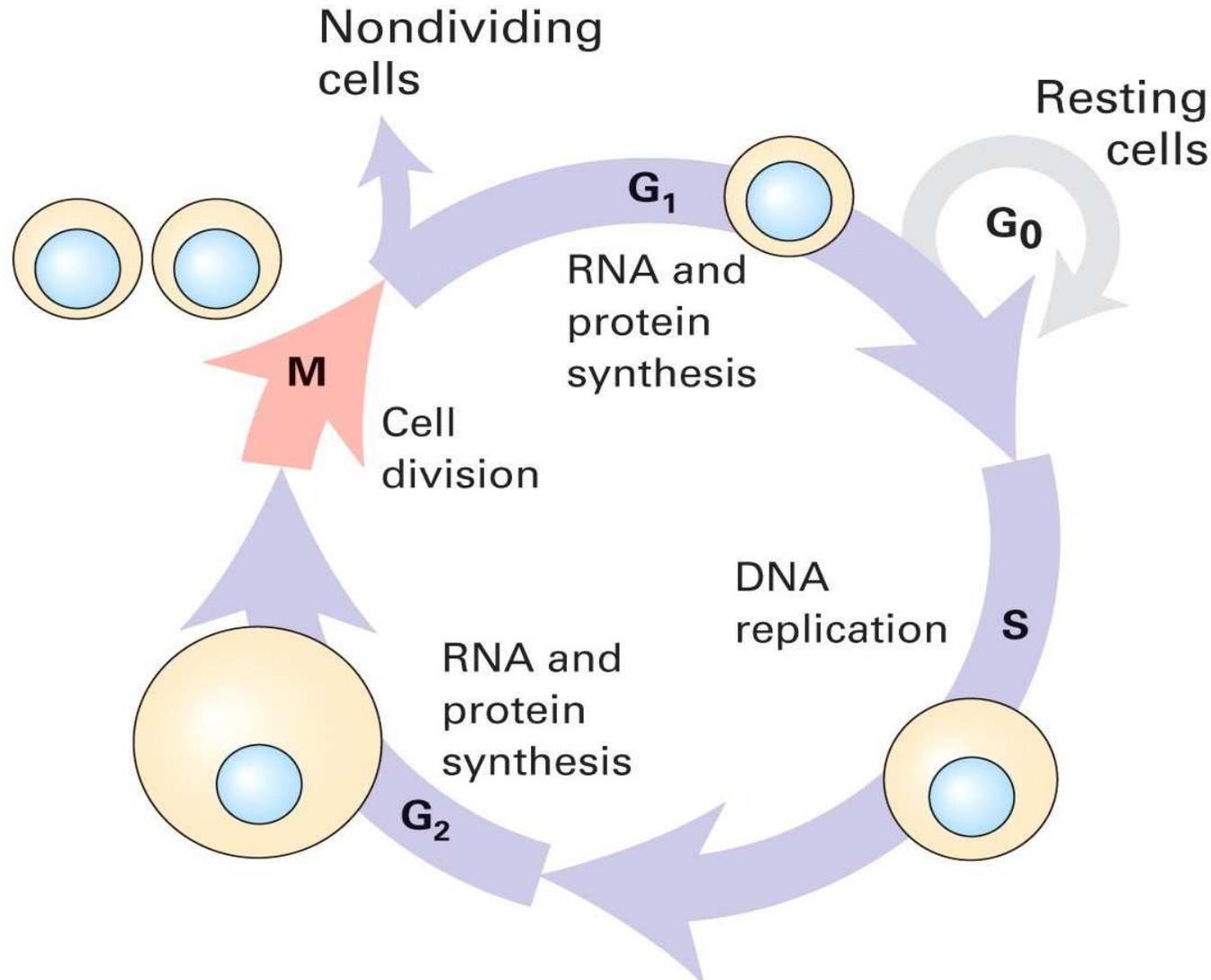
Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

Ciclo Celular

A síntese de DNA celular ocorre numa fase específica do ciclo celular



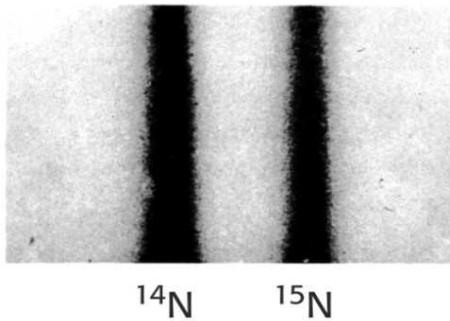
Replicação do DNA

Replicação do DNA é semi-conservativa: Meselson & Stahl (1958)

1º) Crescimento em meio mínimo na presença de Radioisótopos ^{15}N

2º) Após marcação \rightarrow ^{14}N

(A)



DNA pesado (^{15}N)



DNA híbrido (^{15}N - ^{14}N)

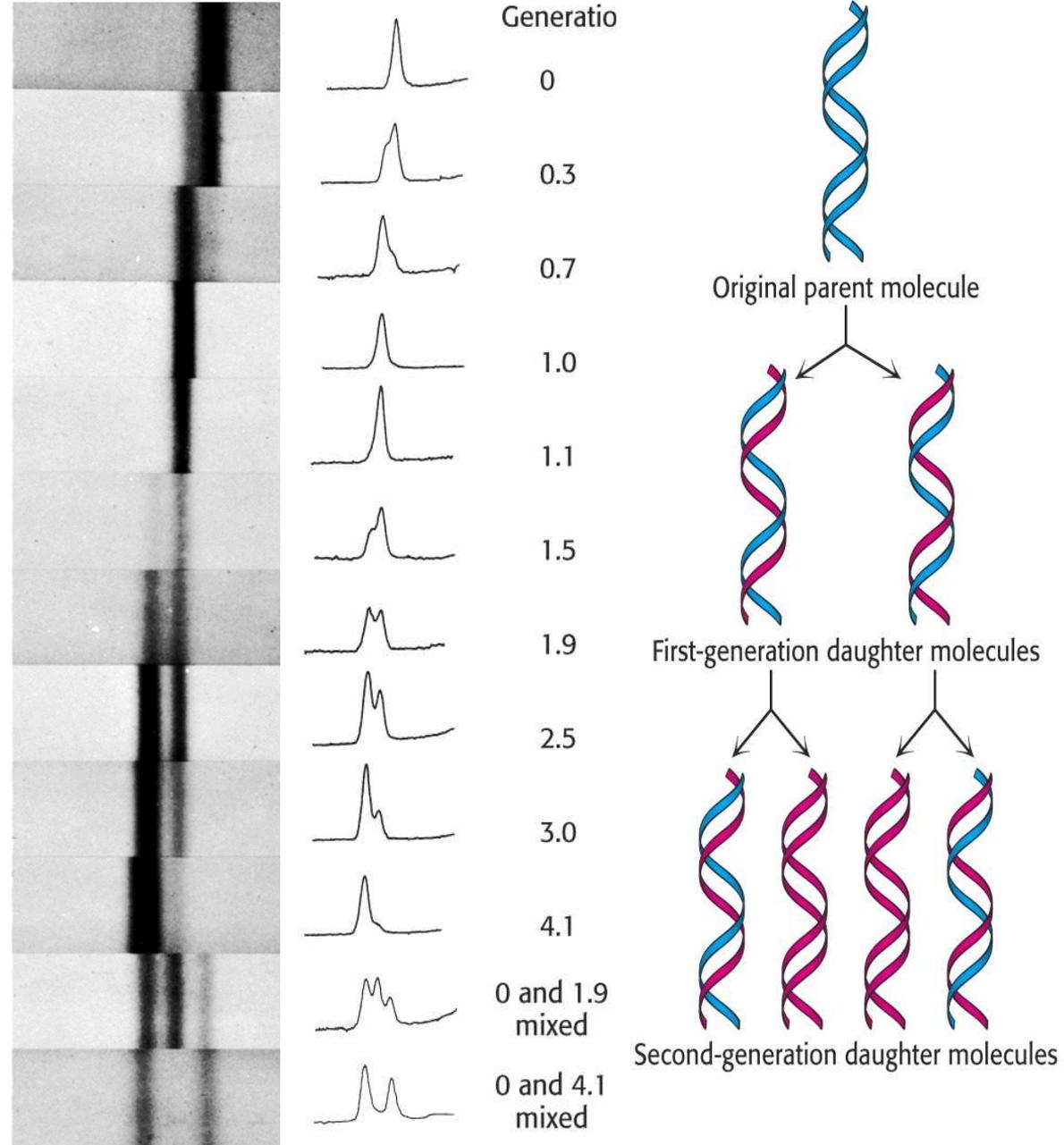
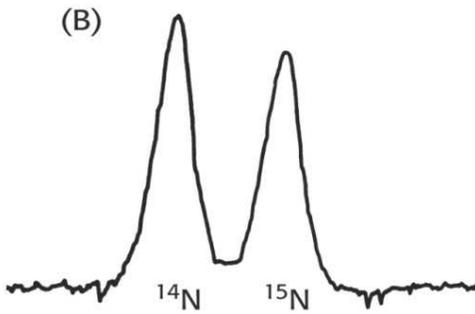


DNA leve (^{14}N)



DNA híbrido

(B)



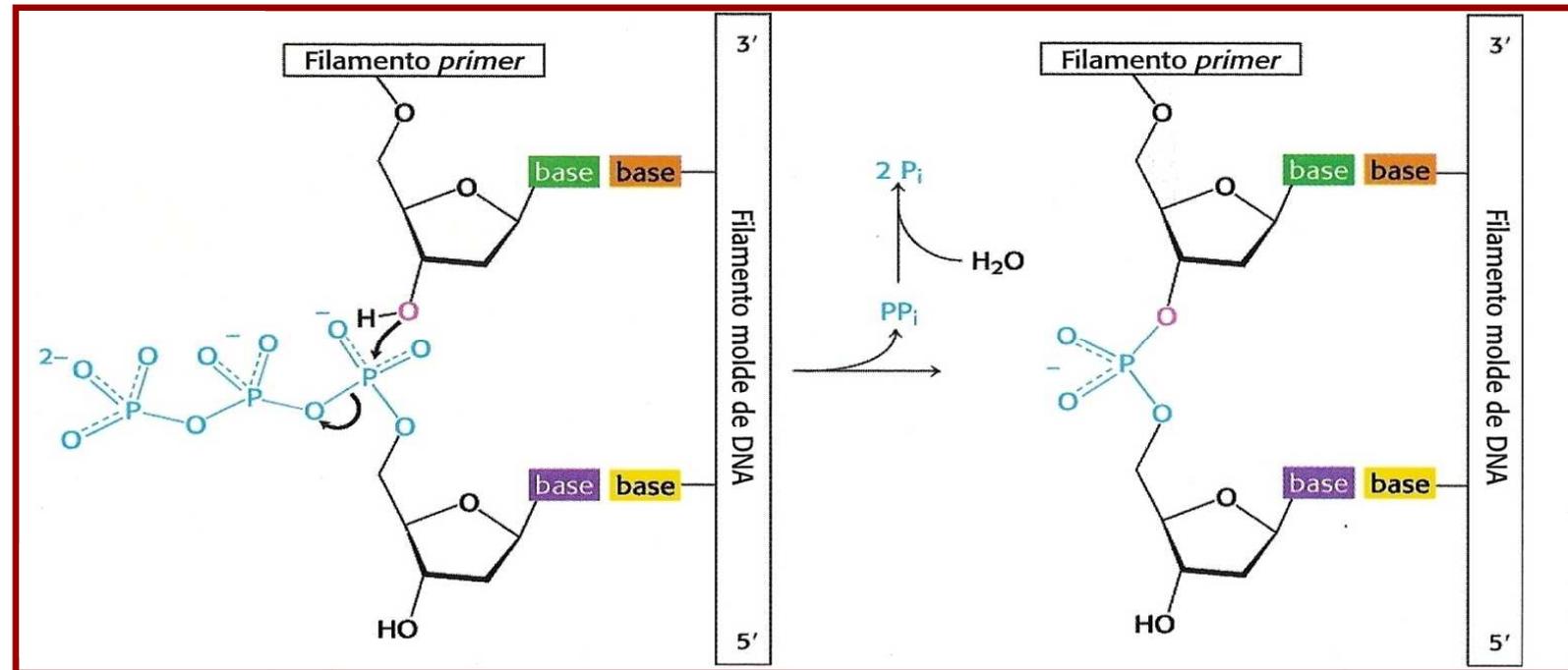
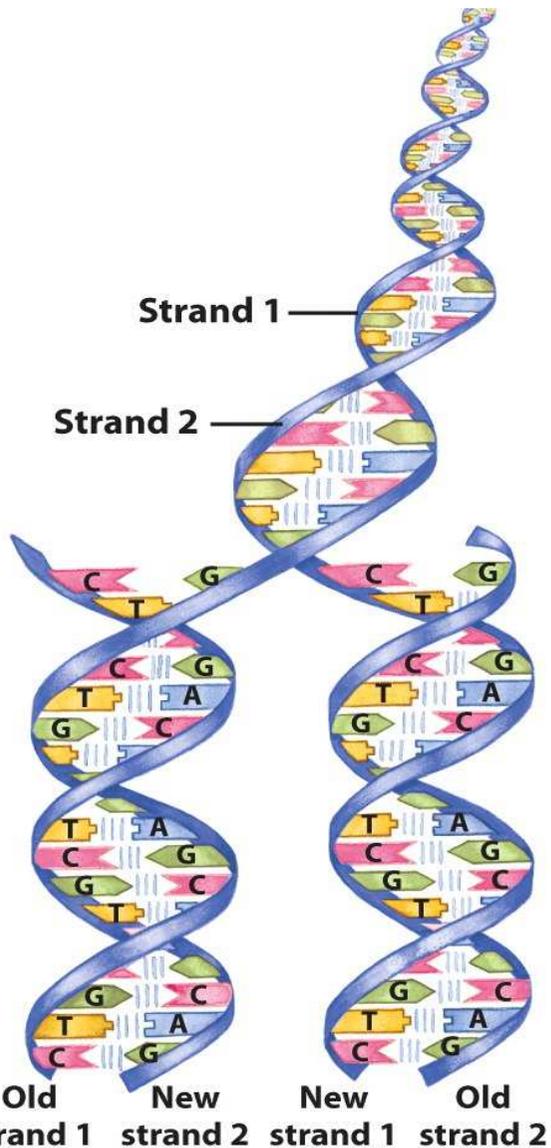
Replicação do DNA

→ Síntese dirigida por complementaridade → DNA-polimerase DNA-dependente

- É dirigido pelo pareamento de bases complementares livres com a fita molde parental

→ Requer a separação das fitas parentais

→ Síntese ocorre no sentido 5' → 3'



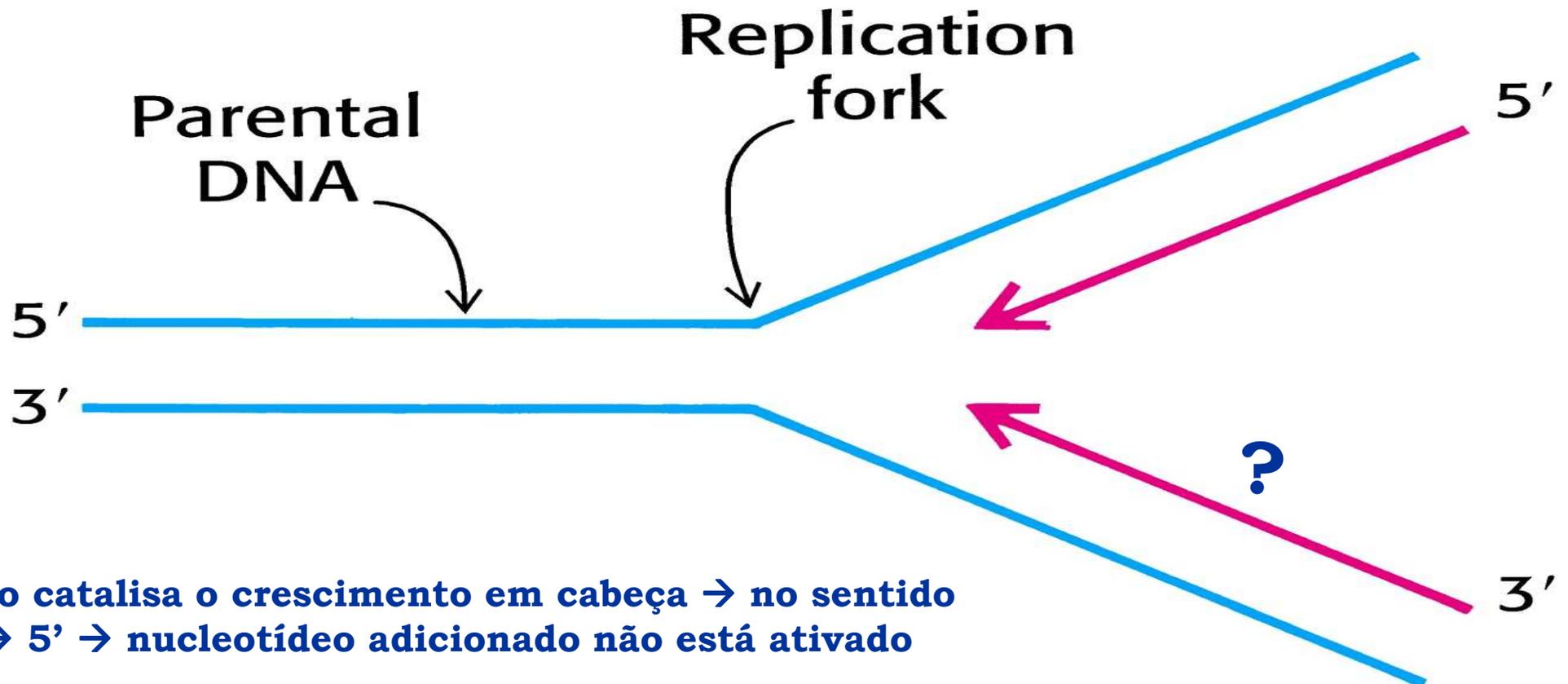
Coordenada da Reação

Replicação do DNA

→ Síntese do DNA obedece direcionamento $5' \rightarrow 3'$

→ **Forquilha de replicação** → abertura da fita-dupla parental para a síntese das fitas “filhas”

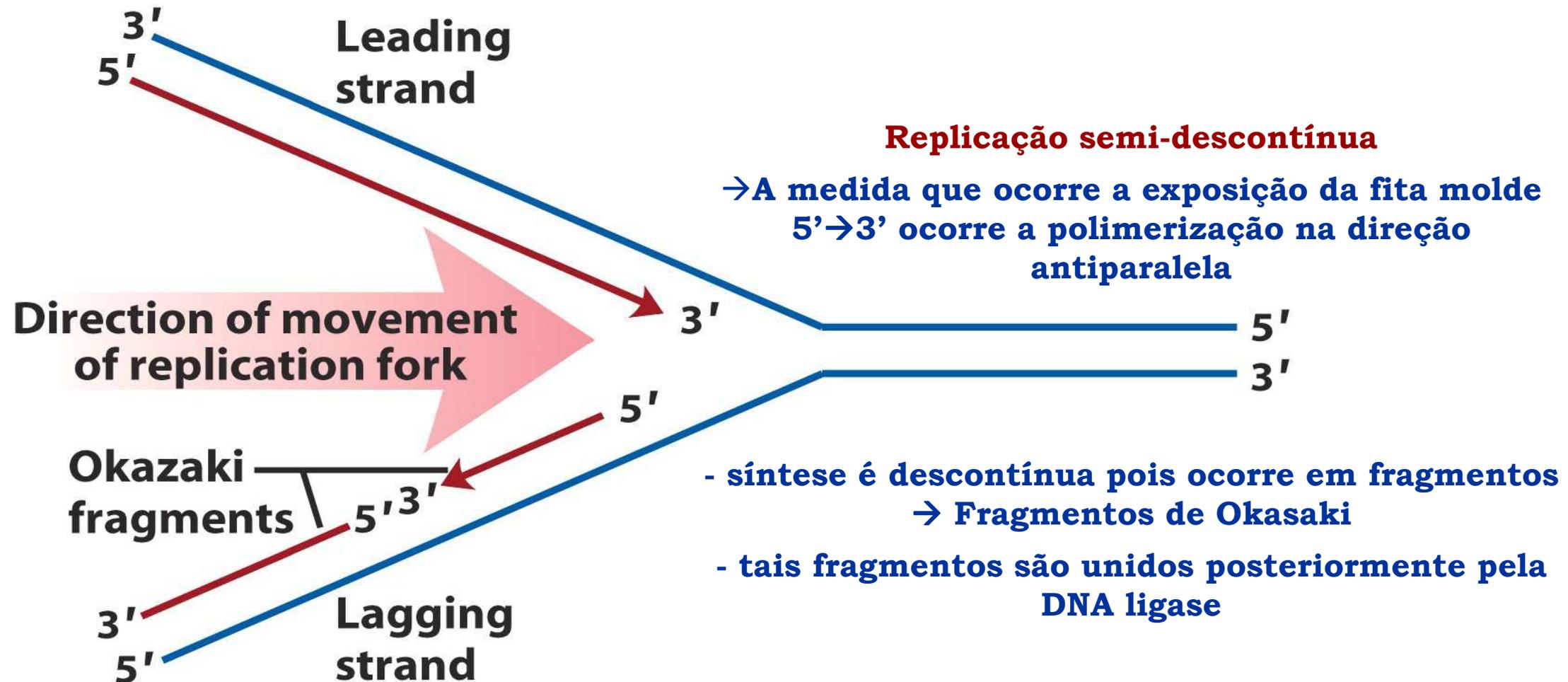
- Síntese a partir do molde $3' \leftarrow 5'$ envolve o empecilho da forquilha devido à natureza antiparalela do DNA → Sentido do crescimento $5' \rightarrow 3'$ da fita filha



→ Não catalisa o crescimento em cabeça → no sentido $3' \rightarrow 5'$ → nucleotídeo adicionado não está ativado

Replicação do DNA

- Estrutura em **Y** contendo dois aparatos multi-enzimáticos com a DNApol
- Natureza antiparalela do DNA fita dupla impõe empecilhos
 - uma das fitas deve ser sintetizada no sentido 3'→5'
- na fita molde 3'→5' exposta → a síntese é contínua → fita líder ou contínua
- na fita molde 5'→3' exposta → a síntese é descontínua → fita descontínua



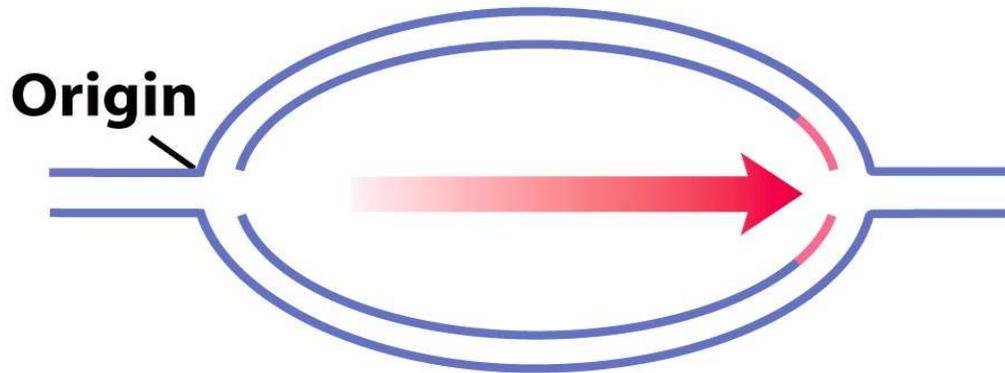
Replicação do DNA

→ Bolha de replicação

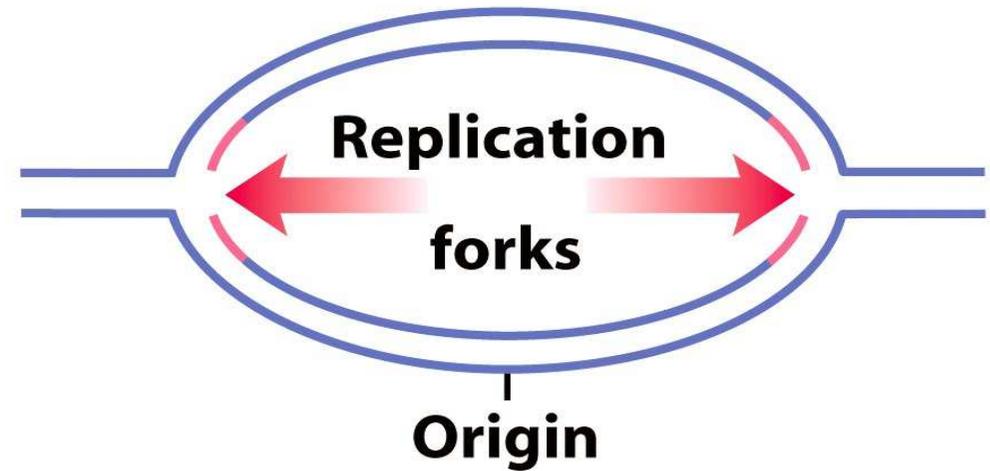
→ Origem de replicação;

→ Direção da replicação (uni ou bi)

Unidirectional



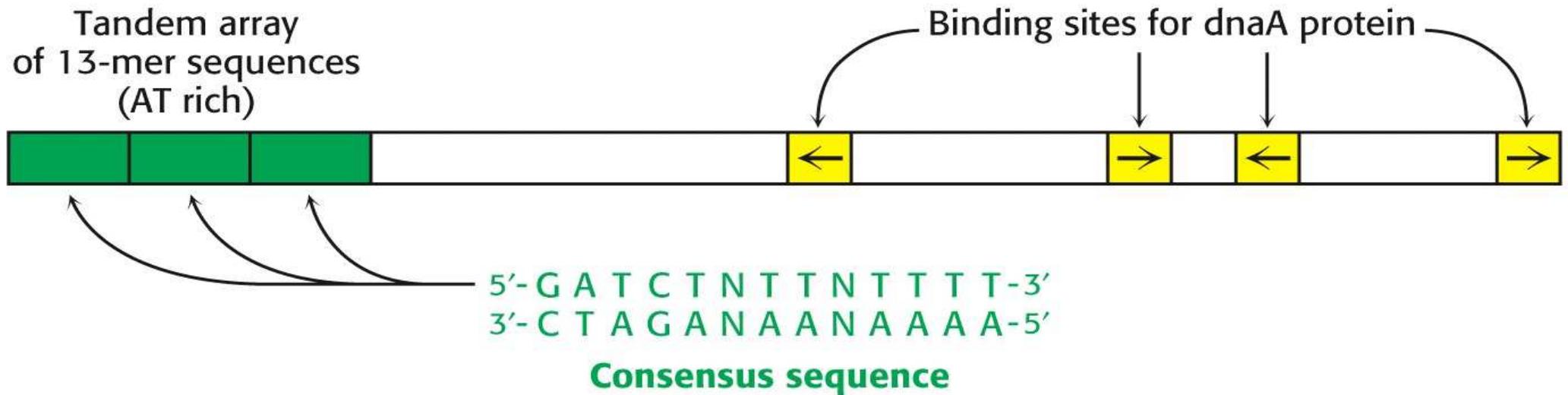
Bidirectional



Replicação do DNA

→ Replicação começa em um sítio *oriC* desenrolado

→ Ligação de proteínas DnaA dispara sinais que desenrolam o DNA e a síntese do primer



Enzimas e Proteínas da Replicação

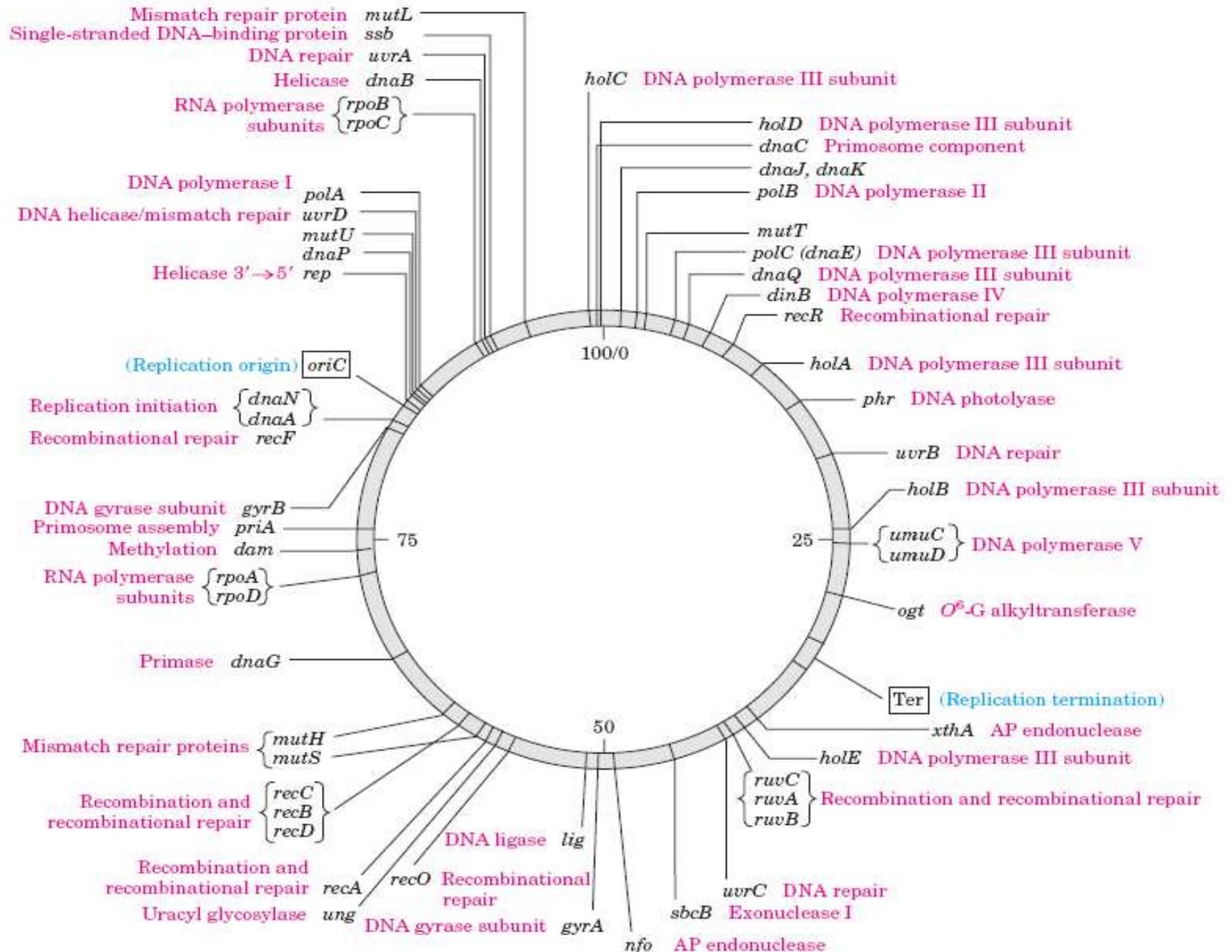
- 1) **Helicases → separação das cadeias**
- 2) **Proteínas que previnem o re-anelamento antes da replicação → SSB**
- 3) **DNA topoisomerase (DNA-girase)**
- 4) **RNA-polimerase DNA-dependente → Primase**
- 5) **DNA-polimerases DNA-dependentes**
- 6) **Enzima removedora dos primers de RNA**
- 7) **DNA ligase**

TABLE 25-3 Proteins Required to Initiate Replication at the *E. coli* Origin

<i>Protein</i>	M_r	<i>Number of subunits</i>	<i>Function</i>
DnaA protein	52,000	1	Recognizes ori 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-binding 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>

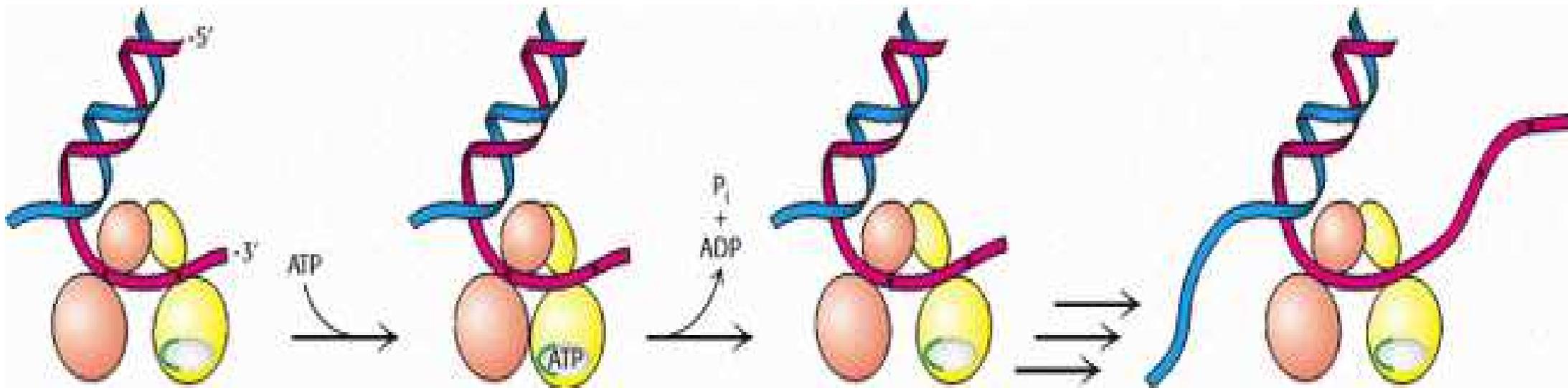
*Subunits in these cases are identical.

É mais complicado do que parece!!!!



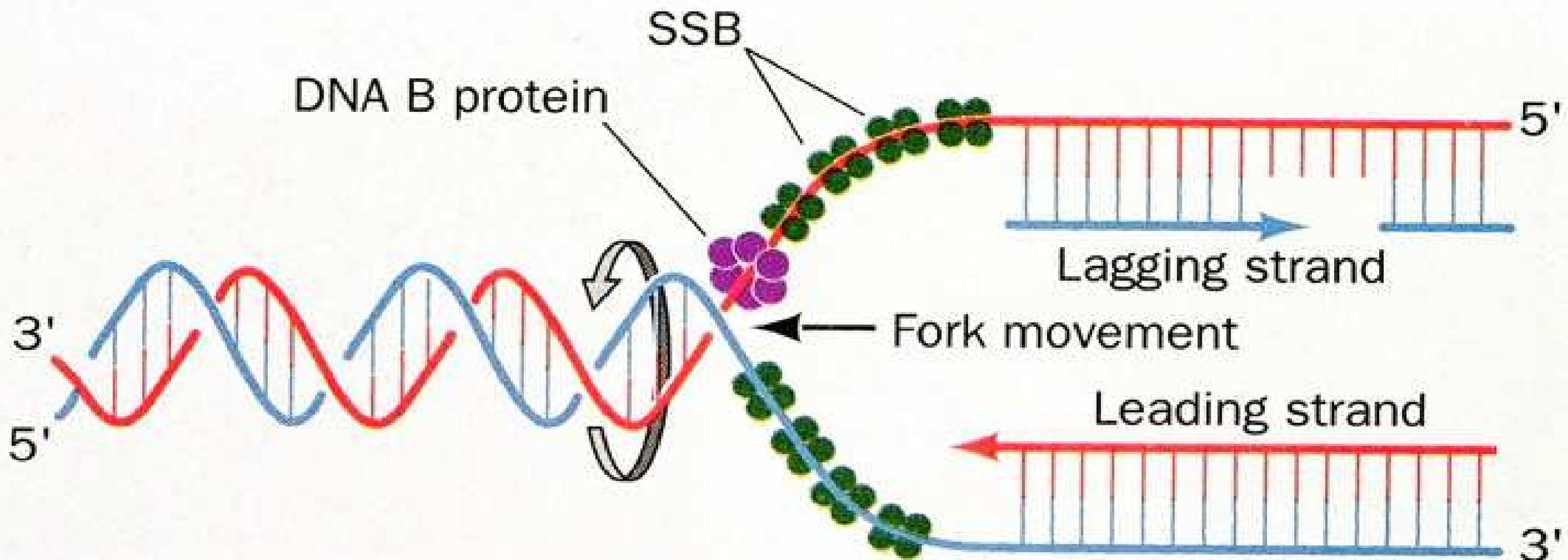
DNA-Helicase

- Catalisam a separação da dupla hélice à frente da forquilha de replicação
- Disponibiliza as fitas parentais em fitas simples para a síntese da fita filha
- A DNA helicase age sobre a fita 5'→3' envolvida na replicação descontínua



DNA-Helicase - DnaB

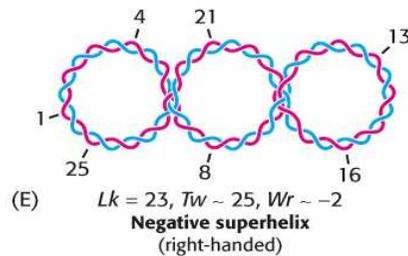
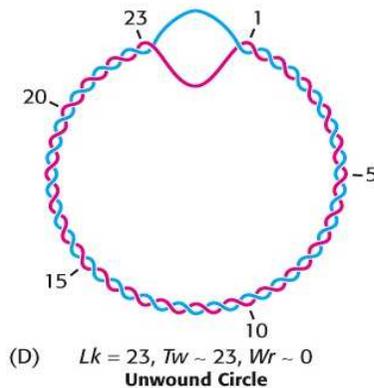
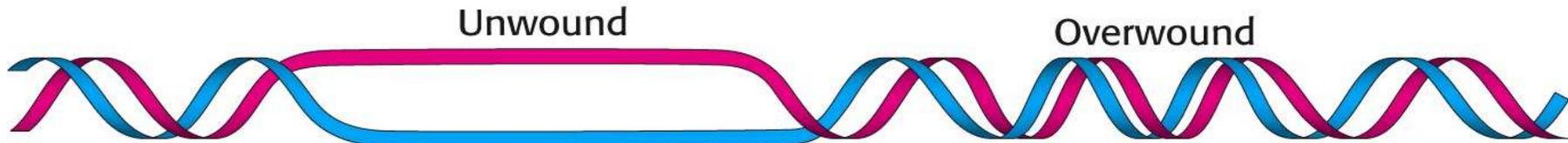
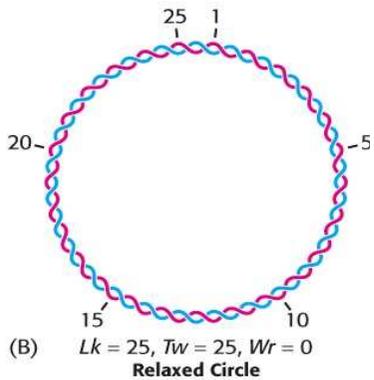
- Hexâmero que forma um anel entorno da fita de DNA simples
 - Catalisam a separação da dupla hélice à frente da forquilha de replicação
 - Disponibiliza as fitas parentais em fitas simples para a síntese da fita filha
 - A DNA helicase age sobre a fita 5'→3' envolvida na replicação descontínua
 - A helicase fornece um suporte adicional para a DNAPol
- Proteínas SSB (single stranded binding protein) previnem re-anelamento



DNA-topoisomerase – Dna girase

Linearização do DNA é um obstáculo topológico

→ A replicação do DNA criam o problema do “enrolamento” do eixo da dupla hélice pelo avanço do Primossomo



→ A topoisomerase é um nuclease reversível que “tira” o enrolamento adicional da dupla-hélice

DNA-topoisomerase – Dna girase

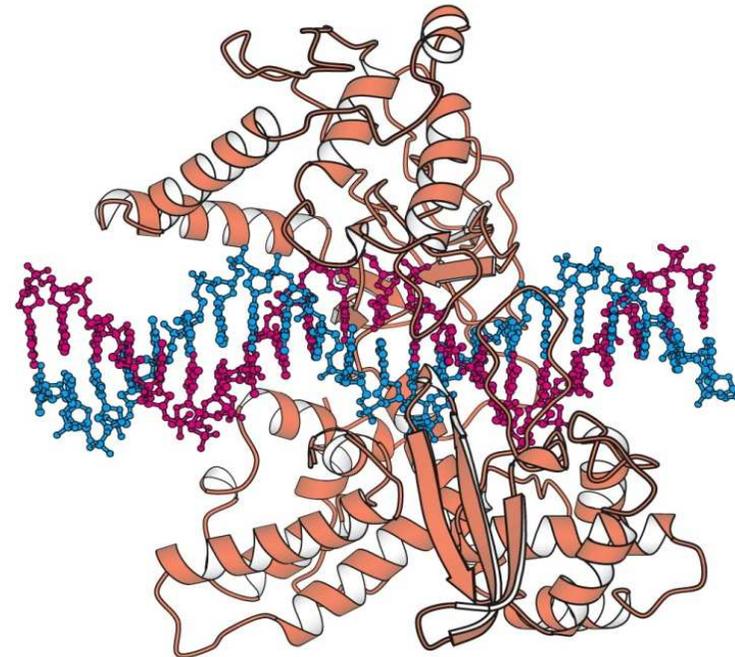
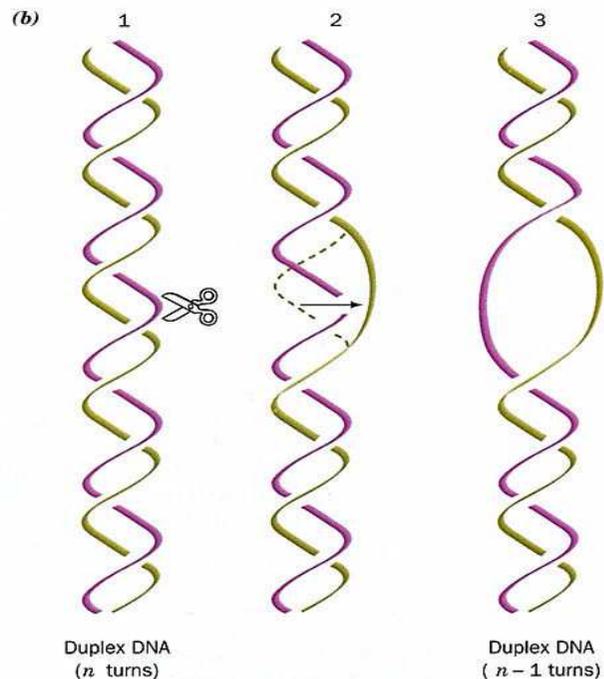
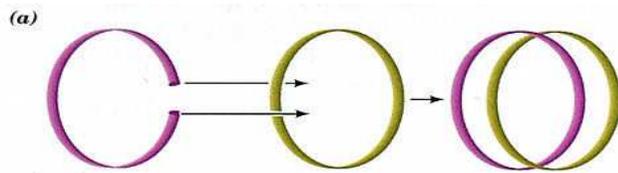
→ A topoisomerase é um nuclease reversível que “tira” o enrolamento adicional da dupla-hélice

1) ele insere um Pi na ligação fosfodiester, clivando uma das fitas → que permanece ligada à enzima

2) permite que uma fita gire livremente entorno da outra → a fita não clivada serve de suporte

3) Regenera a ligação fosfodiester

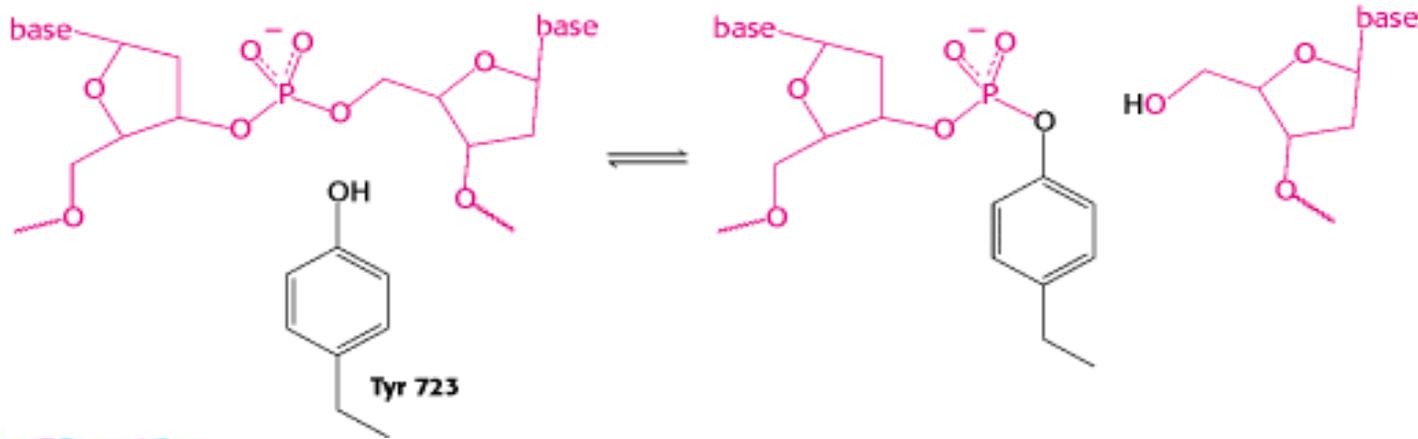
- A tensão da dupla-hélice dita o giro



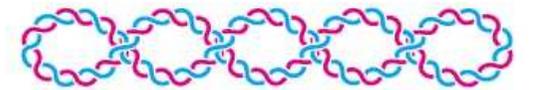
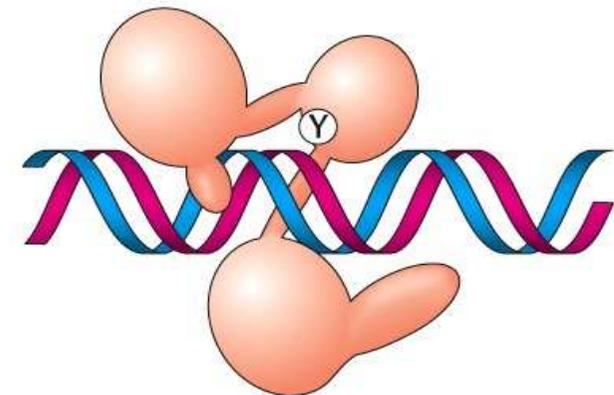
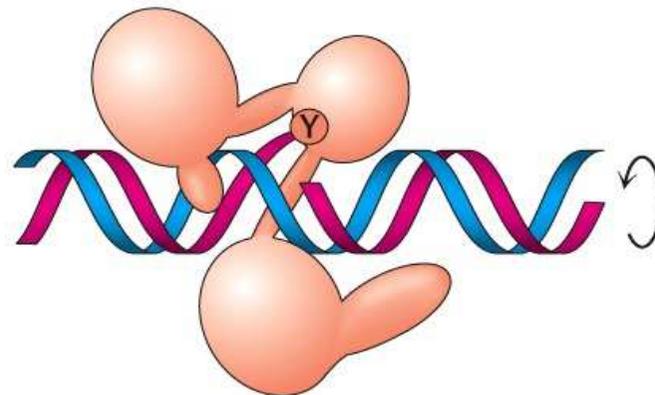
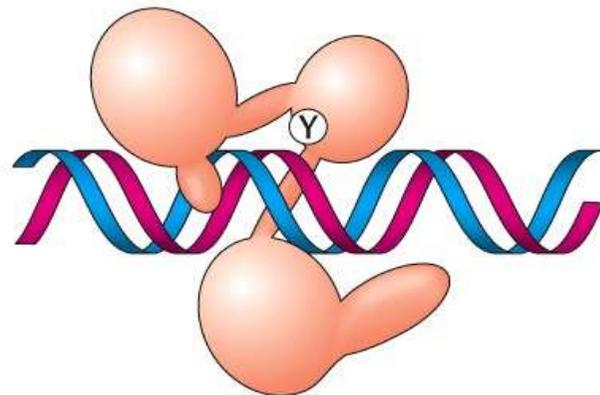
DNA-topoisomerase – Dna girase

- As Topoisomerases I não necessitam de incremento de energia → ligam-se a apenas uma das fitas

→ Ataque nucleofílico de uma Tyr em um átomo de P

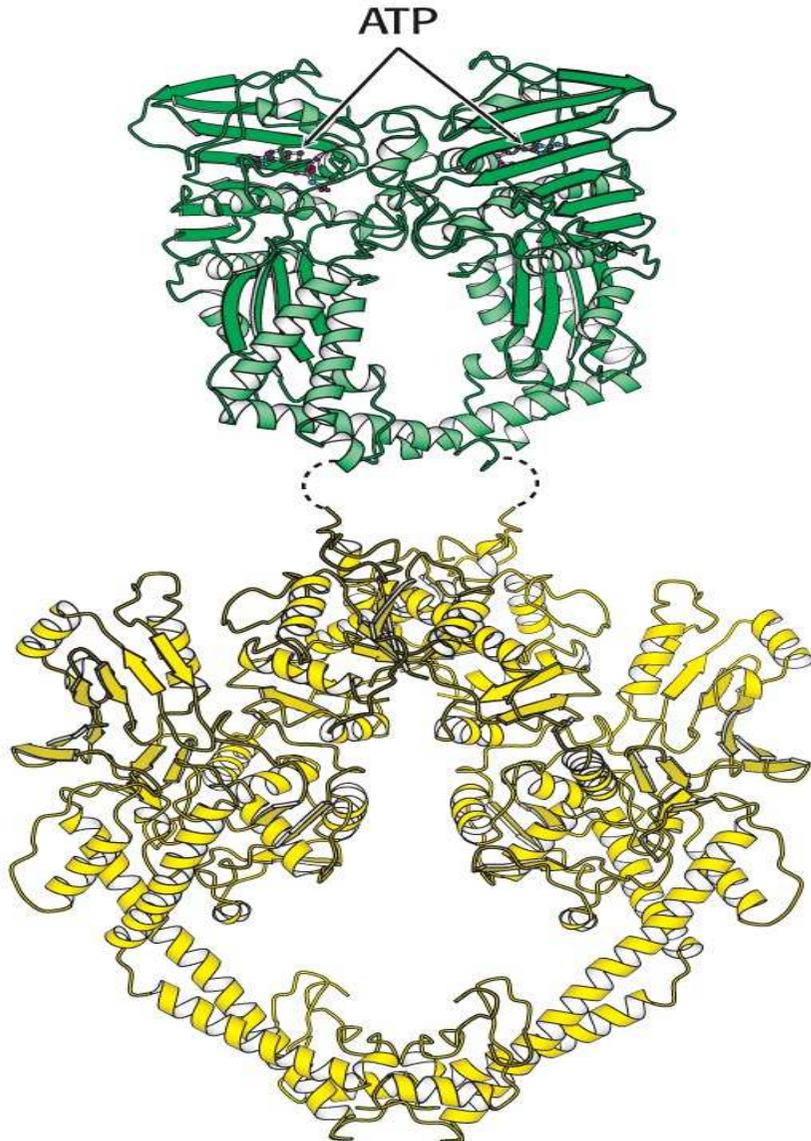


Negatively supercoiled DNA



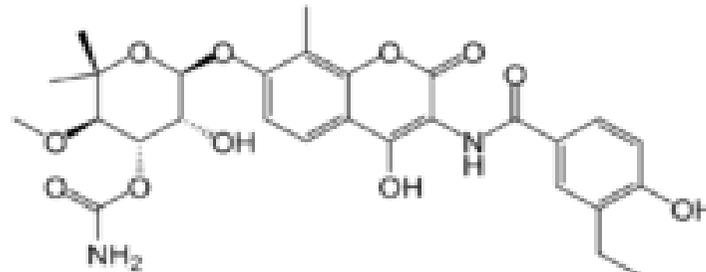
DNA-topoisomerase – Dna girase

- As Topoisomerases II gastam ATP e se ligam a ambas as fitas da hélice
- quebra temporária na hélice
- evitam a formação de laços ou nós nas longas fitas de DNA cromossomal

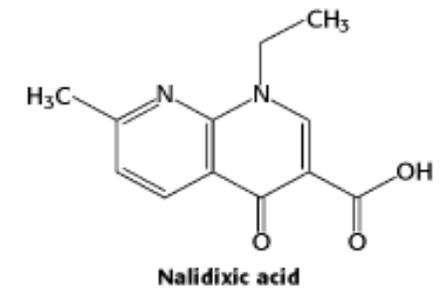


Topoisomerase II bacteriana é alvo de antibióticos que inibem a enzima procariótica muito mais do que a enzima eucariótica

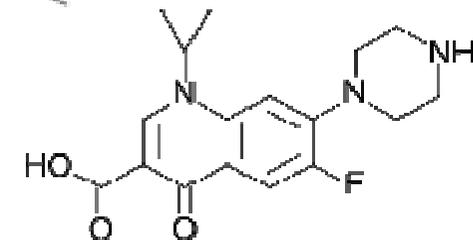
Novobiocina



Ácido Nalidíxico

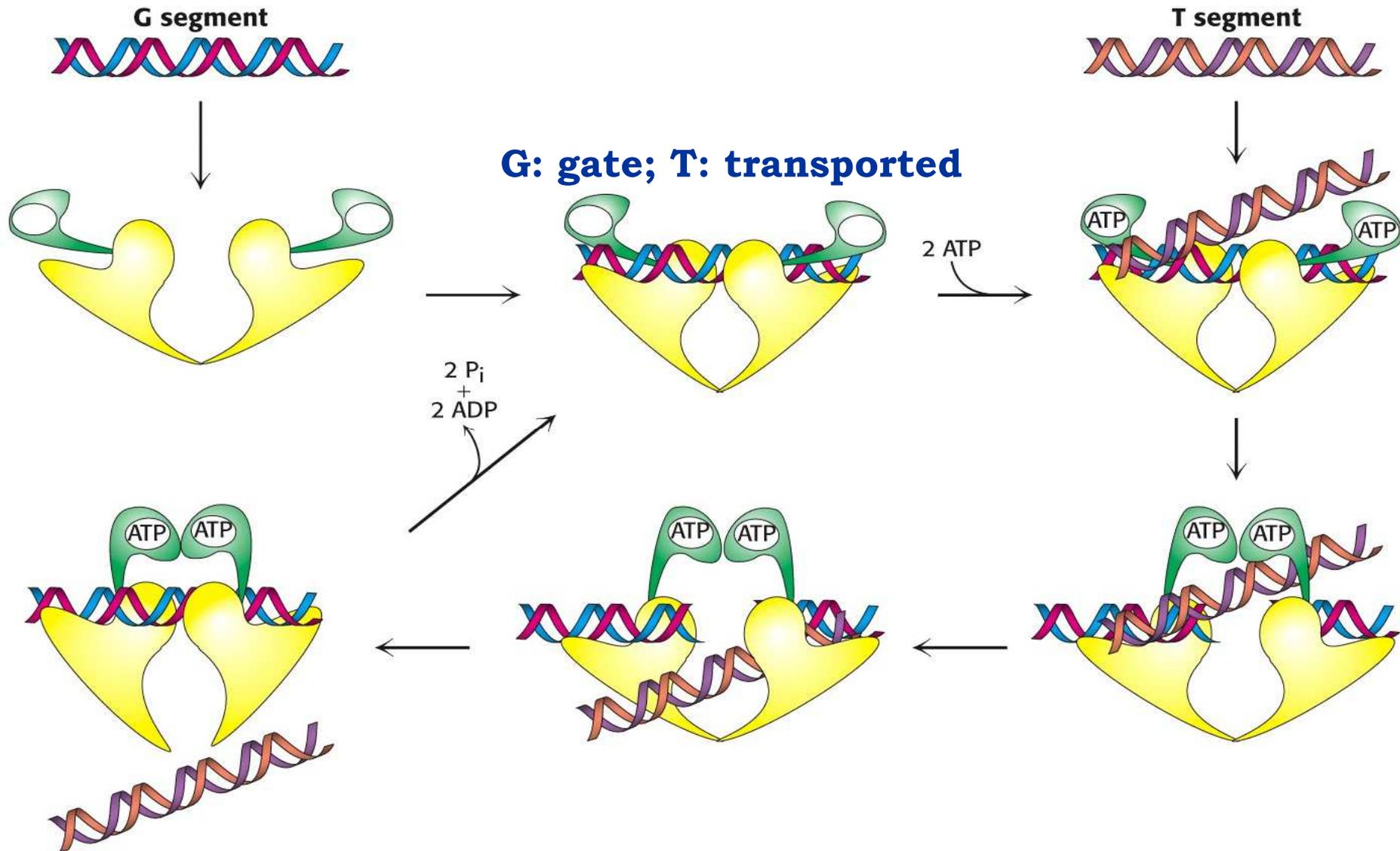


Ciprofloxacina



DNA-topoisomerase – Dna girase

- 1) clivagem reversível da dupla hélice → criam uma “abertura” no DNA
- 2) passam outra dupla-hélice pela abertura
- 3) religa as fitas da abertura



DNA-Primase – RNA-pol DNA-dependente

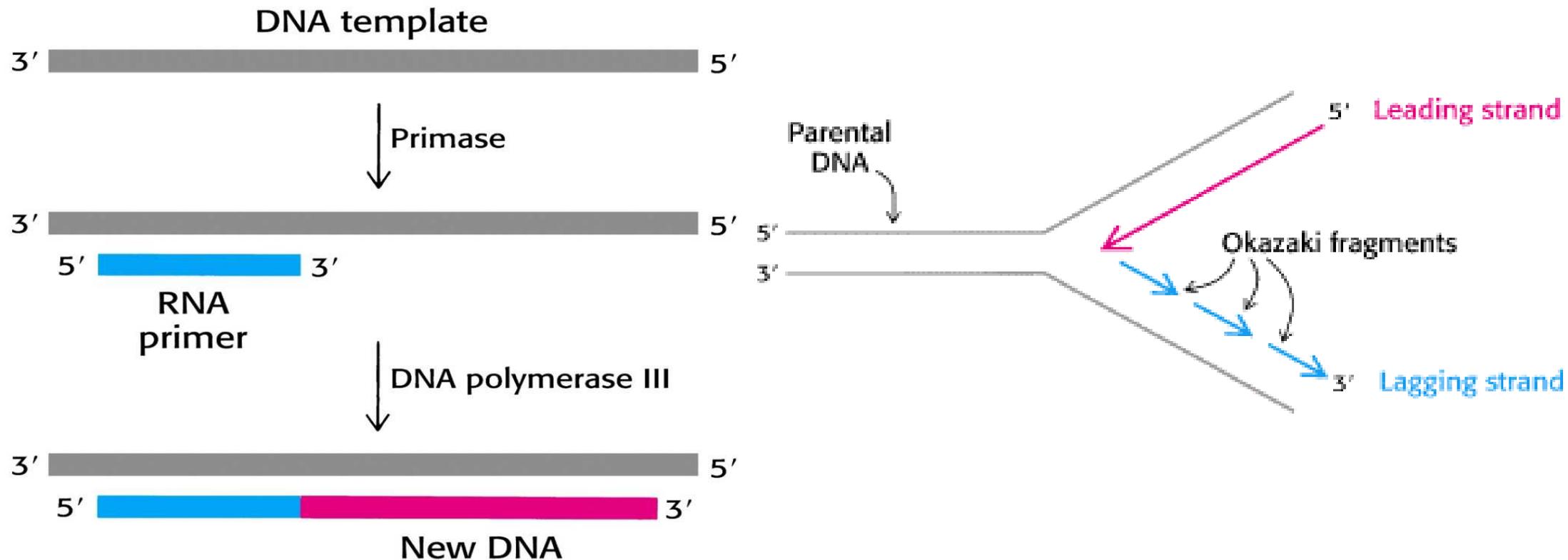
Enzima responsável pela síntese de primers de RNA na forquilha de replicação

- Primers de 10 nucleotídeos necessários → DNAPol não inicia a síntese sem uma OH 3' disponível

→ A replicação da fita descontínua sempre precisa de um novo primer a cada 100-200 bases

- a autocorreção da DNAPol não permite que ela inicie a síntese *de novo* da fita complementar

- preservar mecanismo de autocorreção eficiente

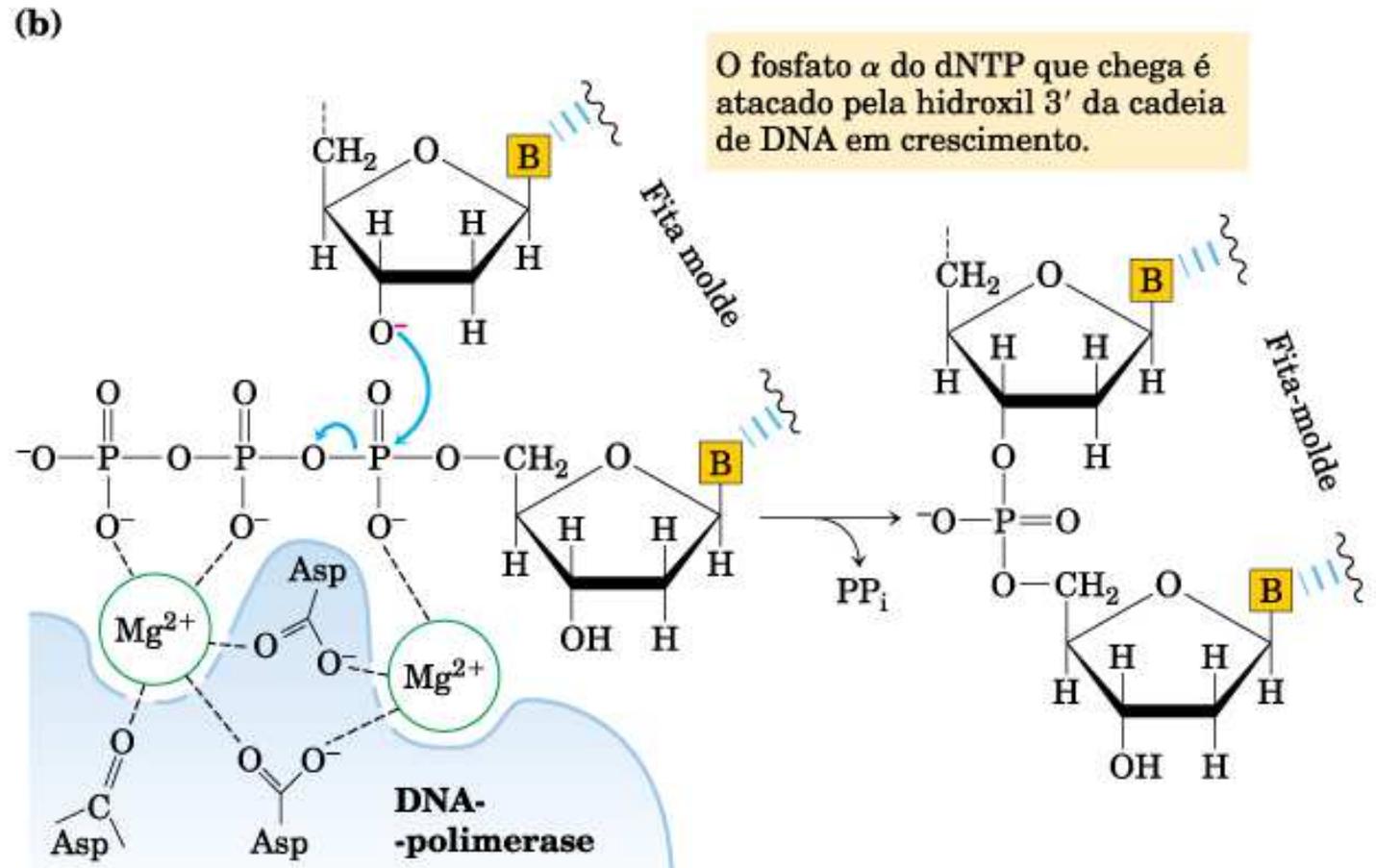
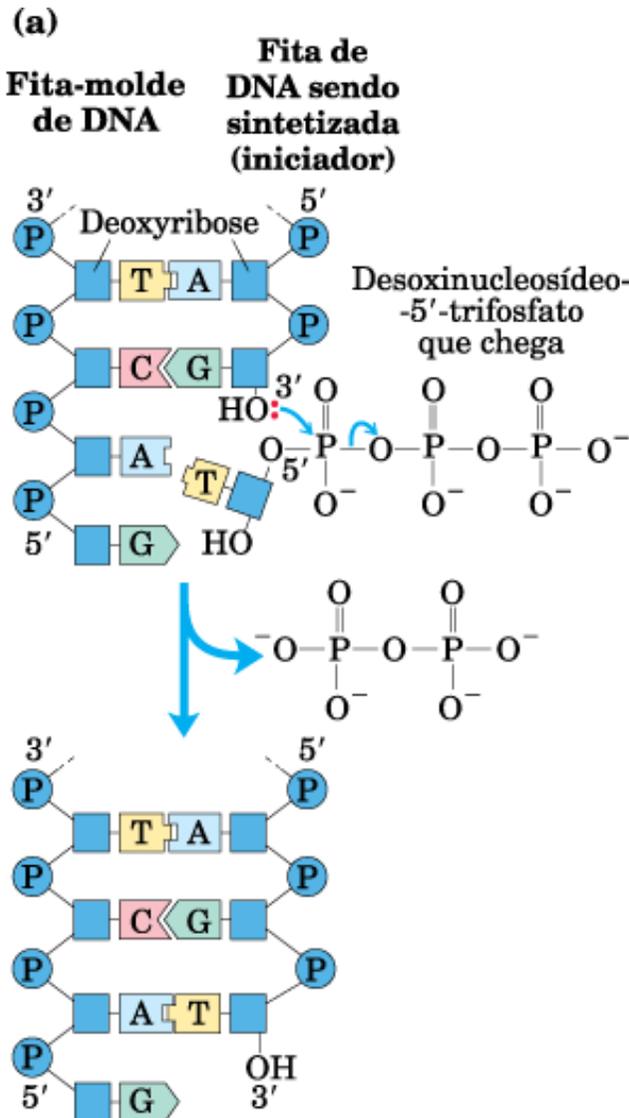


DNA-Polimerases

→ Catalisa o ataque nucleofílico da OH 3' ao Pi alfa do dNTP livre → liberação de pirofosfato → dirige a termodinâmica da reação

→ Cadeias de DNA são alongadas somente no sentido 5'→ 3'

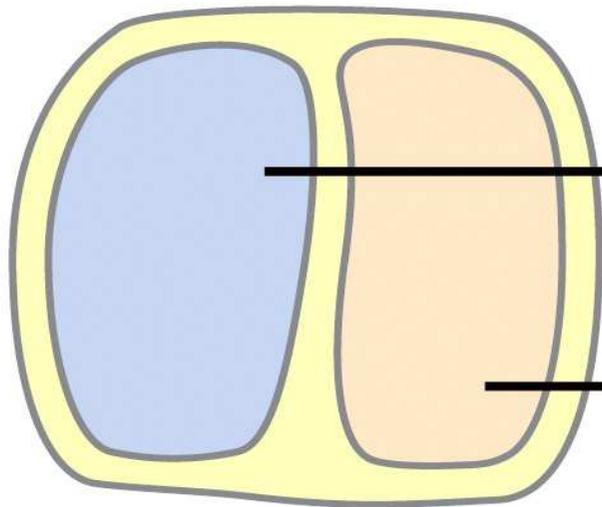
→ Dependente de primers → fornece uma OH 3' confiável para o início da replicação - Reduz erros



- adição contínua de dNTPs livres na extremidade 3' da fita crescente → nucleotídeo livre está ativado

DNA-Polimerases

- Tem atividade 3'→5' exonuclease → mecanismo de autocorreção
- tem atividade 5'→3' exonuclease → remove primers dos fragmentos de Okasaki
- A fidelidade da replicação → 1 erro a cada 1 Bilhão de bases incorporadas
 - maior do que esperado pela precisão do pareamento
 - mecanismos de correção de nucleotídeos mal pareados



DNA polymerase I

**DNA polymerase
active site**

3'→5' (proofreading)

**exonuclease
active site**

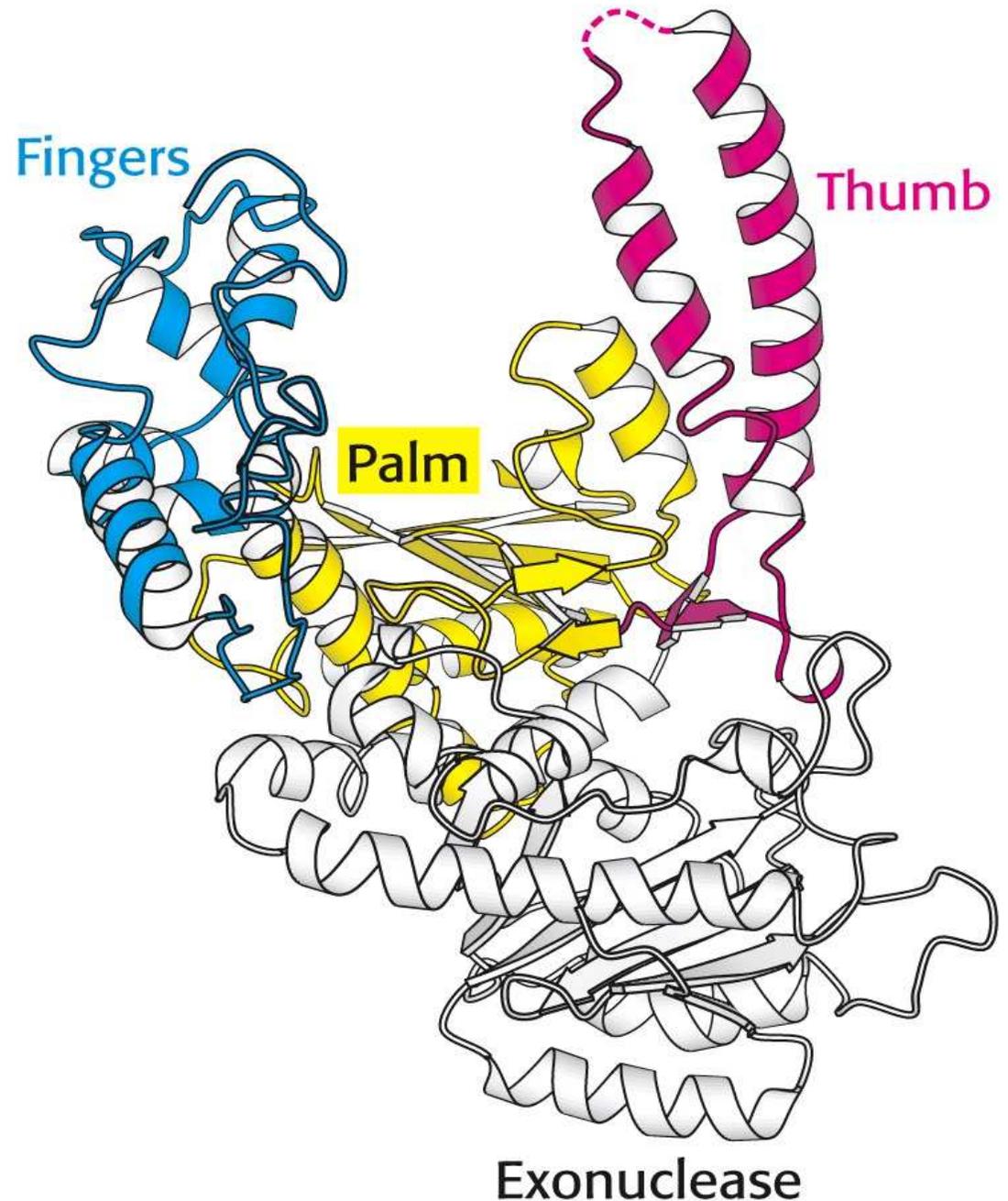
DNA-Polimerase

→ Estrutura de DNA-Pol I

DNA polimerase I
(*E. coli*):

-1957, Arthur Kornberg
-928 resíduos

-DNA liga na 'palma' e mudanças
Conformacionais fazem com que o
'dedão' se feche sobre ele



DNA-Polimerase

1) O pareamento adequado é checado pela DNAPol

- apenas o nucleotídeo correto se liga com alta afinidade ao complexo

DNA-molde-DNAPol

- A DNAPol I verifica a geometria exata do pareamento antes de catalisar a reação

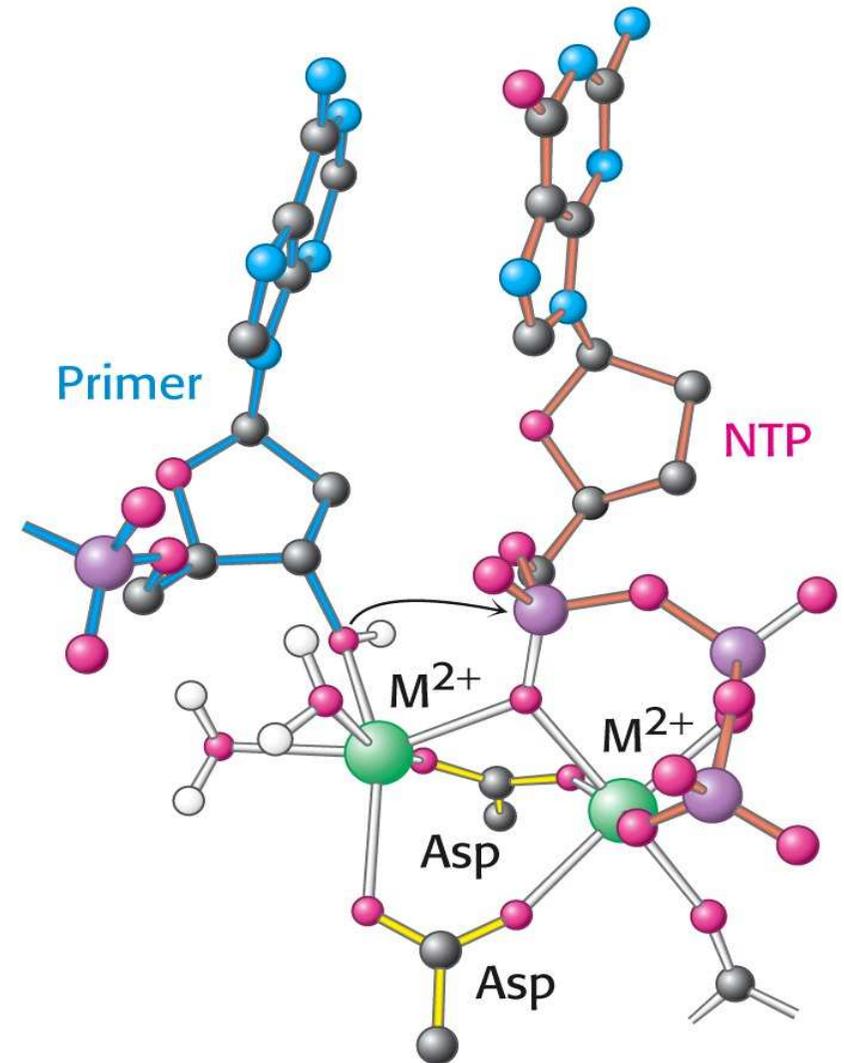
DNA polimerase I:

→ Especificidade requer pareamento
Watson-Crick

→ Envolve dois íons metálicos, usualmente
 Mg^{2+} ;

- Um deles ativa o grupo 3'OH do primer
para o ataque nucleofílico ao grupo fosfato
do dNTP que entra;

- O outro orienta e eletrostaticamente
estabiliza o grupo trifosfato



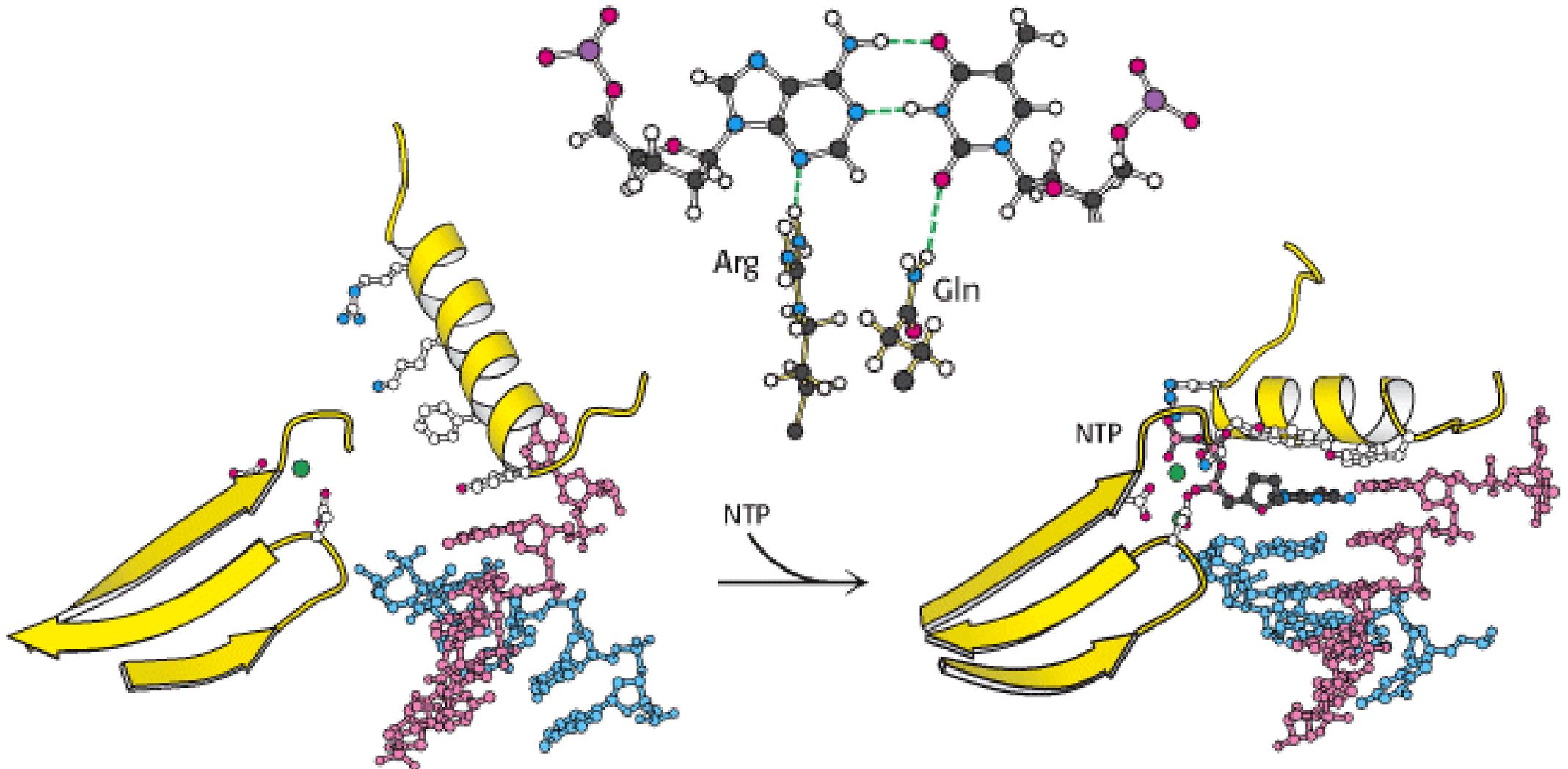
DNA-Polimerase

1) O pareamento adequado é checado pela DNAPol

- apenas o nucleotídeo correto se liga com alta afinidade ao complexo

DNA-molde-DNAPol

- A DNAPol I verifica a geometria exata do pareamento antes de catalisar a reação



DNA-Polimerases

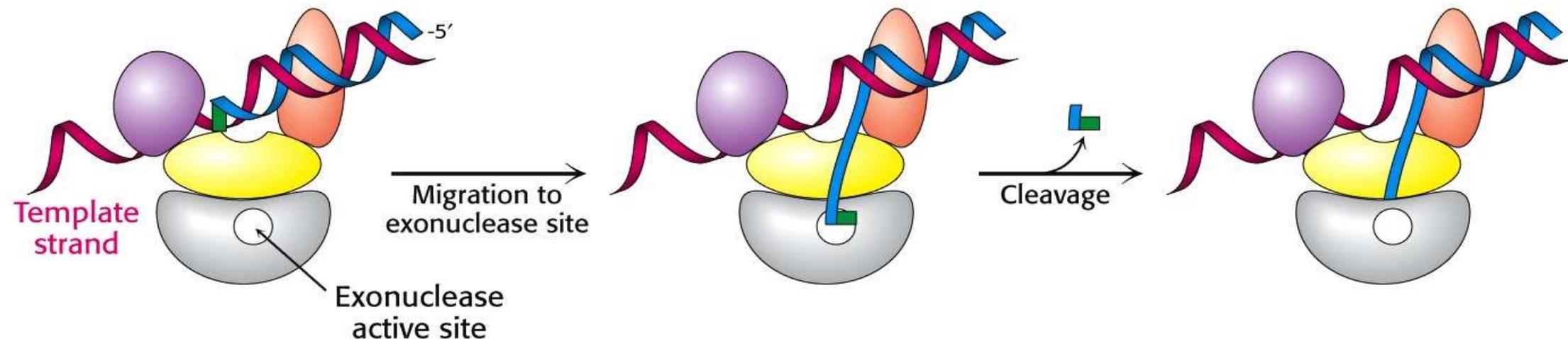
→ Correção exonucleotídica 3'→5'

- Se o nucleotídeo incorreto é adicionado ele pode ser retirado pela ação 3'→5' exonuclease da DNAPol

→ DNAPol é dependente de um primer

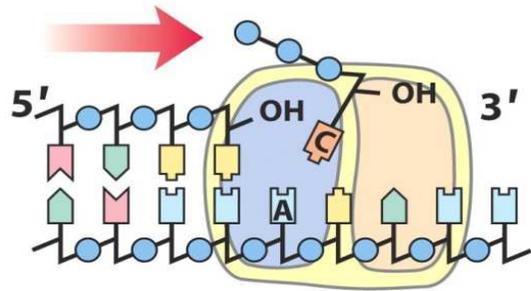
- nucleotídeos mal pareados não fornecem uma boa OH 3' para o ataque nucleofílico da reação

→ DNAPol executa uma ação de “autocorreção”

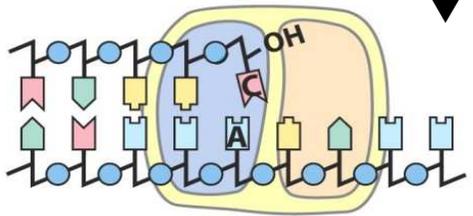


DNA-Polimerases

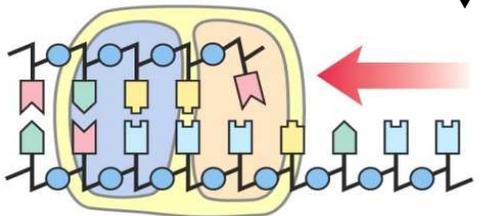
→ Correção exonucleotídica 3'→5'



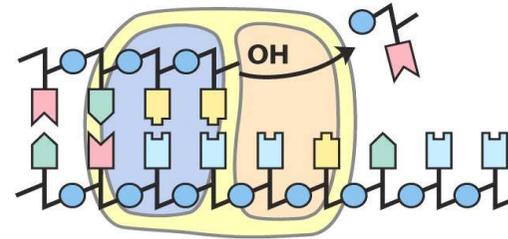
C is a rare tautomeric form of cytosine (C*) that pairs with A and is incorporated into the growing strand.



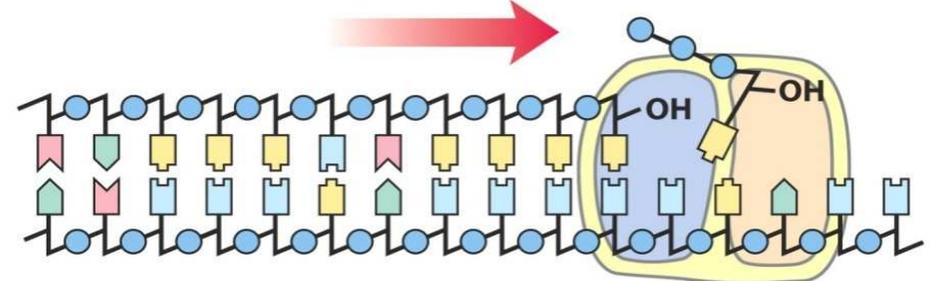
Before the polymerase moves on, the cytosine undergoes a tautomeric shift from C* to C. The new nucleotide is now mispaired.



The mispaired 3'-OH end of the growing strand blocks further elongation. DNA polymerase slides back to position the mispaired base in the 3'→5' exonuclease active site.



The mispaired nucleotide is removed.



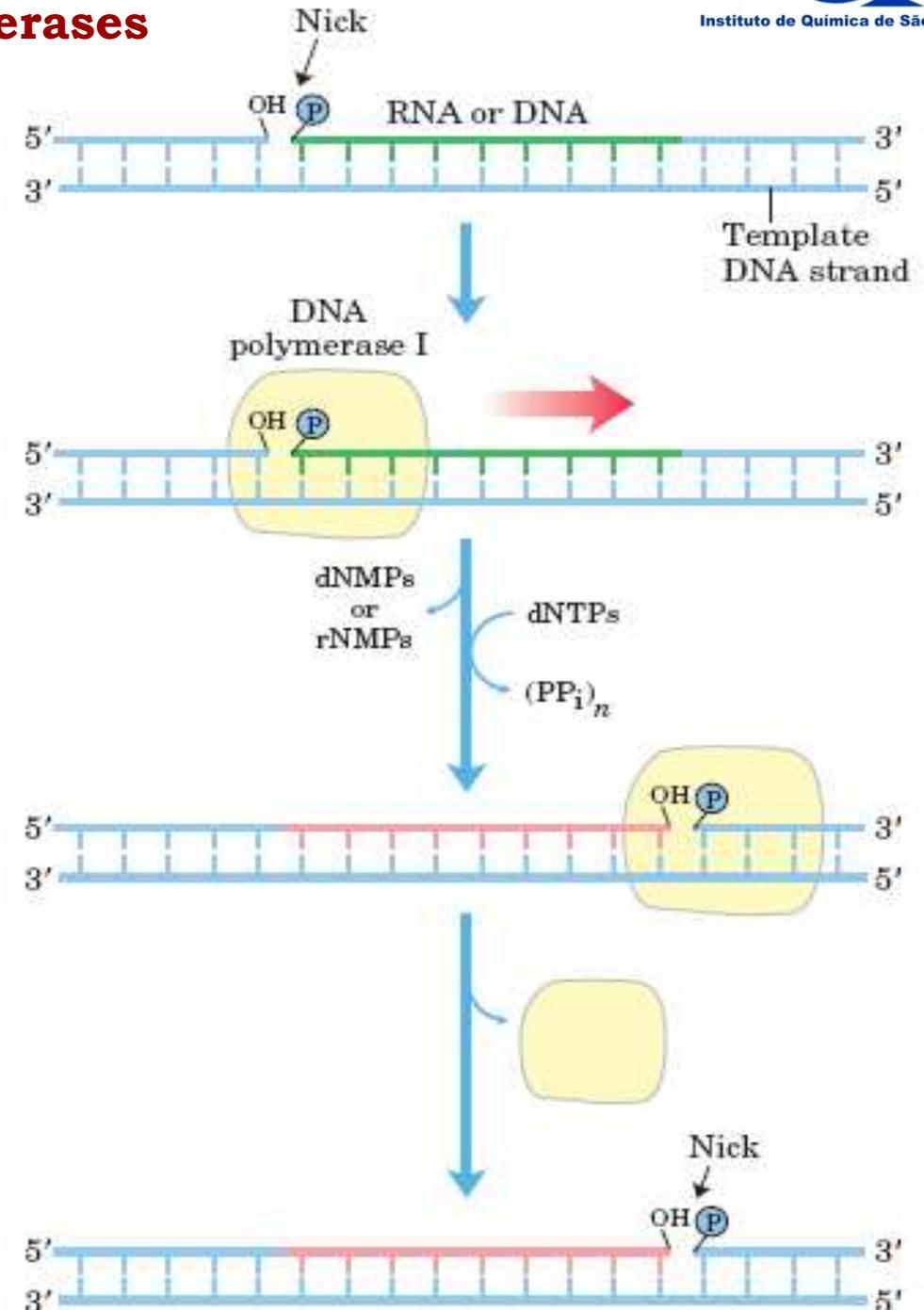
DNA polymerase slides forward and resumes its polymerization activity.

DNA-Polimerases

→ Correção exonucleotídica da DNA-Pol I

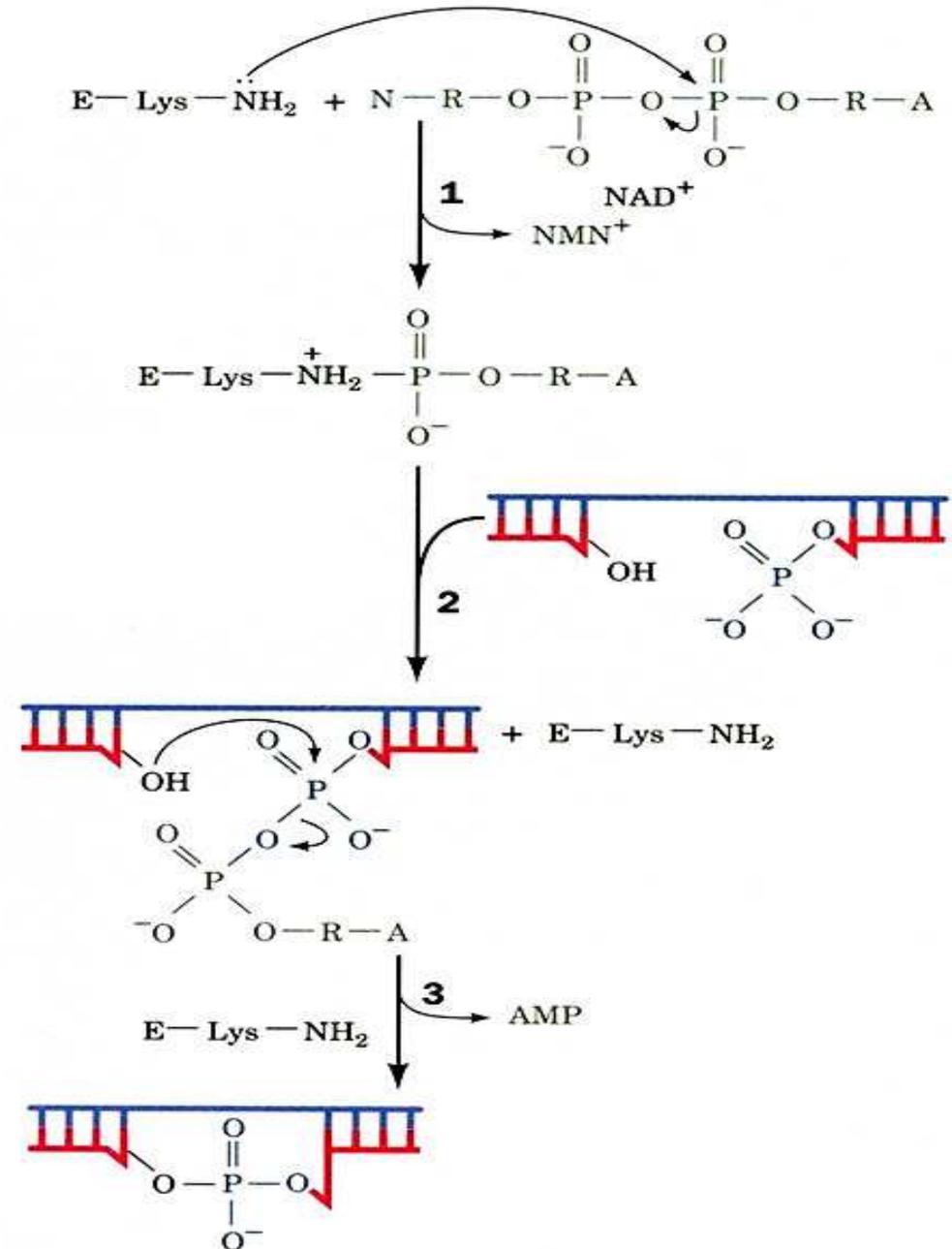
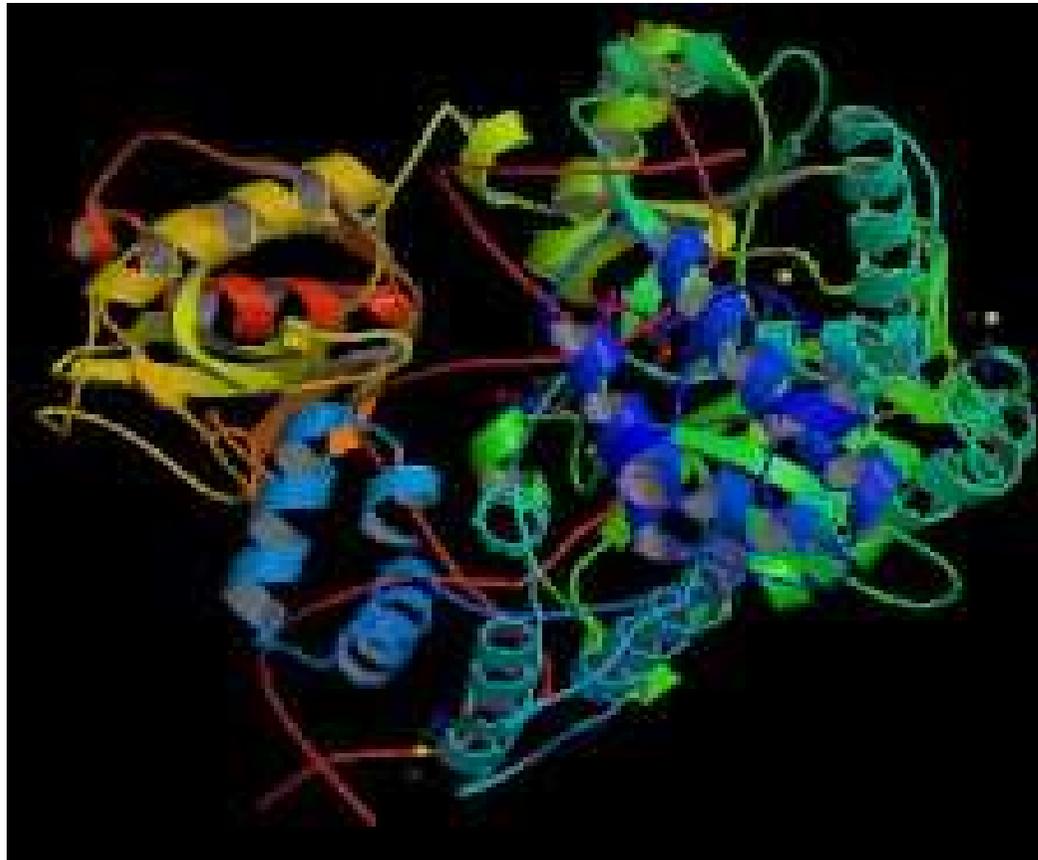
Função 5'→3' exonuclease: atua onde 3'→5' falha, reconhece um nucleotídeo não-pareado e cliva além (até 10 resíduos), simultaneamente completando a polimerização → sistemas de reparo

→ Retira os primers de RNA nos fragmentos de Okazaki e substitui por DNA



DNA ligase: fechar os 'buracos' (nicks) oriundos de fragmentos de Okasaki e reparo

Energia: NAD⁺ a NMN⁺ procariotos;
ATP em eucariotos
- T4 DNA ligase → vírus



DNA-Polimerases

Diferentes tipos de DNA-Pol em *E. coli*

→ DNAPol I: Substitui os fragmentos de Okazaki e trabalha em sistemas de reparo

→ DNAPol II: Trabalha em sistemas de reparo

→ DNAPol III: É a Replicase → alta taxa de polimerização e processividade

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	7	≥10
M_r	103,000	88,000 [†]	791,500
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/s)	16-20	40	250-1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3-200	1,500	≥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 for 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).

DNA-Polimerases III

DNA-Pol III

- Possui alta processividade → é a replicase
- complexo multienzimático
- sem atividade 5' → 3' exonuclease

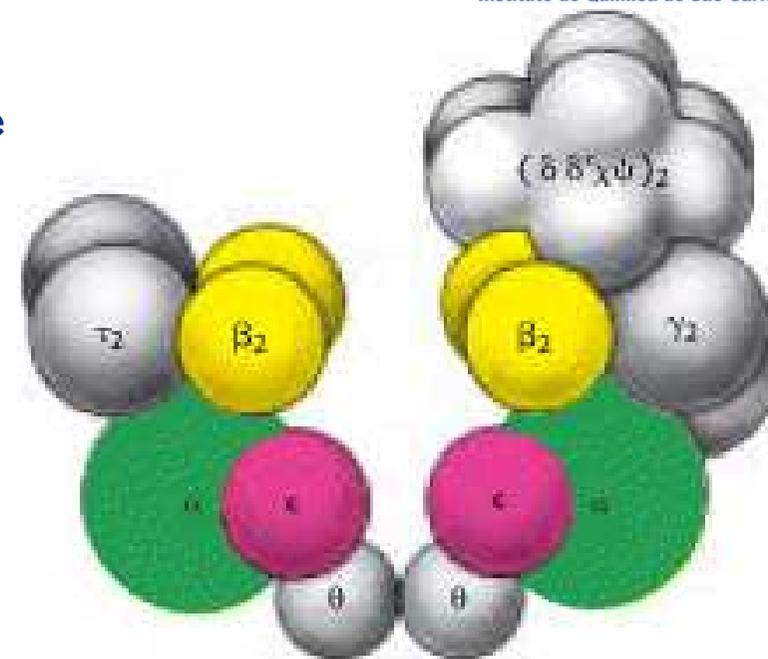


TABLE 25-2 Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

Subunit	Number of subunits per holoenzyme	M_r of subunit	Gene	Function of subunit	
α	2	129,900	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity	} Core polymerase
ϵ	2	27,500	<i>dnaQ (mutD)</i>	3' → 5' Proofreading exonuclease	
θ	2	8,600	<i>holE</i>		
τ	2	71,100	<i>dnaX</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization	} Clamp-loading (γ) complex that loads β subunits on lagging strand at each Okazaki fragment
γ	1	47,500	<i>dnaX*</i>	Clamp loader	
δ	1	38,700	<i>holA</i>	Clamp opener	
δ'	1	36,900	<i>holB</i>	Clamp loader	
χ	1	16,600	<i>holC</i>	Interaction with SSB	
ψ	1	15,200	<i>holD</i>	Interaction with γ and χ	
β	4	40,600	<i>dnaN</i>	DNA clamp required for optimal processivity	

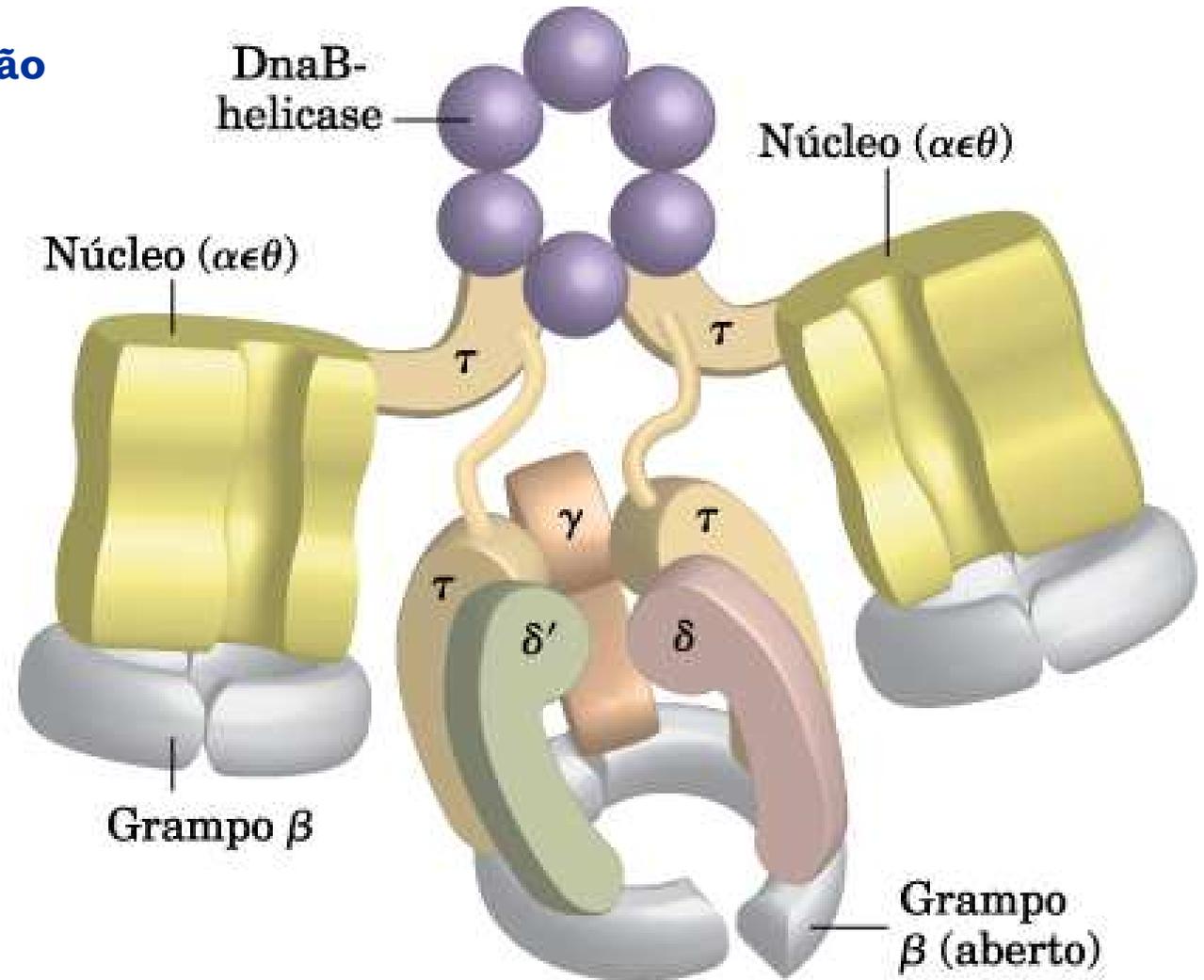
*The γ subunit is encoded by a portion of the gene for the τ subunit, such that the amino-terminal 66% of the τ subunit has the same amino acid sequence as the γ subunit. The γ subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (see Box 27-1) that leads to premature translational termination.

DNA-Polimerases III

DNA-Pol III

O complexo multienzimático

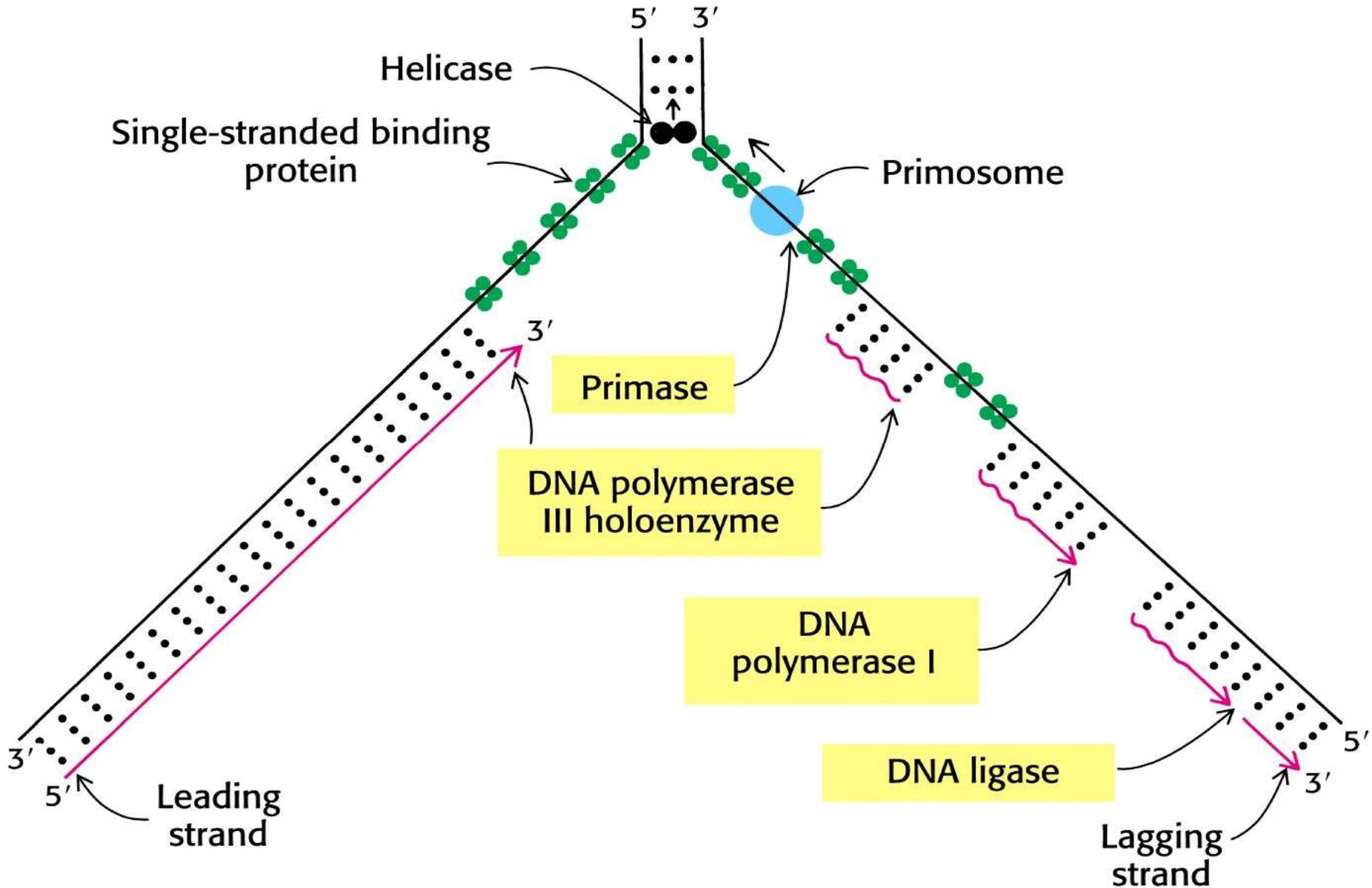
- A síntese de DNA funciona pela ação conjunta das diversas proteínas
- Formação da alça de replicação



- Em bactérias → primossomo
- Força propulsora do complexo → hidrólise de ATP

Replicação do DNA

Complexo multi-enzimático na forquilha de replicação



DNA-Polimerase III

→ Cinta deslizante

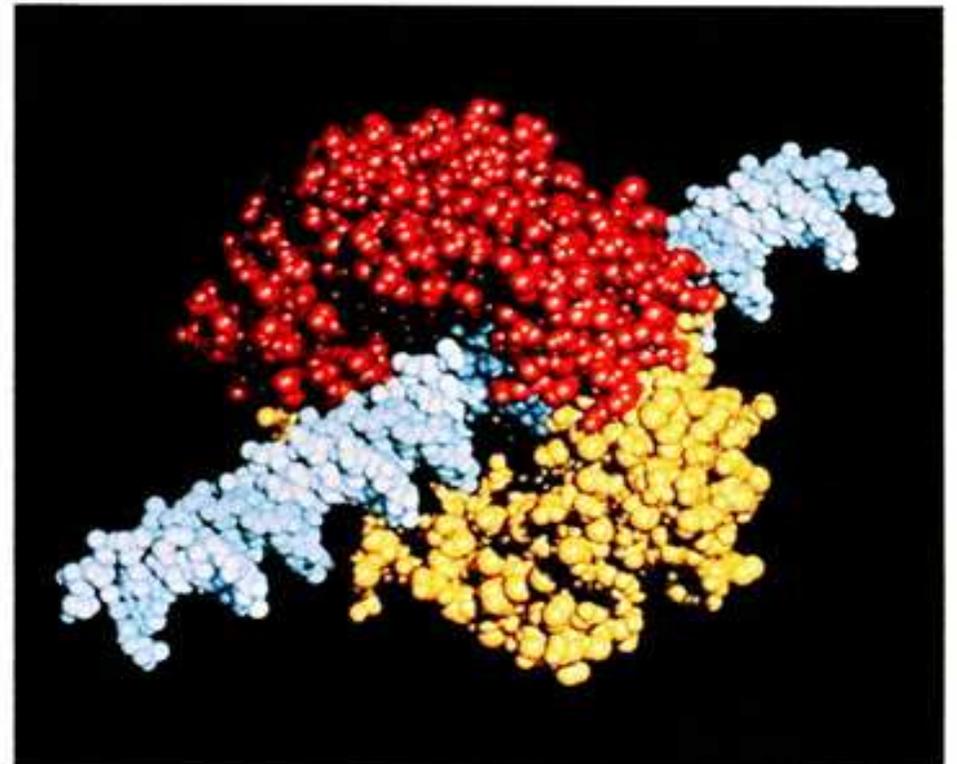
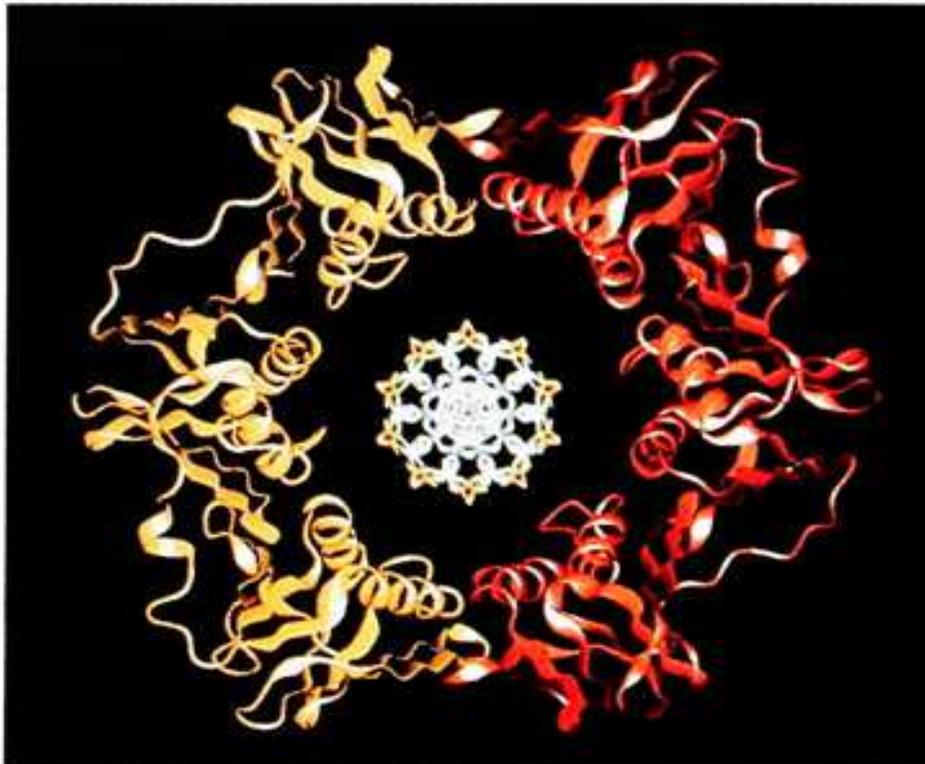
→ A DNAPol III por si só apresenta baixa afinidade pela fita simples e é capaz de sintetizar apenas pequenos trechos

→ Uma proteína móvel age como uma cinta reguladora que “prende” a DNAPol na fita de DNA molde

- aumenta a eficiência da polimerização

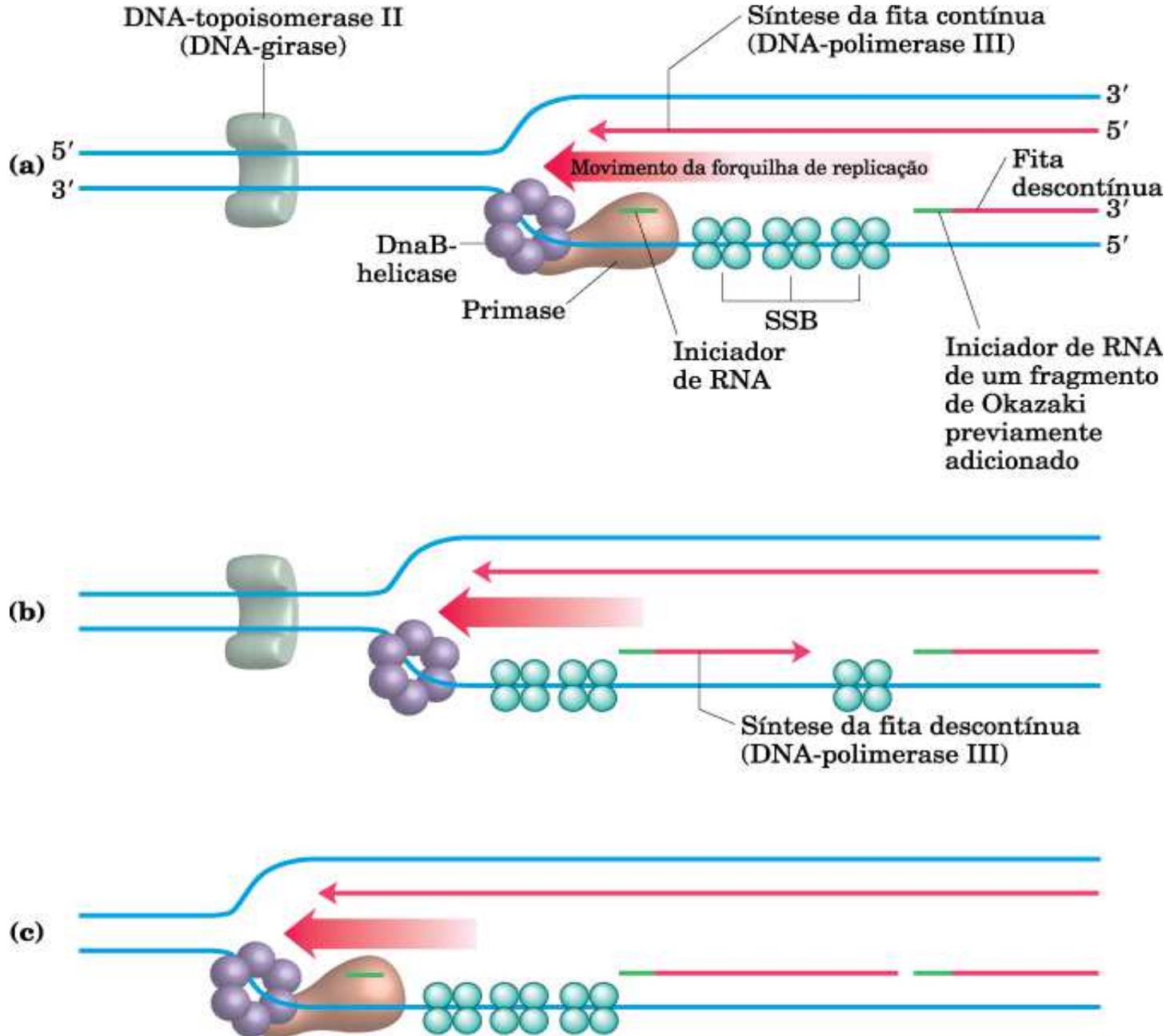
- libera a DNAPol quando encontra DNA fita dupla

→ Subunidade beta (dímero) forma um anel em torno no DNA



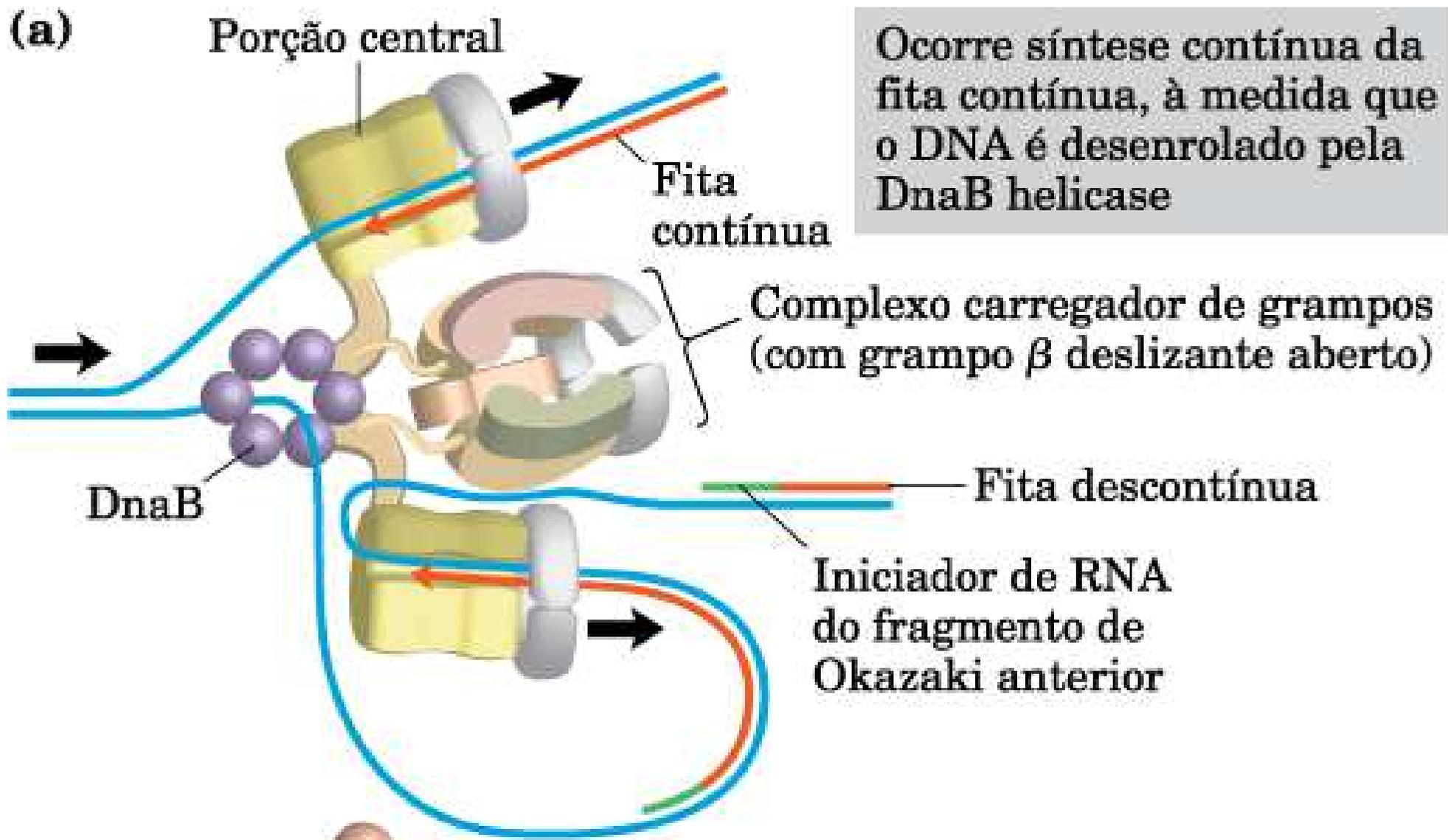
Replicação do DNA

Complexo multi-enzimático na forquilha de replicação



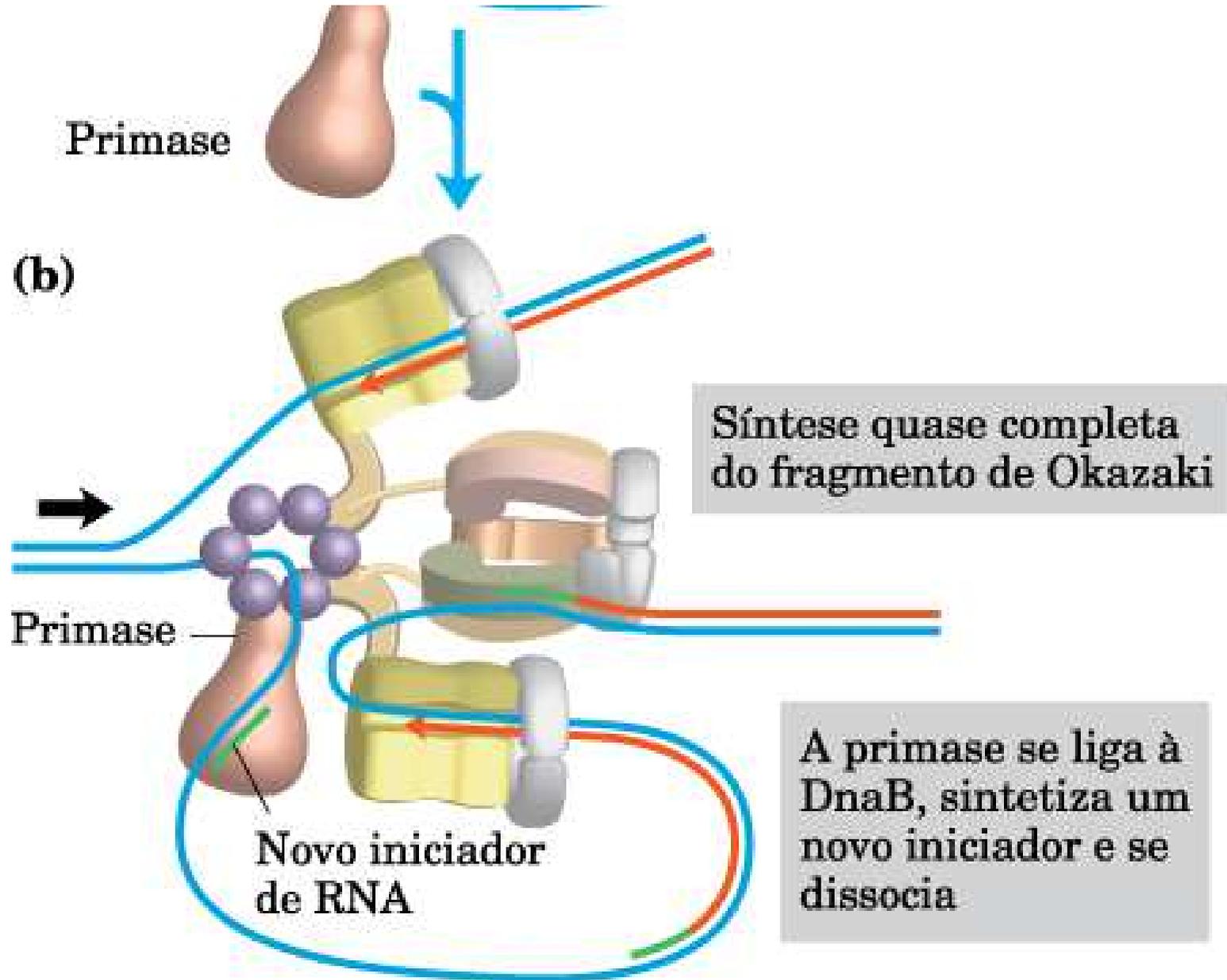
Replicação do DNA

DNA-Pol III



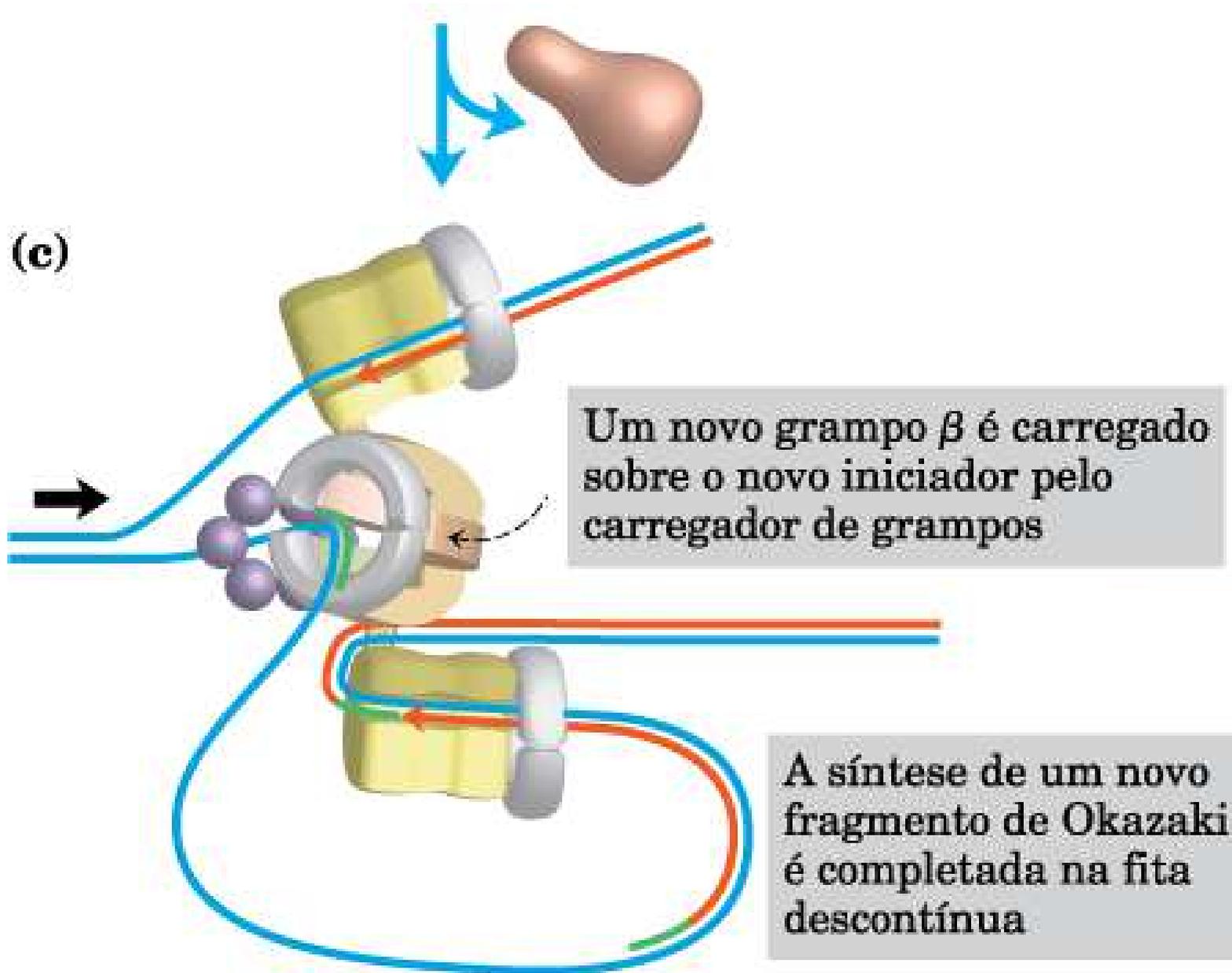
Replicação do DNA

DNA-Pol III



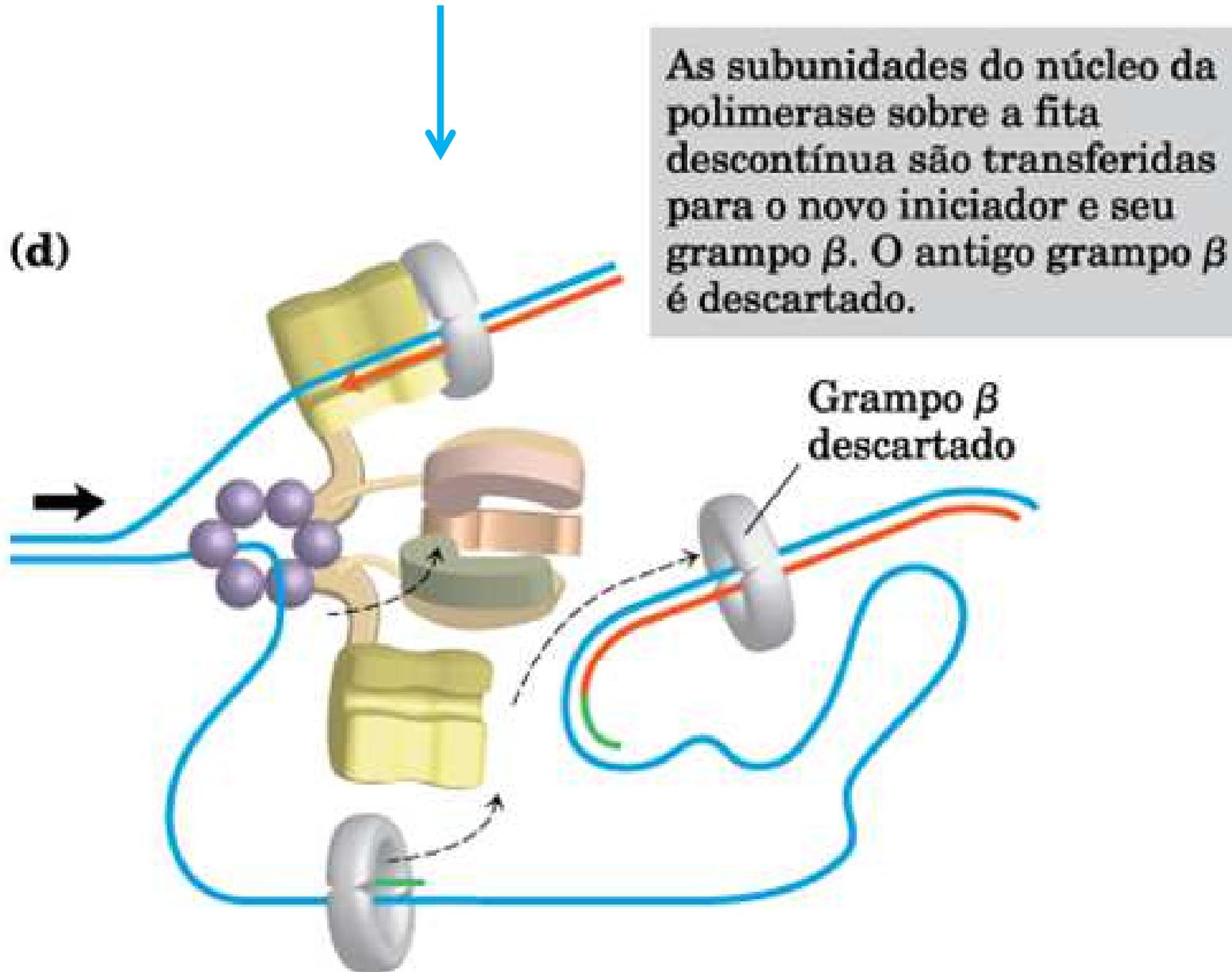
Replicação do DNA

DNA-Pol III



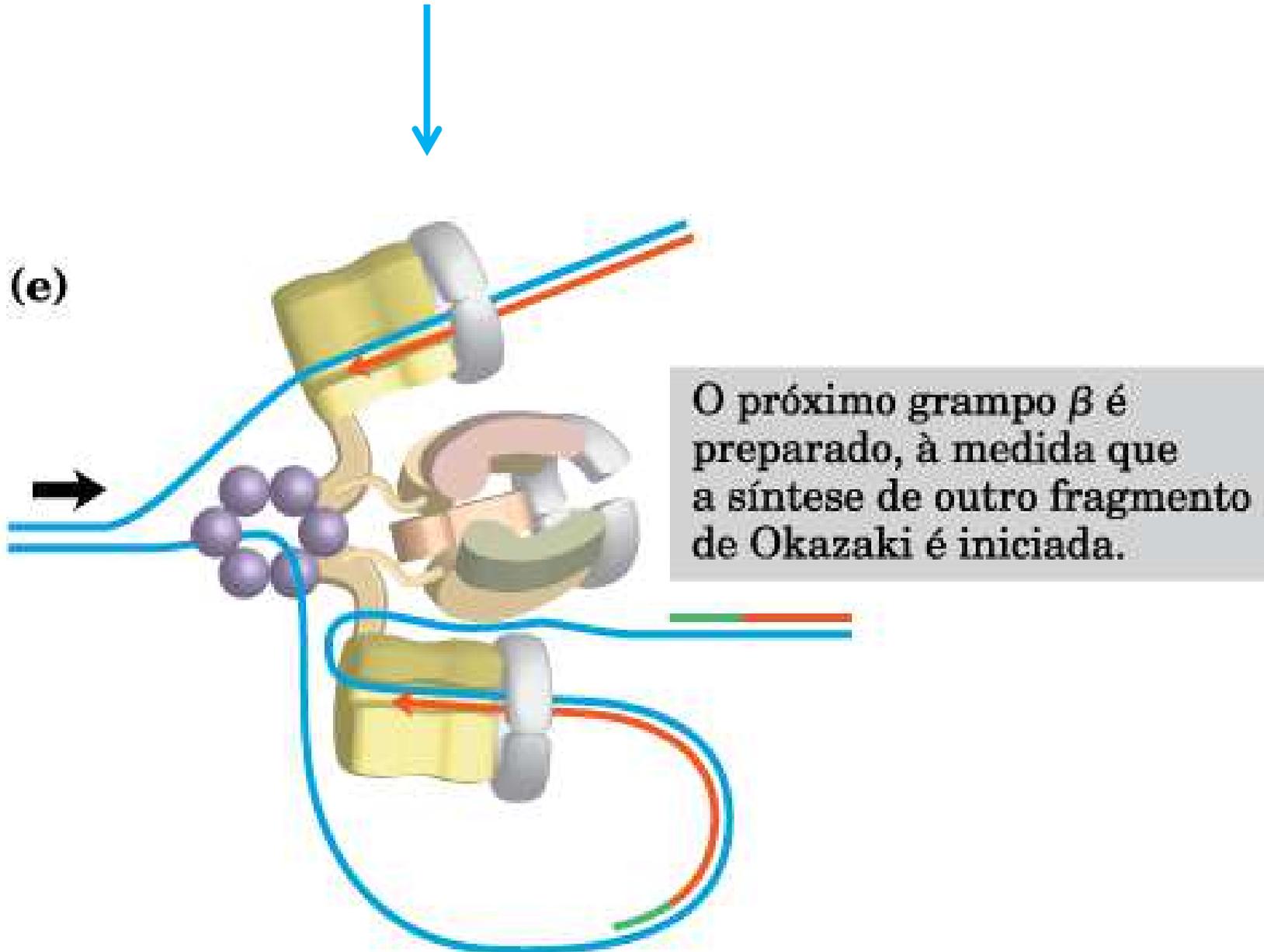
Replicação do DNA

DNA-Pol III

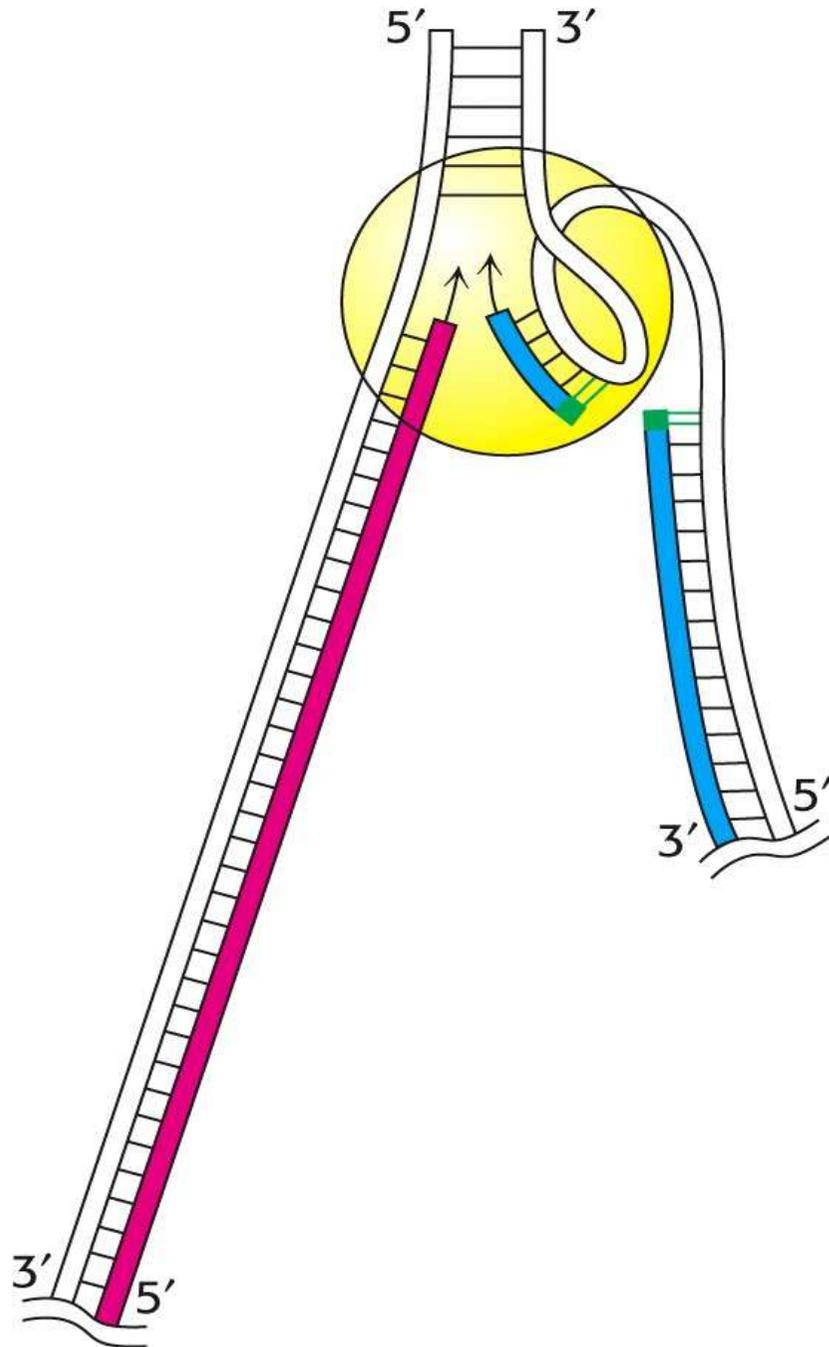


Replicação do DNA

DNA-Pol III



Fidelidade da Replicação



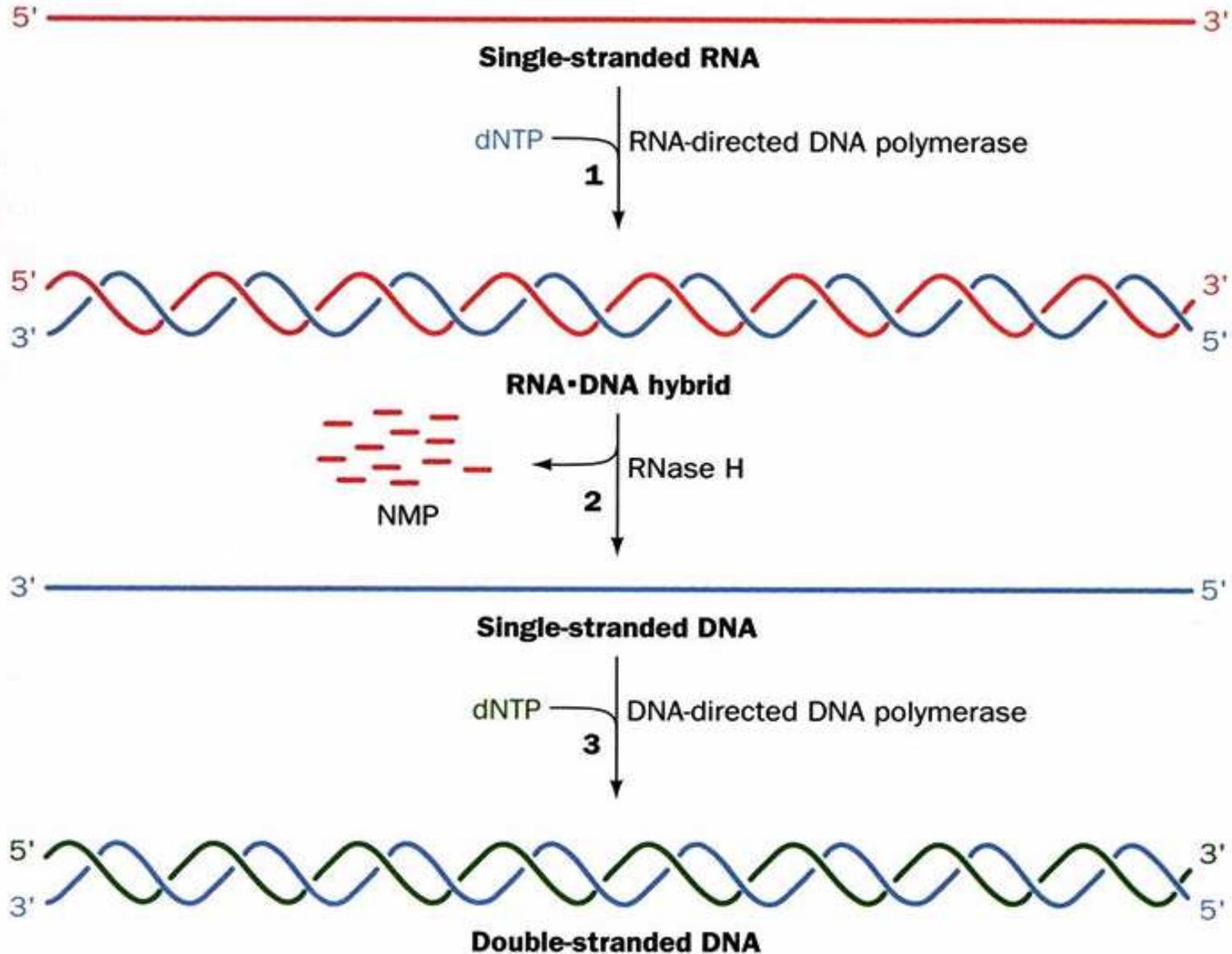
Vários fatores influentes

- 1) Níveis de dNTPs balanceado
- 2) DNAPol
- 3) Ação exonuclease
- 4) Várias enzimas
- 5) Início por primer (chance de pareamento errado no início é maior)
- 6) Presença do co-fator Mg^{2+}

Transcriptase Reversa

→ Vírus de RNA

→ Aplicações na Tecnologia do DNA Recombinante



Evolução Molecular

**→ O DNA não é tão inerte quanto parece.
- Sofre modificações**

→ A fidelidade do processo de replicação do DNA realizada pelas DNA-pol e suas funções de correção de leitura são essenciais para a transmissão e estabilidade da informação genética durante a divisão celular.

→ Existem sistemas de reparo e controle de qualidade para manter a estabilidade de um genoma proporcionando ao mesmo tempo sua evolução

→ A evolução ocorre em saltos → pequenas mutações no DNA → grandes passos evolucionários

→ A evolução depende, principalmente, de acidentes e erros

- Falhas nos mecanismos de replicação e de reparo dos genomas

- Falhas na replicação, recombinação ou no reparo de DNA podem ocasionar diversos tipos de alterações

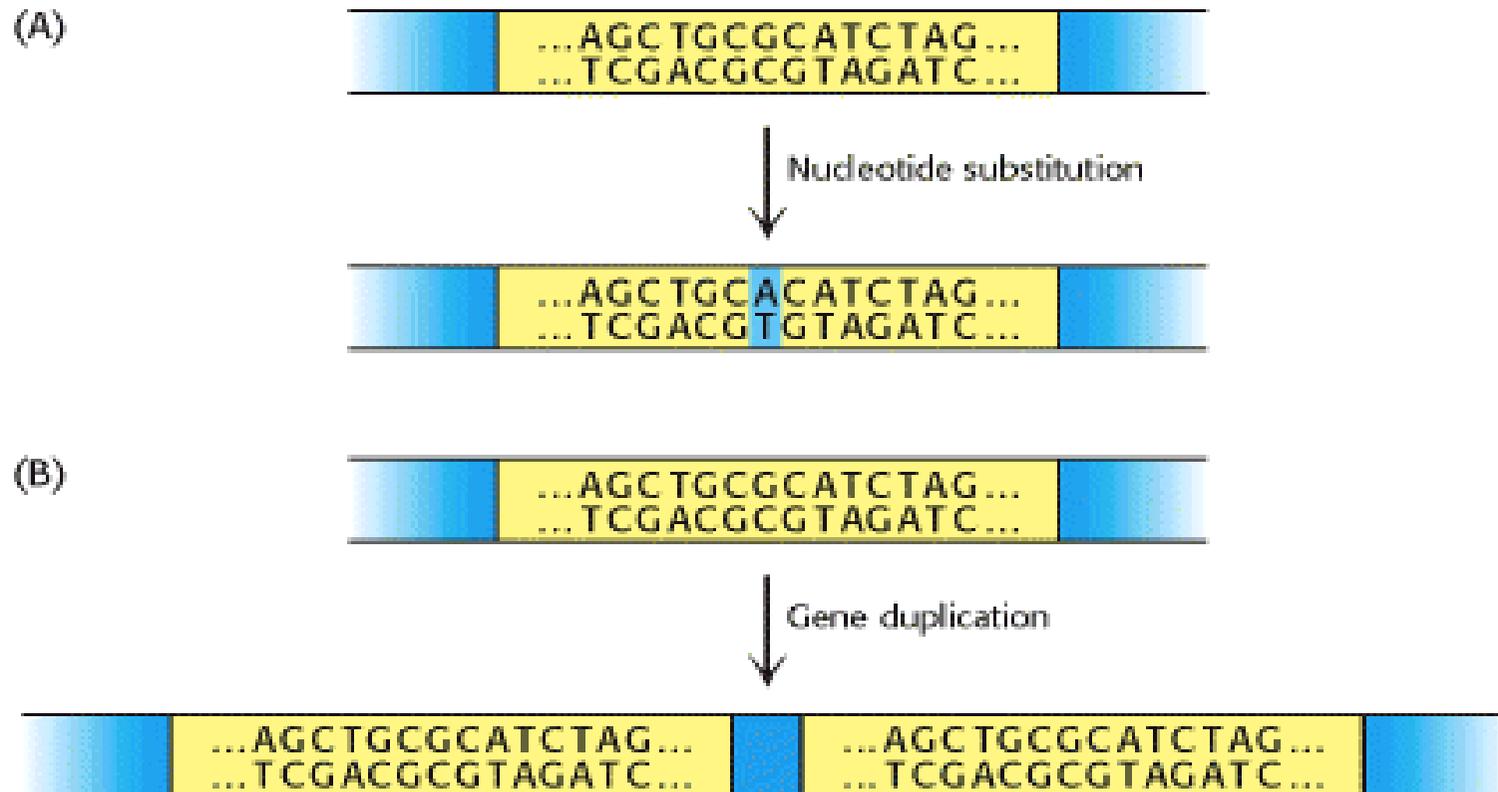
Evolução Molecular

→ Tipos de falhas

- Falhas simples → substituição, inserção ou deleção de um par de bases

- Falhas com rearranjos genômicos → deleções, duplicações, inversões e translocações de seqüências

- As taxas de erros estão em equilíbrio aceitável entre estabilidade e alterações.



Danos ao DNA

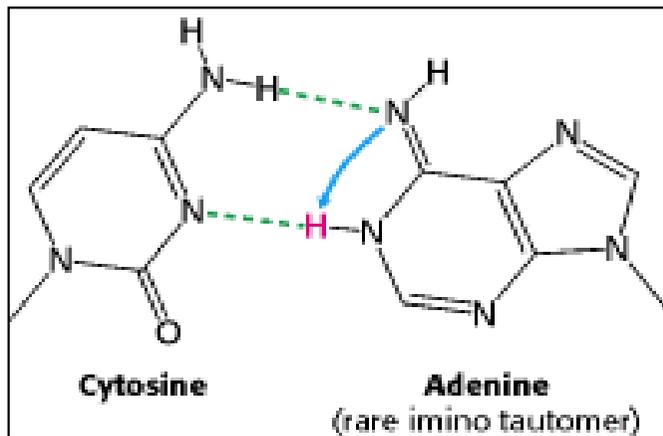
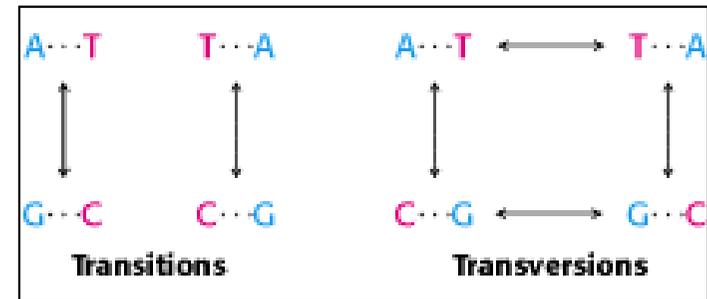
→ Causas de danos ao DNA:

- 1) Meio reativo celular;
- 2) Substâncias tóxicas;
- 3) Danos por radiação-UV;
- 4) Radiação ionizante;
- 5) Erros na polimerização que não são corrigidos pela maquinaria;

→ Mutações de ponto (+ Comuns) → troca de bases → podem ser silenciosas ou semiconservativas

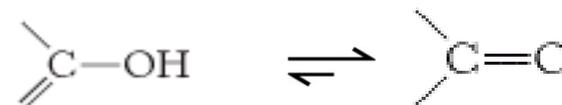
→ Tipo transições (A↔G ou C↔T)

→ Tipo transversões (Purinas por pirimidinas)



→ Os nucleotídeos formam tautômeros que permitem pareamentos não Watson-Crick

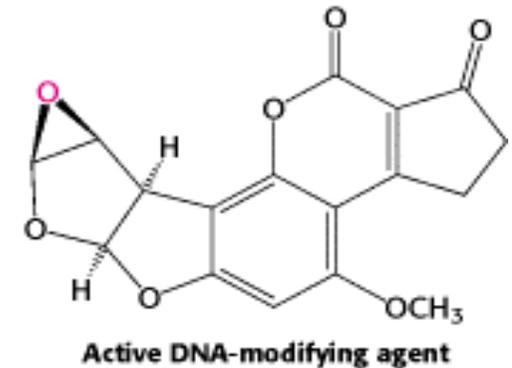
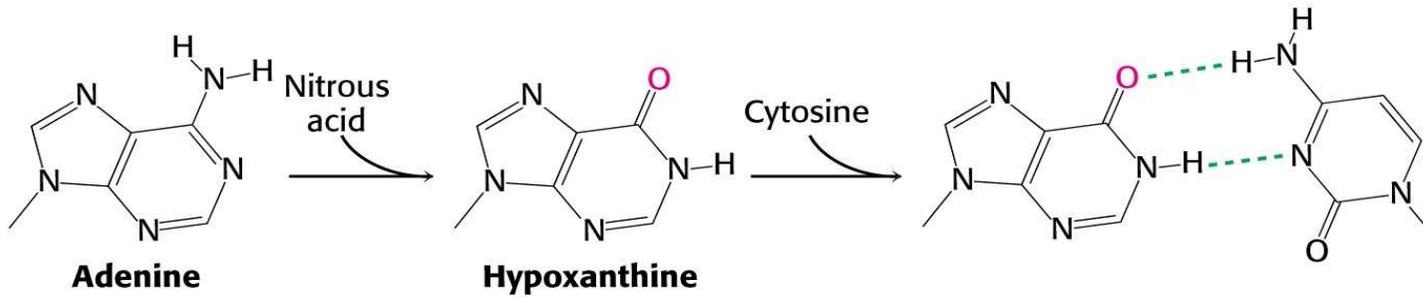
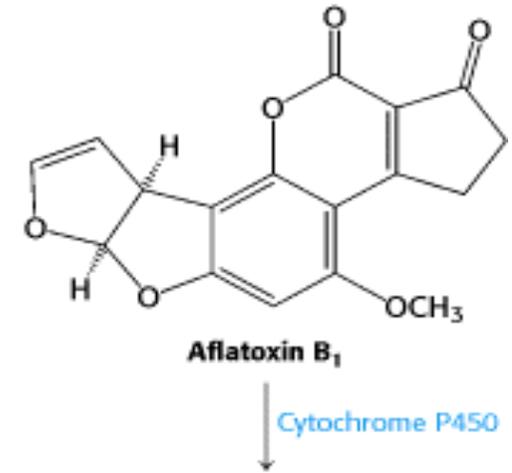
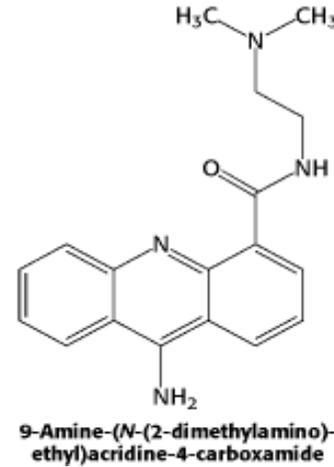
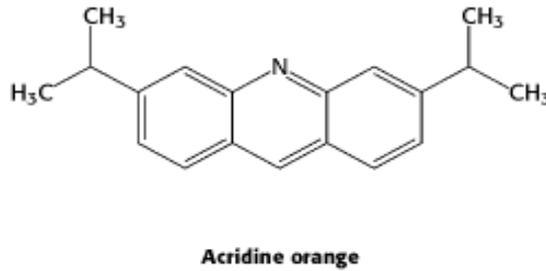
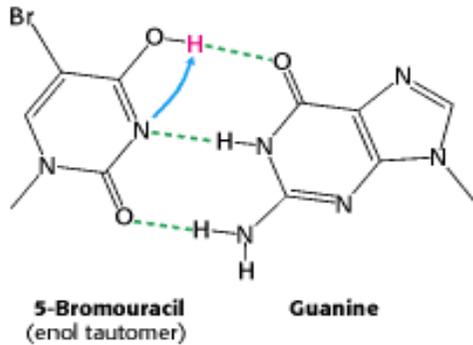
- Taxa do tautômero 1.10^{-4}



→ Mutações de inserções/deleções → mudam a fase de leitura

Danos ao DNA

→ Mutágenos



→ Carcinógenos

- danificam diretamente o DNA ou indiretamente por interferir no sistema de reparo

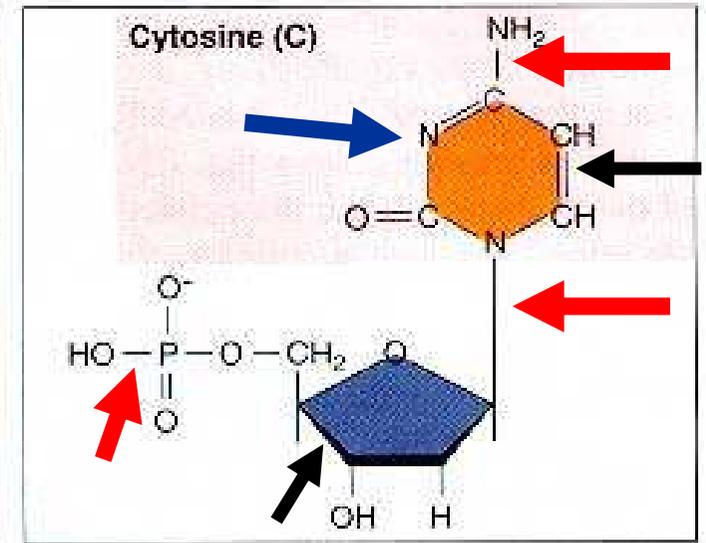
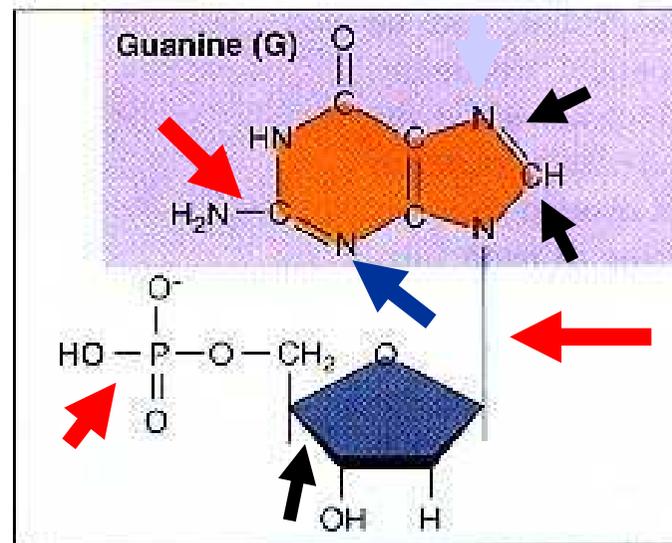
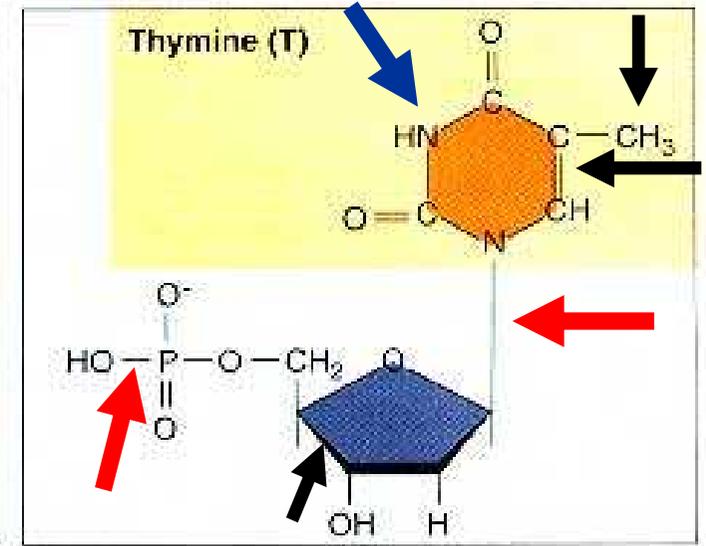
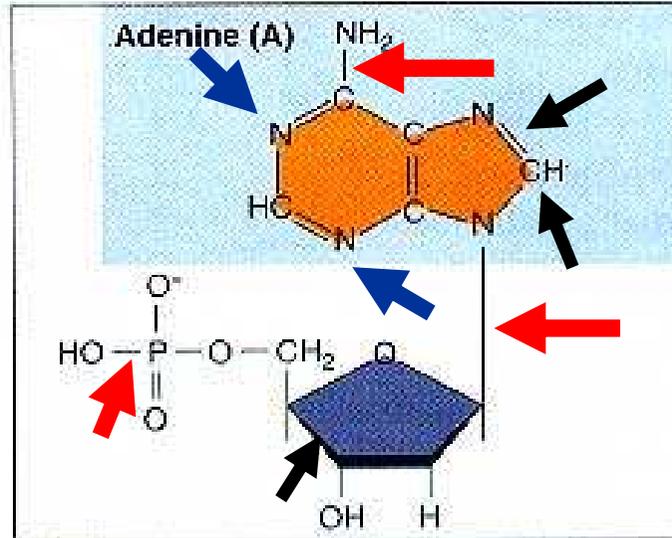
→ Progressão do dano depende da linhagem celular

- Em linhagens germinativas → alterações hereditárias na progêne
- Em linhagens somáticas → perda de função, apoptose, câncer.

Danos ao DNA

Tipos e sítios de danos químicos aos nucleotídeos:

 **Ataque oxidativo**
 **Hidrólise espontânea**

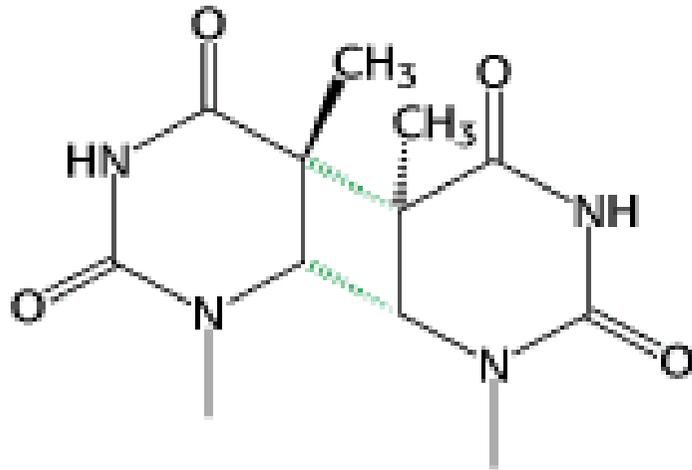


 **Metilação não-enzimática por S-adenosil Met**

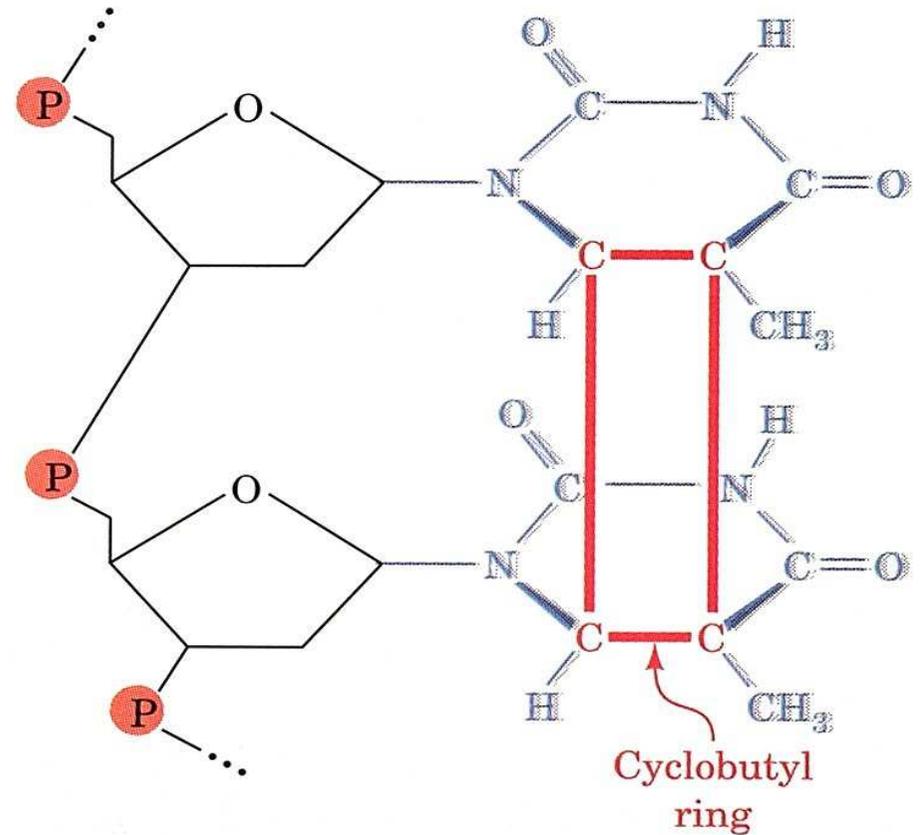
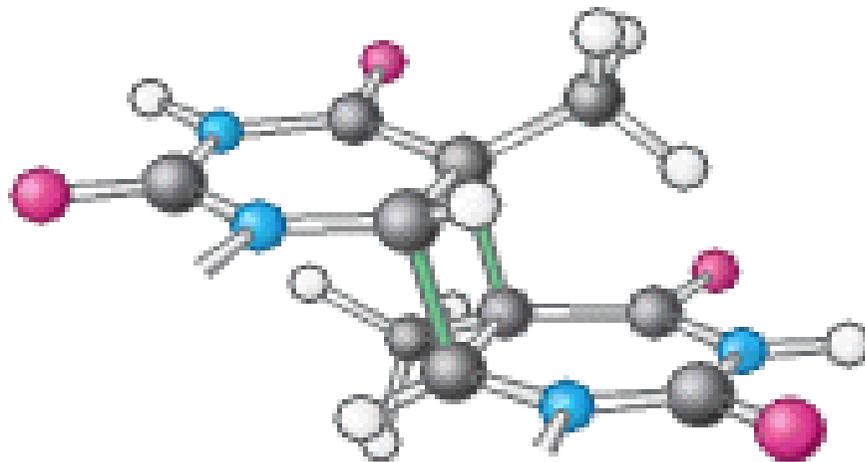
Danos ao DNA

Radiação UV (200-300nm)

→ Dímero de Pirimidina (T/C) causa distorção na dupla-hélice que bloqueia a transcrição e a replicação



Thymine dimer



Mecanismos de Reparo do DNA

- **Reparo é importante para manter integridade da informação (celular e/ou herdada)**
- **Taxa de mutações aumentam quando um mecanismo de reparo é desativado → Doenças humanas – cânceres**
- **Apenas 1 em 1.10^{10} eventos de danos ao DNA não é evitado → os mecanismos de reparo são eficientes**
- **Grande variedade de mecanismos sugere a sua importância → investimento celular é alto → proporcional à importância do processo**
- **O DNA possui cópia para o reparo imediato → dupla hélice → a fita complementar é o molde para o reparo**
- **Vírus de DNA simples e RNA são mais susceptíveis à mutações → sucesso evolutivo pela quantidade e adaptabilidade**

Mecanismos de Reparo do DNA

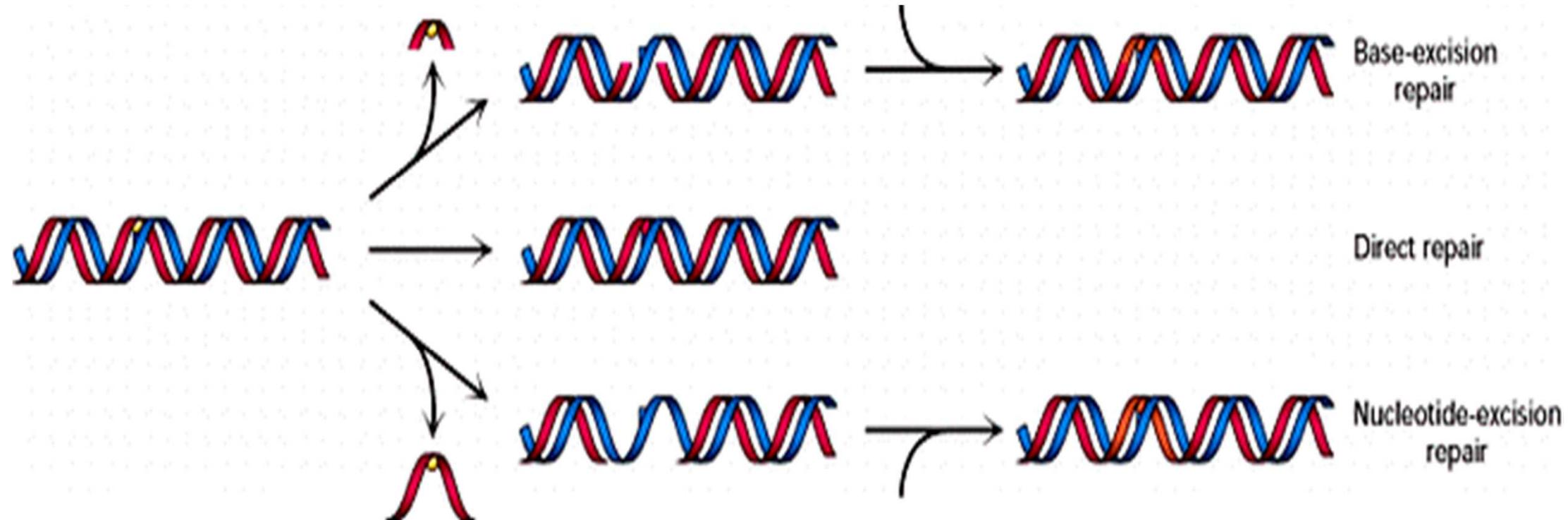
Tipos de Vias de Reparo

1) Reparo por Remoção de Bases

2) Reparo Direto

- DNA fotoliasas revertem a dimerização de Timinas

3) Reparo por Remoção do Nucleotídeo



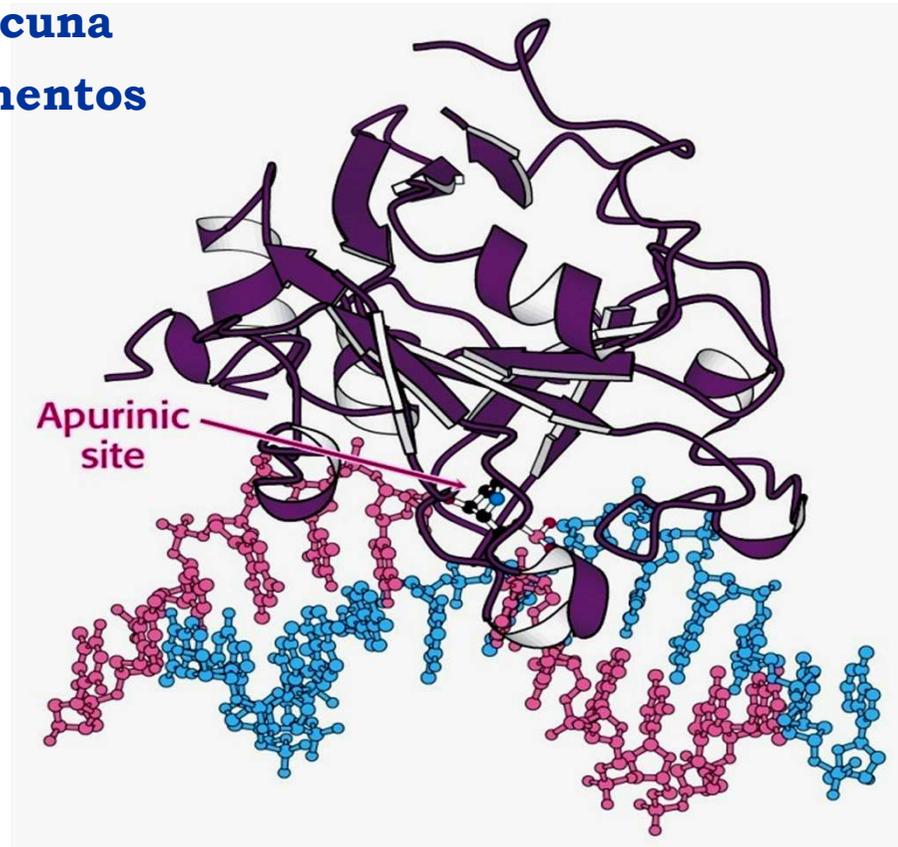
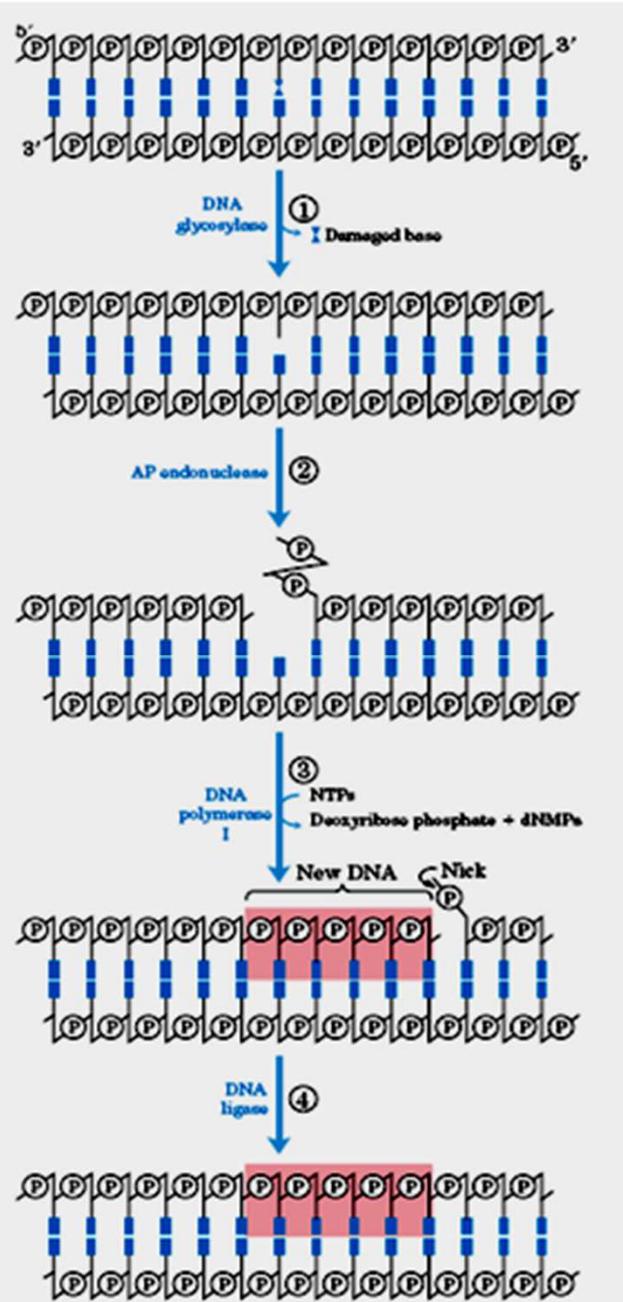
Mecanismos de Reparo do DNA

Tipos de Vias de Reparo

1) Reparo por Remoção de Bases

→ Glicosidases reconhece uma base danificada e a extirpa da dupla-hélice clivando a ligação glicosídica

- Gera um ponto AP (Apurínico ou apirimídico)
- Endonuclease AP reconhece este sítio e cliva a fosfodeoxiribose
- A DNA-pol I preenche a lacuna
- DNA-ligase funde os fragmentos

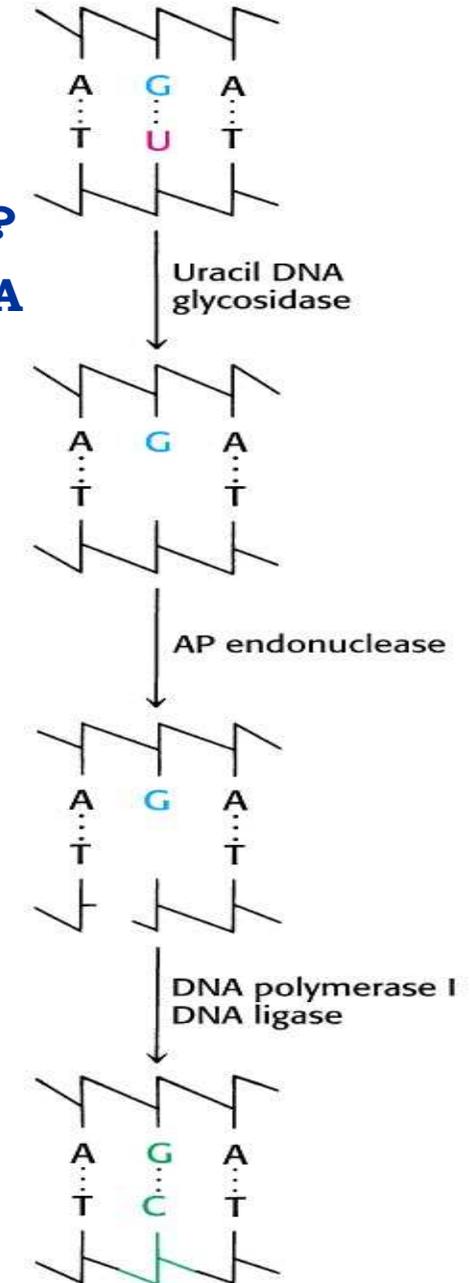
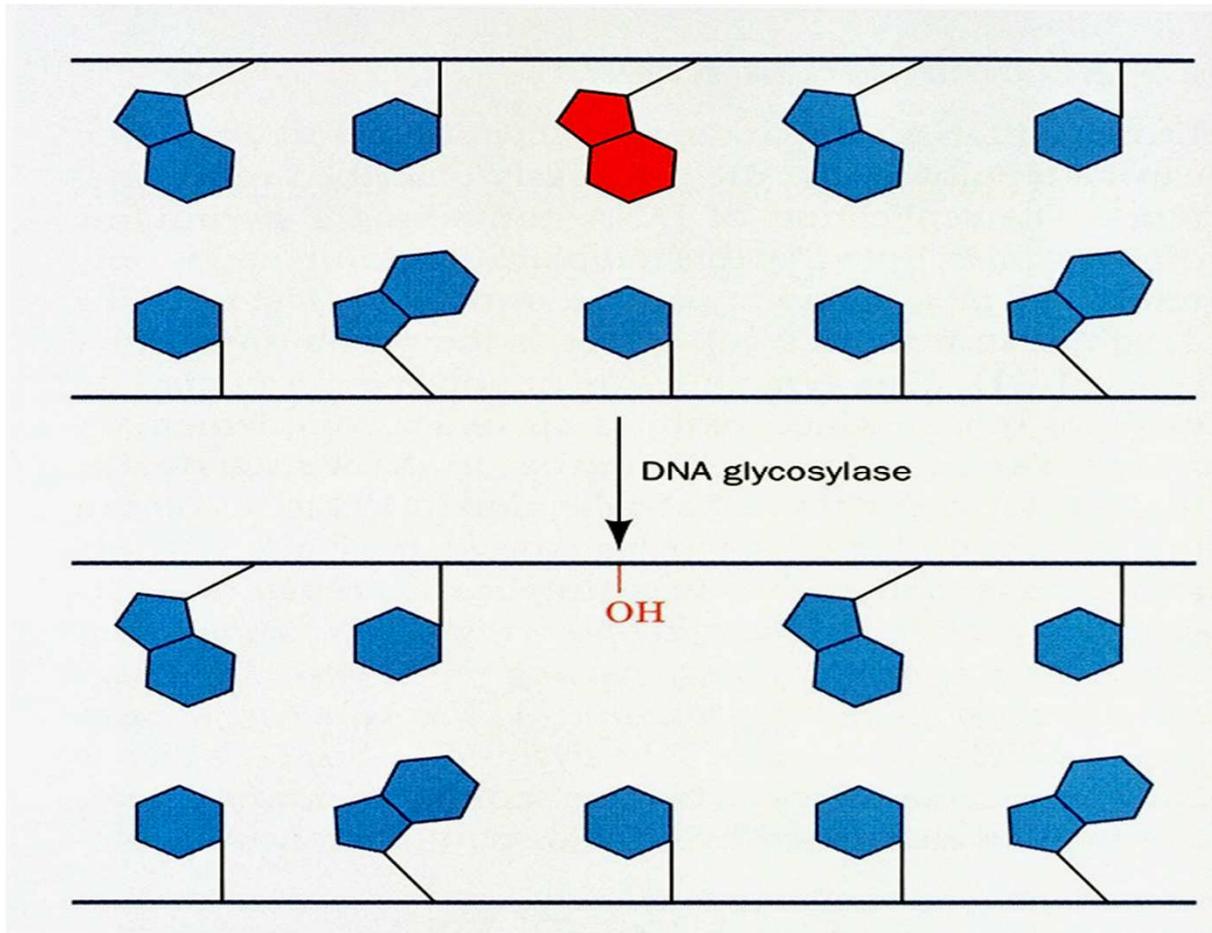


Mecanismos de Reparo do DNA

Tipos de Vias de Reparo

1) Reparo por Remoção de Bases

- Uracil no DNA e altamente mutagênico
 - pois C pode deaminar a U → o par seria GC ou AT?
- Uracil-DNA glicosidase puxa uracil para fora do DNA**



Mecanismos de Reparo do DNA

Tipos de Vias de Reparo

3) Reparo por Remoção do Nucleotídeo

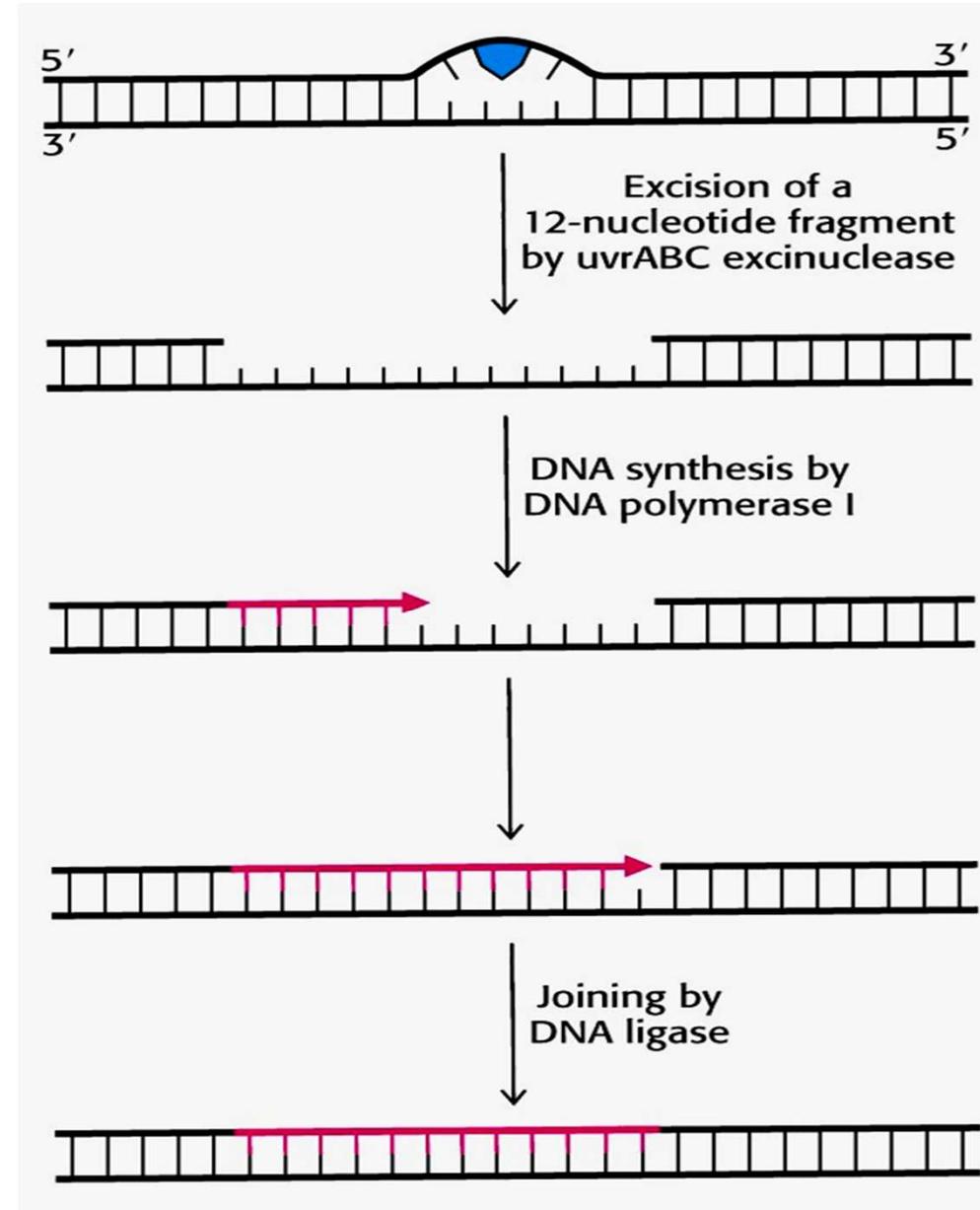
→ **Complexo multi-enzimático reconhece alterações e distorções na estrutura da dupla hélice do DNA**

- **Dímeros de pirimidinas podem ser reparados por excisão e a lacuna preenchida pela DNA-Pol I e DNA-ligase**

- **clivagem por um complexo dependente de ATP na sétima e quarta base na extremidade 5' e 3' do dano**

→ **Defeito neste sistema de reparo gera a Xerodermia pigmentosa**

- **doença autossômica recessiva → luz solar**



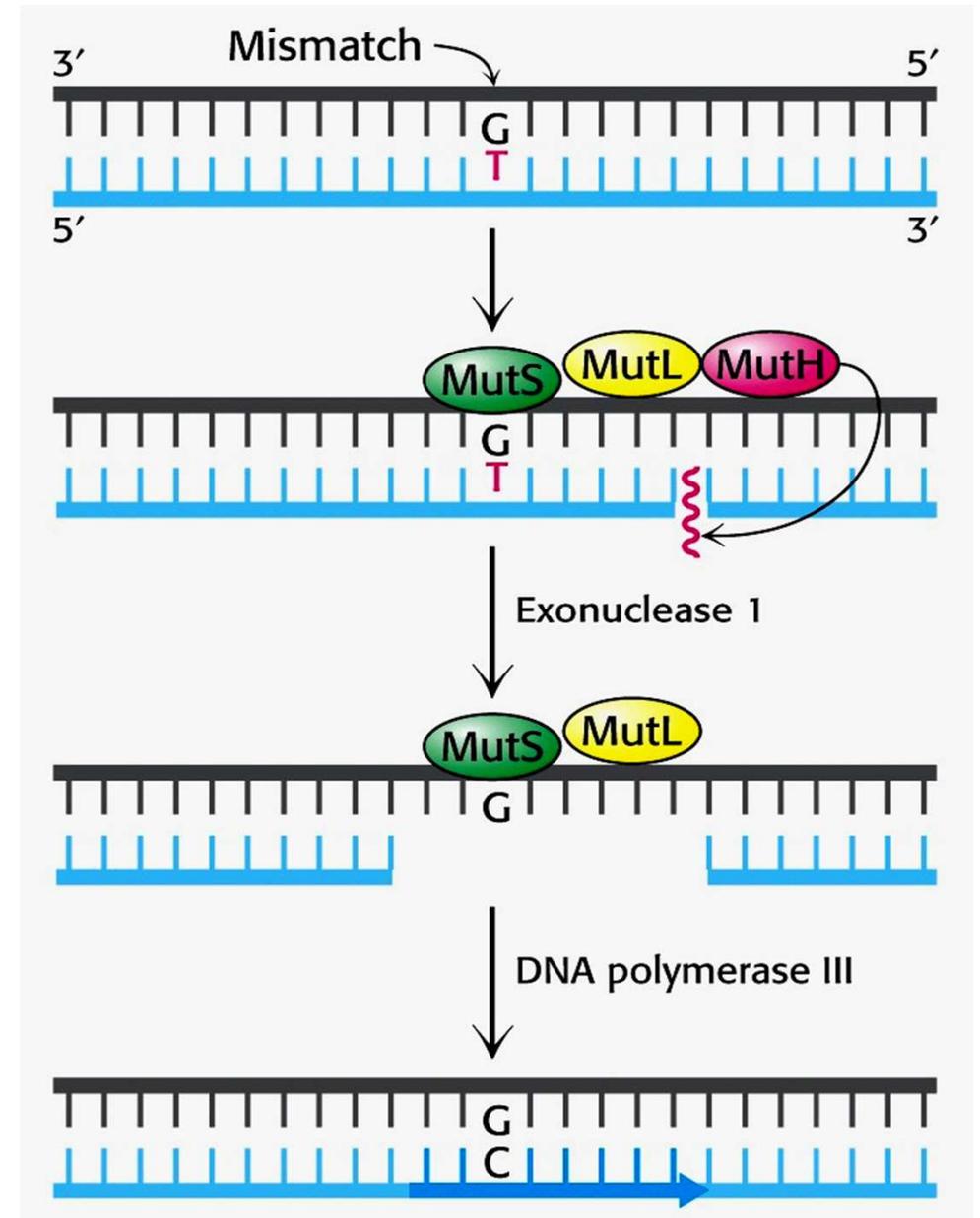
Mecanismos de Reparo do DNA

Tipos de Vias de Reparo

3) Reparo por Remoção do Nucleotídeo

- Mutações pontuais devido à falhas de pareamento na replicação e/ou devido à eventos de tautomerização podem ser corrigidos por um sistemas de reparo

- Falhas nestes sistemas aumentam a frequência de câncer



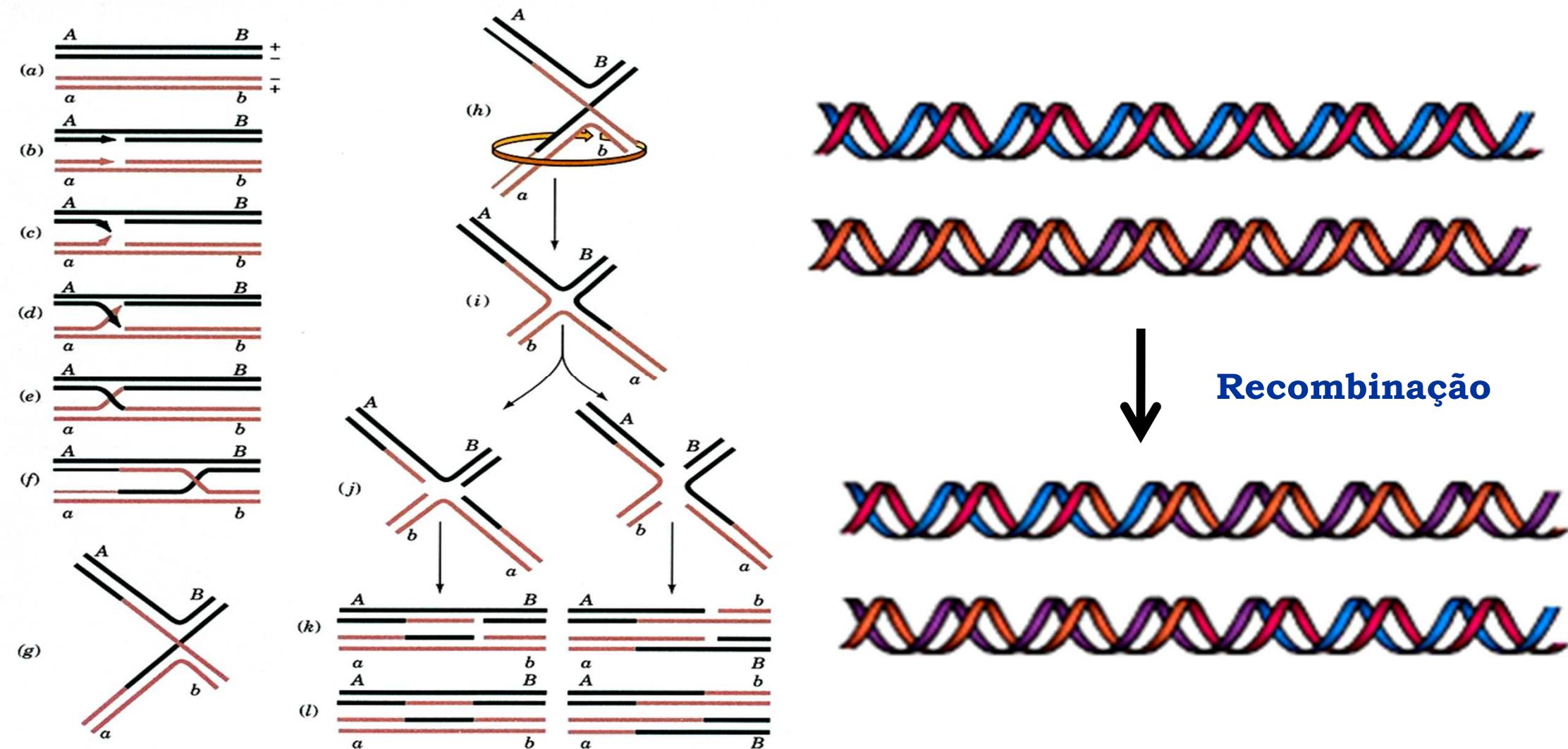
Recombinação Homóloga ou geral

→ Recombinação Geral ocorre entre segmentos de DNA com extensa identidade

→ Mecanismo envolvido no reparo de DNA em células em replicação

→ Mecanismo envolvido na segregação cromossômica → **crossing-over** – entrecruzamento

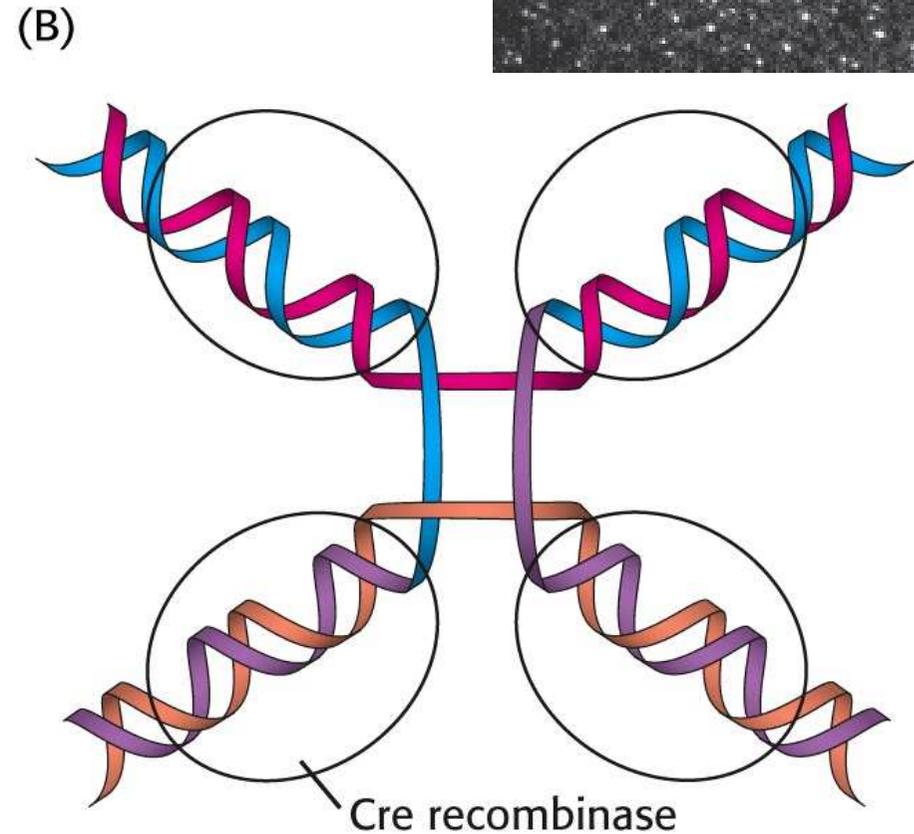
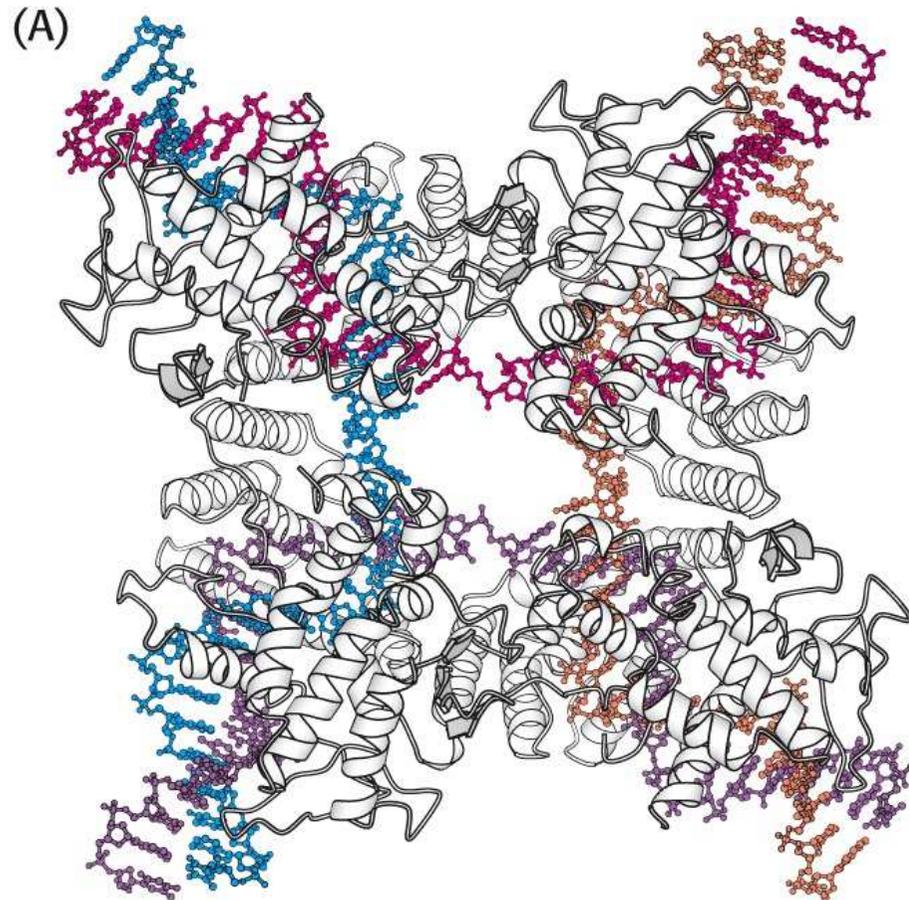
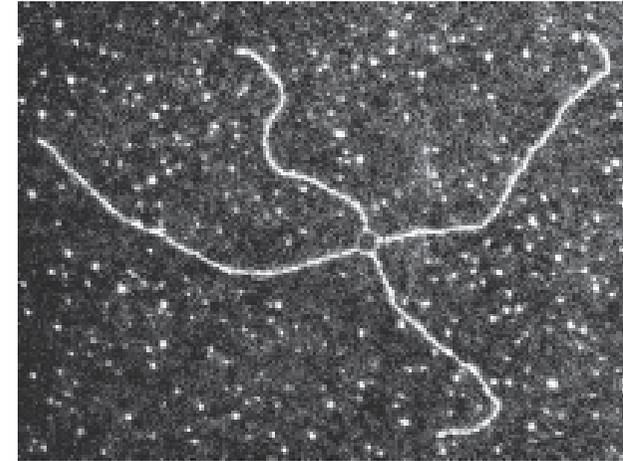
- formação de cromossomas recombinantes



Recombinação Homóloga ou geral

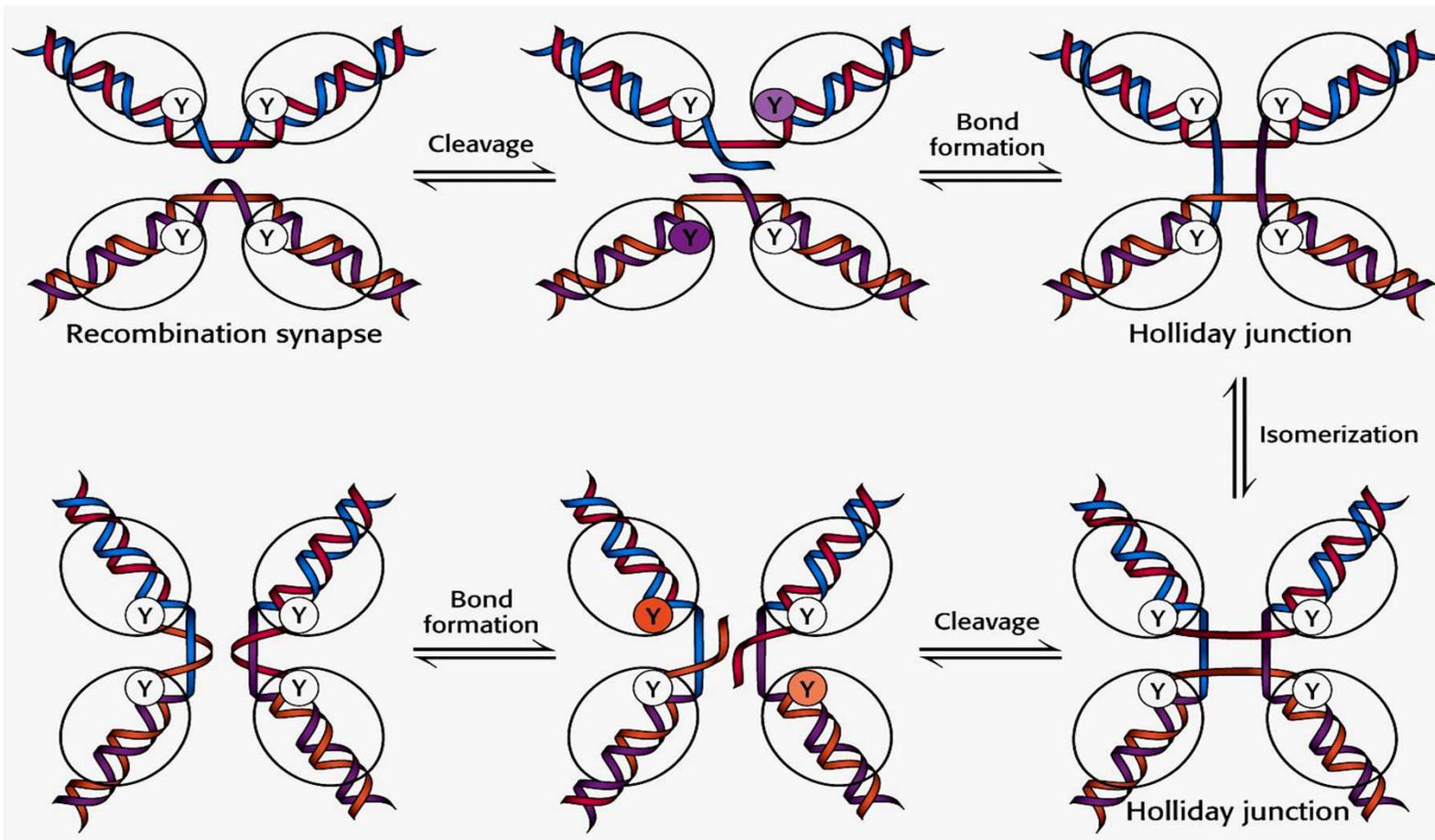
Sistema de Recombinação homóloga

Junção Holliday



Recombinação Homóloga ou geral

- 1) 4 fitas de DNA se pareiam e são cortadas para formarem um novo pareamento
- 2) As fitas quase complementares no duplo-homólogo formam um segmento de DNA heterólogo



- 3) O segmento heterólogo é selado → Formação do crossing-over de 4 fitas de DNA → Junção Holliday → fitas entrecruzadas de heteroduplex
- 4) migração de ramificações em ambas as direções
- 5) Resolução ou Quebra da junção Holliday

Recombinação Homóloga ou geral

- 1) Responsável pela diversidade genética da população
- 2) Responsável pela geração de anticorpos
- 3) Estratégia usada por vírus para a sua integração ao genoma do hospedeiro
- 4) Importante metodologia biotecnologia para a geração de organismos transgênicos

→ Muitas enzimas/proteínas envolvidas na replicação atuam na recombinação

