



Universidade Federal de Pelotas  
CDTec - Graduação em Biotecnologia  
Disciplina de Biologia Molecular

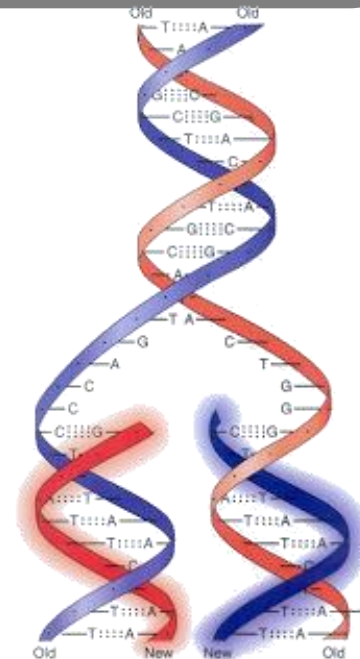


# Replicação de DNA

Priscila M. M. de Leon

Dra., Médica Veterinária

Profa, PNDP Biotecnologia/UFPEL

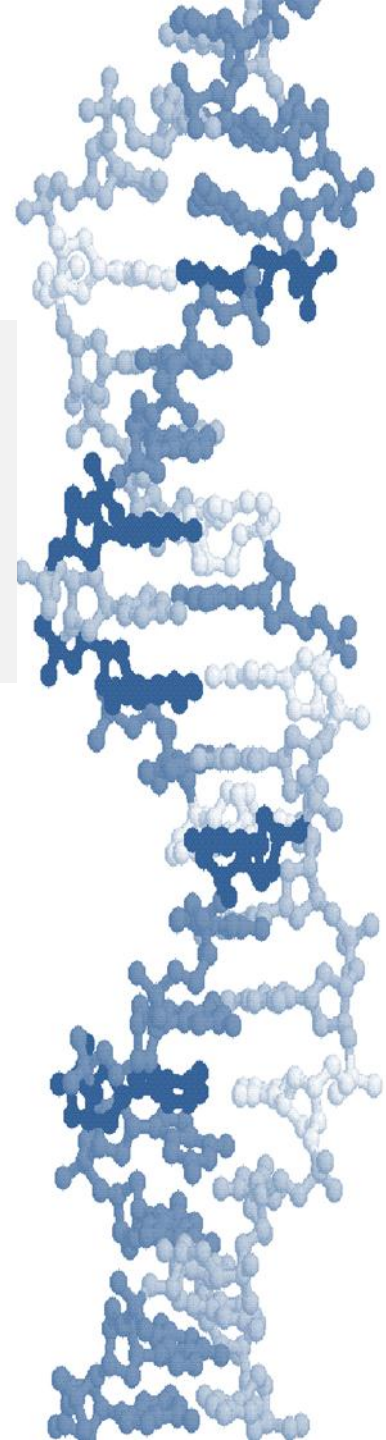


# Replicação de DNA

- Processo de **duplicação do DNA genômico** ao qual a célula passa a cada ciclo de divisão celular, mantendo o mesmo material genético em todas as células de um organismo.

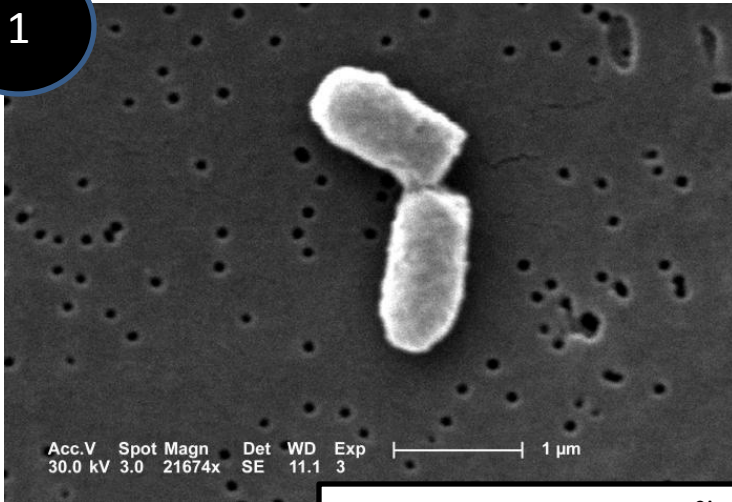
## Conteúdo:

- Replicação do DNA e ciclo celular;
- Origem de Replicação;
- Mecanismos básicos de replicação
- Fases da replicação
  - \*Início
  - \*Alongamento
  - \*Término



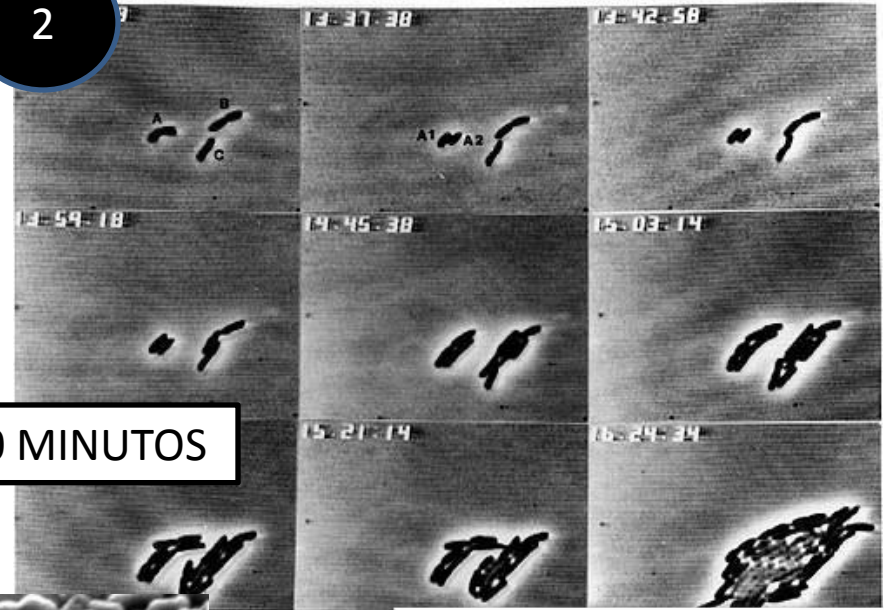
# Replicação do DNA x Ciclo Celular

1



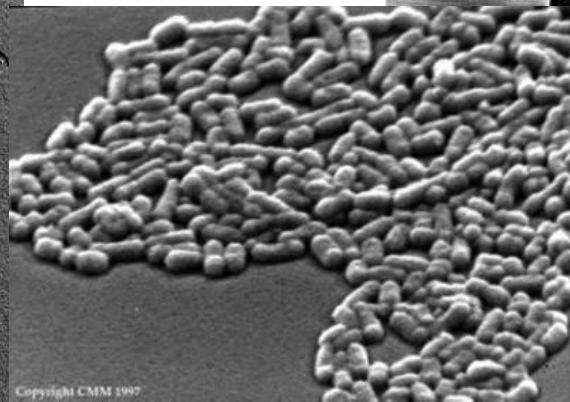
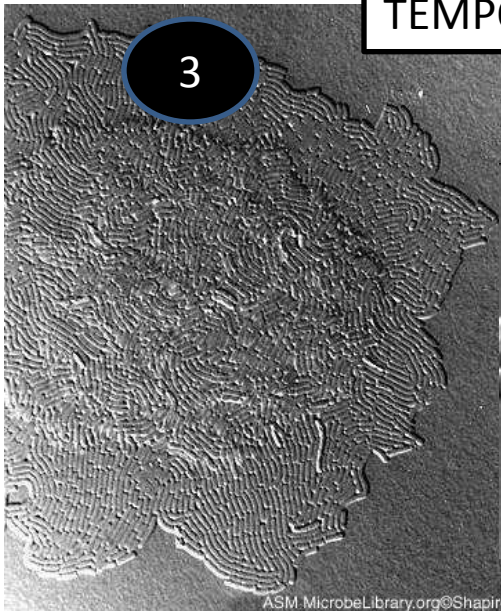
2

*Escherichia coli*

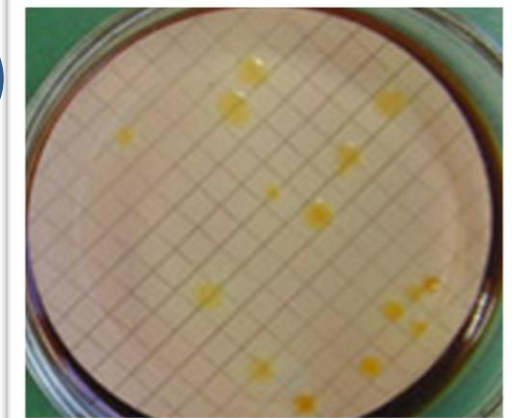


TEMPO DE GERAÇÃO: 20 MINUTOS

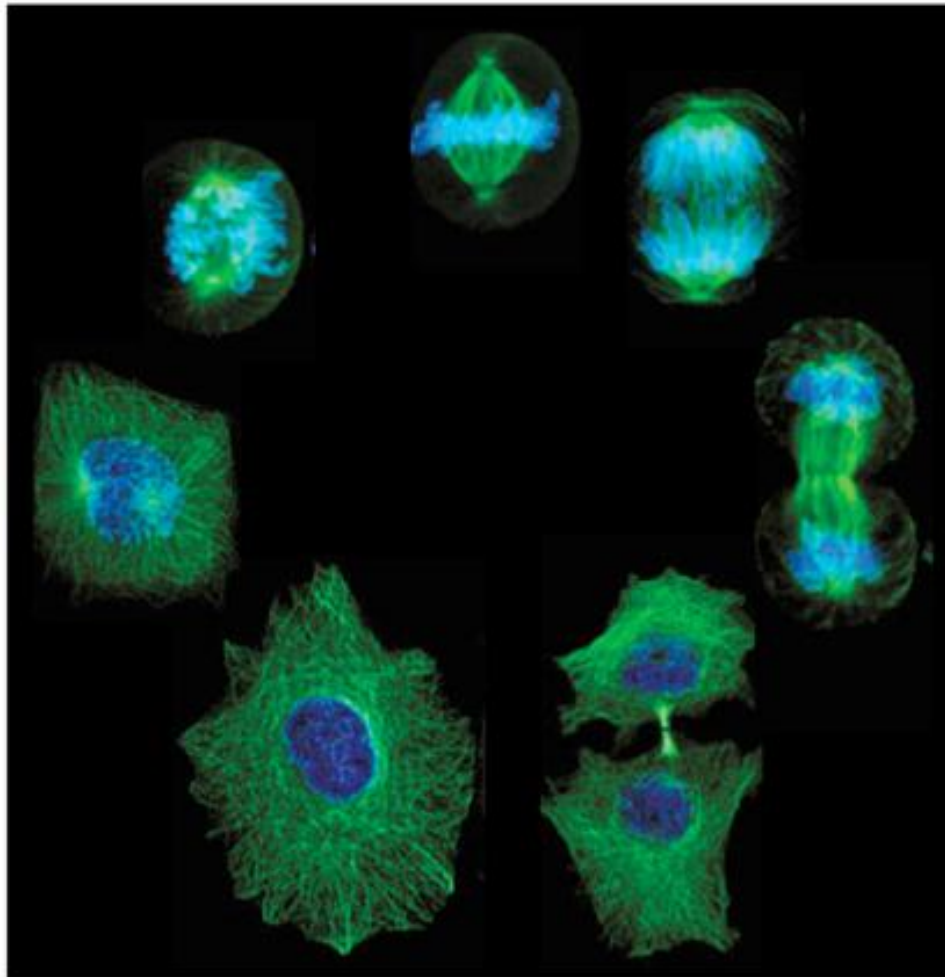
3



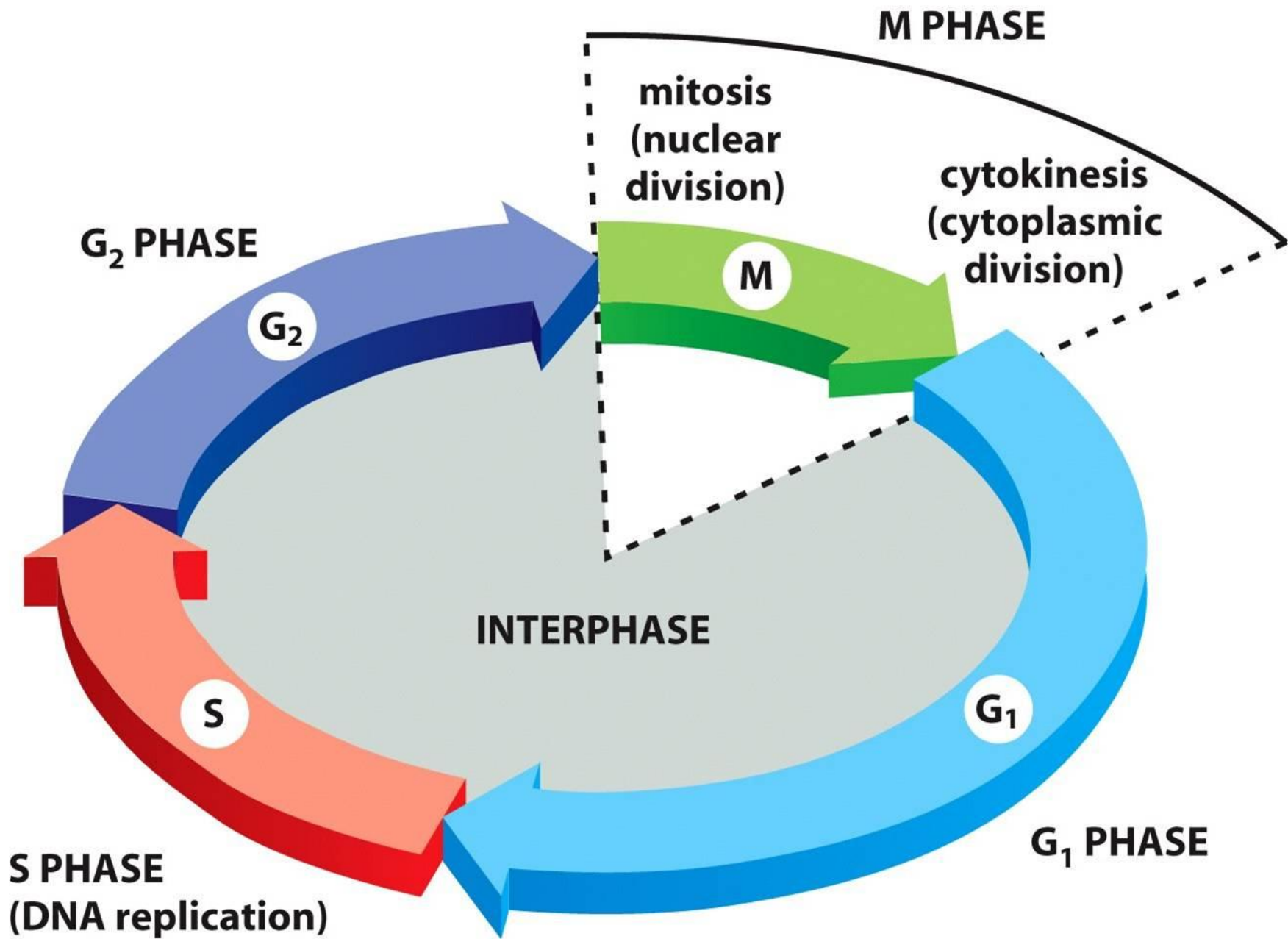
4



# Ciclo Celular

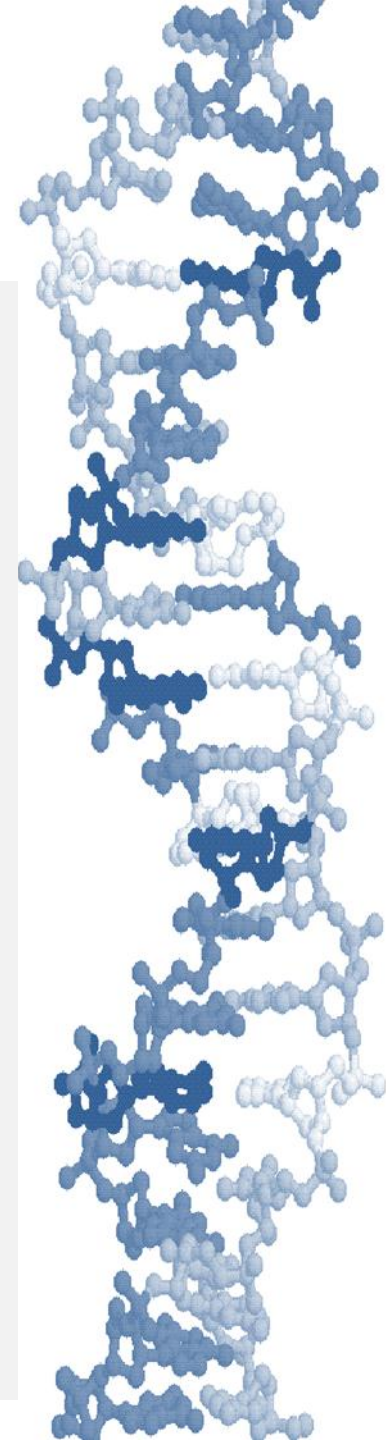




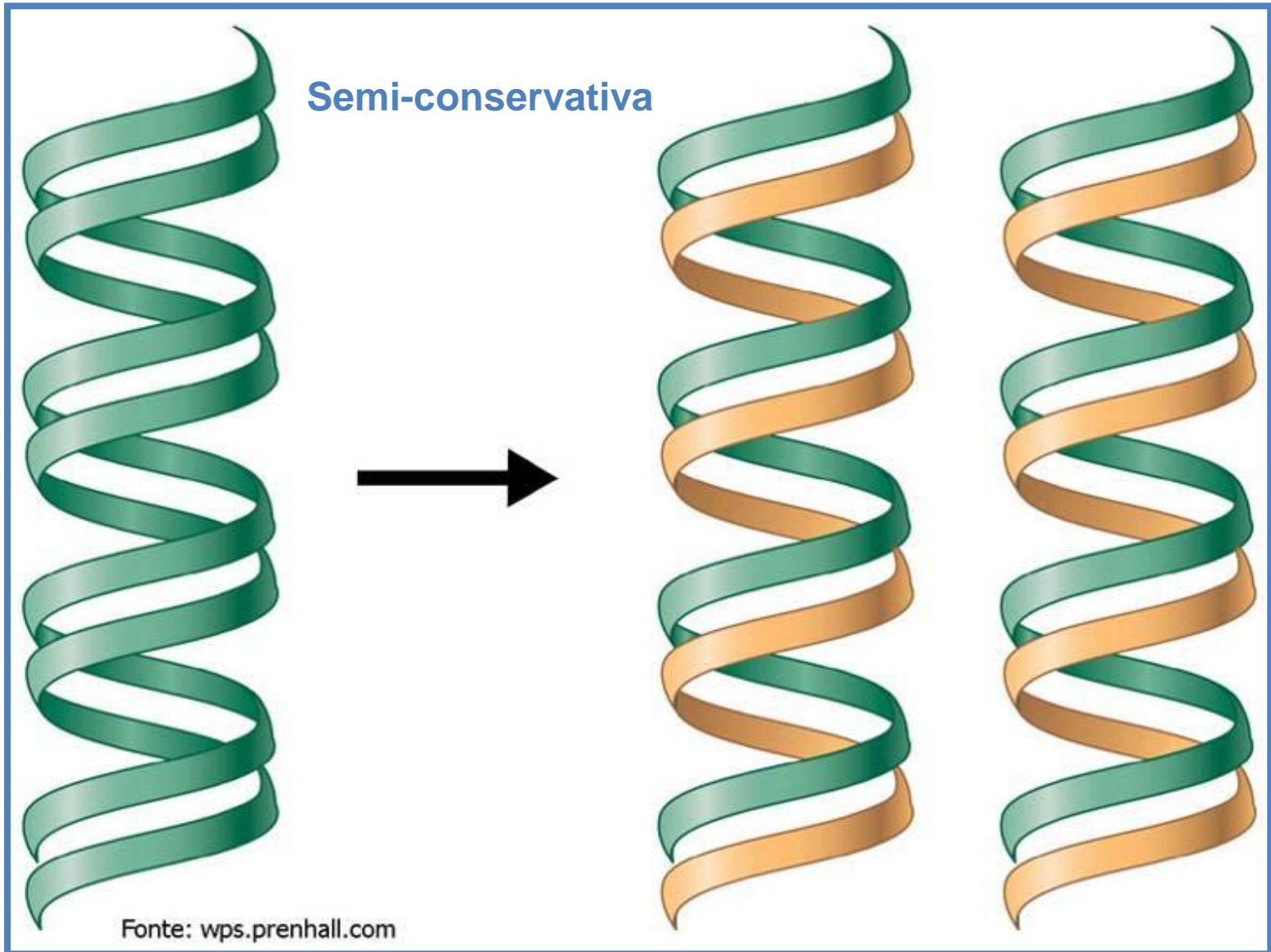


# Replicação de DNA

- **Replissomo**: conjunto de proteínas que atuam na replicação de um organismo.
- Para que ocorra replicação deve haver uma fita molde → DNA a ser copiado – fita dupla ou simples;
- A extremidade 3'-OH deverá estar livre;
- **Características básicas**:
  - **Semiconservativa**
  - **Semidescontínua**
  - Adição de nucleotídeos no **sentido 5' → 3'**
  - Inicia sempre em sequencias específicas – **Origens**
  - **Unidirecional** ou **Bidirecional**

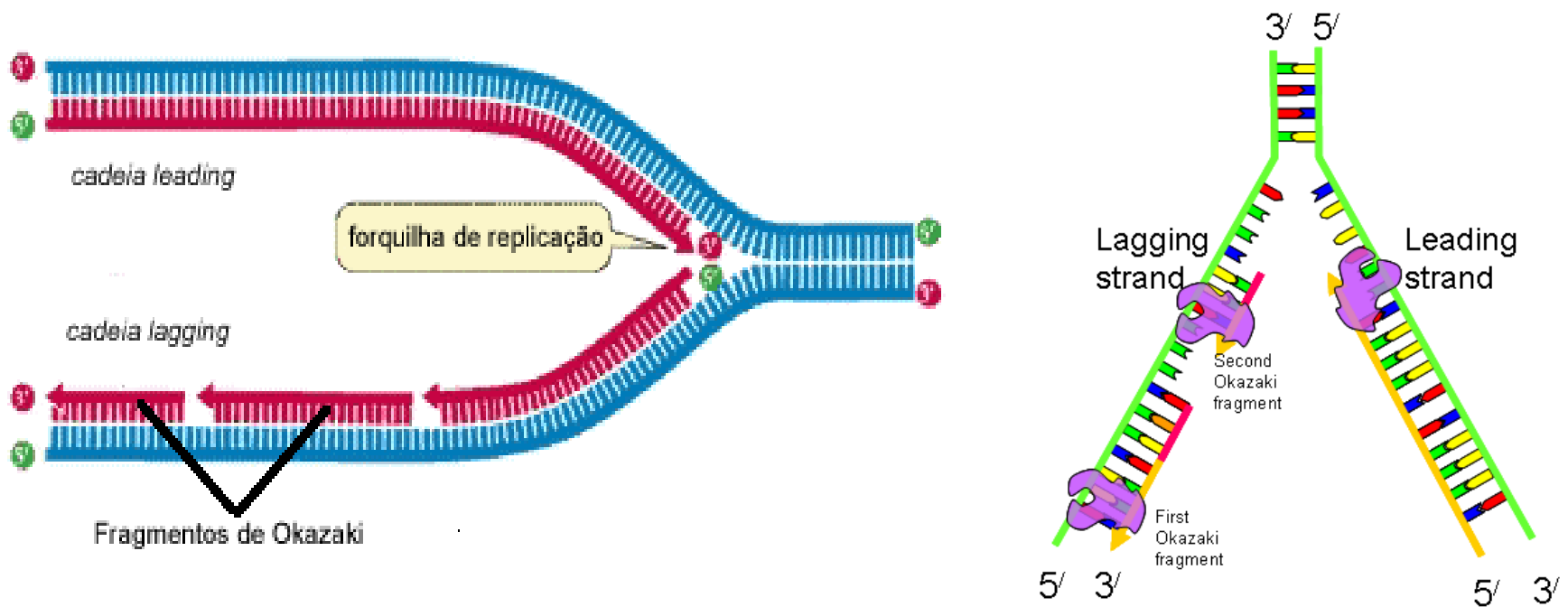


# Replicação do DNA



# SEMI-DESCONTINUIDADE DA REPLICAÇÃO

A replicação ocorre de maneira **contínua** em uma das fitas e **descontínua** na outra fita

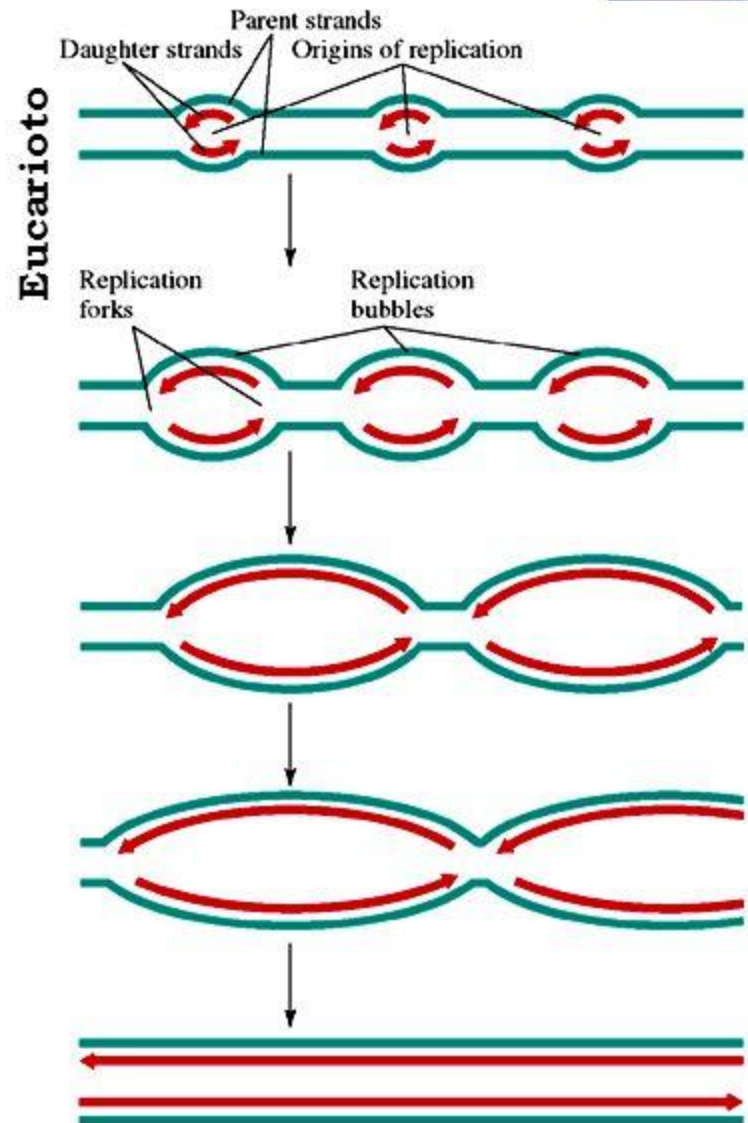
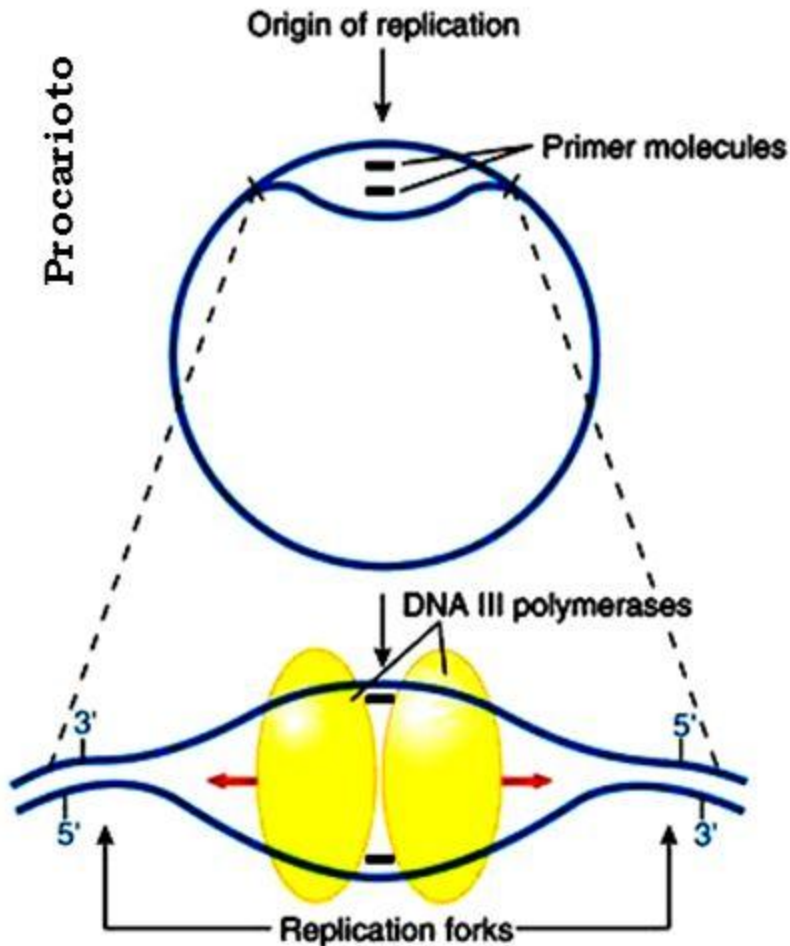




# Mecanismos da Replicação



## Início da Replicação

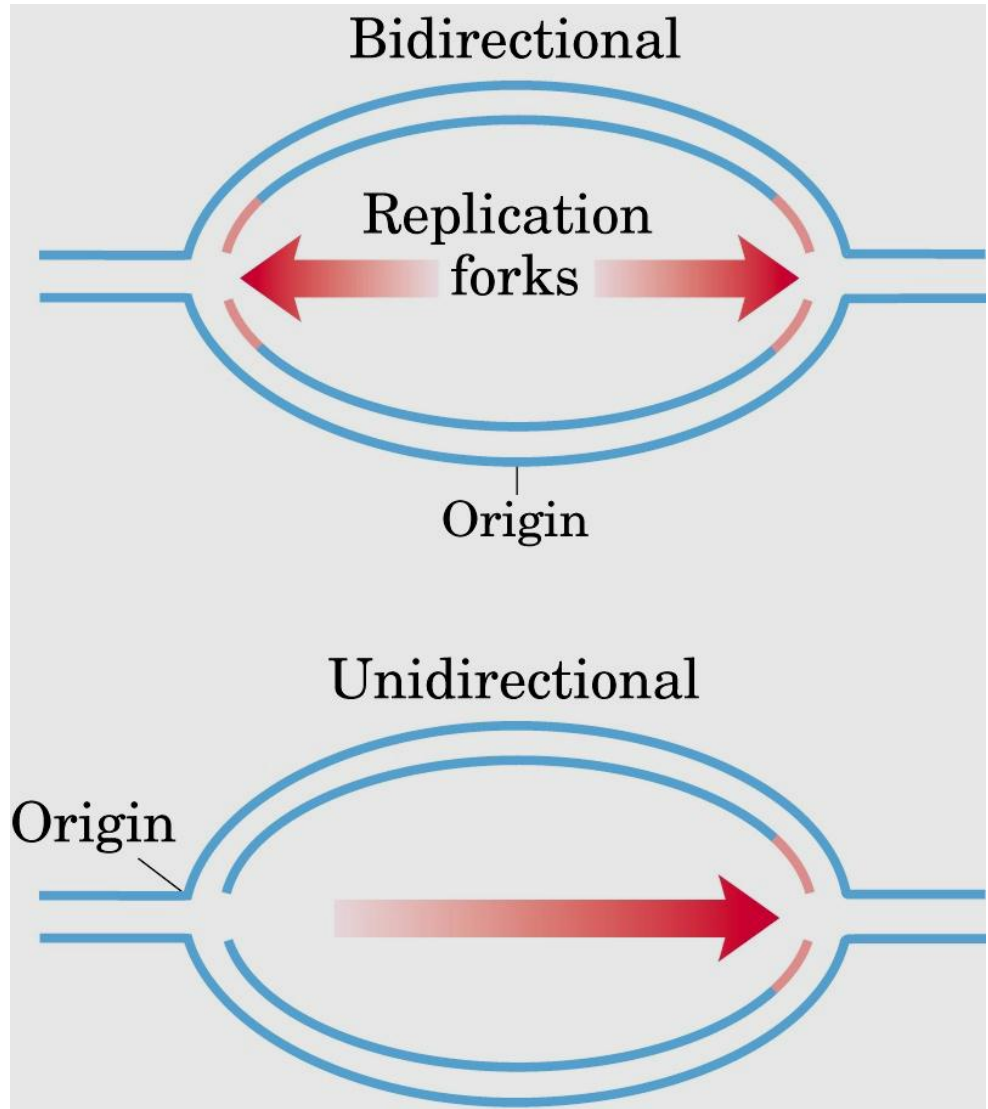


# MOVIMENTO DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO

Unidirecional ou bidirecional

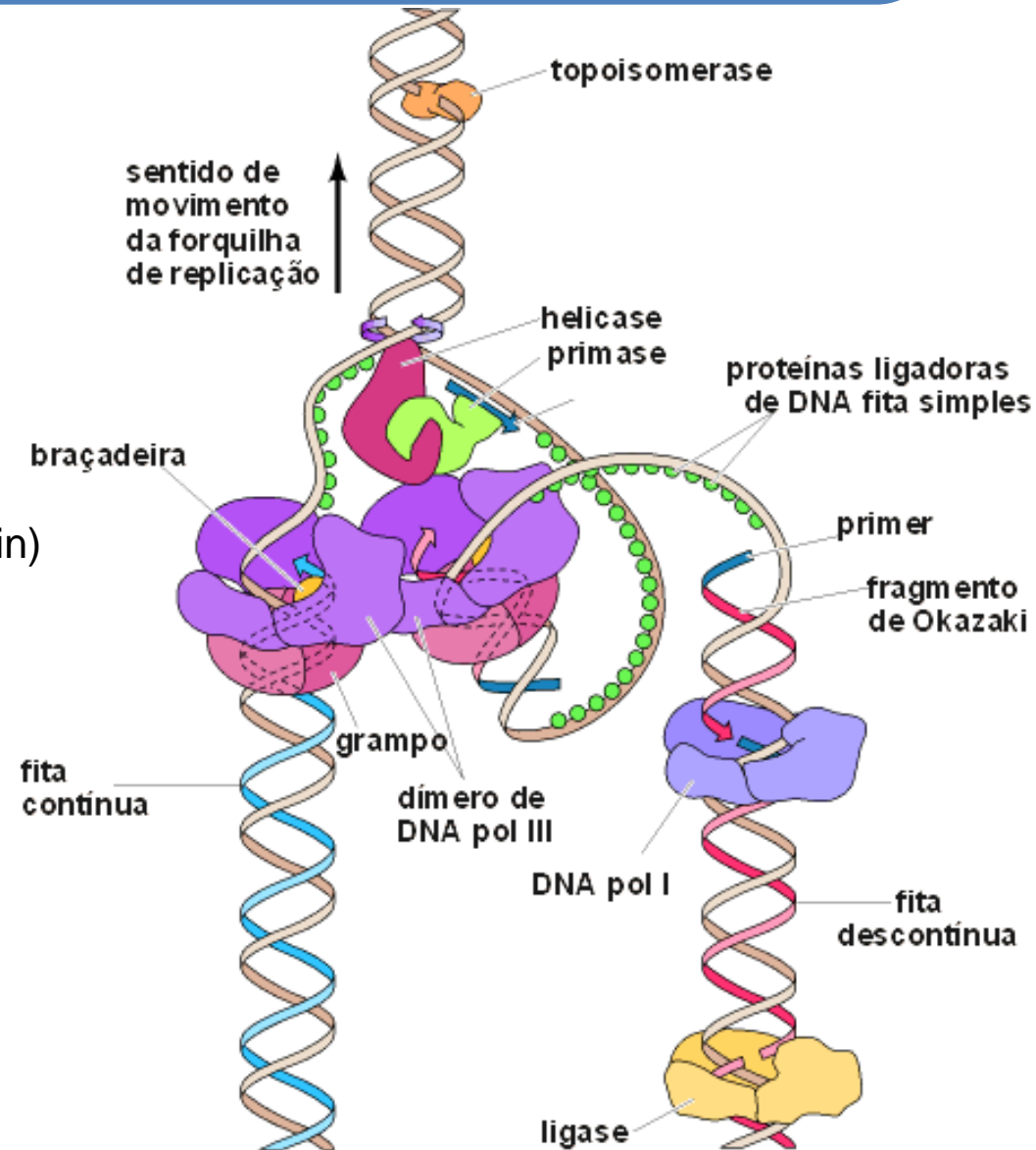
A replicação pode ser bidirecional...

...ou unidirecional



# Proteínas envolvidas na Replicação

- DNA Polimerase
- Helicases (DnaB)
- Primase
- SSB (Single Strand Binding Protein)
- Topoisomerases
- DNA ligase



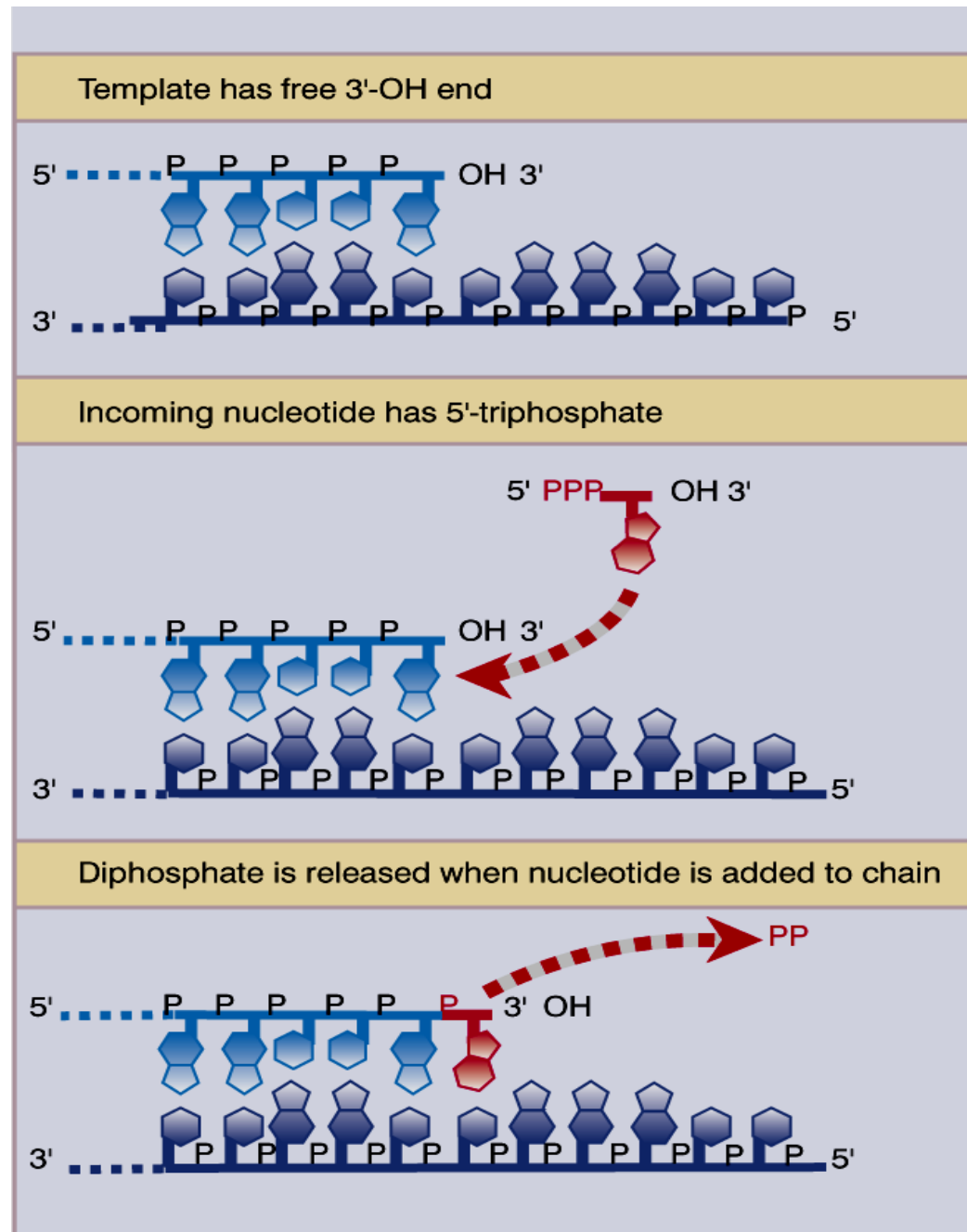
# DNA-Polimerase

- **DNA Polimerase**: enzimas envolvidas na replicação e reparo do DNA;
  - Incorporação de nucleotídeos na extremidade 3' –OH livre
  - Nucleotídeos adicionados são complementares a fita molde
  - É necessária a presença de **iniciadores** (*primers*) pela **primase**
  
- São identificadas 5 DNA-polimerases em *E. coli*:
  - **DNA-polimerase I e III tem atividade participam da replicação**
  - II, IV e V envolvidas na reparação do DNA
    - Atividades de **Polimerização e Exonuclease**



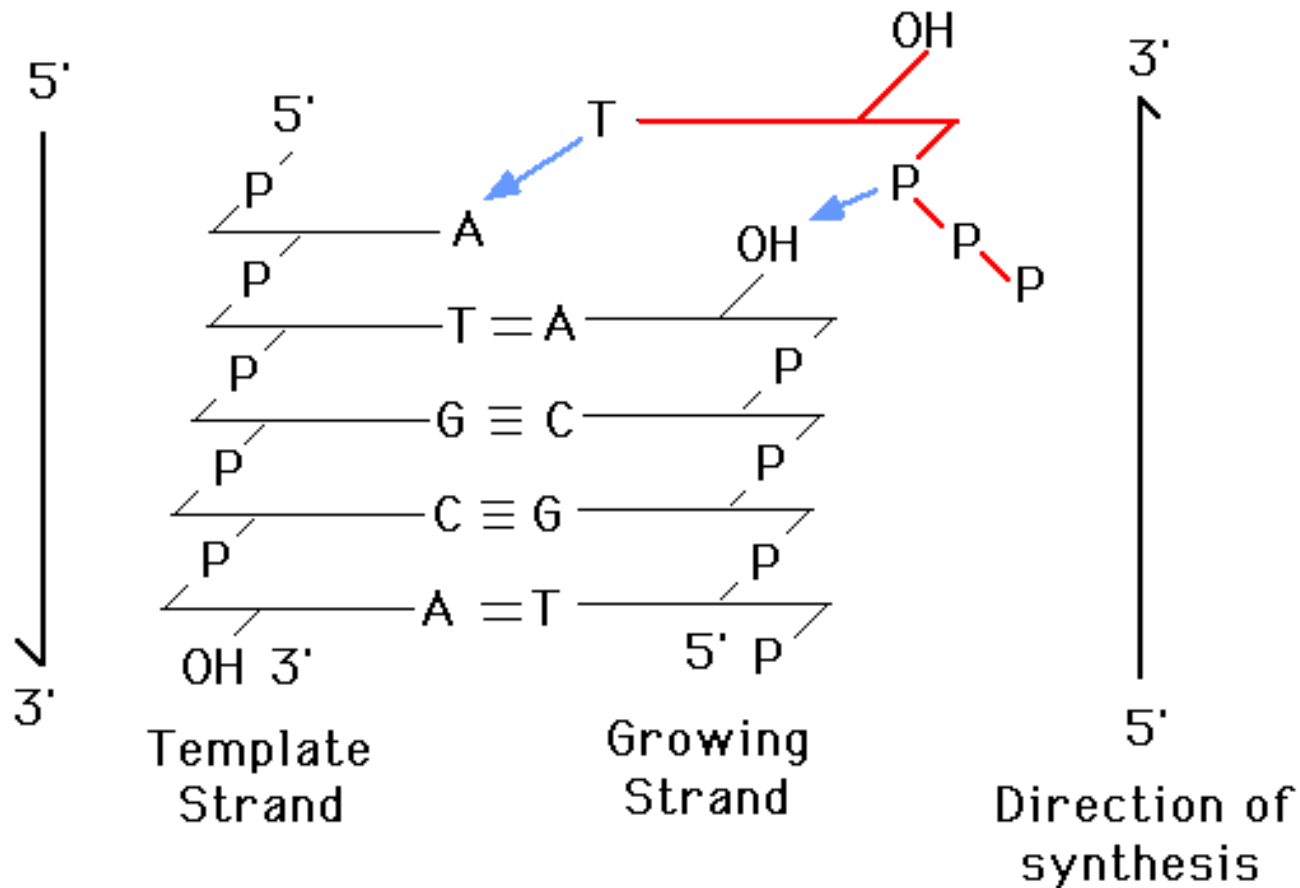
# DNA POLIMERASES

Sintetiza a nova fita de DNA adicionando nucleotídeos na extremidade 3'OH e possibilitando o crescimento da cadeia no sentido 5' – 3'

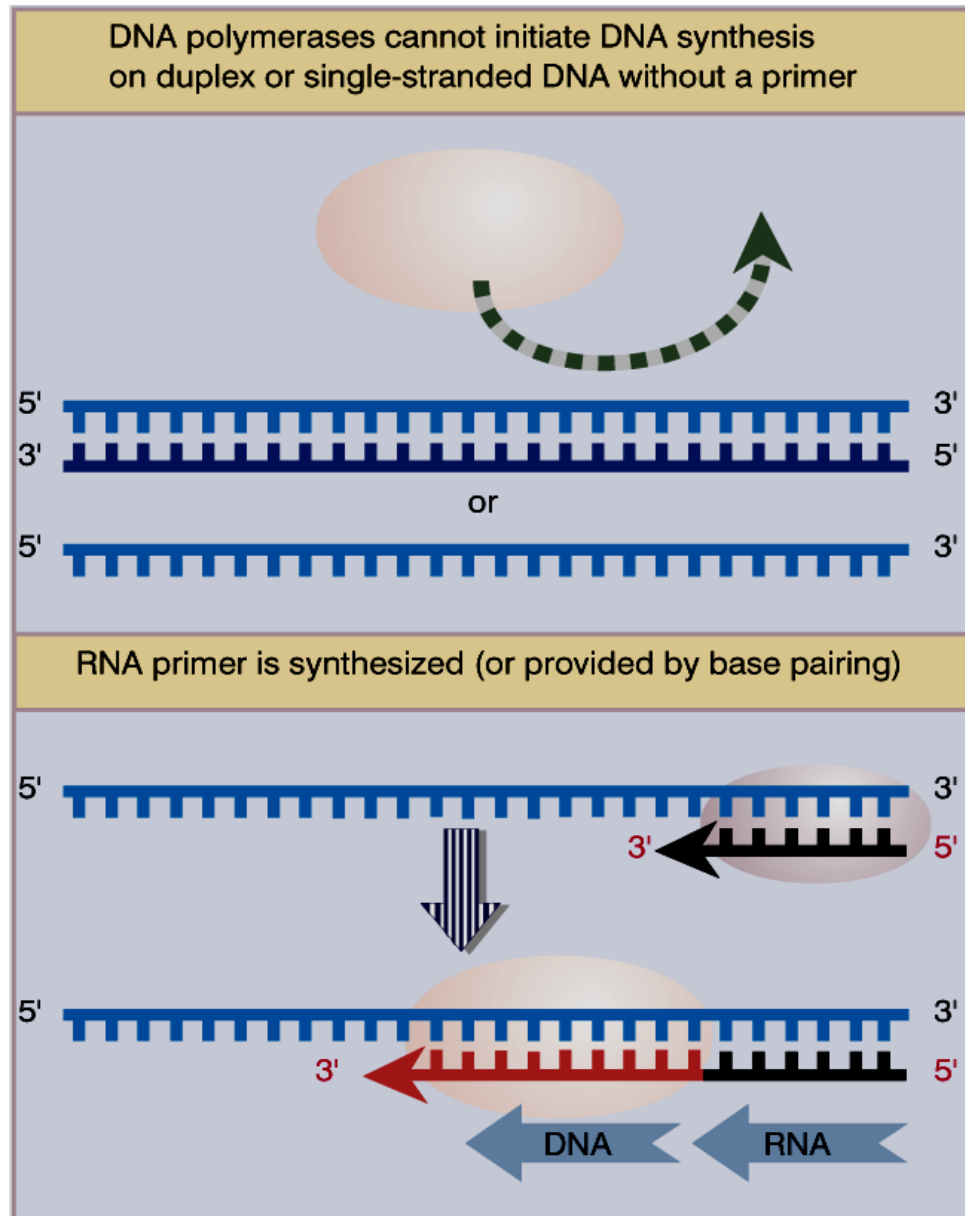


# DIREÇÃO DA REPLICAÇÃO

A adição dos nucleotídeos para o alongamento da cadeia é SEMPRE no sentido 5'-3'

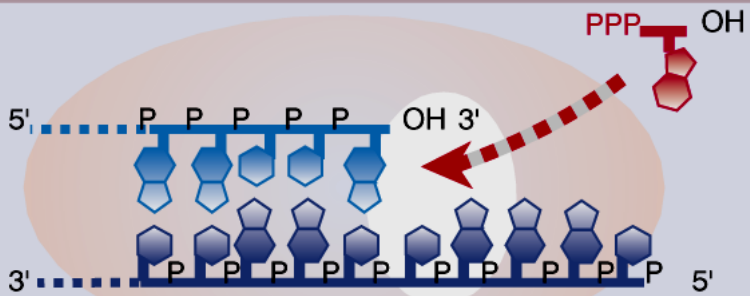


As DNA-polimerases sempre requerem um iniciador previamente pareado ao molde que será copiado

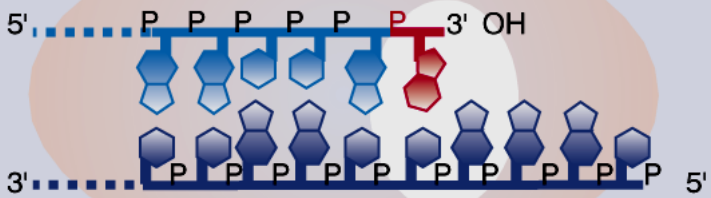


# Atividade revisora 3' → 5' garante a fidelidade da replicação

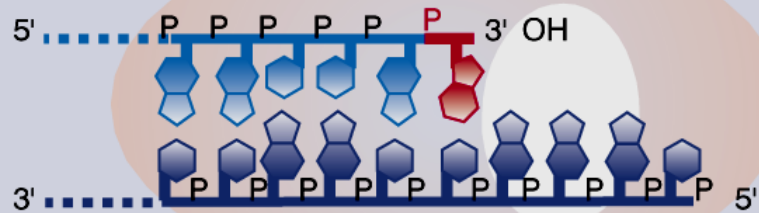
DNA polymerase has entry site available



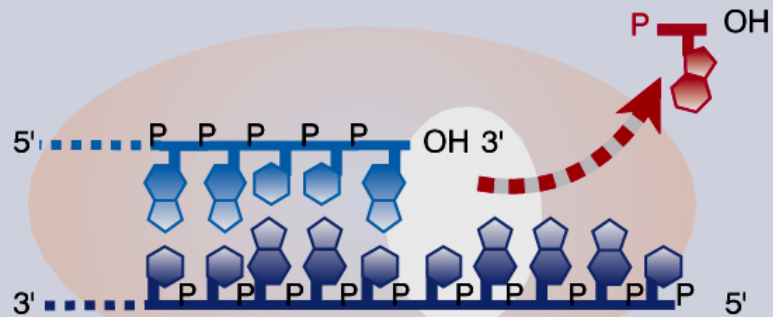
Nucleotide enters and forms bond



Enzyme advances 1 nucleotide



Mismatch causes removal of nucleotide; enzyme retreats 1 bp





# Propriedades das DNA-polimerases Bacterianas

	Pol I	PolII	PolIII
Polimerização 5' → 3'	+	+	+
Exonuclease 3' → 5'	+	+	+
Exonuclease 5' → 3'	+	-	-
Número de subunidades	1	≥4	≥10
Tamanho em kDa	103	90	~900
Velocidade de Polimerização(nt/seg)	16-20	40	250-1000

# DNA POLIMERASES

- Eucariotos - DNA polimerases

  - $\alpha$  - primase

  - $\beta$  e  $\varepsilon$  - reparo do DNA

  - $\delta$  - replicação do genoma nuclear

  - $\gamma$  - replicação do DNA mitocondrial

- Bacteriófagos - T4 DNA Polimerase

- Outras - **Taq** DNA polimerase (*Thermus aquaticus*) – sem atividade de exonuclease 3'-5'



# TAQ DNA POLIMERASE

*Thermus aquaticus*

-Estável a temperaturas de 177 graus;



Temperatura Ótima: 72  
graus



# Outras enzimas

## Helicases

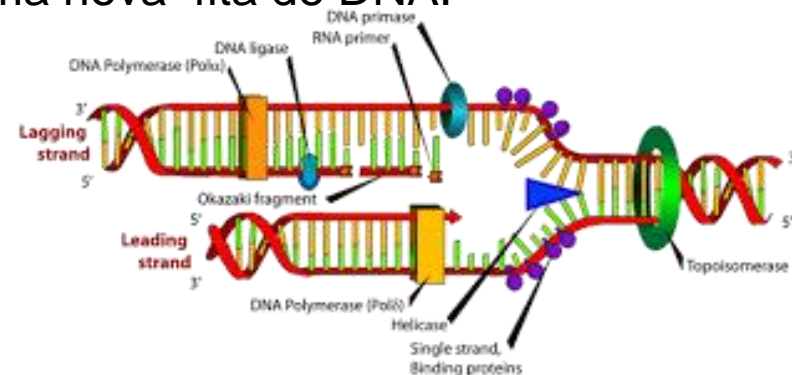
Quebra das pontes de hidrogênio entre as bases, separando as duas fitas para que ocorra replicação

## SSB

Proteínas com afinidade por fita simples de DNA. Ao se ligarem evitam torções, induzindo a conformação ideal para a replicação, além de protegerem as fitas simples de degradação por nucleases. – *Single Strand Binding*

## Primase

Sintetiza primers (pequenas sequências de RNA) com 3'OH livre que são utilizados para o início da síntese de uma nova fita de DNA.





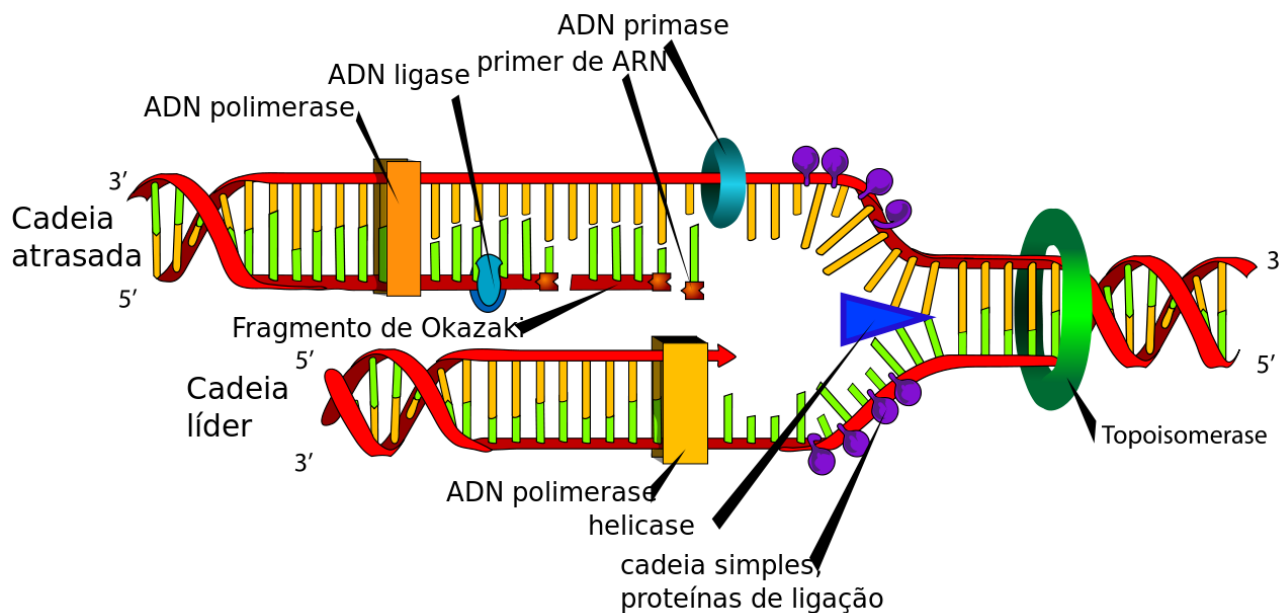
# Outras enzimas

## Topoisomerases

Quebram ligações fosfodiéster da cadeia de DNA. Corrigindo o aumento de tensão provocado pelo desenrolamento da dupla fita de DNA na forquilha de replicação.

## Ligases

Une os fragmentos de Okazaki, após a retirada dos iniciadores (*primers*) pela enzima primase.



# Forquilha de Replicação

- PROBLEMA - 2 fatores:

- ✓ DNA têm fitas opostas - 3'-5' e 5'-3'
- ✓ DNA-polimerases sintetizam somente no sentido 5'-3'

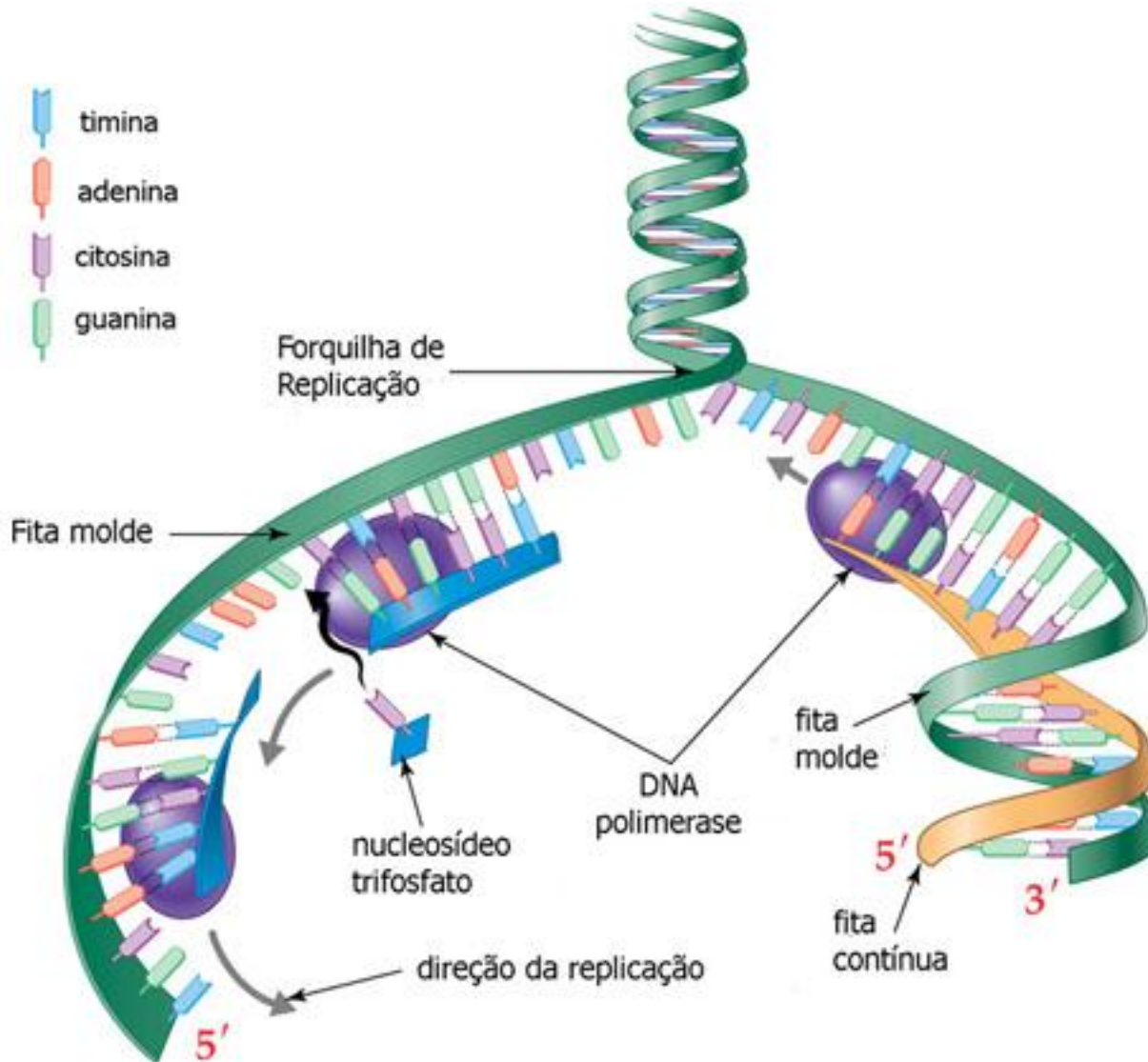
- SOLUÇÃO

✓ Novas fitas são sintetizadas em direções opostas: **contínua e descontínua.**

- ✓ **CONTÍNUA:** um **primer inicial**; fita se alonga no sentido 5'-3'

- ✓ **DESCONTÍNUA:** **vários primers** gerando **vários fragmentos de Okazaki**

# Forquilha de Replicação



# REPLICAÇÃO DO DNA

A síntese do DNA é semi-descontínua e requer um iniciador (primer) de RNA

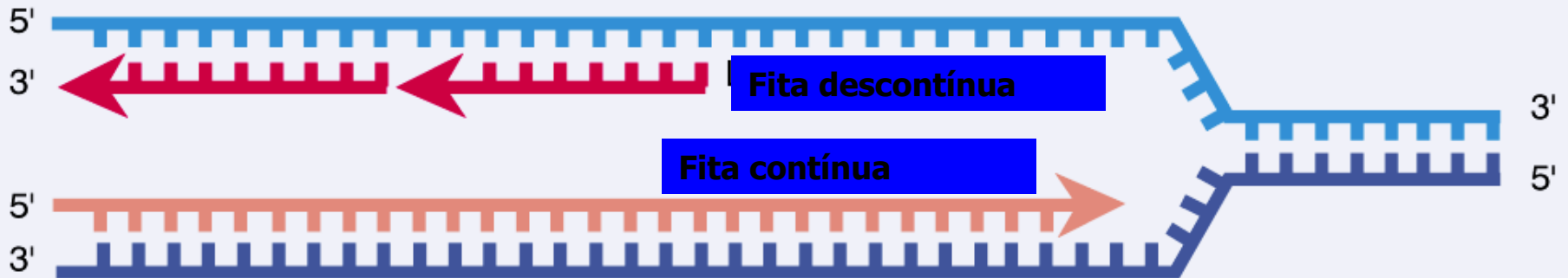
## Síntese da Fita descontínua

Previous fragment

Last fragment

Exposed single strand

Parental DNA

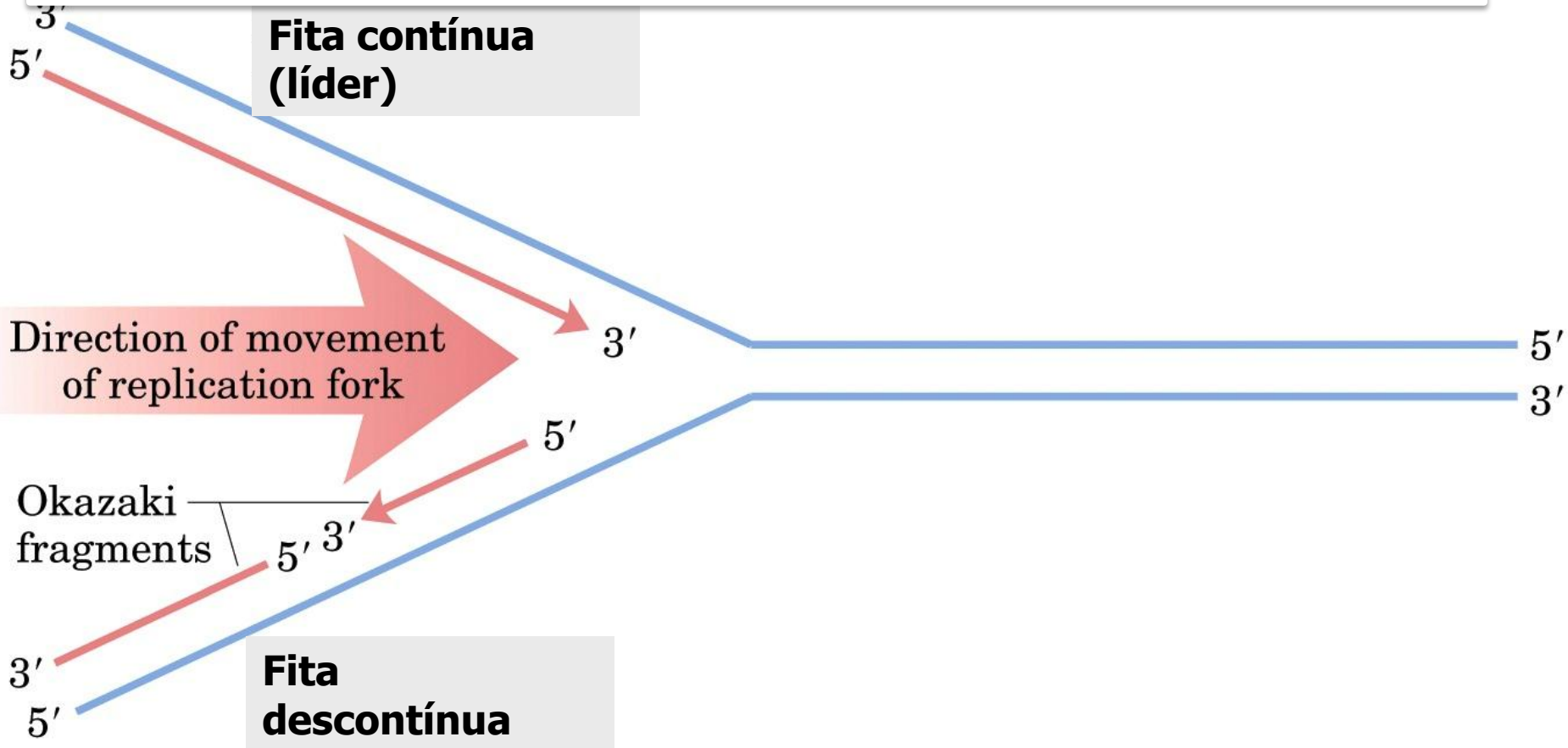


## Síntese da Fita Contínua

Nucleotides added continuously to 3' end

# REPLICAÇÃO DO DNA

**Fita contínua  
(líder)**



Direction of movement  
of replication fork

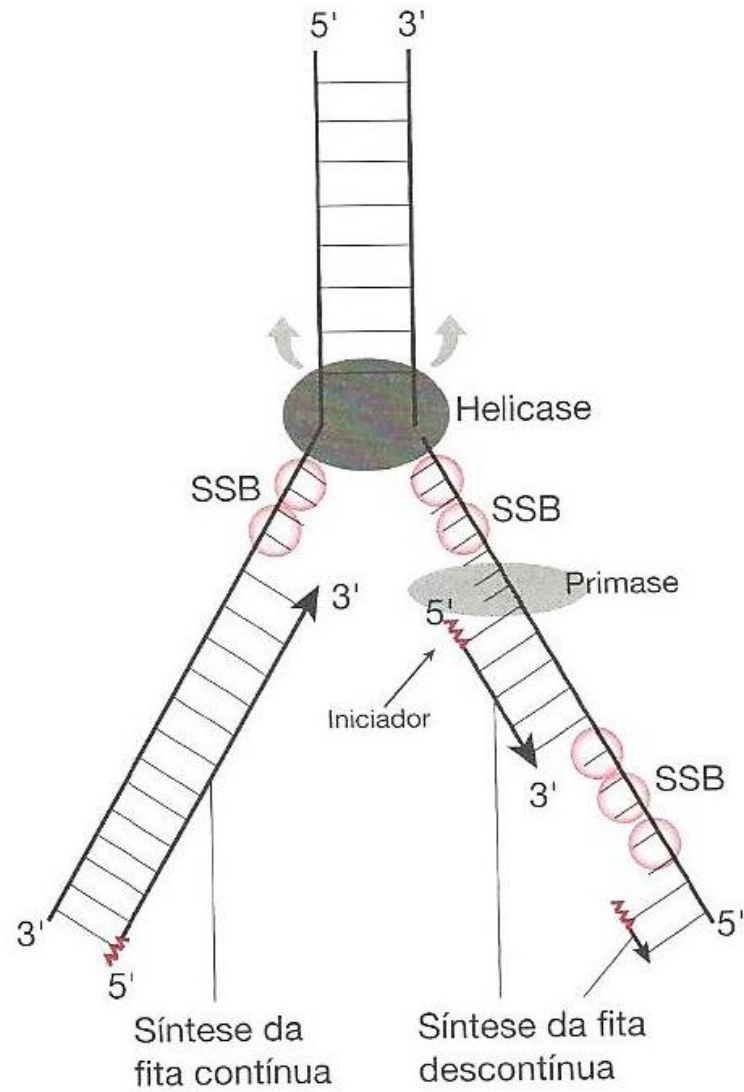
Okazaki  
fragments

**Fragmentos de Okazaki:**

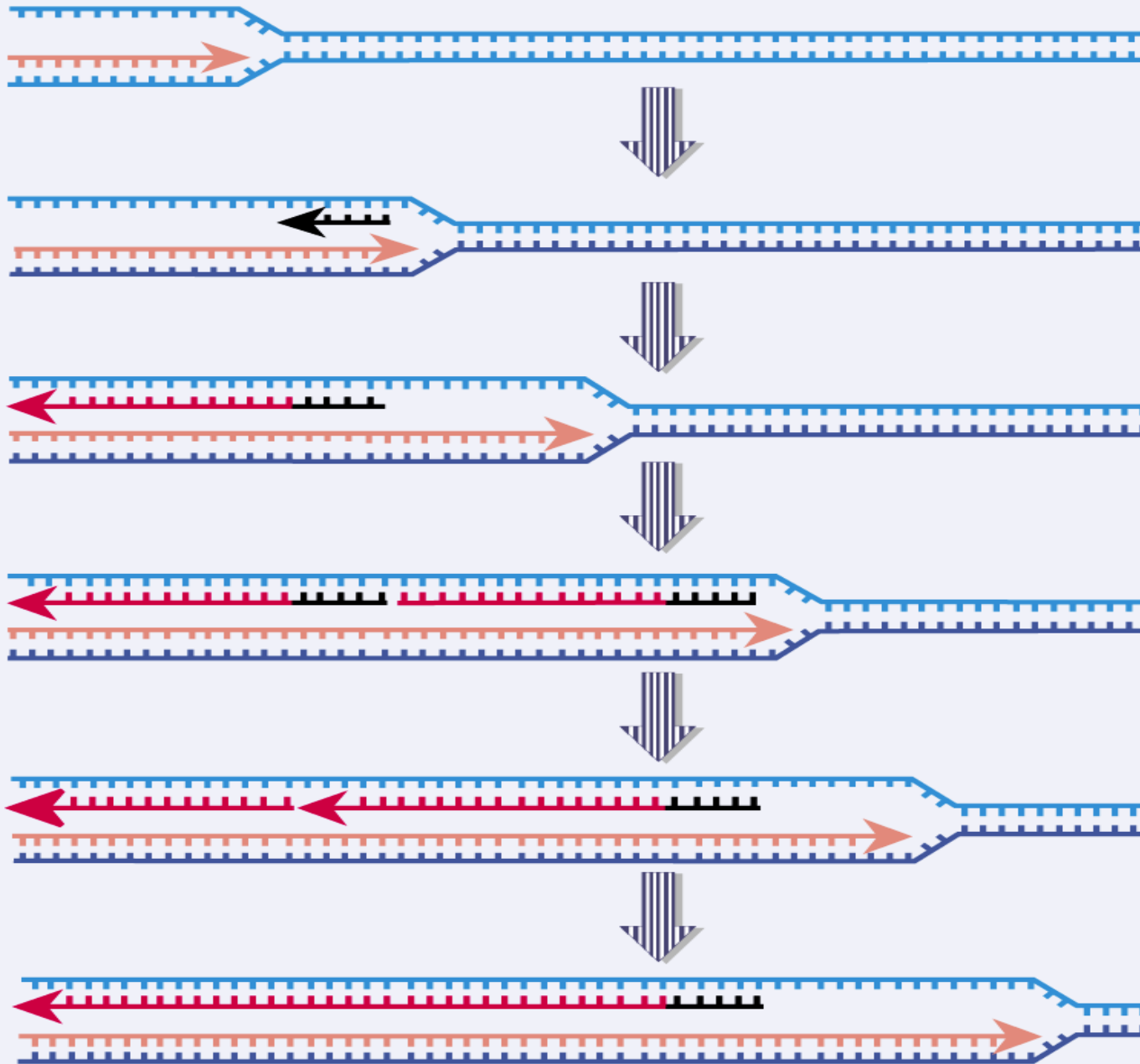
**1000 a 2000 nt (PROCARIOTOS)**

**100 a 200 nt (EUCARIOTOS)**

# REPLICAÇÃO DO DNA







- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

- A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

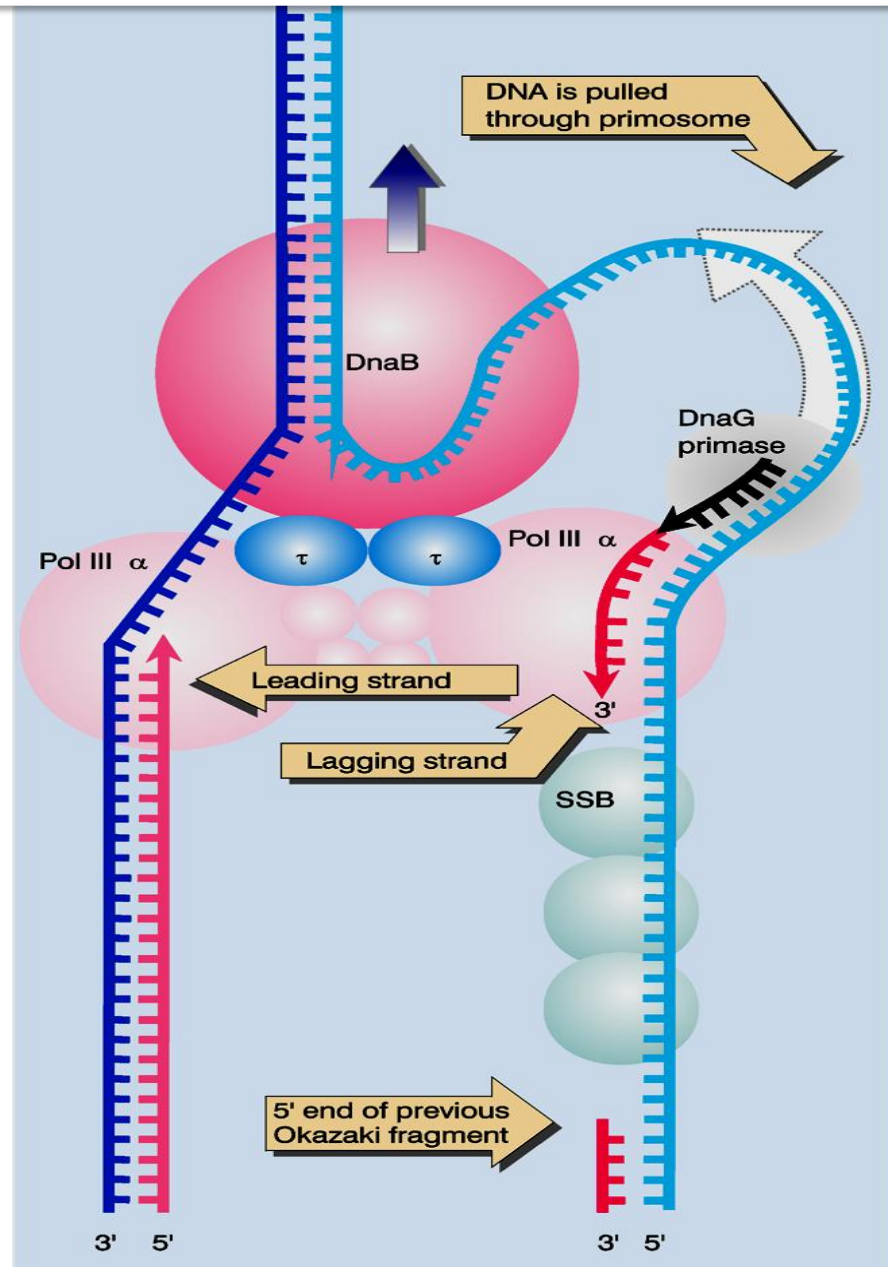
- A DNA polimerase I remove o primer de RNA e preenche as lacunas

- A DNA ligase sela as quebras

# REPLICAÇÃO DO DNA

## O complexo de replicação

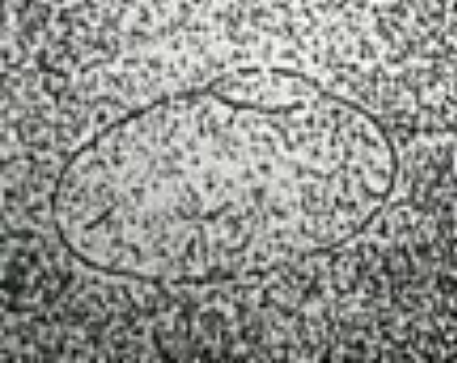
- A proteína DNA B (helicase) é responsável pelo movimento para frente da forquilha
- Cada core catalítico da DNA PolIII sintetiza uma das fitas-filhas
- O primossomo-primase afasta uma das fitas molde
- Proteínas SSB mantêm as fitas parentais separadas



# INÍCIO DA REPLICAÇÃO

Replicon: Unidade do DNA onde está ocorrendo um evento de replicação

1. Origem + Término
2. Durante um ciclo celular, a origem de replicação pode ser ativada **mais de uma vez em procariotos e uma vez em eucariotos**
3. O cromossomo de uma **célula procariótica** constituem um único replicon
4. Cada cromossomo **eucariótico** constitui vários replicons



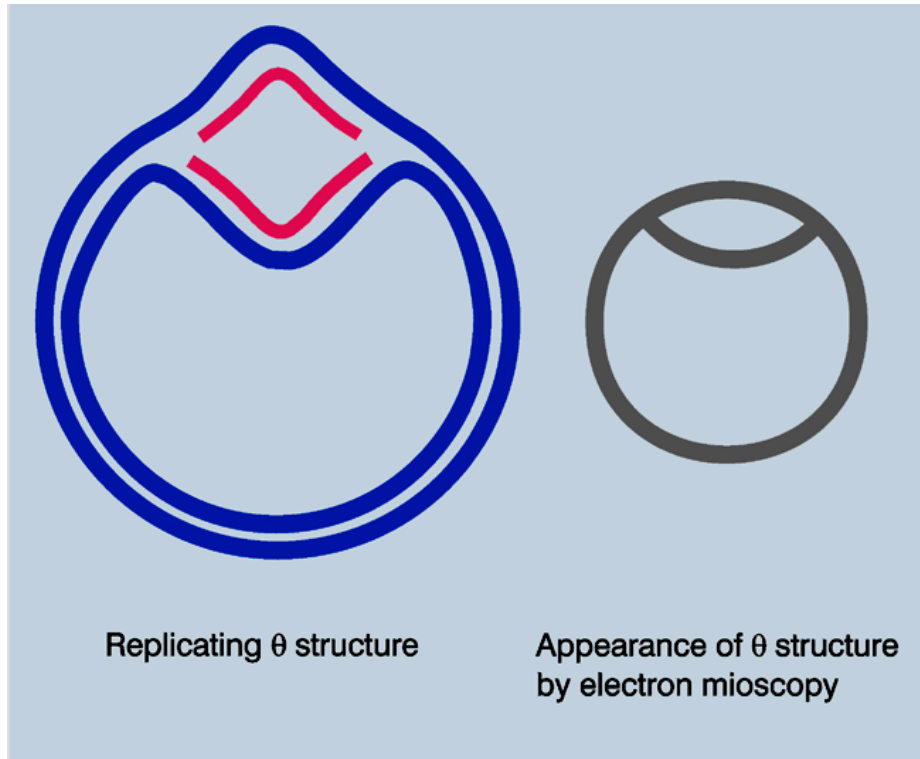
## INÍCIO DA REPLICAÇÃO - ORIGEM DA REPLICAÇÃO -

- Região do DNA onde a replicação começa
  - Origens de procariotos e eucariotos – ricas em AT
- *E. coli* – região de 245 pb essencial à replicação

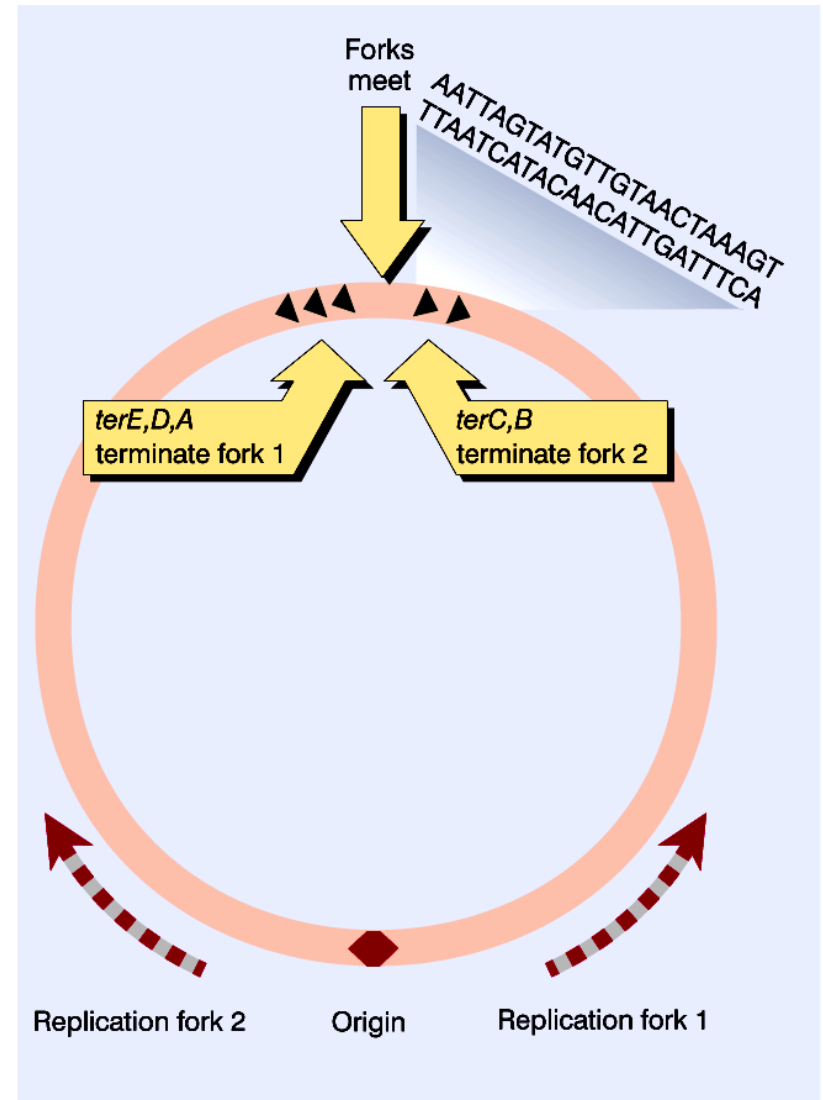
**3 sequências de 13 pb ricas em AT**

**4 sequências de 9 pb - TTAT(C/A)CA(C/A)A**

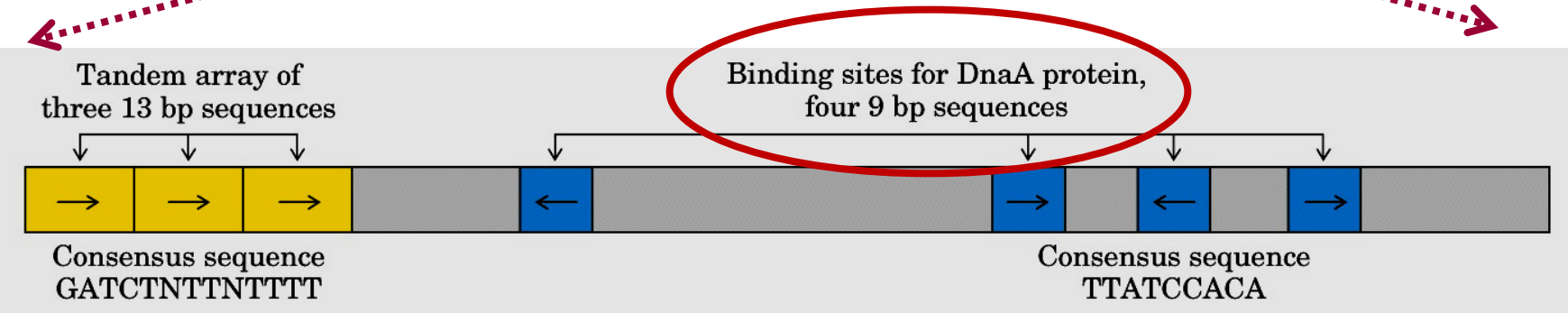
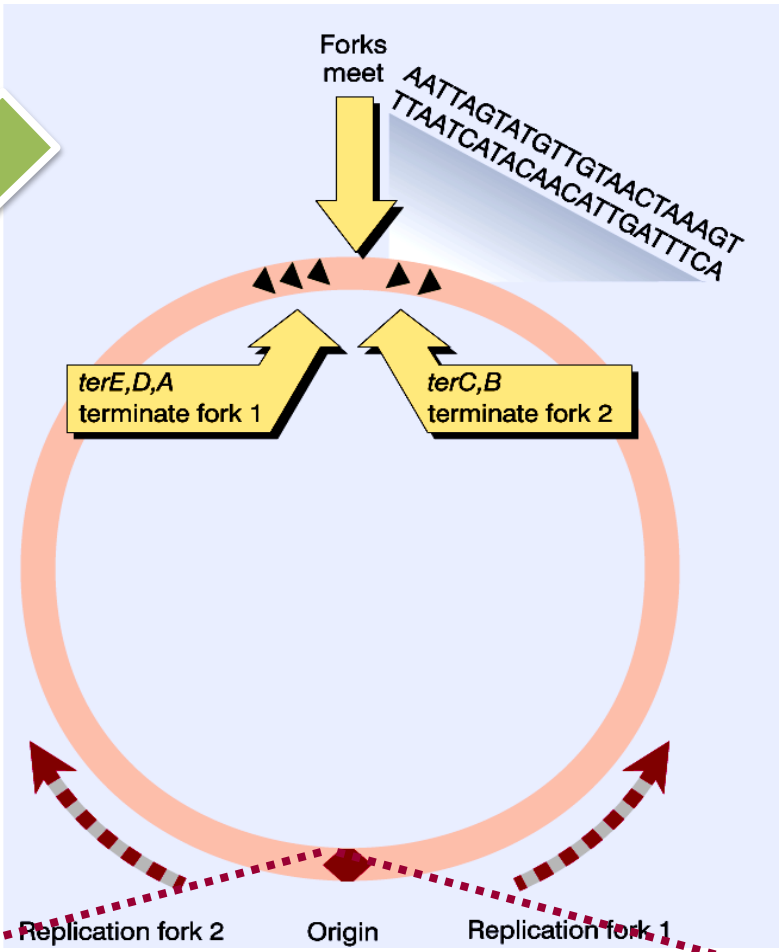
# O genoma bacteriano circular constitui um único replicon



- A velocidade da forquilha de replicação bacteriana é 50000pb/min
- Um única origem de replicação em *E.coli* (OriC, 245 pb)



Oric do cromossomo de E.coli



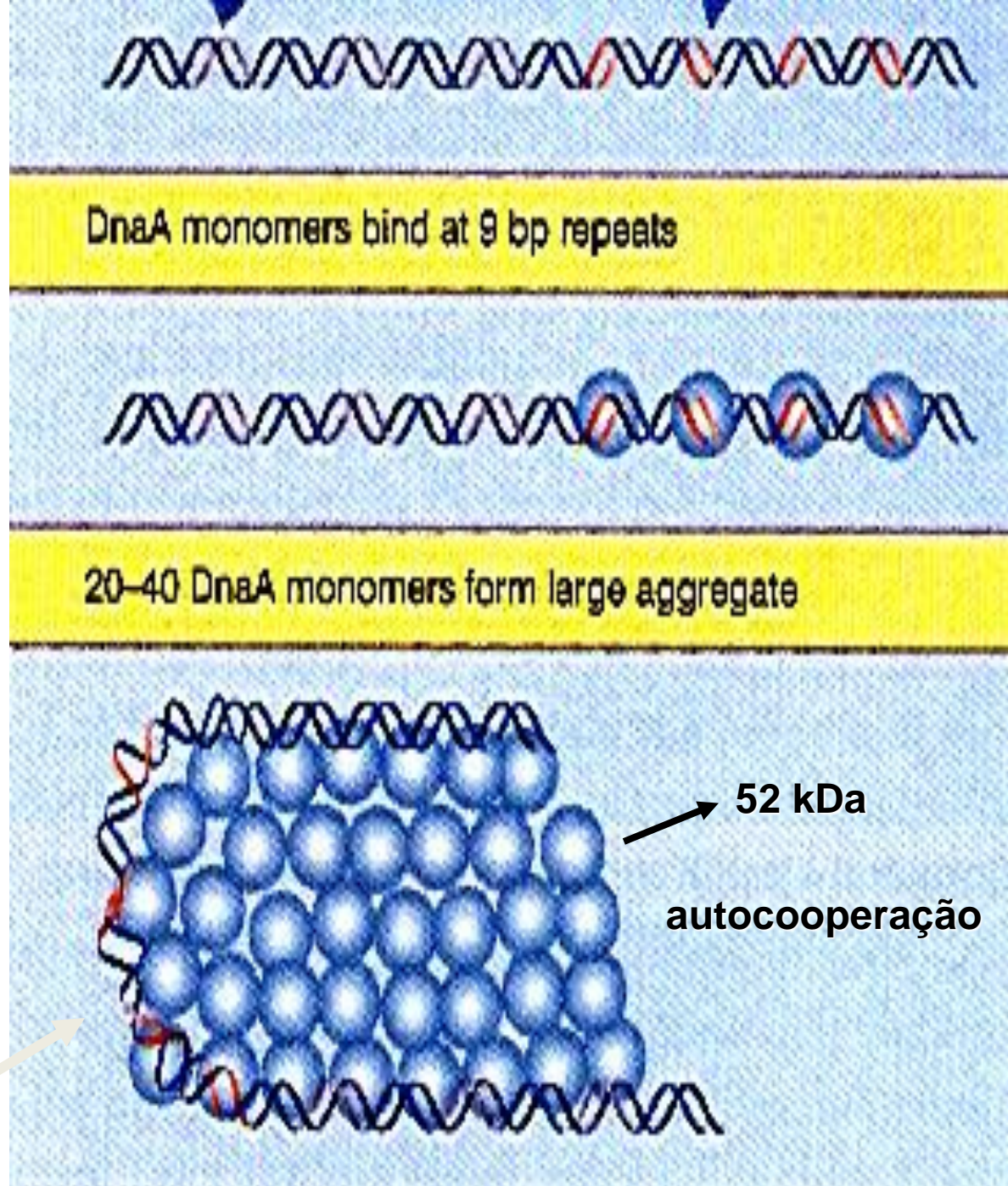


# Processo de início da replicação

## DNA A:

- ✓ Liga-se à origem, determinando início da replicação
- ✓ Induz à abertura das duas fitas de DNA
- ✓ Posiciona a proteína DnaB

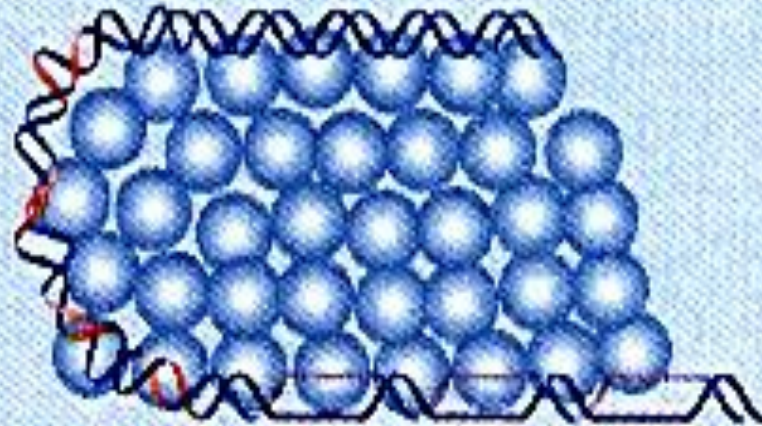
1- Complexo inicial



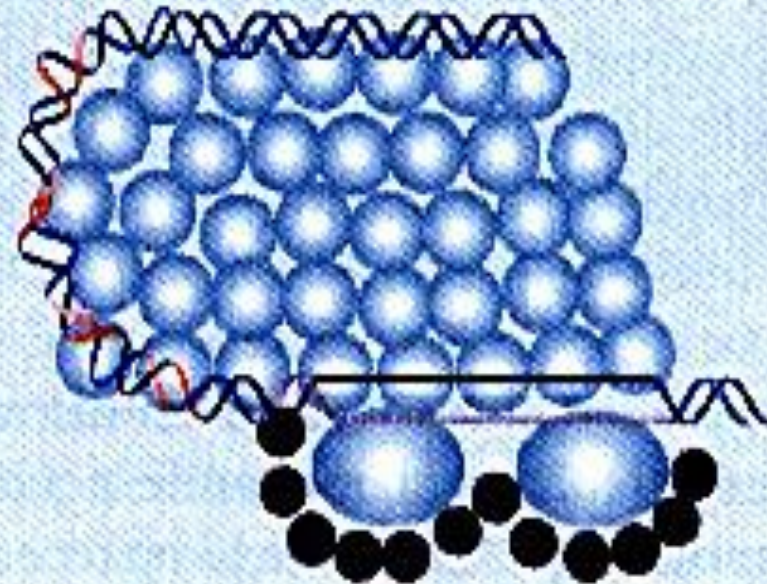


## 2- Complexo aberto

DNA strands separate at 13 bp repeats



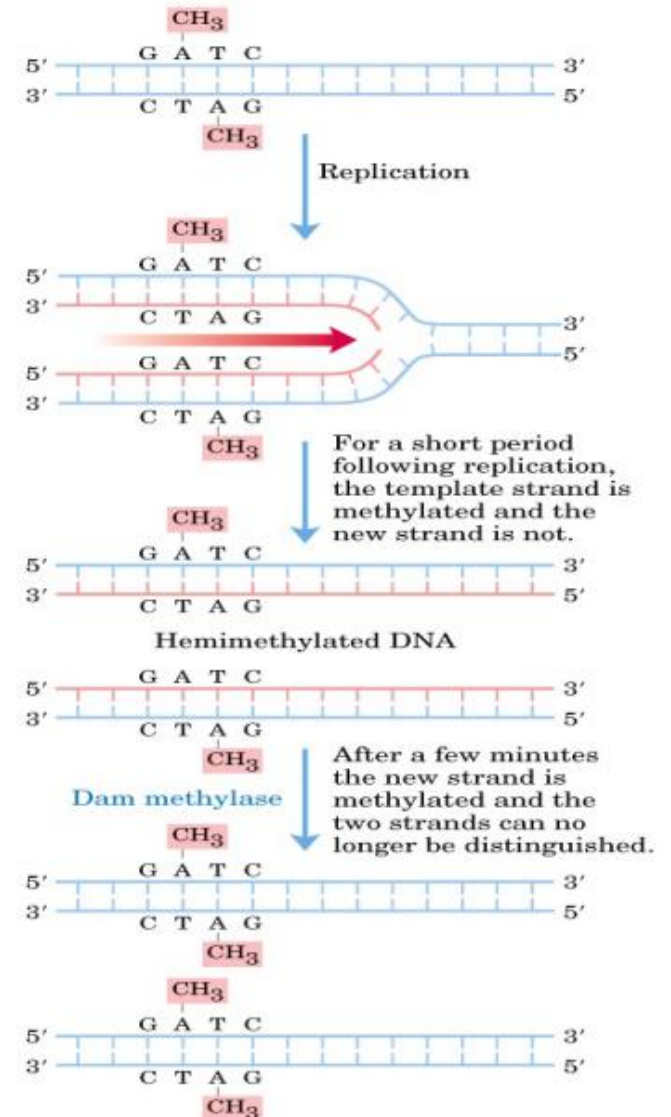
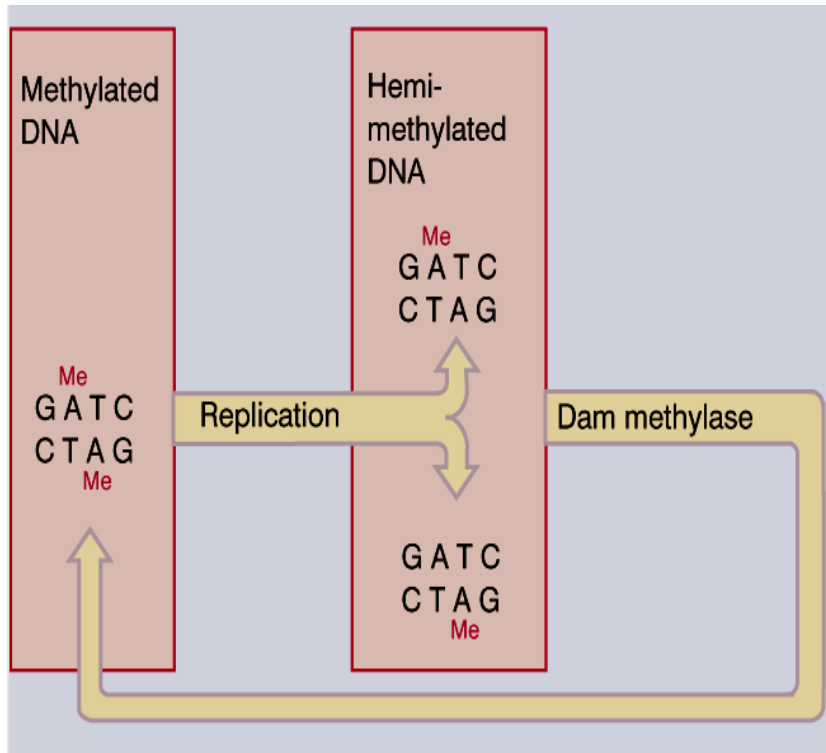
DnaB/DnaC joins complex, forming replication forks



## 3- Complexo *pré-priming*

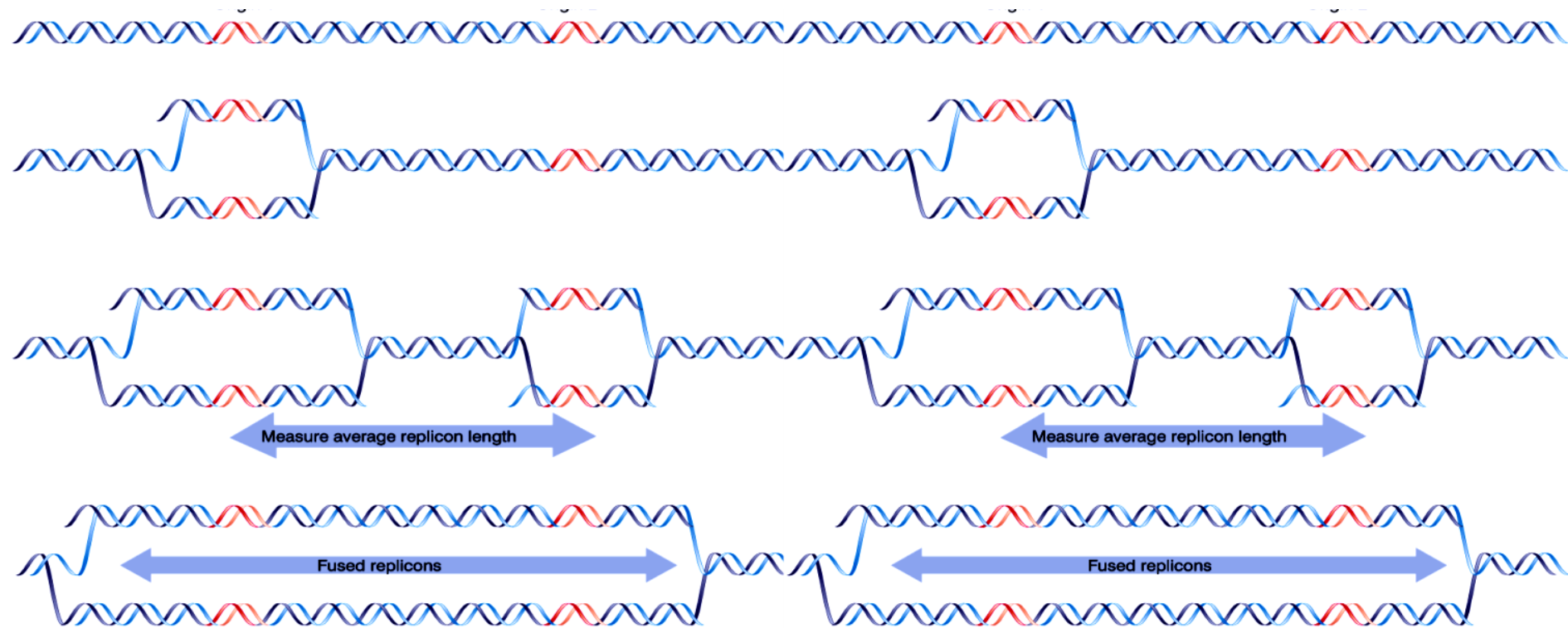
- ✓ DnaB – 13pb
- ✓ DnaB – DnaC – oriC
- ✓ Início da replicação
- ✓ Primase recrutada

# Origem de Replicação em bactérias: Somente origens completamente metiladas podem iniciar a replicação



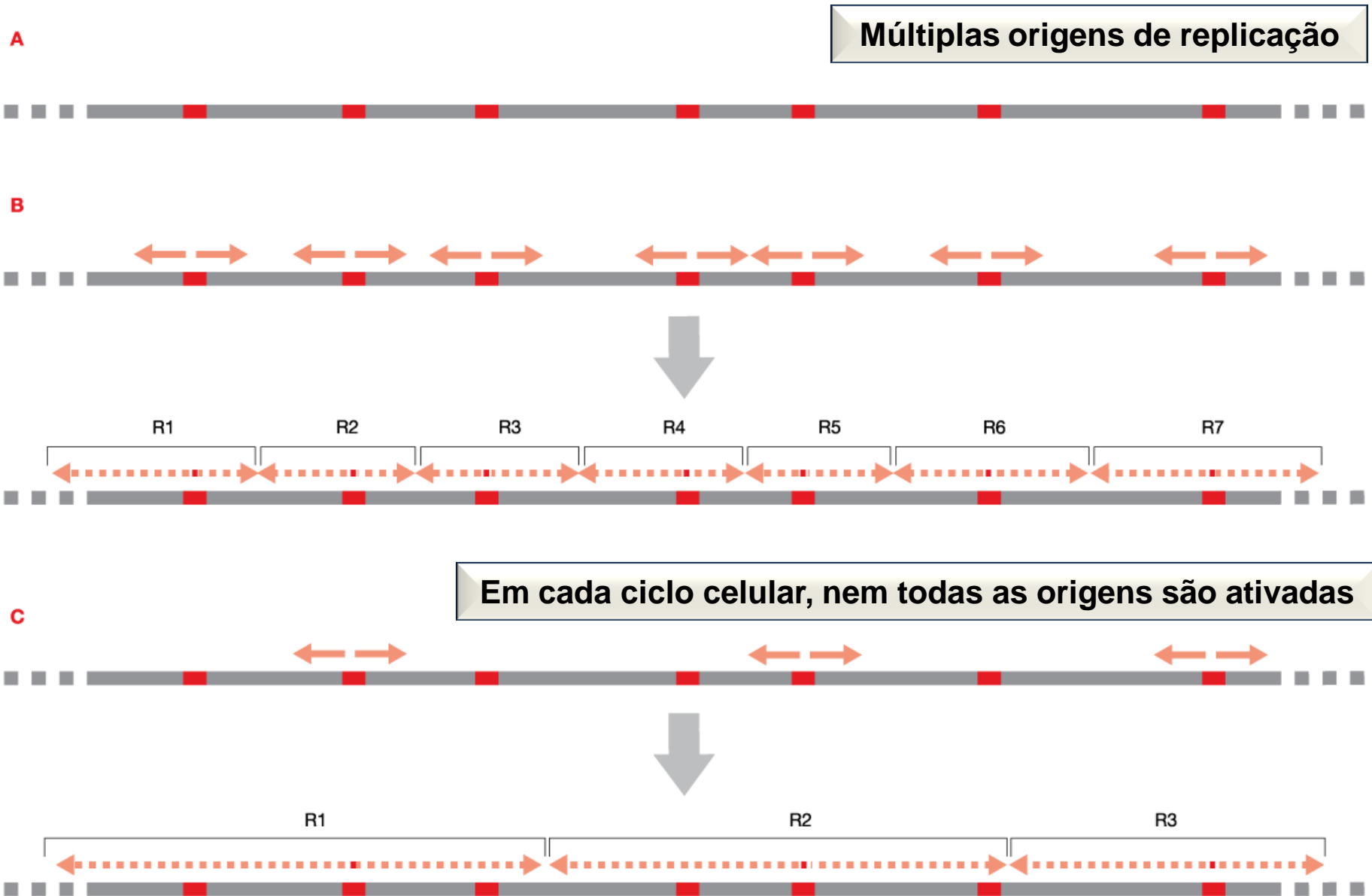
- Metilação – DNA hemi-metilado
- Garante que a origem será ativada uma vez por ciclo

# O genoma eucariótico constitui vários replicons



- A velocidade da forquilha de replicação eucariótica é 2000 pb/min
- Os replicons eucarióticos tem 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes
- Fase S demora ~ 6 h em uma célula somática

# Cromossomos eucarióticos se organizam em replicons...

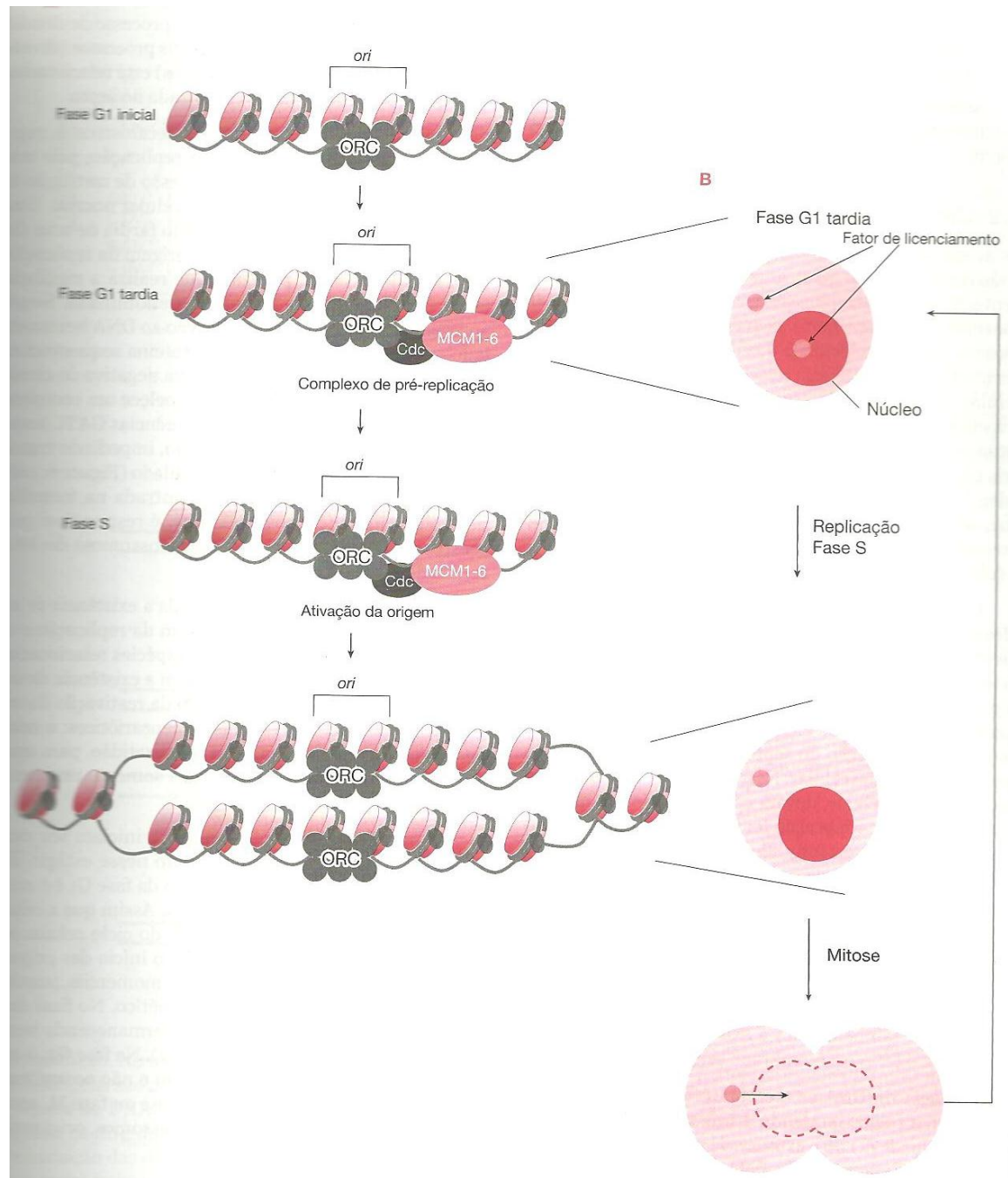




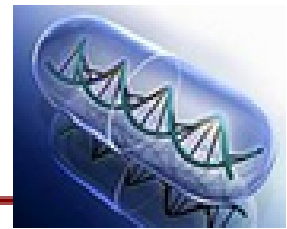
## Início da Replicação em Eucariotos

### ORC – Complexo de Reconhecimento de Origem da Replicação

- Proteínas relacionadas ao início da replicação em eucariotos;
- Domínios similares entre DnaA e ORC







# Término da Replicação

---

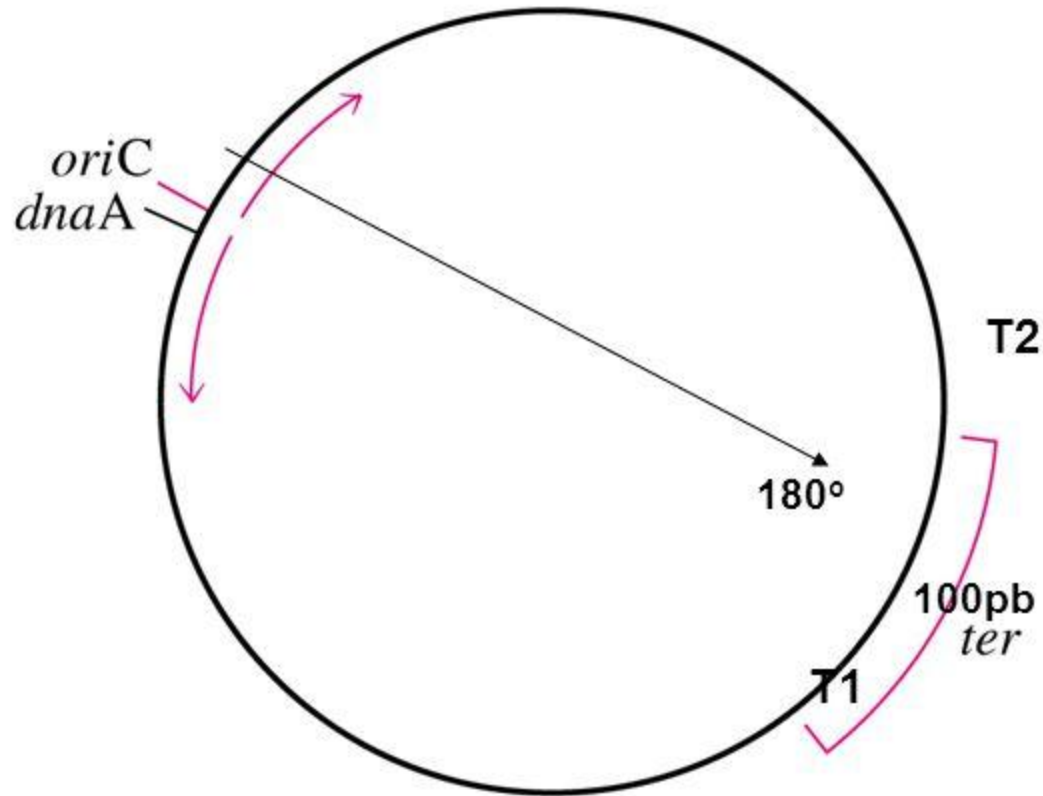
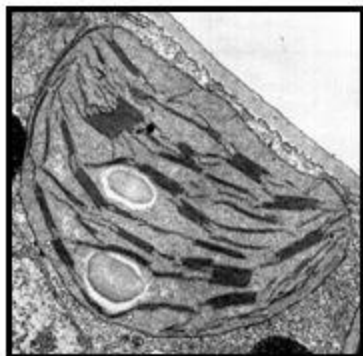
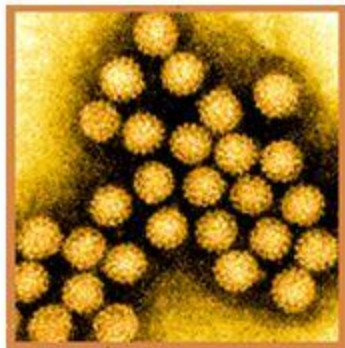
## PROCARIOTO

- Em *E. coli* podem existir 2 forquilhas de replicação que, durante o movimento bidirecional, encontram-se na região terminal *Ter* (180° a partir de *oriC*)
- **T1** e **T2** → regiões de terminação (específicas para a direção do movimento da forquilha).
- # Bidirecional – cada forquilha deve passar pela outra para finalizar a replicação.
- # Unidirecional – a forquilha deve retornar à origem de replicação.
- genomas circulares → não oferecem problemas de replicação.

# Término da Replicação



## PROCARIOTO



# Término da Replicação

---



## EUCARIOTO

• **Telômeros** → regiões terminais dos cromossomos de eucariotos formadas por seqüências bastante conservadas e repetidas.

# Telomerase- enzima responsável pela adição destas seqüências repetidas (RNA-polimerase) nos locais onde ocorreu a retirada dos *primers*

→ reconhecimento e ligação ao telômero

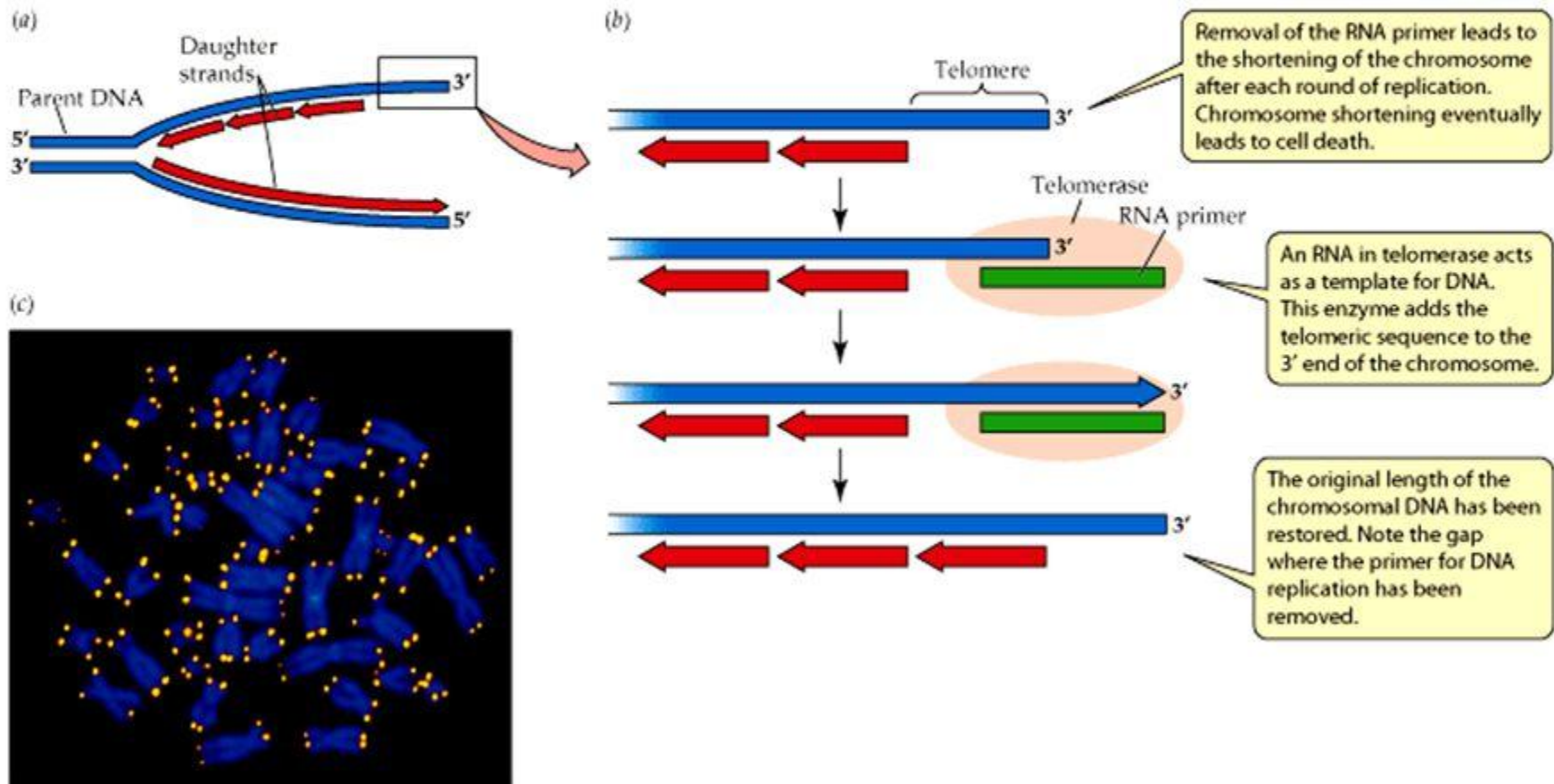
→ adição de nucleotídeos conforme o molde de RNA da enzima

■ A perda de sua função leva à morte celular.

# Término da Replicação



## Genomas Lineares → Telômeros



REPLICAÇÃO DE DNA LINEAR: o modelo demonstra o surgimento de extremidades não pareadas após a remoção dos primers no final da replicação

## **ANIMAÇÃO REPLICAÇÃO**

<http://www.hartnell.edu/tutorials/biology/dnareplication.html>

## **VÍDEO REPLICAÇÃO**

<https://www.youtube.com/watch?v=pin3569Qfgl>