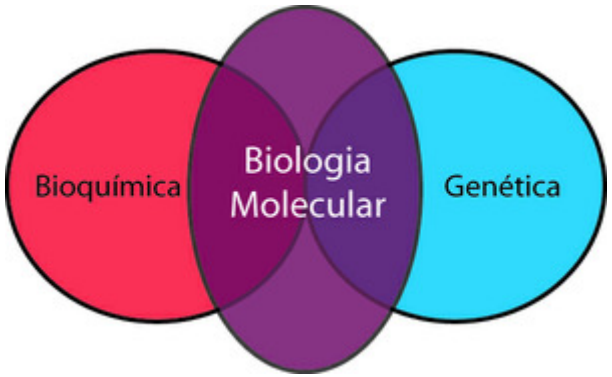
INTRODUÇÃO À BIOLOGIA MOLECULAR

Dr. Marcelo Marchi Costa
Defesa Agropecuária de Jaboticabal

Biologia Molecular (Genética Molecular)

Se relaciona com o estudo da estrutura e função dos genes, bem como da organização e funcionamento do genoma.



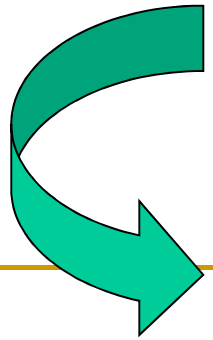
- Replicação, transcrição e tradução do material genético;

- Utiliza bioinformática e biologia computacional para estudar a estrutura e função dos genes

HEREDITARIEDADE

Passagem de informações específicas, minuciosamente detalhadas, dos organismos parentais para seus descendentes durante a reprodução.

Célula – veículo de informações hereditárias que define as espécies.



Diversos questionamentos

HISTÓRICO

1865 - GREGOR MENDEL

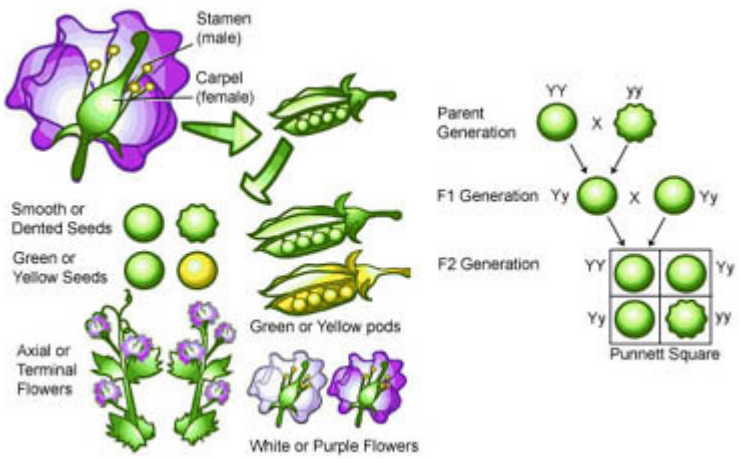
Estudou cruzamento entre diferentes tipos de ervilhas demonstrando que certas características físicas dessas plantas eram transmitidas de geração para geração através de "fatores".

© 1997 The Learning Company, Inc.

A HEREDITARIEDADE

- Herança particulada
- Monge austríaco
  - Foi contemporâneo de Darwin, mas jamais se encontraram...
- Publicou "Experimentos sobre a hibridização de plantas" em 1865 e foi citado apenas 3 vezes nos 35 anos que se seguiram!
- Morreu sem ser reconhecido, estava muito à frente de seus contemporâneos

Gregor Mendel (1822-1884)



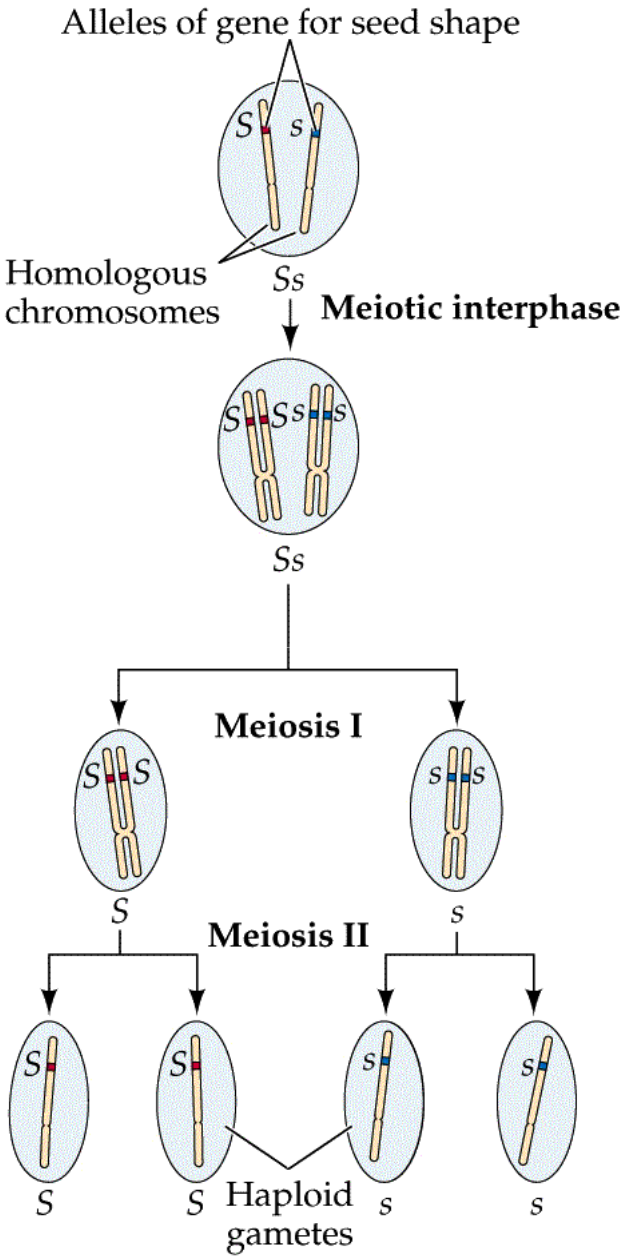
DESCOBERTAS DE MENDEL

- As características hereditárias são condicionadas por pares de "fatores" hereditários.
- Plantas puras são portadoras de apenas um tipo de fator (homozigoto), enquanto plantas híbridas são portadoras de dois tipos (heterozigoto).
- Cada gameta é portador de apenas um fator para cada característica

LEIS DE MENDEL

- Os dois alelos de cada gene presente em um indivíduo segregam-se (separam-se) na formação dos gametas

- Os alelos de dois ou mais genes de um indivíduo segregam-se independentemente, combinando-se ao acaso nos gametas



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

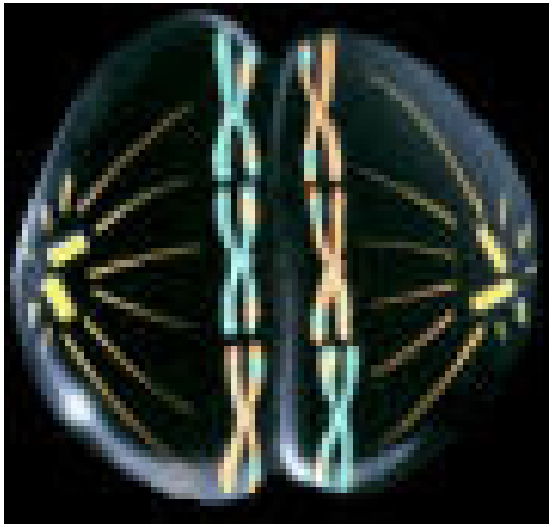
Re-Descoberta de Mendel

- 1900 - Carl Correns and Hugo de Vries
- Correns: publicou um trabalho em 1900 sobre hibridização citando Mendel e Darwin
- De Vries: publicou um trabalho sobre hibridização de plantas sem citar Mendel
- Refutação do darwinismo

Botânico holandês
1848-1935
De Vries

Botânico alemão
1864-1933
Correns

HISTÓRICO



1902 – SUTTON e BOVERI

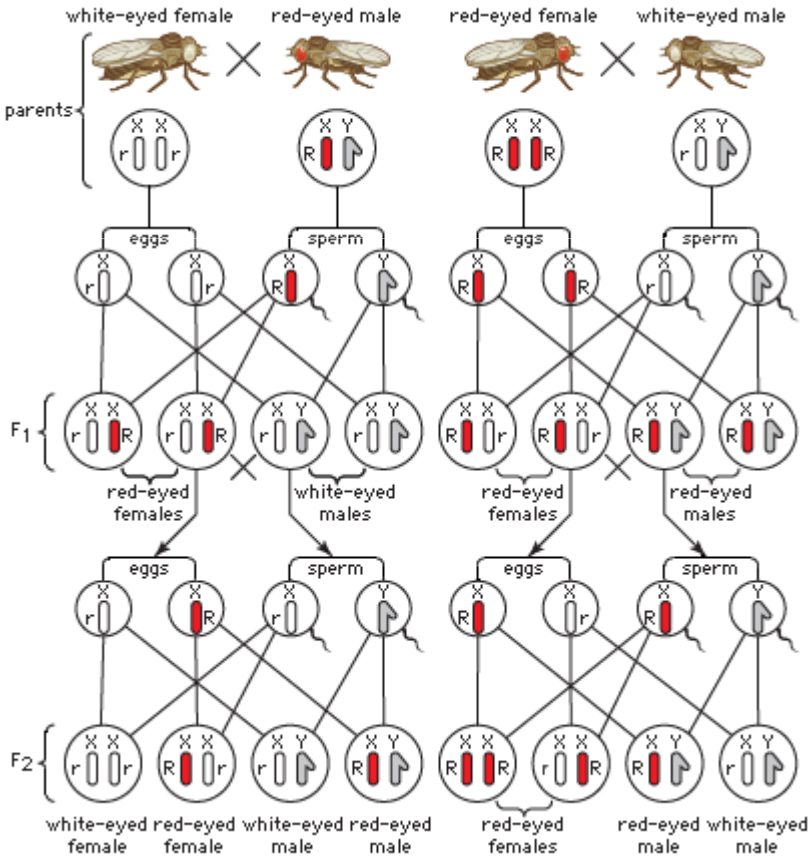
Padrão de herança dos "fatores" acompanhava a segregação dos cromossomos de células em divisão

1909 – JOHANNSEN

Nomeou as unidades mendelianas da hereditariedade ("fatores") de GENES

THOMAS H MORGAN

- ✓ Teoria cromossômica da herança
- ✓ Genética de drosófila
- ✓ Explicava a modificação das características em populações ao longo do tempo
- ✓ Integrou, finalmente, Mendel e Darwin



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

HISTÓRICO

1915 – THOMAS MORGAN

Concluiu que os genes estavam organizados de maneira linear nos cromossomos

Propôs, pela 1ª vez, uma correlação entre um gene (genótipo) e uma característica física (fenótipo)

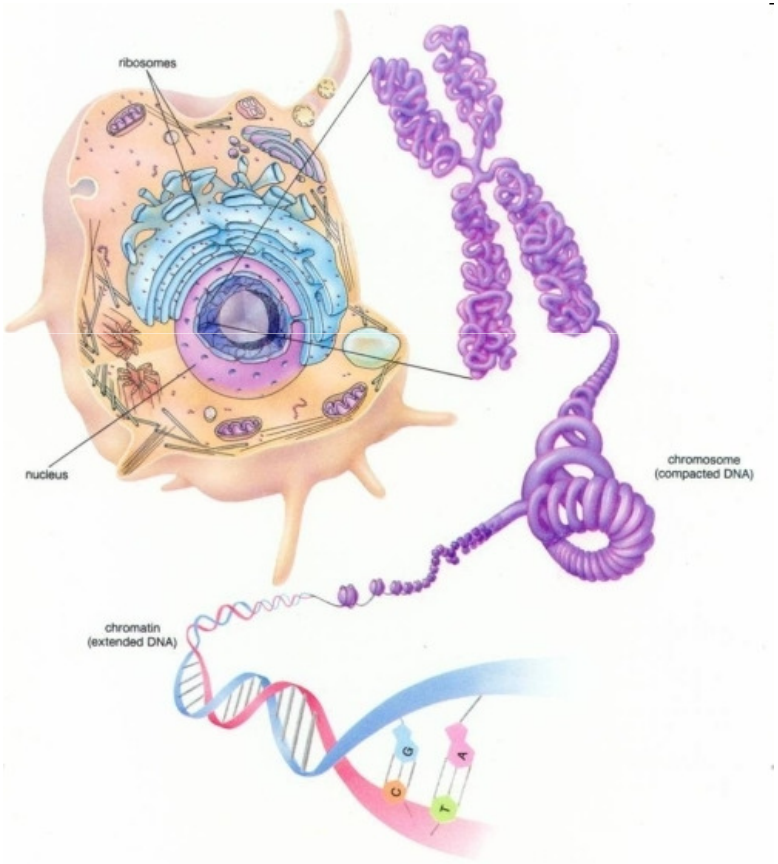
1941 – BEADLE e TATUM

Demonstraram que os genes agiam através da regulação de diferentes eventos químicos

HIPÓTESE: UM GENE → UMA ENZIMA

MAS DE QUE É FEITO O GENE?

- ✓ Resposta de 1940: só pode ser de proteína
- ✓ Polímero complexo, realiza funções catalíticas (ou seja, funciona como enzima)
- ✓ Provavelmente desempenha as principais funções celulares, atuando como máquina molecular
- ✓ E os ácidos nucléicos?
  - ✓ Não podem ser, são moléculas muito simples e presentes em quantidades muito pequenas dentro da célula
- ✓ DOGMA: ninguém questiona a afirmativa, era difícil mesmo encontrar alguém que trabalhasse com ácidos nucléicos à época
- ✓ Procura-se explicar a hereditariedade a partir de proteínas



Descrição moderna da célula, à época mal sabiam o que tinha lá

AVERY, MACLEOD, MCCARTY

Procedures:

1. The encapsulated, virulent bacteria is injected into the mouse. The mouse dies.

2. The non-encapsulated, avirulent bacteria is injected into the mouse. The mouse lives.

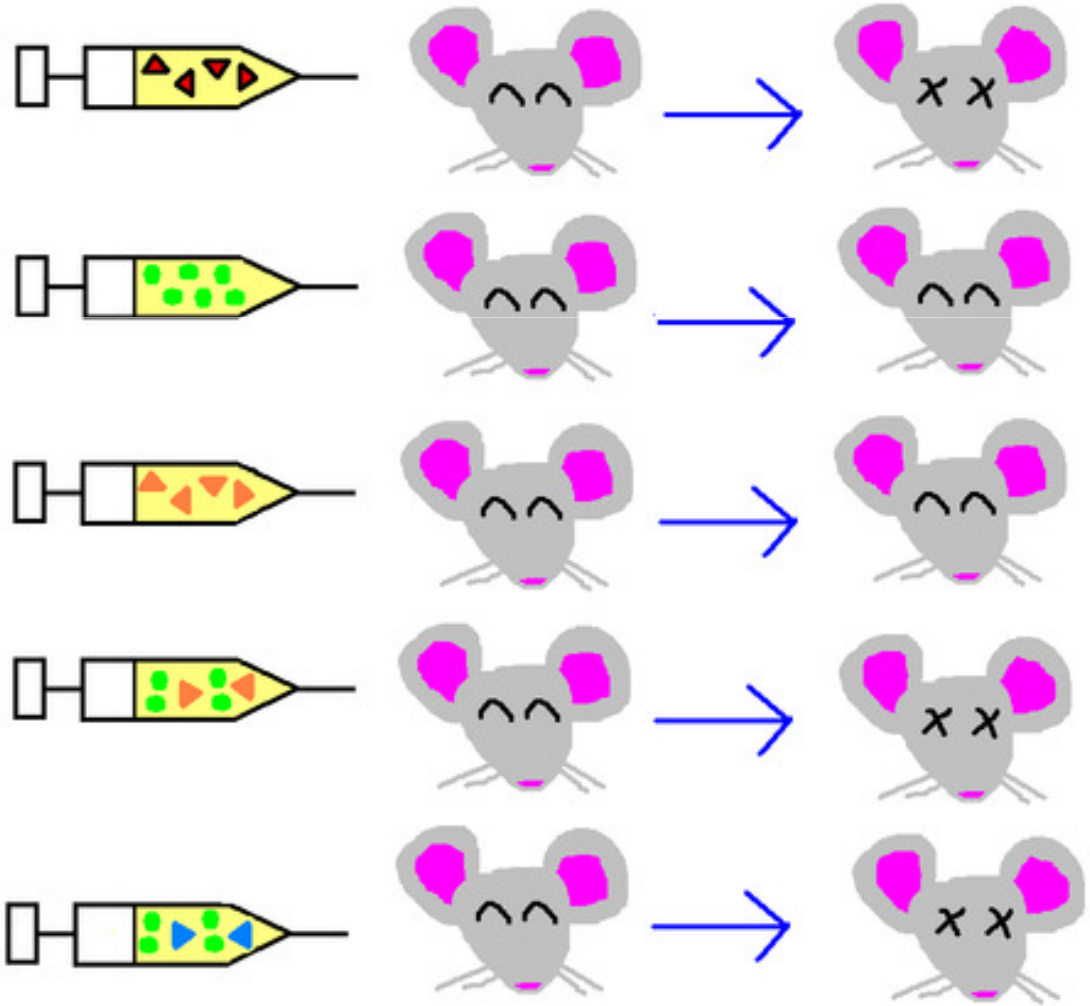
3. The heat-killed, virulent bacteria is injected into the mouse. The mouse lives.

4. The heat-killed, virulent bacteria is mixed with the non-encapsiated avirulent bacteria and injected into the mouse. The mouse dies.

5. The DNA extracted from the heat-killed, virulent bacteria is mixed with the non-encapsiated avirulent bacteria and injected into the mouse. The mouse dies.

Legend:

- encapsulated, virulent bacteria
- heat-killed, virulent bacteria
- DNA extracted from
- non-encapsulated, avirulent bacteria



AVERY, MACLEOD, MCCARTY

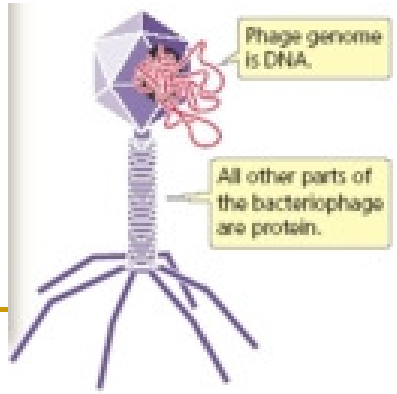
Oswald Theodore Avery
1877 –1955

- ✓ Griffiths (1928)
  - ✓ Princípio transformante era passado da cepa virulenta (morta) para a não-virulenta, matando os camundongos
- ✓ 1944: os três pesquisadores mostraram que seu princípio transformante continha composições químicas tais quais a do DNA
- ✓ Ceticismo: Alfred Mirsky disse que o DNA de AMM deveria estar contaminado com proteínas...
  - ✓ Poucos biólogos à época achavam que a genética podia ser aplicada às bactérias, posto que elas reproduziam assexuadamente e não tinham cromossomos
  - ✓ Lederberg e Tatum, entretanto, publicaram um artigo sobre a conjugação bacteriana (1946)

HERSHEY E CHASE

Martha Cowles Chase 1927–2003 Alfred Day Hershey 1908–1997

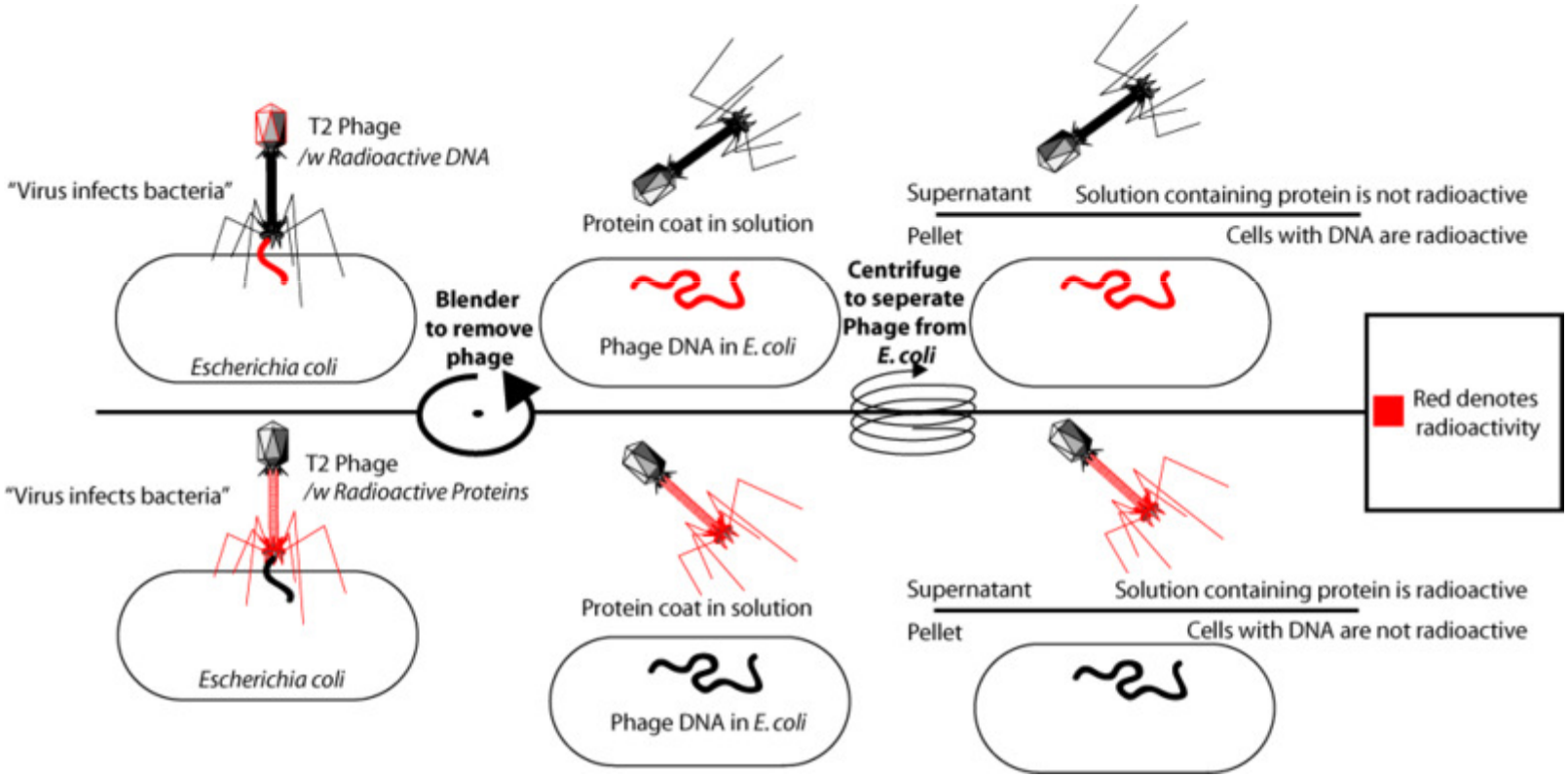
- ✓ Infecção por bacteriófagos
  - ✓ Marcação radioativa de DNA e proteínas do bacteriófago T2 (1952)
- ✓ Enquanto a fração protéica ficava no sobrenadante, a fração de ácidos nucléicos podia ser vista posteriormente dentro da bactéria
- ✓ Confirmação final de que era através do DNA que as informações sobre hereditariedade eram passadas



HERSHEY E CHASE

DNA – marcação com P-radioativo

Proteína – marcação com S-radioativo



CONCLUSÃO: GENÉTICA

- ✓ A herança biológica está codificada em pares de fatores
  - ✓ Genes em organismos diplóides
- ✓ Tais fatores estão nos cromossomos e são feitos de DNA
- ✓ A hereditariedade agora podia ser explicada pela transmissão de moléculas
- ✓ Morte do Vitalismo e integração da biologia à metodologia rígida de trabalho das ciências exatas

Jean Brachet (1909 – 1998)

- Cientista belga trabalhando em Bruxelas
- **1933**
  - DNA está no núcleo, RNA no citoplasma
- **1951**
  - Enfatiza a correlação entre o conteúdo de RNA de uma célula e a síntese de proteínas
- **~1952**
  - Corta a alga em duas metades e percebe que a metade sem núcleo continua produzindo proteínas
    - DNA não tem participação na síntese de proteínas

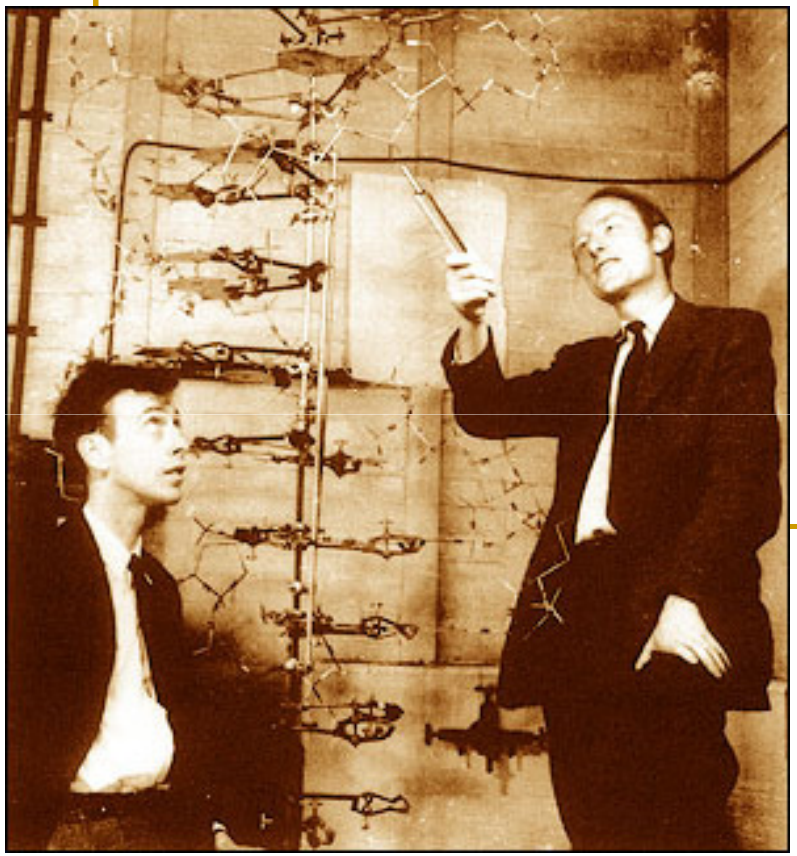
HISTÓRICO

1953 – JAMES WATSON e FRANCIS CRICK

Descrição da estrutura física do DNA baseando-se nos estudos de difração de raio X de Rosalind Franklin e Maurice Wilkins e em estudos químicos da molécula

Modelo da dupla fita proposto foi fundamental para a compreensão do mecanismo de transmissão e execução da informação genética

Introdução à Biologia Molecular: Estrutura e Função do DNA



James Watson, Francis Crick e o Modelo (1950)

"We have discovered the secret of life"

► DNA, em inglês "*Deoxyribonucleic acid*" ou ADN (Ácido desoxirribonucleico);

► A descoberta da estrutura foi um dos grandes marcos da biologia no século XX;

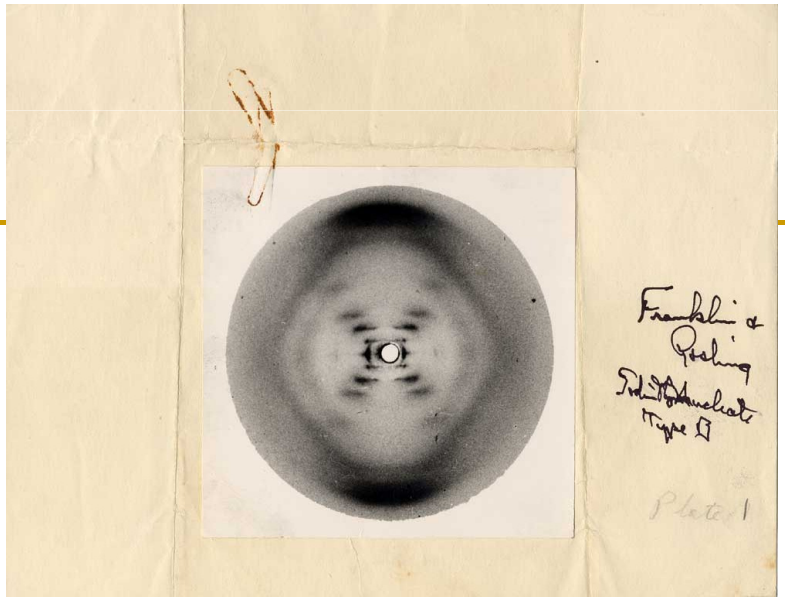
► Determinada por uma estrutura de ferro e madeira, imitando uma hélice dupla usada pelos cientistas James Watson e Francis Crick.

DNA

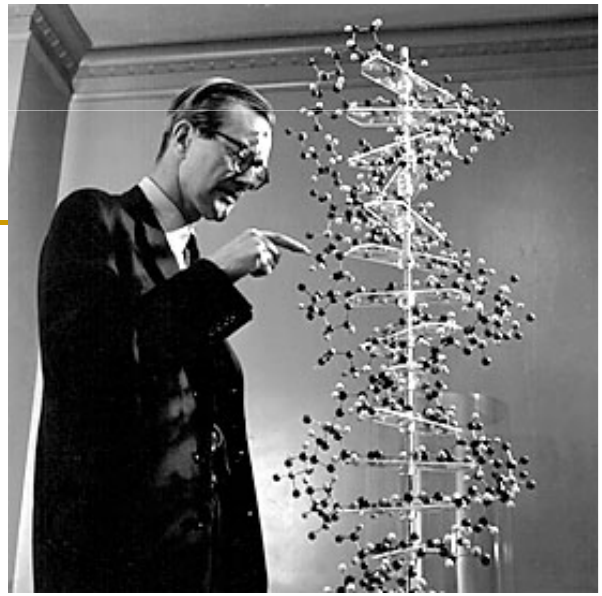
Ajuda de outros cientistas:

Watson teve acesso a uma cópia da fotografia de difração de raios-X por Maurice Wilkins e obtida por Rosalind Franklin, e em menos de um mês, com a fotografia em mãos, Watson e Crick chegaram à estrutura correta.

Rosalind Franklin
(1920-1958)



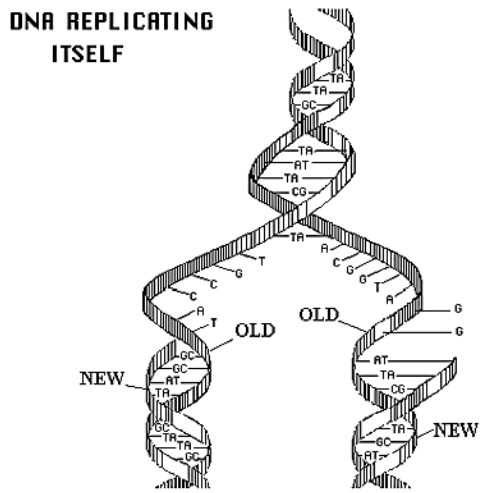
Fotografia da difração de
raio-x do DNA

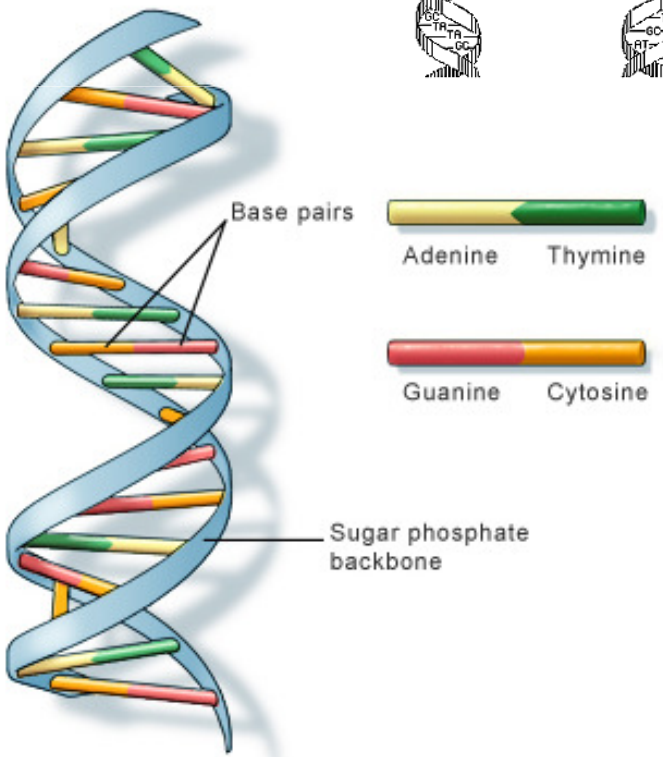


Maurice Wilkins
(1916-2004)

A dupla hélice

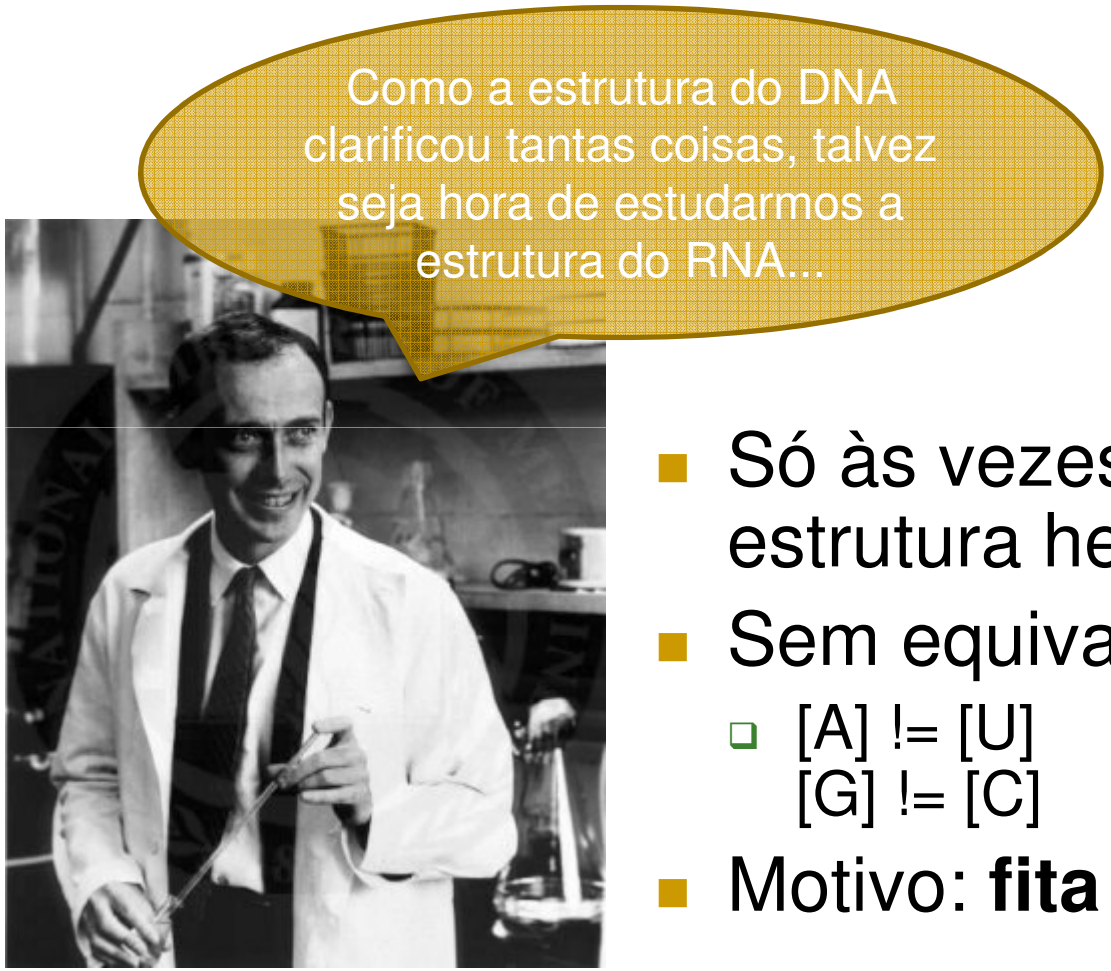
- Alto **poder explicativo** e **preditivo**:
  - Como seria codificado um gene
  - Como ocorreria a duplicação do DNA
  - Estrutura química precisa da molécula
  - Proporções de bases
- **Novas perguntas**...
  - Pra quê servia o RNA?
  - Como acontecia a síntese de proteínas





U.S. National Library of Medicine

A estrutura do RNA



1953: Watson muda-se para Pasadena

Trabalha com **Alex Rich** na estrutura do RNA

Mas...

- Só às vezes parecia ter estrutura helicoidal...
- Sem equivalência
  - [A] != [U]
    [G] != [C]
- Motivo: **fita simples**

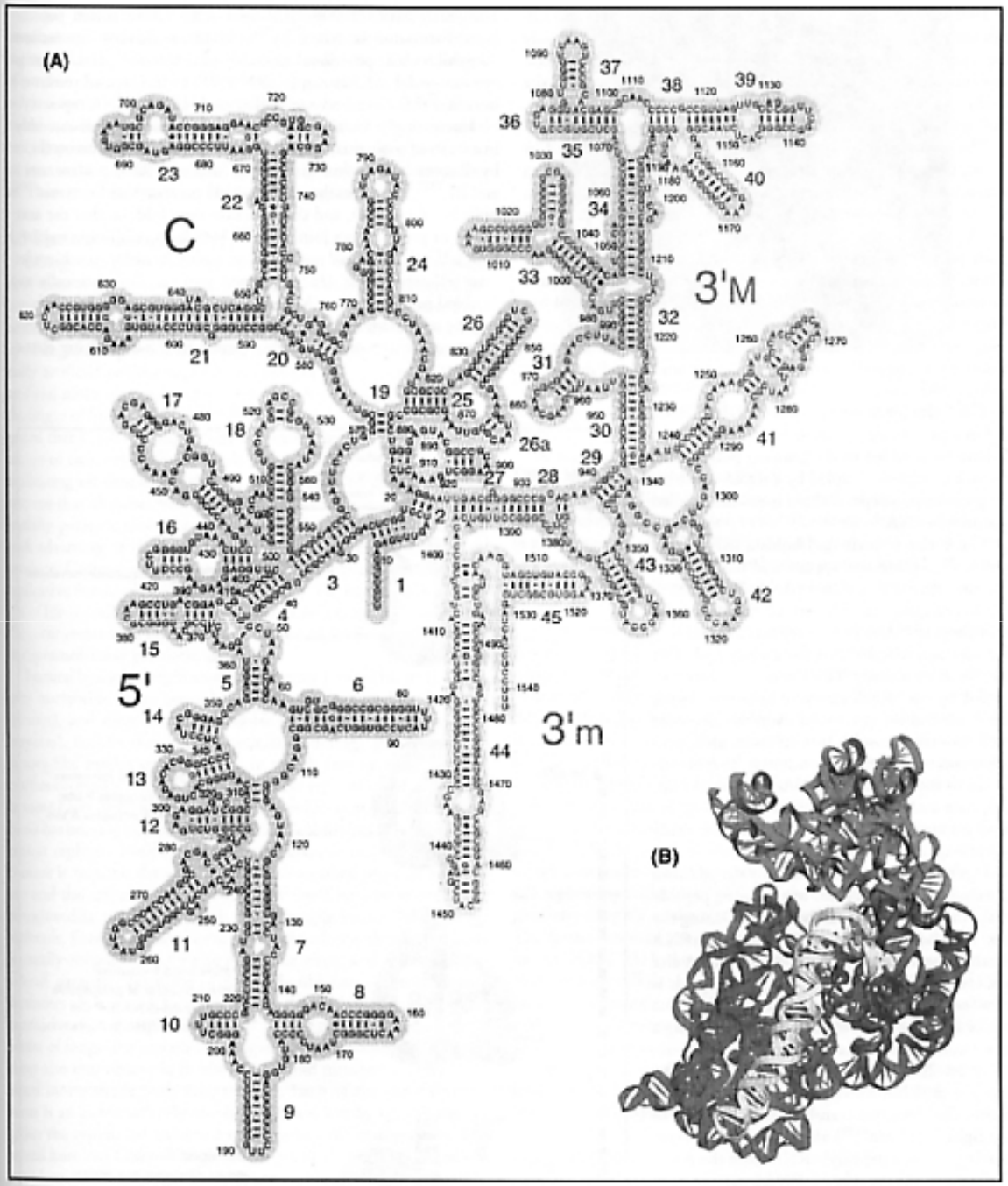


Figure 4.10. Nucleotide base layout (A) and 3-D folded structure (B) of the 16S rRNA, comprising the small 30S subunit.[1688] (courtesy of Yusupov et al)

HISTÓRICO

1955 – JOE HIN TJIO

Definiu como 46 o número exato

de cromossomos humanos

ARTHUR KORNBERG

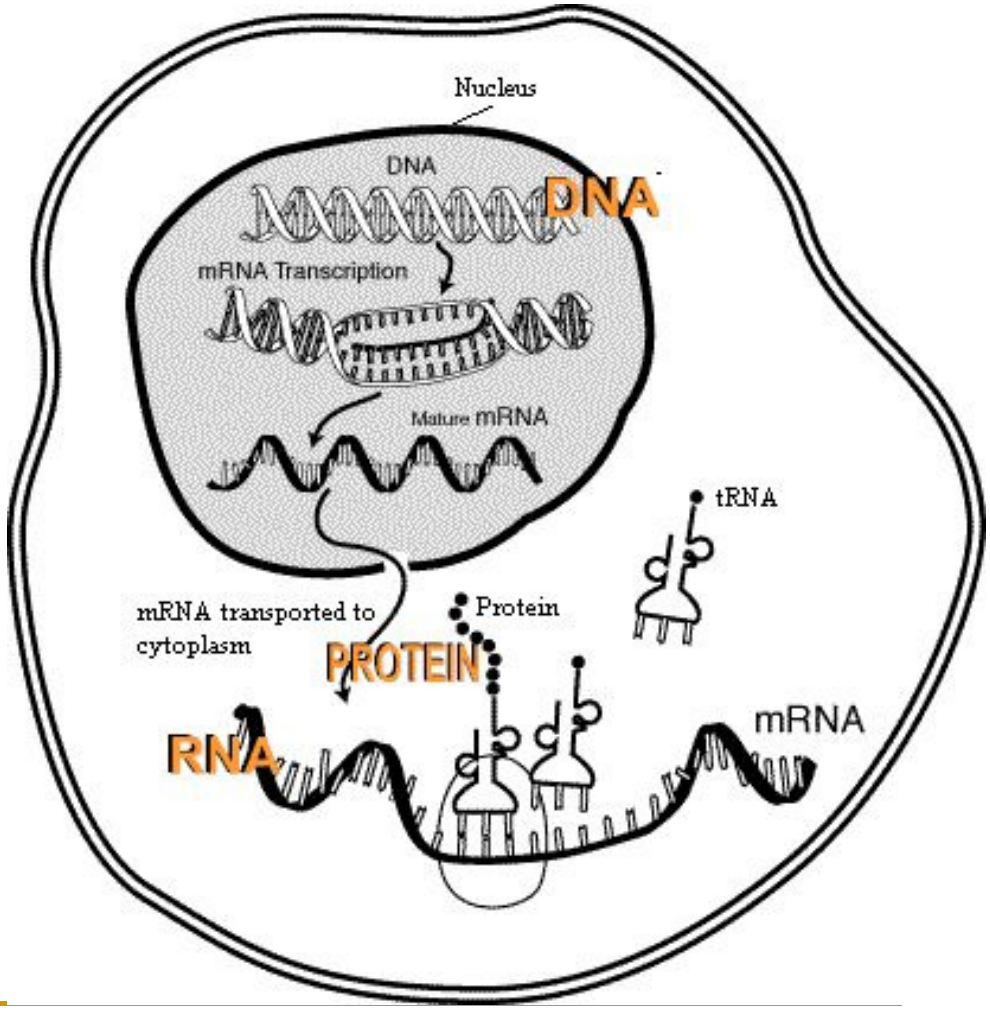
Isolou a enzima DNA polimerase da bactéria *E.coli*

HISTÓRICO

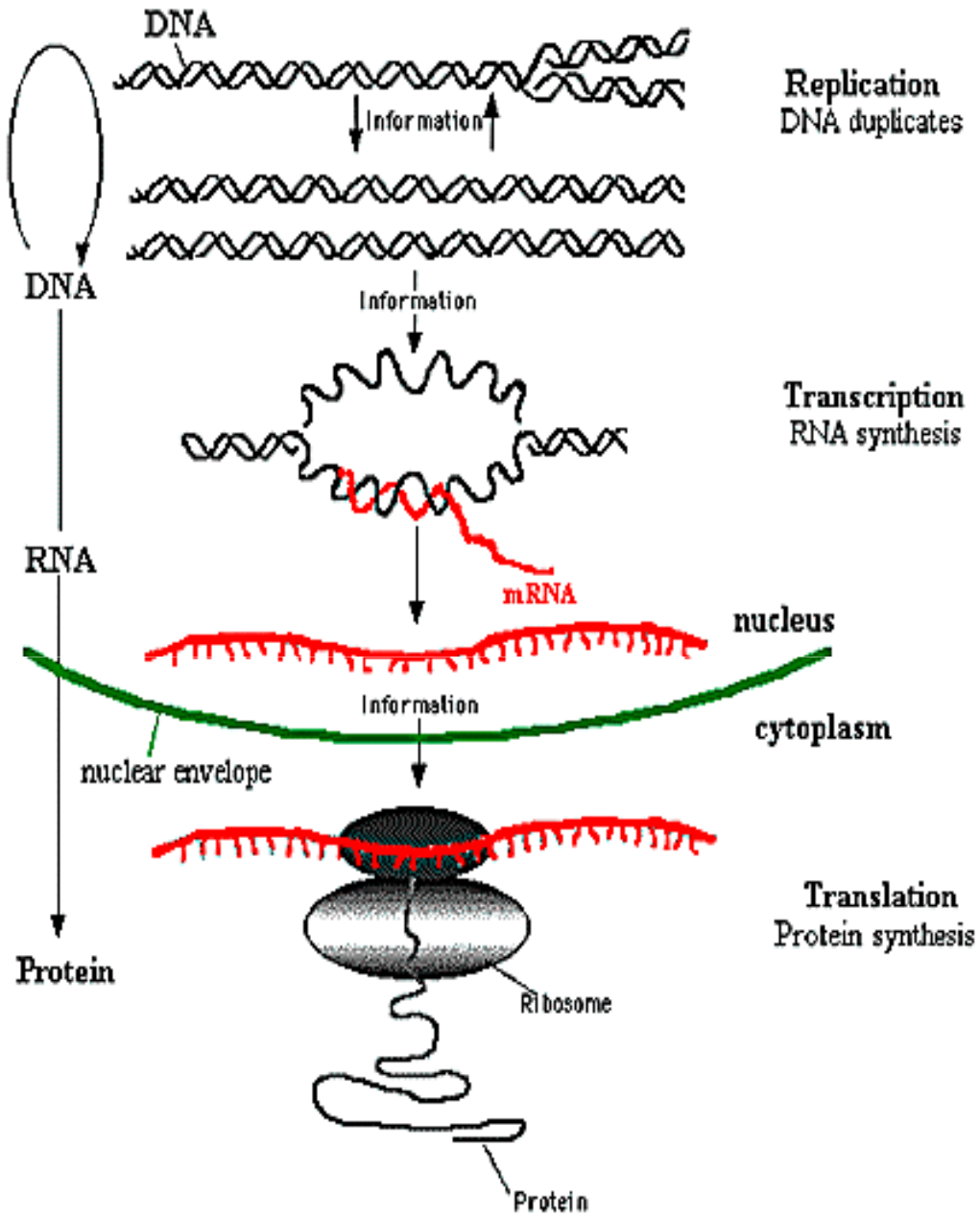
1957 – CRICK e GAMOV

Dogma Central da Biologia Molecular

DNA → RNA → PROTEÍNA



Dogma Central da Biologia Molecular



The Central Dogma of Molecular Biology

HISTÓRICO

- **1961 – BRENNER, JACOB e MESELSON**

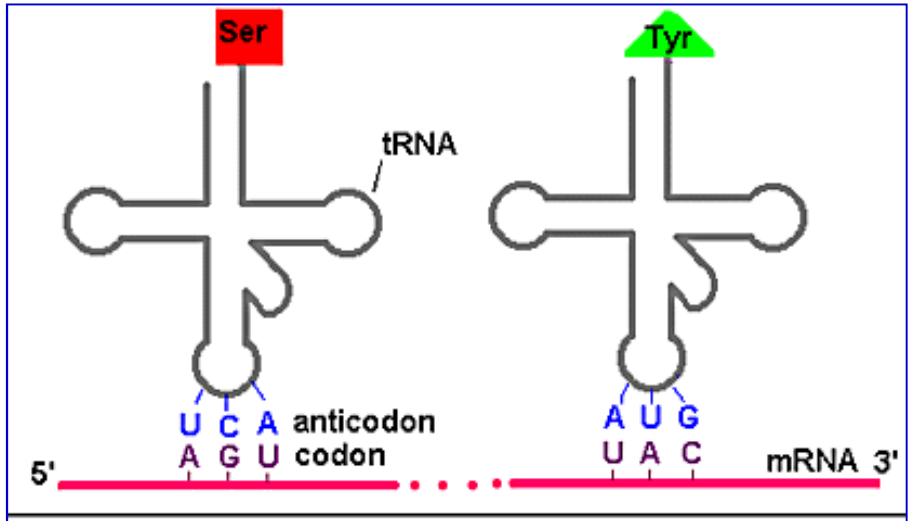
- **mRNA é a molécula que leva informação do DNA no núcleo para a maquinaria de produção de proteínas no citoplasma**

HISTÓRICO

O CÓDIGO GENÉTICO É DESVENDADO!!!

1966 – NIRENBERG, KHORANA e OCHOA

Seqüências sucessivas de três nucleotídeos do DNA (codon) determinam a seqüência de aminoácidos de uma proteína



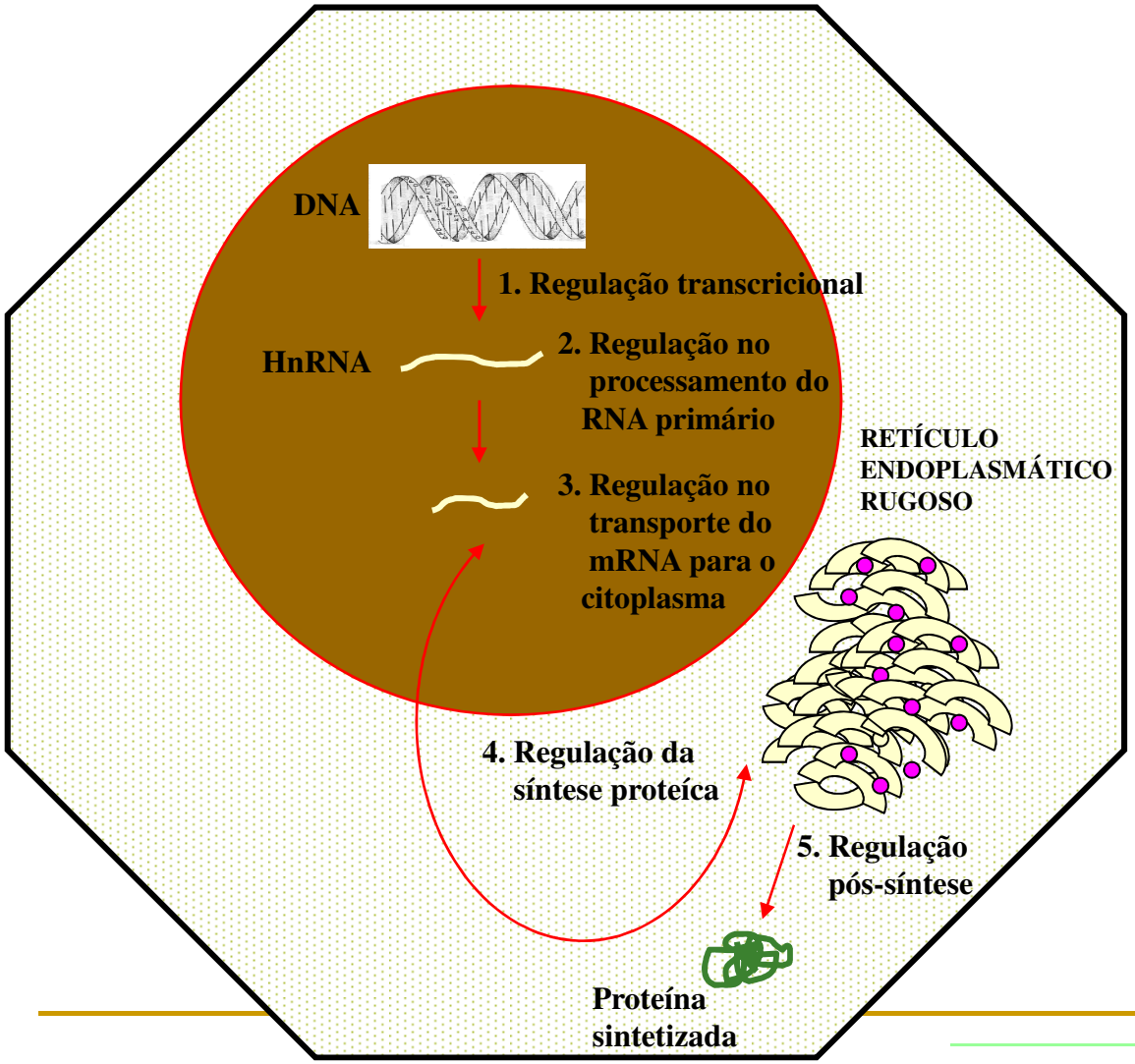
2nd base in codon

1st base in codon	U	C	A	G	3rd base in codon
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

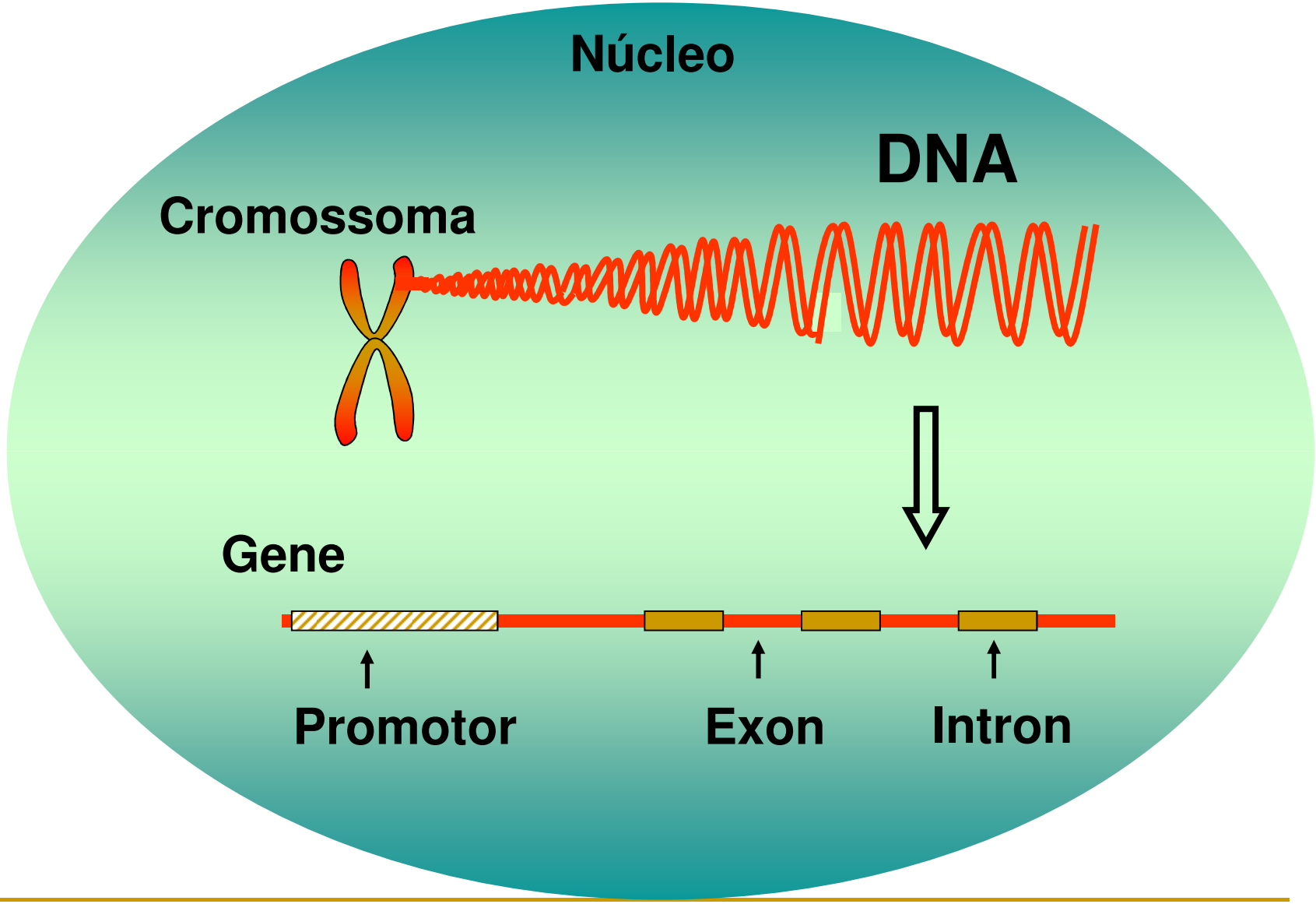
Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante (1972) e do seqüenciamento do DNA (1975-77) tornou-se possível isolar e determinar a seqüência de genes dos mais diferentes organismos.

Desta forma, com a disponibilidade de novos recursos, vários mecanismos biológicos, como a replicação do DNA e a divisão celular, começaram a ser intensamente estudados.

A CÉLULA



- DIFERENCIAÇÃO
- CRESCIMENTO
- FUNÇÃO CELULAR
- RESPOSTA AO AMBIENTE


Núcleo
DNA
Cromossoma
Gene
Promotor
Exon
Intron

DNA

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

Contém toda a informação genética de um organismo

Esta informação está arranjada em unidades hoje conhecidas como genes

DNA

Ácidos nucléicos

• **Sequências de monômeros que possuem toda a informação genética da célula;**

Funções do DNA ou Material Genético

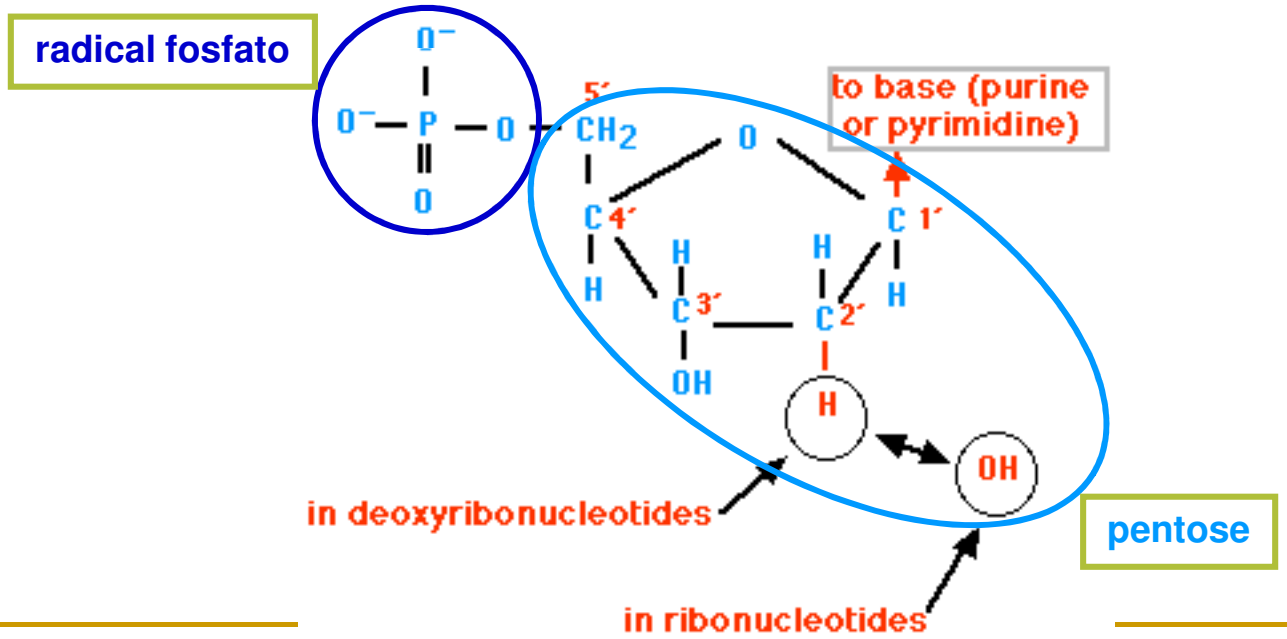
• Genotípica: **replicação**. O material genético deve estocar a informação genética e transmitir com precisão esta informação para a prole.

• Fenotípica: **expressão gênica.** O material genético deve controlar o desenvolvimento do fenótipo do organismo.

• Evolutiva **: mutação**. O DNA deve sofrer mudança para que os organismos possam se adaptar as modificações no ambiente.

ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

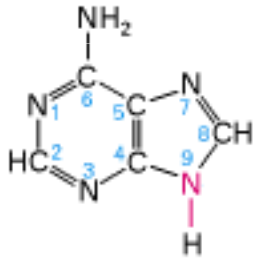
Todos os nucleotídeos apresentam uma estrutura em comum:



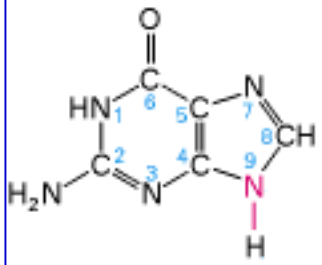
ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

As bases nitrogenadas podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua estrutura:

PURINES

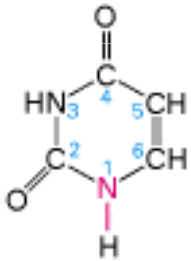


Adenine (A)

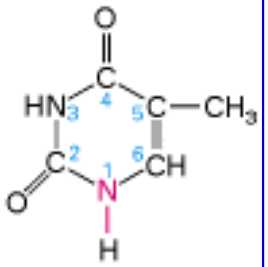


Guanine (G)

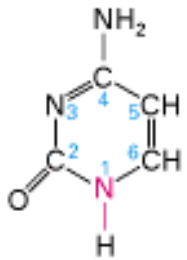
PYRIMIDINES



Uracil (U)



Thymine (T)



Cytosine (C)

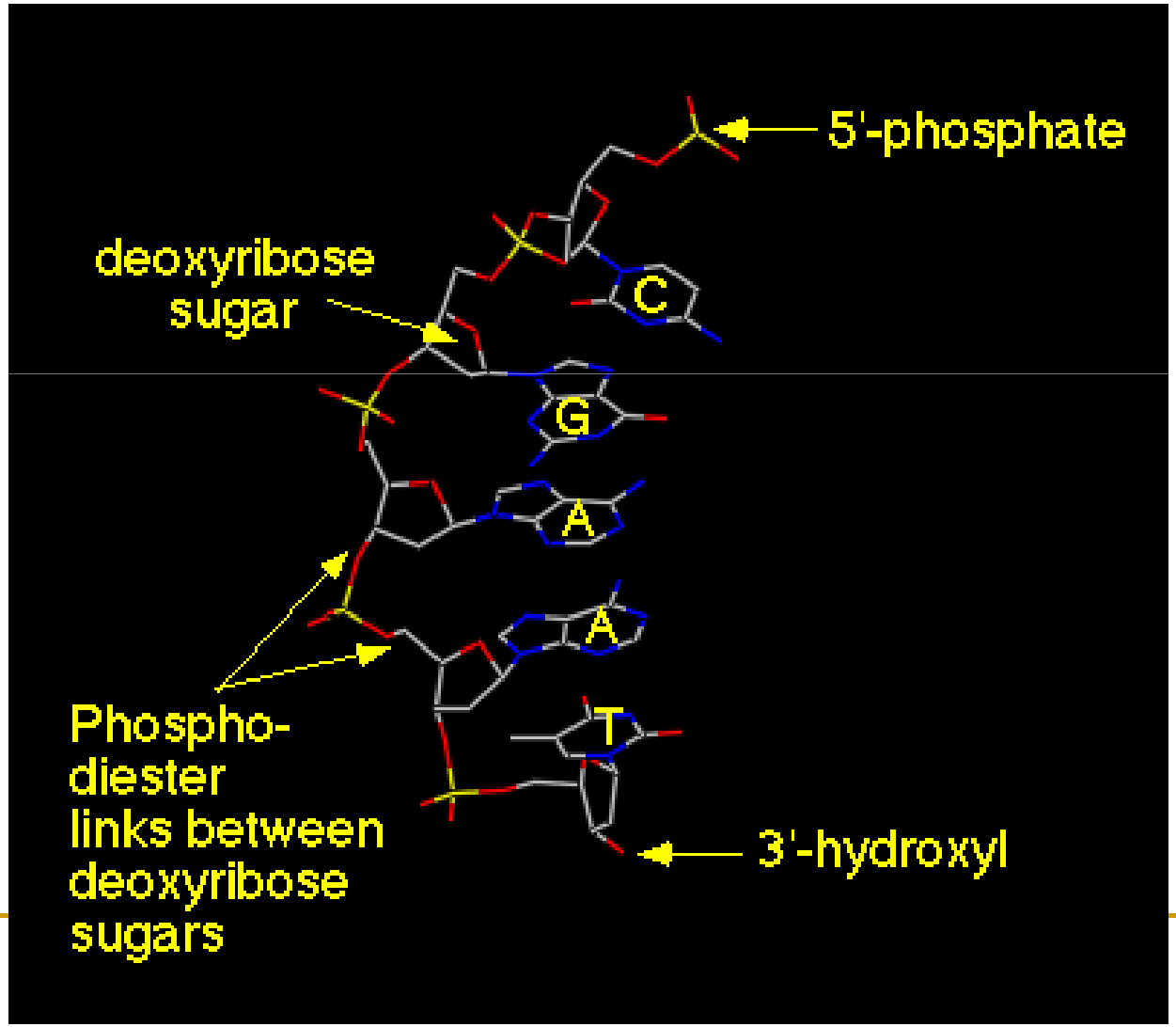
ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

As moléculas de DNA e RNA são compostas por quatro diferentes nucleotídeos:

- **Adenina, Guanina e Citosina – comum para DNA e RNA**
- **Timina – encontrada somente no DNA**
- **Uracila – encontrada somente no RNA**

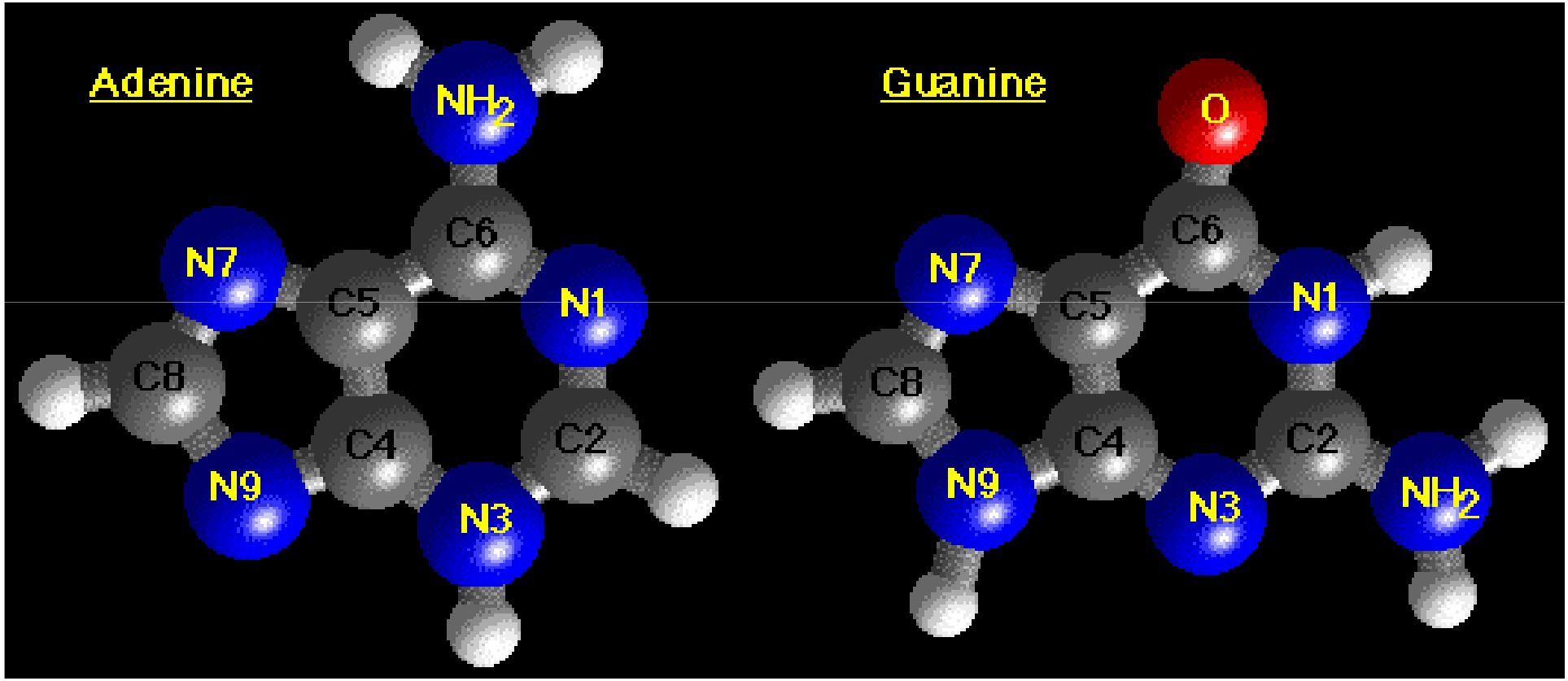
Estrutura do DNA

As bases nitrogenadas ligam-se ao açúcar.



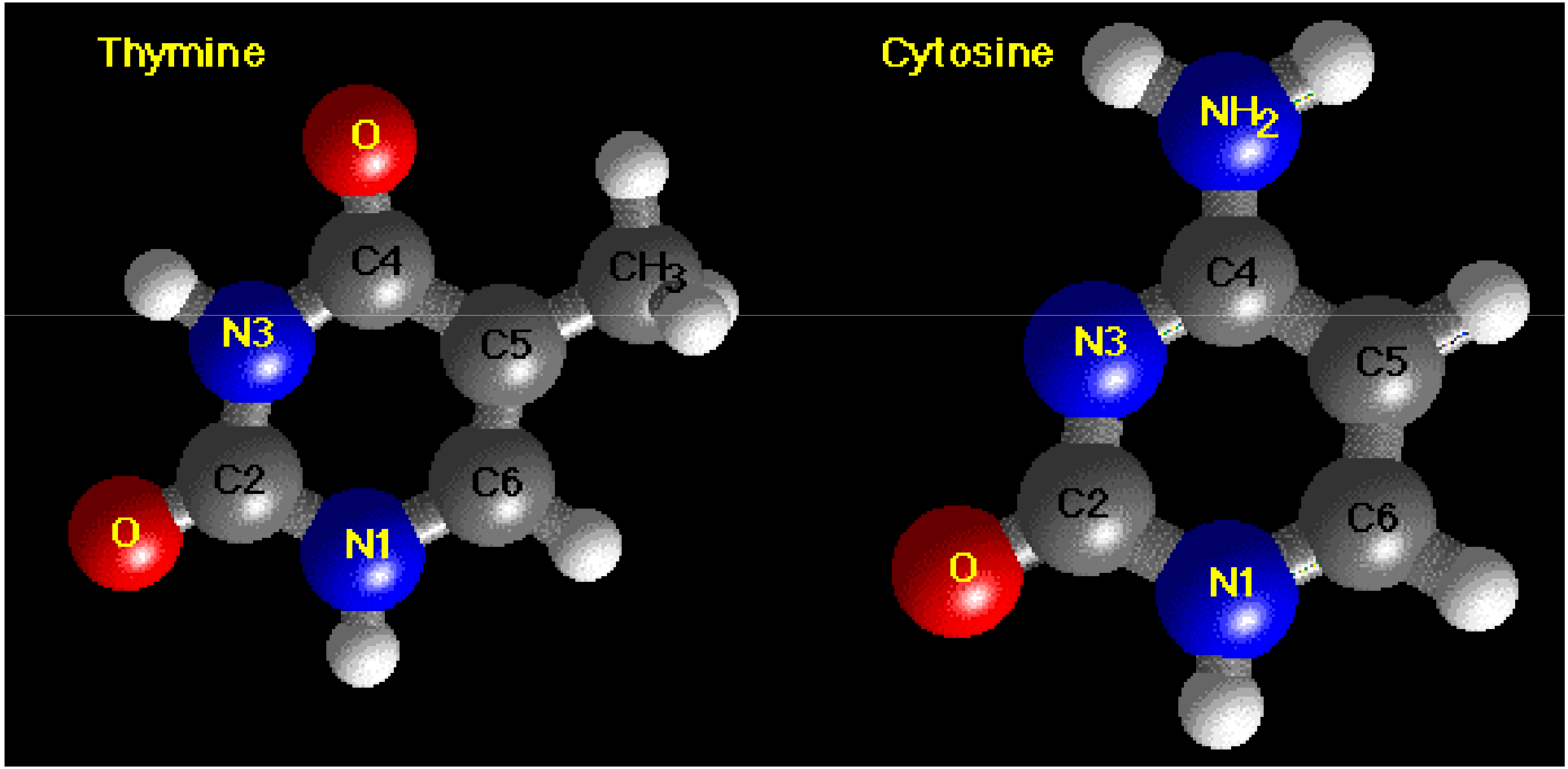
Tipos de Bases: PURINAS

Adenina (A) e Guanina (G)



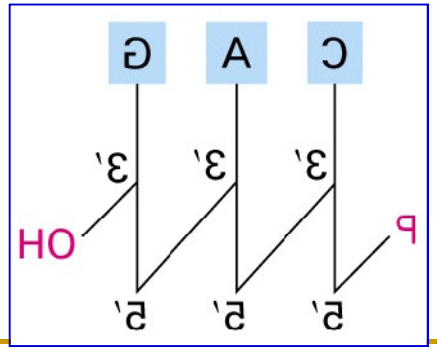
Tipos de Bases: PIRIMIDINAS

Timina (T) e Citosina (C)

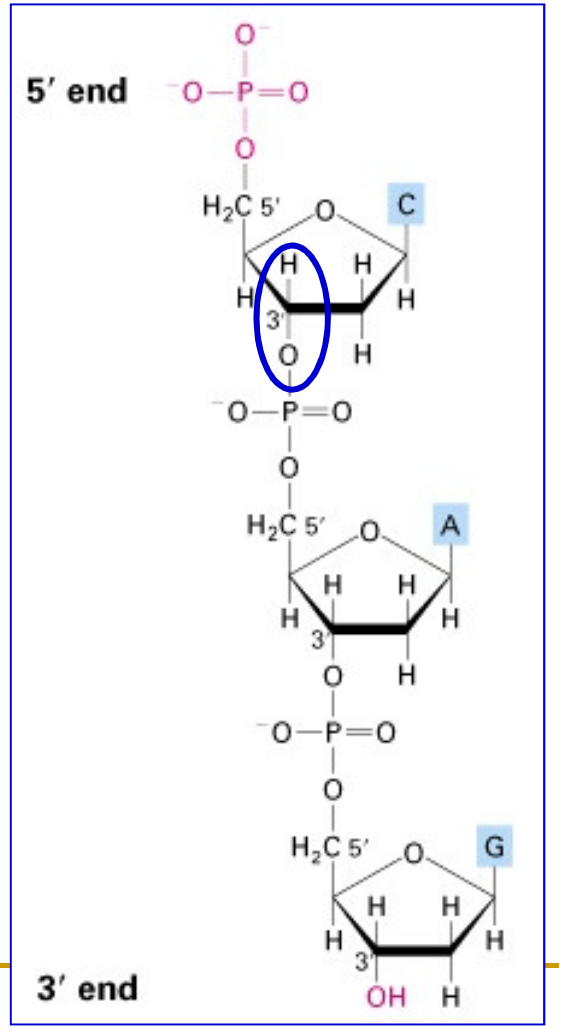


ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

O grupo hidroxil ligado ao carbono 3 da pentose de um nucleotídeo forma uma ligação fosfodiéster com o fosfato do outro nucleotídeo



5' C-A-G 3'



DNA

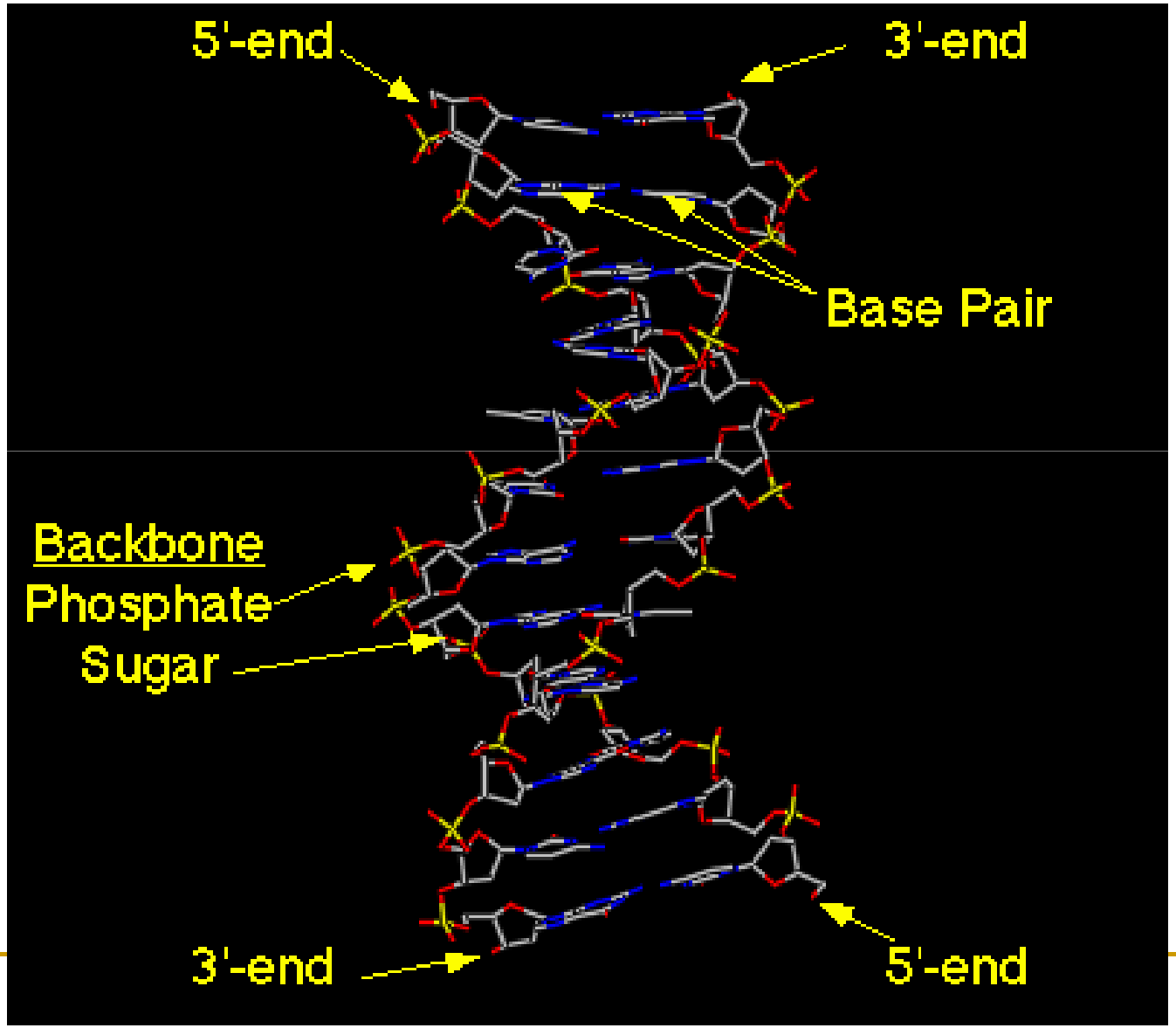
- **Duas fitas de polinucleotídeos associadas formando uma estrutura de dupla hélice onde as pentoses e os radicais fosfato compõe a fita e as bases projetam-se para o interior da mesma**

- **As fitas mantêm-se unidas através da formação de pontes de hidrogênio entre as bases o que contribui para a estabilidade da dupla hélice**

. Adenina (A) pareia com Timina (T) através de 2 pontes de hidrogênio

. Guanina (G) pareia com Citosina (C) através de 3 pontes de hidrogênio

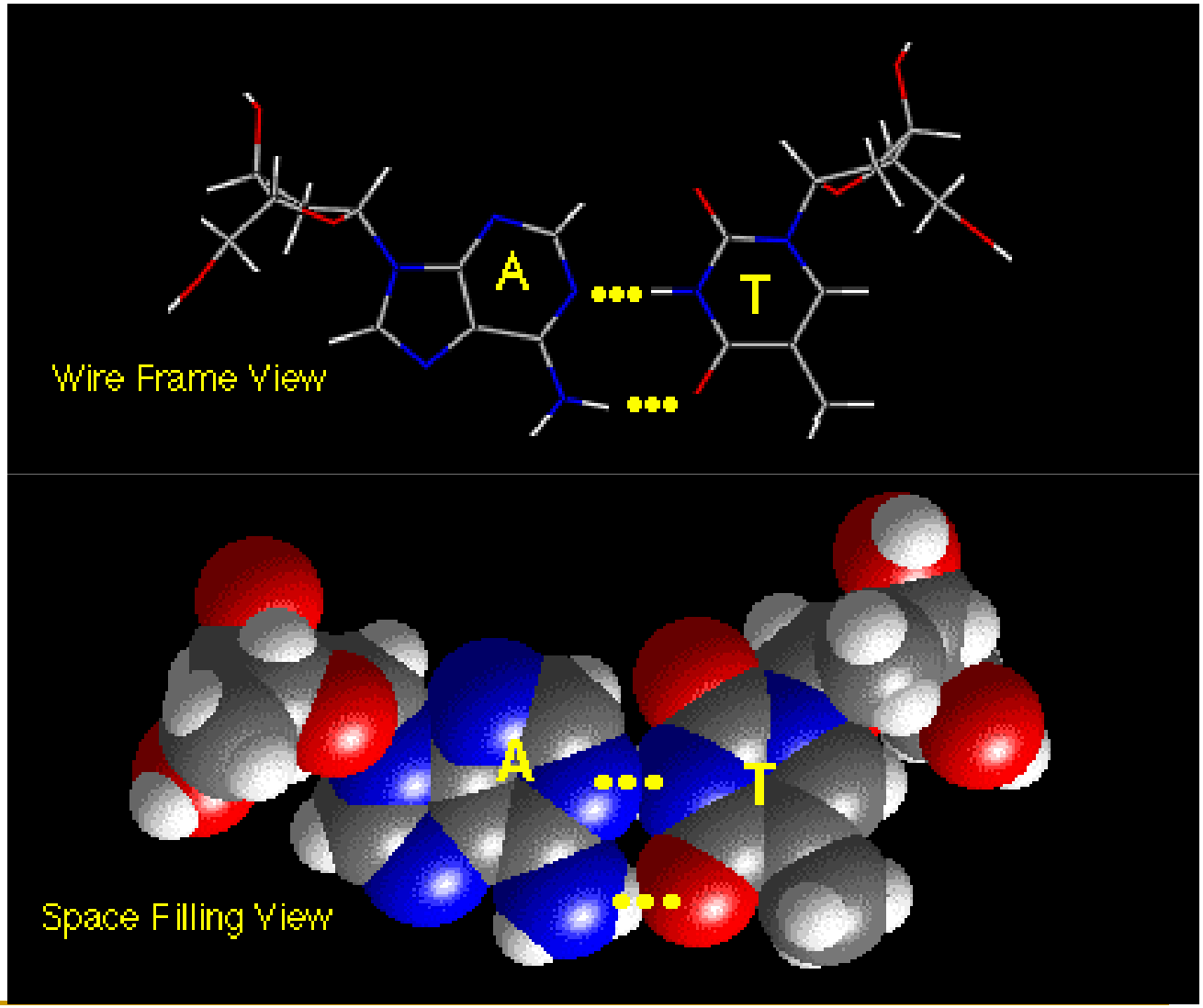
Dupla Hélice do DNA



Pares de Base

Pares de Base são formados por dois tipos de ligação:

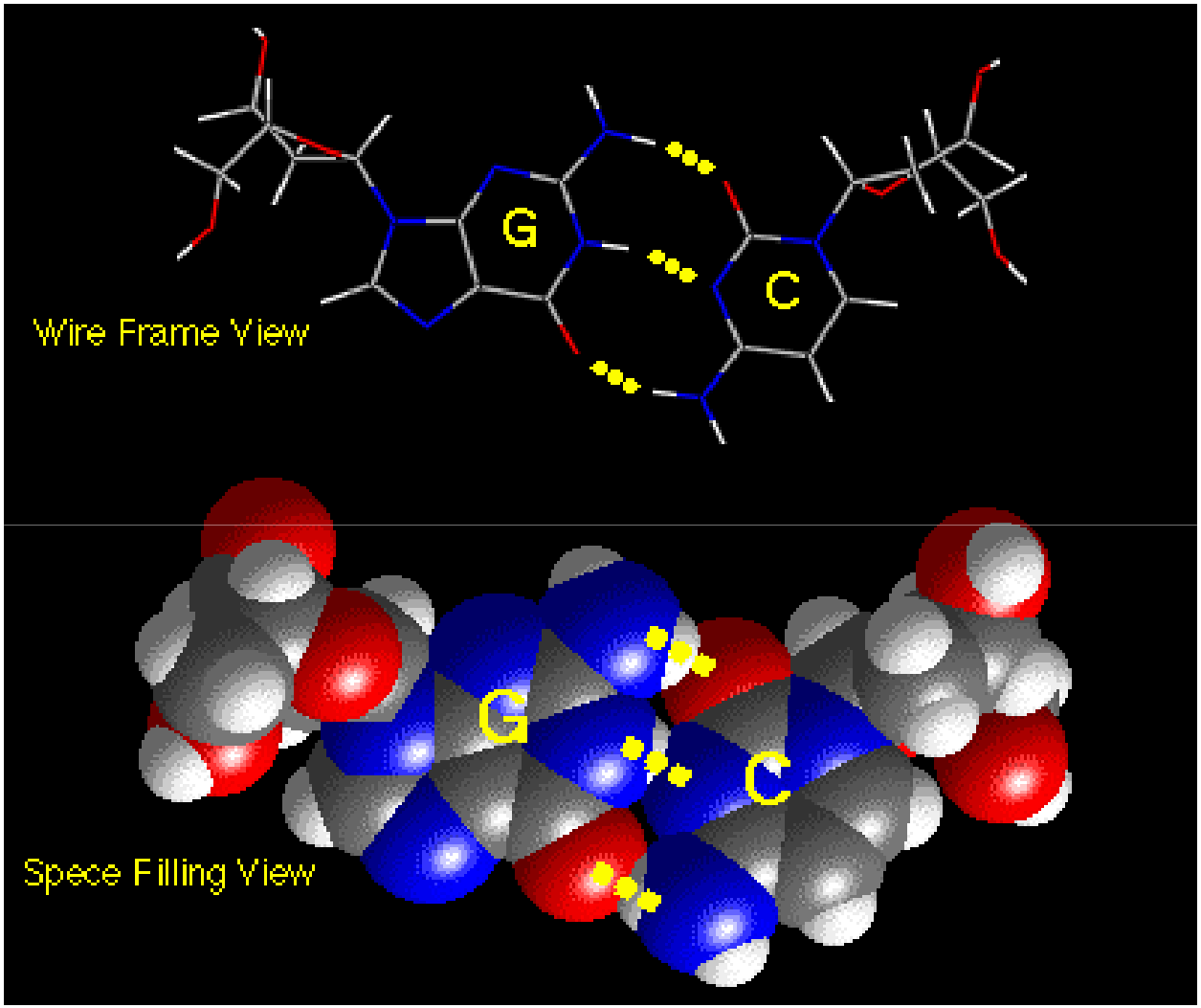
Ligação **A-T**, formada por duas pontes de Hidrogênio.



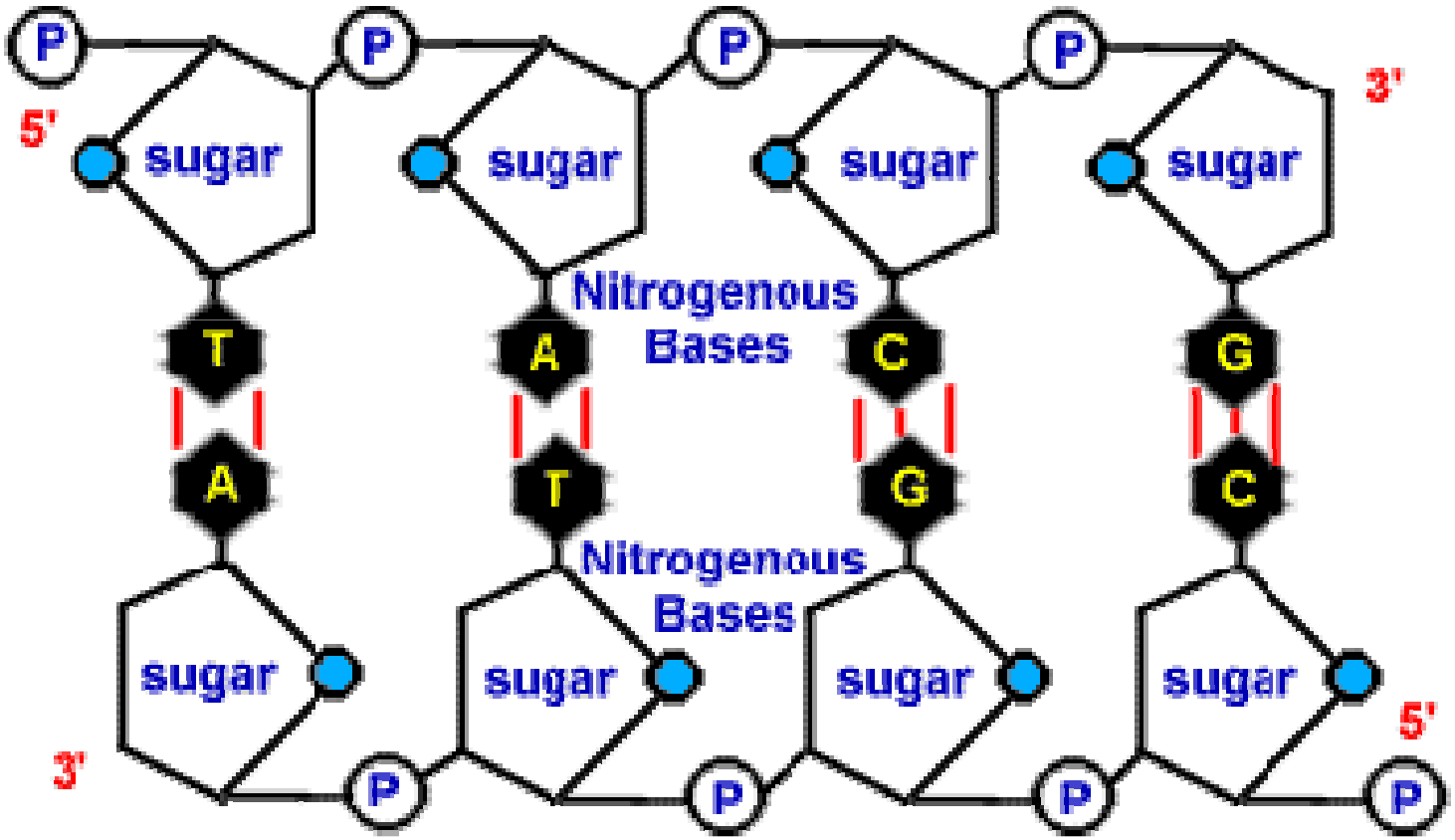
Pares de Base

Pares de Base são formados por dois tipos de ligação:

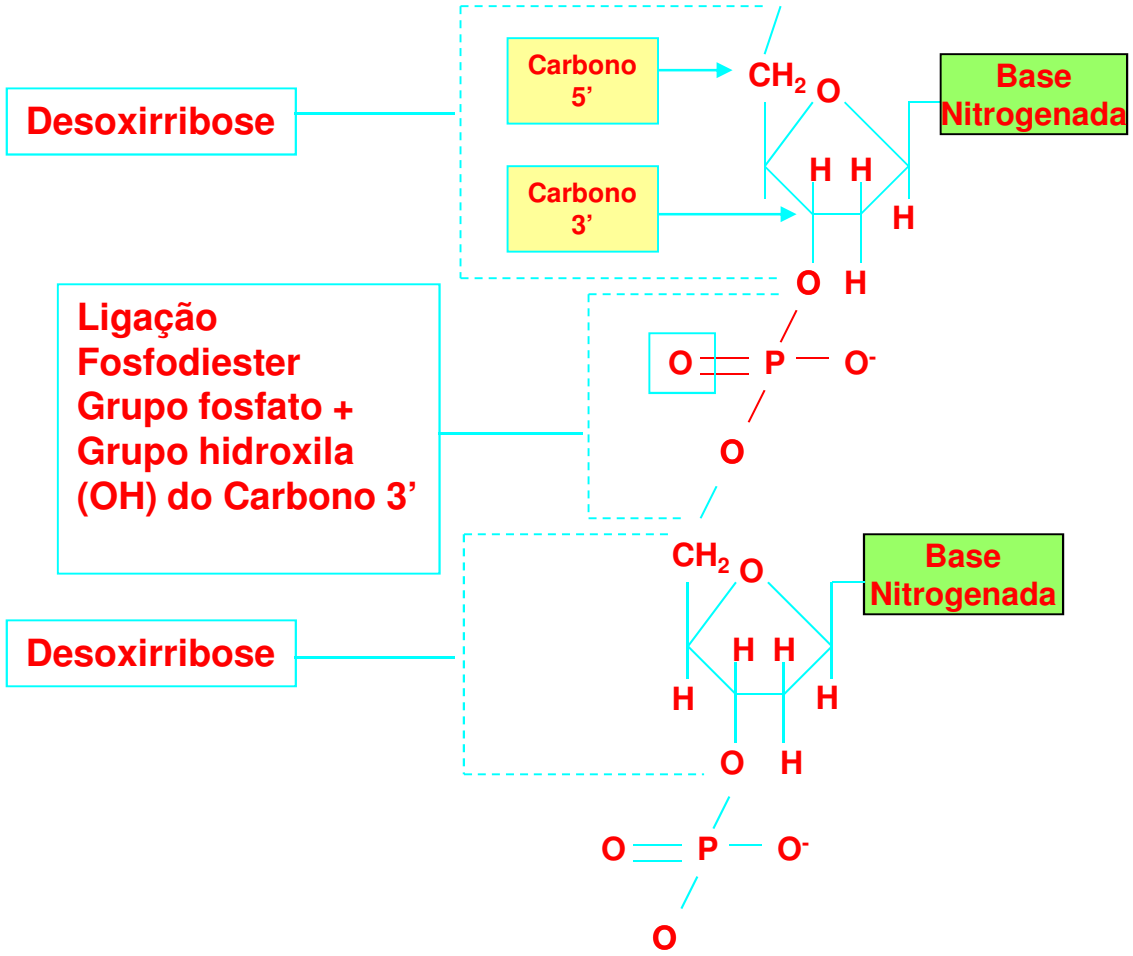
Ligação **C-G**, formada por três pontes de Hidrogênio.



DNA Fita Dupla



ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DO DNA



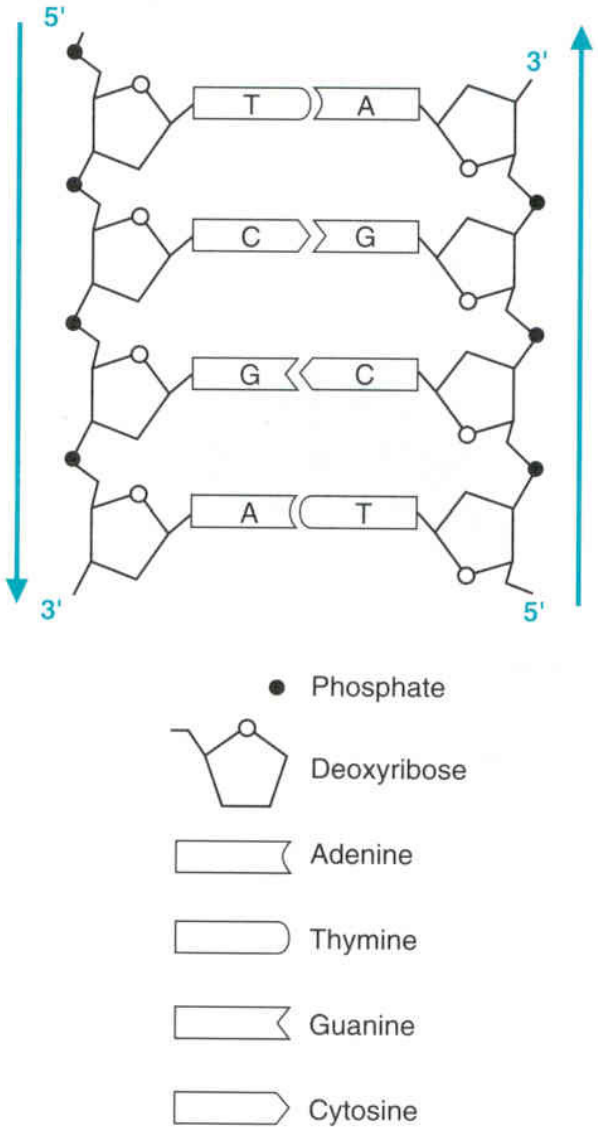
5'

3'

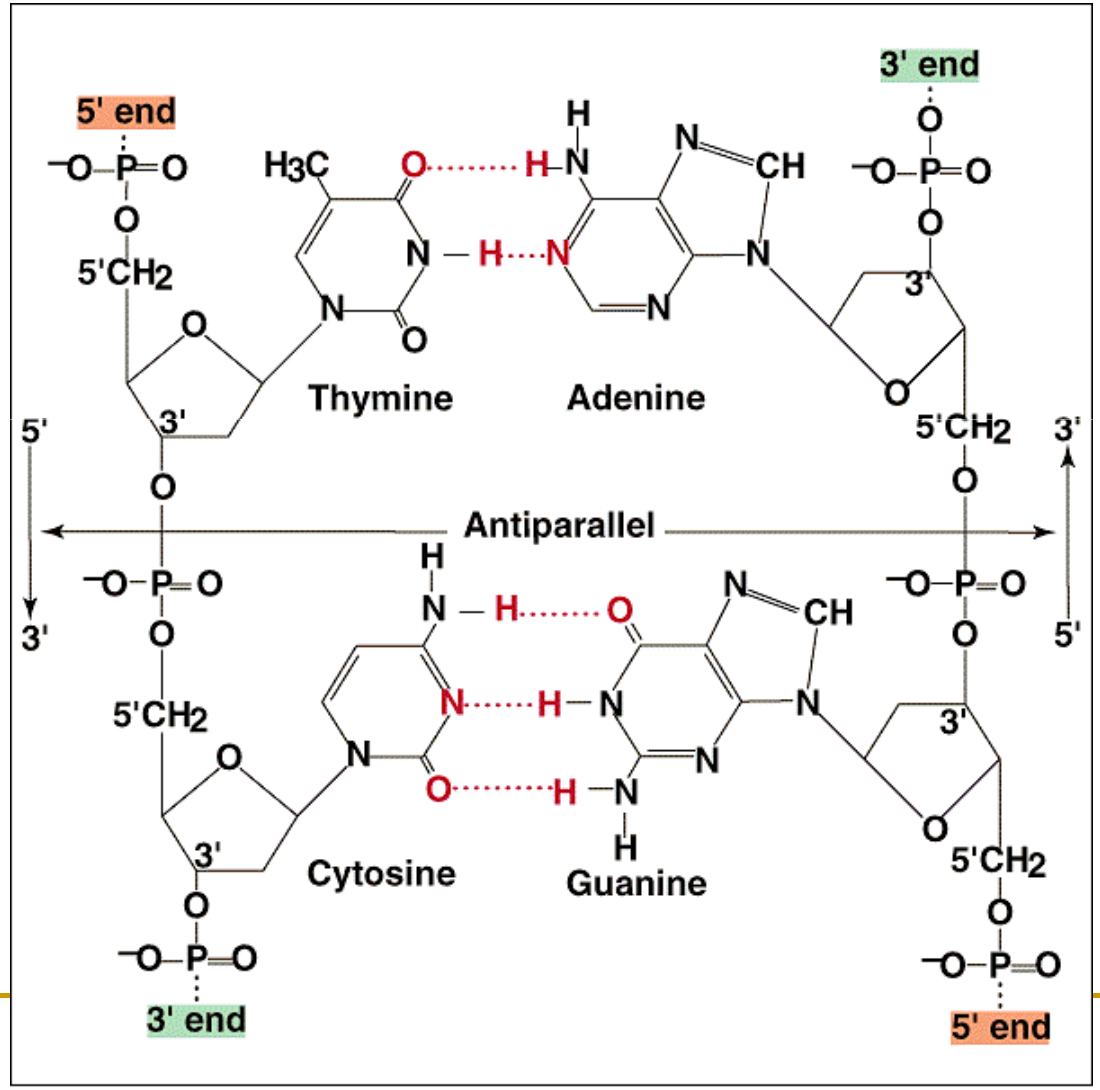
Como a ligação entre uma desoxirribose e outra desoxirribose só pode ser feita quando um grupo fosfato liga-se no Carbono 5'do primeiro açúcar e no Carbono 3'do segundo açúcar dizemos que a molécula de DNA "cresce em direção 5' → 3'

Antiparalelismo

As fitas do DNA estão dispostas em direções opostas

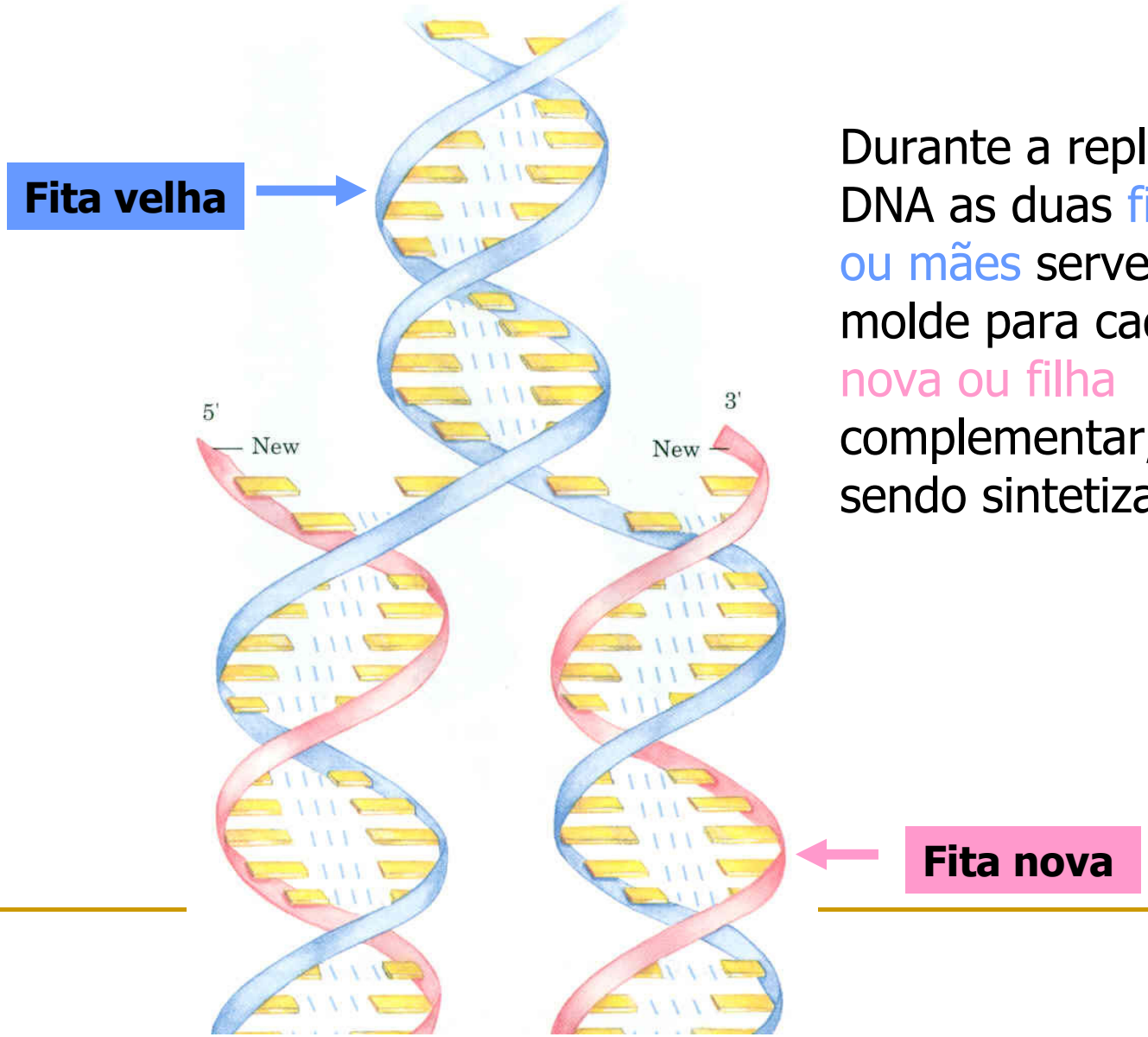


Complementariedade



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Complementariedade



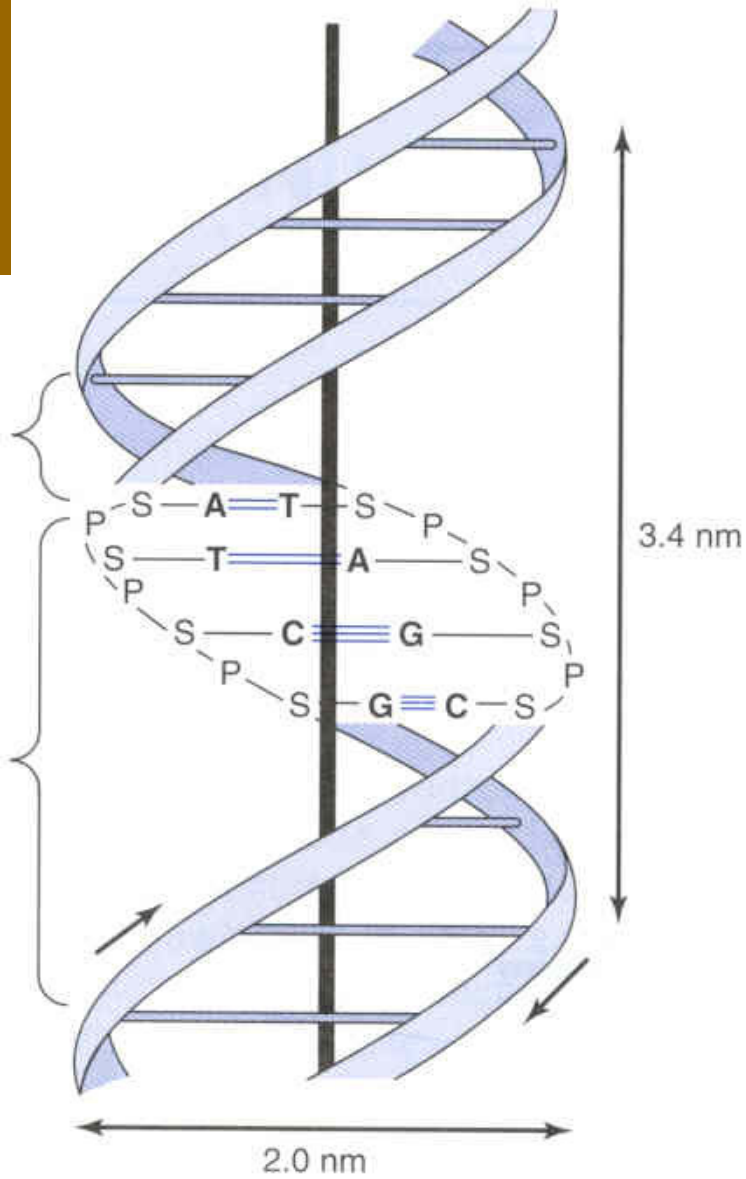
Durante a replicação do DNA as duas fitas velhas ou mães servem de molde para cada fita nova ou filha complementar, que está sendo sintetizada.

A Dupla Hélice

A dupla hélice apresenta dois tipos de sulcos aos quais se ligam as proteínas da cromatina

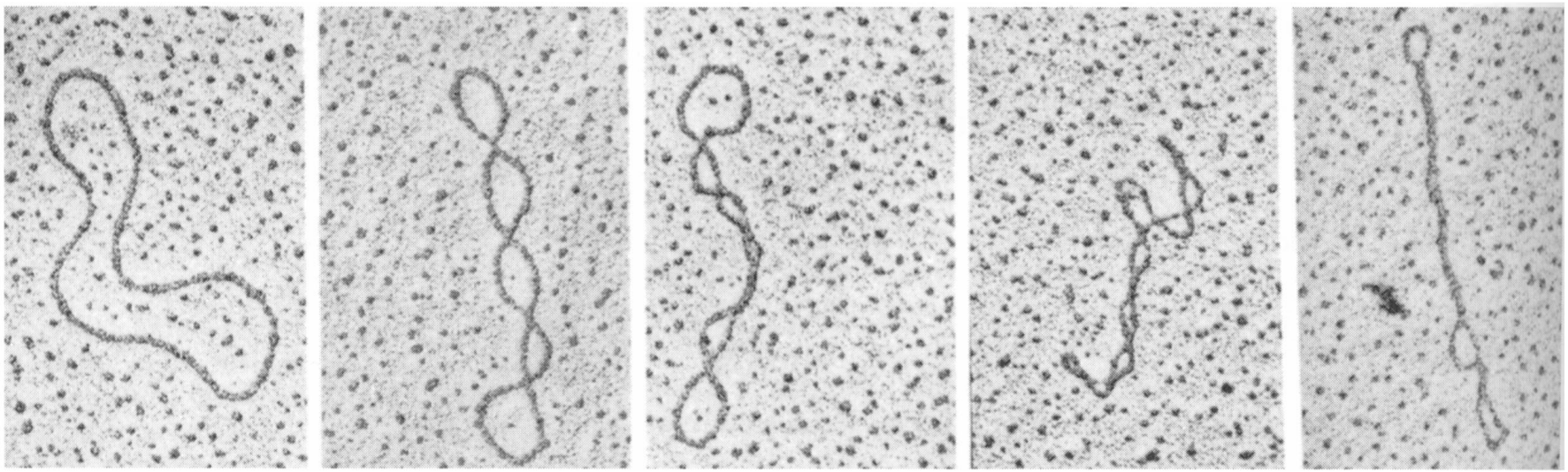
Sulco menor

Sulco maior



O Empacotamento do DNA: a estrutura terciária do DNA

DNA em procariontes: DNA circular nas formas não-super-helicoidal (esquerda) e super-helicoidal (direita)



Eucariontes

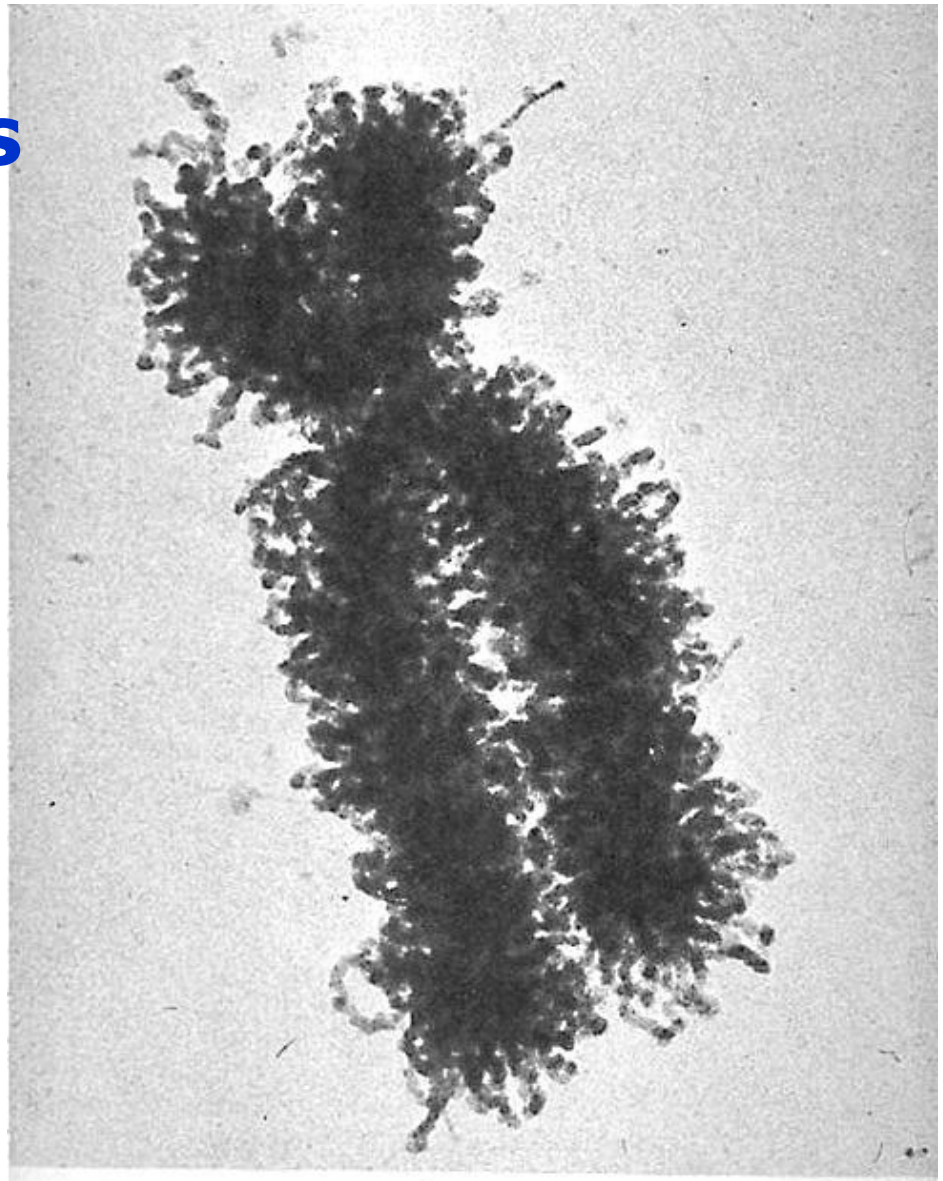
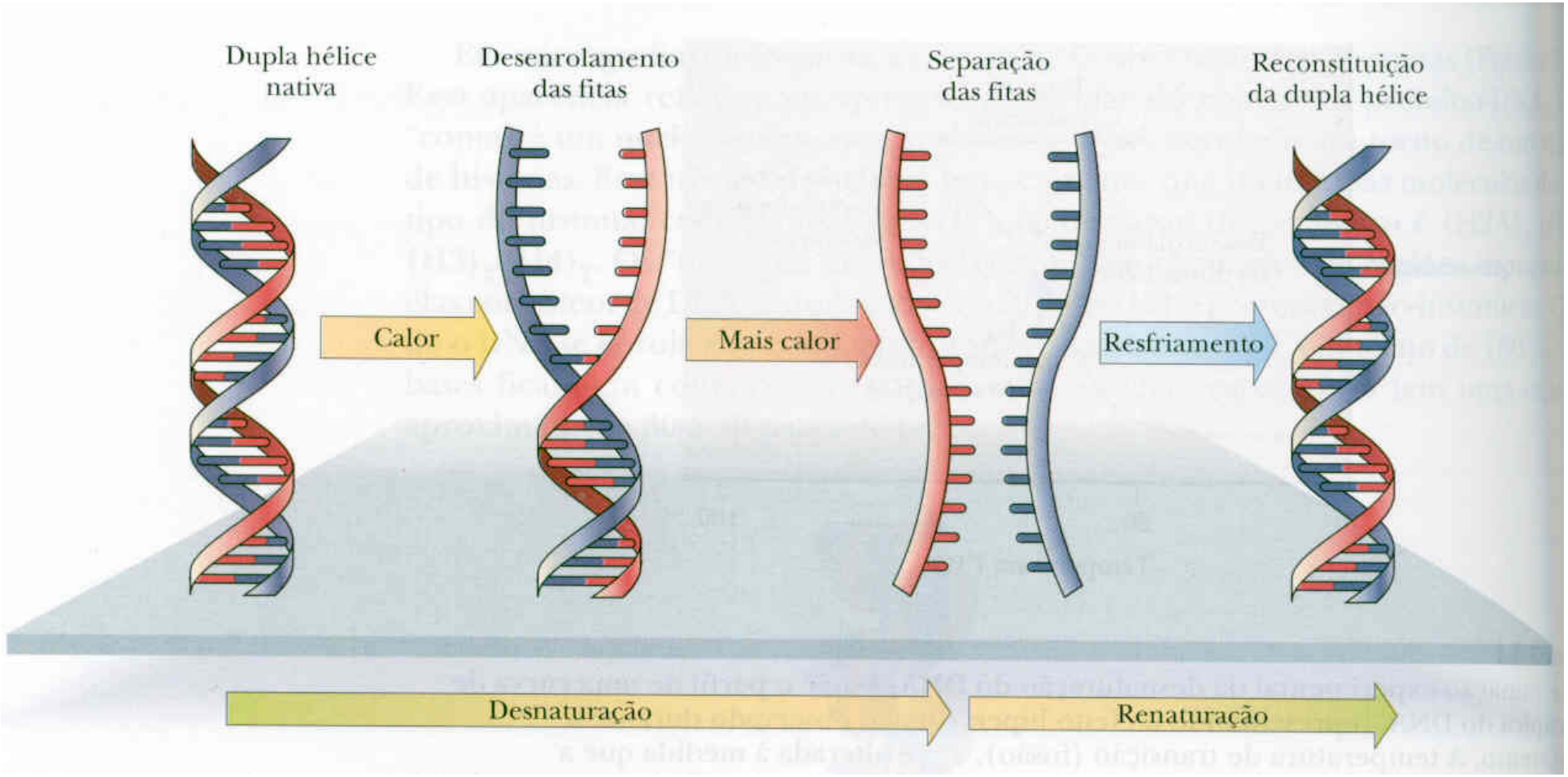


FIGURE 1-14
An electron micrograph of a human chromosome. Chromosome XII from a HeLa cell culture. (Courtesy of Dr. E. Du Praw.)

Propriedades Químicas e Físicas do DNA



REPLICAÇÃO DO DNA

- ✓ **Conservativa ou Semiconservativa?**
- ✓ **Unidirecional ou Bidirecional?**

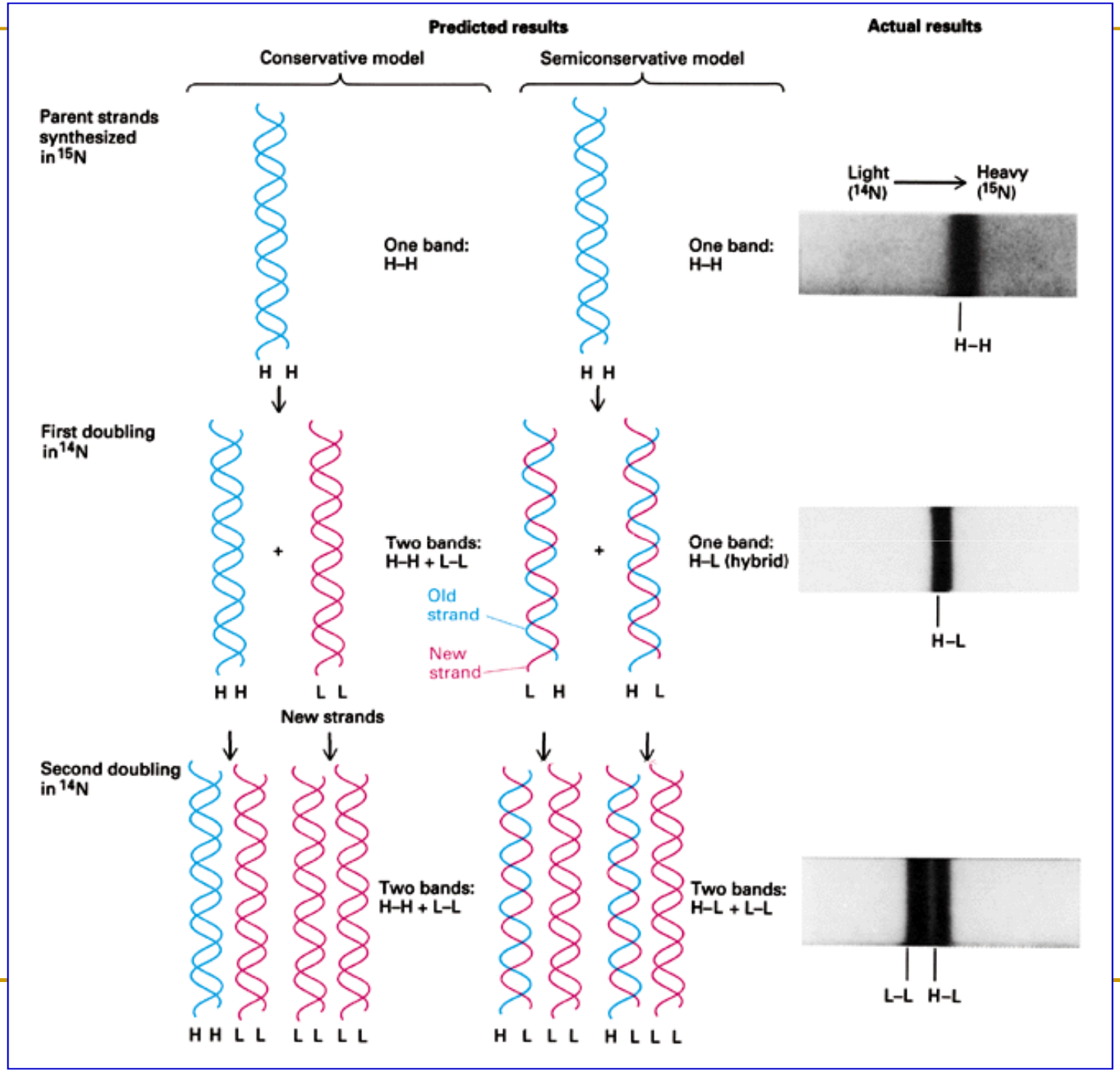
REPLICAÇÃO SEMICONSERVATIVA

Evidência baseada em um experimento clássico de Meselson-Stahl em 1958

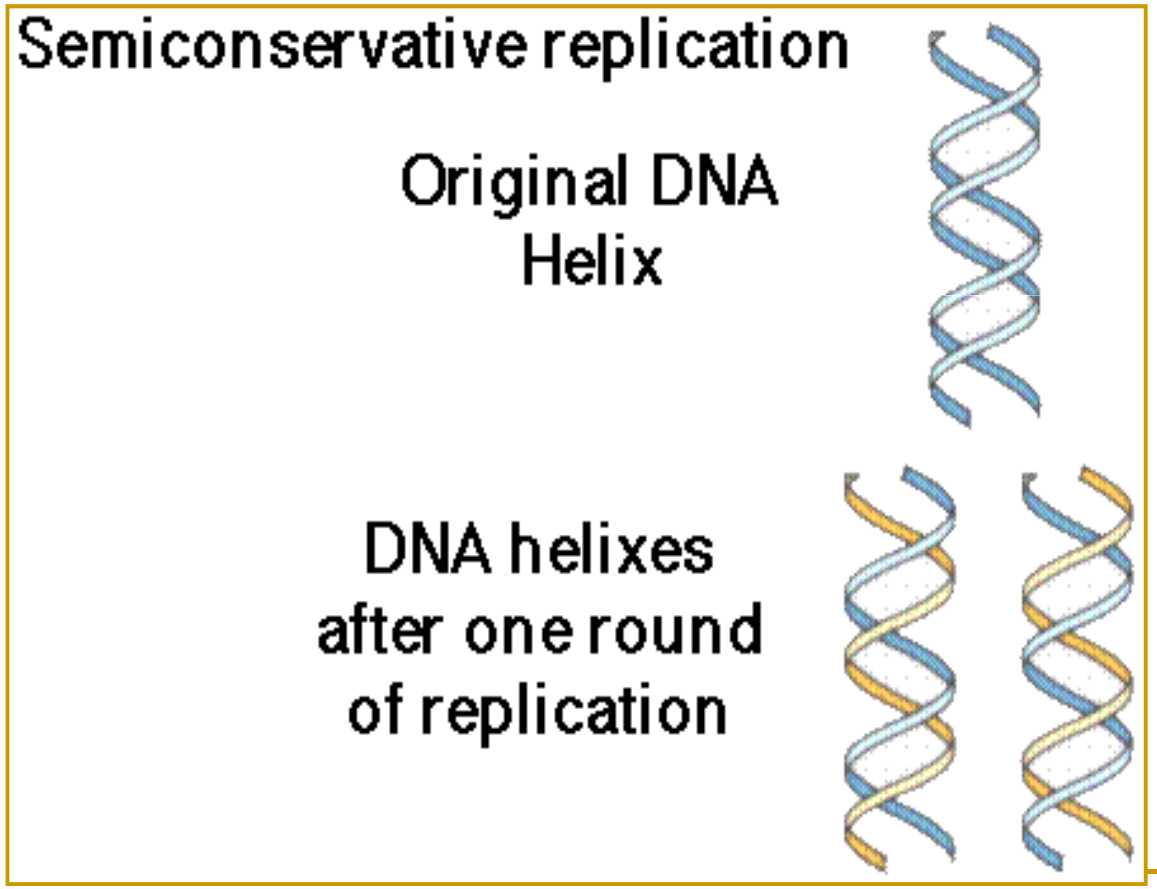
- **Células de *E. coli* foram inicialmente colocadas em um meio para crescimento contendo sais de amônia preparados com ^{15}N (nitrogênio pesado – "heavy") até todo o DNA celular conter o isótopo.**

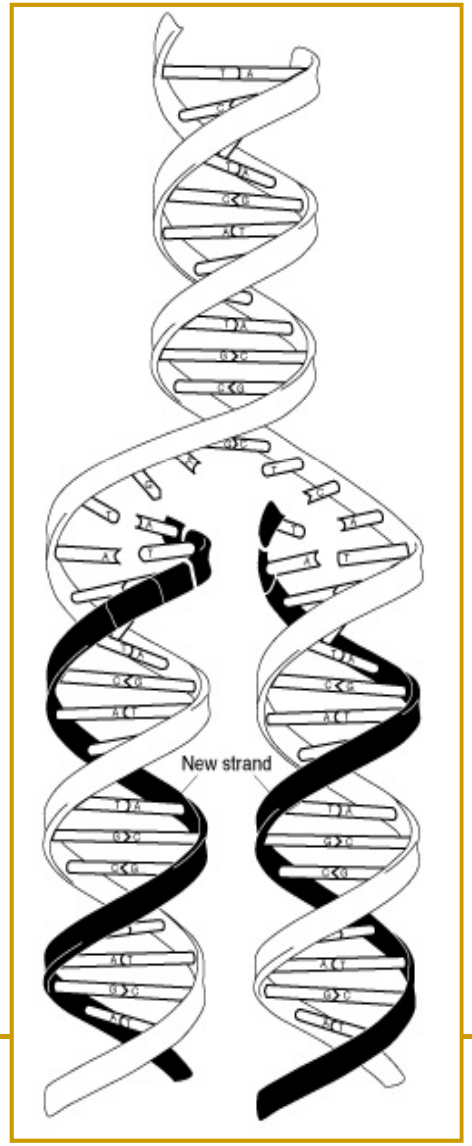
- **As células foram, então, transferidas para um meio contendo ^{14}N (nitrogênio leve – "light").**

- **As amostras foram analisadas com gradiente de densidade que separa as duplas H-H, L-L e H-L em bandas distintas.**


Predicted results
Actual results
Conservative model
Semiconservative model
Parent strands synthesized in ^{15}N
H H
One band: H–H
H H
One band: H–H
Light (^{14}N) → Heavy (^{15}N)
H–H
First doubling in ^{14}N
H H
L L
Two bands: H–H + L–L
Old strand
New strand
L H
H L
One band: H–L (hybrid)
H–L
New strands
Second doubling in ^{14}N
H H L L
L L L L
Two bands: H–H + L–L
H L L L
H L L L
Two bands: H–L + L–L
L–L
H–L

A replicação é semi-conservativa





ORIGEM DA REPLICAÇÃO

Experimento com SV40 (Simian Virus)

- **DNA viral de células infectadas com SV40 foi cortado com a enzima de restrição *Eco*RI, que reconhece um sítio único.**
- **A partir de um "ponto" vai se formando uma bolha chamada bolha de replicação comprovando a existência de um ponto de origem da replicação**

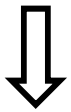
Características da origem de replicação:

. estrutura repetitiva

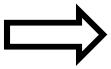
. seqüências ricas em AT

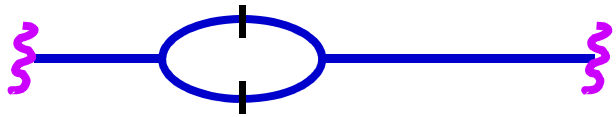
ORIGEM DA REPLICAÇÃO

Cromossomo viral circular



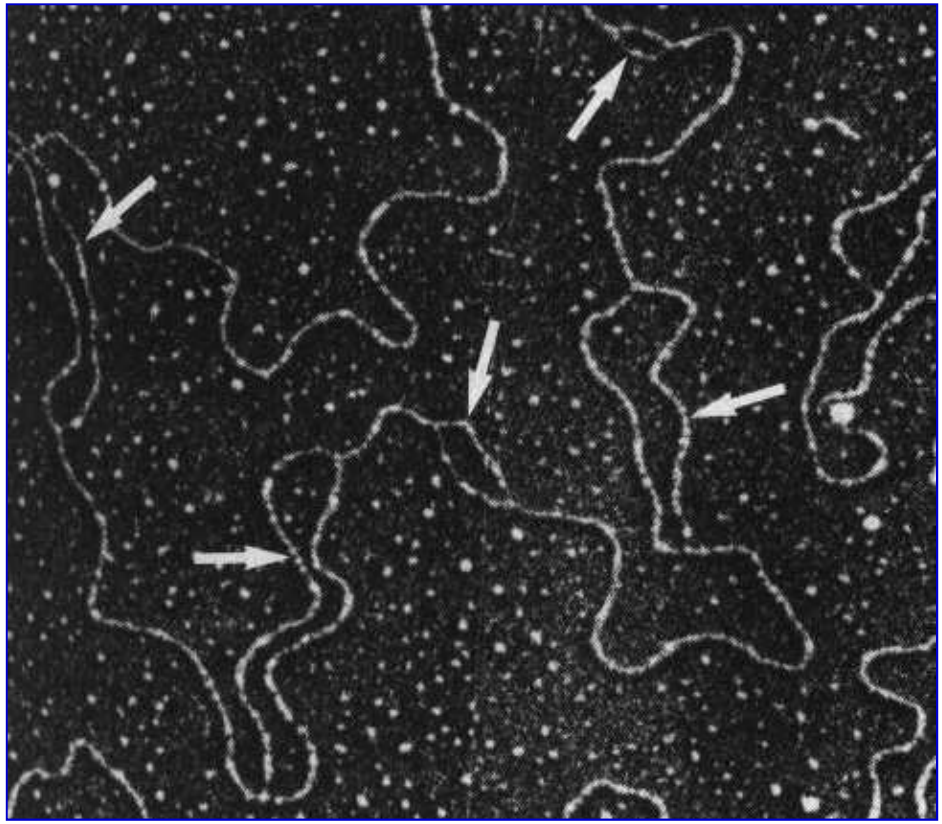
EcoRI





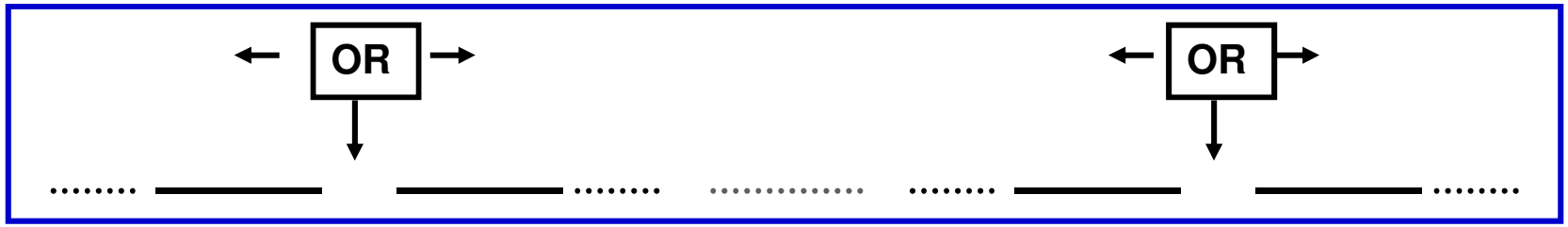
Bolha de replicação

ORIGEM DA REPLICAÇÃO



REPLICAÇÃO BIDIRECIONAL

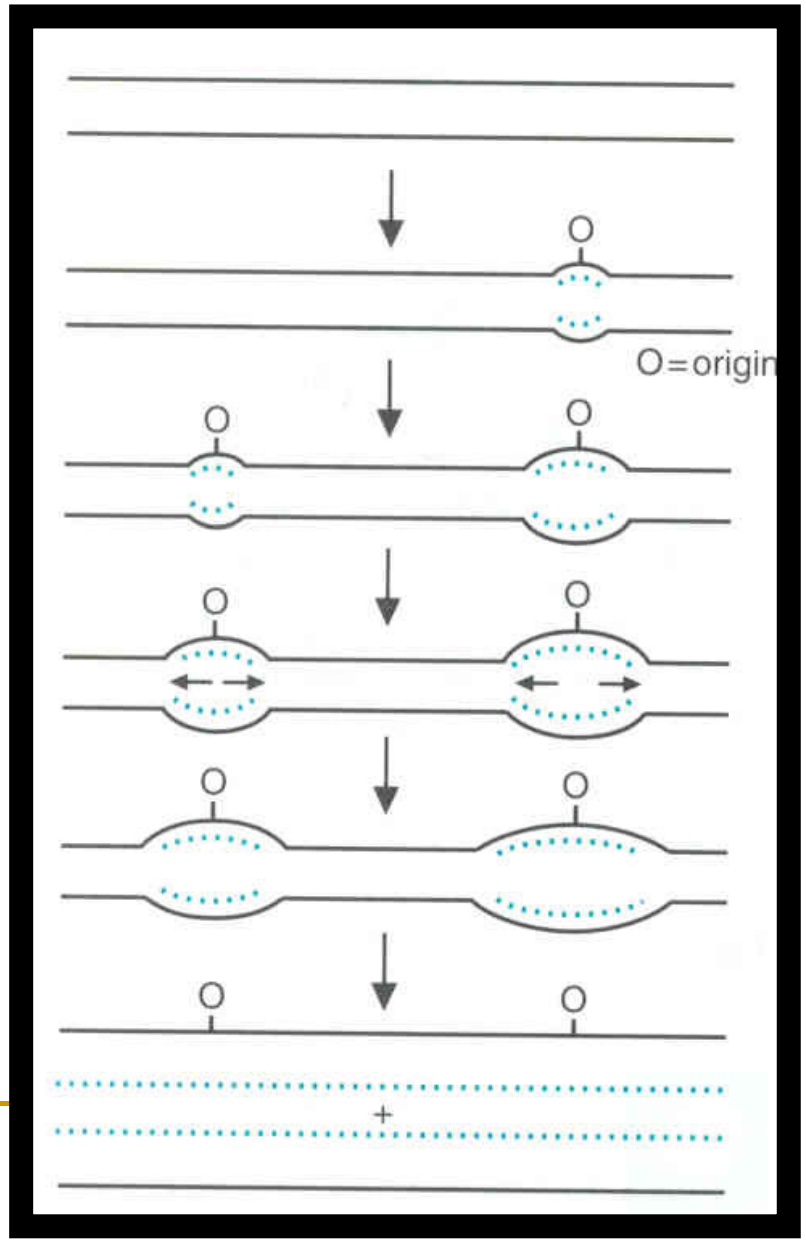
Um experimento através da autoradiografia de moléculas de DNA marcadas de culturas de células mamárias revelou grupos de replicons (unidades de replicação) com um ponto de origem de replicação central



Síntese de DNA em Eucariontes: As "Bolhas de Replicação"

- **Nos eucariontes, a replicação requer "múltiplas origens", devido ao tamanho de seu genoma. A replicação é bidirecional e, em ambas as fitas, simultânea.**

- **Este processo gera "bolhas de replicação".**



Regiões Codificadoras e Não-Codificadoras do DNA

O DNA é formado por 2 regiões:

Intergênicas	**Gênicas**	**Intergênicas**	**Gênicas**

<u>Região Gênica</u>
É a porção que codifica para um produto final, que pode ser uma cadeia polipeptídica ou um RNA

<u>Região Intergênica</u>
É a porção regulatória, que sinaliza o início ou o final de um gene, que influencia a transcrição gênica, ou que é o ponto de início para a replicação do DNA

PROCESSO DE REPLICAÇÃO

Os mecanismos celulares responsáveis pela replicação do DNA foram descobertos primeiramente em bactérias.

A replicação em eucariotos ocorre através de proteínas análogas e com processos semelhantes à replicação do DNA de *E. coli*

PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS (SISTEMA DE REPLICAÇÃO DO DNA)

1. DNA Polimerases
2. Endonucleases
3. Helicases
4. Topoisomerases
5. Primases
6. Telomerases

DNA POLIMERASE

- São incapazes de quebrar as pontes de hidrogênio que ligam as duas fitas do DNA

- Só alongam uma fita de DNA/RNA pré-existente

- Catalisam a adição de um nucleotídeo no radical hidroxil da extremidade 3' da cadeia que está se formando. Desta forma, as fitas só podem crescer no sentido 5' → 3'

DNA Polimerases

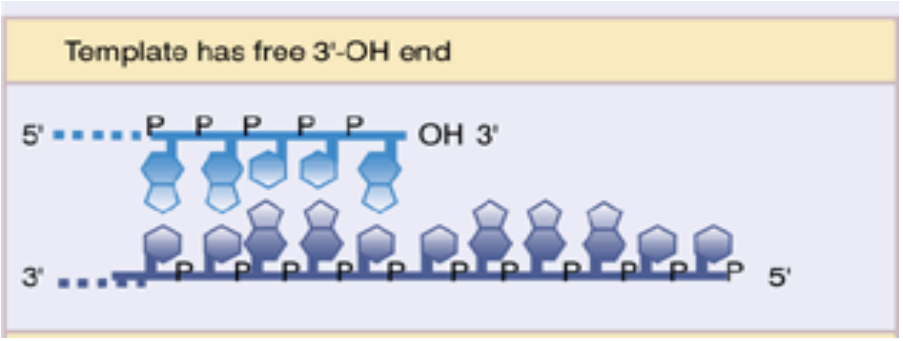
- principais enzimas envolvidas no processo; responsáveis pela adição de nucleotídeos e reparo
- requerem um modelo e um *primer* (segmento de RNA sintetizado pela primase) complementares para início – alongamento
- 3 tipos principais : I, II, III

I : importante no sistema de reparo

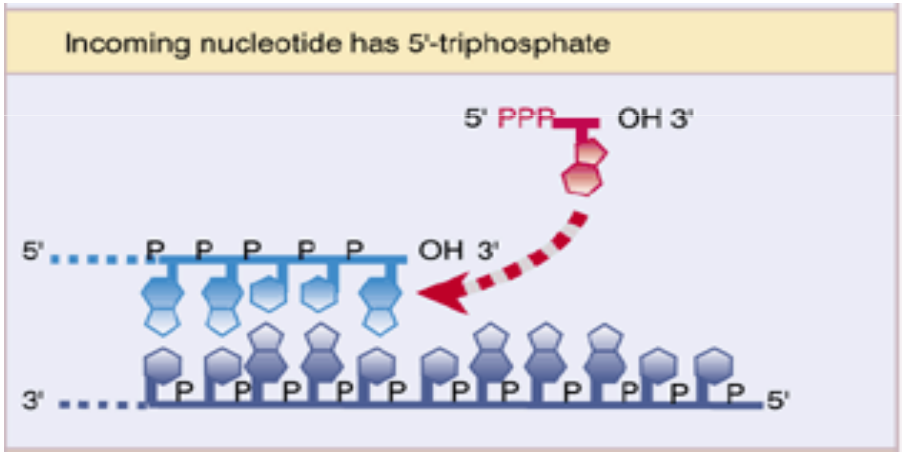
III: principal e mais complexa (mais de 10 subunidades)

Adição de nucleotídeos

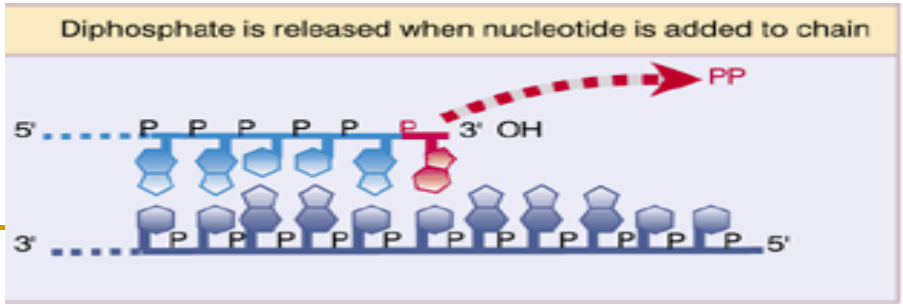
1



2



3



NUCLEASES

- Degradam o DNA, clivando-o em pedaços menores

1. EXONUCLEASES: clivam o DNA a partir do final da molécula
2. ENDONUCLEASES: clivam em qualquer local da molécula

OUTRAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE REPLICAÇÃO

HELICASES – constituem uma classe de enzimas que podem se mover ao longo da fita dupla de DNA utilizando a energia da hidrólise de ATP para separar as duas fitas da molécula.

SSB ("single-strand-binding") – ligam-se a cada uma das fitas impedindo o reanelamento das mesmas.

PRIMASE – RNA polimerase que sintetiza pequenas moléculas de RNA utilizadas como iniciadores durante o processo de replicação do DNA.

TOPOISOMERASES – Responsáveis por aliviar a torção na parte da fita que não está sendo replicada.

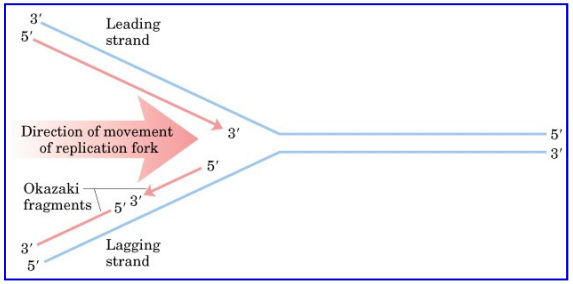
PROCESSO DE REPLICAÇÃO

O movimento da forquilha de replicação revela uma fita molde no sentido 3'→5' e outra no sentido oposto 5'→3'

Desta forma, as fitas novas são sintetizadas em sentidos opostos

FITA "LEADING" – crescimento segue a direção do movimento da forquilha de replicação

FITA "LAGGING" – crescimento no sentido oposto ao movimento da forquilha de replicação



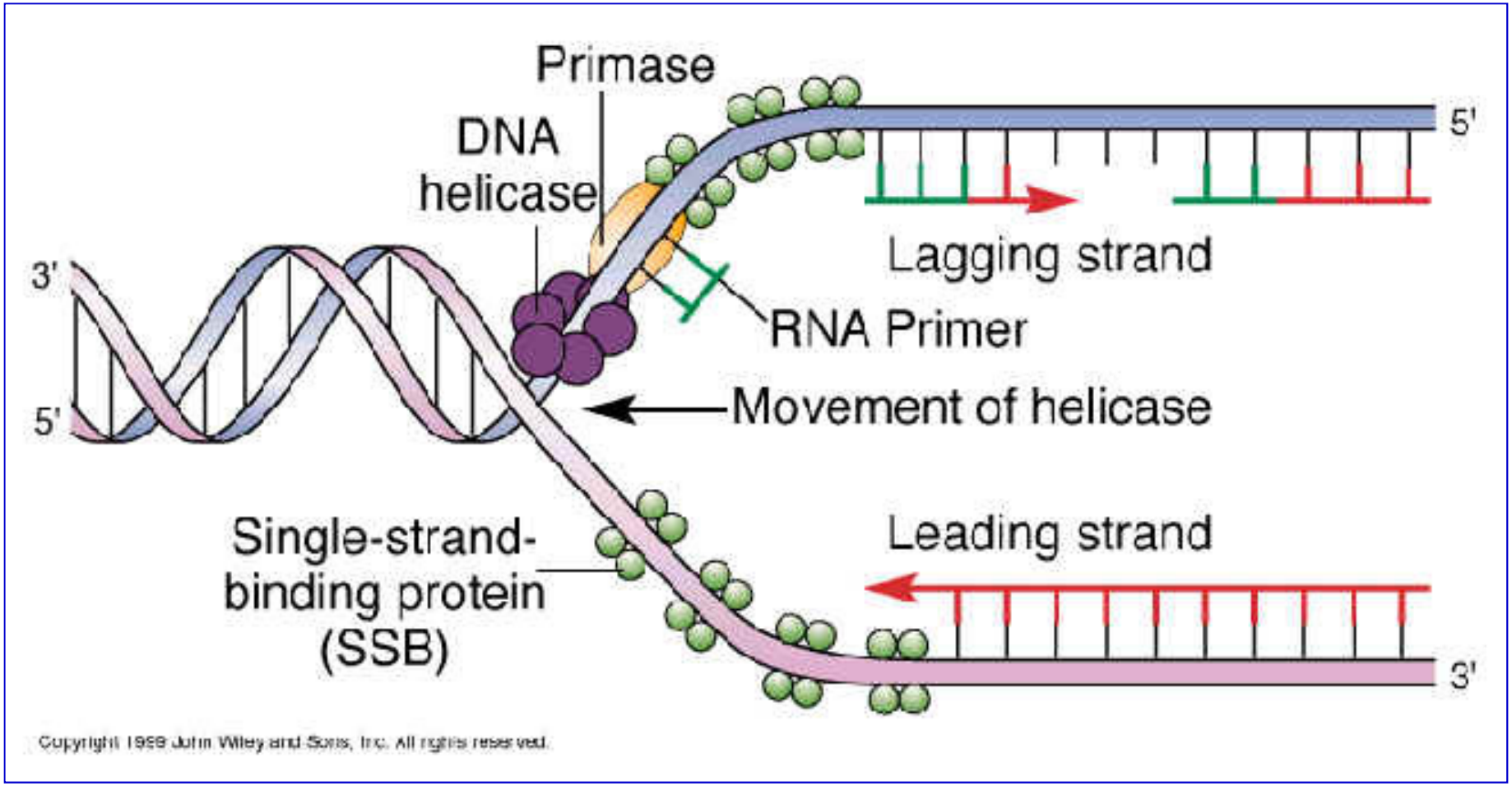
PROCESSO DE REPLICAÇÃO

FITA "LEADING" – sintetizada continuadamente a partir de um iniciador na fita molde 3' → 5'

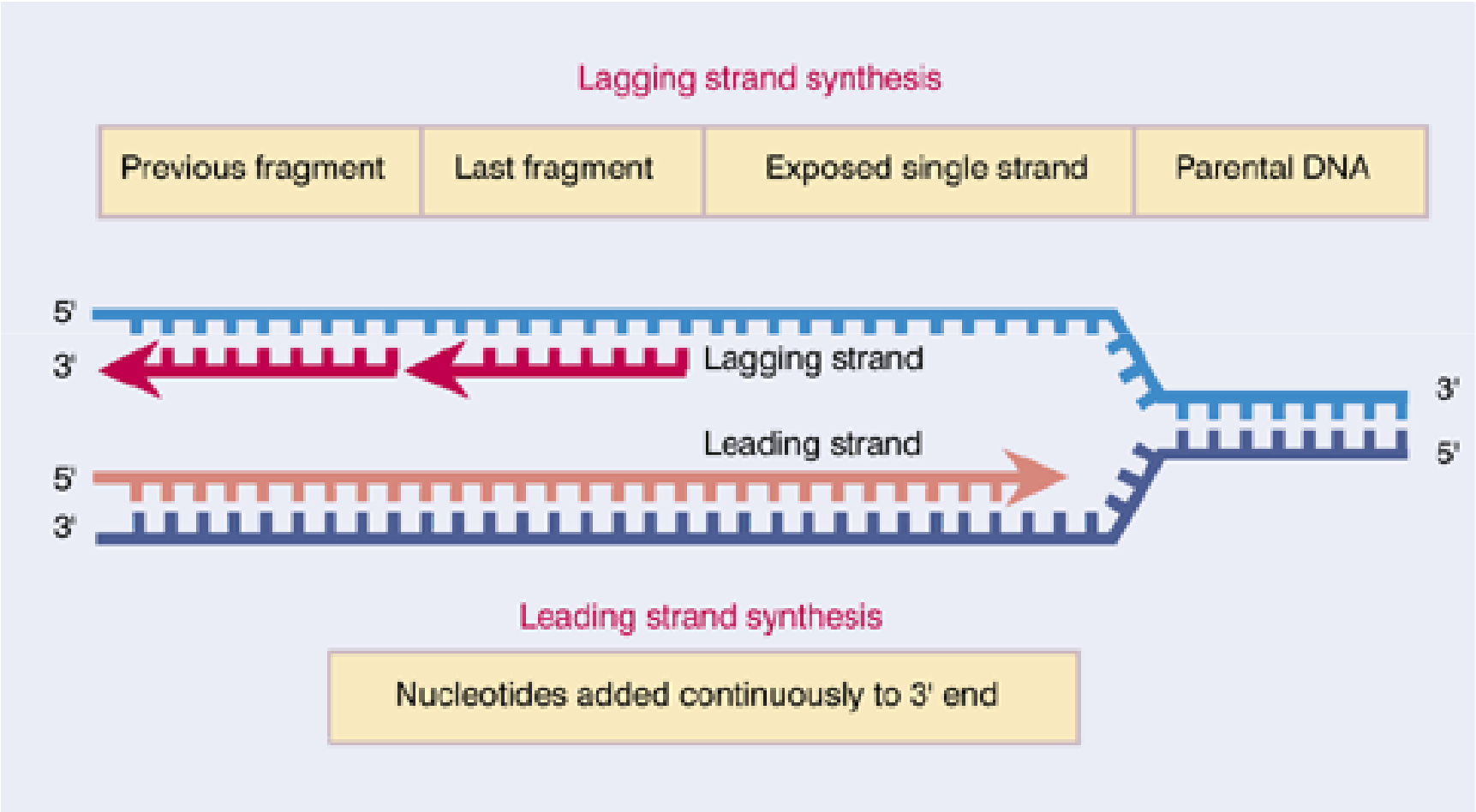
FITA "LAGGING" – sintetizada descontinuadamente a partir de múltiplos iniciadores

- **Sítios descobertos no molde da fita "lagging" são copiados em pequenos iniciadores de RNA pela primase.**
- **Cada iniciador é alongado pela DNA polimerase resultando na formação dos FRAGMENTOS DE OKAZAKI.**
- **DNA polimerase remove o primer do RNA do fragmento adjacente e preenche os "gaps" entre os fragmentos que, então, são unidos pela DNA ligase.**

PROCESSO DE REPLICAÇÃO



PROCESSO DE REPLICAÇÃO



DNA → RNA

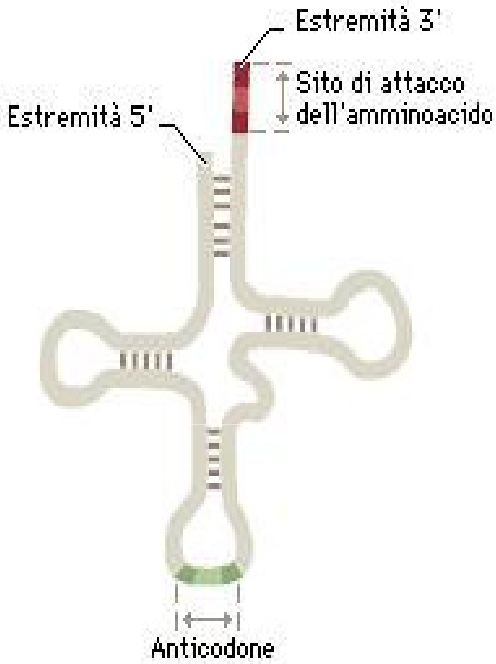
- **Constituído de riboses**
  - **Muito mais reativo e flexível;**

- **Fita simples**
  - **Permite emparelhamento intramolecular de bases.**

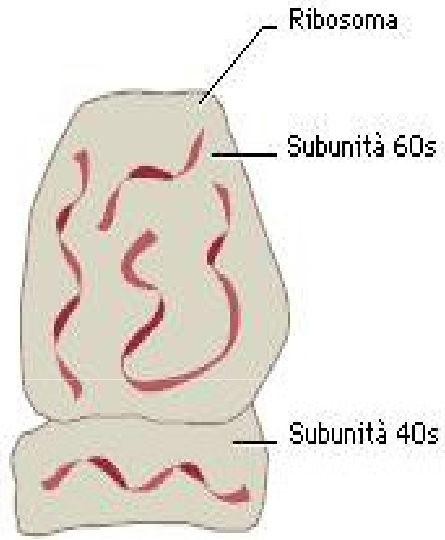
RNA: transcrição

Tipos de RNAs:

RNA messaggero
(m-RNA)



RNA transfer
(t-RNA)



RNA ribosomiale
(r-RNA)

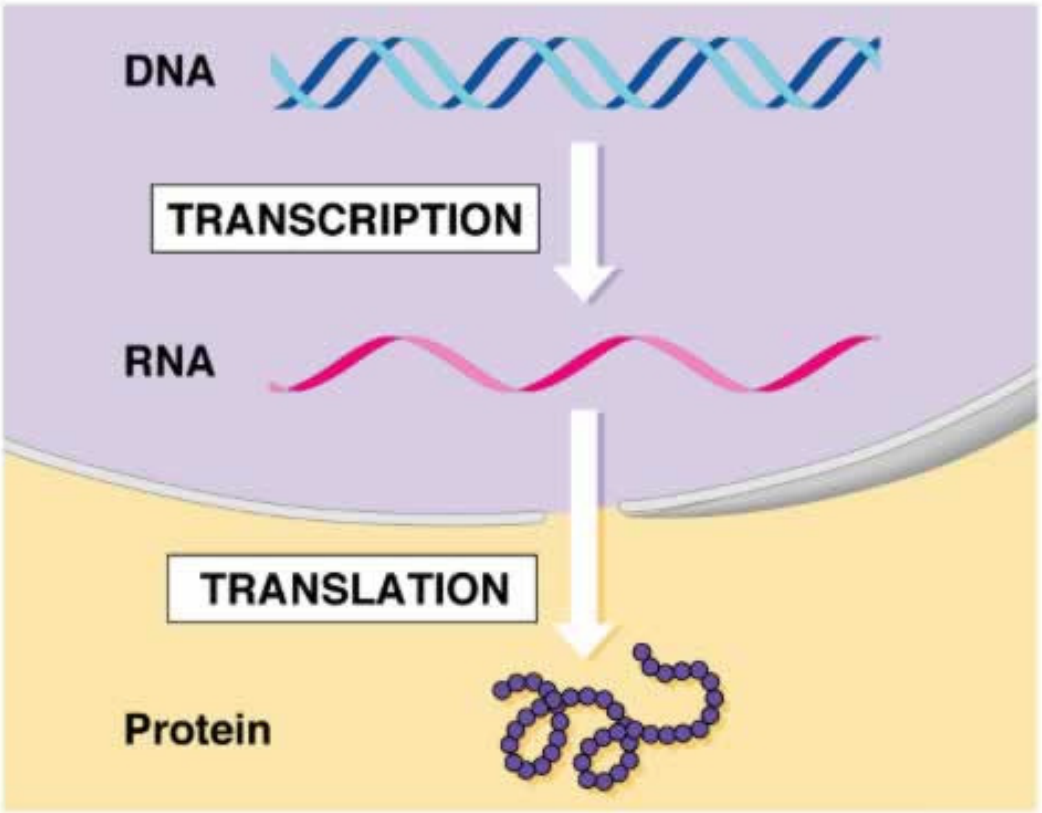
Outros tipos: **snRNAs** → pequenos RNAs nucleares (splicing); **snoRNAs** → RNAs nucleolares (processamento do rRNA).

iRNA; dsRNA...

Dogma Central da Biologia

Como o DNA se relaciona com as proteínas?

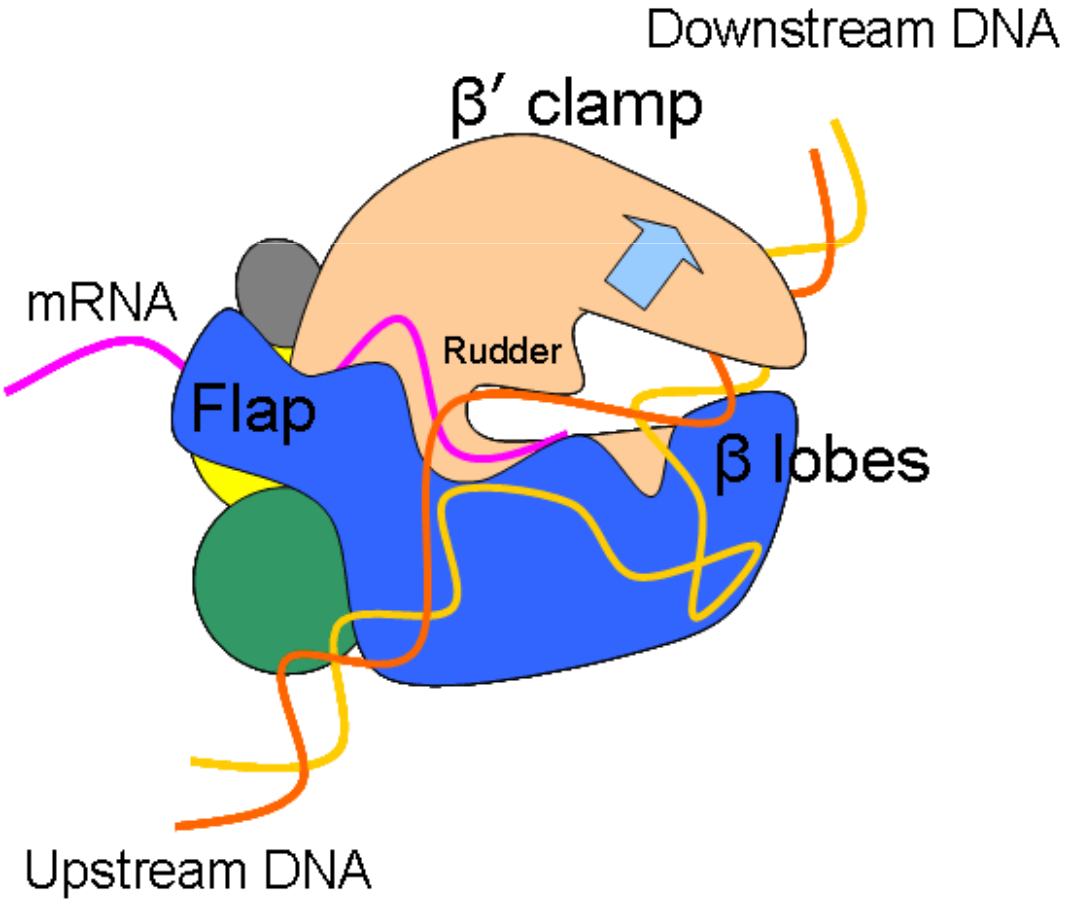
- É feita uma cópia (negativa) de um trecho de DNA (transcrição)
- mRNA é traduzido em resíduos (tradução)



©Addison Wesley Longman, Inc.

RNA Polimerases

RNA polimerases são proteínas que se ligam ao DNA e “processam” o DNA da região upstream para a região downstream, gerando o mRNA.



Transcrição

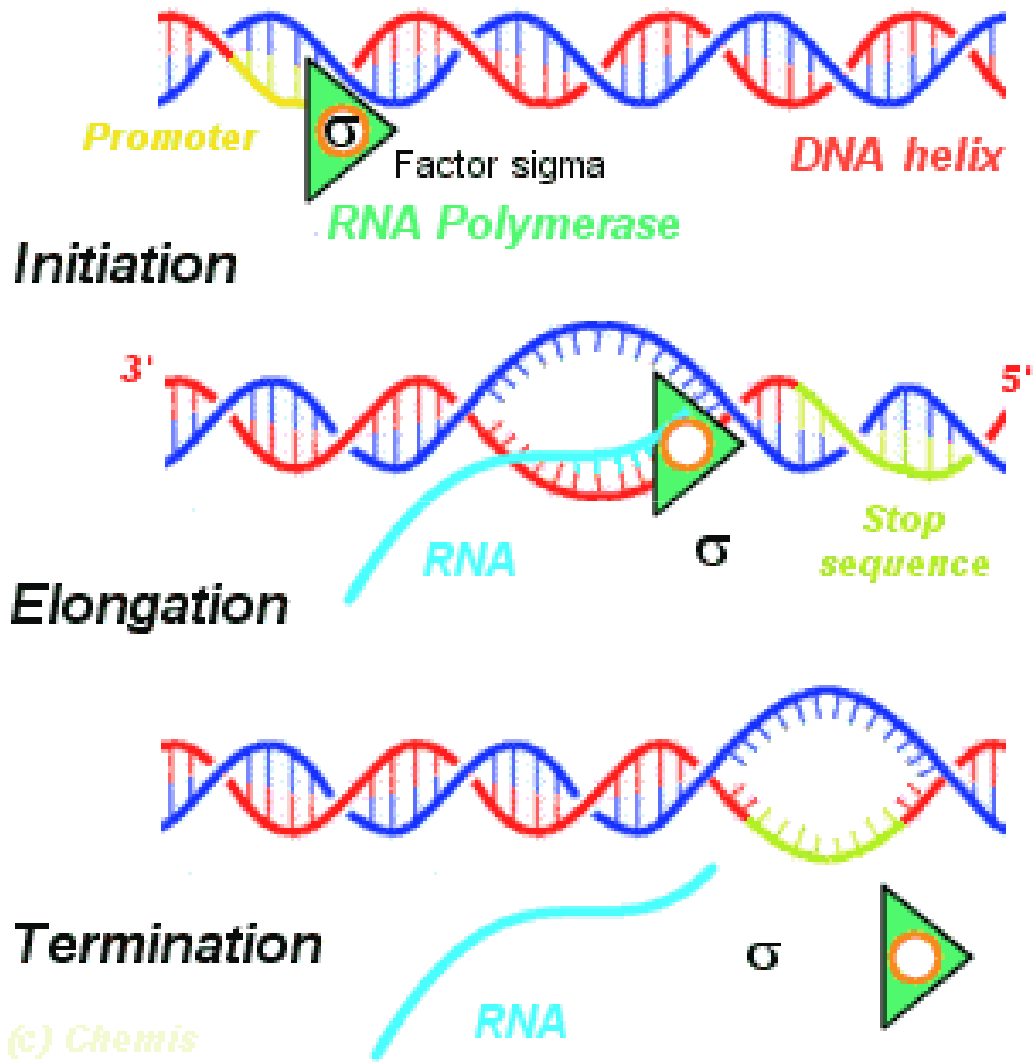
Tem três passos básicos:

1. ***Initiation*** :O ribossomo se liga ao sítio de iniciação específico no mRNA, enquanto o tRNA iniciador é ligado ao códon iniciador e ligado ao ribossomo.

2. ***Elongation*** : Aminoácidos são adicionados à cadeia polipeptídica, de acordo com a seqüência especificada. Os mesmos passos são repetidos até que o STOP códon sinaliza o final.

3. ***Termination*** : A proteína é desligada do ribossomo.

Transcrição



Tradução

O mRNA migra do núcleo para o citoplasma, onde estão os ribossomos.

Os ribossomos são compostos de duas unidades, uma pequena e uma grande, que cercam o mRNA e – para cada códon (seqüência de três nucleotídeos) – agregam um tRNA com o aminoácido correspondente.

Tradução

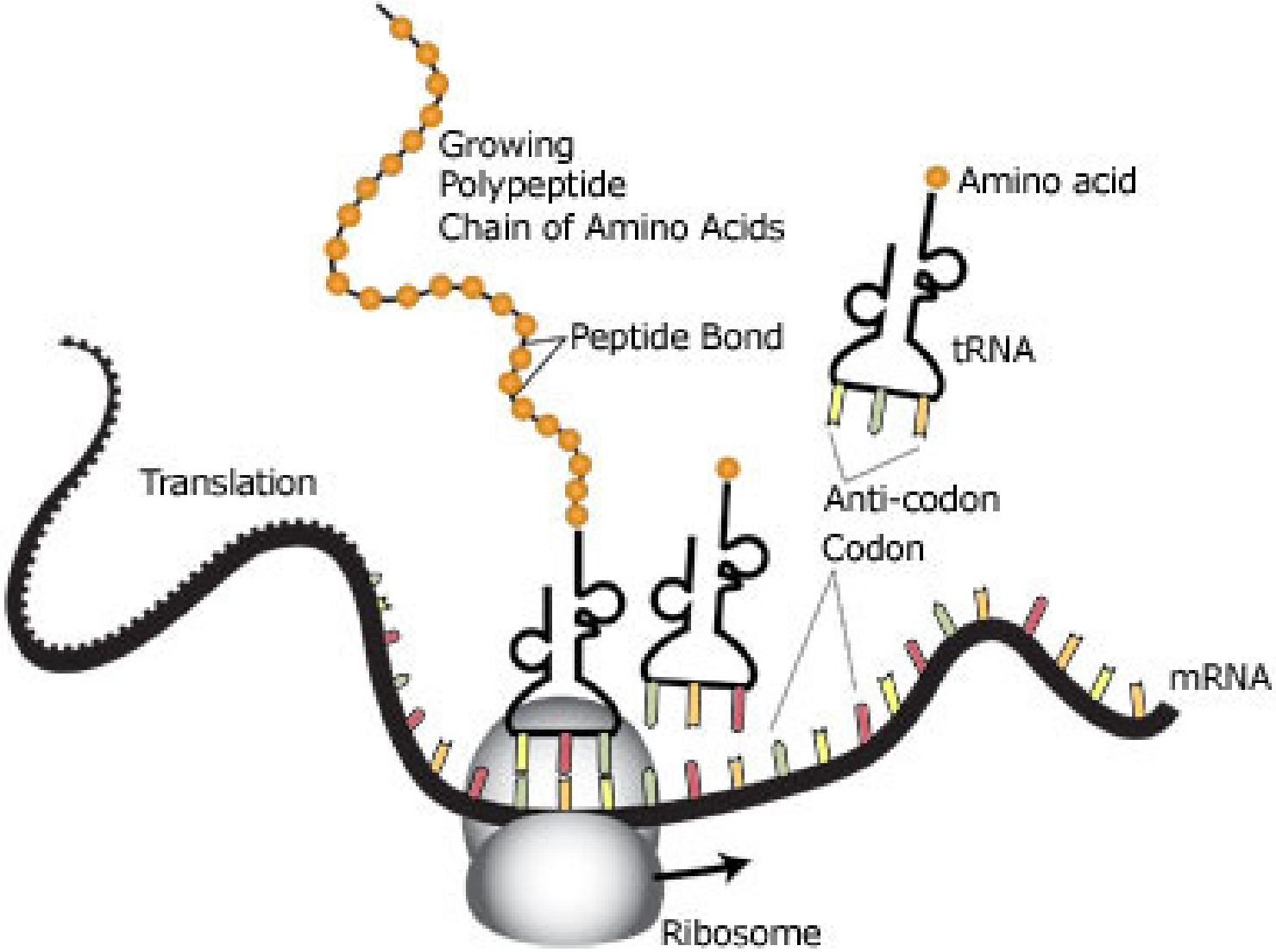
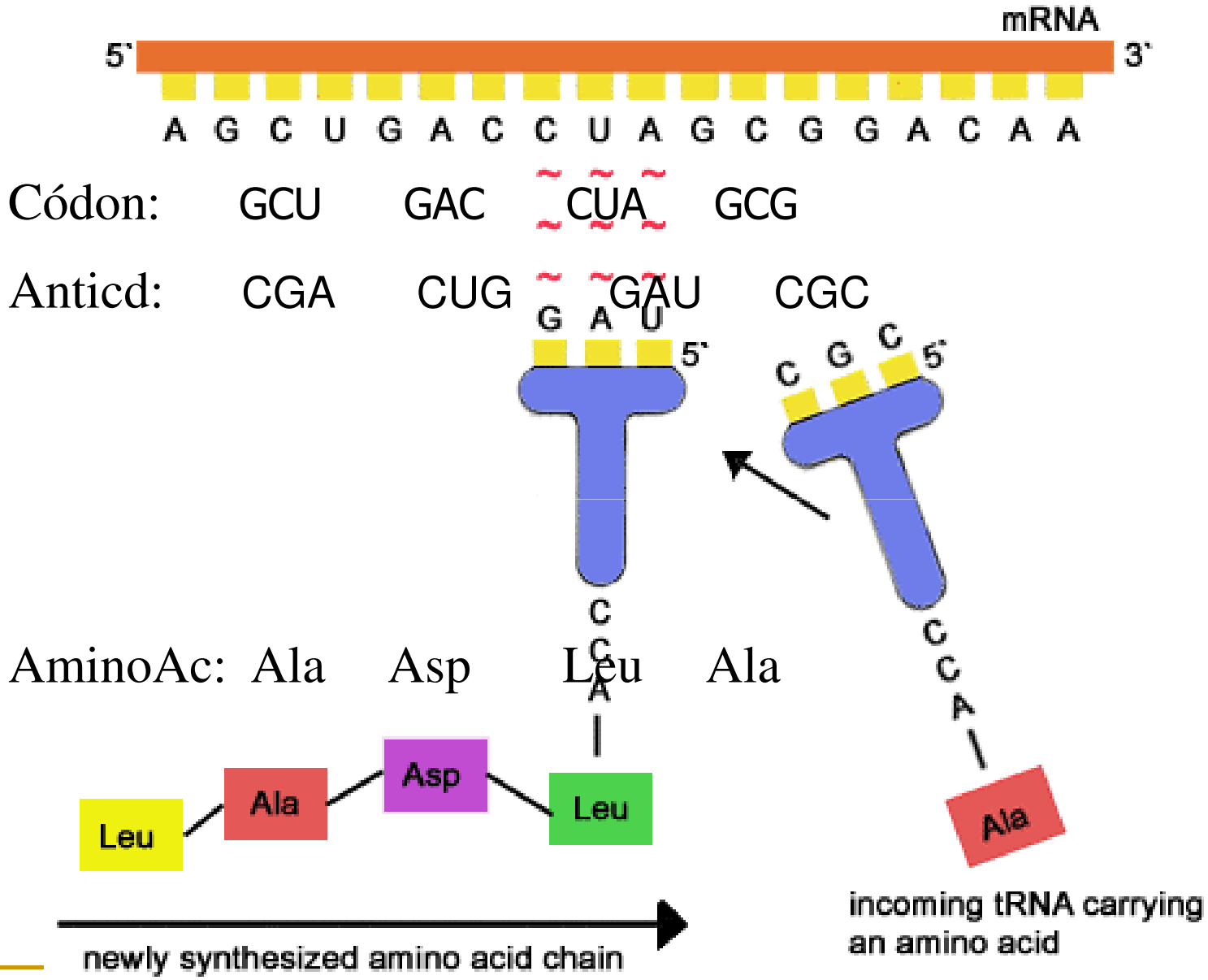
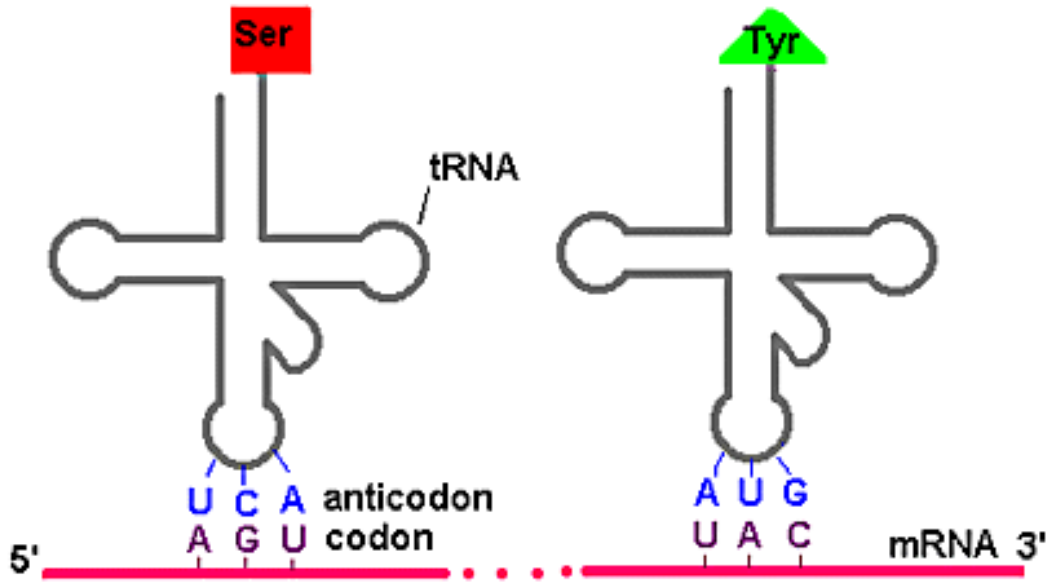


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

Tradução


mRNA
5`
3`
A G C U G A C C U A G C G G A C A A
Códon: GCU GAC CUA GCG
Anticd: CGA CUG GAU CGC
G A U
5`
C G C
5`
C C A
C C A
AminoAc: Ala Asp Leu Ala
Leu
Ala
Asp
Leu
Ala
newly synthesized amino acid chain
incoming tRNA carrying an amino acid

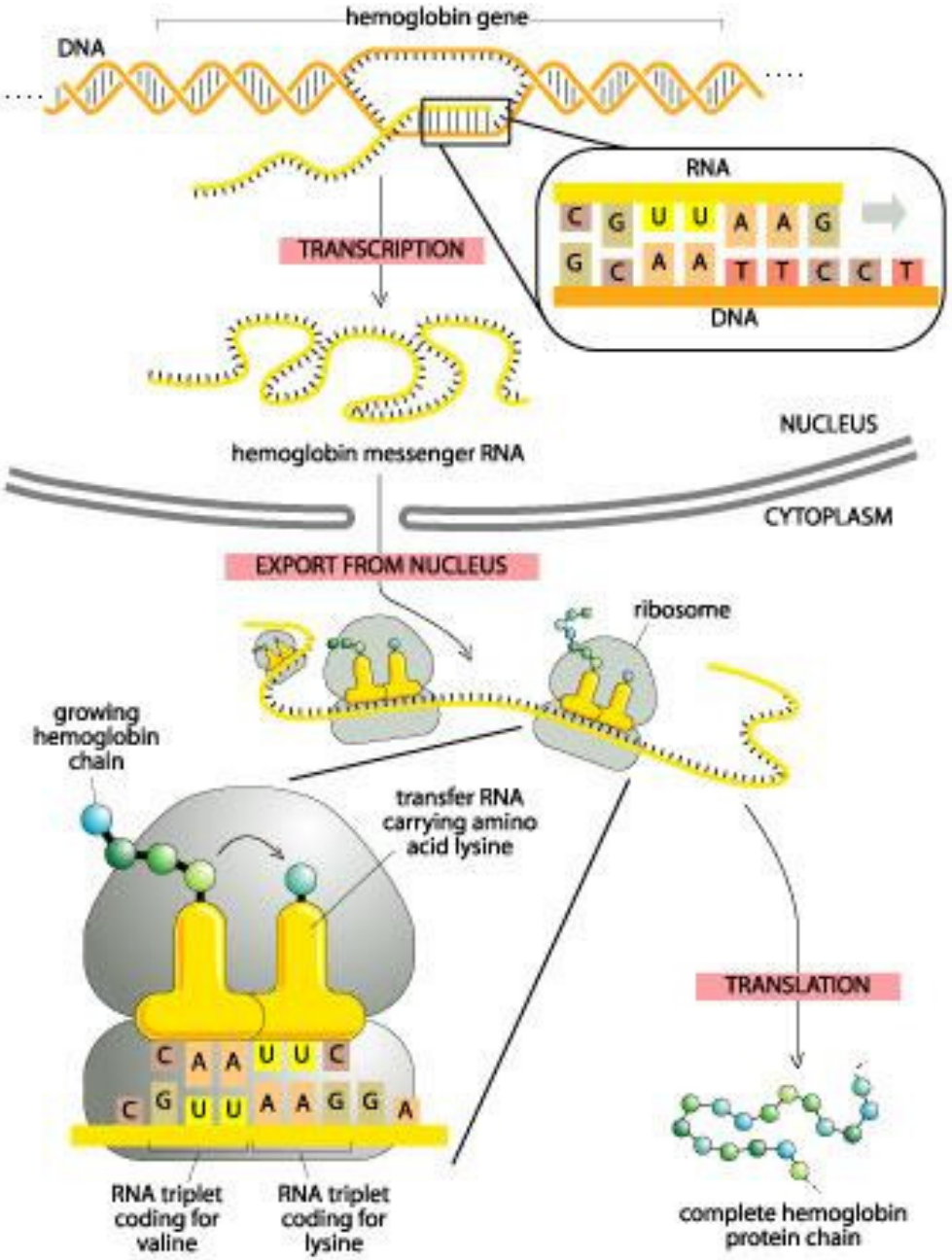
Tradução via tRNA



2nd base in codon

1st base in codon	U	C	A	G	3rd base in codon
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Um Exemplo: Hemoglo-bina



DNA → PROTEÍNA

Charles Yanofsky (1963)

"A seqüência linear de nucleotídeos de um gene determina a seqüência de aminoácidos em uma proteína."

O código genético

Como a seqüência de DNA dita a seqüência de aminoácidos de uma proteína?

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

DNA → PROTEÍNA

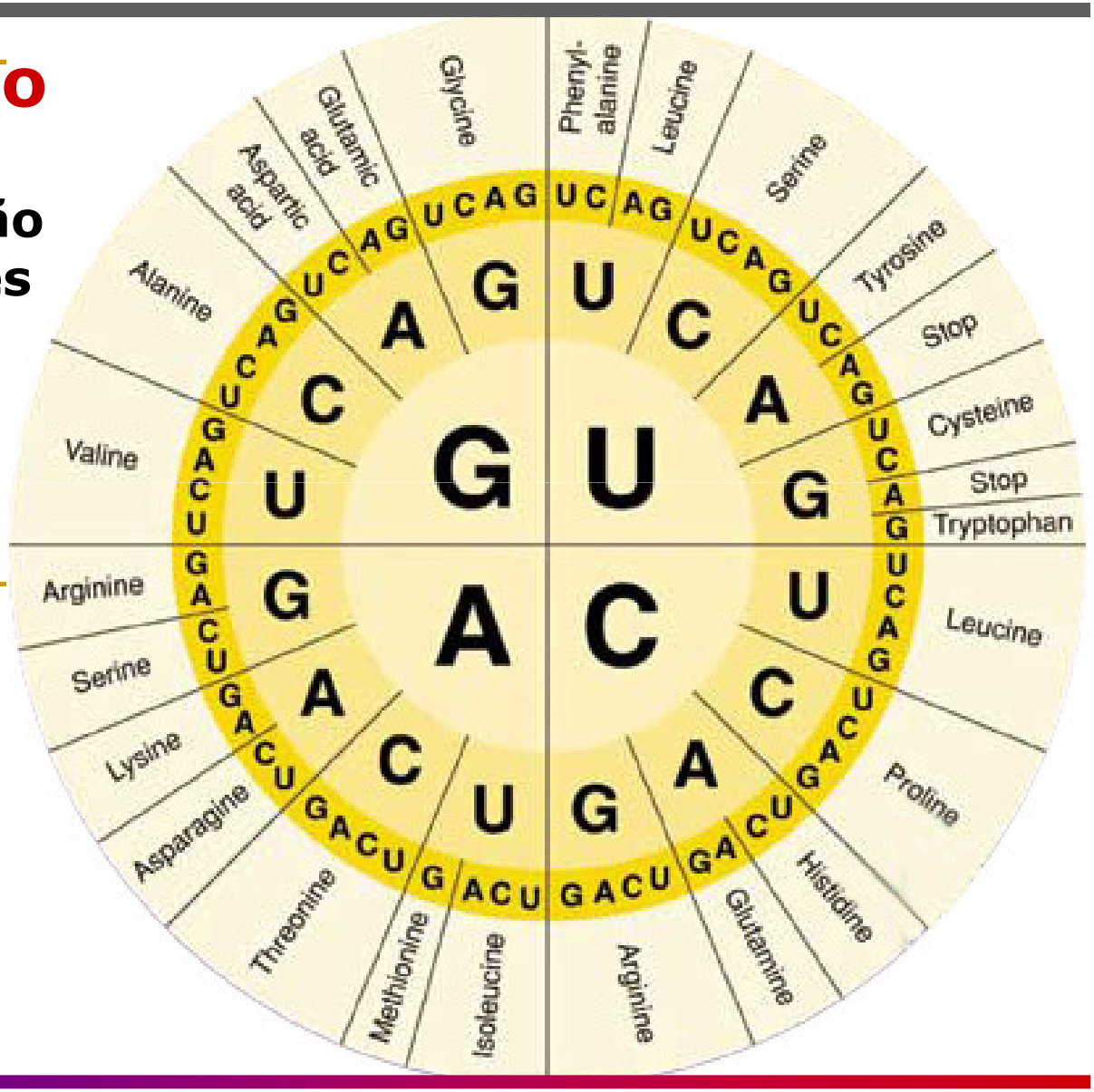
O código genético

- **Os mesmos códons são utilizados por diferentes organismos;**

- **Universal?**

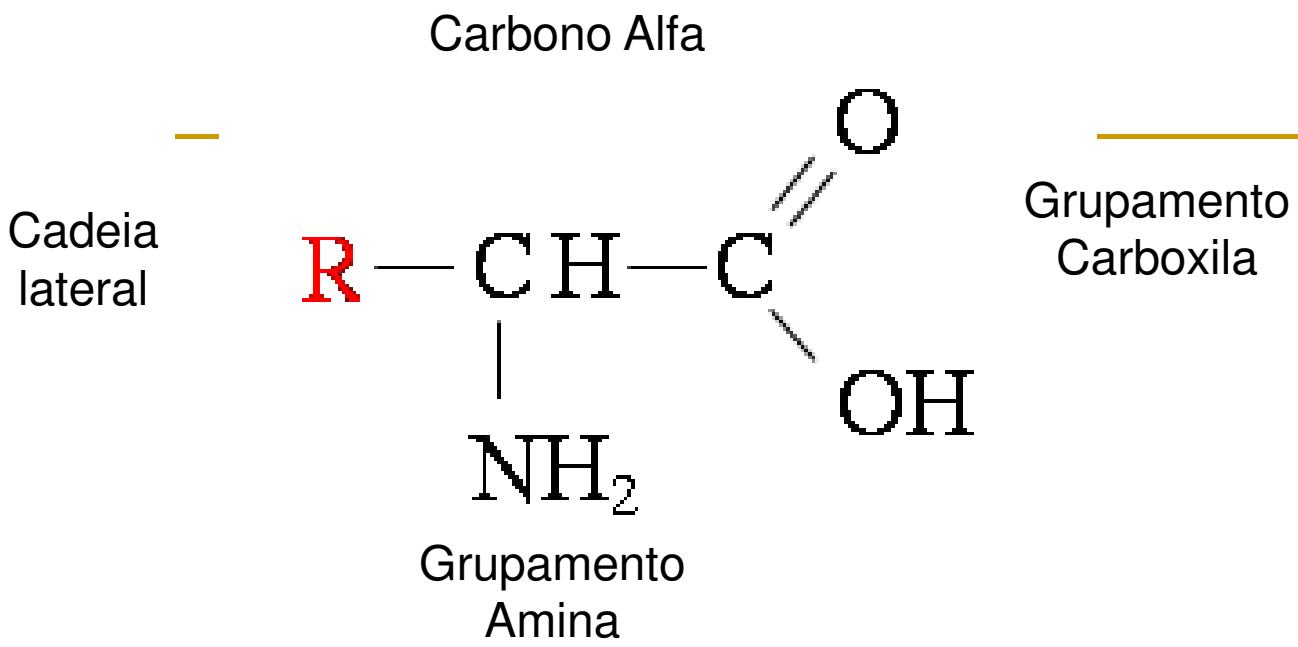
P. ex., em mitocôndrias de mamíferos o códon UGA especifica Trp e não terminação; AGA e AGG especificam terminação e não Arg.

Nas mitocôndrias de plantas, fungos, Drosófila e protozoárias, também ocorrem variações em relação ao código padrão.

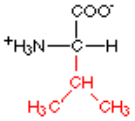


Aminoácidos

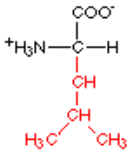
Todas as proteínas, independentemente de sua função ou espécie de origem, são construídas a partir de um conjunto básico de vinte aminoácidos, arranjados em várias seqüências específicas.



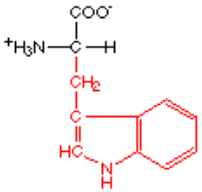
Os vinte aminoácidos que compõe as proteínas



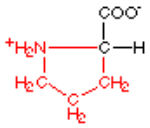
Valina
(Val)



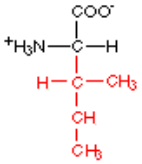
Leucina
(Leu)



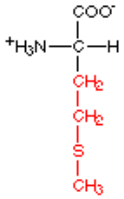
Triptofano
(Trp)



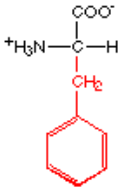
Prolina
(Pro)



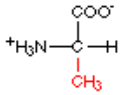
Isoleucina
(Ile)



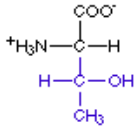
Metionina
(Met)



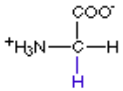
Fenilalanina
(Fen)



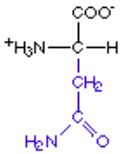
Alanina
(Ala)



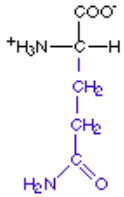
Treonina
(Tre)



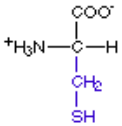
Glicina
(Gli)



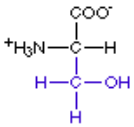
Asparagina
(Asn)



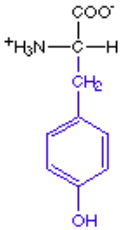
Glutamina
(Gln)



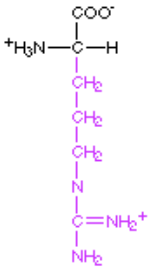
Cisteína
(Cis)



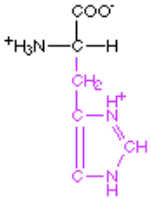
Serina
(Ser)



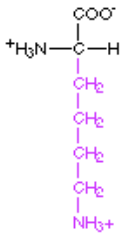
Tirosina
(Tir)



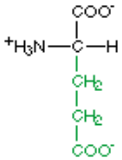
Arginina
(Arg)



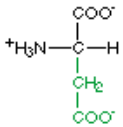
Histidina
(His)



Lisina
(Lis)



Ácido glutâmico
(Glu)



Ácido aspártico
(Asp)

- cadeia lateral apolar
- cadeia lateral polar não-carregada
- cadeia lateral com grupo positivo (básico)
- cadeia lateral com grupo negativo (ácido)

Aminoácidos incomuns:

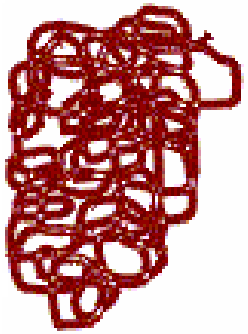
Desmosina (Lys);

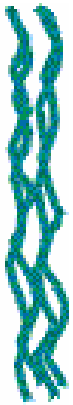
5-hidroxilisina (Lis), etc...

PROTEÍNAS

Proteínas

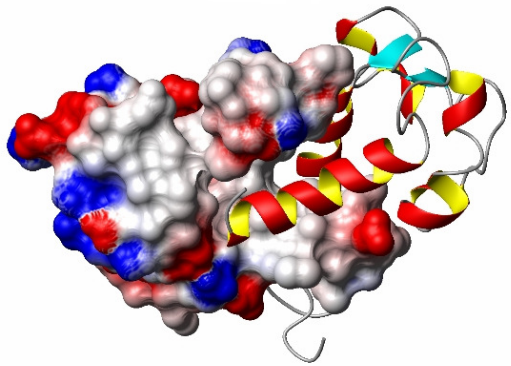
- Fibrosas
- Globulares



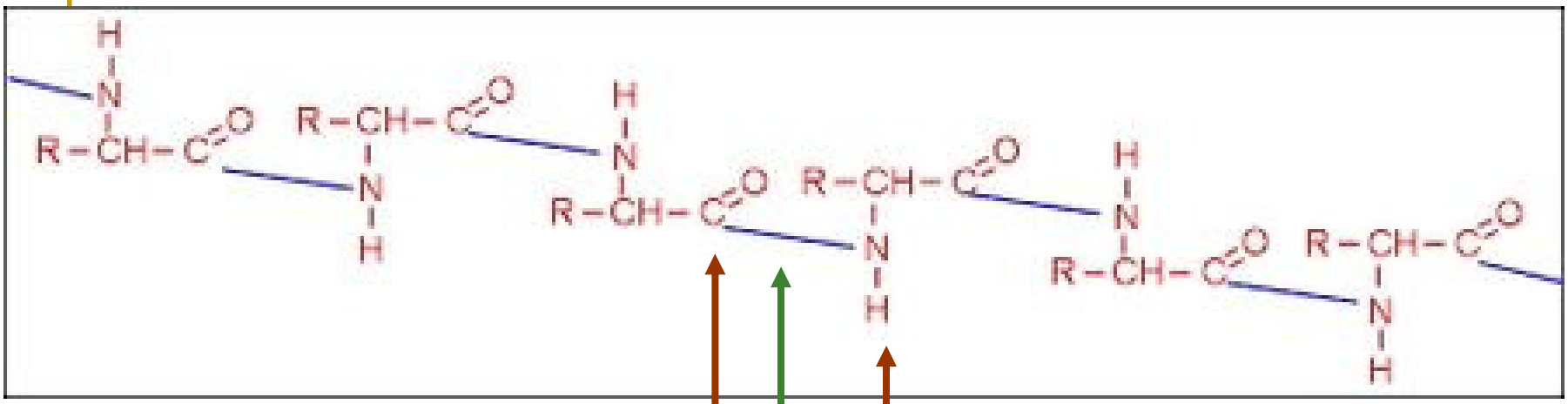


Esquemas de proteínas globulares e fibrosas

- **Elas exercem funções diversas, como:**
  - **Elementos estruturais (colágeno) e sistemas contráteis;**
  - **Armazenamento (ferritina);**
  - **Veículos de transporte (hemoglobina);**
  - **Hormônios;**
  - **Anti-infecciosas (imunoglobulina);**
  - **Enzimáticas (lipases);**
  - **Nutricional (caseína);**



Ligações



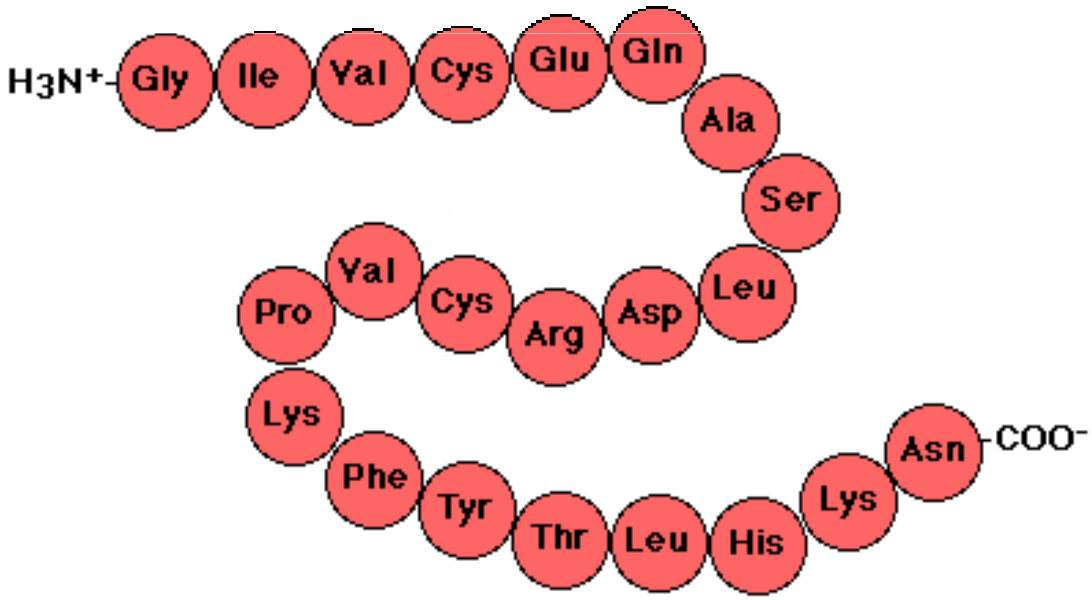
PROTEÍNAS

Estrutura primária

- Longa cadeia de aminoácidos semelhante a um "colar de contas".

- Sua estrutura é somente a seqüência dos aminoácidos.

Amino terminal

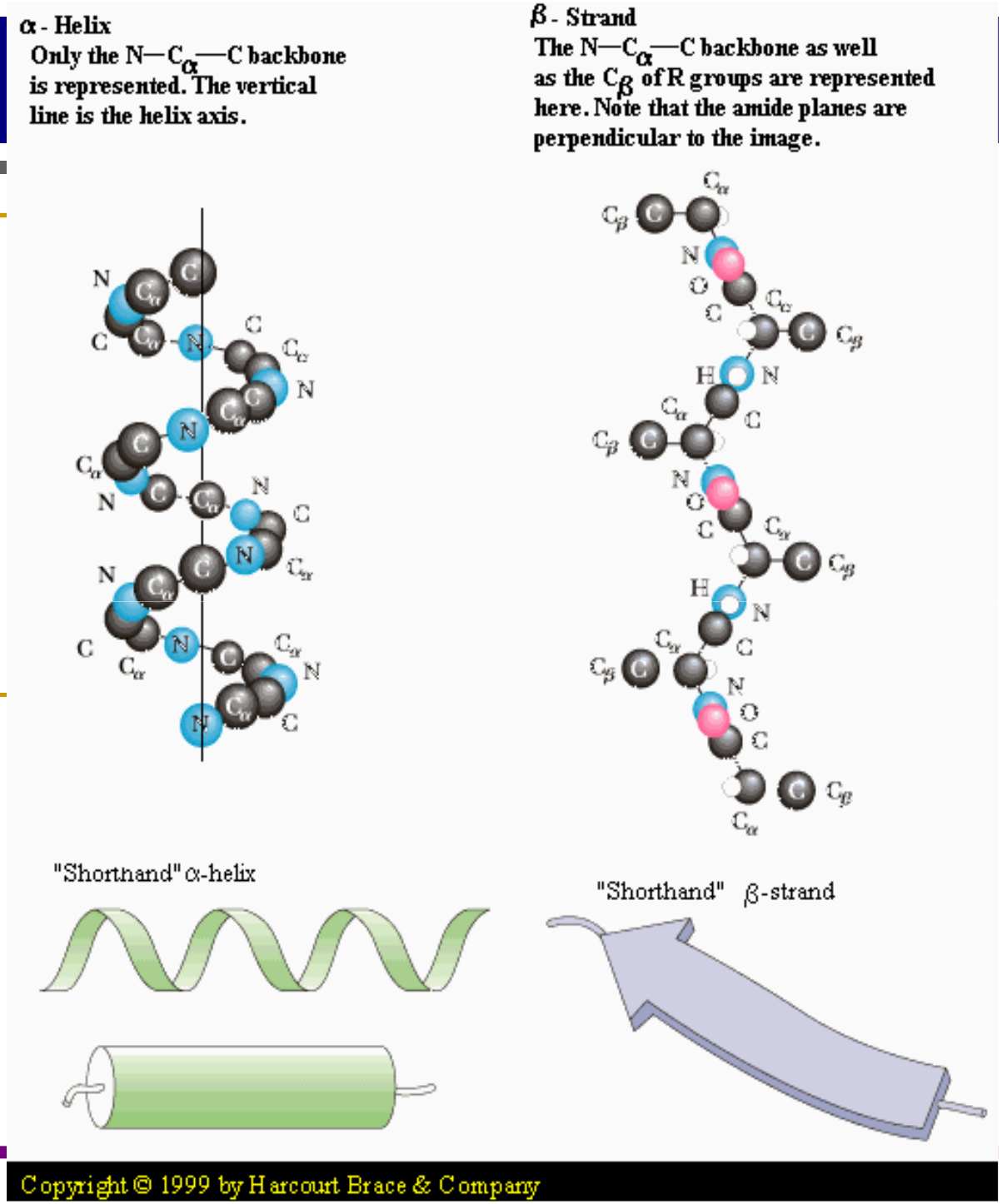


carboxi terminal

PROTEÍNAS

Estrutura secundária

- **A principal força de estabilização da *alfa-hélice* e da *beta-folha* é a ligação de hidrogênio.**

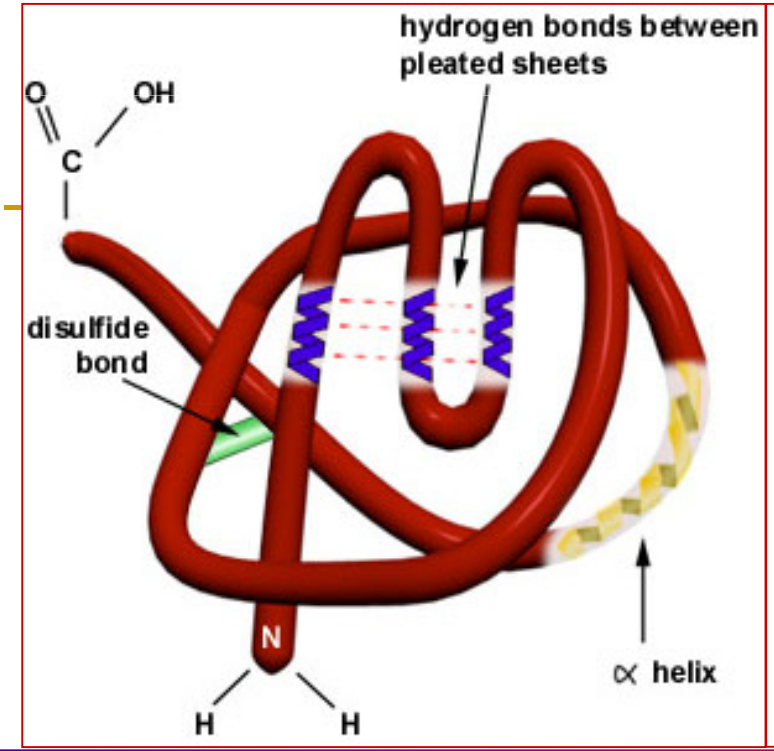


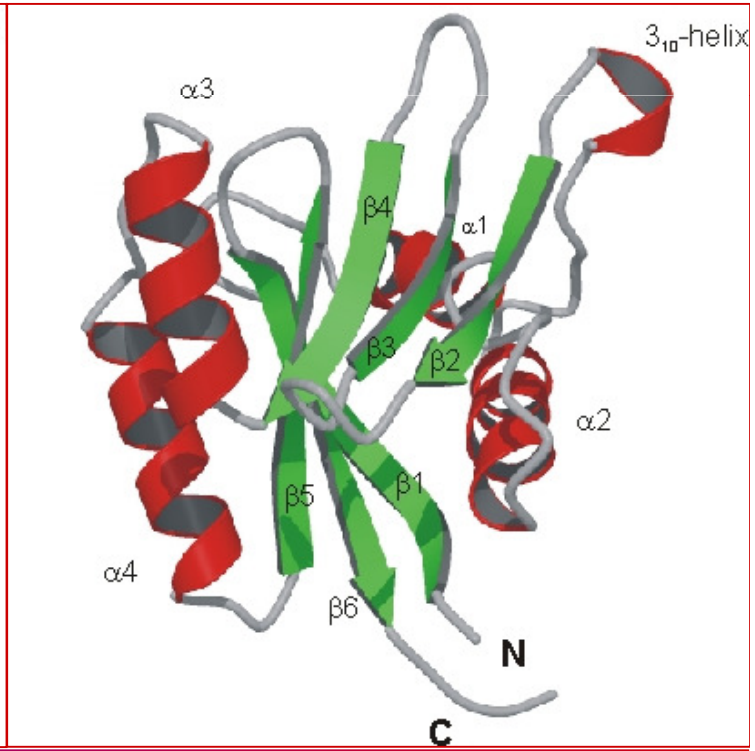
PROTEÍNAS

Estrutura terciária

- Resulta do enrolamento da hélice ou da folha pregueada, sendo mantido por pontes de hidrogênio e dissulfeto.

- Confere atividade biológica às proteínas.



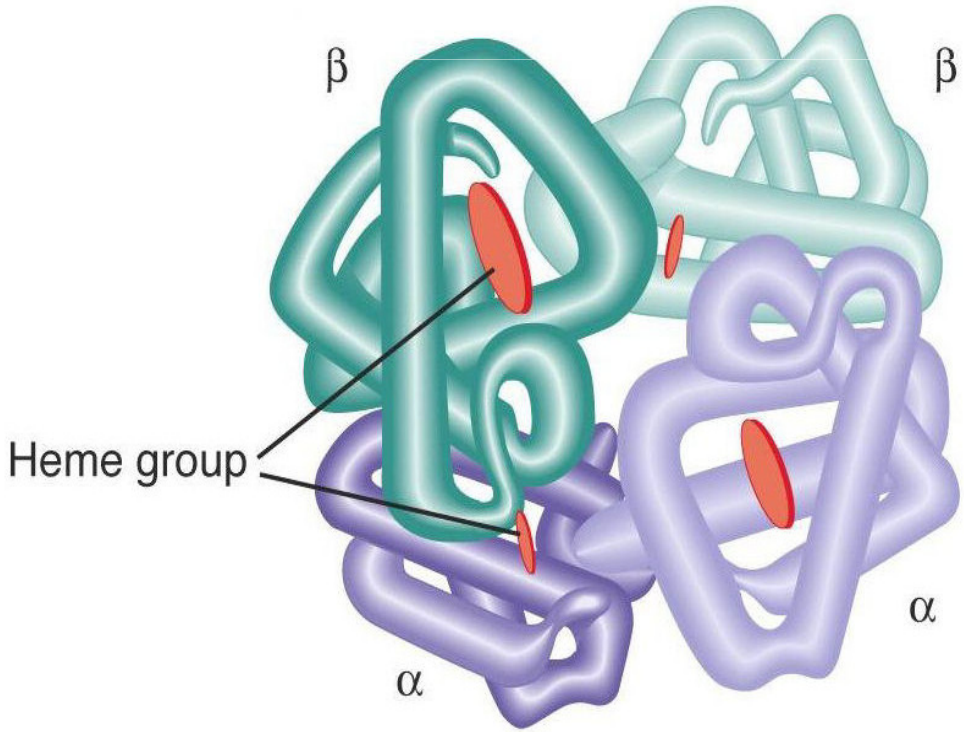


PROTEÍNAS

Estrutura quaternária

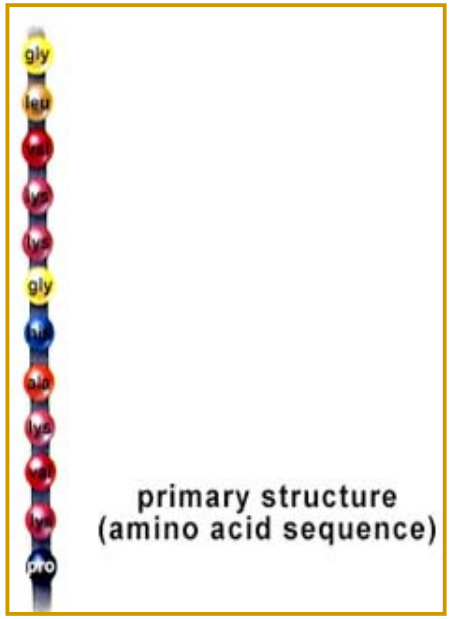
- Cadeias peptídicas podem se associar em estruturas com múltiplas subunidade;

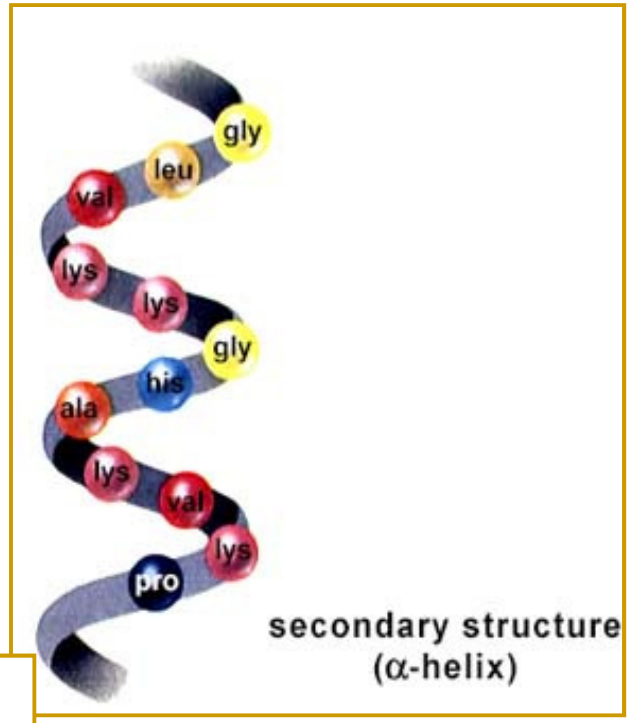
- Refere-se ao arranjo espacial de subunidades e à natureza de suas interações.

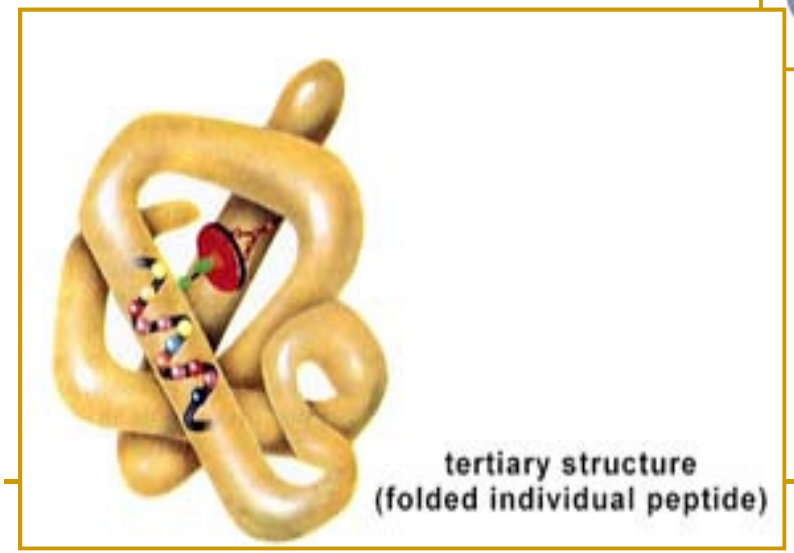


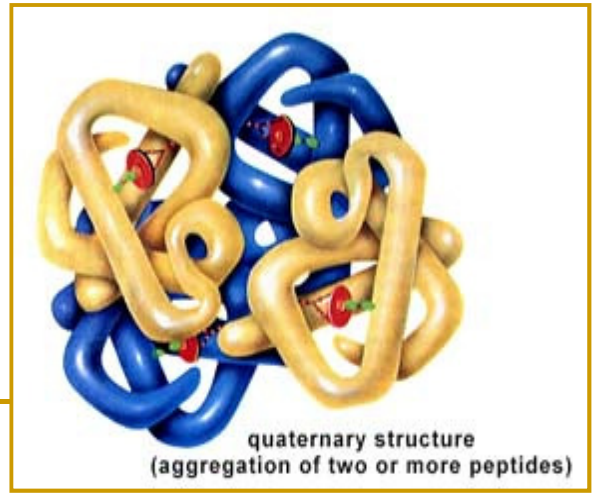
Hemoglobina

Proteínas: níveis de complexidade estrutural









TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A partir do conhecimento da molécula de DNA, os cientistas agora querem administrar essa **fábrica de proteínas**!!

DNA – molécula relativamente simples e muito regular; varia só nas 4 bases (com caract. químicas muito semelhantes) e são macromoléculas com as mesmas propriedades químicas.

↓

pelo comportamento químico é impossível separar uma molécula de DNA

↓

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

↓

O DNA é extraído da célula com o gene de interesse – cortado em fragmentos menores de modo controlado - cada fragmento é ligado em uma outra molécula de DNA – célula hospedeira

↓

célula com a molécula híbrida, passa a copiá-la, duplicando-a em cada divisão celular – com grande quantidade da molécula é possível localizar o gene.

Isolar o gene – multiplicá-lo e obter grande quantidade da proteína

↓

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (endonucleases)

Introdução à Engenharia Genética

Utilizando as enzimas de restrição bacterianas, tornou-se possível cortar dois DNAs diferentes e, pela ação de enzimas ligases, unir os segmentos resultantes e formar um DNA recombinante - Tecnologia do DNA Recombinante – início da Engenharia Genética.

Assim, os cientistas têm desenvolvido técnicas que possibilitam transferir os genes de um tipo celular para outro (por exemplo, de plantas e animais para as bactérias).

Aplicações comerciais: o futuro da engenharia genética é considerado muito amplo, sendo que já resolveu alguns dos maiores problemas de pesquisa. Por exemplo, genes que codificam a produção de compostos importantes, com produção reduzida em seu tecido normal, podem ser retirados de células animais ou vegetais e inseridos na célula bacteriana- esta sintetiza em quantidades ilimitadas os produtos codificados pelos genes. Muitos exemplos de sua aplicação são observados na medicina.

Outra aplicação importante é a transformação de plantas, animais e microrganismos para a obtenção de Transgênicos (OGM).

Importância dos Microrganismos e das Enzimas na Engenharia Genética

As células animais e vegetais usualmente não podem ser cultivadas para produção de compostos específicos – estas perdem a habilidade de síntese quando são isoladas e cultivadas em laboratório. Também , o cultivo de células de tecido em laboratório é dispendioso e requer meios complexos altamente enriquecidos.

Uso de microrganismos – medicina: altamente empregado, pois evita muitos dos problemas associados com a obtenção de compostos importantes (insulina, interferom, hormônios, etc.). As bactérias que carregam os genes para os mais diversos compostos, podem ser cultivadas indefinidamente.

Por meio da introdução de genes estranhos em microrganismos, é possível desenvolver cepas que oferecem novas soluções para problemas diversos, como poluição, escassez de alimento e energia , controle de doenças e até mesmo terapia gênica.

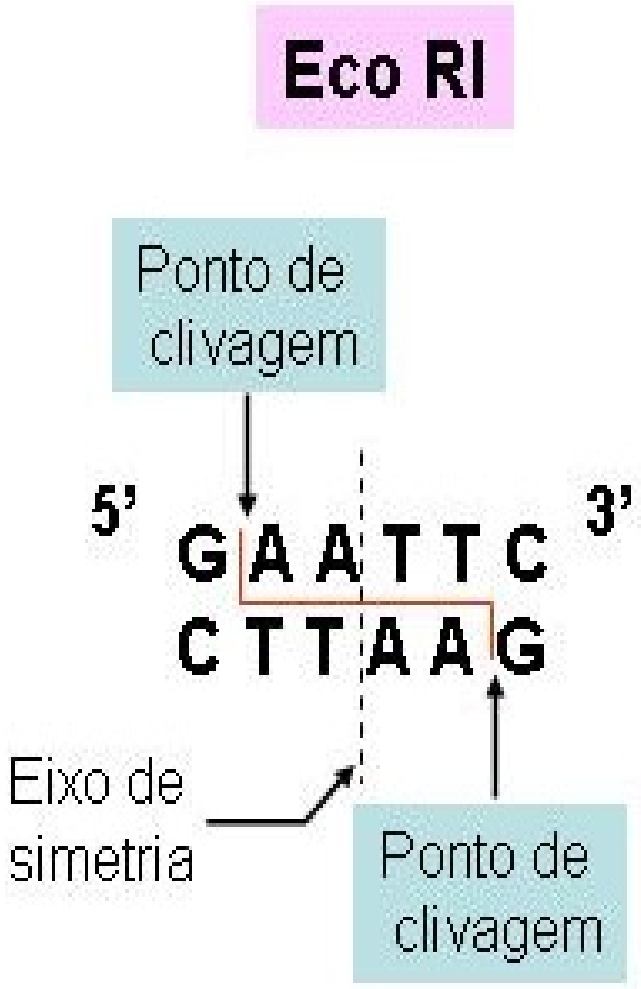
ENZIMAS: fundamental para a tecnologia do DNA recombinante.

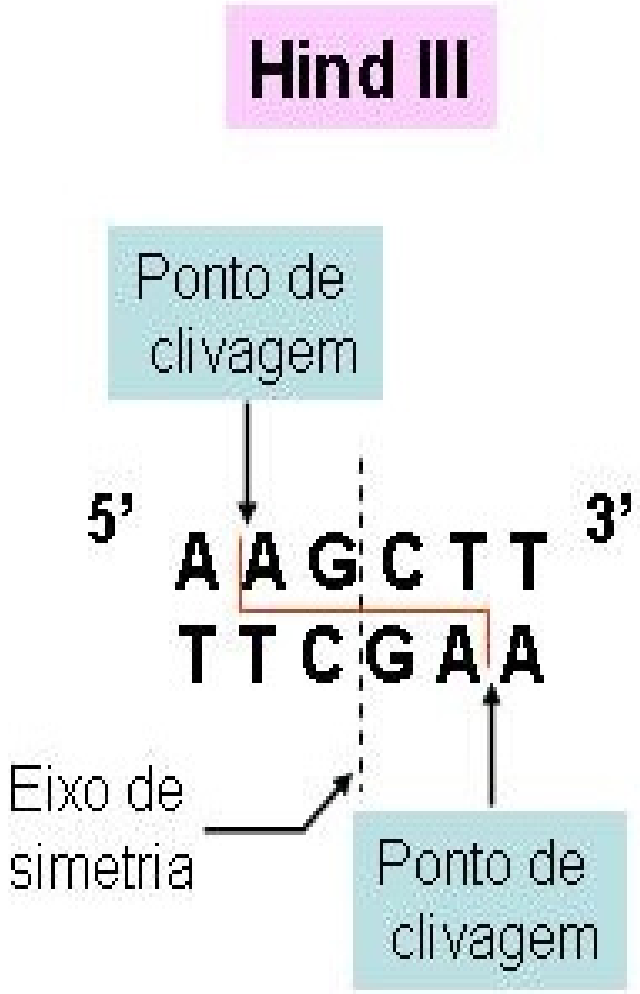
- Endonucleases de restrição: apresentam papel fundamental, clivando o DNA em seqüências específicas, gerando um conjunto de fragmentos menores.
- DNA ligase: os fragmentos separados para serem clonados podem ser unidos a um vetor de clonagem apropriado usando a DNA ligase.

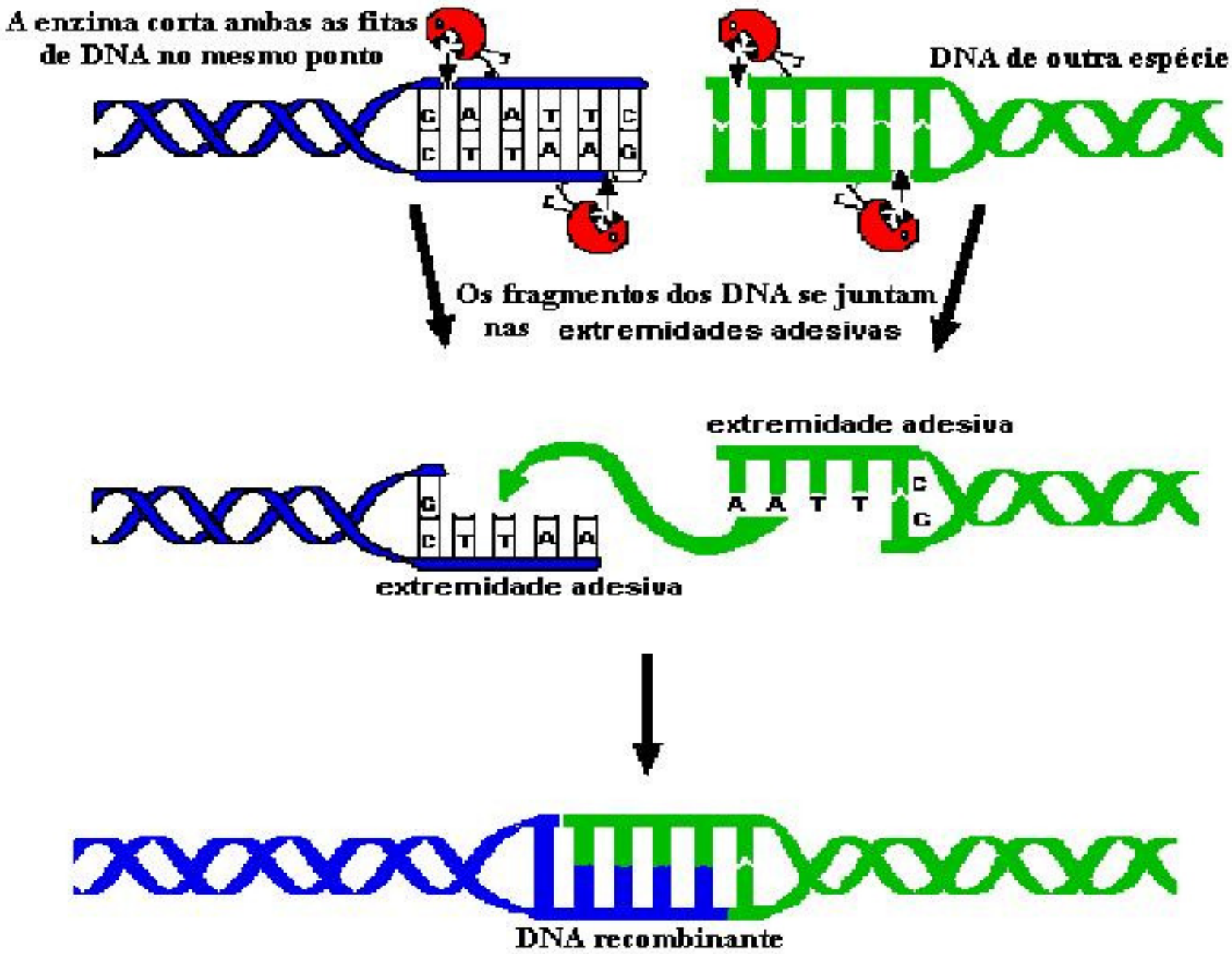
Assim, o vetor recombinante é introduzido numa célula hospedeira que o "clona", a medida que a célula realiza muitas gerações de divisões celulares.

Algumas das enzimas usadas na tecnologia do DNA recombinante

Enzima(s)	Função
Endonucleases de restrição do tipo II	Clivar os DNAs em seqüências de bases específicas
DNA ligase	Unir duas moléculas ou fragmentos de DNA
DNA polimerase I (*E. coli*)	Preencher vazios nos dúplex pela adição sucessiva de nucleotídeos nas extremidades 3′
Transcriptase reversa	Sintetizar uma cópia de DNA de uma molécula de RNA
Polinucleotídeo quinase	Adicionar um fosfato à extremidade 5′-OH de um polinucleotídeo para marcá-lo ou permitir ligação
Terminal transferase	Adicionar caudas homopoliméricas às extremidades 3′-OH de um dúplex linear
Exonuclease III	Remoção de resíduos de nucleotídeos a partir das extremidades 3′ de uma fita de DNA
Exonuclease do bacteriófago λ	Remoção de nucleotídeos, a partir das extremidades 5′ de um dúplex para expor extremidades 3′ de fita simples
Fosfatase alcalina	Remoção de fosfatos terminais a partir das extremidades 5′ ou 3′ ou ambas


Eco RI
Ponto de clivagem
5'
G A A T T C
3'
C T T A A G
Eixo de simetria
Ponto de clivagem


Hind III
Ponto de clivagem
5'
A A G C T T
3'
T T C G A A
Eixo de simetria
Ponto de clivagem


A enzima corta ambas as fitas de DNA no mesmo ponto
DNA de outra espécie
G A A T T C
C T T A A G
Os fragmentos dos DNA se juntam nas extremidades adesivas
extremidade adesiva
A A T T
C
G
G
C T T A A
extremidade adesiva
DNA recombinante

Vetores de Clonagem

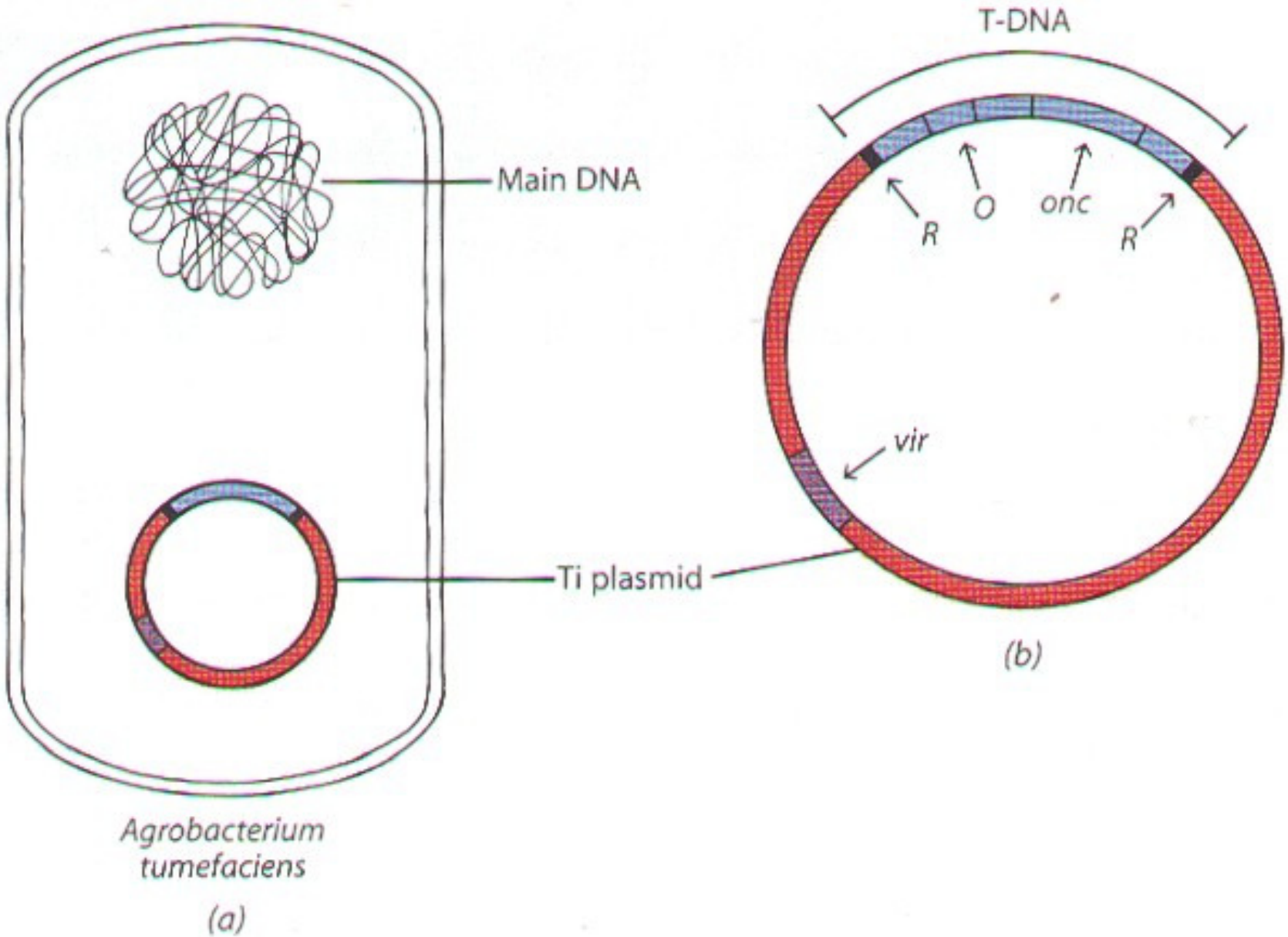
Plasmídios – bacteriófagos – cosmídios - E. coli.

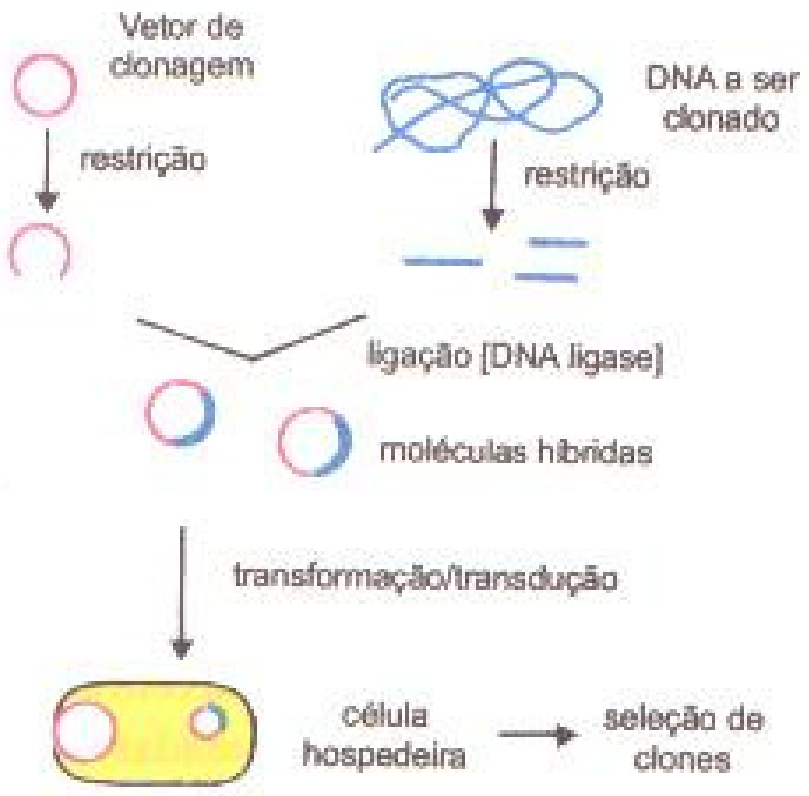
Plasmídios : moléculas de DNA circulares que se replicam separadamente do cromossomo hospedeiro.

-Plasmídios bacterianos naturais – 5.000 a 400.000 pares de bases.

-Plasmídios introduzidos nas células por técnicas de transformação

Utilizados para clonar segmentos de DNA até 15.000 pares de bases.

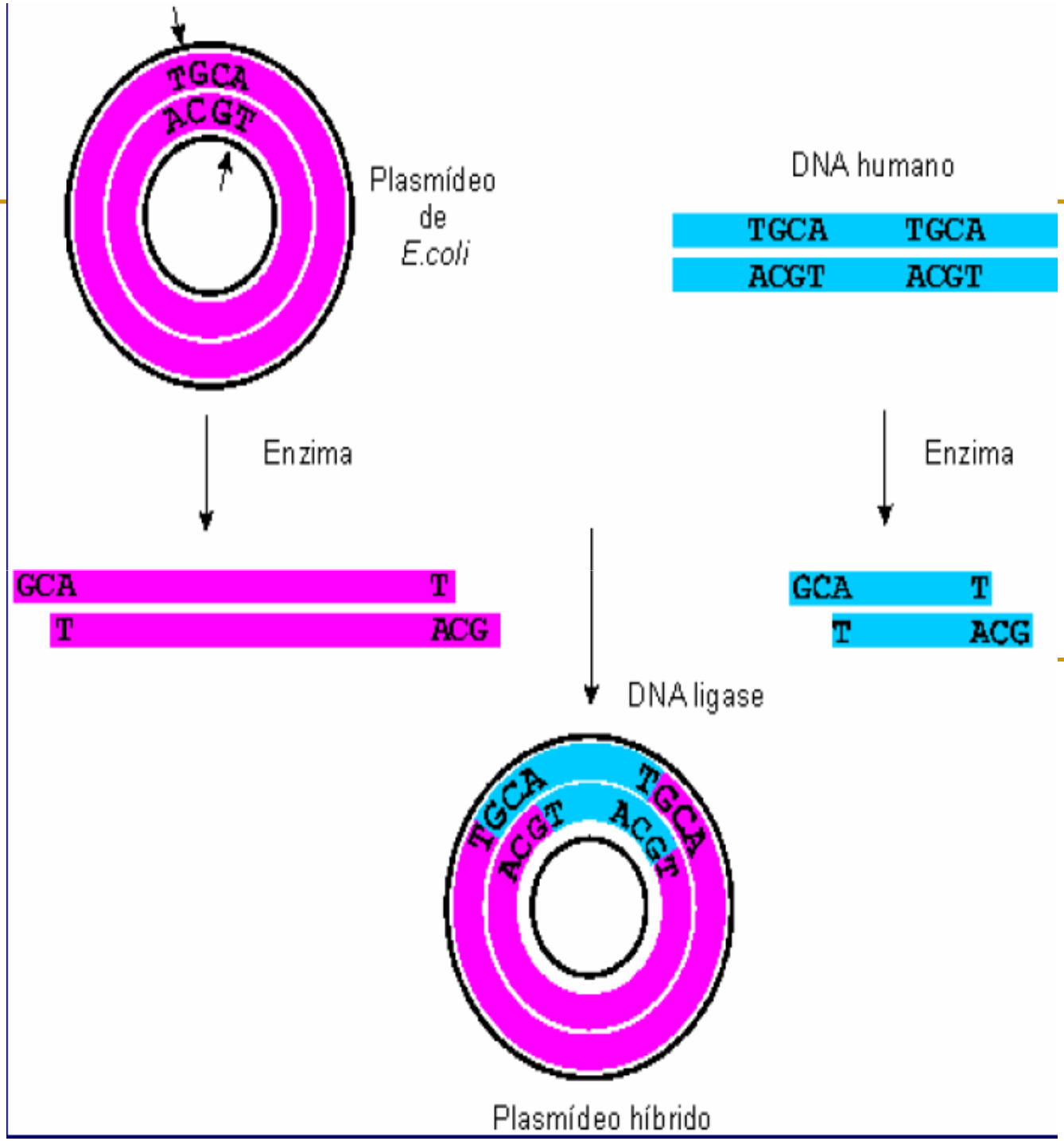

Main DNA
Ti plasmid
Agrobacterium tumefaciens
(a)
T-DNA
R
O
onc
R
vir
(b)



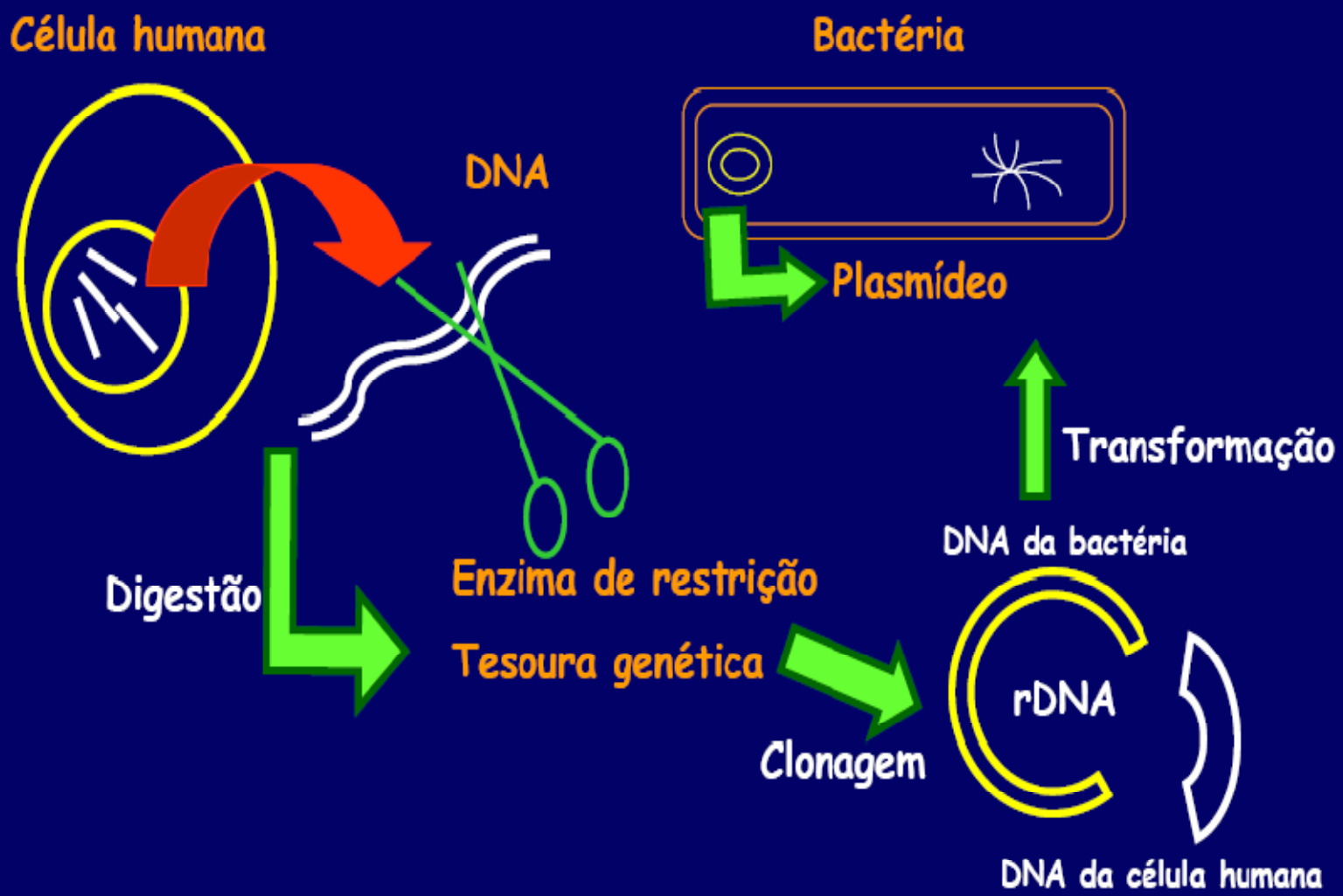
Esquema das etapas envolvidas na clonagem de genes.

Clonagem Molecular

- Consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas
- Primeiro: inserto + vetor = rDNA
- Segundo: rDNA + célula hospedeira = transformação


TGCA
ACGT
Plasmídeo
de
E.coli
DNA humano
TGCA TGCA
ACGT ACGT
Enzima
Enzima
GCA T
T ACG
GCA T
T ACG
DNA ligase
TGCA
ACGT
TGCA
ACGT
Plasmídeo híbrido

Engenharia Genética (1970): o DNA recombinante permite isolar um gene específico, com uma característica desejada, e transfere este gene para outro organismo vivo

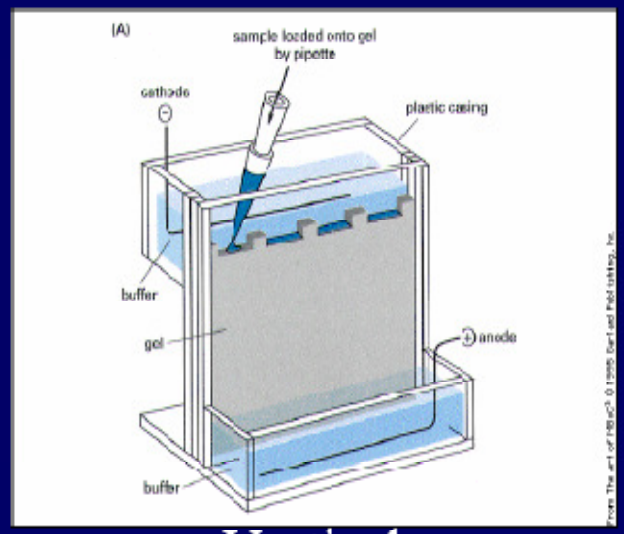


Eletroforese

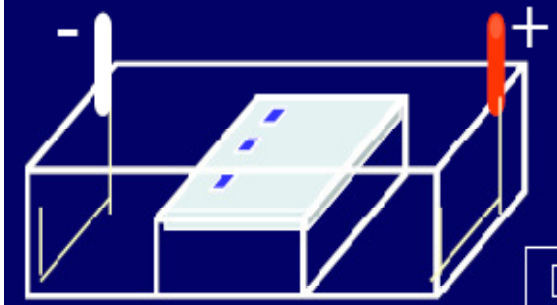
- Já conhecida desde 1930
- Difundida em 1950-1960
- Movimentação de moléculas submetidas a campo elétrico
- Usa um substrato: papel, agarose, poliacrilamida
- Separa proteínas por cargas e peso molecular
- Separa ácido nucléicos por peso molecular

Eletroforese

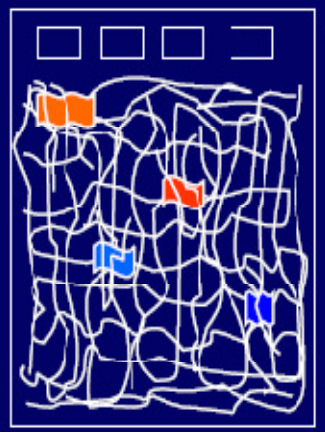
Fonte de eletroforese



Vertical

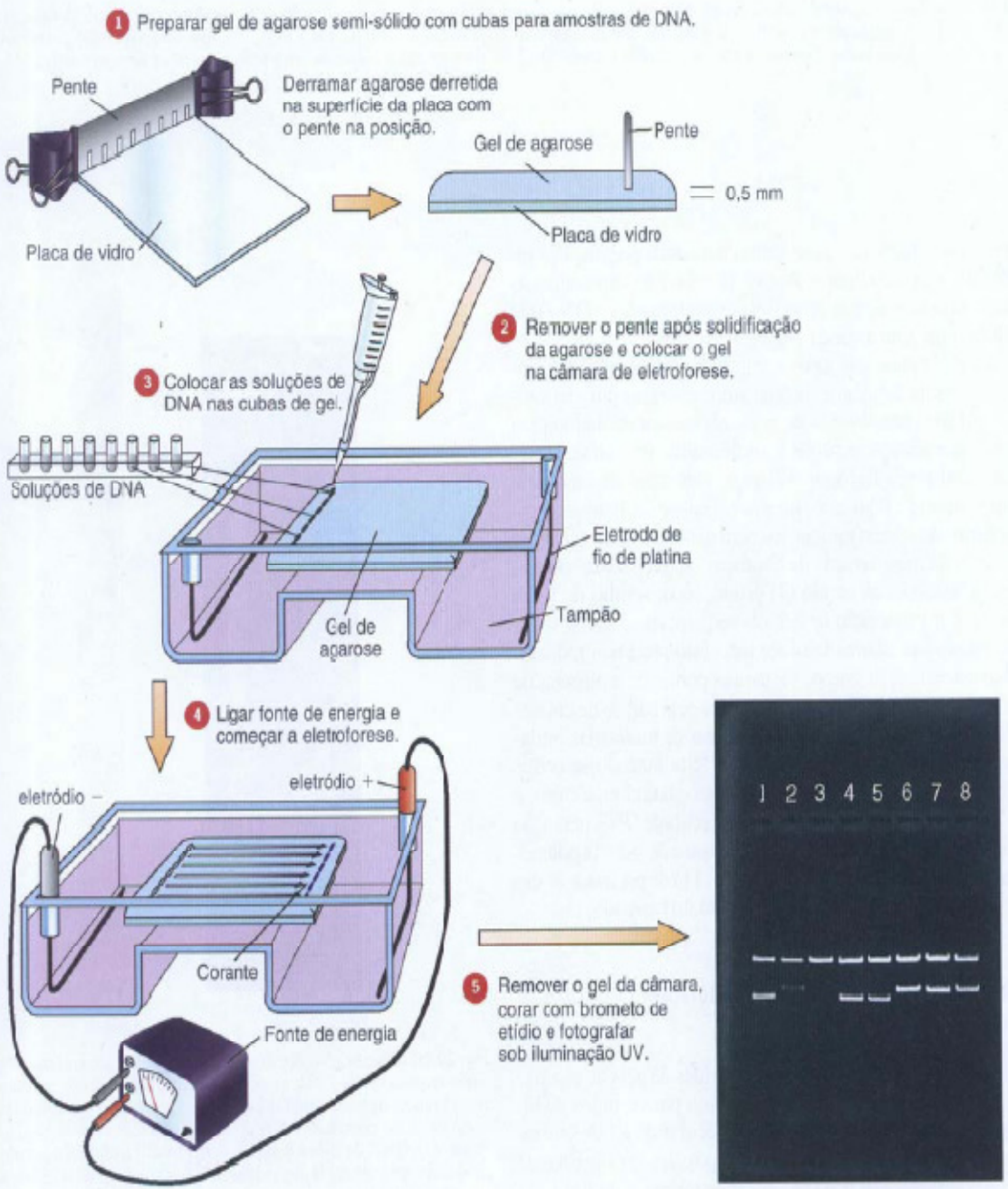


Horizontal



Visualização do gel de agarose

Eletroforese

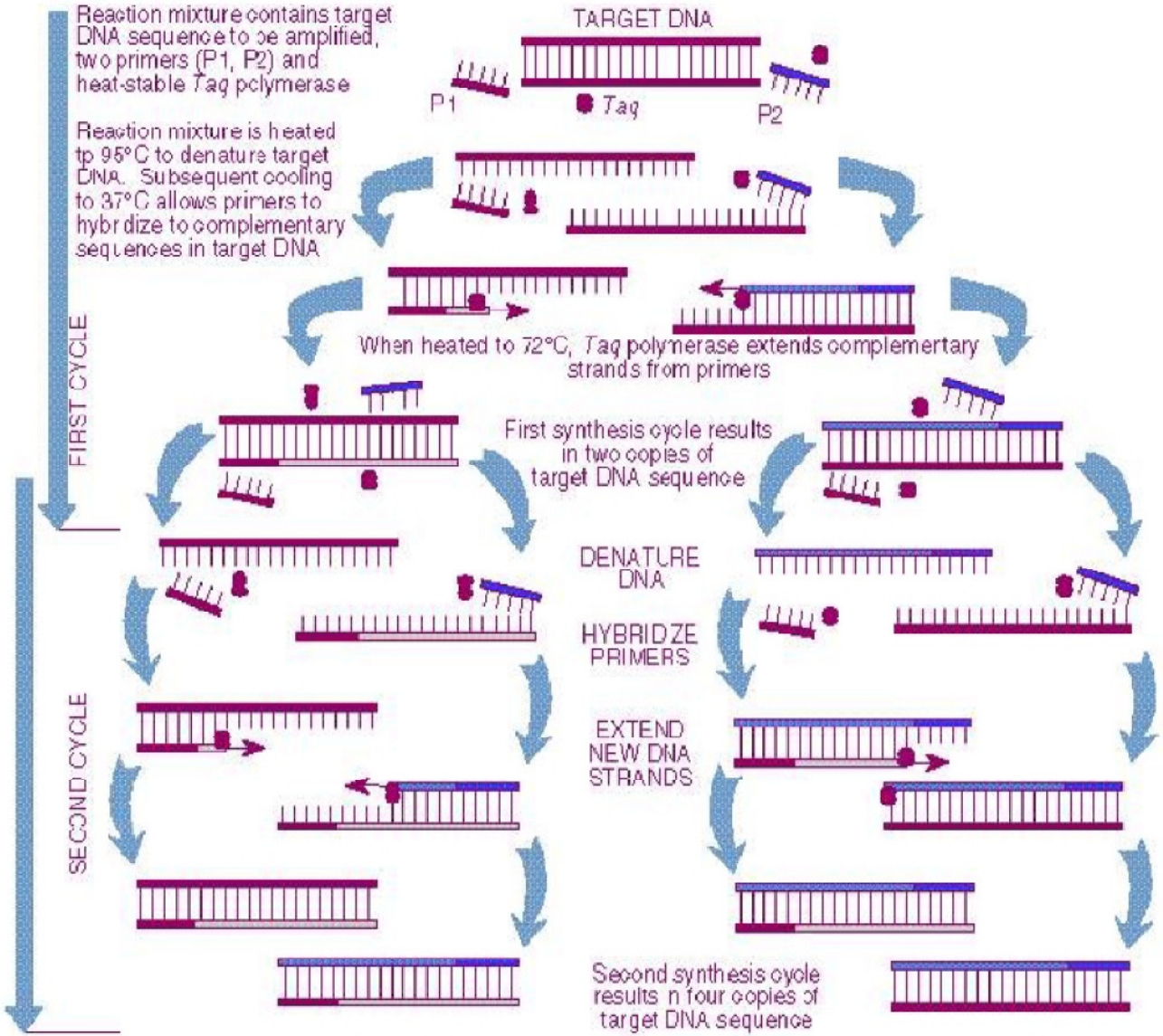


REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

- Saiki et al. (1985), método para análise de DNA que permitiu um grande avanço neste sentido
- A técnica de PCR tem por objetivo amplificar uma seqüência alvo específica por meio de uma enzima termoestável, *in vitro.* Neste método utiliza-se além desta enzima, os quatro nucleotídeos e um par de *primers* (aproximadamente 20pb) que flanqueiam a região a ser amplificada. Estes primers são utilizados para direcionar a síntese do DNA, em ciclos repetidos.
- Em cada ciclo, as fitas servem de molde para a geração de novas fitas. Gerando um grande número de cópias da sequência alvo

ORNL-DWG 91M-17476

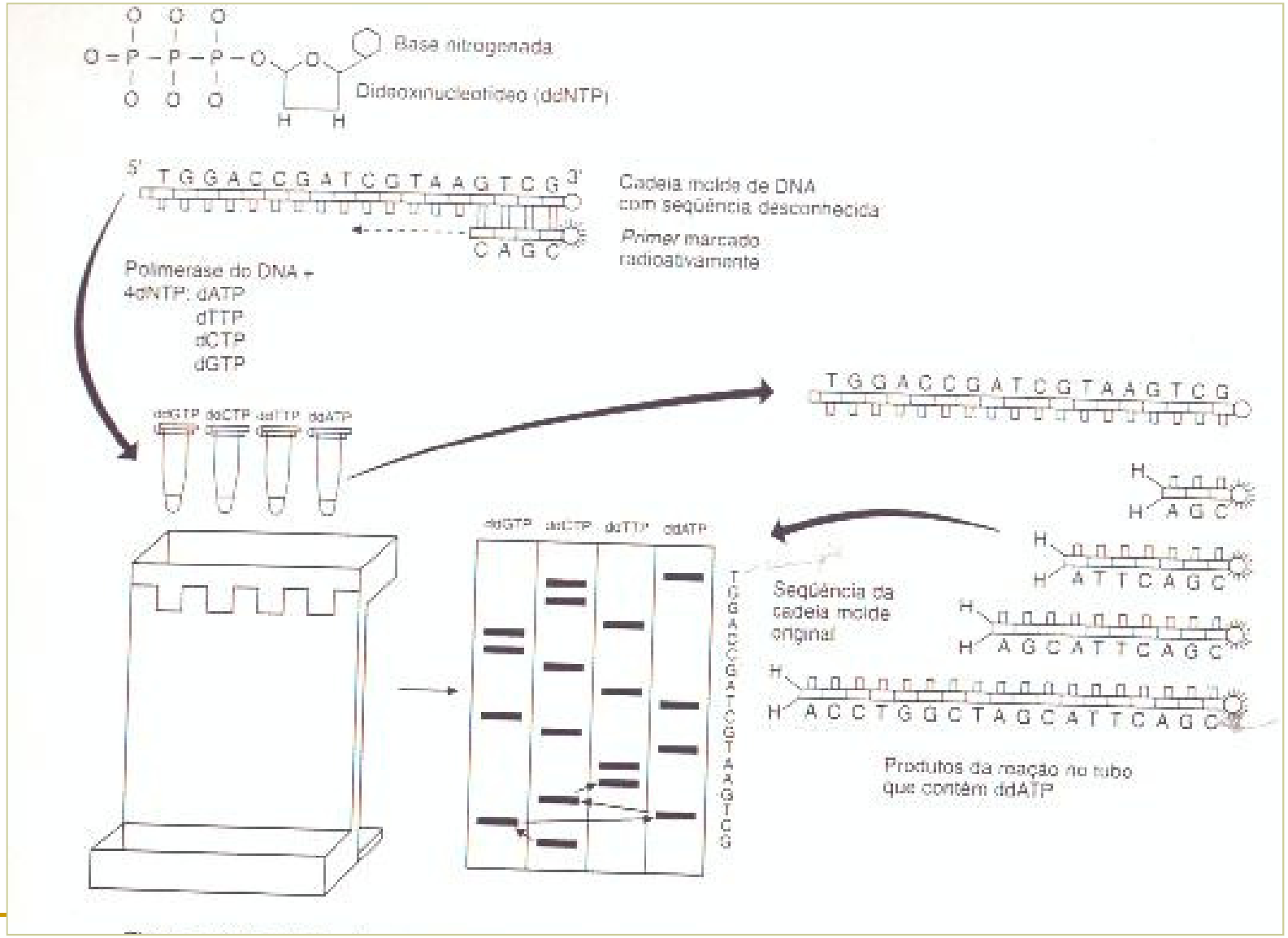
DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



Source: *DNA Science*, see Fig. 13.

SEQUENCIAMENTO

- 1975 - Sanger e colaboradores - método enzimático com terminadores de cadeia específicos, para gerar quatro populações de fragmentos que terminam em As,Gs, Cs e Ts, respectivamente, em quatro reações diferentes
- O método de Sanger utiliza de terminadores de cadeia chamados de 2'3'-didesoxinucleotídeos trifosfatos. As DNA polimerases necessitam de um OH- 3' livre na fita de DNA iniciadora. Se um 2' 3' didesoxinucleotídeo é adicionado à extremidade de uma cadeia, ele irá bloquear a extensão subseqüente desta cadeia, uma vez que os 2'3'-dideoxinucleotídeos possuem um grupo OH-3' trocado por um H.


Base nitrogenada
Dideoxinucleotídeo (ddNTP)
5' T G G A C C G A T C G T A A G T C G 3'
C A G C
Cadeia molde de DNA com seqüência desconhecida
Primer marcado radioativamente
Polimerase do DNA +
4dNTP: dATP
dTTP
dCTP
dGTP
ddGTP ddCTP ddTTP ddATP
T G G A C C G A T C G T A A G T C G
Seqüência da cadeia molde original
A C C T G G C T A G C A T T C A G C
Produtos da reação no tubo que contêm ddATP

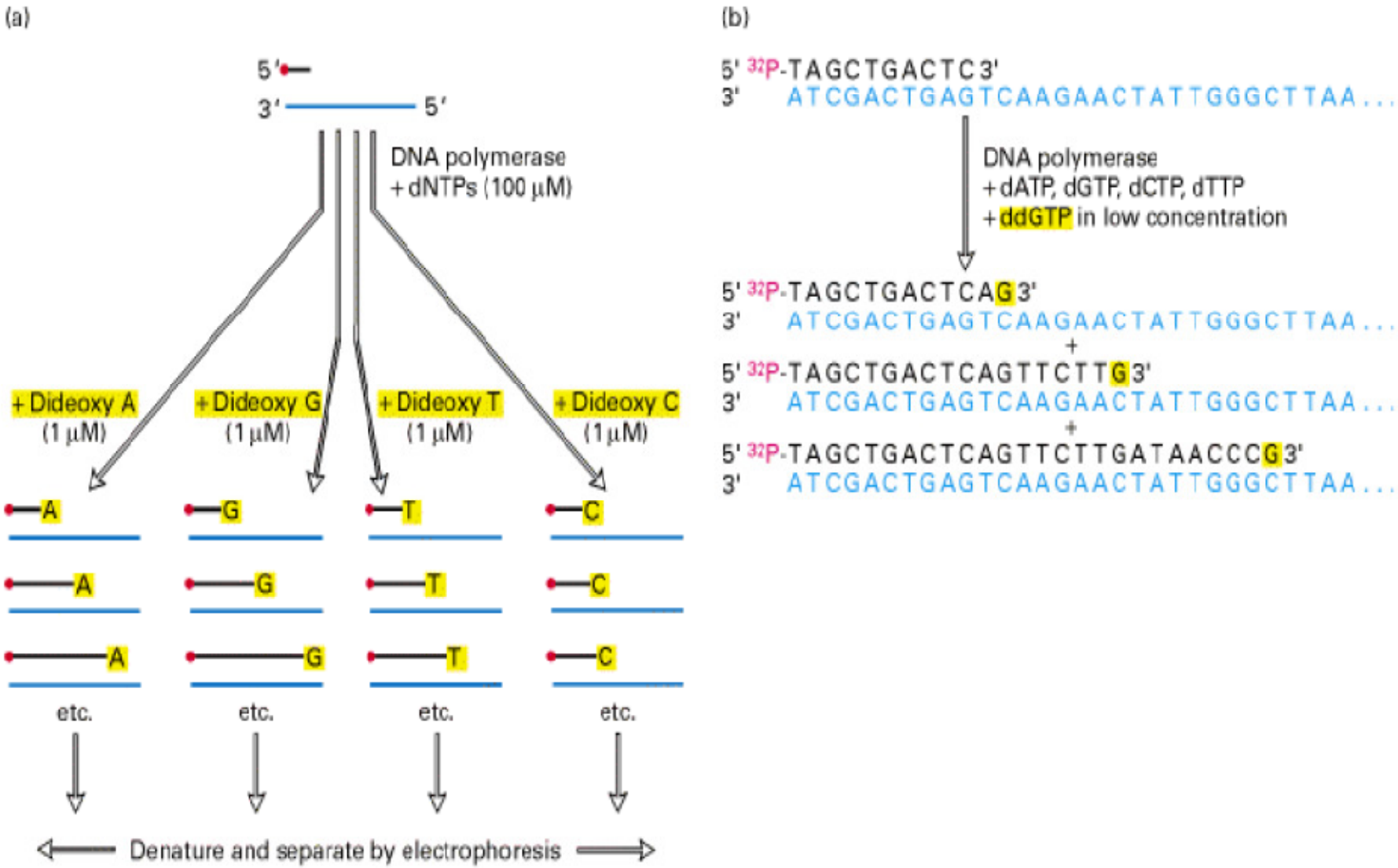


Figura 13 - *Esquema mostrando como é feito o seqüênciamento de DNA pelo método dos desoxirribonucleotídeos desenvolvido por Sanger*

O DNA recombinante

- Não se limita a organismos de uma mesma espécie
- A compatibilidade sexual torna-se irrelevante
- Permite modificações em uma única geração, o que antes levaria dezenas ou centenas de gerações

Teste de Paternidade

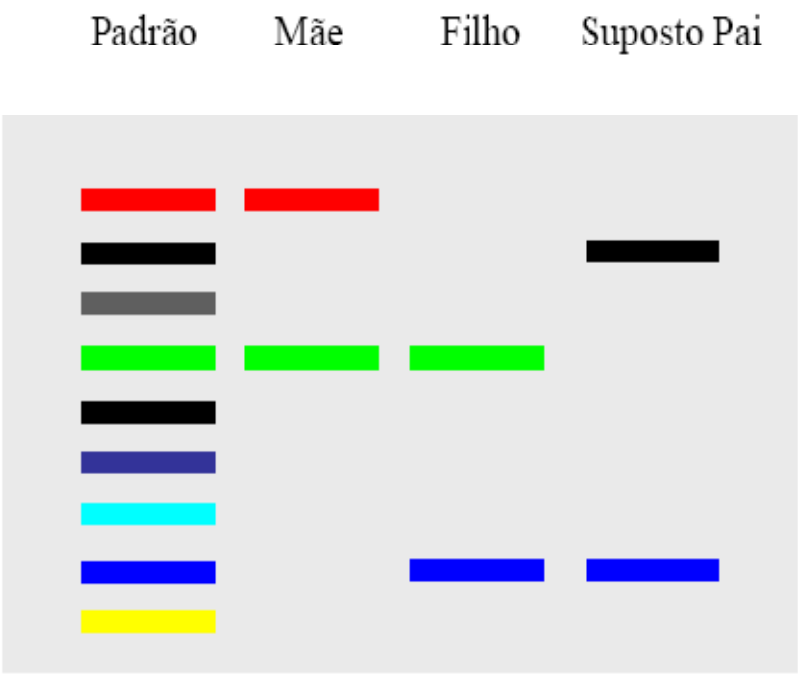


Figura 14- *Esquema mostrando resultado de um teste de paternidade para um loco. Um alelo do filho vem da mãe (verde) e o outro (azul) tem que vir do pai biológico. Esse é um caso de inclusão no qual o suposto pai é o pai da criança (ao menos considerando esse loco).*

Teste Diagnóstico

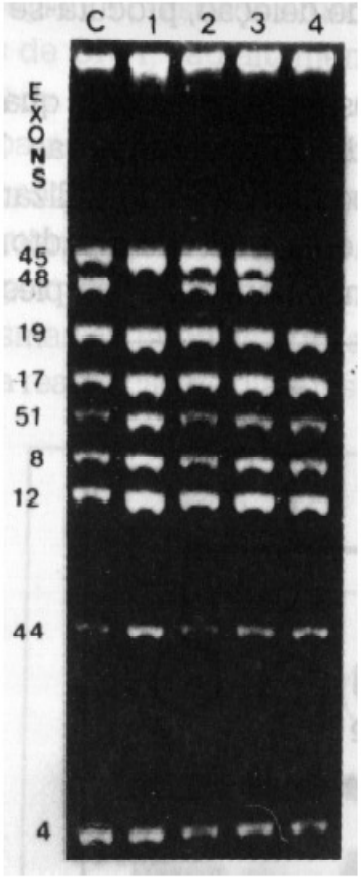
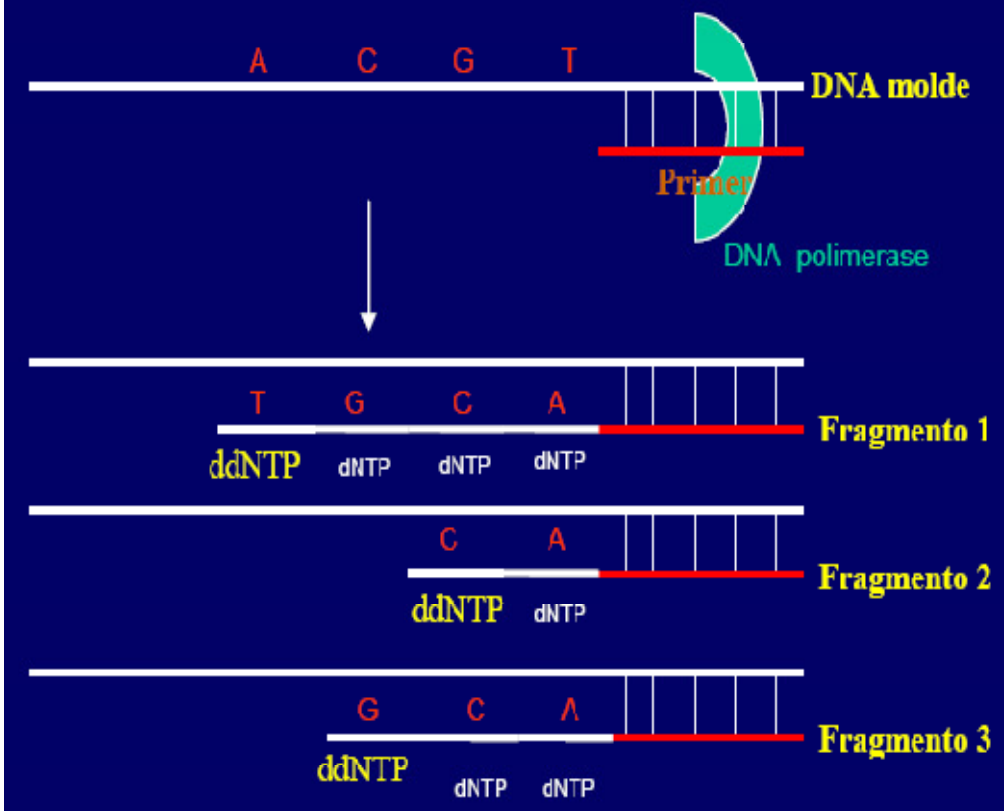
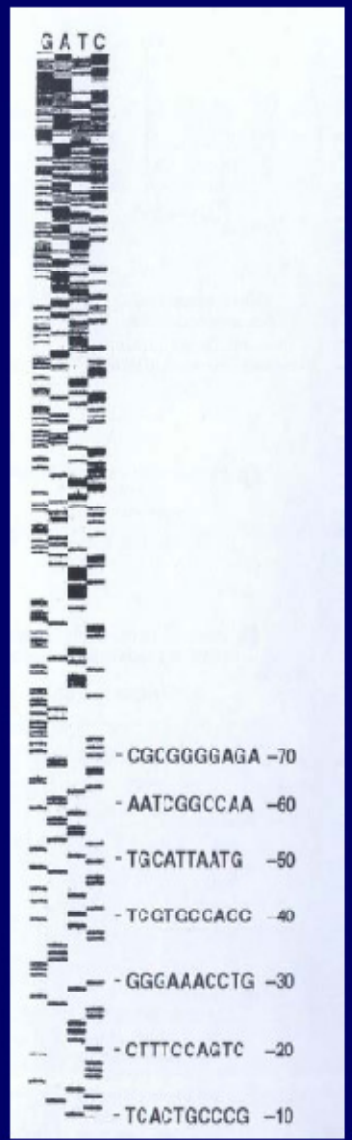


Figura 15 – *Eletroforese em gel de agarose mostrando 4 resultados de diagnósticos de DMD, "C" representa o controle (indivíduo sem deleções); os indivíduos 2 e 3 não apresentam deleção para nenhum dos éxons testados; o indivíduo 1 apresenta deleção do éxon 48 e o indivíduo 4 apresenta deleção nos éxons 45 e 48 (Figura retirada do Capítulo 7 do livro de Ácidos Nucléicos, capítulo escrito pelas Dras Maria Rita Passos Bueno e Mayana Zatz. O livro foi organizado pelo Dr. Francisco J. S. Lara)*

Sequenciamento

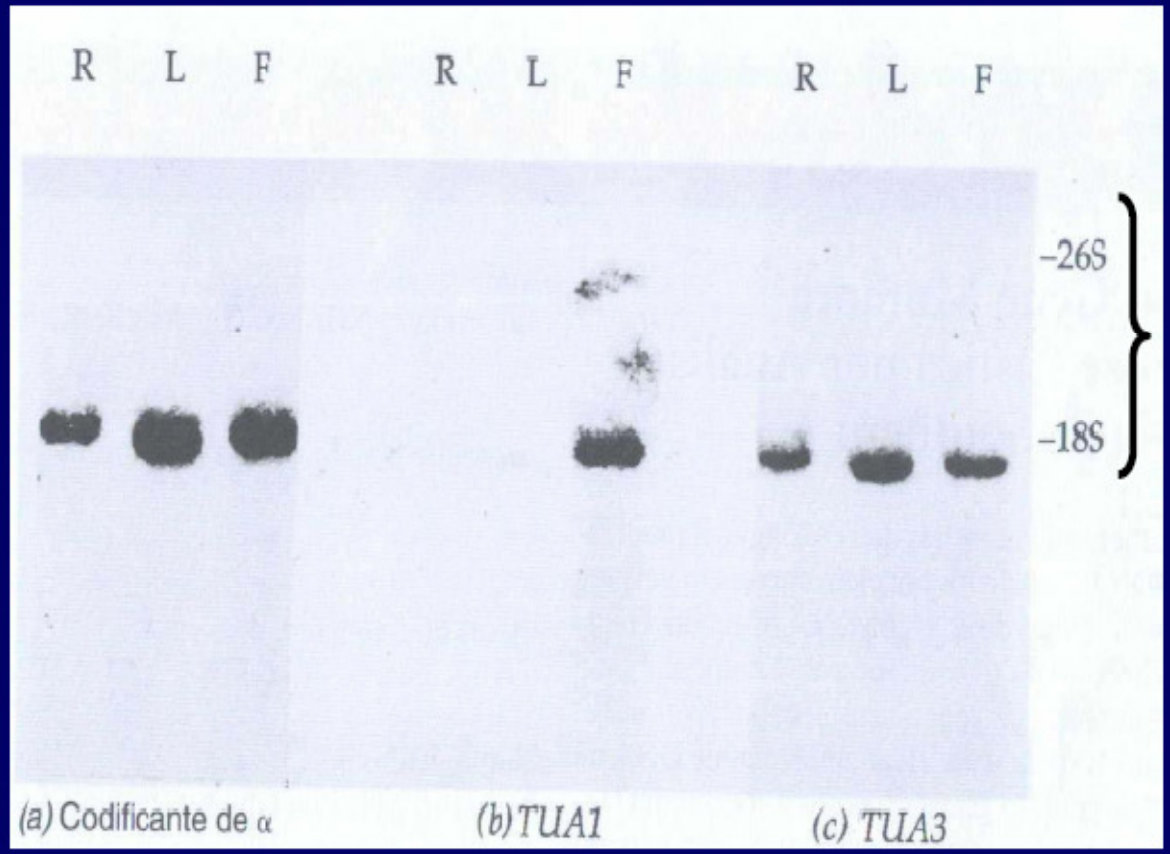
Estuda a integridade da sequência de um DNA molde. Analisa diferentes tamanhos de fragmentos formados a partir de um primer e da inserção randômica de dNTPs (polimeriza) e ddNTPs (para a reação) em gel de poliacrilamida.





By Diam

Northern blotting



Marcadores rRNA

RNAs totais de raízes (R), folhas (L) e flores (F).

A – sonda de α-tubulina – hibrida todos

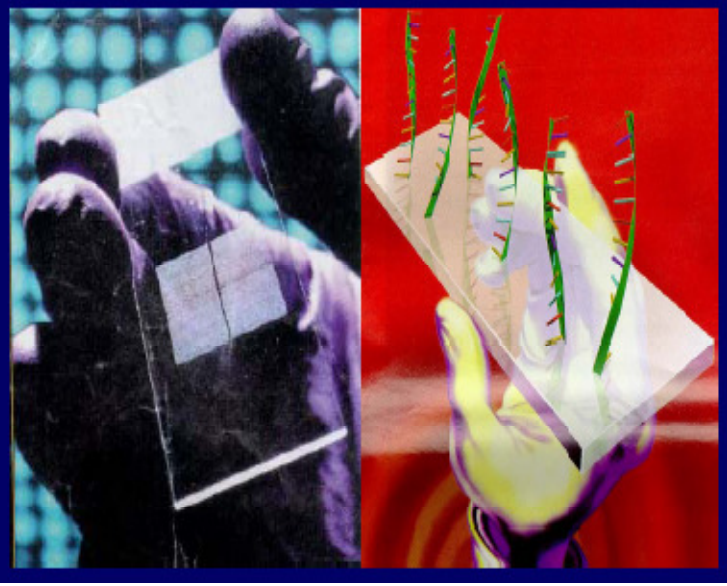
B - sonda de α1- tubulina – hibrida só flores

C - sonda de α3- tubulina – hibrida todos

Microarray

Microarranjos de DNA – Chips de DNA

- É uma técnica que emprega arranjos (*arrays*), que contêm um grande número de genes roboticamente distribuídos de forma ordenada em uma placa de vidro.
- Pode comparar a expressão de um grande número de gene, simultaneamente.
- Existem lâminas de 400.000 pontos. São feitas com ponteiras de titâneo.



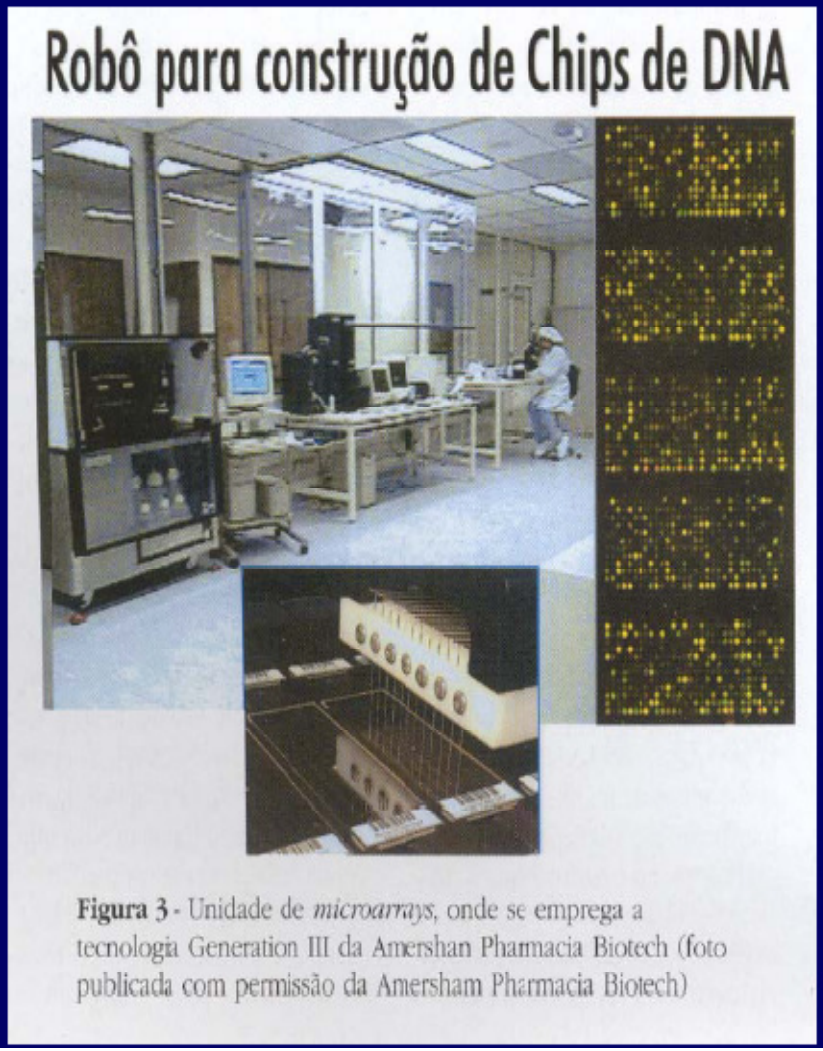
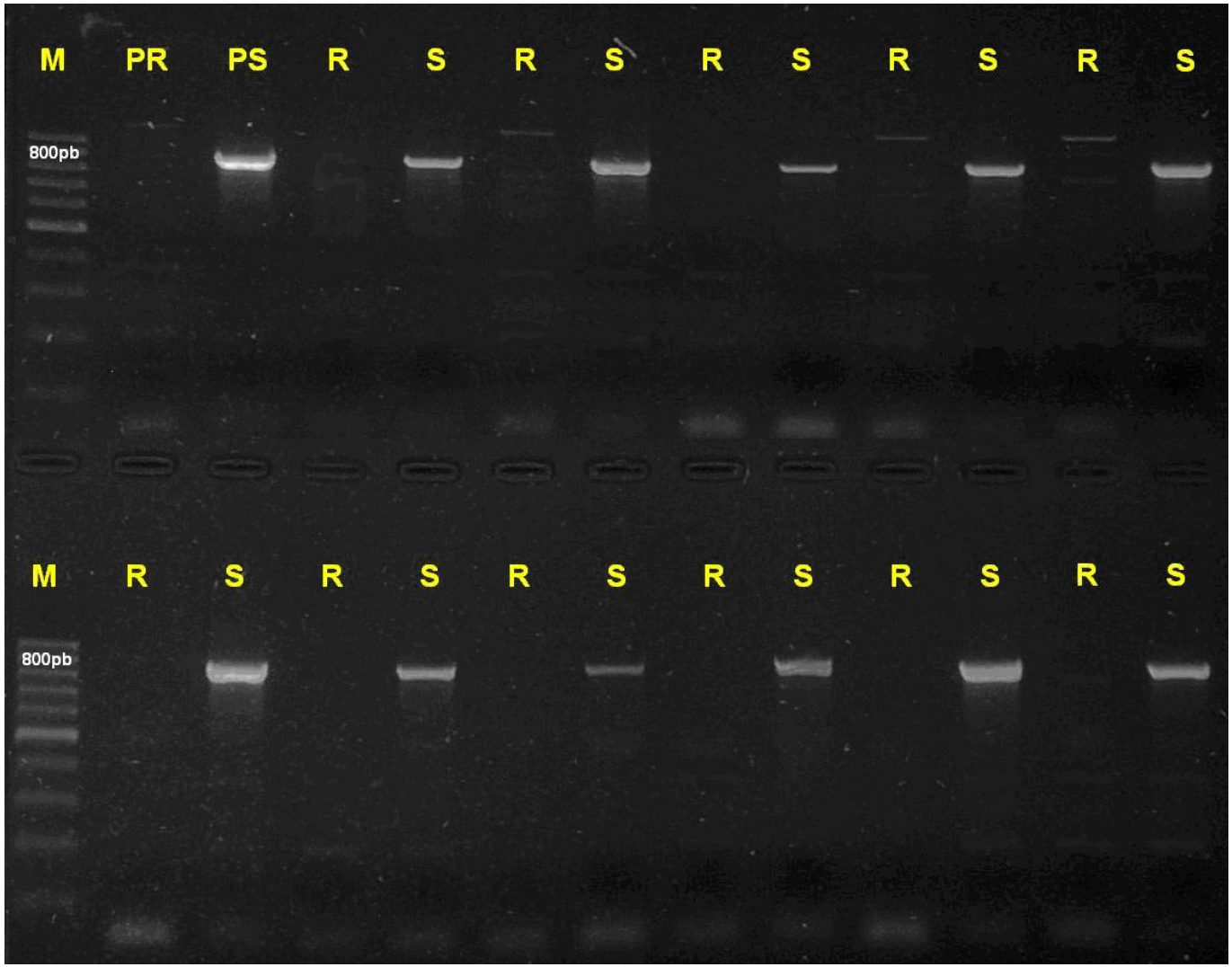


Figura 3 - Unidade de *microarrays*, onde se emprega a tecnologia Generation III da Amershan Pharmacia Biotech (foto publicada com permissão da Amersham Pharmacia Biotech)

Marcadores moleculares



OBRIGADO

Contato: mmarchi@cda.sp.gov.br