

TEXTO 1

O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO: DNA

A descoberta do DNA

Experimentos clássicos

Parte I: A identificação do material hereditário em bactérias

A descoberta da transformação bacteriana

O princípio transformante

Parte II: A identificação do material hereditário de fagos

Parte III: O modelo da dupla -hélice

A descoberta de Chargaff

Análises por difração de raios X

A descoberta de Watson e Crick

Quadro 1: Componentes e estrutura dos ácidos nucléicos

Parte IV: Evidência da replicação semi-conservativa

O teste da hipótese da replicação semi-conservativa

Marcação do DNA por incorporação de nitrogênio pesado ^{15}N

Separação do DNA em gradiente de cloreto de céσιο

Parte V: Visualização da replicação do cromossomo bacteriano

Apêndice: Estruturas secundária e terciária do DNA

Estruturas secundárias do DNA

A forma B do DNA

A forma A do DNA

A forma Z do DNA

Desnaturação e renaturação de ácidos nucléicos

A estrutura Terciária do DNA

O superenrolamento do DNA

As topoisomerases

Exercícios

Bloco I

Bloco II

Apresentação

Este texto trata da descoberta do DNA, de sua identificação como material hereditário, da elaboração de seu modelo molecular por Watson e Crick e das estruturas secundárias e terciárias apresentadas por essa importante substância química. A história do DNA é um excelente exemplo de como o conhecimento científico progride. De uma simples curiosidade química no século passado, o DNA passa a se constituir na mais importante molécula do planeta, uma vez que nela estão escritas as instruções para a vida de praticamente todos os seres vivos. A compreensão da estrutura molecular dessa substância trouxe explicação para o fenômeno da vida e provocou a maior revolução científica já ocorrida na história da humanidade.

Essa apostila foi organizada pelos docentes do Instituto de Biociências da USP que ministraram e ministram as disciplinas “Biologia Molecular e de Microrganismos”, “Biologia Molecular” e “Fundamentos de Biologia Molecular” para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. O texto foi adaptado e compilado de diversos livros didáticos e matérias instrucionais.

O DNA como Material Hereditário: a descoberta do DNA

O DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) foi descoberto em 1869 pelo bioquímico alemão Johann Miescher (1844–1895). Nessa época, Miescher tentava determinar os componentes químicos do núcleo das células e usava como fonte de material para suas análises os glóbulos brancos contidos no pus. Ele usou glóbulos brancos pelo fato de eles possuírem núcleos grandes, fáceis de serem isolados do citoplasma, e de serem, na época, facilmente obtidos nas ataduras usadas em ferimentos infeccionados.

A análise dos núcleos revelou a presença de um composto até então desconhecido, de natureza ácida, rico em fósforo e em nitrogênio, desprovido de enxofre e resistente à ação da pepsina, uma enzima proteolítica. Miescher chamou esse composto, aparentemente constituído por moléculas muito grandes, de **nucleína**. Mais tarde, ele isolou essa mesma substância da cicatrícula da gema do ovo de galinha e de espermatozóides de salmão.

Em 1880, Albrecht Kossel (1853–1927) demonstrou que a nucleína continha bases nitrogenadas em sua estrutura, o que explicava o fato de ela ser rica em nitrogênio. Nove anos mais tarde Richard Altmann (1852–1900), um aluno de Miescher, obteve nucleína com alto grau de pureza e pode confirmar sua natureza ácida, dando-lhe o nome de **ácido nucléico**.

O material mais utilizado para a obtenção de ácidos nucléicos passou a ser o timo de bezerro, um tecido de fácil obtenção e que apresenta células com núcleos grandes. Foi descoberto, então, que a degradação do ácido nucléico do timo, na época chamado de ácido timonucléico, liberava dois tipos de bases púricas, **adenina** e **guanina**, e dois tipos de bases pirimídicas, **citossina** e **timina**.

Foi demonstrado também que um outro produto da degradação do ácido nucléico era um glicídio com 5 carbonos (uma pentose). O fósforo estava presente na forma de um derivado do ácido fosfórico (Quadro 1).

Em 1900, descobriu-se em levedura (fermento de padaria) um outro tipo de ácido nucléico que possuía a base nitrogenada **uracila** em lugar de timina. Esse ácido nucléico diferia também do ácido timonucléico por apresentar o glicídio **ribose** em lugar de **desoxirribose**. Assim, foram caracterizados dois tipos de ácidos que foram denominados, em função do glicídio constituinte, **ácido ribonucléico** (RNA) e **ácido desoxirribonucléico** (DNA).

Em 1912, Phoebis Levene (1869–1940) e Walter Jacobs (1883–1967) concluíram que o componente básico dos ácidos nucléicos era uma estrutura composta por uma base nitrogenada ligada a uma pentose que, por sua vez, estava unida ao fosfato. Esta unidade foi denominada **nucleotídeo**. Uma molécula de ácido nucléico seria, portanto, um polímero constituído por uma série de nucleotídeos unidos entre si, ou seja, um polinucleotídeo.

Apesar de continuarem estudando os ácidos nucleicos, os cientistas não faziam ideia da importância desses compostos para os seres vivos. Muito tempo se passou entre a descoberta do DNA e sua identificação e aceitação como sendo o material hereditário. Acreditava-se que as proteínas, por sua impressionante variabilidade de composição e estrutura, eram a substância perfeita para conter as informações genéticas.

Experimentos Clássicos

Parte I: A identificação do material hereditário em bactérias

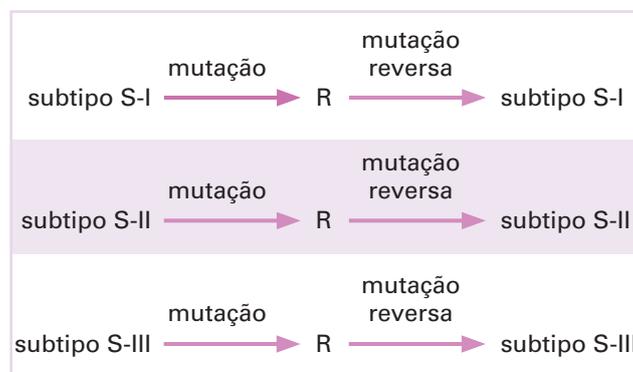
A descoberta da transformação bacteriana

A primeira evidência experimental de que o DNA é o material hereditário foi obtida em experimentos realizados com bactérias, o pneumococo *Streptococcus pneumoniae*.

Os pneumococos podem se apresentar sob a forma de bactérias encapsuladas, que crescem em meio de cultura sólido, formando colônias convexas lisas, brilhantes, cremosas e com bordos regulares, denominadas colônias **S** (do inglês *smooth*, liso). Essa é a forma virulenta da bactéria, a que causa pneumonia em camundongos, levando-os à morte. As bactérias encapsuladas podem dar origem a variantes mutantes sem cápsula, que crescem em meio sólido formando colônias achatadas, rugosas, opacas, friáveis e com bordos irregulares, denominadas colônias **R** (do inglês *rough*, rugoso). Essas bactérias mutantes não são virulentas, isto é, não causam pneumonia em camundongos.

A diferença entre os dois tipos de pneumococo é a presença de uma cápsula de polissacarídeos envolvendo as células S e sua ausência nas células do tipo R. Existem diferentes linhagens de bactéria tipo S, que diferem entre si pela composição química dos polissacarídeos da cápsula. Essas linhagens, ou subtipos, são denominadas S-I, S-II, S-III etc. e podem ser diferenciadas por meio de testes sorológicos, pois cada uma delas induz a produção de anticorpos específicos quando injetadas em coelhos. Assim, por exemplo, um coelho imunizado com a linhagem S-I produz anticorpos capazes de reagir com bactérias do subtipo S-I, mas não com bactérias dos subtipos S-II ou S-III. Esse fato já era conhecido na segunda década do século XX.

Como os anticorpos que permitem a distinção imunológica dos pneumococos são dirigidos contra os polissacarídeos da cápsula, as bactérias do tipo R não podem ser distinguidas por esse critério. Um fato interessante, no entanto, é que, apesar de não produzirem polissacarídeos da cápsula, as bactérias R mantêm, de alguma forma, as características da linhagem original de bactérias S da qual se originaram. Assim, bactérias R originadas por mutação de bactérias S-I, ao sofrerem mutação reversa, originam sempre bactérias com cápsula do subtipo S-I e jamais qualquer um dos outros subtipos.



Em 1928, o médico sanitário Fred Griffith (1877-1941) observou que camundongos injetados com uma mistura de bactérias vivas do tipo R (não virulentas) e bactérias do tipo S (virulentas) mortas pelo calor morriam de pneumonia. Isso foi uma surpresa, visto que nem a injeção de bactérias vivas do tipo R, nem a injeção de bactérias do tipo S mortas pelo calor causava, isoladamente, a doença. Mais surpreendente ainda foi a identificação de bactérias do tipo S vivas no corpo dos animais. Outro fato curioso foi a observação de que as bactérias S vivas

presentes nos animais mortos eram do mesmo subtipo que as S mortas e não do subtipo das R vivas. Por exemplo, se as bactérias S mortas pelo calor fossem do subtipo II, as bactérias S que surgiam eram também do subtipo S-II, mesmo que a bactéria R usada no experimento fosse originária de uma linhagem de outro subtipo.

Duas explicações podiam ser aventadas: ou as bactérias S mortas pelo calor haviam ressuscitado, o que seria um absurdo, ou bactérias R vivas haviam sido transformadas em bactérias S por algum tipo de substância (“princípio transformante”) liberada pelas bactérias mortas. Essa transformação de bactérias do tipo R em S foi chamada **transformação bacteriana** (Fig. 1).

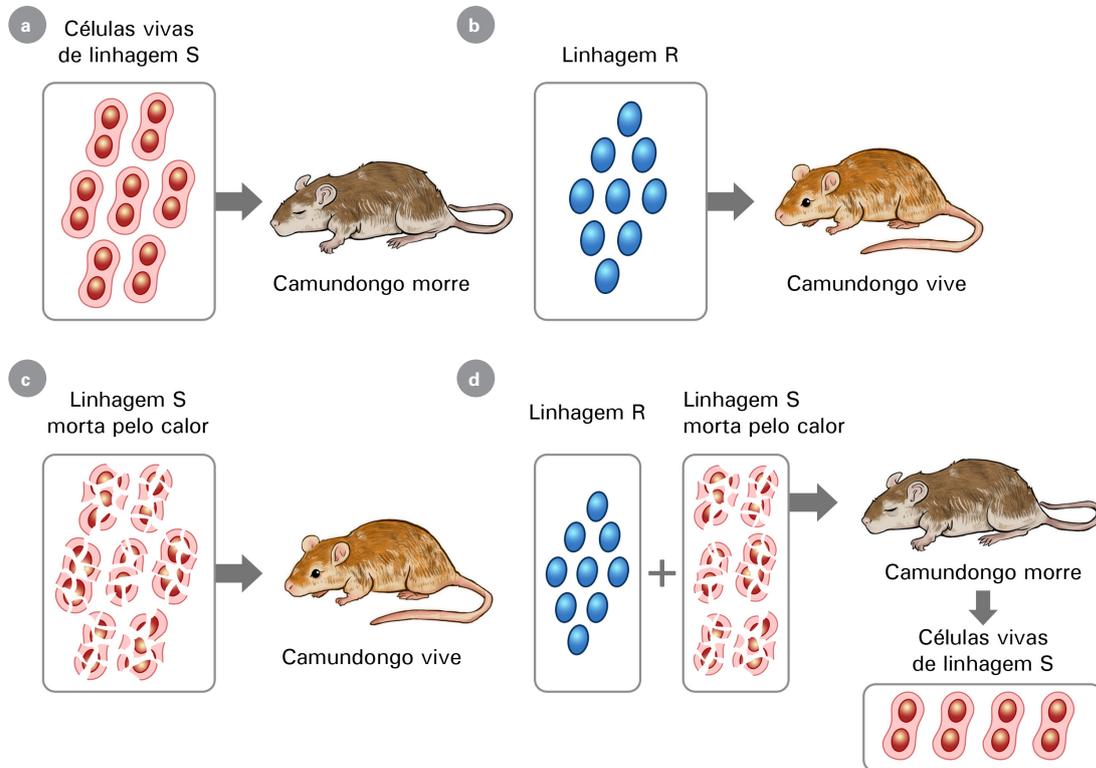


Figura 1. Representação esquemática do experimento de Griffith em que foi descoberta a transformação bacteriana.

(a) Camundongo injetado com bactérias do tipo S morre de pneumonia.

(b) Camundongo injetado com bactérias do tipo R não adquire a doença.

(c) Camundongo injetado com bactérias do tipo S mortas pelo calor não adquire a doença.

(d) Camundongo injetado com uma mistura de bactérias do tipo R vivas e bactérias do tipo S mortas pelo calor adquire pneumonia e morre. No corpo deste último animal são encontradas bactérias S vivas do mesmo subtipo das S mortas que foram injetadas, do que se conclui que as bactérias mortas pelo calor, de alguma forma, transformam as bactérias R vivas não virulentas em bactérias S virulentas.

O princípio transformante

O experimento original de Griffith foi repetido com sucesso em vários laboratórios. Sua elucidação, no entanto, só aconteceu em 1944, após anos de dedicados estudos por parte de Oswald Avery (1877–1955) e seus colaboradores. Esses pesquisadores descobriram inicialmente que a transformação bacteriana podia ocorrer *in vitro*, isto é, em um meio de cultura, fora do corpo de camundongos. Eles verificaram que, em culturas de bactérias R misturadas com bactérias S mortas pelo calor, ocorria o aparecimento de bactérias do tipo S.

Em 1933, James Alloway (1900–1954), um colaborador de Avery, descobriu que um extrato de bactérias S tinha a capacidade de transformar bactérias R em S. Alloway observou também que adição de álcool ao extrato causava a formação de um precipitado espesso e viscoso que retinha a capacidade transformante. Essa descoberta abriu novas perspectivas para a purificação do “princípio transformante”.

A partir de 75 litros de cultura de *Streptococcus* do tipo S, Oswald Avery, Colin Macleod (1909–1972) e Maclyn McCarty (1911–2005) isolaram 25 miligramas de um extrato com altíssimo poder transformante. Tratamentos com amilase (enzima que degrada polissacarídeos), com proteases (enzimas que degradam proteínas) ou com ribonucleases (enzimas que degradam RNA) não afetavam o poder transformante do extrato purificado. No entanto, quando foi submetido a tratamento com DNase (desoxirribonuclease), uma enzima que degrada DNA, o extrato perdeu completamente seu poder de transformar bactérias R em S.

Assim, em 1944, após 12 anos de intensa atividade de pesquisa, Avery e colaboradores chegaram à conclusão de que a substância transformante era DNA (Fig. 2). Alguns pesquisadores imaginaram que, se o DNA tinha capacidade de transformar definitivamente características hereditárias das bactérias, ele deveria ser o próprio material hereditário. Outros pesquisadores, no entanto, argumentavam que, mesmo após toda a purificação do princípio transformante, poderiam restar ainda quantidades mínimas de proteínas e que estas sim seriam as responsáveis pela transformação. Por volta de 1952, foram obtidas preparações ativas de extratos bacterianos com menos de 0,02% de proteínas, indicando que a atividade transformante não poderia ser devida a proteínas contaminantes da preparação de DNA.

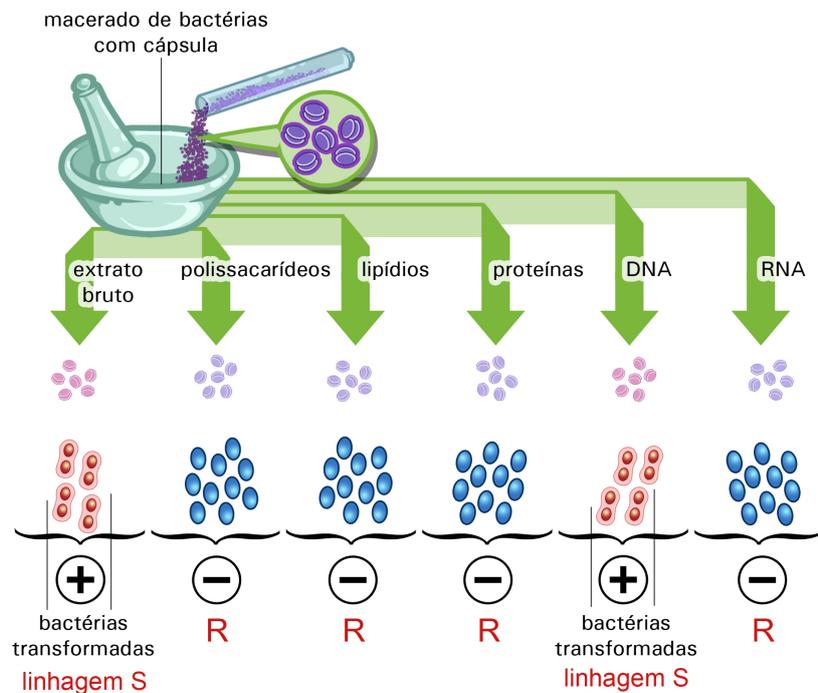


Figura 2. Representação de um experimento mostrando que o DNA é o princípio transformante. O DNA é a única substância presente no extrato de bactérias S capaz de transformar bactérias R em S.

Parte II: A identificação do material hereditário de fagos

Em 1952, o trabalho de Alfred Hershey (1908-1997) e Martha Chase (1927-2003) veio corroborar a identificação do DNA como sendo o material hereditário. Esses pesquisadores trabalharam com o vírus bacteriófago T2, um organismo extremamente simples constituído por uma molécula de DNA envolvida por uma capa protéica e cujo ciclo de vida já era bem conhecido. Um único vírus pode infectar uma bactéria e lisá-la em aproximadamente 30 minutos, liberando centenas de novos vírus que são cópias do fago infectante. A pergunta que se fazia naquela época era qual dos dois componentes do fago, o DNA ou a proteína da cápsula, constituiria o material hereditário.

Hershey e Chase basearam-se na propriedade das proteínas de não conter o elemento fósforo em sua composição e do DNA não conter o elemento enxofre, para realizar um engenhoso experimento que permitiu a identificação do DNA do vírus como o responsável pela sua hereditariedade. Para isso, foi preciso marcar com isótopos radioativos as proteínas e os ácidos nucleicos dos fagos.

Quando bactérias são cultivadas por algumas horas em um meio de cultura contendo o isótopo radioativo do fósforo (^{32}P), todas as moléculas das células bacterianas que tiverem esse elemento em sua composição se tornam radioativas. Se essas bactérias forem infectadas por bacteriófagos, os fagos gerados terão seu DNA radioativo, uma vez que o vírus utiliza matéria-prima da bactéria hospedeira para produzir sua descendência. Da mesma forma, se bactérias forem cultivadas em meio de cultura contendo isótopo radioativo do enxofre (^{35}S), elas produzirão os aminoácidos cisteína e metionina com o elemento radioativo e suas proteínas, consequentemente, ficarão radioativas. Se essas bactérias forem infectadas por fagos, as proteínas virais sintetizadas serão radioativas, uma vez que os fagos utilizam aminoácidos da célula bacteriana como matéria-prima para a formação de sua capa protéica. Foi exatamente isso que Hershey e Chase fizeram para obter fagos com DNA radioativo e fagos com proteínas radioativas.

Os dois tipos de bacteriófagos foram utilizados para infectar, independentemente, bactérias normais (não radioativas) e o destino dos dois componentes básicos (fósforo e enxofre) pode ser seguido graças à radioatividade neles incorporada. Imediatamente após a infecção, as bactérias eram agitadas em um liquidificador, o que desfazia as ligações das capas protéicas virais adsorvidas às paredes das bactérias. Em seguida, as culturas eram centrifugadas a fim de separar as bactérias das capas protéicas virais e a radioatividade era medida tanto nas bactérias precipitadas quanto no sobrenadante da centrifugação onde se encontravam as cápsulas virais (Fig. 3).

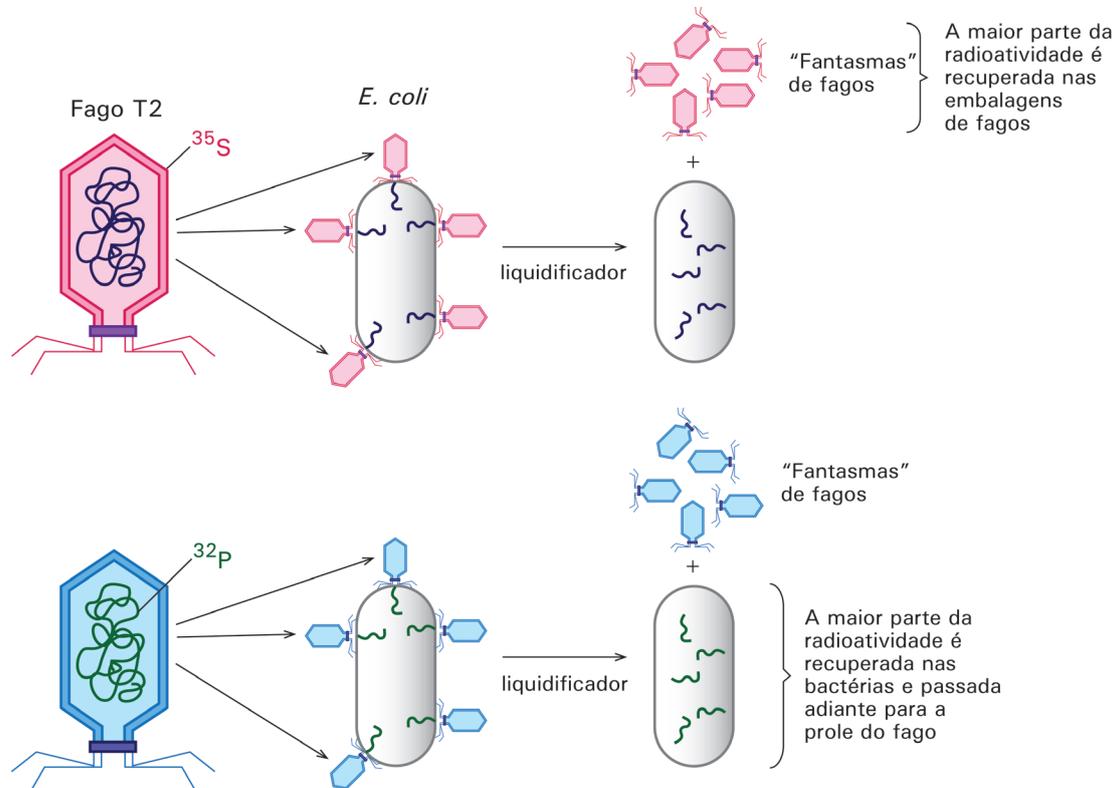


Figura 3. Representação esquemática do experimento de Hershey e Chase em que foi demonstrado ser o DNA e não proteínas o material genético do fago. O experimento utilizou dois tipos de marcação: um em que a cápsula protéica dos fagos era marcada com ^{35}S radioativo e outro em que o DNA viral era marcado com ^{32}P radioativo. Apenas o ^{32}P foi injetado nas bactérias, indicando ser o DNA o agente necessário para a produção de novos fagos.

Verificou-se que grande parte do fósforo radioativo incorporado nos fagos era transferida para o interior das bactérias infectadas e que a radioatividade aparecia posteriormente na progênie de fagos produzida pela lise das bactérias. A radioatividade devida ao enxofre tinha um destino diverso: ela não penetrava na bactéria infectada e não aparecia na progênie produzida.

Esses resultados permitiram concluir que apenas o DNA do fago penetra na bactéria por ocasião da infecção e que, a partir dele, é produzida toda uma geração de fagos com DNA e proteínas típicos da espécie de fagos utilizada. Portanto, a fonte das informações hereditárias é o DNA, pois a partir dele pode ser formado tanto DNA quanto proteínas virais.

Parte III: O modelo da dupla-hélice

A descoberta de que o DNA era realmente o material hereditário fez com que um grande número de pesquisadores tivesse a sua atenção voltada para a elucidação da estrutura dessa molécula: que características permitiriam ao DNA ser o banco de memória da informação hereditária?

O grande desenvolvimento das técnicas biofísicas e bioquímicas no período pós-Segunda Guerra Mundial permitiu que, em menos de dez anos, a estrutura físico-química do DNA fosse elucidada.

As descobertas de Chargaff

Uma contribuição importante para a elucidação da estrutura do DNA veio dos estudos realizados no laboratório de Erwin Chargaff (1905–2002), no período de 1949 a 1953. Chargaff e colaboradores empregaram métodos de cromatografia para quantificar cada um dos tipos de base nitrogenada em amostras de DNA de diferentes espécies e de diferentes órgãos de uma mesma espécie. Alguns dos resultados obtidos nesses estudos estão apresentados na Tabela I.

Tabela I. Proporções molares de bases em DNA de diversas fontes.

Organismo	Tecido	A	T	G	C	A + T
						G + C
<i>E. coli</i>	-	26,0	23,9	24,9	25,2	1,00
<i>S. pneumoniae</i>	-	29,8	31,6	20,5	18,0	1,59
<i>M. tuberculosis</i>	-	15,1	14,6	34,9	35,4	0,42
Levedura	-	31,3	32,9	18,7	17,1	1,79
Ouriço-do-mar	esperma	32,8	32,1	17,7	18,4	1,85
Arenque	esperma	27,8	27,5	22,2	22,6	1,23
Rato	medula óssea	28,6	28,4	21,4	21,5	1,33
Homem	timo	30,9	29,4	19,9	19,8	1,52
Homem	fígado	30,3	30,3	19,5	19,9	1,53
Homem	esperma	30,7	31,2	19,3	18,8	1,62

Os resultados de Chargaff e colaboradores permitiram que fossem tiradas importantes conclusões sobre a composição de bases do DNA. Verificou-se que essa composição variava de uma espécie para outra, mas era constante dentro de uma mesma espécie.

No entanto, em qualquer DNA a porcentagem da base timina é sempre idêntica à da base adenina, enquanto a porcentagem da base citosina é sempre idêntica à da base guanina. Em outras palavras, enquanto as proporções entre as bases variam de espécie para espécie, o total de bases púricas (A+G) é igual ao total de bases pirimídicas (T+C), ou seja:

$$\frac{A}{T} = 1 \quad \frac{G}{C} = 1 \quad \frac{A + G}{T + C} = 1$$

Análises por difração de raios X

Enquanto alguns grupos se dedicavam à análise química do DNA, outros passaram a estudar a estrutura da molécula por meio da difração de raios-X, uma metodologia que estava fornecendo formidáveis contribuições à elucidação da estrutura das proteínas. Os resultados mais importantes de difração de raios X de moléculas de DNA vieram do laboratório de Maurice Wilkins (1916–2004) e Rosalind Franklin (1920–1958). Esses resultados indicaram que o DNA tem uma estrutura helicoidal (Fig. 4).

Com base nos dados bioquímicos e cristalográficos então disponíveis, diversos modelos para o DNA foram propostos. Alguns autores imaginaram que a molécula fosse constituída por duas fitas polinucleotídicas com as bases voltadas para dentro, porém sem qualquer relação específica entre elas; outros imaginaram duas fitas com as bases voltadas para fora ou ainda, três fitas entrelaçadas com as bases também voltadas para fora.

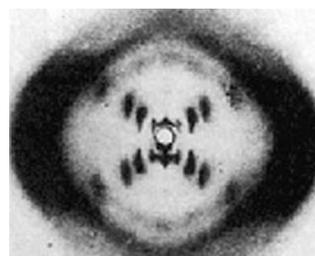


Figura 4. Fotografia de uma difração de raios X, tirada por Rosalind Franklin, que foi peça chave na elucidação da estrutura espacial da molécula, confirmando a sua configuração helicoidal.

O modelo de Watson e Crick

Em 1953, James Watson (1928) e Francis Crick (1916–2004) apresentaram um modelo compatível com os resultados experimentais e que serviu de base para experimentos históricos que confirmaram sua hipótese inicial. A estratégia empregada por esses dois pesquisadores foi a construção de um modelo molecular que levava em conta o tamanho e configuração espacial dos nucleotídeos e ainda respeitava os dados de Chargaff e dos cristalógrafos.

Segundo o modelo proposto por Watson e Crick, a molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice ao redor de um eixo imaginário, girando para a direita (uma hélice dupla). As duas cadeias polinucleotídicas mantêm-se unidas por meio de pontes de hidrogênio, que se estabelecem entre pares de bases específicos: adenina com timina e citosina com guanina. Assim, as duas cadeias que constituem um segmento de DNA são **antiparalelas**, ou seja, elas têm polaridades opostas: em uma delas o esqueleto açúcar-fosfato está orientado no sentido $3' \rightarrow 5'$, ou seja, do carbono $3'$ de um nucleotídeo na extremidade de uma cadeia ao carbono $5'$ do nucleotídeo adjacente, enquanto que na fita complementar a orientação é inversa, do carbono $5'$ ao $3'$ ($5' \rightarrow 3'$).

Os estudos de difração de raios-X haviam revelado que o diâmetro externo da dupla hélice é de cerca de 2 nm, enquanto que a distância entre os açúcares é de 1,1 nm. Assim, os pares de bases A-T e C-G têm o diâmetro exato para caber dentro da dupla hélice. Isso indicou que uma purina sempre se emparelha com uma pirimidina; pares purina-purina ou pirimidina-pirimidina não têm diâmetros que se ajustem ao diâmetro interno da dupla-hélice. A hélice dá uma volta completa a cada 3,4 nm, o que corresponde a, aproximadamente, 10 pares de bases. Assim, a distância entre dois pares de bases vizinhos, ou entre dois degraus da hélice de DNA, é de 0,34 nm. As bases timina e adenina são mantidas emparelhadas por meio de duas pontes de hidrogênio enquanto a guanina se emparelha com a citosina por meio de 3 pontes de hidrogênio (Fig. 5).

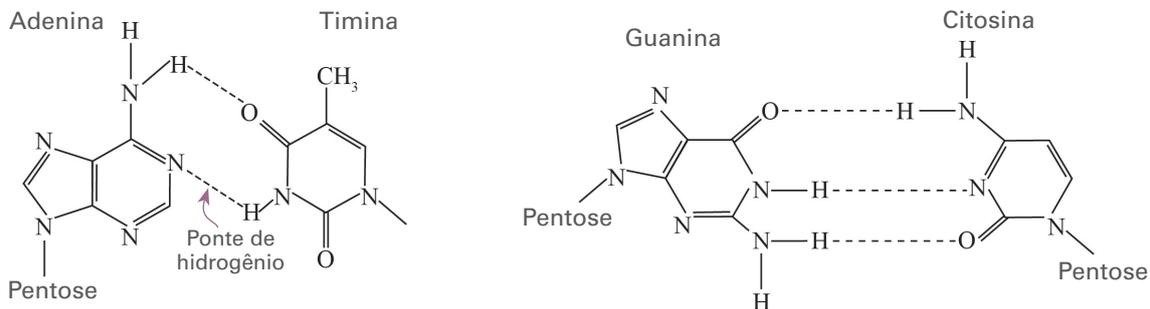


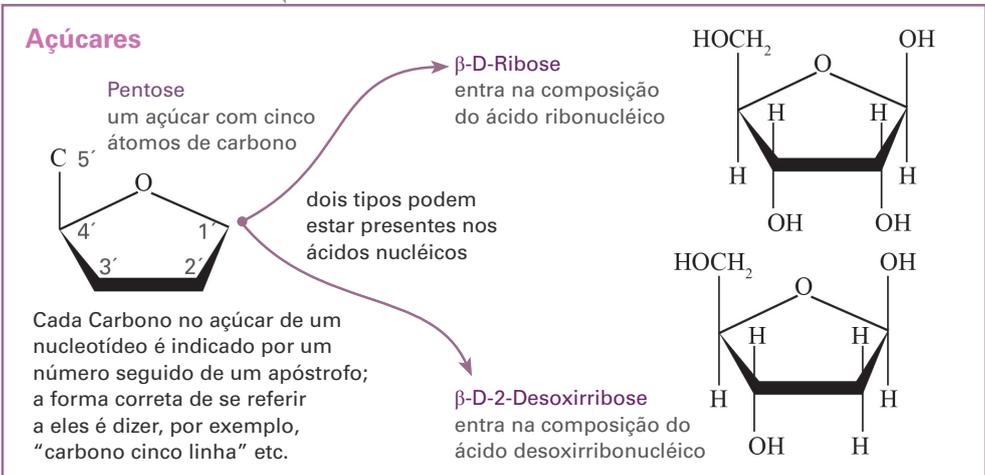
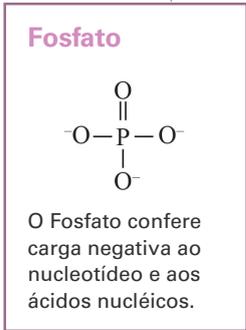
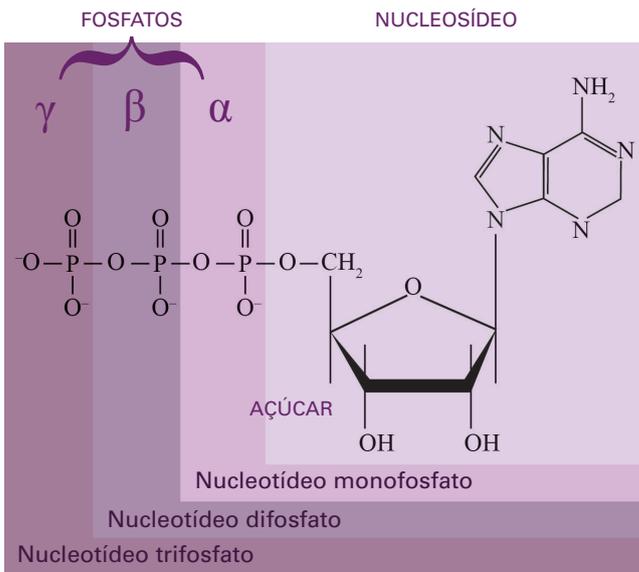
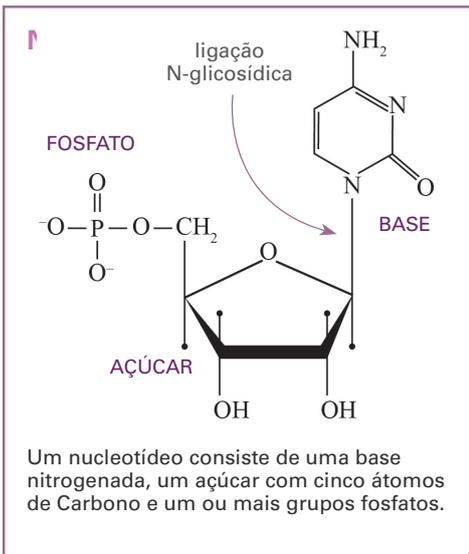
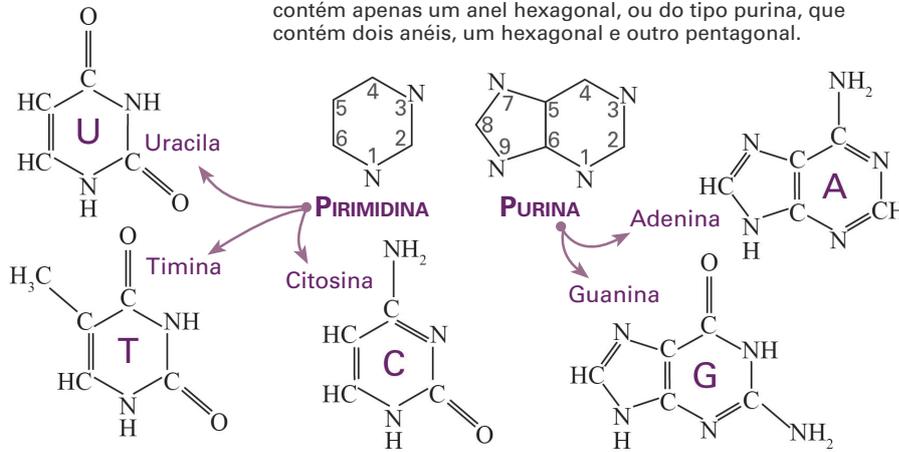
Figura 5. Emparelhamento normal entre as bases do DNA.

Se imaginarmos a hélice de DNA como uma estrutura cilíndrica com cerca de 2,0 nm de diâmetro, notaremos que a superfície da molécula é irregular, formando dois sulcos ou depressões, de tamanhos diferentes que giram ao longo de todo o seu comprimento. O sulco menor resulta da depressão existente entre as duas cadeias complementares, enquanto que o sulco maior resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice. Os sulcos são importantes porque deixam livres superfícies para a interação entre o DNA e proteínas (ver Quadro 1).

Quadro 1: Componentes e estrutura dos ácidos nucleicos

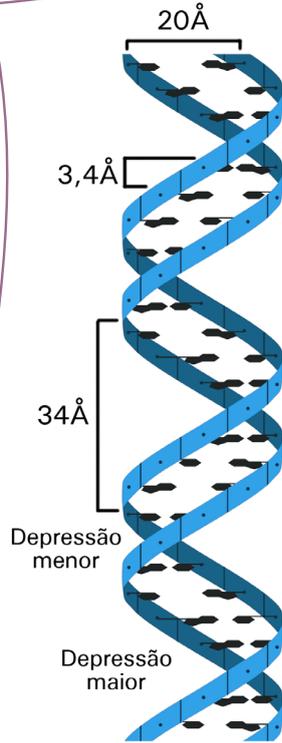
Bases nitrogenadas

Bases nitrogenadas são compostos com esqueleto em anel contendo Nitrogênio. Elas podem ser do tipo pirimidina, que contém apenas um anel hexagonal, ou do tipo purina, que contém dois anéis, um hexagonal e outro pentagonal.

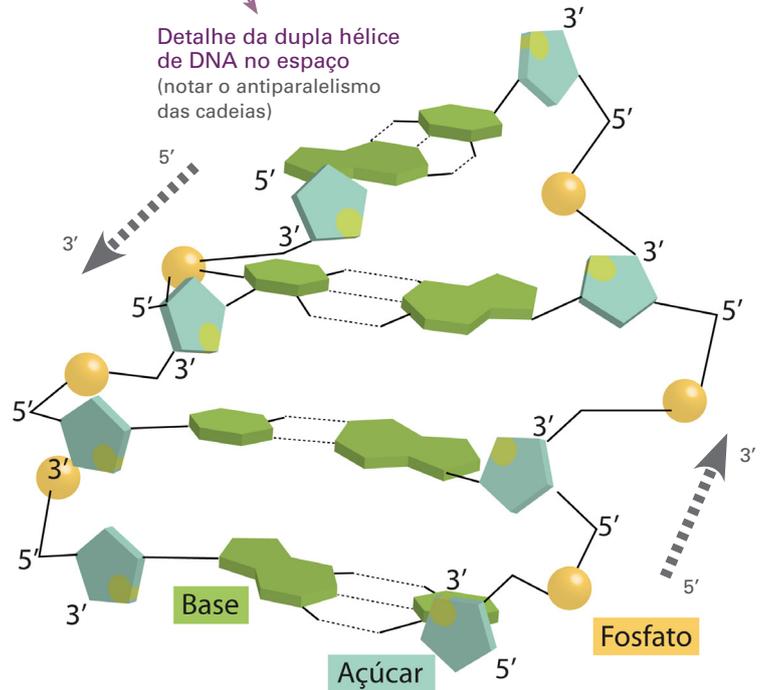


Quadro 1: Componentes e estrutura dos ácidos nucleicos (continuação)

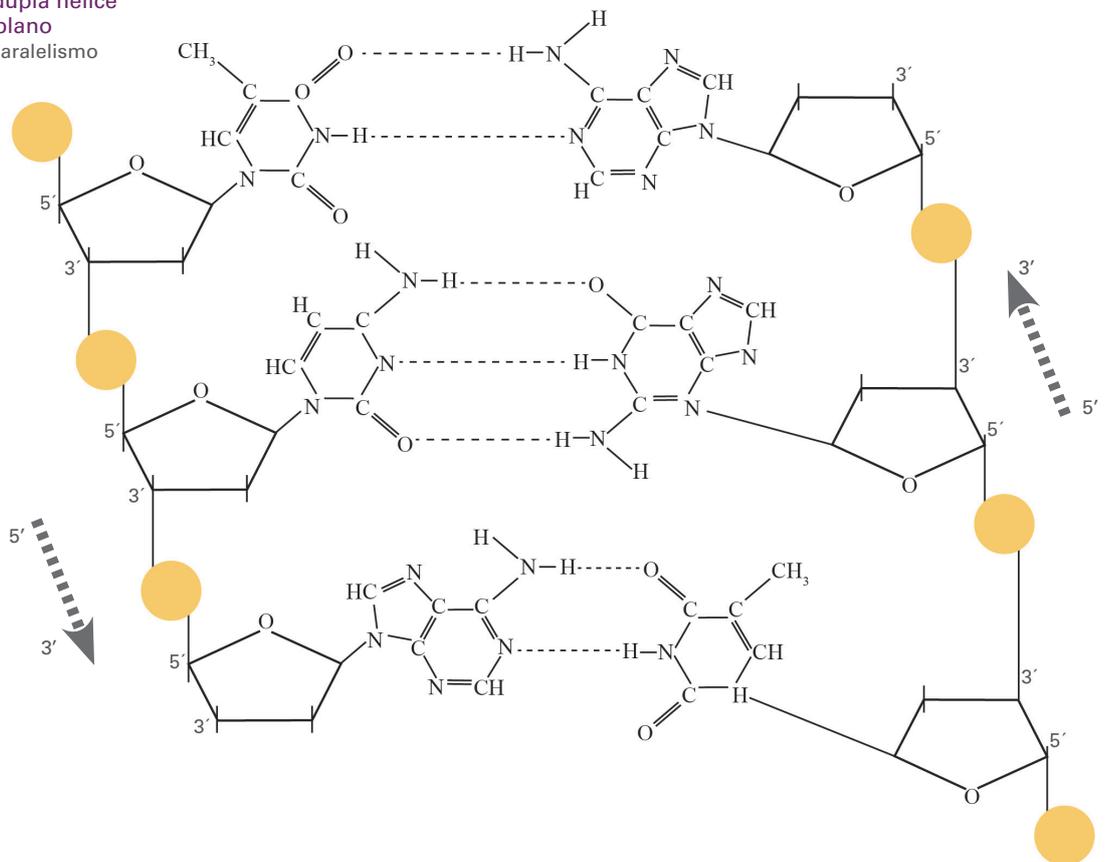
Dupla hélice do DNA
 Uma hélice de DNA é formada por duas cadeias polinucleotídicas emparelhadas por pontes de Hidrogênio entre as bases nitrogenadas.



Detalhe da dupla hélice de DNA no espaço
 (notar o antiparalelismo das cadeias)



Detalhe da dupla hélice de DNA no plano
 (notar o antiparalelismo das cadeias)



Parte IV: Evidência da replicação semiconservativa

Uma hipótese para a replicação da molécula de DNA foi proposta por Watson e Crick em 1953, em seguida à proposição do modelo de sua estrutura. Watson e Crick imaginaram que durante a replicação do DNA cada uma das duas cadeias polinucleotídicas componentes da molécula atuaria como molde para a síntese de uma cadeia complementar. Assim, uma molécula ao se replicar produziria duas moléculas filhas, cada uma delas composta por uma cadeia polinucleotídica antiga, originada da molécula mãe, e outra nova, recém-sintetizada. Como, segundo essa hipótese, metade da molécula é conservada a cada replicação, o mecanismo foi chamado de **replicação semiconservativa** (Fig. 6).

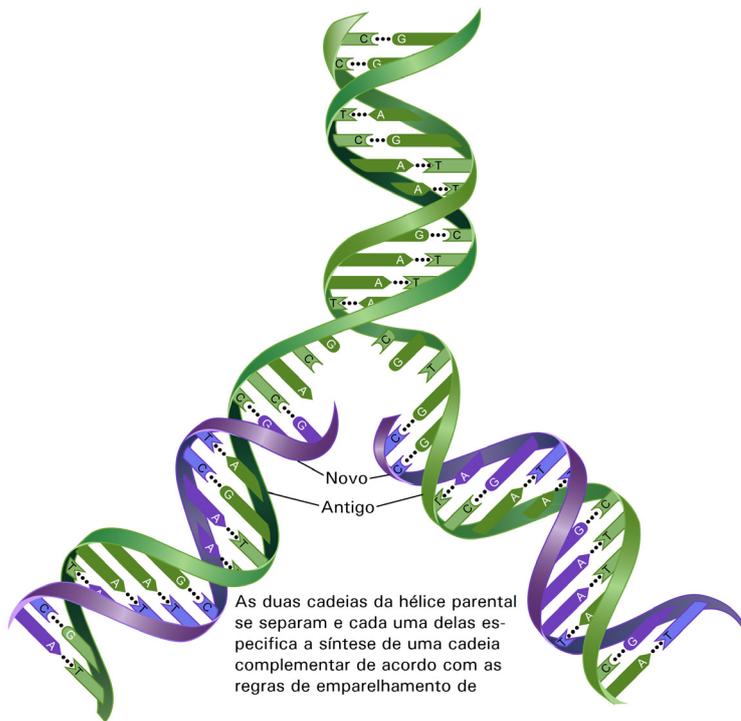


Figura 6. Representação esquemática da hipótese da replicação semiconservativa do DNA. A molécula original se abriria, por meio da quebra das pontes de hidrogênio entre as bases, e cada cadeia atuaria como molde para a síntese da cadeia complementar.

O desenvolvimento das técnicas de análise bioquímica no decorrer da década de 1950 permitiu testar a hipótese da replicação semiconservativa do DNA. Isso foi feito pela primeira vez em 1958 pelos pesquisadores Matthew Meselson (1930) e Franklin Stahl (1929).

Marcação do DNA por incorporação de nitrogênio pesado ^{15}N

Meselson e Stahl imaginaram que, se as duas cadeias polinucleotídicas de uma molécula de DNA fossem marcadas, seria possível fazer uma previsão sobre o destino dessas cadeias no decorrer das gerações celulares subsequentes. Segundo a previsão,

- após uma replicação, ambas as moléculas filhas estariam marcadas e cada uma delas conteria metade da marcação da molécula mãe;
- após duas replicações, metade das moléculas estaria não-marcada enquanto a outra metade apresentaria a mesma quantidade de marcação que a das moléculas filhas resultantes da primeira replicação.

O teste da hipótese semiconservativa foi possível porque na época os autores dispunham de métodos eficientes tanto para marcar moléculas de DNA como para separar as moléculas não-marcadas das marcadas e, dentre essas últimas, distinguir moléculas com diferentes quantidades de marcação entre si.

Meselson e Stahl marcaram as moléculas parentais de DNA com um isótopo pesado (mas não radioativo) do nitrogênio, o ^{15}N . Isso foi feito cultivando-se bactérias *Escherichia coli* em meio de cultura onde a única fonte de nitrogênio disponível era um sal contendo o isótopo ^{15}N . Ao final de quatorze gerações nesse meio, pôde-se prever que todo o DNA das bactérias continha ^{15}N ao invés de ^{14}N . As bactérias foram, então, transferidas para um meio contendo apenas a forma leve do nitrogênio, o ^{14}N , fornecida como $^{14}\text{NH}_4^+$. Portanto, todo o DNA sintetizado no novo meio de cultura, teria ^{14}N , ao invés de ^{15}N .

A hipótese da replicação semiconservativa previa que, após um ciclo de replicação no novo meio, cada molécula de DNA conteria 50% de ^{15}N e 50% de ^{14}N . Após duas replicações no novo meio, metade das moléculas de DNA conteria apenas ^{14}N , enquanto que a outra metade seria constituída por moléculas contendo 50% de ^{15}N e 50% de ^{14}N . Essa previsão está esquematizada na Figura 7 (Fig. 7).

Mas como distinguir esses diferentes tipos de moléculas de DNA para verificar se a previsão se confirmava?

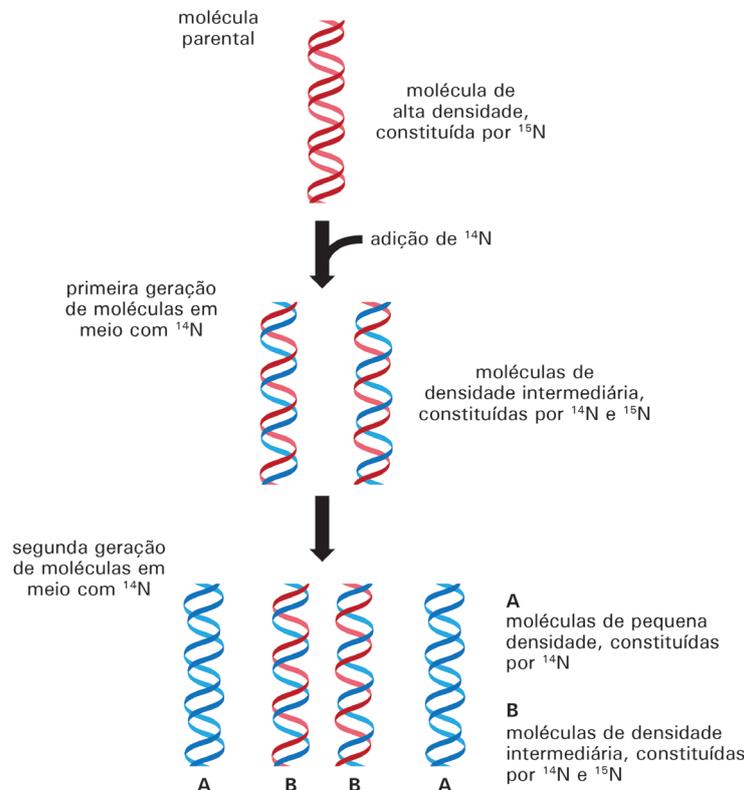


Figura 7. Resultados previstos por Meselson e Stahl caso a replicação do DNA fosse semi-conservativa.

Separação do DNA em gradiente de cloreto de céσιο

Essa distinção foi possível graças à técnica analítica desenvolvida por Jerome Vinograd (1913–1976), que ficou conhecida como **centrifugação de equilíbrio em gradiente de densidade**. O gradiente de densidade se forma quando uma solução de cloreto de céσιο é submetida a uma ultracentrifugação. O sal de céσιο fica distribuído em concentrações gradativamente maiores do topo para o fundo do tubo, de modo que a solução é mais densa no fundo e menos densa no topo. Quando moléculas de uma substância são adicionadas à solução de cloreto de céσιο e a mistura é submetida a uma ultracentrifugação, essas moléculas se posicionam no gradiente em uma faixa correspondente à sua própria densidade.

Moléculas de DNA com proporções diferentes de ^{14}N e ^{15}N têm densidades diferentes e podem ser separadas umas das outras por centrifugação em um gradiente de cloreto de céσιο. Moléculas de DNA com 100% de ^{15}N , com 100% de ^{14}N e com 50% de ^{15}N e 50% de ^{14}N estacionam em posições diferentes no gradiente: as primeiras mais abaixo, as segundas mais acima e as últimas em posição intermediária entre as outras duas.

Em seu experimento, Meselson e Stahl verificaram que as moléculas de DNA extraídas de bactérias cultivadas em meio normal com ^{14}N formavam uma faixa na parte superior do gradiente de cloreto de céσιο, ou seja, tinham uma densidade relativamente baixa. Já o DNA extraído de bactérias cultivadas por quatorze gerações em ^{15}N formava uma faixa na parte inferior do gradiente, ou seja, tinha uma densidade relativamente alta. O DNA extraído de bactérias cultivadas por quatorze gerações em meio com ^{15}N e por uma geração adicional em meio com ^{14}N formava uma faixa no gradiente em posição intermediária entre as duas primeiras. Finalmente, o DNA extraído de bactérias cultivadas por quatorze gerações em ^{15}N e por duas gerações adicionais em ^{14}N formava duas faixas no gradiente de cloreto de céσιο, uma correspondente à do DNA extraído de bactérias da primeira geração em meio com ^{14}N , após quatorze gerações em meio ^{15}N , e outra correspondente à do DNA de bactérias cultivadas sempre em meio com ^{14}N .

Os resultados experimentais concordaram, portanto, com a previsão da hipótese da replicação semiconservativa do DNA, a qual foi, então, aceita como verdadeira (Fig. 8).

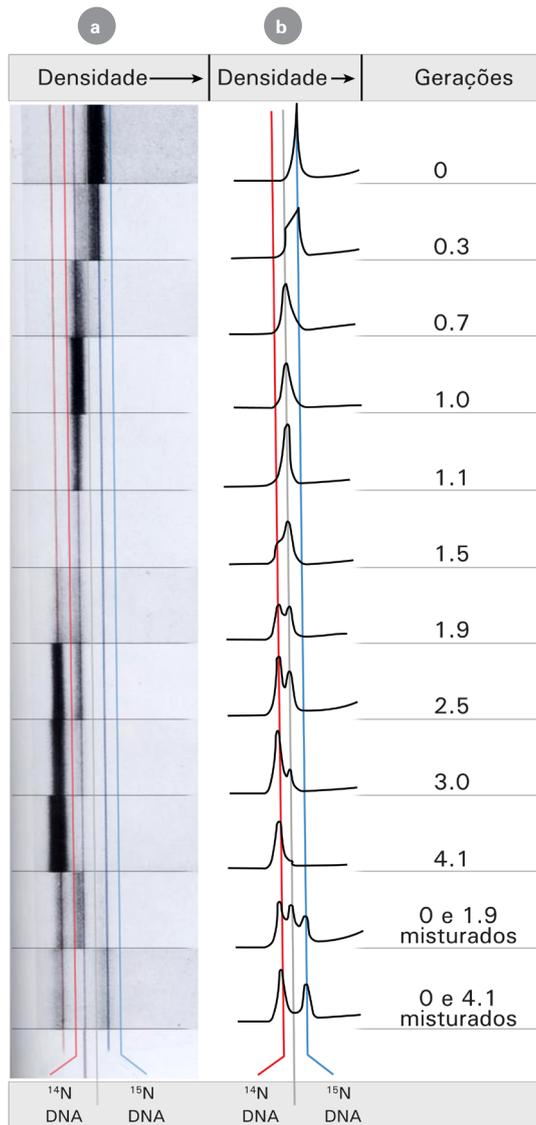


Figura 8. Resultados experimentais obtidos por Meselson e Stahl. **(a)** Fotografias da absorção de luz UV mostrando as bandas de DNA no gradiente de cloreto de céσιο, após 0, 1,0 e 1,9 gerações em meio com ¹⁴N. **(b)** Curvas microdensitométricas das absorções de luz UV mostradas em **(a)**. A baixa densidade do gradiente de cloreto de céσιο está à esquerda e alta, à direita.

Parte V: Visualização da replicação do cromossomo bacteriano

No início da década de 1960, John Cairns (1922) conseguiu pela primeira vez observar DNA bacteriano em duplicação e confirmar a circularidade do cromossomo sugerida anteriormente por experimentos genéticos.

A técnica usada por Cairns permitiu a observação de moléculas íntegras de DNA bacteriano. Esse foi um feito extraordinário, uma vez que essas moléculas se quebram facilmente durante o processo de isolamento. Sobre isso Cairns escreveu o seguinte:

“Embora nada se soubesse a respeito do número de moléculas de DNA no cromossomo da *Escherichia coli*, sabia-se que a dispersão do DNA da bactéria entre seus descendentes era semi-conservativa. Por esta e outras razões, parecia provável que o cromossomo bacteriano fosse uma única molécula de DNA muito grande. No entanto, todo o DNA isolado de bactérias era constituído por moléculas muito menores que o tamanho esperado para o cromossomo completo. Uma razão para isso foi sugerida por A. D. Hershey [...]. Ele afirma que moléculas de DNA gigantes, como as que formam o cromossomo de certos vírus [...] são tão grandes que se tornam excessivamente frágeis. Talvez o mesmo seja verdade a respeito do cromossomo bacteriano [...] que contém cerca de 20 vezes mais DNA que o maior dos vírus bacterianos.”

Cairns concluiu que o procedimento para visualizar a replicação do DNA bacteriano teria que ser delicado o suficiente para proteger a molécula de quebras. Além disso, os contornos da fibra original e das recém-sintetizadas

teriam que ser observados. O aparelho adequado para observar fibras tão finas quanto a molécula de DNA seria o microscópio eletrônico. Cairns, no entanto, optou pela auto-radiografia e observação em microscopia óptica, porque “oferece certas vantagens peculiares e porque já provou ser a técnica mais fácil, embora menos precisa, para a visualização de moléculas grandes de DNA.”

A técnica de auto-radiografia consiste em se marcar com isótopos radioativos as moléculas que se deseja observar. Em seguida, o material marcado é coberto com uma emulsão fotográfica e mantido protegido da luz por um certo tempo que pode variar de horas a meses, dependendo do grau de marcação. Nesse período de exposição, a radiação beta (elétrons resultantes da desintegração atômica do núcleo do isótopo) impressiona a emulsão fotográfica. Assim, após a revelação da emulsão os grãos negros no filme corresponderão a desintegrações atômicas, revelando a presença de isótopos radioativos no local impressionado.

Cairns usou timina radioativa para marcar as moléculas de DNA bacteriano. Ele adicionou essa substância ao meio de cultura das bactérias imaginando que ela seria absorvida pelas células e, no caso dessas estarem duplicando seu cromossomo, ela seria incorporada nas novas moléculas de DNA. A timina é uma base nitrogenada que entra exclusivamente na composição do DNA, sendo, portanto, um marcador específico dessa substância.

Essa técnica já havia sido usada por Cairns para marcar DNA viral e mostrar a forma dos cromossomos de vírus bacterianos. Segundo ele

“Isso foi possível porque, apesar do baixo poder de resolução da auto-radiografia (comparada com o poder de resolução do microscópio eletrônico), as moléculas de DNA são tão longas que aparecem sob a forma de um arranjo linear de grãos (resultantes da impressão do filme autorradiográfico). O método exagera grosseiramente o diâmetro do DNA, mas isso não constitui problema para o estudo que realizo”.

Cairns descreve seu trabalho com as bactérias da seguinte maneira: “O projeto geral dos experimentos requeria que o DNA marcado fosse extraído das bactérias tão delicadamente quanto possível, e depois montado — sem quebrar suas moléculas — para a auto-radiografia. O que fiz foi matar as bactérias que tinham sido alimentadas com timina radioativa por diversos períodos de tempo, colocando-as em um pequeno recipiente, fechado em um dos lados por uma membrana semipermeável. No recipiente foi adicionada uma solução contendo a enzima lisozima e um detergente para romper as células bacterianas e liberar seu DNA”.

Após a digestão das bactérias, a membrana que cobria o recipiente era perfurada e o líquido escoado vagarosamente. Nesse processo, algumas moléculas de DNA ficavam aderidas à membrana que era, então, coberta com a emulsão fotográfica e deixada em exposição por cerca de dois meses. Cairns optou por deixar que o DNA aderisse espontaneamente ao filtro para diminuir a turbulência sofrida pelas moléculas, evitando assim sua quebra. Visto que a *E. coli* sintetiza DNA durante todo seu ciclo de divisão, algum DNA extraído deveria ser flagrado no ato de replicação (Fig. 9).

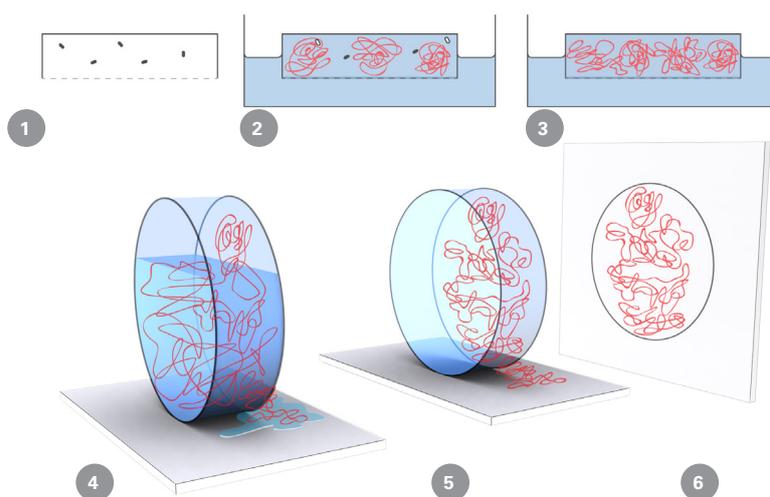


Figura 9. Representação esquemática do experimento de Cairns.

(1) As bactérias e a lisozima são colocadas em um recipiente fechado por uma membrana semi-permeável. (2) O recipiente é mergulhado em uma solução contendo detergente, o qual difunde-se através da membrana semi-permeável e provoca a ruptura das células bacterianas com liberação de seu DNA. (3) O recipiente é transferido para uma solução salina cujo objetivo é eliminar por difusão o detergente. (4) A membrana semi-permeável é perfurada de modo que a solução do recipiente escoe lentamente. (5) À medida que a solução escoo, moléculas de DNA ficam aderidas à membrana semi-permeável. (6) A membrana é retirada, colocada sobre uma lâmina de microscopia e coberta com a emulsão fotográfica.

Segundo Cairns:

“Uma virtude peculiar da auto-radiografia é que se vê apenas aquilo que foi marcado: por isso, a técnica pode dar informações sobre a história, assim como sobre a forma de uma estrutura marcada. A maneira mais fácil de determinar qual dos esquemas de replicação estava ocorrendo seria observar um DNA que tivesse replicado por um curto período de tempo na presença de timina marcada. Apenas o DNA sintetizado mais recentemente seria visível e, assim, seria possível determinar se as duas moléculas descendentes estavam sendo produzidas no mesmo ponto ou em regiões diferentes da molécula original”.

As figuras obtidas após marcação por apenas três minutos, cerca de um décimo do tempo de geração, mostraram que os dois fios marcados estavam sendo produzidos no mesmo local, ou seja, em uma região particular de uma molécula original maior. Elas mostraram também que pelo menos 80 micrômetros de DNA se replica nesse intervalo de tempo.

Outra conclusão foi que duas estruturas estavam sendo sintetizadas simultaneamente na região de replicação o que evidenciava o aspecto semiconservativo da duplicação cromossômica em bactéria. No entanto, saber se o cromossomo bacteriano era constituído por uma única molécula de DNA e como se dava a sua duplicação como um todo demandou um grande esforço. Cairns descreve essa etapa da investigação nos seguintes termos: “foi necessário observar o DNA marcado com timina através de várias gerações. Além disso, era preciso encontrar, no emaranhado de cromossomos extraídos de *E. coli*, auto-radiografias de cromossomos intactos e desembaraçados o suficiente para poderem ser vistos integralmente”. A figura 10 mostra uma auto-radiografia de um cromossomo intacto em replicação, ao lado de um esquema interpretativo.

Os resultados de Cairns permitiram-lhe concluir:

1. “O cromossomo de *E. coli* contém, aparentemente, uma única molécula de DNA, de mais ou menos 1 milímetro de comprimento [...]. É, de longe, a maior molécula de que se tem conhecimento no sistema biológico.
2. A molécula contém duas cadeias polinucleotídicas que se separam na época da duplicação.
3. A molécula se duplica em um único ponto que se desloca por todo o cromossomo. Nesse ponto, as duas novas cadeias estão sendo produzidas: duas cadeias vão se tornando quatro. Esse ponto veio a se chamar “forquilha” de replicação, por causa de sua forma.
4. Os cromossomos em duplicação não têm a forma de letra Y, como aconteceria no caso de uma estrutura linear. Em vez disso, as três extremidades do Y estão unidas: as extremidades das moléculas -filhas estão unidas umas às outras e à extremidade da molécula original. Em outras palavras, o cromossomo é circular enquanto está duplicando.”

Na verdade, experimentos posteriores vieram elucidar que a interpretação de Cairns apresentada no item 3 não era a correta: hoje sabemos que a duplicação do cromossomo circular bacteriano inicia-se em um único ponto, mas prossegue em dois pontos com sentidos opostos, ou seja, é bidirecional.

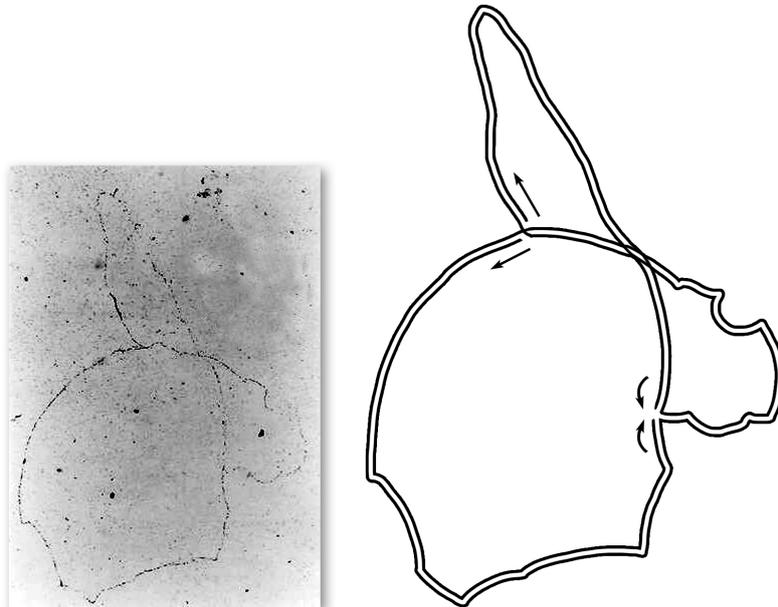


Figura 10. Auto-radiografia mostrando um cromossomo da bactéria *Escherichia coli* em fase de duplicação. O DNA cromossômico está visível porque, durante duas gerações, ele incorporou um precursor radioativo. A timina radioativa aparece como uma linha de grãos escuros na emulsão fotográfica. (Os grãos esparsos provêm de radiação de fundo.) O diagrama acima, à direita, mostra a interpretação da imagem auto-radiográfica em termos de duplicação de DNA. A foto é uma reprodução da imagem publicada no artigo “O cromossomo Bacteriano” de John Cairns, publicado no *Scientific American*, em janeiro de 1966 (pp. 87-95).

Apêndice: Estruturas Secundária e Terciária do DNA

Estruturas secundárias do DNA

A forma B do DNA

O modelo em hélice apresentado por Watson e Crick corresponde à forma B do DNA, ou DNA-B, e é a principal forma presente no interior das células. Contudo, o DNA pode assumir outras formas de estrutura secundária dependendo de sua composição de bases e das condições do meio. Assim, acredita-se que essas outras formas estruturais possam ocorrer em regiões particulares da molécula de DNA (Fig.11).

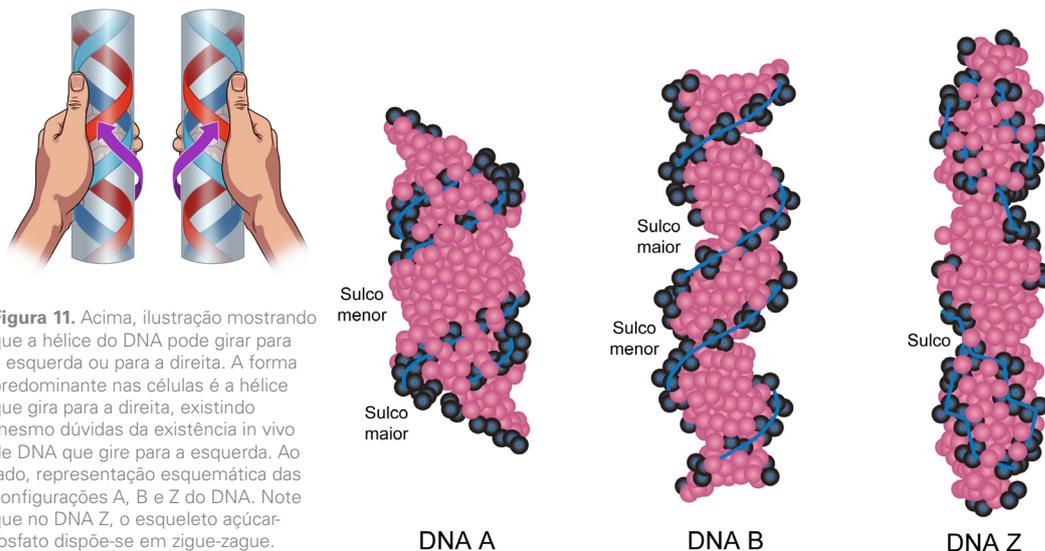
A forma A do DNA

O chamado DNA-A possui em média 11 pares de bases por volta completa da hélice e os pares de bases não são perpendiculares ao eixo da hélice, como no DNA-B. No DNA-A os pares de bases apresentam-se inclinados cerca de 20° em relação ao eixo da molécula e a distância entre os pares adjacentes é cerca de 0,25 nm. Acredita-se que a configuração A seja a presente em moléculas de RNA em dupla-hélice e em moléculas híbridas, onde uma das cadeias é DNA e a outra, RNA.

A forma Z do DNA

Em contraste com as formas A e B que giram para a direita, existe uma variante em que a hélice gira para a esquerda, é o chamado DNA-Z. O nome decorre do fato de que, nessa estrutura, o esqueleto açúcar-fosfato assume uma conformação em zigue-zague.

A conformação Z apresenta em média 12 pares de bases por volta completa da hélice e ocorre em polímeros cuja sequência de bases consiste de purinas e pirimidinas alternadas. O DNA Z foi descoberto *in vitro* e tanto sua ocorrência *in vivo* quanto a sua possível função ainda são motivo de grande controvérsia na literatura.



Desnaturação e renaturação de ácidos nucleicos

As ligações não-covalentes do tipo pontes de hidrogênio, que mantêm a estrutura da dupla-hélice, podem ser desfeitas pelo calor, por pH muito ácido ou muito básico, ou por exposição a baixas concentrações de sais. Quando as pontes de hidrogênio são rompidas, as duas cadeias polinucleotídicas se separam em um processo denominado **desnaturação**. A desnaturação do DNA causa modificações importantes em algumas das propriedades físicas da

molécula; por exemplo, a absorção de luz ultravioleta com comprimento de onda de 260 nm, característica dos ácidos nucleicos, aumenta em até 40%, aproximando-se da absorbância característica de uma mistura de nucleotídeos isolados. Este fenômeno é chamado de efeito **hipocrômico**.

A temperatura em que cerca de 50% das hélices de uma amostra de DNA se encontra desnaturada é denominada temperatura de fusão e representada pelo símbolo T_m . O valor da temperatura de fusão depende da proporção entre as quantidades de pares G-C e A-T da molécula. Como já mencionamos, os pares G-C são unidos por três pontes de hidrogênio e são, portanto, mais difíceis de serem separados no processo de desnaturação. Assim, quanto maior for o conteúdo de pares G-C em uma molécula de DNA, maior será a energia necessária para separar as cadeias e maior será a T_m . DNA em solução, em condições próximas às fisiológicas, possui uma T_m entre 85-95° C. Assim, nas temperaturas que ocorrem em condições fisiológicas, o DNA tende a conservar a estrutura de dupla-hélice.

A desnaturação do DNA é um fenômeno reversível. Em condições favoráveis, duas cadeias complementares de DNA tendem a se unir, reconstituindo a dupla-hélice. Esse fenômeno, que recebe o nome de **renaturação**, depende do encontro das cadeias complementares e do restabelecimento das pontes de hidrogênio entre suas bases, o que é favorecido em concentrações salinas elevadas e temperatura cerca de 25° C abaixo da T_m .

A reação de renaturação dos ácidos nucleicos ocorre em duas etapas: primeiro, as cadeias únicas encontram-se na solução ao acaso; se suas sequências de bases forem complementares, vai ocorrer o emparelhamento de algumas bases, formando uma curta região de dupla-hélice; em uma segunda etapa, a região de emparelhamento das bases vai se estendendo ao longo da molécula, que se fecha como se fosse um zíper. A renaturação faz com que o DNA recupere as propriedades físicas modificadas pela desnaturação (Fig. 12).

A renaturação pode ocorrer entre quaisquer sequências de ácidos nucleicos que sejam complementares entre si. Ela é chamada genericamente de **hibridação** se as cadeias polinucleotídicas envolvidas no processo tiverem origens diversas; pode ocorrer hibridação entre duas cadeias de DNA ou também entre uma cadeia de DNA e outra de RNA. O fato de duas moléculas de ácidos nucleicos poderem se hibridar é uma ferramenta laboratorial muito útil para se testar a complementaridade de suas sequências de bases, uma vez que em certas condições somente cadeias com alto grau de complementaridade podem constituir uma hélice dupla.

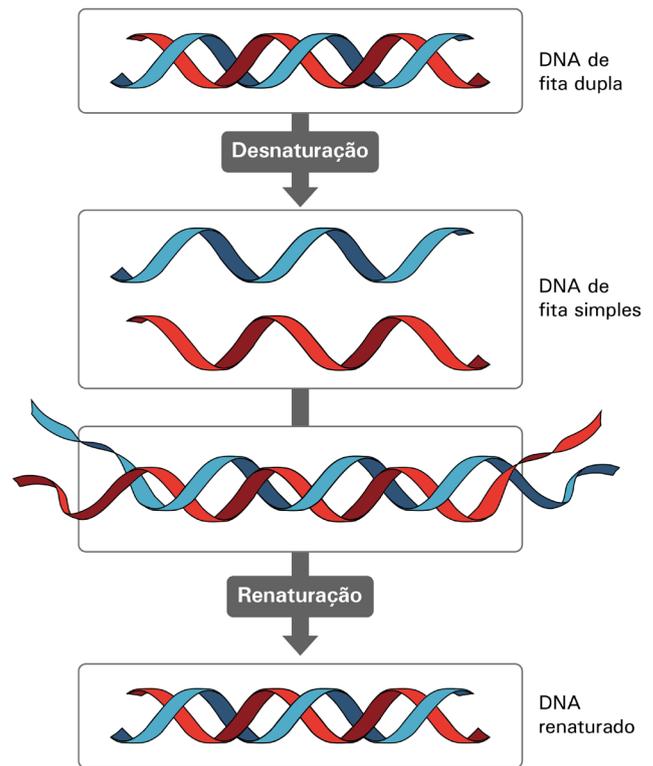


Figura 12. Representação esquemática dos processos de desnaturação e renaturação de ácidos nucleicos. Algumas condições, como alta temperatura, fazem com que se rompam as pontes de hidrogênio que mantêm unidas as duas cadeias polinucleotídicas de uma hélice dupla de ácido nucleico. Se as condições retornarem ao normal, as cadeias se emparelham novamente refazendo as duplas hélices.

A estrutura terciária do DNA

O superenrolamento do DNA

Uma molécula de DNA com extremidades livres, isto é, não circular e não associada a proteínas, está em uma condição denominada **relaxada**. Nessa condição ela não apresenta nenhum outro tipo de enrolamento além da estrutura helicoidal típica, não estando submetida a nenhum tipo de tensão.

Nas células vivas, o DNA não apresenta extremidades livres; em certos vírus, plasmídeos e cromossomos bacterianos ele é circular; nos cromossomos eucarióticos, ele apresenta-se na forma de alças ancoradas no esqueleto cromossômico. Nessas condições a molécula de DNA está sob tensão, a qual é gerada quando a dupla-hélice sofre giros ao redor de seu próprio eixo, tornando-se **superenrolada**. A introdução de giros adicionais no DNA requer energia e consequentemente, a molécula superenrolada pode, de um certo modo, ser encarada como energeticamente carregada.

O superenrolamento de uma molécula de DNA é positivo quando a torção se dá para a direita, ou seja, no mesmo sentido que o giro normal da dupla hélice. É negativo quando a torção ocorre para a esquerda, em sentido contrário ao giro da dupla-hélice.

O DNA celular apresenta-se normalmente com superenrolamento negativo. Isso é importante para a atividade dos genes, pois essa configuração poder ser convertida em separação das cadeias, o que é necessário nos processos de replicação e de transcrição gênicas. O superenrolamento positivo só ocorre transitoriamente e em zonas restritas durante os processos de replicação e transcrição.

As topoisomerases

O superenrolamento do DNA é controlado por dois tipos de enzima denominados **topoisomerases**.

A **topoisomerase I** catalisa a quebra de uma das hélices do DNA superenrolado negativa ou positivamente, diminuindo o superenrolamento. Já a **topoisomerase II** atua quebrando as duas hélices da molécula e superenrolando o DNA negativamente. A enzima girase das bactérias é uma topoisomerase do tipo II.

Tanto a topoisomerase I como a II atuam catalisando a quebra e a reunião das ligações fosfodiéster do DNA. Nesse processo, elas nunca deixam as extremidades das cadeias livres, mas estão sempre ligadas covalentemente às extremidades quebradas, de modo a não permitir em nenhum momento que as cadeias girem livremente (Fig. 13).

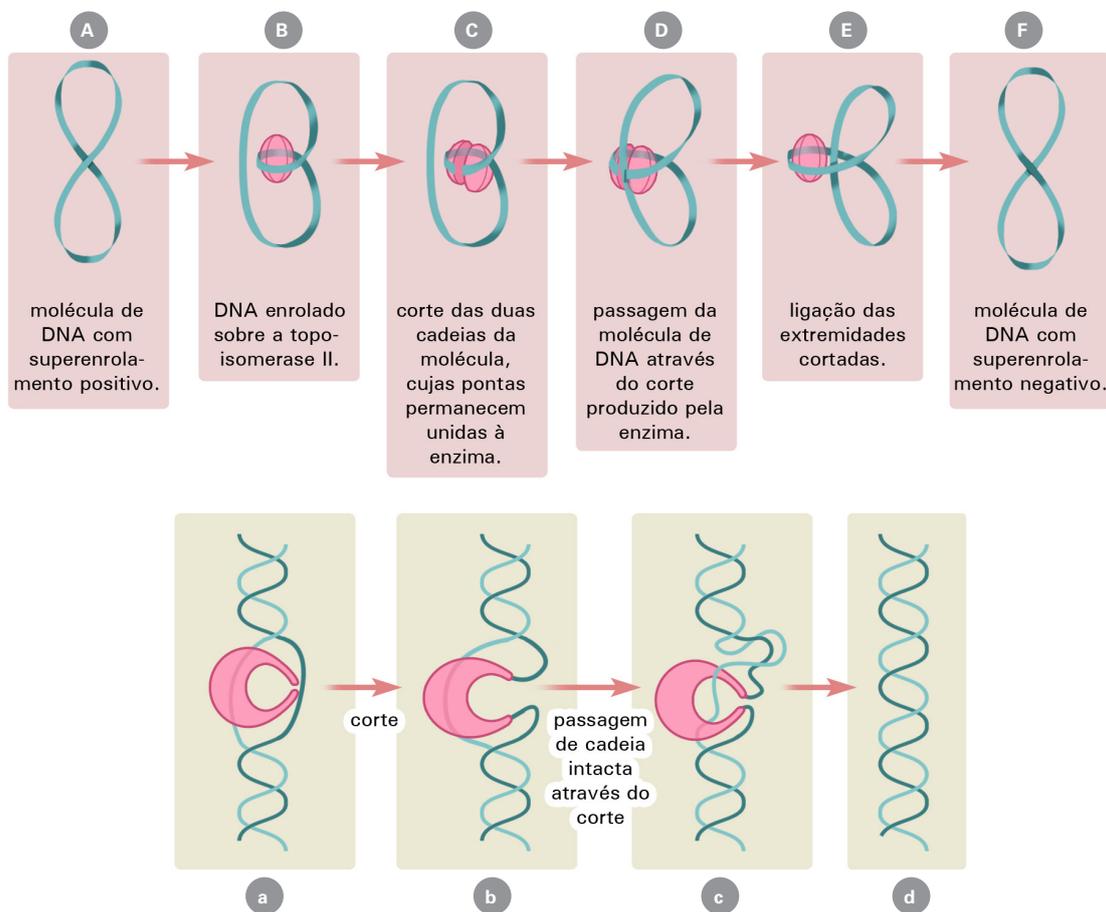


Figura 13. Acima, esquema do provável mecanismo de ação da enzima topoisomerase II. No exemplo, um DNA com superenrolamento positivo enrola-se ao redor da enzima. Em sua atividade, a topoisomerase introduz giros, em sentido contrário ao da torção normal da hélice; fazendo com que a molécula de DNA adquira superenrolamento negativo. Abaixo, esquema do provável mecanismo de ação da enzima topoisomerase I. **(a)** A enzima se liga ao DNA e separa as duas cadeias. **(b)** A enzima quebra uma das cadeias, mas impede sua livre rotação, permanecendo ligada às extremidades quebradas. **(c)** A enzima passa a cadeia intacta através da quebra e religa as extremidades, relaxando em uma volta o superenrolamento. **(d)** A enzima se separa do DNA, deixando-o com uma volta de superenrolamento a menos.

EXERCÍCIOS

Bloco I

Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Preencha os espaços em branco nas frases de 1 a 9, usando o termo mais apropriado:

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| (a) ácido desoxirribonucléico | (f) nucleotídeo |
| (b) ácido nucléico | (g) pirimidina |
| (c) ácido ribonucléico | (h) purina |
| (d) antiparalelismo | (i) nucléína |
| (e) transformação bacteriana | |

1. Miescher chamou o composto ácido e rico em fósforo que ele purificou a partir dos núcleos dos glóbulos brancos do pus de ().
2. () é a unidade estrutural básica dos ácidos nucléicos, composta por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato.
3. () é um polímero constituído por uma cadeia de nucleotídeos.
4. () é uma dupla-hélice constituída por duas cadeias polinucleotídicas que contêm o açúcar desoxirribose e as bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina em sua composição.
5. () é um ácido nucléico unifilamentar que contém o açúcar ribose e a base nitrogenada uracila em lugar da timina.
6. Uma base nitrogenada, como a adenina e a guanina, formada por dois anéis de carbono e nitrogênio, é chamada ().
7. Uma base nitrogenada, como citosina, timina e uracila, formada por um único anel de carbono e nitrogênio, é chamada ().
8. () é o fenômeno de modificação genética de uma bactéria produzida pela aplicação de DNA oriundo de células com genótipo diferente.
9. () é o termo utilizado para descrever a orientação oposta das duas cadeias polinucleotídicas de uma hélice de DNA, na qual a extremidade 5' de uma cadeia se alinha com a extremidade 3' da outra.

Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

Indique a alternativa mais apropriada para completar as frases de 10 a 14.

10. Camundongos que morrem de pneumonia, após serem injetados com uma mistura de pneumococos do tipo S (virulentos) mortos pelo calor e do tipo R (não-virulentos) vivos, apresentam em seu corpo bactérias vivas do tipo S. Se essas bactérias forem injetadas em outros camundongos eles adquirem pneumonia e morrem. Esses resultados indicam que as modificações ocorridas nas bactérias R são
 - a. de natureza transitória, não se perpetuando no decorrer das gerações.
 - b. permanentes e induzidas pelo calor.
 - c. hereditárias.
 - d. causadas pelas cápsulas das bactérias S sobreviventes.
11. A conclusão do experimento de Hershey e Chase de que DNA é o material hereditário do vírus tem por base o fato de
 - a. nenhuma radioatividade ter sido observada nas bactérias infectadas com fagos marcados com ^{32}P ou com ^{35}S .
 - b. grande parte da radioatividade encontrada nas bactérias infectadas ter sido oriunda dos fagos marcados com ^{35}S .
 - c. grande parte da radioatividade encontrada nas bactérias infectadas ter sido oriunda dos fagos marcados com ^{32}P .
 - d. grande parte da radioatividade ter sido detectada nas cápsulas dos fagos marcados com ^{32}P .

12. Isótopos são átomos de
 - a. um mesmo elemento químico, que possuem mesmo número de prótons e mesmo número de nêutrons no núcleo.
 - b. diferentes elementos químicos, que possuem mesmo número de prótons e mesmo número de nêutrons no núcleo.
 - c. um mesmo elemento químico, que possuem mesmo número de prótons, mas números de nêutrons diferentes no núcleo.
 - d. átomos de um mesmo elemento químico, que possuem mesmo número de nêutrons, mas números de prótons diferentes no núcleo.
13. O fato de uma molécula de DNA ser formada por uma cadeia polinucleotídica antiga e outra nova é consequência de sua replicação ser
 - a. dispersiva.
 - b. conservativa.
 - c. semiconservativa.
 - d. semidescontínua.
14. Sobre o experimento de Meselson e Stahl, qual das afirmações abaixo é verdadeira.
 - a. Eles distinguiram o DNA parental do recém-sintetizado marcando as moléculas com isótopos radioativos de hidrogênio.
 - b. Eles cresceram os bacteriófagos T4 em meio onde a única fonte de nitrogênio era o isótopo pesado desse elemento (^{15}N).
 - c. Eles separaram o DNA marcado do não-marcado por centrifugação em gradiente de sacarose.
 - d. Eles verificaram que, após dois ciclos de replicação em meio normal, 50% das moléculas de DNA eram marcadas e 50% eram não-marcadas com ^{15}N .

Parte C: Aplicando Conceitos

15. No experimento de Avery, MacLeod e McCarty, como pode ser descartada a hipótese de que o “princípio transformante” era composto por proteínas?
16. Nos experimentos de transformação em *Streptococcus pneumoniae*, como foi descartada a hipótese de as linhagens virulentas terem sido originadas por mutação reversa, induzida pelo próprio extrato das bactérias virulentas mortas?
17. Por que Hershey e Chase escolheram isótopos radioativos do fósforo e do enxofre e não de outros elementos químicos para realizar seu célebre experimento com bacteriófagos?
18. Qual foi a hipótese testada por Meselson e Stahl em seu experimento?
19. Que dedução eles fizeram a partir da hipótese?

Parte D: Resolvendo Problemas

20. Cairns poderia ter concluído, a partir de suas preparações, que a replicação do cromossomo bacteriano se daria em um único ponto, deslocando-se em uma única direção?
21. Suponha que um pesquisador na década de 50 estivesse testando a hipótese de que o RNA e não o DNA seria o material genético de uma espécie de bacteriófago. Imagine um experimento que permitisse ao pesquisador fazer esse tipo de teste.
22. Qual teria sido o resultado do experimento de Meselson e Stahl se:
 - a. a replicação do DNA fosse conservativa?
 - b. a replicação do DNA fosse dispersiva?
23. Bactérias *Escherichia coli* foram cultivadas durante várias gerações sucessivas em meio onde todo nitrogênio disponível era constituído por átomos do isótopo ^{15}N . Em seguida, essas bactérias foram transferidas para um meio com apenas ^{14}N , onde sofreram três replicações sucessivas. Que previsão se pode fazer a respeito das porcentagens dos diferentes tipos de moléculas após essas replicações?
24. Células humanas sofreram inicialmente uma única replicação cromossômica em meio de cultura contendo timidina tritiada, um precursor radioativo de DNA. Qual a distribuição esperada de radioatividade nas cromátides
 - a. após uma replicação em meio não-radioativo?
 - b. após duas replicações em meio não-radioativo?

BLOCO II

Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Preencha os espaços em branco nas frases de 25 a 32, usando o termo mais apropriado:

- | | |
|------------------|----------------------|
| (a) desnaturação | (e) hibridação |
| (b) DNA Z | (f) renaturação |
| (c) DNA A | (g) superenrolamento |
| (d) DNA B | (h) topoisomerase |
25. () é a principal forma de DNA presente na célula, apresentando em média 10 pares de bases por volta da hélice e rotação para a direita.
 26. () é a estrutura do DNA em que a hélice gira para a direita e os pares de bases, em média 11 por giro da hélice, mantêm-se inclinados em relação ao eixo da molécula.
 27. () é a estrutura do DNA em que a hélice gira para a esquerda e o esqueleto açúcar-fosfato assume uma disposição em zigue-zague.
 28. A separação das duas cadeias polinucleotídicas que constituem uma hélice do DNA, por ação do calor ou de pHs extremos, é denominada ().
 29. A reassociação espontânea das duas cadeias polinucleotídicas complementares de uma molécula de DNA, reconstituindo a dupla-hélice é chamada ().
 30. () é o fenômeno de formação de dupla-hélice de ácidos nucléicos a partir do emparelhamento de cadeias complementares de origens diferentes.
 31. () é a denominação do estado da molécula do DNA quando está retorcida sobre si mesma.
 32. () é nome das enzimas que têm a capacidade de modificar o grau de superenrolamento da molécula de DNA.

Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

Indique a alternativa mais apropriada para completar as frases de 33 e 34.

33. Em uma amostra de DNA, a concentração da base adenina é 10%. A concentração de citosina, guanina e timina deverá ser, respectivamente:

a. 10%, 40%, 40%	c. 40%, 40%, 10%
b. 30%, 30%, 30%	d. 40%, 10%, 40%
34. A concentração de cada uma das quatro bases nitrogenadas presentes em amostras de DNA é (1) a mesma nos diferentes tecidos de um organismo e (2) a mesma em diferentes espécies. Com relação às afirmações (1) e (2), pode-se dizer que

a. ambas são verdadeiras.
b. ambas são falsas.
c. (1) é verdadeira e (2) é falsa.
d. (1) é falsa e (2) é verdadeira.

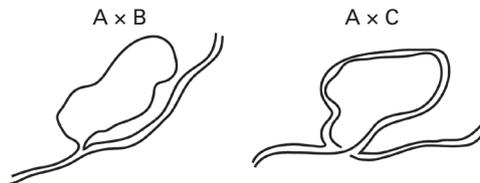
Utilize as alternativas abaixo para responder as questões 35 e 36.

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| (a) DNA de dupla fita. | (c) DNA de fita simples. |
| (b) RNA de dupla fita. | (d) RNA de fita simples. |
35. A análise de uma amostra de ácido nucléico revelou a presença de 40% de C, 10% de G, 25% de U e 25% de A. Trata-se, portanto, de ().
 36. A análise de uma amostra de ácido nucléico revelou a presença de 35% de C, 15% de G, 25% de A e 25% de T. Trata-se, portanto, de ().
 37. Quando dizemos que a T_m de um DNA é igual a 85 °C, isto significa que

a. a absorvância de luz ultravioleta da amostra diminui consideravelmente em temperaturas superiores a 85 °C.
b. a 85 °C toda a amostra se encontra desnaturada, pois a desnaturação se completa nessa temperatura.
c. a 85 °C, cerca de 50% do DNA da amostra se encontra desnaturado.
d. o DNA se encontra completamente desnaturado, pois a desnaturação ocorreu a 60 °C, isto é, 25 °C abaixo da T_m .

Parte C: Aplicando Conceitos

38. Quais elementos quantitativos dos trabalhos de Chargaff foram fundamentais à concepção do modelo da dupla-hélice proposto por Watson e Crick?
39. Por que, segundo o modelo de DNA proposto por Watson e Crick, adenina não poderia se emparelhar com citosina? E por que adenina não poderia se emparelhar com guanina?
40. Um pesquisador purificou DNA de uma linhagem selvagem A e de duas linhagens mutantes (B e C) de uma espécie de bacteriófago. Após realizar uma reação de hibridação entre as amostras de DNA de cada mutante com o DNA do selvagem, ele examinou o resultado no microscópio eletrônico, tendo encontrado as seguintes figuras:



O que estas figuras permitem concluir sobre as diferenças entre a linhagem selvagem e as mutantes?

Parte D: Resolvendo Problemas

41. Se o genoma humano tem cerca de 3×10^9 pares de bases e a distância entre as bases adjacentes na molécula de DNA é cerca de 3,4 Å, qual o comprimento total do DNA em uma célula diplóide? Se considerarmos que temos cerca de 10^{13} células em nosso corpo, qual deve ser o comprimento total do DNA no corpo humano?
42. Um pesquisador purificou e analisou o DNA de duas espécies bacterianas: uma amostra era oriunda de uma espécie de enterobactéria (bactéria que habita o intestino) e a outra era de uma bactéria termófila (que habita fontes de água quente). A porcentagem das bases em uma amostra era C=40%, G=40%, A=10% e T=10% e na outra era C=15%, G=15%, A=35% e T=35%. Em sua opinião, qual deve ser a amostra correspondente ao DNA da bactéria termófila? Justifique o seu palpite.