

Estruturas de ácidos nucleicos

Capítulo 4 e 5
Molecular Biology of the Gene
Watson et al, 2015

Capítulo 2
Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas

Menck & Sluys 2017



Histórico

Avery, MacLeod and
MCarty experiment- 1944

DETERMINING THAT DNA IS THE HEREDITARY MATERIAL

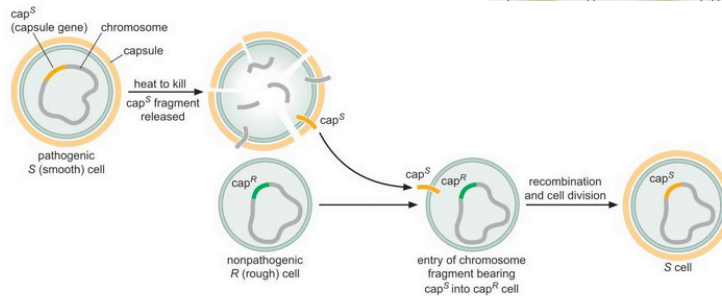
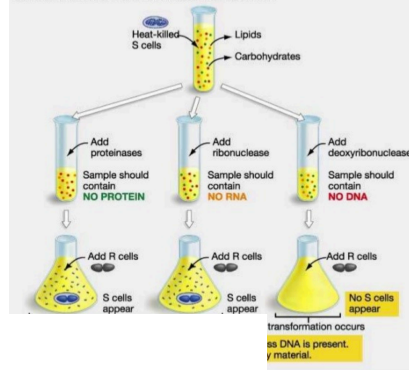

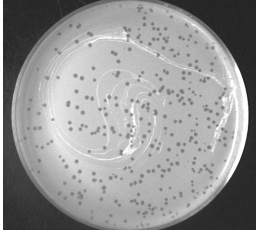


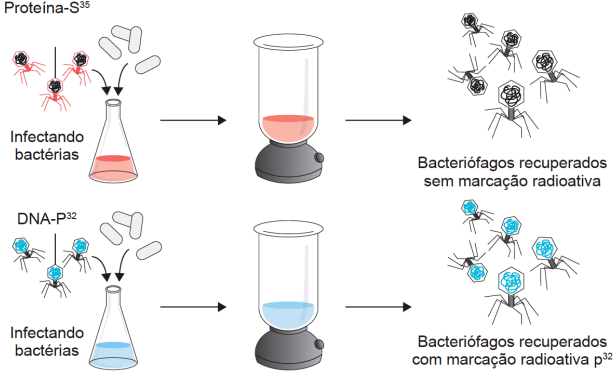
FIGURE 2-1 Transformation of a genetic characteristic of a bacterial cell (*Streptococcus pneumoniae*) by addition of heat-killed cells of a genetically different strain. Here we show an R cell receiving a chromosomal fragment containing the capsule gene from a heat-treated S cell. Since most R cells receive other chromosomal fragments, the efficiency of transformation for a given gene is usually less than 1%.

Histórico



Alfred Hershey and Martha Chase (1952, US)
Bacteriófago T2- o DNA é responsável pela multiplicação viral! (e não as proteínas!).
Nobel em 1969!





Conclusão: o DNA é o material genético!

Hermann Joseph Muller




Histórico

Experimentos de mutagênese de Muller (1926)!
Raios X induzem mutações em drosófila!
(Nobel Fisiologia e Medicina em 1946!)
(ele lutou pela “eugenia” e chamando a atenção para os perigos da radiação ionizante).

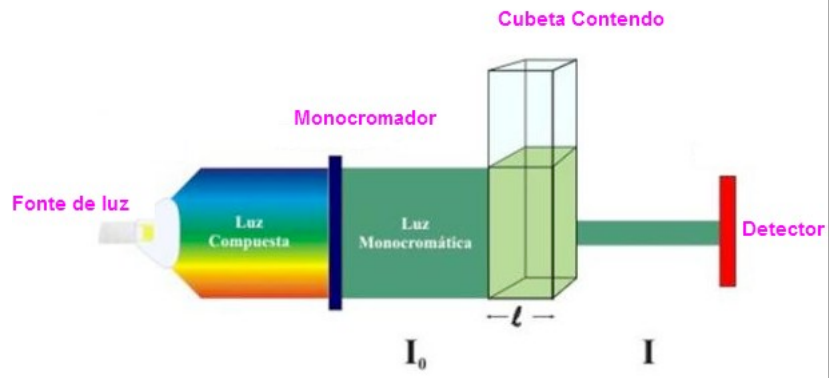


DOSAGE IN R-UNITS	SEX-LINKED MUTATIONS IN PERCENT
1000	2.5
2000	4.5
3000	7.5
4000	10.5
5000	13.5
6000	16.5

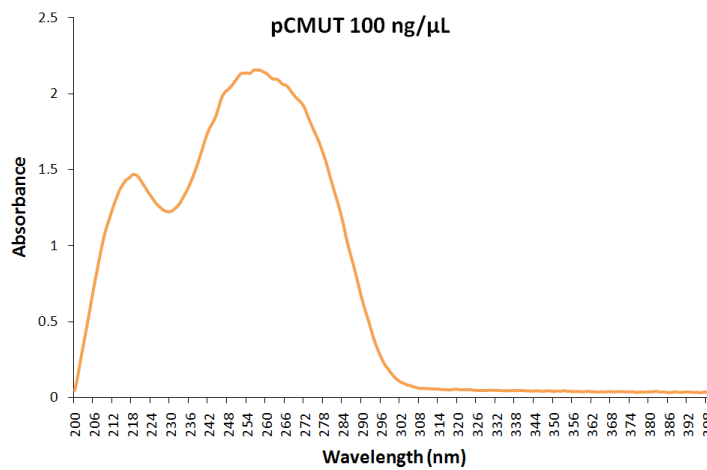
FIG. 867. Graph after Timoféeff-Resovsky showing that the rate of sex-linked mutations in *Drosophila melanogaster* is directly proportional to the amount of radiation applied.

Mas o que está acontecendo aqui?

Espectrofotometria



Espectro de Absorção da molécula de DNA



Como todas as moléculas o DNA tem um espectro de absorção:

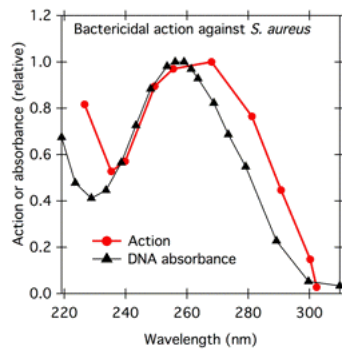


Figure 5. Action spectrum for bactericidal action of UV against *Staphylococcus aureus* (modified from Gates, 1930), plotted with the absorbance spectrum for DNA (modified from Tsuboi, 1950).

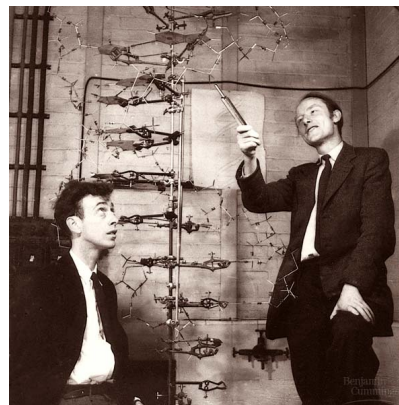
- **Experimento de Alexandre Hollaender (1939)!**
- **Espectro de Mutagenesis:**
- **DNA é a molécula da herança!**



Histórico

Francis Crick e James Watson (1953, UK)

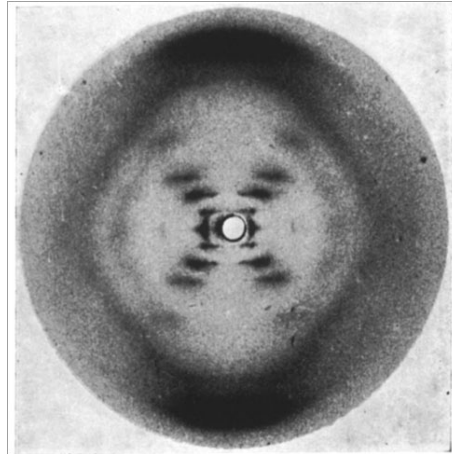
**A dupla hélice revelada! Nobel 1962!
(Watson, Crick e Wilkins)**



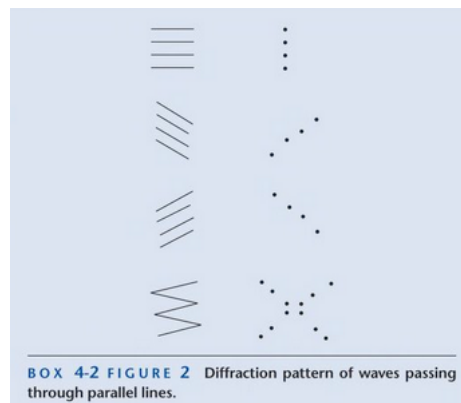
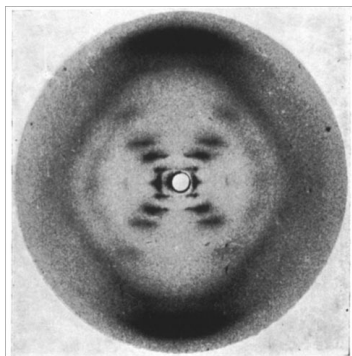
Histórico

Rosalind Franklin e Maurice Wilkins
(1952, UK)

a “fotografia 51”... quem era responsável por ela?

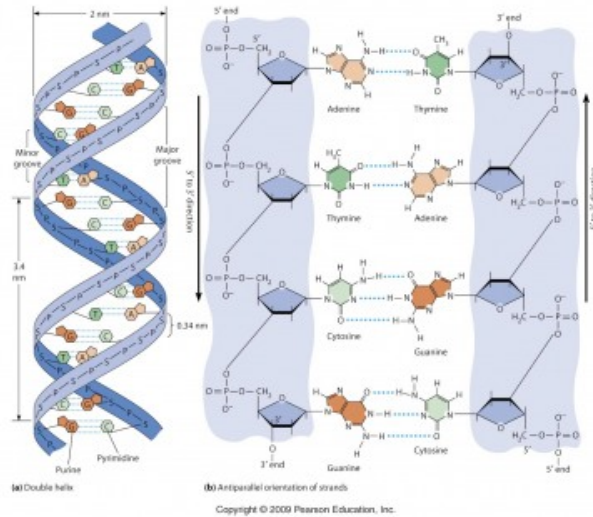


Interpretando a foto 51!



- X indica é helicoidal! A falha indica é dupla hélice!
- E dá os parâmetros de 3.4 nm por volta!
- Molecular Biology of The Gene, Watson et al, 2013

A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!



- Quantas bases por volta? (cada volta tem 34 nm!)
- O que significa polaridade 5' - 3'?

**A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!
O Que é sulco maior ou menor? Importância biológica?**

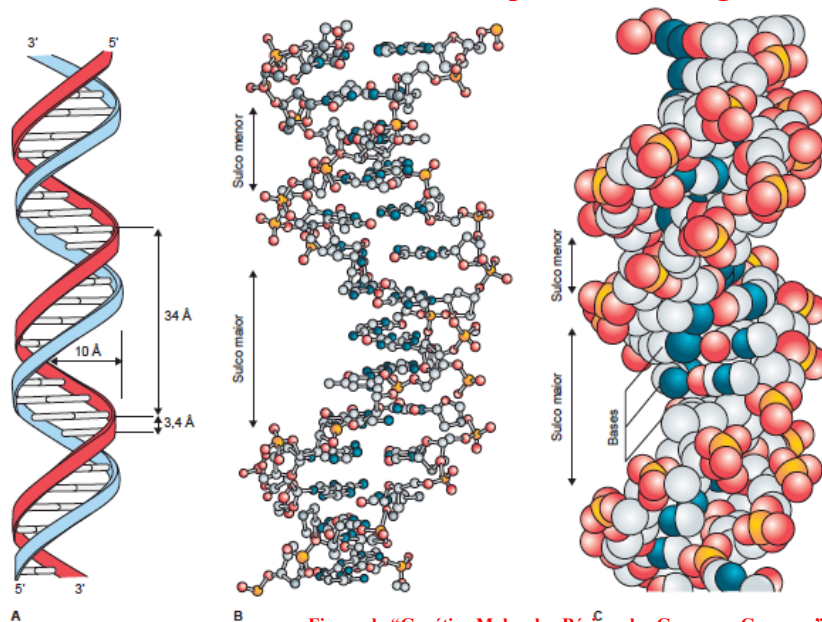
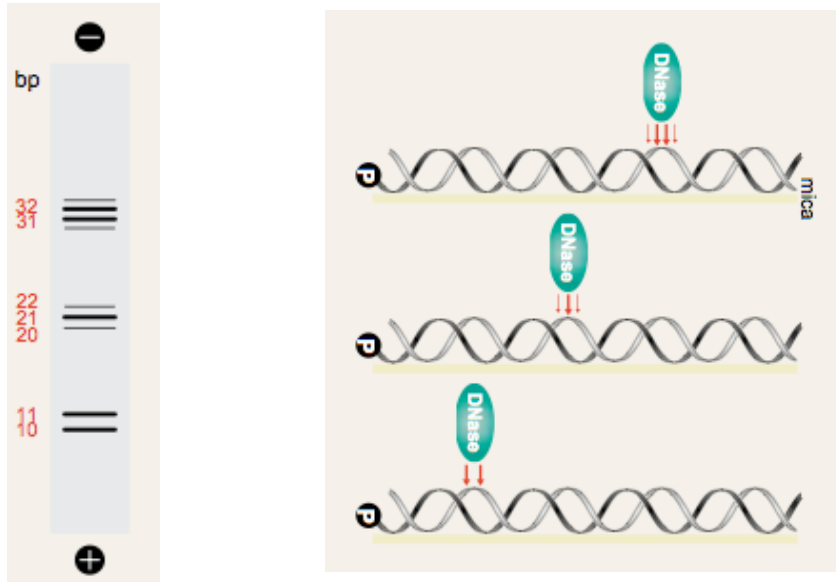


Figura do "Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas", 2017

A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho! *The Mica Experiment*



Quantas bases por volta tem no DNA?

**As bases formam um empilhamento no interior da dupla hélice!
Por que essa situação abaixo é desfavorável?**

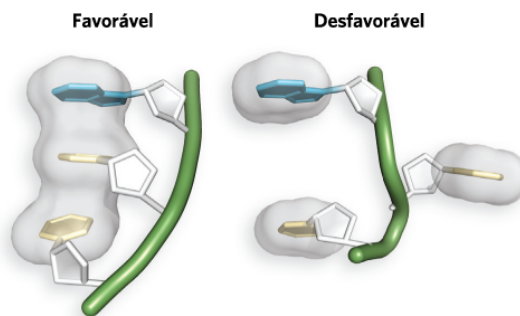
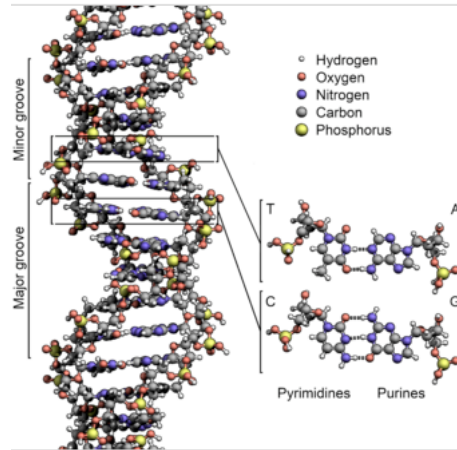


FIGURA 6-10 Empilhamento das bases nos ácidos nucleicos. Interações hidrofóbicas, de van der Waals e eletrostáticas favorecem o alinhamento das bases em solução aquosa ou em uma cadeia polinucleotídica (três nucleotídeos do RNA são mostrados aqui); a orientação não empilhada é desfavorável. O raio das interações de van der Waals é mostrado em cinza.

A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!



The structure of the DNA double helix. The atoms in the structure are colour-coded by element and the detailed structure of two base pairs are shown in the bottom right.

- Qual as posições das bases frente ao esqueleto fosfodiéster?
- O que é esse esqueleto fosfodiéster?
- As bases estão na horizontal?

A estrutura B-DNA- tilt e propeller twist! Esses ângulos podem variar na estrutura da molécula!

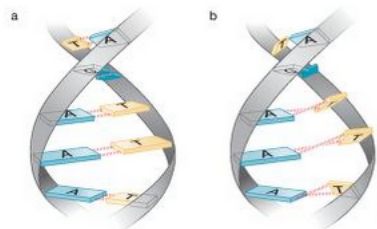
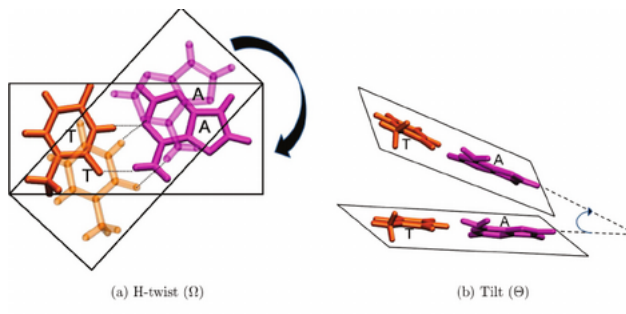
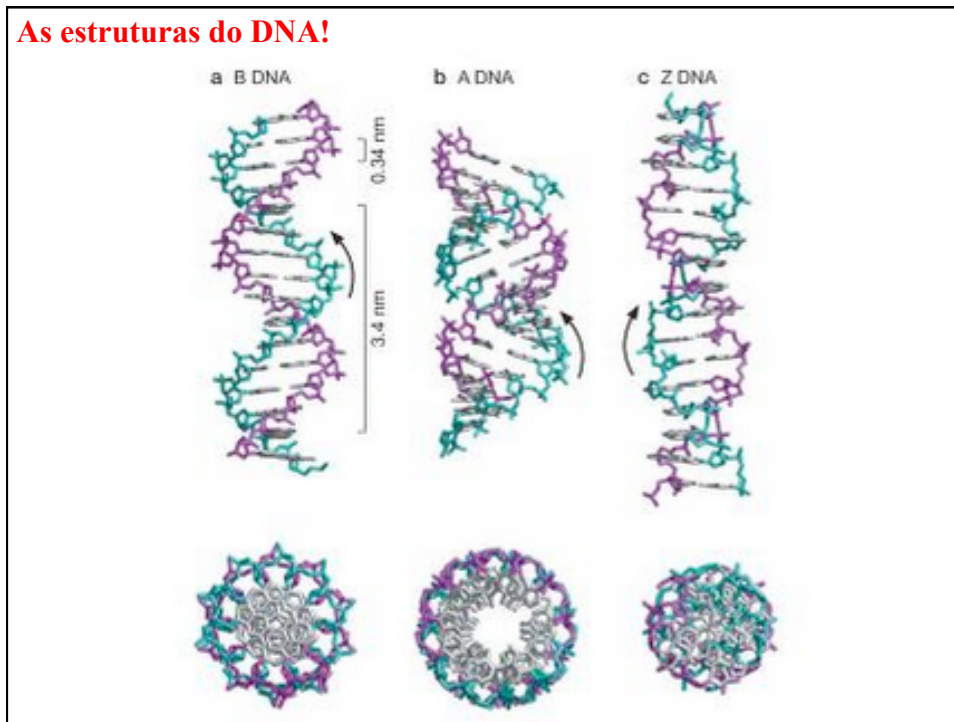


FIGURE 4-12 The propeller twist between the purine and pyrimidine base pairs of a right-handed helix. (a) The structure shows a sequence of three consecutive A:T base pairs with normal Watson-Crick bonding. (b) A propeller twist causes rotation of the bases about their long axes. (Adapted, with permission, from Aggarwal A.K. et al. 1988. *Science* 242: 899-907, Fig. 5b. © AAAS.)

- https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=o_-6JXLYS-k

- Trabalho de Alexander Rich na década de '80...
- Trabalhando com oligonucleotídeos com a sequência (para fazer cristalografia de raio X):
5'-GCGCGCGCGCGC-3'
- Qual a vantagem de usar esse tipo de sequência?
Resultado: O DNA girava para a esquerda!!!
E fazia zig-zag!!! – DNA Z!

As estruturas do DNA!

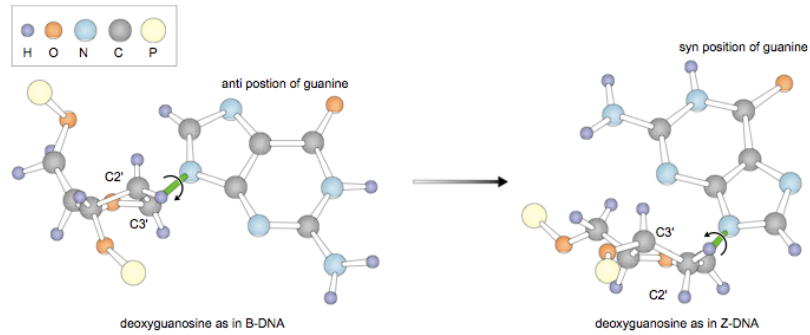


(b)

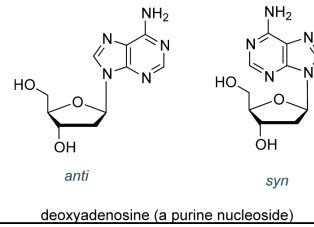
	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Sentido da hélice	Orientado à direita	Orientado à direita	Orientado à esquerda
Diâmetro	~20 Å	~26 Å	~18 Å
Pares de base por volta da hélice	10,5	11	12
Incremento na altura da hélice por par de base	3,4 Å	2,6 Å	3,7 Å
Inclinação das bases em relação ao eixo da hélice	-6°	+20°	-7°
Geometria do açúcar	C-2' endo	C-3' endo	C-2' endo nas pirimidinas C-3' nas purinas
Conformação da ligação glicosídica	Anti	Anti	Anti nas pirimidinas Syn nas purinas

- Que significa que as purinas estão na posição anti ou sin?
- Qual delas é a mais fina?
- Qual o significado biológico dessas sequencias?
- Elas ocorrem in vivo?

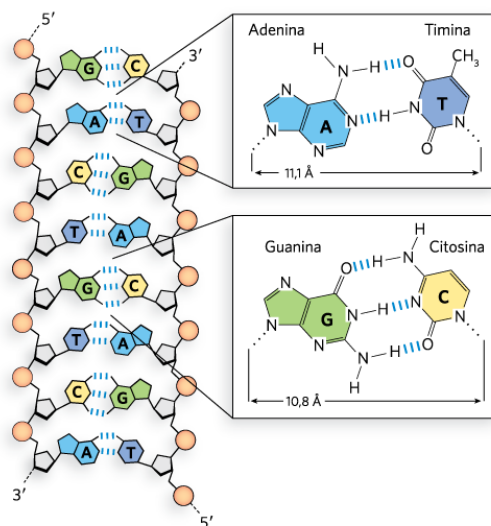
As bases podem girar no nucleotídeo!



Qual delas está no DNA?
No B-DNA é a anti!



Emparelhamento de bases!



1. Quantas pontes de hidrogênio tem em cada par? Qual tem mais força?
2. Como seria o emparelhamento de duas purinas?
3. E duas pirimidinas?

**Observação: Outras estruturas do DNA:
tripla hélice e tetrahélice!
São chamadas estruturas não canônicas.....**

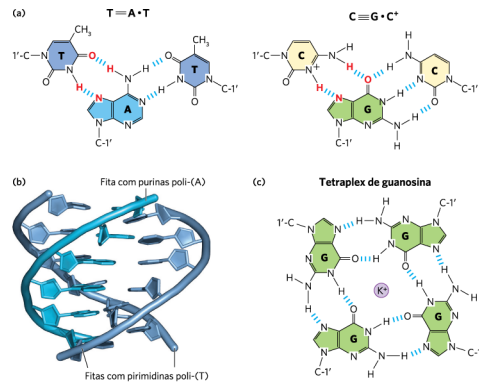
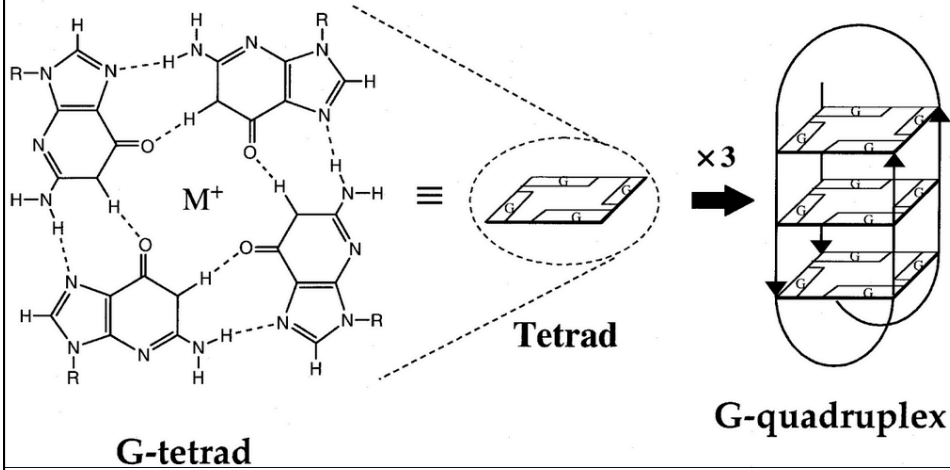


FIGURA 6-21 Estruturas do DNA de três e quatro fitas. (a) O pareamento de bases no triplex de DNA. Os átomos participantes do pareamento de Hoogsteen estão em vermelho; os pareamentos de bases de Watson-Crick tradicionais estão em preto. (b) Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas com poli-(T) e uma com poli-(A). As fitas em azul-claro e azul-escuro, no plano da frente, são antiparalelas

e realizam o pareamento normal de Watson-Crick. A fita poli-(T) no plano de trás é paralela à fita da poli-(A) e está pareada por pontes de hidrogênio de Hoogsteen. (c) Uma camada de estrutura de tetraplex de guanósina. Um íon K^+ no centro do tetraplex estabiliza a estrutura pela coordenação dos grupos funcionais das bases. [Fonte: (b) PDB ID 1BCE.]

**Tetrahélice:
São chamadas estruturas não canônicas.....**



**PERGUNTA CRUEL: Se essas estruturas existem,
Como são processadas na replicação e transcrição???**

E a estrutura do RNA?

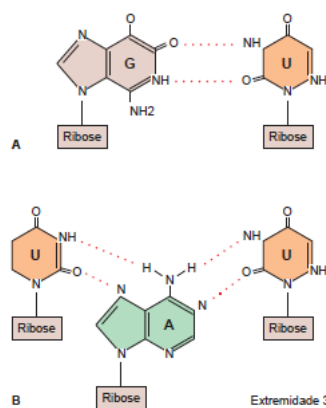
Esta é uma molécula simples fita? O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?

Com é o RNA no plano? E por que?

E a estrutura espacial do RNA, que estrutura assume?

E a estrutura do RNA?

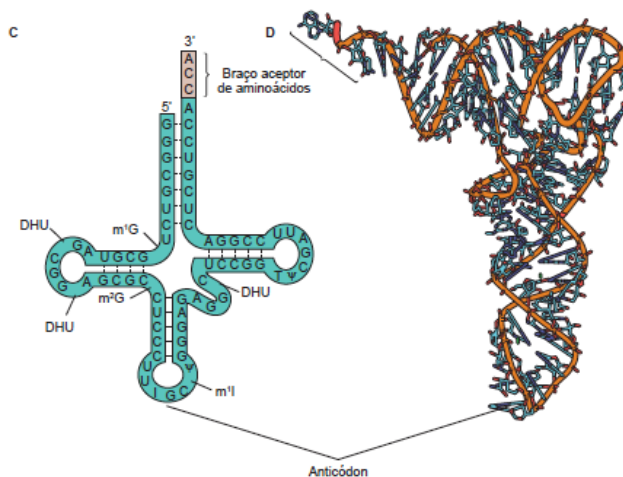
O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?



**Emparelhamento com pontes de hidrogênio alternativos!
Inclusive com 3 bases!**

Figura do "Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas", 2017

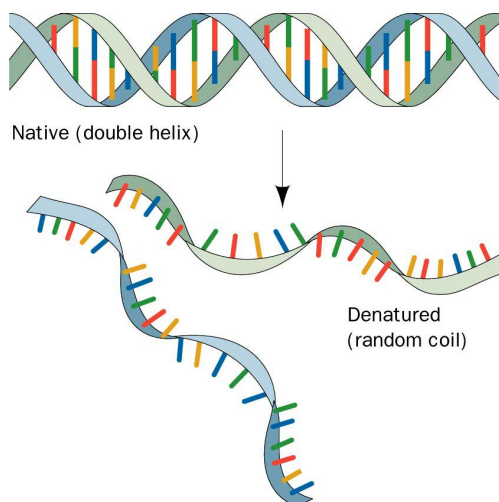
A estrutura do RNA também não é inteiramente simples fita!



Estrutura do t-RNA no plano e espacial!

Figura do "Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas", 2017

Voltando ao DNA: a dupla hélice pode se desnaturar!



Uma sequencia rica em AT desnatura mais rápido ou lento que uma rica em GC..... Por que?

A dupla hélice pode se desnaturar!

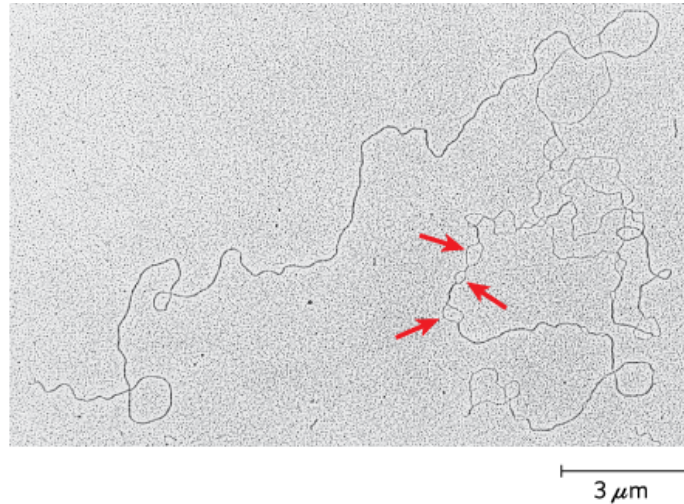
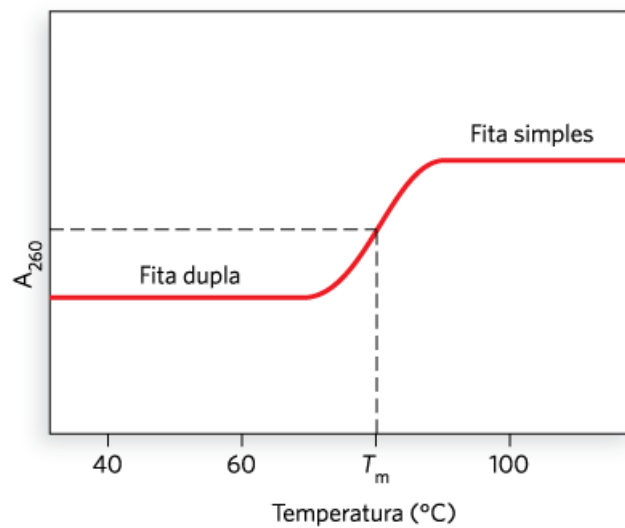


FIGURA 6-29 DNA parcialmente desnaturado. O DNA mostrado nesta micrografia eletrônica foi parcialmente desnaturado e então fixado para impedir a renaturação durante a

A desnaturação provoca um efeito hiper-crômico.... Por que? O que é T_m ?



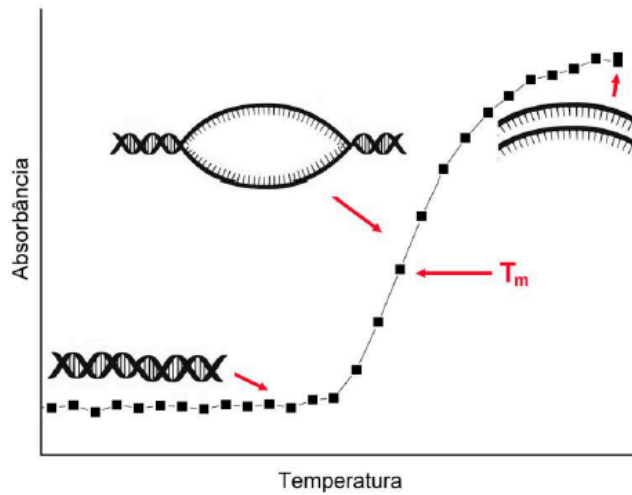
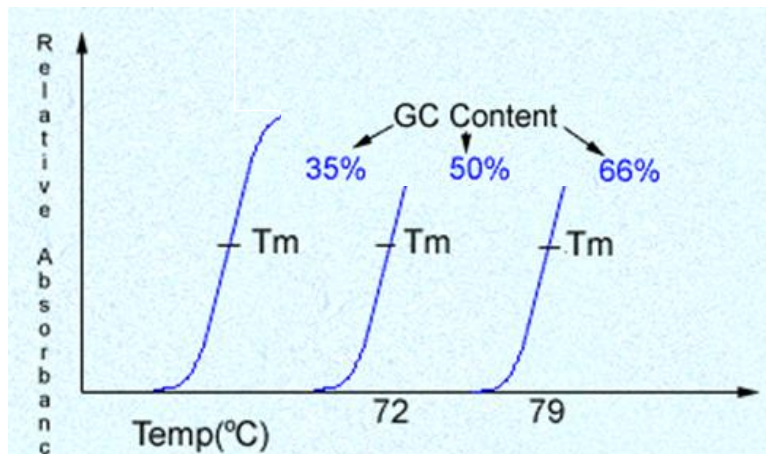


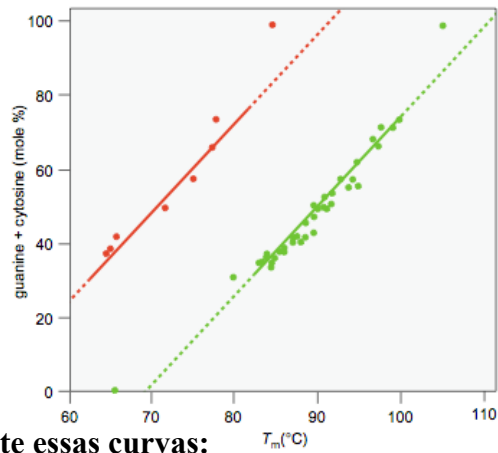
Figura 13. Exemplo de uma curva de desnaturação térmica do DNA

Barra e Neto, 2015, Rev. Virtual de Química

Moléculas de DNA podem ter T_m diferentes.... Por que?



**Mas as mesmas Moléculas de DNA podem ter T_m diferentes....
em condições diferentes...Por que?**

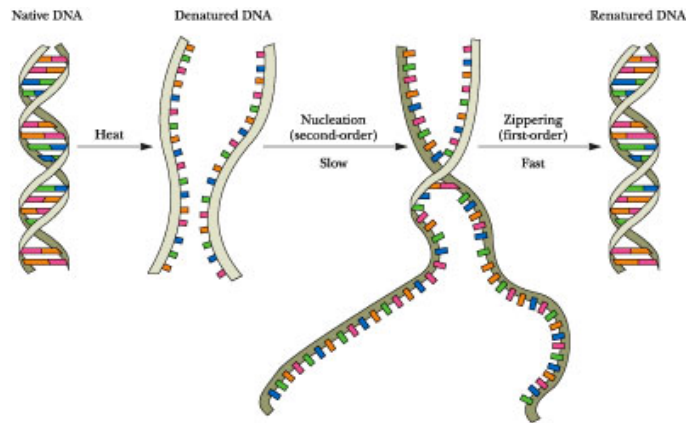


Interprete essas curvas:

**vermelho baixa concentração de sal,
verde, alta concentração de sal.**

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

**Mas podemos renaturar uma molécula de DNA!
 Que condições ela tem que respeitar?
 Que tipo de sequencia pode resultar em renaturação?**



**E podemos medir a velocidade de renaturação, ou
 Reassociação!!!!
 “the Cot value” depende de concentração de DNA e tempo**

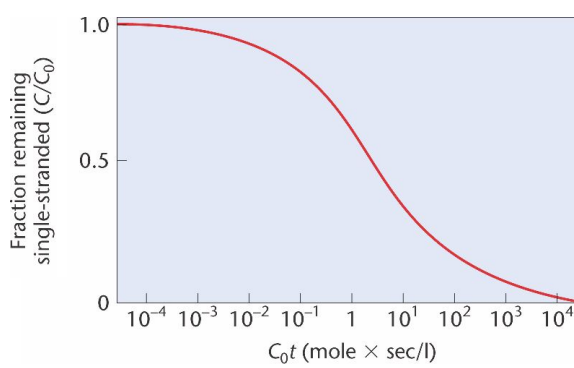
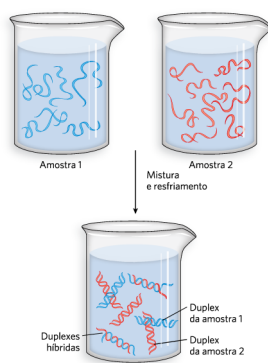
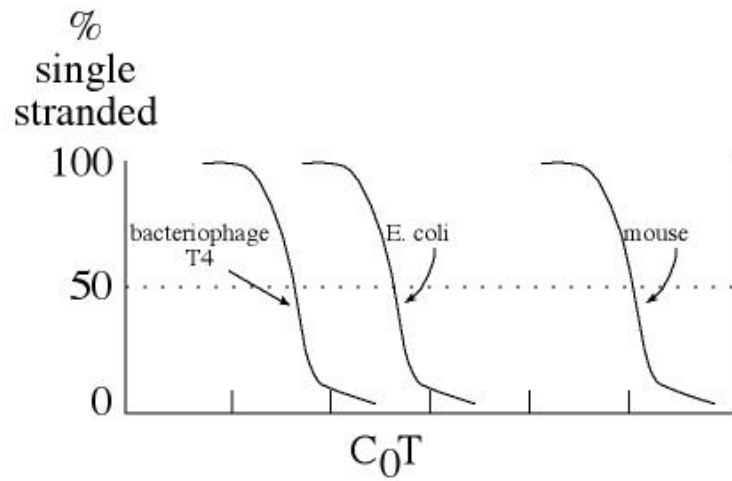


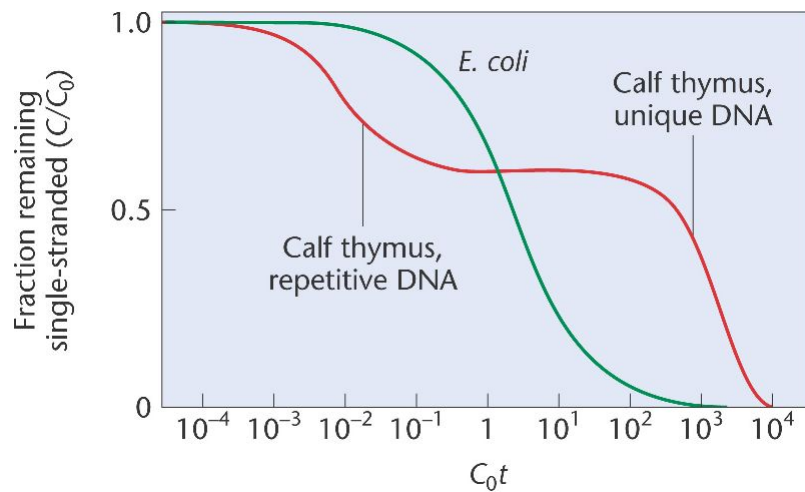
FIGURA 6-30 Hibridização de DNA interespecíficas. Duas amostras de DNA podem ser comparadas pelo aquecimento, para desnaturar as fitas, seguidas pelo resfriamento da mistura, para permitir a formação de duplex entre as fitas complementares. Quanto maior a semelhança entre as duas amostras, maior o número de duplex híbridas formadas, nas quais uma fita deriva da primeira espécie e a outra fita deriva da segunda.

**A curva de reassociação é diferente para diferentes genomas!
(mesma concentração inicial do DNA)**

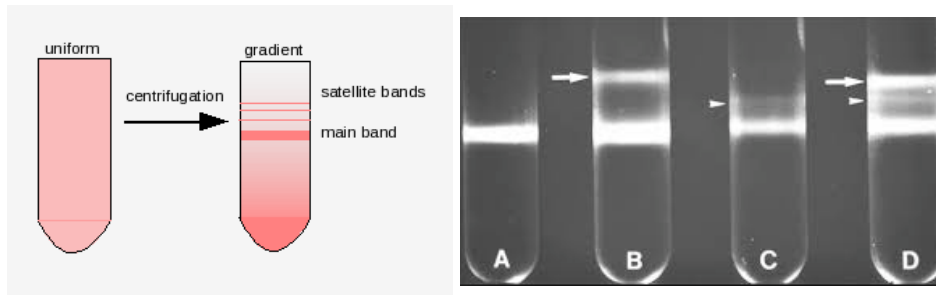
Por que?



**O DNA de mamíferos (incluindo humano) tem curva
de reassociação em duas (ou mais) fases!!! Por que?**

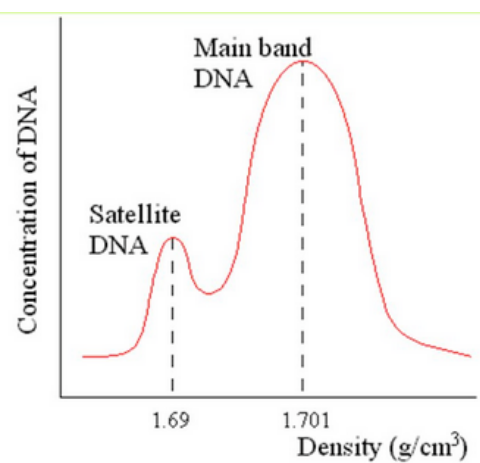


**Esse DNA repetitivo também é chamado DNA satélite
pois pode apresentar densidade diferente do genoma,
E pode ser separado em gradiente de cloreto de césio (CsCl)!**



Esse é um exemplo. DNAs ricos em AT tem densidade menor!

Por que?



Desnaturação e hibridação podem ajudar em várias estratégias de Biologia Molecular

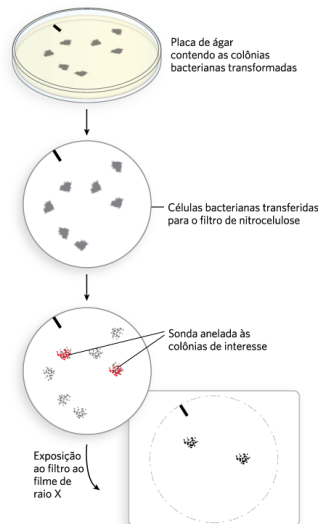
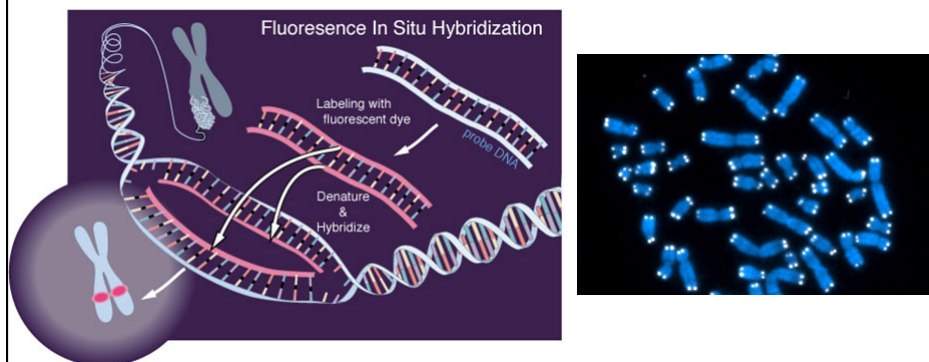
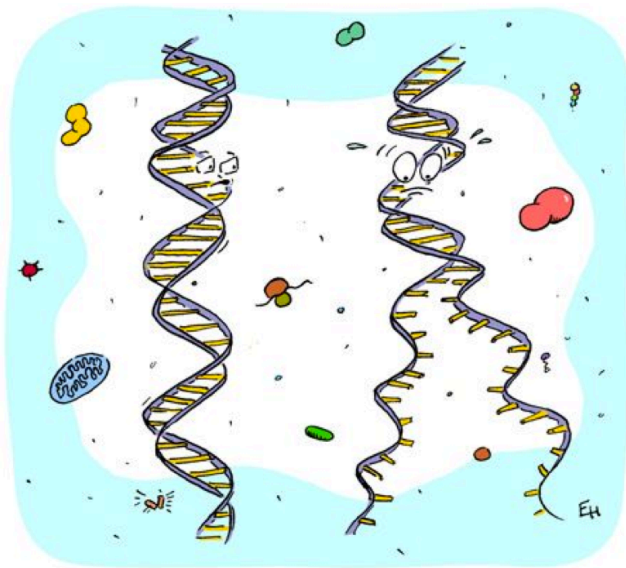


FIGURA 6-31 Hibridização em colônia. Veja o texto para detalhes.

FISH: localizando, in situ, sequencias específicas!!!

Exemplo: telômeros.....





Psst, Bob...you're unzipped.