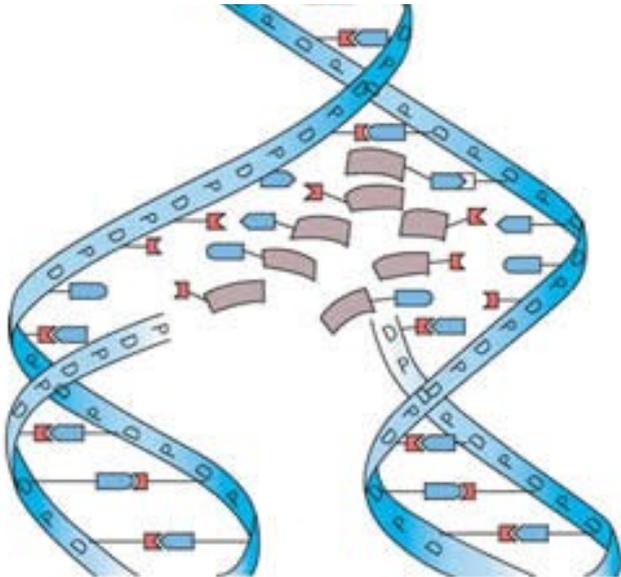


ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E REPLICAÇÃO DO DNA

Aula teórica 4

LGN0114 - Biologia Celular



Leandro F. de Souza
Departamento de Genética
leandro_fonseca@usp.br

FUNÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

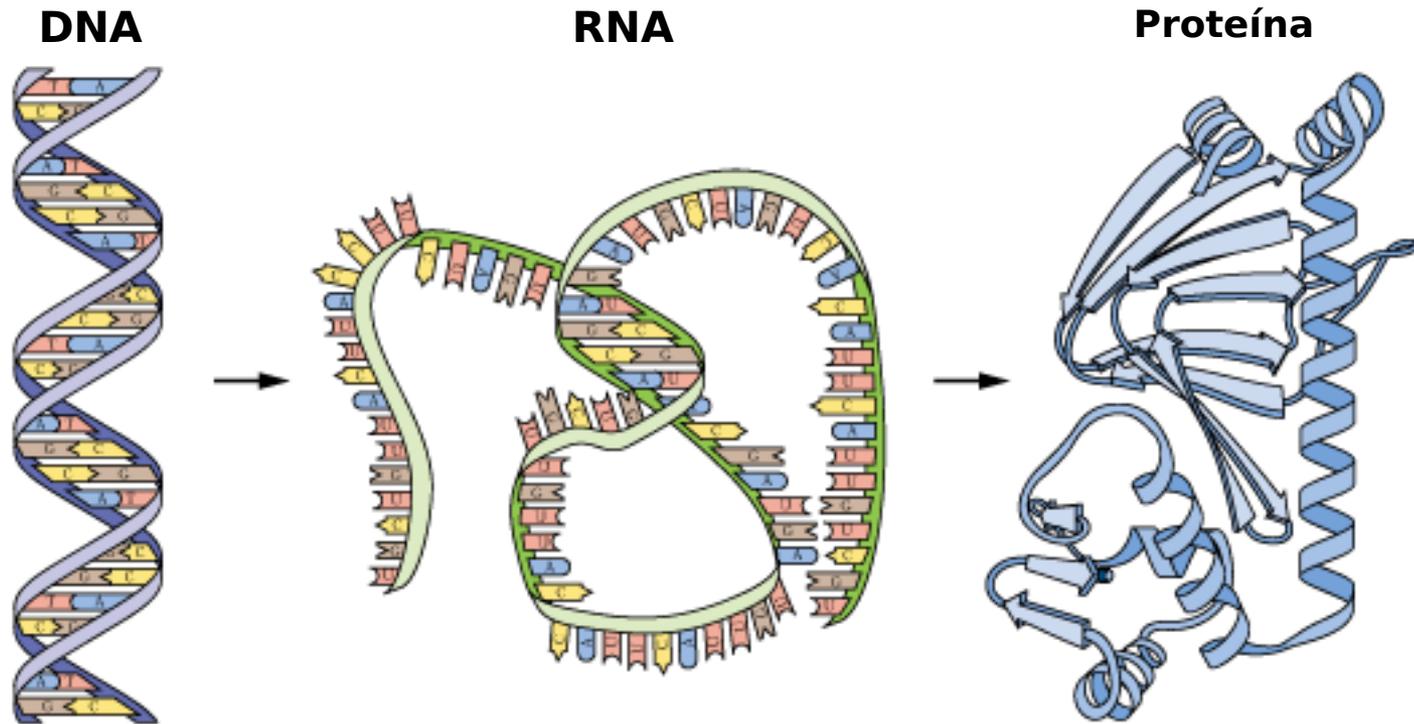
1. Função genotípica: replicação

2. Função fenotípica: expressão gênica

3. Função evolutiva: variabilidade
(mutações, transferência horizontal de genes)

DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA MOLECULAR

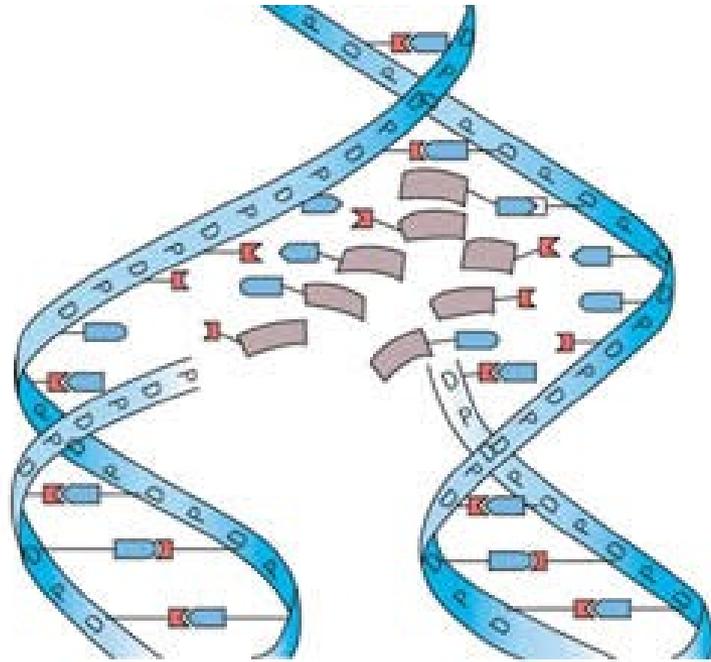
A **informação** genética, armazenada nos cromossomos, é transferida às células filhas através da **replicação do DNA**, sendo expressa através da **transcrição em mRNA** e **traduzida** subsequentemente em cadeias polipeptídicas.



ÁCIDOS NUCLEICOS

- **DNA:** Armazenamento da informação genética
 - Estabilidade
- **RNA:** síntese de macromoléculas - várias funções
 - **RNA ribossomal (rRNA)** - componentes estruturais de ribossomos
 - **RNA mensageiro (mRNA)** - contém a informação genética para a sequência de aminoácidos das proteínas
 - **RNA transportador (tRNA)** - identifica e transporta os aminoácidos até o ribossomo
 - snRNA, microRNA, etc.

A MOLÉCULA DE DNA

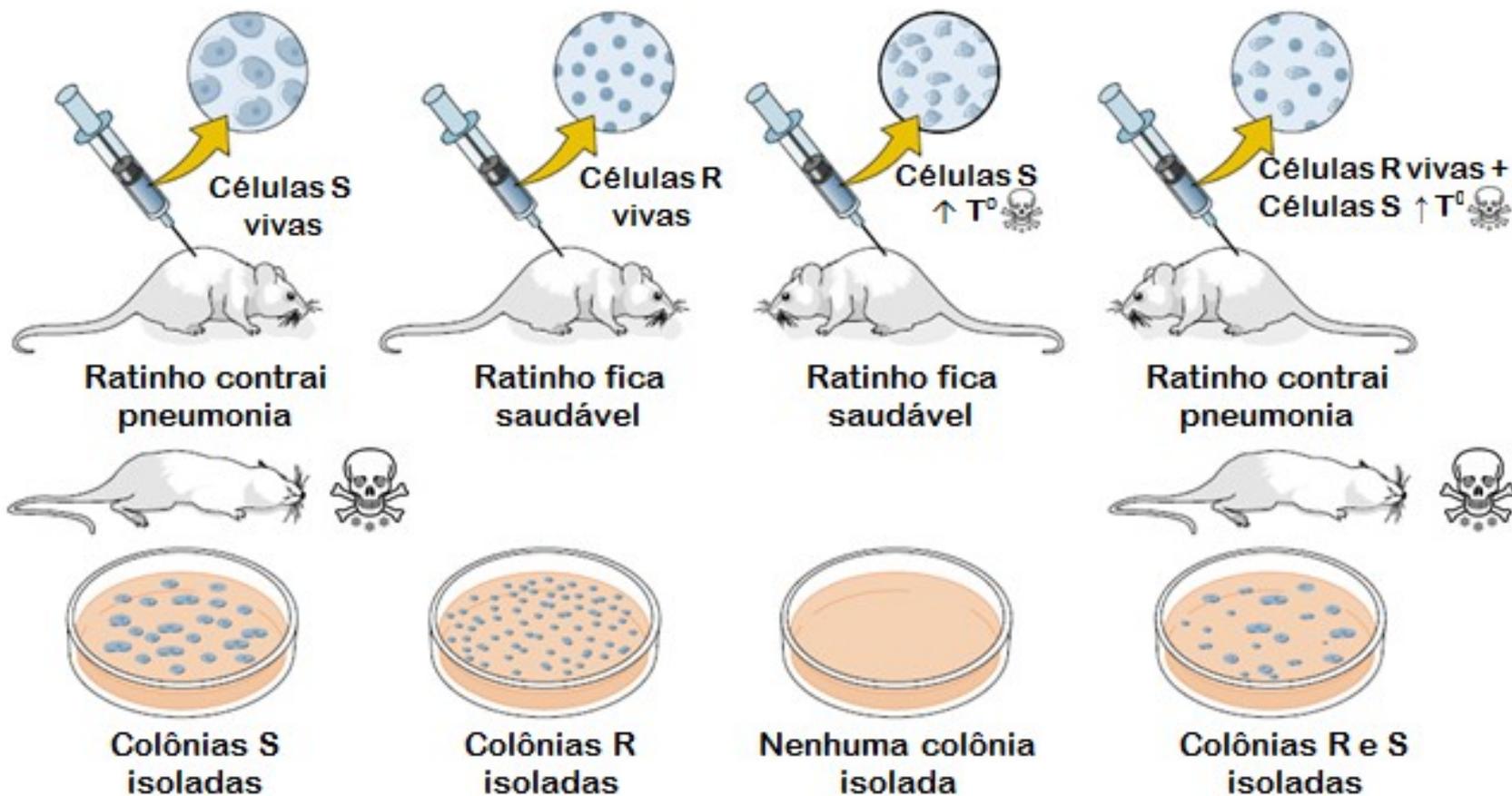
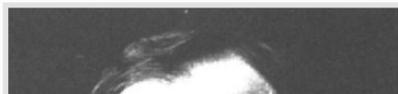


1928 - Frederick Griffith

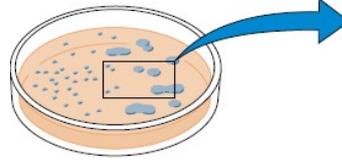


- Britânico
- Bacteriologista
- Pesquisava uma vacina contra *Streptococcus pneumoniae*

1928 - Frederick Griffith



**1928 - Frederick
Griffith**



**Material genético das
bactérias virulentas (mortas)
foi responsável pela
transformação das bactérias
não virulentas (vivas)**

**QUAL É O PRINCÍPIO
TRANSFORMANTE?
PROTEÍNAS?**

STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE
INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES

INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION
ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III

By OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MacLEOD, M.D., AND
MACLYN McCARTY,* M.D.

(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)

PLATE 1

(Received for publication, November 1, 1943)

TABLE II

The Inactivation of Transforming Principle by Crude Enzyme Preparations

Crude enzyme preparations	Enzymatic activity			Inactivation of transforming principle
	Phosphatase	Tributyryl esterase	Depolymerase for desoxyribonucleate	
Dog intestinal mucosa.....	+	+	+	+
Rabbit bone phosphatase.....	+	+	-	-
Swine kidney ".....	+	-	-	-
Pneumococcus autolysates.....	-	+	+	+
Normal dog and rabbit serum.....	+	+	+	+

Conclusão...

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK

1865



SBQ

<http://qnint.s bq.org.br>

(A) Gregor Mendel e seu jardim no monastério, onde realizou os experimentos de **cruzamento com plantas de ervilhas**, os quais levaram-no a desenvolver suas teorias da hereditariedade. (B) Hugo De Vries; em 1900, ele e seus colaboradores redescobriram os trabalhos de Mendel e formularam as leis da hereditariedade.

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK



SBQ



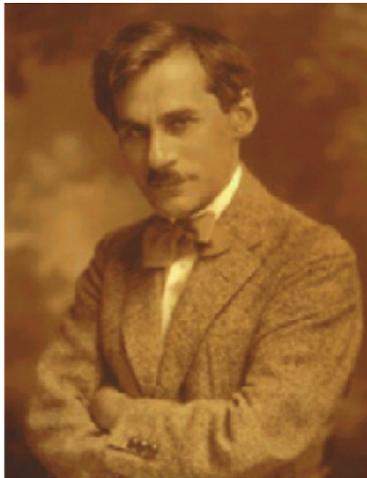
<http://qnint.sbq.org.br>

1868

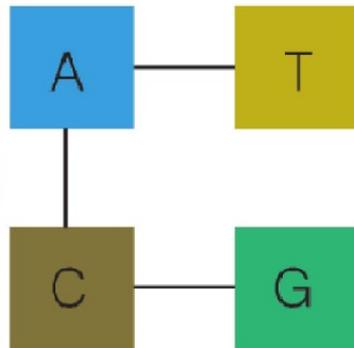
Primeiros estudos de DNA em células de leucócitos de bandagens cirúrgicas.

Substância contendo fósforo:
Nucleína

Friedrick Miescher_



SBQ



<http://qnint.sbq.org.br>

1910

Composição química da nucleína.
Hipótese do tetranucleotídeo

Phoebius A. Levene_

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK



Erwin Chargaff

1950

- Judeu, migrou para EUA durante II Guerra Mundial
- Análise da composição em bases nitrogenadas do DNA de diversas espécies.

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK



1950

Quadro 11.1 Propriedades Molares das Bases* em DNAs de Várias Fontes

Organismo	Tecido	Adenina	Timina	Guanina	Citosina	$\frac{A + T}{G + C}$
<i>Escherichia coli</i> (K12)	—	26,0	23,9	24,9	25,2	1,00
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	29,8	31,6	20,5	18,0	1,59
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—	15,1	14,6	34,9	35,4	0,42
Levedura	—	31,3	32,9	18,7	17,1	1,79
<i>Paracentrotus lividus</i> (ouriço-do-mar)	Espermatozóides	32,8	32,1	17,7	18,4	1,85
Arenque	Espermatozóides	27,8	27,5	22,2	22,6	1,23
Rato	Medula óssea	28,6	28,4	21,4	21,5	1,33
Humanos	Timo	30,9	29,4	19,9	19,8	1,52
Humanos	Fígado	30,3	30,3	19,5	19,9	1,53
Humanos	Espermatozóides	30,7	31,2	19,3	18,8	1,62

* Definidas como moles de constituintes nitrogenados por 100 g de átomos de fosfato no hidrolisado.
 FONTE: E. Chargaff e J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK



Erwin Chargaff



1950

- Judeu, migrou para EUA durante II Guerra Mundial
- Análise da composição em bases nitrogenadas do DNA de diversas espécies.

Regras de Chargaff

✓ quantidade relativa de um dado nucleotídeo pode ser diferente entre as espécies, mas sempre **A = T** e **G = C**.

✓ razão 1:1 entre bases púricas e pirimídicas em todos os organismos estudados - **A + G = T + C**.

✓ quantidade relativa de cada par AT ou GC pode variar bastante de organismo para organismo - razão **A+T/G+C** é característica da espécie analisada.

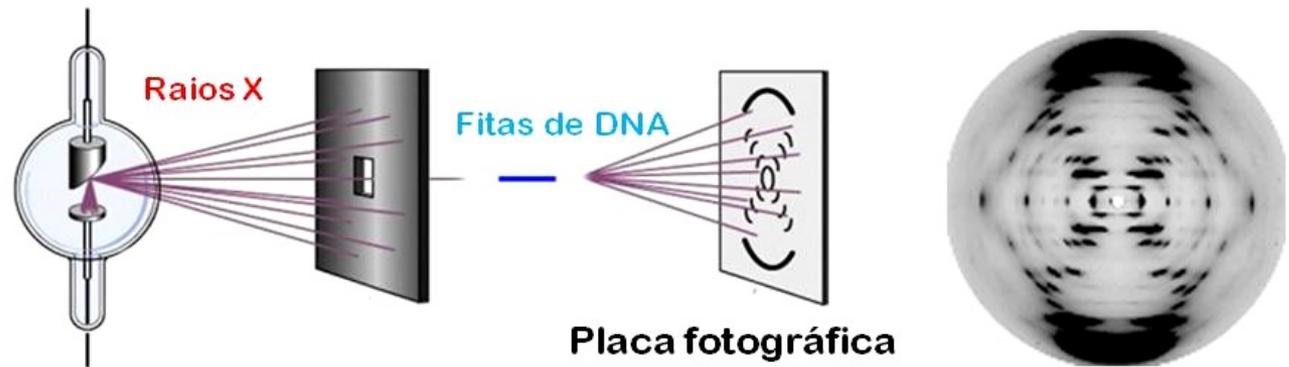
A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK



Rosalind
Franklin

1951- 1953 - Esforços para obter fibras de DNA altamente orientadas para estudos de cristalografia de raio - X (King's College, Londres).

1953 - Franklin obteve uma excelente fotografia de difração de raio-X.



Maurice Wilkins

Molécula helicoidal.

Purinas e Pirimidinas separadas por 0,34 nm.

Grupos fosfatos externos ao eixo.

Hélice constituída por duas fitas.

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK

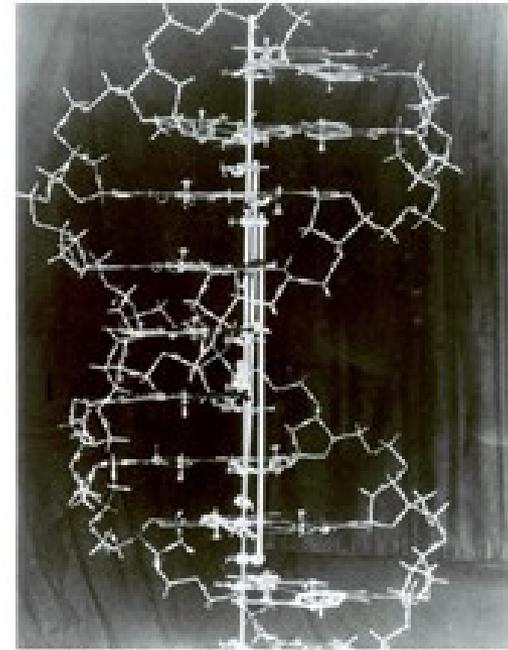


Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives. Noncommercial, educational use only.

James Watson e Francis Crick

1953 - Modelo da molécula de DNA

(A partir dos dados de difração de raio-X de Rosalind Franklin e das regras de Chargaff).



Estrutura em dupla hélice do DNA

A DESCOBERTA DA ESTRUTURA DO DNA: DE MENDEL A WATSON & CRICK

1962 - Prêmio Nobel: Watson, Crick e Wilkins

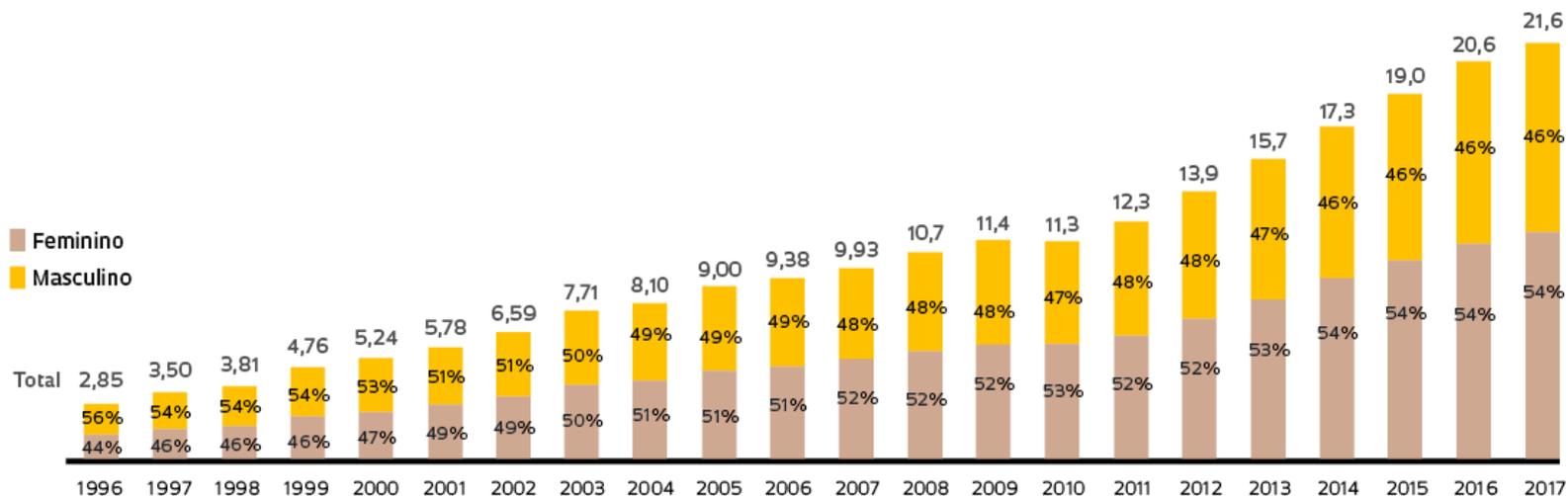


Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives and Sverre K. Pina Photo, Stockholm, Sweden.
Noncommercial, educational use only.

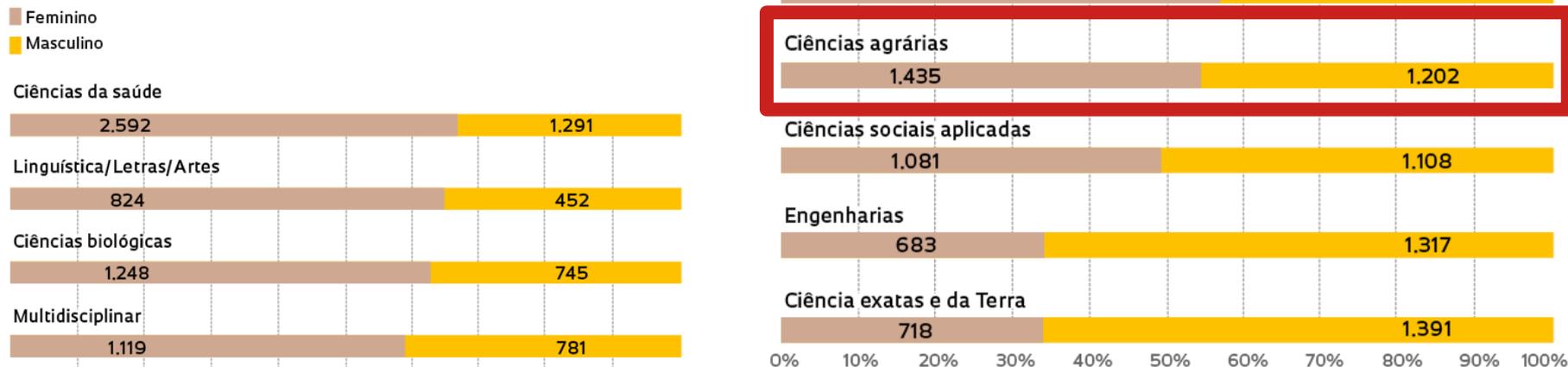
1958 - Rosalind Franklin falece
de câncer de ovário.

As regras não permitem
entregar um prêmio Nobel
pós-morte

Títulos de doutorado por sexo do titulado – Brasil 1996-2017 (em milhares e porcentagem) ▲



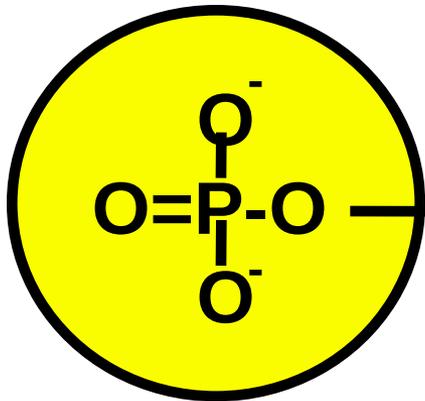
Títulos de doutorado por grande área e sexo do titulado (número e participação) – 2017 ▲



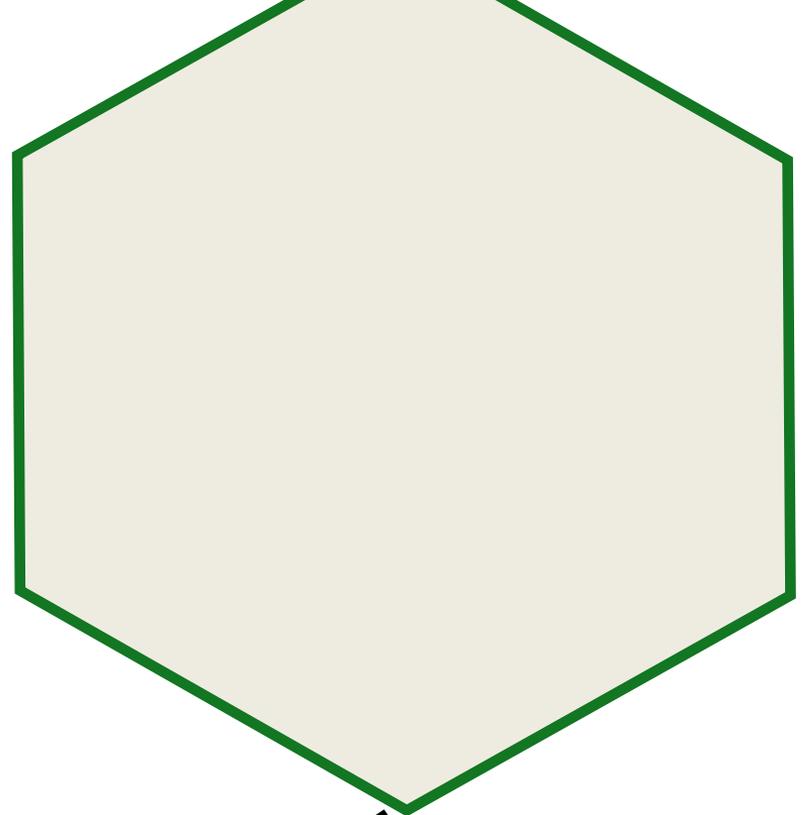
ÁCIDOS NUCLEICOS

São polímeros de nucleotídeos

Grupo fosfato



⁵CH₂



N

Base nitrogenada
(A, G, C, or T)

C⁴

C¹

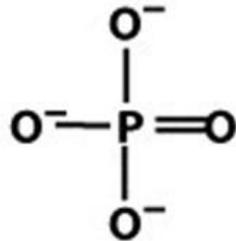
Pentose

C³

C²

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

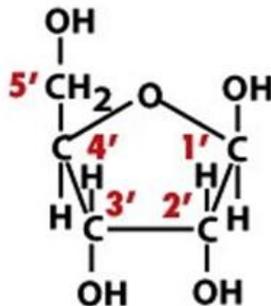
(1)
Um
grupamento
fosfato:



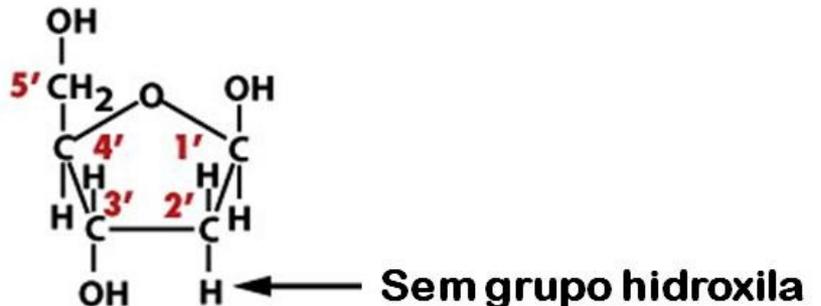
Carbono 5

(2)
pentoses
(açúcares
de 5
carbonos)

(a) RNA:
Ribose



(b) DNA:
2-Desoxirribose

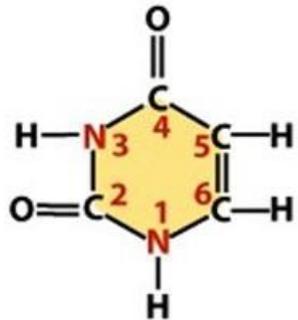


Carbono 2

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

(3)
Uma base
cíclica
contendo
Nitrogênio

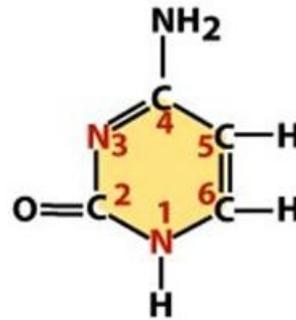
(a) RNA



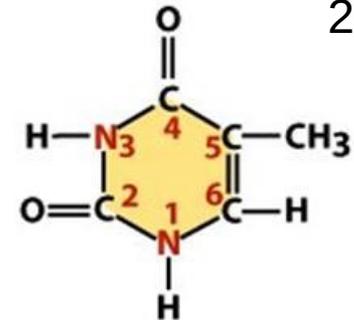
Uracila

214 °C

(b) DNA e RNA (c) DNA

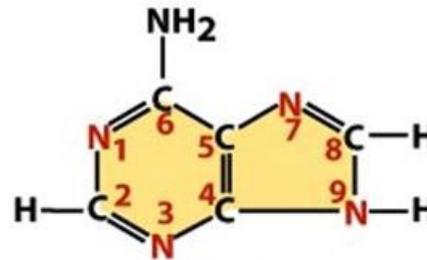


Citosina

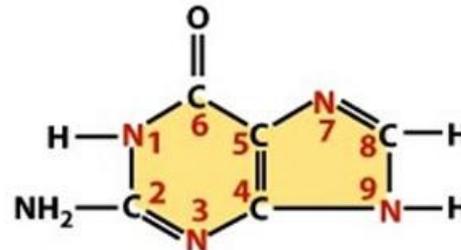


Timina

20-22 °C



Adenina



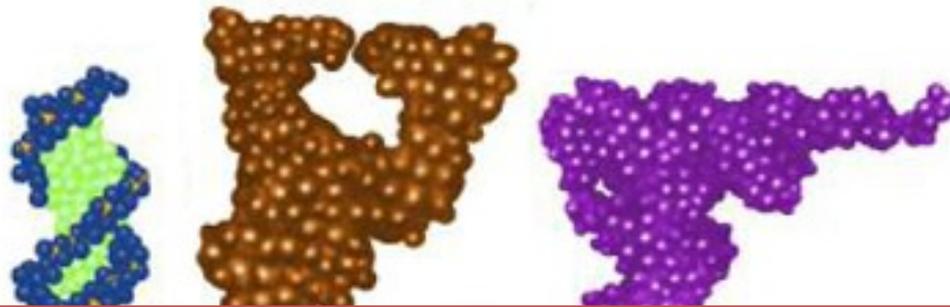
Guanina

Purinas: A, G
Pirimidinas: U, T, C

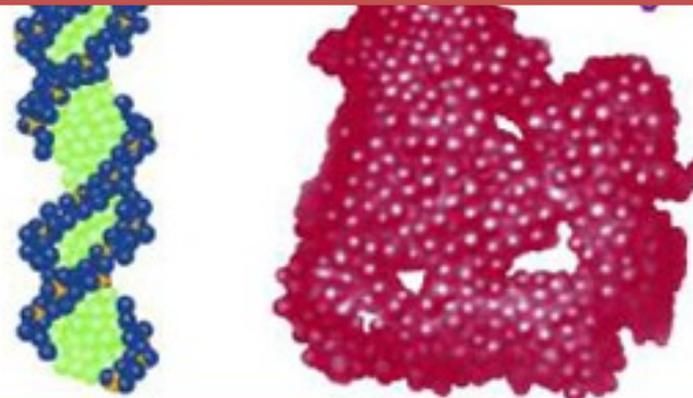
DNA E RNA - MOLÉCULAS DE INFORMAÇÃO

DNA - Descoberto pelo bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher (1869);

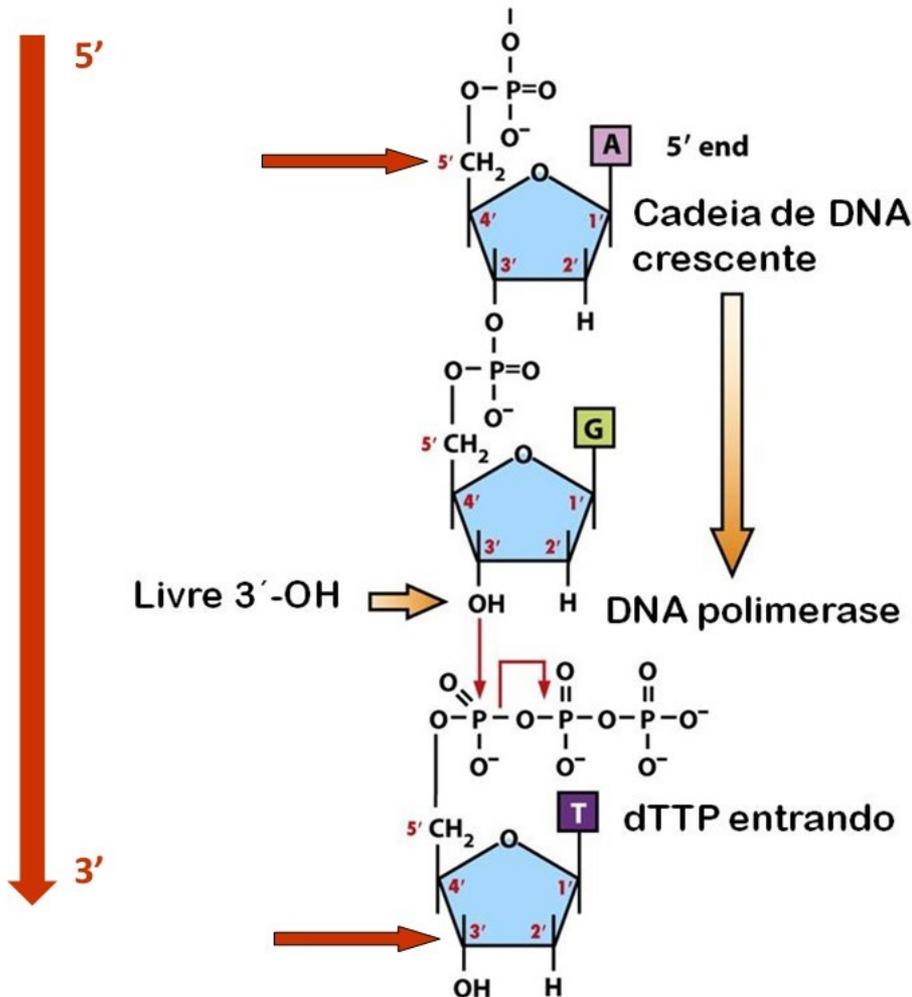
RNA - Descoberto em levedura (1890).



Diferenças estruturais



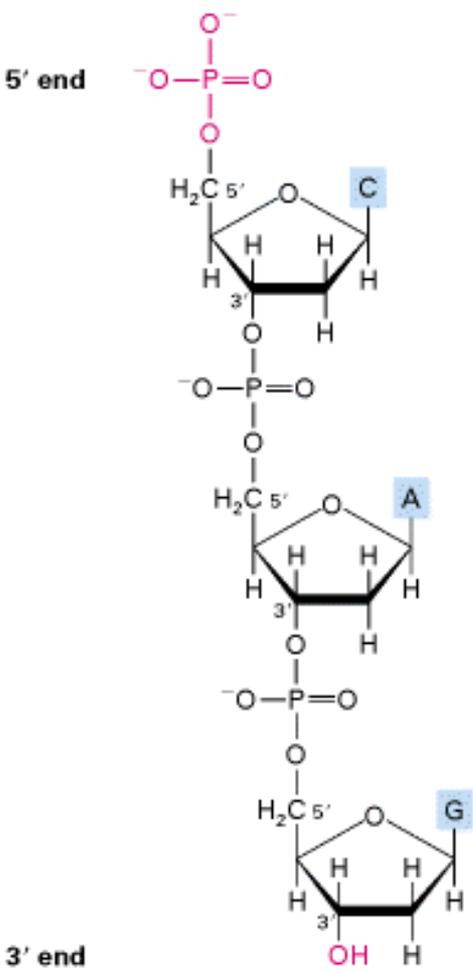
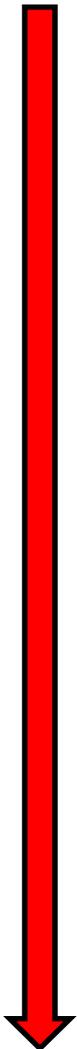
ÁCIDOS NUCLEÍCOS SÃO FORMADOS POR LIGAÇÕES FOSFODIÉSTER



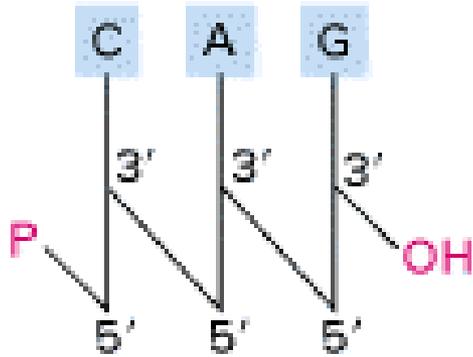
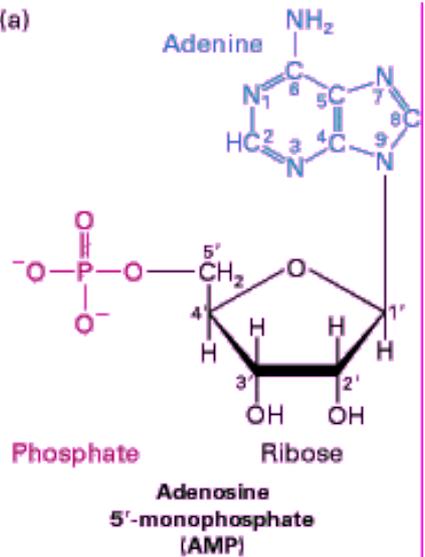
Todo nucleotídeo livre está na forma de tri-fosfato!!

Ligações fosfodiéster - polarização 5' - 3'

(a)



**Adenosina trifosfato!!!
SIM ATP!!!!**



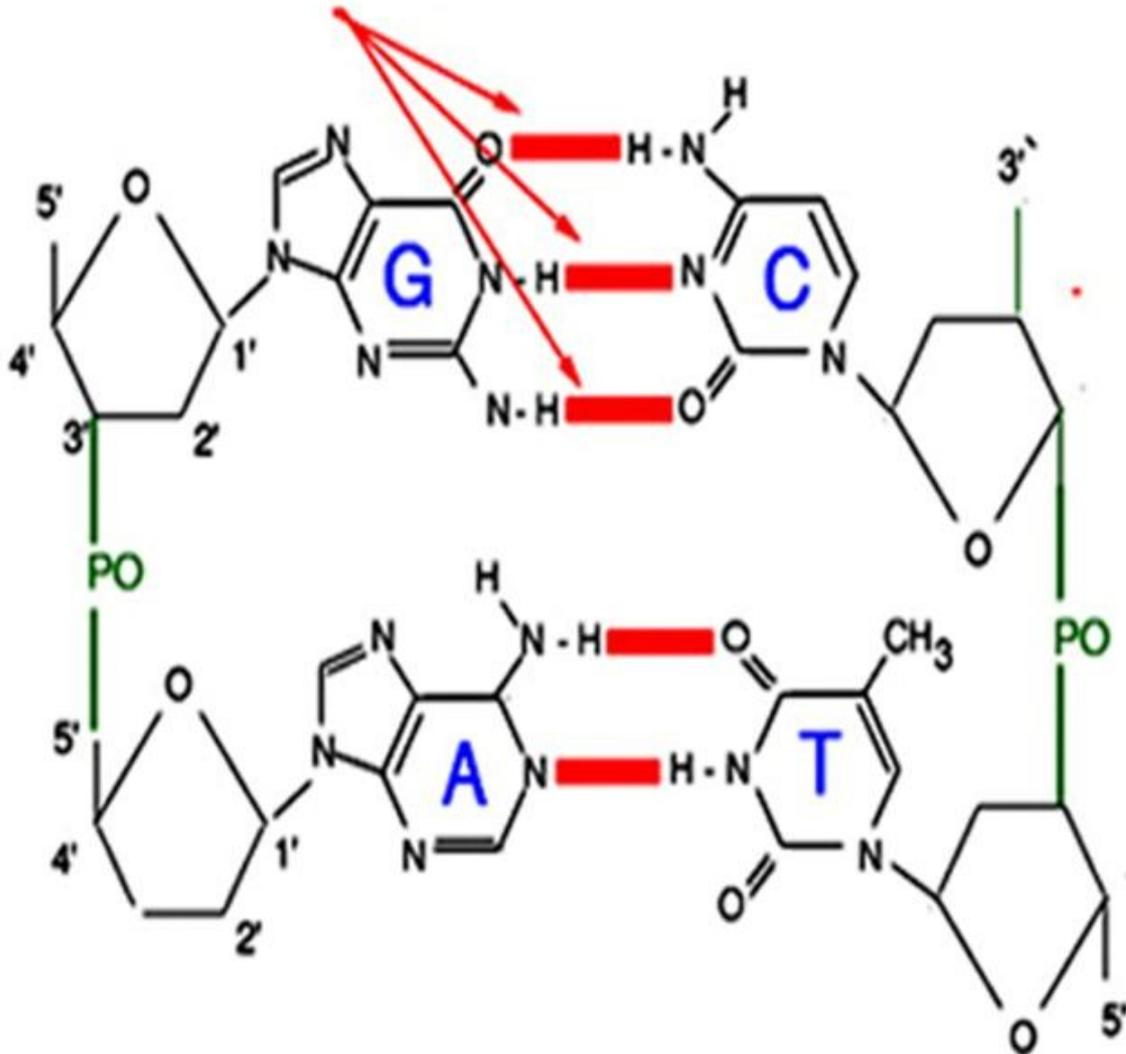
5' C-A-G 3'



- entre o carbono 3' do nucleotídeo de "cima" e o carbono 5' do nucleotídeo de "baixo".

DNA - FITA DUPLA!

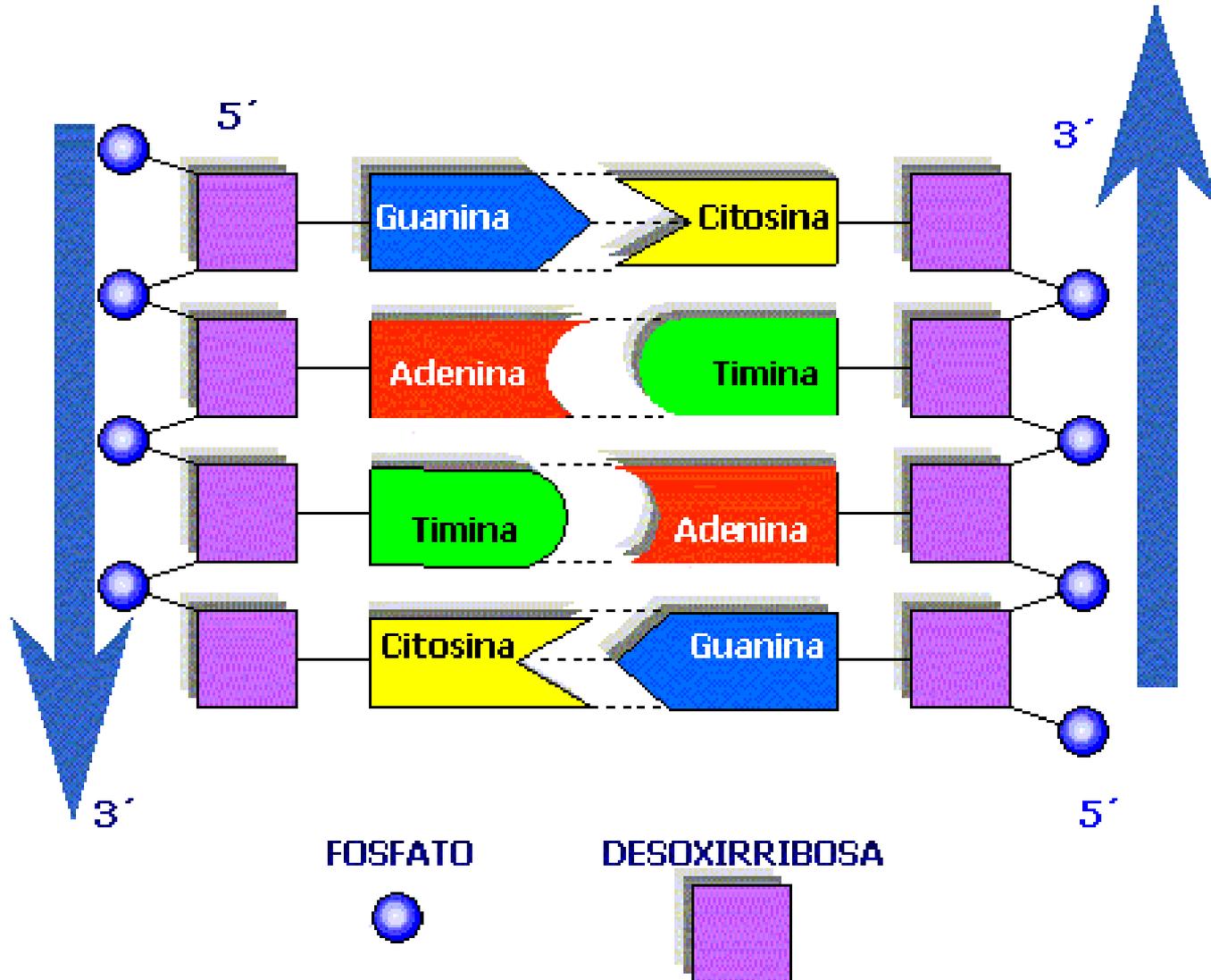
Pontes de hidrogênio



★ Entre o **carbono 3'** (grupo OH-) do nucleotídeo de "cima" e o **carbono 5'** (grupo fosfato) do nucleotídeo de "baixo".

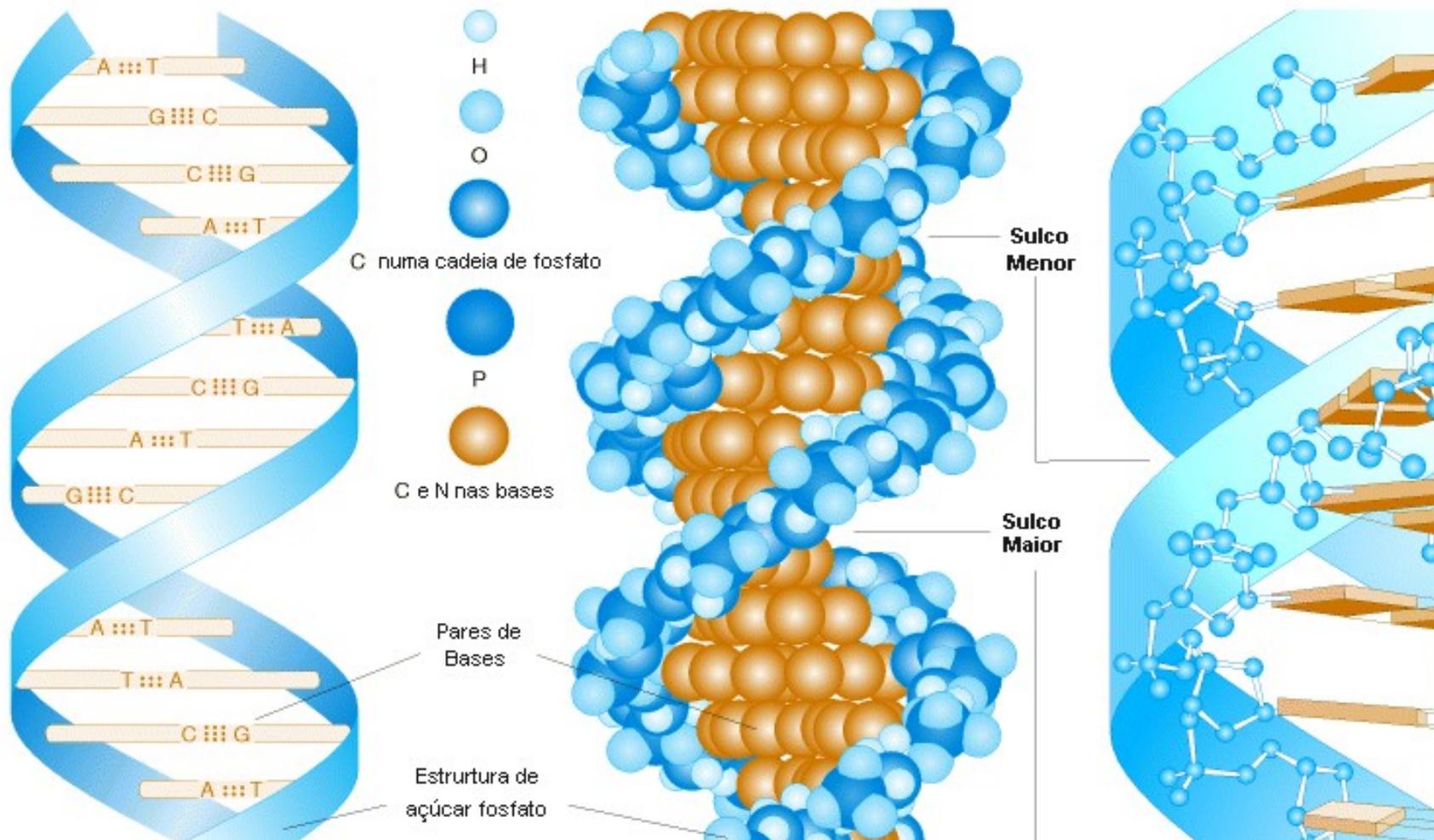
Ligações fosfodiéster 3' - 5'

DNA - FITA DUPLA!



CARACTERÍSTICAS DA DUPLA HÉLICE

- ✓ Contém duas fitas de polinucleotídeos (“corrimão”) antiparalelas;
- ✓ O esqueleto de cada fita é formado por desoxirribose e fosfato;
- ✓ O grupo fosfato ligado ao carbono 5’ de uma desoxirribose se liga **covalentemente** ao terminal hidroxila do carbono 3’ da próxima unidade;
- ✓ As purinas e pirimidinas estão voltadas para dentro da hélice;
- ✓ Cada base forma uma **ligação de H** com uma base oposta a ela, formando um par de bases;
- ✓ 3,4 Å separam os planos (“degraus”), aos quais bases adjacentes estão localizadas;
- ✓ A dupla hélice faz uma volta completa com 10 nucleotídeos (34 Å);
- ✓ Existem em média 25 ligações de H dentro de cada volta completa da hélice, promovendo uma estabilidade de ligação tão forte como uma ligação covalente;
- ✓ O diâmetro da hélice é cerca de 20 Å;



Biochemistry tutorials

Dr. Daniel Fried

DNA's major and minor grooves



https://www.youtube.com/watch?v=QD1TjeszTHQ&ab_channel=DanielFried

PRINCIPAIS TIPOS DE RNA

RNAs ocorrem no núcleo e citoplasma

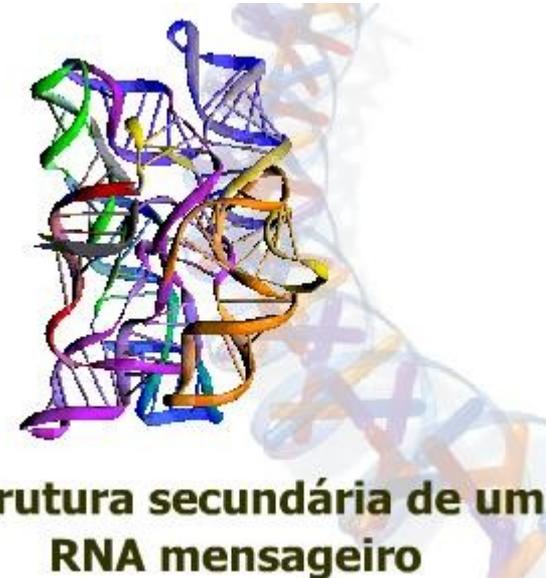
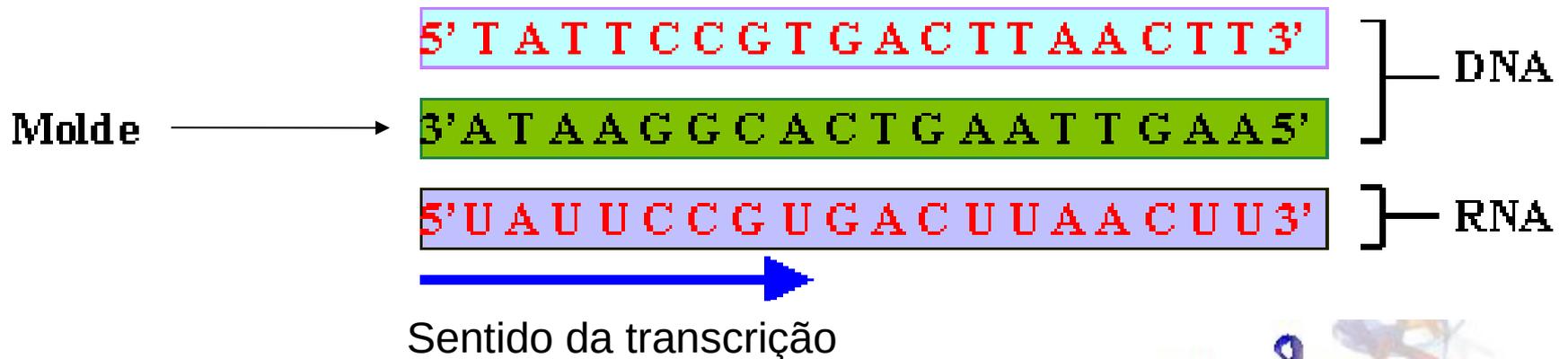
RNA mensageiro (mRNA): contém a informação genética para a sequência de aminoácidos das proteínas

RNA transportador (tRNA): identifica e transporta os aminoácidos até o ribossomo

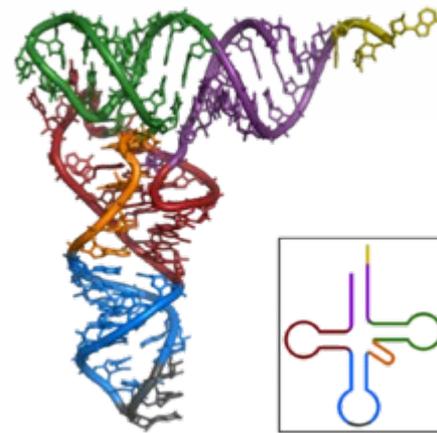
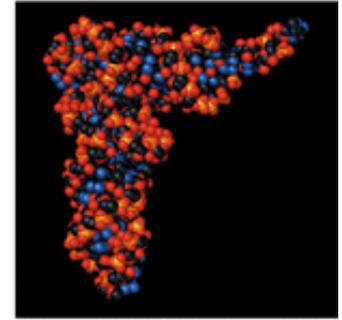
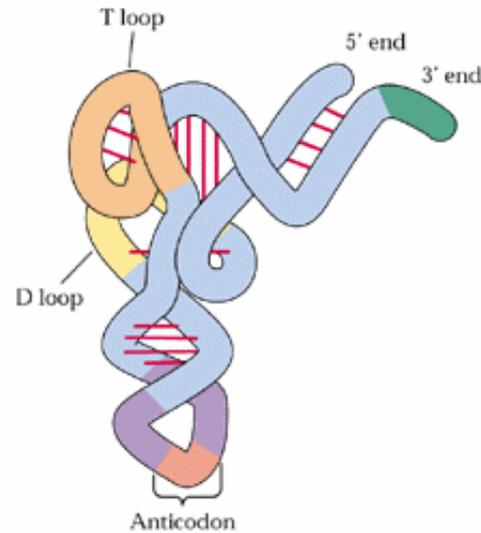
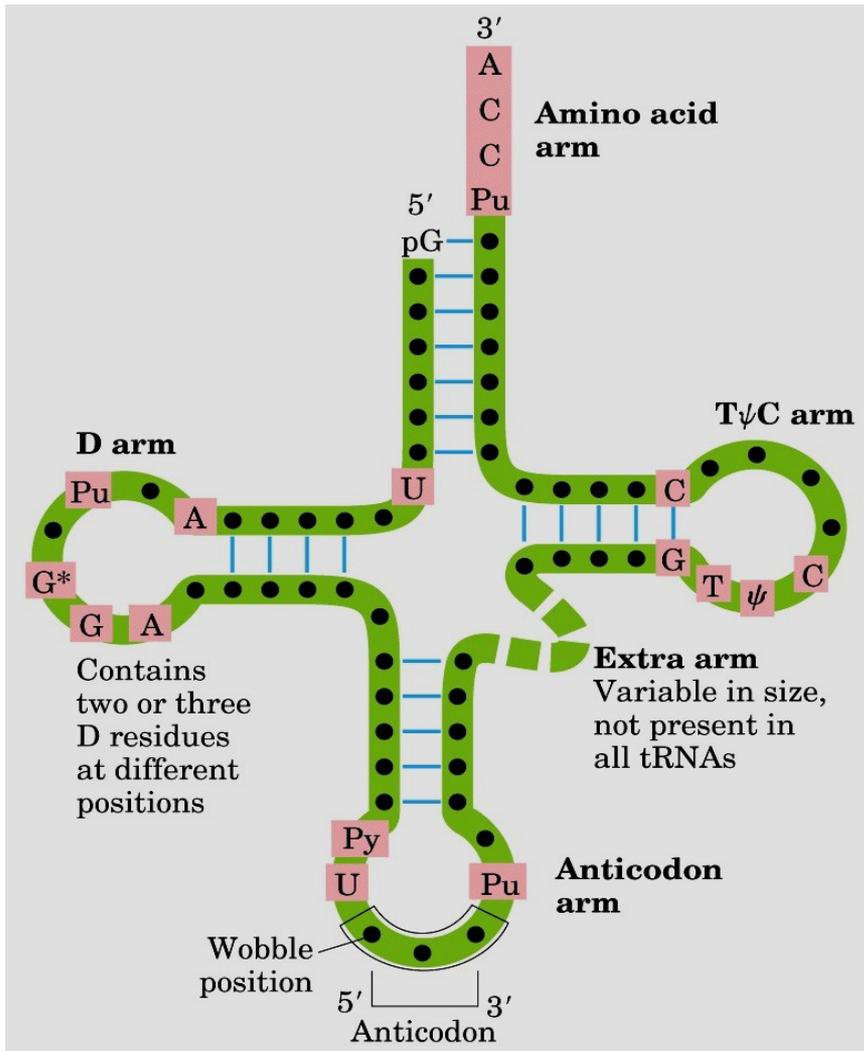
RNA ribossômico (rRNA): constituinte dos ribossomos

RNA mensageiro - mRNA

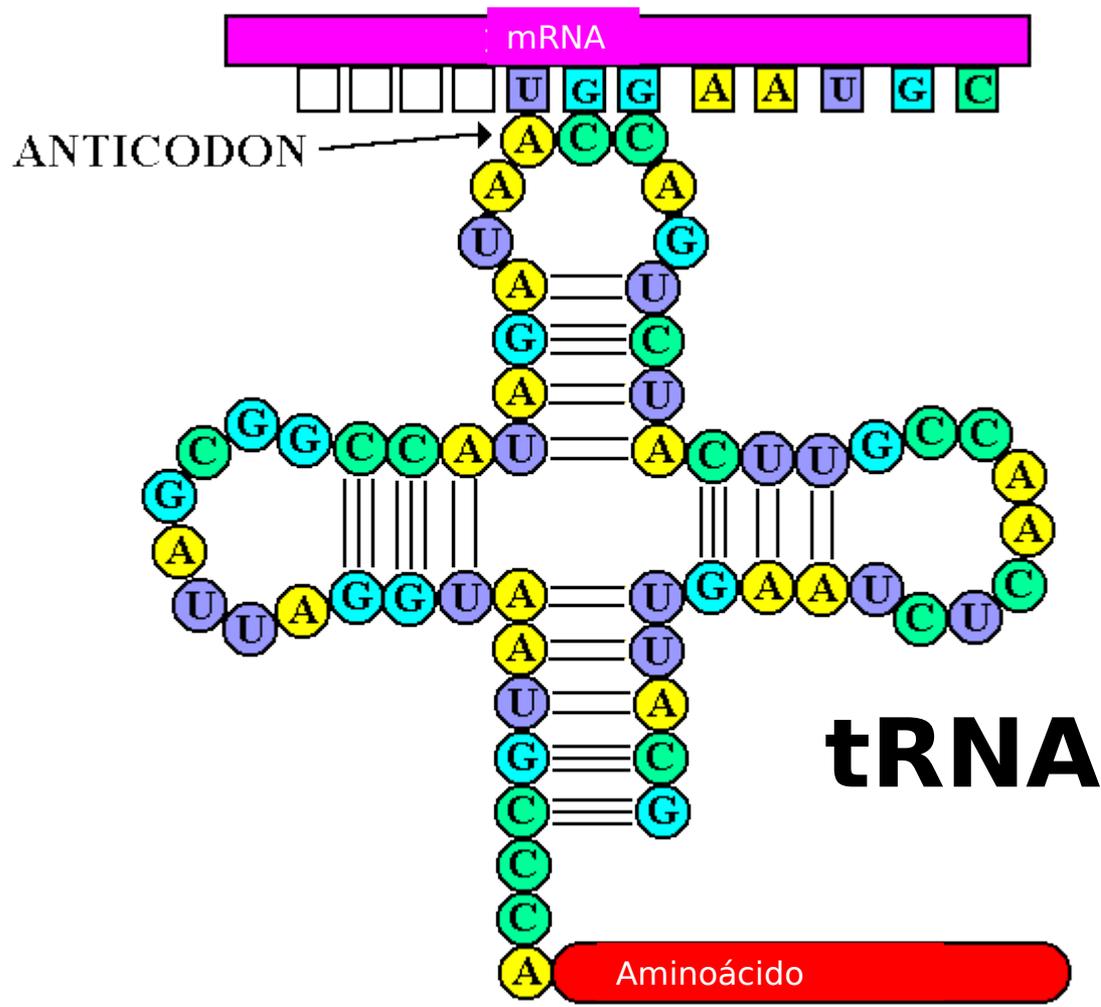
1 trinca de bases nitrogenadas = 1 códon



RNA transportador - tRNA

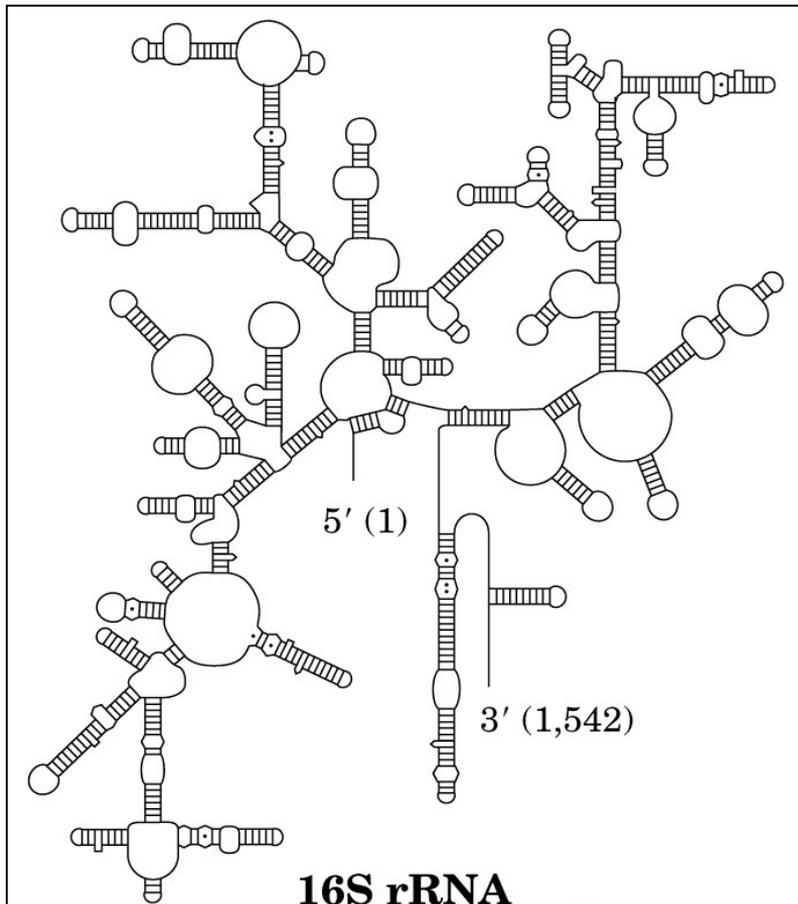


Reconhece códons em mRNA - anticódon



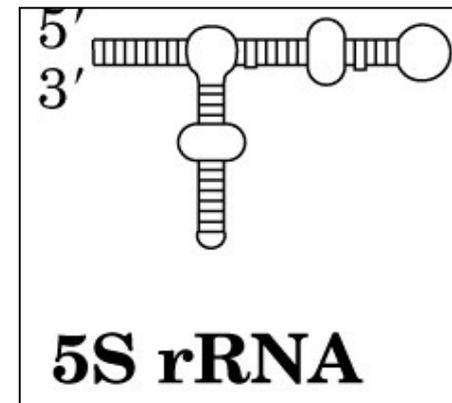
RNA ribossômico - rRNA

Possuem estrutura tridimensional específica visando promover a estabilidade e atividade catalítico nos ribossomos.

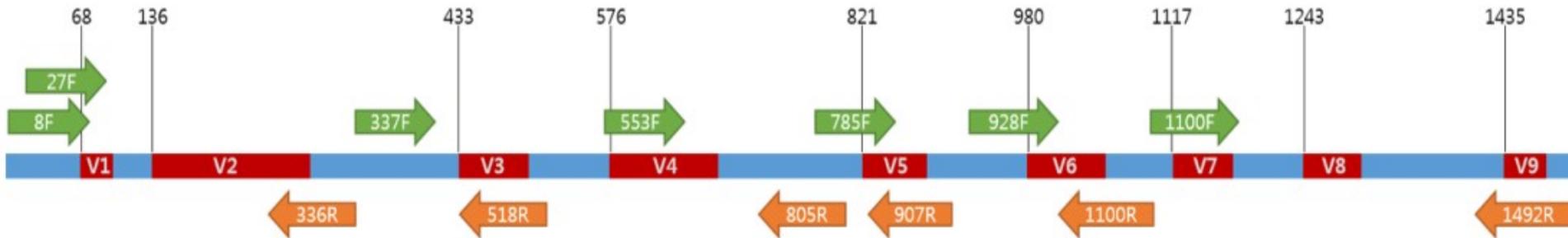


Exemplos de rRNAs:

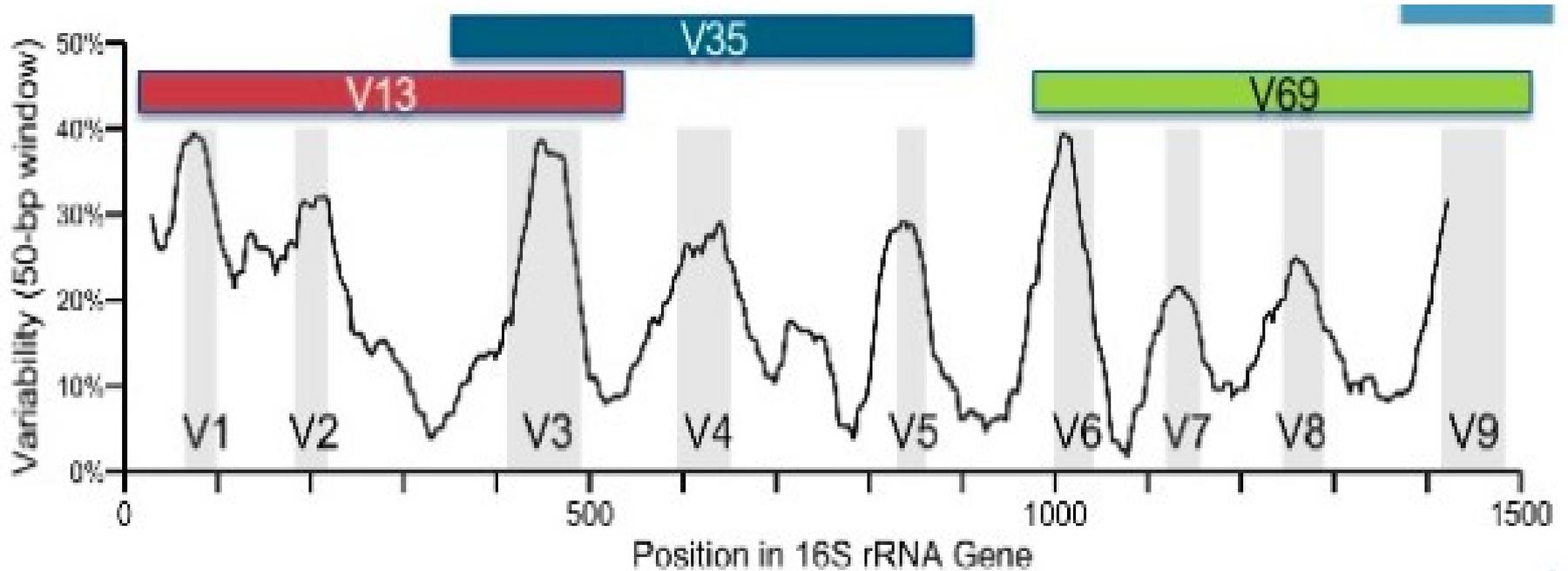
- Estrutura secundária com grampos e alças



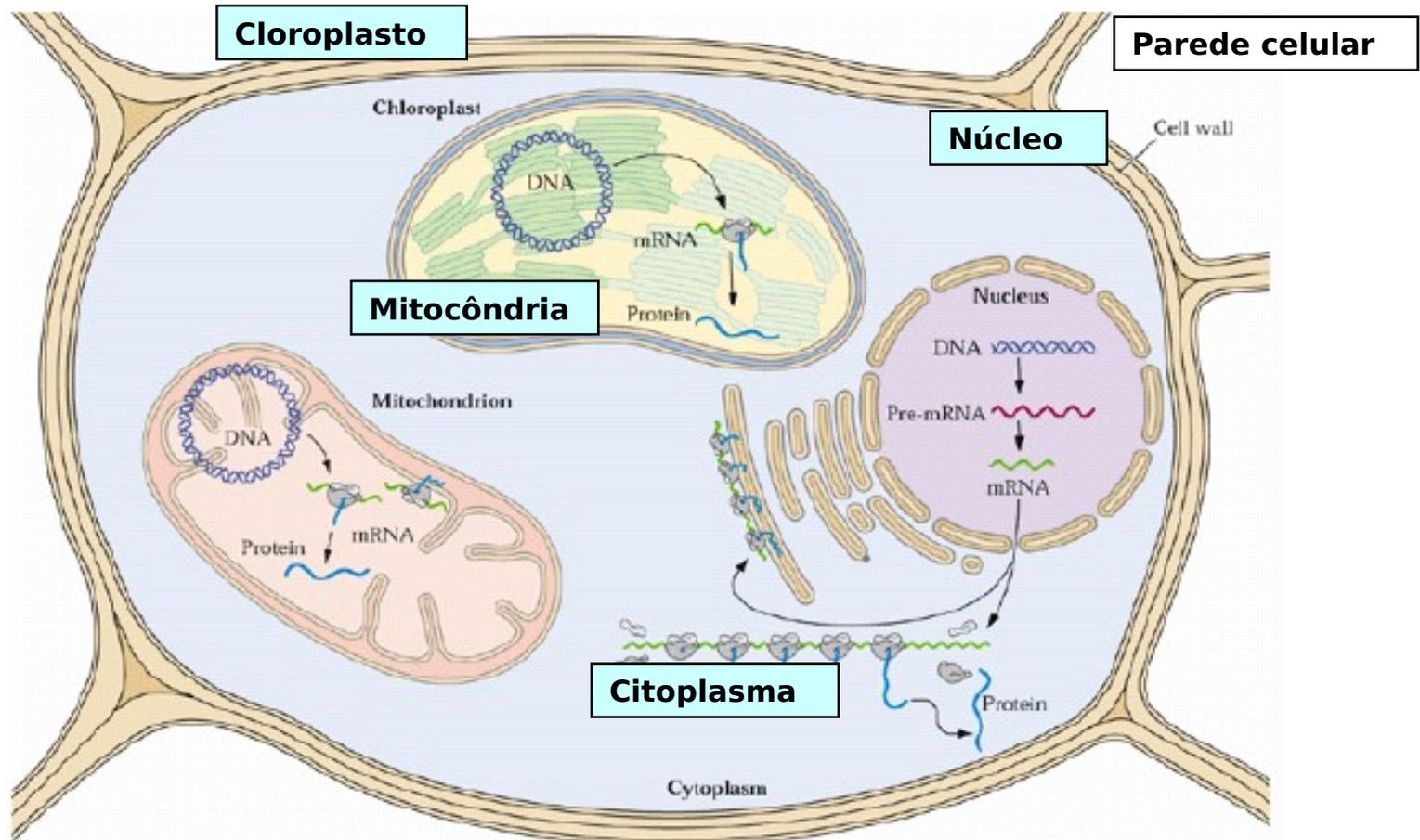
>NR_024570.1 *Escherichia coli* strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence
AGTTTGCATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAG
TGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGCACA
AAGAGGGGGACCTTAGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCAACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCNGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTG
CTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTC
GTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG
GCGTGGCTTCCGGANNTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGG
GAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT
GCCAGCGGTCCGGCCGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTGATGTCGGATTGGAG
TCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCG



16S rRNA



Existem 3 genomas distintos em plantas: cromossomal, plastidial e mitocondrial

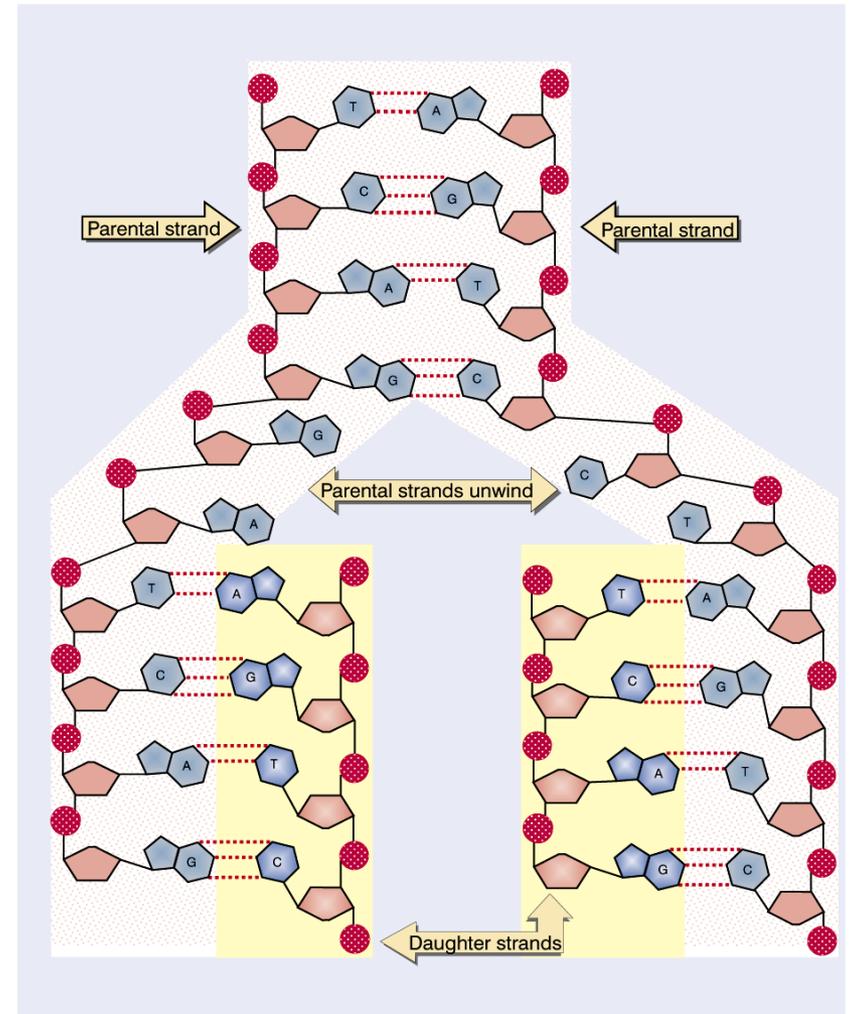


REPLICAÇÃO DO DNA

✓ O DNA replica-se por um mecanismo **semiconservativo**: à medida que os dois filamentos complementares de uma dupla hélice parental se desenrolam e se separam, cada um serve como um molde para a síntese de um novo filamento complementar;

✓ Os potenciais de ligações das bases dos filamentos moldes especificam as sequências de bases complementares nos filamentos de DNA nascentes;

✓ A replicação é iniciada em origens únicas e em geral continua bidirecionalmente a partir de cada origem.



**Meselson, Stahl, and the
Replication of DNA: A History of
"The Most Beautiful Experiment in
Biology"**

by Frederic Lawrence Holmes
Yale University Press: 2001. 416 pp. \$40

Robert Olby

So much attention is given to DNA today that no small effort is required to recapture the climate of uncertainty and caution that met the launch of the double-helix model of its structure by James Watson and Francis Crick in 1953. Looking back in the light of more recent advances in molecular biology, that year seems to mark the decisive turning point. If so, why, one might wonder, did James Watson worry so much that the double-helical structure might prove to be wrong? And why did he advise his co-discoverer against accepting an invitation in 1953 to speak about their structure on the radio?

Consider, too, the research of two young postdocs — Matthew Meselson and Frank



1957-58

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/meselson.html>

REPLICAÇÃO DO DNA

semiconservativo

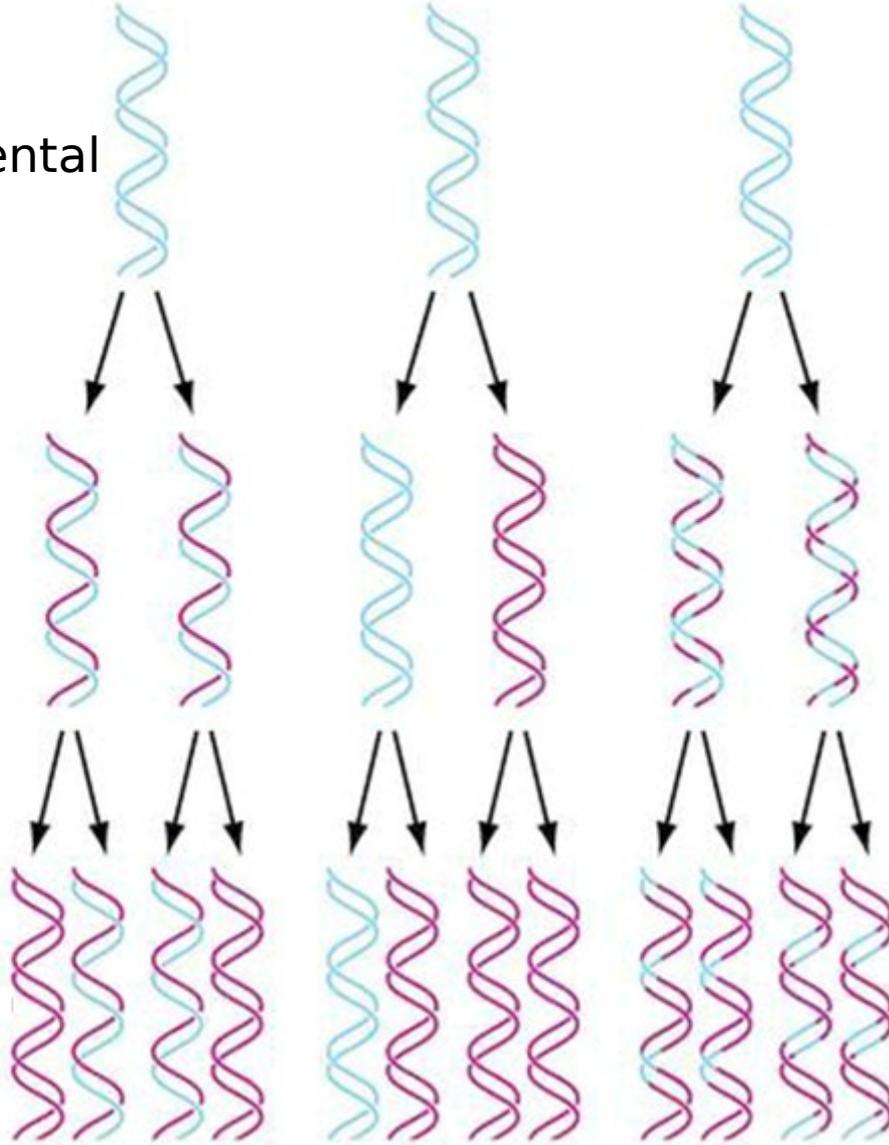
conservativo

dispersivo

DNA parental

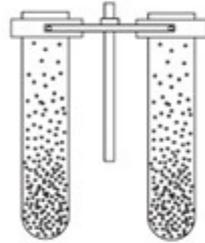
Primeira geração

Segunda geração

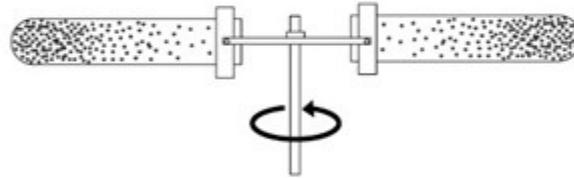


EXPERIMENTO DE MESELSON-STAHN

Solução gradiente de CsCl 6M e a adição de uma mistura de DNAs contendo ^{14}N e ^{15}N



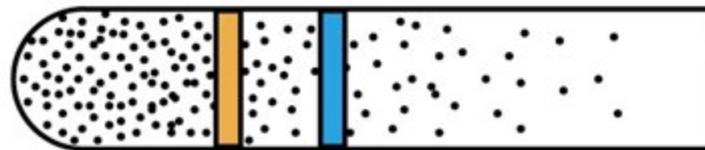
Centrifuga a 50.000 rpm por 48-72 horas



Um equilíbrio é estabelecido entre

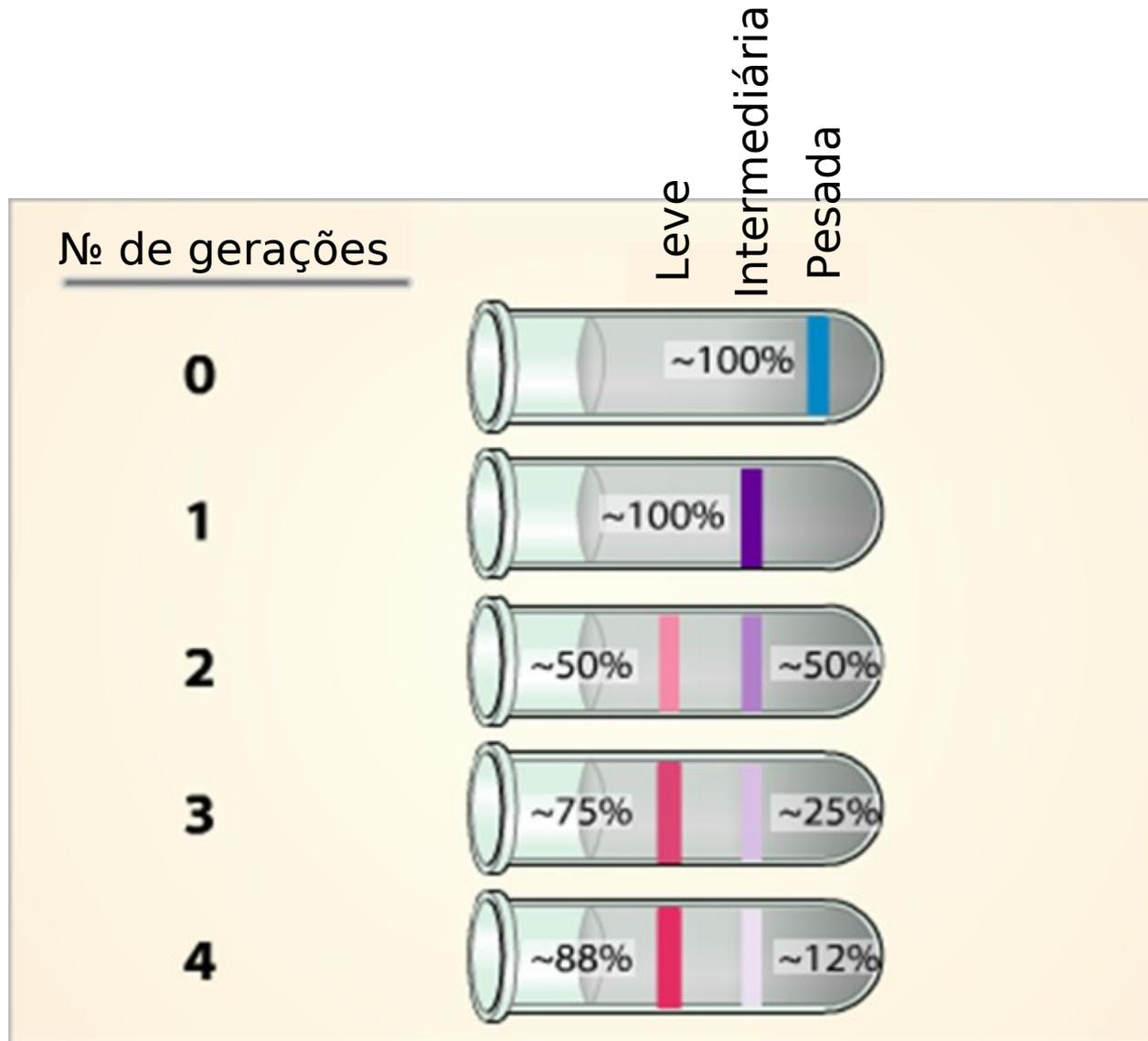
← Força centrífuga e

Difusão →



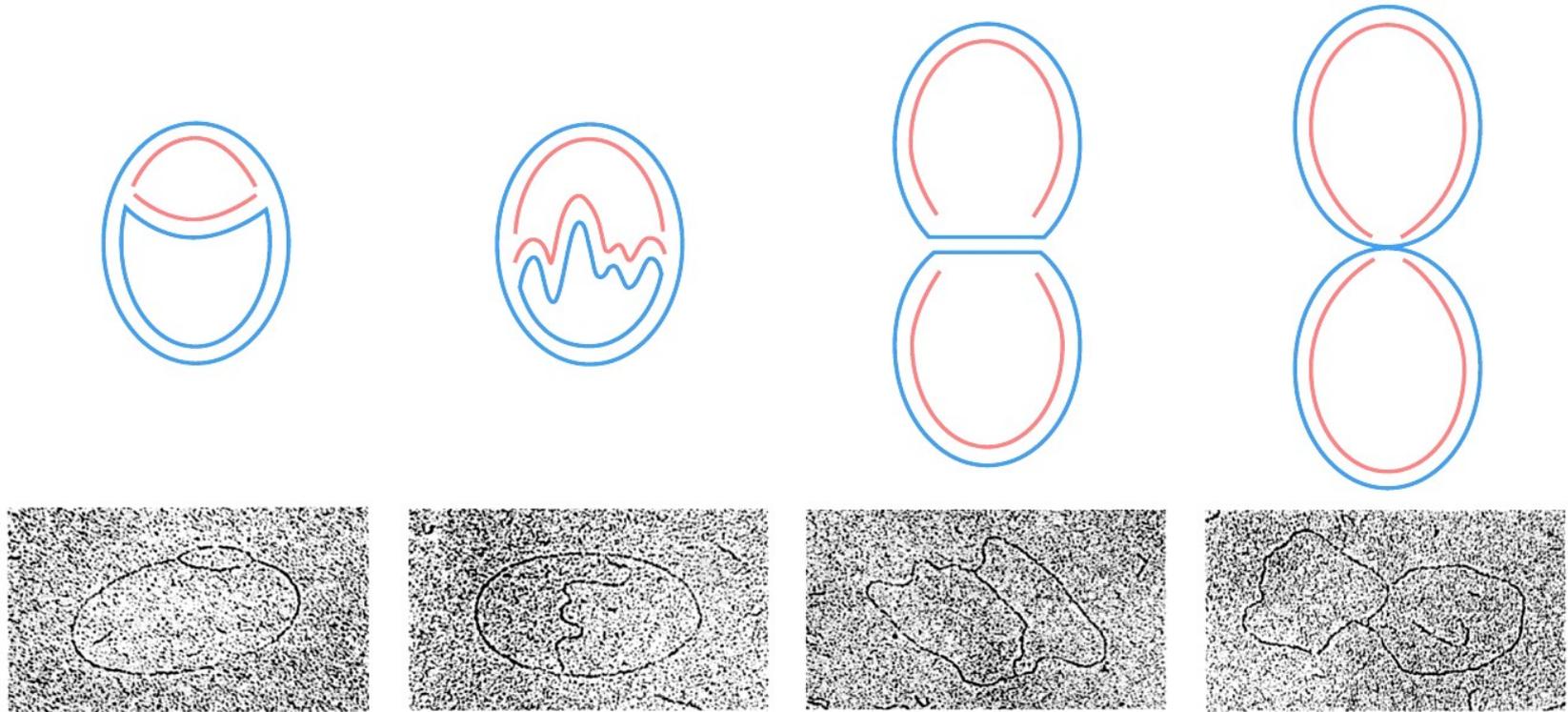
^{15}N ^{14}N

EXPERIMENTO DE MESELSON-STAHN



A REPLICAÇÃO DO CROMOSSOMO CIRCULAR

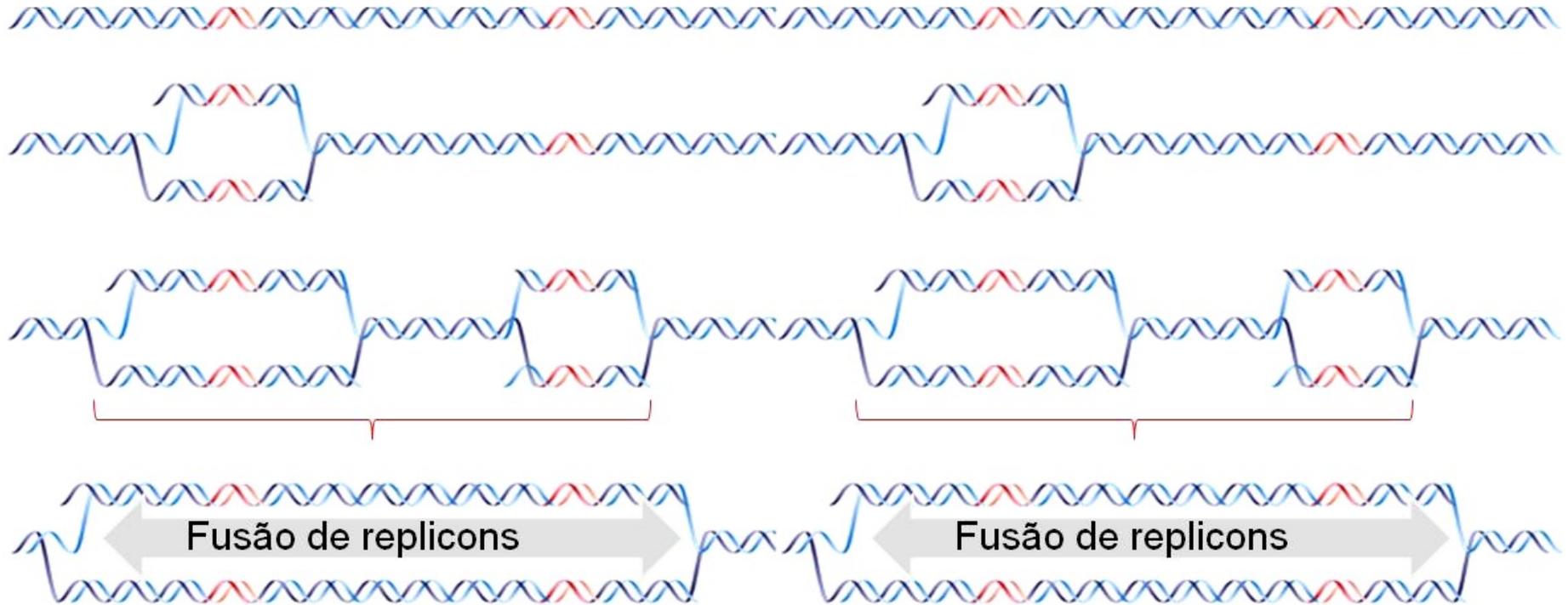
PROCARIOTOS



A replicação é bidirecional

- A velocidade da forquilha de replicação em procariotos é de cerca de 30.000 pb/min
- 1 único replicon

A REPLICAÇÃO DO CROMOSSOMO LINEAR EUCARIOTOS



- A velocidade da forquilha de replicação de eucarioto é cerca de 3.000 pb/min;
- Os replicons de eucariotos têm cerca de 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes. Não sabemos todos os fatores que determinam qual origem e em que momento ela fica ativa - O *timing* da replicação pode, por ex. ser determinado pela atividade do gene: genes mais transcritos são replicados primeiro.

PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS

1. DNA Polimerases
2. Helicases
3. Topoisomerases (girases)
4. Primases
5. Telomerasas

PONTOS IMPORTANTES SOBRE AS DNA POLIMERASES

- ✓ A síntese de DNA é catalisada por enzimas chamadas DNA-polimerases;
- ✓ Todas as DNA-polimerases precisam de um filamento primer, que é ampliado, e um filamento molde que é copiado;
- ✓ Todas as DNA-polimerases tem necessidade absoluta de uma 3'-OH livre do filamento primer, e toda a síntese de DNA ocorre no sentido 5' → 3';
- ✓ As atividades de exonuclease 3' → 5' das DNA-polimerases revisam filamentos nascentes à medida que eles são sintetizados, removendo quaisquer nucleotídeos mal pareados nas pontas 3' dos filamentos primer.

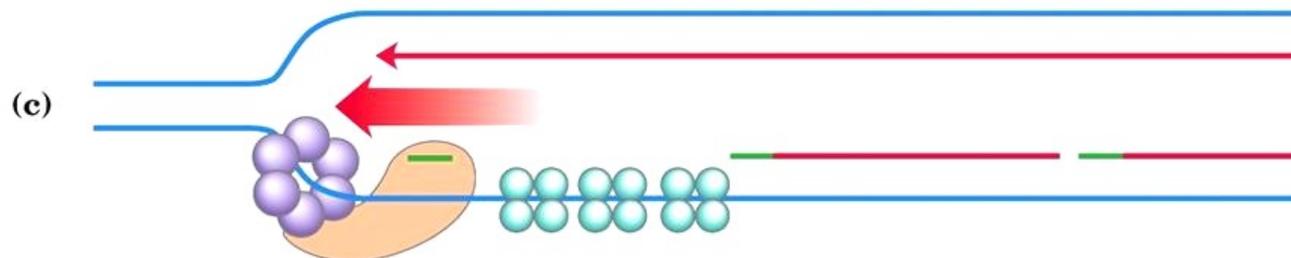
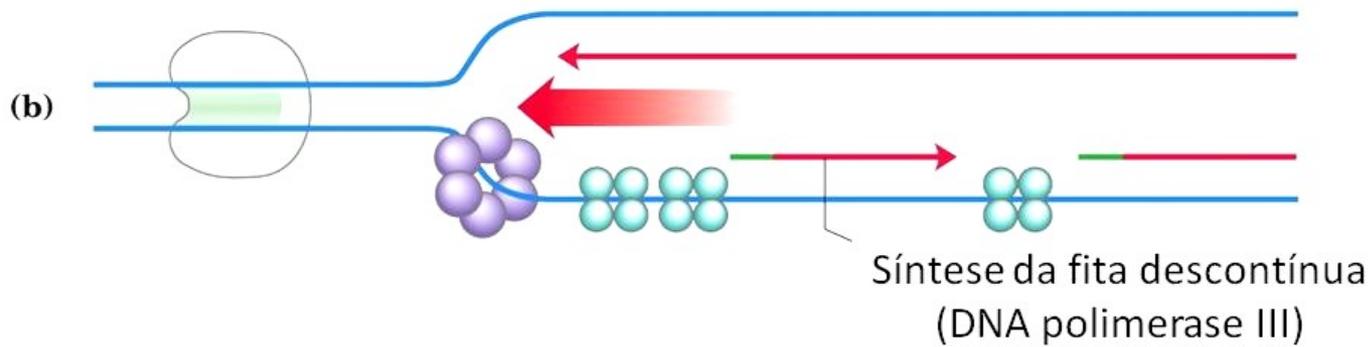
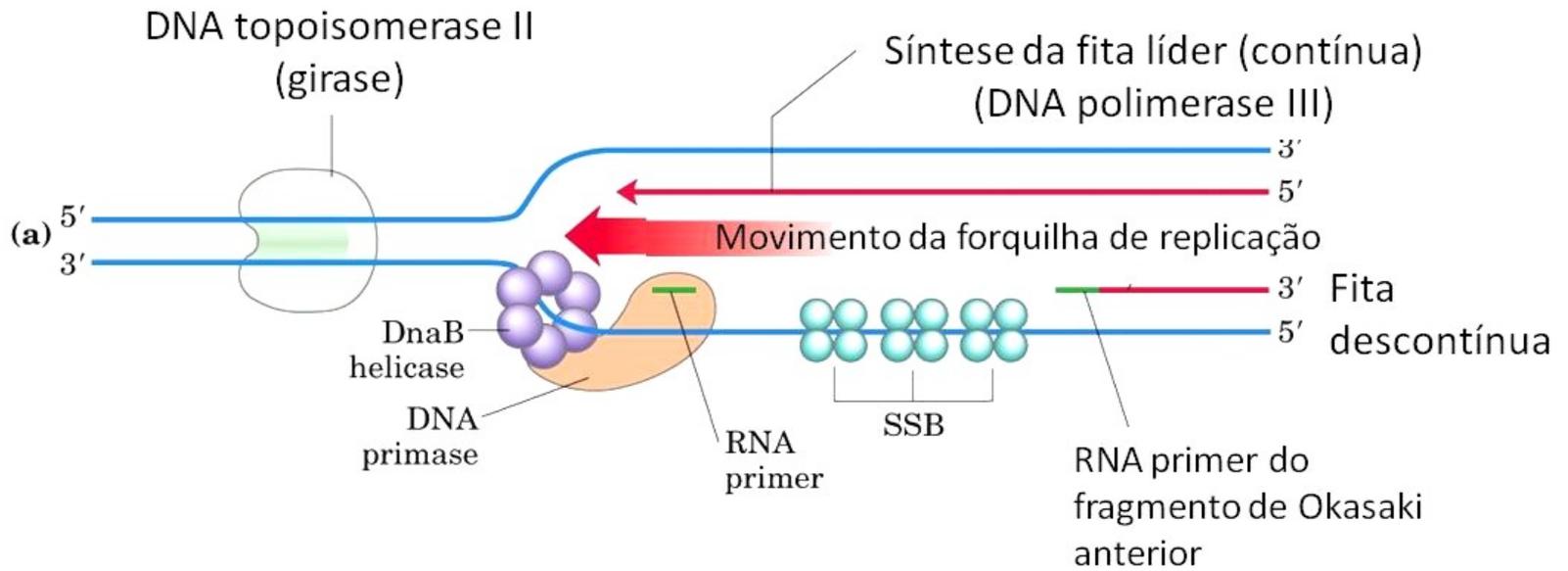
PROTEÍNAS PRESENTES NA ORIGEM DE REPLICAÇÃO

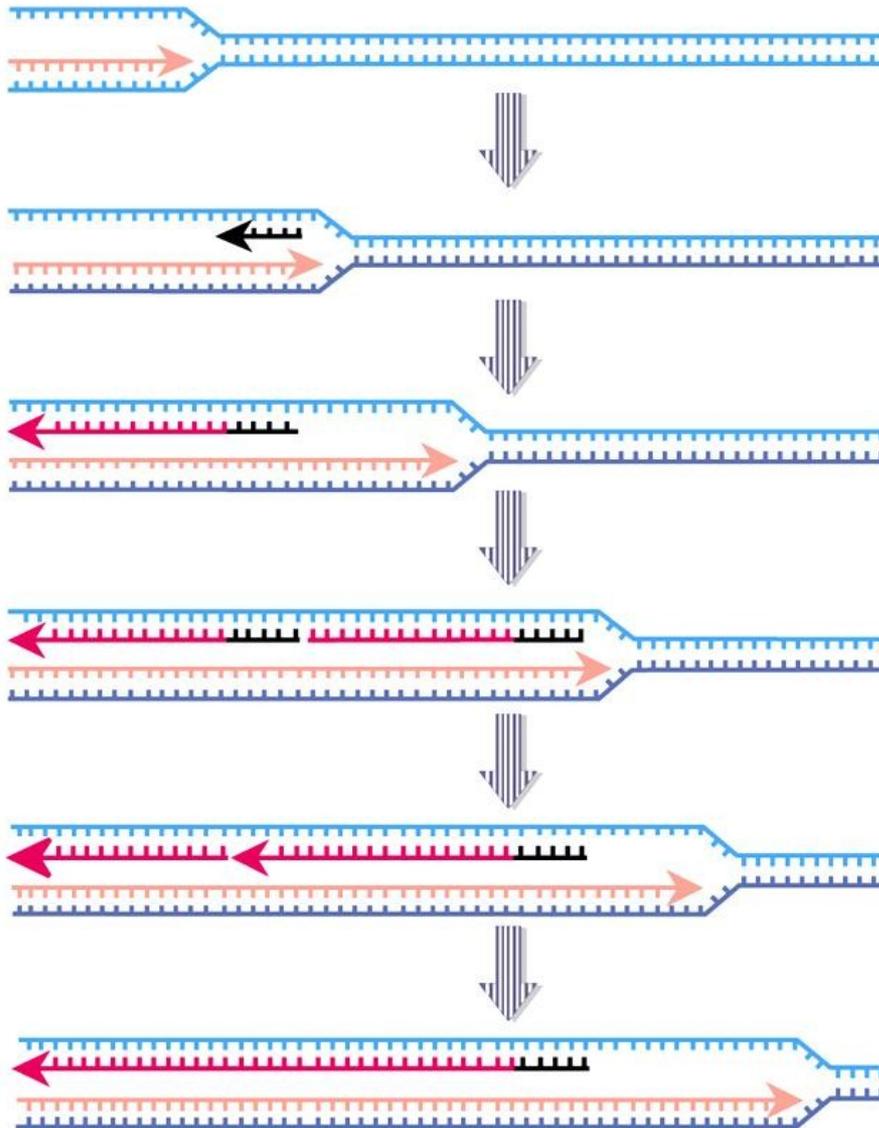
Helicase	Desenrola o DNA
DNA girase (topoisomerase)	Alivia a tensão de torção gerada pela abertura da dupla-fita
Primase	Sintetiza os primers de RNA
DNA polimerases	Polimerização do DNA, retirada dos primers e reparo do DNA
Single strand DNA-binding (SSB)	Expõe a fita simples de DNA
DNA ligase	Une os fragmentos de Okasaki

REPLICAÇÃO DO DNA

- Se a replicação é semi-conservativa e a polimerização deve ser sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$
- Mas o DNA é antiparalelo ou seja, uma fita ocorre no sentido $5' \rightarrow 3'$ e a outra no sentido $3' \rightarrow 5'$
- Como ocorre então a replicação nos dois sentidos?







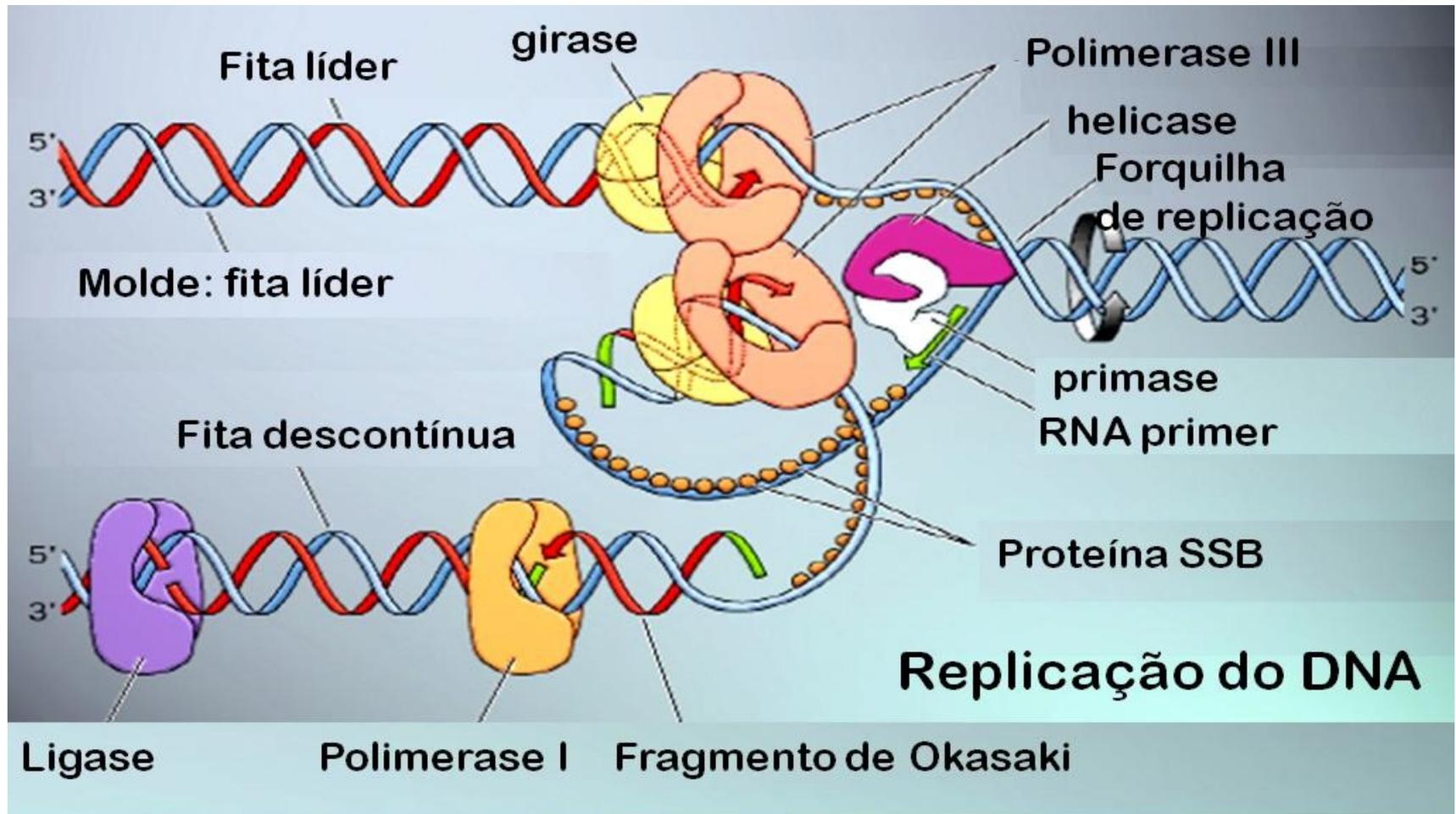
- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

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

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

- A DNA ligase sela as quebras

Síntese das fitas contínua e descontínua é independente



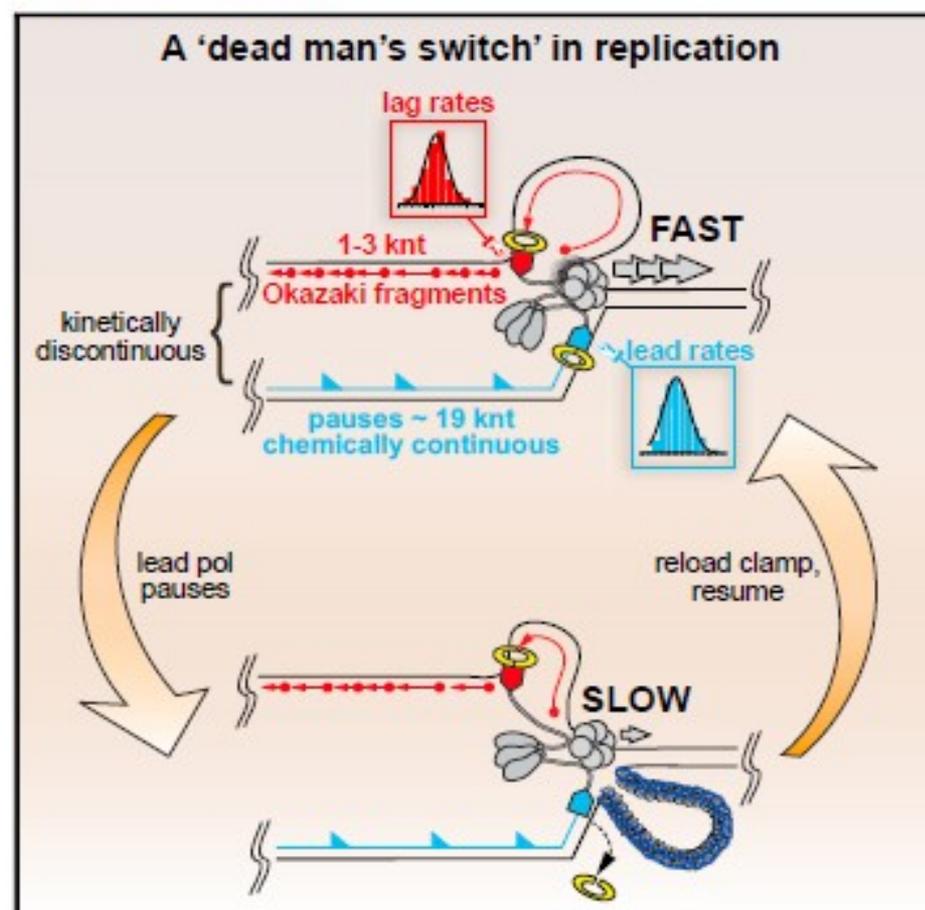
Procaríotos: 1000 a 2000 nucleotídeos
Eucariotos: 100 a 200 nucleotídeos



<https://www.youtube.com/watch?v=4PKjF7OumYo>

Independent and Stochastic Action of DNA Polymerases in the Replisome

Graphical Abstract



Authors

James E. Graham, Kenneth J. Marians,
Stephen C. Kowalczykowski

Correspondence

kmarians@sloankettering.edu (K.J.M.),
sckowalczykowski@ucdavis.edu (S.C.K.)

In Brief

Polymerases within the replisome operate independently and discontinuously, and they are not coordinated.

A replicação em eucariotos

REPLICAÇÃO DO DNA EM EUCARIOTOS

- ✓ É similar a procariotos, semiconservativa e bidirecional. Existe uma fita LÍDER e outra DESCONTÍNUA com fragmentos de Okazaki. Se inicia nas bolhas de replicação (MÚLTIPLAS FORQUILHAS);
- ✓ Várias origens de replicação (genoma de humanos e outros mamíferos contêm cerca de 10.000 mil origens de replicação distribuídas pelos cromossomos a intervalos de 30.000 a 300.000 pares de bases);
- ✓ Atuam enzimas similares às das células de procariotos;
- ✓ Nos fragmentos de Okasaky, os *primers* de RNA são removidos por uma Rnase e não por uma DNA polimerase de reparo;
- ✓ A finalização da replicação é feita com a formação de estruturas nas terminações do cromossomo, os telômeros;
- ✓ Os telômeros são replicados com a ajuda das telomerases .

REPLICAÇÃO DAS PONTAS DO CROMOSSOMO

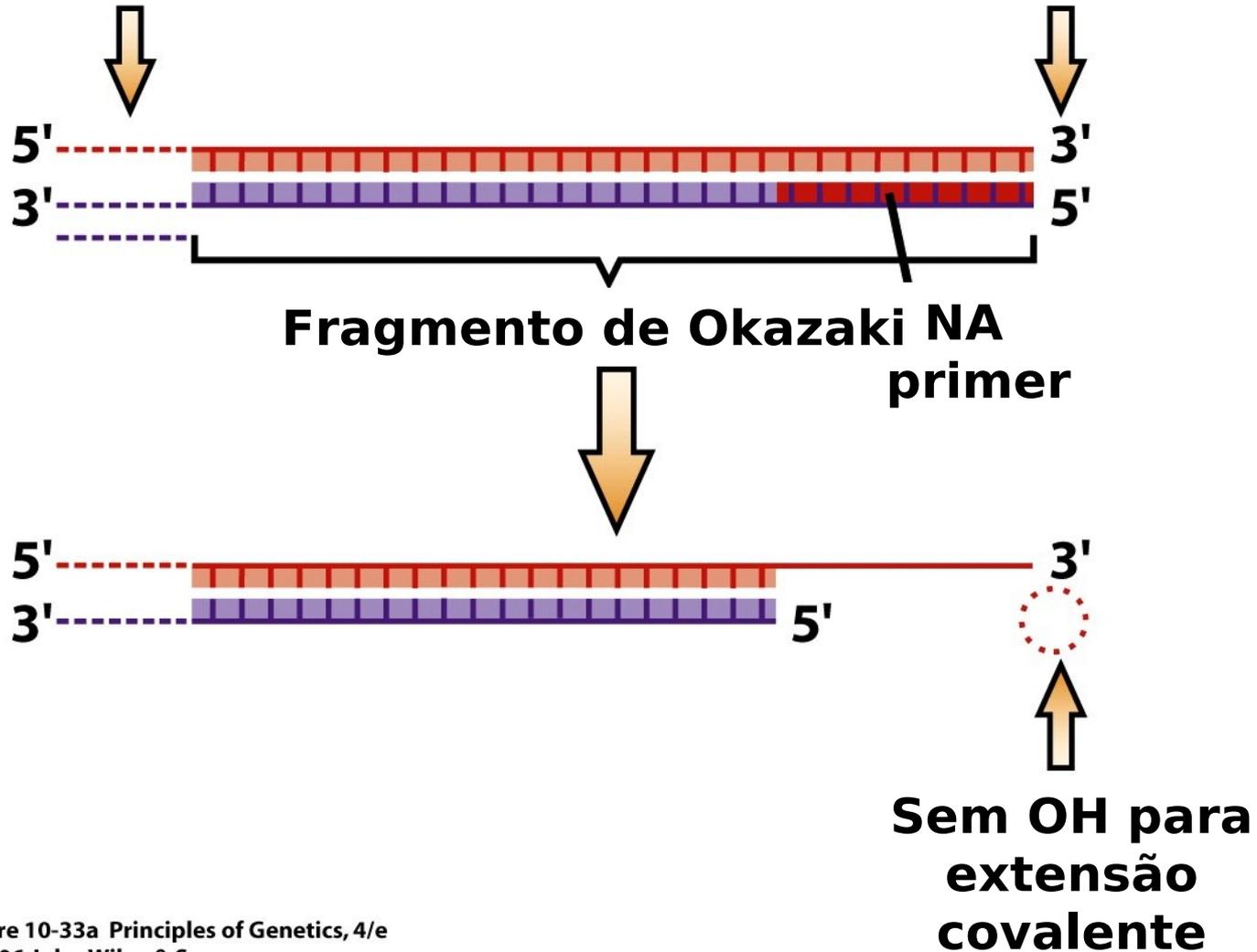
- DNA polimerase não pode replicar o segmento terminal do DNA do filamento descontínuo de um cromossomo linear;
- TELOMERO: tem uma estrutura única que favorece um mecanismo simples para a adição de telômeros feita pela enzima **telomerase** contendo RNA

Repetições dos telômeros de humanos:

TTAGGG

Próximo ao centrômero

Fim do cromossomo



Telomerase resolves the terminal primer problem.

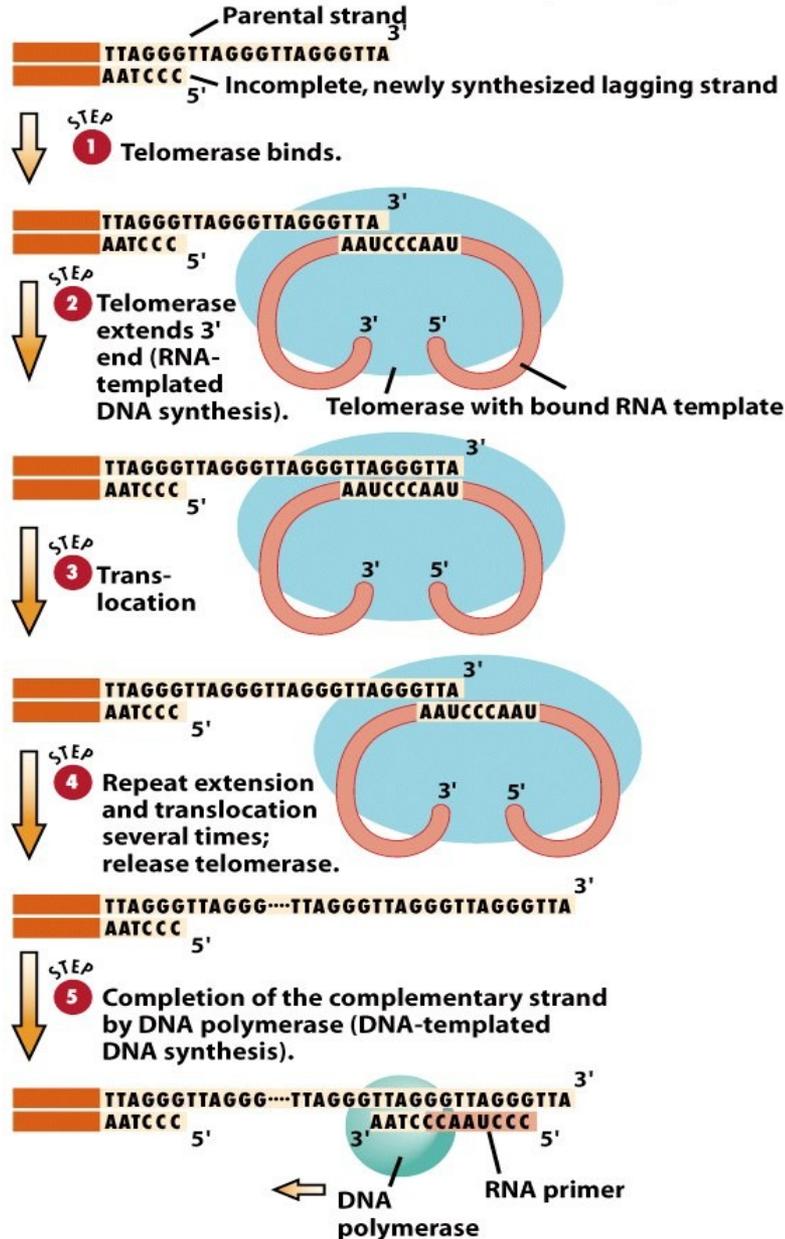
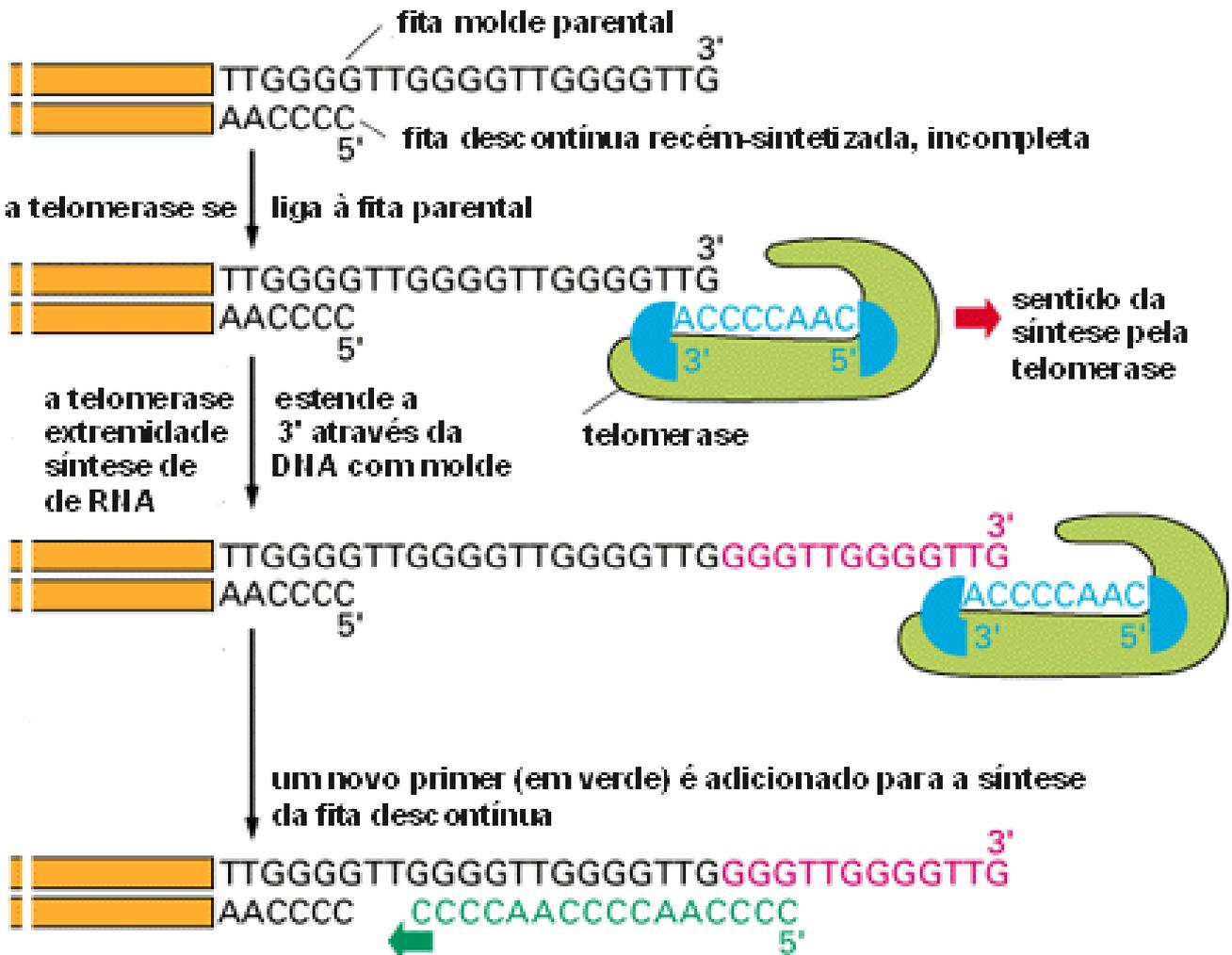


Figure 10-33b Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons



ESTUDO DIRIGIDO

1. Diferenças fundamentais entre DNA e RNA;
2. Estrutura e função do DNA;
3. Principais características da dupla hélice do DNA;
4. Principais tipos e funções dos RNAs.
5. Processo de replicação
6. Enzimas envolvidas na replicação de DNA

Capítulo 6 – Replicação, reparo e recombinação de DNA (páginas 197 a 215)

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2011. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3^a Edição brasileira. Artmed, Porto Alegre

Complementar:

Vídeo com resumo do histórico das descobertas citadas:

<https://www.youtube.com/watch?v=84aNPB9mSMM>

