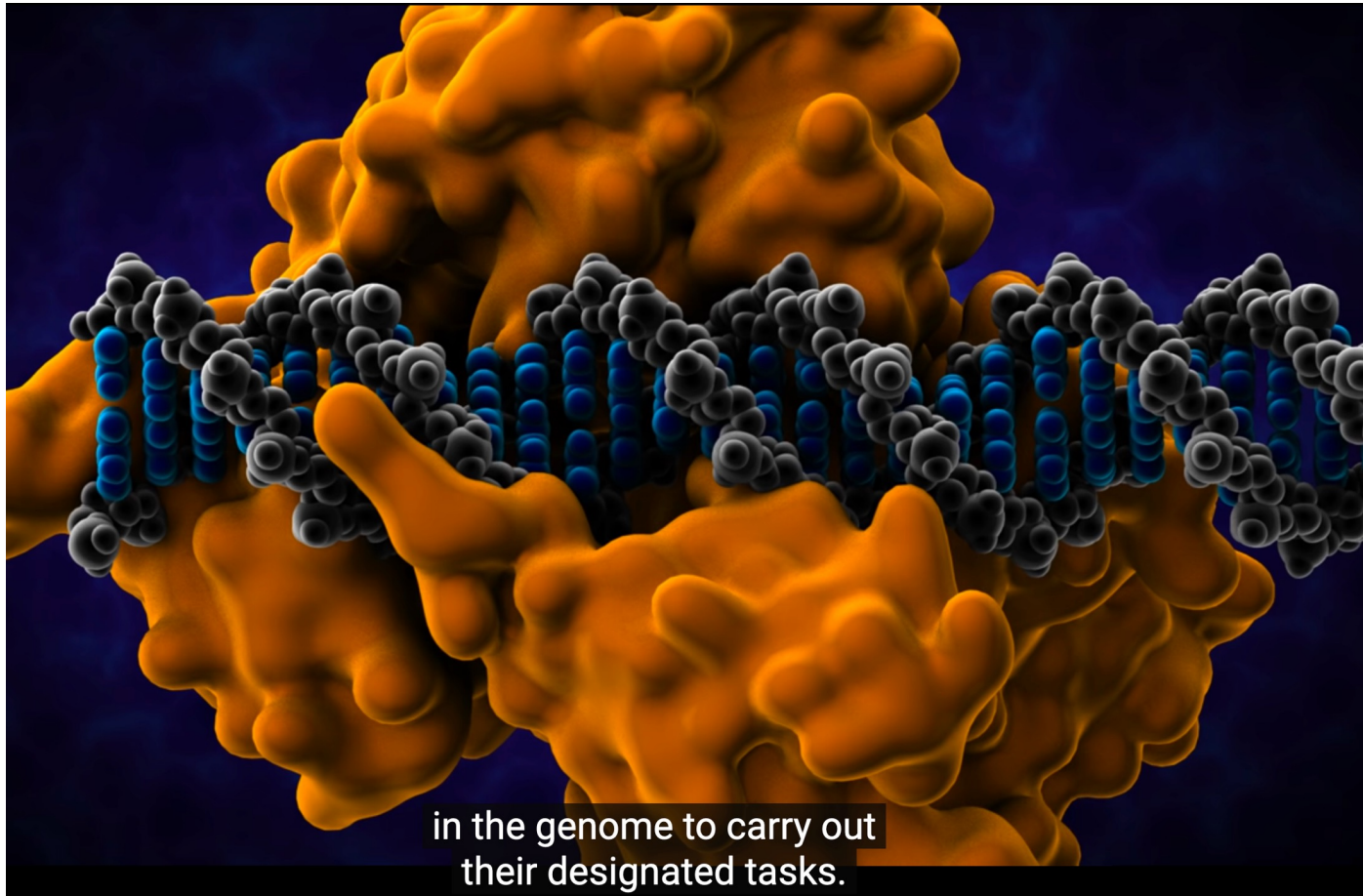


Estruturas de ácidos nucleicos

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

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



A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!

O Que é sulco maior ou menor? Importância biológica?

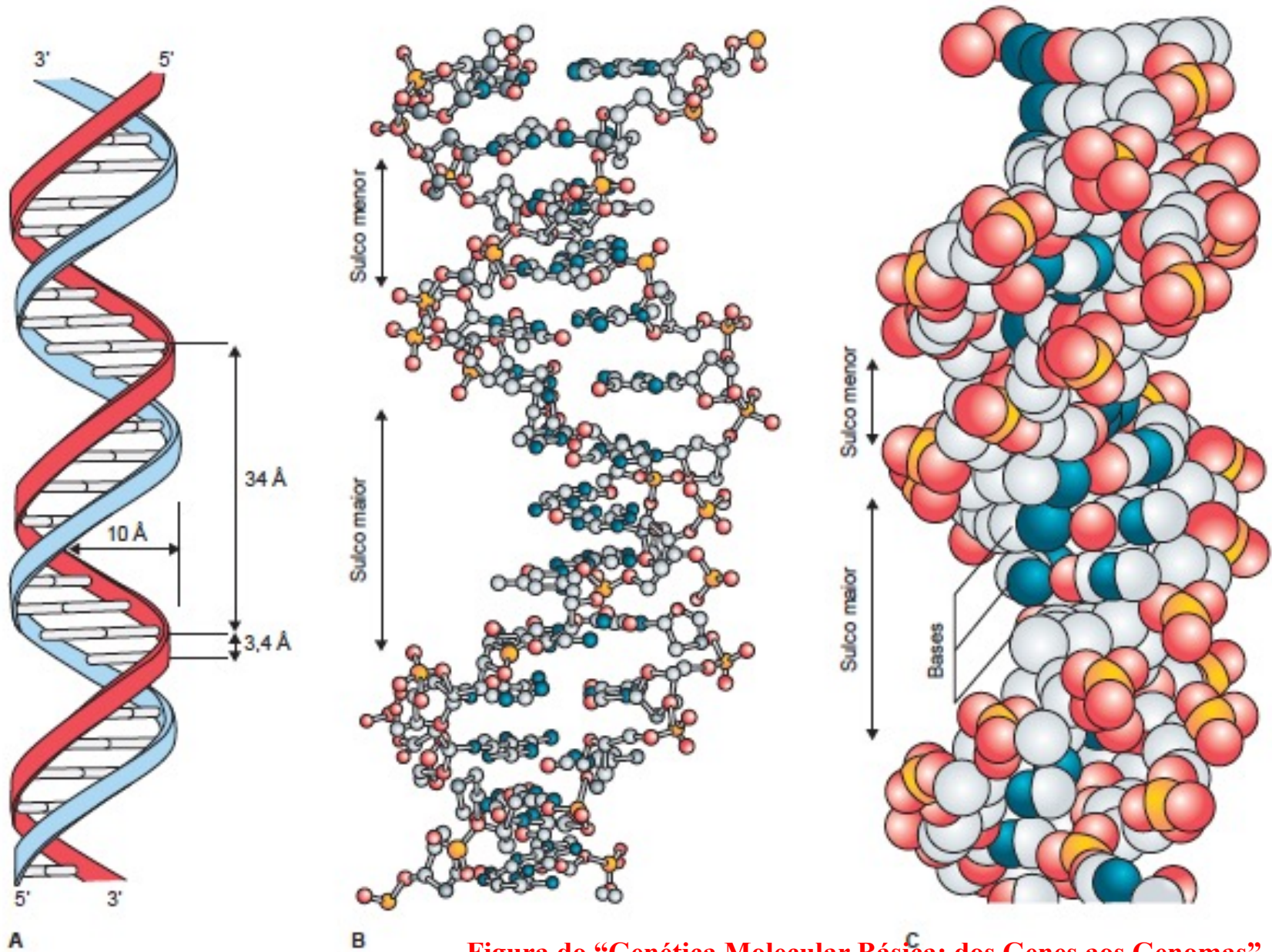
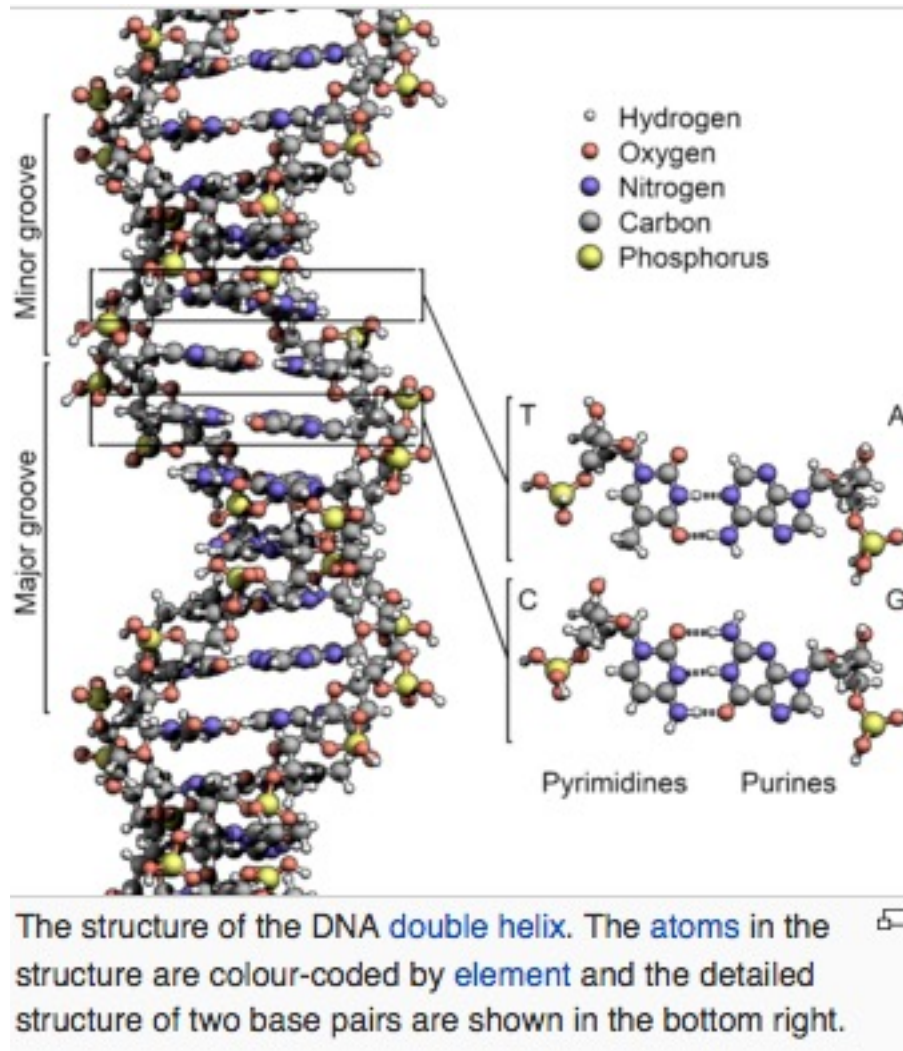


Figura do “Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas”, 2017

A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!



- 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!

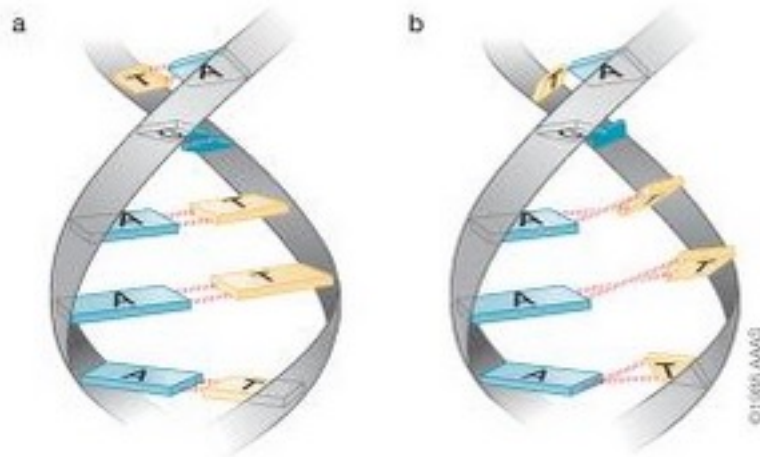
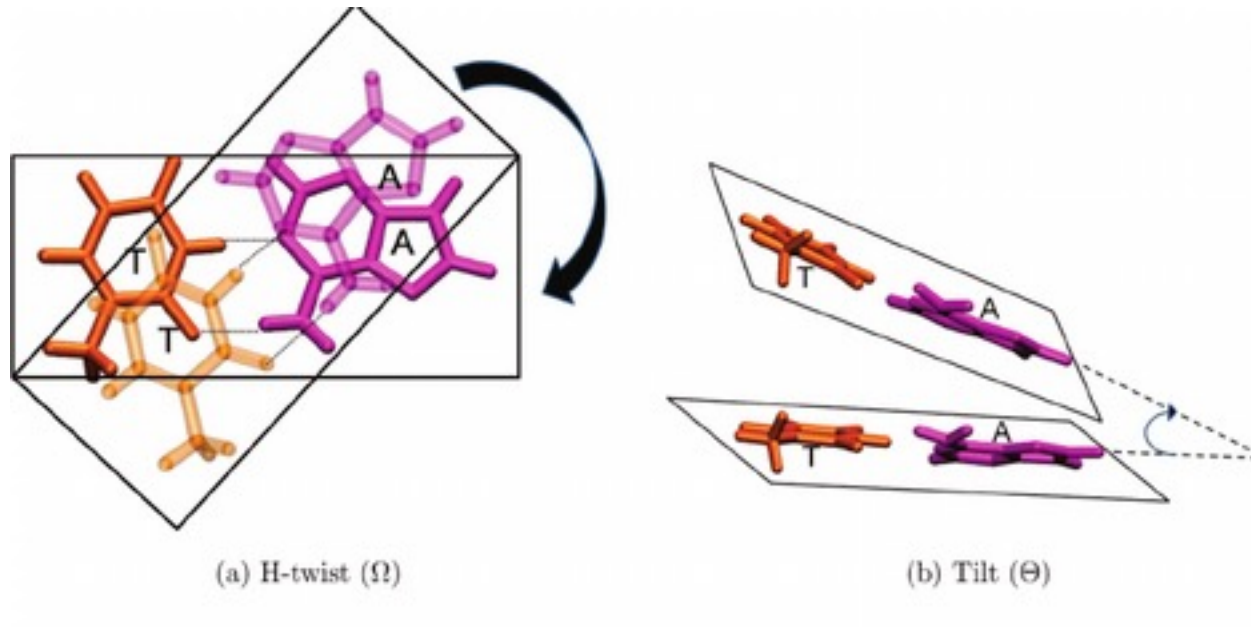


FIGURE 4-12 The propeller twist between the purine and pyrimidine base pairs of a right-handed helix. (a) The structure shows a sequence of three consecutive A:T base pairs with normal Watson-Crick bonding. (b) A propeller twist causes rotation of the bases about their long axes. (Adapted, with permission,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

- **Trabalho de Alexander Rich na década de '80...**
- **Trabalhando com oligonucleotídeos com a sequência (para fazer cristalografia de raio X):**

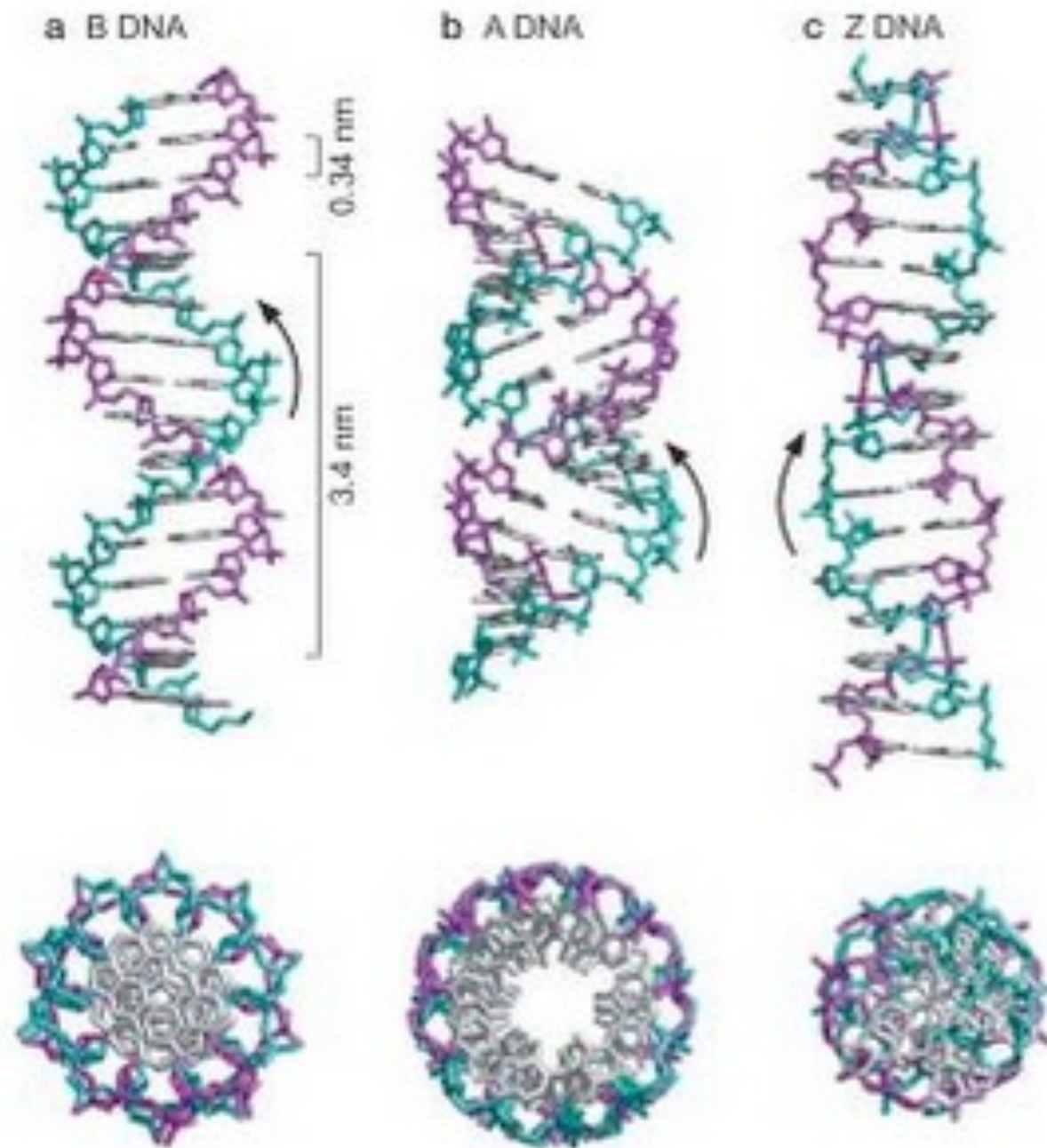
5'-GCGCGCGCGCGC-3'

- **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!

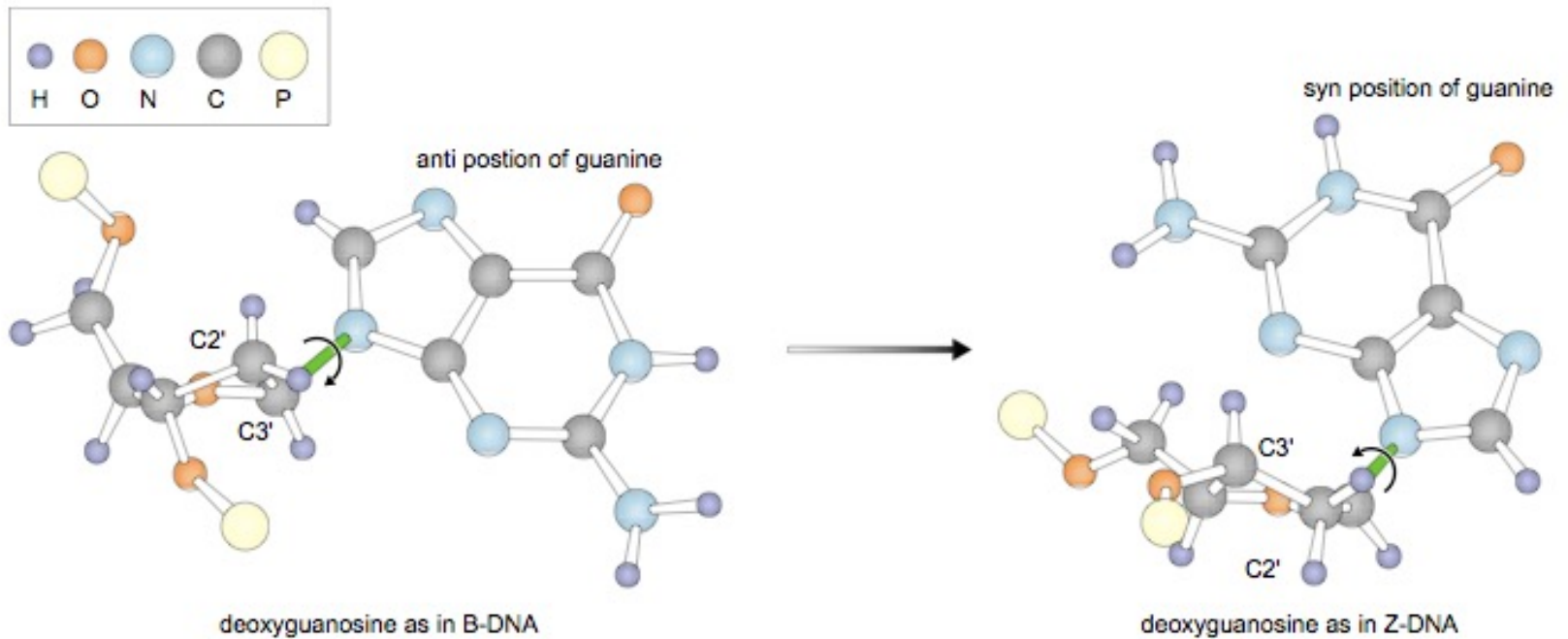


(b)

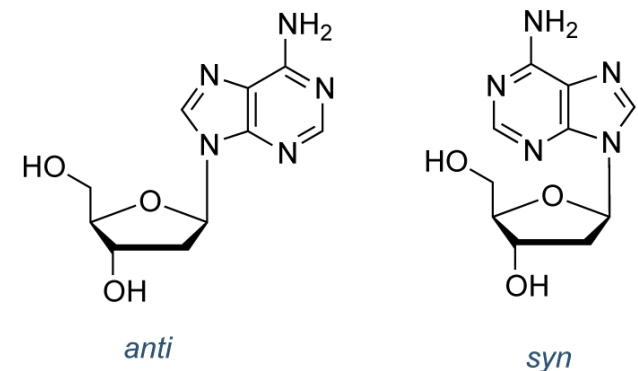
	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Sentido da hélice	Orientado à direita	Orientado à direita	Orientado à esquerda
Diâmetro	~20 Å	~26 Å	~18 Å
Pares de base por volta da hélice	10,5	11	12
Incremento na altura da hélice por par de base	3,4 Å	2,6 Å	3,7 Å
Inclinação das bases em relação ao eixo da hélice	-6°	+20°	-7°
Geometria 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!

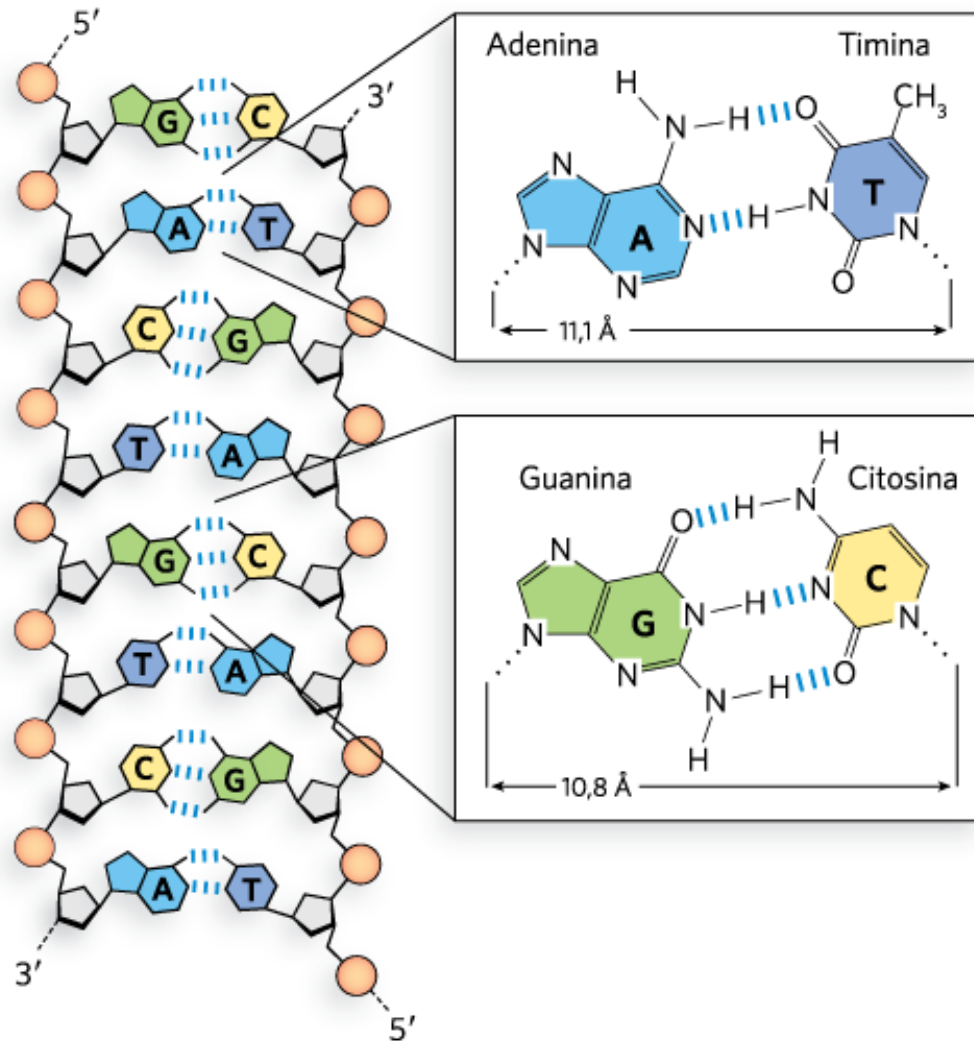


Qual delas está no DNA?
No B-DNA é a anti!



deoxyadenosine (a purine nucleoside)

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.....

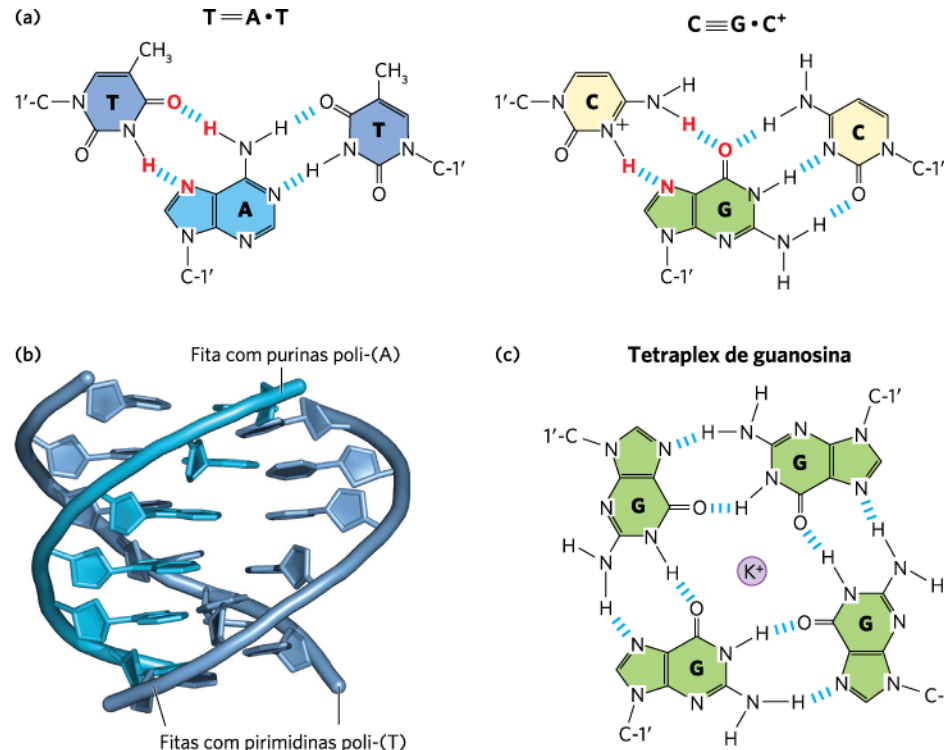
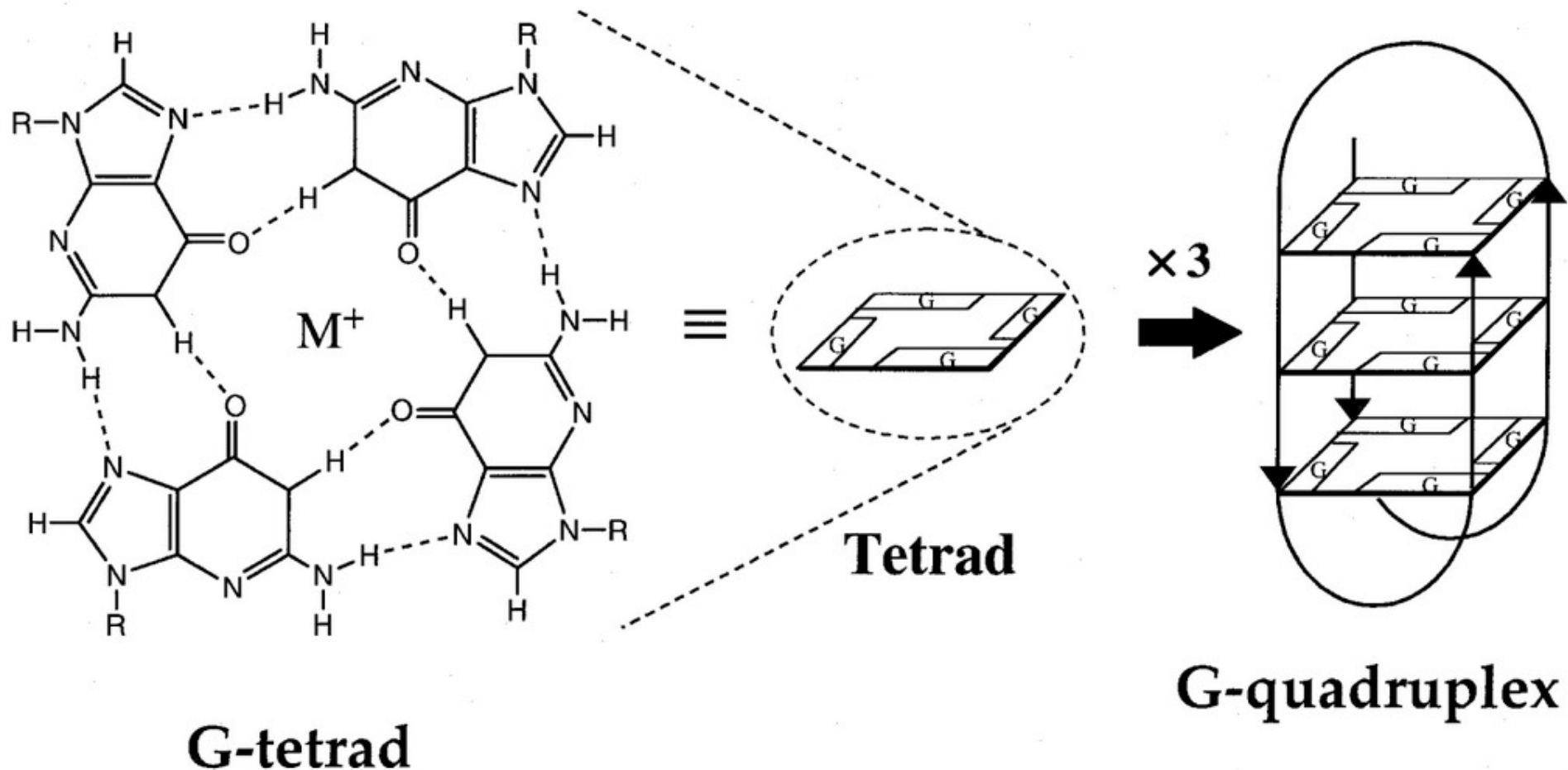


FIGURA 6-21 Estruturas do DNA de três e quatro fitas. (a) O pareamento de bases no triplex de DNA. Os átomos participantes do pareamento de Hoogsteen estão em vermelho; os pareamentos de bases de Watson-Crick tradicionais estão em preto. (b) Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas 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 da guanossina. 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?

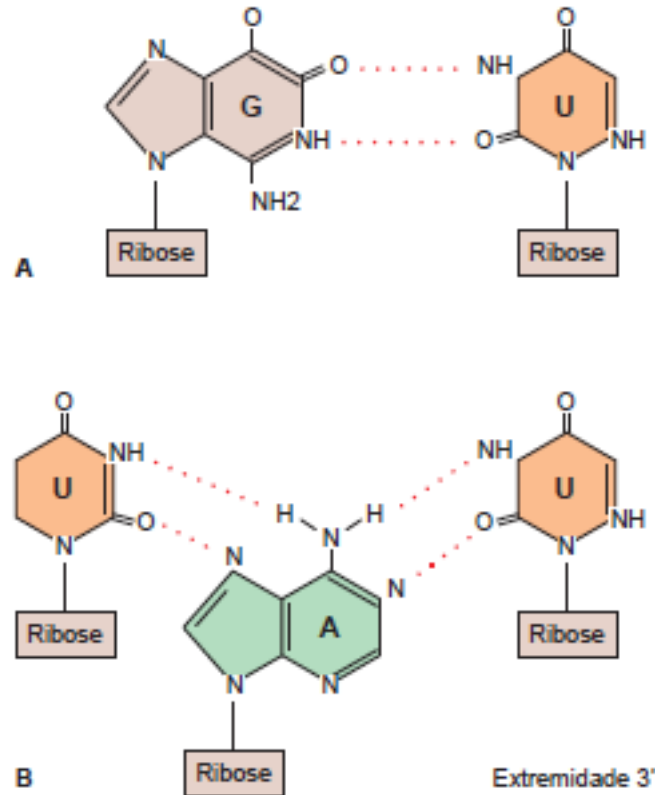
Esta é uma molécula simples fita? O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?

Com é o RNA no plano? E por que?

E a estrutura espacial do RNA, que estrutura assume?

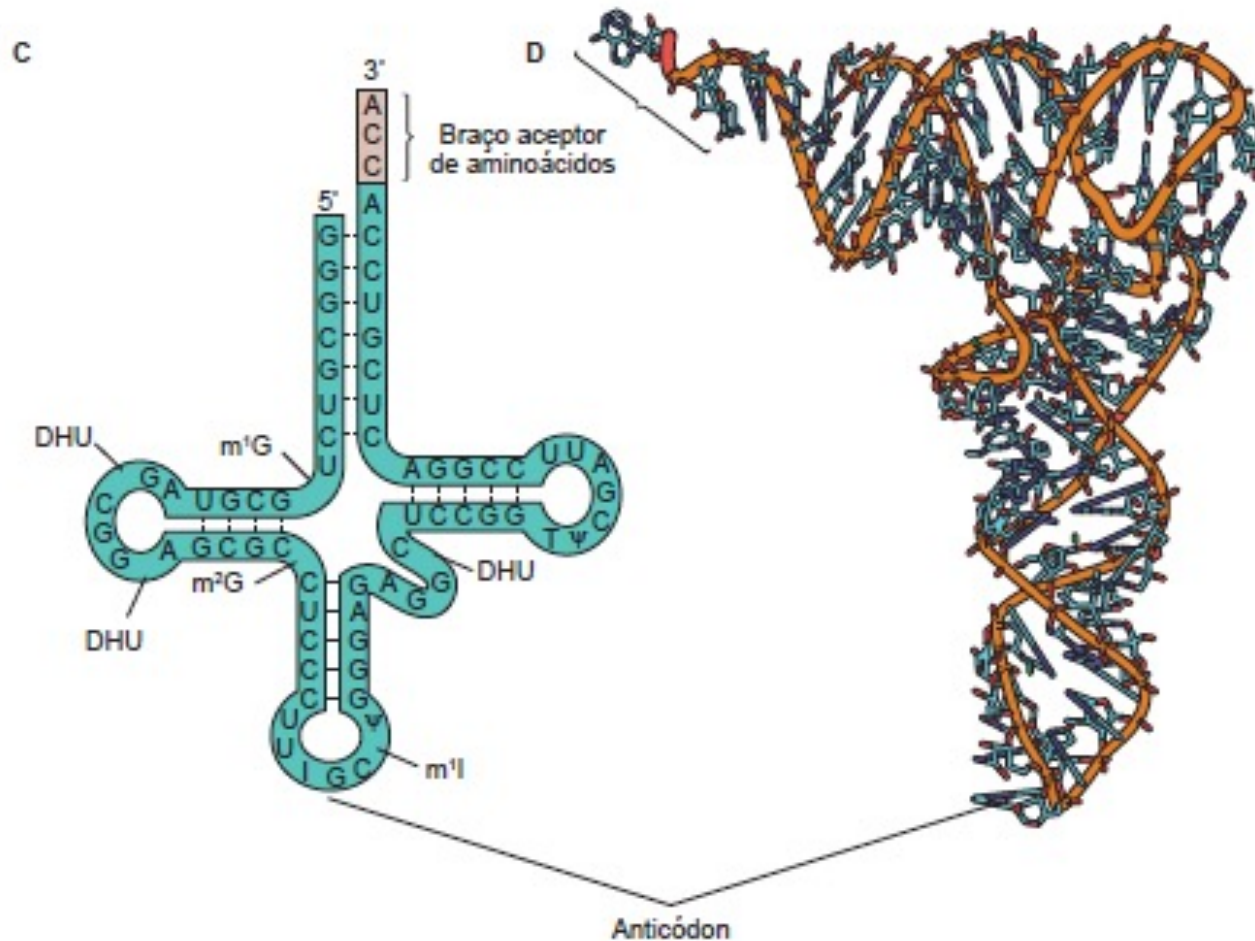
E a estrutura do RNA?

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



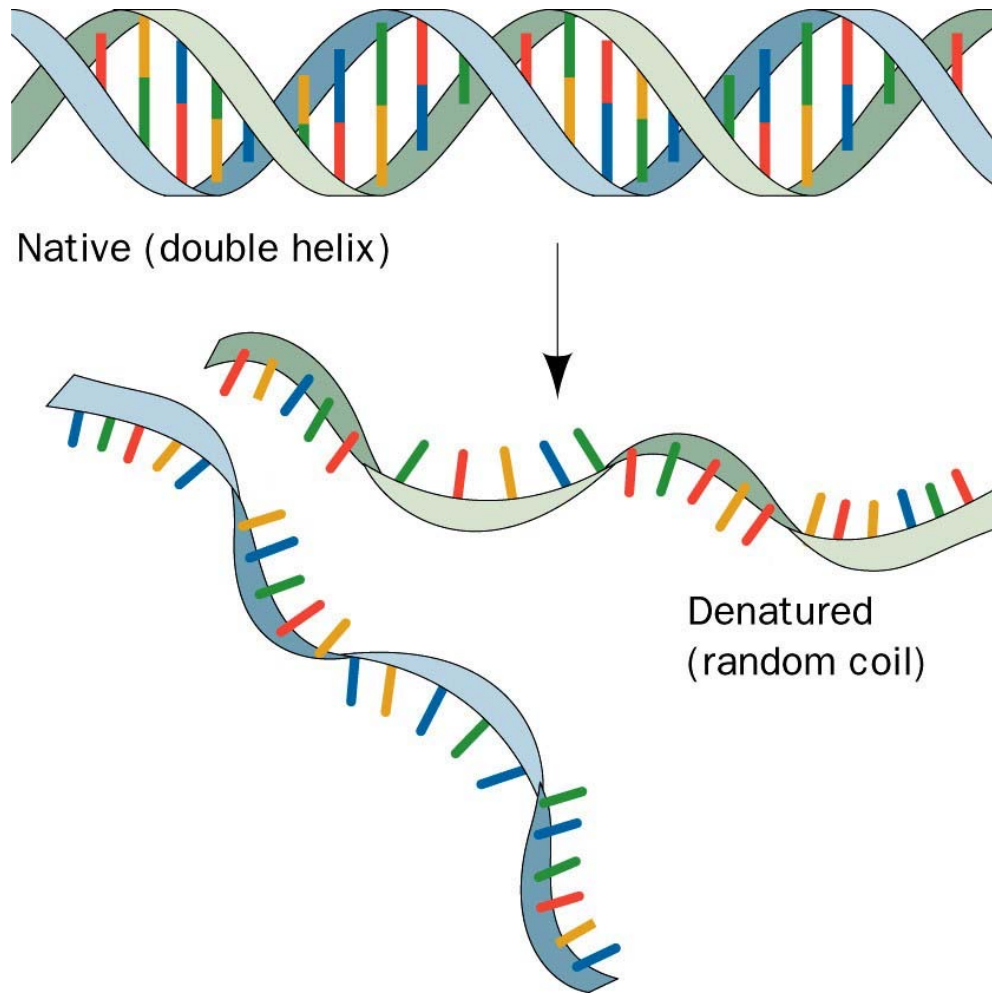
**Emparelhamento com pontes de hidrogênio alternativos!
Inclusive com 3 bases!**

A estrutura do RNA também não é inteiramente simples fita!



Estrutura do t-RNA no plano e espacial!

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!

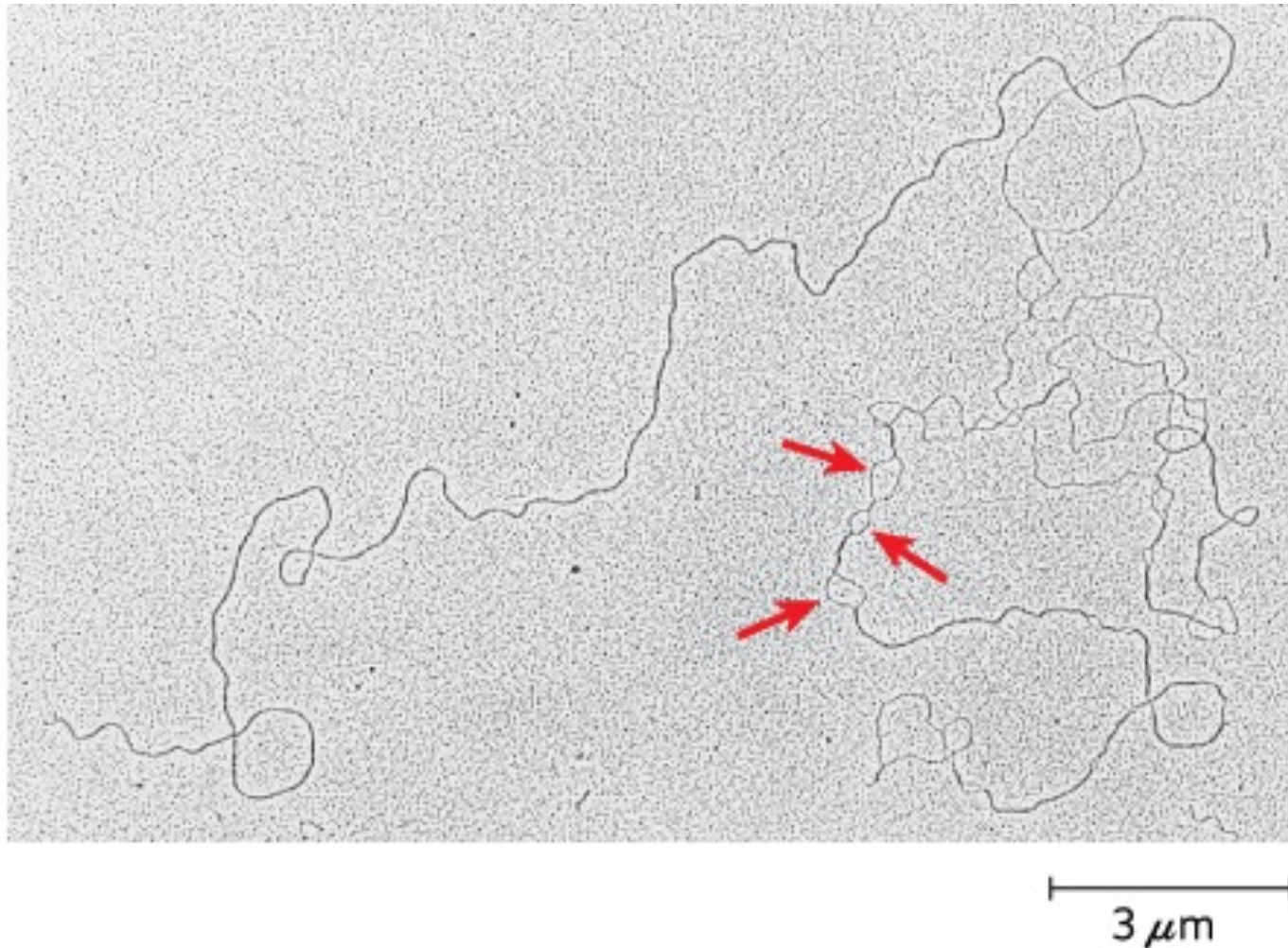
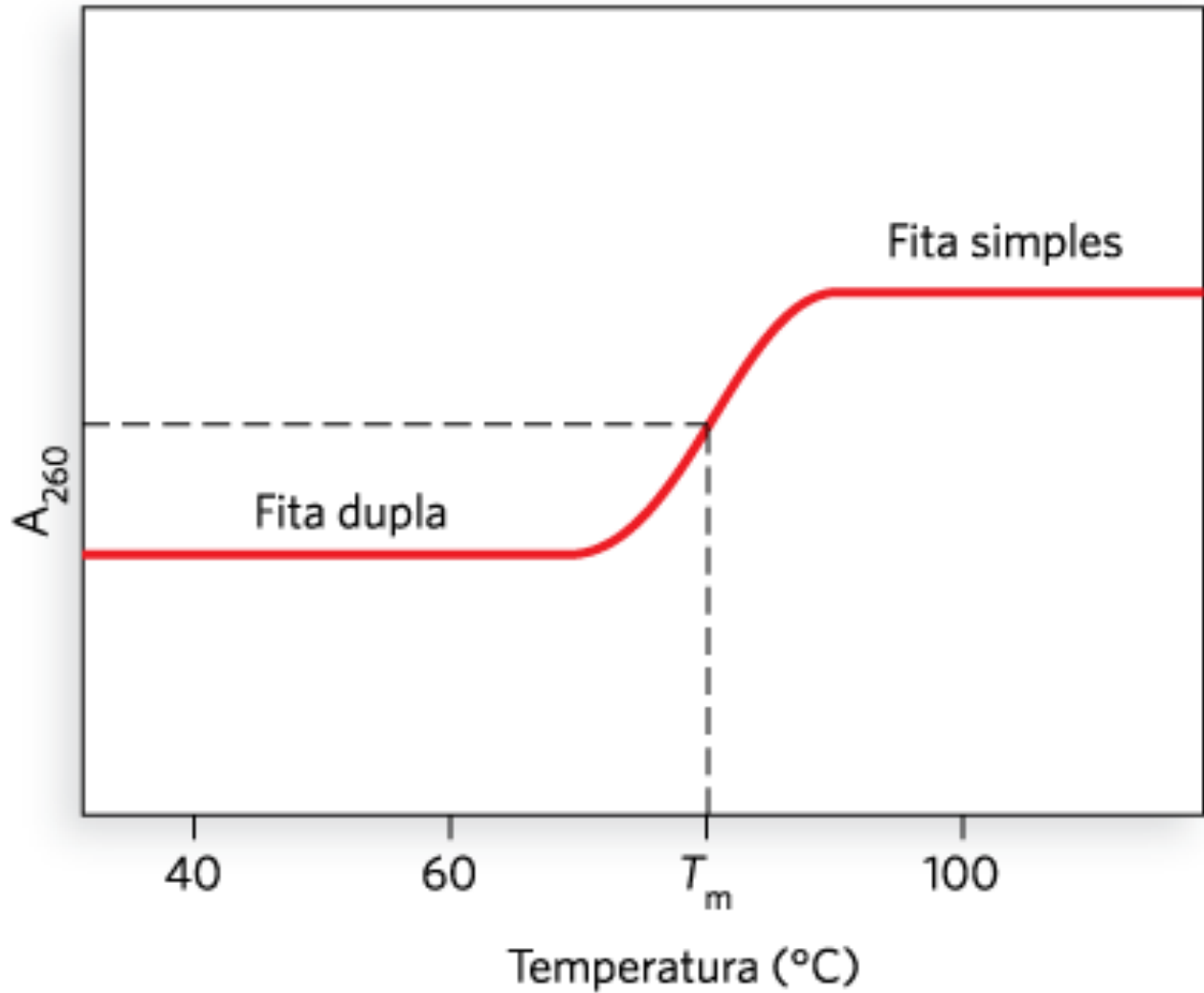


FIGURA 6-29 DNA parcialmente desnaturado. O DNA mostrado nesta micrografia eletrônica foi parcialmente desnaturado e então fixado para impedir a renaturação durante a

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



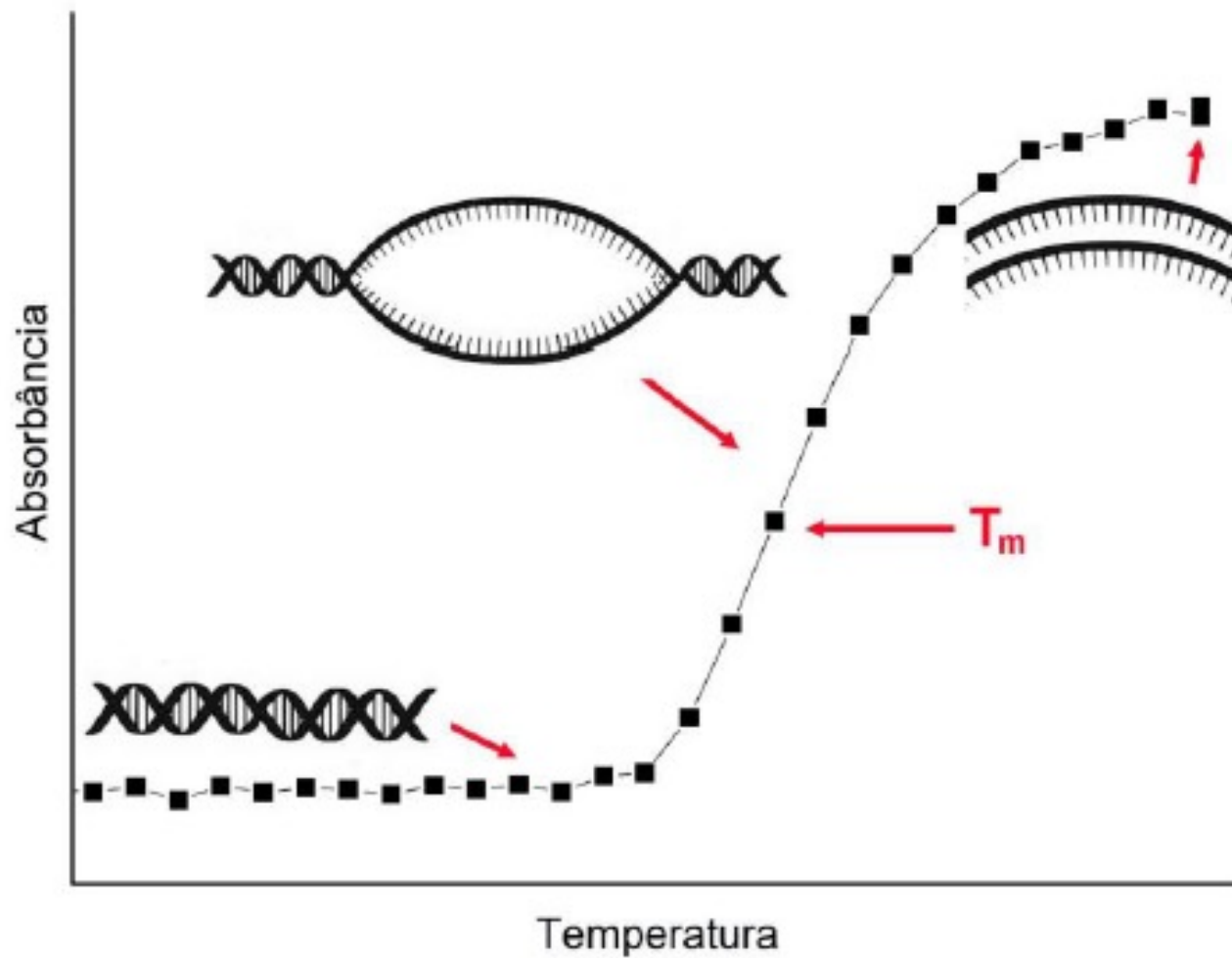
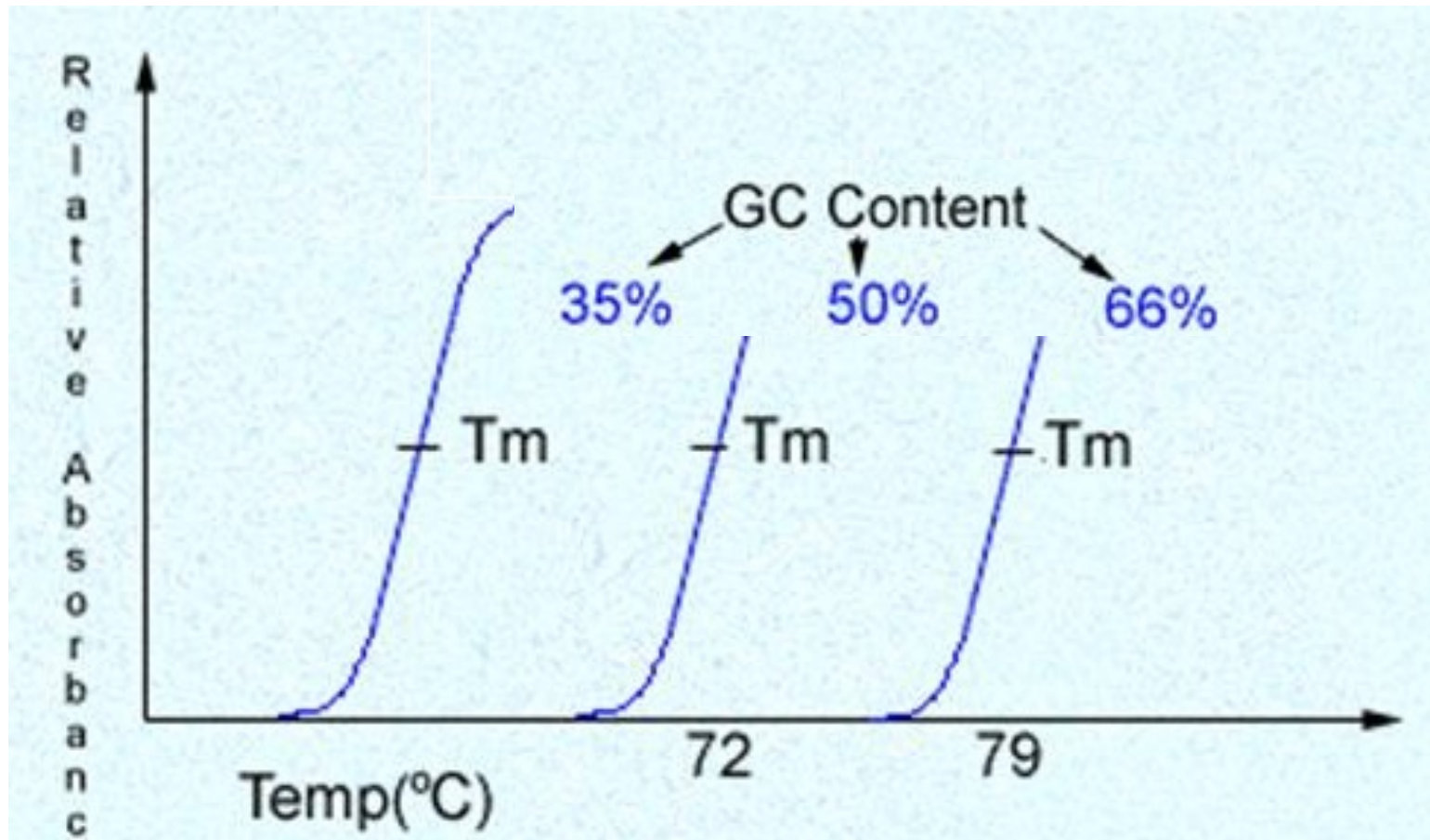
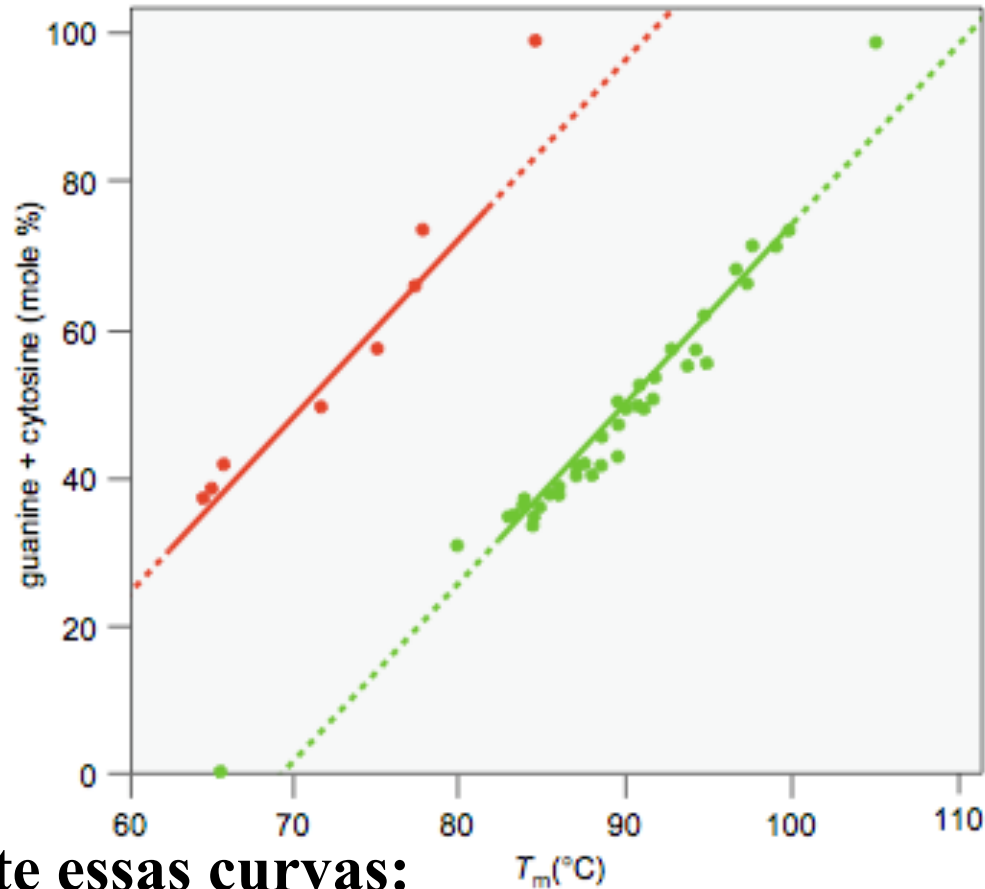


Figura 13. Exemplo de uma curva de desnaturalização térmica do DNA

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?**



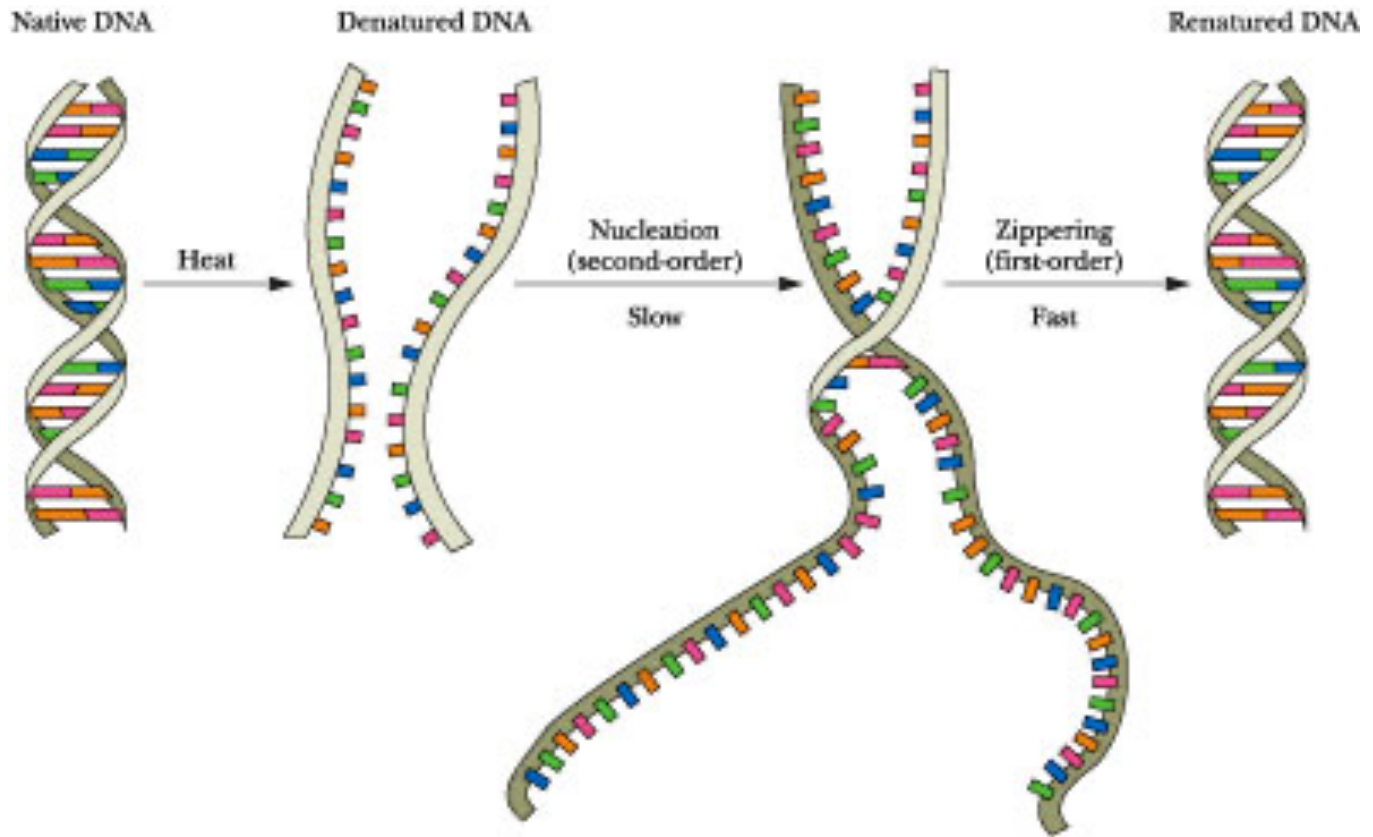
Interprete essas curvas:

vermelho baixa concentração de sal,

verde, alta concentração de sal.

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

**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

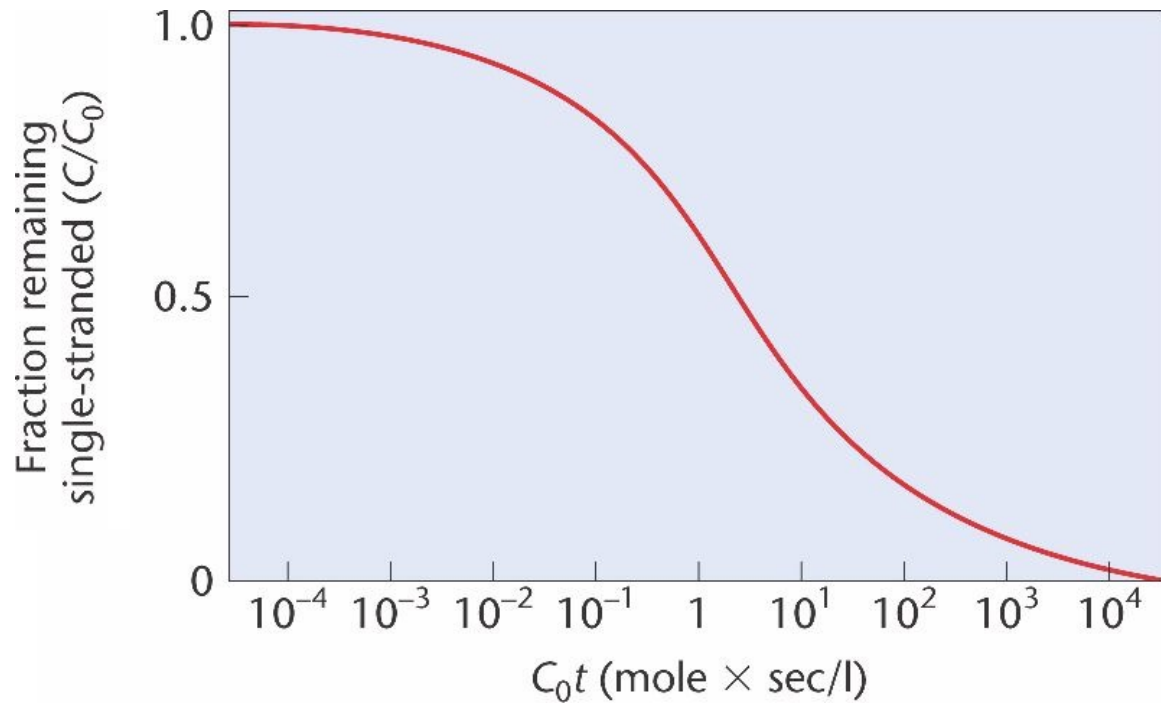
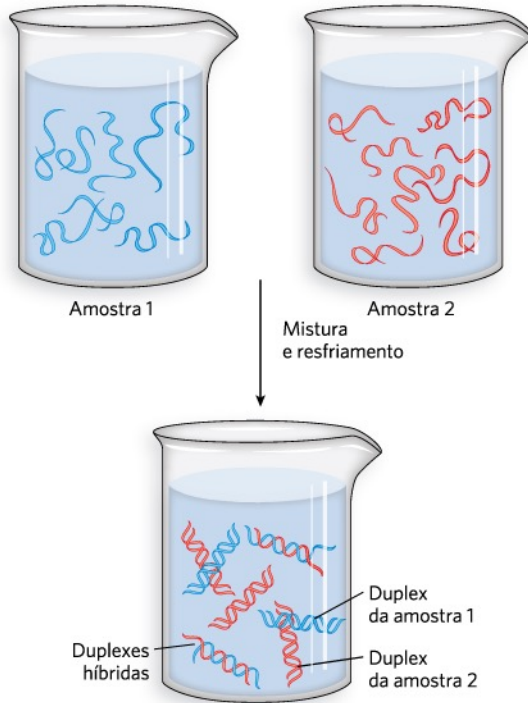
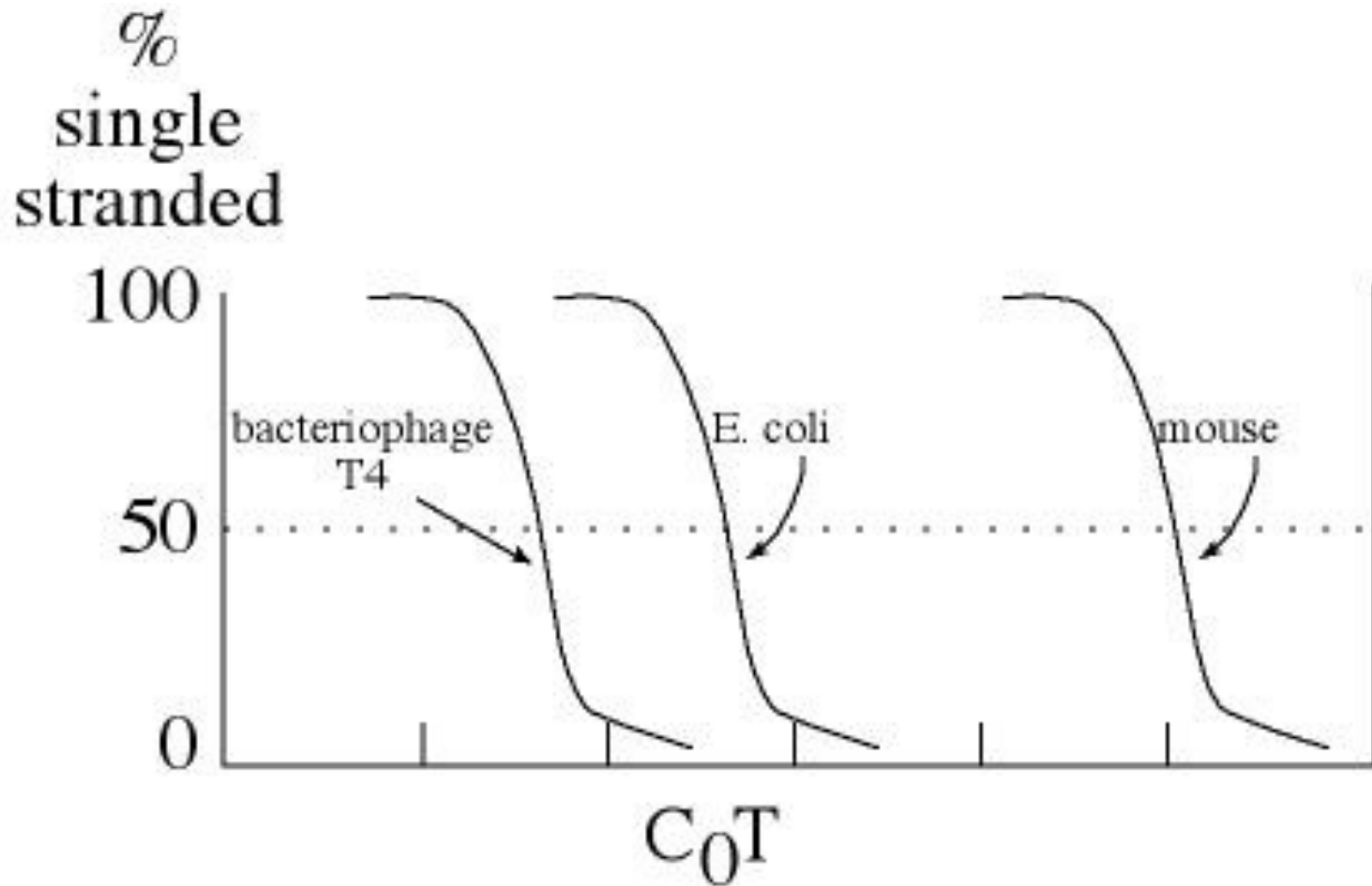


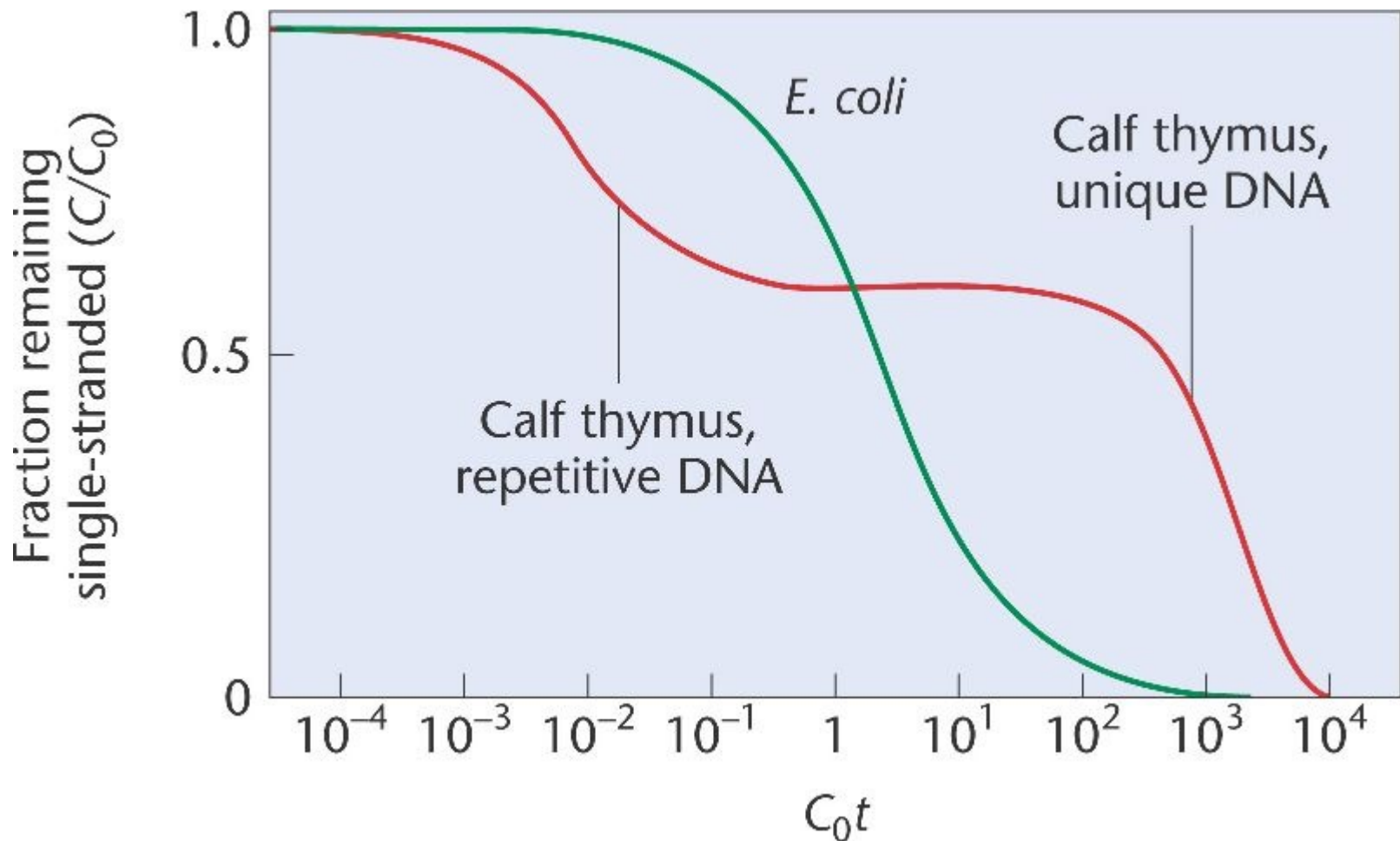
FIGURA 6-30 Hibridização de DNA interespecíes. Duas amostras de DNA podem ser comparadas pelo aquecimento, para desnaturar as fitas, seguidas pelo resfriamento da mistura, para permitir a formação de duplex entre as fitas complementares. Quanto maior a semelhança entre as duas amostras, maior o número 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)**

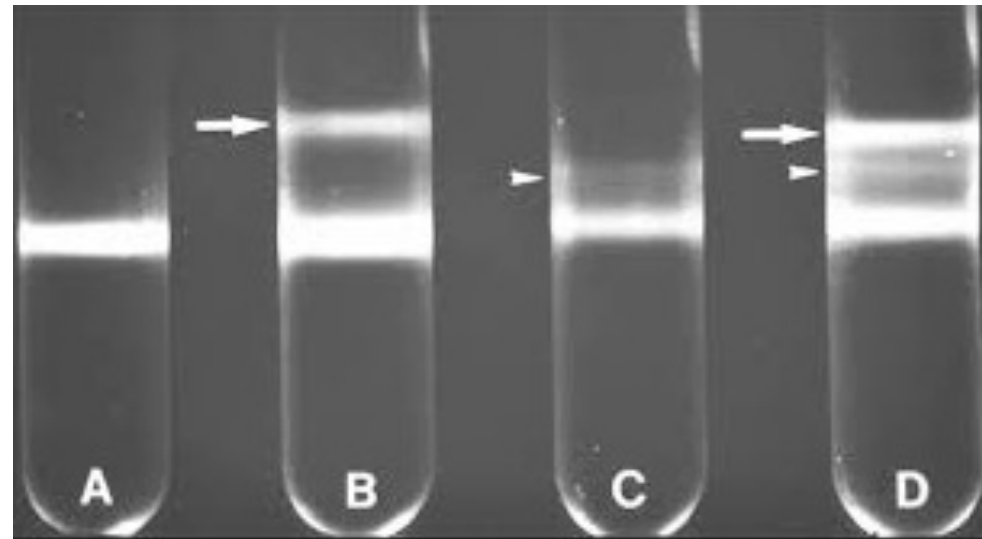
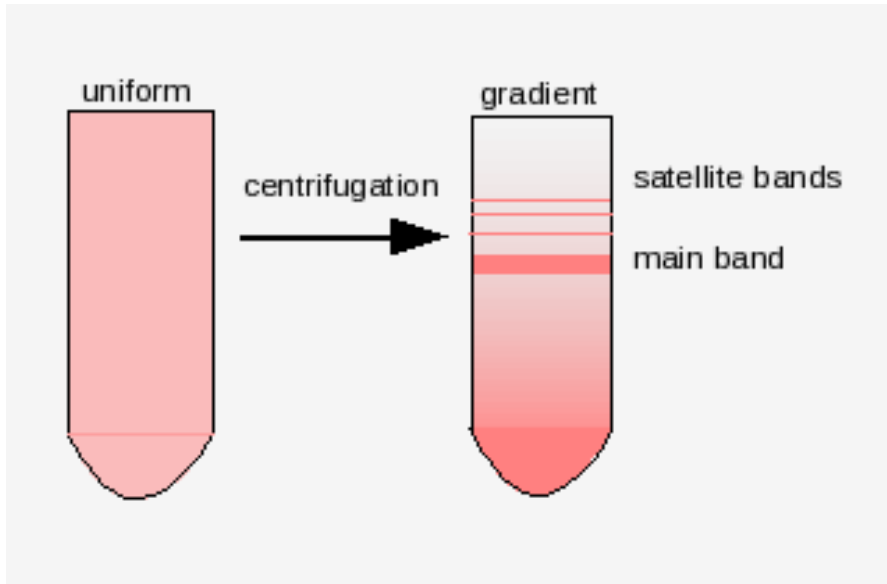
Por que?



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

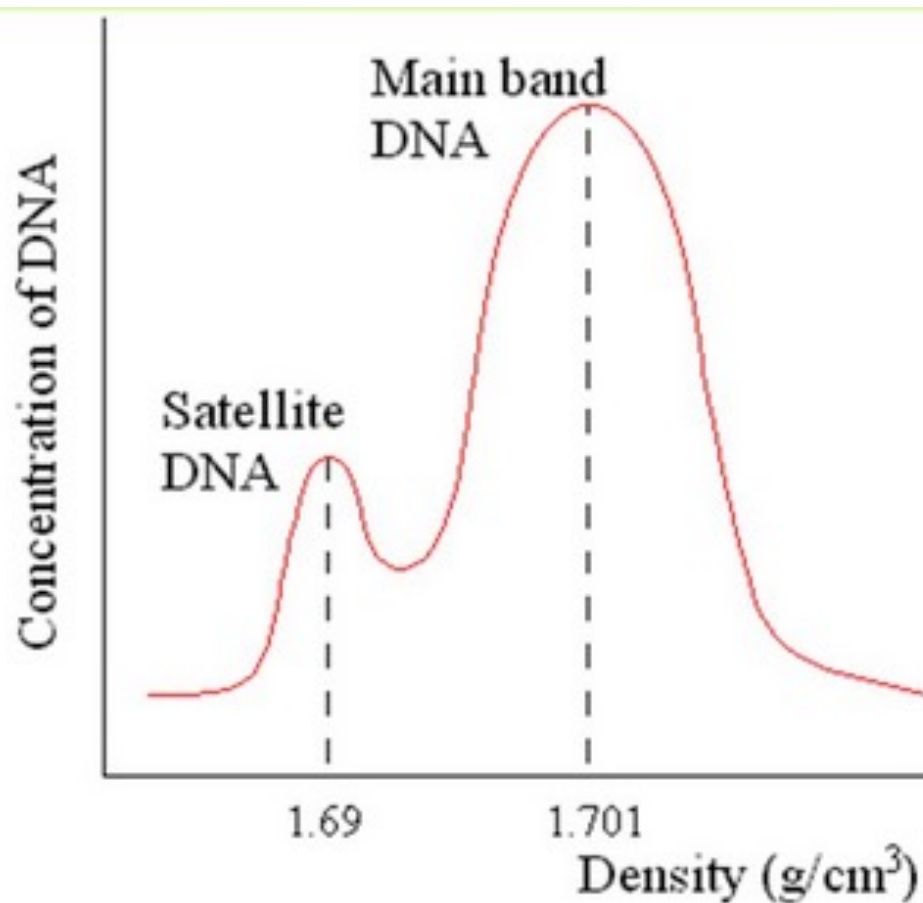


Esse DNA repetitivo também é chamado DNA satélite pois pode apresentar densidade diferente do genoma, E pode ser separado em gradiente de cloreto de césio (CsCl)!



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

Por que?



Desnaturação e hibridação podem ajudar em várias estratégias de Biologia Molecular

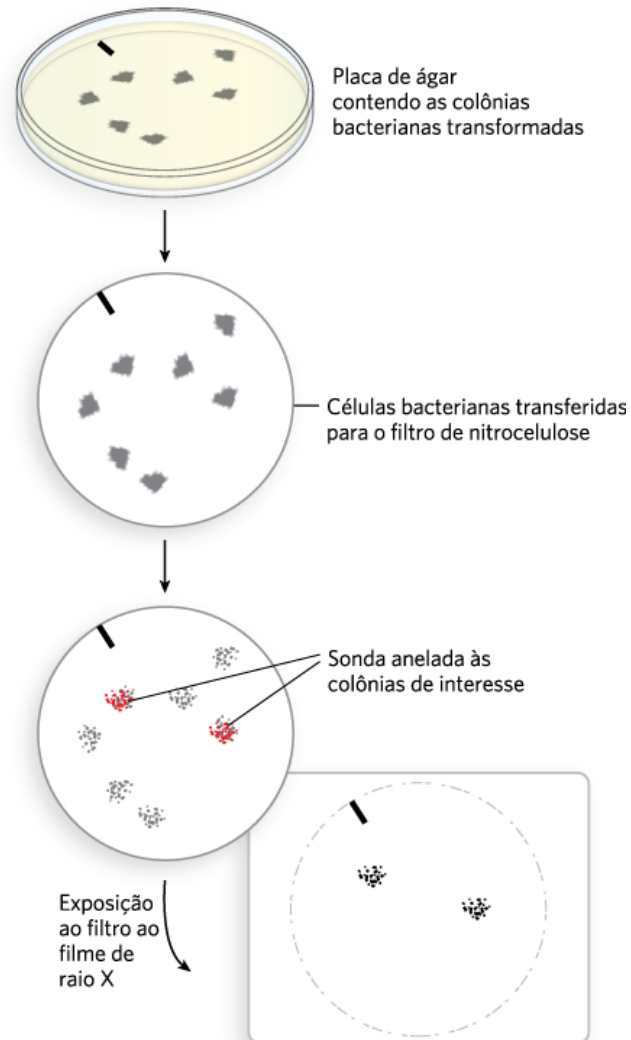
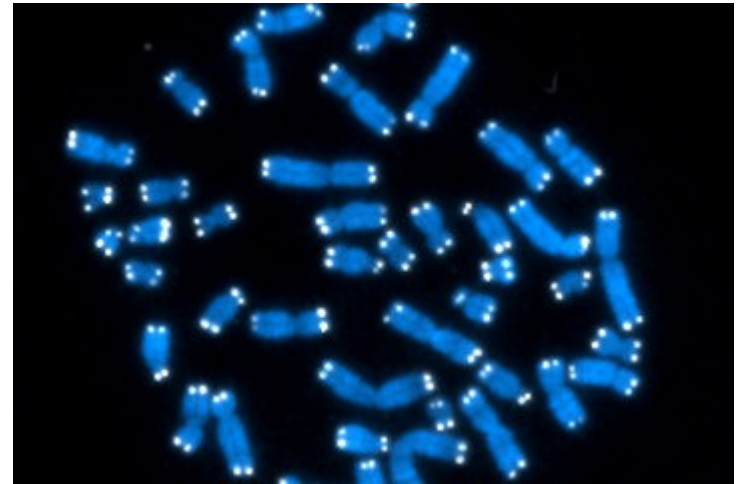
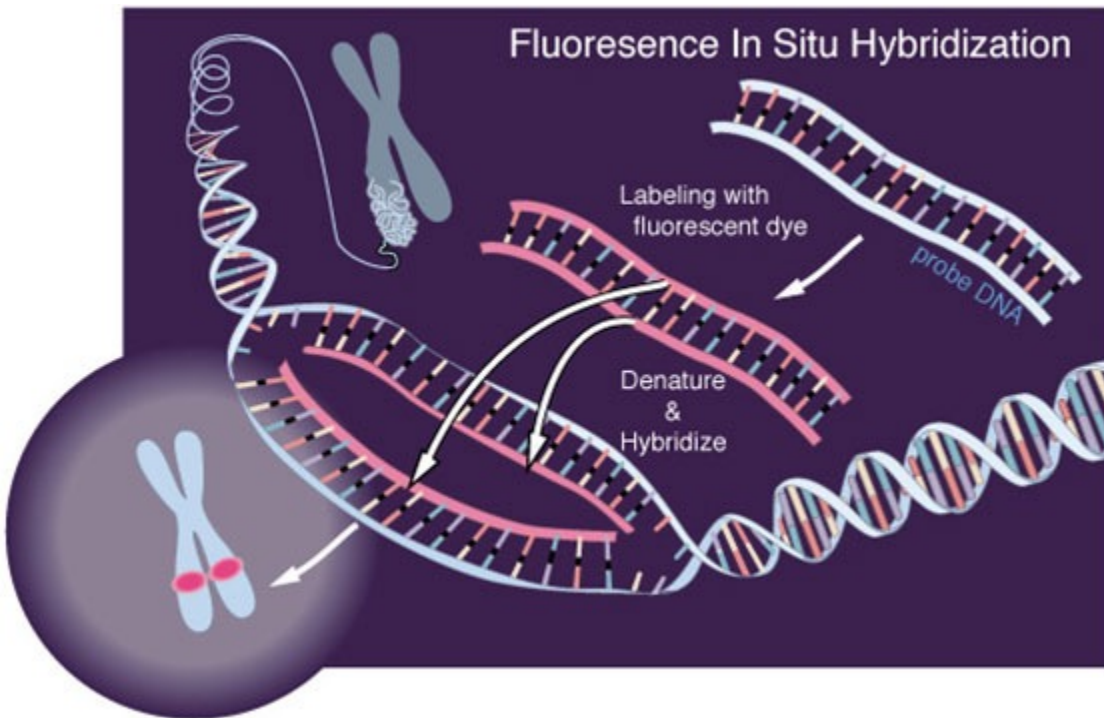


FIGURA 6-31 Hibridização em colônia. Veja o texto para detalhes.

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

Exemplo: telómeros.....



Super estrutura: O DNA circular não tem pontas livres e isso cria uma tensão de giro- e provoca a formação de superhélice.

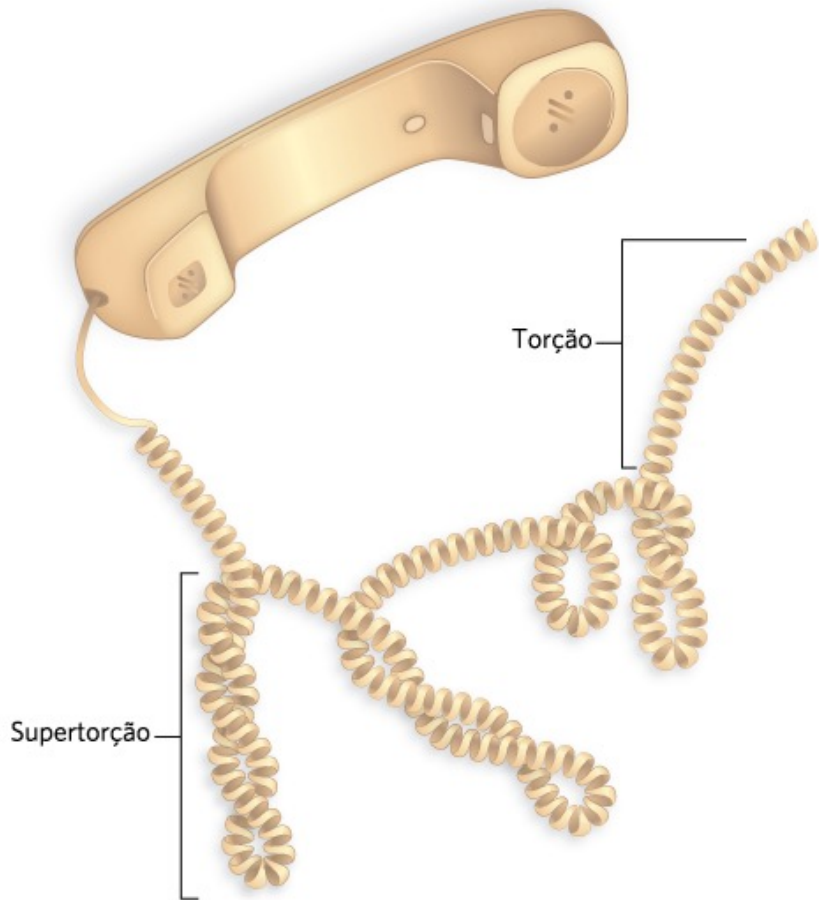


FIGURA 9-6 Supertorções. O cordão de um telefone antigo é torcido como uma hélice de DNA, e o cordão torcido pode se supertorcer.

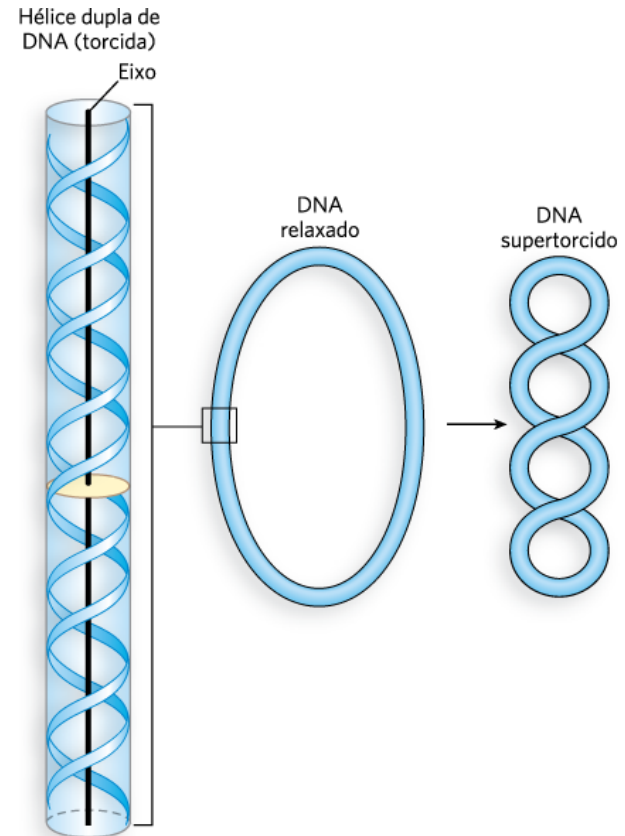


FIGURA 9-7 Supertorção do DNA. Quando se torce sobre si mesma, a fita dupla do DNA forma uma nova hélice, ou super-hélice. Normalmente, a super-hélice de DNA é chamada de supertorcida. [Fonte: Adaptada de N. R. Cozzarelli, T.C. Boles, and J. H. White, in *DNA Topology and Its Biological Effect* (N. R. Cozzarelli and J. C. Wang, eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, pp. 139-184.]

Imagine uma DNA ou RNA polimerase atuando na dupla-hélice.

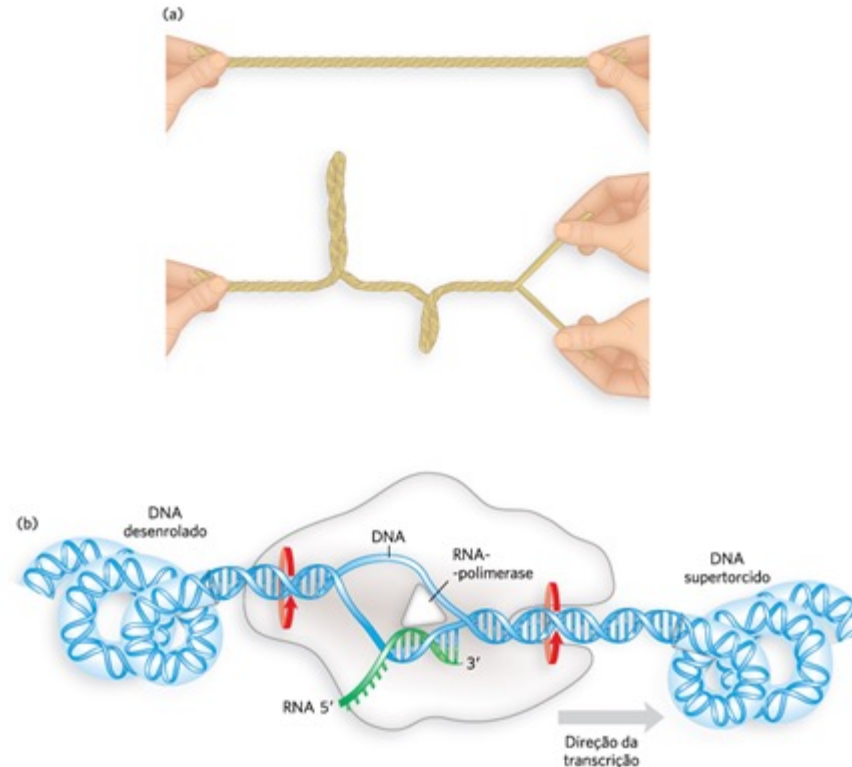


FIGURA 9-8 Os efeitos da replicação e transcrição na super-torção do DNA. Como o DNA é uma estrutura em hélice dupla, a separação das fitas leva a um estresse adicional e super-torção se o DNA estiver preso (sem liberdade para rodar) à frente da separação das fitas. (a) O efeito geral pode ser ilustrado torcendo-se duas fitas de elástico uma sobre a outra para formar uma hélice dupla. Se uma extremidade estiver presa, a separação das duas fitas na outra extremidade leva à

torção. (b) Em uma molécula de DNA, a progressão da DNA-polimerase ou RNA-polimerase (como apresentado aqui) ao longo do DNA envolve a separação da fita dupla. Como resultado, o DNA fica supertorcido à frente da enzima e se desenrola atrás dela. As setas vermelhas indicam a direção da torção. [Fonte: (a) Adaptada de W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, 1984, p. 452.]

Os processos de transcrição e replicação promovem tensão na hélice, que precisa ser resolvido!!!

**Um DNA circular está sujeito a essa torção.
Veja o exemplo nessa foto de microscopia eletrônica.**

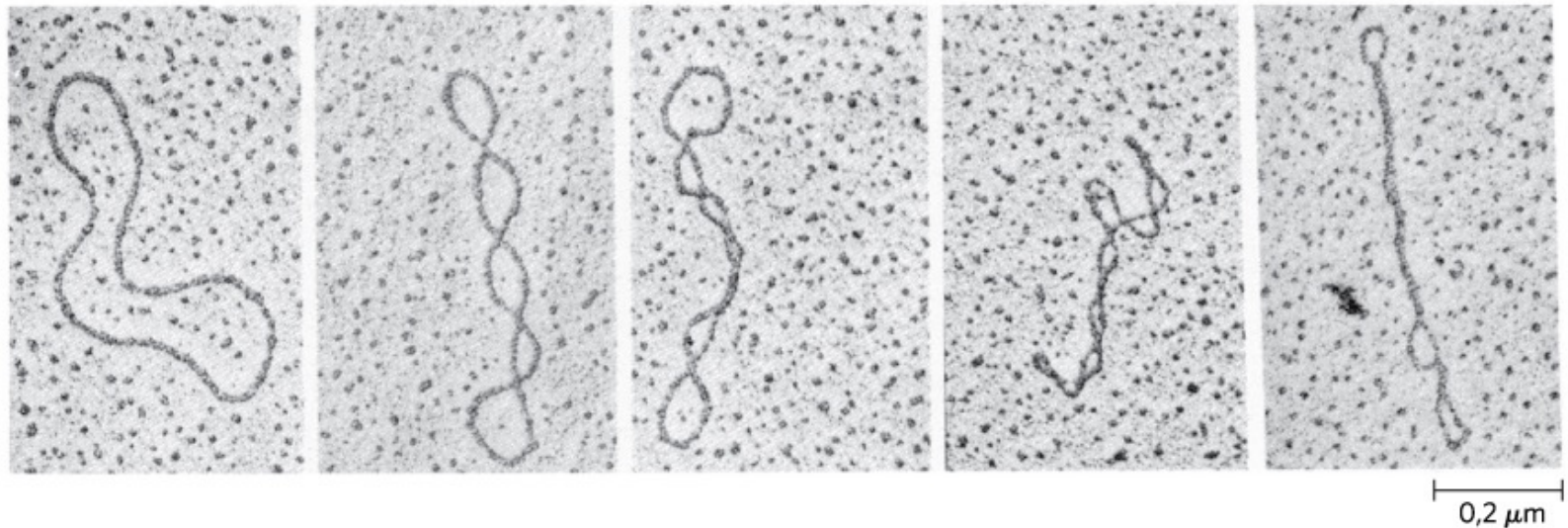
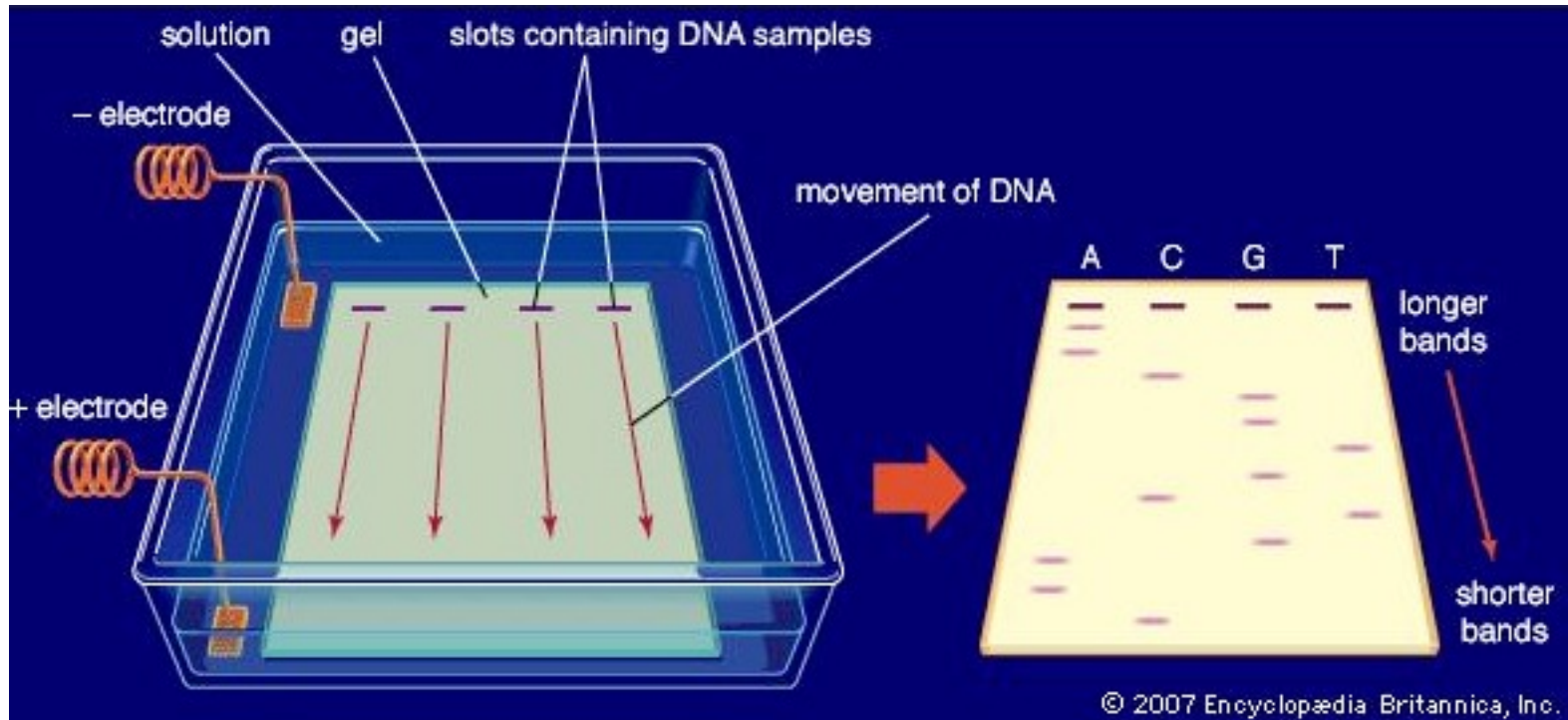


FIGURA 9-9 DNA plasmidial circular fechado relaxado e supertorcido. A micrografia eletrônica de varredura à extrema esquerda mostra o DNA relaxado. Supertorções crescentes são apresentadas da esquerda para a direita. [Fonte: Laurien Polder, de A. Kornberg, *DNA replication*, W. H. Freeman, 1980, p.29.]

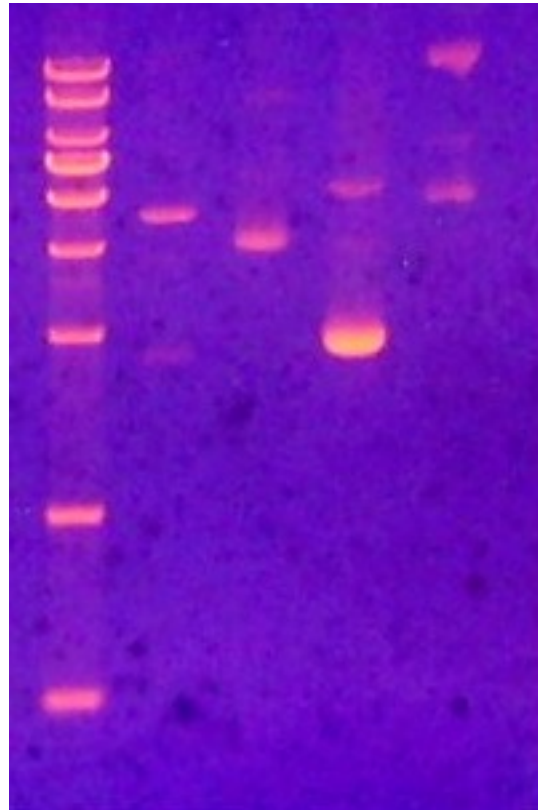
Mas isso existe de fato na célula? O que isso implica para o processamento do DNA?

Formas circulares, lineares e supercoil migram de forma diferente em eletroforese gel de agarose,

- gel de agarose? Aliás, o que é isso?
Para que polo migra o DNA?



Como deve migrar uma molécula de DNA supercoil (Forma 1- F1), Linear (Forma 2- F2) ou circular (Forma 3- F3)?



F2
F3
F1

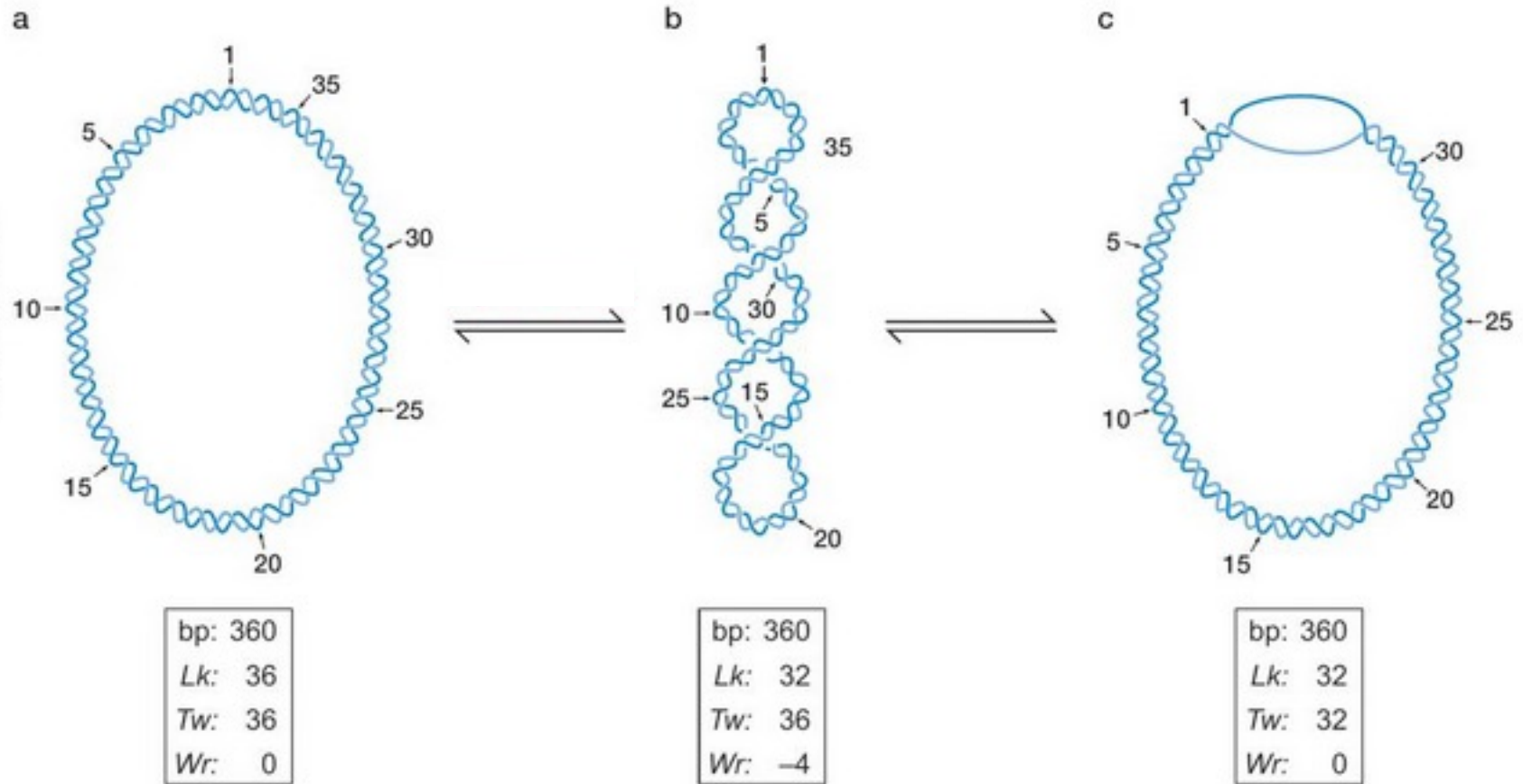


FIGURE 4-17 Topological states of covalently closed, circular (ccc) DNA. The figure shows conversion of the relaxed (a) to the negatively supercoiled (b) form of DNA. The strain in the supercoiled form may be taken up by supertwisting (b) or by local disruption of base pairing (c). (Adapted from a diagram provided by Dr. M. Gellert.) (Modified, with permission, from Kornberg A. and Baker T.A. 1992. *DNA replication*, 2nd ed., Fig 1.21, p. 32. © W.H. Freeman.)

Uma quebra simples no DNA faz ele perder a torção.... E desnaturação do DNA também pode reduzir a tensão.

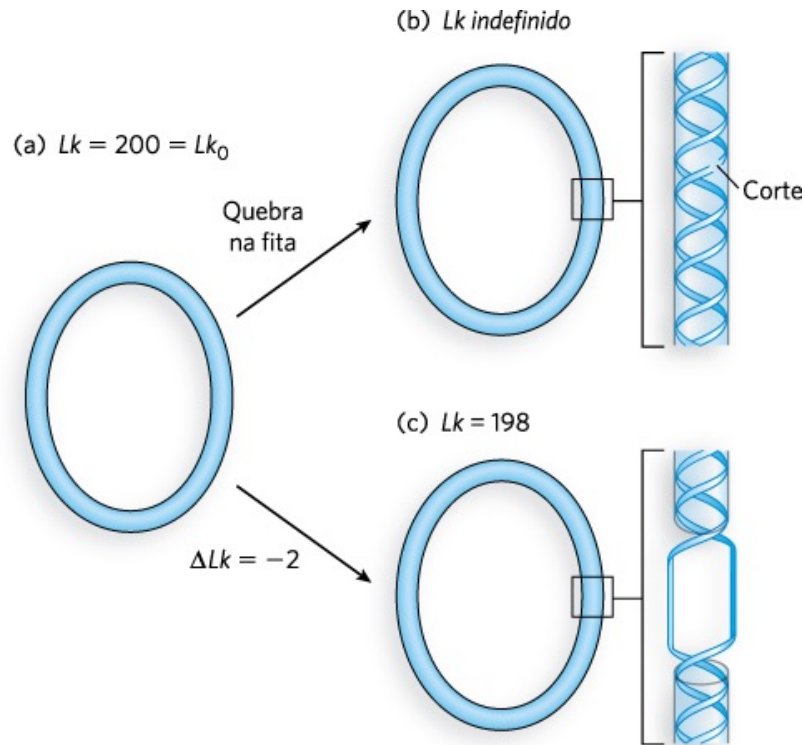


FIGURA 9-13 Número de ligação de DNAs circulares fechados. Uma molécula de 2.100 pb é apresentada em três formas: (a) relaxada, $Lk = 200$; (b) relaxada com uma quebra em uma fita, Lk indefinido; (c) destorcida em duas voltas, $Lk = 198$. A molécula destorcida geralmente é supertorcida, mas o desenrolamento também facilita a separação das fitas de DNA.

E como a célula lida com essas estruturas supercoil??

Elas existem nos cromossomos?

O Cromossomo tem a ponta livre?

A estrutura de um solenoide pode aliviar torções na molécula de DNA.



Fita esticada (DNA relaxado)



Grande contorção, pequenas mudanças na torção



Contorção zero, grande mudança na torção

FIGURA 9-15 Contorção e torção. A fita bege representa o eixo de uma molécula de DNA relaxada. As tensões na fita destorcida podem se manifestar como contorção ou torção. Alterações topológicas no número de ligações em geral são acompanhadas por mudanças geométricas na contorção e torção.

Como isso pode ajudar na estrutura do cromossomo?

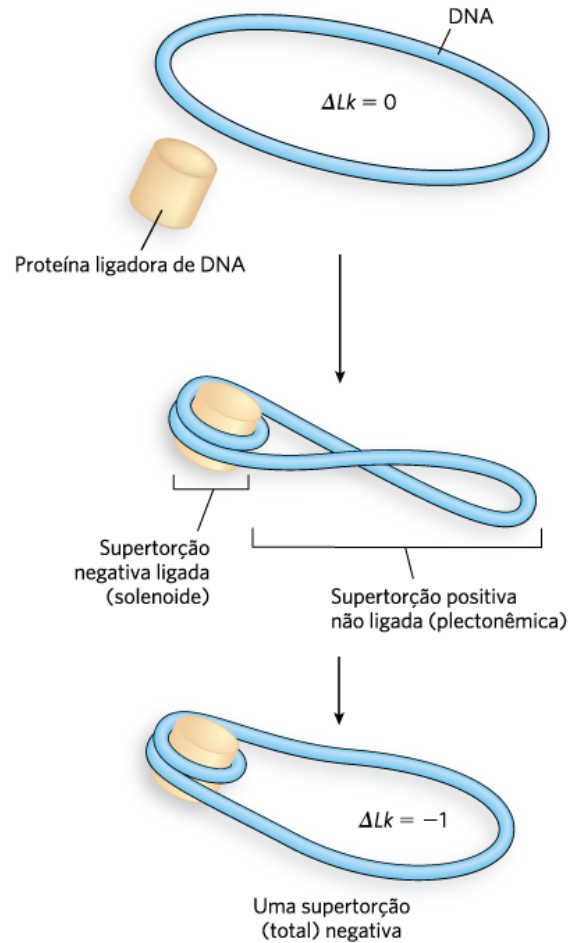


FIGURA 9-22 A origem da supertorção negativa no DNA eucariótico. Quando o DNA é firmemente enrolado ao redor da proteína ligadora de DNA ou complexo proteico, é fixada uma supertorção negativa solenoide no DNA. Em uma molécula de DNA tensionada, as supertorções positivas ocorrem em outros lugares para compensar a tensão resultante. O relaxamento de supertorções positivas não ligadas pelas topoisomerases leva ao desenvolvimento de uma super-hélice negativa no DNA.

A estrutura em cruz também pode aliviar torções na molécula de DNA.

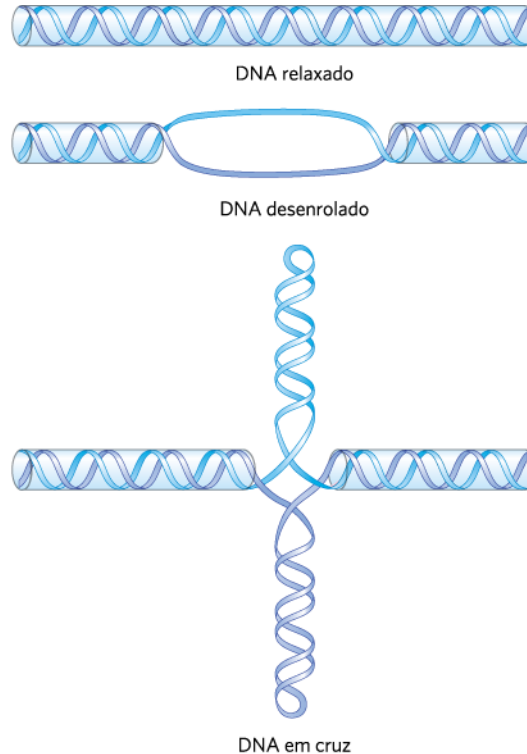


FIGURA 9-16 Promoção da estrutura em cruz pelo desenrolamento do DNA. A cruz pode se formar nas sequências palindrômicas, mas ocorrem aleatoriamente no DNA relaxado porque o DNA circular acomoda mais pares de bases do que a estrutura em cruz. O DNA desenrolado facilita a separação parcial da fita necessária para promover a formação da cruz nas sequências adequadas.

Que tipo de sequencias podem fazer essa cruciforme?

O que são sequencias palindromicas em DNA?

**Além disso, as moléculas de DNA podem sofrer verdadeiros nós!
Por exemplo, após a replicação de moléculas circulares.**

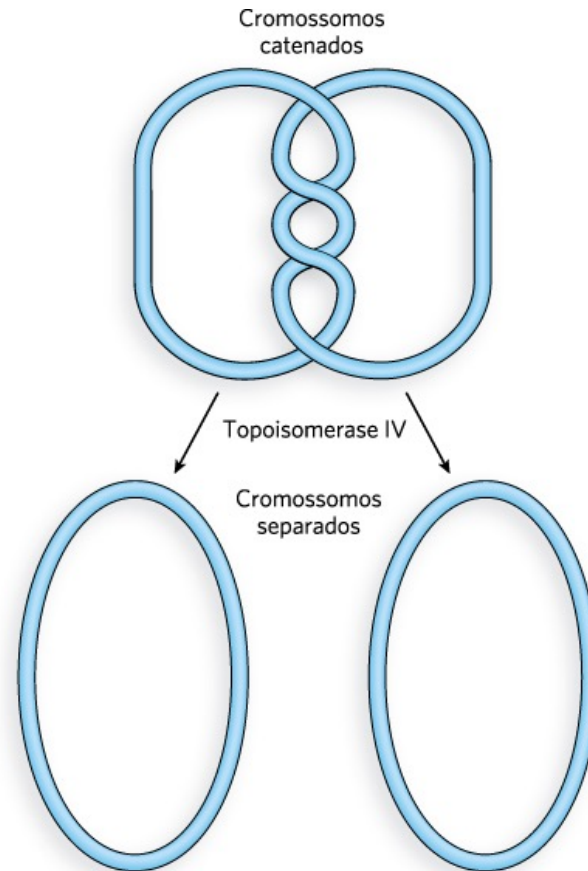


FIGURA 9-21 Resolvendo o problema topológico com topoisomerases tipo II. A topoisomerase tipo II resolve os nós e catenanos que surgem no DNA passando um duplex por uma quebra temporária da fita dupla de outro duplex.

E o DNA está sempre sem pontas livres.... Mesmo nos cromossomos existem alças fixas no arcabouço deste!!!! O que prende o DNA?

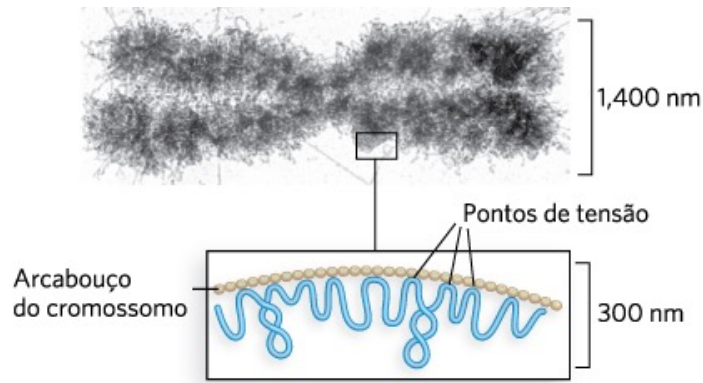
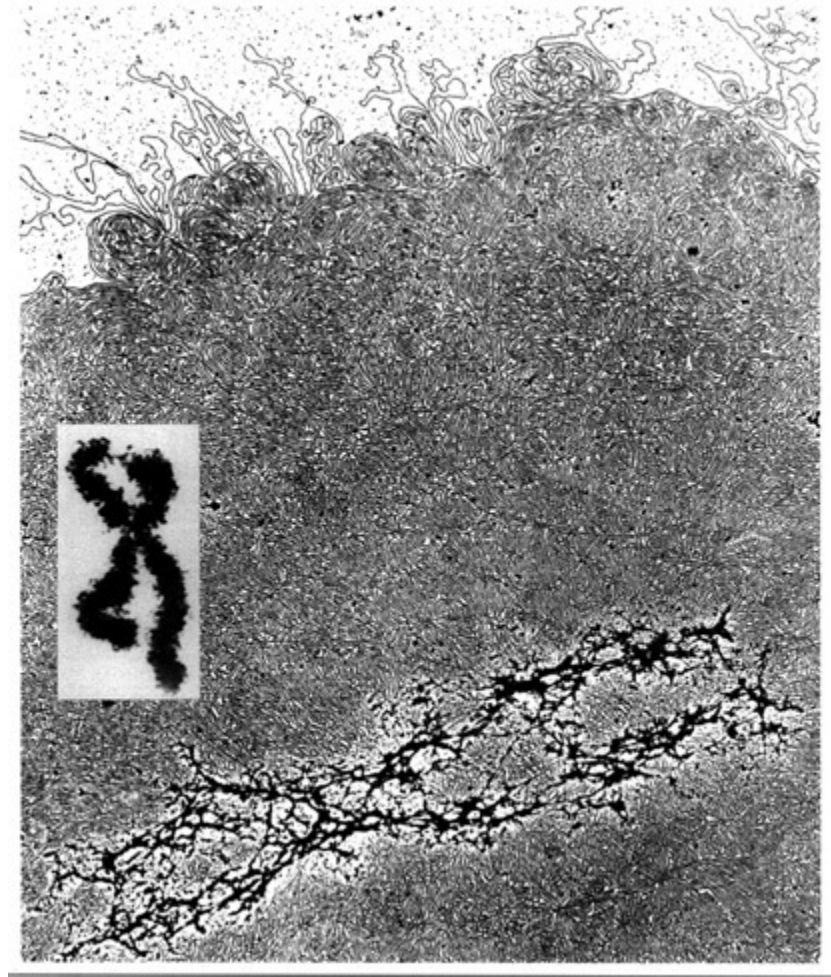
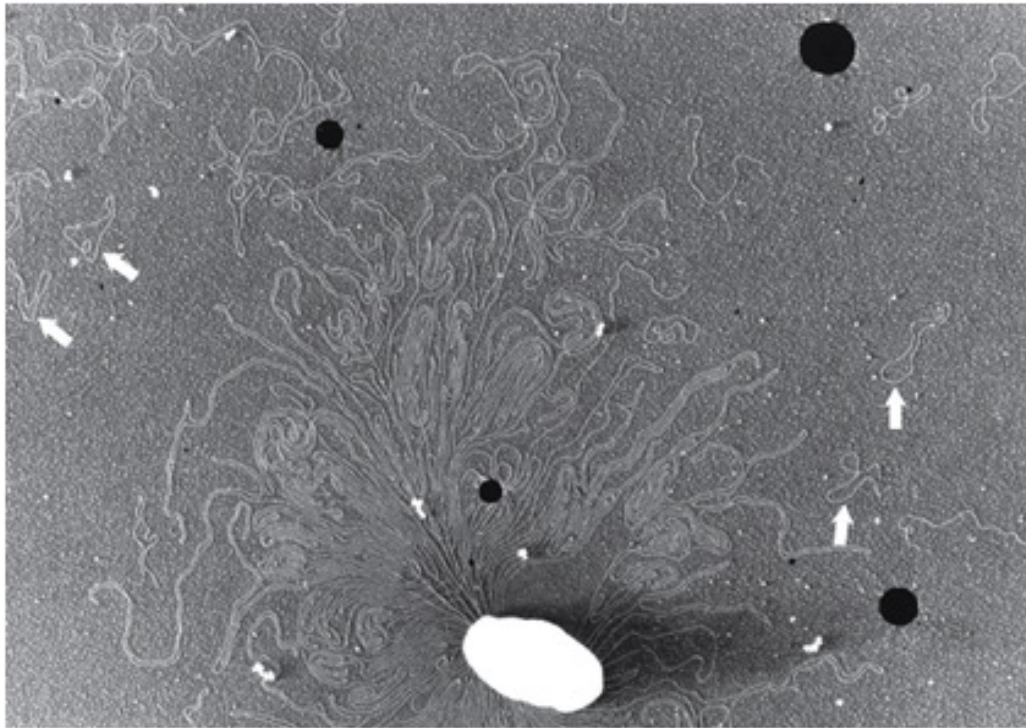


FIGURA 9-11 Alças em um cromossomo eucariótico forçadas por proteínas do arcabouço. O arcabouço da cromatina se liga ao cromossomo em intervalos, com o DNA localizado entre os pontos de ligação definindo as alças que são topologicamente tensas. [Fonte: Fotografia de G. F. Bahr/Biological Photo Service.]



Assim o problema de tensão na dupla hélice é normal em nossas células!

As alças são observadas também em genoma bacteriano, ou de bacteriófagos: vejam essas fotos abaixo



0,5 μ m

Como resolver tantos problemas gerados por questões estruturais??

Não seria possível dar uma tesoura para o DNA tirar os nós?

Essas tesouras são as topoisomerases!

Topoisomerase I, cliva uma das fitas e reduz a torção em 1 volta.

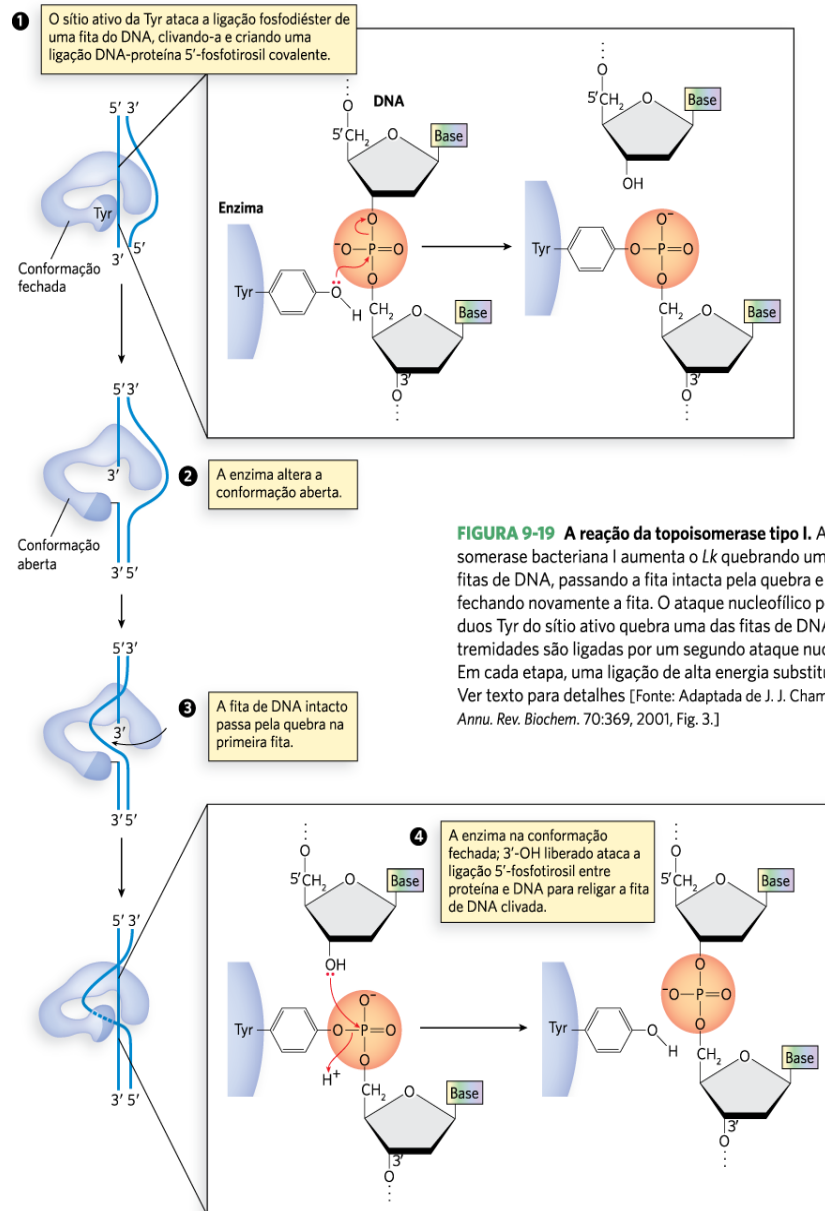


FIGURA 9-19 A reação da topoisomerase tipo I. A topoisomerase bacteriana I aumenta o Lk quebrando uma das fitas de DNA, passando a fita intacta pela quebra e então fechando novamente a fita. O ataque nucleofílico por resíduos Tyr do sítio ativo quebra uma das fitas de DNA. As extremidades são ligadas por um segundo ataque nucleofílico. Em cada etapa, uma ligação de alta energia substitui a outra. Ver texto para detalhes [Fonte: Adaptada de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 3.]

Topoisomerase II, cliva as duas fitas e reduz o Lk em 2. Em procariontes temos a girase: faz hélices negativas!

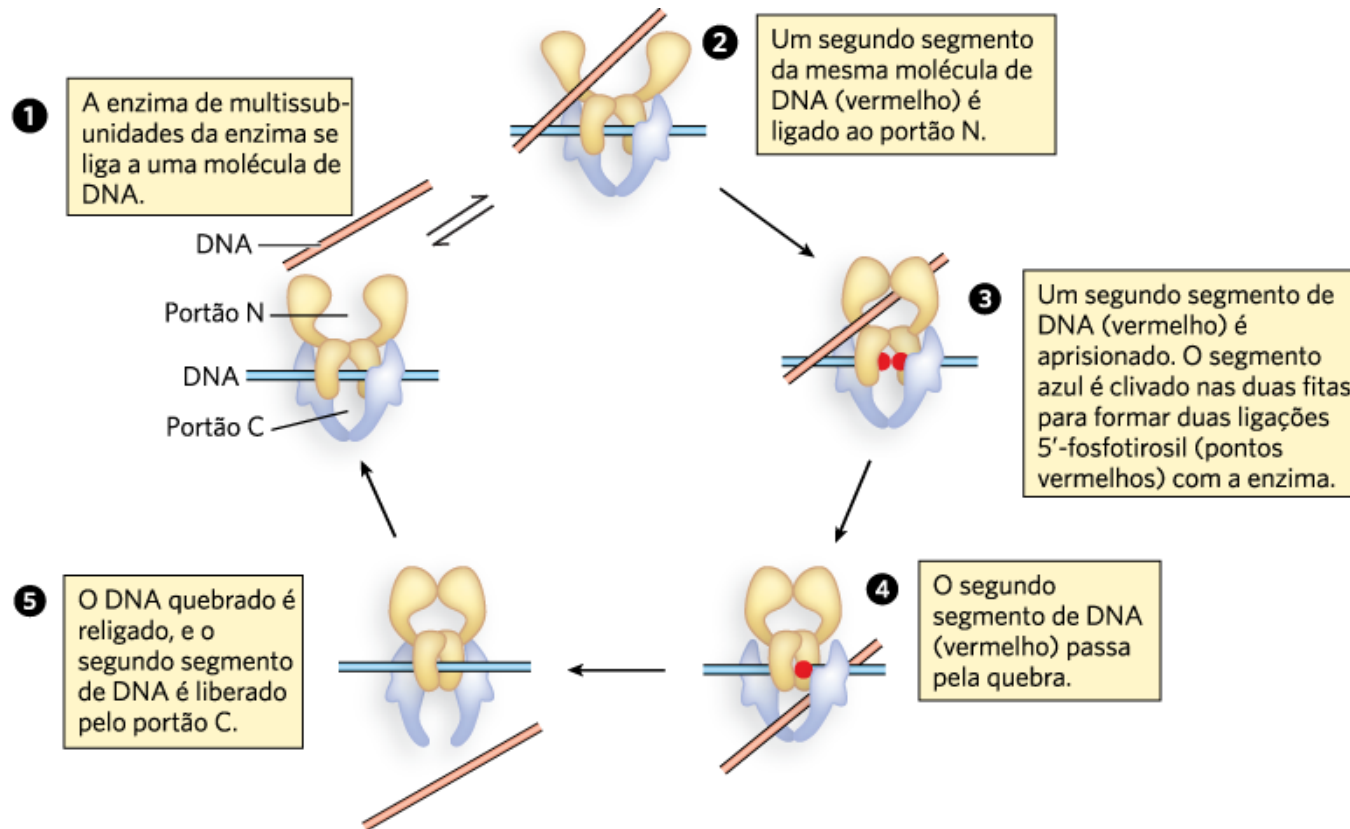


FIGURA 9-23 Alteração do número de ligação pela topoisomerase tipo II. O mecanismo geral é similar ao da DNA-girase bacteriana (ver Figura 9-20b), com um segmento de DNA duplex intacto que passa pela quebra transitória da

fita dupla no outro segmento. A estrutura da enzima e o uso de ATP são distintos nesta reação. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 11.]

Podemos visualizar esses topoisômeros em simples géis de agarose!

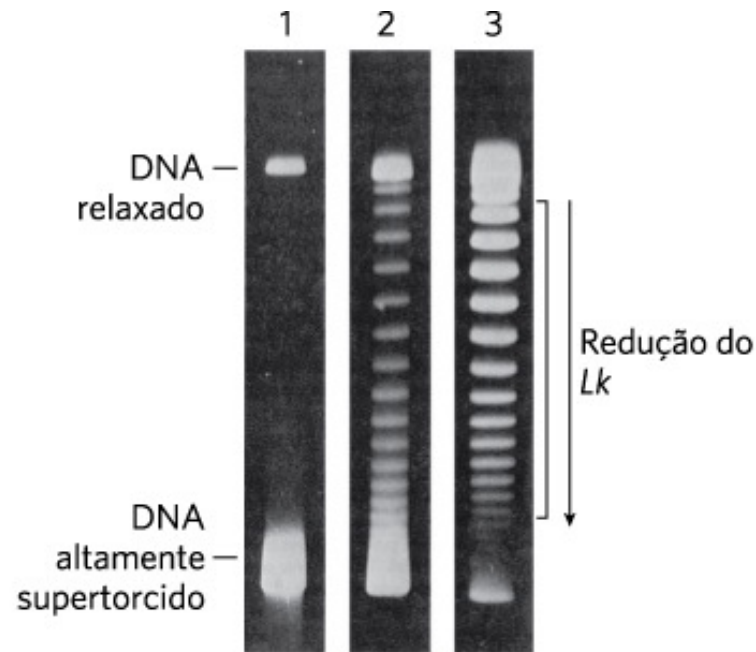
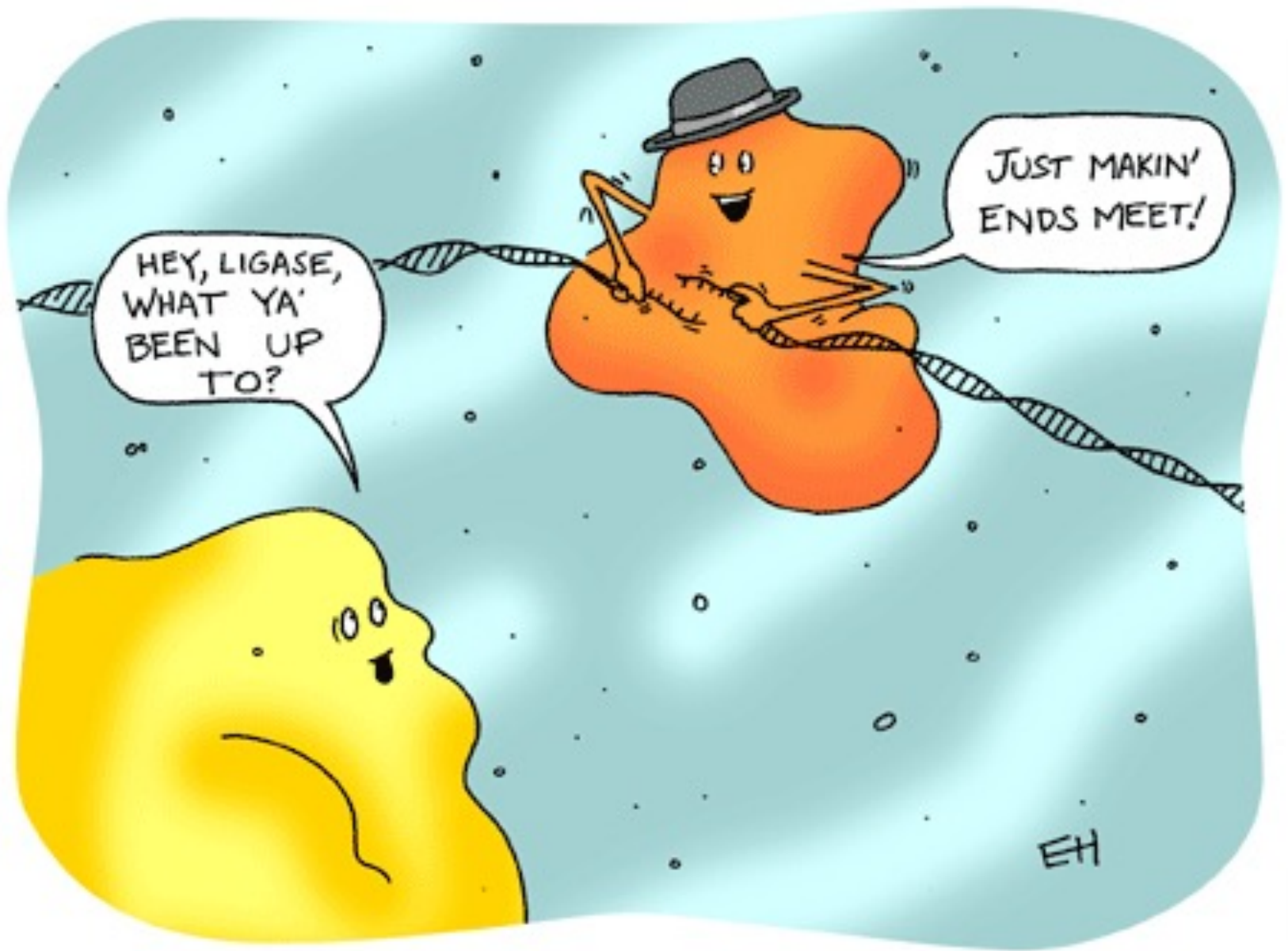


FIGURA 9-18 Visualizando os topoisômeros. Neste experimento, as moléculas de DNA (plasmídeos) possuem um número idêntico de pares de bases mas diferem no grau de supertorção. Na coluna 1, o DNA altamente supertorcido migra como uma banda única. As colunas 2 e 3 mostram o efeito do tratamento do DNA supertorcido com uma topoisomerase tipo I; o DNA na coluna 3 foi tratado por mais tempo do que o DNA da coluna 2. Cada banda da coluna 3 na região dos colchetes contém DNA plasmidial com o mesmo número de ligações; o Lk muda por 1 de uma banda para a outra. [Fonte: W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2553, 1975.]

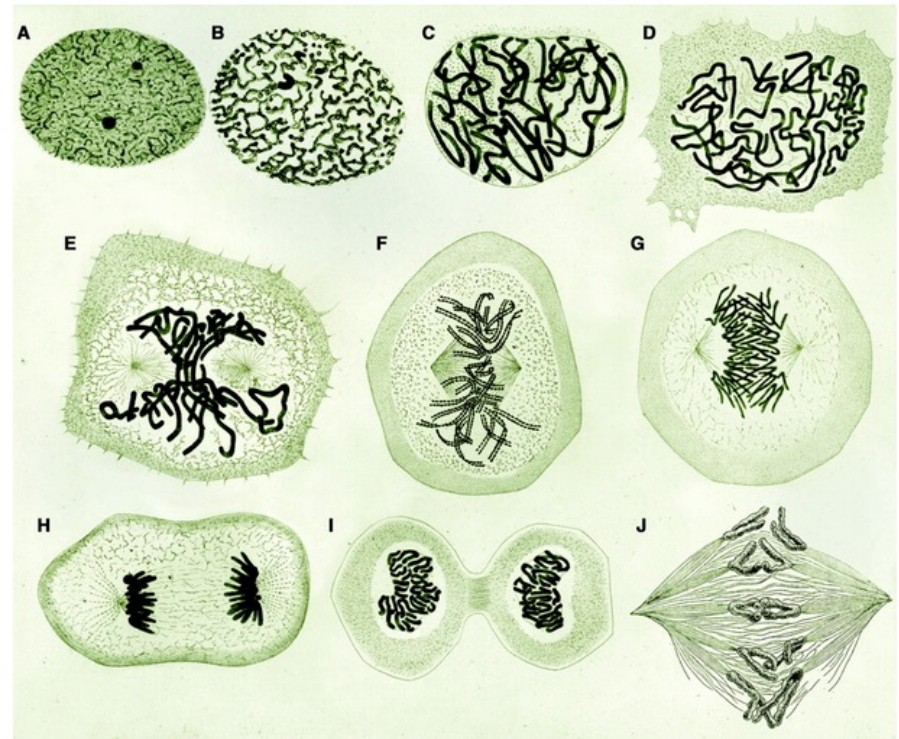
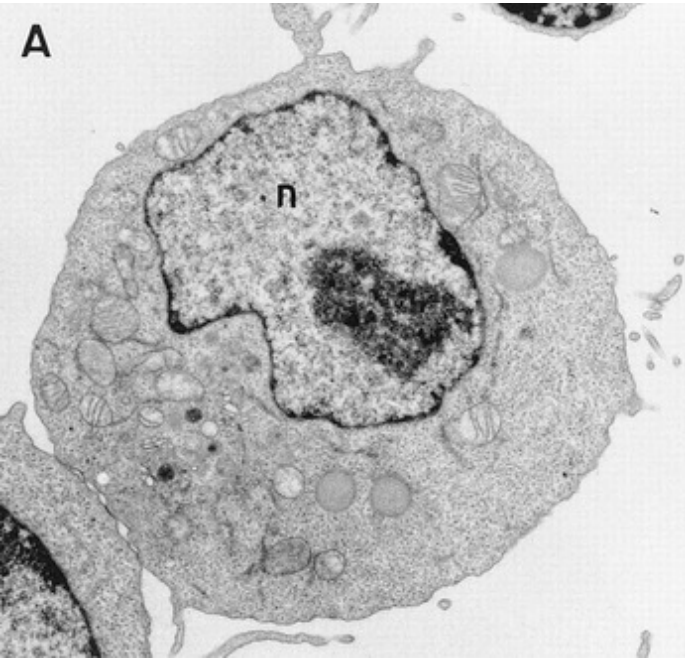


HEY, LIGASE,
WHAT YA'
BEEN UP
TO?

JUST MAKIN'
ENDS MEET!

EH

O Genoma está no núcleo: como? Como ele se comporta na divisão?



Células em mitose desenhado por
Walther Flemming 1879!

A estrutura da cromatina observada em microscópio eletrônico!

The Fundamental Chromatin Fiber is the 10 nm Fiber (DNA Associated With Nucleosomes)

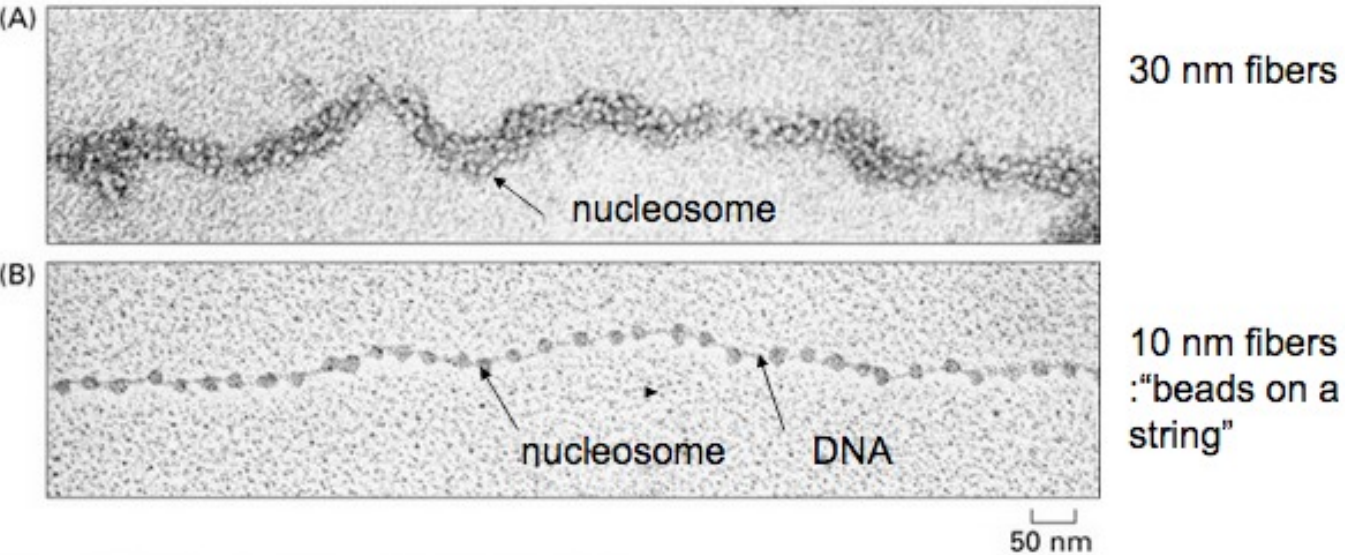
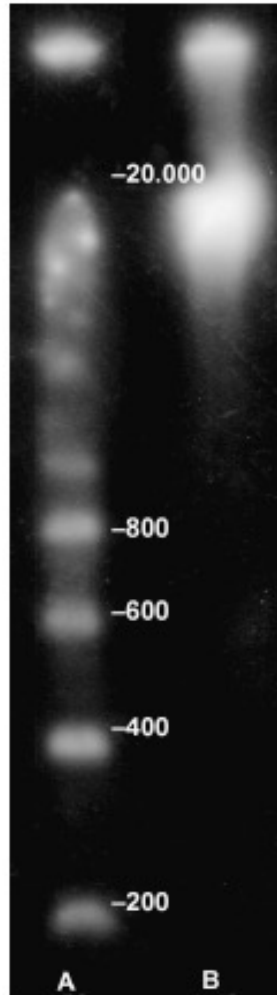


Figure 4-23. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Como um colar de contas!

Digestão de uma cromatina com nuclease revela uma estrutura regular!



O Que dá essa regularidade!

Figura 10.20 A. Núcleos de células de inseto foram digeridos com nuclease micrococcal; em seguida, o DNA foi extraído e os fragmentos obtidos analisados em gel de agarose. **B.** DNA de núcleos de células de inseto que não passaram pelo tratamento com nuclease micrococcal. A numeração refere-se aos tamanhos dos fragmentos de DNA expressos

Probing the 10 nm Fiber With Nuclease

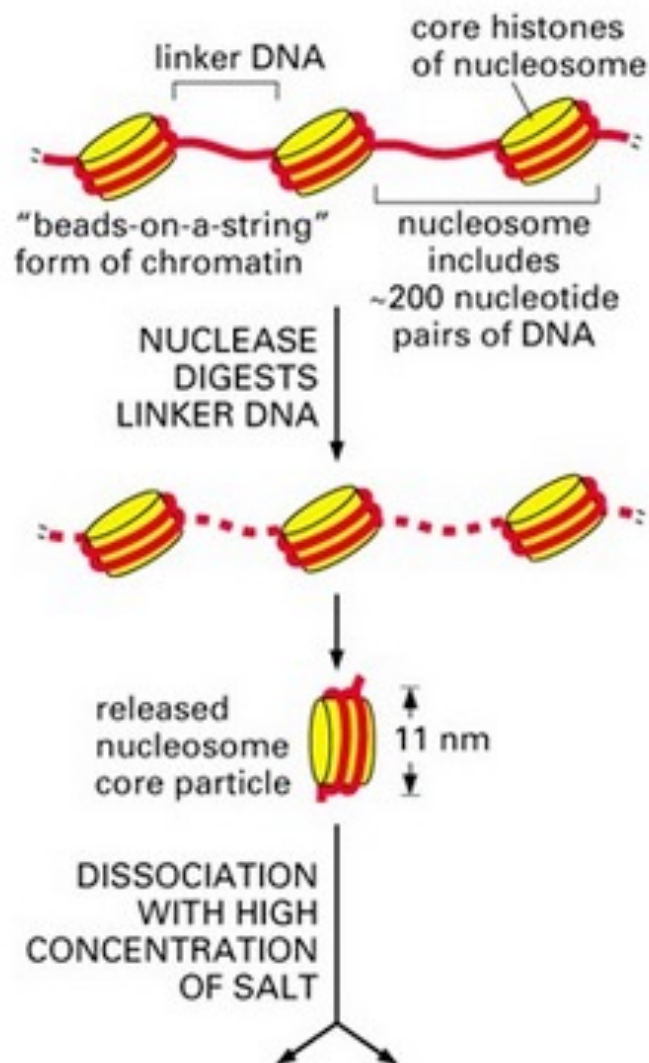


Figure 4-24 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Nucleosomes Are Composed of DNA and an Octamer of Four Histone Pairs + DNA

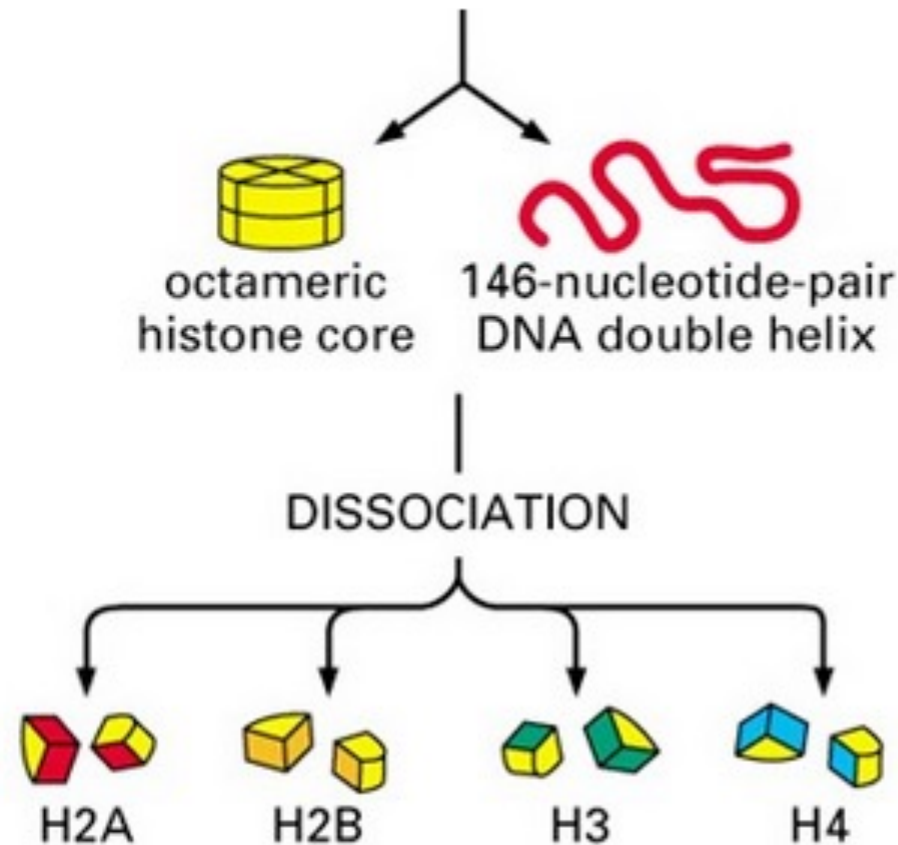
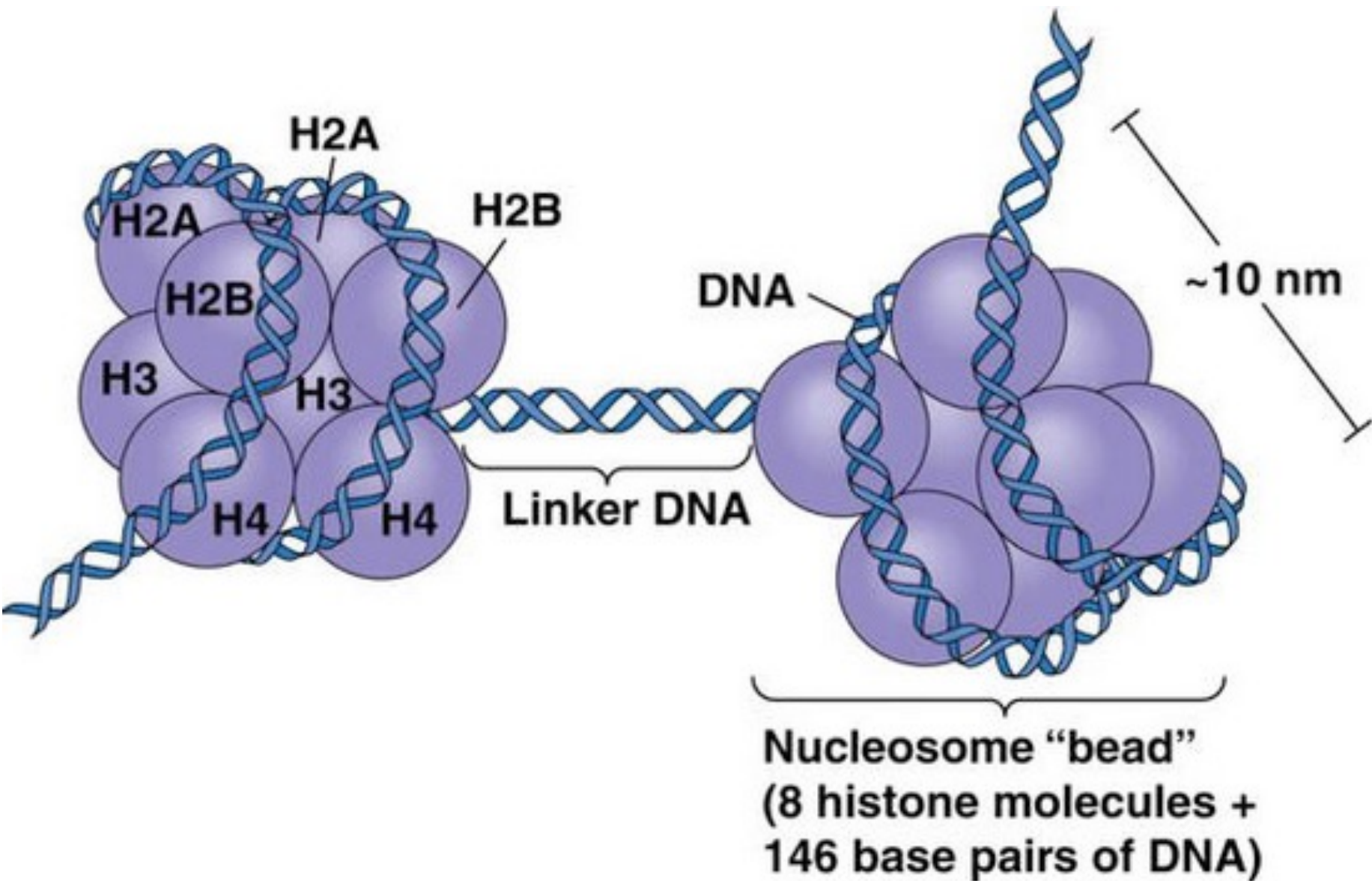


Figure 4-24 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



Nucleosome Structure

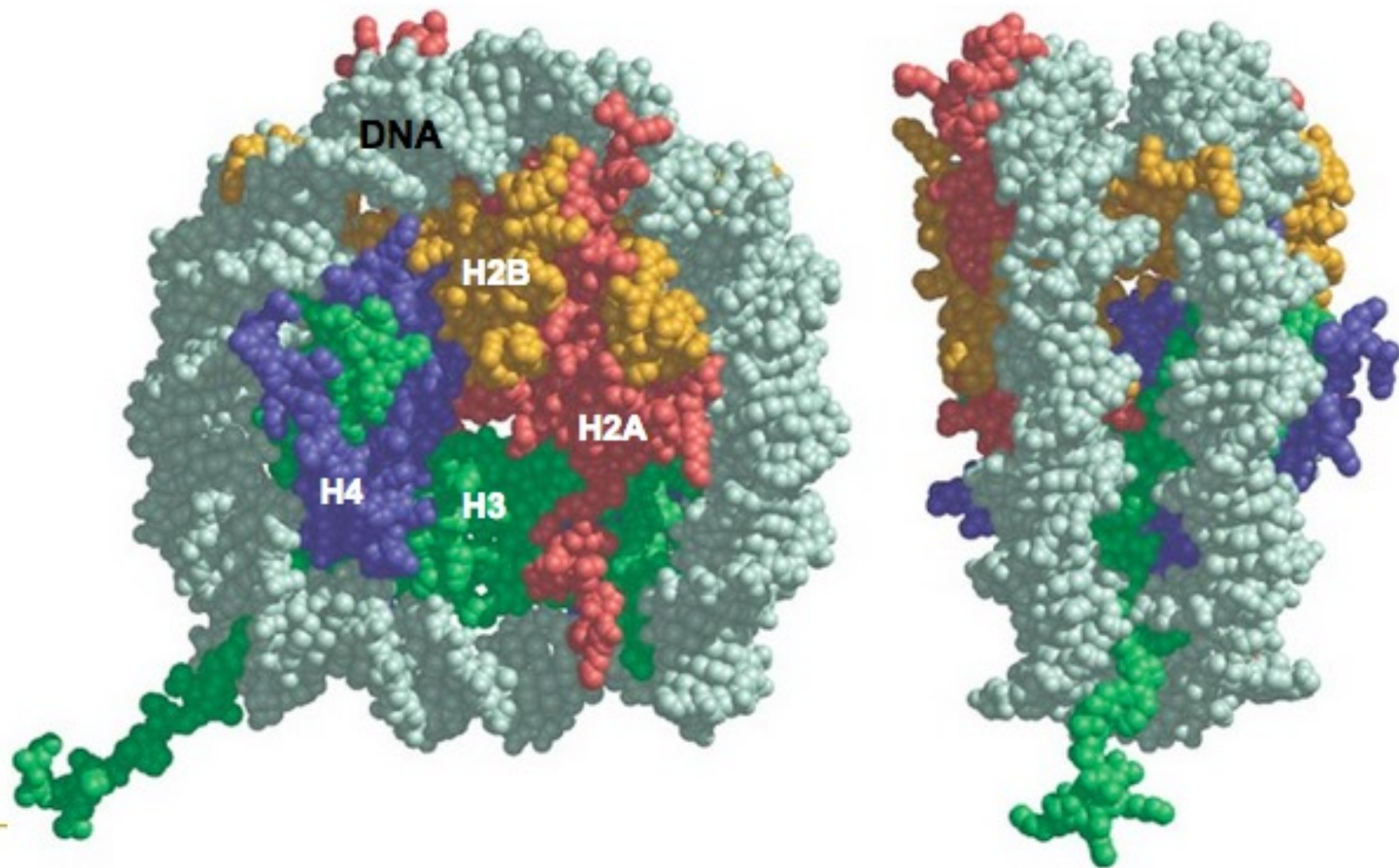
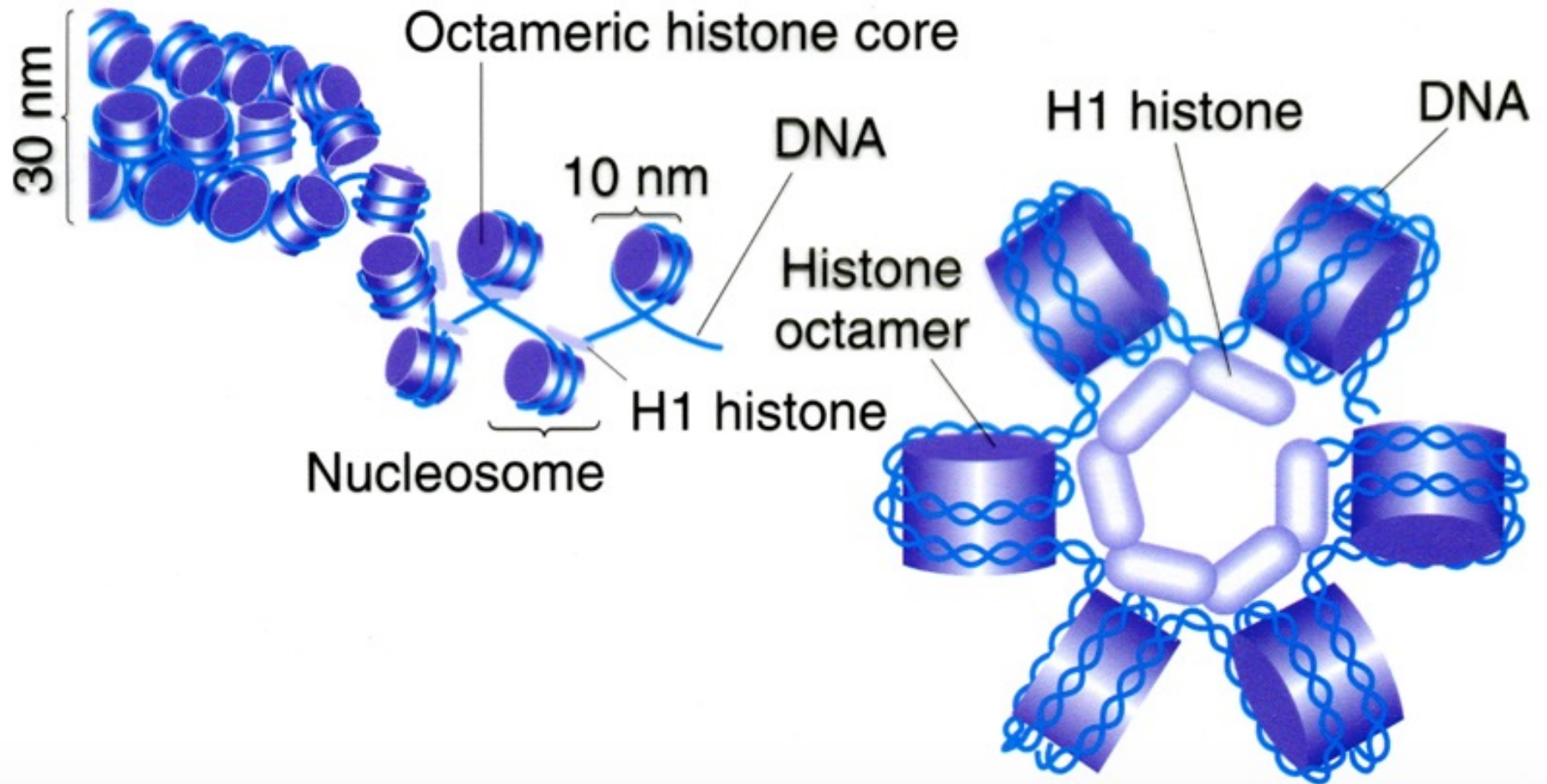


Figure 4-25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A model of chromatin structure

30 nm fibers



Questões importantes sobre histonas:

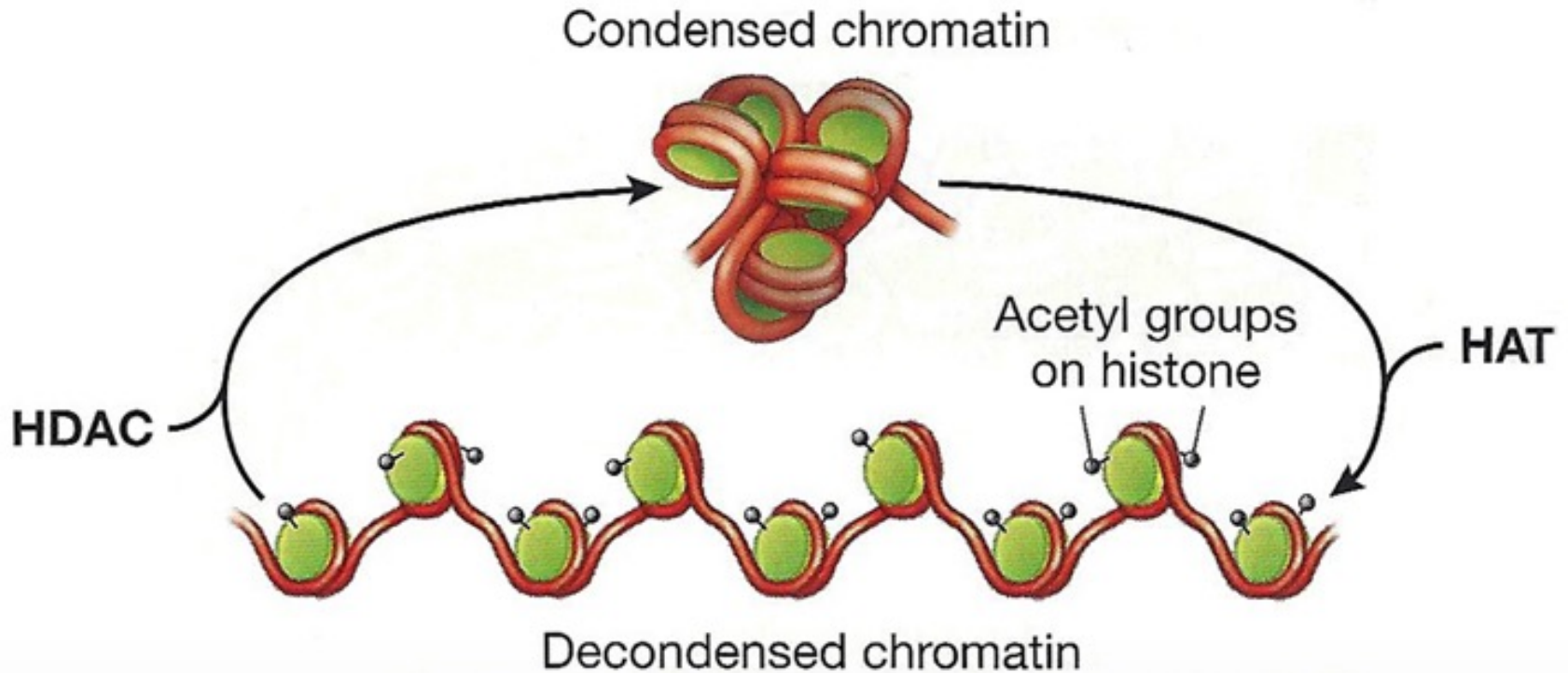
Qual a carga de histonas? (por que?)

Proteínas ricas em lisinas e argininas

Como a compactação da cromatina pode regular a expressão gênica?

Como isso pode ser modificado na células?

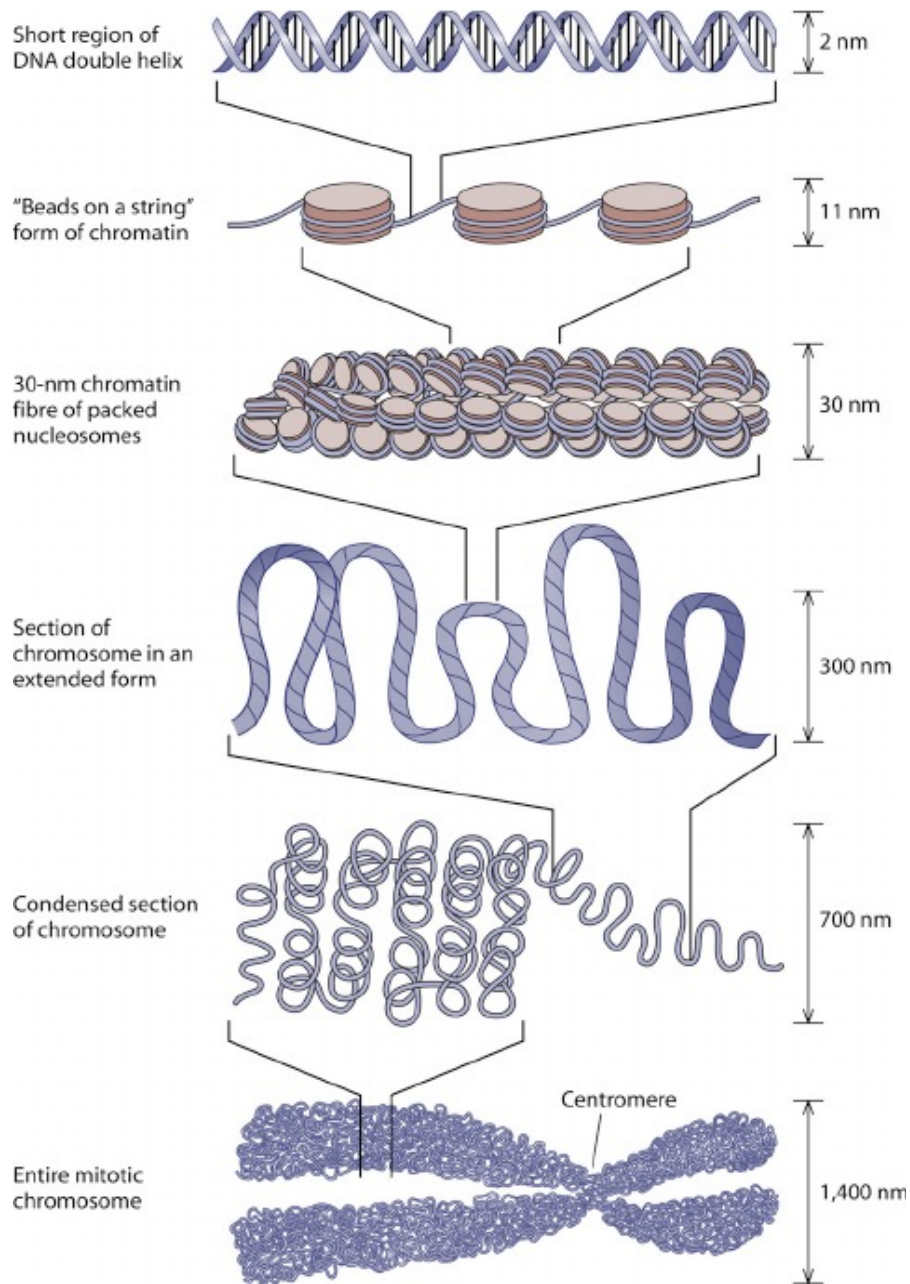
Modificações de histonas podem causar alterações (epigenéticas) Que podem modificar a estrutura da cromatina?



Acetilações de histonas as tornam menos condensadas e metilação as tornam mais condensadas!

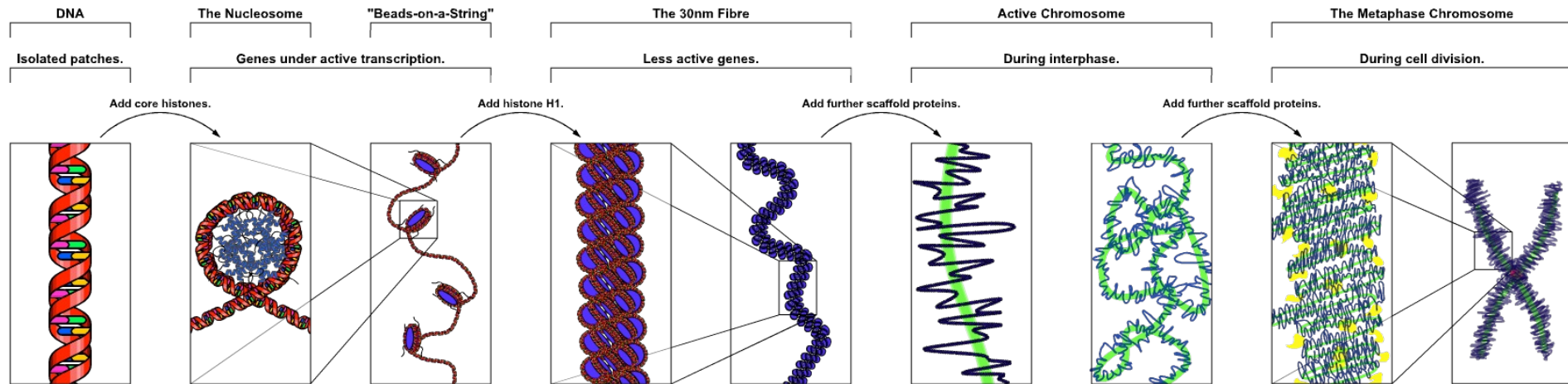
Essas modificações epigenéticas ajudam no controle de expressão gênica!

As diferentes estruturas de cromatina!



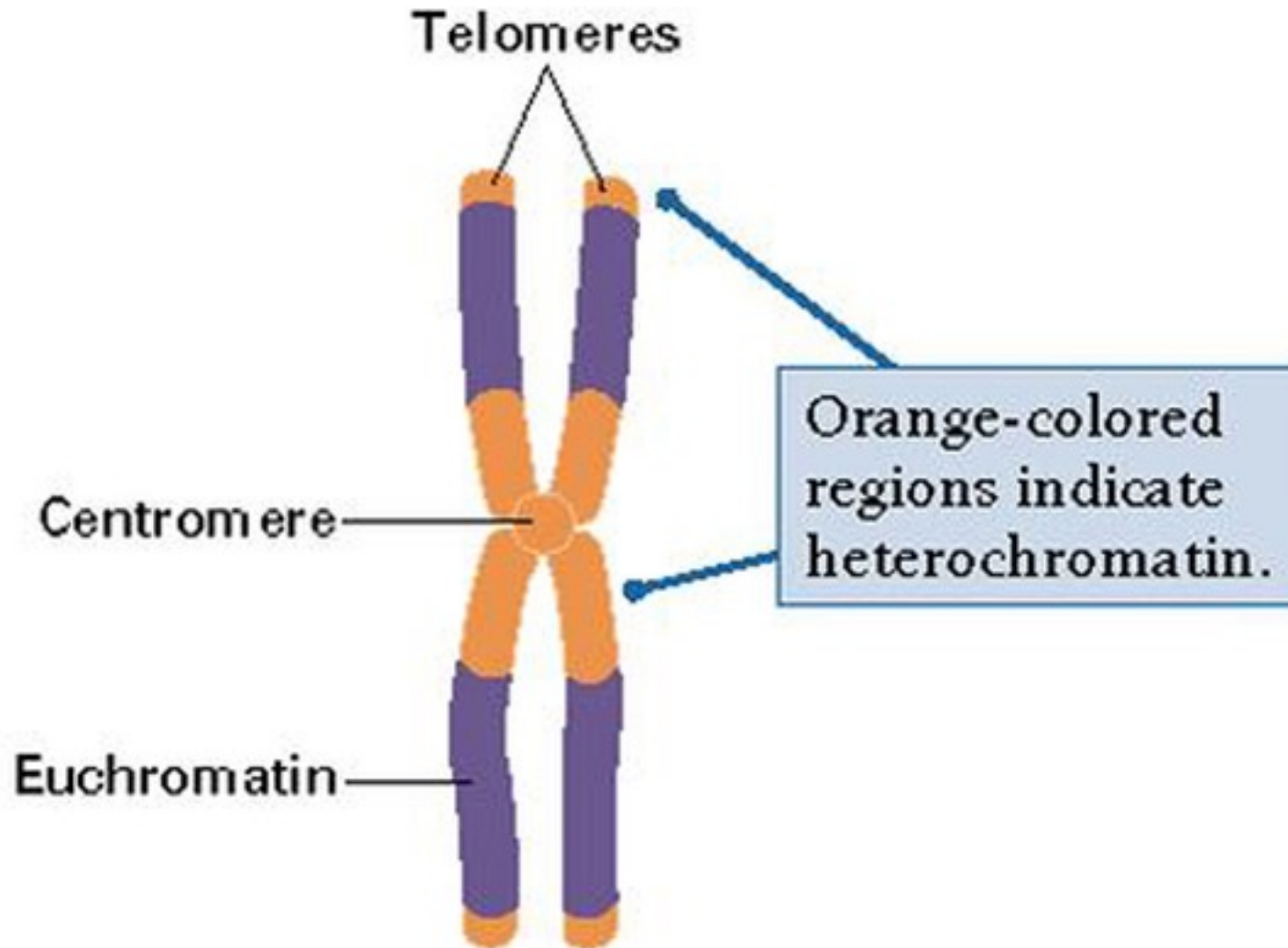
Como resultado o DNA fica 50.000 X menor em seu comprimento.

As diferentes estruturas de cromatina!



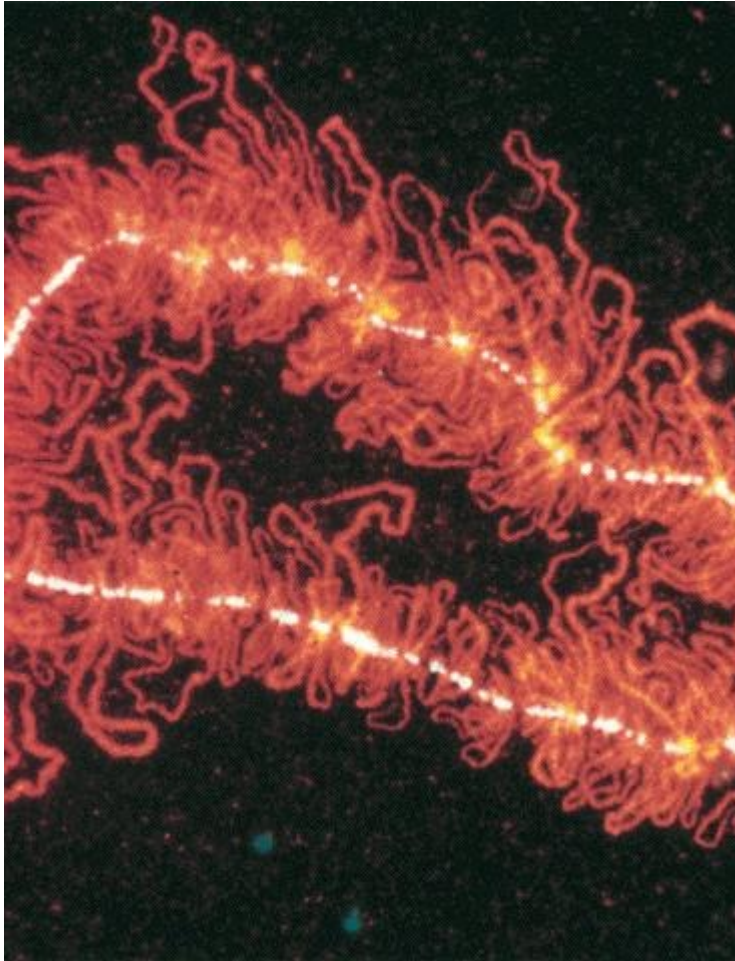
Como resultado o DNA fica
50.000 X menor em seu comprimento.

O Nível de condensamento pode ser visível na mitose!

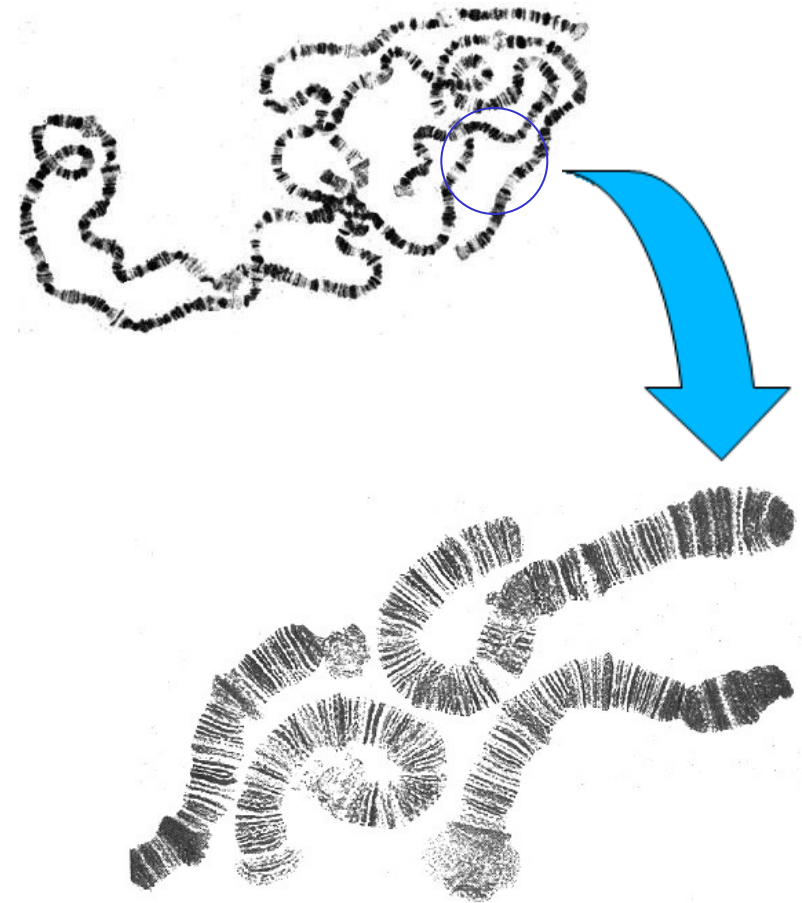


Diferencie heterocromatina e eucromatina!

Essa organização em alças também pode ser observada em cromossomos gigantes:



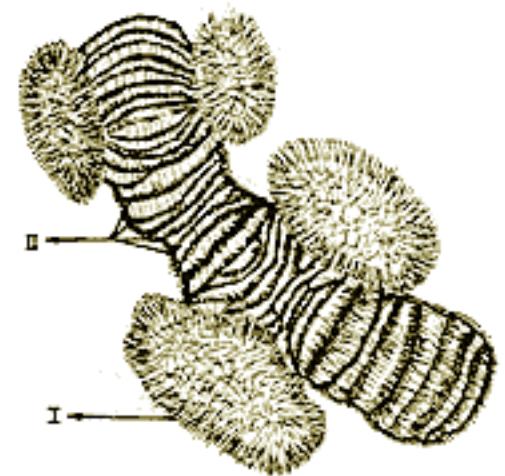
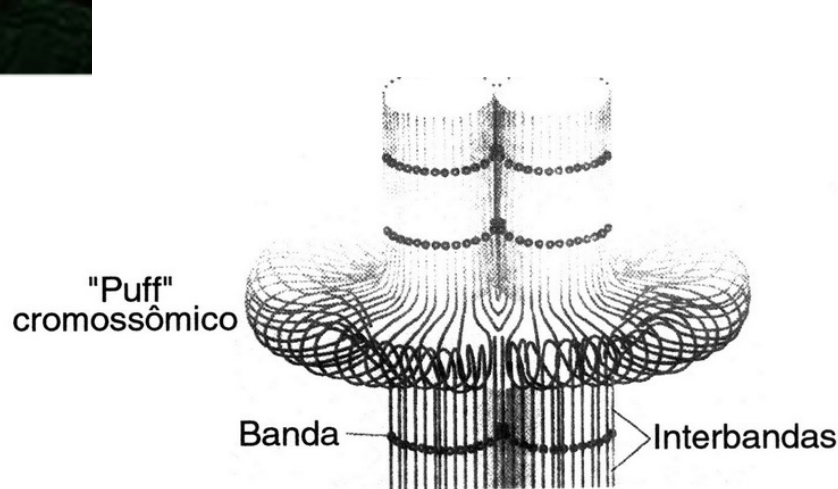
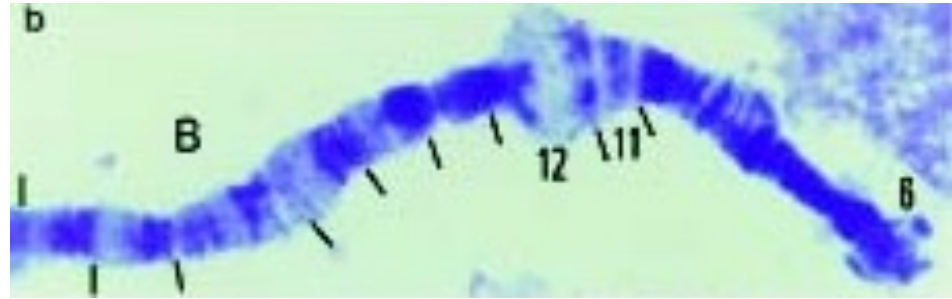
Cromossomo *lampbrush*,
que ocorre em ovócitos de anfíbios e
outros animais.



Cromossomo politênico,
que ocorre em glandula salivar de insetos.

Cromossomos politênicos: impacto na ciência brasileira!

- Experimento de Crodowaldo Pavan e Marta Breuer!
- O que são os puffs de cromossomos politênicos?
- Expressão e amplificação gênica!



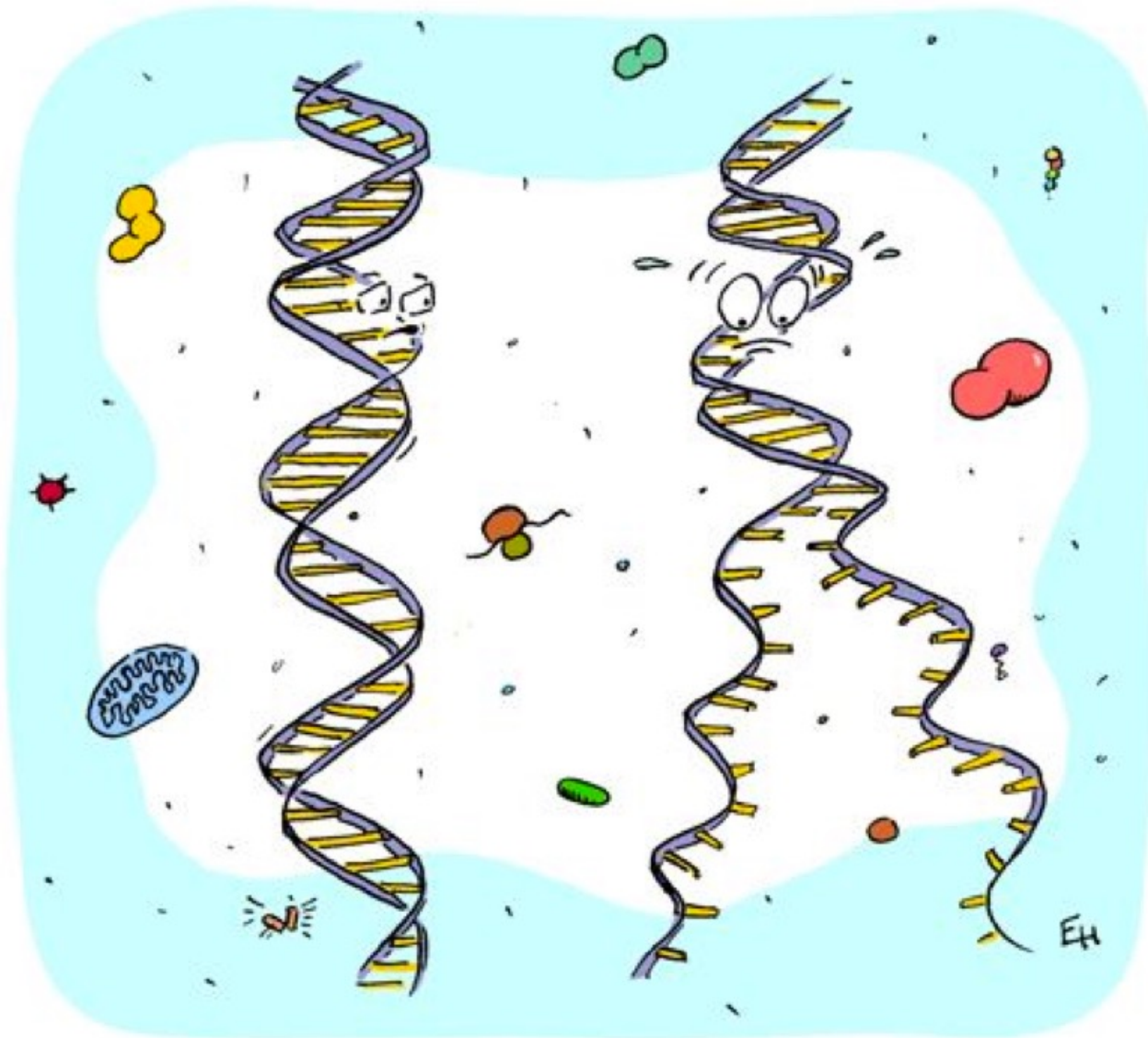
Vídeos interessantes:

histórico:

https://www.youtube.com/watch?v=fecfROFrp_c

animação:

<https://www.youtube.com/watch?v=gbSIBhFwQ4s>



Psst, Bob...you're unzipped.