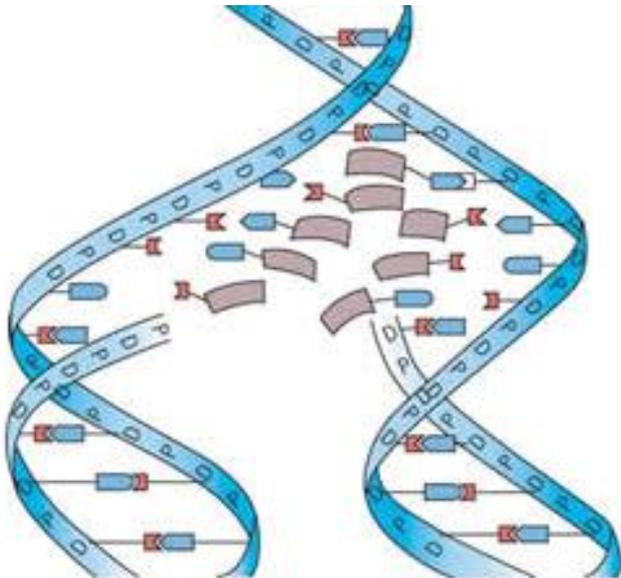


ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E REPLICAÇÃO DO DNA

Aula teórica 4

LGN0114 – Biologia Celular



Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

FUNÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

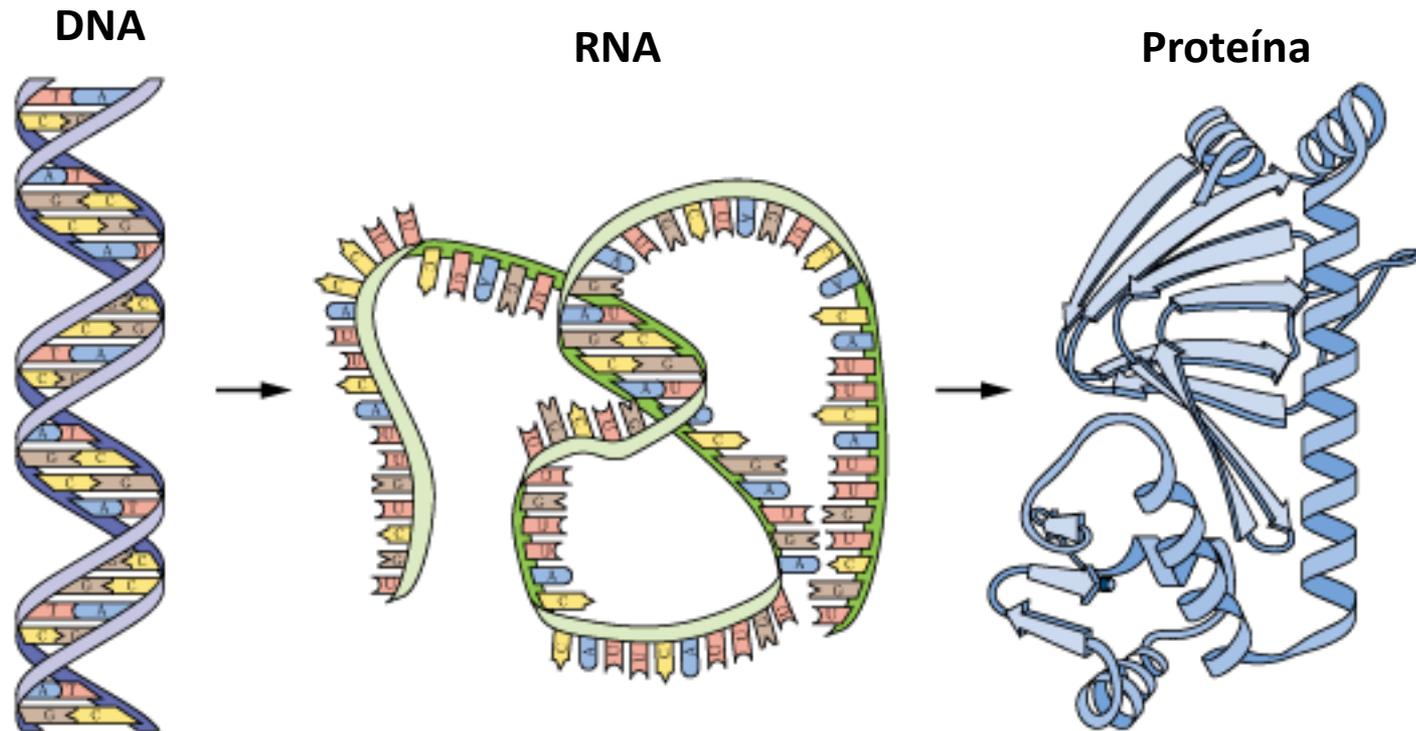
1. Função genotípica: replicação

2. Função fenotípica: expressão gênica

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

DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA

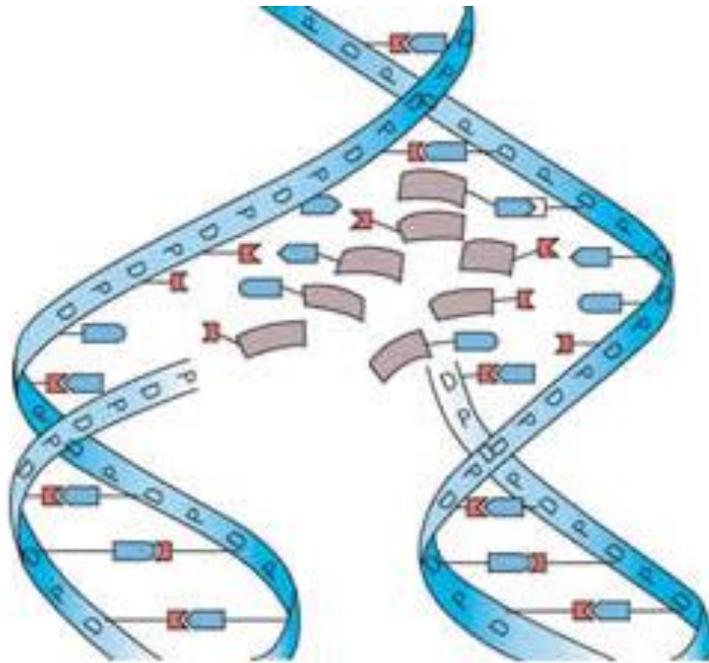
A informação genética, armazenada nos cromossomos, é transferida às células filhas através da **replicação do DNA**, sendo expressa através da **transcrição em mRNA** e **traduzida** subsequentemente em cadeias polipeptídicas.



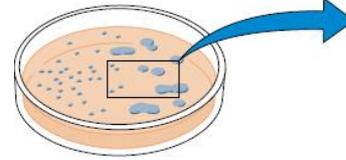
ÁCIDOS NUCLEICOS

- **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.

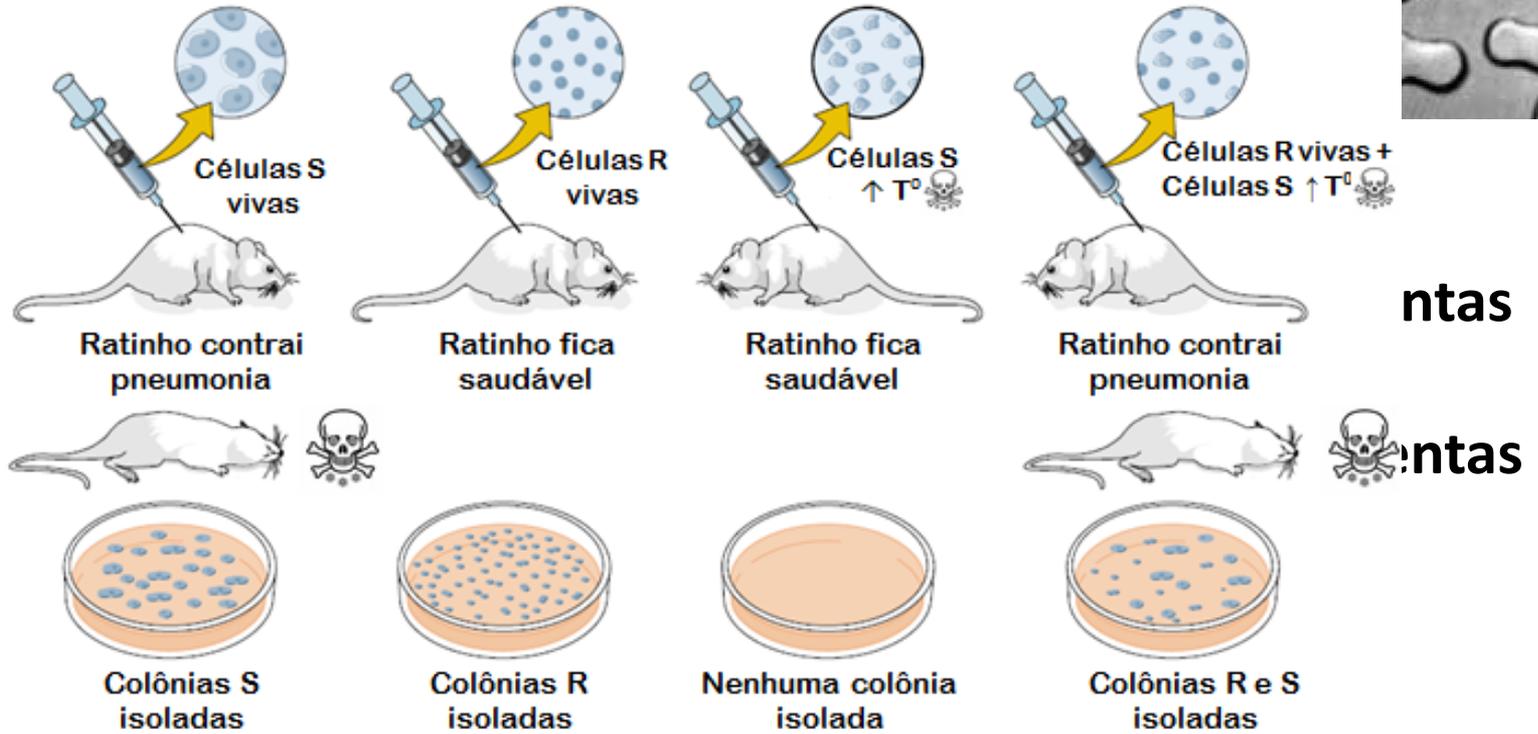
ENTENDO A MOLÉCULA DE DNA



1928 - Frederick Griffith



R = não virulentas



QUAL É O PRINCÍPIO TRANSFORMANTE?

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

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

1865



A



B

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



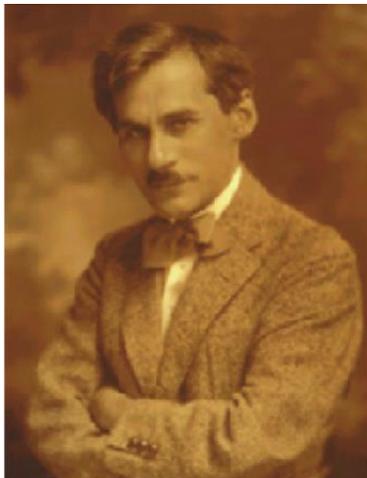
<http://qnint.sbq.org.br>

1868

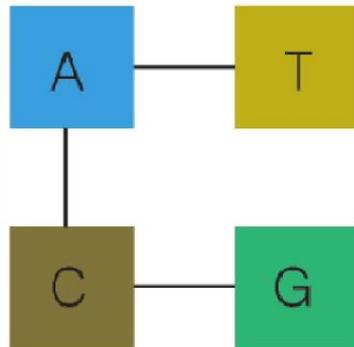
Primeiros estudos de DNA em células de leucócitos de bandagens cirúrgicas.

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

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.



CHARGAFF ESTABELECEU PROPORÇÕES ENTRE AS BASES NITROGENADAS

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

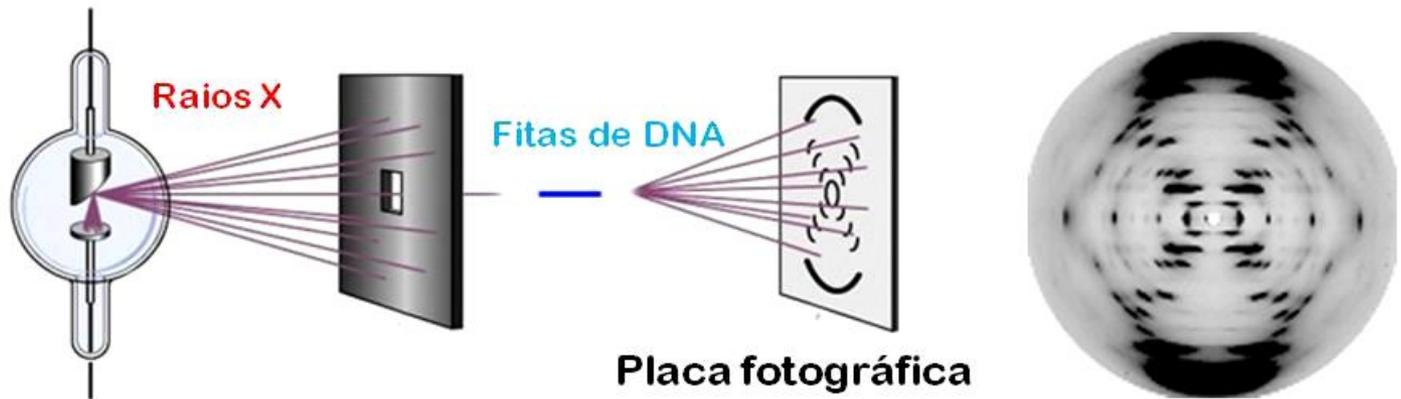
* Definidas como moles de constituintes nitrogenados por 100 g de átomos de fosfato no hidrolisado.
 FONTE: E. Chargaff e J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

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



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.



Rosalind
Franklin



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

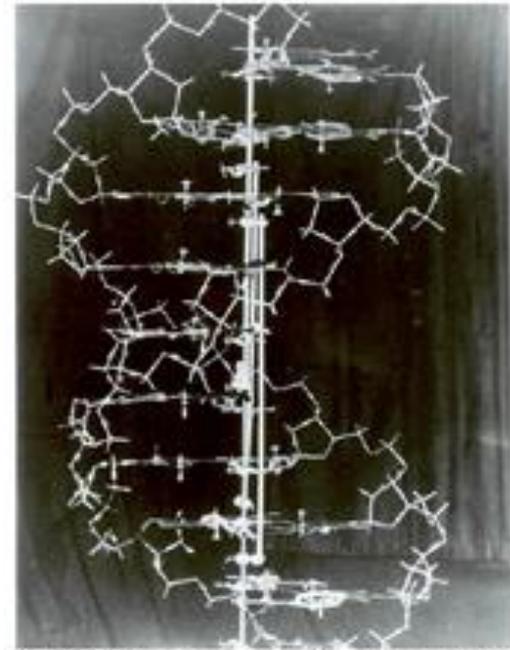


Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives. Noncommercial, educational use only.

James Watson e Francis Crick

1953 - Modelo da molécula de DNA

(A partir dos dados de difração de raio-X de Rosalin 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



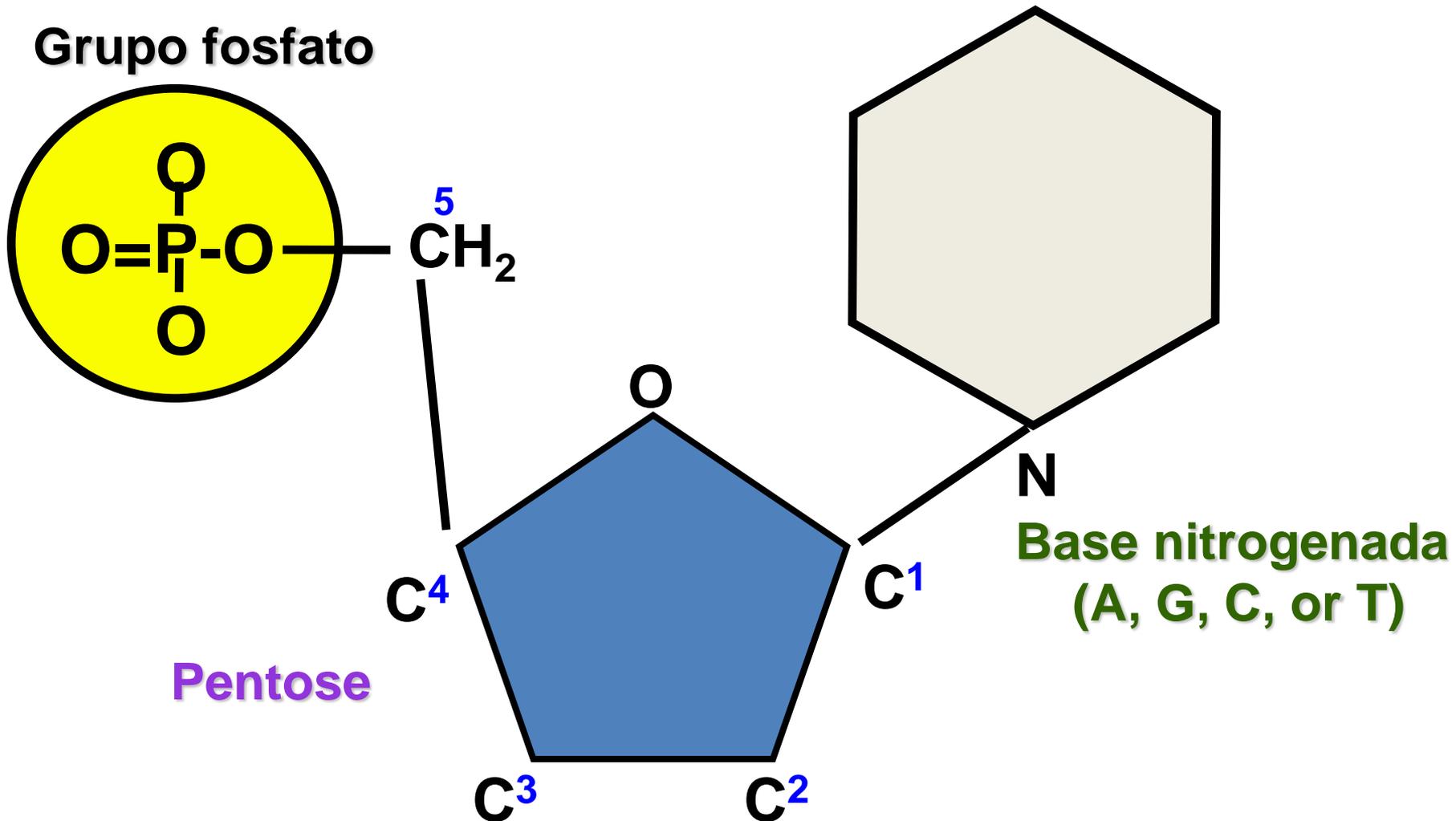
Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives and Svenska Prisa Photo, Stockholm, Sweden.
Noncommercial, educational use only.

1958 - Rosalind Franklin falece de
câncer de ovário.

As regras não permitem entregar um
prêmio Nobel pós-morte

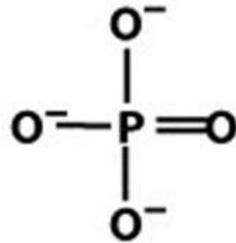
ÁCIDOS NUCLEICOS

São polímeros de nucleotídeos



COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

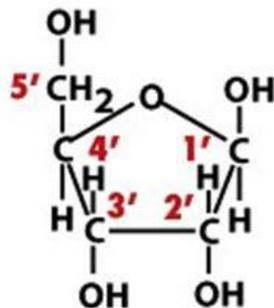
(1)
Um
grupamento
fosfato:



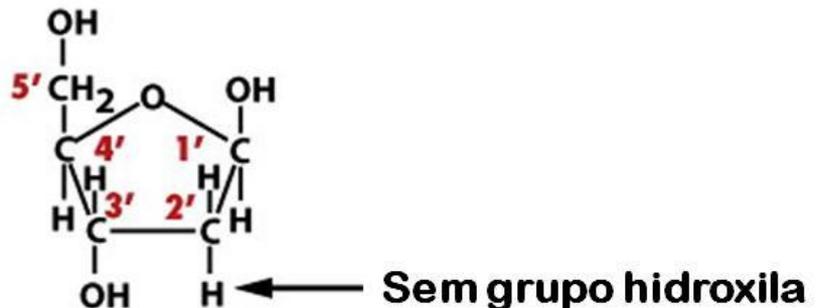
Carbono 5

(2)
pentoses
(açúcares
de 5
carbonos)

(a) RNA:
Ribose



(b) DNA:
2-Desoxirribose

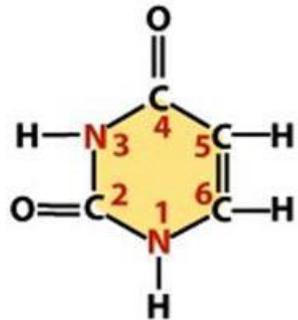


Carbono 2

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

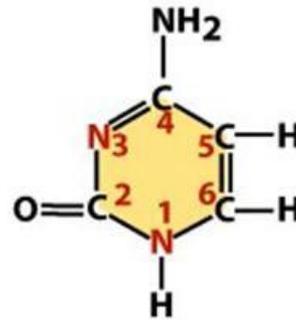
(3)
Uma base
cíclica
contendo
Nitrogênio

(a) RNA

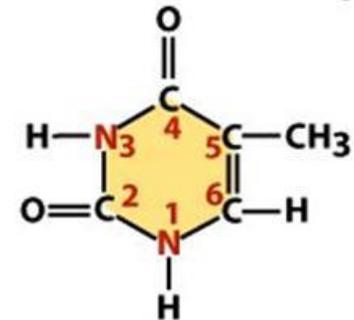


Uracila

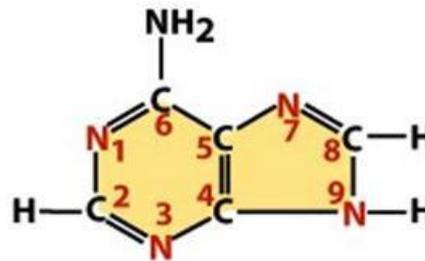
(b) DNA e RNA (c) DNA



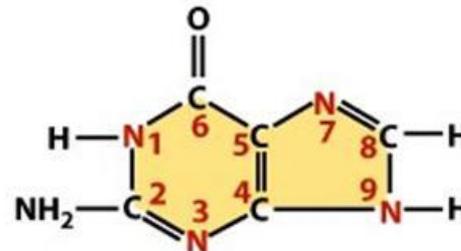
Citosina



Timina



Adenina



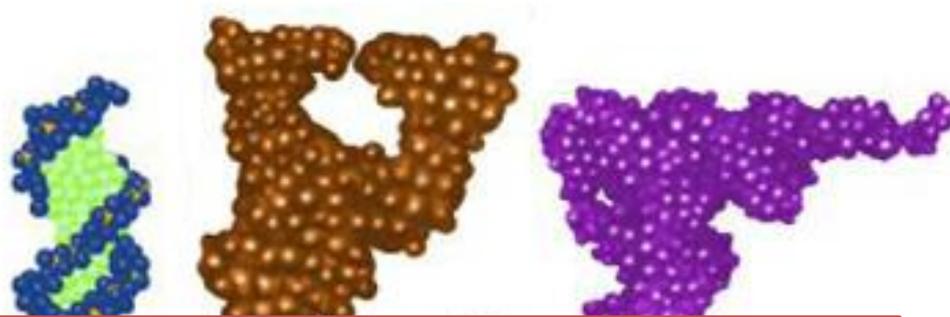
Guanina

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

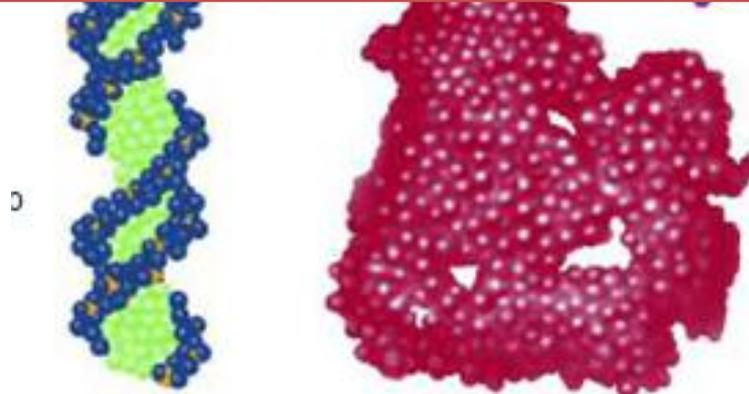
DNA E RNA – MOLÉCULAS DE INFORMAÇÃO

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

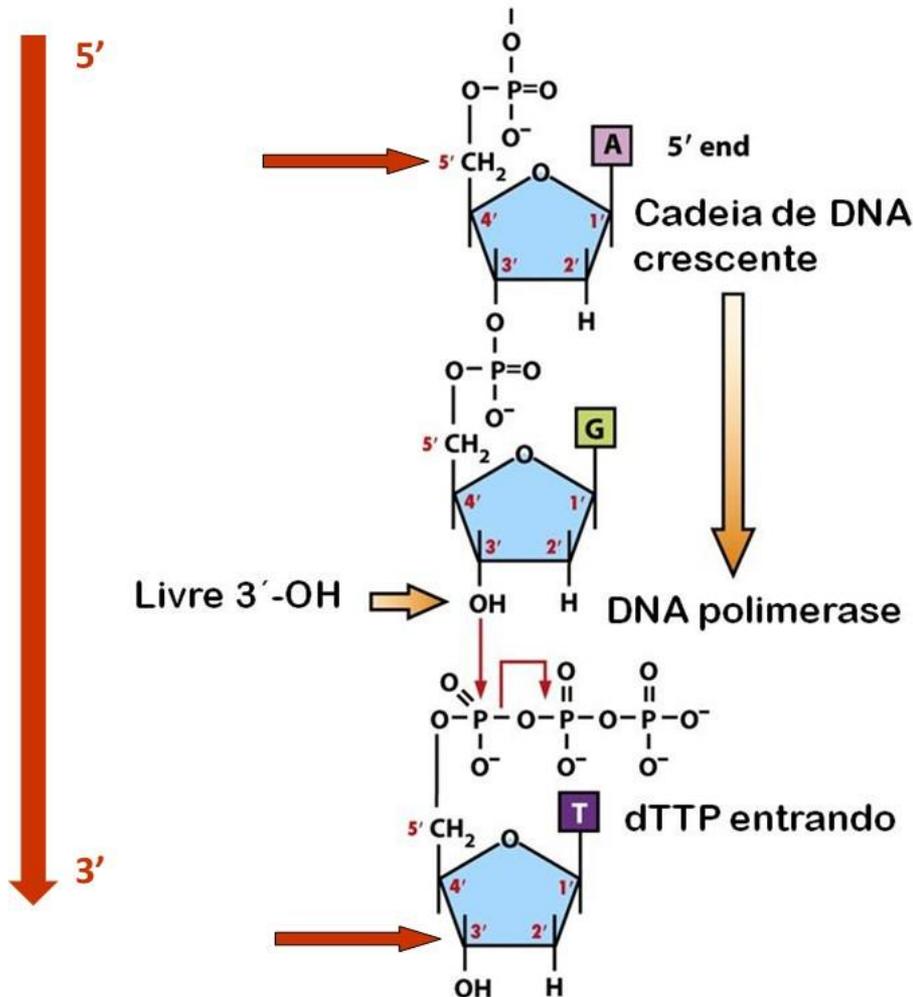
RNA - Descoberto em levedura (1890).



Diferenças estruturais

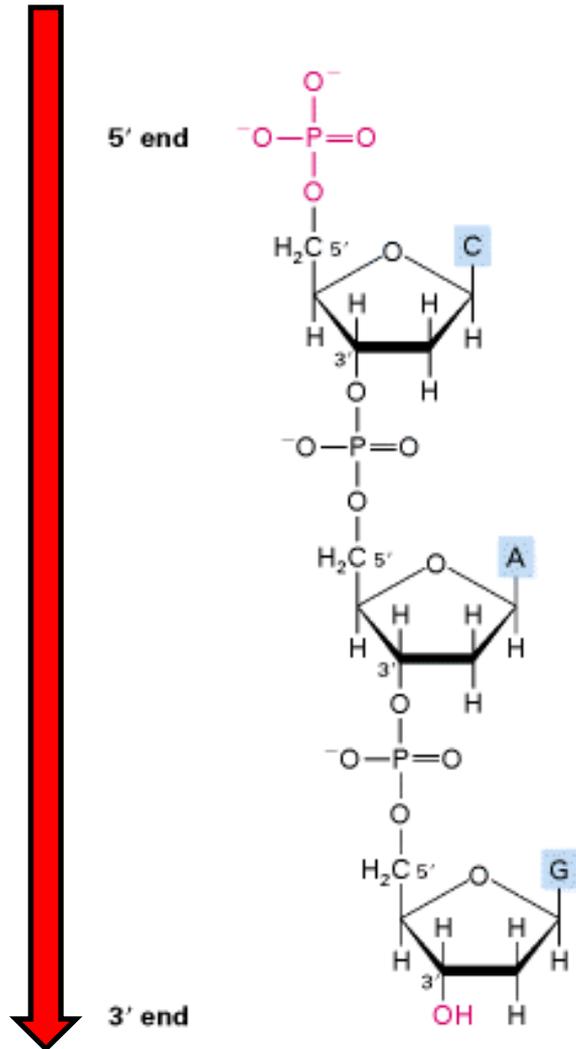


ÁCIDOS NUCLEÍCOS SÃO FORMADOS POR LIGAÇÕES FOSFODIÉSTER

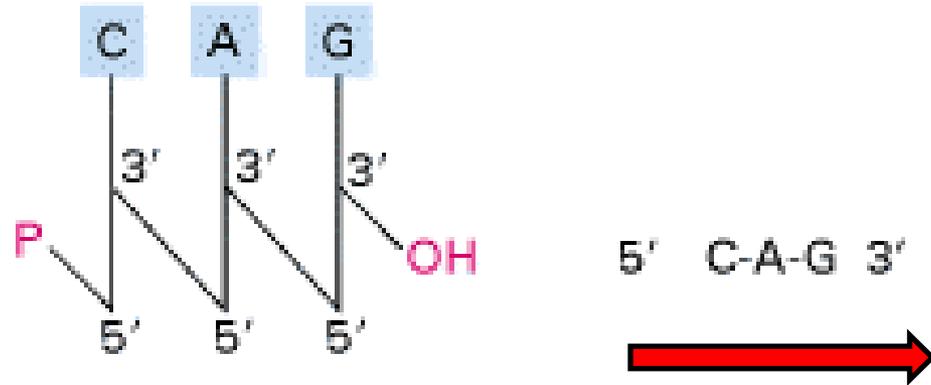
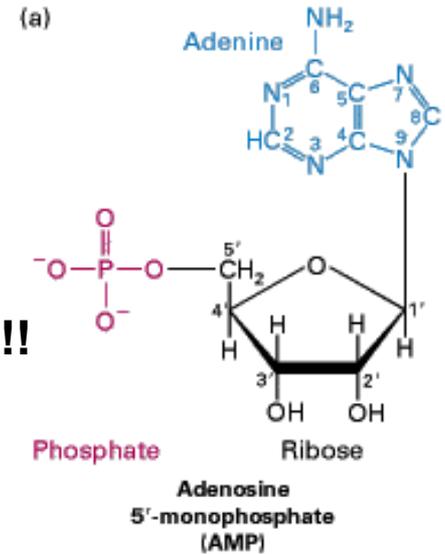


Todo nucleotídeo livre esá na forma de tri-fosfato!!

Ligações fosfodiéster - polarização 5' – 3'



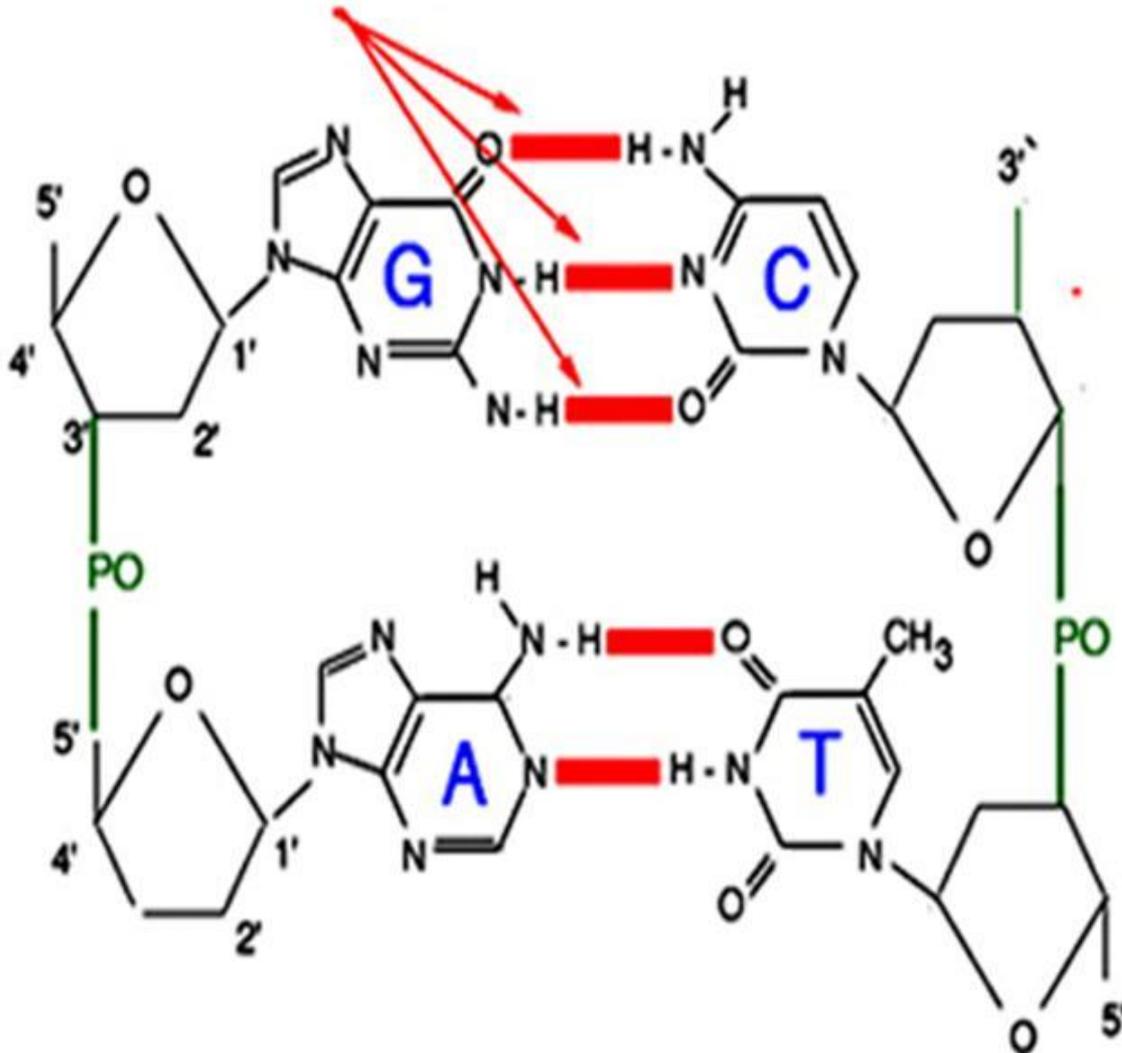
**Adenosina trifosfato!!!
SIM ATP!!!!**



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

DNA – FITA DUPLA!

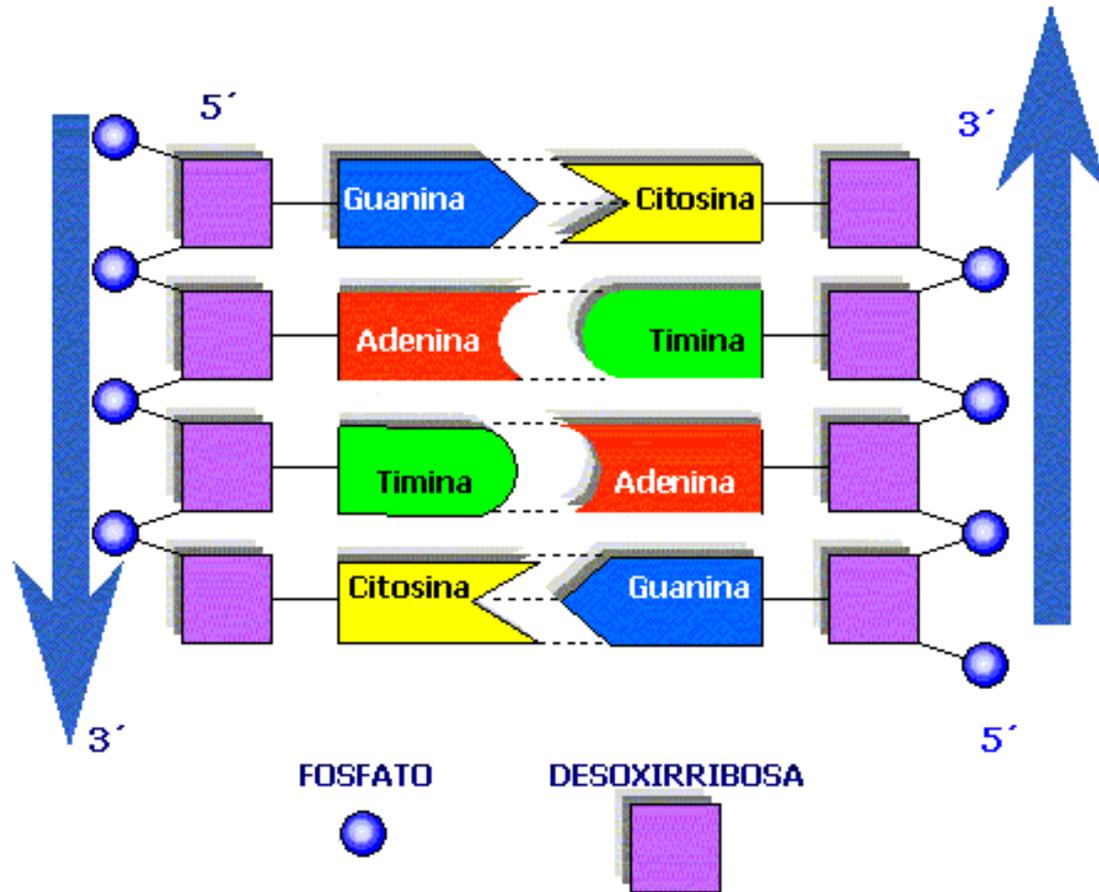
Pontes de hidrogênio



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

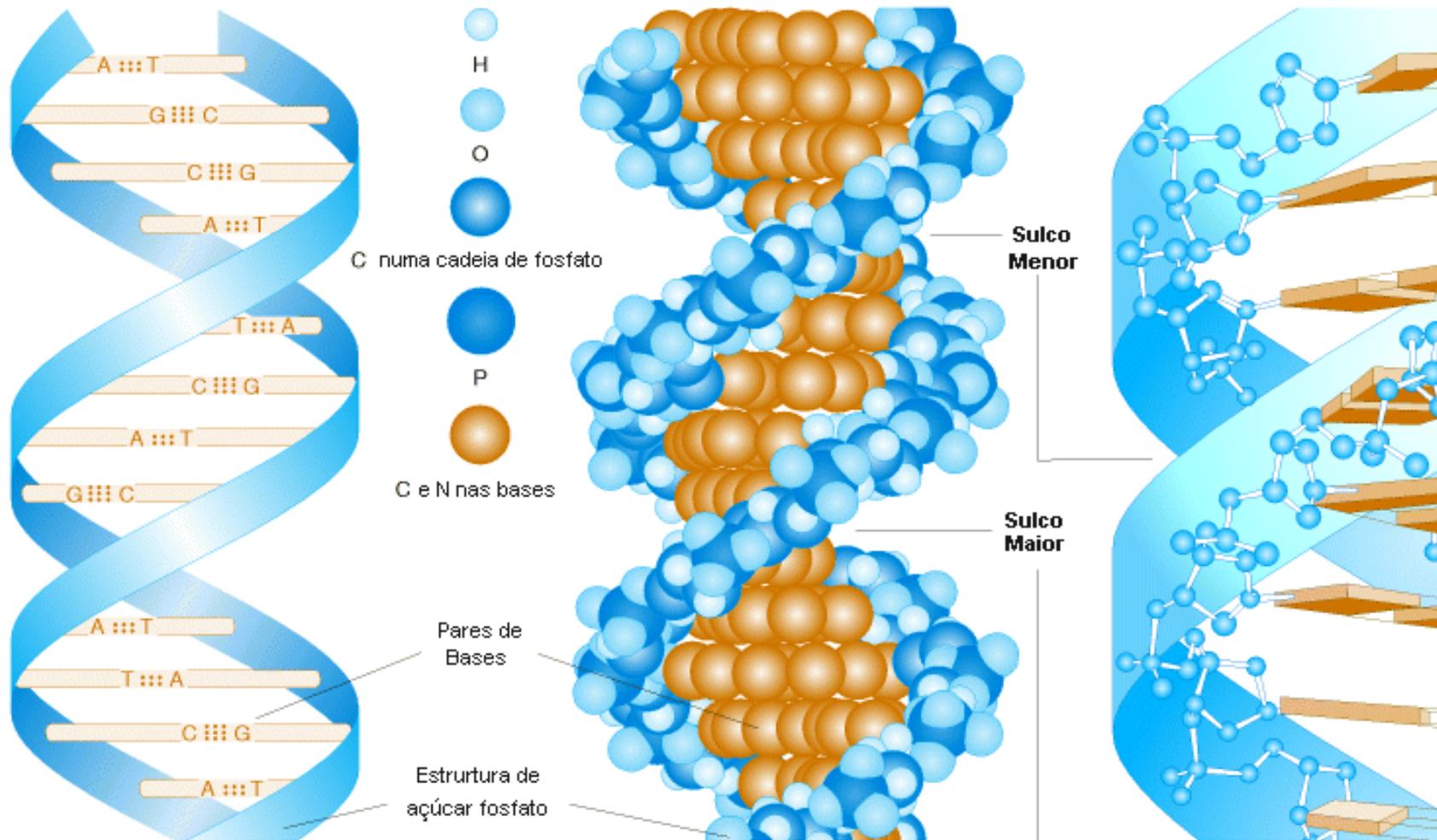
Ligações fosfodiéster 3' – 5'

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 **pontes 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 pontes 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;



PRINCIPAIS TIPOS DE RNA

RNAs ocorrem no núcleo e citoplasma

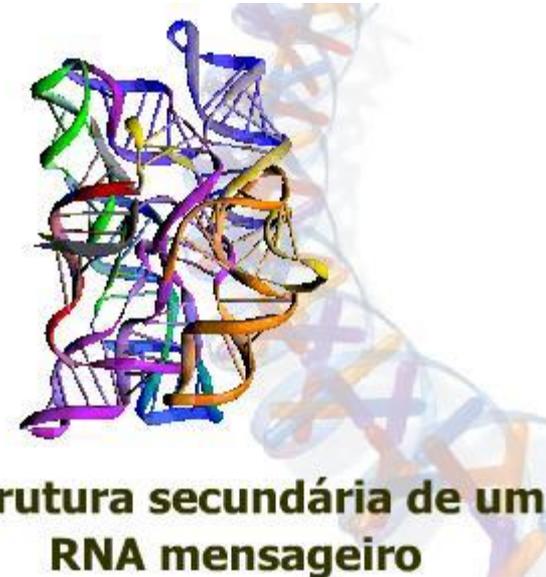
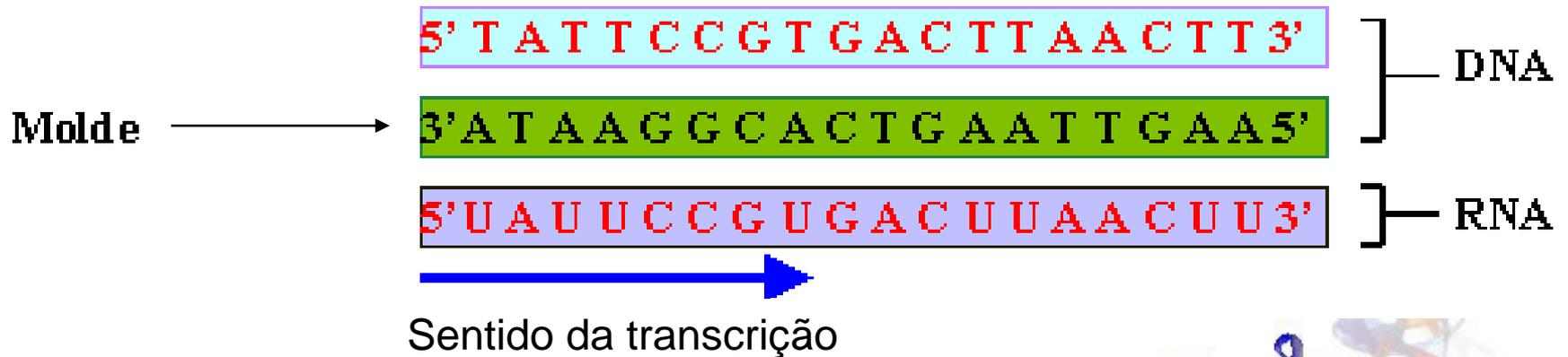
RNA mensageiro (mRNA): contém a informação genética para a sequência de aminoácidos das proteínas

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

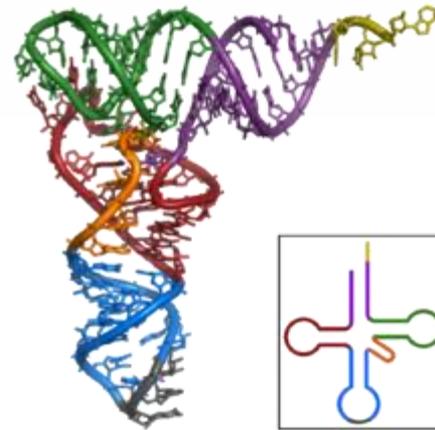
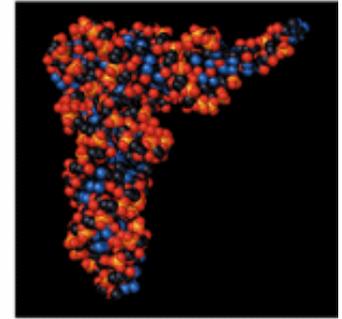
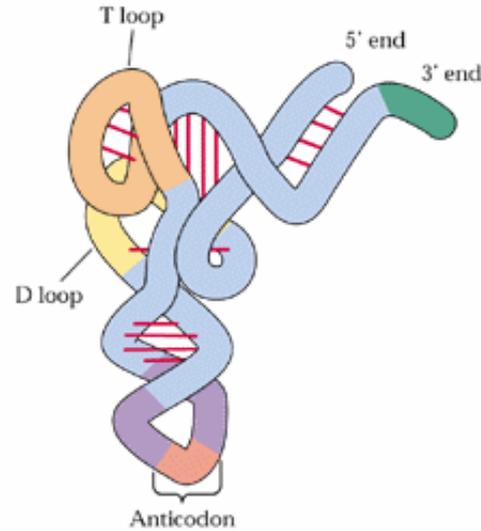
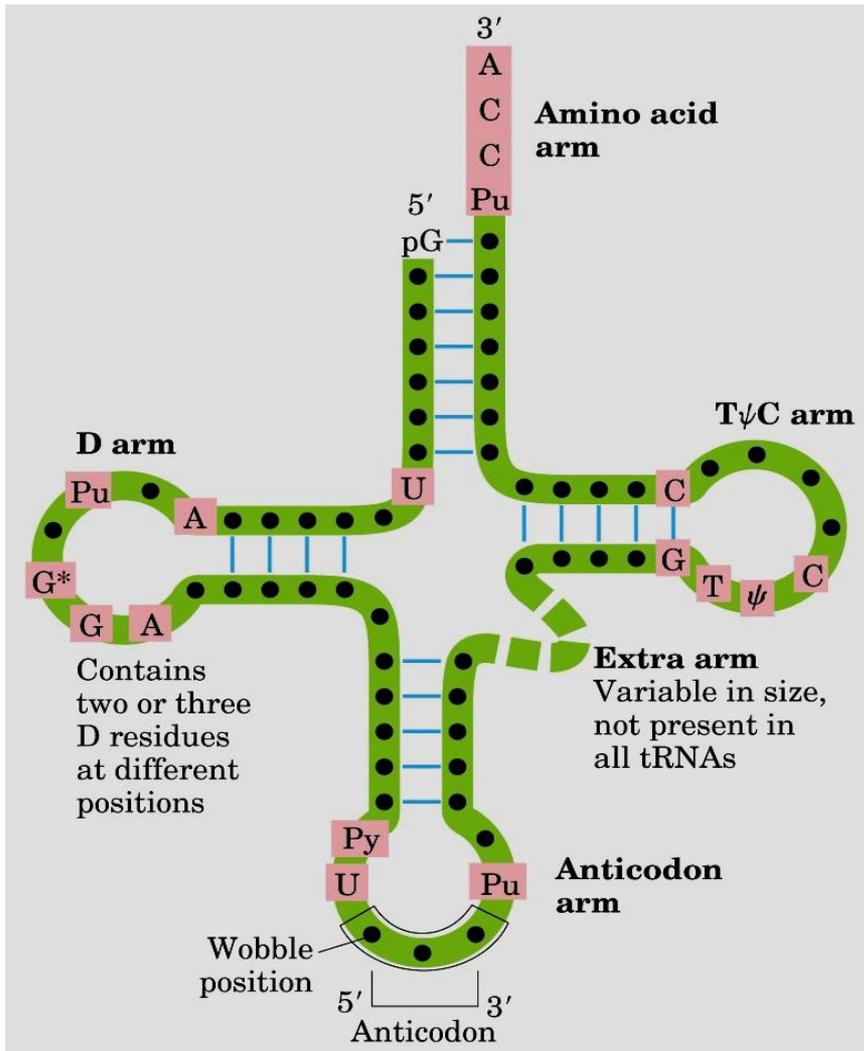
RNA ribossômico (rRNA): constituinte dos ribossomos

RNA mensageiro - mRNA

1 trinca de bases nitrogenadas = 1 códon



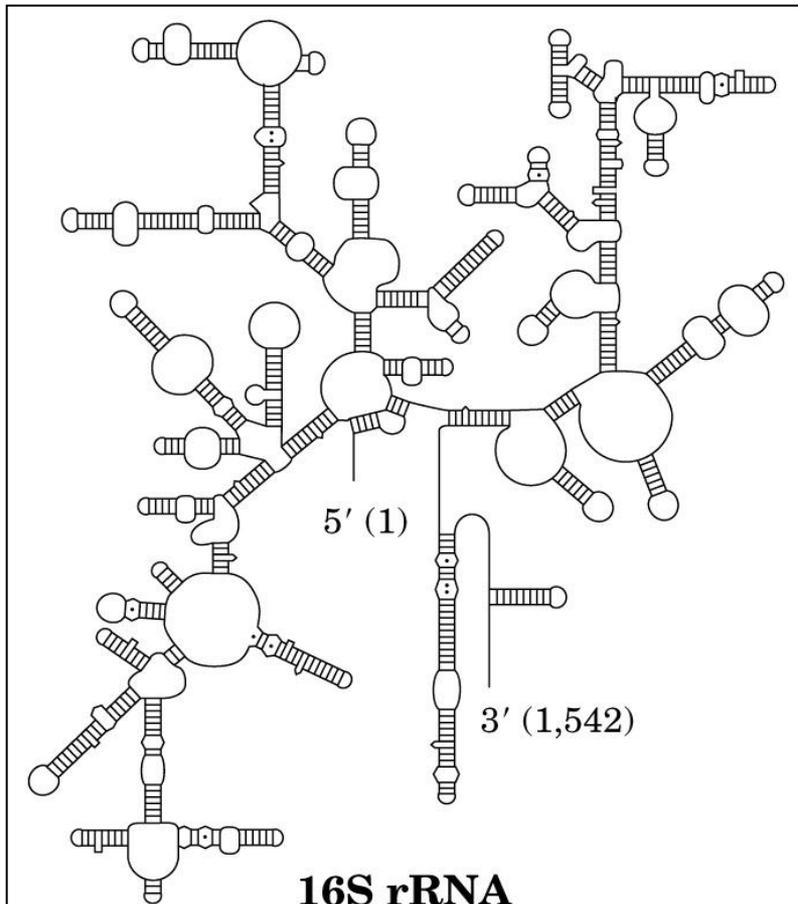
RNA transportador - tRNA



Reconhece códons em mRNA - anticódon

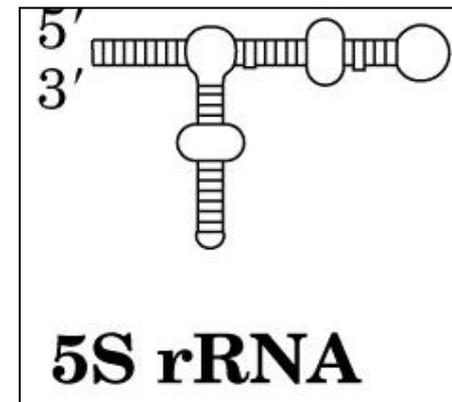
RNA ribossômico - rRNA

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

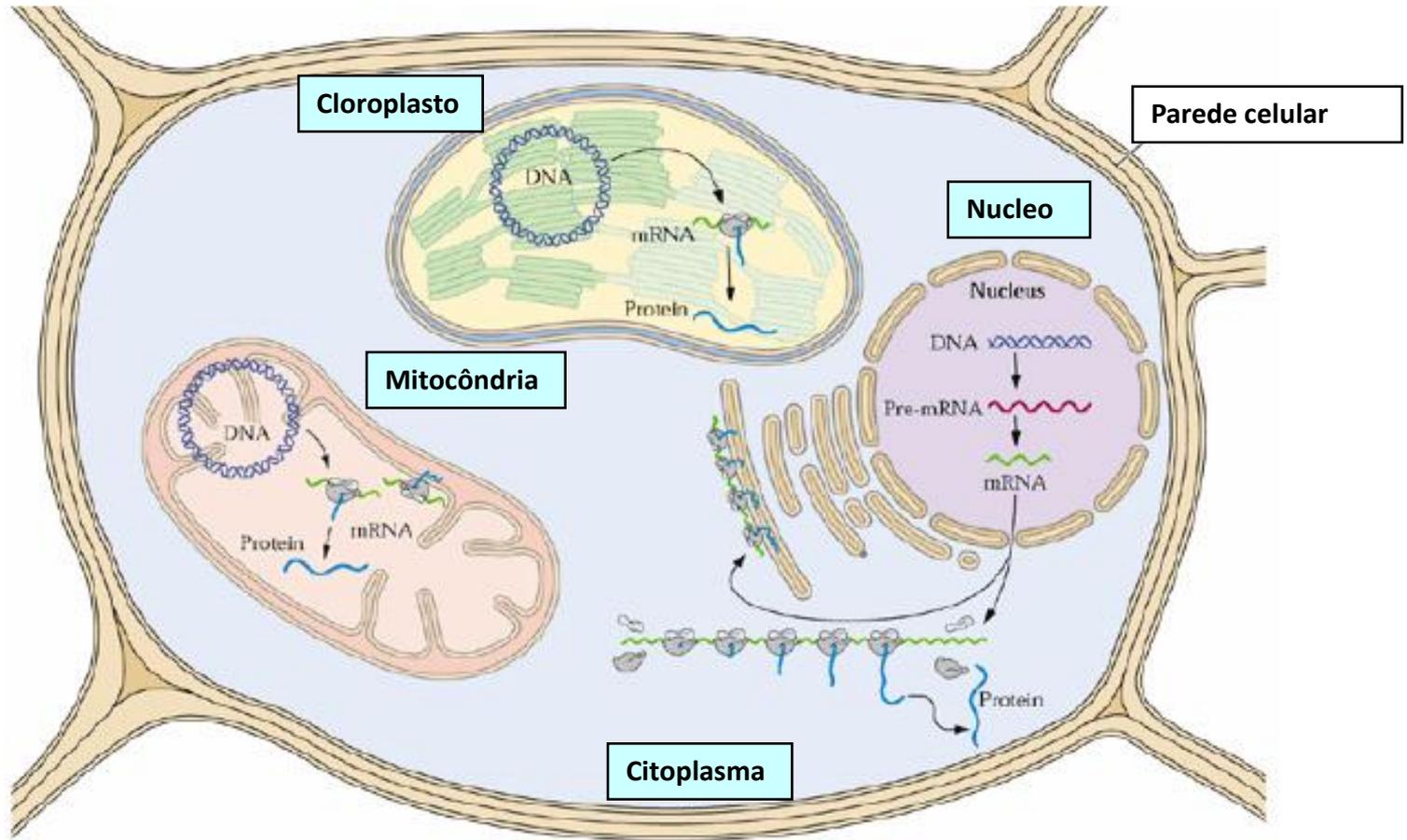


Exemplos de rRNAs:

- Estrutura secundária com grampos e alças

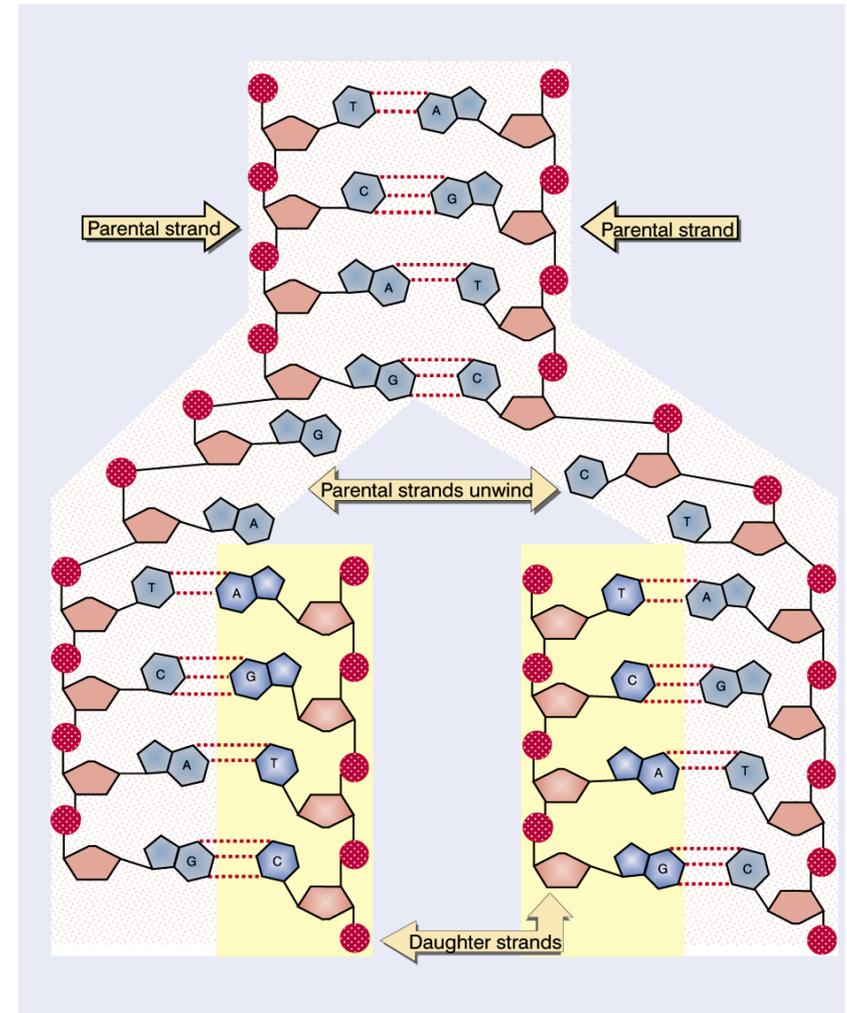


3 Genomas em planta: cromossomal, plastidial e mitocondrial



REPLICAÇÃO DO DNA

- ✓ O DNA replica-se por um mecanismo **semiconservativo**: a 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?

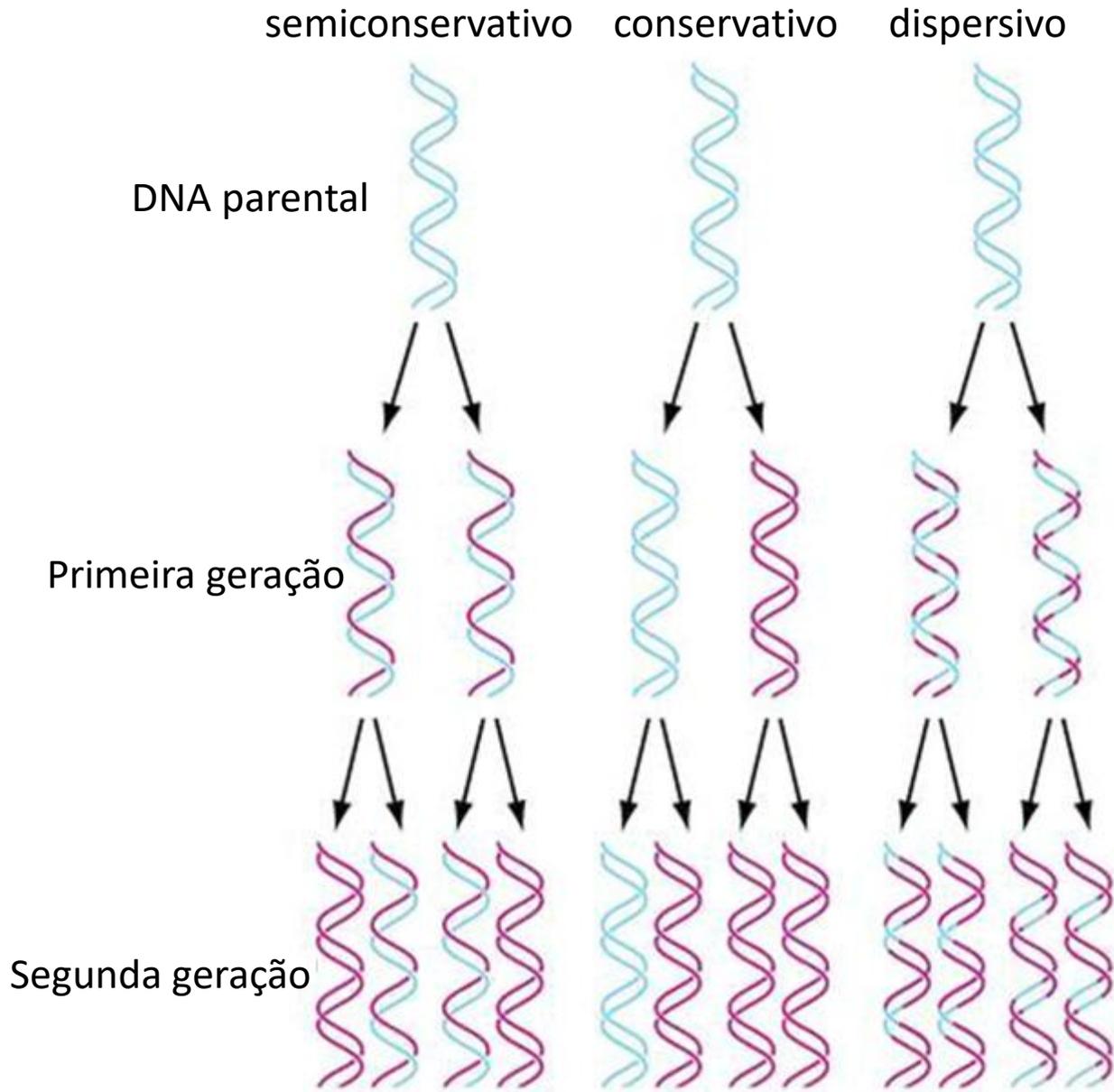
Consider, too, the research of two young postdocs — Matthew Meselson and Frank



1957–58

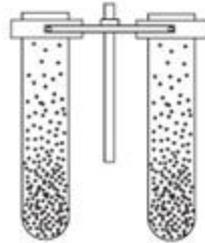
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/meselson.html>

REPLICAÇÃO DO DNA

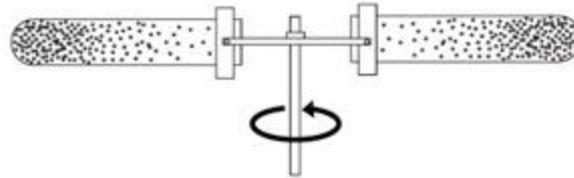


EXPERIMENTO DE MESELSON-STAHN

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



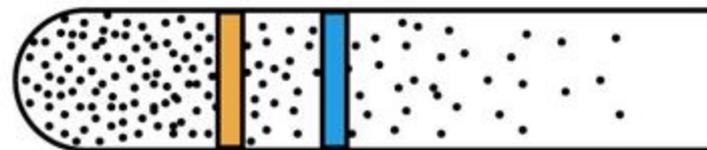
Centrifuga a 50.000 rpm por 48-72 horas



Um equilíbrio é estabelecido entre

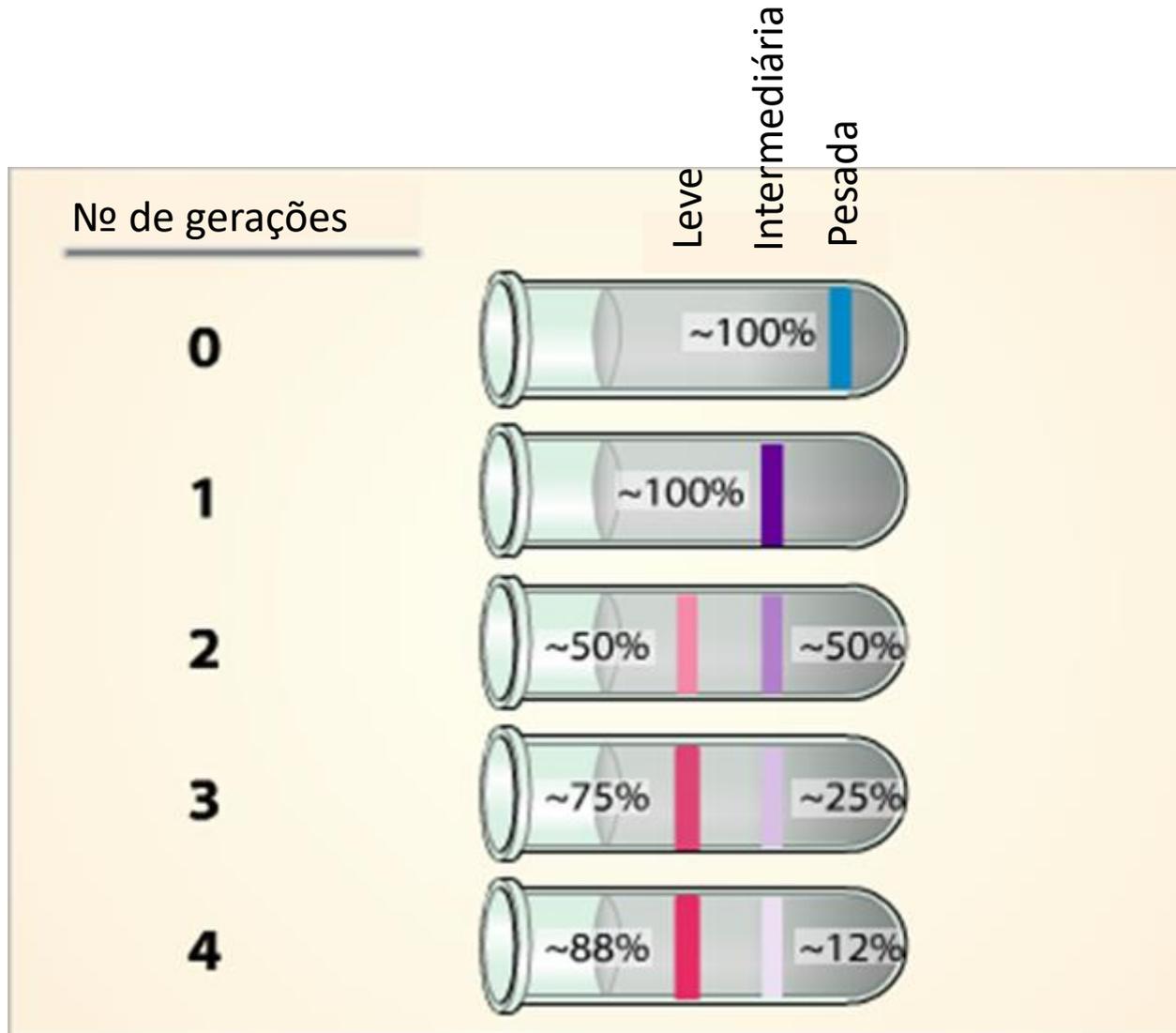
← Força centrífuga e

Difusão →

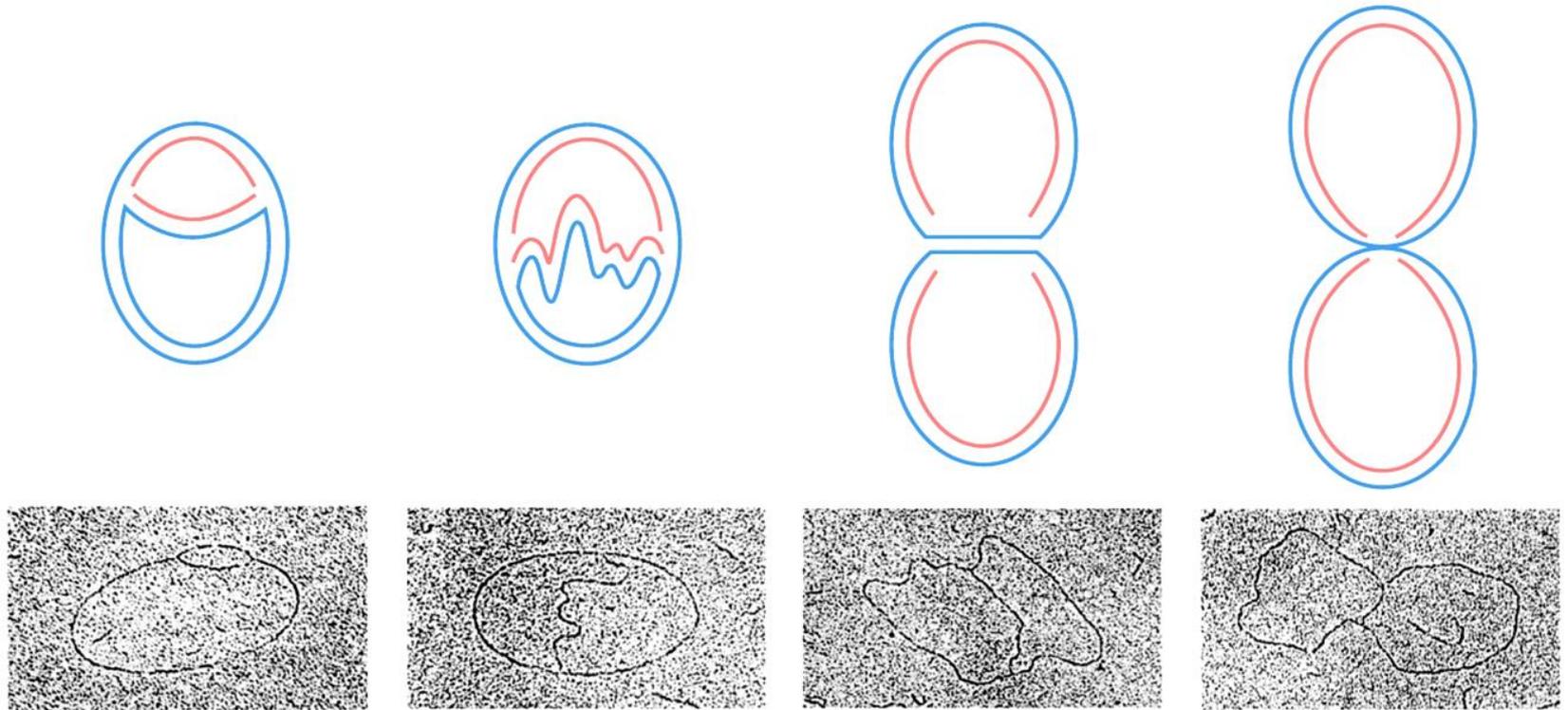


^{15}N ^{14}N

EXPERIMENTO DE MESELSON-STAHN



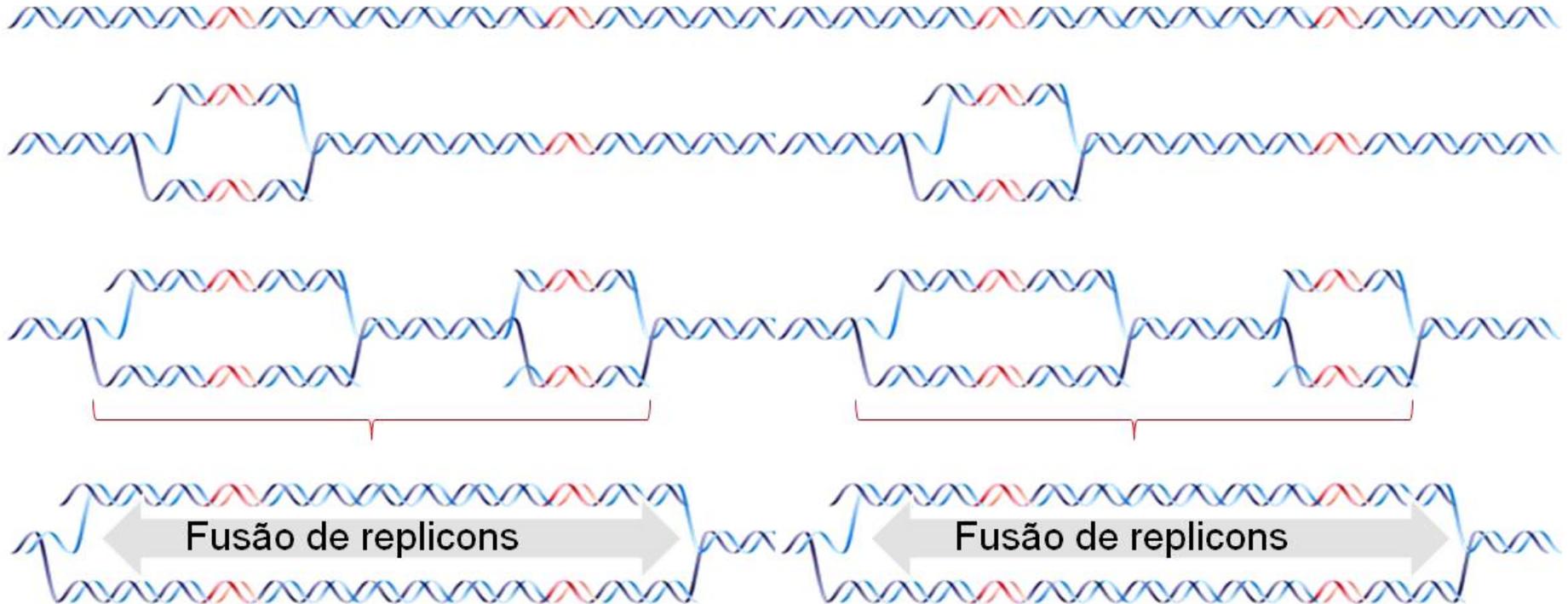
A REPLICAÇÃO DO CROMOSSOMO CIRCULAR



A replicação é bidirecional

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

A replicação do cromossomo linear de eucarioto



- 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. Topoisomerasas (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 malpareados nas pontas 3' dos filamentos primer.

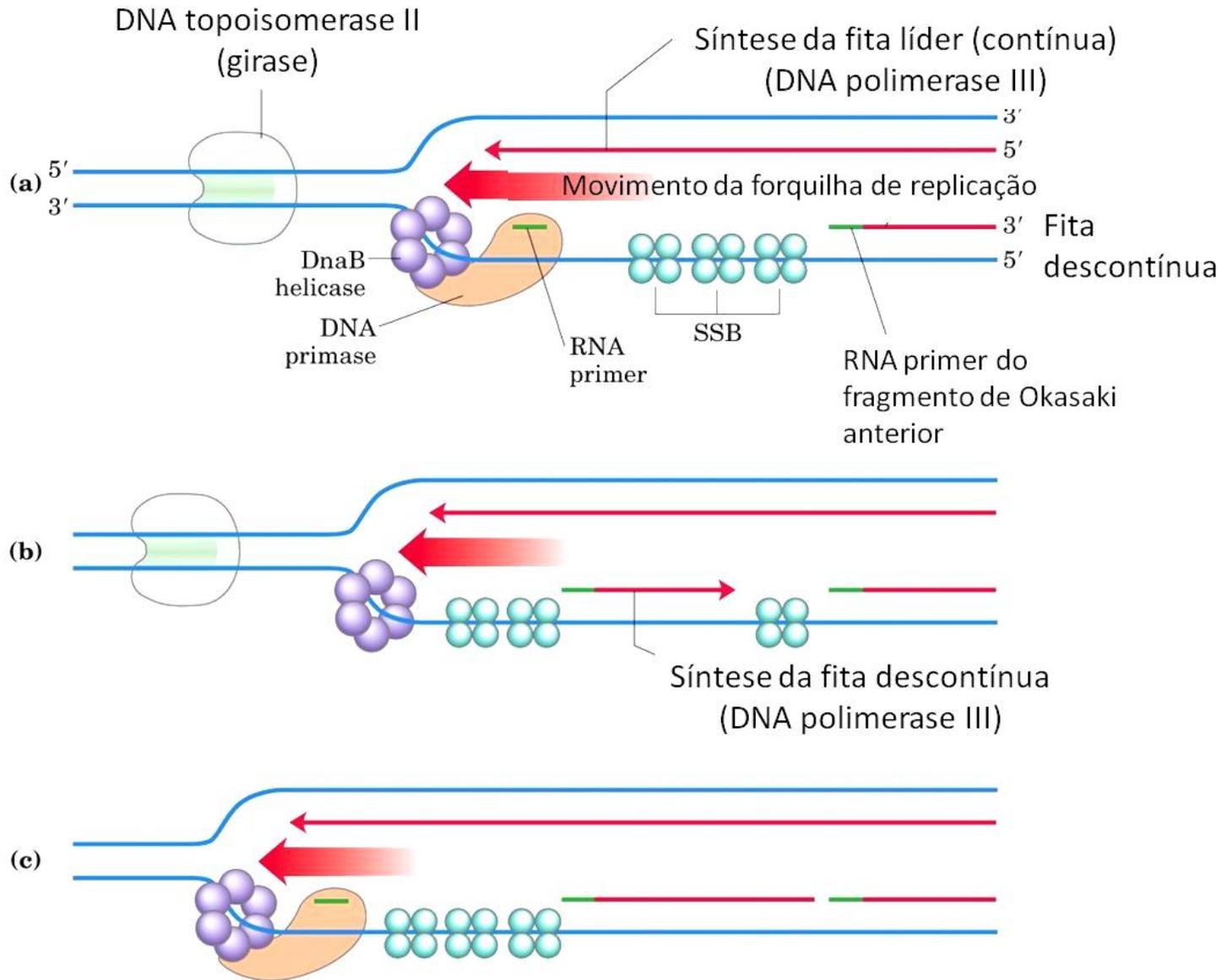
PROTEÍNAS PRESENTES NA ORIGEM DE REPLICAÇÃO

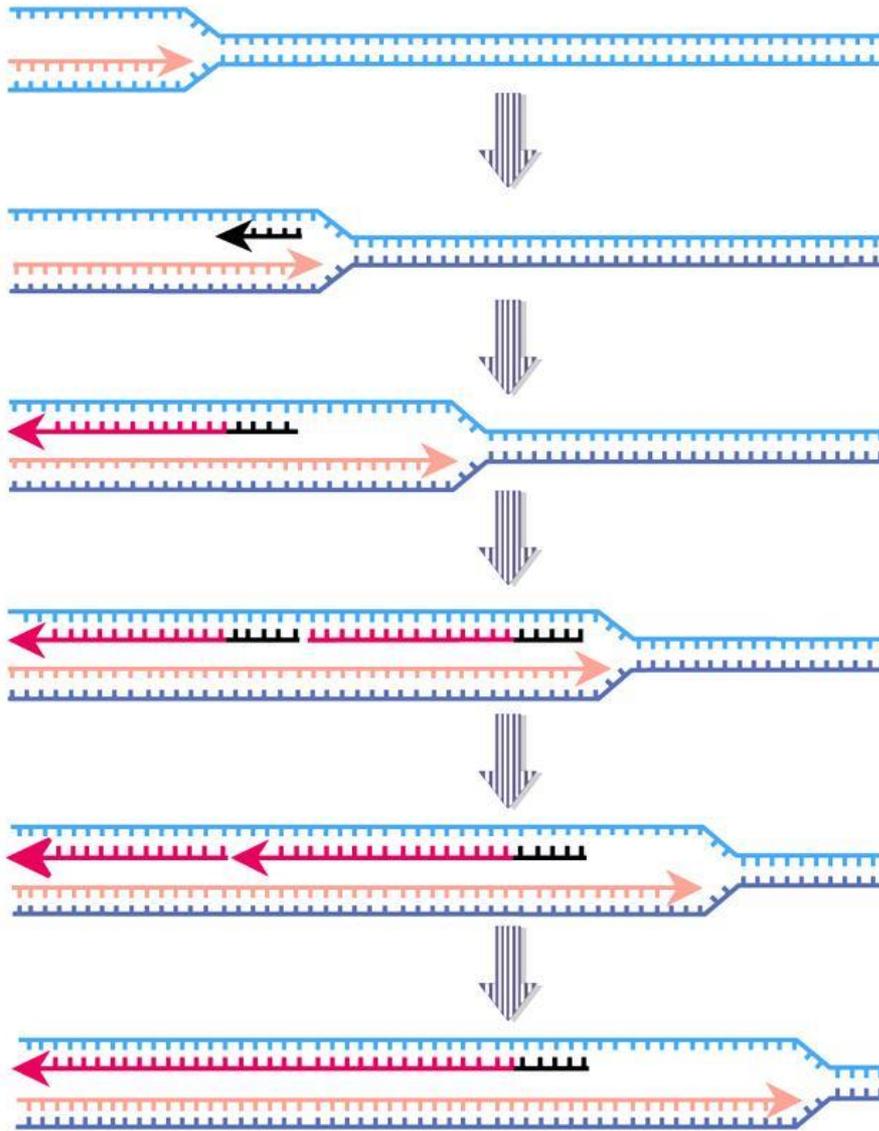
Helicase	Desenrola o DNA
DNA girase (topoisomerase)	Alivia a tensão de torção gerada pela abertura da dupla-fita
Primase	Sintetiza os primers de RNA
DNA polimerases	Polimerização do DNA, retirada dos primers e reparo do DNA
Single strand binding (SSB)	Liga a fita simples de DNA
DNA ligase	Une os fragmentos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







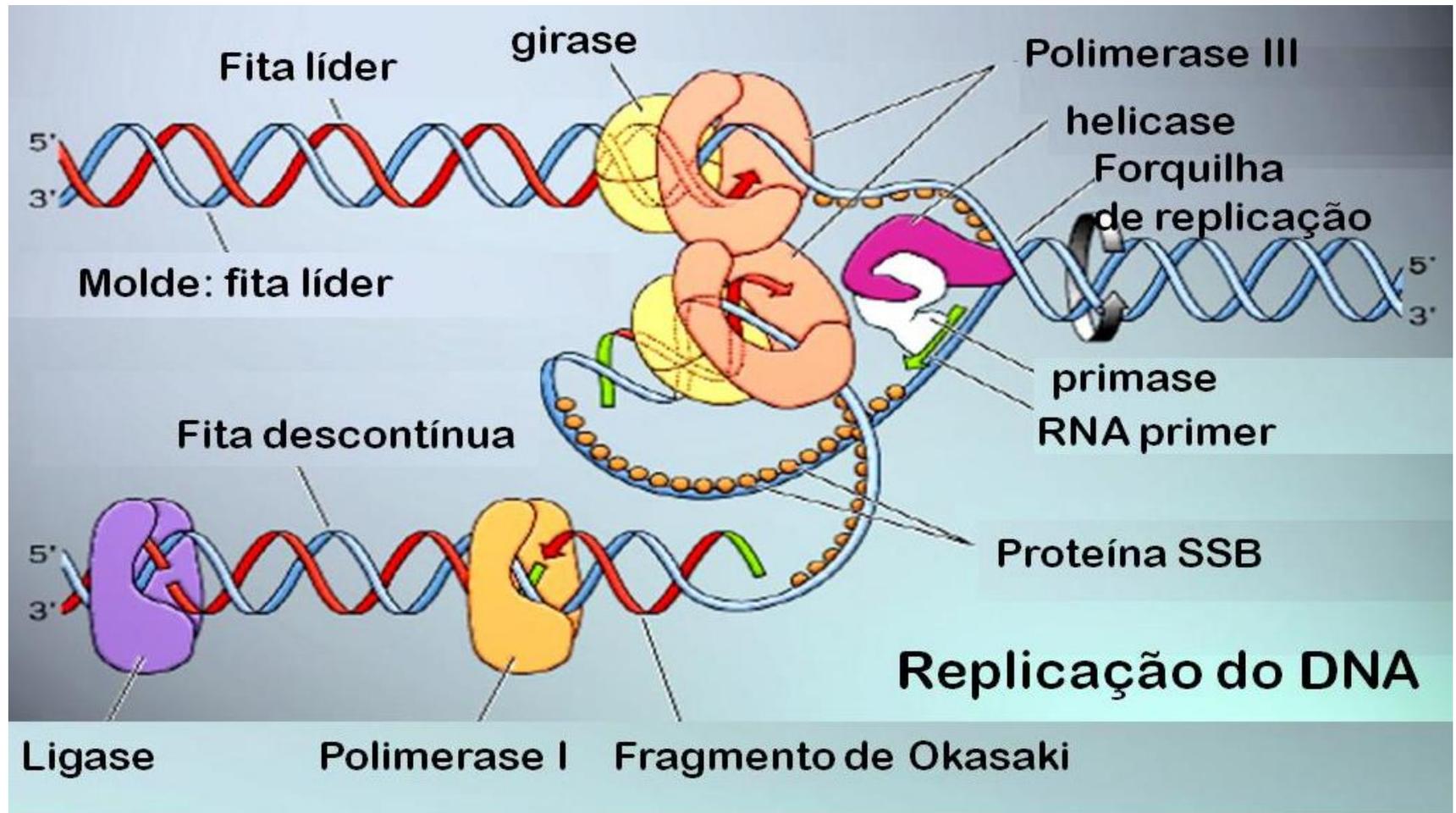
● Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

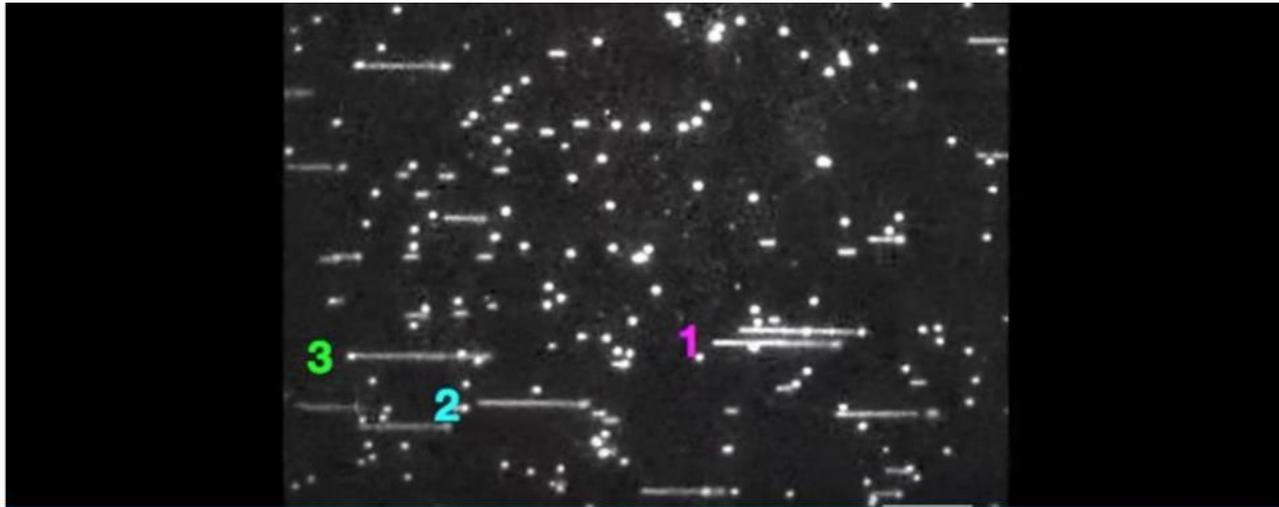
● A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

● 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





James Graham/UC Davis

DNA Replication Has Been Filmed For The First Time, And It's Not What We Expected

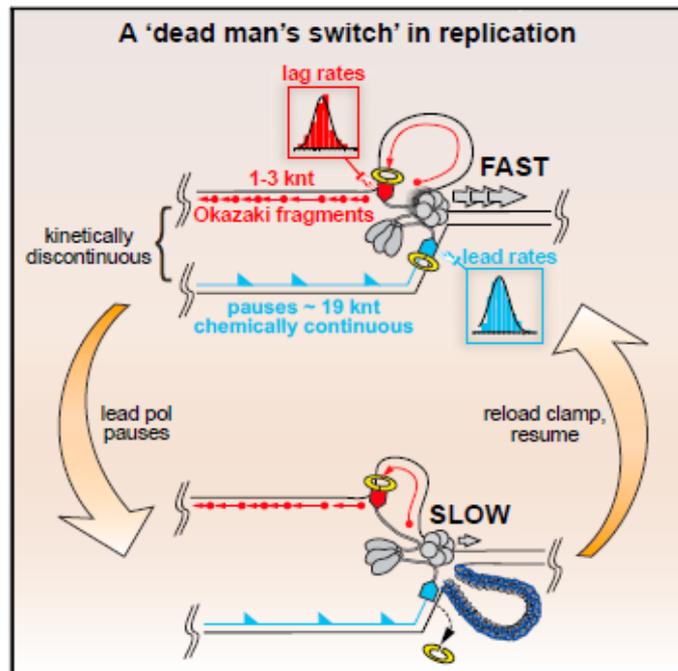
"It undermines a great deal of what's in the textbooks."

BEC CREW 19 JUN 2017

<http://www.sciencealert.com/dna-replication-has-been-filmed-for-the-first-time-and-it-s-stranger-than-we-thought>

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 as 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 telomerasas .

REPLICAÇÃO DAS PONTAS DO CROMOSSOMO

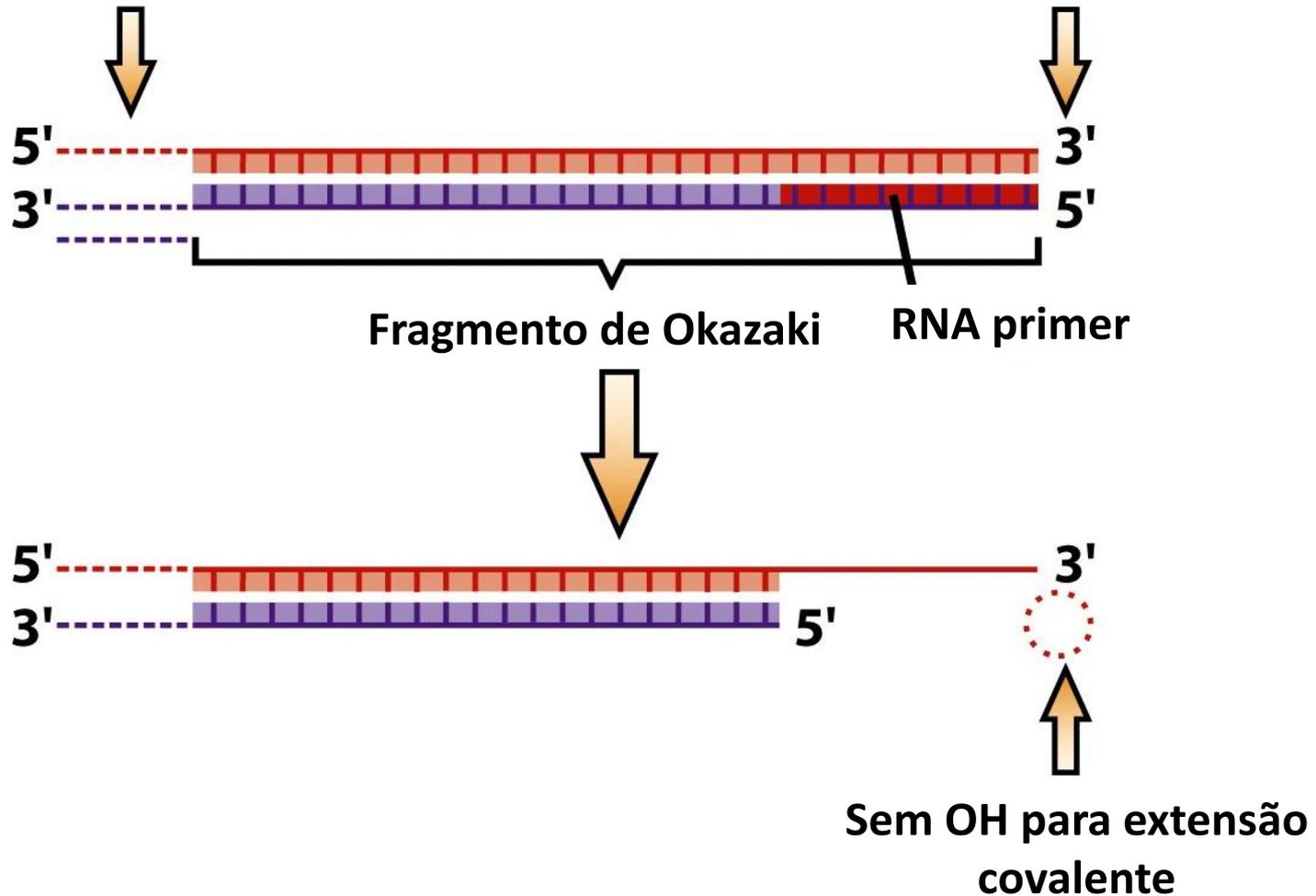
- DNA polimerase não pode replicar o segmento terminal do DNA do filamento descontínuo de um cromossomo linear;
- TELOMERO: tem uma estrutura única que favorece um mecanismo simples para a adição de telômeros feita pela enzima **telomerase** contendo RNA

Repetições dos telômeros de humanos:

TTAGGG

Próximo ao centrômero

Fim do cromossomo



Telomerase resolves the terminal primer problem.

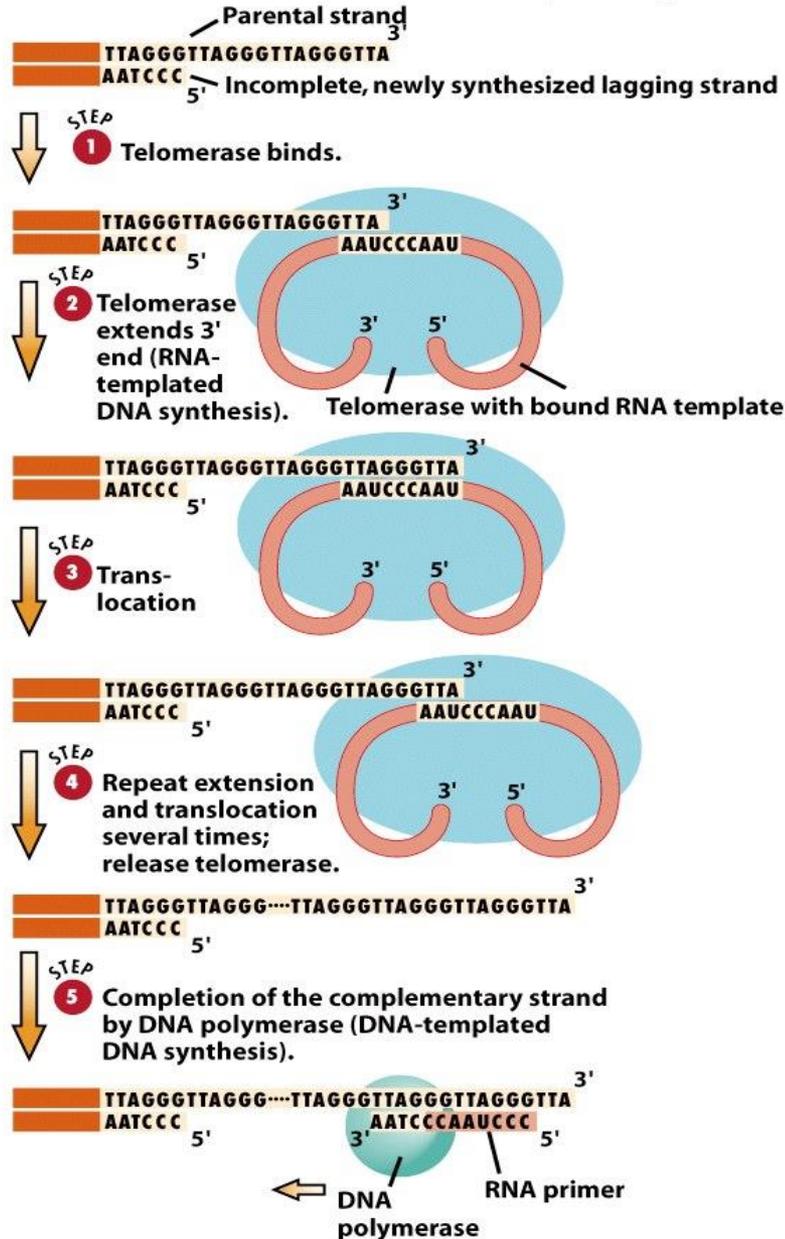
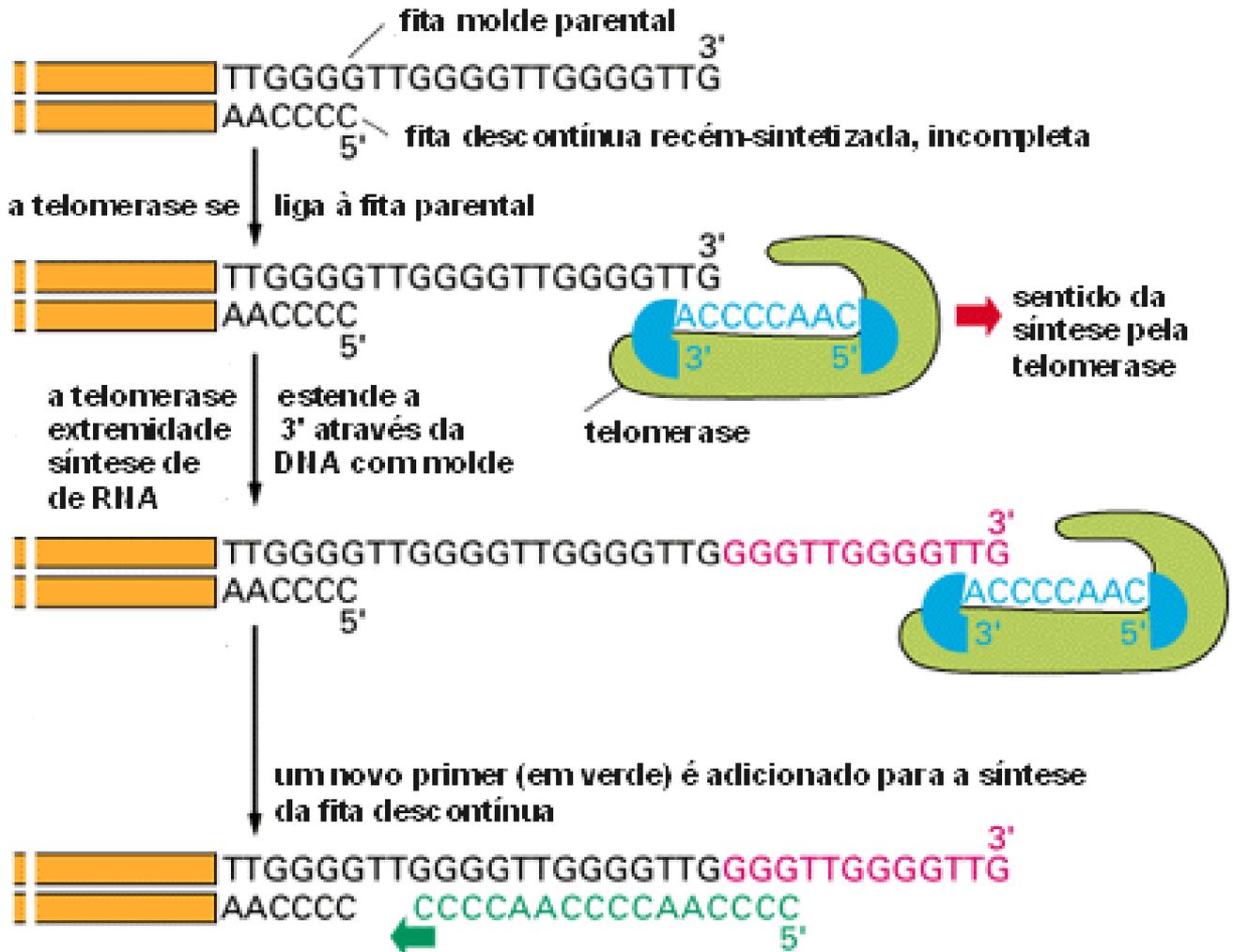


Figure 10-33b Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

AGORA ENTENDEU?



Progeria (envelhecimento prematuro):

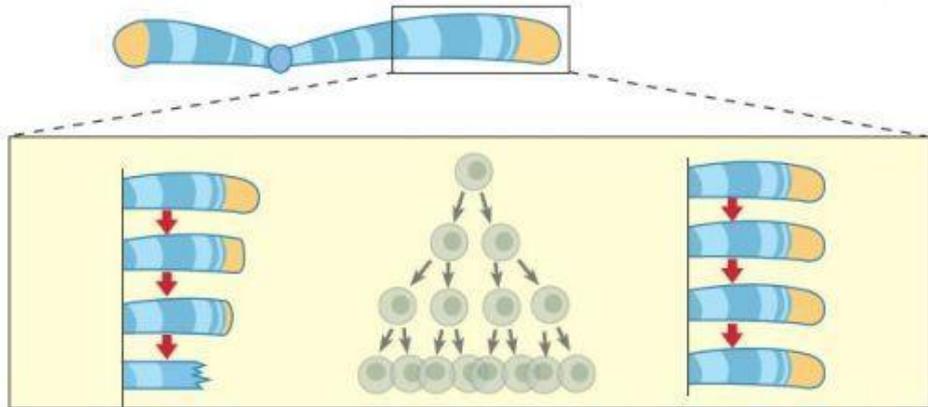
Síndrome de Hutchinson-Gilford: inicia-se imediatamente ao nascimento, morte na adolescência.

Síndrome de Werner: inicia-se na adolescência e morte aos 40 anos

John Tacket, 15 anos



Figure 10-34 Principles of Genetics, 4/e



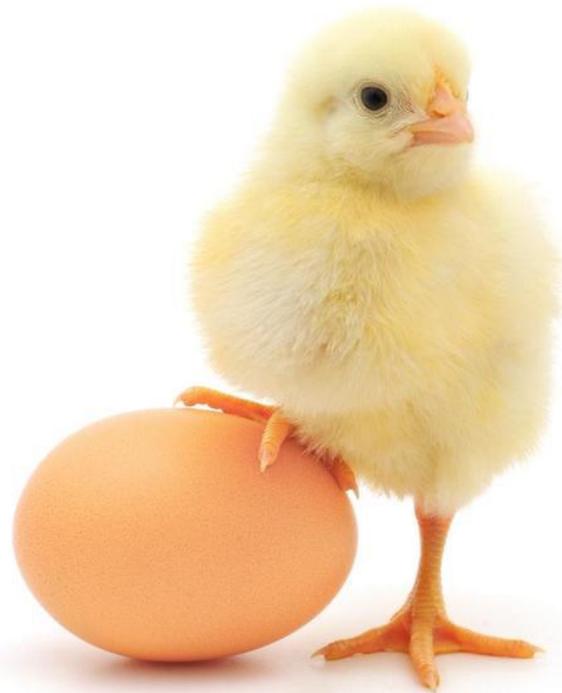
A replicação de DNA

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

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



**QUEM VEIO PRIMEIRO RNA OU O
DNA?**



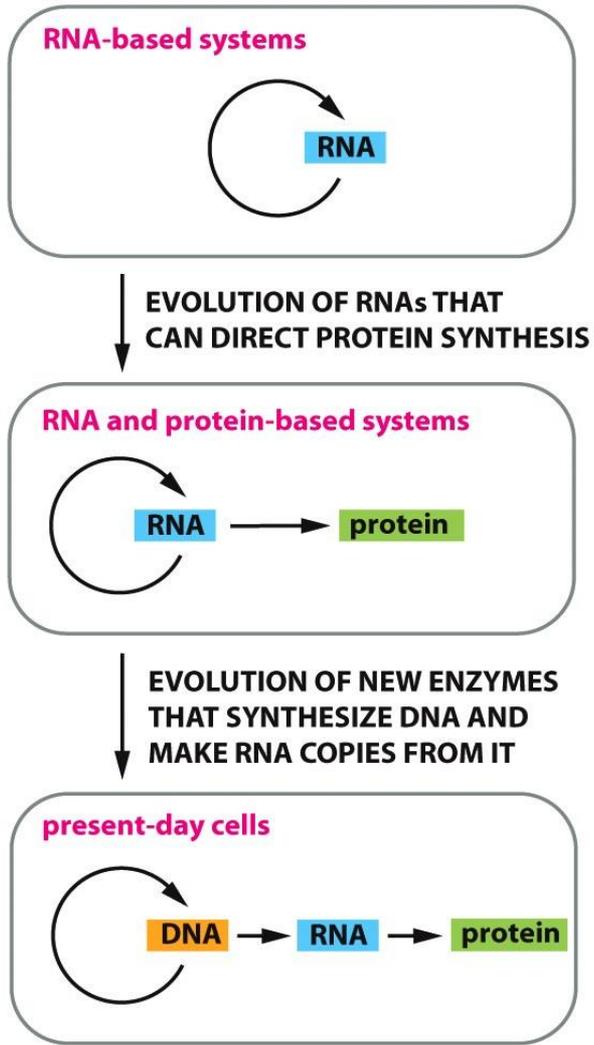


Figure 7-46 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

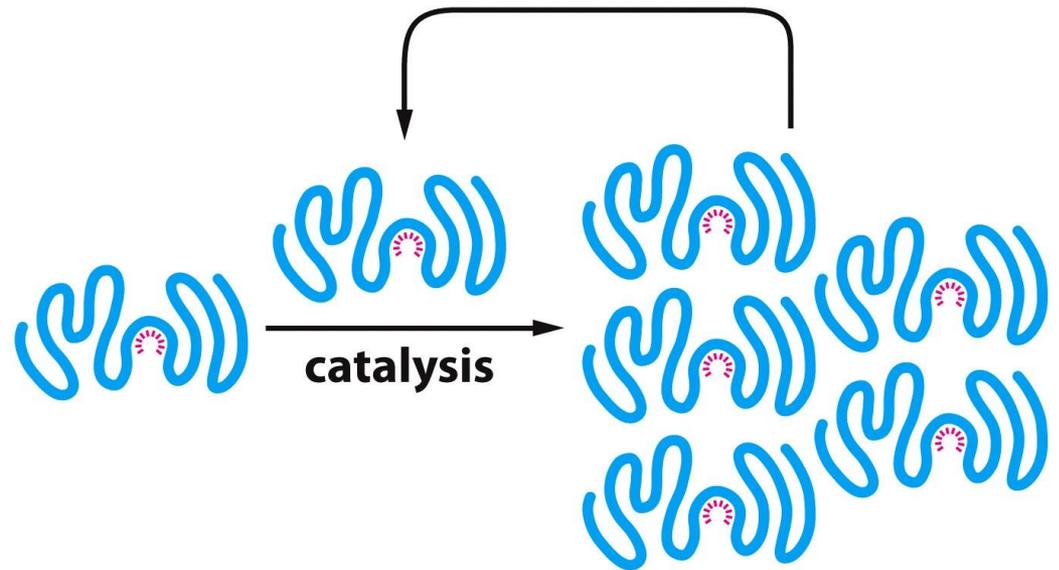


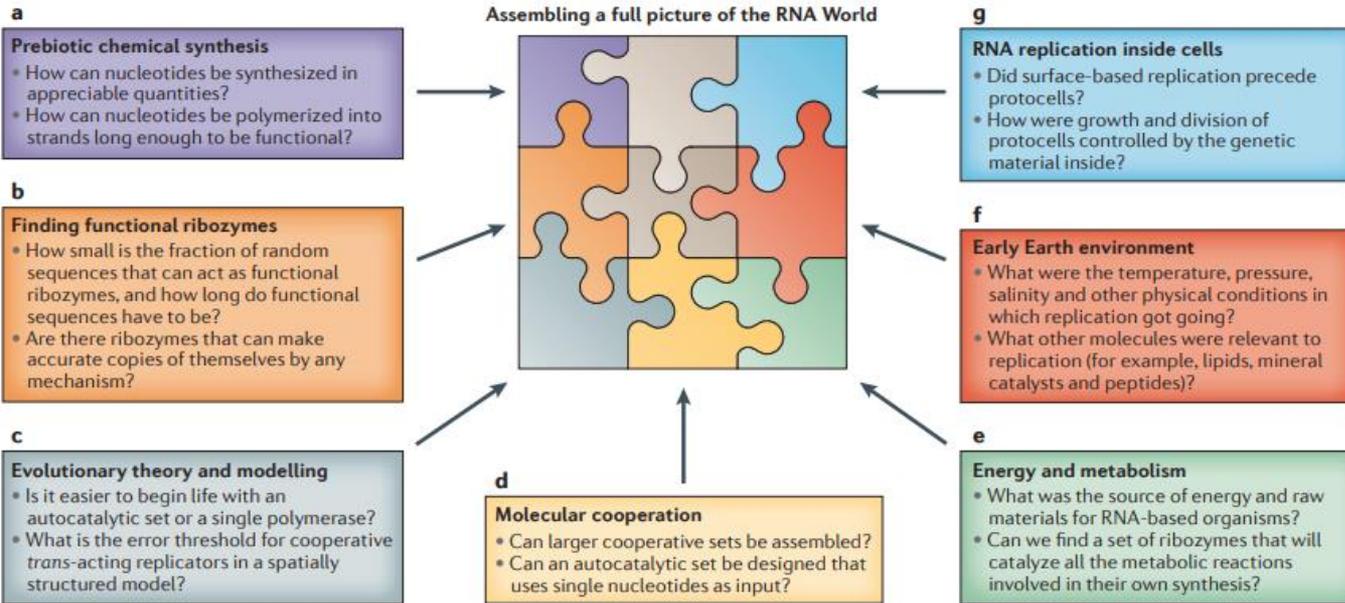
Figure 7-45 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

TABLE 7-4 BIOCHEMICAL REACTIONS THAT CAN BE CATALYZED BY RIBOZYMES

ACTIVITY	RIBOZYMES
RNA cleavage, RNA ligation	self-splicing RNAs
DNA cleavage	self-splicing RNAs
Peptide bond formation in protein synthesis	ribosomal RNA
DNA ligation	<i>in vitro</i> selected RNA
RNA splicing	self-splicing RNAs, RNAs of the spliceosome (?)
RNA polymerization	<i>in vitro</i> selected RNA
RNA phosphorylation	<i>in vitro</i> selected RNA
RNA aminoacylation	<i>in vitro</i> selected RNA
RNA alkylation	<i>in vitro</i> selected RNA
C–C bond rotation (isomerization)	<i>in vitro</i> selected RNA

Table 7-4 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Assembling a full picture of the RNA World



REVIEWS

NON-CODING RNA

The RNA World: molecular cooperation at the origins of life

Paul G. Higgs¹ and Niles Lehman²

Abstract | The RNA World concept posits that there was a period of time in primitive Earth's history — about 4 billion years ago — when the primary living substance was RNA or something chemically similar. In the past 50 years, this idea has gone from speculation to a prevailing idea. In this Review, we summarize the key logic behind the RNA World and describe some of the most important recent advances that have been made to support and expand this logic. We also discuss the ways in which molecular cooperation involving RNAs would facilitate the emergence and early evolution of life. The immediate future of RNA World research should be a very dynamic one.

First li
been b

LIFE 3 June 2020

Article

Selective prebiotic formation of RNA pyrimidine and DNA purine nucleosides

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2330-9>

Received: 12 December 2019

Accepted: 16 April 2020

Published online: 3 June 2020

 Check for updatesJianfeng Xu^{1,6}, Václav Chmela^{1,6}, Nicholas J. Green¹, David A. Russell¹, Mikołaj J. Janicki², Robert W. Góra², Rafał Szabla^{3,4}, Andrew D. Bond⁵ & John D. Sutherland^{1✉}

The nature of the first genetic polymer is the subject of major debate¹. Although the ‘RNA world’ theory suggests that RNA was the first replicable information carrier of the prebiotic era—that is, prior to the dawn of life^{2,3}—other evidence implies that life may have started with a heterogeneous nucleic acid genetic system that included both RNA and DNA⁴. Such a theory streamlines the eventual ‘genetic takeover’ of homogeneous DNA from RNA as the principal information-storage molecule, but requires a selective abiotic synthesis of both RNA and DNA building blocks in the same local primordial geochemical scenario. Here we demonstrate a high-yielding, completely stereo-, regio- and furanosyl-selective prebiotic synthesis of the purine deoxyribonucleosides: deoxyadenosine and deoxyinosine. Our synthesis uses key intermediates in the prebiotic synthesis of the canonical pyrimidine ribonucleosides (cytidine and uridine), and we show that, once generated, the pyrimidines persist throughout the synthesis of the purine deoxyribonucleosides, leading to a mixture of deoxyadenosine, deoxyinosine, cytidine and uridine. These results support the notion that purine deoxyribonucleosides and pyrimidine ribonucleosides may have coexisted before the emergence of life⁵.

der in
ig

r in

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***. 3ª Edição brasileira. Artmed, Porto Alegre

