

MECANISMOS BÁSICOS DA GENÉTICA MOLECULAR: DO GENE À PROTEÍNA (Parte 1)

Aula 2

LGN0232 – Genética Molecular

Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br



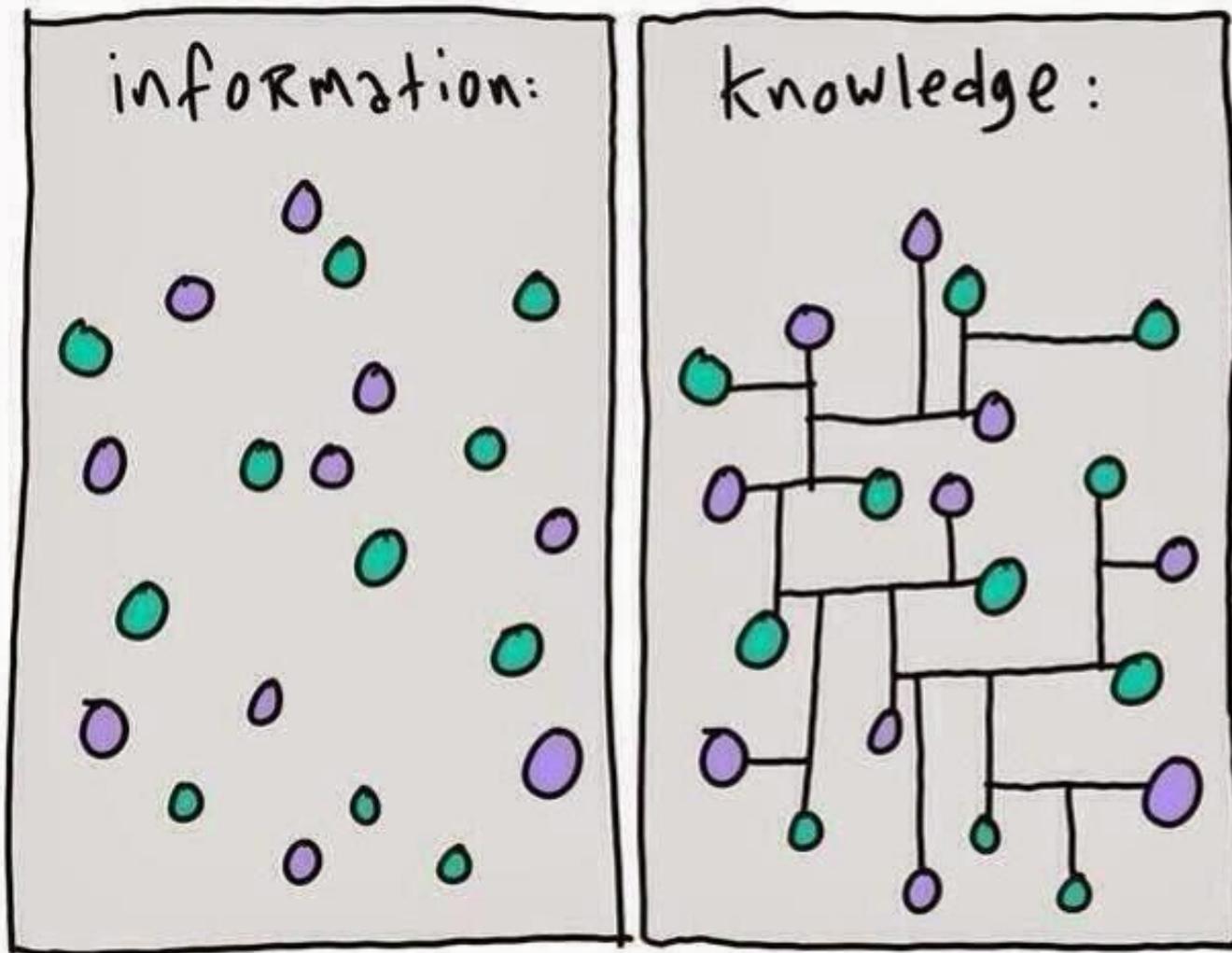
SUMÁRIO

- Fluxo da informação genética;
- Relembrando a molécula de DNA;
- O processo de replicação;
- O processo de transcrição;
- Maturação de mRNAs;
- Estudo dirigido.

Apenas 0,1 % do genoma é responsável pela diferença entre dois humanos



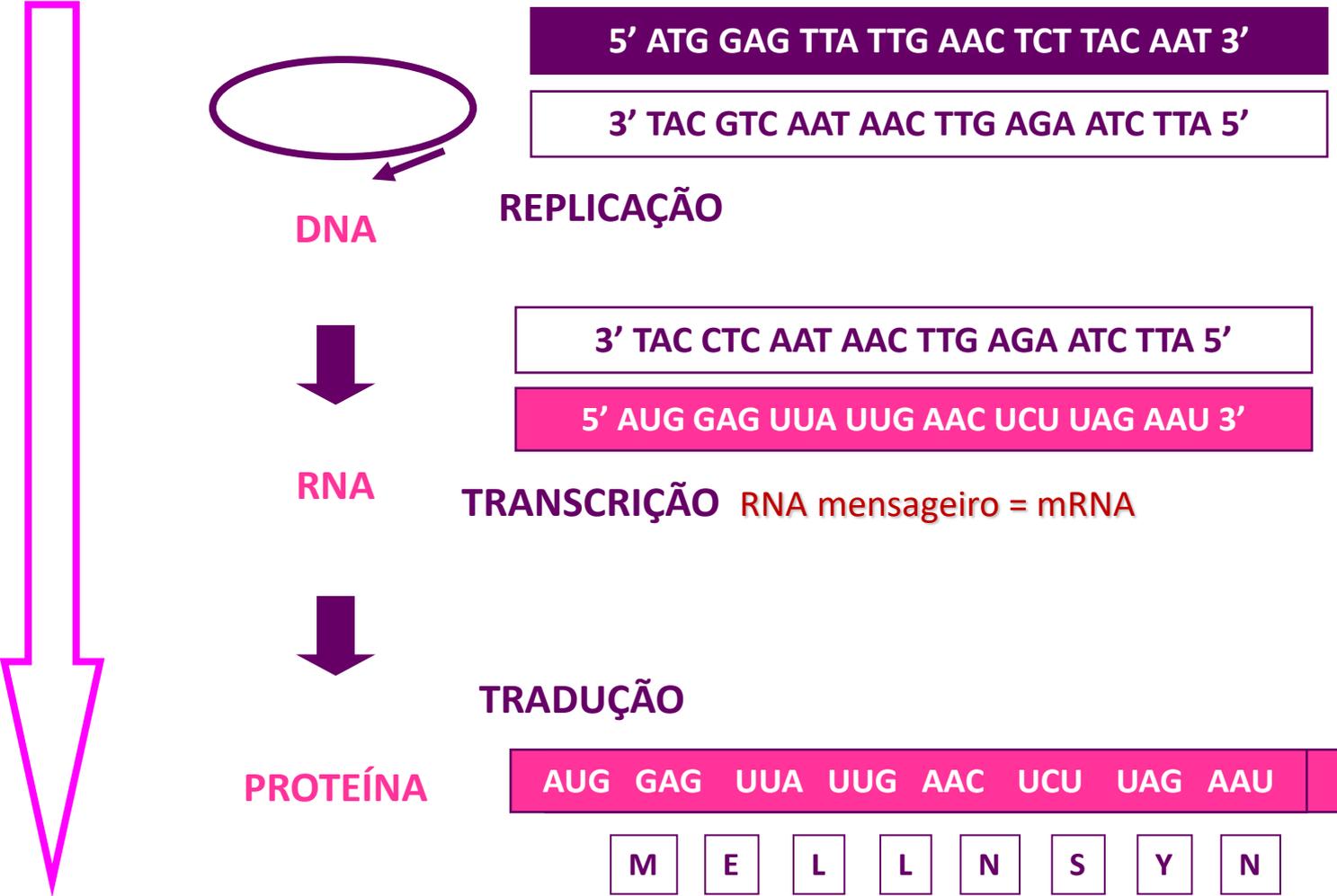
O segredo é entender como essa informação é processada!



@gapingvoid

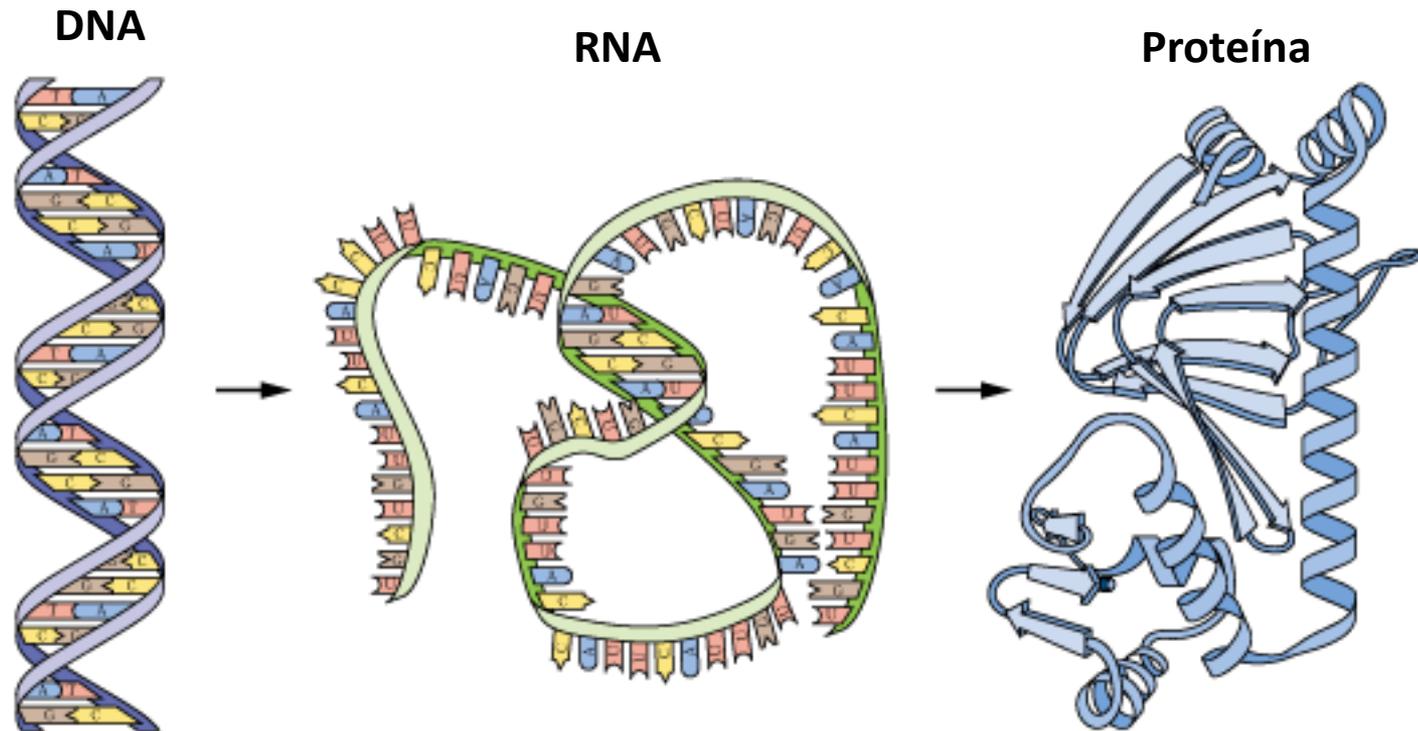
A informação está TODA contida no próprio genoma, mas como interpreta-la corretamente?

FLUXO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA



DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA

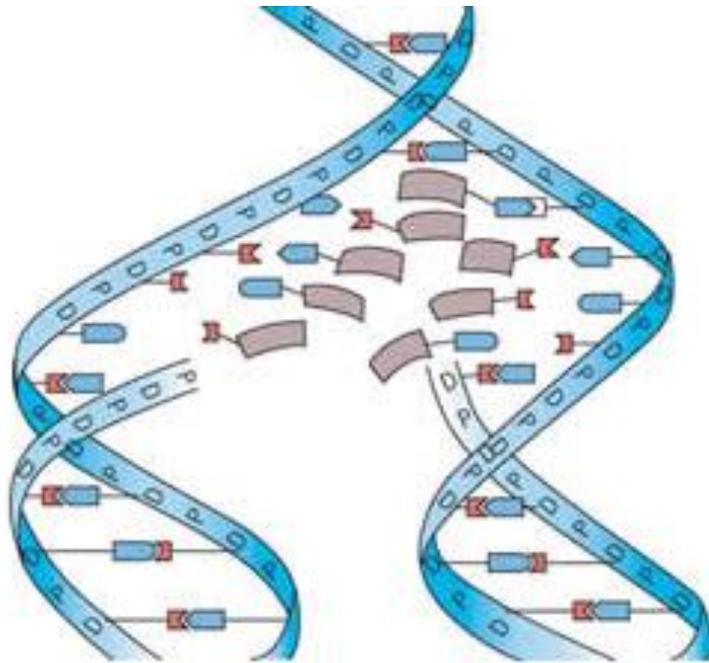
A informação genética, armazenada nos cromossomos, é transferida às células filhas através da **replicação do DNA**, sendo expressa através da **transcrição em mRNA** e **traduzida** subsequentemente em cadeias polipeptídicas.



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



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



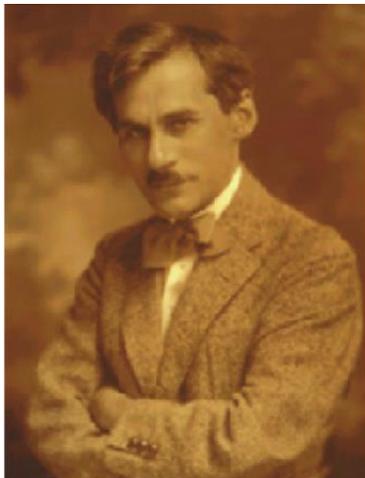
<http://qnint.s bq.org.br>

1868

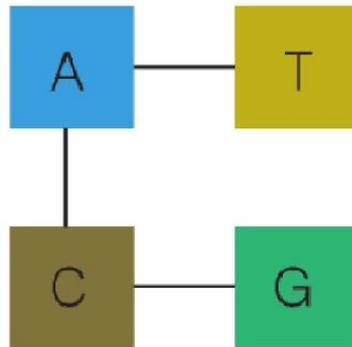
Primeiros estudos de DNA em células de leucócitos de bandagens cirúrgicas.

Substância contendo fósforo: Nucleína

Friedrick Miescher



SBQ



<http://qnint.s bq.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

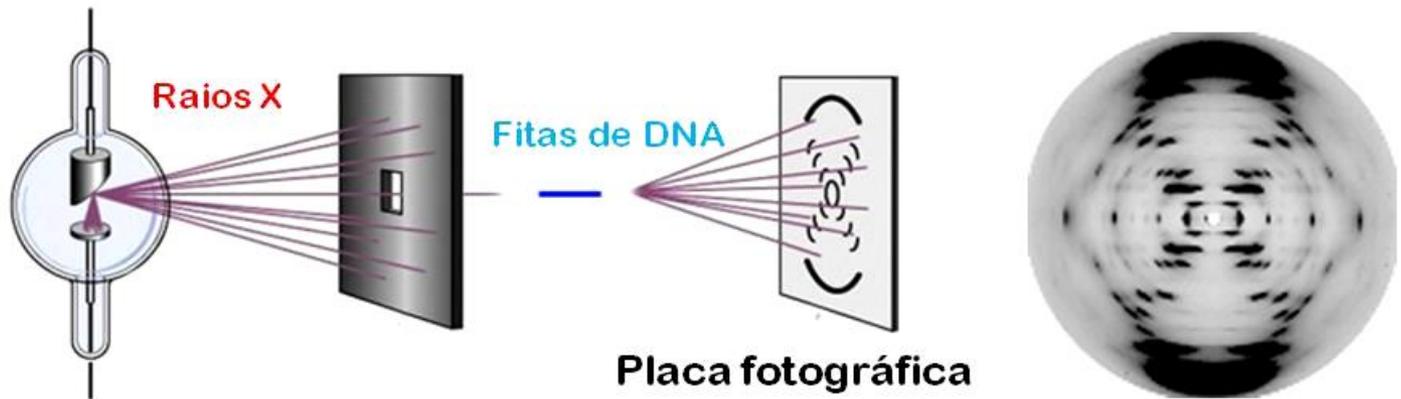
* Definidas como moles de constituintes nitrogenados por 100 g de átomos de fosfato no hidrolisado.
 FONTE: E. Chargaff e J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

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

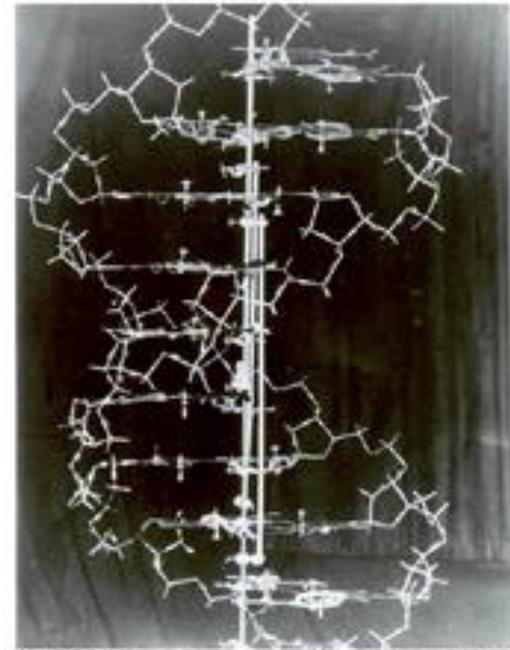


Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives. Noncommercial, educational use only.

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



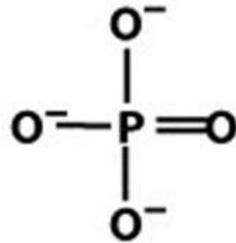
Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory Archives and Svenska Prisa Photo, Stockholm, Sweden.
Noncommercial, educational use only.

1958 - Rosalind Franklin falece de
câncer de ovário.

As regras não permitem entregar um
prêmio Nobel pós-morte

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

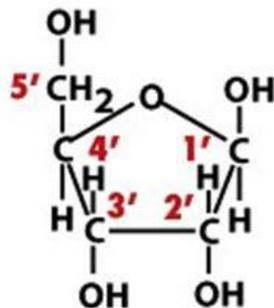
(1)
Um
grupamento
fosfato:



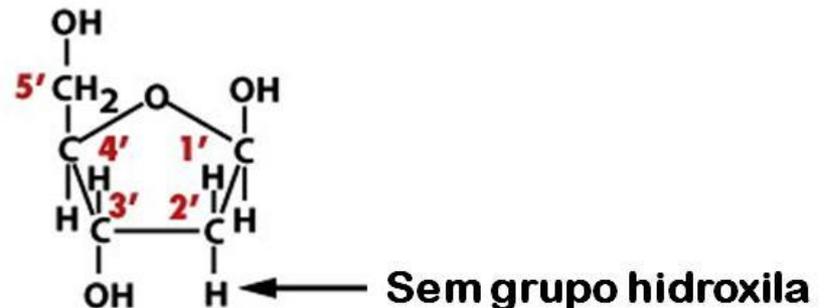
Carbono 5

(2)
pentoses
(açúcares
de 5
carbonos)

(a) RNA:
Ribose



(b) DNA:
2-Desoxirribose

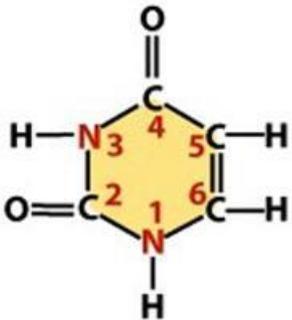


Carbono 2

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

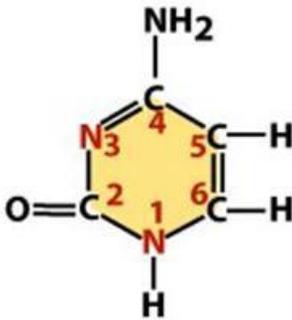
(3)
Uma base
cíclica
contendo
Nitrogênio

(a) RNA

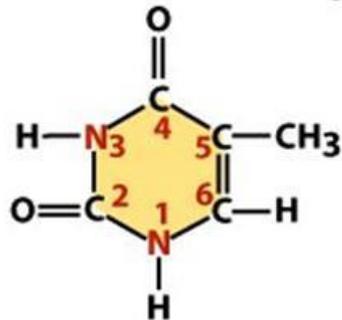


Uracila

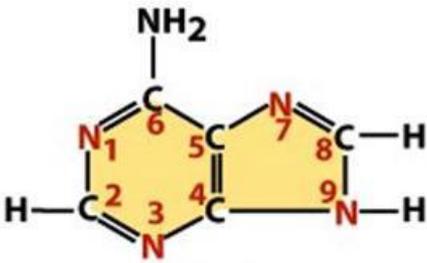
(b) DNA e RNA (c) DNA



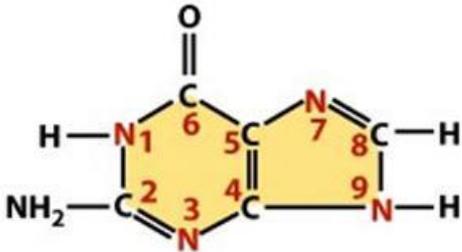
Citosina



Timina



Adenina



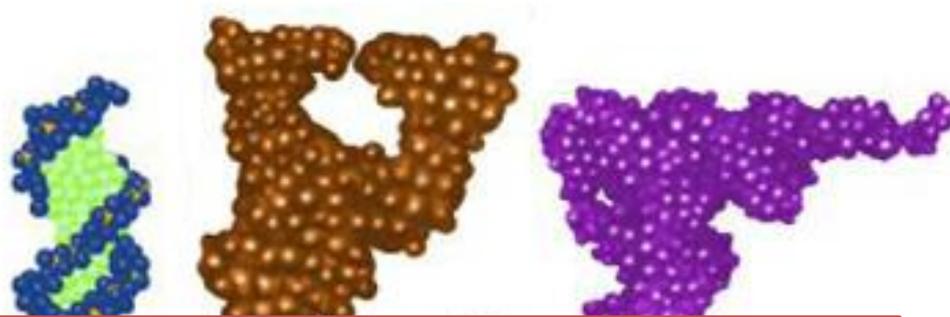
Guanina

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

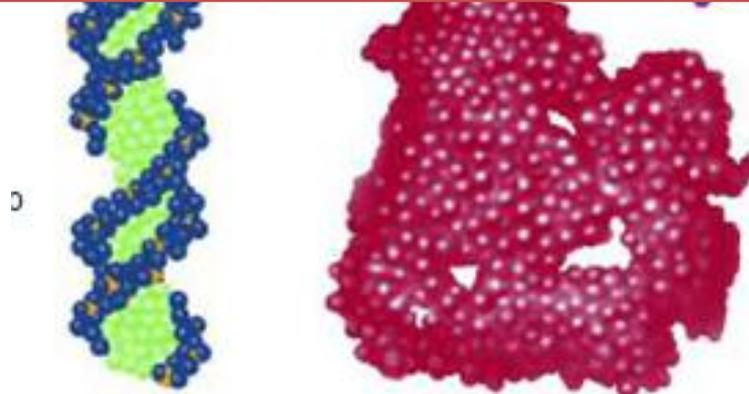
DNA E RNA – MOLÉCULAS DE INFORMAÇÃO

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

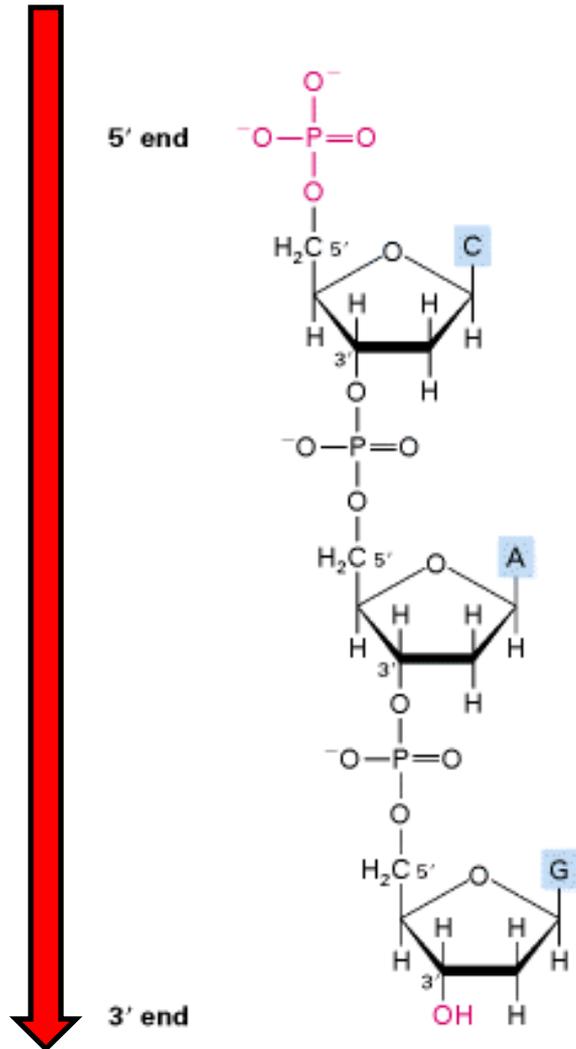
RNA - Descoberto em levedura (1890).



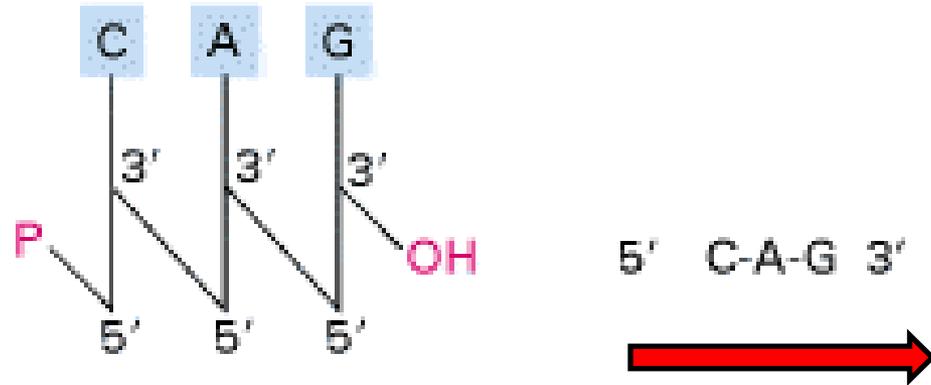
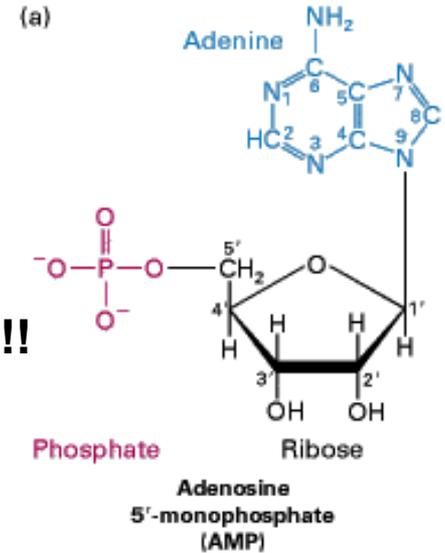
Diferenças estruturais



Ligações fosfodiéster - polarização 5' – 3'



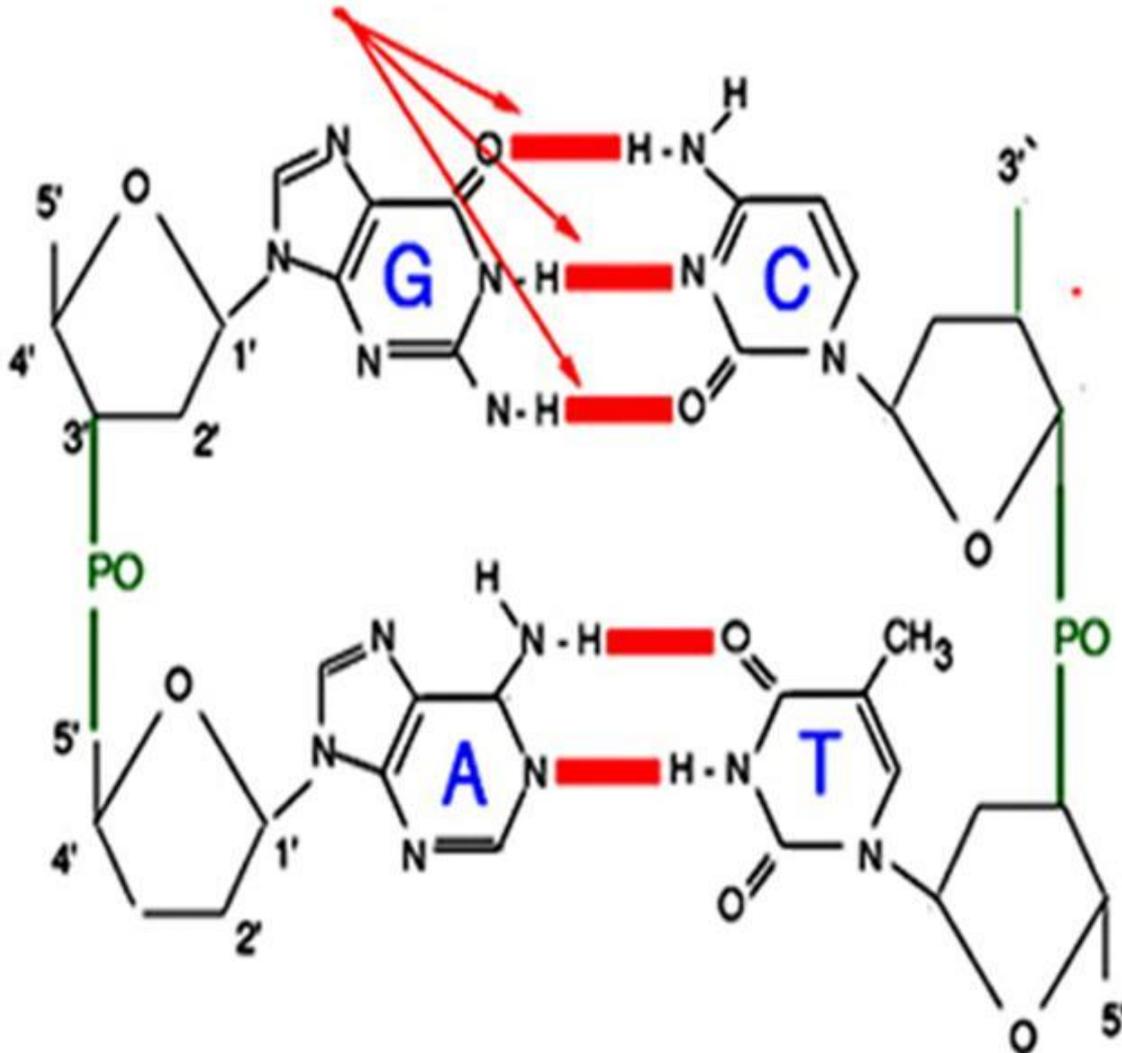
**Adenosina trifosfato!!!
SIM ATP!!!!**



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

DNA – FITA DUPLA!

Pontes de hidrogênio



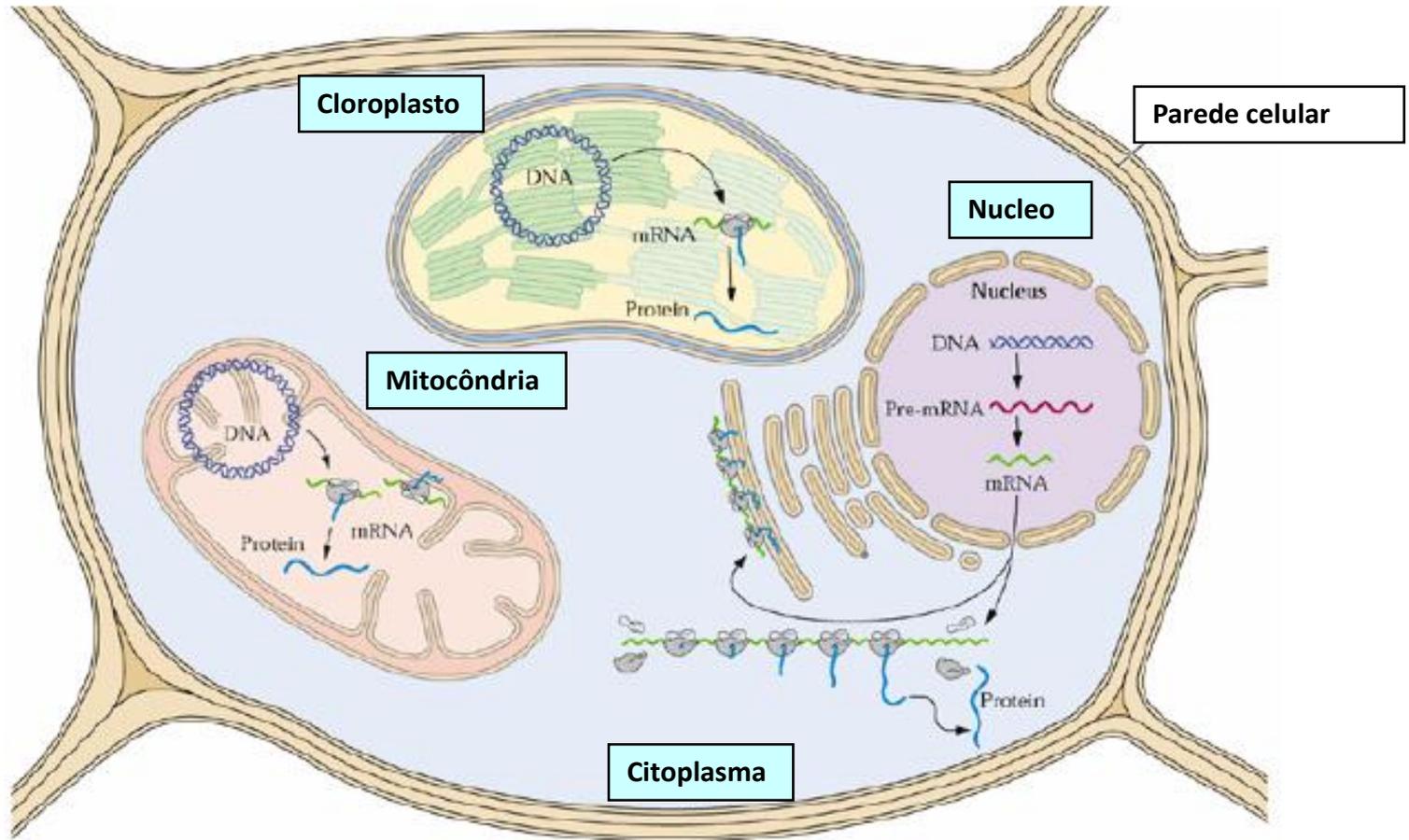
* Entre o **carbono 3'** (grupo OH-) do nucleotídeo de “cima” e o **carbono 5'** (grupo fosfato) do nucleotídeo de “baixo”.

Ligações fosfodiéster 3' – 5'

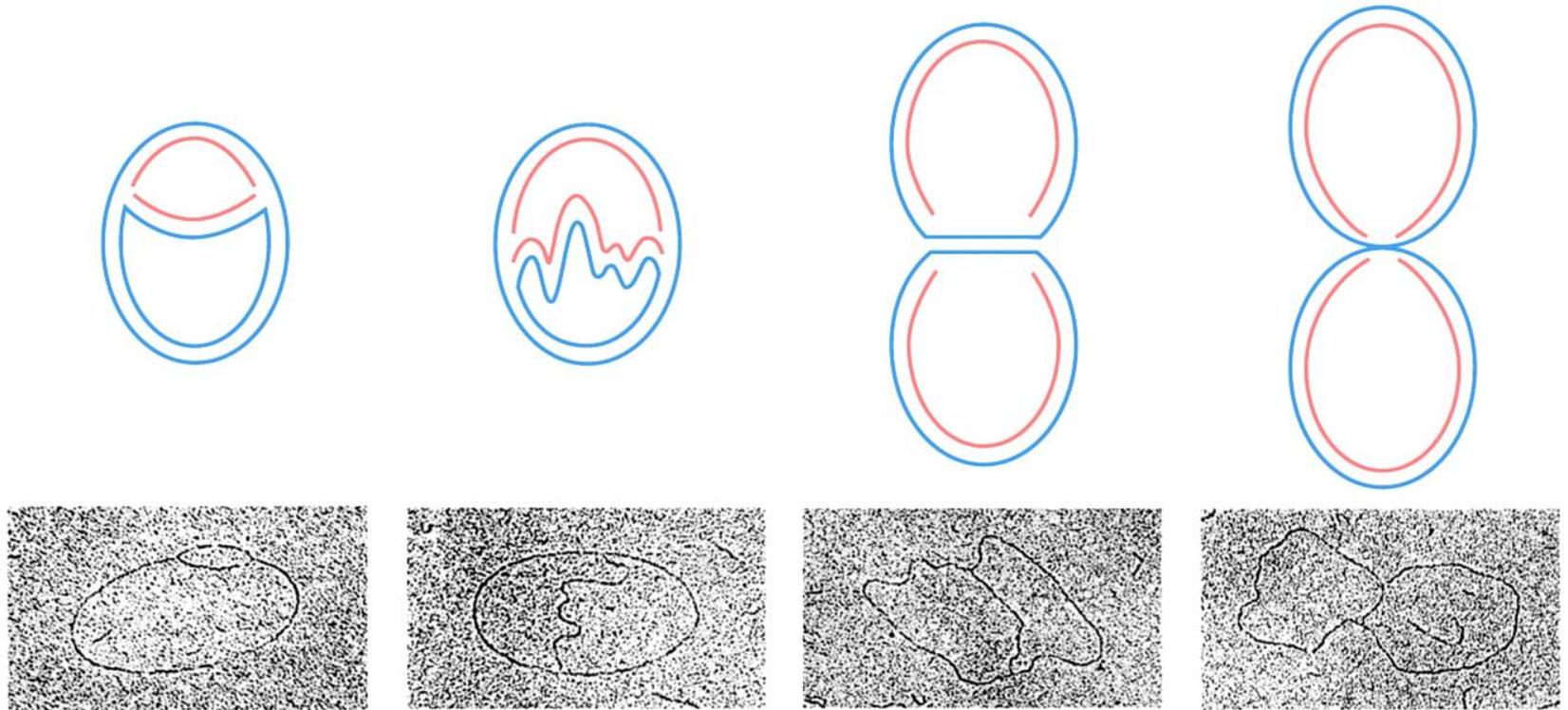
CARACTERÍSTICAS DA DUPLA HÉLICE

- ✓ 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;

3 Genomas em planta: cromossomal, plastidial e mitocondrial



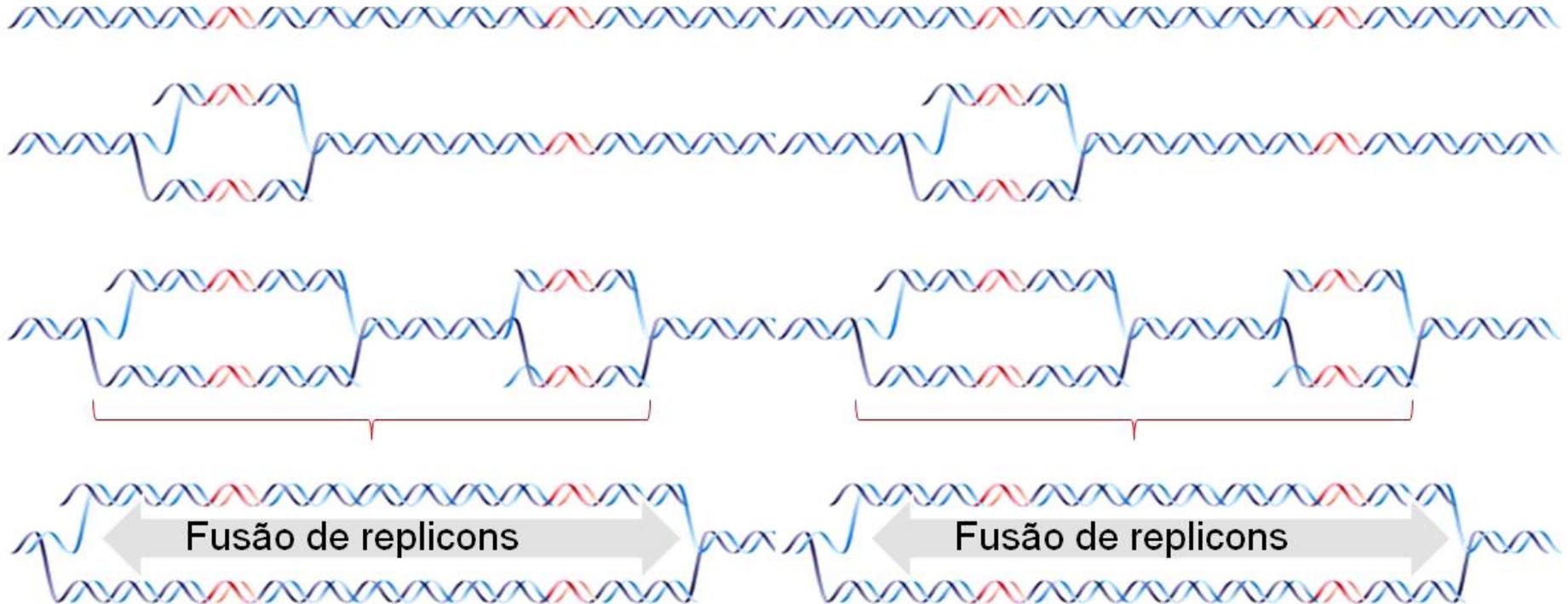
A REPLICAÇÃO DO CROMOSSOMO CIRCULAR



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).

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.

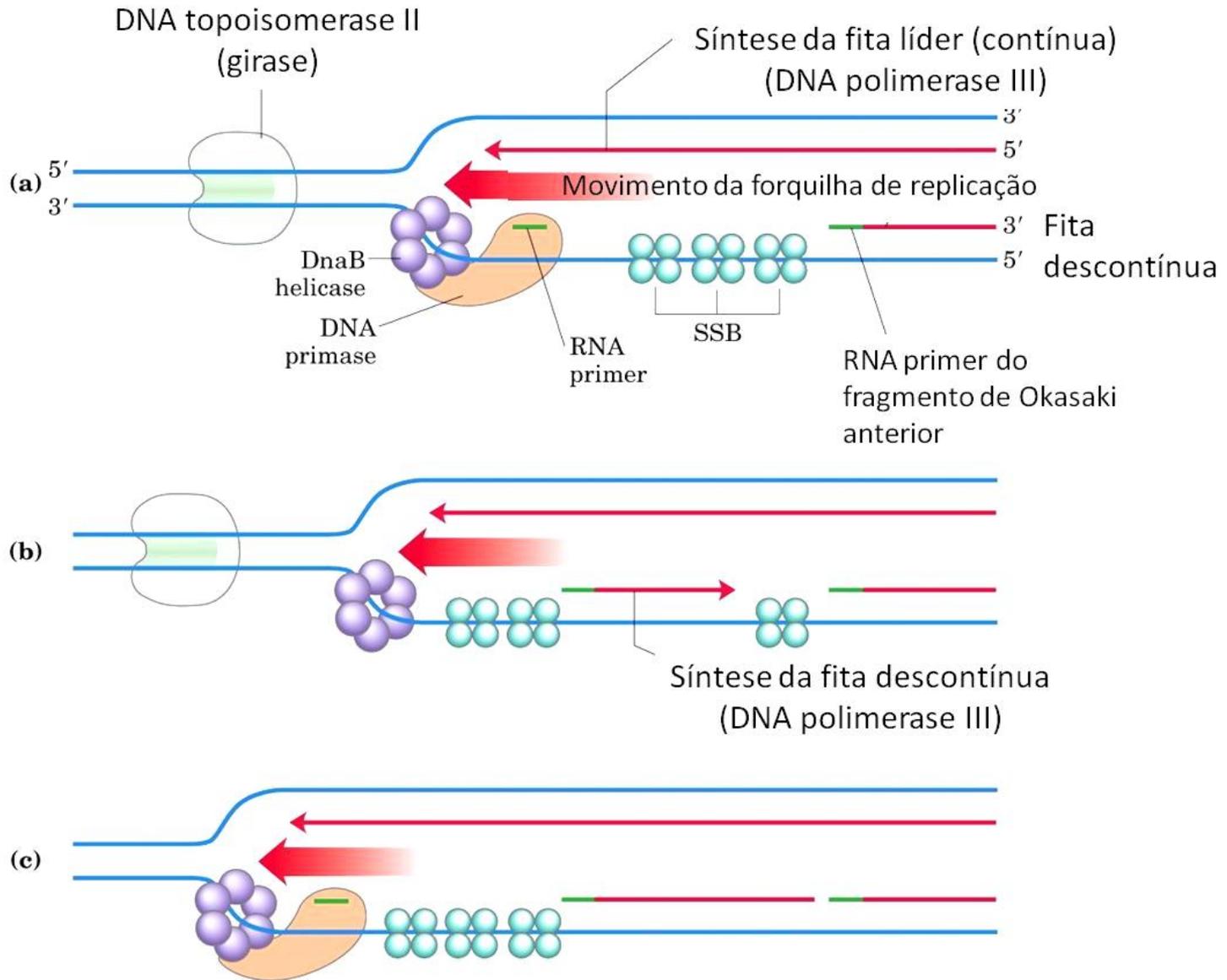
PROTEÍNAS PRESENTES NA ORIGEM DE REPLICAÇÃO

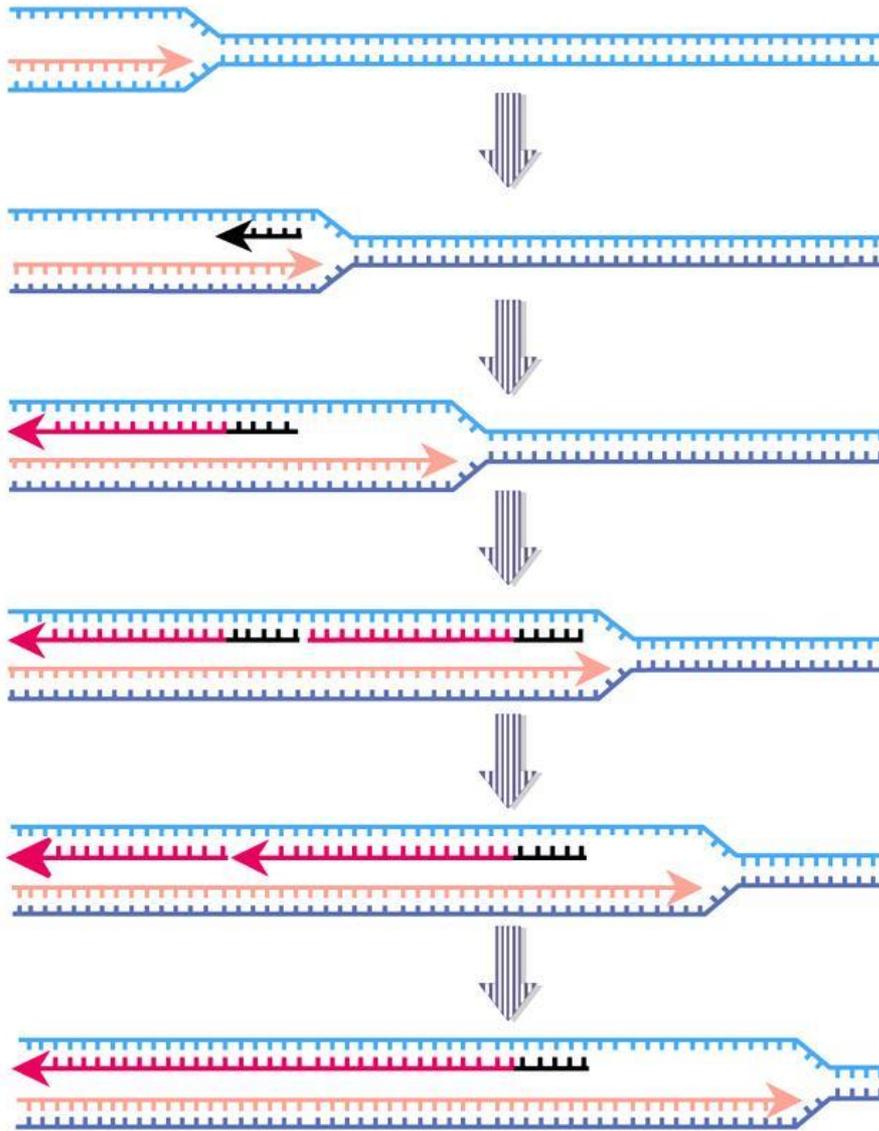
Helicase	Desenrola o DNA
DNA girase (topoisomerase)	Alivia a tensão de torção gerada pela abertura da dupla-fita
Primase	Sintetiza os primers de RNA
DNA polimerases	Polimerização do DNA, retirada dos primers e reparo do DNA
Single strand binding (SSB)	Liga a fita simples de DNA
DNA ligase	Une os fragmentos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







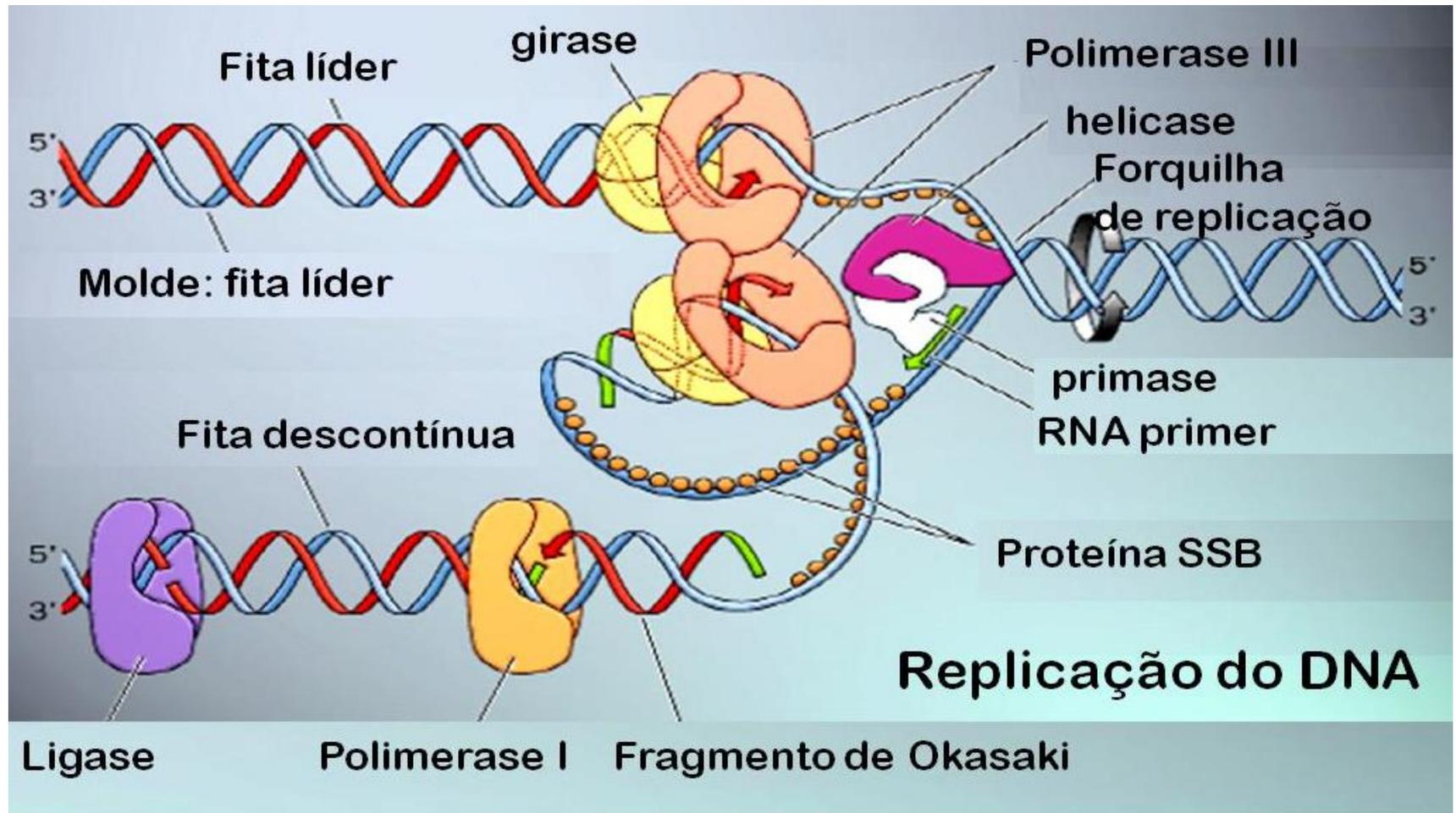
- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

- 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

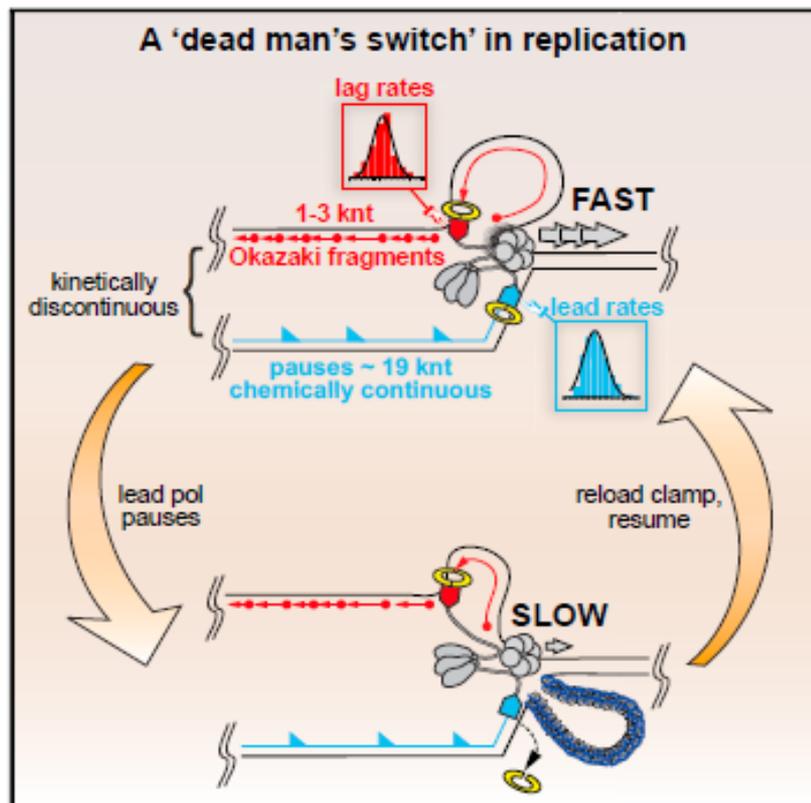
- A DNA ligase sela as quebras

Síntese das fitas contínua e descontínua é independente



Independent and Stochastic Action of DNA Polymerases in the Replisome

Graphical Abstract



Authors

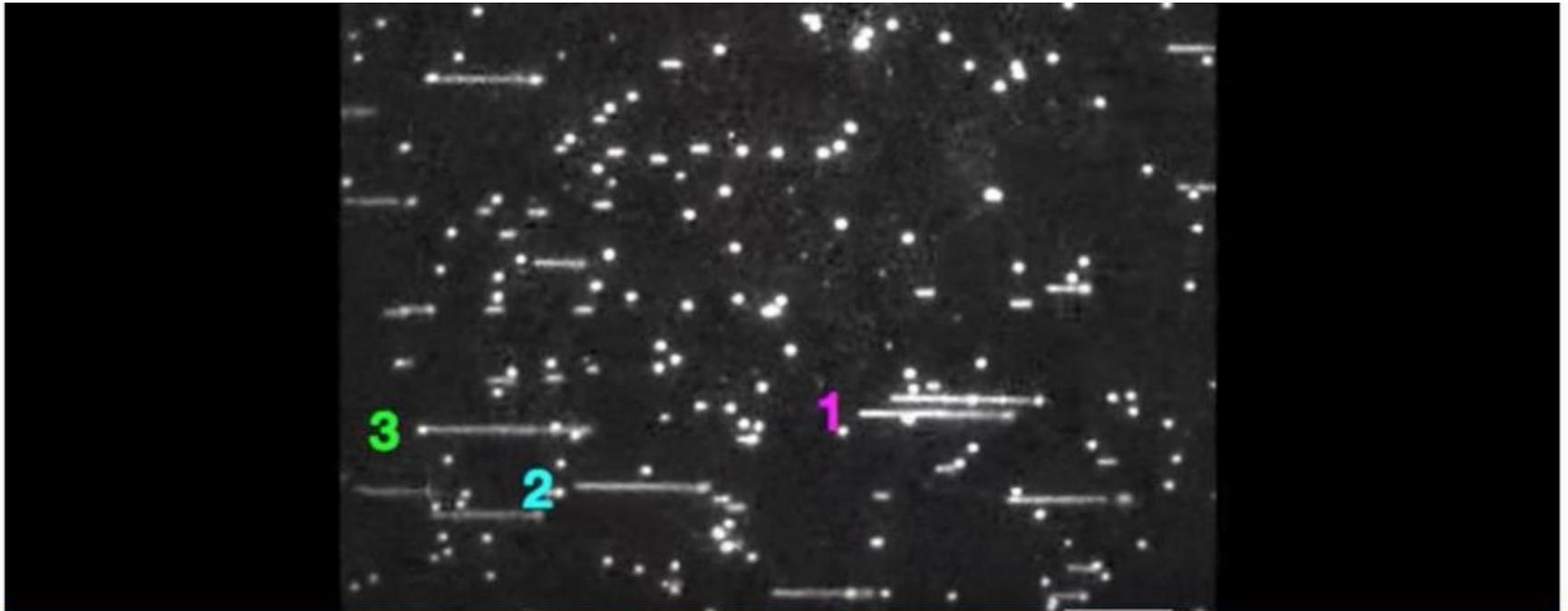
James E. Graham, Kenneth J. Marians,
Stephen C. Kowalczykowski

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.



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>

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

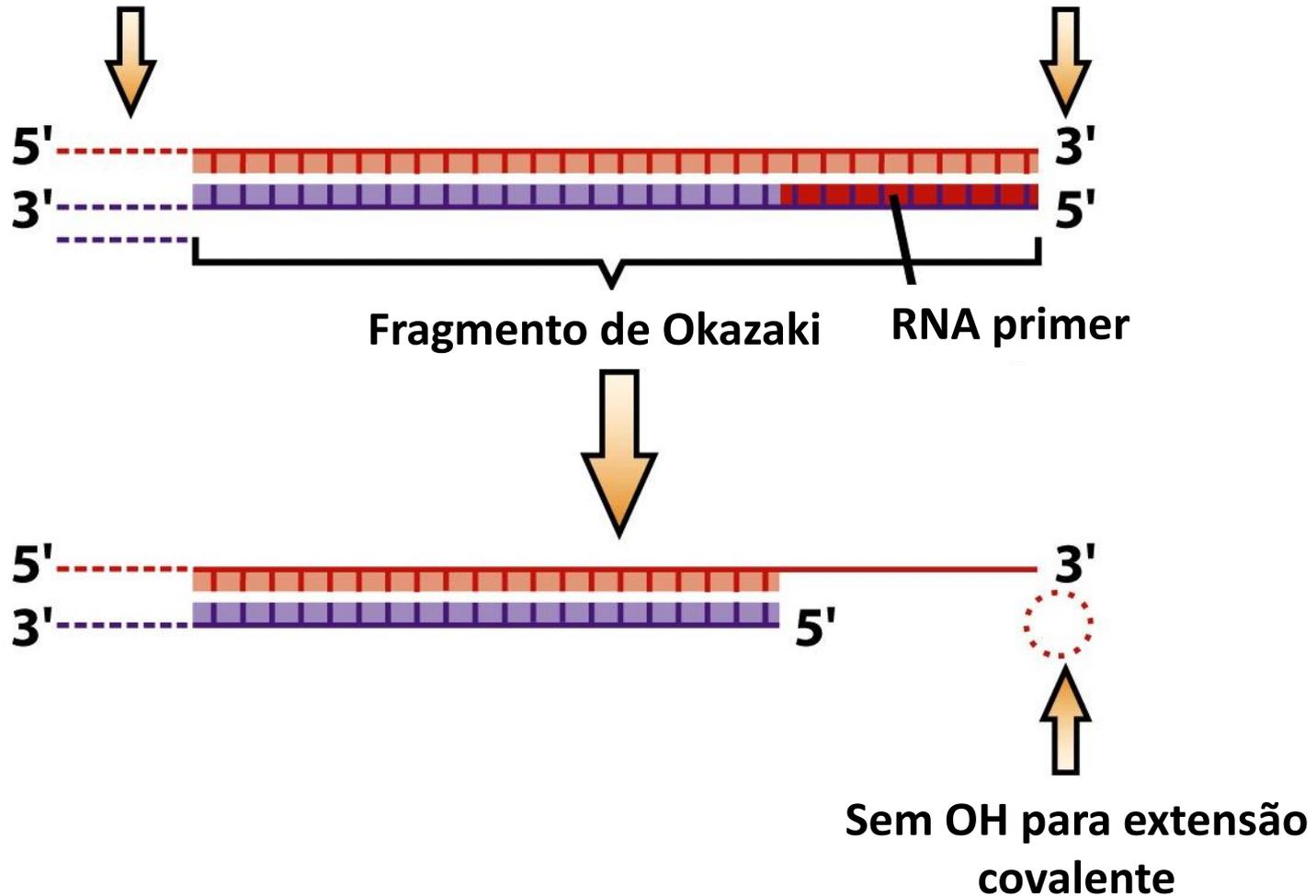
- DNA polimerase não pode replicar o segmento terminal do DNA do filamento descontínuo de um cromossomo linear;
- TELOMERO: tem uma estrutura única que favorece um mecanismo simples para a adição de telômeros feita pela enzima **telomerase** contendo RNA

Repetições dos telômeros de humanos:

TTAGGG

Próximo ao centrômero

Fim do cromossomo





a telomerase se liga à fita parental



a telomerase estende a extremidade 3' através da síntese de DNA com molde de RNA



um novo primer (em verde) é adicionado para a síntese da fita descontínua



Controle quantitativo e temporal das moléculas “subsequentes” ao DNA

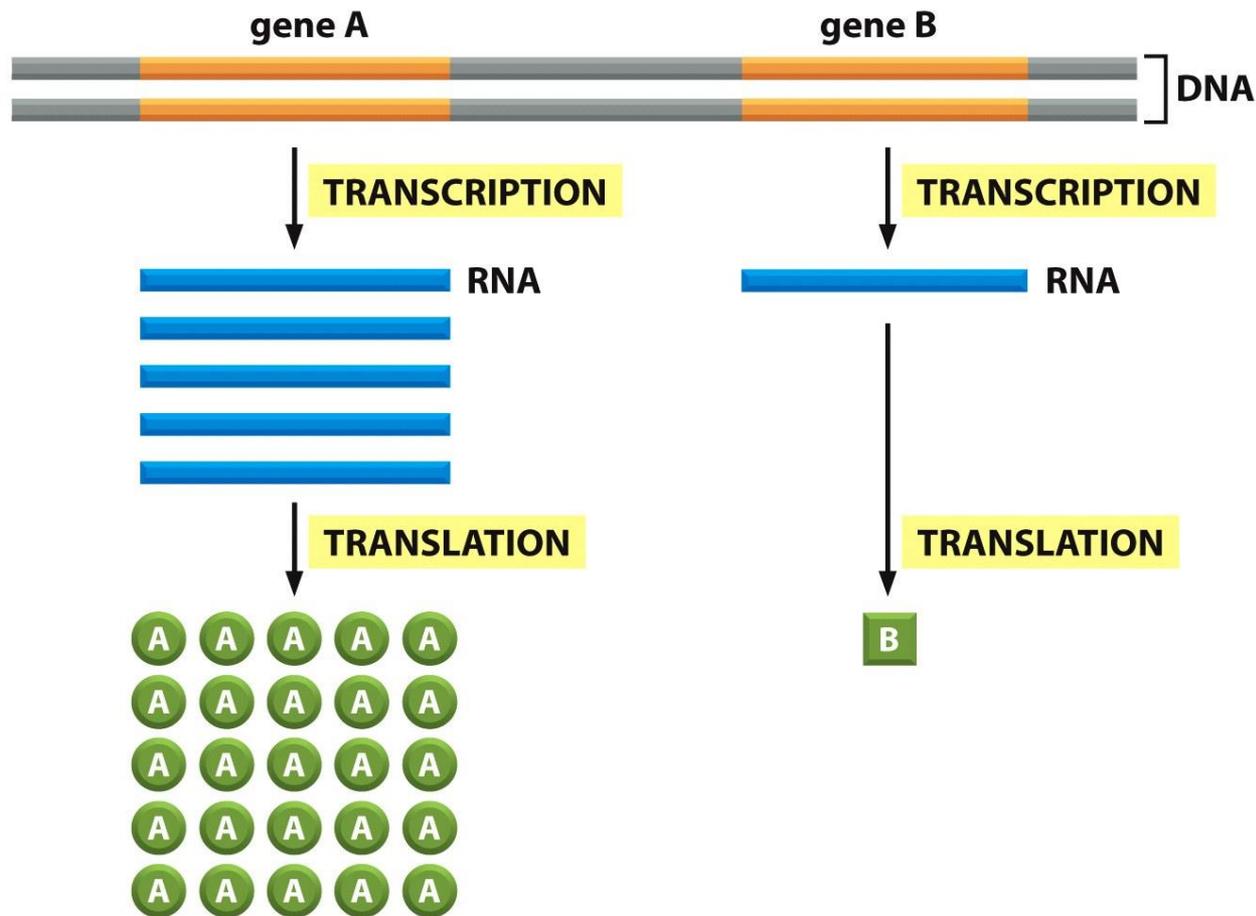


Figure 7-2 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

TRANSCRIÇÃO

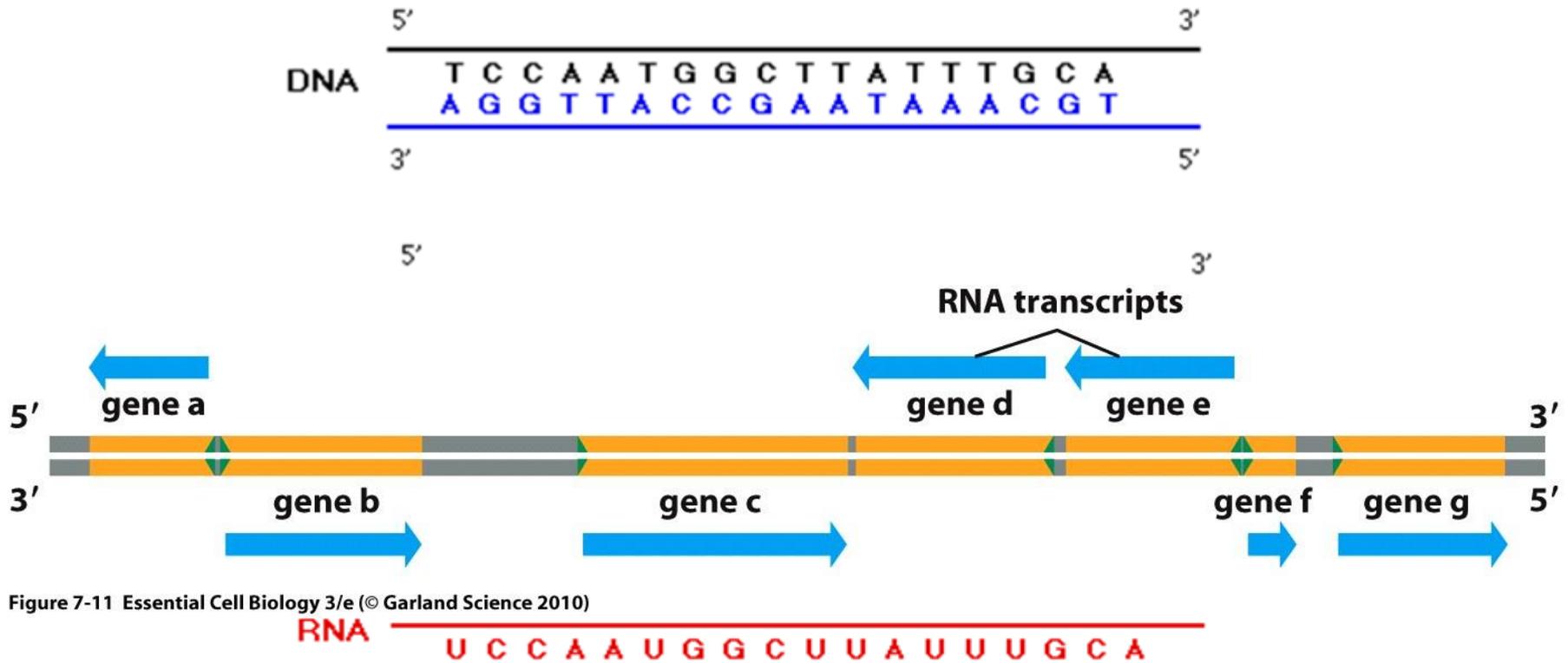


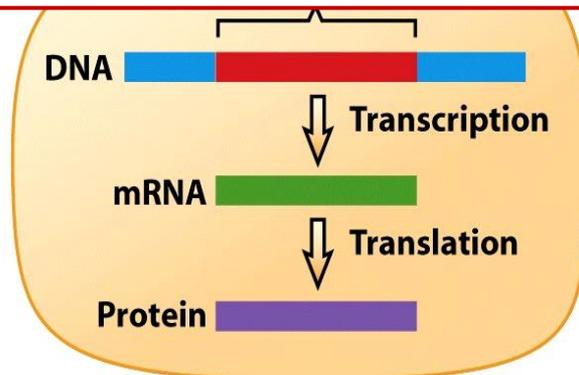
Figure 7-11 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

- ❑ A informação genética contida num segmento do DNA é **reescrita** em uma fita simples de RNA;
- ❑ Esta fita apresenta uma sequência de ribonucleotídeos complementar a uma das fitas da dupla hélice de DNA (**molde**) e idêntica à sequência da outra fita (**codificadora**), com substituição de T por U.

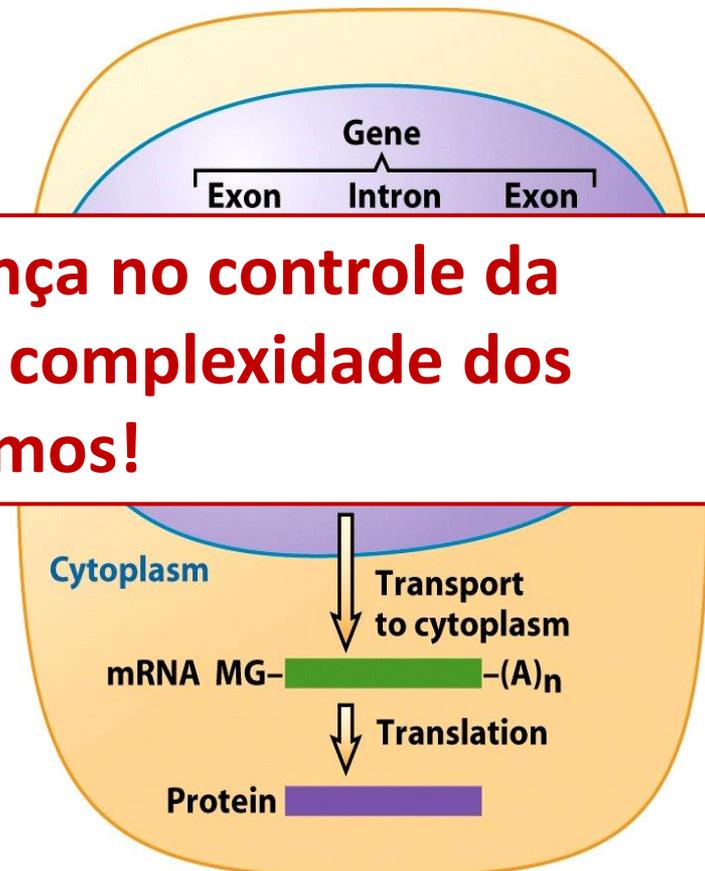
TRANSCRIÇÃO

- ✓ Nos **eucariotos** a transcrição ocorre no núcleo, enquanto a tradução ocorre no citoplasma.
- ✓ Já nos **procariotos** tal separação celular não existe, sendo os dois processos acoplados.

Isso faz toda a diferença no controle da expressão de genes e complexidade dos organismos!

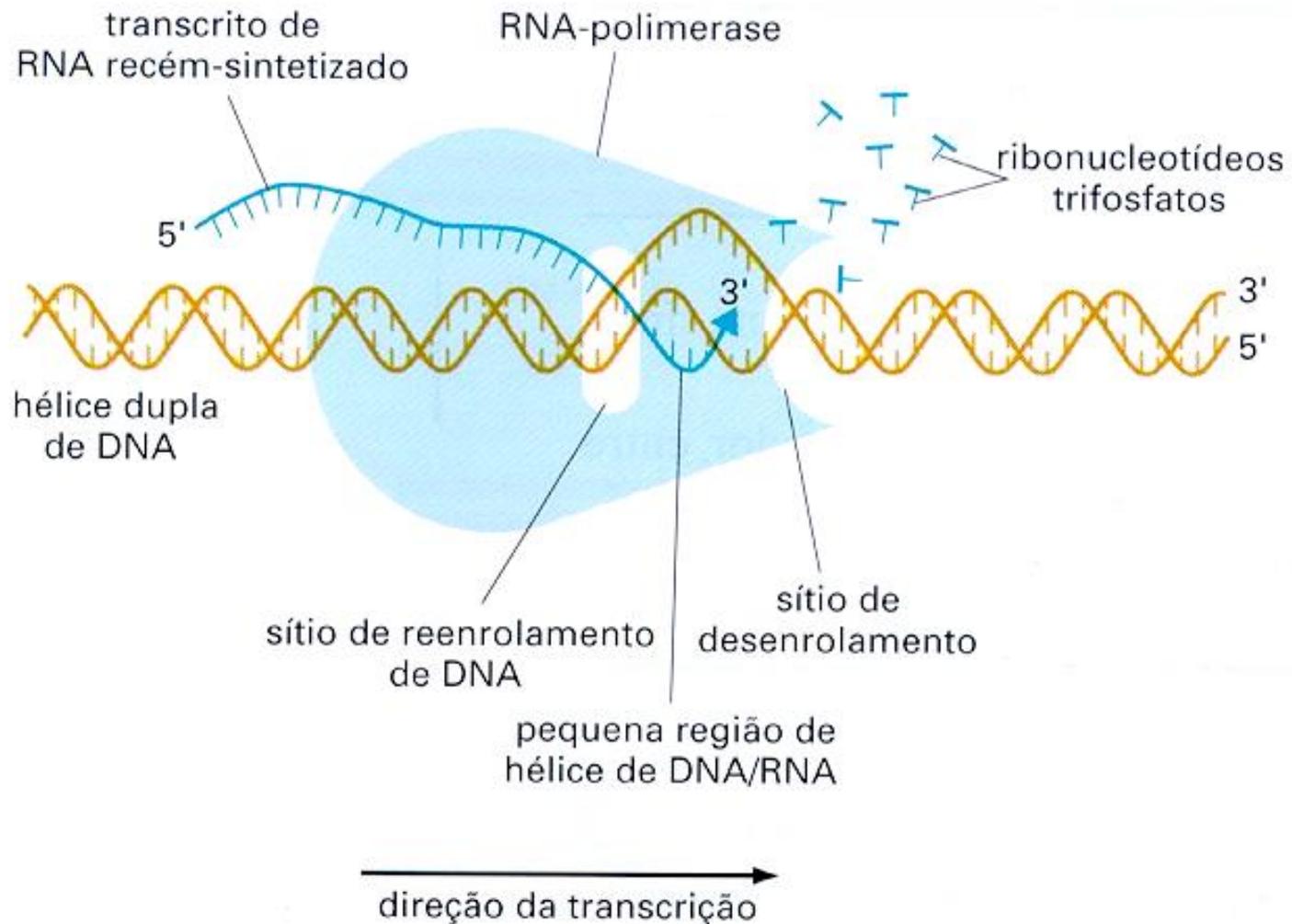


(a) Prokaryotes.



(b) Eukaryotes.

ENZIMA RNA POLIMERASE – UMA ENZIMA POLIVALENTE!!!



RNA POLIMERASE

- ❑ Reconhece e se liga à sequências específicas de DNA (**promotor**);
- ❑ Desnatura o DNA expondo a sequência de nucleotídeos a ser copiada;
- ❑ Mantém as fitas de DNA separadas na região de síntese;
- ❑ Mantém o híbrido DNA:RNA estável
- ❑ Renatura o DNA na região imediatamente posterior à da síntese;
- ❑ Sozinha, ou com o auxílio de algumas proteínas específicas, termina a síntese do RNA.

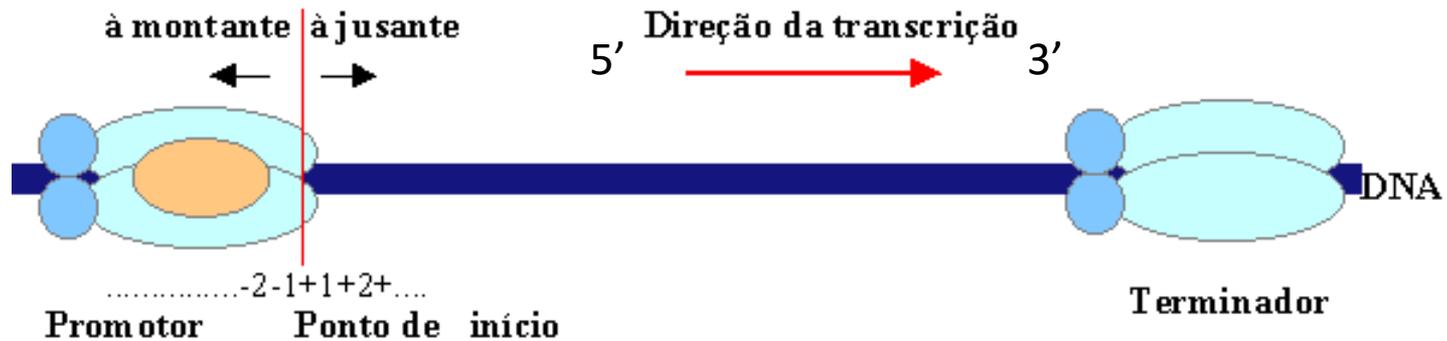
FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Proteínas que auxiliam o processo de transcrição **no reconhecimento do promotor.**

CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SÍNTESE DE RNA

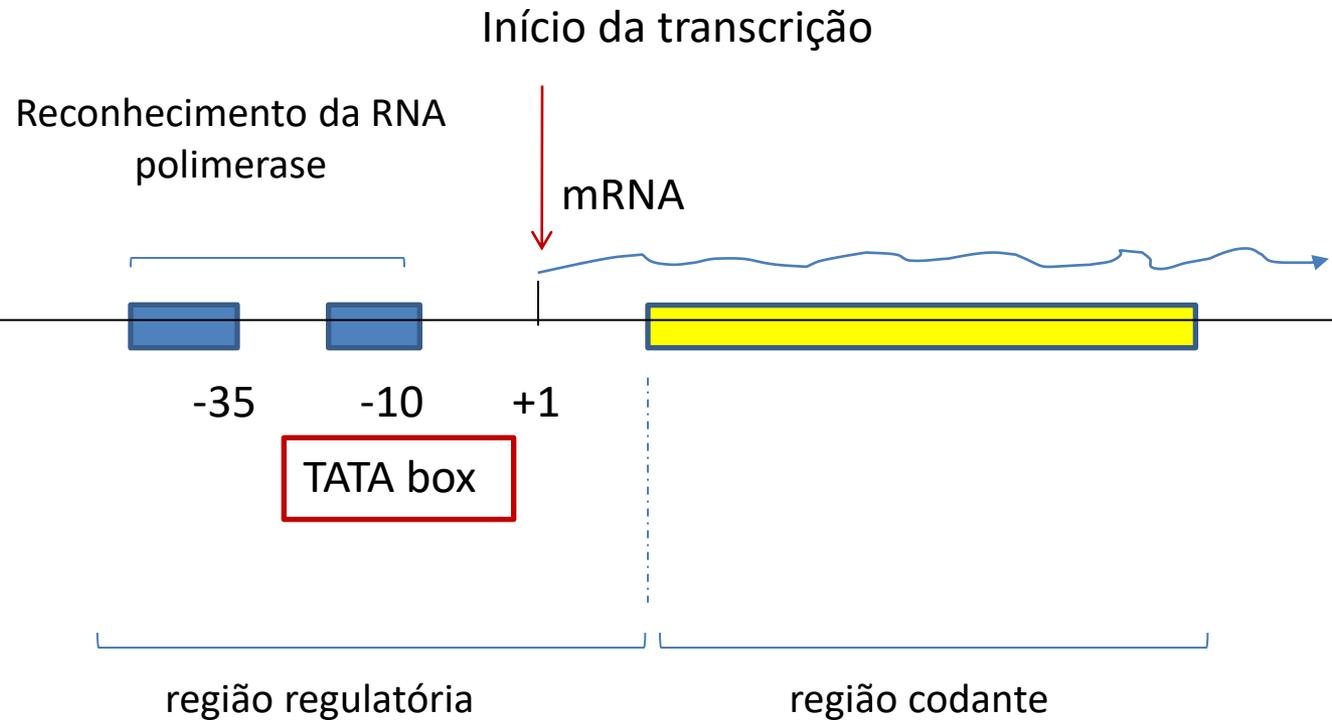
1. Os precursores são **ribonucleotídeos**;
2. Apenas **1 fita de DNA** é utilizada como **molde** para a síntese de RNA complementar;
3. As cadeias de RNA são sintetizadas **sem** a necessidade de um filamento *primer* preexistente (atuação da **RNA polimerase**);
4. Síntese é **complementar ao DNA**, no entanto **A → U**;
5. Polimerização sentido **5' → 3'**;
6. RNA polimerase inicia a transcrição em **sequências específicas** de nucleotídeos → **promotores**;
7. RNA polimerase termina a transcrição em **sequências específicas** de nucleotídeos → **terminadores (finalizadores)**.

REGIÃO PROMOTORA DE UM GENE



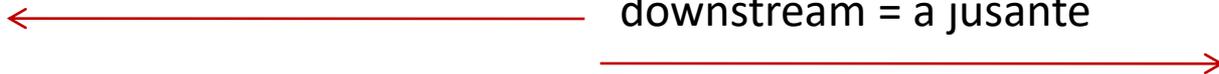
- ❑ Diz-se que as sequências que antecedem o ponto de **início da transcrição** localizam-se à montante (***upstream***) e as que o sucedem localizam-se à jusante (***downstream***);
- ❑ A posição das bases é numerada nos dois sentidos, a partir do ponto de início da transcrição, ao qual se atribui o **valor +1**. Os valores aumentam (valor positivo) à jusante e diminuem (valor negativo) à montante.

ESTRUTURA DO PROMOTOR EM PROCARIOTOS



upstream = a montante

downstream = a jusante

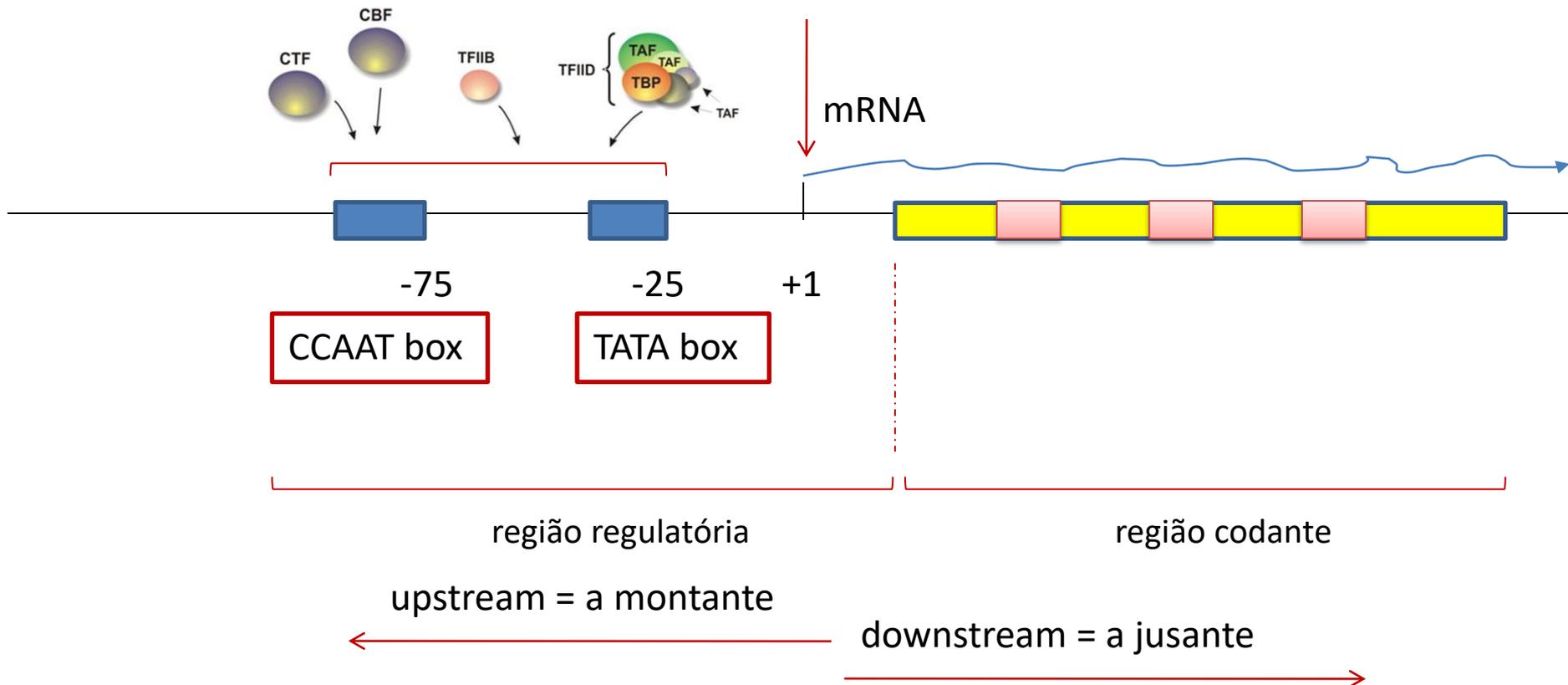


ESTRUTURA DO PROMOTOR EM EUCARIOTOS

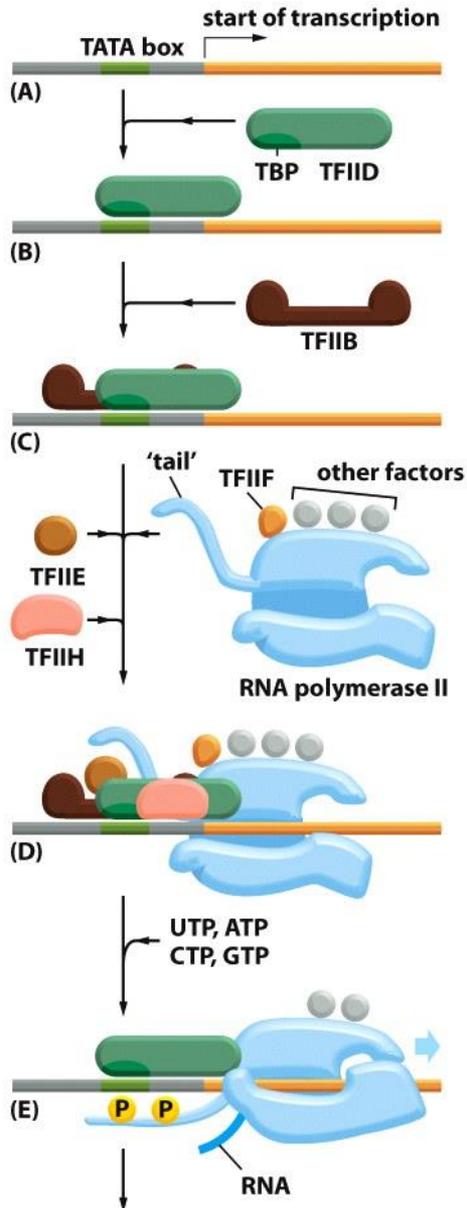
Reconhecimento da RNA polimerase

FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Início da transcrição



AÇÃO DOS FATORES DE INICIAÇÃO



TRANSCRIPTION

Figure 7-12 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

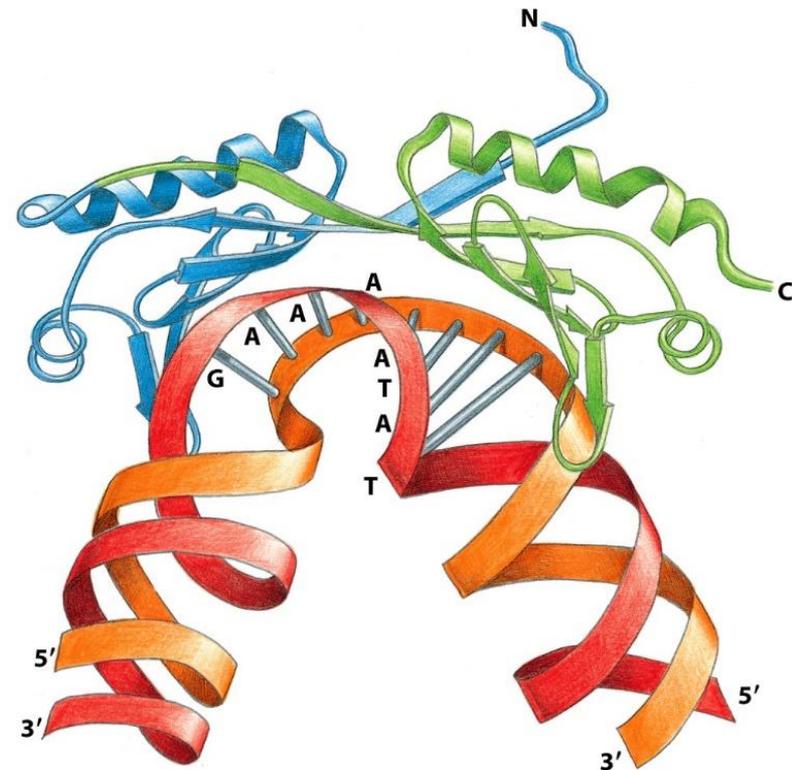
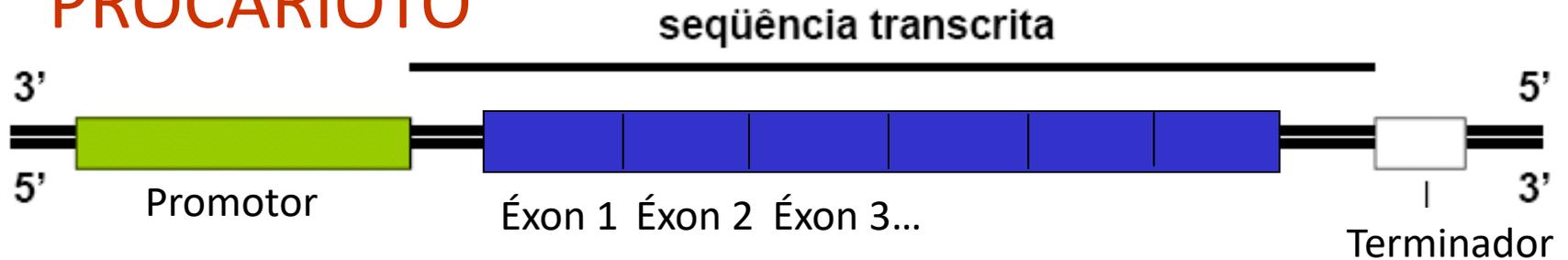


Figure 7-13 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

EM SÍNTESE...

REGIÕES CHAVE DO DNA NA TRANSCRIÇÃO

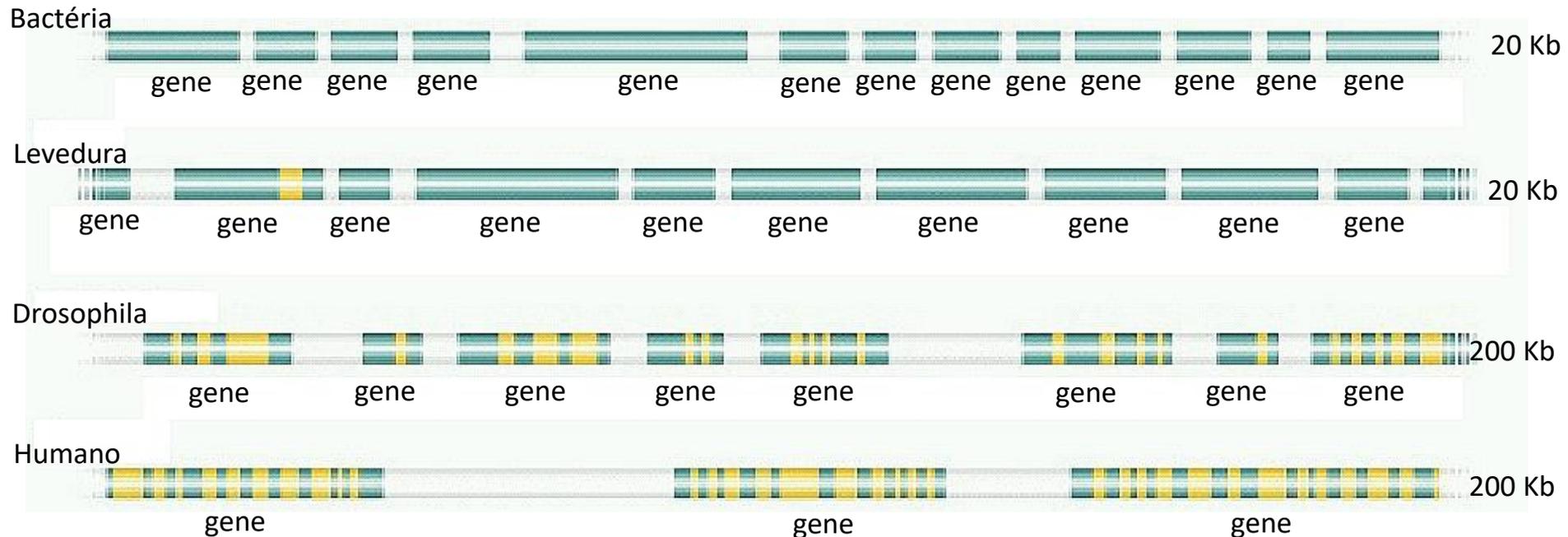
PROCARIOTO



EUCARIOTO



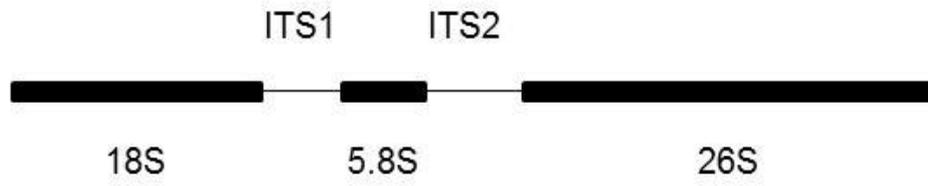
RNA MENSAGEIRO (mRNA)



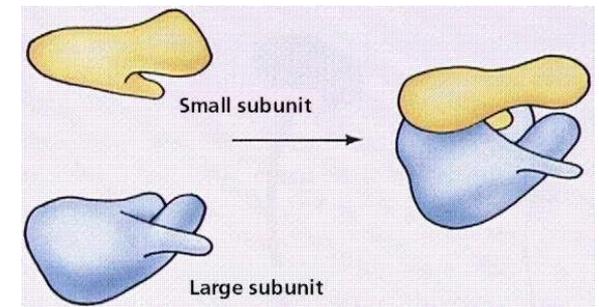
A disposição depende da arquitetura genômica do organismo!

ORGANIZAÇÃO DO AGREGADO GÊNICO DO rRNA DO rRNA

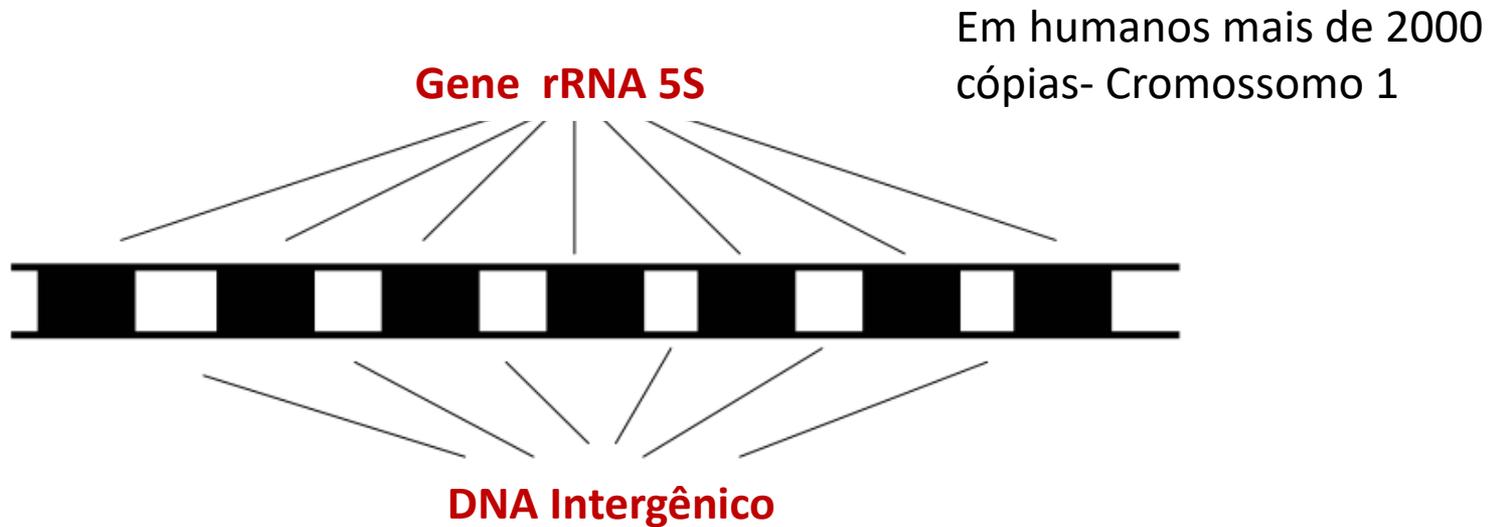
Eucariotos



Procariotos



Mais de 200 cópias em *tandem*!



Gene 45S (28 - 5.8 -18S)

Em humanos 50 a 70 cópias por cromossomo (13,14,15,21,22)



Em humanos aproximadamente 13,4 kb

Aproximadamente 80% do RNA produzido pelas células é de rRNA

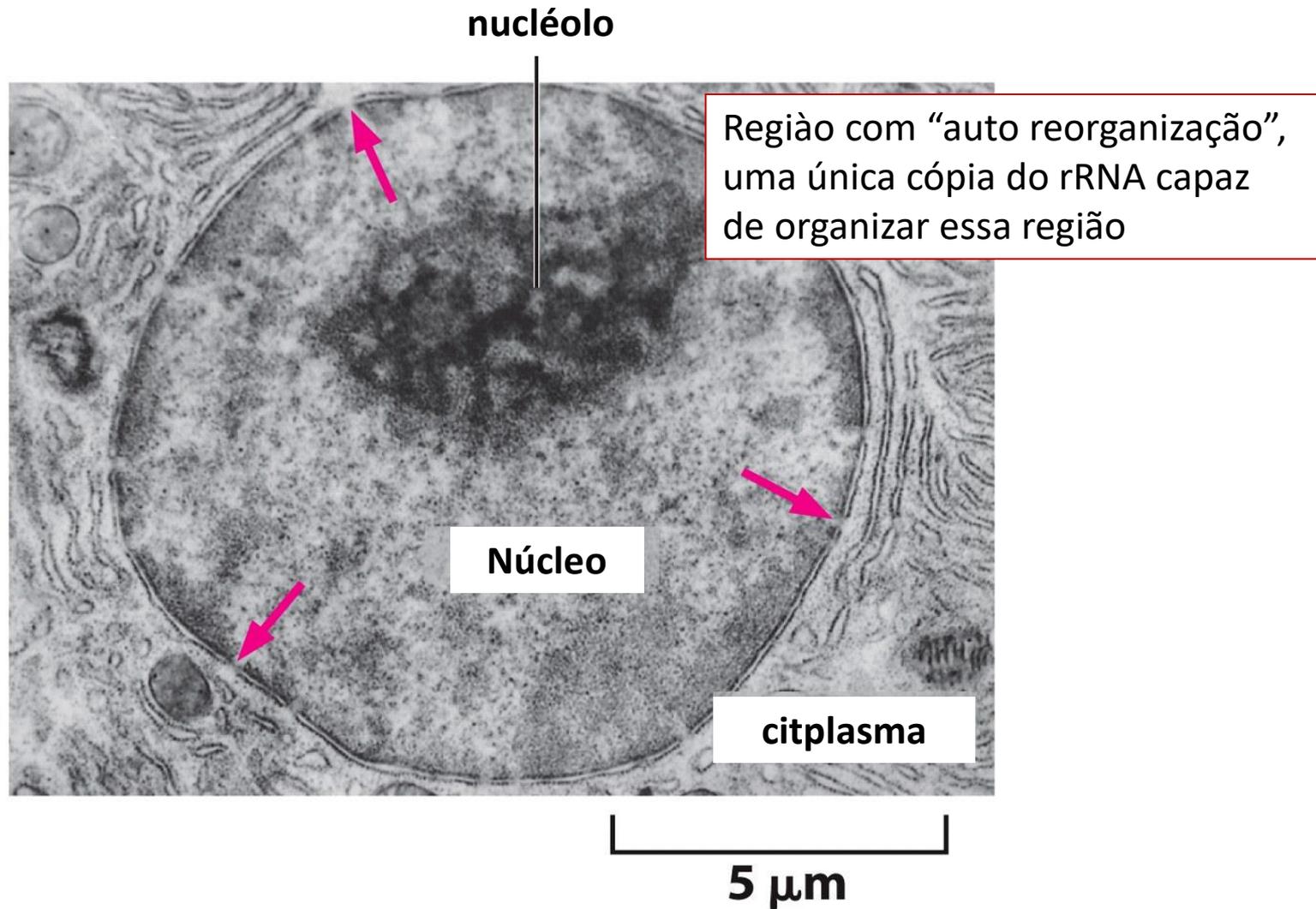


Figure 7-14 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

MONTANDO A MAQUINÁRIA DE TRADUÇÃO

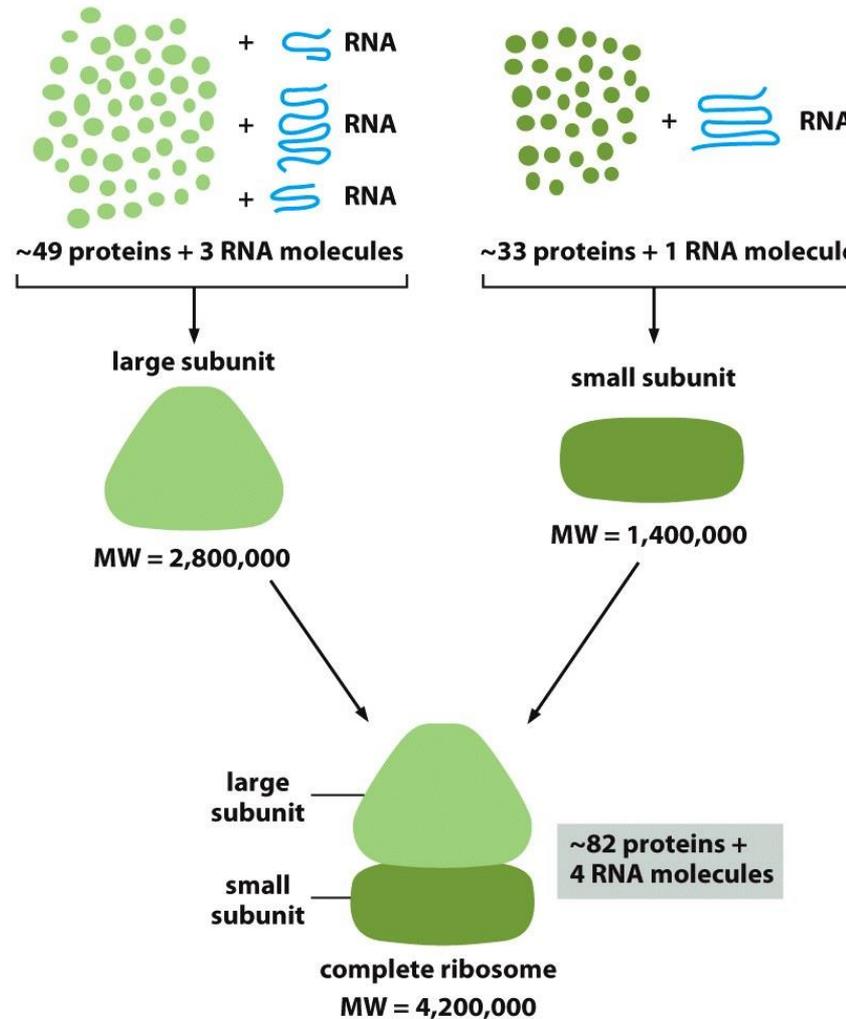
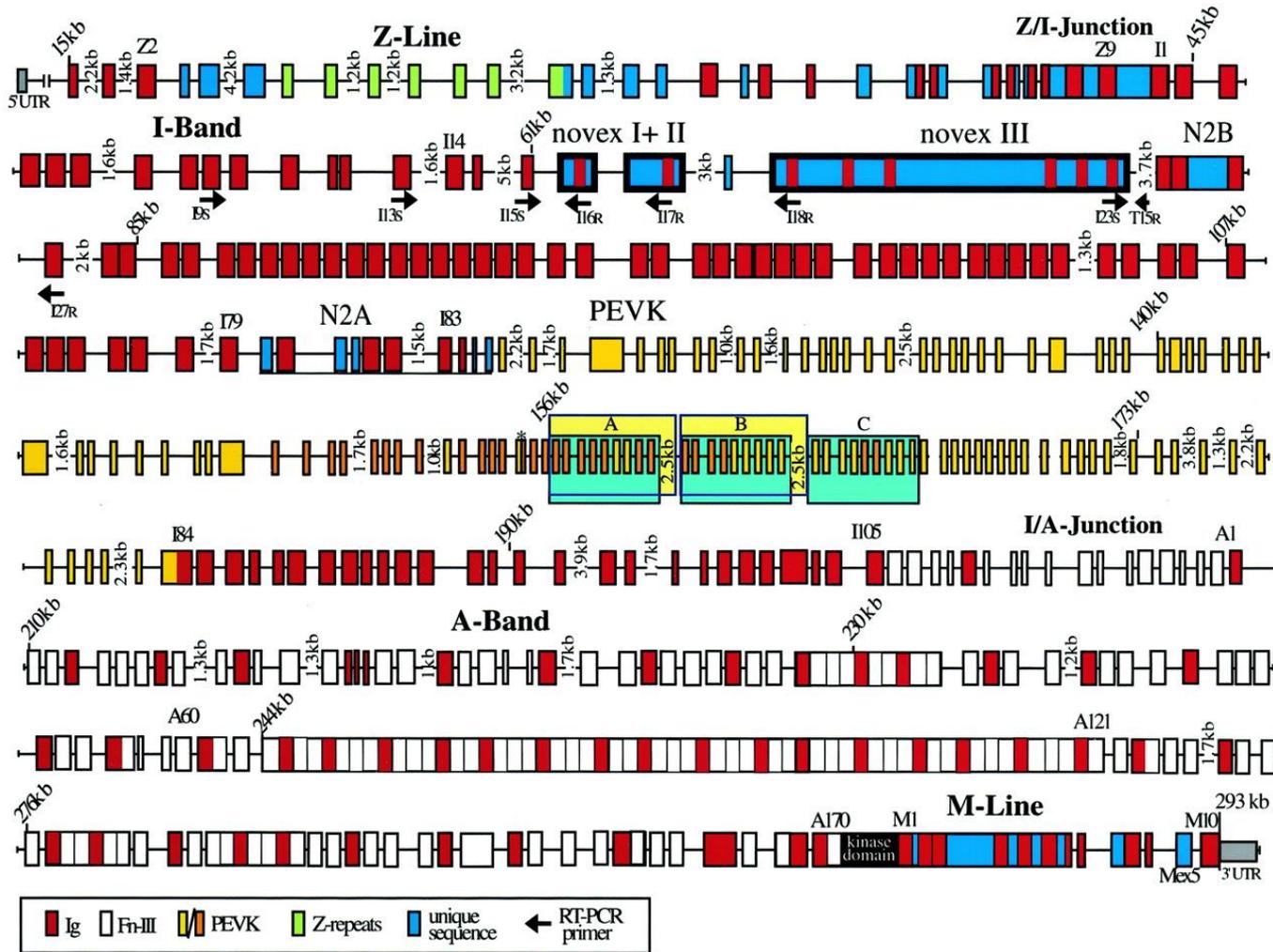


Figure 7-31 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

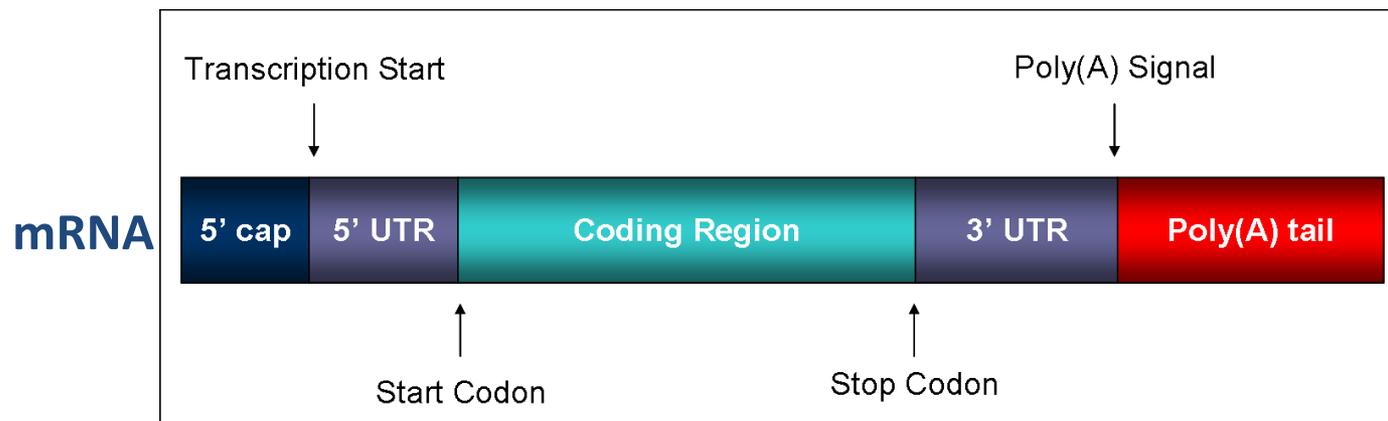
E o RNA mensageiro?

RNA polimerase II - 1kb por minuto – aproximadamente 30 minutos!!



PROCESSAMENTO DO RNA (TRANSCRITO) PRIMÁRIO EM EUCARIOTOS

- As modificações que podem ocorrer nos transcritos nucleares são basicamente de três tipos:
 - Capeamento ("capping") do terminal 5';
 - Poliadenilação do terminal 3';
 - Montagem de segmentos codificadores - *splicing*.
- Este conjunto de modificações no transcrito nuclear originará o mRNA, pronto para **migrar para o citoplasma**.



PROCESSAMENTO DO RNA PRIMÁRIO

Poliadenilação:

Após o término da transcrição – clivagem terminal do RNA;
Adição de aproximadamente 200 resíduos de adenilato (AMP)

FUNÇÕES:

- . Facilitar transporte para o citoplasma;
- . Estabilizar o mRNA;
- . Facilitar a tradução.

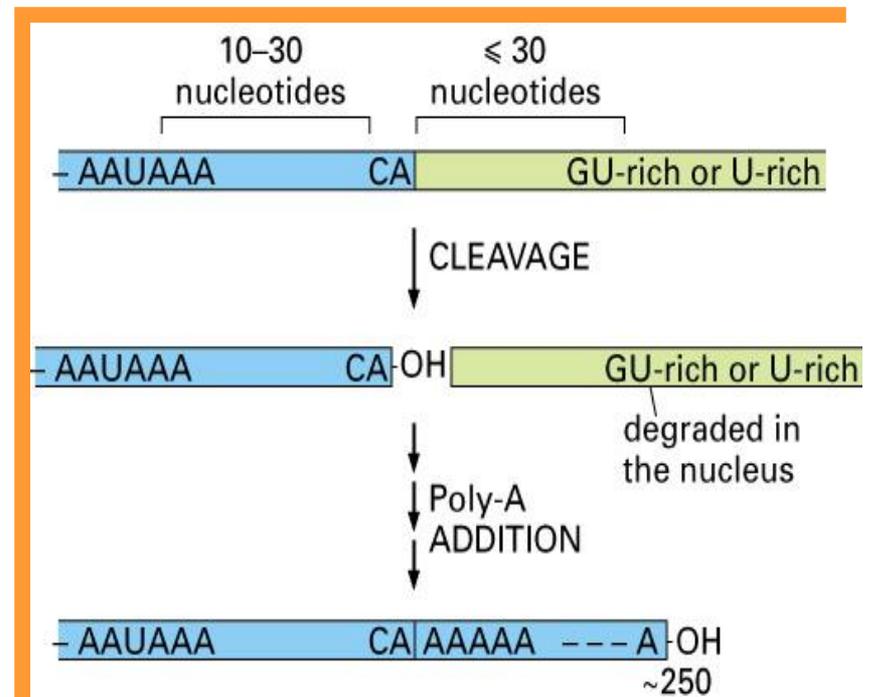


Figure 6–37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Sequências específicas e snRNA (small nuclear RNA – pequenos RNA nucleares) auxiliam junto a proteínas (RPN) na retirada do introns

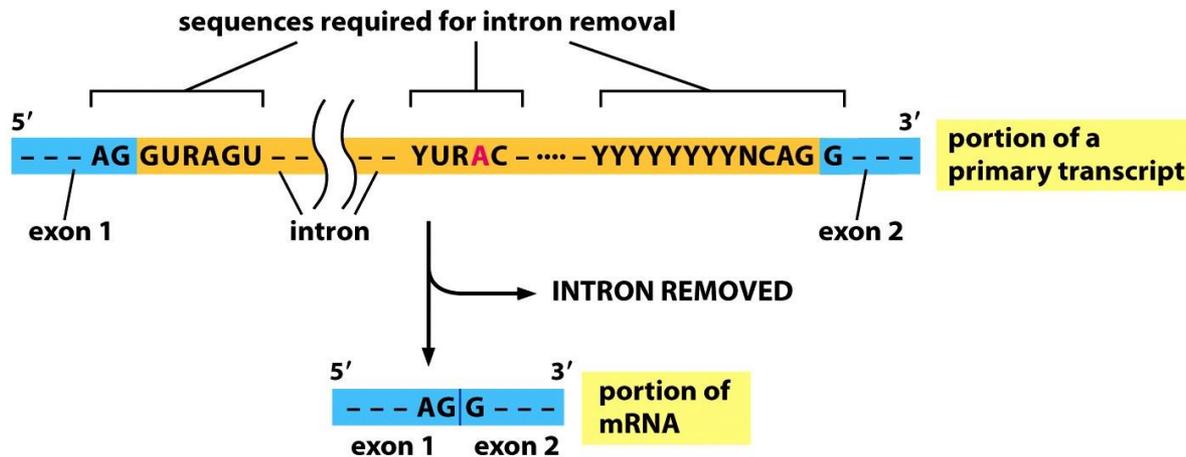


Figure 7-19 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

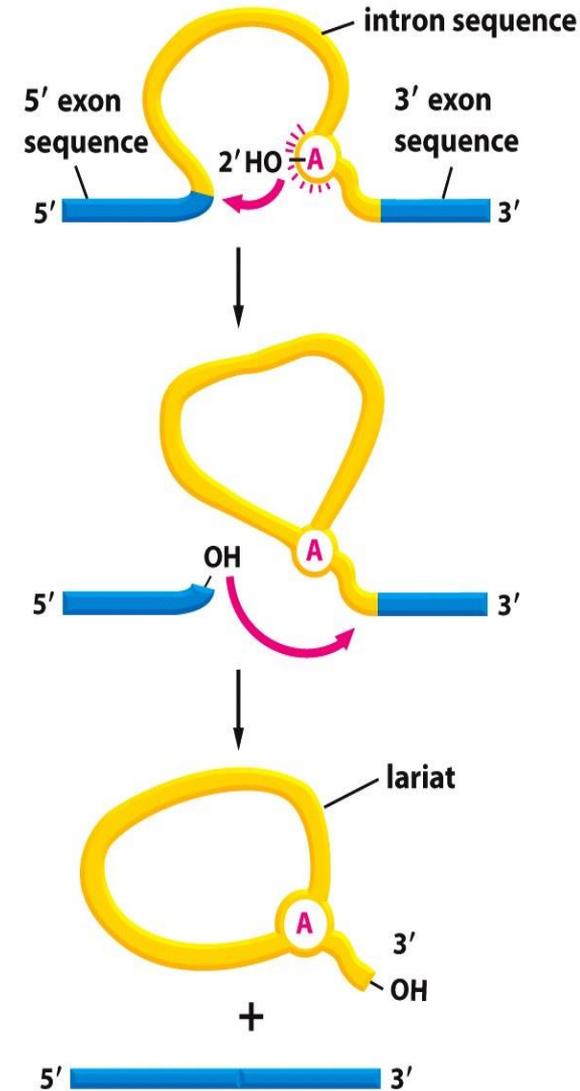
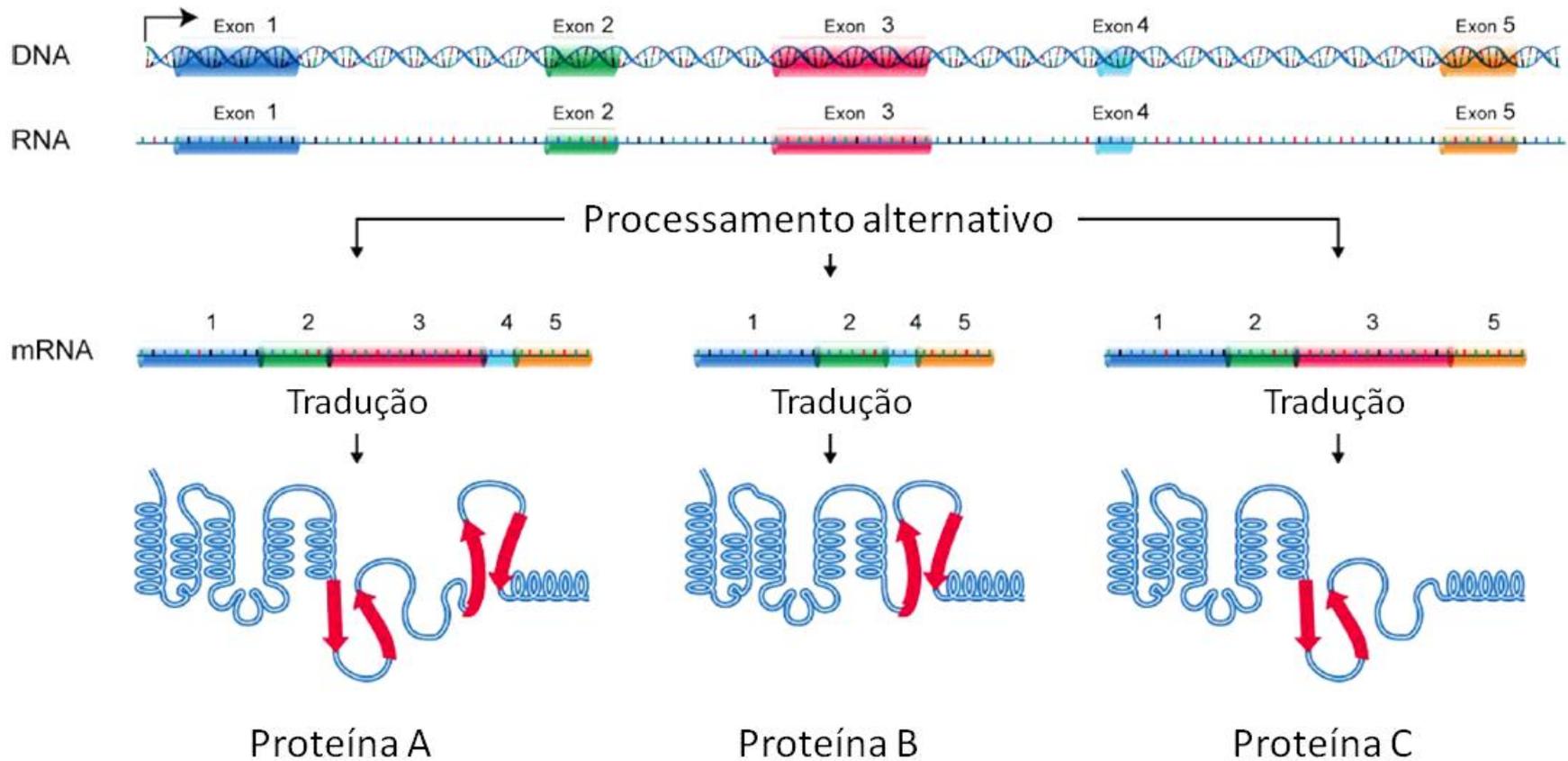
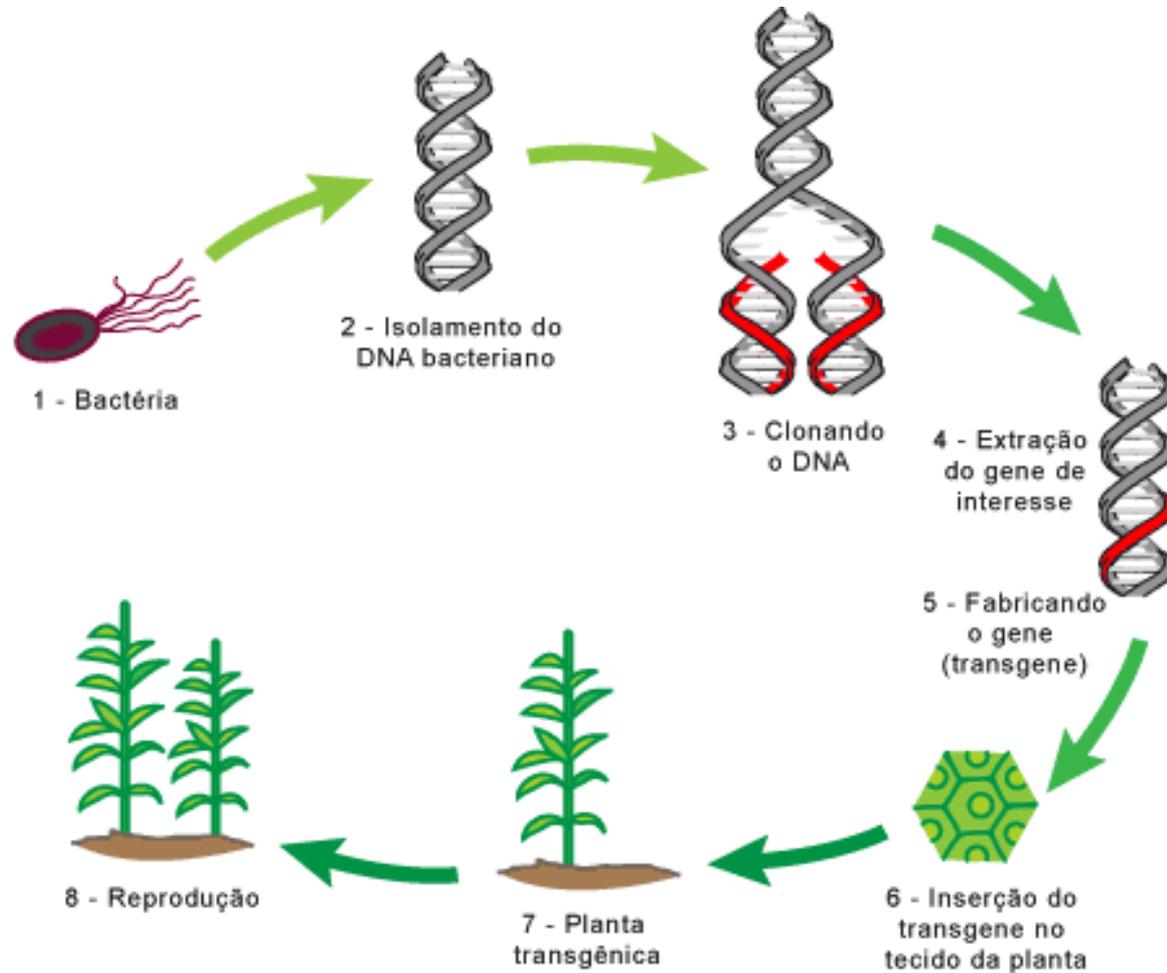


Figure 7-20 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

SPLICING ALTERNATIVO GERANDO DIVERSAS PROTEÍNAS



OBTENÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS



CONSTRUÇÃO PRESENTE NA SOJA RR[®]

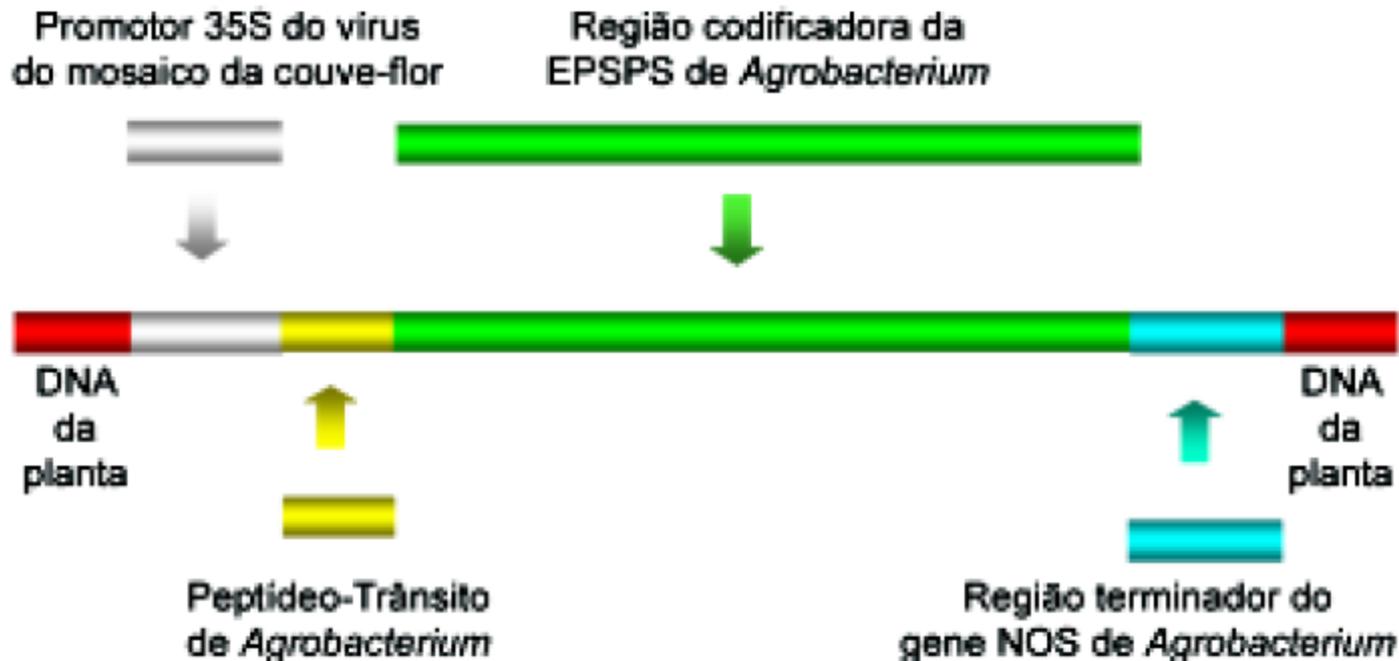
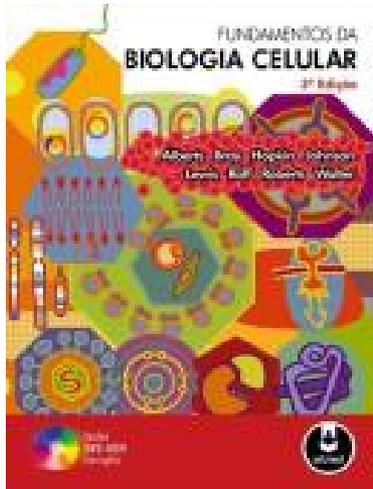


Figura 1 - Representação da construção presente na soja RR[®] (*Roundup Ready*). Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor, peptídeo de trânsito de *Petúnia*, gene que codifica a proteína EPSPS, que confere a resistência ao herbicida, e o terminador do gene da nopalina sintase (NOS).

LEITURA RECOMENDADA



FUNDAMENTOS DA BIOLOGIA CELULAR

Formato: Livro

Autor: ALBERTS, BRUCE

Idioma: PORTUGUES

Editora: ARTMED -

Assunto: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOLOGIA

Capítulos: 5, 6 e 7 –Está no e- disciplinas !

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. Definição de gene;
6. Diferença na estrutura dos genes de eucariotos e procariotos;
7. Região promotora e sua importância para a transcrição em eucariotos e procariotos.
8. Processamento de RNA.

