

# Estruturas de ácidos nucleicos

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

Capítulo 2  
Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas

Menck & Sluys 2017



## Histórico

Avery, MacLeod and  
MCarty  
experiment- 1944

DETERMINING THAT DNA IS THE HEREDITARY MATERIAL

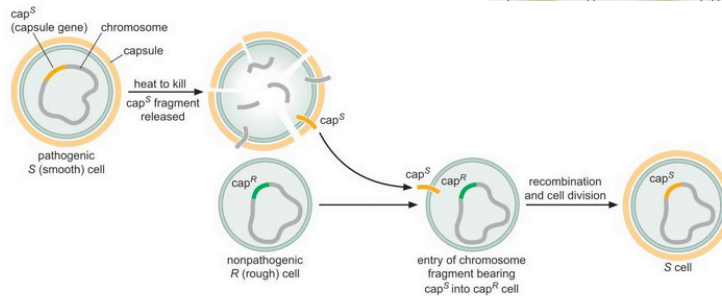
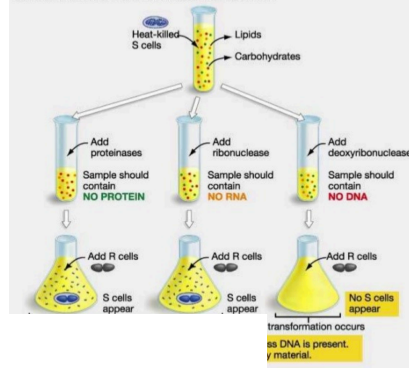

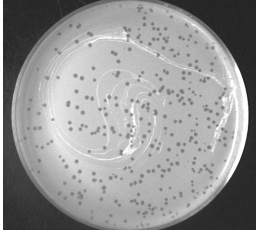


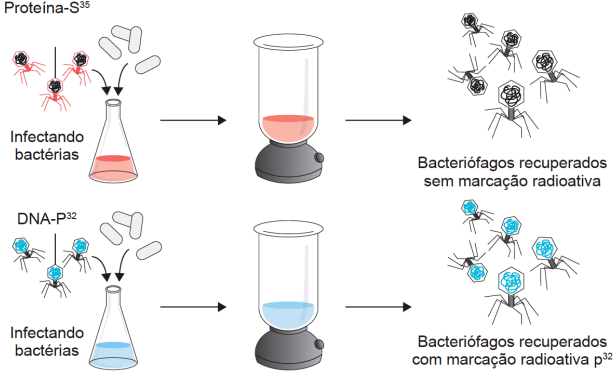
FIGURE 2-1 Transformation of a genetic characteristic of a bacterial cell (*Streptococcus pneumoniae*) by addition of heat-killed cells of a genetically different strain. Here we show an R cell receiving a chromosomal fragment containing the capsule gene from a heat-treated S cell. Since most R cells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

## Histórico




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





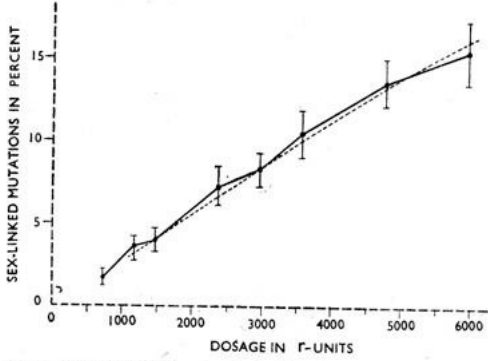
**Conclusão: o DNA é o material genético!**

**Hermann Joseph Muller**

## Histórico

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

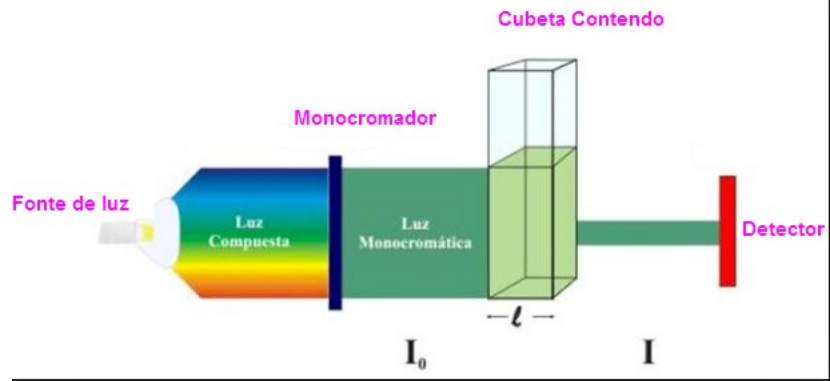


Dosage (R-units)	Sex-linked mutations (%)
1000	2.5
2000	5.0
3000	7.5
4000	10.0
5000	12.5
6000	15.0

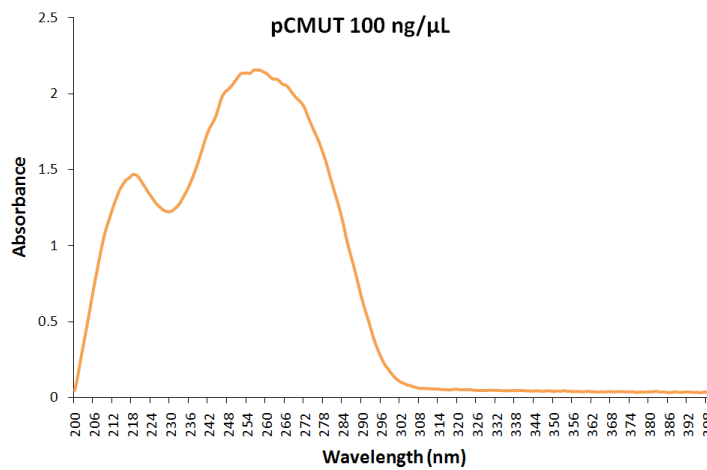
FIG. 867. Graph after Timoféeff-Resovsky showing that the rate of sex-linked mutations in *Drosophila melanogaster* is directly proportional to the amount of radiation applied.

**Mas o que está acontecendo aqui?**

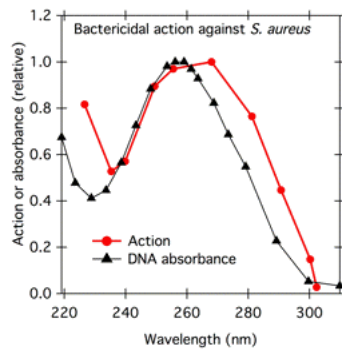
# Espectrofotometria



# Espectro de Absorção da molécula de DNA



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



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

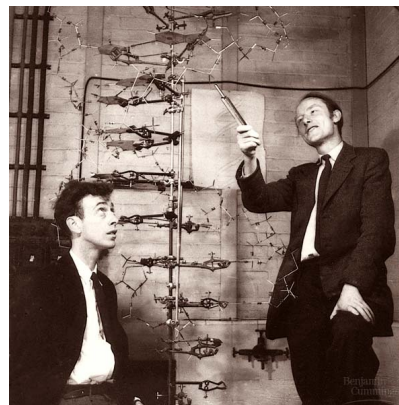
- **Experimento de Alexandre Hollaender (1939)!**
- **Espectro de Mutagenesis:**
- **DNA é a molécula da herança!**



## Histórico

**Francis Crick e James Watson (1953, UK)**

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

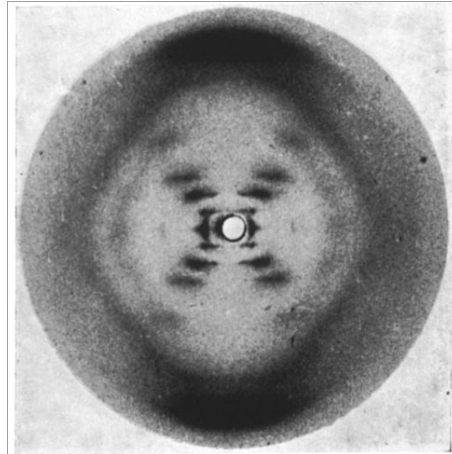




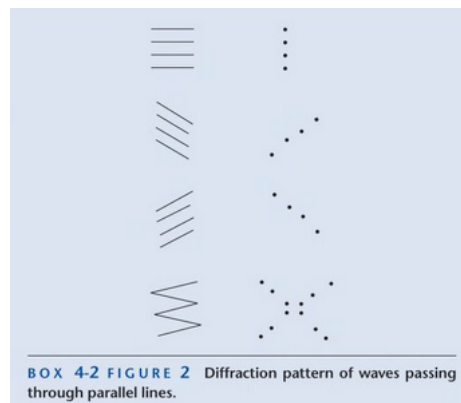
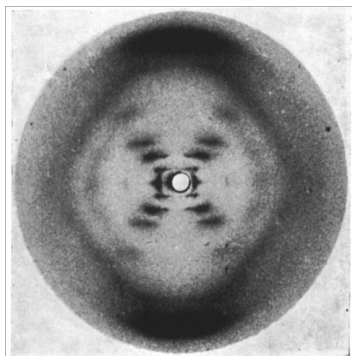
## Histórico

Rosalind Franklin e Maurice Wilkins  
(1952, UK)

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

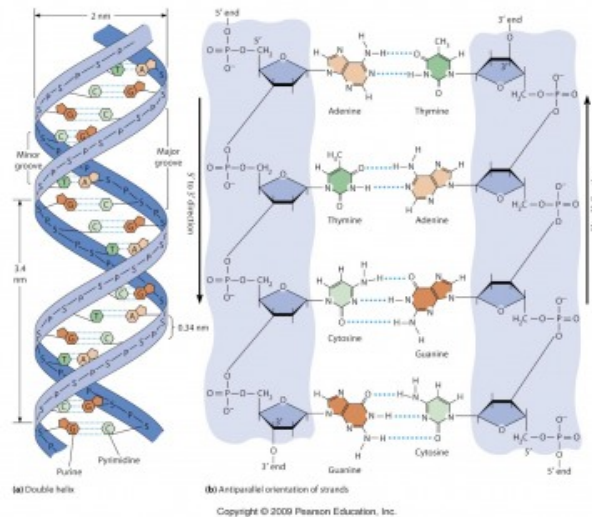


### Interpretando a foto 51!



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

## A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!



- A distância entre as bases é de 0,34 nm, ou 3,4 Å
- Quantas bases por volta? (cada volta tem 3,4 nm!)
- O que significa polaridade 5' - 3'?

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

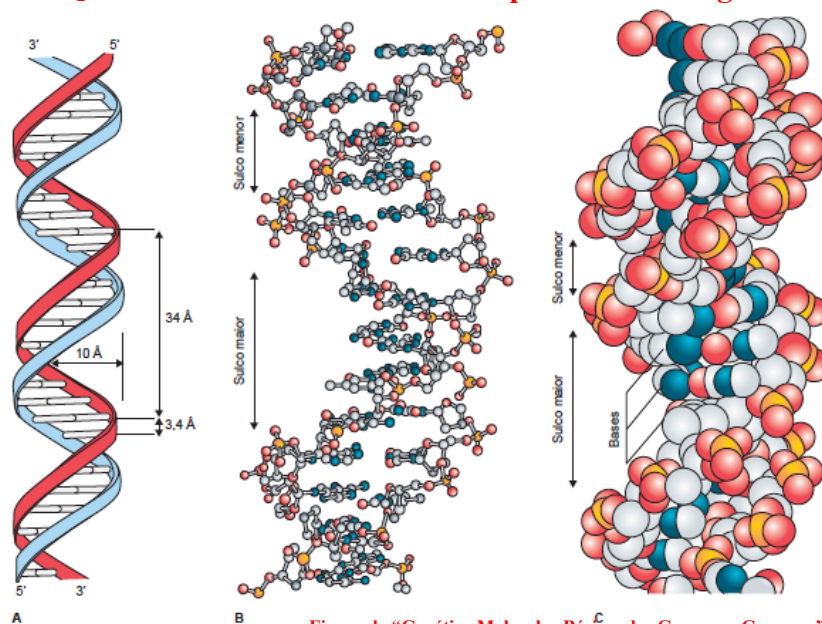
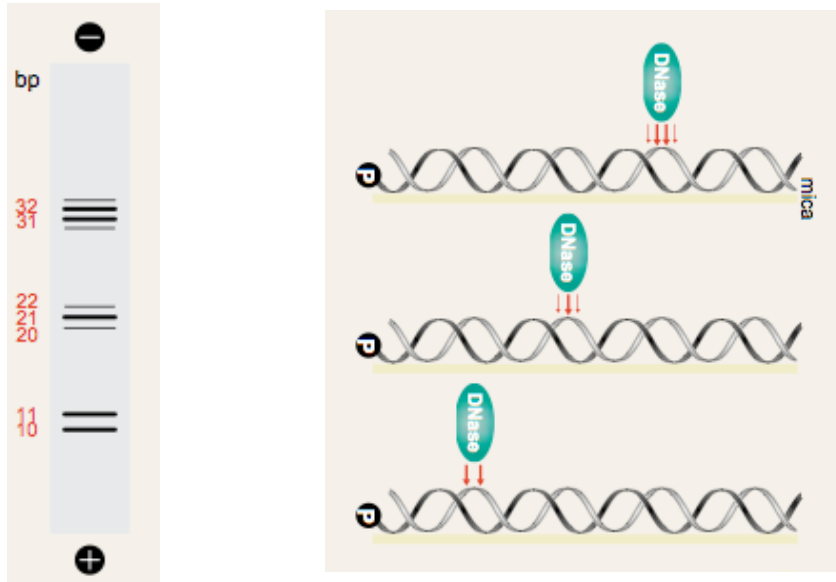


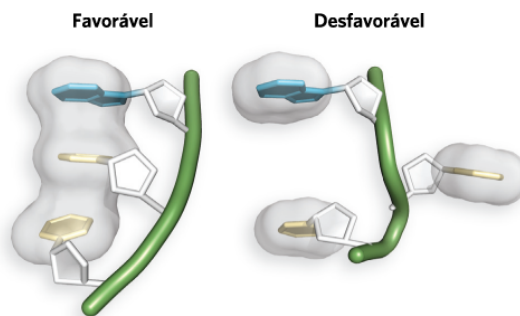
Figura do "Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas", 2017

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



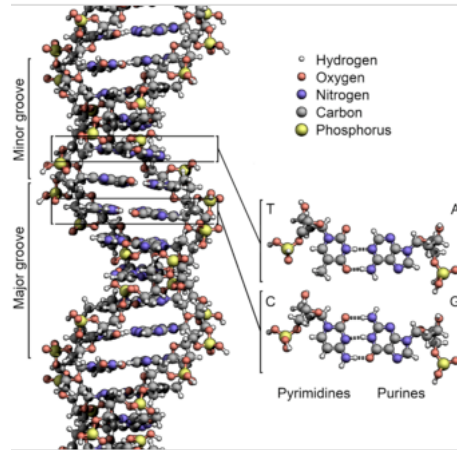
Quantas bases por volta tem no DNA?

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



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

## A estrutura B-DNA- distâncias e tamanho!



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

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

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

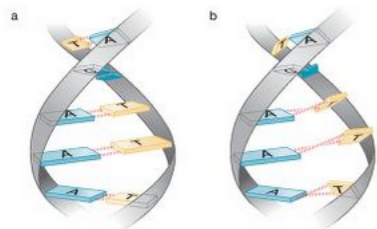
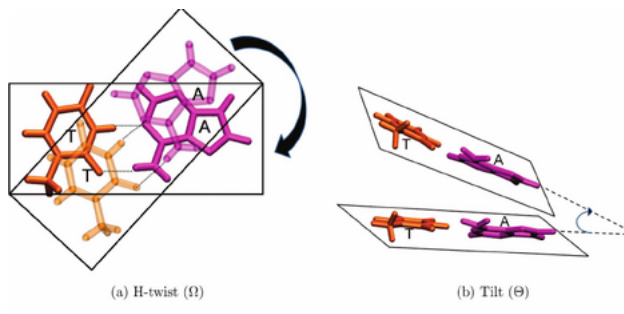
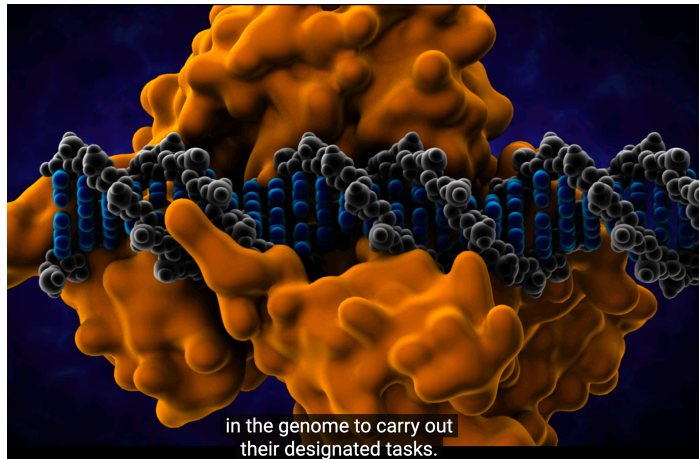


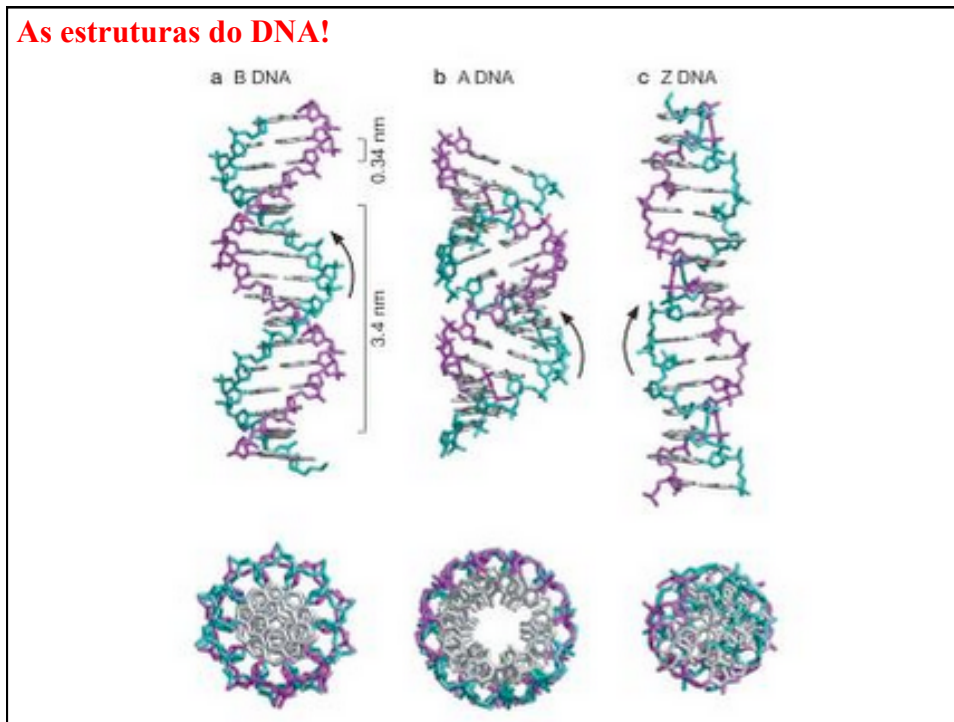
FIGURE 4-12 The propeller twist between the purine and pyrimidine base pairs of a right-handed helix. (a) The structure shows a sequence of three consecutive A-T base pairs with normal Watson-Crick bonding. (b) A propeller twist causes rotation of the bases about their long axes. (Adapted, with permission,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

- [https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=o\\_-6JXLYS-k](https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=o_-6JXLYS-k)



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

## As estruturas do DNA!

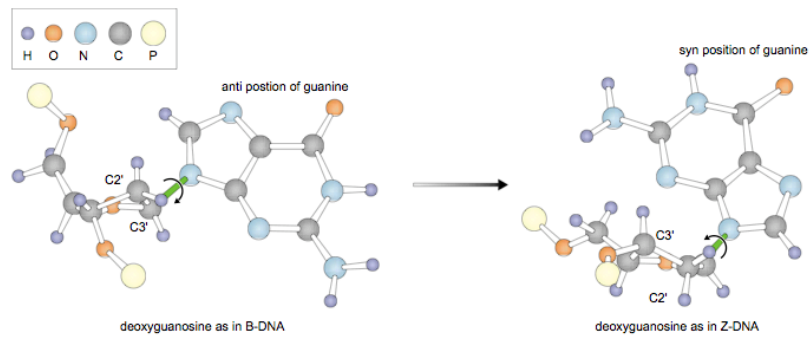


(b)

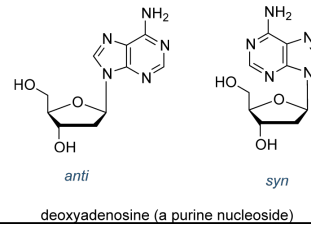
	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Sentido da hélice	Orientado à direita	Orientado à direita	Orientado à esquerda
Diâmetro	~20 Å	~26 Å	~18 Å
Pares de base por volta da hélice	10,5	11	12
Incremento na altura da hélice por par de base	3,4 Å	2,6 Å	3,7 Å
Inclinação das bases em relação ao eixo da hélice	-6°	+20°	-7°
Geometria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

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

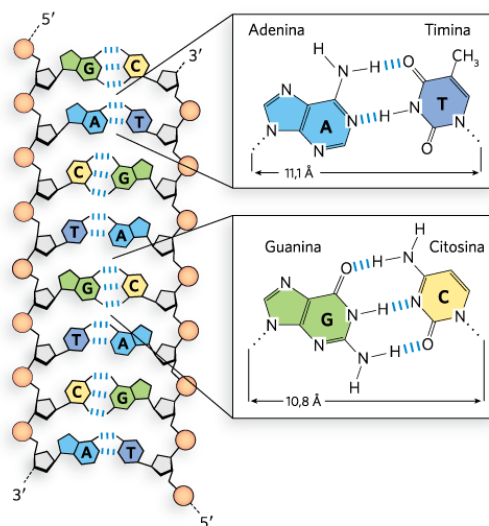
## As bases podem girar no nucleotídeo!



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



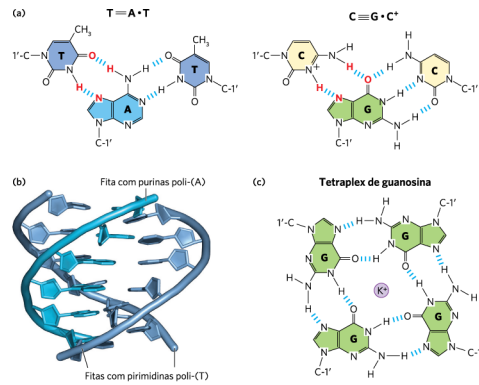
## Emparelhamento de bases!



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



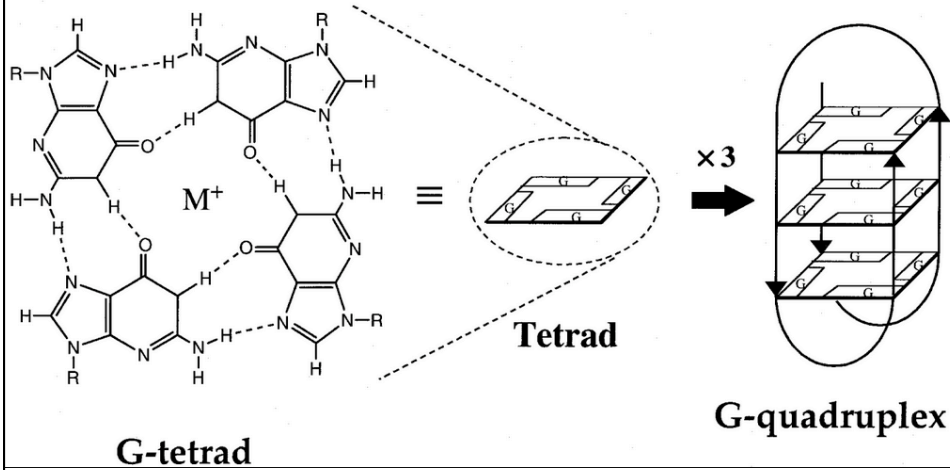
**Observação: Outras estruturas do DNA:  
tripla hélice e tetrahélice!  
São chamadas estruturas não canônicas.....**



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

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

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



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

**E a estrutura do RNA?**

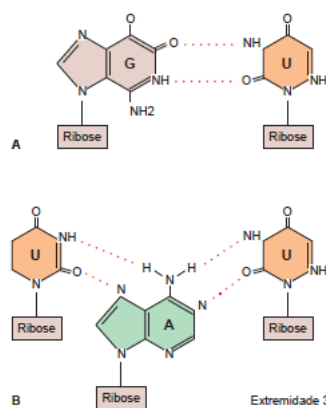
**Esta é uma molécula simples fita? O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?**

**Com é o RNA no plano? E por que?**

**E a estrutura espacial do RNA, que estrutura assume?**

**E a estrutura do RNA?**

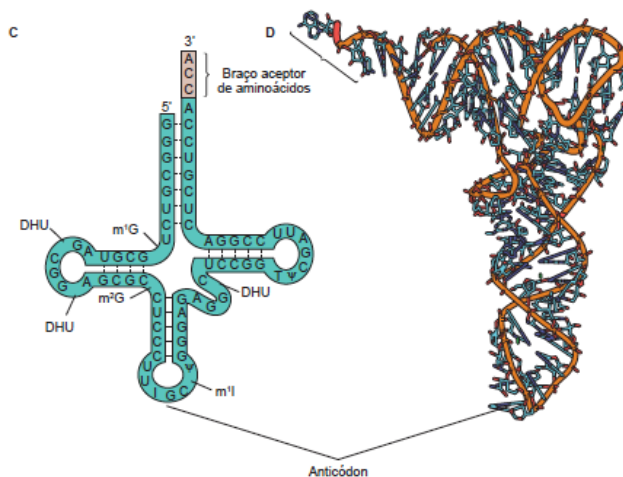
**O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?**



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

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

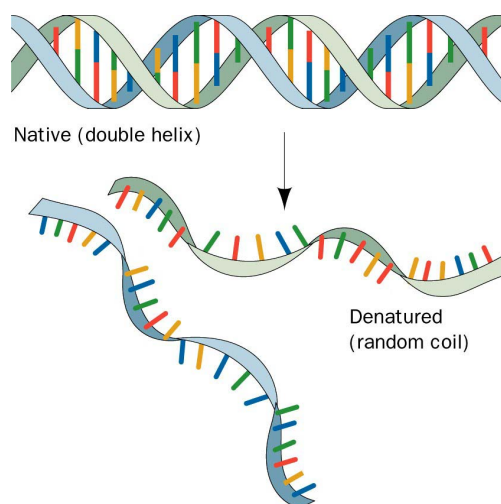
**A estrutura do RNA também não é inteiramente simples fita!**



**Estrutura do t-RNA no plano e espacial!**

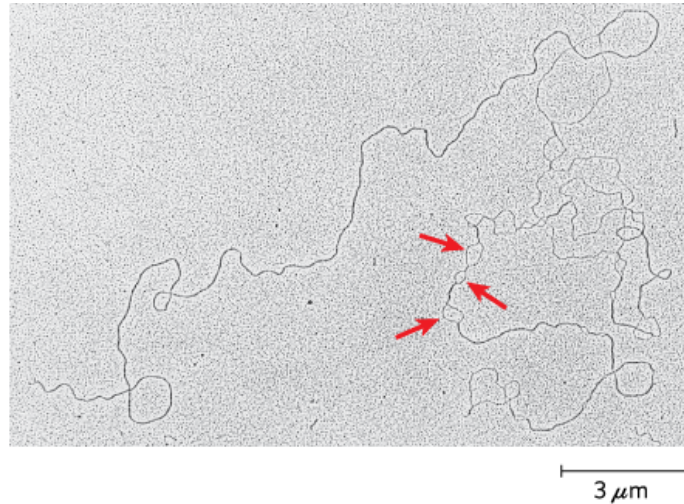
Figura do “Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas”, 2017

**Voltando ao DNA: a dupla hélice pode se desnaturar!**



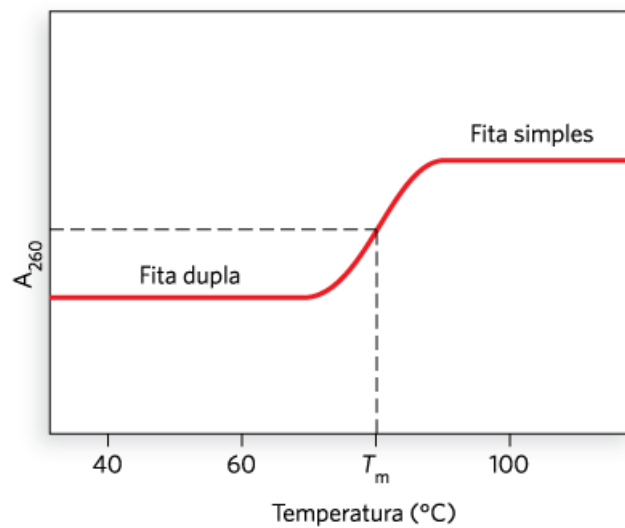
**Uma sequencia rica em AT desnatura mais rápido ou lento que uma rica em GC..... Por que?**

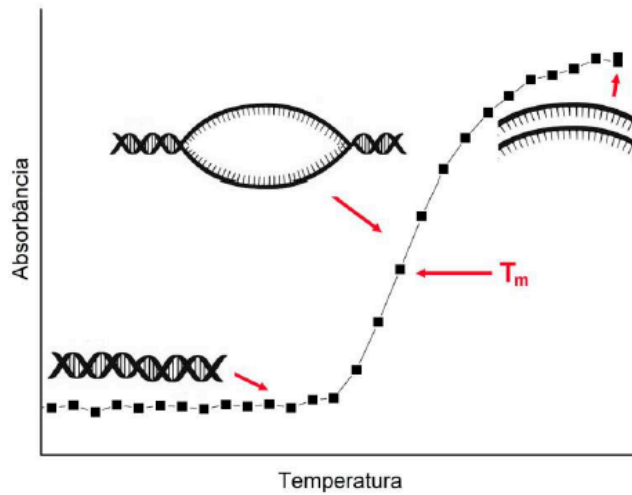
**A dupla hélice pode se desnaturar!**



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

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

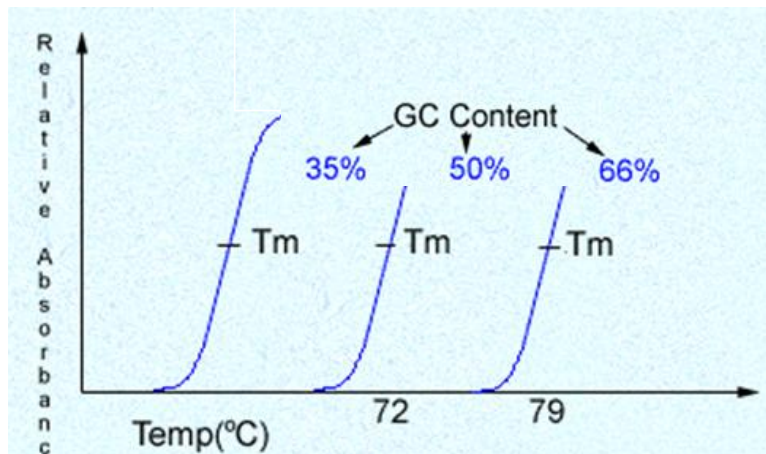




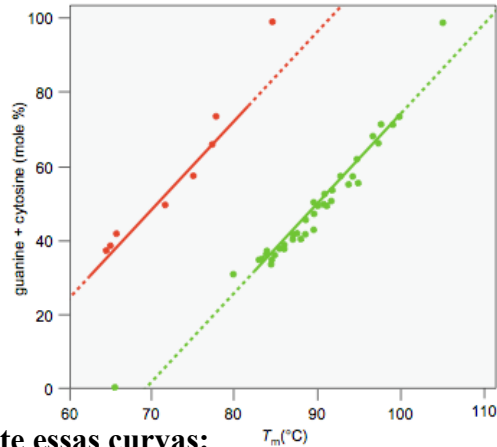
**Figura 13.** Exemplo de uma curva de desnaturação térmica do DNA

Barra e Neto, 2015, Rev. Virtual de Química

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



**Mas as mesmas Moléculas de DNA podem ter T<sub>m</sub> diferentes....  
em condições diferentes...Por que?**



**Interprete essas curvas:**

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

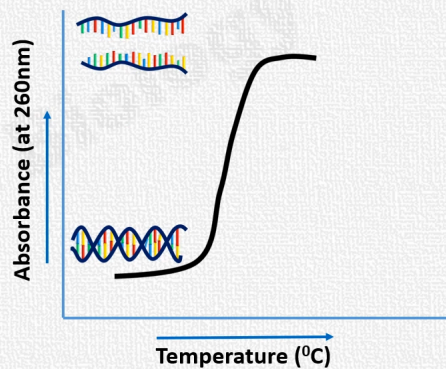
<https://www.youtube.com/watch?v=XtXfHcllrXg>

### DNA DENATURATION

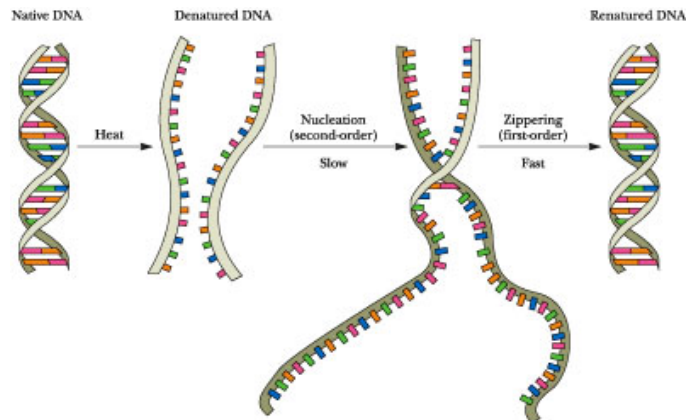
**Melting Temperature  
(T<sub>m</sub>) of DNA**

Temperature at which  
*half of the DNA  
molecules are denatured.*

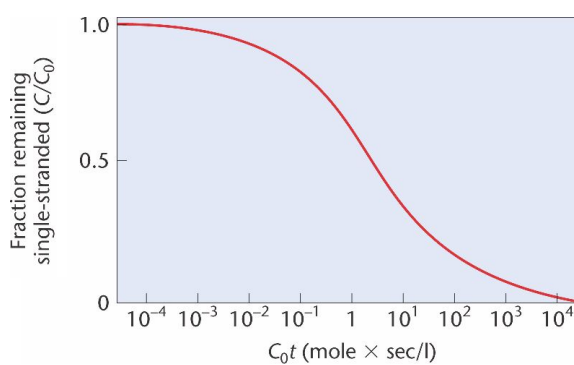
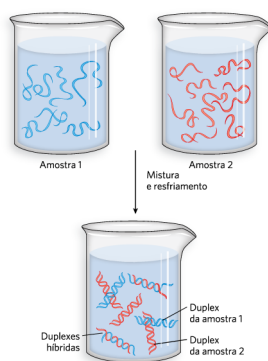
### Melting Curve of DNA



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



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

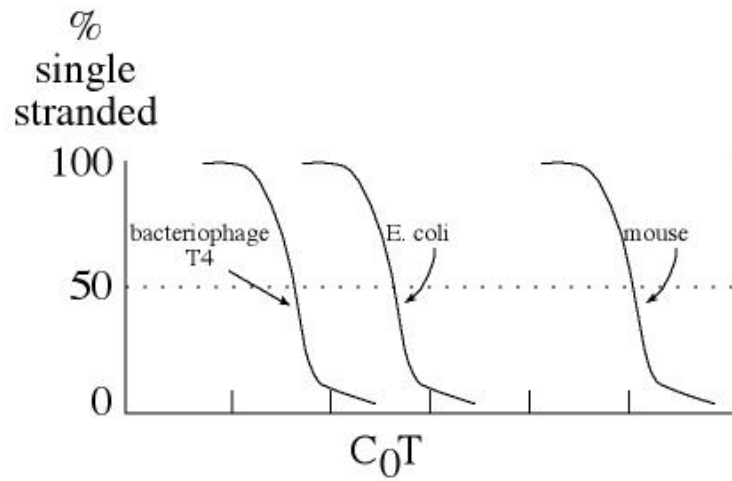


**FIGURA 6-30** Hibridização de DNA interespecíficas. Duas amostras de DNA podem ser comparadas pelo aquecimento, para desnaturar as fitas, seguidas pelo resfriamento da mistura, para permitir a formação de duplex entre as fitas complementares. Quanto maior a semelhança entre as duas amostras, maior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

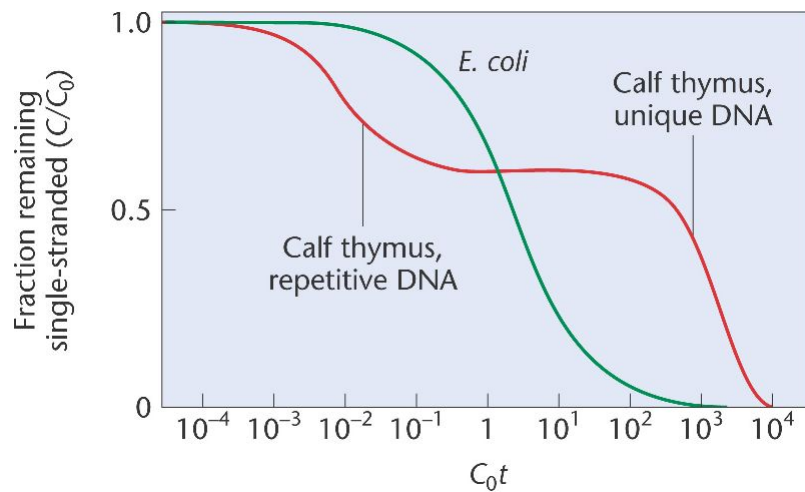


**A curva de reassociação é diferente para diferentes genomas!  
(mesma concentração inicial do DNA)**

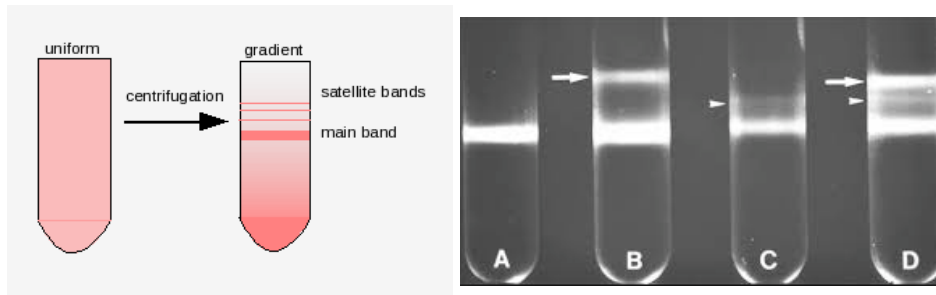
**Por que?**



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

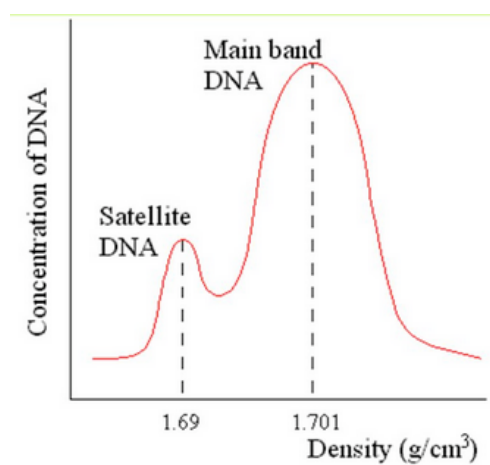


**Esse DNA repetitivo também é chamado DNA satélite  
pois pode apresentar densidade diferente do genoma,  
E pode ser separado em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)!**

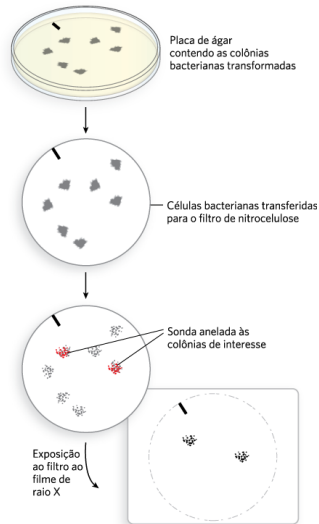


**Esse é um exemplo. DNAs ricos em AT tem densidade menor!**

**Por que?**



## Desnaturação e hibridação podem ajudar em várias estratégias de Biologia Molecular

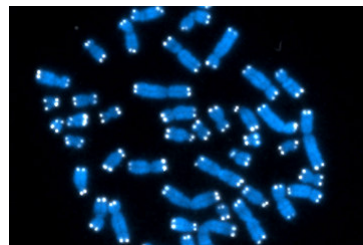
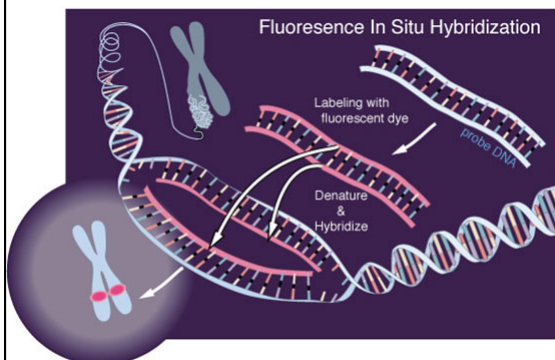


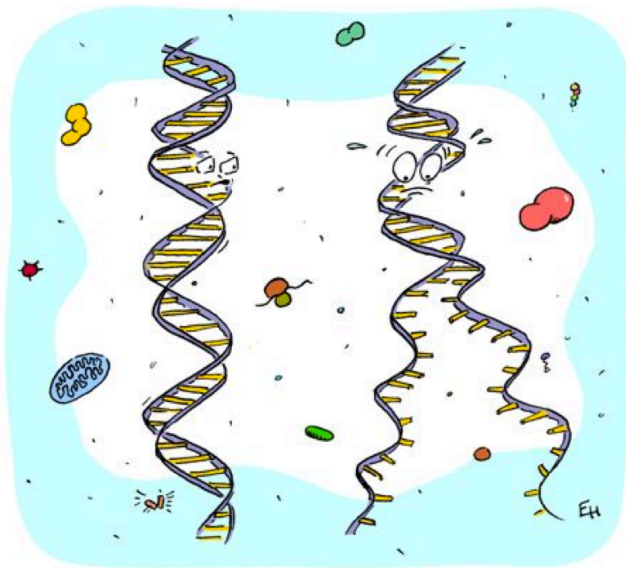
**FIGURA 6-31** Hibridação em colônia. Veja o texto para detalhes.

## FISH: Fluorescence in situ hybridization

localizando, in situ, sequencias específicas!!!

Exemplo: telômeros.....





**Psst, Bob...you're unzipped.**