

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
MCCarthy
experiment- 1944

DETERMINING THAT DNA IS THE HEREDITARY MATERIAL

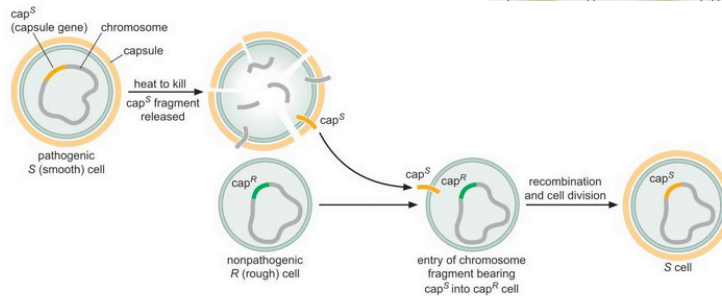
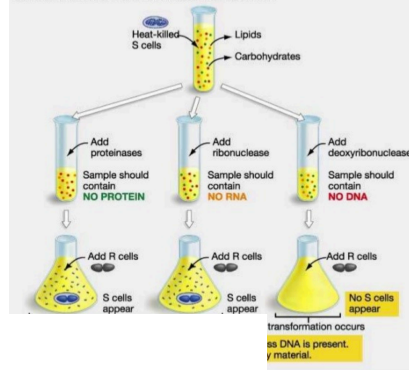

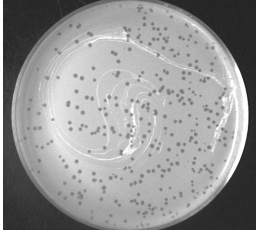


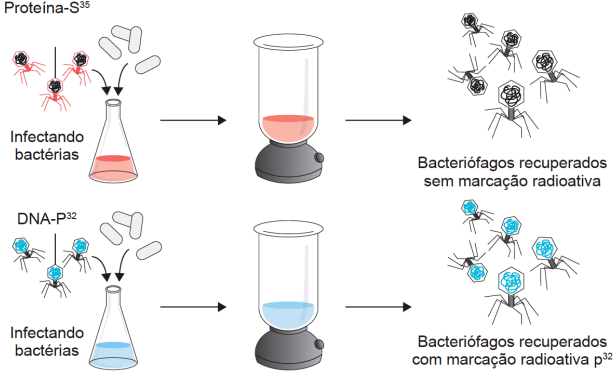
FIGURE 2-1 Transformation of a genetic characteristic of a bacterial cell (*Streptococcus pneumoniae*) by addition of heat-killed cells of a genetically different strain. Here we show an R cell receiving a chromosomal fragment containing the capsule gene from a heat-treated S cell. Since most R cells 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!





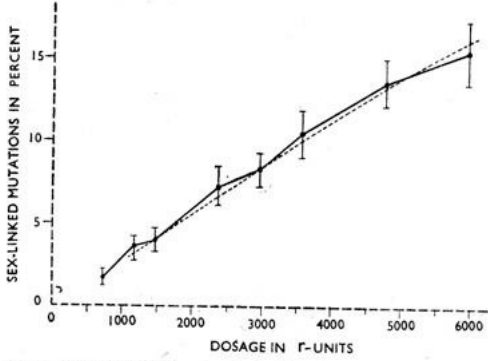
Conclusão: o DNA é o material genético!

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).

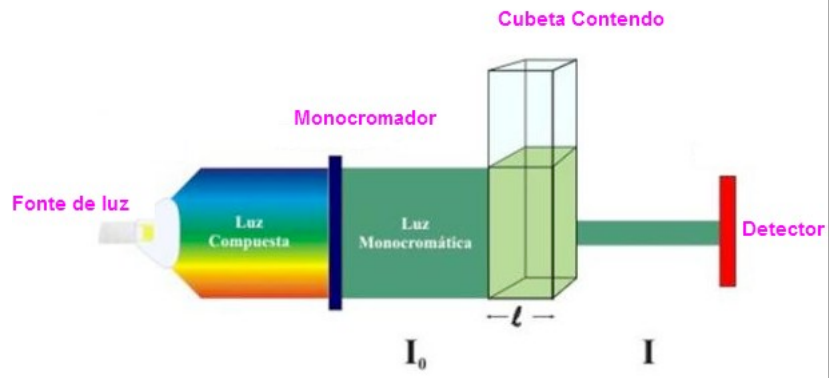


| DOSAGE IN R-UNITS | SEX-LINKED MUTATIONS IN PERCENT |
|-------------------|---------------------------------|
| 1000 | 2.5 |
| 2000 | 4.5 |
| 3000 | 7.5 |
| 4000 | 10.5 |
| 5000 | 13.5 |
| 6000 | 16.5 |

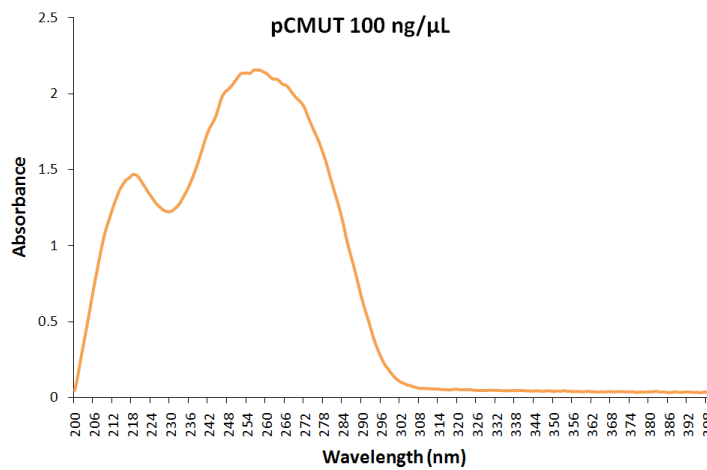
FIG. 867. Graph after Timoféeff-Resovsky showing that the rate of sex-linked mutations in *Drosophila melanogaster* is directly proportional to the amount of radiation applied.

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:

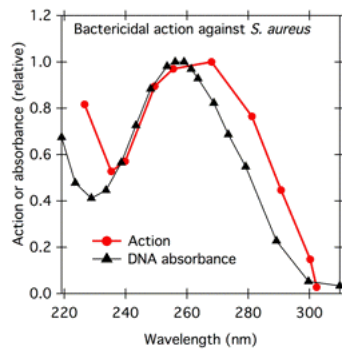


Figure 5. Action spectrum for bactericidal action of UV against *Staphylococcus aureus* (modified from Gates, 1930), plotted with the absorbance spectrum for DNA (modified from Tsuboi, 1950).

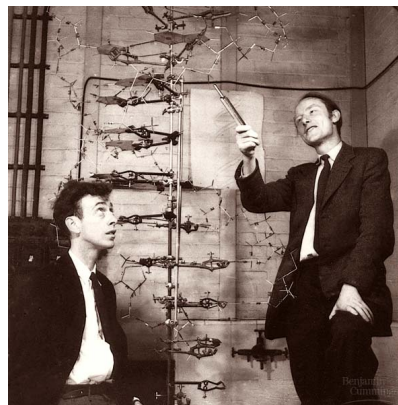
- **Experimento de Alexandre Hollaender (1939)!**
- **Espectro de Mutagenesis:**
- **DNA é a molécula da herança!**



Histórico

Francis Crick e James Watson (1953, UK)

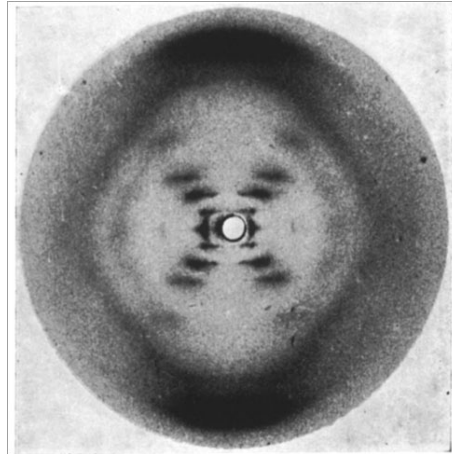
**A dupla hélice revelada! Nobel 1962!
(Watson, Crick e Wilkins)**



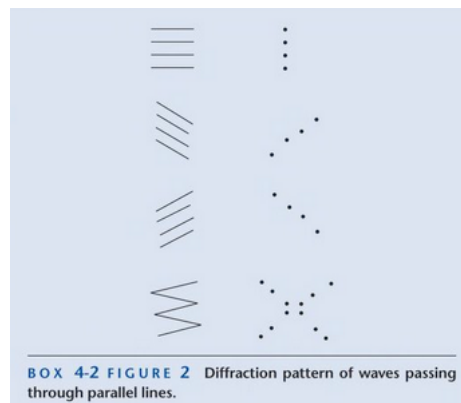
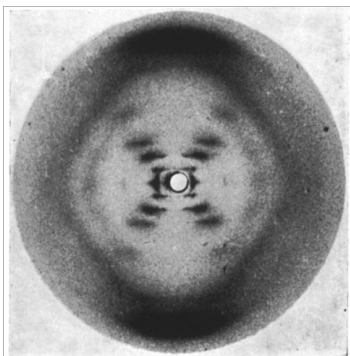
Histórico

Rosalind Franklin e Maurice Wilkins
(1952, UK)

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

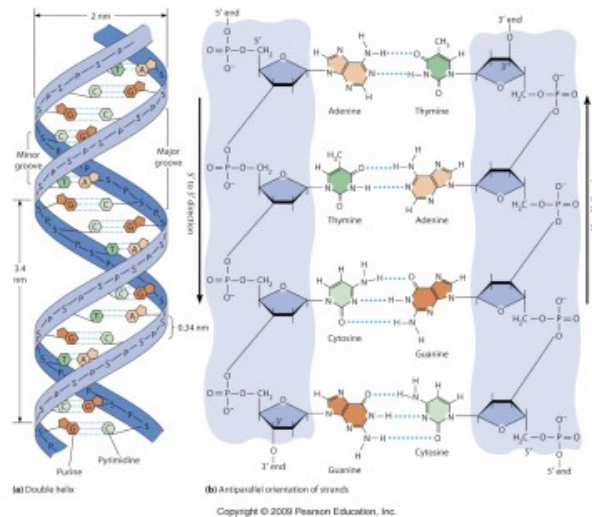


Interpretando a foto 51!



- 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?

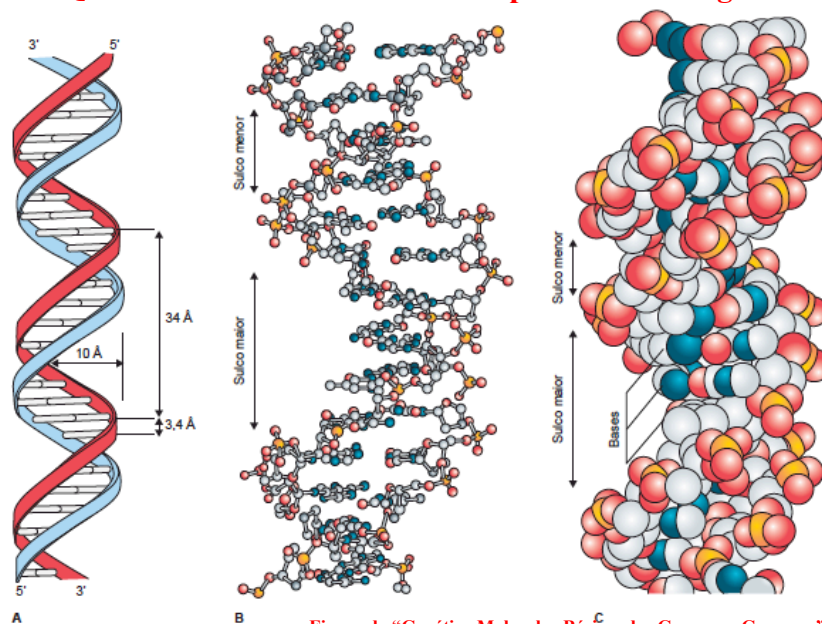
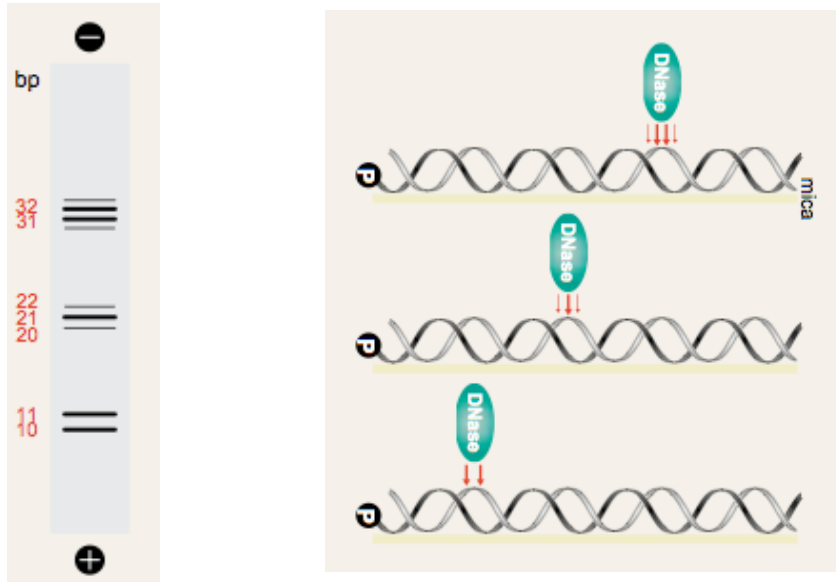


Figura do "Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas", 2017

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?**

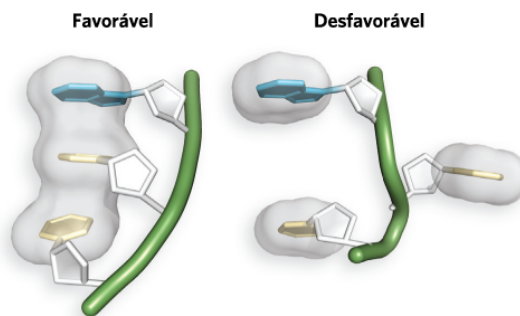
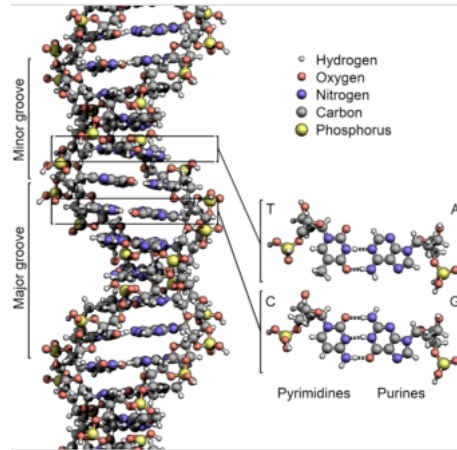


FIGURA 6-10 Empilhamento das bases nos ácidos nucleicos. Interações hidrofóbicas, de van der Waals e eletrostáticas favorecem o alinhamento das bases em solução aquosa ou em uma cadeia polinucleotídica (três nucleotídeos do RNA são mostrados aqui); a orientação não empilhada é desfavorável. O raio das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

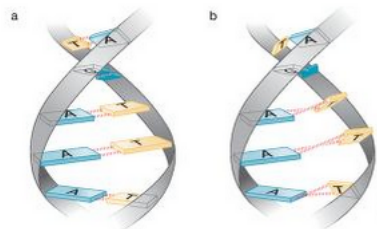
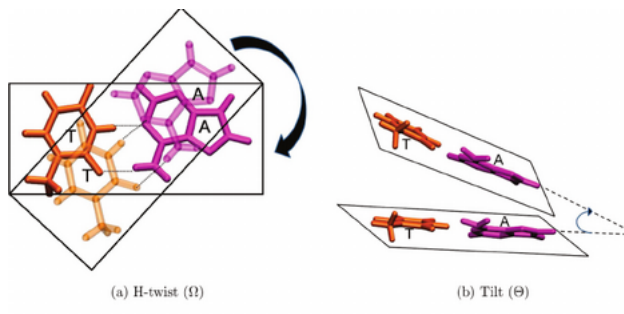
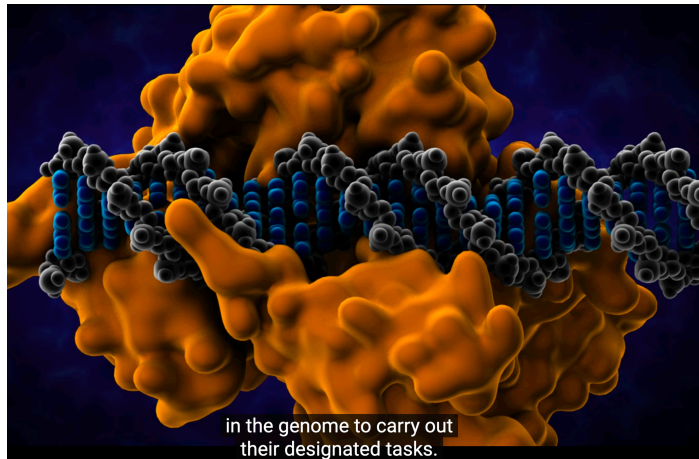


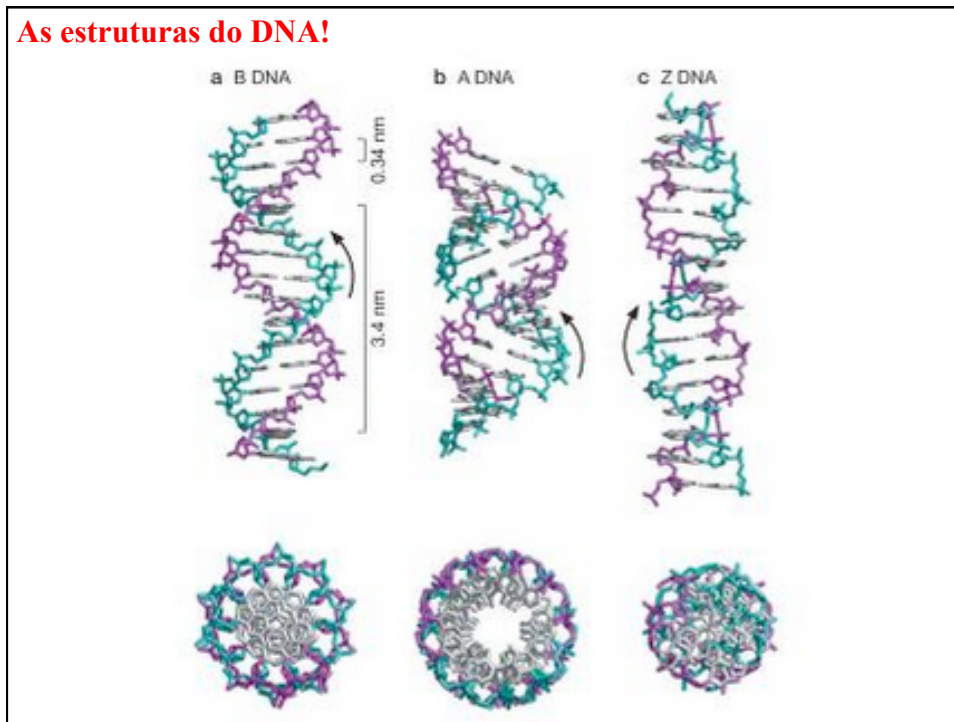
FIGURE 4-12 The propeller twist between the purine and pyrimidine base pairs of a right-handed helix. (a) The structure shows a sequence of three consecutive A-T base pairs with normal Watson-Crick bonding. (b) A propeller twist causes rotation of the bases about their long axes. (Adapted, with permission, 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



- 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!

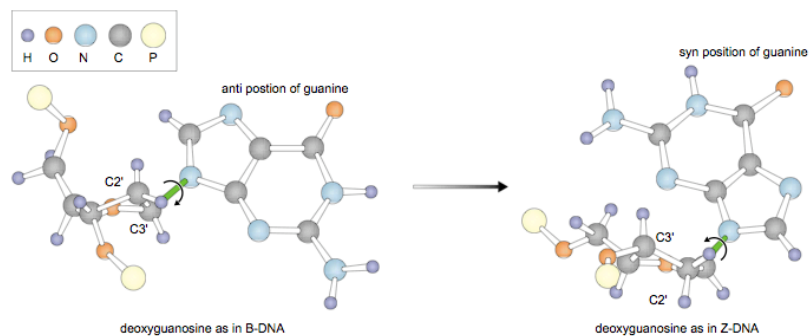


(b)

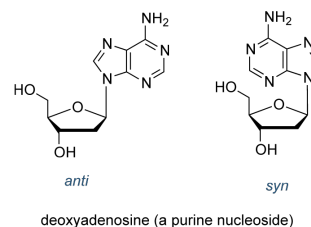
| | B-DNA | A-DNA | Z-DNA |
|---|---------------------|---------------------|---|
| Sentido da hélice | Orientado à direita | Orientado à direita | Orientado à esquerda |
| Diâmetro | ~20 Å | ~26 Å | ~18 Å |
| Pares de base por volta da hélice | 10,5 | 11 | 12 |
| Incremento na altura da hélice por par 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?

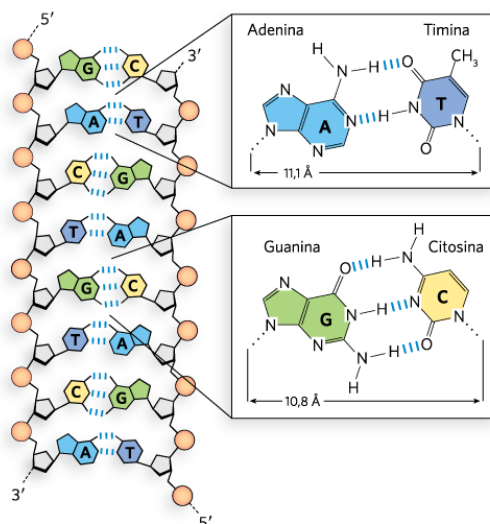
As bases podem girar no nucleotídeo!



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.....**

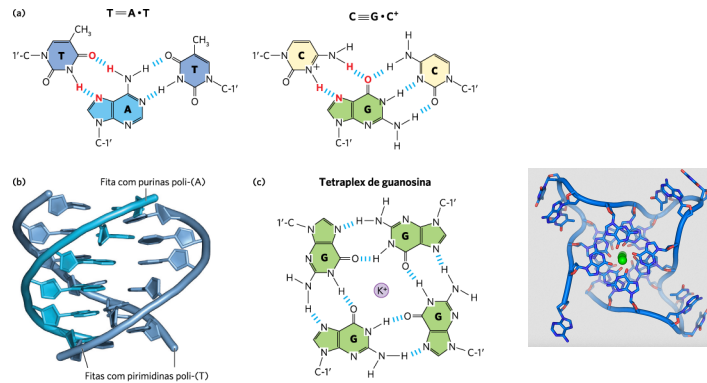
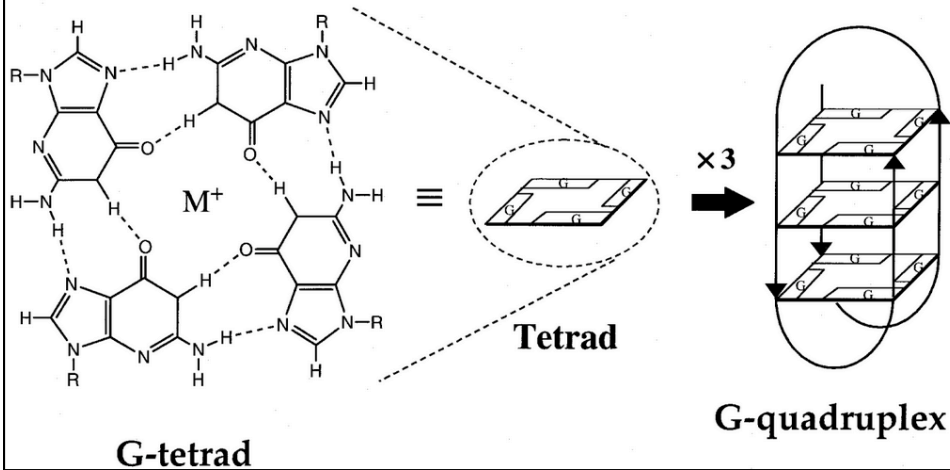


FIGURA 6-21 Estruturas do DNA de três e quatro fitas. (a) O pareamento de bases no triplex de DNA. Os átomos participantes do pareamento de Hoogsteen estão em vermelho; os pareamentos de bases de Watson-Crick tradicionais estão em preto. (b) Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas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

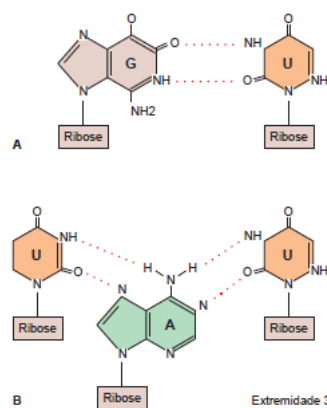
Esta é uma molécula simples fita? O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?

Com é o RNA no plano? E por que?

E a estrutura espacial do RNA, que estrutura assume?

E a estrutura do RNA?

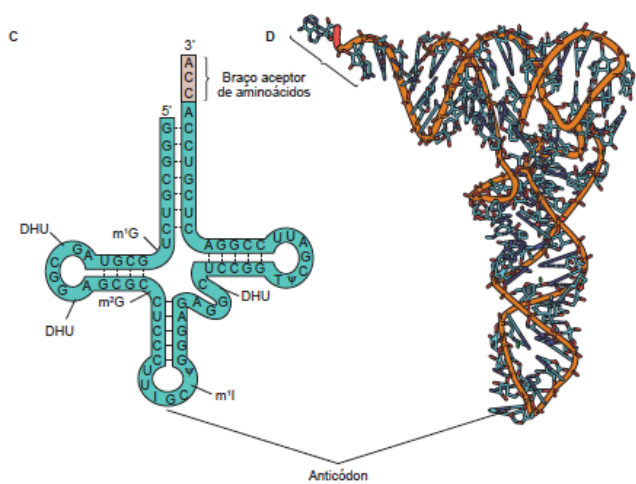
O RNA faz também emparelhamento com pontes de hidrogênio? Quais?



**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!



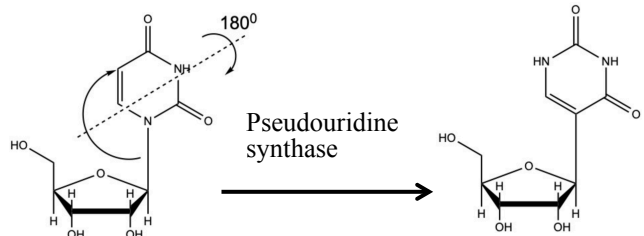
Estrutura do t-RNA no plano e espacial!

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

Bases modificadas no t-RNA:

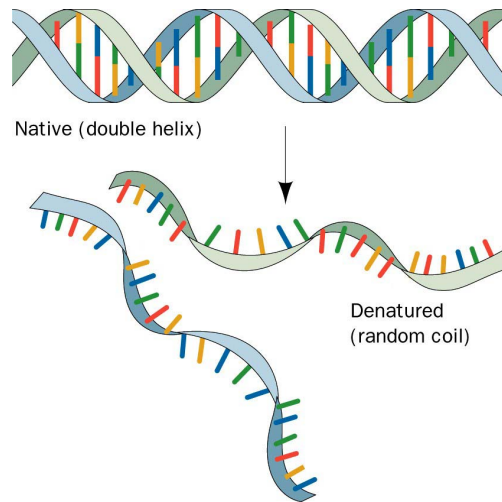
These are examples of modified cytosine, thymine or uridine.

| | | | |
|-------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| | | | |
| Nucleobase | 5,6-Dihydrouracil | 5-Methylcytosine | 5-Hydroxymethylcytosine |
| | | | |
| Nucleoside | Dihydrouridine D | 5-Methylcytidine m ⁵ C | |



Importância da pseudouridina nas vacinas de RNA!

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!

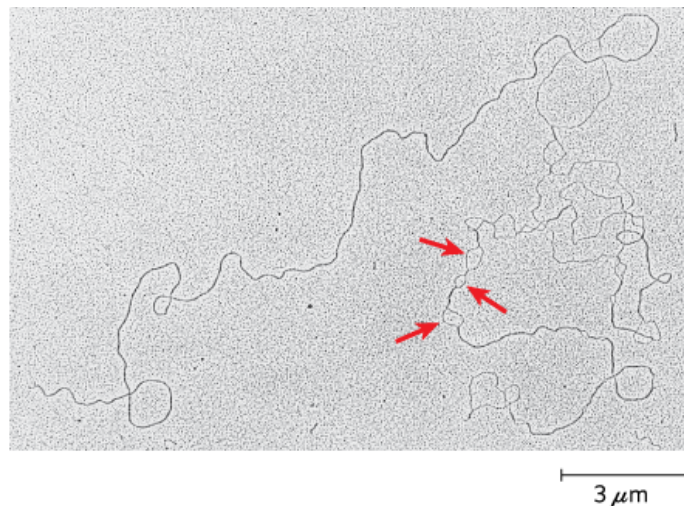


FIGURA 6-29 DNA parcialmente desnaturado. O DNA mostrado nesta micrografia eletrônica foi parcialmente desnaturado e então fixado para impedir a renaturação durante a

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

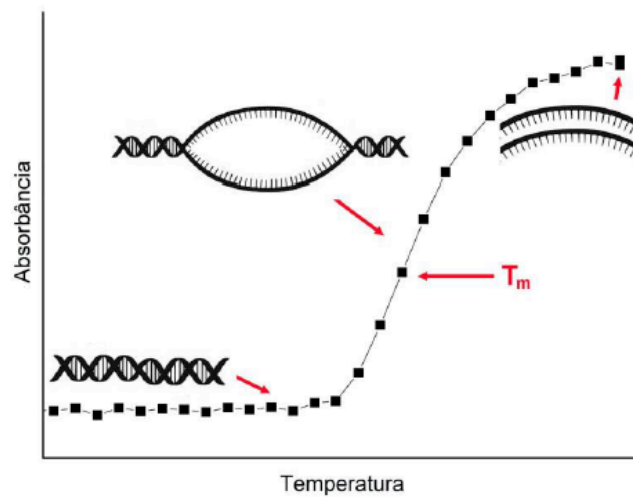
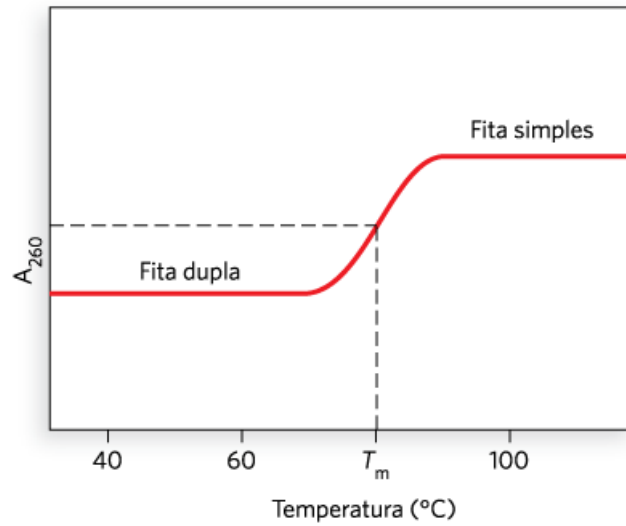
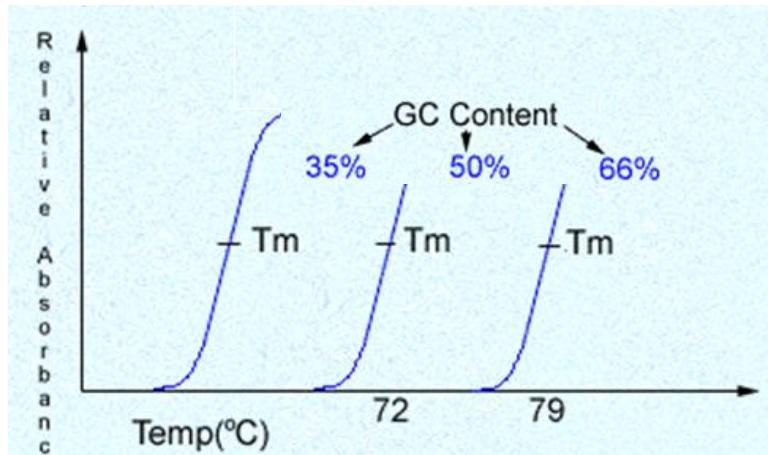
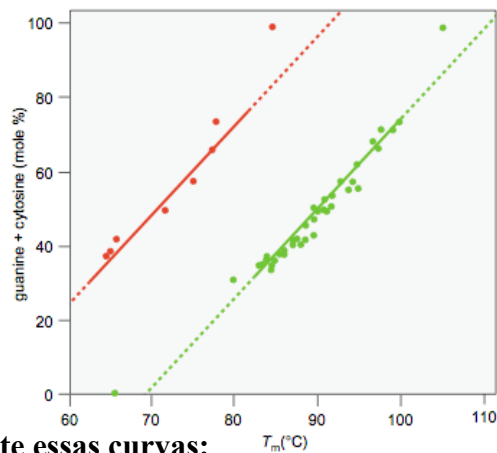


Figura 13. Exemplo de uma curva de desnaturação térmica do DNA

Moléculas de DNA podem ter Tm diferentes.... Por que?



Mas as mesmas Moléculas de DNA podem ter Tm diferentes.... em condições diferentes...Por que?

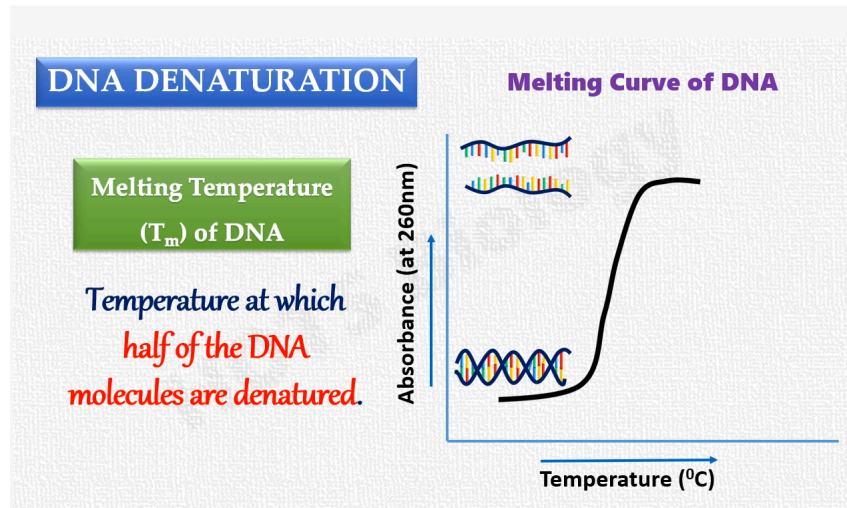


Interprete essas curvas:

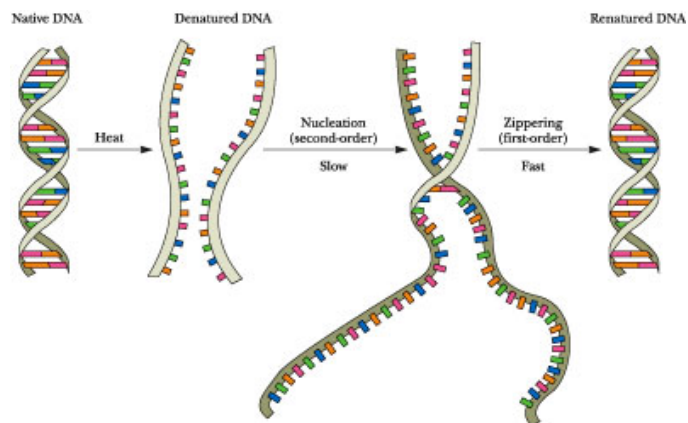
vermelho baixa concentração de sal,

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 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

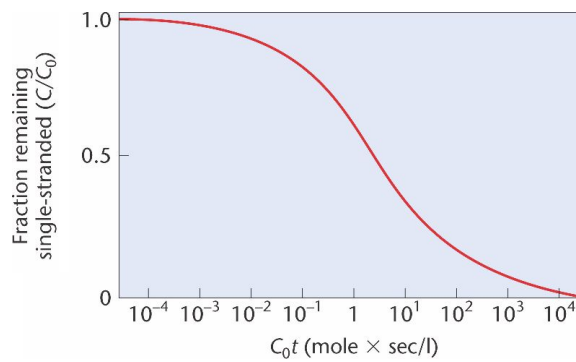
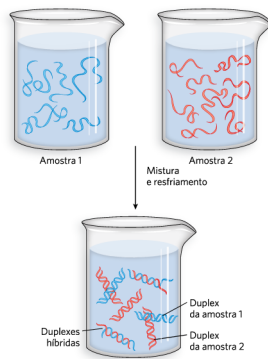
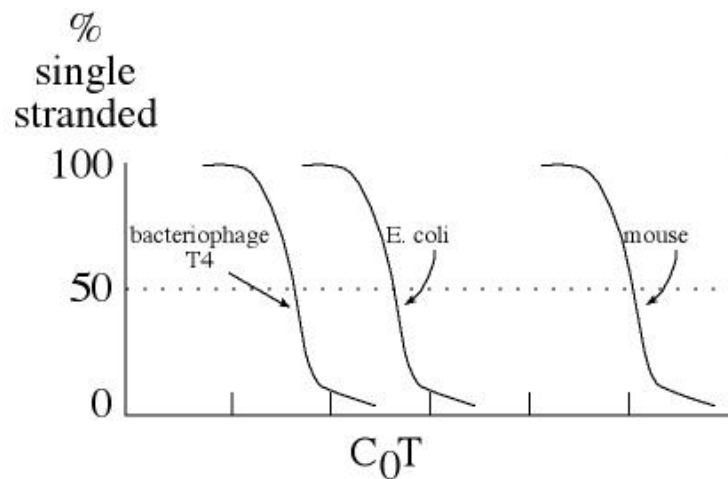


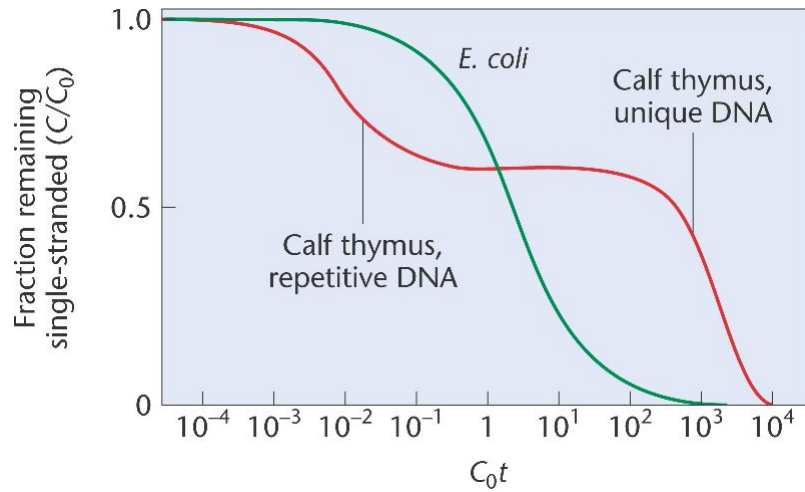
FIGURA 6-30 Hibridização de DNA interespecíficas. Duas amostras de DNA podem ser comparadas pelo aquecimento, para desnaturar as fitas, seguidas pelo resfriamento da mistura, para permitir a formação de duplex entre as fitas complementares. Quanto maior a semelhança entre as duas amostras, maior o número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

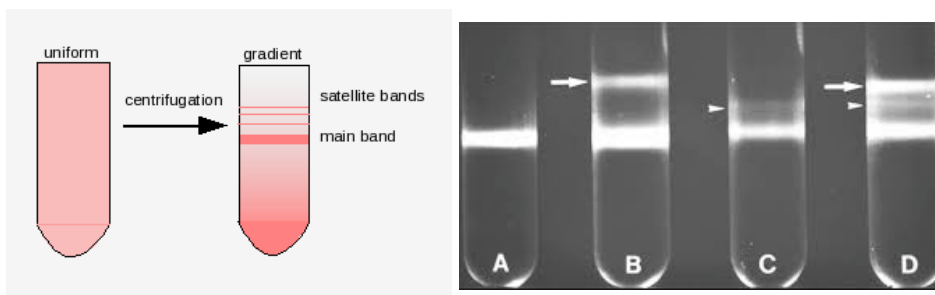
Por que?



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

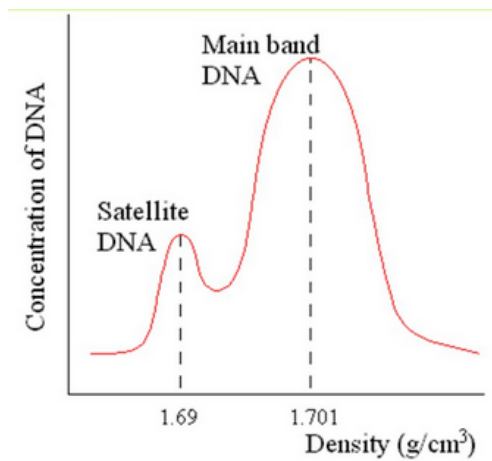


Esse DNA repetitivo também é chamado DNA satélite pois pode apresentar densidade diferente do genoma, E pode ser separado em gradiente de cloreto de césio (CsCl)!



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

Por que?



Desnaturação e hibridação podem ajudar em várias estratégias de Biologia Molecular

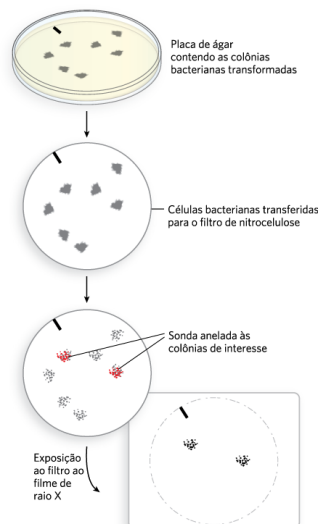


FIGURA 6-31 Hibridação em colônia. Veja o texto para detalhes.

FISH: Fluorescence in situ hybridization

localizando, in situ, sequencias específicas!!!

Exemplo: telômeros.....

