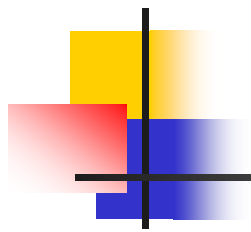




Disciplina : Biologia Molecular: conceitos e Técnicas

Professora. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes



Revisão Geral



Sumário

- História da Genética Molecular
- DNA e RNA
- Dogma Central
- Replicação
- Transcrição
- Tradução
- Organização e estrutura dos genomas



O Ácido Desoxirribonucleico - DNA

- No século XVII, Gregor Mendel, deu o primeiro grande passo para desvendar a hereditariedade.
- Mendel deduziu a presença de fatores hereditários que eram propagados de forma estável de geração a geração, sendo responsáveis pela formação de características individuais através de cruzamentos entre ervilhas

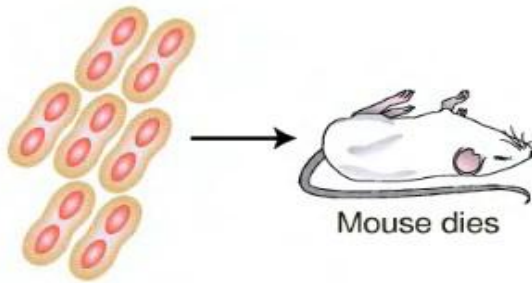


O Ácido Desoxirribonucleico - DNA

- Em 1928, Frederick Griffith, um médico londrino, em experimentos com *Pneumococcus*, células bacterianas causadoras de pneumonia, descobriu o fenômeno da transformação.

DNA: O material genético

(a)

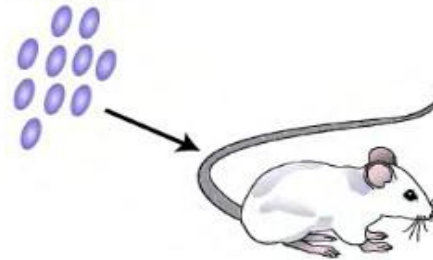


S strain live cells

Mouse dies

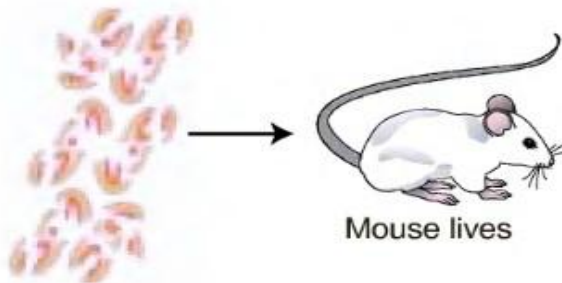
(b)

R strain



Mouse lives

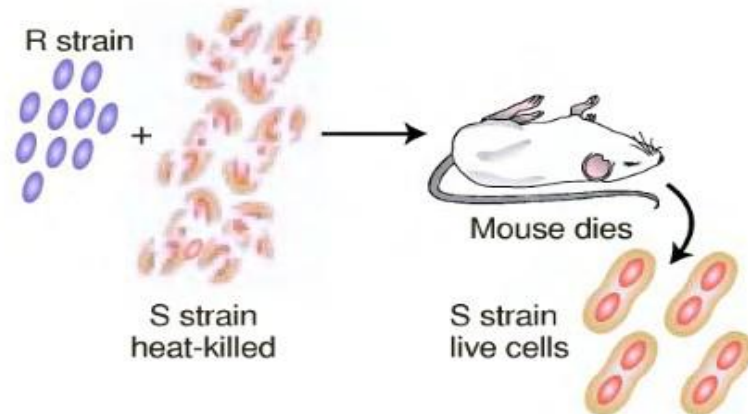
(c)



S strain
heat-killed

Mouse lives

(d)



R strain

+

S strain
heat-killed

Mouse dies

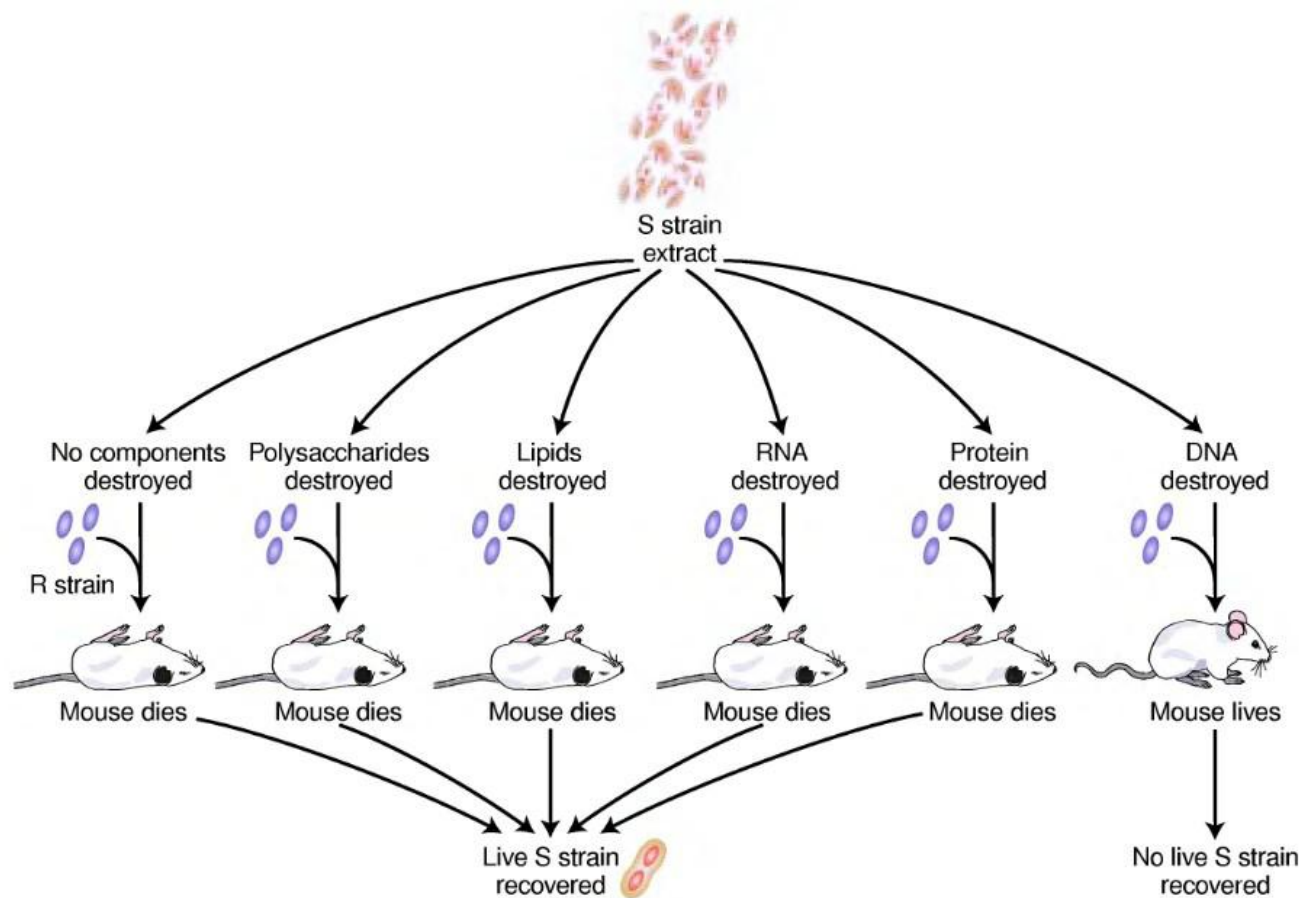
S strain
live cells



DNA: O material genético

- Oswald Avery, C.M. MacLeod e M. McCarty (1944):
- Com base na mesma técnica, identificaram o princípio transformante do experimento de Griffith. Observaram que apenas uma classe de moléculas, o DNA, induzia a transformação das bactérias

DNA: O material genético

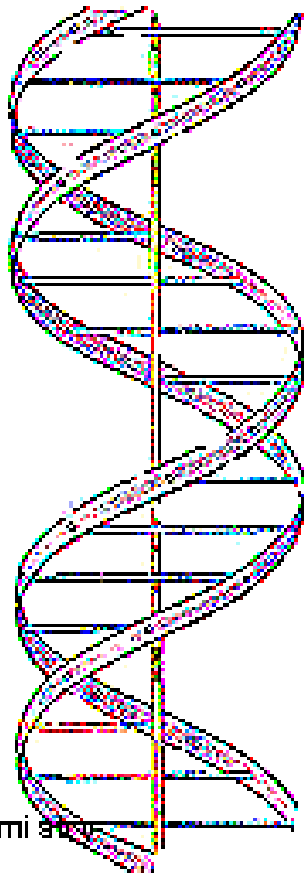




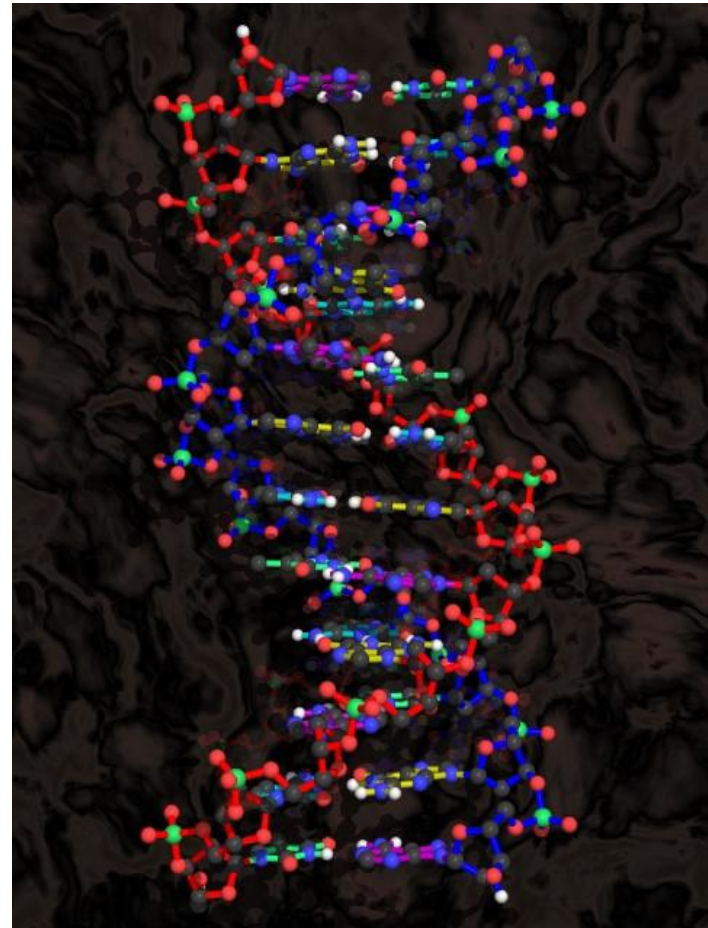
DNA: O material genético

- Em 1953 James Watson e Francis Crick, descreveram o DNA como uma dupla fita, enrolada em hélice ao redor de um eixo, sendo as fitas antiparalelas.
- As bases nitrogenadas das duas fitas estão voltadas para o interior da hélice e pareiam de forma complementar entre si, na qual Adenina se liga a Timina e Guanina se liga a Citosina

O Ácido Desoxirribonucleico - DNA

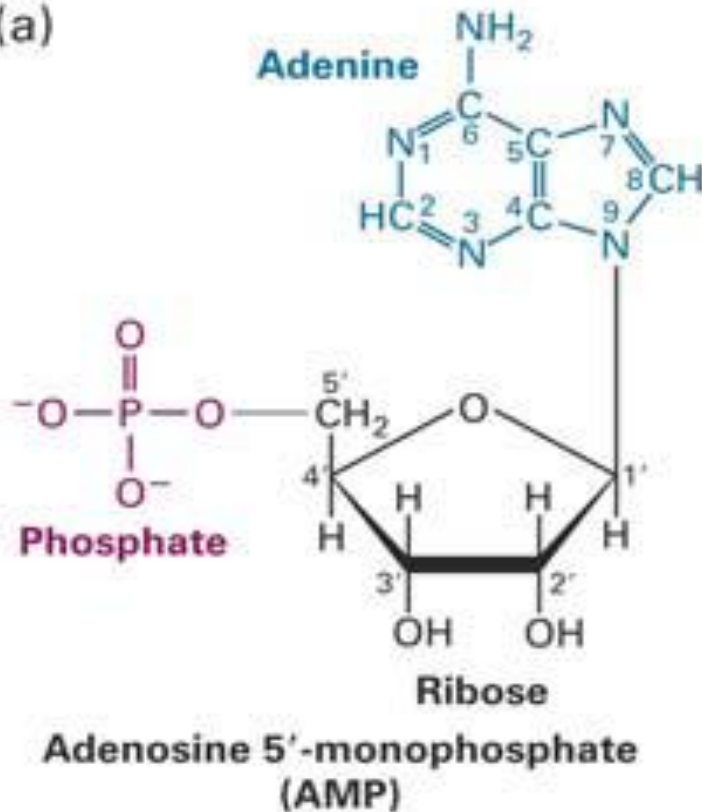


Biochemistry
Stryer, L.



Estrutura do DNA

(a)

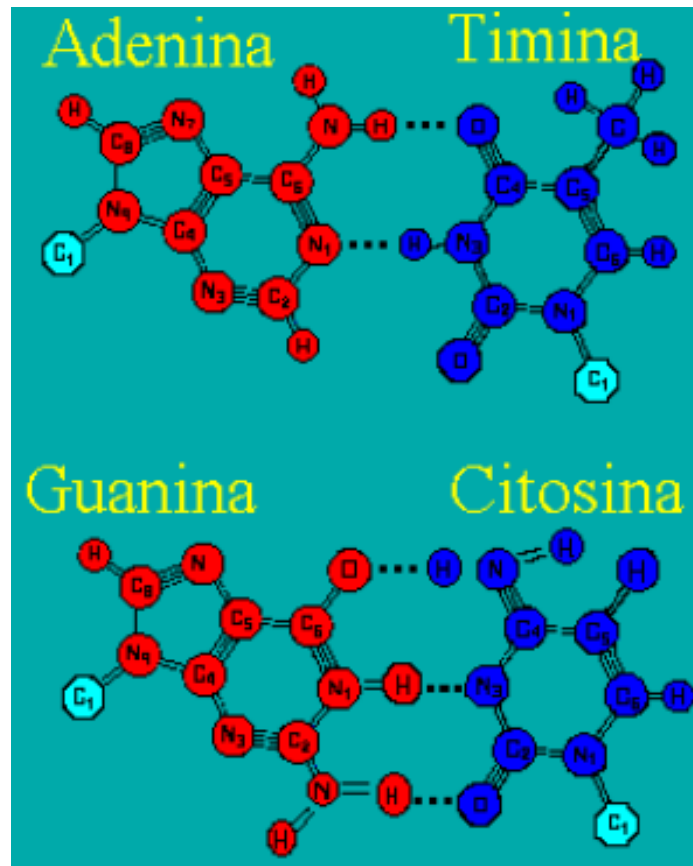


- DNA é composto de moléculas básicas, denominadas nucleotídeos
- Cada nucleotídeo contém um fosfato, uma pentose (desoxirribose) e uma das quatro bases nitrogenadas:

Purinas: Adenina (A) e Guanina (G)

Pirimidinas: Citosina (C) e Timina (T)

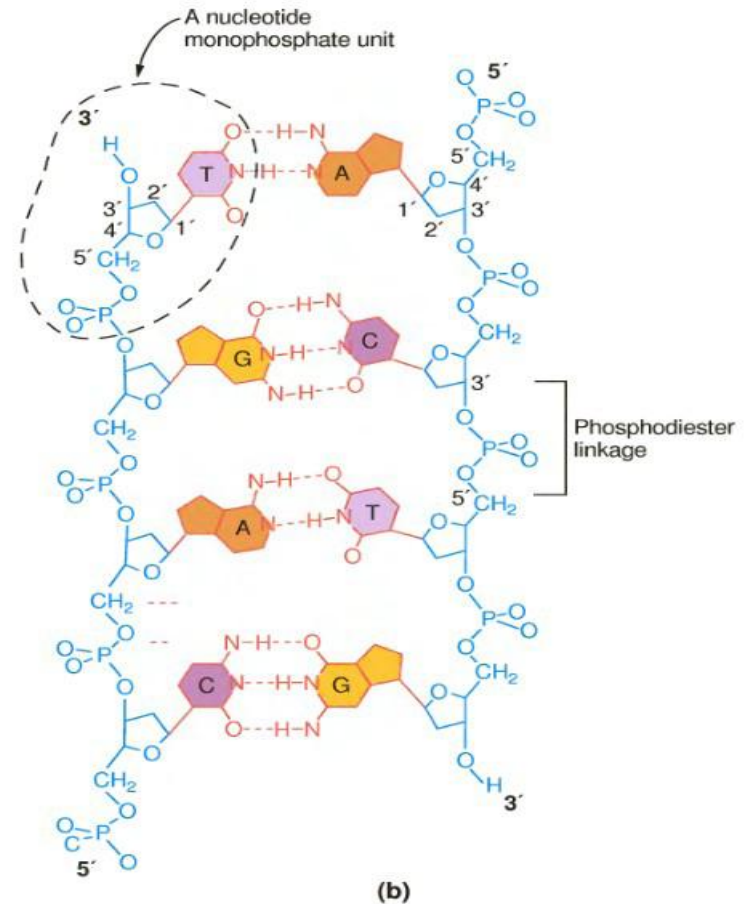
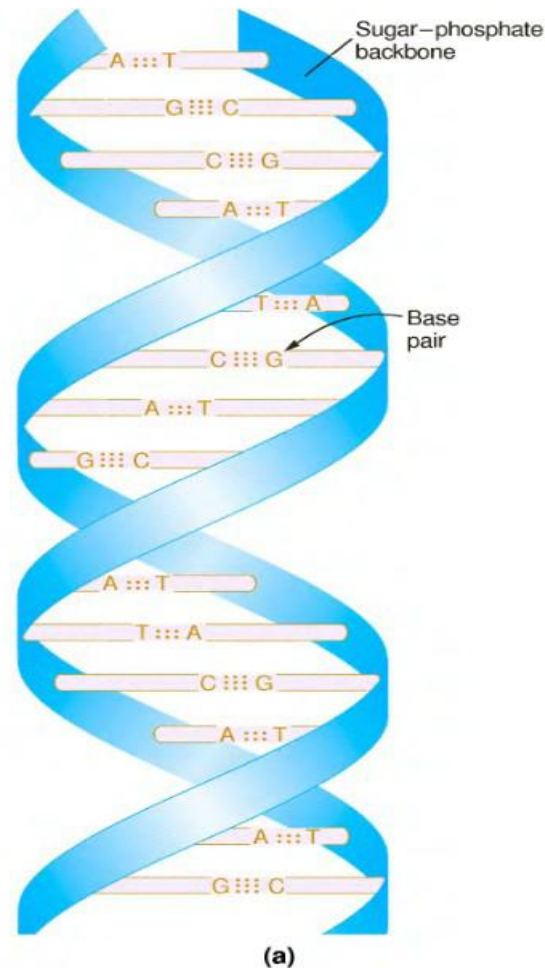
Bases nitrogenadas



Estrutura do DNA

As duas hélices são mantidas juntas por pontes de hidrogênio
Os nucleotídeos são mantidos juntos em cada cadeia por ligações fosfodiéster

Fitas antiparalelas:
ocorrem em direções opostas
Uma 5' → 3'
Outra 3' → 5'

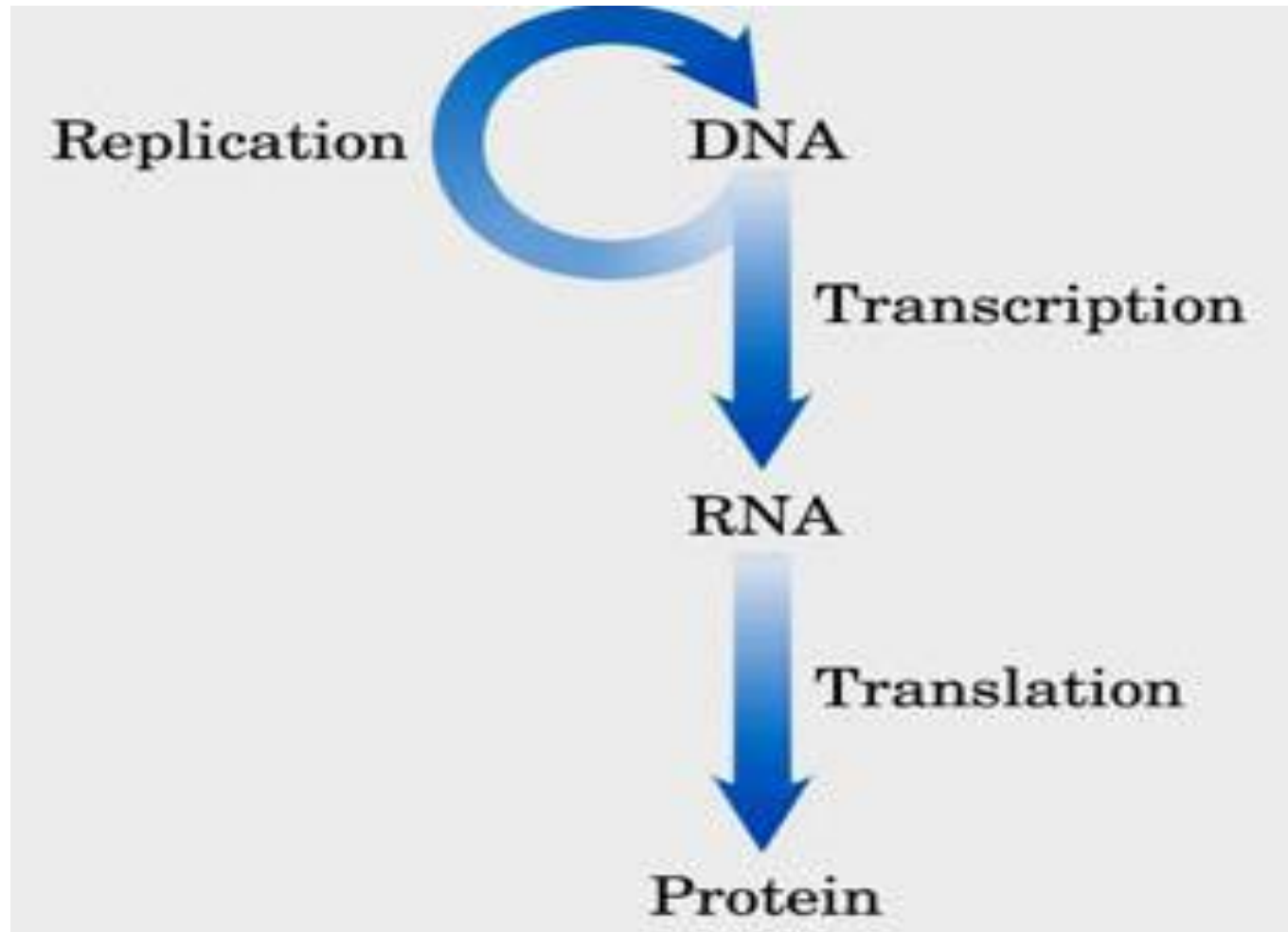


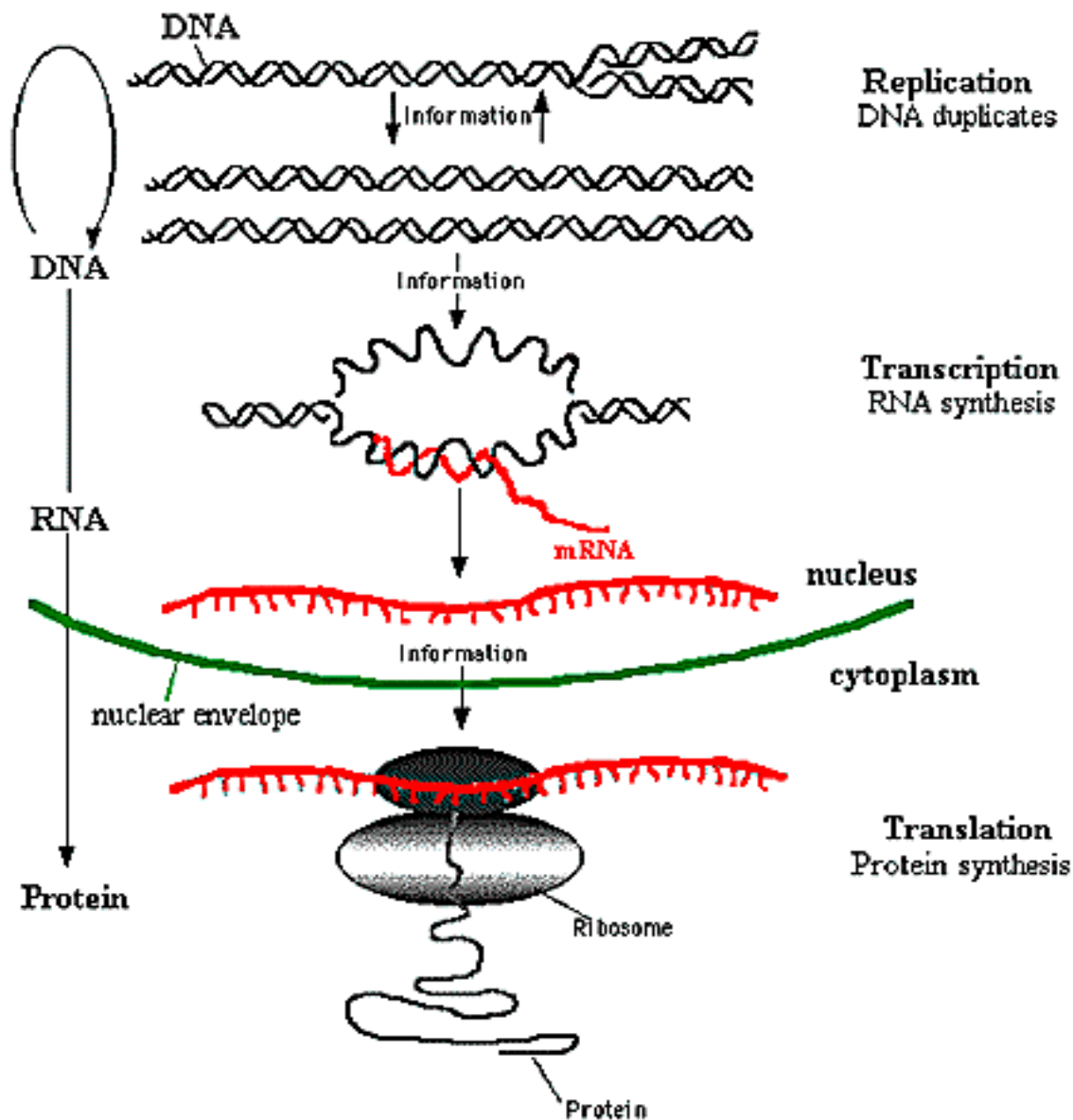


O Ácido Desoxirribonucleico - DNA

- Somente depois do modelo de Watson e Crick o DNA foi considerado o material genético
- O reconhecimento final do trabalho de Watson e Crick veio em 1963 com o recebimento do Prêmio Nobel.

O Dogma Central da Biologia Molecular





The Central Dogma of Molecular Biology



Replicação

A replicação é o processo pelo qual uma molécula de DNA se duplica dando origem a duas moléculas idênticas a molécula inicial e envolve um conjunto de proteínas

Enzimas que participam da replicação

- DNA Polimerase
- SSB (Single Strand Binding Protein)
- Primase
- Helicases (DnaB)
- Topoisomerases
- DNA ligase



DNA
helicases



SSBs



topo-
isomerases



primase



DNA
polymerases



sliding
DNA
clamps



RNase H



DNA
ligase



Replicação

- A abertura das fitas é feita pela enzima **helicase**.
- Para manter as fitas desenroladas proteínas chamadas **SSBP** (*single strand binding protein*) se ligam nas fitas recém-desenroladas evitando que se associem de novo.

A forquilha de replicação

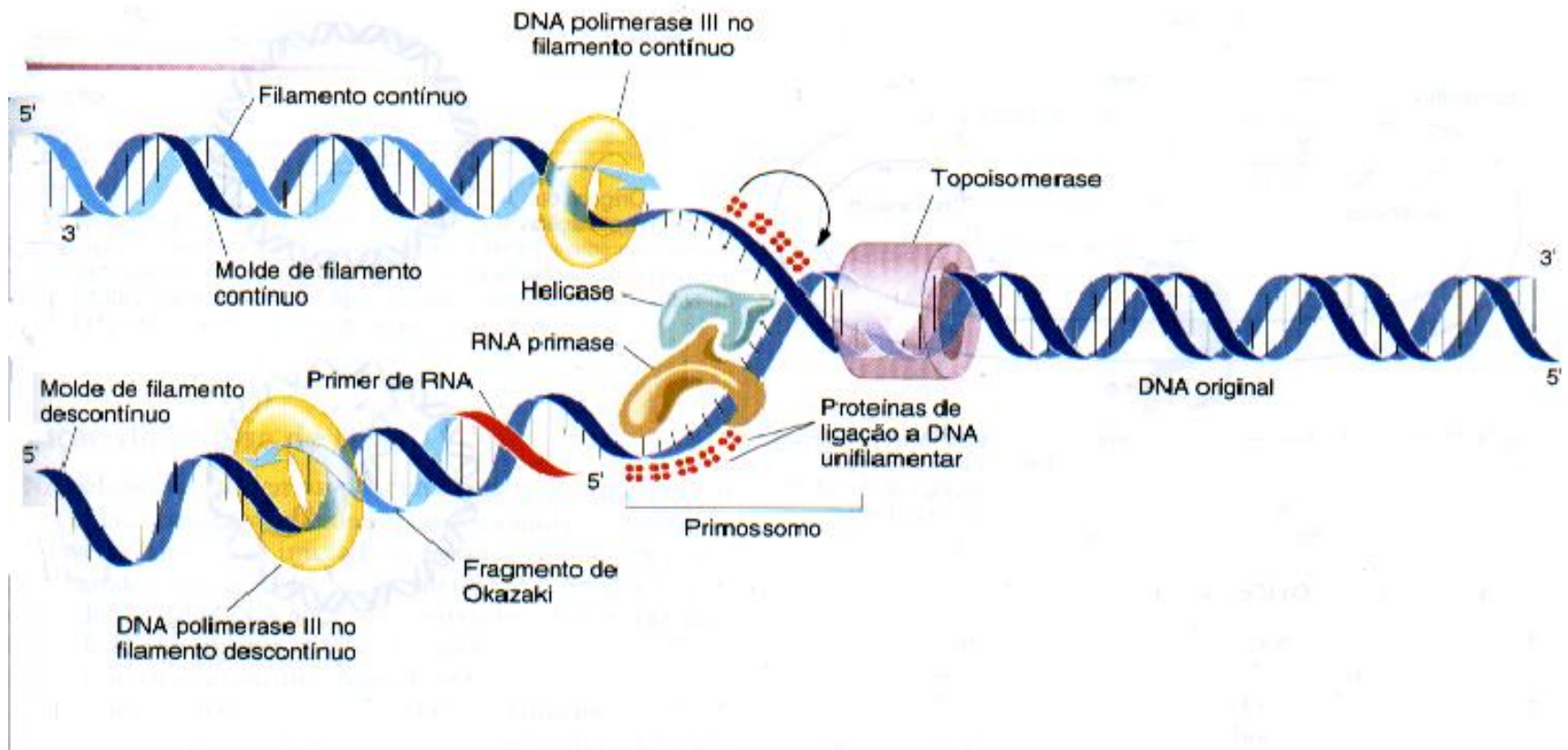


Fig. 8.20 Forquilha de replicação do DNA.



Replicação

Com o desenrolamento das fitas em um ponto, as regiões adjacentes sofrem um “super-enrolamento”, o que dificultaria a continuação do processo. As **topoisomerasas** resolvem esse problema fazendo cortes em uma das fitas de DNA, que se desenrola, e religando-as, diminuindo a tensão provocada por esse “superenrolamento”.

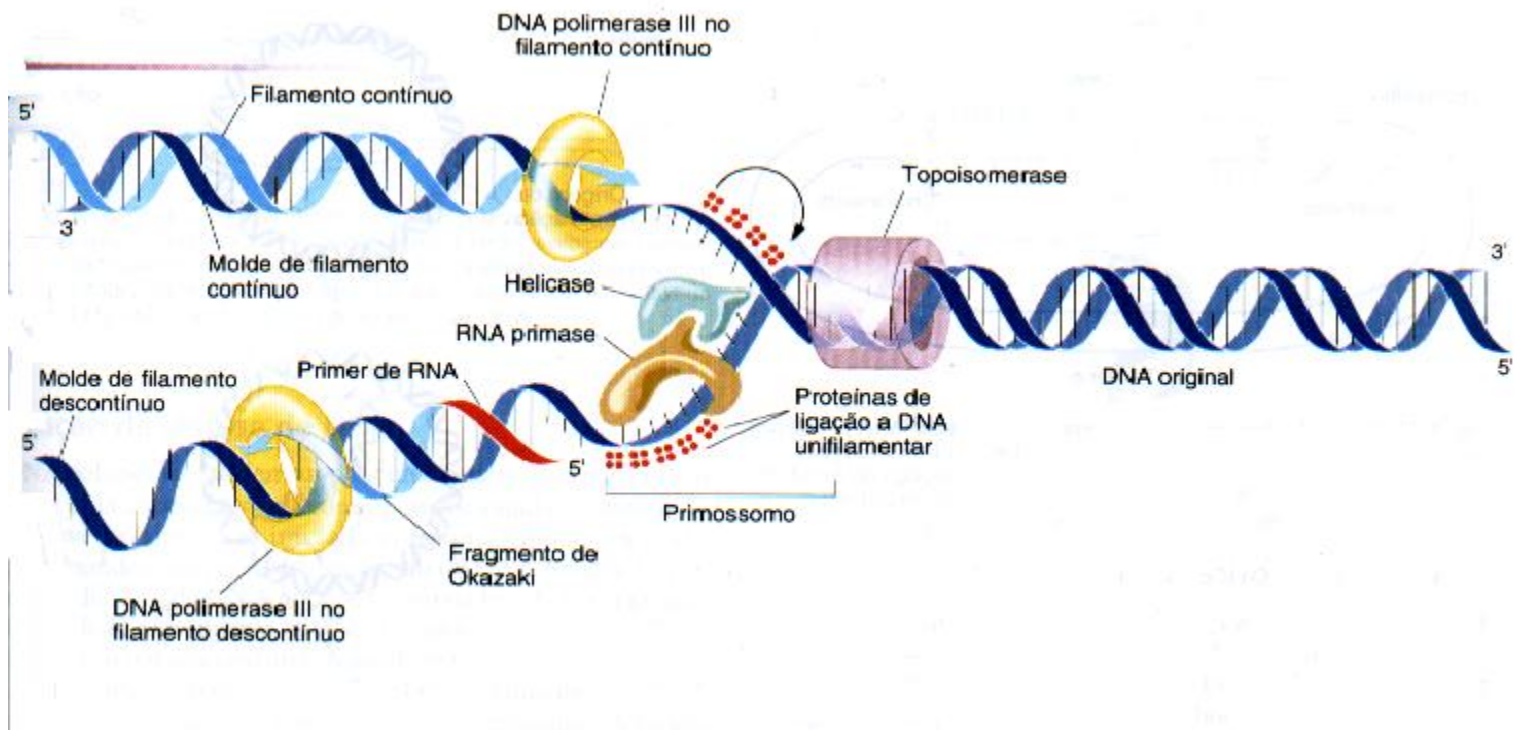
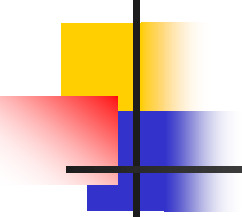


Fig. 8.20 Forquilha de replicação do DNA.



A síntese de novas fitas é feita pela enzima **DNA-polimerase**, sendo que esta enzima não pode sintetizar outra fita a partir de nucleotídeos livres. Dessa forma, a DNA polimerase precisa de um "**Primer**", que é um pedaço de RNA sintetizado por uma RNA polimerase especial chamada **Primase**

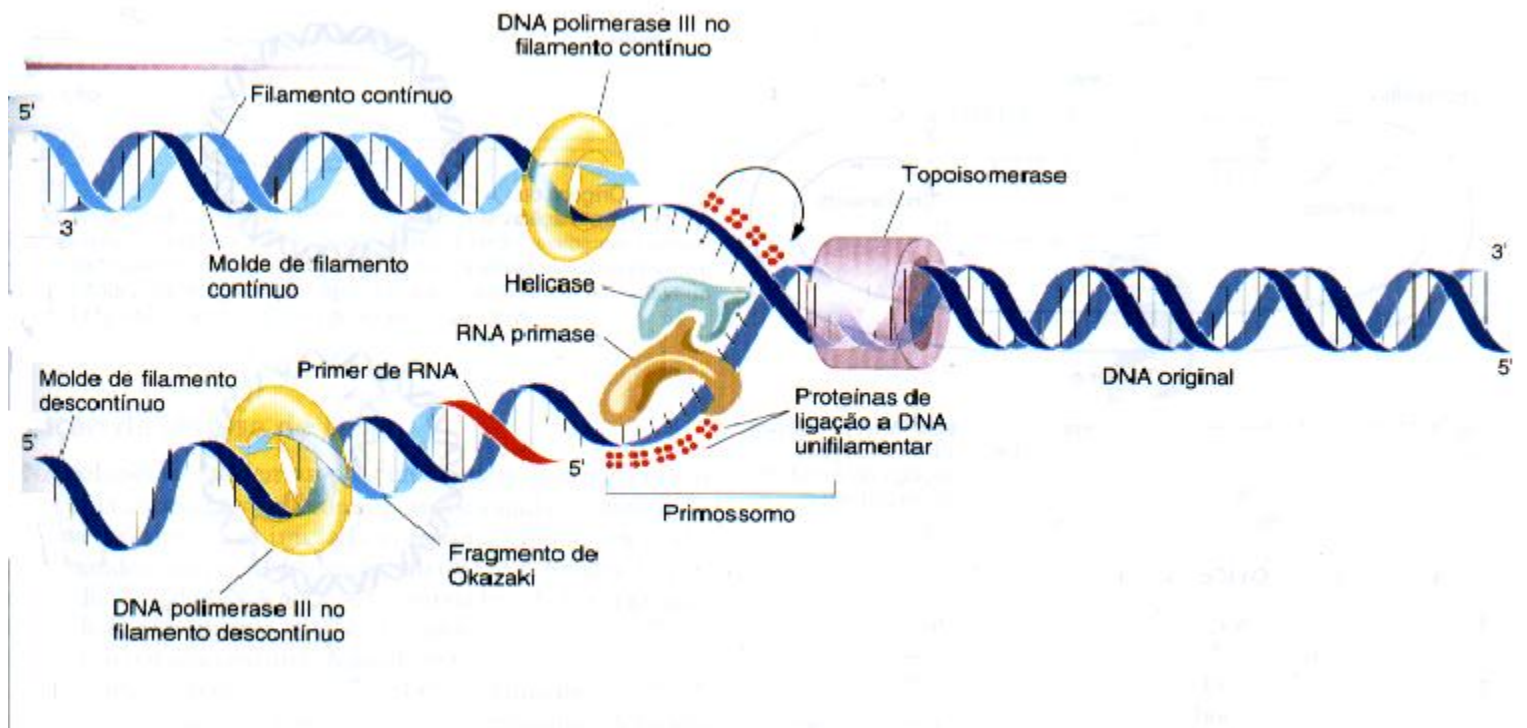


Fig. 8.20 Forquilha de replicação do DNA.



Em bactérias existem três tipos de polimerases:

- A DNA polimerase I, possui baixa capacidade de polimerização $5' \rightarrow 3'$ e é a única que possui atividade exonucleásica $5' \rightarrow 3'$ em DNA dupla fita.
- A DNA polimerase II, possui uma capacidade de polimerização baixíssima e o seu papel na célula ainda não foi muito bem elucidado.
- A DNA polimerase III, é a principal responsável pela síntese das fitas de DNA devido a sua alta capacidade de polimerização.



Replicação - continuação

- DNA polimerase III começa a polimerização no sentido $5' \rightarrow 3'$, esta também possui atividade exonucleásica $3' \rightarrow 5'$, essa atividade chamada **Editorial** permite que os nucleotídeos sejam retirados e é conferido se o seu pareamento está correto (A com T e C com G).



A replicação

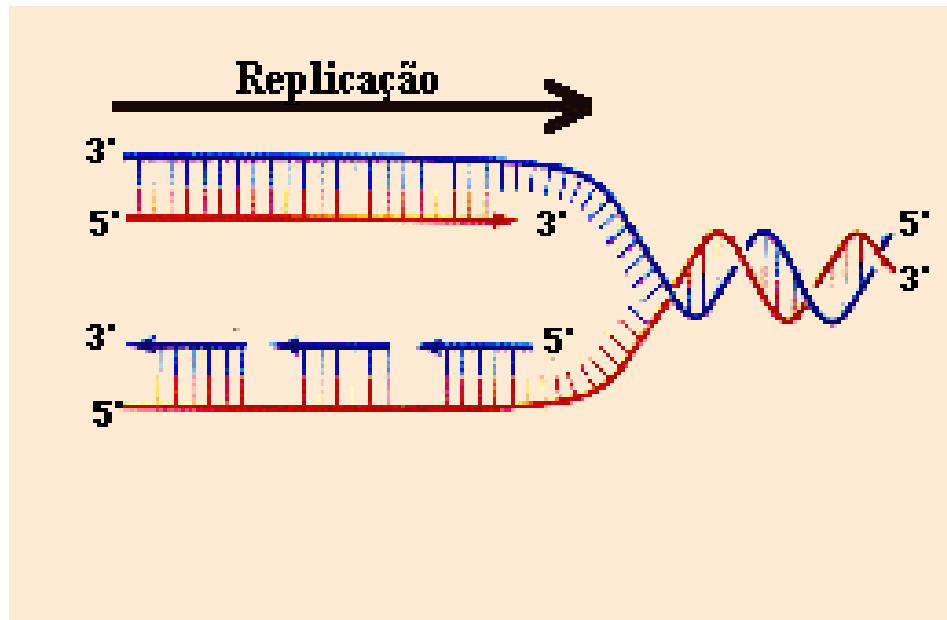
- Se replicação é semi-conservativa e a polimerização deve ser sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$
- Mas o DNA é antiparalelo ou seja, uma fita ocorre no sentido $5' \rightarrow 3'$ e a outra no sentido $3' \rightarrow 5'$
- Como ocorre então a replicação nos dois sentidos?



A replicação

- A síntese da fita descontínua é feita em pequenas partes. O primer de RNA é sintetizado e a fita descontínua sofre um “loop” de forma que a polimerização ocorre na mesma direção que ocorre na fita contínua.
- Assim, a fita complementar a fita contínua é formada por pequenos fragmentos de 100 pb chamados **fragmentos de Okazaki**.

Replicação contínua e descontínua e o produto final da replicação

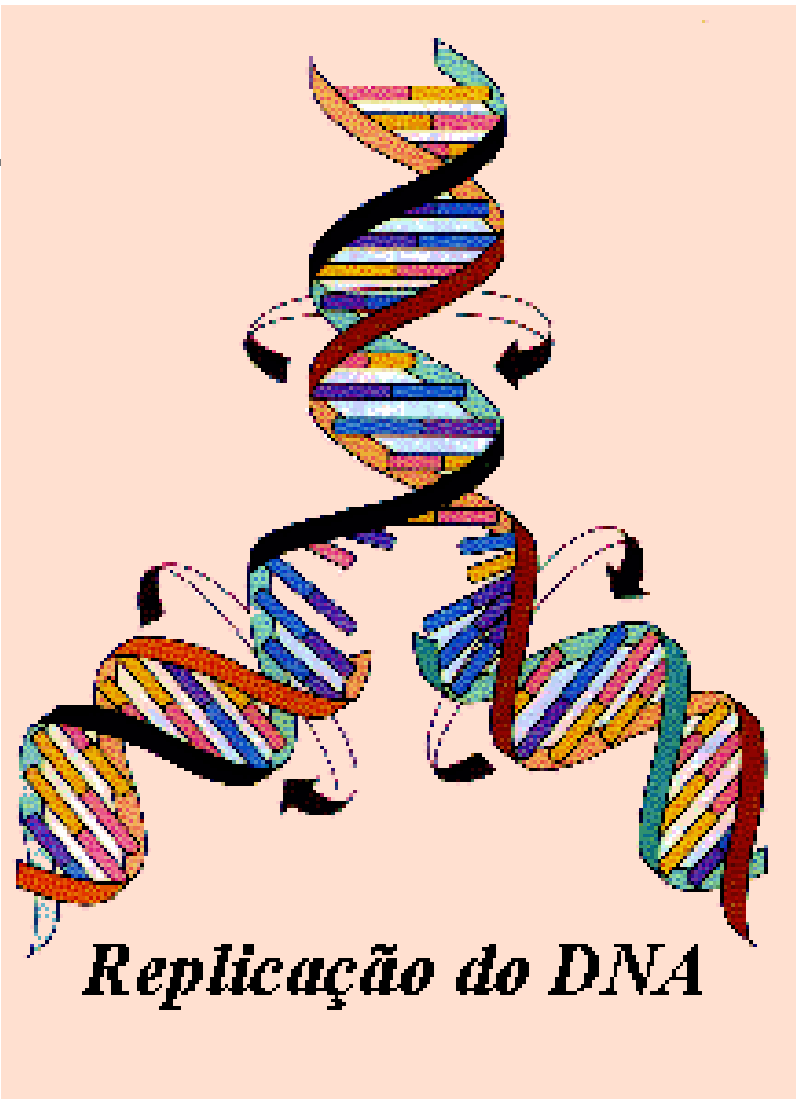




A replicação

Após a síntese das fitas pela **DNA polimerase III**, entra a **DNA polimerase I**, que retira os primers de RNA e os substitui por nucleotídeos de DNA.

Após a substituição do primer, o primeiro nucleotídeo do **fragmento de Okazaki** não está ligado ao último nucleotídeo do fragmento anterior, então uma enzima chamada **ligase** catalisa essa ligação. Assim, as duas fitas já terminadas se enrolam formando a dupla hélice.



Replicação do DNA



Transcrição

A Transcrição é o processo de formação de uma fita de RNA complementar a uma região do DNA.



Transcrição

Os RNAs formados durante a transcrição podem ser de três tipos:

- o RNAm (mensageiro) que é aquele RNA que contém a seqüência que codifica uma proteína;
- o RNAt (transportador) que carrega os aminoácidos até os ribossomos e possibilita a leitura da informação contida no RNAm durante a tradução
- RNAr (ribossômico) que faz parte da estrutura dos ribossomos



Transcrição

- A enzima responsável pela transcrição é a RNA polimerase
- A **RNA polimerase**, em procariotos é única e em eucariotos elas são em três: RNA polimerase I, II e III



Transcrição

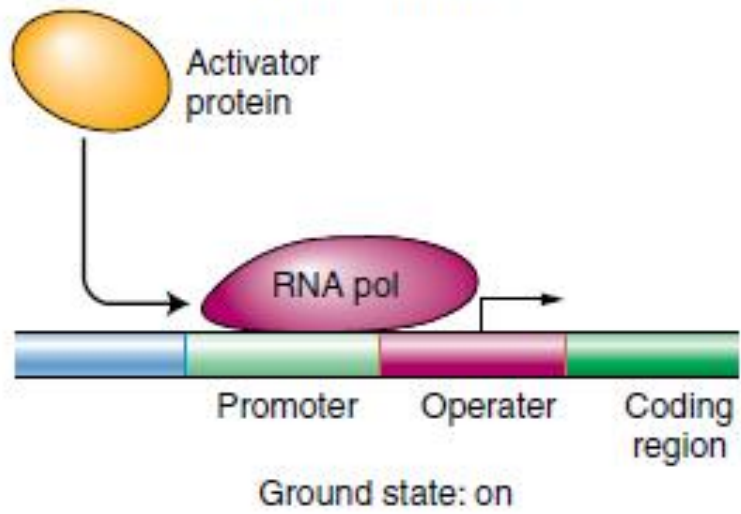
- RNA polimerase reconhece o **promotor**.
- Em procariontes o reconhecimento se dá graças ao fator sigma, que liga-se à RNA polimerase fazendo com que esta tenha maior afinidade as seqüências promotoras.



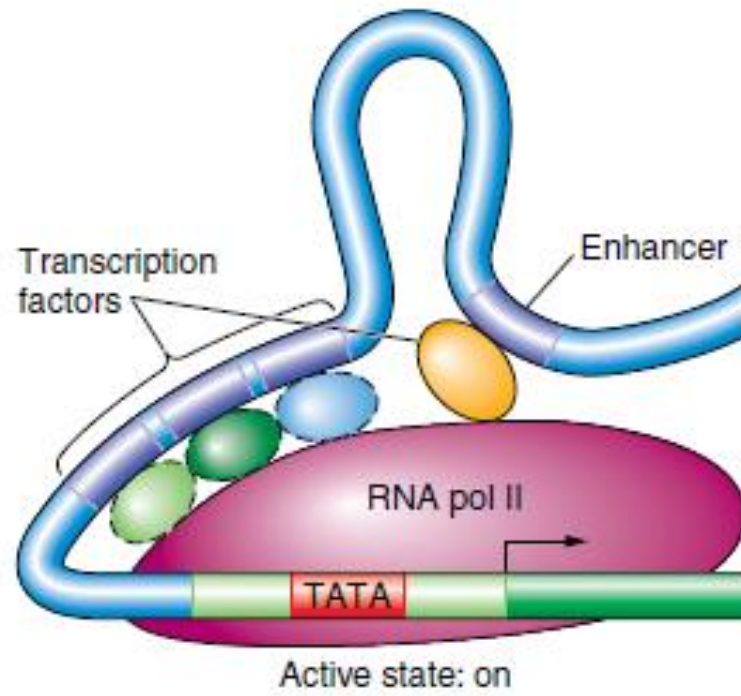
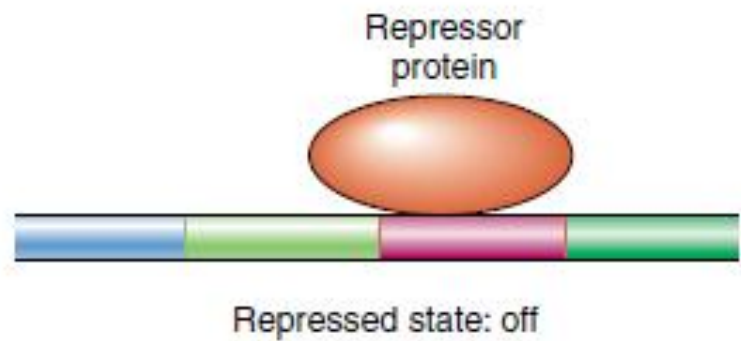
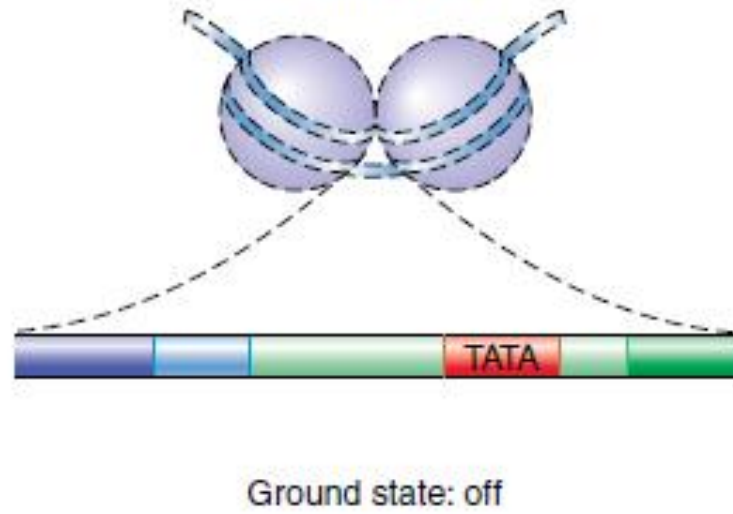
Transcrição

- Os promotores em procariotos geralmente localizam-se na região -10 e -35 do início da transcrição e as seqüências consenso mais conhecidas são o TATA box na região -10 (TATAAT) e a seqüência TTGACA na região -35
- A RNA polimerase liga-se a região promotora e inicia a síntese da fita de RNA complementar a fita molde até parar em uma região chamada terminador.

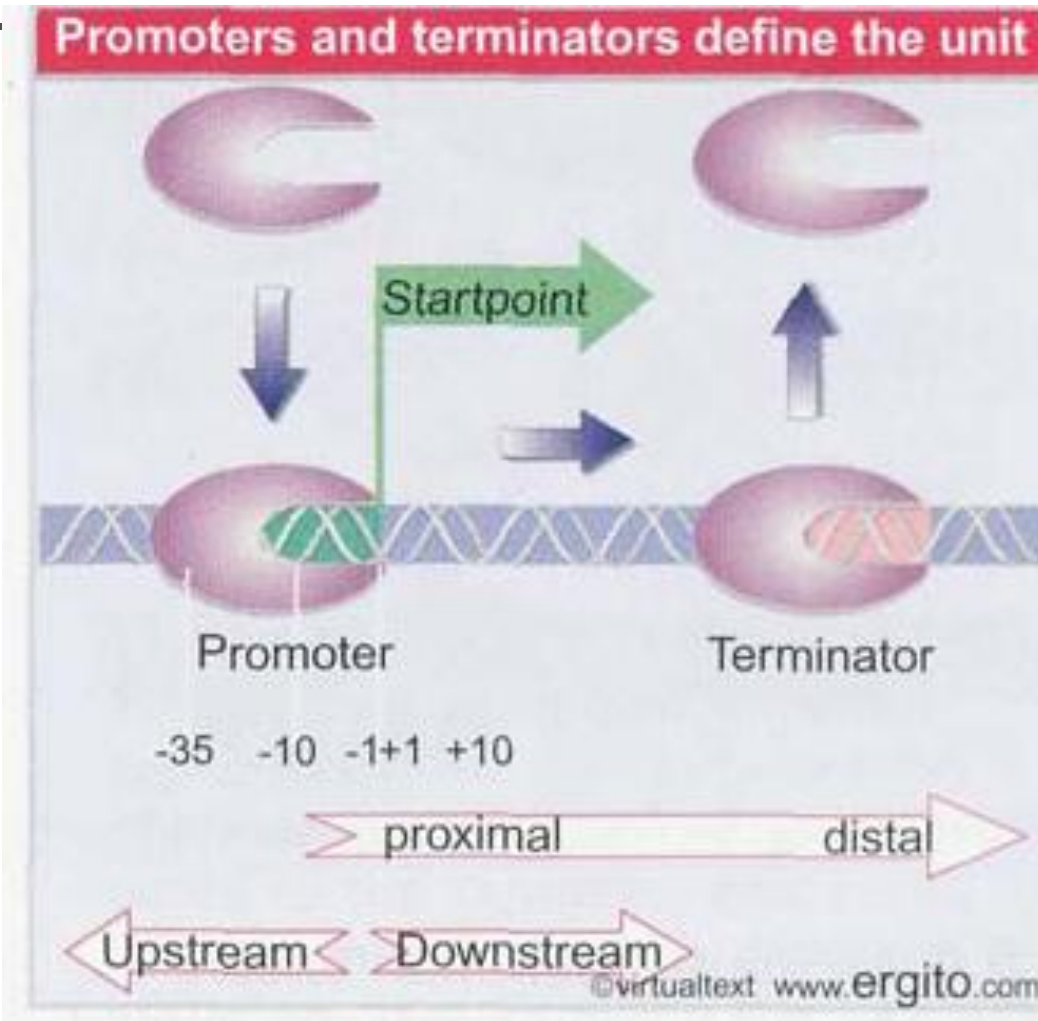
PROKARYOTIC



EUKARYOTIC



Transcrição





Transcrição

Em procariotos, que não possuem envoltório nuclear, a transcrição ocorre no mesmo lugar que ocorre a tradução.

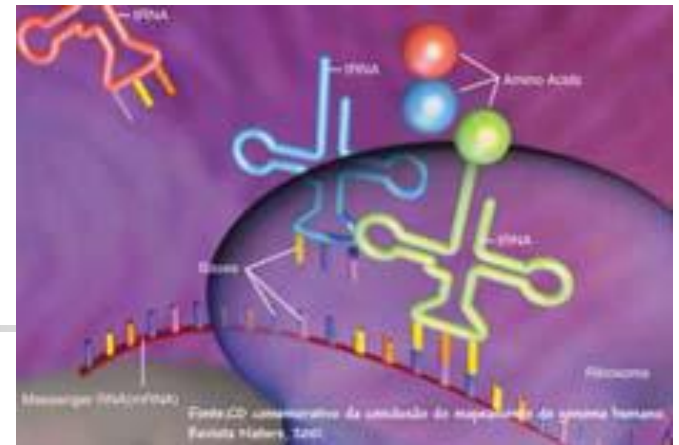


Transcrição

Nos eucariotos, o processo é muito mais complexo, envolvendo um número e diversidade maior de seqüência promotoras e de fatores de transcrição.

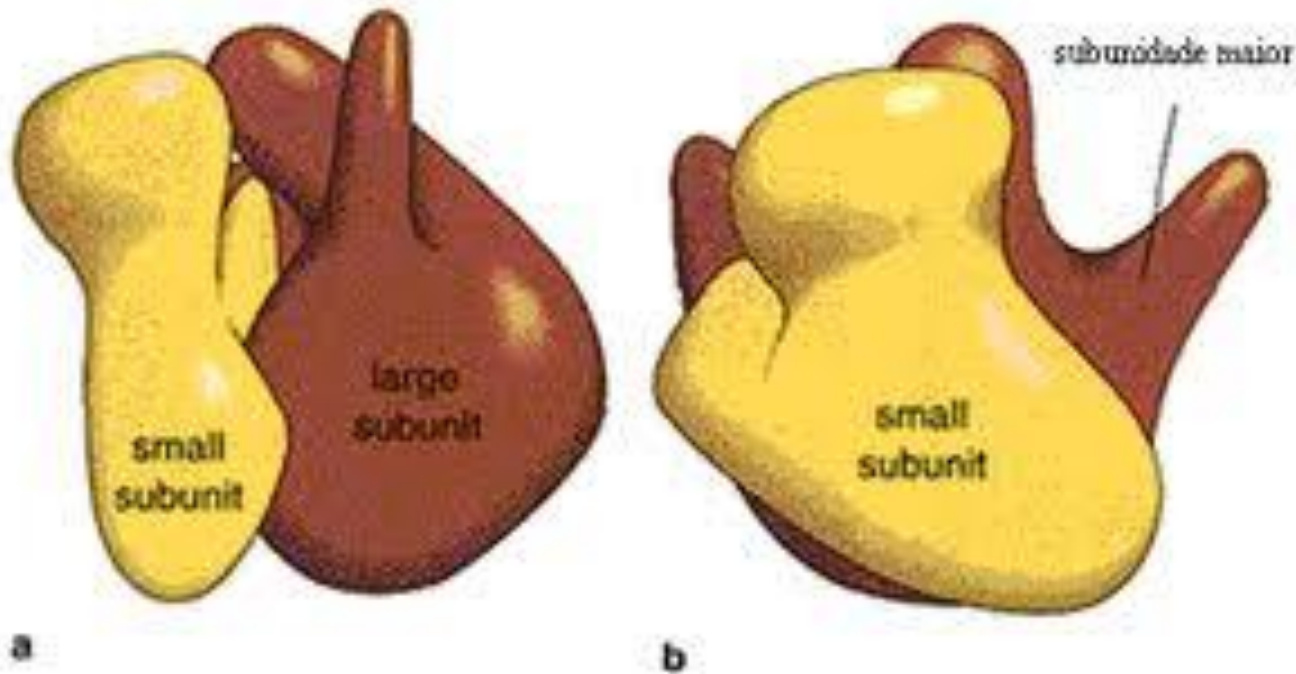
Nos eucariotos a transcrição ocorre no núcleo e a tradução ocorre no citoplasma.

Tradução



- A Tradução converte a informação na forma de trincas de nucleotídeos em aminoácidos, que darão origem a uma proteína.
- A tradução ocorre em uma estrutura citoplasmática chamada ribossomo, formada por várias proteínas e RNAr.

Ribossomos



O ribossomo é dividido em duas subunidades:
subunidade menor (30S em bactérias e 40 S em eucariotos)
subunidade maior (50S em bactérias e 60S em eucariotos)



Tradução

- No modelo bacteriano, o início da tradução se dá quando a subunidade 30S liga-se ao códon de iniciação AUG e logo em seguida o met-tRNA e a subunidade 50S ligam-se ao complexo 30S-RNA_m
- O ribossomo reconhece a trinca correta da metionina iniciadora, através do pareamento de uma seqüência do RNA_r 16S da subunidade menor com uma seqüência no RNA_m que fica próxima ao início da tradução chamada seqüência de Shine-Delgarno.



Tradução

- O ribossomo possui dois sítios de entrada da RNAt, o sítio P e A. O primeiro RNAt entra no sítio P e o segundo entra no A, algumas enzimas da subunidade 50S do ribossomo fazem a ligação do primeiro aminoácido com o segundo, promovendo a ligação peptídica, dessa forma, no sítio A ficará o segundo RNAt com um dipeptídeo.
- Através de um processo chamado translocação o ribossomo se desloca um códon a frente de forma que o dipeptídeo-RNAt fica na sítio P. A partir daí, esse processo se repete, formando um tripeptídeo no sítio A que é translocado para o sítio P formando assim sucessivamente a proteína.

Transcrição

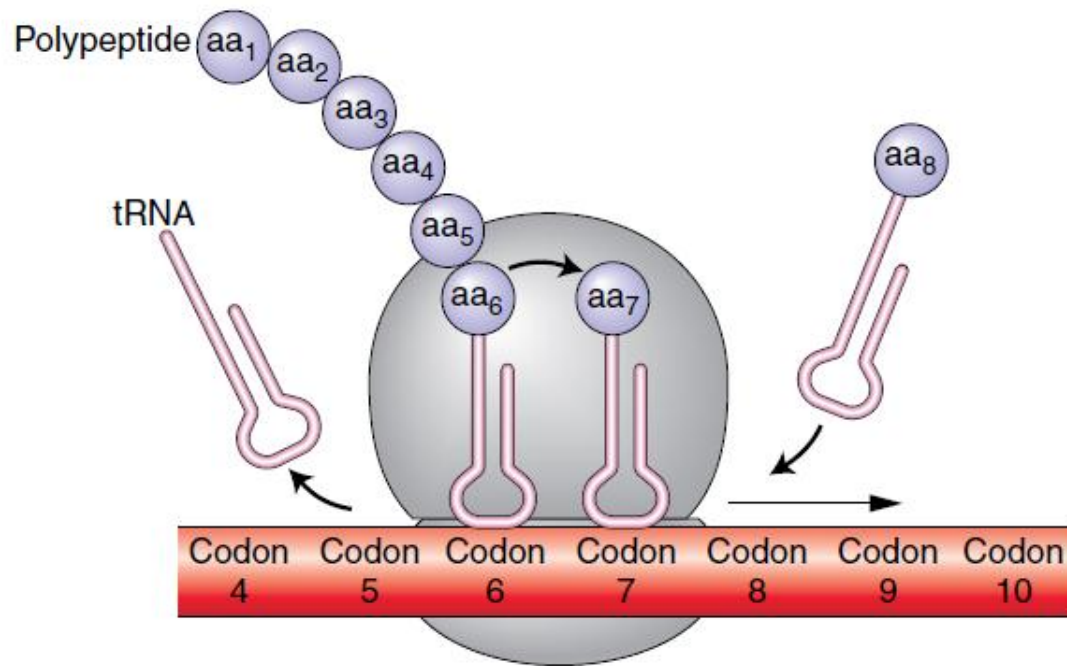


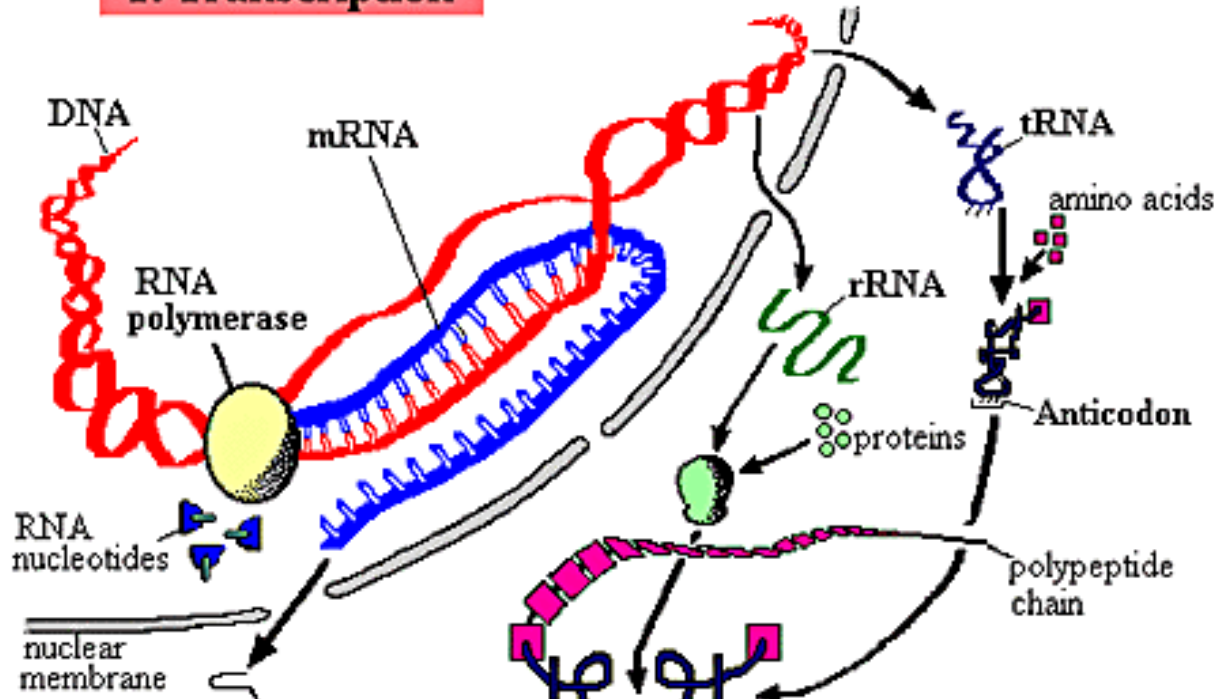
Figure 1-7 Translation. An amino acid (aa) is added to a growing polypeptide chain in the translation of mRNA.



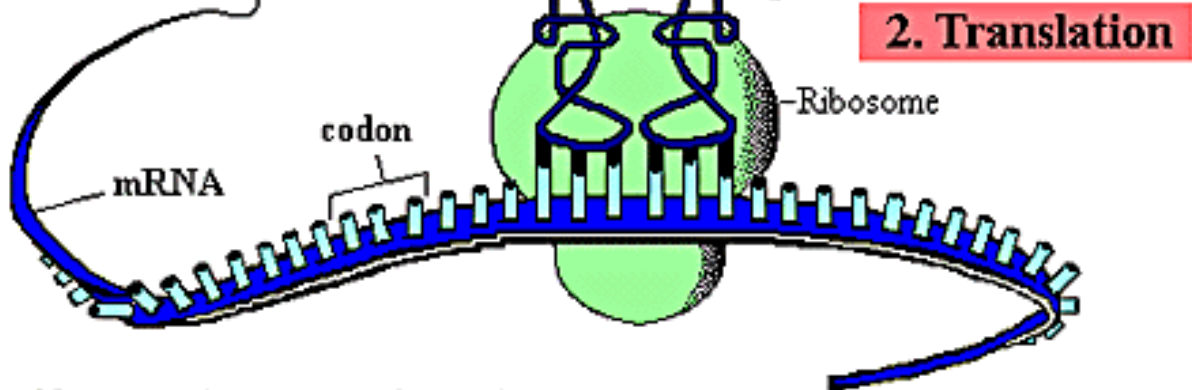
Tradução

- A tradução termina quando o ribossomo encontra um códon de terminação, que não codifica nenhum aminoácido, são eles: UGA, UAG e UAA. A estes códons se liga um fator para terminação da síntese (RF- Releasing Factor)
- Após a tradução as proteínas ainda têm que passar por algumas modificações para que possam exercer adequadamente suas funções.

1. Transcription



2. Translation



Protein synthesis



Código genético

São as instruções para sintetizar moléculas protéicas e estão inscritas em código nas moléculas de DNA dos organismos vivos.



	U	C	A	G
U	UUU	UUC	UUA	UUG
C	UCU	UCC	UCA	UCG
A	AUU	AUC	AUA	AUG
G	GUU	GUC	GUA	GUG

O código genético

		Second letter				
		U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U C A G	
	UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys		
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop		
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp		
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U C A G	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U C A G	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser		
	AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg		
	AUG Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U C A G	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly		



Características do código genético

- **Tríplice:** 3 bases = códon codificam um aa
- **Degenerado ou redundante:** um mesmo aminoácido pode ser codificado por vários códons diferentes
- **Não é ambíguo:** cada códon é corresponde a somente um aminoácido
- **Com sentido:** *Start* códon a um *stop* códon;
- **Universal:** o mesmo para todos seres vivos
- **Utilização preferencial de códons:** *codon usage*

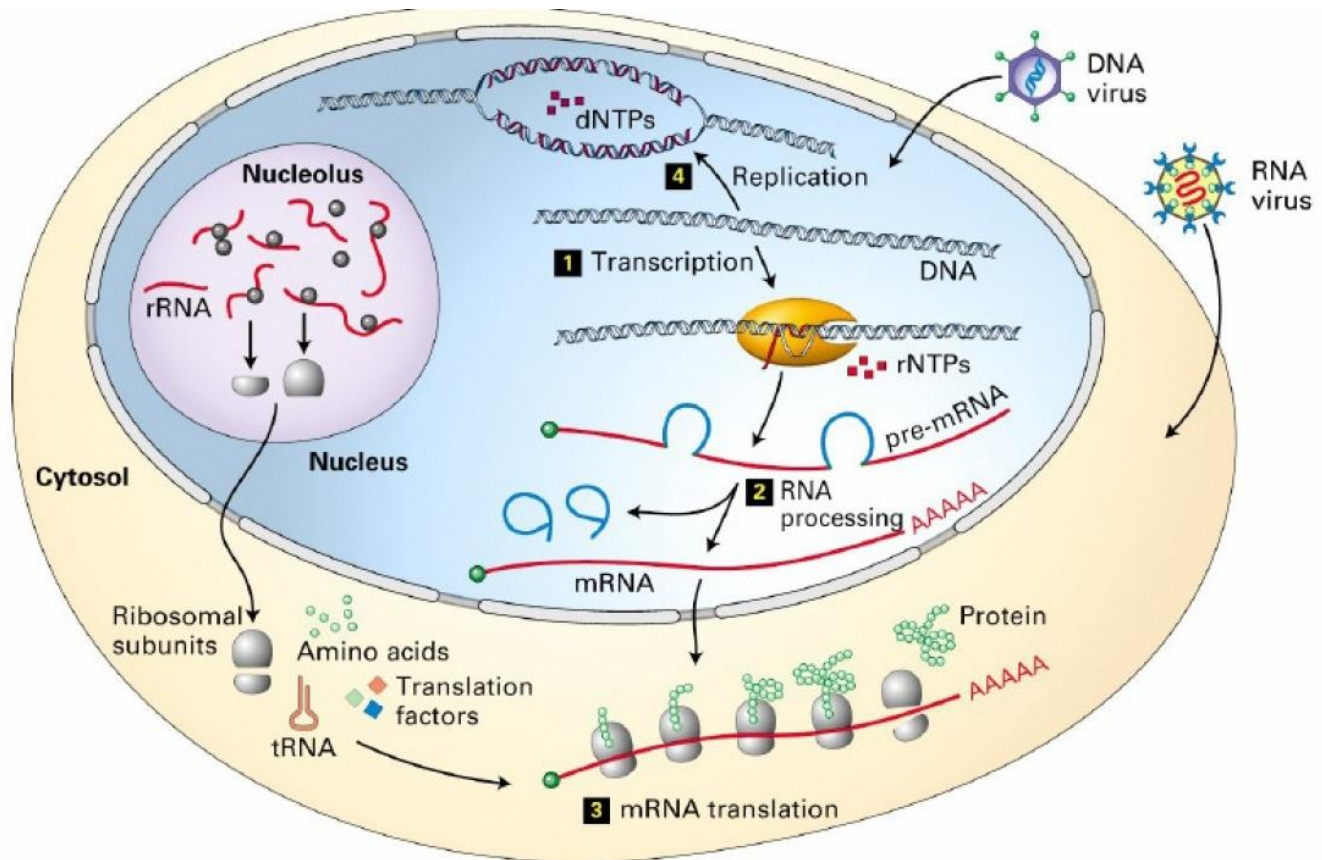


Código genético

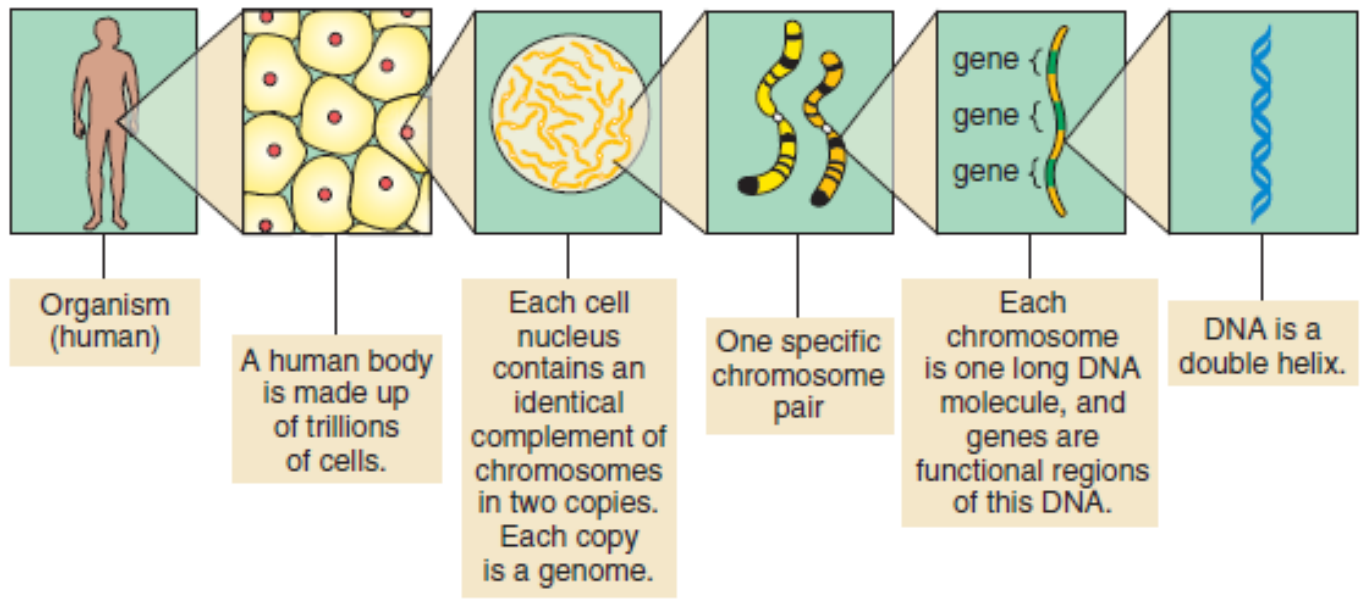
Trincas do Código Genético

- Cada trinca de nucleotídeo do DNA corresponde a um aa na proteína.
- A combinação das 4 letras genéticas TACG, 3 a 3, permite obter 64 trincas diferentes.
- 61 correspondem a aminoácidos e 3 correspondem a códons de terminação; **UAA**, **UAG** e **UGA**.

Replicação, transcrição e tradução

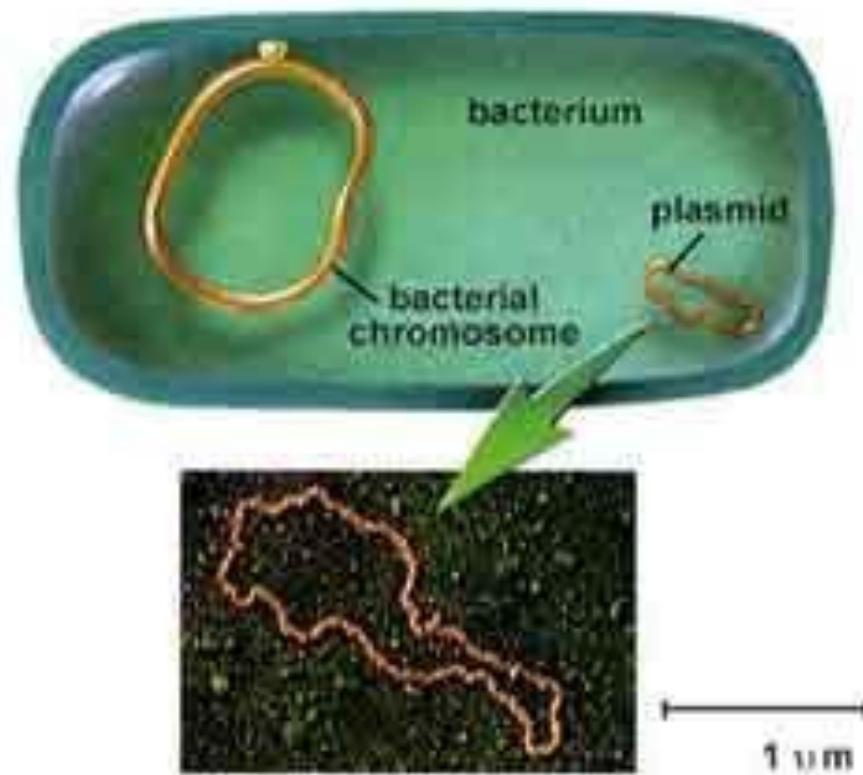


Genoma: organização



Os genomas

Organismos Procarióticos: Bactérias



Genoma de *E.coli*

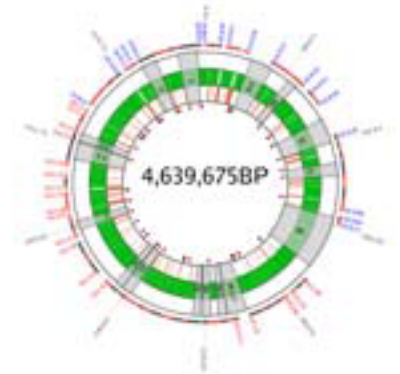
Cromossomo + Plasmídeos

O genoma da *E. coli*

4.639 kb

2.400 genes 80% da molécula de DNA

1.897 genes codificantes de proteínas





Os plasmídeos

“Elemento genético, extra-cromossômico, capaz de replicar independente do cromossomo”

- Dupla fita de DNA; Circular
- 1 – 100(+) Kb
- Não causam danos às células
- Não são formas extracelulares
- Não contém genes essenciais

Biologia Molecular: Conceitos e Técnicas



PCR
Sequenciamento de DNA
etc.....