

A Molécula da Vida

CONTEÚDO

A HISTORIA DA GENETICA	2
Modelo de dupla hélice	6
A descoberta de Chargaff.....	6
Análises por difração de raios X	8
A descoberta de Watson e Crick.....	9
Evidencias da replicação semiconservativa	13
O teste da hipótese da replicação semiconservativa	15
A Molécula da Vida.....	21
Propriedades físicas e químicas do DNA	24
Duplicação do DNA.....	25
Mutações Gênicas	26
RNA.....	27
TRANSCRIÇÃO.....	32
Biossíntese das proteínas (TRADUÇÃO)	34
CÓDON E CÓDIGO GENÉTICO	35
ANTICÓDON.....	37
DNA polimerase I.....	38
<i>Atividade processiva:</i>	39
DNA polimerase II.....	40
DNA polimerase III.....	41
Helicase	41
Síntese do primer de RNA	41
Características da polimerase I do DNA	43
A reação de deslocamento do corte.....	43

A Molécula da Vida

A HISTORIA DA GENETICA

A descoberta do DNA ocorreu em 1869 e foi feita pelo bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher¹ (1844 - 1895). Miescher buscava determinar os componentes químicos do núcleo celular e usava os glóbulos brancos contidos no pus para suas pesquisas. Os glóbulos brancos eram um bom material, pois são células que apresentam núcleos grandes e fáceis de serem isolados do citoplasma. Além disso, o pus era muito fácil de conseguir na época em ataduras usadas em ferimentos.

Analisando os núcleos, Miescher descobriu a presença de um composto de natureza ácida que era desconhecido até o momento. Esse composto era rico em fósforo e em nitrogênio, era desprovido de enxofre e resistente à ação da pepsina (enzima proteolítica). Esse composto, que aparentemente era constituído de moléculas grandes, foi denominado, por Miescher, nucleína. Essa substância foi isolada também da cicatrícula¹ da gema do ovo de galinha e de espermatozóides de salmão.

Em 1880, outro pesquisador alemão, Albrecht Kossel² (1883 - 1927), demonstrou que a nucleína continha bases nitrogenadas em sua estrutura, explicando o fato da nucleína ser rica em nitrogênio. Nove anos depois, Richard Altmann³ (1852 - 1900), que era aluno de Miescher, obteve a nucleína com alto grau de pureza, comprovando sua natureza ácida e dando-lhe, então, o nome de ácido nucléico.

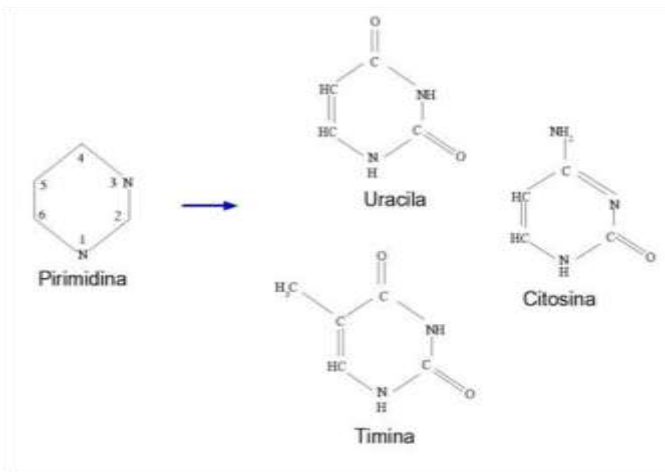
¹ Mancha branca na gema do ovo indicativa do germe.

A Molécula da Vida

A partir daí, o material mais utilizado para estudo e obtenção do ácido nucléico passou a ser o timo de bezerro, cujo tecido apresenta células com núcleos grandes. Foi descoberto que a degradação do ácido nucléico do timo, chamado de ácido timo nucléico, liberava quatro tipos de bases nitrogenadas:

As bases nitrogenadas são compostas com esqueleto em anel contendo Nitrogênio. Elas podem ser de dois tipos:

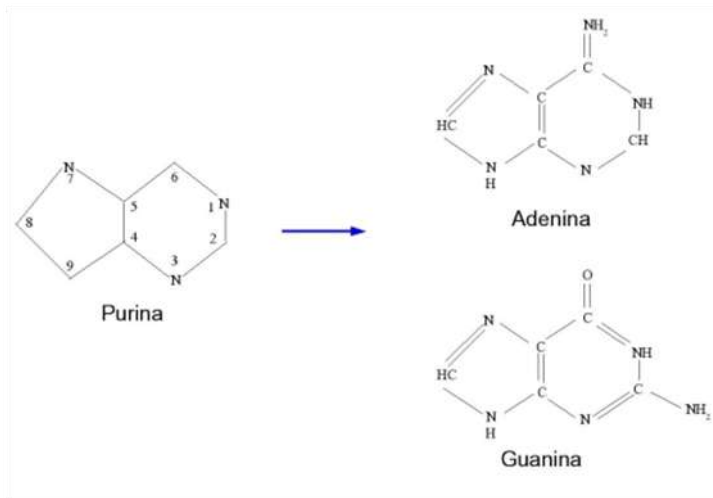
Pirimídicas: derivadas do composto pirimidina e contém apenas um anel



hexagonal

Púricas: derivadas do composto purina e contém dois anéis, um hexagonal e outro pentagonal

A Molécula da Vida



Foi demonstrado também que outro produto da degradação do ácido nucléico era um glicídio com 5 átomos de carbono, uma pentose, no caso uma desoxirribose. O fósforo estava presente na forma de um derivado do ácido fosfórico, fosfato. Tinha-se até o momento que o ácido nucléico era composto de bases nitrogenadas (púricas e pirimídicas), de um glicídio (pentose) e de fosfato.

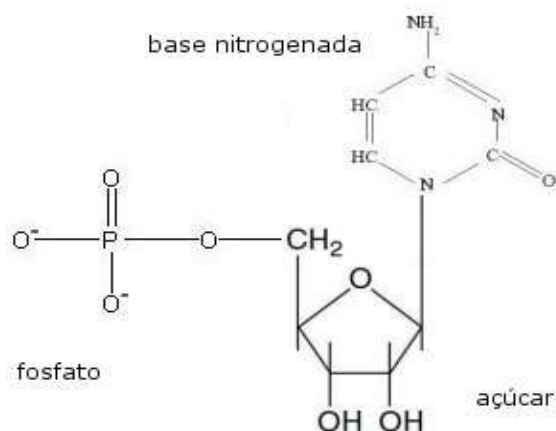
Em 1890, foi descoberto em levedura (fermento) outro tipo de ácido nucléico, que possuía uracila ao invés de timina e ribose ao invés da desoxirribose. Dessa maneira, foram caracterizados dois tipos de ácidos nucléicos, de acordo com o glicídio que possuíam:

- ácido ribonucléico (RNA)
- ácido desoxirribonucléico (DNA)

Em 1912, Phoebus Levine⁴ (1869 - 1940) e Walter Jacobs (1883 - 1967) concluíram que o componente básico dos ácidos nucléicos era

A Molécula da Vida

uma estrutura composta por uma unidade que se constituía numa base nitrogenada ligada a uma pentose, e esta por sua vez, ligada a um fosfato. Esta unidade foi denominada de nucleotídeo².



Um ácido nucléico seria então uma molécula composta por vários nucleotídeos unidos entre si, ou seja, um polinucleotídeo.

Os estudos dos ácidos nucléicos continuaram por muitos anos sem que os cientistas soubessem de sua importância como material hereditário, descoberta que só foi realizada muitos anos depois.

A hipótese de que o DNA era a molécula que continha as instruções hereditárias foi levantada anos após a descoberta de sua existência no núcleo das células.

Dois clássicos experimentos contribuíram para isso. O primeiro deles foi à identificação do material hereditário em bactérias, que levou à conclusão, em 1944, de que o princípio transformante das bactérias era

² Um nucleotídeo consiste de uma base nitrogenada, um açúcar com cinco átomos de carbono e um ou mais grupos fosfato.

A Molécula da Vida

o DNA. O outro experimento foi o da identificação do material hereditário de fagos, que, em 1952, revelou que apenas o DNA do fago penetrava e se multiplicava nas bactérias gerando novos fagos.

Após a descoberta de que o DNA era o material hereditário, iniciou-se uma série de pesquisas que buscavam elucidar sua estrutura, e entender quais características permitiam ao DNA ser o banco de memória da informação hereditária.

Foram realizados experimentos que levaram a proposta do **modelo da dupla hélice** do DNA (1953), experimentos que evidenciaram a replicação semiconservativa (1958) e um experimento que permitiu a visualização da replicação do cromossomo bacteriano (1960).

MODELO DE DUPLA HÉLICE

A descoberta de que o DNA era realmente o material hereditário fez com que diversos pesquisadores voltassem sua atenção para a elucidação da estrutura dessa molécula. A pergunta que se fazia na época era:

QUE CARACTERÍSTICAS PERMITIAM AO DNA SER O BANCO DE MEMÓRIA DA INFORMAÇÃO HEREDITÁRIA?

O grande desenvolvimento das técnicas biofísicas e bioquímicas que havia ocorrido no período pós Segunda Guerra Mundial, permitiu que, em menos de 10 anos, a estrutura físico-química do DNA fosse elucidada.

A DESCOBERTA DE CHARGAFF

A Molécula da Vida

No período de 1949 a 1953, estudos realizados no laboratório de Erwin Chargaff (1905-2002), deram uma contribuição importante para a elucidação da estrutura do DNA.

Chargaff e colaboradores buscaram quantificar cada um dos tipos de base nitrogenada do DNA (adenina, timina, citosina e guanina) de várias espécies. Para isso utilizaram métodos de cromatografia.

Podemos ver na tabela a seguir alguns dos resultados obtidos:

Tabela I: Proporções molares de bases em DNA de diversas espécies

Os resultados que Chargaff e sua equipe conseguiram, levaram a importantes conclusões sobre a composição de bases nitrogenadas do DNA. Foi verificado que:

1 - Essa composição variava de uma espécie pra outra, mas que era constante dentro da mesma espécie.

2 - Em qualquer DNA, de qualquer espécie, a porcentagem da base

Organismo	Tecido	A	T	G	C	$\frac{A+T}{G+C}$
<i>E. coli</i>	-	26,0	23,9	24,9	25,2	1,00
<i>S. pneumoniae</i>	-	29,8	31,6	20,5	18,0	1,59
<i>M. tuberculosis</i>	-	15,1	14,6	34,9	35,4	0,42
Levedura	-	31,3	32,9	18,7	17,1	1,79
Ouriço do mar	esperma	32,8	32,1	17,7	18,4	1,85
Arenque	esperma	27,8	27,5	22,2	22,6	1,23
Rato	medula óssea	28,6	28,4	21,4	21,5	1,33
Homen	timo	30,9	29,4	19,9	19,8	1,52
Homen	figado	30,3	30,3	19,5	19,9	1,53
Homen	esperma	30,7	31,2	19,3	18,8	1,62

A Molécula da Vida

timina era sempre igual a da base adenina, e a porcentagem da base citosina era igual a da base guanina.

Ou seja, enquanto a proporção entre as bases varia entre as espécies, o total de base púricas (A + G) é igual ao total de bases pirimídicas (T + C): $A = T$

$$\frac{A}{T} = 1$$

$$\frac{G}{C} = 1$$

$$\frac{A+G}{T+C} = 1$$

ANÁLISES POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Enquanto alguns grupos se dedicavam à análise química do DNA, outros estudavam a estrutura da molécula por meio da difração de raios-X, uma metodologia que vinha sendo usada e que estava dando formidáveis conclusões sobre a estrutura das proteínas.

Os resultados mais importantes de difração de raios-x sobre a molécula de DNA foram obtidos por Maurice Wilkins (n. 1916) e Rosalind Franklin (1920 - 1958). Os resultados obtidos indicavam que o DNA tinha uma estrutura helicoidal.

Mas, de que maneira as fotografias obtidas por difração de raios-x indicavam essa estrutura helicoidal do DNA? A seguir podemos ver uma imagem obtida pela difração de raios-x. Ao clicar na imagem abaixo, podemos ver uma breve explicação sobre como a difração de raios-X funciona elucidando a estrutura da molécula de DNA.

A Molécula da Vida

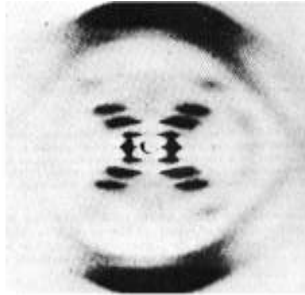


Figura 1: Reprodução parcial da figura original:

Com base nos dados bioquímicos e cristalográficos então disponíveis, diversos modelos para o DNA foram propostos. Alguns autores imaginaram que a molécula fosse constituída por duas fitas polinucleotídicas com as bases voltadas para dentro, porém sem qualquer relação específica entre elas. Outros imaginaram duas fitas com as bases voltadas para fora, ou ainda, três fitas entrelaçadas com as bases também voltadas para fora.

A DESCOBERTA DE WATSON E CRICK

Em 1953, James Watson (n. 1928) e Francis Crick (n. 1916) apresentaram um modelo compatível com os resultados experimentais que haviam sido obtidos até o momento. Esse modelo serviu de base para experimentos históricos que confirmaram sua hipótese inicial. A estratégia empregada por esses dois pesquisadores foi à construção de um modelo molecular que levava em conta o tamanho e configuração espacial dos nucleotídeos e ainda respeitava os dados de Chargaff e os dados obtidos pela difração de raios-X.

A Molécula da Vida

Segundo o modelo proposto por Watson e Crick, a molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice ao redor de um eixo imaginário, girando para a direita (uma hélice dupla).



Figura 2: <http://www.ocf.berkeley.edu/~bsj/images/dna.gif>

As duas cadeias polinucleotídicas mantêm-se unidas por pontes de hidrogênio, que se estabelecem entre pares de bases específicos: adenina com timina e citosina com guanina. Assim, as duas cadeias que constituem um segmento de DNA, são complementares entre si: onde em uma cadeia existir uma timina, na outra existirá uma adenina, e onde em uma existir uma guanina, na outra existirá uma citosina.

Além disso, o modelo prediz que as duas cadeias polinucleotídicas são antiparalelas, ou seja, elas têm polaridades opostas. As ligações fosfodiéster estão orientadas no sentido 3' => 5', ou seja, do carbono 3' de um nucleotídeo ao carbono 5' do nucleotídeo adjacente, enquanto que na fita complementar a orientação é inversa, do carbono 5' ao 3' (5' => 3').

A Molécula da Vida

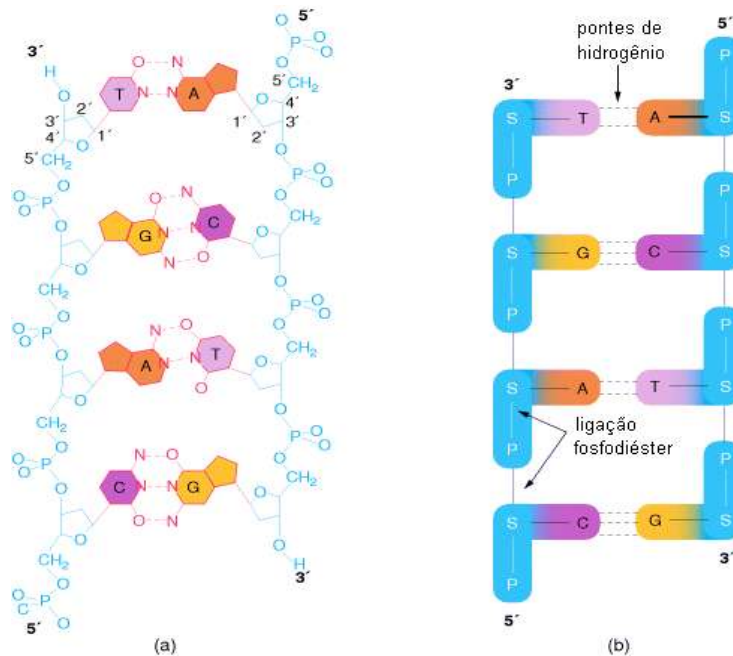


Figura 4 -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/books/bookres.fcgi/mga/ch2f2.gif>

Na figura 4, vemos um arranjo dos componentes do DNA. Um segmento da dupla hélice do DNA foi aberto para mostrar as estruturas claramente:

(a) Um diagrama químico detalhado mostrando o esqueleto de açúcar-fosfato em azul e o hidrogênio ligando as bases no centro da molécula. Podemos ver o emparelhamento das bases (A-T, C-G).

(b) Uma versão simplificada do mesmo segmento, enfatizando o arranjo antiparalelo dos nucleotídeos, que está representado como as estruturas das figuras-L com o fosfato 5 na ponta do "L" e o 3 no vértice do "L".

A Molécula da Vida

Os estudos de difração de raios-X haviam revelado que o diâmetro externo da dupla hélice é de cerca de 2 nm, enquanto que a distância entre os açúcares é de 1,1 nm. Assim, os pares de bases A-T e C-G têm o diâmetro exato para caber dentro da dupla hélice. Isso indicou que uma purina sempre se emparelha com uma pirimidina, porque o emparelhamento purina-purina ou pirimidina-pirimidina não tem diâmetros que se ajustem ao diâmetro interno da dupla hélice.

A hélice dá uma volta completa a cada 3,4 nm, que corresponde a cerca de 10 pares de bases. Assim, a distância entre dois pares de bases vizinhas é de 0,34 nm. As bases timina e adenina são emparelhadas por duas pontes de hidrogênio, enquanto que a guanina com a citosina são emparelhadas por três pontes de hidrogênio, como podemos ver na figura 3 acima.

Se pensarmos na hélice de DNA como uma estrutura cilíndrica, com cerca de 2 nm de diâmetro, notaremos que a superfície da molécula é irregular, formando 2 sulcos ou depressões, de tamanhos diferentes, que giram ao longo de todo o seu comprimento. O sulco menor resulta da depressão entre as duas cadeias complementares, enquanto que o sulco maior resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice. Os sulcos são importantes porque deixam livres superfícies para a interação entre o DNA e as proteínas.

A Molécula da Vida

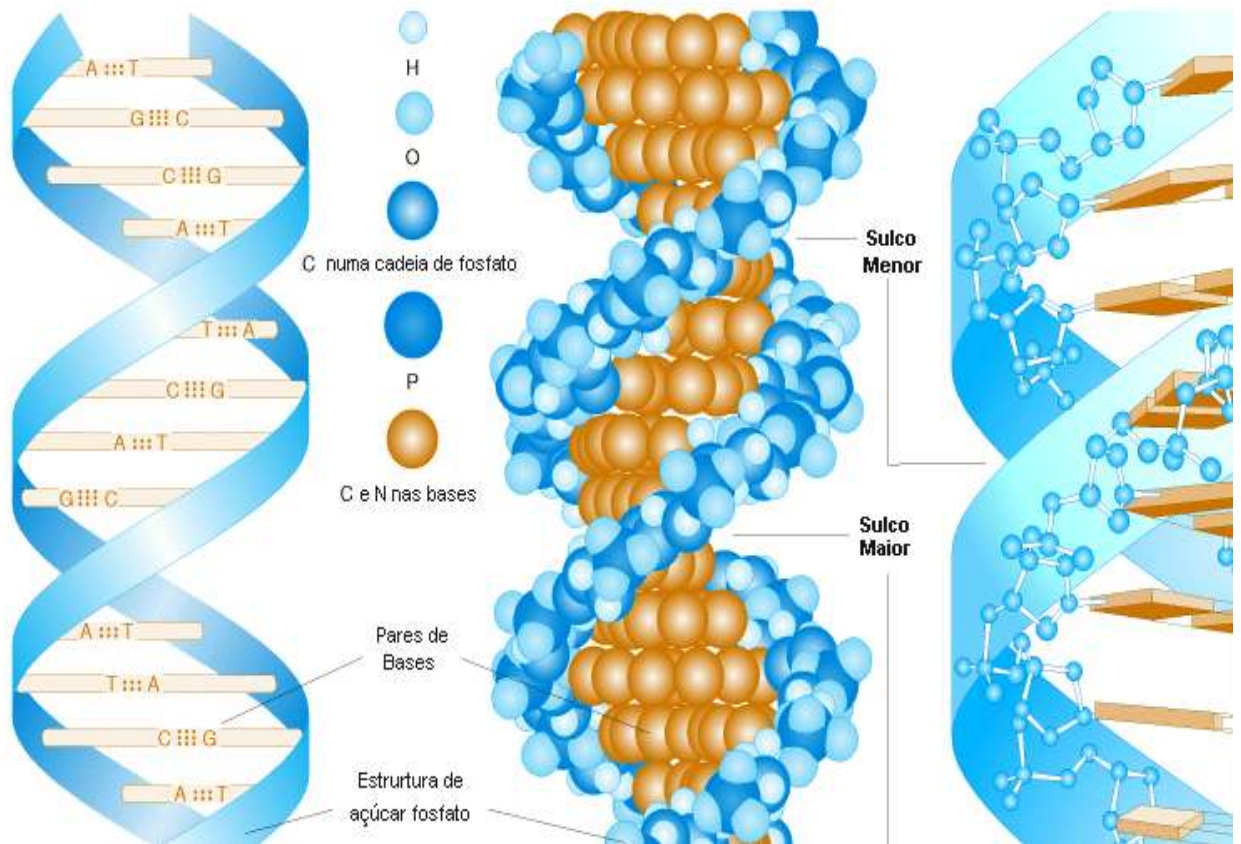


Figura 5 -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/books/bookres.fcgi/mga/ch2f3.gif>

EVIDENCIAS DA REPLICAÇÃO SEMICONSERVATIVA

já se sabia que o DNA era a molécula que continha as informações hereditárias e já se tinha um modelo para sua estrutura. Faltava uma proposta para como essa molécula se replicava, isto é, se reproduzia.

Uma hipótese para a replicação da molécula de DNA foi proposta por Watson e Crick em 1953, em seguida à proposta do modelo de sua estrutura. Watson e Crick imaginaram que durante a replicação do DNA,

A Molécula da Vida

cada uma das duas cadeias da molécula serviria como um molde para a confecção de uma nova cadeia complementar. Dessa forma, uma molécula de DNA, ao se replicar, produziria duas moléculas filhas, idênticas à molécula mãe original, cada uma delas contendo uma das cadeias da molécula mãe antiga, e uma nova cadeia, recém-sintetizada.

De acordo com essa hipótese, metade da molécula de DNA é conservada a cada replicação, portanto, esse mecanismo de reprodução do DNA foi chamado de replicação semiconservativa.



Figura 1 - Representação esquemática da replicação semiconservativa.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/books/bookres.fcgi/hmg/ch1f8.gif>

Cores sólidas - DNA original que consiste de duas hélices complementares, antiparalelas que se abrem através da quebra das pontes de hidrogênio.

Cores sem preenchimento - Nova hélice complementar antiparalela que é sintetizada a partir da molécula original que atua como molde.

A Molécula da Vida

O TESTE DA HIPÓTESE DA REPLICAÇÃO SEMICONSERVATIVA

Tendo a hipótese da replicação semiconservativa, o próximo passo era testar essa hipótese. Esse teste foi possível graças ao desenvolvimento das técnicas de análise bioquímica que ocorreu ao longo da década de 1950.

Esse teste foi feito pela primeira vez em 1958 pelos pesquisadores Matthew Meselson (n. 1930) e Franklin Stahl (n. 1929). Eles trabalharam com a marcação do DNA por incorporação de nitrogênio pesado ^{15}N .

Meselson e Stahl imaginaram que, se as duas cadeias polinucleotídicas de uma molécula de DNA fosse marcadas, seria possível fazer uma previsão sobre o destino dessas cadeias no decorrer das gerações celulares subsequentes. Segundo a previsão:

- a) após uma replicação, ambas as moléculas filhas estariam marcadas e cada uma delas conteria metade da marcação da molécula mãe original.
- b) após duas replicações, metade das moléculas estaria marcada e, a outra metade não. A metade marcada conteria a mesma marcação que as moléculas originais (que foram geradas na primeira replicação).

O teste da hipótese semiconservativa foi possível porque na época os autores dispunham de métodos eficientes para marcar as moléculas de DNA assim como para separar as moléculas marcadas das não-marcadas, e entre as marcadas, distinguir as moléculas com diferentes quantidades de marcação.

Meselson e Stahl marcaram as moléculas parentais de DNA com um isótopo pesado, mas não radioativo, do nitrogênio, o ^{15}N . Eles fizeram

A Molécula da Vida

isso cultivando *Escherichia coli* em um meio de cultura no qual a única fonte de nitrogênio disponível era um sal contendo o isótopo ^{15}N . Após 14 gerações nesse meio de cultura, pôde-se prever que todo o DNA das bactérias continha ^{15}N ao invés de ^{14}N . As bactérias foram, então, transferidas para um meio de cultura contendo apenas a forma leve do nitrogênio, o ^{14}N . Assim, todo o DNA sintetizado a partir desse momento, seria sintetizado com o ^{14}N , e não mais com ^{15}N .

De acordo com a hipótese da replicação semiconservativa era previsto que, após um ciclo de replicação no novo meio de cultura (contendo apenas ^{14}N), cada nova molécula de DNA conteria 50% de ^{15}N e 50% de ^{14}N ; e, após dois ciclos de replicação, metade das moléculas de DNA conteria apenas ^{14}N enquanto que a outra metade seria 50% ^{15}N e 50% ^{14}N , conforme podemos ver no esquema mostrado na figura a seguir.

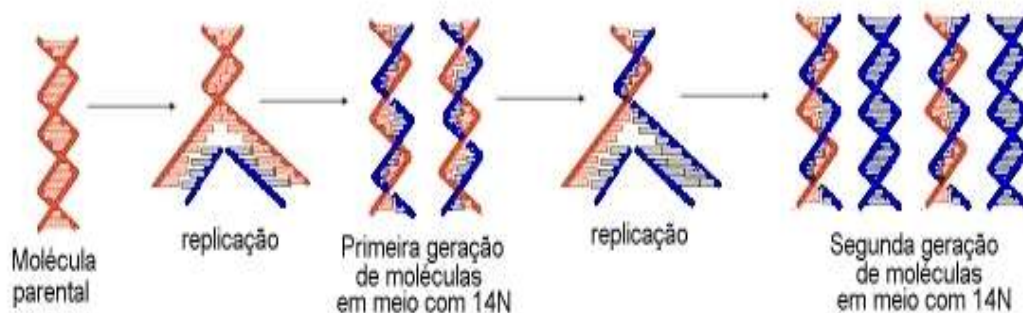


Figura 2 - Resultados previstos caso a replicação do DNA fosse semiconservativa.

Modificada a partir de <http://ntri.tamuk.edu/cell/semiconservative.gif>

Fita clara (vermelha) = ^{15}N Fita escura (azul) = ^{14}N

A Molécula da Vida

Agora, de que maneira foi possível identificar os diferentes tipos de molécula (contendo diferentes quantidade de ^{14}N e ^{15}N) para verificar se a previsão se confirmava?

A distinção entre os diferentes tipos de DNA foi possível graças à técnica analítica desenvolvida por Jerome Vinograd², que ficou conhecida como centrifugação de equilíbrio em gradiente de densidade. O gradiente de densidade se forma quando uma solução de cloreto de céσιο é submetida a uma ultra centrifugação. O sal de céσιο fica distribuído em concentrações gradativamente maiores, do topo para o fundo do tubo de ensaio, de modo que a solução é mais densa no fundo e menos densa no topo. Quando moléculas são misturadas a uma solução de cloreto de céσιο, e essa mistura é submetida a uma ultra centrifugação, as moléculas se posicionarão no gradiente de densidade do céσιο, em uma faixa correspondente à sua própria densidade.

Moléculas de DNA com diferentes proporções de ^{14}N e ^{15}N tem densidades diferentes e, portanto, se posicionarão em regiões diferentes no tubo de ensaio de acordo com a proporção que possuem desse elemento. O ^{15}N é mais denso que o ^{14}N , portanto teremos as moléculas de DNA distribuídas da seguinte maneira no tubo:



A Molécula da Vida

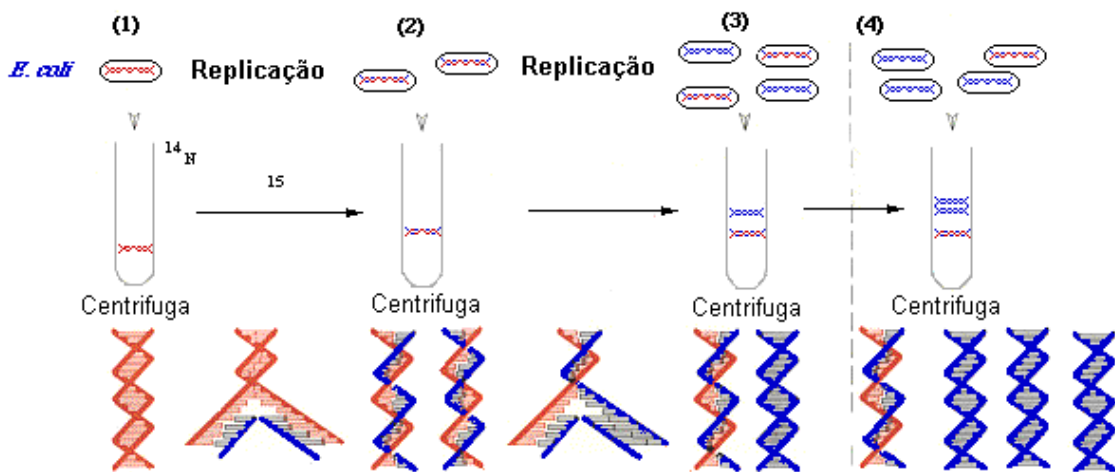
Em seu experimento, Meselson e Stahl verificaram, que:

1 - moléculas de DNA extraídas de bactérias cultivadas em meio normal com ^{14}N formavam uma faixa na parte superior do gradiente de cloreto de céσιο, ou seja, tinham uma densidade relativamente baixa.

2 - O DNA extraído de bactérias cultivadas por 14 gerações em ^{15}N formava uma faixa na parte inferior do gradiente, isto é, tinha uma densidade relativamente alta.

3 - O DNA extraído da primeira geração produzida a partir de bactérias marcadas com ^{15}N e cultivadas em ^{14}N ficavam numa posição intermediária do gradiente, entre as duas anteriores.

4 - O DNA extraído da segunda geração produzida a partir de bactérias marcadas com ^{15}N e cultivadas em ^{14}N formavam duas faixas no gradiente de céσιο, uma correspondente as moléculas não-marcadas (^{14}N) e outra correspondente às moléculas contendo 50% ^{14}N e 50% ^{15}N .



A Molécula da Vida

Figura 3 - Resultados do experimento de Meselson e Stahl.
Modificada a partir de <http://ntri.tamuk.edu/cell/semiconservative.gif>

(1) DNA da *E. coli* todo marcado com ^{15}N após 14 gerações. DNA com alta densidade no fundo do tubo de ensaio.

(2) Primeiro ciclo de replicação. Temos todas as moléculas filhas marcadas (50% ^{15}N , 50% ^{14}N). DNA com densidade média em posição intermediária no tubo de ensaio.

(3) Temos metade das moléculas não-marcadas (apenas ^{14}N) e metade marcada (50% ^{15}N , 50% ^{14}N). As moléculas de DNA ocupam duas faixas no tubo de ensaio, uma de densidade mais leve (posição mais alta) e outra de densidade média (posição intermediária)

(4) Temos 75% das moléculas não-marcadas e 25% das moléculas marcadas (50% ^{15}N , 50% ^{14}N). As moléculas de DNA ocupam duas faixas no tubo de ensaio, uma, em maior quantidade, de densidade mais leve (posição mais alta) e outra de densidade média (posição intermediária).

Os resultados experimentais concordaram, portanto, com a previsão da hipótese da replicação semiconservativa do DNA, a qual foi, então, aceita como verdadeira.

Podemos ver na figura a seguir o modelo da replicação conservativa e o da semiconservativa e as fotografias da absorção da luz UV obtidas, mostrando as bandas de DNA no gradiente de cloreto de cério, comprovando a teoria da replicação semiconservativa.

A Molécula da Vida

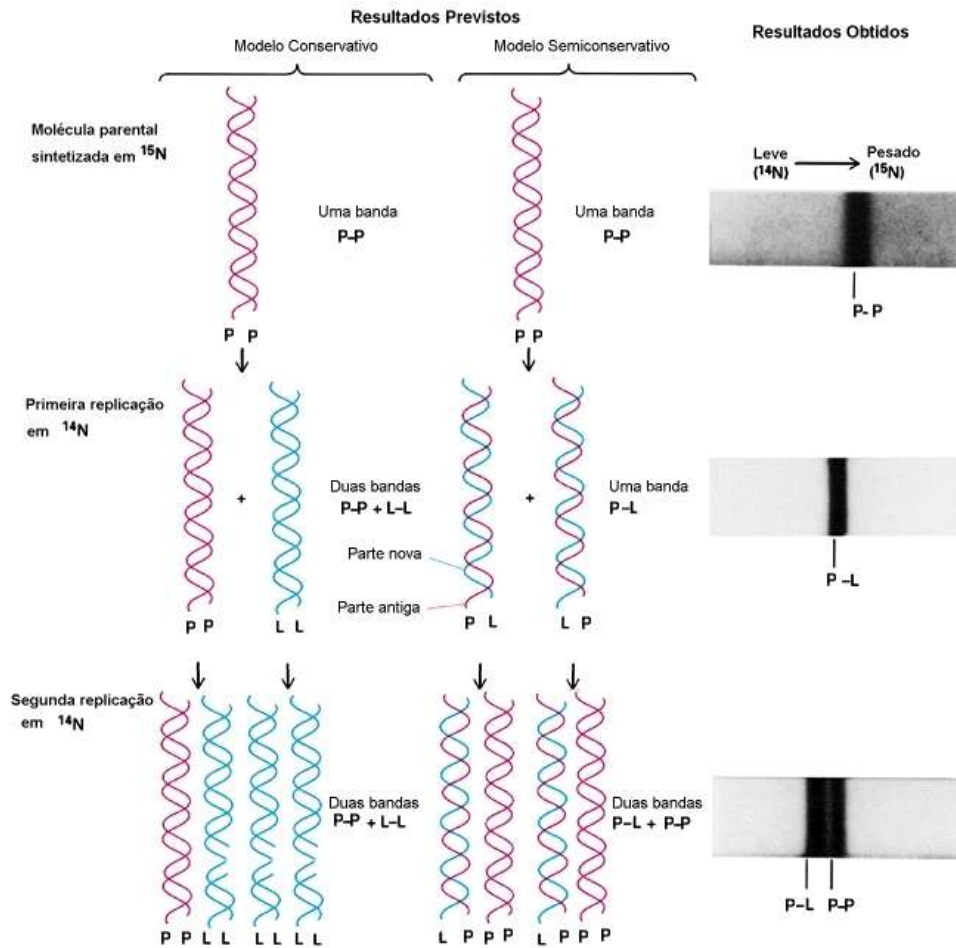


Figura 4 - Resultados do experimento de Meselson e Stahl.

Modificada a partir de: <http://www-biology.ucsd.edu/classes/bimm100.WI00/images/10-1.gif>

P - Pesado L - Leve

Na primeira coluna se observa a proposta de um modelo conservativo, na segunda coluna a proposta do modelo semiconservativo e, na terceira coluna, as fotografias de absorção de luz UV, obtidas por

A Molécula da Vida

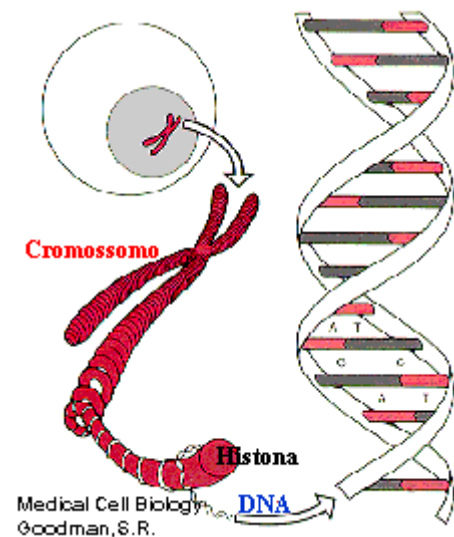
Meselson e Stahl, mostrando as bandas de DNA no gradiente de césio, confirmando a proposta da replicação semiconservativa.

A MOLÉCULA DA VIDA

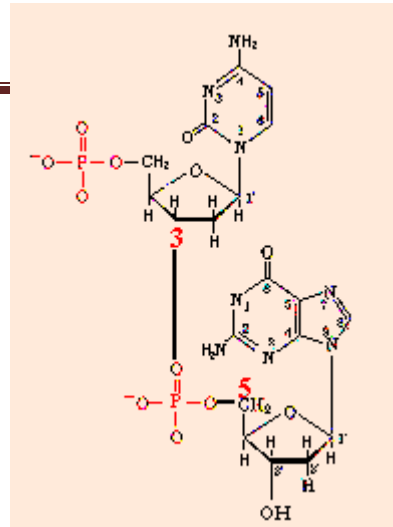
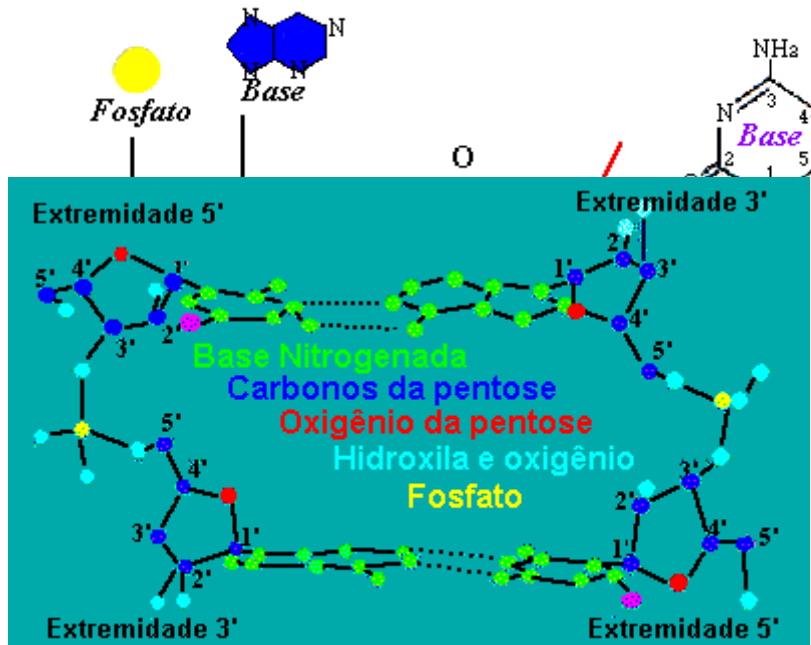
Os cromossomos de células eucarióticas são formado por DNA associado a moléculas de histona, que são proteínas básicas. É na molécula de DNA que estão contidos os **genes**, responsáveis pelo comando da atividade celular e pelas características hereditárias. Cada molécula de DNA contém vários genes dispostos linearmente ao longo da molécula. Cada gene, quando em atividade, é transcrito em moléculas de outros ácidos nucléicos denominados ribonucléicos, que comandarão a síntese de proteínas.

A molécula de DNA é constituída por uma seqüência de nucleotídeos, que por sua vez é formado por três diferentes tipos de moléculas:

- um açúcar (pentose = desoxirribose)
- um grupo fosfato
- uma base nitrogenada



A Molécula da Vida



Devido a esta conformação, a cadeia de DNA fica com uma direção determinada, isto é, em uma

extremidade temos livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra temos livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose.

Isto determina que o crescimento do DNA se faça na direção de 5' para 3'.

Sabendo-se como são feitas as ligações entre os nucleotídeos, formando assim a fita de DNA, podemos analisar a estrutura tridimensional do DNA.

James Watson e Francis Crick postularam um modelo tridimensional para a estrutura do DNA baseando-se em estudos de difração de raios-X.

O DNA consiste de duas cadeias helicoidais de DNA, enroladas ao longo de um mesmo eixo, formando uma dupla hélice de sentido rotacional à direita.

A Molécula da Vida

Ainda com base nestes estudos, concluiu-se que na dupla hélice as duas fitas de DNA estão em direção opostas, isto significa que são anti-paralelas. O termo anti-paralelas deve-se ao fato de que uma das fitas tem a direção exata da sua síntese ($5' \rightarrow 3'$) enquanto que a outra está invertida ($3' \rightarrow 5'$).

Esta conformação em fitas anti-paralelas levará à necessidade de mecanismos especiais para a replicação do DNA.

Com base na estrutura de dupla hélice do DNA e nas características de hidrofobicidade das moléculas, a estrutura do DNA fica da seguinte forma:

- O grupo fosfato e o açúcar (parte hidrofílica) - estão localizados na parte externa da molécula.
- As bases nitrogenadas (parte hidrofóbica) - estão localizadas na parte interna da molécula.
- A relação espacial entre as duas fitas cria um sulco principal e um sulco secundário.

O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira padronizada, sempre uma purina com uma pirimidina, especificamente: adenina com timina e citosina com guanina.

A proximidade destas bases possibilita a formação de pontes de hidrogênio, sendo que adenina forma duas pontes de hidrogênio com a timina e a citosina forma três pontes com a guanina.

A Molécula da Vida

A dupla hélice é mantida unida por duas forças:

- Por pontes de hidrogênio formadas pelas bases complementares e por interações hidrofóbicas, que forçam as bases a se "esconderem" dentro da dupla hélice.

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO DNA

- ➔ Soluções de DNA, em pH = 7,0 e temperatura ambiente, são altamente viscosas;
- ➔ A altas temperaturas ou pH extremos o DNA sofre desnaturação, isto porque ocorre ruptura das pontes de hidrogênio entre os pares de bases. Esta desnaturação faz com que diminua a viscosidade da solução de DNA;
- ➔ Durante a desnaturação nenhuma ligação covalente é desfeita, ficando portanto as duas fitas de DNA separadas;
- ➔ Quando o pH e a temperatura voltam ao normal, as duas fitas de DNA espontaneamente se enrolam formando novamente o DNA dupla fita. Este processo envolve duas etapas:
- ➔ A primeira é mais lenta pois envolve o encontro casual das fitas complementares de DNA, formando um curto segmento de dupla hélice.

A Molécula da Vida

→ A segunda etapa é mais rápida e envolve a formação das pontes de hidrogênio entre as bases complementares reconstruindo a conformação tridimensional.

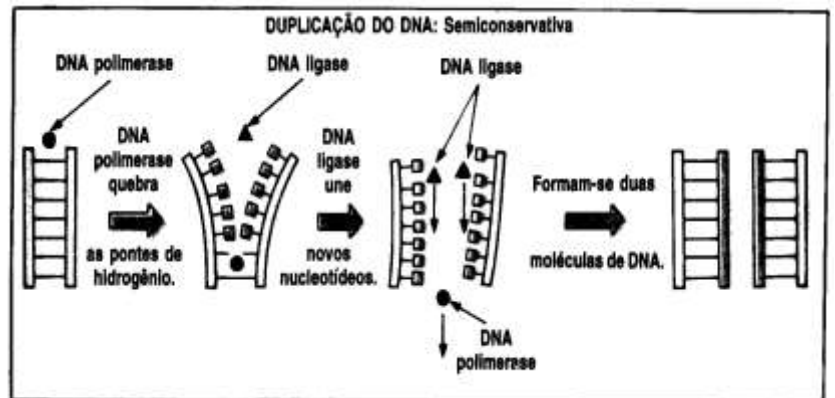
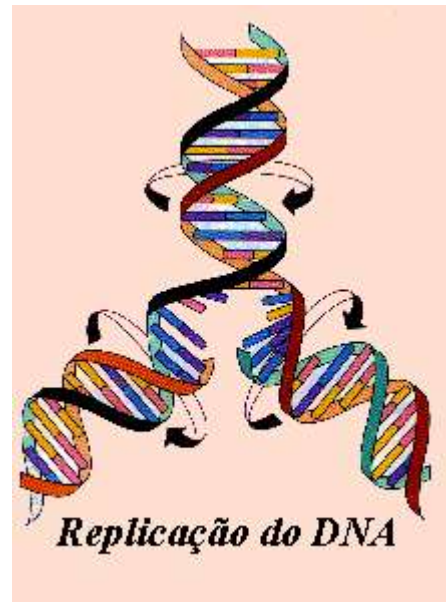
DUPLICAÇÃO DO DNA

- *Replicação do DNA* é o processo de *duplicação* do material genético mantendo assim o padrão de herança ao longo das gerações.

TEORIA SEMI-CONSERVATIVA: CADA FITA DO DNA É DUPLICADA FORMANDO UMA FITA HÍBRIDA, ISTO É, A FITA VELHA PAREIA COM A FITA NOVA FORMANDO UM NOVO DNA; DE UMA MOLÉCULA DE DNA FORMAM-SE DUAS OUTRAS IGUAIS A ELA. TODOS OS DNA RECÉM FORMADO POSSUI UMA DAS CADEIAS DA MOLÉCULA MÃE, POR ISSO O NOME SEMI-CONSERVATIVA.

A molécula do DNA vai-se abrindo ao meio, por ação de uma enzima chamada DNA polimerase. Essa enzima quebra as ligações de pontes de hidrogênio existentes entre as duas bases nitrogenadas das cadeias complementares de nucleotídeos.

Ao mesmo tempo em que o DNA polimerase vai abrindo a molécula de DNA, outra enzima chamada DNA ligase vai ligando um grupo de nucleotídeos que se pareiam com os



A Molécula da Vida

nucleotídeos da molécula mãe.

Além da capacidade de duplicação o DNA também é responsável pela síntese de outro ácido nucléico muito importante para a célula: o ácido ribonucléico ou RNA. Da mesma forma que o DNA, o RNA também é uma molécula grande formada por várias partes menores chamadas nucleotídeos. Por isso diz-se que tanto DNA como RNA são polinucleotídeo.

MUTAÇÕES GÊNICAS

Em 1941, os pesquisadores Beadle e Tatum, fazendo experiências com um tipo de bolor de pão, a *Neurospora sp*, observaram que nem sempre a autoduplicação do DNA ocorria de modo perfeito. O bolor crescia num meio de cultura contendo açúcar e diversos sais inorgânicos. Seus esporos eram submetidos a raios X e alguns deles passavam depois a produzir bolors com novas características. Por exemplo, alguns perdiam a capacidade de fabricar lisina e só conseguiam sobreviver quando aquele aminoácido era acrescentado ao meio de cultura. Essa incapacidade foi relacionada com a falta de uma enzima necessária para a síntese de lisina. Concluíram, então, que os raios X teriam danificado a formação daquele tipo específico de enzima.

Como a produção de uma enzima depende de informação codificada no DNA, a conclusão daqueles pesquisadores ficou conhecida como a relação "um gene → uma enzima". Atualmente, fala-se, com maior precisão, na relação "um gene - uma cadeia polipeptídica".

A modificação genética induzida através dos raios X é conhecida como *mutação*. As mutações podem resultar de uma alteração na seqüência dos nucleotídeos, ou de quebras e mudanças de posição dos

A Molécula da Vida

fragmentos da molécula de DNA. Portanto são mutações as alterações numéricas e estruturais dos cromossomos, que persistem através das autoduplicações, transmitindo-se às células-filhas. Existem também erros que ocorrem no RNA, no momento das transcrições ou das traduções, e afetam somente a própria célula.

As mutações são produzidas por agentes mutagênicos, que compreendem principalmente vários tipos de radiação, dentre os quais os raios ultravioleta, os raios X e substâncias que interferem na autoduplicação do DNA ou na transcrição do RNAm, determinando erros nas seqüências dos nucleotídeos.

A lista das substâncias mutagênicas tem aumentado muito nos últimos anos, sendo bastante conhecidos o gás mostarda, o ácido nitroso, a bromouracila, o formaldeído, a nicotina. Vários tipos de câncer podem ser produzidos por alterações ocorridas nos ácido nucléicos; por isso os mesmos agentes mutagênicos podem ser também cancerígenos.

RNA

O RNA (ácido ribonucléico) é o ácido nucléico formado a partir de um modelo de DNA.

Os nucleotídeos do RNA possuem os mesmos constituintes fundamentais do DNA:

- uma molécula de ácido fosfórico;
- uma molécula de açúcar;
- Uma base nitrogenada.

A Molécula da Vida

O açúcar do RNA também é uma pentose, mas não a desoxirribose e sim a ribose.

As bases púricas do RNA são as mesmas que as do DNA; quanto às bases pirimídicas, o RNA possui a citosina, porém não possui a timina. Em vez da timina, possui outra base pirimídica, chamada uracila (U).

Assim, o DNA e o RNA diferem quanto à pentose e quanto às bases nitrogenadas do nucleotídeo.

A Molécula da Vida

	DNA	RNA
Bases púricas	Adenina (A) Guanina (G)	Adenina (A) Guanina (G)
Bases Pirimídicas	Citosina (C) Timina (T)	Citosina (C) Uracila (U)
Pentose	Desoxirribose	Ribose

A molécula de RNA é formada por uma única cadeia de nucleotídeos, não tendo, portanto, aspecto de dupla hélice.

Essa cadeia de nucleotídeos pode, porém, em determinados pontos, enrolar-se sobre si mesma, assumindo o aspecto de espiral. Quando isto ocorre, as bases complementares pareiam e se ligam através de pontes de hidrogênio.

O pareamento é semelhante ao que acontece no DNA: o nucleotídeo que possui C pareia com o que possui G e o nucleotídeo que possui A, como não pode parear com T, pois esta base não existe no RNA, pareia com a outra base, que é U.

DNA	RNA
A = T	A = U
C = G	C = G

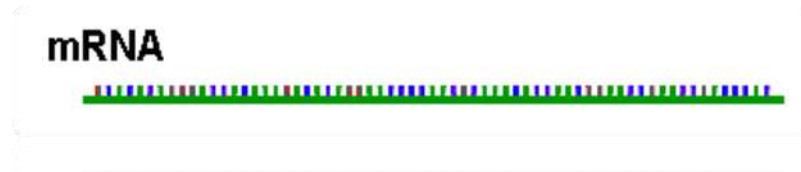
O DNA não é molde direto da síntese de proteínas. Os moldes para síntese de proteínas são moléculas de RNA. Os vários tipos de RNA transcritos do DNA são responsáveis pela síntese de proteínas no citoplasma.

A Molécula da Vida

A Molécula da Vida

Existem três tipos de RNAs:

- RNA mensageiro: Contêm a informação para a síntese de



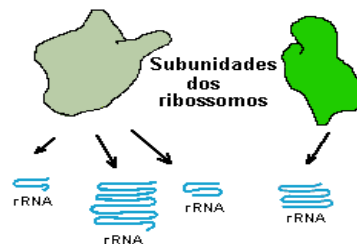
proteínas.

Os RNAm representam cerca de 4% do RNA celular total.

- RNA transportador: Transporta aminoácidos para que ocorra a síntese de proteínas.

Os RNAt correspondem a 10% do RNA total da célula, e são denominados de adaptadores.

- RNA ribossômico: Componentes da maquinaria de síntese de proteínas presente nos ribossomos.



Os RNAr correspondem a 85 % do RNA total da célula, e são encontrados nos ribossomos (local onde ocorre a síntese protéica).

Todas as formas de RNA são sintetizadas por enzimas (RNA polimerases) que obtêm informações em moldes de DNA.

A Molécula da Vida

O RNAr é produzido pelo DNA da região organizadora do nucléolo e, associado a proteínas, vai constituir os nucléolos. Depois passa ao citoplasma para formar os ribossomos.

O RNAm leva para o citoplasma as informações para a síntese das proteínas. Existe um tipo de RNAm para cada tipo de cadeia polipeptídica, que vai constituir uma proteína. O RNAm transporta a informação genética na forma de *códons*, copiados do DNA; um códon consiste em uma seqüência de três nucleotídeos.

O RNAt move-se do núcleo para o citoplasma, onde se liga a aminoácidos, e deslocando-se até os ribossomos. Apresenta regiões com pareamento de bases, que lhe conferem um aspecto de "trevo de três folhas".

Cada molécula de RNAt apresenta uma extremidade que se liga a diferentes tipos de aminoácidos e uma região com uma seqüência de três nucleotídeos, o *anticódon*, que pode parear com um dos códons do RNAm.

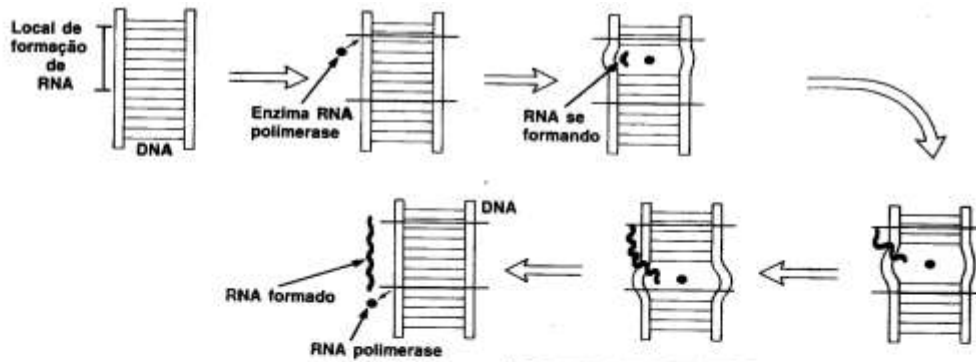
TRANSCRIÇÃO

A síntese de RNA ocorre no núcleo e é denominada transcrição. Nesse processo, uma parte da molécula de DNA é tomada como molde, sendo transcrita, ou copiada, em moléculas de RNA.

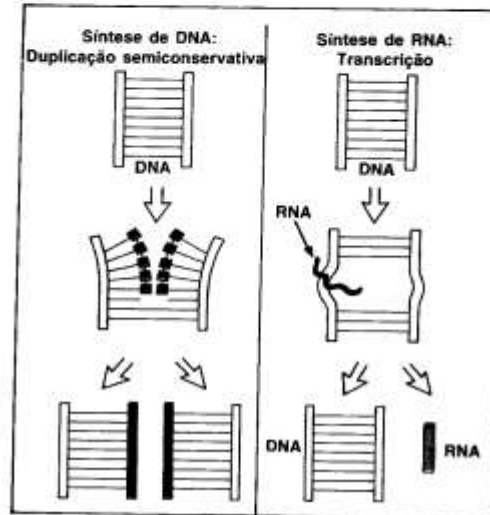
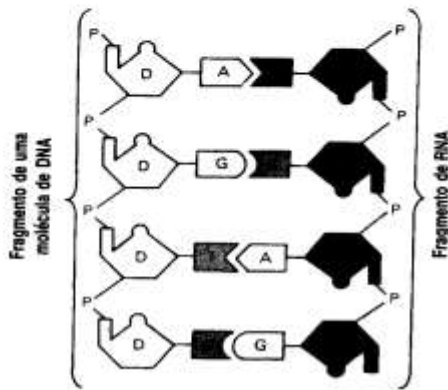
A molécula de DNA abre-se em determinados pontos, através da ação de uma enzima denominada RNA polimerase. Inicia-se, a seguir, o pareamento de novos nucleotídeos, complementares aos do DNA, dando origem ao RNA. Terminada sua transcrição, o RNA se solta do DNA, que

A Molécula da Vida

volta a apresentar o aspecto inicial de dupla hélice. Esquematicamente pode-se representar a formação de um RNA do seguinte modo:



Assim, a seqüência complementar do pedaço de DNA onde está sendo feita a síntese de RNA é:

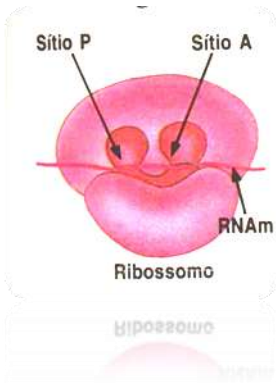


Um gene é uma seqüência de nucleotídeos da molécula de DNA, que transcreve.

A Molécula da Vida

BIOSSÍNTESE DAS PROTEÍNAS (TRADUÇÃO)

Nos eucariontes, quando há necessidade de uma determinada proteína, forma-se, por transcrição do gene no DNA, um RNAm que contém a "mensagem" para aquela proteína. Os vários tipos de RNA, transcritos do DNA, que vão participar da síntese de proteínas, deslocam-se do núcleo para o citoplasma.



Produzido no núcleo, o RNAm dirige-se para o citoplasma e se liga aos ribossomos. Nestes, existem três sítios: o sítio A (relacionado à entrada de aminoácidos), o sítio P (relacionado à formação do polipeptídeo) e o sítio onde se liga o RNAm.

O RNAt carrega os aminoácidos, levando-os até o ribossomo, onde penetram através do sítio A.

O aminoácido que chega ao ribossomo deve ser reconhecido pelo RNAm para ser incorporado à proteína que está sendo sintetizada. Se não for reconhecido, o aminoácido não será incorporado ao polipeptídeo (sítio P).

O aminoácido só será incorporado se o RNAm tiver um código para ele. Esse código depende da seqüência de bases nitrogenadas do DNA que formou o RNAm.

O RNAr, inicialmente armazenado nos nucléolos, passa para o citoplasma e, associado a proteínas, forma os ribossomos, que se prendem às membranas do retículo endoplasmático. Os ribossomos dispõem-se enfileirados, constituindo os polirribossomos ou polissomos,

A Molécula da Vida

junto dos quais as proteínas vão ser sintetizadas. Cada polissomo é também denominado unidade de tradução, pois permite a síntese de um tipo de polipeptídeo.

CÓDON E CÓDIGO GENÉTICO

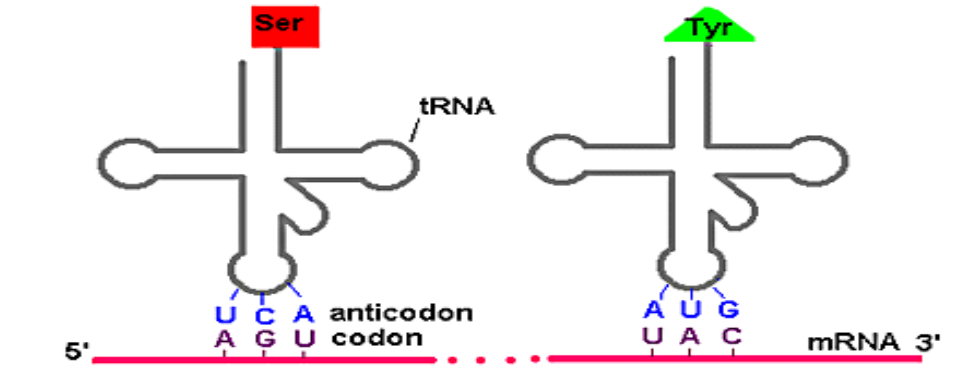
A seqüência das bases que codificam um aminoácido no RNAm é chamada códon e é composta por três bases nitrogenadas. Cada códon codifica apenas um aminoácido. Entretanto, um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, existindo, assim, códons sinônimos.

<p>1 CÓDON → 1 AMINOÁCIDO</p> <p>1 AMINOÁCIDO → 1 OU MAIS CÓDONS</p>
--

Em função da existência de códons sinônimos é que se diz que o código genético é degenerado.

Código genético universal: estabelecido pelas trinças de bases do RNAm (códon), transcritas do DNA. É constituído por 64 trinças diferentes (códon e seus aminoácidos correspondentes). Uma trinça codifica apenas um aminoácido, mas um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de uma trinça, havendo, portanto, códons sinônimos. Dos 64 códons, apenas 3 não especificam aminoácidos particulares, representando sinais de parada que determinam o final da cadeia polipeptídica.

A Molécula da Vida

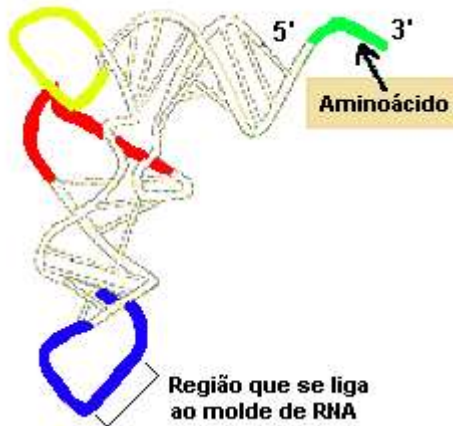


		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

phe = fenilalanina leu = leucina ile = isoleucina met = metionina val = valina	ser = serina pro = pralina thr = treonina ala = alanina tyr = tirosina	his = histidina glu = glutamina asn = aspargina lys = lisina asp = aspartato	cys = cisterna trp = triptofano arg = arginina gly = glicina
---	--	--	---

A Molécula da Vida



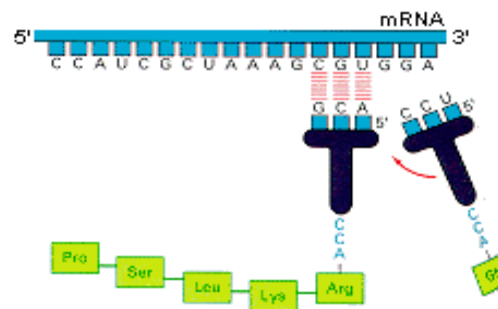
Suponha um gene no cromossomo que codifique uma proteína hipotética, através da seguinte seqüência de bases nitrogenadas no DNA: TTTTCTAAAGAC. O RNAm formado por transcrição dessa parte da molécula do DNA apresentará a seguinte seqüência de bases: AAAAGAUUUCUG. Cada três bases no RNAm (códon) determinará

um aminoácido específico, e a proteína formada apresentará a seqüência de aminoácidos de acordo com a ordem estabelecida pelos códons no RNAm. Neste exemplo, a proteína será constituída pelos seguintes aminoácidos dispostos na seguinte seqüência: lisina, arginina, fenilalanina e leucina.

Caso ocorra uma substituição incorreta de uma base nitrogenada durante a duplicação do DNA, pode-se ter a formação de uma proteína diferente ou, então, da mesma proteína, pois um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de um códon.

ANTICÓDON

Os códons do RNAm são reconhecidos pelo RNAt. Todo RNAt tem um filamento livre de sua molécula composto pela seguinte seqüência de bases nitrogenadas:



A Molécula da Vida

ACC. É nesse local que ocorre a

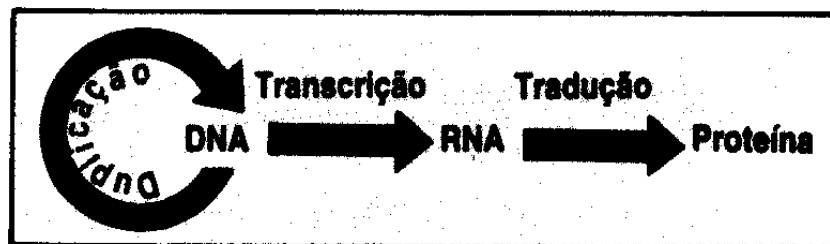
associação com o aminoácido. Em outra região da molécula existe uma seqüência de três bases, denominada anticódon, que reconhece a posição do aminoácido no RNAm, unindo o seu anticódon ao códon do RNAm.

O RNAt desloca-se para o citoplasma, onde se liga a aminoácidos, deslocando-os até pontos de síntese protéica. Numa determinada região, a molécula de RNAt apresenta um trio especial de nucleotídeos, o anticódon, correspondente a um códon do RNAm. Uma das extremidades da molécula de RNAt só se liga a um tipo de aminoácido.

Sobre um mesmo RNAm podem se deslocar vários ribossomos, que mantêm entre si uma determinada distância.

Dessa forma, podem ser formadas várias proteínas iguais sobre o mesmo RNAm.

A duplicação do DNA, sua transcrição em RNA e a tradução do



RNAm em proteínas constituem o Princípio Básico da Biologia.

DNA POLIMERASE I

A Molécula da Vida

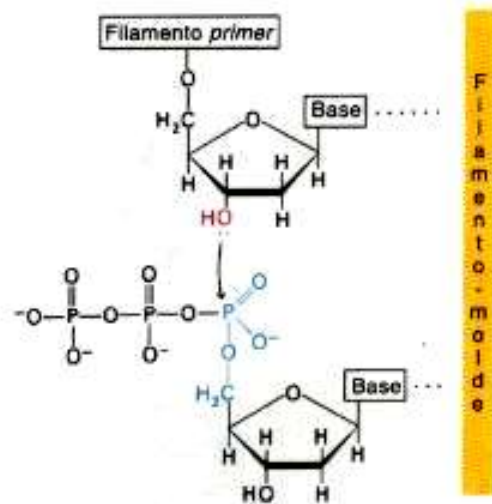
ATIVIDADE PROCESSIVA:

Foi a primeira enzima dirigida por um molde a ser descoberta.

A DNA polimerase I não é a enzima que replica a maior parte do DNA em procariotos. Entretanto, ela tem um papel crítico na replicação, e também no reparo de DNA.

A DNA polimerase I, um monômero de 103 Kd catalisa a adição passo a passo de unidades de desoxirribonucleotídeos a ponta 3' de uma cadeia de DNA: $(DNA)_n \text{ nucleotídeos} + dNTP = (DNA)_{n+1} + PP_i$ / d é qualquer desoxirribonucleotídeo 5' fosfato.

A DNA polimerase I requer todos os quatro desoxirribonucleotídeos 5' trifosfatos -dATP, dGTP, dTTP, dCTP e magnésio para a síntese de DNA. A enzima adiciona desoxirribonucleotídeos às extremidades 3'-OH livre da cadeia que está sendo alongada, que ocorre no sentido 5' para 3'.

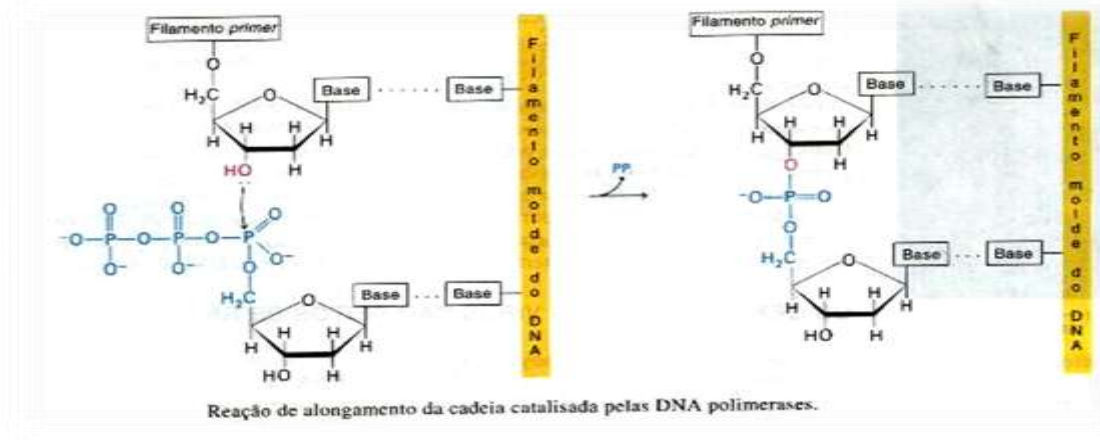


Reação de alongamento de cadeia catalisada pelas DNA polimerases.

Um molde de cadeia (primer) com uma 3'-OH livre é necessário no início da replicação. Também é essencial um molde de DNA contendo uma região uni-filamentar. A polimerase catalisa o ataque nucleofílico do

A Molécula da Vida

terminal 3'-OH do primer no átomo de fósforo mais interno de um dNTP. É formada uma ligação fosfodiéster sendo liberado um pirofosfato. A reação é ativada pela hidrólise subsequente de PPi pela pirofosfatase inorgânica. A polimerização é catalisada por um único centro ativo que pode ligar-se a qualquer um dos quatro dNTPs. Qual o que se liga irá depender da base correspondente no filamento molde.



DNA POLIMERASE II

Similar à DNA polimerase I e III em vários aspectos:

- Catalisa uma síntese de DNA dirigida por molde a partir de precursores desoxirribonucleotídeos 5'-trifosfato,
- é necessário um primer com uma 3'-OH livre.
- a síntese é no sentido 5'-3',
- possui atividade de exonuclease 3'-5'.

A DNA polimerase II participa no reparo do DNA, mas não é necessária para a replicação do DNA.

A Molécula da Vida

DNA POLIMERASE III

A enzima DNA Polimerase III é a principal enzima na cópia do DNA. A cópia de DNA, tecnicamente conhecida como replicação de DNA, é feita conforme o modelo de Watson e Crick. A DNA polimerase III é um complexo enzimático, isto é, é formada por mais de uma cadeia polipeptídica. Cada cadeia polipeptídica, também conhecidas como subunidades, desempenham uma função específica na replicação do DNA, sendo as mais importantes a polimerização dos nucleotídeos - monômeros do DNA -, atividade revisora - exonucleásica.

HELICASE

A helicase é uma enzima que quebra as ligações em ponte de hidrogênio entre as bases azotadas (purinas ou pirimidinas) de ambas as cadeias de DNA, fazendo com que estas se separem. Esta enzima move-se ao longo da cadeia dupla de DNA utilizando energia da hidrólise de ATP para separar as duas cadeias da molécula. A separação das cadeias de DNA é importante para a sua replicação. Ao funcionarem durante o processo de replicação do DNA, as helicases recebem "ajuda" de umas proteínas chamadas de DNA-girases (ou topoisomerases), que desenrolam a cadeia, diminuindo a tensão à medida que as helicases avançam, facilitando assim o seu trabalho. Depois de aberta, a dupla cadeia de DNA não se volta a ligar devido à ação das enzimas SSB, que mantêm a cadeia aberta, para poder ser replicada.

SÍNTESE DO PRIMER DE RNA

Para que a polimerase III do DNA comece uma polimerização é necessário que outra enzima adicione os primeiros nucleotídeos. Essa

A Molécula da Vida

enzima é uma polimerase especial que catalisa a síntese de um pequeno fragmento de RNA sobre a cadeia molde do DNA, o qual atua como iniciador para a polimerase III do DNA adicionar desoxirribonucleotídeos.

O fragmento de RNA iniciador de uma cadeia de DNA que, em bactéria, tem cerca de 2 a 3 nucleotídeos, é chamado de primer de RNA e a enzima que catalisa sua síntese é denominada primase do DNA.

A primase do DNA atua no início da replicação, sintetizando o primer necessário para começar a síntese da cadeia leading, e também, durante todo o processo, sintetizando os primers necessários para o início da síntese de cada fragmento de Okazaki. Isso é necessário porque após completar um fragmento de Okazaki, a polimerase do DNA da cadeia lagging precisa iniciar a síntese de um novo fragmento.

Os primers de RNA são feitos a intervalos regulares sobre a cadeia molde da cadeia lagging e são, em seguida, alongados pela polimerase III para gerar os fragmentos de Okazaki. A síntese de cada fragmento de Okazaki termina quando a polimerase do DNA atinge o primer de RNA ligado à extremidade 5' do fragmento sintetizado anteriormente.

A substituição do primer por um segmento de DNA

Nas proximidades da forquilha de replicação, a cadeia lagging é constituída, portanto, por fragmentos de Okazaki, ligados à seus respectivos primers de RNA, dispostos linearmente ao longo da cadeia molde. Os primers de RNA precisam ser removidos e substituídos por segmentos de DNA, antes dos fragmentos de Okazaki serem unidos entre si. A eliminação dos primers é feita pela atividade exonucleotídica

A Molécula da Vida

5' => 3' de uma enzima que pode ser tanto uma "Rnase H" quanto a "polimerase I" do DNA.

A Rnase é uma enzima que degrada especificamente moléculas de RNA que formam híbridos com DNA, ou seja, cadeias de RNA emparelhadas a cadeias de DNA. Assim, elas podem detectar o primer de RNA, que se encontra emparelhado à cadeia molde de DNA, e degradá-lo. Quando isso ocorre, cria-se uma falha entre dois fragmentos de Okazaki contíguos, a qual é preenchida por ação de uma polimerase de reparo de DNA, a polimerase I do DNA.

CARACTERÍSTICAS DA POLIMERASE I DO DNA

A polimerase I do DNA é uma cadeia polipeptídica única com três atividades enzimáticas: 1 - polimerização no sentido 5' => 3'

2 - atividade exonucleotídica no sentido 3' => 5'

3 - atividade exonucleotídica no sentido 5' => 3'

Existem proteases que cortam a polimerase I em dois fragmentos polipeptídicos de tamanhos diferentes. O maior, denominado fragmento Klenow, conserva a capacidade de polimerização e a atividade exonucleotídica 3' => 5'. Já o fragmento menor, que não recebe denominação especial, mantém a atividade exonucleotídica 5' => 3'.

A REAÇÃO DE DESLOCAMENTO DO CORTE

A Molécula da Vida

Graças a sua capacidade de alongamento de cadeia polinucleotídicas e à sua atividade exonucleotídica $5' \Rightarrow 3'$, a polimerase I do DNA é capaz de substituir os primers de RNA por segmentos de DNA por meio de um processo denominado deslocamento do corte (do inglês nick translation). Nesse processo, a polimerase I reconhece um corte (nick) na cadeia do DNA, isto é, ausência de ligação fosfodiéster entre a extremidade $3'$ de um resíduo de nucleotídeo e a extremidade $5'$ do resíduo vizinho, que, nesse caso, é o início do primer de RNA. Uma vez conhecido o nick, a enzima se liga à extremidade $3'OH$ livre e, por meio de sua atividade exonucleotídica $5' = 3'$, remove por hidrólise o primeiro ribonucleotídeo do primer do fragmento de Okazaki seguinte. Enquanto isso ocorre, a atividade polimerizadora da enzima, adiciona, à extremidade $3'OH$ do fragmento de Okazaki ao qual ela está ligada, um desoxirribonucleotídeo no lugar do ribonucleotídeo que foi removido.

Desse modo, o nick se desloca um nucleotídeo no sentido $5' \Rightarrow 3'$ e o processo se repete. A polimerase I do DNA realiza em sequência cerca de 10 a 12 ciclos de hidrólise e polimerização antes de se dissociar do DNA. Isso é mais do que suficiente para substituir todo o primer de RNA por DNA. Essa reação chama-se nick translation, pelo fato da atividade da enzima mover o nick entre dois fragmentos de Okazaki.