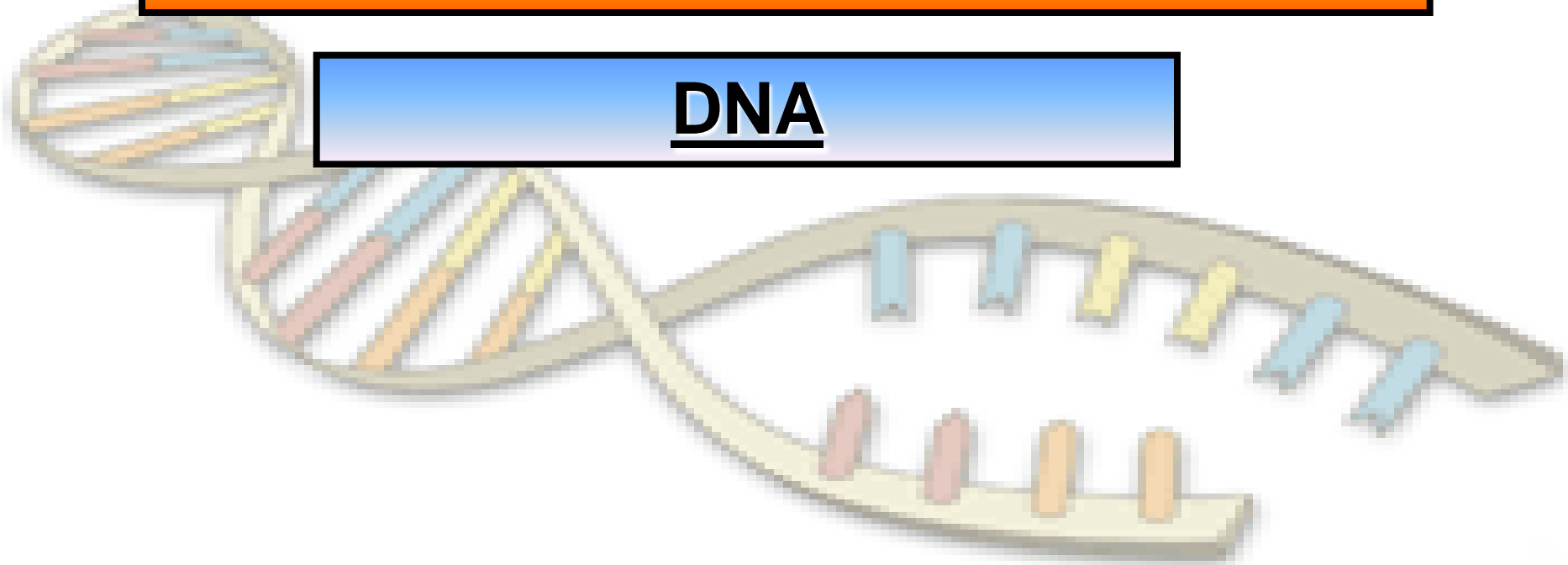
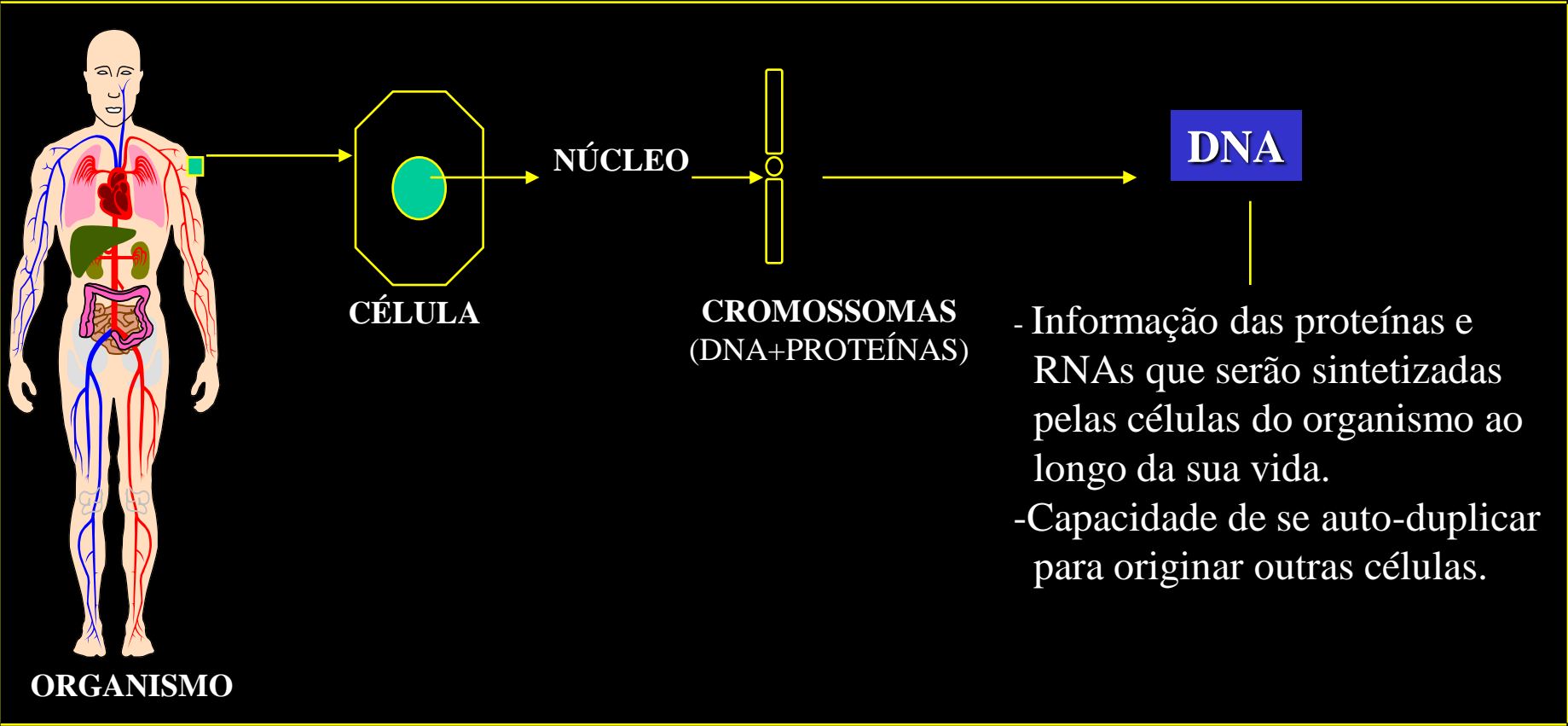


INTRODUÇÃO A BIOLOGIA MOLECULAR

DNA

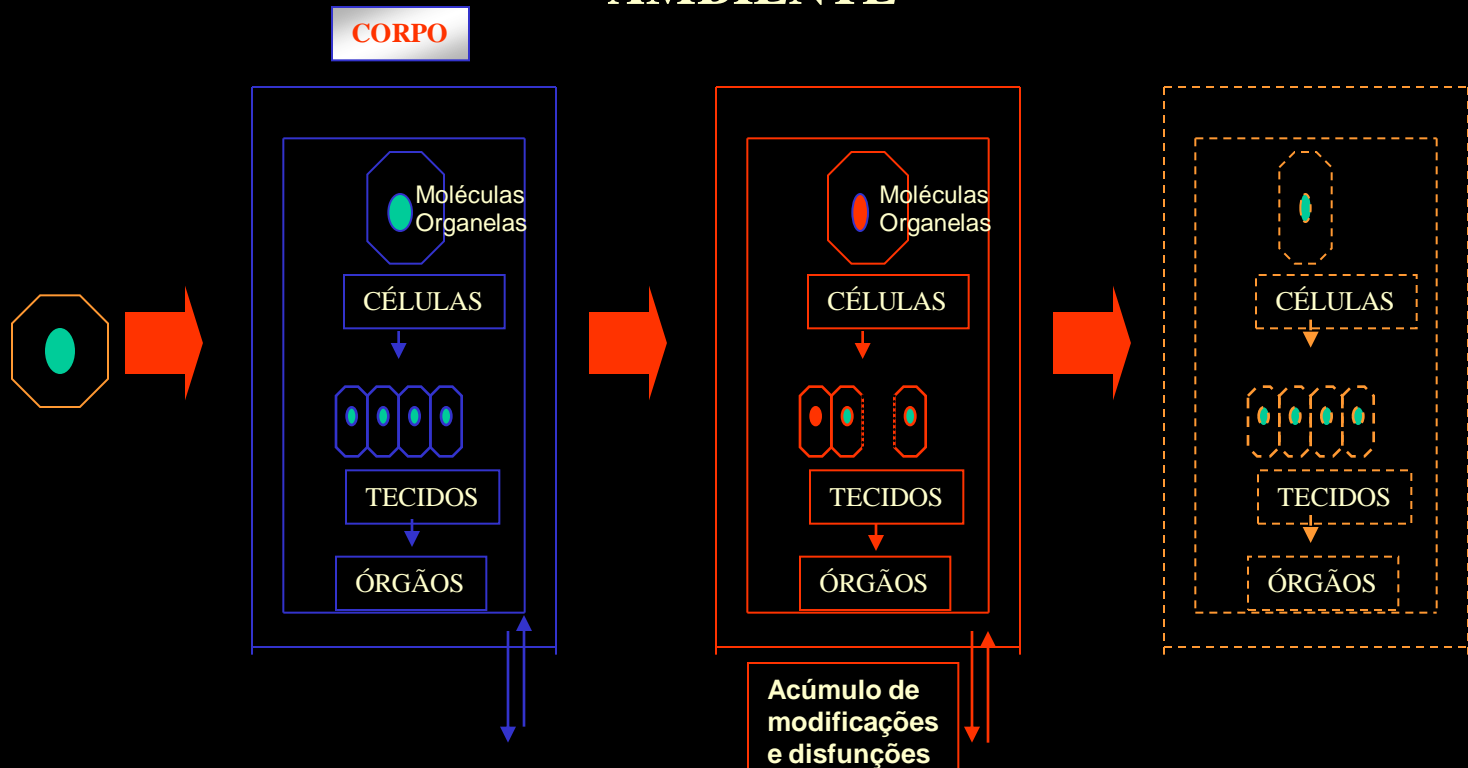


NOS SERES HUMANOS



Envelhecimento...

AMBIENTE



Embriologia

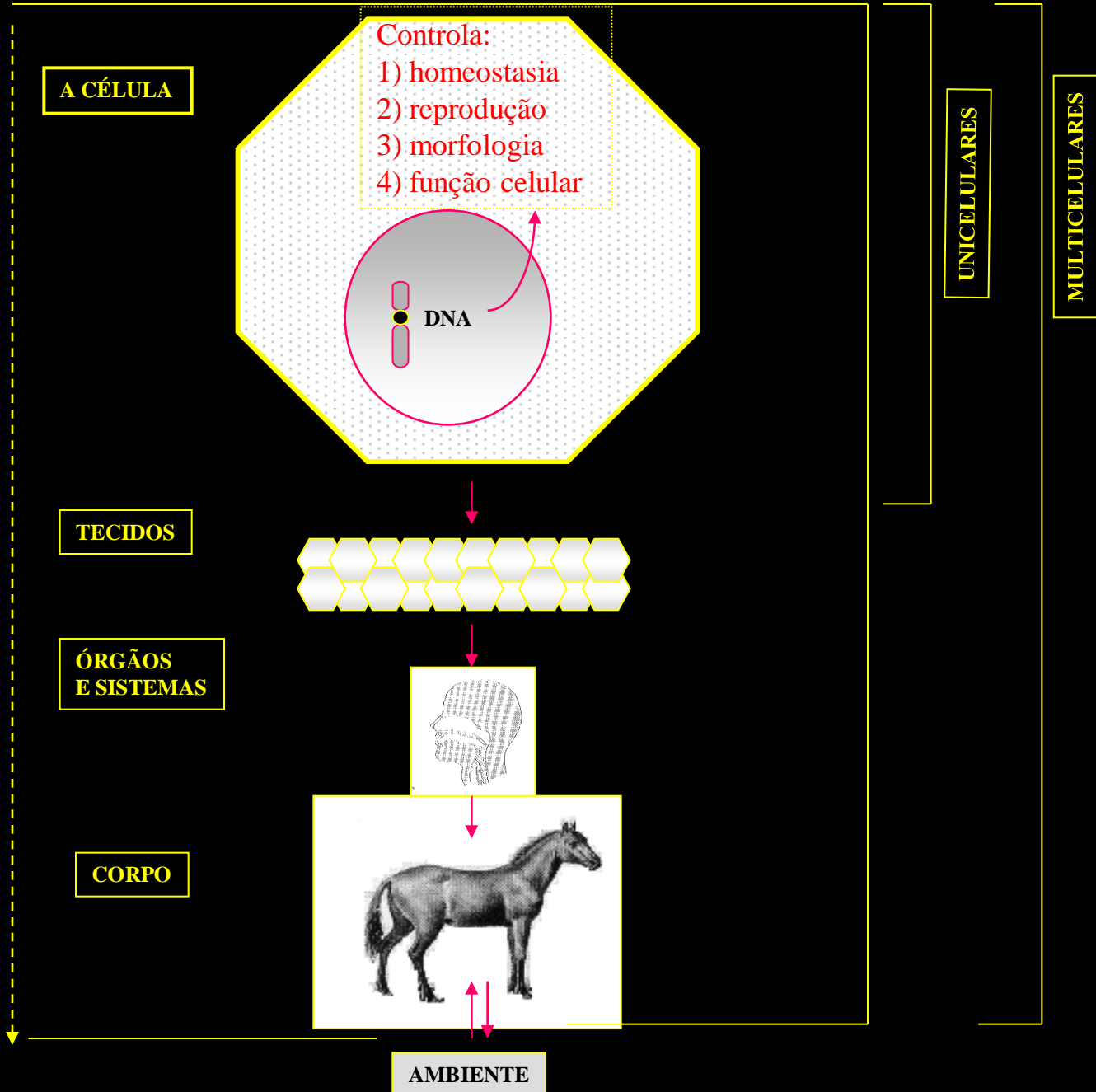
Amadurecimento
e Fase reprodutiva

Envelhecimento

Morte

Desenvolvimento

NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO



HISTÓRICO

1865 - GREGOR MENDEL

Estudou cruzamento entre diferentes tipos de ervilhas demonstrando que certas características físicas dessas plantas eram transmitidas de geração para geração através de “fatores”.

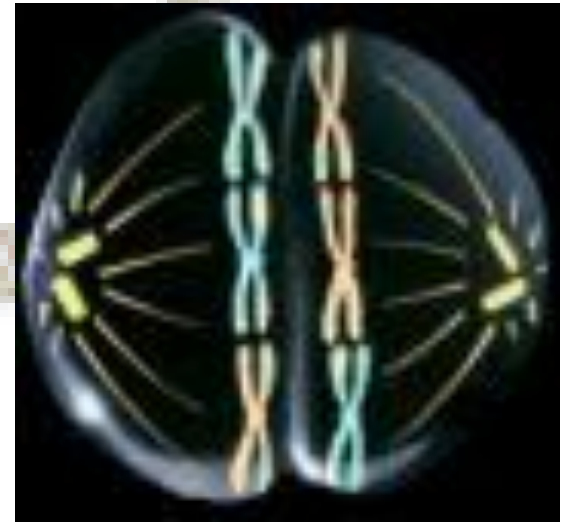


© 1997 The Learning Company, Inc.

HISTÓRICO

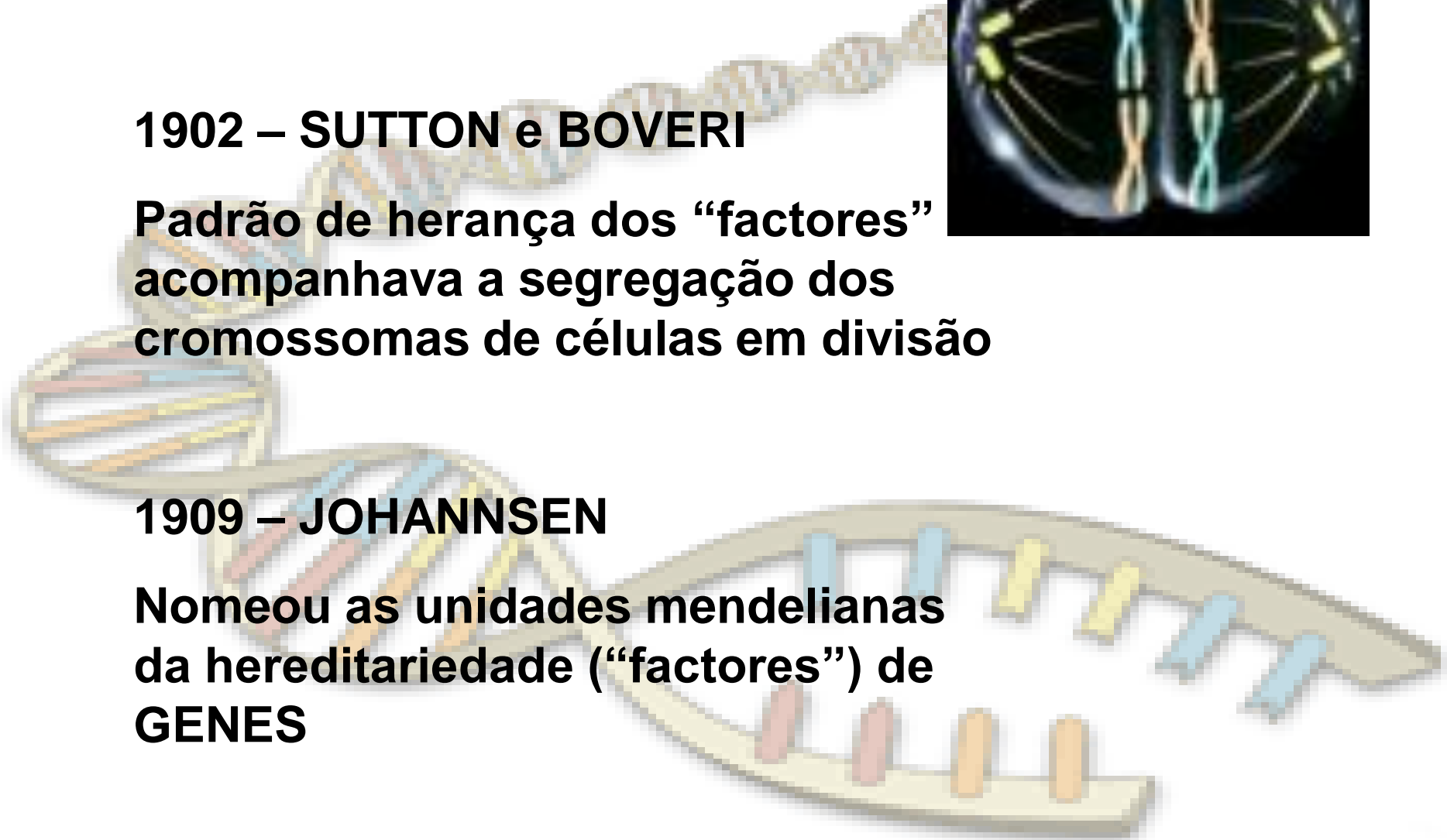
1902 – SUTTON e BOVERI

**Padrão de herança dos “factores”
acompanhava a segregação dos
cromossomas de células em divisão**



1909 – JOHANNSEN

**Nomeou as unidades mendelianas
da hereditariedade (“factores”) de
GENES**



HISTÓRICO

1915 – THOMAS MORGAN

Concluiu que os genes estavam organizados de maneira linear nos cromossomas

Propôs, pela 1ª vez, uma correlação entre um gene (genótipo) e uma característica física (fenótipo)

1941 – BEADLE e TATUM

Demonstraram que os genes agiam através da regulação de diferentes eventos químicos

HIPÓTESE: UM GENE → UMA ENZIMA

HISTÓRICO



1953 – JAMES WATSON e FRANCIS CRICK

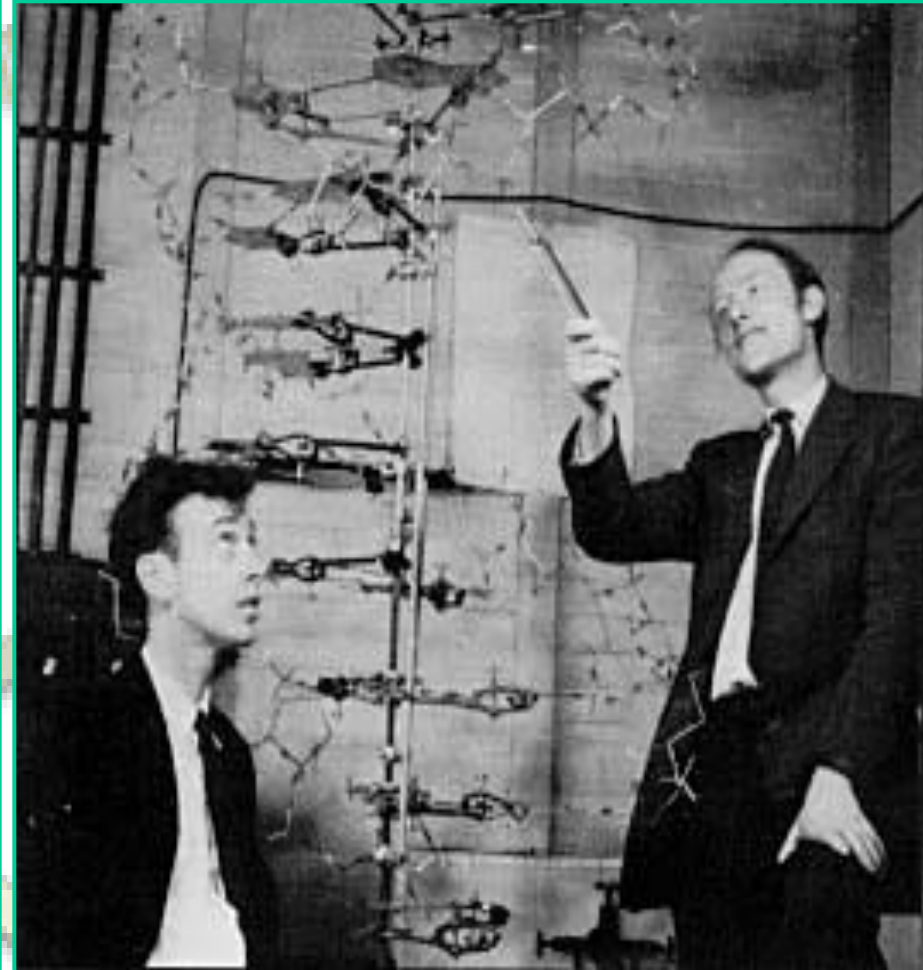
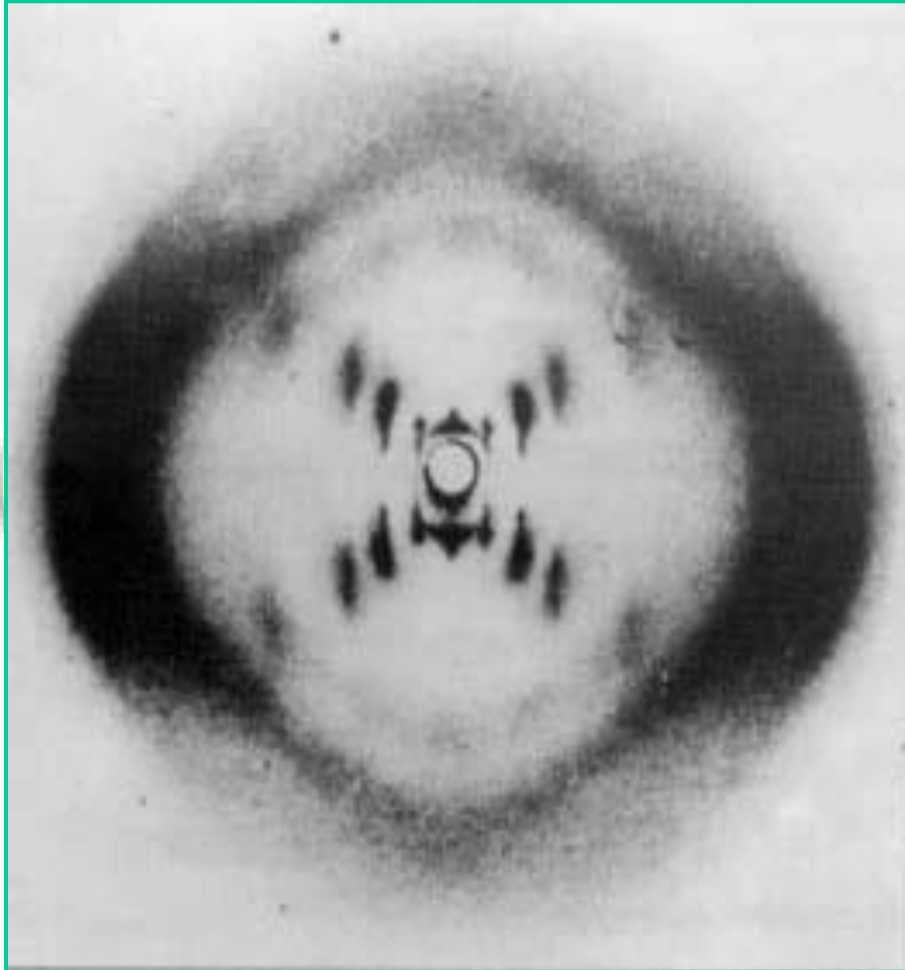
Descrição da estrutura física do DNA baseando-se nos estudos de difração de raio X de Rosalind Franklin e Maurice Wilkins e em estudos químicos da molécula

Modelo da dupla fita proposto foi fundamental para a compreensão do mecanismo de transmissão e execução da informação genética



•1953: Watson and Crick

Estrutura do DNA



HISTÓRICO

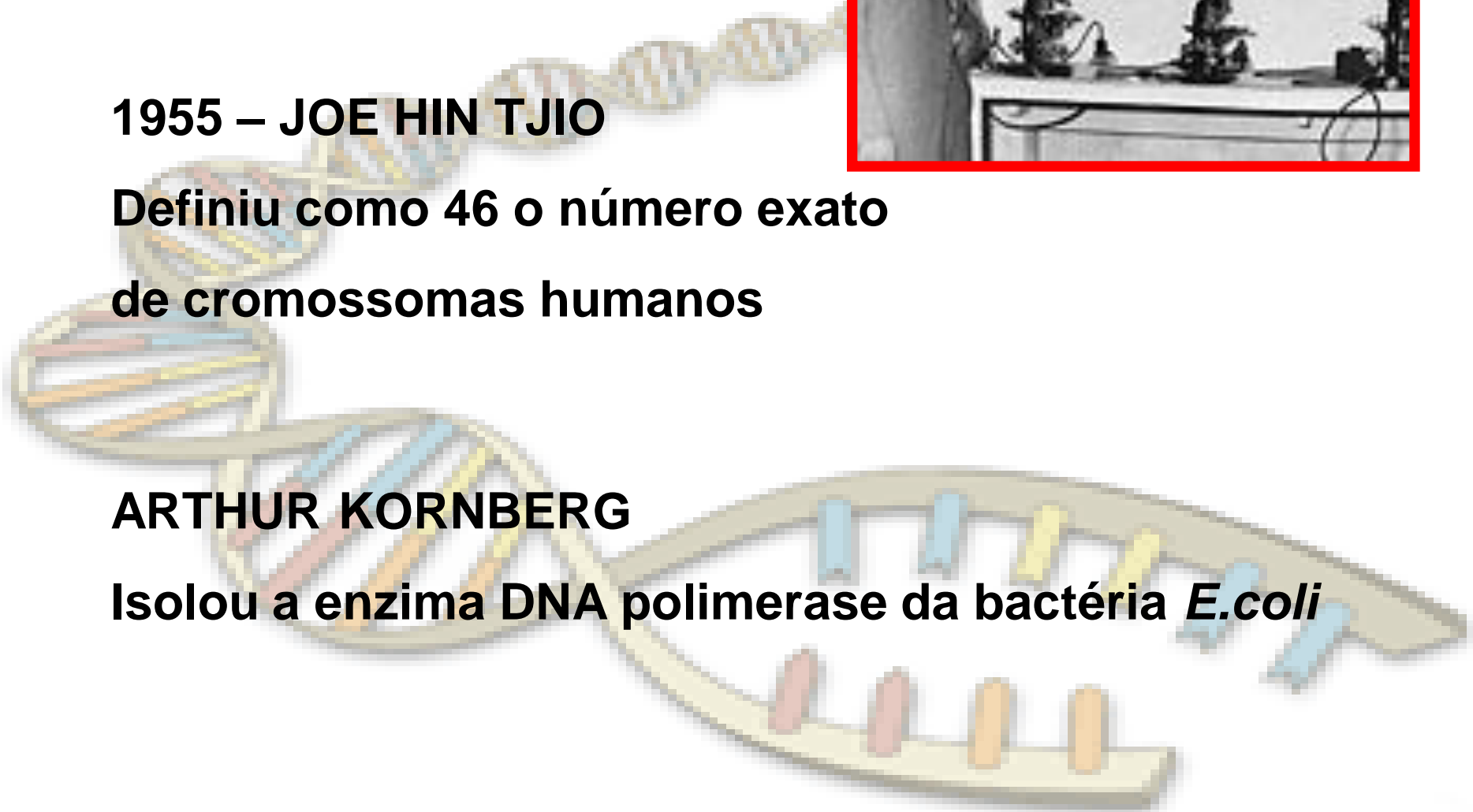
1955 – JOE HIN TJIO

Definiu como 46 o número exato de cromossomas humanos



ARTHUR KORNBERG

Isolou a enzima DNA polimerase da bactéria *E.coli*

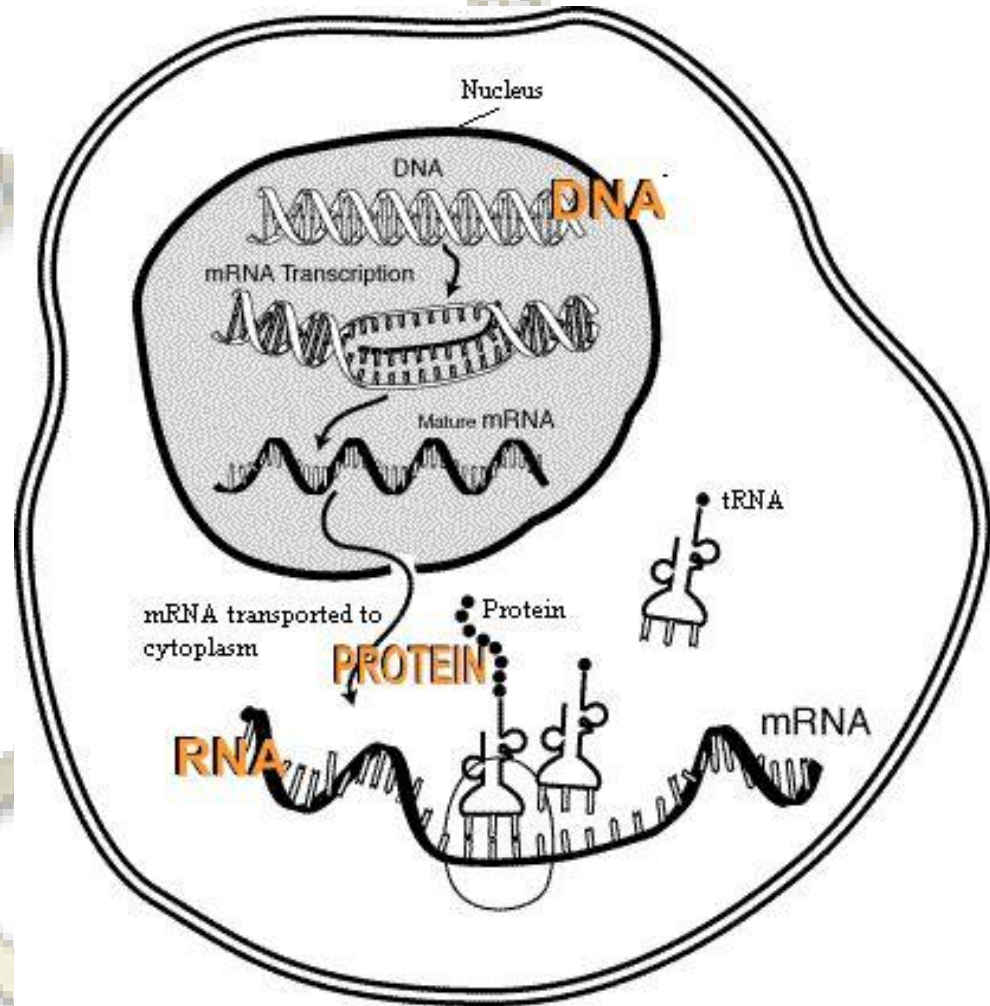


HISTÓRICO

1957 – CRICK e GAMOV

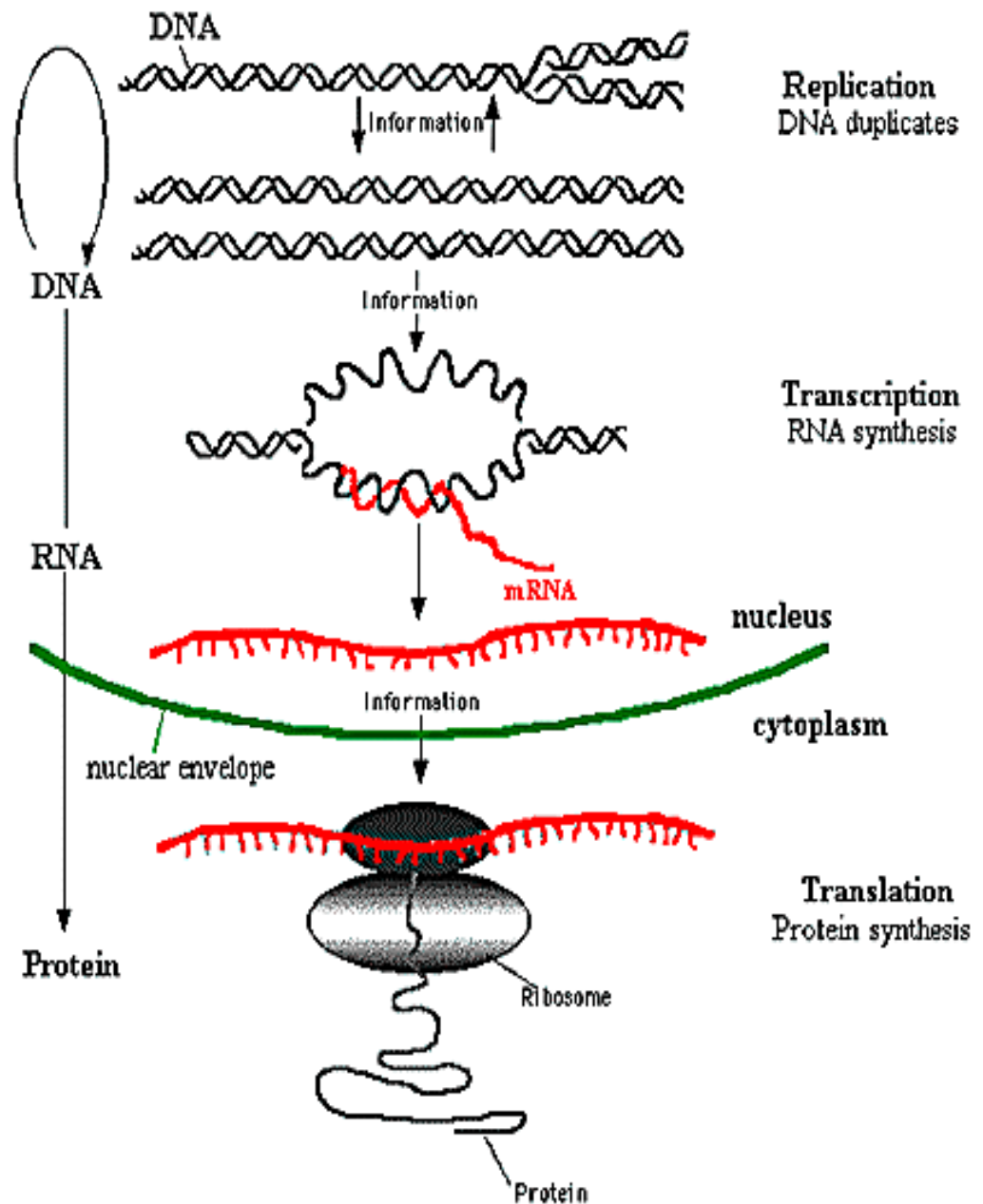
Dogma Central da Biologia Molecular

DNA → RNA → PROTEÍNA





Dogma Central da Biologia Molecular



The Central Dogma of Molecular Biology

HISTÓRICO



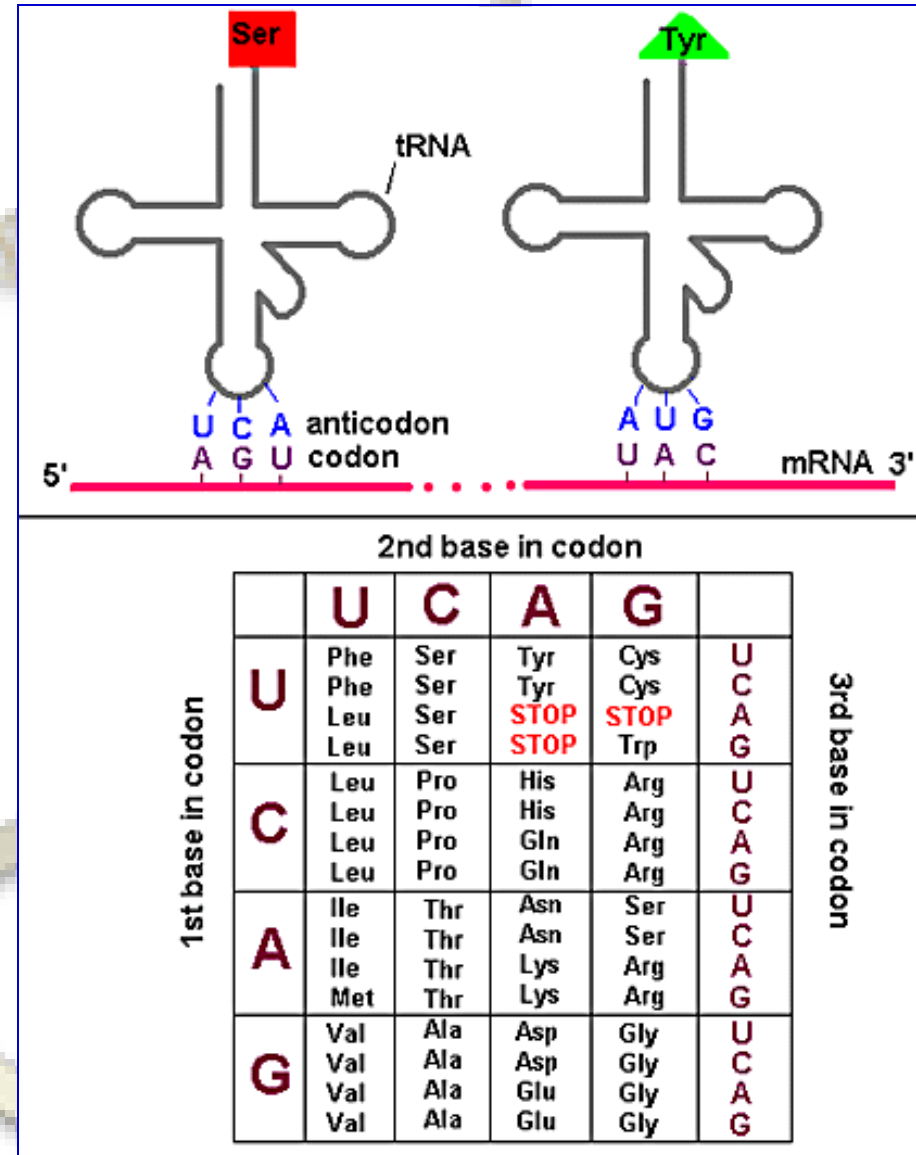
- **1961 – BRENNER, JACOB e MESELSON**
- **mRNA é a molécula que leva informação do DNA no núcleo para a maquinaria de produção de proteínas no citoplasma**

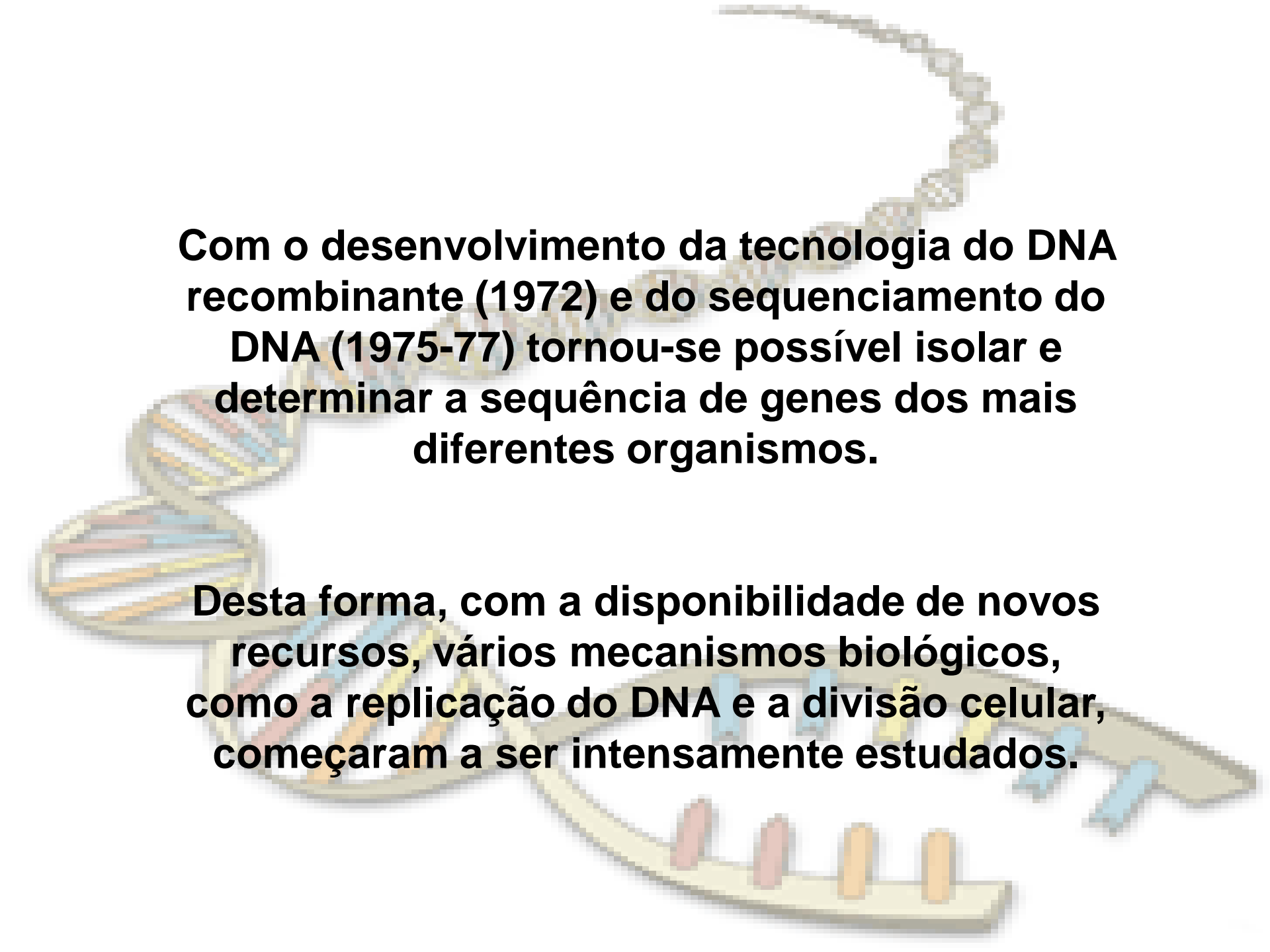
HISTÓRICO

1966 – NIRENBERG,
KHORANA e OCHOA

Sequências sucessivas de três nucleotídeos do DNA (codão) determinam a sequência de aminoácidos de uma proteína

O CÓDIGO GENÉTICO É DESVENDADO!!!

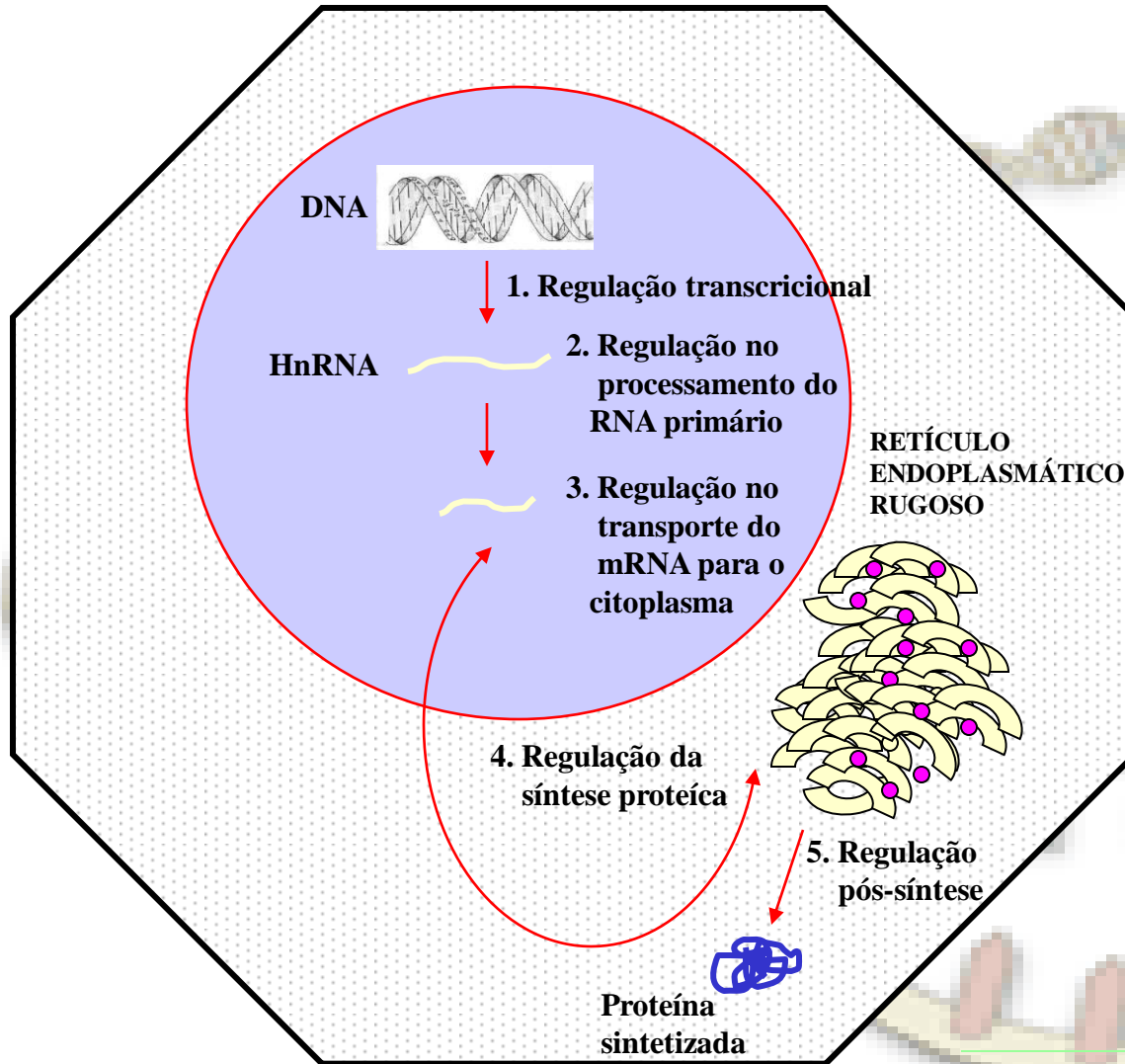




Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante (1972) e do sequenciamento do DNA (1975-77) tornou-se possível isolar e determinar a sequência de genes dos mais diferentes organismos.

Desta forma, com a disponibilidade de novos recursos, vários mecanismos biológicos, como a replicação do DNA e a divisão celular, começaram a ser intensamente estudados.

A CÉLULA

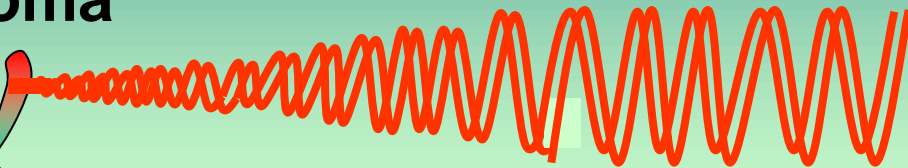


- DIFERENCIAÇÃO
- CRESCIMENTO
- FUNÇÃO CELULAR
- RESPOSTA AO AMBIENTE

Núcleo

DNA

Cromossoma



Gene



Promotor

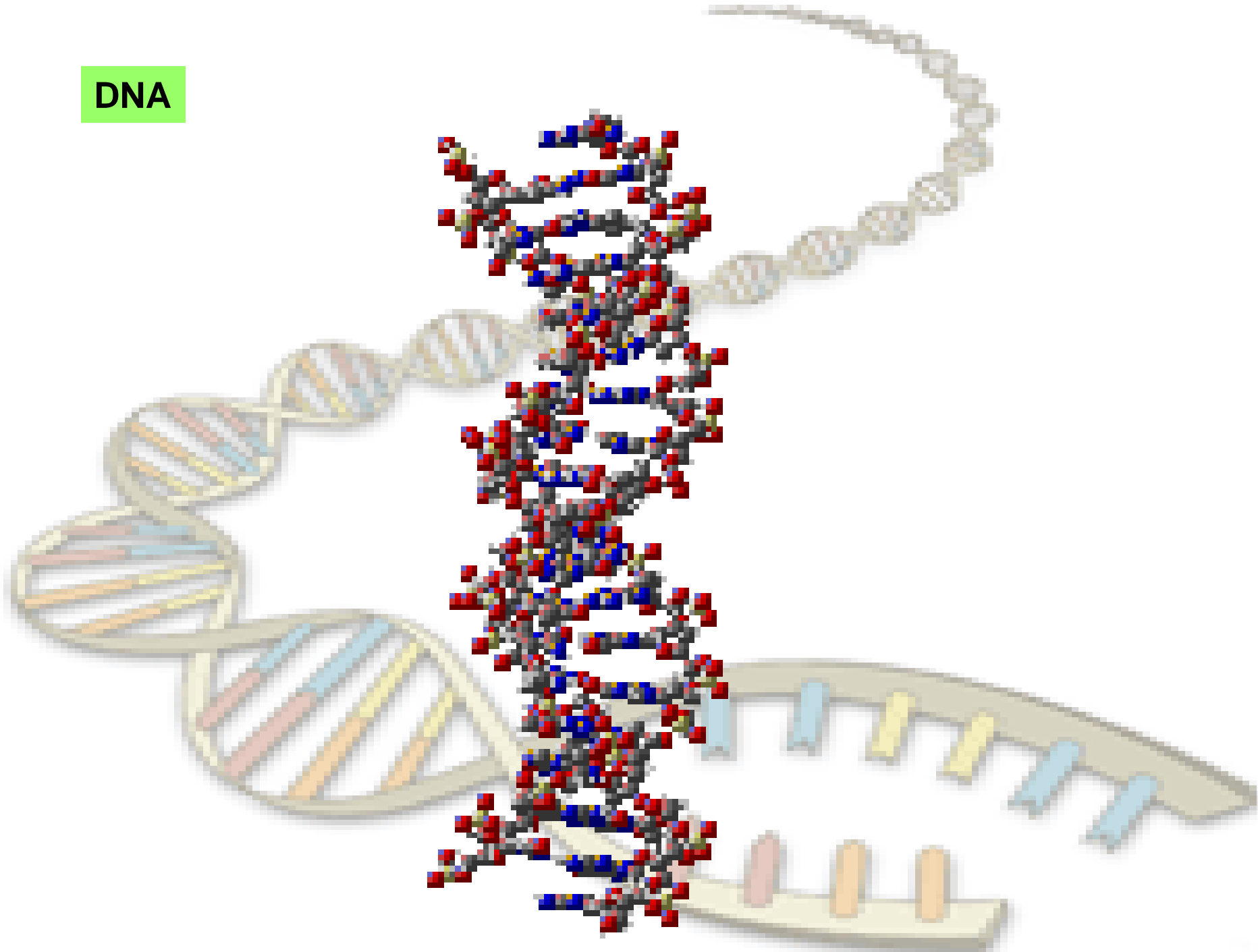


Exão



Intrão

DNA



ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

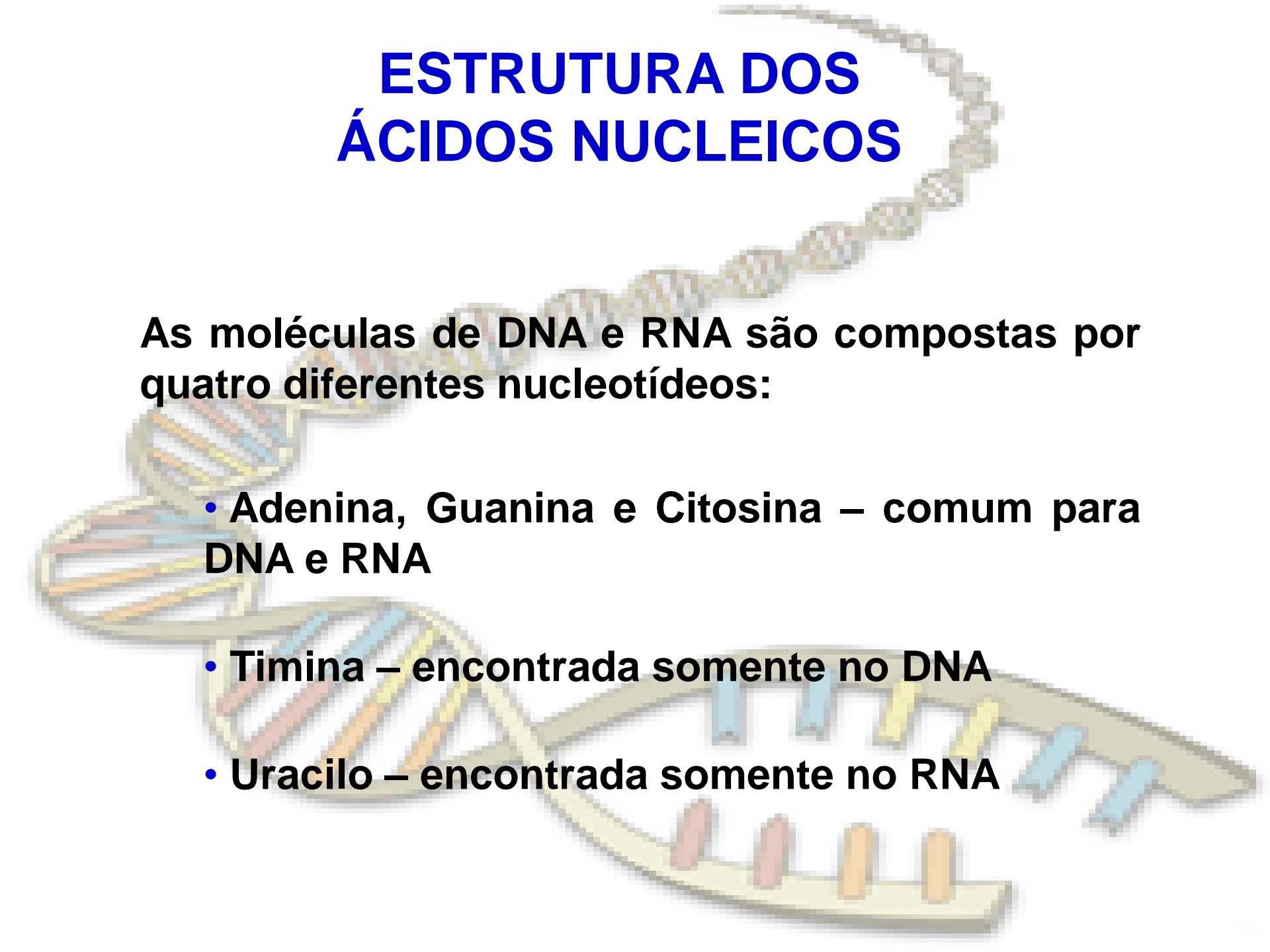
Contém toda a informação genética de um organismo



**Esta informação está arranjada em unidades
hoje conhecidas como genes**



ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS



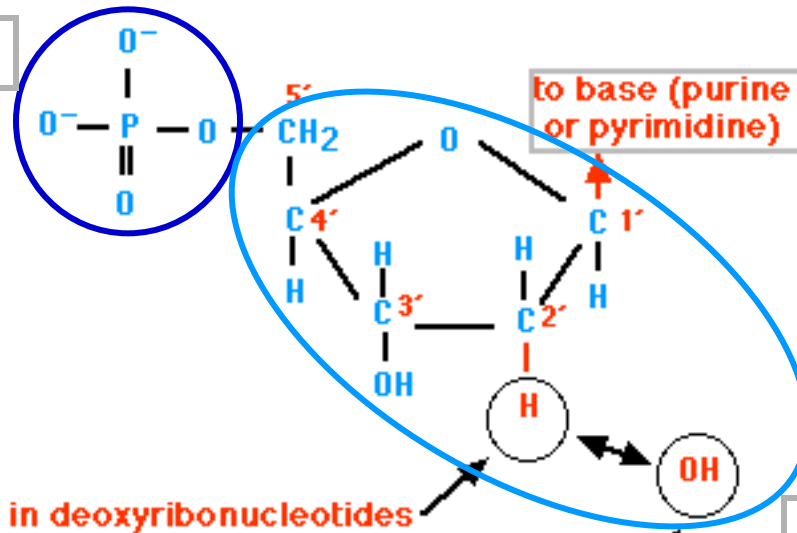
As moléculas de DNA e RNA são compostas por quatro diferentes nucleotídeos:

- Adenina, Guanina e Citosina – comum para DNA e RNA
- Timina – encontrada somente no DNA
- Uracilo – encontrada somente no RNA

ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Todos os nucleotídeos apresentam uma estrutura em comum:

radical fosfato



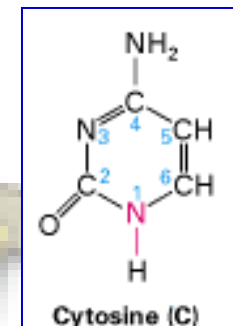
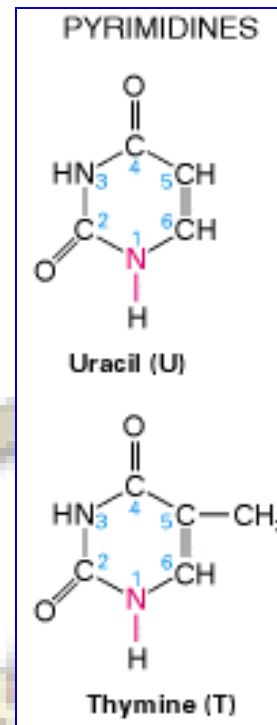
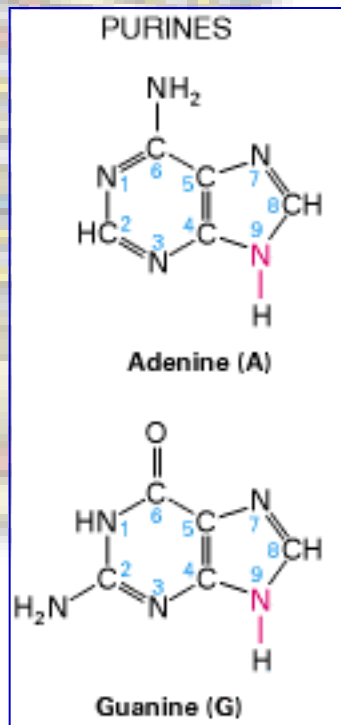
in deoxyribonucleotides

in ribonucleotides

pentose

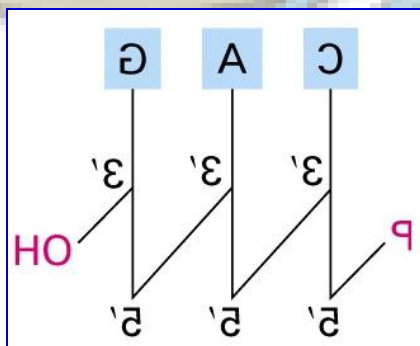
ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

As bases nitrogenadas podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua estrutura:

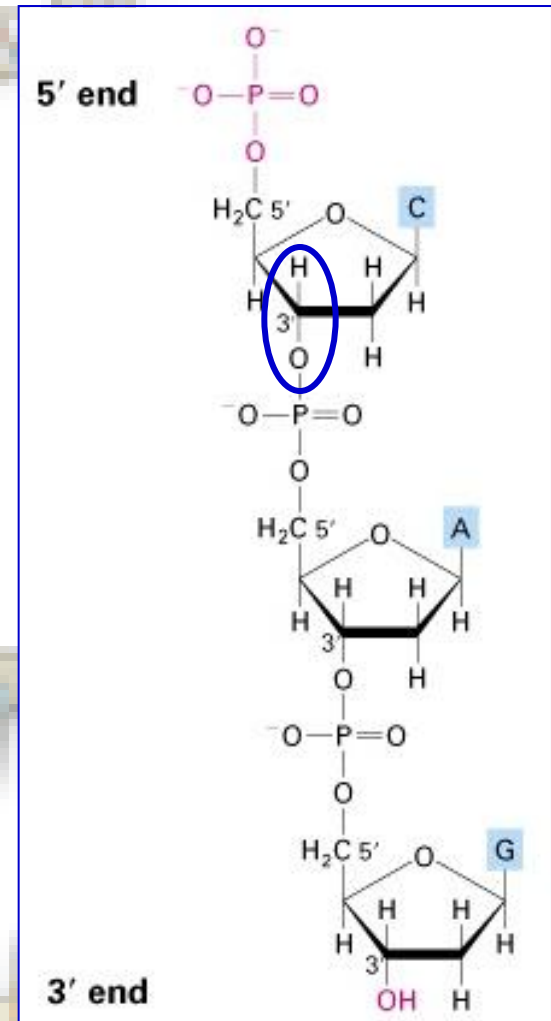


ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

O grupo hidroxil ligado ao carbono 3 da pentose de um nucleotídeo forma uma ligação fosfodiéster com o fosfato do outro nucleotídeo



5' C-A-G 3'

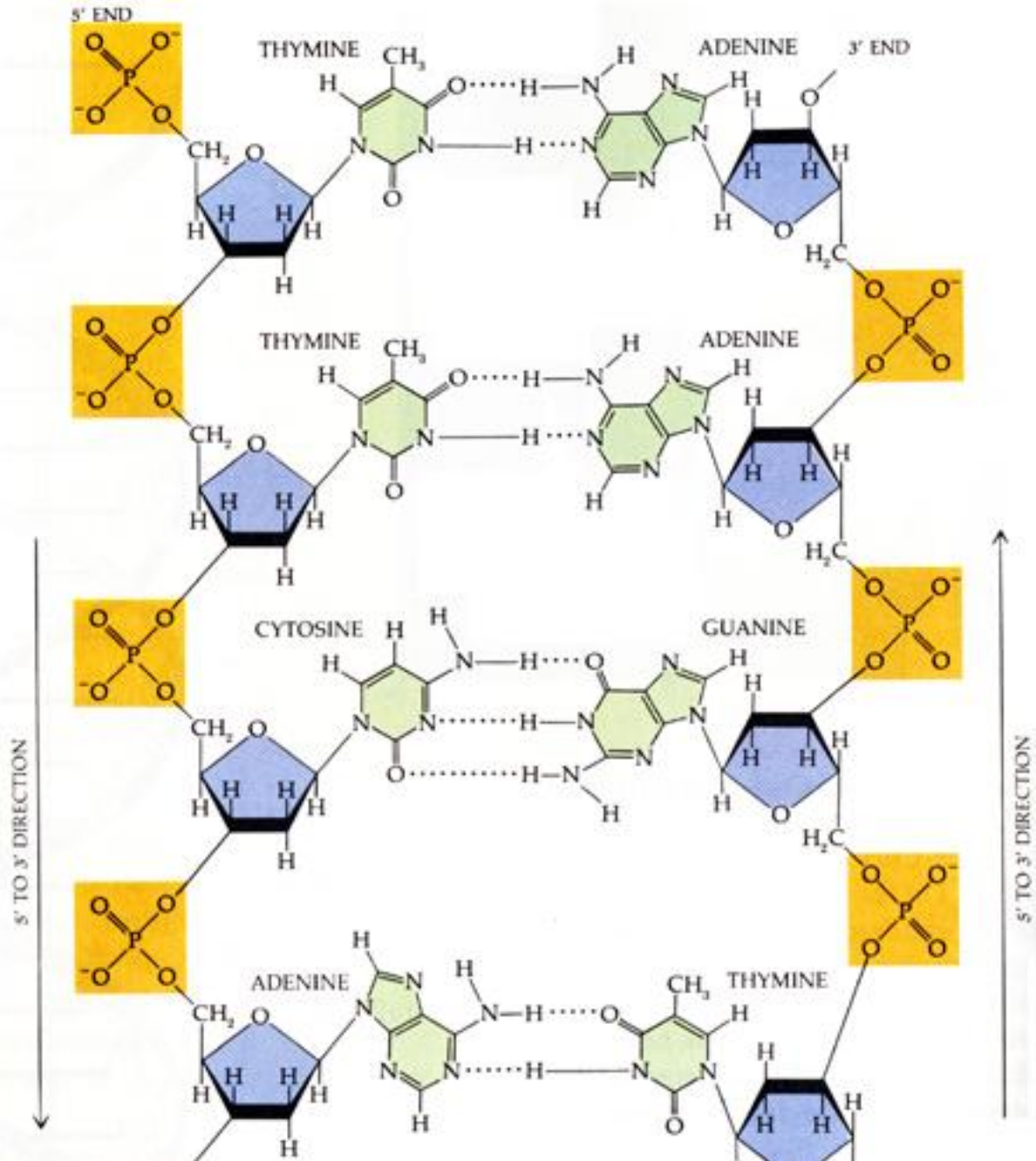


DNA



- Duas fitas de polinucleotídeos associadas formando uma estrutura de dupla hélice onde as pentoses e os radicais fosfato compõe a fita e as bases projetam-se para o interior da mesma
- As fitas mantêm-se unidas através da formação de pontes de hidrogênio entre as bases o que contribui para a estabilidade da dupla hélice
 - . Adenina (A) pareia com Timina (T) através de **2** pontes de hidrogênio
 - . Guanina (G) pareia com Citosina (C) através de **3** pontes de hidrogênio

DNA

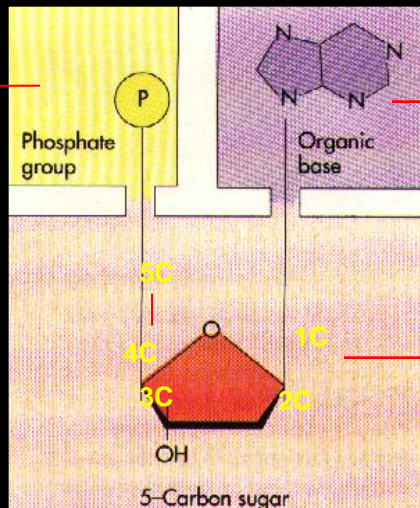


ESTRUTURA DO DNA

1) Estrutura primária

- É um polímero não ramificado
- Formado por monômeros chamados de nucleotídeos
- Cada nucleotídeo contém os seguintes elementos:

NUCLEOTÍDEO



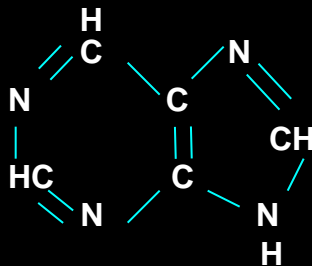
1 Base orgânica nitrogenada
(Por que contém nitrogênio na sua formação)

1 Açúcar chamado
DESOXIRRIBOSE
Possui 5 Carbonos na
sua molécula

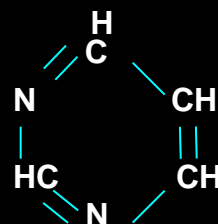
1 grupo fosfato (PO_4^-)

As Bases Nitrogenadas podem ser de dois tipos:

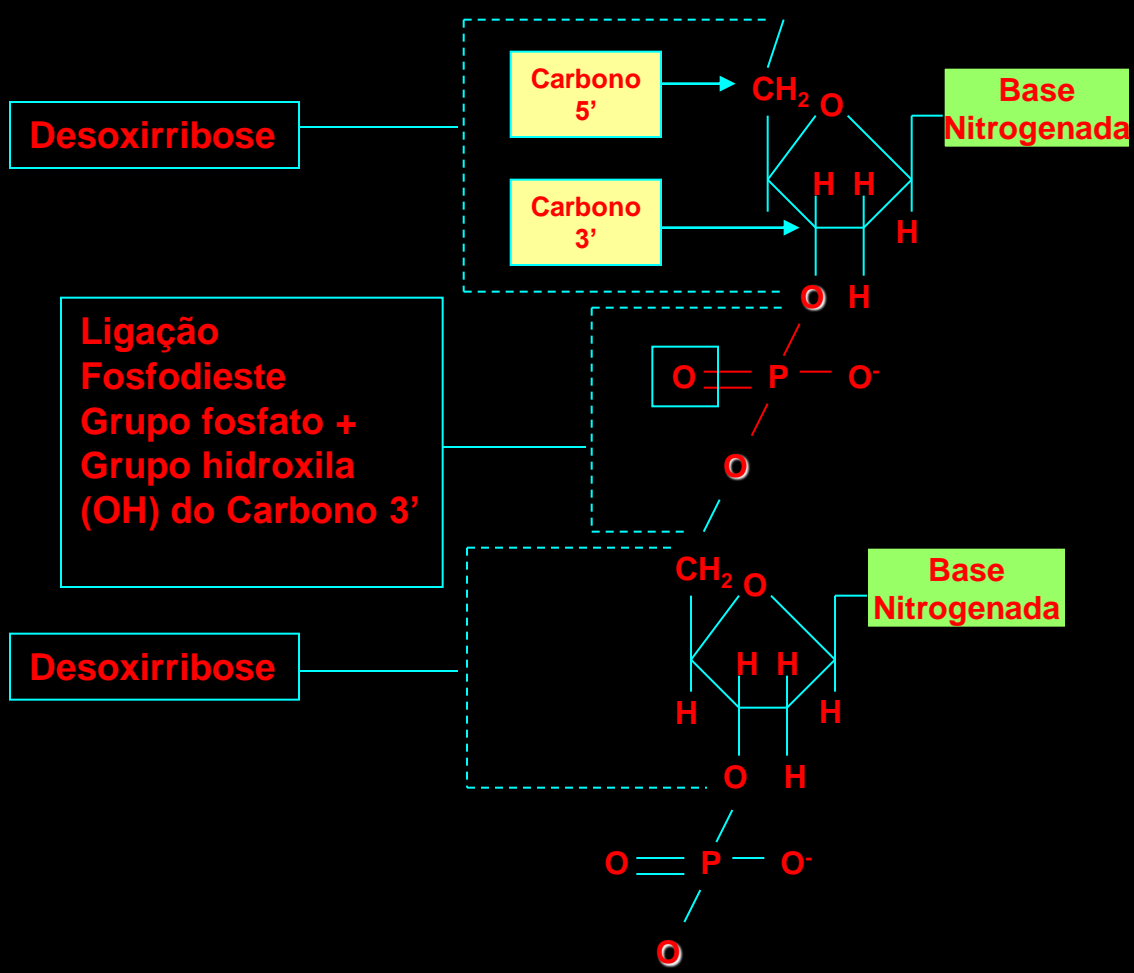
PÚRICAS



PIRIMÍDICAS



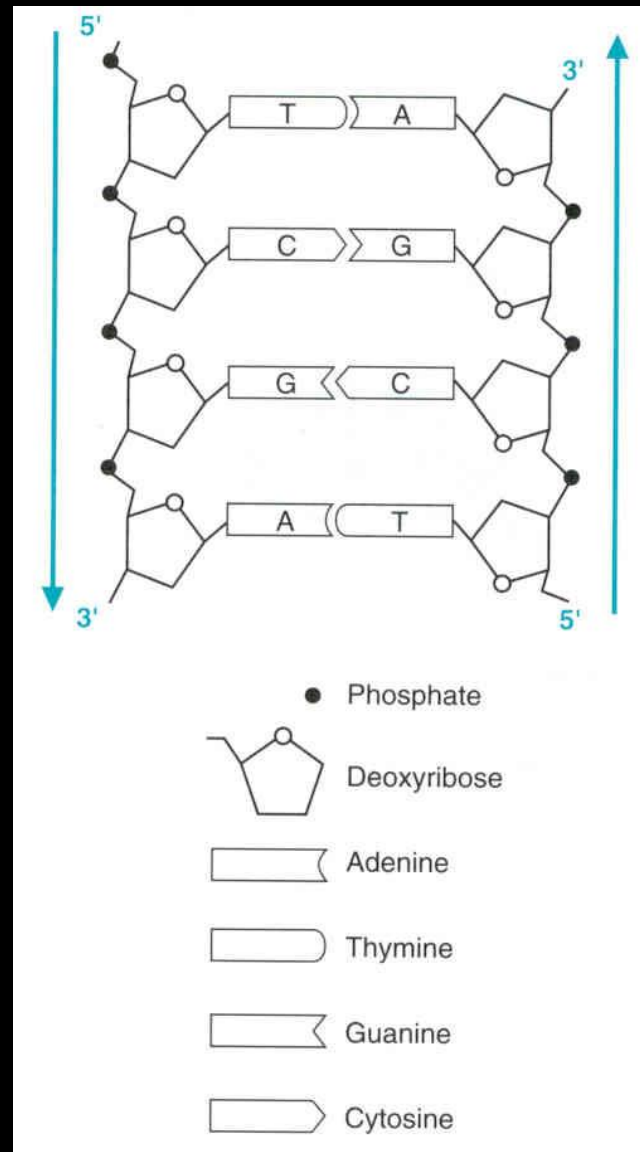
ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DO DNA



Como a ligação entre uma desoxirribose e outra desoxirribose só pode ser feita quando um grupo fosfato liga-se no Carbono 5' do primeiro açúcar e no Carbono 3' do segundo açúcar dizemos que a molécula de DNA “cresce em direção 5' → 3'”

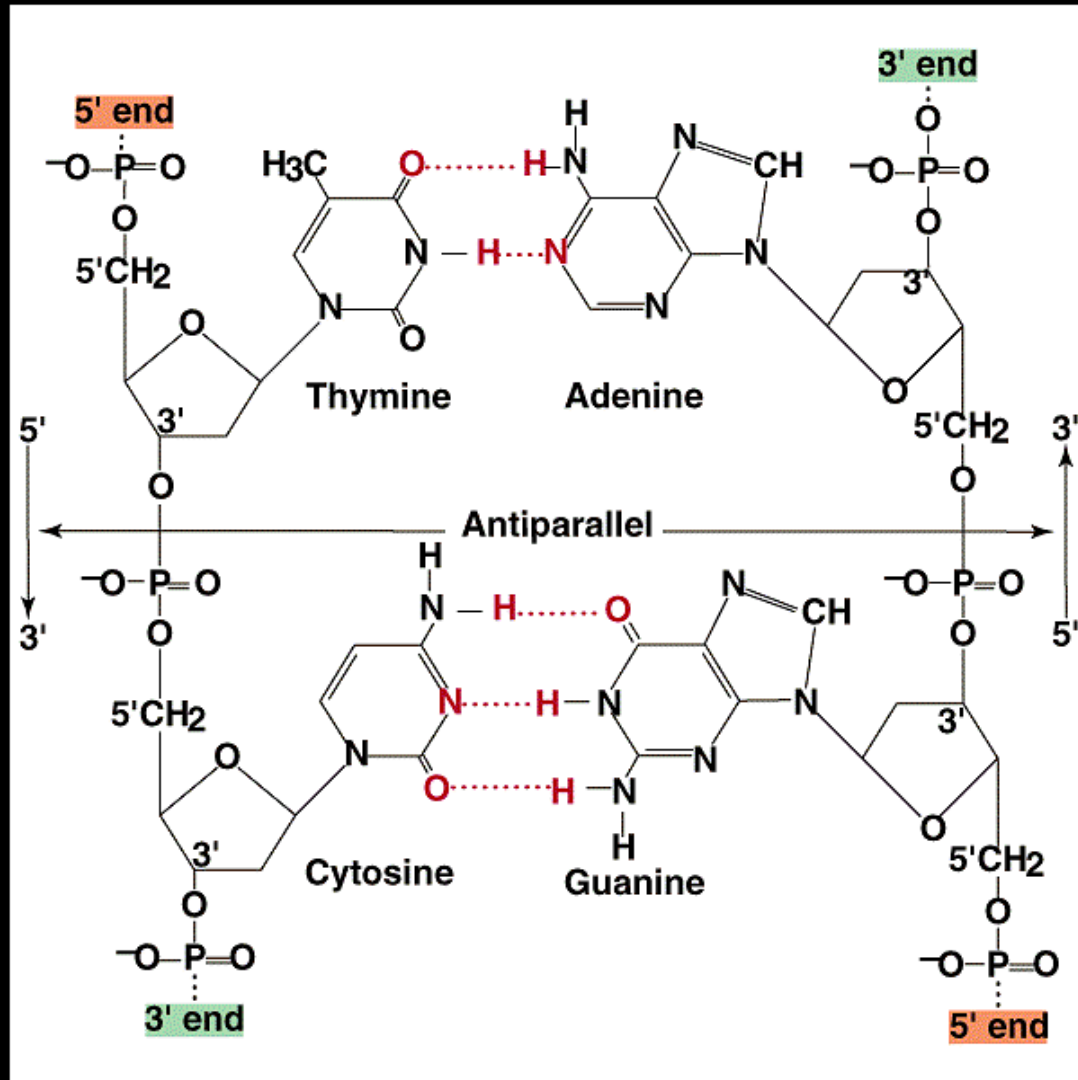
Antiparalelismo

As fitas do DNA estão dispostas em direções opostas



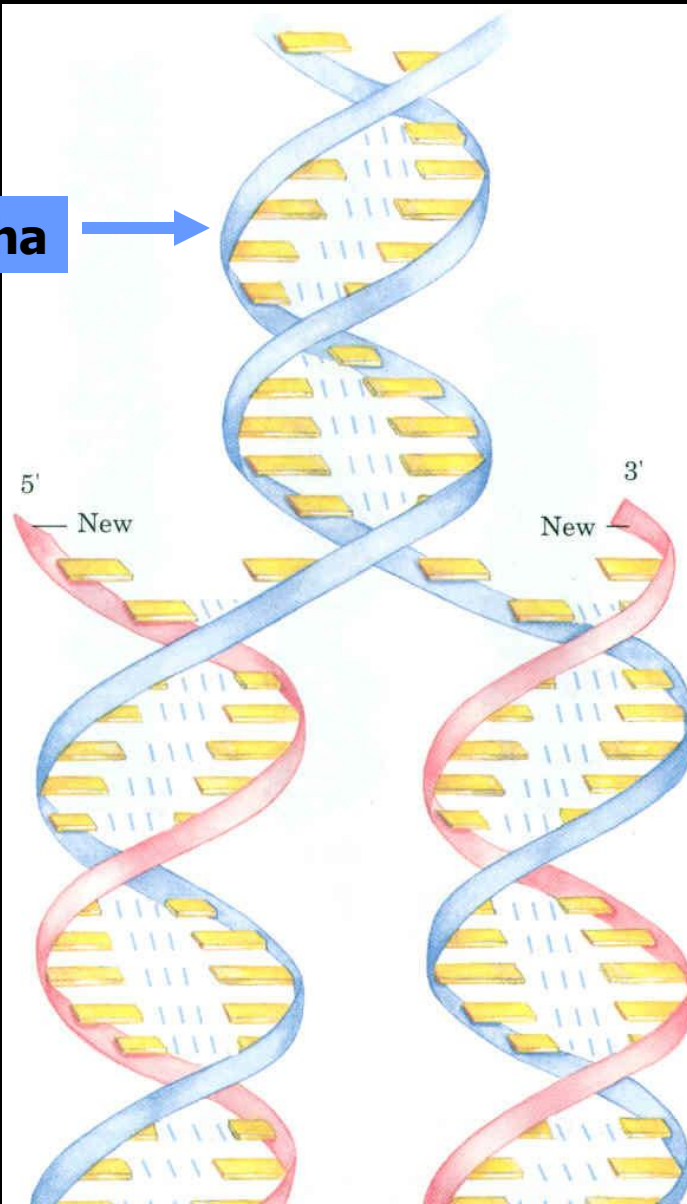
Complementariedade

Cada base de uma fita é pareada com a base complementar da outra fita



Complementariedade

Fita velha



Durante a replicação do DNA as duas **fitas velhas ou mães** servem de molde para cada **fita nova ou filha** complementar, que está sendo sintetizada.

Fita nova

A Dupla Hélice



Fatores que estabilizam a dupla hélice:

- interações hidrofóbicas
- forças de van der Waals
- pontes de hidrogênio

Entre as bases nitrogenadas

- interações iônicas

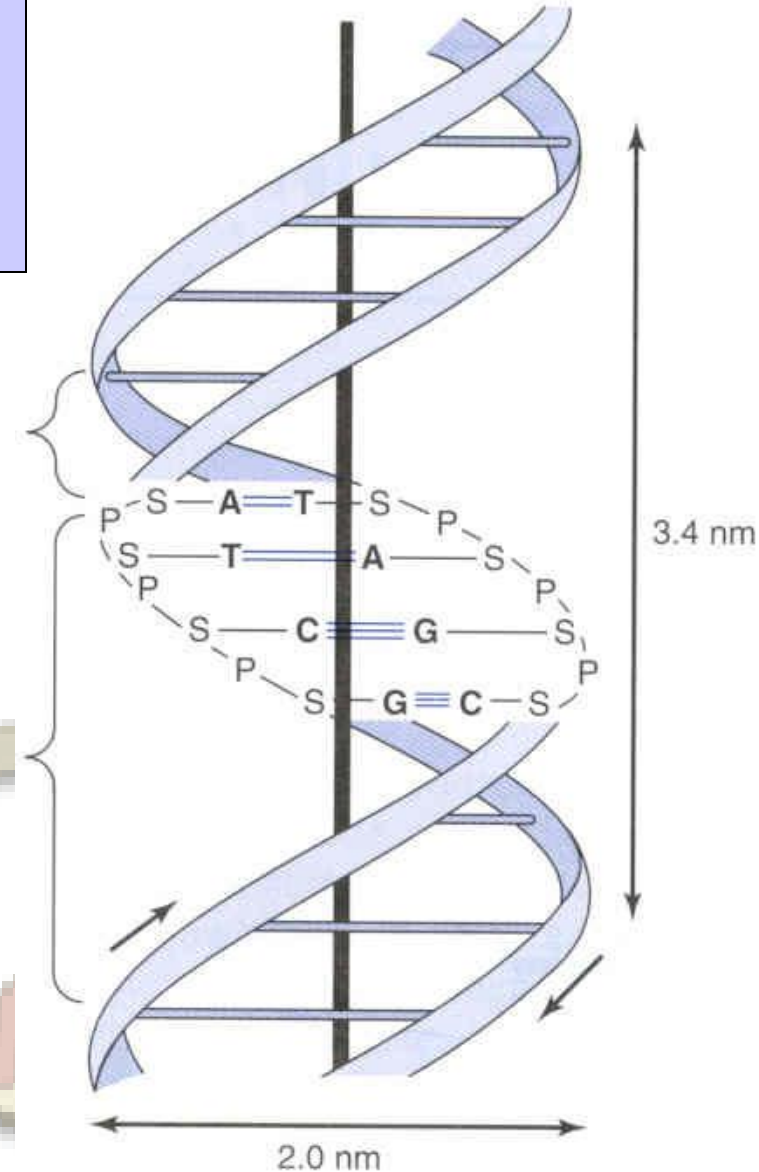
Entre os grupos fosfato do DNA e os cátions (Mg^{2+}) presentes na solução fisiológica

A Dupla Hélice

A dupla hélice apresenta dois tipos de sulcos aos quais se ligam as proteínas da cromatina

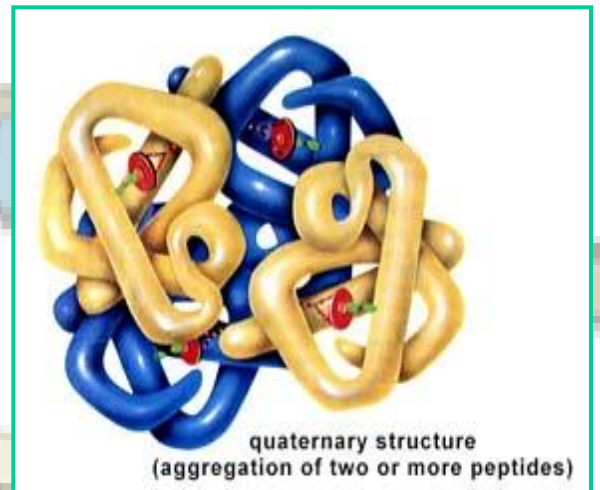
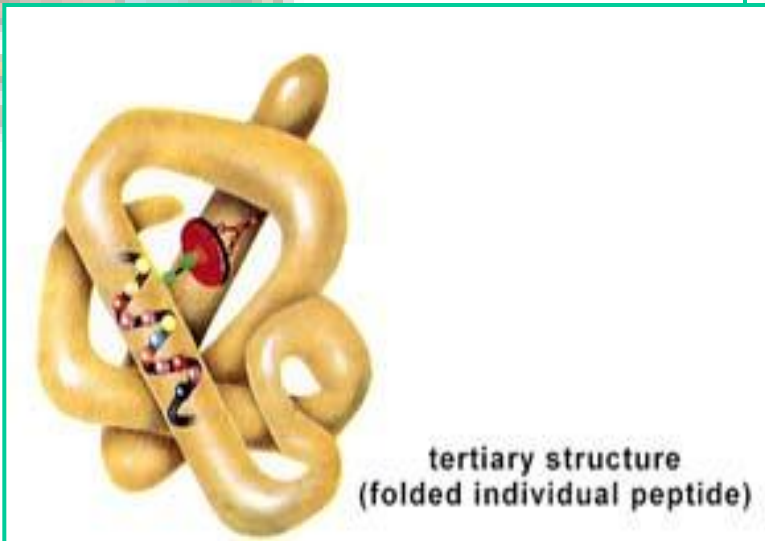
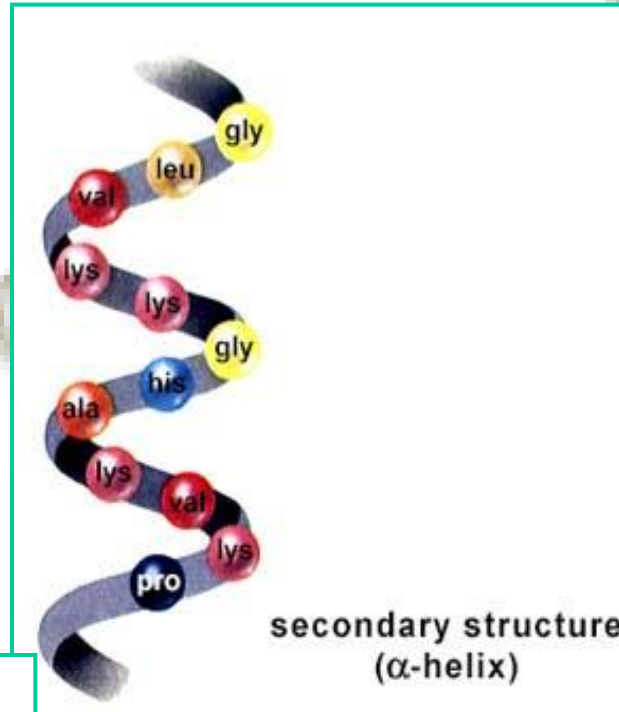
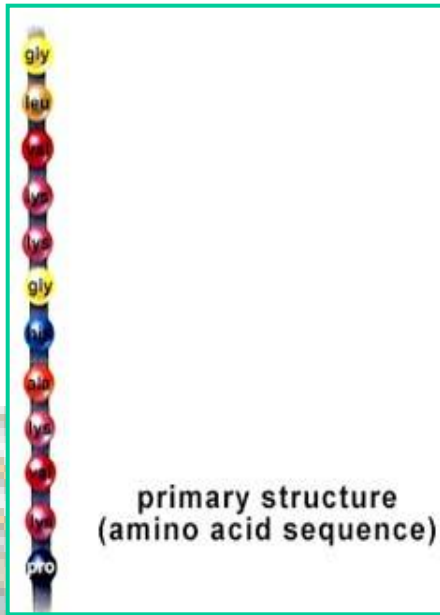
Sulco menor

Sulco maior



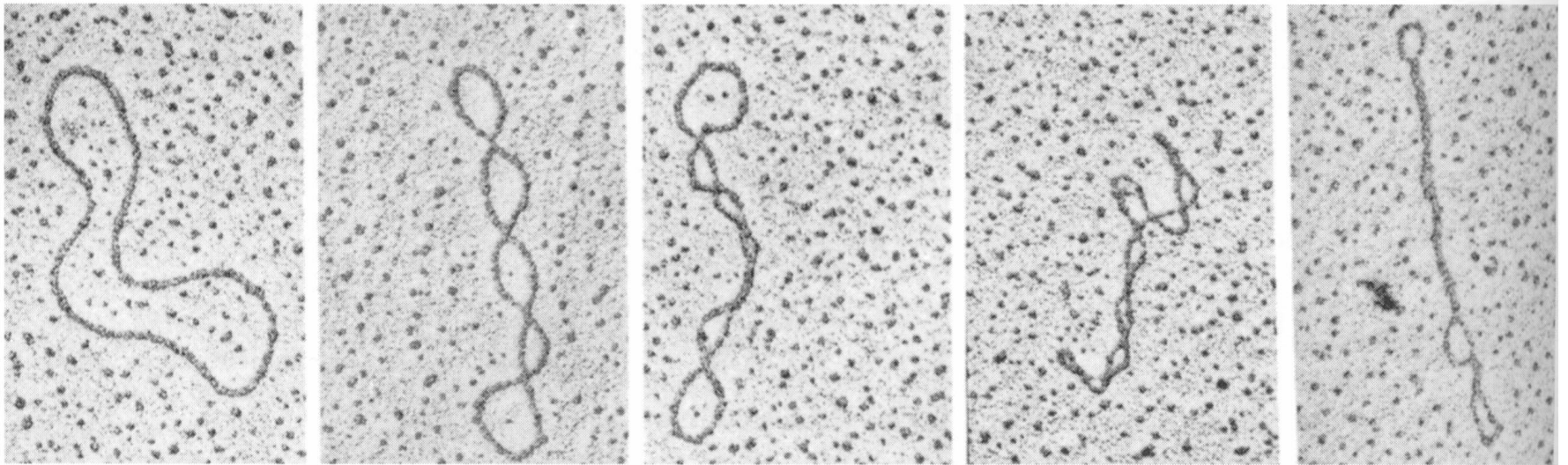


Proteínas: níveis de complexidade estrutural

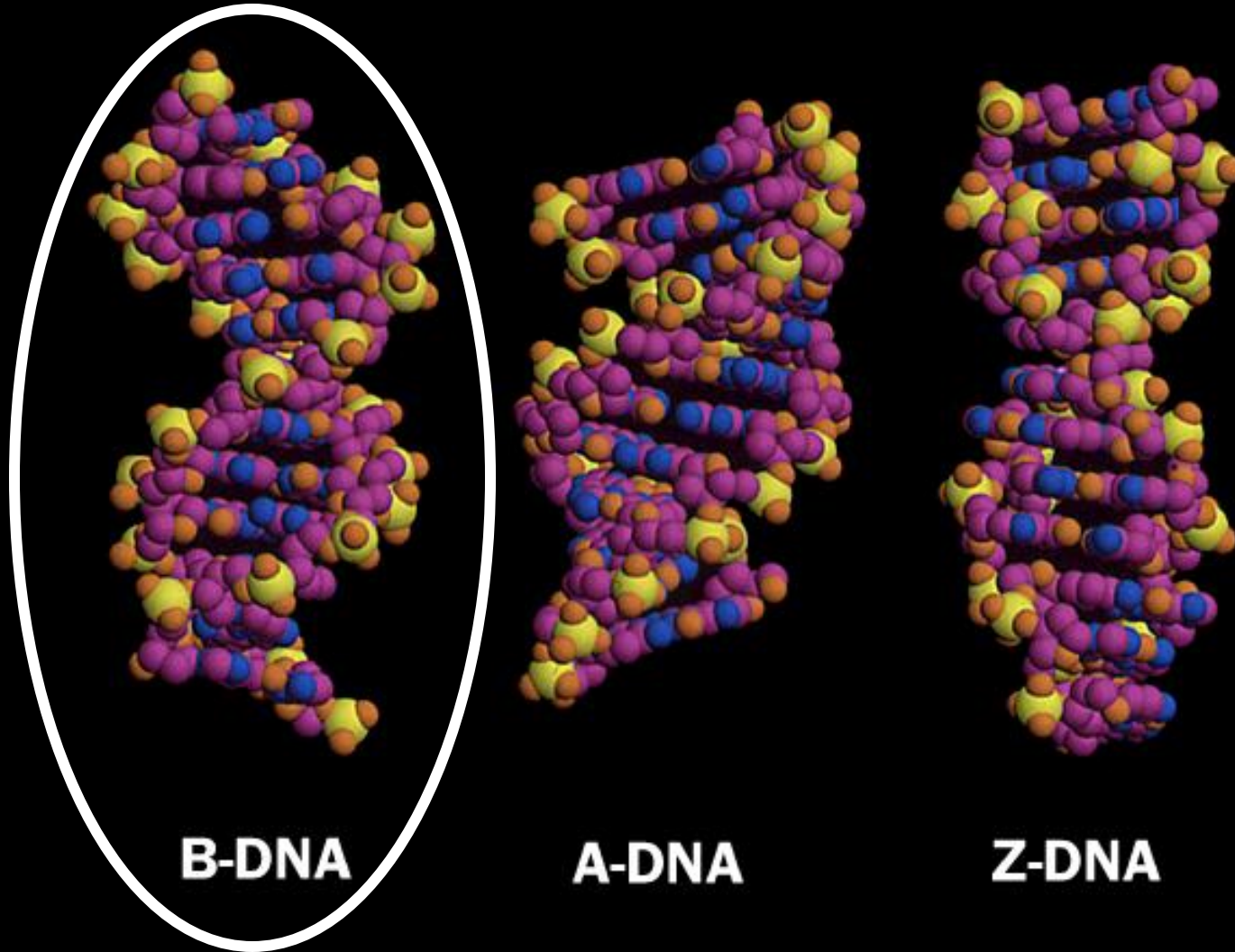


O Empacotamento do DNA: a estrutura terciária do DNA

DNA em procariontes: DNA circular nas formas não-super-helicoidal (esquerda) e super-helicoidal (direita)



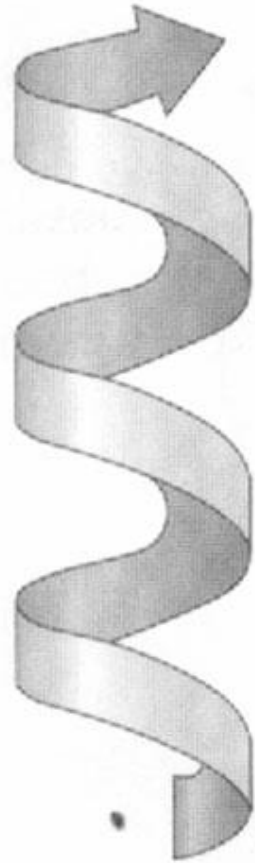
A Dupla Hélice



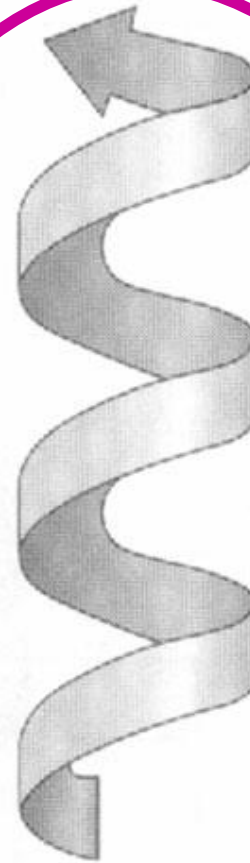
O B-DNA é o predominante em condições fisiológicas

A Dupla Hélice

A forma predominante de torção da espiral do DNA é para a direita ou sentido horário

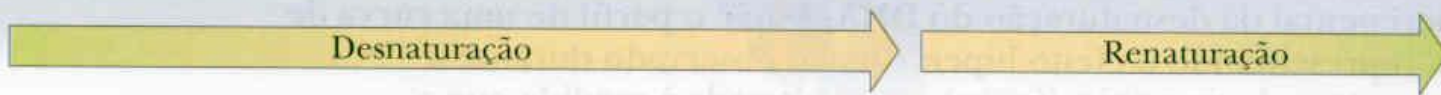
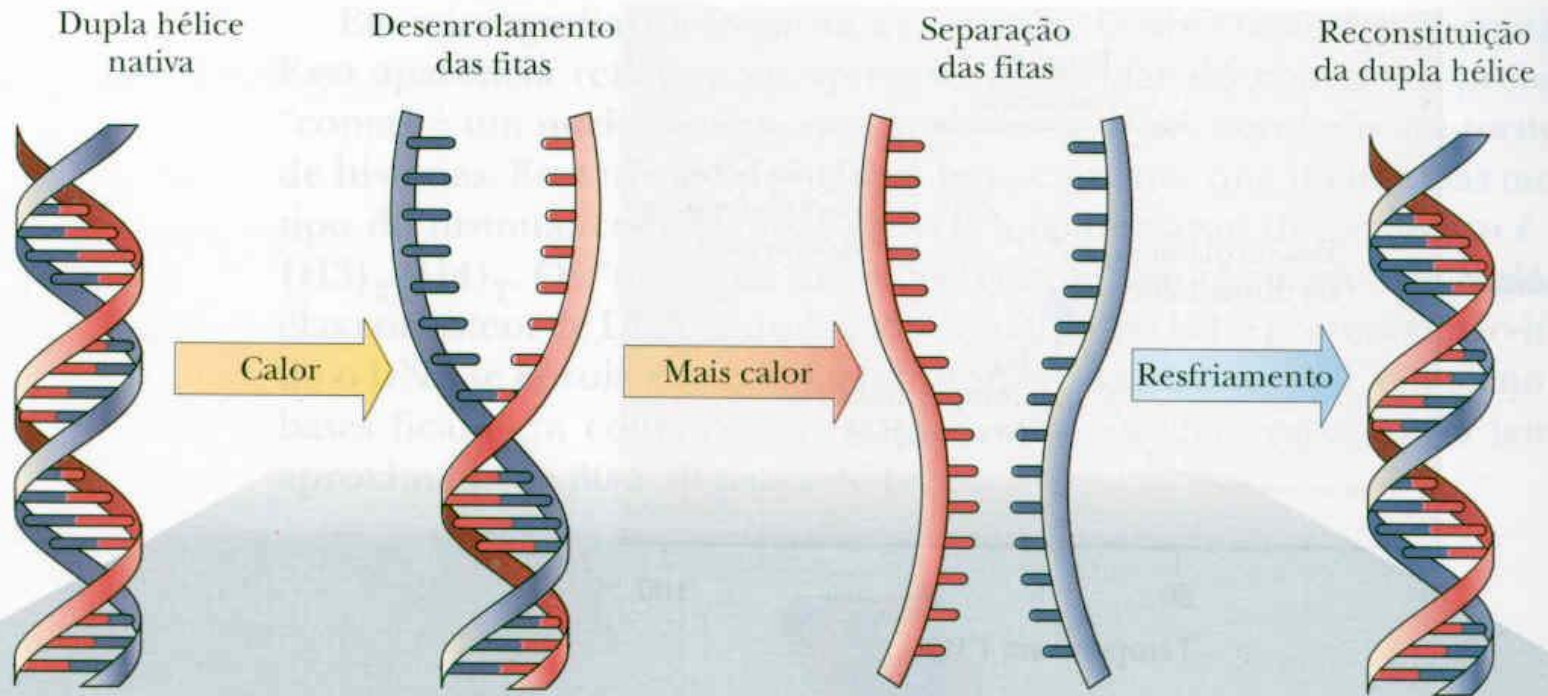


Left-handed



Right-handed

Propriedades Químicas e Físicas do DNA





REPLICAÇÃO DO DNA

✓ **Conservativa ou Semiconservativa?**

✓ **Unidirecional ou Bidirecional?**

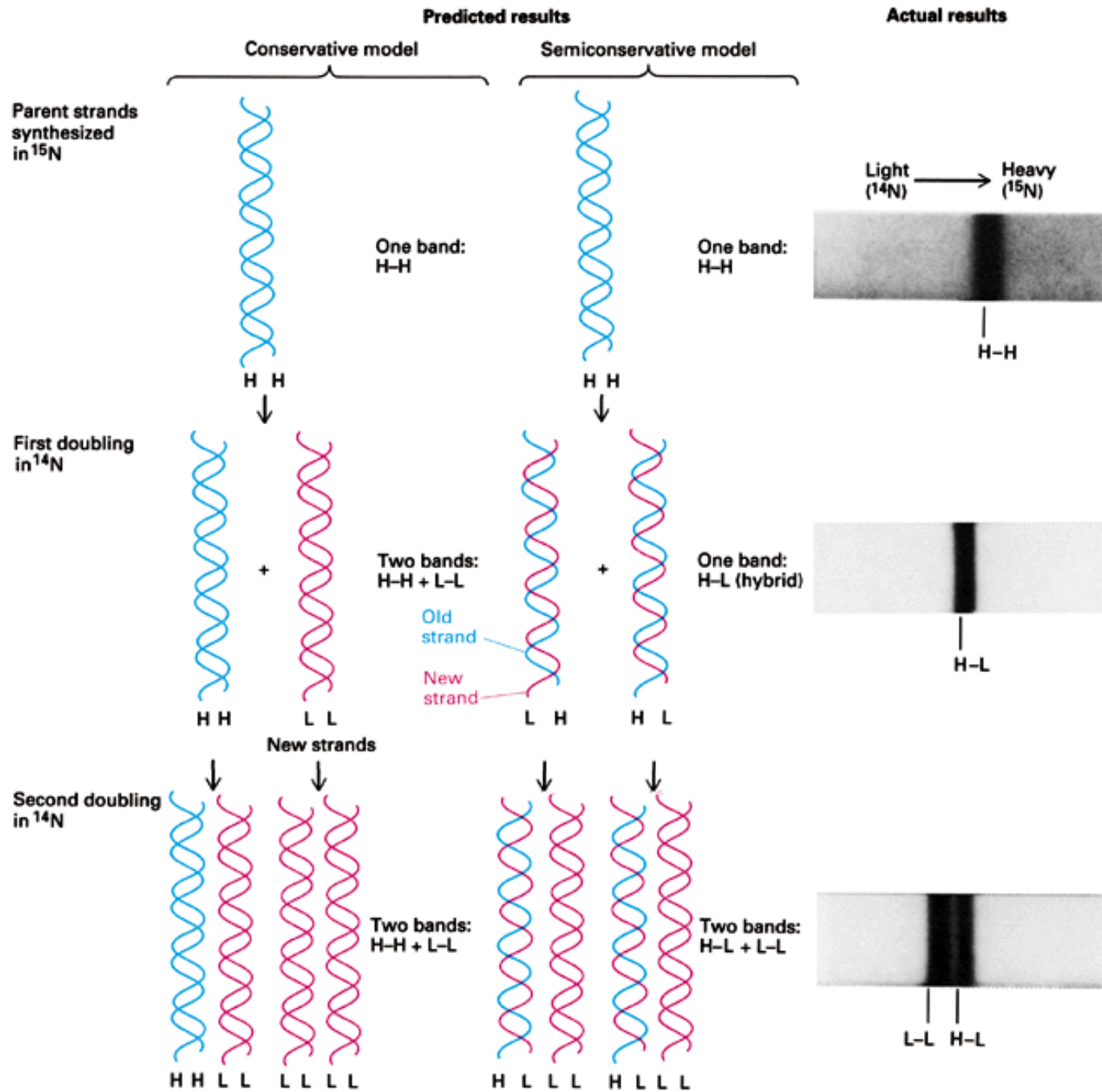
REPLICAÇÃO

SEMICONSERVATIVA



Evidência baseada em um experimento clássico de Meselson-Stahl em 1958

- Células de *E. coli* foram inicialmente colocadas em um meio para crescimento contendo sais de amônia preparados com ^{15}N (nitrogênio pesado – “heavy”) até todo o DNA celular conter o isótopo.
- As células foram, então, transferidas para um meio contendo ^{14}N (nitrogênio leve – “light”).
- As amostras foram analisadas com gradiente de densidade que separa as duplas H-H, L-L e H-L em bandas distintas.



PNAS

44:671, 1958



A replicação é semi-conservativa

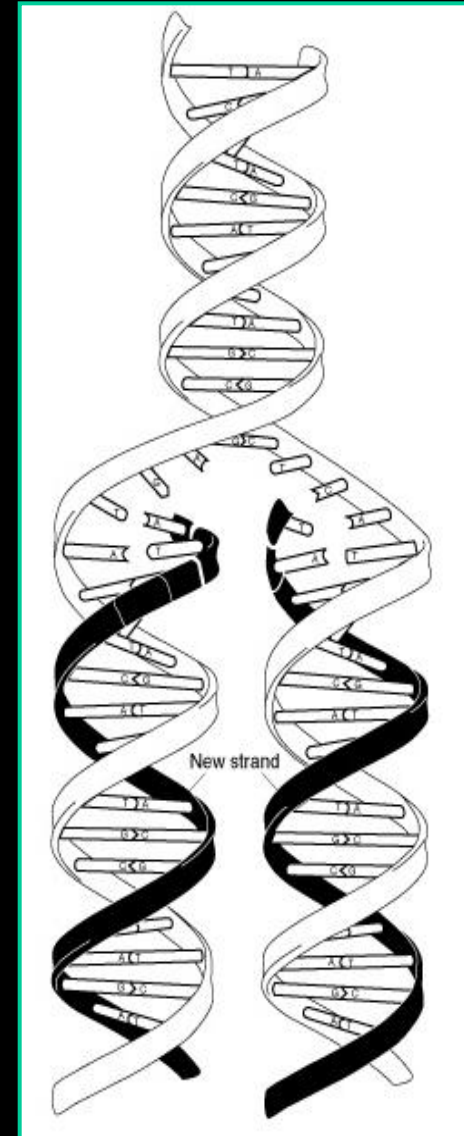
- The Meselson-Stahl experiment

Semiconservative replication

Original DNA
Helix



DNA helixes
after one round
of replication



ORIGEM DA REPLICAÇÃO



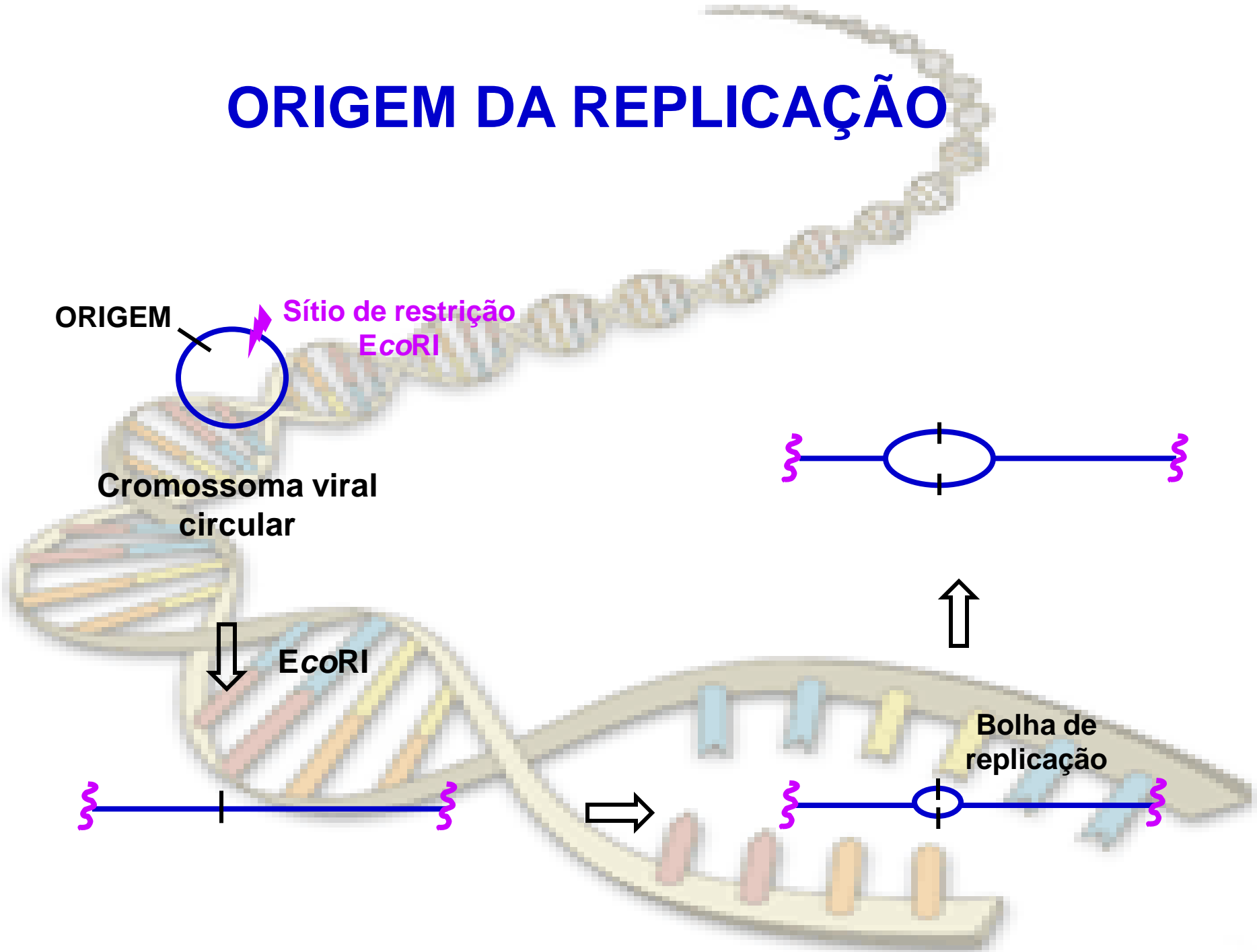
Experimento com SV40 (Simian Virus)

- DNA viral de células infectadas com SV40 foi cortado com a enzima de restrição *EcoRI*, que reconhece um sítio único.
- A partir de um “ponto” vai se formando uma bolha chamada bolha de replicação comprovando a existência de um ponto de origem da replicação

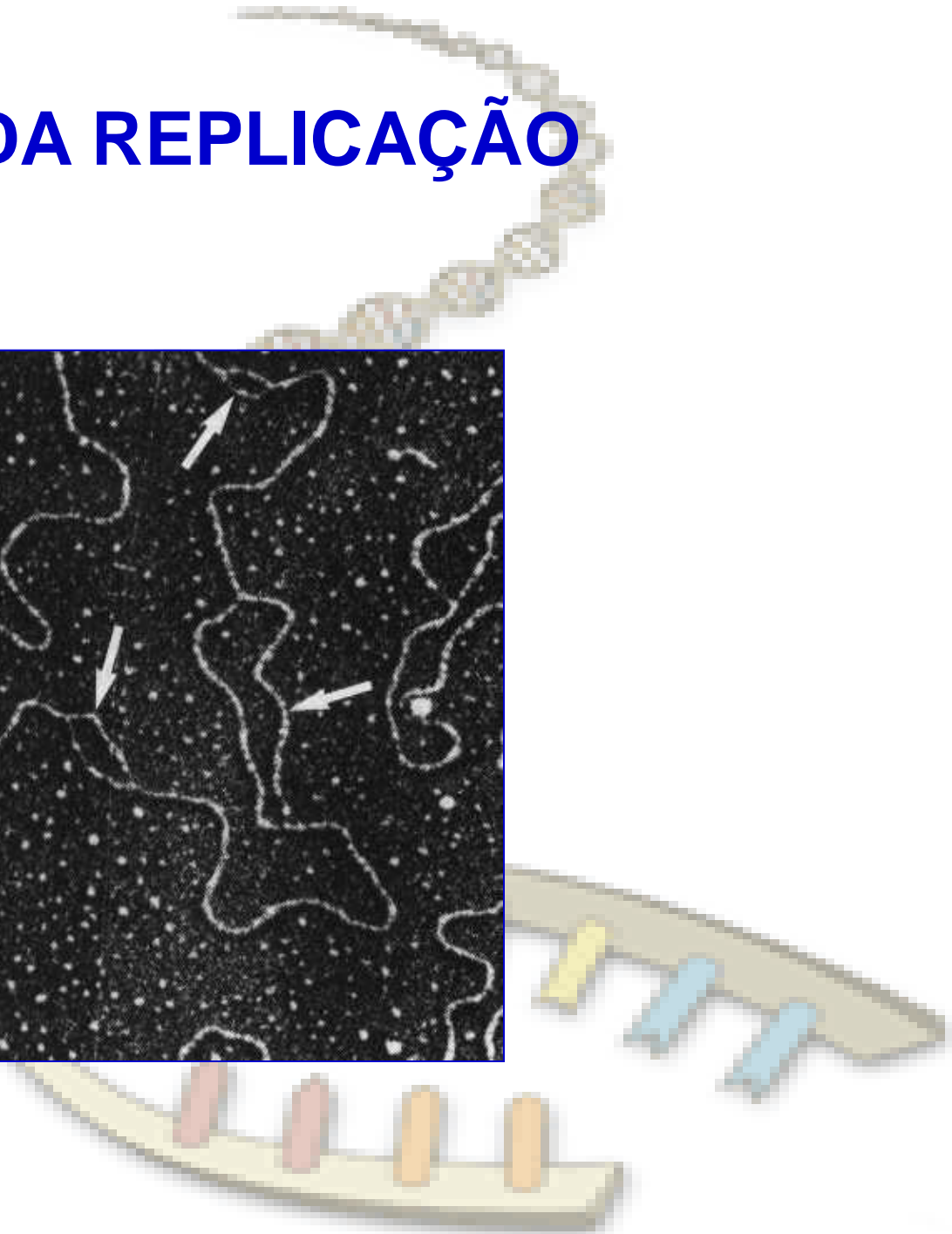
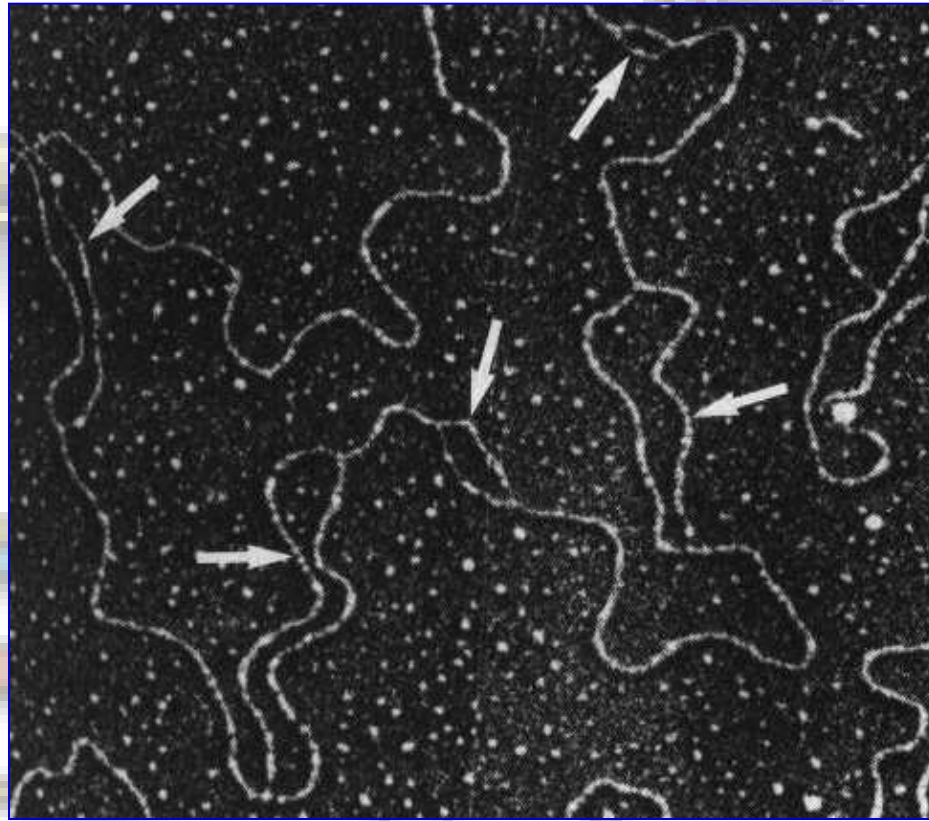
Características da origem de replicação:

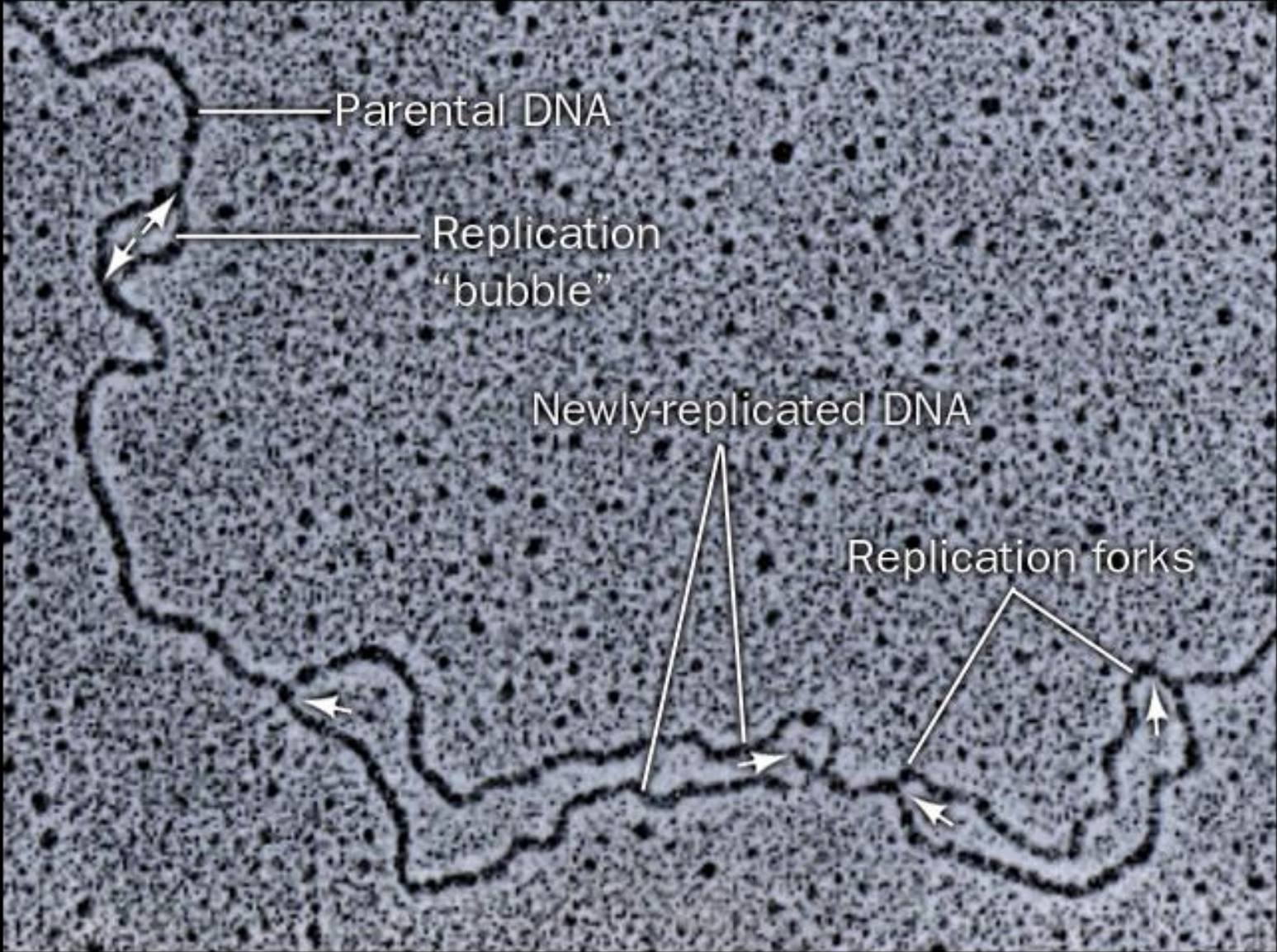
- . estrutura repetitiva
- . sequências ricas em AT

ORIGEM DA REPLICAÇÃO



ORIGEM DA REPLICAÇÃO





— Parental DNA

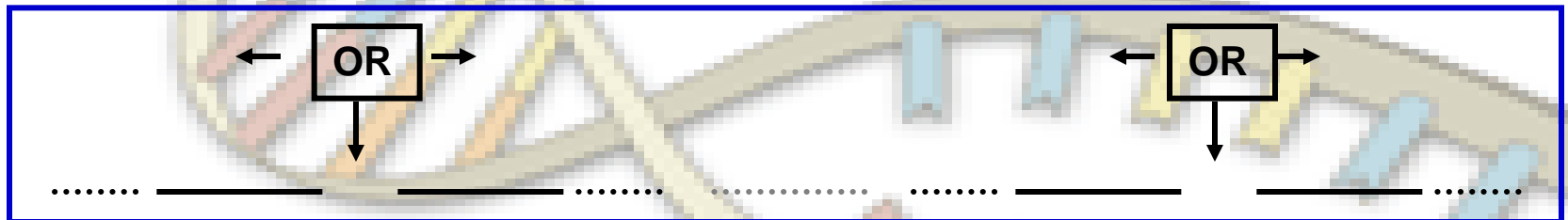
— Replication
"bubble"

Newly-replicated DNA

Replication forks

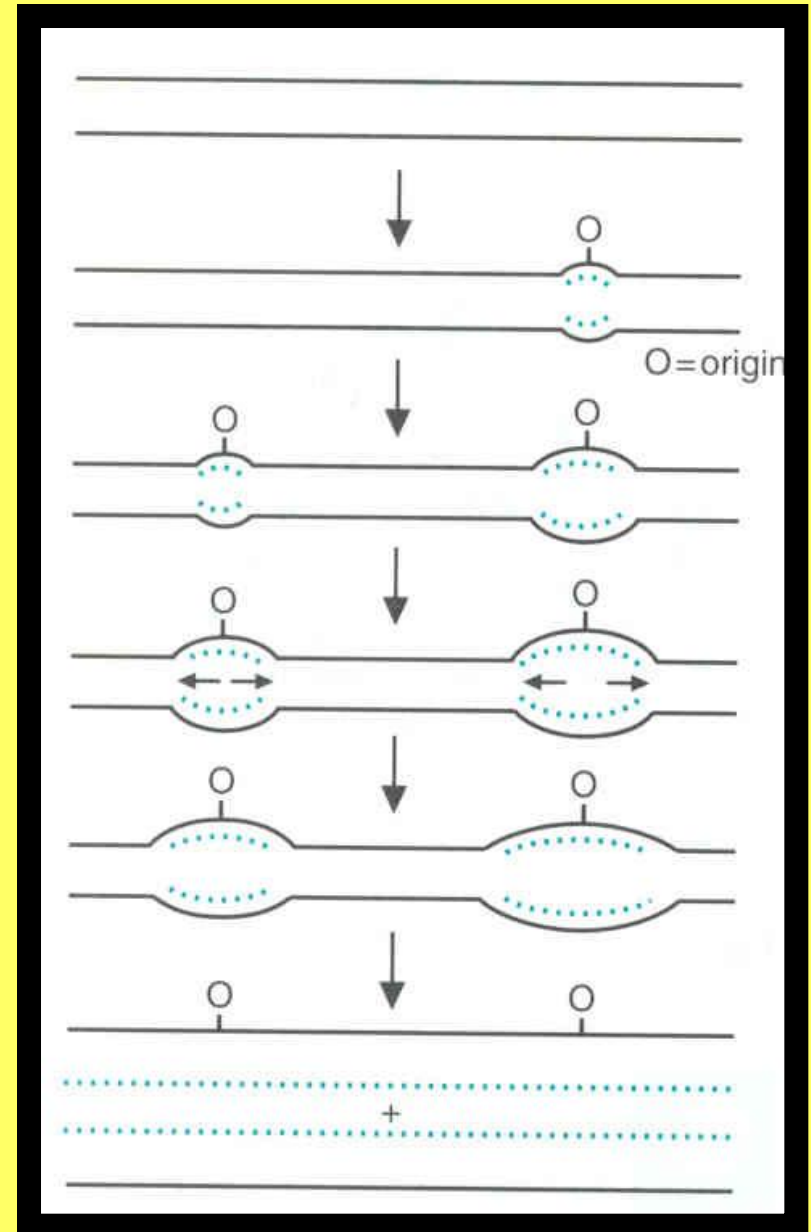
REPLICAÇÃO BIDIRECIONAL

Uma experiência através da autoradiografia de moléculas de DNA marcadas de culturas de células mamárias revelou grupos de replicons (unidades de replicação) com um ponto de origem de replicação central



Síntese de DNA em Eucariontes: As “Bolhas de Replicação”

- Nos eucariontes, a replicação requer “múltiplas origens”, devido ao tamanho de seu genoma. A replicação é bidirecional e, em ambas as fitas, simultânea.
- Este processo gera “bolhas de replicação”.



Regiões Codificadoras e Não-Codificadoras do DNA

O DNA é formado por 2 regiões:

Intergênicas

Gênicas

Intergênicas

Gênicas

Região Gênica

É a porção que codifica para um produto final, que pode ser uma cadeia polipeptídica ou um RNA

Região Intergênica

É a porção regulatória, que sinaliza o início ou o final de um gene, que influencia a transcrição gênica, ou que é o ponto de início para a replicação do DNA


PROCESSO DE REPLICAÇÃO



Os mecanismos celulares responsáveis pela replicação do DNA foram descobertos primeiramente em bactérias.

A replicação em eucariontes ocorre através de proteínas análogas e com processos semelhantes à replicação do DNA de *E. coli*

PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS (SISTEMA DE REPLICAÇÃO DO DNA)

1. DNA Polimerases
 2. Endonucleases
 3. Helicases
 4. Topoisomerases
 5. Primases
 6. Telomerases
- 
- The background features a stylized illustration of a DNA double helix on the left side, with its two strands in different colors (red, blue, green, yellow) and connected by horizontal rungs. On the right side, there is a diagram of a replication fork, showing a grey Y-shaped structure with several blue and yellow rectangular blocks representing proteins or enzymes attached to the DNA strands.

DNA POLIMERASE



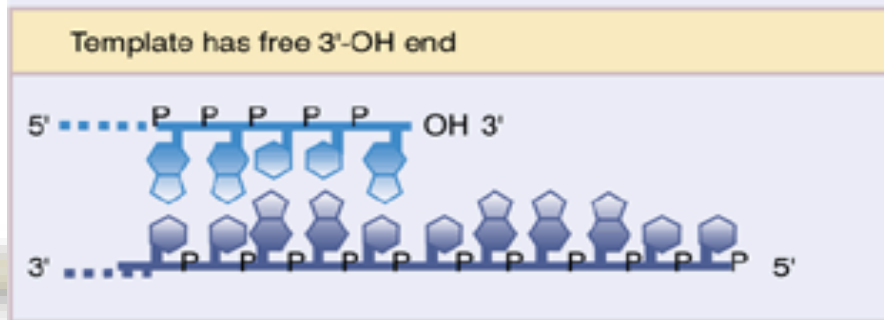
- São incapazes de quebrar as pontes de hidrogênio que ligam as duas fitas do DNA
- Só alongam uma fita de DNA/RNA pré-existente
- Catalisam a adição de um nucleotídeo no radical hidroxil da extremidade 3' da cadeia que está se formando. Desta forma, as fitas só podem crescer no sentido $5' \rightarrow 3'$

DNA Polimerases

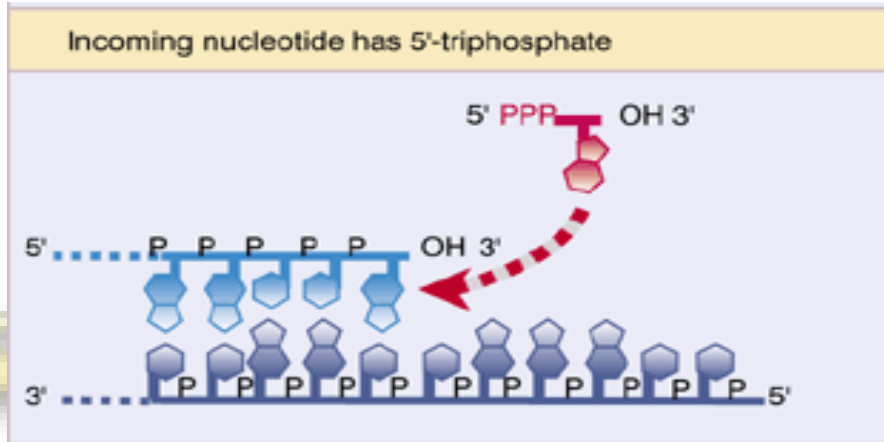
- principais enzimas envolvidas no processo; responsáveis pela adição de nucleotídeos e reparo
- requerem um modelo e um *primer* (segmento de RNA sintetizado pela primase) complementares para início – alongamento
- 3 tipos principais : I, II, III
 - I : importante no sistema de reparo
 - III: principal e mais complexa (mais de 10 subunidades)

Adição de nucleotídeos

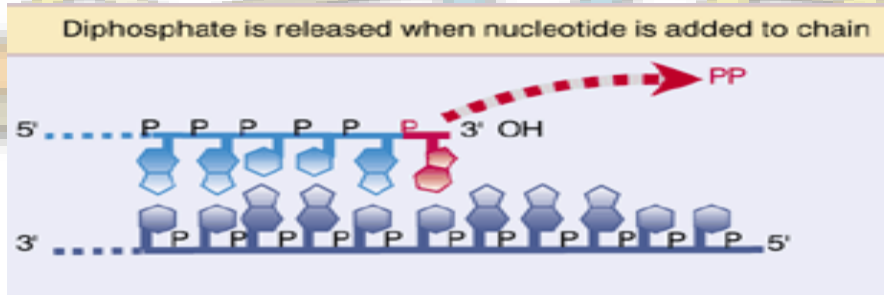
1



2

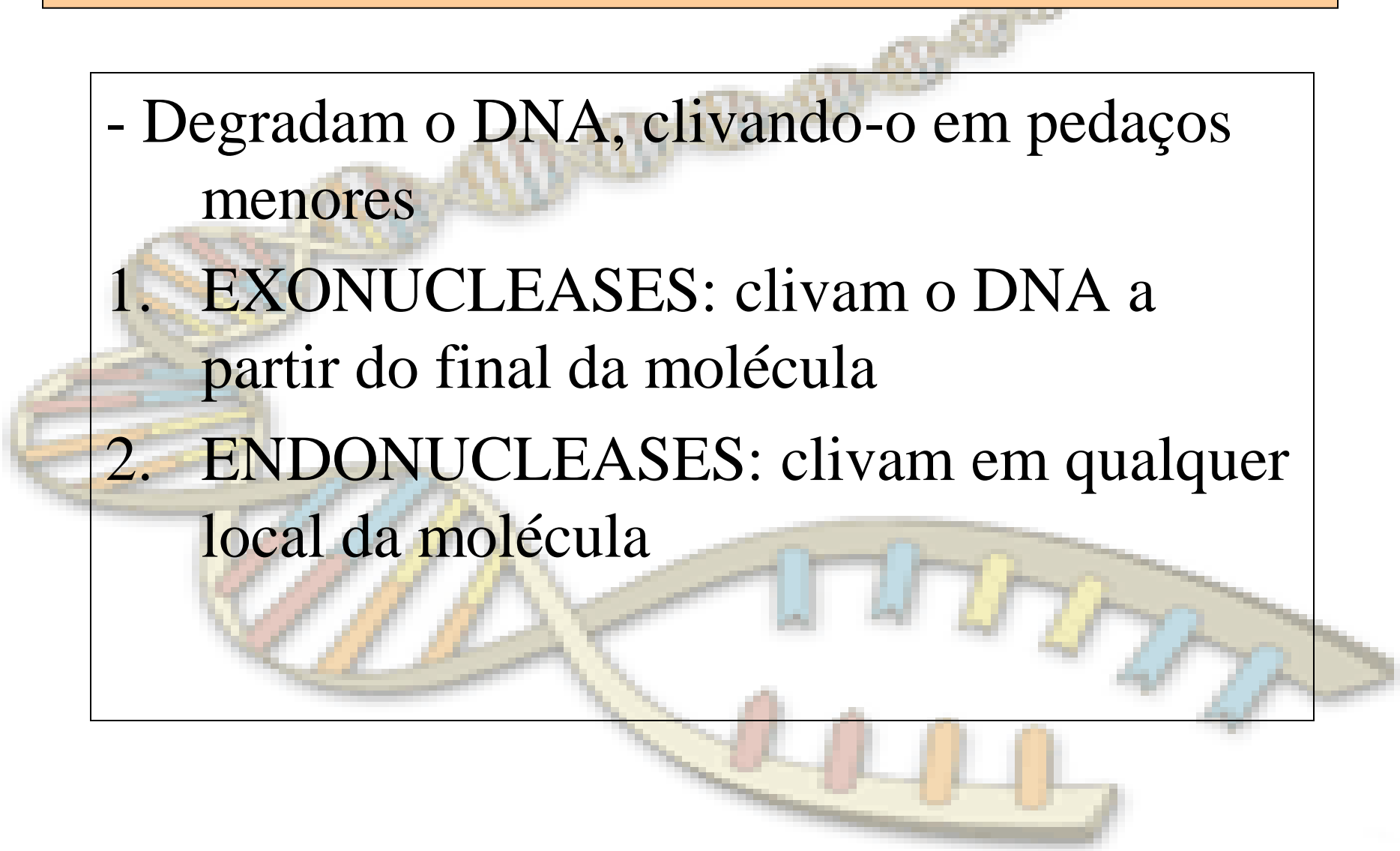


3



NUCLEASES

- Degradam o DNA, clivando-o em pedaços menores
- 1. **EXONUCLEASES:** clivam o DNA a partir do final da molécula
- 2. **ENDONUCLEASES:** clivam em qualquer local da molécula



OUTRAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE REPLICAÇÃO



HELICASES – constituem uma classe de enzimas que podem se mover ao longo da fita dupla de DNA utilizando a energia da hidrólise de ATP para separar as duas fitas da molécula.

SSB (“single-strand-binding”) – ligam-se a cada uma das fitas impedindo o reanelamento das mesmas.

PRIMASE – RNA polimerase que sintetiza pequenas moléculas de RNA utilizadas como iniciadores durante o processo de replicação do DNA.

TOPOISOMERASES – Responsáveis por aliviar a torção na parte da fita que não está sendo replicada.

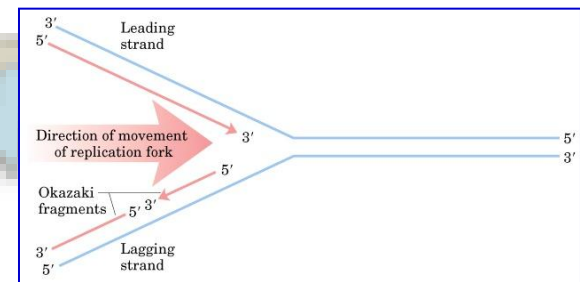
PROCESSO DE REPLICAÇÃO

O movimento da forquilha de replicação revela uma fita molde no sentido $3' \rightarrow 5'$ e outra no sentido oposto $5' \rightarrow 3'$

Desta forma, as fitas novas são sintetizadas em sentidos opostos

FITA “LEADING” – crescimento segue a direção do movimento da forquilha de replicação

FITA “LAGGING” – crescimento no sentido oposto ao movimento da forquilha de replicação



PROCESSO DE REPLICAÇÃO

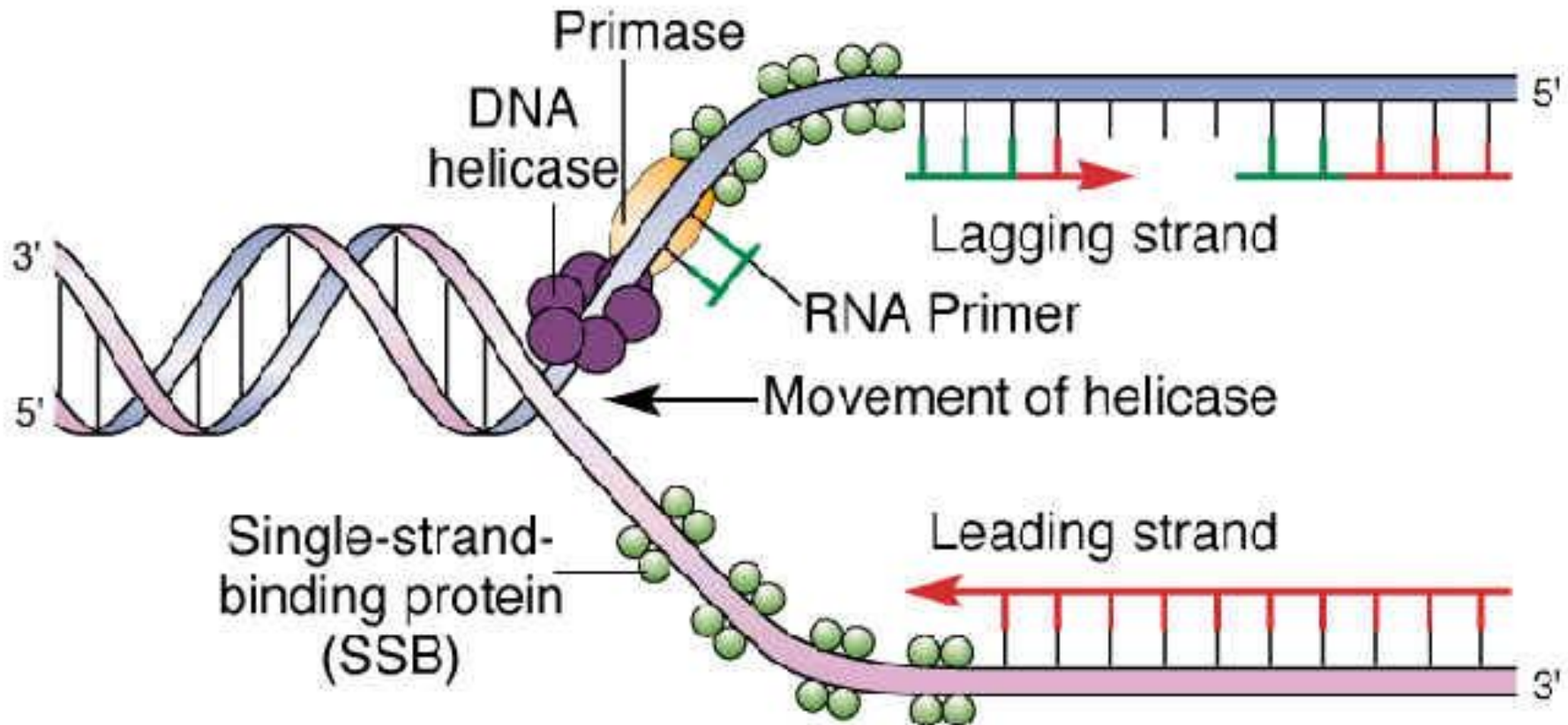


FITA “LEADING” – sintetizada continuamente a partir de um iniciador na fita molde 3' → 5'

FITA “LAGGING” – sintetizada descontinuadamente a partir de múltiplos iniciadores

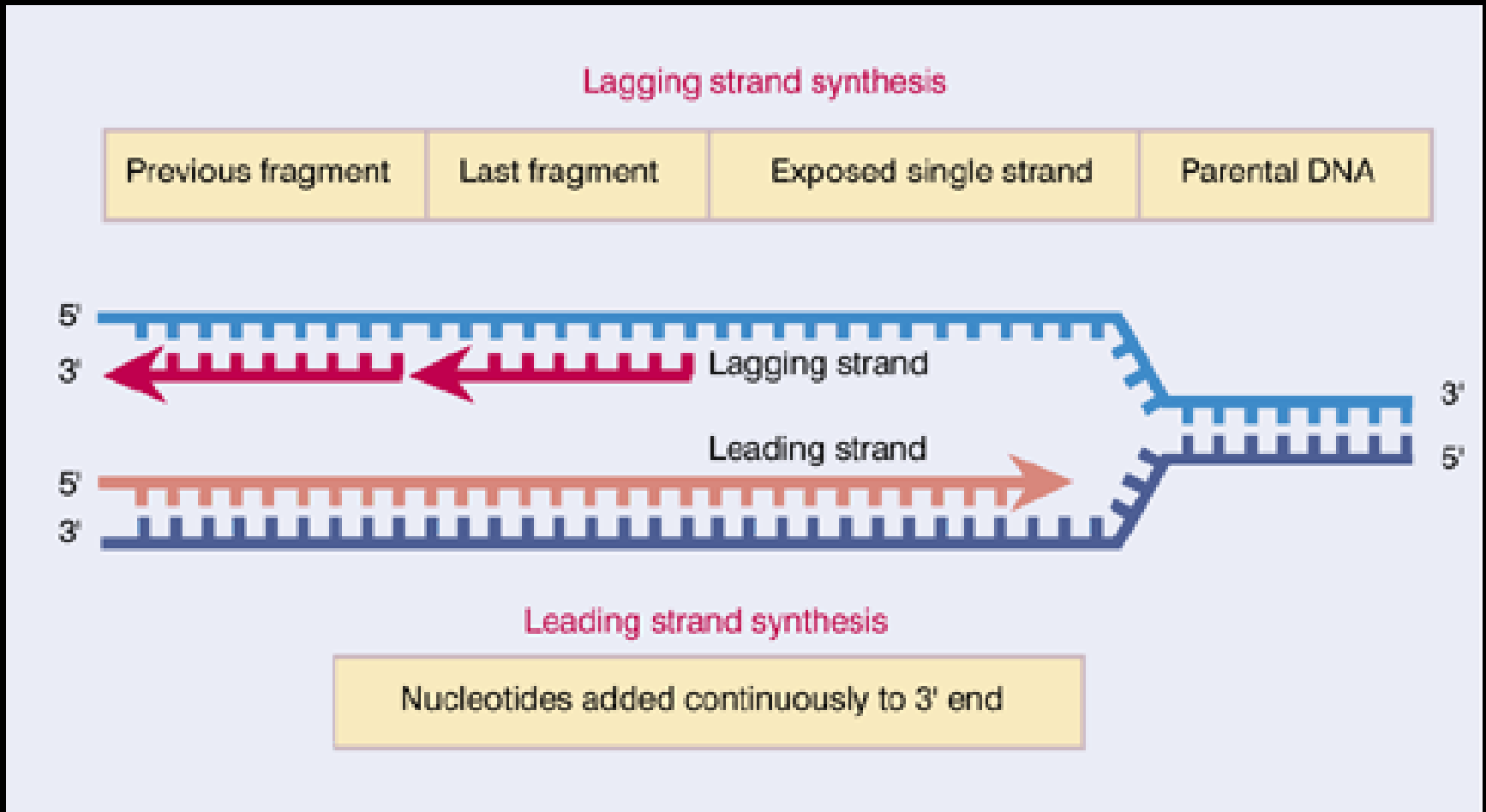
- Sítios descobertos no molde da fita “lagging” são copiados em pequenos iniciadores de RNA pela primase.
- Cada iniciador é alongado pela DNA polimerase resultando na formação dos **FRAGMENTOS DE OKAZAKI**.
- DNA polimerase remove o primer do RNA do fragmento adjacente e preenche os “gaps” entre os fragmentos que, então, são unidos pela DNA ligase.

PROCESSO DE REPLICAÇÃO



PROCESSO DE REPLICAÇÃO

A síntese de DNA é feita na direção 5' → 3' e é semidescontínua

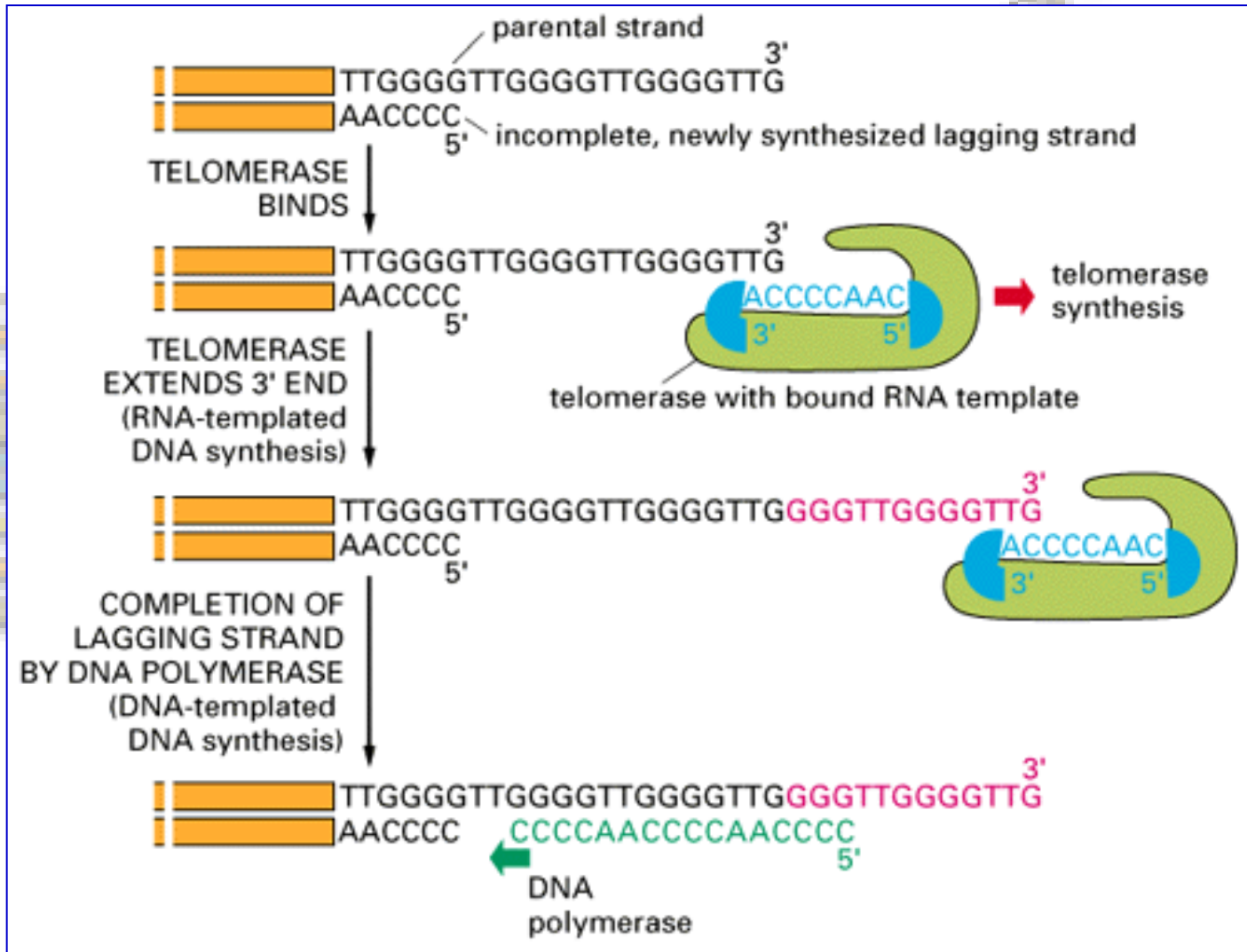


TELOMERASE

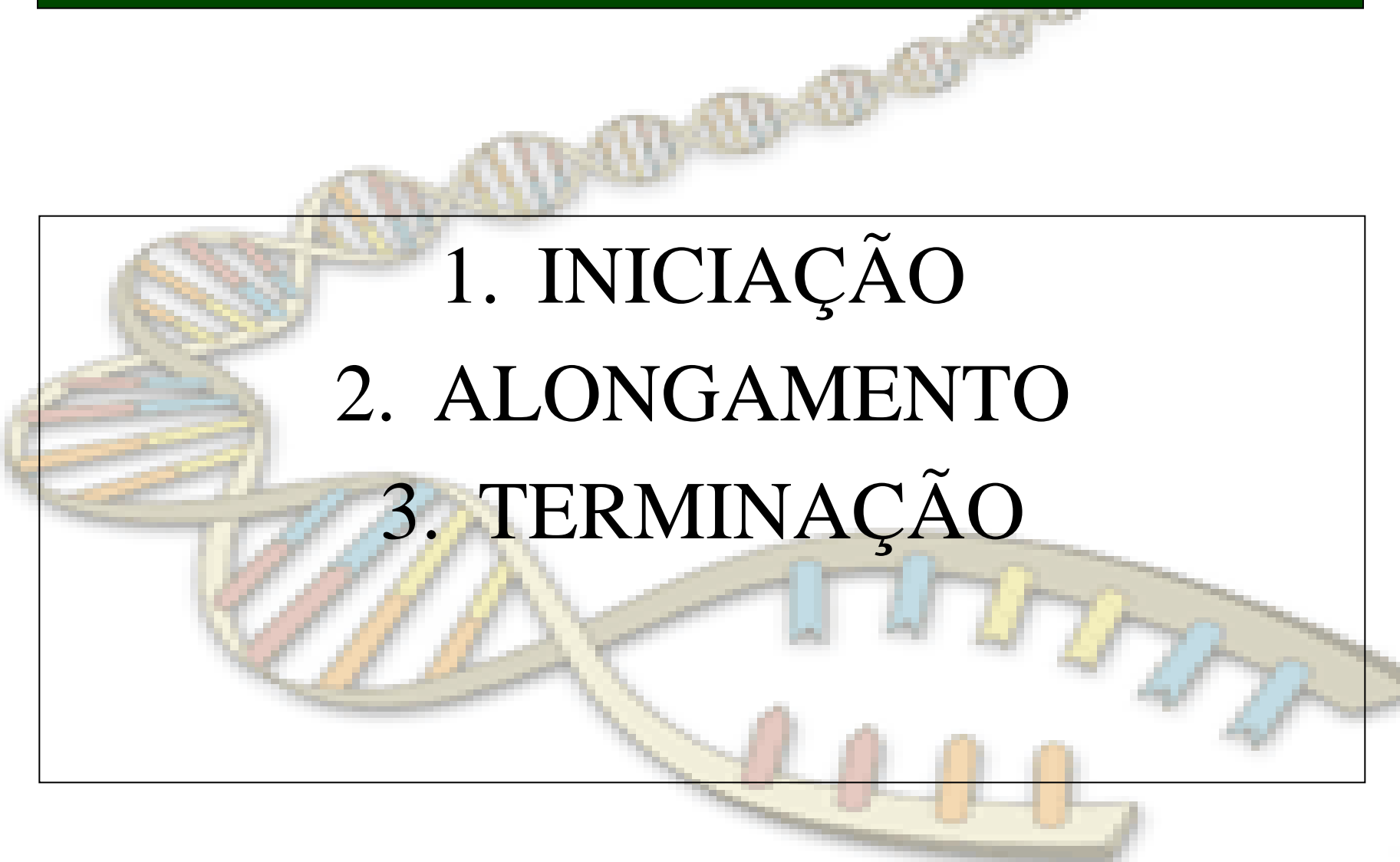


- Os cromossomas de eucariontes são lineares e apresentam sequências repetitivas em suas extremidades denominadas telômeros
- A síntese da fita “leading” continua até o término da fita molde de DNA, no entanto, no telômero a extremidade feita pela primase na fita “lagging” não é digerida.
- Como o iniciador é instável, ele se degrada com o tempo diminuindo, assim, o tamanho do cromossoma.
- Telomerase age evitando a perda do fim do cromossoma.

TELOMERASE



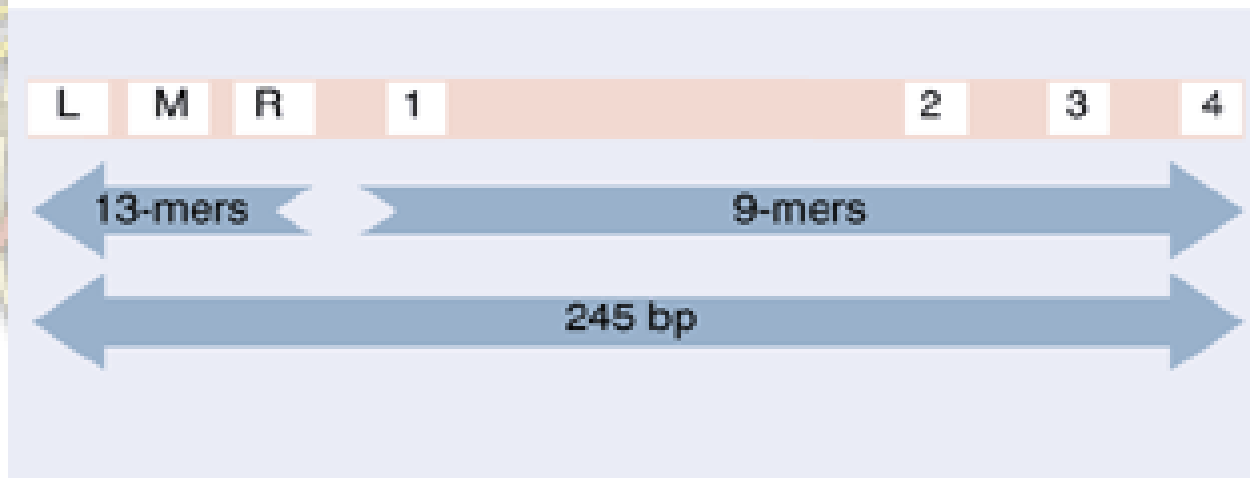
ESTÁGIOS DA REPLICAÇÃO

- 
1. INICIAÇÃO
 2. ALONGAMENTO
 3. TERMINAÇÃO

1. INICIAÇÃO

ORIGEM DA REPLICAÇÃO – OriC :

- 245 pb ;
- 3 repetições de 13 pb;
- 4 repetições de 9 pb; (A=T)



2. ALONGAMENTO



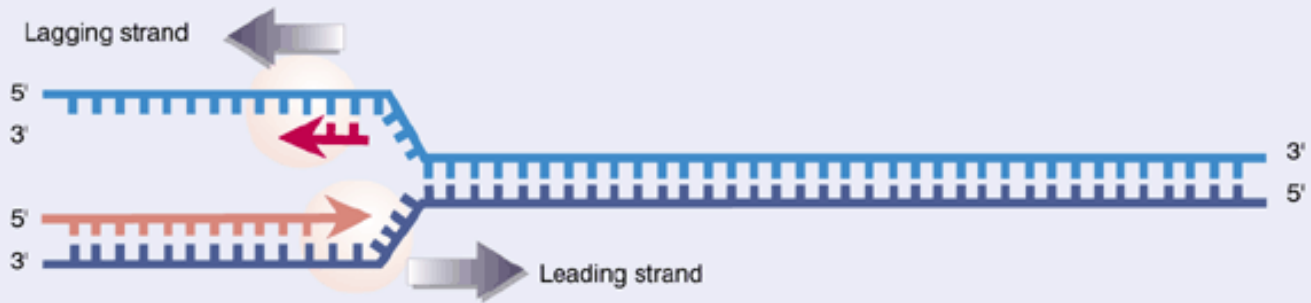
Envolve duas operações distintas, mas relacionadas:

1. Síntese da fita líder
2. Síntese da fita tardia

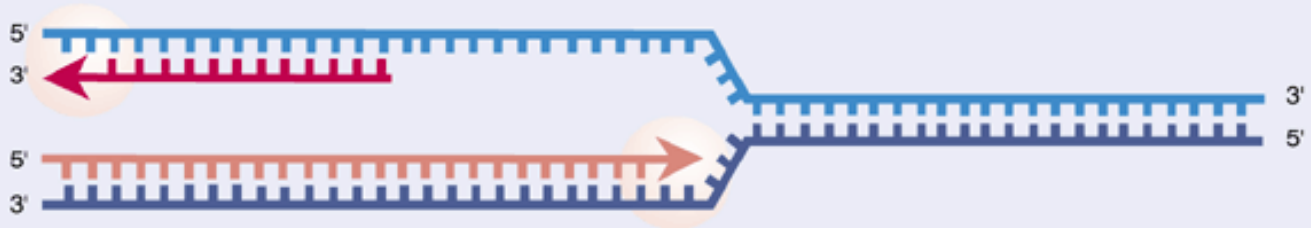
Início comum na forquilha de replicação envolvendo:

- helicases
- topoisomerase
- DNA binding proteins

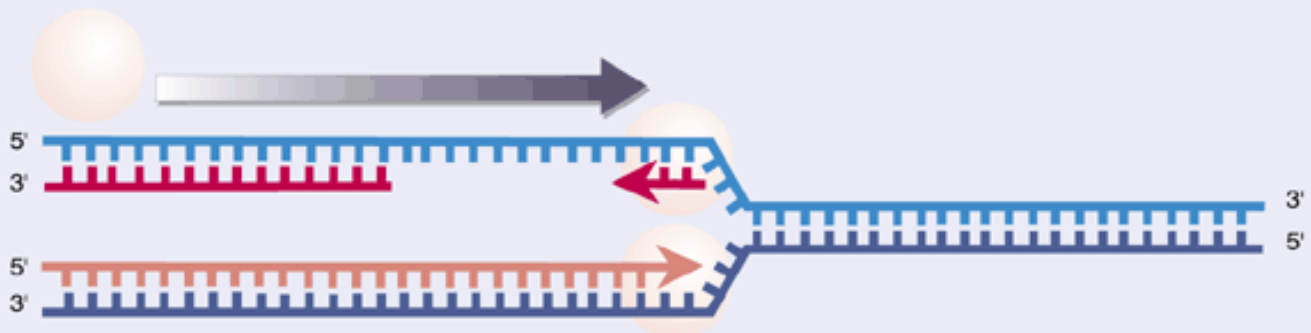
Leading and lagging enzymes start at same point on double helix



Enzymes move in opposite direction and are far apart at completion of Okazaki fragment

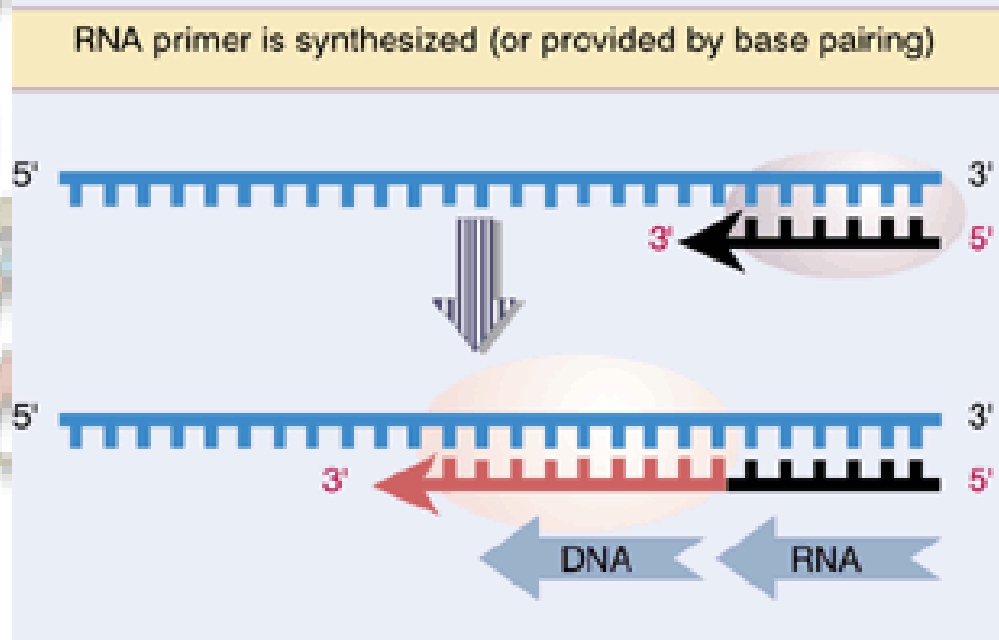


Lagging enzyme must translocate to new position to start another Okazaki fragment



SÍNTESE DA FITA LÍDER

1. Síntese de um RNA primer pela primase na origem de replicação
2. Desoxirribunocleotídeos são adicionados pela DNA polimerase III continuamente a partir da forquilha de replicação



3. TERMINAÇÃO



-Procariontes: DNA circular, quando as duas forquilhas de replicação se encontram ela termina.

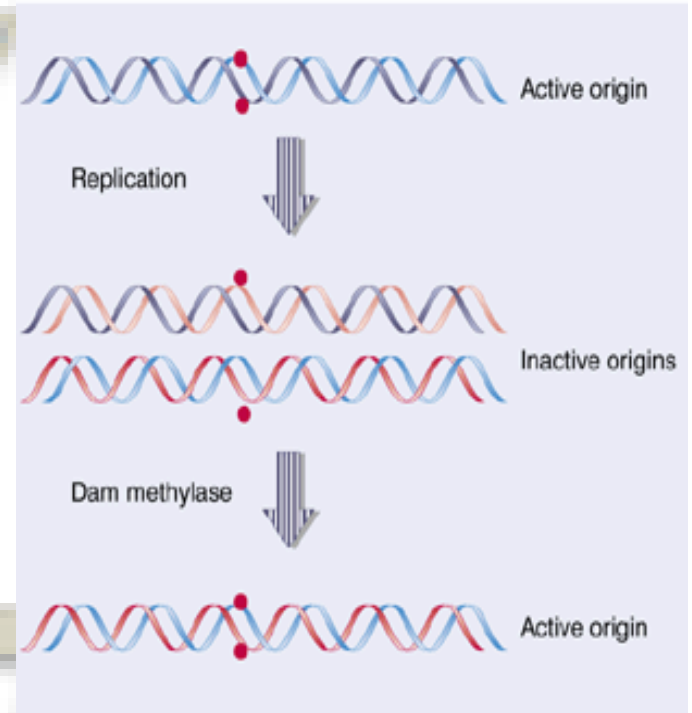
-Eucariontes: sequências de nucleotídeos específicas no final dos cromossomas, incorporadas a telômeros.

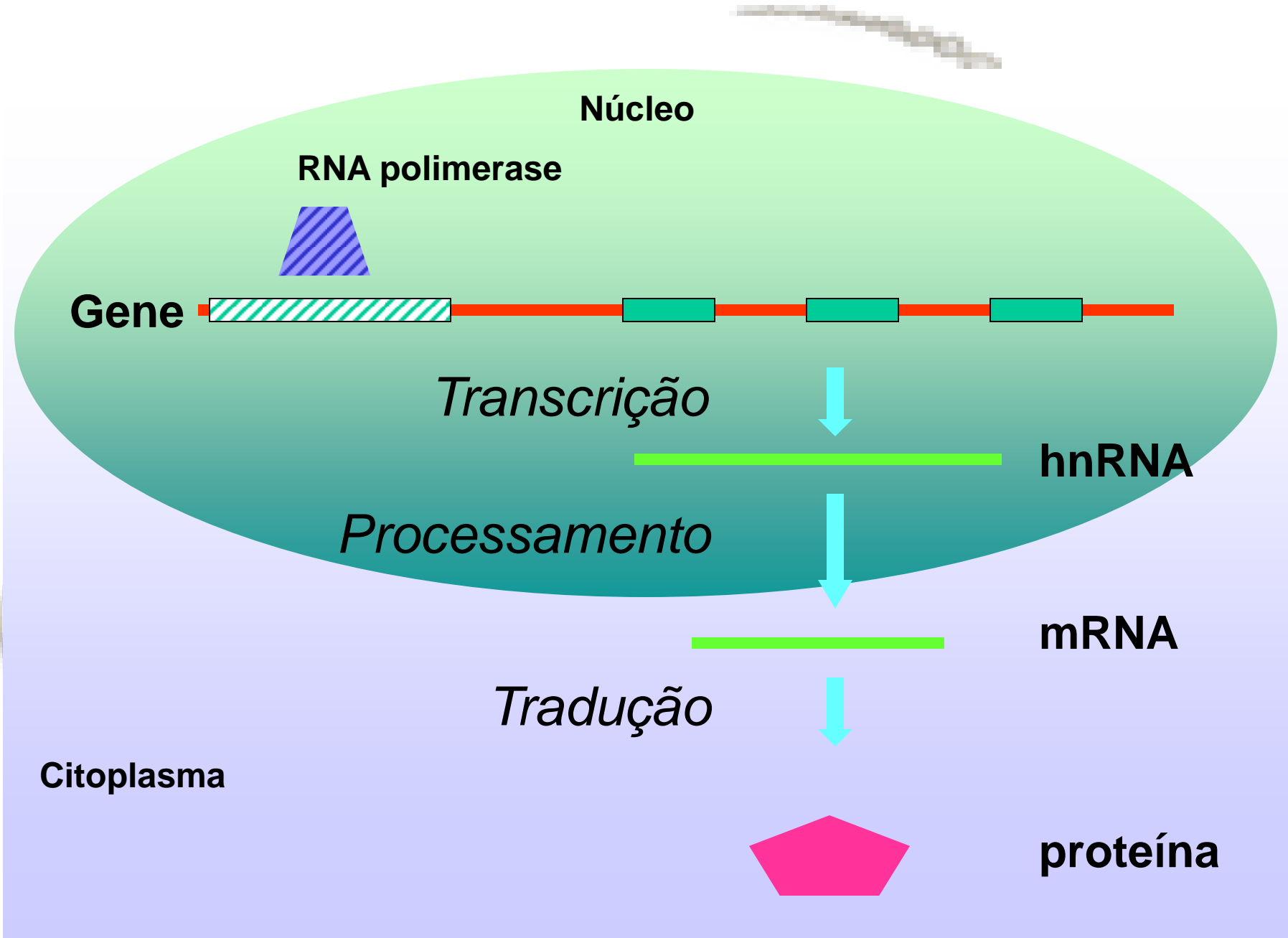
REGULAÇÃO

-única fase regulada da replicação, de forma que só ocorra uma vez por ciclo celular ;

-afetada pela metilação de DNA

-DAM metilase na (5´) GATC sobre a fita parental

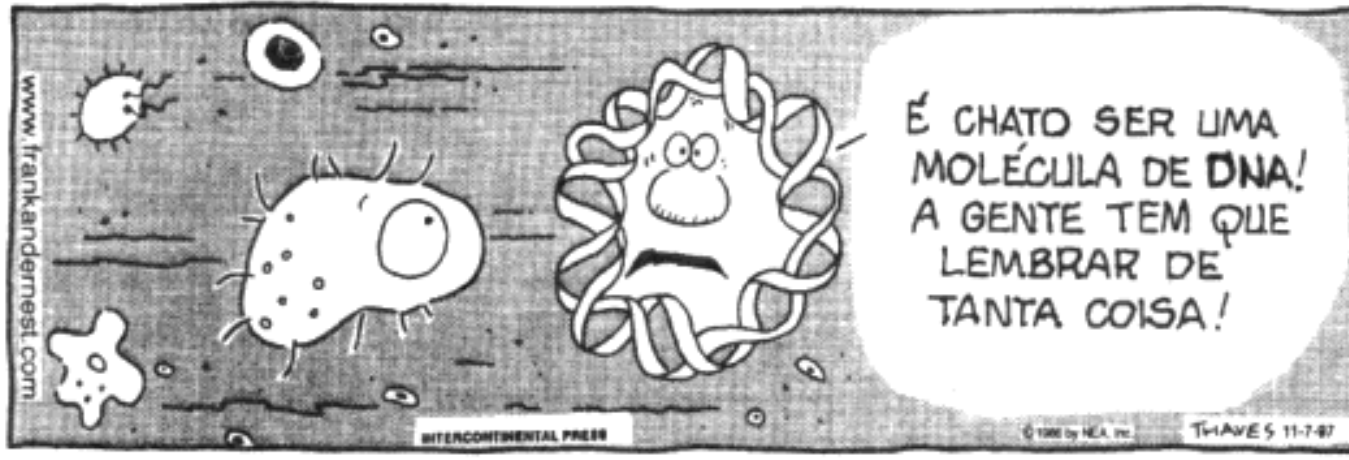






<http://www.virtual.epm.br/cursos/biomol/replica/html/6.htm>

<http://www.johnkyrk.com/DNAreplication.html>



Fim???

