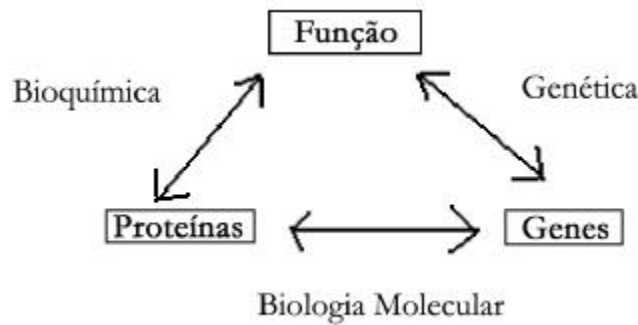


Biologia Molecular I



Bioquímica – estudo de um único componente em um organismo

Genética – estudo de um organismo sem esse componente

Genética Bioquímica

Veja a via biossintética da arginina:



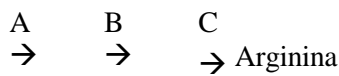
Intermediários: , , Enzimas: A,B,C

A via envolve a conversão de via dois intermediários, e , para arginina. As três etapas na conversão de para arginina são catalisados pelas três enzimas, A, B e C (genes A, B e C). (*Fraser incompleta*)

É possível haver defeitos em qualquer uma das etapas na síntese da arginina. Com arginina no meio, todos os mutantes arg podem crescer em meio mínimo.

Dado um conjunto de mutantes arg, você pode determinar quais mutantes possuem mutações e em quais genes (etapas) da via, para isso testando o crescimento dos mutantes e analisando o acúmulo de intermediários na via.

Via e etapas que são defectivas em cada mutante:



Mutante

Arg1	X			Arg1 possui uma mutação no gene A
Arg3		X		Arg3 possui uma mutação no gene B
Arg5			X	Arg5 possui uma mutação no gene C
Arg1/Arg3	X	X		

(mutante duplo: bloqueado em duas etapas)

Testes de Epístase

Epístase é quando o fenótipo associado com um alelo mascara a expressão do fenótipo associado com outro alelo.

Usando cepas mutantes, você pode fornecer intermediário e testar os mutantes quanto ao crescimento sob certas condições. Usando esse tipo de informação, você pode ordenar os genes na via (se a ordem não for conhecida).

Crescimento de cepas sob as seguintes condições:

Meio mínimo com:

tipo selvagem	arginina			
Arg1	+	+	+	+
Arg3	-	-	+	+
Arg5	-	-	-	+
Arg1/Arg3	-	-	+	+

“+” = crescimento, “-” = sem crescimento

Arg1/Arg3 é haplóide com duas mutações

Interpretações:

Por exemplo, dado o meio mínimo mais “ ”, o mutante Arg1 não consegue crescer porque tem um defeito na etapa que converte → (mutação no gene A).

O mutante Arg1 só consegue crescer se ou ou arginina for adicionado ao meio.

O mutante Arg1 irá se acumular, por que não é possível convertê-lo para .

O mutante duplo possui defeitos em duas etapas da via. Esse mutante possui mutações nos genes A e B. Ele está bloqueado na etapa anterior da via.

O mutante duplo Ar1/Arg3 possui os mesmos requerimentos de crescimento as que o mutante nas última das duas etapas (por exemplo, neste caso, o mutante Arg3).

O mutante duplo Arg1/Arg3 acumula o intermediário como o mutante na primeira das duas etapas (por exemplo, neste caso, o mutante Arg1).

Este é um exemplo de epístase. O fenótipo do mutante Arg3 mascara o fenótipo do mutante Arg1 ao testar o crescimento em diferentes intermediários.

As informações deste tipo de ensaio (teste de crescimento) permitem que se determine a ordem das etapas (ou seja, os genes) em uma via biossintética.

Biologia Molecular

Vários experimentos-chave foram realizados do início até a metade do século XX para se deduzir a natureza do material genético.

§1. A descoberta do “Princípio de Transferência”

1928: Experimentos feitos por F. Griffith com bactérias.

Griffith estava estudando a bactéria pneumococo – infectava camundongo e os matava.

Duas cepas:

- 1) Cepa lisa – infecciosa (virulenta); cresce como colônias lisas em placa de Petri (**cepa S** - do inglês *Smooth*) (ela é encapsulada por uma capa de polissacarídeos que a torna resistente ao sistema imune do camundongo).
- 2) Cepa rugosa – não-infecciosa (não-virulenta); cresce como colônias rugosas em placa de Petri (**cepa R** - do inglês *Rough*) (ela não tem a capa de polissacarídeos, portanto está vulnerável ao sistema imune do camundongo).

Griffith estudou o efeito das cepas SE das bactérias em camundongos.

Ele infectou camundongos com a bactéria pneumococo.

Experimentos:

- 1) Injetou a cepa S no camundongo → o camundongo morreu
- 2) Injetou a cepa R no camundongo → não houve efeito prejudicial
- 3) Injetou cepa S morta pelo calor em camundongos → não houve efeito prejudicial
- 4) Injetou nos camundongos uma mistura de cepa R viva e cepa S morta pelo calor → os camundongos morreram

Os resultados do experimento 4 foram surpreendentes, pois nem a cepa R nem a cepa S morta pelo calor eram virulentas quando administradas independentemente. Griffith isolou o sangue do camundongo morto e fez uma cultura. Ele descobriu bactérias lisas presentes no sangue do camundongo morto!

Ele isolou a cepa S viva do sangue desses camundongos. A cepa S morta pelo calor deve ter transformado a cepa R viva na cepa S!

Deve ter havido algum material na cepa S morta pelo calor que foi capaz de converter uma cepa R não-virulenta em uma cepa S virulenta.

In 1944: O. Avery, C. Macleod e M. McCarty: planejou para descobrir a natureza do princípio de transformação.

- Repetiu os experimentos de transformação em uma proveta.
- Descobriu que eles poderiam converter a cepa R em uma cepa S bastando para isso adicionar um extrato livre de células da cepa S na cepa R.

Mas o que havia no extrato livre de células que poderia converter a cepa R em cepa S?

- Era uma proteína?
- Era um ácido nucléico?
- Era um lipídio?

Para deduzir isso, eles pegaram o extrato livre de células e o trataram com várias enzimas para verificar se o extrato ainda era efetivo na transformação de R → S.

- 1) Tratou o extrato livre de células com proteases (corta as proteínas) → ainda estava ativo portanto não era uma proteína
- 2) Tratou o extrato livre de células com ribonuclease (corta o RNA) → ainda estava ativo portanto não era RNA
- 3) Tratou o extrato livre de células com desoxirribonuclease (corta o DNA) → NÃO estava ativo DEVE SER DNA

A natureza do material que transformou a cepa R na cepa S era DNA (ácido desoxirribonucléico).

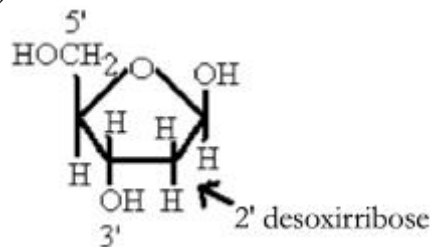
Apesar desses experimentos, as pessoas não estavam convencidas de que DNA era o material genético.

Por quê? Porque o DNA era considerado uma molécula desinteressante. As proteínas eram consideradas mais interessantes; tantos tipos diferentes de proteínas!

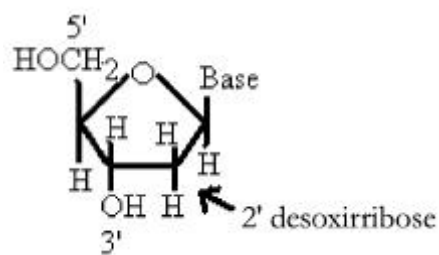
§2. Estrutura do DNA

O DNA é composto de 3 componentes:

a) Açúcar: (pentose)



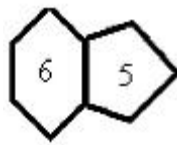
b) Base: 4 tipos no DNA



açúcar + base = nucleosídeo

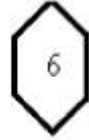
a base está ligada ao carbono C1' do açúcar.

Bases no DNA: Purinas: Adenina (A) e Guanina (G)



duas estruturas anelares feitas de átomos de N, C, H e O

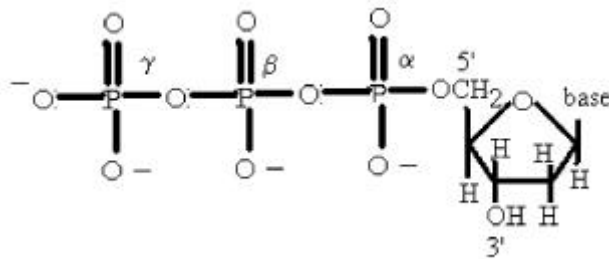
Pirimidinas: Citosina (C) e Timina (T)



uma estrutura anelar feita de átomos de C, H, O e N

c) trifosfato: 3 grupos de fosfato

açúcar + base + grupo fosfato = nucleotídeo

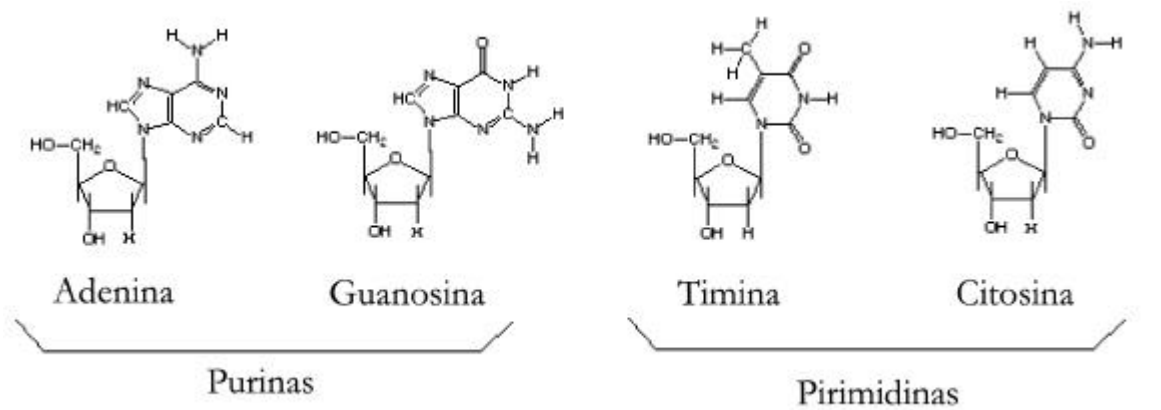


Purina (A, G) ou Pirimidina (C, T (U e C no RNA))

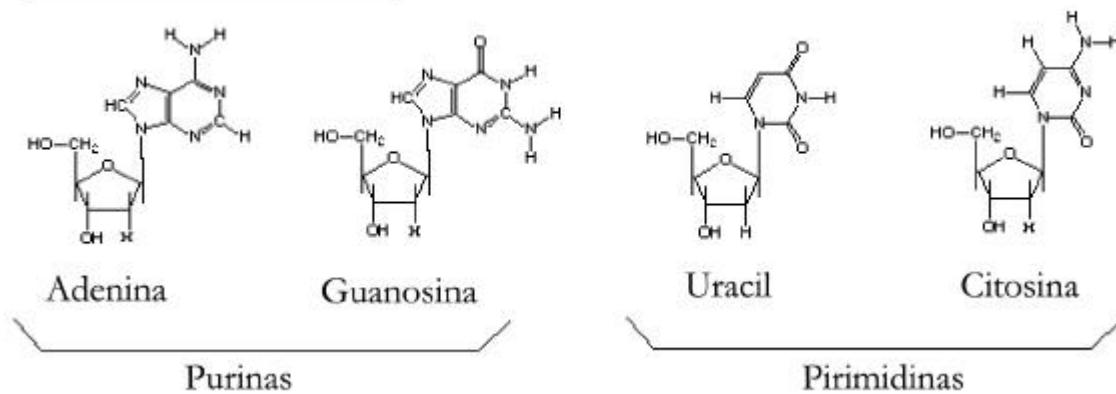
O monômero é um trifosfato

desoxirribose em DNA
ribose (possui 2' OH) em RNA

Os Nucleosídeos do DNA



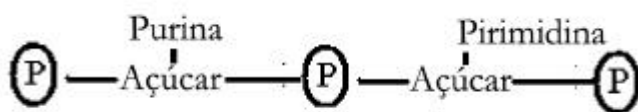
Os Nucleosídeos do RNA



Polimerização de Nucleotídeos:

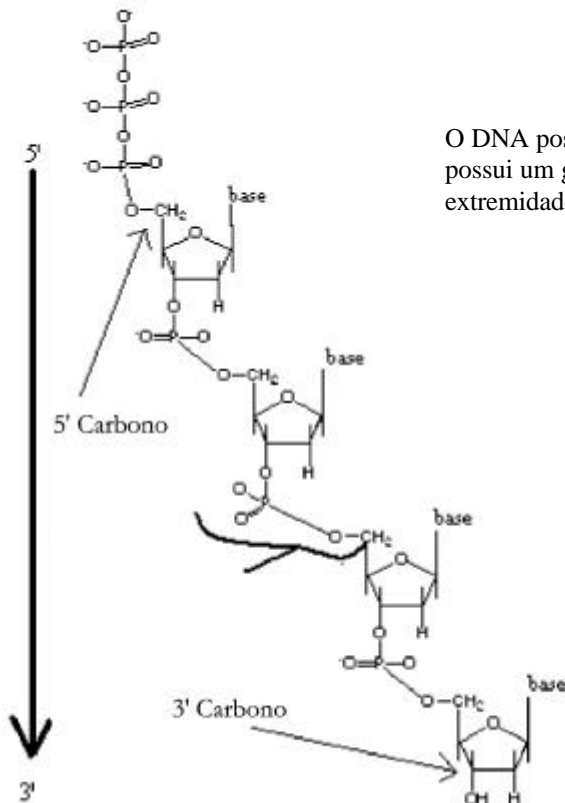
O DNA é composto de monômeros chamados de desoxirribonucleotídeos (dNTPs)

Os dNTPs são ligados por meio de uma ligação de açúcar-fosfato que forma a estrutura do DNA:



O açúcar (desoxirribose) é ligado de modo covalente a um grupo de fosfato via uma ligação fosfodiéster:

Estrutura de açúcar-fosfato do DNA:



O DNA possui polaridade. Uma extremidade possui um grupo de 5' fosfato (P). A outra extremidade possui um grupo 3' OH

novos nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos) sempre adicionam ao grupo 3' OH do nucleotídeo precedente

(de <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleicacids/dna.html>)

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

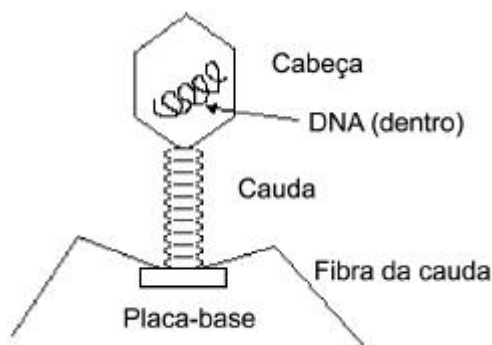
O DNA é um ácido nucléico porque o pKa do grupo fosfato é ~1,0

O DNA tem uma carga negativa de pH 7,0 em razão de seus grupos de fosfato

§3. Vírus Bacterianos e o Experimento de Hershey-Chase

1952: O maior suporte do papel genético do DNA vem de estudos feitos por A. Hershey e M. Chase com um vírus que infecta as bactérias *E.coli*.

Esses vírus são chamados de bacteriófagos (vírus ou patógenos que infecta a bactéria)



- O material genético de um vírus é armazenado dentro de um capsídeo protéico.

- Quando o fago infecta a bactéria, ele injeta seu DNA viral dentro da célula. O DNA é replicado; novos virions de progênie (partículas virais) são feitos. A lise da célula é feita à medida que progênie do vírus é liberada, causando a morte celular.

Como ocorre o processo de infecção?

O bacteriófago injeta seu DNA, seu capsídeo protéico ou ambos?

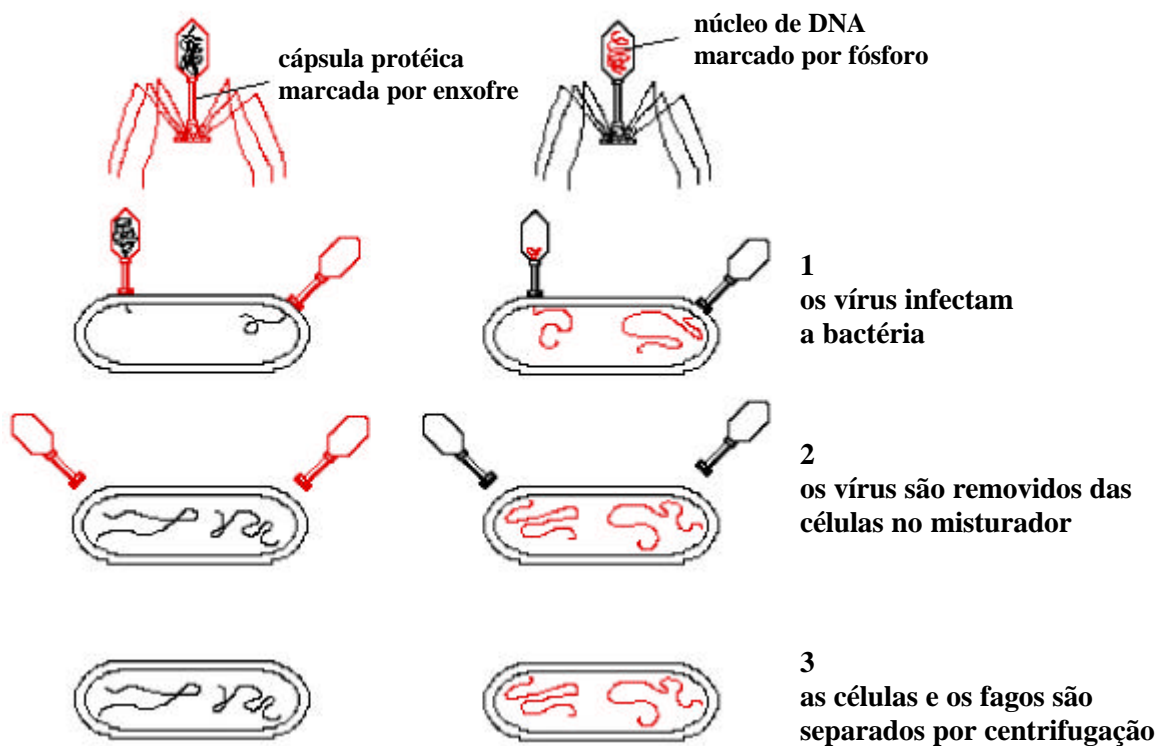
Para rastrear qual material entra na célula, é necessário fazer uma distinção entre DNA e Proteína.

Para rastrear onde a proteína e o DNA entram na célula, eles usaram radioisótopos

- foi usado o isótopo ^{32}P para marcar o DNA viral (marca apenas o DNA – porque o fósforo não está presente em proteínas)

- foi usado o isótopo ^{35}S para marcar proteína virais (marca apenas proteínas, porque o enxofre não está presente no DNA)

O Experimento do Misturador de Hershey-Chase



não foi detectado enxofre nas células fósforo detectado nas células



não foi detectado fósforo no sobrenadante



(de <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/dogma/history2.html>)

As partículas virais são menores que as bactérias que restaram no sobrenadante – parte líquida da mistura na proveta depois da centrifugação. As bactérias fizeram uma pelota no fundo da proveta por serem mais pesadas.

Resultado do Experimento:

- 1) A maior parte da marcação ^{32}P (DNA do fago) foi encontrada dentro das células bacterianas
- 2) A maior parte da marcação ^{35}S (proteína do fago) foi encontrada no sobrenadante

Conclusão:

Como foi encontrado principalmente DNA dentro das células, eles concluíram que DNA era o material genético.

Houve uma marcação ^{35}S encontrada que estava associada com as células bacterianas – assim, algumas pessoas acreditavam que o material genético governava a proteína que estava presa à célula.

MAS, em geral, a maioria das pessoas acreditava que o DNA era o material genético.

Esses experimentos reforçaram as noções propostas anteriormente por Avery, MacLeod e McCarty.

§4. Estrutura do DNA

A partir de estudos feitos por E Chargaff (1950) e M. Wilkins (no início da década de 1950), foram determinadas algumas informações sobre a natureza do DNA.

A partir desses resultados, J. Watson e F. Crick deduziram a estrutura do DNA em 1953.

Model of the structure of DNA: 1953 J. Watson e F. Crick

1) O DNA é formado por dois polinucleotídeos que são antiparalelos, complementares e enrolados um ao redor do outro em uma hélice dupla para a direita.

2) As bases de purina e pirimidina estão na parte interna com açúcar-fosfato a estrutura está na parte externa da hélice

3) As duas cadeias são presas juntas por ligações de hidrogênio especificamente formadas entre as bases:

A se liga com T 2 ligações de hidrogênio (A=T)

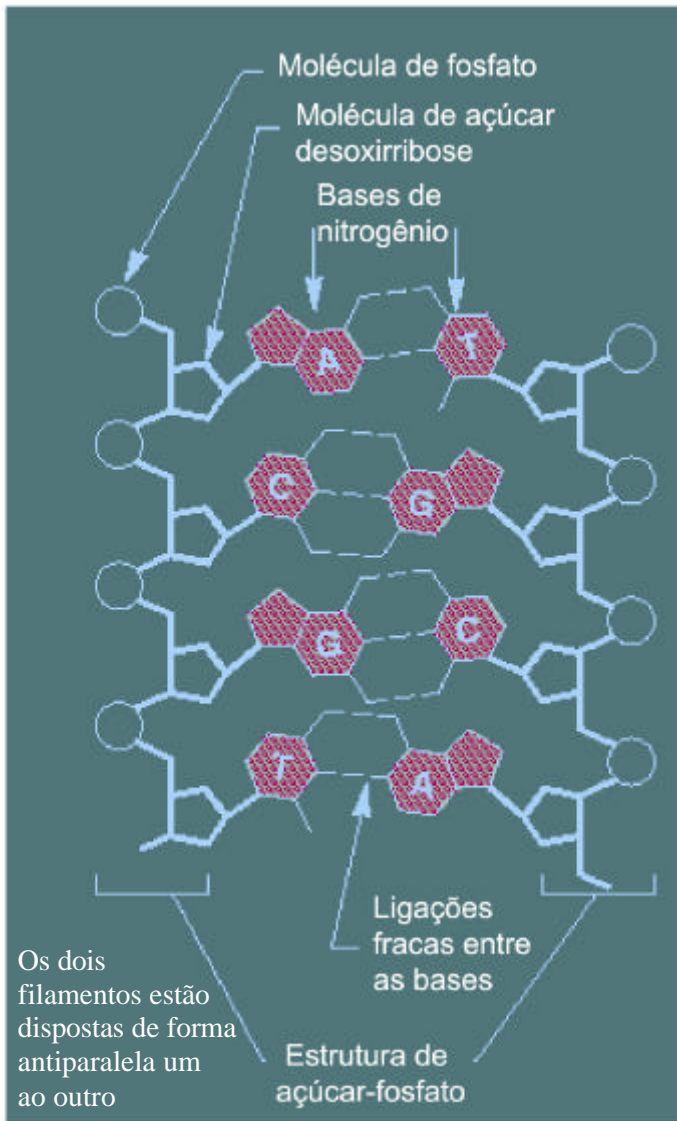
C se liga com G 3 ligações de hidrogênio (C=G)

4) Existem 10 pares de bases (pb) por cada volta da hélice = 34 angstroms

- A distância entre os pares de base é de 0,34 nm e a largura da hélice é de 2nm (20 angstroms)

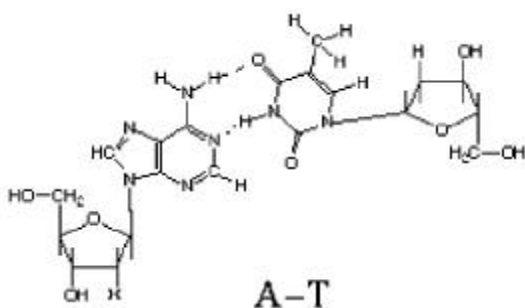
**O aspecto mais importante do modelo de DNA de Watson-Crick era a formação de pares de base encontrada no DNA.

As purinas sempre formavam par com as pirimidinas, mas o A poderia fazer par apenas com o T e somente o G poderia fazer com o C em decorrência dos requerimentos de ligação do hidrogênio.

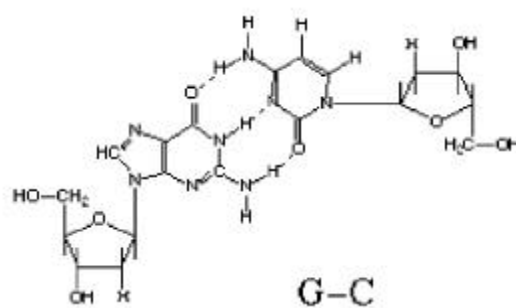


(de <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleicacids/dna.html>)

Pares de Base Encontrados no DNA:



Adenosina – Timidina
(Adenina – Timina)



Guanosina – Citidina
(Guanina – Citosina)

(de <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/lm/nucleicacids/nucleicacids.html>)

- Antigamente (em 1950, antes dos achados de Watson e Crick), E. Chargaff analisou o conteúdo de purina e pirimidinas de vários DNAs de diferentes fontes: leveduras, bactérias, seres humanos, etc.

- Chargaff descobriu que a porcentagem de A era sempre igual à porcentagem de T e que a porcentagem de G era sempre igual à de porcentagem de C.

Regras de Chargaff

$$%A=%T$$

$$%G=%C$$

Mas Chargaff não conseguia dar explicações para seus achados. Não até que Watson e Crick propuseram seu modelo da estrutura de DNA no qual as regras de Chargaff “faziam sentido”.

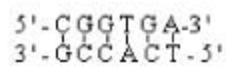
Assim, agora que o modelo do DNA estava deduzido, o que tinha de tão fascinante sobre o DNA?

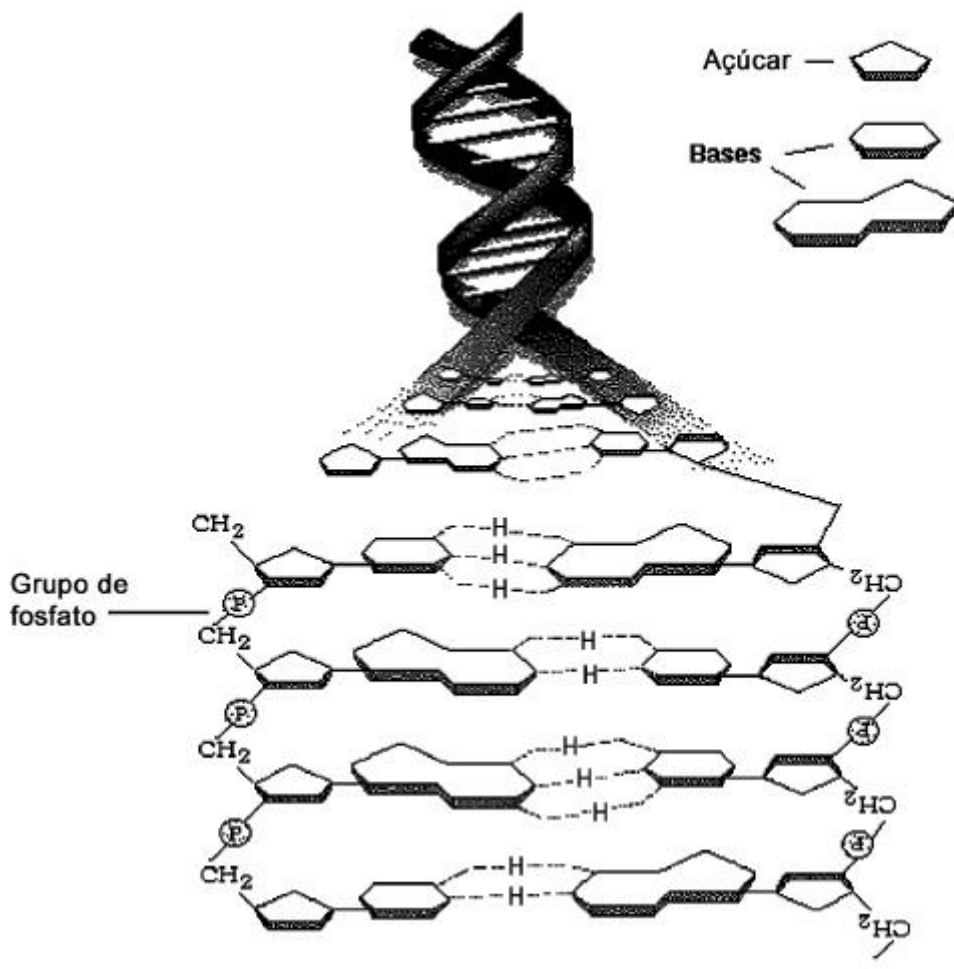
Qual é o segredo da vida? Como você passa a "hereditariedade" para sua prole?

A estrutura do DNA possibilitou que as pessoas tivessem resposta a algumas dessas perguntas.

Cada filamento da hélice de filamentos duplos do DNA é uma "cópia" complementar do outro filamento.

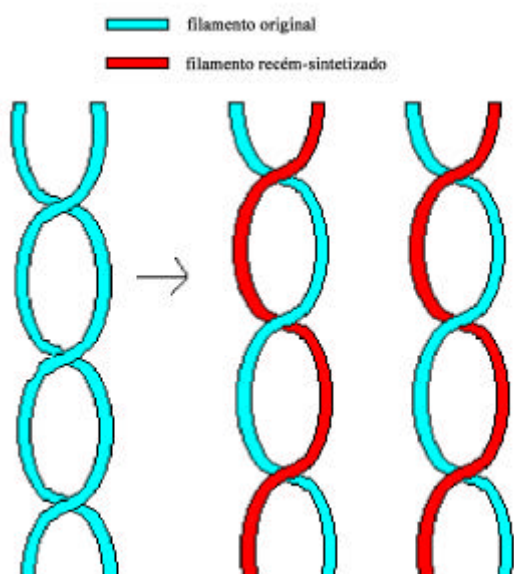
Veja esta pequena seqüência de DNA:





(de <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/dogma/history2.html>)

O modelo de hélice dupla do DNA sugeriu um mecanismo para a replicação do DNA (cópia do DNA)



Os filamentos se separam; cada filamento serve como um modelo para fazer um novo filamento.

Cada nova hélice de DNA com filamento duplo é composta de um filamento principal e um filamento derivado

A estrutura do DNA (dois filamentos complementares de DNA) explica:

1) Processo de Replicação do DNA

Cada filamento serve como modelo para cópia – satisfaz o modelo de hereditariedade

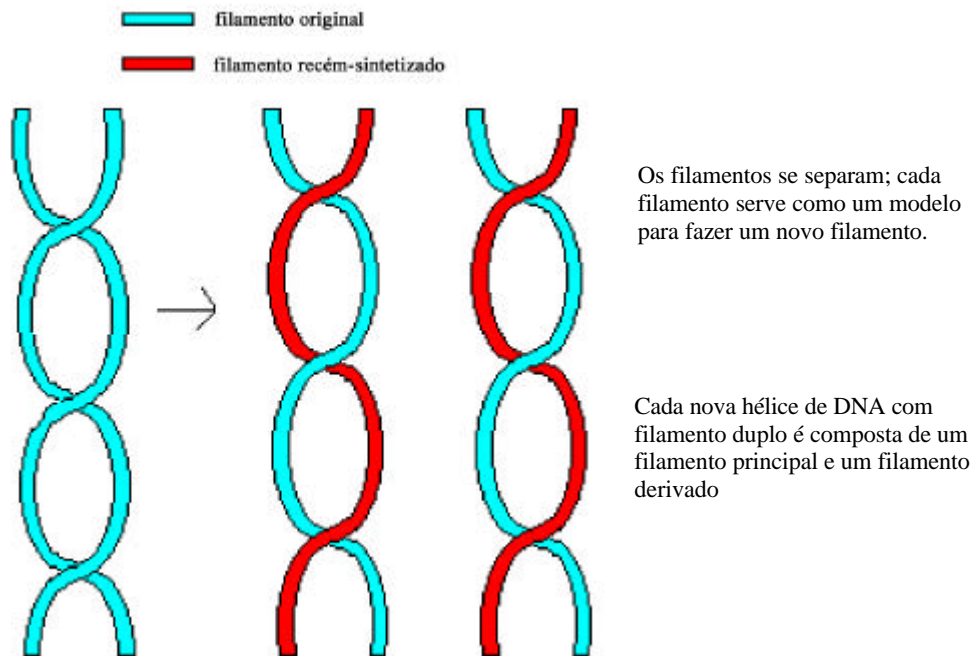
2) Ocorrência de Mutações

Os erros na replicação do DNA (inserção de uma base não complementar durante uma cópia de DNA) levaria a mutações (alterações na seqüência do DNA).

§5. Provando o Modelo de Crick- Watson

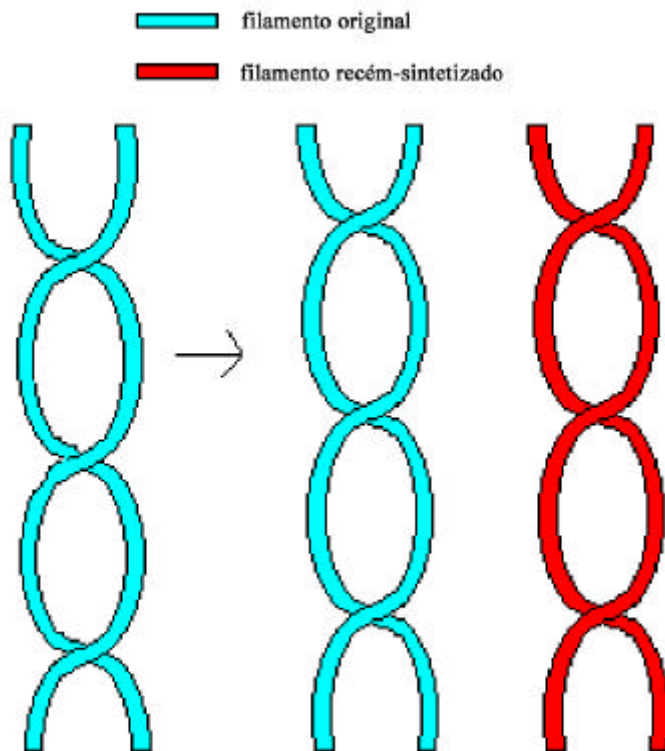
Durante a replicação do DNA, cada filamento age como modelo para a síntese do outro filamento. Cada nova molécula de DNA consistirá de um filamento principal (antigo) e um filamento de progênie (derivado, novo).

Se cada filamento servir como modelo para a replicação de DNA, então ela deveria ocorrer em um mecanismo semi-conservador, ou seja, cada nova molécula de DNA é feita de um novo filamento e um filamento antigo.



O mecanismo semi-conservador da replicação do DNA foi proposto por Watson e Crick.

Outro modelo: A Replicação Conservadora do DNA foi sugerida como:



A hélice dupla original serve de alguma maneira como modelo para replicação; entretanto, depois de a replicação ocorrer, os filamentos original voltam juntos.

1957 M. Meselson e F. Stahl queriam confirmar se a replicação do DNA ocorria de modo semi-conservador.

Eles fizeram isso usando um isótopo pesado (^{15}N) de ^{14}N (nitrogênio).

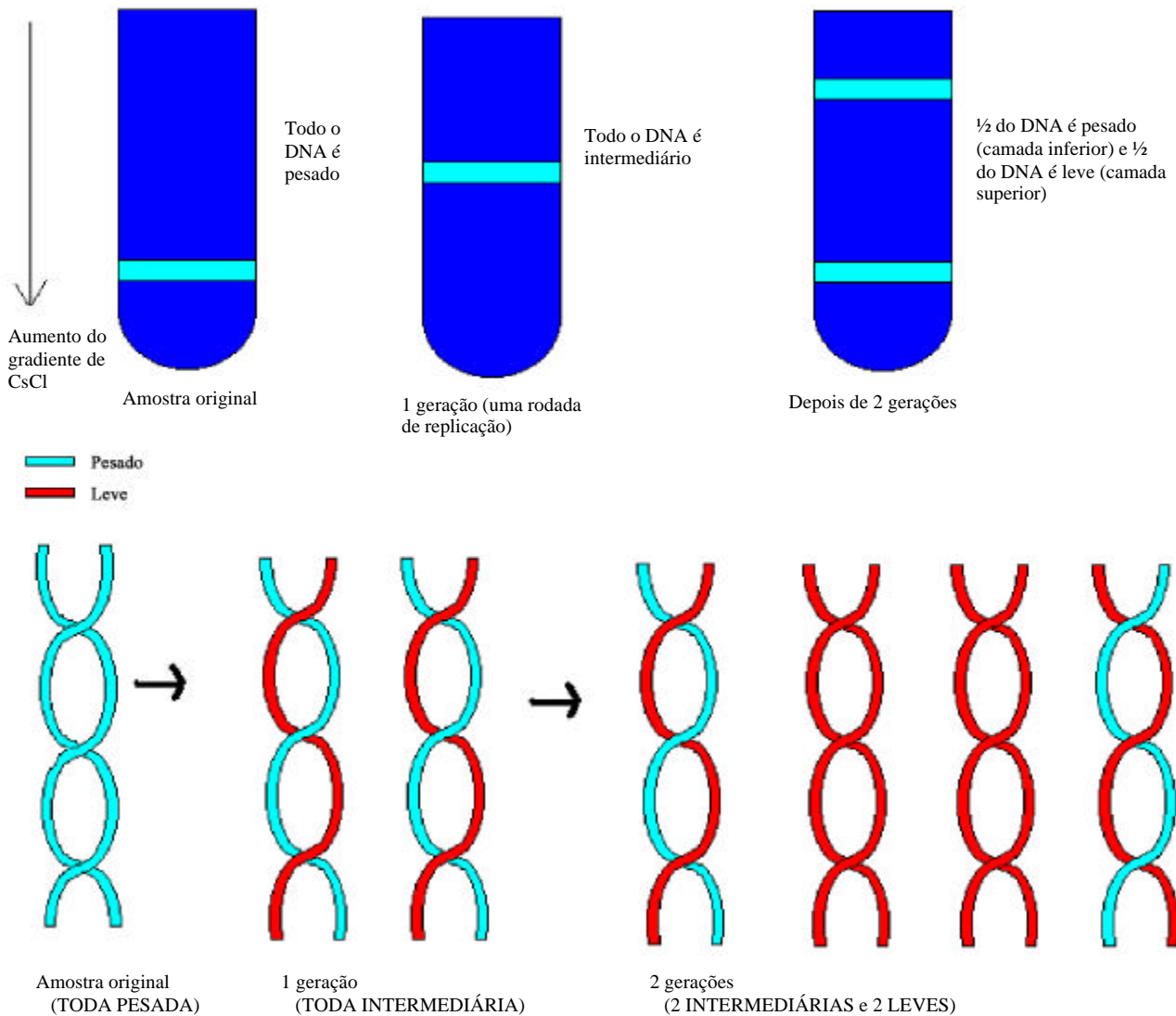
Experimentos:

- 1) Eles cultivaram bactérias *E. Coli* em um meio que continha $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como fonte única de nitrogênio.
 - O ^{15}N é incorporado nas bases de purina e pirimidina no DNA, portanto o DNA será mais pesado que o normal.
 - Eles cultivaram bactérias por muitas gerações em ^{15}N de modo que os filamentos de DNA contivessem ^{15}N . Eles isolaram um pouco desse DNA pesado.
- 2) Eles pegaram as bactérias cultivadas em ^{15}N e as transferiram para um meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$. O DNA então foi isolado em vários momentos depois de a bactéria estar no meio ^{14}N . Eles cultivaram bactérias por duas outras gerações e isolou o DNA.
- 3) Eles usaram a técnica de centrifugação em gradiente de densidade (também chamada de centrifugação isopícnica) que permite que as moléculas de DNA sejam separadas umas das outras com base na densidade.

Centrifugação em Gradiente de Densidade:

O DNA é misturado com uma solução de cloreto de céσιο (CsCl). A mistura de CsCl-DNA é centrifugada com uma alta força G em um tubo de centrífuga. O DNA irá “agrupar” no gradiente do CsCl (formado pela centrifugação) em sua densidade correspondente.

Uma pequena quantidade do DNA $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ original e as diferentes amostras de DNA tiradas depois de 1 geração e 2 gerações foi centrifugada no gradiente do CsCl. Depois, a centrifugação das diferentes amostras:



Por que o DNA forma uma “banda” em determinada posição do gradiente de CsCl?

O DNA se “estabelece” em uma camada na posição do tubo na qual a densidade da solução de CsCl for igual à do DNA.

Os experimentos de Meselson e Stahl provaram que o DNA foi replicado por um método semi-conservador.

**A ausência de uma banda na posição pesada no gradiente depois de uma geração contradisse o método conservador; assim, a replicação era semi-conservadora.

**O Modelo de Crick e Watson estava correto – a replicação do DNA por um método semi-conservador: um filamento de cada molécula de DNA de filamento duplo é conservado na nova molécula derivada de DNA de filamento duplo.