

BIOLOGIA MOLECULAR

Aula 2

Prof^a Inês Rodrigues

2015/16
2^o Semestre

INTRODUÇÃO À BIOLOGIA MOLECULAR



earth



cell



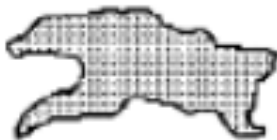
country

chromosome



state

chromosome fragment



city

gene



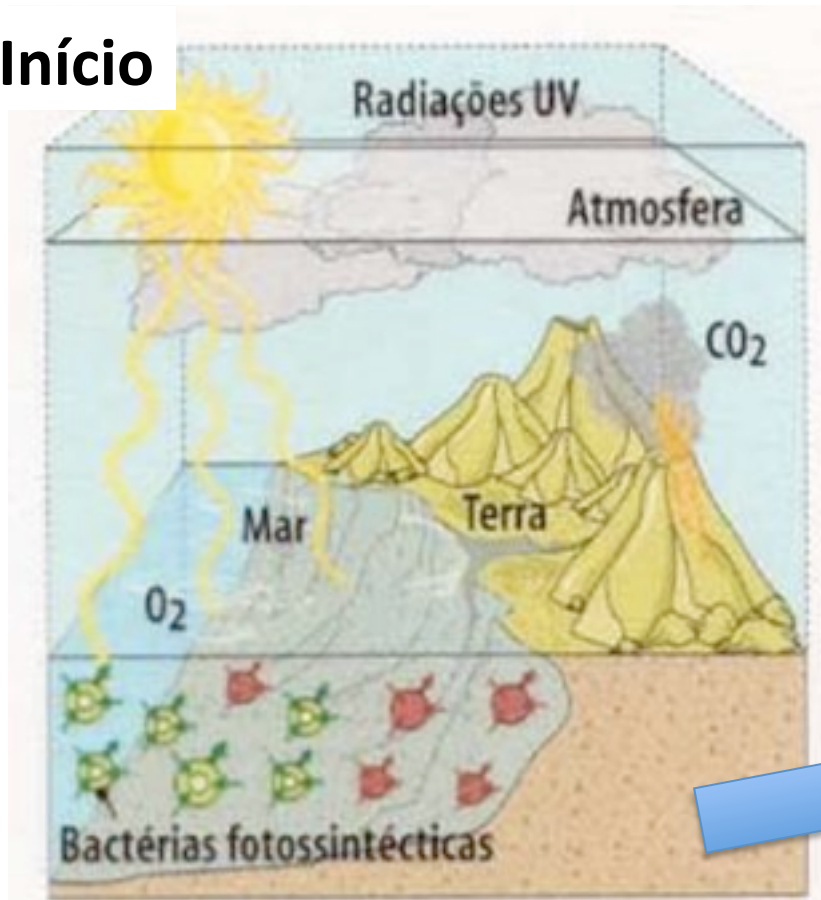
people

nucleotide base pairs



Comparative Scale of Mapping

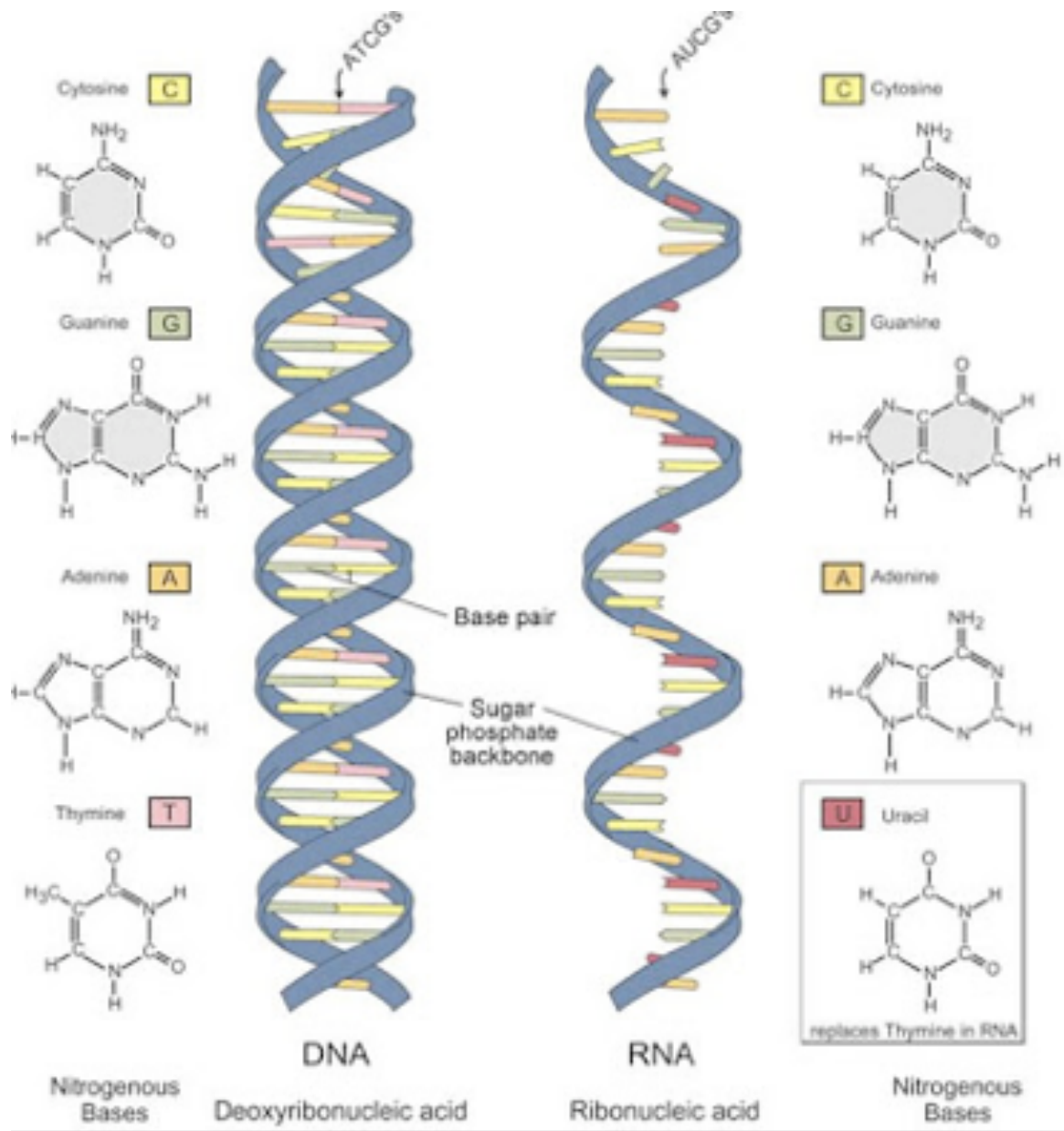
O Início

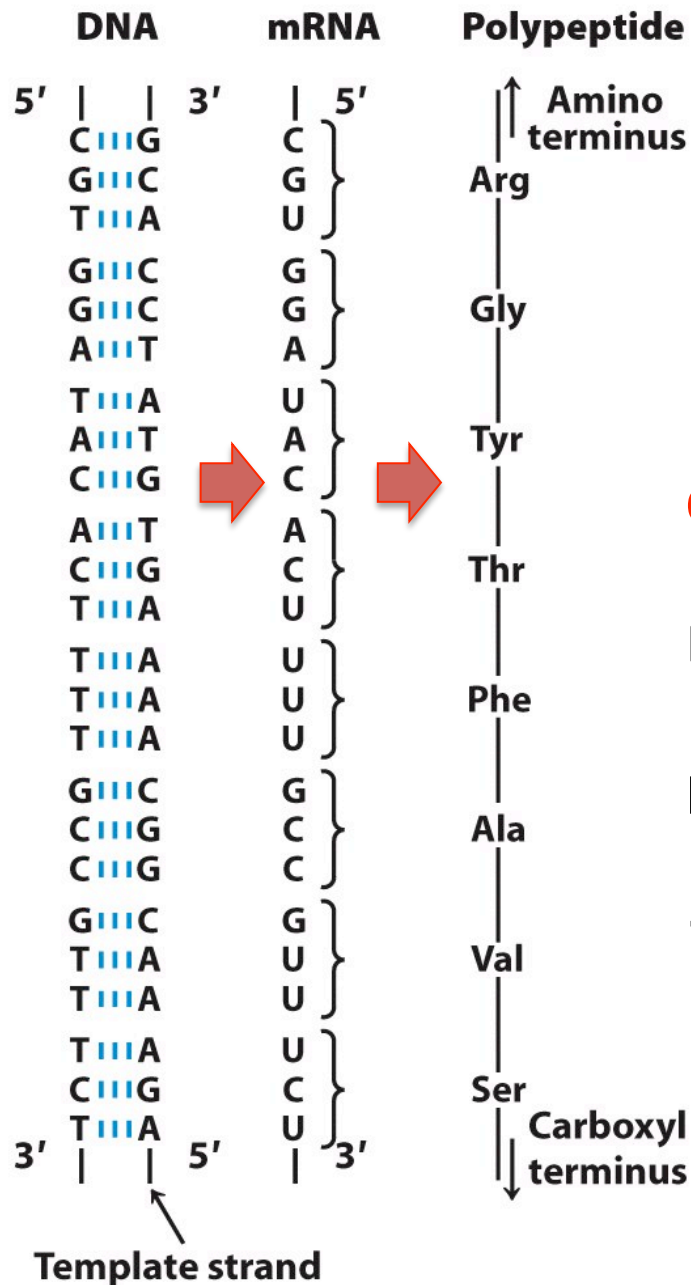


Origem da primeira forma de vida

Aggregação de bases azotadas que formam DNA

→ Reações bioquímicas entre compostos orgânicos





Co-linearidade:

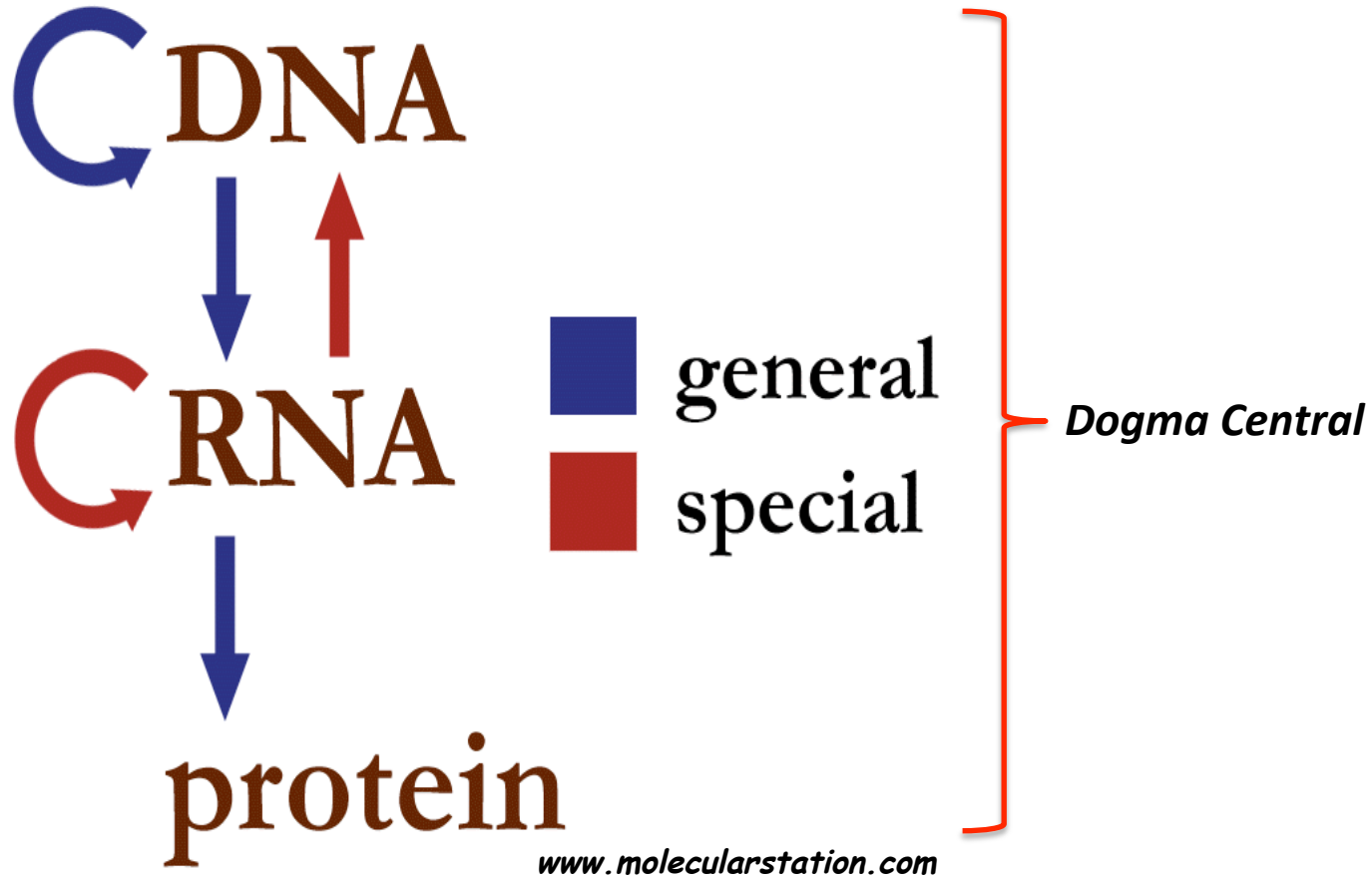
DNA → mRNA → cadeia

polipéptidica (aminoácidos)

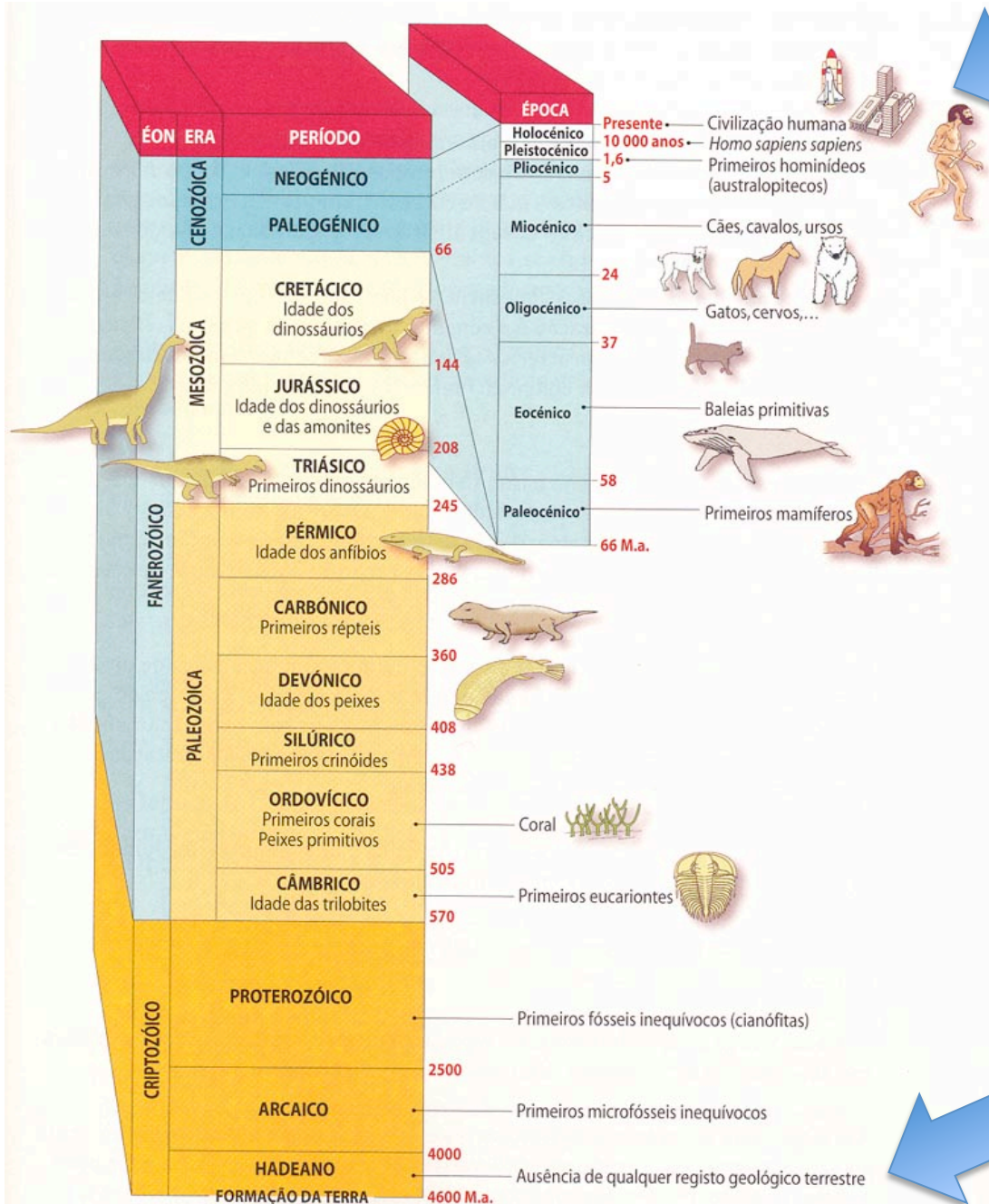
→ Proteína → Função Biológica

Figure 24-2

Biologia Molecular – estudo do DNA, dos genes e da expressão e regulação genética



EVOLUÇÃO DAS ESPÉCIES



DNA & RNA
O Humano descobre o DNA

DNA & RNA
O início

Genómica é mais do que conhecer a sequência do DNA !!!

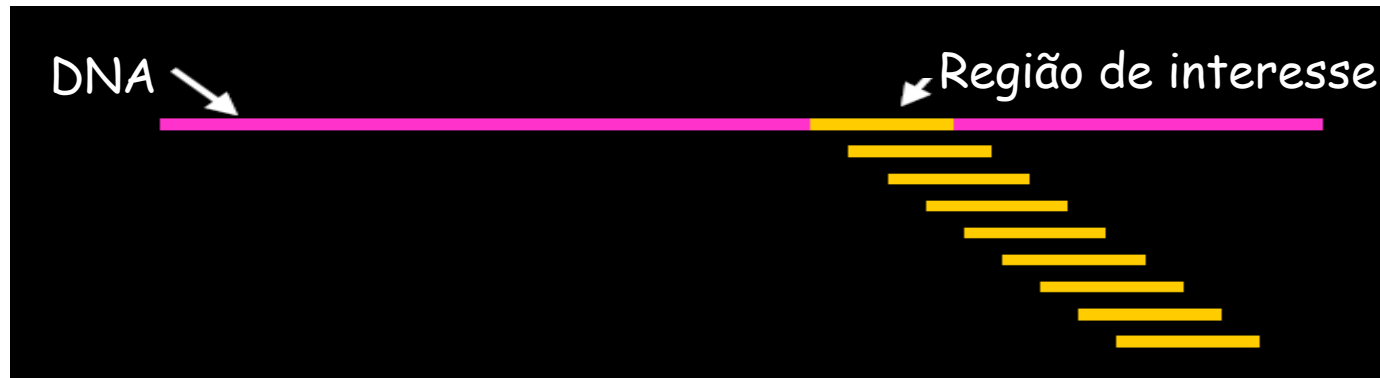
```
tccttctaig aagftaatag aaaaitggic acaaaaagaat actaatactt caacctatcc actaaaitca aatgaatggt tcaaaaacaa aattggftat
ggcatcacag ttatcacat gattttatta tagaaggata gaagtagaaa aataaacata taagaagaac agagaaaagc acaalgcctg
tcctatcag caaataaaat alttglatgt tggtagcttt tgagctacat agaacalait catalaaaaa acaatccaat gtttcaittt tcagttcca
ctctclait caccaalgal agactttct tgcctttcal aaaaaagata lataaaccaa aatgagttga tacttaala tagcalatta altalagaga
agttaccct tcactcaitt taaagatgic ataaagctaa aataactaat ttacatgic atcatccaaa gaatgectec altclaitta atcataaalg
tggctaagtc aattttaca calattcttg aaitalgaaa ttaagatait aaitatttc tcatttctt ctttccaag ggagctgait cacatgcaaa
ggtaagacat ttcalttac tggaaaacti gataaitaat calatattga attttaaic tttcttttt alttcalaga gacatcatgg gtalaaaaga
aaaitccatg laagtggtct tclgataatg tgcactciga alaagtttc ttclctgact atttaltctc clagaalaal tgatagttat ctclcaaata tattlatc
attaaitgct aaagtgtaaa ttgaittcat ttaitctgt tacagaggta aaaggtcaca aaaatctgt gttcaaacag cattcaacg gaaactcaat
tacactctga ataagtcaat ttcaaitat tctttgagag ctaagtlatc ttctictat aaataaitac atgacctaa agaatagttc ctaattctat
gaataaitcc laaitctatg aaglataaca latgcciaat gaagcataga ggctacccat gtaatgtggt ttclatctta taatattga ggatgalaaa
gtctttaaaf taaactiacl gtgctaaait agacagaaaa ttltatttaa caitttticta aatglatgta taaaaalac alattalitt gacctiaat atcaglatga
ataggggtic aaaagttctg cttaclaata tagcaaglat atgtgttaaa aagcactaag taaaatgatg calaaaaagg aatgaggact gtttgtgta
acagcagtgg gtatgaaaga atgtaggagt ttttagagaa agtaagctca ttaaagaat aagatgaaga aacaccacct aagttggaaa
cggtaacttt ctctccccg ttatactcaa tgttgggcaa aatagtaact tggagglaat gttgttaaga agaittaaaa cctgtttgga gaggttgcct
ataalcagtg ttccaacait tattattgcc acaaaaalat caacacacag taaatacttt
```

- ✓ *Onde estão os genes?*
- ✓ *O que fazem os genes?*
- ✓ *O que acontece quando alguma coisa corre mal?*

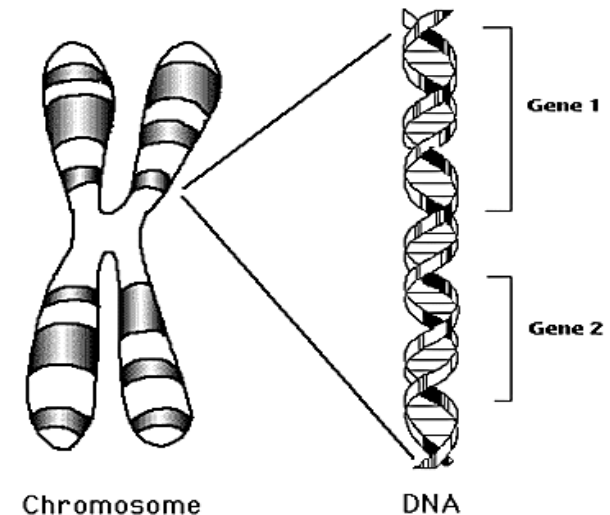
- ✓ Clonagem
- ✓ DNA Recombinante



www.nbcathcon.org



- ✓ Gene
- ✓ Expressão genética
- ✓ Genómica
- ✓ Terapia genética (génica)
- ✓ Organismos transgénicos



Chromosome

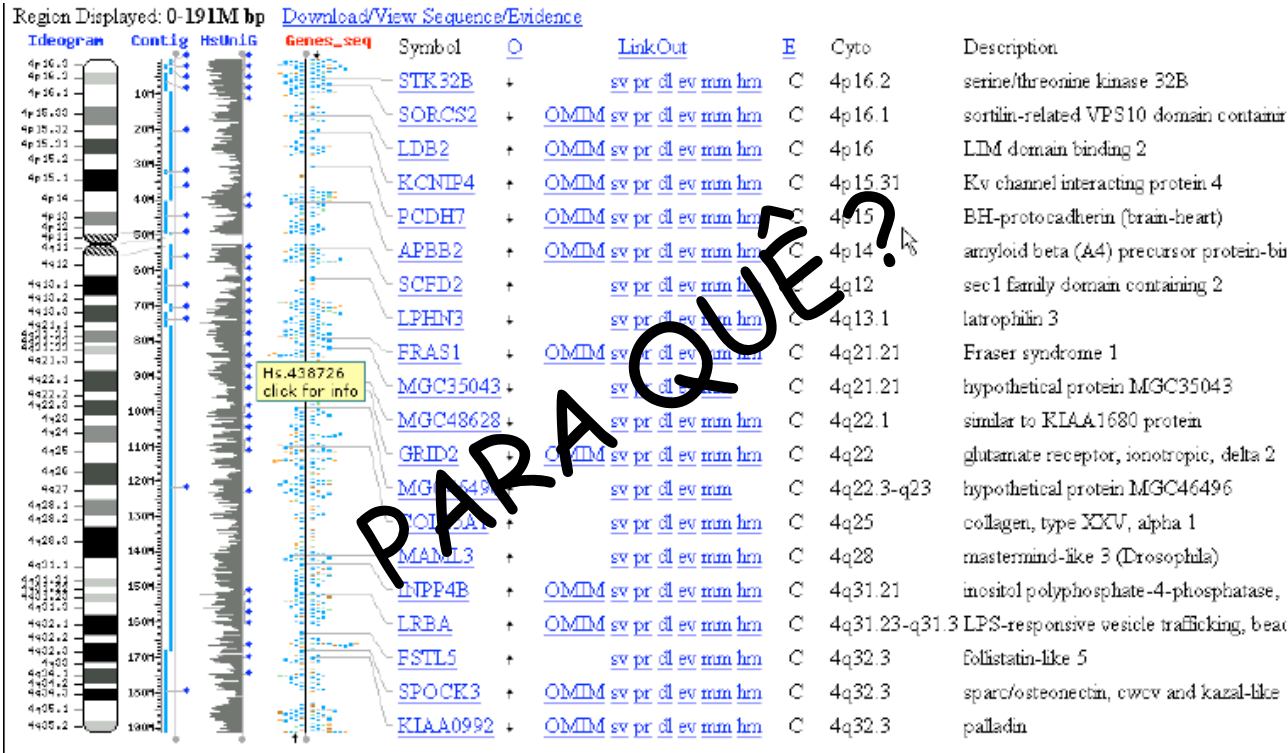
DNA

Genes

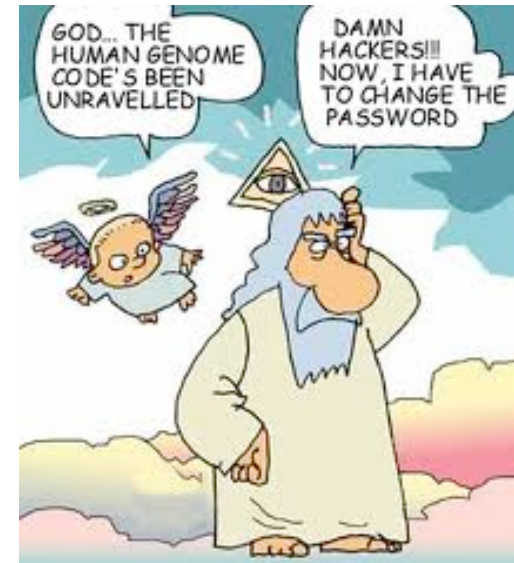
www.montana.edu

Mapeamento genético

O genoma humano foi mapeado e sequenciado



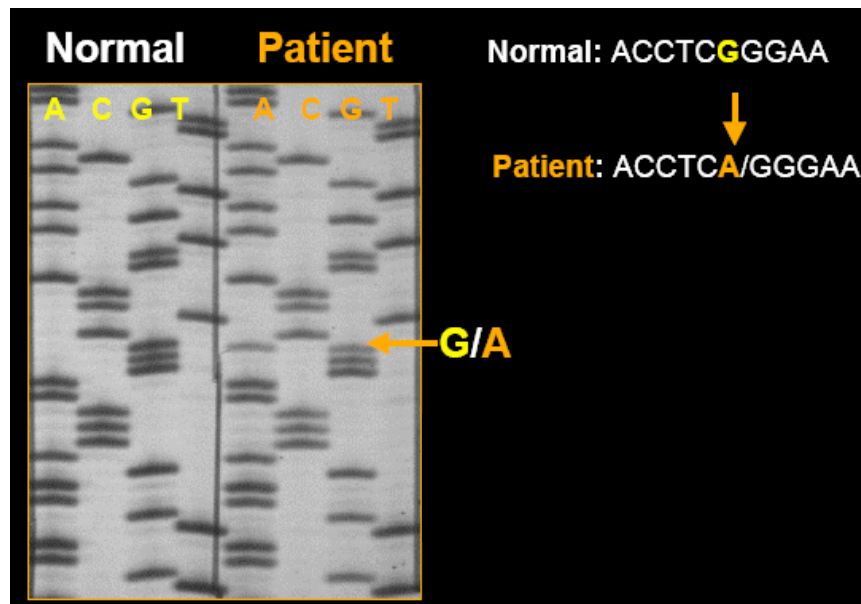
PARA QUÊ?



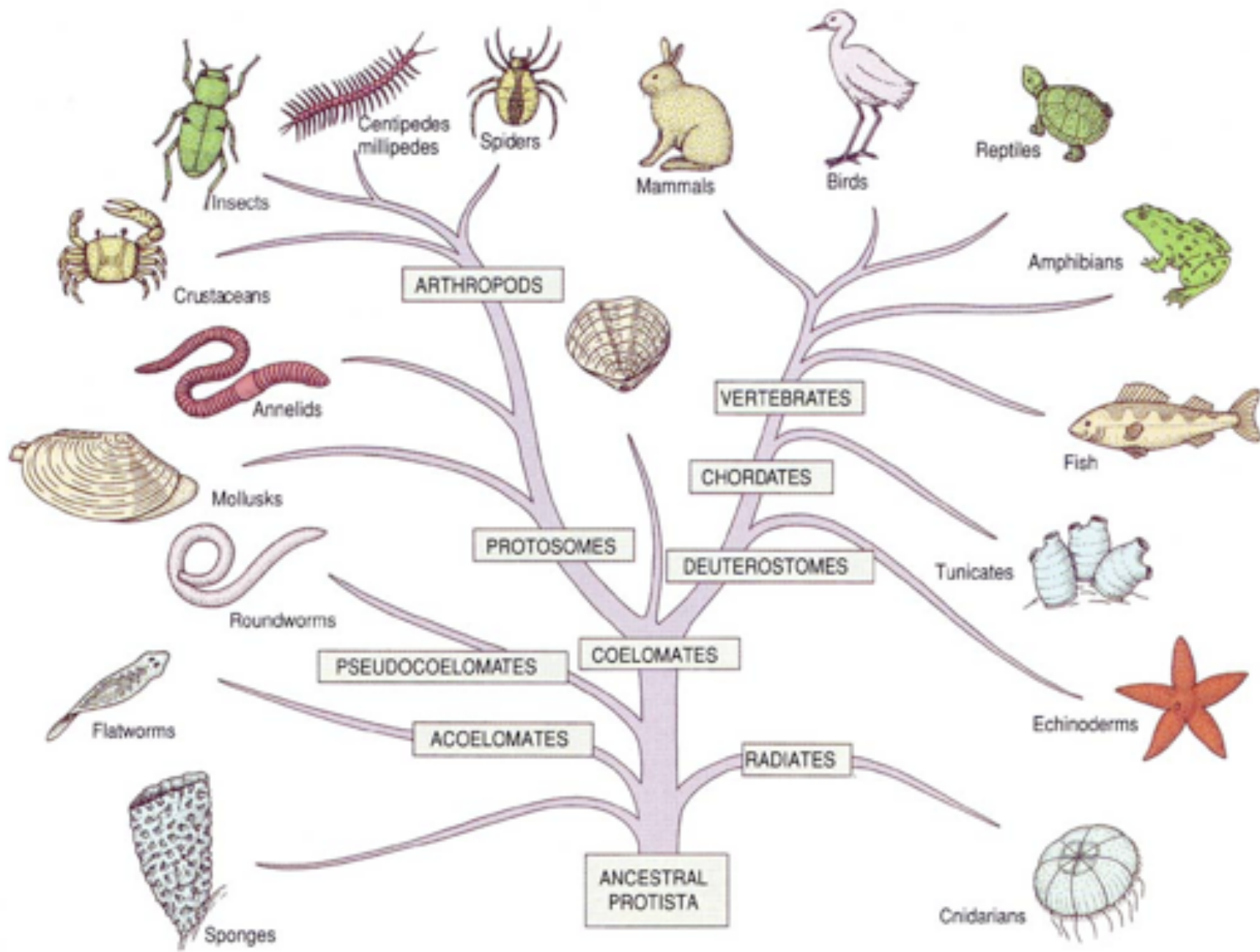
Compreender o genoma torna possível:

- ✓ **Novos conhecimentos sobre estruturas/funções normais**
- ✓ **Reconhecimento de risco de doença**
- ✓ **Delineamento de novas estratégias contra as doenças (herdadas ou adquiridas)**

Identificação de alterações num só nucleótido



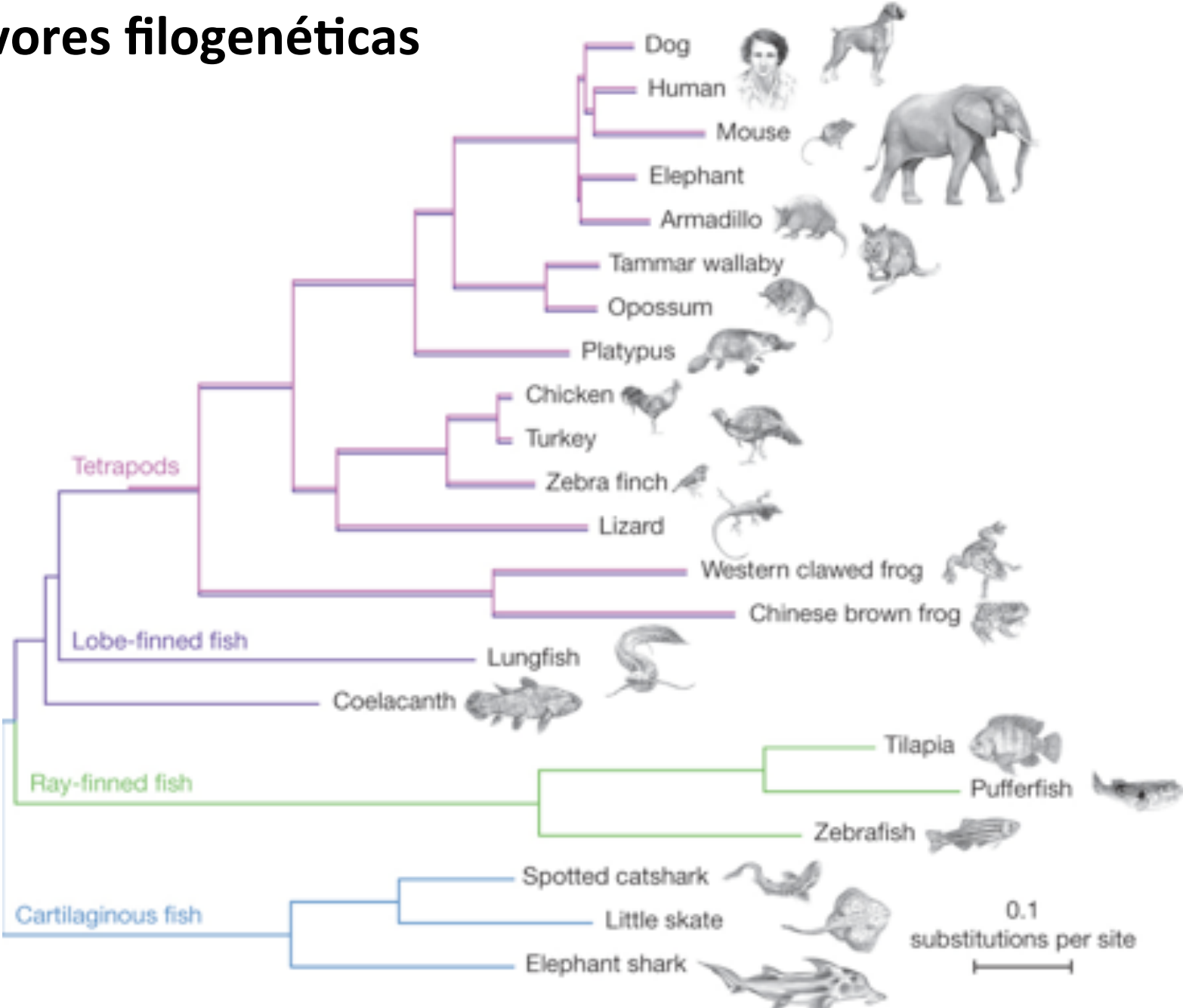
EVOLUÇÃO DAS ESPÉCIES



Q5E940_BOVIN	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_HUMAN	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_MOUSE	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_RAT	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_CHICK	-----MPREDRATWKSNYFMKIIQLDDYPKCFVVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_RANSY	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
Q7ZUG3_BRARE	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0 ICTPU	-----MPREDRATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_DROME	-----MVRENKAANKAQYFIKVVLFDEFPKCFIVGADNVGSKQMQQIRMSLRGK-AVYLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PALE	76
RLA0_DICDI	-----MSGAG-SKRKKLFIEKATKLFYTDKMIVAEADPVGSQLQKIRKSIIRGI-GAVLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PELD	75
Q54LP0_DICDI	-----MSGAG-SKRKNVFIEKATKLFYTDKMIVAEADPVGSQLQKIRKSIIRGI-GAVLMGKNTMMRKAIRGHLENN--PELD	75
RLA0_PLAFB	-----MAKLSKQOKKQMYIEKLSSLIQQYSKILIVHVDNVGSKQMASYRKSIRGK-ATILMGKNTIRRTALEKKNLQAV--POIE	76
RLA0_SULAC	----MIGLAVTTTKIAKWKVDEVAELTEKLLKTKHTIIIANIEGFPADKLHEIRKCLRGL-ADIKVTKNNLNFNIALKNAG----YDIK	79
RLA0_SULTO	----MRIMAVITQERKIAKWKIEEVKELEOKLREYHTIIIANIEGFPADKLHDIRKMMRGM-AEIKVTKNTLFGIAAKNAG----LDVS	80
RLA0_SULSO	----MKRLALALKQKRVASWVLEEVKELTELKNSNTILIGNLEGFPADKLHEIRKCLRGL-ATIKVTKNTLFGIAAKNAG----IDIE	80
RLA0_AERPE	MSVVS LVGQMYKREKPIPEWKTLMLELELFSKHRYVLFADLTGPTIFVYVQRYRKKLWKK-YPMMVAKKRIILRAMKAAGLE---LDDN	86
RLA0_PYRAE	-MMLAIGKRRYVRTQYPAKVKIYSEATELLQKYPYVFLFDLHGLSERILHEYRYRLRY-GVIKIIKPTLFLKIAFTKVYGG---IPAE	85
RLA0_METAC	-----MAEERHTEHIPQWKDEIENIKELIQSHKVFVGMVIEGILATKMKIRRDLDY-AVLKVSRTLTLEALNQLG----ETIP	78
RLA0_METMA	-----MAEERHTEHIPQWKDEIENIKELIQSHKVFVGMVIEGILATKMKIRRDLDY-AVLKVSRTLTLEALNQLG----ESIP	78
RLA0_ARCFU	-----MAAVRES---PPEYKVRAVEEIKRMISKPVVAIVSFRNVPAGQMKIRREFRGK-AEIKVYKNTLLEALDAG----GDYL	75
RLA0_METKA	MAVKAKGPPSGYEPKVAEWKRREVKELKELMDEYENVGLVDLEGIPAPQLQEIIRAKLRERTIIRMSRNTLMRIALEEKLDER--PELE	88
RLA0_METH	-----MAHVAEWKKEVEEQLHDLIKGYEVVGIANLADIPARQLQKMRQTLRDS-ALIRMSKKTLLISLAEKAGREL---ENVD	74
RLA0_METTL	-----MITAESEHKIAPWKIEEVNKLKELLKNGQIVALVDHMEVPAQQLQEIIRDKIR-GTMTLKMSRNTLIEAIEVAEETGNPEFA	82
RLA0_METVA	-----MIDAKSEHKIAPWKIEEVNALKELLKNSANYIALIDHMEVPAQQLQEIIRDKIR-DQMTLKMSRNTLIKRAVEEVAEETGNPEFA	82
RLA0_METJA	-----METKVKAHVAPWKIEEVKTLKGLIKSKPVVAIVDHDVPAQQLQEIIRDKIR-DKVKLRMSRNTLIIRALKEAAEELNPKIA	81
RLA0_PYRAB	-----MAHVAEWKKEVEEELANLIKSYPIALVDVSSMPAYPLSQMRRLIRENGLLRVSRTLTLELAIKKAAQELGKPELE	77
RLA0_PYRHO	-----MAHVAEWKKEVEEELAKLIKSYPIALVDVSSMPAYPLSQMRRLIRENGLLRVSRTLTLELAIKKAAQELGKPELE	77
RLA0_PYRFU	-----MAHVAEWKKEVEEELANLIKSYPIALVDVSSMPAYPLSQMRRLIRENGLLRVSRTLTLELAIKKAAQELGKPELE	77
RLA0_PYRKO	-----MAHVAEWKKEVEEELANIKSYPYIALVDVAGVPAYPLSKMRDKLR-GKALLRVSRTLTLELAIKRAAQELGQPELE	76
RLA0_HALMA	-----MSAESERKTETIPEWQEEVDIVEMIESYESVGVVNIAGIPSRQLQDMRRDLHGT-AELRVSRTLTLEALDDVD----DGLI	79
RLA0_HALVO	-----MSESEVRQTEVIPQWKRREVDLVDVIESYESVGVVGVAGIPSRQLQSMRRELHGS-AAVRMSRNTLVNRALEVN----DGEF	79
RLA0_HALSA	-----MSAEEQRTTEEVPEWKRQVEAELVDLLETYDSVGVVNVYTGIPSKQLQDMRRGLHGT-AALRMSRNTLLVRALEEAG----DGLD	79
RLA0_THEAC	-----MKEYSQQKELYNEITQRIKASRSVAIVDTAGIRTRQIQDIRGKNRGGK-INLKVYKTLFLFKALENLGD----EKLS	72
RLA0_THEVO	-----MRKINPKKKEIYSELAQDITKSKAVAVDIDKVRIRQIQDIRAKNRDK-VKIKVYKTLFLFKALDSIND----EKLT	72
RLA0_PICTO	-----MTEPAQWKIDFVKNLENEINSRKYAAIVSIKCLRNNPEQKIRMSIRDK-ARIKVSRRARLLRLAIENFGK----NNIV	72
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90	

Alinhamento de sequencias de DNA de várias espécies

Árvores filogenéticas



Gregor Mendel

1822 – 1884

Nasceu em Heinzendorf, na Áustria. Filho de fazendeiros, tinha dificuldades financeiras para conseguir estudar.

Em 1843, ingressou como noviço no mosteiro de agostiniano da cidade de Brünn, na atual República Checa.

A observação minuciosa do mundo que o rodeava valeu-lhe o reconhecimento para a história da vida.

Em 1865 estabelece a noção de Genótipo a partir do Fenótipo.



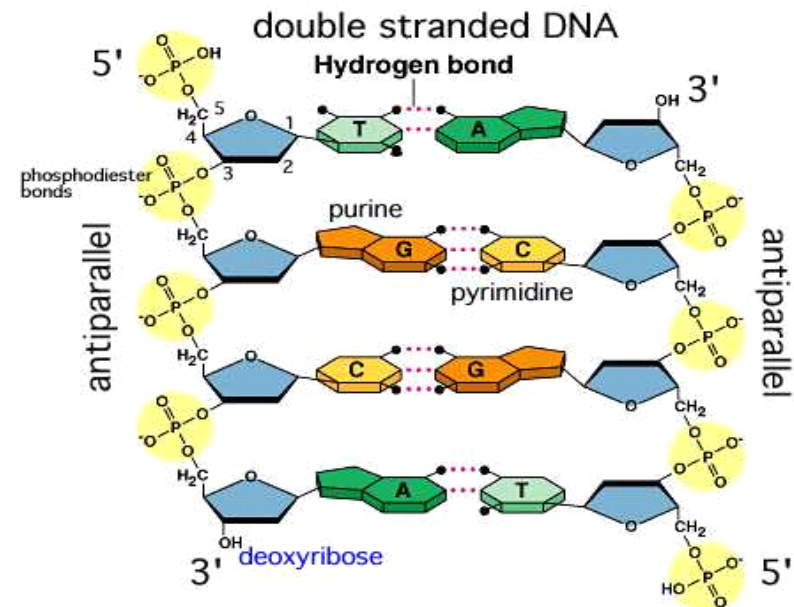
O genoma

DNA e RNA – Estrutura química

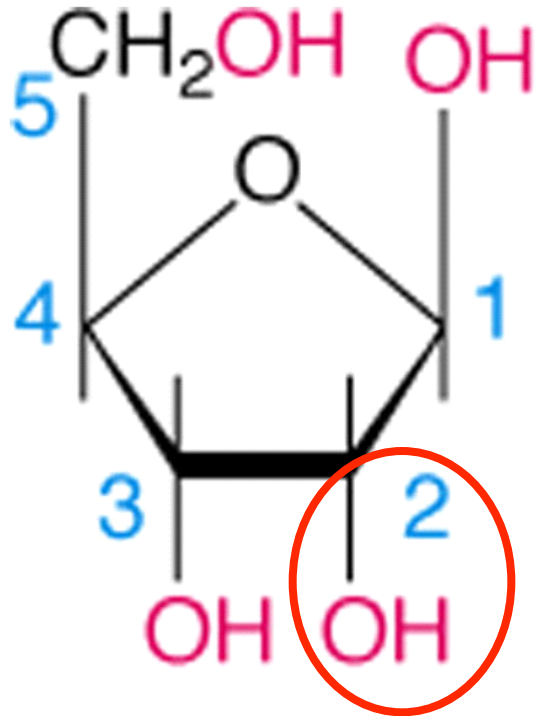
Componentes:

- ✓ Açúcar – desoxirribose (DNA) ou ribose (RNA)
- ✓ Grupos fosfatos
- ✓ Bases azotadas
Comuns: Adenina, Citosina, Guanina
DNA: Timina
RNA: Uracilo

Cadeias polinucleotídicas direcionadas:
 $5' \rightarrow 3'$



Açúcar

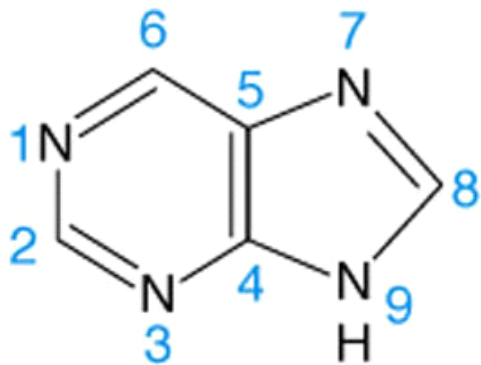


Ribose

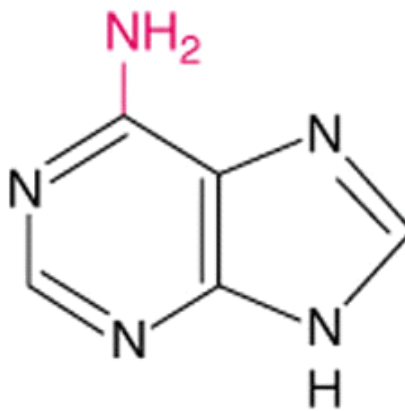


Desoxirribose

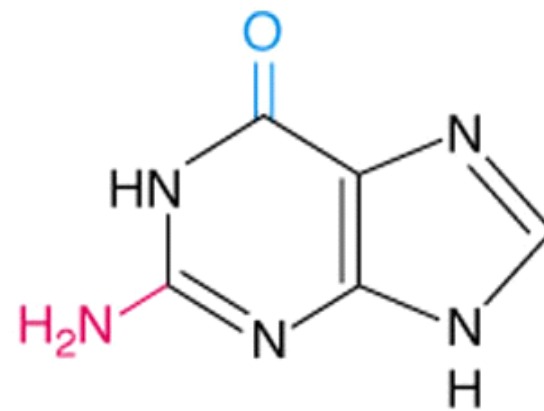
Bases azotadas



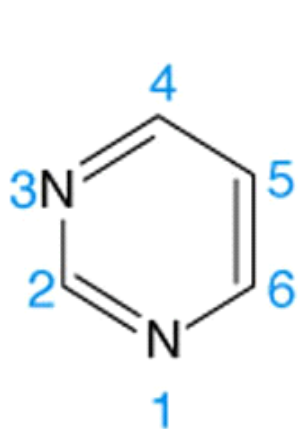
Piridinas



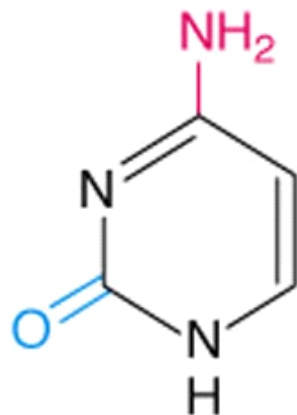
Adenina



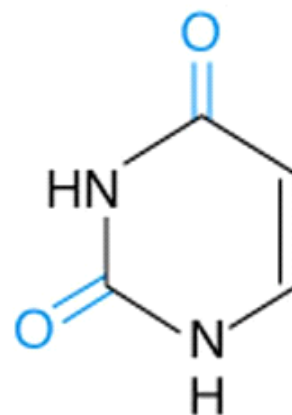
Guanina



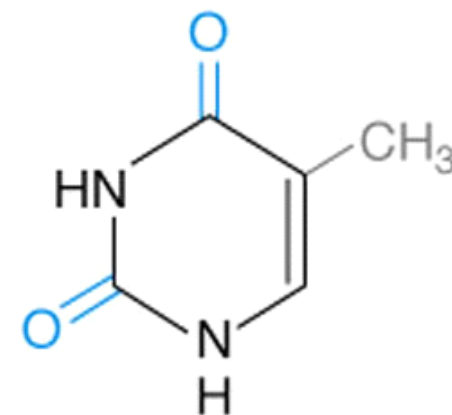
Pirimidinas



Citosina



Uracilo



Timina

Bases azotadas

Bases azotadas presentes em ambos os ácidos nucleicos:

Adenina

Guanina

Citosina

Base azotada presente apenas no DNA:

Timina

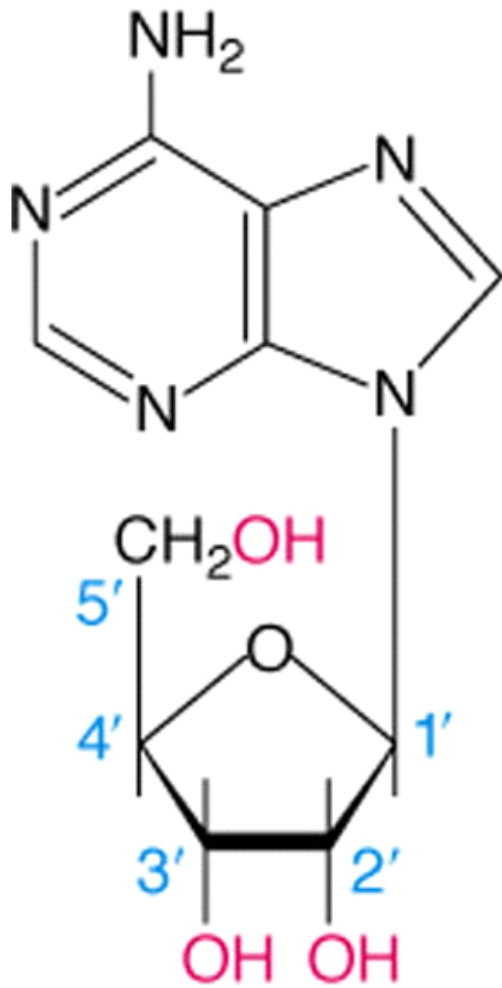
Base azotada presente apenas no RNA:

Uracilo

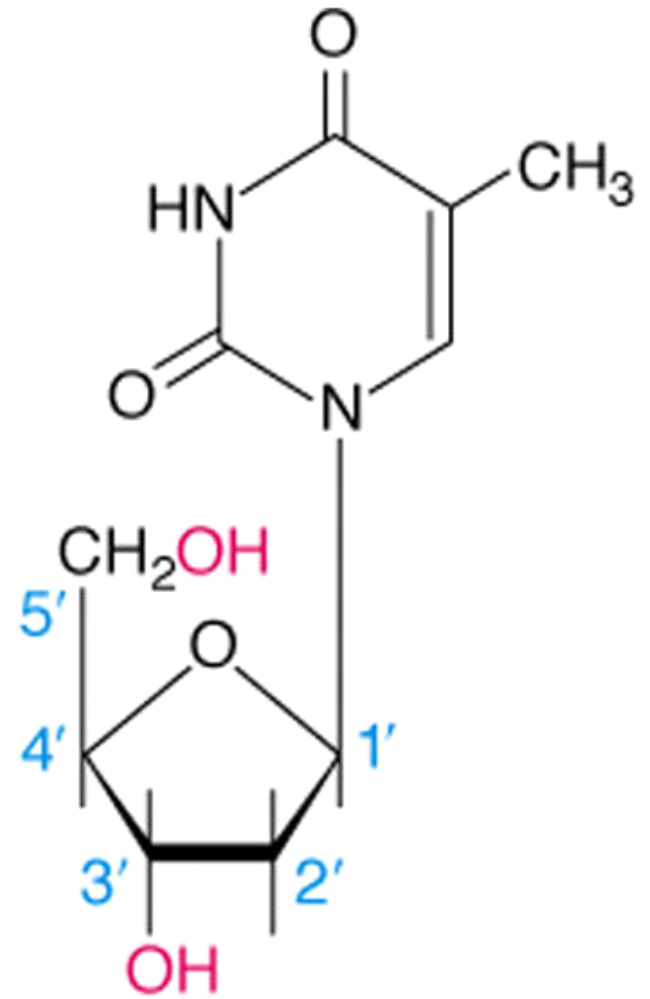


Ambas ligam
à Adenina

Nucleósidos

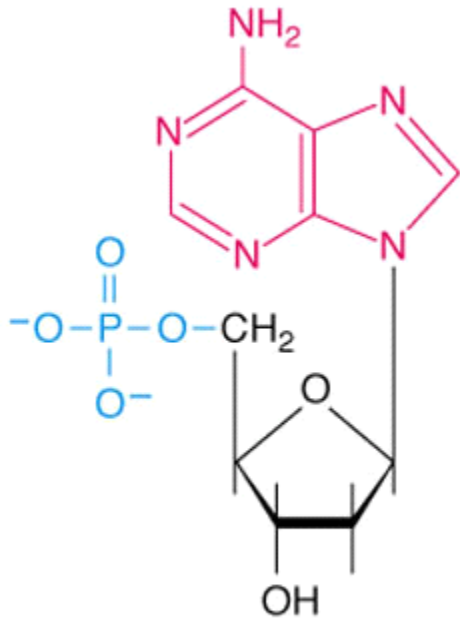


Adenosina

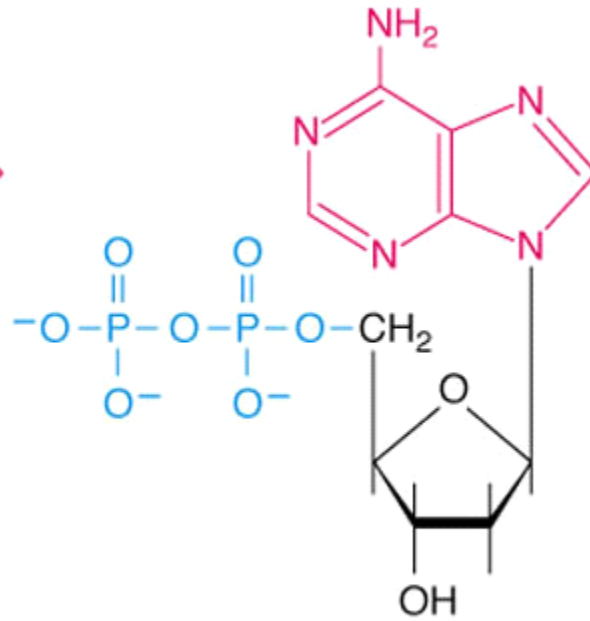


2'- desoxi timidina

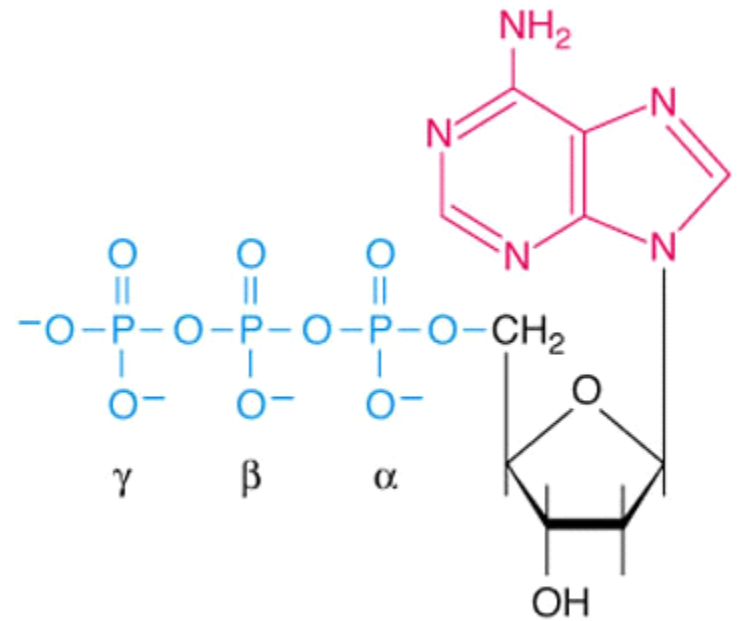
Nucleótidos



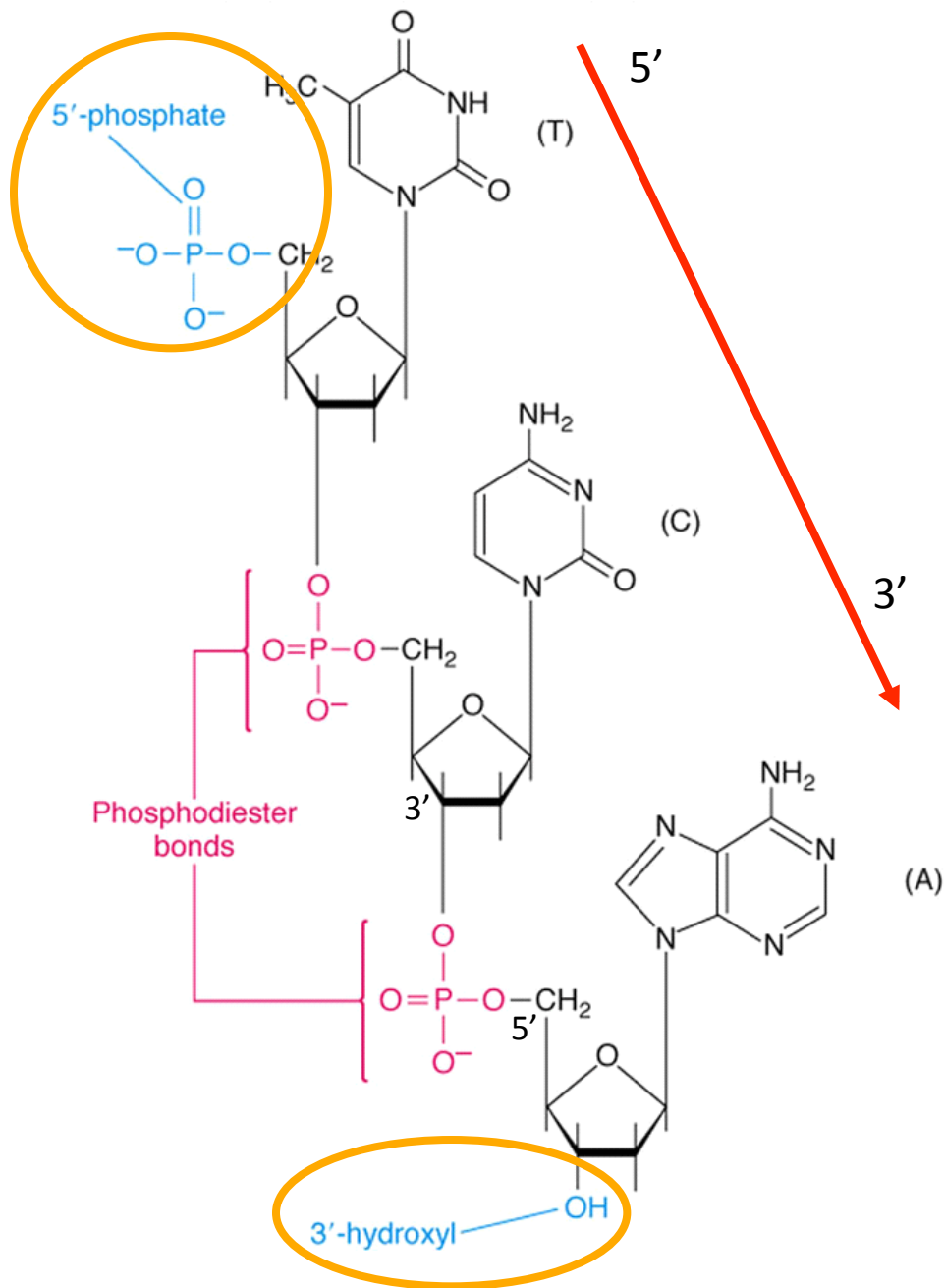
Desoxiadenosina- 5'-
monofosfato (dAMP)



Desoxiadenosina- 5'-
difosfato (dADP)

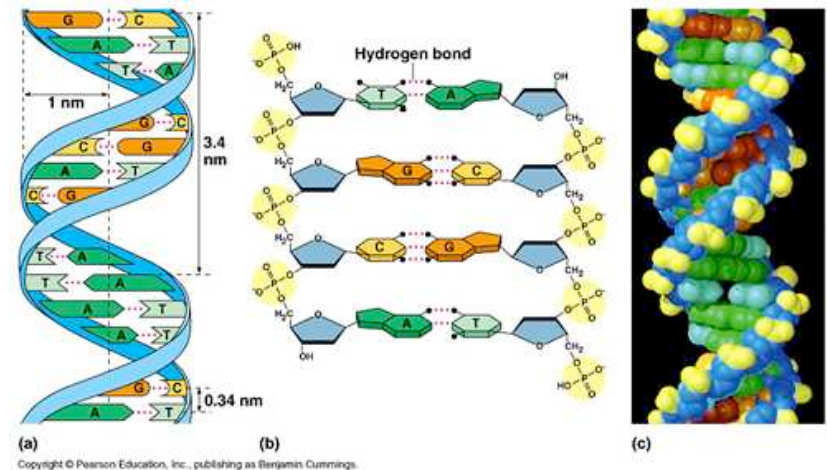


Desoxiadenosina- 5'-
trifosfato (dATP)

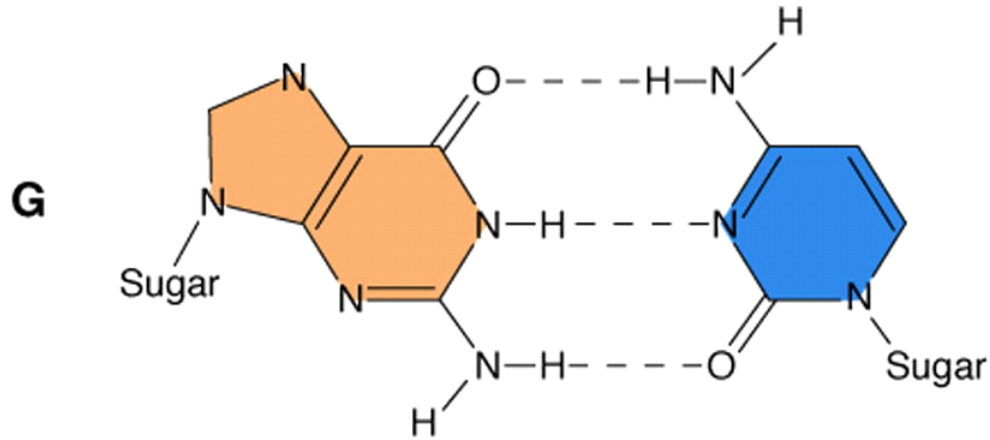


Polaridade química

Cada cadeia tem uma extremidade 3'e 5'

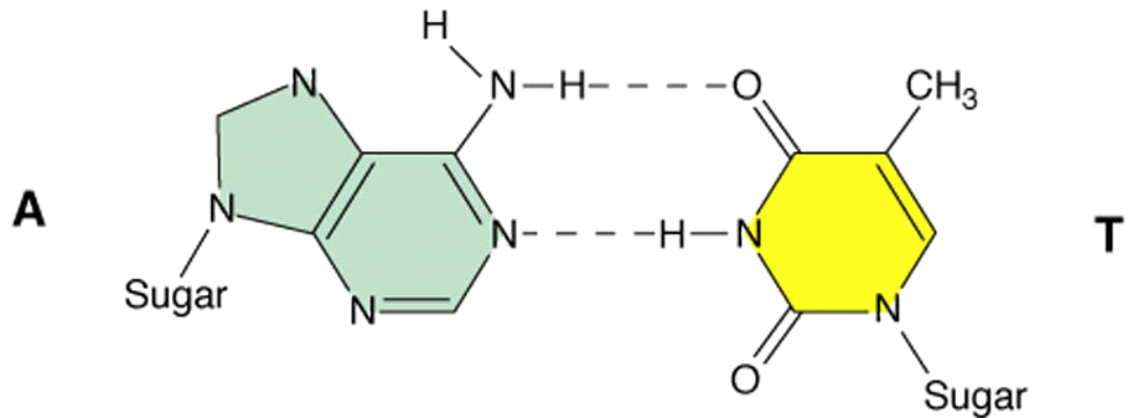


Emparelhamento de bases complementares

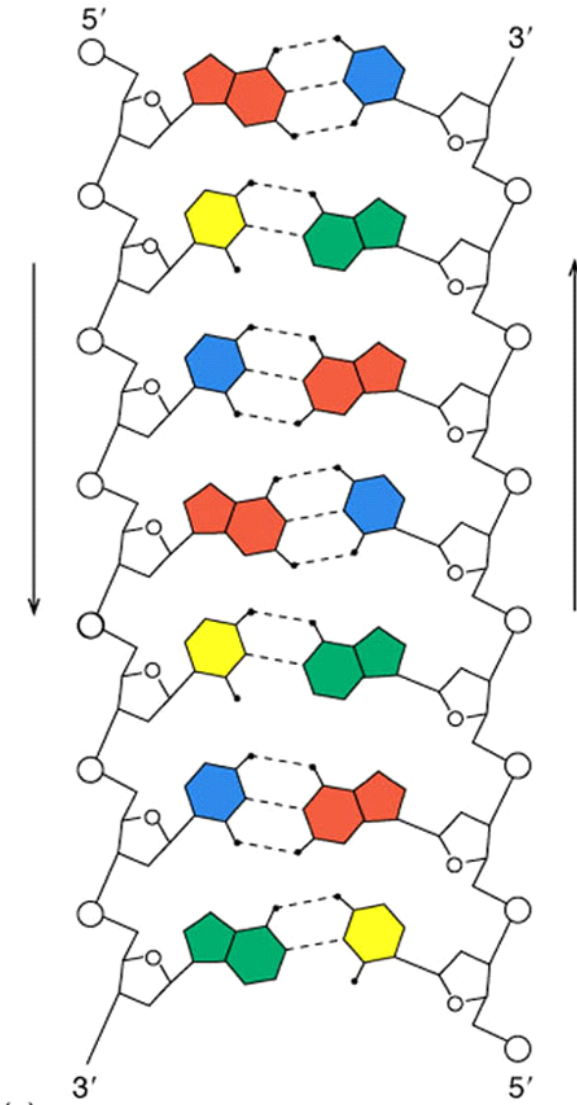


C 3 Ligações de hidrogénio

2 Ligações de hidrogénio



Arranjo energeticamente favorável



Os “esqueletos” açúcar-fosfato enrolam em torno um do outro – DUPLA HÉLICE (estrutura secundária)

Cada volta (3,4 nm, passo da hélice) da hélice corresponde a cerca de 10 pb (10,4)

Cadeias ANTIPARALELAS

As 2 cadeias têm sequências de nucleótidos COMPLEMENTARES

COMPLEMENTARIEDADE

Regras de Chagraff

- ❖ A composição em bases varia entre espécies
- ❖ DNA de diferentes tecidos da mesma espécie tem a mesma composição
- ❖ Qualquer que seja a espécie, os pares de bases são sempre os mesmos:

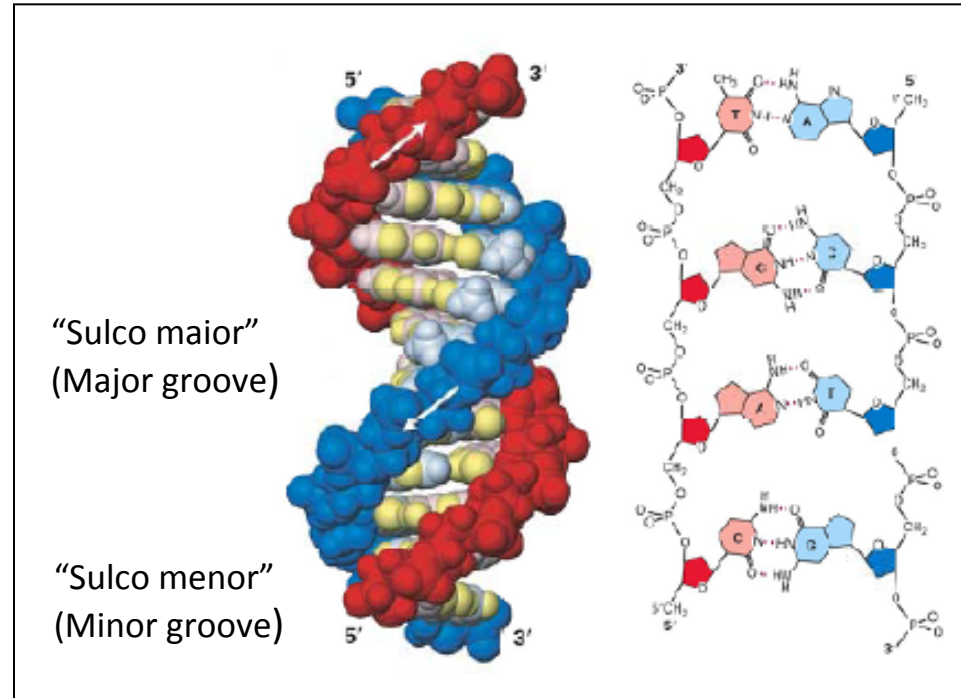
Adenina – Timina

Guanina – Citosina

Piridina – Pirimidina

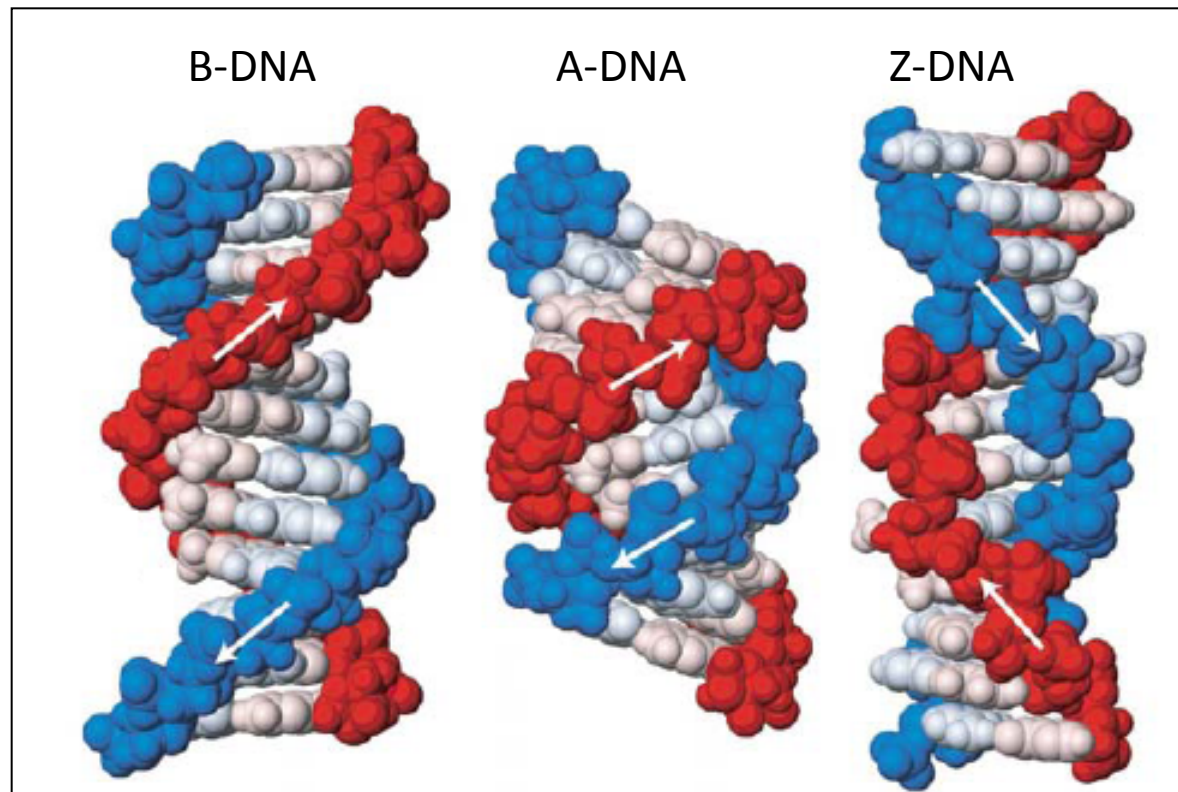
$$\begin{array}{r} A \\ T \end{array} = \begin{array}{r} G \\ C \end{array} = \begin{array}{r} A + G \\ T + C \end{array}$$

A DUPLA HÉLICE



Em condições fisiológicas normais, a dupla hélice enrola para a direita – FORMA B

Os “sulcos” existentes na estrutura (maior e menor) tornam as bases azotadas acessíveis a moléculas que se ligam as DNA (ex.: proteínas)



FORMA A – Forma-se em situações de baixa humidade, mais compacto, 11 pb/volta; Também em hélices RNA-RNA e RNA-DNA

FORMA Z – Forma-se em moléculas de DNA pequenas com piridinas-pirimidinas alternadas; hélice para a esquerda

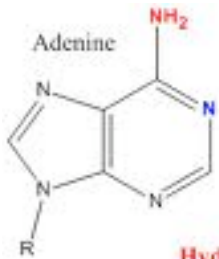
Tripla hélice – só *in vitro*

Forças estabilizantes

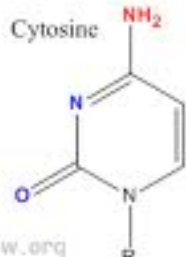
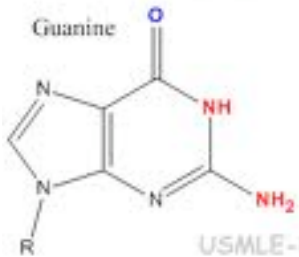
Ligações de hidrogénio
Interações hidrofóbicas
Forças de van der Waals
Ligações iónicas

Bases azotadas

Grupos fosfato/Mg²⁺



Hydrogen Bond Donor
Hydrogen Bond Acceptor



USMLE-Review.org

usmle-review.org

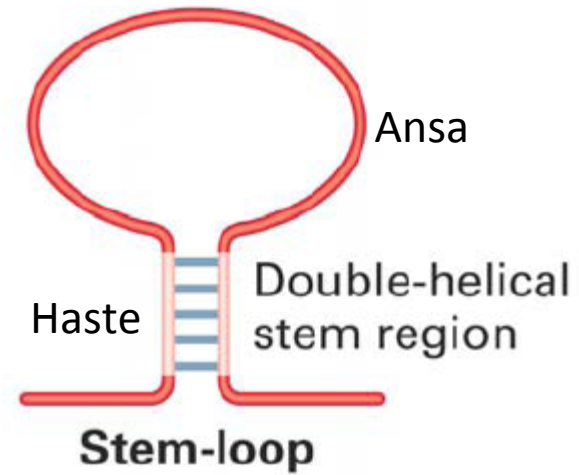
RNA

RNA	Designação	Tamanho	Função
tRNA	Transferência	Pequeno (73-94 nt)	Transporta aminoácidos
rRNA	Ribossomal	Variável	Liga a proteínas para formar ribossomas
mRNA	Mensageiro	Variável	Direciona a sequência de aminoácidos das proteínas
SnRNA	Curto nuclear	Pequeno (100-200 nt)	Processa mRNA inicial (eucariotas)
miRNA	Micro	Pequeno	Afeta expressão genética
SiRNA	Curto de interferência	Pequeno (20-30 nt)	Afeta expressão genética Tem utilidade na investigação

Estruturas secundárias mais simples

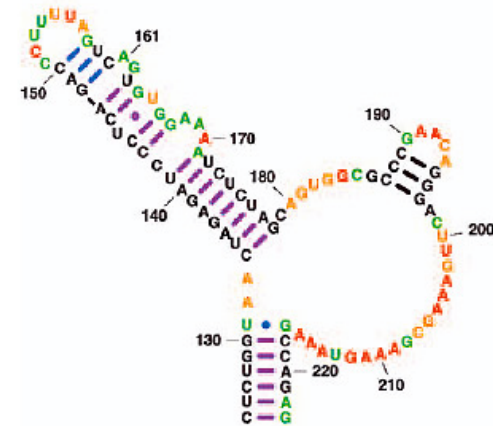
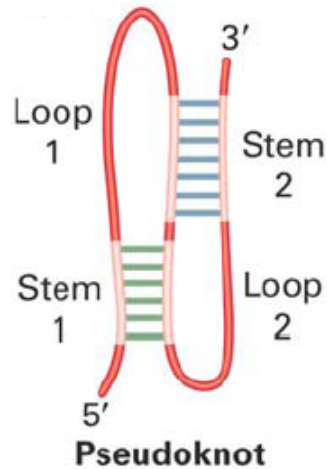


5-10 nucleótidos

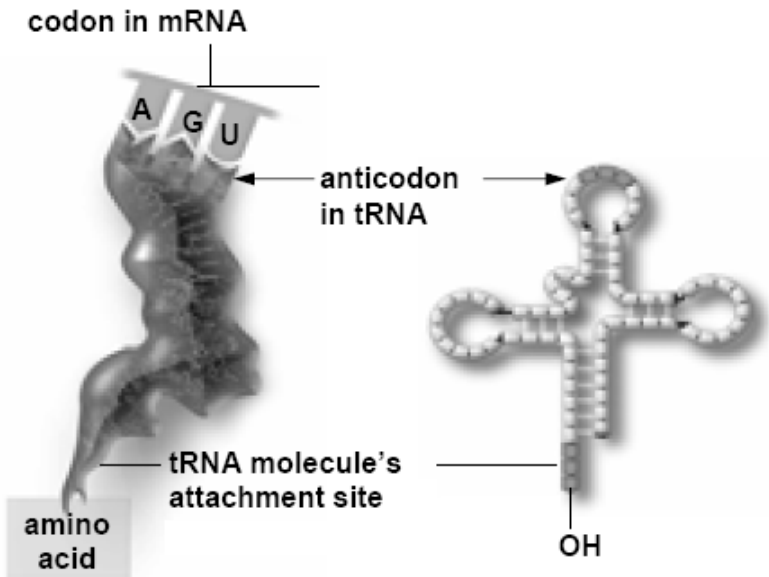


Bases separadas por 50 a centenas de nucleótidos

Estrutura terciária

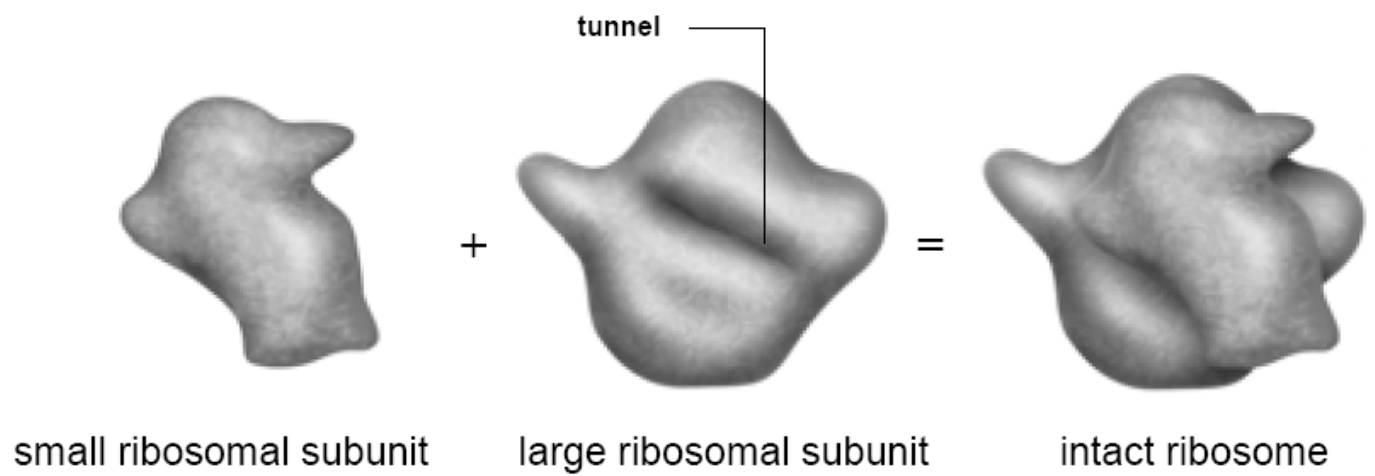


blogs.scienceforums.net/



tRNA

rRNA



- *Como ficou estabelecido que o material genético é um ácido nucleico?*
- *Como ficou estabelecido que era o DNA?*

1928 – Fred Griffith

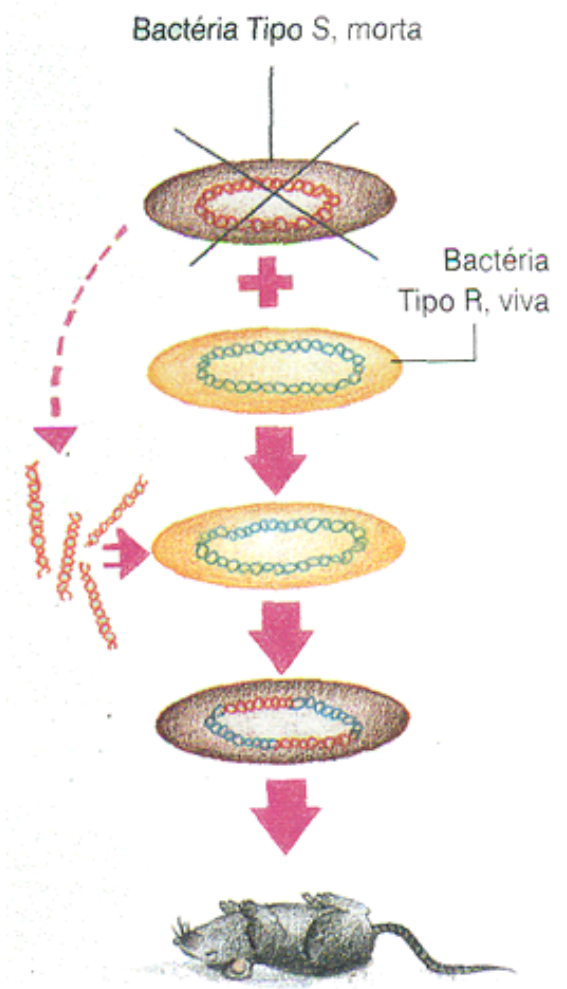
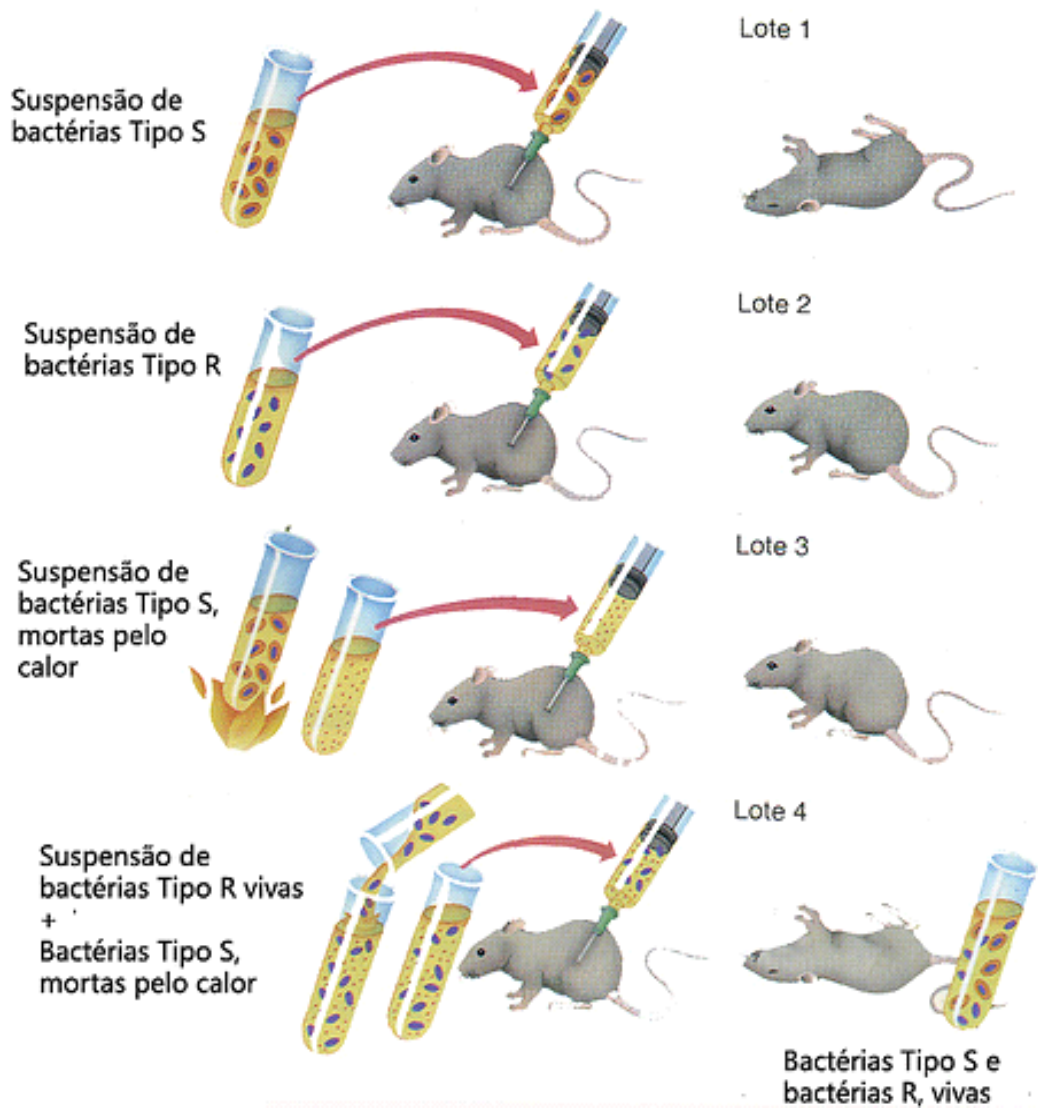
Experiência realizada com *Diplococcus pneumoniae* – bactéria causadora da pneumonia

Estirpe “lisa” – S (smooth) – Virulenta
(COM cápsula de polissacáridos)



Estirpe “rugosa” – R (rough) – Não virulenta
(SEM cápsula de polissacáridos)





Algum “princípio transformador” da estirpe S morta converteu a estirpe R a uma forma virulenta, permitindo a síntese do revestimento de polissacáridos

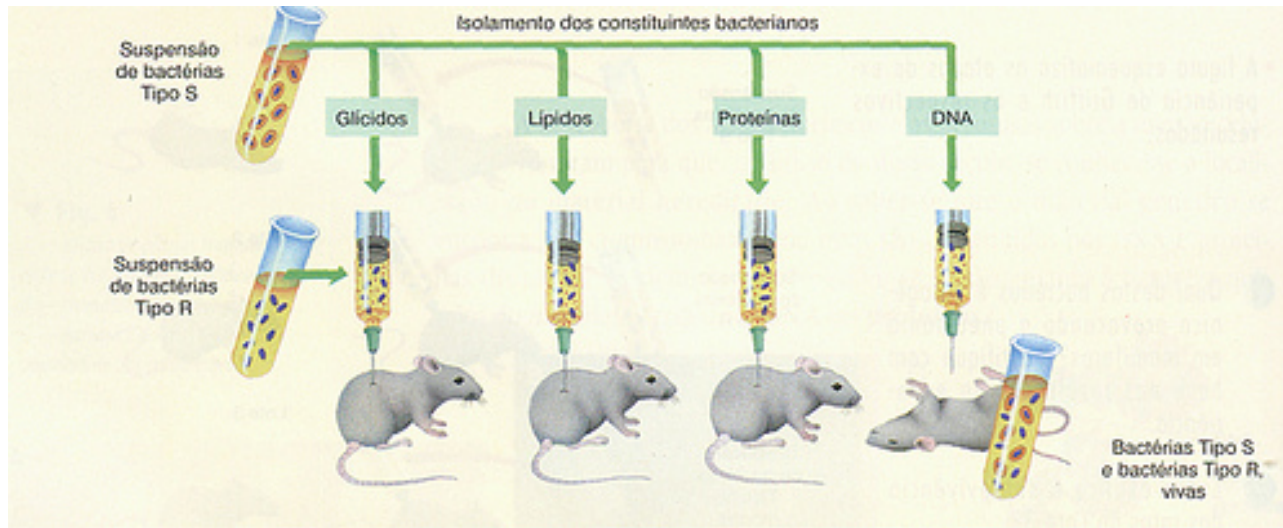
1944 – Avery, MacLeod & McCarty

Conseguiram transformar bactérias *in vitro*

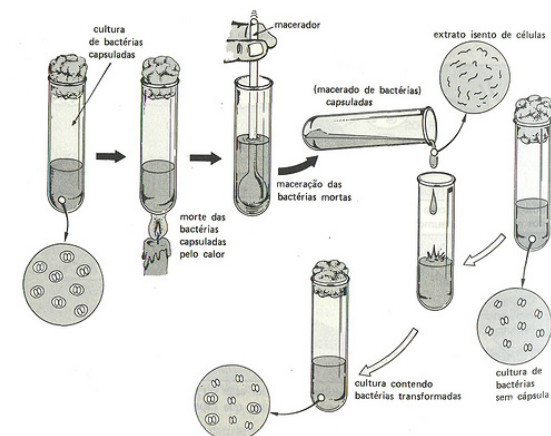
Observaram a formação do revestimento polissacarídico ao microscópio

Obtiveram um extrato contendo apenas o revestimento

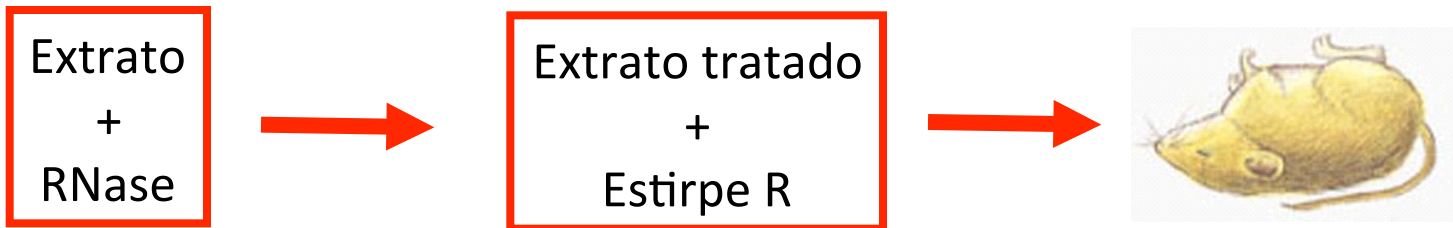
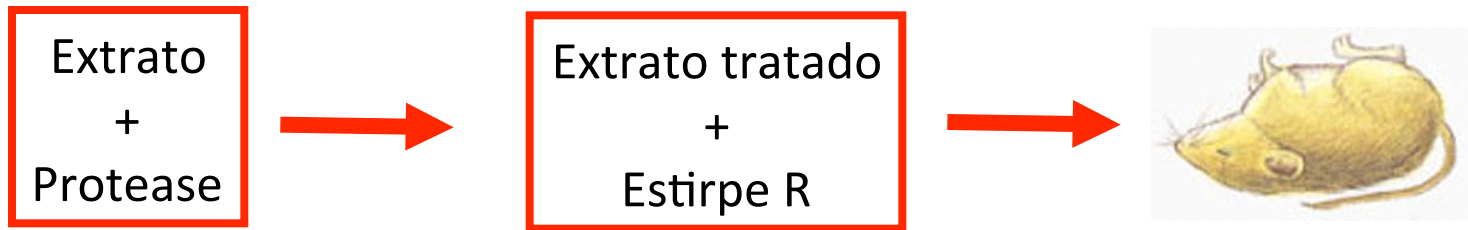
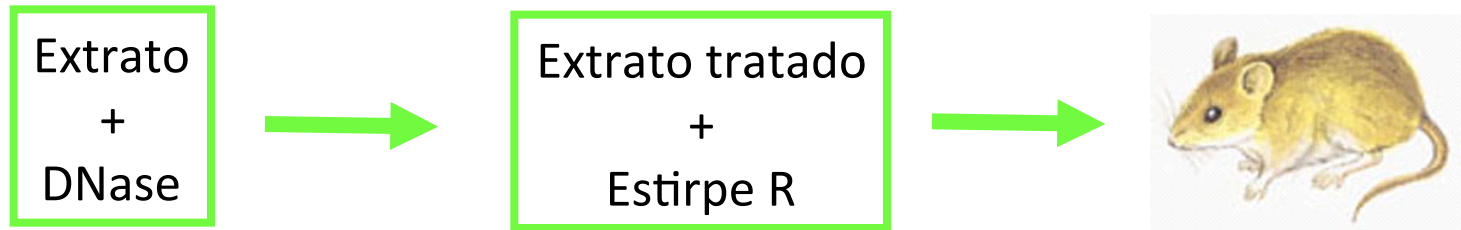
Trataram esse extrato com várias enzimas



sites.google.com/site/geologiaeabiologia

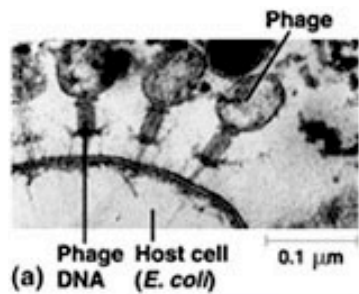


1944 - Avery, MacLeod & McCarty (cont.)

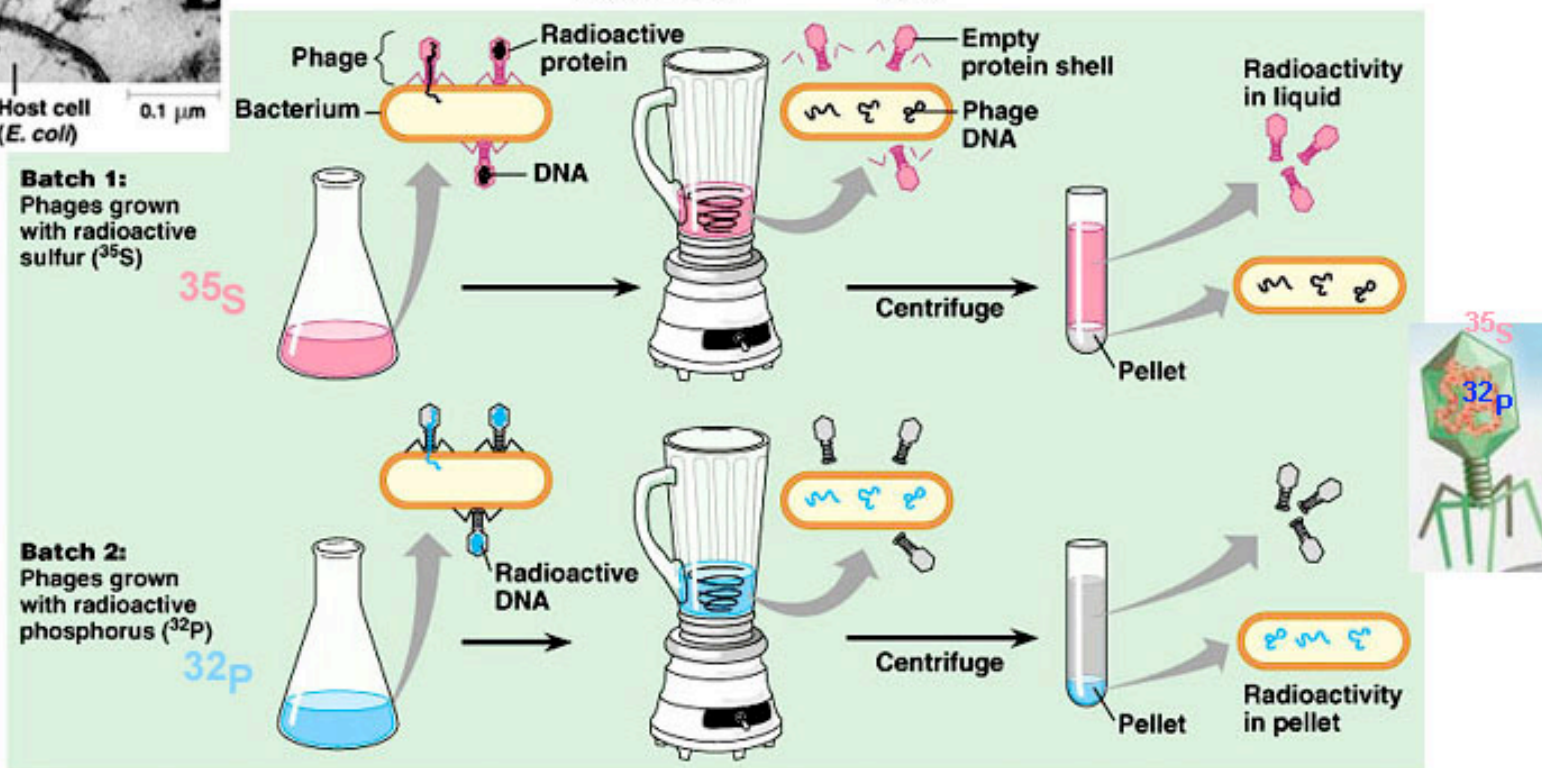


Genes são constituídos por DNA

1953 - Hershey e Chase - Experiência com culturas de bacteriófagos (Primeira utilização de radioisótopos em estudos deste tipo)



- 1 Mix radioactively labeled phages with bacteria. The phages infect the bacterial cells.
- 2 Agitate in a blender to separate phages outside the bacteria from the cells and their contents.
- 3 Centrifuge the mixture so bacteria form a pellet at the bottom of the test tube.
- 4 Measure the radioactivity in the pellet and the liquid.

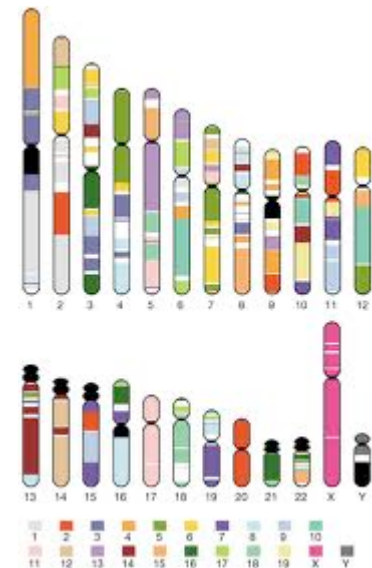
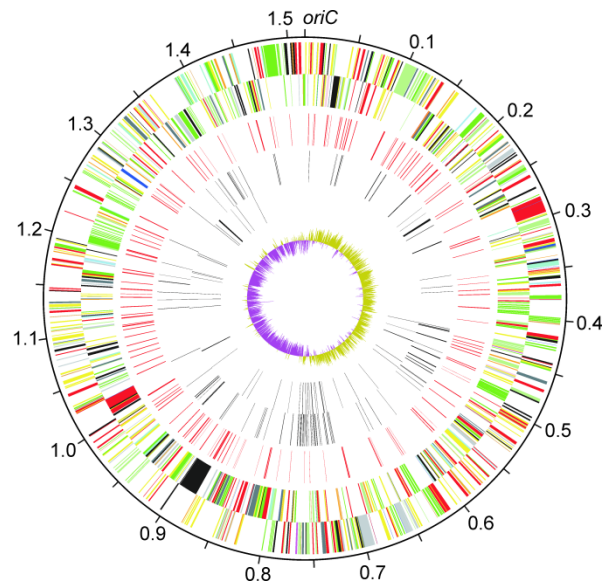
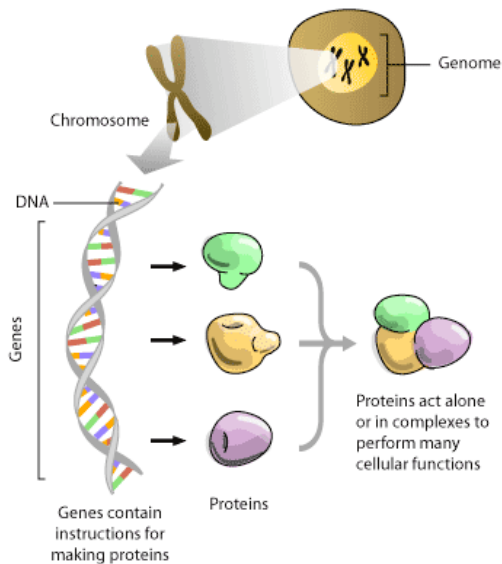


(b) The experiment showed that T2 proteins remain outside the host cell during infection, while T2 DNA enters the cell.

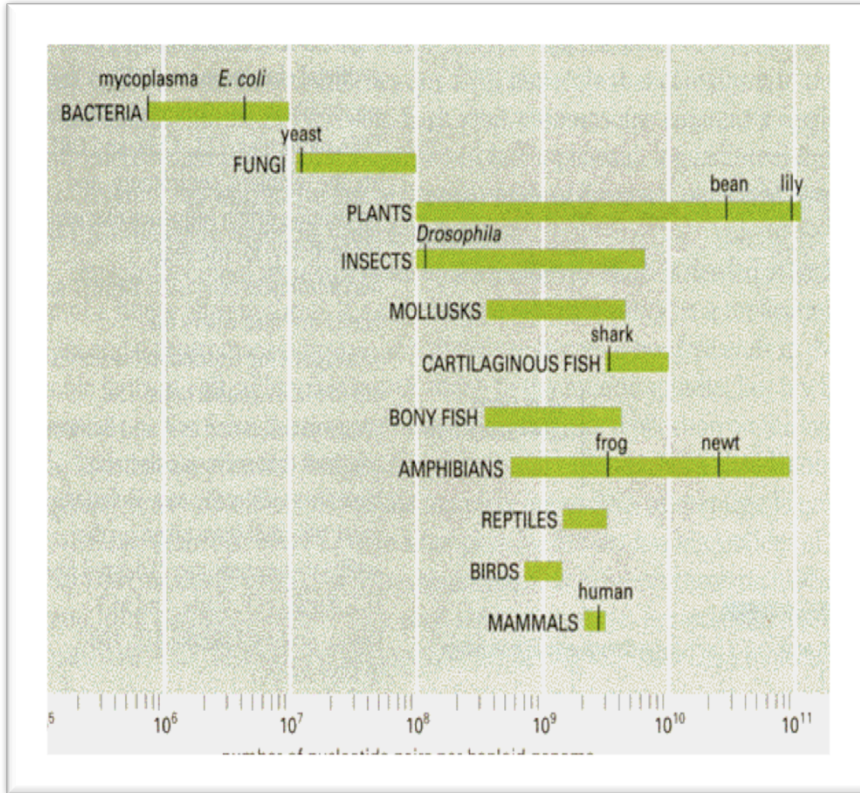
DNA é o material responsável pela hereditariedade

GENOMA

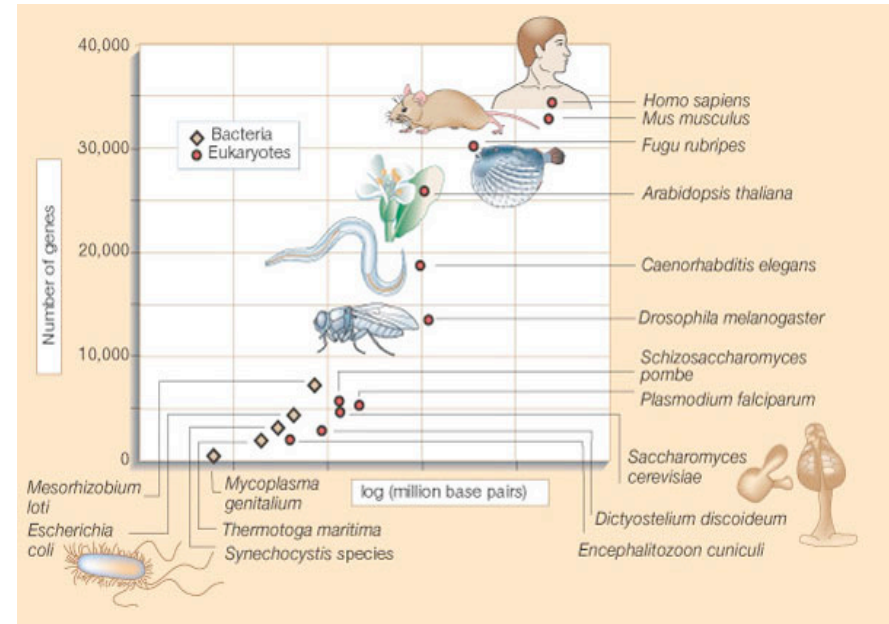
Molécula ou conjunto de moléculas de DNA (ou RNA, em alguns vírus), que contém a informação necessária para construir e manter um organismo vivo, e para passar essa informação para gerações seguintes.



GENOMA: o tamanho não é proporcional à complexidade do organismo



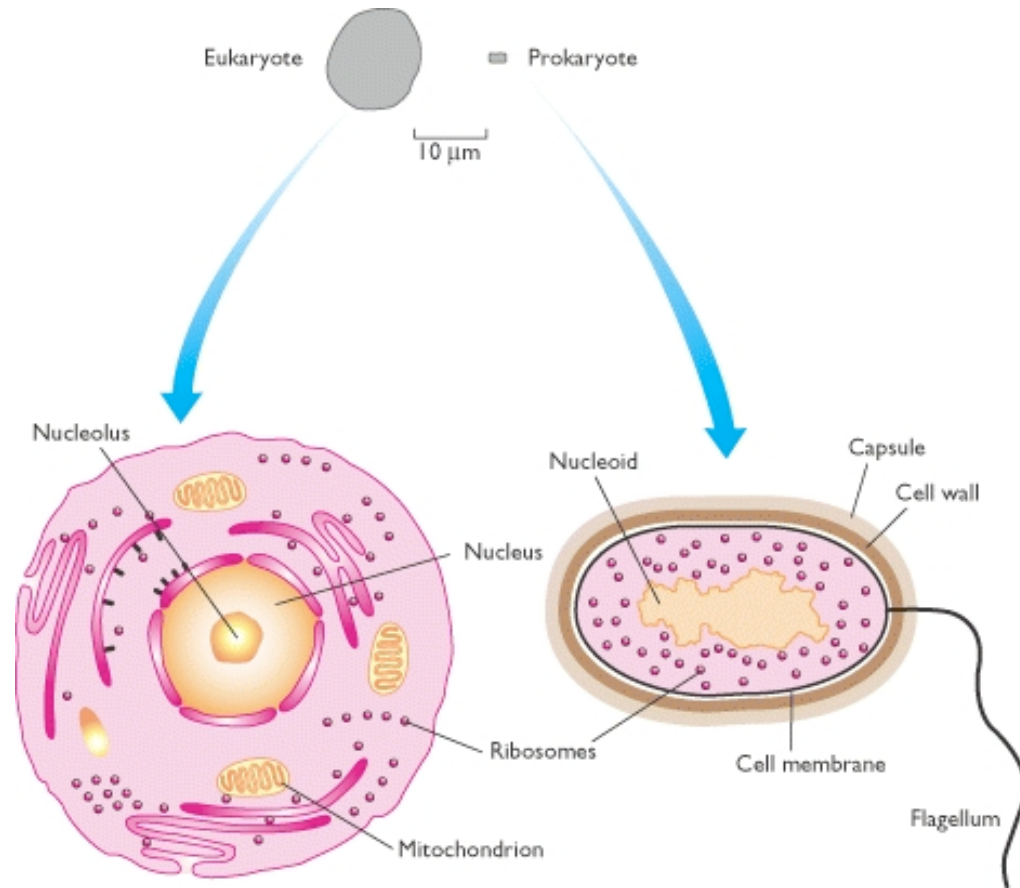
cbs.dtu.dk



www.nature.com

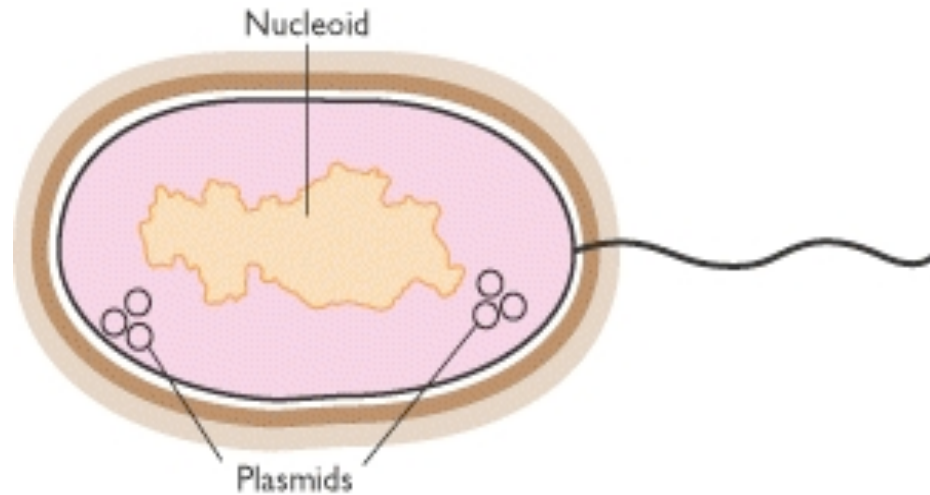
CÉLULAS

Procariotas e Eucariotas



<http://dwi2astin.edublogs.org>

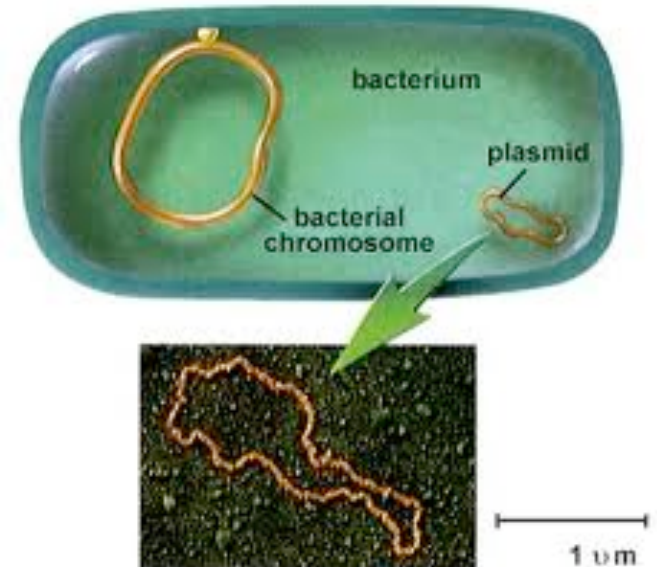
GENOMA - PROCARIOTAS

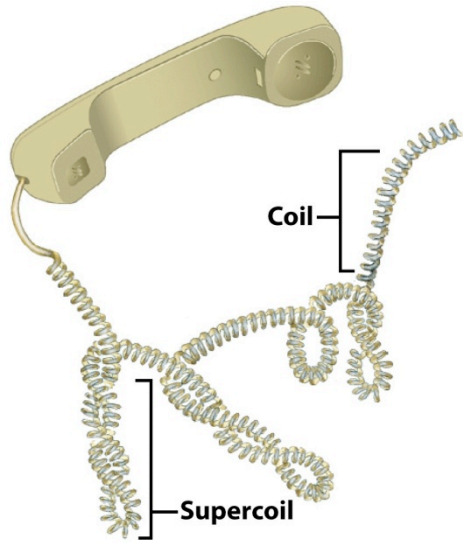


- ✓ Haploide – 1 conjunto de genes
- ✓ 1 cromossoma: circular; cadeia dupla
- ✓ Ausência de membrana nuclear
- ✓ Cromossoma sempre ativo: replicação e transcrição contínuas

PLASMÍDEO

- ✓ Circular; cadeia dupla
- ✓ Extracromossomal
- ✓ Replicação independente
- ✓ Utilidade em laboratório



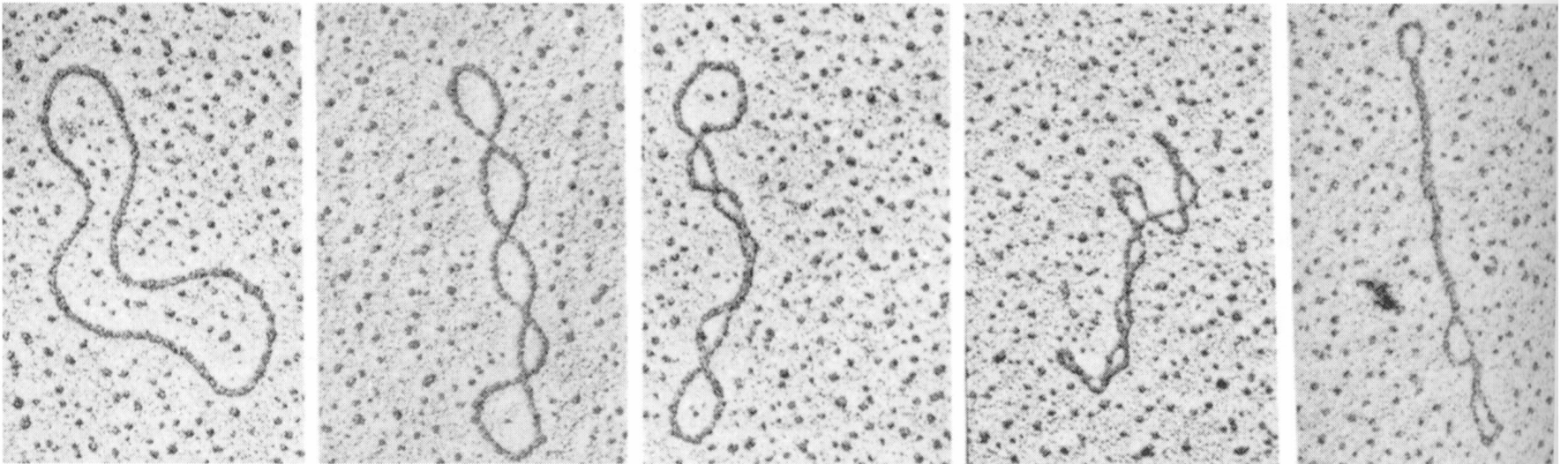


Super-enrolamento – estrutura terciária

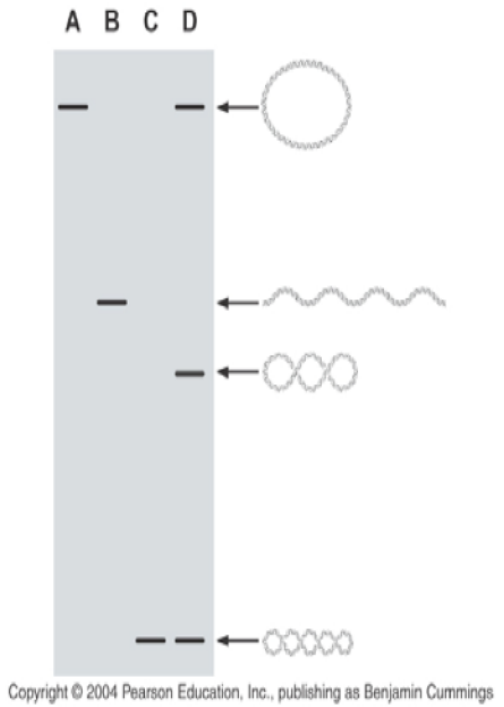
Procariotas - DNA circular

Jerome Vinograd and his colleagues. They first detected DNA supercoiling in small circular viral DNAs (1965)

Figure 24-10
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



Separação de DNA relaxado e enrolado (eletroforese)



(Molecular Biology of the Gene)

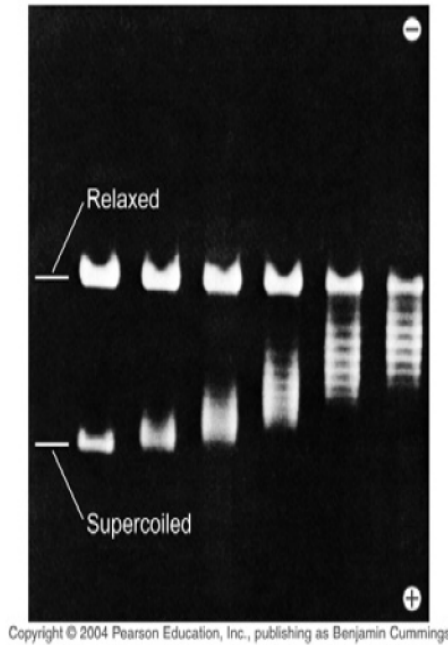
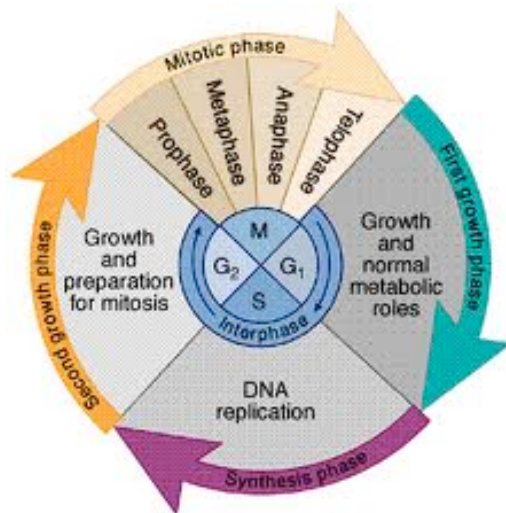


Figure 24-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

GENOMA - EUCARIOTAS

- ✓ Diploide – 2 conjunto de genes (exceto células germinativas)
- ✓ Cromossomas homólogos têm os mesmos genes embora com diferenças
- ✓ Cromossomas: lineares; cadeia dupla
- ✓ Membrana nuclear
- ✓ Existe um ciclo celular



schoolworkhelper.net

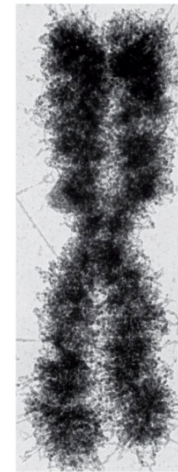
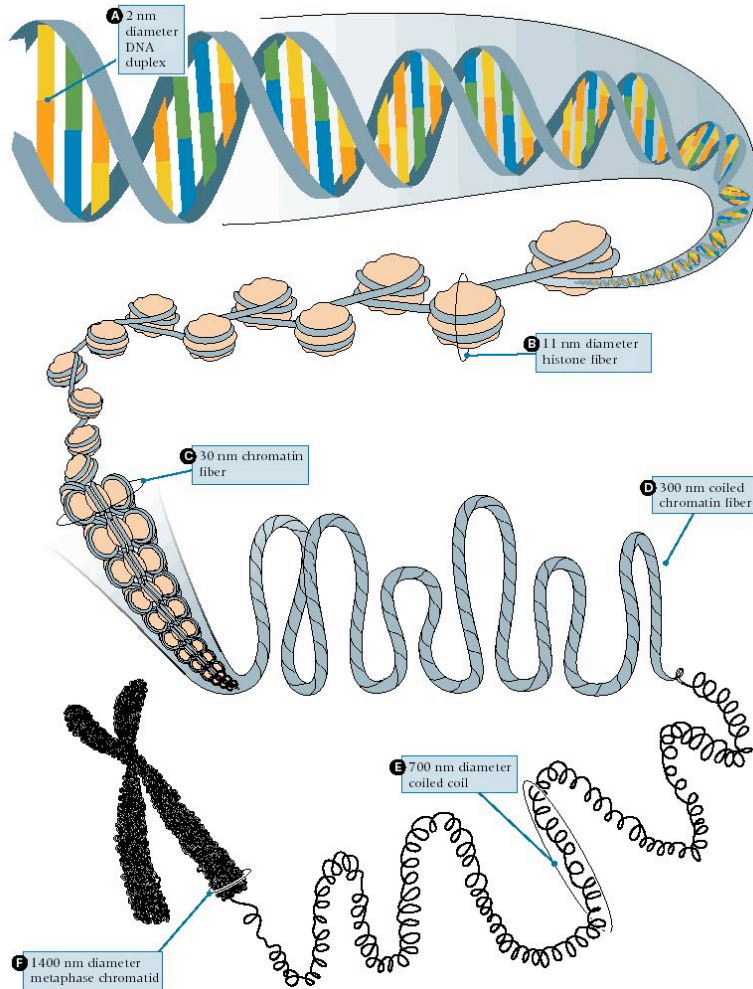


Figure 24-5a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

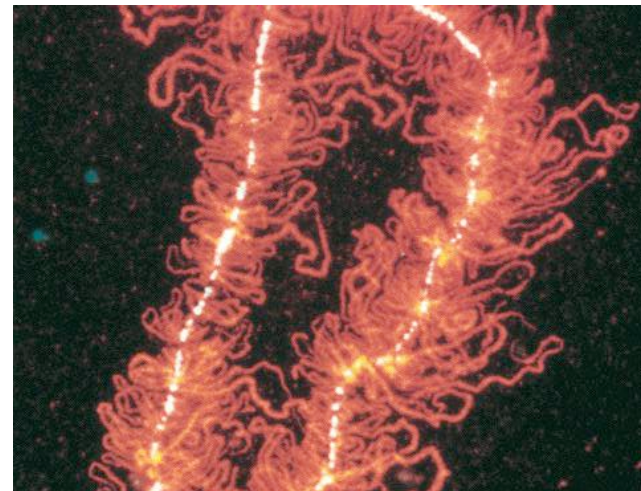


Figure 24-5b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Cada célula (10mm) contém $\approx 1,7\text{-}2$ m de DNA que está muito enrolado em torno de proteínas para formar os cromossomas



- A. Dupla hélice: \varnothing 2 nm
- B. Fibra de histonas: \varnothing 11 nm
- C. Fibra de cromatina: \varnothing 30 nm
- D. Fibra de cromatina enrolada: \varnothing 300 nm
- E. Fibra de cromatina enrolada: \varnothing 700 nm
- F. Cromatídeos (metáfase): \varnothing 1400 nm

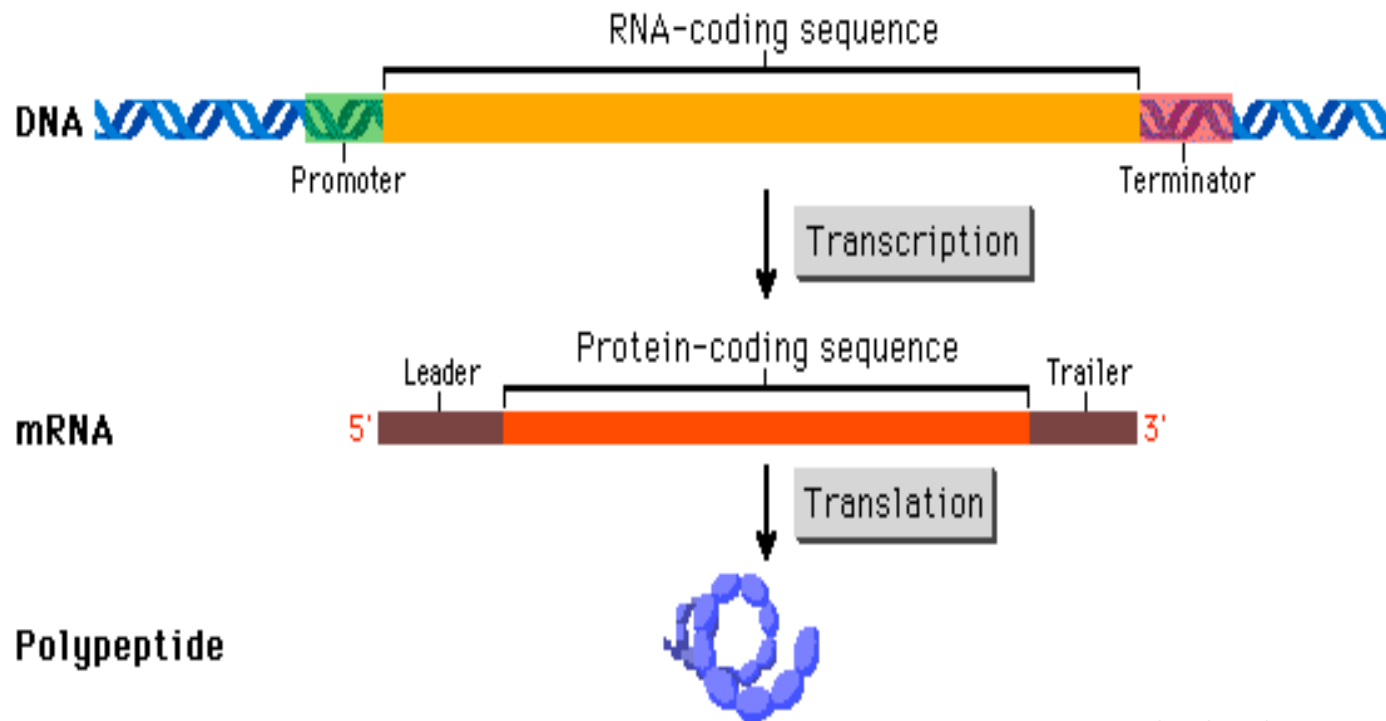


ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Procarionotas

Em sequência

Região codificante contínua



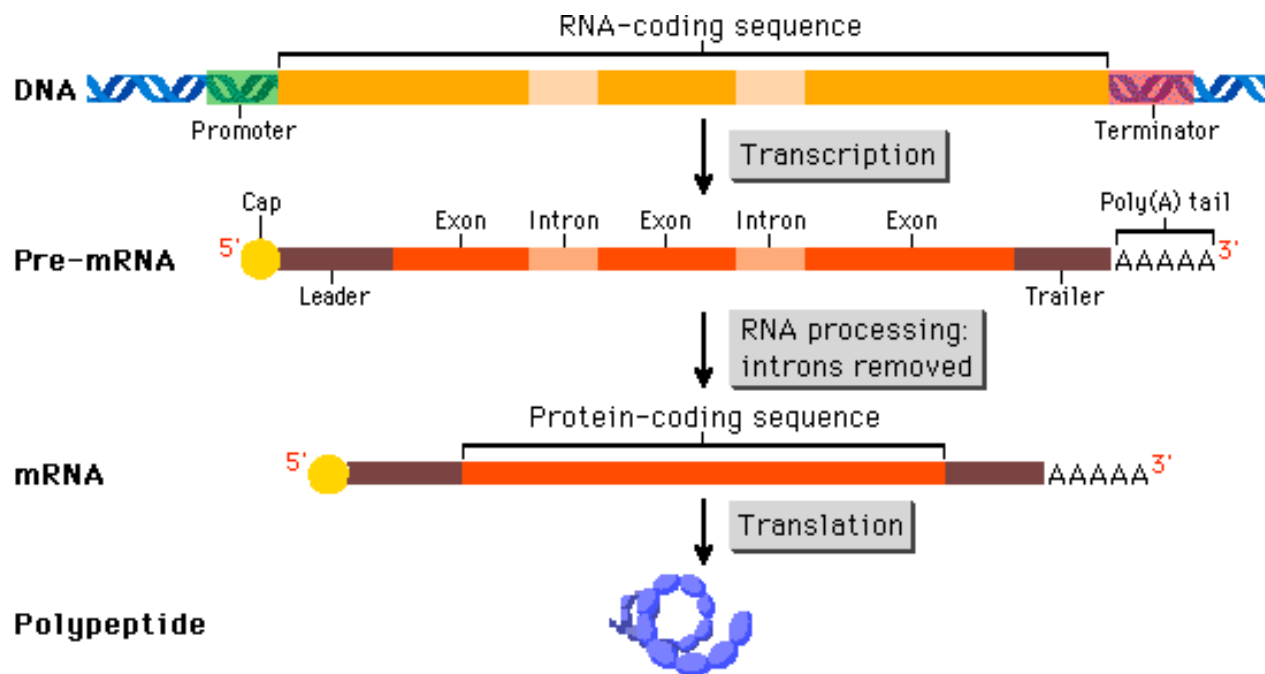
Eucariotas

Região codificante descontínua:

EXÕES: aprox 150 pb

INTRÕES: 50 a 20000 pb
(1 a 500 por gene)

Porque existem intrões?



Informação contida no DNA

- ✓ Necessária à formação de proteínas
- ✓ Necessária à formação de outros ácidos nucleicos (RNA)
- ✓ Necessária à regulação da expressão da restante informação

Tipos de sequências no DNA

- ✓ Sequências repetitivas
 - ✓ Tipo satélite: Agrupadas → heterocromatina
 - ✓ Telómeros
 - ✓ Centrómeros
 - ✓ Dispersas → eucromatina (tipo SINE ou LINE)
- ✓ Sequências únicas → eucromatina

GENOMA HUMANO

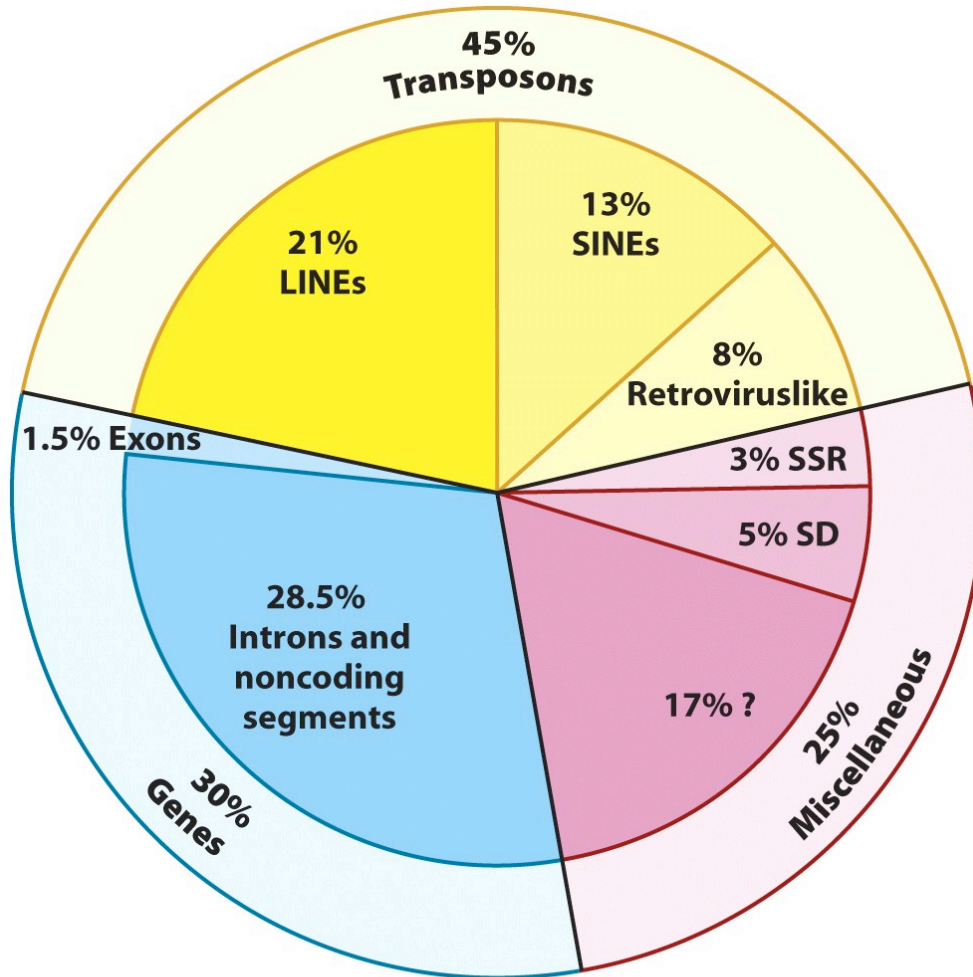


Figure 24-8
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Genes → aprox 30%
Exões → 1,5%

Transposões

Longos

Curtos

Retrotransposões

Outros

Sequências repetitivas

Pseudogenes, enhancers,
silencers, etc

JUNK DNA

← Não ativos

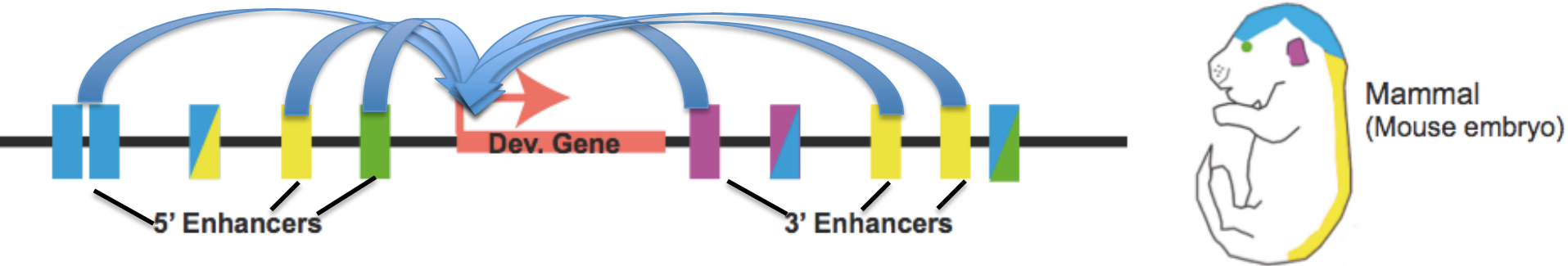
Proteínas não ativas

Fragmentos de proteínas

DNA não codificante e Regulação Genética

Elementos reguladores da **expressão genética**

Enhancers



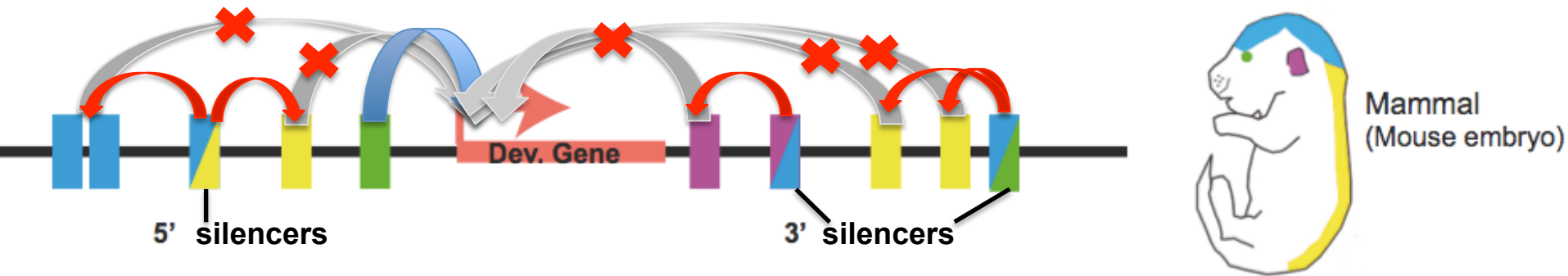
O Gene é essencial para o desenvolvimento do cérebro, ouvidos, olhos e coluna vertebral

Ligam-se especificamente ao promotor de um gene, activando a sua expressão

DNA não codificante e Regulação Genética

Elementos reguladores da **expressão genética**

Silencers



Silenciamento do gene de forma a regular a expressão e dirigi-la só para o olho

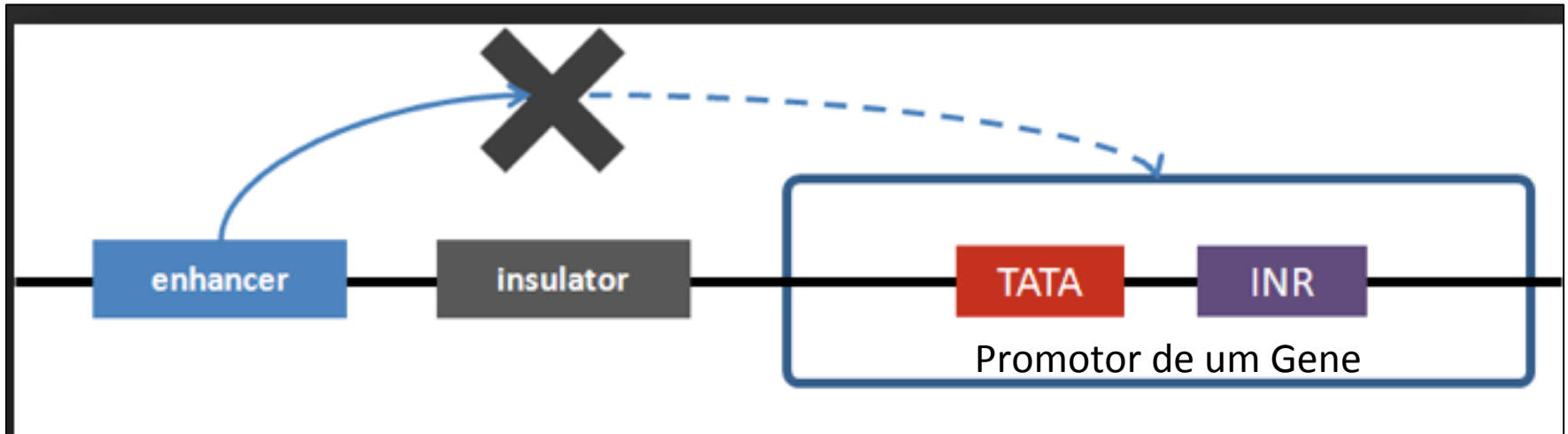
Unem-se especificamente aos enhancers, impedindo a ligação destes com o promotor do gene

Expressão genética selectiva ou ausência de expressão

DNA não codificante e Regulação Genética

Elementos reguladores da **expressão genética**

Insulators

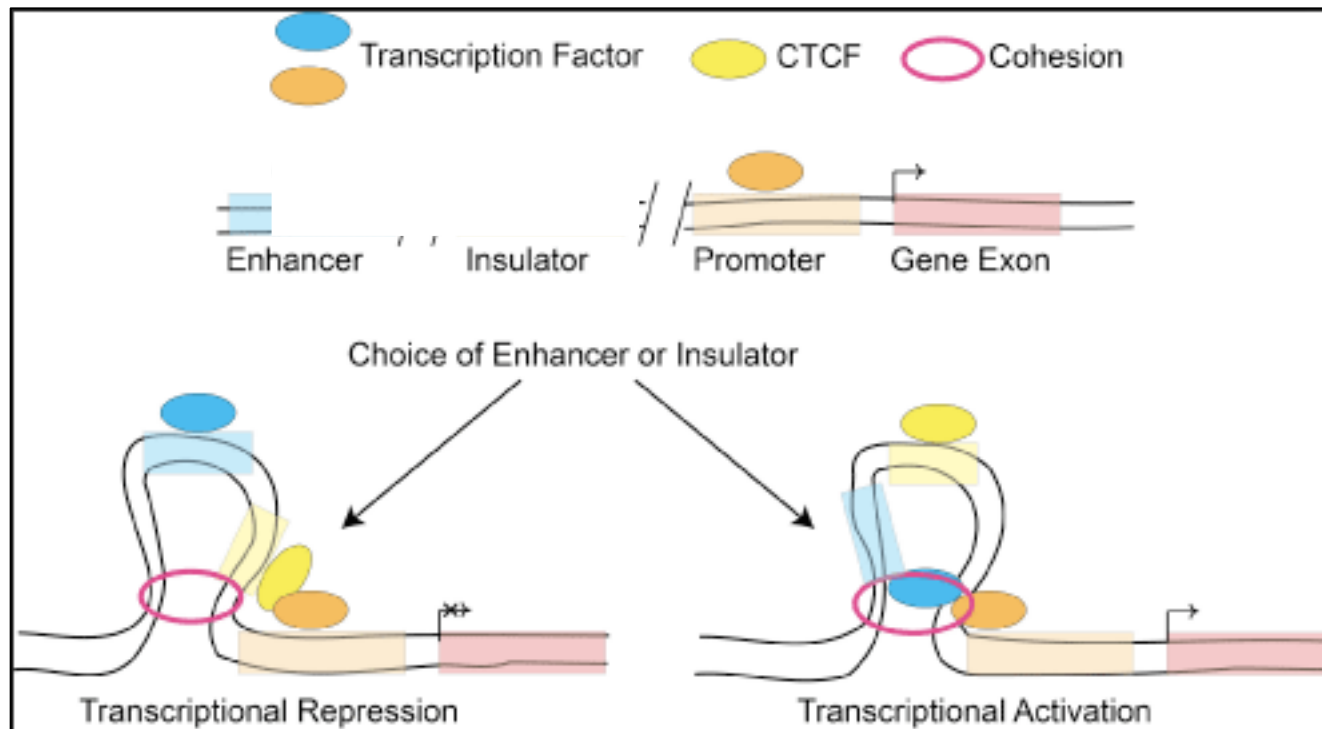


Bolqueiam a união entre enhancer e promotor num entorno genómico.

DNA não codificante e Regulação Genética

Elementos reguladores da **expressão genética**

Enhancers + Insulators



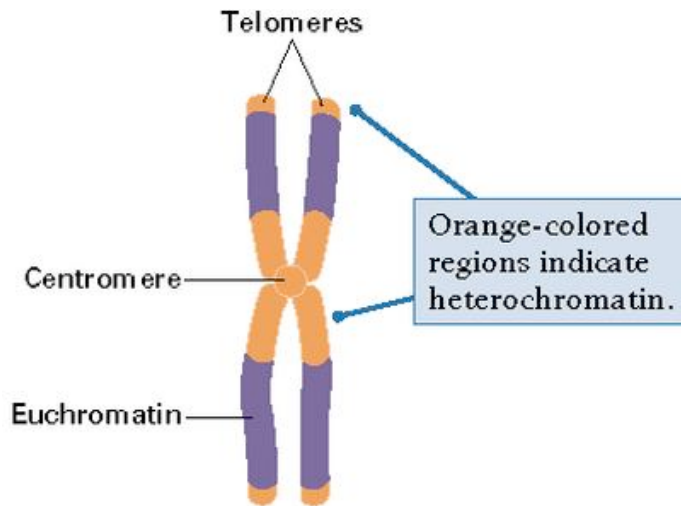
DNA não codificante e Regulação Genética

- ✓ Elementos reguladores da **expressão genética**
- ✓ São usados como elementos para o estudo da expressão dos genes
- ✓ A maioria estão altamente ultra-conservados na evolução
- ✓ O estudo sobre o funcionamento destes elementos é recente
- ✓ Estão intrinsecamente ligados à arquitetura genómica (organização espacial do DNA + Cromatina)

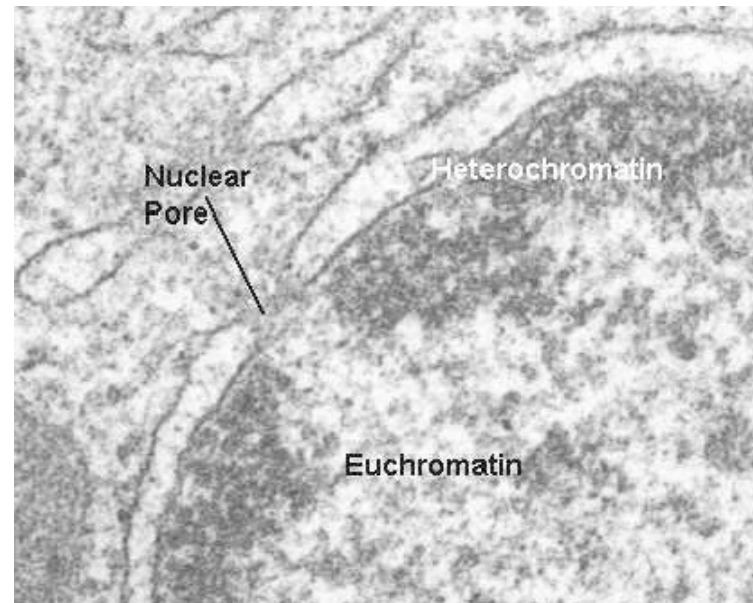
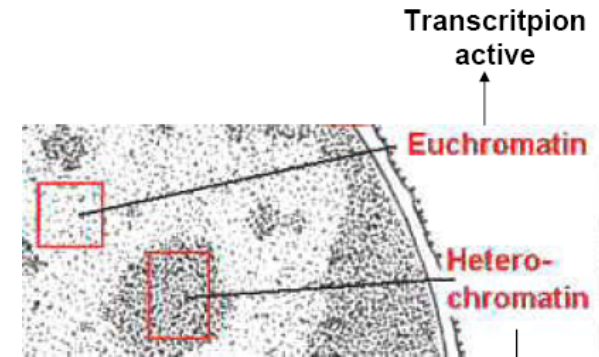
Heterocromatina e eucromatina

Heterocromatina – forma mais compactada, resistente à expressão genética

Eucromatina – forma mais distendida



Heterocromatina associada ao envelope nuclear; interrompida nos poros



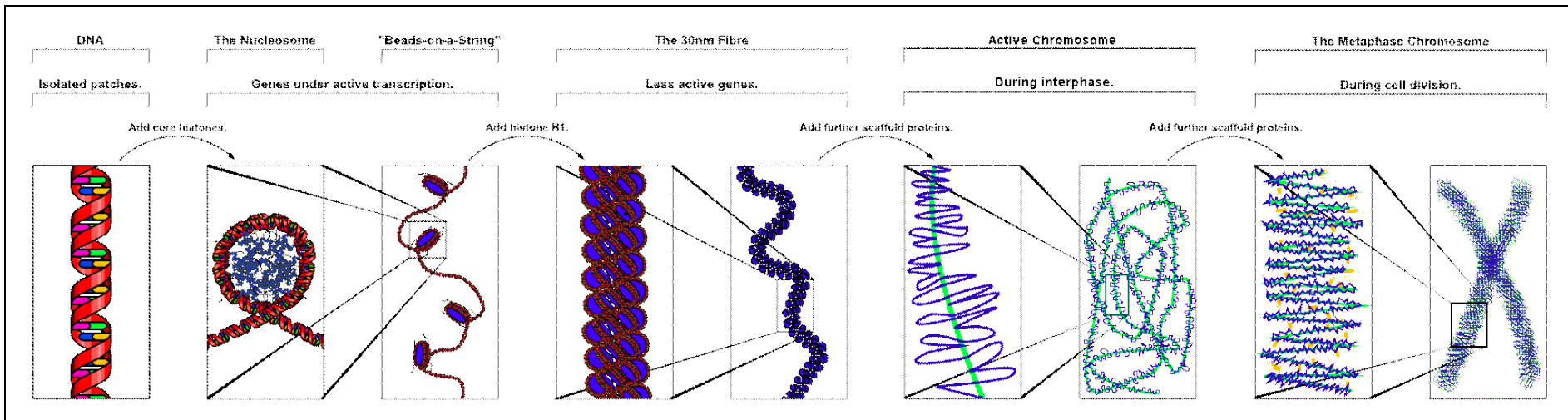
Estrutura da cromatina

Cromatina – Associação entre DNA e Proteínas

Nucleossoma – estrutura mais simples de enrolamento do DNA

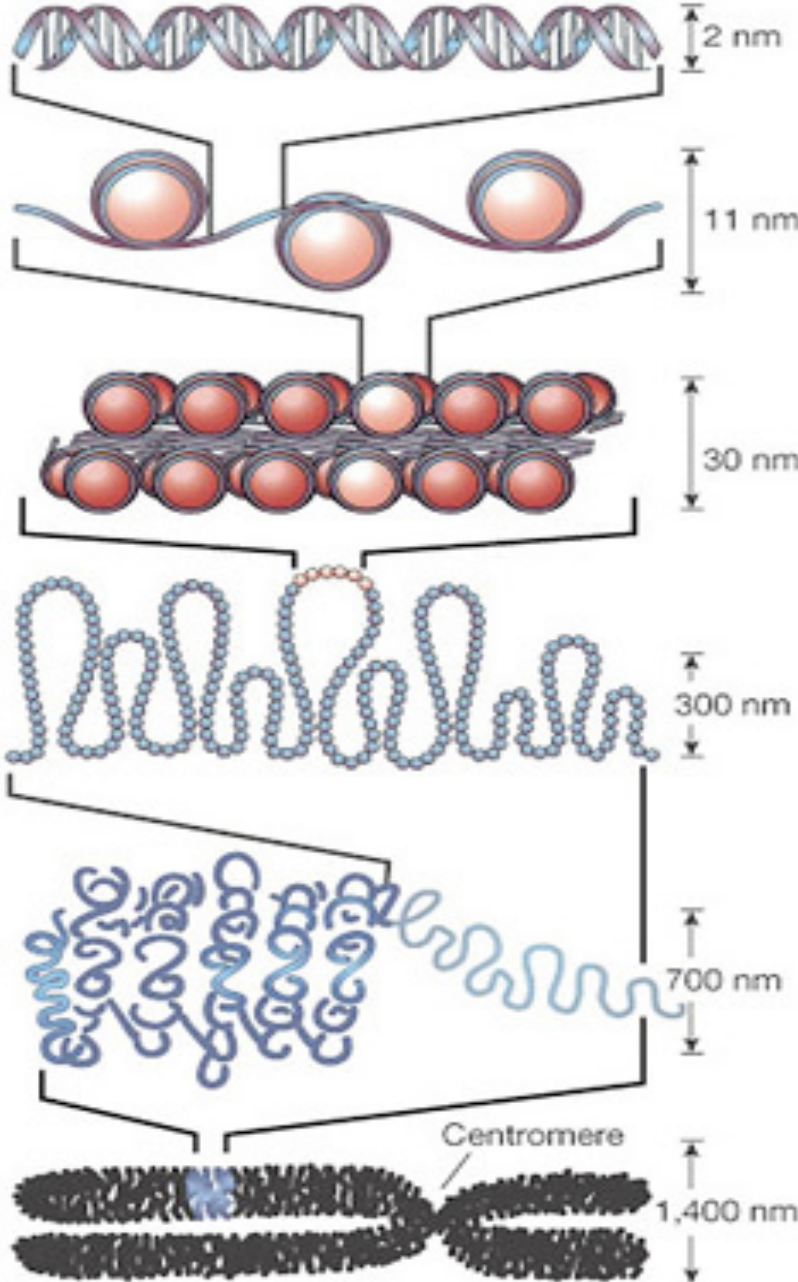
Proteínas: Histonas

Proteínas cromossômicas não-histonas



Arquitectura Genómica

Gene expression ↑



DNA

Unpacked nucleosomes

Packed nucleosomes

Extended chromosome

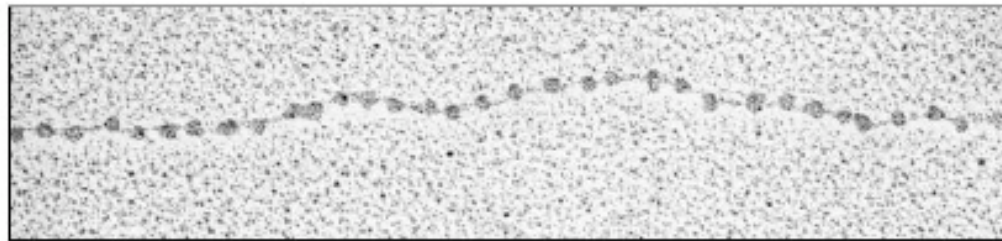
Condensed chromosome

Chromosome

↓ Packed information

Adapted from: Felsenfeld and Groudine. Nature, 2003

Nucleossomas: 1º nível de organização (com as histonas)
(“colar de contas”, *beads on a string*, *nucleosome core particle*)
- Reduz para cerca de 1/3 o comprimento da cadeia



50 nm

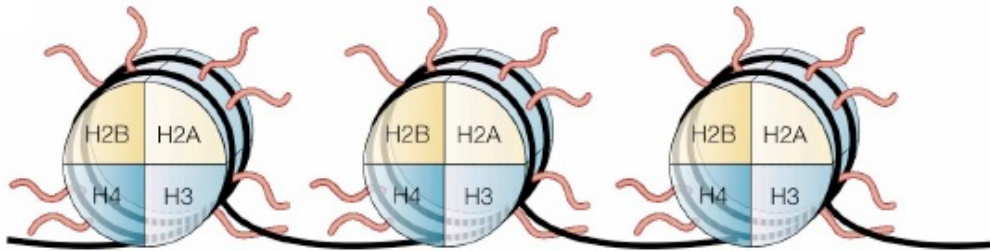
Hamkalo and Foe in *Essential Cell Biology* (1998)

Nucleossomas

- ✓ **Octâmero de histonas**
- ✓ **DNA (\approx 146 nucleótidos)**

Ligados por segmentos de DNA – DNA de ligação (*linker*) – até 80 nucleótidos

Octâmero de histonas



Marks et al., *Nat Rev Cancer* 1:194 (2001)

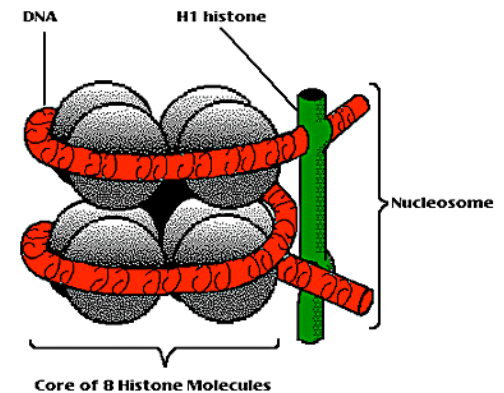
2 histonas H₂A
2 histonas H₂B
2 histonas H3
2 histonas H4

Ligações entre o DNA e o octâmero:

- ✓ 142 pontes de hidrogénio
- ✓ Interações hidrofóbicas
- ✓ Ligações iónicas (lisina e arginina com carga +)
- ✓ Aproxima bases do DNA que

estavam afastadas (± 80 pb) e que

passam a poder interagir com a mesma proteína reguladora



Nucleosome

<http://www.accessexcellence.com/AB/GG/nucleosome.gif>

Nucleossomas

- ✓ Proteínas muito conservadas
- ✓ Extremidade N-terminal longa, exposta ao exterior do octâmero
- ✓ Aminoácidos da cadeia N-terminal sofrem modificações covalentes que controlam a estrutura da cromatina

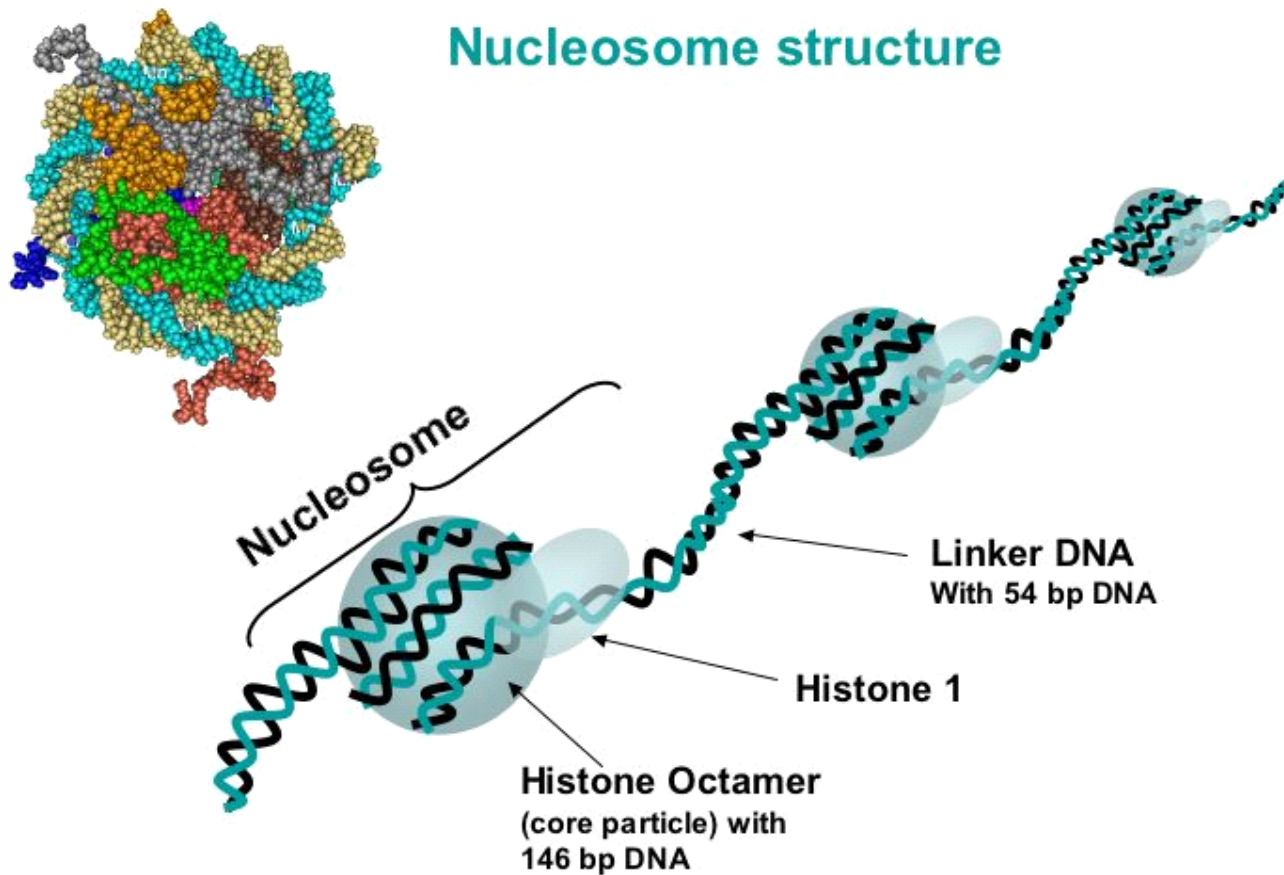
Espaçamento entre nucleossomas é irregular (8-114 pb)

Depende de:

- Capacidade da dupla hélice para dobrar (A-T)
- Presença de outras proteínas ligadas ao DNA (facilitam ou dificultam a formação do nucleossoma)

Varia com:

- Espécie
- Estado de desenvolvimento do organismo
- Regiões específicas do genoma



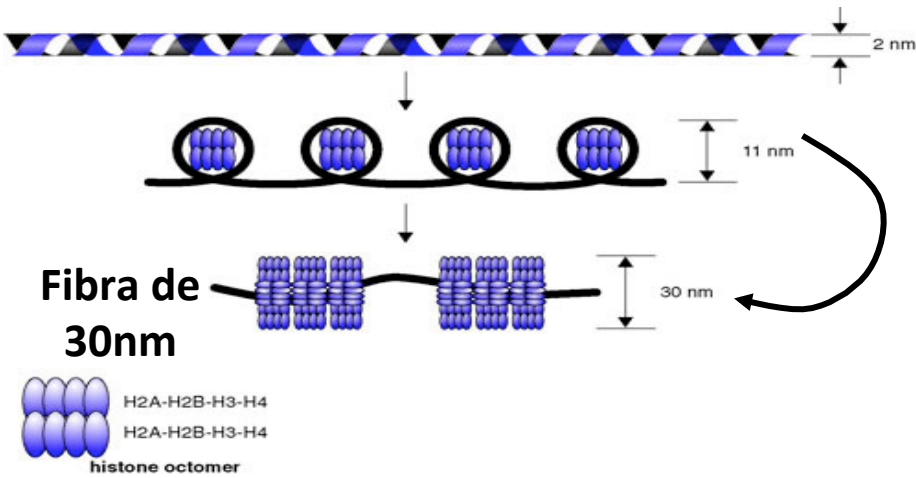
Histona 1:

Menos conservada

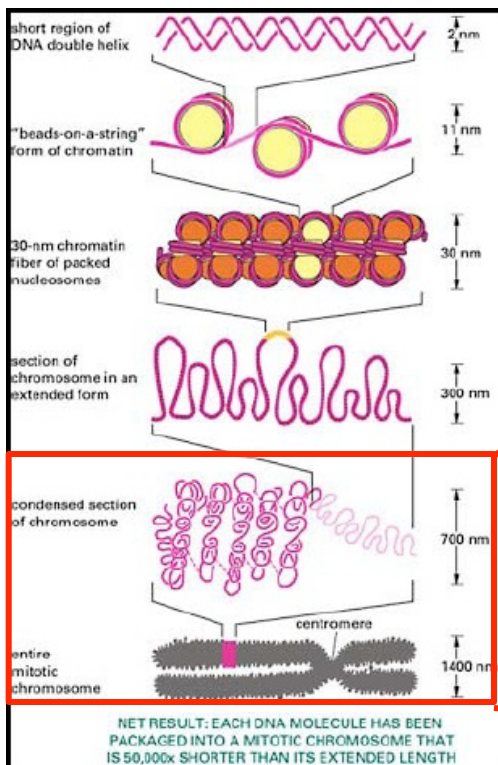
Liga ao DNA e ao octâmero

Desvia o DNA à saída do nucleossoma

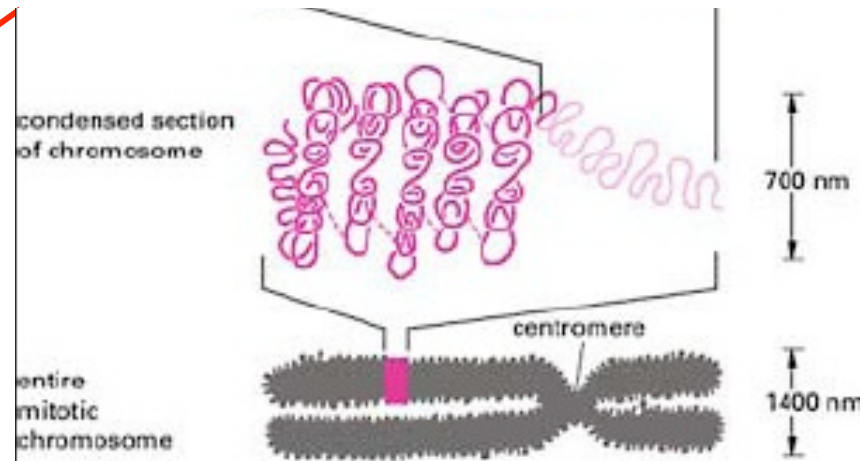
Importante para manter o nível seguinte de compactação



Fibra de 30 nm
Estrutura solenóide
6 nucleossomas/volta

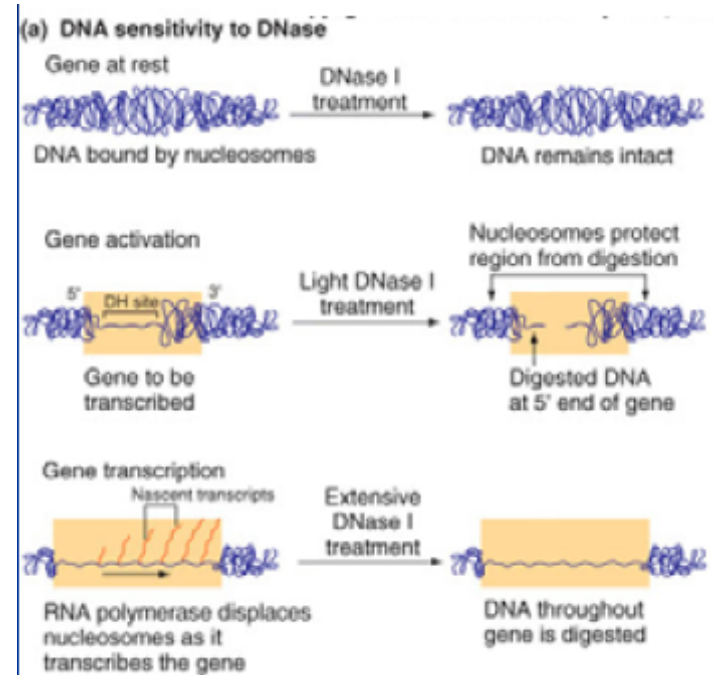
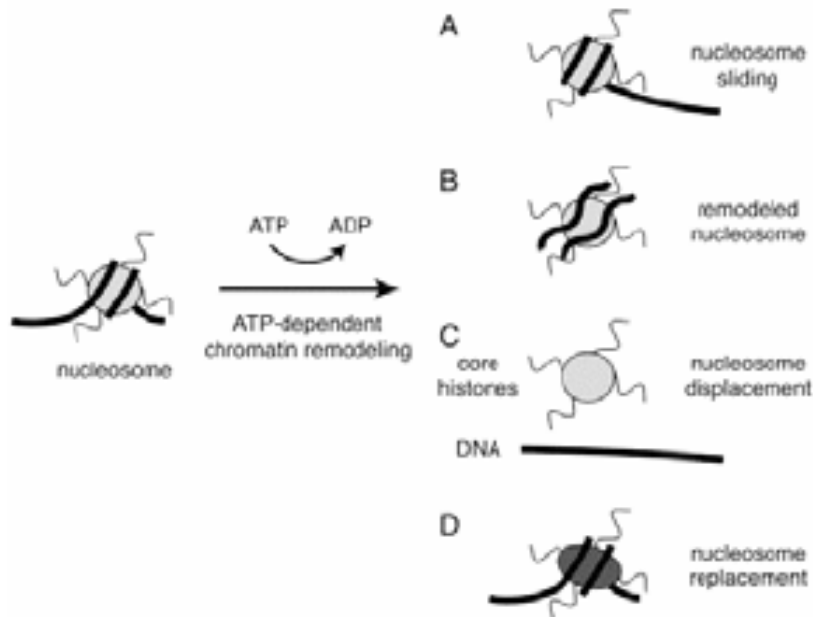


Fibra de 700 nm
Estrutura final de compactação
cromossoma metafásico



Remodelação da cromatina

- ✓ Consumo de ATP
- ✓ Modificação covalente das caudas das histonas
- ✓ Facilitar acesso ao DNA por outras proteínas. Quais???
- ✓ Alterar posição dos nucleossomas



Existem diferentes complexos de remodelação, altamente regulados, com diferentes funções na célula

Ligação de proteínas ao DNA



Molécula deforma sobre o eixo do “esqueleto” açúcar-fosfato

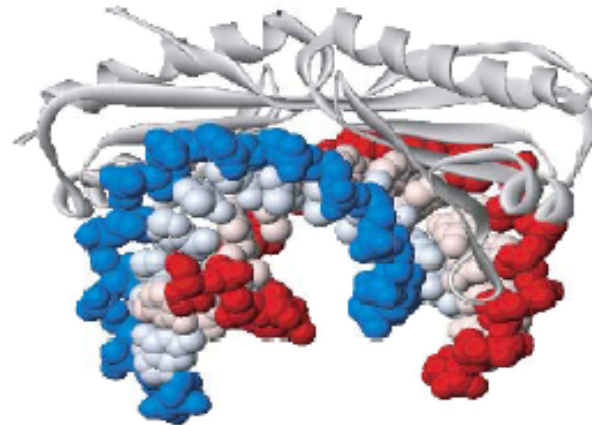
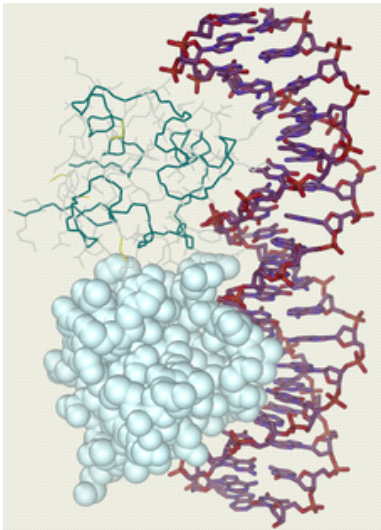


Ajuste entre as moléculas de DNA e de proteína

Custo energético da deformação depende da sequência de nucleótidos

Proteínas reguladoras dos genes reconhecem sequências que deformam com facilidade e provocam uma deformação acentuada

www.zampwiki.com



Topoisomerases

Enzimas responsáveis pelo enrolamento e desenrolamento do DNA

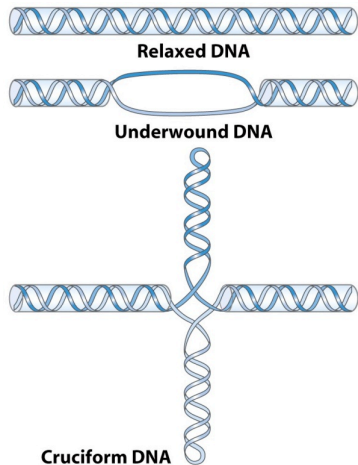


Figure 24-19
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

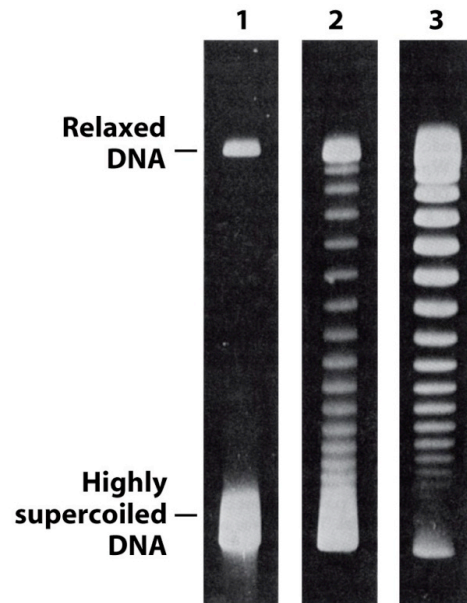


Figure 24-20
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Porque é que o DNA tem que desenrolar?

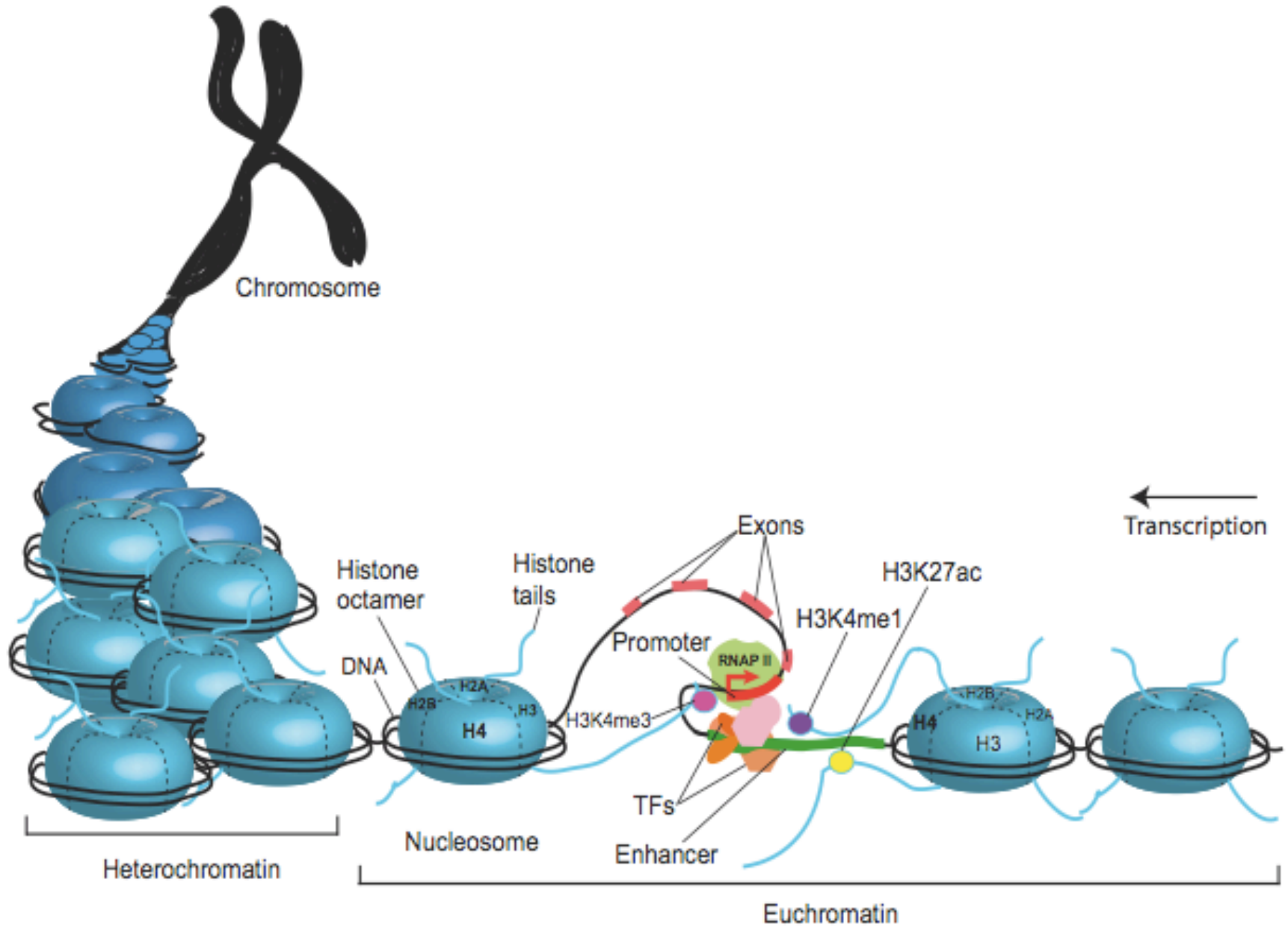
- 1- DNA não tratado
- 2- DNA + Topoisomerase I
- 3- DNA + Topoisomerase I (mais tempo)

São ISOMERASES que atuam na TOPOLOGIA do DNA

Topoisomerases I – ligam a uma cadeia (single strand DNA)

Topoisomerases II – ligam às duas cadeias (double strand DNA)

Expressão Genética - Resumo



Estabilidade química do DNA

1. Hidrólise ácida

Condições ácidas suaves (pH=4)

- ✓ Quebram-se as ligações b-glicosídicas
- ✓ Bases purínicas são protonadas (N7 da guanina, N3 da adenina)
- ✓ Purinas protonadas têm grupos que facilitam a hidrólise
- ✓ O açúcar, “desligado” da purina, isomeriza facilmente para a forma aberta
- ✓ DNA “apurínico” torna-se suscetível à quebra por ação dos iões hidroxilo

2. Hidrólise enzimática

Desoxirribonucleases (DNases)

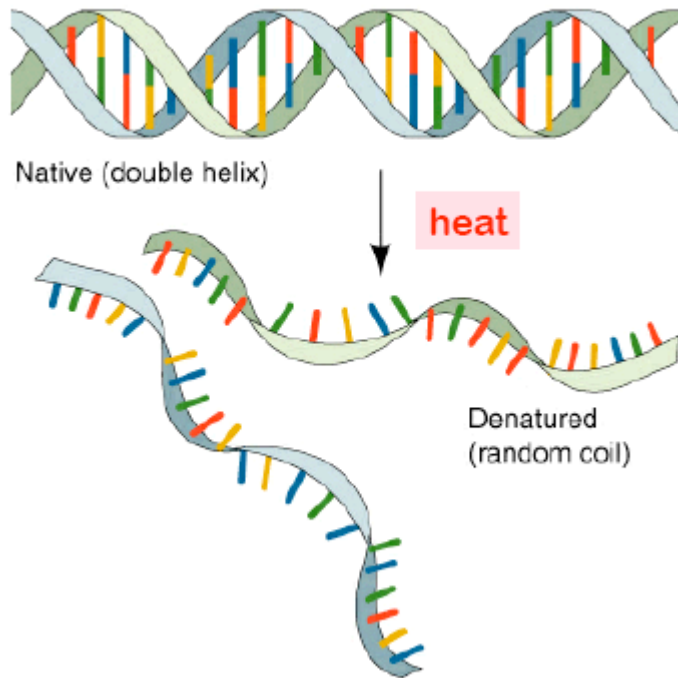
- ✓ Endonucleases (Não específicas, Específicas = enzimas de restrição)
- ✓ Exonucleases ($5' \rightarrow 3'$; $3' \rightarrow 5'$)

Estabilidade química do DNA

3. Oxidação das bases azotadas



Estabilidade física do DNA



Aumento de temperatura



Separação das 2 cadeias

Separação das cadeias

Desnaturação

Fusão

dsDNA



ssDNA

Hélice

“Annealing”
Renaturação
Hibridação

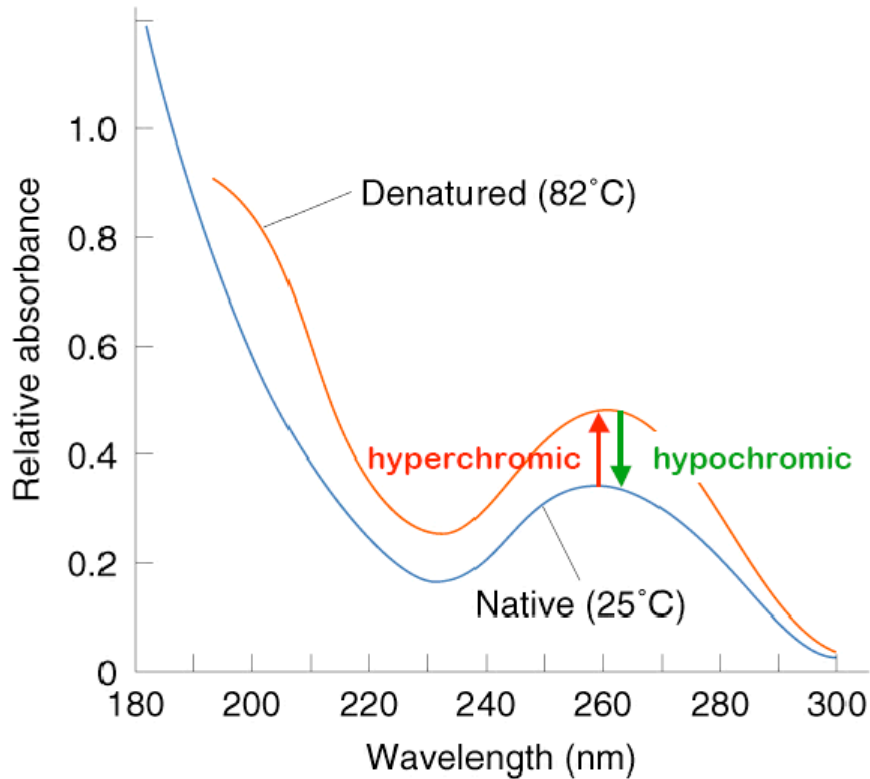
Espiral

ds DNA - estrutura bicatenária (double stranded)

ss DNA- estrutura monocatenária (single stranded)

Estabilidade física do DNA

Observação espectrofotométrica



Aumento da absorção a 260 nm



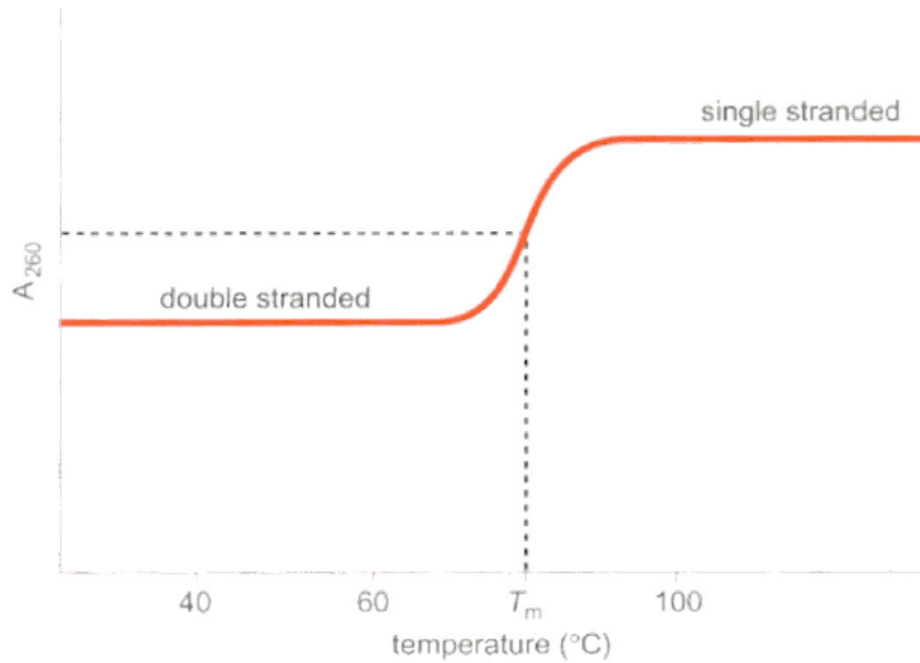
Efeito hipercrômico
(hipercromático)

Figure 23-16. The UV absorbance spectra of native and heat-denatured *E. coli* DNA. [After Voet, D., Gratzler, W.B., Cox, R.A., and Doty, P., *Biopolymers* 1, 205 (1963).]

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Estabilidade física do DNA

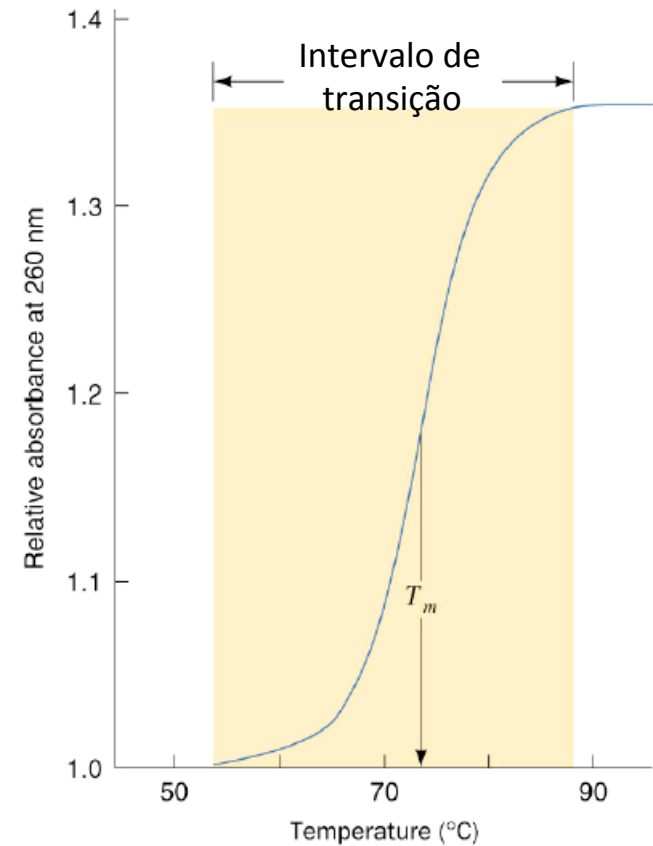
Temperatura de fusão



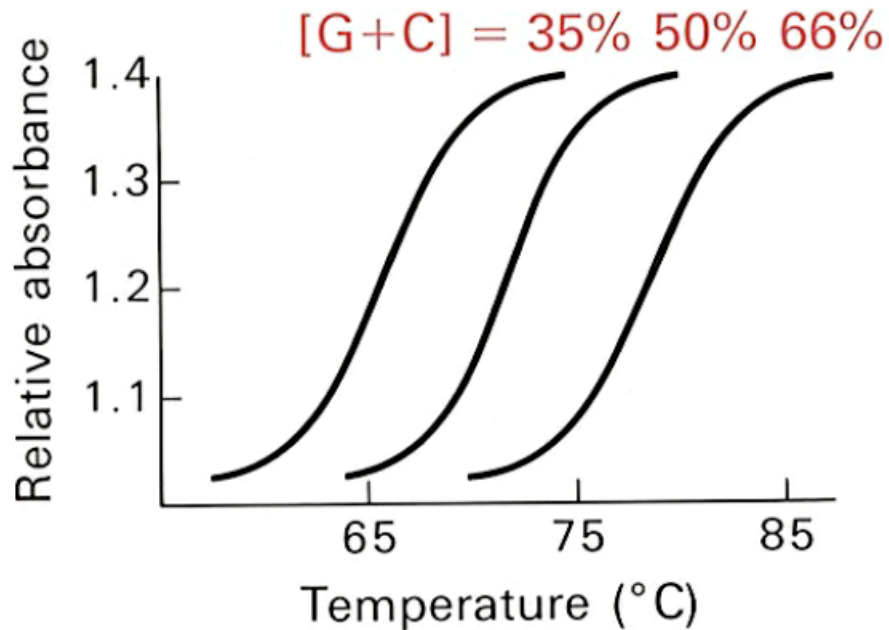
Temperatura de fusão



Intervalo relativamente estreito



Estabilidade física do DNA



Temperatura de fusão



Depende da composição em bases

Mamíferos: $\approx 40\%$ (G+C) $\rightarrow T_f \approx 87^\circ \text{C}$

Estabilidade física do DNA

Outros fatores que afetam a estabilidade

Baixas concentrações salinas

Soluções alcalinas

Soluções concentradas de formamida

Soluções concentradas de ureia



Interferem com as pontes de hidrogénio

Considere a composição do DNA das duas espécies indicadas na tabela seguinte:

espécie 1 - 20% guanina

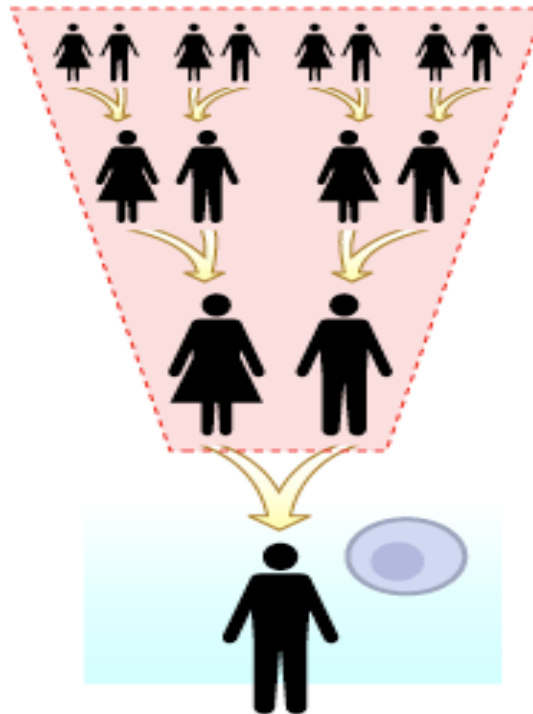
espécie 2 – 35% guanina

- a) Indique, justificando, a percentagem em que estão presentes cada uma das quatro bases azotadas na espécie 1.*
- b) Diga, justificando, qual das duas moléculas de DNA indicadas deverá apresentar maior temperaturas de fusão.*

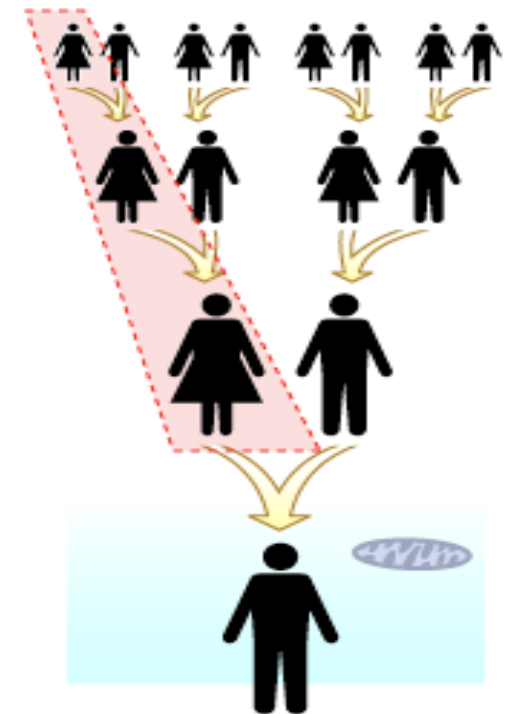
DNA MITOCONDRIAL

- ✓ Cerca de 0.001% do DNA total
- ✓ Codifica pequena % de proteínas mitocondriais e tRNA
- ✓ Circular
- ✓ Aprox 16.500 pb
- ✓ Herança materna

A. Nuclear DNA is inherited from all ancestors.



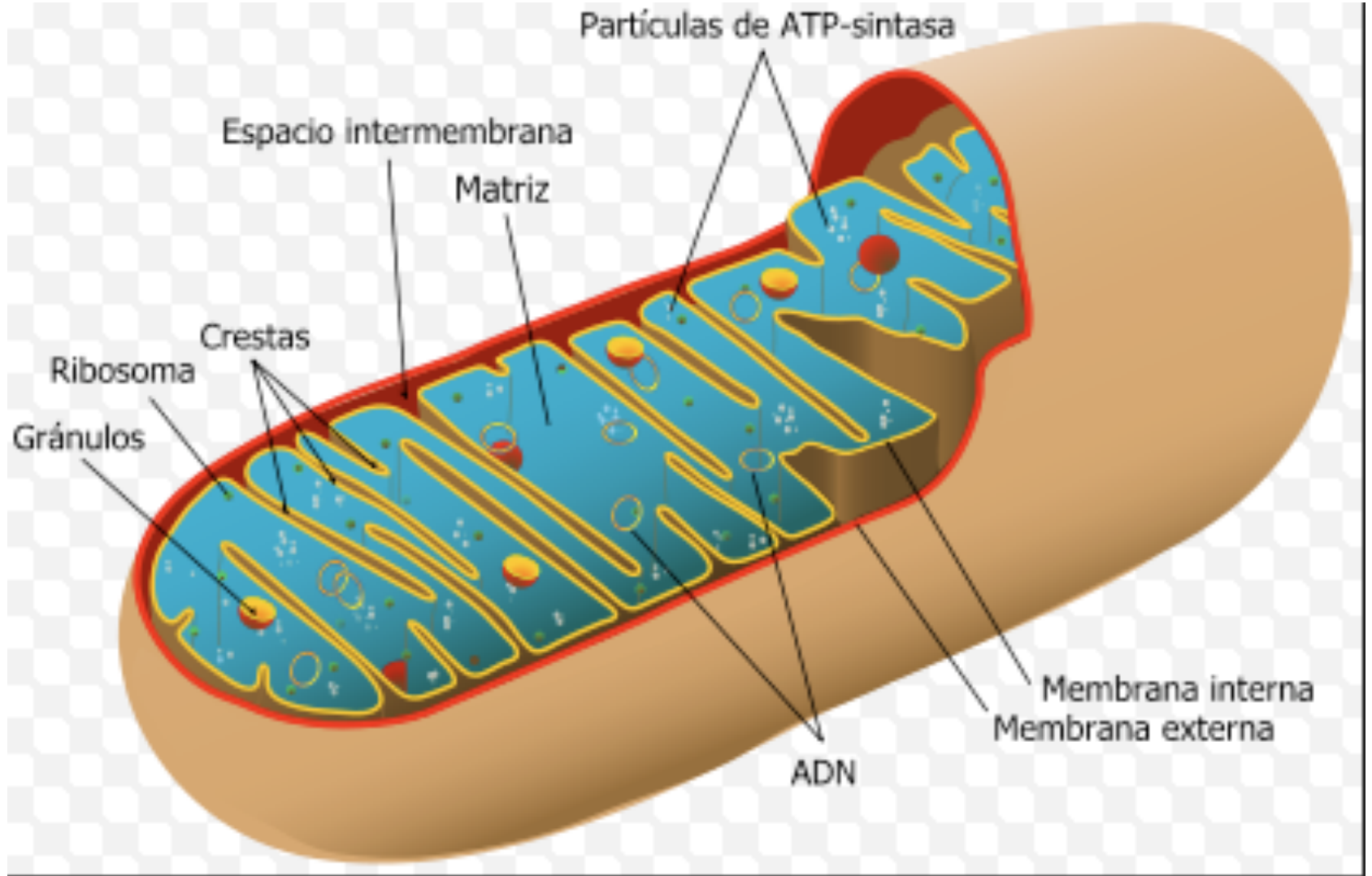
B. Mitochondrial DNA is inherited from a single lineage.



DNA mitocondrial

- Fonte de DNA extra-nuclear nos humanos
- Cada mitocôndria contém 10 cópias de DNA circular, auto-replicativo e superenrolado
- Totalmente de herança materna
- Código deste DNA difere do código do DNA nuclear
- Codifica genes para o RNA ribossômico: 22 para o RNA transportador (tRNA) e 13 para polipeptídeos constituintes de enzimas envolvidas na fosforilação de ATP
- Algum DNA repetitivo (regulação)
- Alta taxa de mutação (20 vezes superior ao DNA nuclear → Grande produção de radicais livres; capacidade reduzida de reparação do DNA
- Associado a doenças mitocondriais (herança materna)

DNA mitocondrial



DNA mitocondrial

