

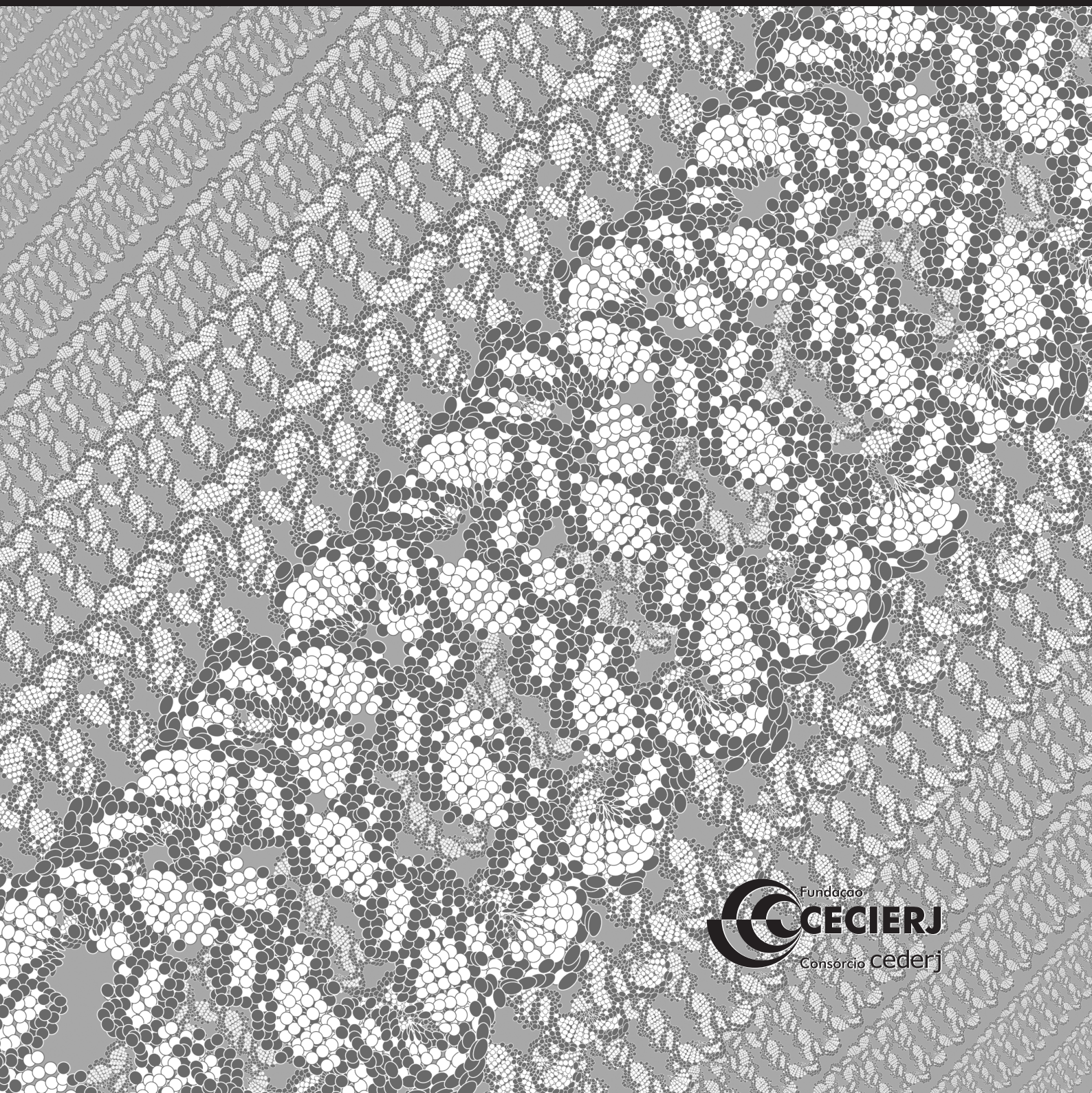
**Módulo 1**

---

Ana Beatriz Garcia  
Jacyara M. B. Macedo

**Volume | 1**

| **Biologia Molecular**









Fundação

**CECIERJ**

Consórcio **cederj**

Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro

## Biologia Molecular

Volume 1 - Módulo 1

Ana Beatriz Garcia

Jacyara M. B. Macedo



**GOVERNO DO  
Rio de Janeiro**

**SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

Ministério  
da Educação



Apoio:



# Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Rua Visconde de Niterói, 1364 - Mangueira - Rio de Janeiro, RJ - CEP 20943-001

Tel.: (21) 2299-4565 Fax: (21) 2568-0725

## Presidente

Masako Oya Masuda

## Coordenação do Curso de Biologia

UENF - Ana Beatriz Garcia

UFRJ - Masako Oya Masuda

UERJ - Cibeles Schwanke

## Material Didático

### ELABORAÇÃO DE CONTEÚDO

Ana Beatriz Garcia

Jacyara M. B. Macedo

### EDITORA

Tereza Queiroz

### COORDENAÇÃO EDITORIAL

Jane Castellani

### COORDENAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL

Cristine Costa Barreto

### COORDENAÇÃO DE LINGUAGEM

Maria Angélica Alves

### DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL E REVISÃO

Ana Tereza de Andrade

Anna Maria Osborne

Carmen Irene Correia de Oliveira

### REVISÃO TÉCNICA

Marta Abdala

### REVISÃO TIPOGRÁFICA

Equipe CEDERJ

### COORDENAÇÃO GRÁFICA

Jorge Moura

### PROGRAMAÇÃO VISUAL

Fabiana Rocha

Leonardo Yozo Kono

### ILUSTRAÇÃO E CAPA

Eduardo Bordoni

Fabio Muniz

Jefferson Caçador

Morvan de Araujo Neto

### PRODUÇÃO GRÁFICA

Andréa Dias Fiães

Fábio Rapello Alencar

Copyright © 2004, Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, mecânico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, da Fundação.

G216b

Garcia, Ana Beatriz.

Biologia molecular v.1. /Ana Beatriz Garcia. – Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, 2007.  
149p.; 19 x 26,5 cm.

ISBN: 85-89200-37-X

1. Biologia molecular. 2. Genética. 3. DNA. 4. RNA.  
I. Macedo, Jacyara M. B. II. Título.

CDD: 572.8

2007/2

Referências Bibliográficas e catalogação na fonte, de acordo com as normas da ABNT.



# Governo do Estado do Rio de Janeiro

Governador  
Sérgio Cabral Filho

Secretário de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação  
Alexandre Cardoso

## Universidades Consorciadas

UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
Reitor: Raimundo Braz Filho

UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO  
Reitor: Nival Nunes de Almeida

UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
Reitor: Cícero Mauro Fialho Rodrigues

UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO  
Reitor: Aloísio Teixeira

UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DO RIO DE JANEIRO  
Reitor: Ricardo Motta Miranda

UNIRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
Reitora: Malvina Tania Tuttman



### SUMÁRIO

**Aula 1** – O que é Biologia Molecular? \_\_\_\_\_ **7**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 2** – Qual a natureza química do material genético? \_\_\_\_\_ **19**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 3** – Nucleotídeos – as unidades que formam os ácidos nucleicos \_\_\_\_\_ **31**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 4** – DNA – aspectos funcionas e estruturais \_\_\_\_\_ **49**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 5** – RNA – aspectos funcionais e estruturais \_\_\_\_\_ **73**

*Jacyara M. B. Macedo*

**Aula 6** – Estrutura dos cromossomos em vírus e procariotos \_\_\_\_\_ **95**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 7** – Superespiralamento do DNA \_\_\_\_\_ **105**

*Ana Beatriz Garcia*

**Aula 8** – Estrutura dos cromossomos em eucariotos \_\_\_\_\_ **121**

*Ana Beatriz Garcia*

**Gabarito** \_\_\_\_\_ **141**





## O que é Biologia Molecular?

AULA

1

Nesta aula, você terá a oportunidade de:

- Acompanhar a construção do conhecimento relacionado à forma pela qual as características de um indivíduo são herdadas pelos seus descendentes.
- Entender a importância de se estudar o aspecto físico, ou seja, a localização no interior das células, e a natureza química da molécula responsável pela hereditariedade.
- Discutir o surgimento da Biologia Molecular, assim como os novos caminhos gerados pelo desenvolvimento de técnicas de análise molecular e suas aplicações em outras áreas das Ciências Biológica e Biomédica.

## APRESENTAÇÃO

Você provavelmente já deve ter ouvido falar em seqüenciamento do genoma de alguns organismos (incluindo o ser humano), terapia gênica, vacinas recombinantes, plantas e animais transgênicos e tantos outros temas que atualmente fazem parte do nosso cotidiano, mas que, provavelmente, para um número grande de pessoas ainda é um “mundo desconhecido”. Tudo isso e muito mais só se tornou possível com o avanço de diversas áreas da ciência, incluindo a Biologia Molecular.

Então você deve estar se perguntando: “E o que é Biologia Molecular?” Pois bem, essa é a primeira aula da nossa disciplina e tenha certeza que, ao final dela, você estará entrando em um novo mundo cheio de surpresas e respostas a inúmeras perguntas que até 50 a 60 anos atrás não podiam ser respondidas. Estamos certas de que, a partir desta aula, você reconhecerá a aplicação de todo esse conhecimento em inúmeros campos das Ciências Biológica e Biomédica.

## Histórico

Para que você entenda como tudo isto começou, precisamos nos reportar a uma época em que a semelhança de certos traços e características de pais e filhos já era alvo de questionamentos. Os filósofos gregos, muitos anos a.C., já se arriscavam a opinar sobre este assunto. Naquela época, o único evento sabidamente necessário para gerar uma criança era o contato sexual entre macho e fêmea. O papel do líquido seminal era evidente, mas a participação da fêmea era controversa. Assim, os filósofos propuseram uma associação entre o sexo da criança e o líquido seminal, o que, de alguma forma, está correto.

Muitos anos se passaram, e somente no século XVII foi possível a observação de certas estruturas, “os espermatozóides”, no sêmen de vários animais devido à construção do microscópio ótico. Esta descoberta estreitou ainda mais o vínculo entre os pais e sua prole. Pouco tempo depois, tanto as células sexuais masculinas quanto as femininas foram reconhecidas. Entretanto, a idéia de que apenas o homem tinha importância para a transmissão dos caracteres prevalecia. Nessa época, acreditava-se na existência de uma miniatura de homem no sêmen que se valia do corpo da mulher apenas para seu desenvolvimento.



Apenas no século XIX, reconheceu-se que ambos os sexos contribuíam para a formação e a herança de seus descendentes. No entanto, uma pergunta ainda pairava no ar com relação aos mecanismos envolvidos neste processo. Inicialmente, acreditou-se que o espermatozóide e o óvulo continham uma amostra das características das diversas partes do corpo parental que, de algum modo, se mesclavam para formar o padrão do novo indivíduo. Entretanto, esse mecanismo não era capaz de explicar, por exemplo, o fato de que as características da prole nem sempre são resultado de uma mistura intermediária das características parentais.

Um personagem fundamental para o desenrolar desta história foi **GREGOR MENDEL**, um monge augustiniano que, na década de 1860, apresentou os resultados obtidos com cruzamentos entre variedades de ervilhas. Você já deve ter ouvido falar sobre ele nas aulas de Genética. Somente para lembrar, Mendel propôs a existência de partículas ou fatores hereditários nas células sexuais e previu o comportamento especial desses fatores (**GENES**), que deveriam se separar durante a formação de gametas. Com a fecundação, então, ocorreria fusão dos gametas e reconstituição do par de fatores hereditários (genes). Mendel postulou, ainda, que os genes não se fundem após a fecundação, mas permanecem lado a lado, independentemente de se manifestarem ou não.

Você deve também se lembrar de que todas as hipóteses de Mendel tiveram origem na análise estatística de seus resultados. O mais interessante é que a análise feita por ele não necessitou de conhecimento sobre o que são os genes e como eles controlam os fenótipos. Todo o seu trabalho se baseou na representação de fatores hipotéticos abstratos de herança (ou genes) por símbolos, não havendo qualquer preocupação quanto à natureza ou localização destes fatores em uma célula.

Apesar de a discussão dos resultados obtidos com o cruzamento de variedades de ervilha ser muito interessante, este assunto é tema da Genética e não será abordado aqui. O que nos interessa dessa história toda é que Mendel foi o primeiro a sugerir a existência de fatores independentes a serem transmitidos dos genitores para sua prole. Entretanto, por inúmeras razões, seus experimentos só foram reconhecidos por volta de 1900, após sua morte.



### GREGOR MENDEL

Monge augustiniano que viveu em um mosteiro na antiga Tchecoslováquia em meados do século XIX. Muitas pessoas naquela região estavam interessadas em plantar frutas e acreditava-se que os progressos recentes em Matemática e Física poderiam ser úteis para se estabelecer um modelo para a variabilidade em plantas, contribuindo, assim, para a prática de reprodução de vegetais. Mendel foi recomendado ao mosteiro por ser excelente aluno de Matemática e Física, apesar de apresentar deficiências no aprendizado de Biologia. Em seu trabalho de 1886, intitulado *Experiências sobre a hibridização nas plantas*, Mendel construiu a base da Genética ao postular pela primeira vez a existência de fatores hereditários distintos, os quais chamamos hoje de genes.

### GENE

Unidade física e funcional da hereditariedade, que leva informações de uma geração para a seguinte.



#### WILLIAM BATESON

Considerado o verdadeiro fundador da Genética pelas inúmeras contribuições dadas nesta área. Criou muitos termos utilizados ainda hoje, incluindo o nome Genética para este novo campo da ciência.

#### CROSSING-OVER

Troca de partes correspondentes entre cromossomos homólogos por quebra e reunião.

Durante os 34 anos que se passaram desde a divulgação dos resultados de Mendel, foi observado que o espermatozóide é constituído principalmente de material nuclear e postulou-se que o núcleo era responsável pela hereditariedade. Em 1877, os cromossomos foram visualizados no interior do núcleo, mas somente no início do século XX (1903), com o desenvolvimento da Citologia, Walter S. Sutton pôde acompanhar o comportamento dos cromossomos durante a produção dos gametas que, surpreendentemente, mostrou-se análogo ao comportamento dos elementos hereditários propostos por Mendel. Foi, então, proposta a teoria cromossômica da herança, na qual se postulava que os fatores hereditários estavam fisicamente localizados nos cromossomos. Esta teoria foi importante no sentido de fornecer um mecanismo de transmissão para explicar o comportamento dos fatores mendelianos, mas não passava de uma teoria.

Os anos seguintes foram marcados pela tentativa de converter esta teoria em fato. Na verdade, o que se buscava era uma explicação física para os resultados genéticos. Primeiramente, **WILLIAM BATESON**, em 1906, descobriu o princípio da ligação (*linkage*), que significa que os genes localizados muito próximos no mesmo par de cromossomos constituem um grupo de ligação, devendo se esperar que fossem herdados em bloco, caso não ocorresse o **CROSSING-OVER** (esta parte certamente você está estudando ou estudará em Genética). Bateson não conseguiu explicar corretamente este fenômeno, entretanto, a enorme contribuição que ele deu a esta área da ciência faz com que seja considerado por muitos o real fundador da Genética.

Alguns anos depois, Thomas Hunt Morgan e três alunos de doutorado, C. B. Bridges, H. J. Muller e A. H. Sturtevant, transformaram a teoria cromossômica da herança no conceito de localização dos genes em uma disposição linear em cada cromossomo. Com a publicação do livro de Morgan, *A Teoria do Gene*, em 1926, ficou estabelecido que a herança é devida a unidades transmitidas de modo ordenado do genitor para o filho.

Até agora você acompanhou o desenrolar da história cujo cerne era entender cientificamente a semelhança entre pais e filhos. Transcorreu muito tempo desde as primeiras tentativas feitas pelos filósofos gregos até os experimentos de Mendel. Lembre-se de que a teoria proposta por Mendel era abstrata e não necessitava de qualquer relação com uma célula.

A redescoberta dos experimentos de Mendel, no início do século XX, abriu novos caminhos, que foram percorridos com avidez pelos pesquisadores da época. Neste período, o grande desafio foi justamente localizar os fatores mendelianos (genes) na célula. Os resultados obtidos por Morgan e colaboradores culminaram na publicação do livro *A Teoria do Gene*, no qual ficou assegurado que os genes estão localizados nos cromossomos, em uma disposição linear, e são transmitidos de genitor para filho.

Uma vez estabelecido o mecanismo de herança, o campo de investigações dos genes partiu para uma nova direção: a “base química da herança”. Assim, os estudos foram direcionados para responder a inúmeras perguntas:

- ⇒ Qual é o material genético?
  - ⇒ O material genético é o mesmo em todos os organismos?
  - ⇒ Em termos de material genético, o que é realmente um gene?
- Sua estrutura molecular pode ser determinada?
- ⇒ O material genético está localizado inteiramente nos cromossomos de eucariotos? Será que o citoplasma exerce algum papel na herança? Como as respostas a estas perguntas se relacionam com os organismos procarióticos?
  - ⇒ Se pensarmos em termos de natureza do gene, o que é mutação? Ou seja, o que ocorre na estrutura do gene quando ele se altera a ponto de produzir um efeito diferente?
  - ⇒ Existe algum mecanismo que protege o gene contra eventuais danos estruturais?
  - ⇒ Como este material genético é duplicado?
  - ⇒ Como este material genético funciona para produzir os caracteres fenotípicos?
  - ⇒ A diferenciação em organismos multicelulares, bem como as reações bioquímicas intermitentes observadas em organismos eucarióticos e procarióticos, sugere que os genes não funcionam o tempo todo. Então, como é regulada a expressão dos genes?

Pois bem, as perguntas listadas e muitas outras foram respondidas nos anos que se seguiram à publicação do livro *A Teoria do Gene*. E foi mais ou menos por essa época que “nasceu” a Biologia Molecular.



## Biologia Molecular

### BACTERÍOFAGO

Também chamado simplesmente por fago, é um vírus que infecta unicamente bactérias.

Saiba que o termo Biologia Molecular foi primeiramente empregado por William Astbury, em 1945, ao se referir ao estudo das estruturas química e física das macromoléculas biológicas. Naquela época, os bioquímicos já haviam descoberto que muitas reações químicas intracelulares e a estrutura de proteínas eram importantes para se definir inúmeras propriedades que as células exibiam. Contudo, o grande avanço da biologia molecular só ocorreu a partir do estudo de sistemas “simples”, tais como bactérias e **BACTERÍOFAGOS**. Como você verá na Aula 2, a utilização de bactérias e bacteriófagos em vários experimentos permitiu, por exemplo, identificar que a molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) contém a maioria, senão toda a informação genética de uma célula.

Após esta descoberta, houve uma corrida para se desvendar as características estruturais do material genético (DNA). Muitos foram os esforços feitos por vários pesquisadores, culminando no modelo da dupla hélice do DNA proposto, em 1953, por James Watson e Francis Crick, e que você estudará em detalhes na Aula 4. A partir de então, um novo campo da genética molecular cresceu assustadoramente ao final da década de 1950 e início da década de 1960. Para nós, os biólogos moleculares, a Biologia Molecular de fato se iniciou com a proposição do modelo de estrutura tridimensional do DNA.

O sucesso inicial atribuído ao acúmulo de um número elevado de informações garantiu a aplicação de técnicas e métodos poderosos de análise molecular a diferentes áreas, incluindo fisiologia, estrutura de membranas, modo de ação de antibióticos, imunologia, diferenciação celular e desenvolvimento. Provavelmente, o desenvolvimento espantoso das mais diversas áreas foi devido ao fato de se acreditar que os princípios biológicos fundamentais que determinavam a atividade de organismos simples, tais como bactéria e vírus, se aplicavam também a células mais complexas, com pequenas variações, o que está correto.

Hoje, a complexidade da Biologia Molecular faz com que ela atravesse as fronteiras de áreas tradicionais, incluindo Genética, Bioquímica, Biologia Celular, Imunologia, Microbiologia, Física, Química Orgânica e Físico-química. A essa altura, você deve estar pensando que Biologia Molecular inclui toda a Biologia. Em parte, isto é verdade, já que o grande

objetivo da Biologia Molecular é entender a base molecular de todos os fenômenos biológicos. Entretanto, para os biólogos moleculares, muitos tópicos não devem ser incluídos na Biologia Molecular, apesar do interesse dos profissionais da área por inúmeros aspectos relacionados a estes tópicos. Com um exemplo acho que você entenderá melhor como isto funciona.

As reações químicas do metabolismo são estudadas pelos bioquímicos. Caso se tenha interesse na regulação dessas reações simplesmente por concentrações de reagentes ou produtos, como uma reação química padrão, este estudo de regulação pertence à Bioquímica. Em se tratando de uma reação catalisada enzimaticamente, se a atenção está voltada para a regulação desta reação por alteração da estrutura de uma enzima, um biólogo molecular pode ser inserido no estudo, embora um bioquímico normalmente não concorde muito com isso.

Um outro exemplo poderia envolver o estudo de arranjo e estrutura de componentes intracelulares, que normalmente é considerado pertencente à Biologia Celular. Contudo, este tema se tornou acessível também à análise molecular, área de atuação do biólogo molecular.

Outros exemplos poderiam ser citados, mas o que importa é você ter conhecimento de que os limites entre a Biologia Molecular e outros ramos da Biologia são tênues e nebulosos. Um ponto negativo desta história é que muitas vezes você vai achar que está andando em círculo. Por exemplo, para entender como uma célula se duplica, você precisa saber sobre DNA e RNA, mas para entender claramente como o DNA e o RNA funcionam, é necessário se referir às células. E então vem a pergunta: “Por onde começar?” Não se preocupe, porque as informações não são excludentes, ao contrário, elas devem se somar ao longo de sua formação profissional.

Ao planejarmos a preparação deste material, optamos por abordar os temas tipicamente pertencentes à Biologia Molecular, material genético e fluxo da informação genética. Assim, o conteúdo foi dividido em quatro módulos. O primeiro módulo diz respeito ao material genético, ou seja, sua identificação, aspectos estruturais, como e onde este material se acomoda no interior de procariotos, eucariotos e vírus. No segundo módulo, será discutida a replicação do DNA (etapa fundamental para que uma célula se divida), os agentes causadores de mutações no DNA, processos de reparo dos danos causados ao DNA e mecanismos responsáveis por

variabilidade genética, tais como recombinação e transposição. O fluxo da informação genética será abordado nos dois últimos módulos.

No Módulo 3, você estudará os mecanismos envolvidos na síntese de RNA, conhecido como transcrição, e os mecanismos de regulação da expressão de um gene a nível transcricional. Já no Módulo 4, você terá a oportunidade de aprender em detalhes sobre a biossíntese de proteínas, que engloba o processo denominado tradução, o processamento pós-traducional e o endereçamento de proteínas na célula. Repare que os tópicos que serão abordados nesta disciplina são justamente aqueles que respondem, ou pelo menos tentam responder, às perguntas listadas anteriormente. É claro que outros tópicos poderiam ter sido incluídos na disciplina, mas acreditamos que esta base da Biologia Molecular será o alicerce sobre o qual você poderá construir um “conhecimento molecular” mais abrangente sobre os fenômenos biológicos.

### **Aplicações do conhecimento gerado pela biologia molecular**

O conhecimento básico que iremos abordar em nossa disciplina teve desdobramentos fantásticos. As metodologias empregadas hoje em dia se baseiam no conhecimento gerado nestes últimos 50-60 anos e envolvem a manipulação direta do DNA, visando à geração de novos organismos ajustados às necessidades do homem.

No início da década de 1970, foram realizados os primeiros experimentos de clonagem de genes. O termo clonagem é hoje empregado de diversas maneiras, até para clonagem de número de telefone fixo ou celular, de cartão de crédito ou de placa de carro. A idéia é produzir algo que tenha as mesmas características daquilo que o originou. No caso da clonagem de genes, o sentido é o mesmo. Vamos entender como isso funciona?

O experimento de clonagem de genes só foi possível após o isolamento e a identificação de enzimas capazes de catalisar reações de corte em locais específicos do DNA e uma enzima capaz de promover a ligação de moléculas de DNA. Assim, se o DNA podia ser cortado e depois ligado, pensou-se que qualquer parte de uma molécula de DNA, independentemente de sua origem, seria capaz de ser cortada e inserida em outra molécula de DNA, de origem muitas vezes completamente distinta.

“Nasce”, então, a “molécula de DNA recombinante” que, após ser introduzida em uma célula bacteriana, por exemplo, dá origem a um conjunto de células, todas originadas de uma única célula, contendo as mesmas características genéticas, o “clone”. Podemos dizer que um determinado gene foi clonado. Esta possibilidade fascinou a todos os profissionais da área biológica e biomédica e abriu espaço para a “Tecnologia do DNA Recombinante”, muitas vezes também chamada de “Engenharia Genética”.

Nos últimos 30 anos, o avanço nesta área foi surpreendente, permitindo que novas metodologias fossem implementadas e abordagens alternativas pudessem ser empregadas na busca de resposta para questões pertinentes a diversas áreas.

Por exemplo, o interesse em melhorar as propriedades de um vegetal ou um animal usado na alimentação é antigo, e muito do que se encontra hoje nas prateleiras dos supermercados é fruto de um trabalho árduo de cruzamento e seleção pelos métodos clássicos da genética. Apesar do sucesso desses experimentos, estamos vivendo uma nova era, em que grande parte das estratégias empregadas envolve técnicas moleculares sofisticadas. Acompanhamos nos jornais e na televisão a discussão sobre a liberação de produtos transgênicos, animais ou plantas. Você sabe o que é um organismo transgênico? Talvez não muito ainda, mas não é nada tão complicado. Um organismo transgênico é aquele cujo **genoma** foi modificado pela inserção de um novo DNA. O que esperar desses organismos? Ah, pode-se esperar características novas que ou são mais adequadas ao cultivo, em se tratando de vegetal, ou criação, quando se tratar de animal, representando um ganho econômico, ou são mais interessantes sob o ponto de vista nutricional.

Você deve saber que fungos, leveduras e bactérias são empregados na indústria para a produção, por exemplo, de antibióticos, álcool, ácido cítrico, respectivamente. No entanto, estes organismos normalmente são melhorados geneticamente para atender às exigências do mercado, tanto aumentando a produção quanto facilitando alguma etapa do processo de produção ou, até mesmo, adicionando alguma característica interessante ao produto formado. Nesse caso, os organismos têm seu **GENÓTIPO** alterado visando a um **FENÓTIPO** desejado.

**GENÓTIPO**

Constituição genética inteira de uma célula ou organismo.

**FENÓTIPO**

Características observáveis de uma célula ou organismo.

#### EXPRESSÃO DE GENES

Processo global através do qual a informação armazenada em um gene é convertida em uma característica observável (na maioria das vezes, a produção de uma proteína).

As vacinas recombinantes revolucionaram o campo da prevenção de doenças. O desenvolvimento dessas vacinas envolveu uma etapa de clonagem do gene de interesse. Nesse caso, o gene relacionado ao antígeno do agente infeccioso é clonado mais usualmente em bactéria ou levedura. Alguns cuidados com relação à **EXPRESSÃO** desse **GENE** devem ser tomados, visando a maximizar a quantidade de produto formado (você entenderá melhor a respeito quando estudar a parte de regulação da expressão gênica). A grande vantagem desta estratégia é a imunização empregando apenas a molécula antigênica em substituição do uso de organismos atenuados.

A técnica de clonagem de genes permitiu também que linhagens de bactéria produzissem substâncias próprias dos mamíferos empregadas no tratamento de determinadas doenças, como a insulina, para o tratamento da diabetes, e o hormônio de crescimento, para o tratamento do nanismo hipofisário. A insulina recombinante, como é chamada, é genuinamente do tipo humano, apresentando vantagens em relação aos produtos de origem bovina ou suína. A produção de hormônio do crescimento por linhagens bacterianas representa uma grande vantagem, já que esta substância, fundamental para garantir o crescimento normal das crianças com nanismo, é difícil de ser obtida a partir de outras fontes. Para você ter uma idéia, um ano de tratamento de uma criança dependia da extração de hormônio de crescimento humano a partir de glândulas hipofisárias de aproximadamente 75 cadáveres.

Com certeza, você ouviu falar de testes de paternidade por DNA. Saiba, então, que o desenvolvimento desta metodologia dependeu do conhecimento adquirido nestes últimos anos e que iremos abordar em nossa disciplina.

Saiba também que, apesar dos bilhões de “letrinhas” que constituem nosso material genético, todos os membros da espécie humana carregam mais ou menos o mesmo conjunto de DNA. Porém, algumas pequenas variações no DNA contribuem para a variação humana e através de análises moleculares é possível fazer a triagem de grandes números de segmentos de DNA, a fim de gerar o que chamamos de *fingerprint* (impressão digital) do DNA. Estes *fingerprints* são específicos para os indivíduos, exceto para os gêmeos idênticos, e são amplamente usados não apenas para confirmação de paternidade, como também em investigações policiais.

A terapia gênica também tem sido assunto dos noticiários, apesar de ainda estar em seus estágios iniciais. Este tipo de tratamento inovador se baseia na possibilidade de se inserir uma cópia de um gene normal em células que transportam o gene correspondente defeituoso. Os primeiros ensaios datam de 1990, com resultados satisfatórios.

Você deve se lembrar, ainda, do nascimento da ovelha *Tracy*, no início da década de 1990, a primeira ovelha transgênica capaz de produzir leite com proteína humana, e da ovelha *Dolly*, por volta de 1996, o primeiro animal clonado do mundo.

As técnicas moleculares desenvolvidas são elegantes e sofisticadas e têm permitido o diagnóstico molecular de certas doenças, como o câncer, e a proposição de projetos ousados, como os projetos de seqüenciamento do genoma de inúmeros organismos. O Projeto Genoma Humano, por exemplo, com lançamento formal em 1990, teve por meta seqüenciar todo o genoma humano e obter um catálogo completo de cada gene. Em maio de 2003, os cientistas anunciaram que o mapa genético do homem está concluído. Com o mapa genético, propaga-se a esperança de compreensão dos mecanismos de doenças, de proposição de diagnósticos precoces e de tratamentos mais eficazes.



Talvez você tenha estranhado, no parágrafo anterior, o uso das palavras "elegantes" e "sofisticadas" como adjetivos de técnicas moleculares. A elegância está associada à forma como estas técnicas foram desenvolvidas de acordo com o vasto conhecimento básico necessário. A sofisticação refere-se aos tipos de equipamentos e reagentes empregados na execução dessas técnicas.

Outros muitos exemplos poderiam ainda ser dados. Parece mesmo não ter fim... Entretanto, pretendemos abordar muitas das técnicas moleculares e suas aplicações em uma disciplina eletiva, em um período mais adiante. De qualquer forma, acreditamos que agora você não tenha mais dúvidas sobre a Biologia Molecular e suas inúmeras aplicações. Esperamos que você usufrua das aulas e que, ao final de cada uma delas, você descubra o prazer de conhecer o mundo dos seres vivos sob o ponto de vista molecular.

## Reflexão

Nesta aula, você viu que as perguntas sobre como os caracteres hereditários são transmitidos do genitor para os filhos são antigas, mas as respostas datam dos últimos 100 anos aproximadamente.

E agora, quais são os novos rumos da ciência? Hoje em dia se discute as consequências do “poder” conferido ao ser humano detentor de todo esse conhecimento. O que você tem a dizer a respeito?

## RESUMO

Apesar da importância dos experimentos de Mendel para o desenvolvimento da Genética, apenas com a publicação do livro de Morgan intitulado *A Teoria do Gene* é que foi assegurado que os genes estão localizados nos cromossomos, em uma disposição linear, e são transmitidos de genitor para filho. Com a identificação do material genético, surge a Biologia Molecular, que se destina principalmente a estudar os aspectos moleculares da molécula da hereditariedade e dos mecanismos envolvidos na conversão da informação genética em um fenótipo observável. O conhecimento gerado nos últimos 50-60 anos contribuiu para o desenvolvimento de inúmeras técnicas de análise molecular com aplicações em diversas áreas.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na Aula 2, você entenderá os principais experimentos realizados no sentido de identificar a natureza química do material genético.



## Qual a natureza química do material genético?

# AULA 2

Nesta aula, você terá a oportunidade de:

- Conhecer os experimentos que marcaram a busca do tipo de molécula associada à hereditariedade.

## EXPERIÊNCIA DE GRIFFITH (1928)

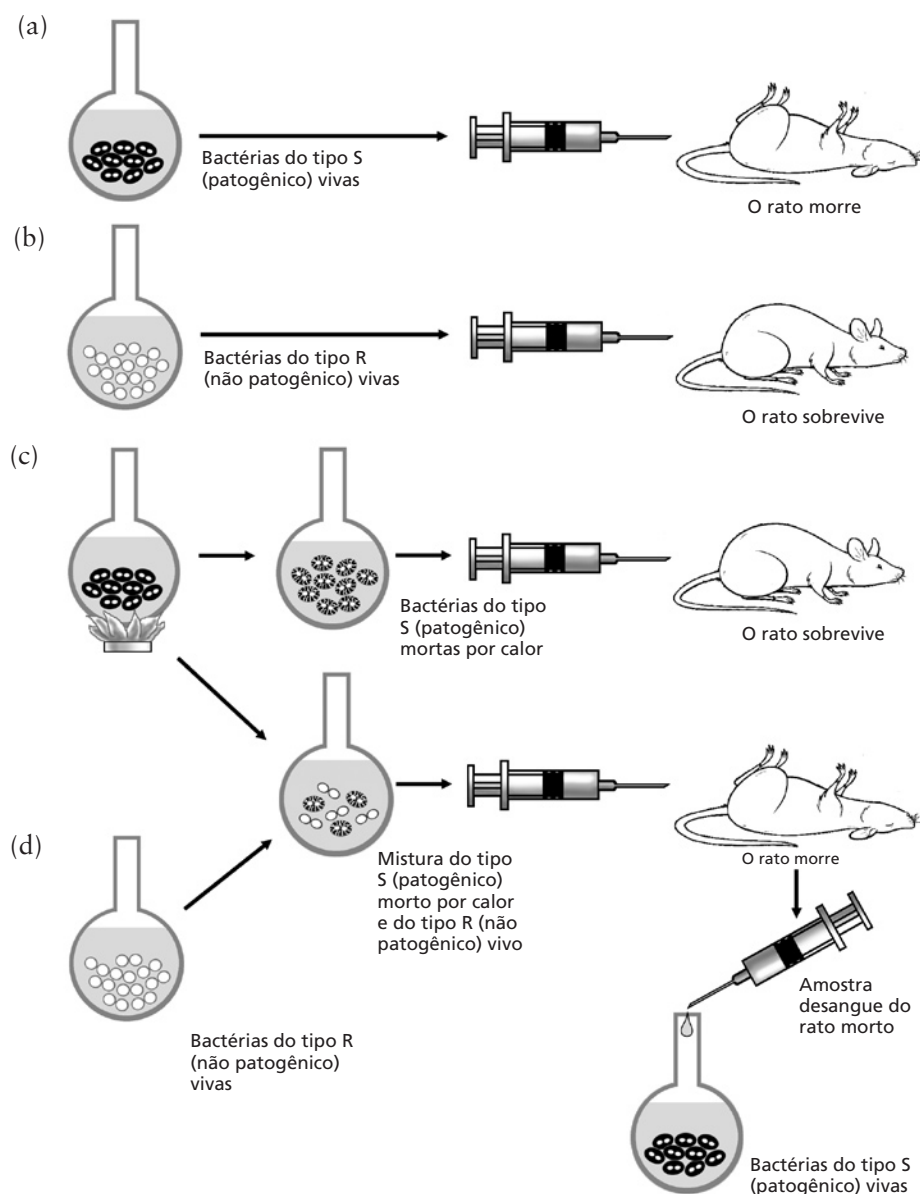


As respostas para as outras perguntas listadas na Aula 1 aparecerão nas aulas seguintes. Não precisa ficar ansioso. Vamos começar pelo que julgamos ser o começo. Está pronto?

Pode-se dizer que a experiência de Frederick Griffith foi o passo inicial para caracterizar os ácidos nucleicos como moléculas da hereditariedade. Seu trabalho envolveu a bactéria pneumococcus (*Diplococcus pneumoniae*), que causa certo tipo de pneumonia. Griffith trabalhou com duas formas de pneumococcus: o tipo encapsulado, apresentando uma capa polissacarídica que contém antígenos específicos através dos quais ocorre o reconhecimento das células a serem infectadas, sendo, portanto, patogênico e capaz de infectar ratos de laboratório, e o tipo não encapsulado, um mutante com defeito na enzima envolvida na formação da capa polissacarídica, sendo, assim, não patogênico e incapaz de causar infecção em ratos. As duas formas de pneumococcus, patogênica e não patogênica, são conhecidas como formas S (do inglês *Smooth*) e R (do inglês *Rough*), por causa do aspecto liso e rugoso, respectivamente, de suas colônias cultivadas em meio de cultura sólido.

As etapas desta experiência estão representadas na **Figura 2.1**. O primeiro passo foi inocular ratos com certa quantidade de bactéria encapsulada (S) viva. Lembre que o tipo S é patogênico, logo, era de se esperar que estes ratos morressem após algum tempo. E foi isso que aconteceu (**Figura 2.1.a**). Outro grupo de ratos foi inoculado com bactérias não encapsuladas (R) vivas. Lembre que o tipo R é não patogênico. O resultado obtido foi o esperado, ou seja, os ratos sobreviveram (**Figura 2.1.b**). Um terceiro grupo de ratos foi também inoculado com bactérias encapsuladas (S), só que mortas por calor. É claro que eles sobreviveram (**Figura 2.1.c**). No entanto, a inoculação de um quarto grupo de ratos com a mistura constituída de bactérias não encapsuladas (R) vivas e bactérias encapsuladas (S) mortas por calor causou a morte desses animais (**Figura 2.1.d**). Epa!!! Como isso aconteceu??? Muito provavelmente, Griffith repetiu esse experimento por inúmeras vezes para se certificar de que não havia cometido nenhum engano.

Mais surpreendentemente ainda é que a análise do sangue dos ratos mortos indicava a presença de bactéria encapsulada (S) viva. E agora??? O certo é que de alguma forma as células encapsuladas (S) mortas haviam transformado as células não encapsuladas (R) em encapsuladas (S). Griffith demonstrou, assim, a capacidade de “transformação” de um tipo de bactéria pneumococcus em outro.



**Figura 2.1:** Experiência de Griffith (1928). A primeira demonstração de transformação bacteriana. (a) O rato morre após injeção com bactérias do tipo S vivas. (b) O rato sobrevive após injeção com bactérias do tipo R vivas. (c) O rato sobrevive após injeção com bactérias do tipo S mortas por calor. (d) O rato morre após injeção com a mistura de bactérias do tipo S mortas por calor e bactérias do tipo R vivas. As partes (a), (b) e (c) são experiências de controle para esta demonstração.

Porém, uma pergunta ainda pairava no ar: “Qual a natureza do princípio transformante?” Somente após alguns anos, Avery, MacLeod e McCarty (1944) evidenciaram que o princípio transformante de um tipo de bactéria em outro era o **DNA**. Vamos entender o experimento realizado por esses pesquisadores?

### DNA

Ácido  
desoxirribonucleico,  
que em inglês é  
DeoxyriboNucleic  
Acid.

## Experiência de Avery, MacLeod e McCarty (1944)

Oswald Avery, C. M. MacLeod e M. McCarty não trabalharam com inoculação de ratos com as diferentes formas da bactéria pneumococcus. A série de experimentos realizados consistiu em cultivos dos dois tipos da bactéria em placas com meio de cultura (**Figura 2.2**). O plaqueamento da forma não patogênica (não encapsulada) viva resultou na formação de colônias de bactérias com o aspecto rugoso característico (**Figura 2.2.a**). Lembra dessa peculiaridade? Em contrapartida, não foi observado crescimento de colônias quando o plaqueamento do **EXTRATO CELULAR** do tipo patogênico (encapsulado) foi feito (**Figura 2.2.b**). Os pesquisadores, então, plaquearam uma mistura de células do tipo não patogênico com o extrato do tipo patogênico (**Figura 2.2.c**). Traçando um paralelo com o experimento de Griffith, o que você acha que aconteceu? Você pensou em transformação de uma forma de bactéria em outra? Pensou certo! Pois é, neste caso, as colônias formadas tinham o aspecto liso, característico das bactérias encapsuladas (virulentas), ou seja, algum componente celular foi capaz de transformar a bactéria não patogênica em patogênica.

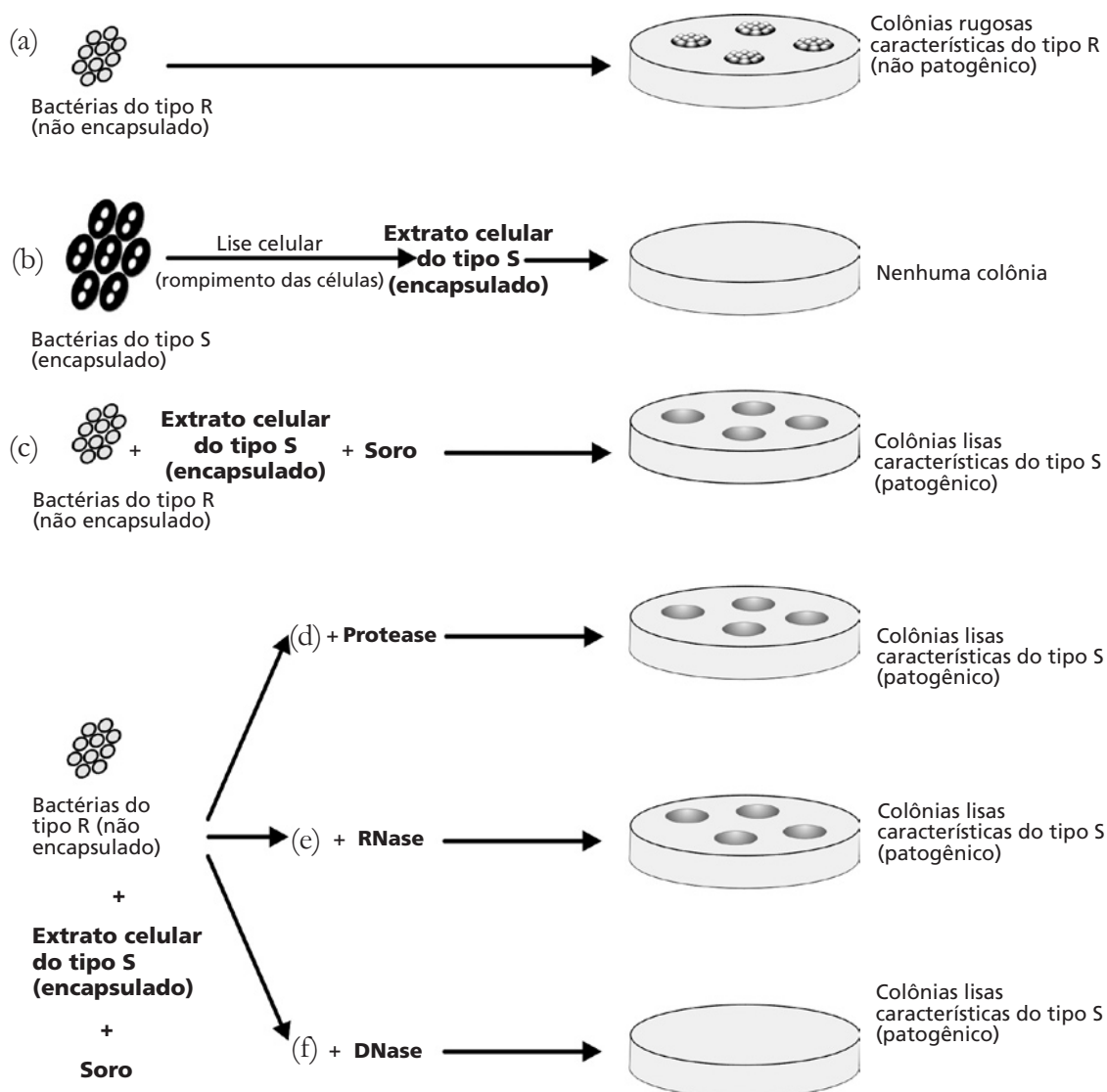
### EXTRATO CELULAR

Nome dado à suspensão obtida após a lise (rompimento) de células. No extrato celular, não se encontram células íntegras capazes de se dividir, mas apenas os componentes intracelulares liberados após o rompimento das mesmas.

Uma vez confirmado o “poder” de um extrato celular de bactérias patogênicas de transformar as características das células vivas do tipo não patogênico, restava descobrir o tipo de molécula responsável por esta transformação. Assim, foram feitos três outros experimentos de plaqueamento da mistura de bactérias não encapsuladas (tipo não patogênico) vivas e extrato de células de bactéria encapsulada (tipo patogênico), sendo que a cada um foi adicionado um tipo diferente de enzima, protease (enzima capaz de degradar proteínas) (**Figura 2.2.d**); ribonuclease (RNase) (enzima capaz de degradar moléculas de ácido ribonucléico (**RNA**) (**Figura 2.2.e**) e desoxirribonuclease (DNase) (enzima capaz de degradar moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) (**Figura 2.2.f**). Você deve estar se perguntando: “O que os três pesquisadores esperavam obter com estes ensaios?” A abordagem escolhida neste experimento foi a de inativação das principais categorias das substâncias químicas presentes no extrato celular, uma de cada vez, buscando descobrir se o princípio “transformante” também estava inativado. Vamos ver, então, o que os pesquisadores observaram: crescimento de colônias nas placas contendo RNase e protease; nenhuma colônia na placa contendo DNase. Antes de continuar lendo, pare um pouco e reflita sobre estes resultados. E então?

### RNA

Ácido ribonucléico, que em inglês é *RiboNucleic Acid*.



**Figura 2.2:** Experiência de Avery, MacLeod e McCarty (1940). Demonstração do DNA como princípio transformante. (a) O plaqueamento de bactérias do tipo R (não encapsulado) resultou em crescimento de colônias rugosas. (b) O plaqueamento de extrato de bactérias do tipo S (encapsulado) resultou em placas sem nenhuma colônia. (c) O plaqueamento de uma mistura de bactérias do tipo R (não encapsulado) e extrato de bactérias do tipo S (encapsulado) resultou em crescimento de colônias lisas. (d) O plaqueamento da mistura citada em (c) acrescida de protease resultou em crescimento de colônias lisas. (e) O plaqueamento da mistura citada em (c) acrescida de RNase resultou em crescimento de colônias lisas. (f) O plaqueamento da mistura citada em (c) acrescida de DNase resultou em placas sem nenhuma colônia. As partes (a) e (b) são experiências de controle para esta demonstração.

Confira se o seu raciocínio está certo! As colônias observadas nos meios de cultivo contendo RNase e protease demonstraram que RNAs e proteínas não eram responsáveis pela transformação, uma vez que, mesmo com a inativação desses compostos, a transformação do tipo não encapsulado no tipo encapsulado havia ocorrido.

No entanto, o fato de nenhuma colônia ter sido observada na placa contendo DNase demonstrava que a degradação de moléculas de DNA havia impedido a transformação, sugerindo que o princípio transformante era o DNA. Além disso, quando a mistura contendo DNase foi aquecida a fim de desnaturar esta enzima, impedindo, assim, sua ação sobre o DNA, o princípio transformante não era afetado. Vale lembrar aqui que outros dois testes também foram feitos para checar se o princípio transformante era de natureza lipídica ou polissacarídica, mas os resultados obtidos descartaram essas duas possibilidades. Essa descoberta, tal qual tantas outras na história da Ciência, foi inicialmente ignorada. Na verdade, o próprio Avery não afirmou seguramente que o DNA era o material genético. Este trabalho, contudo, influenciou muitos bioquímicos, incluindo Chargaff, que realizou experimentos sobre determinação de proporções das bases nitrogenadas no DNA, como você estudará na Aula 3.

Para sua surpresa, a comprovação do DNA como princípio transformante só veio em 1952, com os resultados de experimentos realizados por Hershey e Chase. Vamos, então, entender o que esses pesquisadores fizeram.

### Experiência de Hershey e Chase (1952)

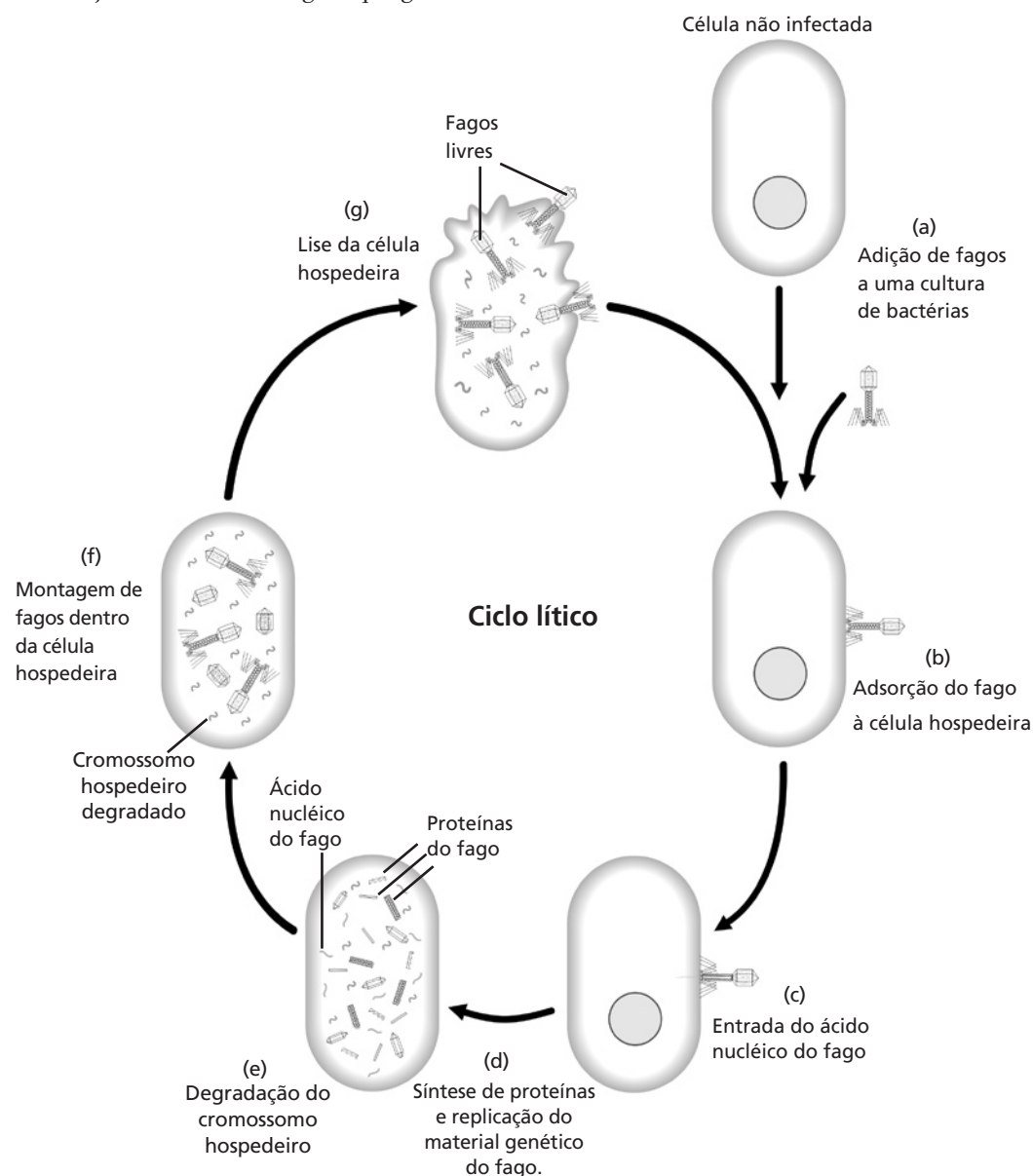
Em uma série de experimentos, Alfred Hershey e Martha Chase empregaram o bacteriófago T2, vírus que infecta a bactéria *Escherichia coli*, constituído por uma cápsula de natureza protéica, também chamada capsídeo, contendo DNA em seu interior (**Figura 2.3.a**). Já havia sido sugerido que os fagos deste tipo poderiam agir como uma agulha hipodérmica cheia de princípio transformante, que é injetado na célula hospedeira (**Figura 2.3.b**).

Para que você entenda melhor o experimento de Hershey e Chase, vamos dar uma “olhadinha” no que se sabe hoje a respeito do ciclo lítico de um bacteriófago em geral (**Figura 2.4**). De fato, quando o fago é adicionado a uma cultura de bactéria (**Figura 2.4.a**), as partículas virais se apóiam na superfície externa da célula (**Figura 2.4.b**), introduzindo seus componentes internos na célula bacteriana (**Figura 2.4.c**). O fago utiliza o maquinário da célula hospedeira infectada determinando a síntese de suas proteínas e seu material genético (**Figura 2.4.d**).



**Figura 2.3:** Representação de um fago da subclasse T par (T2, T4, T6, e assim sucessivamente). (a) O fago em seu estado livre. (b) O fago em seu processo de infecção de uma célula de *E. coli*. Repare que o fago infectante injeta seu DNA no interior da célula.

O cromossomo da célula hospedeira é, então, degradado (Figura 2.4.e) e ocorre a montagem de inúmeras cópias de partículas virais ainda no interior da célula bacteriana (Figura 2.4.f). A lise celular ocorre aproximadamente 20 minutos após a infecção, havendo liberação de um grande número de novas partículas virais (Figura 2.4.g). Apesar de sua aparente simplicidade, o material genético do fago possui comportamento análogo ao dos genomas celulares, de forma que suas características são fielmente reproduzidas e estão sujeitas às mesmas regras que governam a hereditariedade.



**Figura 2.4:** O ciclo lítico de um bacteriófago da subclasse T par. (a) Adição do bacteriófago a uma cultura de bactéria. (b) Partícula viral apoiada na superfície externa da célula hospedeira. (c) Injeção do DNA viral na célula bacteriana. (d) Síntese de proteínas e material genético do fago. (e) Degradação do cromossomo hospedeiro. (f) Montagem de novas partículas virais. (g) Lise da célula hospedeira e liberação de fagos no meio de cultura.



Vamos voltar agora para o experimento de Hershey e Chase, que está representado na **Figura 2.5**.

As partículas do bacteriófago T2 utilizadas foram crescidas na bactéria *E. coli* em dois meios de cultura: o primeiro contendo  $^{32}\text{P}$  (fósforo pesado – radioativo) e o segundo contendo  $^{35}\text{S}$  (enxofre pesado – radioativo). Portanto, as partículas virais obtidas no primeiro meio de cultura apresentavam o DNA, que contém grupamentos fosfatos, marcado radioativamente com  $^{32}\text{P}$  (**Figura 2.5.a**). Já os fagos gerados no segundo meio de cultura apresentavam o capsídeo (**Figura 2.3**), de natureza protéica, marcado radioativamente com  $^{35}\text{S}$  (**Figura 2.5.b**).



Apenas para lembrar, átomos de enxofre são incorporados em aminoácidos, como cisteína e metionina, constituintes de proteínas. Além disso, como será visto na Aula 3, mas já adiantando, a molécula de DNA contém grupamentos fosfatos, formados por átomos de fósforo.

Os fagos assim obtidos foram, então, adicionados a uma cultura de *E. coli* sem radioisótopos. Após o tempo necessário para que os fagos infectassem as células bacterianas, os frascos contendo a mistura bactéria/bacteriófago foram submetidos à agitação suave e centrifugação para separar as células de bactérias do capsídeo viral.

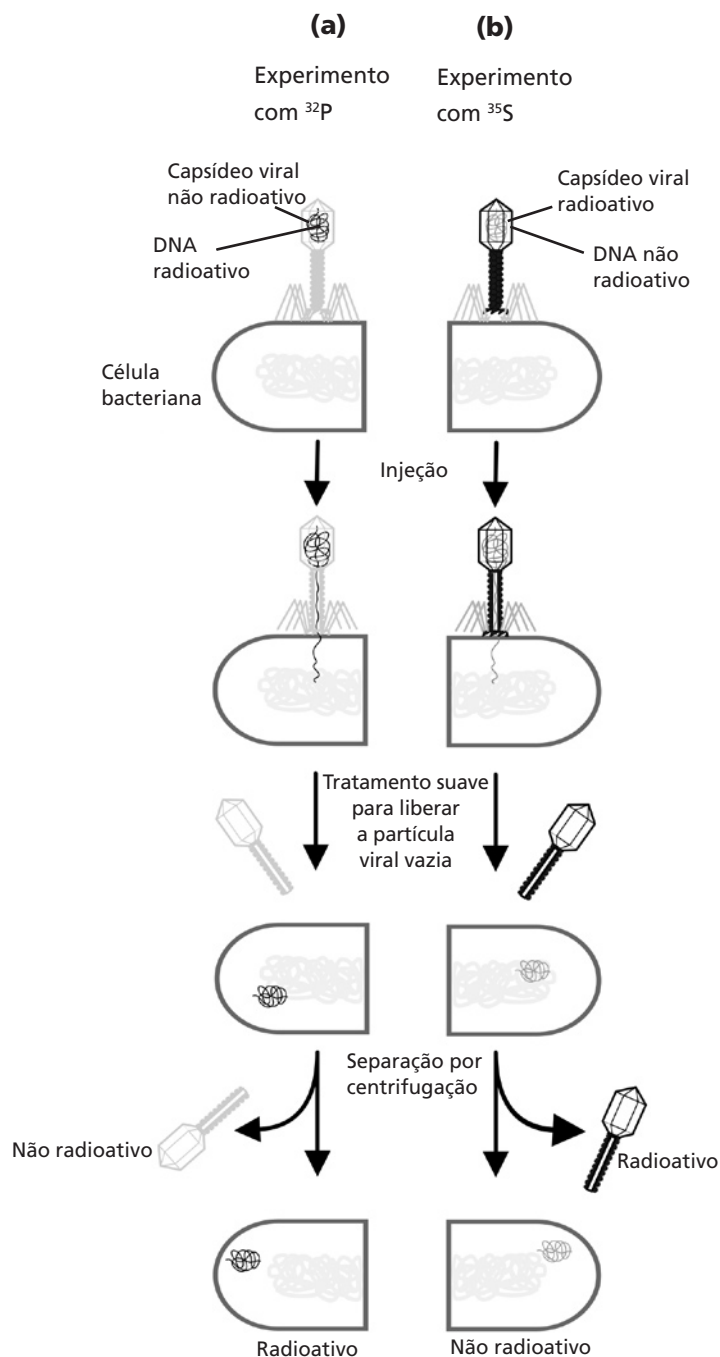
A etapa final consistiu em detectar a presença de moléculas marcadas radioativamente, com  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ , em cada uma das frações.

No experimento com  $^{32}\text{P}$ , a presença de radioatividade foi detectada apenas na fração correspondente à célula bacteriana. Volte à **Figura 2.5.a** e observe que a fração correspondente ao capsídeo viral vazio apresenta-se não radioativa, enquanto a correspondente à célula hospedeira está radioativa. Já no experimento com  $^{35}\text{S}$ , ocorreu exatamente o contrário: apenas o capsídeo viral vazio estava radioativo (**Figura 2.5.b**). Novas partículas virais foram produzidas e liberadas nos dois experimentos



Sugiro que você retorne a esta aula após as aulas do Módulo 2 sobre replicação (duplicação) de DNA, quando, então, você será capaz de entender melhor a razão de parte do material radioativo  $^{32}\text{P}$  aparecer nas novas partículas virais.

algum tempo depois das partículas vazias serem removidas, indicando que a mensagem genética, necessária para a replicação viral, havia sido introduzida na célula hospedeira pelo DNA viral e não por proteínas virais. Interessante é que no experimento com  $^{32}\text{P}$ , 30% do  $^{32}\text{P}$  apareceram nos fagos liberados.



**Figura 2.5:** O experimento de Hershey-Chase. Comprovação do DNA como material genético. Partículas do bacteriófago T2 marcadas com  $^{32}\text{P}$  (a) e  $^{35}\text{S}$  (b) foram utilizadas separadamente na infecção de duas suspensões de bactéria *E. coli* não radioativa. Após o tempo necessário para a etapa de injeção do conteúdo interno do fago na célula hospedeira, as misturas foram agitadas suavemente e submetidas à centrifugação. A etapa final consistiu em detectar a presença de radioatividade nas duas frações geradas: célula hospedeira e partículas virais vazias. No experimento com  $^{32}\text{P}$ , a radioatividade foi detectada na célula bacteriana (a). No experimento com  $^{35}\text{S}$ , as partículas virais vazias estavam radioativas.

Este experimento com o bacteriófago T2 corrobora o fato de que o material genético é o DNA, ou como parte do genoma de uma célula ou de uma partícula viral.

No entanto, nem todos os vírus apresentam DNA em sua constituição, alguns apresentam RNA. Então vem a pergunta: “Que molécula guarda a informação genética desses vírus?” Essa pergunta foi respondida em 1957 por Fraenkel-Conrat e Singer. Vamos ver o que eles fizeram?

### Experiência de Fraenkel-Conrat e Singer (1957)

O vírus do mosaico do fumo, em inglês *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), que causa descoloração da folha do fumo e de muitas outras plantas, foi empregado nos experimentos de Fraenkel-Conrat e Singer porque já se sabia que era constituído apenas de RNA (ácido ribonucléico) e proteína. Portanto, a velha pergunta estava de volta: “No vírus TMV, qual das duas moléculas, RNA ou proteína, guarda a informação genética?”

Estes dois pesquisadores utilizaram, então, dois tipos de vírus TMV: tipo A, constituído de RNA A e proteína A, e tipo B, constituído de RNA B e proteína B. Separadamente, as partículas virais foram degradadas de modo a separar a fração de RNA da fração de proteína. Em seguida, foram preparadas duas misturas: a primeira formada por RNA A e proteína B e a segunda constituída de RNA B e proteína A, que foram posteriormente usadas para infectar lotes separados de folhas de tabaco. Após liberação de partículas virais, seus constituintes foram analisados.

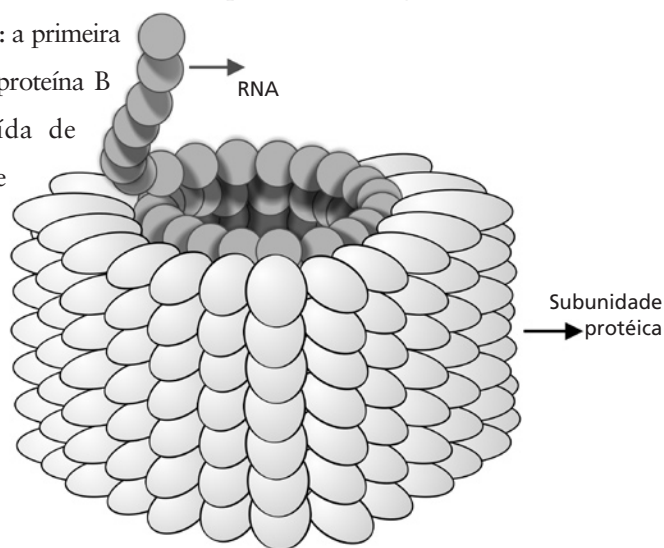
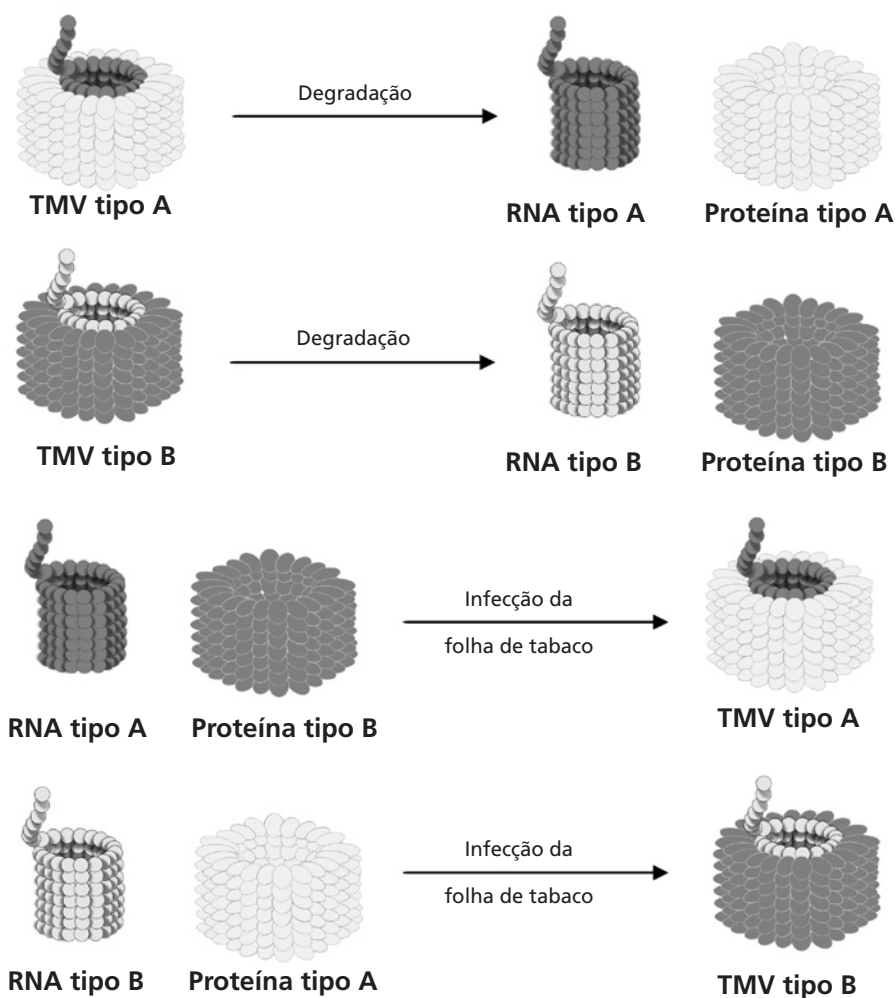


Figura 2.6: Vírus do mosaico do fumo (TMV).

As partículas isoladas do lote de folhas de tabaco inoculado com a mistura (RNA A + proteína B) eram do tipo A, enquanto os vírus isolados do lote de folhas de fumo inoculado com a segunda mistura (RNA B + proteína A) eram do tipo B. Pare e pense! “Que molécula em cada uma das misturas determinou o tipo de vírus a ser produzido?” Pensou RNA? Pensou certo.



**Figura 2.7:** Experimento de Fraenkel-Conrat e Singer. Demonstração do RNA como material genético. (a) Degradação das partículas de dois tipos de TMV, tipo A e tipo B, resultando em frações de RNA e proteínas. (b) A infecção de folha de tabaco com mistura RNA tipo A + Proteína tipo B resultou em formação de TMV tipo A, enquanto a infecção de folha de tabaco com a mistura RNA tipo B + Proteína tipo A resultou em formação de TMV tipo B.

Este experimento foi fundamental para se estabelecer que o material genético é sempre ácido nucléico, DNA ou RNA. Se preferir, podemos dizer que o material genético é sempre DNA, com exceção dos vírus de RNA, em que o material genético é o RNA.

## **RESUMO**

Nesta aula, você conheceu os principais experimentos direcionados à identificação do material genético. A experiência de Griffith foi importante por demonstrar a capacidade de transformação de um tipo de bactéria pneumococcus em outro. Já os experimentos de Avery, MacLeod e MacCarty indicaram que o princípio transformante era o DNA. Contudo, a comprovação do DNA como material genético só foi possível com o trabalho de Hershey e Chase, que envolveu o uso de material marcado radioativamente. Os resultados obtidos por Fraenkel-Conrat e Singer, em ensaios com TMV, indicaram que neste grupo de vírus o material genético era o RNA. Agora você sabe que o material genético em organismos celulares é sempre DNA, mas em vírus de RNA, a molécula que armazena a informação genética é o próprio RNA.

## **EXERCÍCIO**

Remonte cada um dos experimentos apresentados, detalhando cada etapa com as explicações pertinentes aos resultados esperados.

## **AUTO-AVALIAÇÃO**

Se você entendeu bem a aula, não terá encontrado dificuldade em remontar os experimentos. De qualquer forma, ao término do exercício, confira sua resposta com o texto e figuras desta aula para avaliar se não há nenhum ponto obscuro. É importante que você se habitue a acompanhar a lógica dos experimentos que vêm mudando o curso da história da Ciência.

## **INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Agora que você não tem mais dúvida de que o material genético é sempre um ácido nucléico, nas próximas três aulas, você conhecerá quimicamente este grupo de compostos. Na Aula 3, particularmente, você estudará os nucleotídeos que fazem parte dos ácidos nucléicos.

## Nucleotídeos – as unidades que formam os ácidos nucléicos

Nesta aula, você terá a oportunidade de:

- Conhecer quimicamente os nucleotídeos, já que eles são as unidades que formam os ácidos nucléicos.
- Aprender sobre os constituintes dos nucleotídeos e as diferenças entre este grupo de compostos e os nucleosídeos.
- Aprender a distinguir uma molécula de desoxirribonucleotídeo, que compõe o DNA (ácido desoxirribonucléico), de uma molécula de ribonucleotídeo, que compõe o RNA (ácido ribonucléico).
- Conhecer a importância dos nucleotídeos.
- Entender como ocorre a polimerização dos nucleotídeos para formação dos ácidos nucléicos.

### Pré-requisito

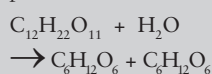
Para que o assunto desta aula seja mais facilmente assimilado, é importante que você reveja alguns conceitos de química e bioquímica.

### FRIEDRICH MIESCHER

Por volta de 1869, este médico suíço, aos 22 anos, isolou uma substância macromolecular a partir de esperma de salmão e de células de pus obtido de ataduras usadas na guerra franco-prussiana. A esta substância, até então não identificada, ele deu o nome de nucleína. Seu trabalho só foi publicado em 1871, mas causou pouco impacto na época. Mais tarde, a nucleína foi rebatizada como “ácido nucléico”, mas somente no início do século XX as bases nitrogenadas constituintes do ácido nucléico foram identificadas, assim como seu açúcar de 5 carbonos e o grupamento fosfato. Alguns anos depois, os dois tipos de ácido nucléico, “desoxirribonucleico” e “ribonucleico”, foram evidenciados. Apenas em 1937, foi demonstrado que a maior parte do conteúdo de DNA de uma célula está localizada no núcleo.

### HIDRÓLISE

Reação de um composto com água originando produtos mais simples. As reações hidrolíticas de diversos compostos necessitam de enzimas específicas. Como exemplo, podemos citar a hidrólise da sacarose pela “sacarase”.



## APRESENTAÇÃO

É importante lembrar que os ácidos nucléicos foram identificados antes mesmo de se conhecer sua relação com a hereditariedade. O ácido desoxirribonucleico (DNA), por exemplo, foi primeiramente isolado, a partir de núcleo de leucócitos, por **FRIEDRICH MIESCHER**, em 1869. A presença de DNA em outros tipos de célula foi comprovada nos anos que se seguiram, mas somente após descobertas marcantes na história da Ciência, algumas já mencionadas nas aulas 1 e 2, é que evidenciou-se que o DNA era a molécula da hereditariedade. Algum tempo depois, Fraenkel-Conrat e Singer (1957) demonstraram que o genoma de alguns vírus é constituído de ácido ribonucleico (RNA).



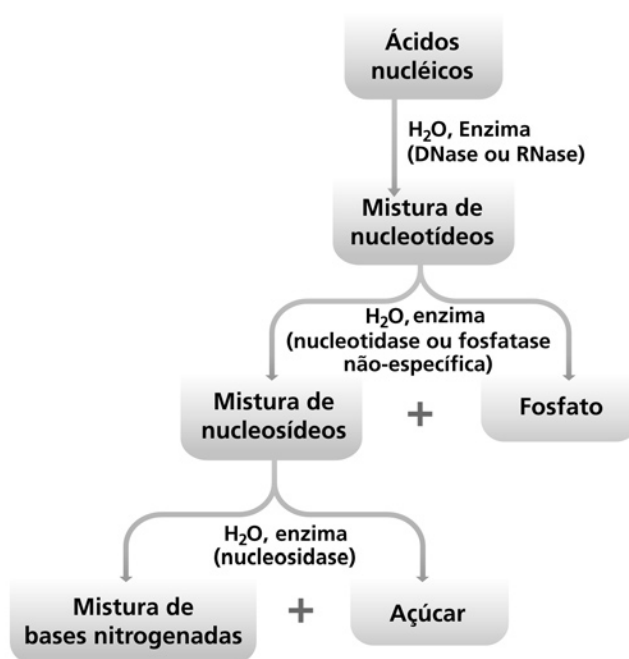
Se você ainda tem alguma dúvida a respeito dos experimentos que foram realizados, retorne às Aulas 1 e 2. Não pense que é perda de tempo. Um assunto bem sedimentado fica guardado para sempre, mesmo que você não perceba. Então, quando você precisa dessa informação, eis que ela surge de onde foi armazenada.

Para que tenhamos um entendimento mais completo dos processos celulares envolvidos na duplicação das moléculas de hereditariedade e no fluxo de informação genética, torna-se essencial o estudo da natureza química dos ácidos nucléicos, DNA e RNA. Por isso, nas Aulas 3, 4 e 5 “olharemos” para os ácidos nucléicos sob o ponto de vista meramente químico. Nas aulas seguintes, quando estudarmos o comportamento destes compostos sob o ponto de vista biológico, você entenderá a importância de conhecê-los quimicamente.

A divisão desse tema é resultado do esquema representado na **Figura 3.1**, correspondente aos vários estágios da **HIDRÓLISE** total dos ácidos nucléicos e seus componentes. Note que o produto resultante da hidrólise dos ácidos nucléicos é uma mistura de nucleotídeos, que por sua vez, ao serem hidrolisados, geram uma mistura de nucleosídeos e fosfato. A hidrólise dos nucleosídeos, então, tem como produtos uma mistura de bases nitrogenadas e açúcar.

Assim, esta aula envolverá o aprendizado dos nucleotídeos e dos nucleosídeos, o que fornecerá suporte para o entendimento das moléculas de ácidos nucléicos.





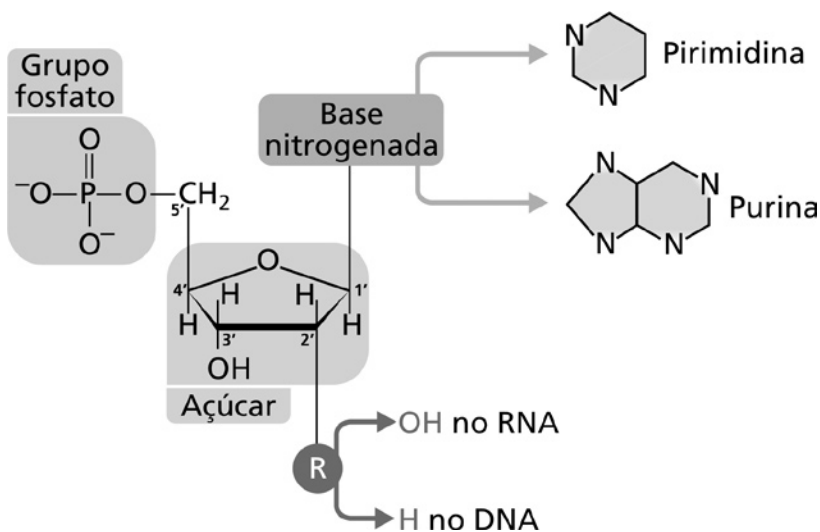
**Figura 3.1:** Hidrólise de um ácido nucléico e das misturas de nucleotídeo e nucleosídeo.

## Nucleotídeos

Como você verá mais adiante, os ácidos nucléicos são polímeros lineares de nucleotídeos, ou seja, os nucleotídeos são os blocos constituintes dos ácidos nucléicos. Portanto, é importante que você conheça detalhadamente as características deste grupo de compostos.

Os nucleotídeos podem ser de dois tipos: os ribonucleotídeos, que compõem o RNA (ácido ribonucleico), e os desoxirribonucleotídeos, que fazem parte do DNA (ácido desoxirribonucleico). Entretanto, todos os nucleotídeos são formados por três partes distintas: um açúcar, uma base nitrogenada e um grupamento fosfato. Porém, é claro que apresentam características próprias que permitem diferenciá-los entre si. Vamos ver, então, como é um nucleotídeo?

Busque a **Figura 3.2**, na qual está representada a fórmula geral de um nucleotídeo. Repare que os nucleotídeos são formados por um açúcar ligado ao(s) grupamento(s) fosfato(s) e a uma base nitrogenada. Chegou a hora, então, de você estudar cada um desses componentes.



**Figura 3.2:** Estrutura geral de um nucleotídeo. Estão representadas as três partes: açúcar, fosfato e base nitrogenada. Apesar de só estar representado um fosfato, um nucleotídeo pode apresentar 1, 2 ou 3 grupamentos fosfatos.

### Açúcar (pentose)

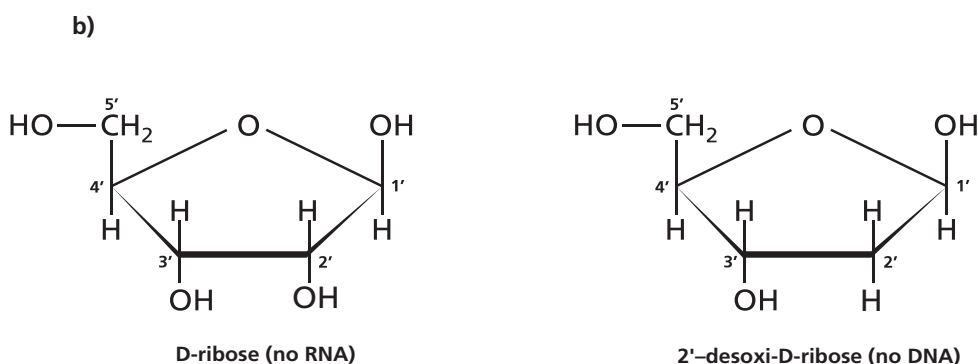
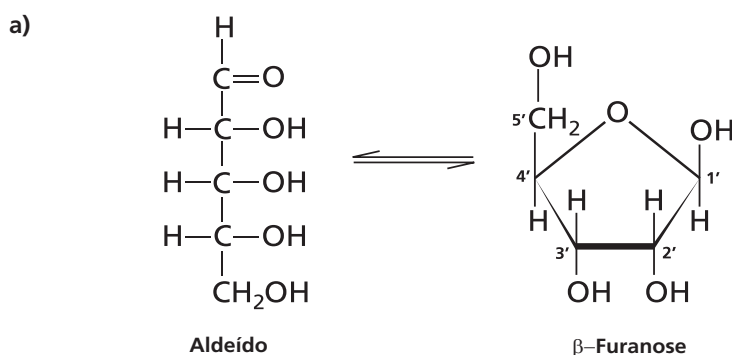
Agora volte sua atenção apenas para o açúcar, que é sempre uma pentose (açúcar de cinco átomos de carbono). Repare na **Figura 3.3.a** que, em solução, a forma aberta (aldeído) e a forma fechada ( $\beta$ -furanose) da ribose estão em equilíbrio. Na forma fechada da ribose, os cinco átomos de carbono são numerados por  $C_1'$  (lê-se “carbono 1 linha”), a partir do carbono mais à direita na figura até  $C_5'$ , no sentido horário. Esta numeração  $C_1'$ , até  $C_5'$ , ou seja, o número seguido de (') serve para diferenciar estes átomos daqueles presentes nas bases nitrogenadas e que recebem a numeração sem (') (você verá adiante na **Figura 3.4**).

Volte à **Figura 3.2** e repare que a pentose está ligada pelo carbono  $C_5'$  a um grupamento fosfato e pelo carbono  $C_1'$ , a uma base nitrogenada. No entanto, será visto mais adiante que um nucleotídeo pode apresentar um, dois ou três grupamentos fosfatos ligados mais comumente ao  $C_5'$ , mas podendo estar ligados também ao  $C_3'$ .

Os ácidos nucleicos apresentam apenas a forma fechada da ribose. Na **Figura 3.3.b**, você encontra a fórmula estrutural dos dois tipos de pentose: D- ribose (um grupamento OH ligado ao carbono C<sub>2</sub>' ), que está presente nos ribonucleotídeos, e a 2'-**DESOXI**-D-ribose (grupamento OH ligado ao carbono C<sub>2</sub>' é substituído por H), que está presente nos desoxirribonucleotídeos. Os nomes dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos correlatos, como será visto em seguida, derivam do tipo de pentose: ribose ou desoxirribose.

**DESOXI-**

O prefixo desoxi- significa “sem oxigênio”. A substituição da hidroxila (OH) por hidrogênio (H) é a única diferença entre ribose e desoxirribose.

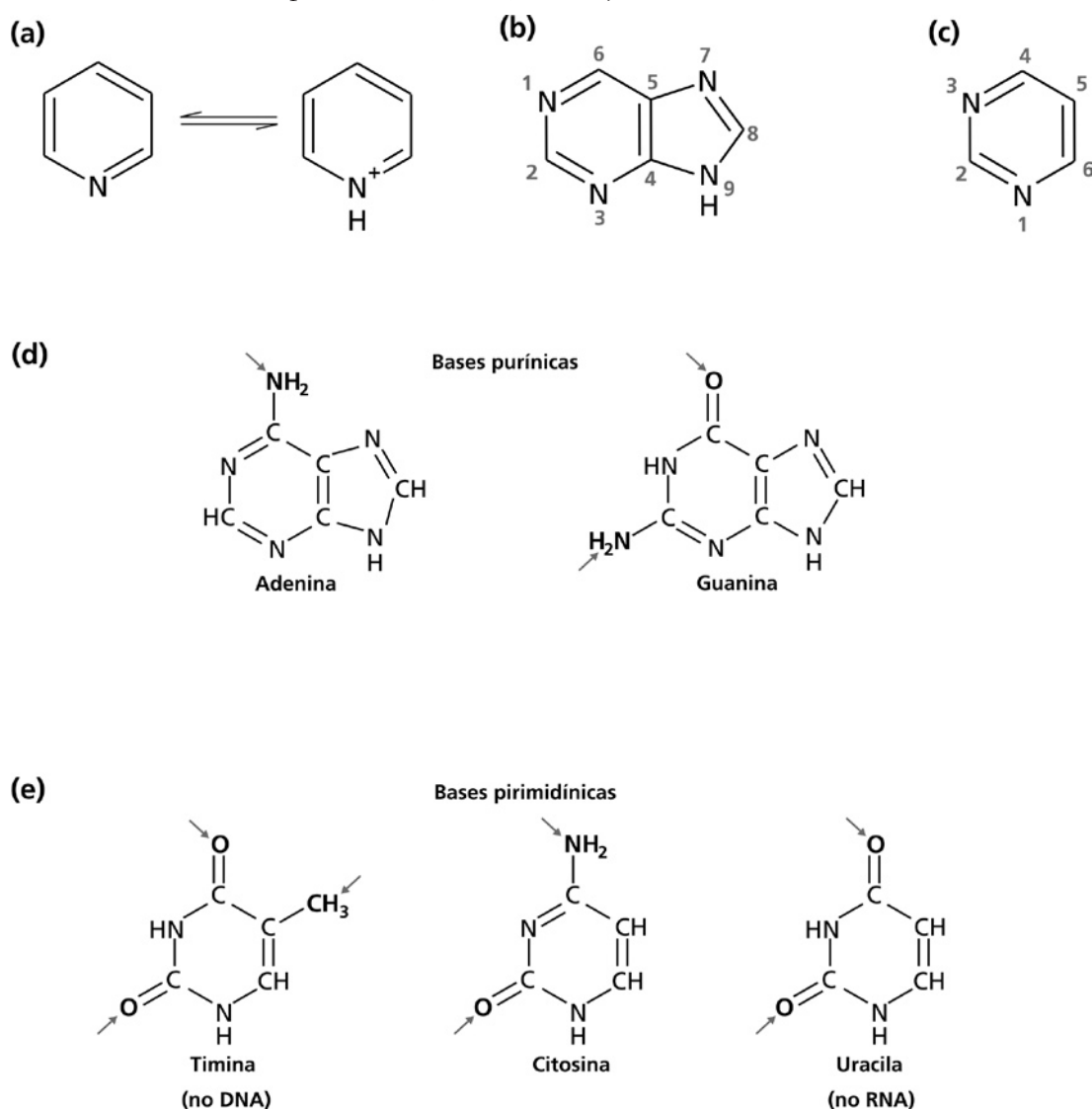


**Figura 3.3:** Tipos de pentose que podem estar presentes em um nucleotídeo. a) equilíbrio das formas aberta (aldeído) e fechada (β-furanose) da ribose. b) a D-ribose está presente nos ribonucleotídeos, ou seja, no RNA, enquanto a 2'-desoxi-D-ribose está presente nos desoxirribonucleotídeos, ou seja, no DNA.

### Base nitrogenada

É importante que você observe agora a **Figura 3.4**. Nela, estão representadas as estruturas da purina, da pirimidina e das bases nitrogenadas. Os anéis aromáticos que incorporam átomos de nitrogênio são essencialmente planos, permitindo o empilhamento dos anéis.

Esta característica é importante para o arranjo espacial das moléculas dos ácidos nucléicos, que será o tema das próximas aulas. Além disso, o nitrogênio confere um caráter básico fraco ao anel, como exemplificado com a pirimidina na **Figura 3.4.a**, de forma que as bases nitrogenadas apresentam-se sem carga em pH fisiológico (7,0), mas podem se apresentar carregadas em valores extremos de pH. O comportamento das bases nitrogenadas em pH fisiológico é fundamental sob o ponto de vista estrutural dos ácidos nucléicos. Isso se comprova quando as bases são expostas a valores extremos de pH, o que leva à presença de carga, perturbando, assim, o arranjo estrutural das moléculas.



**Figura 3.4:** Estrutura das bases nitrogenadas. (a) Caráter básico fraco da pirimidina; (b) representação da pirimidina com a numeração dos átomos constituintes do anel. (c) representação da purina com a numeração dos átomos constituintes dos anéis. (d) estrutura das bases purínicas, adenina e guanina. (e) estrutura das bases pirimidínicas, timina, citosina e uracila. Preste atenção nas setas indicando os grupamentos substituintes da estrutura central das bases.

As bases nitrogenadas, que muitas vezes são chamadas simplesmente bases, dividem-se em dois grupos: as bases purínicas e as bases pirimidínicas, por derivarem da purina e da pirimidina, respectivamente. A purina, apresentada na **Figura 3.4.b**, apresenta dois anéis heterocíclicos fundidos, um de seis e um de cinco átomos, contendo ao todo quatro átomos de nitrogênio. Dizemos que os anéis são fundidos porque dois átomos, o  $C_4$  e o  $C_5$ , são compartilhados pelos dois anéis. Volte à **Figura 3.4.b** para confirmar esta informação. A pirimidina, por sua vez, apresenta um único anel heterocíclico de seis átomos, contendo dois átomos de nitrogênio (**Figura 3.4.c**). Repare na numeração dos átomos dos anéis, que sempre se inicia em um átomo de nitrogênio (N) e segue a direção em que os outros átomos de nitrogênio estejam associados aos menores números. Conforme já comentado, os átomos são numerados sem (') para se diferenciarem da numeração dada à pentose.

As bases purínicas, adenina e guanina, ligam-se ao carbono  $C_1'$  da pentose através de uma **LIGAÇÃO N-GLICOSÍDICA** envolvendo a posição 9 ( $N_9$ ) (observe a numeração na **Figura 3.4.b**). Elas diferem entre si com relação aos grupamentos ligados aos átomos da estrutura central da purina (note as setas na **Figura 3.4.d**). Adenina e guanina são encontradas tanto no DNA como no RNA.

As bases pirimidínicas, citosina, timina e uracila, ligam-se ao carbono  $C_1'$  da pentose através de uma ligação N-glicosídica envolvendo a posição 1 ( $N_1$ ) (observe a numeração na **Figura 3.4.c**). As diferenças entre elas também recaem nos grupamentos ligados aos átomos da estrutura central da pirimidina (note as setas na **Figura 3.4.e**). Citosina está presente tanto no DNA como no RNA. Porém, timina está presente preferencialmente no DNA e uracila somente no RNA.

#### LIGAÇÃO N-GLICOSÍDICA

Este tipo de ligação é formado pela remoção de um grupo hidroxila da pentose e de um hidrogênio da base.



Algumas bases raras podem ser encontradas nos ácidos nucleicos, especialmente no tRNA (RNA transportador), molécula importante para a síntese de proteína, como será visto em aulas posteriores.



Outros derivados importantes de purina e pirimidina. Derivados de purina: tiamina (vitamina B1) e barbituratos. Derivados de pirimidina: cafeína, estimulante para o sistema nervoso e diurético, sendo encontrada no café e no chá; teofilina, também encontrada no chá, é usada como diurético e no tratamento de bronquite asmática; ácido úrico, produto final do metabolismo de purinas.

### Grupamento fosfato

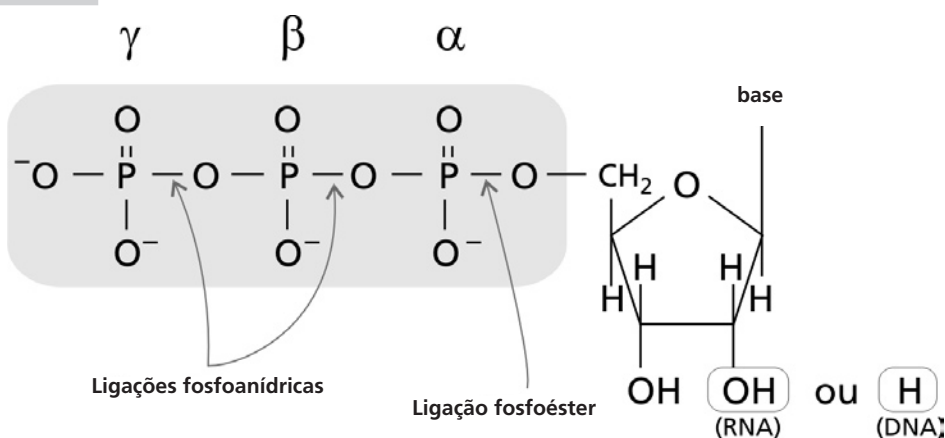
O caráter ácido dos nucleotídeos é devido à presença de resíduos de fosfato, derivados do ácido fosfórico –  $H_3PO_4$ , que se dissociam em pH intracelular, liberando íons hidrogênio ( $H^+$ ) e deixando o fosfato carregado negativamente. Como estas cargas negativas atraem proteínas, a maioria dos ácidos nucléicos nas células está associada com proteínas.

Na **Figura 3.5**, você pode observar um nucleotídeo com três fosfatos: o primeiro fosfato ligado ao carbono  $C_5'$  da pentose, fosfato- $\alpha$ , é um fosfoéster, enquanto os outros dois, fosfatos  $\beta$  e  $\gamma$ , ligam-se como fosfoanidridos.

$\alpha$  - letra grega *alfa*

$\beta$  - letra grega *beta*

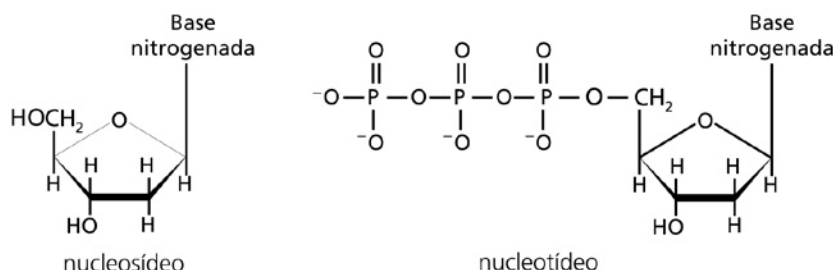
$\gamma$  - letra grega *gama*



**Figura 3.5:** Grupamentos fosfatos ligados à pentose dos nucleotídeos. O primeiro é chamado fosfato  $\alpha$ , o segundo, fosfato  $\beta$  e o terceiro, fosfato  $\gamma$ . O fosfato  $\alpha$  se liga ao  $C_5'$  através de uma ligação do tipo fosfoéster, enquanto o fosfato  $\beta$  se liga ao  $\alpha$  e o fosfato  $\gamma$  se liga ao  $\beta$  através de ligações fosfoanídricas.

## Nucleosídeos

Diferentemente dos nucleotídeos, os nucleosídeos são constituídos apenas da base nitrogenada ligada ao carbono  $C_1'$  da pentose através de ligação N-glicosídica. Na **Figura 3.6**, você pode observar a diferença entre um nucleosídeo e um nucleotídeo. Note também que no nucleotídeo representado na **Figura 3.6**, três grupamentos fosfatos estão ligados ao carbono  $C_5'$ .



**Figura 3.6:** Fórmula geral de um nucleosídeo e de um nucleotídeo.

### LUZ ULTRAVIOLETA

De acordo com o comprimento de onda ( $\lambda$ ), a radiação luminosa pode ser dividida em luz ultravioleta (200-380nm), luz visível (380-780nm) e luz infravermelho (780-2500nm).

## Propriedades dos nucleotídeos e nucleosídeos

Os nucleotídeos, tais quais outros componentes celulares contendo bases purínicas ou pirimidínicas, podem ser facilmente detectados por absorverem **LUZ ULTRAVIOLETA** (UV). As bases purínicas e seus derivados nucleosídeos e nucleotídeos absorvem luz UV mais fortemente que as pirimidinas e seus derivados. O comprimento de onda correspondente à absorção máxima para a maioria desses compostos é aproximadamente 260nm. A medida de **ABSORVÂNCIA** nesse comprimento de onda é amplamente empregada para a quantificação de ácidos nucléicos nas preparações de DNA e RNA.

As ligações N-glicosídicas dos nucleosídeos e nucleotídeos não sofrem hidrólise alcalina. Contudo, a estabilidade dessas ligações frente à hidrólise ácida difere sensivelmente. A ligação N-glicosídica de nucleosídeos e nucleotídeos purínicos é facilmente hidrolisada por ácido diluído em temperaturas elevadas (por exemplo, 60°C), gerando purinas livres, açúcar ou açúcar fosfato. O mesmo tipo de ligação envolvendo as bases uracil, citosina e timina é bastante estável ao tratamento ácido, requerendo condições mais drásticas, como ácido perclórico (60%) a

### ABSORVÂNCIA

Está relacionada à intensidade de radiação absorvida por uma solução. A absorvância de uma solução, representada por  $A$ , é proporcional à sua concentração e à distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra e, além disso, seu valor varia em função do comprimento de onda utilizado. Por isso, ao se expressar o valor de absorvância de uma solução, é necessário se especificar o comprimento de onda empregado, o que é feito da seguinte maneira,  $A_{\lambda}$  ( $\lambda$  representa o valor de comprimento de onda). Por exemplo,  $A_{260}$  representa o valor de absorvância medido no comprimento de onda de 260nm.



100°C, para liberar as pirimidinas livres. Porém, esse tratamento promove completa destruição do açúcar.

Devido à presença de grupamentos fosfatos, que são altamente polares, os nucleotídeos são muito mais solúveis em solução aquosa do que os nucleosídeos e as bases livres. Em geral, os nucleosídeos são mais solúveis que as bases.

## NOMENCLATURA DOS NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

Antes de você aprender como os nucleotídeos se ligam para formar os ácidos nucléicos, é importante que você entenda como os nucleosídeos e os nucleotídeos são chamados. A primeira característica a ser observada é o tipo de base presente, pois a nomenclatura destes dois grupos de compostos deriva do nome da base nitrogenada. Em seguida, o tipo de açúcar, ribose ou desoxirribose, também é importante para a denominação desses compostos, pois se a desoxirribose estiver presente, o nome da molécula deve receber o prefixo desoxi-. Por fim, a presença ou ausência do fosfato é fundamental para a nomenclatura.

Se não houver fosfato, a molécula é um nucleosídeo, e recebe o sufixo *-osina* (se for uma base derivada de purina), ou *-idina* (se a base for derivada de pirimidina). Caso o fosfato esteja presente, a molécula é um nucleotídeo e, então, recebe o mesmo nome do nucleosídeo correspondente acrescido de 5'- (carbono da pentose ao qual o fosfato está ligado) seguido dos prefixos *mono*, *di* ou *tri*, se um, dois ou três grupamentos fosfatos estiverem presentes, respectivamente, além da palavra *fosfato*. O nome do nucleotídeo que apresenta o fosfato ligado ao C<sub>5</sub>' da pentose segue a mesma regra, substituindo o 5' por 3' antes da palavra fosfato.

Assim, se tomarmos como exemplo a purina adenina, o nucleosídeo formado por esta base ligada a D-ribose é chamado adenosina. O nucleotídeo formado pela ligação do grupamento fosfato à adenosina (nucleosídeo formado pela D-ribose e a adenina), na posição C<sub>5</sub>' da pentose, recebe o nome geral de adenosina 5'-fosfato. Conforme o número de grupamentos fosfatos ligados à pentose, o nucleotídeo pode ser denominado mais especificamente como, adenosina 5'-mono, di ou trifosfato, no caso de haver um, dois ou três fosfatos, respectivamente. Lembre que estes nucleotídeos irão compor o RNA.

Os desoxirribonucleotídeos que compõem o DNA recebem o prefixo *desoxi-*. Vamos ver como fica? Se a adenina estiver ligada a desoxi-D-ribose, o nucleosídeo formado recebe o nome de desoxiadenosina. Já o nucleotídeo gerado pela ligação da desoxiadenosina com o(s) grupamento(s) fosfato(s) na posição 5' da pentose é denominado desoxiadenosina 5'-fosfato, ou ainda desoxiadenosina 5'-mono, di ou trifosfato, de acordo com a presença de um, dois ou três grupamentos fosfatos, respectivamente.

Agora tente montar o nome dos nucleosídeos e nucleotídeos derivados das cinco principais bases. Para conferir é só buscar o **Quadro 3.1**.

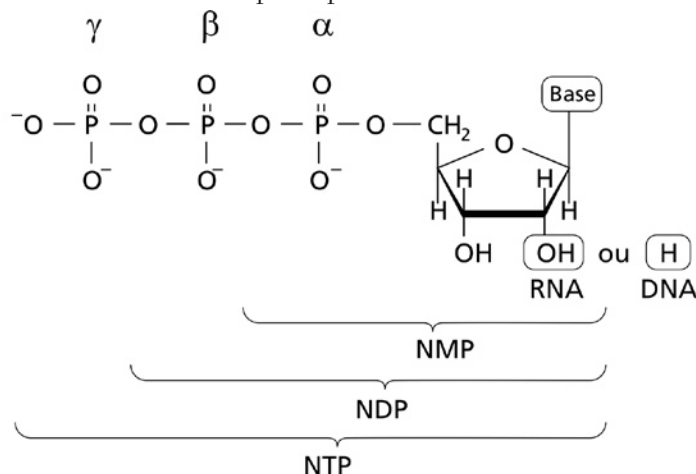
**Quadro 3.1:** Nomenclatura dos nucleosídeos e nucleotídeos formados pelas diferentes bases nitrogenadas presentes nas moléculas de DNA e RNA. A nomenclatura dos nucleotídeos é geral e não está especificando o número de fosfatos presentes na molécula. Ao especificar o número de fosfatos, os prefixos mono, di ou tri devem ser inseridos antes da palavra fosfato, no caso de haver um, dois ou três grupamentos, respectivamente.

Base nitrogenada (Símbolo)	#Nucleosídeo	#Nucleotídeo	Ácido Nucléico
<b><i>Purinas</i></b>			
Adenina (A)	Adenosina	Adenosina 5'-fosfato; adenilato*	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenosina 5'-fosfato; desoxiadenilato*	DNA
Guanina (G)	Guanosina	Guanosina 5'-fosfato; guanidilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanosina 5'-fosfato; desoxiguanidilato*	DNA
<b><i>Pirimidina</i></b>			
Citosina (C)	Citidina	Citidina 5'-fosfato; citidilato*	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidina 5'-fosfato; desoxicitidilato*	DNA
Timina (T)	Timidina ou Desoxitimidina	Timidina ou Desoxitimidina 5'-fosfato; timidilato* ou desoxitimidilato*	DNA
Uracila (U)	Uridina	Uridina 5'-fosfato; uridilato*	RNA

# *Nucleosídeo* e *nucleotídeo* são termos genéricos que incluem ambas as formas, *ribo-* e *desoxirribo-*.

\* Os nomes terminados com o sufixo *-ilato* correspondem às formas aniônicas dos ésteres de fosfato predominantes em pH 7,4.

Apenas para você visualizar como seria cada um dos nucleotídeos listados no **Quadro 3.1**, na **Figura 3.7**, você encontra a fórmula geral deste grupo de moléculas e duas tabelas com as abreviações usualmente empregadas. Note que na fórmula geral existem três chaves correspondendo ao NMP (nucleosídeo 5'-monofosfato), ao NDP (nucleosídeo 5'-difosfato) e ao NTP (nucleosídeo 5'-trifosfato). Repare também que, nas abreviações, a letra *d* minúscula é usada apenas para os desoxirribonucleotídeos.



Símbolos dos ribonucleotídeos 5'-fosfatos				Símbolos dos desoxirribonucleotídeos 5'-fosfatos			
Base	Mono-	Di-	Tri-	Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina (A)	AMP	ADP	ATP	Adenina (A)	dAMP	dADP	dATP
Guanina (G)	GMP	GDP	GTP	Guanina (G)	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina (C)	CMP	CDP	CTP	Citosina (C)	dCMP	dCDP	dCTP
Uracila (U)	UMP	UDP	UTP	Timina (T)	dTMP	dTDP	dTTP

**Figura 3.7:** Estrutura geral dos nucleotídeos 5'-mono-, di- e trifosfatos (NMPs, NDPs e NTPs) e suas abreviações. Nos desoxirribonucleotídeos (dNMPs, dNDPs, e dNTPs), a pentose é 2'-desoxi-D-ribose.

## IMPORTÂNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS

Além de sua importância como unidades monoméricas constituintes dos ácidos nucléicos, cujas funções você estudará adiante, os nucleotídeos desempenham outras funções celulares de igual relevância. A seguir, você terá alguns exemplos.

Carreadores de energia química – o ATP é reconhecido como a molécula armazenadora de energia, sendo formado por reações que são direcionadas pela liberação de energia do metabolismo oxidativo dos alimentos. Além do ATP, outros nucleotídeos, CTP, TTP e GTP, podem desempenhar esta função. Os mono- e dinucleotídeos AMP e ADP também são importantes intermediários energéticos no metabolismo.

Os três grupos fosfatos presentes na molécula do ATP estão ligados em série por duas ligações fosfoanídricas (volte à **Figura 3.5**). A ruptura dessas ligações promove a liberação de grande quantidade de energia, que é, então, utilizada em diversos processos biológicos. O fosfato  $\gamma$ , particularmente, é liberado por hidrólise e transferido para outras moléculas. Este evento ocorre com frequência e é responsável pela liberação de energia necessária para que reações biossintéticas energeticamente dependentes ocorram em diferentes locais da célula.

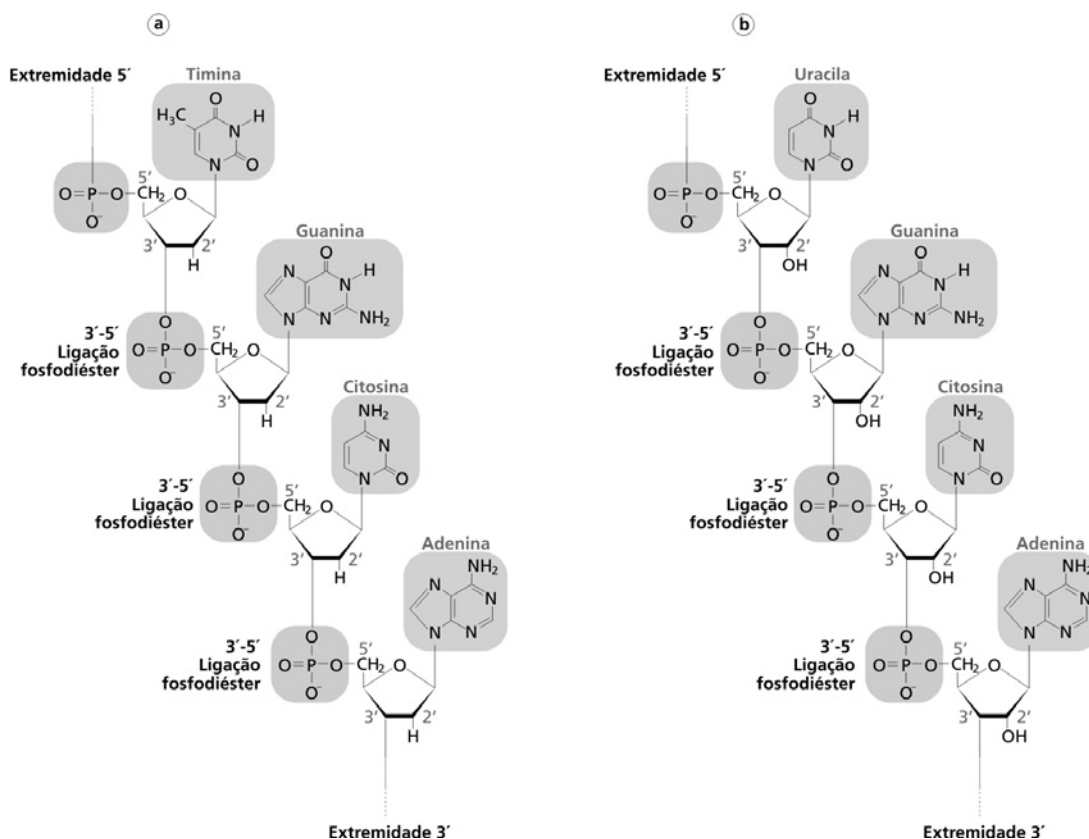
$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$  (fosfato inorgânico) + energia

cAMP (AMP cíclico) – molécula de sinalização. O cAMP intracelular responde a sinais extracelulares, transferindo-os para o processo metabólico no interior da célula.

Componentes de cofatores enzimáticos – alguns nucleotídeos são componentes de nicotinamida adenina dinucleotídeos,  $\text{NAD}^+$  (oxidada) e  $\text{NADH}$  (reduzida), e de flavina mono- e dinucleotídeos, FMN (oxidada) e FAD (reduzida), respectivamente. Estes compostos existem nas formas oxidada e reduzida, o que os torna cofatores importantes para as reações de oxirredução catalisadas enzimaticamente.

## POLIMERIZAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS – FORMAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

Agora que você já é capaz de reconhecer um nucleotídeo e diferenciar um ribonucleotídeo de um desoxirribonucleotídeo, aprenderá como essas unidades se ligam para formar o ácido ribonucléico, RNA, e o ácido desoxirribonucléico, DNA, respectivamente. Na **Figura 3.8**, você pode observar parte de uma cadeia de DNA e parte de uma cadeia de RNA.



**Figura 3.8:** Estrutura de parte de uma cadeia de DNA (a) e de RNA (b). Os átomos de hidrogênio (H) sem relevância para o entendimento da figura foram omitidos.

#### REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO

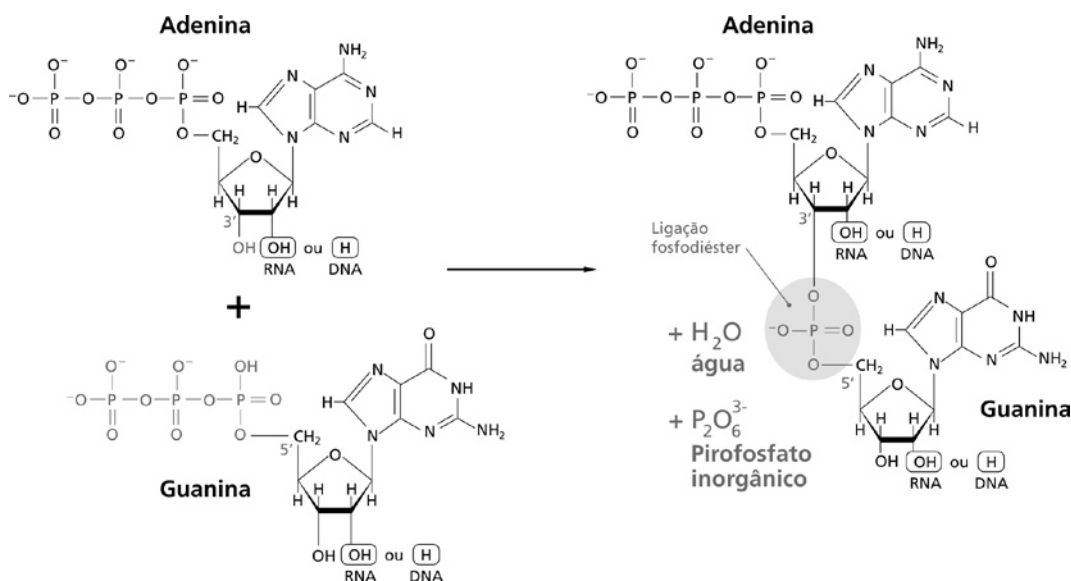
Tipo de reação química na qual dois compostos orgânicos são ligados entre si, por ligação covalente, havendo liberação de uma molécula de água. Reação característica de formação de diversos polímeros biológicos. Certamente, você viu reações deste tipo quando estudou polisacarídeos e proteínas, em Bioquímica.

Vamos discutir os detalhes dessa estrutura!

Primeiramente é importante que você saiba que os ácidos nucléicos são polímeros lineares, ou seja, sem ramificações, de nucleotídeos ligados entre si por ligação do tipo fosfodiéster formada entre o grupo hidroxila do carbono  $\text{C}_3'$  de um nucleotídeo e o grupo fosfato do carbono  $\text{C}_5'$  do nucleotídeo adjacente. A ligação do tipo fosfodiéster é resultante de uma **REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO** entre nucleotídeos-trifosfatos, ricos em energia, com liberação de pirofosfato inorgânico ( $\text{P}_2\text{O}_6^{3-}$ ) e água. Observe a reação entre dois nucleotídeos para a formação de um **DINUCLEOTÍDEO** na Figura 3.9.

#### DINUCLEOTÍDEO

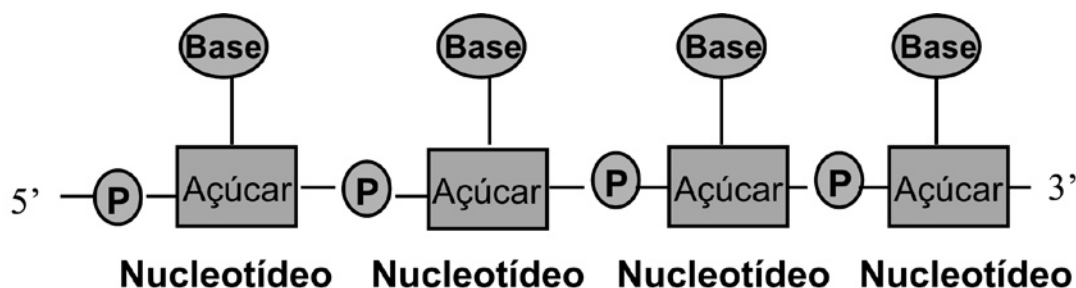
A ligação de dois nucleotídeos resulta em um **dinucleotídeo**, de três nucleotídeos resulta em um **trinucleotídeo**, e assim por diante. Polímeros contendo até 50 nucleotídeos são chamados de **oligonucleotídeos**. Já aqueles contendo mais de 50 nucleotídeos são denominados **polinucleotídeos**.



**Figura 3.9:** Formação de um dinucleotídeo. Reação de condensação entre dois nucleotídeos e formação de ligação fosfodiéster entre a hidroxila do C<sub>3</sub>' de um nucleotídeo e o fosfato do C<sub>5</sub>' do nucleotídeo adjacente.

A cadeia de nucleotídeos tem orientação definida pelo suporte açúcar-fosfato. Um dos nucleotídeos terminais tem a extremidade 5' (lê-se “5 linha”) livre, contendo um fosfato, e o outro tem a extremidade 3' (lê-se “3 linha”) livre, contendo uma hidroxila. Estas extremidades também são chamadas 5' fosfato e 3' hidroxila. Portanto, a orientação da cadeia é designada 5' para 3', ou 5' → 3'. O resultado disso é que a sequência do tetranucleotídeo 5' ACTG 3', que apresenta o nucleotídeo adenina (A) na extremidade 5' e o nucleotídeo guanina (G) na extremidade 3', é *diferente* da sequência do tetranucleotídeo 3' ACGT 5', que apresenta o nucleotídeo timina (T) na extremidade 5' e o nucleotídeo adenina (A) na extremidade 3'. Esta notação é importante, mas quando ela é omitida, significa que o nucleotídeo representado na parte esquerda da sequência é o da extremidade 5', e o representado na parte direita é o da extremidade 3'.

Na **Figura 3.10**, você encontra a representação de uma cadeia de nucleotídeos. Note que a maneira com que os polímeros são formados resulta em uma sequência de fosfato, açúcar, fosfato, açúcar, que se repete por bilhões de vezes, se considerarmos o genoma de um organismo, por exemplo. Ligados aos resíduos de açúcar, encontram-se as bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), no DNA, ou uracila (U), no RNA.



**Figura 3.10:** Esquema da estrutura de um ácido nucleico. Cadeia de nucleotídeos representada por uma sequência de fosfato-açúcar, que se repete inúmeras vezes. O nucleotídeo da extremidade 5' apresenta o grupo fosfato livre, enquanto o nucleotídeo da extremidade 3' apresenta a hidroxila livre.

#### ELETROFORESE

Metodologia amplamente empregada, que se baseia na migração de moléculas com carga em relação a um campo elétrico. No caso dos ácidos nucleicos, que se comportam como poliânions (carga negativa), a migração ocorre em direção ao anodo (pólo positivo).

Observe mais uma vez a **Figura 3.8** e localize os grupamentos fosfatos ionizáveis, que conferem carga negativa às moléculas de ácidos nucleicos. De fato, em pH fisiológico, os ácidos nucleicos se comportam como poliânions, o que permite o fracionamento de moléculas de ácidos nucleicos com pesos moleculares diferentes através da técnica de **ELETROFORESE** em gel.

#### RESUMO

Vamos rever as informações que você recebeu nesta aula?

A principal função dos nucleotídeos é ser a unidade monomérica dos ácidos nucleicos. Existem dois tipos de nucleotídeos: os ribonucleotídeos, que formam as moléculas de RNA, e os desoxirribonucleotídeos, que formam as moléculas de DNA. Todos os nucleotídeos são formados por três partes: açúcar, base nitrogenada e fosfato. O açúcar é sempre uma pentose, D-ribose, nos ribonucleotídeos, e desoxi-D-ribose, nos desoxirribonucleotídeos. Os outros dois componentes se ligam à pentose: o(s) grupo(s) fosfato(s) se liga(m) ao C<sub>5'</sub>, enquanto a base nitrogenada se liga ao C<sub>1'</sub>. Podem existir até 3 grupamentos fosfatos. As bases mais comumente encontradas nos ribonucleotídeos são as purínicas, adenina e guanina, e as pirimidínicas, citosina e uracila. Já nos desoxirribonucleotídeos, são as purínicas, adenina e guanina, e as pirimidínicas, citosina e timina. Os nucleosídeos são constituídos apenas pela pentose ligada à base através do C<sub>1'</sub>. A nomenclatura desses compostos segue uma regra na qual o tipo de pentose, desoxirribose ou ribose, determina a utilização ou não do prefixo desoxi-, respectivamente.

A denominação dos nucleosídeos deriva do nome das bases presentes. Já a denominação dos nucleotídeos é feita através do uso do nome do nucleosídeo correspondente acrescido de 5'-mono, di ou trifosfato, em função do número de grupos fosfato presentes na molécula. Além de seu papel como constituinte dos ácidos nucléicos, os nucleotídeos desempenham funções importantes na célula, tais como carreador de energia, componente de coenzimas e molécula de sinalização intracelular. As reações de condensação entre dois nucleotídeos, ou entre uma cadeia de nucleotídeos e um nucleotídeo livre, resultam na formação de dinucleotídeos ou de oligo ou polinucleotídeos, respectivamente.

## EXERCÍCIOS

1. Quais são os três componentes básicos de um nucleotídeo?
2. Como são chamados e qual(is) a(s) diferença(s) entre os nucleotídeos constituintes do DNA e os constituintes do RNA.
3. Qual a principal diferença entre uma purina e uma pirimidina? Desenhe a estrutura de uma base nitrogenada derivada de purina e outra derivada de pirimidina presentes no DNA e no RNA.
4. Qual a diferença entre um nucleosídeo e um nucleotídeo? Desenhe a estrutura desses compostos.
5. Associe as duas colunas.

(a) ligação fosfodiéster	( ) difere a D-ribose da desoxi-D-ribose
(b) ligação N-glicosídica	( ) ligação de nucleotídeos adjacentes em uma cadeia
(c) fosfato éster (fosfoéster)	( ) difere um nucleosídeo de um nucleotídeo
(d) presença de H ou OH no C <sub>2</sub> ' da ribose	( ) ligação da base à pentose no nucleosídeo
6. Cite duas funções dos nucleotídeos.
7. Qual o tipo de reação que ocorre entre dois nucleotídeos para a formação de um dinucleotídeo? Represente os reagentes e produtos desta reação.



8. Esquematize a estrutura de uma cadeia polinucleotídica, localizando os três componentes e suas localizações.

### **AUTO-AVALIAÇÃO**

As questões são simples e visam apenas à fixação do conteúdo visto nesta aula. Tente resolvê-las somente quando não tiver mais dúvidas em relação aos conceitos estudados. Caso ainda tenha dificuldades para respondê-las, reveja a aula ou peça ajuda aos tutores no pólo.

### **INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Nas Aulas 4 e 5, você estudará a estrutura química do DNA e do RNA e as funções que esses compostos desempenham na célula.

## DNA – aspectos funcionais e estruturais

# AULA 4

## objetivo

Ao final desta aula, você terá a oportunidade de:

- Descrever os aspectos funcionais e estruturais do DNA.

### Pré-requisito

Para acompanhar mais facilmente esta aula, é importante que você reveja alguns conceitos de Química e Bioquímica e, principalmente, a Aula 3 de nossa disciplina.

## APRESENTAÇÃO

Nas aulas de estrutura de proteína (Bioquímica, lembra?), você viu que esta macromolécula apresenta quatro níveis de organização, que englobam desde a sequência de aminoácidos (estrutura primária) até o arranjo espacial de proteínas contendo duas ou mais subunidades (estrutura quaternária). A configuração espacial, na verdade, é uma característica das macromoléculas. Isso parece lógico, já que, se essas moléculas, por vezes gigantescas, fossem distribuídas na célula de forma “relaxada”, não haveria espaço físico para acomodar todas elas. Por exemplo, se o material genético do homem não se apresentasse em sua forma compactada, certamente não caberia no interior do núcleo da célula, uma vez que se “esticado” ele mede aproximadamente 2 metros. Na Aula 3, você estudou como um polímero de nucleotídeos é formado para originar DNA e RNA. Esta é a base de que você precisa para aprender como as cadeias nucleotídicas se acomodam no espaço. O tema das Aulas 4 e 5 é justamente o arranjo espacial dos ácidos nucleicos, DNA e RNA. Ao final dessas duas aulas, temos certeza de que você irá entender que as funções desempenhadas por essas biomoléculas dependem diretamente de sua estrutura.

## ASPECTOS FUNCIONAIS DO DNA

Você se lembra dos experimentos que foram feitos para se descobrir a natureza química do material genético? Volte à Aula 2 se necessário. As pesquisas nesta área já indicavam claramente inúmeras propriedades que a molécula da hereditariedade tinha de apresentar. Vamos ver quais são elas!!

1. O material genético tem de ser capaz de guardar uma enormidade de informações, pois é responsável por codificar todas as proteínas (e são muitas!!!) que um organismo expressa.

2. A duplicação do DNA em cada multiplicação celular precisa ser um processo “confiável”. Afinal, cada célula do nosso corpo não apresenta a mesma constituição genética?

3. Paradoxalmente à segunda propriedade, a molécula de DNA precisa permitir alterações, o que denominamos **MUTAÇÃO**, em raras situações. São estas mutações que conferem a variação genética aos indivíduos de uma população, na qual atua a seleção natural.

### MUTAÇÃO

Descreve qualquer alteração na sequência do DNA genômico. Uma mutação pode ser herdada e comumente resulta em mudança de fenótipo.

Resumindo, a molécula de DNA tem de armazenar informações, duplicar-se de forma a garantir a perpetuação dessas informações, mas permitir mutações em sua molécula, garantindo, assim, a variabilidade genética e, conseqüentemente, o processo evolutivo.

Após a caracterização dos componentes da molécula de DNA, que são, na verdade, os constituintes dos desoxirribonucleotídeos, ou seja, açúcar (desoxirribose), bases nitrogenadas (adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T)) e fosfato, os pesquisadores na época se perguntavam: “Como uma molécula com tão poucos componentes desempenha as funções de uma molécula hereditária?” Essa pergunta começou a ser respondida em 1953, com a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick, e nos anos que se seguiram, com a dedicação e empenho de diversos pesquisadores. Não podemos esquecer também a contribuição de estudos anteriores para o trabalho de Watson e Crick. Talvez o mais importante deles seja o estudo realizado por Chargaff e seus colaboradores com relação à composição de bases nitrogenadas em moléculas de DNA de diferentes organismos.



Se você tem dúvidas sobre os componentes dos ácidos nucléicos, volte à Aula 3. Continuar com dúvidas só vai desestimulá-lo. Isso não pode acontecer!!!

## COMPOSIÇÃO DE BASES NITROGENADAS DO DNA

No final da década de 1940, Erwin Chargaff e seus colaboradores observaram que a composição de bases nitrogenadas no DNA varia enormemente entre organismos diferentes, mas dentro de uma pequena faixa nas espécies correlatas. Também foi observado que as quantidades de certas bases são muito similares. Os dados coletados a partir de DNAs de um grande número de espécies diferentes permitiram que Chargaff concluísse que:

- A composição de bases no DNA geralmente varia entre as espécies.
- Os DNAs isolados de diferentes tecidos de uma mesma espécie apresentam a mesma composição de bases.
- A composição de bases de uma dada espécie não varia com a idade, o estado nutricional ou fatores ambientais.

#### RESÍDUOS DE NUCLEOTÍDEOS

As unidades formadoras de um ácido nucléico são denominadas nucleotídeos. No entanto, quando essas unidades são obtidas a partir da degradação de um ácido nucléico são chamadas **resíduos de nucleotídeos**.

- Todos os DNAs celulares, independentemente da espécie, apresentam igual número de **RESÍDUOS DE NUCLEOTÍDEOS** derivados de adenina e timina, isto é,  $n^\circ \text{ de A} = n^\circ \text{ de T}$  (ou simplesmente  $A = T$ ), e igual número de resíduos de nucleotídeos derivados de guanina e citosina, isto é,  $n^\circ \text{ de G} = n^\circ \text{ de C}$  (ou simplesmente  $G = C$ ). A partir dessas relações pode-se afirmar que a soma de nucleotídeos purínicos é igual a soma de nucleotídeos pirimidínicos, o que pode ser representado em função apenas das bases nitrogenadas, ou seja,  $n^\circ \text{ de A} + n^\circ \text{ de G} = n^\circ \text{ de T} + n^\circ \text{ de C}$  (ou simplesmente  $A + G = T + C$ ).

Estas relações quantitativas, também chamadas “regras de Chargaff”, foram confirmadas por muitos outros pesquisadores. Além de terem sido de suma importância para a elucidação da estrutura tridimensional do DNA, também contribuíram para uma melhor compreensão de como a informação genética é codificada no DNA e passa de uma geração para outra.

Ainda com relação à composição de bases nitrogenadas no DNA, é importante que você saiba que, embora  $[A] = [T]$  e  $[C] = [G]$ , onde  $[ ]$  significa concentração molar, não existe qualquer regra sobre a razão entre as concentrações totais de guanina e citosina e as de adenina e timina em uma molécula de DNA, ou seja,  $([G] + [C]) / ([A] + [T])$ . Entre diversas espécies de bactéria esta razão pode variar de 0,37 a 3,16. Entretanto, a forma mais usual de se expressar a quantidade, que, por sua vez, é mais comumente expressa em termos de concentração, de bases do DNA de um organismo não é por meio desta razão, e sim pela fração das concentrações das bases G e C em relação ao total de bases, isto é,  $([G] + [C]) / [\text{todas as bases}]$ . Esta fração é denominada conteúdo de G + C, ou percentual de G + C. A composição de bases do DNA de inúmeros organismos tem sido determinada. Em geral, o valor do conteúdo de G + C é próximo de 0,50 para os organismos superiores. Nos organismos mais simples, o valor do conteúdo de G + C é bastante variável. Por exemplo, para bactéria, os extremos são 0,27 para o gênero *Clostridium* e 0,76 para o gênero *Sarcina*. O valor para a bactéria *Escherichia coli* é 0,50.

Compare os valores do conteúdo de G + C do DNA de diferentes organismos no **Quadro 4.1**. Repare que os valores de  $[A]/[T]$  e  $[C]/[G]$ , ou simplesmente A/T e C/G, para os organismos listados são próximos de 1,00, o que confirma a “regra de Chargaff”, que diz que  $A = T$  e  $C = G$ .

**Quadro 4.1:** Composição de bases nitrogenadas do DNA de diferentes organismos. Os valores correspondentes às quantidades de A, T, C e G estão expressos em percentuais.

<i>Organismo</i>	A	T	C	G	A/T	C/G	$\frac{G + C}{A + T}$	$\frac{G + C}{\text{Total de bases}}$
<i>Escherichia coli</i> (K12)	26,0	23,9	24,9	25,2	1,09	0,99	1,00	0,50
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	29,8	31,6	20,5	18,0	0,94	1,14	0,63	0,39
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15,1	14,6	34,9	35,4	1,03	0,99	2,38	0,70
Levedura	31,3	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09	0,56	0,36
Milho	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00	0,96	0,49
<i>Drosophila</i>	27,3	27,6	22,5	22,5	0,99	1,00	0,82	0,45
Ouriço-do-mar (espermatozóide)	32,8	32,1	17,7	18,4	1,02	0,96	0,54	0,35
Salmão (espermatozóide)	29,7	29,1	20,8	20,4	1,02	1,02	0,69	0,41
Rato (medula óssea)	28,6	28,4	21,4	21,5	1,01	1,00	0,75	0,43
Humano (fígado)	30,3	30,3	19,5	19,9	1,00	0,98	0,62	0,38

## O DNA É UMA DUPLA HÉLICE

A partir dos resultados de estudos de **DIFRAÇÃO DE RAIOS X** (Figura 4.1), Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, no início da década de 1950, deduziram que as moléculas de DNA eram helicoidais com duas periodicidades ao longo de seu eixo. O problema consistia em formular um modelo tridimensional da molécula de DNA que pudesse não apenas justificar os dados de difração de raios X, como também as equivalências de bases específicas,  $A = T$  e  $G = C$ , descobertas por Chargaff.

### DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Método de determinação de estruturas moleculares. Por esse método, o espaçamento dos átomos em uma estrutura cristalina pode ser determinado medindo-se a localização e a intensidade de manchas produzidas em um filme fotográfico por um feixe de raios X, de certo comprimento de onda, depois da difração provocada pelos elétrons dos átomos.

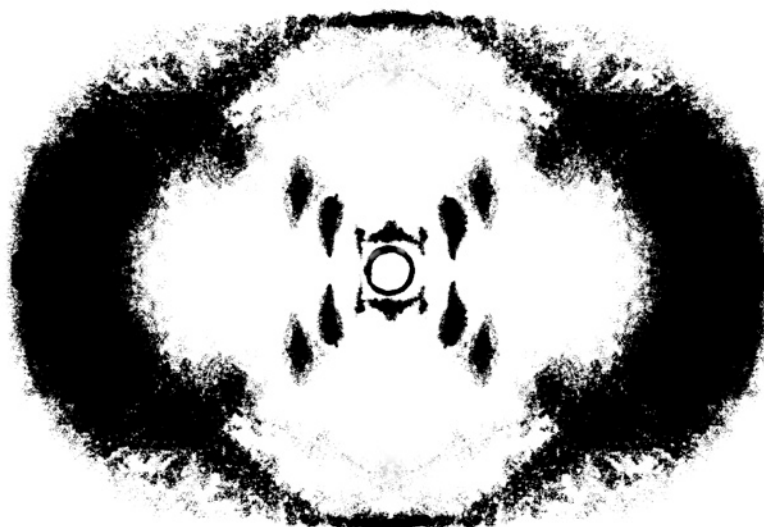
### ÅNGSTRÖM (Å)

Nome dado em homenagem ao físico Anders J. Ångström. Esta unidade é amplamente empregada para descrever distâncias atômicas.

1 angstrom (Å)  
equivale a 0,1nm  
( $=10^{-10}$  m).

### PARES DE BASES A=T E C≡G

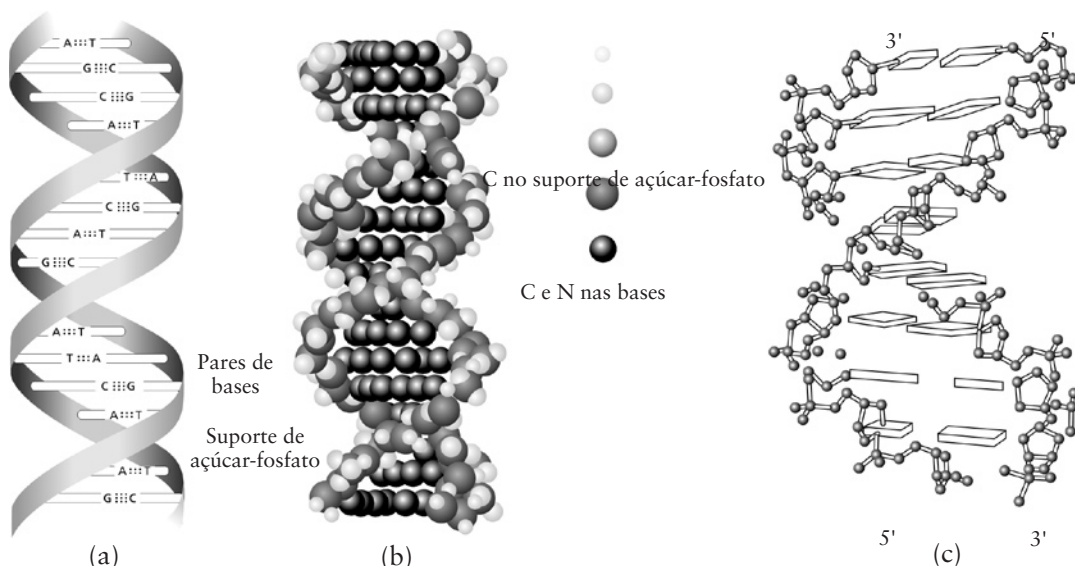
Ao longo do curso, a notação dos pares de bases formados entre A e T e entre C e G incluirá o número de pontes de hidrogênio, que serão representadas por barras entre os símbolos das bases. Assim, o par de bases constituído por A e T, que é formado por duas pontes de hidrogênio, será representado por A=T, para se diferenciar da sequência de bases AT (bases adjacentes em uma cadeia polinucleotídica). Já o par de bases constituído por G e C, que é formado por três pontes de hidrogênio, será representado por C≡G, diferenciando-se da sequência de bases GC (bases adjacentes em uma cadeia polinucleotídica).



**Figura 4.1:** Padrão representativo de difração de raios-X do DNA. As manchas formando uma cruz no centro da figura são um indicativo de estrutura helicoidal. As manchas fortes à esquerda e à direita da figura correspondem à distância de 3,4 Å e indicam que a estrutura do DNA se repete a cada 3,4 Å ao longo do eixo central.

O modelo de estrutura tridimensional da molécula de DNA proposto por James Watson e Francis Crick, em 1953, teve como base muitas evidências químicas e biológicas, tendo sido capaz de justificar todos os dados disponíveis na época.

O modelo de estrutura do DNA, que está representado na **Figura 4.2**, consiste em duas cadeias polinucleotídicas, também chamadas “filamentos” ou “fitas”, helicoidais enoveladas (para a direita) ao redor de um eixo comum para formar uma dupla hélice de 20 Å de diâmetro. Na dupla hélice, as duas fitas de DNA são “anti-paralelas”, “complementares” e são mantidas unidas por interações do tipo pontes de hidrogênio entre as bases A e T e G e C, formando os **PARES DE BASES A=T E C≡G**, respectivamente. A estrutura resultante se assemelha à estrutura de uma escada em espiral, como você pode confirmar na **Figura 4.2.c**.



**Figura 4.2:** Representações da dupla hélice de DNA na forma B. (a) Modelo diagramático. (b) Modelo de preenchimento espacial. (c) Modelo de esferas e bastões.

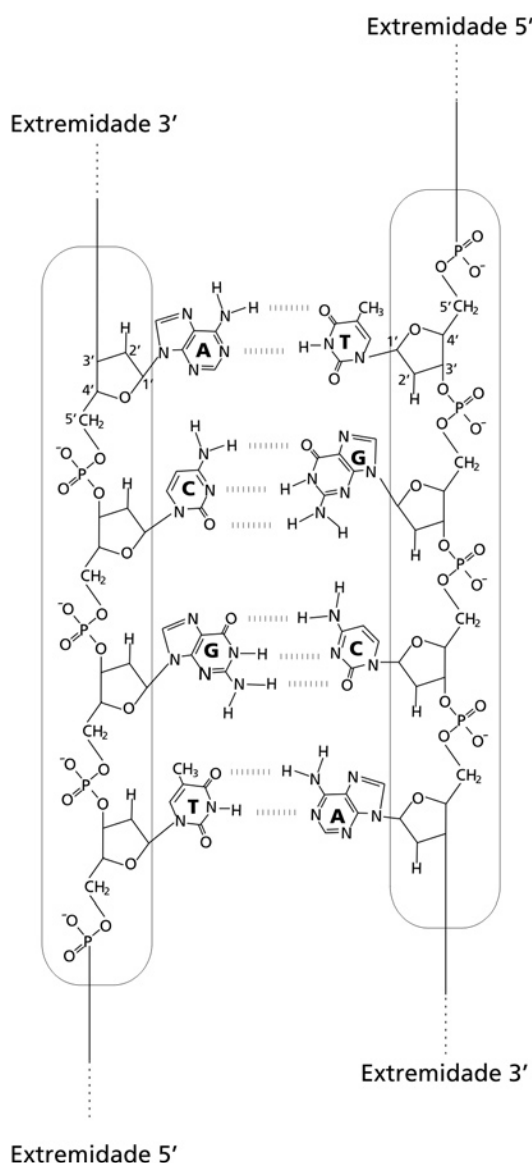
A estrutura de DNA dupla hélice sugeriu imediatamente um mecanismo para a transmissão da informação genética, com base na principal característica do modelo, a complementaridade das duas fitas de DNA (você verá mais detalhadamente adiante). Além da proposição do modelo estrutural, Watson e Crick previram que esta estrutura podia ser replicada (duplicada) pela separação das duas fitas, seguida de síntese da fita complementar a cada uma delas. Como os nucleotídeos de cada fita se ligam de acordo com regras de pareamento de bases, cada fita preexistente funcionaria como um molde para guiar a síntese de uma fita complementar, o que foi confirmado experimentalmente. É importante que você saiba que este modelo da molécula de DNA revolucionou nosso entendimento da herança biológica, dando início à biologia molecular moderna.

### Detalhando a estrutura de dupla hélice do DNA

O DNA é composto por duas cadeias de nucleotídeos. Você já estudou na Aula 3 como essas cadeias são formadas. No DNA, existem duas cadeias, só que elas não estão lado a lado de qualquer maneira. Lembre que os polímeros de nucleotídeos apresentam uma orientação  $5' \rightarrow 3'$  definida pelo esqueleto açúcar-fosfato? Pois, então, busque a **Figura 4.3**. Note que a cadeia representada à esquerda apresenta a extremidade  $5'$  na parte inferior e a extremidade  $3'$  na parte superior. Já a cadeia representada



à direita apresenta a extremidade 3' na parte inferior e a extremidade 5' na parte superior, ou seja, elas estão posicionadas na dupla hélice em orientações opostas, ou em sentido inverso, ou, simplesmente, elas são “antiparalelas”. A natureza antiparalela da dupla hélice assegura o alinhamento ótimo das bases e, portanto, maximiza a interação do tipo ponte de hidrogênio. Também na **Figura 4.3**, repare no suporte açúcar-fosfato a presença de cargas negativas, referentes aos grupamentos fosfatos, ao longo do filamento.



**Figura 4.3:** Componentes do DNA em um segmento de dupla hélice de DNA desenrolado. O suporte açúcar-fosfato está em destaque. No centro da molécula, encontram-se os pares de bases formados por interações do tipo pontes de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio (H) sem relevância para o entendimento da figura foram omitidos.

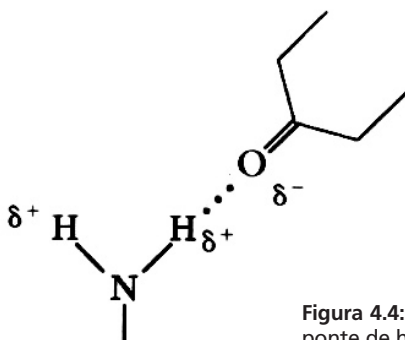
As cadeias de DNA são ditas “complementares”, pois a base presente em uma das cadeias determina a base presente na outra cadeia. Volte à **Figura 4.3** e observe, de cima para baixo, que a base A está em frente à base T, a C em frente à G, a G em frente à C e a T em frente à A. Esse arranjo dá a idéia de “complementaridade” e está de acordo com a regra de Chargaff,  $A = T$  e  $C = G$ . Além disso, esta complementaridade de bases assegura a formação de uma duplicata exata da informação genética parental quando o DNA é replicado. Replicação será um dos temas abordados no Módulo 2.



Não confunda a representação utilizada para a equivalência de bases,  $A = T$  e  $C = G$ , com a representação do par de bases  $A=T$ . Neste último caso, sempre será usada a expressão “par de bases” antes de  $A=T$ . Preste atenção!!

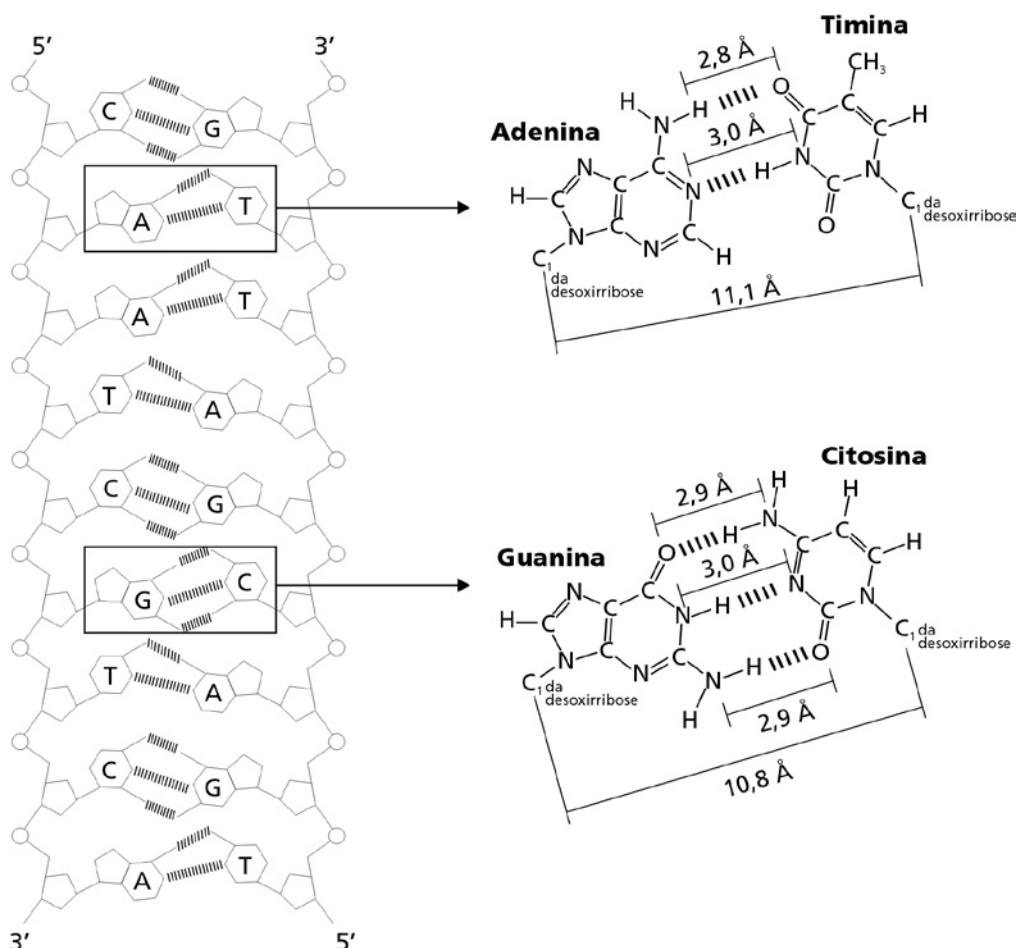
São interações do tipo pontes de hidrogênio que mantêm os filamentos unidos. Você irá entender como elas se formam acompanhando a explicação e ficando “de olho” na **Figura 4.4**. Os dois átomos de hidrogênio no grupamento  $NH_2$  são ligeiramente positivos ( $\delta^+$ ), uma vez que o nitrogênio, por ser mais eletronegativo que o hidrogênio, tende a atrair os elétrons envolvidos nas ligações  $N-H$ . O átomo de oxigênio, por ser também mais eletronegativo que o carbono, atrai os pares de elétrons da ligação dupla com o carbono, ficando ligeiramente negativo ( $\delta^-$ ). Esta situação propicia a formação de uma ponte de hidrogênio, que nada mais é que a interação que se forma entre um H ligeiramente positivo e um átomo ligeiramente negativo, que neste exemplo é o oxigênio, mas podendo ser também o nitrogênio. As pontes de hidrogênio são fracas, com cerca de apenas 3% da força de uma ligação covalente.

**$\delta^+$  E  $\delta^-$**   
Nas ligações covalentes que se formam entre átomos de elementos com eletronegatividades diferentes, o par de elétrons é atraído pelo átomo mais eletronegativo, conferindo-lhe uma carga parcial negativa, que é representada pela letra  $\delta$  (letra grega delta) seguida do sinal ( $-$ ), ficando  $\delta^-$ . O átomo menos eletronegativo fica com uma carga parcial positiva, que é representada por  $\delta^+$ .



**Figura 4.4:** Exemplo de uma interação do tipo ponte de hidrogênio.

Tudo bem até aqui? Então passe para a **Figura 4.5**, onde estão representados os pares de bases A=T e C≡G. Observe que entre as bases adenina (A) e timina (T) são formadas 2 pontes de hidrogênio, enquanto entre as bases guanina (G) e citosina (C) se formam 3 pontes de hidrogênio.



**Figura 4.5:** Pares de bases definidos por Watson e Crick, também chamados pares Watson e Crick. Nesta figura, estão representados os padrões de pontes de hidrogênio formadas entre as bases de cada par, assim como a distância entre as bases e o espaço ocupado por cada par de bases.

Você deve estar pensando: “Será que não existem outras possibilidades de pareamento de bases?”. Até existem. Por exemplo, entre guanina e timina, ou entre adenina e guanina, pode se formar uma ponte de hidrogênio; enquanto entre timina e citosina podem se formar duas pontes de hidrogênio. Entretanto, o pareamento das bases, tal qual proposto por Watson e Crick, tem por resultado um número maior de interações entre as bases dos dois filamentos. O pareamento entre as bases A e T e entre as bases C e G são comumente chamados de pares Watson-Crick.

Além disso, como o diâmetro da molécula de DNA é constante ao longo de toda a sua extensão, parece razoável que o pareamento ocorra entre uma purina, que apresenta dois anéis fusionados em sua estrutura, e uma pirimidina, que contém apenas um anel. Se você voltar à **Figura 4.5**, irá reparar que, de fato, as distâncias entre as bases e o espaço ocupado por elas são praticamente os mesmos nos dois pares de bases  $A=T$  e  $C\equiv G$ . Como será visto em Aulas do Módulo 2, o pareamento entre duas purinas ou entre duas pirimidinas caracteriza alterações no DNA, promovendo distorções estruturais que são reconhecidas por sistemas de reparo específicos.

Você deve estar pensando: “Como uma interação tão fraca, como a ponte de hidrogênio, pode conferir tanta estabilidade à molécula de DNA?” Não é difícil entender. Dizer que a ponte de hidrogênio é uma interação fraca e que representa apenas 3% da força da ligação covalente está certo. Porém, quantas pontes de hidrogênio devem existir em uma molécula de DNA? Veja o quadro a seguir.

Imagine uma molécula de DNA com  $10^6$  pares de bases. Se considerarmos o conteúdo de G + C de 0,50, podemos até calcular. Vamos fazer isso?

Se o conteúdo de G + C é 0,50, significa que o conteúdo de A + T também é 0,50, ou seja, metade dos pares é do tipo  $C\equiv G$  e a outra metade é do tipo  $A=T$ . Ao todo existem  $10^6$  (1.000.000) pares de bases. Então, a metade,  $5 \times 10^5$  (500.000), é do tipo  $C\equiv G$ , e a outra metade,  $5 \times 10^5$  (500.000), é do tipo  $A=T$ .

Se entre cada par  $C\equiv G$  existem 3 pontes de hidrogênio, o total de interações correspondentes a este tipo de par de bases é  $3 \times 5 \times 10^5$ , que é igual a  $15 \times 10^5$  (1.500.000). Se entre A e T existem 2 pontes de hidrogênio, o total de interações referentes a pares de bases deste tipo é  $2 \times 5 \times 10^5$ , que é igual a  $10 \times 10^5$  (1.000.000).

Portanto, o total de pontes de hidrogênio nesta molécula hipotética de DNA é  $(15 \times 10^5) + (10 \times 10^5) = (25 \times 10^5)$ , ou se preferir,  $1.500.000 + 1.000.000 = 2.500.000$ . Parece um número razoável de pontes de hidrogênio, não? Pois é isso! No caso do DNA, o número elevado de pontes de hidrogênio é capaz de conferir estabilidade à molécula.

E você pode estar se perguntando ainda: “E se uma molécula de DNA apresentar maior quantidade de C e G em relação a A e T?” Certamente, a molécula apresentando maior percentual de C e G é mais estável. Mas este assunto será discutido mais adiante.

Para você fixar melhor o que está aprendendo sobre estrutura do DNA, busque a **Figura 4.6**, na qual você encontrará uma representação mais detalhada da estrutura de dupla hélice. Nela, os dois filamentos em sentidos opostos estão claramente representados. Note que as bases ocupam a parte central ou interna da dupla hélice, enquanto as cadeias de açúcar-fosfato, também chamadas “suportes de açúcar-fosfato”, localizam-se na parte externa. Outra característica importante é que o plano formado pelo pareamento das bases é aproximadamente perpendicular ao eixo da hélice.

No modelo original de Watson e Crick, uma volta completa da hélice media 34 Å, correspondendo a 10 pares de bases. Estudos posteriores revelaram que a extensão de uma volta completa é de fato 36 Å, englobando 10,5 pares de bases. Conseqüentemente, a distância entre dois pares de bases é cerca de 3,4 Å. O diâmetro interno ao longo de toda a estrutura é de 20 Å.

Observe que, dentro dos limites do contorno cilíndrico da dupla hélice, encontram-se dois sulcos: o sulco maior, de aproximadamente 23 Å, e o sulco menor, de aproximadamente 13 Å. Estes sulcos são grandes o bastante para acomodar cadeias polipeptídicas, fundamentais nos processos celulares que contam com a participação do DNA, tais como

**REPLICAÇÃO e TRANSCRIÇÃO.**

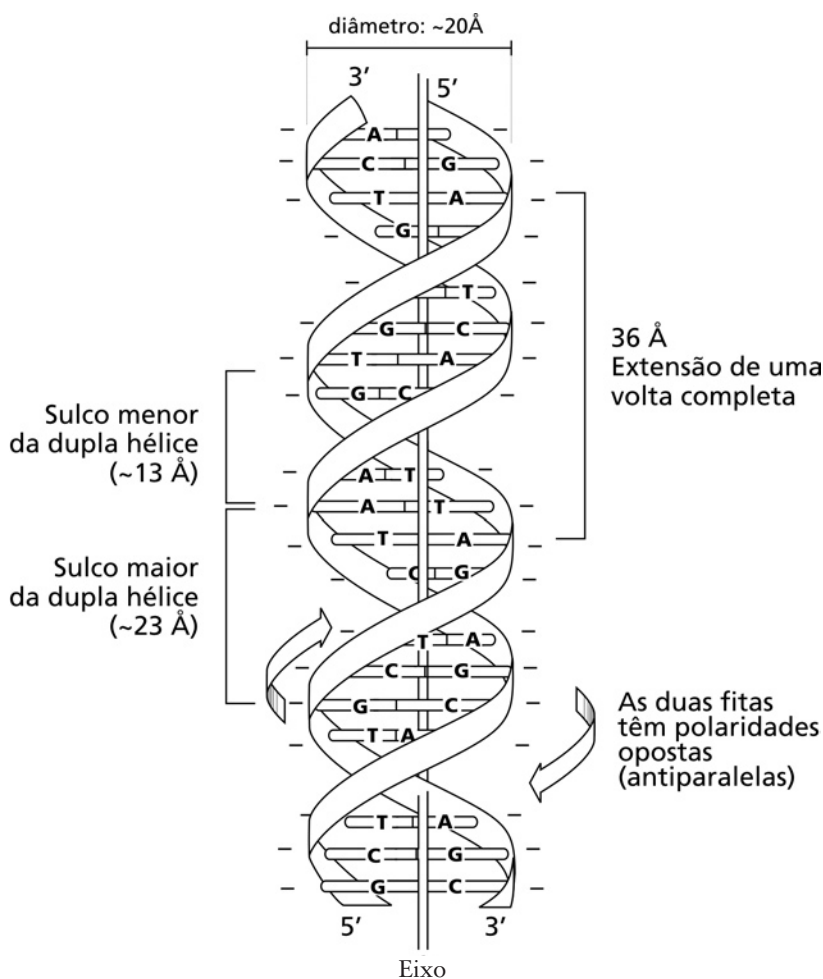
Repare também que ao longo dos filamentos existem sinais negativos que representam os diversos grupamentos fosfatos carregados negativamente (Veja detalhes na **Figura 4.3**). Lembrando a Aula 3, em pH fisiológico, os ácidos nucleicos se comportam como poliânions, o que permite seu fracionamento através da técnica de eletroforese em gel.

#### REPLICAÇÃO

Processo de duplicação do DNA.

#### TRANSCRIÇÃO

Processo de síntese de RNA a partir de um molde do DNA.



**Figura 4.6:** A dupla hélice de DNA em detalhes. Diversas características da molécula estão destacadas, tais como os sulcos maior e menor, a extensão correspondente a uma volta completa da hélice, o diâmetro da molécula, os sentidos dos filamentos, o eixo e os pares de bases na parte central da molécula e os sinais negativos representando os fosfatos carregados negativamente.

## FORÇAS QUE ESTABILIZAM A DUPLA HÉLICE DO DNA

O contato íntimo entre os pares de bases, que estão posicionados em um plano quase perpendicular ao eixo da dupla hélice, é favorecido por interações fracas, que são de suma importância para a estabilização da estrutura tridimensional do DNA. Vamos discutir um pouco as características das bases!!

A ressonância entre os átomos nos anéis da purina e da pirimidina confere caráter parcial de dupla ligação à maioria das ligações. Como consequência, as pirimidinas são moléculas planares e as purinas são aproximadamente planares. A disposição planar

#### **INTERAÇÃO HIDROFÓBICA**

Força que mantém as regiões apolares das moléculas unidas.

#### **INTERAÇÃO DE VAN DER WAALS**

Força de atração entre átomos que estão bem posicionados, isto é, nem muito próximo, nem muito distantes dentro da estrutura de uma molécula.

#### **INTERAÇÃO DIPÓLO- DIPÓLO**

Ocorre quando dois átomos não carregados estão próximos um do outro. Pode ocorrer uma variação nas posições dos elétrons ao redor do núcleo de um dos átomos criando um dipólo elétrico transitório, que, por sua vez, induz um dipólo elétrico oposto, também transitório, no átomo adjacente. Os dois dipólos se atraem muito fracamente, aproximando os núcleos dos átomos.

#### **REPULSÃO ELETROSTÁTICA**

É uma interação iônica caracterizada pela repulsão entre duas cargas de mesmo sinal.

#### **POLIAMINAS**

Compostos com inúmeros grupamentos amino ( $\text{NH}_2$ ). No meio intracelular, comportam-se como moléculas altamente catiônicas, estando em contato direto com o DNA.

dos átomos dos anéis das bases nitrogenadas é importante, pois permite, como será visto mais adiante, o “empilhamento das bases”. Além disso, as bases são hidrofóbicas e praticamente insolúveis em água no pH intracelular. Em valores de pH ácidos ou básicos, as bases se tornam carregadas e sua solubilidade em água aumenta. As **INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS** existentes entre duas ou mais bases em que os planos de seus anéis ficam paralelos, como se fosse um empilhamento de moedas, constituem uma das interações importantes entre as bases dos ácidos nucleicos. O empilhamento das bases também envolve uma combinação de interações dos tipos **VAN DER WAALS** e **DIPÓLO-DIPÓLO**. É importante você saber que o empilhamento de bases contribui para minimizar o contato das bases com água e que as forças de empilhamento estabilizam a dupla hélice quase tanto quanto as pontes de hidrogênio. No entanto, em condições em que as forças de empilhamento não são capazes de compensar a força de **REPULSÃO ELETROSTÁTICA** dos fosfatos, as pontes de hidrogênio garantem a complementaridade das fitas.

Você já viu que os pares de bases se posicionam no interior da dupla hélice ficando, portanto, protegidos da água. Em contrapartida, o suporte açúcar-fosfato, carregado eletricamente e hidrofílico, localiza-se no exterior, em contato direto com a água. A estabilidade da estrutura helicoidal é, de alguma forma, diminuída pela repulsão entre os grupos fosfatos dos filamentos. Por isso, eles devem ser mantidos afastados o máximo possível um do outro para reduzir a repulsão eletrostática. A repulsão também é neutralizada pela presença de íons positivos, tais como cátions divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ , por exemplo), **POLIAMINAS** e polipeptídeos com cadeias laterais carregadas positivamente. De fato, o DNA eucariótico encontra-se em associação com histonas, proteínas carregadas positivamente, no núcleo da célula.

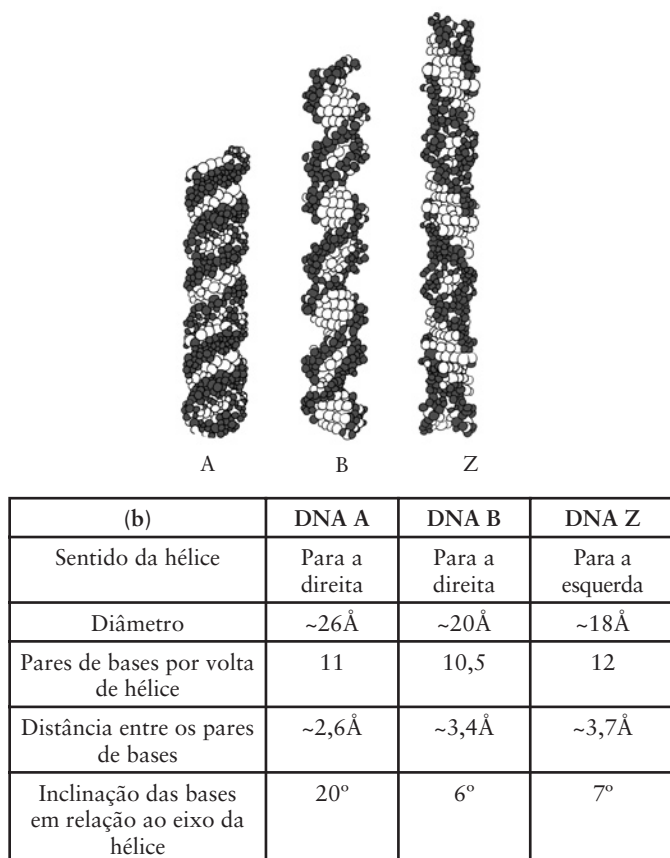
### **OUTRAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DO DNA**

O modelo de estrutura do DNA proposto por Watson e Crick e que foi discutido até agora corresponde à “forma B do DNA”, ou simplesmente “DNA B”. A forma B é a estrutura mais estável para uma sequência aleatória da molécula de DNA em condições fisiológicas e, portanto, é a estrutura de referência para os estudos das propriedades do DNA. Nas aulas de estrutura de cromossomos, você verá que uma molécula de DNA, que possui um comprimento muito maior que o

diâmetro, pode se dobrar sobre si mesma através de torções adicionais e enrolamento, ou até mesmo superenrolamento.

Além da forma B do DNA, outras conformações podem ser observadas em condições diferentes das empregadas nos estudos de Watson e Crick, como, por exemplo, utilizando-se íons positivos distintos em associação com o DNA. As variações estruturais no DNA são resultados de: diferentes conformações assumidas pela desoxirribose, rotação ao redor das ligações contíguas que formam o suporte açúcar-fosfato, e rotação ao redor da ligação C<sub>1'</sub>-N-glicosídica.

Duas estruturas variantes já foram caracterizadas: as formas A e Z do DNA, ou “DNA A” e “DNA Z”. As três formas do DNA, A, B e Z, estão representadas na **Figura 4.7**, juntamente com um resumo de suas propriedades. Algumas diferenças marcantes se referem ao número de pares de bases por volta da hélice, ao posicionamento dos pares de bases em relação ao eixo da hélice e à **DIREÇÃO DO ENROLAMENTO DA HÉLICE**, ou seja, para a esquerda ou para a direita.



**Figura 4.7:** Comparação entre as formas A, B e Z do DNA. (a) Cada uma das estruturas tem 36 pares de bases. (b) A tabela contém um resumo das propriedades das três formas de DNA.

#### DIREÇÃO DO ENROLAMENTO DA HÉLICE

As direções, para a direita e para a esquerda, do enrolamento das hélices estão relacionadas entre si de forma similar ao que ocorre entre as mãos esquerda e direita. Vamos checar!!!

Coloque uma mão ao lado da outra com os polegares para cima e gire os quatro dedos de cada mão. Com relação à mão direita, você verá que seus dedos se direcionarão para a direita, de forma similar ao enrolamento para a direita das hélices. Já com relação à mão esquerda, você perceberá que seus dedos se voltam para a esquerda, de modo análogo ao enrolamento para a esquerda das hélices.



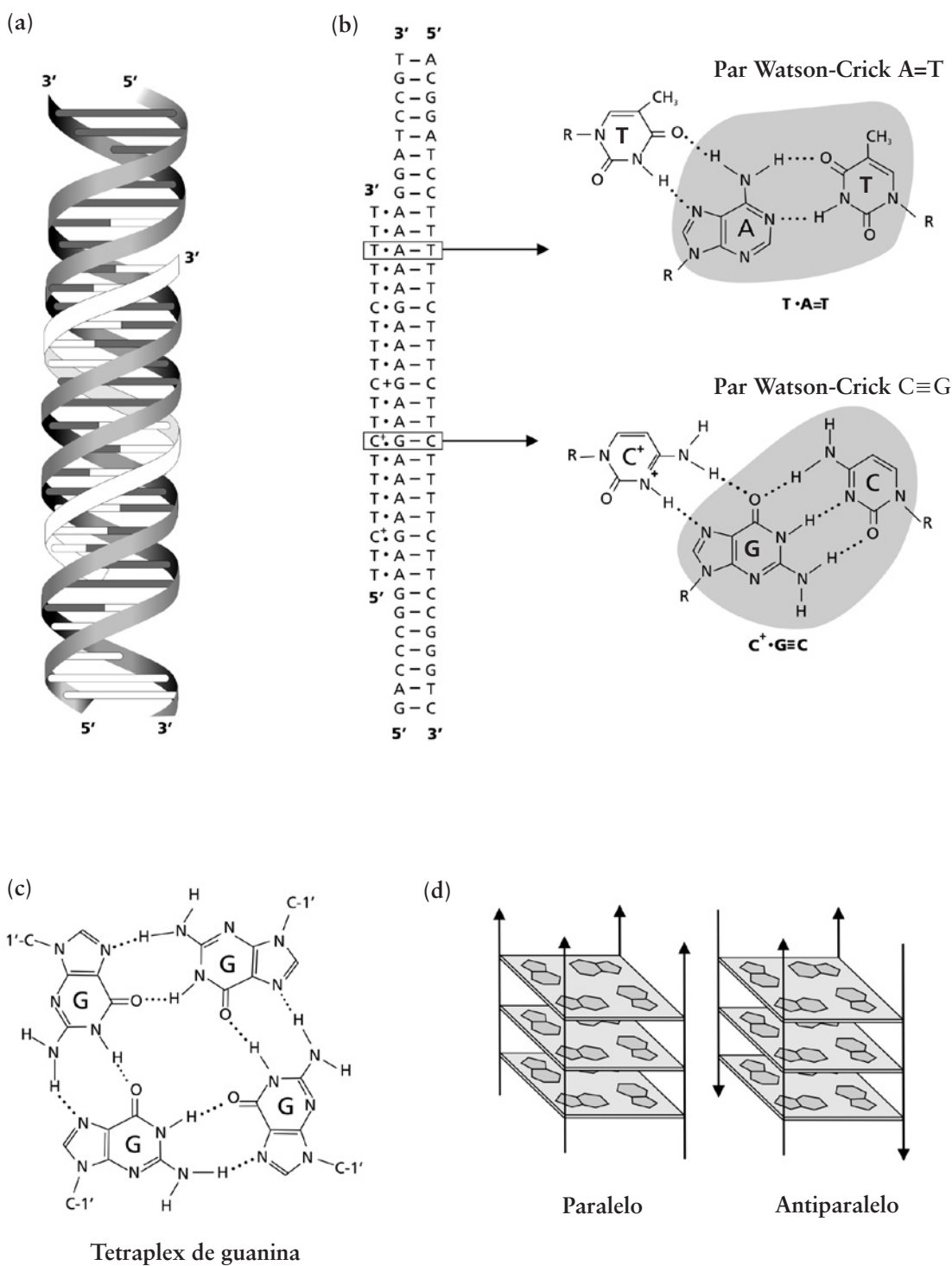
Não se sabe ao certo sobre a ocorrência do DNA A nas células, mas existem fortes evidências a respeito da presença de alguns trechos curtos de DNA Z em eucariotos e procariotos. Apesar de ainda não ter sido confirmado, existe a possibilidade dessas regiões desempenharem algum papel na regulação da expressão de alguns genes (tema do Módulo 3) ou na recombinação genética (tema do Módulo 2).

## VARIAÇÕES ESTRUTURAIS DO DNA

Inúmeras variações estruturais diretamente dependentes de certas seqüências de DNA têm sido observadas nos cromossomos. Muitas delas afetam a função e o metabolismo dos segmentos adjacentes. Elas não serão discutidas nesta aula, mas serão apresentadas ao longo do curso. Portanto, fique atento!

Até agora você estudou as características da estrutura de DNA formada por dois filamentos. Entretanto, é importante que você saiba da existência de estruturas raras do DNA envolvendo 3 ou 4 fitas de DNA, “DNA triplex” e “DNA tetraplex”, respectivamente. Busque a **Figura 4.8**, na qual você encontrará o padrão de pareamento das estruturas triplex e tetraplex de DNA. Mais interessante ainda é que essas variações estruturais muitas vezes surgem em locais onde importantes eventos no metabolismo do DNA, tais como replicação, recombinação e transcrição, iniciam-se ou são regulados.

A “tripla hélice do DNA” se forma pelo pareamento de certas bases com um par Watson-Crick (pares de bases  $A=T$  ou  $C\equiv G$ ). Por exemplo, uma citosina protonada (com carga positiva) pode parear com a guanina do par  $C\equiv G$ , e a timina pode parear com a adenina de um par  $A=T$ . Estudos mais recentes mostram uma possível aplicação para o desenvolvimento de drogas com base em oligonucleotídeos sintéticos, com aproximadamente 15 nucleotídeos em sua extensão, desenhados para uma ligação específica com certa região do DNA dupla hélice. A terceira fita se acomoda no sulco maior formando pontes de hidrogênio específicas, como você pode ver na **Figura 4.8**, impedindo, assim, o acesso de proteínas que, por exemplo, ativariam ou reprimiriam a expressão de um gene.

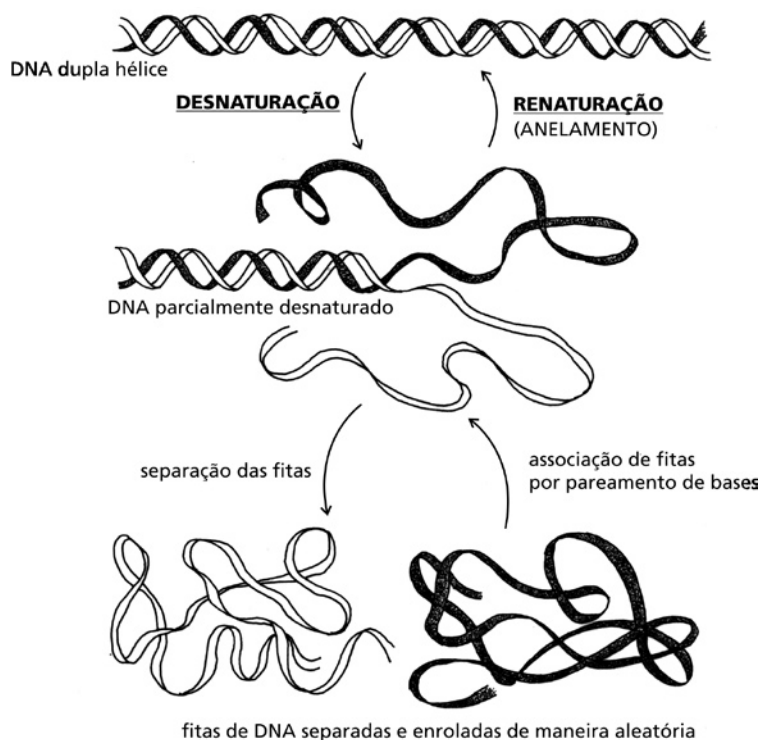


**Figura 4.8:** Estruturas de DNA contendo três ou quatro filamentos. (a) Modelo de um DNA tripla hélice. (b) Diagrama esquemático de um complexo de tripla hélice, com destaque para as pontes de hidrogênio envolvidas na formação da tripla hélice. \*T indica o sítio de ligação da terceira hélice. (c) Padrão de pareamento de bases na estrutura tetraplex de guanina. (d) Possíveis variantes na orientação das fitas em um tetraplex G.

## DESNATURAÇÃO E RENATURAÇÃO DO DNA

Uma solução de DNA em sua estrutura nativa apresenta-se viscosa em pH 7,0 a 25°C. Quando esta solução é submetida a extremos de pH ou a temperaturas acima de 80°C, sua viscosidade diminui drasticamente, indicando a mudança física do DNA. Você já ouviu falar em desnaturação de proteínas, não? Pois então, o calor e os extremos de pH também causam a “desnaturação do DNA dupla hélice”.

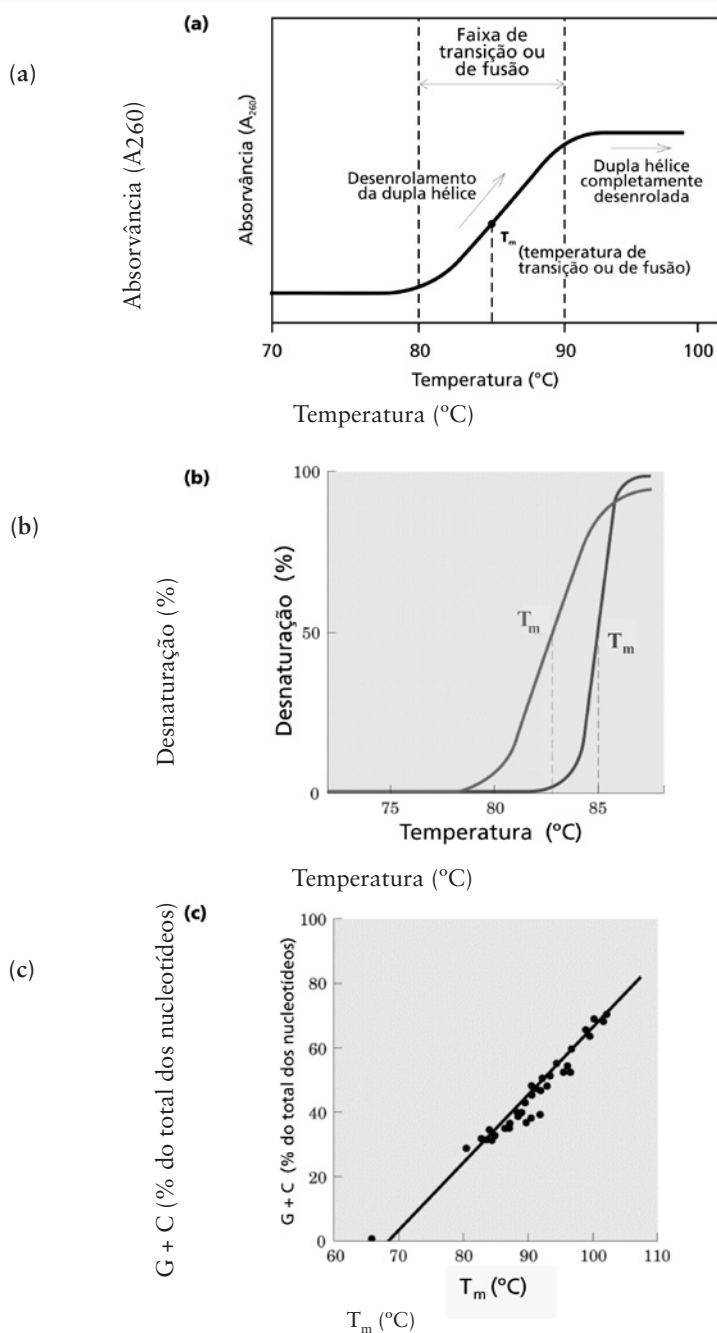
Observe, na **Figura 4.9**, uma representação esquemática do processo de desnaturação e renaturação do DNA. Na desnaturação, a estrutura nativa de uma molécula de DNA dupla hélice pode ser rompida, por calor ou extremos de pH, resultando inicialmente em um DNA parcialmente desnaturado até a separação total das duas fitas. As fitas simples, separadas, assumem, então, uma conformação aleatória. Este processo, como já mencionado, altera as propriedades físicas do DNA, tal como a viscosidade da solução de DNA, que diminui drasticamente. Uma outra mudança observada durante o processo de desnaturação é o aumento considerável da quantidade de luz absorvida a 260nm da solução (**Figura 4.10.a**). Veja uma explicação adicional no quadro a seguir.



**Figura 4.9:** Desnaturação e renaturação (anelamento) do DNA.

Quanto maior for a organização estrutural das bases nitrogenadas e seus derivados, menos luz será absorvida. Isto ocorre por causa da proximidade entre as bases empilhadas no ácido nucléico. Portanto, os nucleotídeos livres absorvem mais luz que os polímeros de DNA ou RNA fita simples, que, por sua vez, absorvem mais luz que uma molécula de DNA dupla hélice. Por exemplo, três soluções de mesma concentração (50  $\mu\text{g/mL}$ ) de DNA fita dupla, DNA fita simples e bases livres, apresentam os seguintes valores de absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ):

Tipo de Solução	$A_{260}$
DNA dupla fita	1,00
DNA fita simples	1,37
Bases livres	1,60



**Figura 4.10:** Desnaturação do DNA por calor. (a) Determinação experimental da desnaturação do DNA, através de medida de absorvância a 260 nm *versus* temperatura. (b) Curva de desnaturação ou de fusão de dois tipos de DNA. A temperatura no ponto médio da transição ( $T_m$ ) é o ponto de fusão e depende do pH, da força iônica, do tamanho e da composição de bases do DNA. (c) Relação entre  $T_m$  e o conteúdo de GC de um DNA.

Diferentemente das proteínas, que raramente se renaturam, o DNA pode ser renaturado. Ao se retirar o agente causador do processo de desnaturação, as fitas simples de DNA tendem a parear suas bases reconstituindo a estrutura de dupla hélice. Esse processo é chamado “renaturação” ou “anelamento” das fitas e está representado também na **Figura 4.9**. Quando um segmento de 12 ou mais resíduos de nucleotídeos ainda mantém os dois filamentos unidos, a renaturação ocorre rapidamente em uma única etapa. Entretanto, se as fitas estiverem completamente separadas, a renaturação ocorre em duas etapas. A primeira etapa é lenta, pois depende do “encontro” ao acaso das fitas para formar um segmento curto de dupla hélice complementar.

Na segunda etapa, muito mais rápida que a primeira, as bases desemparelhadas formam, sucessivamente, os pares de bases, se assemelhando a um “zipper”.

O processo de desnaturação do DNA é dito cooperativo, uma vez que a destruição de uma parte da estrutura desestabiliza a restante. Esta característica pode ser melhor visualizada com as curvas apresentadas nas **Figura 4.10.a** e **4.10.b**. A temperatura em que se atinge o ponto médio da desnaturação total de um DNA é chamada “temperatura de fusão” ou “temperatura de transição”, sendo representada por  $T_m$  (do inglês *melting temperature*). A estabilidade do DNA dupla hélice e, portanto, os valores de  $T_m$  dependem de diversos fatores, tais como natureza do solvente, tipo e concentrações de íons na solução e pH.

É importante que você saiba que os valores de  $T_m$  diferem entre diferentes tipos de DNA (**Figura 4.10.b**). Se você reparar na **Figura 4.10.c**, o valor de  $T_m$  aumenta linearmente com o percentual molar do par de bases C≡G, indicando a maior estabilidade desse pareamento, formado por três pontes de hidrogênio, em relação ao par de base A=T, formado por apenas duas pontes de hidrogênio. Você já estudou isso, lembra?

Como já foi dito anteriormente, a diminuição da temperatura promove a renaturação das fitas de DNA resultantes do processo de desnaturação. As condições em que isso ocorre são conhecidas como condições de anelamento. Essa peculiaridade representa uma vantagem em diversas metodologias empregadas na tecnologia de DNA recombinante, tais como seqüenciamento do DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*), hibridização de dois DNAs diferentes, ou de DNA e RNA, dentre outras. Essas técnicas e suas aplicações em diferentes áreas serão discutidas em uma disciplina eletiva.

**RESUMO**

Nesta aula, você aprendeu um pouco mais sobre o DNA. Esta molécula, que parece simples por apresentar poucos componentes, apresenta uma estrutura tridimensional complexa. O modelo proposto por Watson e Crick consiste em duas cadeias polinucleotídicas, também chamadas fitas ou filamentos, dispostas sob a forma de hélice ao redor de um eixo comum. Na dupla hélice, os filamentos são anti-paralelos e complementares. É importante lembrar que este modelo foi proposto com base em experimentos com o DNA, principalmente os realizados por Chargaff, em relação à composição de bases nitrogenadas, e por Franklin e Wilkins, sobre aspectos estruturais da molécula utilizando difração de raios-X. Interações do tipo pontes de hidrogênio são responsáveis pela formação dos pares de bases  $A=T$  e  $C\equiv G$ . Entretanto, outras interações fracas são importantes para a estabilidade da molécula. As bases nitrogenadas se posicionam na parte central da dupla hélice, enquanto o suporte de açúcar-fosfato se localiza na parte externa. A complementaridade das bases é importante para diversos processos biológicos envolvendo o DNA, tais como a replicação e a transcrição. O modelo de DNA dupla hélice corresponde ao DNA B. Em condições diversas, o DNA pode adquirir outras conformações espaciais que correspondem ao DNA A e ao DNA Z. Algumas variações estruturais dependentes de seqüências específicas do DNA já foram observadas em cromossomos, destacando-se estruturas raras, tais como o DNA triplex e o DNA tetraplex. O aumento de temperatura e os valores extremos de pH promovem a desnaturação do DNA dupla hélice, com separação parcial ou total das fitas. Ao se retirar o agente causador desse processo, o DNA readquire sua estrutura tridimensional. As condições de renaturação, também conhecidas como condições de anelamento, representam vantagens em diversas metodologias empregadas na Engenharia Genética.

## EXERCÍCIOS

1. Discuta os aspectos funcionais do DNA, ressaltando as características que essa molécula deve apresentar para desempenhar seu papel biológico.
2. Discuta as características do modelo estrutural do DNA proposto por Watson e Crick.
3. Uma das fitas do DNA dupla hélice apresenta a seguinte sequência:

5' GCGCAATATTCTCAAAATATTGCGC 3'

Escreva a sequência de bases da fita complementar, especificando as extremidades.

4. Represente os pares de bases presentes no DNA dupla hélice, destacando as interações existentes entre eles.
5. Desenhe as fórmulas estruturais de: desoxirribose, guanina e fosfato. Classifique-as quanto à solubilidade em água (do mais ao menos solúvel). Como a diferença de solubilidade entre esses compostos interfere na estrutura tridimensional do DNA fita dupla?
6. O DNA de uma nova espécie de bactéria foi isolado e a composição de pares de bases foi determinada. Sabendo que o conteúdo do par de bases C≡G encontrado foi 42%, quais são os percentuais de cada uma das bases, A, C, G e T, nesta molécula de DNA?
7. Amostras de DNA foram isoladas de duas espécies, X e Y, não identificadas. O DNA da espécie X contém 35% de adenina, enquanto o DNA da espécie Y contém apenas 17% de adenina. Pergunta-se:
  - a) Determine as proporções relativas que você espera encontrar de adenina, citosina, guanina e timina nas duas amostras de DNA.
  - b) Que hipóteses você utilizou para determinar os percentuais de bases nas amostras de DNA?
  - c) Sabendo que uma das espécies foi isolada de uma corrente de água quente (64°C), sugira qual dos DNAs foi extraído dessa bactéria. Explique.
8. O que significa o aumento de absorção de luz UV (260nm) de uma solução de DNA quando ela é aquecida?

### **AUTO-AVALIAÇÃO**

O principal objetivo das questões desta aula é a fixação do conteúdo visto. Após resolvê-las e conferir as respostas, caso ainda tenha dúvidas em relação aos conceitos estudados, reveja a aula ou peça ajuda aos tutores no pólo.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Na Aula 5 você estudará as características químicas e estruturais do RNA. As funções que esses compostos desempenham na célula também serão discutidas.





## RNA – aspectos funcionais e estruturais

# AULA 5

## objetivo

Ao final desta aula, você terá a oportunidade de:

- Descrever os aspectos funcionais e estruturais do RNA.

### Pré-requisito

Para acompanhar mais facilmente esta aula, é importante que você reveja alguns conceitos de Química e Bioquímica e, principalmente, a Aula 3 de nossa disciplina.

## APRESENTAÇÃO

Na Aula 4, você teve a oportunidade de estudar os aspectos funcionais e estruturais do DNA. Além disso, você viu que, com base na estrutura de DNA dupla hélice, em particular de uma das peculiaridades dessa estrutura – complementaridade de bases –, foram propostos diversos mecanismos associados a processos biológicos envolvendo a participação do DNA. Nós, os biólogos moleculares, acreditamos que a Biologia Molecular de fato se iniciou com a proposição do modelo de estrutura do DNA. Nesta aula, para concluir o tema “ácidos nucleicos”, você verá que o RNA é bastante distinto do DNA no que diz respeito aos aspectos funcionais e estruturais. Entretanto, assim como para o DNA, a estrutura do RNA está intrinsecamente associada à função exercida por esta molécula.

## ASPECTOS FUNCIONAIS DO RNA

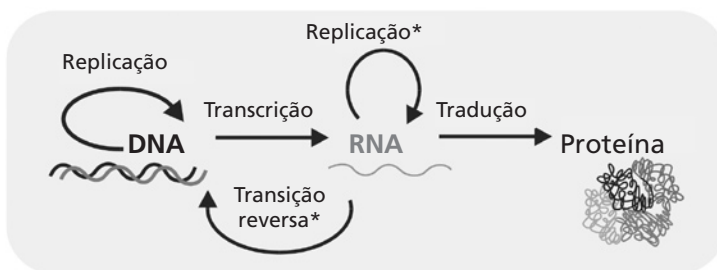
O experimento de Fraenkel-Conrat e Singer, em 1957, citado na Aula 2, foi importante no sentido de identificar o RNA como material genético de um vírus que infecta plantas, o TMV. Você se lembra? O papel do RNA como material genético se restringe a grupos específicos de vírus. Além da função de armazenamento de informação genética, funções variadas podem ser exercidas por diferentes moléculas de RNA, sendo que a principal delas está associada a sua participação no “fluxo da informação genética”. O que será isso?

Toda a informação armazenada na molécula de DNA, que sabemos não ser pouca, em algum momento tem de ser utilizada, seja para determinar o crescimento de uma célula, seja para determinar fenótipos mais evidentes, como aqueles que diferenciam uma célula da outra ou mesmo um organismo complexo do outro. Os fenótipos distintos só se manifestam por causa da produção de proteínas específicas. Essas proteínas, por sua vez, são produzidas de acordo com a informação armazenada nos genes. Portanto, existe uma relação direta entre o que está contido em um gene e o tipo de proteína sintetizada. Ao processo global, desde a utilização da informação contida no gene (DNA) até a síntese de uma molécula funcional, chamamos fluxo da informação genética. Podemos dizer, ainda, que os genes são perpetuados como seqüências de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, mas funcionam após serem expressos sob a forma de proteínas.

Considerando o DNA de eucarioto, que está localizado no núcleo, e sabendo que a síntese de proteínas ocorre nos ribossomos presentes no citoplasma, é bastante provável que exista uma molécula, diferente do DNA, capaz de carrear a mensagem genética do núcleo para o citoplasma, você não acha? Ainda no início da década de 1950, o RNA se mostrou um forte candidato para desempenhar esta função, uma vez que já se sabia que as moléculas de RNA podem ser encontradas tanto no núcleo como no citoplasma, e que o aumento da síntese protéica é acompanhado pelo aumento da quantidade de RNA citoplasmático e do aumento de sua taxa de renovação também. Hoje em dia, sabe-se que o RNA desempenha não só essa função como tantas outras envolvidas na expressão da informação genética da célula.

O conhecimento acumulado ao longo dos últimos 50 a 60 anos de pesquisa nos permite dizer que a expressão de um gene sob a forma de proteínas envolve duas etapas distintas: a transcrição, que se refere ao conjunto de reações envolvidas na síntese de RNA de acordo com a seqüência de bases do DNA, e a tradução, que consiste em um conjunto de reações envolvidas na síntese de proteína, sendo que a ordem dos aminoácidos na proteína formada é determinada pela ordem de bases nitrogenadas presentes no RNA sintetizado.

Na **Figura 5.1**, estão representados os três principais processos envolvidos na perpetuação do material genético e no fluxo da informação genética. A replicação, assunto do Módulo 2, é responsável pela herança do material genético, DNA ou RNA. A transcrição (tema do Módulo 3) e a tradução (tema do Módulo 4) são responsáveis pela conversão da informação contida no DNA em proteínas. Também está representada na **Figura 5.1** a transcrição reversa, processo característico de alguns vírus de RNA, como, por exemplo, o HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), agente causador da AIDS (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Após a infecção da célula hospedeira, o material genético desse vírus, o RNA, é convertido a DNA, que, então, se integra ao genoma do hospedeiro para ter seus genes expressos e garantir a produção das moléculas necessárias à formação de novas partículas virais.



**Figura 5.1:** Perpetuação do material genético, DNA ou RNA, por replicação, e fluxo da informação genética, que engloba transcrição e tradução.

\* Etapas que ocorrem apenas em certos vírus de RNA, conforme explicado no texto.

Quando a informação contida em um gene (DNA) é utilizada para a síntese de uma molécula funcional, dizemos que o gene foi expresso, ou estamos tratando da expressão gênica. Podemos dizer que o RNA atua como um intermediário nesse processo, por usar a informação codificada no DNA para especificar a sequência de aminoácidos na proteína funcional, ou ainda que o RNA serve de molde para a síntese de proteínas. O RNA que desempenha esta função é o RNA mensageiro (mRNA, do inglês *messenger RNA*). Outros dois tipos principais de RNA participam desse processo: o RNA de transferência (tRNA, do inglês *transfer RNA*) e o RNA ribossomal (rRNA, do inglês *ribosomal RNA*). Vamos ver qual a importância de cada um deles!

A síntese de uma cadeia polipeptídica ocorre nos ribossomos, que consiste em uma associação de rRNA e proteínas. Os aminoácidos que fazem parte da cadeia polipeptídica nascente são trazidos para o ribossomo, ligados covalentemente ao tRNA. A ordem dos aminoácidos no polipeptídeo é determinada pela sequência específica de bases do mRNA. A síntese de proteína requer, de fato, uma relação interdependente entre o mRNA, o molde da informação, o tRNA, a molécula transportadora de aminoácido, e o rRNA, que faz parte da maquinaria sintética. Assim, para que a síntese protéica ocorra no momento certo durante o ciclo de vida de uma célula, as sínteses de mRNA, tRNA e rRNA devem estar em perfeita coordenação com a resposta celular aos ambientes intra e extracelulares.

Na mitocôndria, onde também ocorre síntese de proteína, encontram-se os correspondentes aos três tipos principais de RNA já mencionados. Para diferenciá-los, os RNAs mitocondriais são chamados mt mRNA (RNA mensageiro mitocondrial), mt tRNA (RNA de transferência mitocondrial) e mt rRNA (RNA ribossomal mitocondrial).

Até o momento, foi enfatizada a utilização da informação genética para a síntese de proteínas, que, aliás, será o tema das aulas dos Módulos 3 e 4. Contudo, você deve saber que o produto final de alguns poucos genes é o próprio RNA. A análise da sequência de bases do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, revelou a existência de aproximadamente 750 genes (cerca de 10% do número total de genes da levedura) que produzem RNA como produto final. Esses RNAs, como as proteínas, servem como componentes enzimáticos e estruturais para uma variedade de processos na célula.

Já foram apresentados a você o rRNA e o tRNA. Dentre outros tipos de RNA encontrados na célula, destacam-se: o RNA heterogêneo nuclear (hnRNA, do inglês *heterogeneous nuclear RNA*), o RNA nuclear pequeno (snRNA, do inglês *small nuclear RNA*), o RNA nucleolar pequeno (snoRNA, do inglês *small nucleolar RNA*) e o RNA citoplasmático pequeno (scRNA, do inglês *small cytoplasmic RNA*).

Para facilitar o aprendizado, no **Quadro 5.1**, você encontra os principais tipos de RNAs produzidos nas células e as funções atribuídas a cada um deles. Ao observar o quadro, reflita sobre a infinidade de funções que os RNAs podem desempenhar.

**Quadro 5.1:** Principais tipos de RNAs e suas funções na célula

Tipo de RNA	Função
mRNAs (RNAs mensageiros)	Transferência de informação genética do núcleo ao citoplasma ou do gene para o ribossomo.
tRNAs (RNAs de transferência)	Transferência dos aminoácidos para o complexo mRNA-ribossomo de acordo com a sequência de bases do mRNA.
rRNAs (RNAs ribossomais)	Parte integrante da estrutura básica dos ribossomos.
hnRNAs (RNAs heterogêneos nucleares)	Precursos de mRNA e outros RNAs.
snRNAs (RNAs nucleares pequenos)	Participação em uma variedade de processos nucleares, incluindo <i>splicing</i> de pré-mRNAs (Tema do Módulo 3).
snoRNAs (RNAs nucleolares pequenos)	Processamento e modificações químicas do rRNAs.
scRNAs (RNAs citoplasmáticos pequenos)	Seleção de proteínas para excreção.
Outros RNAs	Participação em diversos processos celulares, incluindo síntese de telômero, inativação do cromossomo X, transporte de proteínas para o interior do retículo endoplasmático e sinalização de moléculas de RNA para que sejam degradadas.

É importante que você saiba também que o RNA é a única macromolécula conhecida capaz de atuar no armazenamento e na transmissão de informação genética, além de exercer atividade catalítica. Você já estudou enzimas na Bioquímica, não é? Por muito tempo pensou-se que apenas as proteínas eram capazes de exercer atividade catalítica. A descoberta dos RNAs catalíticos, ou “ribozimas”, causou uma revolução na ciência, e diversos estudos relacionando as funções desempenhadas pelos RNAs e a origem da vida têm sido realizados desde então.

As ribozimas apresentam variações consideráveis de tamanho, podem ser constituídas por um ou mais filamentos e, de maneira análoga às enzimas, sua estrutura tridimensional é importante para sua função. Falaremos um pouco mais sobre as ribozimas nas aulas do Módulo 3.



#### RNAs que atuam como enzimas

Thomas Cech e colaboradores, em 1982, revelaram que alguns RNAs exibem atividade catalítica, comportando-se como as tradicionais enzimas de origem protéica. Esses RNAs receberam o nome de “ribozimas” e esse trabalho rendeu um prêmio Nobel. As ribozimas atuam no processamento de mRNAs e são capazes de cortar e remover seqüências específicas de sua própria molécula ou de outros RNAs.

## CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO RNA

Você viu na Aula 3 que RNA e DNA são quimicamente similares. RNA também é um polímero linear não ramificado de nucleotídeos, os ribonucleotídeos, lembra? Para recordar as principais diferenças entre RNA e DNA, observe o **Quadro 5.2**.

**Quadro 5.2:** Principais diferenças entre DNA e RNA

	DNA	RNA
Nucleotídeo	Desoxirribonucleotídeo	Ribonucleotídeo
Açúcar	Desoxirribose	Ribose
Bases purínicas	Adenina e guanina	Adenina e guanina
Bases pirimidínicas	Citosina e timina	Citosina e uracila
Principal função	Armazenamento de informação genética	Transferência de informação genética

Embora o RNA seja um dos componentes mais estáveis da célula, não é tão estável quanto o DNA. A presença do grupo 2'-hidroxila adjacente faz com que a ligação fosfodiéster do RNA seja mais susceptível às hidrólises química e enzimática do que a ligação fosfodiéster do DNA.

Essa característica faz com que alguns RNAs, como os mRNAs de bactérias, sejam sintetizados, usados e degradados em minutos, embora outros, como os rRNAs, sejam muito mais estáveis metabolicamente.

Você também viu, na Aula 4, que o estudo de composição de bases no DNA feito por Chargaff, no final da década de 1940, em muito contribuiu para o modelo de DNA dupla hélice. A complementaridade de bases neste modelo justifica a correspondência de purinas e pirimidinas encontrada por Chargaff. Já os RNAs de eucariotos, cujo tamanho varia de aproximadamente 65 a mais de 200.000 nucleotídeos, apresentam seqüências de bases complementares às seqüências de porções específicas de somente uma fita de DNA. O resultado disso é que todos os RNAs celulares analisados até o momento são lineares e apresentam uma única cadeia polinucleotídica, ou seja, uma única fita. Assim, diferentemente da composição de bases do DNA, as razões entre A + U e C + G nos RNAs não são iguais, e a regra de Chargaff não se aplica. O mesmo ocorre com moléculas de DNA formadas por um único filamento, como é o caso do material genético de alguns bacteriófagos. Em contrapartida, se estivermos tratando de duas fitas de RNA, como o genoma de certos vírus de RNA, a complementaridade pode existir e a regra de Chargaff pode ser aplicada.

## ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS PRINCIPAIS TIPOS DE RNA

Você agora deve estar imaginando quais os tipos de estruturas que uma molécula de RNA pode assumir. Como essa molécula é constituída por um único filamento, parece óbvio que ela não forme uma dupla hélice extensa. De fato, a estrutura do RNA é o resultado do pareamento **INTRAMOLECULAR (OU INTRACADEIA)** de bases em regiões relativamente pequenas da molécula.

Diferentemente do DNA dupla hélice, o RNA não apresenta estrutura secundária regular e simples que sirva como referência. As estruturas tridimensionais de muitos RNAs, assim como das proteínas, são complexas e únicas. Para a estrutura do RNA, o empilhamento de bases, que atua restringindo as possíveis conformações da molécula, é mais importante para a determinação de interações **INTER E INTRAMOLECULARES** do que a ponte de hidrogênio. As interações de empilhamento de bases desempenham, portanto, um importante papel na estabilização da conformação da molécula.

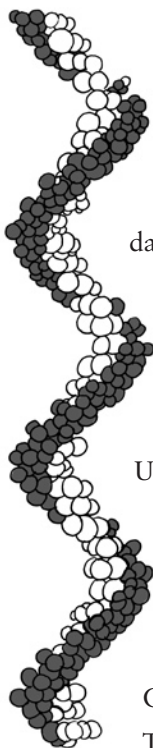
### INTRAMOLECULAR (OU INTRACADEIA)

O termo intramolecular (ou intracadeia) se aplica a processos que ocorrem entre diferentes regiões de uma mesma molécula ou de uma mesma cadeia, quando se trata de um polímero.

### INTERMOLECULAR (OU INTERCADEIA)

O termo intermolecular (ou intercadeia) se aplica a processos que ocorrem entre regiões de duas ou mais moléculas diferentes ou de duas ou mais cadeias, quando se trata de um polímero.





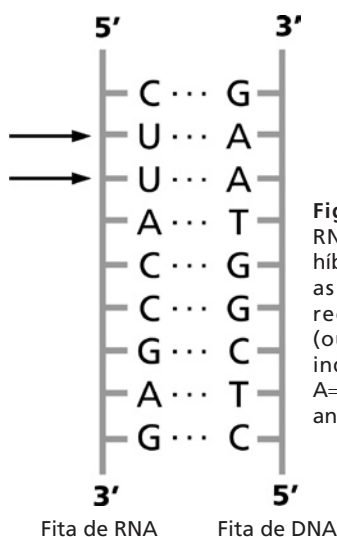
**Figura 5.2:** Padrão de empilhamento típico de um RNA fita simples. As bases estão representadas em branco e o suporte açúcar-fosfato em cinza.

A estrutura helicoidal também existe no RNA (observe a Figura 5.2) mesmo na ausência de pareamento extensivo de bases do tipo Watson-Crick, ou seja,  $A=T$  e  $C\equiv G$ . A estrutura helicoidal ocorre, principalmente, por causa das forças de empilhamento de bases, que são mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina ou entre duas pirimidinas.

As seqüências complementares na molécula de RNA podem produzir estruturas ainda mais complexas. Uma região do RNA pode formar pares de bases com regiões complementares tanto de RNA como de DNA. Repare, na Figura 5.3, um híbrido RNA-DNA formado entre regiões complementares de cada uma das moléculas. O pareamento de bases segue o padrão descrito para o DNA: G pareia com C e A pareia com U (ou com um eventual T presente em alguns RNAs). O pareamento entre G e U, que é raro em DNA, também é muito comum em RNA. Vale

ressaltar, aqui, que o **PAR DE BASES G•U** só ocorre em fitas de RNA já sintetizadas, uma vez que as RNA polimerases (enzimas responsáveis pela síntese de RNA) não inserem U em local oposto ao molde G ou vice-versa. Isto será detalhadamente discutido no Módulo 3. Aguarde!!!

Uma outra característica importante é que as duplas hélices formadas entre RNAs ou entre RNA e DNA são sempre antiparalelas, assim como no DNA. Note a orientação das fitas na Figura 5.3.



**Figura 5.3:** Um híbrido RNA-DNA. A formação do híbrido só é possível quando as moléculas apresentam regiões complementares (ou homólogas). As setas indicam os pares de bases  $A=U$ . Repare que as fitas são antiparalelas.

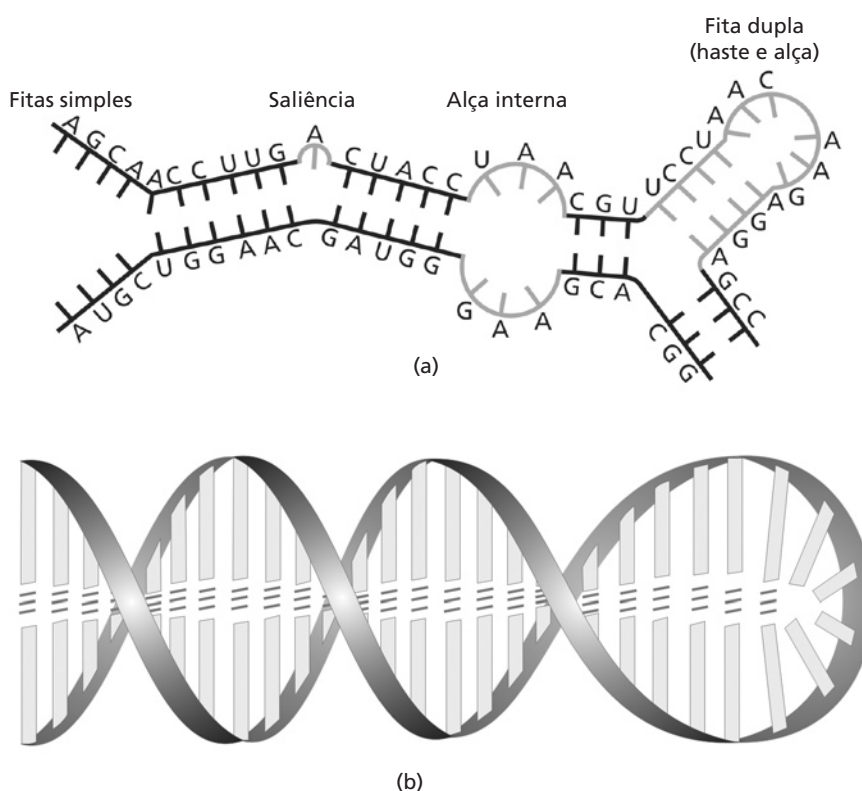
#### PAR DE BASES G•U

Ao longo do curso, a representação de pares de bases que não sejam os pares Watson-Crick (formados entre as bases A e T e entre as bases C e G) será feita com o símbolo (•) entre os símbolos das bases envolvidas no pareamento. Esta notação visa à diferenciação entre um par de bases, como o par G•U, e uma seqüência de bases adjacentes em uma cadeia polinucleotídica, como a seqüência GU.



Um “híbrido” ou um “duplex parcial” é a estrutura formada quando dois DNAs ou dois RNAs diferentes, ou, até mesmo, um RNA e um DNA apresentam homologia, ou seja, regiões complementares.

A estrutura de dupla fita nas regiões que apresentam complementaridade de bases é uma dupla hélice voltada para a direita, como a da forma A do DNA. Lembra das outras estruturas do DNA? As quebras na hélice regular da forma A do RNA são causadas por bases mal emparelhadas ou desemparelhadas, e geram alças internas (*internal loops*, em inglês) e saliências (*bulges*, em inglês). As regiões helicoidais duplas no RNA são chamadas hastes e alças, ou pelo nome em inglês *hairpin*. Essa última estrutura apresenta variações em relação ao comprimento da região com pareamento de bases e o tamanho e o número de alças não pareadas. Você visualizará melhor essas estruturas na Figura 5.4.



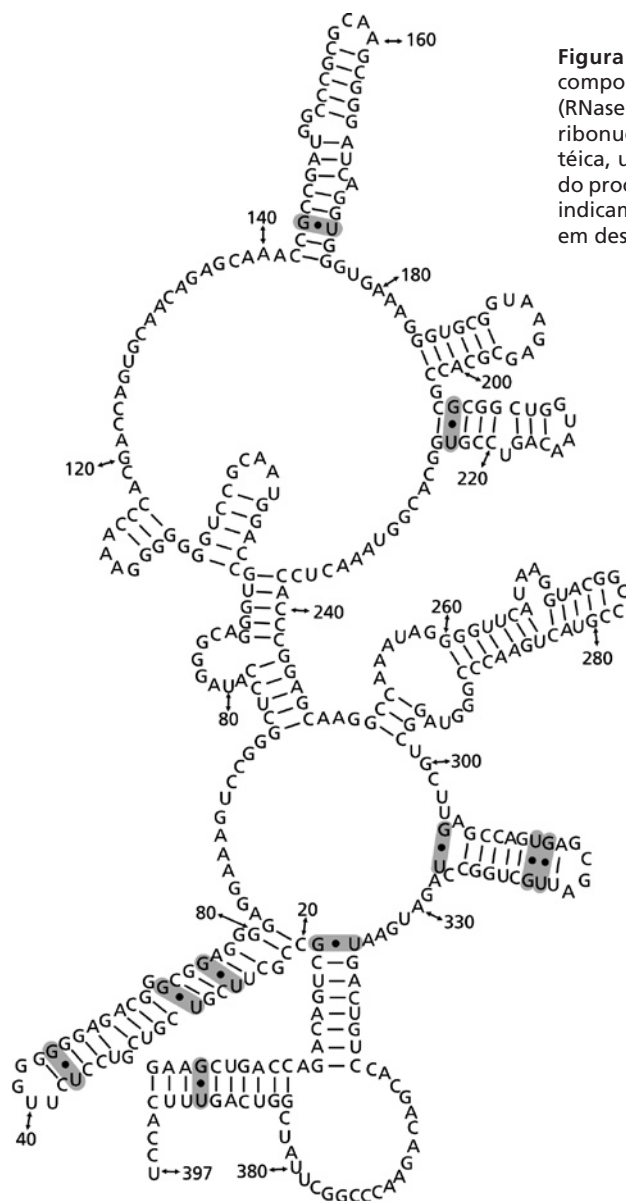
**Figura 5.4:** Estruturas secundárias do RNA. (a) Saliência, alças internas, hastes e alças. (b) Hélice enrolada para a direita, forma A, associada a regiões de pareamento.

Muitos RNAs têm capacidade de formar estruturas helicoidais geradas por pareamentos de bases em uma grande extensão de sua cadeia. Observe, por exemplo, a **Figura 5.5**, na qual está representada a possível estrutura secundária de um RNA, com destaque para o par G U. Repare as estruturas secundárias, haste e alça, saliências e alças internas, distribuídas ao longo do filamento de RNA. Outros pareamentos também podem ocorrer entre diferentes regiões da molécula, resultando em uma estrutura tridimensional característica e, certamente, fundamental para a função desempenhada.

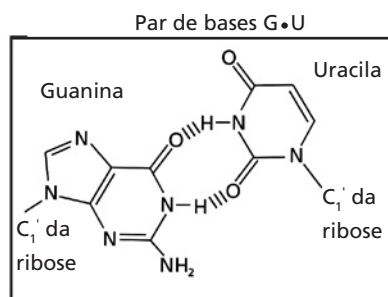
#### RIBONUCLEASE

Enzima que catalisa a hidrólise do RNA.

Vamos olhar, agora, as estruturas dos principais tipos de RNA tentando associá-las às suas funções!



**Figura 5.5:** Possível estrutura secundária do componente de RNA da enzima **RIBONUCLEASE P** (RNase P) de *Escherichia coli*. A RNase P é uma ribonuclease que contém, além da parte proteica, uma parte integrante de RNA e participa do processamento dos tRNAs. As caixas em cinza indicam o par não tradicional G U, representado em destaque separadamente.



## RNAs de transferência (tRNAs)

Aproximadamente 15% do total de RNA celular correspondem aos tRNAs. Para desempenhar seu papel na síntese de proteínas, os tRNAs precisam desempenhar duas funções. Primeiramente, as moléculas de tRNA ativam os aminoácidos, o que favorece energeticamente a formação das ligações peptídicas. Os aminoácidos ativados são, então, transportados para os ribossomos, onde são transferidos para a cadeia polipeptídica nascente. A segunda função dos tRNAs é reconhecer a informação contida no mRNA, mais especificamente nos **CÓDONS** do mRNA, assegurando que o aminoácido correto seja incorporado na cadeia peptídica crescente. Maiores detalhes sobre a participação dessas moléculas na síntese protéica você só verá no Módulo 4. Nesta aula, apenas algumas peculiaridades serão abordadas para que você entenda que duas características estruturais dos tRNAs estão diretamente associadas a estas funções.

### CÓDON

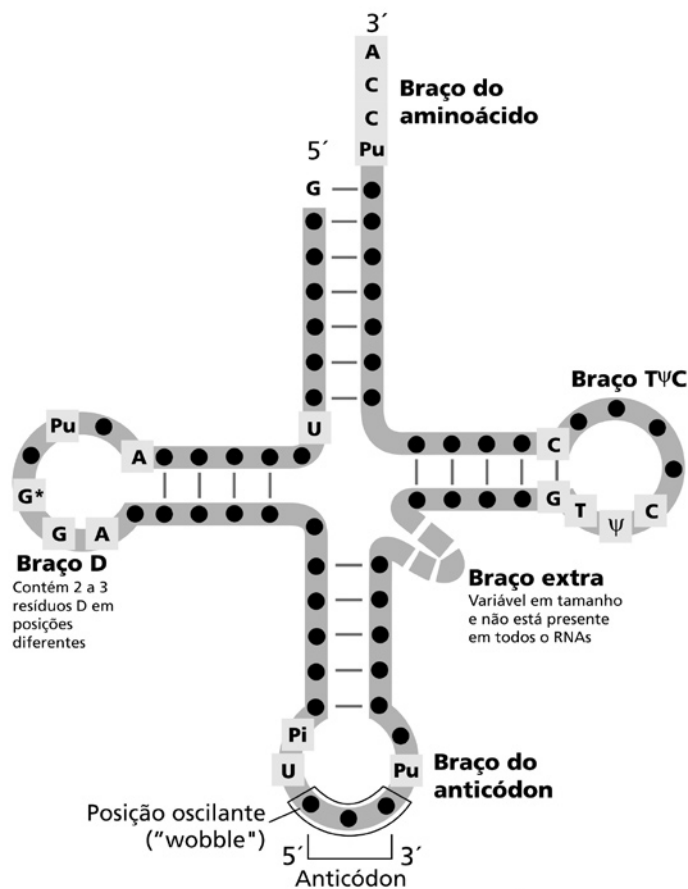
Uma sequência de três nucleotídeos adjacentes em um ácido nucléico que codifica um aminoácido específico.

Sabe-se que cada tRNA pode transferir apenas um aminoácido. Entretanto, embora apenas 20 aminoácidos sejam utilizados na síntese de proteínas, a variedade de tRNAs na célula é grande, existindo pelo menos um tRNA específico para cada um dos aminoácidos incorporados numa cadeia polipeptídica.

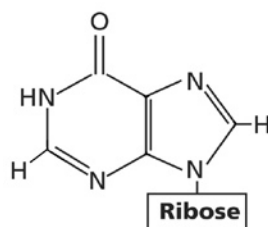
Os tRNAs são polirribonucleotídeos relativamente pequenos, apresentando entre 73 e 93 ribonucleotídeos, o que corresponde a uma faixa de peso molecular de 24.000 a 31.000. As seqüências de todas as moléculas de tRNA de inúmeros organismos, mais de 1.000 conhecidas até o momento, apresentam uma estrutura secundária comum que se assemelha a uma folha de trevo.

Veja na **Figura 5.6** a estrutura secundária geral comum a todos os tRNAs. Note as partes da molécula que estão ligadas por pontes de hidrogênio, chamadas hastes ou braços, e as partes em que essas interações não ocorrem, chamadas alças. No esquema, estão representados os nucleotídeos que não variam com o tipo de tRNA. A presença de vários nucleotídeos modificados também é comum nos tRNAs, como, por exemplo, os resíduos  $\psi$  – letra grega *psi* – (pseudo-uridina), D (5,6-diidrouridina), m<sup>1</sup>G (1-metilguanosina) e I (inosina), dentre outros.

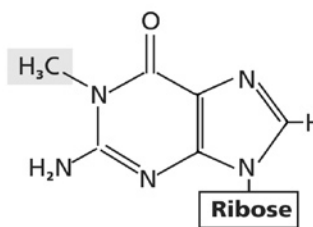
Uma peculiaridade interessante é que essas modificações são introduzidas após a síntese da molécula de tRNA. Observe a fórmula estrutural desses nucleotídeos na Figura 5.7.



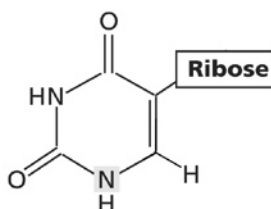
**Figura 5.6:** Estrutura secundária geral de todos os tRNAs. Estrutura de folha de trevo. Note os quatro braços sempre presentes e um braço extra que não está presente em todos os tRNAs. Os círculos fechados representam os nucleotídeos comuns (derivados das bases A, C, G e T) e as linhas entre eles representam pontes de hidrogênio, que caracterizam os pares de bases. As características e/ou resíduos invariantes estão representados em cinza. Os símbolos utilizados na figura são: Pu – qualquer purina; Pi – qualquer pirimidina; G\* – guanossina ou 2'-O-metilguanossina; Ψ – pseudo-uridina.



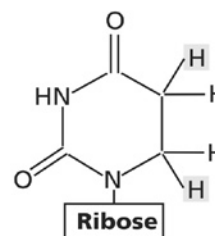
Inosina (I)



1 - Metilguanossina (m¹G)



Pseudo-uridina (Ψ)



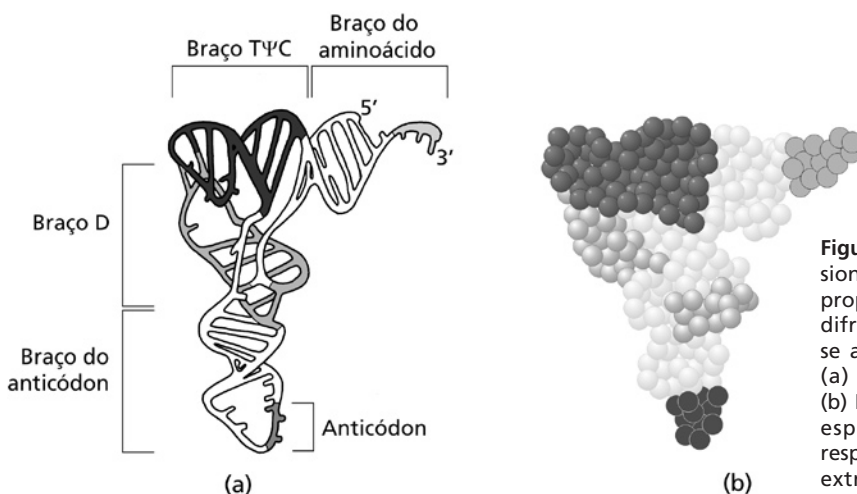
Dihidrouridina (D)

**Figura 5.7:** Bases modificadas que podem estar presentes nos tRNAs. Note que, na pseudo-uridina, a ligação à ribose ocorre através do carbono C<sub>5</sub> em lugar do carbono C<sub>1</sub>, mais usual.

Dois braços de um tRNA são importantes para que a molécula possa desempenhar sua função: o “braço do aminoácido”, que se liga a um aminoácido específico, e o “braço do anticódon”, que contém uma sequência complementar (lembra da complementaridade de bases?) ao códon no mRNA, o que assegura a ordem dos aminoácidos na proteína de acordo com a sequência de bases no mRNA. Os detalhes desse reconhecimento serão vistos no Módulo 4. Os outros dois ou três braços são importantes apenas para a conformação tridimensional das moléculas de tRNAs.

Agora que você já aprendeu sobre as peculiaridades das moléculas de tRNA, incluindo a estrutura de folha de trevo (estrutura secundária), é importante que você conheça sua estrutura tridimensional. Usaremos, como exemplo, o tRNA de levedura específico para o aminoácido fenilalanina, representado por tRNA<sup>Phe</sup> (lê-se fenilalanil tRNA).

Este tRNA, o primeiro ácido nucléico a ter sua sequência de bases completamente determinada, contém 76 nucleotídeos, sendo que 10 são formados por bases modificadas. Na **Figura 5.8**, você pode ver uma representação da estrutura tridimensional do tRNA<sup>Phe</sup> proposta com base na análise de difração de raios X. Note que, nessa estrutura que se assemelha a um L torcido, os dois braços importantes para que o tRNA desempenhe suas funções, os braços do aminoácido e do anticódon, estão arranjados de forma específica no espaço. Essa estrutura, que tem sido observada em todos os tRNAs estudados até o momento, é fundamental para as etapas de ativação de aminoácidos e de transferência de aminoácido para a cadeia peptídica nascente no ribossomo.



**Figura 5.8:** Estrutura tridimensional do tRNA<sup>Phe</sup> de levedura proposta a partir da análise de difração de raios X. A forma se assemelha a um L torcido. (a) Diagrama esquemático. (b) Modelo de preenchimento espacial. As três bases correspondentes ao anticódon, a extremidade 3' no braço do aminoácido e os braços D e TΨC estão em destaque.

## RNAs ribossomais (rRNAs)

A síntese de proteínas, como será visto no Módulo 4, ocorre nos ribossomos, uma maquinaria supramolecular complexa. Em uma célula da bactéria *E. coli*, encontram-se mais de 15.000 ribossomos, que correspondem a aproximadamente  $\frac{1}{4}$  do peso seco da célula. Assim, você tem uma idéia do tamanho dessas partículas e da quantidade de ribossomos presentes em uma célula. A porção de RNA nos ribossomos corresponde a 60-65% do peso total do ribossomo, enquanto os 35 a 40% restantes correspondem à porção protéica. Os ribossomos de procariotos e eucariotos são sempre constituídos de duas subunidades, uma maior e outra menor. Cada subunidade é formada por uma, até três moléculas de rRNA e inúmeras proteínas diferentes, como será visto mais adiante.

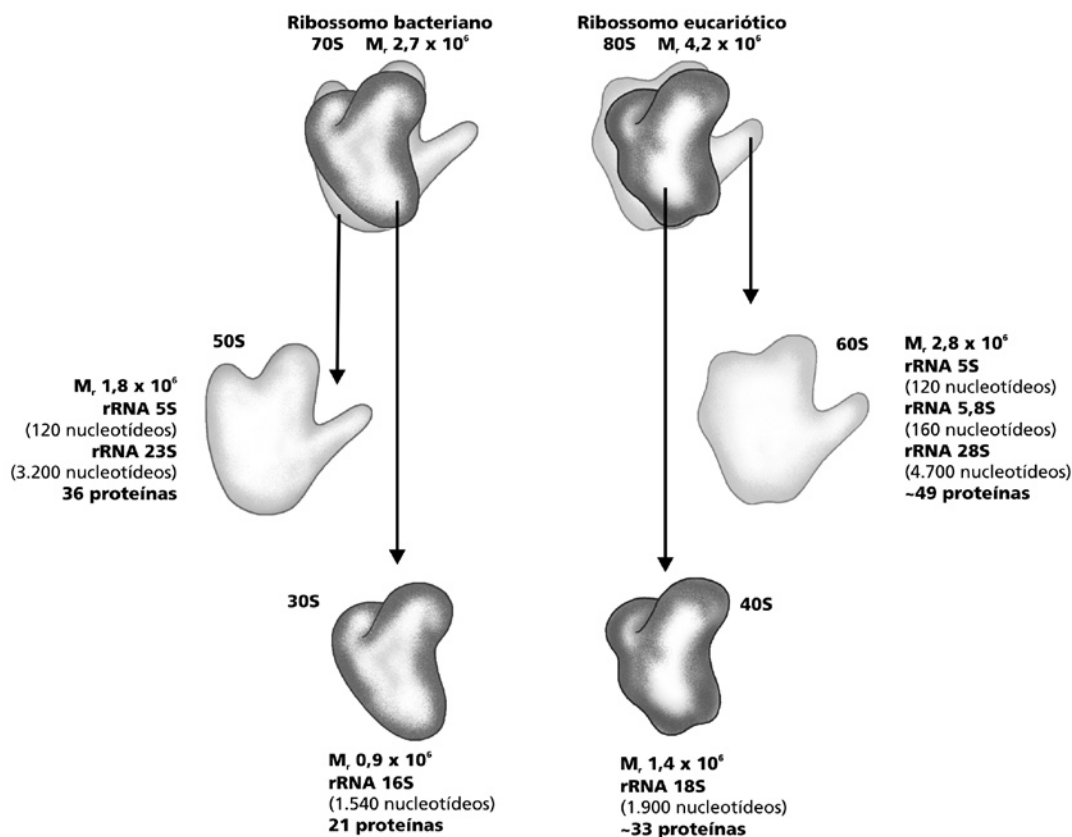
Diferentemente dos tRNAs, as moléculas de rRNAs geralmente são grandes e alguns poucos tipos estão presentes em uma célula. Os rRNAs representam cerca de 80% do RNA celular total e são metabolicamente estáveis. Esta estabilidade é resultado de sua associação com proteínas ribossomais.

Os estudos de dissociação dos ribossomos foram de extrema importância para se entender sua estrutura, suas propriedades e seu papel na síntese de proteínas. A técnica de **ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA**, cujo princípio básico consiste na observação do movimento de moléculas em uma centrífuga, foi, e ainda é, muito empregada no monitoramento da dissociação e da reassociação dos ribossomos. O movimento de uma partícula, que nesse caso específico pode ser ribossomo, RNA ou proteína, na centrifugação é caracterizado pelo **COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO** expresso em **UNIDADES SVEDBERG (S)**.

### ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA, COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO E UNIDADES SVEDBERG (S)

Na técnica de ultracentrifugação analítica, o movimento de uma partícula é caracterizado pelo coeficiente de sedimentação expresso em unidades Svedberg (S). Esse nome foi dado em homenagem a Thedor Svedberg, um cientista sueco que inventou a ultracentrífuga. A rapidez com que uma partícula se move em direção ao fundo do tubo depende de sua forma e de seu tamanho. Assim, o valor de S aumenta com o peso molecular da partícula que está sedimentando, mas esta relação não é diretamente proporcional, uma vez que sua forma também influencia a velocidade de sedimentação.

A partir de agora, esta unidade, Svedberg – S, será comumente empregada para designar os ribossomos de procariotos ou eucariotos, suas subunidades maior e menor e seus rRNAs constituintes. Observe a Figura 5.9 e acompanhe a descrição a seguir.



**Figura 5.9:** Comparação dos ribossomos procarióticos e eucarióticos. Estão representadas as subunidades maior e menor com os dados relativos a cada uma delas.  $M_r$  é a massa molecular relativa.

Na bactéria *E. coli*, a subunidade menor do ribossomo, também chamada de subunidade 30S, é formada por uma molécula de rRNA 16S e 21 proteínas diferentes. Já a subunidade maior, conhecida por subunidade 50S, é constituída de duas moléculas de rRNA, os rRNAs 5S e 23S, e 36 proteínas, sendo 33 proteínas diferentes.

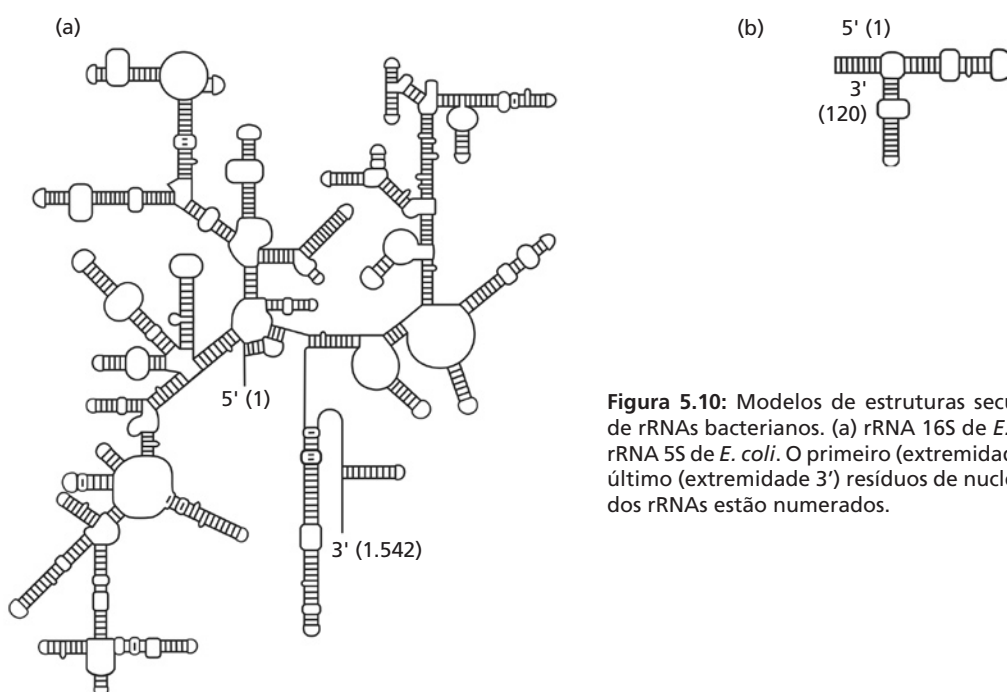


A partícula inteira apresenta coeficiente de sedimentação de 70S. Repare que não basta simplesmente somar os valores de coeficiente de sedimentação das duas subunidades para se determinar o coeficiente do ribossomo, o que comprova que o valor de *S* depende da forma da partícula.

Como serão os ribossomos de eucariotos? Provavelmente mais complexos. Vamos ver como eles são?

Os ribossomos de uma célula eucariótica, não considerando aqueles presentes na mitocôndria e em cloroplasto, são maiores e mais complexos que os ribossomos bacterianos, apresentando coeficiente de sedimentação de 80S. Eles também têm duas subunidades que, apesar de poderem variar de tamanho entre as espécies, apresentam valores médios de coeficiente de sedimentação de 40S e 60S, para as subunidades menor e maior, respectivamente. A subunidade 40S contém um rRNA 18S e a subunidade 60S é formada pelos rRNAs 5S, 5,8S e 28S. Em associação a esses rRNAs encontram-se mais de 80 proteínas diferentes.

Os ribossomos de todos os organismos e organelas são similares em relação aos aspectos estruturais e funcionais. Os rRNAs que integram essas partículas contêm inúmeros nucleotídeos modificados e podem apresentar estruturas secundárias bastante complexas, como as apresentadas na **Figura 5.10**.



**Figura 5.10:** Modelos de estruturas secundárias de rRNAs bacterianos. (a) rRNA 16S de *E. coli*. (b) rRNA 5S de *E. coli*. O primeiro (extremidade 5') e o último (extremidade 3') resíduos de nucleotídeos dos rRNAs estão numerados.

## RNAs mensageiros (mRNAs)

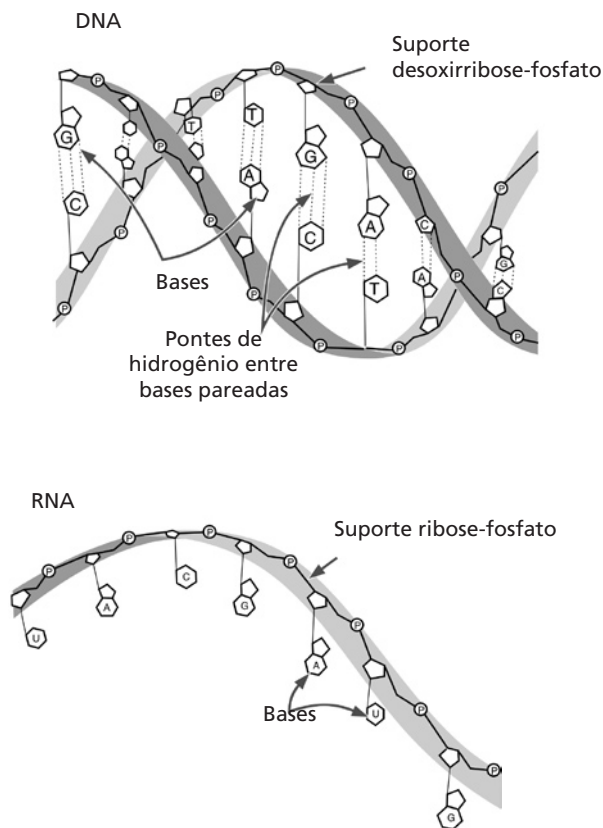
Dos três principais tipos de RNA, os mRNAs são os menos abundantes, representando, na maioria das células, entre 5 e 10% do RNA celular total. Os mRNAs são sintetizados utilizando a mensagem contida na sequência de bases de porções específicas do genoma de um organismo. As sequências de bases do mRNA, por sua vez, determinarão a ordem dos aminoácidos nas proteínas sintetizadas nos ribossomos. Os mRNAs eucarióticos são monocistrônicos, isto é, contêm informação para apenas uma cadeia polipeptídica. Em contrapartida, os mRNAs procarióticos são geralmente policistrônicos, ou seja, contêm informações para a síntese de mais de uma proteína.

É importante ressaltar que o fenótipo e o estado funcional de uma célula está diretamente relacionado ao seu conteúdo de mRNA. Assim, células que se multiplicam muito rapidamente necessitam de diferentes proteínas em um curto intervalo de tempo. Para atender a esta exigência, é de se esperar que os mRNAs tenham um tempo de vida pequeno, sendo rapidamente degradados após participarem da síntese de proteínas, para que os ribonucleotídeos sejam reciclados e utilizados na síntese de moléculas de outros mRNAs.

Os mRNAs apresentam muita variação no tamanho. Isso é fácil de ser entendido! Já que os mRNAs codificam proteínas (determinam a sequência de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas) dos mais diversos tamanhos, é de se esperar que eles devam apresentar também tamanhos heterogêneos. Provavelmente, existem poucos dobramentos intracadeia (ou intramolecular) nos mRNAs e pouco temos a discutir sobre os aspectos estruturais desse tipo de RNA. Os detalhes sobre sua síntese e processamento serão discutidos no Módulo 3.

Para finalizar, sob o aspecto estrutural, o DNA apresenta dois filamentos arranjados espacialmente na forma de dupla hélice. Sua função celular é armazenar e perpetuar a informação genética, o que de alguma forma é assegurado por suas características estruturais. Contudo, o RNA contém um único **filamento**, não apresenta uma estrutura padrão e participa de inúmeros processos celulares.

Na **Figura 5.11**, você pode observar as diferenças estruturais básicas entre os dois ácidos nucleicos. Mas é importante ressaltar que dependendo da molécula de RNA, sua estrutura pode ser bastante complexa e certamente está relacionada à função celular que lhe é atribuída.



**Figura 5.11:** DNA versus RNA. Uma diferença básica entre esses ácidos nucleicos é a presença de duas fitas no DNA e de um único filamento no RNA. Como consequência, as moléculas de DNA, independentemente de sua sequência de bases, assumem a estrutura de dupla hélice, enquanto as moléculas de RNA podem assumir diferentes estruturas tridimensionais, que são dependentes das sequências de bases.

**RESUMO**

Nesta aula, você aprendeu que, além de ser o material genético de alguns vírus, o RNA pode desempenhar inúmeras funções na célula, sendo que a maioria dessas funções está associada a sua participação no fluxo da informação genética, que é o processo global em que a informação contida no DNA é utilizada para a síntese de proteína. O intermediário nesse processo, que conta com a participação de vários tipos de RNA, é uma molécula de mRNA. O RNA é menos estável que o DNA devido à presença do grupo 2'-hidroxila, mas existe variação de estabilidade entre os diferentes tipos de RNA. Diferentemente do DNA, o RNA é formado por um único filamento, de forma que equivalência de bases, conforme a regra de Chargaff, não se aplica a essa molécula. A fita única de RNA pode apresentar uma estrutura helicoidal, que é facilitada pelas forças de empilhamento de bases. Entretanto, as seqüências complementares de diferentes porções do RNA podem formar pares de bases de acordo com o padrão descrito para o DNA, gerando uma estrutura de dupla fita. A regularidade da hélice pode ser quebrada por estruturas conhecidas como alças internas, saliências e hastes e alças. Do total dos RNAs celulares, aproximadamente 15% correspondem aos tRNAs, 85% aos rRNAs e o restante, aos mRNAs. O tamanho de cada um desses tipos de RNA é bastante distinto, assim como a estrutura, que é determinante para as funções que cada um desempenha. O tamanho dos mRNAs é proporcional ao tamanho das proteínas que codificam, sendo, portanto, bastante heterogêneo. Os tRNAs e rRNAs apresentam em suas seqüências um número razoável de nucleotídeos modificados. Os rRNAs são metabolicamente mais estáveis que os outros dois tipos de RNA devido a sua associação com proteínas ribossomais.

## EXERCÍCIOS

1. Discuta as funções do RNA.
2. Quais são os três principais tipos de RNA e de que processo celular eles participam.
3. A estabilidade do DNA é biologicamente vantajosa? E a instabilidade do RNA é biologicamente vantajosa? Discuta a diferença de estabilidade dessas moléculas.
4. Um vírus identificado recentemente teve seu material genético isolado e a composição de bases determinada. Sabendo que o material genético é RNA e que o percentual de adenina é 18% e o de citosina é 32%, é possível calcular o percentual das duas outras bases? Explique.
5. Marque a alternativa correta a respeito do RNA:
  - a) Incorpora bases purínicas e pirimidínicas, modificadas e não modificadas, durante sua síntese.
  - b) Não exibe qualquer estrutura helicoidal dupla.
  - c) As estruturas das moléculas apresentam interações de empilhamento de bases e pareamento de bases ligadas por pontes de hidrogênio.
  - d) Geralmente contém cerca de 65 a 100 nucleotídeos.
  - e) Não exibe pareamento de bases do tipo Watson-Crick.
6. Represente as estruturas secundárias comumente encontradas nos RNAs.
7. Relacione a estrutura tridimensional dos tRNAs com a função desempenhada.
8. O que você acha que seria degradado mais rapidamente na célula, o mRNA ou o rRNA. Por quê?

### **AUTO-AVALIAÇÃO**

As questões desta aula têm por objetivo a fixação do conteúdo estudado. Caso você se sinta inseguro após resolvê-las e conferir suas respostas, não hesite em rever a aula ou pedir ajuda aos tutores no pólo.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Nas próximas aulas, você estudará a organização dos ácidos nucléicos como material genético de procariotos, vírus e eucariotos.



## Estrutura dos cromossomos em vírus e procariotos

# AULA 6

Ao final desta aula, você terá a oportunidade de:

- Discutir a organização do material genético em vírus e procariotos.
- Entender como as moléculas de DNA são empacotadas para caber dentro das estruturas específicas de cada um dos organismos.

### Pré-requisitos

Compreensão do conteúdo das aulas sobre  
Estrutura dos Ácidos Nucléicos.

Material didático utilizado nas disciplinas  
de Bioquímica e Biologia Celular.



## INTRODUÇÃO

Nas aulas anteriores, você teve a oportunidade de aprender que a informação genética de todos os organismos vivos é armazenada nos ácidos nucléicos, que podem ser moléculas de RNA ou DNA, podendo ainda ser fita simples ou fita dupla.

Desde a descoberta da natureza do material genético, uma questão intrigante surgiu relacionada à sua localização e organização. Um princípio geral é evidente na organização de todo material genético. Ele existe como uma massa compacta que ocupa um volume limitado e as suas várias atividades como replicação e transcrição devem ser desempenhadas dentro deste confinamento.

Antes de mais nada, você precisa ter em mente que o tamanho dos genomas, na forma de uma molécula esticada, seria muito maior do que as dimensões dos compartimentos nos quais eles são encontrados. Observe a **Tabela 6.1**.

**Tabela 6.1:** Comparação entre o tamanho dos genomas (número de nucleotídeos, tipo de molécula) e as dimensões dos compartimentos onde são encontrados nos diferentes organismos

Compartimento	Forma	Dimensões	Tipo de ácido nucléico	Tamanho
TMV	Filamento	0,008 X 0,3µm	1 RNA fita simples	2µm = 6,4 kb
Fago φd	Filamento	0,006 X 0,85µm	1 RNA fita simples	2µm = 6,0 kb
Adenovírus	Icosaedro	Diâmetro 0,07µm	1 DNA dupla fita	11µm = 35,0 kb
Fago T4	Icosaedro	0,065 X 0,10µm	1 DNA dupla fita	55µm = 170,0 kb
<i>Escherichia coli</i>	Cilindro	1,7 X 0,65µm	1 DNA dupla fita	1,3µm = 4,3 X 10 <sup>3</sup> kb
Núcleo (humano)	Esferóide	Diâmetro 6 µm	46 cromossomos de DNA dupla fita	1,8 m = 6 X 10 <sup>6</sup> kb

Pensando assim, o DNA (ou RNA, no caso de alguns vírus) deve ser altamente comprimido para caber nesses compartimentos. Quando falamos em DNA, temos o hábito de visualizar a sua estrutura como uma dupla hélice esticada, conforme descrita por Watson e Crick. No entanto, a deformação da estrutura do DNA, dobrado e empacotado em uma forma mais compacta, deve ser encarada como a estrutura mais freqüente apresentada pelo DNA in vivo. Damos o nome de empacotamento ao processo de compactação dos ácidos nucléicos.

Nos próximos tópicos, você vai poder explorar o que se conhece sobre esses mecanismos em vírus e procariotos.

## EMPACOTAMENTO DE GENOMAS VIRAIS

A aparência de uma partícula viral é relativamente simples. Elas são compostas por um capsídeo, que é uma estrutura simétrica ou quase simétrica, formado por um ou poucos tipos de proteínas, e pelo material genético que pode ser DNA ou RNA. O material genético, ou genoma, pode ainda se apresentar na forma de fita simples ou fita dupla. O genoma está contido dentro do capsídeo. Alguns vírus podem apresentar outras estruturas associadas ao capsídeo ou ligadas a ele, formadas por outras proteínas, que são necessárias durante o processo de infecção da célula hospedeira.

De um modo geral, a partícula viral é bastante compacta. Raramente o seu tamanho é maior do que o volume de ácido nucléico nele contido.

Existem dois tipos de mecanismos de montagem de um capsídeo viral contendo ácido nucléico no seu interior:

1. a cobertura protéica pode ser montada em torno do ácido nucléico, condensando o DNA ou o RNA através de interações com as proteínas e entre elas, durante o processo de montagem;
2. o capsídeo pode ser construído a partir dos seus componentes protéicos na forma de uma concha vazia, na qual o ácido nucléico será inserido. A condensação do ácido nucléico ocorre durante a sua entrada.

Você verá, a seguir, dois exemplos de montagem de capsídeos.

Em vírus que apresentam seu genoma na forma de RNA fita simples, o capsídeo é montado em torno do genoma. O melhor exemplo já caracterizado é o do vírus TMV (do inglês Tobacco Mosaic Virus, que significa Vírus Mosaico do Fumo).

A montagem se inicia através da ligação de proteínas numa estrutura de **grampo de cabelo**, formada na molécula de RNA. O local onde esta estrutura é formada chama-se centro de nucleação e, a partir desse ponto, o acoplamento de proteínas ocorre bidirecionalmente até atingir as extremidades do RNA. A unidade do capsídeo é um disco composto por duas camadas; cada camada é composta por 17 subunidades protéicas idênticas. O disco é uma estrutura circular, que forma uma hélice à medida que vai interagindo com o RNA. O RNA se enrola de forma helicoidal dentro da capa protéica conforme ilustrado na **Figura 6.1**.

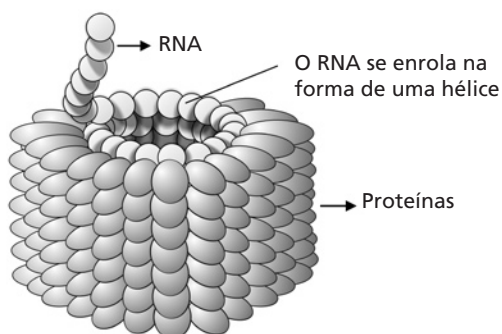
#### Grampo de cabelo

É o nome que se dá a uma estrutura dupla fita que pode ser formada em seqüências de ácido nucléico fita simples a partir do pareamento de regiões complementares presentes na molécula. Por exemplo, a seqüência **AAGCCA**UUGCA **UGGCCAUGGGGAUGGCCAUGCAAUCAU** poderá formar a estrutura abaixo

```

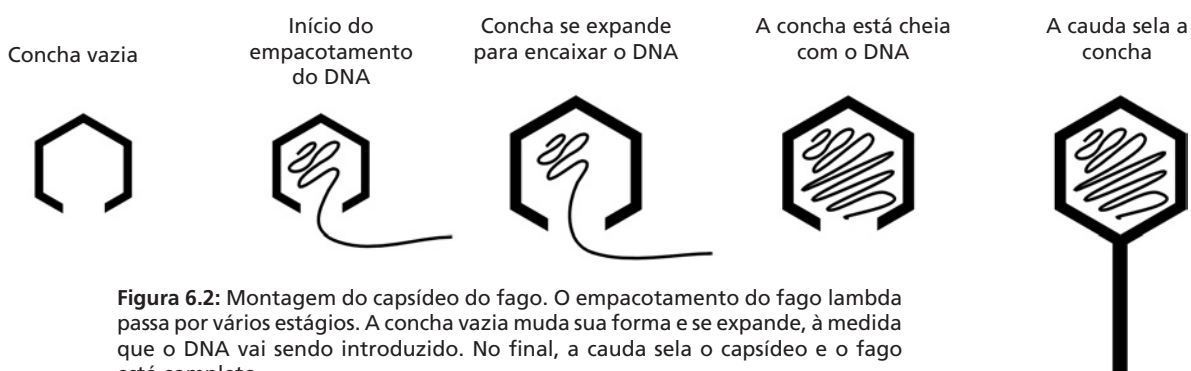
A
A
G  U
C  A
C  C
A - U
U - A
U - A
G - C
C - G
A - U
U - A
G - C
G - C
C - G
C - G
A - U
U - A
G  G
G  G
G
    
```

Repare que somente os nucleotídeos que estão em negrito são complementares e podem se parear. Observe como a estrutura lembra o formato de um grampo de cabelo! Você terá oportunidade de ver a ocorrência dessa estrutura em outras situações.



**Figura 6.1:** Ilustração do vírus TMV. O RNA viral se torna helicoidal devido ao acoplamento de subunidades protéicas ao seu redor.

Os capsídeos esféricos de vírus de DNA são montados antes da introdução do DNA. Acompanhe a montagem do fago  $\lambda$ , esquematizado na **Figura 6.2**. Primeiramente, uma estrutura protéica semelhante a uma concha é montada, e posteriormente assume uma forma mais bem definida. Quando o empacotamento do DNA se inicia, a concha se expande em tamanho mas permanece com o mesmo formato e, por último, a cabeça preenchida com o DNA é selada pela adição da cauda. Pouco se sabe a respeito do mecanismo de condensação. Esse esquema está baseado nas observações feitas através de microscopia eletrônica, em que as diferentes etapas puderam ser observadas.



**Figura 6.2:** Montagem do capsídeo do fago. O empacotamento do fago lambda passa por vários estágios. A concha vazia muda sua forma e se expande, à medida que o DNA vai sendo introduzido. No final, a cauda sela o capsídeo e o fago está completo.

Obviamente, existem outros tipos de vírus, com diferentes tipos de genomas. No entanto, o desafio para todos eles é fazer com que o seu material genético caiba dentro da minúscula estrutura do capsídeo.

## O CROMOSSOMO BACTERIANO

O cromossomo bacteriano é formado por uma grande molécula de DNA fita dupla circular. Muitas bactérias apresentam moléculas de DNA circular, chamadas plasmídios, que são completamente independentes do cromossomo. Damos o nome de genoma ao conjunto total de ácidos nucleicos de um organismo. Assim, nas bactérias que contêm plasmídios, seu genoma será composto pelo DNA cromossomal e pelo DNA plasmidial. Nós voltaremos a falar sobre plasmídios nas próximas aulas.

O cromossomo circular bacteriano é organizado em uma estrutura conhecida como nucleóide. Quando observadas ao microscópio, essas estruturas podem ser vistas como um aglomerado compacto que ocupa cerca de um terço do volume da célula. Quando as células são rompidas ou lisadas, o DNA pode ser visualizado como fibras em formato de alças, ligadas ao envelope celular rompido. Observe o esquema apresentado na Figura 6.3.



**Figura 6.3:** Esquema representativo do cromossomo de *Escherichia coli*, em uma célula que foi rompida. O cromossomo aparece como fibras formando alças múltiplas.

Esta observação sugere que o DNA não se encontra somente na estrutura de dupla hélice, como se acreditava anteriormente, mas sim compactado, provavelmente através da associação com proteínas. De fato, várias proteínas que se ligam ao DNA, e que são superficialmente semelhantes àsquelas encontradas em eucariotos, foram isoladas em *Escherichia coli*.

Dentre elas, uma proteína dimérica chamada HU é capaz de condensar DNA. No entanto, estudos realizados com mutantes que não possuem a proteína HU indicaram que ela não é essencial para a formação do nucleóide. Uma outra proteína, H1, também se liga ao DNA, interagindo preferencialmente com seqüências que estão dobradas.

Da mesma forma como se observou para a proteína HU, estudos com mutantes indicaram que a proteína H1 também não é essencial para a formação do nucleóide. Uma possível explicação para esse fato é que essas duas proteínas teriam função redundante no processo de formação do nucleóide, e que somente a eliminação de ambas com um mutante duplo poderia esclarecer o seu verdadeiro papel no mecanismo.

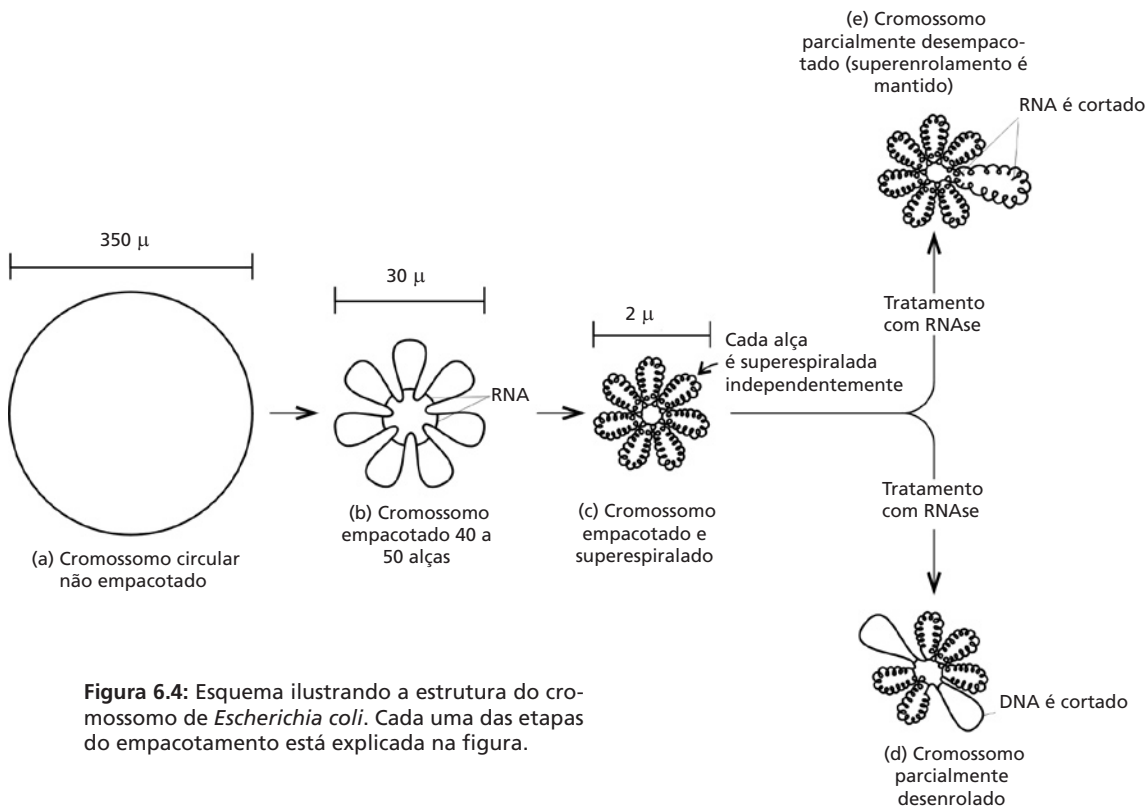
Moléculas de RNA também estão presentes no nucleóide, mas a abordagem experimental para elucidar o seu papel é mais complexa do que para a análise de proteínas, de modo que a sua função ainda não está esclarecida.

Você pode observar a **Figura 6.4**, que propõe um modelo para a estrutura do cromossomo. As observações levaram à conclusão de que a molécula de DNA do cromossomo de *Escherichia coli* está organizada em cerca de 50 a 100 alças, sendo que cada uma delas é independentemente superespiralada. No entanto, o tratamento do cromossomo com **RNases** e **proteases** não destrói o superespiralamento, o que indica que o superespiralamento não depende das proteínas e do RNA, e é o principal responsável pelo empacotamento do nucleóide em procariotos.

Já o tratamento com DNase rompe o superespiralamento porque interfere na tensão na molécula de DNA, uma vez que o DNA pode girar livremente. No entanto, as alças são independentes, confirmando o modelo proposto.

#### RNases

São enzimas com atividade de nuclease que degradam moléculas de RNA em ribonucleotídeos. DNases são enzimas com atividade de nuclease que degradam DNA em desoxirribonucleotídeos. Proteases são enzimas que degradam proteínas, ou polipeptídeos, em peptídeos menores ou aminoácidos.



**Figura 6.4:** Esquema ilustrando a estrutura do cromossomo de *Escherichia coli*. Cada uma das etapas do empacotamento está explicada na figura.

Com base nas informações vistas nesta aula, podemos concluir que os vírus e os procariotos utilizam mecanismos distintos para compactar o material genético. A compactação, muitas vezes, está associada a características intrínsecas das moléculas de ácidos nucleicos presentes. Como vimos, para o vírus TMV, a formação de uma estrutura de grampo permite o acoplamento das proteínas que formarão o capsídeo. A formação dessa estrutura só é possível porque na molécula de RNA existem nucleotídeos que são complementares e, por isso, podem parear e formar a estrutura. Na *Escherichia coli*, um aspecto bastante interessante é o espiralamento do DNA presente na estrutura do nucleóide, que, como vimos, não é destruído após o tratamento com RNases e Proteases, indicando também que se trata de uma propriedade da molécula do DNA. Para que o processo de espiralamento fique claro e complemente as informações vistas nesta aula, veremos na próxima aula de que maneira ocorre o espiralamento do DNA, uma vez que ele ocorre no DNA de todos os organismos e desempenha um papel crucial no empacotamento dos genomas.

**RESUMO**

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de aprender que o material genético de todos os organismos vivos é maior do que o compartimento onde eles são encontrados, por isso eles sofrem uma condensação ou empacotamento. Você também viu como ocorre o empacotamento de genomas virais e a formação da estrutura dos nucleóides em procariotos.

**EXERCÍCIOS**

1. De que maneira ocorre o empacotamento dos genomas virais?
2. Quais são os componentes do nucleóide e de que forma ele está organizado?

**AUTO-AVALIAÇÃO**

Se você compreendeu bem o conteúdo desta aula, provavelmente não teve dificuldades para responder aos dois exercícios propostos. Lembre-se de que o importante é compreender que o objetivo do empacotamento é fazer com que o genoma do indivíduo caiba no compartimento apropriado. Esse conceito é muito importante para entender a dinâmica das moléculas e o que ocorre nas células durante as suas vidas.

**INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Na próxima aula, você terá a oportunidade de estudar como ocorre o superespiralamento dos ácidos nucléicos, as enzimas que participam do processo e a sua importância. Bom estudo e até lá!





## Superespiralamento do DNA

AULA

# 7

Ao final desta aula, você terá a oportunidade de:

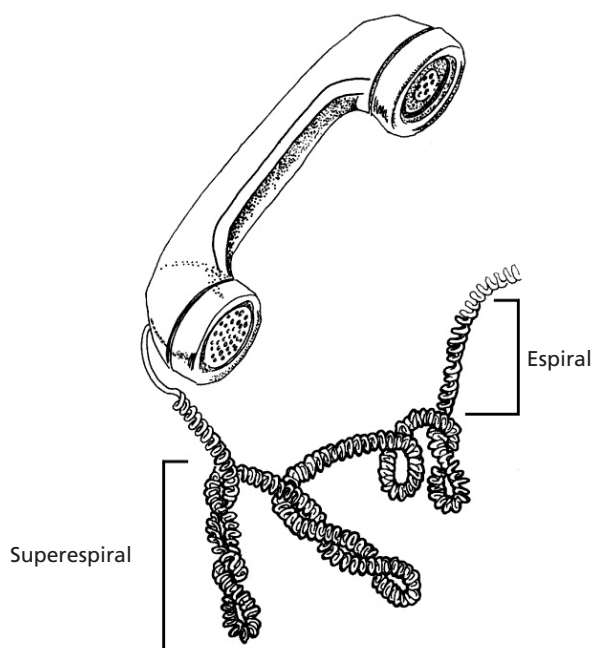
- Entender o mecanismo de espiralamento do DNA.
- Entender a importância do espiralamento no empacotamento do DNA.

### **Pré-requisito**

Conteúdo das aulas sobre estrutura do DNA.

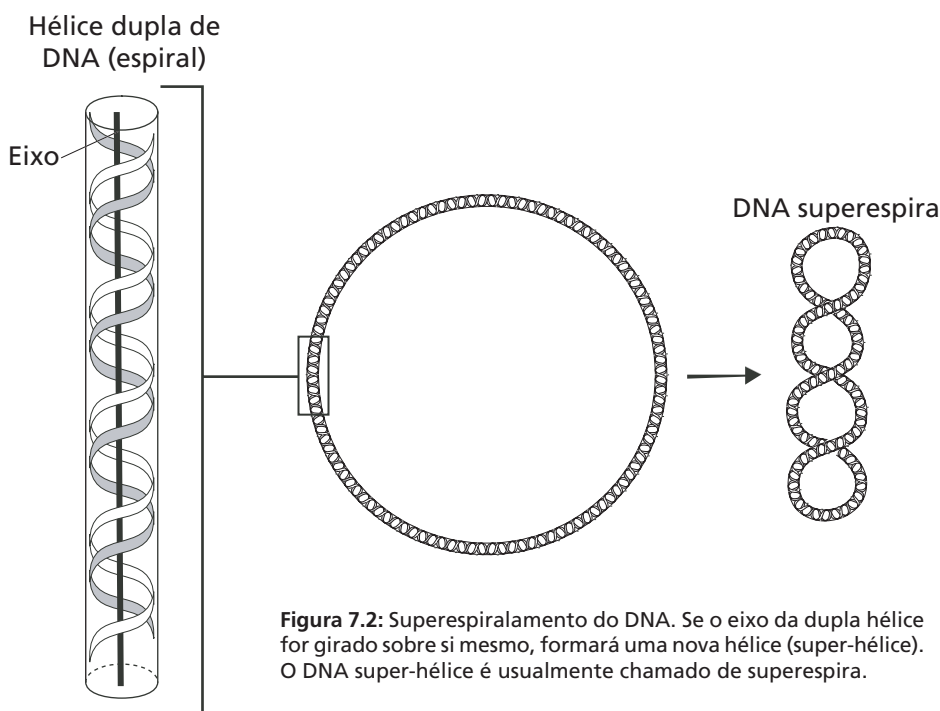
## INTRODUÇÃO

O que significa superespiralamento do DNA? Vamos usar o fio do telefone como exemplo para facilitar a compreensão. Observe o esquema de um telefone ilustrado na **Figura 7.1**. Podemos dizer que o fio do telefone é espiralado, pois possui a forma de uma espiral. Você já deve ter observado que, às vezes, o fio se enrola sobre ele mesmo, ficando mais curto. Pode ser bem trabalhoso colocá-lo novamente na forma original. Esse enrolamento é uma superespira, pois o fio do telefone já é uma espiral e sobre ela foi formada uma outra. Assim, o superespiralamento significa o espiralamento de uma espira.



**Figura 7.1:** Um fio de telefone é um bom exemplo de espiralamento (como uma hélice do DNA). Esta ilustração é apropriada, pois foi a observação de um fio de telefone que levou Jerome Vinograd e seus colaboradores, em 1965, a entenderem que muitas propriedades dos DNAs circulares e pequenos poderiam ser explicadas pelo superespiralamento.

O mesmo acontece com o DNA. Você já sabe que o DNA é espiralado na forma de uma dupla hélice, em que ambas as fitas da espira de DNA se enrolam em torno de um eixo. O espiralamento desse eixo sobre si próprio produz o DNA superespiralado, conforme você pode observar na **Figura 7.2**.



Algumas propriedades do superespiralamento foram estabelecidas e estão baseadas em conceitos derivados de um ramo da Matemática chamado topologia, ciência que estuda os objetos que não se modificam sob deformidades contínuas.

O que vem a ser deformidade contínua? Para o DNA, a deformação contínua inclui alterações conformacionais devidas à movimentação térmica ou a uma interação com proteínas ou outras moléculas. A deformação descontínua envolve a quebra das fitas de DNA. Para uma molécula de DNA circular, uma propriedade topológica é aquela que não é afetada pelas deformações das fitas do DNA, desde que não ocorra nenhuma quebra. As propriedades topológicas só serão alteradas por quebra e reunião de uma ou de ambas as fitas do esqueleto do DNA.

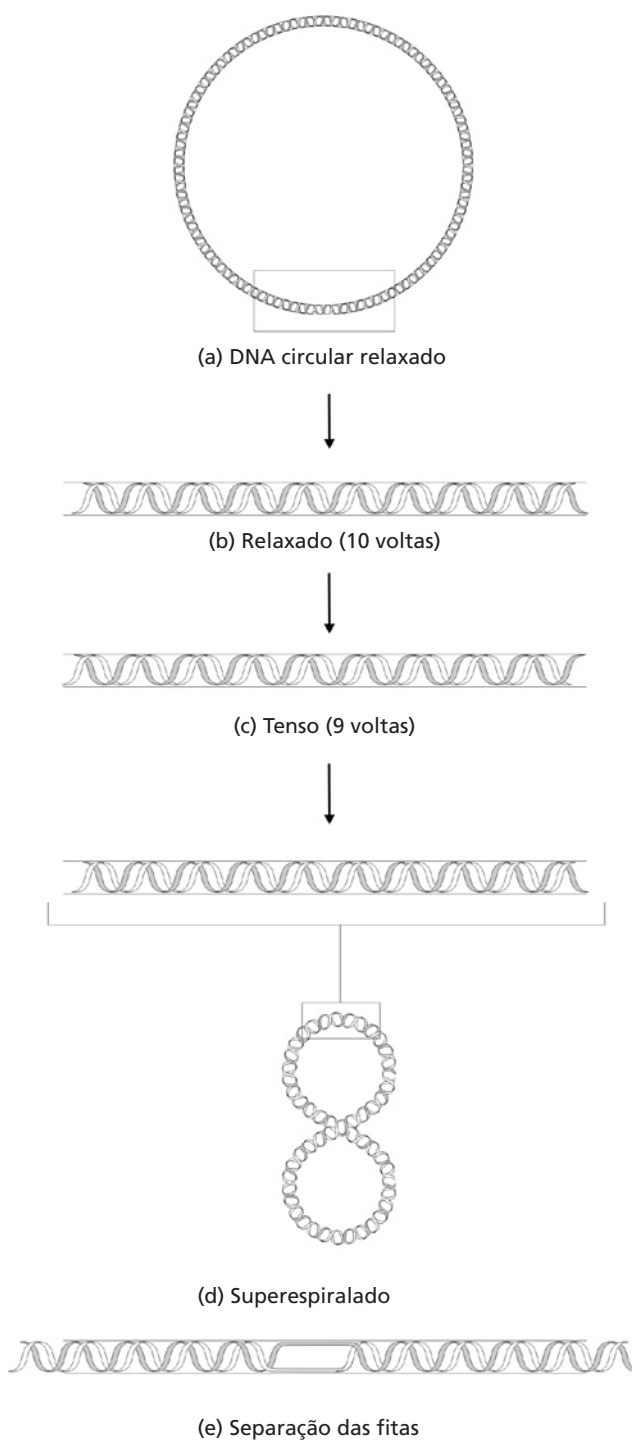
## O SUBENROLAMENTO DO DNA LEVA AO SUPERESPIRALAMENTO

Vamos utilizar o exemplo dos plasmídios, que são moléculas de DNAs circulares pequenas, para facilitar a compreensão de como ocorre o superespiralamento.

Você deve estar lembrado da aula sobre a estrutura do DNA no modelo descrito por Watson e Crick, em que vimos que a molécula dupla hélice apresenta 10,5 pares de bases para cada volta, na forma B do DNA. Se o DNA circular fechado obedecer à estrutura de forma B, apresentará uma estrutura relaxada, ou seja, não estará superespiralado.

O superespiralamento ocorrerá quando o DNA estiver sujeito a alguma forma de tensão estrutural. Essa tensão é provavelmente regulada pela célula para induzir o superespiralamento da molécula. Um fato interessante é que, quando um DNA circular fechado é isolado, nunca se encontra na forma relaxada.

O que causa a tensão no DNA, levando-o ao superespiralamento? Na maioria das vezes, essa tensão é provocada por um subenrolamento da dupla hélice de DNA, ou seja, o DNA apresenta menos voltas do que o observado na estrutura de Watson e Crick. Acompanhe a **Figura 7.3** para entender os efeitos do subenrolamento. O exemplo apresenta uma molécula de DNA circular na forma relaxada (a). Um segmento de DNA de 105 pares de bases formaria 10 voltas na forma relaxada (b). Se uma das voltas fosse removida, haveria 105/9 ou cerca de 11,7 pares de bases por volta em vez de 10,5 pares de bases. Podemos dizer que houve um desvio na forma e, com isso, a molécula fica mais tensa (c). Dessa forma, a maioria da tensão pode ser aliviada pelo espiralamento do eixo do DNA sobre si mesmo, formando uma superespira (d). A tensão também pode ser acomodada separando as duas fitas de DNA em um segmento de cerca de 10 pares de bases (e), equivalente a uma volta.



**Figura 7.3:** Efeito do subenrolamento do DNA. (a) A figura ilustra um DNA circular no estado relaxado. (b) Um segmento de 105 pares de bases do DNA circular relaxado, ilustrado em (a), apresenta 10 voltas. (c) Uma das voltas foi removida gerando uma tensão na molécula. (d) O resultado da tensão provocada pelo subenrolamento é a formação de uma superespira. (e) A tensão poderia ser relaxada se um segmento de 10 pares de bases fosse aberto na molécula circular.

Em um DNA circular fechado, a tensão induzida pelo subenrolamento é geralmente acomodada pelo superenrolamento, em vez da separação das fitas, uma vez que o espiralamento requer menos energia do que o rompimento das pontes de hidrogênio.

Daí surge a pergunta: o DNA é capaz de se subenrolar sozinho? A resposta é não! O subenrolamento do DNA é regulado ativamente pela célula com a ajuda de um processo enzimático, o que facilita sua compactação pelo espiralamento.

A manutenção do subenrolamento e, conseqüentemente, o espiralamento só é possível se o DNA estiver em um círculo fechado (cromossomo bacteriano, cromossomos virais, *plasmídios* e organelas) ou se estiver ligado e estabilizado por proteínas (cromossomos lineares de eucariotos), de tal forma que as fitas não estejam livres para rodar uma em relação à outra, o que levaria à reversão imediata, ao estado relaxado.

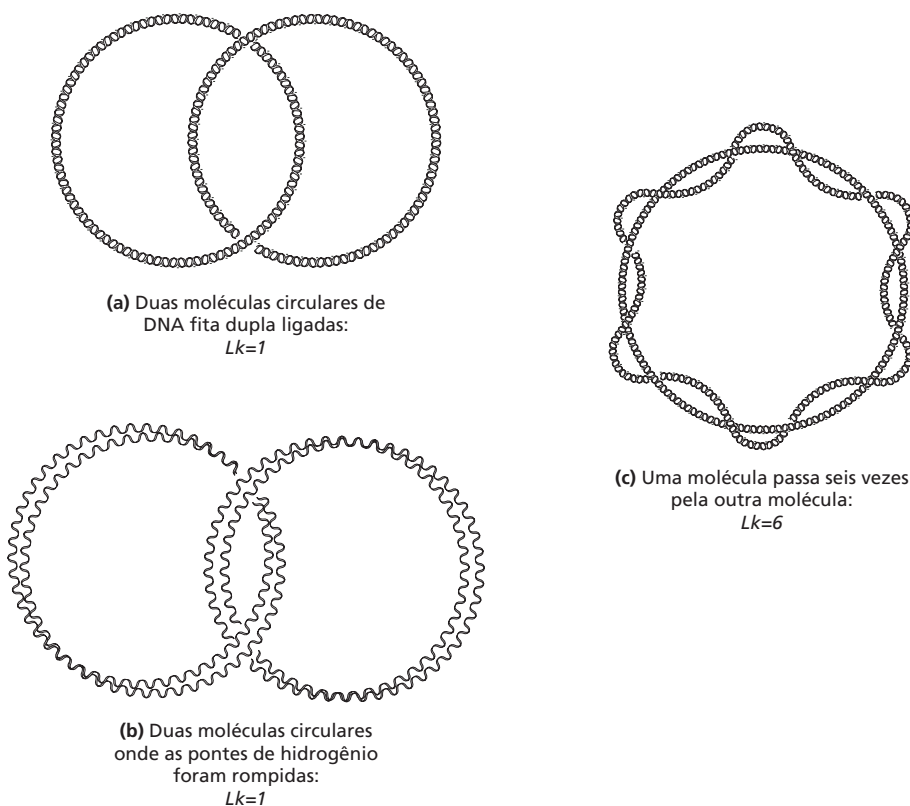
O número de voltas da hélice não pode ser alterado sem que ocorra pelo menos uma quebra transitória em uma das fitas do DNA. Mais adiante, você verá como isso ocorre. O número de voltas da hélice em uma molécula de DNA fornece uma informação precisa do superenrolamento. A seguir, você poderá compreender de que maneira isso pode ser calculado.

## DEFINIÇÃO DE NÚMERO DE LIGAÇÃO TOPOLÓGICA

A topologia fornece algumas idéias que são úteis nesta discussão, particularmente o conceito de número de ligação. O número de ligação é uma propriedade topológica porque ela *não varia* quando o DNA de dupla fita for curvado ou deformado. O conceito de número de ligação ( $Lk$ ) é ilustrado na **Figura 7.4**. O esquema ilustra duas moléculas circulares de DNA dupla fita que estão ligadas (a). Imagine cada molécula como se fosse um elo de uma corrente. As moléculas circulares, ligadas como elos da corrente, estão efetivamente unidas pelo que pode ser descrito como uma ligação topológica.

A **Figura 7.4.b** ilustra que, mesmo se todas as pontes de hidrogênio e as interações de empilhamento das bases fossem abolidas, de forma tal que as fitas não tivessem contato físico, a ligação topológica ainda manteria as estruturas circulares ligadas.

Visualize uma das moléculas circulares de DNA fita dupla, da mesma forma que acontece com uma película de sabão, espalhando-se pelo espaço emoldurado por um fio circular, antes que você sopre uma bolha de sabão. Você já fez bolhas de sabão, não é mesmo?

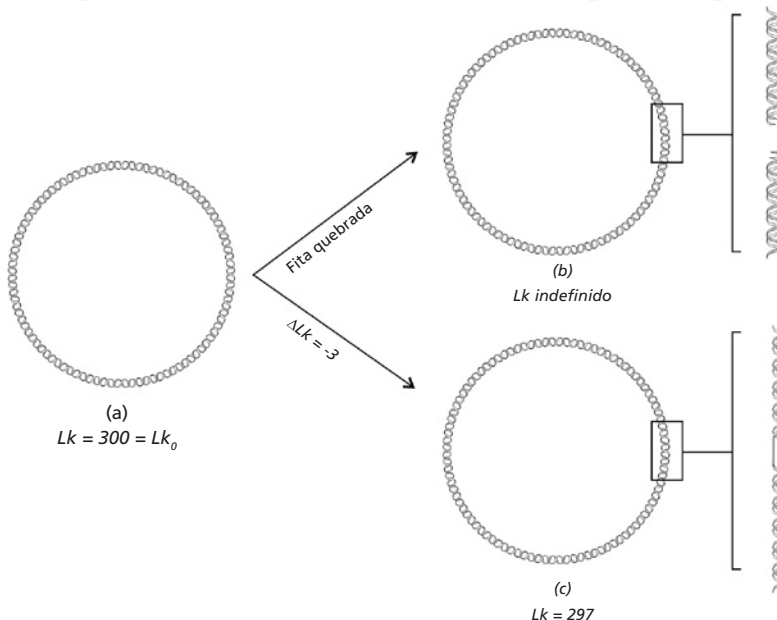


**Figura 7.4:** Definição de número de ligação,  $Lk$ . As moléculas de DNA dupla fita circular estão representadas. Em (a),  $Lk = 1$ , o que acontece também com as moléculas em (b), embora as pontes de hidrogênio que ligam a molécula dupla fita tenham sido rompidas. Em (c),  $Lk = 6$ , pois uma das moléculas passa 6 vezes pela superfície imaginária interna da outra molécula.

O número de ligação pode ser definido rigorosamente como o número de vezes que a segunda molécula circular fura esta superfície (c). Para o exemplo ilustrado na **Figura 7.4.a** e **7.4.b**,  $Lk = 1$ . Para o exemplo na **Figura 7.4.c**,  $Lk = 6$ . O número de ligação de um DNA circular é sempre inteiro.



Vamos analisar esse conceito para um DNA circular fechado com 3.150 pares de bases. Observe a **Figura 7.5** e acompanhe a explicação.



**Figura 7.5:** Esquema ilustrativo de uma molécula circular contendo 3.150 pares de bases. Em (a), podemos observar o DNA relaxado, apresentando um  $Lk = 300$ , correspondente ao número de voltas. Em (b), podemos observar o DNA que sofreu uma quebra; não se pode definir o  $Lk$ , pois não se pode medir a manutenção da estrutura de dupla hélice e, conseqüentemente, o número de voltas. Em (c), podemos observar um segmento da molécula que está subenrolada em 3 voltas,  $Lk = 297$ .

Quando a molécula estiver relaxada, o número de ligação é simplesmente o número de pares de bases por volta, que é próximo de 10,5; nesse caso,  $Lk = 300$ . A propriedade topológica de uma molécula de DNA circular, como o número de ligação, só existe se não houver quebra em nenhuma das fitas. Caso ocorra uma quebra em qualquer fita, ela pode, em princípio, desenrolar-se completamente. Nesse caso, não existe ligação topológica, e o  $Lk$  não pode ser definido (b).

Podemos, agora, descrever o subenrolamento do DNA em termos de variação do número de ligação. O número de ligação no DNA relaxado, chamado  $Lk_0$ , é usado como referência. Para a molécula mostrada na **Figura 7.5**,  $Lk_0 = 300$ , se três voltas forem removidas dessa molécula,  $Lk$  será igual a 297. A variação pode ser descrita pela equação:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 297 - 300 = -3.$$

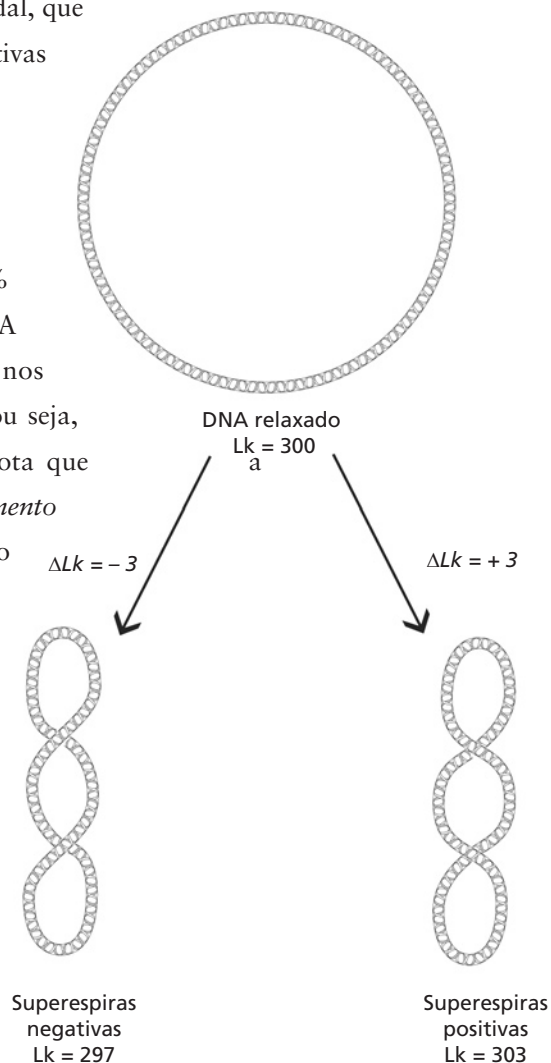
Freqüentemente, é conveniente exprimir a variação do número de ligações em termos de uma quantidade que é independente da extensão da molécula de DNA. Essa quantidade é chamada diferença de ligação específica ( $\sigma$ ), ou densidade super-helicoidal, que é uma medida do número de voltas removidas relativas àquelas presentes no DNA relaxado:

$$\sigma = \Delta Lk / Lk_0.$$

No exemplo,  $\sigma = -0,01$  significa que 1% (3 em 300) das voltas da hélice presentes no DNA foram removidas. O grau de subenrolamento nos DNAs celulares geralmente fica entre 5 e 7%, ou seja,  $\sigma = -0,05$  a  $-0,07$ . O sinal negativo de  $\sigma$  denota que variação no número de ligação se deve ao *subenrolamento* do DNA. O superespiralamento induzido pelo subenrolamento é, portanto, definido como um superespiralamento negativo. Contrariamente, em algumas condições, o DNA pode ser superenrolado, e resulta no superespiralamento positivo.

Na **Figura 7.6**, você pode observar que o caminho torcido tomado pelo eixo da hélice do DNA, quando o DNA estiver subenrolado (superespiralamento negativo), é a imagem especular daquele, adquirido quando o DNA está superenrolado (superespiralamento positivo). O superespiralamento não ocorre ao acaso, pois está diretamente relacionado à tensão da torção imposta ao DNA pela diminuição ou aumento do número de ligação relativo ao DNA relaxado.

A quebra de uma fita de DNA pode alterar o número de ligação em  $\pm 1$  ao rodar uma das extremidades da fita quebrada,  $360^\circ$  sobre a fita não quebrada e ao religar as extremidades quebradas. Essa alteração não tem efeito no



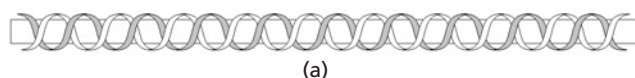
**Figura 7.6:** Ilustração do superespiralamento positivo e negativo, utilizando o exemplo da molécula mostrada na **Figura 7.5**. A molécula de DNA circular relaxada pode sofrer um subenrolamento, levando ao superespiralamento negativo ( $Lk = -3$ ), ou pode sofrer um superenrolamento, levando ao superespiralamento positivo ( $Lk = +3$ ). Observe que a distorção do eixo do DNA é oposta, levando à geração de uma imagem refletida no espelho.

número de pares de bases ou no número de átomos em uma molécula circular de DNA. Duas formas de um dado DNA circular, que difiram apenas em uma propriedade topológica (como o número de ligação), são referidos como topoisômeros.

O número de ligação pode ser dividido em dois componentes estruturais chamados contorção ( $W_r$ , do inglês *writhe*) e distorção ( $T_w$ , do inglês *Twist*) e estão ilustrados na **Figura 7.7**. Esses componentes são mais difíceis de serem descritos do que o número de ligação. No entanto, podemos pensar na contorção como uma medida do espiralamento do eixo da hélice, e na distorção, com uma determinante da distorção local ou do relacionamento espacial dos pares de bases vizinhas. Quando ocorre uma variação no número de ligação, parte da tensão resultante é compensada pela contorção (superespiralamento) e parte pela variação da distorção, fornecendo a equação:

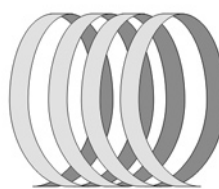
$$Lk = Tw + Wr.$$

Distorção e contorção são propriedades geométricas e não topológicas porque elas *podem* ser alteradas pela deformação de uma molécula de DNA circular fechada. Além disso,  $Tw$  e  $Wr$  não precisam ser números inteiros.



(a)

Tira reta (DNA relaxado)



(b)

Grande contorção, pequena alteração na distorção



(c)

Zero de contorção, grande alteração na distorção

**Figura 7.7:** Modelo de tira para ilustrar a distorção e a contorção. (a) A tira cinza representa o eixo de uma molécula de DNA relaxada. A tensão gerada pelo subenrolamento do DNA irá distorcer a tira cinza como (b) contorção ou (c) distorção. A alteração no número de ligação geralmente é acompanhada por alterações na contorção e na distorção.

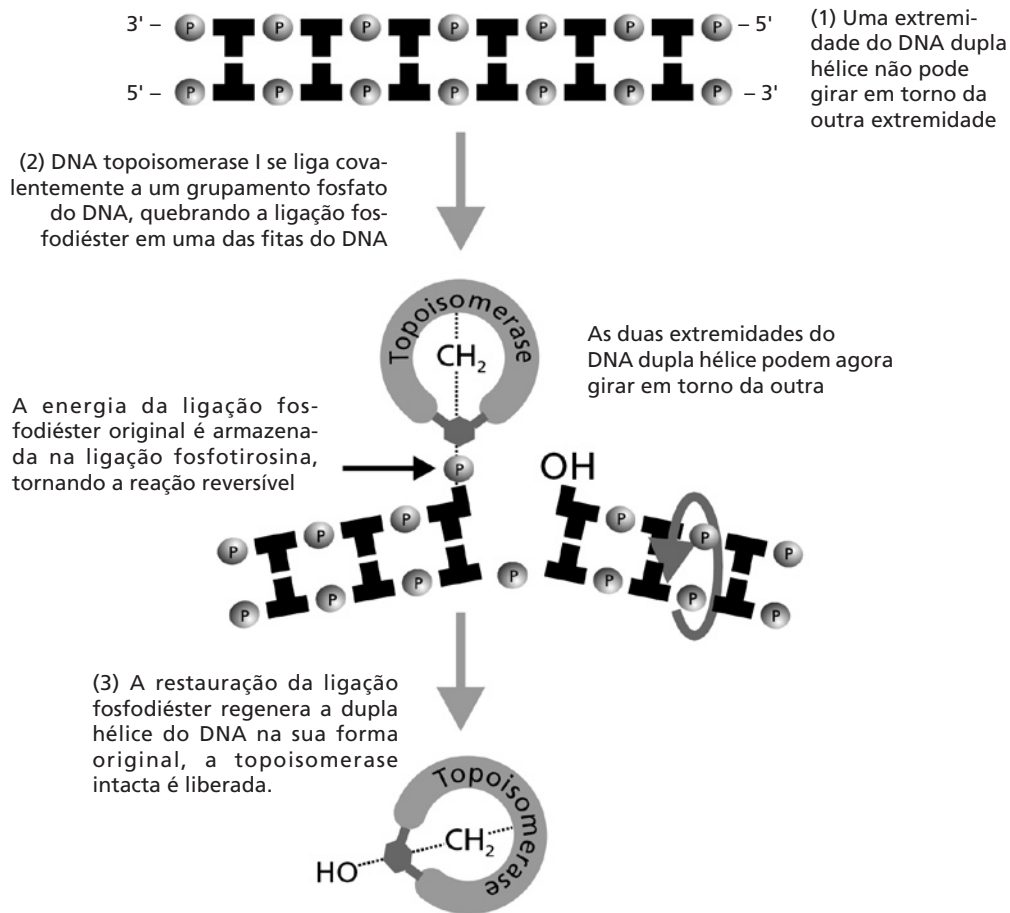
O superespiralamento do DNA é um processo precisamente regulado que influencia muitos aspectos do metabolismo do DNA. Toda célula possui enzimas cuja única função é subenrolar e/ou relaxar o DNA. Enzimas que aumentam ou diminuem o grau de subenrolamento do DNA são chamadas topoisomerases, e a propriedade do DNA que elas afetam é o número de ligação. Lembre-se de que você já viu, nesta aula, a definição de um topoisômero. Assim, a topoisomerase é a enzima que leva à formação dos topoisômeros. Essas enzimas desempenham um papel importante em processos como a replicação e o empacotamento do DNA.

As topoisomerases catalisam quebras nas moléculas de DNA, mas usam ligações covalentes entre elas para segurar as moléculas de DNA que foram quebradas. Existem dois tipos de topoisomerase: a) a topoisomerase I, que produz quebras em uma única fita do DNA e permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta. A ligação das fitas quebradas altera o *Lk* em aumentos de 1; b) a topoisomerase II, que produz quebras nas duas fitas do DNA e alteram o *Lk* em aumentos de 2.

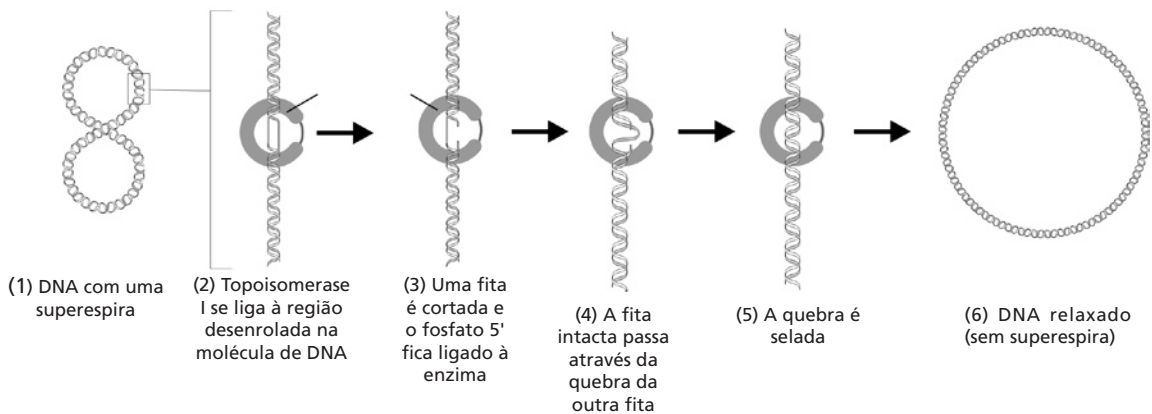
Em *Escherichia coli* já foram caracterizadas duas topoisomerases do tipo I (I e III) e duas topoisomerases do tipo II (II e IV).

As enzimas topoisomerase I são eficientes, energeticamente falando, pois elas conservam a energia do rompimento da ligação fosfodiéster, visto na aula sobre estrutura do DNA, estocando-a na forma da ligação covalente que ocorre entre elas e os grupamentos fosfato, presentes no ponto de clivagem. Posteriormente, elas utilizam essa energia para restaurar a ligação fosfodiéster e selar a quebra. Algumas topoisomerases I podem relaxar superespiralamentos positivos e negativos no DNA. A topoisomerase I de *Escherichia coli* remove uma superespira negativa do DNA quebrando uma fita, passando a fita intacta através da fita quebrada, e selando a quebra (aumentado o *Lk*), conforme você pode observar na ilustração da **Figura 7.8**.

(a) DNA topoisomerase I promove quebras transitórias em uma única fita, que servirá como eixo de rotação nas moléculas de DNA



(b) DNA Topoisomerase I remove superespiras do DNA, uma de cada vez

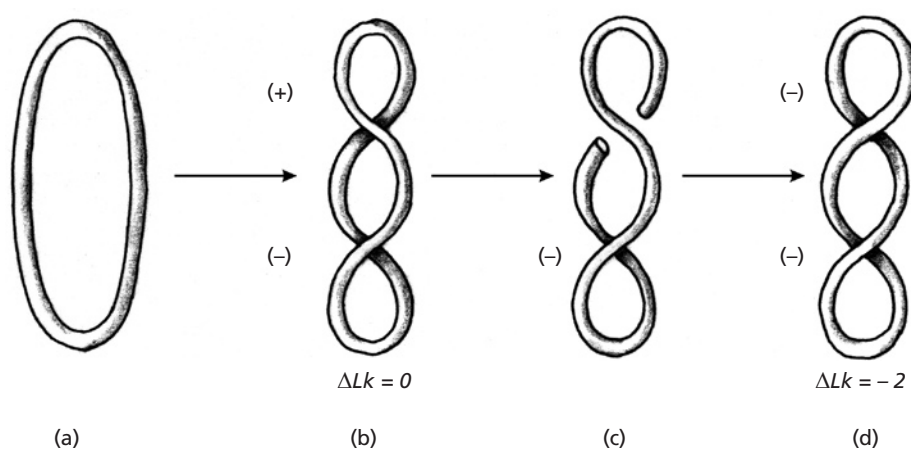


**Figura 7.8:** A topoisomerase I produz quebra em uma das fitas do DNA. Em (a), podemos observar que essas quebras servem como um eixo de rotação para as moléculas de DNA. As reações catalisadas pela DNA polimerase Iremovem superespiras do DNA, uma de cada vez, conforme ilustrado em (b).

As enzimas topoisomerase II quebram as duas fitas ao mesmo tempo e podem introduzir ou retirar superespiras, duas de cada vez, em um mecanismo dependente de ATP. As enzimas cortam as duas fitas do DNA, prendem-se às extremidades através de ligações covalentes, passam a dupla fita através do corte e selam a quebra.

A DNA girase é a topoisomerase II de *Escherichia coli* melhor caracterizada até o momento. Ela é capaz de introduzir espiras negativas (diminuindo o  $Lk$ ) num mecanismo complexo que utiliza ATP. Observe a **Figura 7.9** e acompanhe a explicação.

A girase liga-se ao DNA de forma que duas regiões de uma molécula são cobertas, resultando na configuração de um cruzamento ou nó positivo (+). Numa molécula circular, essa configuração provocará a formação de um cruzamento ou nó negativo (-) para compensar a tensão em qualquer lugar da molécula de DNA. A girase, então, quebra as duas fitas no ponto onde houve a formação do nó positivo, passa a fita dupla pelo ponto de quebra e liga novamente as duas fitas. Como resultado, ocorre a formação de dois nós negativos (-). A girase diminui, dessa forma, o  $Lk$  em -2.



**Figura 7.9:** Mecanismo da DNA girase. A girase se liga ao DNA de forma que duas regiões de uma molécula são cobertas, levando à formação de um cruzamento ou nó positivo (+) (a). Em resposta, um nó negativo é formado (-) (b). A enzima, então, corta a região positiva (+) nas duas fitas, passa a molécula pela outra e sela o corte (c). Como consequência, ocorre a formação de dois nós negativos (d). A alteração reflete uma alteração do  $Lk$  em -2.

A girase desempenha um papel fundamental na replicação do cromossomo de *Escherichia coli*. Você voltará a ouvir falar nela nas próximas aulas.

O grau de superenrolamento do DNA bacteriano é mantido pela atividade final das topoisomerases I e II.

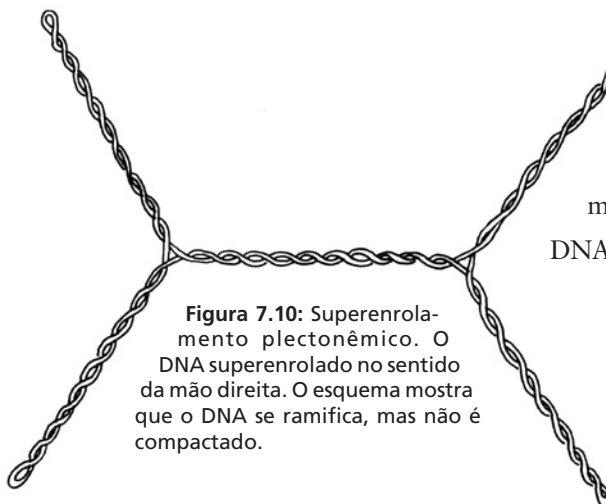
Já os eucariotos possuem topoisomerases do tipo I (I e III) e topoisomerases do tipo II (II $\alpha$  e II $\beta$ ). As topoisomerases do tipo II não conseguem subenrolar o DNA (introduzir superespiras negativas), embora ambas possam relaxar superespiras positivas e negativas. A provável origem das superespiras negativas em eucariotos você estudará na próxima aula, quando falaremos da estrutura da cromatina.

Você aprendeu até agora que o DNA se encontra superespiralado, e teve a oportunidade de conhecer como isso é possível através do subenrolamento das fitas, promovido pelas topoisomerases.

Mas como isso resulta no empacotamento dos genomas? Afinal, nós chegamos à conclusão de que, para caber dentro dos compartimentos, o DNA está superespiralado e contém proteínas. Mas mesmo com a remoção das proteínas, o superespiralamento é mantido. Foi isso que nos levou a procurar entender como ocorre o superespiralamento, não é mesmo?

Um fato interessante que foi observado é que o DNA superespiralado negativamente se encontra no sentido da mão direita da molécula de DNA, e tende a se estender e estreitar em vez de se empacotar, freqüentemente com muitas ramificações. Isso foi observado através de microscopia eletrônica e a **Figura 7.10** ilustra um esquema representando a estrutura que foi encontrada.

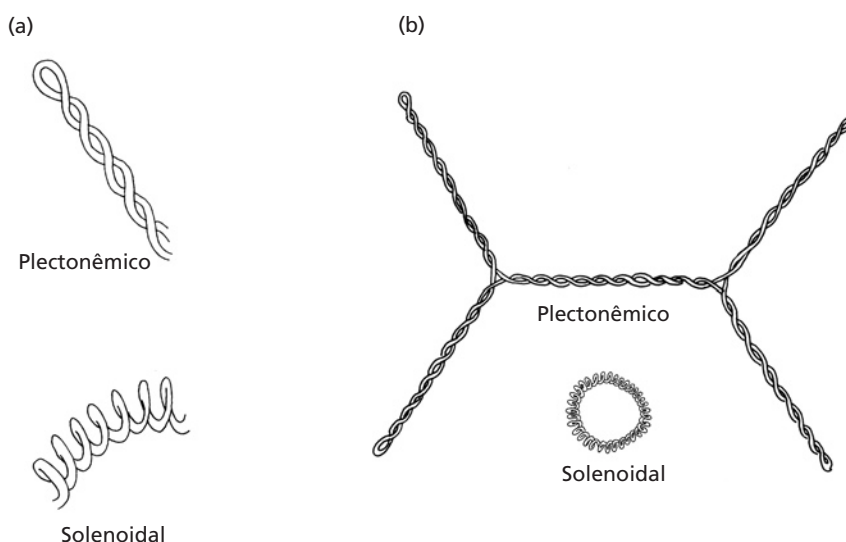
Esse tipo de superespiralamento é chamado plectonêmico (do grego *plektos*, destorcido, e *nema*, fio). O termo pode ser aplicado a qualquer estrutura em que as fitas estejam entrelaçadas de maneira simples e regular. Essa estrutura é comum em DNA superenrolado em solução.



**Figura 7.10:** Superenrolamento plectonêmico. O DNA superenrolado no sentido da mão direita. O esquema mostra que o DNA se ramifica, mas não é compactado.

Essa estrutura não satisfaz a necessidade de empacotamento do DNA. Uma outra forma de superenrolamento pode ser adotada pelo DNA subenrolado, chamado superenrolamento solenoidal. Você pode confrontar os dois tipos de superespiralamento na **Figura 7.11.a**.

O superespiralamento solenoidal envolve voltas apertadas, no sentido da mão esquerda, semelhante à forma tomada por uma mangueira de jardim organizadamente enrolada em uma roda. As duas formas de superenrolamento, solenoidal e plectonêmico, podem ser assumidas por um mesmo DNA subenrolado. Além disso, as duas formas são interconvertíveis. A forma plectonêmica é mais estável em solução, mas a forma solenoidal pode ser estabilizada pela ligação de proteínas, e é a forma encontrada na cromatina. Você pode observar na **Figura 7.11.b** que a estrutura solenoidal resulta em uma maior compactação. Assim, pode-se concluir que o superenrolamento solenoidal é o mecanismo pelo qual o subenrolamento contribui para a compactação do DNA.



**Figura 7.11:** (a) O superenrolamento plectonêmico toma a forma de espiras no sentido da mão direita, enquanto o superenrolamento solenoidal negativo toma a forma de voltas apertadas no sentido da mão esquerda. (b) Comparação entre o superenrolamento plectonêmico e solenoidal na mesma molécula, apresentada em escala. O superenrolamento solenoidal fornece um grau muito maior de compactação.



## RESUMO

Na aula de hoje, você teve a oportunidade de aprender que o superespiralamento é um mecanismo essencial para empacotar todos os ácidos nucléicos e pudemos analisar de que maneira isso ocorre no DNA, através do estudo de alguns parâmetros topológicos. Você viu, também, o papel fundamental desempenhado pela enzima topoisomerase no superespiralamento, bem como o seu mecanismo de ação. E, por último, você viu a importância dos dois tipos de estrutura (plectonêmico e solenoidal) assumidas pelo DNA superespiralado durante o empacotamento do DNA.

## EXERCÍCIOS

1. O que é superespiralamento do DNA?
2. Você consegue explicar de que maneira o subenrolamento do DNA leva ao superespiralamento?
3. Qual a função da enzima topoisomerase? Quantos tipos existem e quais as diferenças entre eles?
4. Por que a DNA girase é um tipo diferente de topoisomerase?
5. Por que a estrutura solenoidal é mais interessante do que a estrutura plectonêmica?

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você compreendeu o conteúdo da aula de hoje, não deve ter encontrado dificuldades para responder aos exercícios. Lembre-se de que o superespiralamento do DNA é importante para o empacotamento dos cromossomos, e você não deve se preocupar com os detalhes, uma vez que as informações aqui apresentadas servem de base para compreender o mecanismo como um todo, e você pode e deve consultá-la todas as vezes que tiver necessidade.

## INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, você terá a oportunidade de estudar como ocorre o empacotamento do cromossomo de eucariotos. Para isso, precisará dos conceitos apresentados na aula de hoje. Por isso, responda os exercícios e bom estudo! Até a próxima aula.

# Estrutura dos cromossomos em eucariotos

## AULA 8

### objetivos

Ao final desta aula, você terá a oportunidade de:

- Entender a organização do material genético, apresentando a estrutura dos cromossomos em eucariotos.
- Conhecer os diferentes componentes do cromossomo eucariótico.
- Entender a importância do empacotamento do DNA na fidelidade da transferência das informações genéticas para as gerações seguintes.

### Pré-requisitos

Conteúdo das aulas sobre estrutura dos ácidos nucleicos.

Conteúdo da aula sobre superespiralamento do DNA (Aula 7).

Material didático utilizado nas disciplinas Bioquímica e Biologia Celular.

## INTRODUÇÃO

Você já deve ter estudado na disciplina Biologia Celular que a maioria dos eucariotos é diplóide, ao contrário dos procariotos que são haplóides, ou seja, o seu genoma contém duas cópias, cada uma sendo proveniente de cada um dos pais. Além do mais, algumas plantas são poliplóides (possuem mais de duas cópias do genoma).

Uma outra diferença importante está relacionada à quantidade de material genético. Os eucariotos em geral apresentam uma quantidade de DNA muito maior que os procariotos, embora a diferença na quantidade de genes muitas vezes não seja tão significativa. Os eucariotos, da mesma forma que os procariotos, apresentam DNA extranuclear. Esses DNAs são encontrados nas organelas mitocôndria (em todas as células) e cloroplasto (e plastídeos de células vegetais). Então, o genoma dos eucariotos consiste no DNA encontrado no núcleo mais o DNA das organelas. Da mesma forma que o DNA plasmidial, essas moléculas são independentes do DNA nuclear e apresentam particularidades que serão estudadas mais tarde.

Um outro fato interessante é que o DNA nuclear dos eucariotos está organizado em cromossomos e o número de cromossomos varia de espécie para espécie. O tamanho dos cromossomos dentro de uma determinada espécie também varia.

É bom que você tenha em mãos o seu material de Biologia Celular referente às aulas sobre mitose e meiose, pois isso facilitará a compreensão de alguns tópicos que serão estudados a seguir.

Durante a maior parte da vida da célula, ou ciclo celular, as células não estão se dividindo e permanecem num estágio conhecido pelo nome de intérfase. Nessa fase, os cromossomos não são visíveis, mas podem ser isolados na forma de um emaranhado de fibras conhecido como cromatina.

Somente na metáfase (na meiose ou mitose) é que os cromossomos, ou seja, a cromatina, podem ser visualizados. É nesse momento que o DNA se encontra no seu mais complexo nível de empacotamento. Na verdade, os cromossomos metafásicos, geralmente representados com o formato da letra X, são compostos de duas cromátides-irmãs ligadas pelo centrômero (um cromossomo que já foi duplicado).

É importante que você tenha esse conceito bem solidificado, pois muitas vezes algumas informações são apresentadas de forma incompleta ou incorreta a

fim de facilitar a compreensão. Então, daqui para a frente, você deve ter em mente que cada cromossomo é formado por uma longa molécula de DNA dupla hélice, e o que é visto durante a metáfase são duas moléculas de DNA dupla hélice idênticas ainda ligadas, chamadas cromátides-irmãs, que serão posteriormente separadas.

A cromatina é formada principalmente por DNA, proteínas e também RNA. As proteínas podem ser divididas em duas classes: proteínas básicas, carregadas positivamente em pH neutro, chamadas histonas, e um grupo heterogêneo de proteínas ácidas, carregadas negativamente em pH neutro, que são chamadas genericamente proteínas cromossomais não histonas.

As histonas desempenham um papel estrutural importante na cromatina. Elas estão presentes em todos os eucariotos em quantidades equivalentes à quantidade do DNA. As histonas de animais e plantas estão divididas em cinco classes: H1, H2a, H2b, H3 e H4. As histonas se ligam ao DNA, permitindo a formação de subunidades estruturais conhecidas como nucleossomos. Mais tarde, nós vamos falar um pouco mais sobre essas estruturas.

De que maneira as histonas interagem com o DNA? Como já foi dito, essas proteínas são básicas porque cerca de 20 a 30% de seus aminoácidos são a arginina e a lisina. Conforme você deve se lembrar do que aprendeu na disciplina Bioquímica, esses dois aminoácidos são carregados positivamente.

Os grupamentos  $\text{NH}^{3+}$  expostos na arginina e lisina permitem que as histonas atuem como polycations, e isso é importante para a sua interação com o DNA, que é polianiónico devido aos grupamentos fosfato carregados negativamente.

Se você estiver em dúvida, dê uma olhadinha nas aulas de Bioquímica que tratam das propriedades e características dos aminoácidos.

## EMPACOTAMENTO DE DNA EM CROMOSSOMOS EUCARIÓTICOS

O maior cromossomo no genoma humano mede cerca de 85mm (85.000 $\mu$ m ou  $8,5 \times 10^7$ nm) de uma molécula gigante de DNA dupla fita. Esta molécula de DNA, de alguma forma, se empacota em uma estrutura encontrada na metáfase que tem cerca de 0,5 $\mu$ m de diâmetro e cerca de 10  $\mu$ m de comprimento, uma condensação da ordem de  $10^4$  com relação ao tamanho da molécula de DNA esticada.

A partir dessa observação, nós podemos elaborar muitas perguntas! Como ocorre essa condensação? Quais componentes dos cromossomos estão envolvidos no processo de empacotamento? As moléculas de DNA dos cromossomos diferentes são empacotadas de maneiras diversas, ou existe um mecanismo universal de empacotamento? Existem diferentes níveis de empacotamento?

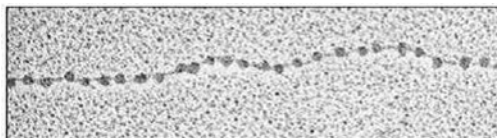
Conforme já vimos, os cromossomos metafásicos estão muito mais condensados do que os cromossomos encontrados na intérfase. Que níveis adicionais de condensação ocorrem nessas estruturas especiais planejadas para garantir a segregação correta do material genético durante a divisão celular? As seqüências de DNA de genes que estão sendo expressos são empacotadas diferentemente daqueles genes que não estão sendo expressos?

Você vai poder estudar as evidências que estabeleceram a existência de três diferentes níveis de empacotamento de DNA nos cromossomos de eucariotos.

Quando a cromatina isolada de células de eucariotos foi examinada por microscopia eletrônica, observou-se que ela é composta por muitas estruturas elipsoidais (medindo cerca de 11nm de diâmetro e 6nm de altura), que estão ligadas entre si por regiões mais finas.

A **Figura 8.1** é uma representação esquemática do que foi observado. Deu-se o nome de estrutura de “colar de contas”, pois a aparência da estrutura é semelhante a um colar.

(a)



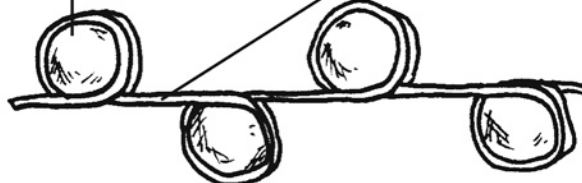
Retirada de Alberts, B. et al. In: *Fundamentos de Biologia Celular*, p. 255, fig. 8.8, Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 1999.

©2002 by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter.

Núcleo de histonas  
do nucleossomo

DNA de ligação do  
nucleossomo

(b)



**Figura 8.1:** (a) Representação esquemática da estrutura de “colar de contas” observada na cromatina. (b) Esquema de uma região do colar contendo quatro contas.

Para se descobrir a natureza dessa estrutura, apresentada pelo DNA, foram feitos estudos tratando a cromatina com **ENDONUCLEASES**. Após o tratamento da cromatina, foi observado que segmentos de DNA de 200 **PARES DE NUCLEOTÍDEOS** eram de alguma forma “protegidos” da degradação com a endonuclease.

### NUCLEASES

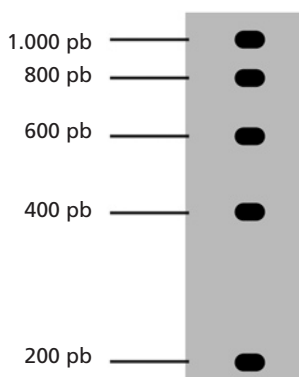
São enzimas que degradam ácidos nucléicos. Elas podem ser ribonucleases (RNases) que degradam RNA em ribonucleotídeos ou podem ser desoxirribonucleases (DNases) que degradam DNA em desoxirribonucleotídeos. As nucleases podem ser classificadas como endonuclease (quando degradam o ácido nucléico internamente) ou **exonuclease** (quando degradam os ácidos nucléicos a partir da suas extremidades) podendo ainda ser exonuclease 5' - 3', quando iniciam a degradação na extremidade contendo o nucleotídeo 5', ou exonuclease 3' - 5' quando iniciam a degradação a partir da extremidade 3' do ácido nucléico. Existe, ainda, um outro tipo de endonuclease, chamado **Endonuclease de Restrição** ou somente **Enzima de Restrição**. Essa enzima reconhece seqüências específicas no DNA dupla fita. Existe um número muito grande de enzimas de restrição que são amplamente utilizadas em Laboratórios de Biologia Molecular para cortar moléculas de DNA em locais específicos.

### PARES DE NUCLEOTÍDEOS

Regiões dupla fita de ácidos nucléicos. Muitas vezes são também chamados **pares de bases**. Você vai encontrar as duas formas, mas é importante que saiba que significam a mesma coisa. Observe ainda que às vezes falamos em cromatina e, outras vezes, falamos em DNA, e isso é proposital, pois a cromatina é formada por DNA, e o DNA é encontrado na forma de cromatina. Você deve fazer um esforço para se familiarizar com os termos.

O tratamento da cromatina com quantidades de nucleases e tempos menores do que aqueles necessários para que haja uma degradação completa é chamado digestão parcial. Em Biologia Molecular, usamos freqüentemente o termo digestão para nos referirmos ao ataque de nucleases aos ácidos nucléicos.

Assim, a digestão parcial da cromatina com essa nuclease resultou na produção de fragmentos de DNA em uma série de tamanhos específicos que eram múltiplos integrais dos fragmentos menores, ou seja, múltiplos de 200. Então, foram observados fragmentos de 200, 400, 600, 800 **pares de nucleotídeos** e assim por diante. A **Figura 8.2** apresenta um esquema ilustrando o que foi descrito anteriormente.



**Figura 8.2:** Esquema representando o resultado da digestão parcial da cromatina. O DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose, tratado com brometo de etídeo e visualizado com luz ultravioleta. Observe o tamanho dos fragmentos sendo múltiplos de 200.

Você já deve estar imaginando por que isso foi observado, pois, baseado nas informações anteriores, vimos que, ao tratar o DNA (cromatina) com nuclease, fragmentos de 200 pares de nucleotídeos foram encontrados. Já na digestão parcial, que é menos eficiente, observa-se o aparecimento de múltiplos de 200. Isso implica a conclusão de que a cromatina apresenta uma estrutura repetitiva, supostamente as contas do colar observadas na microscopia eletrônica.

De alguma forma, o DNA presente nas contas está protegido do ataque da nuclease, enquanto o DNA que une uma conta à outra é justamente o local suscetível ao ataque da nuclease. Então, podemos dizer que o colar de contas é composto por DNA na forma de contas e DNA na forma de cordão.

Para tratar o assunto numa linguagem mais científica, vamos discutir como essas estruturas são chamadas e como elas são formadas. A conta ou subunidade da cromatina é chamada nucleossomo, de acordo com o conceito atual da estrutura da cromatina, e as conexões ou cordões de DNA entre as contas são as regiões suscetíveis ao ataque da nuclease.

Um outro experimento de digestão da cromatina com nuclease demonstrou que se os nucleossomos (200 pares de nucleotídeos) fossem mantidos por mais tempo em contato com a nuclease, um segmento de DNA de 146 pares de nucleotídeos continuava presente em cada nucleossomo. Essa estrutura menor, resistente à nuclease, é chamada centro do nucleossomo. Mas como o nucleossomo é formado?

Nós falamos, no início desta aula, sobre os diferentes componentes do cromossomo e você deve estar lembrado das histonas. Caso não esteja lembrado, volte para o início da aula para poder compreender os próximos tópicos.

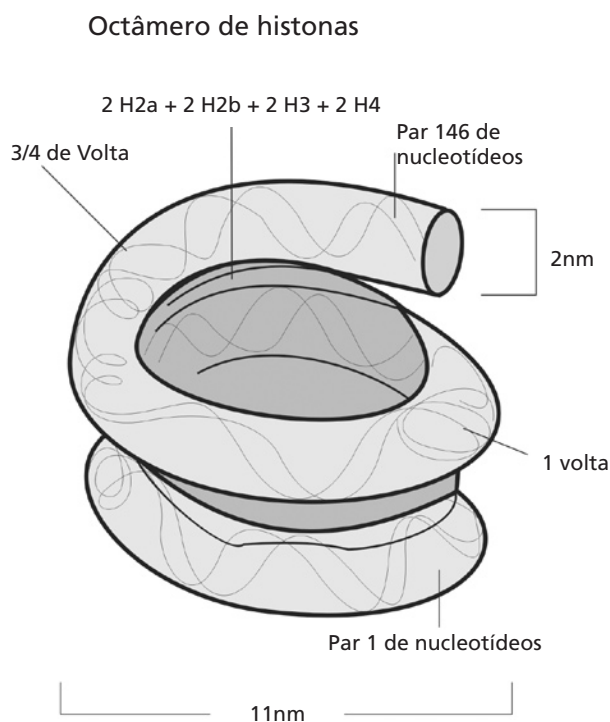
O centro do nucleossomo é formado por 146 pares de nucleotídeos e duas moléculas de cada uma das histonas H2a, H2b, H3 e H4.

As histonas se organizam na forma compacta de um octâmero. Estudos físicos (difração de raios X e análises semelhantes) de cristais do centro do nucleossomo mostram que o DNA (146 pares de nucleotídeos) está enrolado na forma de uma superespira solenoidal (Aula 7), com orientação de mão esquerda, em torno do octâmero de histonas, realizando uma volta completa mais três quartos de uma segunda volta. Observe a **Figura 8.3** e você compreenderá melhor.

A análise criteriosa dessa estrutura revela por que o DNA eucariótico está subenrolado. Você deve estar lembrado que os eucariotos não possuem topoisomerasas que subenrolam o DNA.

Você deve estar lembrado também que o enrolamento solenoidal é uma forma de superenrolamento adotada pelo DNA subenrolado. Se você não estiver se lembrando, pegue a parte final da Aula 7 e revise esse tópico, pois é importante para a compreensão.

O enrolamento dos nucleossomos é solenoidal. Para que o DNA seja enrolado fortemente nas histonas, é necessária a remoção de cerca de uma volta da hélice do DNA. Observe a **Figura 8.4** e acompanhe a explicação.

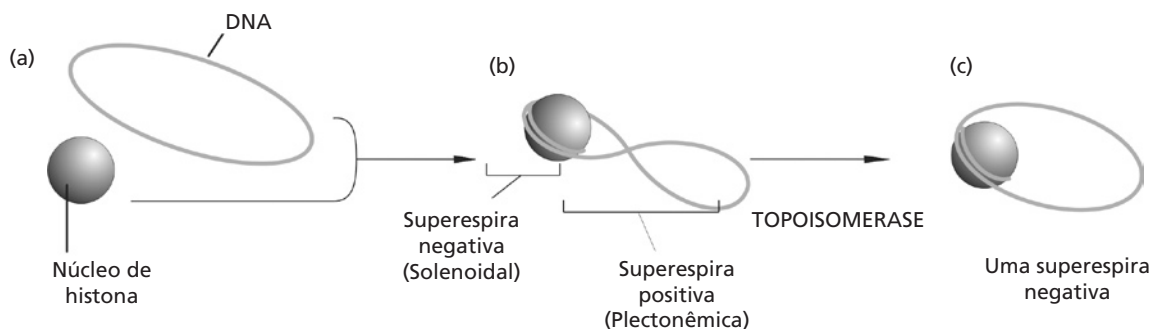


**Figura 8.3:** Esquema representando os 146 pares de nucleotídeos enrolados em torno do octâmero de histonas. A figura apresenta as dimensões do núcleo do nucleossomo. Observe a formação de uma volta mais três quartos de volta.



Quando o núcleo de proteína de um nucleossomo (octâmero de histonas) liga-se *in vitro* a um DNA circular fechado, relaxado, a ligação introduzirá uma superespira negativa. Essa ligação não provoca quebra na molécula de DNA e não altera o número de ligação, mas a formação de uma espira solenoidal negativa irá provocar a formação de uma superespira positiva em algum lugar da molécula para acomodar a tensão.

Nesse ponto, entra a topoisomerase que, como você já sabe, é capaz de remover superespiras positivas. Como resultado da ação da topoisomerase relaxando a superespira positiva, ocorrerá uma diminuição global no número de ligação. Isso resolve o problema da falta de uma enzima capaz de formar superespiras negativas a partir do DNA subenrolado.



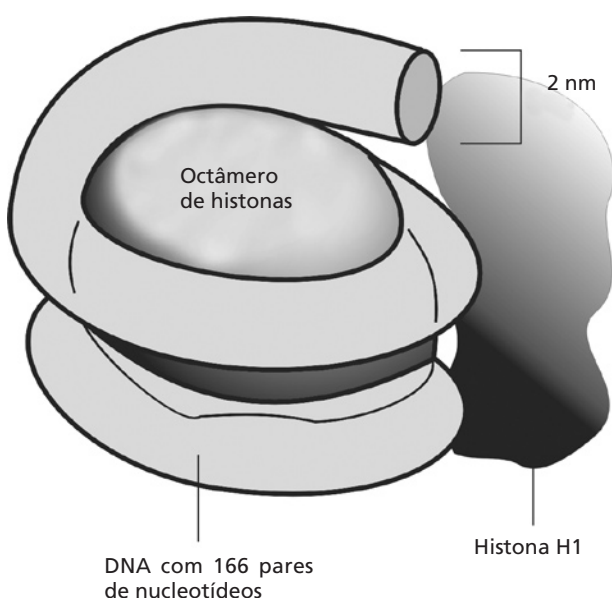
**Figura 8.4:** Montagem da cromatina. (a) O octâmero de histonas e o DNA circular separados. (b) Ao se ligar ao DNA na estrutura solenoidal (superespira negativa), ocorre a formação de uma superespira positiva para acomodar a tensão. A topoisomerase rompe a superespira positiva relaxando novamente o DNA (c).

Os octâmeros de histonas tendem a se ligar em regiões do DNA que apresentam vários pares de bases A = T, no sulco secundário da hélice do DNA, que está em contato com as histonas. A explicação plausível para isso é que o intenso enrolamento do DNA em volta do octâmero requer a compressão do sulco secundário do DNA, e um agregado de dois ou três A = T torna essa compressão mais fácil.

As histonas protegem o segmento do DNA no centro do nucleossomo da clivagem pela nuclease. A estrutura do nucleossomo é, na essência, invariável em todos os cromossomos. Dizemos na essência porque pode haver alguma variação no número de nucleotídeos que compõem o centro do nucleossomo e as conexões.

O nucleossomo é então a subunidade da cromatina. Cada subunidade é composta pelo centro do nucleossomo (146 pares de nucleotídeos mais o octâmero de histonas), o DNA de conexão, uma molécula de Histona H1 e proteínas cromossomais não histonas. Entretanto, não está bem estabelecido se a Histona H1 é distribuída igualmente por nucleossomo ou conexão, na cromatina.

As evidências sugerem que o nucleossomo completo contém uma molécula de Histona H1, que estabiliza duas voltas completas de super-hélices de DNA, na superfície do octâmero de histonas. A **Figura 8.5** ilustra o que foi descrito. O tamanho da DNA de conexão varia de espécie para espécie e de um tipo celular para outro. Já foram descritos conectores que variam de 8 a 114 pares de nucleotídeos.



**Figura 8.5:** Esquema da localização da Histona H1 no nucleossomo. O nucleossomo aqui representado está composto por 166 pares de nucleotídeos, completando duas voltas. A H1 mantém as duas voltas unidas.

Ficou claro que o nucleossomo é o componente básico estrutural da cromatina de eucariotos mas, como foi visto anteriormente, o DNA deve estar empacotado para caber dentro do núcleo da célula eucariótica e somente a organização em nucleossomos não seria suficiente, pois esse tipo de estrutura reduz o tamanho do DNA na ordem de sete vezes, muito menos do que o número visto no início da nossa aula, em que a redução é da ordem de  $10^4$ , ou seja, 10.000 vezes. Veremos, a seguir, o que ocorre com os nucleossomos.

Você pode observar no esquema da **Figura 8.6** que, quando os cromossomos metafásicos são observados por microscopia eletrônica, eles se apresentam como massas de fibras altamente dobradas ou enroladas.

Essas fibras de cromatina têm um diâmetro médio de 30nm, sendo a estrutura da cromatina conhecida como fibra de 30nm. Durante os estágios iniciais da mitose ou meiose, só é possível visualizar as regiões onde as fibras de 30nm estão fortemente empacotadas ou condensadas.

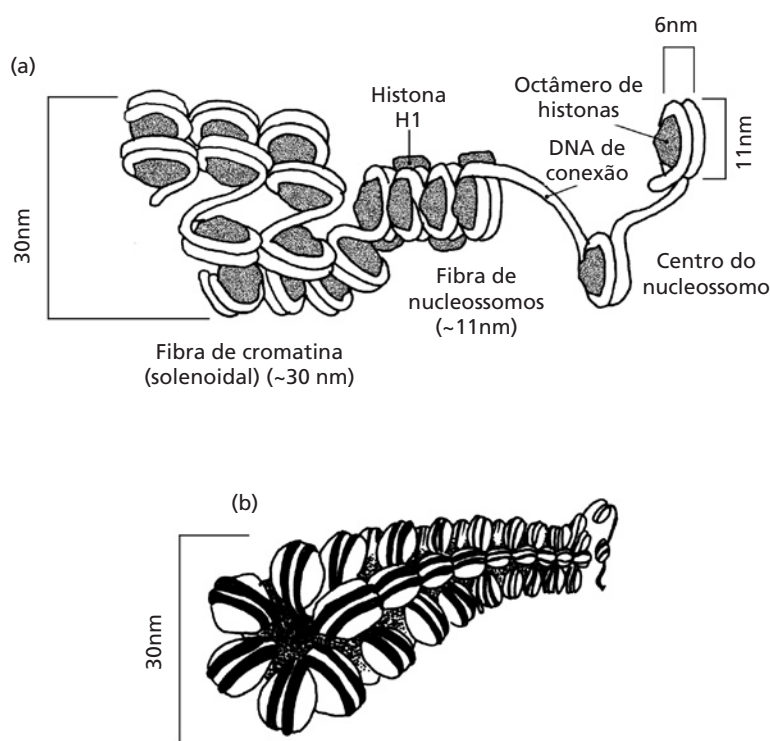
**Figura 8.6:** Esquema de um cromossomo metafásico, baseado na imagem obtida através de microscopia eletrônica. Note a presença de um emaranhado de fibras. Cada uma dessas fibras corresponde a uma estrutura de 30nm.



O que são as fibras de 30nm observadas em cromossomos meióticos e mitóticos? Apesar de não existir uma resposta definitiva para essa pergunta, você já viu que o DNA é enrolado como uma superespira em um octâmero de histonas para formar a estrutura de 10nm do nucleossomo, certo?

O que ocorre, provavelmente, é que os nucleossomos estão em justaposição direta uns com os outros, escondendo as regiões conectoras, formando uma fibra de nucleossomos de 10nm. Se a fibra de 10nm, por sua vez, for dobrada em uma ordem maior de espiralamento (solenoidal), uma fibra de 30nm pode ser formada.

Embora os cientistas não entendam todos os detalhes da estrutura da fibra de 30nm da cromatina, existem boas evidências de que elas representam uma estrutura solenóide como a mostrada na **Figura 8.7**. As fibras de 30nm fornecem um grau de compactação de aproximadamente 100 vezes.



**Figura 8.7:** (a) O esquema apresenta um possível mecanismo de formação da fibra de 30nm. (b) O esquema apresenta a forma como a fibra é encontrada na cromatina, com base em observações feitas por microscopia eletrônica.

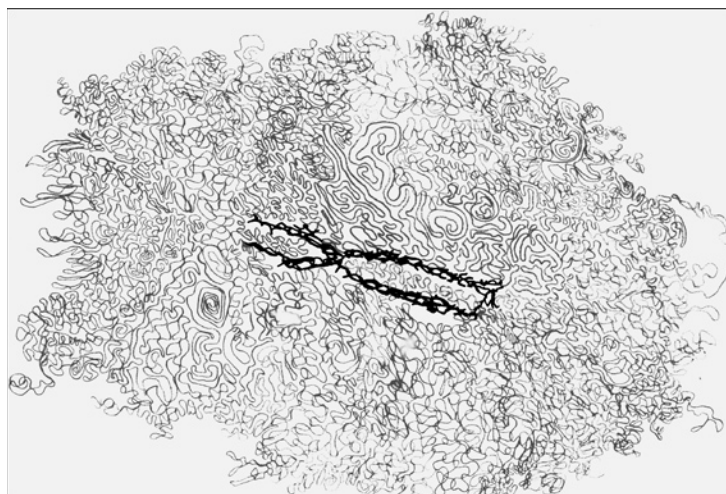
Por que os cromossomos metafásicos são tão condensados? Para responder a essa questão, precisamos recordar o que ocorre na divisão celular. Na metáfase, os cromossomos duplicados (um par de cromátides-irmãs) são alinhados no fuso para que ocorra a separação de metade para cada célula-filha.

Parece lógico que essa organização em uma estrutura tão compacta facilite essa separação, não é mesmo? Então, o papel desses cromossomos, altamente condensados, é organizar e empacotar o DNA em estruturas que facilitarão a segregação para os núcleos das células-filhas sem que as moléculas de DNA dos diferentes cromossomos se tornem emaranhadas e, como resultado, possam ser quebradas durante a separação das cromátides-irmãs.

Então, você pode concluir que a estrutura básica do cromossomo metafásico é a fibra de cromatina de 30nm que, por sua vez, é formada pela fibra de 10nm composta pelos nucleossomos. A maneira como essas fibras se condensam mais ainda até atingir a estrutura observada na metáfase ainda não é muito bem conhecida, mas parece que certas regiões do DNA associam-se a um andaime nuclear.

A **Figura 8.8** ilustra um esquema desse andaime, que pôde ser observado quando o cromossomo metafásico foi tratado com proteases. O resultado foi a formação de um halo de DNA associado ao andaime. As regiões associadas aos andaimes estão separadas por alças de DNA de, talvez, 20.000 a 100.000 pares de bases. O andaime contém várias proteínas, grandes quantidades de histonas H1 (interior da fibra) e a topoisomerase II, o que nos remete novamente ao papel dessa enzima no subenrolamento do DNA e a montagem da cromatina.

Embora não exista um modelo definitivo para demonstrar como o DNA atinge o nível máximo de compactação, a idéia mais aceita é que está sempre dependente da formação de espiras em cima de espiras.



**Figura 8.8:** Esquema baseado na observação da microscopia eletrônica de um cromossomo metafásico tratado com proteases. Observe que o andaime lembra o formato da estrutura observada na **Figura 8.6**, de um cromossomo metafásico. Em torno do andaime, nota-se um halo de DNA formado por muitas alças.

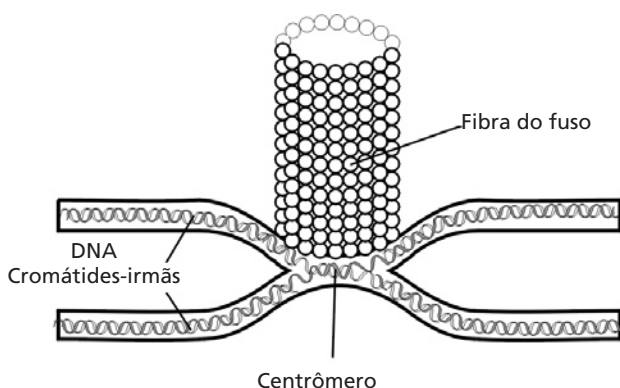
## CENTRÔMEROS E TELÔMEROS

Conforme você já estudou em Biologia Celular, os cromossomos metafásicos duplicados (cada um contendo duas cromátides-irmãs) de cada um dos pares de cromossomos em um indivíduo diplóide se separam para pólos opostos no fuso meiótico durante a anáfase I da meiose.

De modo semelhante, durante a anáfase II da meiose e na única anáfase da mitose, as cromátides-irmãs de cada cromossomo se movem para pólos opostos e se tornam cromossomos-filhos. Esses movimentos, durante a anáfase, dependem da ligação dos microtúbulos, que compõem o fuso, a regiões específicas dos cromossomos, que são chamadas centrômeros.

Todos os centrômeros desempenham a mesma função básica, assim, os centrômeros de diferentes cromossomos de uma espécie contêm componentes estruturais semelhantes.

O centrômero de um cromossomo metafásico (esquematizado na Figura 8.9) pode ser reconhecido como uma constrição, na qual ainda não houve duplicação do cromossomo nessa região. Você pode observar essa constrição no esquema da Figura 8.6. Na verdade, a produção de dois centrômeros funcionais a partir de um centrômero parental é um passo-chave na transição da metáfase para a anáfase. Um centrômero funcional deve estar presente em cada cromossomo-filho para evitar efeitos deletérios como a **NÃO-DISJUNÇÃO**.



**Figura 8.9:** Modelo da estrutura do centrômero em um cromossomo metafásico. As fibras do fuso, que se ligam ao centrômero, são responsáveis pela separação das cromátides-irmãs.

### NÃO-DISJUNÇÃO

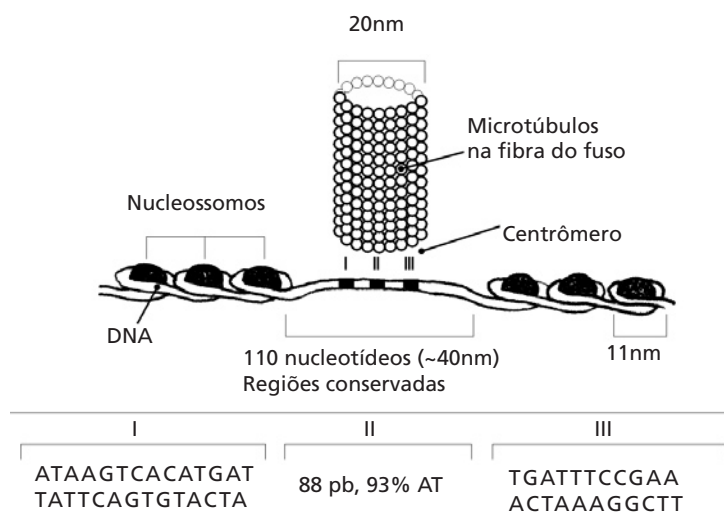
É quando os dois cromossomos migram para uma mesma extremidade gerando células-filhas com alteração no número de cromossomos. Uma delas irá conter 2 cromossomos e a outra conterá o cromossomo daquele par. Vocês vão estudar o fenômeno de não-disjunção, em detalhe, na disciplina Genética Básica.

O que é, e como funciona o centrômero? Muito do que se sabe hoje em dia veio de estudos feitos com leveduras. Os centrômeros de todos os cromossomos da levedura *Sacharomyces cerevisiae* foram isolados e caracterizados. Uma região chamada CEN foi identificada.

Os pesquisadores observaram que as regiões CEN de diferentes cromossomos podem ser trocadas entre si. A troca da região CEN de um cromossomo pela região CEN de um outro cromossomo não tem efeito aparente na célula ou na sua capacidade de se dividir normalmente.

Estudos moleculares demonstraram que o centrômero funcional de levedura apresenta um tamanho de 110 a 120 pares de nucleotídeos e possui três regiões essenciais. Você pode observar a representação esquemática da região CEN na **Figura 8.10**.

As regiões I e III são seqüências conservadas que estão localizadas nas extremidades da região II, que é um segmento central rico em A=T composto por cerca de 90 pares de nucleotídeos. Na região central, o seu tamanho e o fato de ser rica em A=T são provavelmente mais importantes do que a seqüência em que os nucleotídeos estão dispostos. Já nas regiões I e III, as seqüências específicas são importantes, pois atuam como sítios de ligação para proteínas, provavelmente envolvidas na ligação com as fibras do fuso. A estrutura macromolecular exata do complexo de ligação do centrômero com as fibras do fuso ainda não foi totalmente determinada para os cromossomos eucarióticos.



**Figura 8.10:** Esquema da estrutura conservada dos centrômeros de *Sacharomyces cerevisiae* e as seqüências das regiões I, II e III, que formam o CEN.

Até agora você viu que o cromossomo é um filamento longo de DNA, que sofre um empacotamento para atingir a estrutura observada no cromossomo metafásico. Você viu também que isso é importante na separação dos cromossomos para as células-filhas e que essa separação ocorre através de uma estrutura especial, permitindo a ligação de proteínas que formarão o fuso.

Você verá no próximo tópico que os cromossomos eucarióticos apresentam ainda uma outra particularidade, essencial para a sua conservação e estrutura. Essa particularidade é uma estrutura chamada telômero.

Os telômeros (do grego *telos* e *meros* que significa *final* e *parte*) ou extremidades dos cromossomos eucarióticos apresentam propriedades únicas. Uma observação interessante obtida pelos pesquisadores é que os cromossomos com as extremidades quebradas se tornam “grudentos” e tendem a se fundir com outros. Em contraste, as extremidades de cromossomos normais são estáveis e não apresentam tendência de fusão com outros cromossomos.

Uma outra razão para acreditar que os telômeros apresentam estruturas únicas é o fato de o mecanismo conhecido de replicação de moléculas lineares de DNA não permitir a duplicação completa das duas fitas. Assim, os telômeros devem conter estruturas únicas que permitam a replicação ou deve existir alguma enzima que resolva esse problema. Esse assunto será estudado em detalhe nas aulas sobre replicação do DNA.

Qualquer que seja sua estrutura, os telômeros devem prover três funções importantes: impedir que as nucleases degradem as extremidades da molécula de DNA linear; impedir que moléculas lineares de diferentes cromossomos se fundam e facilitar a replicação das extremidades da molécula linear, para que não ocorra perda de material genético.

Sabe-se que os telômeros de cromossomos eucarióticos são formados por repetições contíguas de seqüências curtas de nucleotídeos. As seqüências variam de espécie para espécie, mas a unidade básica da repetição é representada por 5' T1-4 A0-1 G 1-8 3', em quase todas as espécies. Isso significa que, a partir do primeiro nucleotídeo 5', a repetição pode apresentar de 1 a 4 Ts; de 0 a 1 A; de 1 a 8 Gs.



Lembre-se de que o DNA é sempre representado na orientação fosfato 5' para hidroxila 3' e mesmo que o DNA seja dupla fita, somente uma delas é representada, já que a outra fita 3' - 5' será complementar a ela.

Por exemplo, uma sequência repetida encontrada em humanos e outros vertebrados é 5'TTAGGG3', a do protozoário *Tetrahymena thermophila* é 5'TTGGGG3' e a da planta *Arabidopsis thaliana* é 5'TTTAGGG3'. Na maioria das espécies, outras sequências repetitivas de DNA são encontradas nas adjacências dos telômeros, e são chamadas sequências associadas ao telômero.

Em vertebrados, a repetição 5'TTAGGG3' é altamente conservada, e foi identificada em mais de 100 espécies incluindo mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios e peixes. O número de cópias dessa repetição básica em telômeros varia de espécie para espécie, de cromossomo para cromossomo dentro das espécies e até no mesmo cromossomo em diferentes tipos celulares.

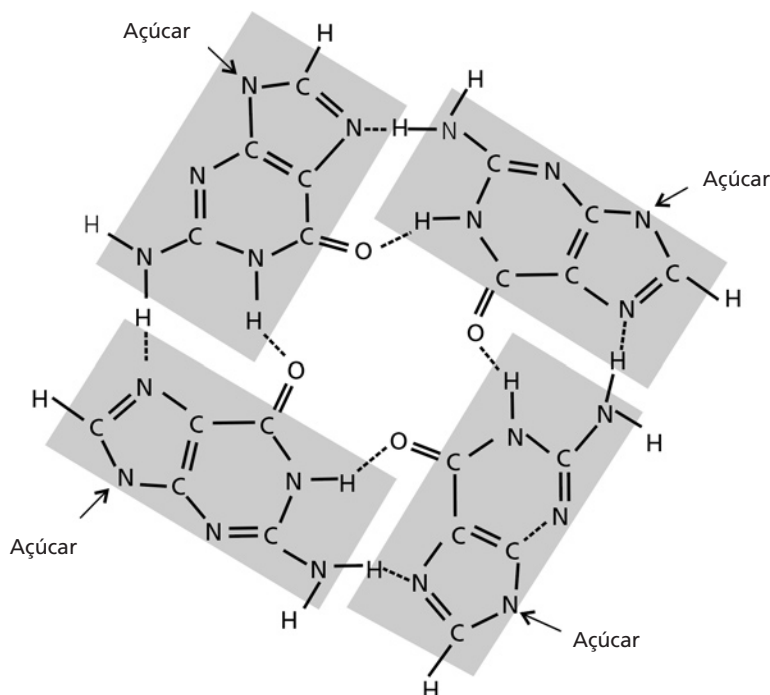
Em cultura *in vitro* de células somáticas humanas normais, os telômeros geralmente contêm de 500 a 3.000 repetições 5'TTAGGG3'; que vão diminuindo com a idade das células. Uma observação interessante é que os telômeros de linhagens de células germinativas e células cancerosas não diminuem com a idade.

Os telômeros de algumas poucas espécies não são compostos por repetições do tipo descrito acima. Na mosca de fruta, *Drosophila melanogaster*, por exemplo, os telômeros são compostos de duas sequências especializadas de DNA que apresentam a capacidade de se mover de um local para outro do genoma. Devido à mobilidade, essas sequências são chamadas elementos genéticos de transposição. Você terá a oportunidade de aprender sobre o assunto mais adiante nessa mesma disciplina.

A maioria dos telômeros termina com uma região fita simples de DNA rica em Gs, chamada extremidade 3' pendurada. Essas regiões são curtas em ciliados como o *Tetrahymena* (12 a 16 nucleotídeos), mas são longas em humanos (125 a 275 nucleotídeos).

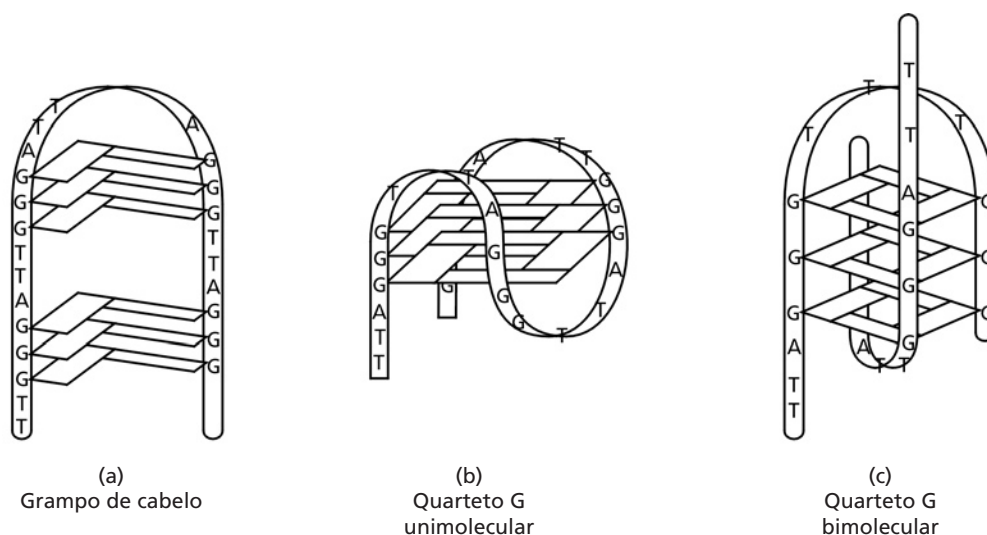
Os nucleotídeos terminais das extremidades fita simples geralmente exibem padrões únicos de metilação (ligação covalente de grupamentos metila) que, sem dúvida, contribuem para a estrutura do telômero. As regiões dos telômeros com sequências ricas em guanina apresentam a capacidade de formar numerosas pontes de hidrogênio (diferentes daquelas produzidas pelo pareamento das bases de Watson e Crick no DNA).

Por exemplo, quatro resíduos de guanina podem formar um quarteto G através de um tipo especial de ponte de hidrogênio chamado pareamento de Hoogsteen. A **Figura 8.11** ilustra a estrutura do quarteto G.



**Figura 8.11:** Estrutura do quarteto G formado em solução utilizando oligonucleotídeos contendo as seqüências repetitivas encontradas nos telômeros.

Experimentos *in vitro* usando seqüências curtas de DNA sintético, chamados oligonucleotídeos, contendo as seqüências repetitivas encontradas nos telômeros, são capazes de formar quartetos G em solução. No entanto, o fato de essas seqüências formarem quartetos G *in vivo* permanece desconhecido. Três modelos da estrutura dos telômeros humanos são mostrados na **Figura 8.12**. Uma sugestão é que os quartetos G bimoleculares (**Figura 8.12 c**) podem desempenhar uma função durante a iniciação do pareamento dos cromossomos na meiose.



**Figura 8.12:** Três modelos para a estrutura do telômero humano. (a) Grampo de cabelo, uma estrutura unimolecular, (b) Quarteto G unimolecular, (c) Quarteto G bimolecular.

Embora a estrutura tridimensional conhecida dos telômeros não seja precisa, os telômeros certamente apresentam características especiais que são responsáveis pelas suas propriedades únicas. O mecanismo de síntese dos telômeros será abordado na aula sobre replicação do DNA. Proteínas que se ligam especificamente aos telômeros já foram identificadas em diferentes espécies.

Essas proteínas provavelmente encobrem o DNA telomérico proporcionando uma estabilidade maior às extremidades dos cromossomos. Uma dessas proteínas chamada TRF2 (*Telomere Repeat-binding Factor 2*, do inglês Fator 2 ligante à Repetição Telomérica) demonstrou impedir a fusão extremidade-extremidade de cromossomos humanos.

Com todas essas informações que você teve a oportunidade de estudar nas duas últimas aulas, você já pode traçar algumas conclusões. Vamos citar algumas delas. Quanto mais complexo o organismo, mais coordenado e preciso é o mecanismo de organização e empacotamento do material genético.

Essa organização está diretamente relacionada à necessidade de transmitir essas informações contidas no DNA e RNA (em vírus) para as próximas gerações, de maneira intacta.

Em todos os organismos, o material genético sofre alterações na sua estrutura que resultam no superespiralamento, além de estar associado a proteínas.

No caso dos eucariotos, você pôde observar que o DNA contido nos cromossomos passa por diferentes níveis de organização e que apresenta regiões que são essenciais para a manutenção da sua integridade.

Apesar das inúmeras informações aqui apresentadas, você deve ter notado que muitas vezes nós citamos que alguns dos mecanismos ainda não são conhecidos em detalhe.

Pois bem. Você deve ter em mente que a Biologia Molecular é uma ciência relativamente recente, pois como você deve estar lembrado, foi em 1953 que a estrutura do DNA foi determinada por Watson e Crick.

Pensando assim, todas essas informações foram obtidas nos últimos 50 anos, e dependeram do desenvolvimento de equipamentos e técnicas especializadas. A Biologia Molecular é uma das áreas das ciências que mais avançou nos últimos anos e acreditamos que no futuro próximo muitas das hipóteses serão comprovadas ou descartadas com base nas evidências experimentais que estão por vir.

## RESUMO

Nesta aula, você teve a oportunidade de aprender que os cromossomos dos eucariotos sofrem diferentes níveis de compactação. O superespiralamento do DNA é essencial para o seu empacotamento. Nos eucariotos, o primeiro nível de compactação ocorre através da interação do DNA com octâmeros de histonas, formando os nucleossomos. Na cromatina, o DNA é encontrado na forma de fibras de 30nm, como resultado do superespiralamento solenoidal da fibra de 10nm, formada pelos nucleossomos. Os níveis superiores de compactação não são bem conhecidos; no entanto, o mecanismo mais provável é que seja dependente da formação de espiras sobre espiras. Você viu ainda que os cromossomos de eucariotos apresentam estruturas especiais. Uma delas, o centrômero, está envolvida na formação do fuso e garante a separação das cromátides-irmãs; a outra, o telômero, está localizada nas extremidades dos cromossomos e desempenha importante função relacionada à estrutura e integridade dos cromossomos.

## EXERCÍCIOS

1. Cite e explique os componentes dos nucleossomos.
2. Um DNA dupla fita de um vírus foi injetado no núcleo de uma célula eucariótica. Esse DNA será empacotado na forma de nucleossomos? Justifique sua resposta.
3. De que maneira é formada a fibra de cromatina de 30nm?
4. Qual a função da topoisomerase no mecanismo de empacotamento do cromossomo eucariótico?
5. Quais são os principais componentes estruturais de um cromossomo eucariótico?
6. Você acha que é possível construir um cromossomo artificial juntando DNA de diferentes organismos? Justifique sua resposta.

## AUTO-AVALIAÇÃO

Se você teve dificuldade para responder aos exercícios 2 e 6, recomendamos que você recorra ao tutor desta disciplina no pólo. Ele com certeza o ajudará. As respostas para os demais exercícios estão contidas no texto da nossa aula de hoje.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Nas próximas aulas, nós estudaremos como funciona o mecanismo de replicação em diferentes organismos. Até lá e bom estudo!

**Biologia Molecular**

Gabbarito

1. Os nucleotídeos são formados por um açúcar de cinco átomos de carbono (uma pentose), uma base nitrogenada ligada ao  $C_{1'}$  da pentose e um, dois ou três grupamentos fosfatos ligados normalmente ao  $C_{5'}$  da pentose.

2. DNA – os nucleotídeos constituintes são chamados desoxirribonucleotídeos; RNA – os nucleotídeos constituintes são chamados ribonucleotídeos. Os desoxirribonucleotídeos contêm o açúcar desoxirribose, as bases purínicas adenina (A) e guanina (G) e as bases pirimidínicas citosina (C) e timina (T). Já os ribonucleotídeos contêm o açúcar ribose, as bases purínicas adenina (A) e guanina (G) e as bases pirimidínicas citosina (C) e uracila (U).

3. A purina é formada por dois anéis heterocíclicos fundidos, um de seis e outro de cinco átomos, e a pirimidina é formada por apenas um anel heterocíclico de seis átomos. Desenhar qualquer uma das bases A, G, C e T presentes no DNA e qualquer uma das bases A, G, C e U presentes no RNA. As fórmulas estruturais desses compostos encontram-se na **Figura 3.4**.

4. Um nucleosídeo é formado por uma base nitrogenada ligada a uma pentose através do carbono  $C_{1'}$ . Já o nucleotídeo é constituído de uma pentose, uma base nitrogenada, ligada ao  $C_{1'}$  da pentose, e um, dois, ou três grupamentos fosfatos, ligados ao  $C_{5'}$  da pentose. As estruturas gerais de um nucleosídeo e um nucleotídeo encontram-se na **Figura 3.6**.

5. Associe as duas colunas.

- |   |  |
|---|--|
| (a) ligação fosfodiéster                      | ( d ) difere a D-ribose da desoxi-D-ribose             |
| (b) ligação N-glicosídica                     | ( a ) ligação de nucleotídeos adjacentes em uma cadeia |
| (c) fosfato éster ou fosfoéster               | ( c ) difere um nucleosídeo de um nucleotídeo          |
| (d) presença de H ou OH no $C_{2'}$ da ribose | ( b ) ligação da base à pentose no nucleosídeo         |

6. Além de serem as unidades formadoras dos ácidos nucléicos, os nucleotídeos desempenham outras funções celulares: são moléculas carreadoras de energia química (o ATP, por exemplo), são moléculas de sinalização (o cAMP, por exemplo), são componentes de co-fatores enzimáticos (NADH, por exemplo).

7. Ocorre uma reação de condensação, havendo formação de uma ligação fosfodiéster e liberação de água e pirofosfato orgânico.  $NTP \text{ (ou dNTP)} + NTP \text{ (ou dNTP)} - \text{dinucleotídeo} + H_2O + \text{pirofosfato}$ . Essa reação está representada na **Figura 3.9**.

8. Este esquema está representado na **Figura 3.10**. Ao longo de toda a cadeia existe um fosfato ligado a um açúcar, que está ligado a um fosfato ligado a um açúcar, e assim por diante. O que diferencia as moléculas de ácidos nucléicos é a seqüência de bases nitrogenadas ligadas a cada açúcar da cadeia.

1. O DNA é a molécula que armazena informação genética nas células. Como molécula da hereditariedade, o DNA tem de ser capaz de:

- armazenar um número enorme de informações, para codificar todas as proteínas necessárias ao funcionamento de uma célula;
- duplicar-se com confiabilidade, para garantir que as células-filhas contenham o mesmo conteúdo genético que a célula-mãe;
- permitir alterações em situações raras, o que garante a variabilidade genética aos indivíduos de uma população.

2. O modelo proposto por Watson e Crick consiste em duas cadeias polinucleotídicas, chamadas fitas ou filamentos, helicoidais e enoveladas para a direita ao redor de um eixo comum, formando uma dupla hélice com 20 Å de diâmetro. A estrutura tridimensional do DNA se assemelha à estrutura de uma escada em espiral. A natureza antiparalela das fitas que formam a dupla hélice garante o ótimo alinhamento das bases.

A complementaridade das fitas que compõem a dupla hélice de DNA assegura a formação de uma duplicata exata da informação genética parental quando o DNA é replicado. As fitas são ditas complementares porque a base em uma das fitas determina a base da outra fita, formando os pares de bases A=T e C≡G, mantidos por duas e três pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, respectivamente.

Os suportes açúcar-fosfato das duas fitas se localizam na parte externa da dupla hélice, enquanto os pares de bases se encontram na parte interna dessa estrutura.

A estrutura global do DNA é mantida pelas pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas que asseguram o empilhamento das bases.

Vários outros aspectos estruturais da molécula de DNA podem ser citados, sendo que todos eles encontram-se no texto de aula. As figuras são importantes para o entendimento; portanto, você deve retornar a cada uma delas na tentativa de extrair o máximo de informações.

3. A resposta a este exercício se baseia no fato de que a base G em uma fita pareia com a base C em outra, e vice-versa, e que a base A em uma fita pareia com a base T em outra, e vice-versa. Além disso, é importante lembrar que as fitas são antiparalelas, ou seja, a extremidade 5' de uma fita coincide com a extremidade 3' da fita complementar. Assim, a sequência da fita complementar é:

```
5' G C G C A A T A T T T C T C A A A T A T T G C G C 3'
3' C G C G T T A T A A A G A G T T T T A T A A C G C G 5'
```



4. Esta representação encontra-se na **Figura 4.5** desta aula. As interações existentes entre as bases são do tipo ponte de hidrogênio. Entre A e T formam-se duas pontes de hidrogênio, enquanto entre C e G formam-se três pontes de hidrogênio.

5. As estruturas da desoxirribose, da guanina e do fosfato podem ser encontradas na Aula 3, mais especificamente nas **Figuras 3.3, 3.4.d e 3.5**, respectivamente.

Ordem de solubilidade: fosfato > desoxirribose > guanina.

Quanto maior a polaridade do composto maior sua solubilidade em água.

Os grupamentos fosfatos, que são altamente polares, e os resíduos de açúcar localizam-se na parte externa da dupla hélice e, portanto, expostos à água. Já as bases hidrofóbicas encontram-se no interior da dupla hélice.

6. Se a molécula de DNA da nova espécie de bactéria contém 42% do par de bases C≡G, podemos deduzir que o conteúdo do par de bases A=T é 58% (100-42).

Em cada par de bases C≡G, existe uma base C e uma base G. Portanto, em termos percentuais, podemos dizer que a metade do conteúdo do par corresponde à base C, 21%, e a outra metade corresponde à base G, 21%.

Já em cada par de bases A=T, existem uma base A e uma base T. Usando um raciocínio análogo ao usado anteriormente, podemos afirmar que o conteúdo de A é a metade de 58%, ou seja, 29%, e é exatamente igual ao conteúdo de T.

Assim, o conteúdo de cada base é: A = T = 29% e C = G = 21%.

7. a) Espécie X – se o conteúdo de adenina é 35%, o conteúdo de timina também é 35%, pois para cada base A em uma fita existe uma base T na fita complementar.

Então, A + T = 70%, sobrando 30% de bases C e G. Como para cada base C em uma fita existe uma base G na fita complementar, podemos dizer que a metade, 15%, corresponde a C, e a outra metade, 15%, corresponde a G.

Resumindo, A = T = 35% e C = G = 15%.

Usando o mesmo raciocínio, podemos calcular o conteúdo de cada uma das quatro bases para o DNA Y.

Espécie Y – se o conteúdo de adenina é 17%, o conteúdo de timina também é 17%, pois para cada base A em uma fita existe uma base T na fita complementar.

Então, A + T = 34%, sobrando 66% de bases C e G. Como para cada base C em uma fita existe uma base G na fita complementar, podemos dizer que a metade, 33%, corresponde a C e a outra metade, 33%, corresponde a G.

Resumindo, A = T = 17% e C = G = 33%.

b) Para o cálculo dos percentuais das bases, foi considerada a complementaridade das bases, conforme já explicado no item a.

c) Para que uma espécie sobreviva a temperaturas elevadas, é importante que suas moléculas sejam mais resistentes à degradação pelo calor. Para uma molécula de DNA, quanto maior o conteúdo do par C≡G maior a temperatura de fusão ( $T_m$ ), já que este par de bases envolve três pontes de hidrogênio, enquanto o par de bases A=T envolve apenas duas pontes de hidrogênio.

Voltando ao resultado obtido no item a, o DNA Y apresenta maior número do par C≡G ( $C + G = 66\%$ ) do que o DNA X ( $C + G = 30\%$ ), portanto, muito provavelmente, o DNA isolado de correntes de água quente foi o da espécie Y.

8. As bases nitrogenadas livres absorvem mais luz UV (260nm) do que o DNA fita simples, que absorve mais luz que o DNA dupla fita. Desse modo, o aumento de absorção de luz observado quando uma solução de DNA é aquecida está associado à desnaturação do DNA, que envolve, inicialmente, a separação parcial das duas fitas até a separação total, originando duas fitas simples.

---

## Aula 5

1. Apenas em grupo pequeno de vírus, o RNA é capaz de atuar como material genético, ou seja, é capaz de armazenar informação genética. A importância do RNA na célula é no fluxo da informação genética, que conta com a participação dos três principais tipos de RNA, o mRNA, o tRNA e o rRNA. Outros RNAs, listados no **Quadro 5.1**, desempenham funções variadas em uma célula. Além disso, os RNAs chamados ribozimas exibem atividade catalítica.

2. Os três principais tipos de RNA, mRNA, tRNA e rRNA, participam do fluxo da informação genética. Na transcrição, uma molécula de mRNA é sintetizada tendo como molde as bases de uma das fitas do DNA. Esse mRNA, então, carrega a informação genética para o ribossomo, uma partícula supramolecular formada por rRNAs e proteínas ribossomais. No ribossomo, ocorre a síntese de proteínas, que conta com a participação dos tRNAs que transferem aminoácidos para a cadeia polipeptídica nascente de acordo com a sequência de bases no mRNA.

3. É claro que a estabilidade do DNA é vantajosa sob o ponto de vista biológico. É justamente esta estabilidade que assegura a perpetuação das informações genéticas.

A instabilidade do RNA também é biologicamente vantajosa. Se tomarmos como exemplo o mRNA, não seria interessante que esta molécula se apresentasse metabolicamente estável, pois sua função de carrear a informação armazenada no DNA para o ribossomo, onde ocorre a síntese protéica, é passageira. Após desempenhar seu papel, esta molécula deve ser degradada, assegurando, assim, a renovação de ribonucleotídeos que serão utilizados na síntese de outras moléculas de mRNA.

A diferença de estabilidade entre RNA e DNA está relacionada à presença do grupo 2'-hidroxila adjacente à ligação fosfodiéster do RNA. Este grupamento hidroxila, presente apenas nas moléculas de RNA, torna a ligação fosfodiéster mais susceptível às hidrólises química e enzimática do que a ligação fosfodiéster do DNA.

4. Em princípio, não, uma vez que o RNA, normalmente, apresenta apenas uma cadeia polinucleotídica, o que não permite a aplicação da regra de Chargaff. Entretanto, o genoma de alguns vírus de RNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas. Nestes casos, a complementaridade de bases pode existir e a regra de Chargaff pode ser aplicada. Como, no enunciado do problema, não há qualquer informação a este respeito, podemos dizer que não é possível calcular o percentual das outras duas bases.

5. a) Falsa. Apesar de inúmeras bases modificadas poderem ser encontradas no RNA, durante sua síntese apenas as bases não modificadas são incorporadas.

b) Falsa. As moléculas de RNA podem apresentar estrutura helicoidal dupla mesmo na ausência de pareamento de bases do tipo Watson-Crick. Neste caso, a estrutura helicoidal ocorre devido às forças de empilhamento de bases, sendo mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina, ou entre duas pirimidinas.

c) Correta. Além das interações de empilhamento de bases, as moléculas de RNA podem apresentar regiões com pareamento de bases ligadas por pontes de hidrogênio

d) Falsa. Apenas as moléculas de tRNA apresentam tamanho variado dentro desta faixa. Os rRNAs, em geral, são moléculas grandes, podendo apresentar um número muito maior de nucleotídeos. Já os mRNAs apresentam tamanho bastante variável e dependente do tamanho das proteínas por eles codificadas.

e) Falsa. Já foi discutido na letra c.

6. As estruturas mais comuns estão representadas na **Figura 5.4**.

7. Os tRNAs participam da síntese de proteínas ativando aminoácidos e transportando-os para o ribossomo, onde são transferidos para o polipeptídeo nascente. Todos os tRNAs apresentam o mesmo tipo de estrutura secundária de trevo de quatro folhas, que é composta por quatro braços (ver **Figura 5.6**). Em alguns tRNAs maiores, pode haver ainda um braço extra. O braço do aminoácido é onde o aminoácido específico se liga ao tRNA, enquanto o braço do anticódon apresenta uma seqüência complementar ao códon no mRNA. Os outros dois ou três braços são importantes apenas sob o aspecto estrutural. A estrutura tridimensional de todos os tRNAs se assemelha a um L torcido (ver **Figura 5.8**) e a localização dos braços do aminoácido e do anticódon nessa estrutura é fundamental para que os tRNAs desempenhem suas funções.

8. O mRNA. Os rRNAs são metabolicamente mais estáveis devido, principalmente, a sua associação com proteínas ribossomais, o que é facilitado por sua estrutura, em geral, complexa. Já os mRNAs, que apresentam poucos dobramentos intracadeia, são mais facilmente degradados na célula.

1. O empacotamento dos genomas virais pode ocorrer, basicamente, de duas maneiras: 1. O ácido nucléico vai se empacotando à medida que as proteínas formadoras do capsídeo vão se ligando a ele, de modo que essas proteínas auxiliam na compactação do ácido nucléico. Um bom exemplo é o TMV. 2. O capsídeo protéico é sintetizado antes do empacotamento; o ácido nucléico vai se compactando à medida que entra no capsídeo. Um bom exemplo é o fago. Comentário: você vai encontrar a resposta para esse exercício no início desta aula. É importante que você entenda que os dois mecanismos têm o objetivo de fazer com que o DNA fique contido dentro da partícula viral.

2. Os componentes do nucleóide são: o DNA cromossomal, as proteínas que se ligam ao DNA e moléculas de RNA. O nucleóide é o cromossomo bacteriano empacotado. O DNA encontra-se superespiralado, formando de 50 a 100 alças que são unidas pelas moléculas de RNA e proteínas. A retirada das moléculas de RNA e proteína não destrói o superespiralamento, indicando que isso é uma característica intrínseca do DNA. Comentário: a resposta deste exercício está contida no corpo do texto desta aula. É importante que você compreenda que o DNA das bactérias não fica solto dentro da célula, mas sim organizado numa estrutura que permite a sua compactação.

1. O DNA é uma espiral, sendo formado por duas fitas antiparalelas e complementares. O espiralamento de uma espiral é chamado superespiralamento. Assim, o superespiralamento do DNA significa a formação de uma outra espiral sobre a estrutura já espiralada, da mesma maneira que pode ser observado com o fio do telefone. Comentário: você pode encontrar a definição do superespiralamento no início da aula de hoje.

2. O subenrolamento significa que o número de voltas na molécula de DNA é menor do que o normal. Essa diminuição no número de voltas gera uma tensão na molécula de DNA, que deverá ser acomodada. A rotação do eixo do DNA sobre si mesmo pode relaxar a tensão, mas o resultado será a formação de uma superespira em algum local na molécula de DNA. Assim, podemos dizer que o subenrolamento leva ao superespiralamento. Comentário: a resposta para esse exercício está contida no texto da nossa aula de hoje. É interessante que você reflita sobre as causas do superespiralamento e a sua importância.

3. A topoisomerase é uma enzima que aumenta ou diminui o grau de subenrolamento do DNA, promovendo a formação de topoisômeros através da alteração do número de ligação. As topoisomerases catalisam quebras nas moléculas de DNA, mas usam ligações covalentes para segurar as moléculas de DNA que foram quebradas. Existem dois tipos de topoisomerases: a topoisomerase I, que produz quebras em uma única fita do DNA, e a topoisomerase II, que produz quebras nas duas fitas do DNA.

Comentário: esse exercício fará com que você revise a reação catalisada pela topoisomerase, bem como a diferença entre os dois tipos apresentados.

4. A DNA girase introduz duas espiras negativas através de um mecanismo que primeiramente forma uma espira positiva, através da ligação da enzima ao DNA. Para compensar a tensão, o DNA se enrola mais adiante formando uma espira negativa. A girase corta, então, ambas as fitas do DNA no local no qual a espira positiva foi formada, promove a passagem da fita intacta pelo corte e liga as duas fitas cortadas. Como resultado, ocorre a formação de duas espiras negativas. As outras topoisomerases cortam o DNA, promovem o giro da molécula e ligam as moléculas, introduzindo, assim, uma espira negativa na molécula, por isso a girase é diferente das outras topoisomerases. Comentário: esse exercício fará com que você revise o mecanismo de ação dessa importante enzima.

5. Porque a estrutura plectonêmica não consegue comprimir o DNA, da mesma forma que ocorre na estrutura solenoidal. Por isso, a estrutura solenoidal é mais interessante para o empacotamento do DNA. Comentário: esse exercício fará com que você trace um paralelo entre os dois processos, compreendendo a necessidade da escolha por um deles.

## Aula 8

---

1. O nucleossomo é formado por um octâmero de histonas (2 subunidades de cada H2A, H2B, H3 e H4) e um segmento de DNA contendo 146 pares de nucleotídeos. O DNA se enrola de forma solenoidal em torno do octâmero de histonas, formando uma volta e mais três quartos de volta.

2. Sim. Porque uma molécula de DNA será sempre uma molécula de DNA. O que irá definir o seu tipo de empacotamento é o ambiente celular onde ele se encontra. Assim, um DNA viral injetado no núcleo de um eucarioto encontrará as histonas que permitirão o empacotamento do mesmo na forma de nucleossomos.

3. A fita de 30nm é formada a partir da sobreposição e enovelamento da estrutura de 11nm composta pelos nucleossomos na estrutura de colar de contas.

4. A formação de um solenóide, pelo DNA enrolado, associado ao octâmero de histonas (nucleossomo), levará à formação de uma superespira positiva em algum lugar da molécula de DNA para acomodar a tensão causada pela formação da estrutura solenoidal. A topoisomerase relaxa a superespira positiva, fazendo com que a molécula apresente uma superespira negativa (como resultado da estrutura solenoidal no nucleossomo). Assim, a topoisomerase de eucariotos, embora não adicione superespiras negativas, indiretamente contribui para que o DNA seja superespiralado negativamente.

5. Sim. Sabemos que existem três componentes principais no cromossomo: os telômeros, localizados na extremidade dos cromossomos; o centrômero, que pode estar localizado em diferentes posições do cromossomo, e o DNA, que corresponde ao restante do cromossomo. Já que essas estruturas apresentam funções semelhantes em todos os organismos, é possível juntar o telômero de um organismo, o centrômero de um outro e a região estrutural de um outro, formando, assim, um cromossomo artificial.

Serviço gráfico realizado em parceria com a Fundação Santa Cabrini por intermédio do gerenciamento laborativo e educacional da mão-de-obra de apenados do sistema prisional do Estado do Rio de Janeiro.



Maiores informações: [www.santacabrini.rj.gov.br](http://www.santacabrini.rj.gov.br)





ISBN 85-89200-37-X



9 788589 200370



**UENF**  
Universidade Estadual  
do Norte Fluminense



Universidade Federal Fluminense

**UFF**



**UNIRIO**



**FUNDAÇÃO  
SANTA CABRINI**  
Provedora de acesso à Cidadania



**FAPERJ**  
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo  
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro



**GOVERNO DO  
Rio de Janeiro**

SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Ministério  
da Educação

