

Genética e Biologia Molecular

5 DNA: a receita da vida e seu código



Roteiro da semana

- Estrutura e Organização do Genoma
- História da descoberta do modelo
- Duplicação semiconservativa
- A replicação de DNA requer DNA pré-existente
- Desnaturação e renaturação do DNA
- O gene
- Mutações: alterações nos genes



Veja como se faz uma
extração de DNA.

O DNA é a principal molécula da vida, pois carrega em sua estrutura a informação hereditária que determina a estrutura das proteínas e as regras que direcionam o crescimento, a divisão e a diferenciação celulares. A composição química e a organização do DNA permitem um número infinito de combinações, o que pode ser percebido nas várias informações hereditárias que ele transmite. O DNA é a base do processo evolutivo,

Uma vez aceito que o DNA é o portador da informação genética, os esforços concentraram-se em decifrar a estrutura da molécula de DNA e os mecanismos pelos quais a informação nele armazenada é expressa para produzir uma característica ou fenótipo.

A Linha do Tempo do DNA



Clique no ícone ao lado para interagir com a linha do tempo do DNA. Obs.: após o término da linha do tempo, clique nas datas para ver o evento correspondente.


- 1865** O tcheco Gregor Mendel publica sobre experimentos com ervilhas, surtindo as leis de Mendel (leis da hereditariedade).
- 1869** O suíço Friedrich Miescher isola o ácido desoxirribonucleico (DNA).
- 1882** O alemão Walter Flemming descobre os cromossomos dentro do núcleo celular.
- 1902** O americano Walter Sutton e o alemão Theodor Boveri concluem que a hereditariedade se encontra nos cromossomos.
- 1909** O dinamarquês Wilhelm Johannsen cria os termos gene (unidade Mendeliana de hereditariedade), genótipo e fenótipo relacionando as características genéticas de uma pessoa com sua aparência externa.
- 1911** Thomas Hunt Morgan descreve que os cromossomos carregam os genes.
- 1912-1927** Ocorrem grandes avanços dos estudos das estruturas do DNA através da difração de raios-X.
- 1931** O russo Phoebus Aoran Levene identifica os componentes básicos dos ácidos nucleicos. Os termos DNA e RNA se tornam bem divulgados.
- 1944** O austríaco Erwin Schrodinger publica o livro "O que é a vida".
- 1949** O austríaco Erwin Chargaff fala sobre as relações quantitativas entre as bases que compõem o DNA.
- 1950** a americana Barbara McClintock, com base em análises feitas em milho, propõe a existência de genes saltadores (transposons). Os americanos Linus Pauling e Robert Corey, após identificar as estruturas das proteínas, propõem uma estrutura equivocada do DNA, o modelo da tripla hélice.
- 1952** A britânica Rosalind Franklin obtém importantes imagens do DNA por difração de raios-X.
- 1953** O americano James Watson e o britânico Francis Crick propõem a estrutura de dupla hélice para o DNA.
- 1955** Joe Hin Tijo define em 46 o número dos cromossomos humanos.
- 1958** Matthew Meselson e Franklin Stahl demonstram a replicação semiconservativa do DNA.
- 1960** O americano Arthur Kornberg identifica a polimerase, uma enzima que catalisa a síntese do DNA, e já se fala sobre engenharia genética.
- 1961** Vários cientistas descobrem que o RNA mensageiro é o que leva as informações genéticas para a produção de proteínas.
- 1966** Vários grupos de pesquisa decifram a série completa de palavras do código genético.
- 1976** É criada uma companhia de engenharia genética e é comercializada a insulina humana.
- 1980** Técnicas importantes para o projeto do genoma humano são desenvolvidas.
- 1982** O primeiro animal transgênico é obtido nos Estados Unidos.
- 1983** Mapeado o primeiro gene para doença genética humana, a síndrome de Huntington.
- 1985** O britânico Alec Jeffreys publica uma técnica importante para a elucidação de crimes, a "Impressão Digital por DNA". Surge o PCR (reação em cadeia) para a obtenção de cópias de segmentos específicos de DNA.
- 1986** Primeiro gene é identificado por clonagem posicional, a Distrofia Muscular de Duchenne.
- 1990** É iniciado o plano de sequenciamento do genoma humano, pelo departamento de Energia e Instituto Nacional de Saúde dos EUA.
- 1995** É obtida a primeira sequência completa de DNA em um organismo de vida livre, a bactéria *Hemophilus influenzae*.
- 1996** Nasce a famosa ovelha Dolly clonada a partir de um animal adulto.
- 2000** Um consórcio público do Projeto Genoma Humano divulga o rascunho do genoma humano. No Brasil, é anunciado o sequenciamento do genoma da bactéria *Xyrella Fastidiosa*.
- 2003** Finalização do sequenciamento do genoma humano. Morre Dolly por envelhecimento precoce.

Estrutura do DNA

O DNA é uma longa macromolécula, semelhante a uma escada que se espiraliza para formar uma hélice dupla. Cada fita da hélice é um polímero linear composto de unidades chamadas nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por um açúcar (desoxirribose no DNA e ribose no RNA), um grupo fosfato e uma base nitrogenada. No DNA, há quatro nucleotídeos diferentes dependendo da base nitrogenada presente: Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) e Citosina (C). Essas quatro bases em milhares de combinações sequenciais especificam a sequência de aminoácidos das proteínas. A molécula do DNA tem duas cadeias açúcar-fosfato,

que são mantidas juntas por pontes de hidrogênio formadas entre as bases nitrogenadas complementares: duas pontes de hidrogênio entre A=T e três pontes entre G≡C.

A relação de complementaridade entre adenina e timina e entre guanina e citosina é essencial para a função gênica, servindo como base tanto para a duplicação do DNA quanto para a expressão gênica. Durante ambos os processos, as fitas de DNA servem como moldes para a síntese de moléculas complementares. Assim, para qualquer segmento de DNA, devido ao pareamento específico entre as bases, se a sequência de uma cadeia for conhecida, a sequência da outra também o será.

 Clique no ícone ao lado para ver a animação sobre a estrutura do DNA.

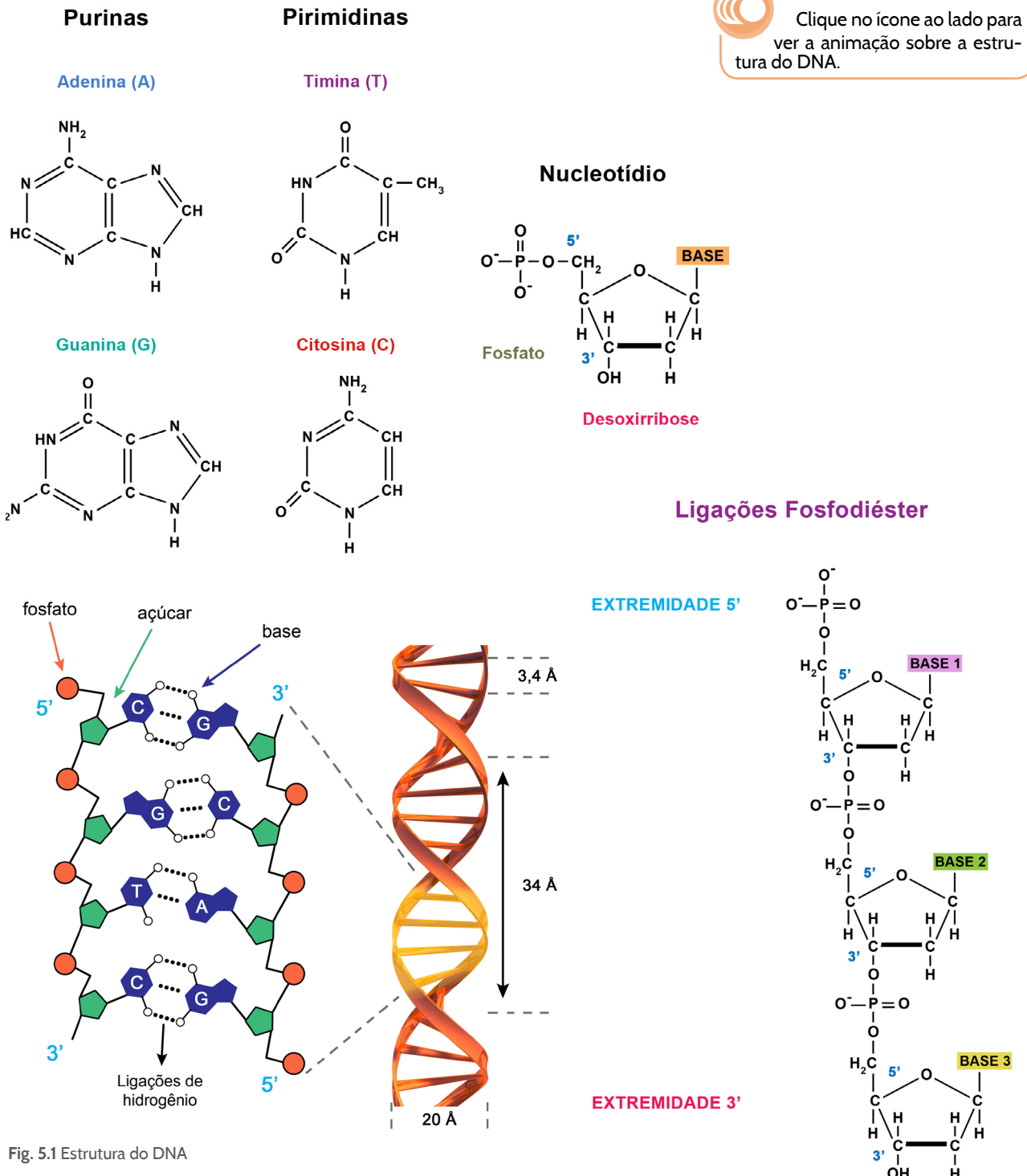


Fig. 5.1 Estrutura do DNA

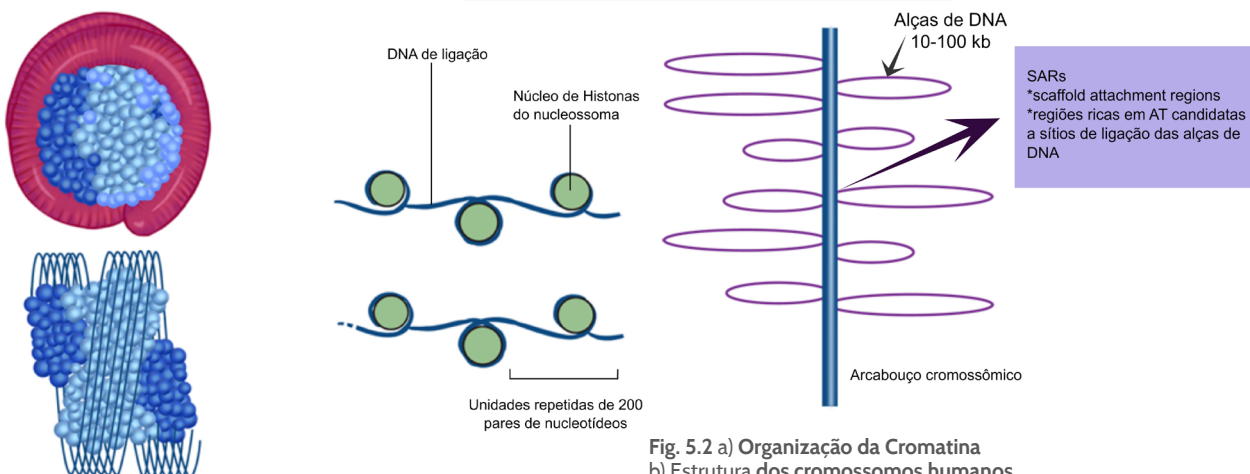
Organização do DNA

O DNA associado a proteínas (cromossomos) encontra-se dentro do núcleo celular nas células eucarióticas.

Na célula, a estrutura de cada cromossomo é altamente organizada. Mesmo no núcleo interfásico, a hélice dupla de DNA, de 2 nm, está sujeita a pelo menos dois níveis de enrolamento. O nucleossomo é a unidade fundamental de empacotamento e consiste de um núcleo de oito histonas, proteínas básicas pequenas altamente conservadas, com 103 a 135 aminoácidos. O cerne é formado por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, e, ao redor dele, um segmento de 146 pb de DNA fita dupla se enrola em 1,75 volta. Os nucleossomos adjacentes são unidos por um DNA espaçador curto. A aparência desta estrutura em microscopia eletrônica é de um colar de contas.

A estrutura em **colar de contas**, com cerca de 11 nm de diâmetro, espiraliza-se formando um filamento de cromatina com 30 nm de espessura denominado **solenóide** ou **fibra cromossômica**. Esta solenóide forma várias alças ao se associar a um esqueleto de proteínas ácidas que sustenta o cromossomo; este nível de organização tem cerca de 300 nm de espessura e constitui o **cromonema** (filamento cromossômico na interfase). Durante a divisão celular, esse filamento cromossômico enrola-se ainda mais chegando a atingir 700 nm de espessura em cada **cromátide** no cromossomo metafásico.

A transcrição só é possível quando o cromossomo está no nível de organização “colar de contas” ou “DNA livre”.



Durante a divisão celular, os cromossomos se tornam cada vez mais condensados, chegando ao nível de 1:10000 de seu comprimento quando em completo relaxamento. As alças do filamento de cromatina de 30 nm, contendo 20 a 100 kb de DNA por alça, estão ligadas a uma haste central. Esta consiste de proteínas não-histonas, ácidas.

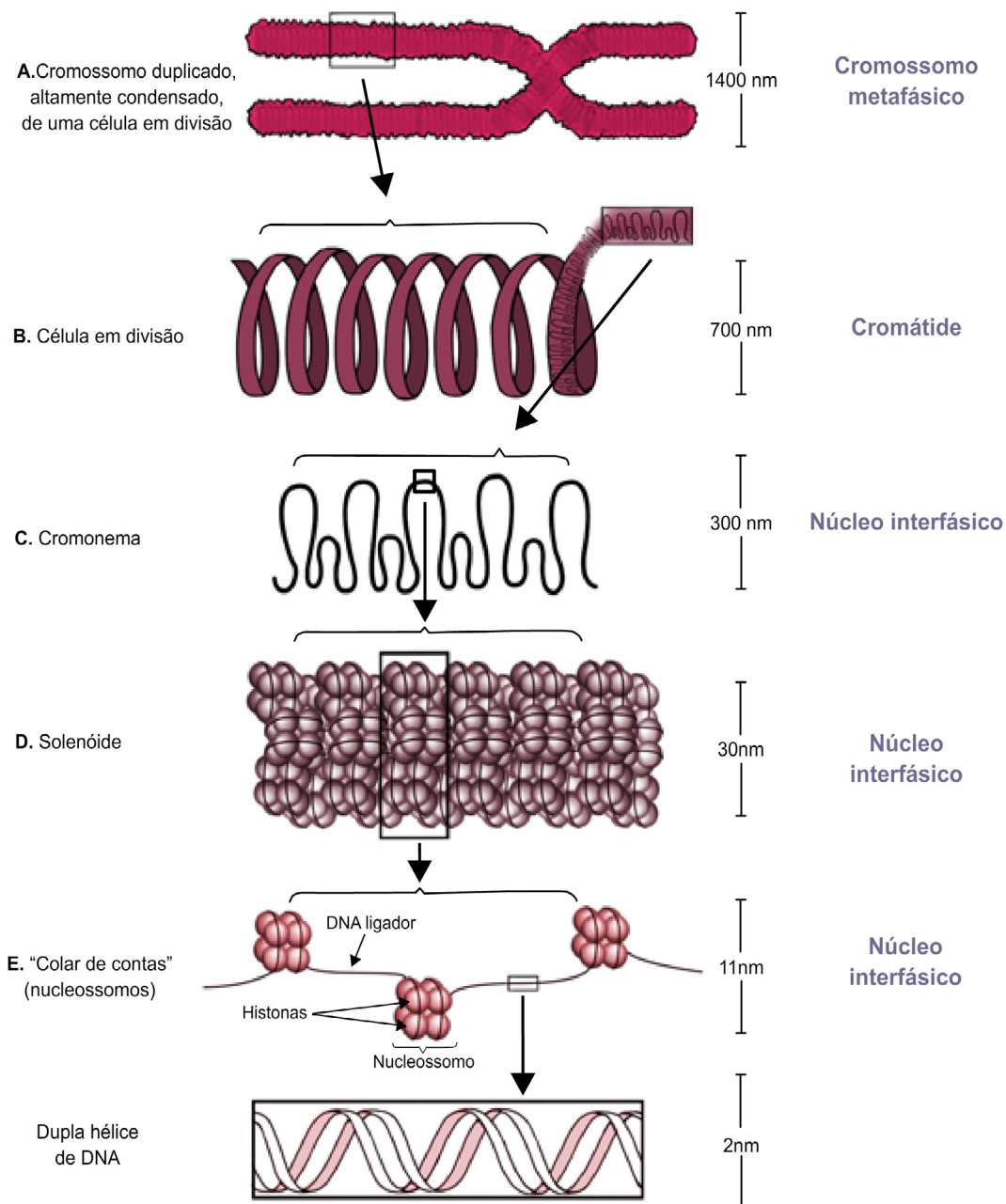


Fig. 5.3 Níveis de compactação dos cromossomos

Grande parte da cromatina é localizada na periferia do núcleo, possivelmente pelo fato de que uma das principais proteínas associadas com a heterocromatina se liga a uma proteína da membrana nuclear interna.

Conhecem-se dois tipos de cromatina (Fig. 5.4):

- **Eucromatina**, que consiste em *DNA* ativo, ou seja, que se pode expressar como *proteínas e enzimas*.
- **Heterocromatina**, que consiste em *DNA* inativo e que parece ter funções estruturais durante o *ciclo celular*.
 - » **Heterocromatina constitutiva**, que nunca se expressa como proteínas e que se encontra localizada à volta do *centrômero* (contém geralmente sequências repetitivas).
 - » **Heterocromatina facultativa**, que, por vezes, é transcrita em outros tipos celulares; conseqüentemente, a sua quantidade varia dependendo da atividade transcripcional da célula. Apresenta-se condensada na interfase.

Tipos de DNA

45% - DNA de Cópia Única (5% Codifica para Proteínas): presente uma única ou poucas vezes no genoma.

55% - DNA Repetitivo : Sequências que aparecem de modo repetido (milhares de vezes) no genoma:

- DNA Repetitivo Disperso (45%) - tende a estar espalhada individualmente por todo o genoma. Não ocorre em tandem. As formas mais comuns são os Elementos Intercalares curtos (SINEs) e Longos (LINEs).
- DNA satélite (10%): são sequências formadas por unidades de nucleotídeos repetidas em tandem (na sequência), agrupadas em certas regiões do cromossomos. Estas sequências geralmente não são transcritas. Existem várias categorias de DNA satélite e alguns destes tipos formam os centrômeros e heterocromatina.

RNA

O RNA, outro ácido nucleico, é quimicamente similar ao DNA, mas é geralmente composto por uma única fita. Diferentemente do DNA, contém como açúcar uma ribose e a base nitrogenada uracila, em lugar da timina, nos seus nucleotídeos. O RNA pode formar estruturas complementares com uma fita de DNA.

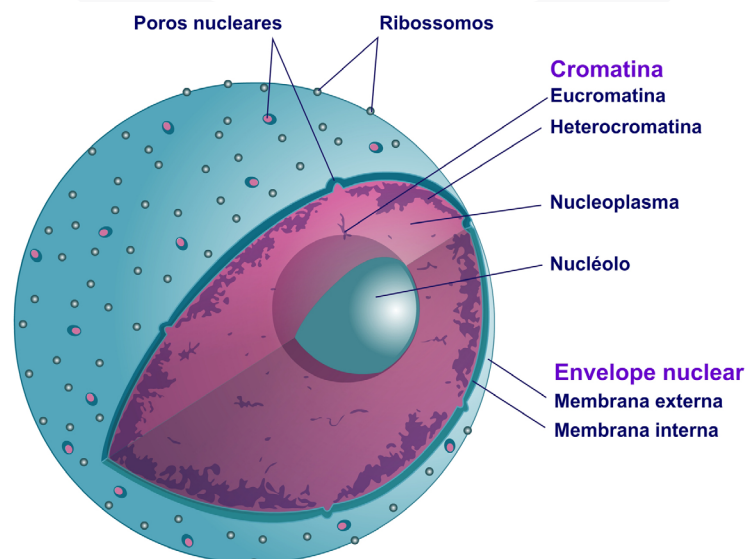


Fig. 5.4 Maquinaria celular / Fonte: CEPA

TIPOS DE RNA

- **Mensageiro (RNAm):** Especifica a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica.
- **Transportador (tRNA):** Transporta os aminoácidos até o ribossomo, ligando-se através dos anticódons ao RNAm.
- **Ribossômico (rRNA):** Associado a proteínas, forma os ribossomos.

História da descoberta do modelo

Uma das grandes descobertas do século XX foi feita, em 1953, por James Watson e Francis Crick, que estabeleceram que as duas fitas de DNA são complementares, de modo que a hélice dupla, os degraus da escadas são sempre constituídos pelos pares A=T e G≡C. Estas descobertas renderam à dupla (juntamente com Maurice Wilkins) o prêmio Nobel em 1962.

Duplicação semiconservativa

O considerável comprimento de um cromossomo humano exige que a duplicação se inicie em milhares de locais ao mesmo tempo, a fim de completar a síntese de toda a molécula dentro da fase S do ciclo celular.

Em caso de duplicação imprópria, a célula reconhece o erro e ativa o sistema de reparo de DNA: bloqueio do ciclo celular e apoptose.

Cada cadeia complementar do DNA funciona como molde para a síntese da nova cadeia durante a duplicação. Estudos de duplicação do DNA utilizando isótopos marcados N^{14} mostraram que os produtos da duplicação do DNA não incluíam a dupla hélice original, mas metade dela. Verificou-se que cada molécula-filha de DNA, após a duplicação, era composta por uma fita parental, e a nova era recém-sintetizada, contendo o N^{14} marcado. Dessa forma, comprovou-se que o processo era semiconservativo.

Evidências por microscopia eletrônica mostraram que o DNA, durante sua duplicação, formava estruturas em Y, que consistiam nas forquilhas de duplicação do DNA, indicando que a separação das duas fitas e a duplicação acontecia simultaneamente. Assim que a dupla hélice começa a se separar, as regiões da fita simples são utilizadas como molde, tornando-se imediatamente novas regiões de fita dupla.



Clique no ícone ao lado para ver a animação da duplicação do DNA.

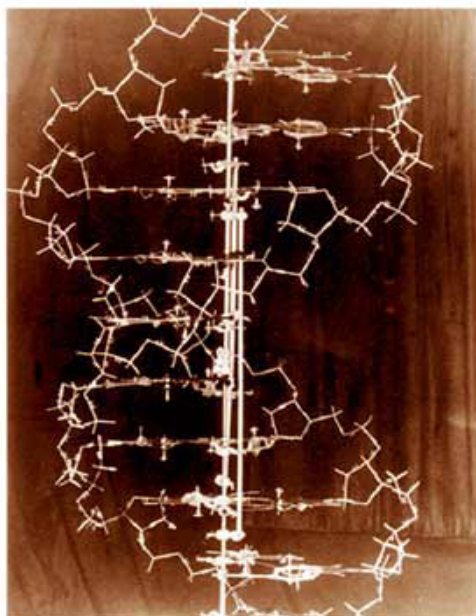


Fig. 5.5 a) O modelo de seis metros de altura do DNA, em metal, feito por Watson e Crick, em 1953. b) Os vencedores do prêmio Nobel de 1962: Maurice Wilkins (Fisiologia ou Medicina), J. Steinbeck (Literatura), James Watson (Fisiologia ou Medicina), J. Kendrew (Química).

Uma outra questão importante é referente à capacidade de duplicação do DNA em função do tempo. Verificou-se que a duplicação se inicia simultaneamente ou gradativamente em diversos pontos do cromossomo, formando fragmentos, chamados fragmentos de Okasaki, que posteriormente são todos ligados. A velocidade de síntese do DNA é de cerca de 1000 nucleotídeos por segundo.

A duplicação requer DNA pré-existente

Estudos realizados no final da década de 50, pelo pesquisador Arthur Kornberg, mostraram que a duplicação do DNA acontecia somente quando havia cadeias preexistentes de DNA para servir de molde. É interessante notar que a composição de bases do DNA produzido em tubo-teste foi idêntica à composição do DNA molde, mostrando que a última determina a composição da primeira.

A duplicação do DNA é realizada por um conjunto altamente complexo de proteínas e DNA polimerases. Esta maquinaria molecular é composta por nove proteínas que desempenham atividades diversas, inclusive ligar-se à fita de DNA, mover-se ao longo da fita, sintetizar uma nova fita, verificar se a síntese está correta e interagir com outras proteínas essenciais para o processo de duplicação. Além das polimerases, participam também do processo de duplicação as helicases, que atuam na desespiralização da hélice, as topoisomerases e outras proteínas, que diminuem a tensão criada pela desespiralização e estabilizam o DNA.

Desnaturação e renaturação do DNA

Em condições fisiológicas normais, as cadeias complementares do DNA não se separam espontaneamente, por causa do grande número de pontes de hidrogênio entre as bases das cadeias complementares.

Entretanto, em temperaturas próximas à ebulição ou em pH extremos, as duas fitas podem ser separadas, ou seja, desnaturadas. A desnaturação é reversível e o DNA é capaz de renaturação de forma perfeita, quando as condições originais são resgatadas. A renaturação é muito específica e produzirá uma dupla hélice perfeita quando as sequências de bases das duas fitas forem exatamente complementares.

Essa capacidade de anelamento do DNA, ou hibridização, constitui uma ferramenta fundamental utilizada, atualmente, nas técnicas de genética molecular.

O gene

O gene é o segmento de DNA com informação para a síntese de um polipeptídeo ou de um RNA. Todo gene expressa-se por meio da transcrição gênica, que é o processo de síntese de RNA que tem por modelo o DNA.

A **unidade de transcrição gênica** é o segmento de DNA que é transcrito de forma contínua em uma molécula de RNA. A transcrição ocorre no sentido 5'-3' da fita molde (anti-senso) do DNA, e os nucleotídeos são sempre adicionados na ponta crescente 3' do mRNA. Portanto a sequência do mRNA será correspondente à FITA senso (figura 1). A unidade de transcrição gênica geralmente apresenta uma sequência que é a região promotora, onde se encaixa a polimerase do RNA, e uma sequência finalizadora, que determina o desligamento da polimerase do RNA da molécula de DNA-modelo, completando o processo. Entre essas duas sequências, estão distribuídos, em número variável em cada gene, trechos de DNA que serão traduzidos em proteínas – os **éxons** – e trechos intercalares que não serão traduzidos – os **íntrons**.

A transcrição de um RNA tem início quando uma polimerase do RNA se encaixa na região promotora e separa, nesse local, as duas cadeias da molécula do DNA. A enzima passa então a orientar o encaixe de ribonucleotídeos nas bases de uma das cadeias do DNA, unindo-os à medida que os ordena na cadeia de DNA modelo. Dessa forma, transcreve tanto as regiões de éxons como as de íntrons, produzindo uma molécula de RNAm correspondente a toda unidade de transcrição. Ao atingir a sequência sinalizadora de término da transcrição, a polimerase solta-se do DNA e a transcrição termina. Nos eucariotos, a molécula deste chamado **pré-RNA mensageiro** sofre um série de modificações, que incluem a remoção dos íntrons – *splicing* ou “ **corte e emenda**” – e adição de nucleotídeos que conferem estabilidade a este RNAm. O corte dos íntrons é determinado por sequências específicas de nucleotídeos. O RNAm processado irá para o citoplasma, onde participa da síntese da proteína correspondente. Um mesmo pré-RNA pode ser cortado e montado de diferentes maneiras, dependendo do tipo de célula ou da fase de desenvolvimento, através do mecanismo de *splicing* alternativo. Esta é uma das explicações para o fato de um número aproximado de 25.000 genes humanos poder produzir mais de 200.000 proteínas diferentes.

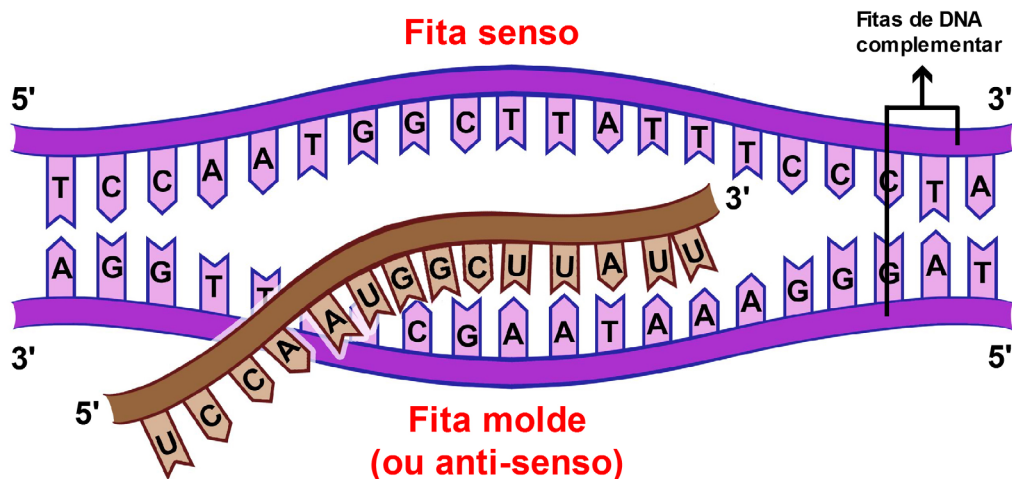
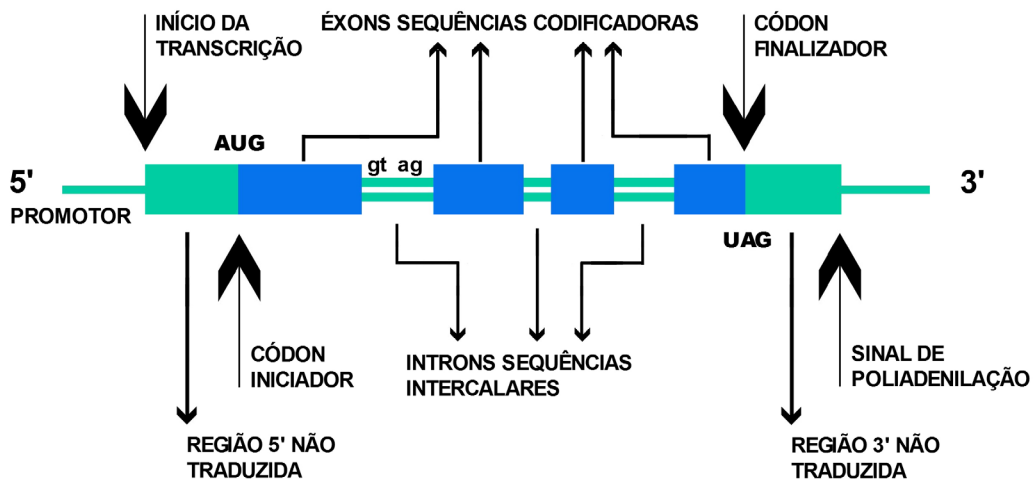


Fig 5.6 Estrutura de um gene em eucariotos. / Fonte: CEPA, Adaptado de desenhos de autoria da Dra Mariz Vainzof.

Mutações: alterações nos genes

Mutações são alterações nos genes, isto é, uma alteração na sequência ou no número de bases na molécula de DNA que compõe um gene.

Se a alteração na sequência de aminoácidos na proteína não afetar o funcionamento da molécula e não prejudicar o organismo, de modo geral, ela passa despercebida, sendo indiferente.

Outras vezes, a alteração leva a um favorecimento. Imagine, por exemplo, que uma certa célula do seu intestino passe a produzir uma enzima chamada celulase, capaz de digerir a celulose dos vegetais que você come. Provavelmente, a mutação que levou a esse erro será vantajosa para você, que poderá eventualmente até se alimentar de papel picado.

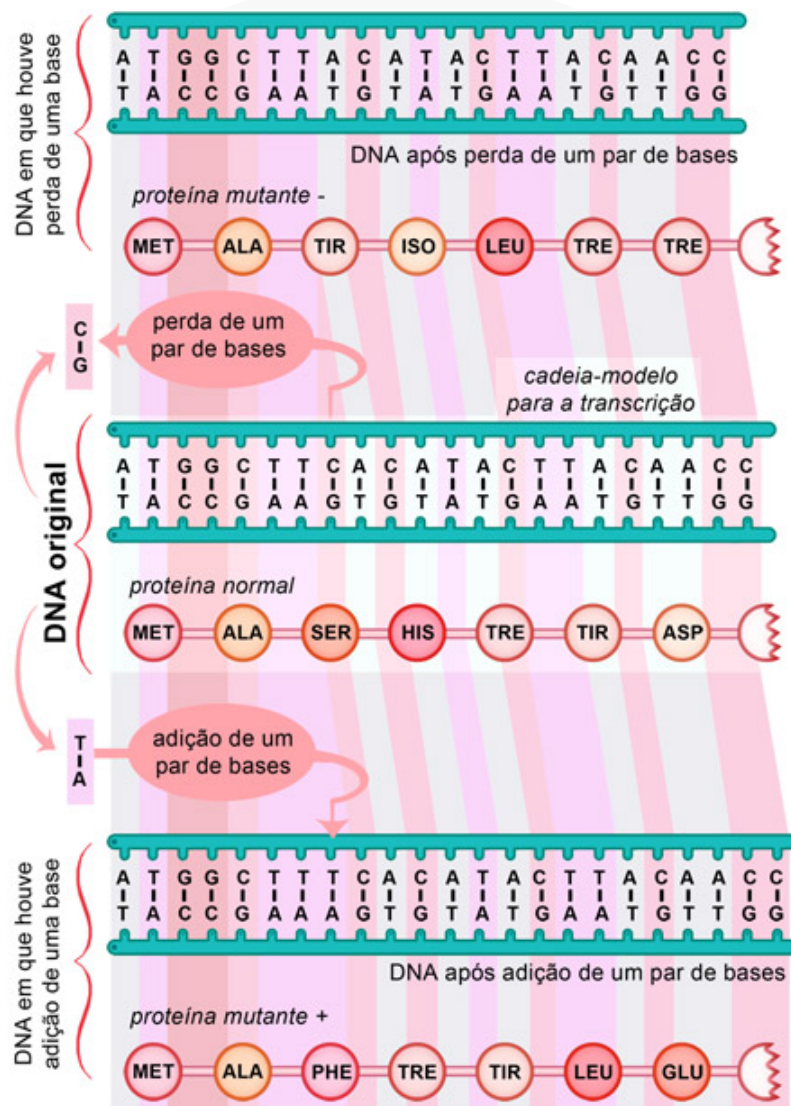


Fig. 5.7 Representação esquemática de mutações gênicas por perda de um par de bases (acima) e por adição de um par de bases (abaixo) do segmento de DNA representado no centro (DNA original). Compare a sequência de aminoácidos nas proteínas mutantes devidas à perda (proteína mutante -) e à adição (proteína mutante +) de bases com a sequência na proteína normal (DNA original). / Fonte: CEPA

TIPOS DE MUTAÇÕES

Elas podem resultar na substituição, inserção ou deleção de apenas uma base, ou abranger deleções ou duplicações de grandes segmentos de DNA.

Mutações pontuais podem ser causadas por agentes mutagênicos ou erros na duplicação do DNA.

Quando uma mutação pontual de **substituição** de uma base ocorre dentro da região codificadora da proteína, ela pode ser classificada como:

- **Mutação silenciosa:** a mudança de base não altera a tradução do códon, mantendo o mesmo aminoácido.
- **Mutação de sentido trocado ou "Missense":** a mudança da base causa uma mudança do aminoácido, que, dependendo de seu papel na estrutura da proteína, pode ser mais ou menos deletério para a sua função.
- **Mutação sem sentido:** a mudança de base leva a um códon de parada, que interrompe a proteína antes de seu término.
- Uma mutação pontual pode ocorrer também por:
- **Deleção ou inserção:** quando ocorre a remoção ou a adição de um ou mais nucleotídeos da sequência de DNA. Essas mutações geralmente modificam o quadro de leitura do RNAm do gene, resultando na tradução de uma proteína truncada.

As mutações também podem ocorrer nos sítios de emenda do RNAm, causando alterações no mecanismo de splicing do gene envolvido, adicionando ou removendo segmentos do RNAm e da proteína.

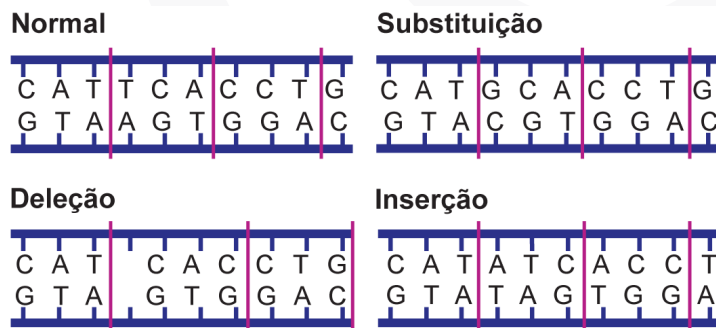


Fig. 5.8 Mutações

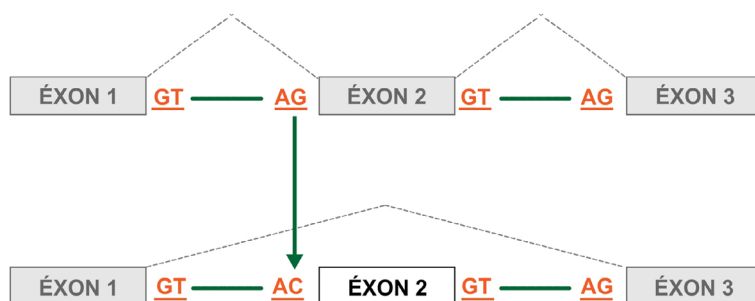


Fig. 5.9 Mutação em sítio de emenda / Fonte: CEPA, adaptado de desenhos de autoria da Dra Mariz Vainzof.

Quanto à sua função, as mutações podem ser de:

- **Perda de função:** quando o produto proteico resultante está ausente, modificado ou não funcional.
- **Ganho de função:** quando o produto proteico é modificado, ganhando uma nova função, ou quando a função gênica ocorre no tecido errado ou no tempo errado.

Algumas mutações patogênicas alteram também a regulação e o funcionamento do próprio gene, ou atuam de forma anormal na regulação da expressão de outros genes.

Na **anemia falciforme**, a substituição do aminoácido ácido glutâmico pelo aminoácido valina, em uma das cadeias de hemoglobina, conduz a uma alteração na forma da proteína como um todo. Essa alteração muda o formato do glóbulo vermelho, que passa a ser incapaz de transportar oxigênio. Outra consequência grave é as hemácias com formato de foice grudarem umas nas outras nos capilares sanguíneos, o que pode provocar obstruções no trajeto para os tecidos.

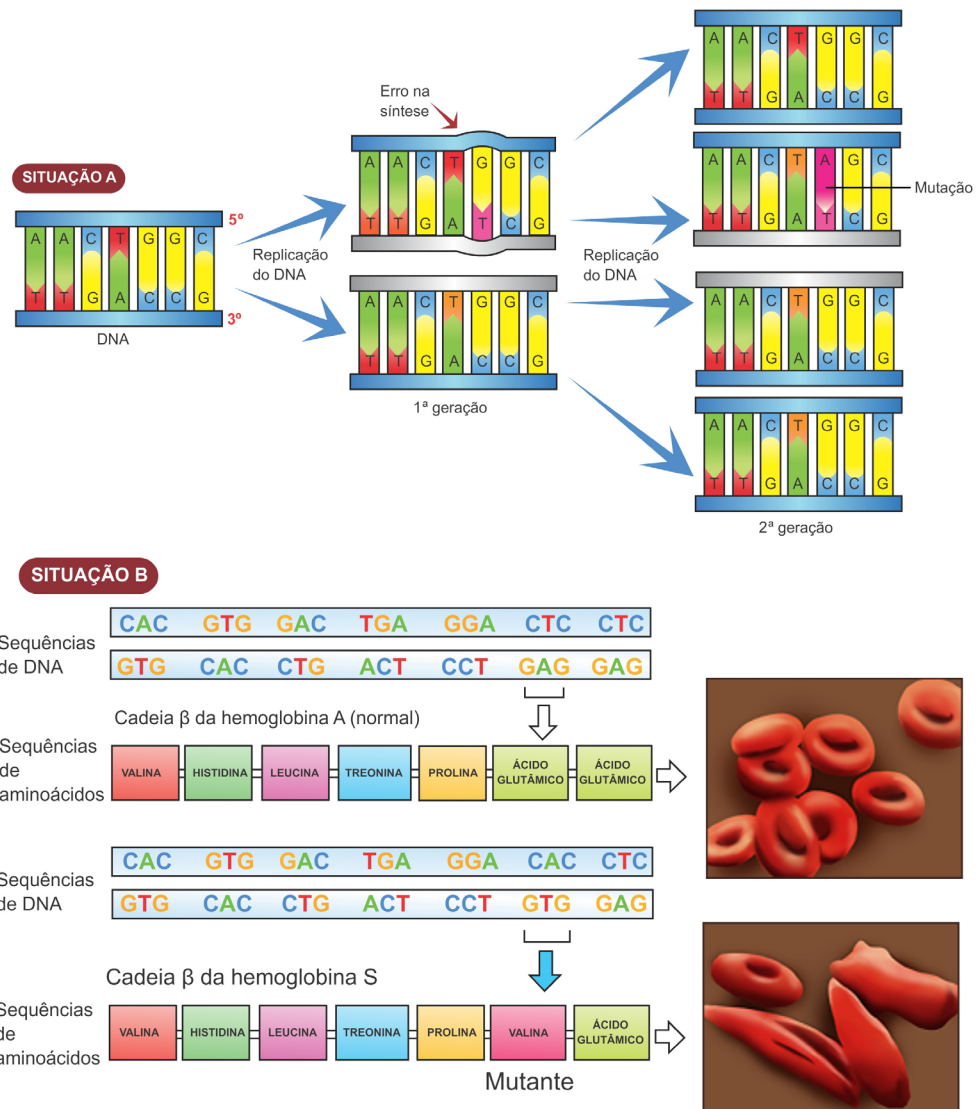


Fig. 5.10 Anemia falciforme

As hemácias, células do sangue, possuem uma proteína, a hemoglobina, que é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas dessas cadeias designadas por cadeias α e duas por cadeias β . A hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio no sangue. A sua alteração conduz ao aparecimento da hemoglobina S, provocando deficiências no transporte de oxigênio. / Fonte: CEPA, adaptado de desenhos de autoria da Dra Mariz Vainzof.

AS MUTAÇÕES SÃO HEREDITÁRIAS

Dependendo da célula em que a mutação ocorre, ela pode ser transmitida à descendência. Quando as mutações são somáticas, evidentemente, não ocorrerá a transmissão dos genes mutantes para os filhos, pois elas ocorrem em células não envolvidas na produção de gametas.

Já quando a mutação é herdada, ela deve ter ocorrido no passado em células da linhagem germinativa de algum antepassado, que a transmitiu aos descendentes.

AS CAUSAS DAS MUTAÇÕES

De maneira geral, as mutações ocorrem como consequência de erros no processo de duplicação do DNA. Acontecem com uma baixíssima frequência. Muitas delas, inclusive, são corrigidas por mecanismos especiais de reparo; por exemplo, a proteína codificada pelo gene p53 é essencial para proteger as células normais dos efeitos dos danos ao DNA e de outros estresses. Essa proteína está envolvida na interrupção do ciclo celular, na reparação do DNA e na morte celular programada. Os níveis dessa proteína são extremamente baixos nas células normais; mas, em células onde ocorreram danos ao DNA, os níveis de proteína p53 aumentam enormemente.

Há, no entanto, certos agentes do ambiente que podem aumentar a taxa de ocorrência de erros genéticos:

- substâncias existentes no fumo,
- raios X,
- luz ultravioleta,
- gás mostarda,
- ácido nitroso e
- alguns corantes existentes nos alimentos.

Não é à toa que, em muitos países, é crescente a preocupação com a diminuição da espessura da camada do gás ozônio (O₃), que circunda a atmosfera terrestre. Esse gás atua como filtro da luz ultravioleta proveniente do Sol. Com a diminuição da sua espessura, aumenta a incidência desse tipo de radiação, o que pode afetar a pele das pessoas. Ocorrem lesões no material genético, que podem levar a certos tipos de câncer de pele.

Bibliografia

THOMPSON & THOMPSON. **Genética Médica.**

WILLIAM S. KLUG, MICHAEL R. CUMMINGS, CHARLOTTE A. SPENCER e MICHAEL A. PALLADINO. **Conceitos de Genética.** 9^a ed. Editora: Artmed.

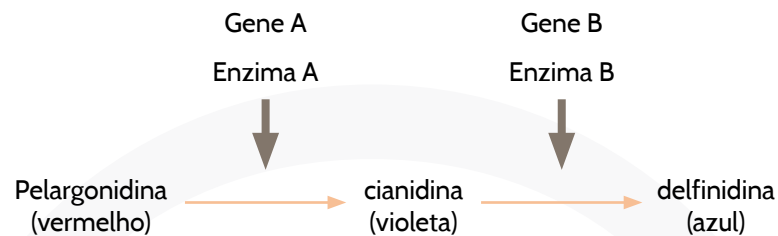
WATSON J.D. RICHARD M. MYERS. CAUDY AMY A. WITKOWSKI, JAN A. **Dna Recombinante - Genes e Genomas.** A. 3^a ed. Editora: Artmed.

STRACHAN T. e READ P. A. **Genética Molecular Humana.** 2^a ed. Editora: Artmed.

Atividades

Questionário

- O esquema abaixo representa a seqüência de reações que leva à síntese de antocianinas, pigmentos responsáveis pela cor das flores de diversas angiospermas.



Os alelos A e B codificam as formas ativas das enzimas e os alelos recessivos a e b codificam formas inativas.

Com base nas informações fornecidas, responda

- Qual é a cor das flores de plantas AAbb? Justifique
 - Qual é a proporção genotípica e fenotípica esperada da progênie (F1) do cruzamento de plantas AAbb X aaBB? Explique.
- A partir da seqüência de DNA da unidade de transcrição abaixo, descreva a seqüência correspondente do mRNA. (3)

5' ATCCGTATCTGAAATTCCGCT 3'



Fonte: CEPA