

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E GENÉTICA
Março 2008

Texto Didático (revisado agosto 2008)

Dr^a Judith Viégas, Prof^a Adjunta

BIOLOGIA MOLECULAR – Parte I
ÁCIDOS NUCLÉICOS

1. INTRODUÇÃO

A ciência da Genética principiou com o trabalho do monge austríaco Gregor Mendel, com as ervilhas de cheiro (ervilhas de jardim), que foi publicado em 1865. Seu trabalho, no entanto, ficou “esquecido” até 1900, quando foi “redescoberto”, independentemente, por Correns, Tschermak e De Vries. Em 1903, Sutton associou, claramente, os “fatores mendelianos” aos cromossomos. A partir de então, o interesse dos pesquisadores focalizou-se em duas importantes questões:

1^a) Como os genes atuam?

2^a) Qual é o material genético?

Em 1945, Beadle concluiu que cada gene dirige uma reação enzimática específica e que genes específicos atuam dirigindo a síntese de proteínas enzimáticas específicas. Surgiu então a teoria: **um gene → uma enzima**.

Posteriormente, em 1949, estudos com a hemoglobina S (hemoglobina mutante do ser humano, que causa a anemia falciforme) mostraram que os genes dirigiam, também, a síntese de proteínas sem efeito enzimático, modificando-se então a teoria para **um gene → uma proteína**.

Mais adiante, foi verificado que, para aquelas proteínas com estrutura quaternária, cada cadeia diferente era codificada por um gene, passando-se a dizer que os genes atuam da seguinte maneira: **um gene → uma cadeia polipeptídica**. Desta maneira, foi respondida a 1^a pergunta sobre “Como os genes atuam”, tendo sido provado que os genes atuam dirigindo a síntese de polipeptídeos específicos. Continuava, no entanto, em aberto a 2^a questão: “Que substância é o gene?”.

Para saber qual molécula orgânica era o gene, ela devia possuir quatro funções essenciais:

1ª) habilidade de replicar a si mesma, realizando a sua autoduplicação exata, ou seja, sintetizar a si mesma;

2ª) ter diversidade de estrutura para regular os processos vitais, isto é, ser capaz de existir ou possuir informação para o desenvolvimento de todos os tipos de órgãos, tecidos, células e processos bioquímicos que caracterizam as espécies;

3ª) ter capacidade de mutação, podendo modificar-se, de maneira que ocorram (a) as diferenças que fazem com que os indivíduos de uma mesma espécie não sejam semelhantes entre si e (b) com que haja diferenças ainda maiores entre as espécies e;

4ª) ter capacidade de tradução/translação, ou seja, deve haver uma maquinaria que leia a informação herdada e traduza-a nas células e/ou órgãos específicos, em seu tempo determinado.

Exemplo não biológico: um xérox pode conter a informação necessária para a construção de um carro, mas sem a fábrica, sem os trabalhadores e sem energia, nenhum carro será produzido. Exemplos biológicos: (1) a fusão de um gameta masculino com um feminino dá origem a um terneiro macho, que na sua maturidade sexual, dará origem a imenso número de gametas, os quais contém a informação necessária para fazer outra geração de bovinos. Ao observarmos esta irmandade, veremos que podem diferir quanto à cor da pelagem, presença ou ausência de chifres, etc..., mas não serão jamais confundidos com uma irmandade de caprinos, apesar destes também poderem diferir entre si quanto à cor da pelagem, presença ou ausência de chifres, etc... (2) A informação da estrutura química da hemoglobina, por exemplo, tanto dos bovinos, como dos caprinos deve ser traduzida em moléculas de hemoglobina, iniciando em um certo estágio do desenvolvimento do feto e, este evento, deve ocorrer nas células da medula óssea e não nas células cerebrais.

Estudos com microrganismos, realizados por Griffith (1928), Avery et al. (1944) e por Hershey e Chase (1952), demonstraram que, dos dois maiores componentes cromossômicos – DNA e PROTEÍNA, o material genético é o DNA.

2. ÁCIDOS NUCLÉICOS: Composição e Estrutura

2.1. DNA (Ácido Desoxirribonucléico)

O DNA é um ácido nucléico encontrado, preferencialmente, no núcleo das células, sendo parte integrante dos cromossomos. Foi isolado, em 1871, das células de pus e sua composição química foi estabelecida, mais ou menos, em 1940. É formado por unidades moleculares, que são denominadas de **nucleotídeos**. Cada nucleotídeo compõe-se de **uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato**.

No DNA, a **pentose é uma desoxirribose (C₅H₁₀O₄)** e o **fosfato é um grupamento fosfato (PO₄)**

Existem quatro tipos de bases nitrogenadas, que podem compor um desoxirribonucleotídeo, e que pertencem a dois grupos:

- **Purinas ou Púricas:** compõem-se de dois anéis, um benzeno e um imidazol. Nesta classe temos a **Adenina (A)** e a **Guanina (G)**.
- **Pirimidinas ou Pirimídicas:** compõem-se apenas de um anel benzeno. São a **Citosina (C)** e a **Timina (T)**.

O DNA é um polinucleotídeo composto pelos quatro tipos de nucleotídeos, arranjados em número e seqüência que dependerá do gene e/ou do cromossomo que for examinado. Analisando-se o DNA de diferentes organismos, observa-se que os quatro nucleotídeos não se encontram em quantidades iguais e que suas taxas variam de espécie para espécie. Também, foi verificado que a quantidade de adenina é igual à de timina (**A=T**) e a de citosina é igual à de guanina (**C=G**), ou seja, que o **total de purinas (A+G) = total de pirimidinas (T+C)**, mas que a relação **A+T/G+C varia de espécie para espécie**. Estas relações foram descobertas pelos pesquisadores Chargaff e Davidson, em 1955, e são chamadas de regra de Chargaff. Resumidamente podemos dizer que:

A molécula do DNA consiste de dois filamentos polinucleotídicos dispostos lado a lado numa configuração helicoidal (normalmente, com giro para direita), que estão ligados um ao outro através de suas bases nitrogenadas. As bases nitrogenadas ficam arranjadas em pares complementares (A pareando com T, formando 2 pontes H e C com G, formando 3 pontes H). O esqueleto de cada filamento consiste na alternância das unidades de desoxirribose e fosfato, ligadas por pontes diester. As bases ficam ligadas covalentemente à desoxirribose, como projeções laterais. Os dois filamentos do DNA

apresentam suas bases viradas uma para a outra e, conseqüentemente, são antiparalelos a fim de possibilitar a formação das pontes H.

O DNA é uma molécula longa, fina e rígida. Esta rigidez se deve à grande quantidade de pontes de hidrogênio entre as bases pareadas. Estas pontes H podem ser destruídas a temperaturas superiores a 70 - 85°C ou a pH extremos.

Os filamentos de DNA são antiparalelos, um em relação ao outro. Isto ocorre devido à necessidade de alinhamento das bases para pareamento. Devido à posição em que se formam as pontes diéster entre a desoxirribose e o fosfato, **um filamento terá alinhamento 3' → 5' e o outro filamento terá alinhamento 5' → 3'**, ficando assim com polaridades opostas. A anotação da direção dos filamentos deve-se aos átomos de carbono da molécula de glicose que fazem ligação com os grupos fosfato: **a glicose liga-se a um grupo fosfato pelo carbono 3' e a outro grupo fosfato pelo carbono 5'**. Este antiparalelismo dos filamentos da molécula de DNA propicia a formação específica das pontes H entre as bases nitrogenadas: 2 pontes H entre A e T e 3 pontes H entre C e G.

O pareamento específico das bases nitrogenadas suporta a 1ª função essencial do gene, ou seja, a **replicação**. A 2ª função, que é a de regulação do metabolismo e implica em **variabilidade** do metabolismo orgânico é suportada pela seqüência e número de bases do DNA. A 3ª função, a capacidade de **mutação**, baseia-se na modificação, troca, perda ou acréscimo de qualquer base nitrogenada ao longo da cadeia. A 4ª função, que é a **tradução** da informação é suportada pela maquinaria genética da síntese de proteínas, resumidamente representada pelos RNAs e ribossomos.

Watson (1970) calculou que, para um gene simples com comprimento de 1.500 nucleotídeos, o número de combinações das 4 bases é de $4^{1.500}$, mais que satisfatório para as necessidades de variabilidade gênica.

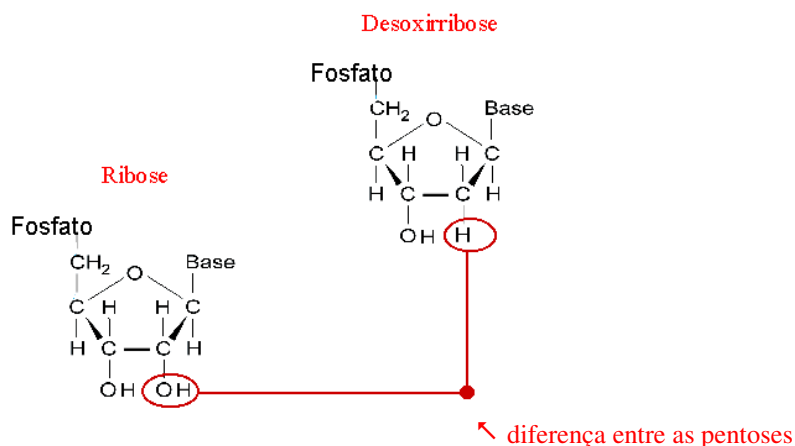


Figura 1: Ribose e Desoxirribose diferenciam-se pela presença ou ausência do grupo hidroxila no carbono-2' da pentose

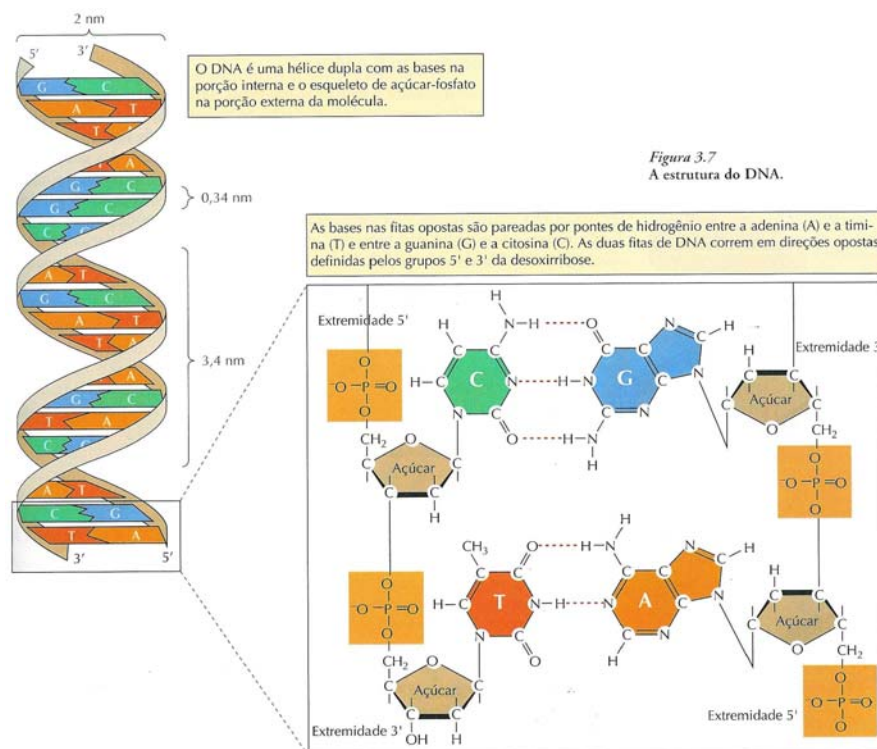


Figura 2: Estrutura do DNA, segundo Cooper (2001)

2.2. RNA (Ácido Ribonucléico)

O RNA é o outro ácido nucleico encontrado nos organismos, também um polinucleotídeo. Assim como o DNA, o RNA é formado por nucleotídeos, cada um possuindo também **uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato**. Neste ácido nucleico, **a pentose é uma ribose (C₅H₁₀O₅)** e o fosfato é **um grupamento fosfato**. Existem, também, quatro tipos de bases nitrogenadas, as **purinas** são as mesmas encontradas no DNA: **adenina (A)** e **guanina (G)**; as **pirimidinas** são a **citosina (C)**, também encontrada no DNA, e a **uracila (U)**, que não é encontrada no DNA. O número e a seqüência das bases nitrogenadas de cada RNA dependerá de sua função específica.

A analogia de estrutura entre o DNA e o RNA é de tal ordem, que se pode produzir moléculas híbridas experimentalmente, isto é, moléculas helicoidais de ácido nucleico híbrido contendo um filamento de DNA e outro filamento complementar de RNA.

Quanto à estrutura, o RNA diferencia-se do DNA por ser **uma molécula de filamento único**, sendo, portanto, uma molécula mais flexível. Sua configuração tri-dimensional dependerá de sua seqüência de nucleotídeos que, ao interagirem uns com os outros, farão a molécula dobrar-se sobre si mesma, pois as bases nitrogenadas complementares, entrando em contato, formam pontes H, propiciando a formação de alças e grampos ao longo de algumas

regiões da molécula. Estas formações determinarão a forma do RNA e terão funções específicas.

3. ÁCIDOS NUCLÉICOS: Classes

Os RNAs foram agrupados em duas classes: (1) a classe do **RNAs mensageiros**, que é a dos RNAs que **codificam a informação necessária para fazer as cadeias polipeptídicas (proteínas)**; (2) a classe dos **RNAs funcionais**, que é a dos RNAs que **são produtos finais, têm várias funções e participam em uma série de processos celulares** e não possuem código para produção de proteínas.

3.1. RNA mensageiro – mRNA ou RNAm

O mRNA, como o próprio nome diz, assim como um mensageiro, serve como um intermediário e passa a informação do DNA, ou seja, a codificação do DNA (que está no núcleo), para o local do citoplasma (em nível dos ribossomos), onde irá ser sintetizada a cadeia polipeptídica. O mRNA constitui cerca de 1 a 5% do RNA celular total.

O mRNA é uma molécula quase linear, de comprimento variável, constituída pelos éxons do pré-mRNA*, possuindo cerca de 350 a 5.000 nucleotídeos. O mRNA possui uma guanina metilada (7-metil-guanosina) adicionada à sua extremidade 5', é o chamado **cap** (capacete ou quepe), e cerca de 150 a 200 nucleotídeos de adenina adicionados à sua extremidade 3', é a chamada **cauda poli-A** ou sequência poli-A. Tanto o cap como a cauda poli-A protegem o mRNA da digestão por exonucleases citoplasmáticas, auxiliando, também, no seu transporte desde o núcleo até o citoplasma. O cap também serve como fator de reconhecimento, pelo ribossomo, do sítio de início da síntese protéica.

Funcionalmente, a molécula de mRNA contém a informação genética para a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo, desta maneira, ela representa a própria tradução do gene “per se”. **A função do mRNA é levar a mensagem genética do DNA ao local da síntese protéica.**

[*O pré-RNA mensageiro (**pré-mRNA**) ou **transcrito primário** é precursor do mRNA e está presente no núcleo. Possui cerca de 5.000 a 50.000 nucleotídeos e é formado por **éxons** e por **íntrons**. Os íntrons são excisados, isto é, são retirados da cadeia de pré-mRNA e os éxons são reunidos formando o mRNA, num processo denominado de *splicing*. Este processo é comandado por pequenas proteínas nucleolares e ocorre no núcleo da célula, somente após ter sido processado é que o mRNA migra para o citoplasma (Figura 3)]

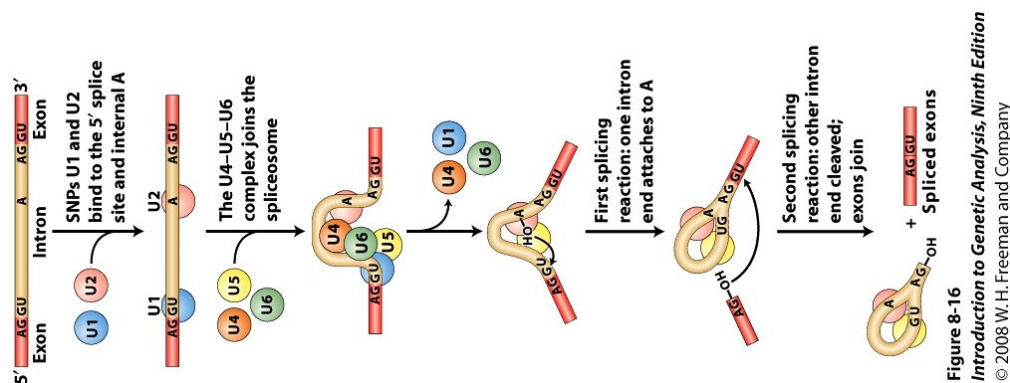


Figura 3: Processamento do pré-mRNA, segundo Griffiths et al, (2008)

3.2. RNA funcional

Existem vários tipos de RNAs funcionais que desempenham muitos papéis na expressão e regulação gênica. É importante ressaltar que **os RNAs funcionais são ativos como RNAs, eles nunca são traduzidos em polipeptídeos.**

A maioria das classes de RNAs funcionais atuam em vários passos na transferência da informação desde o DNA até a proteína, no processamento de outros RNAs e na regulação dos níveis de RNA e de proteínas celulares. Duas classes que são encontradas tanto em procaríotes como em eucariotes são o tRNA (RNA de transferência) e o rRNA (RNA ribossômico).

3.2.1. RNA de transferência ou RNA transportador - tRNA ou RNAt

O tRNA possui cerca de 70 a 80 nucleotídeos de comprimento e caracteriza-se por uma estrutura terciária complexa, em forma de folha de trevo, devido ao pareamento de bases complementares ao longo de sua cadeia ($A = U$ e $G \equiv C$) e às bases “não usuais” que possui. Estas últimas são, geralmente, bases metiladas derivadas de guanina e uracila que, por não possuírem complementaridade, não formam pontes H com outras bases, dando origem às alças do “trevo”. **A função do tRNA é a de transportar o aminoácido para o seu local correto na cadeia peptídica, durante a síntese protéica.** Constitui aproximadamente cerca de 10 a 15% do total de RNA da célula.

A estrutura em forma de trevo do tRNA possui quatro locais funcionais, ou braços, de extrema importância. Cada braço é formado por uma haste (região pareada) e por uma alça (região de filamento simples), conforme Figura 4.

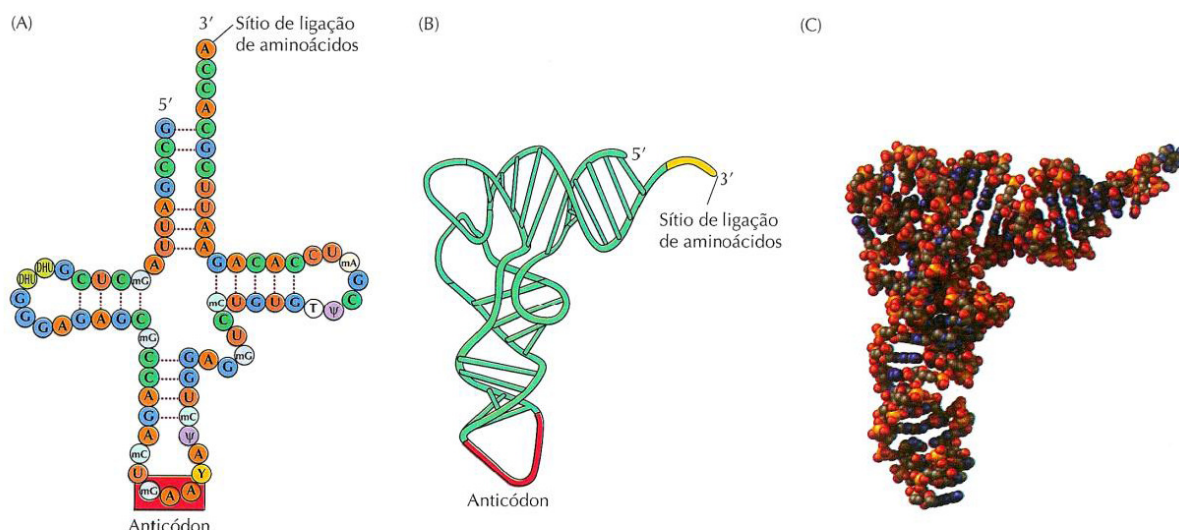


Figura 7.1
Estrutura dos RNAs transportadores A estrutura do tRNA da fenilalanina da levedura está ilustrada em forma de “trevo” aberto (A) para mostrar o pareamento de bases complementares. Bases modificadas estão indicadas como mG, metilguanossina;

mC, metilcitosina; DHU, diidrouidina; T, ribotimidina; Y, uma purina modificada (usualmente adenosina); e ψ , pseudouridina. A forma dobrada da molécula é mostrada em (B) e um modelo de enchimento de espaços em (C). (C, cortesia de Dan Richardson.)

Figura 4: Estrutura do tRNA em diversos modelos: aberto, dobrado e tridimensional, Cooper (2001)

- **Braço acceptor ou haste acceptora (Local de Ligação do Aminoácido):** situa-se na extremidade 3' do tRNA e possui a seqüência de bases 5'-C C A-3'. Esta seqüência de bases é a mesma em todo e qualquer tRNA. A especificidade tRNA-aminoácido deve-se à seqüência de bases do tRNA.
- **Braço ou alça do anticódon:** situa-se no lado oposto do braço acceptor e possui, no centro da alça, três bases nitrogenadas sem pareamento de pontes H, que formam o chamado anticódon. É através do anticódon que ocorre o reconhecimento da ordem da colocação do aminoácido, pelo tRNA, durante a síntese protéica. A ordem em que um aminoácido deve ser colocado na cadeia peptídica está contida no mRNA, o tRNA reconhece o local no mRNA através de seu anticódon que é complementar ao códon do mRNA.
- **Braço ou haste D (Local de Ligação da Aminoacil-tRNA Sintetase):** é uma das alças laterais do tRNA, chamada de D pela presença da base modificada dihidrouidina-D. Esta alça é, provavelmente, local de ligação com a enzima aminoacil-tRNA sintetase, que faz a ligação do aminoácido no final 3' do tRNA.
- **Braço T ou T ψ C (Local de Ligação ao Ribossomo):** a haste deste braço contém, geralmente, cinco nucleotídeos pareados e a alça apresenta a base não usual

pseudouridina (ψ). É o local do trevo através do qual o aminoacil-tRNA (tRNA carregado com o seu aminoácido específico) liga-se ao ribossomo durante o processo da síntese protéica.

O processo de carregamento do tRNA é altamente específico, pois **existe uma aminoacil-sintetase diferente para cada aminoácido**. Esta enzima possui dois sítios de ligação: o sítio do aminoácido e o sítio do tRNA específico para tal aminoácido. O reconhecimento do tRNA correto dá-se através das bases nitrogenadas que formam a haste D, o braço do anticódon e o braço acceptor, de acordo com a Figura 5.

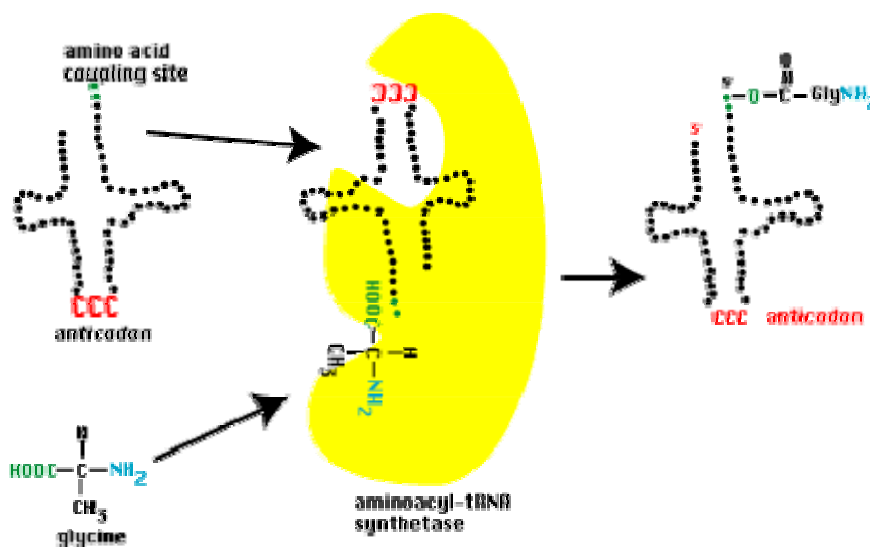


Figura 5: Processo de carregamento do tRNA com seu aminoácido específico, mediado por uma aminoacil-tRNA sintetase específica, no exemplo para o ácido glicina

3.2.2. RNA ribossômico (rRNA)

Os rRNAs, que constituem a maioria do RNA citoplasmático (em torno de 75% do total celular), são os componentes majoritários dos ribossomos, os quais são grandes máquinas macromoleculares que, junto com o mRNA e os tRNAs, guiam o agrupamento da cadeia de aminoácidos na formação do polipeptídeo.

Cada rDNA eucarioto é constituído pelos três genes de rDNA (18S, 5,8S e 28S), que são genes ligados, separados por espaçadores transcritos internos (ITS – *internal transcribed spacers*) e ladeados em ambos os lados por espaçadores transcritos externos (ETS - *external transcribed spacers*). Estes genes existem em milhares de cópias idênticas, em cada cromossomo. Portanto, em cada célula, porções cromossômicas com estas cópias de genes para rRNAs, estão sintetizando estes rRNAs, que são chamados de **pré-rRNAs**.

Cada pré-rRNA, contém os rRNA 18S + rRNA 5,8S + rRNA 28S + ITS que os separam + ETS em suas extremidades (Figura 6). Como os rRNA são sempre necessários ns

células, para formação de ribossomos, estão em constante síntese e vão sendo estocados próximos do cromossomo que contém o seu gene, auxiliando a formar o nucléolo. No nucléolo, os rRNAs são estocados, processados (Figura 6) e ligados às proteínas ribossômicas, formando as subunidades pré-ribossômicas maior e menor. Estas subunidades migram para o citoplasma tornando-se subunidades ribossômicas, que somente irão reunir-se, para formar o ribossomo, quando inicia a síntese protéica. Portanto, os rRNAs estão conjugados a vários tipos de proteínas como parte integrante do ribossomo (Figura 7).

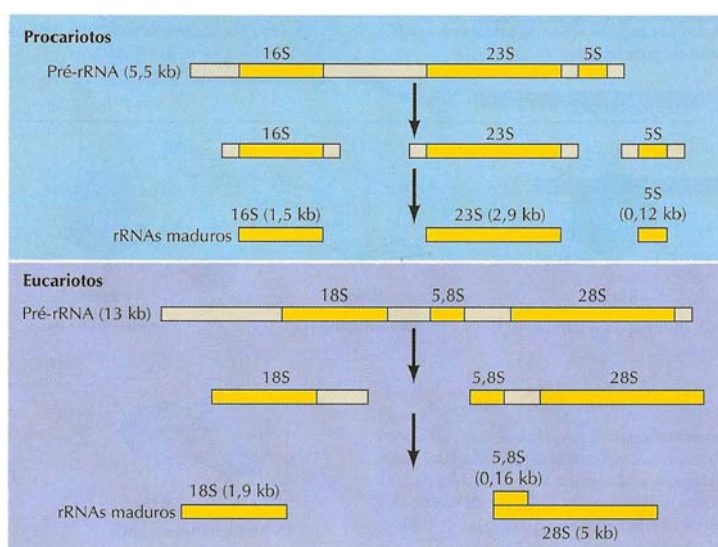


Figura 6.37
Processamento dos RNAs ribossômicos As células procarióticas contêm três rRNAs (16S, 23S e 5S) que são formados pela clivagem de um pré-rRNA. Células eucarióticas (por exemplo, células humanas) contêm quatro rRNAs. Um desses (rRNA 5S) é transcrito de um gene separado; os outros três (18S, 28S e 5,8S) são derivados de um pré-rRNA comum. Após a clivagem, o rRNA 5,8S (somente encontrado em eucariotos) torna-se ligado por pontes de hidrogênio ao rRNA 28S.

Figura 6: Processamento dos rRNAs (as faixas cinza nas extremidades representam os ETS e as interiores, os ITS), segundo Griffiths et al (2002).

Funcionalmente, os rRNAs interagem com o mRNA e o tRNA, em todas as etapas da síntese protéica, auxiliando nas suas ligações com o ribossomo e no reconhecimento códon versus anticódon.

Em procariotes, na subunidade 50S do ribossomo encontra-se o rRNA 23S (2900 nucleotídeos) e o 5S (120 nucleotídeos) conjugados a 31 proteínas ribossômicas diferentes; na subunidade 30S encontra-se o rRNA 16S (1540 nucleotídeos) conjugado a 21 proteínas ribossômicas diversas. Nos eucariotes, a subunidade 40S contém o rRNA 18S (1900 nucleotídeos) e 33 proteínas ribossômicas e a subunidade 60S, o rRNA 28S+5,8S (4800 nucleotídeos + 160 nucleotídeos) e 5S (120 nucleotídeos) ligados a 49 proteínas ribossômicas diversas (Figura 7). Cada rRNA terá sua estrutura 3D própria, dependendo do pareamento de suas bases complementares, que formarão sua estrutura secundária, como pode-se verificar no rRNA 16S de procariotes (Figura 8).

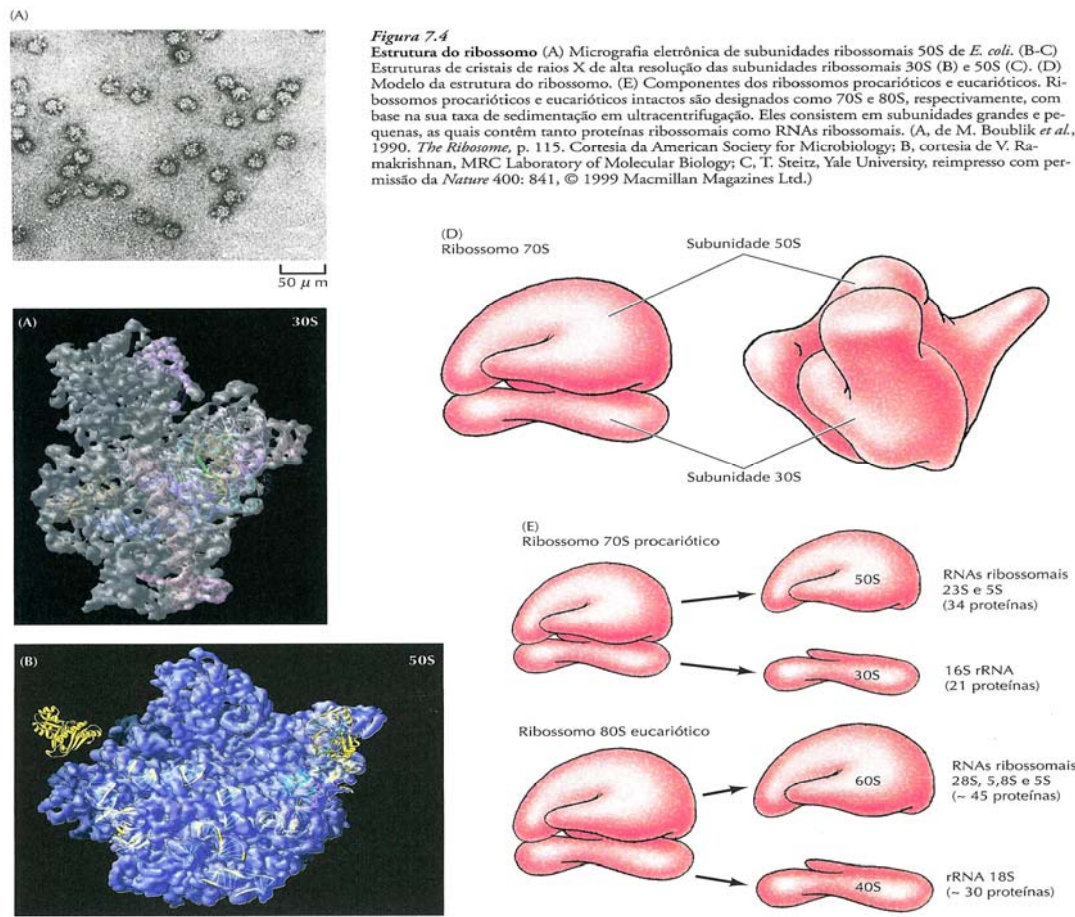


Figura 7: Ribossomos de procarionotes e de eucariotes com seus rRNAs e proteínas específicas, segundo Cooper (2001)

3.2.3. snRNAs (*small nuclear RNAs*) - pequenos RNAs nucleares

Estes pequenos RNAs nucleares fazem parte de um sistema de processamento posterior à transcrição, ou seja, posterior à síntese de RNAs. Alguns snRNAs unem-se a algumas subunidades protéicas formando um complexo ribonucleoprotéico processador (o **spliceossomo**), que remove os íntrons e junta os éxons do pré-mRNA, para formar o mRNA.

3.2.4. miRNA (*micro RNA*)

Foi reconhecido recentemente como tendo um papel na regulação da quantidade de proteína produzida por muitos genes eucariotes.

3.2.5. siRNA (*small interfering RNA*) – pequeno RNA de interferência

Auxilia na proteção da integridade do genoma de plantas e animais, inibindo a produção de vírus e prevenindo o espalhamento de elementos transponíveis para outros locos cromossômicos.

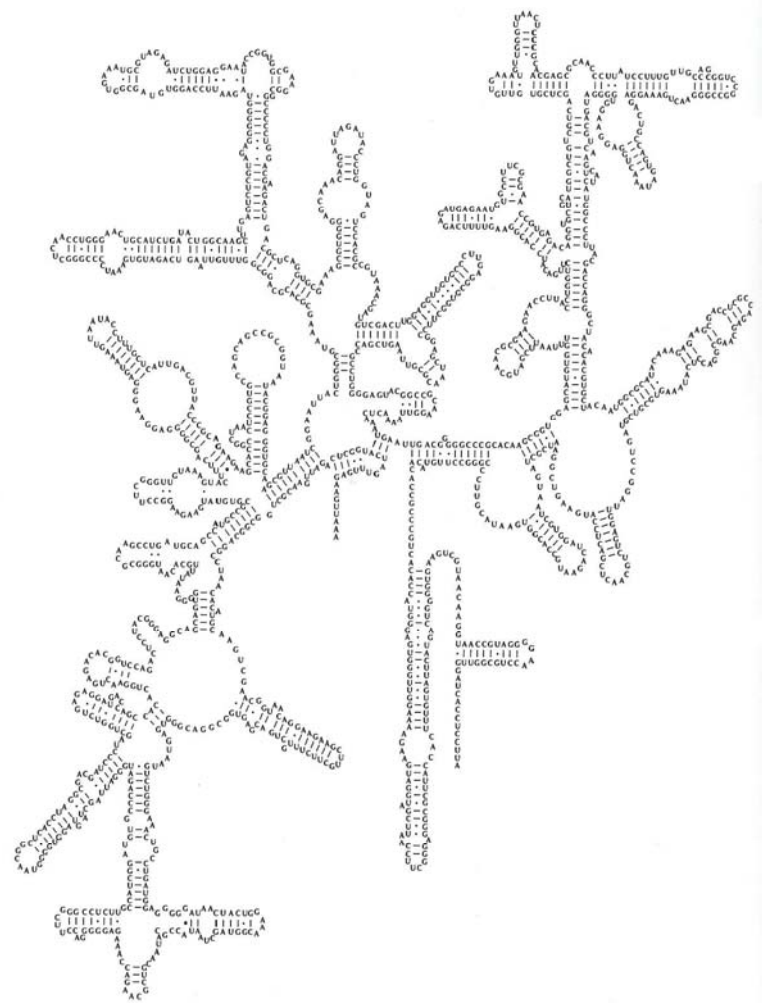


Figura 7.5
A estrutura do rRNA 16S
O pareamento de bases complementares resulta na formação de uma estrutura secundária distinta. (De S. Stern, T. Powers, L.-I. Changchien e H. F. Noller, 1989. *Science* 244: 783.)

Figura 8: Estrutura do rRNA 16S de procariotes, segundo Cooper (2001)








RESUMINDO: Há duas classes de RNAs: (1) os que codificam proteínas, chamados mRNAs, e (2) os que são RNAs funcionais e participam de uma série de processos como as sínteses protéicas (tRNAs e rRNAs), processamento de RNA (snRNA), regulação da expressão gênica (miRNA) e defesa do genoma (siRNA).

BIBLIOGRAFIA

- Borges-Osório, M.R., Robinson, W.M. **Genética Médica**, Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 2001, 459 p.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. **Introdução à Genética**, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2002, 794 p.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B. **Introduction to Genetic Analysis**, W.H. Freeman and Company, New York, 2008, 838 p.
- Cooper, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular**, Editora ARTMED, Porto Alegre, 2001, 712 p.
- Cooper, G.M.; Hausmann, R.E. **The Cell: A Molecular Approach**, ASM Press, Washington, 2004, 713 p.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. **Biologia Molecular**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 287 p.

Figura 1: no site www.enq.ufsc.br/.../genetica/DNA.html, capturado online em 03/08/2008

Extração DNA de morango: capturado online em 03/08/2008 no site <http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/004dna/extracaodna6.html>

Extração de DNA de morango	
<ul style="list-style-type: none"> · Morangos · Saco plástico · Copo transparente · Filtro de papel · Coador · Detergente · Sal · Álcool gelado · Palito de madeira · Água morna 	<p style="text-align: center;">Material necessário:</p> 
Como fazer?	
<p>1 Retire as folhas e os cabos de 3 ou 4 morangos e coloque os morangos dentro de um saco plástico. Feche o saco e os amasse bem.</p>	
<p>2 Adicione uma colher de chá de detergente, uma pitada de sal e um pouco de água morna aos morangos amassados no saco. Amasse mais e misture tudo muito bem.</p>	
<p>3 Passe a mistura pelo coador com filtro de papel para dentro de um copo transparente.</p>	
<p>4 Adicione álcool gelado ao suco de morango que se encontra agora dentro do copo. Coloque mais ou menos o dobro de álcool em relação à mistura de morango.</p>	
<p>5 Mexa a solução e aguarde um pouco. Você verá se formar uma "nuvem branca" na solução. Aí está o DNA!</p>	
<p>6 Puxe o DNA como um palito.</p>	
Sugestões: Tente fazer a extração de DNA usando outras frutas.	