



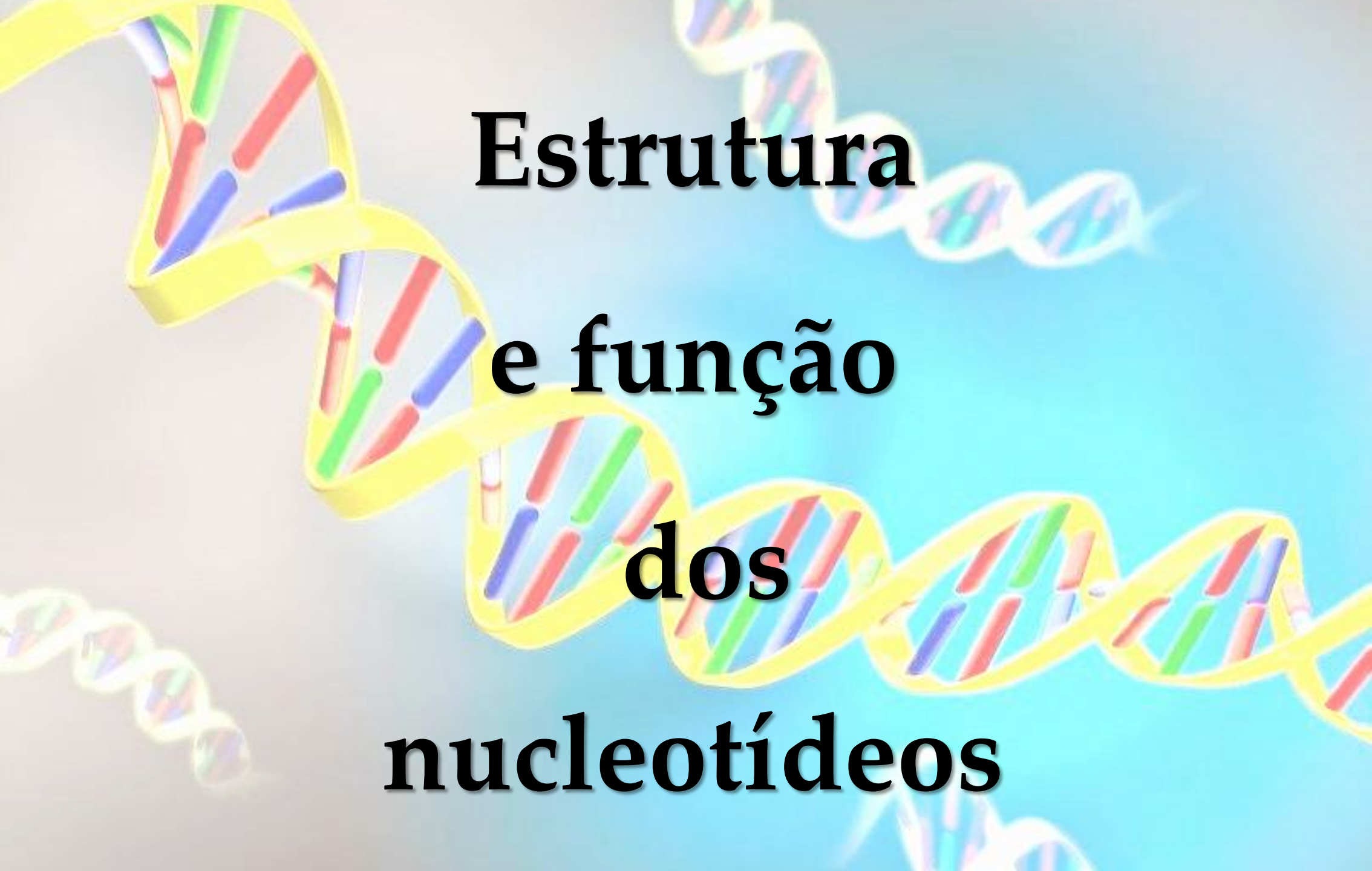
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE

Nucleotídeos **e** **Ácidos Nucléicos**

Angela da Silva Machado

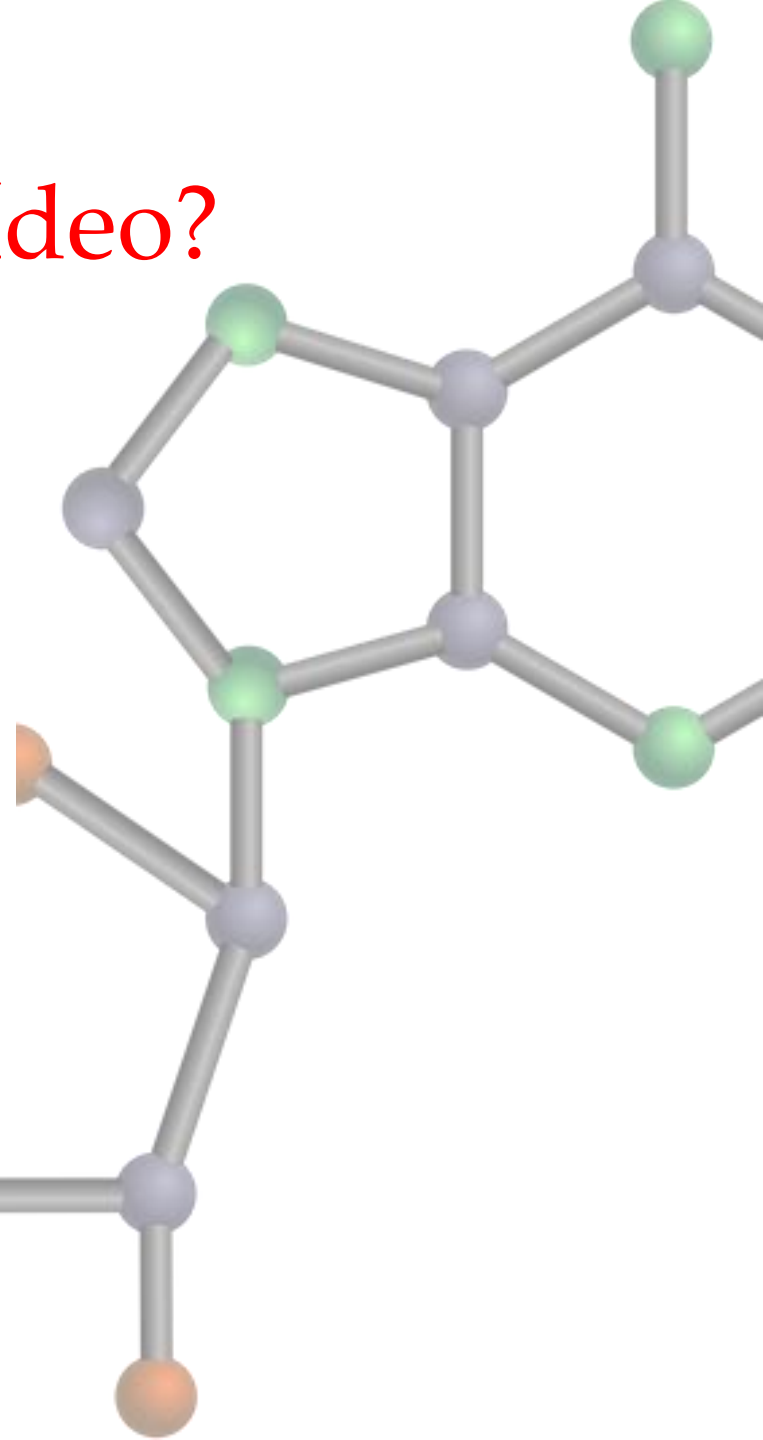
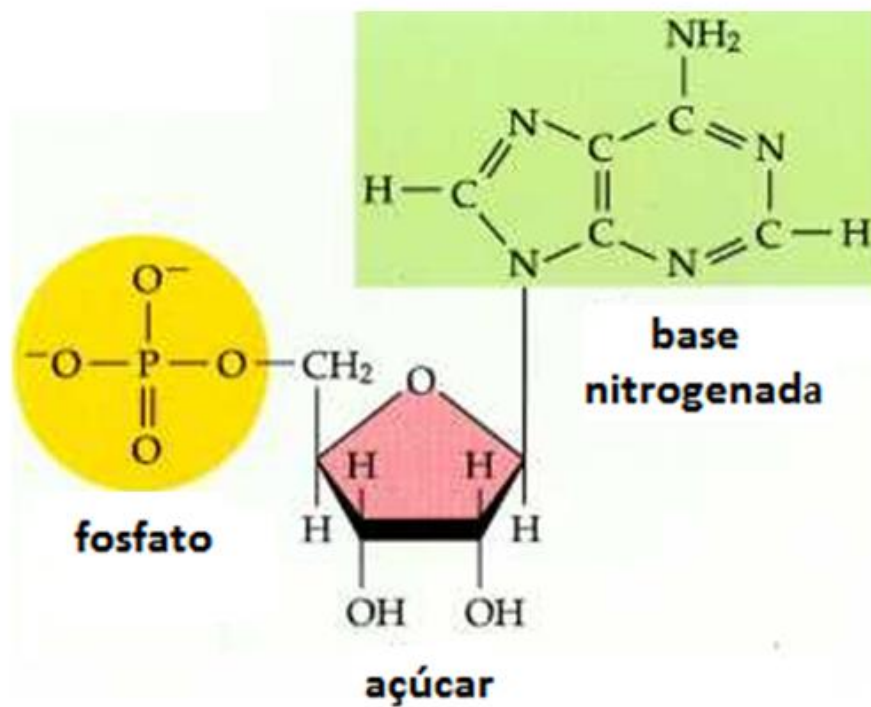
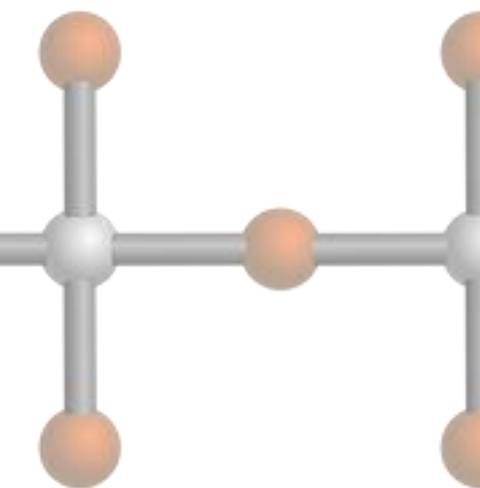
Súmula da aula...

- ❖ Estrutura e função dos nucleotídeos
- ❖ Estrutura dos ácidos nucleicos
- ❖ Endonucleases de restrição
- ❖ Bibliotecas genômicas
- ❖ Amplificação de ácidos nucleicos
- ❖ por PCR

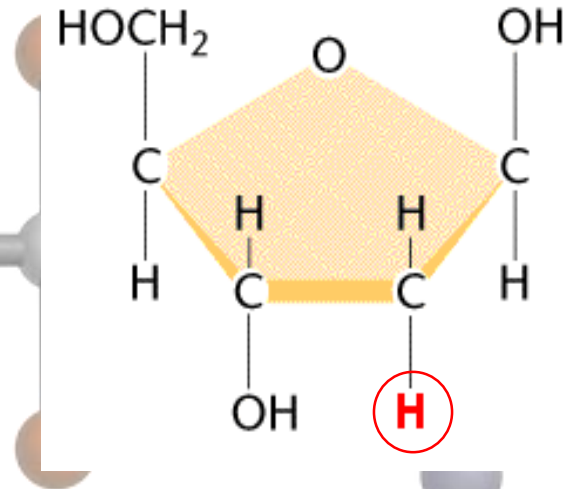
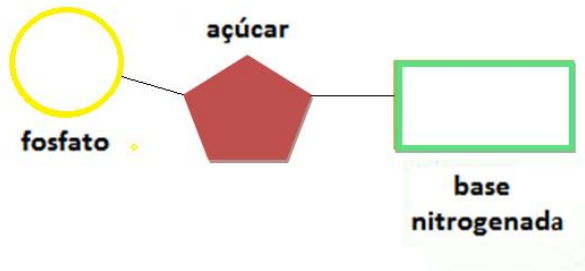
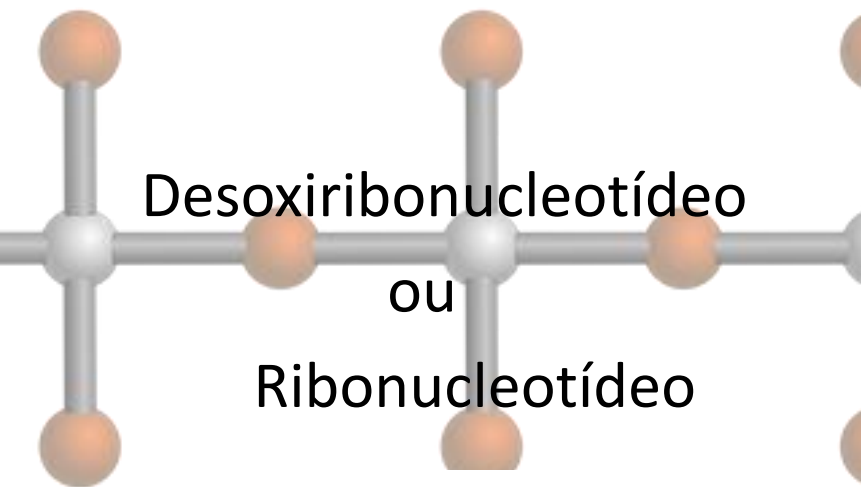


Estrutura e função dos nucleotídeos

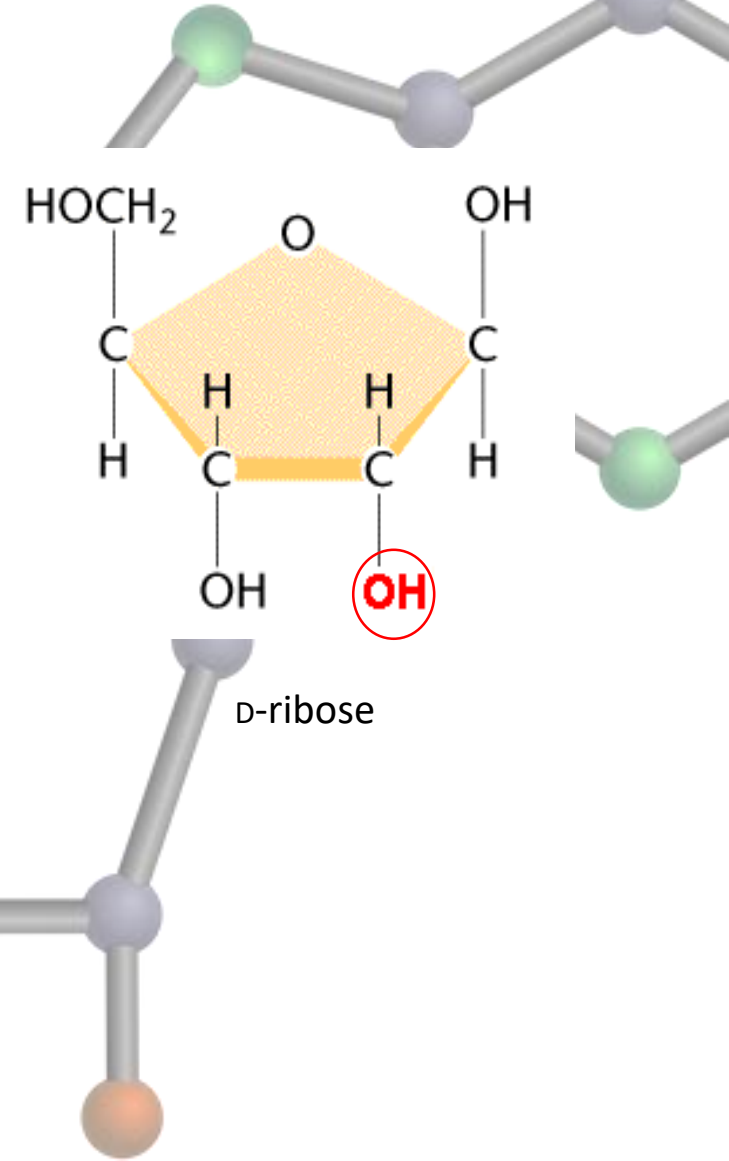
O que é um nucleotídeo?



Nucleotídeo:

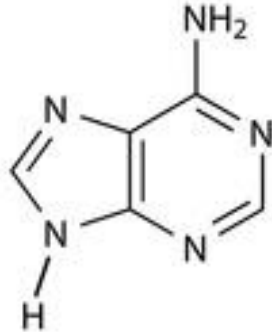
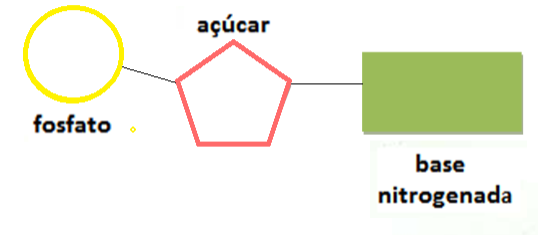


2'-desóxi-D-ribose

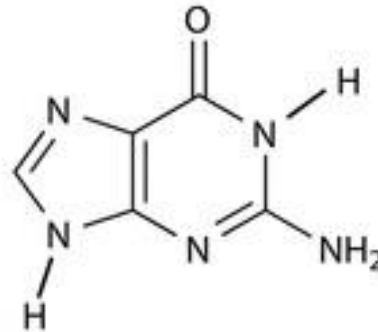


D-ribose

Nucleotídeo:

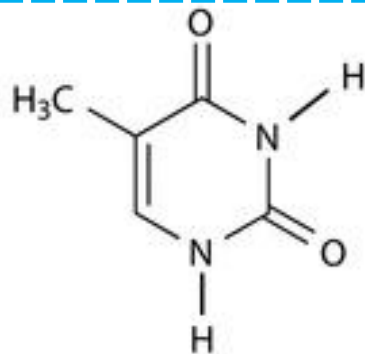


Adenina (A)

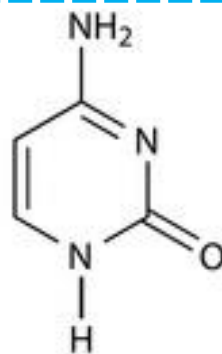


Guanina (G)

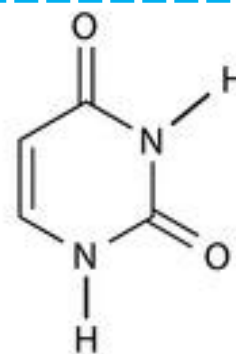
Bases púricas
(purinas)



Timina (T)



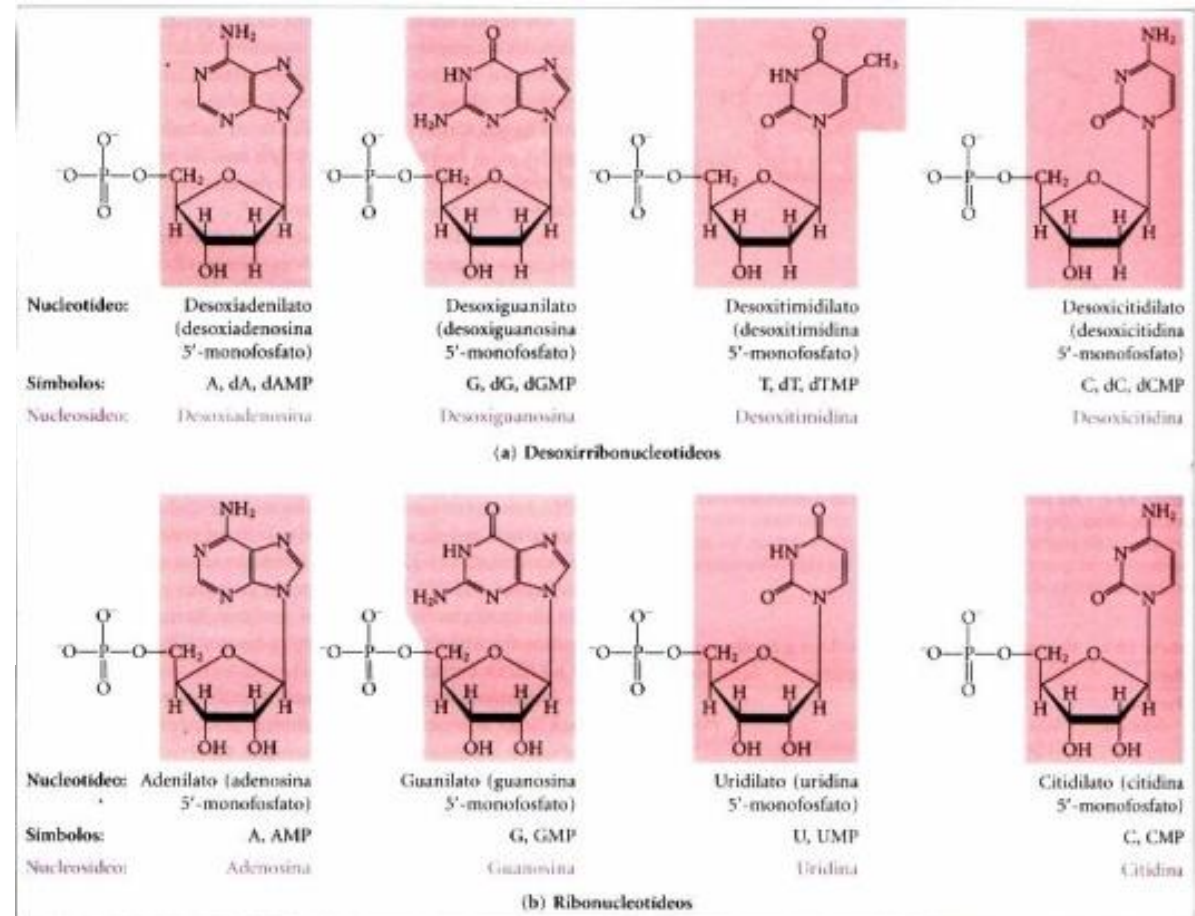
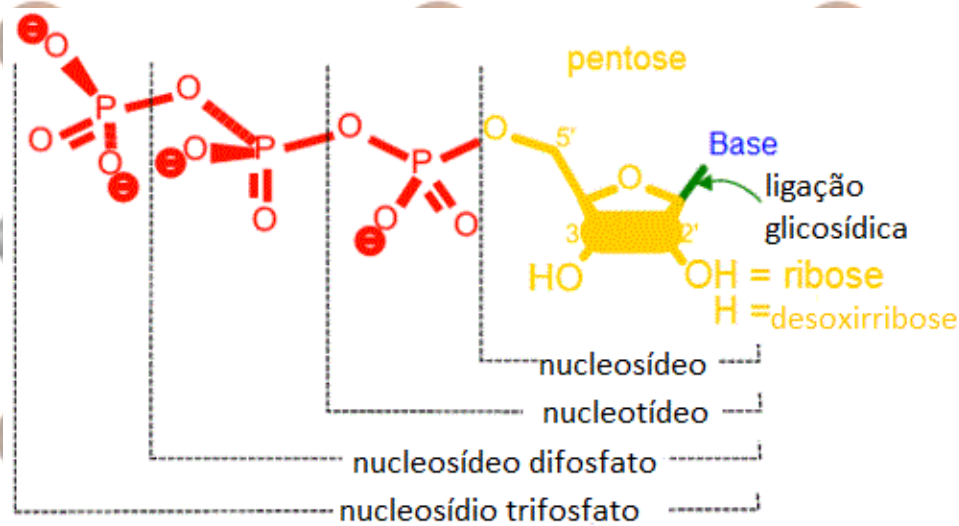
Citosina (C)



Uracila (U)

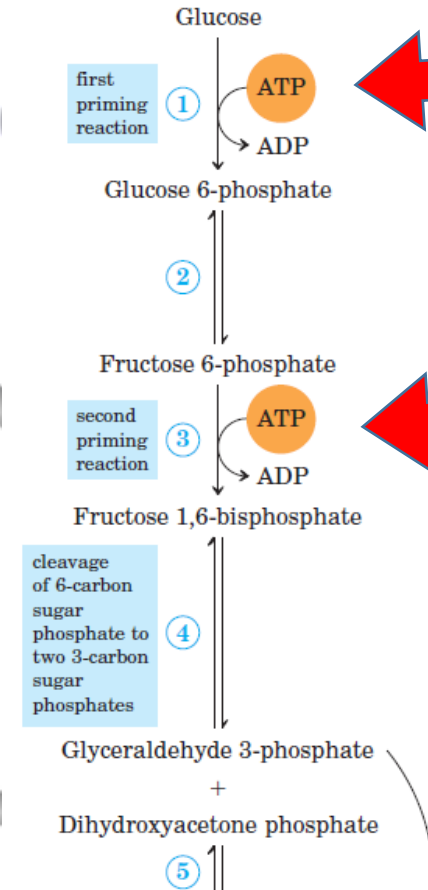
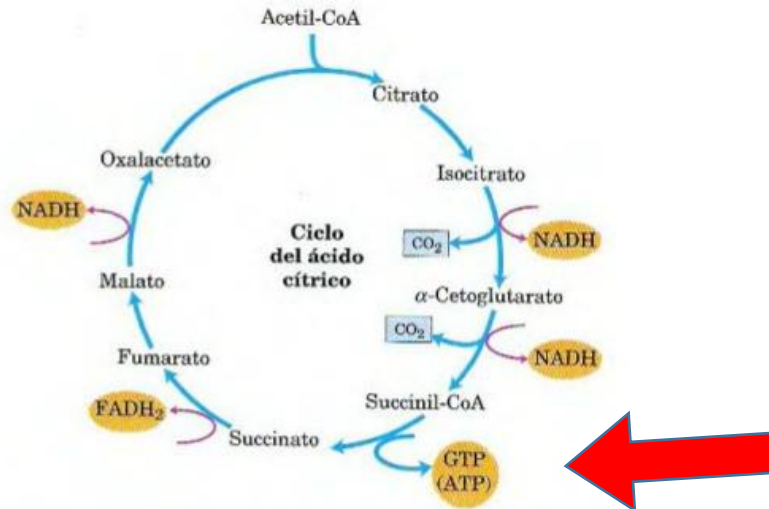
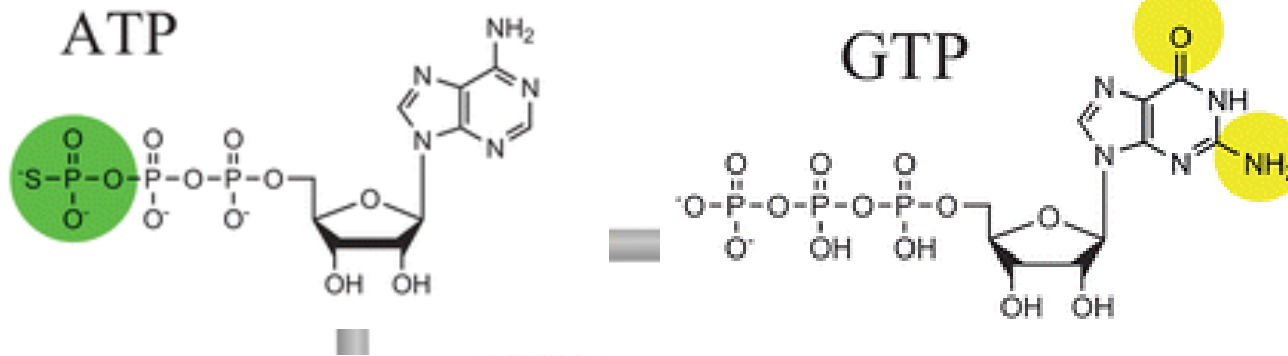
Bases pirimídicas
(pirimidinas)

Nomenclatura: nucleotídeos e núcleosídeos



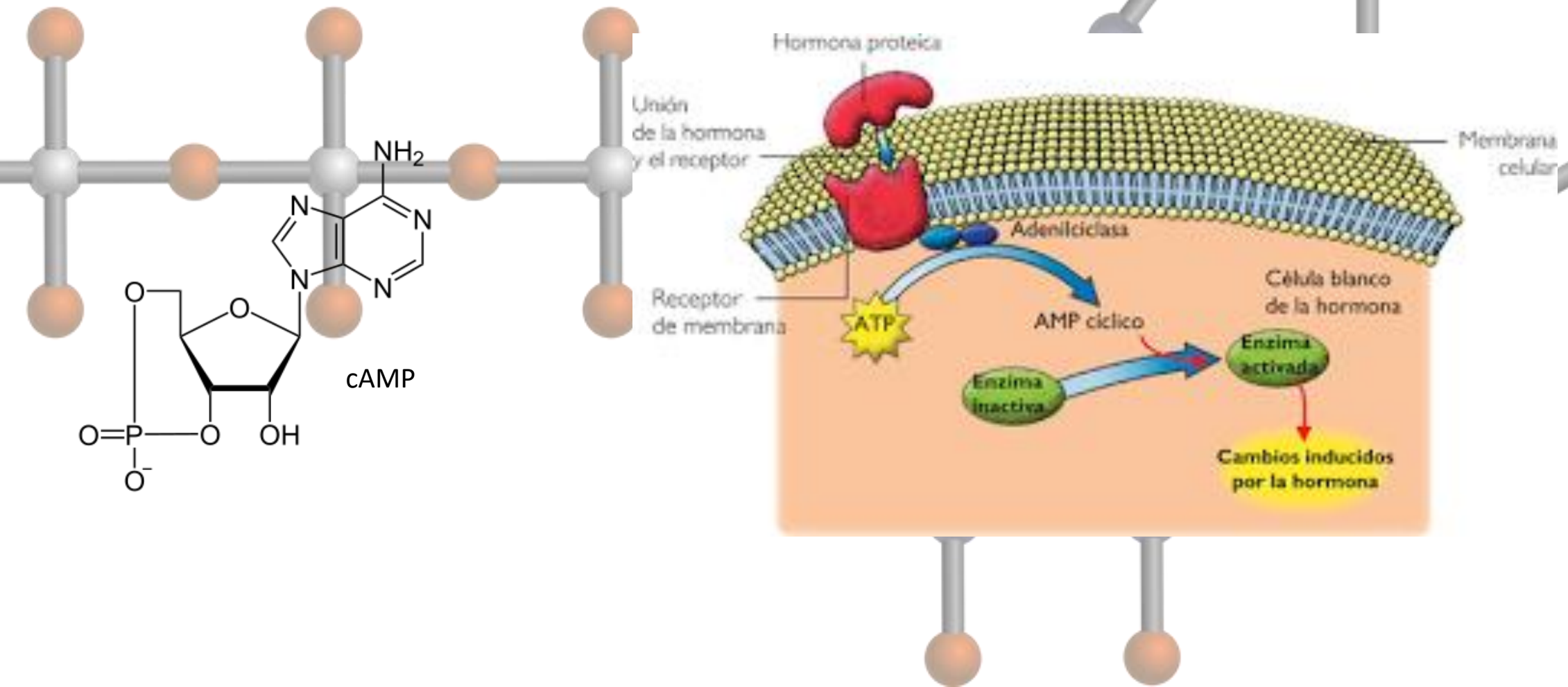
Função dos nucleotídeos

❖ Moedas energéticas nas transações metabólicas



Função dos nucleotídeos

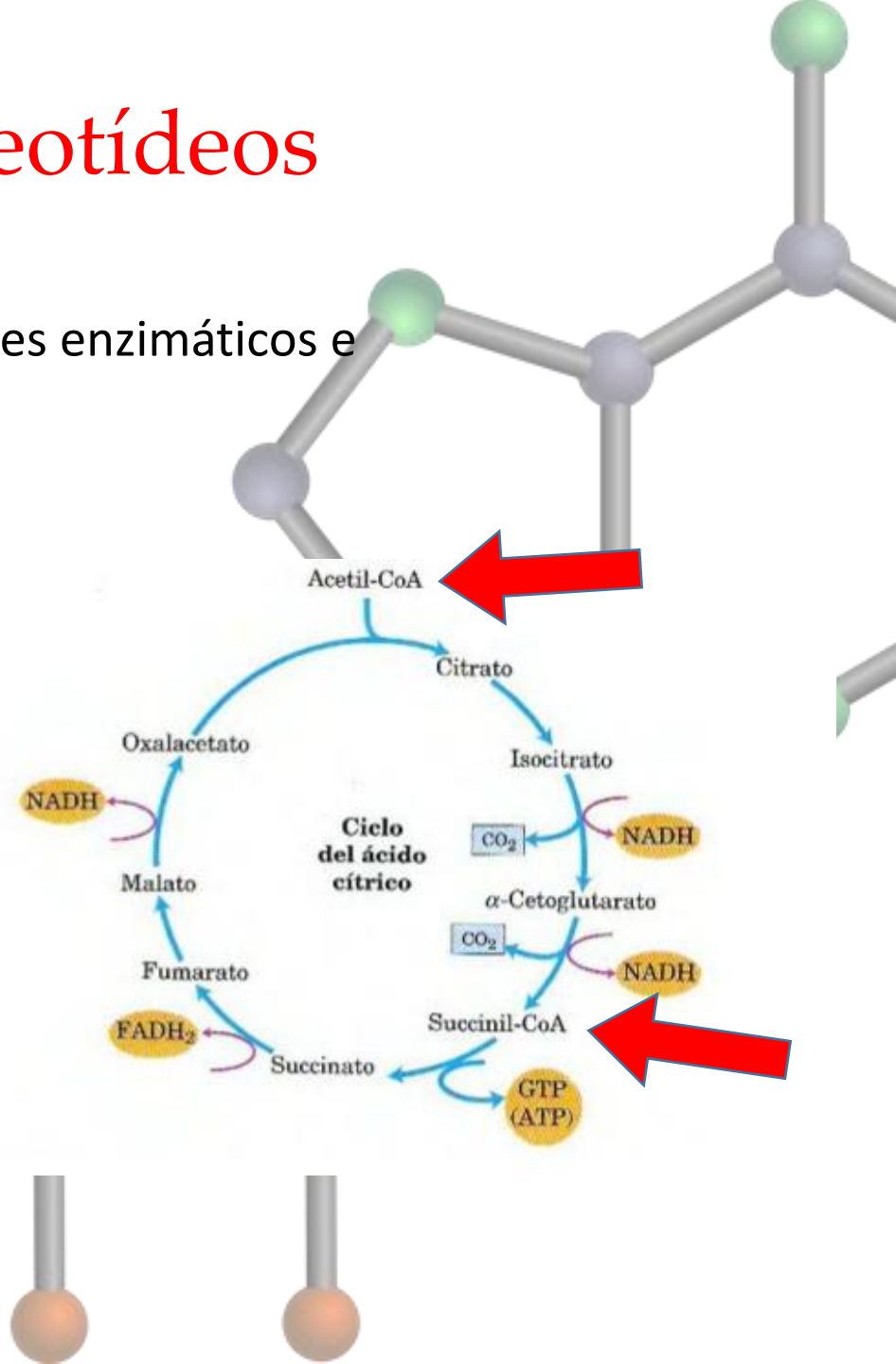
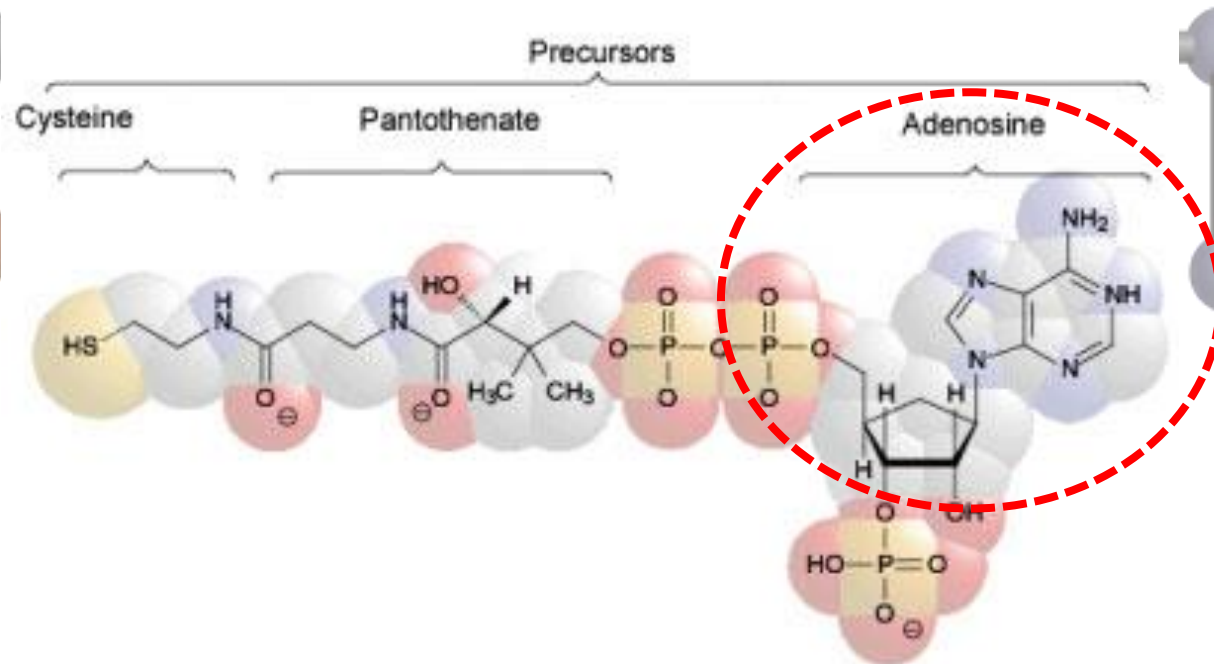
- ❖ Elos químicos essenciais na resposta das células a hormônios e outros estímulos extracelulares



Função dos nucleotídeos

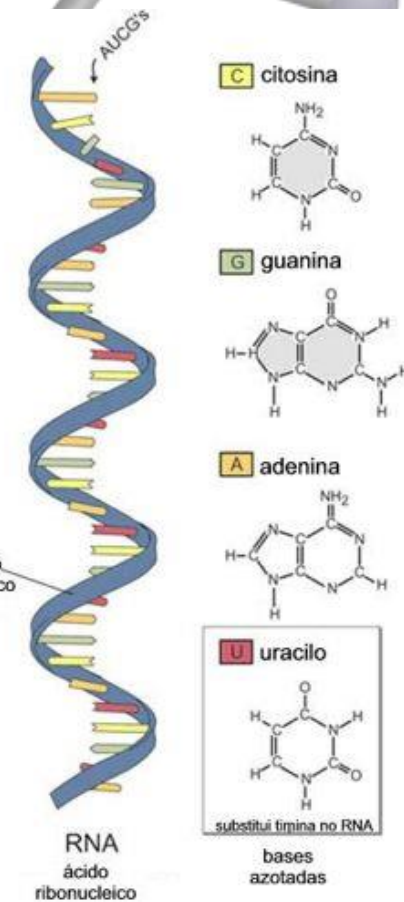
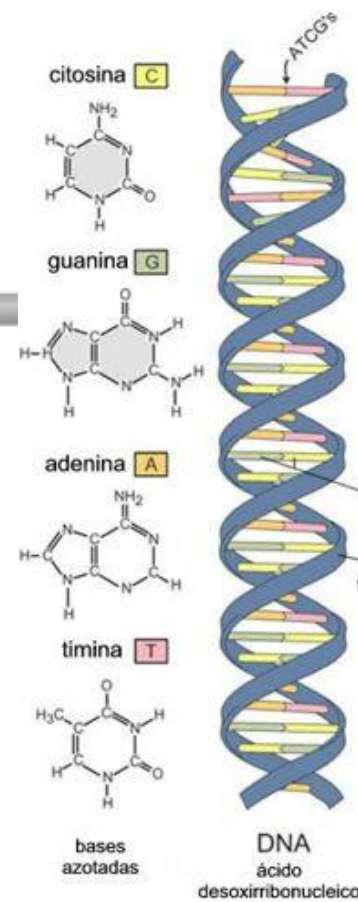
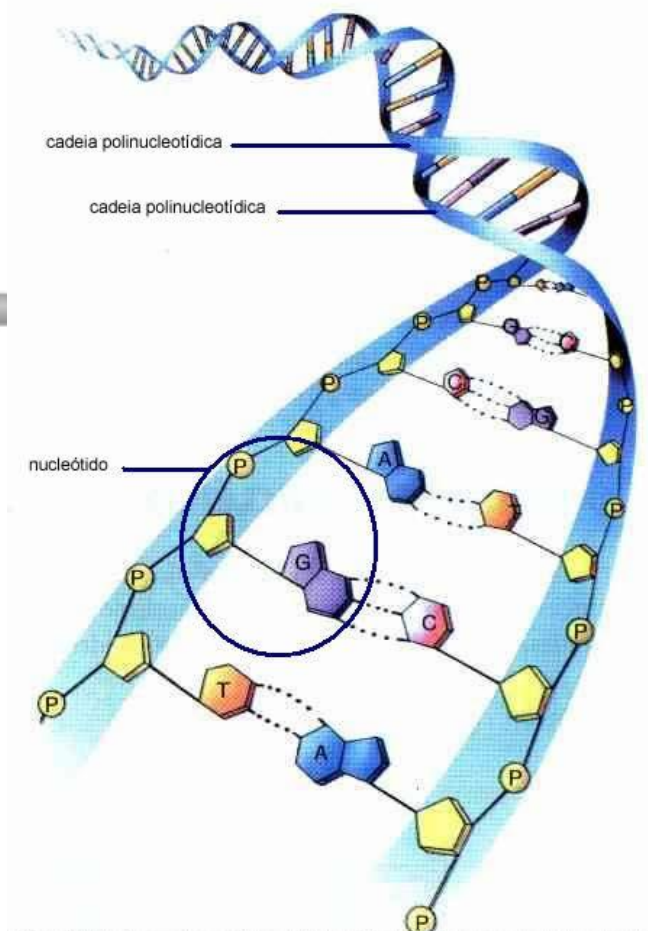
- ❖ Componentes estruturais de uma coleção de fatores enzimáticos e intermediários

Coenzyme A



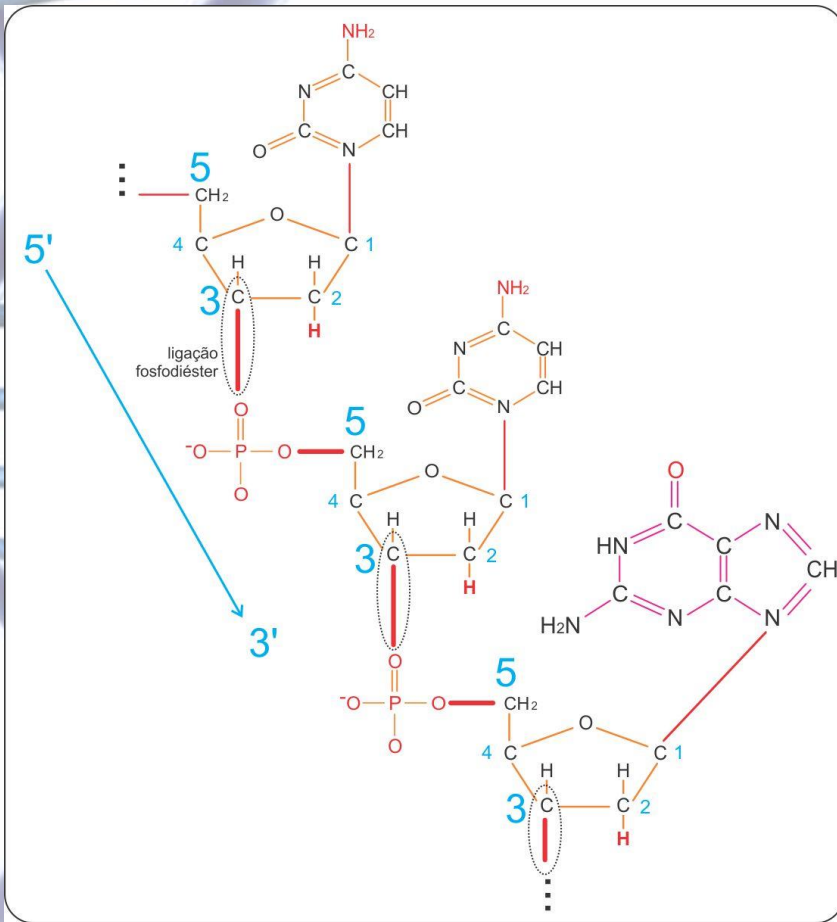
Função dos nucleotídeos

❖ Unidade constituinte dos ácidos nucléicos → DNA e RNA.



**Estrutura
e função
dos
ácidos nucleicos**

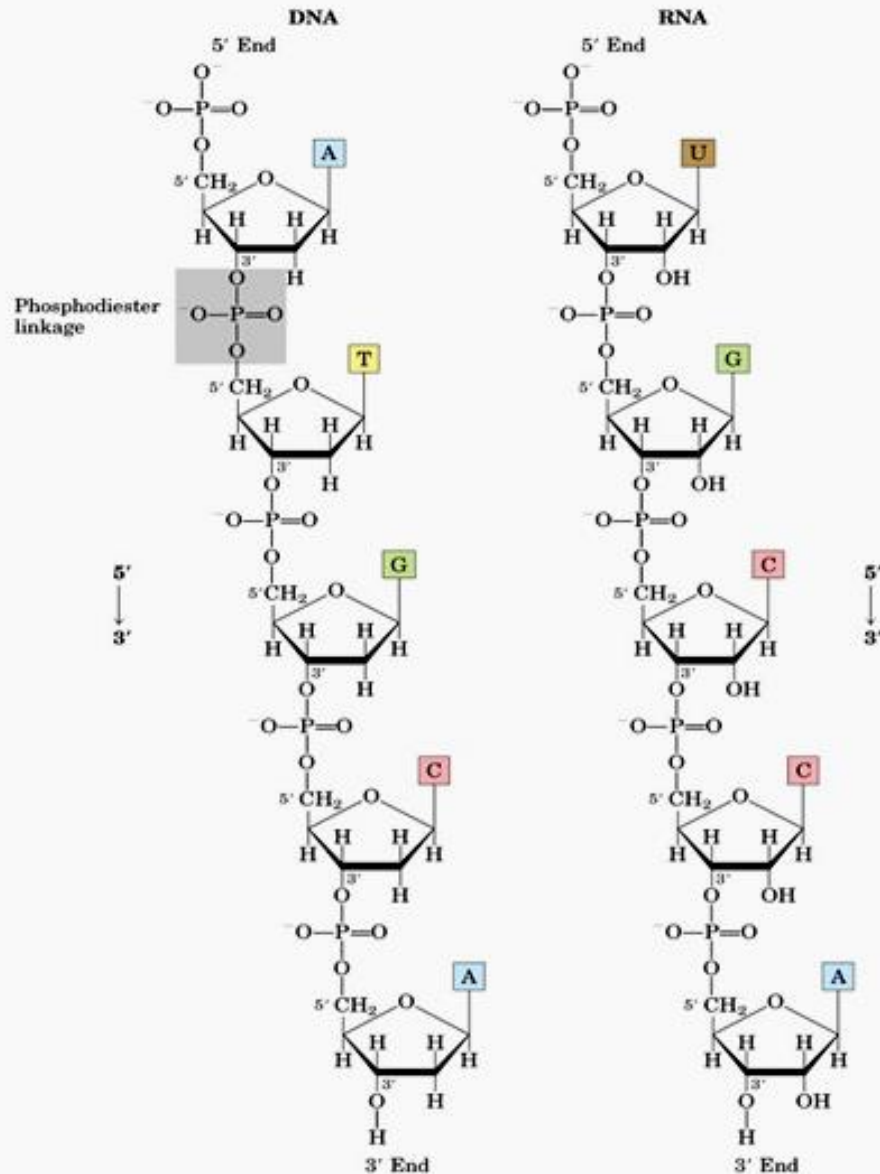
Ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos



Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por **ligações fosfodiéster** formando entre si pontes de fosfato. O grupo hidroxila do carbono-3 da pentose do primeiro nucleotídeo se liga ao grupo fosfato ligado a hidroxila do carbono-5 da pentose do segundo nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster.

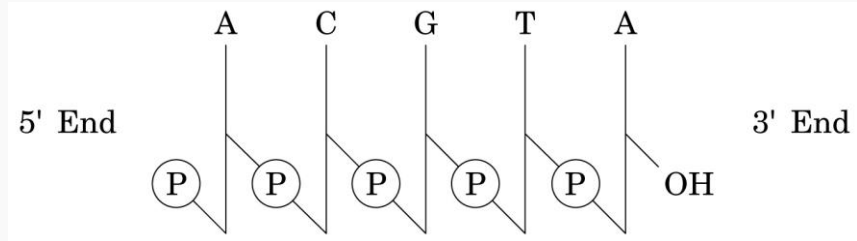


Ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos



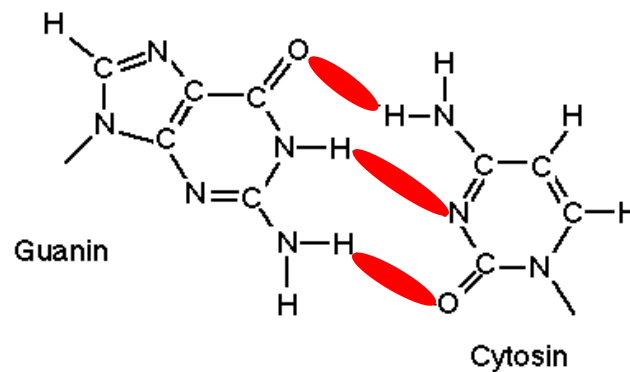
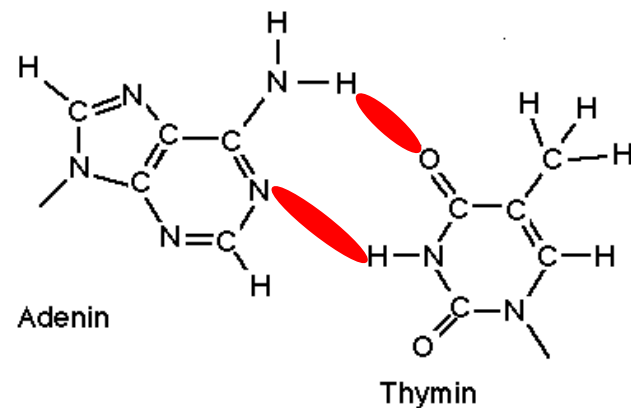
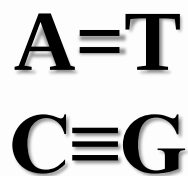
Componentes hidrofílicos:

Resíduos da pentose: se ligam com a água;
Grupos fosfatos: $pK_a \sim 0$ – ionizados em pH 7,0;
São neutralizadas por interações iônicas;



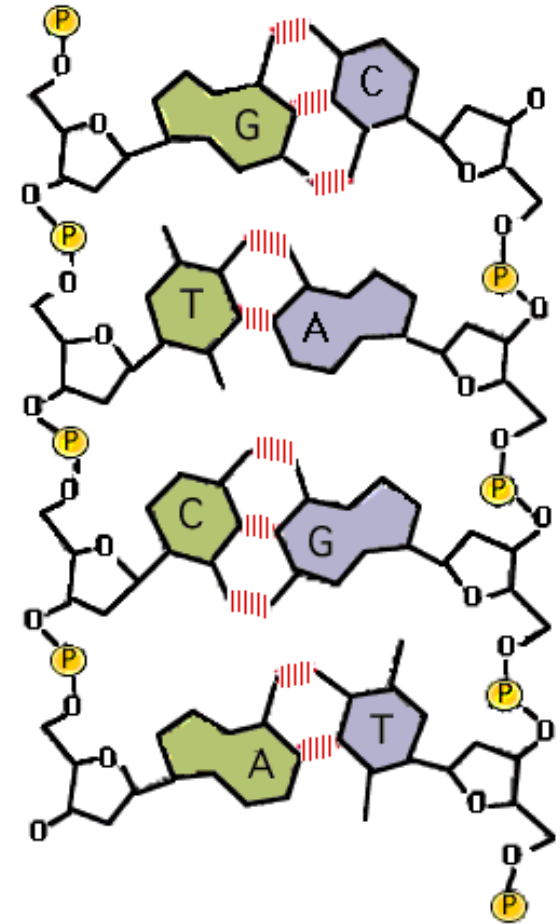
Pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos

Interações entre grupos carboxil e amino das bases



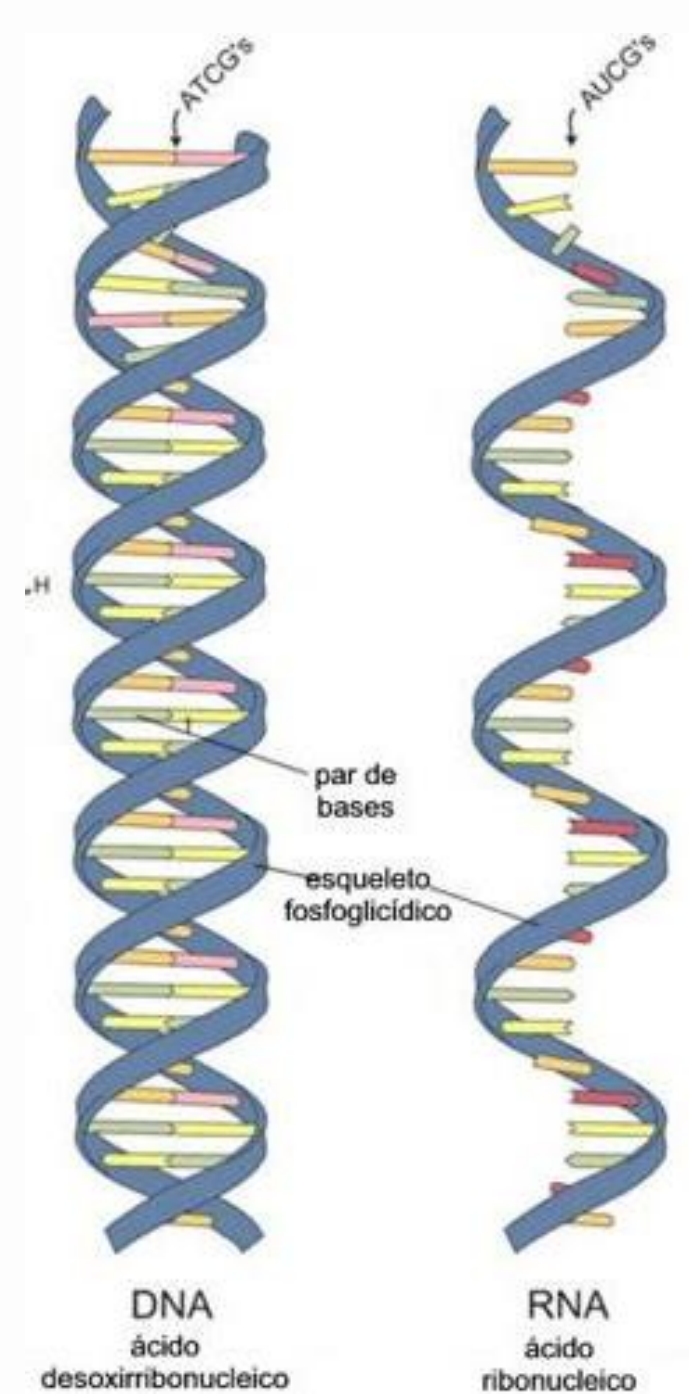
Empilhamento das bases nitrogenadas:

- ❖ Bases: hidrofóbicas em pH 7
- ❖ Interações entre os anéis das bases nitrogenadas: Empilhamento de base em conformação planar;
- ❖ Empilhamento: interações eletrônicas:
- ❖ Força de van der Waals
- ❖ Minimiza o contato com a água
- ❖ Estabiliza a estrutura tridimensional

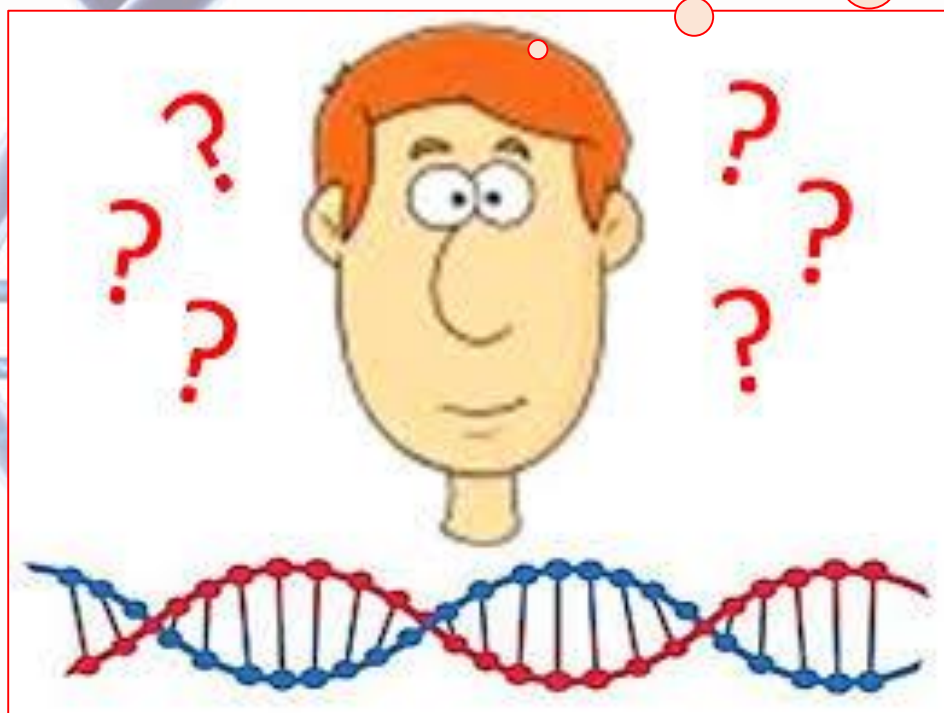




Fita de DNA e RNA

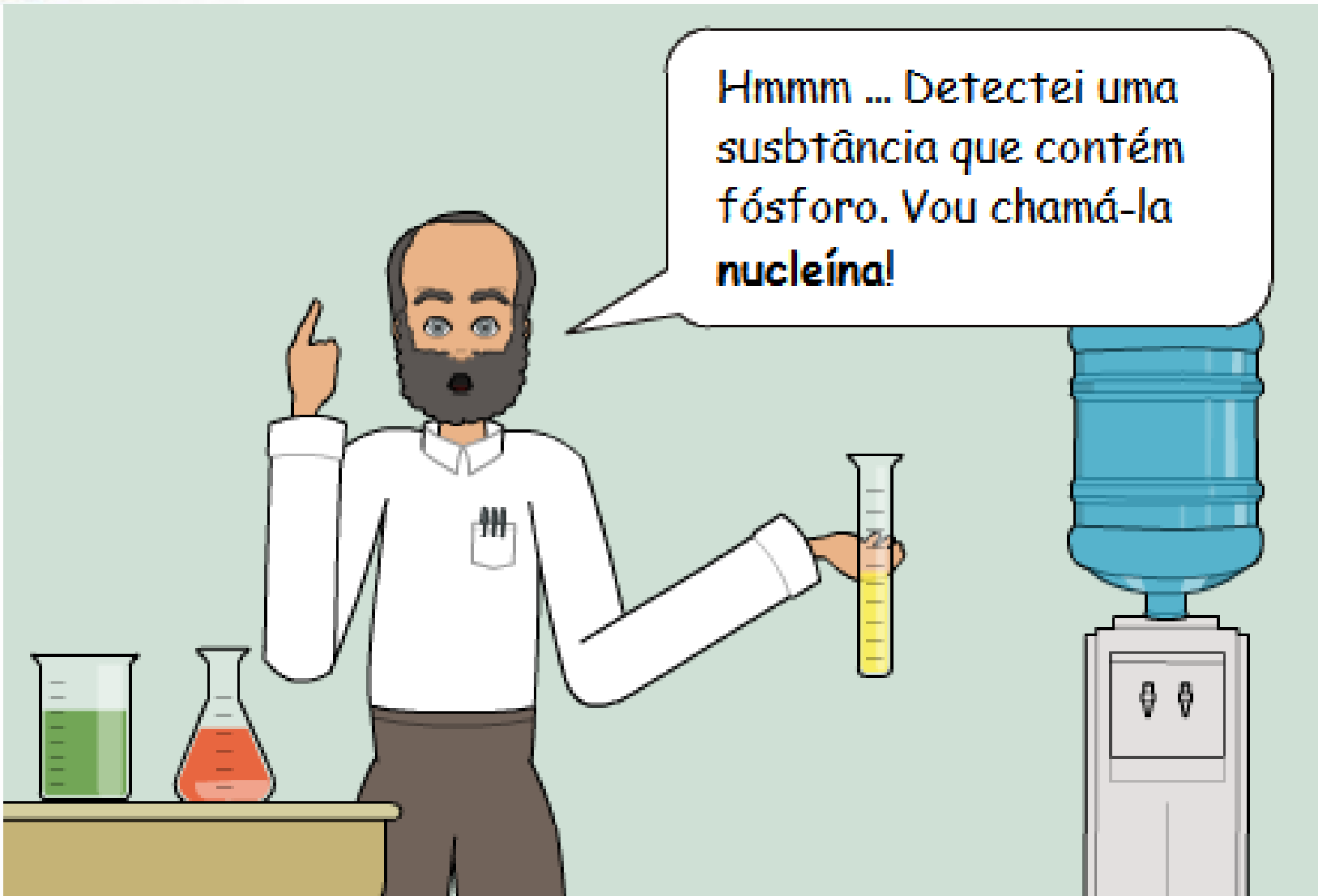


*Mas como se chegou a esta
estrutura tridimensional??*



HISTÓRICO

1868 - Friedrich Miescher



Hmmm ... Detectei uma substância que contém fósforo. Vou chamá-la nucleína!



1928 - Frederick Griffith

Estudava a pneumonia
(doença comum na 1ª Guerra Mundial)

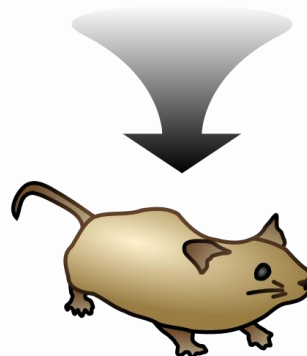
Experimento de Griffith

Streptococcus pneumoniae:

Cepa lisa – cápsula protetora
composta por carboidratos e açúcares
que as protegem do sistema imune do
hospedeiro.

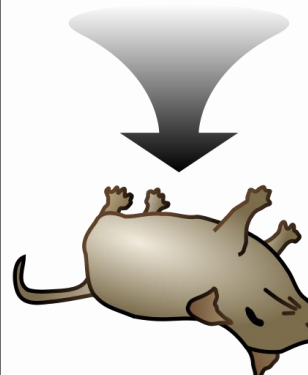
Cepa rugosa – não possui a cápsula.

**Cepa rugosa
(não-virulenta)**



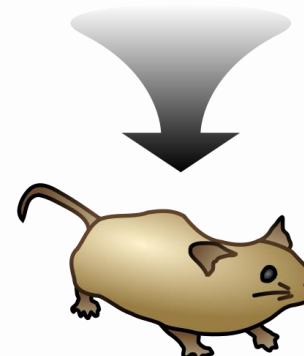
rato vive

**Cepa lisa
(virulenta)**



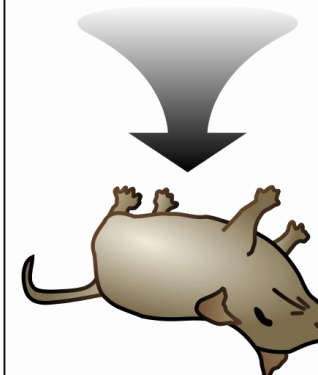
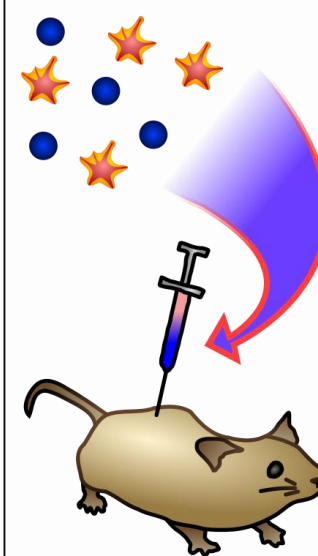
rato morre

**Cepa lisa
submetida ao
calor**



rato vive

**Cepa rugosa &
lisa submetida
ao calor**



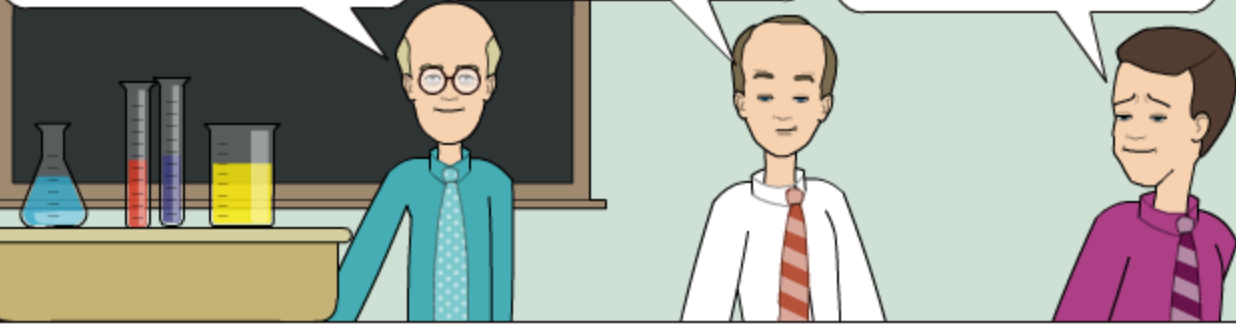
rato morre

1943 - Avery, MacLeod & McCarty

Me pergunto se podemos transformar uma cepa não-virulenta de *S. pneumoniae* em uma forma virulenta?

Eu acho que podemos se usarmos a porção básica do núcleo (as proteínas)

Não, eu acho que você deve tentar com a parte ácida do núcleo (o DNA)



1943 ... no laboratório de Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty

DNA
armazena a
informação
genética

pneumococos lisos do tipo III



cultivo



extração e
purificação



A

fração com princípio
transformante

tratamento
com protease



B



pneumococos lisos
do tipo III recuperados
(ocorre transformação)

pneumococos rugosos do tipo II



cultivo



tratamento
com DNase



C

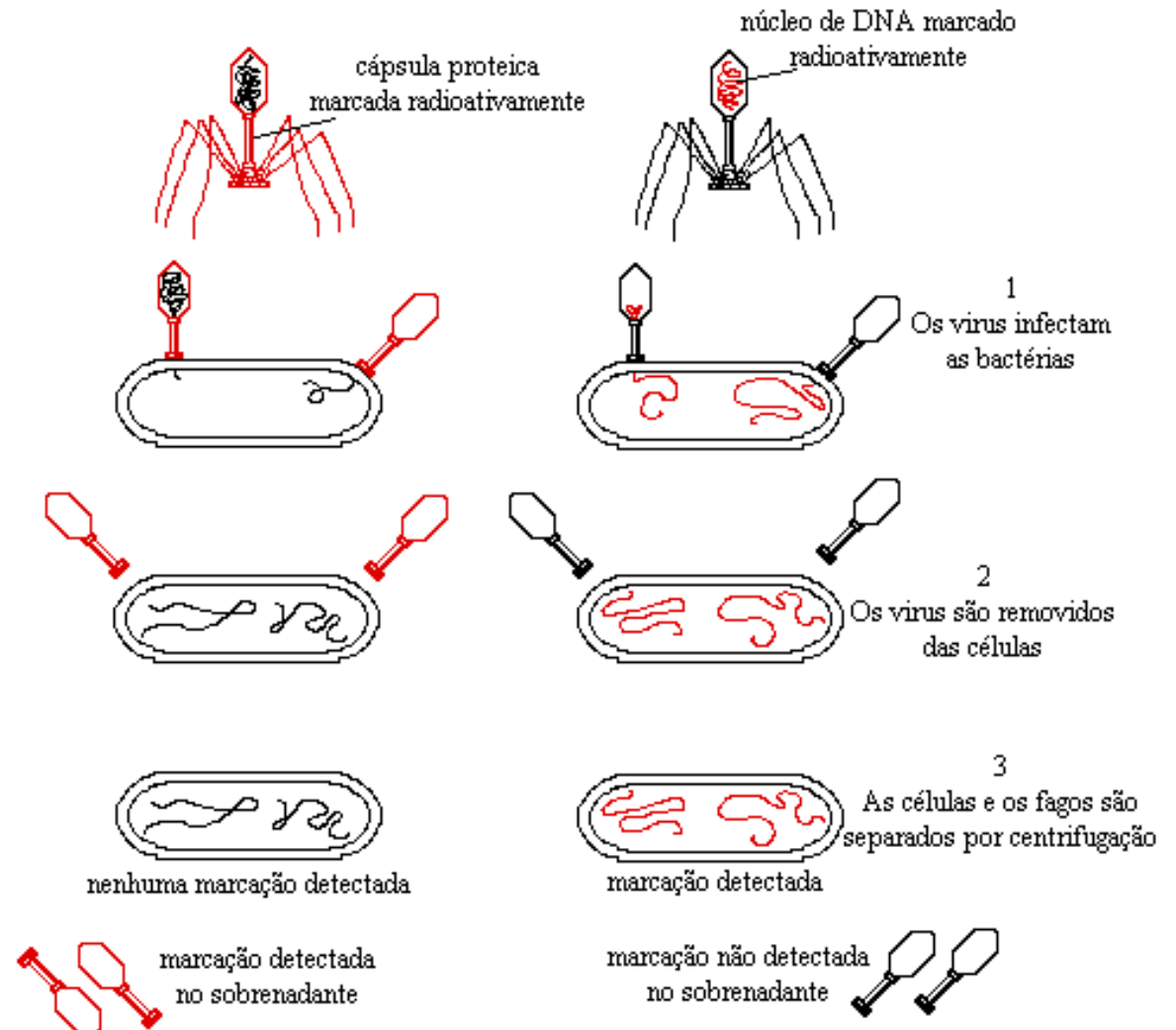


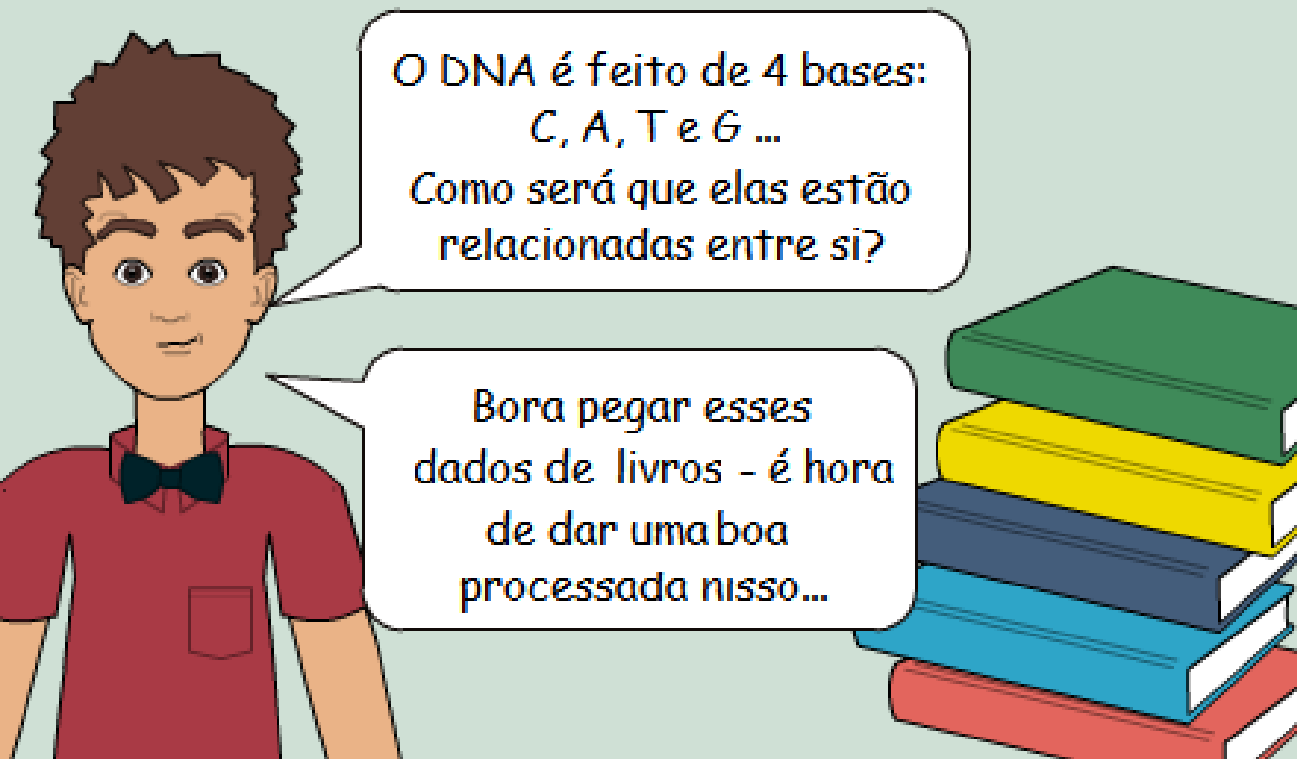
pneumococos rugosos
do tipo II recuperados
(não ocorre transformação)

1952 -
Martha Chase & Alfred D.
Hershey



Experimento de Hershey-Chase





Lá pelos anos de 1940 ... no lab de Erwin Chargaff

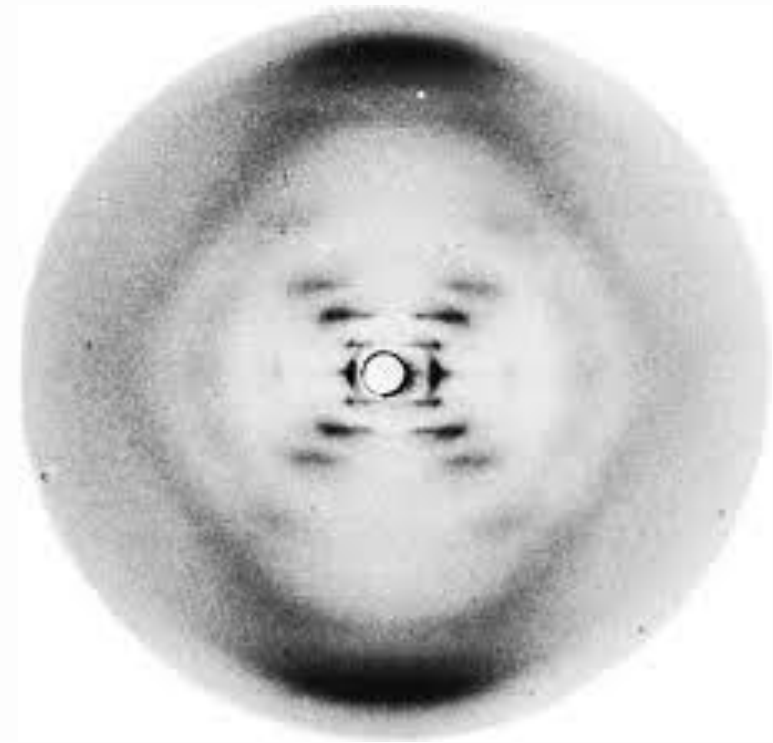
Quantidades de matéria* (em mol) das bases em DNA de diferentes fontes.

Organismo	Tecido	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
E. coli (K12)	—	26,0	23,9	24,9	25,2
D. pneumoniae	—	29,8	31,6	20,5	18,0
M. tuberculosis	—	15,1	14,6	34,9	35,4
Levedura	—	31,3	32,9	18,7	17,1
P. lividus (ouriço do mar)	esperma	32,8	32,1	17,7	18,4
Arenque	esperma	27,8	27,5	22,2	22,6
Rato	tutano de osso	28,6	28,4	21,4	21,5
Humano	timo	30,9	29,4	19,9	19,8
Humano	fígado	30,3	30,3	19,5	19,9
Humano	esperma	30,7	31,2	19,3	18,8

*Por 100 mols de fosfato na forma hidrolisada do DNA.

Regra de Chargaff

1950: Rosalind Franklin e Maurice Wilkins:



Molécula helicoidal

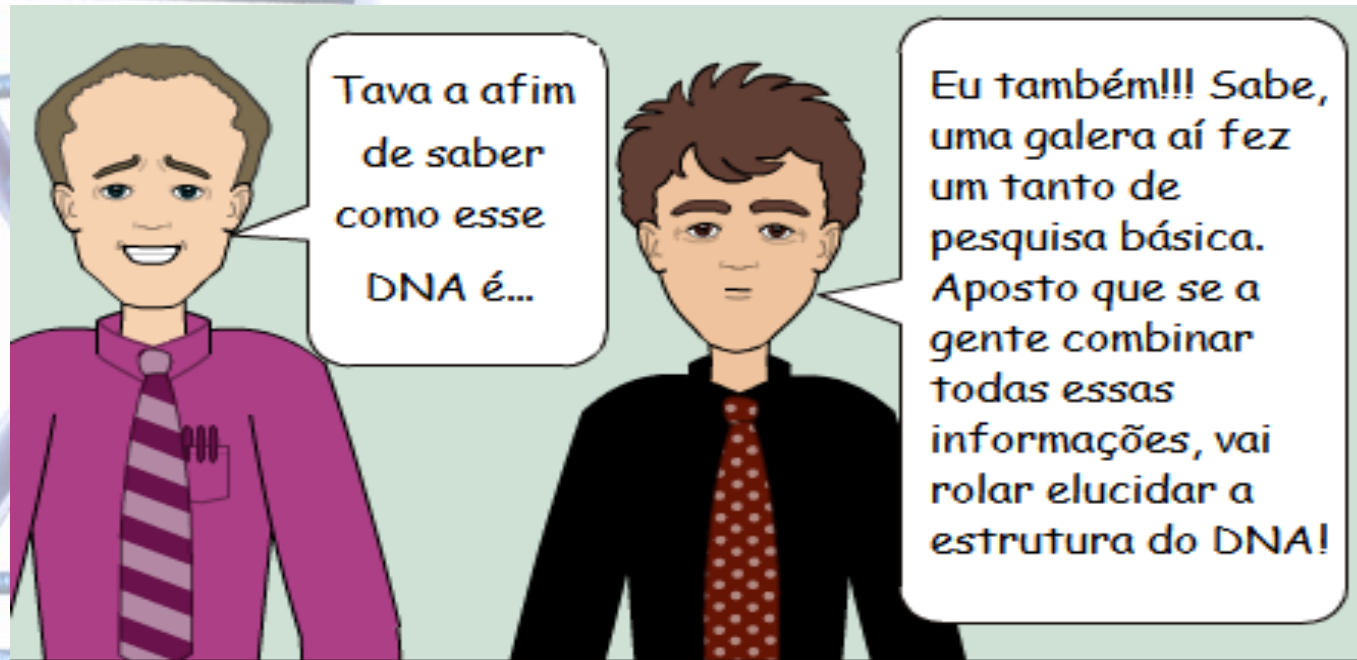
Modelo do DNA???

Compatível aos dados de difração por raio X

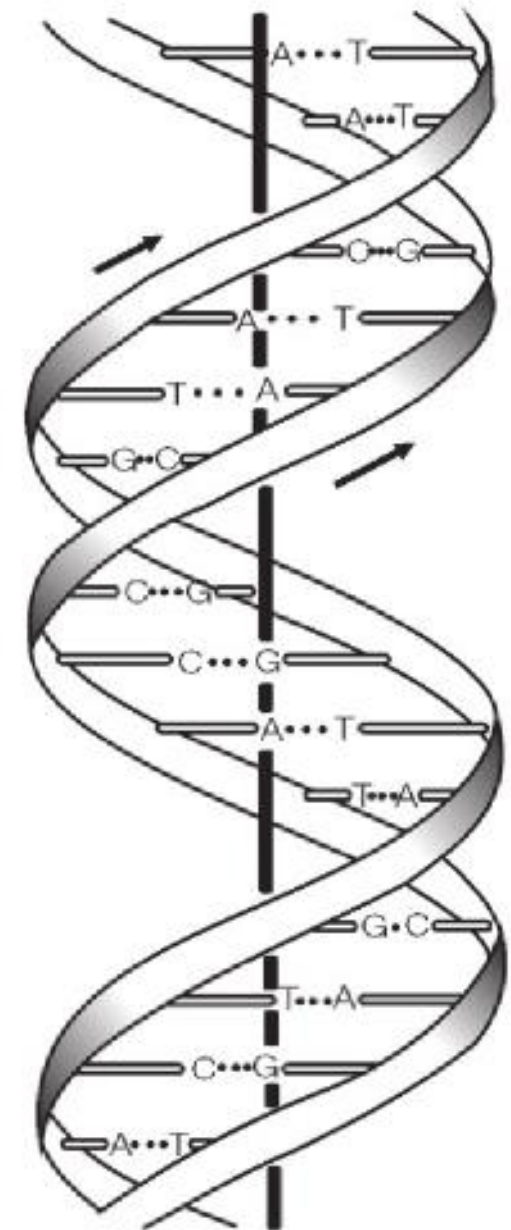
Equivalências de bases: A=T e C=G

Propriedades químicas

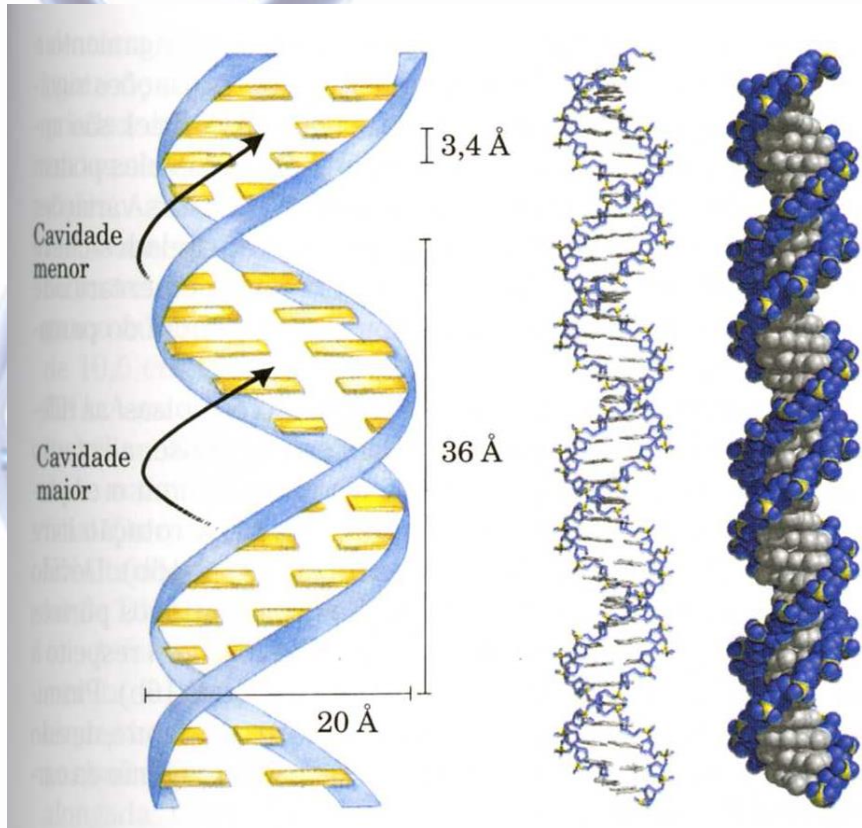
1953: James D. Watson e Francis Crick: Dados e informações a respeito da molécula de DNA



1953 ... no laboratório de James Watson e Francis Crick

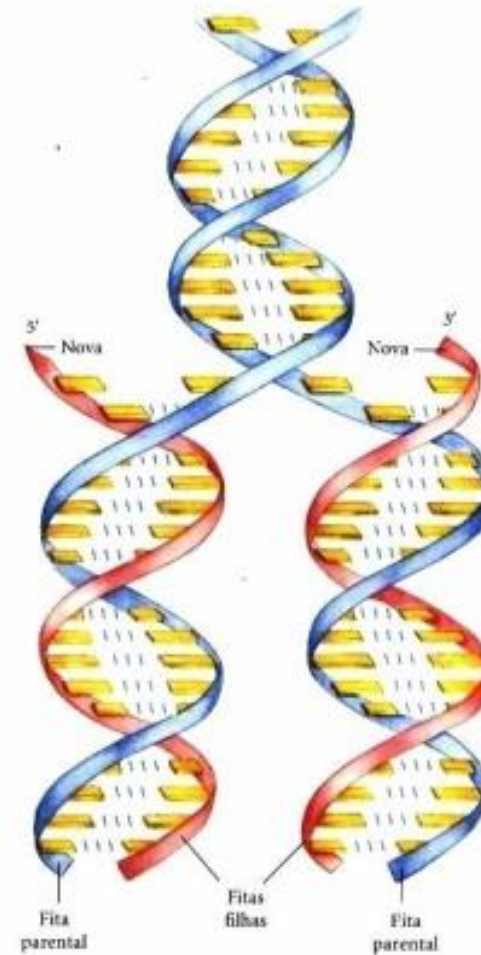
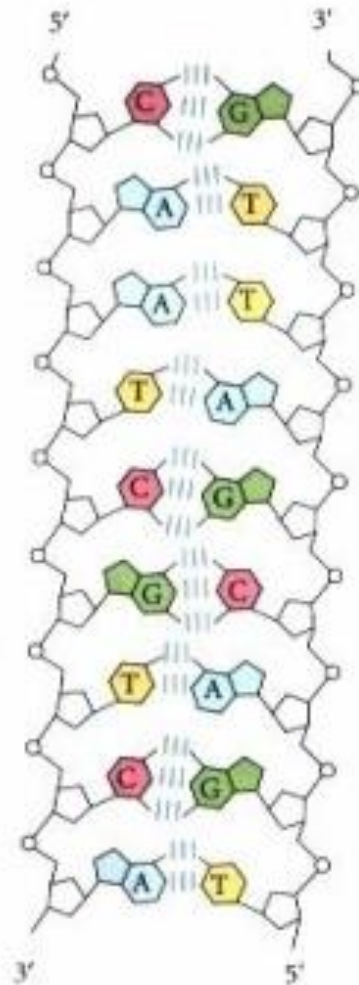


DNA – Ácido Desoxirribonucleico

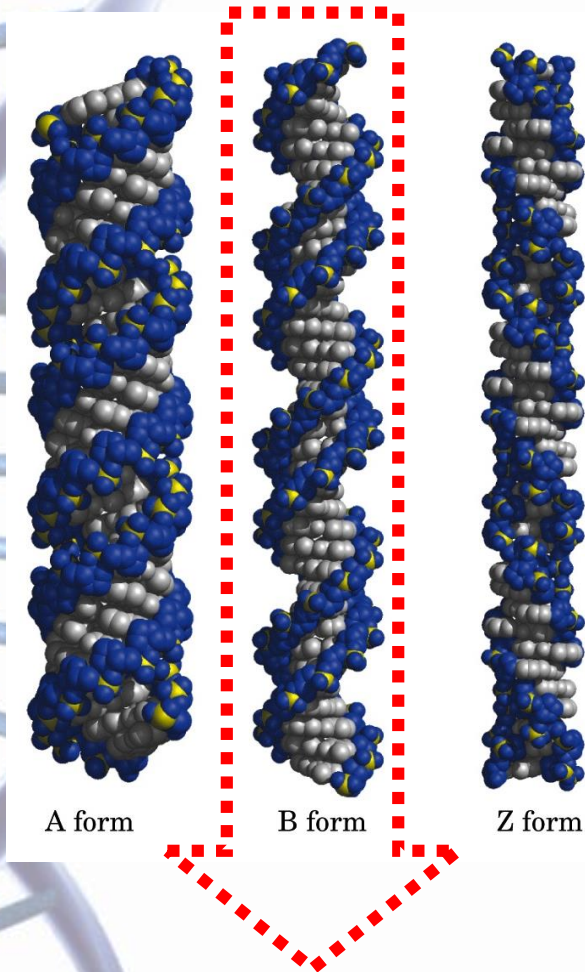


- ❖ Duas cadeias enroladas em torno do mesmo eixo;
- ❖ Orientação a direita
- ❖ Sulcos maiores e menores
- ❖ Grupo fosfato e pentose alternado – hidrofílico
- ❖ Pares de bases- hidrofóbico
- ❖ Pares de bases unidos por pontes de hidrogênio
 - ❖ Relação $A=T$ e $C \equiv G$
- ❖ Fitas Antiparalelas
 - ❖ Complementariedade
- ❖ Forças que mantêm a fita: Lig. H e empilhamento de bases;.

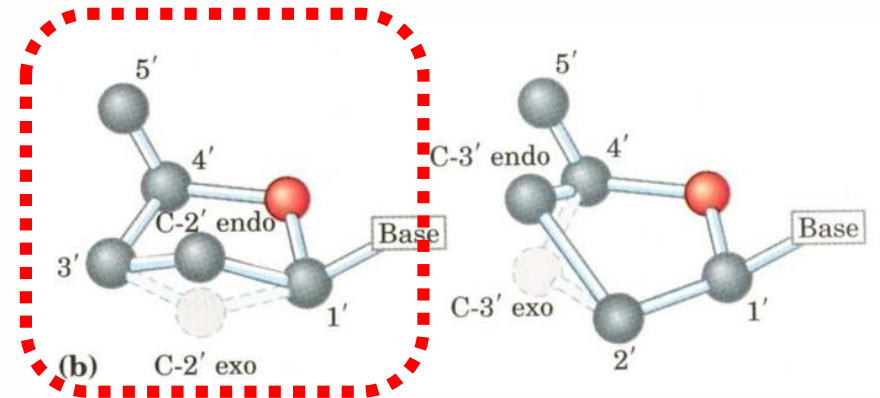
***Complementaridade* → DNA
atuando como molde.**



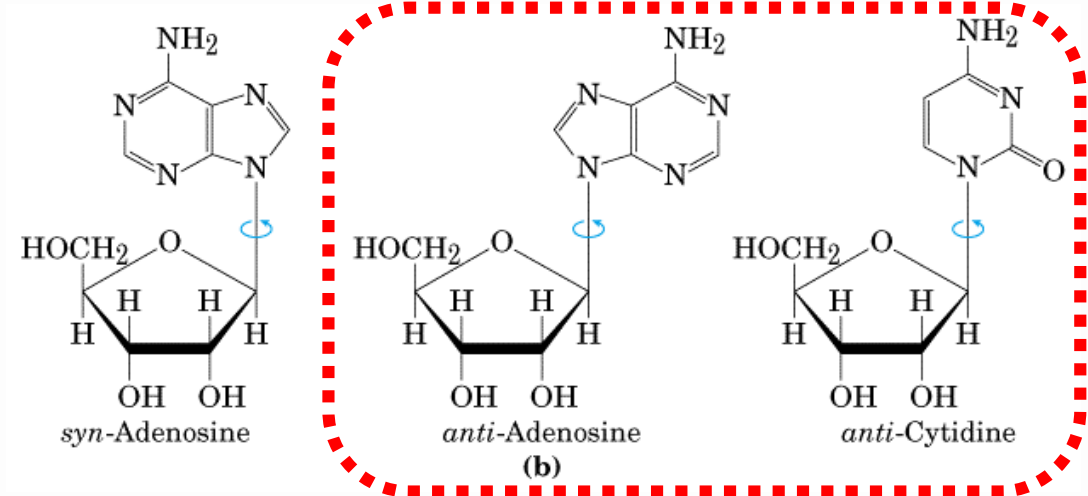
Variações estruturais do DNA:



Mais estável



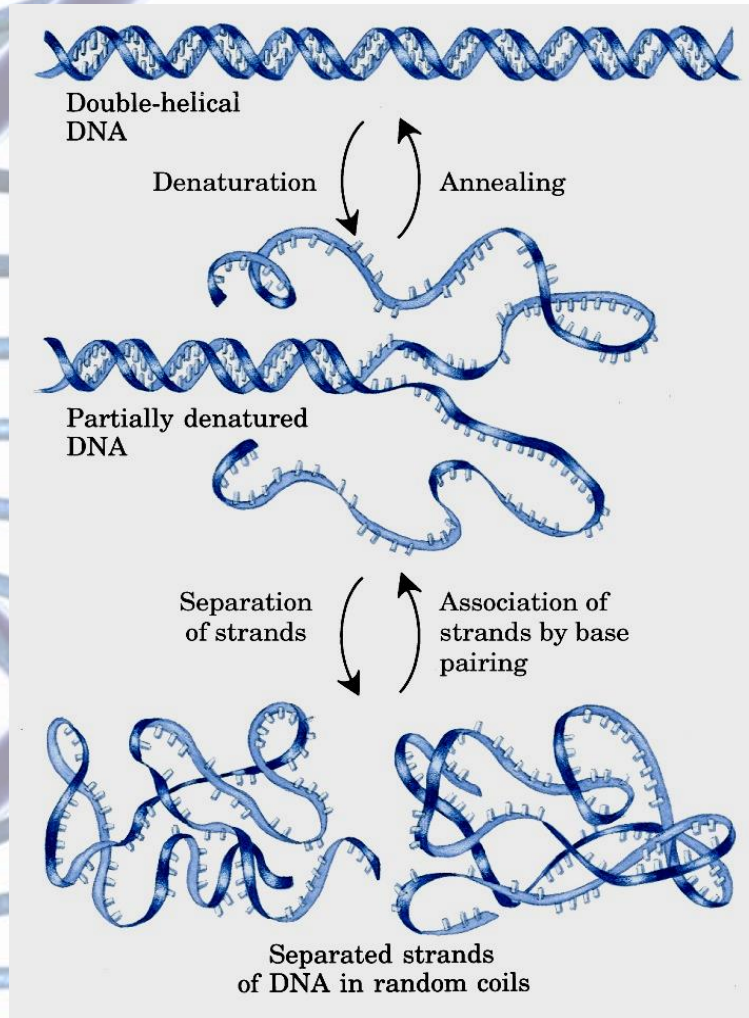
4 átomos de forma planar
Do mesmo lado (endo) ou oposto (exo)
em relação ao C-5'



Bases púricas: *anti* ou *syn*
Bases pirimídicas: *anti*

Características bioquímicas dos ácidos nucleicos

Propriedades químicas: desnaturação do DNA



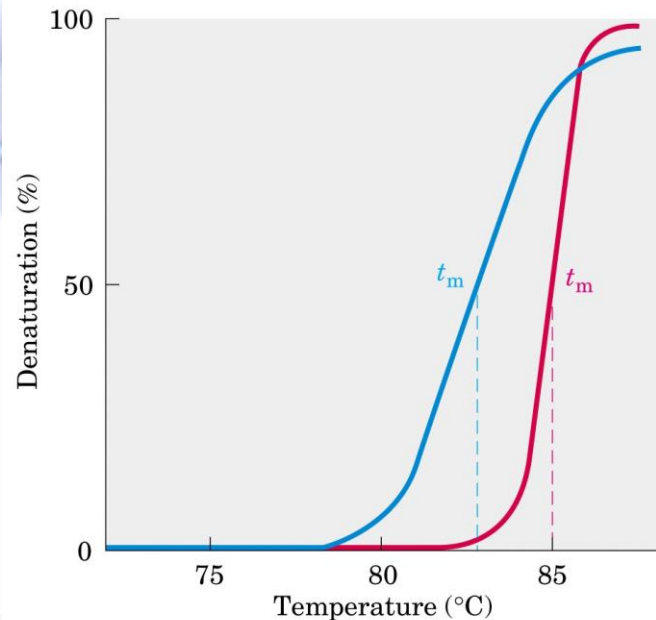
❖ pH extremos

❖ Temperatura elevadas

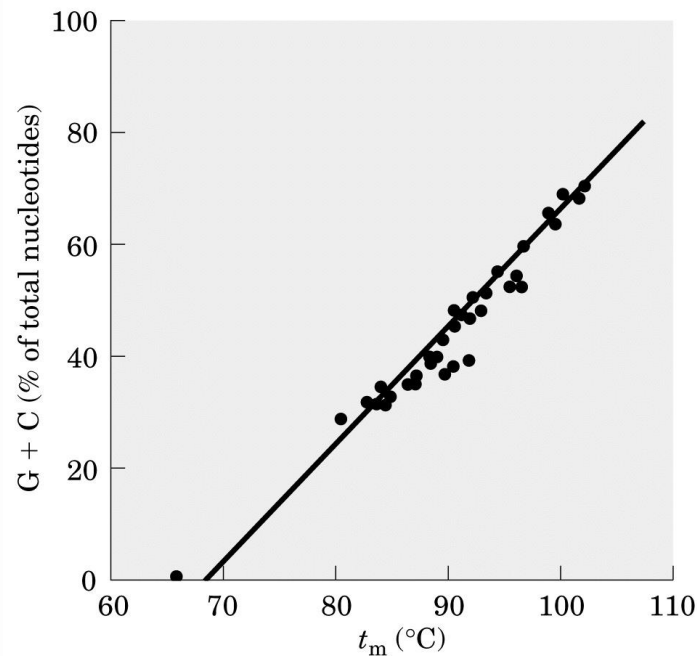
❖ Total ou Parcial

Desnaturação do DNA

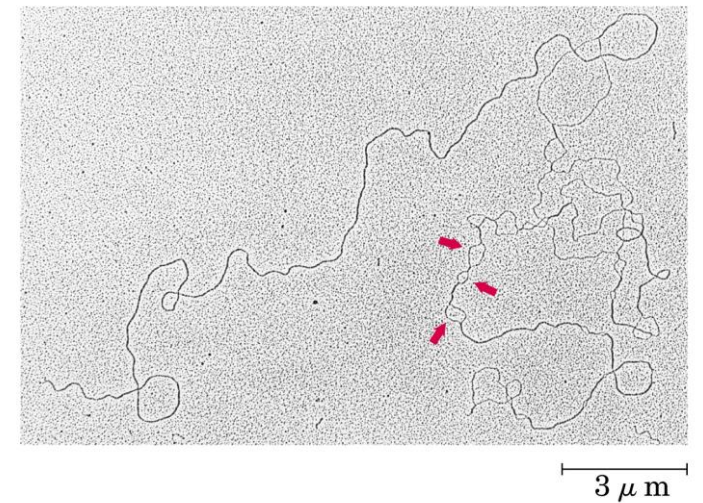
- ❖ Temperatura de desnaturação: relacionado com o conteúdo de A=T e C≡G
- ❖ Ponto de fusão (t_m): ponto médio de transição
- ❖ Condições de pH e força iônica fixa: conteúdo de bases nitrogenadas



(a)



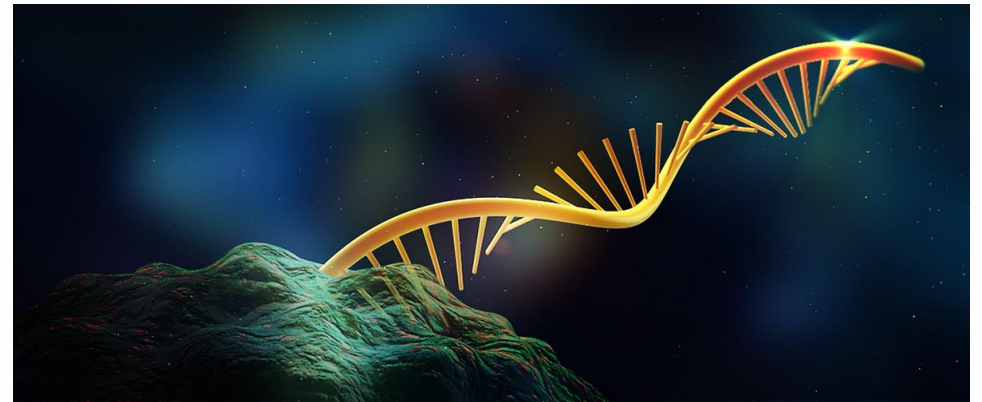
(b)



Regiões de desnaturação:

RNA- Ácido RiboNucleico

- ❖ Segunda forma de ácidos nucleicos nas células
- ❖ Intermediário da informação do DNA
- ❖ Presença no núcleo e citoplasma

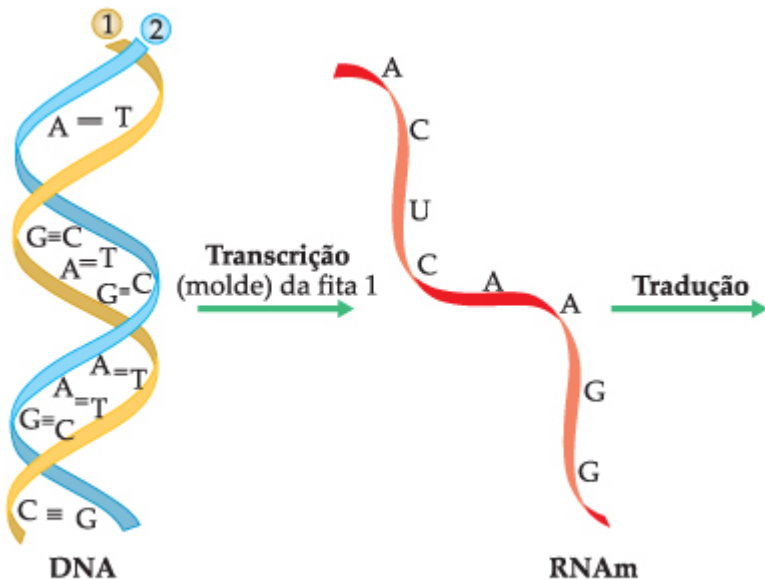


1961 – François Jacob & Jacques Monod:
elucidação do mRNA e a transcrição

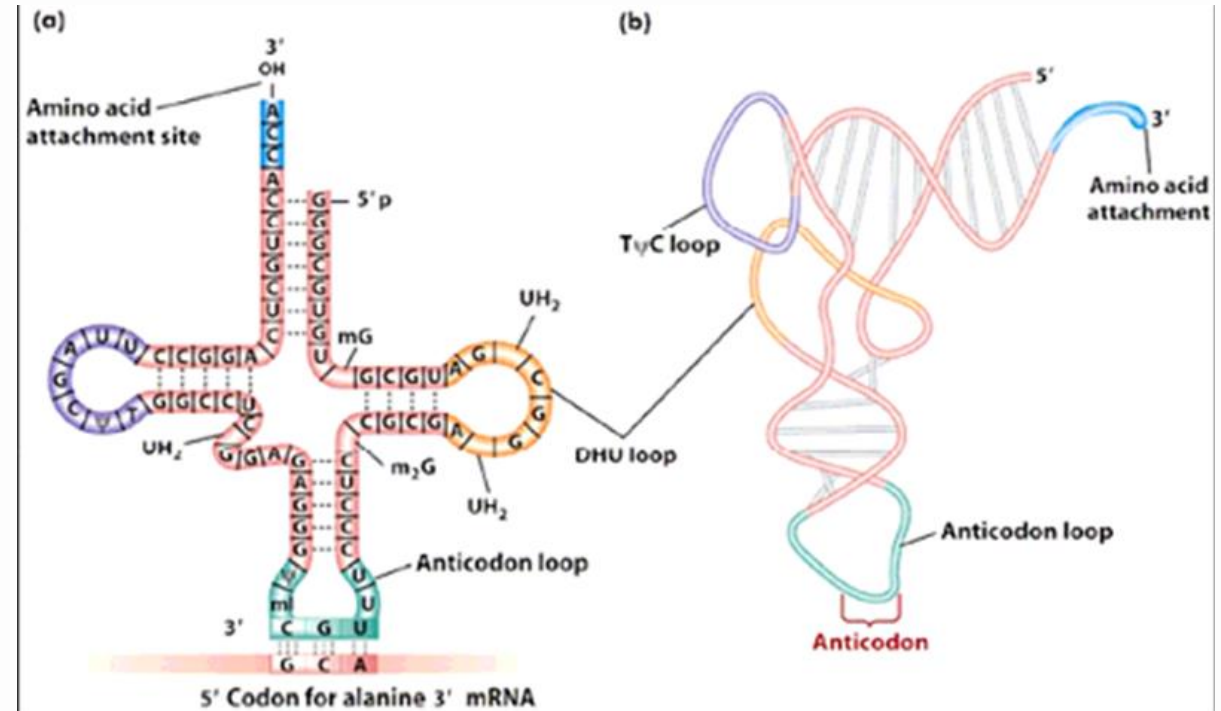


Tipos de RNA

RNA mensageiro (mRNAs): atua na Transcrição da informação do DNA carrega as informações para a tradução no ribossomo;



RNA transportador (tRNAs): síntese protéica



RNA ribossômico (rRNA): componentes do ribossomo, envolvidos na síntese proteica;

mRNA:

AUGUCGGACCAUUCCUGCCGU

1 hour ago

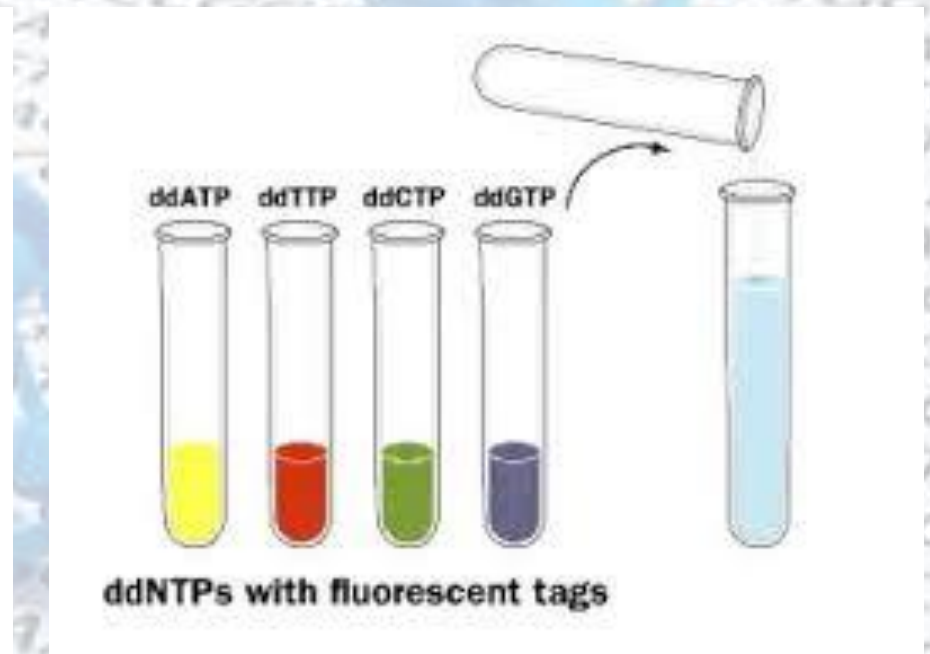
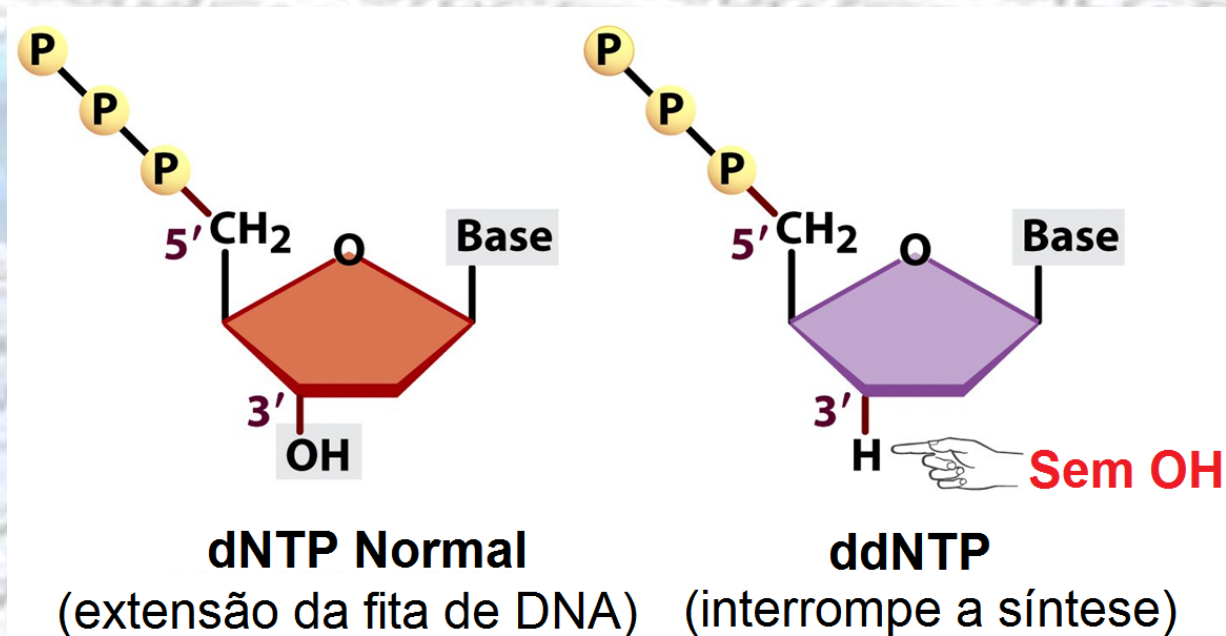
tRNA:

MetSerAspHisSerCysArg

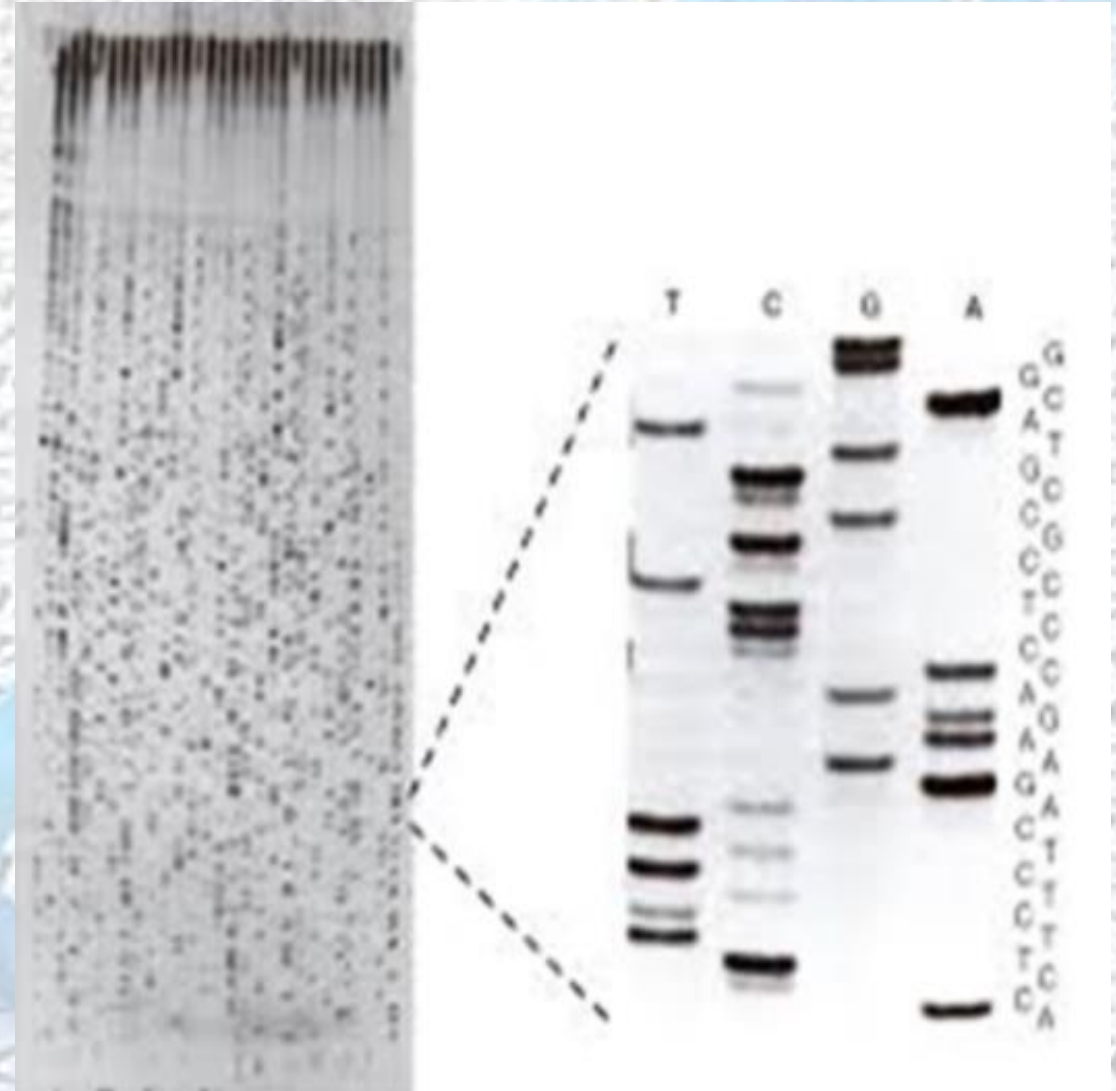
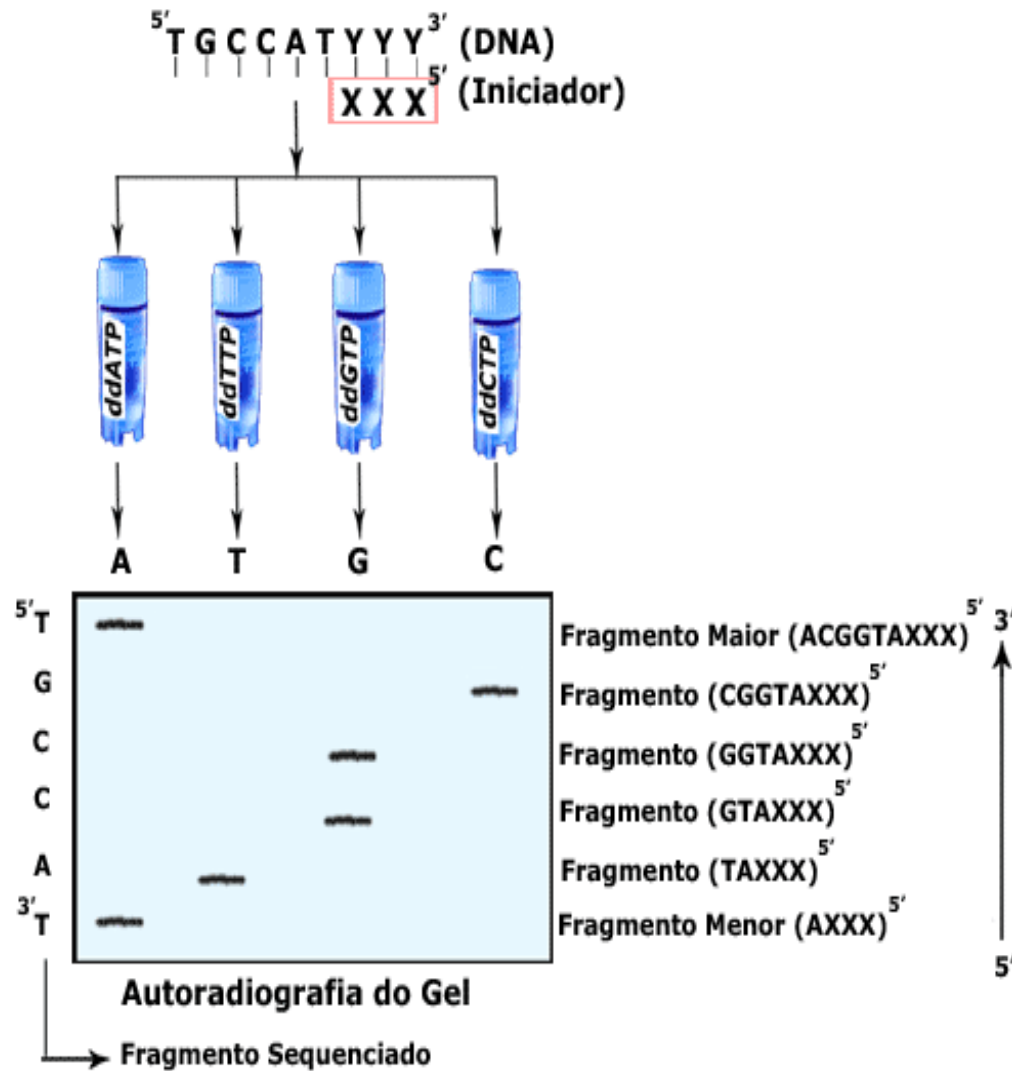
1 hour ago

Sequenciamento de ácidos nucleicos

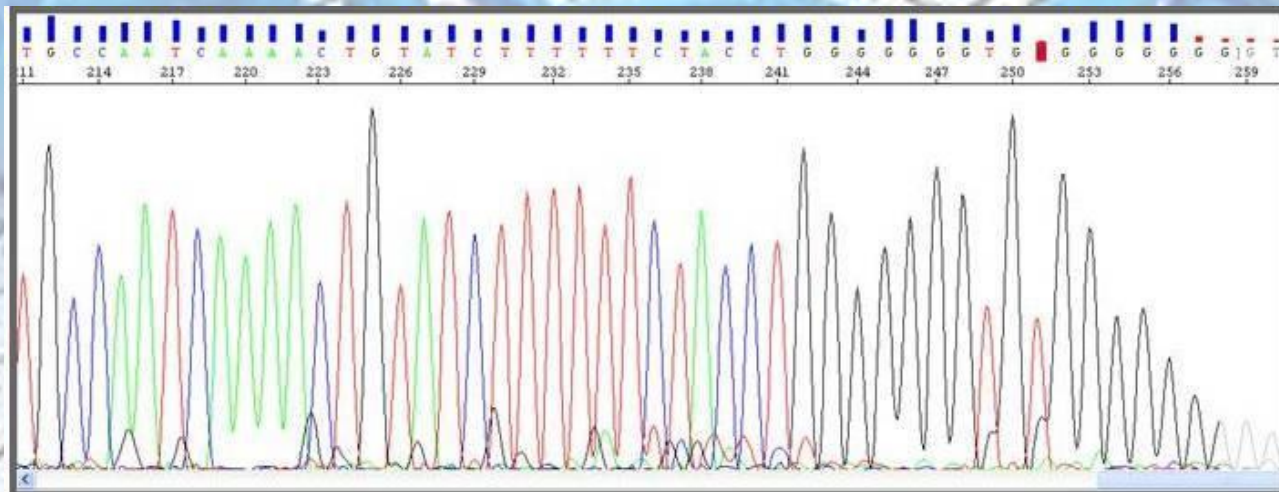
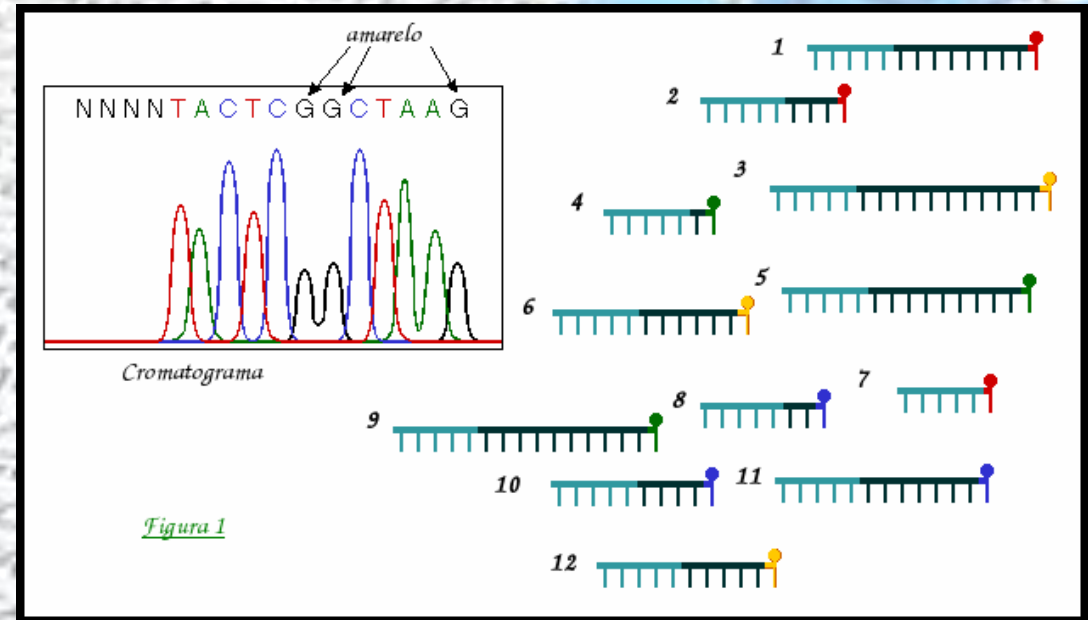
- ❖ Com o desenvolvimento de duas técnicas nos anos 70 foi possível conhecer a sequência do DNA.
- ❖ Uma por Alan Maxam e Walter Gilbert e outra por Frederick Sanger possibilitou o sequenciamento de moléculas maiores de DNA.
- ❖ Ambas são baseadas em eletroforeses e no princípio de reduzir o DNA a quatro grupos de fragmentos marcado quimicamente.



Método de Sanger



Sequenciadores: automatização do método de Sanger

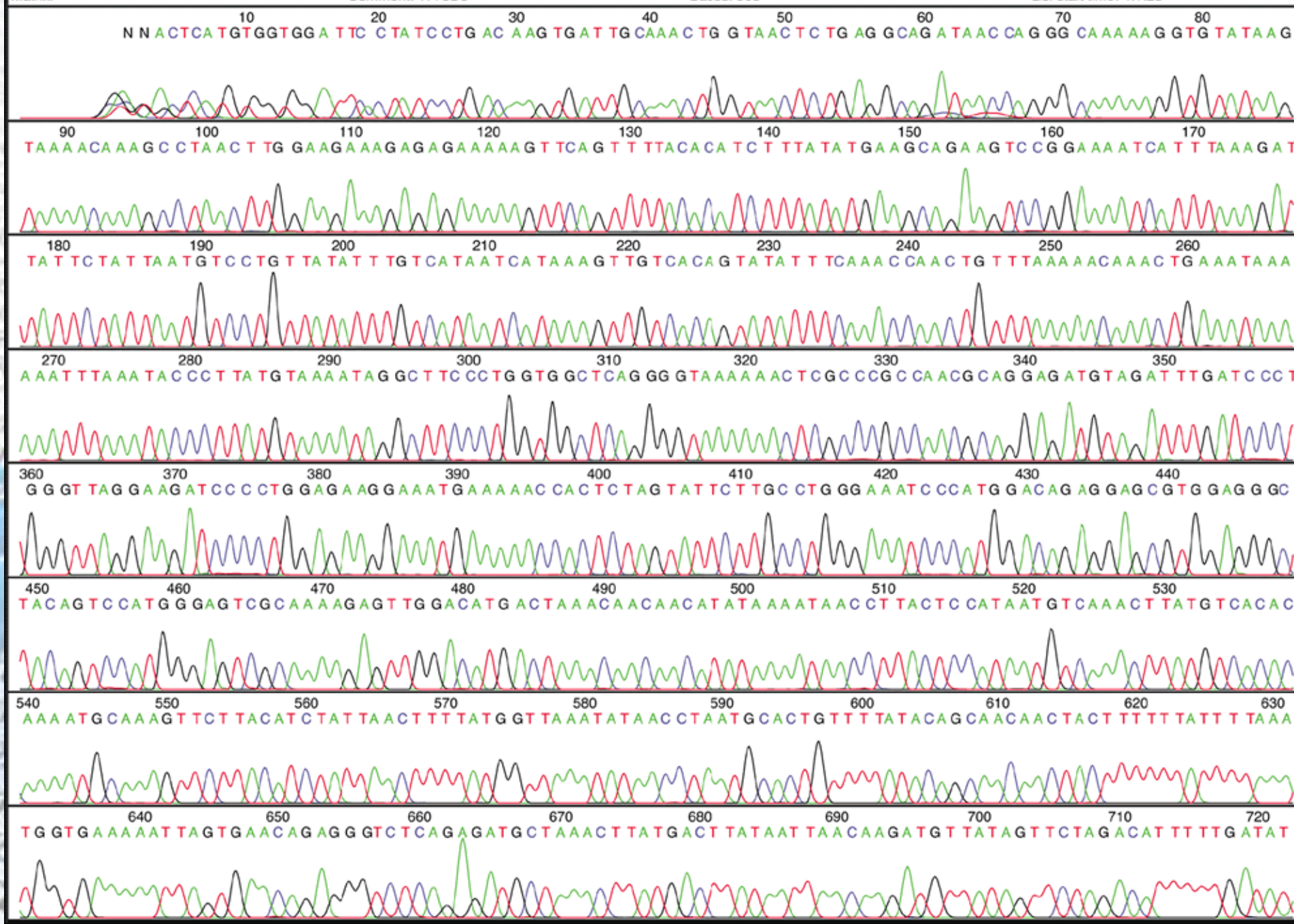


File: gvf11b11.y1
Machine: Cochise-1414-017
Matrix:

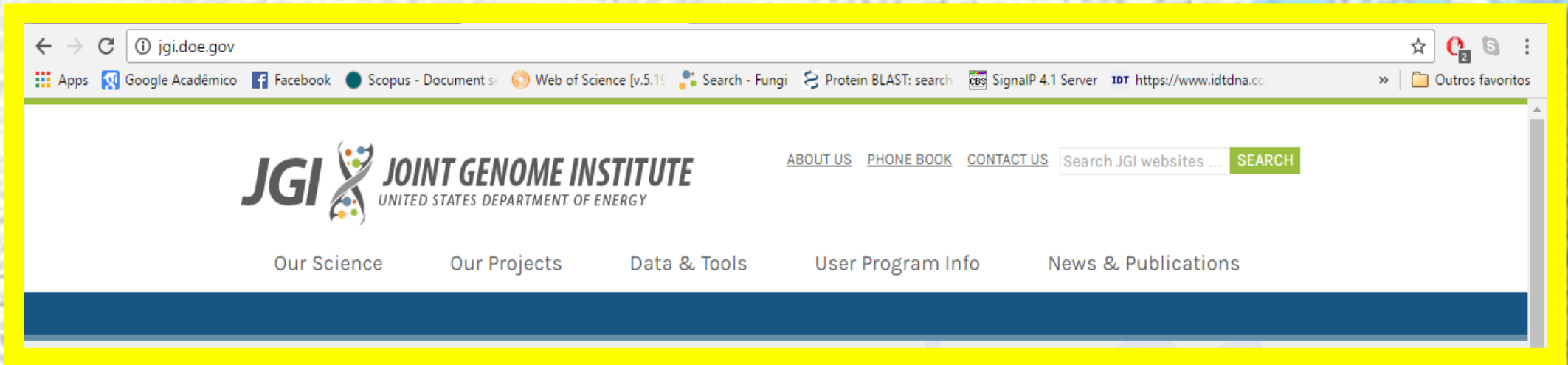
Lane: 93
Primer: DT3730POP7(BDv3).mob
Comment: 1778D3

Spacing: 15.06
Signal: C: 1728 A: 3254 G: 2538 T: 2619
Bases: 903

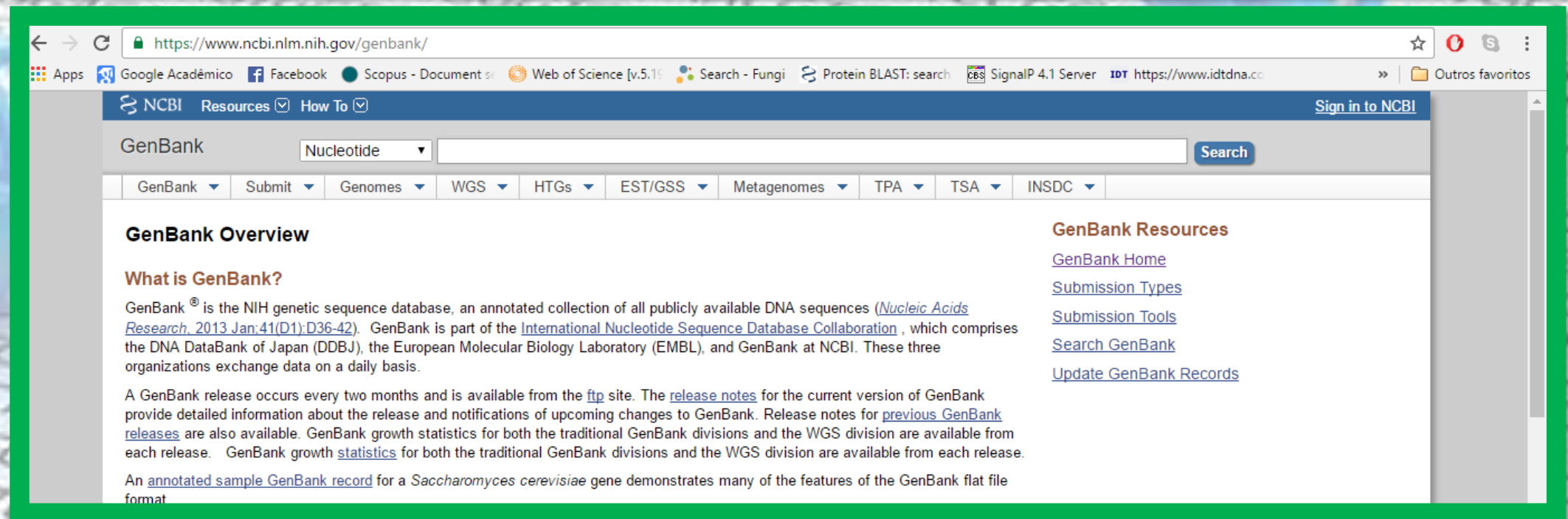
Gel name:
Gel start date: 3 Jan 2004
Gel start time: 4:1:23



Bases de dados de DNAs sequenciados



The screenshot shows the homepage of the Joint Genome Institute (JGI), which is part of the United States Department of Energy. The browser's address bar displays 'jgi.doe.gov'. The page features a navigation menu with links to 'Our Science', 'Our Projects', 'Data & Tools', 'User Program Info', and 'News & Publications'. A search bar is located in the top right corner, labeled 'Search JGI websites ...'. The JGI logo is prominently displayed on the left side of the page.



The screenshot shows the NCBI GenBank website. The browser's address bar displays 'https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/'. The page includes a search bar with a dropdown menu set to 'Nucleotide' and a 'Search' button. Below the search bar, there are tabs for various data types: 'GenBank', 'Submit', 'Genomes', 'WGS', 'HTGs', 'EST/GSS', 'Metagenomes', 'TPA', 'TSA', and 'INSDC'. The main content area is titled 'GenBank Overview' and contains a section 'What is GenBank?' which describes the database as a collection of publicly available DNA sequences. To the right, there is a 'GenBank Resources' section with links to 'GenBank Home', 'Submission Types', 'Submission Tools', 'Search GenBank', and 'Update GenBank Records'.



Endonucleases

(enzimas)

de

restrição

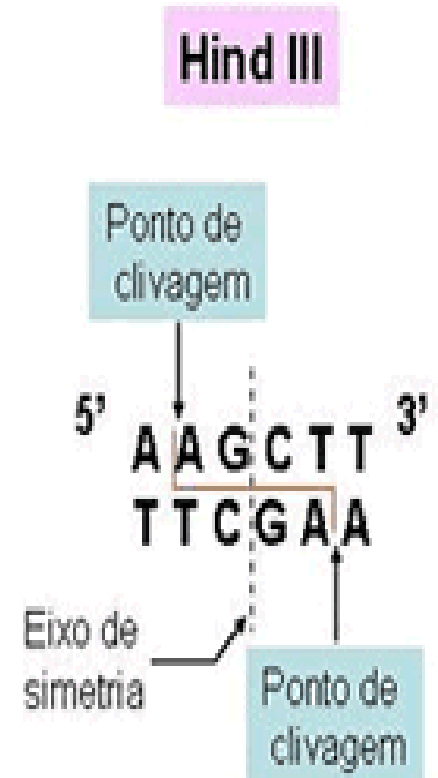
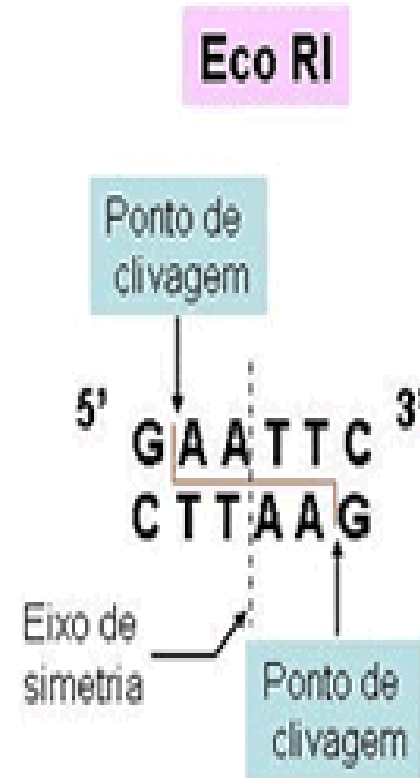
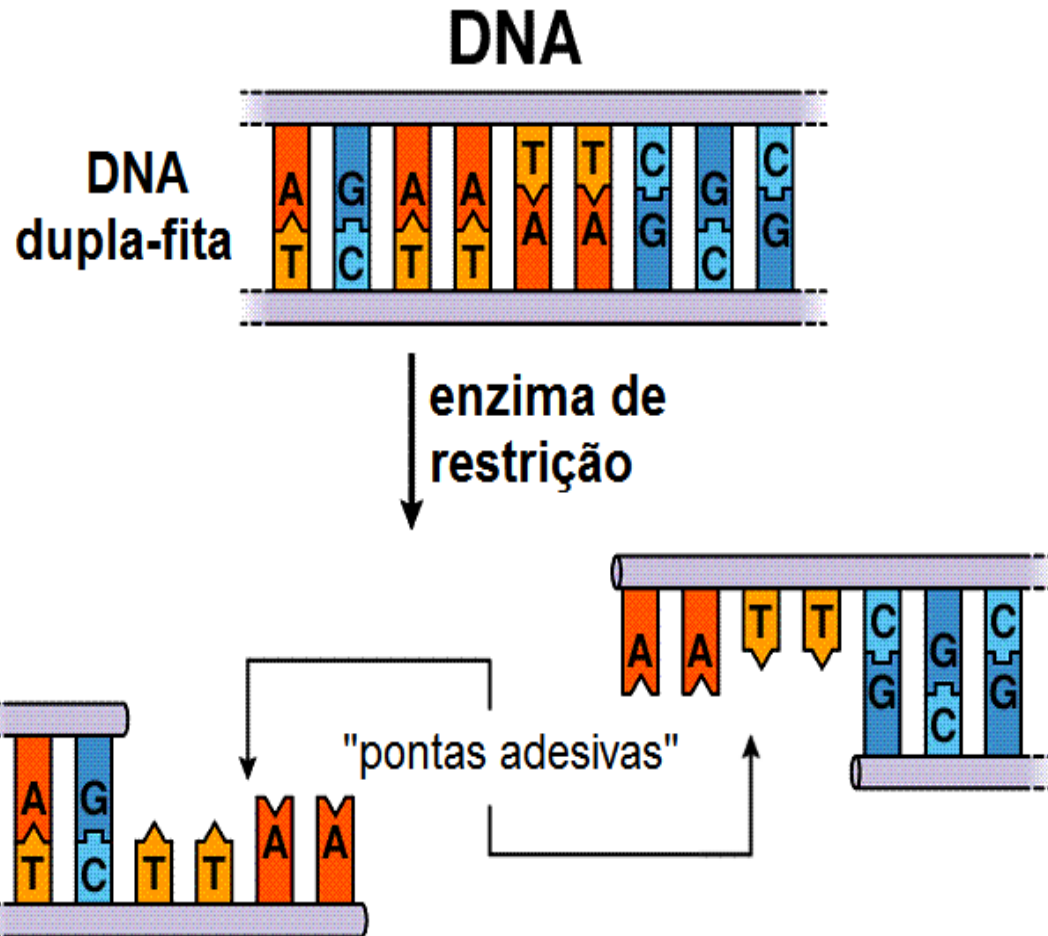
Conceito de enzimas de restrição



❖ Estas enzimas são **endonucleases**, ou seja, no interior (daí o prefixo *endo-* dentro) das moléculas de DNA, cortando-as em locais bem definidos.

❖ Foram descobertas na década de 1970 e são enzimas produzidas normalmente por bactérias e que possuem a propriedade de defendê-las de vírus invasores.

Modo de ação das enzimas de restrição



***Enorme variedade de enzimas de restrição



Bibliotecas Genômicas e de cDNA

Conceito de bibliotecas genômicas

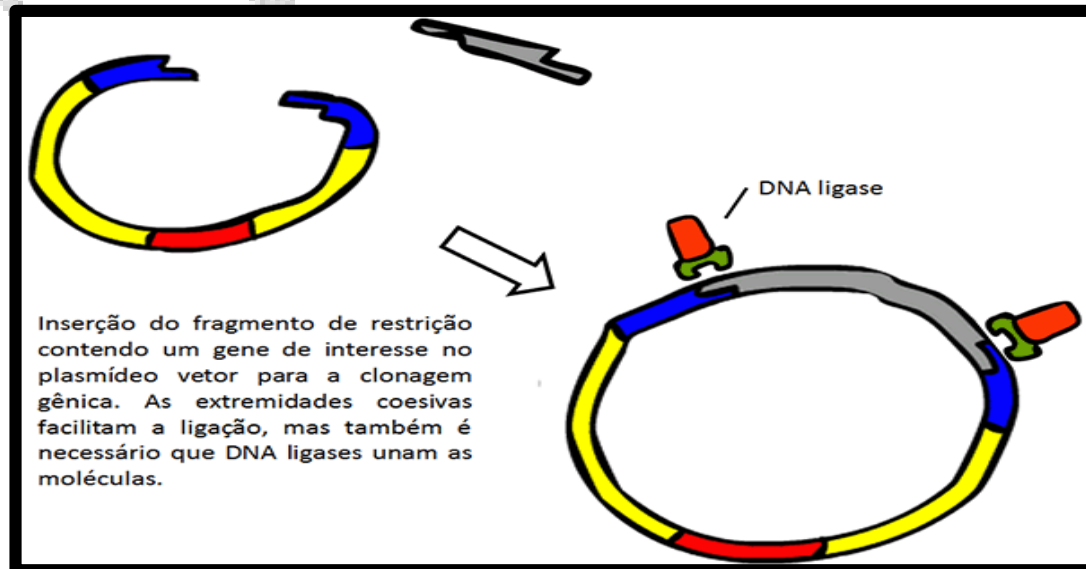
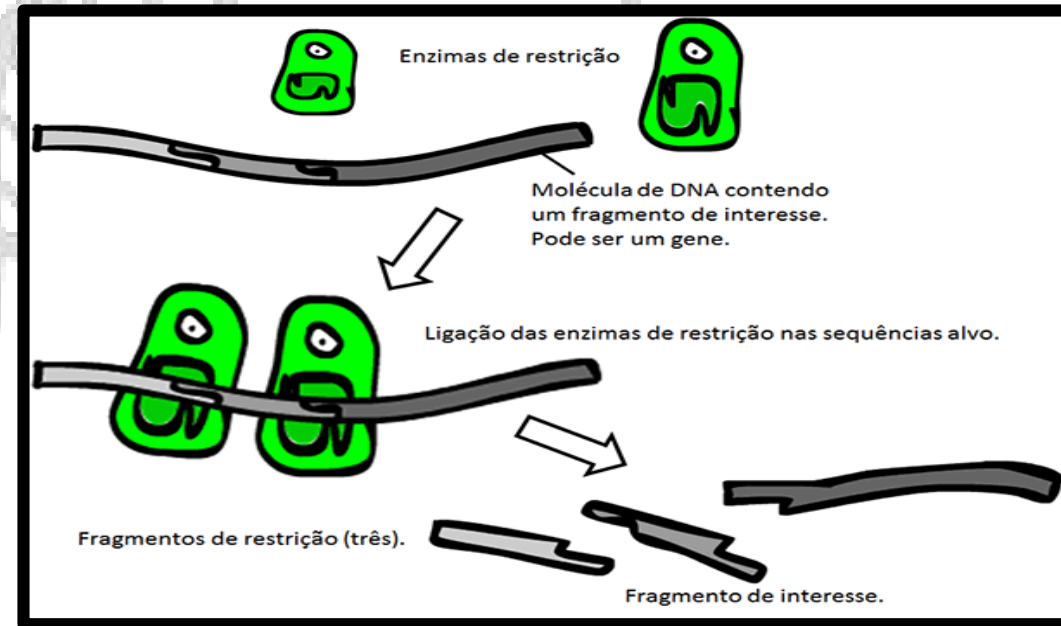
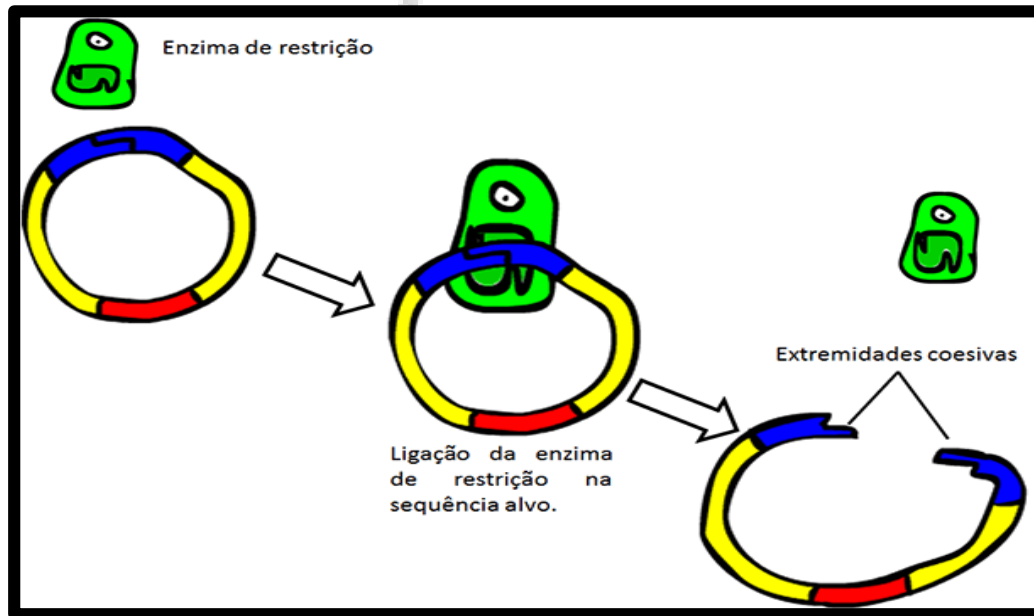
- ❖ Coleção de fragmentos de DNA de uma determinada espécie de organismo, obtidos a partir da ação de endonucleases de restrição, ligados as **vetores** apropriados e clonados após terem sido inseridos num hospedeiro.
- ❖ Representativa de todos os genes do organismo
- ❖ Inclui sequências de um conjunto muito grande, como o genoma inteiro de um organismo, sequências expressas de um tipo celular particular ou sequências presentes num fragmento de DNA → **DNAg**
- ❖ Ou pode ser proveniente de **cDNA** fragmentos oriundos do mRNA reversamente transcrito à um DNA.

Aplicações e importância

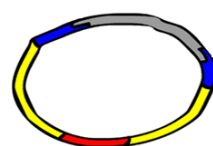
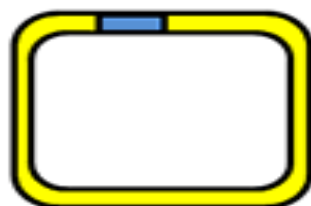
- ❖ Isolamento de um gene específico;
- ❖ Sequenciamento;
- ❖ Clonagem;
- ❖ Identificação de genes em diferentes espécies;
- ❖ Análise de proteínas relacionadas;
- ❖ Auxílio a metagenômica

*apenas 1 % dos microrganismos existentes são cultiváveis.

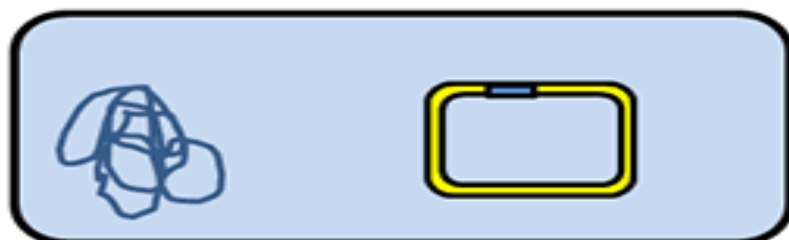
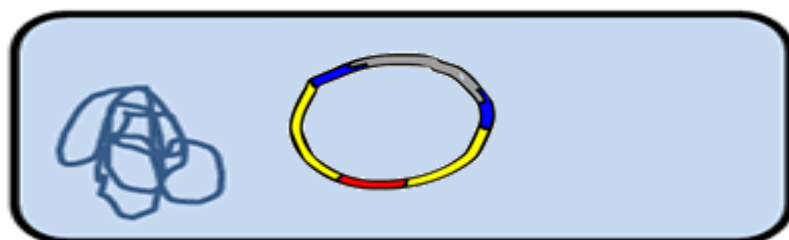
Construção de bibliotecas genômicas



Plasmídeos vetores



Bactérias



Biblioteca de DNA

- Vídeo sobre a construção de bibliotecas genômicas

https://www.youtube.com/watch?v=eiK7F_wCsTI

**Amplificação
de ácidos nucleicos
por PCR**

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

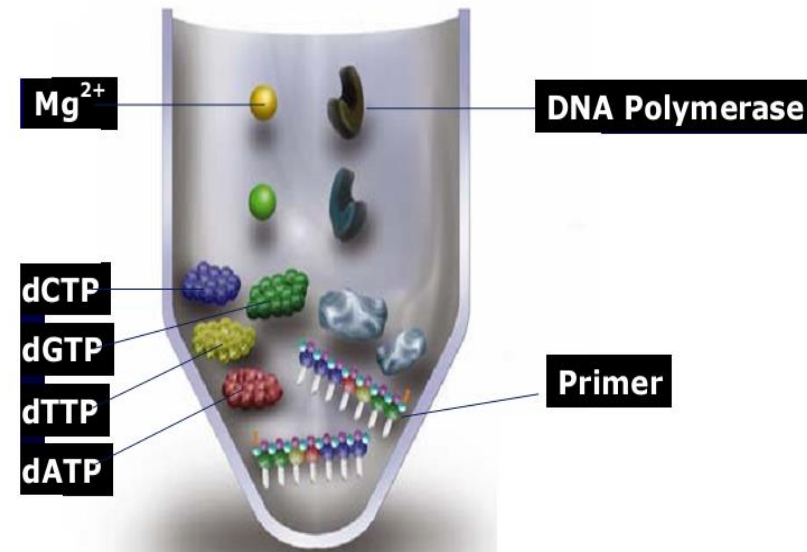
1985- Kary Mullis inventou a reação em cadeia da polimerase (PCR) durante uma viagem de carro ao longo da costa da Califórnia. Sua ideia foi a concepção de uma técnica genial, relativamente simples, que funciona como complemento perfeito para a clonagem gênica.



Consiste em fazer cópias do DNA “in vitro”, usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.

Componentes

- ✓ Tampão
- ✓ Água
- ✓ DNA molde
- ✓ Primers (iniciadores)
- ✓ dNTPs
- ✓ Mg^{2+}
- ✓ DNA polimerase



Etapas do PCR

1. Desnaturação: 94-96°C

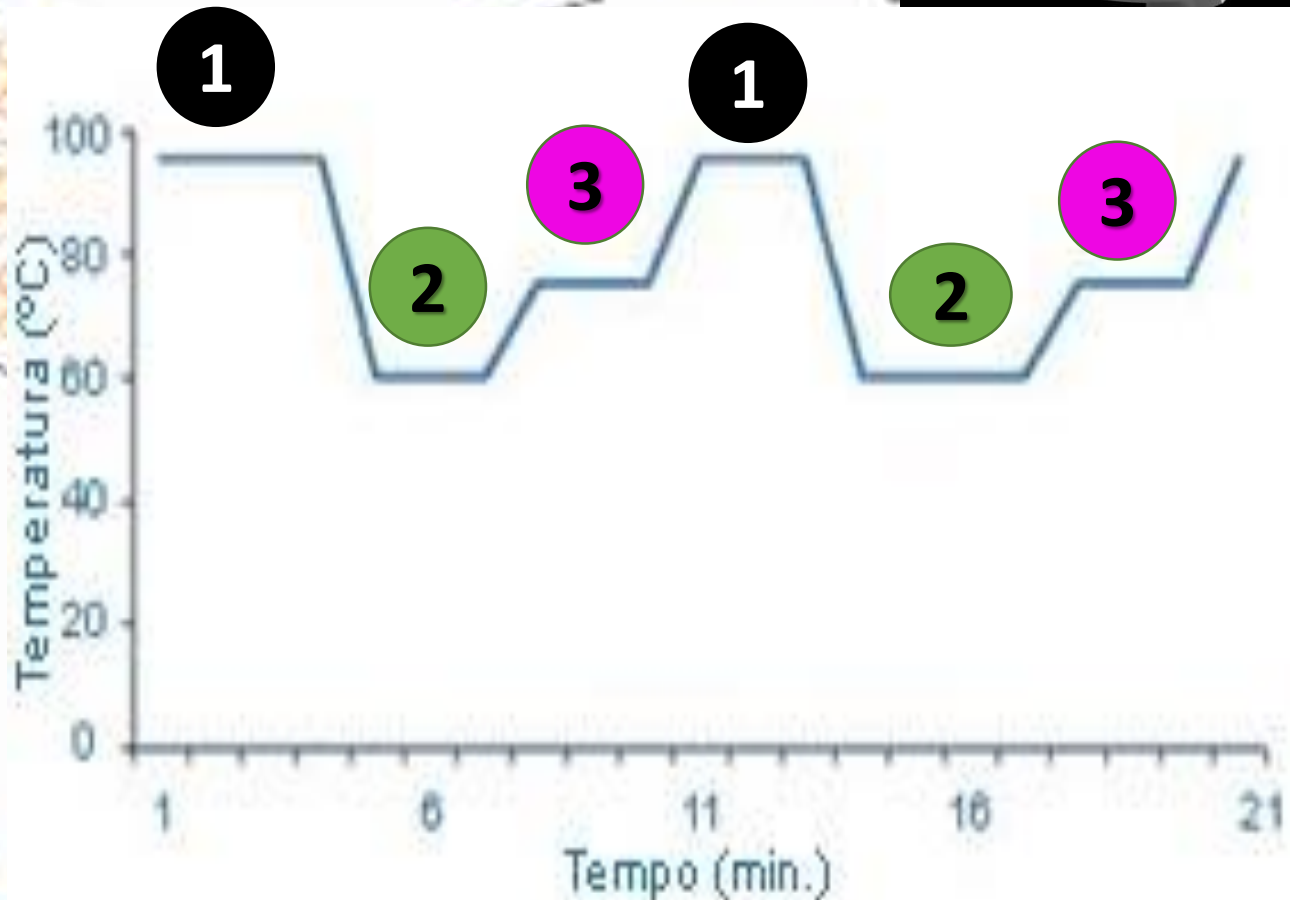
Separação do DNA em duas fitas simples;

2. Anelamento: 37-65°C

Primers anelando na região específica do DNA;

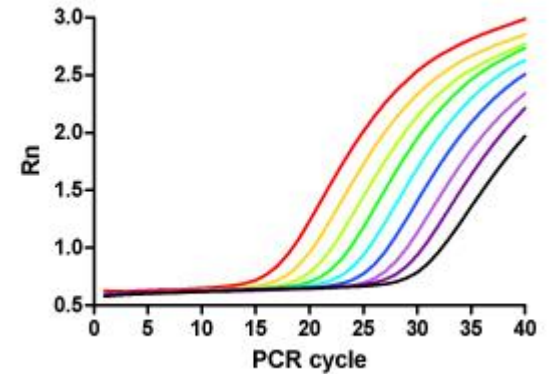
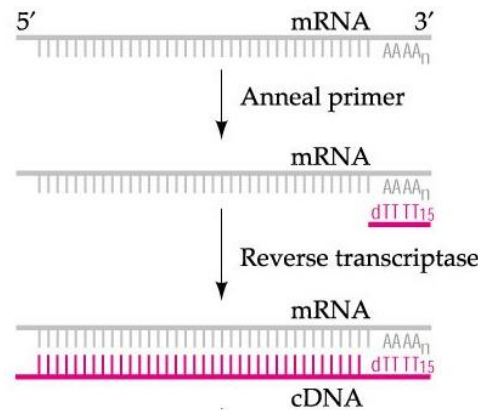
3. Extensão: 72°C

DNA polimerase utiliza os elementos para fazer nova fita; polimerização.

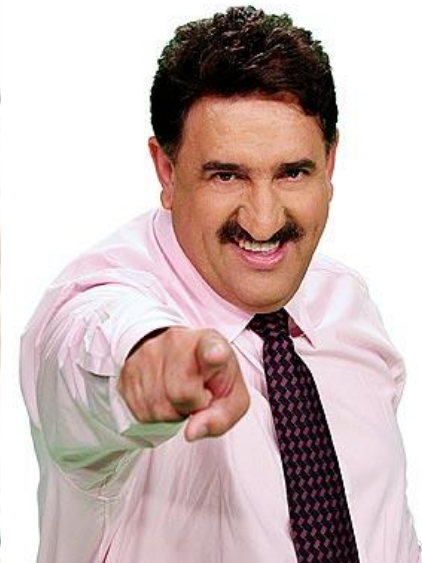


Tipos de PCR e suas aplicações

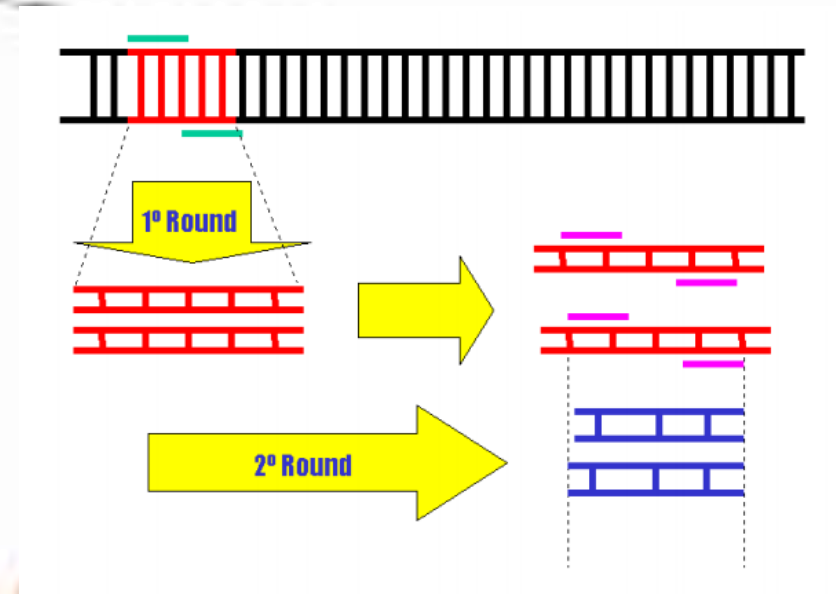
- ❖ **RT-PCR** (Reverse Transcriptase Chain Reaction): mRNA usado como molde. Usado na análise de expressão de genes (real-time qRT-PCR)



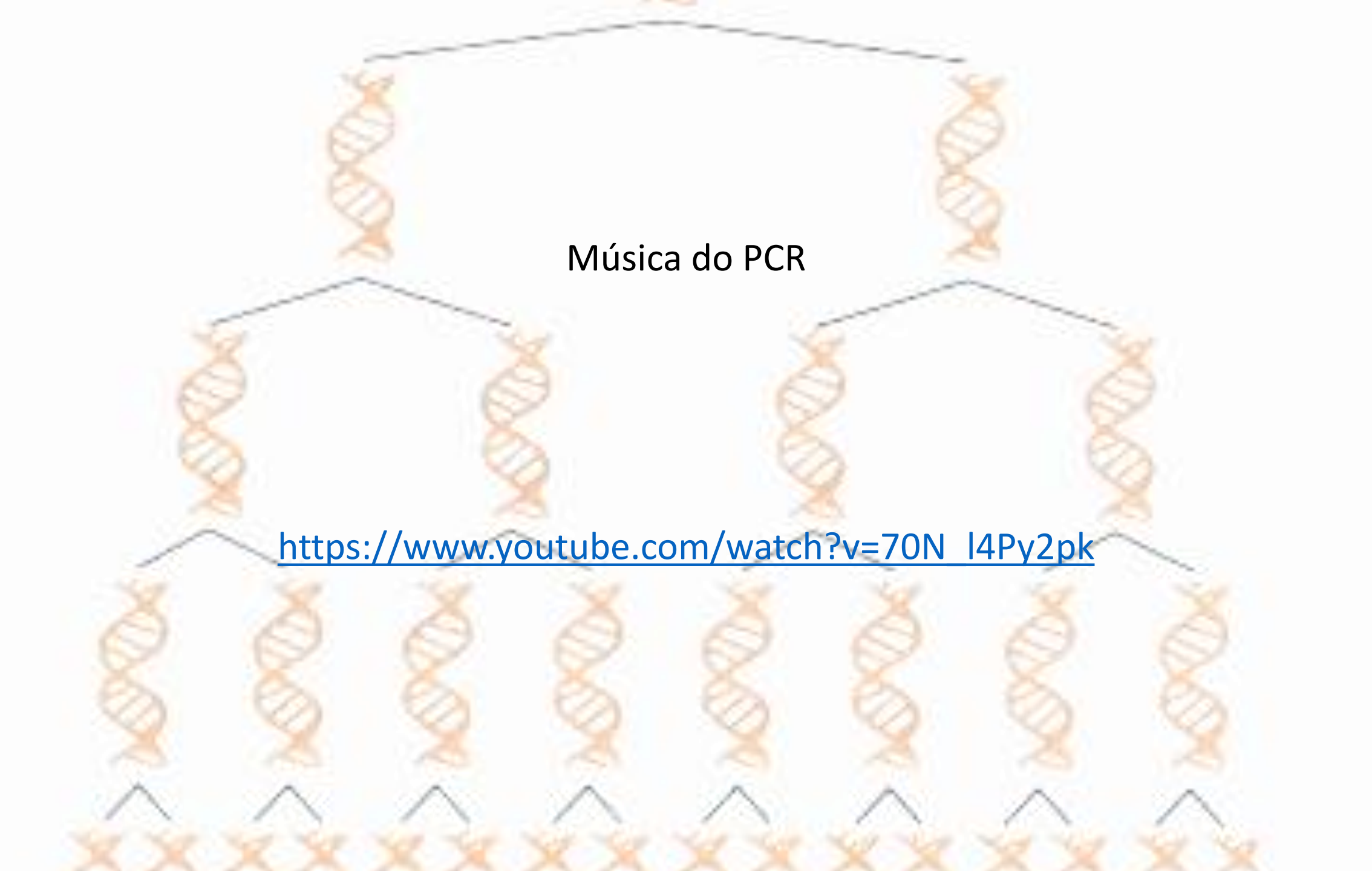
- ❖ **Multiplex PCR:** mais de um alvo no DNA feito na mesma reação. Largamente utilizada em investigações de paternidade, já que se analisa mais de uma característica comum.



- ❖ **Nested PCR:** amplificação do alvo em duas reações de PCR, primeiro de uma forma mais abrangente e depois mais específica. Podem ser realizadas concomitantes ou em separado (*Semi-nested PCR*)

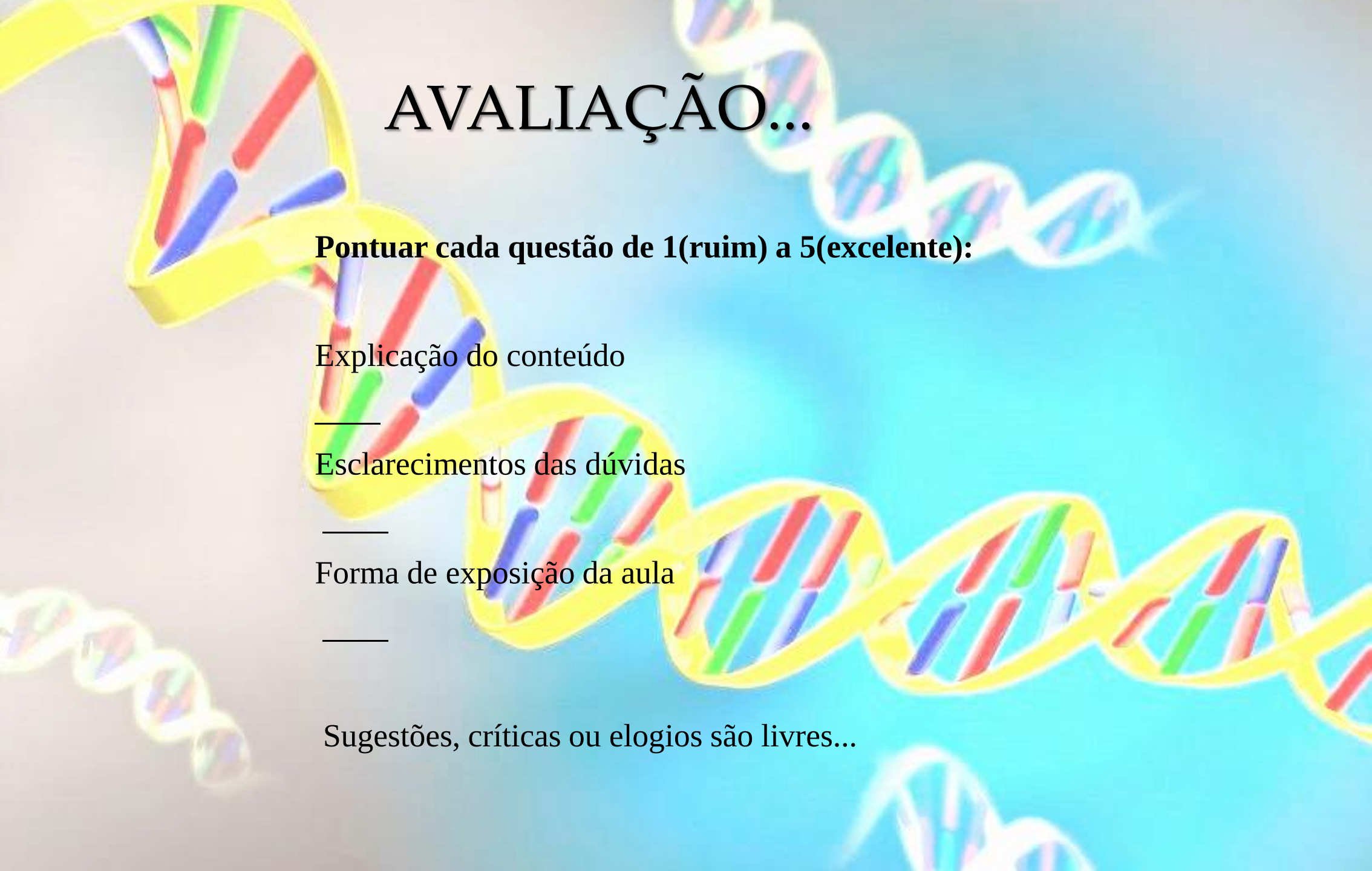


- ❖ **PCR Competitiva:** é adicionado à reação um outro trecho de DNA, de sequência, tamanho e concentração conhecidos (controle), cujas extremidades são complementares também aos primers que irão amplificar a sequência-alvo. O resultado é a amplificação de dois trechos de DNA: a de interesse e a controle. Esta técnica é utilizada principalmente em kits diagnósticos (Carga Viral de HIV).



Música do PCR

https://www.youtube.com/watch?v=70N_I4Py2pk



AVALIAÇÃO...

Pontuar cada questão de 1(ruim) a 5(excelente):

Explicação do conteúdo

Esclarecimentos das dúvidas

Forma de exposição da aula

Sugestões, críticas ou elogios são livres...