

A BIOLOGIA MOLECULAR

PELO OLHAR DO ALUNO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ISABELLA MORAES
MATHEUS MACHADO
NATHAN MOURAT
TAÍS PAIXÃO
VINÍCIO DE SOUZA



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

| ABRIL 2020

**Portfólio de Biologia Molecular realizado pelos alunos do 3º ano da
habilitação de Biotecnologia da Escola Politécnica de Saúde
Joaquim Venâncio localizada da Fiocruz.**

Sumário

1. Fundamentos de Biologia Molecular	2
2. Replicação, Transcrição e Tradução	6
3. Replicação, Transcrição e Tradução - continuação	12
4. Extração de ácidos nucleicos e eletroforese	17
5. Regulação da Expressão Gênica (Procaritos) - parte I	22
6. Regulação da Expressão Gênica (Eucariotos) - parte II.....	25
7. PCR – parte I	29
8. Variações da PCR – parte II	30
9. Clonagem Molecular –	31
10. CRISPR	33
11. Tira dúvidas	35
12. Sequenciamento de DNA	36
13. Referência bibliográfica	43

Fundamentos de Biologia Molecular

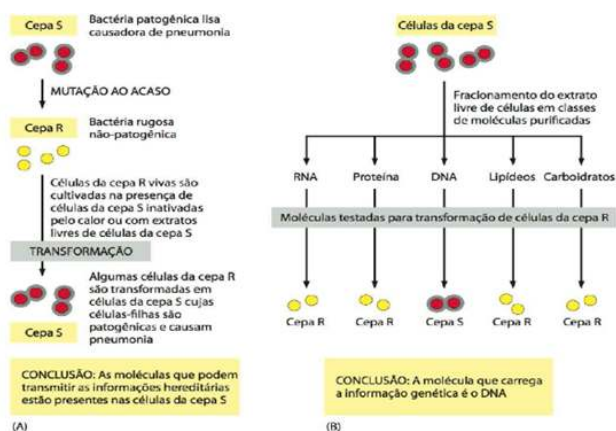
A biologia molecular é a área da biologia que pesquisa a estrutura e a função do material genético e das proteínas. Se encontra de modo intrínseco entre a bioquímica e a genética.

Gregor Mendel foi o primeiro cientista a estudar a hereditariedade (transmissão da informação genica) e os fatores hereditários difundidos através dos descendentes.

Histórico

Os primeiros estudos bioquímicos referentes ao núcleo celular foram realizados por Friedrich Miescher em 1868. Seu material de estudo foram os núcleos de células oriundas de curativos cirúrgicos (leucócitos de secreção purulenta).

Em 1928, Frederick Griffith introduziu o conceito de transformação bacteriana com o seguinte experimento:



Oswald Avery, Maclyn McCarty e Colin Munro MacLeod, apontaram o DNA como Carreador da informação Genética.

O primeiro indício de que o DNA era o material genético, surgiu em 1944.

Era de conhecimento, portanto, no início do século XX, que o DNA era composto por desoxinucleotídeos. Da mesma forma o RNA era conhecido, uma vez que a existência do ribonucleotídeos já era reconhecida. No entanto, a estrutura da molécula de DNA ainda não havia sido descoberta.

Em 1949, E. Chargaff apontou as quantidades relativas das quatro variedades de nucleotídeos do DNA. Segundo a regra de Chargaff:

$$T = A \\ (C = G)$$

Em 1952, Alexander Todd confirmou que os nucleotídeos estavam conectados ao DNA por meio de ligações fosfodiéster 3' – 5' entre suas desoxirriboses estruturando uma cadeia polinucleotídica.

M.H.F. Wilkins e Rosalind Franklin estudaram a difração de Raio X da molécula de DNA, porém, seus resultados foram interpretados por James Watson e Francis Crick.

Assim, em 1953 James Watson e Francis Crick apresentaram a estrutura da molécula de DNA.

Mecanismos de Perpetuação e Interpretação da informação Genética

Em 1961, M.W.Niremberg e J.H.Matthaei observaram a sequência sintética do polinucleotídeo Uracila (UUUU). Eles perceberam que essa sequência de nucleotídeos produzia o aminoácido Fenilalanina, dessa forma, compreenderam que existia uma correlação entre uma sequência e um aminoácido e logo o código genético foi descoberto.

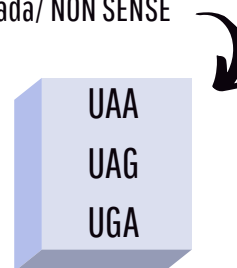
		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
	UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
First letter C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
First letter A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAU } Asn	AGC } Ser	C	
	AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
	AUG Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
First letter G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	

O código genético também era conhecido como degenerado, pois nem sempre um aminoácido será formado por apenas uma sequência, por vezes, mais de uma sequência de códons diferentes formará o mesmo aminoácido.

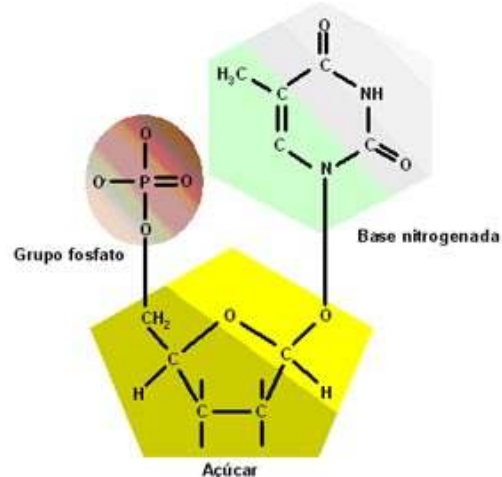
Existem 64 possibilidades de trípletos da sequência de nucleotídeos (códons), porém, em apenas em 61, os aminoácidos são traduzidos em proteínas. Os outros 3, são códons de parada e não formarão aminoácidos, assim, finalizam a sequência da proteína.

Todos os peptídeos iniciados com a metionina (AUG) são códons iniciadores, —> as cadeias proteicas sempre iniciarão com esses aminoácidos.

As cadeias proteicas serão finalizadas assim que encontrarem com um dos três códons de parada/ NON SENSE



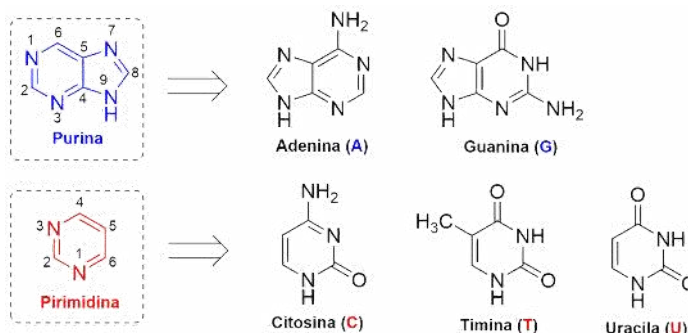
Formado por Dupla Hélice, que oferece estabilidade, o Dna deve ser capaz de estocar grande quantidade de informações, se replicar fielmente, garantindo a perpetuação das espécies, e codificar o fenótipo (capacidade de determinar as características). A Dupla Hélice ou cadeias de polinucleotídeos, são constituídas por vários nucleotídeos:



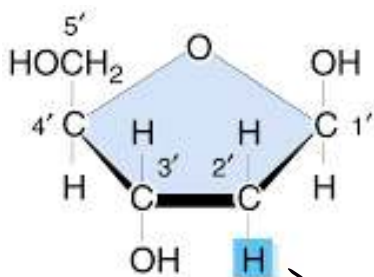
Os nucleotídeos são formados por uma Base Nitrogenada (átomos de carbono e nitrogênio) uma Pentose (açúcar com 5 carbonos) e um Grupo Fosfato (molécula com 1 átomo de fósforo cercado por 4 oxigênios de **carga negativa**).

Dando carga negativa a molécula de DNA

As Bases Nitrogenadas do DNA são compostas pelas purinas e pirimidinas: *A molécula de Dna não possui uracila *



A pentose do DNA é a Desoxirribose:

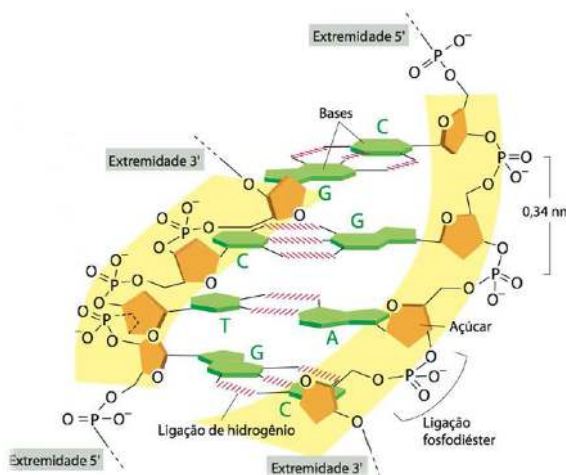


A ausência de oxigênio no 2º carbono, Auxilia a identificação da molécula de DNA.

As purinas possuem duplo anel aromático

Existe uma regra que determina a direção da molécula:

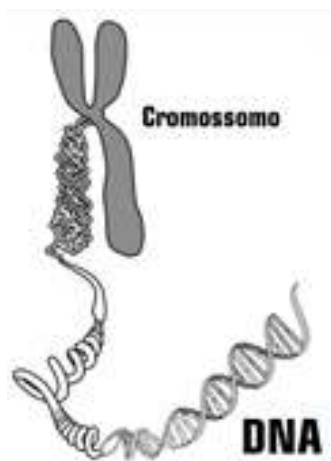
5' - 3'



Estrutura Primária do DNA:

A Estrutura Primária do DNA se refere a ligação dos nucleotídeos:

1 cromossomo humano → 1 Molécula de DNA



Composição das fitas:

A extremidade 5' possui um grupo fosfato em aberto, já a extremidade 3' terá uma hidroxila em aberto. A ligação que a DNA polimerase fará, está intimamente ligada a essas extremidades, onde a molécula da enzima será ligada e reconhecida.

Estrutura Secundária do DNA:

Se refere à configuração tridimensional da molécula do DNA (estrutura helicoidal fundamental), favorecida pela força das pontes de hidrogênio

A exemplo desta matéria, publicada no início da pandemia de covid-19, podemos perceber a importância de se estudar o código genético:

O código genético, é também motivo de inspiração e curiosidade para muitos:

A descoberta do código genético:

2.3 A DESCOBERTA DO CÓDIGO GENÉTICO

No final da década de 50 e início da década de 60, os cientistas dessa área estavam diante de um enigma ainda maior. Como uma sequência linear de nucleotídeos seria capaz de produzir proteínas que são formadas por aminoácidos? Eles sabiam que havia uma linguagem semelhante entre o DNA e o RNA, guardadas algumas pequenas diferenças, essa comunicação poderia ser entendida pelo sistema de pareamento de bases nitrogenadas por complementariedade. Mas o mesmo não se podia dizer sobre o RNA e as proteínas, pois havia um problema de codificação. Logo como seria possível a tradução?

Link de acesso ao artigo completo:

Neste artigo é possível encontrar todo o seguimento do conteúdo deste capítulo:

Link de acesso ao artigo:

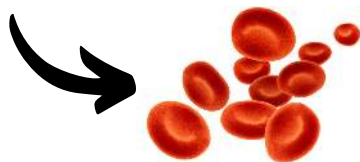
Fluxo da informação Genética

As informações que realizam todas as atividades celulares são codificadas na estrutura do DNA, porém o DNA sozinho não leva essa informação adiante, desta forma, é necessário um fluxo dessa informação genética, já que o DNA não está comprometido diretamente na realização dessas operações.

É necessário, portanto, da transcrição de outras moléculas para realizarem essa atividade: O RNA E AS PROTEINAS.

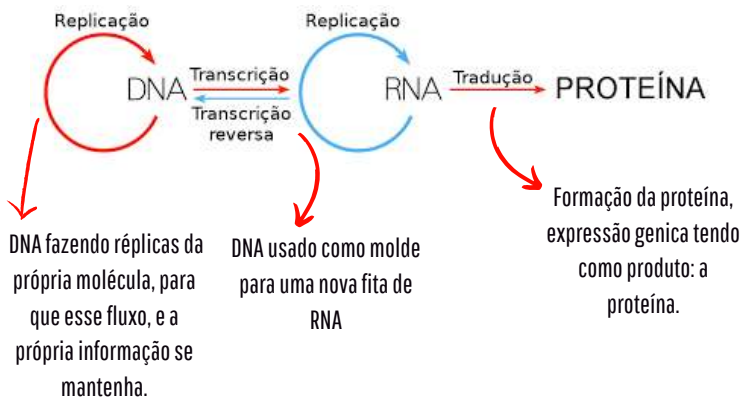
Toda via, os instrumentos que serão utilizados para realizar para as funções biológicas correspondem principalmente em proteínas.

Por exemplo, o transportador de oxigênio nas hemácias é a proteína hemoglobina, e não o DNA que especifica sua estrutura.



Como ocorre esse fluxo de informação???

Dogma Central – 1ª Via de informação



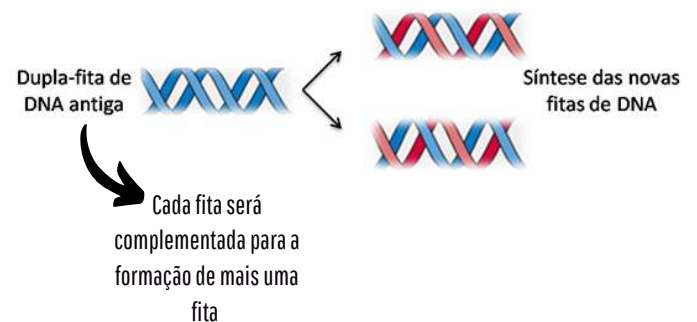
Existem, porém, outras Vias de Informação:

RNA \longrightarrow DNA: Transcrição Reversa
 RNA \longrightarrow RNA: Replicação do RNA

Estão mais relacionadas aos vírus

Replicação

Como acontece a replicação do DNA??



Na natureza, in vivo, cada fita da molécula de DNA será molde por vez, em cada momento será uma fita, nunca as duas ao mesmo tempo servirão de modelo para a síntese de DNA.

In vitro, porém, em uma pcr por exemplo, as duas fitas servirão de modelo

Esse processo, tanto in vivo quanto in vitro, é chamado de Semiconservativo, por que cada fita nova vai carrear uma fita parental, uma fita antiga. Esse processo conserva parte da informação genética que estava presente na molécula de DNA anterior.

Início da Replicação

A replicação de um cromossomo começa em pontos especiais chamados de origens de replicação: curtas porções de DNA com sequências específicas de nucleotídeos. Quando as enzimas específicas para essa replicação perceberem esse trecho, elas irão identificar aquela região como o local de replicação.

Para os cromossomos de eucariotos, temos várias origens de replicação, diversos trechos em que o DNA pode ser replicado. No bacteriano, existe apenas uma origem de replicação, já que o DNA bacteriano não é um DNA retilíneo, mas sim circular.

As proteínas que introduzem a replicação do DNA identificam essa sequência e se ligam ao DNA, separando as duas fitas e gerando a "bolha" de replicação.

Como se a dupla fita fosse inflada, separando as fitas para que as enzimas tenham acesso a esse material genético.



Assim, a replicação do DNA segue em duas direções, até que toda a molécula seja copiada.

Devido ao seu tamanho e quantidade de informações genéticas distribuídas, um cromossomo eucarioto pode possuir centenas, até milhares, de origens de replicação.

Em cada extremidade da bolha de replicação está a forquilha de replicação, região que possui formato de Y onde as fitas de DNA parental estão sendo desenroladas.

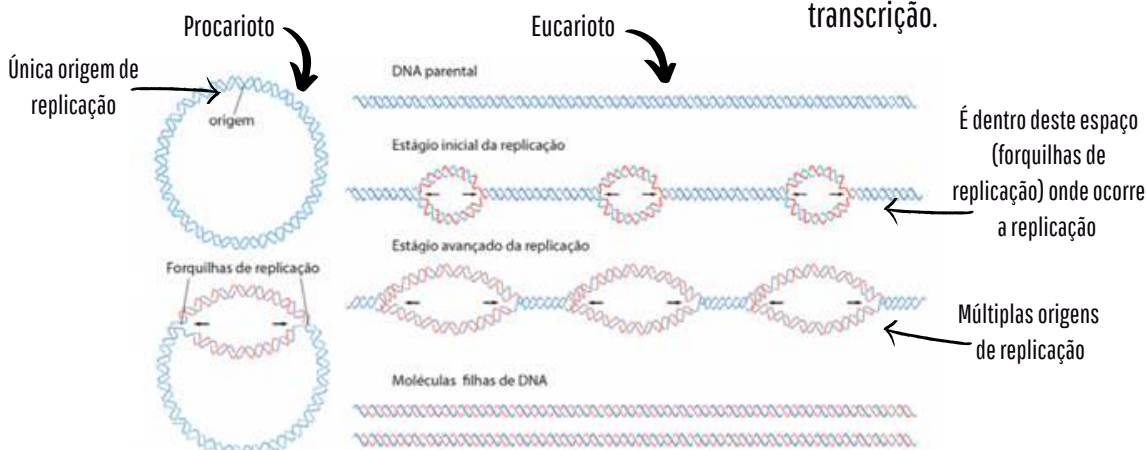
As helicases são enzimas que desenrolam a dupla-hélice nas forquilhas de replicação, separando as duas fitas parentais e as tornando disponíveis como fitas-molde.

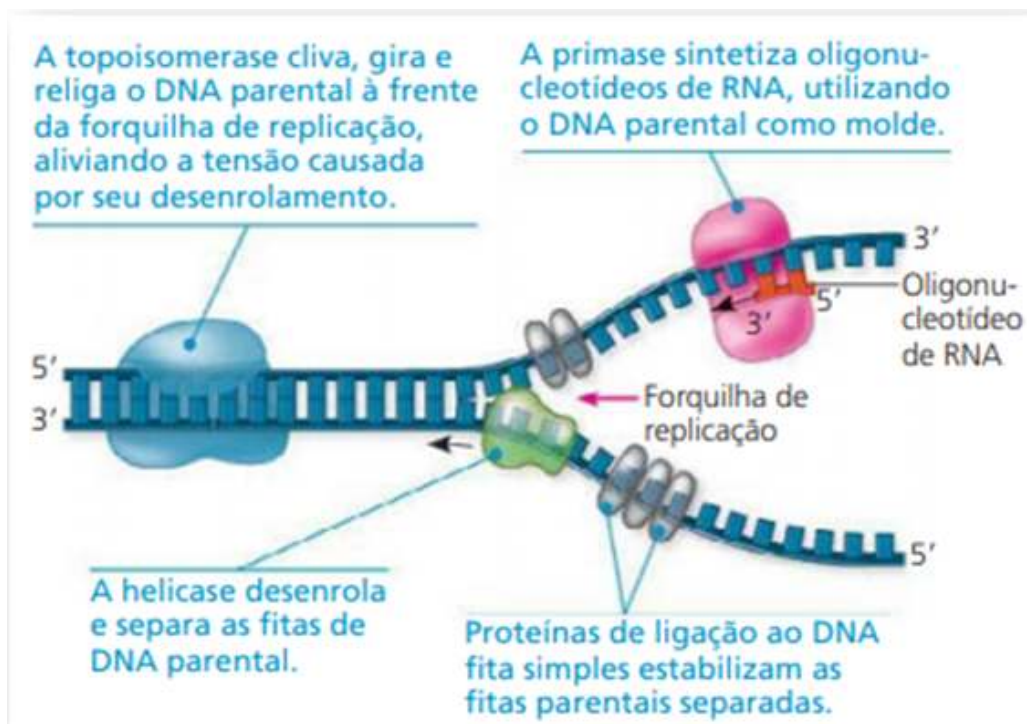
As helicases operam no ponto da bolha de replicação e as outras regiões, onde não está ocorrendo a replicação, continuam entrelaçadas. Somente no ponto onde é necessário que enzimas tenham acesso para que aconteça a replicação ou uma transcrição, que as helicases irão atuar na forquilha, promovendo o desenrolar da dupla hélice.

Depois da separação das fitas parentais, proteínas de ligação à fita simples se juntam às cadeias de DNA não pareadas, impedindo que elas se vinculem novamente, auxiliando, assim, a estabilidade, já que naturalmente o DNA é helicoidal.

O desenrolamento da dupla-hélice causa um aumento na torção da cadeia no trecho da frente da forquilha de replicação, como uma força reversa. As topoisomerases auxiliam a atenuar esse aumento na tensão pela quebra, giro e religação das fitas de DNA.

Todas essas proteínas facilitam a abertura da dupla hélice, promovendo a replicação e transcrição.

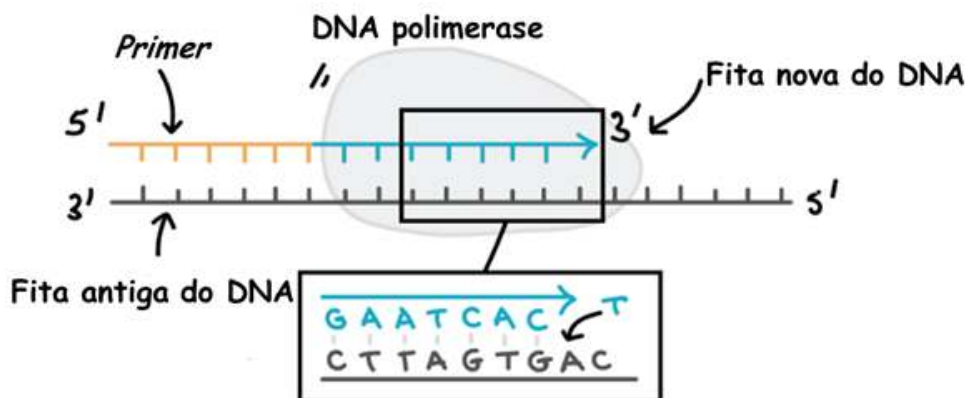




As primases produzem os chamados primer, ele é aquele pequeno trecho que vai se ligar a essa molécula e permitir que a DNA polimerase pegue os nucleotídeos do meio e monte a nova fita.

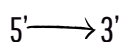
As Enzimas DNA-polimerases catalisam a síntese do novo DNA pelo acréscimo de nucleotídeos a uma cadeia preexistente. Esse processo necessita da presença do oligonucleotídeo iniciador (primer) e de uma fita de DNA - molde, além dos nucleotídeos de DNA complementares e alinhados à fita-molde.

O primer é uma pequena sequência de oligonucleotídeos de RNA. Se ligando a sequência do DNA parental, ele irá iniciar a sequência de nucleotídeos para que a DNA polimerase possa se encaixar no trecho e continuar a inserção dos nucleotídeos do meio celular e assim, incorporá-los na fita nova de DNA.

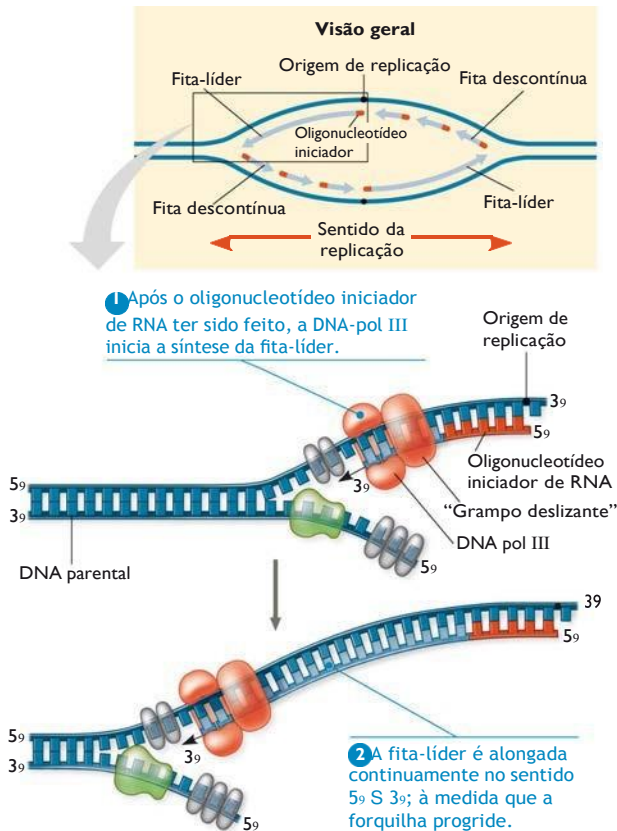


Sintetizando uma nova fita de DNA

As enzimas DNA-polimerases, devido a sua estrutura, conseguem apenas adicionar nucleotídeos à extremidade 3' livre de um oligonucleotídeo iniciador (primer) ou de uma fita crescente de DNA, e nunca à extremidade 5'. Assim, uma nova fita de DNA somente pode ser alongada em apenas no sentido.



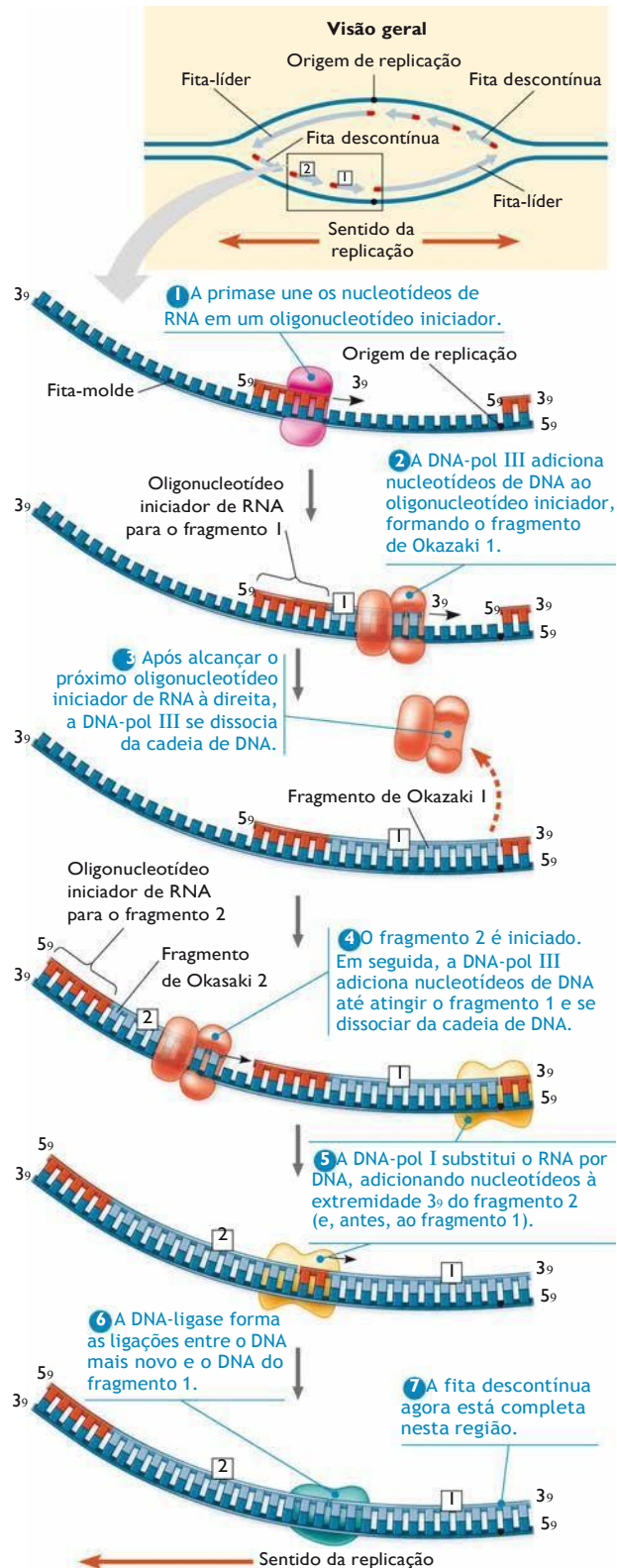
A DNA-polimerase também possui atividade exonucleásica (corrige erros de incorporação de nucleotídeos no decorrer da síntese).



▲ **Figura 16.15 Síntese da fita-líder durante a replicação do DNA.** Este diagrama se concentra na forquilha de replicação mostrada no quadrinho com a visão geral. A DNA-polimerase III (DNA-pol III), com o formato de mão cônica, está associada a uma proteína chamada de "grupo deslizante", que circunda a dupla-hélice recém-sintetizada como um anel. O grupo deslizante desloca a DNA-pol III ao longo da fita-molde.

é alongada de maneira contínua, a fita retardada é sintetizada de forma descontínua, em uma série de fragmentos. Esses fragmentos da fita retardada são chamados de **fragmentos de Okazaki**, em homenagem ao cientista japonês que os descobriu. Os fragmentos têm entre 1.000 e 2.000 nucleotídeos de extensão em *E. coli* e 100 a 200 nucleotídeos de extensão em eucariotos.

A **Figura 16.16** ilustra as etapas de síntese da fita retardada. Enquanto apenas um oligonucleotídeo iniciador é necessário para a síntese da fita-líder, cada fragmento de Okazaki na fita retardada deve ser iniciado separadamente (etapas 2 e 4). Após a DNA-pol III sintetizar um fragmento de Okazaki (etapas 2 a 4), outra DNA-polimerase, a DNA-polimerase I (DNA-pol I), substitui os nucleotídeos de RNA dos oligonucleotídeos iniciadores por seus equivalentes em DNA, adicionando-os um a um à extremidade 3' do fragmento de Okazaki adjacente (etapa 5). A DNA-pol I não pode unir o nucleotídeo final desse fragmento de DNA de reposição com o primeiro nucleotídeo de DNA do fragmento de Okazaki cujo oligonucleotídeo iniciador foi substituído (fragmento 1 na Figura 16.16). Outra enzima, a **DNA-ligase**, realiza essa tarefa, unindo as



▲ **Figura 16.16 A síntese da fita descontínua.**

cadeias principais açúcar-fosfato de todos os fragmentos de Okazaki em uma fita contínua de DNA (etapa 6).

Como a DNA polimerase necessita de uma extremidade livre da região 3' da fita para se ligar, ela não consegue fazer isso de forma contínua na direção oposta, dessa forma, a enzima fará o processo por pequenos pedaços, fragmentos, que são chamados de fragmentos de okazaki.

Sentido da Replicação:

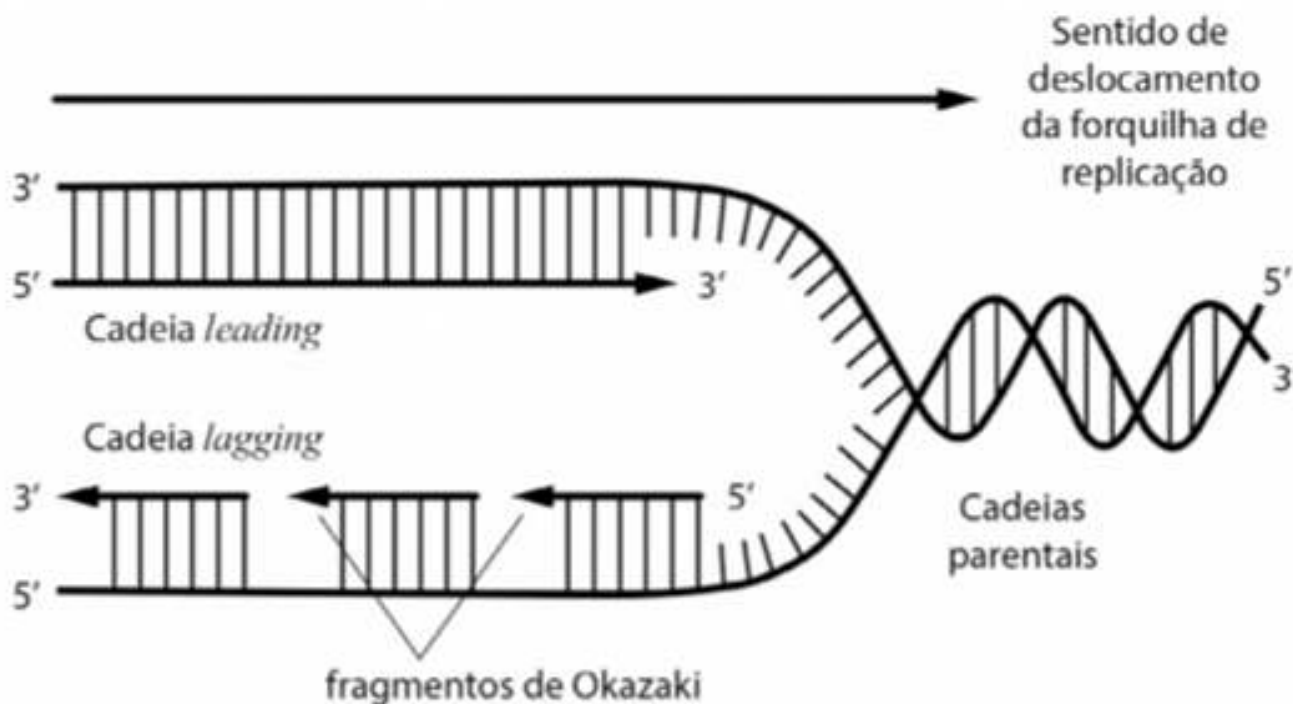


Figura 5. Na replicação do DNA, ambas as cadeias filhas são sintetizadas no sentido 5' → 3'. A cadeia *leading* é sintetizada continuamente, enquanto a cadeia *lagging* é sintetizada descontinuamente.

Para que a fita descontínua não permaneça com lacunas, as DNA ligases irão promover a ligação dos trechos, resultando em uma fita contínua.

- A direção 5' 3' é em relação a fita molde.

Na fita onde é possível ser realizada a inserção 5' 3' de forma contínua, a síntese da nova fita será contínua, porque já obedece ao sentido de leitura da DNA polimerase. Já na fita oposta (descontínua) que possui o sentido contrário, para que essa formação aconteça é necessário que também se mantenha o sentido 5' 3', mas dentro de uma outra orientação, assim, nesta indicação a construção acontece por fragmentos.

Neste artigo, podemos entender mais detalhadamente a replicação dos plasmídeos :

- **Replicação dos plasmídeos:**

Os plasmídeos ligam-se a enzimas da célula hospedeira na replicação de DNA para a sua reprodução. Mas a iniciação da replicação é controlada pelos genes dos plasmídeos. Em consequência, o número de cópias do plasmídeo numa célula varia conforme o seu tipo, dependendo da regulação na iniciação da replicação.

Os plasmídeos contêm uma série de genes para o estabelecimento de ligações entre células e para transferir DNA do dador para o receptor. Uma cópia do plasmídeo pode ser transferida na ligação da célula. A transferência é sempre acompanhada por uma replicação do plasmídeo.

Link de acesso ao artigo completo:

Replicação do novo coronavírus

Animação sobre a Replicação do DNA

Seguindo o dogma central, após a replicação temos a:

Transcrição

A Transcrição é a síntese de RNA operando as informações presentes no DNA. Ambos os ácidos nucleicos empregam a mesma linguagem, a informação é apenas transcrita/copiada do DNA para o RNA.

Da mesma maneira que uma fita de DNA funciona como molde para a formação de uma nova fita complementar no decorrer da replicação do DNA, ela também serve como molde para a síntese de uma sequência complementar de nucleotídeos de RNA.

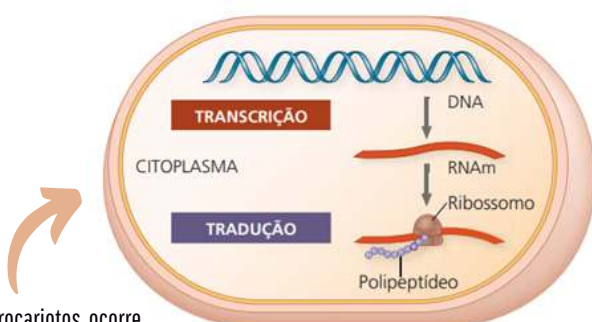
Assim, a mesma fita que pode se replicar, fazendo uma cópia de si mesma, pode também servir de molde para uma molécula de RNA.

Em uma fita de DNA existem diversos genes que possuem um promotor. Eles promovem o início da síntese, como um sinalizador, esse trecho, no momento em que a célula precisar de uma molécula específica, estará apto a fazer a transcrição.

O promotor de um gene manifesta em sua estrutura o ponto de início da transcrição (o nucleotídeo onde a síntese de RNA se inicia verdadeiramente).

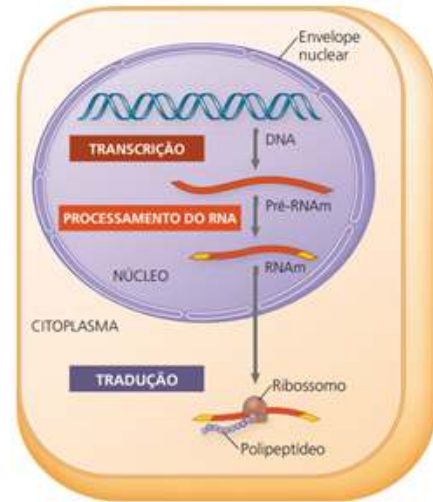
Assim como na replicação, na transcrição a RNA-polimerase se acopla em uma posição e uma orientação específicas no promotor, definindo o início da transcrição, e qual das duas cadeias da hélice de DNA será empregada como molde naquele momento.

Nos procarionotos:



Nos procarionotos, ocorre de forma direta, no citoplasma.

Nos eucariotos:

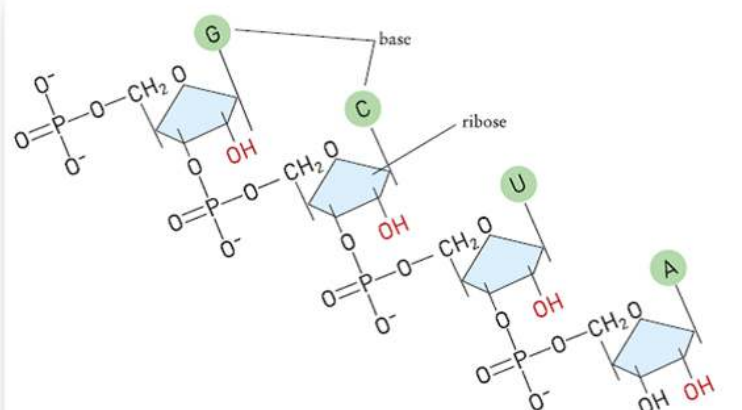


Nos eucariotos, as etapas ocorrem de maneira dividida, porém, a replicação e transcrição ocorrem no núcleo.

O processamento do RNA é uma forma de identificar a eficácia da molécula de RNAm, certificando se está apta a sair do núcleo e fazer a tradução no citoplasma.

O RNAm do eucarioto só vai até o citoplasma para fazer a tradução quando está de acordo com esse processamento.

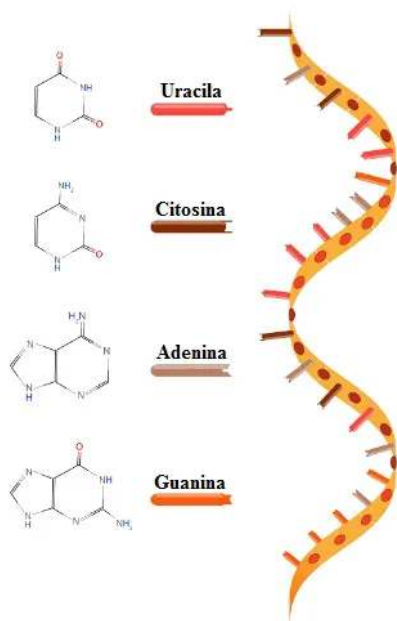
Estrutura do RNA:



(ALBERTS, Bruce. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.)

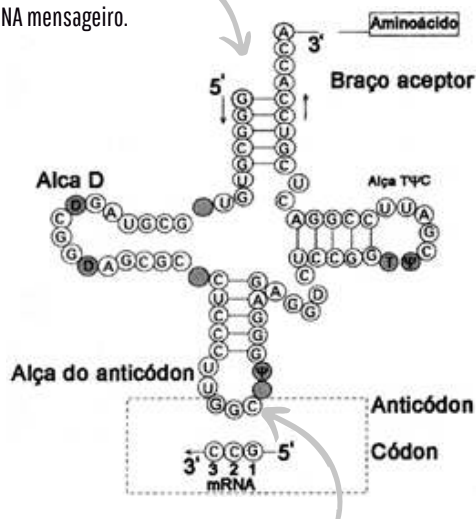
- O RNA possui fita simples;
- Sua pentose (ribose) possui uma hidroxila a mais em relação a pentose de DNA;
- A ligação, na mesma fita, entre o grupamento fosfato e uma pentose é chamada de ligação fosfodiéster;
- Purinas: Adenina e Guanina;
- Pirimidinas: Citosina e Uracila.

Estrutura Primária:



Estrutura secundária:

Terá um aminoácido específico relacionado ao anticódon que irá parear com o RNA mensageiro.

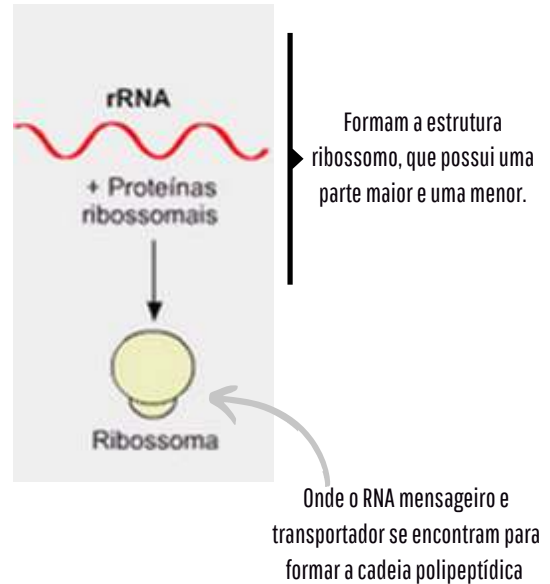


Transporta os anticódons que irão se ligar com os códons do RNA mensageiro.

Cada anticódon só irá transportar um aminoácido específico.

Classes de RNA encontrados nos procaríotos e eucariotos:

RNA ribossômico – rRNA – irá fazer a composição. É a estrutura onde a tradução irá acontecer.

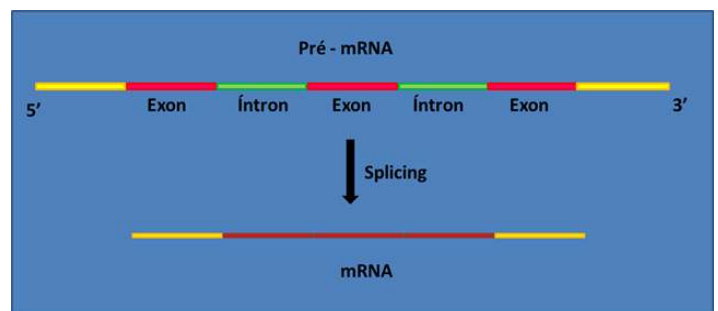


RNA mensageiro – mRNA – possui códons, trincas



Processamento do mRNA em Eucariotos

Nos eucariotos, esse processamento do RNA mensageiro, chamado de splicing:

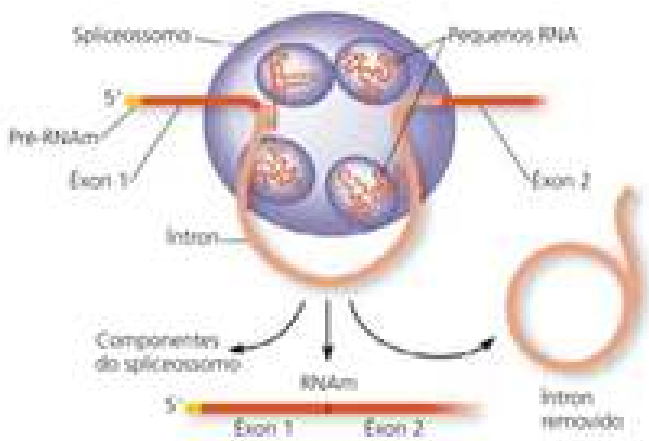


splicing: O processamento do RNAm é a etapa de clivagem e retirada dos íntrons e de ligação dos exons com a promoção das extremidades 5' e 3', formando o RNA mensageiro maduro.

Os íntrons são trechos não codificantes, apenas possuem função estrutural, mas não de síntese.

Os exons são trechos codificantes, capazes de produzir uma proteína.

É no spliceossomo que acontece todo o processo de remoção dos íntrons, esse grande complexo é formado por proteínas e pequenas moléculas de RNA. Os íntrons são então dispensados e rapidamente degradados, e o spliceossomo une os dois éxons adjacentes a cada íntron, formando o RNAm maduro.



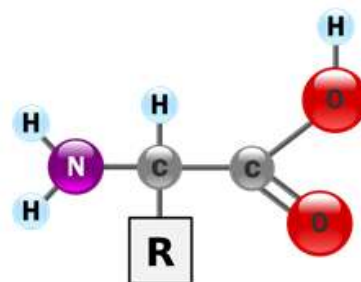
No citoplasma de uma célula encontramos todos 20 tipos de aminoácidos. Eles são obtidos via síntese a partir de outros compostos ou por meio da captação de aminoácidos contidos nas soluções que a cercam.

Função das Proteínas:

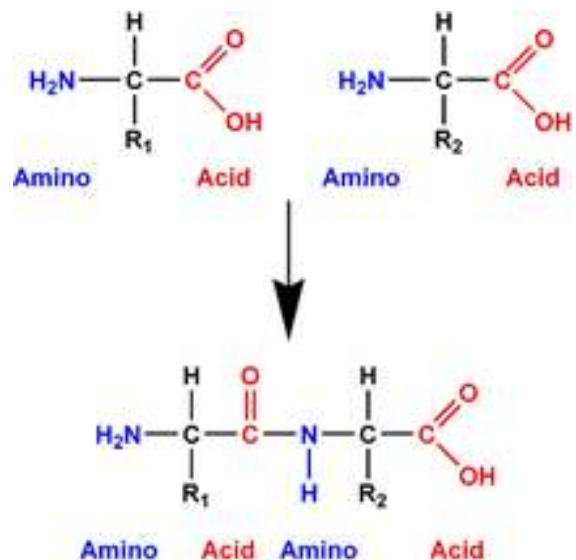
- Diversas proteínas são enzimas. Exemplos: amilase salivar, tripsina, pepsina;
- Componentes estruturais. Exemplo: queratina do cabelo;
- Auxiliam no transporte de substâncias. Exemplo: hemoglobina, albumina;
- realizam funções: reguladoras, de comunicação e defesa. Exemplo: hormônios, anticorpos.

Estrutura das Proteínas:

•São constituídas por aminoácidos.



Os aminoácidos são ligados por ligações peptídicas, construindo cadeias polipeptídicas.



Tradução

Neste processo, a mensagem genética é interpretada pela célula, ela então sintetiza um polipeptídeo correspondente.

O RNA transportador (RNAt) interpreta a mensagem presente no mRNA. A informação interpretada é uma série de códons que estão presentes ao longo da cadeia de RNA mensageiro.

A função do RNAt:

O RNAt desloca os aminoácidos contidos no citoplasma para o polipeptídeo (cadeia de proteínas) formado no ribossomo.

FORMA ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS



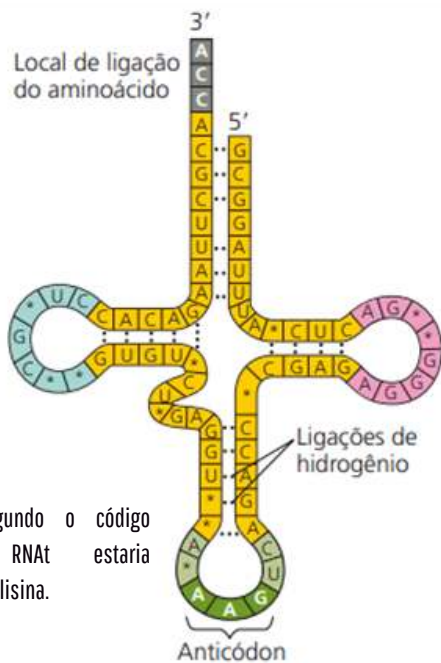
Estrutura primária: Sequência de aminoácidos

Estrutura Secundária: folha β pregueada e a hélice α

Estrutura Terciária: resultado da interação entre as estruturas secundárias – forma tridimensional.

Estrutura Quaternária: Interação entre duas ou mais cadeias polipeptídicas.

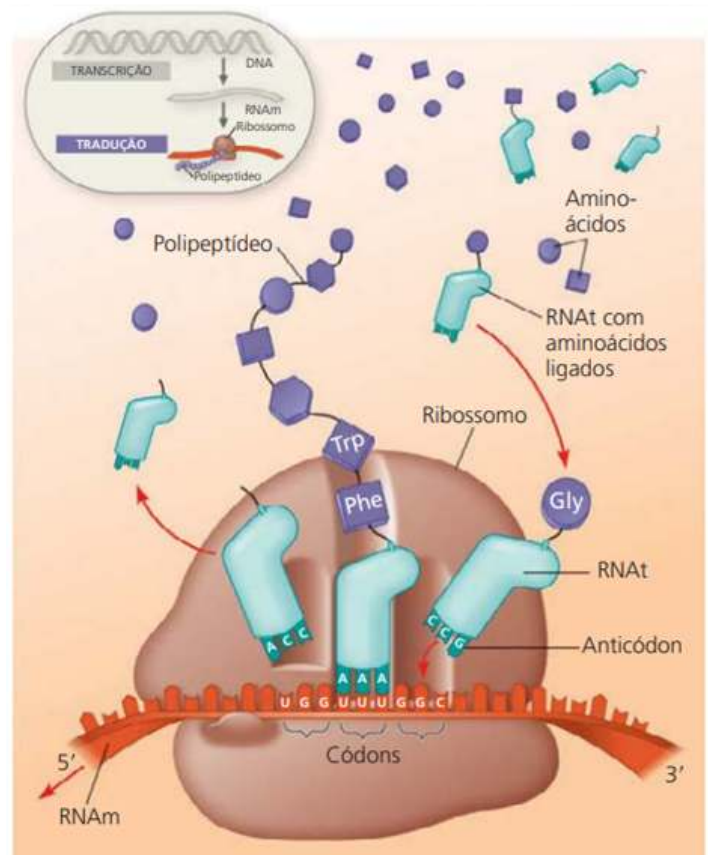
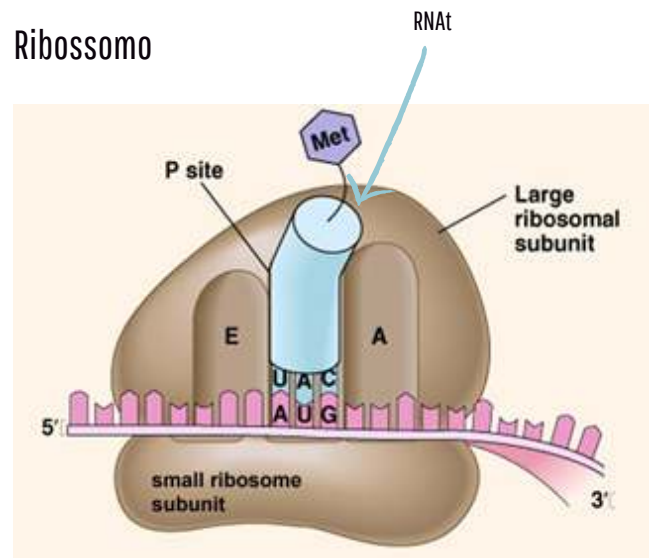
RNA transportador – tRNA



Nesse caso, segundo o código genético, o RNAt estaria transportando uma lisina.

A enzima Aminoacil-tRNA sintetases (1 enzima para cada aminoácido) recarrega o RNAt após ele desprezar o aminoácido na formação da cadeia.

Ribossomo



O processo acontece até a chegada de um stop códon que interrompe a formação da cadeia e um fator de liberação, onde a cadeia é finalmente liberada.

Neste artigo, podemos entender mais detalhadamente o DNA que antes era considerado lixo:

Na ausência de conhecimento sobre as funções das regiões intrônicas, foi proposto inicialmente que elas seriam um “DNA-lixo” (cf. Ohno apud Keller, 2002). Isso foi enfatizado pelo subsequente sequenciamento do genoma humano, no qual foi mostrado que somente cerca de 1,2% das bases de DNA constituem éxons codificantes e, portanto, que a maior parte do genoma seria feita desse suposto “DNA-lixo” (cf. Lander et al., 2001; Venter et al., 2001).

Link de acesso ao artigo completo:

Do DNA à Proteína:

Extração de ácidos nucleicos e eletroforese

Extração de Ácidos Nucleicos

O que é?

A extração de ácidos nucleicos consiste em uma técnica primordial para a realização de muitos outros procedimentos da Biologia Molecular. Ou seja, a partir dessa técnica, é possível obter algum tipo de ácido nucleico (DNA ou RNA) e utilizá-lo em outras metodologias.

Baseia-se em quatro etapas primordiais, independente do protocolo; são elas: lise das membranas lipídicas, purificação do DNA, precipitação do DNA e reidratação do DNA.



(Aula Extração de ácidos nucleicos e Eletroforese – Tainah Galdino)

Lise das membranas lipídicas (ou lise celular)

A lise das membranas lipídicas, ou lise celular, é o primeiro passo para que ocorra a extração dos ácidos nucleicos; tem como objetivo expor o DNA/RNA, contidos no núcleo da célula, da membrana das diferentes células que podem ser utilizadas nessa técnica. Além da membrana (composta por fosfolipídios + proteínas), ocorre também a lise de outros compartimentos membranosos (organelas) indesejadas. A lise ocorre através de detergentes que desestabilizam os lipídios das membranas, fazendo com que a mesma se rompa e exponha seus componentes internos; um exemplo de detergente é o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Essa etapa deve sempre ocorrer em um pH apropriado, de acordo com o tampão utilizado ao realizar a técnica. Ocorre também o uso de agentes quelantes, tais quais removem íons metálicos e formam complexos estáveis com os mesmos. Esses íons funcionam como cofatores de DNases, inibindo-as. Um exemplo desses agentes é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Purificação do DNA / RNA (Desproteínização)

A purificação do DNA, ou RNA, consiste na eliminação de impurezas que podem inibir a realização das próximas etapas do procedimento. São removidos componentes como proteínas, lipídeos, entre outros restos celulares. É um processo também conhecido como desproteínização pois, assim como o termo nos sugere, ocorre a eliminação de proteínas, que são as principais moléculas contaminantes, ressaltando as histonas por estarem diretamente ligadas aos ácidos nucleicos; para isso, fazem uso das proteases, lipases (eliminar lipídios) ou detergentes. Essas reações enzimáticas e/ou interações entre macromoléculas possuem sempre o intuito de purificar ao máximo aquela mostra, favorecendo a retirada de contaminantes ao DNA/RNA e visando a extração limpa e completa dos ácidos nucleicos.

Quando o objetivo é extrair apenas o DNA, o RNA é retirado através da adição de RNases que irão degradá-lo, permitindo a sua retirada do meio.

Ainda nesta etapa de purificação, são adicionados solventes orgânicos como fenol, trizol e clorofórmio. Os mesmos funcionam como desnaturadores de proteína, passando as moléculas proteicas para uma fase orgânica, enquanto o DNA/RNA continua em fase aquosa. Pode haver um aprimoramento desta etapa utilizando solventes orgânicos em conjunto, como por exemplo o uso do clorofórmio juntamente ao fenol, exercem a função de desnaturantes porém estabilizam a junção entre as fases aquosa e fenólica, ou seja, a utilização dessa mistura diminui a quantidade de solução aquosa retida na fase orgânica, melhorando o rendimento.

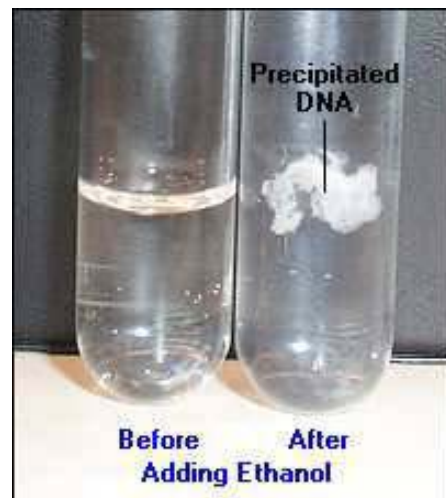
Após o processo de desnaturação das proteínas, a amostra é levada para a centrifugação com o intuito de separar por completo as fases aquosa e orgânica, resultando em uma fase aquosa contendo o DNA/RNA de interesse; um anel intermediário entre as duas fases, tal qual contém as proteínas desnaturadas; e uma fase orgânica contendo os outros restos celulares que serão eliminados.



Fase aquosa: DNA
Interfase: proteínas
Fase orgânica: lipídios

Precipitação do DNA/RNA

A precipitação do DNA/RNA consiste em separar esse ácidos nucleicos do restante dos componentes celulares. Considerando que DNA/RNA são solúveis em água, a precipitação dos mesmos ocorre através do uso de etanol ou isopropanol; por sua composição química, o etanol, por exemplo, induz a agregação e precipitação dos ácidos nucleicos; tal qual, torna-se menos denso do que a solução aquosa obtida. Utilizando o etanol, ocorre também uma remoção de resíduos de fenol e de clorofórmio presentes na amostra. Após isso, o álcool é retirado para que ocorra a formação do sedimento (pellet).



Reidratação do DNA/RNA

A reidratação é a última etapa do processo de extração de ácidos nucleicos, nela ocorre a ressuspensão do DNA ou RNA em condições específicas. A ressuspensão do DNA ocorre em água ultrapura (livre de contaminantes e DNase), ou TE ou NaOH 8mM. Já a ressuspensão do RNA, ocorre em água ultrapura, livre de contaminante e RNase.

A estocagem ocorre de formas distintas para cada ácido nucleico, o DNA deve ser estocado a -20 graus Celsius, enquanto o RNA deve ser estocado a -70 graus Celsius.



Quantificação do material extraído

Após a realização da extração dos ácidos nucleicos, deve haver uma quantificação do material extraído; com o intuito de verificar a pureza e a relação entre quantidade/qualidade do material.

Essa quantificação conta com a técnica da espectrofotometria, que consiste na utilização de um aparelho chamado espectrofotômetro, tal qual permite comparar a radiação absorvida pela amostra ao incidirmos radiação na mesma. Essa quantidade de luz absorvida é quantificada e analisada.

A quantificação no aparelho ocorre através do seguinte esquema: a energia emitida eleva os elétrons das moléculas para níveis energéticos mais altos; e a energia necessária para essa elevação varia de acordo com a molécula.

Para a molécula de RNA, a leitura deve ser feita em uma razão de 260/280nm, e a absorvância do resultado obtido ideal deve ser igual a 2, abaixo disso, o material é considerado contaminado, dependendo da circunstância. Para a leitura da molécula de DNA, a mesma razão de 260/280nm deve ser considerada, e o resultado é considerado um material puro entre 1,75 e 1,80 de absorvância, quando é menor, o mesmo é considerado um material contaminado.

Porém, para que essas leituras ocorram, a amostra não pode obter nenhum contaminante de fenol, pois o mesmo interfere diretamente na leitura, por fluorescer em um comprimento de onda muito próximo ao dos ácidos nucleicos. Existem diferentes tipos de espectrofotômetro e de extração de ácidos nucleicos, o melhor aparelho e a melhor técnica devem ser escolhido a partir da sua pergunta inicial ao experimento. A escolha da metodologia também varia de acordo com a amostra utilizada, ou seja, tudo depende das circunstâncias da análise.

Curiosidade

Mas depois de toda essa explicação, por que estudar como funciona o processo de extração de ácidos nucleicos?

Essa técnica nos permite conhecer muitas coisas consideradas banais ao ver da sociedade, como, por exemplo, um teste de paternidade; ou até mesmo estudos mais rebuscados como a paleonparasitologia, que estuda o DNA de microrganismos ancestrais (com milhões de anos). É uma técnica muito utilizada em diversos tipos de pesquisa, diagnósticos e afins.

Eletoforese

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas; porém, também permite identificar e purificar, ou seja, é uma das principais técnicas de análise de DNA/RNA/Proteínas/Produto amplificado (a partir da PCR).

Essa técnica consiste na migração das macromoléculas através de um gel, a separação acontece de acordo com a carga e o peso molecular das moléculas. Assim, em um polo do aparelho é fornecida a carga negativa, e em outro, é fornecida a carga positiva; essa migração para os polos ocorre pela carga negativa dos grupos fosfato presentes na molécula de DNA, que correm para o polo positivo.

A eletroforese em gel é a o método mais utilizado, onde as moléculas migram atravessando os poros do gel, um tipo de malha; ela pode ser empregada na separação de DNA/RNA/Proteínas. Porém, a composição do gel varia de acordo com a qualidade do material a ser separado, podendo variar entre poliacrilamida e agarose. Através dessa técnica, ocorre a visualização dos ácidos nucleicos e/ou proteínas por cores.

Eletoforese em Gel de Agarose

A agarose é um polissacarídeo proveniente de algas marinhas; a mesma deve ser pesada e dissolvida com tampão de TBE ou TAE. Sua propriedade gelificante se deve por conta da formação de pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares. A utilização desse gel é importante para a separação de DNA/RNA, e os tamanhos de seus poros podem variar de acordo com a concentração de agarose na mistura.

Pra obter poros grandes, deve haver uma baixa concentração de agarose, e para obter poros menores, a mistura deve possuir alta concentração de agarose, onde ocorre uma maior retenção de moléculas.

A preparação do gel ocorre através da mistura do pó de agarose com a solução tampão escolhida, essa mistura deve ser aquecida para ocorrer a fusão da agarose; após isso, o gel deve ser levado ao molde, também conhecido como “caminha”. O molde contém “pentes” formadores de poços, que permitirão a adição da amostra após a solidificação do gel. Essa solidificação ocorre diretamente na cuba de corrida da amostra.

Após realizar a corrida em gel de agarose, coloca-se a amostra em contato com brometo de etídio, um corante capaz de se intercalar entre as bases do DNA e que fluoresce quando excitado com luz UV.



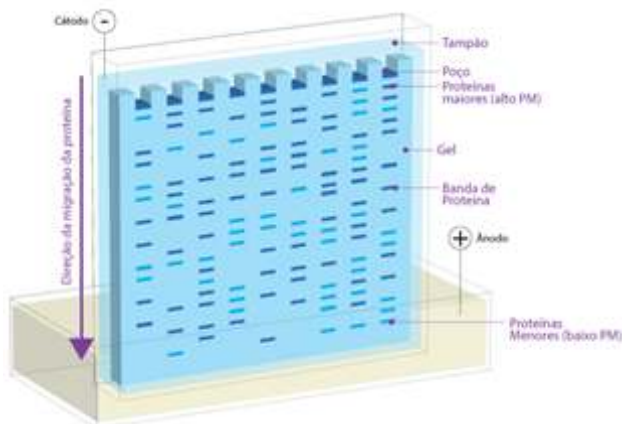
Eletoforese em Gel de Poliacrilamida

A poliacrilamida é formada através da polimerização de dois compostos, a acrilamida e bisacrilamida. Para preparar o gel, deve ser adicionado o Temed, que atua como catalisador da polimerização, formando assim, o gel de poliacrilamida. Dependendo da concentração utilizada no gel, os poros formados no gel apresentam-se maiores ou menores, podendo

influenciar na resolução de diferentes tamanhos de DNA (por isso a concentração é importante na hora de formular o gel, dependendo da amostra em questão).

Depois de sua formação, o gel levado ao compartimento que fará a leitura, possuindo uma cuba de plástico e um pente que forma os canais, tais quais possibilitam a adição das amostras. Após a adição da amostra, o tampão escolhido é adicionado ao topo do compartimento. O mesmo é ligado à eletrodos, possibilitando a utilização da técnica de separação por carga da molécula.

Uma especificidade dos géis de poliacrilamida, são as formas de corar a mostra; nesta composição, pode ser utilizado o nitrato de prata, que é mais sensível, ou seja, há uma detecção mais fácil de pequenas quantidades de DNA, por exemplo.

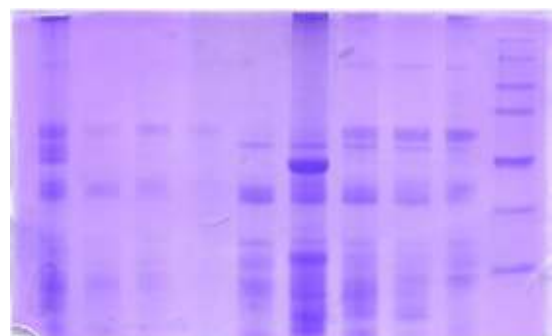
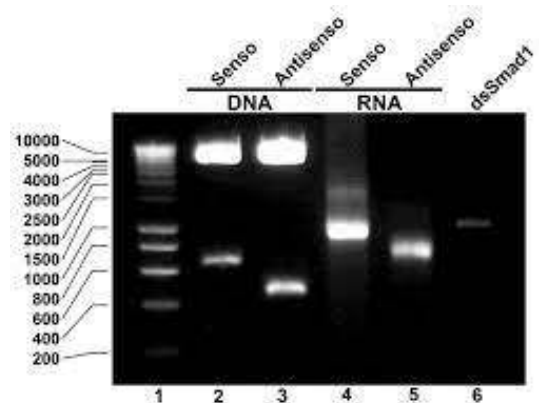


E para concluir

No gel de agarose, a “corrida” ocorre com duas moléculas denominadas monitores de corrida, são elas o azul de bromofenol e o xilenocianol. O azul de bromofenol possui cor azulada e corre como um DNA pequeno, ao passo que o xilenocianol possui cor esverdeada e corre como um DNA maior.

No caso do gel de poliacrilamida, esse mesmo processo pode ocorrer quando a amostra se trata de DNA ou amplicões (produto da PCR), ocorrendo da mesma forma, com a adição do brometo de etídio, entre outras soluções semelhantes; em outros casos, a poliacrilamida pode contar com o nitrato de prata como um corante, onde a molécula é corada por impregnação, ou seja, as partículas vão se sobrepondo às moléculas e se tornando visíveis.

Vale lembrar que os tampões de amostra, azul de bromofenol e xilenocianol, não tem como objetivo revelar a amostra em sua fase final, mas sim, corar a amostra ao longo da corrida. Esse corante entra em ação quando o gel é colocado em contato com corantes como brometo de etídio que, em conjunto com o tampão adicionado anteriormente, permite a leitura dos resultados através da luz UV.



Curiosidades

Para realizar a eletroforese, não é necessário que o ácido nucleico tenha passado pelo procedimento de extração... como é uma técnica de separação de molécula, na maioria das vezes, é utilizada a molécula inteira! Porém, se o objetivo da técnica for avaliar a integridade da molécula de DNA, o mesmo deve ter passado por uma extração, com o intuito de garantir o melhor resultado, sempre!

Por ser um procedimento simples e de baixo custo, a eletroforese é uma técnica importante de análise laboratorial. Pode ser utilizada tanto em projetos de investigação quanto no diagnóstico, ou seja, em testes de paternidade, na identificação de mutações, sendo útil no diagnóstico de leucemias, por exemplo, na verificação da expressão de proteínas... são infinitas possibilidades!!

Regulação da expressão gênica - Procarioto (I)

O que é?

A regulação da expressão gênica nada mais é do que a etapa de transcrição entre as etapas de replicação, transcrição e tradução dos genomas (proteínas). Neste caso, vamos abordar a expressão de procariotos, utilizando as bactérias como representante desse grupo!

Algumas informações relevantes sobre as bactérias...

As células bacterianas que conseguem conservar recursos e energia têm vantagem seletiva sobre as que não conseguem, ou seja, a seleção natural resultou apenas em células que não desperdiçam energia, sendo assim, aquelas que expressam apenas genes cujos produtos são requeridos pela célula.

Controle da expressão gênica

Esse controle é um equilíbrio do gasto de energia, ou seja, a expressão gênica não terá acionamento de forma a desperdiçar a energia da célula; de forma mais aprofundada, é um balanço entre a taxa de síntese (quantidade e tipo de produto sintetizado) e a taxa de degradação (quantidade e tipo de produto gênico degradado).

No caso das bactérias, a expressão gênica mantém uma flexibilidade interna onde a célula vai trabalhar de acordo com a necessidade da mesma, e em resposta à mudanças ambientais (principalmente procariotos, que são estruturalmente mais primitivos).

Mas muitas pessoas podem se perguntar... pra que regular a expressão gênica? Basicamente, todo o processo de feitura de uma proteína tem uma demanda muito grande de energia (ATP) entre outras moléculas, ou seja, o "custo" seria muito grande para produzir proteínas a todo tempo. E aí a regulação entra em ação, com o intuito de realizar apenas os processos necessários, otimizando o gasto de energia da célula.

De forma mais genérica, o estado metabólico da célula determina o acionamento dos genes do genoma bacteriano; e o mecanismo básico para esse controle da expressão gênica é conhecido como modelo operón (François Jacob e Jacques Monod – Instituto Pasteur – Paris 1961).

Modelo Operón

O operón é uma sequência de DNA bacteriano com locais específicos, que estão funcionalmente relacionados, transcritos juntos sob o controle de um único promotor; ou seja, é formado por um promotor, um operador e por seus genes estruturais.

Os operóns são classificados entre reprimíveis e induzíveis. Os reprimíveis normalmente têm sua transcrição ligada, mas pode ser reprimida quando uma molécula específica se liga a proteína repressora (reguladora); já os induzíveis normalmente estão desligados mas podem ser estimulados (induzidos) quando uma molécula específica interage com a proteína reguladora (repressora), e esse é o caso do operón lac (lactose).

Falando um pouco sobre o operón lac, devemos nos embasar no por que da utilização do mesmo. No meio, a bactéria (utilizando como exemplo, a *E. coli*) tem preferência pela utilização da glicose como fonte energia, porém, quando a glicose está em baixa quantidade e a lactose em maior quantidade, a mesma serve de fonte de energia para a *E. coli*, e é aí onde o operón lac entra em ação.

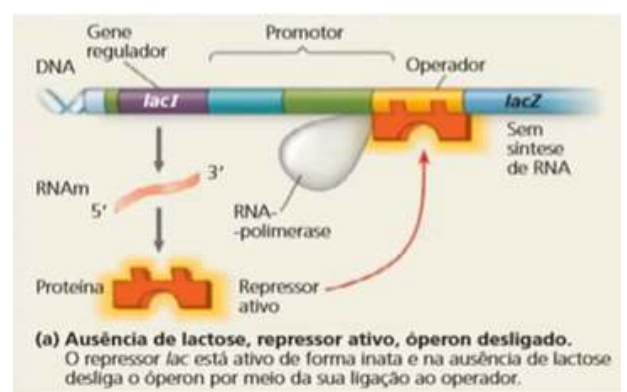
Mas uma pergunta que pode surgir é “como a *E. coli* sabe a concentração de glicose no meio e como essa informação chega no operón lac?”. Primeiro ocorre a entrada da lactose (que está em alta no meio) na célula bacteriana através de um poro; dentro da célula, ocorre a hidrólise da lactose através da enzima β -Galactosidase, tal qual promove, também, a formação da alolactose (isômero da lactose – estrutura parecida com a da lactose), além da glicose e da galactose.

A partir disso, podemos concluir que o operón lac vai agir de diferentes formas a depender da concentração de lactose no meio... então vamos a análise!

Operón lac na ausência de lactose no meio

Quando a lactose se encontra em ausência no meio, o operón lac recebe um controle negativo, por estar sendo guiado por um repressor de lactose, ou seja, na ausência dessa molécula, o repressor está ativo e o operón está desligado.

Tudo isso acontece em uma parte específica do gene (apresentada na imagem abaixo). O gene regulador (*lac I*), na ausência de lactose, transcreve uma proteína repressora, tal qual vai se ligar ao sítio operador e impedir que a RNA-polimerase se ligue neste sítio e faça a transcrição dos genes estruturais.

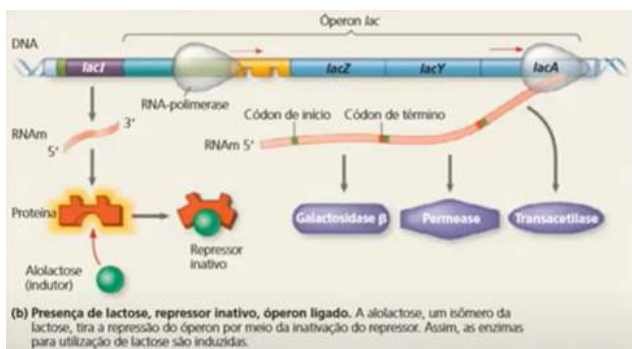


Operón lac na presença de lactose no meio

Agora analisando a situação contrária... na presença de lactose no meio, ocorre uma ação da alolactose (formada pela enzima β -Galactosidase), onde a mesma se liga à enzima repressora que foi sintetizada pelo gene regulador (*lac I*), impedindo que ela chegue ao operador, ou seja, a alolactose inativa o repressor. Desta forma, a RNA-polimerase está livre para fazer a transcrição dos genes estruturais do operón.

Quando formados, os genes estruturais vão sintetizar as enzimas (proteínas) da β -Galactosidase (na presença de lac, a hidrólise da mesma precisa ocorrer; e ocorre através dessa enzima), da permease (altera a membrana da célula bacteriana e permite, ainda mais, a entrada de lactose do meio para a célula) e da transacetilase (tal qual ainda não possui uma ação muito bem definida).

Lembrando que tudo isso ocorre com o operón ligado e o repressor desligado. A ação está expressa na imagem abaixo.



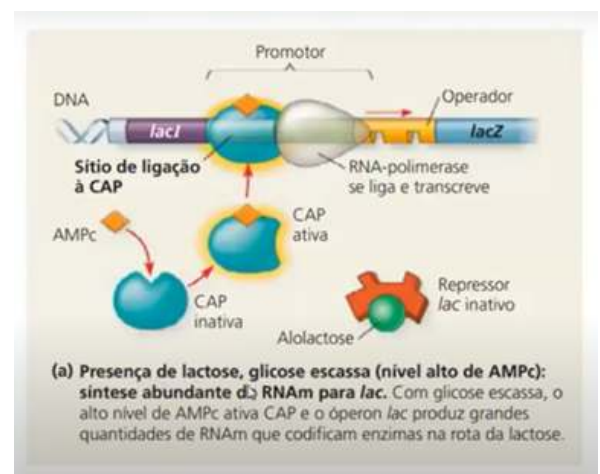
Mas não acaba por aí! Além do controle negativo citado na etapa anterior, na presença da lactose, o operón lac tem um controle positivo, tal qual é remediado pelo AMP cíclico (AMPc); ou seja, quando a glicose está em baixa concentração no meio, o AMPc se acumula neste meio.

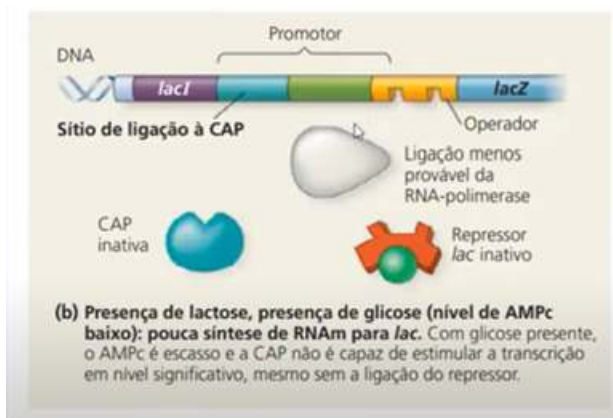
Em conjunto com o AMPc, a proteína ativadora de catabólito (CAP) funciona como um ativador e se liga ao DNA, estimulando a transcrição do gene. Ou seja, o AMPc em conjunto com a CAP, resultam em um aumento na transcrição de genes (transcrição ativa). Essa ligação (AMPc + CAP) aumenta a afinidade da RNA-polimerase pelo promotor e, conseqüentemente, aumenta o volume da taxa de transcrição. Conclui-se que esse mecanismo resulta em uma regulação ativa.

Porém quando se tem a presença de lactose e glicose, o nível de AMPc diminui, considerando que a glicose é a preferência de fonte de energia da célula. E, nesse caso, a síntese dos genes estruturais é baixa pois não ocorre o estímulo da RNA-polimerase (ocorre, mas é em menor quantidade).

Podemos concluir que o operón lac possui um controle duplo. O negativo sendo feito pelo repressor lac, e o positivo sendo feito pela CAP. Ou seja, o estado do repressor (com ou sem alolactose ligada) determina se a transcrição dos genes desse operón irá ou não ocorrer; enquanto a CAP (com ou sem AMPc ligada) controla o volume da taxa de transcrição quando o operón lac estiver livre de repressor.

Estes processos citados acima estão exemplificados nas imagens abaixo.





Para resumir

- Glicose presente e lactose ausente: Não ocorre transcrição do operón lac (repressor ligado, impedindo ligação da RNA-polimerase)
- Glicose presente e lactose presente: Baixo nível de transcrição do operón lac (preferência pela glicose não induz a alta nos processos de transcrição pelo operón lac)
- Glicose ausente e lactose ausente: Não ocorre transcrição do operón lac (AMPc em altos níveis; repressor ligado e impedindo ligação da RNA-polimerase)
- Glicose ausente e lactose presente: Ocorre alto nível de transcrição do operón lac (sem repressor; transcrição ativa [AMPc + CAP])

Regulação da expressão gênica - Eucarioto (II)

Ainda no assunto de regulação da expressão gênica, vamos abordar como funciona esse processo em organismos eucarióticos! Todos os organismos (procaríotos e eucariotos /uni e pluricelulares) devem regular a expressão gênica de forma a otimizar o gasto de energia da célula, eles devem desligar e ligar continuamente os genes em resposta a sinais dos meios externo e interno.

Essa regulação é muito importante em organismos pluricelulares, pois desta forma ocorre uma especialização das células; sempre com o intuito de realizar apenas os processos necessários.

Como ocorre a expressão gênica em uma célula eucariótica?

Primeiramente, ocorre uma modificação da cromatina (proteínas que estão envelopando o DNA), com o intuito de estabelecer o desempacotamento do DNA. Desta forma, o mesmo é exposto aos fatores de transcrição; a transcrição (expressão gênica) ocorre e resulta em um transcrito primário contendo exons e íntrons. Após isso, ocorre o processamento do DNA, onde os íntrons são retirados e os exons ligados; também ocorre a inserção de um "quepe" (guanina modificada – contém um grupo fosfato e uma metila) na extremidade 5'. Uma cauda é ligada à extremidade 3', tal qual se caracteriza como poliA. Lembrando que tudo isso ocorre no núcleo da célula.

Após o amadurecimento do RNA mensageiro, o mesmo sai do núcleo e se desloca até o citoplasma, onde ocorre a tradução e todo o processamento da proteína em questão. Vale ressaltar que cada etapa da expressão gênica dessa célula, é uma potencial abertura para que haja o controle deste processo.

Controle da expressão gênica em eucariontes

Para que haja o controle da expressão gênica em células eucarióticas, vale ressaltar que a maioria dos genes não são organizados em operons (raramente são transcritos juntos em uma mesma molécula de RNAm). E que a estrutura da cromatina vai afetar a expressão gênica (mas isso a gente vê mais pra frente).

Cada gene estrutural tem seu próprio promotor, ou seja, já percebe-se uma diferenciação para a estrutura procariótica. Ressalto também que ativadores são mais comuns em eucariontes e que, de novo, a membrana nuclear é importante, uma vez que separa transcrição e tradução (em todos os sentidos).

Agora, você deve saber que existem alguns processos importantes que afetam a regulação gênica neste tipo de célula. Quer saber quais são eles? Continue lendo.

Processos que afetam a regulação gênica

Entre os processos que afetam a regulação da expressão gênica, estão: o remodelamento da cromatina, a modificação das proteínas histonas e a metilação do DNA.

Remodelamento da cromatina

Para compreender esse processo, devemos nos familiarizar com a estrutura da cromatina.

A cromatina é composta por uma dupla-hélice de DNA e por proteínas histonas, tais quais estão envoltas pela dupla-hélice e, conseqüentemente, oferecem uma proteção ao material genético; o que dificulta o acesso ao mesmo. Ou seja, essa cromatina reprime a expressão gênica, e para que os fatores de transcrição, ativadores e RNA-polimerase se liguem ao DNA, o mesmo deve ser descoberto por essa capa protetora. Sendo assim, deve haver um remodelamento da estrutura da cromatina, antes de acontecer a expressão gênica, com o intuito de tornar a molécula de DNA mais acessível aos fatores citados acima.

Regulação da estrutura da cromatina: Modificação das proteínas histonas

A regulação da estrutura da cromatina ocorre através da modificação das proteínas histonas e da metilação do DNA.

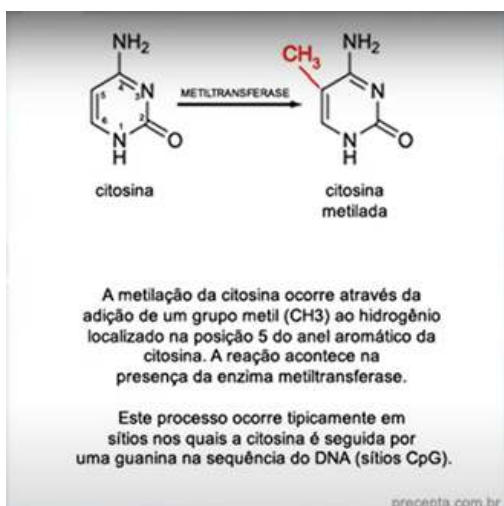
A modificação das histonas se dá pelo N-terminal de cada histona se entendendo para fora de seu nucleossomo (unidade da cromatina); essas caudas são acessíveis à muitas enzimas modificadoras, capazes de adicionar ou remover grupos químicos como acetila, metila e fosfato.

Regulação da estrutura da cromatina: Metilação do DNA

A metilação do DNA ocorre em um grupo diferentes de enzimas, tais quais podem metilar certas bases do próprio DNA (normalmente acontece na citosina).

Quando o DNA é intensamente metilado, ele está relacionado à repressão da transcrição. Como já dito, a metilação do DNA é mais comum em bases citosinas adjacentes às guaninas (CpG – na mesma fita). Ou seja, quando tem-se um excesso de metilação (inserção de um grupamento metila CH₃ na molécula) em um trecho, neste ocorre um silenciamento gênico; portanto, antes de acontecer a transcrição, os grupamentos metila são retirados através da ação de enzimas.

No caso da metilação em citosinas, o processo ocorre através da metiltransferase. Segue um esquema deste processo de metilação da citosina.



Uma curiosidade é que quando há a quebra do controle da metilação das moléculas, isso pode se relacionar com a formação de alguns tipos de câncer.

Concluindo, quando o a metila (CH₃) está presente na molécula, não ocorre a transcrição, caso contrário, esse processo pode ocorrer.

Metilação do DNA e carcinogênese

Nesta etapa vamos analisar a relação entre a metilação do DNA e a formação de tumores, ou seja, a carcinogênese.

A carcinogênese pode acontecer por conta da alteração de genes críticos, através da metilação, podendo haver dois padrões distintos, hiper ou hipometilação generalizada do genoma.

A hipometilação generalizada do genoma promove instabilidade cromossômica e ativação de oncogenes (genes capazes de gerar tumores). Contraditoriamente, a hipermetilação de ilhas CpG pode inativar genes supressores tumorais (genes que iriam inibir a formação de tumores), ou também a inativação de genes de reparo. Ou seja, a célula deve encontrar um equilíbrio neste processo de metilação, pois os dois extremos podem causar danos.

Modificação das proteínas histonas

Retomando o papo sobre as proteínas histonas, vamos abordar algumas características sobre as mesmas.

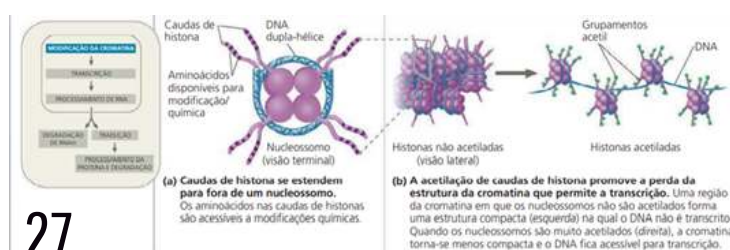
As histonas possuem dois domínios, um globular (associa-se com outras histonas e com DNA) e um de cauda com cauda positiva, tal qual faz com que haja uma interação com os grupos fosfato presentes no DNA.

Mas quais são as modificações que podem acontecer nas histonas? São algumas... vamos lá!

Pode ocorrer a adição do grupo metila (CH₃) às caudas das proteínas histonas, ou seja, ocorre uma metilação na cauda da histona, ajudando no processo de repressão da cromatina. Além disso, pode ocorrer a acetilação, ou seja, a adição de grupos acetila (CH₃CO) ao aminoácido lisina (situado na cauda histona), através da ação da acetiltransferase (promove relaxamento da cromatina, fazendo com que o DNA seja exposto aos fatores de transcrição); portanto, as enzimas desacetilases retiram esse grupo das caudas da histonas e restauram a cromatina.

A acetilação das histonas facilita o acesso dos fatores de transcrição e da RNA-polimerase ao DNA, ou seja, relaxa a cromatina e estimula a expressão gênica, por outro lado, a desacetilação da histona vai reprimir a transcrição, condensando a cromatina e dificultando o acesso ao DNA.

Para exemplificar um pouco tudo que foi falado até agora, segue um esquema que ilustra alguns processos citados anteriormente.



Vale lembrar que as lisinas localizadas nas caudas das histonas são passíveis de ligações covalentes pela ligação de grupos acetil e metil. A Histona acetiltransferase (HAT) é uma enzima capaz de adicionar o grupo acetil, ou seja, favorece o mecanismo de transcrição; enquanto as Histonas desacetilases (HDAC) promovem a retirada do grupo acetil e a repressão da expressão gênica.

Conclui-se que a acetilação está relacionada à transcrição e a metilação está relacionada à repressão transcricional. Podendo gerar genes ativos com DNA desmetilado e histonas acetiladas, ou genes inativos com DNA metilado e histonas desacetiladas ou DNA metilado e histonas metiladas.

Epigenética

A partir de todos os estudos feitos até agora, vamos adentrar no mundo da epigenética, que é a área da biologia que estuda as interações entre os genes, podendo variar entre a expressão e a supressão dos mesmos. É a área que investiga a formação do fenótipo (características visíveis no ser), a partir da formação do genótipo e sem a alteração do mesmo; ou seja, ela investiga a informação contida no DNA, transmitida na divisão celular, mas que não constitui parte da sequência do DNA em questão.

Os processos epigenéticos ocorrem nos processos discutidos anteriormente, ou seja, no DNA por metilação e nas histonas pela ação da acetilação ou metilação, sendo assim, processos pós-traducionais. E esses processos constituem os fatores epigenéticos, tais quais promovem a transcrição do DNA.

Ou seja, “As modificações epigenéticas podem ser herdadas no momento da divisão celular (mitose) e irão ter um profundo efeito

na biologia do organismo, definindo diferentes fenótipos” (Marcelo Fantappié, Revista Carbono). De acordo com Marcelo Fantappié, da Revista Carbono, as modificações no genoma são vagarosas e para que um traço genético (ou fenótipo) se instale numa população, isso pode levar muito tempo; por outro lado, o epigenoma pode mudar rapidamente e ser transmitido para a geração seguinte.

Nesse sentido, através da herança epigenética um organismo pode ajustar a expressão gênica de acordo com o ambiente onde vive, sem mudanças no seu genoma. “Nesse sentido, através da herança epigenética um organismo pode ajustar a expressão gênica de acordo com o ambiente onde vive, sem mudanças no seu genoma” (Marcelo Fantappié, Revista Carbono).

Isso pode ser exemplificado a partir da experiência de gêmeos idênticos. Já foi comprovado cientificamente que durante a transição da infância para a vida adulta, os gêmeos podem divergir significativamente em sintomas relacionados à depressão e/ou ansiedade; por terem o mesmo padrão genético (exatamente a mesma sequência de bases em ambos os genomas), essa divergência só pode ser explicada através das diferentes experiências individuais de cada um, que dão frutos diferentes para cada indivíduo (e também pelas mudanças epigenéticas).

E para concluir “o esforço atual tem sido depositado em cima do sequenciamento do epigenoma, ou seja, na identificação de todas as citosinas metiladas ao longo do genoma. O epigenoma na sua totalidade irá levar a um melhor entendimento de como a função do genoma é regulada na saúde e na doença, e também como a expressão genética é influenciada pela alimentação e pelo ambiente” (Marcelo Fantappié, Revista Carbono).

PCR

O que é?

Reação cadeia da polimerase(PCR), ou em inglês "Polymerase Chain Reaction", consiste em uma técnica de biologia molecular que permite replicação in vitro do DNA de forma rápida, além de amplificação rápida de segmento específico de cDNA também.

História

Foi na década dos anos 80 que o cientista Kary Mullis quando teve a ideia de usar um par de primers para delimitar uma sequência de DNA e copiá-la usando DNA polimerase. Sendo em 1985 a 1ª publicação sobre PCR na revista Science. Em 1993, Mullis ganhou o prêmio Nobel em Química.

Funcionamento

A dupla hélice é estabilizada por ligações hidrogênio, duas entre as bases adenina (A) e timina (T) e três entre as bases guanina (G) e citosina (C). Inicialmente, para que o DNA possa ser replicado, a dupla hélice precisa ser totalmente desnaturada pelo aumento da temperatura, quando são desfeitas as ligações hidrogênio entre as diferentes bases nitrogenadas.

1º Etapa: Desnaturação/ 94°C - 96°C

Inicialmente, para que o DNA possa ser replicado, a dupla hélice precisa ser totalmente desnaturada pelo aumento da temperatura, quando são desfeitas as ligações hidrogênio entre as diferentes bases nitrogenadas.

2º Etapa: Anelamento/ Temperatura: 55°C - 65°C

No processo de finalização a polimerase adiciona dNTP fazendo a extensão da nova fita.

3º Etapa: Extensão/ 72°C

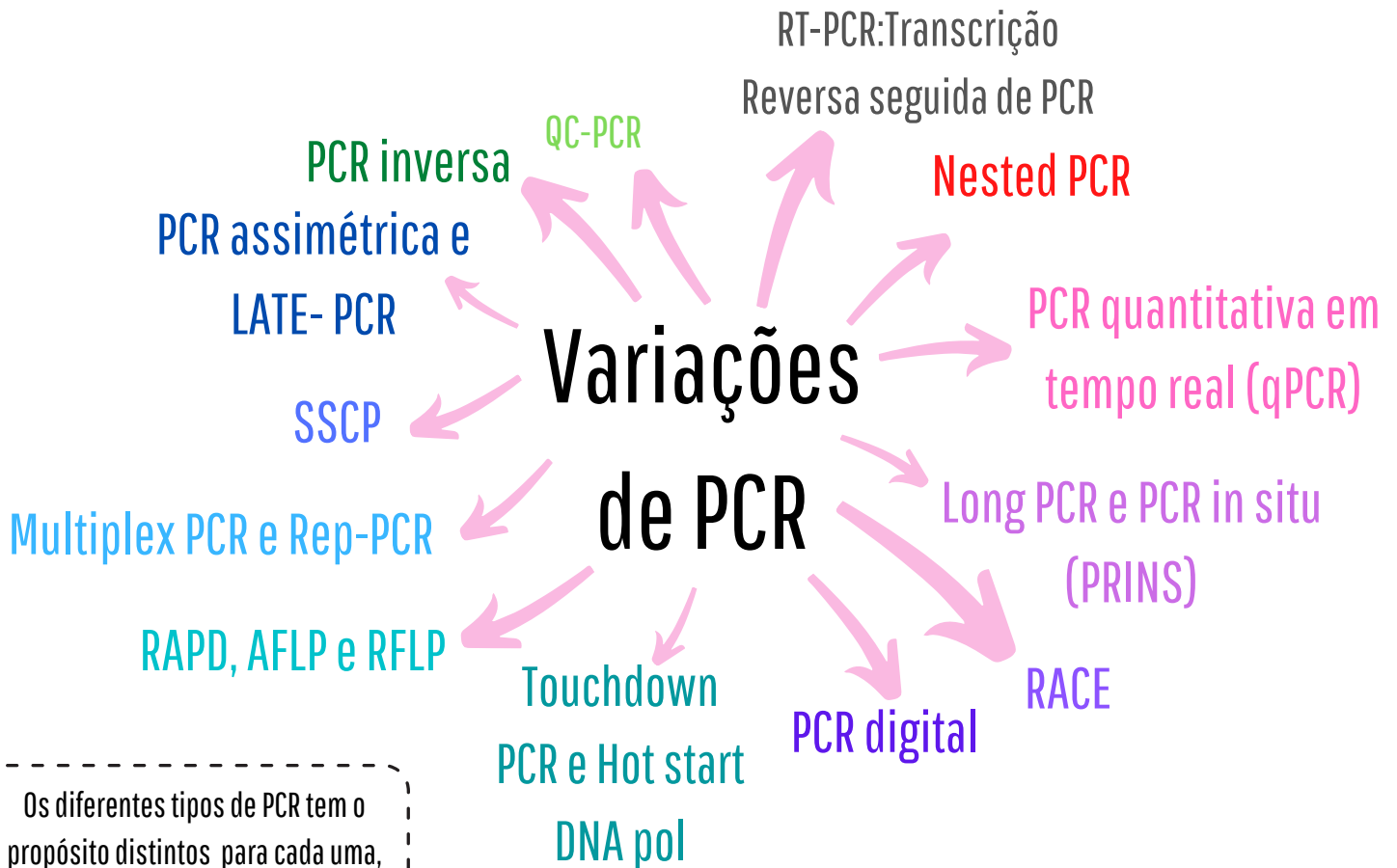
No processo de finalização a polimerase adiciona dNTP fazendo a extensão da nova fita.

Vídeo que demonstra a aplicação:

.Atualidade

Hoje a teste de PCR está muito presente no combate à pandemia causado pelo vírus Sars-cov-2, mas também utilizada no diagnóstico de infecção de um paciente por outros determinado vírus, pelo fato de técnica permitir a amplificação específica de material genético do vírus. A especificidade da reação é garantida. Portanto, percebe-se a importância dessa técnicas nos dias de hoje para humanidade.

Variações da PCR



Os diferentes tipos de PCR tem o propósito distintos para cada uma, varia muito pelo interesse do objetivo da pesquisa.

Clonagem Molecular

Cosmídeos

Cosmídeos são moléculas de DNA circulares extracromossomais que combinam as vantagens de um plasmídeo com a de um bacteriófago. O limite de clonagem é de 35 a 50 kb.

(Técnica) Transformação de E.coli

- As bactérias podem incorporar DNA exógeno em um processo denominado transformação.
- A transformação é um passo fundamental na clonagem de DNA. Ocorre após clivagem e ligação e transfere plasmídeos recém-criados para bactérias.
- Após a transformação, as bactérias são selecionadas em lâminas antibióticas. As bactérias com um plasmídeo são resistentes a antibióticos e cada uma formará uma colônia.
- As colônias com o plasmídeo sicerto podem ser cultivadas para formar grandes culturas de bactérias idênticas, que são usadas para produzir plasmídeo ou sintetizar proteína.

Preparação do DNA vetor e inserto

Preparação do vetor

- Digestão com enzima(s) de restrição
- Sistemas TA

Preparação do inserto

- Métodos de produção de fragmentos de DNA: inserto
- Digestão com enzimas de restrição
- Digestão parcial com DNase I
- Quebra mecânica controlada
- Síntese enzimática (cDNA, PCR)
- Síntese química de oligodesoxirribonucleótidos.

Métodos de produção de fragmentos de DNA: inserto

- Digestão com enzimas de restrição
- Digestão parcial com DNase
- Quebra mecânica controlada
- Síntese enzimática (cDNA, PCR)
- Síntese química de oligonucleotídeos

Transformação bacteriana

- Bactérias especialmente preparadas são misturadas com DNA.
- Um choque térmico é dado nas bactérias, o que faz com que algumas delas incorporem um plasmídeo.
- Os plasmídeos usados na clonagem contém um gene para resistência a antibiótico.
- Desta forma, todas as bactérias são colocadas em uma lâmina de antibiótico para selecionar aquelas que incorporaram um plasmídeo.

- Bactérias sem um plasmídeo morrem. Cada bactéria com um plasmídeo dá origem a um aglomerado de bactérias idênticas, contendo plasmídeo, que são denominadas de colônia.
- Várias colônias são verificadas para identificar uma com o plasmídeo correto.
- Uma colônia contendo o plasmídeo correto cresce em volume e é usada para a produção de plasmídeo ou proteína.

CRISPR

A francesa Charpentier, de 51 anos, e a americana Doudna, de 56 anos, se tornaram a sexta e a sétima mulheres a serem agraciadas com o Nobel de Química, se juntando à lista que inclui Marie Curie, a primeira mulher a ganhar o prêmio nesta categoria, em 1911.

Enquanto pesquisava uma bactéria nociva comum, Charpentier descobriu uma molécula que era parte do antigo sistema imunológico da bactéria e que combate vírus cortando partes do seu DNA. Depois de publicar o estudo em 2011, ela trabalhou com Doudna para recriar a tesoura genética da bactéria, simplificando a ferramenta para usá-la em outros materiais genéticos. Elas reprogramaram então a tesoura para ser usada em qualquer molécula do DNA.

Crispr é a sigla para Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ou seja, repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas. Essas repetições correspondem a regiões do DNA bacteriano onde se encontram sequências que contêm instruções para produzir moléculas de RNA não codificantes para proteínas que são capazes de reconhecer moléculas de DNA de bacteriófagos que as infectam. Normalmente, após o contato dessas bactérias com seus invasores naturais, os RNAs produzidos guiam as nucleases do sistema Crispr para o DNA do bacteriófago invasor para cortá-lo e inutilizá-lo, e, assim, bloquear a infecção.

O acionamento dessas áreas no genoma bacteriano funciona como um mecanismo de defesa contra infecções, neutralizando a reprodução do material genético viral por um processo denominado RNA de interferência.

Cientistas descobriram que essa região atua como um sistema de defesa de bactérias, em que pedaços de DNA de vírus invasores são inseridos entre as repetições. São usados como se fossem uma “memória” numa infecção futura. Quando uma nova infecção ocorre, as bactérias produzem enzimas (Cas9 é a mais conhecida) que atuam como tesouras moleculares que carregam a “memória” do vírus. Com isso, se o novo invasor apresentar sequências idênticas a alguma dessas “memórias”, o material genético será picotado pela enzima.

Baseado nesse mecanismo de defesa das bactérias, os cientistas descobriram como informar a essas enzimas, a sequência a ser editada em um genoma. A informação ocorre por meio de uma sequência de RNA que é construída e sintetizada em laboratório.

Esse RNA é chamado de RNA-guia (sgRNA) pois, é construído de acordo com a sequência de DNA a ser modificada, ou seja, um ou mais genes de interesse. Dessa maneira o sgRNA pode conduzir, por exemplo, a proteína Cas9 até uma região do genoma do organismo que está sendo modificado e cortar a dupla fita de DNA.

As células possuem mecanismos naturais de reparo de sequência de DNA, que são ativados toda vez que este é danificado. Uma vez que o DNA é cortado pela proteína Cas9, o sistema de reparo dessa célula é ativado e vai “consertar” o fragmento alvo. Esse reparo pode acontecer por recombinação homóloga ou não homóloga.

Na recombinação homóloga a célula utiliza um molde de fragmento de DNA, que pode ser natural da célula ou exógeno. Neste caso é possível inserir genes. Já na recombinação não homóloga a célula apenas une as duas extremidades do fragmento de DNA. Neste caso é possível inativar genes.

Um trecho do artigo traduzido que demonstra uma possível aplicação:

Pesquisadores na universidade de Tel Aviv (TAU) demonstraram que a técnica CRISPR/Cas9 é bastante efetiva no tratamento de câncer metastático (glioblastoma e ovários), um passo significativo em direção à descoberta da cura do câncer. Pesquisadores desenvolveram um novo lipídio com um sistema de entrega baseado em nanopartículas que agem especificamente nas células cancerígenas e as destroem através de manipulação genética.

Tratamento revolucionário a base da técnica de edição genética CRISPR destrói células cancerígenas

Link de acesso ao artigo:

Tira dúvidas

Aula se aprofundou em forense, tema solicitado por uma aluna que pretende trabalhar como perita futuramente.

A forense a partir de técnicas de biologia molecular alcança uma resposta de um crime, com o propósito de as vítimas não sejam prejudicadas e que haja justiça.

Pode ser ver a aplicação da forense neste vídeo:

A biologia molecular tem uma diversidade bem grande de oportunidades de trabalhos. BioMol não se limita a está no laboratório sentado em uma bancada realizando PCR.

O vídeo a baixo é bem explicativo sobre as diversas áreas de atuação de Biologia Molecular:

Sequenciamento do DNA.

O que é?

O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nesta estrutura.

Quais são os objetivos do sequenciamento?

- Determinar a estrutura de uma molécula de DNA, identificando a ordem dos nucleotídeos componentes.
- Detecção de mutações
- Tipagem de microrganismos
- Determinação de polimorfismos

TIPOS DE SEQUENCIAMENTO:

- Baseada em hidrólise química, desenvolvida por Alan Maxam e Walter Gilbert.
- Baseada em reação enzimática, desenvolvida por Frederick Sanger e cols.

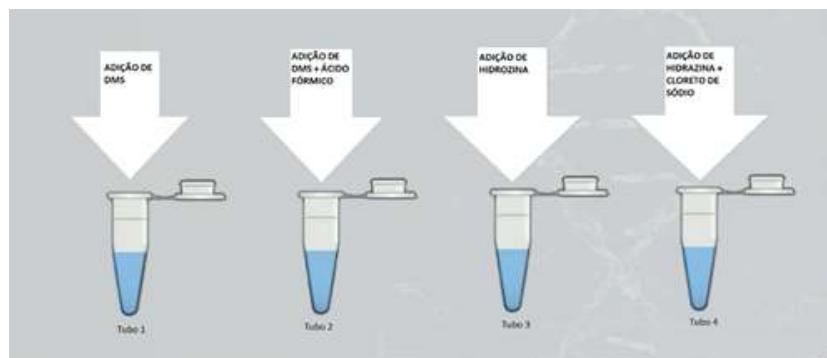
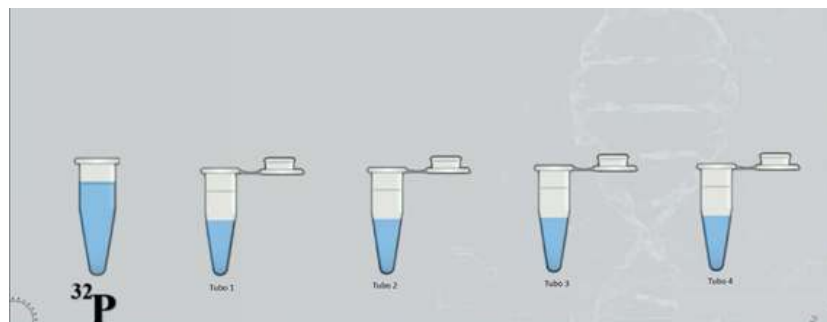
Maxam e Gilbert:

-(1976 - 1977) - Allan Maxam e Walter Gilbert desenvolveram um método de sequenciamento de DNA baseado na modificação química do DNA e na clivagem subsequente de bases específicas.

Etapas:

- Preparação do DNA;
- Tratamento químico;
- Eletroforese;
- Autorradiografia.
- Análise do Resultado

1. Separa-se a amostra em 4 tubos.
2. Insere-se o ^{32}P nas amostras de DNA, assim a extremidade 5' do DNA fica marcada pela radiação do ^{32}P .



No primeiro tubo adiciona-se Dimetil Sulfato (DMS). (guanina)

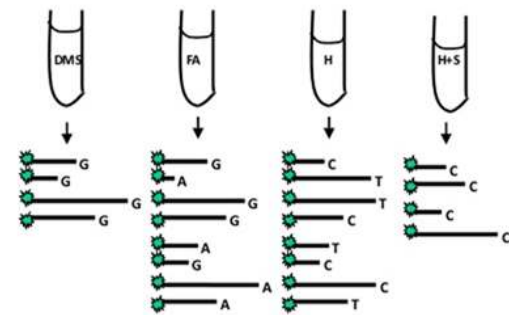
No segundo adiciona-se Dimetil Sulfato + Ácido Fórmico. (guanina + adenina)

Esses dois primeiros clivam a coluna de fosfato e açúcar, no primeiro identifica-se a guanina, no segundo identifica-se a guanina + adenina.

Os dois últimos modificam as bases, identificando as pirimidinas (citosina e timina)

No terceiro adiciona-se Hidrazina (citosina)

No quarto adiciona-se Hidrazina + Cloreto de Sódio (citosina + timina)



³²P 5' G A C G T G C A A C G A 3'

As bandas geradas após a “corrida” destes fragmentos em gel de poliacrilamida podem ser visualizadas após a impressão de um raio X. A determinação da sequência de nucleotídeos é obtida “lendo-se” de baixo para cima, um a um, os nucleotídeos representados pelas bandas do gel

Sanger:

A sequenciamento do Sanger também utiliza a radioatividade, porém marca os fragmentos de DNA sintetizados a partir da fita molde.

Observação: A síntese de novos fragmentos de DNA a partir da fita molde só foi possível graças ao desenvolvimento da técnica de PCR.

DNA molde que será sequenciado separado em 4 tubos.

Enzima DNA polimerase capaz de produzir cópias relativamente fiéis do DNA molde;

Polimerase; Solução tampão, contendo o cofator magnésio (Mg), necessário para que a enzima DNA polimerase desempenhe sua atividade

Didesoxinucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), que atuam como terminadores da síntese de DNA

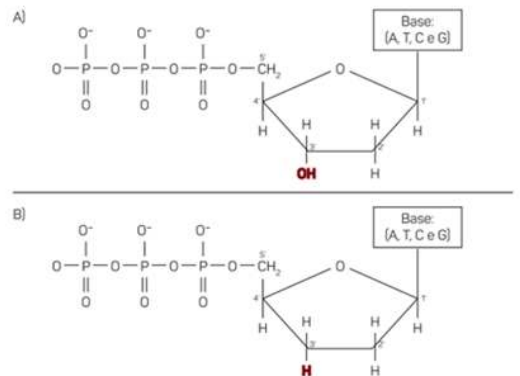
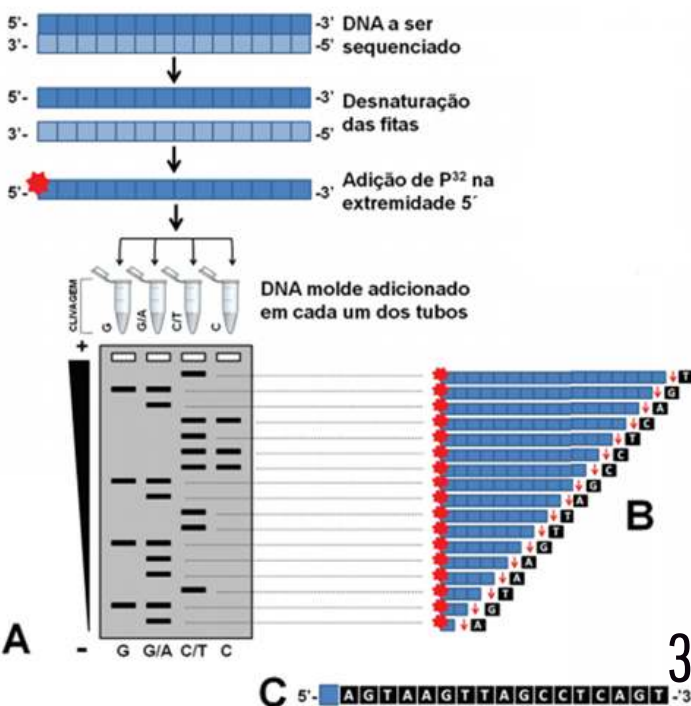
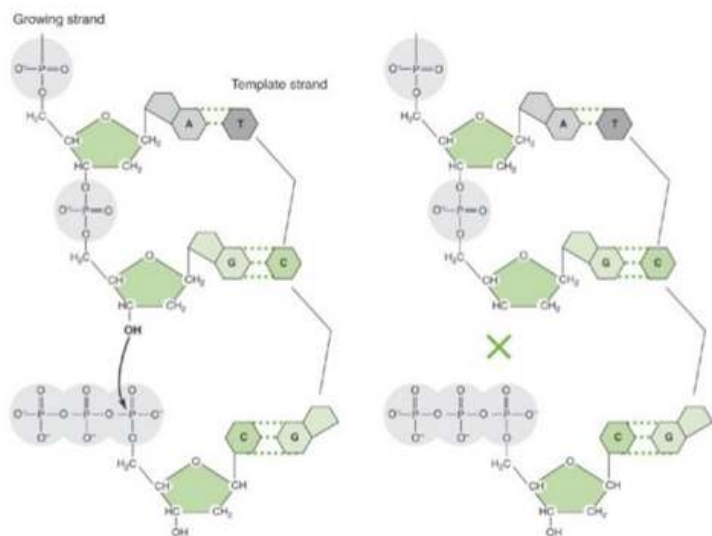


Figura 3. Diferença entre desoxinucleotídeo e dideoxynucleotídeo. Em (A), temos um desoxinucleotídeo contendo três grupos fosfato, uma ribose com uma hidroxila na posição 3' (vermelho) e uma das quatro bases nitrogenadas. Em (B), temos o dideoxynucleotídeo evidenciando a ausência da hidroxila na posição 3' da ribose (vermelho).

A ausência do grupo OH na posição 3' impede a entrada de um novo nucleotídeo (por isso este método é também conhecido como "terminador de cadeia" ou "didesoxi").



Na esquerda a dNTP, à direita ddNTP.

Sem a carboxila (OH), a formação da ligação entre os fosfatos é interrompida.

ddNTP

Após a adição de ddNTP ocorre a inibição da síntese da cadeia

Usa-se baixas concentrações de ddNTP e altas concentrações de dNTP

Em cada reação, um ddNTP é incorporado aleatoriamente ao invés do dNTP correspondente, provocando a terminação da cadeia.

Aprimoramentos do Método de Sanger;

- Semiautomático;
- Automático.

Modelo de sequenciador semiautomático;

ABI 377: Este sequenciador detecta a fluorescência emitida pelos didesoxinucleotídeos e a decodifica para determinar a sequência de nucleotídeos do fragmento de interesse;



Modelos de sequenciadores automático;



Método de Sanger semiautomático;

O princípio de Sanger se mantém o mesmo, porém a segurança do técnico que antes tinha contato direto com a radioatividade, fica mais seguro, tendo em vista, que agora não utiliza mais o composto radioativo.

Desnaturação da dupla fita, ddNTP marcados com compostos fluorescentes são incorporados à cadeia nascente de DNA sintetizada pela DNA polimerase.

Através de um sistema de eletro injeção, os fragmentos de DNA recém-sintetizados começam a migrar e encontram, num determinado ponto, um feixe de raios laser que excita os fluoróforos fazendo com que estes emitam fluorescência característica de um dos quatro tipos de nucleotídeos.

Um detector registra a intensidade e comprimento de onda desta fluorescência e a transmite a um computador que possui um software capaz de converter fluorescência em picos coloridos (cromatograma) que são decodificados na sequência de nucleotídeos do fragmento

Sequenciamento de Nova Geração (NGS):

O projeto do genoma humano,

Necessidade de obtenção de informações genéticas para medicina personalizada,

Avanço da tecnologia

Impulsionaram o desenvolvimento de novas metodologias de sequenciamento: com melhor qualidade, menor custo, maior rapidez e maior capacidade de geração de informações (“high throughput” / alta demanda)

Atualmente existem diversas tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala;

A Roche foi a primeira empresa a desenvolver esta estratégia que se baseia na tecnologia de pirosequenciamento (Plataforma 454):



(NGS):454

Esta tecnologia dispensa a clonagem e tem baixo custo (comparado a outros métodos existentes);

O sistema de sequenciamento é cerca de 100 vezes mais rápido quando comparado ao método de sequenciamento padrão de Sanger.

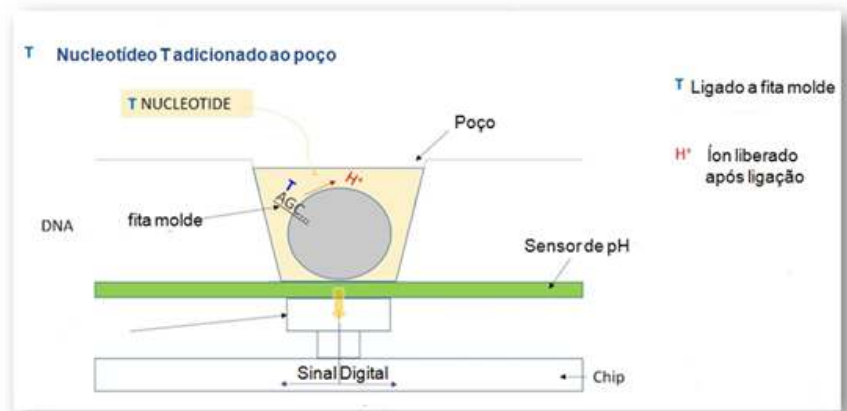
Este método pode ser dividido em três etapas:

1. preparo da amostra (Na primeira etapa, o DNA é fragmentado aleatoriamente por nebulização, sendo selecionados os fragmentos com tamanho adequado)

Assim é possível saber qual nucleotídeo foi adicionado.

Ciclos de fornecimento de A, T, C e G são constantemente repetidas até que todos os segmentos tenham suas fitas complementares formadas e a sequência obtida.

Detecção direta - método de sequenciamento bastante rápido.



Sequenciamento do DNA

Referência bibliográfica

Fonte imagens:

- https://pt.wikipedia.org/wiki/Base_nitrogenada
- <https://www.hemocentro.unicamp.br/noticias/evento-para-medicos-e-enfermeiros-abordara-as-alteracoes-mais-frequentes-no-hemograma/>
- <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/tipos-rna.htm>
- (https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4295692/mod_resource/content/1/Aula%206%2020%20Extra%C3%A7%C3%A3o%20de%20acidos%20nucleicos%20e%20%20Replica%C3%A7%C3%A3o.pdf)
- (https://www.google.com/urlsa=i&url=https%3A%2F%2Fjoneilers.github.io%2Fdnaextraction%2F&psig=A0vVaw3Wnq8TvZ9LnW0VnqAH5vzd&ust=1616793869993000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCKDp_eawz08CFQAAAAAdAAAAABAD)
- (https://lh3.googleusercontent.com/proxy/JJ6XeH3oAnBaEKcsA_OfETTJvIFqk3ezKKYnXhFPb2_NPf92ghisoyssfqNYApxiogg0yfyGWueJ6EhUiPU043ZRIZAmISBdwjJ07RwQzP8x4GLONp4YUk3wpH3zPksEm9SNKSTH0fBB0VV_ScDj-77MlnXn0gvNo5p01M)
- (<https://kasvi.com.br/wp-content/uploads/2016/08/6-gel-agarose-cuba.jpg>)
- (<https://kasvi.com.br/wpcontent/uploads/2019/01/eletroforesesepara%C3%A7%C3%A3o-proteina.png>)
- (Resultado eletroforese em Gel de Agarose - https://www.researchgate.net/figure/Figura-9-Eletroforese-em-gel-de-agarose-1-5-das-diferentes-etapas-de-preparacao-do-RNA_fig7_278645710)
- (Resultado eletroforese em Gel de Poliacrilamida - <https://www.researchgate.net/profile/JoseFreire2/publication/320912098/figure/fig1/AS:558192201797633@1510094799451/Figura-01-Eletroforese-em-gel-de-poliacrilamida-12-5-p-v-em-condicoes-desnaturantes-e.png>)
- Biologia de Campbell – 10ª Edição

