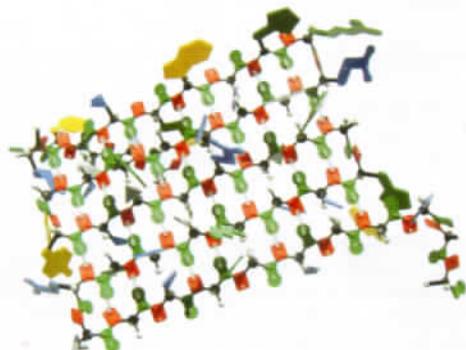
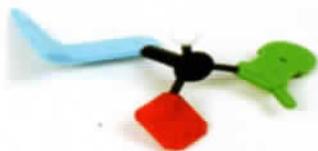
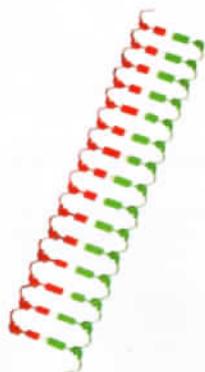


Construindo as moléculas da vida: DNA-RNA-Proteína

Manual do Professor



Trabalhando com o KIT Construindo as Moléculas da Vida: DNA-RNA-Proteína

1) Construindo as moléculas da vida: DNA e RNA

Distribuir as peças (1 conjunto para cada grupo) e deixar que todos se familiarizem com o material. Deixe montar o que quiserem (cerca de 5 minutos). Oriente para que observem as peças e tentem diferenciá-las (cor, tamanho, quantidade de orifícios, formato). Apresente as peças do kit: uma única peça denominada complexo fosfato-açúcar (CFA), representa o fosfato e a pentose ligados, e cinco peças simbolizam as diferentes bases nitrogenadas: pirimidínicas (**T, C e U**) e púricas (**A e G**), com letras indicativas em auto-relevo. A **ribose** do RNA é representada pela peça **CFA** de cor **roxa**. As ligações de **H** são representadas duplas e triplas, figura 1.



Figura 1 - Peças do Kit "Construindo as moléculas da via: DNA e RNA"

Montar os nucleotídeos e a estrutura do DNA

O primeiro passo é construir os nucleotídeos, a estrutura básica dos ácidos nucleicos. Instrua para que montem tanto nucleotídeos com bases púricas como pirimidícas, figura 2.



Figura 2 - Modelo de nucleotídeo

No DNA, os desoxirribonucleotídeos contêm: uma pentose (**desoxirribose**), um grupo **fosfato** e uma das bases nitrogenadas: **A, T, C, G**.
No RNA, os ribonucleotídeos, contêm: uma pentose (**ribose**), um grupo **fosfato** e uma das bases nitrogenadas: **A, U, C, G**.
O complexo ribose-fosfato do RNA é representado pela peça de cor **roxa**.

As peças das bases nitrogenadas possuem tamanhos diferentes: A, G (púricas) são maiores que T, C e U (pirimidícas). A e G são constituídas por dois anéis aromáticos, T, C e U são constituídas por um anel aromático.

De acordo com a numeração aplicada aos carbonos da pentose, o fosfato está ligado na posição do carbono 5' e as bases na posição do carbono 1'. Portanto, para montar um nucleotídeo deve-se encaixar uma das bases nitrogenadas ao pino da posição 1' da pentose, figura 2.

Como sugestão cada grupo poderá montar uma ou todas as sequências abaixo sugeridas:

Grupo 1 – ATT TAA ATG TAA TTC GAA TAC

Grupo 2 – ATG GAT CCA GAA CTT CGG TAC

Grupo 4 – ATT TTT TGG GGA ATT CGG TAC

Grupo 6 – TTT AAA TAA AAT CGA TAA TAC

Grupo 3 – AAT TCG AAT TCC ATT TAA TAC

Grupo 5 – AAG CTT TTC GAA CGA TAA TAC

Grupo 7 – TTG CTT TTC GAA TGG AAT TAC

ou outras.

As representações dos nucleotídeos de DNA, montadas como proposto na figura 2, possuem um orifício na posição 3' e um pino ligado ao fosfato, que está na posição 5' da pentose. Os pinos representam ligações covalentes do tipo fosfodiéster, que se formam quando estes se encaixam nos orifícios da posição 3' de outro nucleotídeo. Desta forma, através de subseqüentes ligações fosfodiéster, os grupos fosfatos unem-se às pentoses de outros nucleotídeos, gerando longas fitas chamadas de polinucleotídeos, figura 4.



Figura 3 - Um polinucleotídeo.

Os orifícios laterais nas peças das bases nitrogenadas representam o número de pontes de hidrogênio que cada nucleotídeo forma. A e T formam duas ligações de H, G e C formam três ligações de H.

Após montar a seqüência da fita simples, montar a complementar obedecendo o antiparalelismo, através do pareamento das bases **A-T** e **C-G** (regra de Chargaff), unindo-as com as peças que correspondem às ligações de H, figura 4.

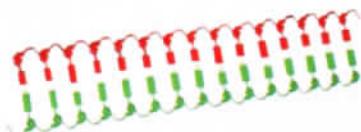


Figura 4 - Fita dupla de DNA.



Figura 5 - A dupla fita é estruturalmente organizada como dupla hélice, como um giro de mão direita ou sentido anti-horário. A seguir amasse e segure por um minuto, solte e a hélice ficará formada (a) e (b).

Duplicando DNA

Uma das propriedades da molécula de DNA é sua autoduplicação, que ocorre antes do início do processo de divisão celular. A dupla hélice se separa através do rompimento das ligações de hidrogênio e novos nucleotídeos são adicionados ao longo de cada uma das fitas. Como a seqüência de uma cadeia é determinada pela seqüência da outra, conforme a regra de complementaridade das bases, os nucleotídeos incorporados às fitas recém formadas são complementares aos das "fitas-mãe". Este processo é chamado de duplicação semiconservativa, uma vez que são formadas duas moléculas de DNA idênticas à inicial, sendo cada uma constituída por uma das "fitas-mãe" e uma fita nova (figuras 6).



Figura 6 - ilustrando a duplicação do DNA

Seguir a regra de Chargaff, lembrando que a fita vai se alongando no sentido antiparalelo (contrário) à fita molde e sempre 3' para 5'.

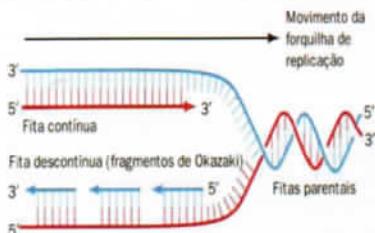


Figura 7: Duplicação, crescimento contínuo e descontínuo.

As fitas se alongam, uma de forma contínua e outra descontínua, produzindo, neste último caso, fragmentos de fita, (chamados fragmentos de Okazaki), que são ligados entre si ao final do processo.

Todos os passos da duplicação do DNA, desde a abertura das fitas até a ligação dos fragmentos produzidos na fita descontínua, são conduzidos por diferentes enzimas especializadas. A principal delas a DNA polimerase é a enzima responsável pela síntese do DNA.

Enzimas de Restrição: por que precisamos saber o que são e o que fazem?

Os organismos muitas vezes são confrontados com o problema de terem que lidar com DNA estranho, normalmente provenientes de vírus ou bactérias (DNA exógeno) que podem perturbar o metabolismo normal da célula e desencadear processos que levam à morte celular. A bactéria *Escherichia coli*, um organismo procaríote, resolveu este problema através de um mecanismo que destrói o DNA invasor, produzindo enzimas específicas para esta finalidade, chamadas de endonucleases de **restrição** ou **enzimas de restrição**. Essas enzimas atuam como tesouras, cortando o DNA invasor em diversos fragmentos. Estes locais, onde o DNA é cortado, contêm uma seqüência de bases específica e são chamados de palíndromes ou seqüências palindrômicas, isto é - seqüências em que a leitura de ambas as fitas é a mesma na direção 5' para 3' possuindo uma dupla simetria rotacional. Essas seqüências são normalmente curtas contendo 4, 6 ou 8 pares de bases. As enzimas de restrição são de grande importância no estudo do DNA, pois permitem cortar grandes moléculas de DNA em fragmentos menores. Antes da descoberta das enzimas de restrição não era possível cortar com precisão um gene de um trecho da cadeia de DNA, dificultando a manipulação desta molécula. As enzimas de restrição podem ser classificadas considerando:

a) Composição de seqüência nucleotídica, b) Posição de clivagem, c) Seqüência de reconhecimento, d) Co-fatores envolvidos, e) Estrutura da enzima. De acordo com suas estruturas e especificidade elas são classificadas em **tipo I, II e III**. A nomenclatura das enzimas de restrição indica o organismo do qual ela foi purificada. Exemplos no quadro abaixo. Algumas enzimas clivam (cortam) a molécula de DNA em sítios que não estão perfeitamente alinhados, deixando "caudas" de fitas simples nos novos terminais. Esse tipo de terminação é chamado de "extremidades coesivas", pois se liga facilmente a sua coesiva complementar. Nem todas as enzimas de restrição possuem finais coesivos, pois algumas enzimas cortam a fita de DNA sobre o mesmo eixo, de forma alinhada, produzindo uma extremidade "cega". A enzima do tipo II é a mais empregada na tecnologia do DNA recombinante.

Tabela 1: Enzimas de restrição e seus respectivos sítios de clivagem

Nome da enzima	Bactéria de origem	Sítio de restrição
<i>Aha</i> III	<i>Aphanthece holophytica</i>	5' - TTAAA - 3' 3' - AAA TTT - 5'
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloquefaciens</i> H	5' - GATCC - 3' 3' - CCTAG G - 5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	5' - GAATC - 3' 3' - CTTAA G - 5'
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5' - AAGCTT - 3' 3' - TTCGA A - 5'
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i> YTI	5' - TCGA - 3' 3' - AGCT - 5'

Quando os cientistas estudam a molécula de DNA, uma das primeiras etapas é determinar os vários sítios de restrição deste DNA que, em bactérias, localizam-se no plasmídeo (são fitas de DNA circular extracromossômico) que dentre outros, contêm genes que confere às bactérias resistência a um dado antibiótico. Eles então constroem um mapa de restrição mostrando a localização dos sítios de clivagem para as diferentes enzimas. Este mapa também pode ser obtido do conteúdo de DNA das células de um indivíduo. Estes mapas servem de diagnóstico, por exemplo, em casos de investigação de paternidade.

Atualmente é possível construir mapas de restrição com DNAs da maioria das espécies vivas. Conhecendo a localização dos sítios de clivagem, por exemplo nos plasmídeos da *E. coli*, pode ser inseridos genes de outra espécie de ser vivo, os chamados genes de interesse ou exógenos. Assim, a bactéria *E. coli* pode ser usada para expressar genes de outra espécie. Por exemplo, o hormônio de crescimento e a insulina humana são produzidos por este processo e utilizados como medicamentos. Esses hormônios ou outra proteína qualquer, cujo gene foi inserido em outro organismo, são chamados de **proteína recombinante**. Com esta tecnologia, é possível produzir plantas resistentes a pragas, adaptar plantas para cultivo em terras inóspitas, adaptá-las a condições climáticas adversas, enriquecer plantas alimentícias com nutrientes especiais, usar as plantas como produtoras de substâncias para fins terapêuticos, produzir enzimas em grandes quantidades para serem utilizadas industrialmente. Além *E. coli*, leveduras, células de insetos e de mamíferos podem produzir proteínas recombinantes. Esta informação é fundamental para que o professor possa trabalhar as atividades sugeridas nos cadernos (roteiros para estas atividades são encontradas nos sites indicados no final deste manual).

O processo da tradução também poderá ser trabalhado ludicamente. Apresentar aos alunos as peças que compõem o kit: o carbono alfa (Ca), com os ângulos de um tetraedro definido pelos pinos de conexão e que representam as ligações permitidas neste átomo. Os grupos funcionais a serem a ele ligados são: grupo amino (NH₂), representado pela peça **N-H**, com um orifício cilíndrico que permite esta conexão, o outro orifício (quadrado) permitirá a formação da ligação peptídica; grupo carboxil (COOH), representado pela peça **C=O**, com o orifício que permite a conexão e uma haste que representará a ligação peptídica ao ser conectado ao grupo amino de um aminoácido subsequente; esfera branca representando o **Hidrogênio (H)**; **cadeias laterais**, diferentes peças que representam cada aminoácido, em suas formas geométricas; ligação de **H** e ligação dissulfeto (**S-S**), que ocorre entre resíduos de cisteínas. A ligação **H** e ligação **S-S** permitem a construção de estruturas secundárias de proteínas tais como, folhas betas e hélices alfa, figura 10.

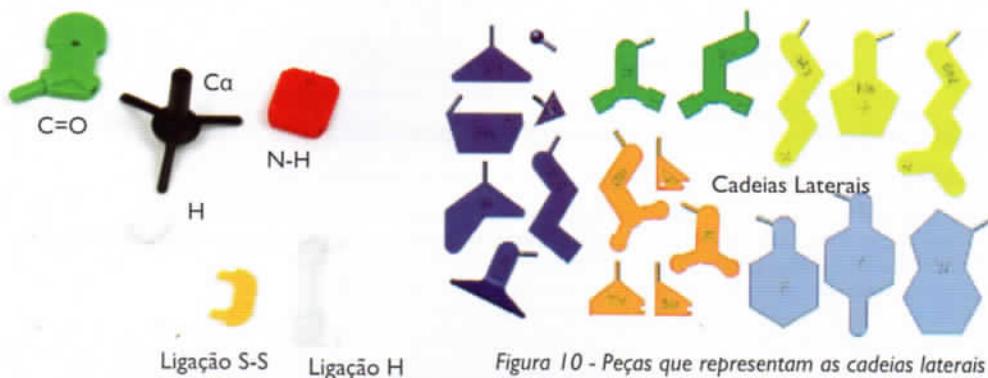


Figura 10 - Peças que representam as cadeias laterais

Montando os aminoácidos

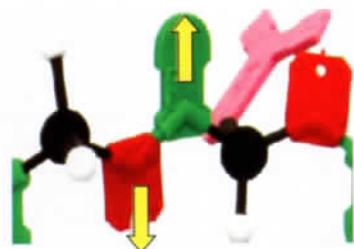
Na natureza a maioria dos aminoácidos são sintetizados como L-aminoácidos. Com as peças do kit é possível montar L e D aminoácidos, porém recomendamos que sejam montados SEMPRE na forma L, pois facilitará a formação das estruturas secundárias, ou seja hélices alfa e folhas beta. Assim, posicione a cadeia lateral para cima, figura 11 (a), no caso a peça que representa o aminoácido Alanina (ALA ou A), conecte a direita a peça que representa o grupo amino (N-H), siga no sentido horário e conecte a peça que representa o H (esfera branca), a esquerda conecte a peça da carboxila (C=O). A figura 11 (b) mostra o aminoácido Prolina (Pro ou P), cuja estrutura é diferente das outras cadeias laterais, pois é ligada a um grupo imina, assim as peças foram confeccionadas para representar o grupo imina ligado diretamente na peça que representa a cadeia lateral.



Figura 11 - Representação de um L-aminoácido mostrando a posição dos diferentes grupos (a); representação do aminoácido Prolina (b).

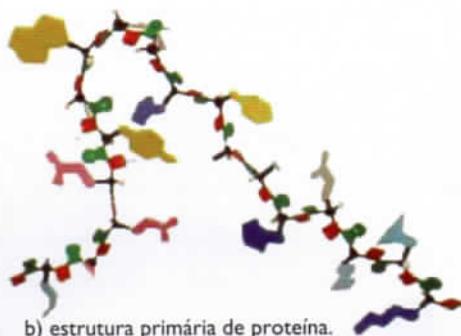
Iniciar a estrutura primária montando as ligações peptídicas, que ocorrem através da conexão da haste do grupo carboxil com o "orifício quadrado" do grupo amino, conforme demonstrado na figura 12 (a).

Deve-se sempre atentar para a correta posição dos grupos, **segundo a orientação das setas amarelas**. Um exemplo de estrutura primária de proteína é apresentado na figura 12 (b).



a) ligação peptídica

Figura 12 - a) posição correta dos grupos amino e carboxil na ligação peptídica.



b) estrutura primária de proteína.

Montando a estrutura espacial das proteínas

I) **Hélices- α** : a partir da estrutura primária, deve-se seguir as instruções das figuras 13, 14 e 15:

1. Imaginar um eixo central e iniciar a montagem no sentido amino-terminal, carboxil terminal;
2. Girar os resíduos de forma que as faces dos grupamentos amina e carboxila fiquem paralelas a esse eixo;
3. As cadeias laterais devem ser posicionadas para o lado externo da hélice;
4. Grupos amino são direcionados para o **terminal amino da hélice**;
5. Grupos carboxil são direcionados para o **terminal carboxil da hélice**;
6. Colocar uma ligação de hidrogênio entre a amina do **resíduo 1 (R1)** e a carboxila do **resíduo 5 (R5)**.
7. Seguindo com a montagem, acrescenta-se ligações de hidrogênio a cada pareamento carboxila-amina. Em geral, a cada volta da hélice são encontradas duas ligações de hidrogênio.
8. O resultado será uma hélice com perfil triangular e ligações peptídicas em cada face do triângulo.

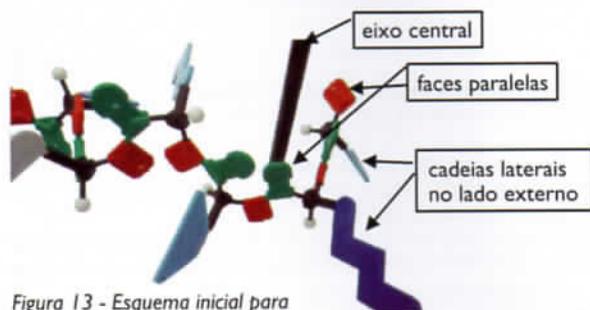


Figura 13 - Esquema inicial para início da montagem de uma hélice alfa

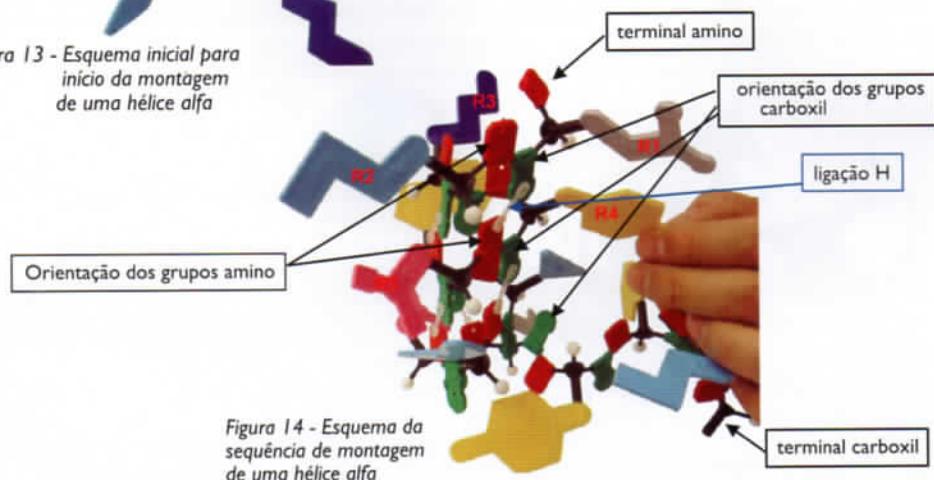


Figura 14 - Esquema da sequência de montagem de uma hélice alfa

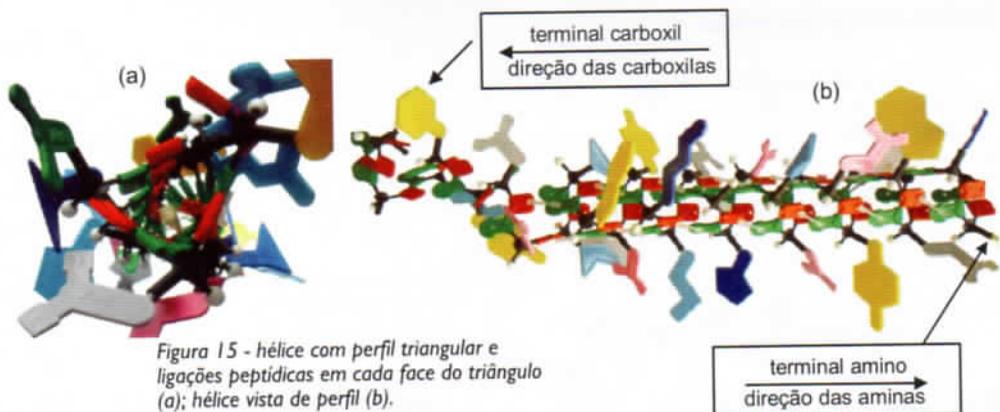


Figura 15 - hélice com perfil triangular e ligações peptídicas em cada face do triângulo (a); hélice vista de perfil (b).

2) Fitas e folhas beta

Para montar fitas e folhas- β , após construir uma estrutura primária, deve-se seguir as instruções e os esquemas mostrados nas figuras 16, 17 e 18.



Figura 16 - Fita beta

A seqüência de resíduos é organizada alternando a direção das cadeias laterais de forma que os eixos de ligação com o Ca estejam a 180° entre os resíduos vizinhos (**uma cadeia lateral para cima e outra para baixo, alternadamente**). Isso faz com que a seqüência polipeptídica fique quase linear e a estrutura é conhecida como fita- β .

3) Folha beta antiparalela

Em seguida a fita- β é dobrada (volta- β) pareando e fazendo as ligações de H entre os grupos carboxil e amino, figuras 18 (a e b). Observar que as ligações de H estão a 90° em relação ao alinhamento dos resíduos na cadeia.

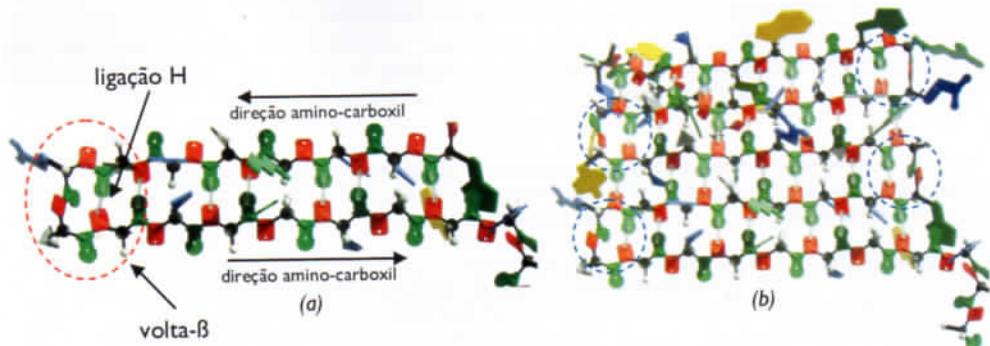


Figura 18 - Esquema da montagem de uma folha beta antiparalela.

Folha beta paralela

Nas **folhas- β paralelas** a direção amino-carboxil é a mesma para as fitas- β que estão lado a lado e não ocorrem as volta- β . As ligações de hidrogênio são inclinada em relação ao alinhamento dos resíduos na cadeia. A montagem deve ser realizada conforme apresentado na figura 19.

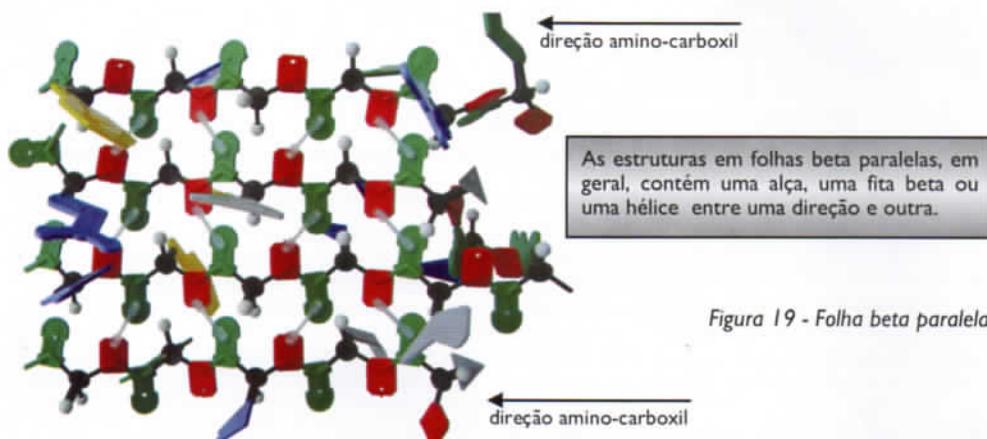


Figura 19 - Folha beta paralela

As proteínas, além das estruturas secundárias (hélices, fitas, folhas beta, voltas) se arranjam em outros níveis chamados de estrutura terciária e estrutura quaternárias, para que possam exercer suas funções fisiológicas.

A estrutura terciária pode ser definida como a forma tridimensional da molécula, tomando por base o posicionamento de todos os seus átomos espacialmente, é determinada e estabilizada por uma série ligações: ligações dissulfeto, interações hidrofóbicas, ligações iônicas, e ligações de hidrogênio que não fazem parte dos elementos de estrutura secundária.

A estrutura quaternária são representadas pelas proteínas constituídas por mais de uma cadeia polipeptídica: dímeros (duas cadeias), trímeros (três cadeias), tetrâmeros (quatro cadeias) ou mais cadeias. O número destas cadeias pode variar de duas até mais de 100, as quais podem ser idênticas ou distintas. Estas proteínas também são conhecidas como proteínas oligoméricas e cada cadeia é uma subunidade. As subunidades podem ser unidas por ligações covalentes, como ligações dissulfeto, porém são mais comumente unidas por ligações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas.

No portal do Espaço Interativo de Ciências (<http://eic.ifsc.usp.br>) o professor encontrará roteiros e protocolos para diferentes situações de aprendizagem, isto é, aplicações destes conhecimentos que podem ser executados em sala de aula.

Extração de DNA com reagentes domésticos.

Utilizando enzimas de restrição para quebrar a molécula de DNA.

Quem é o pai do bebê?

Identificação de suspeitos de um crime a partir de um fio de cabelo ou mancha de sangue.

Troca de bebês na maternidade.

Esta metodologia foi desenvolvida no Instituto de Física de São Carlos/USP, em projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Autores: Profas. Dras. Leila Maria Beltramini, Ana Paula Ulian de Araujo, Dr. Aparecido Rodrigues da Silva, Ms Luciano Douglas Abel. Patentes: INPI registro: PI03015122, depositada em 16/05/2003 e concedida em 23/09/2014; INPI registro PI0802082-5, depositada em 19/05/2008.

O material está sendo produzido em parceria com o CDCC (Centro de Divulgação Científica e Cultural de São Carlos-USP) e parcialmente financiado pela FAPESP, através do projeto CIBFar (Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos, CEPID/FAPESP).

BIBLIOGRAFIA:

Beltramini e cols, 2006. A new three-dimensional education model kit for building DNA and RNA molecules. *Bioch. and Mol. Biology Education*, 34, 187, 2006.

Silva, A.R.; Bossolan, N.S.; Beltramini, L.M. 2008. Development and Evaluation of Amino Acid Molecular Models to Building Amino Acids and Protein Secondary Structures. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Athens, 2008.

KREUZER, H.; MASSEY, A. Engenharia Genética e Biotecnologia. 2a. ed, Porto Alegre: ArtMed, 2002.

David L. Nelson, Michael M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition 2004.

FERNANDO, Cláudio (Org.). Guia de tecnologias educacionais 2008. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2009. p. 89.

PROTEIN data bank. Disponível em: "<http://www.rcsb.org>" <http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 20 mar. 2005.
<http://www.biologianaweb.com>" <http://www.biologianaweb.com>
<http://genome.gsc.riken.go.jp/hgmis/posters/chromosome/index.html>"
<http://genome.gsc.riken.go.jp/hgmis/posters/chromosome/index.html> (Exploring genes and genetic disorders)



E I C
Espaço Interativo de Ciências

Espaço Interativo de Ciências

<http://eic.ifsc.usp.br> - eic@ifsc.usp.br

Rua 9 de Julho, 1205, Centro
São Carlos - SP - CEP 13560-042
Fone: (16) 3373-9159