

 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco

Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

GENÉTICA MOLECULAR

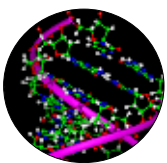
Daniel Macedo de Melo Jorge
 danielmacedo.jorge@gmail.com


 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco

Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

SUMÁRIO

- História da Genética Molecular;
- Organização e estrutura dos genomas;
- DNA e RNA
- Dogma Central
 - ✓ Replicação
 - ✓ Transcrição
 - ✓ Tradução
- Genes e genomas;
- Técnicas Genética Molecular
 - ✓ PCR
 - ✓ Sequenciamento
 - ✓ EST

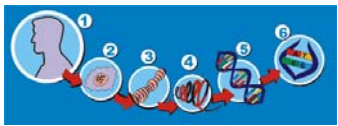



 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco

Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

O QUE É GENÉTICA?

- É o estudo dos genes e de sua transmissão para as gerações futuras.
- É dividida em:
 - Genética Clássica → Mendel (1856 – 1865)
"unidade fundamental da hereditariedade"
 - Genética Moderna → Watson e Crick (1953)
"pedaço de DNA que codifica uma proteína"




 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco


Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

O QUE É GENÉTICA?

Escala Comparativa

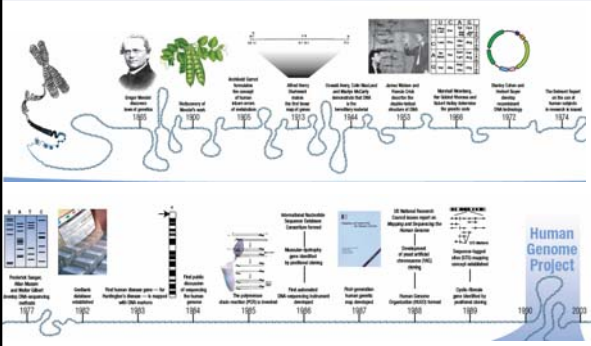
Terra	Célula
País	Cromossomo
Estado	Fragmento cromossômico
Município	Gene
Pessoas	Bases de pares





 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco

Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

Acontecimentos na genética e genômica

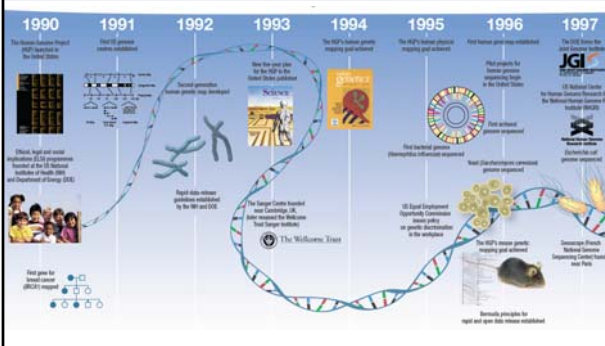


1900: Mendel's laws of inheritance are rediscovered.
 1927: Avery, McClelland, and McCarty demonstrate that DNA is the transforming principle.
 1953: Watson and Crick discover the structure of DNA.
 1966: Crick, Brenner, and Meselson demonstrate the triplet code.
 1970: Discovery of restriction enzymes.
 1973: First recombinant DNA molecule.
 1976: First recombinant DNA vaccine (against hepatitis B).
 1978: First transgenic animal (mouse).
 1980: First transgenic plant (tobacco).
 1982: First transgenic human (chimpanzee).
 1983: First transgenic human (baboon).
 1984: First transgenic human (chimpanzee).
 1985: First transgenic human (baboon).
 1986: First transgenic human (chimpanzee).
 1987: First transgenic human (baboon).
 1988: First transgenic human (chimpanzee).
 1989: First transgenic human (baboon).
 1990: First transgenic human (chimpanzee).
 1991: First transgenic human (baboon).
 1992: First transgenic human (chimpanzee).
 1993: First transgenic human (baboon).
 1994: First transgenic human (chimpanzee).
 1995: First transgenic human (baboon).
 1996: First transgenic human (chimpanzee).
 1997: First transgenic human (baboon).
 1998: First transgenic human (chimpanzee).
 1999: First transgenic human (baboon).
 2000: First transgenic human (chimpanzee).


 Faculdade de Medicina
 de Pernambuco

Grupo de Biogenética
 Dept. de Genética - IMB/USP

Acontecimentos na genética e genômica



1990: The International Human Genome Mapping Consortium is established.
 1991: The first human genome map is published.
 1992: The first human genome map is published.
 1993: The first human genome map is published.
 1994: The first human genome map is published.
 1995: The first human genome map is published.
 1996: The first human genome map is published.
 1997: The first human genome map is published.

Acontecimentos na genética e genómica

1997 The JGI Genome Project
1998 The Human Genome Project
1999 The Human Genome Project
2000 The Human Genome Project
2001 The Human Genome Project
2002 The Human Genome Project
2003 Finished version of human genome sequence completed

Ácido desoxirribonucléico - DNA

A estrutura do DNA

- DNA é o material genético
- Estrutura regular (difração de Raio-X)
- Fitas complementares de nucleotídeos
- Dupla hélice
- DNA associado a proteínas

A dupla hélice de DNA

A estrutura do DNA

- Nucleotídeo:
 - **Acúcar:** pentose, desoxirribose
 - **Fosfato**
 - **Bases nitrogenadas:**
 - Purina: Adenina guanina
 - Pirimidina: citosina timina
 - Pareamento
 - Ligadas por pontes de hidrogênio
- Ligações fosfodiester
- Quantidade de A = quantidade de T
- Quantidade de G = quantidade de C

Nucleotídeo – A unidade de construção do DNA

(a)

Adenosine 5'-monophosphate (AMP)

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Desoxirribose: o açúcar do DNA

Ribose

2-Deoxyribose

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Bases nitrogenadas

Purinas

Pirimidinas

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Ácido ribonucléico - RNA

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Principais Tipos de RNA

- RNA mensageiro (mRNA): contém a informação genética para a seqüência de aminoácidos das proteínas
- RNA transportador (tRNA): identifica e transporta os aminoácidos até o ribossomo
- RNA ribossômico (rRNA): constituinte dos ribossomos

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Ribonucleotídeo – O bloco de construção do RNA

(a)

Adenine

Ribose

Phosphate

Adenosine 5'-monophosphate (AMP)

Logo: Grupo de Biobioquímica, Depto. de Genética - FMBP/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

RNA: um ácido nucléico com estrutura química diferente do DNA

(a)

ribose: used in ribonucleic acid (RNA)

deoxyribose: used in deoxyribonucleic acid (DNA)

(b)

RNA structure showing bases: C (Cytosine), A (Adenine), U (Uracil), G (Guanine).

DNA x RNA

DNA	RNA
Desoxirribose	Ribose
A; G; C; T	A; G; C; U
Dupla fita	Fita simples; dobrada
Armazena informações	Transporta informações; funções estrutural e catalítica
Molécula grande	Molécula pequena

Dogma Central da Biologia Molecular

Replicação
Transcrição
Tradução
Transcrição Reversa
DNA
RNA
Proteína

Replicação

•É o processo na qual o DNA é duplicado, a partir da fita molde.

Regras básicas do processo de replicação do DNA

- Processo semiconservativo
- Início da replicação
 - Origem
- Movimento da forquilha de replicação
 - Unidirecional ou bidirecional
- Direção da replicação
 - 5' → 3'
- Semidescontinuidade da replicação

Enzimas que participam da replicação

- DNA Polimerase
- SSB (Single Strand Binding Protein)
- Primase
- Helicases (DnaB)
- Topoisomerases
- DNA ligase

Replicação

Síntese da cadeia principal
Síntese da cadeia secundária
Garfo de Duplicação cresce
DNA mais recentemente sintetizado
... e crescem os fragmentos de Okazaki

Transcrição

•É o processo pelo qual uma molécula de RNA é sintetizada a partir da informação contida na seqüência de nucleotídeos de uma molécula de DNA de fita dupla

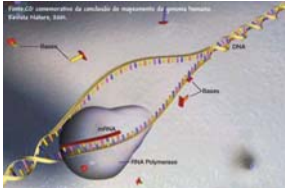


Figura 22.11 Ilustração da síntese de segmentos de genes transcritos. ©2004 Sinauer Associates, Inc.

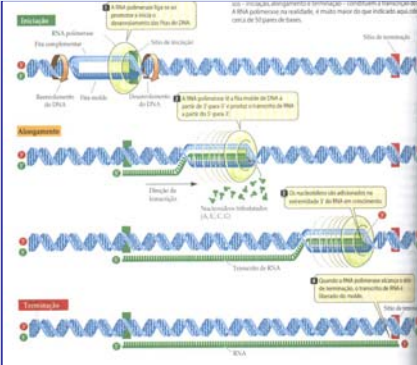
Características da transcrição

- RNA é imediatamente liberado do DNA
- Produção simultânea de muitas cópias a partir do mesmo gene

- Gene com 1.500pb
 - Transcrição = 50 segundos
 - 15 RNA-polimerase/gene
 - 1 hora = milhares de transcritos

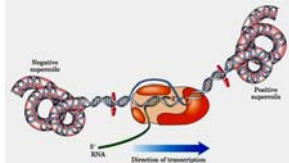


Transcrição

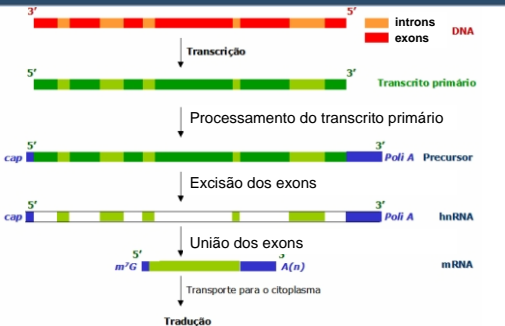


Transcrição

(5') CGCTATAGCGTTT(3') DNA fita codificadora
 (3') GCGATATCGCAA(5') DNA fita molde
 (5') CGCUAUAGCGUUU(3') RNA transcrito



Processamento do mRNA




Íntrons e Êxons

•**Íntron** – região não-codificante de um gene, transcrita na molécula de RNA, mas removida pelo processamento do RNA

- 80 a 10.000 nucleotídeos

•**Êxon** – Seguimento de um gene formado por uma seqüência de nucleotídeos que serão representados no RNA

•**Processamento**: processo de remoção de íntrons e junção de êxons no RNA mensageiro de eucariotos



Tradução

• **Processo na qual uma seqüência de mRNA é convertido em uma proteína.**

Este diagrama ilustra o processo de tradução. Um mRNA (em verde) está sendo lido por um ribossomo (em azul). Vários tRNA (em cores diferentes) carregados com aminoácidos (AA) estão se ligando ao mRNA através de suas bases complementares. O ribossomo facilita a formação de uma cadeia polipeptídica.

Tradução

Este diagrama mostra as etapas da tradução em três fases:

- Iniciação:** O ribossomo se liga ao mRNA.
- Alongamento:** O ribossomo se move ao longo do mRNA, adicionando aminoácidos à cadeia polipeptídica.
- Terminação:** O processo termina quando um códon de parada é alcançado, liberando a cadeia polipeptídica completa.

Código Genético

• **Conceito:**

São as instruções para sintetizar moléculas protéicas e estão inscritas em código nas moléculas de DNA dos organismos vivos.

A tabela mostra a correspondência entre os códons de mRNA (colunas) e os aminoácidos resultantes (linhas). O código é degenerado, pois muitos aminoácidos são codificados por múltiplos códons.

Código Genético

Características do código genético

- **Triplíce:** 3 bases = códon codificam um aa
- **Degenerado ou redundante:** um mesmo aminoácido pode ser codificado por vários códons diferentes
- **Não é ambíguo:** cada códon corresponde a somente um aminoácido
- **Com sentido:** Start códon a um stop códon;
- **Universal:** o mesmo para todos seres vivos
- **Utilização preferencial de codons:** *codon usage*

Código Genético

Trincas do Código Genético

- Cada trinca de nucleotídeo do DNA corresponde a um aa na proteína.
- A combinação das 4 letras genéticas TACG, 3 a 3, permite obter 64 trincas diferentes.
- 61 correspondem a aminoácidos e 3 correspondem a códons de terminação; **UAA, UAG e UGA**.

Código Genético

Esta tabela detalha o código genético, rotulando as letras da trinca de nucleotídeos: Primeira letra (U, C, A, G), Segunda letra (U, C, A, G) e Terceira letra (U, C, A, G). Ela mostra a correspondência entre cada trinca e o aminoácido resultante.

Tradução

(5') CGCTATAGCGTTT(3') **DNA fita codificadora**
 (3') GCGATATCGCAA(5') **DNA fita molde**
 (5') CGCUAUAGCGUUU(3') **RNA transcrito**

Arg-Tyr-Ser-Val **Proteína traduzida**

Resumo da tradução

The diagram illustrates the two-step process of protein synthesis. **Passo 1: Transcrição** shows a DNA double helix being transcribed by RNA polymerase into a single-stranded mRNA molecule. **Passo 2: Tradução** shows the mRNA being translated by a ribosome. The ribosome consists of two subunits (E3Am and E5Am) and a peptidyl transferase. tRNAs with anticodons (e.g., tRNA^{Arg}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Val}) carrying amino acids (e.g., Arg, Tyr, Ser, Val) pair with the mRNA codons (e.g., CGC, UAU, AGC, GUU) to form a growing polypeptide chain. Labels include: DNA dupla hélice, RNA polimerase, Nucleotídeos de RNA, E3Am, E5Am, Aminoácidos, Anticodon, Proteína, Cadeia polipeptídica, E3Am, E5Am, and Códons.

Os Genomas

Vírus → DNA ou RNA → Fita simples / Fita Dupla

Células → DNA e RNA → Procarióticas / Eucarióticas

Procarióticas → Cromossomo / Plasmídios

Eucarióticas → Cromossomo / Mitocôndrias / Cloroplastos

Os Genomas

Organismos Procarióticos: Bactérias

The diagram shows a bacterium containing a large circular **Cromossomo** (bacterial chromosome) and a smaller circular **Plasmídeo**. A microscopic view below shows the bacterial chromosome with a 1 μm scale bar.

Os Genomas

- **Cromossomo + Plasmídeos**
- **O genoma da E. coli**
 - 4.639 kb
 - 2.400 genes
 - 80% da molécula de DNA
 - 1.897 genes codificantes de proteínas

A circular map of the E. coli genome showing the 4,639,675 base pairs (BP) and various genes and plasmids.

Os Plasmídios

“Elemento genético, extra-cromossômico, capaz de replicar independente do cromossomo”

- Dupla fita de DNA; Circular
- 1 – 100(+) Kb; < 1/20 do cromossomo

Diferentes dos vírus

- Não causam danos às células
- Não são formas extracelulares

Diferentes do cromossomo

- Não contém genes essenciais

A diagram of a pRECFA plasmid showing its circular structure with various genes and regulatory elements: ori, amp^r, pRECFA, g01, g02, g03, g04, g05, g06, g07, g08, g09, g10, g11, g12, g13, g14, g15, g16, g17, g18, g19, g20, g21, g22, g23, g24, g25, g26, g27, g28, g29, g30, g31, g32, g33, g34, g35, g36, g37, g38, g39, g40, g41, g42, g43, g44, g45, g46, g47, g48, g49, g50, g51, g52, g53, g54, g55, g56, g57, g58, g59, g60, g61, g62, g63, g64, g65, g66, g67, g68, g69, g70, g71, g72, g73, g74, g75, g76, g77, g78, g79, g80, g81, g82, g83, g84, g85, g86, g87, g88, g89, g90, g91, g92, g93, g94, g95, g96, g97, g98, g99, g100.

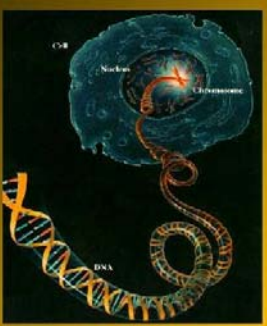
Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP


O Genoma dos Organismos Eucarióticos

Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

O Genoma Humano

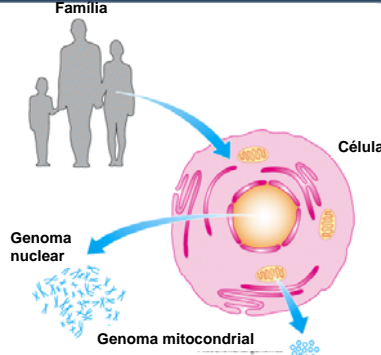
23 cromossomos
31.000 genes
3.000 milhões de bases





Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

O Genoma Humano



Família → **Célula**

Genoma nuclear (from nucleus) and **Genoma mitocondrial** (from mitochondria)

Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

O Genoma dos Eucarióticos

- O genoma nuclear:
 - *E. coli*: 2.400 genes; 1.897 codificam proteínas
 - *Saccharomyces cerevisiae*: 6.600 genes; 5.800 codificam proteínas Exemplos utilização
 - **Humanos**: 100.000 genes, codificam proteínas; genes > (+ introns)

Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

O Genoma dos Eucarióticos



- Genoma humano:
 - Éxons } → **70%**
 - Íntrons }
 - DNA repetitivo (não essencial ?)
 - 30%
 - Não codifica
 - Não transcreve
 - Repetidas muitas vezes

Logo: Grupo de Biobioinformática, Depto. de Genética - FMF/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP


Compactação do DNA em Cromossomos




- Genoma humano
 - 23 cromossomos - 1 metro
 - ½ DNA + ½ Proteínas
- Proteínas
 - RNA polimerase, DNA polimerase, reguladoras, Histonas
- Cromatina
 - DNA-Proteína → Compactação do DNA


Técnicas de Genética Molecular




- PCR
- Sequenciamento
- EST





Reação em Cadeia da Polimerase - PCR




- 1983: Kary Mullis
- 1985: 1º artigo
- Processo patenteado em 1989 por Cetus Corporation & Hoffman-LaRoche
- 1993: Nobel da Química





PCR




- Grande quantidade de DNA em pouco tempo.
- Baixo custo
- A amostra de DNA não necessita de estar altamente purificada
- PCR pode amplificar uma única molécula de DNA / RNA
- O produto do PCR pode ser digerido com enzimas de restrição, sequenciado ou clonado.

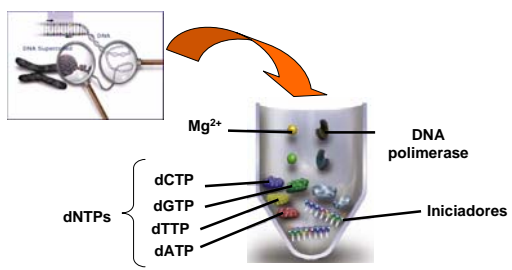



PCR


- É difícil exagerar o impacto da PCR na Biologia Molecular
- Simplificou e democratizou as técnicas de Biologia Molecular
- Possibilitou extender a Biologia Molecular para disciplinas nunca pensadas como Ecologia, Direito, Arqueologia, Economia, etc.




O que é necessário?




Em solução tampão de PCR, H2O ultra-filtrada (pH 7,0) e óleo mineral.


Termocicladores




Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Mecanismo

- Divide-se em 3 passos principais, que se repetem por 25 a 35 ciclos:
 - Desnaturação
 - Hibridação
 - Extensão
- A quantidade de DNA final segue uma função exponencial, onde:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$
 - N: número final de cadeias de DNA
 - N^o: número inicial de DNA molde (template)
 - n: número de repetições do ciclo

www.ibdm.fiocruz.br/helpdesk/microbiology/PCRcurso.pdf

Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Desnaturação

- Processo no qual ocorre a separação da fita dupla de DNA por meio da elevação da temperatura.

- As amostras são aquecidas a 94-96 °C durante um a vários minutos.

Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Hibridação

- A temperatura é reduzida a 55-65 °C durante alguns minutos.

- Os iniciadores hibridam com as seqüências complementares do Molde.

Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Extensão

- Eleva-se a temperatura a 72°C durante 2 minutos.

- O DNA polimerase atua junto dos iniciadores que hibridaram, começando a duplicação da cadeia e recrutando no meio os nucleótidos complementares disponíveis.

Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Sequenciamento

Reação de Sequenciamento

Molde
Taq polimerase
Primer
Deoxinucleotídeos
Dideoxinucleotídeos

Grupo de Biotecnologia
Departamento de Genética - FAMP/USP

Faculdade de Medicina
USP

Sequenciamento

- Método dideoxi conhecido também como de terminadores de cadeia ou de Sanger

Normal nucleotides:
Dideoxy Chain Terminators:

Polimerização de DNA

5' ATGCTT 3'

TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'

3'

Polimerização de DNA

5' ATGCTTC 3'

TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'

3'

Polimerização de DNA

5' ATGCTTC 3'

TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'

3'

Polimerização de DNA

5' ATGCTTC TGG 3'

TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'

3'

Polimerização de DNA

5' ATGCTTC TGGC 3'

TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'



3'

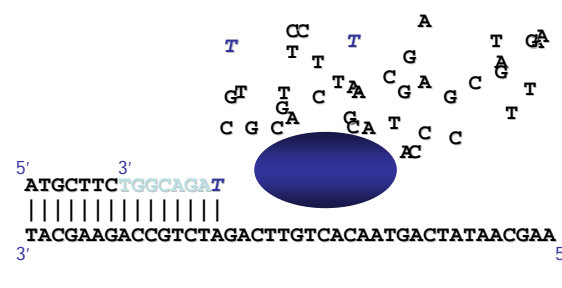
Polimerização de DNA



5' ATGCTTC TGGCAGAT 3'

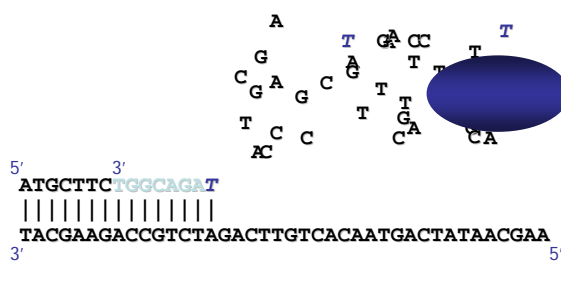
TACGAAGACCGTCTAGACTTGTGCACAATGACTATAACGAA 5'



3'

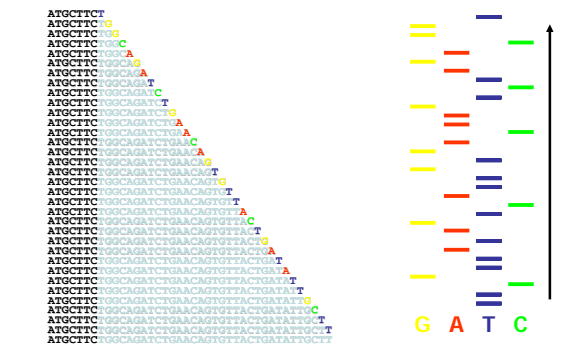

Polimerização de DNA





Polimerização de DNA





Sequenciamento de DNA





Gel de sequenciamento de DNA





Sequenciadores





Sequenciamento parcial de transcritos




O que são ESTs?

EST= Expressed Sequence Tag
(Etiquetas de Sequências Expressas)

5' 3' Intrão exon DNA

Transcrição

5' 3' Transcrito primário

Processamento do transcrito primário

Excisão dos exons

5' 3' Pull A IntronA

União dos exons

5' 3' m7G A(U)A

Transporte para o citoplasma

Tradução

Sequenciamento parcial de transcritos

cDNA

REGIÃO CODIFICADORA

ATG | STOP

EST 5' ——— AAAAA TTTTT EST 3'

EST 5' ——— AAAAA TTTTT EST 3'

EST 5' ——— AAAAA TTTTT EST 3'

Sequenciamento parcial de transcritos

“Cluster” de ESTs ou de “reads”

EST 5' AAAAA TTTTT EST 3'

EST 5' AAAAA TTTTT EST 3'

EST 5' AAAAA TTTTT EST 3'

EST 5' AAAAA TTTTT EST 3'

Sequência “consenso”

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Sergio Lifschitz.
- Ao comitê organizador do BSB e ao comitê do IWGD.
- A todos os presentes.