

# **Grupo Tchê Química**

## **Análise de Moléculas de DNA**

EDUARDO GOLDANI, ROCHELE FERNANDES

## **ÍNDICE**

<b>Introdução</b>	<b>03</b>
<b>Fundamentação teórica</b>	<b>05</b>
<b>Como as moléculas de DNA são analisadas</b>	<b>08</b>
<b>Fotos de eletroforese em gel</b>	<b>12</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>13</b>

## INTRODUÇÃO

Os ácidos nucléicos são as maiores moléculas encontradas no mundo vivo e responsáveis pelo controle dos processos vitais básicos em todos os seres. Daí os ácidos nucléicos serem considerados as “moléculas mestras da vida”. As enzimas regulam a atividade celular mediante o controle que exercem sobre as reações químicas que se processam no interior da célula. Acontece que todas as enzimas celulares são produzidas sob a “supervisão” de um ácido nucléico. Em outras palavras: os ácidos nucléicos comandam a síntese de enzimas de acordo com o tipo de “programação” que apresentam.

Assim, qualquer alteração na estrutura química de um determinado ácido nucléico pode provocar uma alteração na síntese da enzima por ele “supervisionada”. Isso, evidentemente, pode acarretar modificações, por vezes profundas, no comportamento bioquímico da enzima e, portanto, nas reações das quais ela participa, com comprometimento até da própria vida celular.

É bem interessante que o reconhecimento do DNA como material genético tenha sido um processo lento. Por volta de 1869, Friedrich Miescher, um médico suíço de 22 anos de idade, tinha isolado de células de pus obtidas de ataduras usadas na guerra franco-prussiana e de esperma de salmão uma substância macromolecular até então não identificada, à qual deu o nome de *nucleína*. Apesar de não saber a estrutura e a função da nucleína, apresentou seus achados para publicação. O editor que recebeu o trabalho teve dúvidas sobre alguns aspectos do relato e retardou por dois anos a publicação enquanto tentava repetir alguns dos aspectos mais questionáveis do trabalho de Miescher. Finalmente em 1871 foi publicado o relato de Miescher, mas fez pouco impacto imediato. Ele continuou seu cuidadoso trabalho até sua morte em 1895, reconhecendo (com o auxílio do seu aluno Altmann, em 1889) que a nucleína era de alto peso molecular e estava, de algum modo, associada a uma proteína básica, à qual deu o nome de *protomina*. Em 1895, o citologista pioneiro E.B. Wilson especulava que “a herança... pode ser afetada pela transmissão física de um determinado composto químico do pai para o filho”.

A nucleína foi mais tarde rebatizada como *ácido nucléico*, e os trabalhos sobre ele continuaram lentamente em diversos laboratórios. No início do século XX o bioquímico Kossel identificou as bases nitrogenadas constituintes do ácido nucléico, assim como seu açúcar de cinco carbonos, e o ácido fosfórico. O trabalho de Kossel e investigações

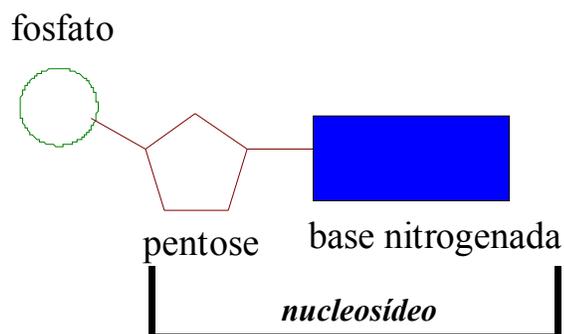
posteriores de Ascoli, Levine e Jones durante o primeiro quarto do século evidenciaram os dois tipos de ácido nucléico, o desoxirribonucléico e o ribonucléico. O desenvolvimento de técnicas de coloração específicas para DNA por Feulgen e Rossenbeck em 1924 permitiu a Feulgen demonstrar em 1937 que a maior parte do conteúdo de DNA de uma célula está localizada no núcleo. H.F. Judson escreveu um relato de leitura agradável sobre as descobertas em genética e biologia molecular envolvendo esta história do DNA.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Em 1953, James Watson e Francis Crick propuseram um modelo molecular para o DNA após cerca de um ano e meio de trabalho conjunto na Universidade de Cambridge. Seu modelo foi tão completamente substanciado por investigações subseqüentes que esta dupla repartiu um prêmio Nobel em 1962 com Maurice Wilkins.

Estes cientistas reconheceram que o DNA deveria existir como uma dupla hélice. Esta estrutura explica ambos aspectos importantes, ou seja, a replicação e a transmissão da informação genética. A elucidação da estrutura do DNA é considerada como o início do desenvolvimento da genética moderna. Com isso, a estrutura e função do gene podem ser compreendidas em nível molecular. A informação para o desenvolvimento e funções específicas das células e tecidos estão ancoradas nos genes. Um gene é uma porção de informação genética definida de acordo com a estrutura e função. Trata-se de uma complexa cadeia longa, o ácido desoxirribonucléico (DNA).

Nos seres vivos, existem dois tipos básicos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucléico, representado pela sigla DNA ou ADN, e o ácido ribonucléico, representado pela sigla RNA ou ARN. Os ácidos nucleicos são moléculas gigantes constituídas por unidades menores denominadas *nucleotídeos*. Cada nucleotídeo, por sua vez, é constituído de uma molécula de ácido fosfórico (fosfato) ligada a uma pentose (monossacarídeo com cinco átomos de carbono); a pentose se acha ligada a uma base nitrogenada, conforme esquema abaixo.

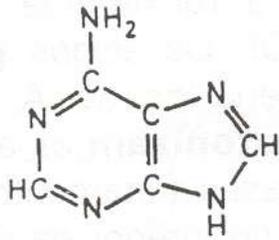


\* Dá-se o nome de nucleosídeo ao conjunto formado por uma base nitrogenada e a pentose a ela associada.

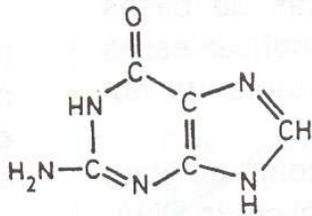
A pentose, nos ácidos nucleicos, pode ser de dois tipos: ribose e desoxirribose. Já as bases nitrogenadas são classificadas em duas categorias: púricas e pirimídicas.

***Bases púricas***

Adenina

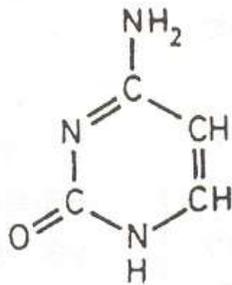


Guanina

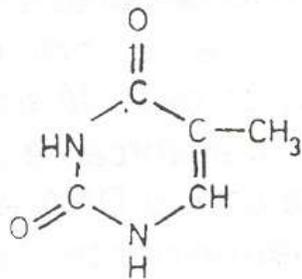


***Bases pirimídicas***

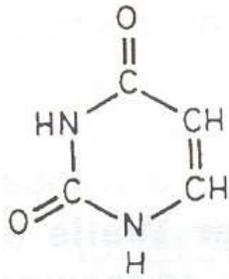
Citosina



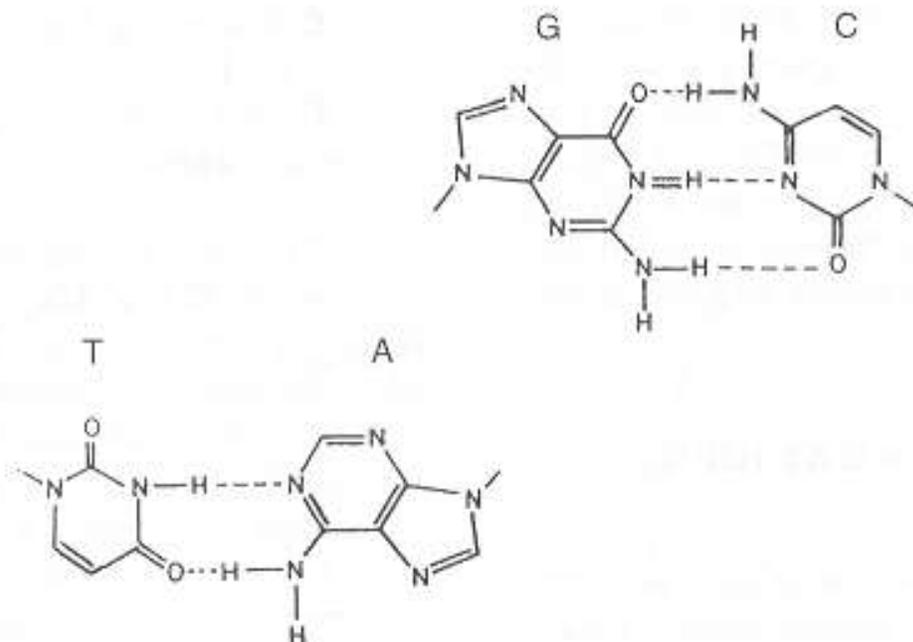
Timina



## Uracila



No DNA, a pentose é sempre a desoxirribose e as bases nitrogenadas que podem ser encontradas são: adenina, guanina, citosina e uracila. Portanto, no DNA não existe uracila e no RNA não existe timina. Na dupla-hélice os nucleotídeos de um mesmo filamento ficam unidos através de uma ligação que se estabelece entre a pentose de um nucleotídeo e o fosfato do nucleotídeo vizinho. E os filamentos, também chamados de fitas, estão ligados por meio de pontes de hidrogênio situadas entre uma base púrica e uma base pirimídica. No DNA, a base púrica adenina (A) liga-se sempre à base pirimídica timina (T); e a base púrica guanina (G) liga-se sempre à base pirimídica citosina (C), conforme os esquemas abaixo:



## COMO AS MOLÉCULAS DE DNA SÃO ANALISADAS

Desde que se soube que a informação genética era codificada na seqüência de nucleotídeos de DNA, os cientistas desejaram ser capazes de olhar diretamente o DNA e determinar sua seqüência de nucleotídeos a fim de descobrir como os genes funcionam em nível molecular. Antes da revolução na tecnologia do DNA, isto era quase impossível. Avanços enormes no conhecimento da estrutura e regulação gênica foram feitos por meio de métodos genéticos indiretos em organismos – tais como a bactéria *E. coli* e *Drosophila*, porém os genomas grandes e complexos dos mamíferos eram um território bastante inexplorado. Naquela época, a tarefa de isolar um único gene a partir de um grande cromossomo parecia inatingível. Diferente de uma proteína, um gene não existe como uma entidade discreta nas células, mas como uma parte de uma molécula muito maior de DNA. Embora o DNA possa ser quebrado em pequenos pedaços pela clivagem mecânica, o fragmento contendo um gene em particular ainda será somente um entre centenas de milhares ou mais de fragmentos de DNA que são obtidos a partir do genoma de um mamífero por esses métodos. E em uma amostra contendo diversas cópias idênticas da mesma grande molécula de DNA, cada molécula seria quebrada de modo diferente pela clivagem, produzindo um conjunto confuso de fragmentos ao acaso. Como, então, poderia algum gene ser isolado e purificado?

A solução para este problema surgiu com a descoberta de uma classe de enzimas bacterianas conhecidas como *nucleases de restrição*. Uma nuclease catalisa a hidrólise de uma ligação fosfodiéster em um ácido nucléico. Mas estas enzimas têm uma propriedade que é distinta de outras nucleases: elas somente cortam DNA em sítios específicos, determinados por uma curta seqüência de nucleotídeos. Portanto, as nucleases de restrição podem ser usadas para reproduzir um conjunto de fragmentos específicos do DNA de um genoma.

### *Endonucleases de restrição cortam moléculas de DNA em sítios específicos*

Assim como a maioria das ferramentas da tecnologia de DNA, as nucleases de restrição foram primeiramente descobertas por pesquisadores estudando um problema

biólogo especializado que despertou sua atenção. Foi observado que determinadas bactérias sempre degradavam DNA de outras bactérias que eram experimentalmente introduzidas dentro delas pelos métodos utilizados pelos cientistas naquela época. Uma busca da causa desta degradação revelou uma nova classe de nucleases presentes dentro da bactéria hospedeira. A característica mais importante destas nucleases é que elas clivam DNA somente em determinadas seqüências de nucleotídeos. O DNA da própria bactéria é protegido da clivagem por meio das modificações químicas destas mesmas seqüências. Uma vez que estas enzimas restringem a transferência de DNA entre determinadas estirpes de bactérias, o nome nuclease de restrição foi dado a elas. Distintas espécies de bactérias contêm distintas nucleases de restrição, cada uma cortando em uma seqüência diferente e específica de nucleotídeos.

As nucleases de restrição usadas na tecnologia de DNA vêm principalmente de bactérias, e uma vez que as seqüências-alvo são curtas – geralmente 4-8 pares de nucleotídeos – elas ocorrerão, puramente por acaso, em qualquer molécula longa de DNA. Assim, elas podem ser usadas para analisar DNA de qualquer origem. Nucleases de restrição são atualmente um insumo importante na tecnologia de DNA e são tipicamente encomendadas por correspondência; o catálogo de um fornecedor lista atualmente mais de 100 destas enzimas, cada uma capaz de cortar uma seqüência distinta de DNA.

Sua capacidade de cortar o DNA em seqüências específicas torna as nucleases de restrição cruciais para todos os aspectos da moderna tecnologia do DNA. A razão para sua utilidade é que uma determinada nuclease de restrição sempre cortará uma determinada molécula de DNA nos mesmos sítios. Por exemplo, para uma amostra de DNA de tecido humano, o tratamento com uma determinada nuclease de restrição sempre produzirá o mesmo conjunto de fragmentos de DNA. As seqüências-alvo das nucleases de restrição variam em relação à freqüência com a qual elas ocorrem no DNA. O tamanho médio dos fragmentos de DNA produzidos pelas distintas nucleases de restrição pode então ser bastante diferente. Isto possibilita a clivagem de longas moléculas de DNA em fragmentos com tamanhos que possam ser adequados para cada aplicação em particular.

### *Eletrforese em gel separa fragmentos de DNA de diferentes tamanhos*

Depois que uma grande molécula de DNA é clivada em pequenos pedaços usando uma nuclease de restrição, fragmentos de DNA precisam ser separados uns dos outros. Isto é normalmente obtido usando a eletrforese em gel, a qual separa os fragmentos em função dos seus comprimentos. A mistura de fragmentos de DNA é aplicada no extremo de um bloco de agarose ou poliacrilamida (o gel), o qual contém uma rede microscópica de poros. Uma voltagem é então aplicada ao longo do bloco. Uma vez que o DNA é carregado negativamente, os fragmentos migram em direção ao eletrodo positivo; os fragmentos maiores migram mais lentamente porque o seu avanço é mais impedido pela matriz de agarose. No decurso de várias horas, os fragmentos de DNA ficam espalhados ao longo do gel de acordo com o tamanho, formando uma escada de bandas discretas, cada uma composta de uma coleção de moléculas de DNA de comprimento idêntico. Isolar um determinado fragmento é freqüentemente uma questão simples: uma pequena parte do gel contendo a banda é facilmente cortada usando um bisturi ou uma lâmina.

As bandas de DNA em géis de agarose e poliacrilamida são invisíveis, a menos que o DNA seja marcado ou corado de algum modo. Um método sensível de colorir DNA é expô-lo a um corante que fluoresce sob luz ultravioleta quando ele é ligado ao DNA. Um método de detecção ainda mais sensível envolve a incorporação de radioisótopos nas moléculas de DNA antes da eletrforese;  $^{32}\text{P}$  é freqüentemente usado, uma vez que ele pode ser incorporado nos fosfatos do DNA e emite uma partícula energética  $\beta$  que é facilmente detectada pela técnica de auto-radiografia.

Uma das primeiras aplicações da clivagem usando nucleases de restrição seguida pela separação de fragmentos individuais de DNA foi a construção de mapas físicos de pequenas regiões de DNA. Um mapa físico de DNA é aquele que caracteriza um pedaço de DNA pela diagramação da posição de diversas marcas presentes ao longo dele. Os sítios da clivagem por nucleases de restrição estão entre os tipos de marcas mais úteis. Pela comparação dos tamanhos dos fragmentos de DNA produzidos por uma região particular de DNA após o tratamento com distintas combinações de nucleases de restrição, um mapa físico da região pode ser construído mostrando a localização de cada sítio de corte. Este mapa é conhecido como um mapa de restrição.

Uma vez que um mapa de restrição depende da seqüência de nucleotídeos do DNA correspondente, ele pode revelar diferenças mesmo entre DNAs bastante parecidos. Entretanto, o mapa físico final de um DNA é sua seqüência completa de nucleotídeos.

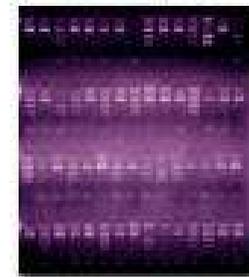
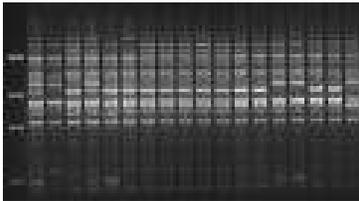
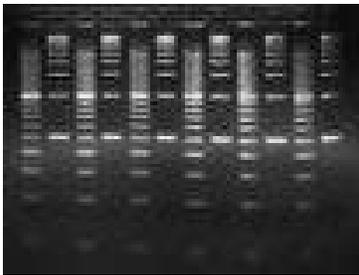
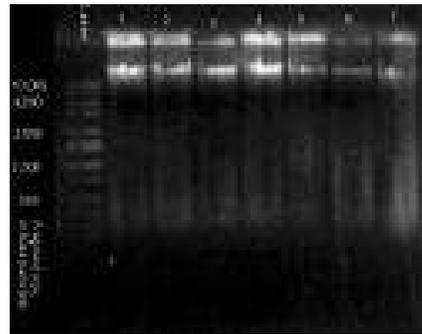
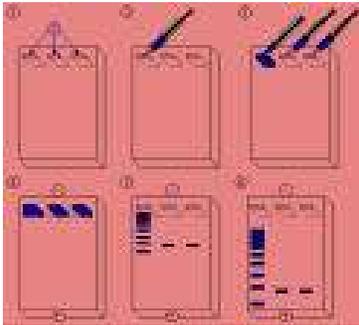
***As Seqüências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA podem ser determinadas***

No final dos anos 70, foram desenvolvidos métodos que permitem que a seqüência de nucleotídeos de qualquer fragmento de DNA purificado seja determinada de forma simples e rápida. Diversos esquemas para seqüenciamento têm sido desenvolvidos, porém os mais usados empregam a DNA-polimerase para gerar cópias parciais dos fragmentos de DNA para serem seqüenciados. Estas reações de replicação de DNA são conduzidas *in vitro* sob condições nas quais é assegurado que as novas fitas de DNA terminam quando um dado nucleotídeo (A, G, C ou T) é alcançado. Este método produz uma coleção de cópias distintas de DNA que termina em cada uma das posições no DNA original, e assim difere no comprimento por um único nucleotídeo. Estas cópias de DNA podem ser separadas com base em seu comprimento pela eletroforese em gel, e a seqüência de nucleotídeos do DNA original pode ser determinado a partir da ordem destes DNAs no gel.

As seqüências completas de DNA de dezenas de milhares de genes, diversos genomas completos de bactérias, e o genoma do eucarioto simples *S. cerevisiae* (levedura de brotamento) já foram determinadas. O volume de informação da seqüência de DNA contido em uma base computadorizada de DNA é atualmente tão grande (centenas de milhões de nucleotídeos) que programas altamente sofisticados são necessários para organizá-la e analisá-la.

À medida que as técnicas de seqüenciamento de DNA melhoraram, os cientistas começaram a determinar a seqüência de nucleotídeos do genoma humano inteiro. Isto representa um comprimento total de seqüência de DNA de aproximadamente  $3 \times 10^9$  nucleotídeos. Uma vez que esta seqüência determina todas as moléculas de RNA e proteínas possíveis que são usadas para construir o corpo humano, sua finalização nos fornecerá um “dicionário do ser humano”, o qual irá agilizar os futuros estudos de células e tecidos humanos.

# FOTOS DE ELETROFORESE EM GEL



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

PAULINO, Wilson Roberto. *Biologia Atual*. São Paulo, Ática, 1998, v.1.

SCHRANK, Augusto et al. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto, 1996.

BURNS, George W e BOTTINO, Paul J. *Genética*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

KOOLMAN, Jan e RÖHM, Klaus-Heinrich. *Color Atlas of Biochemistry*. New York, Thieme Stuttgart, 1996.

PASSARGE, Eberhard. *Color Atlas of Genetics*. New York, Thieme Stuttgart, 1995.