

Os Genes São DNA

1

1.1 Introdução

1.2 O DNA É o Material Genético das Bactérias

- A transformação bacteriana forneceu a primeira prova de que o DNA é o material genético das bactérias. As propriedades genéticas podem ser transferidas de uma linhagem bacteriana para outra, extraindo-se o DNA da primeira linhagem e adicionando-o à segunda.

1.3 O DNA É o Material Genético dos Vírus

- A infecção por fagos provou que o DNA é o material genético dos vírus. Quando o DNA e as proteínas de bacteriófagos são marcados com diferentes isótopos radioativos, apenas o DNA é transmitido para a progênie de fagos produzida pelas bactérias infectadas.

1.4 O DNA É o Material Genético das Células Animais

- O DNA pode ser utilizado para introduzir novas características genéticas em células animais ou em animais inteiros.
- Em alguns vírus, o material genético é RNA.

1.5 As Cadeias Polinucleotídicas Possuem Bases Nitrogenadas Ligadas a um Esqueleto de Açúcar-Fosfato

- Um nucleosídeo consiste em uma base de purina ou pirimidina ligada à posição 1 de um açúcar do tipo pentose.
- As posições no anel de ribose são designadas por um apóstrofo (') para distingui-las.
- A diferença entre o DNA e o RNA está no grupamento da posição 2' do açúcar. O DNA possui um açúcar do tipo desoxirribose (2'-H); o RNA tem um açúcar do tipo ribose (2'-OH).
- Um nucleotídeo consiste em um nucleosídeo ligado ao grupamento fosfato tanto na posição 5' ou 3' da (desoxi)ribose.
- Resíduos sucessivos de (desoxi)ribose de uma cadeia polinucleotídica são ligados por um grupamento fosfato entre a posição 3' de um açúcar e a posição 5' do açúcar adjacente.
- Uma das extremidades da cadeia (convencionalmente, a esquerda) possui uma extremidade 5' livre, e a outra, uma extremidade 3' livre.
- O DNA contém as quatro bases: adenina, guanina, citosina e timina; o RNA possui uracila, ao invés de timina.

1.6 O DNA É uma Dupla Hélice

- A forma B do DNA é uma dupla hélice consistindo em duas cadeias polinucleotídicas de sentido antiparalelo.
- As bases nitrogenadas de cada cadeia são anéis planos de purinas ou pirimidinas que se projetam para o interior da

dupla hélice e pareiam umas com as outras por meio de pontes de hidrogênio, formando somente os pares A-T ou G-C.

- O diâmetro da dupla hélice é de 20 Å, havendo uma volta completa a cada 34 Å, com cada volta composta por dez pares de bases.
- A dupla hélice forma um sulco maior (largo) e outro menor (estreito).

1.7 A Replicação do DNA É Semiconservativa

- O experimento de Meselson-Stahl empregou marcação por densidade para provar que uma única cadeia polinucleotídica é a unidade de DNA que é conservada durante a replicação.
- Cada fita de um duplex de DNA atua como molde na síntese de uma fita filha.
- As seqüências das fitas filhas são determinadas pelo pareamento de bases complementares com as fitas parentais separadas.

1.8 As Fitas de DNA São Separadas na Forquilha de Replicação

- A replicação do DNA é realizada por um complexo enzimático que separa as fitas parentais e sintetiza as fitas filhas.
- A forquilha de replicação é o ponto onde as fitas parentais são separadas.
- As enzimas que sintetizam DNA são denominadas DNA polimerases; as enzimas que sintetizam RNA são denominadas RNA polimerases.
- Nucleases são enzimas que degradam ácidos nucléicos; estas incluem DNAases e RNAases e podem ser divididas em endonucleases e exonucleases.

1.9 A Informação Genética Pode Ser Fornecida pelo DNA ou RNA

- Os genes celulares são de DNA, embora vírus e viróides possam apresentar genomas de RNA.
- O DNA é convertido em RNA pela transcrição, e o RNA pode ser convertido em DNA pela transcrição reversa.
- A tradução do RNA em proteína é unidirecional.

1.10 Os Ácidos Nucléicos Hibridizam-se por Pareamento de Bases

- O aquecimento promove a separação das duas fitas de um DNA duplex.
- A T_m é o ponto médio da faixa de temperatura de desnaturação.
- Fitas simples complementares podem renaturar quando a temperatura é reduzida.

Continua na próxima página

- A desnaturação e a renaturação/hibridização podem ocorrer entre combinações de DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA e podem ser intermoleculares ou intramoleculares.
- A capacidade de duas preparações de ácidos nucleicos de fita simples hibridizarem é uma medida de suas complementaridades.

1.11 As Mutações Modificam a Seqüência do DNA

- Todas as mutações consistem em modificações na seqüência do DNA.
- Mutações podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidas por agentes mutagênicos.

1.12 As Mutações Podem Afetar Pares de Bases Únicos ou Seqüências mais Longas

- Uma mutação pontual altera um único par de bases.
- Mutações pontuais podem ser causadas pela conversão química de uma base em outra, ou por erros que ocorrem durante a replicação.
- Uma transição substitui um par de bases G-C por um par de bases A-T, ou vice-versa.
- Uma transversão substitui uma purina por uma pirimidina, tal como a modificação A-T em T-A.
- Inserções são o tipo mais comum de mutação e resultam da movimentação de elementos de transposição.

1.13 Os Efeitos das Mutações Podem Ser Revertidos

- As mutações diretas inativam um gene, e as mutações reversas (ou revertentes) reverterem seus efeitos.
- As inserções podem ser revertidas pela deleção do material inserido, e as deleções não são revertidas.
- A supressão ocorre quando uma mutação em um segundo gene anula o efeito da mutação do primeiro gene.

1.14 As Mutações São Concentradas em Hotspots

- A freqüência de uma mutação em qualquer par de bases é determinada por uma flutuação estatística, exceto nos *hotspots* (“sítios quentes”), onde a freqüência é aumentada em pelo menos uma ordem de grandeza.

1.15 Muitos Hotspots Resultam de Bases Modificadas

- Uma causa comum de ocorrência de *hotspots* é a presença da base modificada 5-metilcitosina, que é espontaneamente desaminada, originando timina.

1.16 Alguns Agentes Hereditários São extremamente Pequenos

- Alguns agentes hereditários muito pequenos não codificam proteínas e consistem em RNA ou proteína com propriedades hereditárias.

1.17 Resumo

1.1 Introdução

A natureza hereditária de todo o organismo vivo é definida por seu **genoma**, que consiste em uma longa seqüência de **ácido nucléico**, que fornece a *informação* necessária para construir o organismo. Utilizamos o termo “informação”, porque o genoma por si só não desempenha qualquer papel ativo na construção do organismo: na realidade, é a seqüência das subunidades individuais (bases) do ácido nucléico que determina as características hereditárias. Por meio de uma complexa série de interações, essa seqüência é utilizada para produzir todas as proteínas do organismo no momento e local apropriados. As proteínas fazem parte da estrutura do organismo, ou apresentam a capacidade de construir as estruturas, ou ainda realizam as reações metabólicas necessárias à vida.

O genoma contém o conjunto completo da informação hereditária para qualquer organismo. Fisicamente, o genoma pode ser dividido em algumas moléculas diferentes de ácidos nucléicos. Funcionalmente este pode ser dividido em **genes**. Cada gene corresponde a uma seqüência no interior do ácido nucléico, a qual representa uma única proteína. Cada uma das diferentes moléculas de ácidos

nucléicos que compreendem o genoma pode conter um grande número de genes. Genomas de seres vivos podem conter de menos de 500 genes (no caso de um micoplasma, um tipo de bactéria) até mais de 25.000, em um ser humano.

Neste capítulo, analisaremos as propriedades dos genes no que se refere à sua construção molecular básica. A **FIGURA 1.1** resume os estágios de transição a partir do conceito histórico do gene até a definição moderna do genoma.

Um genoma consiste no conjunto completo de cromossomos de qualquer organismo em particular. Este compreende, portanto, uma série de moléculas de DNA (uma para cada cromossomo), cada uma contendo muitos genes. A definição final de um genoma está na determinação da seqüência de DNA de cada cromossomo.

A primeira definição de gene como uma unidade funcional se seguiu à descoberta de que genes individuais eram responsáveis pela produção de proteínas específicas. A diferença na natureza química entre o DNA do gene e o seu produto protéico levou ao conceito de que um gene *codifica* uma proteína. Isso, por sua vez, levou à descoberta de um aparato complexo que permite à seqüência de DNA de um gene originar a seqüência de aminoácidos de uma proteína.

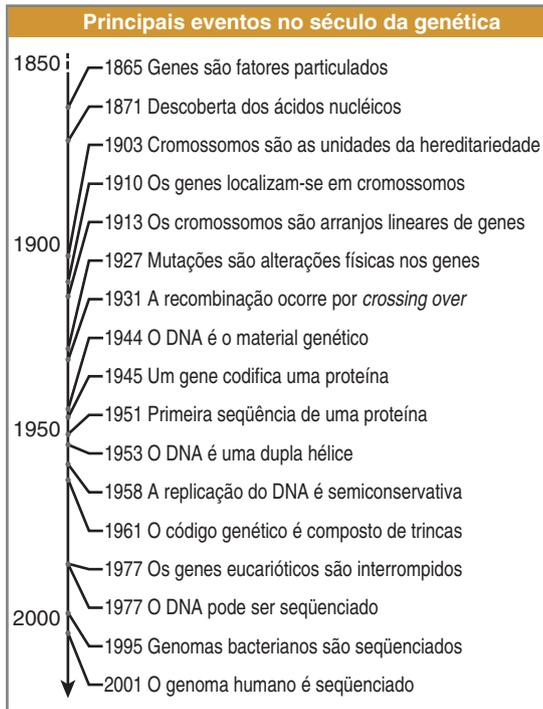


FIGURA 1.1 Uma breve história da genética.

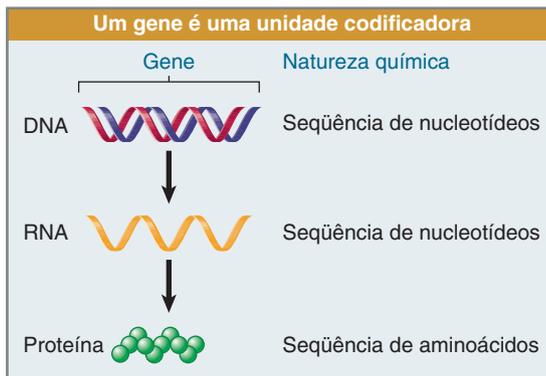


FIGURA 1.2 Um gene codifica um RNA, o qual pode codificar uma proteína.

A compreensão acerca do processo pelo qual um gene é expresso nos permite fazer uma definição mais rigorosa de sua natureza. A FIGURA 1.2 apresenta o tema base deste livro. Um gene é uma seqüência de DNA que produz outro ácido nucléico, o RNA. O DNA possui duas fitas de ácido nucléico, e o RNA possui apenas uma fita. A seqüência do RNA é determinada pela seqüência do DNA. (De fato, ela é idêntica a uma das fitas de DNA.) Em muitos, mas não em todos, casos, o RNA é utilizado para a dirigir a produção de uma proteína. Assim, um gene é uma seqüência de DNA que codifica um RNA; em genes que codificam proteínas, o RNA, por sua vez, codifica a proteína.

A partir da demonstração de que um gene consiste em DNA, e que o cromossomo consiste em um longo segmento de DNA representando muitos genes, podemos passar para a organização geral do genoma no que se refere à sua seqüência de DNA. No Capítulo 3 – O Gene Interrompido –, abordaremos em maior detalhe a organização do gene e a sua representação na forma de proteínas. No Capítulo 4 – O Conteúdo do Genoma –, consideraremos o número total de genes e, no Capítulo 6 – Agrupamentos e Repetições –, discutiremos outros componentes do genoma e a manutenção de sua organização.

1.2 O DNA É o Material Genético das Bactérias

Conceitos Essenciais

- A transformação bacteriana forneceu a primeira prova de que o DNA é o material genético das bactérias. As propriedades genéticas podem ser transferidas de uma linhagem bacteriana para outra, extraindo-se o DNA da primeira linhagem e adicionando-o à segunda.

A idéia de que o material genético é um ácido nucléico tem suas raízes na descoberta da **transformação**, em 1928. A bactéria *pneumococo* mata camundongos causando-lhes pneumonia. A virulência desta bactéria é determinada por seu *polissacarídeo capsular*. Esse é um componente de superfície que permite à bactéria escapar da destruição pelo hospedeiro. Muitos tipos (I, II e III) de *pneumococo* apresentam diferentes polissacarídeos capsulares. Estes possuem uma aparência lisa (S, do inglês *smooth*). Cada um dos tipos lisos de *pneumococo* pode originar variantes que não produzem o polissacarídeo capsular. Essas bactérias têm uma superfície rugosa (R, do inglês *rough*) (consistindo no material que se encontra abaixo do polissacarídeo capsular). Estas são **avirulentas**. Não são capazes de matar os camundongos, pois a ausência do polissacarídeo permite ao animal destruí-las.

Quando bactérias lisas são mortas por tratamento térmico, elas perdem a capacidade de causar danos ao animal. No entanto, bactérias S mortas pelo calor misturadas a bactérias variantes R ineficazes produzem um efeito bastante diferente daquele obtido por cada uma isoladamente. A FIGURA 1.3 mostra que quando estas são injetadas simultaneamente em um animal, o camundongo morre em decorrência de uma infecção *pneumocócica*. Bactérias virulentas S podem ser recuperadas do camundongo morto.

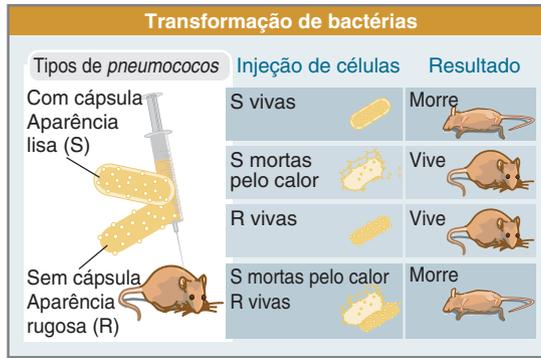


FIGURA 1.3 Bactérias do tipo S mortas pelo calor, ou bactérias vivas do tipo R não matam os camundongos, mas a injeção simultânea de ambas pode matar os camundongos tão eficientemente quanto células do tipo S vivas.

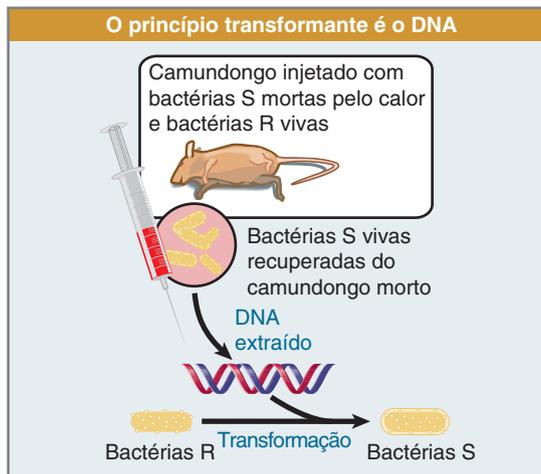


FIGURA 1.4 O DNA das bactérias do tipo S pode transformar as bactérias do tipo R em bactérias do mesmo tipo S.

Neste experimento, as bactérias S mortas eram do tipo III. As bactérias R vivas eram derivadas do tipo II. As bactérias virulentas recuperadas da infecção mista apresentavam um envoltório liso do tipo III. Assim, alguma propriedade das bactérias S do tipo III mortas podia *transformar* as bactérias R vivas, de tal forma que eram capazes de sintetizar o polissacarídeo capsular do tipo III, tornando-se virulentas.

A **FIGURA 1.4** ilustra a identificação do componente das bactérias mortas que é responsável pela transformação. Este foi denominado **princípio transformante**. Ele foi purificado por meio do desenvolvimento de um sistema livre de células, no qual extratos das bactérias S mortas podiam ser adicionados às bactérias R vivas antes da injeção no

animal. A purificação do princípio transformante, em 1944, revelou que se tratava do **ácido desoxirribonucléico (DNA)**.

1.3 O DNA É o Material Genético dos Vírus

Conceitos Essenciais

- A infecção por fagos provou que o DNA é o material genético dos vírus. Quando o DNA e as proteínas de bacteriófagos são marcados com diferentes isótopos radioativos, apenas o DNA é transmitido para a progênie de fagos produzida pelas bactérias infectadas.

A partir da demonstração de que o DNA era o material genético das bactérias, o próximo passo foi demonstrar que o DNA era o material genético de um sistema bastante diferente. O fago T2 é um vírus que infecta a bactéria *Escherichia coli*. Quando partículas do fago (vírus) são adicionadas às bactérias, estas as adsorvem em sua superfície externa, parte do material penetra na bactéria e, após cerca de 20 minutos, cada bactéria se rompe (sofre lise), liberando um grande número da progênie de fagos.

A **FIGURA 1.5** ilustra os resultados de um experimento realizado em 1952, no qual bactérias foram infectadas com fagos T2, os quais haviam sido marcados radioativamente *ou* em seu DNA (com ^{32}P), *ou* em seu componente protéico (com ^{35}S). As bactérias infectadas foram agitadas em um homogeneizador, e duas frações foram separadas por centrifugação. Uma fração continha os capsídeos vazios dos fagos que foram liberados da superfície das bactérias; a outra consistia nas próprias bactérias infectadas.

A maior parte da marcação de ^{32}P estava presente nas bactérias infectadas. A progênie de partículas virais produzidas pela infecção continha ~30% da marcação original de ^{32}P . A progênie recebeu muito pouco – menos de 1% – da proteína contida na população original de fagos. Os capsídeos virais consistem em proteínas e, portanto, apresentavam a marcação com ^{35}S radioativo. Portanto, este experimento mostrou diretamente que apenas o DNA dos fagos parentais entra nas bactérias e então se torna parte da progênie viral, o que corresponde exatamente ao padrão de hereditariedade esperado para o material genético.

Um fago se reproduz comandando a maquinaria de uma célula hospedeira infectada, no sentido de que esta produza mais cópias suas. O fago pos-

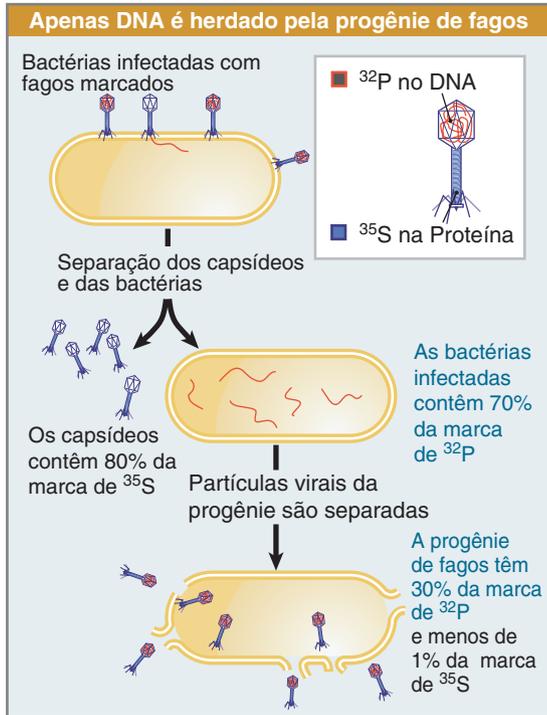


FIGURA 1.5 O material genético do fago T2 é DNA.

sui um material genético cujo comportamento é análogo ao apresentado por genomas celulares: seus traços são reproduzidos de forma fiel e são submetidos às mesmas regras que governam a hereditariedade. O caso do T2 reforça a conclusão geral de que o DNA é o material genético, sendo este parte do genoma de uma célula ou de um vírus.

1.4 O DNA É o Material Genético das Células Animais

Conceitos Essenciais

- O DNA pode ser utilizado para introduzir novas características genéticas em células animais ou em animais inteiros.
- Em alguns vírus, o material genético é RNA.

Quando DNA é adicionado a populações de células eucarióticas em cultura, o ácido nucléico entra na célula e, em algumas delas, resulta na produção de novas proteínas. Quando um DNA purificado é usado, sua incorporação leva à produção de uma proteína em particular. A FIGURA 1.6 representa um dos sistemas-padrão.

Apesar de, por razões históricas, esses experimentos serem denominados **transfecção**, quando

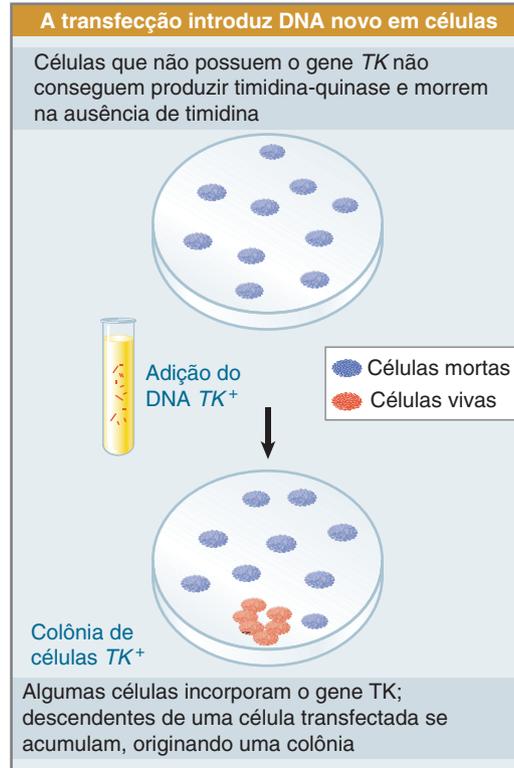


FIGURA 1.6 Células eucarióticas podem adquirir um novo fenótipo como resultado de transfecção pela adição de DNA.

realizados em células eucarióticas, são um equivalente direto da transformação bacteriana. O DNA que é introduzido na célula receptora se torna parte do seu material genético e é herdado da mesma forma que qualquer outra parte. Sua expressão confere um novo traço às células (síntese de timidina-quinase, no exemplo da Figura 1.6). Inicialmente, esses experimentos foram bem-sucedidos apenas com células individuais, adaptadas ao crescimento em meio de cultura. Desde então, no entanto, DNA foi introduzido em óvulos de camundongos por microinjeção, tornando-se uma parte estável do material genético do camundongo.

Tais experimentos mostram diretamente que além do DNA ser o material genético de eucariotos, *ele pode ser transferido entre diferentes espécies e ainda permanecer funcional*.

O material genético de todos os organismos conhecidos e de muitos vírus é o DNA. Entretanto, alguns vírus usam um tipo alternativo de ácido nucléico, o *ácido ribonucleico (RNA)*, como material genético. Assim, o princípio geral em relação à natureza do material genético é tal que este é sempre um ácido nucléico, o DNA, exceto nos casos dos vírus de RNA.

1.5 As Cadeias Polinucleotídicas Possuem Bases Nitrogenadas Ligadas a um Esqueleto de Açúcar-Fosfato

Conceitos Essenciais

- Um nucleosídeo consiste em uma base de purina ou pirimidina ligada à posição 1 de um açúcar do tipo pentose.
- As posições no anel de ribose são designadas por um apóstrofo (') para distingui-las.
- A diferença entre o DNA e o RNA está no grupamento da posição 2' do açúcar. O DNA possui um açúcar do tipo desoxirribose (2'-H); o RNA tem um açúcar do tipo ribose (2'-OH).
- Um nucleotídeo consiste em um nucleosídeo ligado ao grupamento fosfato tanto na posição 5' ou 3' da (desoxi)ribose.
- Resíduos sucessivos de (desoxi)ribose de uma cadeia polinucleotídica são ligados por um grupamento fosfato entre a posição 3' de um açúcar e a posição 5' do açúcar adjacente.
- Uma das extremidades da cadeia (convencionalmente, a esquerda) possui uma extremidade 5' livre, e a outra, uma extremidade 3' livre.
- O DNA contém as quatro bases: adenina, guanina, citosina e timina; o RNA possui uracila, ao invés de timina.

O bloco constituinte básico dos ácidos nucleicos é o nucleotídeo, o qual possui três componentes:

- Uma base nitrogenada,
- um açúcar, e
- um fosfato.

A base nitrogenada é um anel de purina ou pirimidina. A base é unida à posição 1 de um açúcar do tipo pentose por uma ligação glicosídica a partir do N₁ das pirimidinas ou N₉ das purinas. Para eliminar ambigüidades entre os sistemas de numeração dos anéis heterocíclicos e do açúcar, as posições na pentose são designadas pelo apóstrofo (').

Os ácidos nucleicos são denominados de acordo com o tipo de açúcar; o DNA possui uma 2'-desoxirribose; o RNA possui ribose. A diferença está no fato de o açúcar no RNA apresentar um grupamento OH na posição 2' do anel de pentose. O açúcar pode ser ligado por suas posições 5' ou 3' a um grupamento fosfato.

Um ácido nucleico consiste em uma longa cadeia de nucleotídeos. A **FIGURA 1.7** mostra que o esqueleto da cadeia polinucleotídica consiste em uma série alternada de resíduos de pentose (açúcar) e de fosfato. Essa cadeia é construída pela ligação da posição 5' do anel de pentose à posição 3' do anel da próxima pentose, por meio do grupamento fosfato. Assim, o esqueleto de açúcar-fosfato consiste em ligações fosfodiéster 5'-3'. As bases nitrogenadas “salientam-se” a partir do esqueleto.

Cada ácido nucleico contém quatro tipos de bases. As duas purinas, adenina e guanina, estão presentes no DNA e no RNA. No DNA, as duas pirimidinas são citosina e timina; no RNA, a uracila é encontrada no lugar da timina. A única diferença entre uracila e timina é a presença de um metil na posição C₅. As bases são em geral referidas por iniciais. O DNA contém A, G, C e T; o RNA contém A, G, C e U.

O nucleotídeo terminal em uma extremidade da cadeia possui um grupamento 5' livre; e o nucleotídeo terminal na outra extremidade possui um grupamento 3' livre. Convencionou-se redigir as seqüências de DNA na direção 5' para 3' – isto é, a partir da extremidade 5', à esquerda, para a terminação 3', à direita.

1.6 O DNA É uma Dupla Hélice

Conceitos Essenciais

- A forma B do DNA é uma dupla hélice consistindo em duas cadeias polinucleotídicas de sentido antiparalelo.
- As bases nitrogenadas de cada cadeia são anéis planos de purinas ou pirimidinas que se projetam para o interior da dupla hélice e pareiam umas com as outras por meio de pontes de hidrogênio, formando somente os pares A-T ou G-C.
- O diâmetro da dupla hélice é de 20 Å, havendo uma volta completa a cada 34 Å, com cada volta composta por dez pares de bases.
- A dupla hélice forma um sulco maior (largo) e outro menor (estreito).

A observação de que as bases estavam presentes em diferentes quantidades em DNAs de diferentes espécies levou ao conceito de que a *seqüência de bases é a forma pela qual a informação genética é transmitida*. Por volta dos anos 1950, o conceito de informação genética era comum: os dois problemas impostos referiam-se a como trabalhar na estrutura do ácido nucleico e a explicar de que maneira uma seqüência de bases no DNA podia representar a seqüência de aminoácidos de uma proteína.

A convergência de três conceitos levou à construção do modelo de dupla hélice do DNA proposto por Watson e Crick, em 1953:

- Dados de difração de raios X revelaram que o DNA possuía a forma de uma hélice regular, apresentando uma volta completa a cada 34 Å (3,4 nm), com um diâmetro de ~20 Å (2nm). Uma vez que a distância entre nucleotídeos adjacentes é de 3,4 Å, deveriam haver 10 nucleotídeos por volta.
- A densidade do DNA sugere que a hélice deve conter duas cadeias polinucleotídicas.

O diâmetro constante da hélice pode ser explicado se as bases em cada cadeia estiverem voltadas para o interior e restrinjam-se de tal forma que uma purina está sempre em oposição a uma pirimidina, evitando o pareamento de purina-purina (muito largo) e pirimidina-pirimidina (muito estreito).

- Independente das quantidades absolutas de cada base, a proporção de G é sempre igual à proporção de C no DNA, e a proporção de A é sempre a mesma de T. Assim, a composição de qualquer DNA pode ser descrita pela proporção de suas bases, isto é G + C. Essa proporção varia de 26 a 74% nas diferentes espécies.

Watson e Crick propuseram que as duas cadeias, polinucleotídicas na dupla hélice se associavam *por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas*. G pode formar especificamente pontes de hidrogênio apenas com C, e A pode formar especificamente com T. Essas reações são descritas como **pareamento de bases**, e as bases pareadas (G com C, ou A com T) são ditas **complementares**.

O modelo propôs ainda que as duas cadeias polinucleotídicas corriam em direções opostas (**anti-paralelas**), como ilustrado na **FIGURA 1.8**. Observando-se ao longo da hélice, uma fita corre na direção 5' para 3', e a outra, de 3' para 5'.

O esqueleto de açúcar-fosfato situa-se na face externa e apresenta cargas negativas nos grupamentos fosfato. Quando o DNA está em solução *in vitro*, as cargas são neutralizadas pela ligação de íons metálicos, tipicamente Na^+ . Na célula, proteínas carregadas positivamente contribuem com parte da força de neutralização. Essas proteínas desempenham um importante papel na determinação da organização do DNA na célula.

As bases encontram-se voltadas para o interior. Estas são estruturas planas, que se dispõem aos pares, perpendiculares ao eixo da hélice. Considerando a dupla hélice como uma escada em espiral, os pares de bases seriam os degraus, conforme ilustrado esquematicamente na **FIGURA 1.9**. Prosseguindo ao longo da hélice, as bases estão empilhadas umas sobre as outras, semelhante a uma pilha de pratos.

Cada par de bases é rotado em aproximadamente 36° ao redor do eixo da hélice, em relação ao próximo par. Assim, ~ 10 pares de bases formam uma volta completa de 360° . A torção das duas fitas forma uma dupla hélice contendo um **sulco menor** ($\sim 12 \text{ \AA}$ de largura) e um **sulco maior** ($\sim 22 \text{ \AA}$ de largura), como pode ser visto no modelo em escala

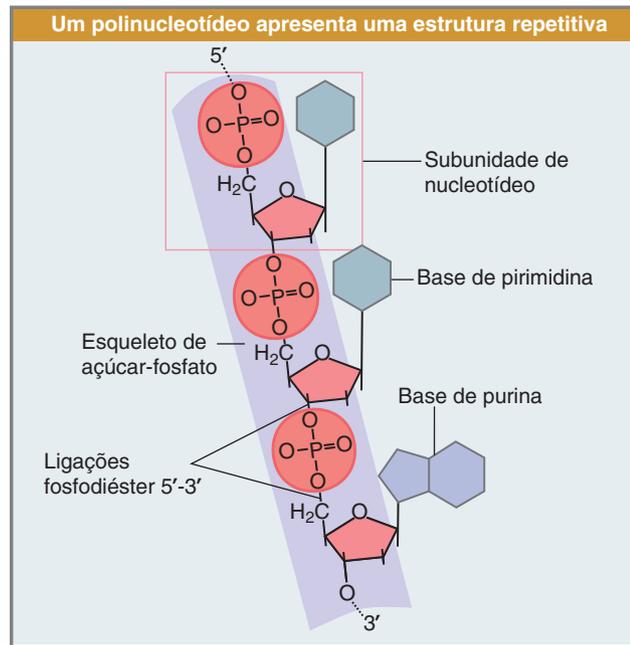


FIGURA 1.7 Uma cadeia polinucleotídica consiste em uma série de ligações de açúcar-fosfato 5'-3' que forma um esqueleto a partir do qual as bases se projetam.

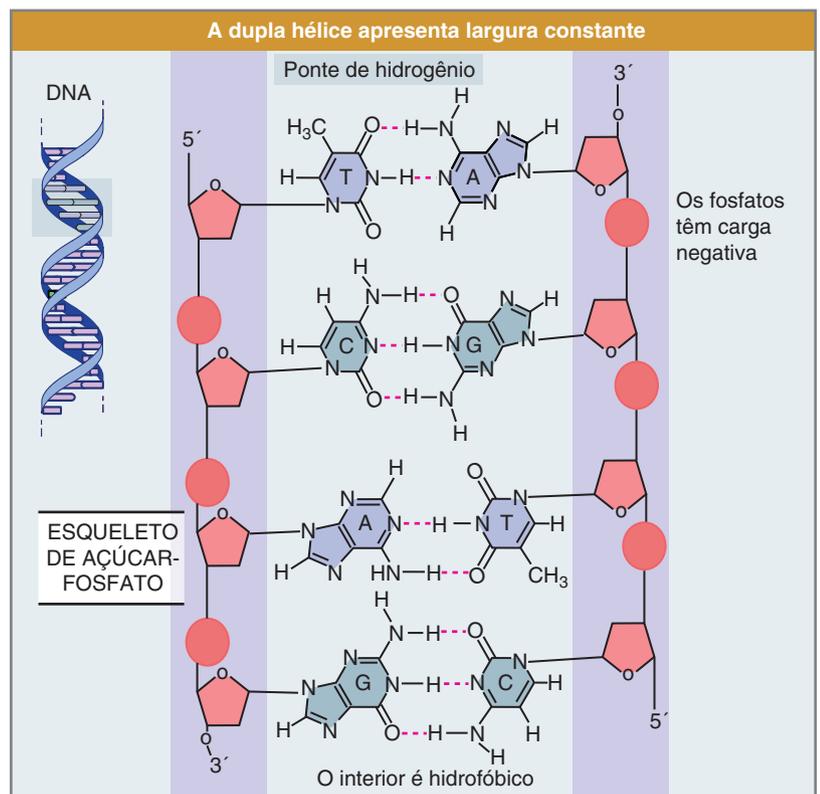


FIGURA 1.8 A dupla hélice mantém uma largura constante, porque as purinas sempre se posicionam frente a pirimidinas nos pares de bases complementares A-T e G-C. A sequência na figura é T-A, C-G, A-T, G-C.

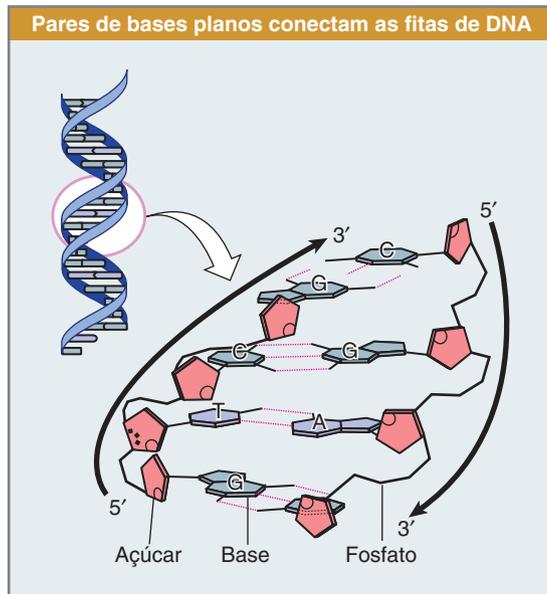


FIGURA 1.9 Os pares de bases planos estão perpendiculares ao esqueleto de açúcar-fosfato.

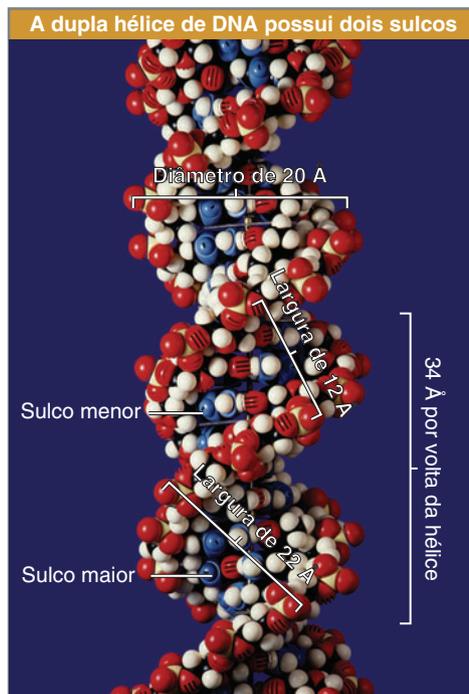


FIGURA 1.10 As duas fitas de DNA formam uma dupla hélice. Photo® Photodisc.

da **FIGURA 1.10**. A dupla hélice é **dextrógira**; as voltas se dão no sentido horário ao longo do eixo da hélice. Essas características representam o modelo aceito para o que é conhecido como **forma B** do DNA.

É importante notar que a forma B representa uma *média*, e não uma estrutura precisamente especificada. A estrutura do DNA pode sofrer alterações locais. Se esta apresenta mais bases por voltas é denominada **superenovelada**; se apresenta menos bases por volta é denominada **relaxada**. O enovelamento local pode ser afetado pela conformação global da dupla hélice de DNA no espaço ou pela ligação de proteínas em sítios específicos.

1.7 A Replicação do DNA É Semiconservativa

Conceitos Essenciais

- O experimento de Meselson-Stahl empregou marcação por densidade para provar que uma única cadeia polinucleotídica é a unidade de DNA que é conservada durante a replicação.
- Cada fita de um duplex de DNA atua como molde na síntese de uma fita filha.
- As seqüências das fitas filhas são determinadas pelo pareamento de bases complementares com as fitas parentais separadas.

É crucial que o material genético seja reproduzido de forma precisa. As duas fitas polinucleotídicas são ligadas apenas por pontes de hidrogênio; assim, são capazes de se separar sem requerer quebras de ligações covalentes. A especificidade do pareamento de bases sugere que cada uma das fitas **parentais** separadas possa agir como **fita molde** na síntese de uma fita **filha** complementar. A **FIGURA 1.11** mostra o princípio pelo qual uma fita filha é montada sobre cada uma das fitas parentais. A seqüência da fita filha é determinada pela fita parental, um *A* na fita parental promove a colocação de um *T* na fita filha, um *G* parental direciona a incorporação de um *C* na fita filha, e assim sucessivamente.

A parte superior da Figura 1.11 ilustra um duplex parental (não-replicado) que consiste nas duas fitas parentais originais. A parte inferior mostra os dois dúplexes filhos que estão sendo produzidos por meio do pareamento de bases complementares. Cada um dos dúplexes filhos possui uma seqüência idêntica à parental original, contendo uma fita pa-

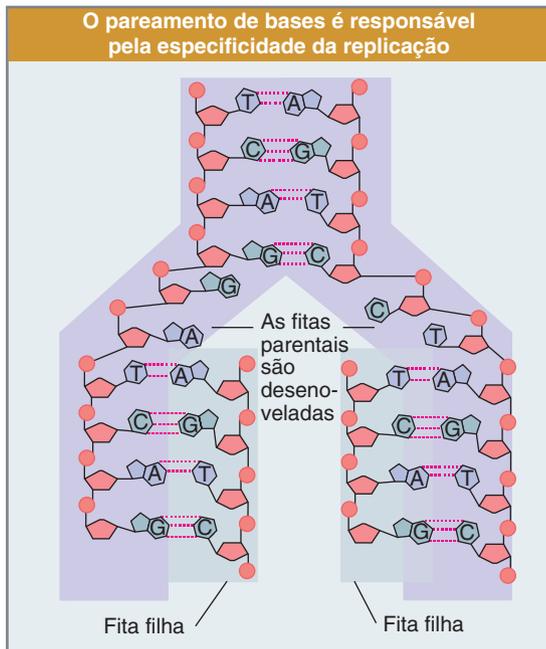


FIGURA 1.11 O pareamento de bases fornece o mecanismo de replicação do DNA.

rental e uma recém-sintetizada. *A estrutura do DNA carrega a informação necessária para perpetuar a sua seqüência.*

As conseqüências desse modo de replicação são ilustradas na **FIGURA 1.12**. O duplex parental é replicado, formando dois dúplexes filhos, cada um consistindo em uma fita parental e uma fita filha (recém-sintetizada). *A unidade conservada de uma geração para a próxima é uma das duas fitas individuais que compreendiam o duplex parental.* Esse comportamento é denominado **replicação semiconservativa**.

A Figura 1.12 ilustra a predição desse modelo. Se o DNA parental carrega uma marca de densidade “pesada” devido ao organismo ter sido cultivado em um meio contendo um isótopo apropriado (por exemplo, ^{15}N), suas fitas podem ser diferenciadas daquelas que são sintetizadas quando o organismo é transferido para um meio contendo isótopos normais “leves”.

O DNA parental, consiste em um duplex com duas fitas pesadas (vermelhas). Após uma geração de crescimento em meio leve, o duplex de DNA apresenta densidade “híbrida” – que consiste em uma fita parental pesada (vermelha) e uma fita filha leve (azul). Após uma segunda geração, as duas fitas de cada duplex híbrido foram separadas. Cada uma recebe uma complementar leve, de forma que agora metade dos dúplexes de DNA permanece hí-

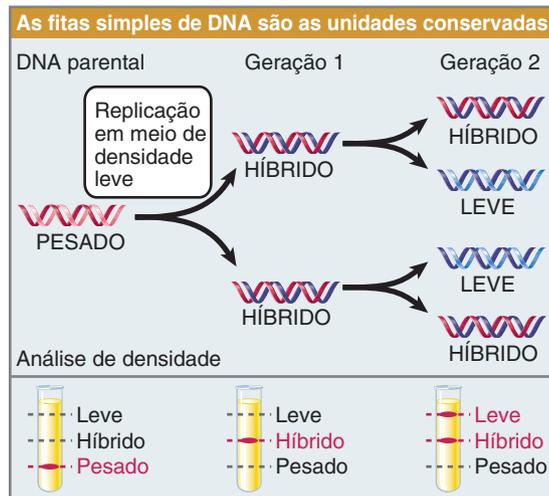


FIGURA 1.12 A replicação do DNA é semiconservativa.

brida e a outra metade é inteiramente leve (as duas fitas são azuis).

As fitas individuais desses dúplexes são inteiramente pesadas ou leves. Esse padrão foi confirmado experimentalmente pelo experimento de Meselson-Stahl em 1958, que acompanhou a replicação do DNA por três gerações de crescimento de *E. coli*. Quando o DNA era extraído das bactérias e sua densidade medida por centrifugação, o DNA original apresentava bandas correspondentes à sua densidade – pesada para o parental, híbrida na primeira geração e metade híbrida e metade leve na segunda geração.

1.8 As Fitas de DNA São Separadas na Forquilha de Replicação

Conceitos Essenciais

- A replicação do DNA é realizada por um complexo enzimático que separa as fitas parentais e sintetiza as fitas filhas.
- A forquilha de replicação é o ponto onde as fitas parentais são separadas.
- As enzimas que sintetizam DNA são denominadas DNA polimerases; as enzimas que sintetizam RNA são denominadas RNA polimerases.
- Nucleases são enzimas que degradam ácidos nucléicos; estas incluem DNAases e RNAases e podem ser divididas em endonucleases e exonucleases.

A replicação requer a separação das duas fitas do duplex parental. No entanto, a ruptura da estrutura é apenas transiente, sendo revertida à medida que o duplex filho é formado. Somente um peque-

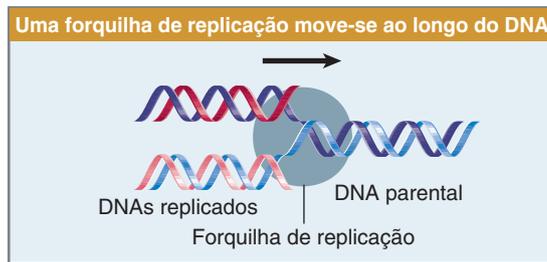


FIGURA 1.13 A forquilha de replicação é a região do DNA na qual há uma transição entre o duplex parental desenovelado e os dúplexes filhos recém-sintetizados.

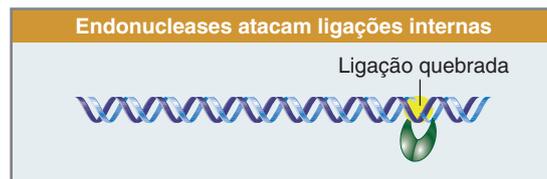


FIGURA 1.14 Uma endonuclease cliva uma ligação no interior de um ácido nucléico. Esse exemplo mostra uma enzima que ataca uma fita de um duplex de DNA.

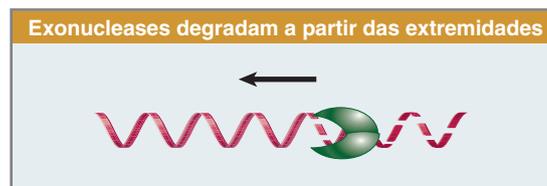


FIGURA 1.15 Uma exonuclease remove uma base de cada vez, clivando a última ligação em uma cadeia polinucleotídica.

no segmento do duplex de DNA é separado em fitas simples, em qualquer momento.

A estrutura helicoidal de uma molécula de DNA envolvida na replicação é ilustrada na **FIGURA 1.13**. A região não replicada consiste no duplex parental, que se abre na região replicada, onde os dois dúplexes filhos se formaram. A estrutura em dupla hélice é rompida na junção entre as duas regiões, a qual é denominada **forquilha de replicação**. A replicação envolve a movimentação da forquilha de replicação ao longo do DNA parental; assim, ocorre um desenovelamento contínuo das fitas parentais e um enovelamento dos dúplexes filhos.

A síntese de ácidos nucléicos é catalisada por enzimas específicas, que reconhecem o molde e realizam a tarefa de catalisar a adição de subunidades à cadeia polinucleotídica que está sendo sintetizada. As enzimas são denominadas de acordo com o tipo de cadeia que está sendo sintetizada: as DNA

polimerases sintetizam DNA e as RNA polimerases sintetizam RNA.

A degradação de ácidos nucléicos também requer enzimas específicas: **desoxirribonucleases** (DNAases) degradam DNA e **ribonucleases** (RNAases) degradam RNA. As nucleases são agrupadas nas classes gerais de **exonucleases** e **endonucleases**:

- As endonucleases clivam ligações *no interior* de moléculas de RNA ou DNA, gerando fragmentos distintos. Algumas DNAases clivam as duas fitas de um duplex de DNA no sítio-alvo, e outras clivam apenas uma das duas fitas. As endonucleases estão envolvidas em reações de clivagem conforme apresentado na **FIGURA 1.14**.
- As exonucleases removem sucessivos resíduos individuais da extremidade da molécula, gerando mononucleotídeos. Elas sempre atuam em uma única fita de ácido nucléico, sendo que cada exonuclease prossegue em uma direção específica, isto é, a partir da extremidade 5' ou 3', prosseguindo em direção à outra extremidade. Tais enzimas estão envolvidas em reações que aparam as extremidades, como mostrado na **FIGURA 1.15**.

1.9 A Informação Genética Pode Ser Fornecida pelo DNA ou RNA

Conceitos Essenciais

- Os genes celulares são de DNA, embora vírus e viróides possam apresentar genomas de RNA.
- O DNA é convertido em RNA pela transcrição, e o RNA pode ser convertido em DNA pela transcrição reversa.
- A tradução do RNA em proteína é unidirecional.

O **dogma central** define o paradigma da biologia molecular. Os genes são perpetuados como seqüências de ácidos nucléicos, mas atuam sendo expressos sob a forma de proteínas. A replicação é responsável pela herança da informação genética. A transcrição e a tradução são responsáveis pela conversão dessa informação de uma forma para outra.

A **FIGURA 1.16** ilustra os papéis da replicação, da transcrição e da tradução, vistas pela perspectiva do dogma central:

- *A perpetuação do ácido nucléico pode envolver tanto DNA ou RNA como material genético.* As células utilizam apenas DNA. Alguns vírus usam RNA, e a replicação do RNA viral ocorre na célula infectada.

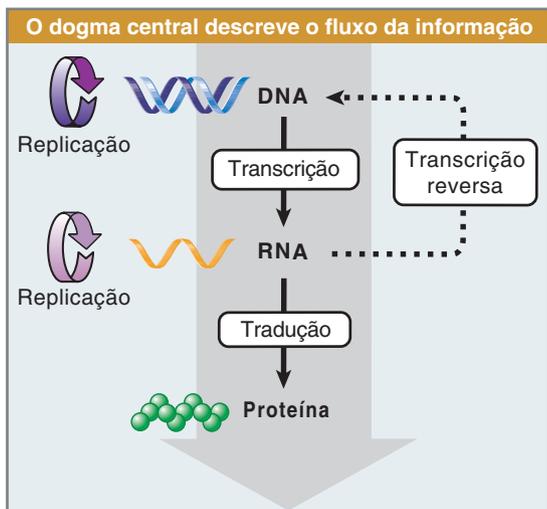


FIGURA 1.16 O dogma central afirma que a informação no ácido nucléico pode ser perpetuada ou transferida, mas a transferência de informação em proteína é irreversível.

- *A expressão da informação genética celular é geralmente unidirecional.* A transcrição do DNA gera moléculas de RNA que podem ser usadas em seguida *apenas* para gerar seqüências de proteínas; via de regra, os RNAs não podem ser recuperados e usados como informação genética. A tradução do RNA em proteínas é sempre irreversível.

Esses mecanismos são igualmente efetivos em relação à informação genética de procariontos e de eucariotos e para a informação carreada por vírus. Os genomas de todos os seres vivos consistem em um duplex de DNA. Vírus têm genomas que consistem em DNA ou RNA, havendo exemplos de cada um dos tipos, que são fitas duplas (fd) ou fitas simples (fs). Detalhes do mecanismo usado para replicar o ácido nucléico variam dentre os sistemas virais, mas o princípio da replicação via síntese de fitas complementares é o mesmo, como ilustrado na **FIGURA 1.17**.

Os genomas celulares reproduzem o DNA pelo mecanismo de replicação semiconservativa. Os genomas virais de fita dupla, DNA ou RNA, também se replicam usando as fitas individuais do duplex como moldes para a síntese das fitas complementares.

Os vírus com genomas de fita simples usam a fita simples como molde para sintetizar uma fita complementar; essa fita complementar é, por sua vez, utilizada para sintetizar o seu complemento, que é, obviamente, idêntico à fita original. A replicação pode envolver a formação de intermediários

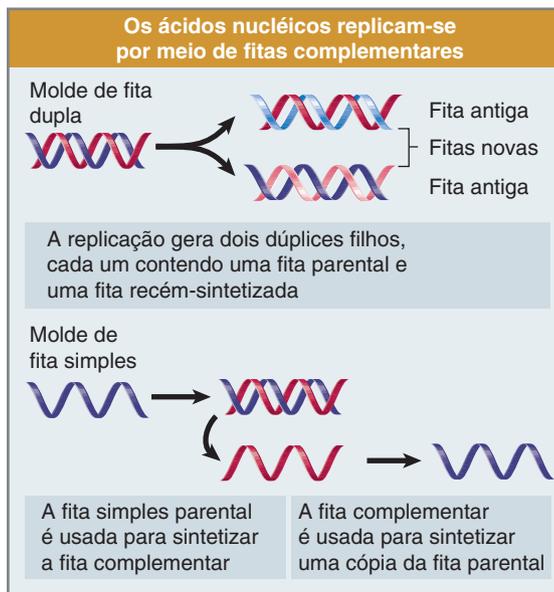


FIGURA 1.17 Ácidos nucléicos de fita dupla e de fita simples replicam-se pela síntese de fitas complementares, dirigida pelas regras do pareamento de bases.

estáveis de fita dupla ou o uso de ácidos nucléicos de fita dupla somente como um estágio transitório.

A restrição em relação à transferência unidirecional de DNA para RNA não é absoluta. Esta é superada pelos **retrovírus**, cujos genomas consistem em moléculas de RNA de fita simples. Durante o ciclo infectivo, o RNA é convertido pelo processo de **transcrição reversa** em um DNA de fita simples, o qual é, por sua vez, convertido em um DNA de fita dupla. Esse duplex de DNA torna-se parte do genoma da célula, sendo herdado como qualquer outro gene. Assim, a **transcrição reversa** permite que uma seqüência de RNA seja recuperada e utilizada como informação genética.

A existência da replicação de RNA e da transcrição reversa estabelece o princípio geral de que a **informação sob a forma de seqüências de qualquer um dos tipos de ácido nucléico pode ser convertida no outro tipo**. No entanto, durante o curso habitual dos eventos, a célula baseia-se nos processos de replicação do DNA, de transcrição e de tradução. Entretanto, em ocasiões raras (possivelmente mediadas por um vírus de RNA), a informação de um RNA celular é convertida em DNA e inserida no genoma. Embora a transcrição reversa não desempenhe um papel nas operações regulares da célula, esta torna-se um mecanismo de potencial importância quando consideramos a evolução do genoma.

Os mesmos princípios são seguidos na perpetuação da informação genética de genomas enor-

Os genomas apresentam uma grande variação de tamanho		
Genoma	Número de genes	Pares de bases
Organismos		
Plantas	<50.000	<10 ¹¹
Mamíferos	30.000	~3 x 10 ⁹
Vermes	14.000	~10 ⁸
Moscas	12.000	1,6 x 10 ⁸
Fungos	6.000	1,3 x 10 ⁷
Bactérias	2–4.000	<10 ⁷
Micoplasmas	500	<10 ⁶
Vírus de fdDNA		
Variola	<300	187.000
Papovavírus (SV40)	~6	5.226
Fago T4	~200	165.000
Vírus de fsDNA		
Parvovírus	5	5.000
Fago φX174	11	5.387
Vírus de fdRNA		
Reovírus	22	23.000
Vírus de fsRNA		
Coronavírus	7	20.000
Influenza	12	13.500
TMV	4	6.400
Fago MS2	4	3.569
STNV	1	1.300
Viróides		
RNA PSTV	0	359

FIGURA 1.18 A quantidade de ácido nucléico no genoma varia em uma escala enorme.

mes de plantas ou anfíbios, de pequenos genomas como de micoplasmas, ou ainda informações genéticas menores de vírus de RNA ou DNA. A **FIGURA 1.18** resume alguns exemplos que ilustram a variação de tipos e tamanhos de genomas.

Ao longo de toda a gama de organismos, cujo conteúdo total dos genomas varia em uma ordem de até 100.000 vezes, um princípio comum prevalece: *O DNA codifica todas as proteínas que a(s) célula(s) do organismo devem sintetizar, e as proteínas, por sua vez, (direta ou indiretamente) fornecem as funções necessárias à sobrevivência.* Um princípio similar descreve a função da informação genética dos vírus, sejam de DNA ou RNA: *O ácido nucléico codifica a(s) proteína(s) necessária(s) para empacotar o genoma e também para quaisquer outras funções adicionais àquelas fornecidas pela célula hospedeira, necessárias à reprodução viral durante seu ciclo infeccioso.* (O menor vírus – o vírus satélite da necrose do tabaco [STNV] – não se replica independentemente. Ele requer a presença simultânea de um vírus “auxiliar” – o vírus da necrose do tabaco [TNV] – que é um vírus normalmente infeccioso.)

1.10 Os Ácidos Nucléicos Hibridizam-se por Pareamento de Bases

Conceitos Essenciais

- O aquecimento promove a separação das duas fitas de um DNA duplex.
- A T_m é o ponto médio da faixa de temperatura de desnaturação.
- Fitas simples complementares podem renaturar quando a temperatura é reduzida.
- A desnaturação e a renaturação/hibridização podem ocorrer entre combinações de DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA e podem ser intermoleculares ou intramoleculares.
- A capacidade de duas preparações de ácidos nucléicos de fita simples hibridizarem é uma medida de suas complementaridades.

Uma propriedade crucial da dupla hélice é a capacidade de separar-se sem romper as ligações covalentes. Isso torna possível a separação e a reunião das duas fitas sob condições fisiológicas, em velocidades (muito rápidas) necessárias à manutenção das funções genéticas. A especificidade de processo é determinada pelo pareamento de bases complementares.

O conceito de pareamento de bases é central para todos os processos envolvendo ácidos nucléicos. A ruptura dos pares de bases é um aspecto crucial da função de uma molécula de fita dupla, enquanto a capacidade de formar pares de bases é essencial à atividade de um ácido nucléico de fita simples. A **FIGURA 1.19** mostra que o pareamento de bases permite que ácidos nucléicos de fita simples formem uma estrutura em duplex.

- Uma região de duplex intramolecular pode ser formada pelo pareamento de bases entre duas seqüências complementares que fazem parte de uma molécula de fita simples.
- Uma molécula de fita simples pode parear suas bases com uma molécula de fita simples complementar independente, formando um duplex intermolecular.

A formação de regiões de duplex a partir de ácidos nucléicos de fita simples é mais importante para o RNA, embora DNAs de fita simples também existam (em genomas virais). O pareamento de bases entre fitas simples complementares independentes não é restrito a DNA-DNA ou RNA-RNA, podendo ocorrer também entre uma molécula de DNA e uma molécula de RNA.

A ausência de ligações covalentes entre fitas complementares permite a manipulação do DNA *in*

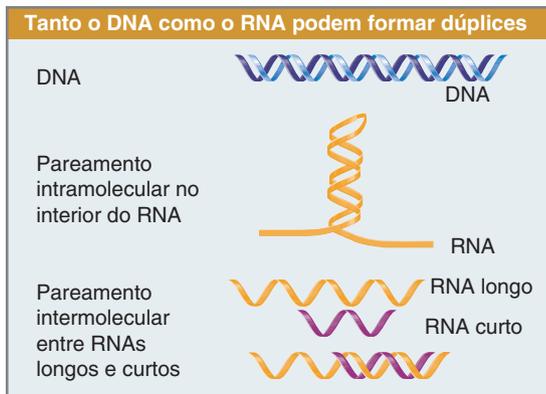


FIGURA 1.19 O pareamento de bases ocorre no duplex de DNA e também em interações intra- e intermoleculares no RNA (ou DNA) de fita simples.

vitro. As forças não-covalentes que estabilizam a dupla hélice são rompidas pelo aquecimento ou pela exposição a baixas concentrações de sal. As duas fitas de uma dupla hélice separam-se completamente quando as pontes de hidrogênio entre elas são desfeitas.

O processo de separação das fitas é denominado **desnaturação** ou (mais coloquialmente) *fusão*. (O termo “desnaturação” é também utilizado para descrever a perda da estrutura verdadeira de uma proteína; este é um termo geral e implica que a conformação natural de uma macromolécula foi convertida em alguma outra forma.)

A desnaturação do DNA ocorre em uma faixa estreita de temperatura e promove modificações profundas em muitas de suas propriedades físicas. O ponto médio da faixa de temperatura na qual as fitas de DNA se separam é denominado *temperatura de fusão* (T_m) (do inglês: *melting temperature*). Essa temperatura é dependente da proporção de pares de bases G-C. Uma vez que o par G-C apresenta três pontes de hidrogênio, é mais estável que um par A-T, que apresenta apenas duas pontes de hidrogênio. Quanto maior o conteúdo de pares de bases G-C, maior será a energia necessária para separar as duas fitas. Em solução, sob condições fisiológicas, um DNA que contém 40% de G-C – um valor típico de genomas de mamíferos – se desnatura a uma T_m de cerca de 87°C. Assim, o duplex de DNA é estável em temperaturas existentes na célula.

A desnaturação do DNA é reversível sob condições apropriadas. A capacidade das duas fitas complementares separadas formarem novamente uma dupla hélice é denominada **renaturação**. A renaturação depende do pareamento de bases específico entre as fitas complementares. A **FIGURA 1.20** mostra que a reação ocorre em dois estágios. Inicial-

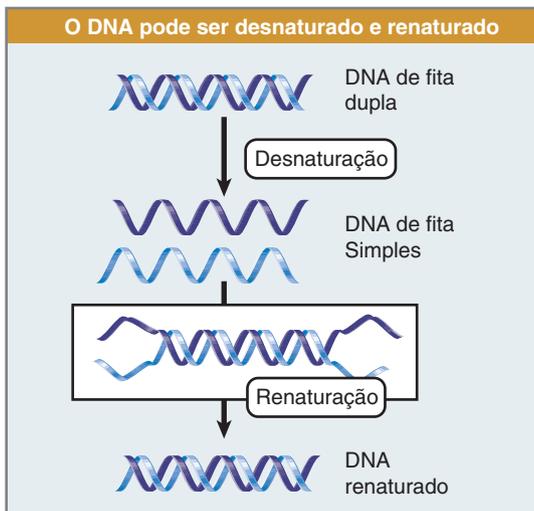


FIGURA 1.20 Fitas simples de DNA desnaturado podem ser renaturadas, originando a forma de duplex.

mente, as fitas simples do DNA em solução encontram-se aleatoriamente; se suas seqüências forem complementares, as duas fitas pareiam suas bases e geram uma região curta de dupla hélice. Em seguida, a região de pareamento de bases estende-se ao longo da molécula por um efeito semelhante a um zíper, formando uma longa molécula de duplex. A renaturação da dupla hélice restaura as propriedades originais perdidas quando o DNA foi desnaturado.

A renaturação descreve a reação entre duas seqüências complementares que foram separadas por desnaturação. Entretanto, a técnica pode ser estendida para permitir que duas seqüências complementares de quaisquer ácidos nucleicos reajam entre si e formem estruturas em duplex. Isso algumas é vezes chamado de **anelamento**, embora a reação seja geralmente descrita como **hibridização**, sempre que ácidos nucleicos de diferentes origens estão envolvidos, como no caso quando uma das preparações consiste em DNA, e a outra, em RNA. *A capacidade de duas preparações de ácidos nucleicos hibridizarem constitui um teste preciso de sua complementaridade, visto que apenas seqüências complementares podem formar uma estrutura em duplex.*

O princípio da reação de hibridização baseia-se na exposição de duas preparações de ácidos nucleicos de fita simples uma à outra, medindo-se em seguida a quantidade de material em fita dupla formado. A **FIGURA 1.21** ilustra um procedimento no qual uma preparação de DNA é desnaturada e as fitas simples são adsorvidas a um filtro. Então, uma segunda preparação de DNA (ou RNA) desnaturado é adicionada. O filtro é tratado de forma que a segunda preparação pode adsorver-se a ele somen-

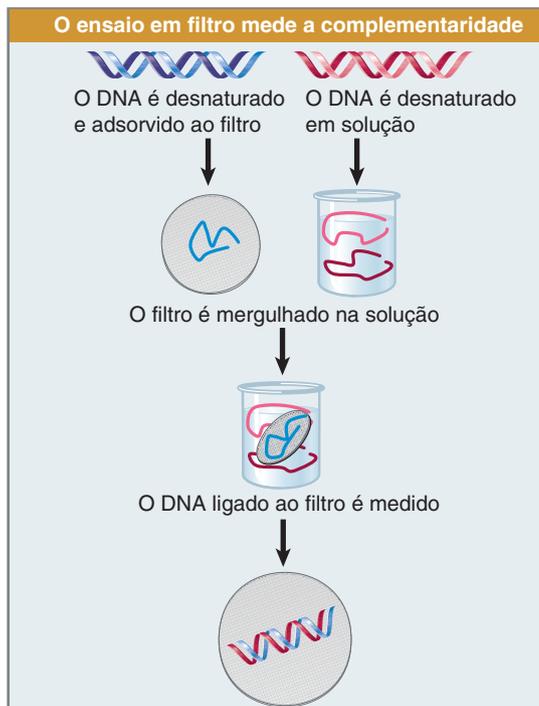


FIGURA 1.21 A hibridização no filtro estabelece se uma solução de DNA (ou RNA) desnaturado contém seqüências complementares às fitas imobilizadas no filtro.

te se for capaz de parear suas bases com o DNA que foi inicialmente adsorvido. Geralmente, a segunda preparação é marcada radioativamente, de maneira que a reação pode ser medida pela quantidade de marcação radioativa retida pelo filtro.

A extensão da hibridização entre dois ácidos nucleicos de fita simples é determinada por sua complementaridade. Duas seqüências não precisam ser *perfeitamente* complementares para hibridizarem. Se estas forem bastante relacionadas, mas não idênticas, um duplex imperfeito é formado, no qual o pareamento de bases é interrompido nas posições onde as duas fitas não são correspondentes.

1.11 As Mutações Modificam a Seqüência do DNA

Conceitos Essenciais

- Todas as mutações consistem em modificações na seqüência do DNA.
- Mutações podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidas por agentes mutagênicos.

As mutações fornecem evidências decisivas de que o DNA é o material genético. Quando uma modificação na seqüência de DNA provoca uma altera-

ção na seqüência de uma proteína, podemos concluir que o DNA codifica aquela proteína. Além disso, uma modificação no fenótipo do organismo pode permitir-nos identificar a função da proteína. A existência de muitas mutações em um gene pode possibilitar a comparação entre as muitas formas variantes de uma dada proteína, e uma análise detalhada pode ser usada para identificar as regiões da proteína responsáveis por funções enzimáticas individuais, ou outras funções.

Todos os organismos estão sujeitos a um certo número de mutações como resultado de operações celulares normais ou interações aleatórias com o ambiente. Essas são denominadas **mutações espontâneas**; a sua taxa de ocorrência é característica de um determinado organismo, sendo algumas vezes denominada **nível basal**. As mutações são eventos raros e, obviamente, aquelas que causam danos em um gene são selecionadas negativamente durante a evolução. Assim, é difícil obter-se grandes números de mutantes espontâneos para um estudo, a partir de populações naturais.

A ocorrência de mutações pode ser aumentada pelo tratamento com determinados compostos. Estes são chamados de **compostos mutagênicos**, e as modificações que causam são referidas como **mutações induzidas**. A maioria dos compostos mutagênicos atua diretamente devido a sua capacidade de modificar uma determinada base do DNA, ou de incorporar-se ao ácido nucléico. A eficiência de um composto mutagênico é avaliada pelo aumento da taxa de mutações em relação aos níveis basais. A partir do uso de compostos mutagênicos, tornou-se possível a indução de muitas modificações em qualquer gene.

Mutações espontâneas que inativam a função gênica ocorrem em bacteriófagos e bactérias em uma taxa relativamente constante de $3-4 \times 10^{-3}$ por genoma, por geração. Dada a grande variação no tamanho dos genomas entre bacteriófagos e bactérias, essa taxa corresponde a grandes diferenças na taxa de mutação por par de bases. Isso sugere que a taxa global de mutações esteve sujeita a forças seletivas que equilibraram os efeitos deletérios da maioria das mutações e os efeitos vantajosos de algumas mutações. Essa conclusão é reforçada pela observação de que um microrganismo do domínio Archaea, que habita ambientes em condições extremas de temperatura e acidez (condições que normalmente danificariam o DNA), não apresenta uma taxa elevada de mutação e, de fato, tem uma taxa um pouco abaixo da taxa média.

A **FIGURA 1.22** mostra que a taxa de mutações em bactérias corresponde a cerca de 10^{-6} eventos por locus, por geração, ou a uma taxa média de 10^{-9} a 10^{-10} de modificação por par de bases, por geração. A taxa

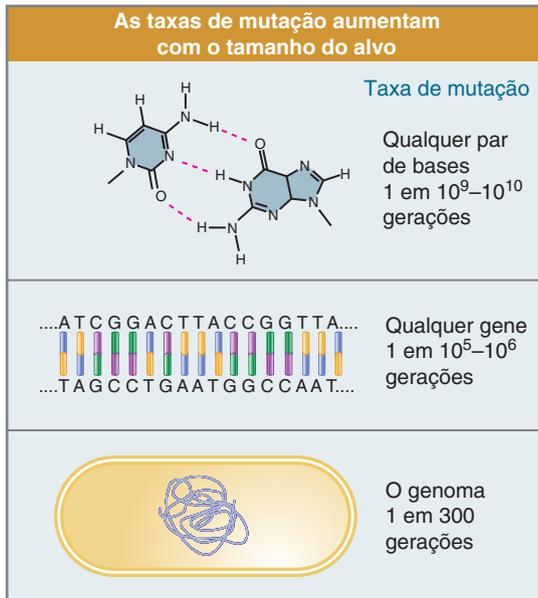


FIGURA 1.22 Um par de bases é mutado com uma taxa de 10^{-9} – 10^{-10} por geração, um gene de 1.000 pares de bases é mutado a $\sim 10^{-6}$ por geração, e o genoma bacteriano é mutado a 3×10^{-3} por geração.

em pares de bases individuais varia amplamente, em uma escala de 10.000 vezes. Não temos medidas precisas da taxa de mutação em eucariotos, apesar de, em geral, considerarmos que é similar àquela encontrada em bactérias por lócus, por geração.

1.12 As Mutações Podem Afetar Pares de Bases Únicos ou Seqüências mais Longas

Conceitos Essenciais

- Uma mutação pontual altera um único par de bases.
- Mutações pontuais podem ser causadas pela conversão química de uma base em outra, ou por erros que ocorrem durante a replicação.
- Uma transição substitui um par de bases G-C por um par de bases A-T, ou vice-versa.
- Uma transversão substitui uma purina por uma pirimidina, tal como a modificação A-T em T-A.
- Inserções são o tipo mais comum de mutação e resultam da movimentação de elementos de transposição.

Qualquer par de bases de DNA pode ser mutado. Uma **mutação pontual** modifica apenas um único par de bases e pode ser causada por qualquer um dos dois tipos de eventos:

- Modificações químicas do DNA provocam diretamente a troca de uma base por outra diferente.
- Um mau funcionamento durante a replicação do DNA promove a inserção de uma

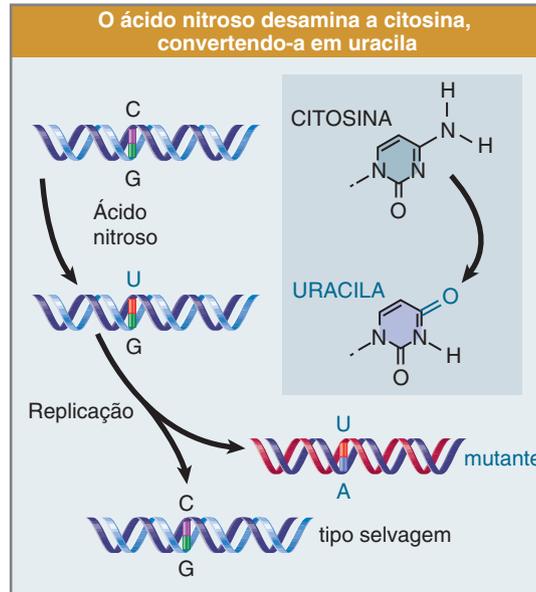


FIGURA 1.23 Mutações podem ser induzidas por modificação química em uma base.

base errada em uma cadeia polinucleotídica durante a síntese do DNA.

Mutações pontuais podem ser classificadas em dois tipos, dependendo da natureza da modificação quando uma base é substituída por outra:

- A classe mais comum é a **transição**, que corresponde à substituição de uma pirimidina por outra, ou de uma purina por outra. Isso troca um par G-C por um par A-T, ou vice-versa.
- A classe menos comum é a **transversão**, na qual uma purina é trocada por uma pirimidina, ou vice-versa. Assim, um par A-T se torna um par T-A ou C-G.

Os efeitos do ácido nitroso são um exemplo clássico de uma transição causada pela conversão química de uma base em outra. A **FIGURA 1.23** mostra que o ácido nitroso realiza uma desaminação oxidativa que converte a citosina em uracila. No ciclo de replicação após a transição, U parecia com um A, ao invés do G, que pareava com o C original. Dessa forma, o par C-G é substituído por um par T-A, quando A parear com T no próximo ciclo de replicação. (O ácido nitroso também desamina a adenina, causando uma transição reversa de A-T para G-C.)

Transições também podem ser causadas pelo **pareamento incorreto de bases**, quando membros pouco comuns se pareiam, desobedecendo às restrições usuais dos pares de Watson-Crick. O pareamento incorreto geralmente é uma aberração resultante da incorporação de uma base anormal com propriedades ambíguas de pareamento no DNA. A **FIGURA 1.24**

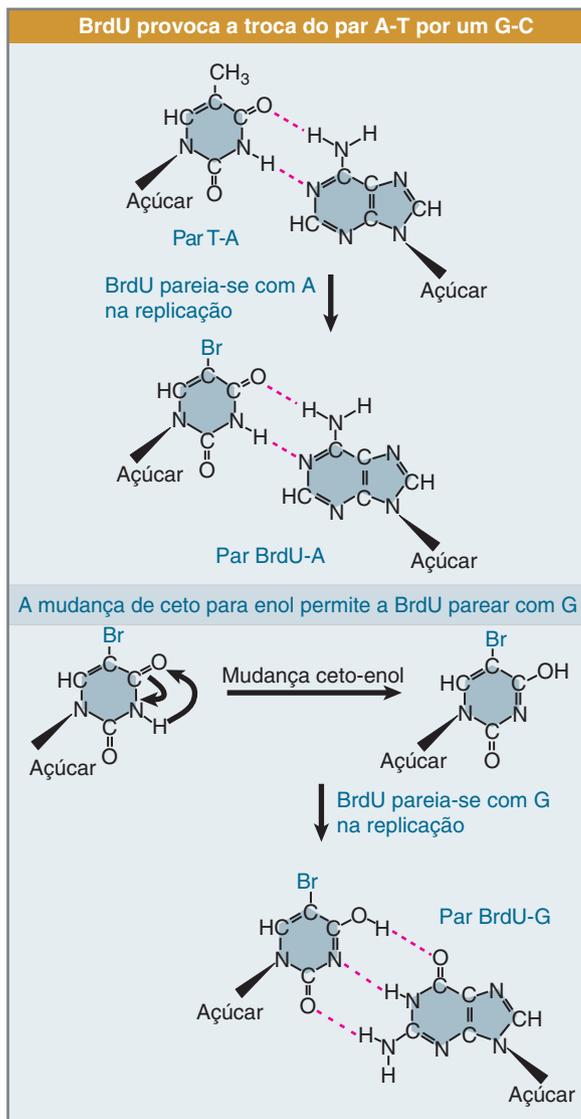


FIGURA 1.24 Mutações podem ser induzidas pela incorporação de análogos de bases no DNA.

ilustra o exemplo da bromouracila (BrdU), um análogo de timina que contém um átomo de bromo no lugar do grupo metil da timina. A BrdU é incorporada no DNA no lugar da timina. Entretanto, essa base apresenta propriedades ambíguas de pareamento, devido à presença do átomo de bromo que permite a ocorrência de uma mudança na qual a base altera sua estrutura de um grupo ceto (=O) para uma forma enol (-OH). A forma enol pode parear com guanina, o que leva à substituição do par original A-T por um par G-C.

O pareamento incorreto pode ocorrer tanto durante a incorporação original da base ou no ciclo de replicação subsequente. A transição é induzida com uma certa probabilidade a cada ciclo replicativo; por isso, a incorporação de BrdU tem efeitos continuados na sequência de DNA.

As mutações pontuais foram consideradas durante um longo tempo como a principal forma de modificação de genes individuais. No entanto, sabemos que as **inserções** de segmentos de material adicional são bastante frequentes. A fonte de material inserido normalmente corresponde a **elementos transponíveis**, que são seqüências de DNA capazes de se mover de um sítio para o outro (Ver Capítulo 21, Transposons, e Capítulo 22, Retrovírus e Retrotransposons). Uma inserção geralmente abole a atividade de um gene. Quando tais inserções ocorrem, **deleções** de parte ou de todo o material inserido, e algumas vezes de regiões adjacentes, podem ocorrer subsequentemente.

Uma diferença significativa entre mutações pontuais e inserções/deleções é que a frequência de mutações pontuais pode ser aumentada por compostos mutagênicos, e a ocorrência de modificações causadas por elementos transponíveis não é afetada. No entanto, inserções e deleções podem também ocorrer por outros mecanismos – por exemplo, aqueles envolvendo erros durante replicação ou recombinação –, apesar de, provavelmente, serem menos comuns. Além destes, uma classe de compostos mutagênicos denominados acridinas introduz inserções e deleções (muito pequenas).

1.13 Os Efeitos das Mutações Podem Ser Revertidos

Conceitos Essenciais

- As mutações diretas inativam um gene, e as mutações reversas (ou revertentes) revertem seus efeitos.
- As inserções podem ser revertidas pela deleção do material inserido, ao passo que as deleções não são revertidas.
- A supressão ocorre quando uma mutação em um segundo gene anula o efeito da mutação do primeiro gene.

A **FIGURA 1.25** mostra que o isolamento de **revertentes** é uma característica importante que distingue as mutações pontuais e inserções das deleções:

- Uma mutação pontual pode ser revertida pela restauração da seqüência original ou pelo ganho de uma mutação compensatória em outro local do gene.
- Uma inserção de material adicional pode ser revertida pela deleção do material inserido.
- Uma deleção de parte de um gene não pode ser revertida.

Mutações que inativam um gene são denominadas **mutações diretas**. Seus efeitos são revertidos por **mutações reversas**, que são dois tipos: reversões verdadeiras ou reversões de segundo sítio.

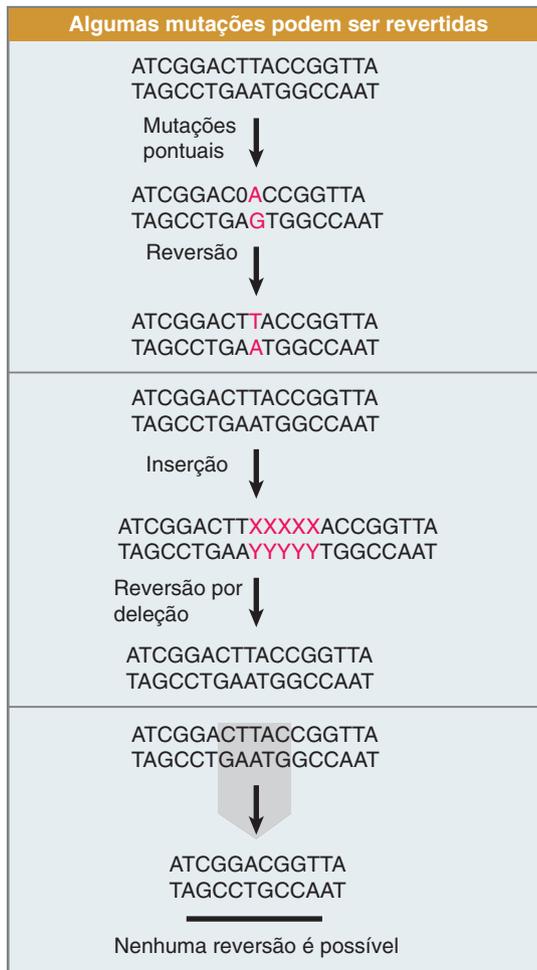


FIGURA 1.25 Mutações pontuais e inserções podem ser revertidas, mas deleções não são revertidas.

Uma reversão exata da mutação original é chamada de **reversão verdadeira**. Assim, se um par A-T foi substituído por um par G-C, uma outra mutação que restaure o par A-T irá regenerar exatamente a seqüência selvagem.

O segundo tipo de mutação reversa – a **reversão de segundo sítio** – pode ocorrer em outro local no gene e seu efeito compensa a primeira mutação. Por exemplo, uma modificação de um aminoácido em uma proteína pode abolir a função de um gene, mas uma segunda alteração pode compensar a primeira e restaurar a atividade da proteína.

Uma mutação direta resulta de qualquer mudança que inative um gene; uma mutação reversa deve restaurar a função de uma proteína danificada por uma mutação direta em particular. A taxa de mutação reversa é correspondentemente inferior à de mutação direta, tipicamente na ordem de ~ 10 .

Mutações também podem ocorrer em outros genes, de modo a contornar os efeitos da mutação no gene original. Esse efeito é denominado **supressão**. Um locus no qual uma mutação suprime o efeito de uma mutação em outro locus é chamado de **supressor**.

1.14 As Mutações São Concentradas em Hotspots

Conceitos Essenciais

- A frequência de uma mutação em qualquer par de bases é determinada por uma flutuação estatística, exceto nos *hotspots* (“sítios quentes”), onde a frequência é aumentada em pelo menos uma ordem de grandeza.

Até agora lidamos com mutações em relação às mudanças individuais na seqüência do DNA que influenciam a atividade da unidade genética na qual estas ocorrem. Quando consideramos as mutações no que tange à inativação do gene, a maioria dos genes de uma espécie revela taxas mais ou menos similares de mutação em relação ao seu tamanho. Isso sugere que o gene pode ser considerado como um alvo de mutação, e que danos em qualquer parte de um gene podem abolir sua função. Como resultado, a suscetibilidade à mutação é aproximadamente proporcional ao tamanho do gene. Ao considerarmos os sítios de mutações no interior da seqüência de DNA: todos os pares de bases em um gene são igualmente suscetíveis, ou existem alguns mais prováveis de serem mutados que outros?

O que acontece quando isolamos um grande número de mutações independentes em um mesmo gene? Muitos mutantes são obtidos. Cada um é resultado de um evento mutacional individual. Então, o sítio de cada mutação é determinado. A maioria das mutações ocorrerá em sítios diferentes, mas algumas ocorrerão na mesma posição. Duas mutações independentemente isoladas em um mesmo sítio podem corresponder exatamente à mesma alteração no DNA (neste caso, o mesmo evento mutacional ocorreu em mais de uma ocasião), ou podem corresponder a modificações diferentes (três mutações pontuais diferentes são possíveis para cada par de bases).

O histograma da **FIGURA 1.26** revela a frequência com a qual mutações são encontradas em cada par de bases do gene *lacI* de *E. coli*. A probabilidade estatística de mais de uma mutação ocorrer em um sítio particular é dada pela cinética de acerto aleatório (como observado na distribuição de Poisson). Assim, alguns sítios apresentarão uma, duas ou três mutações, e outros, nenhuma. Alguns sítios apre-

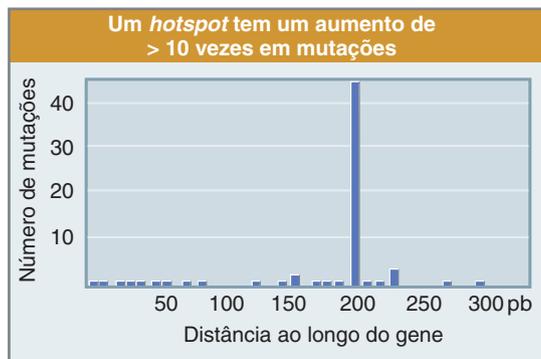


FIGURA 1.26 Mutações espontâneas ocorrem ao longo do gene *lacI* de *E. coli*, mas estão concentradas em um *hotspot*.

sentam números muito maiores de mutações que o esperado para uma distribuição aleatória; tais sítios apresentam 10 ou mesmo 100 vezes mais mutações que o predito para acertos casuais. Esses sítios são chamados de **sítios quentes** (do inglês: *hotspots*). Mutações espontâneas podem ocorrer em *hotspots* e diferentes agentes mutagênicos atuar sobre diferentes *hotspots*.

1.15 Muitos *Hotspots* Resultam de Bases Modificadas

Conceitos Essenciais

- Uma causa comum de ocorrência de *hotspots* é a presença da base modificada 5-metilcitosina, que é espontaneamente desaminada, originando timina.

Uma das principais causas de mutação espontânea é decorrente da presença de bases incomuns no DNA. Além das quatro bases inseridas no DNA quando este é sintetizado, **bases modificadas** são algumas vezes encontradas. Este nome reflete sua origem; estas são produzidas pela modificação química de uma das quatro bases já presentes no DNA. A base modificada mais comum é a 5-metilcitosina, a qual é gerada por uma enzima metilase que adiciona um grupo metil a certos resíduos de citosina, em sítios específicos no DNA.

Os sítios que contêm 5-metilcitosina correspondem a *hotspots* de mutações pontuais espontâneas em *E. coli*. Em cada caso, a mutação assume a forma de uma transição de G-C para A-T. Os *hotspots* não são encontrados em linhagens de *E. coli* incapazes de metilar a citosina.

A razão para a existência de *hotspots* deve-se ao fato de as bases citosinas sofrerem desaminação espontânea com uma frequência considerável. Nessa

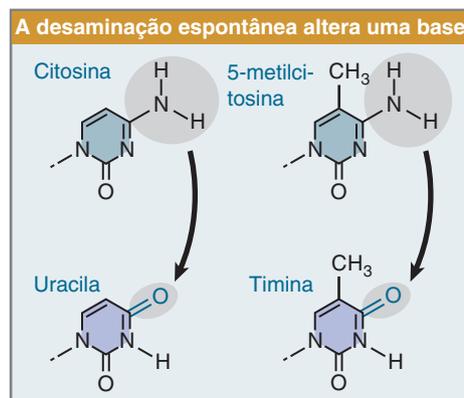


FIGURA 1.27 A desaminação da citosina produz uracila, e a desaminação da 5-metilcitosina produz timina.

reação, o grupamento amino é substituído por um grupo ceto. Lembre-se de que a desaminação de uma citosina gera uracila (ver Figura 1.23). A **FIGURA 1.27** compara essa reação com a desaminação da 5-metilcitosina, onde a desaminação gera uma timina. O efeito no DNA é a geração de pares de bases G-U e G-T, respectivamente, promovendo o **pareamento incorreto** entre os parceiros.

Todos os organismos possuem sistemas de reparo que corrigem os pareamentos incorretos de bases por meio da remoção e da substituição de uma das bases. A atuação desses sistemas determina se os pares incorretos, tais como G-U e G-T, resultarão em mutações.

A **FIGURA 1.28** mostra que as conseqüências da desaminação são diferentes para 5-metilcitosina e citosina. A desaminação da (rara) 5-metilcitosina provoca uma mutação, ao passo que a desaminação da citosina, que é mais comum, não tem esse efeito. Isso acontece porque os sistemas de reparo são muito mais eficientes no reconhecimento de G-U que de G-T.

E. coli contém uma enzima, uracila-DNA-glicosidase, que remove resíduos de uracila do DNA (ver Seção 20.5, A Inversão de Bases É Utilizada por Metilases e Glicosilases). Essa atividade deixa um resíduo de G não-pareado, e então um “sistema de reparo” insere uma base C, a qual se torna o seu par. O resultado líquido dessas reações é a restauração da seqüência original de DNA. Esse sistema protege o DNA contra as conseqüências da desaminação espontânea da citosina. (Esse sistema não é, no entanto, ativo o suficiente para impedir os efeitos do nível aumentado de desaminação provocado pelo ácido nitroso; ver Figura 1.23.)

Observe que a desaminação da 5-metilcitosina origina timina. Este processo cria um par de bases incorreto, G-T. Se o erro não for corrigido antes

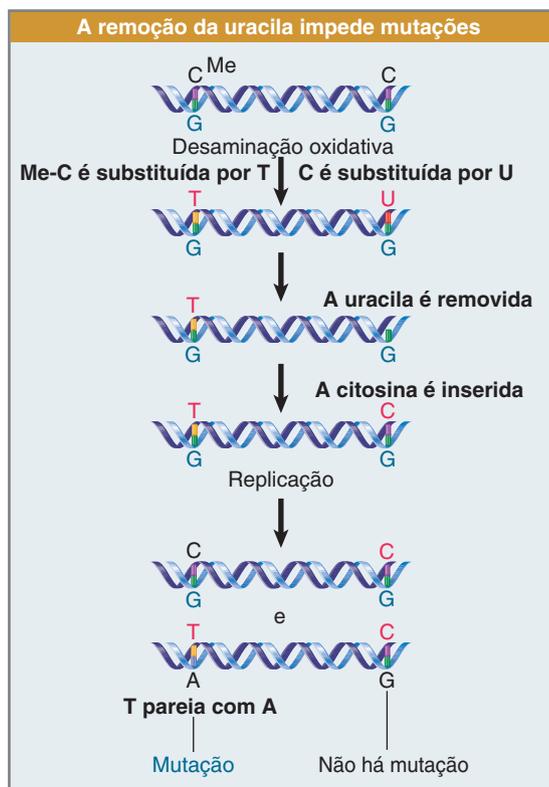


FIGURA 1.28 A desaminação da 5-metilcitosina produz timina (por transição C-G para T-A); a desaminação da citosina produz uracila (que normalmente é removida e então é substituída por citosina).

do próximo ciclo de replicação, ocorrerá uma mutação. Na replicação seguinte, as bases incorretas do par G-T serão separadas e formarão pares com novas bases, produzindo um par G-C selvagem e um par mutante A-T.

A desaminação da 5-metilcitosina é a causa mais comum de formação de pares G-T incorretos no DNA. Sistemas de reparo que atuam em erros do tipo G-T tendem a repor o T por um C (ao invés da reposição alternativa de repor o G por um A), o que ajuda a reduzir a taxa de mutação (ver Seção 20.7, O Controle da Direção do Reparo de Pareamentos Incorretos). No entanto, esses sistemas não são tão efetivos quanto a remoção do U do par G-U incorreto. Assim, a desaminação da 5-metilcitosina promove mutações com muito mais frequência que a desaminação da citosina.

A 5-metilcitosina também cria *hotspots* no DNA eucariótico. Isto é comum em dinucleotídeos CpG que estão concentrados em regiões denominadas ilhas CpG (ver Seção 24.19, Ilhas CpG São Alvos Regulatórios). Embora a 5-metilcitosina corresponda a apenas cerca de 1% das bases do DNA humano, sítios contendo esta base modificada são responsáveis por ~30% de todas as mutações pontuais.

Isso torna o estado de 5-metilcitosina um determinante particularmente importante de mutações em células animais.

A importância dos sistemas de reparo na redução da taxa de mutações é enfatizada pelos efeitos decorrentes da eliminação da enzima MBD4 de camundongo, uma glicosilase que remove T (ou U) de pares formados incorretamente com G. O resultado é o aumento, com um fator de 3×, da taxa de mutação nos sítios CpG. (Esse efeito não é ainda maior porque MBD4 é apenas um dos vários sistemas que atuam em pares incorretos G-T; podemos imaginar que a eliminação de todos os sistemas aumentaria muito mais a taxa de mutações.)

A atuação desses sistemas traz uma luz interessante em relação ao uso de T no DNA comparado ao uso de U no RNA. Talvez essa propriedade esteja relacionada à necessidade de estabilidade da sequência no caso do DNA; o uso de T implica que quaisquer desaminações em C são imediatamente reconhecidas, pois geram uma base (U), a qual em geral não está presente no DNA. Isso aumenta muito a eficiência com a qual os sistemas de reparo podem atuar (se comparado à situação onde estes devem reconhecer erros G-T, os quais podem ser produzidos também por situações onde a remoção do T não seria a resposta adequada). Além disso, a ligação fosfodiéster do esqueleto é mais lábil quando a base é U.

1.16 Alguns Agentes Hereditários São extremamente Pequenos

Conceitos Essenciais

- Alguns agentes hereditários muito pequenos não codificam proteínas e consistem em RNA ou proteína com propriedades hereditárias.

Viróides são agentes infecciosos que causam doenças em plantas superiores. Estes correspondem a moléculas muito pequenas e circulares de RNA. Diferentemente dos vírus – para os quais os agentes infecciosos correspondem a um **vírion**, um genoma encapsulado em um envoltório protéico –, o RNA do viróide é, ele mesmo, o agente infeccioso. O viróide consiste somente em RNA, que exibe um extenso, porém imperfeito, pareamento de bases, e assume uma forma de bastão característica, como mostrado na **FIGURA 1.29**. Mutações que interferem com a estrutura de bastão reduzem a sua infectividade.

Um RNA de viróide consiste em uma única espécie molecular, a qual é replicada de forma autônoma nas células infectadas. Sua sequência é precisamente perpetuada em seus descendentes. Virói-

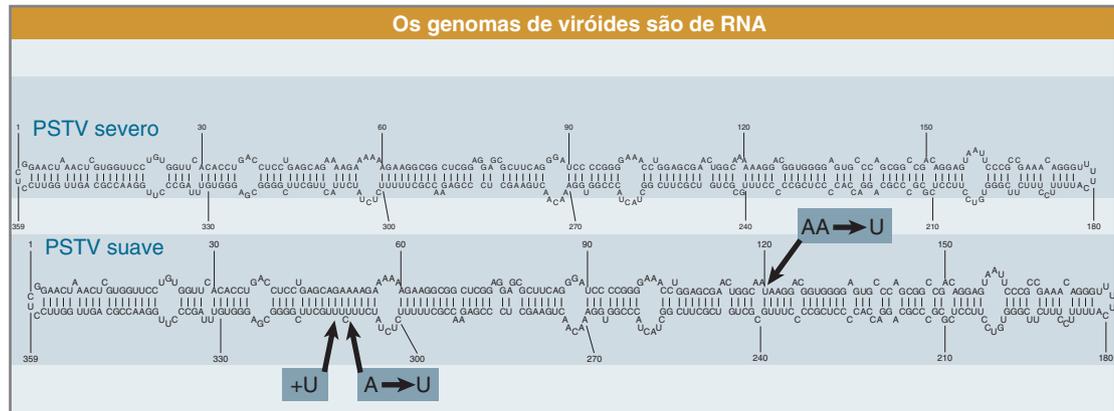


FIGURA 1.29 O RNA de PSTV é uma molécula circular que forma uma extensa estrutura em dupla fita, interrompida por muitas alças internas. As formas severa e suave diferem em três sítios.

des são classificados em diferentes grupos. Um determinado viróide é identificado como membro de um grupo devido à similaridade da sua seqüência com a seqüência de outros membros do grupo. Por exemplo, quatro viróides relacionados ao PSTV (viróide do Tubérculo Afilado de Batata, do inglês *potato spindle tuber viroid*) apresentam de 70 a 83% de similaridade de seqüência com PSTV. Diferentes isolados de uma mesma linhagem de viróide variam entre si, e a modificação pode afetar o fenótipo das células infectadas. Por exemplo, as linhagens *suave* e *severa* de PSTV diferem em três substituições de nucleotídeos.

Os viróides se assemelham aos vírus por possuírem genomas de ácidos nucléicos herdáveis. Assim, preenchem os critérios em relação à informação genética. Entretanto, os viróides, que por vezes são chamados de **patógenos subvirais**, diferenciam-se dos vírus tanto na estrutura quanto na função. O RNA do viróide parece não ser traduzido em proteínas e, desta forma, não é capaz de codificar as funções necessárias à sua sobrevivência. Essa situação leva a duas questões: como o RNA do viróide é replicado e como o viróide afeta o fenótipo da célula vegetal infectada?

A replicação deve ser realizada pelas enzimas da célula hospedeira, subvertidas de suas funções normais. A natureza herdável da seqüência do viróide indica que o RNA do viróide atua como molde.

Os viróides são presumivelmente patogênicos porque interferem com os processos celulares normais. Esta ação é realizada de forma relativamente aleatória, por exemplo, seqüestrando uma enzima essencial para a sua própria replicação, ou interferindo com a produção de RNAs celulares necessários. Alternativamente, os viróides podem se comportar como moléculas regulatórias anormais, exercendo efeitos particulares na expressão de genes individuais.

Um agente ainda mais incomum é o *scrapie* – o causador de uma doença neurológica degenerativa

em ovelhas e cabras. A doença está relacionada às doenças humanas kuru e síndrome de Creutzfeldt-Jacob, que afetam a função cerebral.

O agente infeccioso do *scrapie* não contém ácido nucléico. Esse extraordinário agente é chamado de **príon** (agente infeccioso proteínico). Este corresponde a uma glicoproteína hidrofóbica de 28 kDa, PrP. PrP é codificada por um gene celular (conservado nos mamíferos) que é expresso no cérebro normal. A proteína é encontrada sob duas formas: o produto encontrado no cérebro normal é denominado PrP^c e é totalmente degradado por proteases. A proteína encontrada em cérebros infectados é denominada PrP^{sc} e é extremamente resistente à degradação por proteases. PrP^c é convertida em PrP^{sc} por uma modificação ou alteração conformacional que confere resistência a proteases, a qual ainda não está completamente definida.

O agente do *scrapie*, PrP^{sc} deve, de alguma forma, modificar a síntese do seu equivalente celular normal, tornando-o infeccioso, ao invés de inócua (ver Seção 31.12, Príons Causam Doenças em Mamíferos). Camundongos que não possuem o gene PrP não são infectados e não desenvolvem *scrapie*, demonstrando que PrP é essencial ao desenvolvimento da doença.

1.17 Resumo

Dois experimentos clássicos provaram que o DNA é o material genético. O DNA isolado de uma linhagem das bactérias *pneumococos* conferiu propriedades dessa linhagem em outra linhagem. Além disso, o DNA é o único componente que é herdado pela progênie de fagos a partir dos fagos parentais. O DNA pode ser usado para transfectar novas propriedades em células eucarióticas.

O DNA é uma dupla hélice, consistindo em fitas antiparalelas nas quais as unidades de nucleó-

tídeos são unidas por ligações fosfodiéster 5'-3'. O esqueleto corresponde à porção externa; bases de purinas ou de pirimidinas encontram-se empilhadas no interior aos pares, nos quais A é complementar a T e G é complementar a C. As fitas separam-se e usam o pareamento de bases complementares para originar fitas filhas em uma replicação semiconservativa. O pareamento de bases complementares é também utilizado para transcrever um RNA representando uma das fitas do duplex de DNA.

Um segmento de DNA pode codificar uma proteína. O código genético descreve a relação entre a seqüência de DNA e a seqüência da proteína. Apenas uma das duas fitas do DNA codifica a proteína. Um códon consiste em três nucleotídeos que representam um único aminoácido. Uma seqüência codificadora de DNA consiste em uma série de códons, os quais são lidos a partir de um ponto de iniciação fixo. Normalmente, apenas uma das três possíveis fases de leitura é traduzida em proteína.

Uma mutação é uma mudança na seqüência dos pares de bases A-T e G-C no DNA. Uma mutação em uma seqüência codificadora pode modificar a seqüência de aminoácidos na proteína correspondente. Uma mudança de alteração de fase modifica a fase de leitura subsequente pela inserção ou deleção de uma base; isso gera a codificação de uma série inteiramente nova de aminoácidos após o sítio da mutação. Uma mutação pontual modifica apenas o aminoácido representado pelo códon onde a mutação ocorre. As mutações pontuais podem ser revertidas por mutações reversas da mutação original. Inserções podem ser revertidas pela perda do material inserido, e as deleções não são revertidas. Mutações podem ser também suprimidas indiretamente, quando uma mutação em um gene diferente compensa o defeito original.

A incidência natural de mutações é aumentada por compostos mutagênicos. Mutações podem ser concentradas em *hotspots*. Um tipo de *hotspot* responsável por algumas mutações pontuais é provocado pela desaminação da base modificada 5-metilcitosina.

Mutações ocorrem em uma taxa de $\sim 10^{-6}$ por locus, por geração; as mutações reversas são mais raras. Nem todas as mutações têm efeitos no fenótipo.

Apesar de toda a informação genética das células ser carregada pelo DNA, vírus apresentam genomas de fita dupla ou fita simples de DNA ou RNA. Viróides são patógenos subvirais que consistem apenas em pequenas moléculas circulares de RNA, desprovidas de envoltório protetor. O RNA não codifica proteínas e o seu modo de perpetuação e de patogênese é desconhecido. O *scrapie* consiste em um agente infeccioso proteináceo.

Referências

1.1 Introdução

Revisões

- Cairns, J., Stent, G., and Watson, J. D. (1966). Phage and the Origins of Molecular Biology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*
- Judson, H. (1978). *The Eighth Day of Creation*. Knopf, New York.
- Olby, R. (1974). *The Path to the Double Helix*. MacMillan, London.

1.2 O DNA É o Material Genético das Bactérias

Artigos de pesquisa

- Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 98, 451-460.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27, 113-159.

1.3 O DNA É o Material Genético dos Vírus

Artigo de pesquisa

- Hershey, A. D. and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage *J. Gen. Physiol.* 36, 39-56.

1.4 O DNA É o Material Genético das Células Animais

Artigo de pesquisa

- Pellicer, A., Wigler, M., Axel, R., and Silverstein, S. (1978). The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell* 14, 133-141.

1.6 O DNA É uma Dupla Hélice

Artigos de pesquisa

- Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953). A structure for DNA. *Nature* 171, 737-738.
- Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953). Genetic implications of the structure of DNA. *Nature* 171, 964-967.
- Wilkins, M. F. H., Stokes, A. R., and Wilson, H. R. (1953). Molecular structure of DNA. *Nature* 171, 738-740.

1.7 A Replicação do DNA É Semiconservativa

Revisão

- Holmes, F. (2001). *Meselson, Stahl, and the Replication of DNA: A History of the Most Beautiful Experiment in Biology*. Yale University Press, New Haven, CT.

Artigo de pesquisa

- Meselson, M. and Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 671-682.

1.11 As Mutações Modificam a Sequência do DNA

Revisões

- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667-1686.
- Drake, J. W. and Balz, R. H. (1976). The biochemistry of mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 11-37.

Artigos de pesquisa

- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7160-7164.
- Grogan, D. W., Carver, G. T., and Drake, J. W. (2001). Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7928-7933.

1.12 As Mutações Podem Afetar Pares de Bases Únicos ou Sequências mais Longas

Revisão

- Maki, H. (2002). Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu. Rev. Genet.* 36, 279-303.

1.15 Muitos *Hotspots* Resultam de Bases Modificadas

Artigos de pesquisa

- Coulondre, C. et al. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *E. coli*. *Nature* 274, 775-780.
- Millar, C. B., Guy, J., Sansom, O. J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P. D., Bishop, S. M., Clarke, A. R., and Bird, A. (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 297, 403-405.

1.16 Alguns Agentes Hereditários São extremamente Pequenos

Revisões

- Diener, T. O. (1986). Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 58-62.
- Diener, T. O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol. Suppl.* 15, 203-220.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363-13383.

Artigos de pesquisa

- Bueler, H. et al. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C., and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.