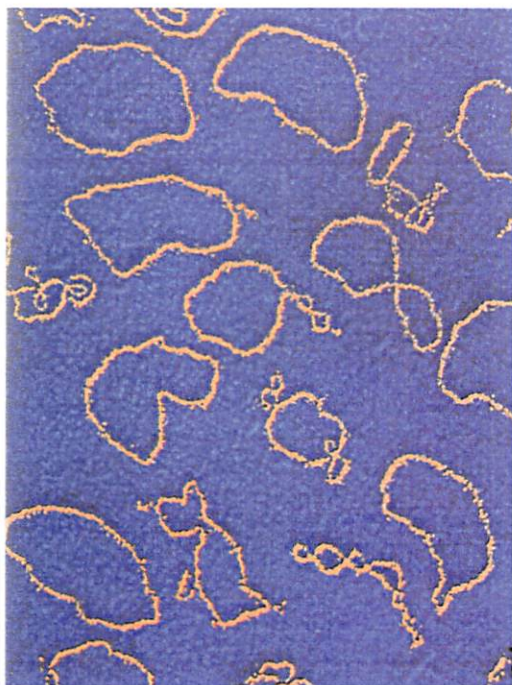


GENÔMICA, BIOTECNOLOGIA E DNA RECOMBINANTE



Micrografia eletrônica dos plasmídeos de DNA da bactéria *Escherichia coli*. Estes plasmídeos são usados na engenharia genética.

(© Dr. Gopal Murti/SPL/Photo Researchers, Inc.)

OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Examinar as técnicas de clonagem do gene 358
2. Examinar as técnicas de criação de mapas de restrição 377
3. Estudar os métodos de sequenciamento de DNA 383
4. Verificar os objetivos e métodos do Projeto Genoma Humano 390
5. Examinar os benefícios práticos e questões humanas da engenharia genética 397

VISÃO GERAL DO ESTUDO

Ferramentas Genômicas 359

- Endonucleases de Restrição 359
- Vetores Procarióticos 360
- Clonagem de um Gene Específico 364
- Transferência Southern 366
- Sondagem para um Gene Clonado 368
- Vetores Eucarióticos 369
- Expressão de DNA Estrangeiro nas Células Eucarióticas 372

Mapeamento de Restrição 377

- Construindo um Mapa de Restrição 379
- Digestões Duplas 379
- Poliformismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição 380

Reação em Cadeia da Polimerase 381

Sequenciamento do DNA 383

- O Método Dideoxi 383
- Criando um *Primer* Geral 386

Mapeamento e Sequenciamento do Genoma Humano 390

- Localizando um Gene de Interesse 390
- O Projeto Genoma Humano 391
- Ética 397

Benefícios Práticos da Clonagem do Gene 397

- Medicina 397
- Agricultura 398
- Indústria 398

Resumo 398

Problemas Resolvidos 399

Exercícios e Questões 400

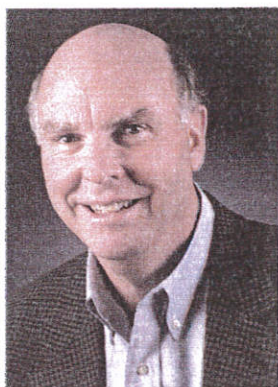
Questões para Raciocínio Crítico 404

Boxe 13.1 O Debate Sobre o DNA Recombinante 370

Boxe 13.2 A Clonagem de Dolly 374

Boxe 13.3 Genes Dentro de Genes 388

N primavera do ano 2000, J. Craig Venter, o CEO da Celera Genomics e Francis Collins, diretor do National Institutes of Health's Human Genome Research Institute, anunciaram em conjunto que eles e seus colaboradores haviam completado a sequência do genoma humano. Apesar de ainda haver muito trabalho para a finalização do projeto, a realização desse feito foi de enorme importância. Para alguns, era como desvendar do segredo da vida. Esse trabalho estabeleceu a ciência da **genômica**, o estudo do mapeamento e sequenciamento dos genomas.



J. Craig Venter (1946-).
(Cortesia da Celera Genomics.)



Francis S. Collins (1950-).
(Cortesia de Francis Collins.)

Desde meados dos anos 70, o campo da genética molecular vem obtendo um enorme crescimento, percebido não somente pelos geneticistas, mas também pela classe de médicos e pesquisadores, além de agrônomos, cientistas da área animal, empresários e o público em geral. A classe de médicos e pesquisadores possuem novos tratamentos disponíveis para doenças. Os agrônomos vislumbram a possibilidade de aumentar os rendimentos das colheitas, e os cientistas da área animal ganharam a possibilidade de aperfeiçoar a produção de alimentos de animais domesticados. Geneticistas e biólogos moleculares adquirem um conhecimento cada vez maior devido à compreensão da expressão do gene e de seu controle.

As novas técnicas de manipulação do DNA, com foco na separação, amplificação, sequenciamento e expressão dos genes, estão baseadas na inserção de uma parte específica de DNA estrangeiro em um vetor—um plasmídeo ou fago. Um plasmídeo é colocado em uma célula hospedeira, procariótica ou eucariótica, que então se divide repetidamente, produzindo inúmeras cópias do vetor com seu pedaço de DNA estrangeiro. Um fago simplesmente se multiplica nas células hospedeiras (fig. 13.1). Em ambos os casos, o pedaço de DNA estrangeiro é amplificado em número e pode ser expressado (transcrito e traduzido em uma proteína) quando está em um plasmídeo em uma célula hospedeira. Uma célula hospedeira comumente usada

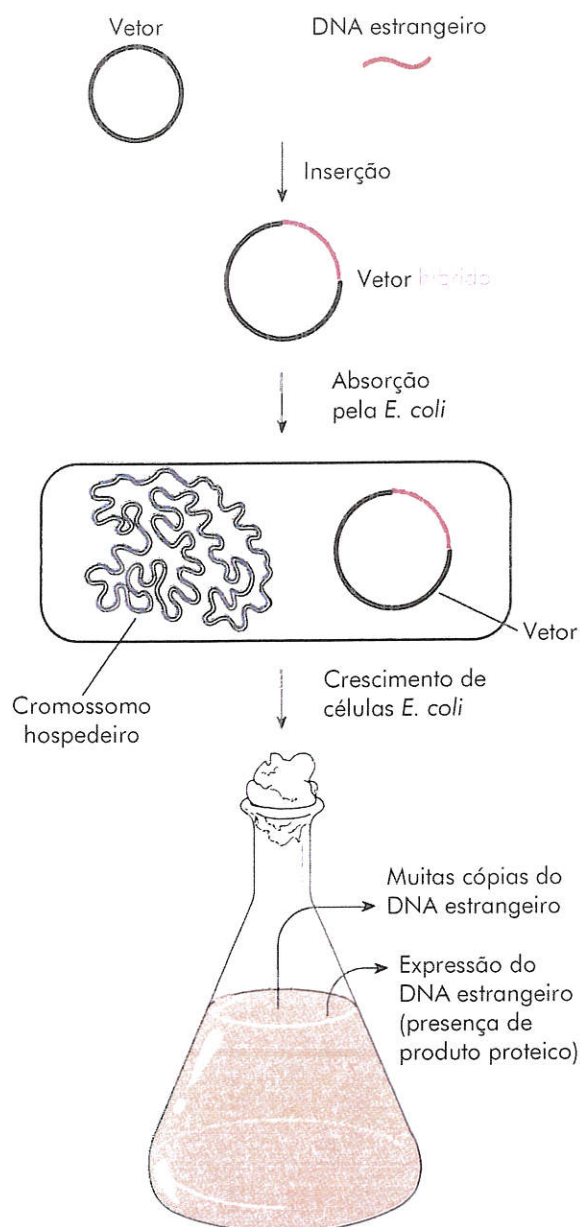


Figura 13.1 Visão geral das técnicas de recombinação de DNA. Um vetor híbrido com uma inserção de DNA estrangeiro é criado. Então, o vetor é inserido dentro de um organismo hospedeiro. A replicação do hospedeiro resulta em muitas cópias do DNA estrangeiro e, se o gene é expressado, também em grande quantidades do produto do gene. (Todo o DNA mostrado é de fita dupla.)

é a da *E. coli*. Depois de sua amplificação, o DNA estrangeiro pode ser purificado e sua sequência de nucleotídeos determinada. Quando é expressado, podem ser obtidas grandes quantidades do produto gênico do DNA estrangeiro. A nova tecnologia é conhecida de várias formas: **clonagem gênica**, **tecnologia do DNA recombinante** ou **engenharia genética**. Neste capítulo, analisaremos em detalhes os métodos e procedimentos da tecnologia do DNA recombinante, incluindo o sequenciamento do DNA.

FERRAMENTAS GENÔMICAS

Endonucleases de Restrição

Em 1978, W. Arber e H. Smith ganharam o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pelo trabalho pioneiro no estudo das **endonucleases de restrição**. Enzimas que as bactérias usam para destruir o DNA estrangeiro, supostamente, o DNA de vírus invasores. As enzimas reconhecem certas sequências nucleotídicas (**sítios de restrição**) encontradas no DNA estrangeiro, em geral com um comprimento de quatro a oito pares de base, e então clivam aquele DNA nesses sítios ou perto deles. (As endonucleases de restrição foram assim chamadas porque restringiam as infecções de fago nas linhagens bacterianas. Os fagos que conseguiam sobreviver em uma cadeia, não sobreviviam em outras com diferentes enzimas de restrição).

Três tipos de endonucleases de restrição são conhecidos. Seus agrupamentos são baseados em tipos de sequências que reconhecem a natureza do corte realizado no DNA e a estrutura de enzima. Os tipos I e III de endonucleases de restrição não são úteis para a clonagem de genes, pois clivam o DNA em sítios que não são os sítios de reconhecimento e assim, produzem padrões de clivagem aleatórios e imprevisíveis. As endonucleases tipo II, no entanto, clivam sítios específicos que reconhecem, produzindo padrões de clivagem previsíveis. Os sítios que as endonucleases tipo II reconhecem são repetições invertidas, que possuem simetria duplicada. Para observar a simetria, você deve ler a sequência de dentro para fora a partir de eixo central nas fitas opostas do DNA. Por exemplo, a endonuclease de restrição tipo II *Bam*HI reconhece:



Lendo a partir do centro (linhas verticais) encontramos AGG na cadeia superior e AGG na cadeia inferior. De certa forma, a sequência é um **palíndromo**, uma sequência que pode ser lida da mesma forma em qualquer direção. (Palíndromo vem do grego *palíndromos*, que significa “correr em sentido inverso”. O nome Hannah e a sequência numérica 1238321 são palíndromos). Na figura 13.2 há algumas sequências palindrômicas que as endonucleases de restrição do tipo II reconhecem. Mais de cem enzimas do tipo II são conhecidas.

A célula hospedeira protege seu DNA não pelo fato de não conter esses sítios de restrição, mas geralmente por metilar o DNA nessas regiões (fig. 13.3). As mesmas sequências que as endonucleases atacam em uma condição

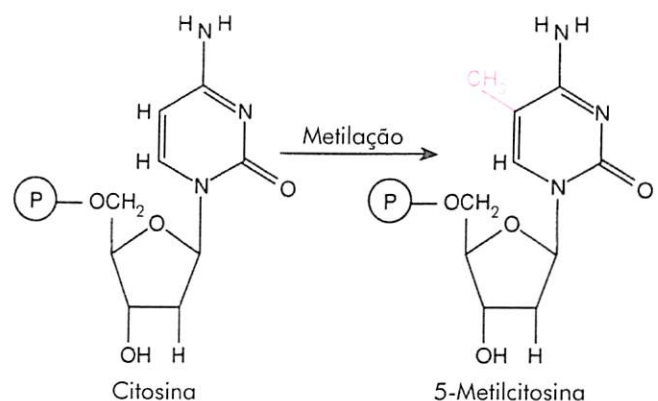


Figura 13.3 Uma enzima metilase adiciona um grupo metil à citosina, convertendo-a em metilcitosina-5.

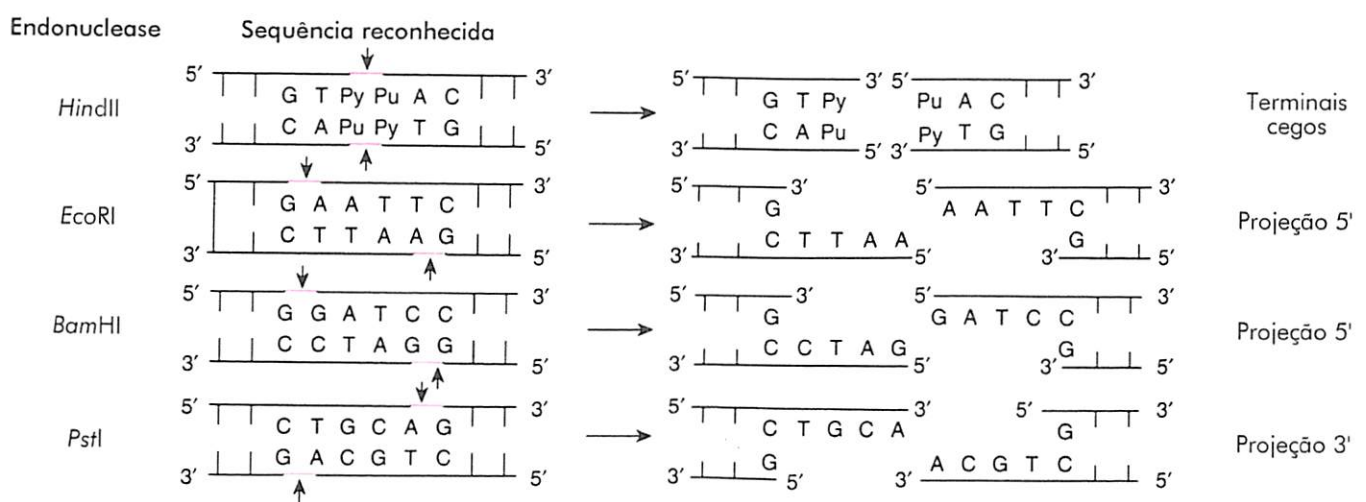


Figura 13.2 Sequências cortadas por várias endonucleases de restrição II. Py é pirimidina e Pu é purina. As setas denotam os pontos onde as endonucleases cortam o DNA. Em 1971, K. Danna e D. Nathans mostraram que a endonuclease de restrição cortaria o DNA de forma coerente em pedaços do mesmo tamanho. Essa precisão e capacidade de repetição da ação da enzima tornaram as enzimas úteis para futuras pesquisas. Nem todas as endonucleases de restrição fazem cortes irregulares com projeções 3' e 5', algumas produzem terminais cegos.

não metilada são protegidas quando metiladas. Após a replicação do DNA hospedeiro, novas duplas hélices são semimetiladas. Isto é, a fita antiga é metilada, mas a nova não. Nessa configuração, a nova fita é rapidamente metilada (fig. 13.4). O DNA estrangeiro, sem grupos metil em qualquer fita, não é metilado.

As endonucleases de restrição recebem seus nomes de acordo com a bactéria da qual foi isolada: *Bam*HI vem de *Bacillus amyloliquefaciens*, linhagem H; *Eco*RI de *E. coli*, linhagem RY13; *Hind*II de *Haemophilus influenzae*, linhagem Rd; e *Bgl*I do *Bacillus globigii*. A partir desse ponto, vamos nos referir às endonucleases de restrição tipo II somente como enzimas de restrição.

As enzimas de restrição cortam o DNA de duas maneiras diferentes. Por exemplo, *Hind*II corta a sequência de reconhecimento ao meio, deixando terminais “cegos” no DNA (fig. 13.2). Discutiremos como pedaços de DNA com terminais cegos podem ser usados em clonagens. Os cortes irregulares feitos, por exemplo, pela *Bam*HI, deixam terminais aderentes (uma projeção 5') que podem se reassociar espontaneamente à medida que as ligações de hidrogênio se formam entre as bases complementares (fig. 13.2). A habilidade de reassociação desses terminais aderentes, demonstrada pela primeira vez por S. Cohen, H. Boyer e seus colaboradores em 1971, abriu campo para a clonagem de genes.

Vetores Procarióticos



Com a atual tecnologia é comum juntar, *in vitro*, DNAs de fontes bastante diferentes. Na figura 13.5, vemos como uma molécula de DNA circular cortada por uma enzima de restrição específica pode recircularizar se for clivada apenas em um local, ou como moléculas diferentes com os mesmos

terminais livres podem se anelar para formar moléculas híbridas. Para fazer com que essas moléculas fiquem completas, basta a ação de uma DNA ligase (capítulo 9).

Uma das partes do DNA envolvido no anelamento pode ser um plasmídeo, um pedaço de DNA que pode replicar-se em uma célula de forma independente do cromossomo celular. O **plasmídeo recombinante** (fig. 13.6) pode ser transferido para dentro uma célula. (Um plasmídeo recombinante também é conhecido como um **plasmídeo híbrido**, **veículo híbrido**, **vetor híbrido** ou **plasmídeo quimérico**. Esta última denominação se origina da palavra quimera, um monstro mitológico com cabeça de leão, corpo de bode e cauda de serpente). Há vários procedimentos que podem introduzir este plasmídeo recombinante dentro da célula hospedeira. Por exemplo, uma célula bacteriana pode tornar-se permeável a esse plasmídeo, ou a qualquer outro, pela adição de uma solução diluída de cloreto de cálcio. Uma vez dentro da célula, o DNA estrangeiro é replicado cada vez que o DNA se replica.

Observe que no processo de inserção de um pedaço de DNA estrangeiro, o sítio de restrição é duplicado, com uma cópia em ambos os terminais da inserção. Essa propriedade facilita a remoção posterior da inserção clonada caso seja necessário, já que está incluída entre os sítios de restrição (fig. 13.6).

Clonagem com Enzimas de Restrição

Para que as clonagens de DNA de diferentes procedências tenham êxito, algumas condições devem ser satisfeitas. Um plasmídeo veículo deveria ser clivado em apenas um ponto pela endonuclease. Se for clivado em mais de um ponto, ele irá se fragmentar durante o experimento. Entretanto, alguns fagos veículos devem ser clivados em dois pontos, de modo que o DNA estrangeiro possa substituir a extensão do DNA do fago, ao invés de simplesmente ser inserido. Veículos comuns, derivados do fago λ , foram chamados de **fagos Caronte** por causa do barqueiro mitológico do Rio Estige. (Veja capítulo 14 para uma discussão detalhada sobre o fago λ).

Durante a infecção normal do fago (capítulo 7), somente o genoma do tamanho do fago é empacotado nas cabeças λ . Assim, para λ ser um vetor válido, o DNA estrangeiro deve substituir parte de seu DNA. Observamos que λ pode funcionar com bastante eficiência como um veículo híbrido com um segmento de 15.000 pares de bases (15 quilobases ou 15 kb) substituído pelo DNA estrangeiro, porque tal segmento do DNA do fago é usado para integração dentro do cromossomo da *E. coli*, uma função não essencial do fago. Ou seja, o fago pode infectar uma bactéria, replicar-se dentro dela e ser liberado sem a região de integração. Os engenheiros genéticos criaram uma molécula de DNA do λ sem a região não essencial e que contém um sítio de cli-

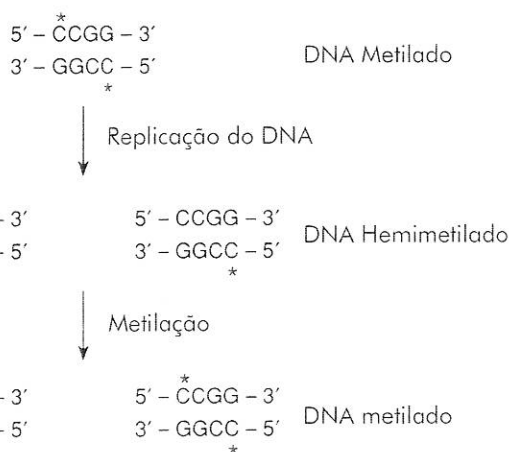


Figura 13.4 O DNA hospedeiro é metilado no sítio de restrição *Hpa*II. O asterisco indica grupos de metil nas citosinas. Após a replicação, o DNA é hemimetilado; as novas fitas não possuem grupos metil. Então, o DNA hemimetilado é totalmente metilado por enzimas celulares.

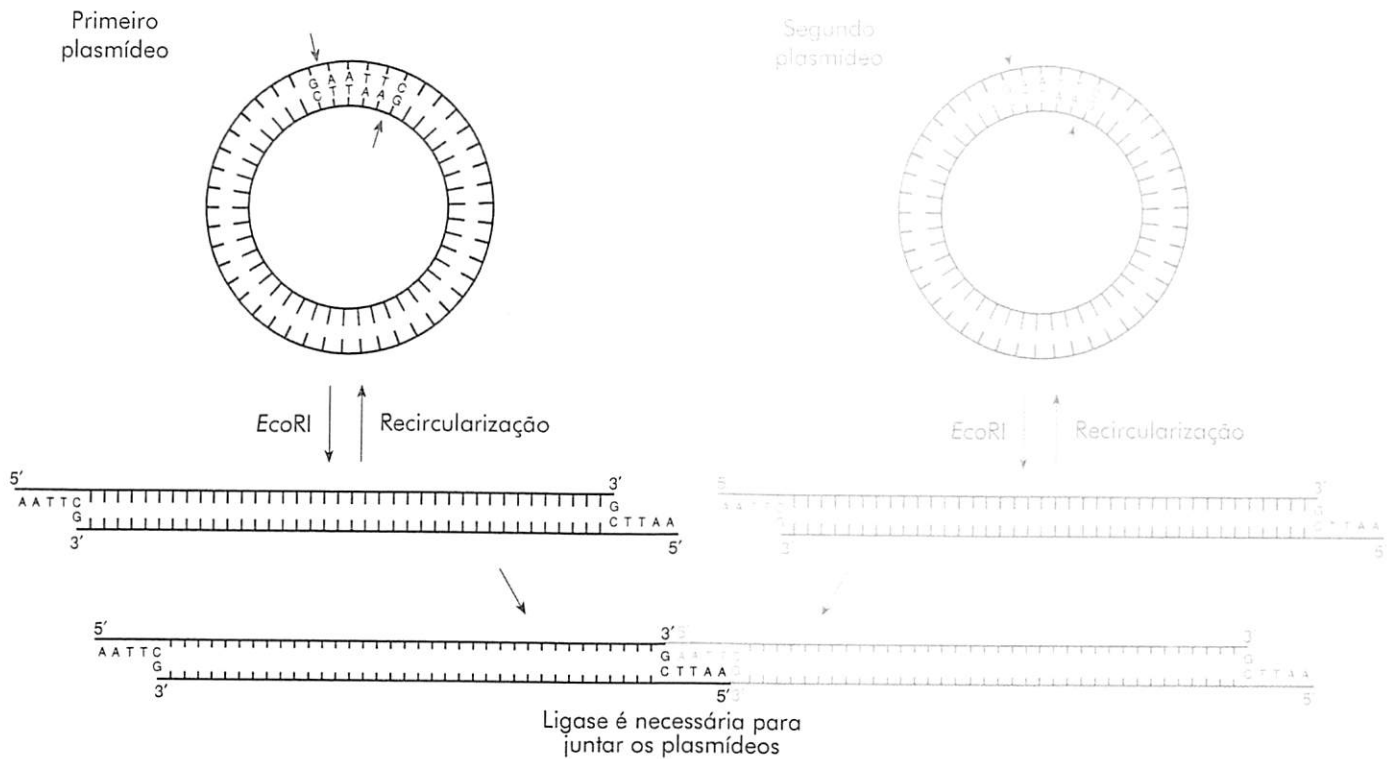


Figura 13.5 DNA circular do plasmídeo com um palíndromo reconhecido pela *EcoRI*. Após o DNA ser clivado pela endonuclease, ele apresenta dois terminais expostos que podem se juntar para recircular a molécula ou unir duas ou mais moléculas lineares do DNA clivado pela mesma endonuclease de restrição. Os cortes são fechados com a DNA ligase. S. Cohen, H. Boyer e seus colaboradores uniram plasmídeos pela primeira vez através desta técnica em 1971.

vagem em seu lugar. Assim, somente o DNA híbrido pode ser incorporado nas cabeças do fago, pois o DNA menor, sem uma inserção, é pequeno demais para ser empacotado.

Uma desvantagem da clonagem com plasmídeos normais de *E. coli* é que eles são instáveis se o DNA estrangeiro for muito grande, maior que 15 kb. Ou seja, se um segmento cromossômico for clonado, o plasmídeo tende a perder partes do clone quando se replica. Principalmente por esta razão, os geneticistas começaram a usar o fago λ como vetor (fig. 7.21), pois estes fagos poderiam manter com êxito o DNA estrangeiro no tamanho de 24 kb.

O cromossomo do fago tem cerca de 50 kb de DNA. Dentro da cabeça do fago ele é linear, e dentro da célula, circular. O DNA que preenche a cabeça do fago é reconhecido durante a infecção porque possui um pequeno segmento de DNA de fita simples chamado sítio *cos* (doze bases; derivado de *cohesive ends* ou terminais aderentes ou coesivos) em qualquer um dos terminais. A reassociação dos sítios *cos* permite que os cromossomos λ se circularizem ao entrarem em uma célula hospedeira. Cortando o DNA no sítio *cos* o círculo se abre em uma molécula linear (fig. 13.7). Os sítios *cos* têm a vantagem de permitir que os geneticistas clonem segmentos ainda maiores, porque até mesmo os 24 kb pode não ser adequado para se estudar alguns genes ou grupos de genes em eucariotos. Muitos genes eucarióticos são muito grandes devido a seus ín-

trons e segmentos de controle transcricional. DNA de até 50 kb pode ser clonado se os segmentos *cos* forem anexados a um dos terminais com uma origem plasmidial de replicação do DNA e com um gene antibiótico selecionável. Esses plasmídeos que contêm sítios *cos* são chamados de **cosmídeos** (fig. 13.7). Os cosmídeos permitem não só a clonagem de porções muito grandes de DNA, mas também selecionam grandes segmentos de DNA estrangeiro, pois pequenos cosmídeos não são incorporados nas cabeças do fago. Assim, o DNA estrangeiro que varia de 2,5 a 50 kb em tamanho pode ser clonado usando plasmídeos, fagos Caronte ou cosmídeos (pedaços muito maiores de DNA, com cerca de um milhão de bases, podem ser clonados na levedura, como descreveremos adiante).

Selecionando Vetores Híbridos

Nos métodos que descrevemos, as enzimas de restrição cortam tanto o vetor quanto o DNA estrangeiro. Então, os dois são misturados na presença da ligase. Os muitos produtos que são criados podem ser divididos em três categorias: vetores com DNA estrangeiro, vetores sem DNA estrangeiro e fragmentos. Em uma seção posterior, discutiremos os métodos para se encontrar um pedaço específico de DNA estrangeiro em um vetor. Aqui, vamos ressaltar como os vetores com inserções de qualquer tipo são selecionados.

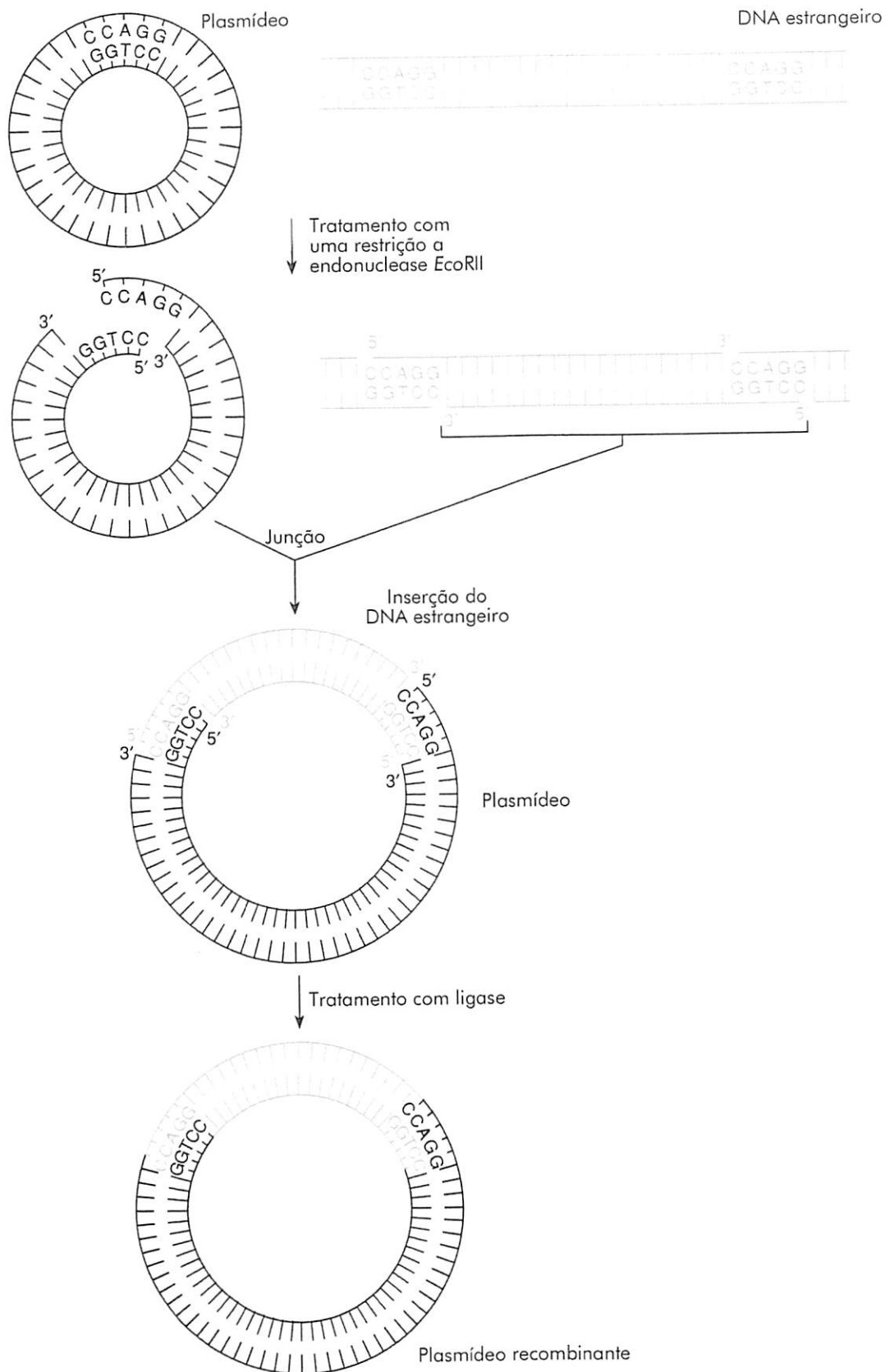


figura 13.6 Formação de um plasmídeo recombinante. A mesma endonuclease de restrição, neste caso *EcoRII*, é usada para clivar tanto o DNA hospedeiro quanto o estrangeiro. Algumas vezes, os terminais clivados irão se ligar para formar um plasmídeo com uma inserção de DNA estrangeiro. A ligase sela as fendas (nicks). Em 1973, P. Berg foi o primeiro cientista a clonar um pedaço de DNA estrangeiro quando inseriu o genoma do vírus SV40 em um do fago λ .

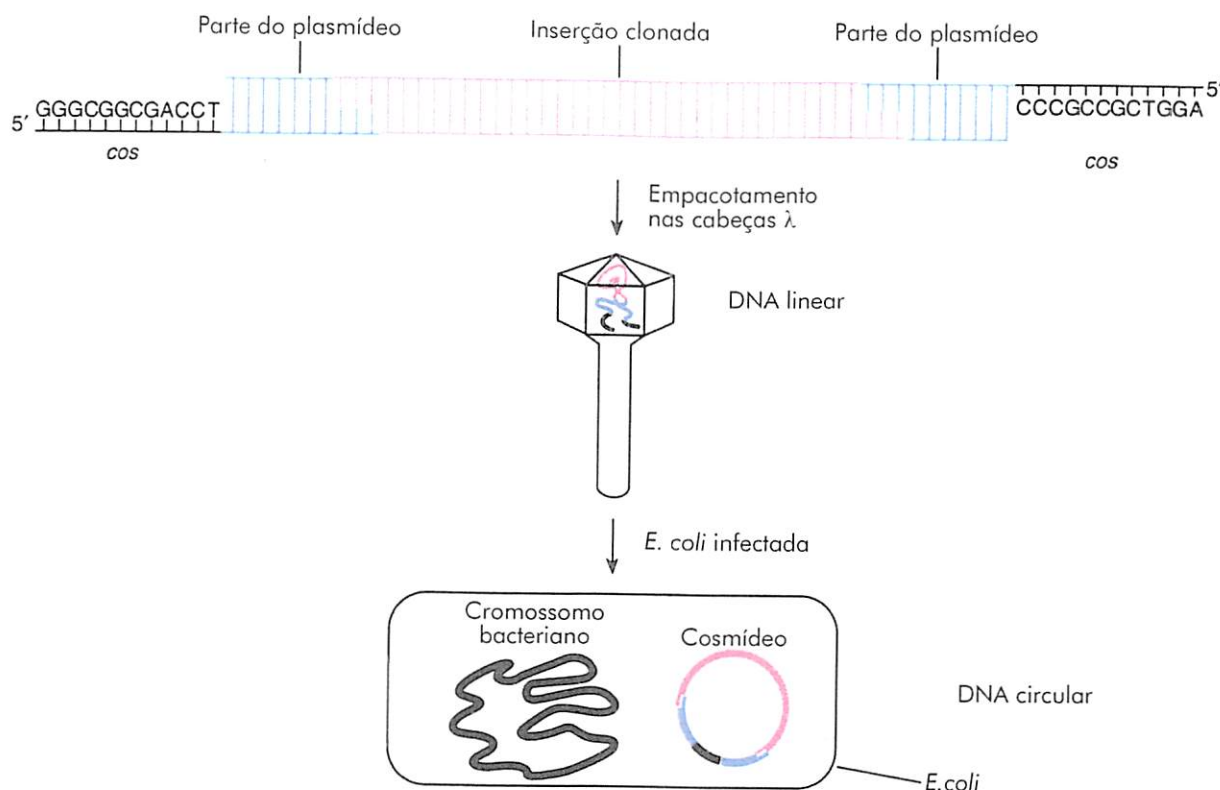


Figura 13.7 Um cosmídeo é um plasmídeo, presente dentro das cabeças dos fagos lambda e com sítios cos, que pode ser transferido para dentro de bactérias, um método muito eficiente de infecção. Os sítios cos possuem fita simples; eles se reanexam em um círculo quando estão dentro do hospedeiro. (As linhas mais fortes do DNA linear, do cromossomo bacteriano e do cosmídeo possuem DNA de fita dupla.)

Os fagos Caronte são selecionados simplesmente por sua capacidade de infectar células de *E. coli*. Como já mencionamos, após a manipulação, somente o DNA λ com uma inserção estrangeira é empacotado devido às exigências de tamanho. Os plasmídeos que contêm DNA estrangeiro podem ser selecionados através da triagem para resistência a antibióticos. Por exemplo, um plasmídeo de clonagem amplamente usado é chamado de pBR322. (Normalmente, os plasmídeos são nomeados com as iniciais de seus descobridores. O vetor pBR322 foi descrito pela primeira vez em um trabalho publicado em 1977 pelos autores F. Bolivar e R. Rodriguez, portanto, pBR.) O plasmídeo pBR322 contém genes para a resistência à tetraciclina e à ampicilina e vários sítios de restrição. Há, por exemplo, um sítio *Bam*HI no gene para resistência à tetraciclina (fig. 13.8). Após o procedimento de ligação, plasmídeos com e sem DNA estrangeiro estarão presentes. Então, as células da *E. coli* são expostas a essa mistura de DNA na presença do cloreto de cálcio. Após absorver o DNA, a *E. coli* é inseminada em um meio sem antibióticos. A replicação em placas é feita em meios com um ou os dois antibióticos. As colônias resistentes a ambos os antibióticos são compostas de células com plasmídeos que não contêm inserções. As que são resistentes apenas à ampicilina possuem um plasmídeo com uma inserção.

As colônias que não são resistentes a nenhum antibiótico possuem células sem plasmídeos.

Ligação de Terminal Cego (*blunt-end*)

O tratamento com a endonuclease de restrição pode não ser suficiente para a clonagem, pois ela pode clivar o gene no lugar errado, como por exemplo, no meio de um gene desejado, ou o DNA estrangeiro pode ter sido isolado por outros métodos, tais como a fragmentação física. Nesses casos, vários outros métodos de clonagem podem ser usados.

O método mais comum de unir moléculas estrangeiras e veículos que não possuem terminais aderentes é chamado de **ligação de terminal cego** (*blunt-end*). A enzima do fago, a ligase do DNA T4, pode juntar o DNA de terminal cego. Os terminais cegos podem ser criados quando segmentos do DNA, a serem clonados, são criados fisicamente quebrando o DNA ou usando endonucleases de restrição específicas, tais como *Hind*II (fig. 13.2) que formam terminais cegos. Uma vez que a ligase não é específica sobre quais terminais cegos que ela une, muitos produtos diferentes não desejados resultam de sua ação. As enzimas de restrição que produzem terminais aderentes são preferidas para a clonagem.

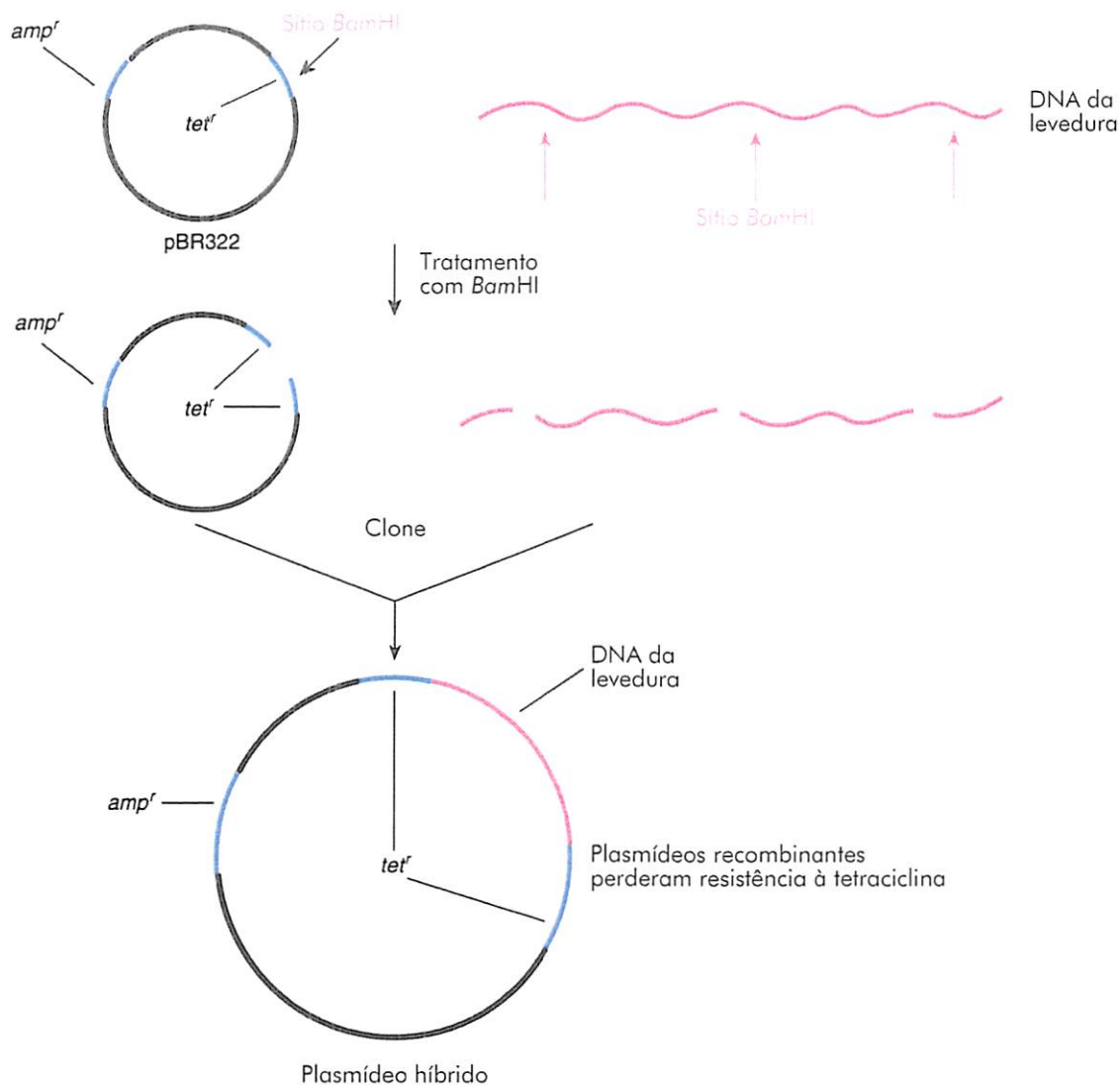


Figura 13.8 Plasmídeo pBR322 da *E. coli*. Este plasmídeo carrega dois genes, *amp^r* e *tet^r*, que conferem resistência à ampicilina e à tetraciclina, respectivamente. Um sítio de restrição *Bam*HI ocorre dentro do gene *tet^r*. Um fragmento clonado dentro do gene *tet^r*, conseqüentemente, destrói a resistência à tetraciclina. (As linhas fortes pretas, azuis e vermelhas representam DNA de fita dupla).

Uma variação da ligação de terminal cego usa **ligadores (linkers)**—porções curtas de DNA, sintetizadas artificialmente que contêm um sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição. Quando esses ligadores são anexados aos pedaços cegos do DNA, e então são tratados com a endonuclease de restrição adequada, terminais aderentes são criados. Na figura 13.9, os ligadores são segmentos de DNA de doze pares de base (pb) com um sítio *Eco*RI no meio. Eles estão anexados ao DNA para serem clonados com a DNA ligase do T4. O tratamento subsequente com *Eco*RI resultará em um DNA com terminais aderentes *Eco*RI.

Geralmente, o DNA para a clonagem pode ser obtido de duas formas: (1) um gene desejado ou um segmento de DNA pode ser sintetizado ou isolado ou (2) o genoma de um organismo pode ser quebrado em pequenos pedaços e estes pequenos pedaços podem ser clonados aleatoriamente (**clonagem *shotgun***). O segmento de DNA desejado pode

então ser escolhido entre os vários clones criados. Primeiro, consideraremos a síntese ou o isolamento de um gene específico antes de cloná-lo e, então, examinaremos o processo de localização do gene desejado depois de ter sido clonado.

Clonagem de um Gene Específico

Criação de DNA para Clonagem

Para clonar um gene específico (ou segmento do DNA) o cientista deve ter um pedaço de DNA purificado de fita dupla, que contém aquele gene. Há inúmeras formas de se obter este DNA. Algumas requerem a criação ou o isolamento de RNA mensageiro de fita simples que então é enzimaticamente convertido em um DNA de fita dupla. O problema é então reduzido à obtenção do RNA mensageiro desejado.

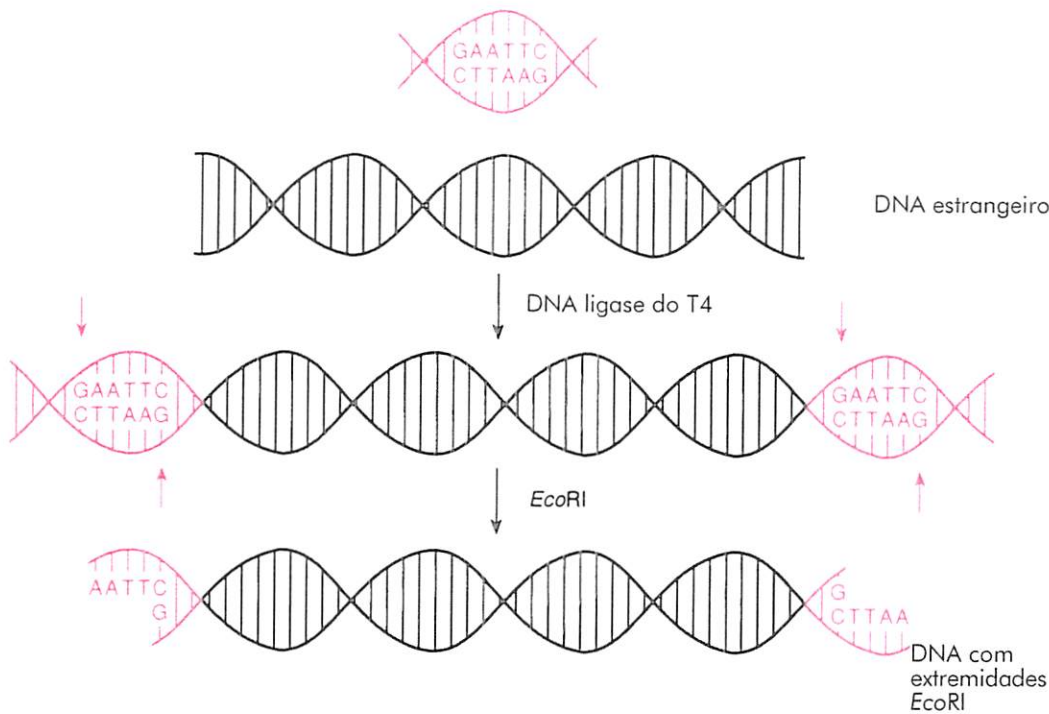


Figura 13.9 Ligadores: pequenos segmentos de DNA com um sítio de restrição interno. Ligadores podem ser adicionados ao DNA de terminais cegos pela DNA ligase do T4. As enzimas de restrição criam o DNA com terminais que são compatíveis com qualquer corte do DNA pela mesma enzima de restrição (neste caso, *EcoRI*).

O RNA mensageiro para um gene específico pode ser obtido de várias formas diferentes, dependendo do gene em questão. Se grandes quantidades de RNA de uma célula específica estiverem disponíveis, o RNA pode ser diretamente isolado. Por exemplo, eritrócitos mamíferos possuem quantidades abundantes de RNAs mensageiros de α e β -globinas. Da mesma forma, o RNA ribossômico e muitos RNAs transportadores são relativamente fáceis de serem isolados em quantidades adequadas para a clonagem.

O DNA de fita dupla para a clonagem é feito a partir de RNA purificado com o auxílio da enzima transcriptase reversa, isolada de vírus tumorais de RNA (capítulo 10). Descrevemos aqui a conversão de RNA para DNA usando um RNA mensageiro eucariótico com cauda poli-A 3' (fig. 13.10). No primeiro estágio, um *primer* poli-T é adicionado, o qual se parece com a cauda poli-A do RNA mensageiro. Essa região curta de fita dupla agora é um *primer* para a atividade da polimerase—há um 3'-OH. O RNA com *primer* é então tratado com a enzima transcriptase reversa, que irá polimerizar os nucleotídeos do DNA usando o RNA como molde. O resultado é uma molécula híbrida DNA-RNA (fig. 13.10c).

Então, o híbrido é tratado com a enzima RNaseH, que cria cortes aleatórios na parte do RNA do híbrido. Esses cortes fornecem ao *primer* a configuração para a síntese de reparo, o mesmo reparo feito nos fragmentos Okazaki quando o *primer* de RNA é removido e substituído por DNA. Assim, o híbrido é tratado com a DNA polimerase I que substitui cada pequeno segmento de RNA por DNA, base por base. Por fim, os curtos segmentos

de DNA da segunda fita são ligados através da ação da DNA ligase (fig. 13.10f). O DNA resultante de fita dupla é chamado de **DNA complementar (cDNA)**. Dessa forma, começando com um pedaço de RNA mensageiro de fita simples, criamos um pedaço de DNA de fita dupla. Agora, esse pedaço pode ser clonado usando os métodos de terminais cegos que já descrevemos.

Se o RNA não está disponível em quantidades grandes o suficiente, é possível sintetizar o DNA *in vitro* se a sequência de aminoácido de sua proteína for conhecida. Uma possível sequência de nucleotídeos pode ser obtida do dicionário do código genético (tabela 11.4) se conhecermos a sequência de aminoácidos de um produto proteico do gene. Esse método provavelmente não recriará o DNA original por causa da redundância no código genético. Em outras palavras, qualquer um dos seis diferentes códons poderia ter codificado uma leucina da proteína. Apesar da natureza conjectural, é possível sintetizar um pedaço de DNA que codificará uma proteína específica. Atualmente, máquinas automáticas que adicionam uma base por vez em ciclos de dez minutos podem sintetizar sequências de DNA com mais de cem bases.

Pode-se perceber que os métodos descritos até aqui, de se criar cDNA ou DNA sintético usando o dicionário do código genético, produzem um DNA que não possui o promotor e suas sequências de controle transcricional, assim como outras áreas não traduzidas do DNA (introns). Caso se queira clonar um gene intacto com seus promotores e introns, então a clonagem pode ser feita a partir da criação de pedaços aleatórios do genoma. O gene de interesse pode

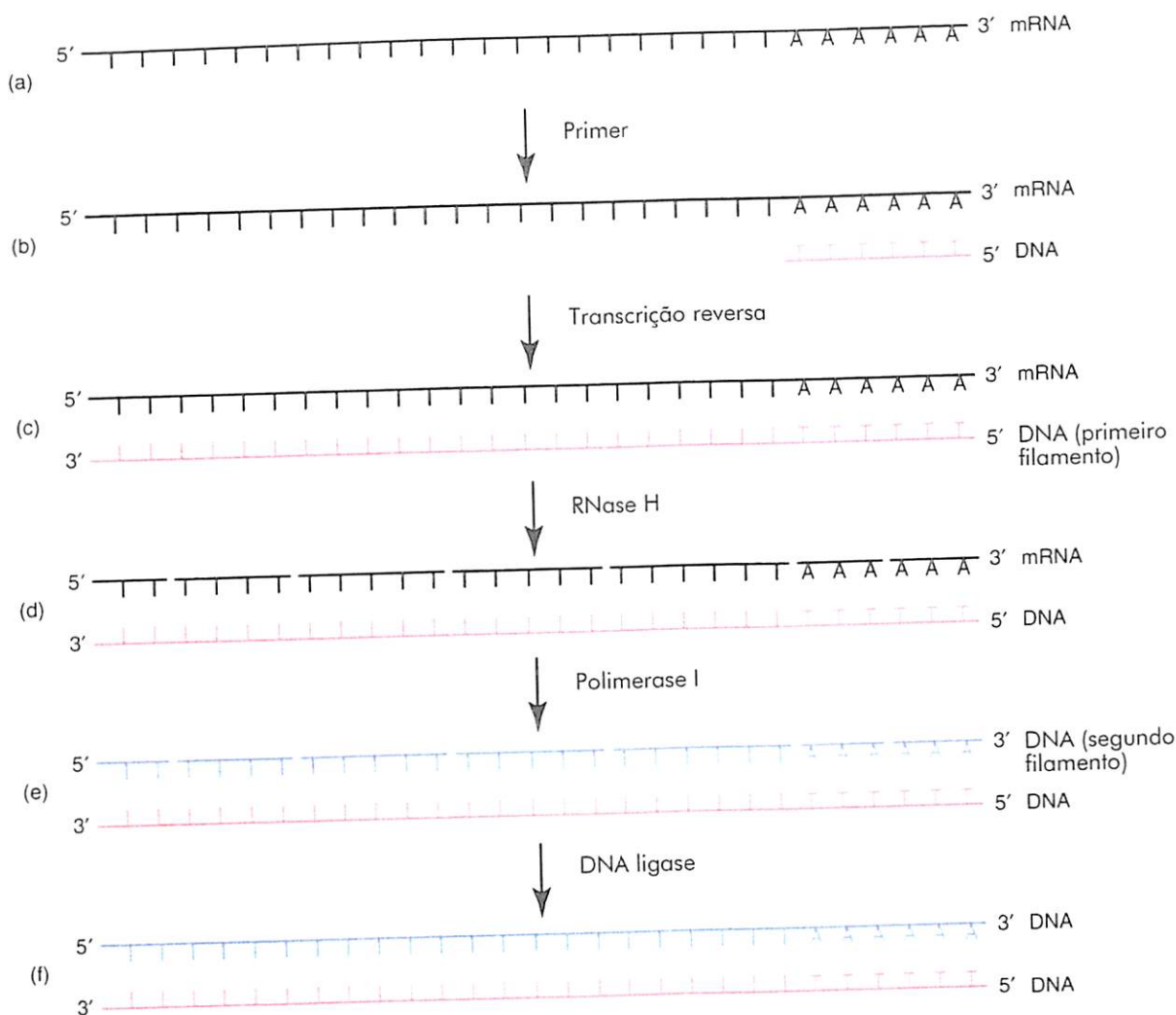


figura 13.10 (a) Um RNA mensageiro, mostrado em preto, começa como uma fita simples. (b) Um segmento de DNA poli-T (marrom) é adicionado como *primer*, complementando a cauda poli-A 3' do RNA mensageiro eucariótico. (c) A transcriptase reversa age nessa configuração de *primer* para sintetizar a fita simples de DNA a partir do molde de RNA. (d) O RNA é então degradado aleatoriamente pela RNase H. (e) Os segmentos do RNA são, então, substituídos por DNA (azul) através da ação da DNA polimerase I. (f) Após o tratamento com DNA ligase, o resultado final é um DNA complementar de fita dupla (cDNA).

ser encontrado tanto antes quanto depois cloná-lo, embora geralmente isso seja feito após a clonagem.

Criando uma Biblioteca Genômica

Quando um cDNA ou DNA sintético não pode ser usado para a clonagem, o DNA total de um organismo pode ser quebrado em pequenos pedaços para isolar o gene ou fragmento de DNA desejado. O isolamento pode ser feito antes ou depois da clonagem. Este DNA é chamado de DNA genômico para diferenciá-lo do cDNA.

Se o DNA original for isolado antes da clonagem, então, somente aquele DNA precisa ser clonado. Outra alternativa é utilizar uma abordagem "*shotgun*" para clonar uma amostra do genoma inteiro de um organismo (em pequenos pedaços, é claro), criando uma **biblioteca genômica**, um conjunto de fragmentos clonados do genoma

original de uma espécie (fig. 13.11). Em uma biblioteca genômica, um gene desejado pode ser localizado após já ter sido clonado.

Transferência Southern



Quando segmentos de DNA são gerados aleatoriamente pela digestão da endonuclease, um gene desejado deve ser localizado. Como mencionado, podemos procurar o gene antes ou depois de ter sido clonado. Primeiro, vamos considerar o procedimento para a localização de um gene específico em uma digestão do DNA, antes do DNA ter sido clonado.

Para localizar um gene específico no meio da digestão de um DNA, deve-se ter uma **sonda** específica. Em geral, sondas são ácidos nucleicos com sequências que localizam de modo preciso uma sequência de DNA complementar

através de hibridização. As sondas são marcadas para que sejam identificadas posteriormente por autorradiografia ou técnicas quimiluminescentes (técnicas nas quais as marcações usadas apresentam fluorescência em luz ultravioleta ou laser). Assim, se quisermos localizar o gene da β -globina, poderíamos usar o RNA mensageiro ou o cDNA da β -globina marcados radiativamente. Os híbridos RNA-DNA ou DNA-DNA iriam se formar entre o gene específico e a sonda radioativa. Então, a autorradiografia ou a quimiluminescência iriam localizar a sonda radioativa.

Vamos supor que desejamos clonar o gene β -globina do coelho. Primeiro, teríamos de criar uma digestão de restrição do DNA do coelho (fig. 13.12). Depois, submeteríamos esta digestão à eletroforese em agarose para se-

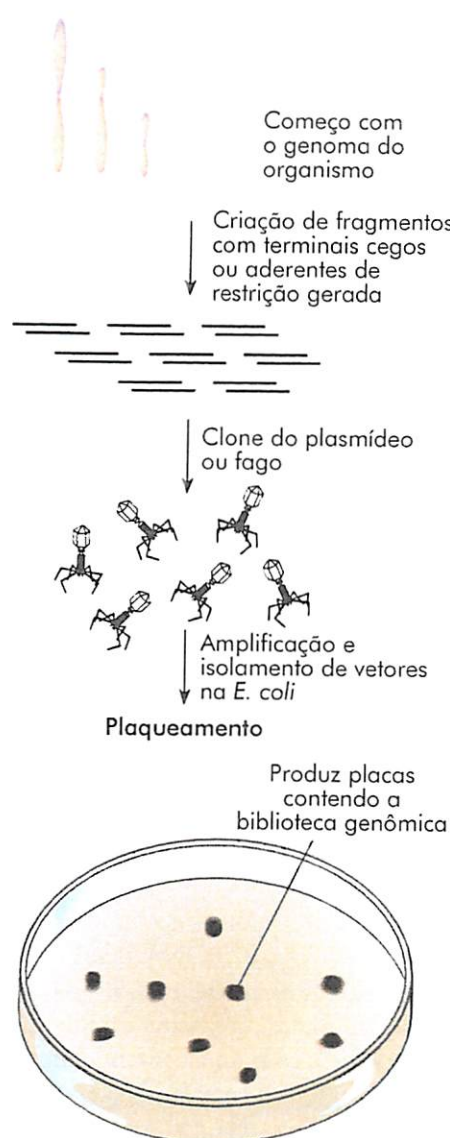


Figura 13.11 Criação de uma biblioteca genômica usando a abordagem *shotgun* na criação de inserções. Primeiro o genoma é fragmentado. Depois, os fragmentos são clonados aleatoriamente em vetores. O conjunto desses vetores é chamado de biblioteca genômica.

parar os vários fragmentos de acordo com o tamanho. A agarose é um bom meio para separar fragmentos de DNA de ampla variedade de tamanhos.

Em uma digestão desse tipo, no entanto, normalmente há tantos fragmentos que o resultado é simplesmente uma "mancha" de oligonucleotídeos, desde o menor até o maior. Para prosseguir, temos que transferir os fragmentos para outro meio de sondagem, ou os fragmentos de DNA iriam se difundir para fora do gel de agarose. Os filtros de nitrocelulose ou membranas de nylon são excelentes para a hibridização, pois os fragmentos de DNA se ligam a estas membranas e não se dissipam. O procedimento de

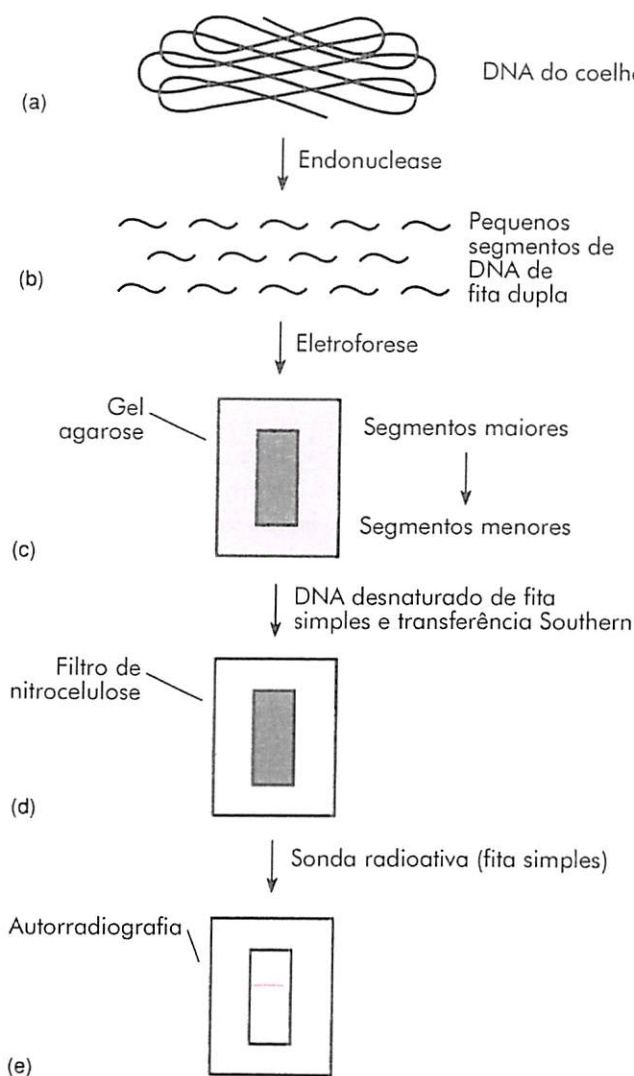


Figura 13.12 Localização do gene da β -globina do coelho em uma digestão de DNA usando a técnica de transferência Southern. O DNA do coelho é segmentado com uma endonuclease de restrição (b) e depois é submetido à eletroforese em géis de agarose. A transferência Southern transfere o DNA para filtros de nitrocelulose (d). Por fim, uma sonda radioativa (RNA mensageiro de β -globina) localiza o fragmento de DNA com o gene da β -globina depois da autorradiografia (e).



Edwin M. Southern (1938-).
(Cortesia de Edwin Southern.)

transferência, realizado pela primeira vez por E. M. Southern, é chamado de **transferência Southern (Southern blotting)**. Nesta técnica, o DNA de fita dupla no gel de agarose primeiro é desnaturado tornando-se um DNA de fita simples, geralmente com NaOH. Então, o gel de agarose é colocado diretamente contra um pedaço do filtro de nitrocelulose. Essas duas camadas são então colocadas em cima de uma esponja com o lado da agarose para baixo. Filtros secos de papel colocados em cima da nitrocelulose absorvem por capilaridade o fluido da esponja que passa através do gel e do filtro de nitrocelulose, transferindo os segmentos de DNA da agarose para a nitrocelulose (fig. 13.13). NaOH é usado como solução de transferência na bandeja. Então, os fragmentos da digestão do DNA são fixados de modo permanente no filtro de nitrocelulose por aquecimento. A hibridização DNA-DNA acontece no filtro. (Uma técnica similar pode ser realizada no RNA, que é chamada ironicamente de **transferência northern (northern blotting)** [N.T.: já que Southern é o mesmo que “sul” em inglês, e “northern”, seu oposto, norte]. As técnicas imunológicas, que não envolvem a complementaridade nucleotídica, podem ser usadas para sondar proteínas em uma técnica análoga chamada **transferência western**).

Uma sonda marcada pode ser obtida de várias maneiras. Nesse exemplo, a maneira mais fácil de obter uma sonda radioativa é isolar o RNA mensageiro da β -globina a partir de reticulócitos do coelho e construir o cDNA correspondente, utilizando o método da transcriptase reversa, conforme mencionado. Os desoxirribonucleotídeos usados durante a transcrição reversa são então sintetizados para conter fósforo radioativo, ^{32}P . Como mostra a figura 13.12, após a hibridização, uma única banda radioativa localiza um segmento de DNA com o gene da β -globina. Observe que a sonda, originada do RNA mensageiro, não terá os íntrons presentes no gene. Porém, a sondagem é bem sucedida desde que haja regiões complementares nas duas cadeias de nucleotídeos.

Para clonar o gene da β -globina, um segundo gel de agarose é colocado com uma amostra da digestão usada

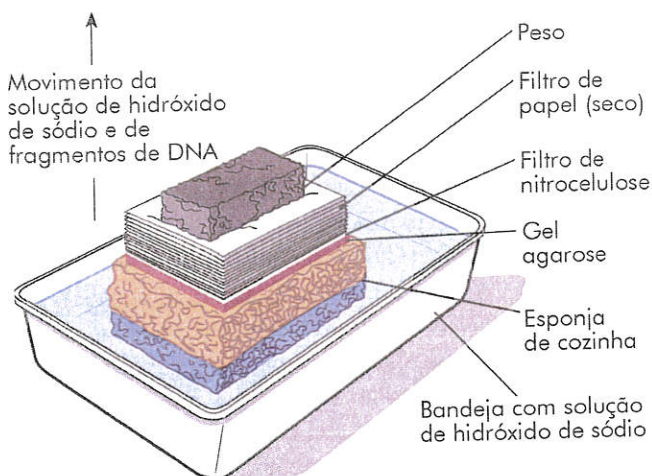


Figura 13.13 Disposição do gel e filtros na técnica de transferência Southern. A solução de NaOH é absorvida por capilaridade pelo filtro seco de papel, transferindo o DNA do gel de agarose para o filtro de nitrocelulose.

na figura 13.12. Este gel, que não está sujeito à hibridização DNA-DNA, teria o segmento β -globina no mesmo lugar. A banda, cuja localização é conhecida a partir da autorradiografia, poderia ser cortada do gel de agarose para isolar o DNA. Poderíamos então, clonar o DNA pelos métodos discutidos anteriormente neste capítulo.

Sondagem Para um Gene Clonado



Transferência Pontual (Dot Blotting)

Os métodos que descrevemos também são úteis na localização de genes já clonados dentro de plasmídeos, por exemplo, após uma biblioteca genômica ter sido construída. Neste caso, a eletroforese e a transferência Southern não são necessárias uma vez que estaremos sondando uma sequência específica do DNA já clonado, e não os segmentos do DNA dentro de uma digestão.

Por exemplo, o DNA de uma linhagem de célula híbrida humano-camundongo foi clonada a fim de localizar o DNA humano. Neste caso, uma linhagem celular híbrida tinha somente um cromossomo humano, o cromossomo 20. A fim de localizar o DNA desse cromossomo, foram usadas sondas isoladas de cromossomos humanos, as quais foram radiotivamente marcadas. Enquanto isso, 288 colônias de *E. coli*, cada uma contendo um plasmídeo híbrido, foram cultivadas e transferidas diretamente para um filtro de nitrocelulose. Na preparação da sondagem, as células foram lisadas e seus DNAs desnaturados. O DNA do plasmídeo dentro das células de cada clone foi então hibridizado com sondas radioativas. A figura 13.14 é uma autorradiografia dos 288 clones. As duas manchas escuras indicam clones que carregam o DNA do cromos-

somo humano 20 (estes clones se “acendem” por autorradiografia.) Esta técnica de hibridização do DNA clonado sem um estágio de separação eletroforética é chamada de **transferência pontual (dot blotting)**.

Essas técnicas também podem ser realizadas sem a disposição em grade de colônias que utiliza a replicação em placa, como descrito no capítulo 7. Assim, um gene específico pode ser localizado após a clonagem *shotgun*.

Transferência Western (Western Blotting)

Um método completamente diferente usado para localizar os genes específicos clonados utiliza a verdadeira expressão dos genes clonados nas células que contêm os plasmídeos. Se um gene eucariótico é clonado em um plasmídeo de *E. coli* numa posição *downstream* de um promotor ativo, este gene pode ser expressado (transcrito e traduzido em proteína). Os plasmídeos que permitem a expressão de seu DNA estrangeiro são chamados de **vetores de expressão**. Essa técnica apresenta alguns problemas, pois as bactérias normalmente não expressariam os genes eucarióticos. No entanto, foram desenvolvidos vetores especiais nos quais o sítio de clonagem está numa posição *downstream* de um promotor. Assim, o gene eucariótico torna-se parte do gene procariótico, produzindo uma proteína de fusão, geralmente com alguns poucos aminoácidos do procarioto. Obviamente, o gene eucariótico deve estar na orientação e na frase de leitura do códon corretas para uma tradução adequada, o que significa que a taxa de êxito desta técnica é relativamente baixa.

Um produto proteico específico pode ser localizado pela transferência de western, um método inteiramente análogo à transferência Southern e à transferência pontual.

Nessa técnica, ao invés de uma sonda de oligonucleotídeos radioativos, a sondagem é feita com anticorpos específicos para uma determinada proteína. Um segundo anticorpo, específico para o primeiro e rotulado com um marcador, geralmente fluorescente, localiza o primeiro anticorpo. Por exemplo, suponha que estamos procurando a expressão de uma determinada proteína nos clones da figura 13.14. Os clones seriam transferidos para uma membrana de nitrocelulose, onde seriam lisados (por exemplo, com vapor de clorofórmio). Então, um anticorpo, específico para determinada proteína, seria aplicado. Um segundo anticorpo, específico para o primeiro e rotulado com um marcador fluorescente, seria aplicado aos filtros. A fluorescência do segundo anticorpo localizaria a presença dos primeiros anticorpos e, assim, indicariam quais dos clones estão expressando o determinado gene. (fig. 13.15).

Vetores Eucarióticos

O assunto que descrevemos até agora envolve a introdução de plasmídeos quiméricos em bactérias, principalmente na *E. coli*. No entanto, há várias razões por que desejamos estender estas técnicas às células eucarióticas (boxe 13.1). Primeiro, um procarioto como a *E. coli* não é capaz de expressar plenamente alguns genes eucarióticos, uma vez que ele não possui sistemas enzimáticos necessários para algumas modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, tais como a eliminação dos íntrons e alguma modificação proteica. Segundo, desejamos estudar a organização e expressão dos genomas eucarióticos *in vivo* (no sistema vivo), algo que só podemos fazer trabalhando diretamente com células eucarióticas. Por fim, também



Figura 13.14 Autorradiografia da transferência pontual de 288 clones do DNA de uma linhagem celular híbrida humano-camundongo. Depois de lisar amostras de cada clone em um filtro de nitrocelulose, o pesquisador hibridizou os clones com sondas radioativas para sequências humanas específicas. As duas manchas escuras indicam clones que carregam DNA humano. A radiação ligeira de fundo na maior parte das manchas fornece o padrão de manchas necessário para orientar o pesquisador. (Fonte: Cortesia de Nick O. Bukanov.)

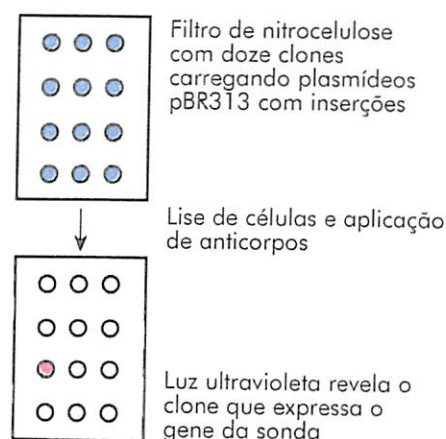


Figura 13.15 A técnica da transferência Western é usada para localizar uma proteína expressada dentre muitos clones. Os clones que podem carregar a proteína expressada são lisados. Anticorpos marcados são aplicados para localizar a proteína; um segundo anticorpo localiza o primeiro anticorpo por meio de um marcador colorido fluorescente, como mostrado aqui, ou por meio da autorradiografia.

BOXE 13.1

Ética e Genética

O Debate Sobre o DNA recombinante



Paul Berg (1926-).
(Cortesia do Dr. Paul Berg.)

Em 1980, Paul Berg recebeu o Prêmio Nobel de química por criar a primeira molécula de DNA clonada, um fago λ híbrido que continha o genoma do vírus tumoral dos símios, SV40. Seu trabalho foi preocupante para muitos, inclusive para ele. A discussão acerca do DNA recombinante estava em andamento. Berg voluntariamente parou de inserir os genes de vírus tumorais em fagos que atacam o vírus a bactéria intestinal comum *E. coli*.

As pessoas continuavam preocupadas com os perigos de se trabalhar com o DNA recombinante. Uma preocupação óbvia era a de que os genes para o câncer para toxinas "escapassem" do laboratório. Em outras palavras, a tecnologia do DNA recombinante poderia criar uma bactéria ou plasmídeo que contivesse genes para toxinas ou para tumores. Então, a bactéria ou plasmídeo modificados poderia acidentalmente infectar as pessoas. Um relatório de 1974 pela National Academy of Sciences resultou em uma reunião em fevereiro de 1975, no Asilomar Conference Center, no sul de São Francisco. Berg estava nesta reunião, juntamente com cem biólogos moleculares. As recomendações do Asilomar Committee mais tarde formaram as bases para as diretrizes oficiais desenvolvidas pelo National Institute of Health (NIH). Em essência, o NIH estabeleceu diretrizes de contenções.

Contenção significa levantar barreiras físicas e biológicas contra o escape de organismos perigosos. As orientações da NIH definiram quatro níveis de risco, desde mínimo até alto, e quatro níveis de contenção física para eles (chamados de P1 até P4). Os experimentos mais arriscados, que lidam com a manipulação de vírus tumorais e de genes para toxinas, exigem cuidado extremo, que inclui travas de pressão negativa de ar no laboratório e experimentos feitos em cabines de fluxo laminar, na qual o ar é filtrado ou incinerado.

Contenção biológica significa desenvolver células hospedeiras e vetores manipulados que são incapazes de se reproduzir fora do laboratório, mesmo se escaparem. Os trabalhos de alto risco são feitos com células hospedeiras ou vetores modificados. Por exemplo, uma bactéria da linhagem EK2 da *E. coli* não consegue sobreviver no intestino humano porque possui mutações que não lhe permitem sintetizar a timina ou o diaminopimelato. A falta da capacidade de síntese de timina é letal, pois a célula não pode replicar seu DNA. O diaminopimelato é um elemento da parede celular e sem ele as células se rompem. Estas bactérias também carregam mutações que as tornam ex-

gostaríamos de aprender a manipular os genomas dos eucariotos por razões médicas e econômicas. Para esses fins, discutiremos os plasmídeos eucarióticos e a manipulação direta dos genomas eucarióticos *in vivo*.

Vetores da Levedura

As leveduras, pequenos eucariotos que podem ser manipulados em laboratório da mesma forma que os procarionotos, vêm sendo estudadas exaustivamente. A levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, possui um plasmídeo que ocorre naturalmente. Além disso, plasmídeos bacterianos foram introduzidos na levedura. Infelizmente, as células tendem a perder esses plasmídeos. No entanto, esse entrave foi superado pela construção de plasmídeos bacterianos que contêm um centrômero de levedura (CEN) e a origem da replicação de DNA das leveduras (ARS para a sequência de replicação autônoma; fig. 13.16). A levedura carrega os plasmídeos de uma geração à outra. Os plasmídeos podem possuir sequências teloméricas inseridas e podem então se tornar lineares através do corte das sequências teloméricas pela endonuclease. De outro modo, os plasmídeos podem ser linearizados primeiro e depois ter as sequências teloméricas adicionadas a seus terminais. Então, os plasmídeos são chamados de **cromossomos artificiais de levedura (YACs)**. A principal vantagem dos YACs é que eles são capazes de aceitar pedaços grandes de inserções de DNA. Lembre-se que um cosmídeo pode reter cerca de 50 kb; um YAC pode reter 800 kb ou mais. A capacidade de clonar tal quantidade de DNA é valiosa quando se considera os grandes genes eucarióticos e o Projeto do Genoma Humano (veja a seção com este título mais adiante neste capítulo).

Os estudos sobre o DNA recombinante na levedura têm contribuído para o aumento de nosso conhecimento a respeito da regulação dos genes em eucariotos, para entender como o centrômero funciona e a maneira na quais os terminais dos cromossomos lineares eucarióticos são replicados. Além disso, os YACs têm nos proporcionado analisar sequências de grandes segmentos do DNA eucariótico.

tremamente sensíveis aos sais da bile. Assim, se por acidente as células escapassem, não ofereceriam virtualmente nenhuma ameaça. Os plasmídeos usados na pesquisa recombinante foram modificados para que não pudessem ser transferidos de uma célula a outra. Novamente, se a contenção falhasse, nem as células hospedeiras nem seus plasmídeos sobreviveriam.

Em 1979, as normas de procedimento se tornaram mais brandas. Apesar da consciência de se ter cuidado, parece que os receios iniciais eram injustificáveis. Hoje, o trabalho com o DNA recombinante parece oferecer pouco perigo: a contenção funciona muito bem e as bactérias que sofreram modificações genéticas sobrevivem muito pouco em condições naturais. A *E. coli* vive no intestino dos mamíferos há milhões de anos e, portanto, já teve inúmeras oportunidades de incorporar DNA mamífero em seu genoma (células intestinais estão morrendo e descamando do intestino o tempo todo). Nenhuma "linhagem Andrômeda" surgiu e não há nenhuma previsão de que isso aconteça no futuro.

A preocupação atual está centrada na aceitabilidade de culturas geneticamente modificadas (culturas GM).

Como discutiremos mais tarde, um quarto das terras americanas cultiváveis está plantada com culturas geneticamente modificadas, modificadas principalmente para resistência a insetos. Essas modificações reduziram o uso de inseticidas. (Para o algodão e o milho, por exemplo, o uso do inseticida líquido caiu 3,6 milhões de litros e o de inseticida em pó caiu 300 mil quilos em 1999). Entretanto, as pessoas estão preocupadas com os efeitos que essas modificações genéticas podem ter sobre os ecossistemas naturais: Quantos destes insetos valiosos serão mortos por engano? Apesar de os países do Terceiro Mundo estarem desesperados por tais tecnologias, os Estados Unidos, a Europa e os parceiros comerciais asiáticos estão exigindo que as culturas que exportamos não sejam geneticamente modificadas. Os agricultores também se preocupam com o fato de que as culturas geneticamente modificadas foram criadas para serem estéreis (a chamada "tecnologia *terminator*"), de modo que novas sementes devem ser compradas a cada ano.

Mais recentemente, o debate sobre o DNA recombinante sofreu uma nova reviravolta, mostrando-se como um conflito entre a liberdade acadê-

mica e o sigilo industrial. Parece que a tecnologia do DNA recombinante é muito lucrativa. Muitos cientistas acadêmicos fundaram empresas de engenharia genética ou se afiliaram a empresas farmacêuticas. Todavia, as filosofias das empresas privadas e da academia estão sempre em conflito. Os esforços acadêmicos supostamente se resumem à liberdade de informações, com livre intercâmbio de dados entre os colaboradores, enquanto a empresa privada impõe certo grau de sigilo, pelo menos até a obtenção das patentes para proteger seus investimentos. Dessa forma, um conflito básico pode surgir para os cientistas especialistas na clonagem de genes. O conflito tem prevalecido desde 1980, quando a primeira patente para as técnicas do DNA recombinante foi concedida a Stanford University e a University of California. Em abril do ano de 2000, quando o presidente dos Estados Unidos, Bill Clinton, e o primeiro ministro britânico, Tony Blair, emitiram uma declaração conjunta solicitando que os dados sobre o genoma humano não fossem patenteados, o mercado de ações americano sofreu um declínio significativo. Este é um tempo tumultuado para a biotecnologia.

Vetores Animais

O veículo mais comumente usado em animais superiores é o vírus tumoral de DNA SV40. (O SV, que vem de *simian vacuolating virus*, ou vírus de vacuolização dos símios foi isolado pela primeira vez em macacos. No entanto, ele pode transformar células normais de camundongo, coelho ou hamster. Diferente do uso em bactérias da palavra *transformação*, em eucariotos a transformação se refere à alteração de uma célula normal para uma célula cancerosa de crescimento rápido.) Os SV40 é uma partícula icosaédrica com um pequeno cromossomo (5.224 pares de base), que é uma molécula de DNA circular e fita dupla.

Assim como os vetores λ , os vírions SV40 permitem que o DNA estrangeiro substitua parte de seu DNA. Assim, os vírus podem então ser usados nos estudos do DNA recombinante de duas maneiras (fig. 13.17). Eles podem se replicar e completar seu ciclo de vida com o auxílio de vírus não recombinantes, ou podem se replicar no hospedeiro sem ativar as partículas do vírus permanecendo como

plasmídeos circulares no citoplasma ou integrando-se aos cromossomos do hospedeiro. O SV40 tornou-se uma ferramenta valiosa nos estudos genômicos dos mamíferos. Por exemplo, o gene da β -globina do coelho foi clonado no SV40, além das sequências intensificadoras (capítulo 10) terem sido descobertas no SV40. Os vírus tumorais de DNA também têm aprofundado nossa compreensão a respeito da transformação em eucariotos (oncogêneses).

Vetores de Plantas

O sistema mais bem estudado para introduzir genes estrangeiros em plantas é o sistema natural do tumor galha-da-coroa (*crown gall*). A bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* causa tumores, conhecidos como galhas-da-coroa, em muitas plantas dicotiledôneas (fig. 13.18). Em essência, a galha-da-coroa é composta de células das plantas transformadas. Essas células foram transformadas por um plasmídeo dentro da bactéria chamada de plasmídeo indutor de tumor, ou *Ti*. A transformação ocorre quando

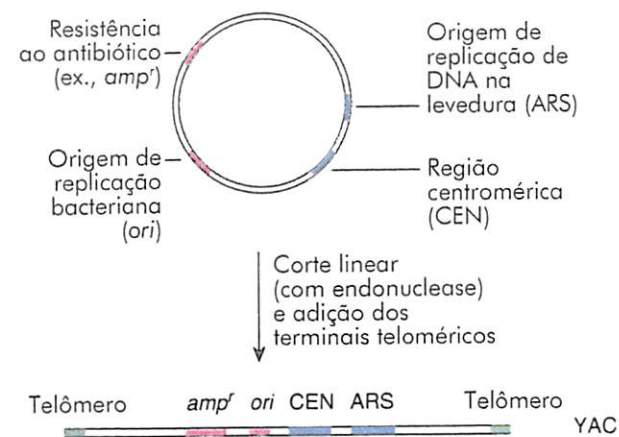


Figura 13.16 Plasmídeo pBR322 da *Escherichia coli* para o uso na levedura. Esse plasmídeo sobrevive e se replica tanto na levedura quanto na *E. coli*, porque contém a origem da replicação para ambos, assim como uma região centromérica da levedura (CEN). Quando o plasmídeo se torna linear e os telômeros são adicionados, o cromossomo artificial da levedura (YAC) torna-se adequado para a clonagem de grandes pedaços do DNA.

um pedaço do plasmídeo chamado de T-DNA (que corresponde ao DNA transferido) é integrado ao cromossomo da planta hospedeira. As células da galha-da-coroa produzem aminoácidos derivativos, chamados *opinas*, que as células *A. tumefaciens* utilizam. Através da manipulação desse sistema, os geneticistas começaram a entender o processo de transformação nas plantas, bem como a desenvolver um sistema de manipulação para a introdução de genes estrangeiros nelas.

O estudo de genética em plantas foi impulsionado pela grande disponibilidade de organismos modelos, similares à *E. coli*, às levedura e às moscas de frutas. Recentemente, muita atenção tem sido dada erva arabeta, *Arabidopsis thaliana* (fig. 13.19). Esta pequena planta é ideal para estudar a genética das plantas, pois seu genoma é pequeno, aproximadamente 100 milhões de pares de base localizados em apenas cinco cromossomos ($2n = 10$). Isso representa somente cinco vezes o genoma da levedura ou vinte vezes o genoma da *E. coli*. Assim, em termos de tamanho do genoma, a arabeta é bastante manejável. *A. thaliana* está incluída nas categorias dos organismos que foram sequenciados. As plantas crescem facilmente em grande número e cada planta produz até dez mil sementes. Consequentemente, este organismo se compara, de maneira favorável, às moscas de frutas e à levedura no estudo de questões sobre o controle genético em um eucarioto, neste caso, a planta.

Expressão de DNA Estrangeiro em Células Eucarióticas

O DNA estrangeiro pode ser introduzido em células eucarióticas por métodos similares à transformação bacteriana. Entretanto, o processo em eucariotos é chamado

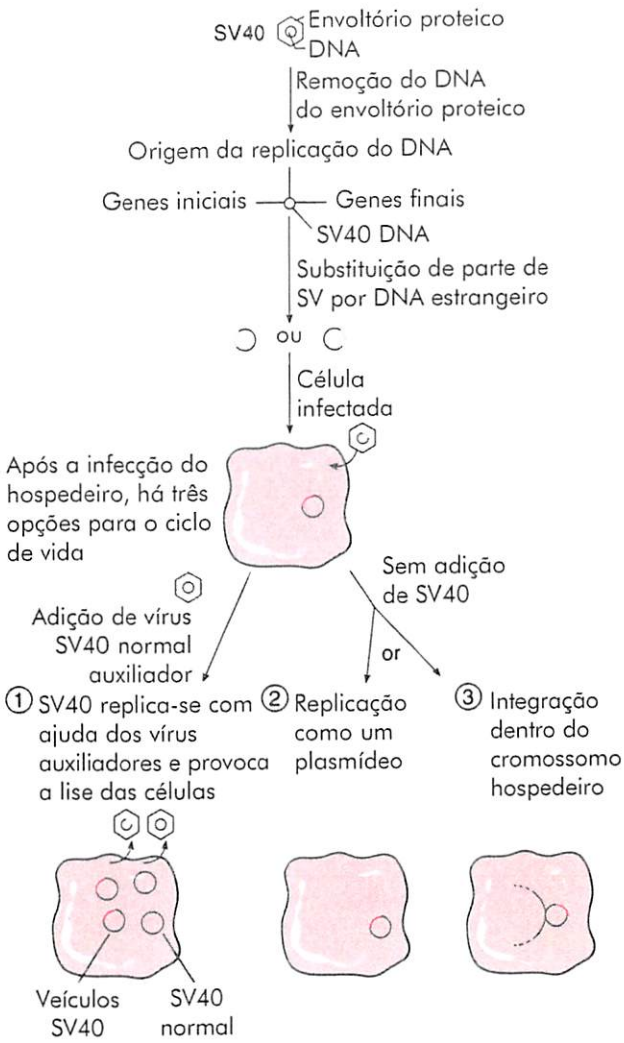


Figura 13.17 O vírus SV40 pode ser usado como um veículo de clonagem gênica. Apesar de parte dos vírus ser substituído pelo DNA inserido durante a clonagem, ele ainda pode se replicar com a ajuda dos vírus auxiliares normais (SV40 não recombinante). Sem a ajuda dos vírus auxiliares, ele pode tanto se replicar como um plasmídeo ou se integrar no cromossomo hospedeiro.



Figura 13.18 Galha-da-coroa na planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*) produzida pela *Agrobacterium tumefaciens*, contendo plasmídeos Ti. (Cortesia de Robert Turgeon e B. Gillian Turgeon, Cornell University).

de **transfecção**, pois, conforme descrevemos, o termo *transformação* em eucariotos é usado para indicar alterações que produzem células cancerosas. Os organismos que absorvem DNA estrangeiro são conhecidos como **transgênicos**. A maior parte das técnicas descritas aqui transcende as linhas taxonômicas.

As células de animais, ou células de plantas com suas paredes removidas (protoplastos), podem absorver cromossomos estrangeiros ou DNA diretamente do ambiente com uma baixa eficiência (na presença do fosfato de cálcio). Injetando-se diretamente o DNA, haverá um aumento considerável da eficiência. Por exemplo, hoje é comum produzir camundongos transgênicos através da injeção de DNA nos oócitos ou embriões de duas células obtidos de camundongos fêmeas após o tratamento hormonal apropriado (fig. 13.20). Após a injeção de cerca de 2 picolitros (2×10^{-12} litros) de DNA clonado, as células são reimplantadas nos úteros das fêmeas hospedeiras. Em cerca de 15% dessas injeções, o DNA estrangeiro incorpora-se ao embrião. Os animais transgênicos são usados para o estudo da expressão e controle de genes estrangeiros eucarióticos. Em 1988, o camundongo transgênico com propensão a ter câncer foi o primeiro animal geneticamente modificado a ser patenteado. Este camundongo forneceu um excelente modelo para o estudo do câncer

(capítulo 16). (Houve controvérsia em relação ao fato de os organismos superiores poderem ser patenteados; atualmente eles são). Camundongos já foram transfectados com êxito com um gene do hormônio do crescimento de um rato (fig. 13.21) e ovelhas transgênicas que expressam o gene para o fator de coagulação humano foram produzidas. O último debate sobre o DNA recombinante surgiu da clonagem de ovelhas em 1997 (boxe 13.2).

A transfecção também pode ser mediada por retrovírus (vírus de RNA que contém o gene para a transcriptase

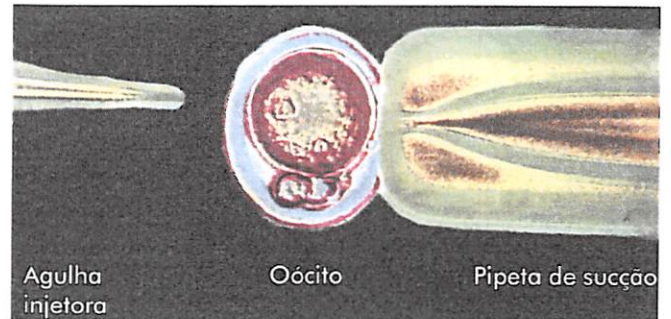


Figura 13.20 Injeção de DNA no núcleo (vesícula germinal) de um oócito de camundongo. O oócito é preso por uma pipeta de sucção. (© John Gardon/Phototake.)

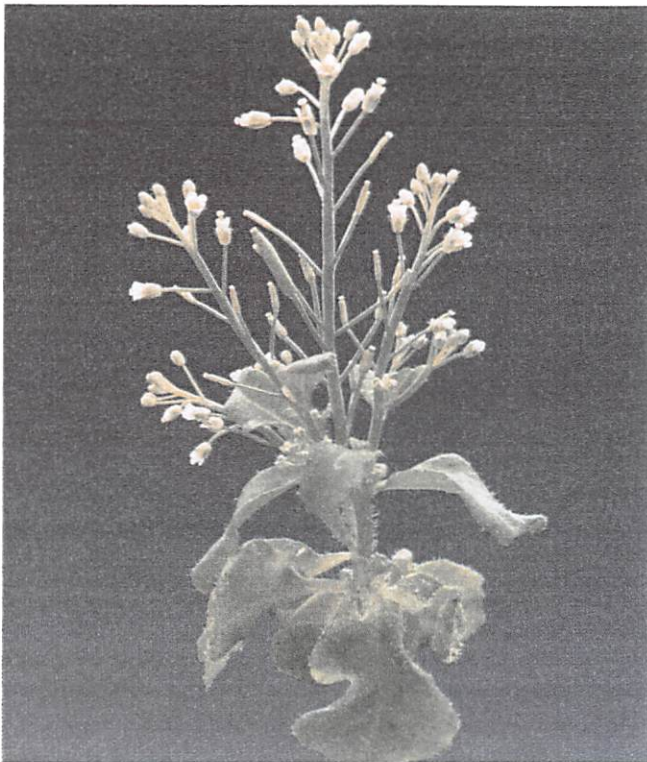


Figura 13.19 Uma forma anã da planta *Arabidopsis thaliana*. (Fonte: *Science*, vol. 243, 10 de março de 1989, capa. © 1989 AAAS, Washington, DC, Foto de deVere Patton. Cortesia de E. I. DuPont de Nemours and Company).



Figura 13.21 Camundongos da mesma ninhada. O maior é um camundongo transgênico que possui o gene do hormônio de crescimento de rato. (Fonte: Richard D. Palmiter, Ralph L. Brinster, et. al. "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes", *Nature* 300, 16 de dezembro, 1982, capa. Fotografia por Dr. Ralph L. Brinster, Copyright © 1982, Macmillan Magazines Ltd.)

BOXE 13.2

Escritores de ficção do passado criaram histórias nas quais os cientistas clonavam uma pessoa para criar inúmeras cópias. Os temas destas histórias variavam desde a clonagem de Adolph Hitler até a clonagem de um homem muito ocupado para ajudá-lo a cumprir suas obrigações cotidianas. A possibilidade desses cenários tornou-se um pouco mais próxima da realidade em fevereiro de 1997, quando um grupo de cientistas do Roslin Institute e PPL Therapeutics, ambos em Edimburgo, Escócia, publicaram na revista *Nature* que haviam clonado com êxito uma ovelha a partir de uma célula retirada da mama de uma ovelha de seis anos. A ovelha clonada foi chamada de Dolly (fig. 1). No passado, embriões de animais geneticamente idênticos haviam sido criados somente com células de anfíbios, e aqueles criados a partir de núcleos adultos nunca alcançaram a fase adulta. A clonagem já havia sido realizada com êxito em mamíferos, mas somente com a utilização de núcleos obtidos de células fetais ou de linhagens celulares.

Para clonar um animal, é necessário começar com um ovo, a única célula que pode iniciar e proporcionar desenvolvimento. Seguindo a defi-

Ética e Genética

A Clonagem de Dolly

nição propriamente dita da palavra *clone*, que significa criar uma cópia geneticamente idêntica, é necessário obter um ovo sem núcleo e depois transplantar um núcleo de origem conhecida. As técnicas para o transplante nuclear já haviam sido realizadas em rãs e sapos nos anos 50. Os cientistas escoceses conseguiram obter ovos de ovelhas, remover seus núcleos e, então, conseguiram transferir os núcleos doadores para os ovos enucleados através de fusão por meio de um impulso elétrico. O impulso elétrico também iniciava o desenvolvimento do ovo. Apesar de somente uma gestação de uma série de vinte e nove ter tido êxito, o cordeiro que nasceu parece normal em todos os aspectos e até já produziu descendentes.

Outros tentaram esse tipo de experimento com muitos tipos de animais, incluindo camundongos, mas não tiveram sucesso por várias razões. De acordo com os cientistas, a explicação mais

provável para o sucesso de Dolly é de que as células doadoras foram mantidas em uma fase de não desenvolvimento por vários dias, o que pode ter provocado a sincronização delas com o oócito. Dessa forma, o núcleo e o oócito estavam no mesmo estágio do ciclo celular e, portanto, eram compatíveis. Outras reorganizações que aconteceram nos cromossomos doadores na verdade não são conhecidas ao certo, mas uma coisa é clara: o núcleo de uma célula adulta na ovelha possui todo o material genético necessário para sustentar o crescimento e o desenvolvimento normais do ovo. (Desde então, o trabalho foi repetido com bodes, gado e camundongos).

Há inúmeras ramificações para o sucesso desse trabalho. Primeiro, a clonagem dos mamíferos poderia se tornar um procedimento de rotina. Isso nos permitiria estudar o desenvolvimento dos mamíferos e replicar indivíduos geneticamente idênticos, em especial, animais transgênicos que possuíam genomas para fins específicos. Podemos também usar estas técnicas para estudar o envelhecimento, já que um núcleo "velho" está iniciando o desenvolvimento de um novo organismo. Também é interessante a interação entre um genoma e um citoplasma distintos, já que o citoplasma contém não somente os ma-

reversa). Por exemplo, um vetor retroviral infectou leucócitos humanos e reparou os que não possuíam a enzima adenosina desaminase. Um retrovírus responsável pela leucemia em roedores, vírus da leucemia murina de Moloney, foi modificado a fim de que todos os genes virais fossem removidos e substituídos por um marcador antibiótico (resistente à neomicina) e pelo gene humano da adenosina desaminase. O vírus se anexa à superfície da célula e é incorporado para dentro, seu RNA é convertido em DNA pela transcrição reversa, e o DNA é incorporado em um dos cromossomos da célula. Não é possível que este vírus altamente modificado ataque e danifique as células, a menos que um vírus auxiliador seja adicionado. Diferentemente dos vírus SV40 na figura 13.17, os vírus Moloney não podem iniciar uma infecção bem sucedida sem os auxiliadores, pois genes vitais foram retirados.

Três outras técnicas recentes introduzem DNA recombinante em células eucarióticas: eletroporação, trans-

ferência mediada por lipossomos e transferência "biolística". Na **eletroporação**, o DNA exógeno é absorvido pelas células sujeitas a uma breve exposição de eletricidade de alta voltagem. Supostamente, este campo elétrico cria microporos temporários na membrana da célula, permitindo que o DNA exógeno entre.

A transfecção mediada por lipossomo é uma técnica que encapsula o DNA estrangeiro em vesículas artificiais de ligação à membranas chamadas de **lipossomos**. Os lipossomos são usados para levar o DNA para as células-alvo. Em um experimento, 50% dos camundongos injetados com lipossomos contendo DNA foram transfectados com êxito—eles expressaram as proteínas que o DNA transfectado codificava.

Por último, estão as técnicas desenvolvidas para levar o DNA estrangeiro às mitocôndrias e aos cloroplastos. Essas organelas provaram serem alvos difíceis para a engenharia genética, pois, entre outras razões, elas possuem

teriais necessários para o início do desenvolvimento, mas também organelas celulares, incluindo mitocôndrias que possuem seu próprio material genético.

Finalmente, as questões éticas devem ser consideradas se esta técnica for possível em seres humanos. Os pais poderão desejar fazer um clone de um filho que faleceu, ou clonar para obter irmãos compatíveis imunologicamente para uma criança que necessita de um transplante de órgãos ou de medula. Outros podem se opor à clonagem com base em suas convicções morais e religiosas. Em resposta a essas últimas considerações, em 1997 o presidente Bill Clinton pressionou o congresso a proibir a clonagem de seres humanos nos Estados Unidos por pelo menos cinco anos.

Figura 1 Dolly é a primeira ovelha clonada produzida pela transferência de um núcleo da célula de uma ovelha adulta. (AP/Wide World Photos).



paredes de membrana dupla que não são acessíveis ao DNA recombinante. Recentemente, a transfecção em mitocôndrias e cloroplastos teve êxito através do uso de um processo **biolístico** (balística biológica), que literalmente atira microprojéteis de tungstênio revestidos com DNA recombinante para dentro dessas organelas.

Camundongos Knockout

Normalmente, um gene usado para transfectar camundongos é incorporado de maneira aleatória no genoma do camundongo. Entretanto, em cerca de um a cada mil experimentos, o gene substitui o gene normal através de um processo similar à recombinação meiótica (*recombinação homóloga* vide capítulo 12). Com isso em mente, os geneticistas foram capazes de selecionar a recombinação homóloga e através da transfecção de genes defeituosos criaram camundongos sem cópias funcionais de um gene específico.

Os camundongos produzidos são chamados de **camundongos knockout**, que permitem aos geneticistas estudar o fenótipo de um animal que não tem um gene específico.

Primeiro, o geneticista cria um vetor com o gene em questão modificado. Além disso, as regiões de flaqueamento do gene são adicionadas de modo que a recombinação homóloga possa ocorrer. Por fim, dois genes antibióticos são introduzidos para que a seleção bem sucedida para a transfecção aconteça. Dentro das regiões de flaqueamento, o gene para a resistência à neomicina (*neo^r*) é inserido; seu produto inativa o antibiótico neomicina (fig. 13.22). Fora das regiões de flaqueamento, o gene para quinase timidina (*tk*) é inserido. Este gene fosforila a droga ganciclovir. O ganciclovir fosforilado é um nucleotídeo análogo ao que é incorporado durante a síntese de DNA, matando assim a célula. Dessa forma, a combinação do gene *tk* e do ganciclovir é letal. Sem o gene *tk*, o ganciclovir é inofensivo. Se as células são expostas tanto a ambas

as drogas, neomicina e ganciclovir, as células normais serão mortas pela neomicina, as células com o gene *tk* serão mortas pelo ganciclovir e somente as células com o gene *neo^r*, mas que não possuem o gene *tk*, irão sobreviver. Esses resultados alternativos nos permitem selecionar as células nas quais a recombinação homóloga aconteceu (fig. 13.22).

As células que não incorporaram o vetor morrerão por causa dos efeitos da neomicina (pois são sensíveis a ela). As células que absorveram aleatoriamente o DNA vetor por recombinação não homóloga conterão os genes *neo^r* e *tk* e serão mortas pelo ganciclovir. Porém, as células que sofrerão recombinação homóloga irão conter o gene *neo^r*, mas não o *tk* e, conseqüentemente, vão sobreviver na presença dos dois antibióticos (fig. 13.22). Os geneticistas podem isolar as células-tronco embrionárias dos camundongos, que podem produzir qualquer tecido do camundongo, para efetuar a transfecção. As células transfectadas são então desenvolvidas em cultura tecidual na presença da neomicina e do ganciclovir. Apenas as células que sofrem recombinação homóloga sobreviverão. Depois, essas células são injetadas em embriões de camundongos em estágio inicial para tornarem-se parte do camundongo em desenvolvimento. Os camundongos que se desenvolvem

serão quiméricos e alguns terão incorporado as células transfectadas para dentro da linhagem germinativa e se tornam heterozigotos para o gene não ativado. Por fim, quando camundongos como este são cruzados, um quarto de sua descendência será homozigoto para o gene não ativado. Portanto, através desta engenhosa técnica, os camundongos *knockout* foram criados.

Os camundongos *knockout* são úteis para o estudo do desenvolvimento e da imunologia. Por exemplo, se o gene para a substância inibidora mulleriana é removido por *knockout*, os machos não são férteis porque desenvolvem órgãos reprodutores femininos. Esse experimento esclareceu muito as trajetórias para a determinação genética do sexo (capítulo 5). Centenas de experimentos *knockouts* são publicados a cada ano.

Sistemas Repórter

Concluimos esta seção discutindo dois **sistemas repórter**, que são usados para indicar que um experimento de transfecção foi bem sucedido. As plantas podem ser transfectadas com plasmídeos Ti da *Agrobacterium tumefaciens*, como mencionado anteriormente. Quando uma planta é

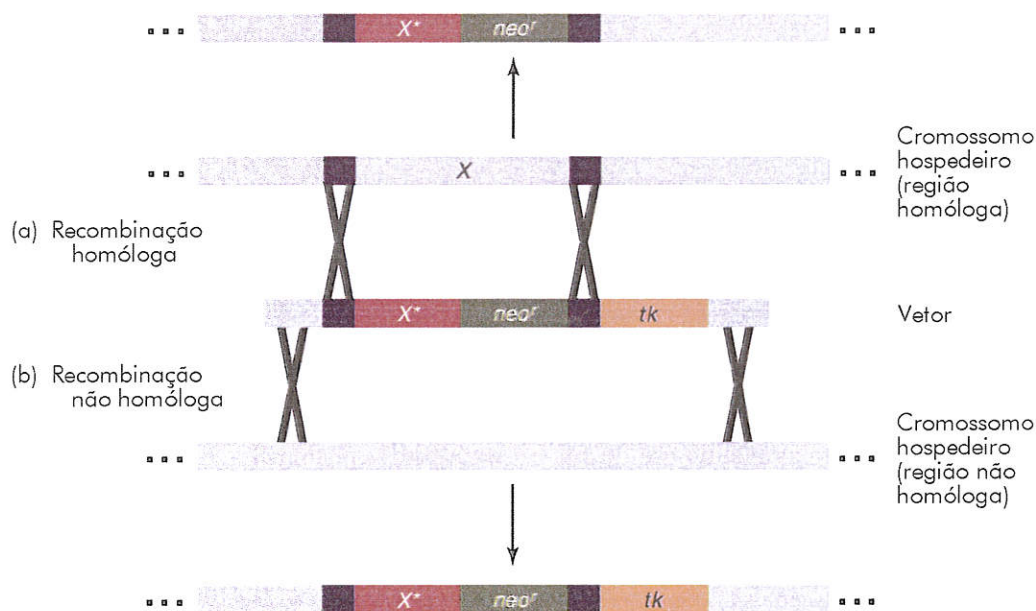


Figura 13.22 Criação de um camundongo *knockout*. Um vetor é criado e possui uma forma não ativada (não funcional) do gene em questão (*X**; vermelho). Próximo ao gene em questão está o gene resistente à neomicina (*neo^r*, verde); ambos os genes estão cercados por regiões (azul) que flanqueiam o gene normal em seu cromossomo. Por fim, fora das regiões de flanqueamento no vetor está o gene para a timidina quinase (*tk*; amarelo). Na recombinação homóloga (a), envolvendo crossing over nas regiões de flanqueamento homólogas, o gene desativado e o gene resistente à neomicina substituem o gene normal nas células do cromossomo. Na recombinação não homóloga (b), quase todo o vetor é incorporado no cromossomo hospedeiro, incluindo o gene da timidina quinase. Assim, essas técnicas permitem o crescimento seletivo de células com o raro evento da recombinação homóloga. Um quarto da descendência de ratos quiméricos heterozigotos serão *knockouts* para o gene em questão.

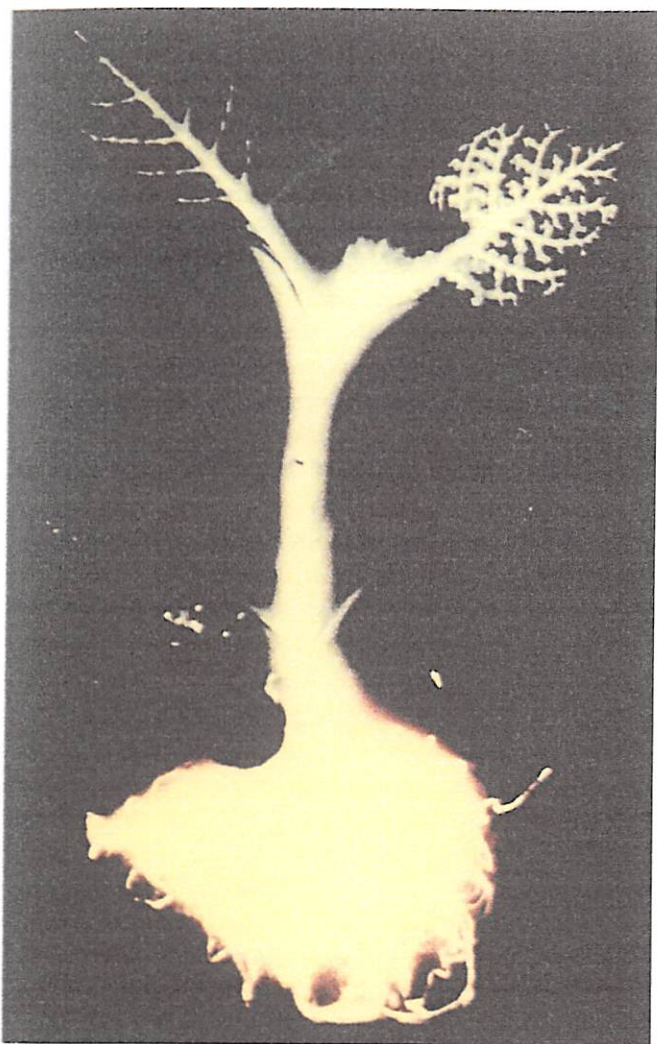


Figura 13.23 Planta do tabaco transgênica luminescente que contém o gene luciferase do vagalume. A planta foi regada com luciferina, resultando no brilho do vagalume. (© Science VU/Keith V. Wood/Visuals Unlimited.)

infectada com *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo Ti, um tumor de galha-da-coroa é induzido quando o plasmídeo Ti transfeta a planta hospedeira, transferindo a região T-DNA. Essas células transfectadas com o T-DNA são induzidas a se desenvolverem e também a produzirem opinas que alimentam a bactéria. Grande parte de pesquisas recentes tem se concentrado nos plasmídeos Ti modificados para conter outros genes que também são transferidos para as plantas hospedeiras durante a infecção, criando plantas transgênicas. Uma série de experimentos foram feitos e alguns se mostraram especialmente fascinantes.

As plantas de tabaco foram transfectadas pelos plasmídeos Ti contendo o gene luciferase dos vagalumes. O produto deste gene catalisa a oxidação dependente de ATP da luciferina, que emite luz. Quando uma planta transfectada é regada com luciferina, ela brilha como se fosse um vagalume (fig. 13.23). O valor deste experimento não é a



Figura 13.24 Expressão da proteína verde fluorescente nas células da raiz da planta *Arabidopsis thaliana* sob luz fluorescente. Os cromossomos são visíveis em uma célula em mitose, e a cromatina se apresenta como círculos verdes na interfase dos núcleos. O gene da proteína verde fluorescente foi fundido ao terminal carboxi do gene para o fator de transcrição Cry2, que controla os genes para a resposta fototrópica (a flexão em direção à luz). (Copyright Sean Cutler, Stanford University Plant Biology Department.)

produção de plantas brilhantes, mas sim o uso de brilho para “reportar” a ação de genes específicos. Em experimentos posteriores, os promotores e intensificadores de certos genes foram adicionados ao gene da luciferase. Como resultado, a luciferase somente seria produzida quando tais promotores fossem ativados, assim, as áreas de brilho das plantas mostram onde o gene transfectado está ativo.

Um dos mais recentes sistemas repórteres desenvolvidos usa um gene da água-viva que produz uma **proteína verde fluorescente**. O valor desse sistema é que ele “reporta”, ou brilha, quando exposto à luz ultravioleta e não necessita de uma complementação como no caso do sistema da luciferase. O gene da proteína verde fluorescente é recombinado com o gene em questão e, então, a transfecção é realizada. Se o gene em questão foi transferido com êxito, carregando o gene para a proteína verde fluorescente, a proteína fluorescente relatará isso quando ativada pela luz ultravioleta (fig. 13.24).

MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO

O número de cortes que uma enzima de restrição faz em um segmento do DNA de fita dupla depende do tamanho deste DNA, de sua sequência e do número de pares de bases na sequência de reconhecimento de certa enzima. Ou seja, uma enzima de restrição com uma sequência de reconhecimento de apenas três pares de base efetuará cortes mais vezes do que aquela com seis pares de base na sequência de reconhecimento, uma vez que a probabilidade de uma sequência ocorrer ao acaso é uma função do comprimento desta sequência. Uma sequência de três bases ocorre ao acaso em uma frequência maior ($1/4^3 = 1/64$ pares de base) do que uma sequência de seis bases

($1/4^6 = 1/4.096$ pares de base). *HindII*, por exemplo, corta o DNA circular do vírus tumoral SV40 em onze pedaços. Algumas enzimas de restrição podem cortar o DNA da *E. coli* em centenas de pedaços. O produto da ação de uma enzima de restrição em uma amostra de DNA é chamado de **digestão de restrição**.

Usando a eletroforese, podemos separar os fragmentos de uma digestão de restrição pelo tamanho. Com técnicas que serão descritas posteriormente, podemos localizar os sítios de restrição no gene ou pedaço original do DNA. Ou seja, podemos construir um mapa de sítios de reconhecimento de restrição que nos darão a distância física entre os sítios dos pares de bases (fig. 13.25). Este **mapa de restrição** é extremamente valioso por várias razões. Por exemplo, quando o nucleotídeo radioativo timidina tritiada foi adicionado por um período de tempo muito curto durante o início da replicação do DNA no vírus SV40, a radioatividade sempre aparecia em apenas um fragmento de restrição. Isso demonstrou que a replicação de SV40

começou a partir de um único e específico ponto, localizado em um segmento específico do cromossomo SV40.

Além disso, um mapa de restrição sempre permite aos pesquisadores correlacionar o mapa genético e o mapa físico de um cromossomo. Certas alterações físicas no DNA, tais como: deleções, inserções ou alterações nucleotídicas em sítios de restrição, podem ser localizadas no mapa genético. Essas alterações podem ser vistas como alterações no tamanho ou como a ausência total de certos fragmentos de restrição quando comparados ao DNA tipo selvagem. Tais informações nos permitem ver as alterações no DNA e também nos informa sobre a evolução das espécies (capítulo 21). As diferenças nos tamanhos dos fragmentos são chamadas de **polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição (RFLPs)** e se mostraram valiosos para a identificação exata da localização dos genes e para a determinação da identidade e relação dos indivíduos. Uma digestão de restrição é também útil para isolar segmentos curtos de DNA que podem ser facilmente sequenciados.

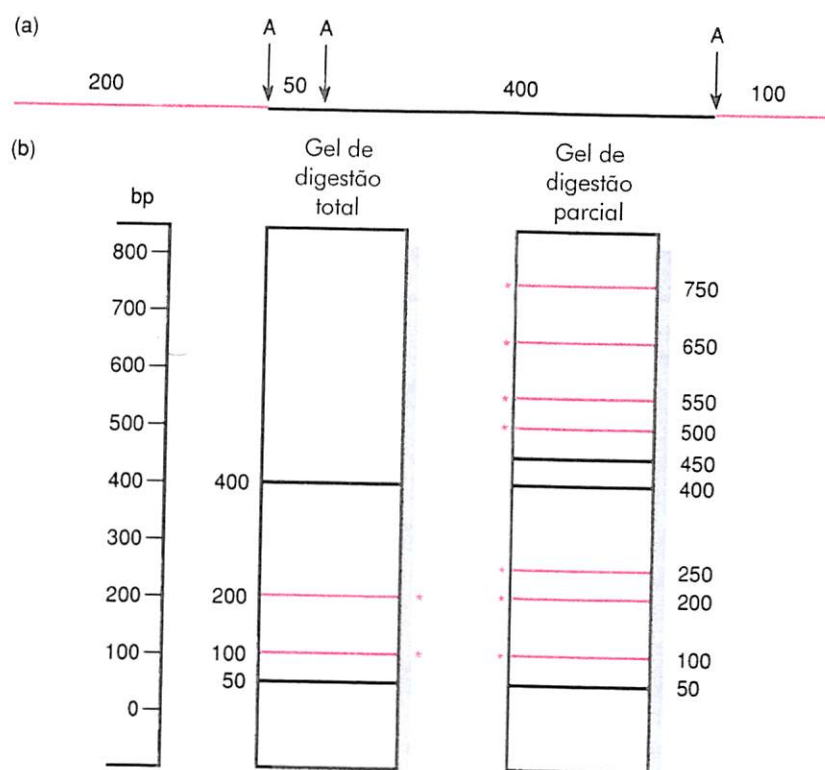


Figura 13.25 Mapa de restrição a partir da eletroforese de uma digestão da endonuclease de restrição. (a) Pedaço original do DNA, mostrando os sítios de restrição marcados pela letra A. (b) Géis de agarose mostrando as bandas das digestões de restrição total e parcial. O asterisco marca as bandas radioativas produzidas por segmentos com terminais marcados. À esquerda está a escala de peso molecular em pares de bases (ex: 800 pb, 700 pb). A digestão total produz fragmentos que têm 400, 200, 100 e 50 pares de base—e fragmentos de 200 e 100 pb marcados nos terminais. A digestão parcial permite seis faixas adicionais.

Construindo um Mapa de Restrição

Como construímos um mapa de restrição? A figura 13.25 mostra um pedaço hipotético de DNA cortado pela enzima de restrição *A*. Abaixo deste mapa, há um diagrama da digestão que passou por eletroforese em géis de agarose, os quais são normalmente usados devido a sua porosidade que permite aos fragmentos de DNA relativamente grandes se moverem. A enzima de restrição faz três cortes no DNA, criando quatro fragmentos que possuem 200, 50, 400 e 100 pares de base de comprimento. O padrão de bandas no gel à esquerda na figura 13.25b é o resultado da eletroforese desta digestão. (Observe que os segmentos menores se movem mais rápido que os maiores). Os tamanhos dos segmentos são determinados por comparação com padrões de bandas de tamanho conhecido (embora não mostrada, a escala está indicada à esquerda). O gel não revela a ordem destes segmentos no cromossomo. Vários métodos podem ser usados para determinar a ordem exata dos segmentos de restrição no pedaço original do DNA.

Antes da digestão da enzima de restrição, os terminais 5' do DNA podem ser marcados radiotivamente com ^{32}P usando a enzima polinucleotídeo quinase. Como a enzima está agindo no DNA de fita dupla, ambos os terminais serão marcados. Na figura 13.25, após a digestão do DNA e sob a eletroforese, as bandas de 200 e 100 pares de bases (pb) serão marcadas radioativamente, mostrando que esses segmentos são os terminais daquele pedaço de DNA. Mas ainda não sabemos a ordem dos pedaços do meio.

A ordem dos outros segmentos pode ser determinada pela desaceleração do processo de digestão para produzir uma **digestão parcial**. Se a reação for esfriada ou prosseguir por um curto período de tempo, nem todos os sítios de restrição serão cortados. Alguns pedaços de DNA não serão cortados, outros serão cortados somente uma vez, alguns duas vezes e outros serão cortados em todos três sítios de restrição. O resultado da eletroforese desta digestão parcial pode ser visto à direita na figura 13.25b. A partir desse gel, podemos reconstruir a ordem do segmento. Ele contém os quatro segmentos originais mais seis novos segmentos, cada um contendo pelo menos um sítio de restrição inteiro.

A partir do gel de digestão total, sabemos que os segmentos de 200 e 100 pb estão no exterior, pois foram identificados radioativamente. Isso significa que os segmentos de 50 e 400 pb estão no interior. Na digestão parcial, encontramos um segmento de 250 pb, mas não um segmento de 150 pb, que nos diz que o segmento 50 pb está no interior e bem ao lado do terminal de 200 pb (fig. 13.26b). Há um segmento de 500 pb mas não um segmento de 600 pb, o que nos diz que o segmento de 400 pb é adjacente ao terminal de 100 pb (fig. 13.26c). Um segmento não marcado com radiação de 450 pb confirma que os segmentos 400 e 50 pb são adjacentes e

internos no DNA. Assim, sem equívocos, reconstruímos o DNA original (compare fig. 13.26e com a fig. 13.25a), criando um mapa de sítios de restrição das regiões de reconhecimento da enzima, as quais são separadas por comprimentos conhecidos de DNA.

Digestões Duplas

Na prática, o mapeamento de restrição é feito com diferentes enzimas de restrição. A figura 13.27 é um mapa do DNA da figura 13.25, com sítios de reconhecimento de uma segunda endonuclease, *B*, incluída. Usando a mesma metodologia que acabamos de esquematizar, podemos mostrar que a ordem dos segmentos *B* é de 350, 250 e 150 pares de base originando-se dos dois cortes pela endonuclease *B*. O que não sabemos é como fazer a sobreposição dos dois mapas. Os segmentos *B* vão da esquerda para a direita, ou da direita para a esquerda em relação aos segmentos *A* (fig. 13.27a e b)? Podemos determinar a ordem evidente pela digestão de uma amostra do DNA original com as duas enzimas simultaneamente, produzindo, portanto, uma **digestão dupla**.

As duas ordens mostradas na figura 13.27a e b são usadas para fazer diferentes previsões sobre a digestão dupla. Da primeira ordem (a) prevemos um segmento terminal de 200 pb, marcado radioativamente. Da segunda ordem (b),

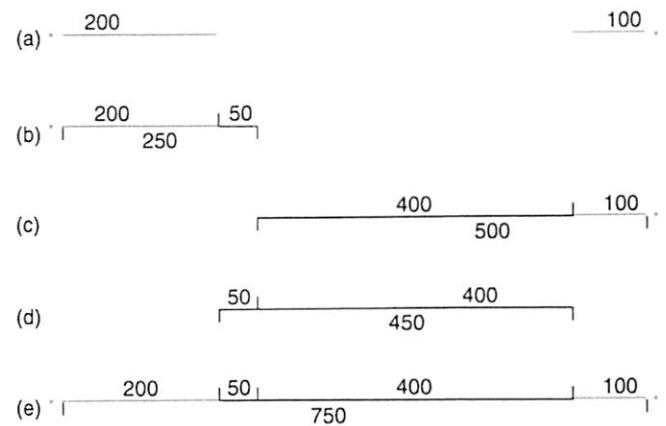
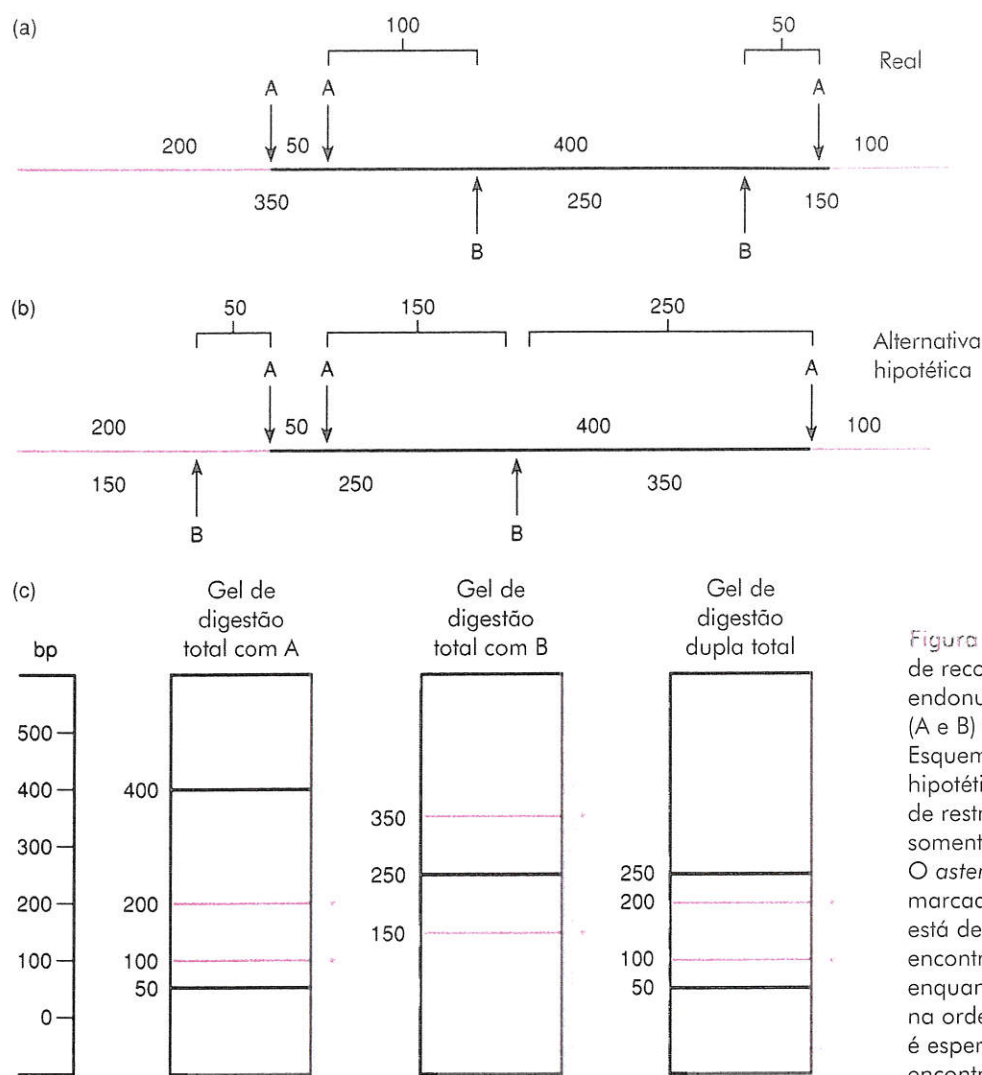


Figura 13.26 Etapas na reconstrução do DNA da figura 13.25. O asterisco mostra os terminais marcados com ^{32}P . A partir da digestão total, os segmentos 100 e 200 pb são estabelecidos como os segmentos da extremidade (a). Uma vez que também há fragmentos de 50 e 400 pb dentro do DNA (estabelecidos pela digestão total), somente certas bandas (fragmentos) são possíveis pela digestão parcial, estabelecendo que o fragmento de 50 pb é adjacente ao fragmento de 200 pb, e que o fragmento de 400 pb é adjacente ao segmento da extremidade de 100 pb (passos b e c). A ocorrência de um fragmento não marcado de 450 pb na digestão parcial verifica a existência de fragmentos de 50 e 400 pb (d) produzindo a estrutura final (e). Todos os fragmentos na digestão parcial estão de acordo com este esquema.



prevermos que o segmento identificado 200 pb será cortado para 150 pares de base; não deveria haver um segmento marcado de 200 pb. A digestão dupla mostra um segmento de 200 pb, indicando a ordem (a). Todos os outros aspectos de ordem (a) estão de acordo com a digestão dupla.

O mapeamento de restrição nos fornece um mapa físico de um pedaço de DNA, mostrando os sítios da endonuclease de restrição separados por comprimentos conhecidos de DNA. Essa técnica nos fornece curtos segmentos de DNA com posições conhecidas que podemos sequenciar, além do mapa físico do DNA que pode ser comparado com o mapa genético, permitindo a localização de mutações e quaisquer outros marcadores.

Polimorfismos de Comprimento do Fragmento de Restrição

Polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição (RFLPs), que são obtidos por meio das digestões de restrição, provaram ser marcadores genéticos muito

valiosos em duas áreas de estudo: o mapeamento dos genes humanos e a medicina forense. Em uma digestão de restrição de genoma humano, pode haver milhares de fragmentos de uma única enzima de restrição. Sondas exclusivas foram desenvolvidas para a transferência Southern destas digestões. A variação genética geralmente aparece na forma de um segundo alelo que, devido a uma mutação, não possui um sítio de restrição e assim é parte de um pedaço maior de DNA (fig. 13.28). Algumas sondas revelaram **loci hipervariáveis** com muitos alelos (qualquer pessoa possui somente dois de muitos possíveis alelos). A variação genética na população surge porque o loci hipervariável contém muitas repetições em tandem de segmentos curtos (10 a 60 pb). Supostamente devido ao crossing over desigual (cap. 8), somente um desses locus, chamado de **loci do número variável de repetições em tandem (VNTR - *variabel number of tandem repeats*)**, podem gerar muita variação. Como resultado, a sondagem para um desses loci VNTR em uma população revela muitos alelos.

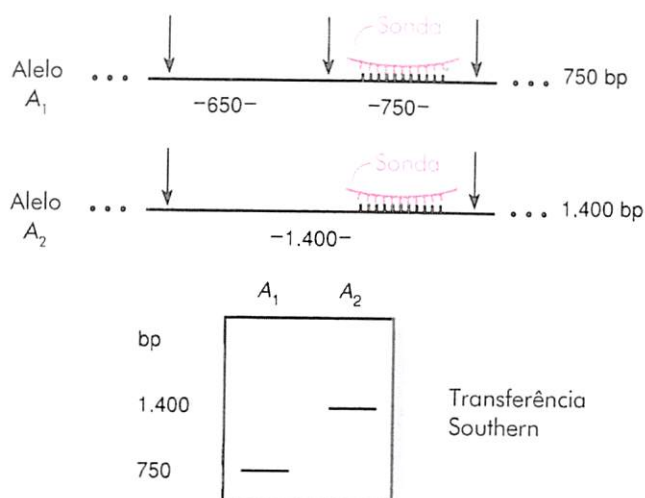


Figura 13.28 Análise de polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição (RFLP). O alelo A₁ é um segmento do gene com 750 pb de comprimento, identificado por sua ligação com a sonda. No alelo A₂, o sítio de restrição, à esquerda do alelo A₁, foi modificado. Assim, a sonda reconhece um fragmento de 1.400 pb ao invés de um fragmento de 750 pb. Durante a transferência Southern duas bandas diferentes aparecem a partir dos dois alelos. As setas indicam os sítios de restrição.

A transferência Southern dessas digestões cria uma impressão digital de DNA (um *fingerprint* de DNA) de extremo valor para a medicina forense. O DNA extraído de amostras de sangue ou sêmen deixados por um criminoso pode ser comparado com os padrões de DNA dos suspeitos (fig. 13.29). Quando uma única sonda reconhece vários loci diferentes, cada indivíduo terá muitas bandas em uma transferência Southern, e a grande maioria das pessoas produzem padrões únicos de bandas. Em um sistema, desenvolvido por A. Jeffreys, uma única sonda localiza cinquenta ou mais bandas variáveis por pessoa. Se as sondas de Jeffrey são usadas para comparar os padrões, a probabilidade de que dois padrões sejam correspondentes ao acaso é infinitamente pequena. Portanto, essa técnica possui maior precisão na identificação de indivíduos do que quando suas impressões digitais propriamente ditas são usadas.



Alec Jeffreys (1950-).
(Cortesia do Dr. Alec Jeffreys.)

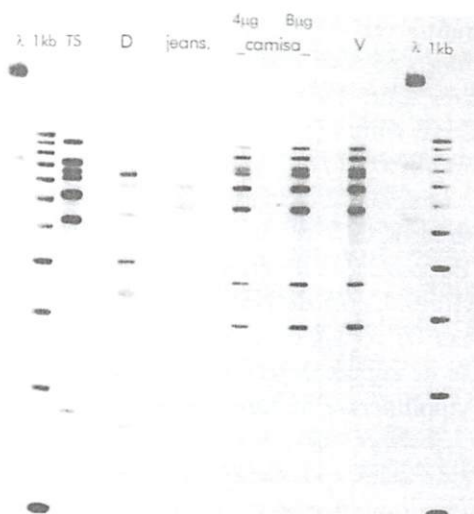


Figura 13.29 Fingerprinting do DNA utilizada pela medicina forense. A transferência Southern do DNA da vítima (V) e do acusado (D) de um crime. O jeans e a camisa referem-se às amostras de sangue tiradas do vestuário do acusado. O padrão na camisa combina claramente com o sangue da vítima, e não com o próprio sangue do acusado. Todas as outras colunas de coagulação contêm padrões de controle e tamanho. A probabilidade de que as manchas de sangue não sejam da vítima foi estimada como uma em trinta e três bilhões, mais do que o número de pessoas na Terra. Mas essas probabilidades são controversas, dependendo das suposições estatísticas em relação à variabilidade dentro de subpopulações étnicas e raciais. (Cortesia de Cellmark Diagnostics, Germantown, M.D.)

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE



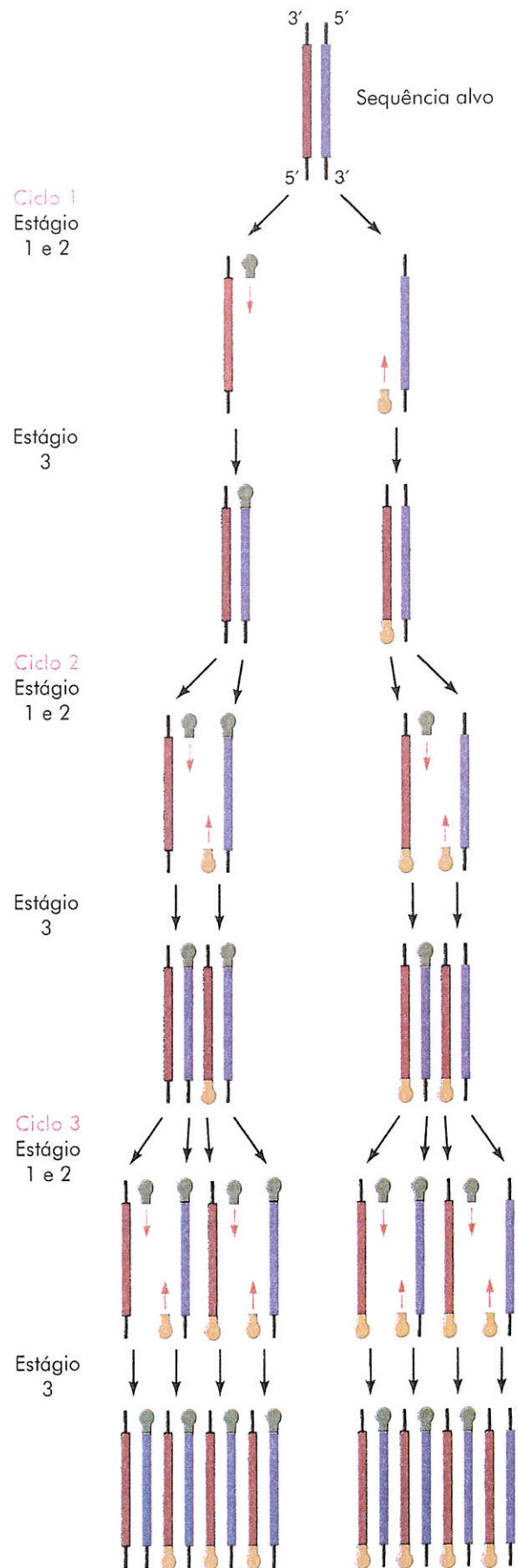
Em muitos casos do passado (espécimes de museus, espécimes empalhados, provas da cena de crimes e fósseis), havia uma amostra de DNA, mas em quantidade tão pequena ou tão antiga que poderia ser considerada inútil para o estudo. Esta situação mudou em 1938 quando Kary Mullis, um bioquímico que trabalhava para a Cetus Corporation, inventou a técnica que daqui em diante chamaremos de **reação em cadeia da polimerase (PCR)**. A PCR pode ser usada para amplificar qualquer DNA existente, seja em pequena quantidade ou em baixa qualidade. A única exigência é que a sequência de nucleotídeos de ambos os lados da sequência de interesse seja conhecida. Essa informação é necessária para construir *primers* para ambos os lados da sequência de interesse. Uma vez feito isso, a sequência entre os *primers* pode ser ampliada.

Na técnica da PCR, os *primers* e os ingredientes para a replicação do DNA são adicionados às amostras. Depois, a mistura é aquecida (ex: 95°C por vinte segundos) para desnaturar o DNA. Subsequentemente, diminui-se

a temperatura (ex: 55°C por vinte segundos), de modo que os *primers* possam se associar às suas sequências complementares. Então, a temperatura é elevada novamente (ex: 72°C por vinte segundos) para a replicação do DNA. Então, um novo ciclo de replicação é iniciado (fig. 13.30). Os vários estágios do ciclo são controlados por alterações na temperatura, uma vez que as temperaturas de desnaturação, de associação do *primer* e de replicação do DNA são diferentes. Cerca de vinte ciclos de PCR produzem um milhão de cópias de DNA; trinta ciclos produzem um bilhão de cópias. A técnica é realizada com o auxílio da DNA polimerase de uma bactéria de fontes termais, *Thermus aquaticus*, que pode suportar temperaturas desnaturantes. Assim, após cada ciclo de replicação, nenhum componente novo tem que ser adicionado à mistura de reação. Preferivelmente, o ciclo pode ser continuado sem a interrupção em máquinas PCR (banhos de água programáveis que alteram a temperatura da água de forma precisa e rápida). Algumas máquinas podem processar noventa e seis amostras de uma vez só.

A PCR tem sido utilizada para criar impressões do DNA através da amplificação de **DNA microssatélite**, que são repetições de sequências muito curtas do DNA dispersadas ao longo do genoma. Por exemplo, as repetições da citosina-adenina (CA) acontecem dez mil vezes em eucariotos, em repetições de vinte a sessenta pares de base. Como no caso dos loci VNTR, há uma enorme variabilidade entre as pessoas no número destas repetições em um locus, provavelmente devido a erros de crossing over. Ao contrário do que ocorre com os loci VNTR, no entanto, a amplificação por PCR de um destes loci pode ser feita sem cortes de restrição, transferência Southern e sondagem—a PCR fornece os resultados diretamente pela eletroforese. Tudo que precisamos são as sequências *primer* que estão redor de qualquer locus microssatélite. Hoje, a PCR é uma ferramenta de rotina usada em laboratórios dos geneticistas moleculares, que a utilizam para amplificar rapidamente as regiões de interesse do DNA para a pesquisa ou para o uso da medicina forense.

Figura 13.30 Reação em cadeia da polimerase. O DNA é desnaturado (estágio 1), oligonucleotídeos *primer* complementares às sequências terminais nas duas fitas se associam (estágio 2) e a replicação do DNA acontece (estágio 3). Cada estágio no ciclo é controlado pelas alterações de temperatura. A sequência alvo é mostrada em vermelho em uma fita e em azul na outra. Os *primers* são mostrados como "palitos" verdes ou amarelos. O *primer* verde começa a cópia da fita vermelha produzindo uma fita azul complementar; um *primer* amarelo começa a cópia da fita azul produzindo uma fita complementar vermelha. Em três ciclos, uma região de fita dupla do DNA se torna oito. O processo exige a adição de *primers*, de desoxinucleotídeos trifosfatos e de DNA polimerases, além de ciclos de mudança de temperatura.



Agora, vamos voltar nossa atenção para o grande resultado da tecnologia do DNA recombinante, o sequenciamento do DNA. A tecnologia do DNA recombinante, com sua capacidade de isolar e amplificar regiões pequenas e bem definidas dos cromossomos, proporcionou o desenvolvimento das técnicas para o sequenciamento do DNA.

SEQUENCIAMENTO DO DNA

Paul Berg da Stanford University, Walter Gilbert da Harvard University e Frederick Sanger do Medical Research Council em Cambridge, Inglaterra, dividiram o Prêmio Nobel de Química em 1980. Berg ganhou o prêmio por criar as primeiras moléculas clonadas do DNA quando integrou o genoma SV40 dentro do fago λ . Gilbert e Sanger ganharam o prêmio por desenvolverem, de maneira independente, métodos de sequenciamento do DNA. Juntamente com Allan Maxam, Gilbert desenvolveu um método de sequenciamento de DNA chamado de *método químico*, o qual envolve a degradação química do DNA em bases específicas. Sanger, que ganhou o Prêmio Nobel em 1959 por sequenciar a proteína da insulina, mais tarde participou do desenvolvimento de métodos para o sequenciamento do RNA. Seu método de sequenciamento, desenvolvido junto com Alan Coulson, envolveu a síntese do DNA e foi chamado *método mais-e-menos*. O desenvolvimento posterior do método de Sanger, Coulson e S. Nickelen, usando nucleotídeos específicos terminadores de cadeia, modificou o método mais-e-menos e passou a ser conhecido como *método de didesoxi*.



Walter Gilbert (1932-).
(Foto: Rick Stafford.)



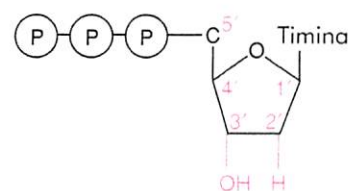
Frederick Sanger (1918-).
(Cortesia do Dr. Frederick Sanger.)

O Método Didesoxi

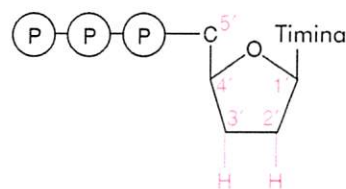
No **método didesoxi**, a manipulação da síntese de DNA permite seu sequenciamento. Lembre-se do capítulo 9 que a síntese do DNA ocorre em uma configuração *primer*, na qual o DNA de fita dupla termina com o grupo 3'-OH em uma fita. A outra fita continua em forma de DNA de fita simples (fig. 13.31, *meio*). O método didesoxi cria uma

configuração *primer* do DNA a ser sequenciada e permite que a replicação continue. Um artifício que utiliza nucleotídeos terminadores de cadeia interrompe a síntese de DNA em posições conhecidas. Esses nucleotídeos terminadores de cadeia são formados de açúcares que carecem de grupos OH nos carbonos 2' e 3' (daí o termo *didesoxi*). Sem um grupo 3'-OH, um didesoxinucleotídeo não pode ser usado para a posterior polimerização do DNA (fig. 13.31).

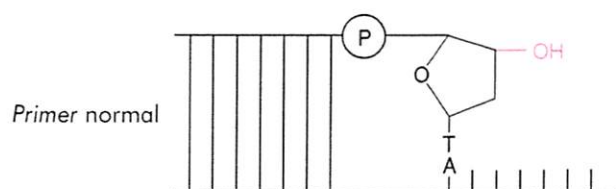
Os nucleotídeos terminadores de cadeia permitem que a síntese seja interrompida em uma base conhecida. A amostra a ser sequenciada é alongada separadamente em quatro diferentes misturas de reação, cada uma possuindo todos os quatro nucleotídeos normais, mas também tendo uma proporção de um nucleotídeo didesoxi terminadores de cadeia. Por exemplo, se o conjunto de nucleotídeos trifosfatos que contém timina contiver uma porção de moléculas didesoxitimidina trifosfato, então a síntese da fita nascente algumas vezes é interrompida quando a adenina aparece (comple-



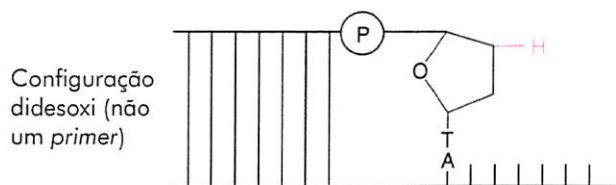
Desoxitimidina trifosfato (dTTP)



Didesoxitimidina trifosfato (ddTTP)



Primer normal



Configuração dideoxi (não um primer)

Figura 13.31 Os nucleotídeos dideoxi provocam à terminação da cadeia durante a replicação do DNA. A configuração *primer* dideoxi não possui o grupo 3'-OH necessário para o alongamento da cadeia em uma configuração *primer* normal.

terminada na primeira vez que o comprimento desta base aparecesse na fita molde. Misturando os didesoxinucleotídeos e os desoxinucleotídeos, asseguramos que a terminação ocorrerá em cada posição adequada.

Na figura 13.32c, vemos que o molde possui duas adeninas. Assim, na mistura de reação ddTTP, o complemento da adenina (timina) é necessário duas vezes mais. Portanto, há dois pontos possíveis para ddTTP incorporar-se, duas possíveis terminações de cadeia e, desta forma, dois fragmentos que poderiam terminar em dideoxitimidina, de duas e sete bases, respectivamente. De maneira similar, há três fragmentos possíveis terminando em adenina de uma, três e oito bases; três fragmentos terminando em citosina de quatro, cinco e nove bases; e

um fragmento terminando em guanina de seis bases (fig. 13.32c e fig. 13.33, acima).

Depois da síntese do DNA, o antigo *primer* é removido, deixando somente os fragmentos do DNA recém-sintetizados (fig. 13.33). Os segmentos recém-replicados de vários comprimentos de cada mistura de reação são colocados em colunas separadas para a eletroforese em géis de poliacrilamida a fim de determinar os comprimentos dos segmentos. Já que somente os segmentos recém-sintetizados de DNA são radioativos, a autorradiografia nos permite acompanhar o DNA recém-sintetizado. Como se pode ver a partir da autorradiografia do gel na figura 13.33, cada subamostra produz segmentos que começam na configuração *primer* (início da síntese) e terminam com a base

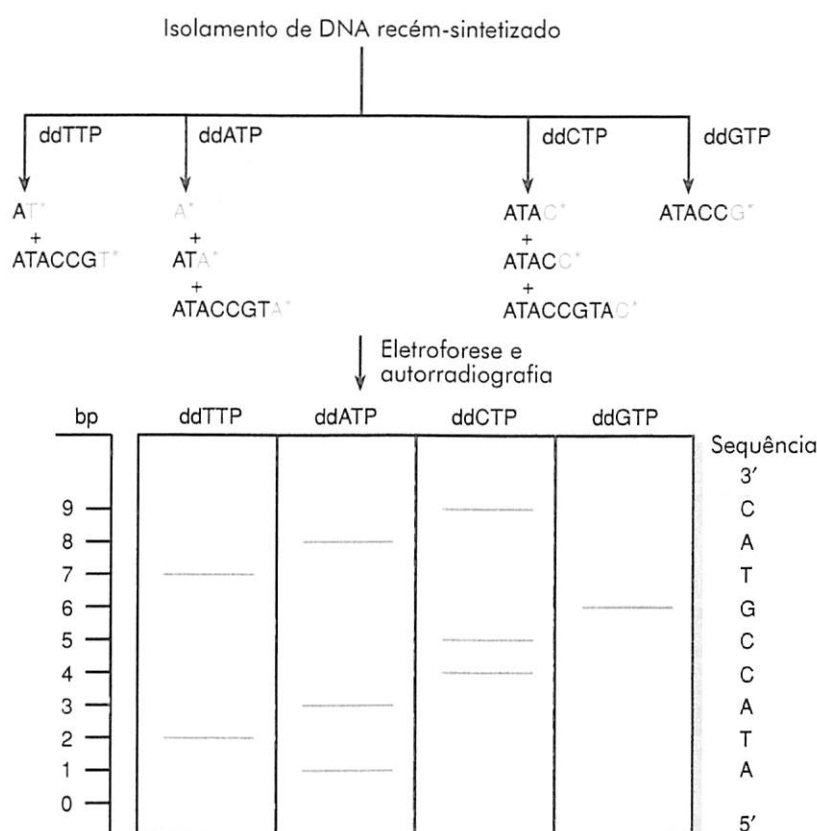


Figura 13.33 Eletroforese de segmentos produzidos pelo método dideoxi de sequenciamento do DNA. Este método permite a leitura direta da sequência. O asterisco indica os dideoxinucleotídeos. Os produtos de reação recém-sintetizados vistos na figura 13.32 são isolados pela eliminação do *primer* e do molde. Cada mistura de reação (ex: ddTTP é a mistura que contém trifosfatos dideoxitimidina) produz produtos de comprimentos específicos que podem ser determinados pela eletroforese. No caso da mistura ddTTP, dois fragmentos que terminam em timina são possíveis, nos quais um possui o comprimento de duas bases e o outro de sete bases. Assim, o complemento da timina, adenina, aparece nas posições 2 e 7 do pedaço original do DNA. Porém, tanto a fita original quanto seu complemento (a nova síntese) produzem a sequência original já que o DNA é uma dupla hélice, ou seja, a sequência em uma fita sempre é definida pela sequência complementar na outra fita.

didesoxi terminadora de cadeia. Começando a leitura de baixo para cima, de trás para frente ao longo do gel, podemos determinar a sequência exata do segmento do DNA. Devido ao fato de eles possuírem a aparência de degraus de uma escada em cada coluna (fig. 13.34), em geral os géis são chamados de **géis de degraus** ou **géis de escada**.

Esta técnica (na forma do método original mais-e-menos) foi usada pela primeira vez para sequenciar o genoma do fago ϕ X174 (boxe 13.3). Esse fago foi usado, pois era adequado ao método de sequenciamento, já que possui um DNA de fita simples dentro de seu envoltório, mas que assume a configuração de fita dupla quando entra na bactéria. Assim, criar uma configuração *primer* é relativamente fácil. O círculo de fita dupla dentro do hospedeiro poderia ser tratado com a endonuclease de restrição para produzir fragmentos de fita dupla (fig. 13.35). Então, esses fragmentos poderiam ser desnaturados. A partir dessa mistura, um fragmento poderia ser isolado por eletroforese. A fita isolada se reassociaria ao DNA de fita simples oriundo das cabeças do fago, formando um *primer* para um novo crescimento. A mesma endonuclease de restrição liberaria o novo crescimento após ter ocorrido. Assim, o método didesoxi foi relativamente fácil de ser aplicado ao cromossomo do fago ϕ X174 que contém 5.387 bases.

Criando um Primer Geral

Para tornar o método didesoxi eficiente, pesquisadores criaram um *primer* geral para o trabalho rotineiro de sequenciamento através da engenharia de DNA recombinante de um vetor da *E. coli*, o fago M13 com DNA de fita simples. Este fago é similar ao ϕ X174, pois ambos são empacotados como DNA de fita simples e ambos são replicados em duplas hélices dentro do hospedeiro. Assim sendo, a forma de fita dupla dentro do hospedeiro, chamada de forma de replicação, pode ser planejada por métodos padrões e a forma de fita simples pode ser usada para sequenciamento. O sistema funciona como descrito abaixo.

Através de um processo muito criativo de engenharia, J. Messing e seus colaboradores criaram sítios de clonagem para uma variedade de enzimas de restrição em um gene bacteriano (*lacZ*) que tinha sido inserido no M13 (fig. 13.36). O gene codifica a enzima β -galactosidase que normalmente quebra a lactose. Ele também quebra um substrato artificial da enzima, o X-gal, que normalmente é incolor. Quando clivado pela β -galactosidase, o X-gal torna-se azul. Dessa maneira, na presença do gene funcional *lacZ*, as placas M13 são azuis. Se o gene for rompido por uma inserção clonada, o X-gal não se quebra e, consequentemente, as placas são incolores. (M13 não forma placas verdadeiras porque não lisa as células de *E. coli*, mas na verdade ele forma sítios turvos devido ao crescimento bacteriano reduzido).

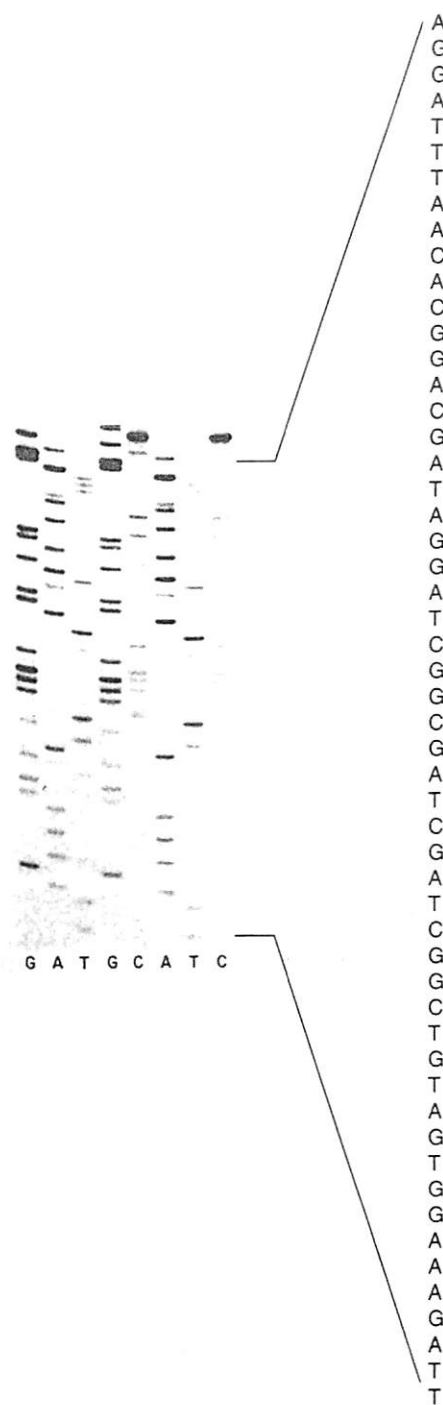


Figura 13.34 Autorradiografia de um gel de sequenciamento didesoxi. As letras G, A, T e C na parte de baixo referem-se às misturas de reação ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP, respectivamente. As colunas são repetidas para melhor identificação das bandas. O sequenciamento também é verificado através de um sequenciamento prova da fita complementar. (Cortesia de Richard J. Roberts.)

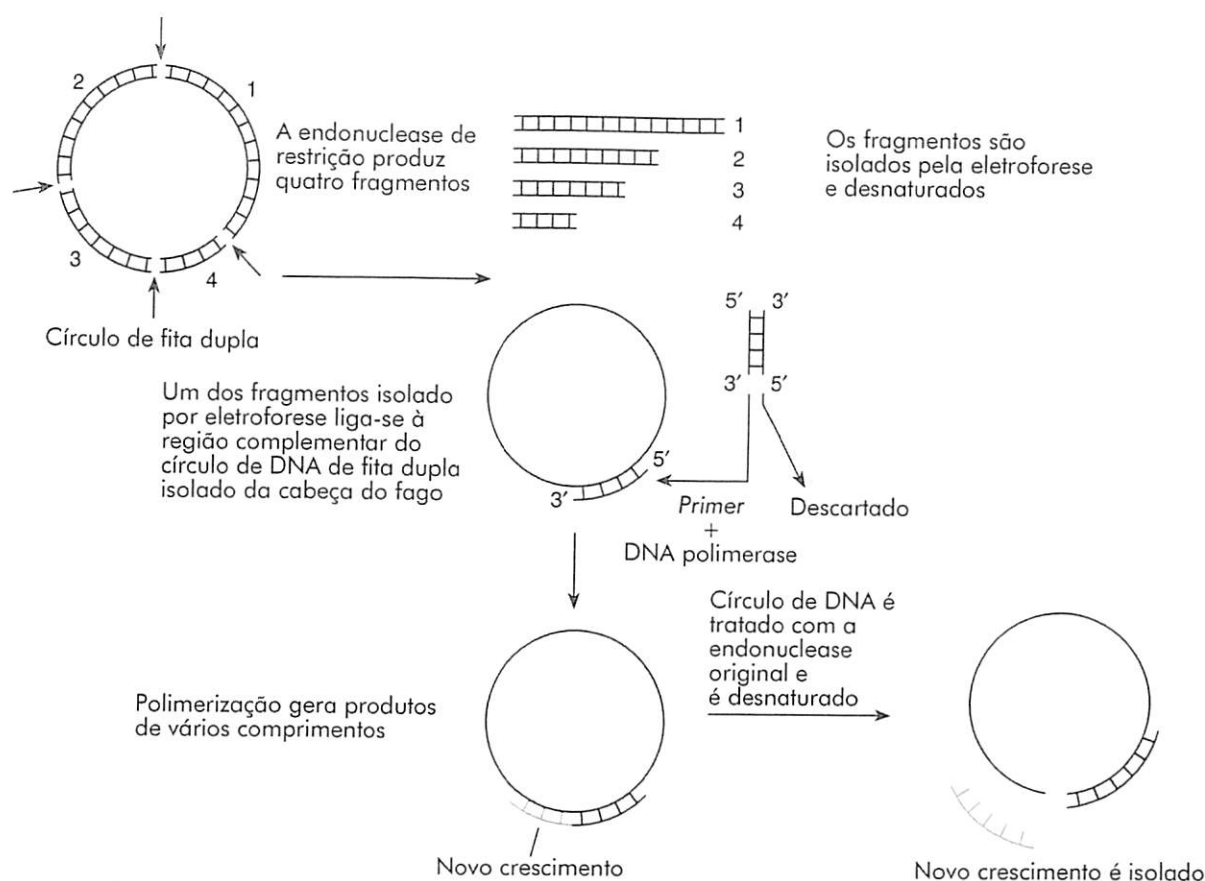


Figura 13.35 O genoma do fago ϕ X174 se presta ao sequenciamento do DNA pelo método didesoxi (originalmente, o método mais-e-menos). Devido ao fato de o fago ocorrer tanto na forma de fita simples, quanto na de fita dupla, o fago pode ser manipulado para o sequenciamento. A forma de fita dupla é fragmentada através da ação de uma endonuclease. Um fragmento é isolado pela eletroforese e hibridizado com a forma de fita simples, criando um *primer* para a síntese do novo DNA e, assim, para o sequenciamento didesoxi. O DNA recém-sintetizado pode ser isolado por meio do tratamento com a mesma enzima de restrição, que efetuará o mesmo corte original. Então, os pedaços recém-isolados podem ser submetidos à eletroforese, como na figura 13.34.

Pode-se sintetizar um oligonucleotídeo *primer* que é complementar à região do DNA do fago numa posição *upstream* dos sítios de clonagem. O DNA de fita simples do fago que contém uma inserção clonada é isolado e hibridizado com oligonucleotídeo sintético. Esta operação cria a configuração *primer* para o sequenciamento didesoxi do DNA clonado. Basicamente, qualquer segmento clonável do DNA pode ser sequenciado usando este método bastante geral. Teoricamente, tal segmento pode ser de qualquer tamanho.

Os géis de degraus, no entanto, são eficazes somente para sequenciamento de segmentos de até cerca de quatrocentos pares de base. Para sequenciar regiões maiores é necessário sequenciar segmentos sobrepostos e reconstituir a sequência pelo padrão de superposição, similar aos métodos que descrevemos para o sequenciamento de aminoácidos (capítulo 11, boxe 11.1). Os segmentos sobrepostos do DNA geralmente são obtidos usando-se duas ou mais enzimas de restrição.

A mais recente inovação no sequenciamento do DNA envolve o uso de quatro corantes fluorescentes, cada um

fluorescendo em um comprimento de onda distinto (505, 512, 519 e 526 nm); cada um dos quatro nucleotídeos didesoxi possui um corante diferente anexado. Após os fragmentos recém-sintetizados serem isolados, os produtos de todas as quatro reações são colocados juntos na mesma coluna do gel poliacrilamida. O gel é então escaneado com um laser argônico que excita as moléculas do corante. Um instrumento registra a cor dos picos, lendo a sequência de maneira direta e automática (fig. 13.37). Este método simplifica bastante o sequenciamento, já que é automático. Ele também diminui a necessidade de marcações radioativas.

O método didesoxi ou o método químico de sequenciamento (não discutido aqui) nos permite ler a sequência de centenas de nucleotídeos em um único gel. Genomas completos de vírus, procariotos e eucariotos, além de numerosas regiões de interesse foram sequenciados. Como W. Gilbert disse em seu discurso de recebimento do Prêmio Nobel, em 1981: “Quando desvendamos a estrutura das moléculas de DNA, examinamos o nível fundamental que sustenta todos os processos nas células vivas”.

BOXE 13.3

Métodos Experimentais

Genes dentro de Genes

O sequenciamento completo do DNA de um genoma usando o método mais-e-menos (o precursor do método didesoxi) de Sanger e Coulson foi realizado pela primeira vez com o ϕ X174, um vírus que contém um círculo de DNA de fita simples com 5.387 pares de base dentro de seu envoltório proteico. Uma vez injetado no hospedeiro, o DNA é replicado para formar uma dupla hélice que então continua a se replicar como um vírus normal, fabricando suas próprias proteínas de revestimento, lisando a célula e escapando para fora dela. Esse vírus possui nove genes. O vírion é um poliedro pequeno de vinte faces com uma pequena ponta em cada um de seus doze vértices. Esta ponta anexa o ϕ X174 à *E. coli*. O envoltório representa uma proteína e a ponta representa duas. Dessa maneira, três dos nove genes do vírus fabricam proteínas de revestimento. A figura 1 ilustra a localização dos genes no ϕ X174, obtida através de métodos de mapeamento padrão.

A partir de informações obtidas pelo sequenciamento do vírus de RNA MS2, os geneticistas acreditavam que sempre deveria haver uma sequência não traduzida entre os genes, supostamente com o propósito de controlar a expressão de cada gene. Porém, exames cuidadosos da sequência do ϕ X174 forneceram várias surpresas. Primeiro, as terminações de três genes sobrepuseram os inícios dos próximos genes (*A-C*, *C-D*, e *D-f*); nos primeiros dois casos, o códon de iniciação está inteiramente dentro do término do gene anterior, porém, é lido em um diferente quadro de referência. Na sequência ATGA, o ATG é a iniciação do próximo gene, enquanto TGA é a terminação do gene anterior. Na interface *D-f*, um A é compartilhado: TAATG (UA-AUG em nucleotídeos ribose; fig. 2). É a base número 3 do códon de terminação e a base número 2 do códon de iniciação. As surpresas não terminam aqui.

A princípio, com a sequência de nucleotídeos espalhada na frente deles, os pesquisadores não puderam encontrar os genes *B* e *E*; parecia que eles não estavam lá. Porém, em análise cuidadosa, os cientistas descobriram que o gene *B* estava inteiramente dentro do gene *A* e o gene *E*, dentro do gene *D* (fig. 3). Essa descoberta foi contra a teoria. Somos levados a acreditar, a partir de argumentos lógicos, que os genes não podem se sobrepor de forma substancial. Haveria muita restrição na função: a sequência funcional de um gene também teria que ser a sequência funcional do outro. Da mesma forma, haveria uma restrição evolutiva envolvida. Os genes teriam que evoluir juntos. Mas aqui temos dois casos nos quais os genes realmente se sobrepõem. Como podem ter surgido esses genes sobrepostos?

Há um grande número de bases de timina no genoma ϕ X174. No gene *D* em especial, muitos dos códons terminam com a timina. O gene *E* embutido é lido em uma frase de leitura deslocada em relação a *D*, de modo que as bases terminais dos códons *D* estejam na posição do meio nas bases de *E*. Uma verificação no código genético (tabela 11.4) mostra que os códons com *U* no meio (códon de *E*) são principalmente para aminoácidos hidrofóbicos. Assim, *E* é uma proteína com propriedades detergentes. Na verdade, é a proteína responsável pela dissolução da parede

celular externa da bactéria hospedeira, um processo que um detergente pode realizar *in vitro*. As propriedades do gene *E*, então, são mais as propriedades de seus aminoácidos individuais do que sua sequência exata.

No caso do *A-B*, há uma indicação de que os dois genes eram autônomos. Essa indicação é baseada nos padrões dos códons; os códons *A* tendem a terminar em timina antes da sobreposição, mas, depois disso, na região da sobreposição, os códons *B* terminam em timina, enquanto os códons *A* não. Supostamente, um evento de mutação marcou o material *B* no final do primeiro e menor gene *A*, e aperfeiçoou sua capacidade enzimática. No entanto, isso é apenas uma suposição.

A surpreendente ordenação deste DNA viral é de extrema economia. O envoltório proteico é pequeno, porém, um mínimo de nove genes deveria ser empacotado nele. Já havíamos visto esse tipo de economia no uso do códon do DNA mitocondrial (capítulo 11).

À medida que novos sequenciamentos foram ocorrendo, os geneticistas descobriram outras novas situações de sobreposição. Por exemplo, em um caso, dois genes de um rato eram transcritos a partir de fitas opostas na mesma região do DNA. Em uma das fitas está o gene que libera o hormônio gonadotrofina (*GnRH*). Na outra há um gene (*RH*) que produz uma proteína expressada no coração.

A sobreposição de genes é também ocorre nas bactérias. Na *E. coli*, o promotor para o gene *ampC* (que codifica a enzima β -lactamase) começa dentro dos últimos dez códons do gene *frdC*, que codifica uma subunidade da enzima fumarato redutase. Há evidências de que neste arranjo, o terminador *frdC* pode exercer algum controle regulador da transcrição de *ampC*. (Veja capítulo 14 para a discussão dos processos reguladores em procariotos.)

Com os dados da sequência do DNA, incluindo as sequências completas de outros cromossomos tais como o SV40 e a mitocôndria, temos acumulado muitas informações sobre os arranjos dos genes. A sobreposição em maior ou menor grau foi encontrada em pequenos vírus (ϕ X174, SV40),

virus grandes (λ), cromossomos mitocondriais, DNA bacteriano e até em eucariotos, dos quais vários casos agora são conhecidos, e seus genes estão localizados dentro de íntrons de outros genes. Em um dos poucos exemplos conhecidos, três genes estão localizados em um íntron do gene para a neu-

rofibriomatosis, um gene que provoca uma doença neurológica desfigurante. Apesar de relativamente raros, a sobreposição e o embutimento dos genes pode ter alguma função reguladora na transcrição, além de minimizar o comprimento do cromossomo.

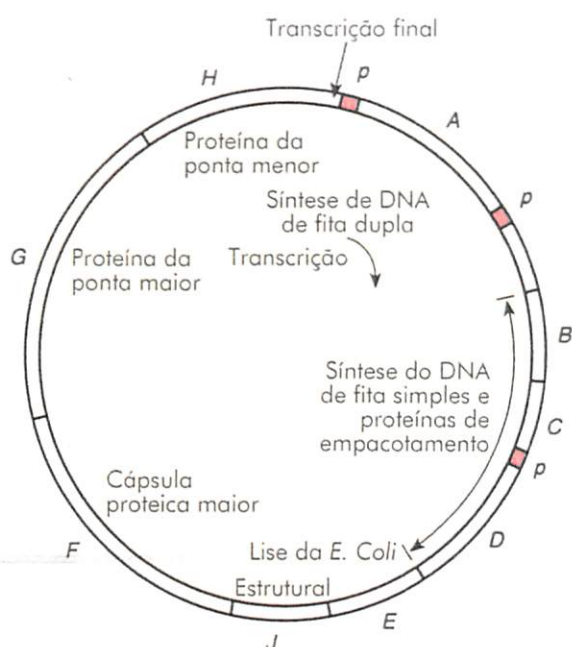


Figura 1 Suposta localização dos nove genes do fago ϕ X174 em seu cromossomo circular. A transcrição começa em três lugares diferentes, cada um deles marcado com *p*, para promotor. A função de cada gene aparece dentro do círculo.

J Met Ser
5' . . . AAGGAGUGAUGUAAUGUCU . . . 3'
E Lys Glu Stop
D Glu Gly Val Met Stop

Figura 2 Sequência, mostrada como nucleotídeos da ribose, em que os genes *E* e *D* terminam e *J* começa. Cada uma está fora do registro com as outras duas. O A de AUG para o gene *J*, por exemplo, é o segundo A do terminador UAA do gene *D*.

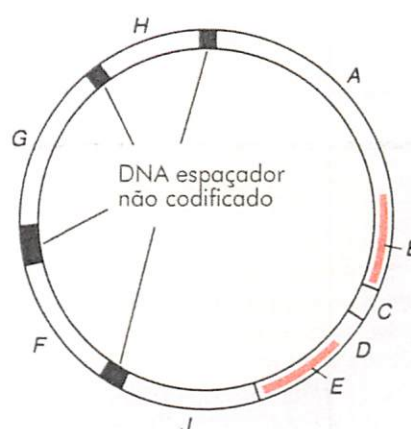


Figura 3 O mapa real dos nove genes do fago ϕ X174. Observe que B está inteiramente dentro de A e E está inteiramente dentro do D.

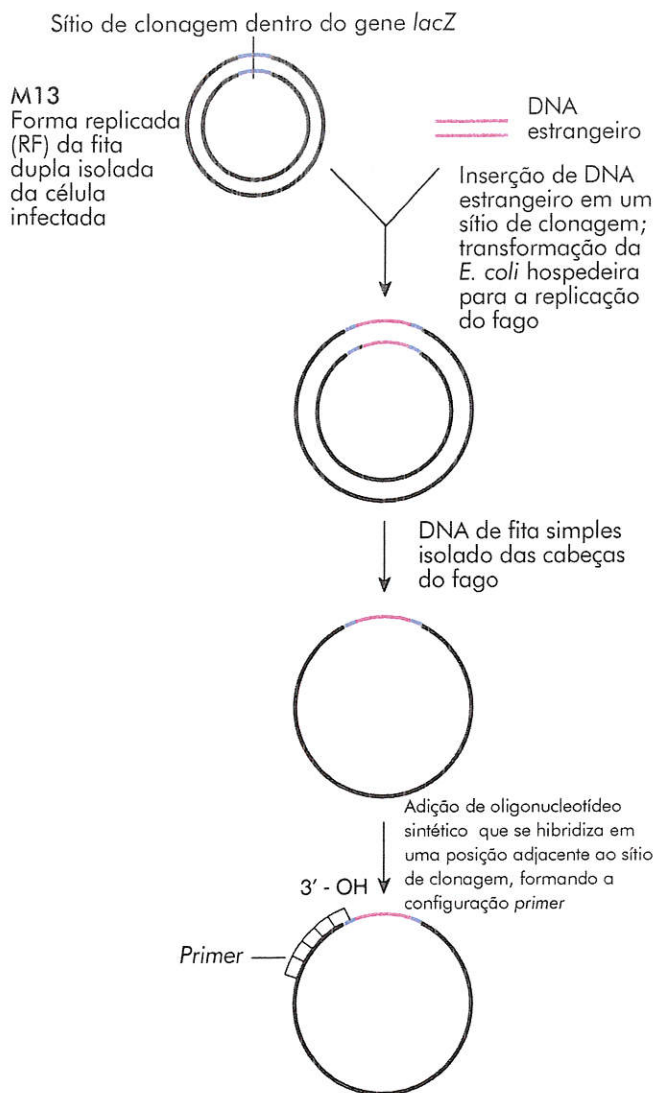


Figura 13.36 O fago M13, um vetor útil para sequenciar pelo método didesoxi um pedaço de DNA clonado, já que o material genético do fago existe tanto na forma de fita dupla quanto na de fita simples. Além disso, o fago contém sítios de restrição dentro de uma cópia do gene *lacZ* (azul). Isso permite a seleção de clones com pedaços enxertados de DNA estranho. Um oligonucleotídeo artificial, que se hibridiza em uma posição adjacente ao sítio de clonagem, fornece a configuração *primer* necessária para a nova síntese.

MAPEAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO GENOMA HUMANO

Localizando um Gene de Interesse

Genes de importância geral podem ser pesquisados diretamente. O gene para o câncer de mama é um bom exemplo. Outros genes que foram descobertos desta forma incluem os genes para a fibrose cística e para a doença de Hunting-

ton. O conceito de se descobrir um gene é relativamente simples, mas a metodologia é exaustiva. A busca por muitos genes, incluindo os importantes na área médica como o gene para o câncer de mama, significa procurar um gene somente através de seus sintomas. Ou seja, não conhecemos o produto proteico do gene ou sua localização. A busca começa pela procura de genealogias de famílias que segregam a doença e depois pela tentativa de correlacionar a ocorrência da doença com um RFLP específico ou com marcadores microssatélites. Quando tal correlação é feita, o gene é localizado em uma região de um cromossomo específico. Depois, com o auxílio de uma biblioteca genômica, realiza-se a técnica de caminhada cromossômica (*chromosome walking* - ver próxima seção), até que seja encontrado um gene na vizinhança do marcador que pode ser o gene alvo. Com o gene em mãos, sua sequência e o produto proteico podem ser determinados, o primeiro estágio no tratamento médico.

Caminhada Cromossômica (*Chromosome Walking*)

Apesar de qualquer pedaço de DNA estranho inserido ter um tamanho limitado, é possível analisar extensões mais longas do DNA utilizando uma técnica de clones sobrepostos chamada de **caminhada cromossômica** (*chromosome walking*). Digamos que certo gene (na região A) está localizado no clone 1, conforme descoberto através de sondagem. A inserção clonada pode ser removida, usando a mesma enzima de restrição inicialmente usada para inseri-la no vetor, e quebrada em pequenos pedaços que são usados como as próprias sondas. A ideia é localizar outro clone com uma região inserida que se sobrepõe à primeira (fig. 13.38). Então, o segundo clone é tratado da mesma forma—com segmentos usados para sondar outra sobreposição mais adiante no cromossomo. Dessa forma, segmentos relativamente longos de um cromossomo podem estar disponíveis para estudo em clones de sobreposição.

Um uso óbvio da caminhada cromossômica é descobrir quais genes estão próximos uns dos outros nos cromossomos eucarióticos. A técnica é cansativa e está sujeita a interrupções em certas áreas difíceis da caminhada, tais como sequências repetidas encontradas no DNA dos eucariotos (capítulo 15). Uma vez que a sonda de sobreposição contenha uma sequência repetida, ela se hibridiza com muitos clones que não contêm segmentos adjacentes. Essa "referência cruzada" diminui o valor da técnica. Atualmente, estão sendo desenvolvidas técnicas mais novas (uma delas denominada de **salto cromossômico**, ou *chromosome jumping*), criadas para desviar das regiões que não são acessíveis à caminhada cromossômica. Essas técnicas dependem da capacidade de localizar os dois terminais de um segmento sem ter que caminhar através do meio. Os terminais de um segmento podem ser localizados se a

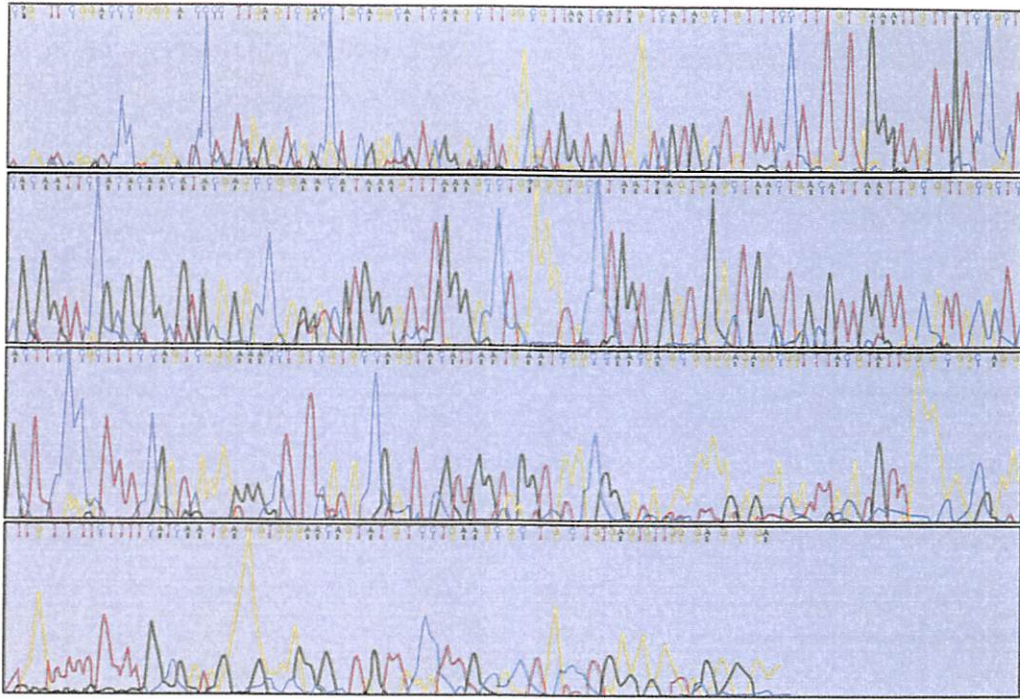


Figura 13.37 Dados processados de uma análise automatizada do DNA usando corantes fluorescentes. O DNA é sequenciado, adicionando um corante fluorescente em cada base de didesoxi. Dessa forma, as bases de didesoxi podem ser identificadas por sua cor fluorescente em luz a laser ao invés de pela posição na coluna que ocupam no gel. Somente uma coluna precisa então ser trabalhada. Neste diagrama, a guanina é amarela, a citosina é azul, a adenina é verde e a timina é vermelha. A sequência é lida da esquerda para a direita, de cima para baixo. (De L. Johnston-Dow, et. al. *BioTechniques*, 5:754-65, 1987. Copyright © 1987. Eaton Publishing, Natick, MA. Reimpressão autorizada.)

região foi invertida ou se uma região grande for clonada e a parte do meio for mais tarde removida, deixando apenas os terminais. Uma sonda dos terminais permite ao pesquisador localizar os clones com o primeiro terminal e depois o outro, efetivamente saltando a região intermediária.

O Gene do Câncer de Mama

A localização inicial do gene *BRCA1* para o câncer de mama foi determinada por M. King em 1990, usando um marcador (*D17S74*) no braço longo do cromossomo 17 (fig. 13.39). Foi o 183º marcador que King tinha experimentado (fig. 13.40). O gene *BRCA1* do câncer de mama foi especialmente difícil de localizar porque está relacionado a somente 5% de todos os cânceres de mama. Porém, ele explica uma porcentagem muito mais alta de início precoce hereditário de cânceres de mama em mulheres abaixo dos cinquenta anos de idade. Uma

em cada 200 mulheres herda este gene e entre elas de 80 a 90% possuem o risco de desenvolver a doença. A localização e clonagem efetivas deste gene foram realizadas em 1994 por uma equipe liderada por M. Skolnick. O gene codifica uma proteína de 1.863 aminoácidos, que parece atuar como uma proteína de supressão do tumor (vide capítulo 16). Seu mecanismo de ação é como o mecanismo de um fator de transcrição associado à RNA polimerase II (ver capítulo 10).

O Projeto Genoma Humano



O Método Padrão

No capítulo 6, desenvolvemos um mapa cromossômico humano. Em geral, um locus estava localizado em um determinado cromossomo através de técnicas de cultura teciduais (hibridização de célula somática). Posteriormente, os loci poderiam ser identificados com grande precisão usando cromossomos anormais, como aqueles que contêm deleções. Se um locus estivesse presente quando o cromossomo humano intacto estivesse presente, mas estivesse ausente se o cromossomo com deleção estivesse presente, o gene poderia estar localizado na região deletada. Além disso, as sondas para os genes específicos podem nos mostrar de modo grosseiro onde tal gene está localizado (fig. 13.41).



Mary-Claire King (1946).
(Cortesia do Office of Public
Information, Berkeley Campus,
University of California. Foto ©
Jane Scherr.)

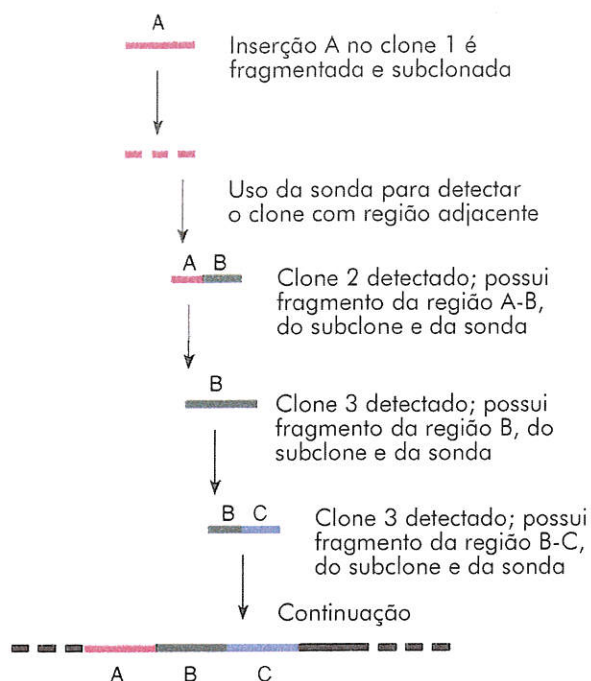


Figura 13.38 Técnica da caminhada cromossômica (chromosome walking). Essa técnica permite o estudo de regiões cromossômicas longas através da localização de inserções clonadas sobrepostas. Começamos com um pedaço específico de DNA clonado, chamado do inserção A. Esse pedaço é fragmentado para criar sondas para outros clones em uma biblioteca genômica que contém regiões que se sobrepõem a A (a próxima região abaixo é conhecida como B). Então o próprio clone A-B é fragmentado para criar sondas que repitam o processo, percorrendo todo o cromossomo.

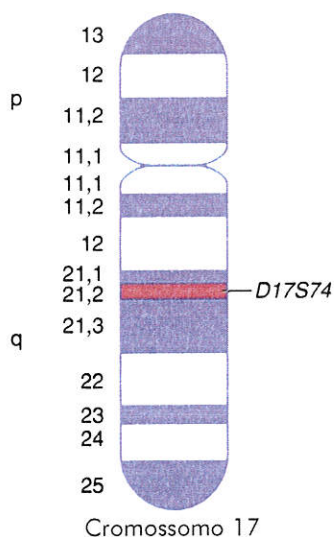


Figura 13.39 Cromossomo 17 corado em bandas através do uso de corante Giemsa, mostrando a numeração das regiões e a localização na região 21q no qual o marcador D17S74 está localizado. A terminologia do marcador refere-se à seção 74 do cromossomo 17. Este marcador está correlacionado à posição do gene BRCA1.

Dois métodos gerais foram desenvolvidos para o mapeamento do genoma humano, o *método padrão*, apoiado em grande parte por financiamentos dos governos e o *método shotgun do genoma inteiro*, usado pela Celera Genomics Company. No método padrão, o projeto se restringe à descoberta de um segmento do genoma e à sua localização. Depois, o segmento é sequenciado. Pela sobreposição de pedaços sequenciados, o genoma inteiro é montado. O mapeamento é feito cromossomo por cromossomo, já que os cromossomos individuais podem ser isolados em grandes números pelos métodos de citometria de fluxo, descrito no capítulo 15. Nos estágios iniciais do Projeto do Genoma Humano, quando a primeira etapa era o mapeamento, os cromossomos artificiais de levedura (YACs) foram os primeiros agentes de clonagem. No entanto, à medida que a ênfase do projeto se dirigia para

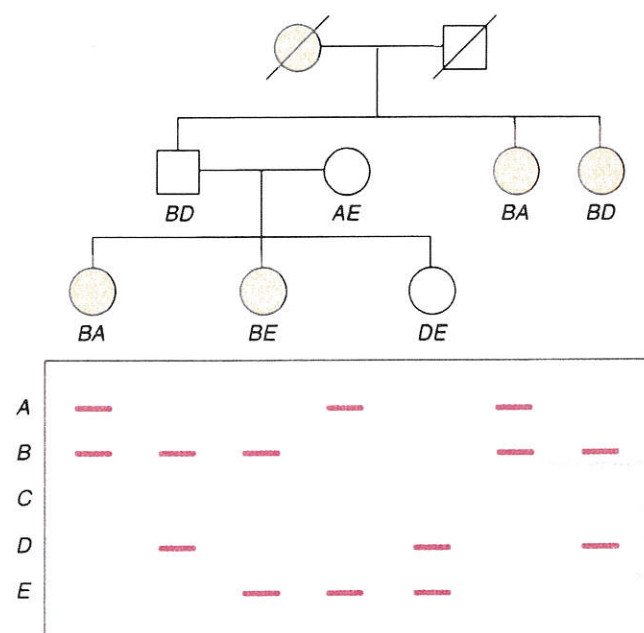


Figura 13.40 Pedigree de uma família de indivíduos nos quais o câncer de mama precoce está segregado. Na parte de baixo da figura há um gel com várias bandas, mostrando alelos de D17S74, marcados de A-E em tamanho decrescente do fragmento de sonda. Os indivíduos no pedigree estão diretamente em cima de suas colunas no gel. Os pais originais morreram (linha diagonal) e, portanto, não foram tipados. A mãe, duas de suas filhas e duas de suas netas foram diagnosticadas com câncer de mama em idades entre vinte e três e quarenta e cinco anos (amarelo). Observe que em todos os casos de câncer de mama, a mulher possui o alelo B do marcador D17S74. É esta correlação que localizou o gene do câncer de mama naquela região do cromossomo. D17S74 estava no 183º marcador que M. King e seus colaboradores estudaram; os outros marcadores não mostraram nenhuma correlação com o câncer de mama. (Reimpresso com permissão de J. M. Hall et al., "Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21", *Science*, 250:1684-89, 1990. Copyright © 1990 American Association for the Advancement of Science.)



Figura 13.41 A localização física de um gene ou marcador pode ser encontrada pela sondagem dos cromossomos com uma sequência de DNA complementar que possui um componente fluorescente específico anexado a ela. Quando ativada, a sonda é vista (*manchas amarelo-brilhantes*) em um microscópio confocal por varredura a laser. Os cromossomos são contrastados com iodeto de propidium, que os torna *vermelho fluorescente*. Neste caso, a sonda localizou uma sequência no cromossomo humano 11. (© Peter Menzel/Fotografado na Yale University Medical School.)

o sequenciamento, **cromossomos artificiais bacterianos (BACs)** foram utilizados. Os cromossomos artificiais bacterianos são derivados do fator de fertilidade (fator F, vide capítulo 7). Eles possuem propriedades de estabilidade e homogeneidade que os tornam mais compatíveis com as técnicas automatizadas de sequenciamento.

Para começar o sequenciamento, cada cromossomo individual é quebrado em segmentos de sobreposição com cerca de 150.000 pb em uma biblioteca BAC. Cada BAC é então digerido em pedaços menores que são clonados em cosmídeos ou fagos P1 digeridos em pedaços menores para o sequenciamento.

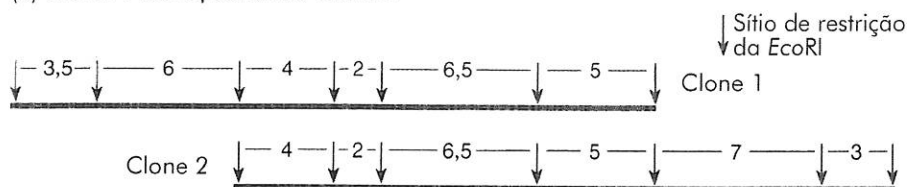
Antes de definirmos as técnicas, devemos mencionar que não estamos lidando com somente um mapa do genoma, mas com vários tipos de mapas. Embora o objetivo final fosse a sequência completa do DNA do genoma, com a localização exata de cada gene, precisávamos passar por vários estágios para chegar até lá—lembre-se que estamos tentando rastrear as 3,3 bilhões de bases. Estamos familiarizados com o mapa de ligação genético dos cromossomos descritos no capítulo 6. Esses mapas são chamados de **mapas de ligação clássicos**, os quais definem as distâncias em frequências de recombinação. Um **mapa de ligação moderno** é aquele que usa dos marcadores RFLP ao invés de genes ao longo de seu comprimento. Há também o **mapa físico**, no qual as distâncias estão em unidades físicas de pares de base. Esses mapas podem ser de marcadores microssatélites ou de **sítios com sequência marcada (STSs - *sequence-tagged sites*)**. Os sítios com sequência marcada são porções de DNA de 100-500 pares de base que são exclusivos no genoma. Eles são criados pela ampliação dos *primers* pela reação em cadeia da polimerase obtidos pelos segmentos de sequenciamento do genoma. Depois, os *primers* são testados para assegurar que a sequência é exclusiva. Cerca de 50% das tentativas produzem sítios com sequência marcada.

O mapa físico também pode ser marcado pelas diferenças entre os indivíduos que resultam em diferenças em pares de bases únicos. Essas diferenças são chamadas de **polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*)** - pronuncia-se “snips”), os quais estão localizados a cada mil bases ao longo do genoma humano. Esses polimorfismos de nucleotídeo único são especialmente úteis no acompanhamento de diferenças entre os indivíduos em relação a genes responsáveis por doenças.

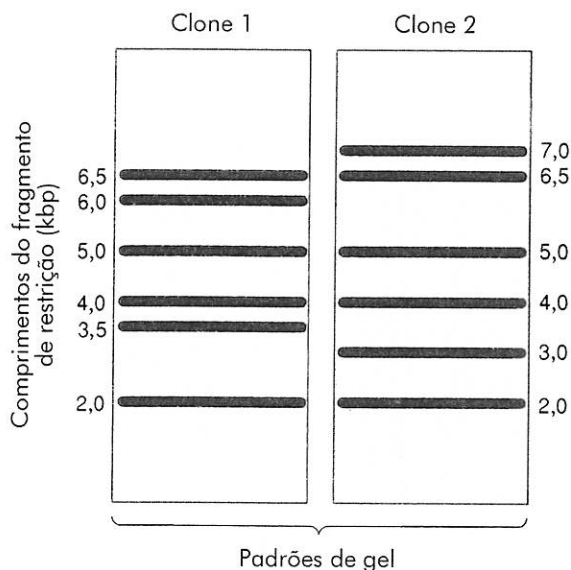
Os RFLPs, os marcadores microssatélites, os STSs, e os SNPs nos permitem acompanhar os BACs e pedaços clonados em cosmídeos e fagos P1. Entretanto, quando localizamos vários pedaços de DNA, estamos construindo regiões contínuas de um cromossomo pela sobreposição destes pedaços. Esses clones contíguos e sobrepostos são chamados de **contigs**. Esse processo é repetido cromossomo por cromossomo. Em outras palavras, estamos criando uma biblioteca de clones de sobreposição que abrange todo o comprimento de cada cromossomo. Em essência, estamos montando um quebra-cabeça linear. Os contigs são criados pela comparação dos segmentos que os clones têm em comum, caso o tenham (fig. 13.42). A partir dos segmentos compartilhados, podemos inferir em quais partes os clones se sobrepõem. Através deste processo, os contigs das partes do cromossomo podem ser construídos (fig. 13.43). Mais tarde, os contigs que compreendem parte de um cromossomo podem ser ordenados pegando-se um clone final de um contig completo e usando-o como sonda para iniciar a caminhada cromossômica a fim de encontrar um clone final de um contig próximo (fig. 13.44).

Impressões (fingerprints) do fragmento de restrição

(a) Clone 1 sobrepõe-se ao clone 2



(b) Impressões (fingerprints) dos clones 1 e 2



(c) Regiões de sobreposição e não sobreposição inferidas das impressões (fingerprints) em (b). Os fragmentos são arbitrariamente ordenados do menor para o maior, dentro de cada região



Figura 13.42 Para criar contigs, os pesquisadores devem encontrar os clones de sobreposição e determinar suas regiões de sobreposição. Em (a), temos dois pedaços de DNA sobrepostos encontrados pela caminhada cromossômica. Os pedaços são então digeridos com *EcoRI* e submetidos à eletroforese, produzindo as bandas na parte (b). A partir desses géis, vemos que os fragmentos de 2,0, 4,0, 5,0 e 6,5 Kb são comuns, indicando que estão na região de sobreposição de ambos os clones. Assim, isolamos a região de sobreposição e as regiões únicas dos terminais de ambos os clones (compare c com a). Os mapas de restrição de cada segmento podem ser feitos, ordenando os pedaços. (Reimpressão autorizada, cortesia de Los Alamos Science, volume número 20, uma publicação de Los Alamos National Library, Los Alamos, NM).

Por exemplo, vamos começar com um BAC do cromossomo 7 de 150.000 pares de base com três sítios de identificação de sequência localizados ao longo de seu comprimento. Podemos determinar BACs vizinhos pelo compartilhamento dos sítios de sequência marcada (STS). O BAC é então digerido e clonado em cosmídeos. A sobreposição de cosmídeos pode ser determinada pe-

los sítios de sequência marcada, por RFLPs, por SNPs ou por microssatélites em comum. Os cosmídeos são então digeridos e sequenciados. A partir das sequências, trabalhamos de trás para frente, encontrando a sobreposição e, assim, construindo um contig daquele BAC. O mesmo processo é realizado nos BACs vizinhos, estendendo o contig até abranger o cromossomo inteiro.

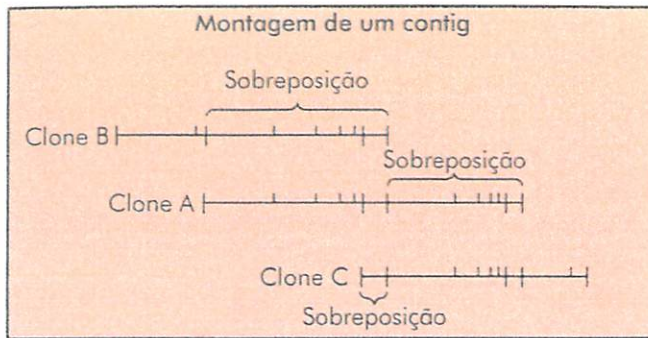


Figura 13.43 Um contig é posteriormente construído pela montagem em pares de clones sobrepostos em sequências mais longas. Aqui vemos que o clone A sobrepõe-se ao clone B à esquerda e ao clone C à direita. Neste caso, há um fragmento comum para todos os três clones. Pela comparação de clones desta maneira, podemos percorrer todo o cromossomo, criando um contig cada vez maior. (Reimpressão autorizada por Los Alamos Science, Volume número 20, uma publicação dos Los Alamos National Library, Los Alamos, NM.)

No início do Projeto de Genoma Humano, vários objetivos foram estabelecidos. Um mapa de ligação moderno de marcadores microssatélites do genoma humano estaria completo quando os marcadores estivessem espaçados em cerca de 0,7 centimorgans (cerca de 700.000 pares de base) de distância. Esse objetivo foi alcançado em 1996 com 2.335 marcadores microssatélites localizados no genoma. O mapa físico de sítios de sequência marcada estaria completo com marcadores a cada 100.000 bases, o equivalente a 30.000 sítios de sequência marcada no genoma clonado em BACs. Esse objetivo foi alcançado em 1997. A sequência do genoma completo foi prevista para 2001 e anunciada em 2000.

Uma das razões pelas quais os objetivos foram otimistas foi o fato de que métodos de produção em massa foram desenvolvidos à medida que o projeto se desenvolvia. Esses métodos incluem a automação do sequenciamento e da clonagem, além do desenvolvimento de algumas tecnologias inovadoras. Por exemplo, os cientistas em Affy-

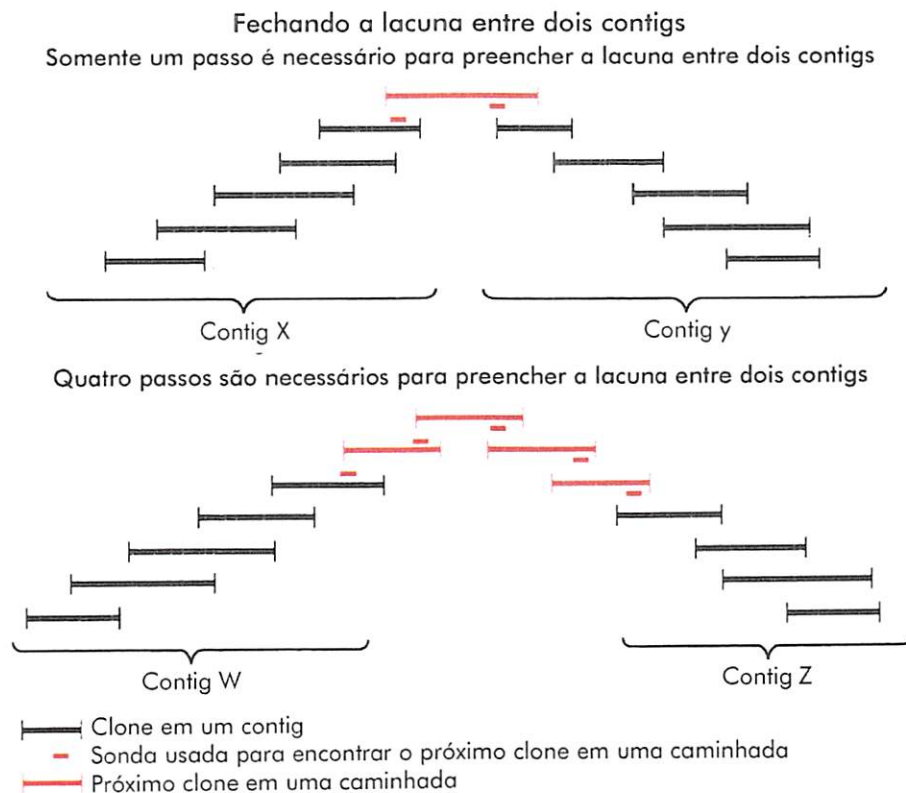


Figura 13.44 Quando contigs de partes grandes de um cromossomo são construídos, eles precisam ser conectados. Podemos fazer isso diretamente se há uma sobreposição no final de um contig e no início do próximo. Caso isso não aconteça, devemos realizar uma caminhada cromossômica para achar clones que preencham o espaço entre os dois contigs. Na parte de cima da figura, na técnica típica de caminhada cromossômica, o DNA de um terminal clonado é fragmentado e usado para sondar uma sobreposição. Neste caso, é encontrado um clone que sobrepõe dois contigs e, assim, une-os em um contig longo. Na parte de baixo da figura, a caminhada exige a descoberta de quatro clones de sobreposição que preencham os espaços entre os dois contigs. Em ambos os casos, o processo obtém êxito, juntando dois contigs em um mais longo. (Reimpressão autorizada por Los Alamos Science, Volume número 20, uma publicação dos Los Alamos National Library, Los Alamos, NM.)

metrix, Inc., desenvolveram o equivalente a uma sonda de DNA em chip de computador. Milhares de sequências de DNA conhecidas são sintetizadas em um substrato de vidro. O DNA a ser sondado é introduzido neste chip, onde a hibridização acontece. Usando a tecnologia fluorescente, a sondagem bem sucedida pode ser determinada utilizando um sistema confocal por varredura a laser (fig. 13.45). Esses chips permitem análises extremamente rápidas de sequências de DNA. Vários outros fabricantes desenvolveram tecnologias similares.

Como mencionado no início deste capítulo, J. C. Venter da Celera Genomics foi o coanunciador do término do sequenciamento do genoma humano. Venter e seus colaboradores usaram um método de *shotgun* de genoma inteiro no qual o genoma humano foi quebrado em pequenos segmentos, clonado e sequenciado. Então, o grupo Celera irá montar o quebra-cabeças do genoma com o auxílio da grande capacidade de resolução dos computadores. Antes, acreditava-se que este método não funcionaria em um genoma tão grande quanto o genoma humano. Venter e seus colaboradores, entretanto, terminaram o sequenciamento do genoma da *Drosophila* (180 milhões de pares de base) até março de 2000 através deste método. Venter e seus colaboradores também sequenciaram o primeiro organismo

verdadeiro, a bactéria *Haemophilus influenzae* (1,8 milhões de pares de base) em julho de 1995. Depois disso, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (12 milhões de pares de base) foi sequenciada em 1996, e um organismo modelo genético, o verme nematoide, *Caenorhabditis elegans* (97 milhões de pares de base; vide capítulo 16), foi sequenciado em 1998. Desde 1995, outras inúmeras bactérias e eucariotos tiveram seus genomas sequenciados.

Bioinformática e Proteômica

Essas incríveis realizações na genômica fizeram surgir duas novas ciências, a **bioinformática** e a **proteômica**. A bioinformática é a ciência da extração de dados das sequências de DNA obtidos por meio do sequenciamento. Extração se refere a armazenamento, recuperação e análise dos dados. Proteômica é o estudo do **proteoma**, de *proteínas* do *genoma* e se refere ao estudo de todo o conjunto de proteínas de um genoma específico. A proteômica é o análogo proteico da genômica. Estima-se que há de 50.000 a 2 milhões de diferentes proteínas nos sistemas biológicos, embora o número de formatos diferentes—motivos (*motifs*)—pode ser somente cerca de cinco mil. A função da proteômica é caracterizar todas as proteínas e determinar suas estruturas e

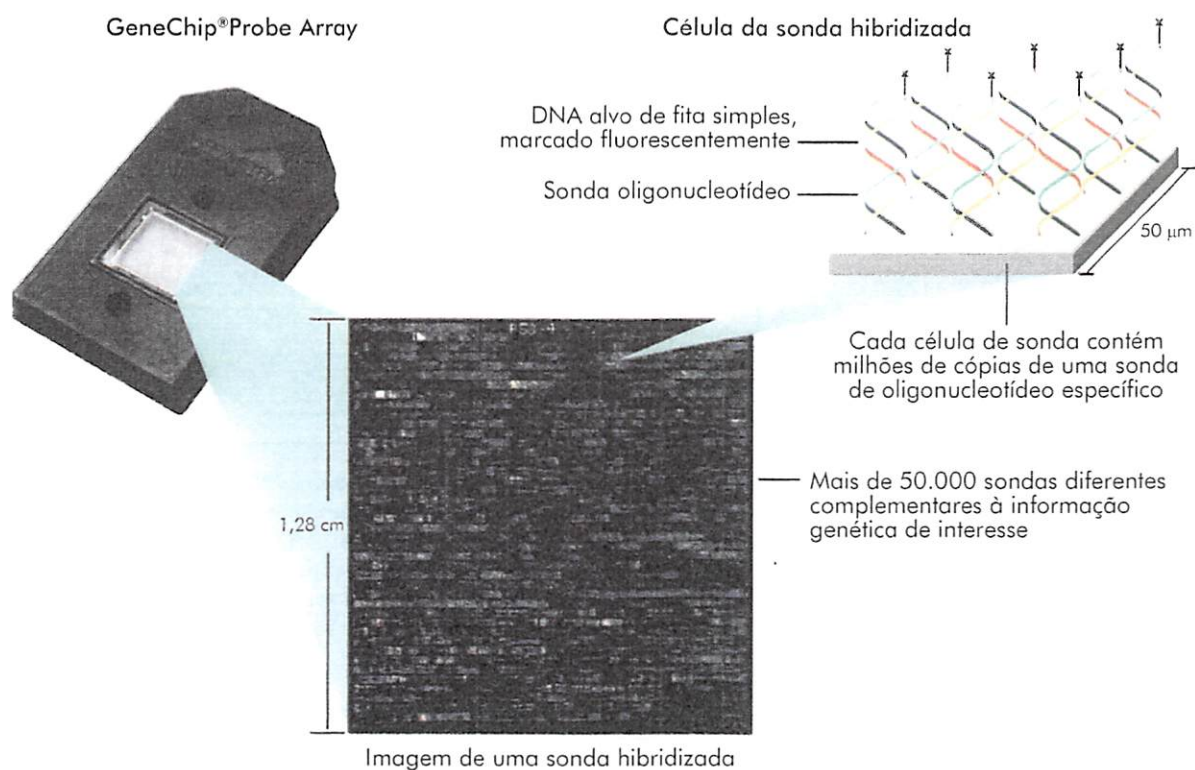


Figura 13.45 O Gene Chip®Probe Array é uma placa de vidro que contém cerca de sessenta e cinco mil a um milhão ou mais sequências diferentes de DNA. Os chips são criados por técnicas fotolitográficas, similares às usadas na fabricação de chip de computadores. O DNA a ser sondado deve ter moléculas fluorescentes anexadas para permitir uma rápida triagem. (Cortesia da Affymetrix, Inc.)

formas. Assim como a genética clássica trabalhou do fenótipo para o genótipo, a genética molecular está trabalhando do genótipo (genômica) ao fenótipo (proteômica).

Ética

Além das informações médicas e científicas esperadas que vamos obter a partir do sequenciamento do genoma humano, há os problemas éticos que o projeto também produzirá. Logo seremos capazes de realizar testes para saber se as pessoas possuem genes ativos para doenças latentes como, por exemplo, a doença da artéria coronária ou câncer. Então, as empresas de seguro poderiam exigir testes em relação ao conteúdo genético de indivíduos para decidir se tais pessoas estão aptas a serem seguradas ou para decidir a taxa de seus planos de seguro? Haverá muitas pessoas não aptas a serem seguradas devido ao fato de possuírem genes que possam conferir uma predisposição ao câncer? Haverá indivíduos considerados não aptos a determinados empregos pelas mesmas razões? O que os médicos deveriam fazer quando diagnosticassem uma doença genética (ex: doença de Huntington) que não tem cura? Deveriam contar ao paciente? Outra questão ética é até que ponto a intervenção genética deveria ser usada para mudar o curso da vida de uma pessoa. Com o conhecimento da sequência e da localização de nossos genes, e com a tecnologia para transferir os genes para as pessoas, os indivíduos transgênicos irão se tornar comuns (ver boxe 13.2)? Não deveríamos somente curar as doenças através de tal tecnologia, ou deveríamos moldar uma pessoa para atingir um estado ideal? A intervenção genética em relação a nosso projeto genético básico seria uma rotina? Para responder essas questões, um painel ético foi estabelecido no Projeto do Genoma Humano.

BENEFÍCIOS PRÁTICOS DA CLONAGEM DO GENE

Ao longo deste capítulo, mencionamos algumas das aplicações da engenharia genética. Aqui resumimos algumas realizações e futuros direcionamentos nas áreas da medicina, agricultura e indústria.

Medicina

Na medicina, a engenharia genética tem obtido notáveis realizações em algumas áreas. Por um lado, o conhecimento básico do funcionamento dos genes (e do não funcionamento) tem tido grande avanço. Por outro lado, a metodologia do DNA recombinante permitiu a produção em larga escala de substância antes bastante escassas, como por exemplo, a insulina, interferons (um agente antiviral), hormônio do crescimento, fatores de

crescimento, fatores de coagulação sanguínea e vacinas para doenças como a hepatite B, herpes e a raiva. Os avanços nas pesquisas sobre a AIDS e o câncer são discutidos no capítulo 16. A engenharia genética tornou possível a fabricação de anticorpos para diagnosticar e tratar doenças. Posteriormente, o sequenciamento do genoma humano ajudará a medicina na identificação dos genes de várias doenças, um primeiro passo na descoberta das curas. Até o momento, vários genes de grande importância foram localizados, clonados e sequenciados. Também destacamos o uso de polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição e a reação em cadeia da polimerase como técnicas de grande capacidade para identificar indivíduos para fins forenses.

Em outra frente de pesquisa, camundongos transgênicos e ovelhas clonadas mostraram que a engenharia genética pode ser aplicada aos organismos superiores (fig. 13.46). O uso desta tecnologia para tratar as doenças humanas, no entanto, é somente o início. Em julho de 1990, o National Institute of Health aprovou tratamentos de terapia gênica em pessoas: inseriu-se células em uma criança para substituir um gene para a enzima adenosina desaminase, uma enzima cuja ausência resulta em um sistema imune disfuncional. Embora este último tratamento tenha obtido sucesso, ele foi realizado juntamente com outros tratamentos, levando a conclusões equivocadas. Camundongos e cachorros tiveram a hemofilia B corrigida pela infusão de um adenovírus geneticamente modificado. A AIDS, a hemofilia, a fibrose cística e a diabetes são outras doenças que podem ser acessíveis à terapia gênica em um futuro próximo.



Figura 14.46 A porca mostrada é transgênica e produz grandes quantidades da proteína C humana em seu leite. A proteína controla a coagulação do sangue e, normalmente, é encontrada apenas em quantidades vestigiais no sangue humano. (Cortesia de William H. Velander, Virginia Tech.)

Agricultura

Atualmente, cerca de um quarto da terra cultivável nos Estados Unidos é de culturas geneticamente modificadas. A maior parte é resistente a certas pestes de insetos porque contém genes do *Bacillus thuringiensis* (frequentemente referidos como Bt). Estes genes são proteínas inseticidas chamadas de endotoxinas δ . Por exemplo, as proteínas Cry1A e Cry1C do *Bacillus thuringiensis* protegem as plantas de formas larvais dos lepidópteros, tais como a broca-do-milho europeia. Cry3A protege as plantas contra coleópteros como o besouro-da-batata. Mais de cinquenta plantas de culturas geneticamente modificadas foram aprovadas para o plantio, incluindo aquelas protegidas contra pestes de insetos, congelamento e amadurecimento prematuro. O arroz está sendo modificado, de modo que sua vitamina A em potencial seja mantida mesmo após a casca ser removida, um procedimento feito para permitir o armazenamento, já que a casca se torna rançosa. Somente esta alteração aperfeiçoará a saúde de milhões de pessoas por todo o mundo. O boxe 13.1 discutiu algumas das principais preocupações éticas relacionadas à cultura de plantas geneticamente modificadas.

Indústria

As aplicações industriais da biotecnologia incluem bactérias modificadas para degradar lixo tóxico, leveduras modificadas para utilizar a celulose na produção da glicose e álcool, utilização de algas na maricultura (cultivo de organismos marinhos em seus ambientes naturais) para produzir alimento e substâncias úteis, além do desenvolvimento de métodos para um melhor processamento e aproveitamento dos alimentos, evitando o desperdício. Como exemplo, a levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi modificada com um plasmídeo que contém dois genes para celulasas, uma endoglucanase e uma exoglucanase, que convertem celulose em glicose. Assim, as leveduras podem converter a glicose em álcool etílico. Agora, estas leveduras são capazes de digerir madeira (celulose) e convertê-la diretamente em álcool. Existe potencial para colher o álcool que as leveduras produzem como combustível de substituição dos escassos combustíveis fósseis que poluem o planeta.

Como se pode ver, não há uma direção que a biotecnologia não esteja seguindo. Estão sendo feitos muitos avanços que provavelmente irão afetar de forma benéfica a vida de todas as pessoas. Neste cenário, é prudente ter um otimismo cauteloso.

RESUMO

OBJETIVO DO ESTUDO 1: Examinar as técnicas da clonagem de genes 359-377

As técnicas do DNA recombinante giram em torno da clonagem de DNA estrangeiro em um plasmídeo ou fago. O DNA clonado pode ser amplificado, expressado e sequenciado. As técnicas de clonagem gênica surgiram com a descoberta das endonucleases de restrição. As endonucleases de restrição do tipo II clivam o DNA em regiões palindrômicas que possuem simetria dupla.

Os vetores recombinantes podem ser construídos de várias formas diferentes. O DNA estrangeiro e do vetor podem se tornar compatíveis através do tratamento de cada um com a mesma endonuclease de restrição—cada uma terá então os mesmos terminais aderentes (*sticky ends*). Se isso não funcionar, a DNA ligase T4 pode unir terminais cegos (*blunt end*). Em uma variação deste método, ligadores que contêm sítios de restrição são adicionados ao DNA estrangeiro e do vetor. Esses ligadores são posteriormente tratados com uma endonuclease de restrição que propicia ao DNA terminais aderentes.

O DNA a ser clonado pode ser sintetizado a partir de um molde de RNA (c DNA) ou pode ser isolado através de várias técnicas. Se o RNA mensageiro estiver disponível, ele pode ser convertido em um DNA complementar

clonável pela ação da enzima transcriptase reversa. Se o DNA for isolado diretamente, ele deve ser identificado entre todos os outros fragmentos de DNA criados. A localização de um pedaço específico de DNA é feita por meio de sondas, ácidos nucleicos complementares marcados com radioatividade ou quimiluminescência. Primeiro, utiliza-se uma técnica de transferência (blotting) denominada de transferência Southern, seguida pela hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA e pela autorradiografia. Se o DNA for clonado primeiro, como ocorre na criação de uma biblioteca genômica, sondas podem ser criadas ou a expressão do gene clonado pode ser determinada.

Vetores eucarióticos foram desenvolvidos, incluindo os plasmídeos de leveduras, veículos de vírus tumorais em animais e plasmídeos de tumor galha-da-coroa. Os eucariotos podem ser transfectados com DNA estrangeiro e expressá-lo em organismos transgênicos. O DNA pode ser injetado, atirado contra as células por meio de projéteis, por eletroporação ou pode ser introduzido por vírus, plasmídeos ou lipossomos. Camundongos «knockout», que não possuem um gene específico, podem ser criados.

OBJETIVO DE ESTUDO 2: Examinar as técnicas de criação de mapas de restrição 377-383

As digestões de restrição podem ser separadas por eletroforeses e depois utilizadas para construir um mapa de restrição. Este é um mapa de DNA que mostra a localização dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição. Os mapas genéticos, gerados pela análise de acasalamento, podem então ser sobrepostos aos mapas de restrição, localizando regiões de interesse no mapa físico. Os polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição (RFLPs) fornecem uma ferramenta para a localização de genes através da análise de ligação, além de serem de grande importância na ciência forense. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica usada para amplificar rapidamente segmentos específicos do DNA.

OBJETIVO DO ESTUDO 3: Estudar os métodos do sequenciamento do DNA 383-390

Em geral, o DNA pode ser sequenciado através de dois métodos. O método dideoxi, desenvolvido por Sanger e seus colaboradores, necessita da síntese de DNA na presença de nucleotídeos (dideoxi) de terminação de cadeia. A eletroforese seguida pela autorradiografia permite que seja diretamente determinada a sequência de nucleotídeos sintetizados. A marcação fluorescente permite determinações computadorizadas de sequência. O fago ϕ X174 foi inteiramente sequenciado através

do precursor desta técnica, o método mais-e-meros. O método químico de Gilbert e Maxam também é amplamente usado.

OBJETIVO DE ESTUDO 4: Examinar os objetivos e métodos do Projeto Genoma Humano 390-397

O Projeto Genoma Humano é uma iniciativa internacional ampla para mapear e sequenciar todas as 3,3 bilhões de bases do genoma humano. O sucesso inicial foi anunciado na primavera do ano 2000. Estão sendo criados mapas de ligação modernos em relação a sítios de restrição, marcadores microssatélites, sítios de sequência marcada e polimorfismos de nucleotídeo único. Eles estão sendo coordenados com mapas físicos criados com a sobreposição clones contíguos dos cromossomos. Atualmente, essas técnicas nos permitem encontrar genes de interesse. O projeto também inclui o sequenciamento de genomas de outros organismos relevantes.

OBJETIVO DE ESTUDO 5: Examinar os benefícios práticos e questões humanas da engenharia genética 397-398

A engenharia genética está abrindo várias frentes. Aplicações médicas, da agricultura e também industriais estão se tornando difundidas.

PROBLEMAS RESOLVIDOS

Problema 1: Um pedaço de DNA eucariótico é obtido pelo uso de uma endonuclease de restrição que produz terminais cegos (*Hae*III). Como poderíamos colocar este pedaço de DNA em um sítio *Bam*HI no plasmídeo pBR322, e como poderíamos saber quando o DNA estrangeiro foi clonado?

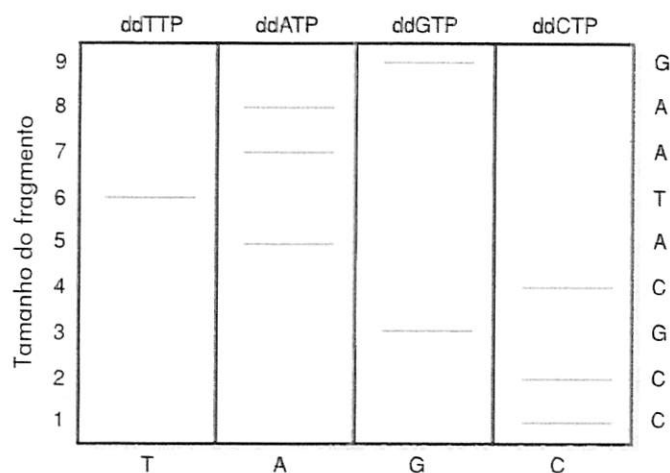
Resposta: Como os dois pedaços de DNA (o eucariótico e o plasmídeo) possuem terminações diferentes, eles devem se tornar compatíveis antes da clonagem. A forma mais simples seria anexar ligadores com terminais cegos no DNA estrangeiro através da atividade da DNA ligase do fago T4 (fig. 13.9). Os ligadores, é claro, conteriam o sítio *Bam*HI. Depois de os ligadores serem anexados ao DNA estrangeiro, ele seria tratado com a enzima de restrição *Bam*HI, conferindo ao DNA estrangeiro os terminais *Bam*HI. O plasmídeo é então tratado com a enzima de restrição e ambos (o DNA estrangeiro e o plasmídeo cortado) são agora misturados na presença de DNA ligase da *E. coli*, que sela os plasmídeos, com ou sem as inserções clonadas (vide fig. 13.6). Como eles possuem terminais compatíveis, em algum momento, um pedaço de DNA estrangeiro é inserido em um plasmídeo. Os plasmídeos são então absorvidos pelas células de *E. coli* que são cultivadas de um dia para o outro em uma incubadora. As colônias bacterianas são então replicadas em placa em meios com os antibióticos ampicilina ou tetraciclina. Colônias que são resistentes à ampicilina, mas sensíveis a tetraciclina são as bactérias que contêm plasmídeos com inserções clonadas (fig. 13.8).

PROBLEMA 2: Como um sistema repórter funciona?

Resposta: Um sistema repórter é um sistema geneticamente manipulado que exhibe um fenótipo ou reação quando um evento desejado acontece. Neste capítulo, discutimos o sistema repórter da luciferase do vagalume, no qual o resultado desejado (transcrição de um promotor específico) faz com que a planta do tabaco brilhe. Suponha que estamos estudando o controle da transcrição de um gene eucariótico específico. Poderíamos anexar o promotor do gene em questão ao gene da luciferase dos vagalumes em um plasmídeo Ti através das técnicas de clonagem. Então, o plasmídeo poderia transfectar as plantas de tabaco e poderíamos continuar nosso experimento para determinar se o promotor em estudo está ativo sob várias condições. Poderíamos saber se está ativo, regando as plantas com luciferina. Se a planta brilhar, então o produto do gene luciferase está presente, o que significa que o promotor em questão está ativo. Em outras palavras, o brilho da planta relata, ou "reporta", a ação do promotor em questão. O promotor está ativo porque permitiu a transcrição do gene luciferase. Também discutimos a proteína verde fluorescente no sistema repórter.

PROBLEMA 3: Um pedaço de DNA possui a sequência 3'-GGCGTATTC-5'. Ele é sequenciado usando o método dideoxi. Quantas bandas são encontradas no gel de escada? Quantas bandas e de que tamanho são encontradas para cada mistura de reação?

Resposta: Como o pedaço de DNA tem nove bases de comprimento, o número total de bandas em todas as quatro pistas de um gel sequenciador somam nove (fig. 13.33). Temos quatro misturas de reação, ou seja, quatro misturas de reação, cada uma com um dos didesoxinucleotídeos. Na mistura de reação com ddTTP, a terminação da cadeia ocorre na adenina. Isto é, um segmento DNA de seis bases de comprimento foi sintetizado (ver figura abaixo). Na mistura de reação com ddATP, a terminação da cadeia ocorre na posição oposta a cada uma das timinas, produzindo segmentos de DNA de cinco, sete e oito nucleotídeos. Na mistura de reação com ddGTP, a terminação da cadeia ocorre no oposto das citosinas nas posições um e três. E, por fim, na mistura de reação com ddCTP, a terminação da cadeia ocorre após a síntese dos segmentos com



comprimento de uma, duas e quatro bases. Observe que o gel nos dá a sequência da fita complementar do pedaço original de um DNA de fita simples.

PROBLEMA 4: Uma molécula de DNA linear de 1.000 pares de base de comprimento é digerida com as seguintes enzimas de restrição e produz os seguintes resultados:

<i>EcoRI</i>	400 pb, 600 pb
<i>BglII</i>	250 pb, 750 pb
<i>EcoRI</i> + <i>BglII</i>	250, 350, 400 pb

Determine o mapa de restrição.

Resposta: Cada enzima sozinha produz dois fragmentos, de modo que a molécula possui um sítio para cada enzima. Como obtemos fragmentos de diferentes tamanhos com cada enzima, os sítios devem estar localizados assimetricamente ao longo do DNA. Desenhe estes sítios:

<i>EcoRI</i>		<i>BglII</i>
400	↓	600
		250
		↓
		750

O fragmento *EcoRI* que não possui o sítio *BglII* deveria aparecer na digestão dupla. Se o *BglII* corta dentro do fragmento de 400 pares de base, poderíamos esperar ver 150, 250 e 600 fragmentos de pares de base. Isso não é observado e, portanto, o sítio *BglII* não está dentro do fragmento de 400 pares de base da *EcoRI*. Portanto, o mapa fica desta forma:

<i>EcoRI</i>		<i>BglII</i>
400	↓	350
		↓
		250

EXERCÍCIOS E QUESTÕES*

FERRAMENTAS GENÔMICAS

1. Que propriedades específicas das endonucleases tipo II as tornam úteis na clonagem do gene?
2. Abaixo há uma dupla hélice de DNA. Caso existam, quais são as sequências de reconhecimento em potencial da enzima de restrição?

5'-TAGAATTCGACGGATCCGGGGCATGCAGATCA-3'
3'-ATCTTAAGCTGCCTAGGCCCCGTACGTCTAGT-5'

3. Suponha um arranjo aleatório de nucleotídeos em um pedaço de DNA, qual é a probabilidade de que a endonuclease de restrição, cujo sítio de reconhecimento consiste de quatro bases (um cortador de quatro bases), cortará o DNA? Qual é a probabilidade de um cortador de seis? E um de oito?
4. Sob que circunstâncias uma endonuclease de restrição não serve para a clonagem de um pedaço de DNA estrangeiro?
5. Quais métodos existem para criar terminais aderentes ou criar terminais para união de dois pedaços incompatíveis de DNA? Quando cada método é favorecido?

6. Diagrame um possível heteroduplex entre dois vetores do fago λ, um com e outro sem uma inserção, criada pela hibridização DNA-DNA.
7. Quais são as diferenças entre plasmídeo, cosmídeo, vetor de expressão e YAC? Em que circunstâncias cada um é utilizado?
8. Quais são os passos pelos quais o RNA mensageiro pode ser convertido em cDNA? Como poderíamos obter cDNA radioativo? E um RNA mensageiro radioativo?
9. O que é caminhada cromossômica (*chromosome walking*)? Quando ela é usada?
10. Como poderíamos isolar um gene humano de RNA transportador de alanina para clonagem? Como poderíamos localizar um clone com um gene humano de RNA transportador de alanina em uma biblioteca genômica?
11. Quais são as diferenças entre a transferência Southern, western, northern e a transferência pontual (*dot blotting*)?
12. Como você desenvolveria uma sonda para um gene cujo RNA mensageiro não pudesse ser isolado? Como um vetor de expressão poderia ser usado para isolar um gene clonado?

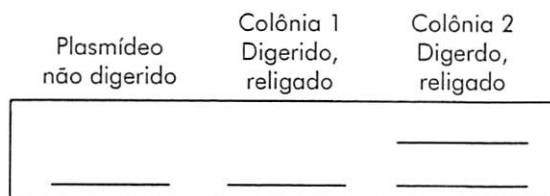
* Resposta para os exercícios e problemas selecionados estão na página A-14.

13. Como os plasmídeos da *E. coli* são manipulados para sobreviver na levedura? Como os genomas de vírus, tais como o SV40 e do fago λ , podem sobreviver como vetores de funcionamento, quando partes de seus genomas são substituídos pelo DNA clonado?
14. Quais métodos são usados para incorporar DNA estranho em células eucarióticas? O que é transfecção? O que é um camundongo transgênico?
15. A exonuclease III é uma enzima que remove sequencialmente bases do terminal 3' do DNA de fita dupla. As duas moléculas seguintes, cada uma com 100 pb de comprimento, são digeridas pela exonuclease III. A molécula 1 é completamente digerida e a molécula 2 é parcialmente digerida. Explique os resultados.

Molécula 1: CGTTCAG...
GCAAGTC...

Molécula 2: AAAAAAAAAA...
TTTTTTTTTT...

16. Um plasmídeo que contém um sítio *EcoRI* dentro de um gene resistente à ampicilina é cortado com *EcoRI* e depois religado. Este plasmídeo é usado para transformar células de *E. coli*, e o plasmídeo é isolado novamente a partir das colônias resistentes à ampicilina. Os plasmídeos isolados novamente a partir de duas colônias diferentes passam por eletroforese e os resultados aparecem na seguinte figura:



Como você explica as duas faixas na colônia 2?

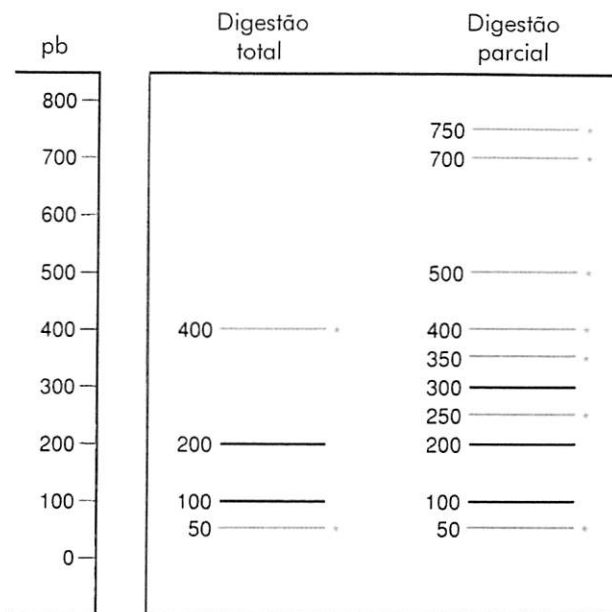
17. A maior parte dos genes humanos contém um ou mais íntrons. Uma vez que as bactérias não podem excisar íntrons do RNA mensageiro nuclear (snRNPs são necessários), como elas podem ser usadas para produzir grandes quantidades de uma proteína humana?

MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO

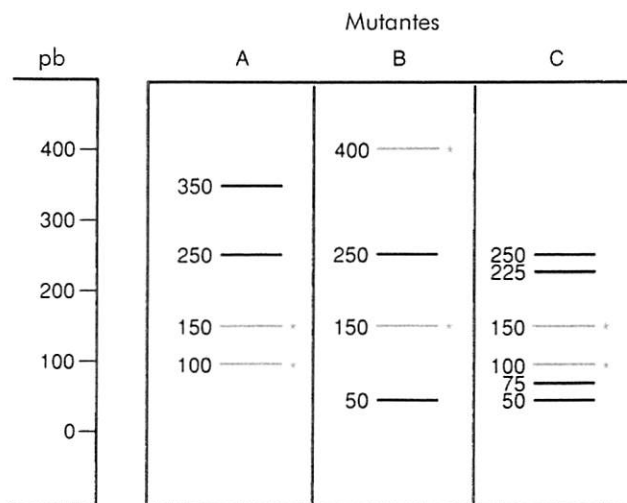
18. Como as impressões (*fingerprint*) de DNA são úteis em casos forenses? Como podem ser usadas na exclusão da paternidade?
19. O seguinte segmento de DNA é cortado quatro vezes pela endonuclease de restrição *EcoRI* nos lugares indicados. Diagrame o padrão de bandas do gel que resultaria a partir da eletroforese da digestão total e da digestão parcial. Observe os segmentos com os terminais marcados e as regiões onde vários segmentos formam bandas no mesmo sítio no gel.

100 ↓ 300 ↓ 50 ↓ 250 ↓ 150

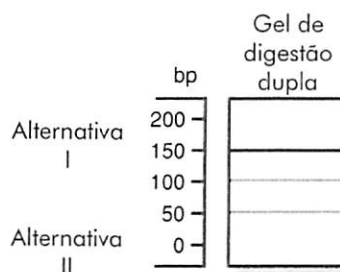
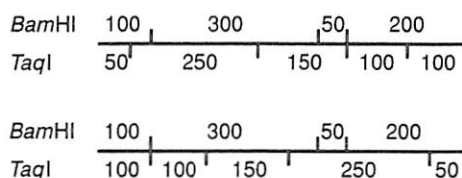
20. A figura seguinte mostra um gel de uma digestão total e de uma digestão parcial de um segmento de DNA tratado com *HindII*. Segmentos com os terminais marcados são indicados por asteriscos. Desenhe o mapa de restrição do segmento original.



21. Vários mutantes do segmento de DNA mostrado no problema 19 foram isolados. Eles forneceram os seguintes padrões de gel quando as digestões totais foram submetidas à eletroforese. Os asteriscos denotam os segmentos com terminais marcados. Você pode determinar a natureza das mutações?



22. Os mapas de restrição de um segmento de DNA foram desenvolvidos separadamente para *BamHI* e *TaqI*. Duas sobreposições dos mapas são possíveis. O gel de digestão dupla é mostrado na seguinte figura (os asteriscos denotam terminais marcados). Qual sobreposição seria correta?



23. Uma molécula de DNA linear de 1.000 pb de comprimento fornece os seguintes tamanhos de fragmentos quando tratada com enzimas de restrição. Deduza um mapa de restrição.

<i>EcoRI</i> :	300 pb, 700 pb
<i>BamHI</i> :	150 pb, 200 pb, 250 pb, 400 pb
<i>EcoRI + BamHI</i> :	50 pb, 100 pb, 200 pb, 250 pb, 400 pb

24. Uma molécula de DNA linear cortada com *EcoRI* produz fragmentos de 3 kb, 4,2 kb e 5 kb. Quais são os possíveis mapas de restrição?

25. Você tem um DNA de fita dupla que radioativamente é marcado nos terminais 5'. A digestão dessa molécula com *EcoRI* ou com *BamHI* produz os seguintes fragmentos. Os números estão em quilobases (kb) e o asterisco indica os fragmentos que estão marcados.

EcoRI: 2,8; 4,6; 6,2*; 7,4, 8,0*
BamHI: 6,0*; 10,0*; 13,0

Se um DNA não identificado é digerido com as duas enzimas simultaneamente, os seguintes fragmentos aparecem: 1,0, 2,0, 2,8, 3,6, 6,0, 6,2, 7,4. Qual é o mapa de restrição para as duas enzimas?

26. Uma molécula de DNA de 12 kb cortada com *EcoRI* produz um fragmento 12 kb. Quando a molécula original é cortada com *BamHI*, três fragmentos de 2 kb, 4,5 kb e 5,5 kb são produzidos. Quando o fragmento da *EcoRI* é tratado com *BamHI*, quatro fragmentos de 2 kb, 2,5 kb, 3,0 kb e 4,5 kb são produzidos. Desenhe um mapa de restrição.

27. Um plasmídeo de 3 kb de comprimento contém um gene resistente à ampicilina e um gene resistente à tetraciclina. O plasmídeo possui um único sítio para cada uma das seguintes enzimas: *EcoRI*, *BglII*, *HindIII*, *PstI* e *SaI*. Se o DNA for clonado dentro do sítio *EcoRI*, a resistência a qualquer um dos antibióticos não é afetada. O DNA clonado nos sítios *BglII*, *HindIII* ou *SaI* anula a resistência à tetraciclina e o

DNA inserido no sítio *PstI* elimina a resistência à ampicilina. Se o plasmídeo é digerido completamente com misturas de enzimas, os seguintes fragmentos são produzidos:

Mistura	Tamanho do fragmento (kb)
<i>EcoRI + PstI</i>	0,7; 2,3
<i>EcoRI + BglII</i>	0,3; 2,7
<i>EcoRI + HindIII</i>	0,08; 2,92
<i>EcoRI + SaI</i>	0,85; 2,15
<i>EcoRI + BglII + PstI</i>	0,3; 0,7; 2,00

Desenhe um mapa de restrição do plasmídeo e indique as localizações dos genes resistentes e os sítios da clivagem enzimática.

28. Um gene possui o seguinte mapa de restrição *EcoRI* (em quilobases):

1,0 ↓ 0,7 ↓ 2,0

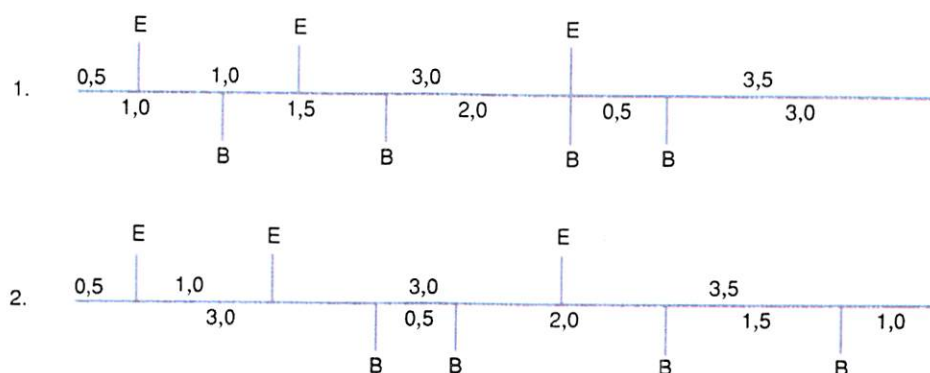
Desenhe o padrão do gel esperado a partir de:

- a. um mutante que perdeu o sítio entre os fragmentos de 1,0 e 0,7 kb.
b. um mutante que possui um novo sítio dentro do fragmento 2,0 kb.

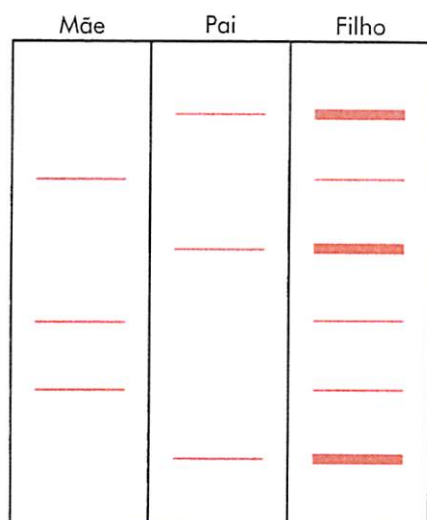
29. Um fragmento de DNA de 8 kb de tamanho é marcado com ³²P nos terminais 5'. Então ele é digerido com *EcoRI*, *BglII*, ou com a mistura de ambas as enzimas. O tamanho dos fragmentos e os fragmentos marcados (*) aparecem a seguir. Os tamanhos estão em quilobases:

	<i>EcoRI</i>	<i>BglII</i>	Mix
3,5	— *		
3,0	—	— *	— *
2,0		—	—
1,5		—	
1,0	—	— *	—
0,5	— *	—	— *

Qual dos dois mapas seguintes está de acordo com os resultados?



30. Pegue agora uma molécula não marcada do problema 29, faça a digestão dela com *Hind*III e obtenha dois fragmentos de 5,5 e 2,5 kb de tamanho. Se *Hind*III não corta dentro do fragmento 3,5 kb da *Eco*RI, que tamanhos de fragmentos você espera em uma digestão dupla de *Hind*III e *Eco*RI?
31. Dois indivíduos normais têm um filho com a Síndrome de Down. A análise RFLP com uma sonda a partir do cromossomo 21 é realizada em todos os três indivíduos, e os resultados dos géis aparecem a seguir. Com base nos resultados, o que você conclui a respeito das origens dos cromossomos de número 21?



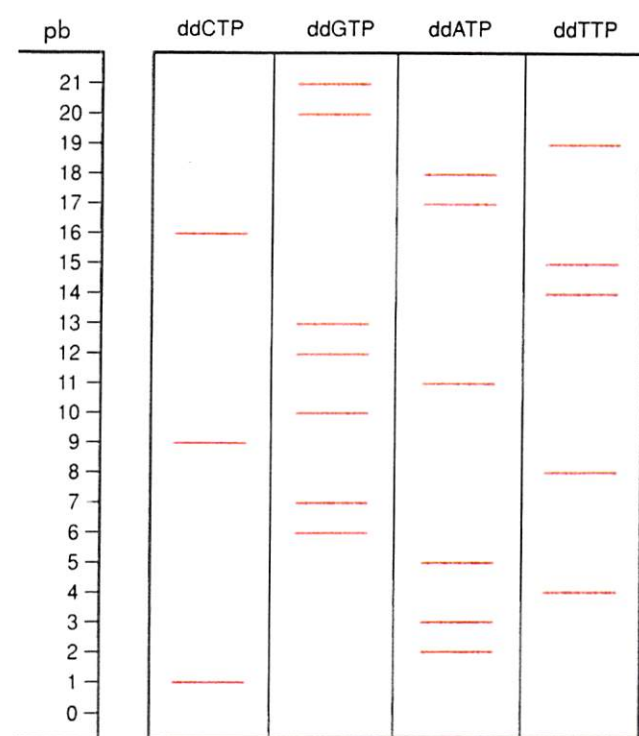
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

32. O que é PCR? Quando é usada?

SEQUENCIAMENTO DO DNA

33. Quais são os passos no método dideoxi no sequenciamento do DNA? Como a técnica foi aperfeiçoada com os corantes fluorescentes?

34. O seguinte diagrama é um gel de sequenciamento dideoxi. Qual é a sequência do DNA em estudo?



35. Como certo pedaço de DNA pode ser manipulado para estar na configuração apropriada para o sequenciamento dideoxi?
36. Se possível, forneça as sequências do DNA que podem marcar a terminação de um gene e o início de outro, sabendo-se que os genes se sobrepõem em bases de um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete.
37. Desenhe o padrão de gel esperado derivado de o método de sequenciamento dideoxi para uma fita de molde com a seguinte sequência:

5'-CAGCGAATGCGGAA-3'

38. Uma fita de DNA com a sequência 3'-GACTATTC-CGAAAC-5' é sequenciada pelo método dideoxi. Se a mistura de reação contém todos os quatro desoxinucleotídeo trifosfatos radioativos adicionados de dideoxiti-midina, que tamanho de faixas identificadas você espera ver no gel?

MAPEAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO GENOMA HUMANO

39. O que é DNA hipervariável? Um RFLP? Um locus VNTR? Um DNA microssatélite? Um sítio de sequência marcada (vide também MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO).

BENEFÍCIOS PRÁTICOS DA CLONAGEM DO GENE

40. Descreva algumas áreas de benefício prático da engenharia genética. Por que algumas pessoas podem se preocupar com seu uso disseminado?

QUESTÕES PARA RACIOCÍNIO CRÍTICO

1. No passado, geneticistas usaram vários métodos diferentes para unir pedaços de DNA que não possuem "terminações aderentes" compatíveis. Mencionamos a ligação de terminais cegos e adição de ligadores que contêm sítios de restrição específicos. Sabendo que os nucleotídeos podem ser adicionados aos terminais 3' do DNA de fita dupla com a enzima desoxinucleosídeo terminal transferase, é possível ver outra maneira de criar

terminais compatíveis no DNA estrangeiro e no DNA veículo?

2. O filme *Jurassic Park* foi baseado na premissa de que o DNA dos dinossauros poderia ser extraído do sangue sugado pelos mosquitos preservados em âmbar e que tal DNA poderia inserido no genoma de uma rã, produzindo assim dinossauros vivos. Esta premissa tem fundamento?