



PORTFÓLIO DA DISCIPLINA DE BIOLOGIA MOLECULAR

Organização
Mariana Passos
Gabriella Christine
Milena Dalalibere
Rodrigo Lima



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Gonçalo Moniz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Sumário

Biologia molecular: Definição e história.....	4
Fundamentos em biologia molecular.....	7
Expressão Genica.....	19
Extração de ácidos nucleicos.....	29
Reg. da expressão genica em eucariotos.....	32
Reg. da expressão genica em procariotos.....	36
Clonagem.....	42
Polymerase chain reaction (PCR).....	51
CRISPR.....	60
Sequenciamento genético	63
Informações finais de desenvolvimento.....	71

Capítulo 1

Biologia molecular: Definição e história

1. Introdução

A biologia molecular é a área da biologia que estuda a base molecular das reações químicas entre biomoléculas nos vários sistemas de uma célula, incluindo DNA, RNA, proteínas e também regulação dessas interações. Com isso, biologia molecular é uma matéria que envolve muita genética e bioquímica.

Houveram três nomes muito importantes e responsáveis pelo o que seria o início do que conhecemos hoje como biologia molecular, são eles: Gregor Mendel, Johann Friedrich Miescher e James Dewey Watson.

2. *Johann Gregor Mendel*

Johann Gregor Mendel (1822-1884) também chamado de o "pai da genética", era um professor e cientista. A partir do seu estudo feito com ervilhas, Mendel foi responsável por algumas das descobertas mais importantes em biologia.

Em 1856, Mendel iniciou um projeto de pesquisa que durou cerca de uma década para investigar padrões de hereditariedade. Apesar de ter começado sua pesquisa usando ratos, posteriormente abelhas e plantas, ele acabou por fim optando pelas ervilhas (*Pisum sativum*) de jardim como seu sistema modelo primário. Para realizar esse trabalho, Gregor analisou sete características das ervilhas, que eram divididas entre verdes e amarelas: o tamanho da planta, textura da semente, cor da semente, forma da vagem, cor da vagem, cor da flor e posição da flor. Ele cultivou estas linhagens por algumas gerações até que elas fossem puras (sempre produzindo descendentes idênticos aos genitores) e então cruzou-as entre si e observou como as características eram herdadas. Após várias gerações de cruzamentos Mendel foi capaz de postular suas regras gerais de herança genética. Em sua teoria ele propôs que cada no momento da fecundação, os gametas se juntam e levam consigo suas características, que podem ser visíveis ou não. Mendel chamou a forma visível de traço dominante e a forma escondida de traço recessivo. Além disso, ele descobriu também que as características eram herdadas de forma independente, que a característica, como altura da planta, não influenciava a herança de outra, como cor da flor ou forma da semente.

Em 1865, Mendel apresentou os resultados de seus experimentos, e com base nos padrões observados, nos dados coletados e em com sua análise, Mendel propôs um modelo de herança no qual as características como cor da flor, altura da planta e forma da semente eram controladas por pares de fatores de herança que ocorriam em diferentes versões, que uma versão de um fator (a forma dominante) poderia mascarar a presença da outra versão (a forma recessiva) e que os dois fatores pareados controlavam características diferentes e eram herdados independentemente um do outro.

Assim, Mendel estipulou duas importantes leis da genética; as chamadas Lei do monoidrismo e Lei da recombinação ou da segregação independente

De forma clara, A primeira lei chamada foi resultado de uma série de cruzamentos com ervilhas durante gerações sucessivas e, mediante a observação do predomínio da cor (verde ou amarela), que lhe permitiu formular que existe nos híbridos uma característica dominante e uma recessiva. Cada caráter é condicionado por um par de fatores (genes) que se separam na formação dos gametas. Enquanto a segunda lei foi formulada com base na premissa segundo a qual a herança da cor era independente da herança da superfície da semente, ou seja, num cruzamento em que estejam envolvidos dois ou mais caracteres, os fatores que determinam cada um deles se separam de forma independente durante a formação dos gametas e se recombinam ao acaso, para formar todas as recombinações possíveis.

3. *Johann Friedrich Miescher*

Johann Friedrich Miescher (1844-1895) foi um bioquímico suíço que descobriu o ácido desoxirribonucleico em 1869 durante um estudo onde seu objetivo era identificar os componentes químicos do núcleo celular. Naquela época já se havia o conhecimento de que os genes tinham relação com a hereditariedade, mas pouco se sabia sobre a estrutura deles.

O laboratório de Hoppe-Seyler era o primeiro da Alemanha a dar foco em química tecidual. Miescher recebeu então de Hoppe-Seyler, a tarefa de pesquisar a composição de células linfóides – células da linhagem branca do sangue. Essas células eram difíceis de serem extraídas de glândulas linfáticas, mas elas eram encontradas em grande quantidade em amostras de pus em infecções. Observando isso, Miescher foi até uma clínica próxima, coletou bandagens já utilizadas em pacientes e fez um lavado do pus presente nelas. Então, Em 1868, estudando o pus de feridas – escolha feita devido ao tamanho do núcleo – o jovem Miescher descobriu a presença de um composto de natureza ácida que era desconhecido até o momento. Era rico em fósforo e em nitrogênio, desprovido de enxofre e resistente à ação da pepsina (enzima proteolítica). Esse composto, que aparentemente era constituído de moléculas grandes, foi denominado por ele de nucleína.

Sua pesquisa sobre a nucleína foi publicada apenas em 1871. Pelo fato da nucleína ser uma molécula tão única, Hoppe-Seyler estava cético e preferiu confirmar os resultados de Miescher antes da publicação. Após isso Johann continuou a trabalhar com a nucleína pelo o resto de sua carreira. Ele também examinou as mudanças metabólicas que ocorrem no salmão quando desovam. Através de seus estudos, lançou as bases para diversas descobertas moleculares. Friedrich Miescher morreu em 1895, após contrair uma tuberculose.

4. *James Dewey Watson.*

James Dewey Watson nasceu em Chicago no dia 6 de abril de 1928. Era biólogo molecular, geneticista e zoologista americano. Ele é um dos autores do "modelo de dupla hélice" para a estrutura da molécula de DNA, que foi publicado em 1953 na revista Nature. Watson foi premiado com o Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1962, juntamente com Francis Crick e Maurice Wilkins

Apesar do DNA ter sido descoberto em 1869 pelo bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher, que desenvolveu vários estudos importantes, principalmente no que se refere à hemoglobina. Mas, até então, não se conhecia nada sobre a estruturação tridimensional do DNA e nem como poderia ser sua configuração molecular.

Em 1951, em Nápoles, sul da Itália, num congresso internacional consagrado ao tema da estrutura de moléculas encontradas em células vivas, Francis Crick conheceu James Watson, dando início a uma parceria que, dois anos mais tarde, seria responsável por uma das mais importantes descobertas das ciências biológicas: juntos, elaboraram o modelo da dupla hélice para a molécula de DNA.

A estratégia empregada por Watson e Crick foi construir um modelo molecular que levasse em conta o tamanho e a configuração espacial dos nucleotídeos. Assim, através de estudos de difração de raios X, Watson e Crick revelaram que a molécula de DNA é um composto formado por duas longas cadeias paralelas, constituídas por nucleotídeos dispostos em sequência. Os nucleotídeos são moléculas compostas por uma pentose (desoxirribose), uma molécula de ácido fosfórico e uma base nitrogenada. Hoje se sabe que essas duas cadeias polinucleotídicas são rigorosamente complementares: se houver uma base nitrogenada do tipo adenina (A) em uma das cadeias, haverá, na outra cadeia, na mesma posição, uma timina (T). da mesma forma; Se houver uma citosina (C) em uma das cadeias, haverá uma guanina(G) na posição correspondente da cadeia complementar. Os nucleotídeos de uma das cadeias da molécula de DNA mantêm-se unidos aos nucleotídeos da outra cadeia por ligações de hidrogênio, estabelecidas entre as bases: a adenina liga-se especificamente à timina, e a citosina liga-se especificamente à guanina.

Portanto, segundo o modelo proposto por Watson e Crick, a molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice ao redor de um eixo imaginário, girando para a direita (uma hélice dupla). Ou seja, a molécula de DNA apresenta a forma de uma escada em caracol, na qual os "degraus" são compostos por bases de nitrogênio dos nucleotídeos e, os "corrimãos" são fosfato e açúcar ligados covalentemente - por isso, diz-se que o DNA tem o formato de uma fita helicoidal.

Em 1953, Watson e Crick apresentaram um modelo compatível com os resultados experimentais que haviam sido obtidos até aquele momento. Esse modelo serviu de base para experimentos históricos que confirmaram a hipótese inicial desses cientistas, que inclusive gerou a ambos Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1962, tornando-os dois dos cientistas mais importantes da história moderna.

Capítulo 2

Fundamentos Básicos em biologia molecular

1. Introdução

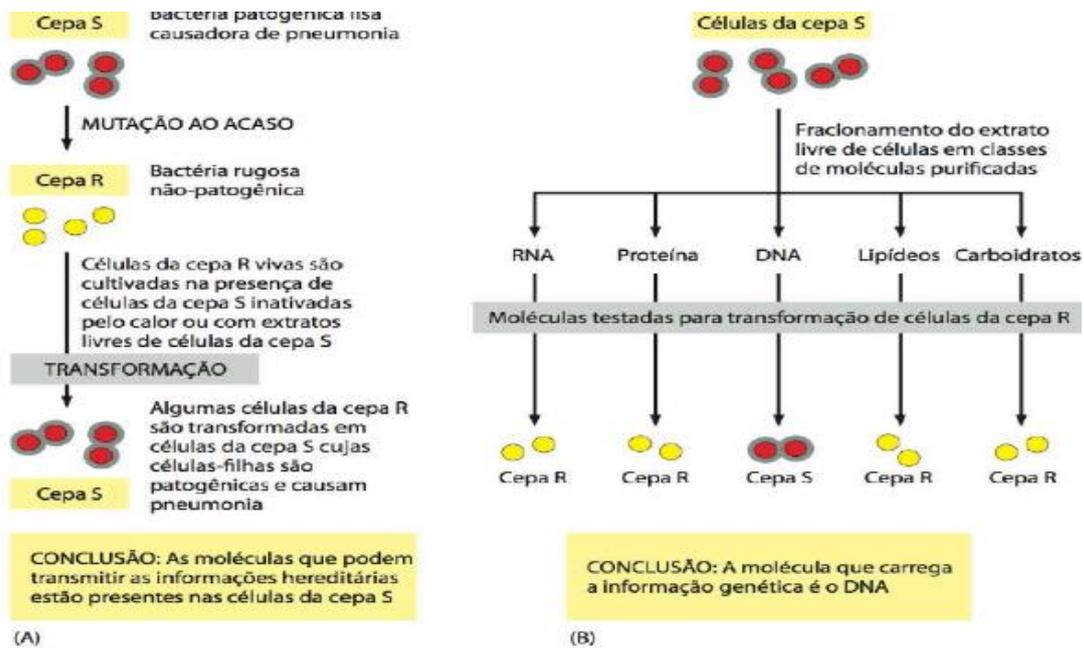
Esta parte corresponde aos fundamentos básicos e extremamente importantes em biologia molecular descobertos por oito diferentes cientistas em um período que durou desde 1889 até 1957, contendo experimentos responsáveis pela descoberta da existência e identificação dos ácidos nucleicos, a identificação do DNA como material genético, criação de regras que levariam a descoberta da estrutura da dupla hélice do ácido desoxirribonucleico e outras informações importantes sobre composição e estrutura do material genético.

2. *Friedrich Miescher*

Friedrich Miescher foi bioquímico suíço que utilizou técnicas de precipitação de substâncias, como por exemplo a técnica de alterações de pH no meio, e com isso foi capaz de isolar uma substância do núcleo celular até então desconhecida. Tratava-se do ácido nucléico que, com a tecnologia disponível até então, apresentava-se apenas como um precipitado branco e floculento, e que Miescher viria a denominar nucleína. Miescher tratou logo de analisar a substância que conseguiu isolar de dentro do núcleo. Nesta análise, para a surpresa dele e do resto da comunidade científica, a substância apresentou uma grande quantidade de fósforo, elemento não encontrado na composição de proteínas. Ele esperava encontrar, em vez disso, as próprias proteínas como principal componente nuclear. Logo, se pode concluir que a nucleína não se tratava de uma substância já conhecida: Miescher estava diante de uma nova classe de moléculas orgânicas. Esta descoberta provocou certo ceticismo entre a comunidade acadêmica. Para esquivar das dúvidas, Miescher foi obrigado, inclusive, a repetir os experimentos. Após não haver dúvidas sobre a existência da nucleína, a comunidade acadêmica passou a especular sobre sua função, esperando, sobretudo, que estas moléculas tivessem participação na herança de características entre indivíduos. Não demorou muito até que Miescher, desta vez utilizando espermatozoides de salmão como amostra, fosse capaz de catalogar os principais elementos da nucleína, que são carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e fósforo (DAHM, 2008). O início de uma corrida para o desvendamento estrutural dos ácidos nucléicos estava, então, lançado. Na época de Miescher, no século XIX, os cientistas não tinham ainda a disposição uma tecnologia que fosse capaz de estabelecer evidências sólidas da estrutura do DNA. Veremos adiante que somente no século XX a técnica de difração de raio-x passou a estar disponível (ainda assim, importante dizer, se exigiu uma boa dose de dedução). Após Miescher, outros pesquisadores, motivados pelas descobertas, deram continuidade na investigação do núcleo celular. Em 1889, Richard Altmann, conseguindo isolar o material nuclear de impurezas das quais Miescher não foi capaz de eliminar em sua amostra, renomeou a nucleína, confirmando sua natureza ácida, chamando-a então de ácido nucleico, termo até hoje usado.

3. Frederick Griffith

Em 1928, o bacteriologista britânico Frederick Griffith conduziu uma série de experimentos usando a bactéria *Streptococcus pneumoniae* e ratos. Griffith não estava tentando identificar o material genético, mas sim criar uma vacina contra a pneumonia. Em seus experimentos, Griffith usou duas cepas relacionadas de bactéria, conhecidas como R e S.



■ **Cepa R:** Quando cultivadas em placa de Petri, a bactéria R forma colônias ou aglomerados de bactérias relacionadas, que têm bordas bem definidas e aparência rugosa (daí a sigla "R"). As bactérias R são avirulentas, ou seja, não causam doenças quando injetadas em ratos.

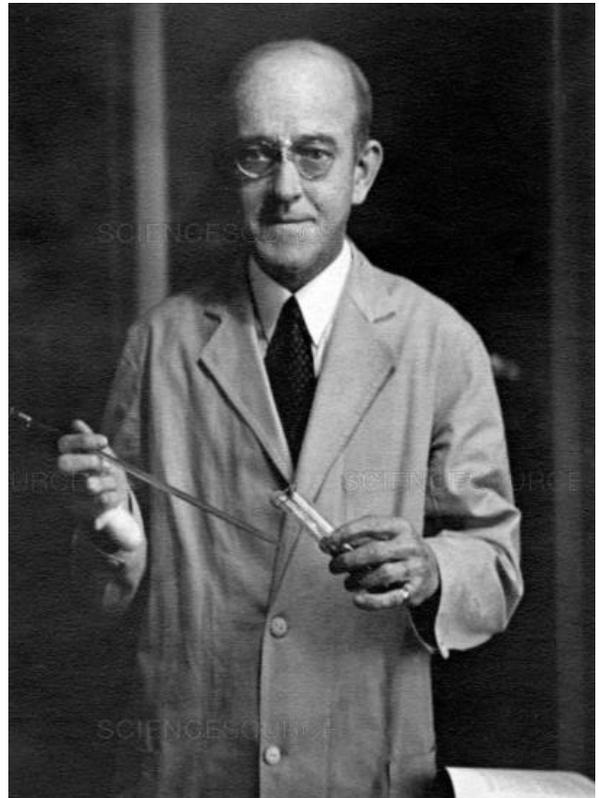
■ **Cepa S:** A bactéria S formou colônias arredondadas e suaves (daí a sigla "S"). A aparência suave se dá por conta de um polissacarídeo ou uma capa a base de açúcar produzida pela bactéria. Essa capa protegeu a bactéria S do sistema imune do rato, transformando-as em virulentas (capazes de causar doenças). Ratos em que foram injetadas bactérias S vivas desenvolveram pneumonia e morreram.

Como parte de seus experimentos, Griffith tentou injetar em ratos bactérias S mortas por calor (isso é, bactérias que haviam sido aquecidas a altas temperaturas, causando a morte das células). Sem surpresas, a bactéria S morta pelo calor não causou doença nos ratos.

Os experimentos tiveram um resultado inesperado, contudo, quando bactérias R inofensivas foram combinadas com bactérias S mortas por calor e injetadas em um rato. Não só o rato contraiu pneumonia e morreu, mas quando Griffith retirou uma amostra de sangue do rato morto, ele encontrou bactérias S vivas! Griffith concluiu que as bactérias da cepa R teriam adquirido o que ele chamou de "princípio transformante" da bactéria S morta por calor, permitindo que elas se "transformassem" em bactérias S, tornando-se virulentas.

4. *Oswald Avery, Maclyn McCarty e Colin Macleod: Os cientistas que indicaram o DNA como carregador da informação genética*

4.1 – *Avery*: A pesquisa de Oswald Avery centrou-se na bactéria que provoca a pneumonia. A bactéria pneumococo tem duas formas: uma estirpe viral coberta por um invólucro ou cápsula lisa, e outra não infecciosa que não possui cápsula e tem uma aparência rugosa. Experiências conduzidas pelo microbiólogo inglês Frederick Griffith haviam demonstrado que quando um extrato morto da estirpe lisa era misturado com a estirpe rugosa viva e injetada num rato, os tecidos do animal passavam a conter uma estirpe viva e lisa. A maioria dos cientistas teorizava que a mudança deveria ser provocada por uma proteína, mas após repetir a experiência muitas vezes, entre 1932 e 1944, Avery provou que era o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) o responsável pela transferência de material genético entre células num processo chamado "transformação". A descoberta sugeria que o DNA fosse o material genético básico da célula, fato que veio a ser confirmado por cientistas posteriores.



4.2 – *McCarty*: O trabalho de Avery inspirou várias pesquisas sobre a estrutura do DNA, agora conhecida como código genético. Naquela época, as pesquisas no laboratório da Avery estavam focadas na transformação pneumocócica, a alteração hereditária de uma cepa pneumocócica de uma forma áspera não-virulenta para uma forma virulenta encapsulada e lisa. A chegada de McCarty ao Rockefeller Institute, em setembro de 1941, marcou 13 anos desde essa descoberta, também conhecida como fenômeno de Griffith. Antes dessa descoberta, a década de 1920 havia sido marcada por uma série de observações díspares sobre o *Streptococcus pneumoniae* que pareciam envolver uma troca de receptores entre diversas bactérias, crescidas juntas em meios líquidos ou expostas a vários tipos de extratos e sobrenadantes. Com raras exceções, os primeiros pesquisadores nesta área ficaram totalmente confusos sobre a distinção entre genótipo e fenótipo.

Nenhum experimento foi levado adiante para confirmação por outros observadores, de modo que todo o campo da "para aglutinação" foi de certa forma desacreditado. No entanto, em 1928, Fred Griffith, líder em pesquisa em saúde pública na Grã-Bretanha, demonstrou que a conversão de uma cepa para outra poderia acontecer in vivo em camundongos.

Logo após a publicação de seus resultados, eles foram confirmados em vários trimestres, incluindo o laboratório de Avery. A análise baseou-se na sorotipagem: sabia-se que a diferenciação fenotípica de grupos pneumocócicos poderia ser diagnosticada por suas reações com anti-soros específicos, já reconhecidos por refletir polissacarídeos capsulares quimicamente distintos. Griffith não tinha os recursos nem a inclinação para purificar e identificar o agente responsável nos extratos pneumocócicos que induziam as alterações do sorotipo, mas o fenômeno da transformação foi pelo menos vagamente entendido como compreendendo uma alteração do que chamaríamos agora de fatores genéticos.

Quando McCarty chegou à Universidade Rockefeller, a equipe de Avery havia praticamente decidido que o reagente ativo não era uma proteína, então tinha de ser RNA ou DNA. O progresso dessa pesquisa nos próximos três anos é descrito nas memórias de McCarty, *The Transforming Principle*, escritas no início dos anos 80. À medida que a purificação progredia, a exposição de extratos à RNase cristalina e às preparações de proteinase ajudou a equipe de Avery a determinar que a atividade biológica dos extratos não era dependente de RNA ou proteína. A DNase cristalina não estava disponível até 1948, mas a atividade biológica foi rapidamente reduzida por extratos de tecido ricos em DNase. A chegada de McCarty à Universidade Rockefeller também foi marcada por outro marco: o desenvolvimento de um ensaio reagente à difenilamina para correlacionar positivamente o DNA com a atividade biológica.

Gradualmente tornou-se evidente que o material ativo nos extratos purificados tinha uma potência surpreendentemente alta em microgramas de DNA que poderiam consumir a transformação pneumocócica *in vitro*. McCarty, MacLeod e Avery lutaram com o padrão de prova exigido para afirmar que haviam realizado a transformação

pneumocócica com DNA altamente purificado a partir de extratos. Após muita investigação, em 1944, eles publicaram no *Journal of Experimental Medicine* que o material ativo era o DNA, desprovido de proteínas ou qualquer outro polímero conhecido.



4.3 – *MacLeod*: MacLeod estava descrevendo este mesmo fenômeno na linguagem da década de 1930, que assumiram que as bactérias adquirem novos personagens adaptativos de uma forma Lamarckiana. Estes estudos foram seguidos por uma tentativa, em colaboração com Avery, de identificar a substância misteriosa produzida no sangue de pacientes com infecções agudas de pneumonia. Eles chamaram de "proteína C-reativa" mas por que foi produzido e qual sua função permaneceu um enigma.

Nesta fase (1940) Avery e MacLeod julgaram que era hora de voltar para transformação bacteriana. O fenômeno da transformação bacteriana foi algo de uma raridade. Cepas de pneumococo foram agrupadas em um número de "tipos" com base em suas reações imunológicas e as diferentes constituições de seus casacos ou cápsulas de proteção açucarados. Eles poderiam perder seus casacos para se tornar "rough" (por conta da aparência das suas colônias) e poderiam reverter-se para a forma capsular, que produziu colônias "suaves". Tal reversão espontânea de R para S estava sempre ao mesmo tipo capsular. Mais tarde nesse ano, McCarty se juntou ao laboratório de Avery e, em 1942, o grupo começou a se concentrar no DNA como ingrediente indescritível na linhagem S e como fator responsável pela transformação de R pneumococos para S pneumococos. No entanto, cultivadas com as células mortas de um pneumococo S de outro tipo, as células R podiam adquirir as cápsulas do tipo morto; que poderia ser "transformada". Antes de MacLeod entrar no campus o processo de transformação, embora in vitro, foi irregular e as estimativas quantitativas de transformar a atividade não eram fiáveis.



MacLeod isolou uma estirpe particular R do pneumococo tipo II (R36), que não tinha tendência a reversão espontânea para S, e que era muito suscetível a transformação por outros tipos de pneumococos. Ele também melhorou a forma, o aquecimento do fluido de peito para inativar enzimas que destruíram o princípio de transformação, e adaptou para atingir as operações de transformação em grande escala.

Como observou Walsh McDermott, MacLeod tinha tomado um fenômeno quase sem forma, errático e se tornou em algo previsível e mensurável. Ele também tinha conseguido uma escala de produção suficiente para o isolamento e identificação do princípio transformador.

No início de 1943, Avery, MacLeod e McCarty tinha mostrado que DNA foi o fator de transformação, e em fevereiro de 1944, foi publicado o primeiro de uma série de artigos científicos no Diário de Medicina Experimental demonstrando que o DNA era o princípio transformador. Experiências subsequentes confirmaram DNA como um portador de informação genética universal. No entanto, apesar da enorme importância científica do trio neste trabalho, que ficou conhecido como o experimento Avery-MacLeod-McCarty, eles não ganharam um Prêmio Nobel por sua descoberta.

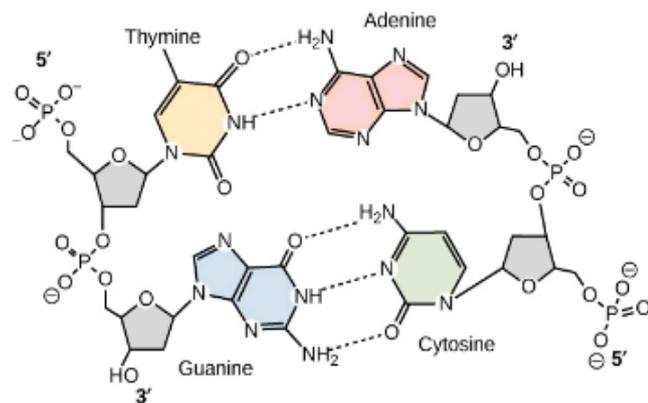
5. Erwin Chargaff

Erwin Chargaff foi um bioquímico austríaco emigrado para os Estados Unidos durante o período nazista. Através de um experimento cuidadoso, Chargaff descobriu duas regras que ajudaram a levar à descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA. Chargaff analisou o DNA de diferentes espécies, determinando sua composição de bases sendo: A, T, C e G. Com base nessa experimentação ele fez várias observações fundamentais para a ciência:

- A, T, C e G não eram encontradas em quantidades iguais (como alguns modelos da época diziam)

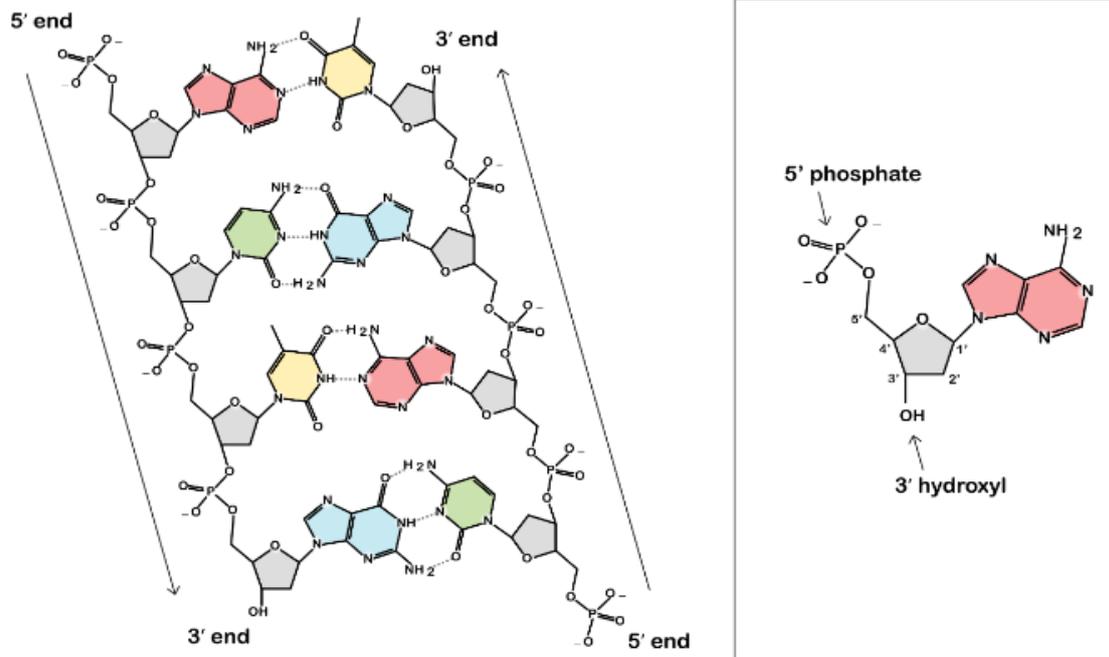
- As quantidades de bases variavam entre as espécies, mas não entre indivíduos da mesma espécie

- A quantidade de A sempre igualava a quantidade de T, e a quantidade de C sempre igualava a quantidade de G (A = T) e G = C)



6. Alexander Robertus Todd

Alexander Robertus Todd foi um químico britânico. Foi agraciado com o Nobel de Química de 1957, em reconhecimento a suas pesquisas sobre a estrutura e síntese de nucleotídeos, nucleosídeos e coenzimas. Demonstrou que os nucleotídeos estariam ligados no DNA através de ligações fosfodiéster 3' – 5' entre suas desoxirriboses formando uma cadeia polinucleotídica;



O DNA de fita dupla é uma molécula antiparalela, ou seja, é composta de duas fitas que correm lado a lado mas apontam para direções opostas. Em uma molécula de DNA de fita dupla, a extremidade 5' (com fóstato livre) de uma fita se alinha com a extremidade 3' (com hidroxila livre) de sua parceira, e vice-versa.

■ [Qual o motivo das marcas em 3' e 5'?]: Os átomos de carbono do açúcar desoxirribose nos nucleotídeos do DNA estão marcados por números acompanhados de símbolos gráficos chamados plicas. Plicas parecem-se com apóstrofos (e.g., 3'). O propósito das plicas é distinguir os átomos de carbono do açúcar, dos átomos do anel de bases nitrogenadas. Os átomos de carbono e nitrogênio dos anéis de bases nitrogenadas também têm números, mas esses números não têm plicas. Pode-se ver os números atribuídos aos carbonos e nitrogênios dos anéis das bases nitrogenadas no diagrama abaixo. As purinas de dois anéis e as pirimidinas de um anel têm esquemas numéricos diferentes, graças a seus números diferentes de átomos de carbono.

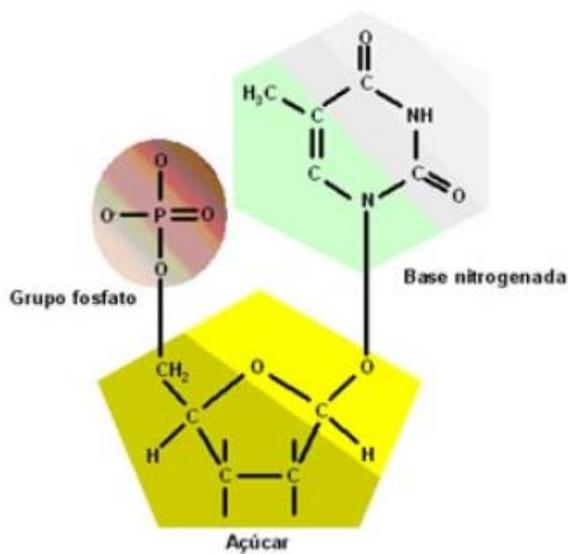
7. Sobre o material genético

A estrutura do DNA, como representada no modelo de Watson e Crick, é uma hélice de dupla fita, antiparalela, para a direita. Os esqueletos de açúcar-fosfato das fitas de DNA constituem o exterior da hélice, enquanto as bases nitrogenadas são encontradas no interior e formam pares ligados por ligações de hidrogênio que mantêm as fitas de DNA juntas.

7.1 – Orientação antiparalela

O DNA de fita dupla é uma molécula antiparalela, ou seja, é composta de duas fitas que correm lado a lado, mas apontam para direções opostas. Em uma molécula de DNA de fita dupla, a extremidade 5' (com fosfato livre) de uma fita se alinha com a extremidade 3' (com hidroxila livre) de sua parceira, e vice-versa. Serve para prover estabilidade.

7.2 – Nucleotídeos



- Base Nitrogenada – átomos de carbono e nitrogênio
- Pentose - açúcar com 5
- Grupo fosfato – molécula com 1 átomo de fosforo cercado por 4 oxigênios de carga negativa

7.3 – Código genético

Os genes que fornecem instruções para proteínas são expressos num processo de duas etapas:

- Na transcrição, a sequência de DNA de um gene é "reescrita" em RNA. Nos eucariontes, o RNA deve passar por etapas adicionais de processamento para se tornar um RNA mensageiro ou RNAm.
- Na tradução, a sequência de nucleotídeos do RNAm é "traduzida" em uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo (cadeia proteica).

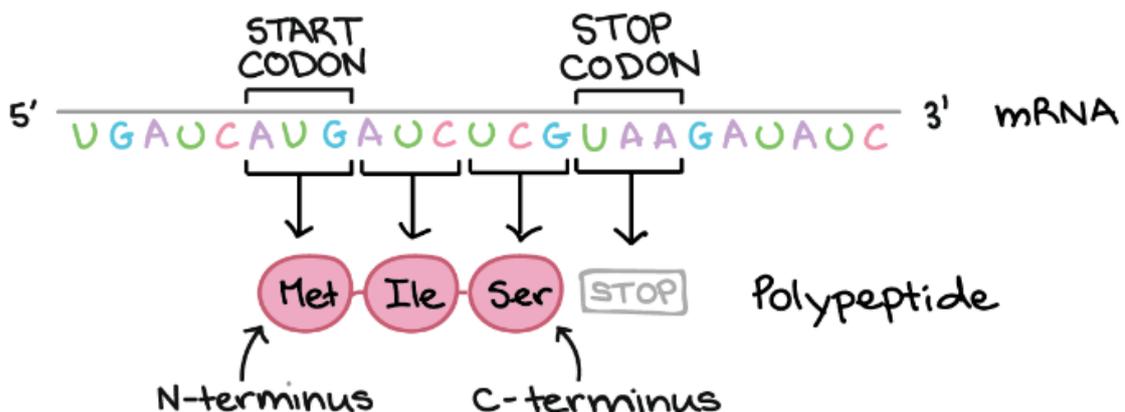
7.4 – Códon

As células decodificam mRNAs lendo seus nucleotídeos em grupos de três, chamados de códon. Aqui estão algumas características dos códon:

- A maioria dos códon especifica um aminoácido
- Três "códon de parada" marcam o fim de uma proteína



- Um "códon de início", AUG, marca o início de uma proteína e também codifica o aminoácido metionina.



Os códon em um RNAm são lidos durante a tradução, começando com um códon de início e continuando até que um códon de parada é alcançado. Os códon de RNAm são lidos de 5' para 3', e especificam a ordem dos aminoácidos em uma proteína da região N-terminal (metionina) para a C-terminal. (Um **N-terminal** com um grupo amino exposto. Um **C-terminal** com um grupo carboxila exposto)

7.5 – Tabela do código genético

O conjunto completo de relações entre códons e aminoácidos (ou sinais de parada) é chamado de código genético. O código genético é, muitas vezes, resumido em uma tabela

		U	C	A	G		
Primera base	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gin CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	
						Tercera base	

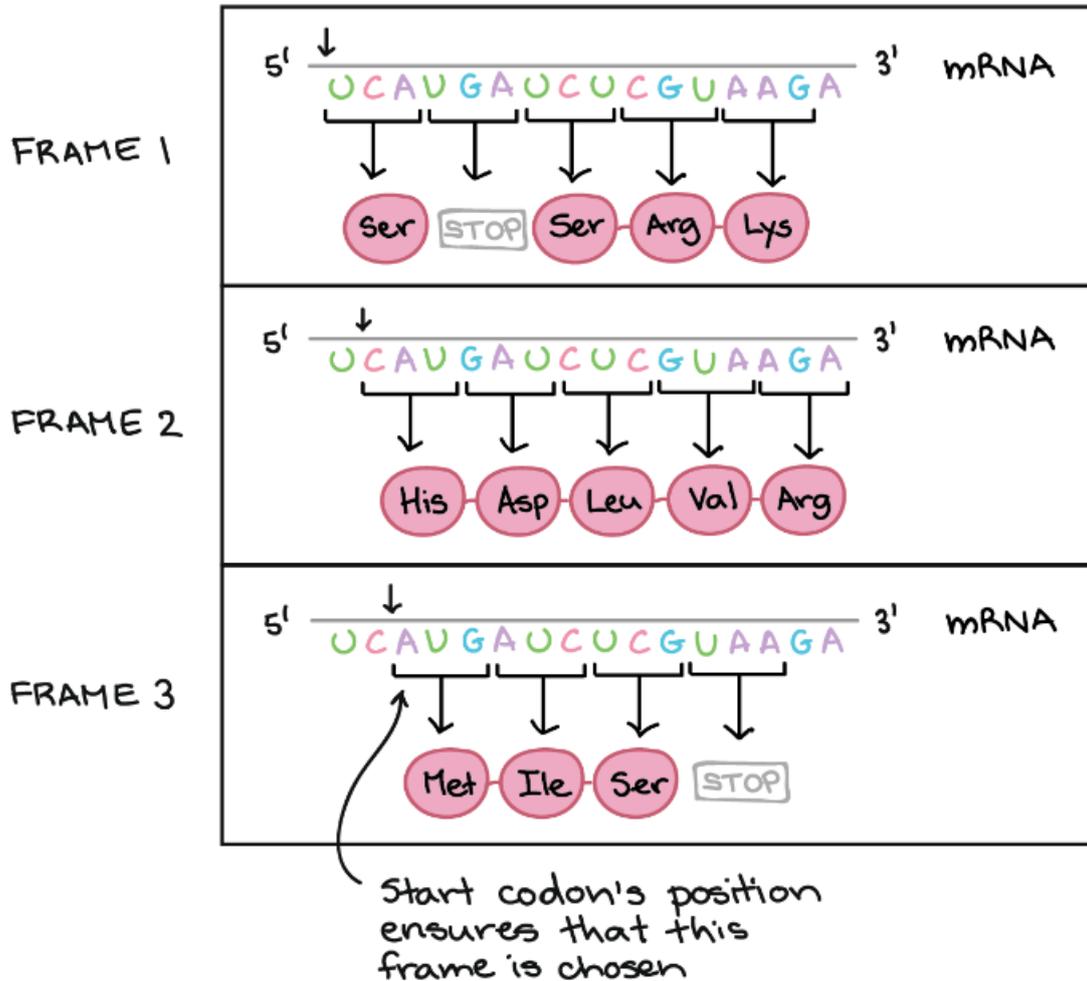
A tabela de códons pode parecer um pouco intimidante no começo. Felizmente, é organizada de maneira lógica, e não é muito difícil de usar uma vez que você entende esta organização. Para ver como funciona a tabela de códons, vamos examinar um exemplo. Suponha que estamos interessados no códon CAG e queremos saber qual aminoácido ele especifica:

■ Primeiro, olhamos para o lado esquerdo da tabela. O eixo do lado esquerdo, refere-se à primeira letra do códon, assim, encontramos C ao longo do eixo esquerdo. Isto mostra em que linha (ampla) da tabela nosso códon será encontrado.

■ Em seguida, olhamos para o topo da tabela. O eixo superior refere-se à segunda letra do códon, assim, encontramos A ao longo do eixo superior. Isto nos mostra em qual coluna da tabela nosso códon será encontrado. A linha e a coluna das etapas 1 e 2 se cruzam numa única caixa da tabela de códons, contendo quatro códons. Muitas vezes, é mais fácil simplesmente olhar os quatro códons e ver qual deles é o que você está procurando.

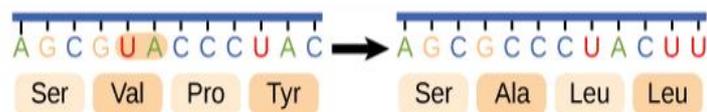
7.6 – Pauta de leitura

Determina como a sequência de RNAm é dividida em códons durante a tradução. Esse é um conceito bastante abstrato, então vamos olhar para um exemplo para entender melhor. O RNAm abaixo consegue codificar três proteínas diferentes, dependendo da pauta em que é lida:



Então, como uma célula sabe qual destas proteínas deve fazer? O códon de início é o sinal chave. Como a tradução começa no códon de início e continua em grupos sucessivos de três, a posição do códon de início garante que o RNAm seja lido da forma correta (no exemplo acima, na pauta 3). Mutações (mudanças no DNA) que inserem ou deletam um ou dois nucleotídeos podem mudar a pauta de leitura, causando a produção de uma proteína incorreta "a jusante" do sítio de mutação:

Frameshift Mutations



Capítulo 3

Expressão Genica

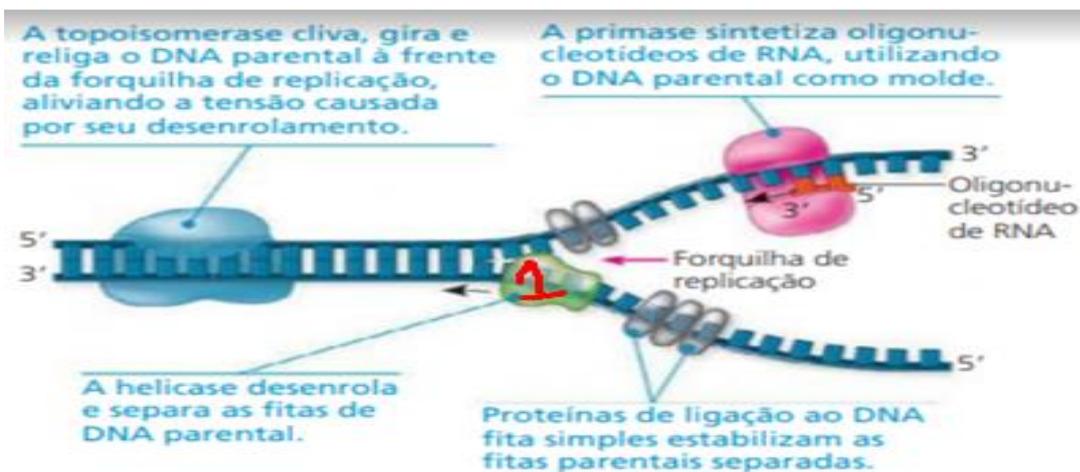
1. Introdução

A expressão gênica ou expressão genética é o processo pelo qual toda a informação hereditária que é contida em um gene, tal como a sequência de DNA, é utilizada de modo a formar um produto gênico funcional, tal como proteínas ou RNA. As informações que programam todas as atividades celulares são codificadas na estrutura do DNA, no entanto, ele não está envolvido diretamente na realização dessas operações. A expressão gênica ocorre em um processo de replicação > transcrição > tradução, comumente chamado de dogma central.

2. Replicação

Durante o processo de replicação as fitas de DNA são divididas e uma delas é usada como molde para a formação de novas fitas num processo semi-conservativo. A replicação de um cromossomo inicia em pontos especiais chamados de origens de replicação: pequenas porções de DNA com sequências específicas de nucleotídeos. As proteínas que iniciam a replicação do DNA reconhecem essa sequência e se ligam ao DNA, separando as duas fitas e originando a “bolha” de replicação e replicação do DNA então prossegue nas duas direções, até que toda a molécula seja copiada.

2.1 – A forquilha



Em cada extremidade da bolha de replicação está a forquilha de replicação, região em forma de Y em que as fitas de DNA parental estão sendo desenroladas. As Helicases (enzima) DNA tem a função de reconhecer a origem de replicação e desenrolar a dupla-hélice de DNA, na forquilha de replicação, separando as duas fitas parentais e as tornando disponíveis como fitas-molde. São também essenciais na reparação e recombinação de DNA.

2.2 – Fragmentos de Okazaki

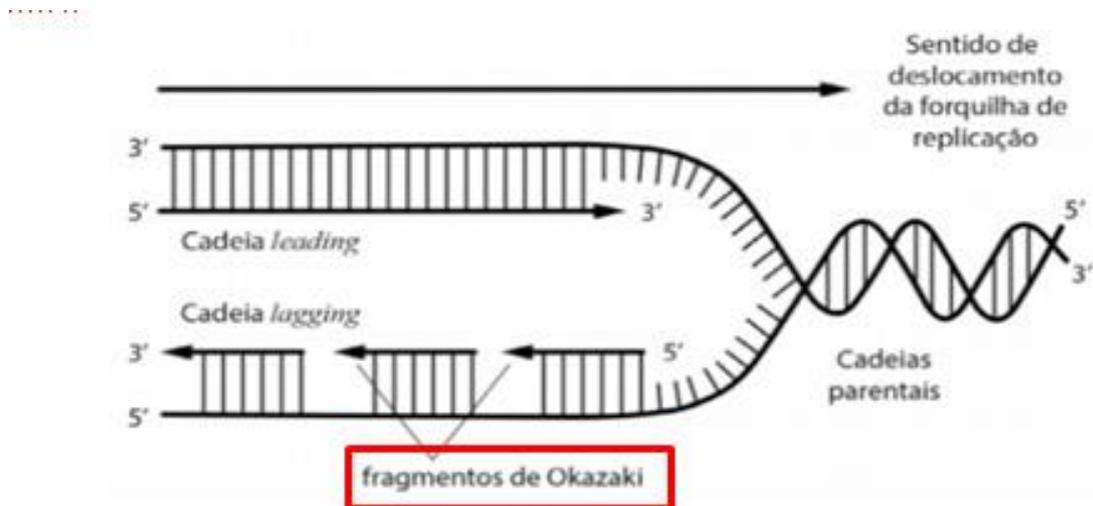
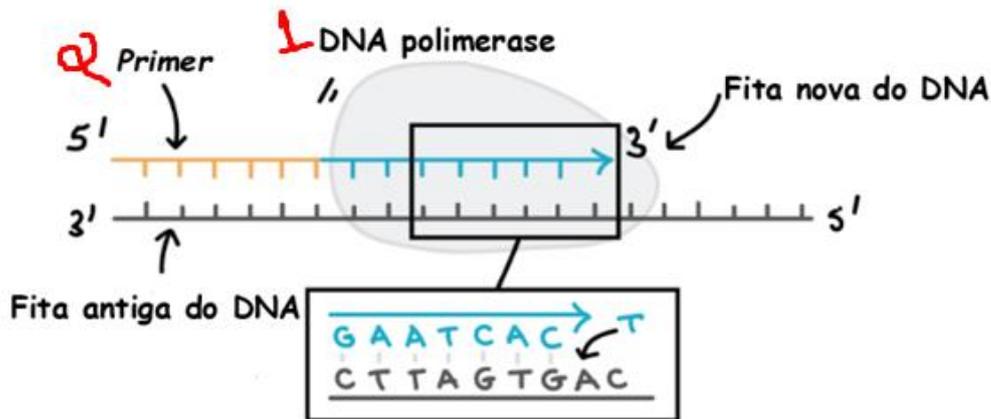


Figura 5. Na replicação do DNA, ambas as cadeias filhas são sintetizadas no sentido 5' → 3'. A cadeia *leading* é sintetizada continuamente, enquanto a cadeia *lagging* é sintetizada descontínuamente.

Na fita retardatória ou descontínua é necessário que, periodicamente a primase adicione um novo primer. A cada primer é construído um fragmento de fita nova de DNA, mas como o deslocamento da DNA polimerase é no sentido contrário ao da abertura da forquilha de replicação, a enzima não encontra mais uma fita molde disponível e abandona o DNA, então para produzir uma nova fita complementar a fita molde que foi recém exposta pelo deslocamento da forquilha, é preciso ocorrer a adição de um novo primer. Os fragmentos de DNA que compõem a fita de DNA com replicação descontínua se chamam fragmentos de Okazaki.

2.3 – As enzimas utilizadas durante a replicação



2.3.1 – A DNA polimerase → A DNA-polimerase é a enzima que faz a síntese de uma nova fita de DNA. Ela possui a capacidade de adicionar nucleotídeos na extremidade 3'OH de uma região pareada do DNA, fazendo com que a cadeia se estenda, pela adição de nucleotídeos a uma cadeia preexistente, no sentido 5'→3' – e só replicam nesse sentido. Ela é necessária para a síntese contínua da cadeia líder, enquanto que na cadeia atrasada, para além da DNA polimerase III é, também, precisa a primase para a síntese de primers iniciadores de polimerização pela DNA polimerase III, a DNA polimerase I para a remoção de primers e preenchimento de espaços e ainda a participação da DNA ligase para unir os fragmentos de Okasaki.

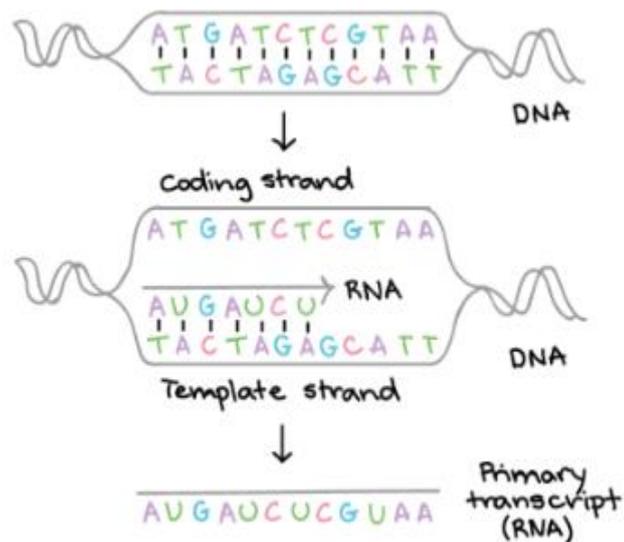
Obs: Esta enzima pode também corrigir erros de replicação. Se foi introduzido um nucleótido errado, a DNA polimerase reconhece-o e retorna a esse ponto hidrolisando o nucleótido errado a partir da extremidade 3'. Depois de removido, a DNA polimerase prossegue o crescimento da cadeia nova.

2.3.2 – Primer → o chamado primer-iniciador é sintetizado por uma RNA Polimerase (primase). , uma vez que a DNA polimerase III necessita de uma extremidade 3' (grupo hidroxilo) livre para iniciar a síntese de DNA. Para iniciar essa polimerização, é preciso que uma enzima adicione os primeiros nucleotídeos, a partir disso, é preciso de disponibilizar uma extremidade 5` livre para que a DNA Polimerase dê continuidade ao processo e, conseqüentemente, o primer acaba sendo retirado e substituído por DNA. Como nenhum DNA faz isso, o DNA primase é a enzima responsável por fazer a ligação entre os primeiros nucleotídeos que iniciam a síntese de uma nova fita (retardada), que utiliza de ribonucleotídeos para isso. Cada nova fita de DNA é iniciada por um pequeno trecho de RNA de aproximadamente 10 ribonucleotídeos, que são complementares a fita molde de DNA. A primase do DNA atua no início da replicação, sintetizando o primer necessário para começar a síntese da cadeia líder, e também durante todo o processo, sintetizando os primers necessários para o início da síntese de cada fragmento de Okasaki.

3. Transcrição

No processo de transcrição a sequência de DNA de um gene é copiada para fazer uma molécula de RNA. Essa etapa leva o nome de transcrição pois envolve reescrever, ou transcrever, a sequência de DNA num alfabeto similar de RNA.

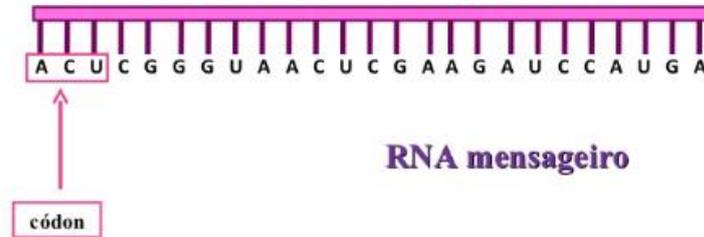
O promotor de um gene apresenta em sua estrutura o ponto de início da transcrição (o nucleotídeo onde a síntese de RNA começa de fato). A RNA-polimerase se liga em uma posição e uma orientação específicas no promotor, determinando onde a transcrição inicia, e qual das duas cadeias da hélice de DNA será utilizada como molde.



Nos eucariontes, a molécula de RNA deve passar por um processamento para se tornar um RNA mensageiro (RNAm) maduro. Na transcrição, uma fita de DNA que compõe um gene, chamada de fita não codificante, age como molde para a síntese de uma fita correspondente (complementar) de RNA por uma enzima chamada RNA polimerase. Essa fita de RNA é o transcrito primário. O transcrito primário carrega a mesma sequência de informação que a fita de DNA não transcrita, algumas vezes chamada de fita codificante. Contudo, o transcrito primário e a fita codificante de DNA não são idênticos, graças a algumas diferenças bioquímicas entre DNA e RNA. Uma diferença importante é que as moléculas de RNA não incluem a base timina (T). Ao invés disso, elas têm uma base similar uracila (U). Como a timina, a uracila parecia com adenina.

O promotor de um gene apresenta em sua estrutura o ponto de início da transcrição (o nucleotídeo onde a síntese de RNA começa de fato – códon iniciador) . A RNA-polimerase se liga em uma posição e uma orientação específicas no promotor, determinando onde a transcrição inicia, e qual das duas cadeias da hélice de DNA será utilizada como molde.

3.1 – RNAm

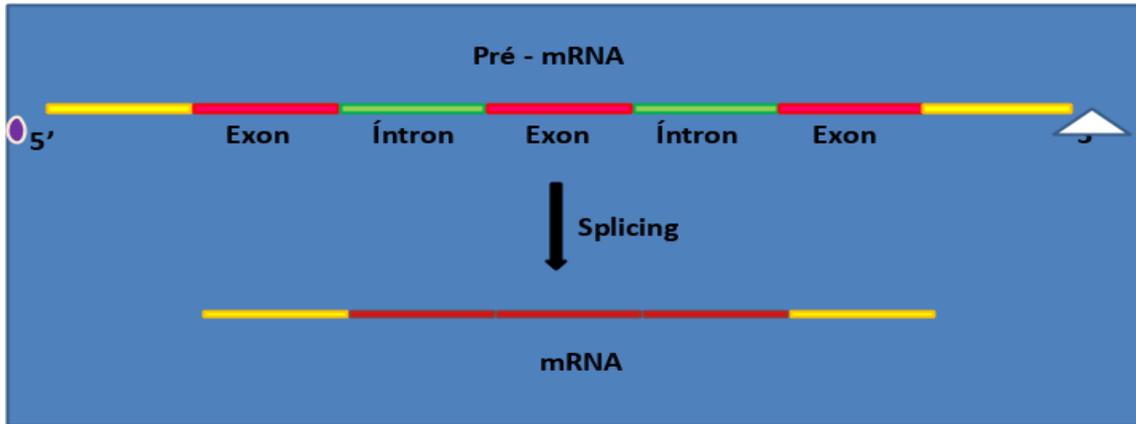


A molécula de RNA mensageiro é sintetizada a partir de um molde de DNA pelo mecanismo de transcrição. O mRNA contém a informação necessária para construir uma proteína, ou seja, a sequência de bases no mRNA determina a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica resultante da tradução.

Nas bactérias (procariotos) o transcrito primário de RNA pode servir diretamente com um RNA mensageiro, ou RNAm. RNAs mensageiros recebem esse nome pois agem como mensageiros entre o DNA e ribossomos. Ribossomos são estruturas de RNA e proteína dentro do hialoplasma, onde proteínas são realmente fabricadas. Nos eucariontes (como os humanos), um transcrito primário tem de passar por umas etapas a mais de processamento para se tornar um RNAm maduro.

3.2 – Processamento do RNA em eucariotos

Durante o processo caps são adicionadas às terminações do RNA, e alguns de seus pedaços podem ser cuidadosamente removidos em um processo chamado splicing

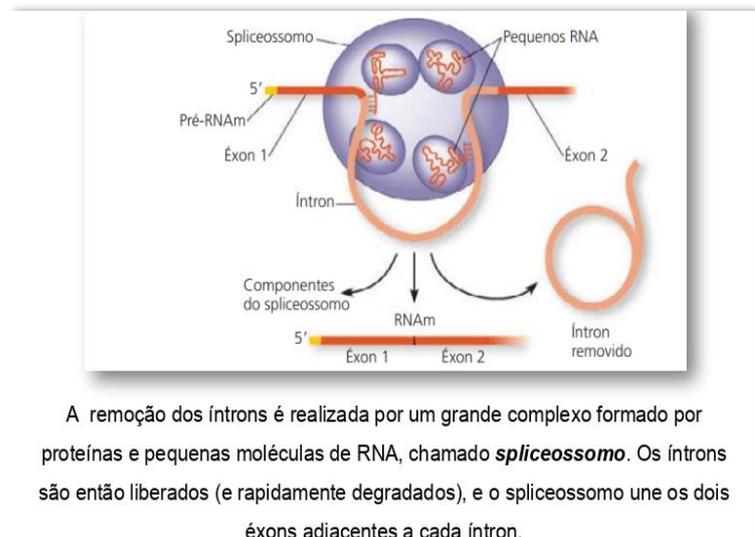


splicing: Etapa de clivagem e retirada dos íntrons e de ligação dos exons, chamada de processamento do RNA

A remoção de íntrons é realizada por proteínas e pequenas moléculas de DNA chamado spliceossomo. Os íntrons são liberados e degradados enquanto os spliceossomo unem os exons.

Essas etapas não acontecem em bactérias. A localização da transcrição também é diferente entre procariontes e eucariontes. A transcrição eucariótica acontece no núcleo, onde o DNA é guardado, enquanto a síntese de proteína ocorre no hialoplasma. Por causa disso, um RNAm eucariótico deve ser exportado do núcleo antes que ele possa ser traduzido em um polipeptídio.

Células procarióticas, por outro lado, não têm um núcleo, então elas executam tanto a transcrição quanto a tradução no hialoplasma. Após a transcrição (e, nos eucariontes, após o processamento), uma molécula de RNAm está pronta para dirigir a síntese proteica. O processo de se usar informação contida em um RNAm para construir um polipeptídio é chamado de tradução.

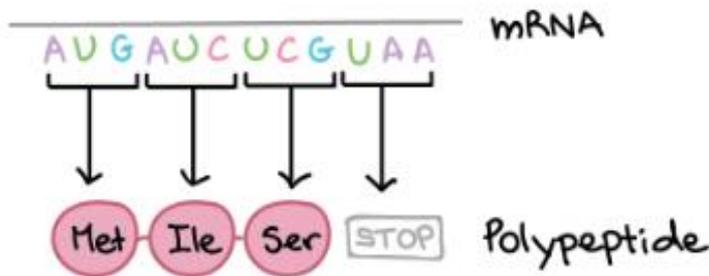
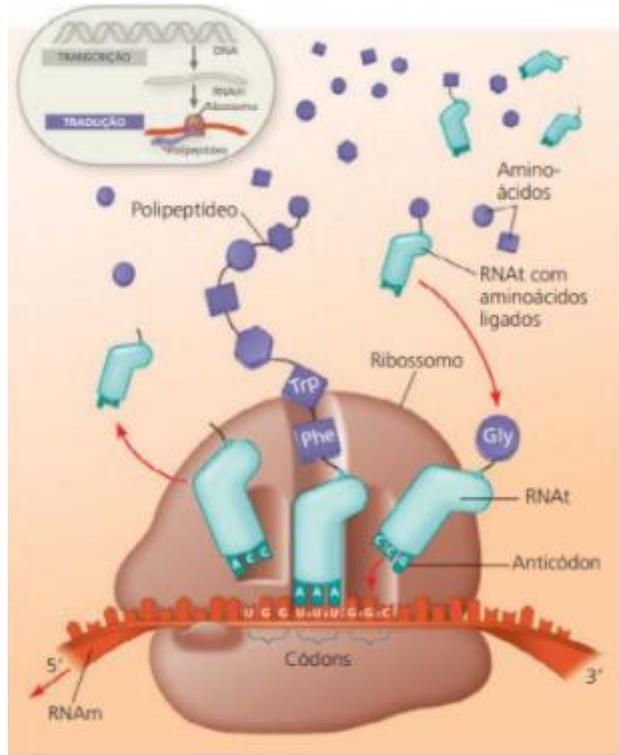


A remoção dos íntrons é realizada por um grande complexo formado por proteínas e pequenas moléculas de RNA, chamado **spliceossomo**. Os íntrons são então liberados (e rapidamente degradados), e o spliceossomo une os dois éxons adjacentes a cada íntron.

4. Tradução

O nome tradução significa que a sequência do RNAm precisa ser traduzida numa linguagem de aminoácidos completamente diferente. No processo de tradução, a célula interpreta a mensagem genética e sintetiza um polipeptídeo correspondente. A mensagem lida é uma série de códonos ao longo da cadeia de RNAm; O RNA transportador (RNAt) interpreta a mensagem vinda do RNAm. A função do RNAt é transferir aminoácidos presentes no citoplasma para o polipeptídeo formado no ribossomo.

Uma célula mantém um estoque de todos os 20 aminoácidos em seu citoplasma, seja por meio da sua síntese a partir de outros compostos ou por meio da captação de aminoácidos presentes nas soluções que a envolvem.



Especificamente, os nucleotídeos do RNAm são lidos em tripletos (grupos de três) chamados códonos. Há 61 códonos que especificam aminoácidos. Um códon é o códon de "início" que indica onde começar a tradução. O

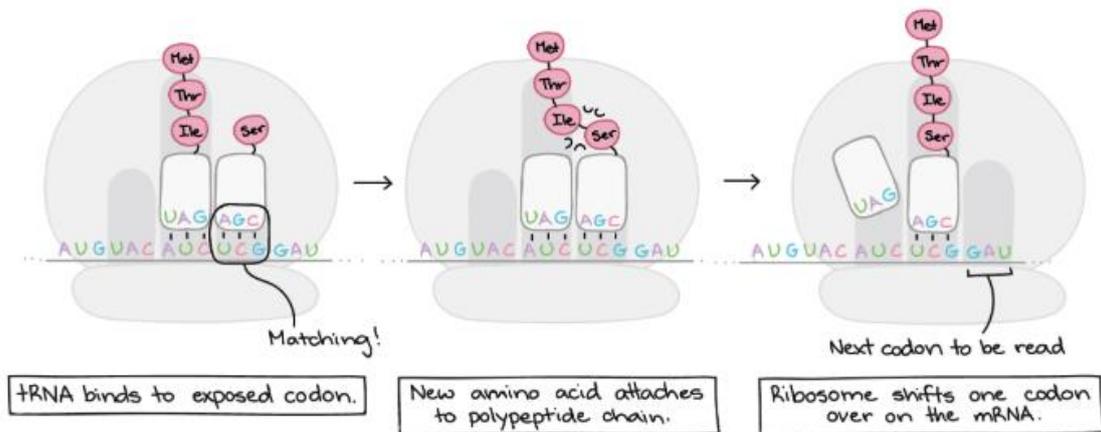
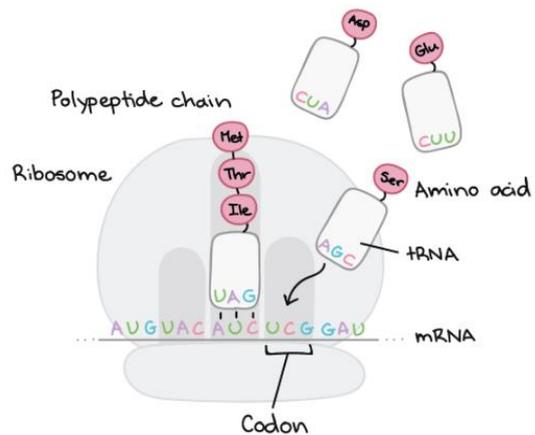
códon de início especifica o aminoácido metionina, assim a maioria dos polipeptídios iniciam com este aminoácido. Três outros códonos de "parada" sinalizam o final de um polipeptídeo. Essas relações entre códonos e aminoácidos são chamadas de código genético.

4.1 – Etapas da tradução

A Tradução ocorre dentro de estruturas conhecidas como ribossomos. Ribossomos são máquinas moleculares cujo trabalho é construir polipeptídios. Uma vez que o ribossomo se prende a um RNAm e encontra o códon de início, ele irá se mover rapidamente ao longo do RNAm, um códon de cada vez. Conforme for, ele irá gradualmente construindo uma cadeia de aminoácidos que espelha exatamente a sequência de códons no RNAm.

→ Mas como o ribossomo "sabe" qual aminoácido adicionar para cada códon?

■ Na verdade, esse pareamento não é feito pelo próprio ribossomo. Ao invés disso, ele depende de um grupo especializado de moléculas de RNA chamadas RNA transportadores (RNAt). Cada RNAt tem três nucleotídeos expostos em uma extremidade, que podem reconhecer (parear bases com) apenas um ou poucos códons específicos. Na outra extremidade, o RNAt carrega um aminoácido - especificamente o aminoácido que corresponde àqueles códons.



Esse processo se repete várias vezes, com o ribossomo se movendo ao longo do RNAm um códon de cada vez. Uma cadeia de aminoácidos é construída um por um, com uma sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de códons encontrados no RNAm.

A tradução termina quando o ribossomo chega a um códon de parada e solta o polipeptídeo. Uma vez que o polipeptídeo está terminado, ele pode ser processado ou modificado, combinado com outros polipeptídeos ou enviado a um destino específico dentro ou fora da célula. Em última instância, ele irá realizar um trabalho específico de que a célula ou o organismo necessita

5. Resumidamente...

O Ácido desoxirribonucleico é dividido em unidades funcionais chamadas genes, que podem especificar polipeptídeos (proteínas e subunidades de proteínas) ou RNAs funcionais (como RNAt e RNAr). A Informação de um gene é usada para construir um produto funcional em um processo chamado expressão gênica.

Um gene que codifica um polipeptídeo é expresso em duas etapas. Nesse processo, a informação flui do DNA para o RNA e posteriormente para proteína, em uma relação direcional conhecida como dogma central da biologia molecular.

Na Transcrição uma fita do DNA do gene é copiada para RNA. Nos eucariontes, o transcrito de RNA deve passar por etapas adicionais de processamento para se tornar um RNA mensageiro (RNAm) maduro.

Durante a tradução a sequência de nucleotídeos do RNAm é decodificada para especificar a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo. Este processo ocorre dentro de um ribossomo e requer moléculas adaptadoras chamadas de RNAt. Durante esse processo, os nucleotídeos do RNAm são lidos em grupos de três, chamados códon. Cada códon especifica um aminoácido em particular ou um sinal de parada. Esse conjunto de relações é conhecido como o código genético.

Capítulo 4

Extração de ácidos nucleicos

1. Introdução

Os ácidos nucleicos são as biomoléculas mais importantes no que diz respeito ao controle celular e informação genética, compondo e armazenando os processos de transmissão do DNA e RNA. Na biologia molecular um procedimento muito realizado envolvendo estes ácidos é a extração de ácidos nucleicos.

São diversas as razões para se realizar a extração e purificação de ácidos nucleicos, como a determinação precisa de todos os detalhes genéticos da pessoa, identificação e combate de problemas de saúde considerados genéticos e comprovação de paternidade.

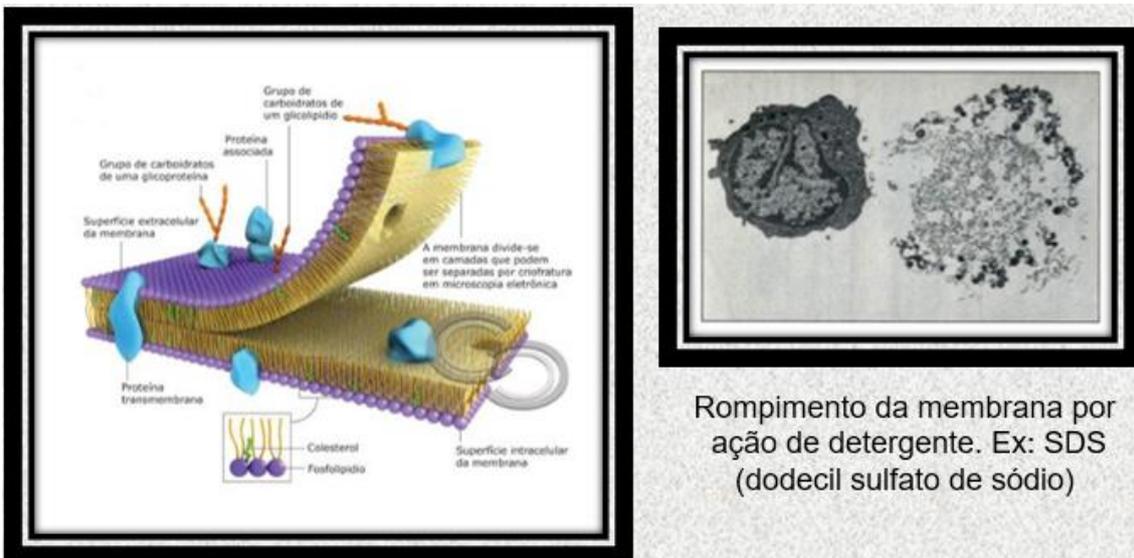
Em linhas gerais a extração de ácidos nucleicos ocorre em 4 etapas



Lise celular para expor o material genético, seja DNA ou RNA. Logo em seguida a Desproteínização para a remoção de proteínas; A precipitação (concentração do ácido nucleico) e a reidratação (ressuspensão do DNA ou RNA)

2. As etapas da extração

2.1 – A lise celular ocorre mediante o rompimento das membranas celulares (fosfolipídios + proteínas) o que libera o material contido no núcleo. Para esse processo é utilizado detergentes (dodecil sulfato de sódio - SDS) que desestabilizam e quebram os lipídios da membrana



- pH apropriado pra não degradar o material que estava sendo usado
- Nessa fase é comum também que o uso de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) seja utilizado para retirar íons bivalentes
- Uso de agentes quelantes (“sequestradores de íons”): Na química podem ser utilizados para remover íons metálicos em soluções – Formam complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. EX: EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).

2.2 – A purificação, também chamada de Desproteïnização, serve também para que as proteínas não contaminem a amostra do material genético. Essa fase é feita adicionando várias vezes a protease (enzimas que degradam as proteínas) ou com a adição de solventes orgânicos seguido de centrifugação. Os solventes mais comuns são o trizol, o fenol e o clorofórmio.

2.3 – A precipitação. Essa é a etapa em que o DNA ou RNA é separado do restante dos componentes celulares.

- Para a precipitação do DNA, utiliza-se etanol ou isopropanol a 4°C, pois o DNA é insolúvel em álcool e se torna menos denso do que a solução aquosa obtida
- A precipitação do DNA feita por meio da utilização de etanol absoluto associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico. O etanol induz a transição estrutural nas moléculas de ácido, fazendo-as se agregarem, com consequente precipitação. A precipitação com etanol absoluto, além de concentrar o DNA, ajuda a remover resíduos de fenol e de clorofórmio presentes na amostra. O etanol a 70% é utilizado para remover resíduos de sais. Embora tanto o cloreto de sódio como o acetato de sódio e o acetato de amônio sejam eficazes na precipitação do DNA, é mais difícil remover o cloreto de sódio, em razão da sua menor solubilidade em etanol.

2.4 – Durante a reidratação ocorre a suspensão do DNA com água ultra pura (livre de contaminantes e DNase) ou TE ou NaOH 8 mM Ou Ressuspensão do RNA em água ultra pura (livre de contaminantes e RNase).

- DNA deverá ser estocada a -20°C
- RNA deverá ser estocado a - 70°C

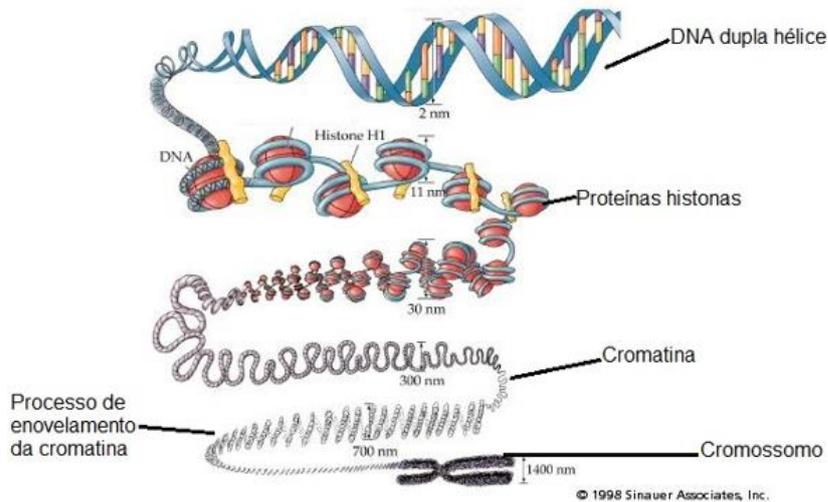
Capítulo 5

Regulação da expressão genica em eucariotos

1. Introdução

Há diversas formas de regular a expressão genica, de formas diferentes em procariotos e eucariotos. A regulação serve pra que não haja a transcrição e a tradução de genes em momentos desnecessários e simultâneos, além de poupar energia. Ou seja, serve para que só seja feita uma expressão genética quando seja necessário. Esse processo é feito em três etapas: O remodelamento da cromatina, a modificação das proteínas Histonas e a metilação do DNA.

2. A Cromatina



- A cromatina reprime a expressão gênica
- Cromatina = DNA + Proteínas Histonas
- Mudança da estrutura da cromatina antes da transcrição: torna o DNA mais acessível

2.1 – Regulação da cromatina

- Modificações das histonas
- Metilação do DNA

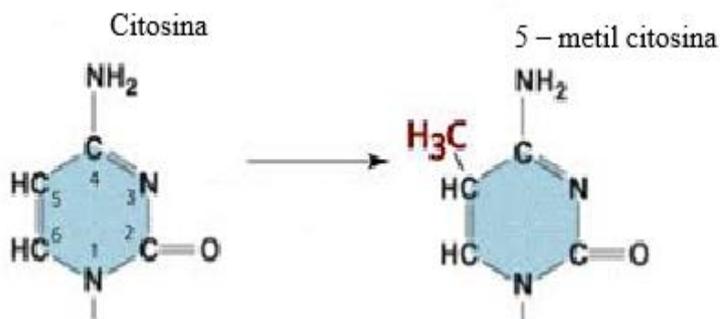
2.1.1 – Modificações das histonas

O N-terminal de cada histona se estende para fora do nucleossomo. Essas caudas são acessíveis a várias enzimas modificadoras (capazes de adicionar ou remover grupos químicos: acetila, metila e fosfato) afim de alterar a carga energética, promovendo a mesma carga do DNA às proteínas causando um “relaxamento” que permite a polimerase chegar no DNA e realizar a transcrição

- Histonas possuem dois domínios:
 - Domínio Globular: que se associa com outras histonas e com o DNA
 - Domínio de cauda com **carga positiva**: Interação com os fosfatos presentes no DNA.
- Adição de grupos metila (CH_3) às caudas das ptns histonas.
- Acetilação: Adição de grupos acetila – CH_3CO ao aminoácido lisina situados na cauda da histona pela ação da enzima acetiltransferase. As enzimas desacetilases retiram os grupos acetilas das histonas e restauram a cromatina

- Acetilação da histona: estimula a transcrição (cromatina relaxada)
- Desacetilação da histona: reprime a transcrição (cromatina condensada)
- Estudam-se a importância da acetilação e desacetilação de histona nas doenças inflamatórias dos pulmões - aumento da expressão de genes inflamatórios regulados por fatores de transcrição

2.1.2 – Metilação do DNA



A metilação consiste na adição de um radical metil (CH₃) no carbono 5 da base nitrogenada citosina que é seguida por uma base guanina (lembre-se que as bases nitrogenadas do DNA são: citosina, guanina, adenina e timina).

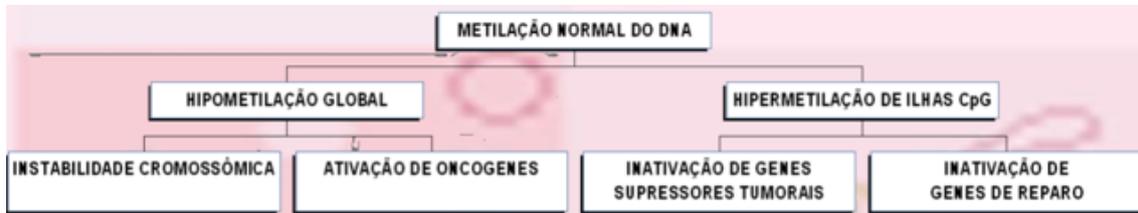
Após a adição do radical metil, a base nitrogenada metilada passa a se chamar 5-metilcitosina. Essa adição é feita por enzimas DNA-metil-transferases (DNMTs) que podem ser de 3 tipos: DNMT3A e DNMT3B são responsáveis por fazer novas metilações; enquanto a DNMT1 cuida da manutenção da metilação.

A metilação suprime a transcrição de determinados genes pois isso induz o recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, impedindo que a enzima RNA-polimerase se ligue à molécula, além de também promover a alteração da estrutura da cromatina para formas mais condensadas.

- Metilação de bases de citosina → 5' – metilcitosina
- DNA intensamente metilado está associado a repressão da transcrição (silenciamento dos genes).
- A metilação do DNA é mais comum em bases citosinas adjacentes a guanina (CpG): Na mesma fita!!!
- Quando os genes **não** estão sendo transcritos, as regiões ricas em CpG estão metiladas, mas os grupos metilas são retirados antes da transcrição

2.3 – Metilação do DNA e a carcinogênese

- Padrões anormais de metilação estão associados a alguns tipos de câncer
- Uma variedade de cânceres por alterar a expressão de genes críticos.



- 2 padrões de metilação distintos:

- 1. Hipometilação generalizada do genoma: instabilidade cromossômica e ativação de oncogenes).
- 2. Hipermetilação que se apresenta na região promotora – ilhas CpG: responsável pelo silenciamento de genes supressores tumorais e genes de reparo.

2.4 – Epigenética

Epigenética é a área da biologia que estuda mudanças no funcionamento de um corpo que não são causadas por momentos na sequência de DNA e que se perpetuam nas divisões celulares, meióticas ou mitóticas. É denominado um caráter epigenético quando o fenótipo é causado por tais mudanças.

- Permitem a formação do fenótipo (características apresentadas) sem alteração do genótipo.
- Ela investiga a informação contida no DNA, transmitida na divisão celular, mas que não constitui parte da sequência desse DNA

3. Simplificando...



Capítulo 6

Regulação da expressão genica em procariotos

1. Introdução

Há diversas formas de regular a expressão genica, de formas diferentes em procariotos e eucariotos. A regulação serve pra que não haja a transcrição e a tradução de genes em momentos desnecessários e simultâneos, além de poupar energia. Ou seja, serve para que só seja feita uma expressão genética quando seja necessário.

Jacob e Monod descobriram em 1961 uma das coisas mais importantes sobre a regulação gênica em bactérias, que culminaram com a concepção do *operon* utilizando o sistema Lac de *E. coli*, o qual envolve três enzimas indutíveis que atuam no metabolismo da lactose.

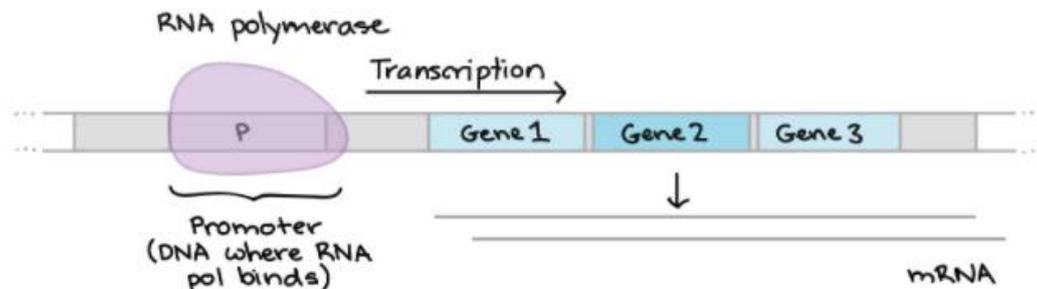
2. Operon

O operon é um conjunto de genes que se encontram funcionalmente relacionados e transcritos juntos por um único promotor. (O operon *lac* contém três genes: *lacZ*, *lacY*, e *lacA*. Esses genes são transcritos como um único RNAm, sob o controle de um promotor.)

- Operon reprimível: Sua transcrição normalmente está ligada, mas pode ser inibida (reprimida) quando uma molécula se liga a sua proteína repressora (reguladora) e assim impedindo sua transcrição Ex: Operon *trp*(triptofano)
- Operon induzível: normalmente está desligado, mas pode ser induzido quando uma pequena molécula específica interage com a proteína reguladora. Ex: Operon *Lac* (lactose)

2.1 – A anatomia de um operon

Os operons não são compostos somente por sequências de genes codificadoras. Em vez disso, eles também têm sequências de DNA reguladoras que controlam a sua transcrição. Tipicamente, essas sequências são sítios de ligação para proteínas reguladoras, que controlam o quanto o operon é transcrito. O promotor, ou sítio de ligação da RNA polimerase, é um exemplo de uma sequência reguladora de DNA.

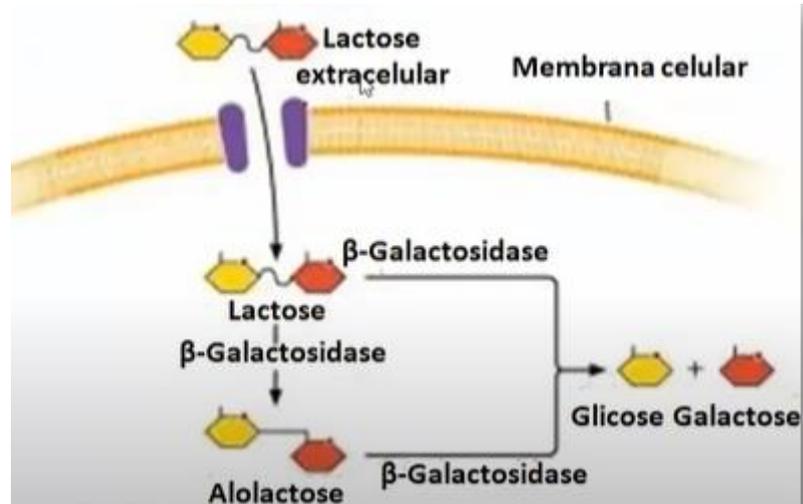


A maioria dos operons apresenta outras sequências de DNA reguladoras além do promotor. Essas sequências são sítios de ligação de proteínas reguladoras que "ativam" ou "desativam" a expressão do operon.

- Algumas proteínas reguladoras são repressoras que se ligam a segmentos do DNA chamados operadores. Quando ligado a seu operador, o repressor reduz a transcrição (por exemplo, impedindo a RNA polimerase de avançar sobre o DNA).
- Algumas proteínas reguladoras são ativadoras. Quando um ativador se liga a seu sítio de ligação, ele aumenta a transcrição do operon (por exemplo, ajudando a RNA polimerase a se ligar ao promotor).

2.2 – Como começa?

Quando há presença de glicose e lactose no organismo, a bactéria tende a escolher a glicose como fonte de energia. Todavia quando a lactose está em maior quantidade e a glicose em menor, a bactéria começa a utilizar a lactose como fonte de energia e produz uma síntese de proteínas para quebra-lá (operon Lac).

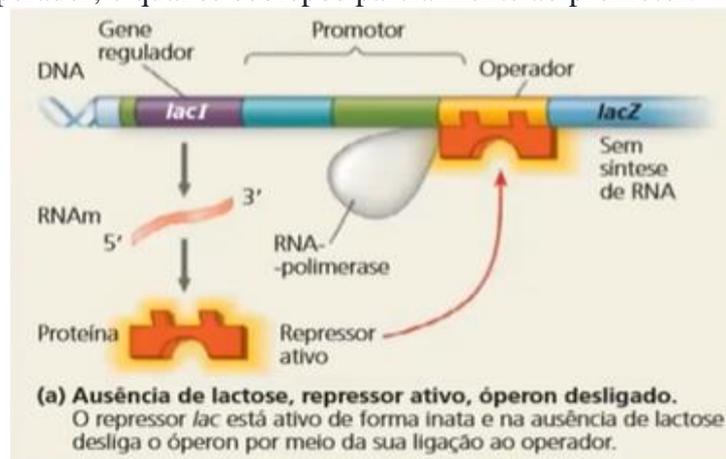


■ [Mas como a bactéria percebe que o nível de lactose é maior que o de glicose?]

- Quando a lactose entra na célula e aumenta o seu nível no meio celular ocorre a hidrólise celular pela Beta galactosidase, promovendo também a formação da alolactose, além da glicose e a galactose. O repressor lac atua como um detector de lactose. Ele normalmente bloqueia a transcrição do operon, mas para de atuar como repressor quando a lactose está presente. O repressor *lac* detecta a lactose indiretamente, através do isômero alolactose – que foi produzida durante a hidrólise feita pela Beta galactosidase.

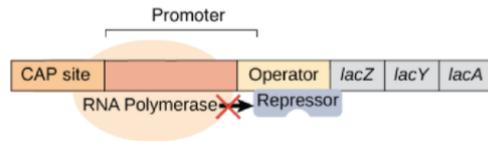
2.3 – Operon Lac de controle negativo

O repressor *lac* é uma proteína que reprime (inibe) a transcrição do operon *lac*. Ela faz isso através da ligação com o operador, o qual se sobrepõe parcialmente ao promotor.



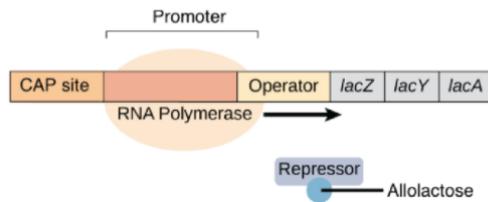
No lactose:

When lactose is absent, the *lac* repressor binds tightly to the operator. It gets in RNA polymerase's way, preventing transcription.



With lactose:

Allolactose (rearranged lactose) binds to the *lac* repressor and makes it let go of the operator. RNA polymerase can now transcribe the operon.



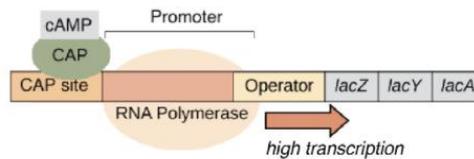
Quando ligado, o repressor *lac* impede que a RNA polimerase faça a transcrição do operon, mas quando a lactose não está disponível, o repressor *lac* se liga firmemente ao operador, evitando a transcrição pela RNA polimerase. No entanto, quando a lactose está presente, o repressor *lac* perde sua capacidade de se ligar ao DNA. Ele se desliga do operador, abrindo o caminho para a RNA polimerase fazer a transcrição do operon.

2.4 – Operon Lac na presença de lactose

Quando a lactose está presente, o repressor *lac* perde a capacidade de ligar-se ao DNA. Isso abre caminho para a RNA polimerase ligar-se ao promotor e transcrever o operon *lac*. Parece que chegamos ao fim da história, certo? Não é bem assim... Como podemos constatar, a RNA polimerase sozinha não se liga muito bem ao promotor do operon *lac*. Até consegue fazer algumas transcrições, mas não vai fazer muito ao menos que tenha a ajuda extra da proteína ativadora de catabólitos (CAP). A CAP se liga à região do DNA que precede o promotor do operon *lac* e auxilia na ligação da RNA polimerase ao promotor, conduzindo altos níveis de transcrição.

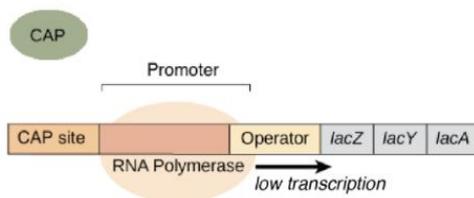
Low glucose:

When glucose levels are low, cAMP is produced. The cAMP attaches to CAP, allowing it to bind DNA. CAP helps RNA polymerase bind to the promoter, resulting in high levels of transcription.



High glucose:

When glucose levels are high, no cAMP is made. CAP cannot bind DNA without cAMP, so transcription occurs only at a low level.



2.5 – Operon lac na presença de lactose (controle +)

O controle positivo se dá pelo AMPc que se acumula no meio quando há baixo nível de glicose. O CAP é ativador pois ativa a transcrição de um gene na presença do AMPc ao se ligar com o DNA

- ❖ AMP cíclico (AMPc) acumula no meio intracelular quando a glicose está escassa;
- ❖ A proteína reguladora, chamada de proteína ativadora de catabólito (CAP, *catabolite activator protein*), é um ativador, se liga ao DNA e estimula a transcrição de um gene;

AMPc + CAP → transcrição ativa

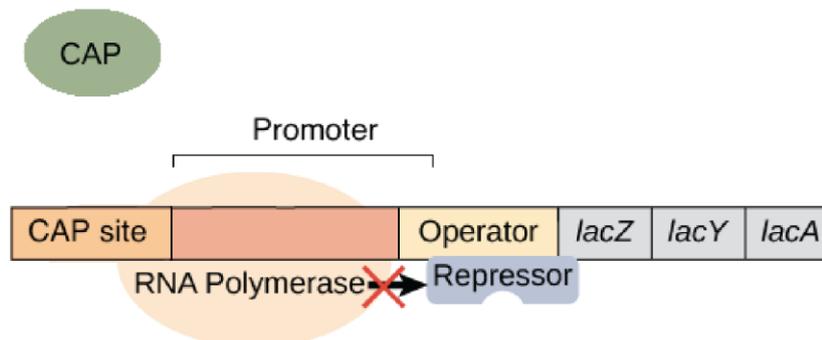
- ❖ Essa ligação aumenta a afinidade da RNA-polimerase pelo promotor aumentando a taxa de transcrição. A ligação da CAP ao promotor estimula diretamente a expressão gênica. Assim, esse mecanismo caracteriza a **regulação positiva**.

3. Resumindo...

O operon lac está sob controle duplo. Negativo pelo repressor Lac e positivo pela CAP. O estado do repressor Lac (com ou sem alolactose ligada) determina se a expressão dos genes irá ocorrer ou não, enquanto o estado do CAP (ligado a AMPc ou não) controla a taxa de transcrição quando o operon estiver livre de repressor.

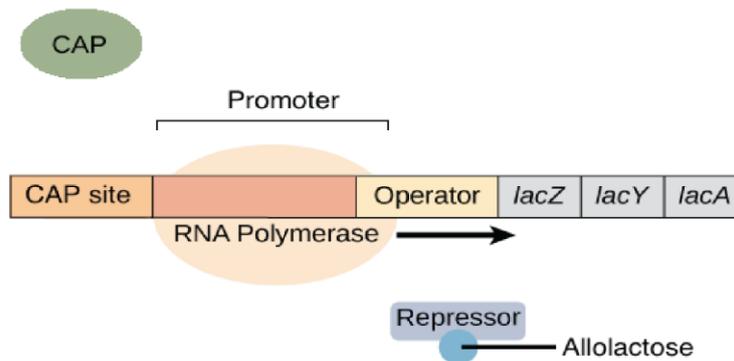
■ **Glicose presente, lactose ausente:** Não ocorre transcrição do operon *lac*. Isso porque o repressor *lac* permanece ligado ao operador, impedindo a transcrição pela RNA polimerase. Além disso, os níveis de AMPc estão baixos em função dos níveis altos de glicose, portanto a CAP está inativa e não é capaz de se ligar ao DNA.

Glucose present, lactose absent:



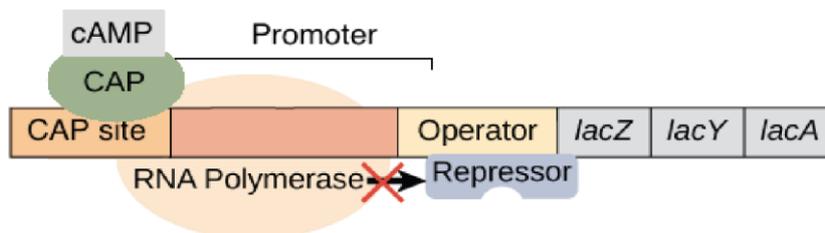
■ **Glicose presente, lactose presente:** ocorre um nível baixo de transcrição do operon *lac*. O repressor *lac* é liberado do operador porque o indutor (alolactose) está presente. No entanto, os níveis de AMPc estão baixos, pois há glicose presente. Logo, a CAP se mantém inativa e não é capaz de se ligar ao DNA, portanto a transcrição acontece em um nível baixo, fraco.

Glucose present, lactose present:

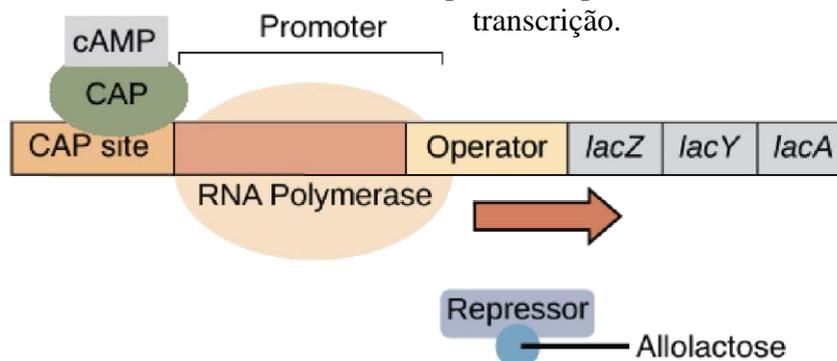


■ **Glicose ausente, lactose ausente:** Não ocorre transcrição do operon *lac*. Os níveis de AMPc estão altos, pois a glicose está ausente. No entanto, o repressor *lac* também estará ligado ao operador (em razão da ausência de alolactose), atuando como uma barreira à RNA polimerase e impedindo a transcrição.

Glucose absent, lactose absent:



■ **Glicose ausente, lactose presente:** Ocorre intensa transcrição do operon *lac*. O repressor *lac* se solta do operador, pois o indutor está presente (allolactose). Os níveis de AMPc estão altos, já que não há glicose. Portanto, a CAP está ativa e se liga ao DNA. **Glucose absent, lactose present:** A CAP auxilia a RNA polimerase a se ligar ao promotor, permitindo altos níveis de transcrição.



Capítulo 7

Clonagem

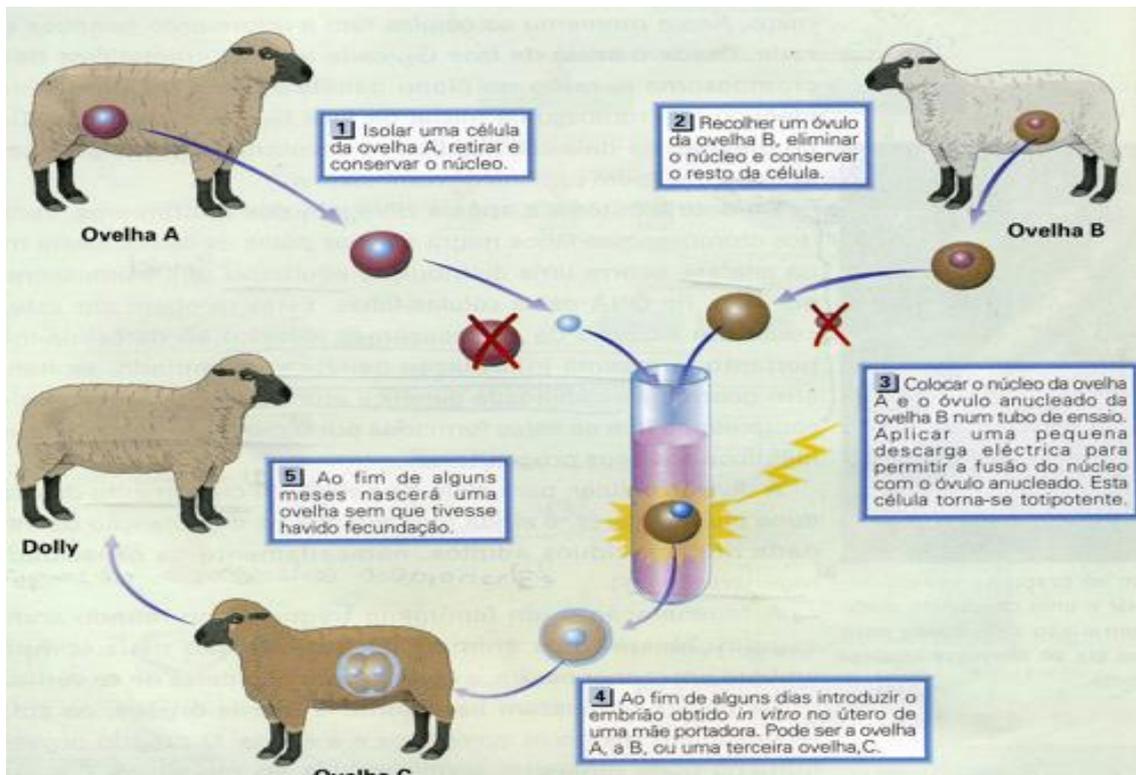
1. Introdução

Clonagem é a produção de indivíduos geneticamente iguais. É um processo de reprodução assexuada que resulta na obtenção de cópias geneticamente idênticas de um mesmo ser vivo – micro-organismo, vegetal ou animal. O melhor termo usado para definir a clonagem é: “Clones são um conjunto de células (ou moléculas) que descendem de uma mesma matriz.”

- Termo clone utilizado pela primeira vez por Herbert Webber em 1903
- Definição: Clones são um conjunto de células (ou moléculas) que descendem de uma mesma matriz
- São geneticamente idênticos
- Relacionados a reprodução assexuada
- Ovelha Dolly como marco da história da genética e clonagem

2. Ovelha Dolly

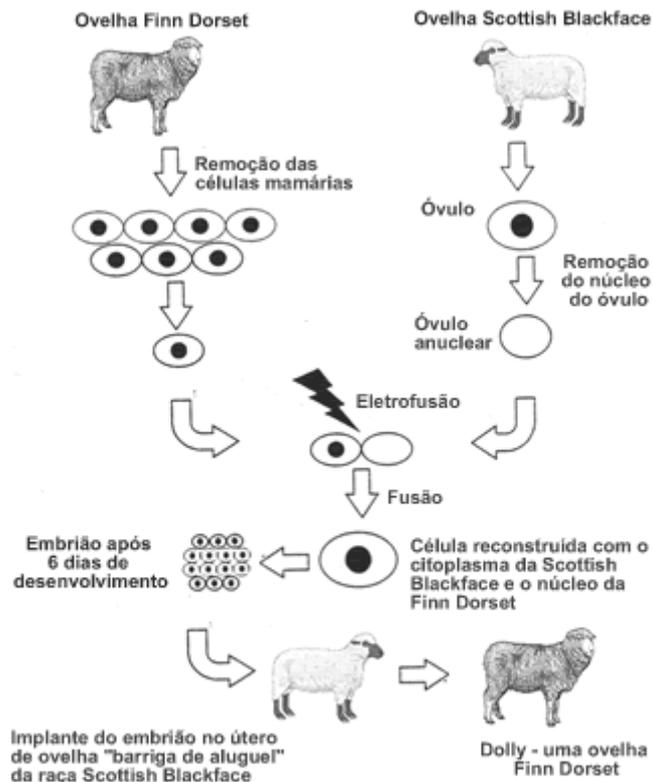
Em 1996, um anúncio marcou a história da genética. O escocês Ian Wilmut, do Instituto Roslin, de Edimburgo, com a colaboração da empresa de biotecnologia PPL Therapeutics conseguiram a proeza de mostrar que era possível a partir de uma célula somática diferenciada clonar um mamífero, tratava-se de uma ovelha da raça Finn Dorset chamada de Dolly.



2.1 – Como foi o processo de clonagem da ovelha Dolly

Eles isolaram uma célula mamária congelada de uma ovelha da raça Finn Dorset de seis anos de idade e a colocaram numa cultura com baixa concentração de nutrientes. Com isso a célula entrou em um estado de latência parando de crescer.

Em paralelo, foi retirado o óvulo não fertilizado de uma outra ovelha, da raça Scottish Blackface, de cor escura. Desse óvulo não fertilizado foi retirado o núcleo, transformando-o em um óvulo não fertilizado e sem núcleo. Através de um processo de eletrofusão ocorreu a união do núcleo da ovelha da raça Finn Dorset com o óvulo sem núcleo da ovelha da raça Scottish Blackface, dando início à divisão celular: uma célula em duas, duas em quatro, quatro em oito e assim por diante.



Na fase de oito a 16 células, as células se diferenciam formando uma massa de células internas originando o embrião propriamente dito. Após seis dias, esse embrião, agora com cerca de 100 células, é chamado de blastocisto. O blastocisto foi colocado no útero de uma outra ovelha da raça Scottish Blackface que funcionou como "barriga de aluguel". Após a gestação, esta ovelha que é escura deu à luz um filhote branquinho da raça Finn Dorset chamada Dolly. A ovelha Dolly não era tão idêntica ao doador do núcleo, apesar de herdar da ovelha branca o DNA contido nos cromossomos do núcleo da célula mamária, ela também herdou da ovelha escura o DNA contido nas mitocôndrias, organelas que ficam no citoplasma das células. Com o passar do tempo foi percebido que Dolly apresentava as extremidades dos cromossomos (telômeros) diminuída gerando envelhecimento celular precoce. Devido ao envelhecimento, Dolly sofria de artrite no quadril e joelho da pata traseira esquerda. Sugere-se que isto ocorra pelo fato de que ela tenha sido criada a partir de uma célula adulta de seis anos (idade da ovelha doadora do núcleo), e não de um embrião.

Dolly foi sacrificada aos 6 anos de idade, depois de uma vida marcada por envelhecimento precoce (por terem utilizado células de uma ovelha com mais idade, não de uma recém nascida) e doenças. Em seus últimos dias, Dolly estava com uma doença degenerativa e incurável nos pulmões. Os problemas de saúde de Dolly levantam dúvidas sobre a possibilidade da prática de copiar a vida.

■ começou a se questionar sobre clonagem humana e sobre quem iria clonar, os requisitos para a escolha desse alguém, a forma que isso revolucionaria a ciência. Gerou também diversas discussões no campo da bioética (Novela O Clone/Serie Orphan Black)

3. Clonagem

3.1 – Conceito: A clonagem molecular é o processo de construção do DNA recombinante e sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitem a seleção do gene de interesse.

■ Nomes Similares: Engenharia genética, Manipulação gênica, Clonagem gênica, Tecnologia do DNA recombinante

■ Porque Clonar?

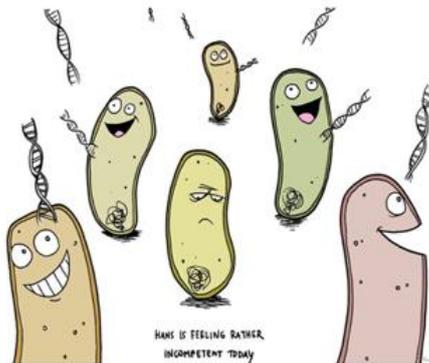
- Sequenciamento de DNA
- Separar fragmentos de DNA em clones independentes
- Estudar a transcrição e a tradução do gene
- Fazer estudos de expressão funcional
- Sintetizar proteínas para produção de anticorpos
- Sintetizar proteínas para uso terapêutico

■ [Um experimento de PCR pode ser completado em poucas horas, ao passo que a obtenção de um gene por clonagem pode levar semanas ou meses. Por que a clonagem gênica ainda é utilizada?]

- A PCR só pode ser utilizada para utilizar genes previamente estudados (a clonagem gênica pode estudar genes que nunca foram estudados anteriormente!). Além de ter um limite para a extensão de seqüências de DNA pela PCR (até 5 Kb)

3.2 – Células Competentes: Capacidade da célula de permitir a entrada de DNA através de sua membrana para multiplicar esse fragmento genético através das vias metabólicas das próprias células. Suas Características são:

- Quimicamente competente ou eletrocompetente
- Crescimento rápido
- Não-patogênica
- Capaz de receber e multiplicar o inserto (DNA recombinante)
- Ex ⇒ *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*



4. Etapas da clonagem

Primeiro há a preparação do DNA vetor (escolha do vetor) e logo em seguida a preparação do inserto (– DNA recombinante // PCR prévia). Após isso ocorre a Ligação do DNA vetor ao inserto e posteriormente a transformação – que é a introdução de DNA recombinante nas células hospedeiras (Células competentes) – a multiplicação das células e dos clones recombinantes e, por fim, a seleção e identificação de clones recombinantes.

4.1 – Etapa 1: Vetor de clonagem

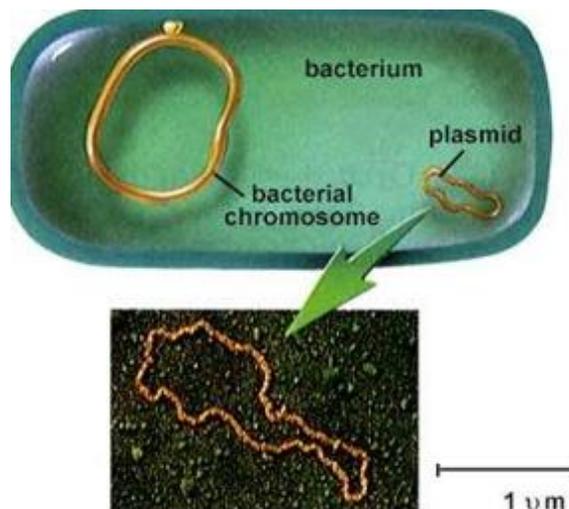
■ Características dos vetores de Clonagem

- Moléculas de DNA dupla fita
- Capacidade de replicação
- Sítios únicos de restrição para clonagem
- Possuir um ou mais genes para seleção
- Devem ser capazes de se replicar e ser isolados independentemente do genoma do hospedeiro;
- Marcador selecionável ⇒ um gene que permita que as células hospedeiras contendo o vetor sejam selecionadas (Ex. Sítios de resistência a antibióticos)

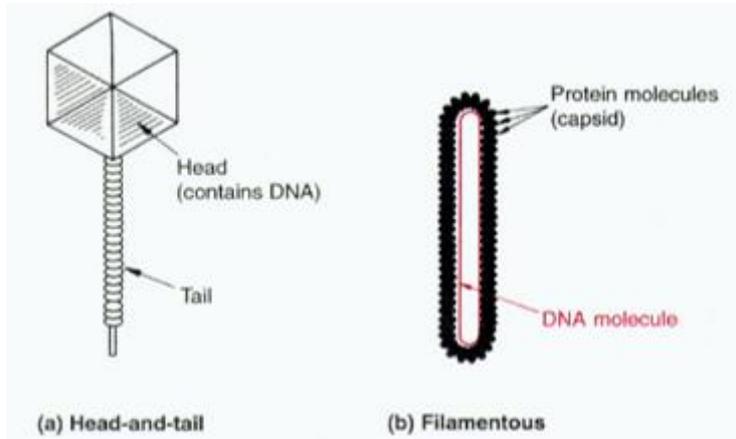
4.1.1 – Clonagem bacteriana:

■ Os Plasmídeos: fragmentos até 10 kb: DNA circulares bacterianos

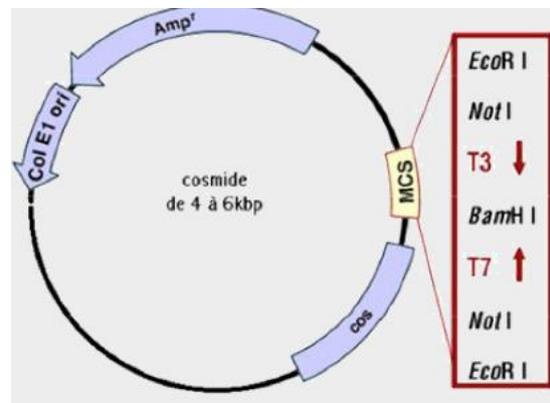
- Recebem de 100 a 10.000 pb
- Duplicação independente do cromossomo
- Presentes em múltiplas cópias
- Genes importantes.



- Os Bacteriófagos: fragmentos até 20 kb: Vírus que infectam especificamente bactérias. Recebe maior quantidade de DNA (10.000 a 20.000 pb), versatilidade.



- Cosmídeos: fragmentos até 40 kb: São híbridos entre plasmídeos e bacteriófagos. São utilizados como veículos de clonagem molecular através do empacotamento *in vitro* reconstitui a estrutura do fago em cabeça e cauda: usados para infectar a célula hospedeira. As enzimas de empacotamento reconhecem dois locais com distância de 35.000 a 49.000 pb, o que limita o tamanho dos fragmentos passíveis de serem empacotados



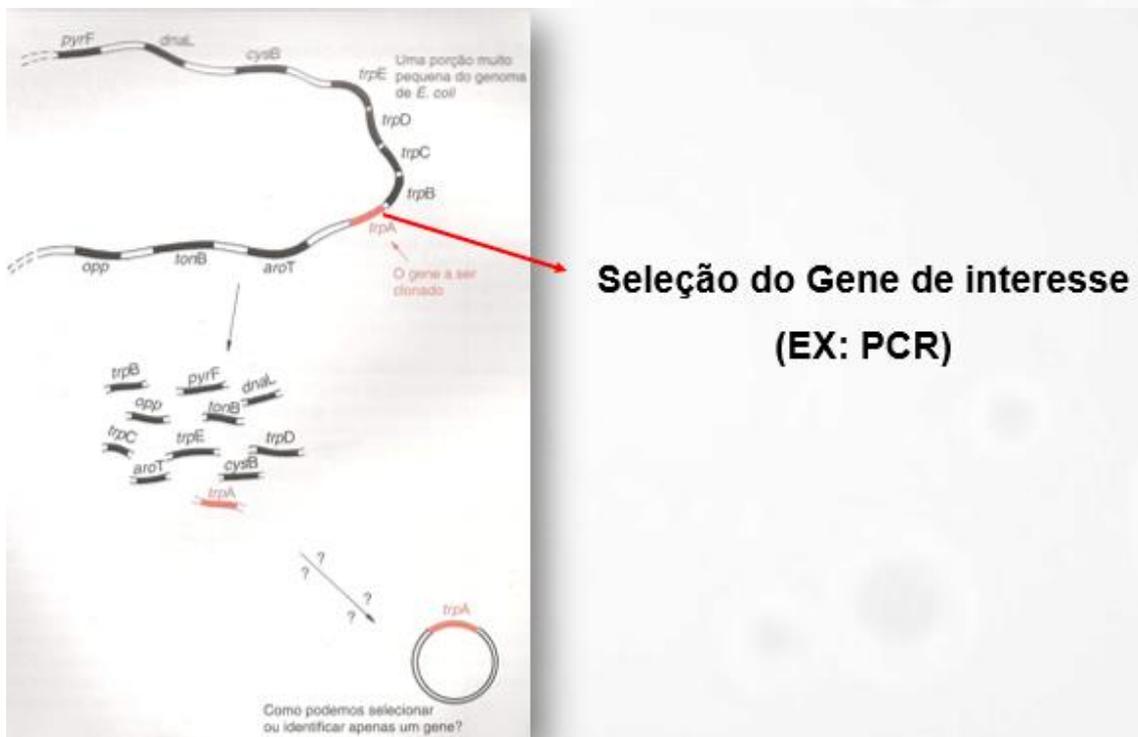
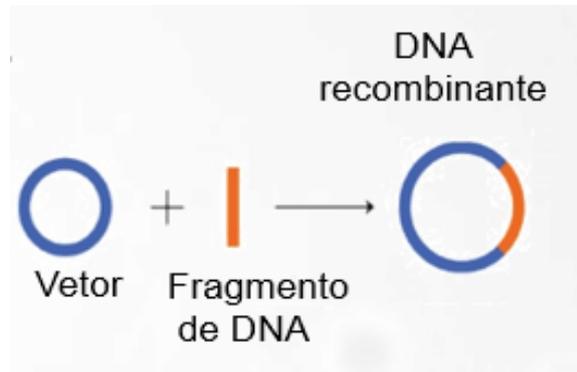
- BACs (cromossomo artificial bacteriano): até 300 kb

4.1.2 – Clonagem de Leveduras:

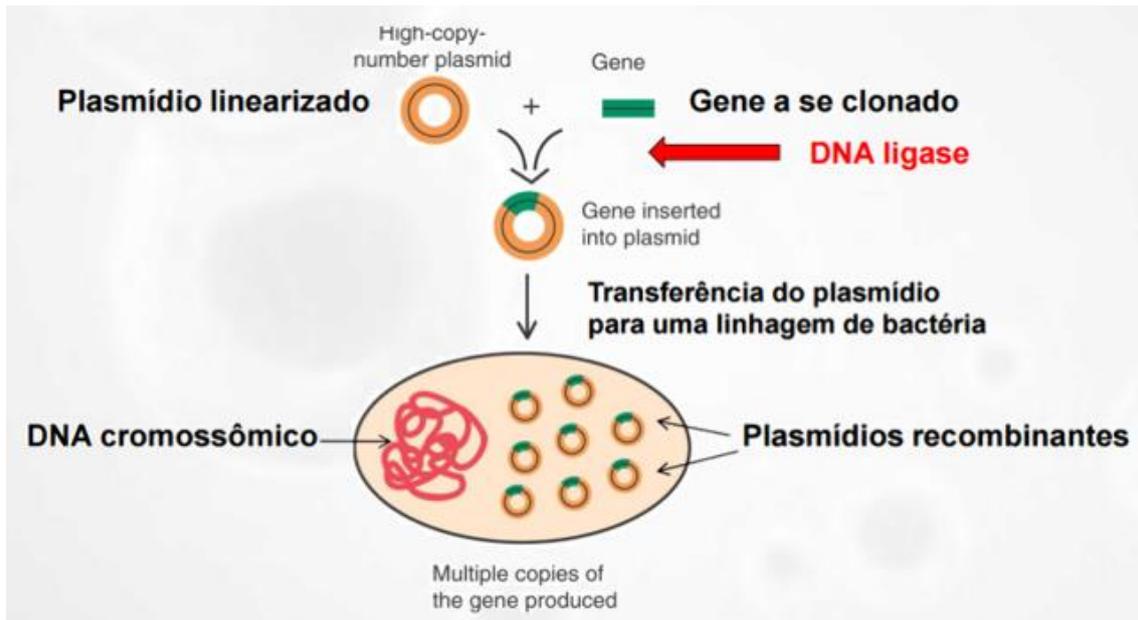
- YACs: até 1 Mb (cromossomo artificial de levedura)

4.2 – Etapa 2: Preparação do Inseto

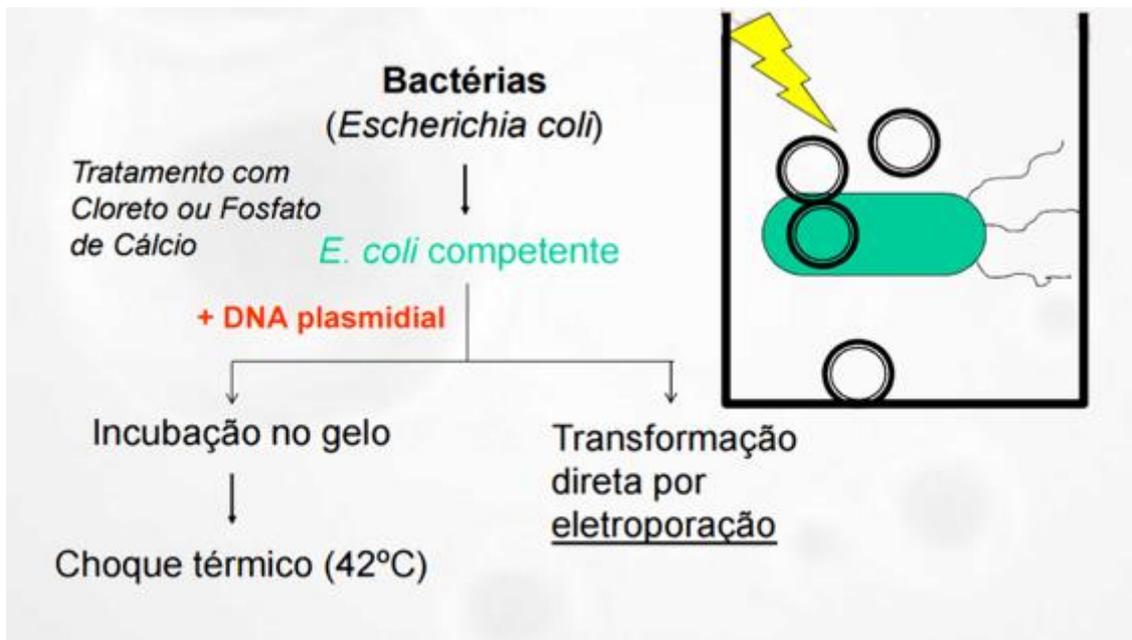
- Vetor: digestão com enzimas de restrição
- Inseto: O que se deseja clonar (DNA genômico, cDNA, um gene específico, cDNA, PCR, etc).



4.3 – Etapa 3: Ligação



4.4 – Etapa 4: Transformação



Durante a transformação, é dado um choque (por exposição a alta temperatura, seja por choque químico utilizando cloreto de cálcio ou fosfato de cálcio, ou então por eletroporação) nas células bacterianas para prepara-las para incorporar DNA estranho.

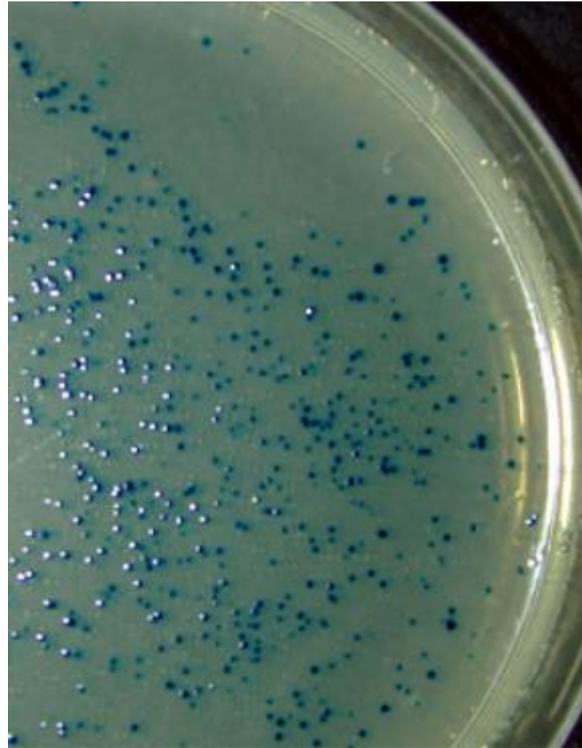
- [Por que um choque de calor faz bactérias incorporarem DNA?]

Ótima pergunta! Curiosamente, ninguém parece ter certeza total da resposta, apesar de a transformação pelo choque de calor ser uma técnica muito comum em biologia molecular. Em geral, acredita-se que o choque de calor altera a fluidez da membrana e/ou faz com que se formem poros – buracos – tornando mais fácil o DNA atravessar e entrar na célula.

4.5 – Etapa 5: Seleção

O Gene LacZ é responsável por produzir a enzima B-galactosidase. Essa enzima age sobre o substrato incolor X-Gal, convertendo-o em um corante azul. Colônias com inserto ficam brancas: Silenciam Lac Z - enzima β -gal não é codificada, logo não degradam X-gal.

- Seleção azul e branca: você realiza o esfregão na placa de petri e semeia ela com a bactéria já com o inserto para que ela cresça e produza uma colônia. As colônias brancas indicam que a ligação foi eficiente porque não há a produção da enzima B-galactosidase. Enquanto nas azuis a ligação não foi eficiente, há a produção de enzima B-galactosidase, a enzima quebra o substrato X-Gal e produz um corante azul.



- As bactérias são cultivadas no meio líquido (Agar, lb e água autoclavados) e no momento da seleção é colocado X-Gal e IPTG, para fazer o crescimento da célula e a quebra do X-Gal, causada pela B-galactosidase, que dá a coloração azul caso a ligação não seja eficiente.

Capítulo 8

Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Introdução

A Polymerase chain reaction (PCR) ou reação em cadeia da polimerase, em português, é uma técnica que consiste em fazer cópias de DNA in vitro por uso dos elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. É um método de amplificação rápida de segmentos específicos do DNA ou Cdna.

2. *Histórico da técnica*

1983 – Kary Mullis estava dirigindo um carro quando teve a ideia de usar um par de primers para delimitar uma sequência de DNA e copia-la usando o DNA polimerase

1985 – Primeira publicação sobre PCR na revista Science

1989 – Science declara a Taq polimerase como a “molécula do ano”

1993 – Kary Mullis ganha o prêmio Nobel em química pela Taq polimerase

3. *Fundamentos da PCR*

PCR significa reação em cadeia da polimerase. A técnica em si consiste em fazer cópias de DNA in vitro com base no uso dos elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. É um método de amplificação rápida de segmentos específicos do DNA ou cDNA (é o DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro) e os produtos da PCR são chamados de amplicons

3.1 – Vale lembrar

- Polimerização in vitro apenas moléculas de DNA
- Enzima: DNA polimerase
- Amplificação de sequencias especificas
- Reação em cadeia: Reação cíclica
- Os produtos de um ciclo são substrato para o ciclo seguinte

2. *Os primers*

Em genética, os são iniciadores (ou primers) são segmentos de ácidos nucléicos de 15-30 nucleotídeos, de fita única e que tem o objetivo de se flanquear (ligar) as extremidades da região a ser amplificada. Afim de demarcar o inicio e o fim da sequência alvo.

- Um primer em cada extremidade (em cima e embaixo) da sequência alvo deve ser desenhado para que as fitas sejam copiadas simultaneamente em ambas as direções
- São colocados em excesso na reação para que eles se ligam ao DNA alvo ao invés de duas fitas se ligarem de novo uma na outra

2.3 – Os problemas com os primers

“Desenhando” Iniciadores

Primer-Dimers (anelamentos Sense/Antisense),



Self-Dimers (anelamentos Sense/Sense ou Antisense/Antisense)



Hairpins (dobramentos da cadeia de um primer, fazendo com que ela se pareie consigo mesma).



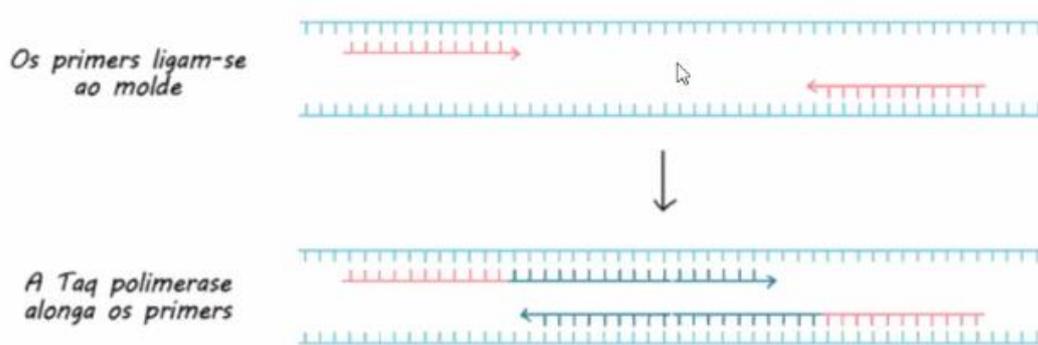
Há três possíveis problemas que podem ocorrer com os primers. O que chamamos de Primer-Dimers que é quando a transcrição ocorre no sentido oposto ao indicado pelo Primer; os Self-Dimers quando as transcrições ocorrem no sentido contrário. E os Hairpins, que é quando há dobramento entre as fitas, promovendo um auto pareamento.

3. O processo

O processo da PCR ocorre em 3 etapas: Desnaturação, anelamento/hibridização e extensão/polimerização. Na fase de desnaturação o DNA genômico contendo a sequência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento a cerca de 95°C por cerca de 30 segundos. A dupla fita é aberta (desnaturada), tornando-se uma fita única.

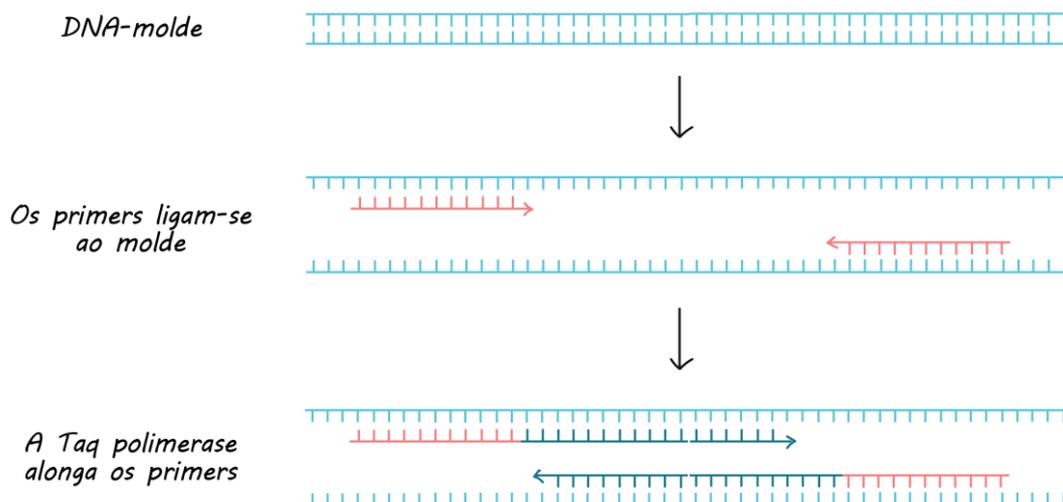


O Anelamento ocorre após a separação das fitas, um par de iniciadores ou primers (uma fita de DNA específica para o gene que se quer estudar) complementam a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada.



Ou seja, um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro é complementar à sequência na outra fita. O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se anexam a fita. Essa etapa ocorre a uma temperatura de 60°C e as pontas dos primers indicam aonde a polimerase deve iniciar a transcrição.

O processo de extensão, também chamado de polimerização, é o último processo da PCR. Com o molde já identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA. Esse processo acontece a uma temperatura de 72°C. Geralmente ocorre o uso dos dNTPs na extensão das novas cadeias de DNA.



E por fim, o ciclo inteiro é então reiniciado, os produtos do primeiro ciclo de replicação são então desnaturados, hibridizados e novamente replicados com DNA-polimerase. O procedimento é repetido muitas vezes até que o nível desejado de amplificação seja obtido. Na prática, a amplificação efetiva do DNA requer de 20 a 32 ciclos de reação, com os produtos de cada ciclo servindo como DNA-molde para o próximo – dando origem ao termo “reação em cadeia” da polimerase. Como cada etapa da reação ocorre em uma temperatura específica, a reação pode ser controlada. É utilizado um termociclador para determinar a temperatura e o tempo de cada etapa, bem como o número de ciclos de replicação.

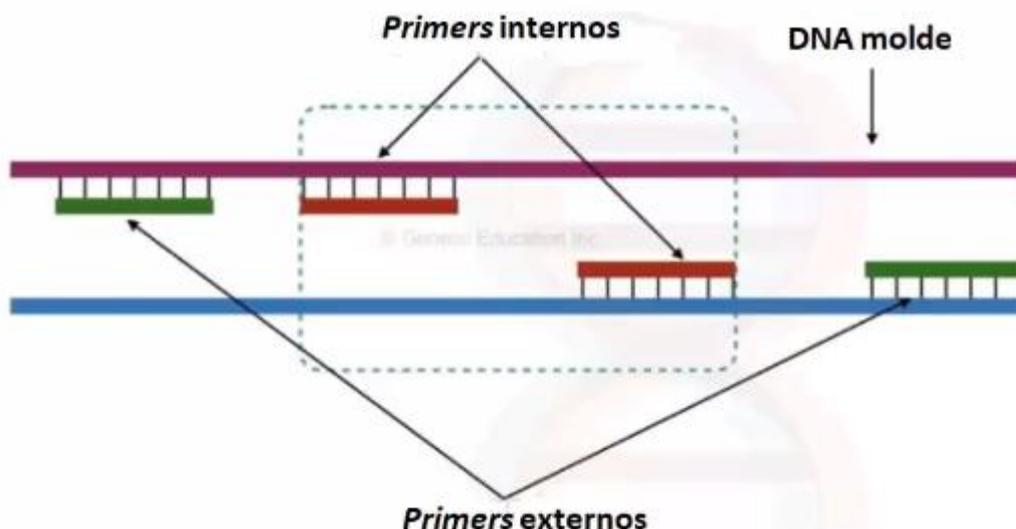
4. Variações da PCR

- ❖ **Nested PCR**
- ❖ **RT-PCR: Transcrição Reversa seguida de PCR**
- ❖ **PCR quantitativa em tempo real (qPCR)**
- ❖ **Long PCR e PCR in situ (PRINS)**
- ❖ **RACE**
- ❖ **PCR digital**
- ❖ **Touchdown PCR e Hot start DNA pol**
- ❖ **RAPD, AFLP e RFLP**
- ❖ **Multiplex PCR e Rep-PCR**
- ❖ **SSCP**
- ❖ **PCR assimétrica e LATE-PCR**
- ❖ **PCR inversa**
- ❖ **QC-PCR**

4.1 – NESTED PCR

Geralmente usados pra genes pequenos dentro de uma grande área para melhorar a especificidade e a eficiência da reação. O segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real sequência-alvo.

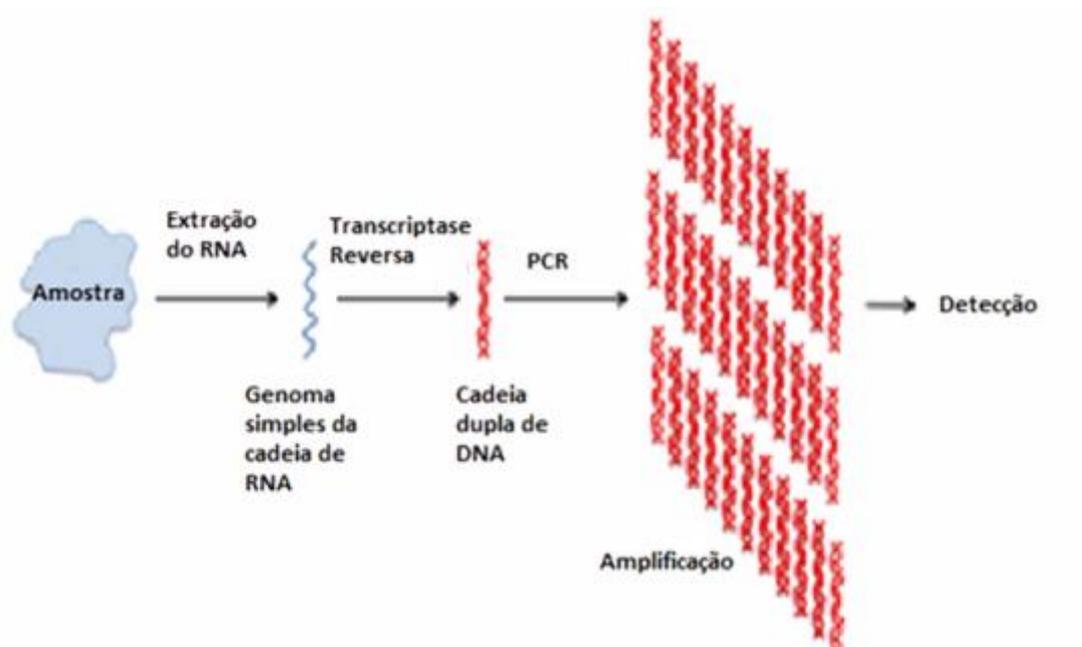
Em palavras mais simples: “você faz uma seleção maior, contendo coisas que você não quer, e depois você corta só o que você quer. Primeiro uma PCR geral zona e depois uma mais específica”



4.2 – RTPCR

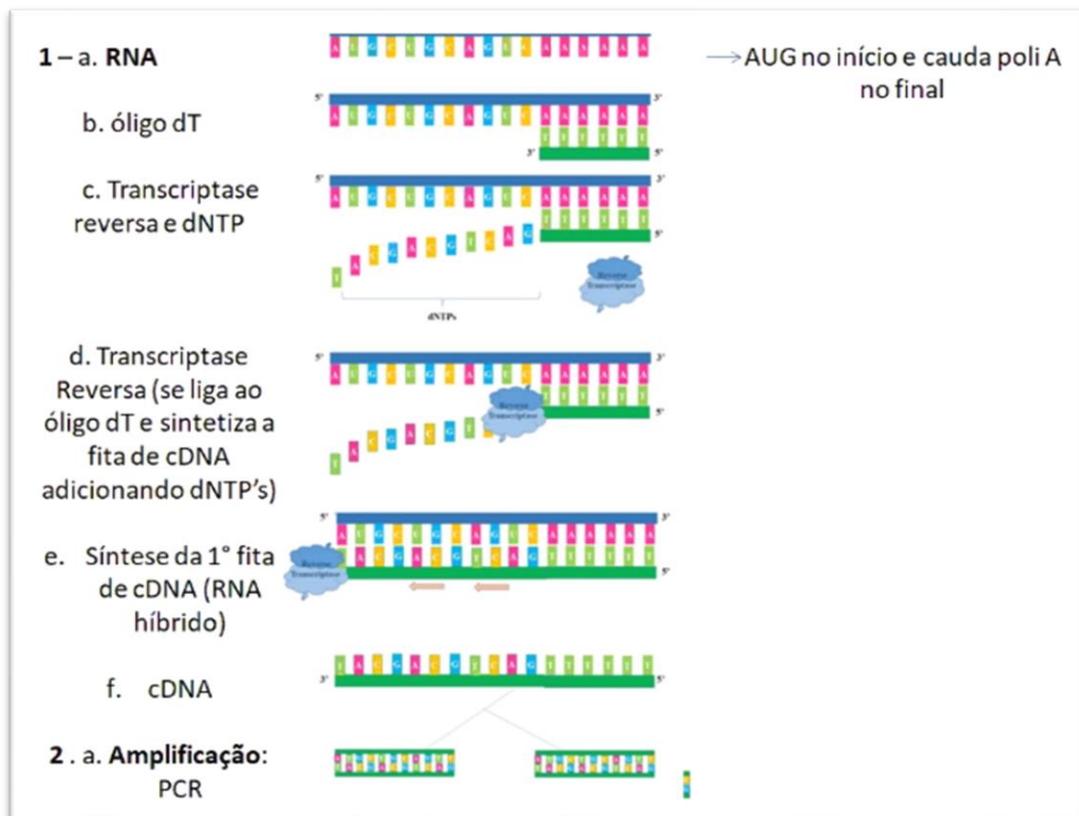
Transcrição reversa seguida de PCR: É um método laboratorial usado desde 1983 que utiliza a enzima transcriptase reversa para transformar o RNA do vírus em DNA complementar (cDNA). É usado principalmente para medir a quantidade de um RNA específico. Isto é conseguido através do monitoramento da reação de amplificação usando fluorescência, uma técnica chamada PCR quantitativo em tempo real. RT-PCR combinado e qPCR são rotineiramente usados para análise da expressão gênica e quantificação do RNA viral em pesquisas e contextos clínicos.

- O RNA é transcrito para DNA para depois ser feita a PCR



A partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de cDNA. A transcriptase reversa utiliza um pequeno trecho iniciador, feito de DNA de fita simples (denominado primer) que se pareia ao RNA para começar o alongamento da fita de cDNA. Para isso, é interessante a escolha de um primer adequado, havendo três possibilidades mais utilizadas:

- Primer *poli T*, que se pareia com o trecho na extremidade 3' do RNA mensageiro, que nos eucariotos é uma cauda *poli A*
- Primers randômicos (ou oligo dT), que se pareiam aleatoriamente em qualquer trecho da sequência de RNAs mensageiros, ribossomais e transportadores
- Primers específicos para a sequência de interesse



Cada um dos tipos tem as suas vantagens e desvantagens, sendo influenciados principalmente pelo tipo de RNA de interesse e seu estado de conservação, visto que o RNA é uma molécula facilmente degradável. Após a síntese de cDNA a partir do RNA, pode-se usar uma enzima que degrade o RNA, usualmente a RNase H, que degrada apenas RNA que esteja pareado com DNA. Ao cDNA aplica-se então a técnica de PCR.

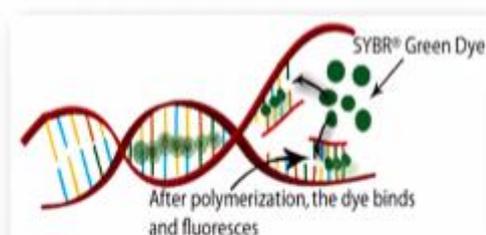
4.3 – PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A tecnologia de PCR em Tempo Real (qPCR) é uma evolução do método de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase). O resultado dessa versão da PCR é visualizado imediatamente, dispensando a eletroforese. Isto é possível pela adição de sondas fluorescentes às reações de PCR. A amplificação do DNA-alvo é monitorada durante o processo de qPCR. À medida que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente. Por meio do monitoramento da taxa de aumento da fluorescência na reação é possível determinar com precisão a quantidade de DNA alvo presente na amostra original (alta ou baixa carga)

- Como?

Fluoróforos

Baseia-se na detecção e quantificação de um corante fluorescente (reporter) que aumenta o sinal diretamente proporcional ao aumento do produto de PCR formado.



4.3.1 – SYBR GREEN é um corante que se intercala na dupla fita de DNA, e se há o aumento da duplicação das dupla-fitas ele aumenta de forma proporcional a intensidade da fluorescência (limitação inespecífica pois ele intercala em fita dupla de *qualquer* DNA) ou seja melhor visualização de quantas duplicações houve na PCR

4.3.2 – TaqMan:

Sonda de Hidrólise (TaqMan[®])

- ❖ Óligo nucleotídeo desenhado para uma região alvo específica.
- ❖ Varia de tamanho. Na extremidade 5' há uma molécula fluorescente ancorada (Reporter – R) que deverá ser detectada ao longo da PCR.
- ❖ Na extremidade 3' há outra molécula denominada Quencher (Q).



- ❖ Quando essas moléculas estão próximas, acontece uma troca de energia entre elas inibindo a fluorescência do Repórter.

5. Aplicações da técnica de PCR

A RT-PCR é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese de proteínas. Se há uma proteína específica presente, é porque o gene da mesma está sendo expresso e originando mRNA para tal proteína.

Atualmente, existem técnicas que permitem a análise de todo o RNA presente em uma dada célula em um dado momento (denominado transcriptoma). Tais técnicas, que são parte da transcriptômica, são muito importantes se for considerado que os tipos de RNAs mensageiros sendo expressos variam conforme o tipo de célula (células musculares produzem proteínas em quantidade e tipo diferente de células da pele), com a situação da célula (células em ambiente com pouco oxigênio expressam proteínas diferentes das de em ambiente com muito oxigênio) e a idade/fase da célula (células em período de multiplicação produzem proteínas diferentes das que apenas estão crescendo em tamanho).

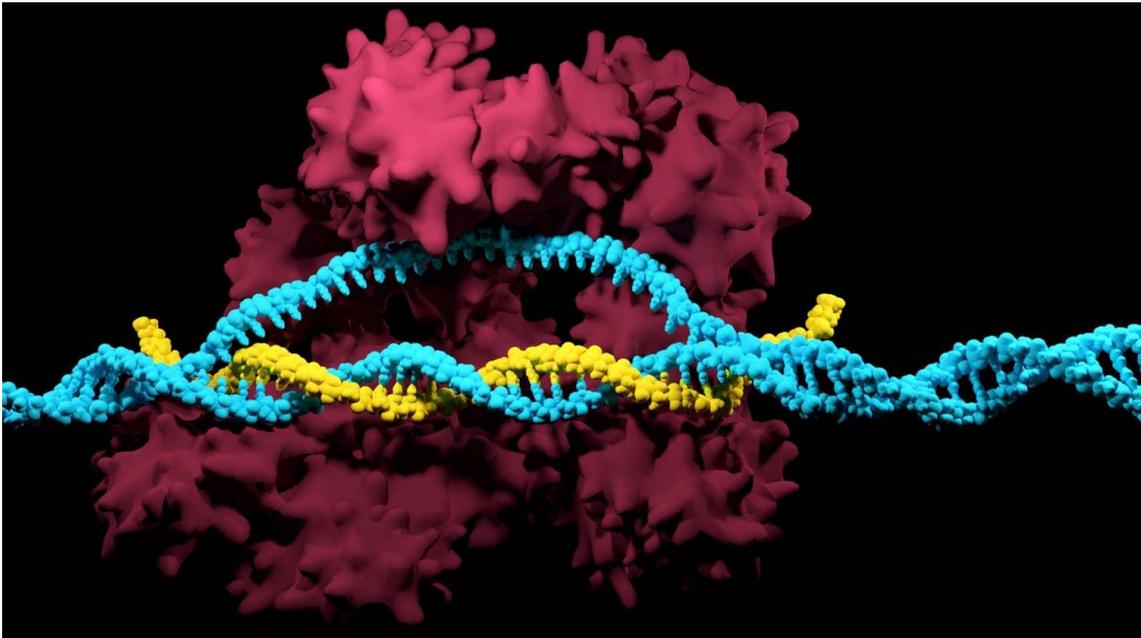
Capitulo 9

Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Introdução

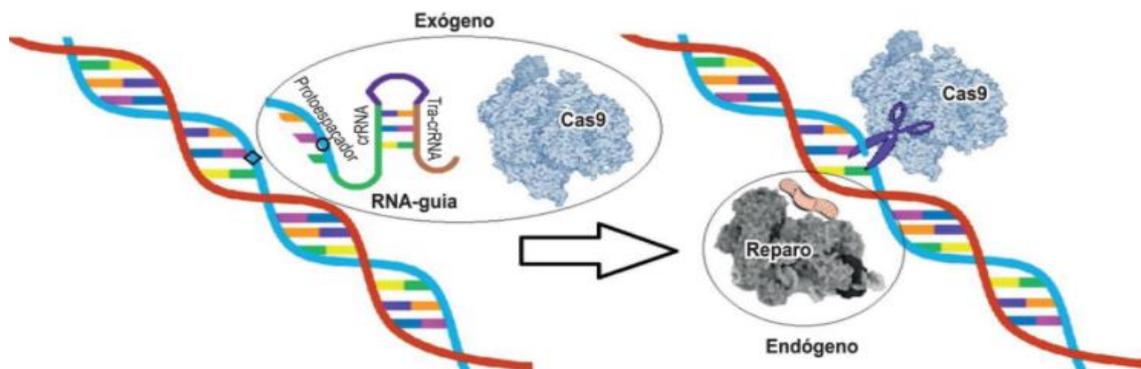
The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ou em português, O sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas é uma técnica desenvolvida pela bioquímica Jennifer Doudna (UCLA) juntamente com a microbiologista e imunologista francesa Emmanuelle Charpentier, do instituto Max Planck, que possibilita por meio de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano a edição de um genoma, utilizando também um processo de clivagem do DNA e uma endonuclease (Cas9) que é guiada a partir de uma sequência de RNA capaz de se parear com as bases de uma sequência.

A estrutura genética do CRISPR, no sistema bacteriano, é constituída de repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespaçadas. As repetições e os espaçadores quando são transcritos, formam o *RNA transativador* (ou RNA guia), que serve para direcionar a enzima Cas9, uma nucleasse, ao alvo. Aproveitando-se desta estratégia, tanto a proteína Cas9 quanto o RNA guia, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células e direcionados a locais específicos do genoma, para que provoquem quebras na fita dupla. Após esta clivagem, a maquinaria molecular intrínseca do organismo, responsável pela correção de erros no genoma, é utilizada para alterar a sequência de DNA, adotando a modificação.



Desta forma, o sistema pode ser utilizado tanto para reparar mutações (restaurando a função gênica) quanto para introduzir mutações novas (causando o "nocaute" gênico). Assim, conciliando sofisticadas técnicas moleculares e biotecnológicas, o sistema CRISPR/Cas9 foi publicado no ano de 2012 em um artigo –que inclusive proporcionou às cientistas a vitória do Nobel de 2020 – como uma aplicação em edição genômica, e hoje já se encontra comercialmente disponível para milhares de alvos. Tanto o RNA guia e a proteína Cas9, produzidos *in vitro*, podem ser entregues às células usando diferentes mecanismos, tais como uso de vetores ou agentes químicos.

2. A técnica



O RNA guia é projetado para reconhecer a sequência-alvo a ser modificada no DNA e introduzir modificações. Quando o pareamento de bases nitrogenadas ocorre (em função do anelamento da sequência-alvo com a região do protoespaçador do RNA guia), algumas modificações são adicionadas (aqui, representadas pelo círculo) e a enzima Cas9 é acionada, causando quebras na dupla-fita de DNA (onde há falhas de pareamento em razão das mutações introduzidas). As quebras ativam os sistemas de reparo intracelulares que refazem a dupla-fita, aceitando as modificações oriundas do RNA guia. As novas mutações, de forma geral, causam falhas na sequência e geram proteínas não-funcionais. Mas o mecanismo pode ser utilizado também para corrigir mutações originalmente presentes no DNA e gerar proteínas funcionais.

O sistema CRISPR/Cas9 está sendo rapidamente adotado para a edição e modificação de genomas em vários tipos celulares, incluindo células-tronco,⁹ e mostrando bons resultados na edição de genes humanos.

[Vídeo disponibilizado pela Nature explicando a técnica]: <https://www.youtube.com/watch?v=4YKFW2KZA5o>

Capítulo 10

Métodos de sequenciamento genético

1. Introdução

O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nesta estrutura, identificar a ordem dos nucleotídeos componentes, detecção de mutações, tipagem de microorganismos e/ou a determinação de polimorfismos.

Para determinar a ordem das bases dos nucleotídeos adenina, timina, citosina e guanina na molécula do DNA foram usados dois métodos: uma desenvolvida por Alan Maxam e Walter Gilbert, que é baseada em hidrólise química, e outra por Frederick Sanger e cols que se baseia em reações enzimáticas), que permitiram determinar a sequência de nucleotídeos de fragmentos maiores de DNA.

2. Maxam e Gilbert

Allan Maxam e Walter Gilbert desenvolveram dentro do período de 1976 – 1977 um método de sequenciamento de DNA baseado na modificação química do DNA e na clivagem subsequente de bases específicas. Técnica essa baseada na Marcação da extremidade 5', na Aliquotas da amostra de DNA divididas em 4 tubos, promoção de modificação na base, reação de clivagem, eletroforese em gel, autorradiografia e na interpretação dos resultados

2.1 – O processo de Allan e Walter

Figura 1: Modificações Químicas e Clivagem

> Modificações das bases usando **Dimetil Sulfafo (DMS)**

- **Purinas: Adenina e Guanina**

- > Apenas DMS: **G**
- > DMS + Ácido fórmico (FA): **G + A**

> **Clivagem na coluna de fosfato e açúcar**

Figura 2: Início do processo

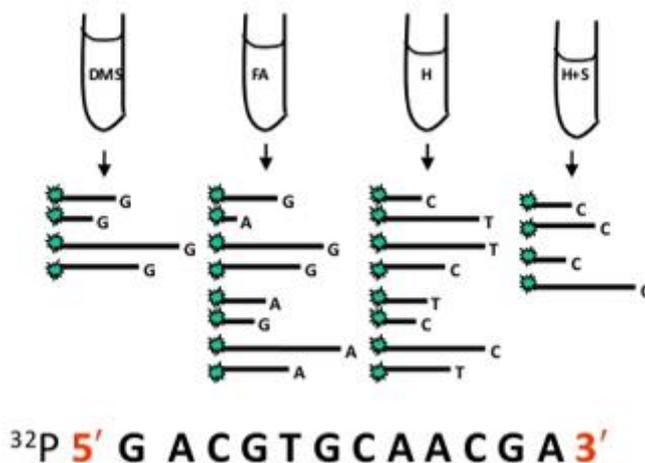


Figura 3: Eletroforese e Autoradiografia

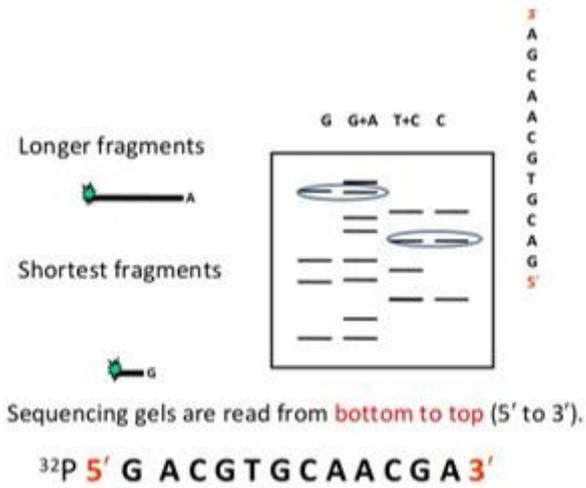
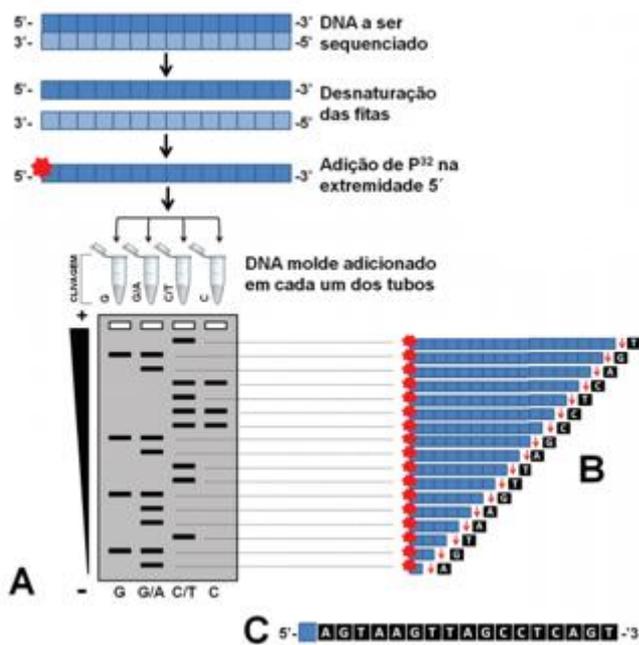


figura 4:



As bandas geradas após a “corrida” destes fragmentos em gel de poliacrilamida podem ser visualizadas após a impressão de um raio X. A determinação da sequência de nucleotídeos é obtida “lendo-se” de baixo para cima, um a um, os nucleotídeos representados pelas bandas do gel

3. Sanger



A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase

F. SANGER AND A. R. COULSON

*Medical Research Council
Laboratory of Molecular Biology
Hills Road, Cambridge CB2 2QH, England*

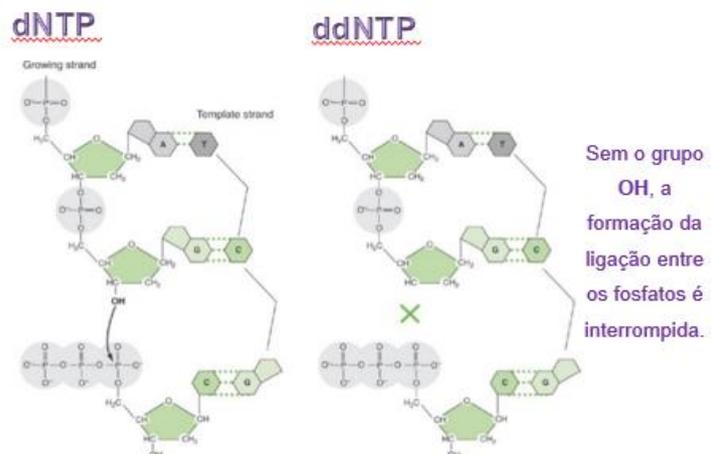
Regiões de DNA com até 900900900 pares de base de comprimento são rotineiramente sequenciados pelo método Sanger de sequenciamento ou método de terminação da cadeia. O método Sanger foi desenvolvido pelo bioquímico britânico Fred Sanger e seus colaboradores, em 1977.

Neste método o DNA alvo é copiado muitas vezes, produzindo fragmentos de comprimentos diferentes. Nucleotídeos “terminadores de cadeia” fluorescentes marcam os finais dos fragmentos e permitem que a sequência seja determinada

Para o método Sanger os ingredientes necessários são similares àqueles usados para replicação de DNA em um organismo ou para PCR, ou seja: Uma enzima DNA polimerase, um primer, que é um pequeno fragmento de DNA de fita simples que se liga ao DNA molde e atua como um "iniciador" para a polimerase, Os quatro nucleotídeos do DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), O DNA molde a ser sequenciado Entretanto, uma reação de sequenciamento de Sanger contém um ingrediente único: Versões Dideoxi, ou terminadores de cadeia, para os quatro nucleotídeos, tendo cada um deles sua marcação com um corante de uma cor diferente.

A ausência do grupo OH na posição 3' impede a entrada de um novo nucleotídeo (por isso este método é também conhecido como “terminador de cadeia” ou “didesoxi”).

Após a adição de ddNTP ocorre a inibição da síntese da cadeia. Usa-se baixas concentrações de ddNTP e altas concentrações de dNTP

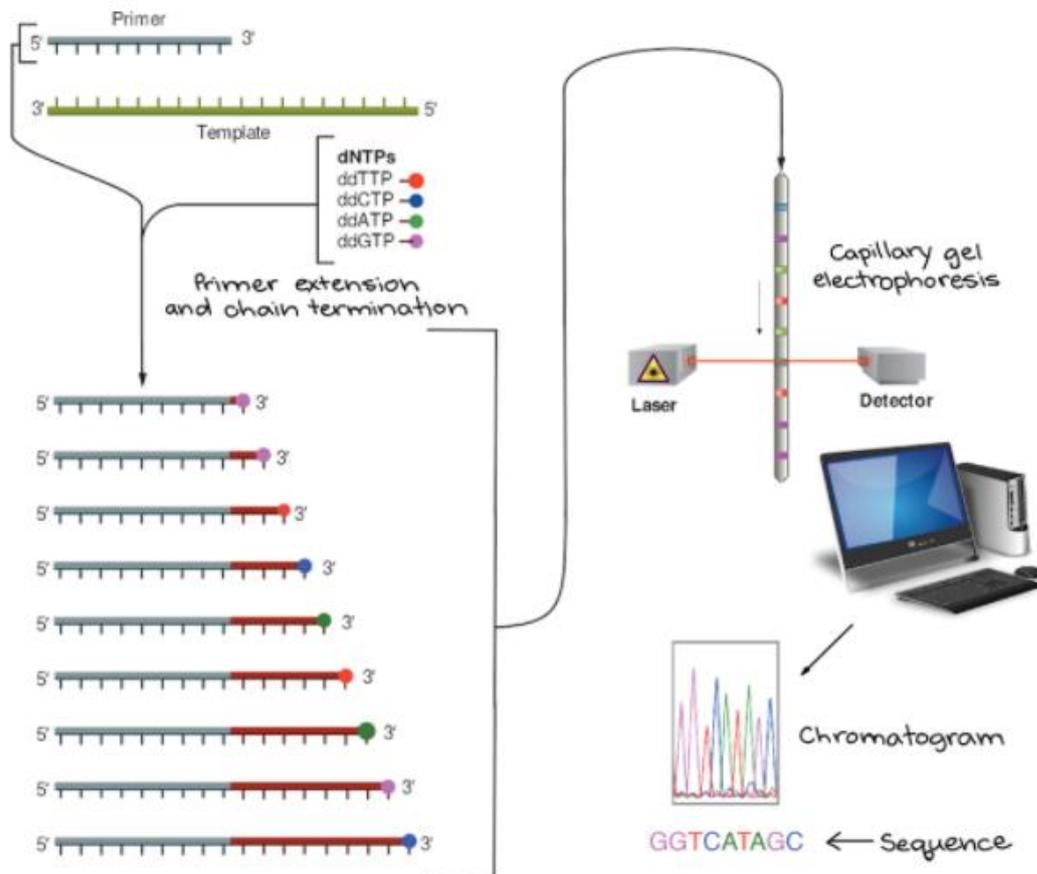


3.1 O processo

A amostra de DNA a ser sequenciada é combinada em um tubo com primer, a DNA polimerase e nucleotídeos de DNA. Os quatro nucleotídeos terminadores de cadeia marcados com corantes são adicionados também, mas em concentração muito menor que a dos nucleotídeos comuns.

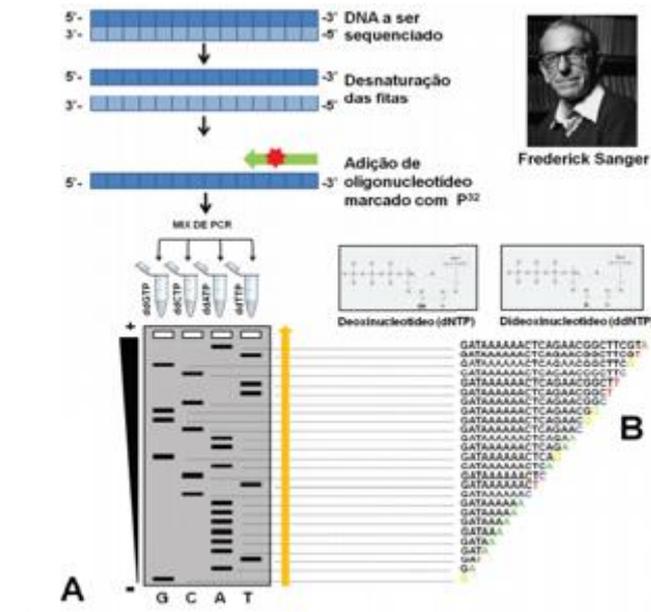
A mistura é primeiramente aquecida para a desnaturação do DNA molde, afim de separar as fitas, e então resfriadas para que os primers possam se ligar ao molde de fita simples. Uma vez que o primer se liga, a temperatura é aumentada novamente para permitir que a DNA polimerase sintetize um novo DNA a partir do primer. A DNA polimerase continua a adicionar nucleotídeos à cadeia até que aconteça a adição de um dideoxynucleotídeo ao invés de um normal. Nesse ponto, os nucleotídeos não podem mais ser adicionados, e então a fita termina em um dideoxynucleotídeo

Este processo é repetido em um número determinado de ciclos e quando o ciclo se completa, é praticamente garantido que um dideoxynucleotídeo terá se incorporado em todas as posições do DNA alvo em pelo menos uma reação. Ou seja, o tubo irá conter fragmentos de diferentes comprimentos, terminando em cada uma das posições de nucleotídeos no DNA original e com as extremidades dos fragmentos serão rotuladas com corantes que indicam o nucleotídeo final.

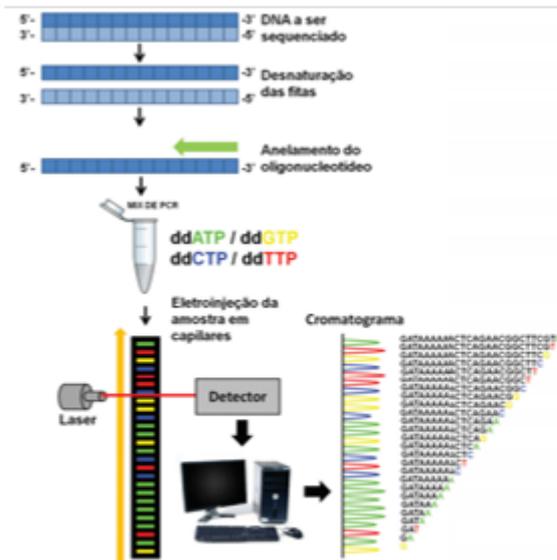


Depois que a reação é executada, os fragmentos são levados através de um longo e fino tubo contanto uma matriz de gel em um processo chamado de electroforese capilar em gel. Pequenos fragmentos movem-se rapidamente através dos poros do gel, enquanto longos fragmentos movem-se mais devagar. Assim que cada fragmento cruza a "linha de chegada" no final do tubo, ele é iluminado por um laser, permitindo que o corante anexado seja detectado. O menor fragmento (que termina apenas um nucleotídeo após o primer)

atravessa a linha de chegada primeiro, seguido do próximo menor fragmento (terminando dois nucleotídeos após o primer), e assim por diante. Portanto, a partir das cores dos corantes registradas uma após a outra no detector, a sequência do pedaço original de DNA pode ser construída com um nucleotídeo por vez.



4. O aprimoramento do método de Sanger



- 1) desnaturação da dupla fita, ddNTP marcados com compostos fluorescentes são incorporados à cadeia nascente de DNA sintetizada pela DNA polimerase.
- 2) Através de um sistema de eletronejeção, os fragmentos de DNA recém-sintetizados começam a migrar e encontram, num determinado ponto, um feixe de raios laser que excita os fluoróforos fazendo com que estes emitam fluorescência característica de um dos quatro tipos de nucleotídeos.
- 3) Um detector registra a intensidade e comprimento de onda desta fluorescência e a transmite a um computador que possui um software capaz de converter fluorescência em picos coloridos (cromatograma) que são decodificados na sequência de nucleotídeos do fragmento

O princípio do método proposto por Sanger permaneceu o mesmo. A técnica foi aprimorada ficando mais simples, rápida e segura por não utilizar compostos radioativos prejudiciais a saúde humana. A principal modificação foi a adição aos didesoxinucleotídeos, de corantes capazes de emitir fluorescência quando ativados por um comprimento de onda específico. O método aprimorado utiliza fluoróforos diferentes para cada um dos quatro tipos de didesoxinucleotídeos, que ao serem excitados, emitem luz característica do didesoxinucleotídeo incorporado.

Como consequência da incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados com fluorescência, as quatro reações passaram a ocorrer num tubo único e seu conteúdo podia agora ser aplicado numa única canaleta do gel. Este fato fez com que o número de amostras analisadas por corrida fosse quatro vezes maior.

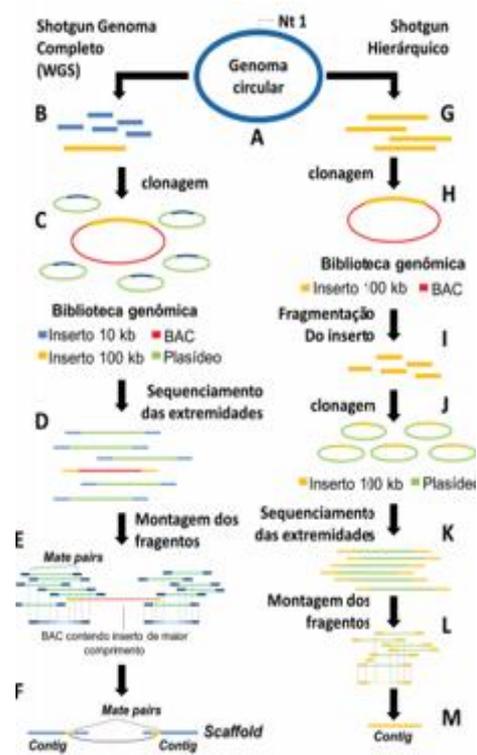
ABI 377: Este sequenciador detecta a fluorescência emitida pelos didesoxinucleotídeos e a decodifica para determinar a sequência de nucleotídeos do fragmento de interesse.

Os géis foram substituídos por finíssimos capilares preenchidos com gel onde os fragmentos de DNA são separados em altíssima velocidade. As amostras são aplicadas, através de um sistema de eletronejeção diretamente nos capilares. Após a eletronejeção, os fragmentos começam a migrar e encontram, num determinado ponto, um feixe de raios laser que excita os fluoróforos presentes na extremidade 3' de cada fragmento fazendo com que estes emitam fluorescência característica de um dos quatro tipos de fluoróforos. Um detector registra esta fluorescência e a transmite para um computador que possui um software capaz de converter fluorescência em picos coloridos, sendo utilizado uma única cor para cada um dos quatro tipos de nucleotídeos (verde para adenina, preto para guanina, azul citosina e vermelho para timina)

4.1– Estratégias pro sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento automatizado, descrita anteriormente, permitir sequenciar com qualidade, aproximadamente 700 nucleotídeos consecutivos de um fragmento é necessário “picotar” o DNA em fragmentos menores, sequenciar os pedacinhos obtidos depois sobrepô-los em busca do genoma completo. As técnicas de fragmentação são várias - Exs: enzimas de restrição de corte frequente e quebra aleatória por fragmentação mecânica do genoma a ser sequenciado (shotgun).

O termo shotgun Consiste em “atirar no escuro” ou seja, bombardear aleatoriamente o genoma a ser sequenciado com partículas que promovem sua fragmentação. Após este passo, obtêm-se a biblioteca genômica pela inserção de cada inserto num vetor apropriado. Fragmentos clonados pequenos (no máximo 1400pb) podem ser completamente sequenciados somente com o uso de *primers* que anelam no vetor.



Informações finais de desenvolvimento

- Escrita e formatação do portfólio: Mariana Passos
- Revisão e correção de literatura:
 - Capítulo 1 ao 4 – Gabriella Christine e Milena Dalalibere
 - Capítulo 5 e 6 – Milena Dalalibere
 - Capítulo 7 – Rodrigo Lima
 - Capítulo 8 ao 10 – Mariana Passos
- Materiais consultados: Resumos pessoais (Mariana e Gabriella) slides disponibilizados na plataforma sobre o conteúdo abrangente neste portfolio e também a gravação das aulas.

Nota Final

Gostaríamos de, primeiramente, agradecer a você por ser uma professora extraordinária. Biologia molecular é uma matéria complexa e extremamente densa, mas com o seu senso de humor e compreensão as aulas ficam 100% mais leve, o animo pra estudar o conteúdo e participar aumenta e o aprendizado também. Você é uma pessoa incrível e é graças a isso que nos apegamos tanto a você, a sua matéria no ano de 2020 e a matéria de 2019 também. Sermos seus alunos foi e sempre será uma honra, é um tremendo privilegio ter convivido com você durante tanto tempo. Esperamos que mais pra frente tenhamos essa sorte de novo.

Fizemos esse portfolio com muito zelo, carinho e admiração. O trabalho ser tão grande e detalhado foi uma tentativa de mostrar que tentamos absorver ao máximo o conteúdo que a senhora nos passou durante esse ciclo de biologia molecular. Mostrar que seu esforço em montar as aulas e achar uma didática que entregasse tudo a nós realmente funcionou. Esperamos que você goste.

Att, Mariana Passos, Gabriella Christine, Milena Dalalibere e Rodrigo Silva.