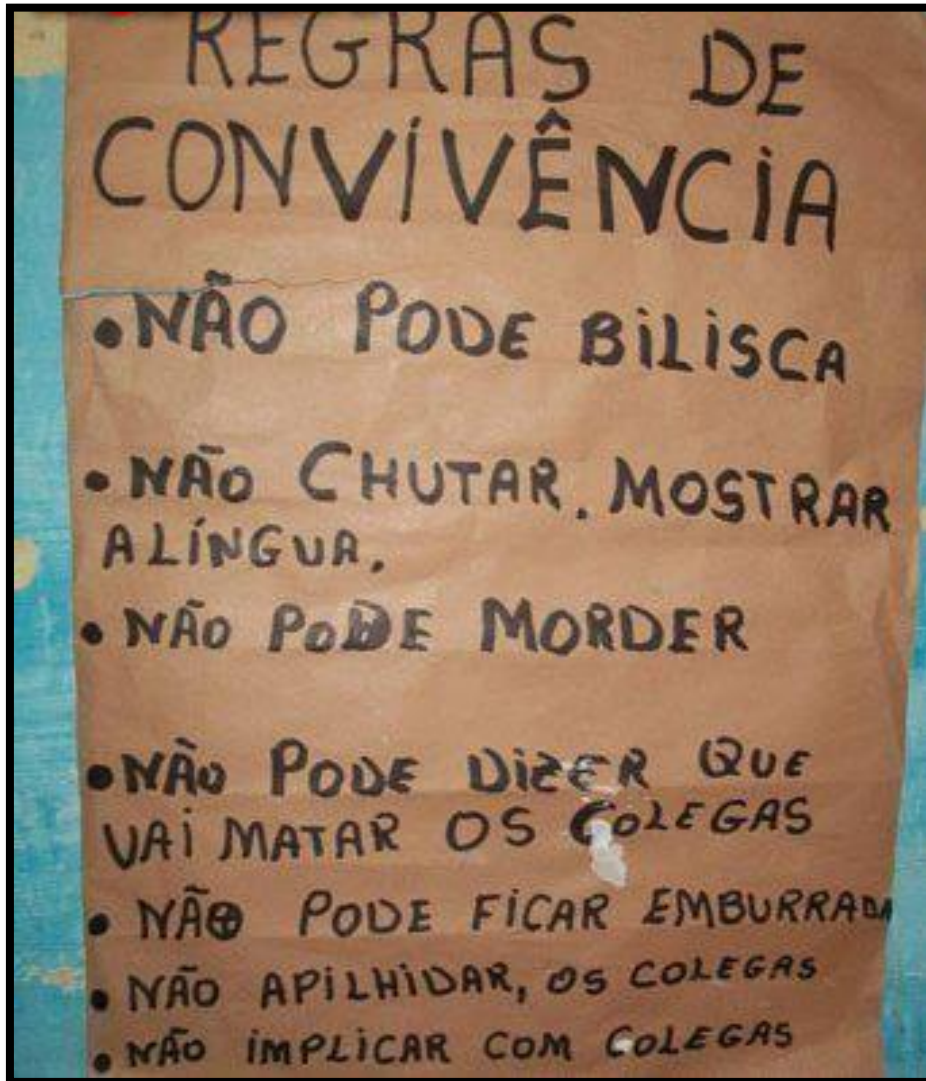


Os princípios da clonagem molecular: DNA recombinante

Deise Schroder Sarzi

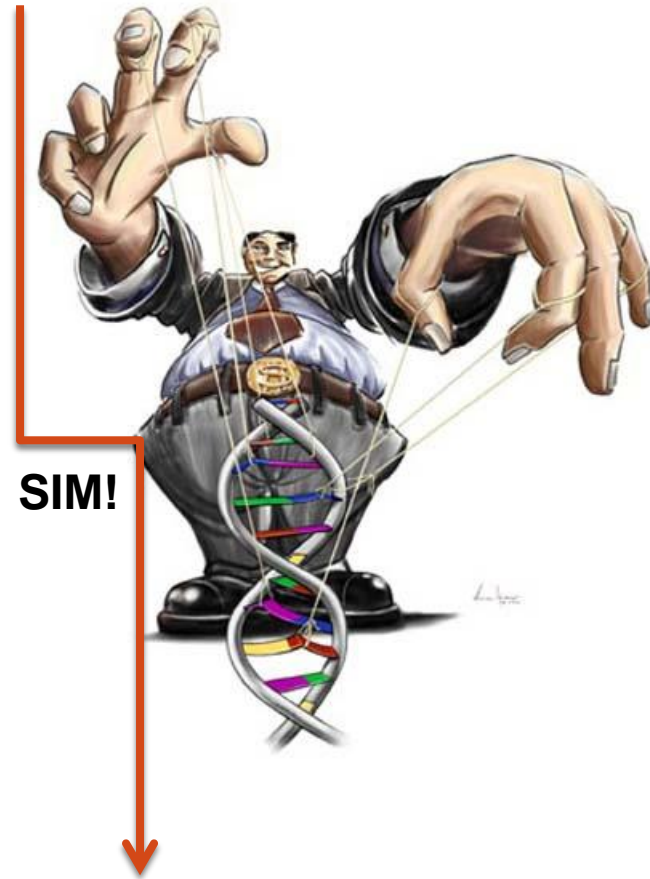
Estudo dirigido: TRINCAS



- 14/05 – Aula de revisão e dúvidas
- 16/05 – Avaliação e entrega do ED

Sabemos como a maquinaria funciona, podemos manipular?

- DNA é o repositório da informação genética
- Formado por duas cadeias de Ácido Deoxirribonucleotídico;
- As duas cadeias são complementares;
- Orientam-se em direções opostas;
- É “estável” ;
- Pode ser desnaturado e renaturado;
- Pode ser sintetizado quimicamente;
- **As propriedades do DNA são universais!**



SIM!

Tecnologia do DNA Recombinante:

Conjunto de técnicas que permitem a manipulação de moléculas de DNA específicas, considerando as propriedades do DNA.

Clonagem molecular/ DNA recombinante

O que é? Para que serve?

- Permite pegar um “pedaço” do DNA e combiná-lo com outro, produzindo muitas cópias de diferentes combinações genéticas.
- Clonar significa fazer uma cópia geneticamente exata, seja de um **organismo completo** ou até mesmo de um **pequeno fragmento de DNA**.
- Desde os **anos 60** uma série de descobertas revolucionaram o estudo da genética e permitiram um grande desenvolvimento da engenharia genética.

Uso de enzimas para executar passos específicos de manipulação do segmento de DNA alvo

- 1 – Moléculas específicas de DNA podem ser amplificadas - **Reação em cadeia da polimerase – PCR**
- 2 – O DNA pode ser cortado em posições específicas - **Endonucleases de restrição**
- 3 – Seleção de pequenas moléculas de DNA capazes de auto-replicação - **Vetores** contendo marcas de seleção
- 4 – Diferentes moléculas de DNA podem ser ligadas covalentemente - **DNA-Ligase**
- 5 – Moléculas de DNA sintéticas podem ser inseridas em células vivas - **Transformação** de células Geração de OGMs
- 6 – Células contendo o DNA recombinante pode ser selecionada - **Seleção do clone** de interesse

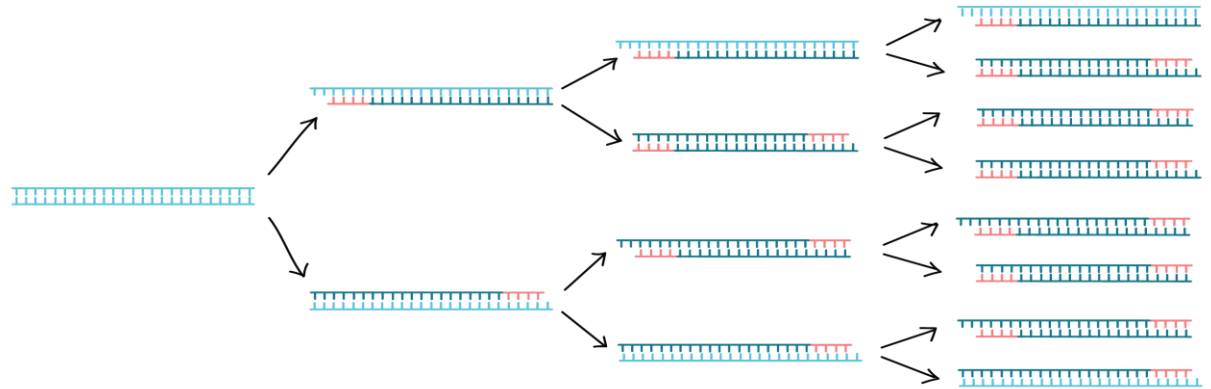
Reação em cadeia da Polimerase - PCR

- Kary Mullis Nobel Prize winner Chemistry (1993)
- **Ciclo térmico** de síntese *in vitro* de DNA pela DNA pol
- Permite a **amplificação de um fragmento de DNA específico**
- Necessita de **primer** = iniciador = oligonucleotídeo sintético específico
- Desenho do Primer :
 - São oligonucleotídeos de DNA (**~20 pb**) complementares ao DNA de interesse
 - Usa o fato da DNApol necessitar de um iniciador para a polimerização - **Deve Flanquear a sequência de DNA de interesse**
 - Pode carregar modificações na sequência para **introduzir sítios de restrição para endonucleases**

Reação em Cadeia da Polimerase

Polymerase Chain Reaction - PCR

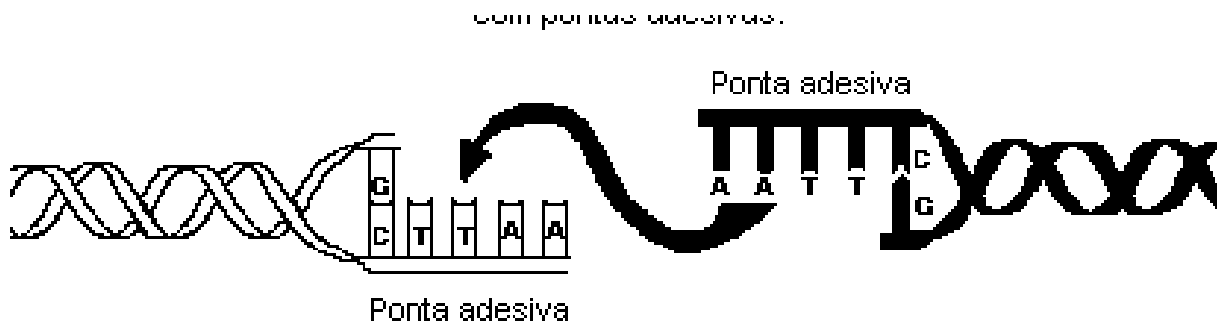
- Reação cíclica que se baseia em 3 etapas:
 - 1º - Desnaturação do DNA - ~95 °C
 - 2º - Anelamento do Primer - ~45-65 °C
 - 3º - Polimerização - 72 °C
- Depende de DNA pol termoestável: - *Thermus aquaticus* polimerase:
Taq polimerase



- Requer:
 - DNA molde
 - Par de primers flanqueando o DNA molde ²
 - Os 4 dNTPs - Mg²⁺

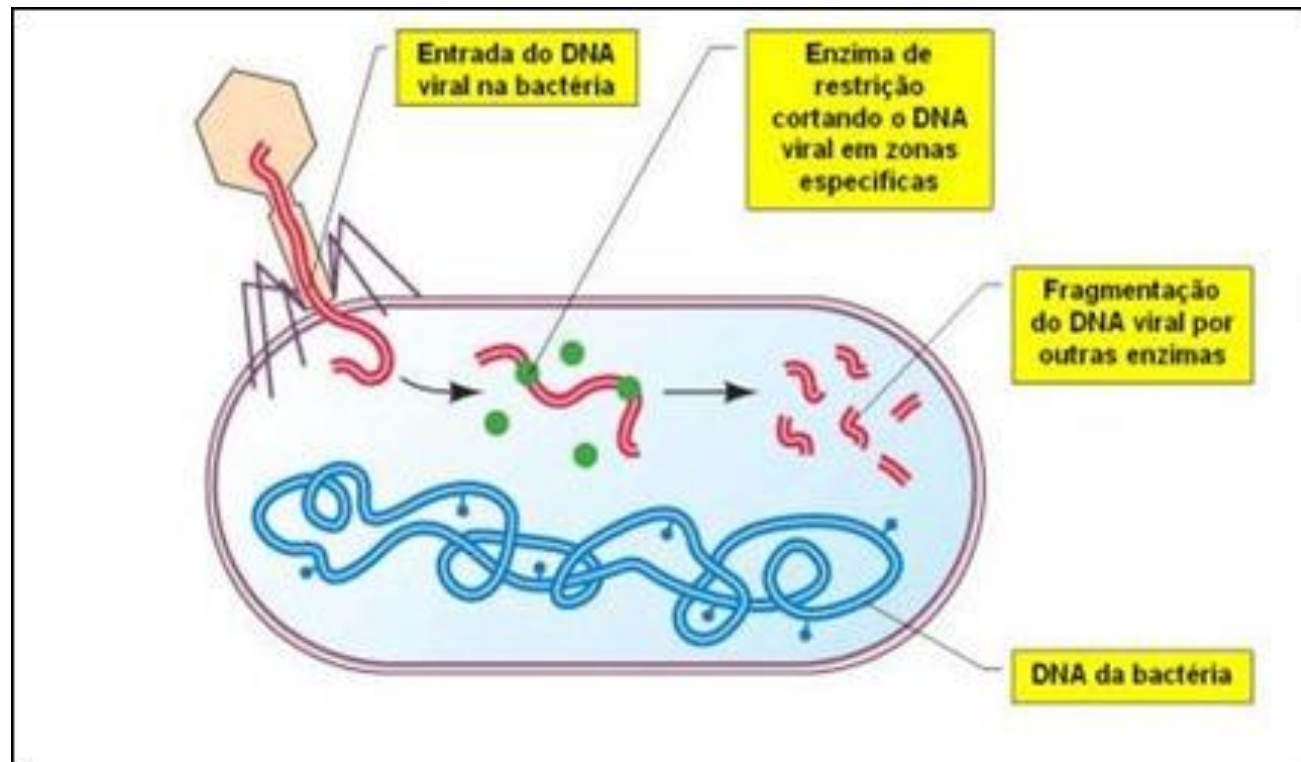
Endonucleases/enzimas de restrição

- É uma enzima **encontrada em bactérias** que reconhece uma sequência alvo específica e **corta o DNA** em dois pedaços neste sítio ou próximo a ele.
- Cada enzima de restrição reconhece apenas uma ou algumas sequências específicas de DNA, chamadas **sítios de restrição**.
- Ocorre em um padrão arrumado, previsível.
- Produzem extremidades cortadas com saliências curtas de fita simples extremidades **“pegajosas”**.
- Extremidades pegajosas são úteis em clonagem porque seguram dois pedaços de DNA que podem ser ligados **pela DNA ligase**.



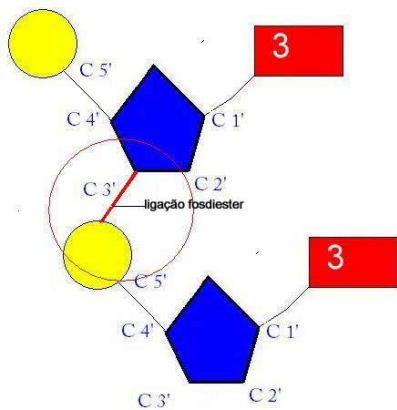
Por que bactérias possuem enzimas de restrição?

- Acredita-se que as enzimas de restrição **evoluíram como um mecanismo de defesa**, permitindo que as bactérias cortem os DNAs estranhos que são potencialmente prejudiciais (por exemplo, o DNA dos vírus infectantes de bactérias).

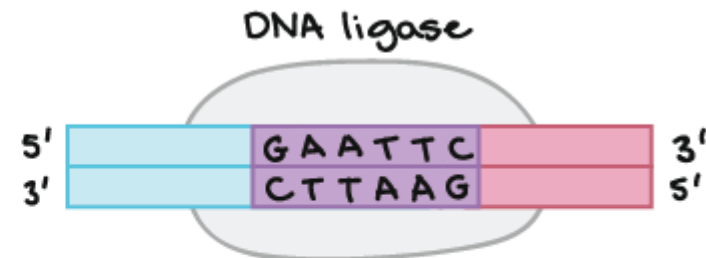


DNA Ligase

- Replicação: ligases unem fragmentos de DNA recém sintetizados para formar uma fita sem emenda.
- As ligases de clonagem de DNA fazem basicamente a mesma coisa: **unem dois pedaços de DNA com terminações complementares para fazer uma molécula intacta.**
- Usa o ATP para catalisar uma reação em que o grupo **fosfato** terminal da **extremidade 5'** de uma fita de DNA é ligado ao grupo **hidroxila** terminal da **extremidade 3'** da outra. Esta reação produz um esqueleto intacto de açúcar-fosfato.



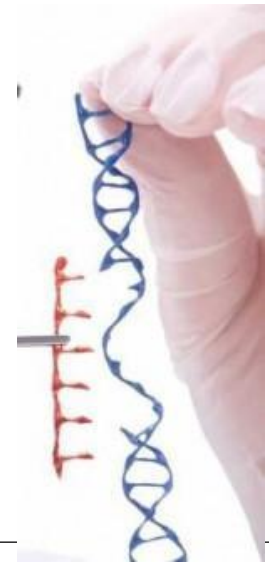
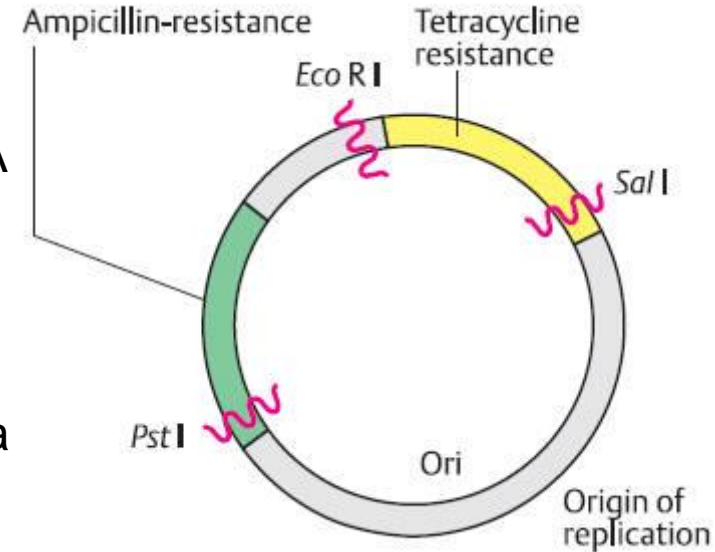
"Sticky ends" stick together,
but gaps remain



Ligase seals the gaps

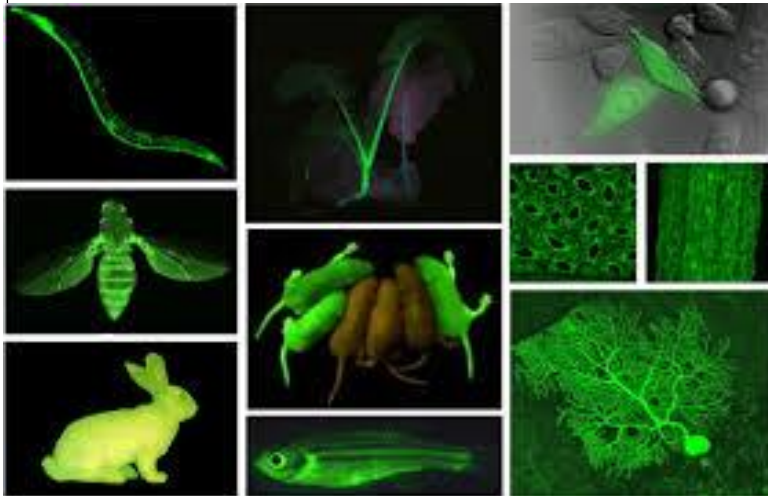
Vetores de clonagem

- ~1970: Trabalho com **plasmídeos** - peças de DNA circulares e não cromossomais encontradas em bactérias
- Condições necessárias:
- Ter uma **origem de replicação**, que consiste numa sequência de DNA que permite **a replicação do vector** na célula hospedeira;
- Possuir Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC), ou seja, vários locais únicos de clivagem para **endonucleases de restrição**, os quais constituem o **sítio de inserção** no vector de clonagem;
- Conter um gene que codifique uma substância que possa **distinguir uma célula transformada de uma não transformada**. Muitas vezes, são utilizados genes que conferem **resistência a um antibiótico**.



O que, então, era possível fazer?

- Pegar o DNA de qualquer espécie, picotá-lo e inseri-lo em uma bactéria que o amplificaria milhões de vezes
- ENGENHARIA GENÉTICA
- Mas o que se pode fazer? Até onde podemos chegar?
 - Ninguém sabe ao certo...



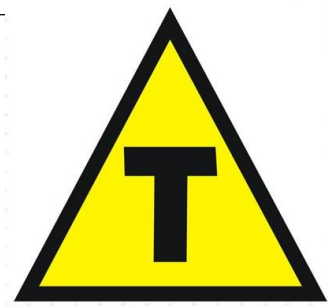
Discussões éticas – engenharia genética

- 1970 - Riscos possíveis da Engenharia Genética – necessidade de uma regulamentação
- Conferência de Asilomar (Califórnia – 1975)
 - Princípios de Biossegurança
- Lei de biossegurança no Brasil: **LEI Nº 11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005**
 - Esta Lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a **construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGM** e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.
- Para Watson, a natureza já fez muitos mais experimentos, por muito mais tempo e muitos mais jeitos do que podemos imaginar e nada de muito significativo aconteceu...
 - Se fosse causar algum dano, a natureza *per se* já teria causado...

O DNA recombinante hoje

- Há centenas de vetores de clonagem comerciais, cada um com vantagens específicas (encontrar promotores, descobrir interações entre genes, expressar proteína em larga escala, etc)
- DNAs das mais variadas espécies são clonados a todo instante em laboratórios de biologia molecular em todo o mundo
- Parece que nada de muito anormal aconteceu... Ainda...
 - Será que Watson está certo?

Clonar genes, por quê? OGMs



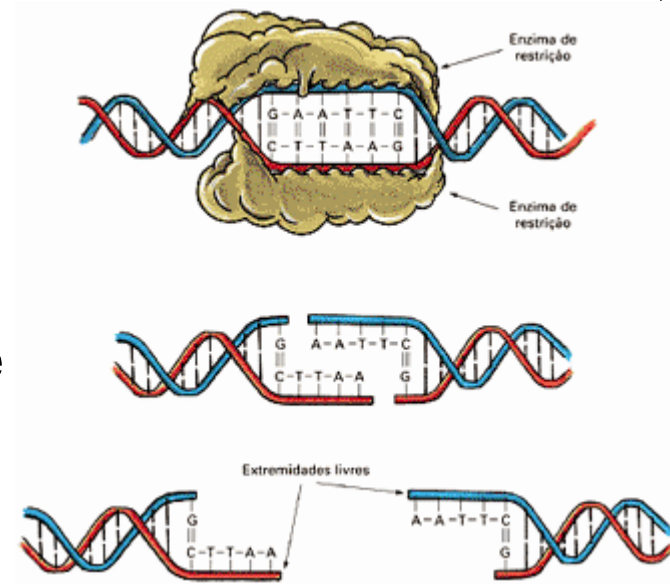
- É preciso diferenciar a **tecnologia** de transgênicos de seu **abuso** pela indústria do capital!
 - Produção de insulina, hormônio de crescimento, etc.
- Genes de resistência a patógenos
 - Milho BT
 - Soja resistente ao glifosato
 - Aumento da produtividade, desequilíbrio ecológico
- Aumento nutricional
 - Adição de determinado aminoácido torna alimentos mais nutritivos (vit A)
- Prejuízo ecológico da monocultura
 - A maior parte do prejuízo ecológico vem da **monocultura**
 - A engenharia genética adiciona um nível de prejuízo ecológico ligeiramente maior

Etapas da clonagem molecular

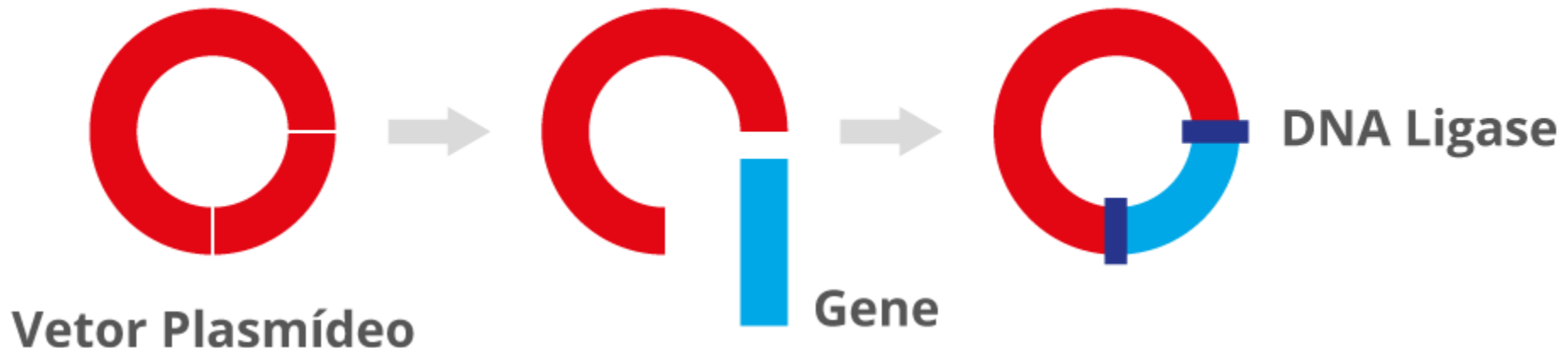
- Escolher um **gene de interesse** -> Desenhar Primer -> Bioinformática
- **Amplificar** o fragmento de DNA -> PCR
- Isolar o fragmento de interesse no gel de agarose -> Eletroforese
- “**Cortar**” **DNA** em posição definida -> **Enzima de restrição**
- Ligar com vetor de clonagem -> **DNA ligase**
- Inserir o DNA-recombinante numa célula competente -> **Transformação**
- Selecionar as células com DNA modificado -> **Seleção dos clones** de interesse

Seleção do gene de interesse e ligação ao vetor

- 1. Isolar o gene de interesse
- 2. Unir o gene ao vetor: **DNA recombinante**: têm origens de replicação e são capazes de se replicar independentemente do cromossomo bacteriano.
- DNA ligase**

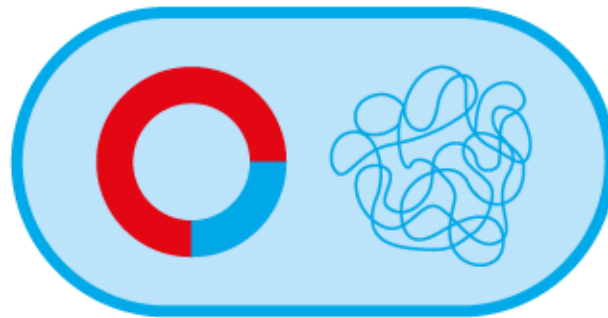


**DNA
Recombinante**



Inserir o plasmídeo em bactéria: Transformação

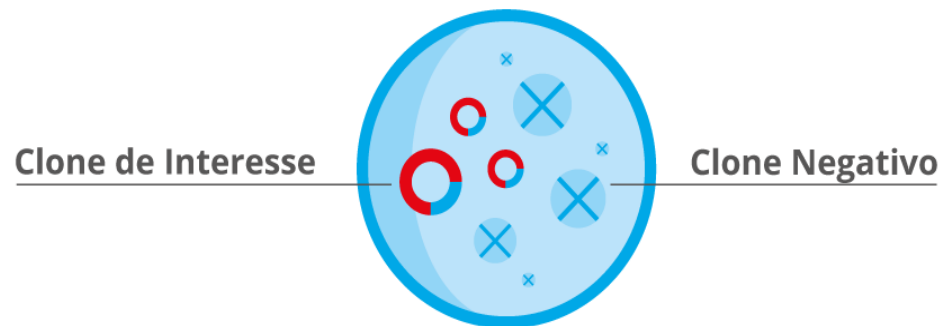
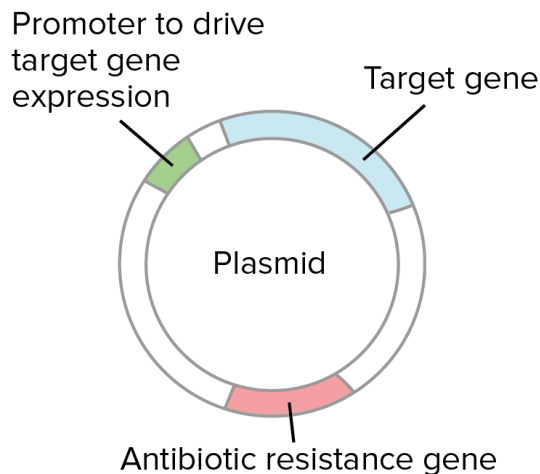
- **Transformação:** introdução do plasmídeo em um organismo hospedeiro, podendo então ser replicadas.
 - **Choque térmico**, choque elétrico (**eletroporação**)
- Copiam o DNA do vetor juntamente com o próprio DNA, criando múltiplas cópias do DNA inserido.
 - *Escherichia coli*
- Algumas células contêm o gene clonado de interesse, ao passo que outras podem conter outros genes do DNA original.



Introdução do Vetor

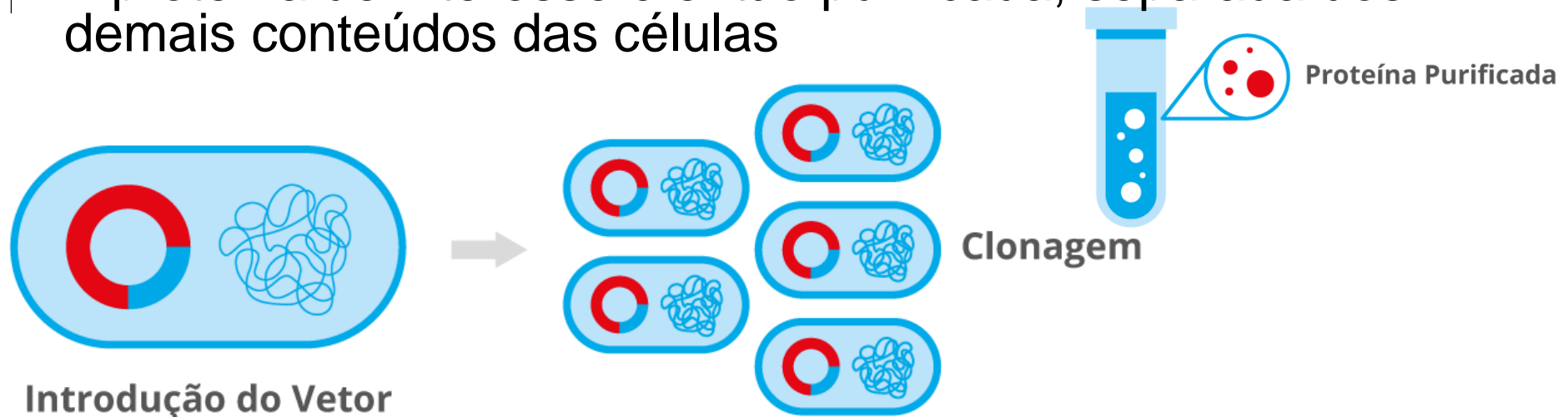
Seleção dos clones recombinantes

- Marcador de resistência a antibiótico nos plasmídeos clonados
- Bactérias são colocadas em uma lâmina de antibiótico
- Bactérias sem um plasmídeo morrem. Cada bactéria *com* um plasmídeo dá origem a um aglomerado de bactérias idênticas, contendo plasmídeo, que são denominadas de **colônia**.



Multiplicação ou expressão do gene

- Após as células com o plasmídeo recombinante serem identificadas, elas podem crescer em grande escala, replicando o fragmento de DNA.
- Servem como “**mini fábricas**”, produzindo grandes quantidades de proteína.
- A proteína de interesse é então purificada, separada dos demais conteúdos das células



Aplicação da técnica de DNA recombinante

- **Insulina** – foi a primeira proteína humana produzida comercialmente utilizando bactérias modificadas por engenharia genética. Hoje outros hormônios e proteínas humanas estão sendo produzidos.
- **Hormônio de crescimento humano** – a administração deste hormônio durante a infância possibilita a correção da baixa estatura em casos correlacionados com a ausência ou pequena produção do hormônio do crescimento (**GH**).
- **Plantas com inseticidas** – A bactéria ***Bacillus thuringiensis*** produz naturalmente uma proteína, conhecida como toxina Bt, letal para muitos insetos. Essa toxina é específica para alguns insetos, degradada rapidamente no ambiente e não tóxica para os humanos e outros animais.
- **Terapia genética** – Em algumas desordens genéticas, os pacientes não possuem a forma funcional de um gene particular. A terapia genética tenta fornecer uma cópia normal do gene para as células do corpo do paciente. É utilizada no tratamento da **fibrose cística**.

É tão fácil produzir proteínas humanas em bactérias?

- Os seres humanos e as bactérias compartilham o mesmo código genético, significando que um gene humano pode ser transcrito e traduzido nas bactérias.
- No entanto, para um gene humano ser expresso em bactérias, ele **não deve ter íntrons**. As bactérias não têm íntrons e não podem emendar transcritos de RNA.
- Uma versão sem íntrons de um gene humano pode ser feita de **RNA que codifica o gene**, utilizando a enzima transcriptase reversa
- A **transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA usando um segmento de RNA como um modelo**. Depois de uma etapa adicional para o DNA de dupla-hélice, é produzida uma versão sem íntrons do gene (chamado de chamada um DNAc)

Transgênicos



MOCINHO?



VILÃO?

