



ICATFCUL

Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

1

ENGENHARIA GENÉTICA

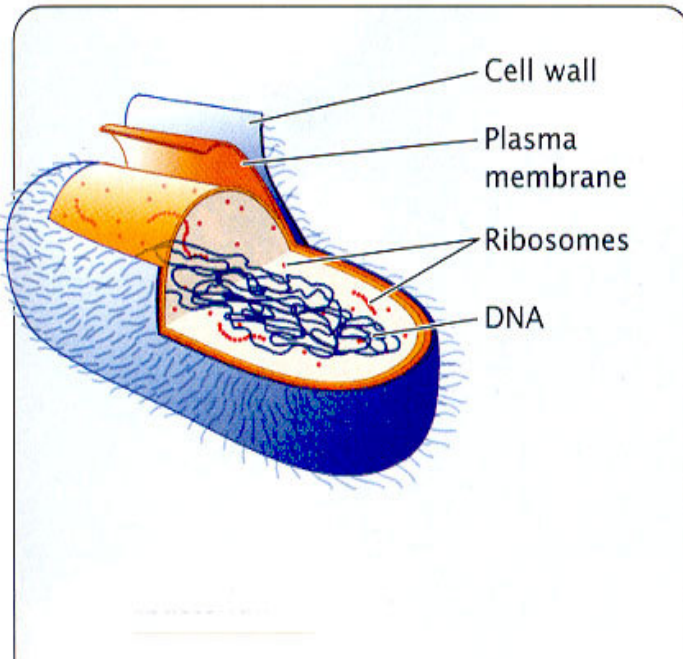
Carlos São José

Maio 2006

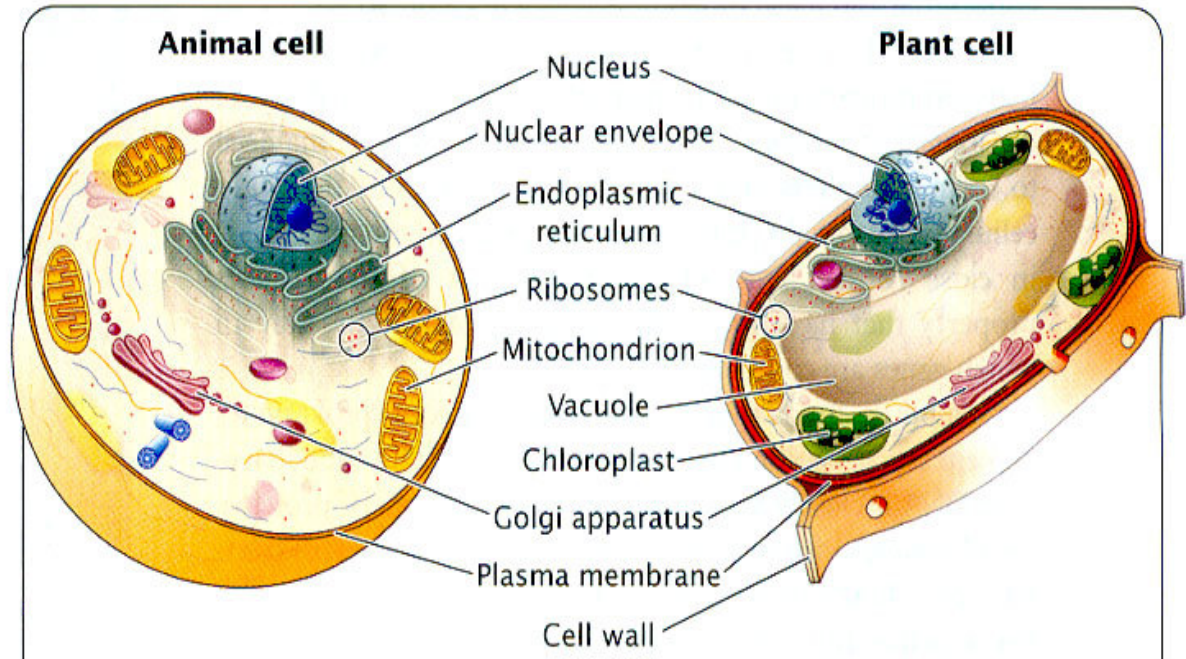
Conceitos Básicos em Biologia/Genética Molecular

- 2 tipos básicos de células: **Procariotas** e **Eucariotas**

Prokaryote



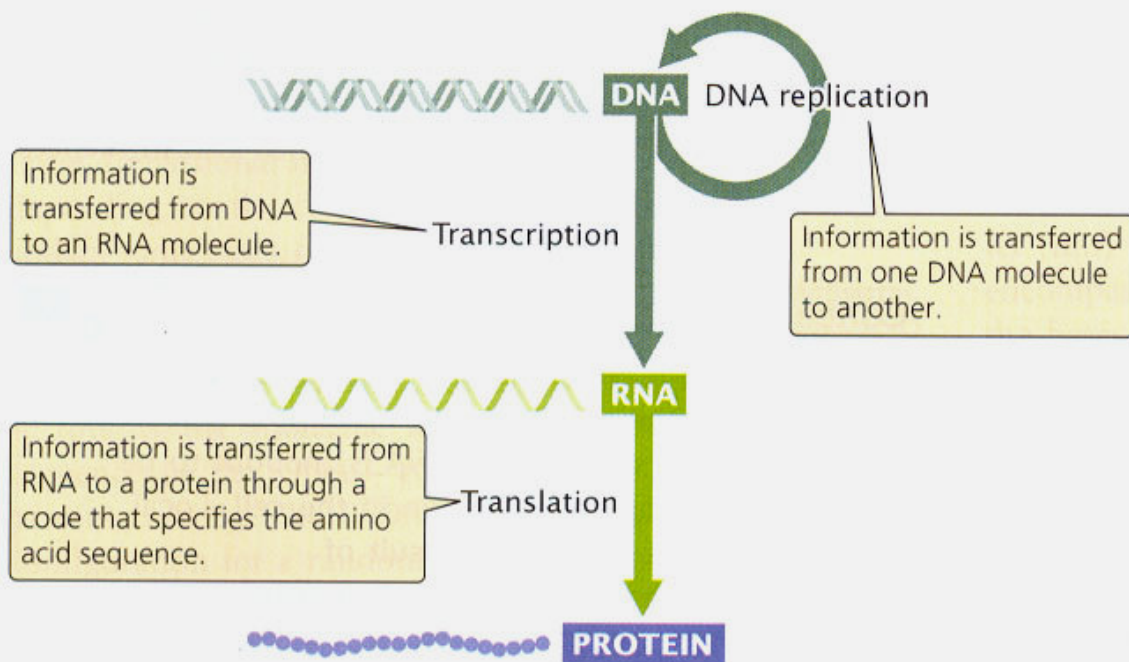
Eukaryote (**Estrutura celular compartimentalizada por membranas**)



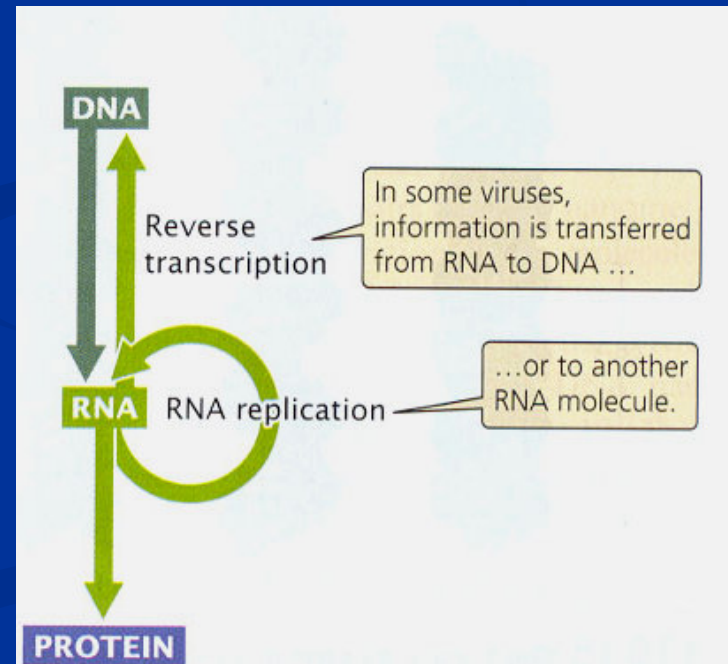
- O material genético de todas as formas de vida celular é constituído por 1 ou várias moléculas de **DNA** (deoxyribonucleic acid)
- Regiões específicas das moléculas de DNA definem os **genes** - unidades fundamentais que transportam a informação para a síntese e funcionamento de todos os componentes celulares

Conceitos Básicos em Biologia/Genética Molecular

- A informação genética está codificada na estrutura molecular dos ácidos nucleicos (sequência das bases nucleotídicas)
- Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) medeiam os processos de **transferência da informação genética**
- As três principais vias de transferência da informação genética:
Replicação, Transcrição e Tradução ⇒ **O Dogma Central da Biologia Molecular**



10.16 The three major pathways of information transfer within the cell are DNA replication, transcription, and translation.



Engenharia Genética

- Os ácidos nucleicos e as enzimas envolvidas nos processos de transferência da informação genética são a matéria prima e as ferramentas da engenharia genética
- O estudo dos processos de transferência genética (Biologia Molecular) permitiu desenvolver métodos e técnicas com aplicação em vários campos:

Investigação fundamental e aplicada

Biotecnologia (agricultura e indústria)

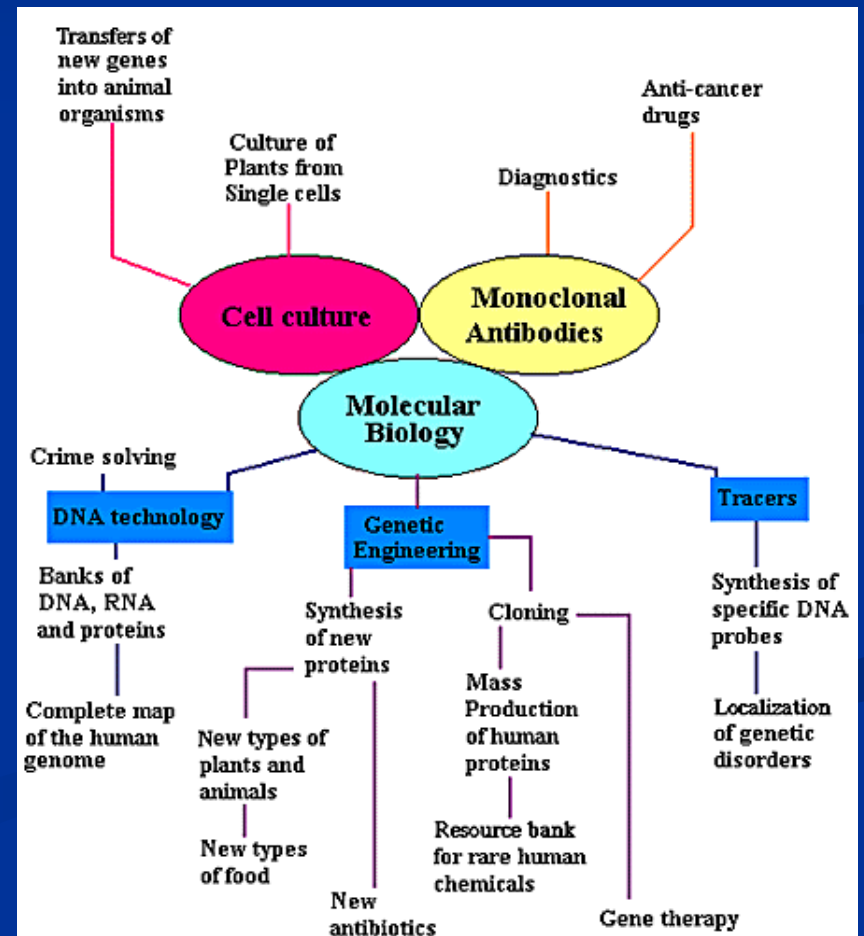
Indústria farmacêutica

Diagnóstico de doenças

Criminologia

Terapia

etc...



Engenharia Genética

- **Descobertas fundamentais para o avanço da engenharia genética:**

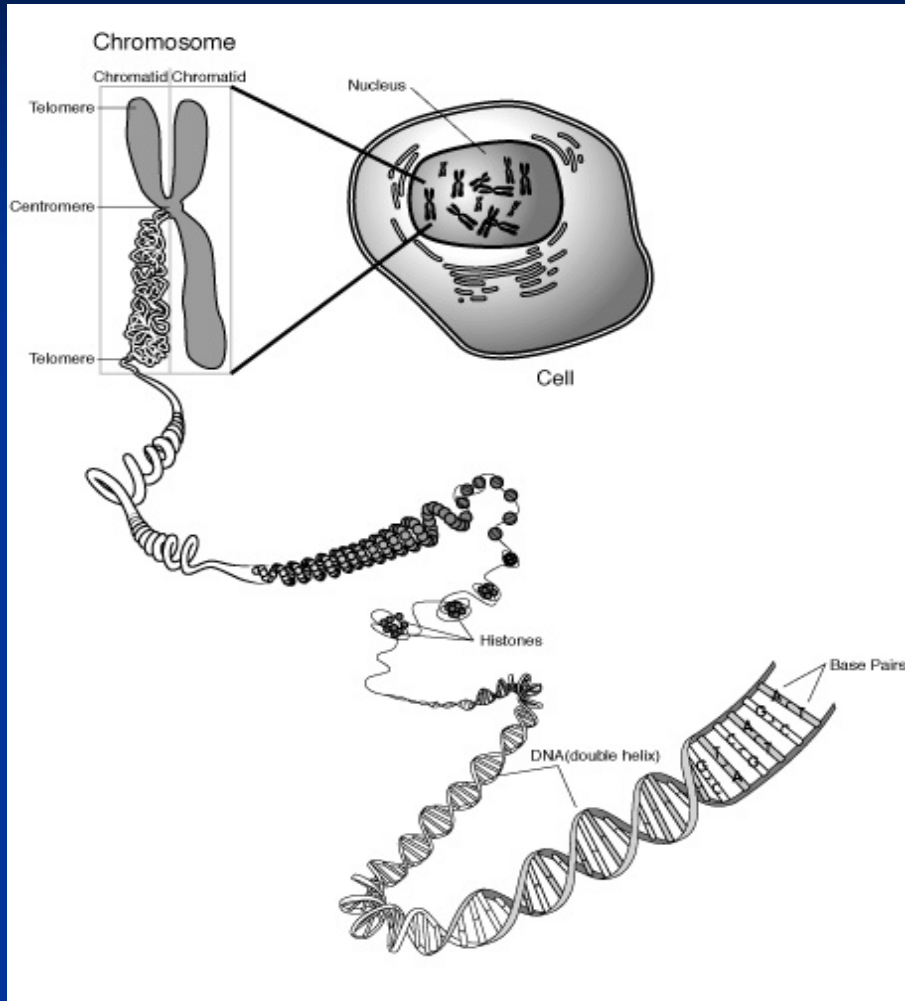
1. **PCR - “Polymerase Chain Reaction** - Amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos pela reacção de polimerização em cadeia

2. **Endonucleases de restrição** - Enzimas que cortam o DNA
Fundamentais para a tecnologia de DNA recombinante e clonagem molecular

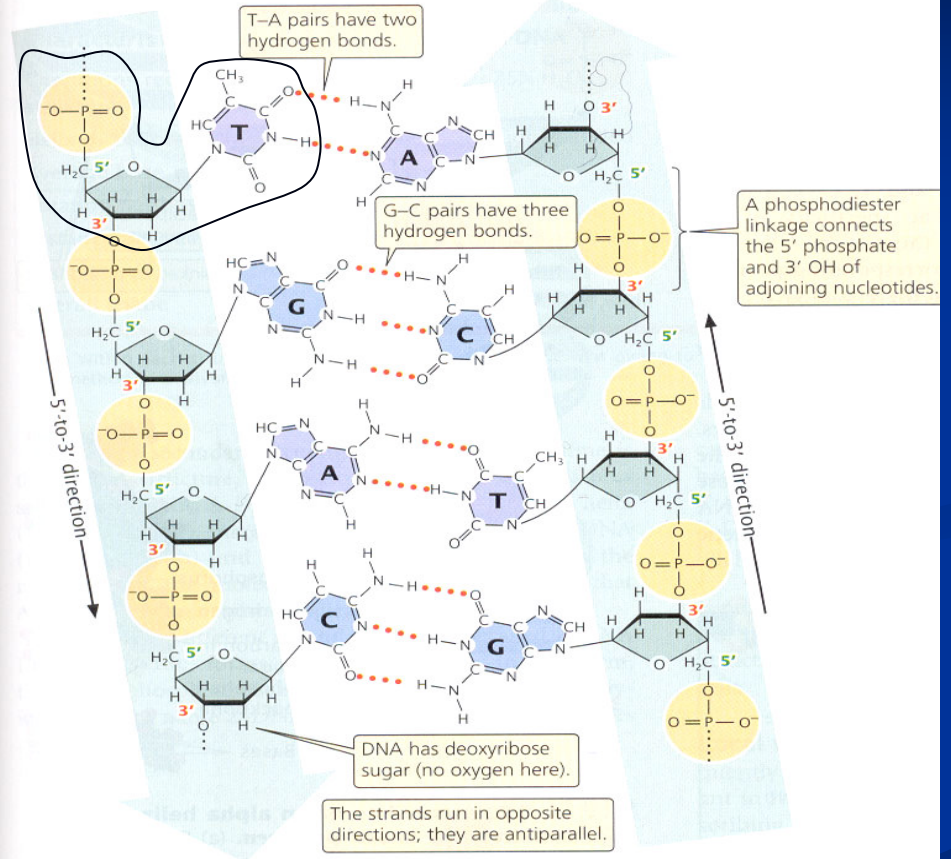
3. **Técnicas de sequenciação de DNA** - Determinação da sequência nucleotídica de genomas completos, genes ou pequenas regiões de DNA

4. **Universalidade do código genético** - Por exemplo permite que genes eucariotas possam ser traduzidos em sistemas bacterianos e vice-versa

A Estrutura do DNA



DNA polynucleotide strand



10.13 DNA consists of two polynucleotide chains that are antiparallel and complementary, and RNA consists of a single nucleotide chain.

A Replicação do DNA é Semi-Conservativa

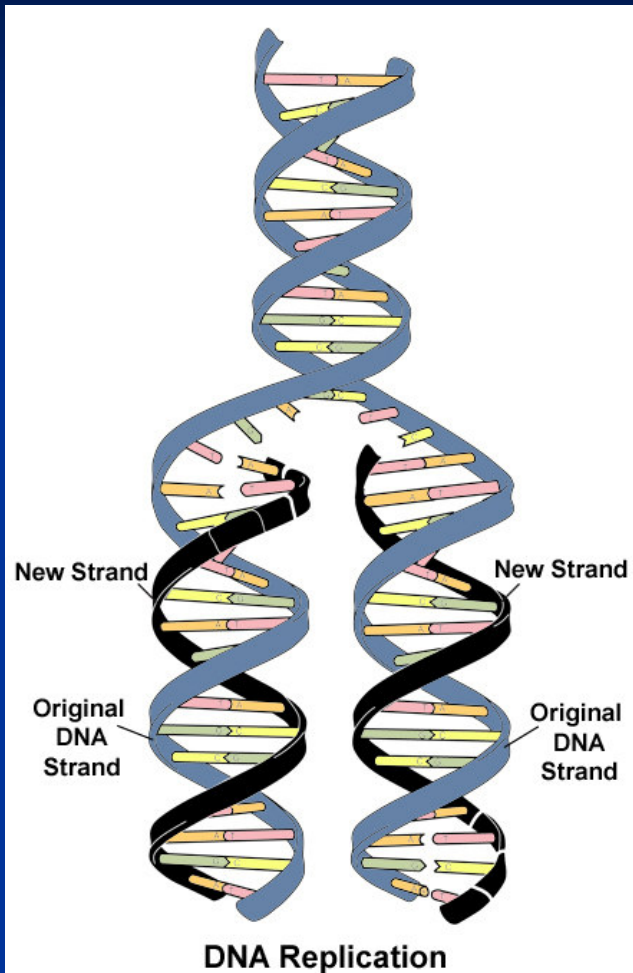


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

• **Modelo de Watson e Crick (1953)** desde logo apresentou pistas para a replicação do DNA:

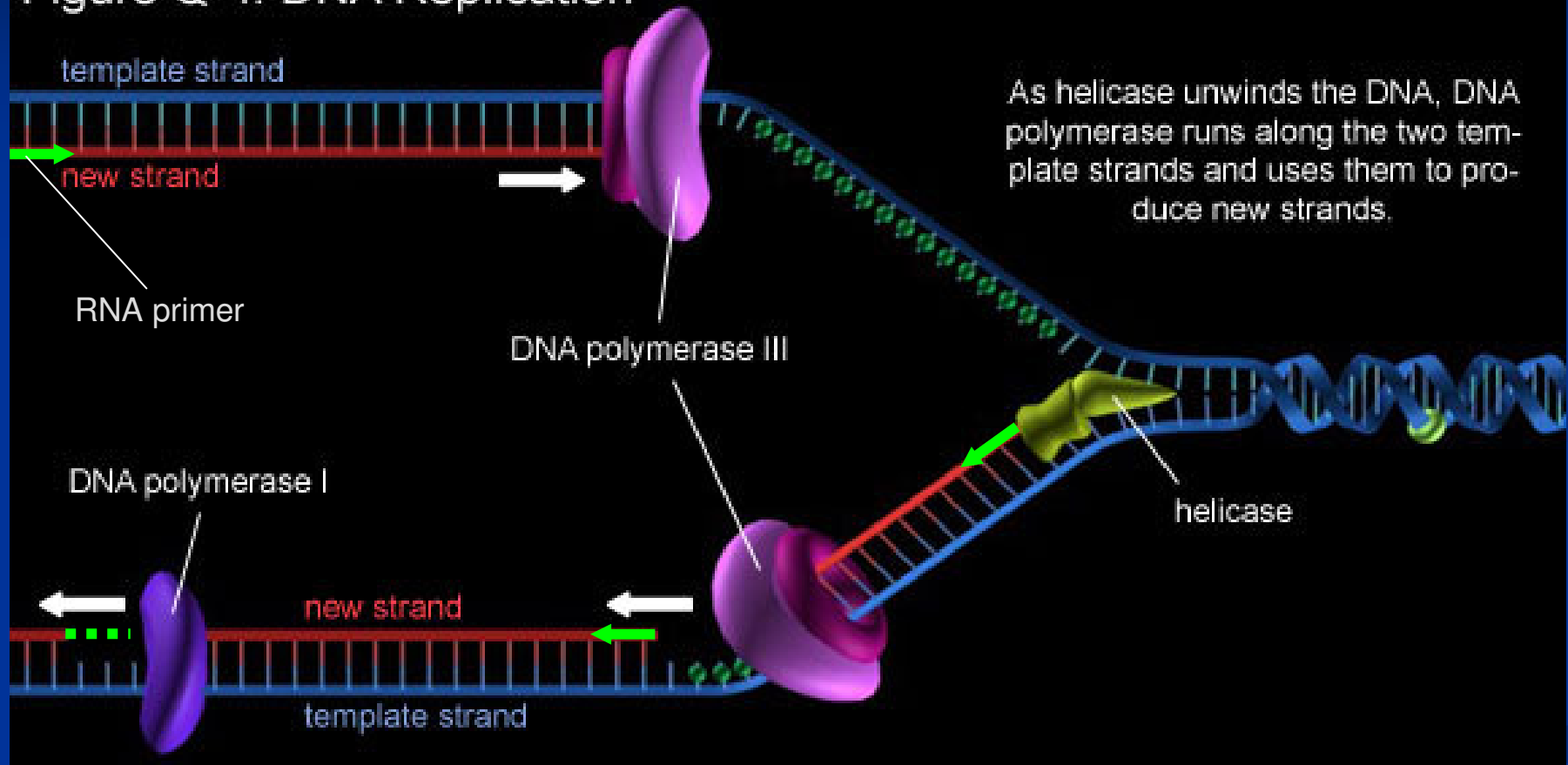
1 – **Complementaridade** entre as 2 cadeias polinucleotídicas do DNA sugeria que cada uma delas poderia funcionar como molde para a síntese de novas cadeias

2 – A **especificidade de emparelhamento** (A-T; C-G) ⇒ apenas uma sequência de nucleótidos pode ser especificada por cada molde ⇒ 2 cadeias novas a partir dos 2 moldes

3 – Cada uma das 2 cadeias molde é conservada nas 2 moléculas novas (**replicação semi-conservativa**)

A Replicação do DNA

Figure Q-4: DNA Replication



Amplificação de Sequências Nucleotídicas *in vitro*

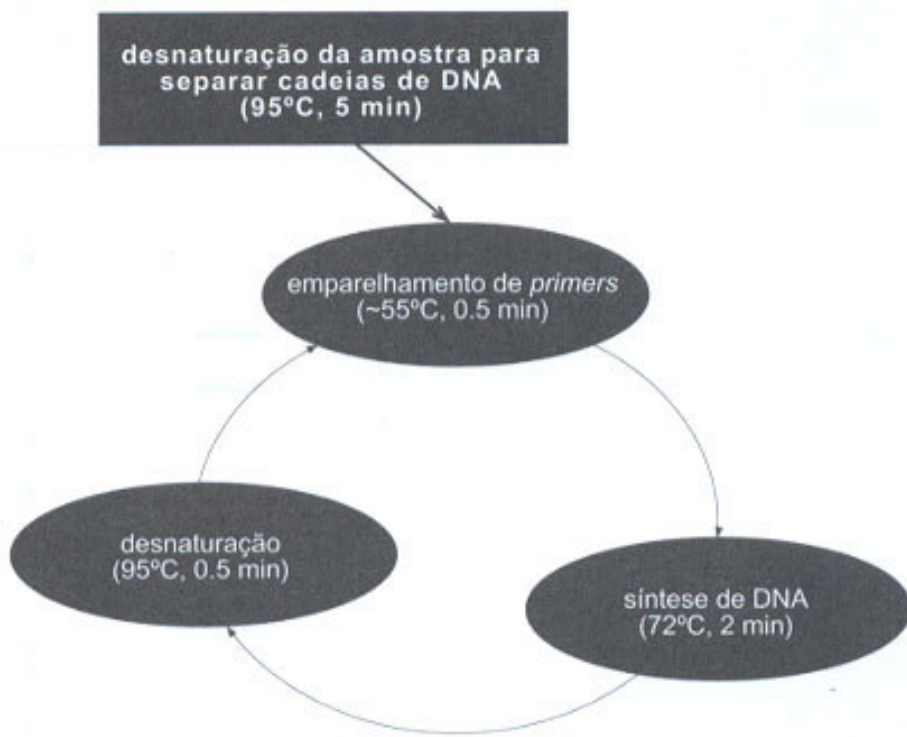
- A maior parte das vezes apenas estamos interessados em obter em grande quantidade uma pequena região, um gene ou mesmo um pequena sequência de um determinado genoma
- Por vezes a **quantidade de amostra biológica é diminuta** (ex. cena de um crime ou agente infeccioso em amostra de sangue, urina, etc) ⇒ não permite análise directa do DNA extraído
- 1983 – **Kary Mullis** ⇒ Técnica de amplificação de DNA *in vitro* – **PCR** (“polymerase chain reaction”)
 - Permite obter milhões de cópias de um fragmento de DNA, em poucas horas, a partir de uma pequeníssima amostra de DNA original (por vezes basta uma molécula!)
 - A molécula alvo pode fazer parte de uma mistura complexa de DNAs e/ou RNAs
- A técnica de **PCR revolucionou a detecção e obtenção de DNA e RNA**- actualmente uma das técnicas mais utilizadas em todas as aplicações da Biologia Molecular e Engenharia Genética

A Reacção de PCR

- A técnica baseia-se na polimerização repetida (**vários ciclos de polimerização**) de cadeias polinucleotídicas a partir do mesmo molde de DNA :
 - **molde DNA** = fragmento de DNA alvo (ambas as cadeias do DNA funcionam como molde)
 - **Extremidades 3'-OH** (oligonucleótidos = “*primers*”) para a síntese das novas cadeias
 - **DNA polimerase termoestável** (Taq – *Thermus aquaticus*)
 - **dNTPs**

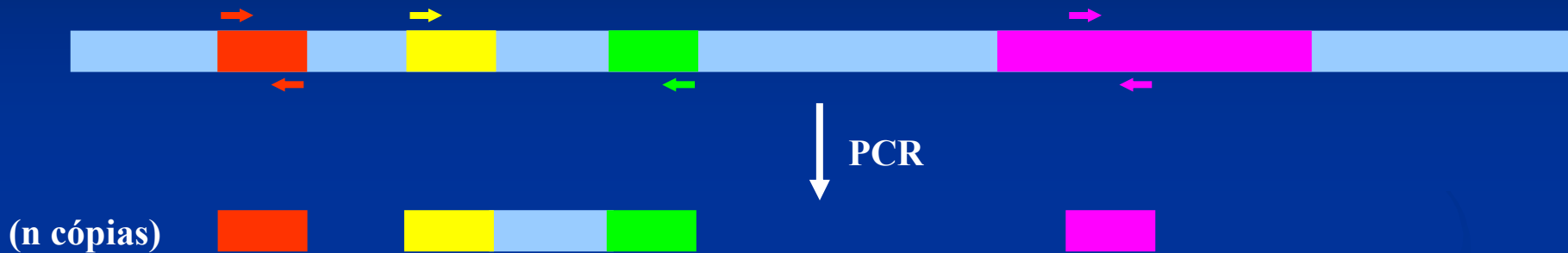
- **Inovações chave para evolução da técnica:**

- Aparelhos
- DNA polimerases termoestáveis (durante passo desnaturação) – DNAPol *Thermus aquaticus* (Yellowstone). No início, DNAPol *E. coli* adicionada a seguir a cada desnaturação.



A Reacção de PCR

- O **ponto de partida para a síntese de DNA é definido pela posição dos primers** ⇒ pode-se virtualmente amplificar, especificamente, qualquer fragmento de DNA de um genoma com uma precisão de tamanho ao nível do nucleótido, **desde que se conheça a sequência alvo.**



- 1 par de Primers – 18 a 30 nucs (cada um complementar à sua cadeia). A escolha da sequência de cada primer obedece a critérios rigorosos (especificidade, T_m , estruturas secundárias, etc.)

• Componentes da reacção:

- Tampão DNA polimerase
- Iões Mg^{2+} ($MgCl_2$)
- dNTPs
- Primer “forward”
- Primer “Reverse”
- DNA molde (pg a ng)
- DNA polimerase termoestável

• Reacção típica: (em aparelho PCR)

94-95 °C- < 5 min	Desnaturação inicial (1 X)	
94-95 °C- < 1 min	Desnaturação	} 30 - 40 X
50-65 °C- < 1,5 min	Emparelhamento primers	
72°C- X min	Polimerização (extensão)	
72°C- 10 min	Extensão final (1X)	

Endonucleases de Restrição

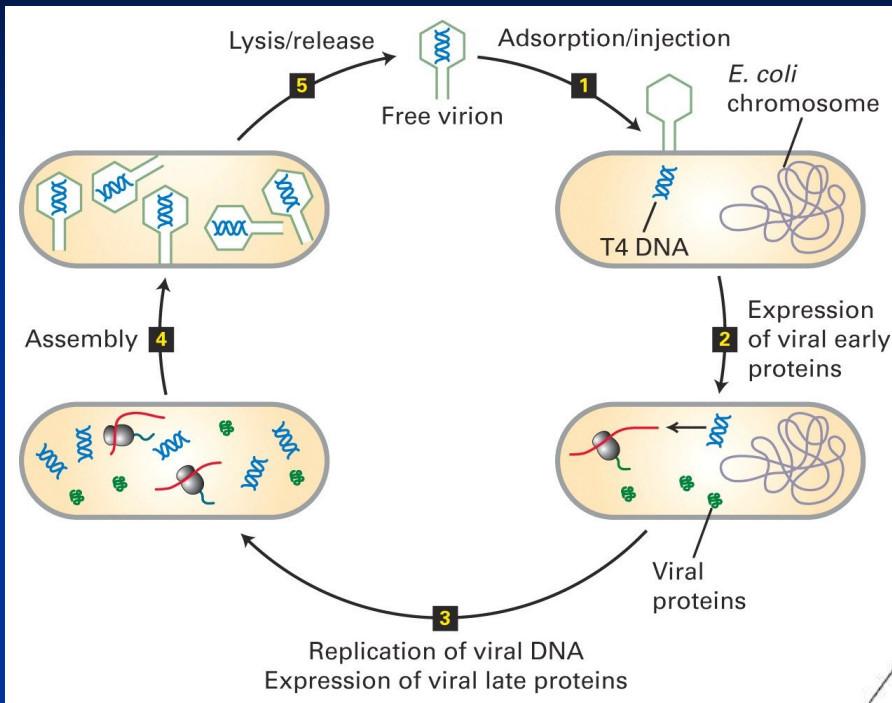
- **Endonucleases de restrição** (isoladas de bactérias)
 - enzimas que introduzem cortes em moléculas de DNA de cadeia dupla em locais específicos (cada endonuclease reconhece uma sequência específica)
- Descobertas no fim dos anos 60 – ferramenta chave no processo de clonagem de genes ou fragmentos de DNA

Table 18.1

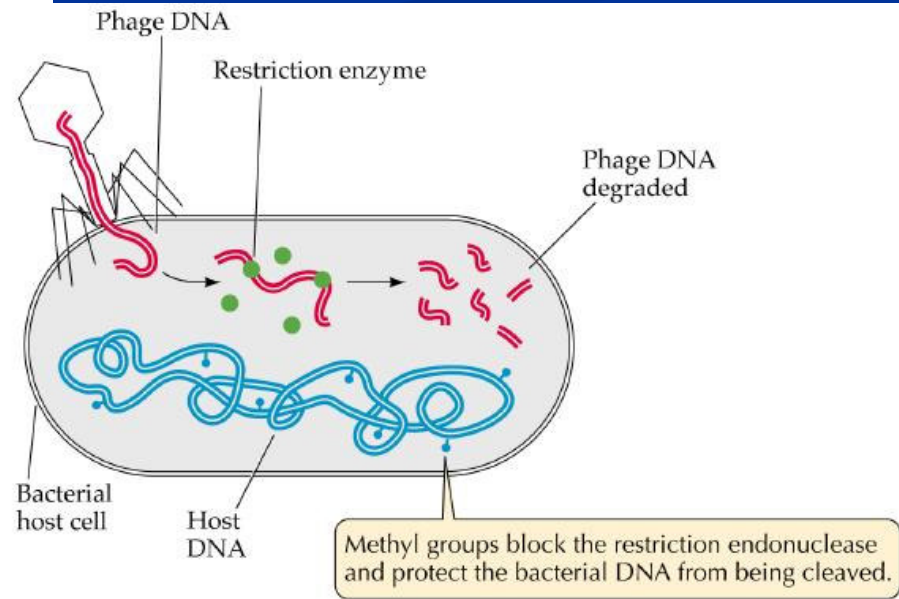
Types of restriction enzymes

Type	Activity of Enzyme	ATP Required	Cleavage Site
I	Cleavage and methylation	Yes	Random sites distant from recognition site
II	Cleavage only	No	Within recognition site
III	Cleavage and methylation	Yes	Random sites near recognition site

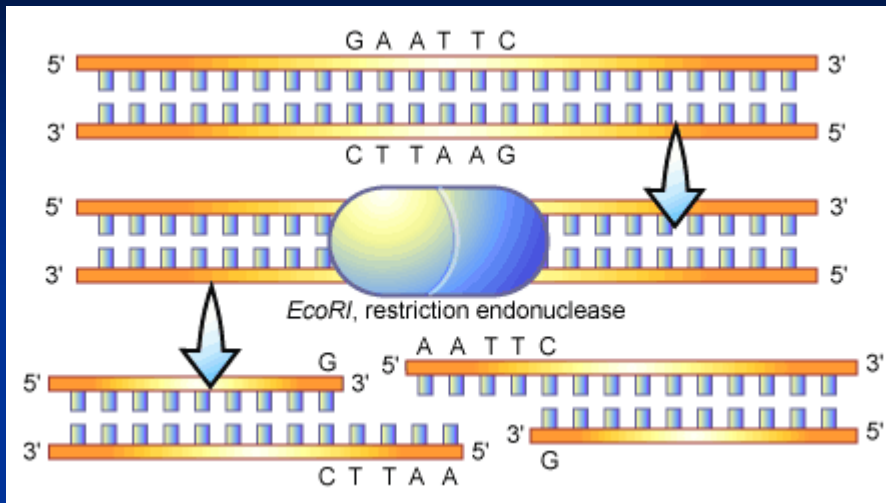
Endonucleases de Restrição



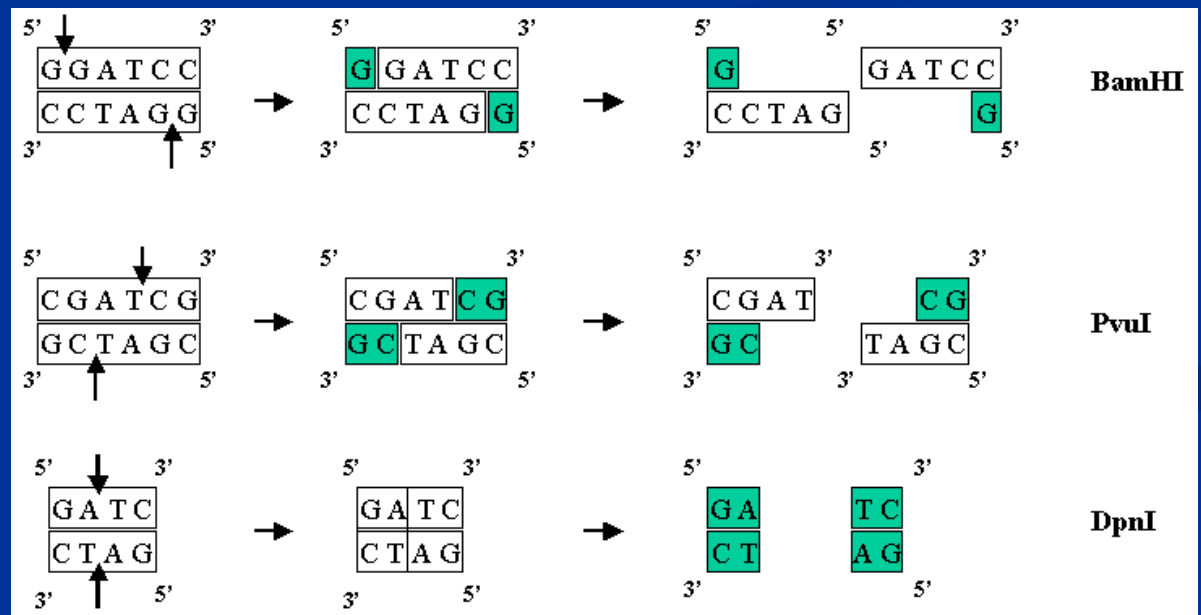
• Nas bactérias fazem parte dos sistemas de protecção contra a invasão de DNA estranho, por exemplo de vírus. O DNA bacteriano é protegido por metilação das sequências de reconhecimento das enzimas de restrição



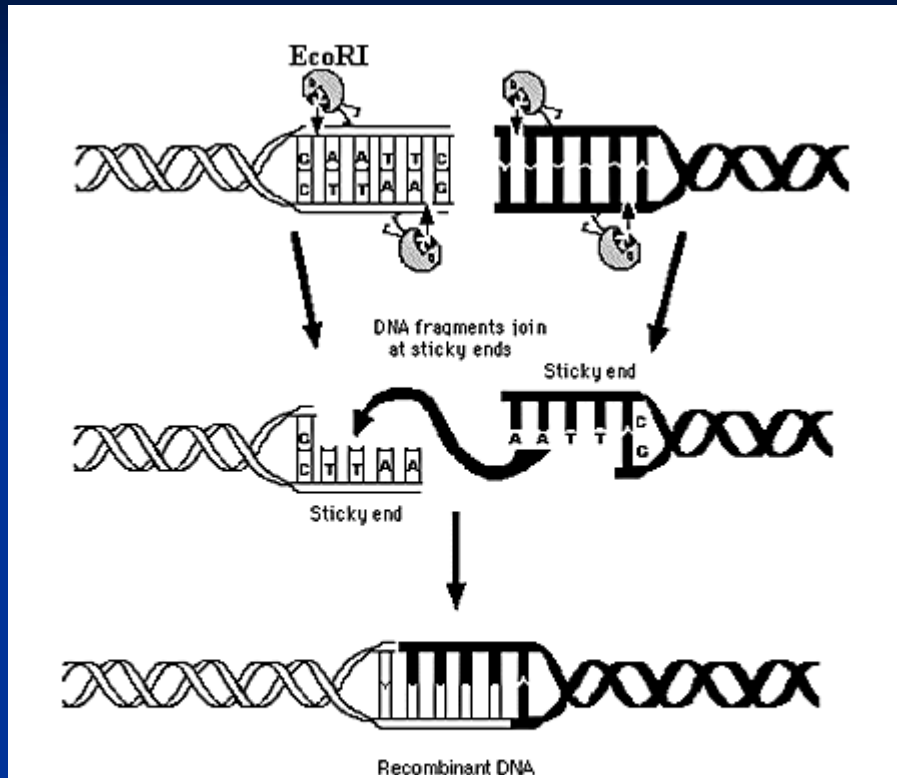
Endonucleases de Restrição



- As que reconhecem sequências de 4 a 8 pb são as geralmente utilizadas e podem gerar 3 tipos de extremidade diferentes após o corte

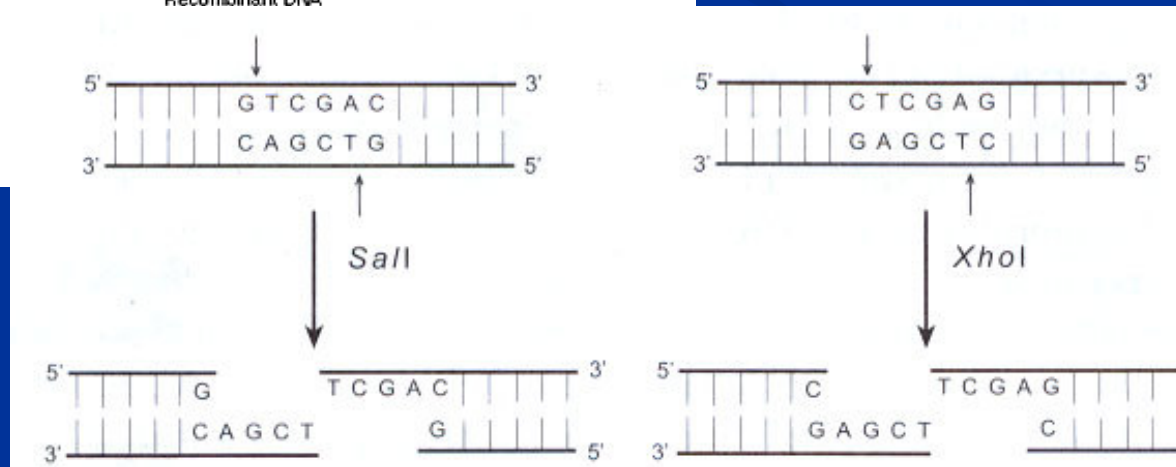


Endonucleases de Restrição



- As extremidades do DNA geradas após clivagem com uma enzima de restrição são coesivas (excepto no caso das enzimas que geram extremidades cegas).

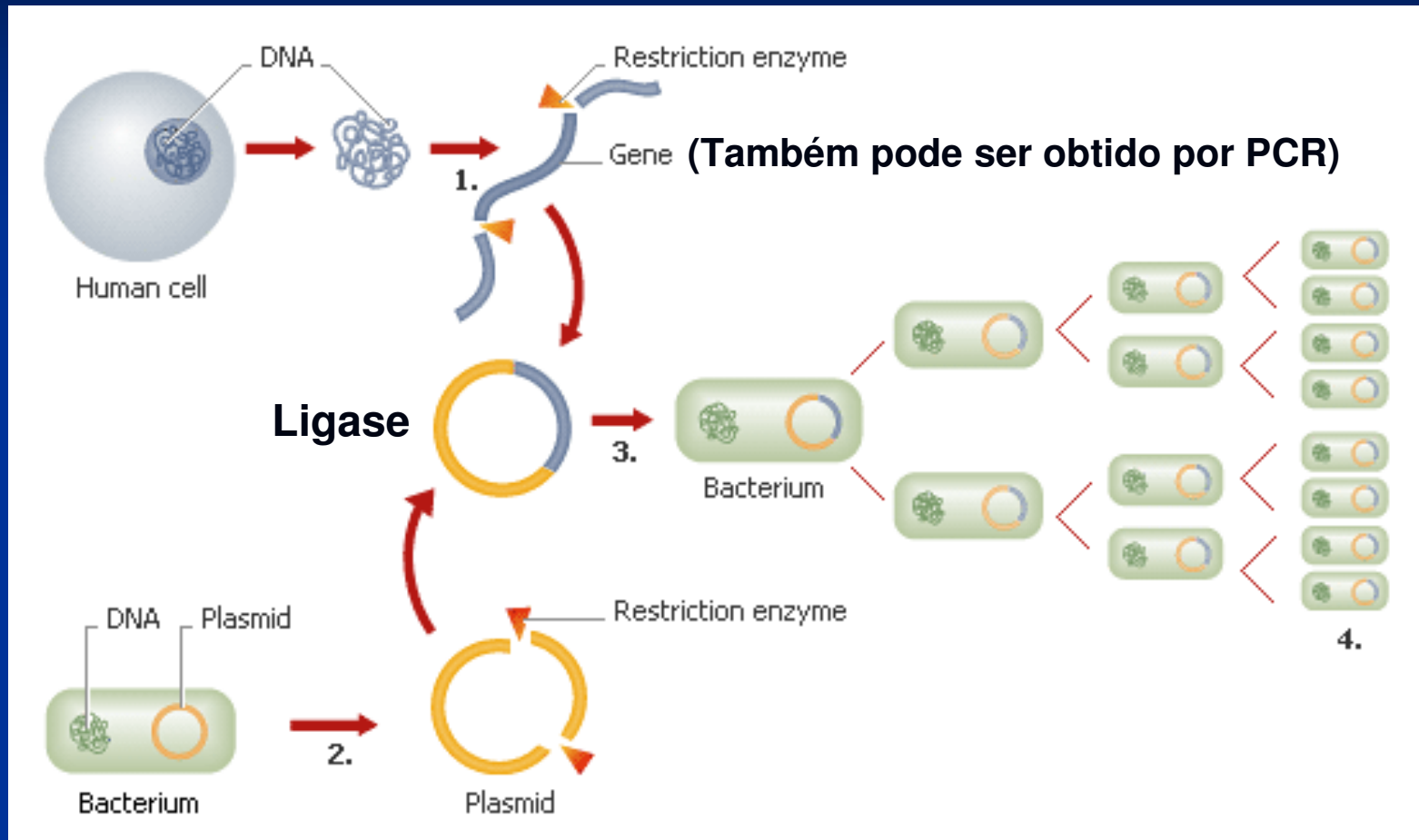
- Contudo, enzimas diferentes também podem gerar este tipo de extremidades



Clonagem Molecular

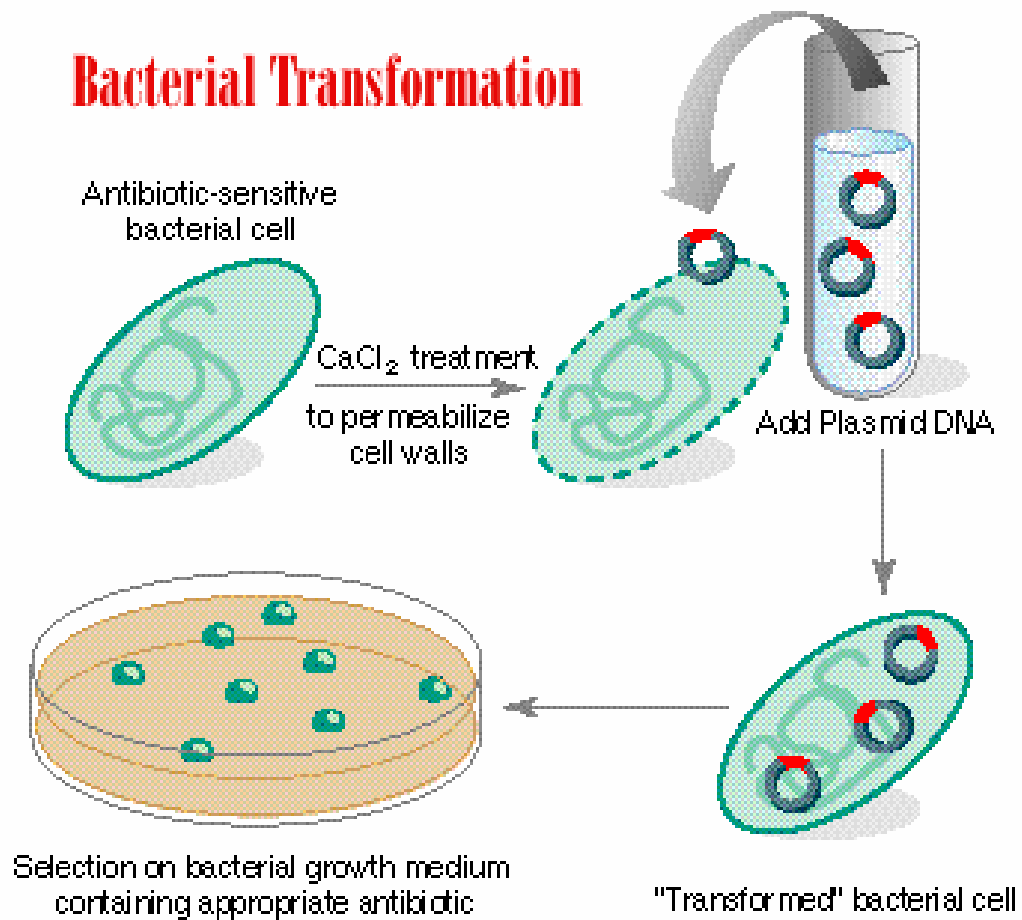
- Permite a amplificação *in vivo* de genes ou fragmentos de DNA
 - Fragmentos de DNA de interesse (ex. genes), obtidos pela clivagem de DNA com enzimas de restrição ou por PCR, são ligados a um **vector de clonagem** formando uma **molécula recombinante** que depois é introduzida em células hospedeiras apropriadas (procariotas ou eucariotas).
- Essas células ao se dividirem vão replicar não só o seu próprio genoma como a molécula recombinante que transportam, permitindo assim obter milhões de cópias idênticas (**clones**) do fragmento de DNA pretendido.
- Certos vectores especiais (**vectores de expressão**) permitem uma elevada expressão dos genes clonados possibilitando assim a produção de grandes quantidades de proteínas de interesse
- Os **vectores de origem plasmídica e bacteriofágica** são os mais usados para clonagem em bactérias.
- Nalguns casos bactérias transportando plasmídeos podem funcionar como vectores (ex. transformação de plantas com *Agrobacterium tumefaciens*)

Clonagem Molecular em Bactérias



Transformação

Bacterial Transformation



Produção de Insulina em *E. coli*

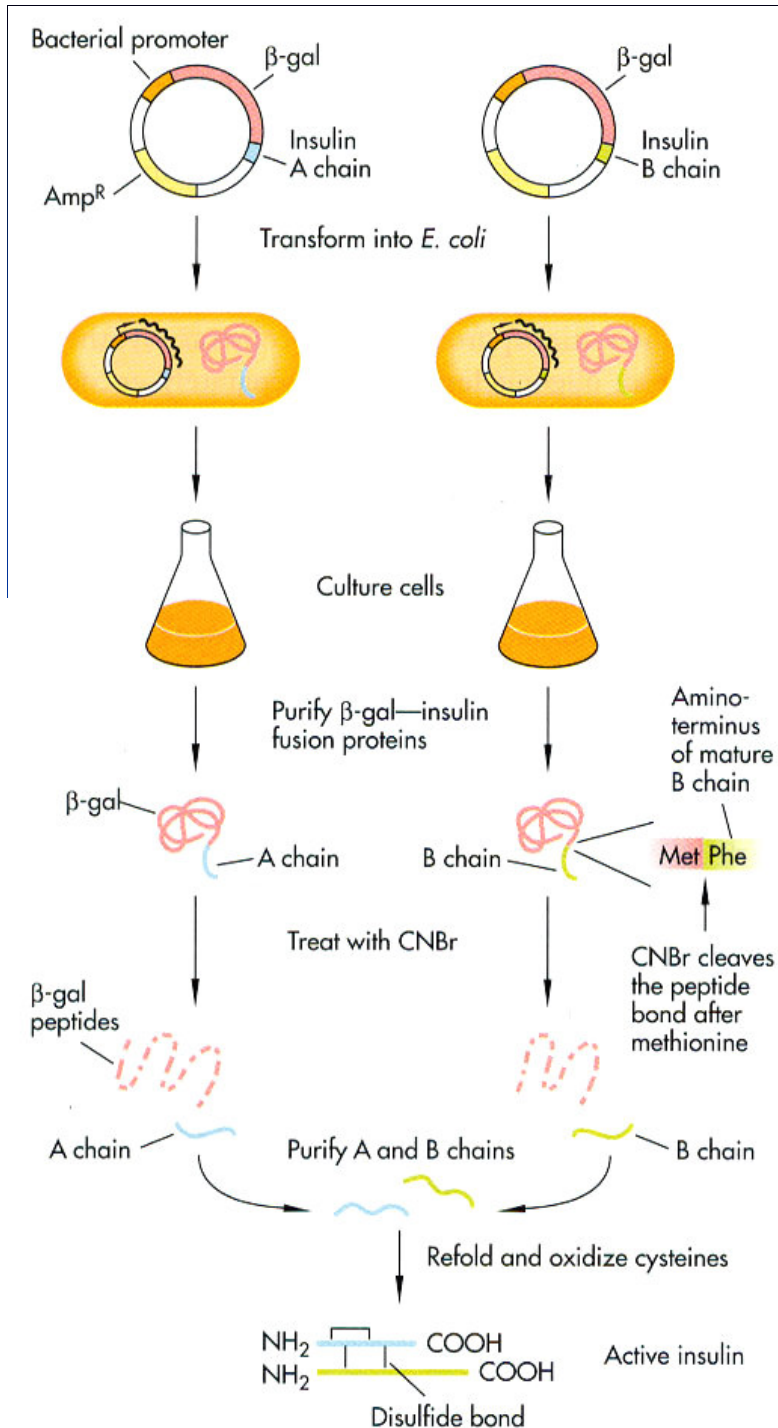
- Foi primeira proteína recombinante licenciada para uso no ser humano

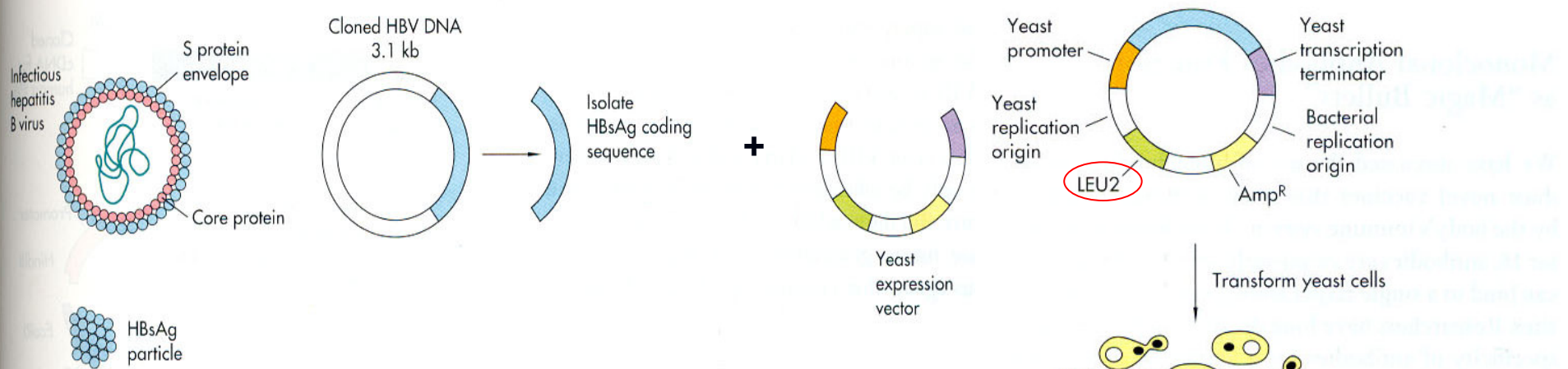
- Insulina funcional = **Cadeia A** + **Cadeia B** (resultam do processamento de um único polipéptido)

- Cada uma das cadeias foi produzida em separado na forma de **produtos de fusão** com a extremidade C-terminal da β -galactosidase de *E. coli*

- Depois de purificadas as proteínas de fusão as porções β -galactosidásicas foram removidas por tratamento com CNBr (brometo cianogénico) e as duas cadeias renaturadas na insulina funcional

- Entretanto foi desenvolvido um sistema de produção da insulina em *S. cerevisiae* (levedura)

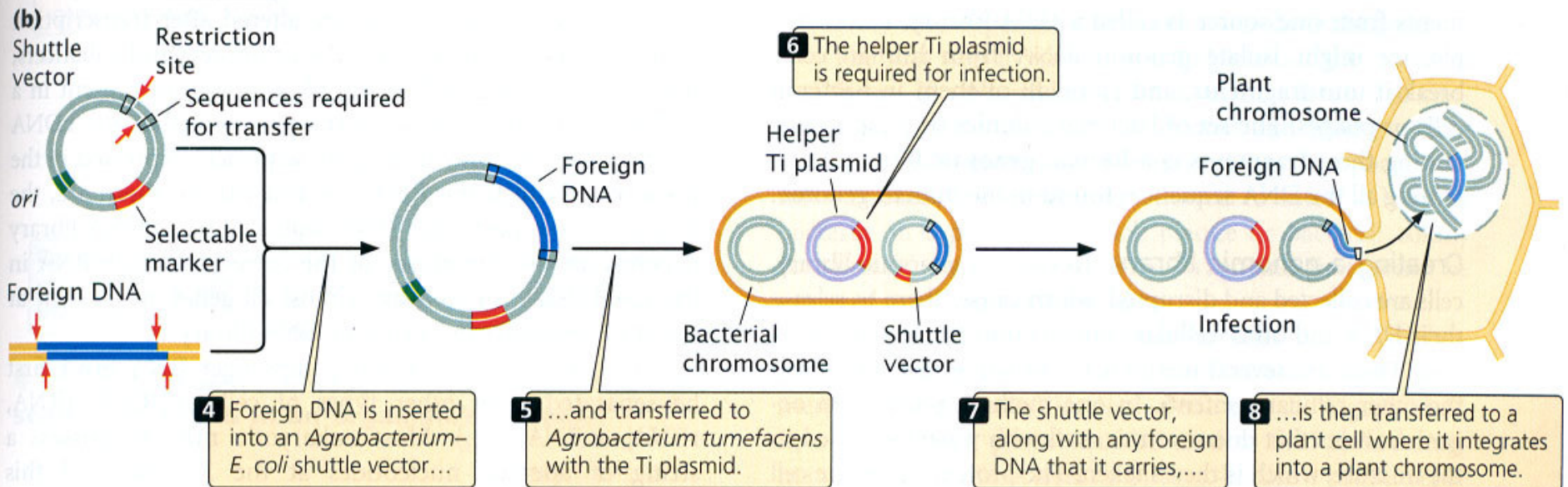
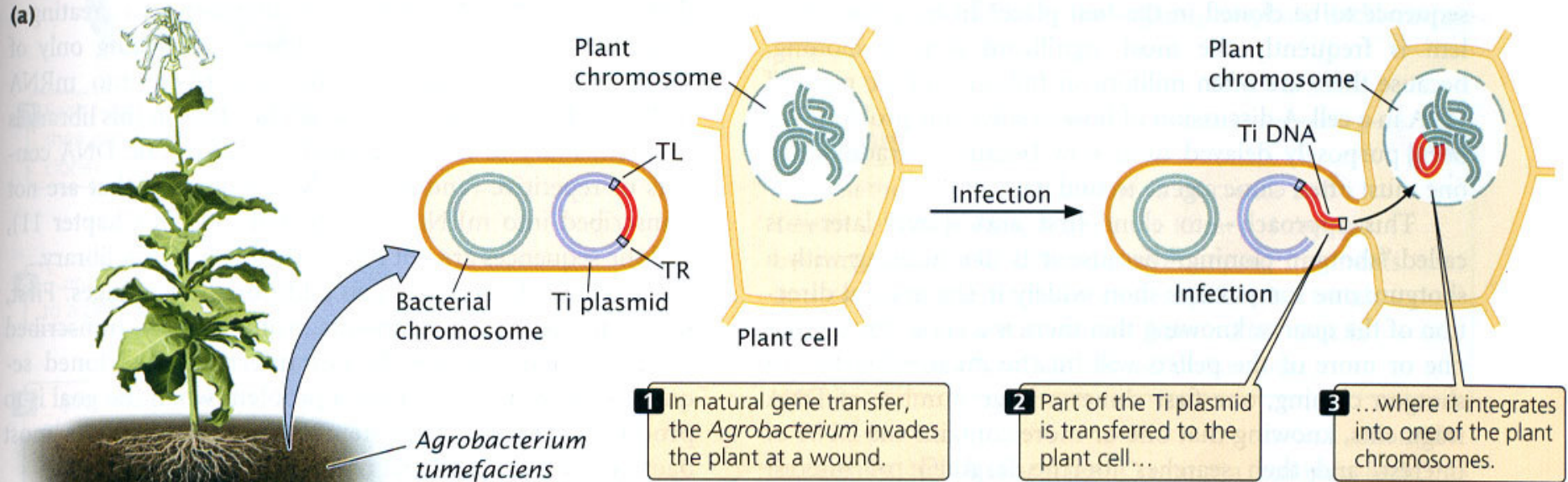




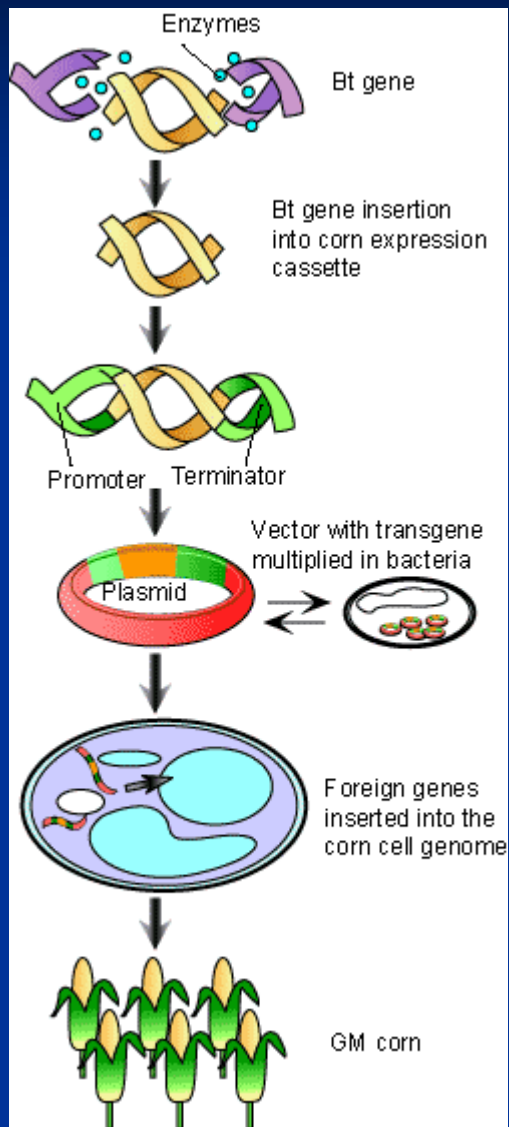
Produção de vacina contra o vírus da hepatite B

- Clonagem e expressão em levedura de um gene viral que codifica para um antígeno de superfície

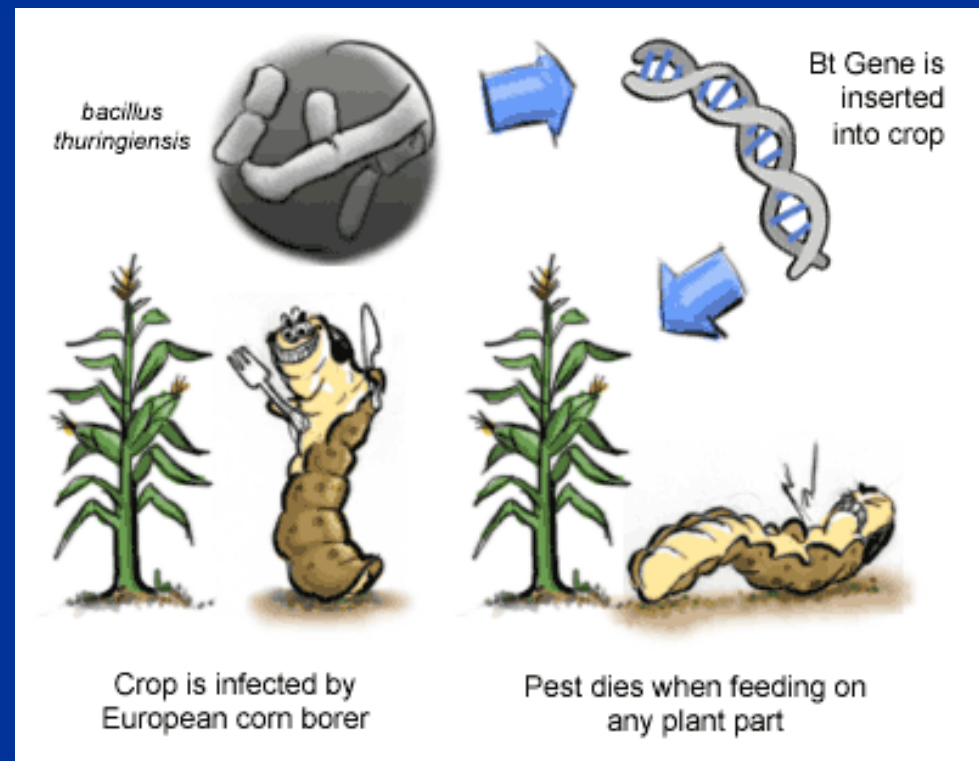
Clonagem Molecular em Plantas



Produção de Plantas transgênicas

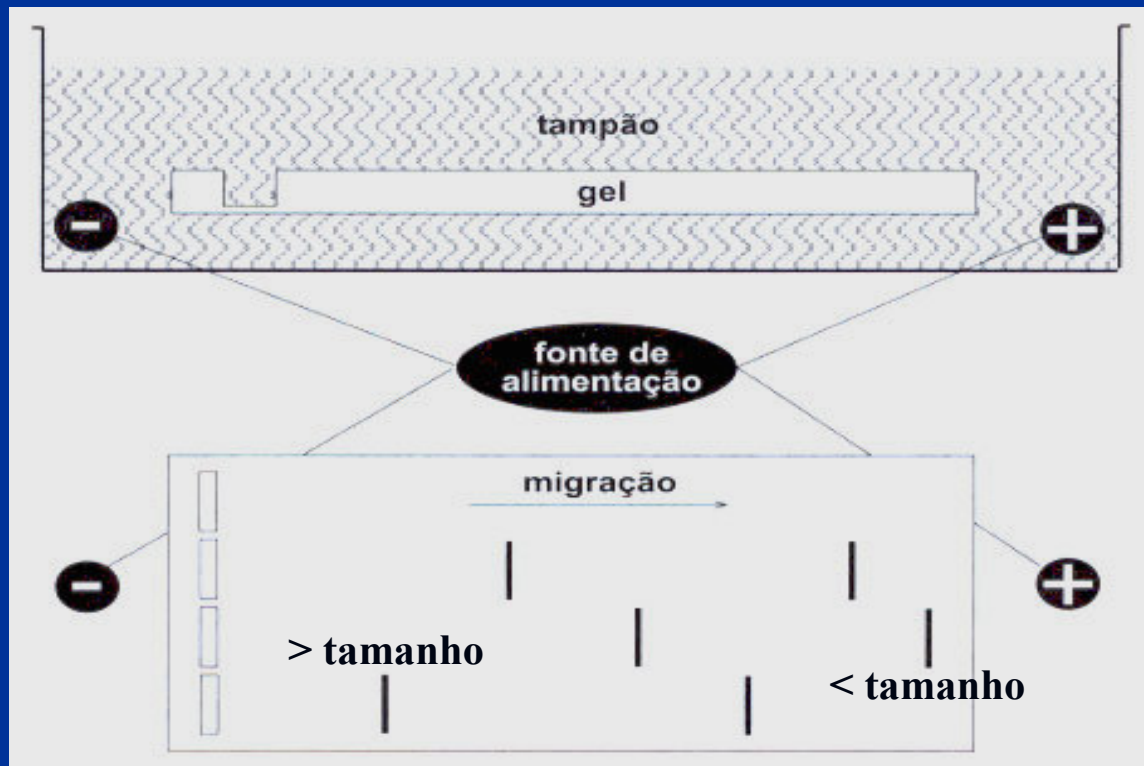
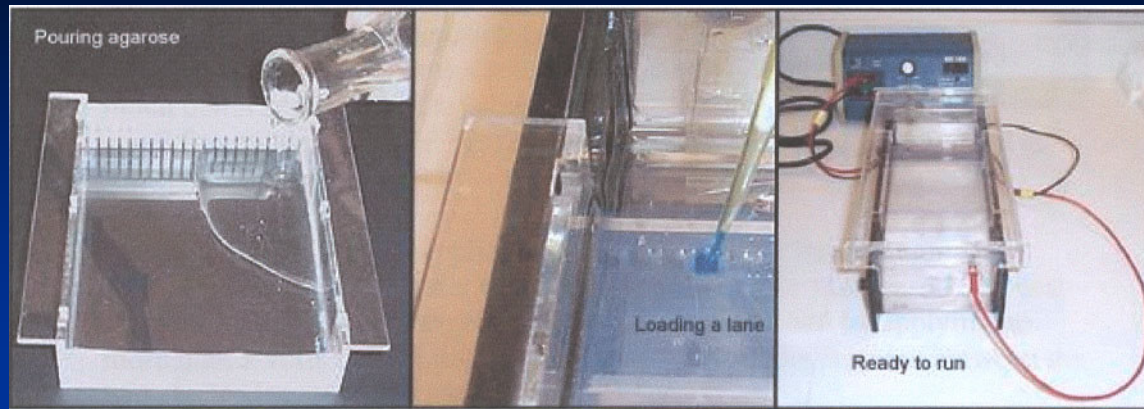


Gene Bt (*Bacillus thuringiensis*) – codifica para proteína tóxica que mata a broca do milho europeia - larva de insecto lepidóptero que se alimenta do caule da planta do milho.





Detecção e Separação Electroforética de DNA



Visualização das Moléculas de DNA

