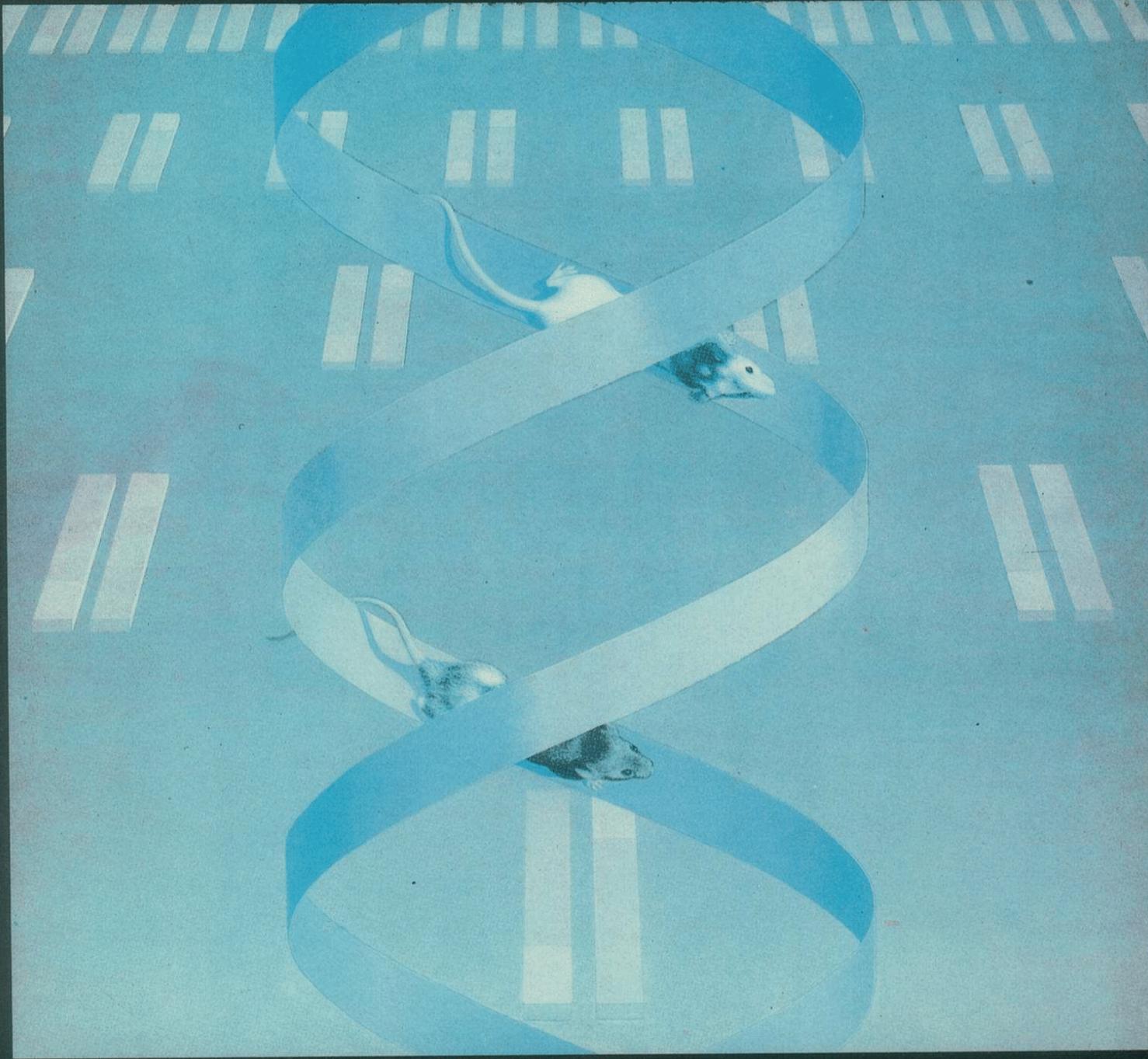


SEGUNDA EDIÇÃO

# O DNA Recombinante



James D. Watson  
Michael Gilman



Jan Witkowski  
Mark Zoller

James D. Watson  
Michael Gilman  
Jan Witkowski  
Mark Zoller

# O DNA Recombinante

(2ª edição)

Tradução coordenada por  
Elio Hideo Babá



Ouro Preto  
1997

REITOR

Dirceu do Nascimento

VICE-REITOR

Marco Antônio Tourinho Furtado

CONSELHO EDITORIAL

*Presidente*

Geraldo Antônio Batista

*Membros*

Leonardo Barbosa Godefroid, Rinaldo Cardoso dos Santos, Jorge Carvalho de Lena, Guiomar de Grammont, Rosa Maria Esteves Arantes, Solange Ribeiro de Oliveira e Rosângela Maria Zanetti

REVISÃO

Valéria Maria Lopes Rodrigues, Andréa Gonçalves Rodrigues, Jânio Luiz Penna, Rosângela Maria Zanetti e Magda de Magalhães Machado Salmen

COORDENAÇÃO DA TRADUÇÃO

Élio Hideo Babá

PROJETO GRÁFICO

Maria Alice Hitomi Kodama e Alvimar Ambrósio

FOTOLITOS

Fotoprint Stúdio Gráfico-BH

NORMALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Regina Gontijo Cançado Viana

TÍTULO ORIGINAL

Recombinant DNA (2<sup>nd</sup> Edition)

Copyright © 1983 by W.H. Freeman and Company

Copyright © 1992 by W.H. Freeman and Company

CAPA

A ilustração da capa, feita por Marvin Mattelson, simboliza alguns elementos deste livro. A dupla hélice do DNA é, naturalmente, o ponto central do livro e também da capa. Os blocos representam fragmentos de fita dupla de DNA sintetizados pela reação da polimerase em cadeia, uma técnica que tem revolucionado os procedimentos de pesquisa da genética molecular. O número de fragmentos duplica-se repetidamente, perdendo-se à distância (Cap.6). A cor do pêlo do camundongo percorrendo a hélice (na mesma direção, mas com polaridades opostas) está mudando de albino para quimérica e de quimérica para *agouti*. Essa mudança da cor do pêlo dos camundongos retrata o uso da manipulação genética no nocaute de um gene específico. Esse experimento é mostrado na forma mais realística na Fig. 14.9.

Direitos adquiridos para a língua portuguesa, no Brasil,  
pela Editora UFOP, Campus Universitário  
35400-000 – Ouro Preto – MG

Impresso no Brasil/ Printed in Brazil  
ISBN: 85-288-0023-7

FICHA CATALOGRÁFICA

D629 O DNA Recombinante / James D. Watson...  
[et al]; Tradução coordenada por Élio Hideo  
Babá. – Ouro Preto, MG: Ed. UFOP, 1997.  
646 p.: il.

Tradução de: Recombinant DNA.

1. Biologia molecular. 2. DNA.  
I. Watson, James D. II. Babá, Élio Hideo.

CDU: 577.21

Catalogado pela Coordenadoria de Bibliotecas da UFOP

Depósito legal efetuado junto à Biblioteca Nacional conforme Decreto nº 1.825 de 20 de dezembro de 1907.

# ÍNDICE

Prefácio  
Agradecimentos

## DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

<i>I</i> ESTABELECENDO O PAPEL DOS GENES NAS CÉLULAS	1
Células são blocos construtivos de todos os seres vivos	2
Células são pequenas fábricas com capacidade para sintetizar, simultaneamente, milhares de diferentes moléculas	2
Moléculas que ocorrem nas células podem ser divididas em pequenas moléculas e macromoléculas	2
Catalisadores especiais denominados enzimas efetivamente determinam as reações químicas que ocorrem nas células	3
Uma dada proteína possui uma única seqüência de aminoácidos ao longo de sua cadeia polipeptídica	3
A função de enzima depende de um dobramento preciso de sua cadeia polipeptídica (estrutura tridimensional)	4
Ativação de moléculas a compostos de alta energia promove sua reatividade química	4
O metabolismo celular pode ser visualizado através de mapas metabólicos	5
As enzimas não podem determinar a ordem dos aminoácidos nas cadeias polipeptídicas	6

Os experimentos de Mendel com cruzamento de ervilhas mostraram pela primeira vez a independência dos determinantes genéticos (genes)	6	A maioria das duplas hélices está orientada para a direita, mas, sob condições especiais, certas seqüências nucleotídicas de DNA determinam hélices orientadas para a esquerda	26
Cromossomos são portadores celulares da hereditariedade	6		
O desenvolvimento da hipótese um gene – uma proteína	9		
<b>2 DNA É O MATERIAL GENÉTICO PRIMÁRIO</b>		<b>3 ELUCIDAÇÃO DO CÓDIGO GENÉTICO</b>	31
O DNA está situado nos cromossomos	11	Uma mutação de hemoglobina é evidenciada através de substituição de um único aminoácido	31
Células contêm RNA e DNA	12	O uso da <i>E. coli</i> leva ao rápido desenvolvimento da genética fina	32
Descoberta de ensaio biológico para moléculas genéticas	13	Gene e seus produtos polipeptídicos são colineares	32
O vírus é material genético empacotado que move de célula a célula	14	O RNA transporta informação do DNA para os sítios citoplasmáticos de síntese de proteínas	33
Moléculas com tamanhos e formas complementares se atraem	14	Como aminoácidos se alinham em moldes de RNA?	34
O diâmetro do DNA é estabelecido	15	O papel das enzimas e dos moldes na síntese de ácidos nucléicos e proteínas	34
Os nucleotídeos de DNA e RNA estão unidos entre si por ligações fosfodiésteres 5' - 3' regulares	16	As proteínas são sintetizadas do aminoterminal para o carboxiterminal	35
A composição de bases do DNA provenientes de organismos diferentes é muito variável	16	Três tipos de RNA estão envolvidos na síntese de proteínas	35
O DNA tem forma altamente regular	17	Evidências genéticas revelam que os códons contêm três bases	36
A unidade fundamental do DNA consiste em duas cadeias polinucleotídicas interligadas (a dupla hélice)	17	As cadeias de RNA são sintetizadas e traduzidas na direção 5' para 3'	37
A dupla hélice é estabilizada por pontes de hidrogênio entre pares de bases	18	O mRNA sintético é utilizado na execução de tarefas do códon	37
A natureza complementar do DNA é essencial para sua capacidade de autoduplicação	18	O código genético foi totalmente decifrado em junho de 1966	37
A replicação do DNA é semiconservativa	19	A freqüente “oscilação” permite que simples espécies de tRNA reconheçam múltiplos códons	39
Moléculas de DNA podem ser desnaturadas e renaturadas	20	O código genético é universal?	40
Pares de bases G•C separam-se com mais dificuldade do que seus equivalentes A•T	21	Genes de tamanho médio contêm, no mínimo, 1200pb	40
Palíndromos promovem formação de pontes de hidrogênio intracadeia	21	Mutações mudam a seqüência de bases do DNA	40
5-Metilcitosina pode substituir citosina no DNA	21	tRNAs supressores causam erro de leitura no código genético	40
Os cromossomos contêm uma única molécula de DNA	22	Sinais de iniciação e parada de síntese de moléculas específicas de RNA são codificados dentro de seqüências de DNA	41
Os vírus são fontes de moléculas homogêneas de DNA	22	Sistemas cada vez mais precisos são desenvolvidos para a tradução <i>in vitro</i> de mRNAs exógenos	43
O DNA do fago $\lambda$ pode ser inserido em sítio específico no cromossomo da <i>E. coli</i>	22		
Fagos transdutores anormais fornecem segmentos incomuns de cromossomos bacterianos	23	<b>4 ELEMENTOS GENÉTICOS QUE REGULAM A EXPRESSÃO GÊNICA</b>	47
Plasmídeos são minicromossomos com replicação autônoma	24	Repressores controlam a síntese de enzimas indutíveis	47
Moléculas de DNA circular podem ser superespiraladas	25		

Genes bacterianos com funções relacionadas são organizados dentro de operons	49	DNA de organismos superiores torna-se disponível para análise molecular	71
Promotores são sinais iniciais para a síntese de RNA	49	Opinião dos cientistas com relação ao perigo de clonagem irrestrita de genes	72
Moléculas repressoras são normalmente sintetizadas a velocidades constantes	50	Normas para pesquisa de DNA recombinante são propostas na conferência de Asilomar	72
Repressores são isolados e identificados	50	DNA recombinante atinge a maioria	73
Regulação positiva da transcrição do gene também ocorre	50		
Atenuação é outra forma de regulação	51	<b>ANÁLISE DOS GENES CLONADOS</b>	
O controle da tradução é o segundo meio de controle da síntese protéica	52	<b>6 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA</b>	75
Dificuldades encontradas na comprovação da regulação gênica em plantas superiores e em animais	53	A reação da polimerase em cadeia amplifica regiões específicas do DNA	75
Isolamento de genes purificados de RNA ribossômico de <i>Xenopus</i>	54	Executando a reação da polimerase em cadeia	76
RNAs mensageiros de eucariotas têm cápsula e cauda	54	A <i>Taq</i> polimerase simplifica e melhora a PCR	77
Considera-se que eucariotas possuem três tipos de RNAs polimerases	54	A fidelidade da síntese de DNA pela <i>Taq</i> polimerase determina a precisão da amplificação por PCR	79
O DNA eucariótico está organizado dentro de nucleossomos	55	O DNA para PCR origina-se de uma variedade de fontes	80
Vírus animais são sistemas-modelo para a expressão gênica em célula superiores	56	PCR é usado para amplificar seqüências específicas de DNA humano	81
Vírus RNA tumorais se replicam por meio de uma fita dupla de DNA intermediário	56	Produtos da PCR podem ser seqüenciados diretamente	81
		Detectando mutações através da amplificação por PCR	82
		Amplificação por PCR é utilizado para acompanhamento do tratamento do câncer	84
<b>5 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS DE DNA RECOMBINANTE</b>	61	Amplificação por PCR é usado para detectar infecções bacterianas e virais	84
Desenvolvimento de métodos para seqüenciar ácidos nucléicos	61	Amplificação por PCR é usado para determinação do sexo em células pré-natais	86
Enzimas de restrição fazem cortes em seqüências específicas de DNA	62	Métodos da PCR permitem análise de ligação pelo uso de apenas uma célula espermática	88
Os mapas de restrição são altamente específicos	63	Técnicas de PCR são usadas em estudos de evolução molecular	89
Os fragmentos de restrição conduziram a novos e eficientes métodos para seqüenciamento de DNA	65	A contaminação pode ser um problema nos estudos sobre PCR	89
Oligonucleotídeos podem ser sintetizados quimicamente	66	Reação da polimerase em cadeia—uma revolução técnica da genética molecular	90
Muitas enzimas de restrição produzem fragmentos que contêm extremidades coesivas ( <i>sticky ends</i> )	67	<b>7 O ISOLAMENTO DE GENES CLONADOS</b>	95
Muitas enzimas estão envolvidas na replicação do DNA	68	Desenvolvimento de bactérias e vetores mais eficientes	96
Extremidades coesivas podem ser adicionadas enzimaticamente a moléculas de DNA de extremidades cegas ( <i>blunt-ends</i> )	70	Estratégias básicas para clonagem envolvem três etapas	96
Pequenos plasmídeos são usados como vetores para clonagem de genes estranhos	70	A escolha de matéria-prima correta é essencial para clonagem	98
		mRNA é convertido a cDNA por reações enzimáticas	98

Moléculas de cDNA são inseridas no vetor para propagação em bactéria	100	Genes que codificam produtos abundantes são freqüentemente repetidos sucessivamente	137
Sondas de ácidos nucleicos são utilizadas para localizar clones que contêm seqüência de DNA desejada	101	Os genes agrupados de globina apresentam expressão coordenada durante o desenvolvimento	138
Sondas sintéticas de oligonucleotídeos podem ser projetadas a partir de seqüência conhecida de proteína	101	Pseudogenes surgem por duplicação de um gene ativo e acumulam mutações durante a evolução	138
cDNAs específicos de tecidos são identificados por hibridização diferencial	105	Seqüências repetitivas curtas de DNA estão dispersas ao longo do genoma eucariótico	139
Sondas obtidas de segmentos conservados em famílias de proteínas identificam novos genes relacionados	105	Regiões transcricionalmente inativas do genoma estão freqüentemente metiladas	140
Vetores de expressão podem ser usados para isolar cDNAs específicos	108	A maioria de genes é muito maior que seu mRNA	140
Genes clonados podem ser isolados de <i>E. coli</i> através de dosagem de função de proteína	108	Às vezes genes são codificados dentro de genes	141
Genes clonados podem ser isolados através de dosagem de atividade funcional em células eucarióticas	110	Resumo	142
Análises de DNAs clonados através de seqüenciamento	110		
Computadores têm simplificado tradução de seqüência de DNA em proteínas	112	<b>9 CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTAS</b>	147
Pesquisando dados de seqüência para identificação de proteínas e de suas respectivas funções	115	Seqüências-motivos comuns são encontradas na região flanqueadora-5'	147
Existem vários procedimentos para analisar proteínas codificadas por clones de cDNA	116	Seqüências intensificadoras ( <i>enhancers</i> ) ativam a expressão gênica a longa distância	149
Fragmentsos genômicos são clonados em bacteriófagos	119	As seqüências intensificadoras podem ser tecido-específicas ou reguladas por sinais	150
Cosmídeos permitem a clonagem de grandes fragmentos de DNA genômico	121	As seqüências intensificadoras contêm sítios de reconhecimento para proteínas ligantes de DNA	152
A técnica de <i>chromosome walking</i> é usada para analisar longas extensões de DNA eucariótico	121	A transcrição gênica pode ocorrer em extratos livres de células	153
Utilização de <i>Southern e Northern blotting</i> para analisar DNA e RNA	121	Fatores de transcrição gene-específicos são proteínas ligantes de DNA	154
	121	Fatores de transcrição são purificados e clonados	155
	121	Fatores de transcrição constituem famílias estruturais	157
	129	Os fatores de transcrição são modulares	159
<b>8 A COMPLEXIDADE DO GENOMA</b>	129	Como os fatores de transcrição funcionam?	159
A descoberta de genes que sofrem processamento	130	O mecanismo de processamento celular é extraordinariamente seletivo e preciso	162
A descoberta de íntrons em genes eucarióticos	130	Pré-mRNAs sintéticos sofrem processamento em oócitos e extratos livres de células	162
Seqüências de bases específicas são encontradas nos limites exon-íntrons	132	O fracionamento de extratos livres de células permitiu identificar os fatores de processamento.	164
Vias de processamento alternativo geram mRNAs diferentes a partir de um mesmo gene	132	Fatores de processamento que atuam em <i>trans</i> determinam o processamento alternativo	165
Íntrons, algumas vezes, sinalizam domínios protéicos funcionais	135		
Regiões de controle transcricional ocorrem ao longo de genes eucarióticos	136		
A transcrição de RNA polimerase III é regulada por seqüências no meio do gene	136	<b>10 GENES MÓVEIS</b>	169
		O seqüenciamento revela organização de elementos de transposição bacterianos	170

Alguns elementos de transposição em eucariotas assemelham-se a transposons bacterianos	170
Os elementos Ty em leveduras são uma classe diferente de elementos de transposição	172
Elementos repetitivos e pseudogenes processados são remanescentes de eventos de transposição	172
Transposons bacterianos “saltam” através de intermediários de DNA	173
Elementos Ty sofrem transposição através de um intermediário de RNA	175
Interconversão entre tipos de acasalamento em leveduras ocorre através de transposição replicativa	177
Genes funcionais para imunoglobulinas são formados por rearranjos gênicos ordenados	178
Rearranjos gênicos algumas vezes falham	180
Elementos de transposição são ferramentas potentes para identificação e manipulação de genes	181

## NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DA FUNÇÃO DOS GENES

### 11 MUTAGÊNESE *IN VITRO*

A mutagênese <i>in vitro</i> é utilizada para estudar a função do gene	186
Os sítios de restrição de endonuclease fornecem o mais simples acesso à mutagênese	187
A inserção de um ligante é usada para mapear um transposon bacteriano	189
A construção de uma série de deleções define as regiões de controle transcricional	189
A mutagênese pelo método <i>linker scanning</i> permite uma análise sistemática de promotores	189
A substituição aleatória de nucleotídeos é obtida por modificação química do DNA ou por erro de incorporação enzimática	191
Oligonucleotídeos sintéticos facilitam a mutagênese	195
Os clones mutantes podem ser identificados pela hibridização e seqüenciamento de DNA	195
Oligonucleotídeos cassetes constituem um método simples para introduzir mutações dirigidas	196
A síntese de gene facilita a produção de proteínas normais e mutantes	198
A PCR pode ser utilizada para construir genes que codificam proteínas quiméricas	201

A mutagênese é a porta de entrada para o estudo das funções dos genes e da engenharia de proteínas	203
--	-----

### 12 TRANSFERÊNCIA DE GENES PARA CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A criação de linhagens de células imortais torna prática a transferência de genes	208
A transferência de genes foi inicialmente usada em estudos de vírus tumorais	208
Marcadores seletivos que funcionam em células de mamíferos permitem a transferência de genes por co-transformação	210
DNA exógeno é transientemente expresso em várias células imediatamente após transfecção	212
A amplificação de genes é usada para obter altos níveis de expressão protéica	213
Métodos especializados são desenvolvidos para as células resistentes à transfecção	215
Vetores virais introduzem o DNA exógeno nas células com grande eficiência	216
A vaccínia e o baculovírus são usados para produção de proteínas em larga escala	218
Os retrovírus fornecem vetores de alta eficiência para transferência estável de genes	219
O pesquisador tem pouco controle sobre o destino do DNA transferido	222
O RNA e o DNA anti-senso podem eliminar a função do gene	223
A recombinação homóloga é usada para inativar genes celulares	223

### 13 USANDO LEVEDURAS PARA ESTUDAR A FUNÇÃO DE GENES EUCARIÓTICOS

Genes da biossíntese em leveduras são clonados por complementação de mutantes de <i>E. coli</i>	230
Os vetores mistos replicam-se tanto em <i>E. coli</i> como em leveduras	231
Genes de leveduras podem ser clonados por estratégias de simples complementação	233
A recombinação homóloga é um evento relativamente freqüente em leveduras	234
A clonagem de genes necessários ao acasalamento revela uma via sinalizadora semelhante àquela observada nos organismos superiores	235
Os experimentos genéticos em leveduras podem responder questões bioquímicas com precisão	239
A análise genética em leveduras pode ser explorada para identificar e estudar genes de organismos superiores	244

## 14 INTRODUÇÃO DE GENES EXÓGENOS EM CAMUNDONGOS

Genes exógenos tornam-se integrados nos cromossomos dos animais receptores	249
DNA exógeno pode tornar-se integrado de forma estável em linhagens de células germinativas	249
Células precursoras embrionárias podem carregar genes exógenos	250
Transgenes podem ser regulados pela especificidade de tecido	251
Expressão do transgene pode ser direcionada para tecidos específicos	253
Transgenes podem ser usados para matar tipos específicos de células	253
Retrovírus podem ser usados para determinação de linhagens de células	254
Transgenes podem interromper o funcionamento de genes endógenos	255
Nocaut de genes por recombinação homóloga pode elucidar sistemas gênicos complexos	256
Estudo do controle genético do desenvolvimento de camundongos	257
Transgenes podem ser usados para detectar genes hospedeiros	258
Um único gene transforma camundongos fêmeas em machos	259
Camundongos transgênicos fornecem modelos de doenças humanas	259
Marca genética ( <i>imprinting</i> ) de machos e de fêmeas contribui com diferentes aspectos genéticos para suas proles	262

## 15 MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

As vantagens e as desvantagens das plantas na engenharia genética	270
Plantas completas podem ser obtidas a partir de uma única célula	270
Folhas em discos podem ser um importante alvo para transferência de genes	271
Plasmídeo Ti de <i>Agrobacterium</i> causa um tumor denominado coroa-de-galha ( <i>crown gall</i> )	272
T-DNA, parte do plasmídeo Ti, é transferido para células vegetais	273
O T-DNA tem sido modificado para servir como um vetor gênico	274
Genes-repórteres revelam a expressão transgênica em tecidos vegetais	277
Os vírus podem ser utilizados como vetores para todas as partes da planta	278

O DNA pode ser introduzido nas células vegetais através de revólver ou choque elétrico	278
O bombardeamento com esferas cobertas com DNA pode produzir organelas transgênicas	281
Os genes de plantas podem ser clonados com o uso de elementos de transposição	281
O T-DNA é usado como um mutagênico de inserção	283
A <i>Arabidopsis</i> está sendo usada como um organismo-modelo para a análise da genética molecular de vegetais	286

## ANÁLISE DE PROCESSOS BIOLÓGICOS ATRAVÉS DE DNA RECOMBINANTE

### 16 MOLÉCULAS DO RECONHECIMENTO IMUNOLÓGICO

	289
A estrutura básica dos anticorpos é definida	290
Tecnologia do DNA recombinante comprova hipótese de Dreyer e Bennett	290
Rearranjo gênico de anticorpos gera diversidade adicional na junção V-C	291
Troca de classes de imunoglobulinas fornece especificidades de reconhecimento às moléculas de anticorpos com propriedades funcionais diferentes	294
Mecanismo de rearranjo de genes de anticorpos pode ser estudado através de inserção de genes artificiais em células	295
Estudo de atividade celular teve grande avanço após início de clonagem de genes	298
Células T reconhecem antígenos somente em células do mesmo indivíduo	300
A clonagem de genes do MHC demonstra que identidade própria é determinada por alguns genes polimórficos	301
Receptores de células T reconhecem apenas antígeno associado a moléculas de MHC	301
Comunicação intercelular regula funções do sistema imunológico	303
Genes da superfamília de imunoglobulinas codificam proteínas que participam de interações celulares	305
Disfunções do sistema imune são responsáveis por várias doenças	306

## 17 TRANSMISSÃO DE SINAIS ATRAVÉS DE MEMBRANAS

Receptor de acetilcolina é um canal iônico aberto por ligantes	309
Alguns receptores estão acoplados a sistemas de mensageiros secundários via proteínas ligantes a GTP	310
Receptores ligados a proteínas G atravessam a membrana sete vezes	310
Troca de domínio revela a base estrutural do acoplamento receptor-efetor	313
Pigmentos da visão são receptores de sinalização	314
Receptores do fator de crescimento têm atividade enzimática intrínseca	316
Receptores podem estar associados a proteínas quinases intracelulares	318
Receptores ativam sistemas mensageiros secundários comuns	318
Fosforilação de proteínas é um dos principais mecanismos para sinalização	320
Receptores esteróides são fatores de transcrição	322
Os sinais de AMP <sub>c</sub> alcançam o núcleo via fosforilação do fator de transcrição	323
Estudo de genes-alvo revela a organização de vias de transdução de sinais	325
Genes precoces imediatos são mensageiros terciários	325

Câncer é uma doença genética	328
Células tumorais apresentam propriedades aberrantes quando crescidas em cultura de células	331
Vírus tumorais introduziram os métodos moleculares no estudo do câncer	332
Oncogenes retrovirais são capturados do DNA celular	332
Vírus podem ativar proto-oncogenes celulares através de mutagênese de inserção	332
Análise de cromossomos tumorais revela o rearranjo de proto-oncogenes	334
Fenótipo transformado pode ser passado via transfecção mediada pelo DNA	335
O oncogene humano ativado é clonado	336
O oncogene do carcinoma humano de bexiga é um gene <i>ras</i> ativado	341
O oncogene <i>ras</i> do carcinoma da bexiga é ativado por uma mutação pontual	341
Os proto-oncogenes codificam componentes de vias de transdução de sinais	343
Os proto-oncogenes podem codificar fatores de crescimento ou seus receptores	345

Muitos proto-oncogenes atuam como transdutores de sinais intracelulares	345
Alguns proto-oncogenes são fatores de transcrição	347
Descobrimos experimentalmente a complexidade do câncer: a teoria de múltiplos impactos	348
Oncogenes causam câncer em camundongos transgênicos	349
O paradoxo da fusão: o crescimento normal é dominante à transformação	350
A suscetibilidade ao câncer pode ser hereditária	350
A clonagem do gene de suscetibilidade ao retinoblastoma	354
A proteína RB é o alvo de oncogenes de DNA de vírus tumorais	354
O estranho caso da p53: um oncogene que muda para o outro lado	355
As várias etapas do câncer colorretal: uma história real sobre oncogenes e antioncogenes	356
Câncer resulta do acúmulo de mutações dominantes e recessivas	359

## 19 ANÁLISE MOLECULAR DO CICLO CELULAR

O ciclo celular possui quatro estágios	365
Existem dois tipos de controle no processo de divisão celular	366
Leveduras são bons sistemas para o estudo do controle do ciclo celular	368
Mutantes termosensíveis são uma valiosa ferramenta no estudo do ciclo de divisão celular	368
Gene <i>CDC28</i> codifica uma proteína quinase onipresente	372
Atividade de proteína quinase da proteína Cdc2 varia no ciclo celular	374
MPF contém Cdc2	374
Clonagem das ciclinas	375
Ciclina e Cdc2 formam um complexo de proteínas	376
A destruição da ciclina é necessária para inativar a atividade quinase	378
Grupo diferente de ciclinas regula as proteínas Cdc28 na fase G1 da mitose	379
Outras proteínas Cdc estão também envolvidas na regulação da atividade quinase de Cdc2	382
DNA recombinante estabelece uma linguagem comum para diferentes sistemas experimentais	382

## 20 GENES QUE CONTROLAM O DESENVOLVIMENTO DA *Drosophila*

Casualidade e triagem genética sistemática identificam os genes que controlam o desenvolvimento	385
Os primeiros genes do desenvolvimento da <i>Drosophila</i> foram clonados por <i>chromosome walking</i>	386
O <i>homeo domínio</i> é compartilhado entre os genes de desenvolvimento da <i>Drosophila</i>	388
A polaridade ântero-posterior surge do gradiente de uma proteína do <i>homeo domínio</i>	390
Os genes <i>gap</i> definem as primeiras subdivisões do embrião	391
Genes de segmentação dividem o embrião em listras	391
A proteína <i>bicoid</i> regula diretamente a transcrição de <i>hunchback</i>	392
A expressão de listras é codificada por elementos reguladores distintos que atuam em <i>cis</i>	394
A especificidade dos genes homeóticos permanece inexplicada	395
A formação das extremidades do embrião requer uma via de transdução de sinais dependente de uma proteína quinase	397
A polaridade dorso-ventral é atingida pelo transporte regulado de um fator de transcrição para o núcleo	398
Os genes de desenvolvimento da <i>Drosophila</i> ajudam a isolar novos genes de desenvolvimento de vertebrados	400

## 21 OS GENES QUE ESTÃO POR TRÁS DO FUNCIONAMENTO DO CÉREBRO

A clonagem dos genes que especificam o desenvolvimento dos neurônios	405
Os fatores neurotróficos estimulam o crescimento e a diferenciação dos neurônios	406
Os retrovírus são usados para marcar e imortalizar os neurônios	408
A clonagem e a mutagênese estabelecem modelos estruturais dos canais iônicos sensíveis à voltagem	409
Os receptores de neurotransmissores são membros de uma grande família de genes	412
A clonagem por homologia é usada para isolar componentes das vias de transdução de sinal em neurônios olfativos	415
A aprendizagem e a memória exigem mudanças estáveis na função neural	418
	419

A clonagem molecular e o mapeamento genético começam a explorar a doença de Alzheimer	423
---	-----

## 22 O DNA RECOMBINANTE E A EVOLUÇÃO

A vida pode ter-se originado do RNA	429
Por que tanto DNA?	434
Os genes podem ser ligados (ou desligados) por elementos móveis	435
Os íntrons são componentes antigos dos genes	436
O embaralhamento de exons contribui para a evolução gênica	437
A duplicação de genes é uma força motriz na evolução	439
Relógios de DNA medem a velocidade da evolução	440
O seqüenciamento de RNA ribossômico identifica os três grandes reinos de organismos vivos	441
A tecnologia do DNA recombinante separou as relações de parentesco na família dos primatas	442
O DNA mitocondrial como relógio molecular	442
Algumas organelas intracelulares foram outrora bactérias	443
A impressão digital ( <i>fingerprinting</i> ) de DNA nos ajuda a entender a base genética do altruísmo	444

## APLICAÇÕES DO DNA RECOMBINANTE NA BIOTECNOLOGIA

## 23 O DNA RECOMBINANTE NA MEDICINA E NA INDÚSTRIA

Sistemas de expressão são desenvolvidos para produzir proteínas recombinantes	449
A insulina é a primeira droga recombinante licenciada para utilização humana	450
O hormônio do crescimento humano recombinante é produzido em bactérias por dois métodos	451
Uma vacina contra o vírus da hepatite B é produzida em levedura pela expressão de antígeno viral de superfície	451
Proteínas humanas complexas são produzidas por culturas de células de mamíferos em grande escala	454
Anticorpos monoclonais funcionam como "balas mágicas"	454
Anticorpos humanos que reconhecem antígenos específicos podem ser diretamente clonados e selecionados	456
	458

Anticorpos monoclonais "humanizados" mantêm a atividade, mas perdem a imunogenicidade 460  
 A engenharia de proteínas pode modelar anticorpos para aplicações específicas 461  
 A engenharia de proteínas é usada para melhorar uma enzima detergente 461  
 Variantes do hormônio do crescimento com propriedades de ligação melhoradas são selecionadas por exposição em fagos 462  
 Novas tecnologias prometem novas estratégias para o planejamento de fármacos 464

## 24 PRODUÇÃO DE PLANTAS E ANIMAIS IMPORTANTES NA AGRICULTURA

Plantas que expressam a proteína da capa viral se tornam resistentes a infecções 467  
 Insetos não conseguem atacar plantas que expressam uma toxina de bactéria 468  
 Plantas transgênicas tolerantes a herbicidas permitem uma melhor manipulação das ervas daninhas 469  
 Flores que exibem novas colorações e novos padrões podem ser obtidas por engenharia genética 470  
 O uso de plantas para produzir proteínas é de grande importância comercial 472  
 O hormônio de crescimento bovino recombinante estimula a produção de leite e aumenta a utilização de alimento 474  
 Procedimentos desenvolvidos para a geração de animais transgênicos 474  
 Proteínas de uso farmacêutico podem ser produzidas em animais transgênicos 475  
 Animais da pecuária podem ser protegidos contra infecção viral por meio de expressão transgênica da proteína da capa do vírus 476  
 A implementação de biotecnologia agrícola requer pesquisa constante e discussão social 477

## 25 CONVOCANDO O DNA RECOMBINANTE PARA COMANDAR A LUTA CONTRA A AIDS

Vírus da imunodeficiência humana é a causa da AIDS 481  
 HIV é um retrovírus 482  
 HIV pertence à classe mais complexa dos retrovírus descobertos até o momento 482  
 Gene *tat* regula a síntese do RNA do HIV 484  
 Transporte do RNA do HIV do núcleo ao citoplasma celular é regulado pela Rev 485

Gene *nef* parece ser essencial para replicação *in vivo* do vírus da AIDS 488  
 AZT interfere na síntese do DNA viral 490  
 Protease do HIV é um outro alvo para o tratamento da AIDS 492  
 HIV infecta e mata linfócitos T que expressam o receptor do CD4 493  
 Moléculas CD4 solúveis podem ser utilizadas para prevenir a infecção com HIV 493  
 Toxinas conjugadas com as moléculas CD4 matam especificamente células infectadas pelo HIV 496  
 Transporte de proteínas do HIV para a superfície celular pode ser inibido 496  
 Vírus da imunodeficiência simia e modelos animais também são úteis no estudo da AIDS 496  
 Proteínas recombinantes do HIV poderão ser imunógenos eficazes na vacinação contra a AIDS 497  
 Sarcoma de Kaposi é um tumor associado com a AIDS 500  
 A origem e a evolução do vírus da imunodeficiência humana são reveladas através das técnicas do DNA recombinante 500  
 DNA recombinante lidera a batalha contra a AIDS 501

## IMPACTO DO DNA RECOMBINANTE NA GENÉTICA HUMANA

### 26 MAPEAMENTO E CLONAGEM DE GENES DE DOENÇAS HUMANAS

As doenças genéticas humanas têm padrões de herança simples ou complexa 508  
 A base metabólica de algumas doenças hereditárias humanas é determinada 509  
 A "clonagem posicional" (*positional cloning*) usa a localização de um gene no cromossomo para cloná-lo 510  
 O mapeamento subcromossômico de genes e marcadores pode ser realizado com células somáticas híbridas 510  
 Genes clonados e marcadores podem ser localizados por hibridização *in situ* em cromossomos 512  
 Anormalidades cromossômicas fornecem outros meios de localização de genes relacionados às doenças 514  
 O polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs) serve como marcador para a análise de ligação 515

A ligação é calculada a partir da frequência de recombinação	518	Privacidade genética vai tornar-se um tema importante	559
Cromossomos X anormais fornecem meios para clonar gene da distrofia muscular de Duchenne	519		
Os cDNAs do gene de DMD foram clonados usando duas estratégias	521	<b>28 TRABALHANDO EM FUNÇÃO DA GENETERAPIA HUMANA</b>	563
O gene da fibrose cística foi clonado pela análise de RFLP e <i>chromosome jumping</i>	522	Defeitos gênicos são corrigidos em animais transgênicos	564
O gene de fibrose cística foi identificado por sequenciamento de DNA	525	A geneterapia humana suscita discussão de valores éticos	565
As indicações sobre a função de proteínas surgiram a partir das seqüências de genes clonados de doenças	526	O defeito da fibrose cística pode ser corrigido <i>in vitro</i>	565
Os genes clonados são utilizados em estudo de expressão e função de proteínas	528	Células hematopoiéticas são usadas para a expressão de genes humanos em animais	568
A clonagem de genes causadores de doenças poligênicas e multifatoriais é difícil	528	Células da medula óssea geneticamente manipuladas sobrevivem por longos períodos <i>in vivo</i>	569
Genes candidatos podem ser usados para clonar genes de doenças humanas	529	Fibroblastos da pele são células-alvo para geneterapia	569
A clonagem de genes de doenças humanas continuará a depender de estudos de ligação	529	Hepatócitos podem ser usados para geneterapia	571
		Experimentos de geneterapia têm sido realizados em animais de grande porte	572
		A transferência de mioblasto é usada no tratamento da distrofia muscular de Duchenne	572
	535	Genes podem ser distribuídos diretamente para os sítios-alvo <i>in vivo</i>	573
<b>27 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS GENÉTICAS UTILIZANDO DNA</b>		Linfócitos geneticamente modificados são administrados em seres humanos	573
Marcadores bioquímicos usados para diagnósticos precoces	536	A deficiência da adenosina desaminase humana é tratada pela geneterapia	574
Mutações nos genes da globina causam as talassemias	536		
RFLPs e análises de ligação são usados para diagnóstico	539	<b>29 ESTUDO DE GENOMAS INTEIROS</b>	579
A ligação de desequilíbrio pode ser usada para diagnóstico	543	Grandes fragmentos de DNA podem ser separados por eletroforese em gel de campo pulsado ( <i>pulsed field gel electrophoresis – PFGE</i> )	580
Deleções de exons são usadas para diagnóstico direto de DMD	544	PFGE é usado para fazer mapas físicos em larga escala	581
Mutações gênicas podem alterar o sítio de restrição de uma enzima: diagnóstico direto de anemia falciforme	545	A análise do genoma clonado de <i>E. coli</i> requer encontrar superposição nos segmentos	583
Sondas oligonucleotídicas alelo-específicas (ASO) são usadas para detectar mutações	545	Cromossomos artificiais de leveduras ( <i>yeast artificial chromosomes – YACs</i> ) são usados para clonagem de grandes fragmentos de DNA	586
A detecção de mutações pela técnica da ligase	547	YACs são usados para ligar <i>contigs</i> de cosmídeos de <i>C. elegans</i>	588
A PCR revoluciona o diagnóstico utilizando DNA	548	Clones de cosmídeo e de YACs são ordenados ao longo de cromossomos das glândulas salivares de <i>Drosophila</i> por hibridização <i>in situ</i>	588
Métodos de diagnóstico utilizando DNA para distinguir tipos diferentes de tumores	550	Um cromossomo inteiro de levedura foi sequenciado	589
Novos métodos foram desenvolvidos para testar mutações	553		
A análise genética pode trazer tanto problemas quanto benefícios	554		
<i>Loci</i> hipervariáveis ou seqüências repetidas <i>em tandem</i> podem ser usados para identificar indivíduos	554		
DNA <i>fingerprinting</i> é usado nos tribunais	557		

Método <i>multiplex</i> agiliza seqüenciamento de DNA			
Seqüenciamento automatizado de DNA acelera enormemente o processo	589	Fragmentos de cromossomos humanos irradiados com raios X são usados para mapeamento genético	604
A compreensão das seqüências de DNA é favorecida pelas comparações de homologias	591	Fragmentos de DNA humano clonados precisam ser ordenados de forma contígua em tamanhos correspondentes a megabases	605
Novos métodos serão necessários para seqüenciamento de DNA em larga escala	594	Sítios com uma seqüência marcada identificam DNAs clonados	606
	596	Genes completos de doenças humanas podem ser agrupados em YACs	607
		Os YACs são utilizados para clonar os telômeros dos cromossomos humanos	607
	599	Os YACs auxiliaram na elucidação dos mistérios da síndrome do X frágil	607
		Seqüenciamento em larga escala do gene HPRT humano foi feito em quatro estágios	610
Fazendo um mapa genético humano de alta resolução utilizando marcadores de referência	601	O armazenamento e a análise de dados obtidos de um genoma requerem grandes bancos de dados	611
Cromossomos humanos podem ser separados utilizando fracionadores de células	602	O mapeamento de genes pode ser facilitado pela comparação entre espécies	611
DNA para clonagem pode ser microdissecado de cromossomos humanos	602	O entendimento de nosso genoma pode beneficiar a humanidade	611
Células somáticas híbridas servem como fonte de DNA cromossômico humano purificado	604		

### 30 O PROJETO GENOMA HUMANO – DESCOBRINDO TODOS OS GENES HUMANOS