



# UNIVERSIDADE DE ÉVORA

## LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Engenharia Genética - Clonagem de DNAs em Bactérias (Módulo I)

ACÇÃO FOCO - 1998

Docente Responsável: Prof. Carlos Sinogas

---

Carlos Moreira, David Mendes

---

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO

CLONAGEM DE GENES

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VECTORES

TIPOS DE VECTORES

Plasmídeos

Características básicas dos plasmídeos

Conjugação e compatibilidade

Classificação dos plasmídeos

Bacteriófagos

Características básicas dos bacteriófagos

Fagos lisogénicos

a) Organização génica na molécula de ADN de  $\lambda$

- [b\) As formas linear e circular do ADN de  \$\lambda\$](#)
- [c\) M13 – um fago filamentoso](#)
- [d\) O M13 como um vector de clonagem atraente](#)
- [e\) Os vírus como veículos de clonagem para outros organismos](#)

## [VECTORES DE CLONAGEM PARA E. COLI](#)

[Vectores de Clonagem baseados em plasmídeos de E. Coli](#)

[Vectores de Clonagem baseados no bacteriófago M13](#)

[Vectores híbridos plasmídeo-M13](#)

[Vectores de clonagem baseados no bacteriófago  \$\lambda\$](#)

[Vectores de inserção e de substituição](#)

[Vectores de inserção](#)

[Vectores de substituição](#)

[Cosmídeos](#)

[Vectores de alta capacidade](#)

[Vectores para outras bactérias](#)

[Vectores de Clonagem para outros organismos além da E. coli](#)

[Vectores para leveduras e outros fungos](#)

[Plasmídeos epissomais](#)

[Outros tipos de vectores de clonagem de leveduras](#)

[a\) Plasmídeos integrativos de leveduras \(YIps\)](#)

[b\) Plasmídeos replicativos de leveduras \(YRps\)](#)

[Cromossomas artificiais de leveduras](#)

[Vectores para outras leveduras e fungos](#)

## Vectores de clonagem para plantas superiores

Agrobacterium tumefaciens – o engenheiro genético mais pequeno da natureza

a) A utilização do plasmídeo Ti para introduzir novos genes numa célula vegetal

b) Produção de plantas transformadas através do plasmídeo Ti

Clonar genes em plantas por transferência directa de genes

A utilização de vírus de plantas como vectores de clonagem

Os problemas com a clonagem de genes em plantas monocotiledóneas

## Vectores de clonagem para células animais

Vectores baseados em vírus animais

## BIBLIOGRAFIA

---

# INTRODUÇÃO

Imagine que se podem "ensinar" bactérias ou outros microorganismos unicelulares a produzir produtos químicos importantes para o nosso organismo e que normalmente apenas são produzidos pelos seres humanos. Poderá isso ter alguma utilidade para a medicina? Já imaginou ensinar bactérias a limpar derrames de petróleo e outros produtos nos oceanos? Poderá isso servir como uma boa ferramenta para a protecção ambiental? Imagine que pode ensinar plantas de cultivo a fabricar o seu próprio fertilizante ou alimentos, tão importantes como o arroz, serem enriquecidos com novas vitaminas. Já imaginou a utilidade de tudo isto na nossa tentativa de alimentar a população humana em constante crescimento?

O primeiro ponto desta lista de desejos é já hoje uma realidade na nossa medicina, o segundo ponto já foi conseguido, mas apresenta ainda limitações significativas e o terceiro ponto é actualmente o grande objectivo no campo da genética, estando a ser vigorosamente perseguido. Pensa-se que num período

relativamente curto surgirão resultados com êxito e as expectativas neste campo são inúmeras, pois as possibilidades de intervenção são ilimitadas.

Em qualquer dos casos o processo de "ensino" consiste sempre em acrescentar a um organismo genes de outro organismo que é capaz de fazer algo que o organismo receptor não é capaz de fazer. Este processo junta técnicas de biologia molecular, genética microbiana e bioquímica. Tornou-se conhecido por "Tecnologia do ADN recombinante" e popularmente por "Engenharia genética" e "Clonagem". Entende-se por ADN recombinante, todo o ADN composto por segmentos de diferente origem e ligados entre si, podendo esta origem ser de duas espécies diferentes (ADN natural) ou a combinação de uma espécie (ADN natural) com ADN sintético. Um exemplo da combinação de ADN de duas espécies diferentes é o caso da inserção de um gene humano no ADN de uma levedura, obrigando esta a funcionar como uma "fábrica" produtora de proteínas humanas.

O objectivo deste trabalho é mostrar exactamente os "meios de transporte" utilizados pelos genes até atingirem o novo ADN, isto é, identificar e caracterizar os principais vectores de clonagem.

[Índice](#)

---

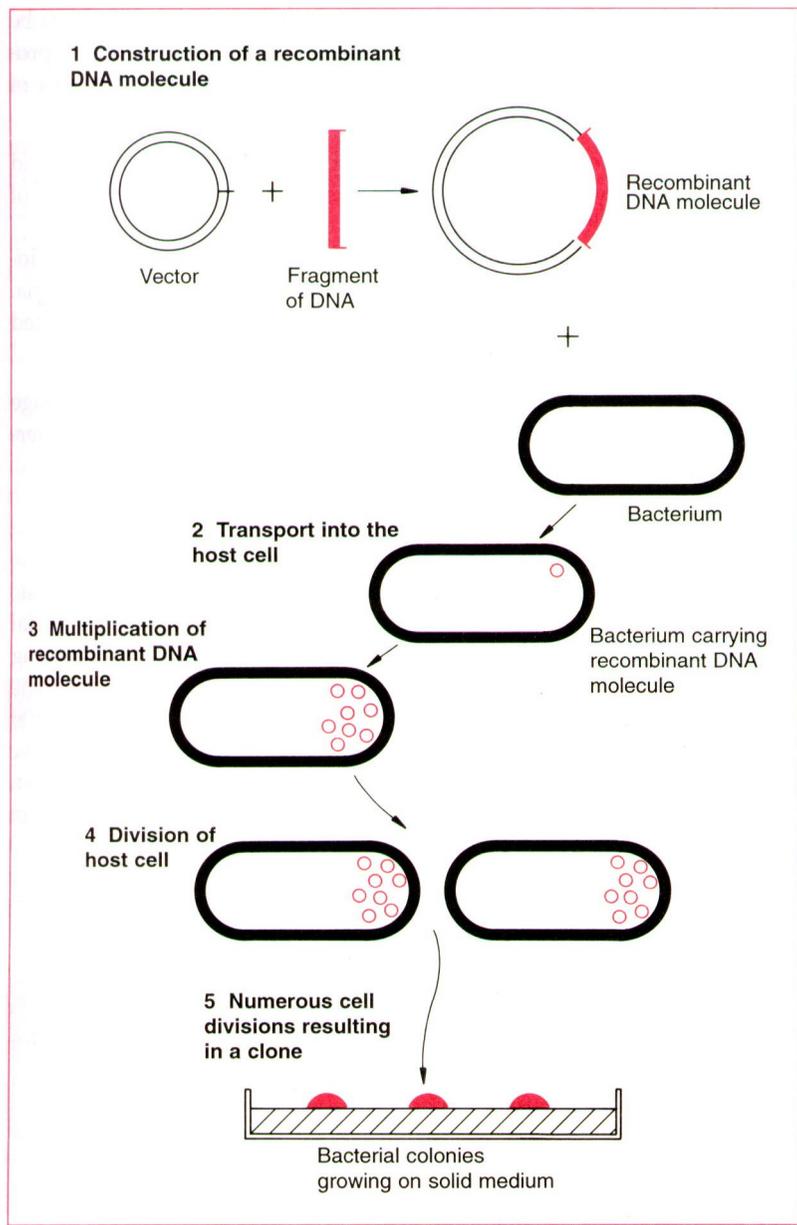
## CLONAGEM DE GENES

Um dos principais objectivos nos trabalhos com ADN recombinante é obter muitas cópias de um determinado gene. Para isso produzem-se bactérias ou leveduras transgênicas que contêm o gene desejado, deixando-as depois multiplicarem-se, o que nos permite obter grandes quantidades dos genes pretendidos.

Uma célula ou organismo transgénico contém ADN estrangeiro, isto é, ADN sintético ou de outro organismo, integrado no seu próprio material genético. Para assegurar que o gene estrangeiro seja integrado no organismo transgénico deve ter-se em atenção os seguintes passos (Fig.1):

Um fragmento de ADN contendo o gene a ser clonado, é inserido num elemento genético auto-replicante – geralmente um vírus ou um plasmídeo – chamado vector, de modo a produzir uma "quimera" ou "molécula de ADN recombinante".

1. O vector funciona como um veículo que transporta o gene para o interior da célula hospedeira, que é normalmente uma bactéria, embora outras células vivas possam ser utilizadas.
2. Dentro da célula hospedeira o vector multiplica-se, produzindo numerosas cópias idênticas não só de si próprio, mas também do gene que transporta.
3. Quando a célula hospedeira se divide, a sua descendência recebe cópias das moléculas de ADN recombinante, continuando depois a replicação dos vectores.
4. Após um grande número de divisões celulares, é produzido uma colónia ou clone, de células hospedeiras idênticas. Cada célula no clone contém uma ou mais cópias da molécula de ADN recombinante. O gene transportado pela molécula recombinante é agora conhecido como sendo clonado.



**Fig. 1 – Os principais passos da clonagem de genes**

Quando as células hospedeiras são leveduras os genes estrangeiros podem ser inseridos de 3 formas diferentes:

1. O ADN recombinante está presente em uma ou mais cópias do plasmídeo no qual foram inseridos um centrómero (clonado de um cromossoma de levedura) e um local de replicação. O centrómero torna os plasmídeos estáveis, de modo a que o fuso acromático possa distribuí-los pelos núcleos filhos da levedura.

2. O ADN recombinante está presente em muitas cópias de um plasmídeo sem centrómero. Estes plasmídeos são instáveis e passam para as células filhas ao acaso.
3. O ADN recombinante é inserido directamente num cromossoma de levedura.

[Índice](#)

---

## **CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VECTORES**

Uma molécula de ADN deve dispor de várias características de modo a ser capaz de agir como um veículo para a clonagem de genes. A característica mais importante é que deve ser capaz de se replicar dentro da célula hospedeira, de modo a que se possam produzir numerosas cópias de ADN recombinante, sendo estes capazes de passar para as células filhas.

Um veículo de clonagem também precisa de ser relativamente pequeno, sendo o seu tamanho ideal inferior a 10 Kb, pois as moléculas grandes tendem a degradar-se durante a purificação e são também mais difíceis de manipular. Dois tipos de moléculas de ADN que satisfazem estes critérios podem ser encontrados em células bacterianas: plasmídeos e cromossomas de bacteriófagos. Embora os plasmídeos sejam frequentemente utilizados como veículos de clonagem, dois dos tipos de vectores mais importantes, hoje em dia, são derivados de bacteriófagos.

[Índice](#)

---

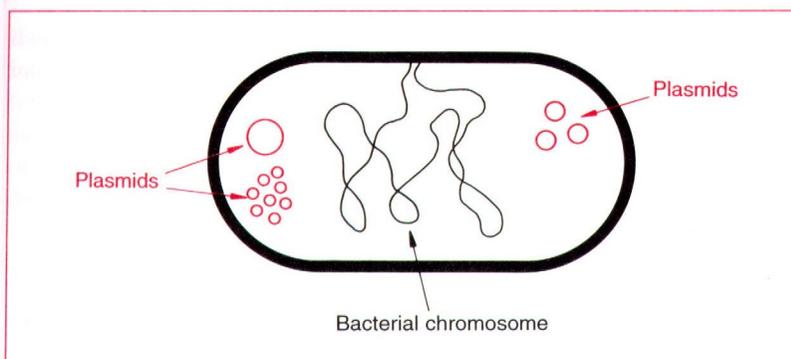
## **TIPOS DE VECTORES**

### **Plasmídeos**

#### **Características básicas dos plasmídeos**

Os plasmídeos circulares extracromossómicos de ADN (Fig. 2), foram os primeiros vectores a serem utilizados na clonagem de genes. Para uma dada

experiência selecciona-se um plasmídeo com certas características específicas.



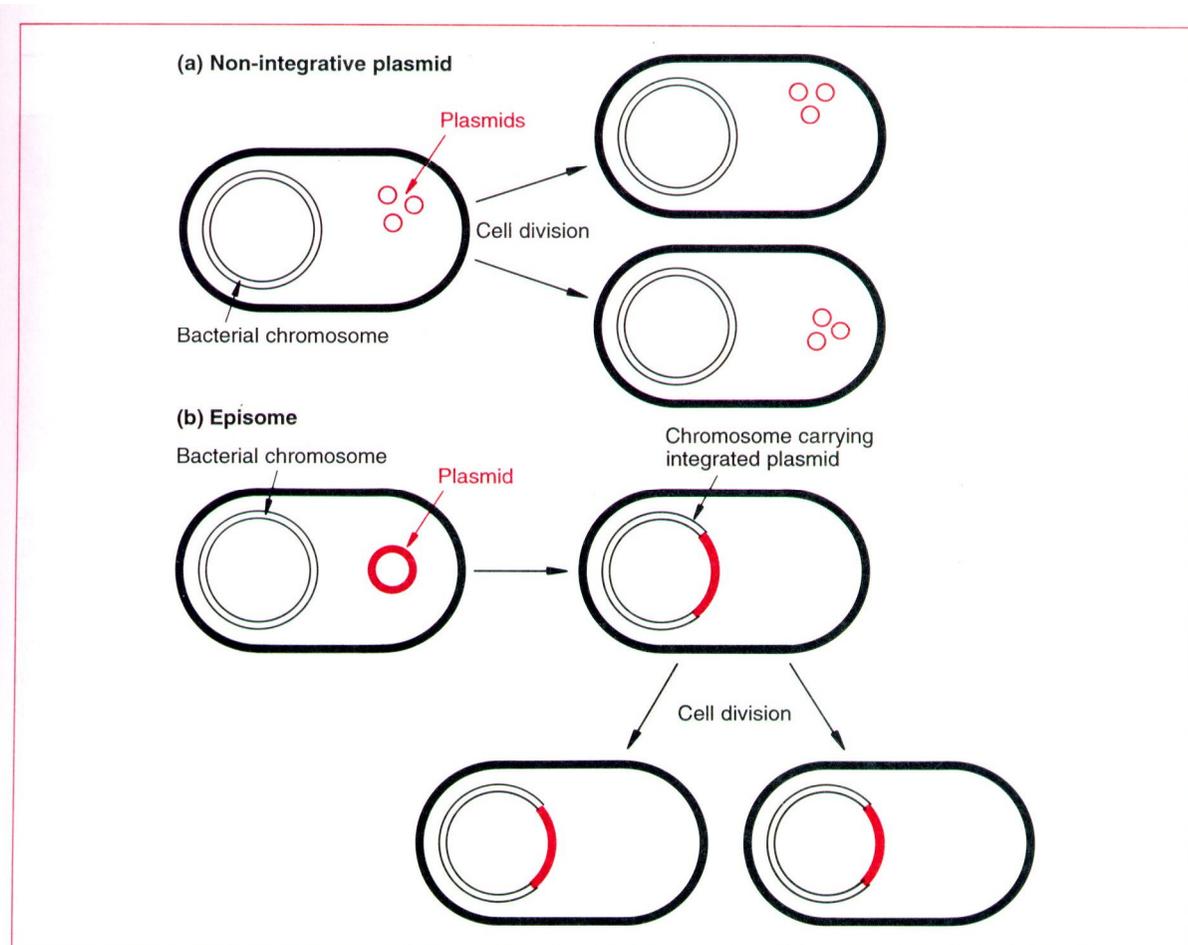
**Fig. 2 - Plasmídeos: elementos genéticos independentes encontrados em células bacterianas.**

Primeiro o plasmídeo deve transportar um ou mais genes que lhe confirmam propriedades particulares, tais como a resistência a certos antibióticos – como o Cloranfenicol e a Ampicilina – que possam servir como indicadores seleccionáveis.

Segundo, o plasmídeo deve possuir pelo menos uma sequência de ADN que possa actuar como origem de replicação, de modo a que seja capaz de se multiplicar independentemente dos cromossomas bacterianos. (Fig.3a). Os plasmídeos mais pequenos aproveitam as enzimas de replicação de ADN da célula hospedeira de modo a fazerem cópias de si próprios, enquanto que alguns dos maiores transportam genes que codificam enzimas especiais e específicas para a replicação dos plasmídeos.

Alguns tipos de plasmídeos são também capazes de se replicarem inserindo-se no cromossoma bacteriano (Fig. 3b). Estes plasmídeos integrativos ou epissomas podem ser mantidos de um modo estável nesta forma ao longo de numerosas divisões celulares, mas irão em algumas alturas existir como elementos independentes.

Terceiro, o plasmídeo deve ter apenas um local de reconhecimento onde as endonucleases o irão cortar. Se não tiver esse local, o plasmídeo não pode ser aberto para a inserção de novos genes; se tiver dois ou mais a endonuclease de restrição e a ADN ligase podem formar muitos produtos diferentes em vez de um só. Com apenas um local de reconhecimento a probabilidade de conseguir a inserção desejada é maior mas mesmo assim não é elevada.



**Fig. 3 – Estratégias de replicação para plasmídeos não integrativos (a) e epissomas (b).**

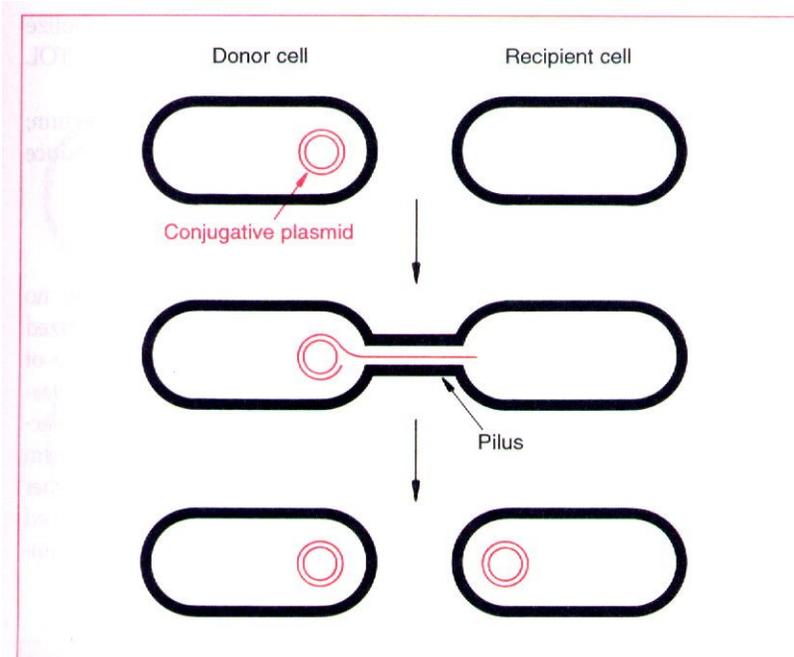
Embora os plasmídeos sejam exclusivos de organismos procariontes, há no entanto alguns organismos eucariontes que possuem moléculas circulares e autoreplicantes de ADN no seu genoma (ex. *Saccharomyces cerevisiae*). Estes plasmídeos eucarióticos não podem, (segundo alguns autores), ser considerados como verdadeiros plasmídeos, uma vez que a sua forma circular não é permanente, apresentando nalgumas ocasiões uma estrutura linear.

[Índice](#)

### Conjugação e compatibilidade

Os plasmídeos podem ser divididos em dois grupos: os conjugáveis e os não conjugáveis. Os plasmídeos conjugáveis são caracterizados pela capacidade de promoverem a conjugação sexual entre células bacterianas (Fig. 4) e, conseqüentemente, a sua passagem de uma célula para todas as outras células de uma

cultura. A conjugação e a transferência de plasmídeos são controladas por um conjunto de genes *tra* ou de transferência, que estão presentes nos plasmídeos conjugáveis e ausentes dos plasmídeos do tipo não conjugáveis. No entanto, um plasmídeo não conjugável pode, em algumas circunstâncias, ser cotransferido com um plasmídeo conjugável quando ambos estão presentes na mesma célula.



**Fig. 4- Transferência de plasmídeos por conjugação entre células bacterianas.**

Vários tipos diferentes de plasmídeos podem ser encontrados numa só célula, incluindo mais do que um plasmídeo conjugável diferentes numa determinada altura. De facto, tem-se conhecimento da existência de até 7 plasmídeos diferentes num determinado momento em células de *Escherichia coli*. De modo a permitir a coexistência na mesma célula, os vários plasmídeos devem ser compatíveis. Se dois plasmídeos forem incompatíveis então a célula perderá rapidamente um deles. Assim sendo, podem-se formar vários grupos de incompatibilidade baseados no facto de poderem ou não existir, estando os plasmídeos de um mesmo grupo de incompatibilidade relacionados de várias maneiras. A base da incompatibilidade ainda não é bem compreendida, mas pensa-se que certos acontecimentos durante a replicação dos plasmídeos estão na base do fenómeno.

[Índice](#)

## *Classificação dos plasmídeos*

A classificação mais útil dos plasmídeos de ocorrência natural é baseada nas características principais codificadas pelos genes plasmídicos. De acordo com esta classificação, os cinco principais tipos de plasmídeos são os seguintes:

1. **Plasmídeos F ou de fertilidade** – transportam apenas genes tra e não possuem nenhuma característica além da capacidade de promoverem a transferência conjugativa de plasmídeos; ex. plasmídeo F da *E. coli*.
2. **Plasmídeo R ou de resistência** – transportam genes que conferem à bactéria hospedeira resistência a um ou mais agentes antibacterianos, tais como o chloranphenicol, a ampicilina e o mercúrio. Os plasmídeos R são muito importantes em microbiologia clínica na medida em que o seu alastramento através de populações naturais pode ter consequências profundas no tratamento de infecções bacterianas; ex. RP4, normalmente encontrado em *Pseudomonas*, mas que ocorrem também em muitas outras bactérias.
3. **Plasmídeos Col** – que codificam colicinas, proteínas que matam outras bactérias; ex. Col E1 da *Escherichia coli*.
4. **Plasmídeos degradativos** – permitem às bactérias hospedeiras metabolizarem moléculas invulgares, tais como o tolueno e o ácido salicílico; ex. TOL da *Pseudomonas putida*.
5. **Plasmídeos virulentos** – conferem patogenicidade nas bactérias hospedeiras; ex. Ti do *Agrobacterium tumefaciens*, que induzem a doença "Crown gall" em plantas dicotiledóneas.

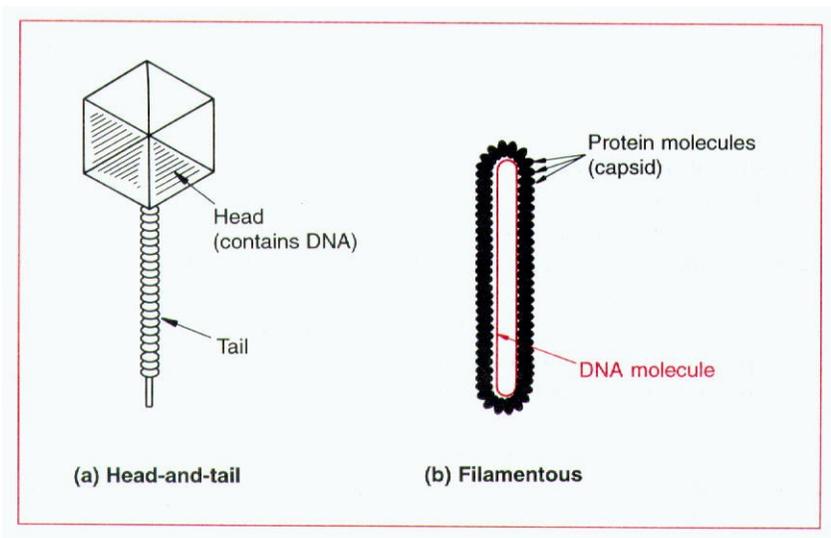
[Índice](#)

---

## **Bacteriófagos**

### **Características básicas dos bacteriófagos**

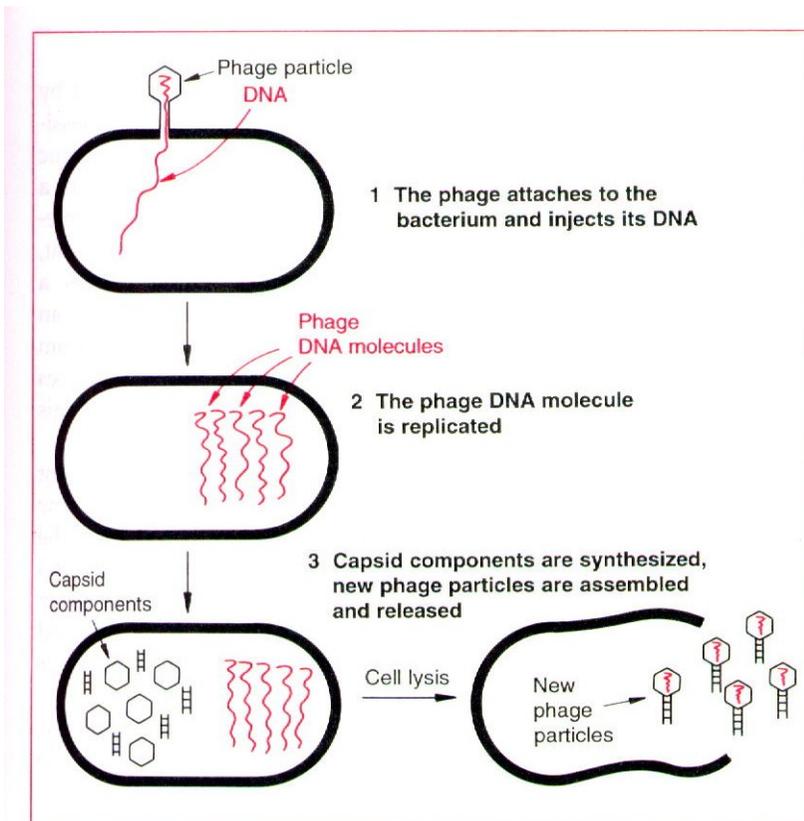
Os bacteriófagos ou fagos, são vírus que infectam especificamente as bactérias. Tal como todos os vírus, os fagos têm uma estrutura muito simples, consistindo meramente numa molécula de ADN ( ou ocasionalmente ARN), que transporta determinado número de genes, nos quais se incluem vários para a replicação do fago, rodeado por um invólucro protector ou um cápside composto por moléculas proteicas.(Fig. 5).



**Fig. 5- Representação esquemática dos dois principais tipos de fago. (a) - Cabeça e cauda, ex.  $\lambda$ . (b) - Filamentoso, ex. M13.**

O padrão geral de infecção/contaminação, que é o mesmo para todos os tipos de fagos, é um processo de 3 etapas (Fig.6)

1. O fago liga-se ao exterior da bactéria e injecta o seu ADN cromossómico para o interior desta.
2. A molécula de ADN do fago é replicada, normalmente por acção de enzimas codificadas por os genes presentes no cromossoma do fago.
3. Outros genes do fago orientam a síntese dos componentes proteicos do cápside, levando á montagem de novos fagos e posterior libertação da bactéria.



**Fig. 6- Esquema geral da infecção de uma célula bacteriana por um bacteriófago.**

Em alguns tipos de fagos um ciclo completo de infecção decorre muito rapidamente, possivelmente em menos de 20 minutos. Este tipo de infecção rápida é chamada um ciclo lítico, pois a libertação dos novos fagos está associada á lise da célula bacteriana. A característica principal de um ciclo lítico de infecção é que a replicação do ADN do fago é seguida imediatamente pela síntese de proteínas do cápside, e a molécula de ADN do fago nunca se mantém numa condição estável na célula hospedeira.

[Índice](#)

### *Fagos lisogénicos*

Em contraste com o ciclo lítico, a infecção lisogénica é caracterizada pela retenção da molécula de ADN do fago na bactéria hospedeira, possivelmente durante milhares de divisões celulares. Com a presença de muitos fagos lisogénicos o ADN do fago é inserido no genoma da bactéria de uma forma similar á inserção epissómica.(Fig. 3b).

A forma integrada do ADN do fago (chamado o profago) é quiescente e a bactéria (referida como lisogénio) que transporta o profago não se consegue normalmente distinguir, em termos fisiológicos de uma célula não infectada. Contudo, o profago é eventualmente libertado do genoma hospedeiro e o fago volta ao modo lítico e provoca a lise da célula. O ciclo de infecção de  $\lambda$ , um fago lisogénico típico é mostrado na fig. 7.

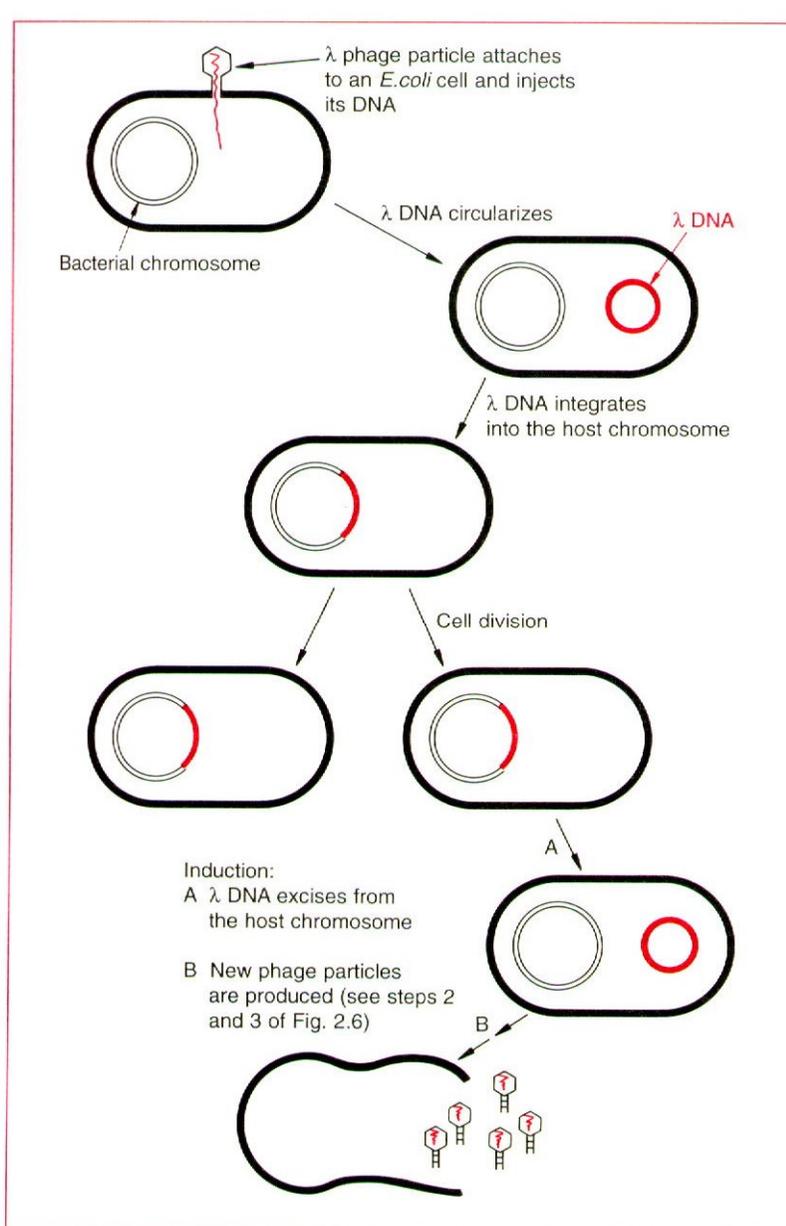
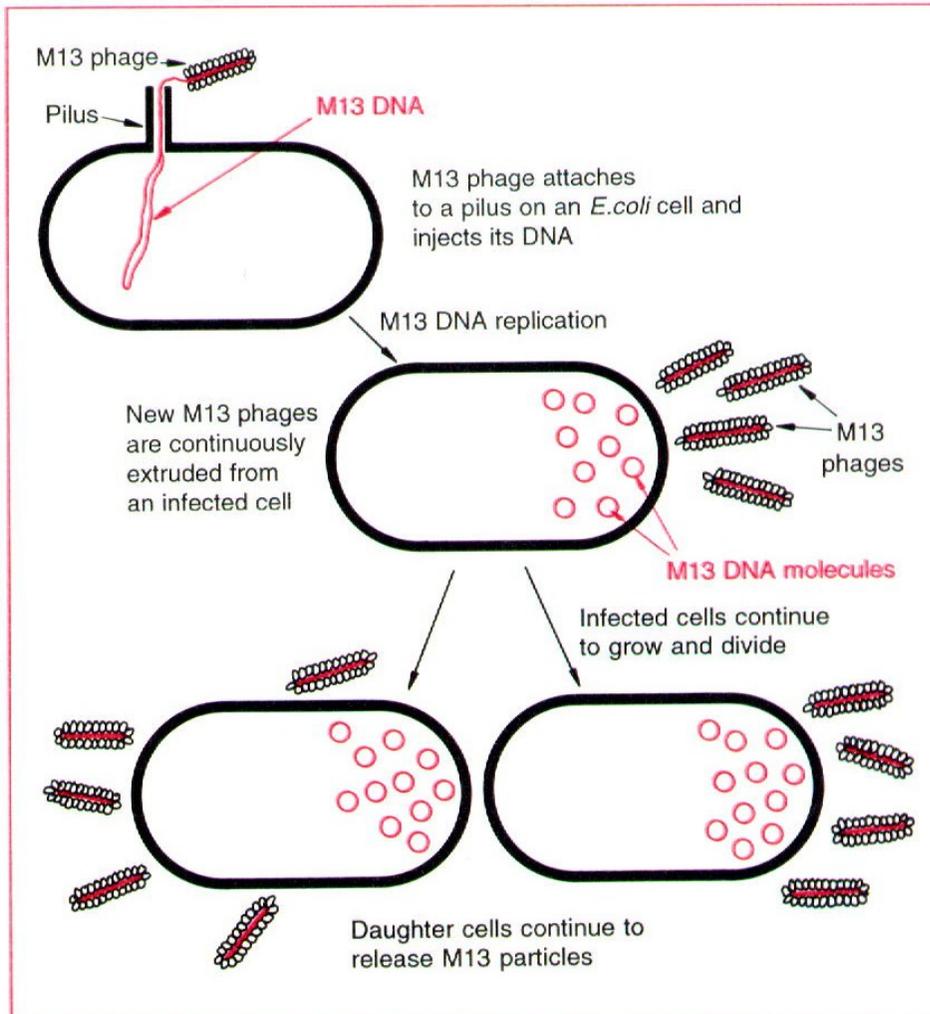


Fig. 7- Ciclo lisogénico de infecção de um bacteriófago  $\lambda$ .

Nem todos os fagos lisogénicos seguem este ciclo de infecção. Por exemplo, quando o M13 ou outro semelhante infecta a *E. coli*, são montados e libertados da célula de modo contínuo mais fagos. O ADN do M13 não é assim integrado no genoma bacteriano e não se torna quiescente. Com estes fagos a lise celular nunca acontece e a bactéria infectada pode continuar a crescer e a dividir-se, embora a um ritmo mais lento do que uma célula não infectada. A figura 8 mostra o ciclo de infecção do M13.



**Fig. 8- O ciclo de infecção do bacteriófago M13.**

Embora existam muitas variedades diferentes de bacteriófagos apenas o  $\lambda$  e o M13 servem como verdadeiros vectores de clonagem.

[Índice](#)

### **a) Organização génica na molécula de ADN de $\lambda$**

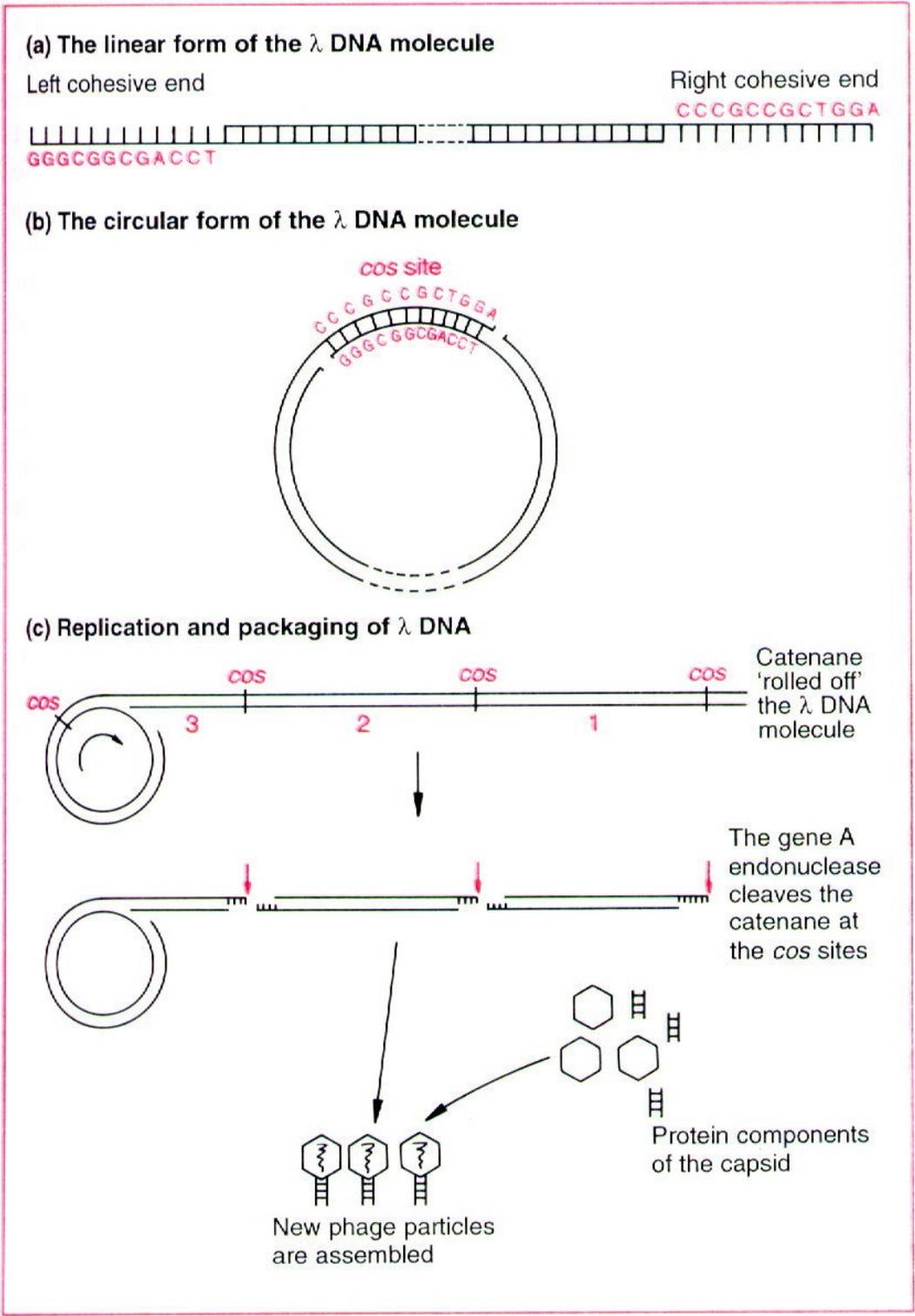
$\lambda$  é um exemplo típico de um fago que apresenta cabeça e cauda (Fig.5a). O ADN está contido numa cabeça poliédrica e a cauda serve para se ligar à superfície da bactéria e para injectar o ADN dentro da célula. (Fig.7).

A molécula de ADN de  $\lambda$  apresenta um tamanho de 49 Kb e tem sido muito estudado para técnicas de mapeamento génico e sequenciamento de ADN. Como resultado desse estudo são já conhecidas a posição e a identidade da maioria dos genes de  $\lambda$ . Uma característica do mapa génico de  $\lambda$  é que os genes com funções semelhantes estão agrupados no genoma. Por exemplo, todos os genes que codificam componentes do cápside estão agrupados no terço esquerdo da molécula, e os genes que controlam a integração do prófago no genoma do hospedeiro estão agrupados no centro da molécula. O agrupar de genes afins é muito importante para o controlo da expressão do genoma de  $\lambda$ , na medida em que permite que sejam ligados e desligados como um grupo em vez de individualmente. Esta capacidade de agrupar genes é também importante na construção de vectores de clonagem baseado em  $\lambda$ .

#### [Índice](#)

### **b) As formas linear e circular do ADN de $\lambda$**

Uma segunda característica de  $\lambda$  que se torna importante na construção de vectores de clonagem é a capacidade da molécula de ADN poder mudar de forma. Como se sabe, o ADN apresenta-se como uma molécula linear, formada por duas cadeias complementares que se ligam entre si, formando, segundo o modelo de Watson e Crick, uma dupla hélice. No entanto em ambas as extremidades da molécula há uma pequena porção de 12 nucleótidos em que o ADN é uma cadeia simples (Fig.9a). As duas cadeias simples são complementares, podendo unir-se e formar uma molécula circular de dupla cadeia (Fig 9b).



**Fig. 9 – As formas linear e circular de  $\lambda$  ADN.**

As porções complementares de cadeias simples são normalmente referidas como "sticky ends" ou "extremidades coesivas" porque a ligação das bases entre elas pode "colar" as duas extremidades de uma molécula de ADN ou as extremidades de duas moléculas diferentes de ADN. As extremidades coesivas de  $\lambda$  são chamadas locais cos e desempenham duas funções diferentes durante o ciclo de infecção de  $\lambda$ . Em primeiro lugar permitem que a molécula linear de ADN que é injectada na célula fique com a forma circular, sendo isto essencial para a inserção no genoma bacteriano, (Fig. 7). Uma segunda função dos locais cos entra em acção após a excisão do prófago do genoma hospedeiro, altura em que são produzidos um grande número de novas moléculas de ADN de  $\lambda$  pelo mecanismo circular rotativo de replicação (Fig. 9c), no qual uma cadeia contínua de ADN é desenrolada a partir de uma molécula molde. O resultado é uma cadeia que consiste numa série de genomas lineares de  $\lambda$  ligados entre si pelos locais cos. A função destes locais cos consiste agora em agir como sequências de reconhecimento para a endonuclease que corta a cadeia nos locais cos produzindo genomas individuais de  $\lambda$ . Esta endonuclease (que é o produto do gene A na molécula de ADN de  $\lambda$ ) cria "sticky ends" e age também conjuntamente com outras proteínas para empacotar cada genoma de  $\lambda$  dentro de uma cabeça de fago.

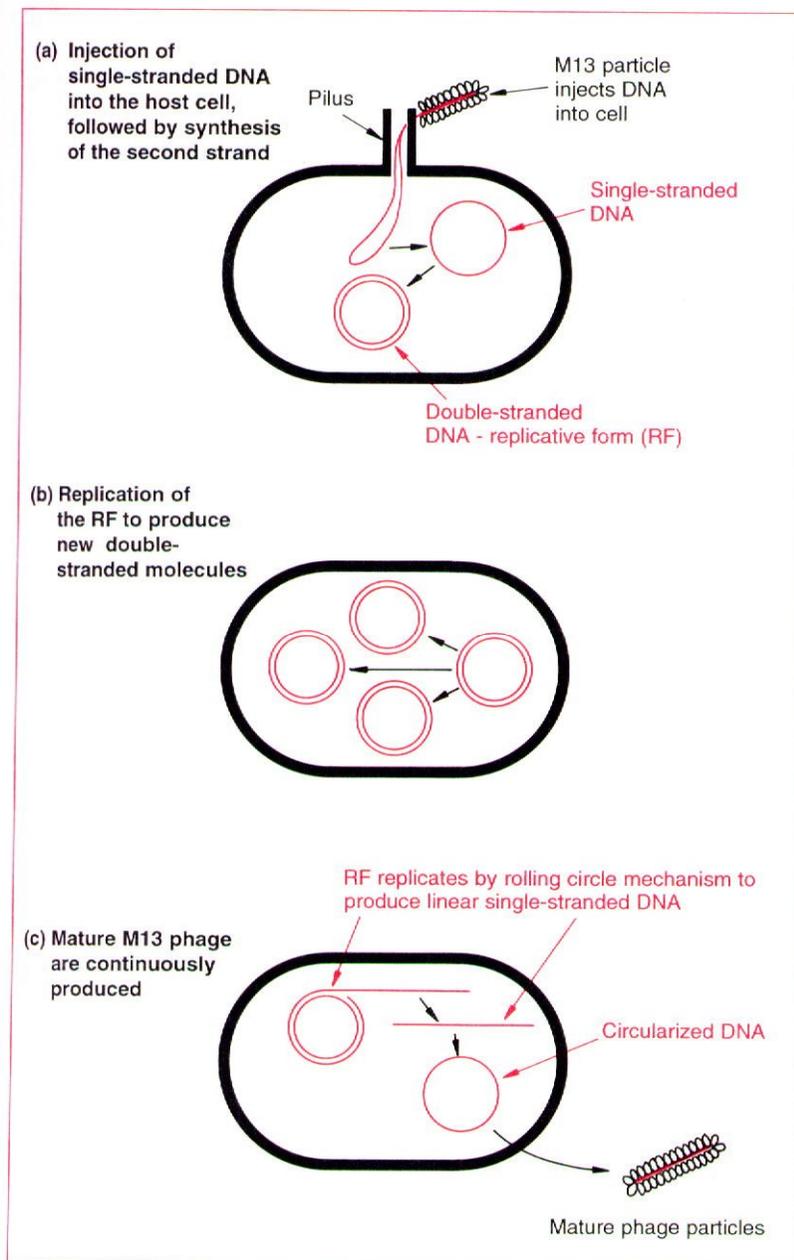
Os processos de clivagem e empacotamento reconhecem apenas os locais cos e as sequências de ADN vizinhas. A alteração da estrutura das regiões interiores do genoma de  $\lambda$ , por exemplo pela inserção de novos genes, não tem qualquer efeito nestes acontecimentos desde que o comprimento total do genoma não seja muito alterado.

## [Índice](#)

### **c) M13 – um fago filamentososo**

O M13 é um exemplo de um fago filamentososo (Fig 5.b), e a sua estrutura é completamente diferente da do  $\lambda$ . Para além disso, a molécula de ADN do M13 é muito menor que o genoma de  $\lambda$ , tendo apenas 6407 nucleótidos de comprimento. Isto é possível porque o capsídeo do M13 é constituído a partir de cópias múltiplas de apenas 3 proteínas, (requerendo apenas 3 genes), enquanto que a cabeça e a cauda de  $\lambda$  envolvem mais de 15 proteínas diferentes. Além disso o M13 segue um ciclo de infecção mais simples que o do  $\lambda$ , não necessitando de genes para a inserção no genoma hospedeiro. É um vírus circular e torna-se invulgar na medida em que consiste apenas numa cadeia simples de ADN. A consequência imediata do seu reduzido tamanho é que apresenta menos espaço para genes do que o genoma de  $\lambda$ .

A injeção de uma molécula de ADN do M13 dentro de uma célula de *E. coli* ocorre pelo pilo que une as duas bactérias durante a conjugação sexual (Fig.4). Uma vez dentro da célula a molécula de cadeia simples age como molde para a síntese de uma cadeia complementar, resultando numa dupla cadeia de ADN normal (Fig.10 a). Esta molécula não é inserida no genoma bacteriano, mas replica-se até haver mais de 100 cópias presentes na célula, (Fig. 10.b). Quando a bactéria se divide, cada célula filha recebe cópias do genoma do fago, que continua a replicar-se, mantendo assim o seu número total por célula. Como se vê na figura 10 c, são continuamente produzidos e libertados mais fagos, havendo a produção de cerca de 1000 novos fagos durante cada geração de uma célula infectada.



**Fig. 10 – O ciclo de infecção de M13, mostrando os diferentes tipos de replicação de ADN que ocorrem.**

## Índice

### **d) O M13 como um vector de clonagem atraente**

O M13 possui várias características que o tornam atractivo como base para um veiculo de clonagem. O seu genoma tem menos que 10 Kb, bem dentro do intervalo considerado desejável para um vector potencial. Além disso, a forma

replicativa de cadeia dupla do genoma de M13 tem um comportamento muito parecido ao de um plasmídeo e pode ser tratado como tal para fins experimentais. É facilmente preparado a partir de uma cultura de células de *E. Coli* infectadas e pode ser reintroduzido por transfecção.

Uma das características mais importantes é que genes clonados com um vector baseado no M13 podem ser obtidos na forma de ADN de cadeia simples. As versões de cadeia simples de genes clonados são úteis para várias técnicas, tais como o sequenciamento de ADN.

[Índice](#)

### e) Os vírus como veículos de clonagem para outros organismos

A maioria dos organismos vivos são infectados por vírus e como tal, estuda-se a possibilidade de os vírus poderem ser utilizados como veículos de clonagem para organismos superiores. Isto é especialmente importante quando se sabe que apenas as bactérias possuem plasmídeos.

O potencial dos vírus como vectores de clonagem para células animais é enorme e a quantidade de vírus estudados para este fim tem vindo a aumentar consideravelmente nos últimos anos, tendo no entanto recebido mais atenção alguns vírus de mamíferos tais como o *Simian vírus 40 (SV40)*, o *Adenovirus* e o *Baculovirus*.

[Índice](#)

---

## VECTORES DE CLONAGEM PARA *E. COLI*

### Vectores de Clonagem baseados em plasmídeos de *E. Coli*

Os vectores de clonagem mais simples e os mais utilizados na clonagem de genes, são os baseados em pequenos plasmídeos bacterianos. Há um vasto número de vectores plasmídicos diferentes disponíveis com a *E. coli* e que se podem obter em fornecedores comerciais. Estes plasmídeos apresentam a vantagem de combinar a facilidade de purificação com outras propriedades desejáveis, tais como uma alta eficiência de transformação, indicadores

seleccionáveis convenientes para transformantes e recombinantes e a capacidade de clonar porções relativamente grandes de ADN, (até 8 Kb). A maioria das experiências de clonagem de genes de "rotina" utilizam um destes vectores plasmídicos, sendo um dos mais utilizados o pBR322, que foi um dos primeiros a ser desenvolvido. Actualmente utilizam-se também outros que derivaram dele, tais como o pBR327, o pUC8 e o pGEM3Z.

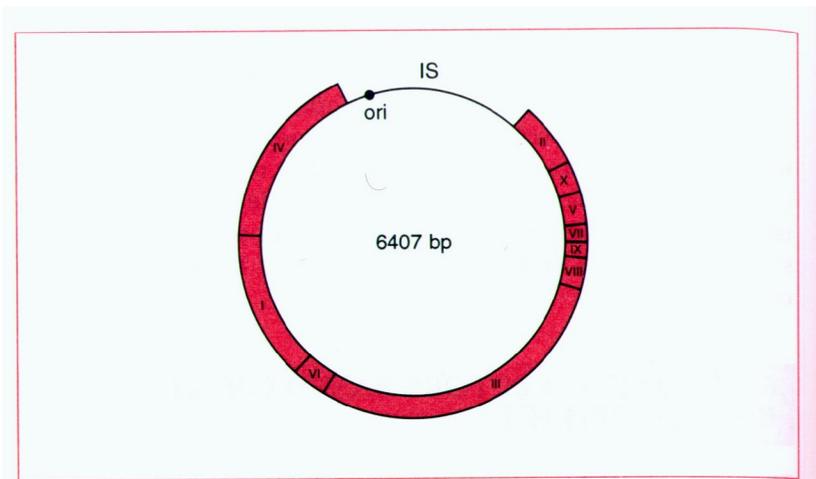
[Índice](#)

## **Vectores de Clonagem baseados no bacteriófago M13**

Como já foi referido, o requisito essencial para qualquer vector de clonagem é a capacidade de replicação no interior da célula hospedeira. Para os vectores plasmídicos, este requisito é fácil de satisfazer, na medida em que algumas sequências relativamente pequenas de ADN são capazes de agir como origens de replicação e a maioria das enzimas, senão todas, necessárias para a replicação são fornecidas pela célula hospedeira.

Com os bacteriófagos, como o M13, a situação no que respeita à replicação, é mais complexa. As moléculas de ADN dos fagos transportam vários genes essenciais para a replicação, incluindo genes que codificam componentes da capa proteica do fago e enzimas replicatórias específicas de ADN. A alteração ou deleção de qualquer um destes genes irá prejudicar ou destruir a capacidade replicativa da molécula resultante. Há assim muito menos liberdade em modificar as moléculas de ADN do fago e, de um modo geral, os vectores de clonagem são ligeiramente diferentes da molécula original.

Os problemas na construção de um vector de clonagem a partir de um fago são bem patentes no M13. O genoma normal de M13 tem 6,4 Kb de comprimento, mas a maioria é ocupada por dez genes agrupados (Fig.11), sendo cada um essencial para a replicação do fago. Há apenas uma pequena sequência intergénica constituída por cerca de 507 nucleótidos, na qual se poderá inserir ADN novo sem quebrar qualquer gene e além disso, esta região inclui a origem de replicação que deverá também manter-se intacta. Torna-se assim bem evidente a grande limitação para a alteração do genoma de M13. Apesar disto a grande atractividade do M13 reside na possibilidade da obtenção de versões de cadeias simples de ADN clonado. Esta característica tem servido como estímulo para o desenvolvimento de vectores de clonagem baseado no M13, dos quais se podem destacar o M13mp2, o M13mp7, M13mp8 e o M13mp9.



**Fig. 11 – Genoma do M13 mostrando as posições dos genes I ao X.**

[Índice](#)

### **Vectorios híbridos plasmídeo-M13**

Embora os vetores de M13 sejam muito úteis para a produção de versões de cadeia simples de genes clonados, apresentam a desvantagem do curto tamanho do fragmento de ADN que pode ser clonado com um vector de M13. Para ultrapassar este problema têm-se criado novos vetores combinando uma parte do genoma de M13 com ADN plasmídico. Um exemplo destes vetores híbridos é o pEMBL8 que foi feito pela transferência de um fragmento de 1300 bp do genoma de M13 para o pUC8. Com pEMBL8 podem obter-se versões de cadeia simples de fragmentos de ADN clonado até 19 Kb de comprimento, aumentando significativamente o alcance do sistema de clonagem do M13.

[Índice](#)

### **Vectorios de clonagem baseados no bacteriófago $\lambda$**

Antes de se poderem desenvolver vetores de clonagem baseados em  $\lambda$ , tiveram de ser resolvidos dois problemas. Em primeiro lugar a molécula de ADN de  $\lambda$  apenas pode ser aumentada em cerca de 5%, representando a adição de apenas 3 Kb de ADN novo. Se o comprimento total da molécula for superior a 52 Kb, então ela não poderá ser empacotada na cabeça de  $\lambda$  e não se formarão fagos infecciosos, limitando assim o tamanho do fragmento de ADN que pode ser inserido num vector de  $\lambda$  não modificado.

Em segundo lugar o genoma de  $\lambda$  é tão grande que possui mais de uma frequência de reconhecimento para praticamente todas as endonucleases de restrição. A restrição não pode ser utilizada para clivar uma molécula normal de  $\lambda$  de modo a permitir a inserção de ADN novo, pois a molécula seria cortada em vários fragmentos pequenos que muito improvavelmente voltariam a formar um genoma de  $\lambda$  viável.

Tendo em atenção estas dificuldades, torna-se surpreendente que se tenham desenvolvido tantos vectores de clonagem baseados em  $\lambda$ . Estes vectores têm como principal utilidade a clonagem de fragmentos grandes de ADN, desde as 5 Kb até aos 25 Kb, que seriam demasiado grandes para serem tratados em plasmídeos ou por vectores M13.

O desenvolvimento de vectores de clonagem baseados em  $\lambda$  foi possível por se ter conseguido descobrir um grande segmento na região central da molécula de ADN de  $\lambda$  e poder ser removido sem afectar a capacidade do fago infectar células de *E. coli*. A remoção de toda ou parte dessa região não essencial diminui até 15 Kb o tamanho da molécula de  $\lambda$  resultante, significando isto que se podem adicionar até 18 Kb de ADN novo.

A região "não essencial" contém a maioria dos genes envolvidos na excisão e integração do profago de  $\lambda$  do cromossoma de *E. coli*. Um genoma de  $\lambda$  cortado é assim, não lisogénico e pode apenas seguir o ciclo lítico de infecção. Isto é desejável para um vector de clonagem, pois significa que a indução não é necessária antes da formação de placas.

O genoma de  $\lambda$ , mesmo depois da região "não essencial" ser removida, apresenta numerosos locais de reconhecimento para a maioria das endonucleases de restrição. Este é um problema que se encontra frequentemente quando se está a desenvolver um novo vector. Se apenas um ou dois locais precisam de ser removidos, então pode ser utilizada a técnica de mutagénese in vitro. Por exemplo um local de EcoRI, GAATTC, pode ser alterado para GGATTC, que não é reconhecido pela enzima. Contudo, não é um meio eficiente para alterar mais do que poucos locais numa única molécula.

Em vez disso foi utilizada a selecção natural para fornecer novas estirpes de  $\lambda$  aos quais faltavam os locais de restrição indesejados. Pode-se recorrer á selecção natural utilizando como hospedeiro uma estirpe de *E. coli* que produza EcoRI. A maioria das moléculas de ADN de  $\lambda$  que invadem a célula serão destruídas pelas endonucleases de restrição, no entanto algumas irão sobreviver e produzir placas. Estes serão fagos mutantes de onde se perderam espontaneamente um ou mais

locais de EcoRI. Vários ciclos de infecção irão eventualmente resultar em moléculas de  $\lambda$  às quais faltam todas ou a maioria dos locais de EcoRI.

[Índice](#)

## *Vectores de inserção e de substituição*

Uma vez resolvidos os problemas resultantes do pouco espaço disponível para a inserção de ADN novo e dos muitos locais de restrição, abriu-se o caminho para o desenvolvimento de diferentes tipos de vectores de clonagem baseado em  $\lambda$ . As duas primeiras classes de vectores a serem produzidas foram os vectores de inserção e vectores de substituição.

### **a) Vectores de inserção**

Um vector de inserção possui, pelo menos, um único local de restrição no qual se pode inserir ADN novo. O tamanho do fragmento de ADN que um vector individual pode transportar depende da quantidade da região "não essencial" que foi retirada. Os vectores de inserção mais comuns são o  $\lambda$  gt10 e o  $\lambda$  ZAP II.

[Índice](#)

### **b) Vectores de substituição.**

Um vector de substituição  $\lambda$  tem dois locais de reconhecimento para a endonuclease de restrição utilizada para a clonagem. Estes locais flanqueiam o segmento de ADN que é substituído pelo ADN do ser clonado. Normalmente o fragmento substituível transporta locais de restrições adicionais que podem ser utilizadas para cortá-lo em bocados mais pequenos, de modo a que sua reinserção durante a experiência de clonagem seja muito improvável. Os vectores de substituição são geralmente destinados para transportar porções de ADN maiores do que os vectores de inserção seriam capazes de lidar. Os vectores de substituição mais populares são o  $\lambda$  WES. $\lambda$  B' e o  $\lambda$  EMBL 4.

## *Cosmídeos*

O mais recente e mais sofisticado tipo de vector baseado em  $\lambda$  é o cosmídeo. Este é o resultado da hibridação entre uma molécula de ADN de um fago e um plasmídeo bacteriano. Devem esta designação ao facto das enzimas responsáveis pela ligação da molécula de ADN de  $\lambda$  na membrana proteica necessitarem apenas de locais cos para funcionar. Um cosmídeo é basicamente um plasmídeo que contém um local cos. Precisa de um marcador seleccionável, tal como o gene

de resistência à ampicilina e uma origem de replicação plasmídica, pois aos cosmídeos faltam todos os genes de  $\lambda$ , não produzindo assim placas. Em vez disso as colónias são formadas em meios selectivos, tal como acontece com os vectores plasmídicos.

[Indice](#)

## Vectores de alta capacidade

Durante os últimos anos, têm-se feito vários progressos no desenvolvimento de vectores de alta capacidade. Um desses novos vectores é baseado no bacteriófago P1 que tem a vantagem sobre  $\lambda$  de poder introduzir 110 Kb de ADN no seu cápside. Vectores do tipo cosmídeo baseados em P1 têm sido destinados e utilizados para clonar fragmentos desde os 75 Kb e os 100 Kb. Outros tipos de novos vectores, baseados no plasmídeo F, chamados cromosso-mas bacterianos artificiais ou BAC, têm uma capacidade ainda maior e conseguem lidar com inserções de ADN até aos 300 Kb.

## Vectores para outras bactérias

Têm sido também desenvolvidos vectores de clonagem para várias outras espécies de bactérias, incluindo *Streptomyces*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Alguns destes vectores são baseados em plasmídeos específicos ao organismo hospedeiro e outros são baseados em plasmídeos capazes de se replicarem numa variedade de hospedeiros bacterianos. Alguns, poucos, derivam de bacteriófagos específicos a esses organismos; por exemplo, vários vectores de clonagem para *Streptomyces* são baseados num fago tipo  $\lambda$  chamado  $\phi$  C31. Muitos destes vectores são muito semelhantes aos veículos da *E. coli* em termos de objectivos gerais.

[Indice](#)

---

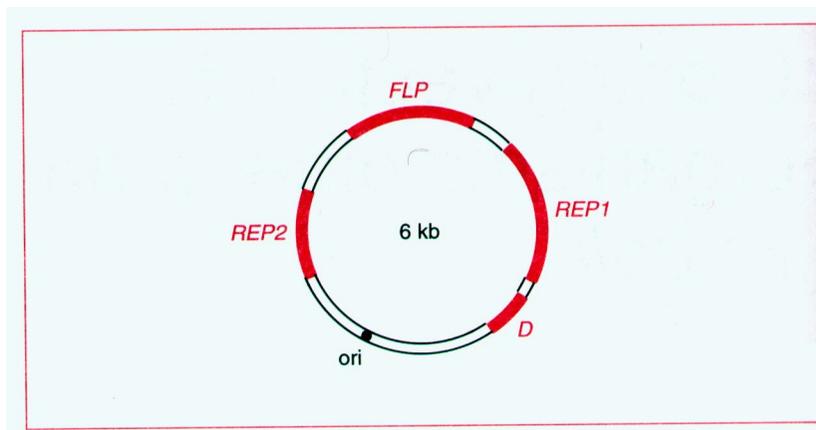
# VECTORES DE CLONAGEM PARA OUTROS ORGANISMOS ALÉM DA *E. coli*

A maioria das experiências de clonagem são levadas a cabo com a *E. coli* como hospedeiro e a maioria dos vectores de clonagem disponíveis são para este organismo. A *E. coli* é muito popular quando o objectivo da experiência de clonagem consiste em estudar as características básicas da biologia molecular tais como a estrutura e a função dos genes. Contudo, em algumas circunstâncias, pode ser desejável utilizar outros hospedeiros para as experiências de clonagem de genes. Isto torna-se evidente em biotecnologia em que o objectivo não é estudar um gene, mas sim utilizar a clonagem para controlar ou melhorar a síntese de um produto metabólico importante, (por exemplo, uma hormona como a insulina) ou então para alterar as propriedades do organismo (por exemplo, para introduzir a resistência a herbicidas numa planta de cultivo).

[Índice](#)

## Vectorios para leveduras e outros fungos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos mais importantes em biotecnologia. Para além do seu importante papel no fabrico da cerveja e do pão, as leveduras têm sido utilizadas como organismos hospedeiros para a produção de produtos farmacêuticos a partir de genes clonados. O desenvolvimento de vectores de clonagem para leveduras foi muito estimulado com a descoberta de um plasmídeo com 2  $\mu$  m, presente na maioria das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 12).



**Fig. 12 – O círculo de 2  $\mu$  m de levedura.**

O círculo de 2  $\mu$  m é, de facto, uma excelente base para um vector de clonagem. Tem um comprimento de 6 Kb, o que o torna ideal para um vector e existe nas

células das leveduras em número elevado. Para que ocorra a replicação são utilizados uma origem de replicação presente no plasmídeo, assim como várias enzimas fornecidas pela célula hospedeira e também proteínas codificadas pelos genes REP1 e REP2 transportados pelo plasmídeo.

Contudo, a utilização do plasmídeo de 2  $\mu$  m como vector de clonagem também tem os seus problemas. O problema principal é o marcador seleccionável. Um ou dois dos mais recentes vectores de clonagem, com origem em leveduras transportam genes que lhes conferem resistência a certos inibidores como o "methotrexate" e o cobre, mas a maioria dos vectores de leveduras utilizam um tipo de sistema de selecção radicalmente diferente. É costume ser utilizado um gene normal da levedura que normalmente codifica uma enzima envolvida na biosíntese de aminoácidos. Um exemplo é o LEU2 que codifica a  $\beta$ -isopropil malato desidrogenase, uma das enzimas envolvida na conversão do ácido pirúvico em leucina.

[Índice](#)

## Plasmídeos epissomais

Os vectores derivados do círculo de 2  $\mu$  m são chamados plasmídeos epissomais de leveduras ou YEps. Alguns YEps contêm a totalidade do plasmídeo de 2  $\mu$  m e outros incluem apenas a origem de replicação do círculo de 2  $\mu$  m. Um exemplo deste último tipo é o YEp 13.

O YEp 13 contém várias características gerais dos vectores de clonagem de leveduras. Além de possuir a origem de replicação do círculo de 2  $\mu$  m e o gene de selecção LEU2, o YEp 13 também inclui toda a sequência do pBR322 e pode por esse motivo ser replicado e seleccionado tanto nas leveduras como em *E. coli*.

[Índice](#)

## Outros tipos de vectores de clonagem de leveduras

Além dos YEps, há também outros tipos de vectores de clonagem que podem ser utilizados com *S. cerevisiae*. Dois dos mais importantes são os seguintes:

### **a) Plasmídeos integrativos de leveduras (YIps)**

Estes são basicamente plasmídeos bacterianos que transportam um gene de levedura. Um YIp não pode replicar-se como um plasmídeo uma vez que não

contém qualquer parte do círculo de 2  $\mu$  m, mas depende da integração do ADN cromossomal da levedura para a sua sobrevivência.

### b) Plasmídeos replicativos de leveduras (YRps)

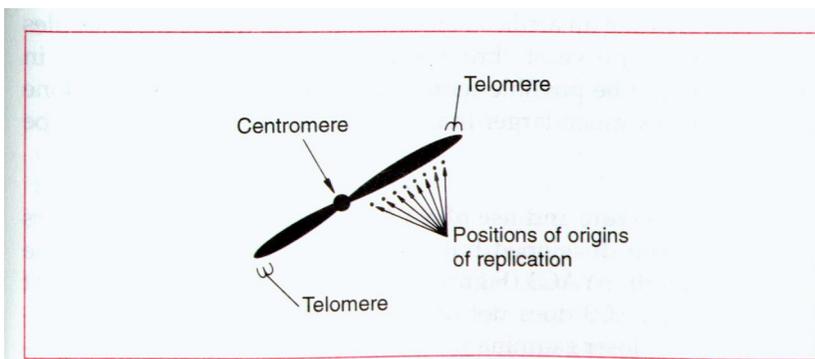
Estes são capazes de se multiplicarem como plasmídeos independentes porque transportam uma sequência de ADN cromossomal que inclui uma origem de replicação. Sabe-se que as origens de replicação estão localizadas muito perto de vários genes de leveduras, incluindo um ou dois que possam ser utilizados como marcadores seleccionáveis.

#### [Índice](#)

### Cromossomas artificiais de leveduras

O último tipo de vector de clonagem de leveduras a ter em consideração é o YAC que significa cromossoma artificial de levedura. O desenvolvimento dos YACs foi uma consequência da pesquisa feita em torno da estrutura dos cromossomas eucarióticos. Graças a esse trabalho foi possível identificar os comportamentos chave de um cromossoma (Fig. 13), como sendo:

1. O centrómero, que é necessário para a distribuição correcta do cromossoma para as células filhas durante a divisão celular.
2. Dois telómeros, as estruturas nas extremidades de um cromossoma, que são necessários para que as extremidades sejam replicadas de forma correcta e que também previnem que o cromossoma seja "mordiscado" pelas exonucleases.
3. As origens de replicação, que são os locais ao longo do cromossoma onde a replicação do ADN se inicia, que são semelhantes às origens de replicação dos plasmídeos.



**Fig. 13 – A estrutura de um cromossoma**

Uma vez definida a estrutura do cromossoma levanta-se a possibilidade de isolar os componentes individuais por técnicas de ADN recombinante, e depois voltar a uni-los num tubo de ensaio, criando um cromossoma artificial. Como as moléculas de ADN presentes em cromossomas naturais de leveduras têm várias centenas de Kb de comprimento, talvez seja possível, com um cromossoma artificial, clonar porções de ADN muito maiores que qualquer outro tipo de vector pode suportar.

O estímulo inicial no desenvolvimento de cromossomas artificiais veio dos geneticistas de leveduras que queriam utilizá-las para estudar vários aspectos da estrutura e do comportamento dos cromossomas. Um exemplo foi o estudo da segregação dos cromossomas durante a meiose. Estas experiências determinaram que os cromossomas artificiais podem ser propagados de forma estável em células de leveduras e aumentaram a possibilidade deles poderem ser utilizados como veículos para genes demasiadamente grandes para serem clonados como um fragmento único num vector de *E. coli*. Muitos genes importantes de mamíferos têm um comprimento superior a 100 Kb ultrapassando assim a capacidade da maioria dos sistemas de clonagem de *E. coli*, mas bem dentro do raio de um vector YAC. Os YACs abriram deste modo o caminho a estudos das funções e modos de expressão de genes que antes não eram possíveis analisar pelas técnicas de ADN recombinante. Foi recentemente proporcionada uma nova dimensão para estas experiências com a descoberta de que, sob certas circunstâncias, os YACs podem ser propagados em células de mamíferos, permitindo assim a análise funcional no organismo onde o gene normalmente reside.

[Índice](#)

## *Vectores para outras leveduras e fungos*

São necessários vectores de clonagem para estudar a biologia molecular de outras espécies de leveduras e fungos e para alargar o raio de acção das leveduras e fungos na biotecnologia. Os plasmídeos epissomais baseados no círculo de 2  $\mu$  m de *S. cerevisiae* têm a capacidade de se replicarem nalguns tipos de fungos, mas o número de espécies não é suficientemente vasto para que o vector de 2  $\mu$  m possa ser de uso generalizado. Em qualquer caso os requisitos da biotecnologia são melhor servidos por plasmídeos integrativos equivalentes aos YIps, na medida em que proporcionam recombinantes estáveis que se podem manter em crescimento em bioreactores durante longos períodos de tempo. Estão disponíveis vectores integrativos eficientes para um conjunto de espécies,

incluindo leveduras como a *Pichia pastoris* e *Kluveromyces lactis* e os fungos filamentosos *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*.

[Índice](#)

## **Vectores de clonagem para plantas superiores**

A utilização de plantas superiores como organismos hospedeiros para a clonagem de genes apresenta benefícios potenciais muito importantes, pois através da clonagem de genes já foi possível produzir plantas resistentes a vírus e a insetos, havendo também tomates aos quais foram melhoradas as propriedades de armazenamento e que se podem encontrar em qualquer supermercado. Há um grande optimismo quanto à possibilidade do desenvolvimento de uma grande variedade de culturas agrícolas, através da clonagem de genes, com qualidades nutritivas melhoradas e com a capacidade de crescerem sob condições adversas.

Têm sido utilizados três sistemas de vectores com vários graus de sucesso nas plantas superiores:

1. Vectores baseados em plasmídeos de ocorrência natural de *Agrobacterium*.
2. Transferência directa de genes utilizando fragmentos de ADN não ligados a um vector de clonagem de planta.
3. Vectores baseados em vírus de plantas.

[Índice](#)

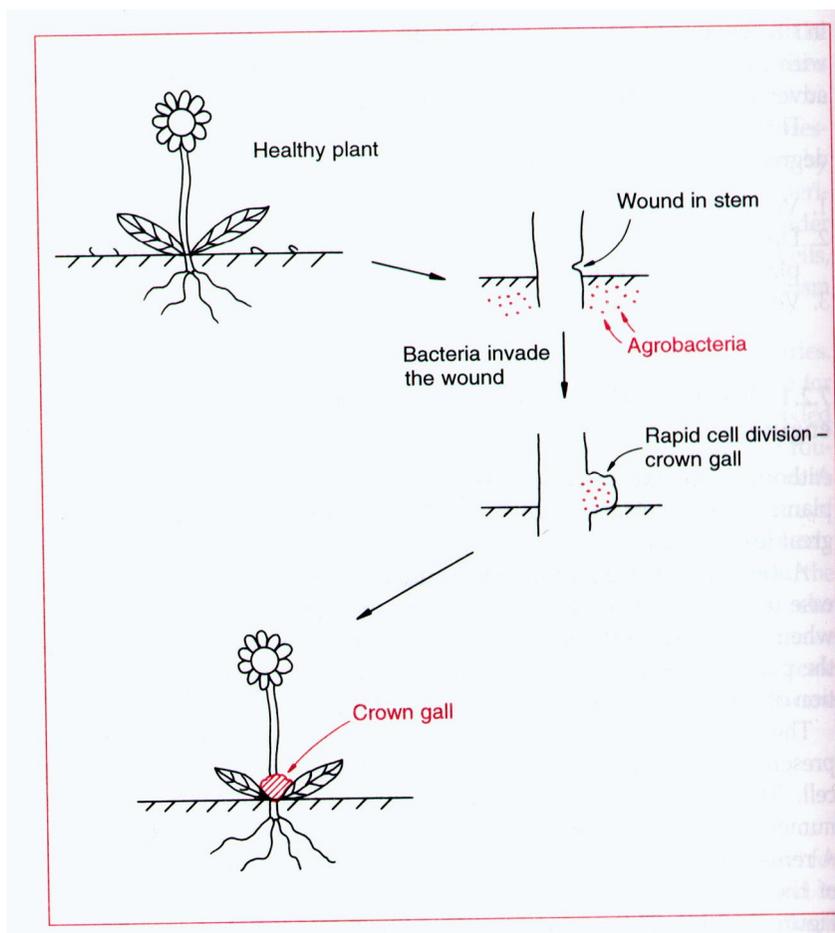
## ***Agrobacterium tumefaciens* – o engenheiro genético mais pequeno da natureza**

Embora não se conheçam plasmídeos de ocorrência natural em plantas superiores, há um plasmídeo bacteriano, o plasmídeo Ti da *A. tumefaciens*, que se mostra de grande importância.

Esta bactéria é um microorganismo do solo que provoca um tumor bacteriano (crown gall) em muitas espécies de plantas dicotiledóneas. Este tipo de tumor ocorre quando uma ferida no caule permite à bactéria *A. tumefaciens* invadir a planta. Após a infecção a bactéria causa uma proliferação cancerosa do tecido do caule na região do colo (Fig. 14).

A capacidade de provocar o tumor bacteriano está associada à presença do plasmídeo Ti (Tumour Inducing) nas células bacterianas. É um plasmídeo

grande, superior a 200 Kb, que transporta numerosos genes envolvidos no processo de infecção. Uma das principais características do plasmídeo Ti é que, após a infecção, uma parte da molécula é integrada no ADN cromossomal da planta. Este segmento, chamado de T-ADN, tem entre 15 e 30 Kb de comprimento, dependendo da cadeia. Mantém-se numa forma estável no interior da célula vegetal e é transmitido às células filhas como uma parte integrante dos cromossomas. Mas a característica mais importante do plasmídeo Ti é que o T-ADN contém oito ou mais genes que se exprimem na célula vegetal e que são responsáveis pelas propriedades cancerígenas das células transformadas. Estes genes são também responsáveis pela síntese de compostos pouco usuais denominados opinas, que as bactérias utilizam como nutrientes. Em resumo, a *A. tumefaciens* manipula geneticamente a célula vegetal para os seus próprios interesses.



**Fig.14 – Tumor bacteriano**

[Indice](#)

### **a) A utilização do plasmídeo Ti para introduzir novos genes numa célula vegetal**

Cedo se notou que o plasmídeo Ti poderia ser utilizado para transportar novos genes para células vegetais. Tudo o que é necessário para isso é inserir os novos genes no T-ADN e depois cabe à bactéria o difícil trabalho de os integrar no ADN cromossomal da planta. Na prática esta técnica tem-se mostrado muito complicada, especialmente porque a dimensão do plasmídeo Ti torna a sua manipulação muito difícil.

O principal problema é a impossibilidade de existir apenas um local de restrição num plasmídeo com 200 Kb de comprimento. Têm-se no entanto, desenvolvido novas estratégias para a inserção de ADN novo nos plasmídeos.

#### Índice

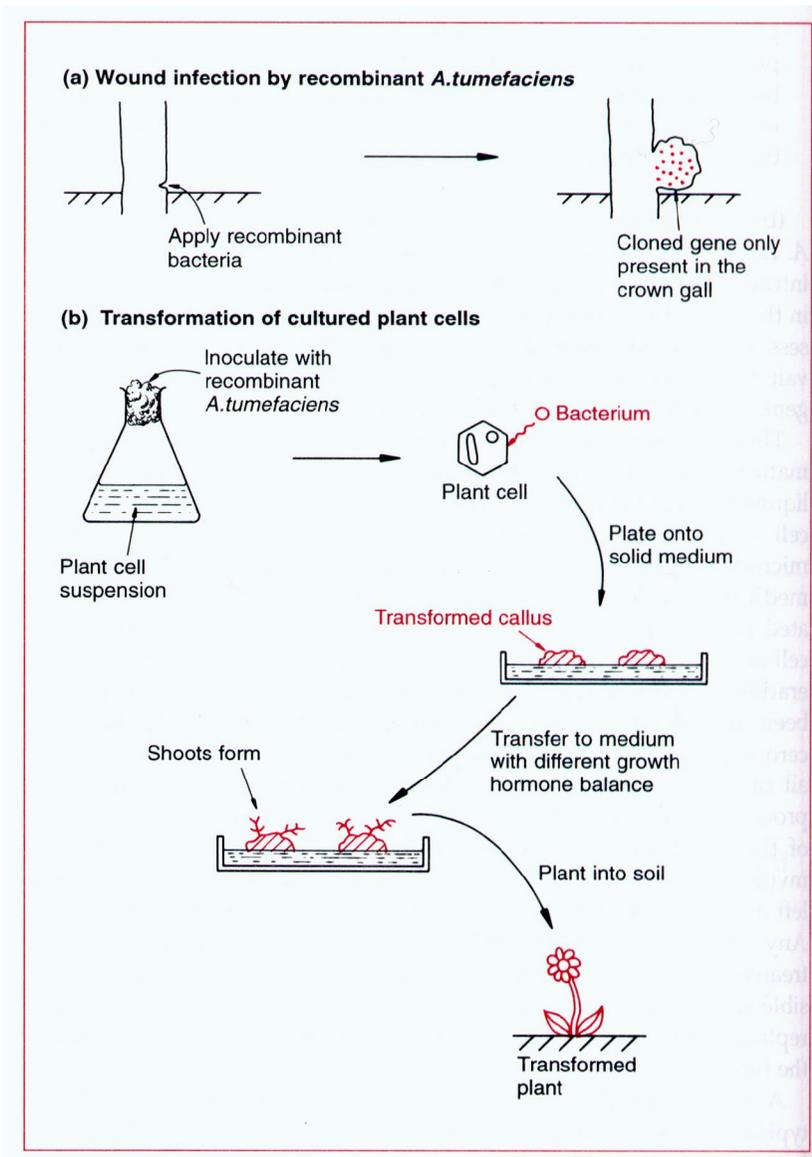
### **b) Produção de plantas transformadas através do plasmídeo Ti**

Se bactérias *A. tumefaciens*, que contêm um plasmídeo Ti alterado forem introduzidas numa planta de forma natural, pela infecção de uma ferida no caule, então apenas as células do tumor bacteriano resultante irão possuir o gene clonado (fig. 15a).

Isto tem, obviamente pouco valor a nível biotecnológico. Torna-se necessário então um modo de introdução de novos genes em cada uma das células da planta.

Há muitas soluções, mas a mais simples consiste em infectar culturas de células vegetais em protoplastos em meio líquido em vez de plantas maduras (Fig. 15b). As células vegetais e os protoplastos cujas paredes foram reestruturadas, podem ser tratadas da mesma forma que os microorganismos, por exemplo, elas podem ser cultivadas num meio selectivo de modo a isolar as transformantes. Uma planta madura regenerada a partir de células transformadas irá conter o gene clonado em cada célula e passará o gene clonado para a sua descendência. Contudo, a regeneração de uma planta transformada irá apenas ocorrer se o vector Ti tiver sido "desarmado" de modo a que as células transformadas não disponham de características cancerígenas. O desarmamento é possível porque os genes do cancro, que se encontram todos no T-ADN, não são necessários para o processo de infecção, sendo a infecciosidade controlada principalmente pela região de virulência do plasmídeo Ti. De facto, as únicas partes do T-ADN que estão envolvidas na infecção são duas sequências repetidas de 25 bp encontradas nas extremidades esquerda e direita da região integrada no ADN da planta. Qualquer porção de ADN colocada entre estas duas sequências repetidas será tratada como "T-ADN" e transferida para a planta. Assim, é possível remover

todos os genes de cancro do T-ADN normal e substituí-los por um conjunto completamente novo de genes sem interferir com o processo de infecção.



**Fig.15** – Transformação de células vegetais por *Agrobacterium tumefaciens* recombinante.

Vectores Ti como o pBIN19 têm sido recentemente substituídos por vectores baseados no plasmídeo Ri da *Agrobacterium rhizogenes*. Os plasmídeos Ti e Ri são muito semelhantes, residindo a maior diferença na transferência do T-ADN de um plasmídeo Ri para a planta não resultar em tumor bacteriano mas em "hairy root disease", caracterizada por uma proliferação massiva de um sistema radicular altamente ramificado. A possibilidade de cultivo altamente denso de raízes transformadas, em cultura líquida, está a ser explorada pelos

biotecnologistas como um meio potencial de obtenção de elevadas quantidades de proteínas a partir de genes clonados em plantas.

[Índice](#)

### *Clonar genes em plantas por transferência directa de genes*

A transferência directa de genes é baseada na observação de que um plasmídeo bacteriano super-enrolado, embora incapaz de se auto-replicar no interior de uma célula vegetal, pode ser integrado por recombinação em um dos cromossomas da planta. A recombinação está muito mal compreendida mas é quase de certeza distinta dos processos responsáveis pela integração do T-ADN. É também distinta da integração cromossomal de um vector de levedura, na medida em que não é necessária uma região de homologia entre o plasmídeo bacteriano e o ADN da planta. De facto a recombinação parece ocorrer ao acaso em qualquer posição e em qualquer um dos cromossomas da planta.

### *A utilização de vírus de plantas como vectores de clonagem*

Versões modificadas de bacteriófagos  $\lambda$  e M13 são vectores de clonagem importantes para a *E. coli*, e muitos vectores animais são baseados em vírus. Atendendo a que a maioria das plantas estão sujeitas a infecções virais, era de supor que os vírus poderiam ser também utilizados para clonar genes em plantas, no entanto, esta possibilidade tem sido explorada há alguns anos sem grande sucesso. Um dos maiores problemas deve-se ao facto de uma vasta maioria dos vírus de plantas possuírem genomas de ARN e não de ADN. Os vírus com ARN não são tão úteis como vectores de clonagem porque a manipulação do ARN é muito mais difícil de executar. Apenas se conhecem duas classes de vírus com ADN capazes de infectar plantas superiores, os caulimovírus e os geminivírus, e nenhum deles é apropriado para a clonagem de genes. Há uma lista variada de problemas resultantes da aplicação tanto do caulimovírus como do geminivírus para o melhoramento genético de plantas superiores, tornando-se improvável a sua utilização de forma rotineira como vectores de clonagem, excepto provavelmente, para umas poucas aplicações especializadas.

[Índice](#)

### *Os problemas com a clonagem de genes em plantas monocotiledóneas*

Há um conjunto de factores combinados que facilitam a clonagem de genes em dicotiledóneas como o tomate, o tabaco, a batata, as ervilhas e os feijões, mas que dificultam a obtenção dos mesmos resultados com as monocotiledóneas. Isto torna-se frustrante na medida em que as monocotiledóneas incluem muitas culturas importantes tais como o trigo, a cevada, o arroz e o milho, isto é, plantas que são os alvos preferenciais para projectos de engenharia genética.

A primeira dificuldade surge do facto de na natureza a *A. tumefaciens* e a *A. rhizogenes* infectarem apenas plantas dicotiledóneas, estando as monocotiledóneas fora do raio normal dos seus hospedeiros. Durante algum tempo pensou-se que esta barreira natural era insuperável e que as monocotiledóneas eram totalmente resistentes a transformações com vectores Ti e Ri, mas acontece que foram criadas técnicas artificiais para obter a transferência de T-ADN. A transformação com um vector de *Agrobacterium* envolve a regeneração de uma planta intacta a partir de um protoplasto transformado ou de culturas de células ou calos. A facilidade com que uma planta pode ser regenerada depende muito da espécie envolvida e, uma vez mais, as plantas que apresentam as maiores dificuldades são as monocotiledóneas. O fracasso no desenvolvimento de procedimentos eficazes para a regeneração de plantas intactas a partir de células transformadas tem significado que, apesar de resolverem os problemas com a transferência de T-ADN, os vectores de *Agrobacterium* têm um valor limitado para a clonagem de genes com monocotiledóneas.

A transferência directa de genes proporciona uma solução parcial e incompleta. O processo de recombinação que integra ADN plasmídico super-enrolado num cromossoma vegetal parece ser igualmente eficiente tanto para as monocotiledóneas como para as dicotiledóneas. Assim sendo, a transferência directa de genes é uma forma eficaz de obter células transformadas de monocotiledóneas. Mas pelos métodos padrão para a transferência directa de genes, o transformante inicial é um protoplasto o que faz com que a dificuldade em regenerar uma planta intacta continua a manter-se. Tem-se tentado dar a volta a este problema com o bombardeamento por microprojecteis para introduzir ADN plasmídico directamente nos embriões das plantas. Embora seja um procedimento de transformação bastante violento, não parece ser muito prejudicial para os embriões, que continuam o seu desenvolvimento normal para produzir plantas maduras. Este procedimento tem sido bem sucedido com o milho e outras monocotiledóneas importantes sendo muito promissor para o futuro.

[Indice](#)

## Vectorios de clonagem para células animais

Tem havido um forte investimento no desenvolvimento de sistemas de vectores para clonar genes em células animais. Estes vectores são necessários em biotecnologia para a síntese de proteínas a partir de genes que não funcionam correctamente quando clonados em *E. coli* ou leveduras. Os biólogos moleculares também tentam desenvolver estes vectores de modo a idealizar uma metodologia para terapia génica que consiste na correcção de defeitos genéticos herdados pela substituição de um gene mutante por um gene normal introduzido no paciente por técnicas de clonagem.

A transferência directa de genes é possível com células animais mas não é muito eficiente. Os cromossomas artificiais de mamíferos, semelhantes em conceito aos YACs, são também uma possibilidade mas ainda não foi reportado nenhum sistema trabalhável. Assim sendo, a maioria das experiências de clonagem com células animais dependem de vectores baseados em vírus.

[Índice](#)

### Vectorios baseados em vírus animais

A primeira experiência de clonagem envolvendo células animais ocorreu em 1979 com um vector baseado no vírus símio 40 (SV40). Este vírus é capaz de infectar várias espécies de mamíferos segundo o ciclo lítico em alguns hospedeiros e o ciclo lisogénico em outros. O SV40 sofre do mesmo problema que  $\lambda$  e os caulimovírus das plantas em que os estrangimentos do empacotamento limitam a quantidade de ADN novo que pode ser inserido no genoma. Assim sendo, a clonagem com o SV40 implica a substituição de um ou mais genes existentes pelo ADN a ser clonado.

Desde 1979 têm sido utilizados outros tipos de vírus na clonagem de genes em animais. Os adenovírus foram introduzidos porque possibilitam a clonagem de fragmentos maiores de ADN do que seria possível com um vector SV40, embora sejam de manuseamento mais difícil dado o tamanho dos genomas. Os papillomavírus, que também possuem uma capacidade relativamente alta de inserirem ADN, têm a vantagem importante de permitir a obtenção de uma linha estável de células transformadas. Muitos dos vírus de mamíferos matam as células hospedeiras pouco tempo após a infecção, sendo portanto necessária a utilização de truques especiais se quisermos utilizá-los para algo além das experiências de transformação a curto prazo. O papillomavírus bovino (BPV) que provoca o aparecimento de verrugas no gado, tem um ciclo de infecção invulgar

em células de rato, tomando a forma de um plasmídeo multicopiado, havendo aproximadamente 100 moléculas presentes por célula. Não causa a morte das células do rato e as moléculas de BPV são transmitidas às células filhas durante a divisão celular. Os vectores consistindo em sequências de BPV e de pBR322, e capazes de se replicarem tanto em células de rato como em bactérias, são consequentemente de grande valor para a biotecnologia de células animais. Os biotecnologistas estão também animados com a possibilidade proporcionada pelos baculovírus que permitem a obtenção de grandes quantidades de proteínas a partir de genes clonados em células de insectos.

[Indice](#)

---

## **BIBLIOGRAFIA**

- BROWN, T. A.** (1995) "Gene Cloning An Introduction", 3ª edição, Chapman & Hall, London.
- DALE, Jeremy W.** (1994) "Molecular Genetics of Bactéria", 2ª edição, John Wiley & Sons, West Sussex.
- PURVES, W. K.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C.** (1995) "Life – The Science of Biology", 4ª edição, Sinauer Associates, Inc, Sah Lake City.
- ALBERTS, B et al** (1994) "Molecular Biology of the Cell" 3ª edição, Garland Publishing, Inc. Nova Iorque, Londres.
- 

**Nota:** Todos os esquemas foram retirados e adaptados de Brown, T.A., 1995.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.