

DO CROMOSSOMO AOS GENES

Prof. Paulo Cesar Naoum
Academia de Ciência e Tecnologia

Não é raro as pessoas perguntarem a respeito de como se descobriram as localizações dos genes nos cromossomos. Da forma como professores e pesquisadores apresentam seus conhecimentos em biologia molecular, parece que tudo o que temos à disposição apareceu de “forma mágica”. Certamente não foram magias, mas muita observação e análises científicas cuidadosas. Dessa forma, resumimos os principais momentos dessa “suposta magia” conforme as fotos abaixo 1, 2 e 3 e o relato cronológico das descobertas.

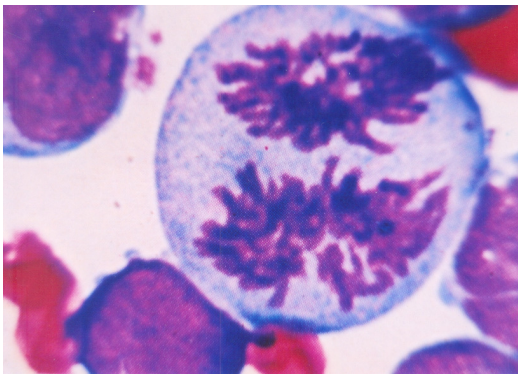


Foto 1: Polarização de cromossomos em eritroblasto basófilo.

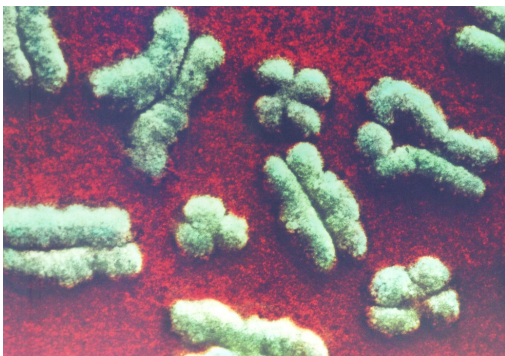


Foto 2: Disposição de cromossomos em Microscopia Eletrônica de Varredura.

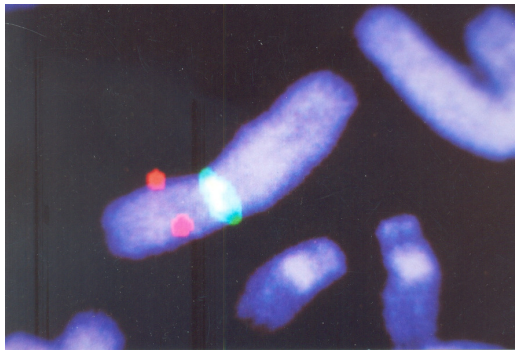
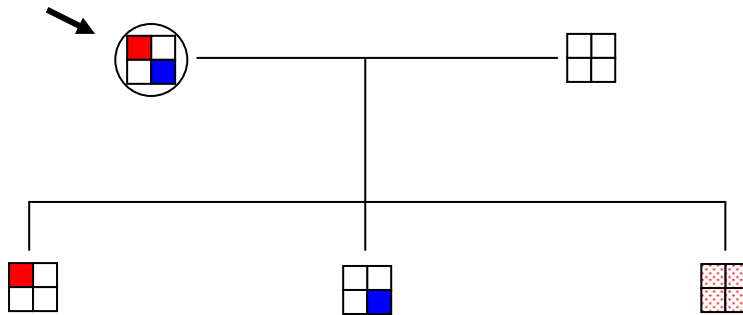


Foto 3: Cromossomos humanos com FISH – a cor verde fluorescente é um marcador do cromossomo X, enquanto que a cor rosa fluorescente é um marcador do gene associado à distrofia muscular de Duchenne. Para manifestar a doença na mulher, os dois cromossomos X tem que ter o gene anormal.

Cronologia da descoberta de genes da hemoglobina nos cromossomos 11 e 16.

1958 – A primeira evidência de que as globinas alfa e beta eram sintetizadas em cromossomos diferentes se deveu à presença da dupla heterozigose entre as Hb S e Hb Hopkins-2 encontrada em membros de uma família da cidade de Baltimore (USA).



 Hb A/Hb S/Hb Hopkins-2 (AS – Hop-2)

 Hb A/Hb Hopkins-2 (A-Hop-2)

 Hb A/Hb S (AS)

 Hb A (AA)

 Não estudado

Nessa família a mãe era portadora de Hb A, Hb S e Hb Hopkins-2. Nessa data já se sabia que a Hb A era formada por duas globinas alfa e duas beta ($\alpha_2 \beta_2$). As análises bioquímicas mostraram que a Hb Hopkins-2 era uma variante de globina alfa enquanto que a Hb S era de globina beta. Pelo fato da portadora ter ambas hemoglobinas, concluiu-se que os genes alfa e beta estavam em cromossomos diferentes.

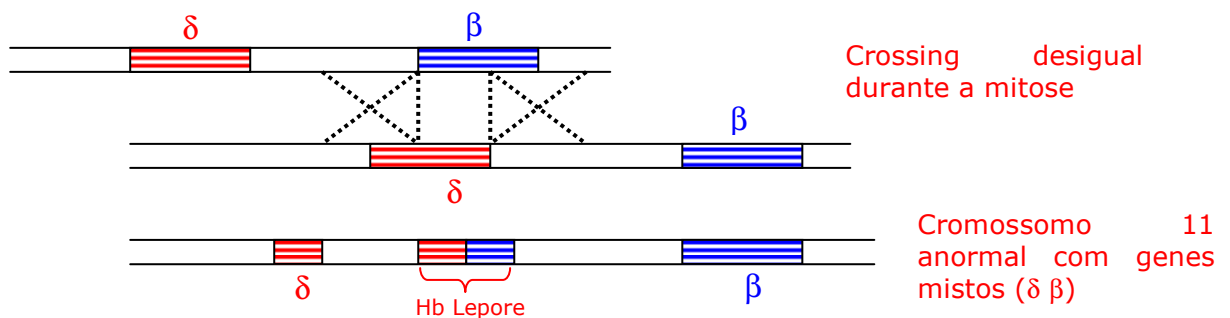
1962 – Verificou-se que os genes beta e delta estavam no mesmo cromossomo devido ao estudo da Hb Lepore que mostrava por meio de análises de aminoácidos que a uma parte da globina era composta por globina beta (β 1 a 75 aminoácidos) e a outra parte era constituída por globina delta (δ 76 a 146).



1972 – Demonstrou-se que os genes beta e gama também estavam no mesmo cromossomo devido à identificação da Hb Kenya, que era resultante da fusão beta-gama.



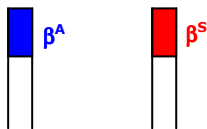
Observação: Os dois tipos de fusões beta-delta (Hb Lepore) e beta-gama (Hb Kenya) se devem ao pareamento desigual dos cromossomos 11 durante a mitose.



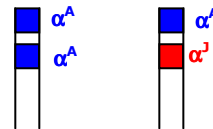
A Hb Kenya ocorre da mesma forma, só que a fusão é entre os genes gama e beta.

1974 – O Prof. Hermann Lehmann sugeriu que havia um gene beta por cromossomo 11 pois todos os casos de Hb variantes com mutação no

gene beta em heterozigose apresentavam concentrações entre 35% a 50%, e o restante era composto por Hb A. Por outro lado, ao analisar as variantes de globina alfa (Hb J, Hb G Filadélfia, Hb Hopkins-2, etc.) observou que a concentração da Hb Variante alfa era sempre abaixo de 25% (18 a 23%), e por essa razão deveriam haver dois genes alfa por cromossomo, ou quatro genes alfa no indivíduo, conforme mostra a figura.



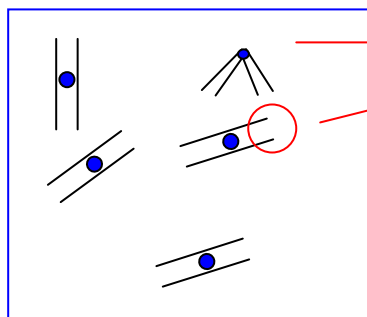
Cromossomos 11 no portador de Hb AS.
A conc. de Hb S é $\pm 50\%$



Cromossomos 16 no portador de Hb AJ.
A conc. de Hb J é $< 25\%$

1974–1975 – Tem início o uso das técnicas de hibridização “in situ”. Nesse processo se faz o uso de sondas de DNA com sequência conhecida de nucleotídeos. Esse pedaço de DNA é conhecido e é ligado à biotina. A biotina é uma molécula orgânica que permite a ligação com uma proteína fluorescente – a avidina. Assim, vários genes puderam ser localizados em diferentes cromossomos, uma vez que análises bioquímicas de diferentes proteínas permitiram conhecer a sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, das bases nitrogenadas.

1

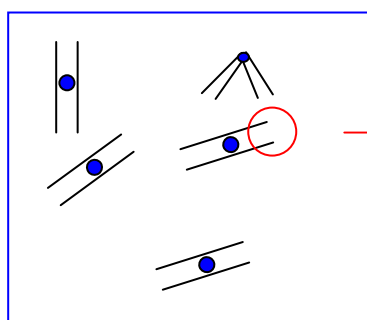


Cromossomos em Mitose

∞∞∞∞∞∞∞ DNA em dupla hélice

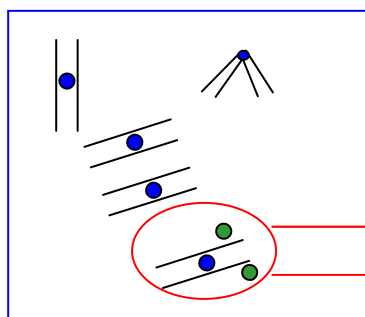
Desnatura-se o DNA com solução salina quente para desfazer a dupla hélice em fita simples.

2



~~~~~ DNA desnaturado com as fitas Simples.  
~~~~~

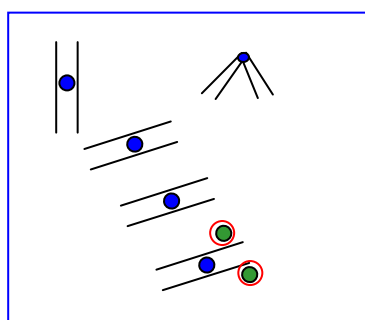
3



Adiciona-se à cultura a sonda de DNA com nucleotídeos conhecidos e ligados à biotina, ou DNA-biotina – avidina.

~~~~~ A sonda do DNA-biotina – avidina (~~~~~) hibridiza com o DNA em estudo (~~~~~).

4



Ao ser submetido à luz fluorescente do microscópio, o gene em estudo e que captou a sonda do DNA-biotinado fica fluorescente, indicando a localização do gene e a identificação do cromossomo pelo cariótipo, conforme mostra a foto 4.

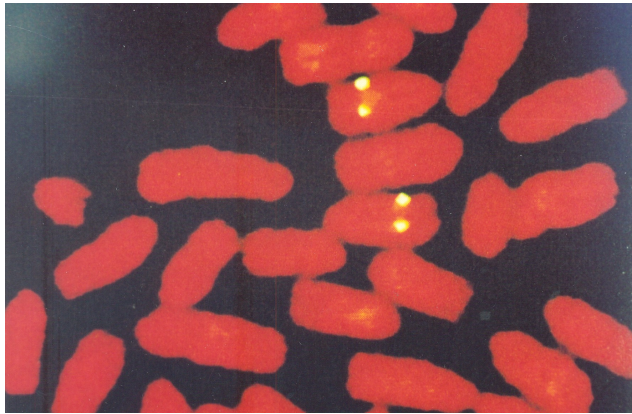


Foto 4: Genes com sondas de DNA-biotinado dos cromossomos 11

1977-1980 – Nesse período muitos estudos foram realizados em camundongos e em humanos, e gradualmente foram sendo seqüenciados os genes das globinas alfa e beta. Em 1977-1978, Diesseroth demonstrou que os loci dos genes  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  estavam no cromossomo 11 e os do gene  $\alpha$  estavam no cromossomo 16.

Em 1980 (Lauer) e em 1982 (Proudfoot) estabeleceram definitivamente todos os loci dos genes tipo alfa e beta, inclusive os seus pseudogenes.

A partir dessas descobertas a biologia molecular se desenvolveu de tal forma que os progressos científicos resultaram em técnicas de alta resolução.