

**ENZIMAS USADAS EN LA MANIPULACION DE
ACIDOS NUCLEICOS
2022**

Docente: Adriana Krapp

TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANTE

Insulina humana recombinante



Cultivos con resistencia a herbicidas (glifosato): Expresan EPSPs o GOX de distintos organismos



Plantas Bt: producen la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* que es un insecticida natural contra lepidópteros.



Eliminan o reducen el uso de insecticidas inespecíficos

Quesos producidos con quimosina recombinante (1990) en *Aspergillus* (hongo)

En 2017 se aprobó la producción en plantas de cártamo (INDEAR)



En qué consiste la tecnología del ADN recombinante:

Fragmento de ADN (codifica por un determinado gen) + Vector

Unir fragmentos de ADN de distintas fuentes: ADN recombinante. Luego se introduce en un organismo huésped capaz de replicar esa nueva molécula

➡ Huésped : bacterias, levaduras, hongos, insectos, plantas, células de mamíferos, animales)...(Transformación-Transfección).... CLONADO del GEN y EXPRESION DE LA PROTEINA

TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE: usa las técnicas de biología molecular

- Producción de proteínas recombinantes

FARMACOS Insulina

Hormona de crecimiento humana: problemas de crecimiento

Tirotrofina: problemas de tiroides; Interferon: esclerosis múltiple, hepatitis B y C

Vacunas: hepatitis B (Ag de superficie), papiloma, etc. Factores de coagulación: para tratar la hemofilia.

-INDUSTRIA Amilasa: fabricación de cerveza

Lipoxidasa: fabricación de pan

Pectinasas: elaboración de vinos y jugos

-Enzimas: jabones en polvo

-VENTAJAS: Obtener grandes cantidades de proteínas en forma reproducible cualquiera sea su origen, libres de patógenos que puedan causar una enfermedad.

-LAS TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR: se usan también en

- Estudios de regulación de la expresión génica; Terapia génica

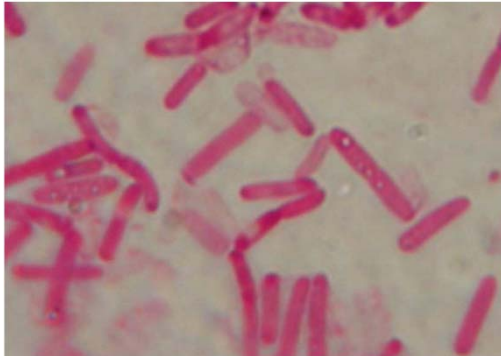
- Identificación de personas, Diagnóstico de enfermedades infecciosas, hereditarias, y neoplásicas, etc, etc

HUESPEDES QUE USAMOS PARA PRODUCIR LAS PROTEINAS RECOMBINANTES

Bacterias: *Escherichia coli* (Gram -) bacilo que forma parte de la flora bacteriana del intestino grueso. *Bacillus subtilis* (Gram +)

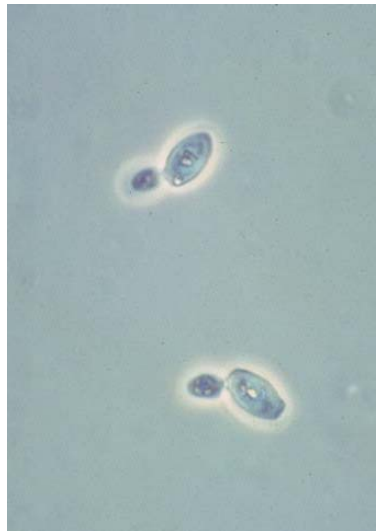
Cepa K12 y BL21 de *Escherichia coli*, : no poseen capacidad para colonizar el intestino humano porque tiene varias mutaciones (lipopolisacarido O). Material genético: **cromosoma** único está compactado en un nucleoide: 4000 genes, 4000 Kb. Tiempo de duplicación: 20 min se duplica. Cultivos en medios líquidos o semisólidos.

Puede incorporar material genético: por conjugación, transducción, transformación



Bacilos Gram (-)

Levaduras:
Saccharomyces cerevisiae: levadura del pan
Pichia pastoris



Plantas
(modelo)

↙
Arabidopsis thaliana



↘
Nicotiana tabacum
(Tabaco)



- Hongos
- Células de mamíferos
- Insectos

ADN como material genético está involucrado en dos procesos fundamentales:

- REPLICACION
- TRANSCRIPCION

ARN: TRADUCCION

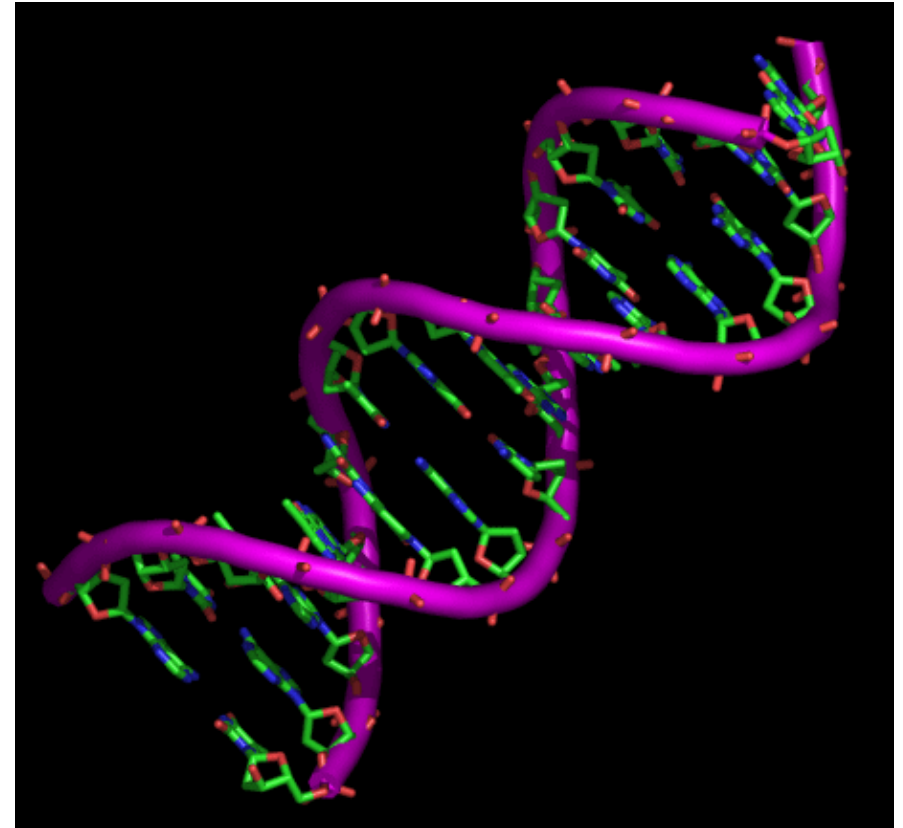
En estos mecanismos subyacen las reglas del apareamiento de bases

A con T (U)

G con C

MUCHAS PROTEÍNAS INTERACTUAN CON EL ADN

- PROTEINAS REGULATORIAS (FACTORES DE TRANSCRIPCION)
- PROTEINAS ESPECIFICAS CON ACTIVIDADES ENZIMATICAS ENCARGADAS DE MANTENER LA INTEGRIDAD DEL ADN: **POLIMERASAS, NUCLEASAS, ETC**



ENZIMAS USADAS EN LA MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS

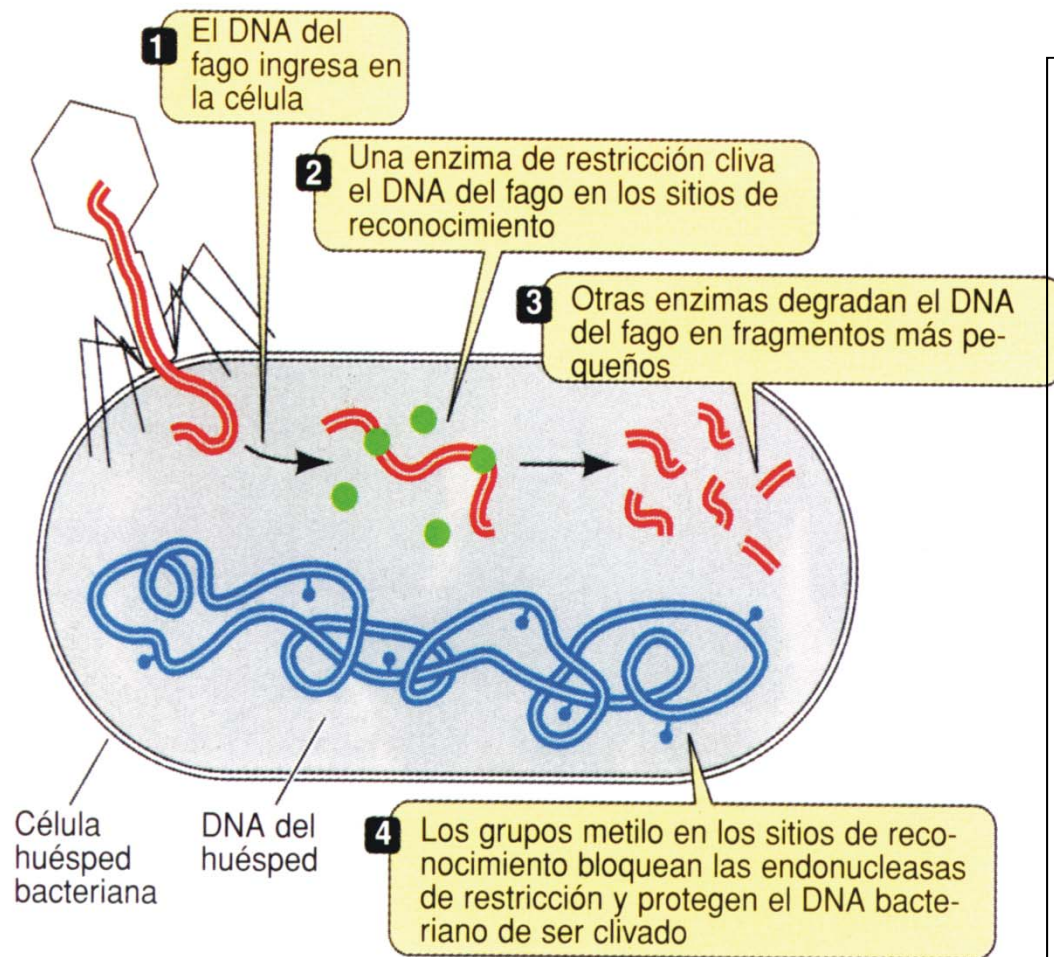
SISTEMA DE RESTRICCION - MODIFICACION BACTERIANOS

FUNCIÓN: Monitorear el ADN que entra a la célula y destruirlo si lo reconoce como extraño. Es un sistema de defensa natural de las bacterias.

-Enzimas de restricción: Endonucleasas: degradar el ADN extraño: reconocen una secuencia y cortan el ADN.

-Enzimas del sistema de modificación: Metilasas: modificar el ADN propio para que no sea degradado. Metilación en residuos de Adenina o Citosina en secuencias específicas, cada bacteria reconoce una secuencia determinada. El ADN metilado es inmune, sino sería degradado.

La metilación en eucariotas tiene una finalidad distinta!!



Principales metilasas de *E. coli*

Transfieren un grupo metilo desde la **S-adenosil metionina**

Sistema dam: metilación de adenina (GA*TC)

Sistema dcm: metilación de citosina (CC*AGG o CC*TGG)

Sistema hsdM: metilación de adenina (MEcoK, metilasa del sistema de restricción de tipo I)

Las contrapartes correspondientes a la enzima de restricción de tipo II.

La restricción no es absoluta, algunos fagos escapan y en ese caso adquieren la modificación del huésped (1/10.000)

Principales sistemas de modificación restricción

TIPO II (se usan en técnicas de ingeniería genética)	TIPO I (sistema <i>hsd</i>)	TIPO III
endonucleasa y metilasa son proteínas separadas	Enzima Bifuncional de 3 subunidades, R, M y S (2:2:1)	Enzima Bifuncional de 2 subunidades MS y R
sitio de reconocimiento: por lo general palíndromo corto de 4-8 pb, la misma sec para R y M	Sitio de reconocimiento asimétrico secuencia = 5-7 pb	Sitio de reconocimiento asimétrico secuencia = 5-7 pb
Cortan en el sitio de reconocimiento. Produce extremos romos o cohesivos; necesitan Mg como cofactor.	Corta el DNA a ~100-1000 bases de distancia del sitio de reconoc, al azar.	Corta 24-26 pb río abajo del sitio de reconocimiento
R y M actúan por separado, no requieren ATP	R y M pueden competir o ser exclusivos ; requieren ATP	R y M ocurren simultáneamente y pueden competir; requieren ATP

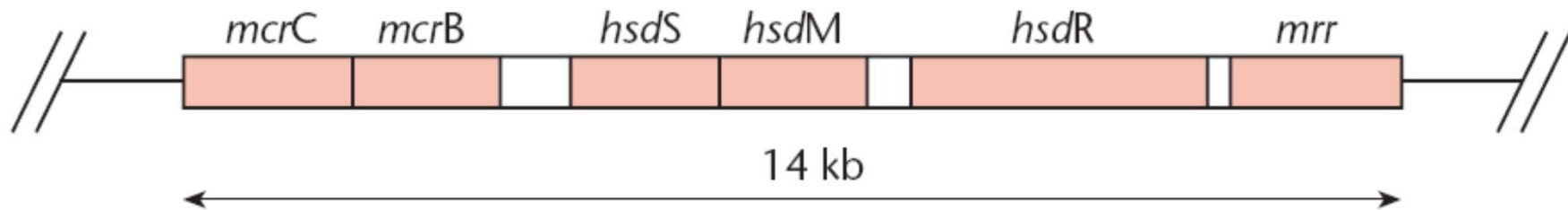


Fig. 3.4 The immigration control region of *E. coli* strain K12.

Las cepas de *E. coli* que se usan como huéspedes de ADN recombinante deben ser deficientes en los sistemas de restricción

Ejemplos de cepas usadas

DH5α: *hsdR*

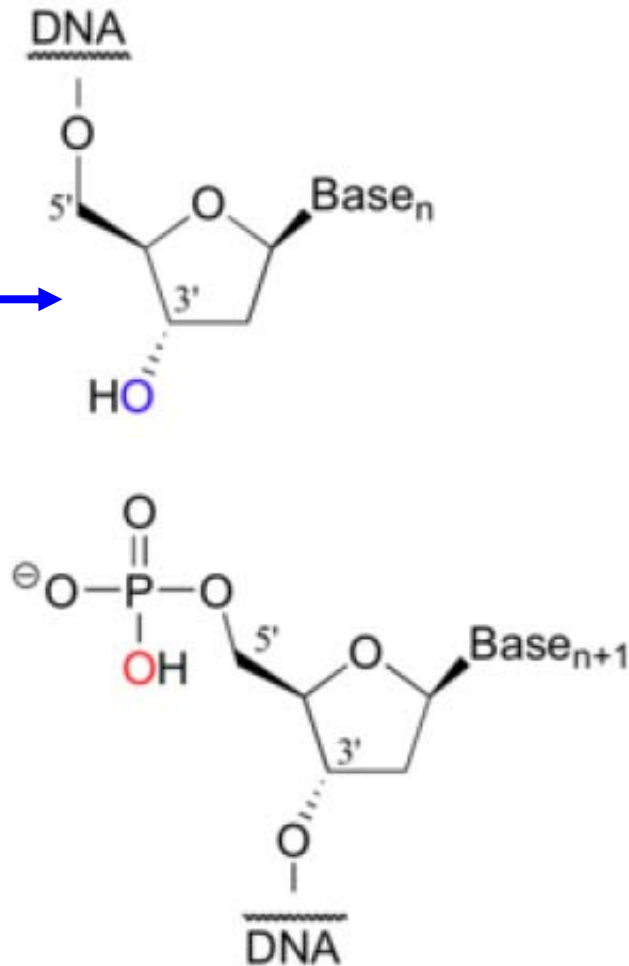
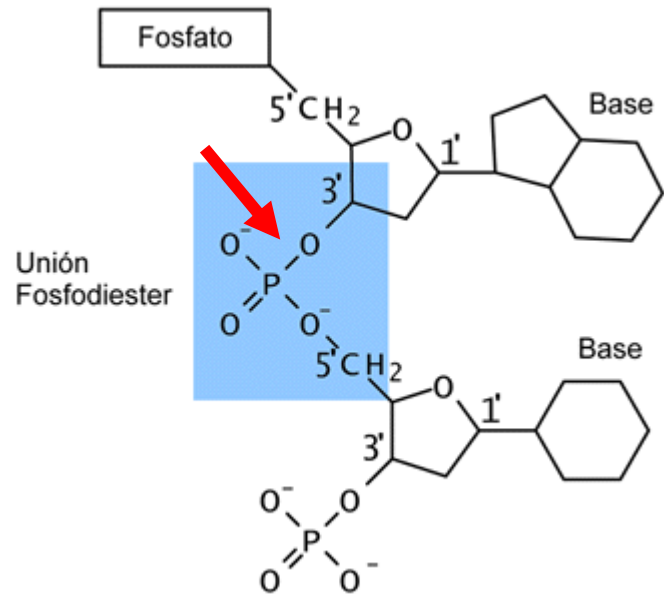
HB101: Δ *mcrC-mrr*

JM109: *hsdR*

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE TIPO II

Cortan el ADN hidrolizando el enlace fosfodiester

generando fragmentos 3' OH (hidroxilo) y 5' PO₄ (fosfato)



ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE TIPO II

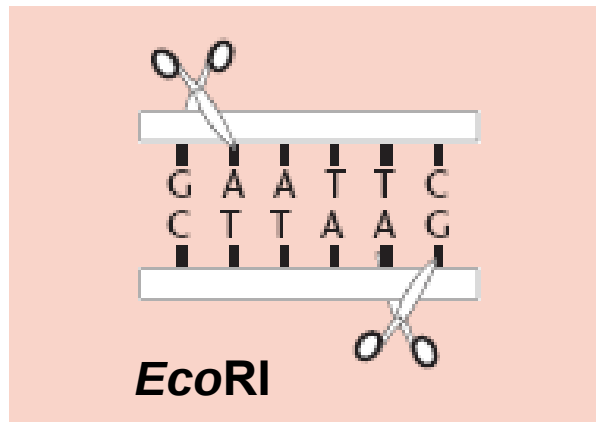
Secuencia
simétrica
(palíndromo)



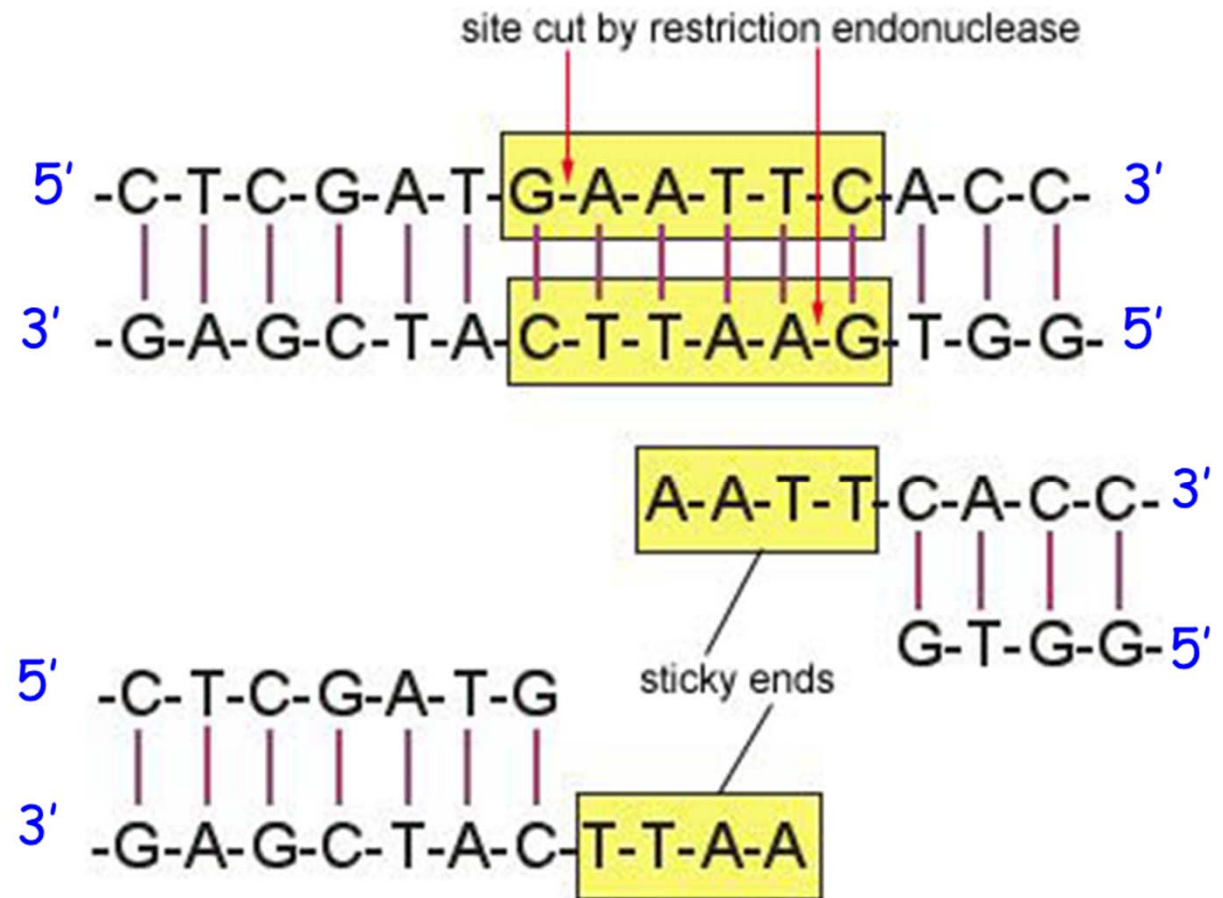
A B B'A' o A B C C'B'A' o A B N B'A'

A' B' C' son complementarias de A, B, C

4 – 8 nt

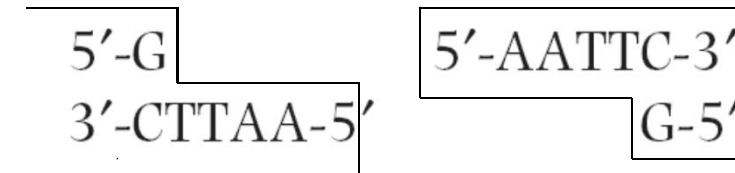


EcoRI aislada de
Escherichia coli cepa
R, primer enzima (I)

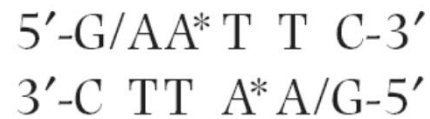


Extremos cohesivos (sticky ends):

5' protuberantes (protruding)



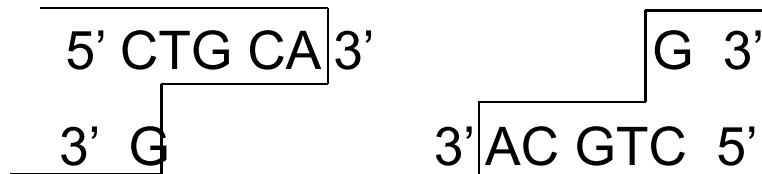
EcoRI: G/AATTC.



/ el sitio de corte
* Base que es metilada

3' protuberantes (protruding)

Pst I: CTGCA/G



Extremos romos (blunt o flush ends)

Sma I CCC/GGG

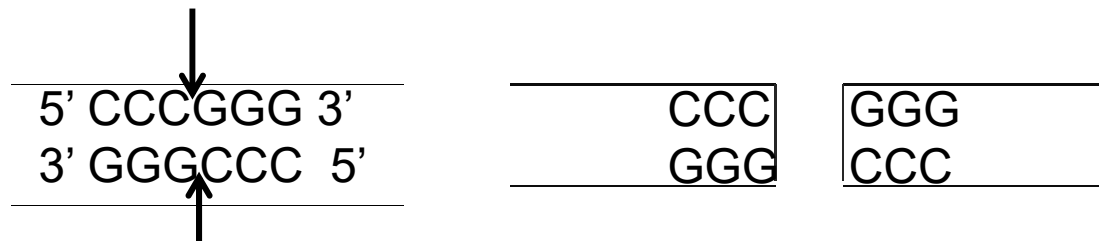


Table 3.2 Examples of restriction endonuclease nomenclature.

Enzyme	Enzyme source	Recognition sequence
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> , 1st enzyme	CCCGGG
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i> , 3rd enzyme	GGCC
<i>Hind</i> II	<i>Haemophilus influenzae</i> , strain d, 2nd enzyme	GTPyPuAC
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> , strain d, 3rd enzyme	AAGCTT
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , strain H, 1st enzyme	GGATCC

Enzyme	Recognition sequence
4-Base cutters	
<i>Mbo</i> I, <i>Dpn</i> I, <i>Sau</i> 3A1	/GATC
<i>Msp</i> I, <i>Hpa</i> II	C/CGG
<i>Alu</i> I	AG/CT
<i>Hae</i> III	GG/CC
<i>Tai</i> I	ACGT/
6-Base cutters	
<i>Bgl</i> II	A/GATCT
<i>Cla</i> I	AT/CGAT
<i>Pvu</i> II	CAG/CTG
<i>Pvu</i> I	CGAT/CG
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C
8-Base cutters	
<i>Not</i> I	GC/CGCCGC
<i>Sbf</i> I	CCTGCA/GG

★ **Isoezquizómeros:** enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia, aisladas de distintos microorganismos. Si reconocen la misma secuencia pero cortan en una posición distinta: **neoeschizómeros**

Ej: *Sma*I: CCC/GGG

*Xma*I: C/CCGGG

★ **Enzimas que dejan extremos compatibles:**

Ej: *Bam*HI: G/GATCC

*Bgl*II: A/GATCT

Buffers de corte para enzimas de restricción

10x Low salt buffer (Baja fuerza iónica)

100mM Tris-HCl, pH 7.6
100mM MgCl₂, 10mM DTT

10x Medium salt buffer (Media fuerza iónica)

500mM NaCl
100mM Tris-HCl, pH 7.6
100mM MgCl₂, 10mM DTT

10x High salt buffer (Alta fuerza iónica)

1.0M NaCl
500mM Tris-HCl, pH 7.6
100mM MgCl₂, 10mM DTT

1 U de enzima es la cantidad que digiere completamente 1 µg de ADN (fago λ o plásmido pBR322) en 1 h a la Temperatura (37°C) y condiciones óptimas

Actividad “star”: cuando se reduce la especificidad respecto del sitio canónico

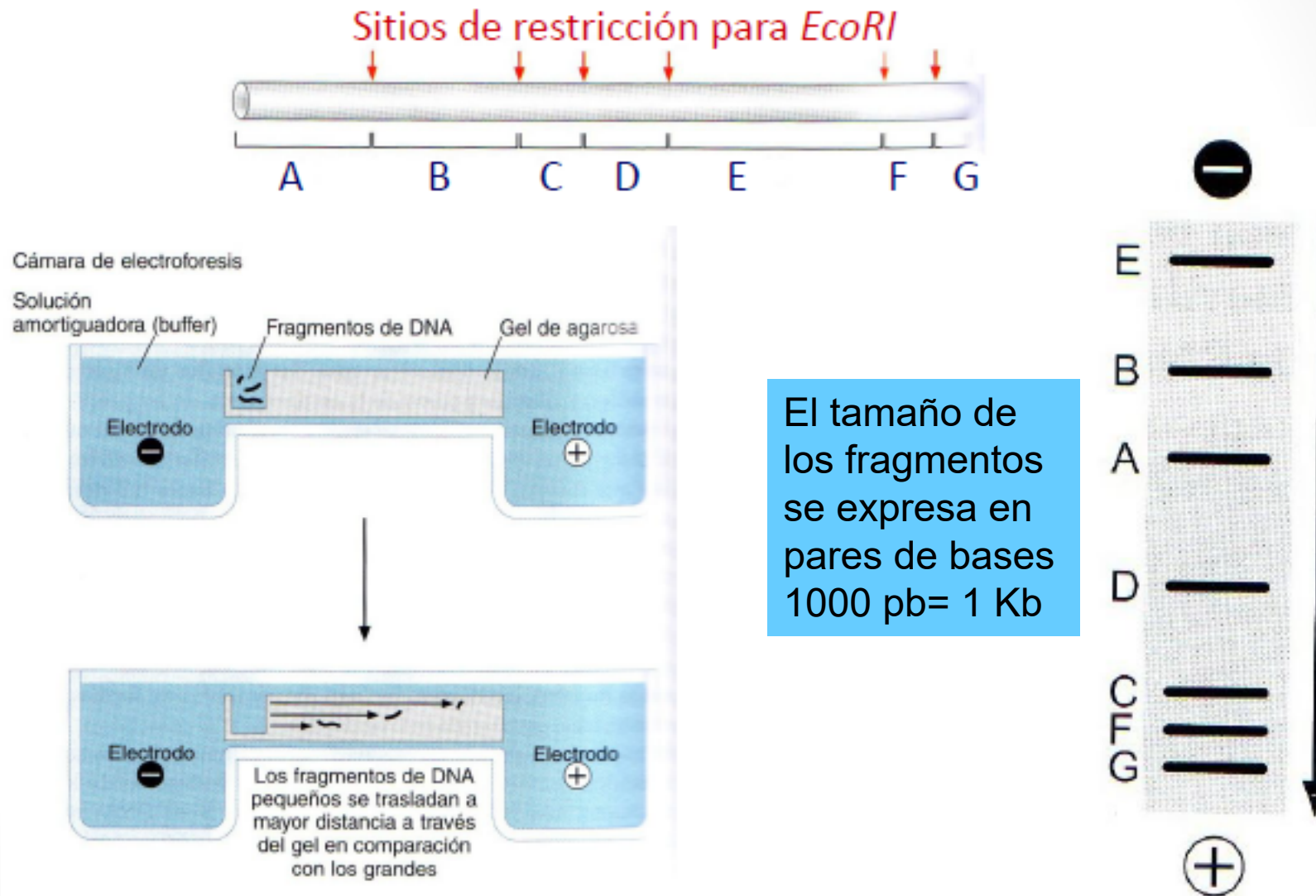
Se produce cuando se alteran las condiciones óptimas de incubación (baja fuerza iónica, alto pH, bajo Mg⁺⁺, alta [enzima], [glicerol >20 %], solventes orgánicos)

Digestión parcial (corto tiempo, densidad de sitios, composición de bases adyacentes, superenrollamiento del ADN)

MAPAS DE RESTRICCIÓN

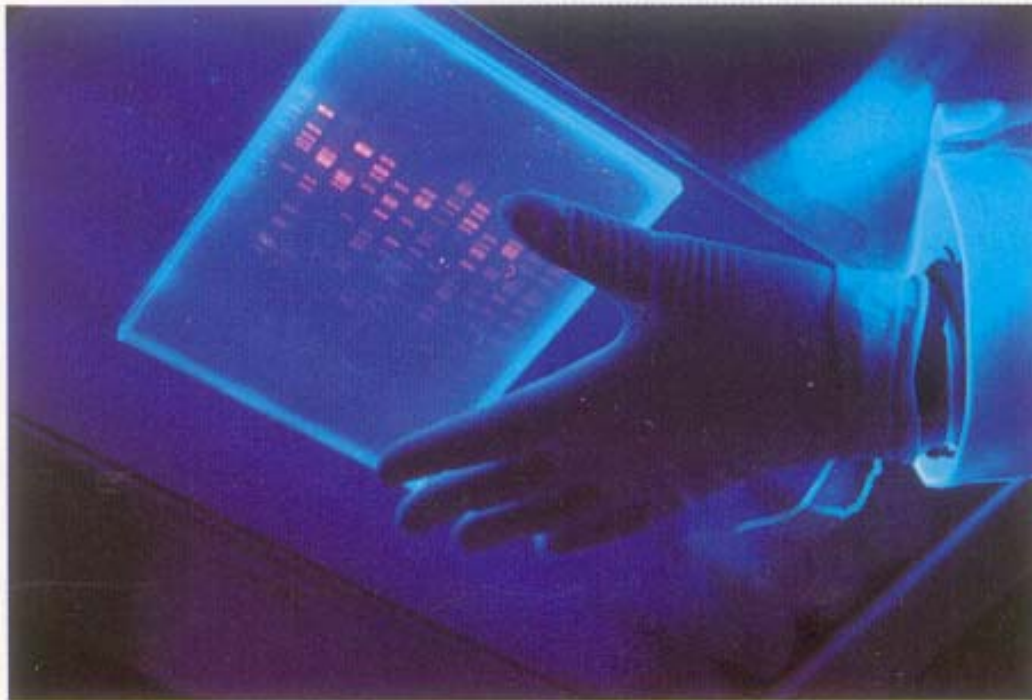
Las enzimas de restricción cortan el ADN de un organismo en un número reproducible de fragmentos

- Separación de los fragmentos de restricción mediante electroforesis

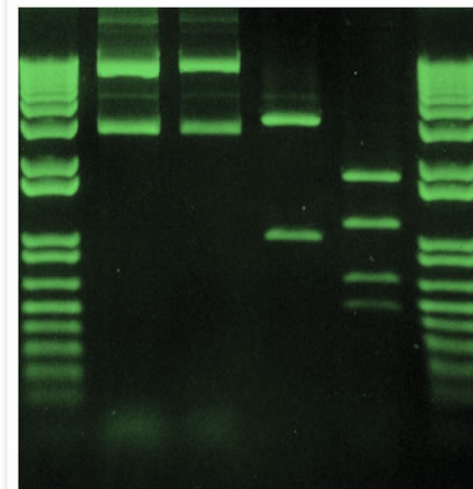


- Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida
- Se tiñe el ADN con Bromuro de Etidio u otro colorante
- Se expone el gel sobre un transiluminador con luz UV
- Los fragmentos se separan de acuerdo a su tamaño (en pares de bases). 1Kb=1000 pb

Bromuro de Etidio



Syber safe



Tamaño de los fragmentos en pares de bases (bp)

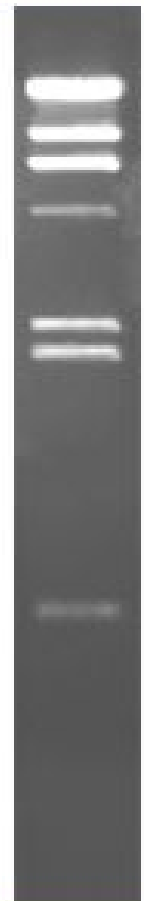
λ HindIII
ready-to-use

*23130
9416
6557
*4361

2322
2027

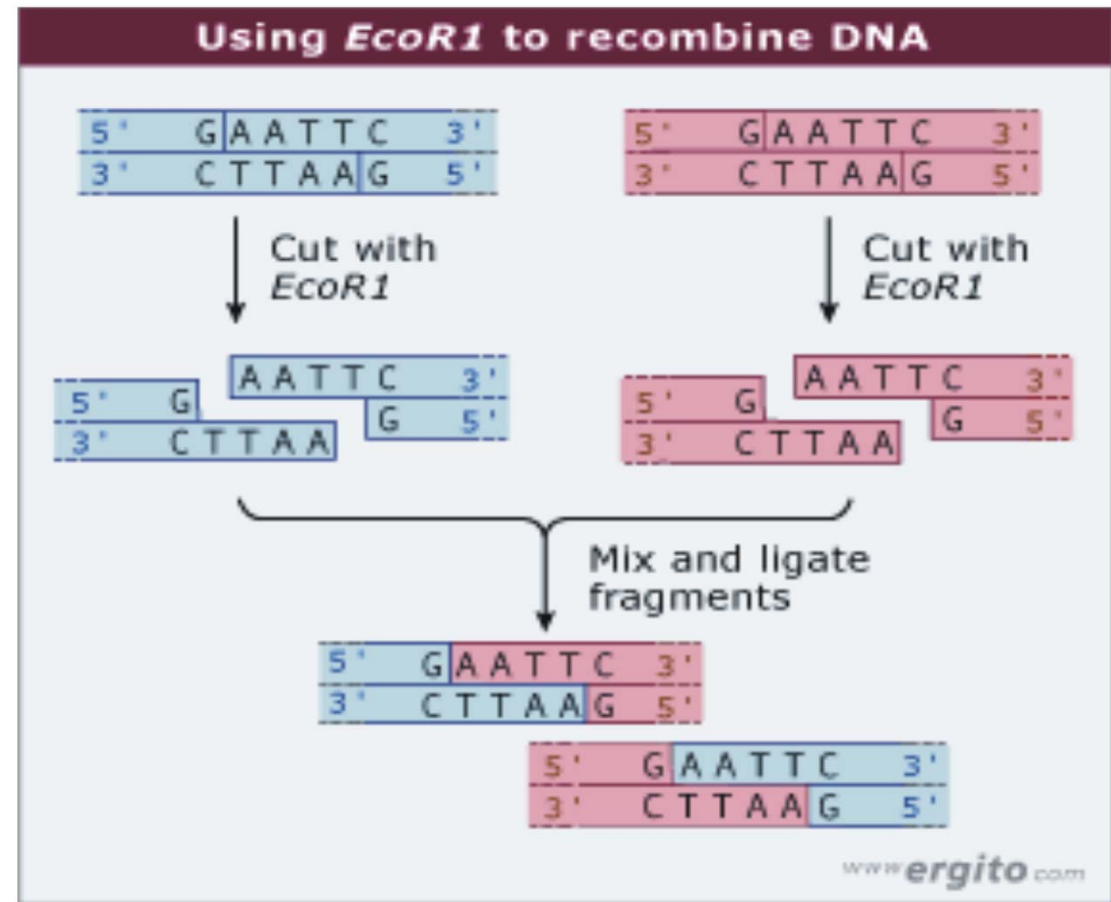
564

125



Ligación: con DNA ligasa

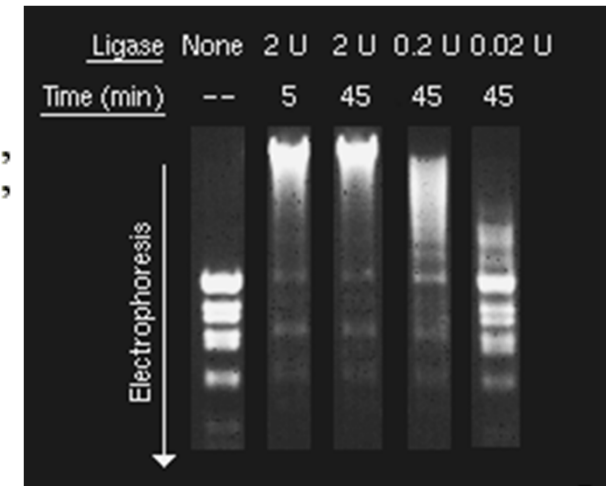
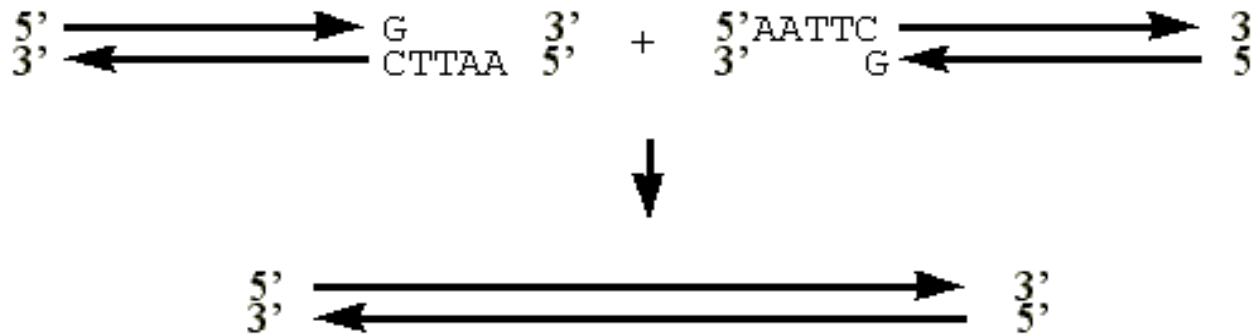
Unir “in vitro” fragmentos
de ADN de distinto origen:
fragmento + vector =
ADN recombinante
(quimera, ADN quimérico)



Ligases catalyze the formation of phosphodiester bonds between the directly adjacent 3'-hydroxyl and 5'-phosphoryl termini of nucleic acid molecules. The substrates may be DNA or RNA, and the cofactors that generate high-energy intermediates in the reaction may be ATP or NAD⁺, depending on the type of ligase.

In vivo, DNA ligases are required for enzymatic completion of lagging-strand synthesis during replication of DNA, and they are also involved in genetic recombination and in DNA repair (Gottesman et al. 1973; Horiuchi et al. 1975; Waga et al. 1994; for review, please see Kornberg and Baker 1992; Shuman 1996; Lehman 1998). In vitro, DNA ligases are used chiefly to create novel combinations of nucleic acid molecules and to attach them to vectors before molecular cloning.

DNA ligasas



- catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3' OH y un 5' PO₄

La reacción se hace a baja temperatura: 12-15 °C, 4° C (toda la noche) extremos cohesivos

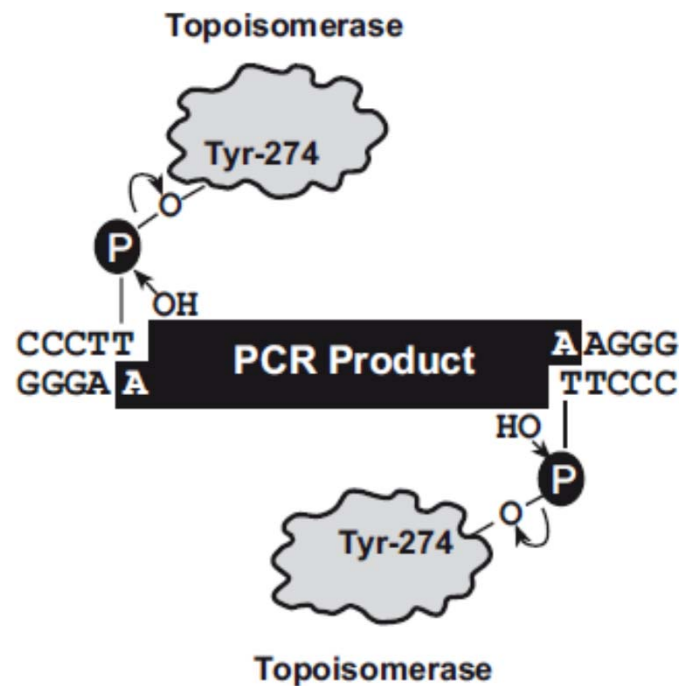
Extremos romos: a T. ambiente (<30°C) y > conc. de enzima

- T4 DNA ligasa**: del fago T4, más usada en la formación de moléculas de DNA recombinante. Liga fragmentos cohesivos (complementarios) y romos; ATP como cofactor

- E.coli DNA ligasa**: sólo extremos cohesivos; cofactor NAD⁺

DNA Topoisomerasa : (esta enzima participa en vivo en la replicación del ADN)

Puede unir fragmentos de ADN covalentemente y la reacción procede en 5 min. Se usa en los **“vectores T”** que tienen una T 3' (TIMINA) activados con topoisomerasa unida covalentemente (reconoce una secuencia específica terminada en T y puede unir fragmentos de ADN). Los fragmentos de PCR que tengan una A 3' terminal o romos se pueden unir a los vectores T linealizados. Puede unir fragmentos cohesivos o romos.



Otras enzimas usadas en la manipulación de ácidos nucleicos

DNA polimerasas

- **dependientes de DNA:** DNA pol I, T4 pol, Polimerasas termoestables
- **dependientes de RNA:** Transcriptasa reversa
- **independientes del molde:** Transferasa terminal

RNA polimerasas

- **dependientes de DNA:** RNA polimerasa de *E. coli* y fagos
- **independientes de DNA:** poly(A) polimerasa

Fosfatasa alcalina

T4 polinucleótido kinasa

Exonucleasas

Endonucleasas

Ribonucleasas

DNA POLIMERASAS DEPENDIENTES DE DNA: síntesis de ADN

Involucradas *in vivo* en la replicación y reparación del ADN. 1) **Requieren un cebador unido a un molde.** 2) **añade al cebador los nucleótidos complementarios a la hebra molde siempre en sentido 5'-3'**

Actividad 5'-3' polimerasa: agregan dNTPs a un 3'OH de un cebador sobre una molécula de ADN, el nucleótido a agregar es determinado por la especificidad del apareamiento de bases (A-T, G-C). **La síntesis es en el sentido 5'-3' con respecto a la cadena sintetizada.**

Actividad 3'-5' exonucleasa: correctora o “proofreading” degrada DNA desde un extremo 3'OH libre. Procede en dirección inversa a la síntesis.

Actividad 5'-3' exonucleasa: remueve 1 a varios nt desde un extremo 5'.
Importante para la PCR en tiempo real !!!

