

Puede cometer errores la DNA polimerasa?

Sustituciones: cuando entra un nt impropriamente apareado. El nivel de error es determinado por la eficiencia de “proofreading” (actividad exonucleasa 3' - 5').

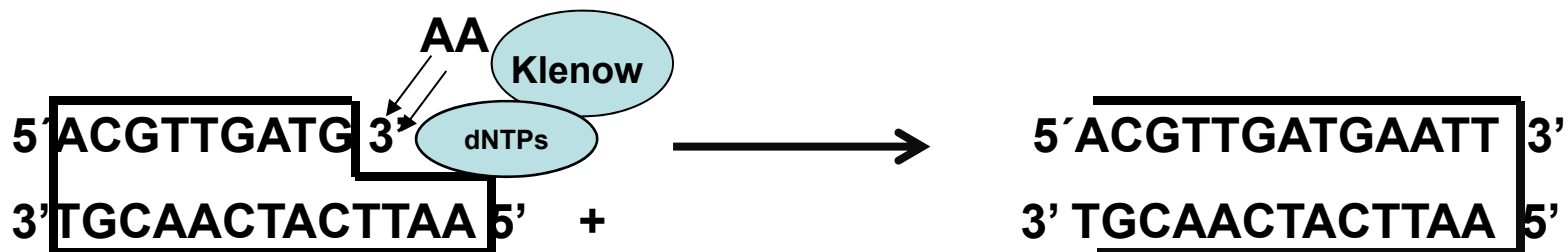
Cambios de fase (Frameshifts): cuando es incorporado un nucleótido extra o es omitido. Fidelidad está determinada por la *procesividad* de la enzima: la tendencia a permanecer sobre el templado sin disociarse.

DNA polimerasa I de *Escherichia coli*: 103 kDa (codificada por *polA*) participa en la replicación y reparación del DNA (no es la principal replicasa)

– **fragmento Klenow (68 kDa)** contiene la actividad polimerasa y exonucleasa 3' – 5' (este mecanismo de corrección explica la alta fidelidad de la Pol I)

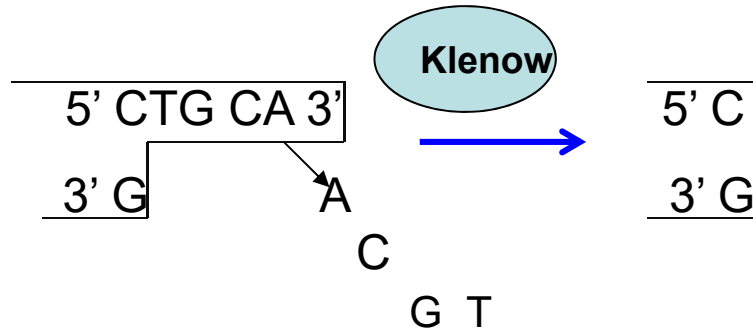
– **fragmento pequeño (35 kDa)** contiene la actividad 5' – 3' exonucleasa (usada en marcación de sondas por la técnica de nick translation o de traslado de la mella)

-**Aplicaciones de Klenow: Filling o Rellenado (polimerasa 5'- 3')**: rellenar extremos cortados con una enzima que deja 5' protuberantes (overhanging o sticky ends) para convertirlos en romos o agregar nt marcados a un DNA.



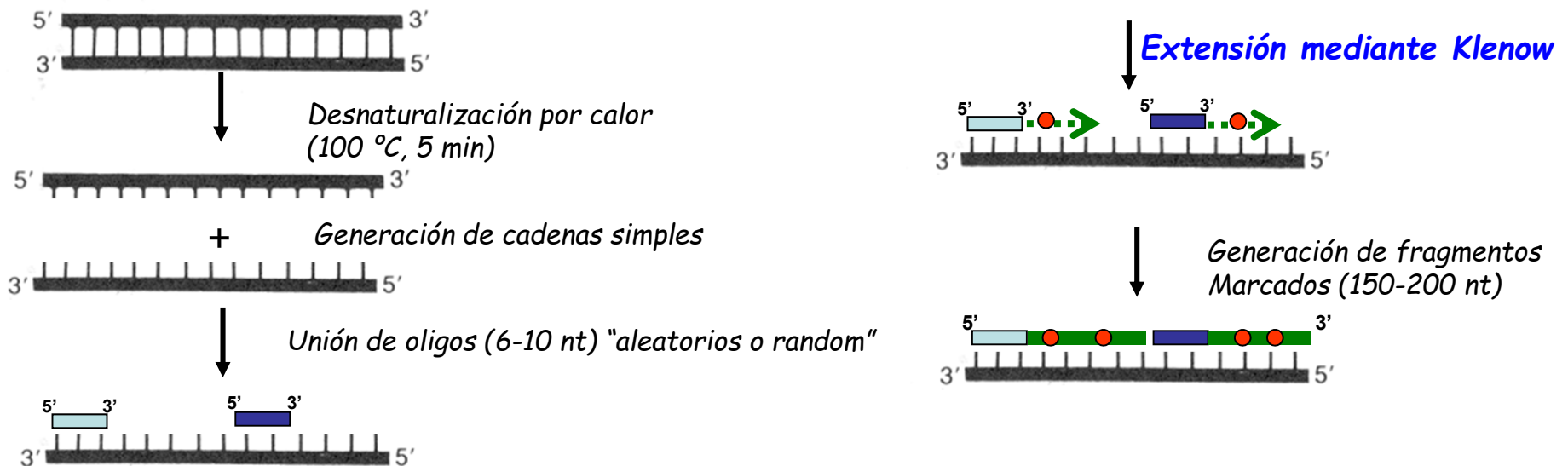
-**Convertir extremos 3' protuberantes en romos**: con la actividad 3'- 5' exonucleasa (que es la «correctora») y en presencia de dNTPs (la actividad es baja comparada con la T4 polimerasa)

Pst I: CTGCA/G



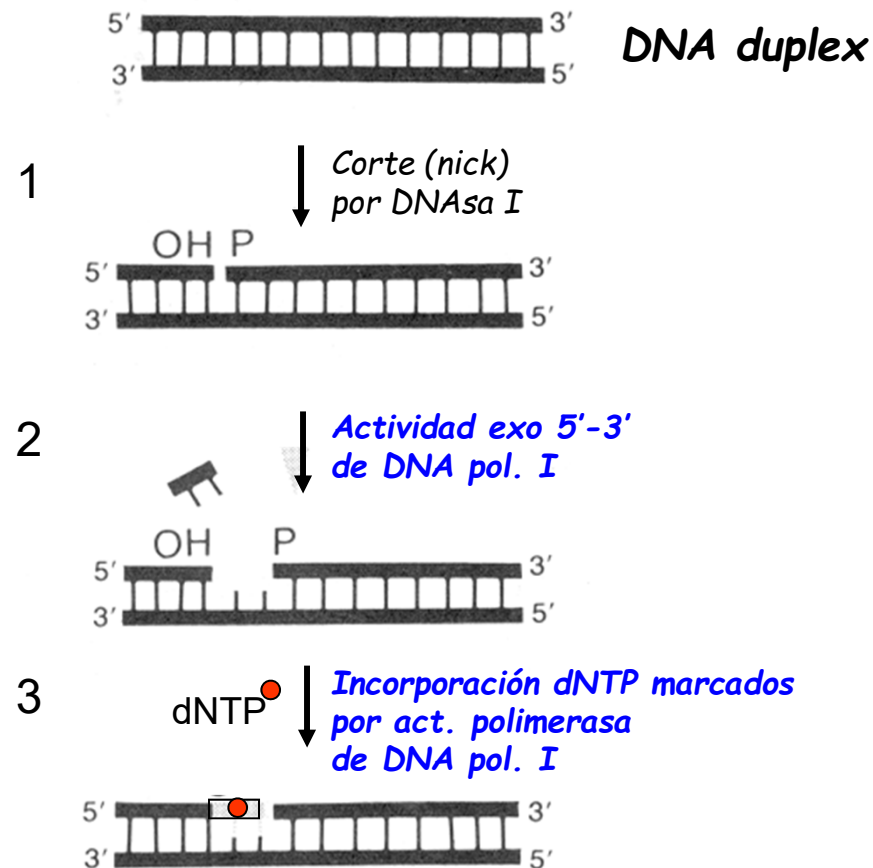
-**Síntesis de la segunda cadena de cDNAs para el clonado posterior**

-**Preparar DNA marcado radioactivamente** por síntesis primada por hexanucleótidos aleatorios (**random priming**) y uno de los dNTPs marcado



DNA pol I: Síntesis de sondas de DNA uniformemente marcado.

- a) **Nick translation (traslado de la mella)** : se trata el DNA con Dnasa I que produce cortes al azar de simple hebra, luego la **DNA pol remueve nt con su actividad 5'- 3' exonucleasa e incorpora dNTPs con su actividad polimerasa** . Se usan nucleotidos radioactivos (α P) o marcados con un fluoróforo.

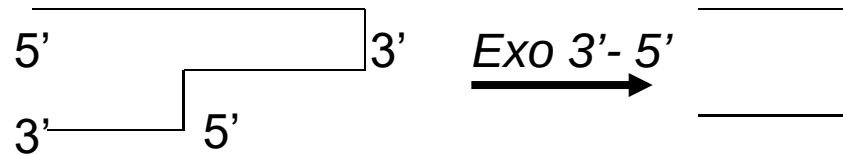


T4 DNA polimerasa (fago T4)

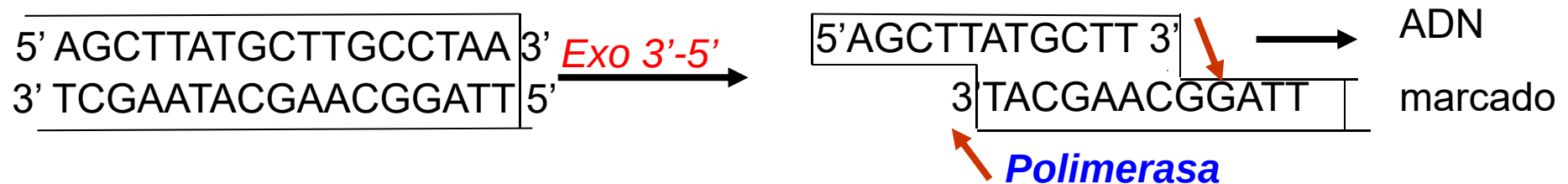
Actividad polimerasa 5'-3' y 3'-5' exonucleasa muy activa de simple y doble cadena

Carece de actividad exonucleasa 5'-3'

Aplicaciones: Convertir extremos de ADN protuberantes en romos **en presencia de altas [] de dNTPs** con la actividad Exonucleasa 3'-5' que se detiene cuando alcanza el ADN doble hebra.

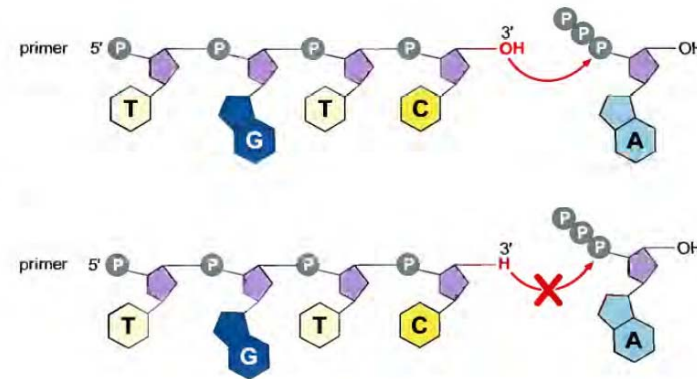
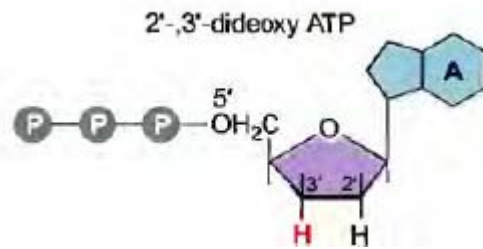


En ausencia de dNTPs: degrada desde ambos 3' aún en la doble hebra

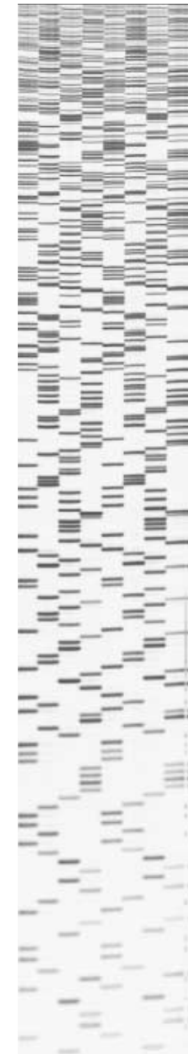
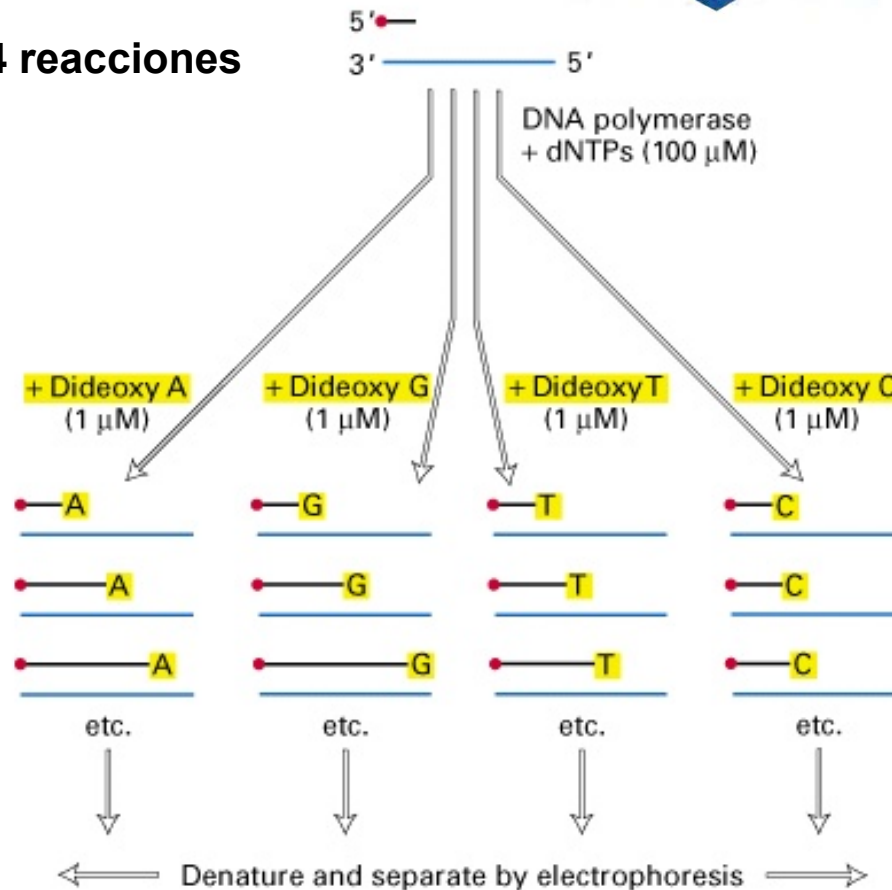


-marcación extensiva por síntesis de reemplazo : se incubaba el fragmento de ADN con T4 DNA pol (en ausencia de dNTPs) la cual degrada selectivamente los extremos 3' (30-40%), **luego se agregan los 4 dNTPs** incluyendo uno radioactivo para activar la polimerasa que extiende los extremos 3' hasta que finaliza el templado.

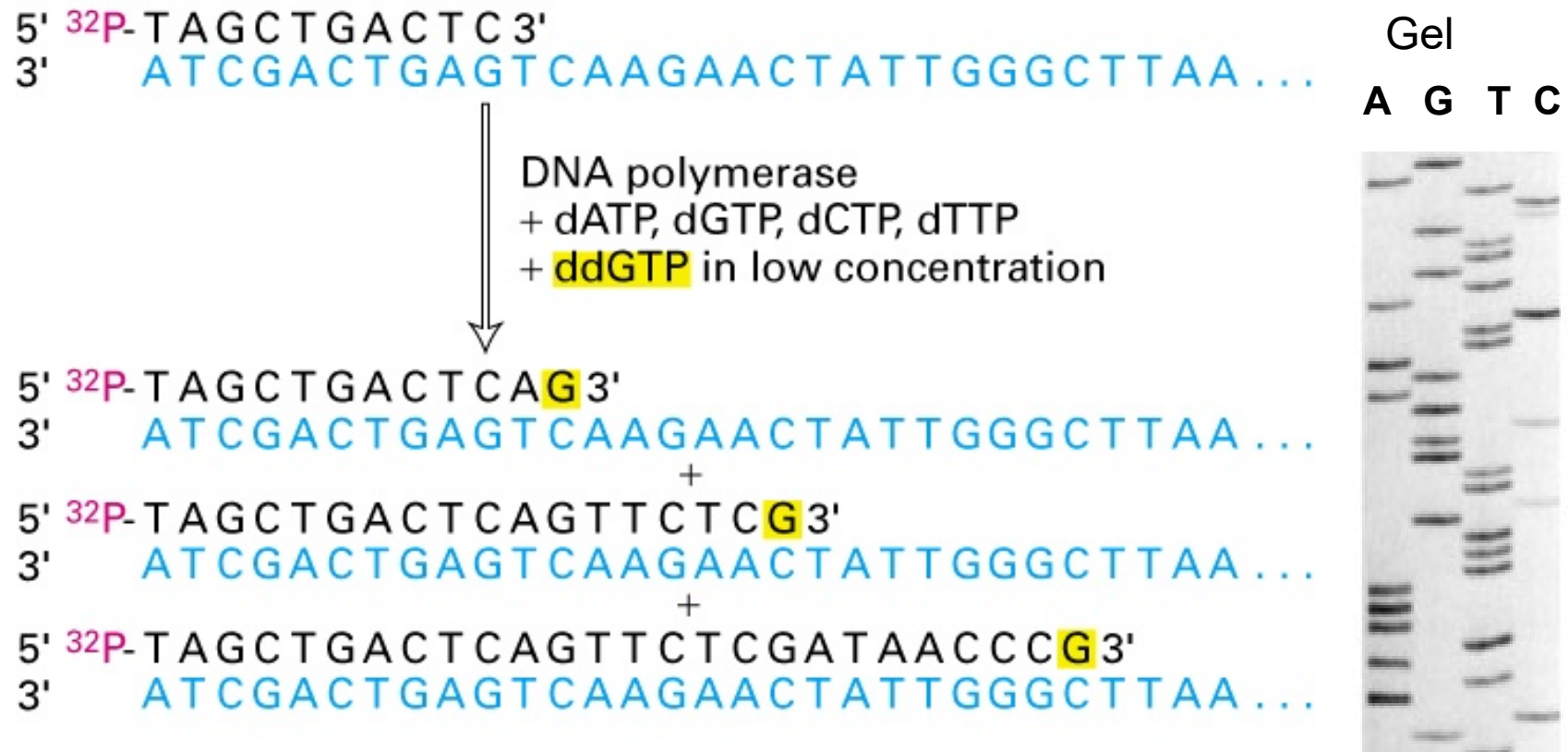
Secuenciación de DNA: the Sanger method (dideoxi) Terminación de la cadena. T 7 DNA polimerasa muy procesiva (fago T 7) y polimerasas termoestables



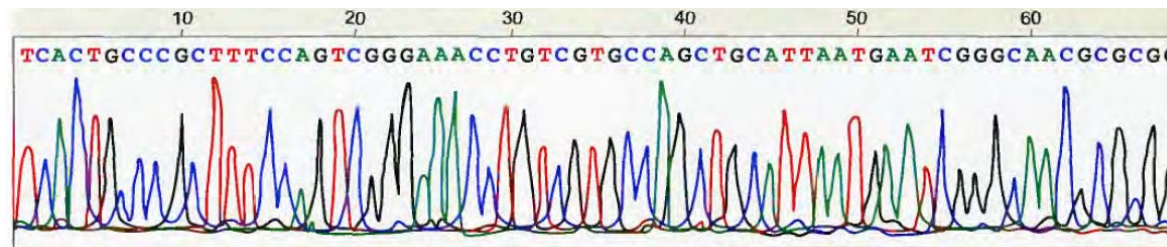
Se llevan a cabo 4 reacciones por separado



DNA sequencing: the Sanger (dideoxy) method

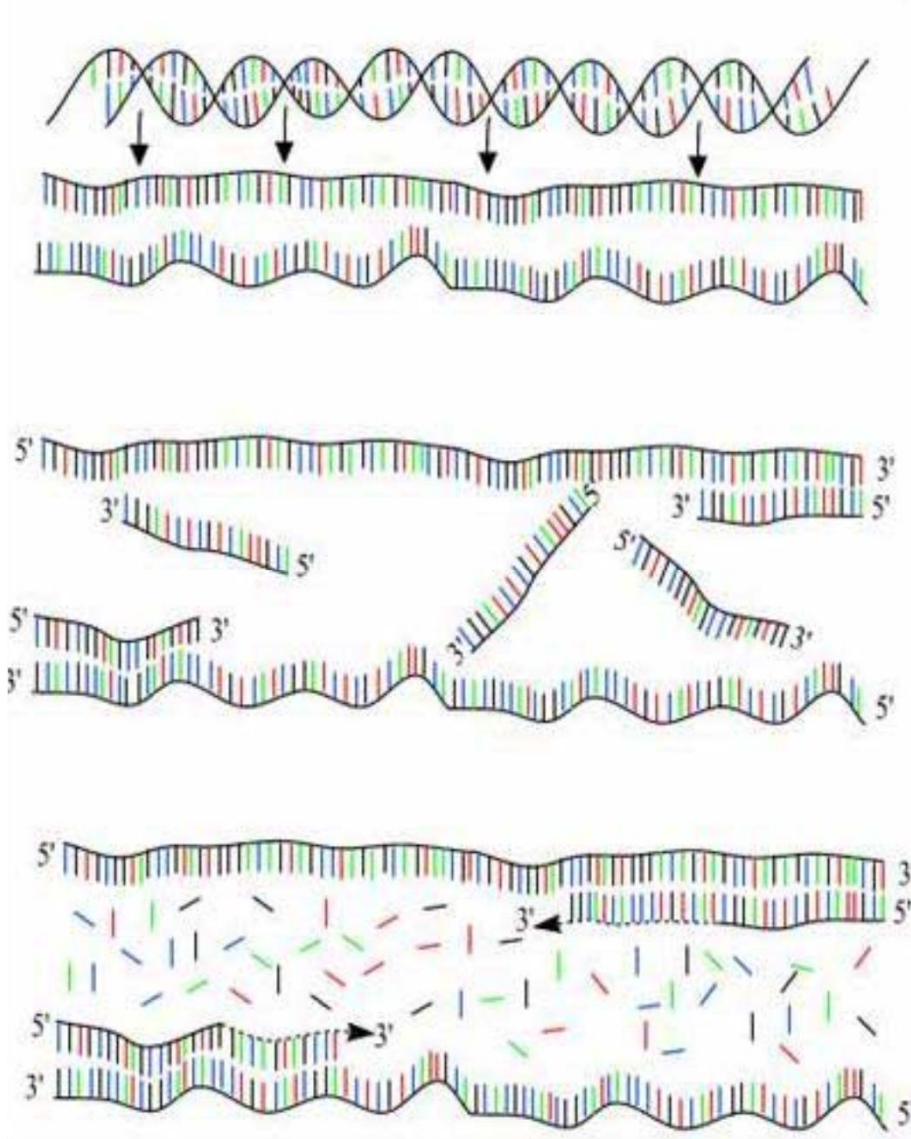


Automatizado



DNA polimerasas termoestables: muy importantes!!

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



ADN molde o Templado

Desnaturalización: 94 - 95 °C

30 seg- 1 min

Anillado o Hibridación: 40 – 65 °C

30 seg- 1 min

Extensión: 72 °C

30 seg- 3 min

Los 3 pasos constituyen un Ciclo.

La repetición de estos ciclos produce la amplificación exponencial del ADN blanco

DNA Polimerasas Termoestables (Taq, Pfu, Vent, etc)

TAQ DNA polimerasa 1976: *Thermus aquaticus* (bacteria termófila) → 1988 PCR
temperatura óptima de polimerización de 75°C - 80°C, a 37° tiene 10% de actividad. No tiene proofreading: comete errores!

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Diagnóstico de enfermedades infecciosas, identificación de personas, filiación, etc, etc.

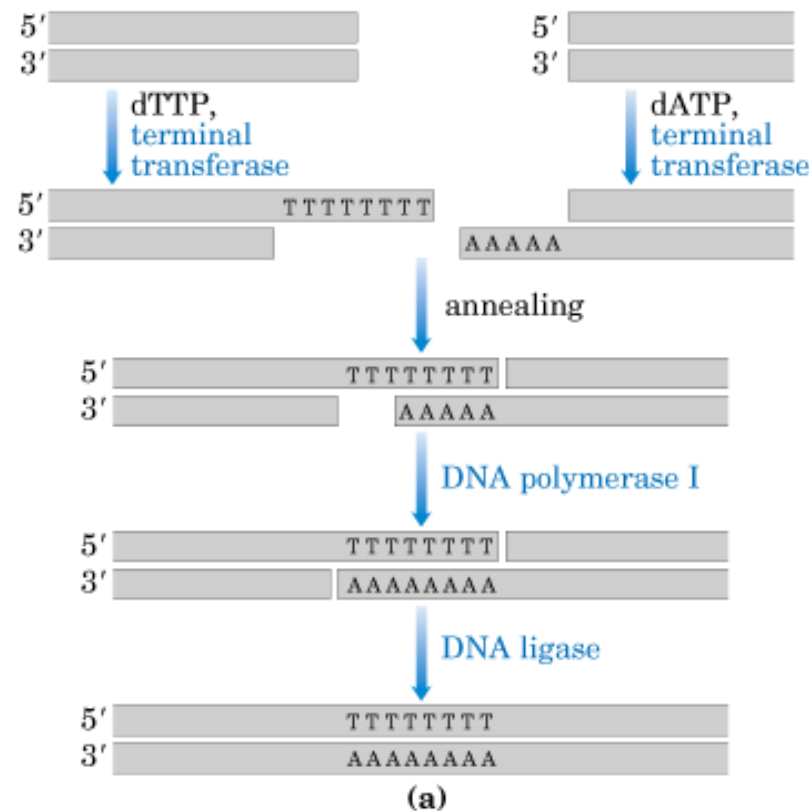
- Secuenciación de ADN (trabajar con temperaturas altas para reducir las estructuras secundarias en el templado)

Nombre	3'- 5' Exo	Origen	Propiedades
Taq	No	<i>Thermus aquaticus</i>	Vida media a 95° C 100 min. Alta tasa de error (10^{-4} a $2 \cdot 10^{-5}$ por pb)
Pfu	Sí	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Baja tasa de error. $1-2 \cdot 10^{-6}$ por pb)
Vent (T li)	Sí	<i>Thermococcus litoralis</i>	Vida media a 95° C aprox. 7 horas

Polimerasa independiente del templado

TRANSFERASA TERMINAL (desoxinucleotidiltransferasa terminal):
no requiere templado, agrega dNTPs al 3'OH de ADN de cadena simple o doble. Requiere cationes divalentes que determinan la preferencia del nt

Para hacer un tallo homopolimérico: puede agregar 10 nt a cada extremo 3' en 30 min



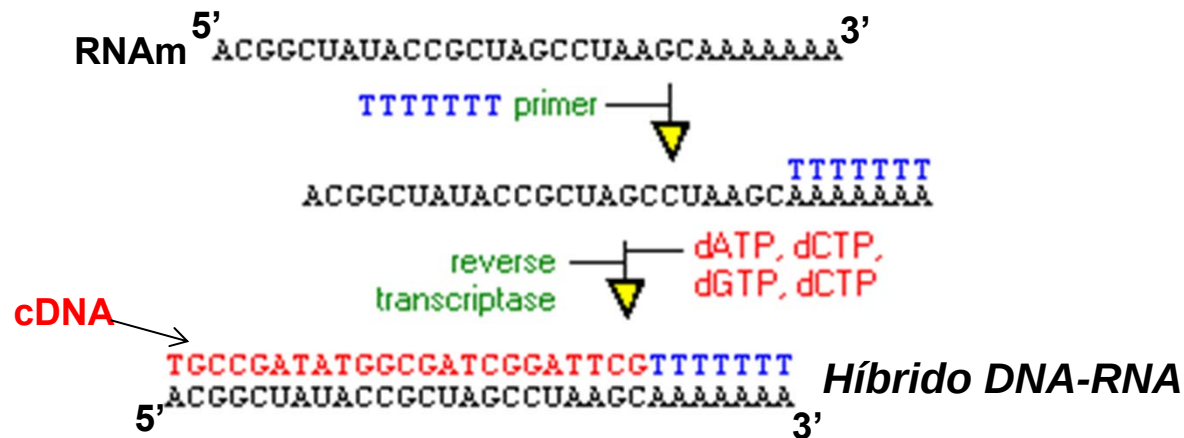
DNA polimerasas dependientes de RNA: molde es RNA !

TRANSCRIPTASA REVERSA: derivan de retrovirus que tienen genomas de RNA y usan esta enzima para hacer copias de DNA; también tienen otras actividades.

AMV: avian myoblastosis virus

MMLV: Moloney murine leukemia virus

a) **Templado: RNA**. Necesitan un cebador o primer [polímero de oligo dT, hexámeros aleatorios, oligo específico]. El DNA sintetizado usando RNA como templado: **cDNA (DNA complementario)**.



La transcriptasa reversa también tiene actividades de

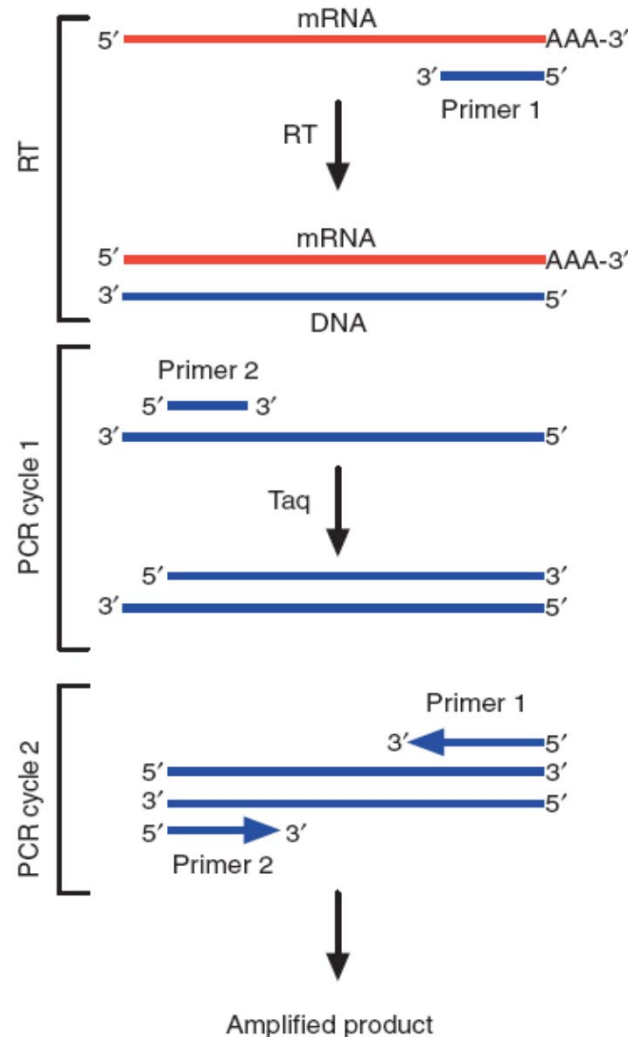
b) **DNA polimerasa dependiente de DNA**: baja y no tiene proofreading

c) **RNasa H**: exonucleasa que degrada el RNA en los híbridos RNA-DNA desde el 5' o 3'; también puede introducir «gaps» de varios nt actuando como endonucleasa.

Hay 2 APLICACIONES muy usadas de la transcriptasa reversa

- Síntesis de todos los cDNA

RT-PCR: permite amplificar un cDNA particular



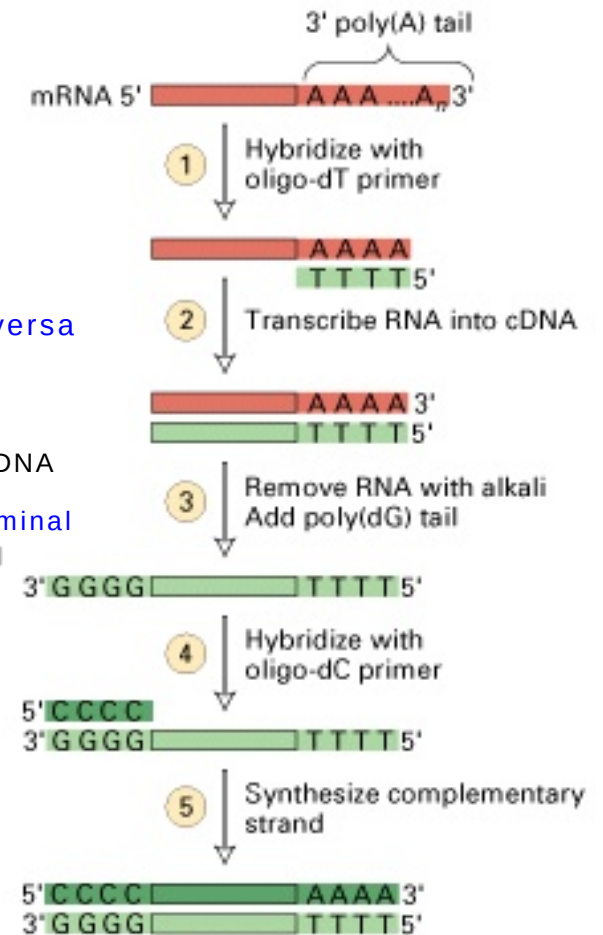
Trasncriptasa reversa
y dNTPs

Transferasa terminal
Single-stranded
cDNA

Fragmento Klenow

cDNA doble hebra

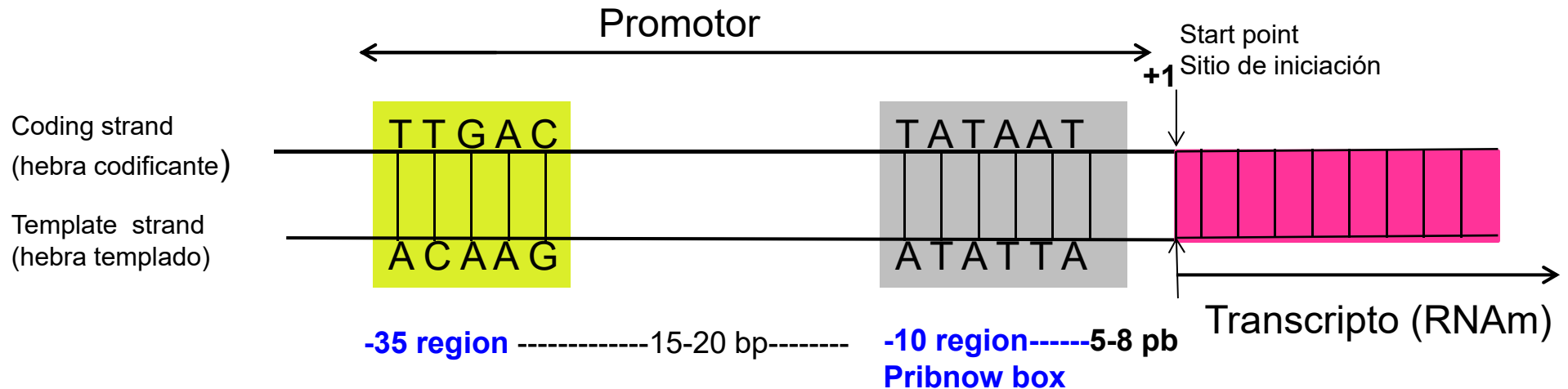
Lo podemos clonar
en un plásmido



RNA polimerasas dependientes de DNA

***E. coli* RNA polimerasa:** reconoce los elementos -10 y -35 del promotor

Gen procariótico: secuencias reguladoras



Uso: para obtener transcritos in vitro; dificultades: difícil de obtener transcritos de más de 500 b, baja especificidad por el promotor

RNA polimerasas de fagos T7, T3 y SP6 que reconocen su propio promotor (20 pb) con alta especificidad; muy procesivas (no se disocian del templado transcribiendo cientos de bases), muy rápidas (10 veces > que *E.coli* RNA pol) y producen alta cantidad de transcritos. Estos promotores están presentes en plásmidos como el pBluescript. Aplicaciones: generar sondas de RNA, traducción in vitro; **en los plásmidos de la serie pET encontramos el promotor del fago T7 y junto a la polimerasa del fago T7 nos permiten obtener una alta expresión de genes clonados.**

RNA polimerasas independientes de DNA:

Poly(A) polimerasa: cataliza la incorporación de residuos de AMP en el 3'OH de RNA usando ATP como precursor

Aplicaciones:- clonar RNA que carece de cola de polyA. Se sintetiza la cola de polyA con la Poly(A) polimerasa y se hace el cDNA con un primer oligodT.

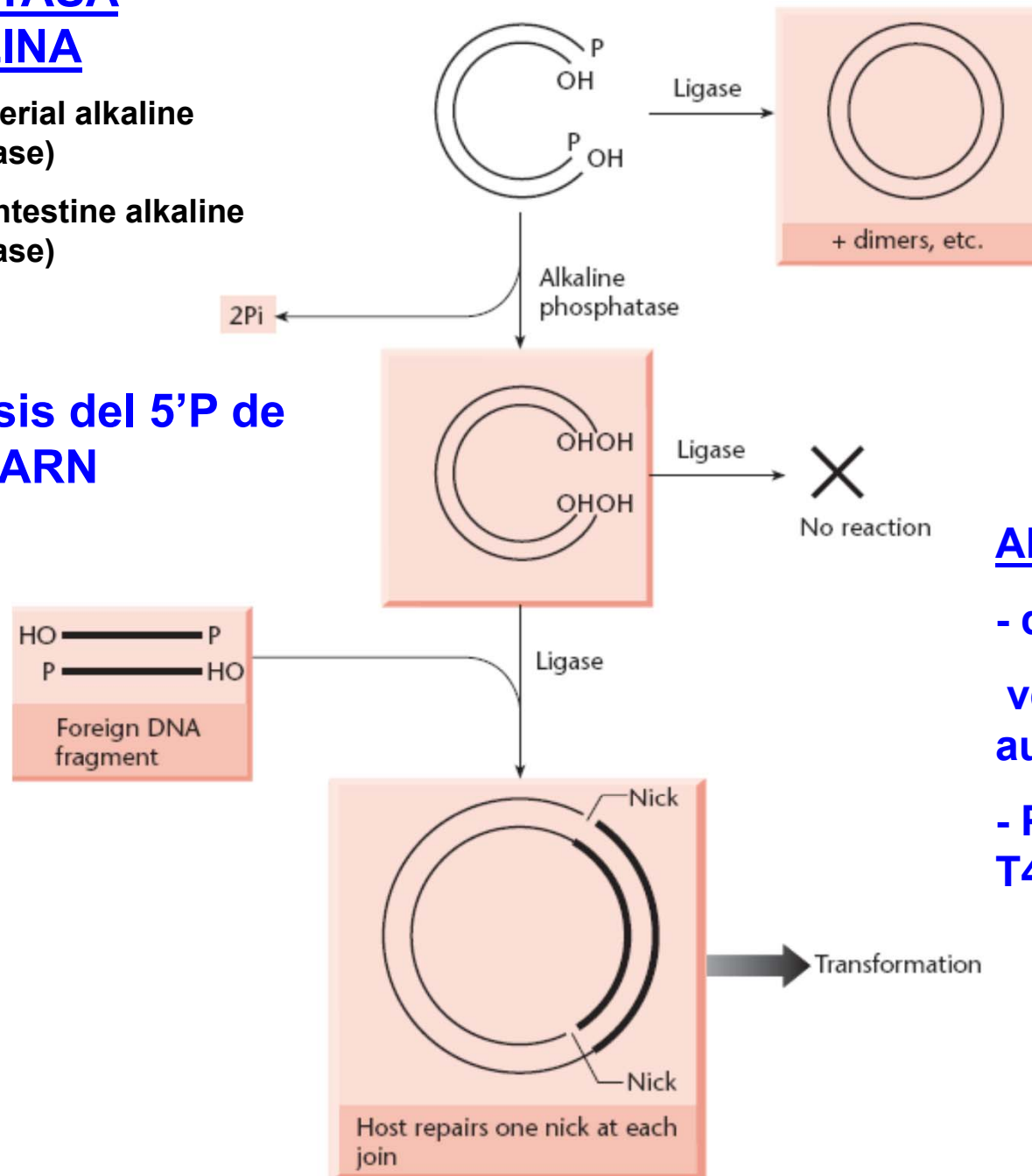
- agregar residuos de AMP marcados con ATP(α^{32} -ATP)

FOSFATASA ALCALINA

BAP (bacterial alkaline phosphatase)

CIP (calf intestine alkaline phosphatase)

Hidrólisis del 5'P de ADN o ARN



APLICACIONES

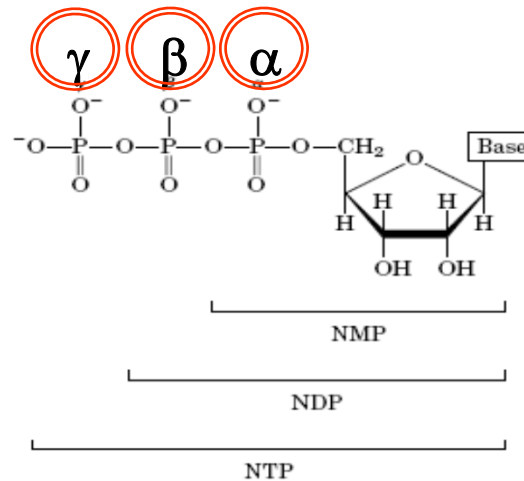
- desfosforilar el 5' de
vectores para impedir
autoligación
- Previo a marcar con
T4 polintKinasa

Fig. 3.8 Application of alkaline phosphatase treatment to prevent recircularization of vector plasmid without insertion of foreign DNA.

T4 POLINUCLEOTIDO KINASA: FOSFORILA EXTREMOS 5'

Reacción Forward:
cataliza la transferencia del fosfato (γ) de ATP al 5'OH de DNA o RNA.

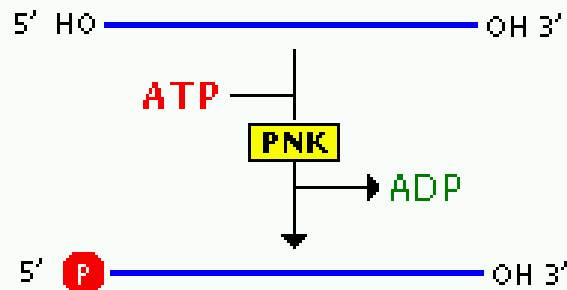
Primero se usó FOH para sacar el PO_4^-



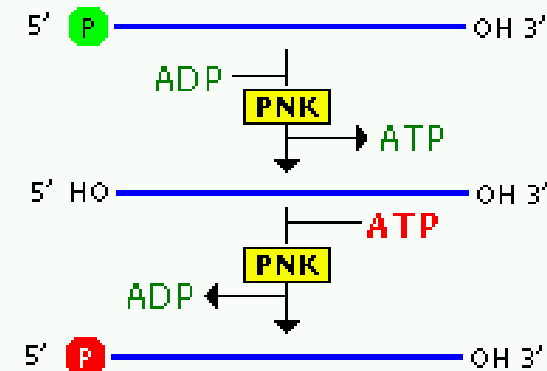
Reacción de intercambio: cataliza el intercambio de **5'P** en presencia de exceso de **ADP**, luego se fosforila con $\gamma\text{P}_3\text{ATP}$.

En esta reacción no se usa FOH para sacar el PO_4^- , lo saca la PNKinasa

Forward Reaction



Exchange Reaction



Aplicaciones

- para **marcar** extremos 5' (se usa γ P32ATP)
- para **fosforilar extremos 5' no fosforilados**: fragmentos de DNA sintéticos (para ligación de “linkers” o adaptadores)

Síntesis química de ADN u oligonucleótidos: el producto final contiene extremos 5'-OH (**no fosforilado**) y 3'-OH.

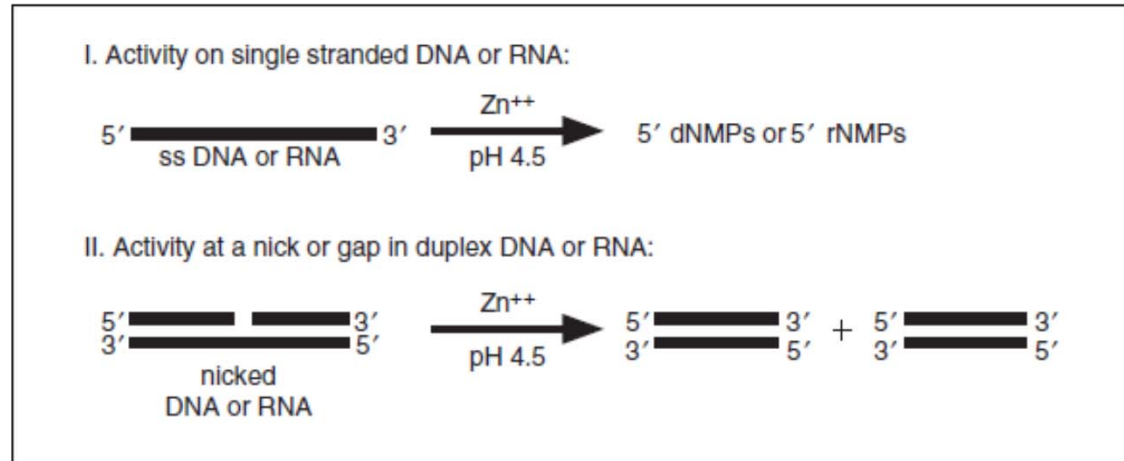
La síntesis química de ADN es un proceso cíclico en el que cada nucleótido es incorporado secuencialmente (desde 3' a 5') para formar una cadena de nucleótidos. El nucleótido 3' está covalentemente unido a un soporte sólido (resina), y sobre el se van añadiendo monómeros de uno en uno en un proceso que implica distintas reacciones químicas.

ENDONUCLEASAS

S1 Nucleasa: endonucleasa de cadena simple aislada de *Aspergillus orizae*, degrada DNA y RNA desapareados, **no degrada moléculas doble hebra.**

Aplicaciones:

- Remover fragmentos de cadena simple para producir extremos romos
- Mapear los extremos 5' y 3' de transcriptos analizando los híbridos RNA/DNA resistentes a S1. Mapear posiciones de intrones



Mung Bean nucleasa: endonucleasa de cadena simple similar a S1

- para hacer extremos romos, preferencia por 5' protuberantes, para 3' protuberantes es mejor S1.

Es más fácil de controlar que la S1. Tiene preferencia por regiones ricas en AT para producir nicks. - mapeo de transcriptos.

DNasal: es una endonucleasa que requiere cationes divalentes. En presencia de Mg **produce nicks en el ADN duplex** y en presencia de Mn produce cortes en el ADN duplex. Aplicaciones: Nick translation.

EXONUCLEASAS: hidrolizan el ADN desde el extremo

De cadena simple 5'- 3' y 3'- 5' Exonucleasa VII (ExoVII)

T5 Exonucleasa: actividad 5'-3': importante en el clonado por método de Gibson!!

De cadena doble : Lambda Exonucleasa (λ Exo), Exonucleasa III (ExoIII)

RIBONUCLEASAS: Hidrolizan el RNA

Ribonucleasa H: endorribonucleasa que hidroliza el RNA en duplex RNA/DNA, pero no simple hebra; o desde los extremos actuando como exorribonucleasa. Aplicaciones: síntesis de cDNA

Ribonucleasa A: endorribonucleasa. Aplicaciones: eliminar RNA contaminante en preparaciones de DNA

