

Tecnologia do DNA recombinante

Clonagem Molecular

Fragmentos de DNA de interesse

Vetores: Plasmídeos
Fagos
Cosmídeos
BACs/ YACs

Hospedeiros:
E.coli
Levedura
Células vegetais
Células animais

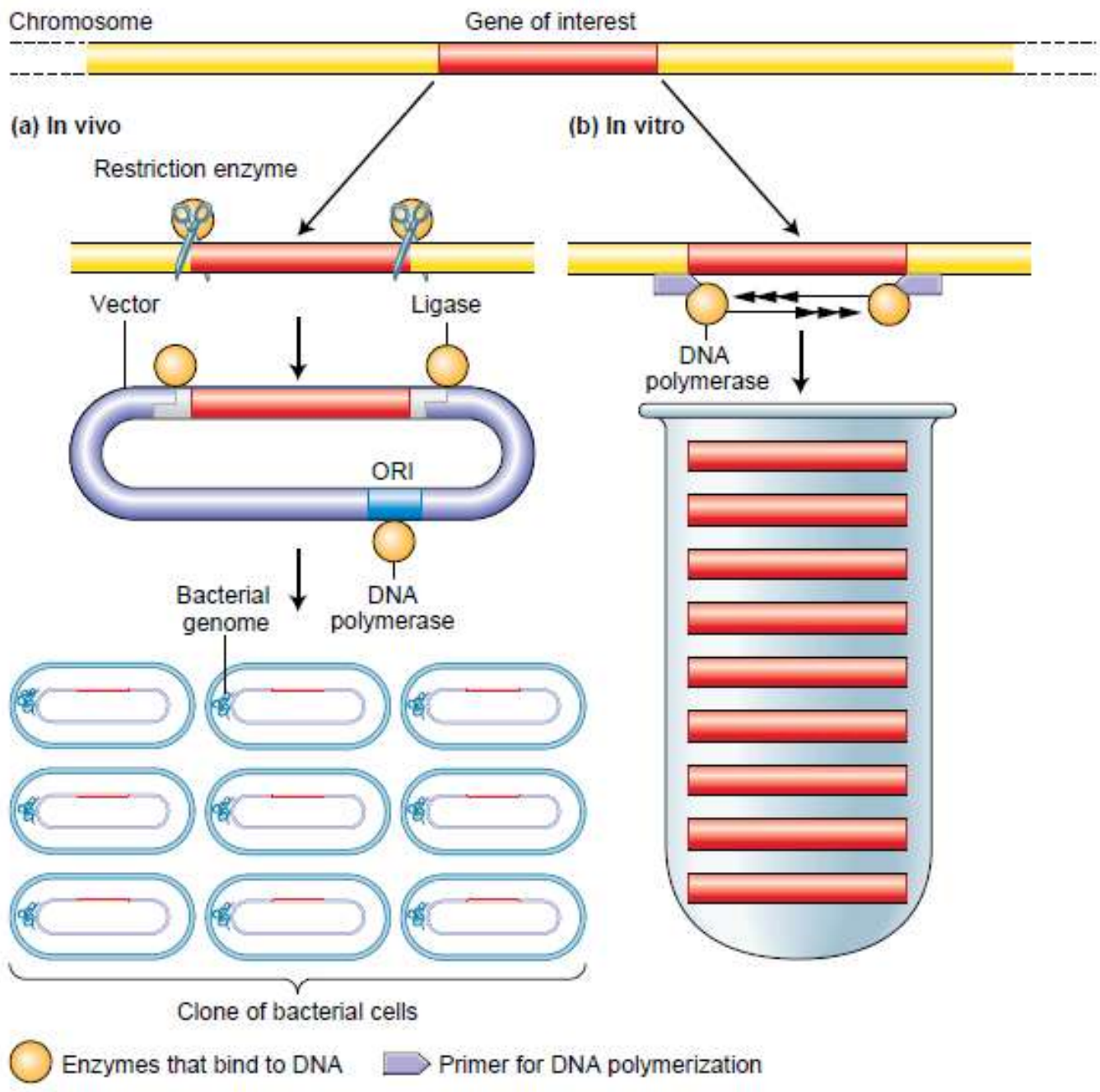
Enzimas: Enzimas de restrição
DNA polimerases
DNA ligases
Topoisomerasas
Fosfatases

Clonagem

- Colocar um fragmento de DNA , em um trecho de DNA de replicação autônoma, conhecido como **vetor**.
- Será formada uma molécula de **DNA recombinante**, que pode ser replicada independentemente do genoma original e normalmente em outra célula hospedeira.
- A propagação do organismo hospedeiro contendo o DNA recombinante forma uma conjunto de organismos geneticamente idênticos, ou um **clone**.
- Este processo é chamado **clonagem do DNA**.

Para que serve a clonagem?

- Facilita o isolamento e a manipulação dos fragmentos do genoma de um organismo replicando-os independentemente como parte de um vetor autônomo



Aplicações da clonagem molecular:

- Sequenciamento de DNA: e a obtenção da sequência de proteínas
- Isolamento e análise dos genes
- Investigação da função da proteína
- Identificação de mutações, ex. defeitos gênicos que levam a doença

Aplicações da clonagem molecular:

- Biotecnologia: produção comercial em grande escala de proteínas e outras moléculas de importância biológica, como a insulina e hormônio de crescimento
- Transformação de animais e plantas e terapia gênica
- Modificações na sequência de aminoácidos de proteínas para alterar suas propriedades

Clonagem

Resumindo.....

ligar 2 ou + segmentos de DNA, gerando uma molécula capaz de se replicar de forma autônoma em um hospedeiro

Vetores de clonagem

❑ Vetores de Clonagem Bacterianos

- **Plasmídeos:** fragmentos até 10 kb
- **Bacteriófagos:** fragmentos até 20 kb
- **Cosmídeos:** fragmentos até 40 kb
- **BACs** (cromossomo artificial bacteriano): até 300 kb
- ❑ **Levedura:** YACs: até 1 Mb (cromossomo artificial de levedura)

Vetores de clonagem

- Plasmídeos
- Bacteriófagos
- Cosmídeos
- BAC – Bacterial Artificial Chromosome
- YAC – Yeast Artificial Chromosome

Plasmídeos

- Definição: Todos determinantes de hereditariedade extracromossomais (Lederberg, 1952)
- Desde 1970, se tornaram elemento chave na tecnologia do DNA recombinante e tem sido usados como vetores de clonagem para a propagação do DNA dentro das espécies.
- Ocorrem naturalmente em bactérias e alguns organismos eucarióticos como leveduras.

Plasmídeos

- São moléculas de DNA circular, dupla fita, extracromossômico
- Possuem capacidade de replicação autônoma
- Codificam genes de resistência (fator R)

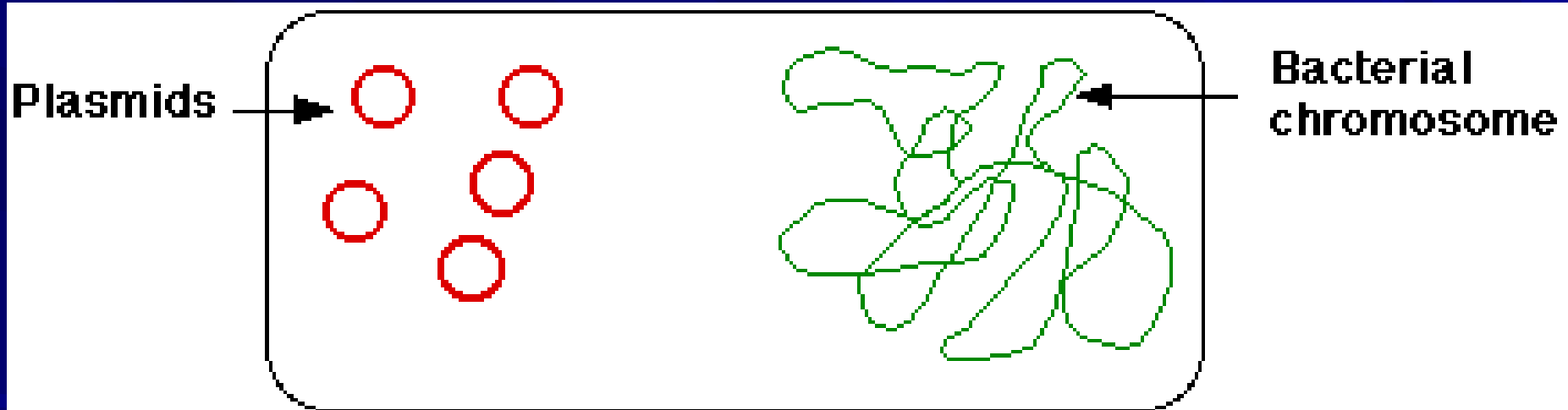
Plasmídeos

Na células, são responsáveis por funções como:

- Fixação de nitrogênio em certas bactérias
- Resistência a metais pesados e radiação
- Desenvolvimento de tumores em plantas
- Produção de determinantes de virulência bacteriana

Plasmídeos

- DNA circular acessório (extracromossômico), auto-replicativo tamanho de 1 a 10kb



Plasmids: small circular DNA molecules present in many bacteria

Vetores de clonagem: Características

- Normalmente devem ser capazes de se replicar e ser isolados independentemente do genoma do hospedeiro
- Marcador selecionável:
um gene que permite que as células hospedeiras contendo o vetor sejam selecionadas dentre as que não contém, em geral conferem resistência a antibióticos ou permite sua sobrevivência em determinadas condições.

Estrutura dos plasmídeos:

- Origem de replicação para a propagação do plasmídeo
- Genes para seleção
- Sítios de clonagem
- Natureza circular e fechados covalentemente

Origem de replicação

Genes para seleção

Sítios de clonagem

Elementos para facilitar a clonagem:
-Sítios de múltipla clonagem
-Genes para seleção

Elementos transcrição:
-Promotores
-Terminadores
-Sequencias regulatórias

Elementos para manutenção e replicação:
-Genes para a regulação da replicação
-Múltiplas origens para replicação

Elementos para tradução:
-Sítio de ligação ao ribossomo
-Códon de iniciação da tradução (ATG)
-Codons de terminação (TAA, TGA, TAG)
-Genes para fusão

Plasmídeo

plasmídeo



DNA



RESTRIÇÃO E LIGAÇÃO



Plasmídeo
recombinante



TRANSFORMAÇÃO (em *E. coli*)



Bactéria
Geneticamente
modificada

DNA
cromossômico



Antibiótico (seleção de clones)



Clones

Tipos de vetores para *E.coli*

- Vetores para isolamento e propagação
- Vetores para expressão

Tipos de vetores para *E.coli*

1-Plasmídeos utilizados para isolamento e propagação de fragmentos de DNA:

- Plasmídeos com estabilidade
- Plasmídeos com seleção melhorada
- Plasmídeos com alto número de cópias

Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

1-Plasmídeos utilizados para isolamento e propagação de fragmentos de DNA:

a) Plasmídeos com estabilidade :

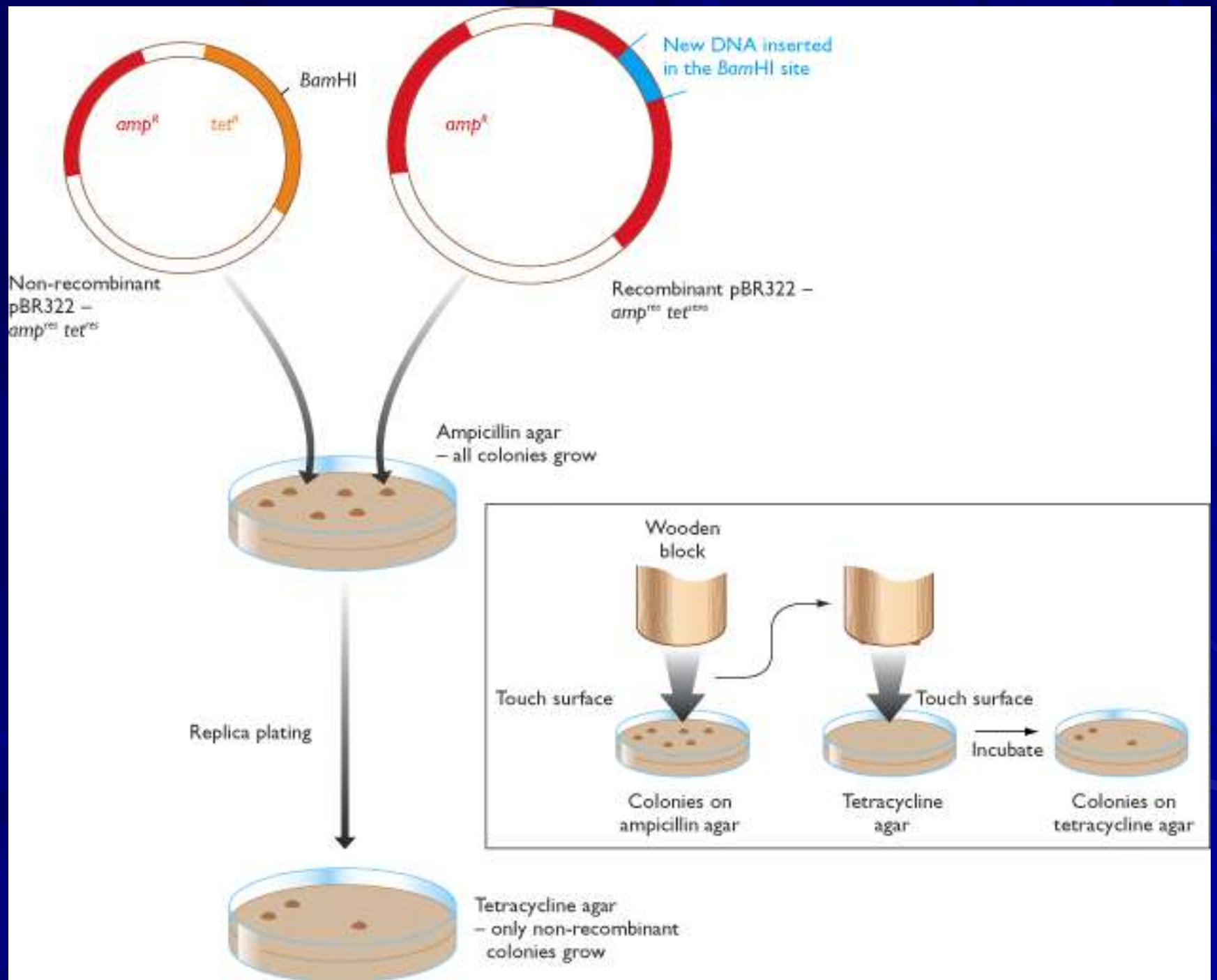
Incluem plasmídeos com várias origens de replicação, estabilizando funções de sobrevivência que garantem a manutenção das linhagens hospedeiras que contém o plasmídeo

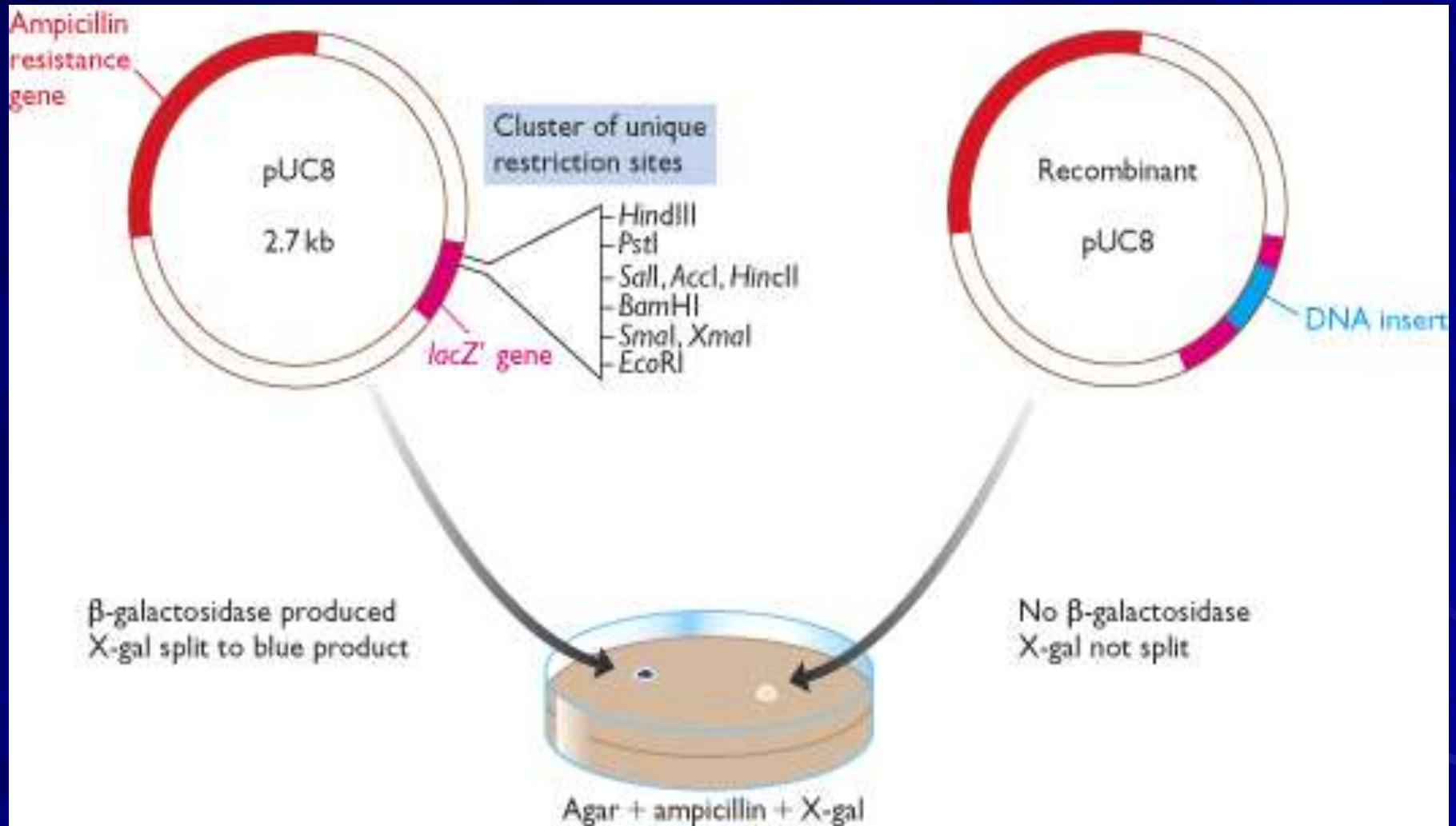
Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

1-Plasmídeos utilizados para isolamento e propagação de fragmentos de DNA:

b) Plasmídeos com seleção melhorada:

Inativação insercional de um gene que tenha alguma atividade específica

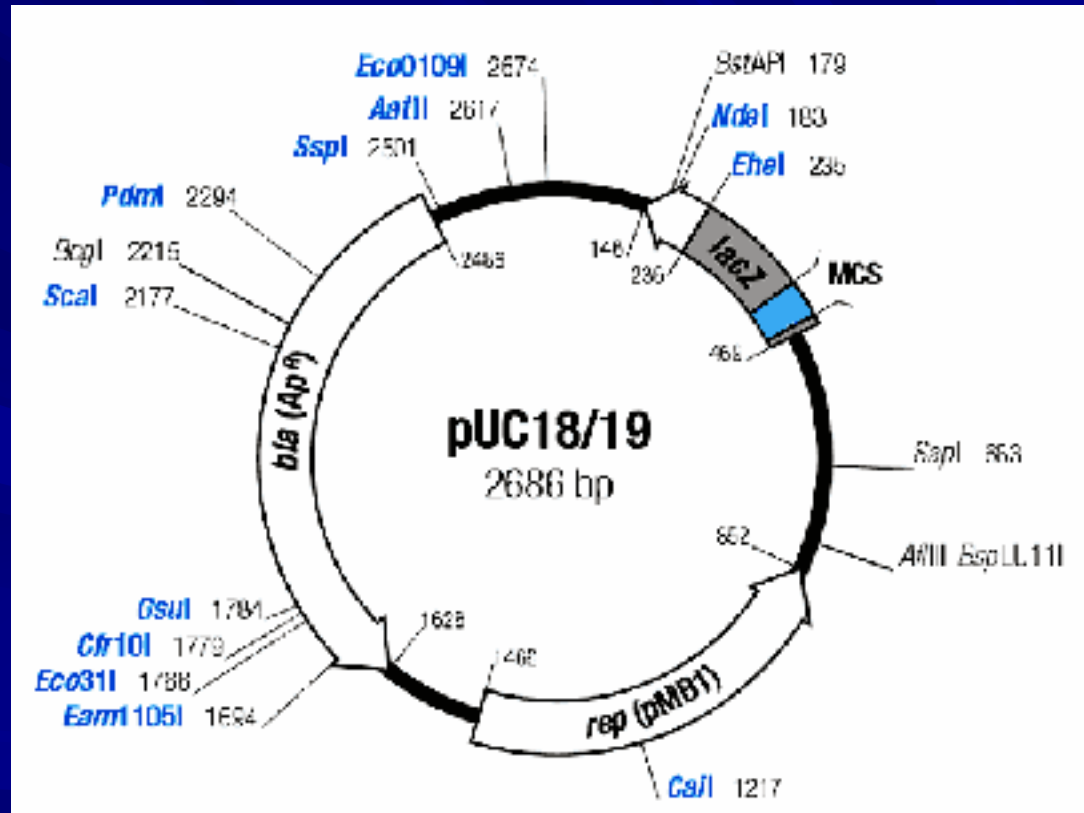




Exemplos de plasmídeos

Plasmídeos da série pUC possuem gene de resistência a ampicilina e da origem de replicação de DNA ligados ao gene da β -galactosidase de *E.coli*, além de vários sítios de clonagem.

A inserção de um fragmento de DNA em um destes sítios causa a interrupção do gene, levando a perda da função β -gal. As bactérias contendo os plasmídeos recombinantes são selecionados pela coloração branca das colônias, enquanto aqueles que receberam o plasmídeo sem inserto apresentam coloração azul, resultantes da ação da β -gal ativa

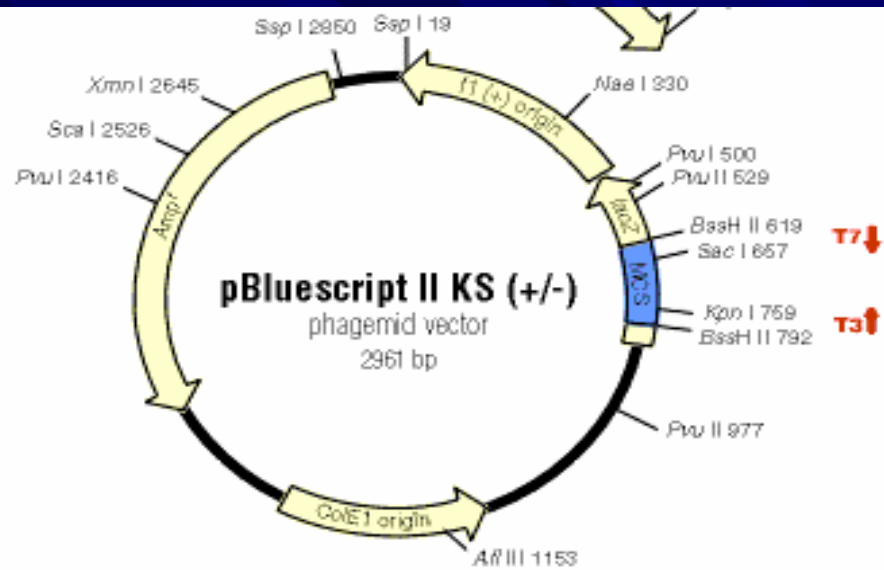


Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

1-Plasmídeos utilizados para isolamento e propagação de fragmentos de DNA:

c. Plasmídeos com alto número de cópias

O número de cópias chega a 20 por célula. Este alto número de cópias é útil para a síntese de grandes quantidades de DNA plasmidial.



Reverse primer 5' GBAAACAGCTATGACCATG 3'

T3 primer 5' AATTAACCCCTCACTAAAGGG 3'

KS Primer 5' TCGAGGTCBACGGTATC 3'

5' GBAAACAGCTATGACCATGATTAAGCCAAAGCAGCAGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAACAAAGCTGGGTACCAGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCG
 3' CCTTTGTCGATACGGTACTAATGCAGGTTCCGCGCTTAATTGGGAGTGAATTTCCCTGTTTTTCBACCCATGCGCCGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGAACTATAGCTTAA

ori
 p-galactosidase

ori
 T3 promoter +1

ori
 +1 T7 promoter

ori
 M13 -20 Primer

SK Primer 3' CTAGGTGATCAAGATCTCGC 5'

T7 Primer 3' CGGGATATCACTCAGCATAATG 5'

M13 -20 Primer 3' TGACCAGCAAAAATG 5'

Restriction sites: MET, BssH II, Kpn I, EcoRI, Hinc II, Bsp I, Hnd III, Pst I, Sna I, BamHI, Spe I, Xba I, Not I, EcoRI, BstXI, Sac II, Sac I, BssH II.

Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

2-Plasmídeos para sistemas de expressão:

Estes plasmídeos maximizam a eficiência da iniciação da transcrição com a introdução de promotores fortes para se conseguir altos níveis na síntese de mRNA.

Tipos de vetores para *E.coli*

Plasmídeos para sistemas de expressão:

- a) Plasmídeos para expressão direta da proteína:
- b) Plasmídeos para fusões traducionais:

Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

- a) Vetores para expressão direta da **proteína**: a expressão do gene pode ser alcançada pela clonagem do DNA contendo a região necessária para a transcrição e tradução eficiente do gene

Vetor de expressão plasmidial

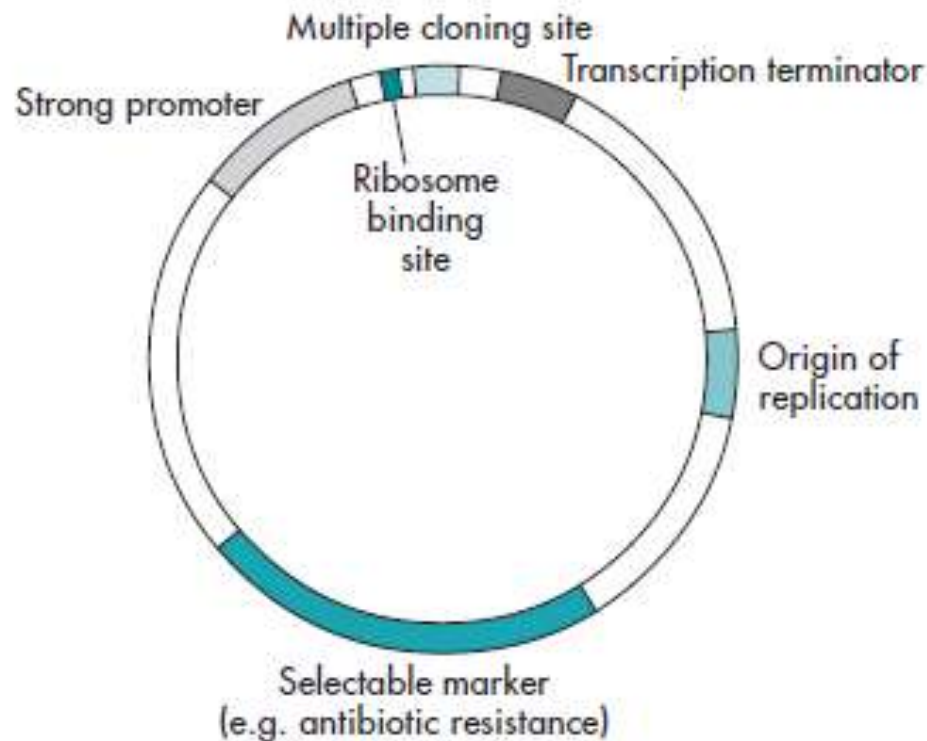


Figure 9.1 The key features of a typical vector for protein production.

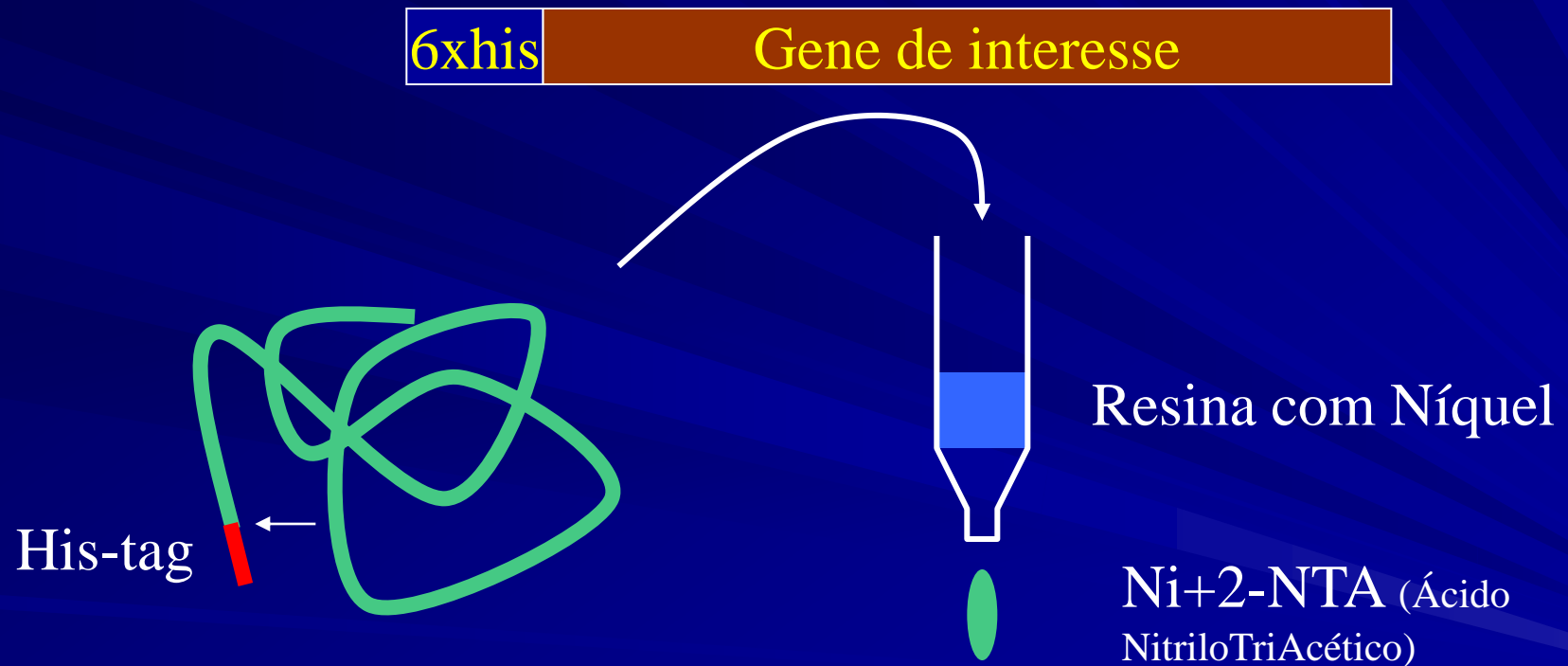
Tipos de vetores plasmidiais para *E.coli*

b) Plasmídeos para fusões traducionais:

Para que servem as fusões?

- Aumentar a solubilidade da proteína
- Purificação da proteína

Plasmídeos para fusões tradicionais:



Plasmídeos para fusões tradicionais:

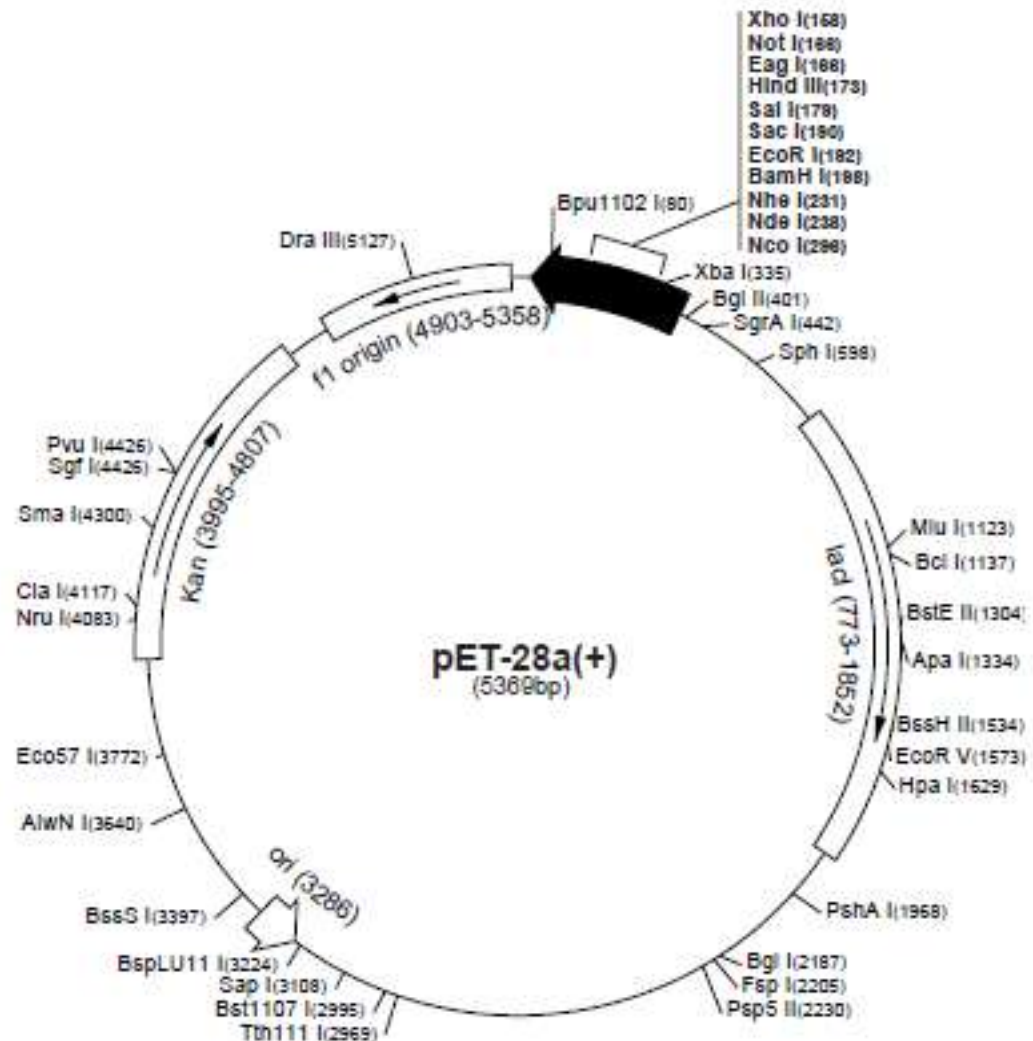
Proteína de Fusão	Ligante imobilizado	Competidor
Glutathione S transferase (GST)	Glutathione reduzida	Glutathione reduzida
Cauda de histidinas(His-tagged)	Níquel ou Cobalto	Imidazol
Proteína de ligação a maltose (MPB)	Dextrina	Maltose

Exemplos de plasmídeos para sistemas de expressão:

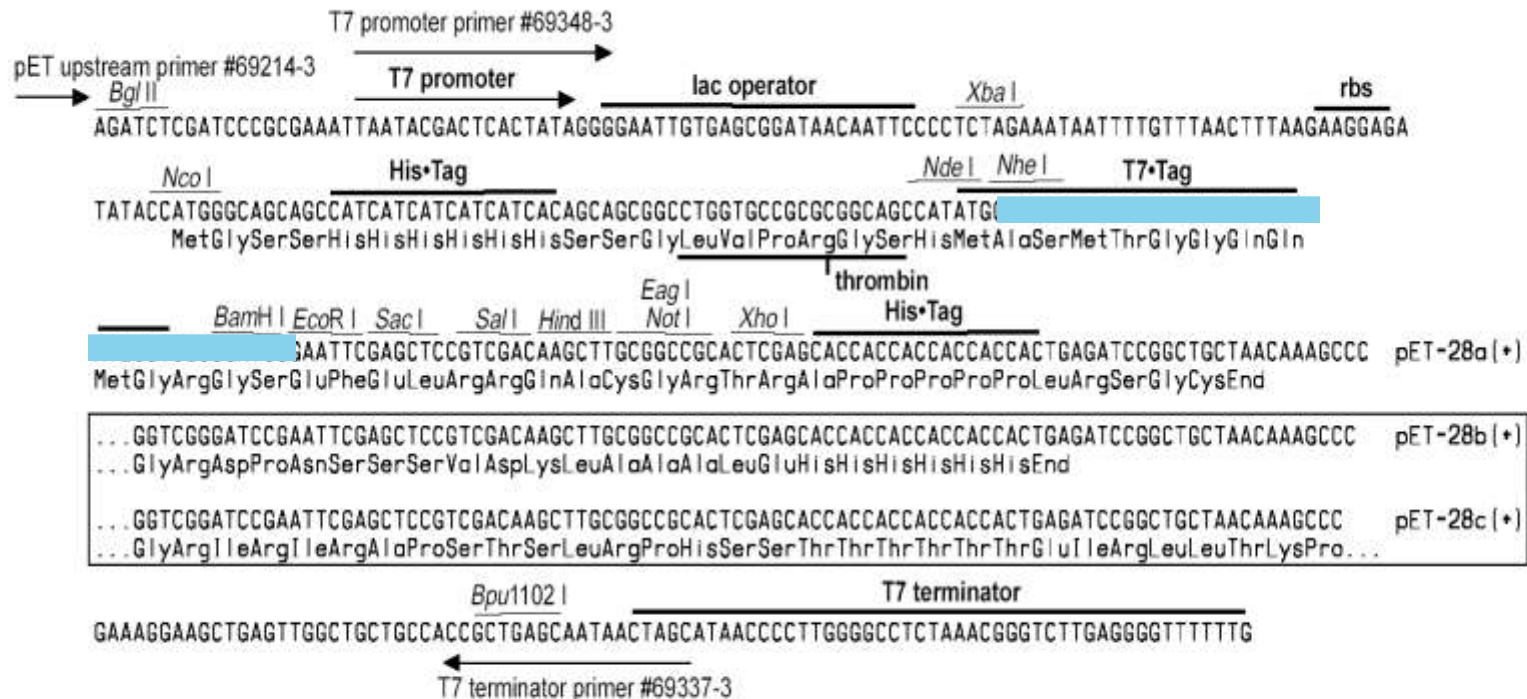
pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.

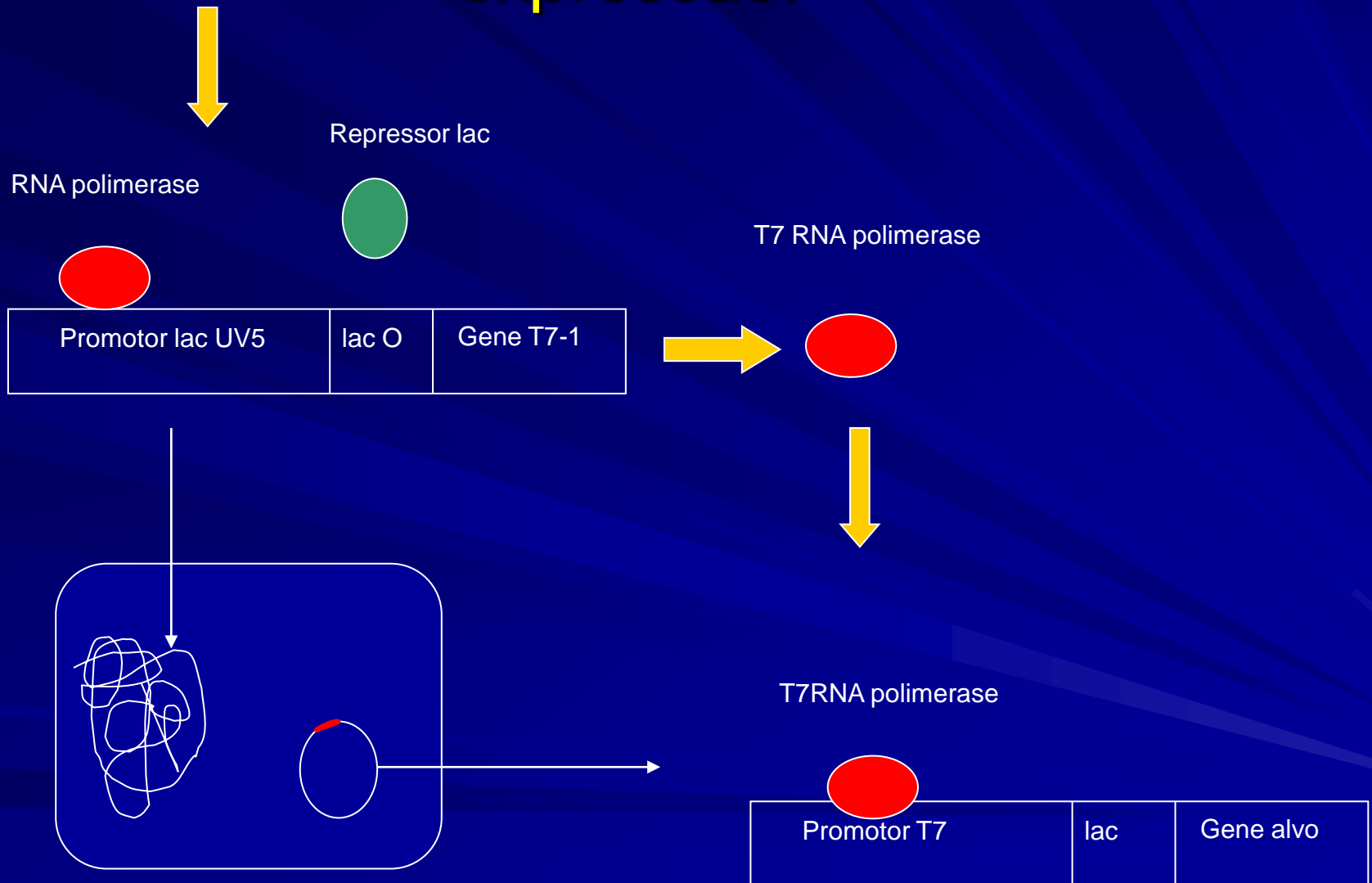


Exemplos de plasmídeos para sistemas de expressão:



pET-28a-c(+) cloning/expression region

Exemplos de plasmídeos para sistemas de expressão:



Vetores de clonagem

- Bacteriófagos

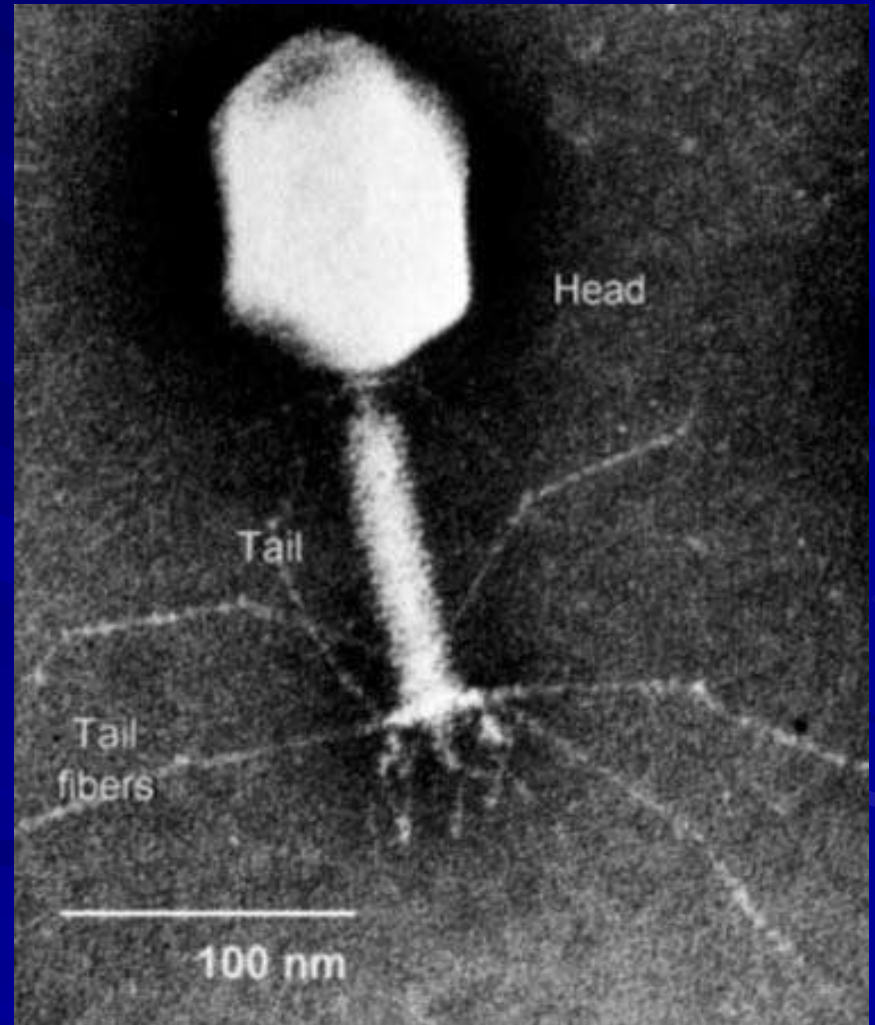
- Cosmídeos

- BAC – Bacterial Artificial Chromosome

- YAC – yeast artificial Chromosome

Bacteriófagos ou fagos

- Bacteriófagos:
insertos até 20kb



Características gerais

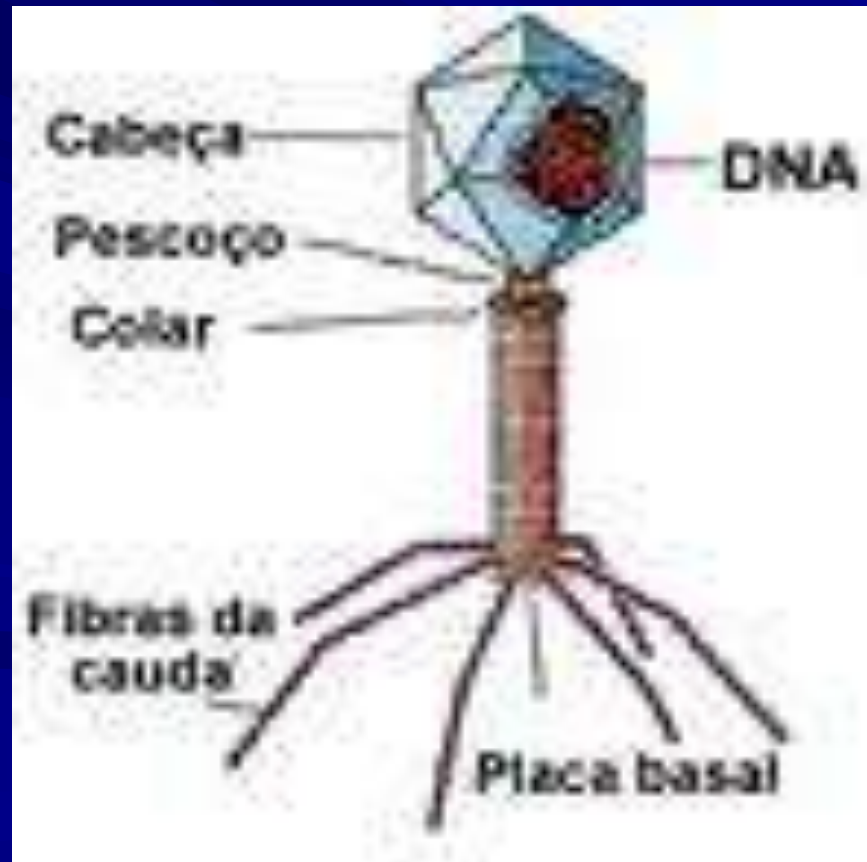
- Agentes infecciosos extremamente pequenos. Tamanho entre 20 e 1.000 nm.
- Parasitas intracelulares obrigatórios: necessitam de células hospedeiras para a sua multiplicação

Bacteriófagos ou fagos

- ❑ virus que infecta bactérias
- ❑ capaz de se replicar dentro de bactérias
- ❑ O genoma de um fago pode variar entre 2,5 a 150 Kb
- ❑ Alguns podem ser usados como vetores de clonagem

Bacteriofago Lambda

- Consiste em uma cabeça icosaédrica contendo o genoma linear de 48.5 Kb de DNA e uma longa cauda flexível

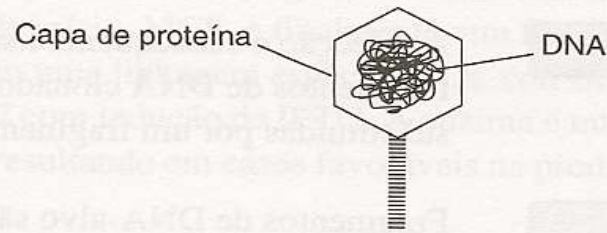


- O bacteriofago Lambda pode ser usado como vetor de clonagem
- Em resumo, o fago injeta se DNA linear na célula
- Ele pode se replicar para formar muitas partículas de fago, que são liberadas da célula por lise e morte celular (fase lítica) ou o DNA pode se integrar ao genoma do hospedeiro por recombinação sítio específica onde pode permanecer por longo período (fase lisogênica)

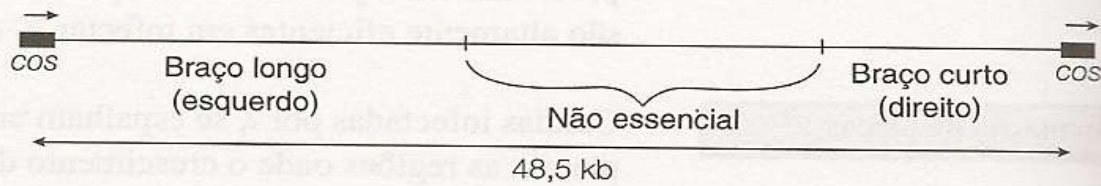
Biologia do fago Lambda

- **Lambda virion:** consiste na cabeça do fago, a qual contém moléculas de DNA e na calda a qual é usada para adsorção celular e é provavelmente usada para injetar o DNA na célula.
- O cromossomo Lambda é uma molécula de DNA (simples e dupla fita) com 48.501 pb. Na extremidade da molécula de DNA há extensões complementares simples fita de 12 bases
- A extremidade coesiva anelada cria um sítio chamado **COS**

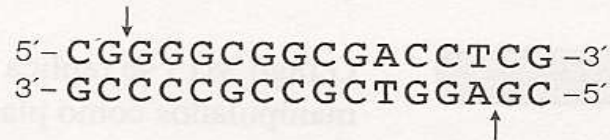
(a)



Bacteriófago λ

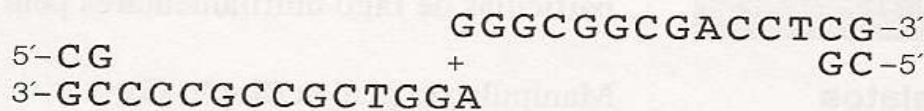


(b)



Clivagem
(durante embalagem)

Ligação
(após infecção)

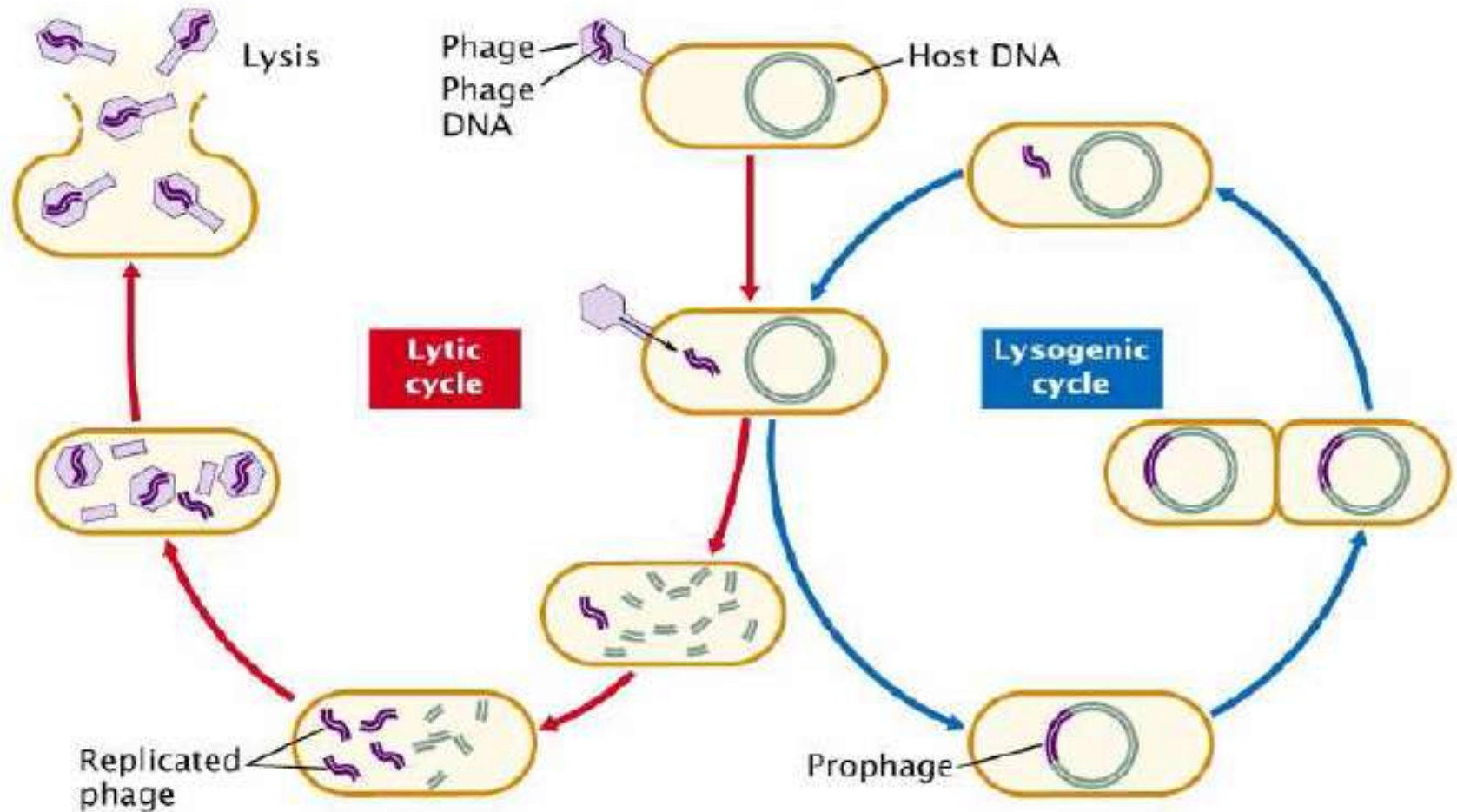


■ Quando o fago Lambda infecta a célula dois resultados são possíveis:

1- Desenvolvimento **lítico** que resulta na produção de 100 progênies de *Virions* e lise celular, tudo dentro de 35 minutos.

2- O cromossomo Lambda carrega a resposta **lisogênica**, no qual genes líticos se tornam reprimidos e o DNA Lambda se torna recombinado e pode ser replicado por muitas gerações como parte do cromossomo bacteriano

Lise de bactérias após infecção fágica



Infecção do fago Lambda

Lambda adsorve na parede bacteriana através de uma interação entre uma proteína **J** situada na ponta da calda do *Virion* e a proteína **Lam B**, localizadas no lado de fora da membrana celular.

Infecção do fago Lambda

- O fago se liga a receptores específicos na membrana externa de *E.coli* e o genoma viral é linear dentro do *virion*, suas pontas são unifilamentares e complementares, são chamadas de **cos**.
- As pontas coesivas **cos** se ligam quando estão na célula, produzindo um DNA circular

Infecção do fago Lambda

- Dentro da célula infectada o fago poderá sofrer ciclos de vida líticos ou lisogênicos

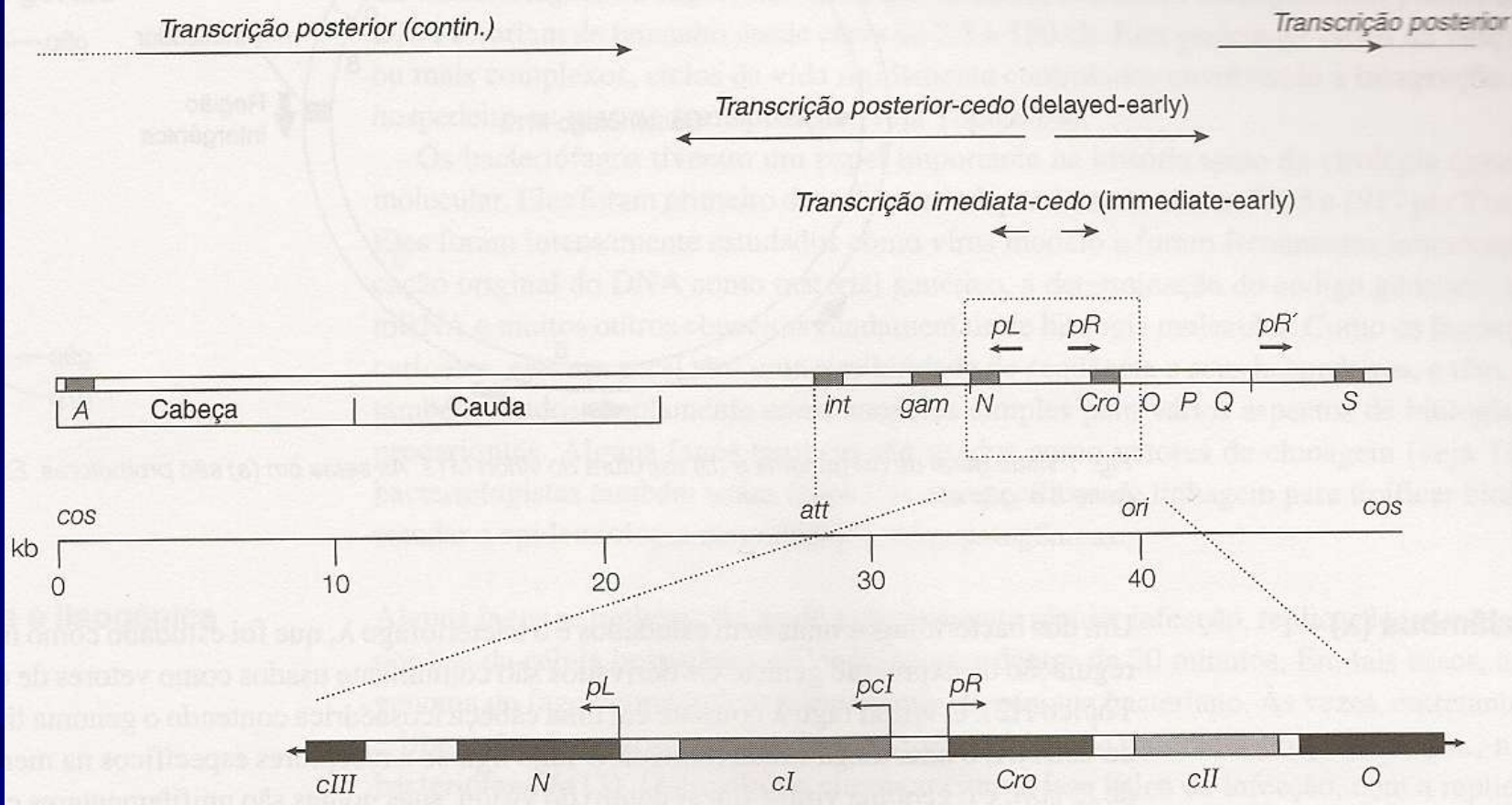
Ciclo Lítico:

- Existem três classes de genes do fago λ expressos em diferentes tempos após a infecção.
- **Genes IE (Immediate-early)**: após a circularização ocorre a transcrição de genes IE nos promotores p_R e p_L que levam a transcrição dos genes N e cro
- **Genes DE (Delayed-early)**: que resulta na replicação do genoma
- **Genes L (late)**: produz proteínas estruturais necessárias para a montagem de novas partículas virais e lise celular

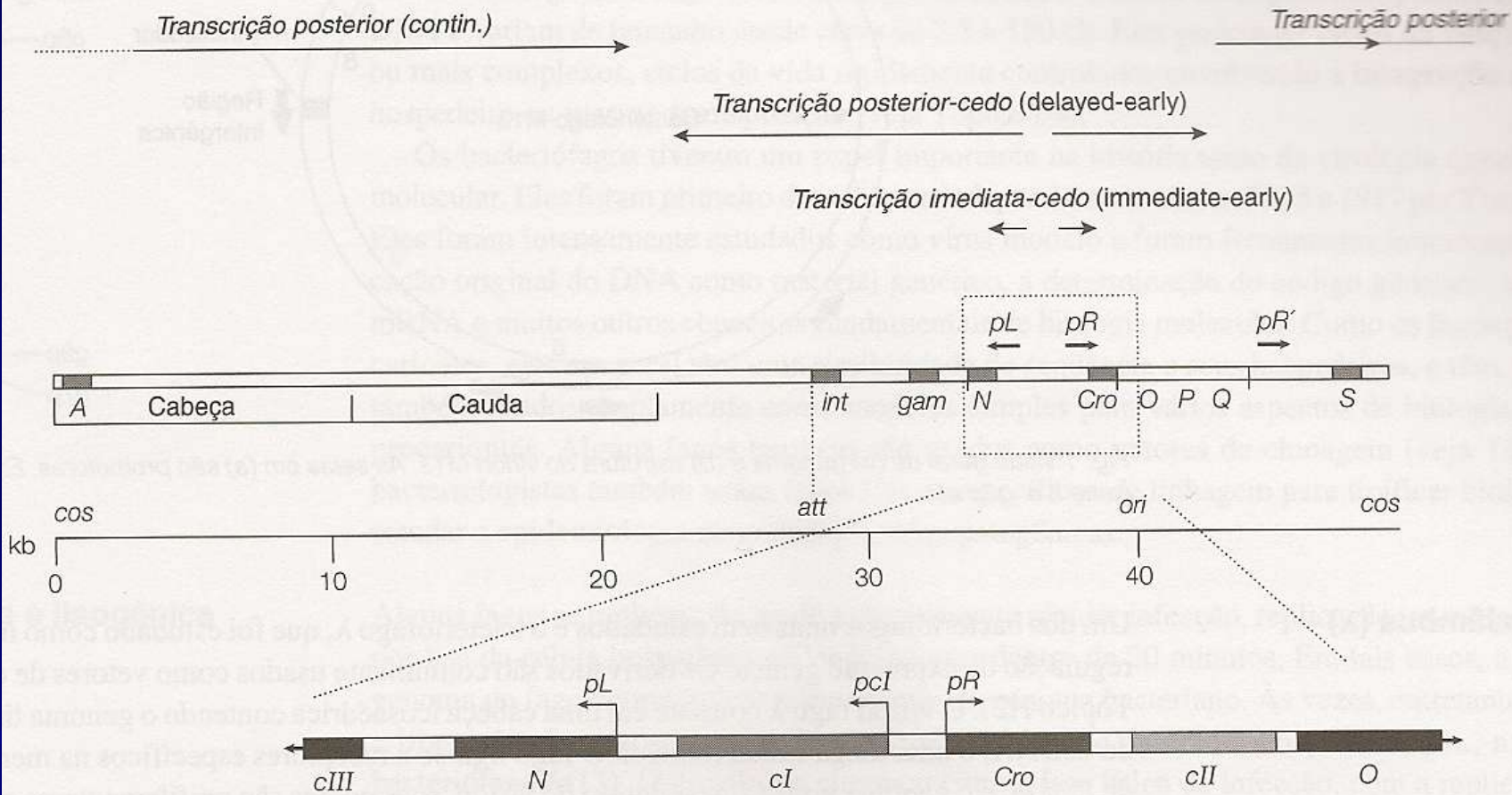
Ciclo Lítico:

A circularização do genoma é seguida pela transcrição de **genes IE**, que é iniciada a partir de dois promotores P_L e P_R , que levam a expressão dos genes **N** e **Cro**.

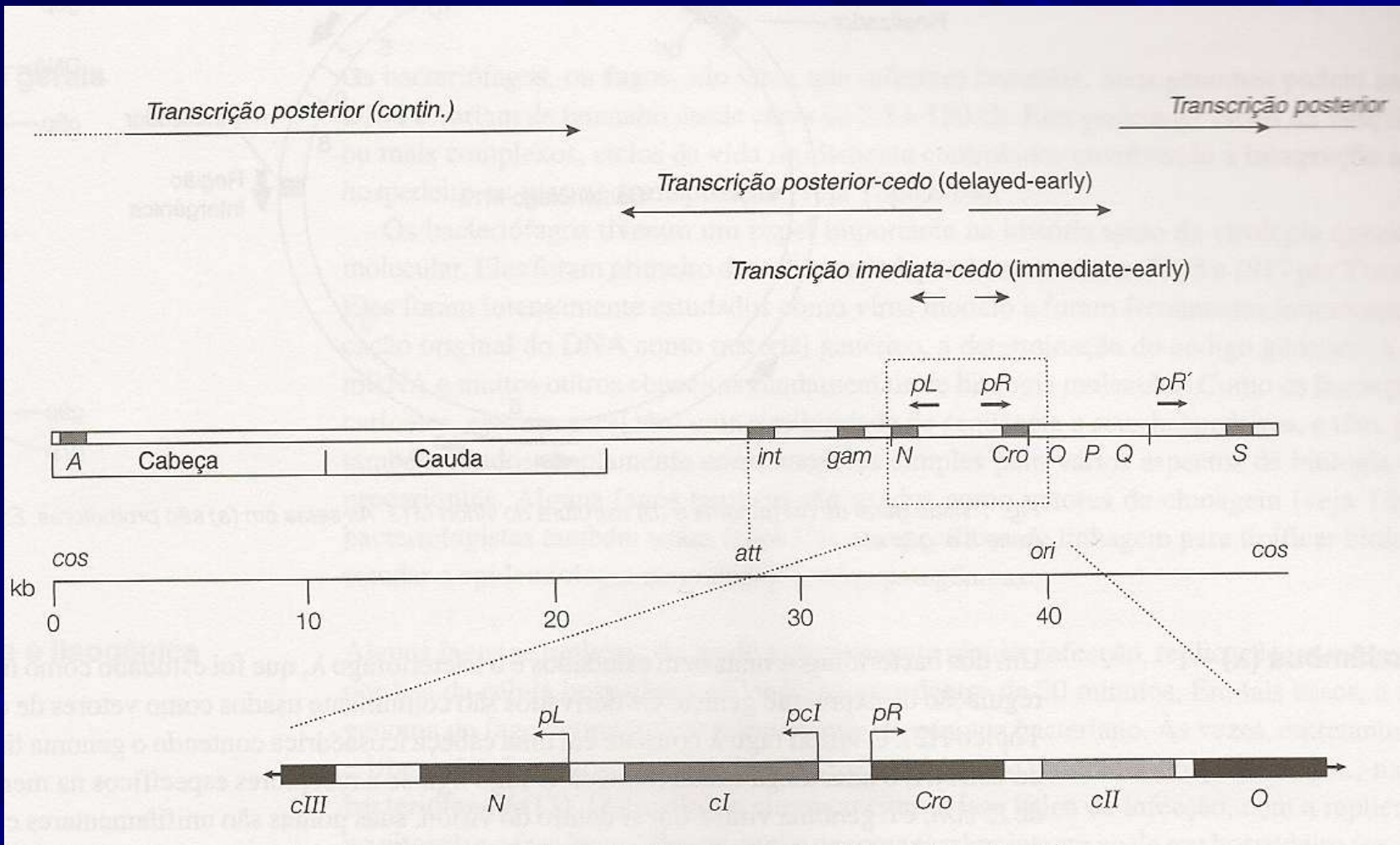
Os 2 promotores são transcritos para a esquerda (P_L) e para a direita (P_R) usando diferentes filamentos de DNA como molde para a síntese de RNA.



- A transcrição de pR leva a um acúmulo de proteína N, que atua como um anti-terminador da transcrição e inibindo a terminação da transcrição a partir destes promotores



- Como resultado os mRNA transcritos são produzidos a partir de pL e pR,.
- Os quais continuam a transcrição para a direita, produzindo os genes O, P e Q e para a esquerda genes envolvidos na recombinação, que levam a replicação do genoma

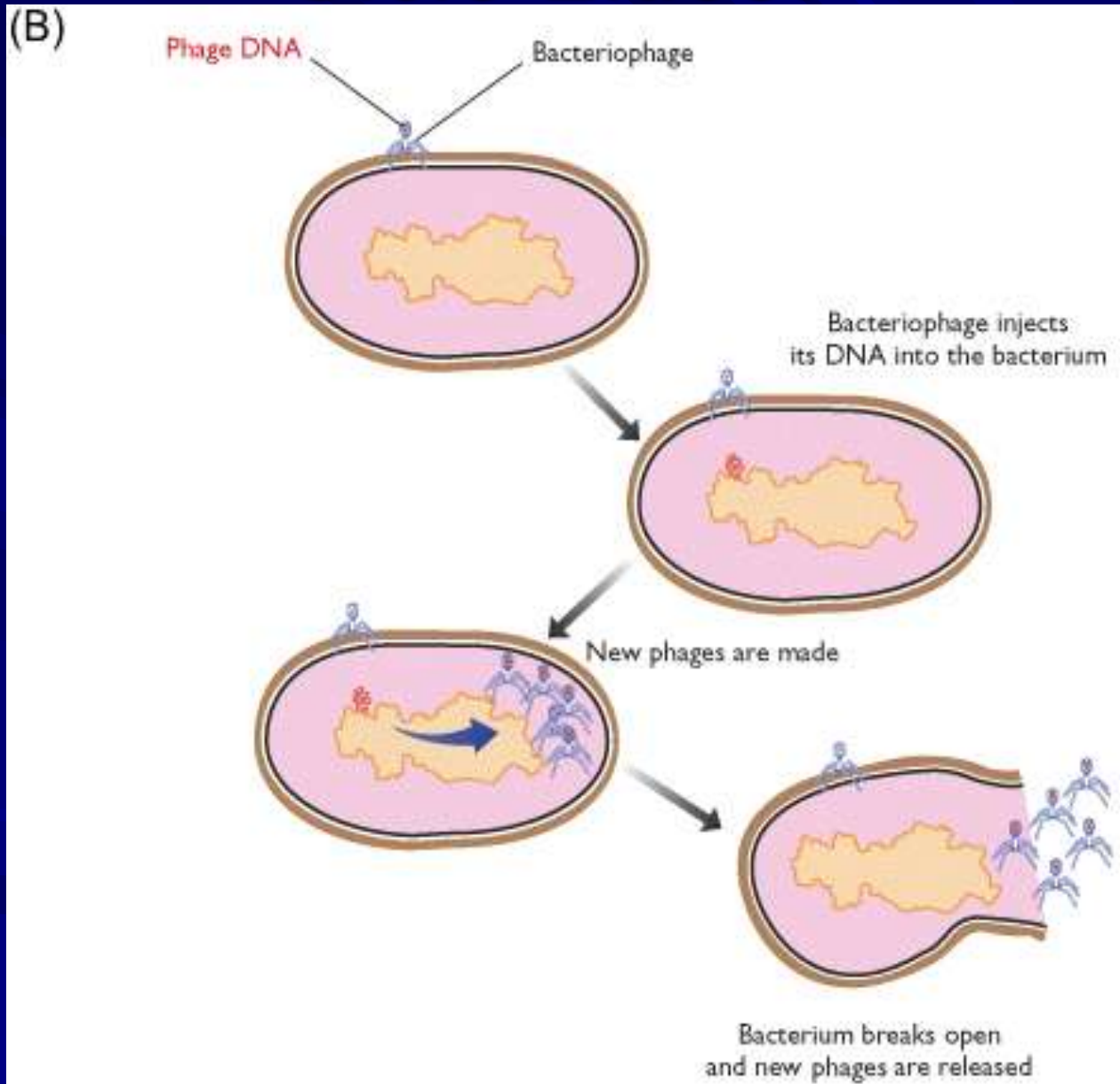


- A transcrição a partir do pR resulta na produção de proteína **Cro**
- A proteína Cro se liga a sítios de sobreposição de pL e pR e inibe a transcrição a partir destes promotores
- Como resultado: a transcrição termina

Resultado do acúmulo do da proteína Cro:

- A transcrição inicial é desligada
- O acúmulo de **proteína N e Q** permitem a transcrição de **Genes Late** a partir de pR
- Os **Genes Late** ou tardios codificam:
 - proteínas estruturais da cabeça e cauda do virion
 - Uma proteína para cortar a ponta cos
 - Uma proteína que permite a lise da célula hospedeira e liberação viral
- O ciclo lítico pode ser completado em 35 minutos

Ciclo Lítico:



Ciclo Lisogênico

- A decisão entre desenvolvimento lítico ou resposta lisogênica envolve aspectos de infecção do fago e o estado metabólico da célula hospedeira.

Ciclo Lisogênico

- A lisogenia depende depende da síntese da proteína **Repressora Lambda**, que é o produto do **gene *cl***.
- O Repressor Lambda reprime pR e pL, e portanto toda a expressão inicial
- Conseqüentemente ele reprime toda a expressão dos genes tardios quanto o ciclo lítico, isso leva a lisogenia

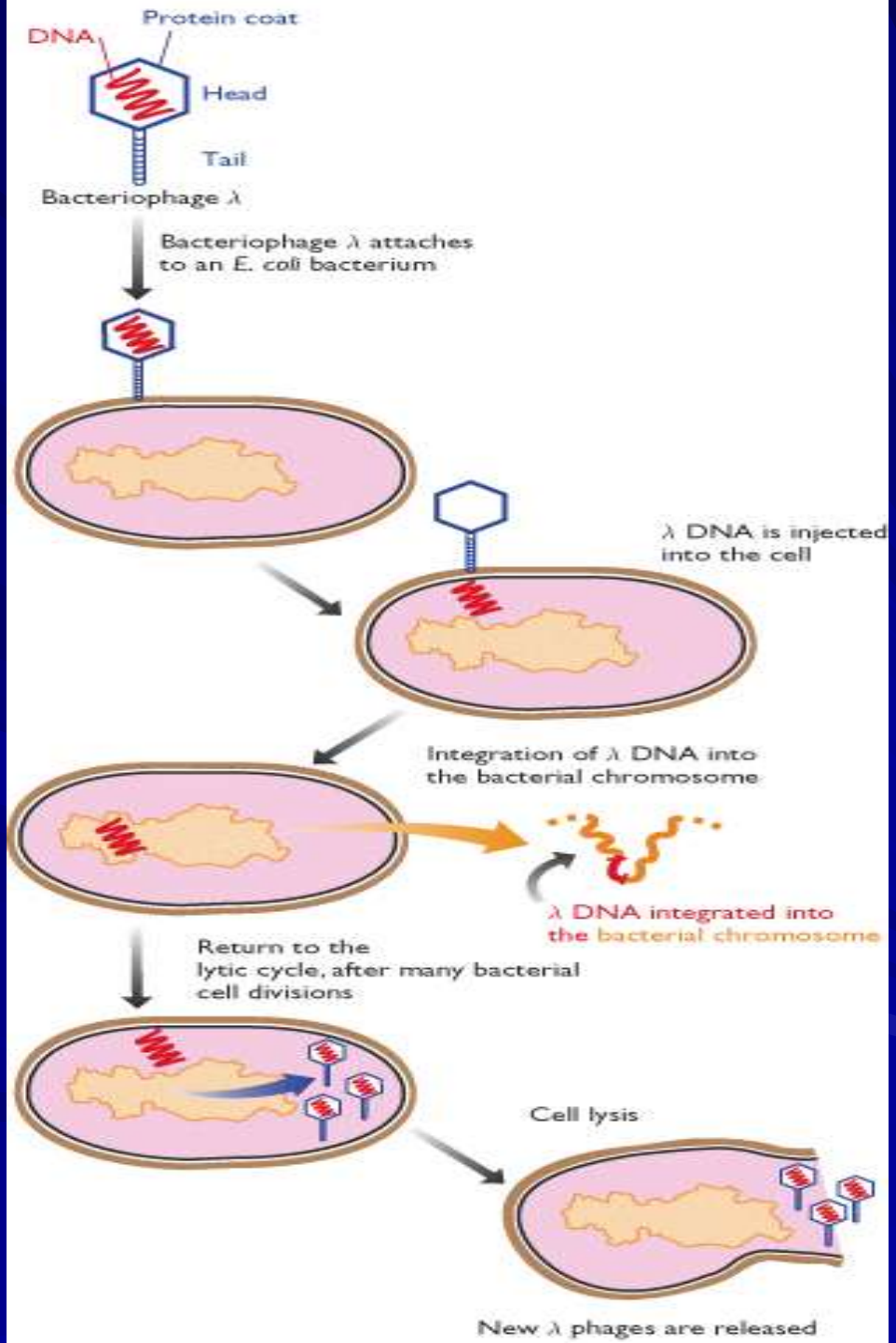
Ciclo Lisogênico

- O balanço entre as vias líticas e lisogênicas é determinado pela concentração da **proteína Cro** (que inibe a transcrição do gene *cl*) o que favorece a lise

Ciclo Lisogênico

- A infecção lisogênica pode ser mantida por muitas gerações durante o qual o profago é replicado
- A transcrição durante a lisogenia é amplamente limitada ao gene *cl*, que a partir de seu próprio promotor.
- Escapar da lisogenia ocorre particularmente em situações a célula infectada está sob ameaça de dano

Ciclo Lisogênico



Indução do ciclo lítico

- Os fagos Lambda são induzidos ao ciclo lítico por luz UV.
- Os danos da luz U.V ativam um conjunto de genes da bactéria chamados SOS
- Estes genes estão sob controle do **repressor Lex A**
- Os danos causados pela luz UV levam a inativação do repressor Lex A

Indução do ciclo lítico

- Os danos por UV levam ao reparo do dano
- O produto destes reparos alteram a atividade da proteína rec A e esta adquire atividade proteolítica.
- O repressor Lex A é clivado em 2 domínios perdendo sua atividade repressora

Indução do ciclo lítico

- Assim, a inativação dos repressores levam a expressão dos genes de P_L e P_R , de modo que os genes do ciclo lítico são expressos mais cedo.

Empacotamento de DNA:

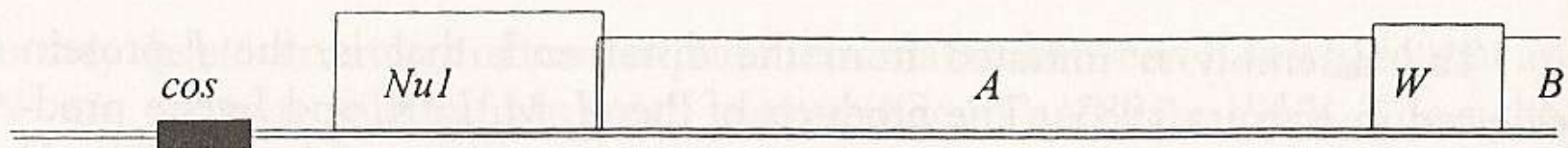
- Concatâmeros de DNA são reconhecidos e cortados por uma enzima do fago chamada **Terminase**
- A **Terminase** se liga no DNA no sítio cos B e introduz cortes no sítio adjacente, Cos N, para gerar extremidade coesiva como encontrada no DNA do Virion

Empacotamento de DNA:

- Durante o empacotamento a **Terminase** continua em contato com o DNA que está sendo empacotado e cliva o sítio **Cos B terminal**
- O empacotamento é processivo ao longo do concatâmero, indicando que a **Terminase** continua ligada no cromossomo para uma série empacotamentos posteriores

Empacotamento de DNA:

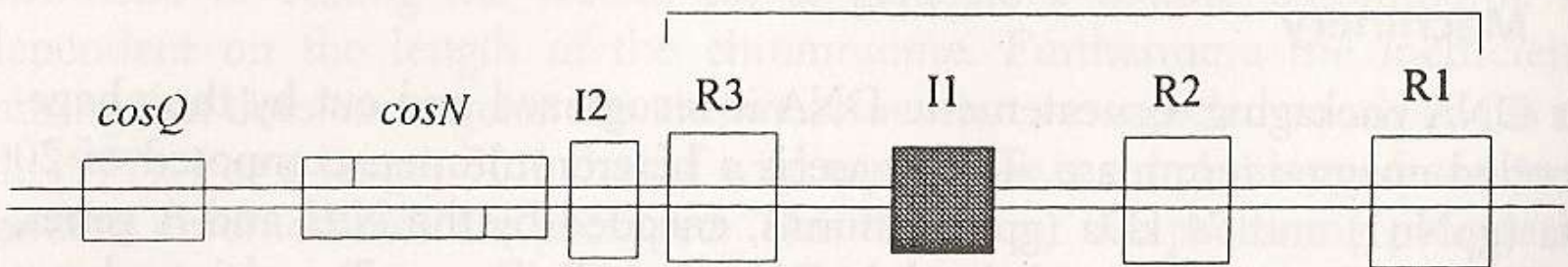
- O sítio contendo o sinal do DNA a ser empacotado é chamado **Cos** e consiste em cos N, cosB e cos Q
- **Cos N:** sítio onde o corte é introduzido para gerar extremidades coesivas
- **Cos B:** sítio de ligação da Terminase, a cos B tem função crucial no empacotamento do DNA por participar da formação do complexo pós-clivagem que se liga a pró-cabeça.
- **Cos Q:** Sítio requerido para a terminação do empacotamento do DNA



N — HTH ATP gpA — C

N — gpNul — ** — ATP bZip Pro — * — C

cosB



Utilizando o Lambda como vetor

- Região de substituição e inserção de vetores
- Sítios de endonucleases de restrição para clonagem e excisão do inserto
- Seleção de recombinantes

■ *Bacteriophago Lambda:*

A- Elementos para expressão:

A proteína repressora Lambda codificada pelo gene cI é muito eficiente na repressão dos promotores P_L e P_R . Por esse motivo o promotor P_L tem sido utilizado para a expressão de proteínas recombinantes

Mecanismo do bacteriófago para expressão de proteínas

O mecanismo básico para o uso deste sistema promotor/repressão é ter um gene de interesse clonado sob controle do promotor P_L .

No mesmo plasmídeo, o gene repressor cl contém uma mutação $cl857$ que faz o repressor ser sensível a temperatura.

Mecanismo do bacteriofago para expressão de proteínas

Baixas temperaturas o repressor é ativado e reprime o promotor PL

Quando a temperatura é aumentada, o repressor se torna inativado porque ele desnaturou e o promotor PL é desreprimido.

A expressão de um gene pode ser alcançada e controlada por temperatura.

Este é um dos primeiros sistemas a ser utilizado por ser eficiente e de baixo custo

↓ Temperatura

RNA polimerase



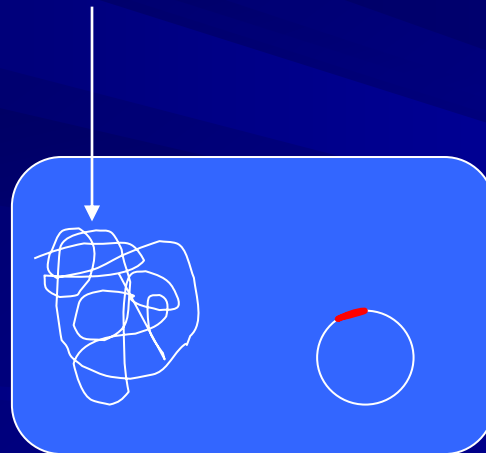
Repressor CI857



T7 RNA polimerase



T7RNA polimerase



BL21(G2)

Problemas utilizando o fago Lambda:

Para inativar a proteína cl 857, deve-se aumentar a temperatura. Fazendo isso pode induzir a resposta “heat shock” em *E.coli*, e esta induz a expressão de várias proteínas, incluindo proteases, que podem produzir um clone instável e impedir a produção da proteína de interesse