



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

QBQ0317 – 2020

Aula 17



Ferramentas e aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

Regina Baldini (baldini@iq.usp.br)

O que é “DNA recombinante”?

- DNA artificialmente criado que combina sequências que não ocorrem juntas na natureza
- Aplicações em pesquisa e biotecnológicas
 - clonagem molecular de genes
 - superexpressão de proteínas
 - Vacinas, insulina...
 - organismos transgênicos/“sintéticos”
 - Agricultura, animais para pesquisa, produção de drogas

O que é um clone?

- Organismo geneticamente idêntico a outro
 - microrganismos que se multiplicam por divisão binária
 - plantas propagadas sem semente
 - gêmeos univitelinos
 - ovelha Dolly e outros exemplos
- Clonagem de DNA
 - criação de cópias idênticas de um dado DNA, isolado de um organismo e replicado em outro (geralmente uma bactéria)

Como é feita a junção de DNAs de origem distintas?

- Obtenção do DNA de interesse do organismo doador
 - sequência codificadora
 - sequências regulatórias
 - outras sequências não codificadoras
- Após isolamento do material genético, podem ser realizados
 - PCR
 - fragmentação aleatória do DNA genômico
 - digestão com enzimas de restrição
 - transcrição reversa de mRNA

Como é feita a junção de DNAs de origem distintas?


- Obtenção do DNA
- Inserção em um vetor de clonagem
 - geralmente um plasmídeo
- Propagação em *E. coli*
- Transferência para o organismo desejado
- Seleção dos organismos recombinantes

Ferramentas para clonagem “clássica”

- Enzimas (endonucleases) de restrição
- DNA ligase
- Vetor de clonagem
- Eletroforese em gel de agarose
 - [vejam vídeo no e-disciplinas \(atividade prática virtual\)](#)
- Células hospedeiras competentes para transformação
 - [atividade prática virtual](#)

Enzimas (endonucleases) de Restrição

- Descoberta das enzimas de restrição como barreiras contra infecção por bacteriófagos
- Reconhecem uma sequência simétrica específica no DNA, clivando-o
- Aplicação na construção de mapas genéticos e posteriormente na clonagem

 The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978
Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton O. Smith




The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978

Nobel Prize Award Ceremony

Werner Arber

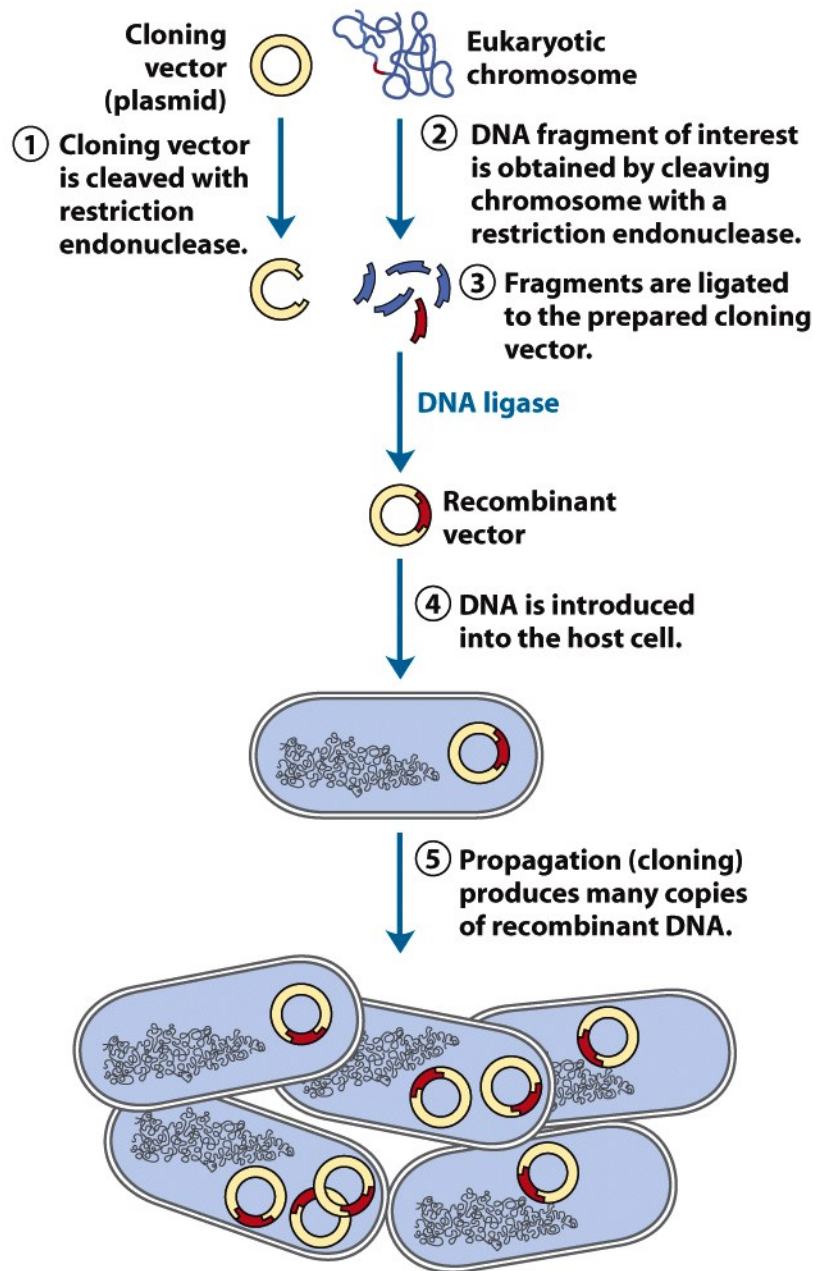
Daniel Nathans

Hamilton O. Smith



Werner Arber Daniel Nathans Hamilton O. Smith

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics".



Etapas da clonagem do DNA de um doador em *E. coli* usando enzimas de restrição

Biblioteca de DNA, com potencialmente todo o DNA do doador dividido em vários clones de bactérias

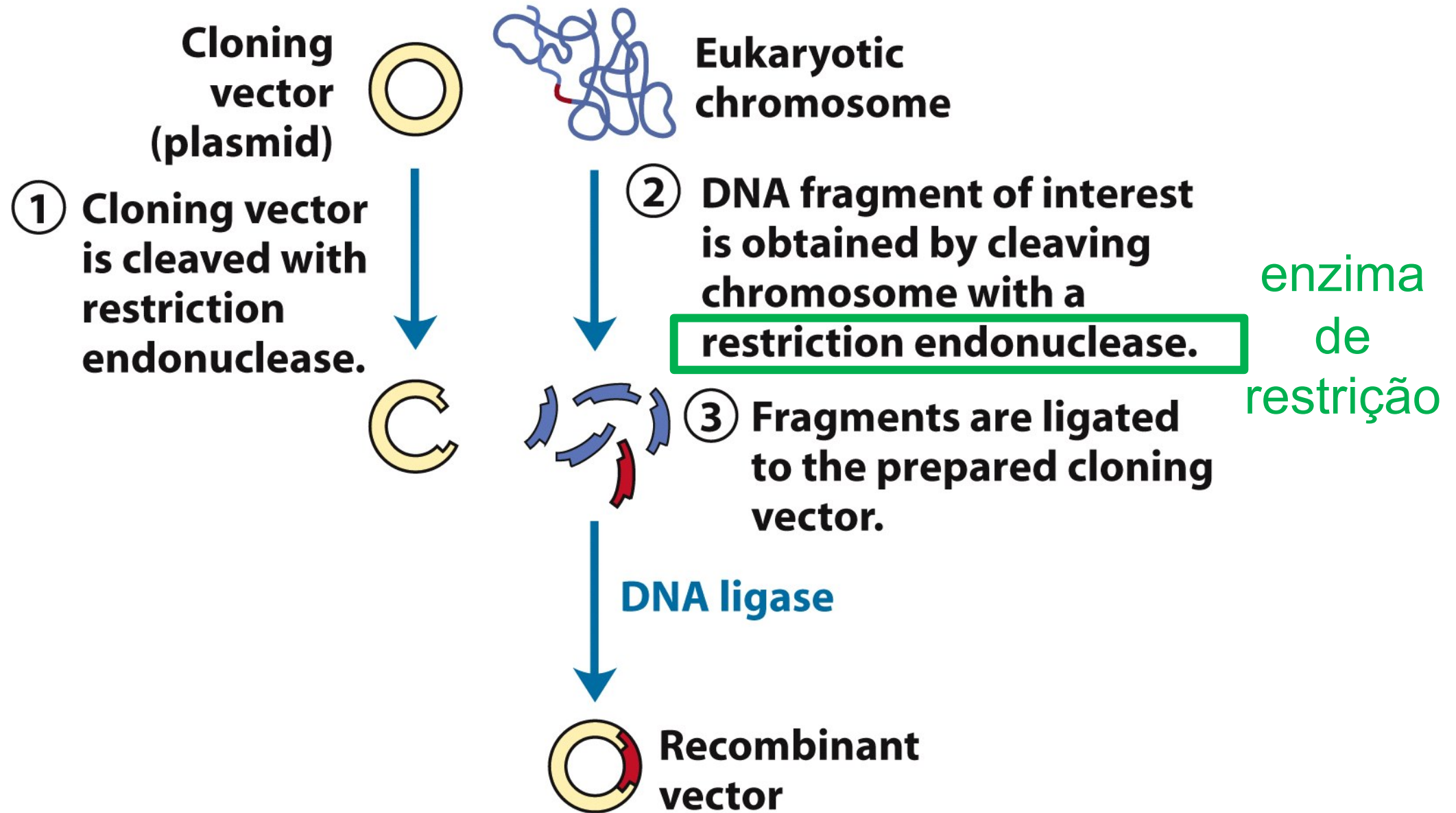


Figure 9-1 part 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

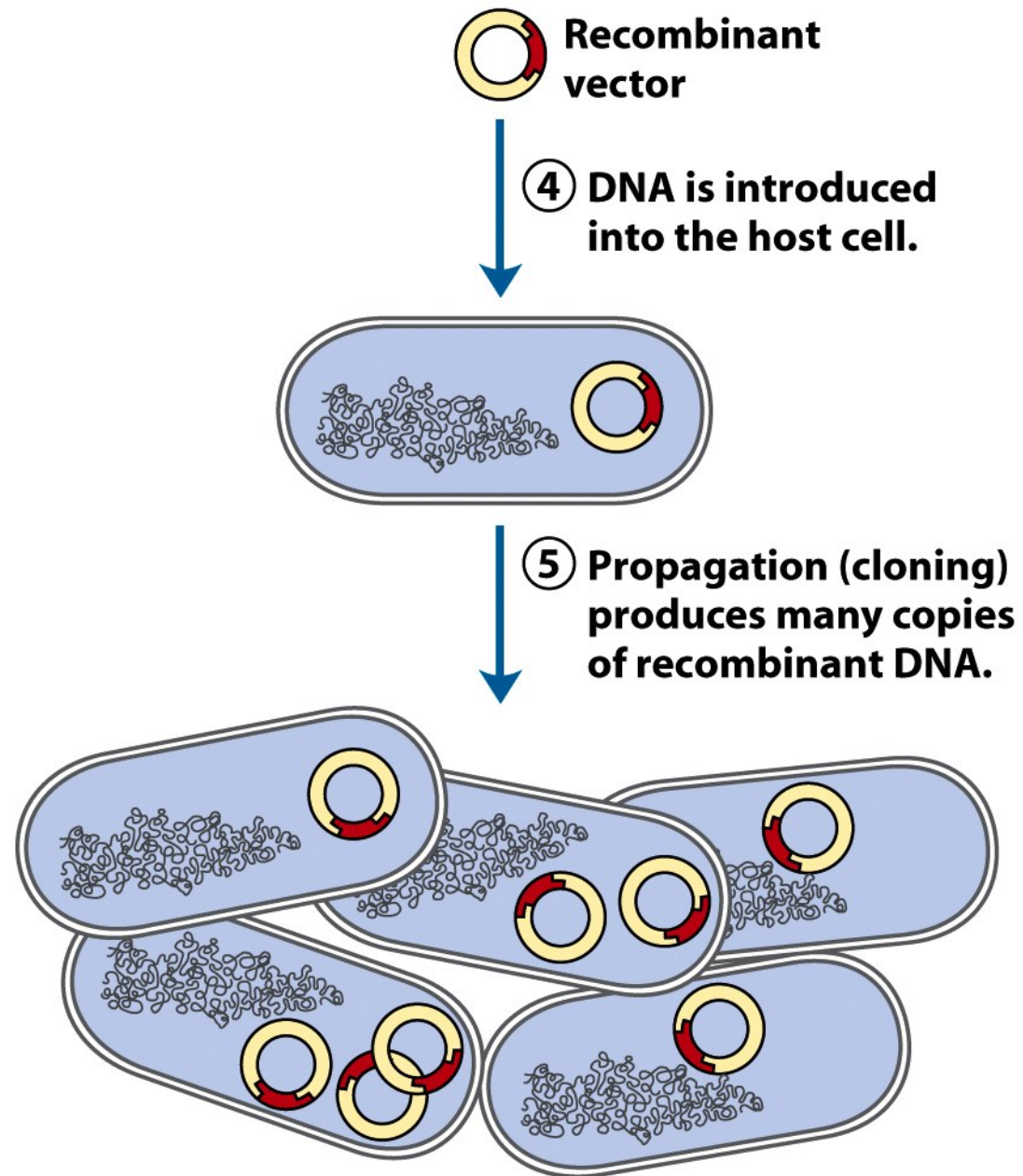
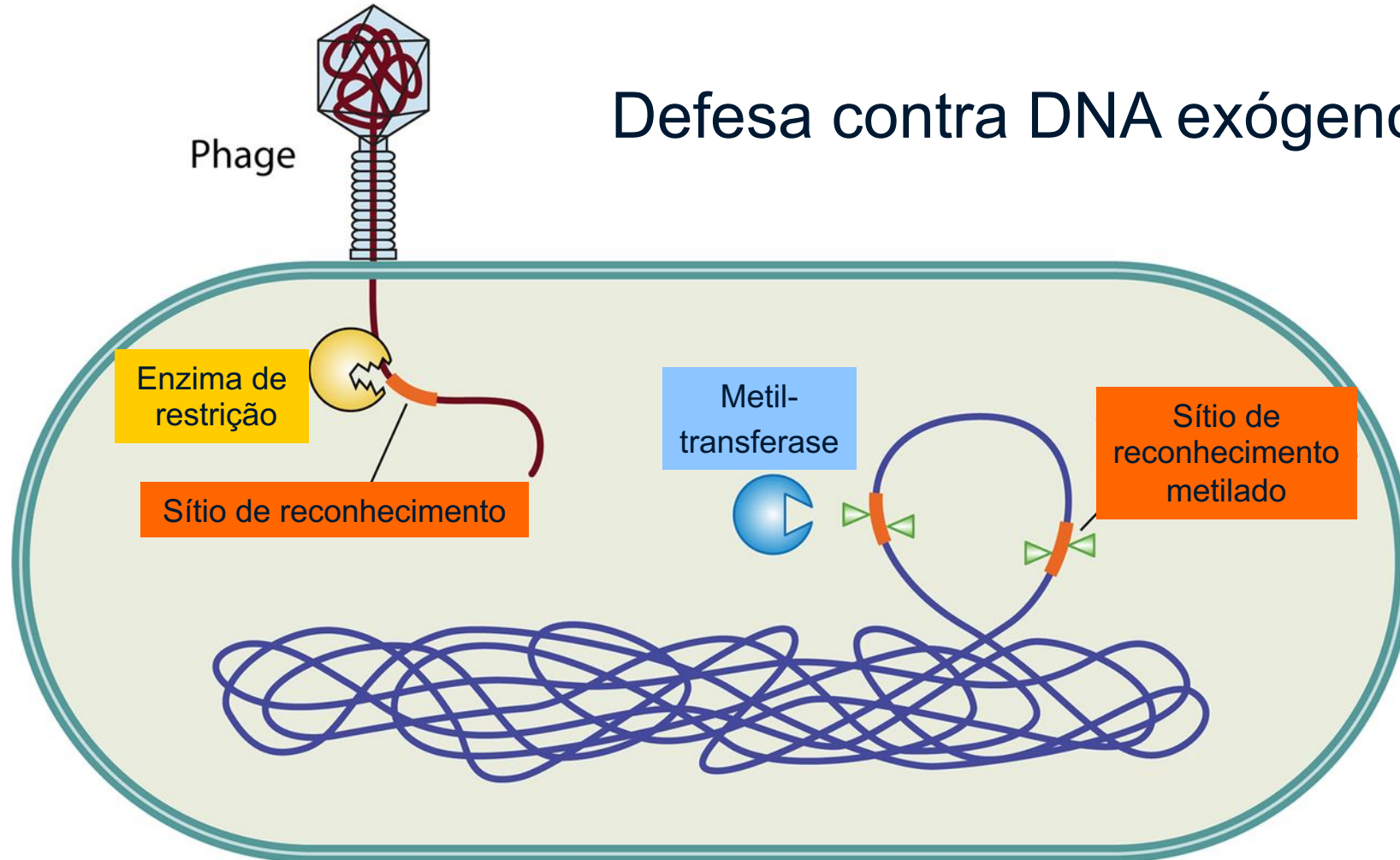


Figure 9-1 part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Sistemas de restrição-modificação

Defesa contra DNA exógeno



Enzimas de restrição

TABLE 9-2		Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases	
<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GGATCC} (3') \\ \text{CCTAGG} \\ * \quad \uparrow \end{array}$	<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{AAGCTT} (3') \\ \text{TTCGAA} \\ \quad \uparrow \end{array}$
<i>Cl</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ATCGAT} (3') \\ \text{TAGCTA} \\ * \quad \uparrow \end{array}$	<i>Not</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GCGGCCGC} (3') \\ \text{CGCCGGCG} \\ \quad \uparrow \end{array}$

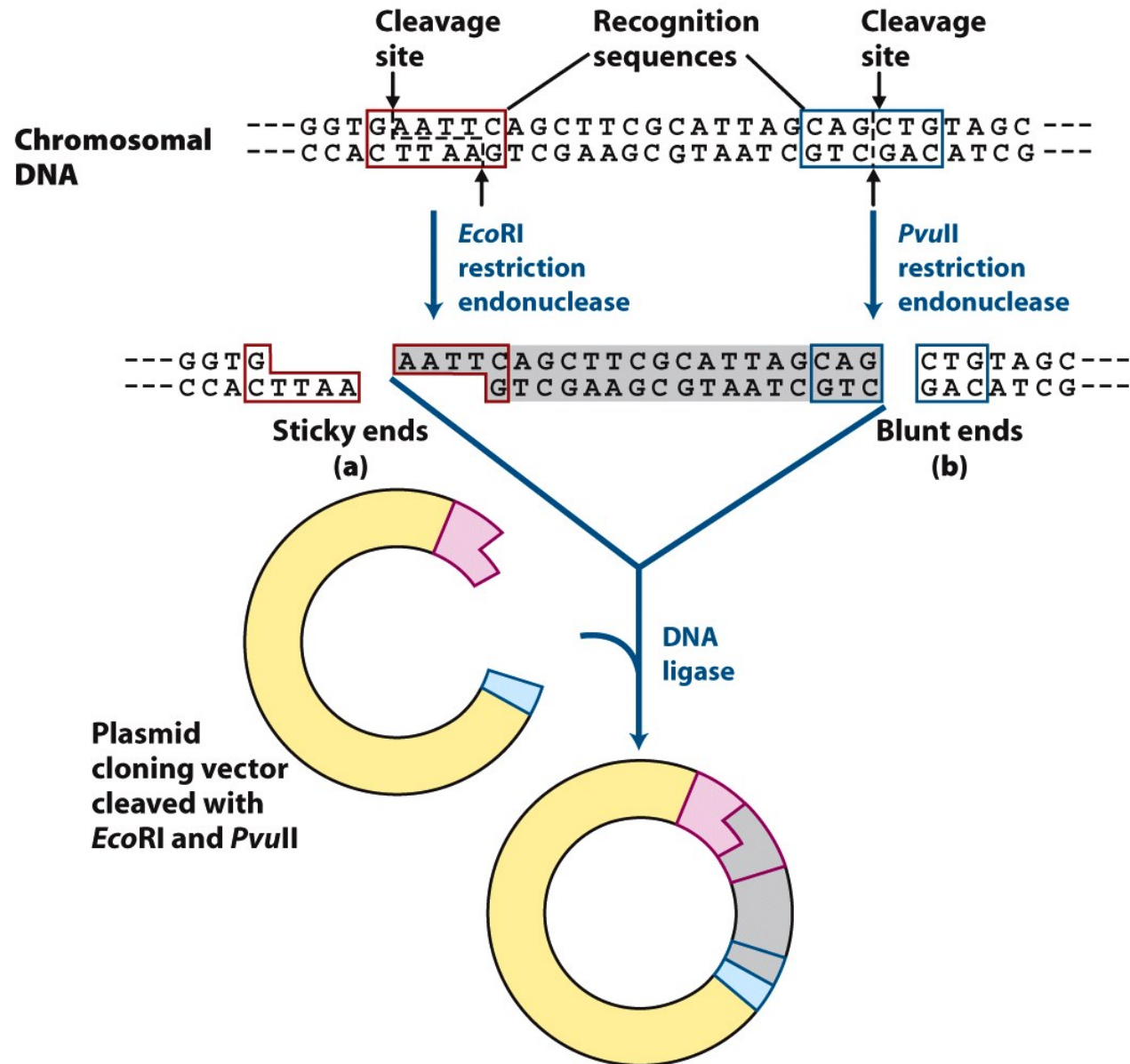
Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation (in italics) of the bacterial species from which it is derived, sometimes followed by a strain designation and Roman numerals to distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species. Thus *Bam*HI is the first (I) restriction endonuclease characterized from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain H.

Table 9-2

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

- Reconhecem palíndromos na sequência de DNA
 - ex: GGATCC
 - sequência idêntica nas duas fitas de DNA
- Clivam o DNA
 - podem deixar pequenas regiões em fita simples, que são usadas para facilitar ligação ao vetor de clonagem

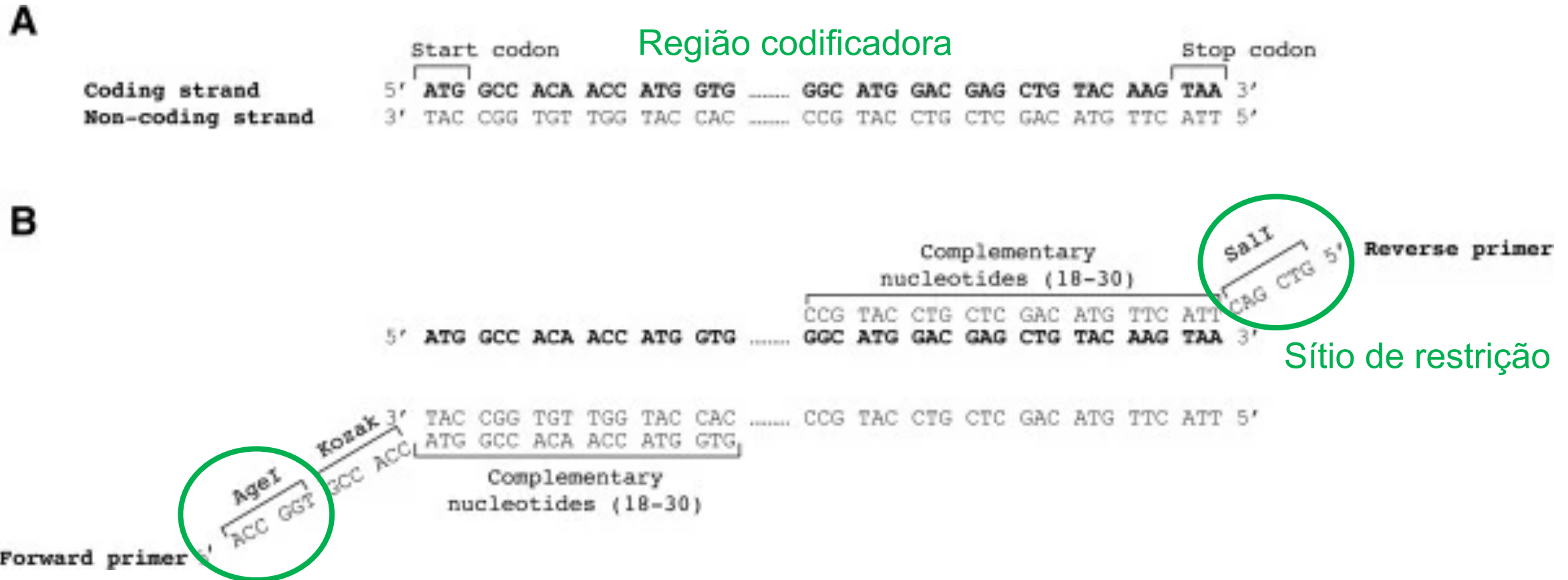


Se o DNA de origem e o vetor forem digeridos com as mesmas enzimas de restrição, as extremidades em fita simples se pareiam

Uma enzima ligase é adicionada para unir covalentemente as duas moléculas

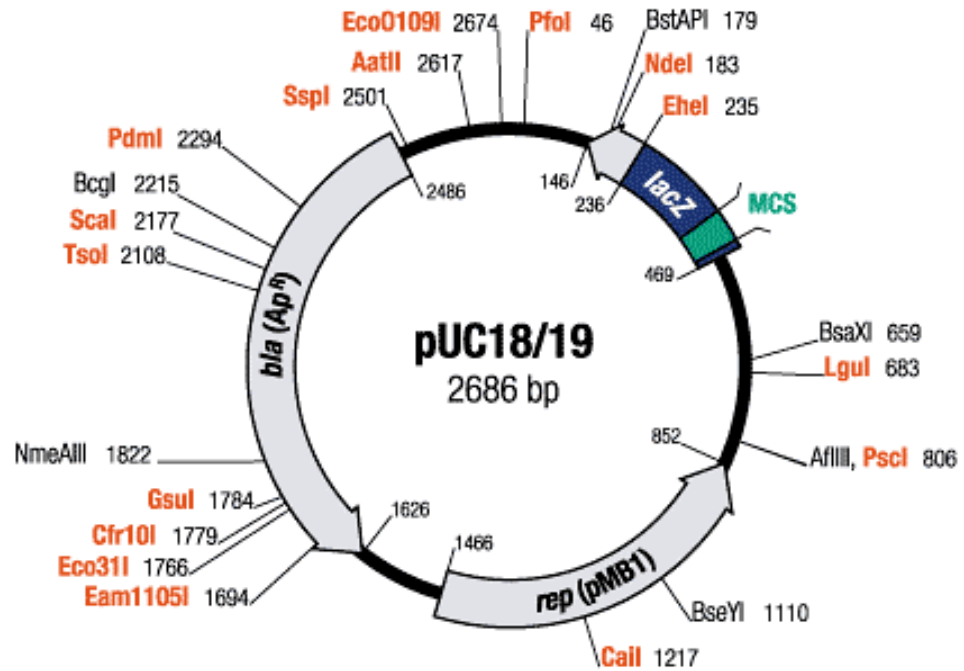
Figure 9-2ab
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Sítios de restrição podem ser inseridos por PCR nas extremidades dos insertos

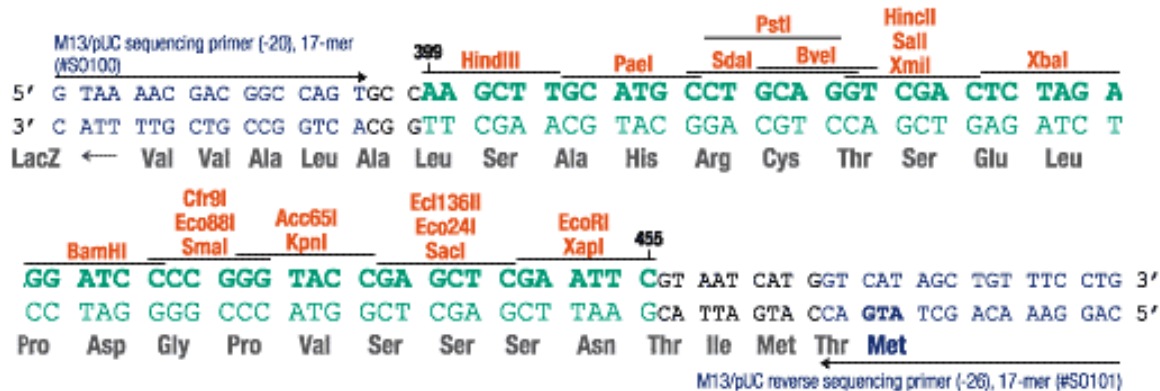


- Primers sintéticos

Vetor de clonagem plasmidial: pUC18



Multiple cloning sites of pUC18



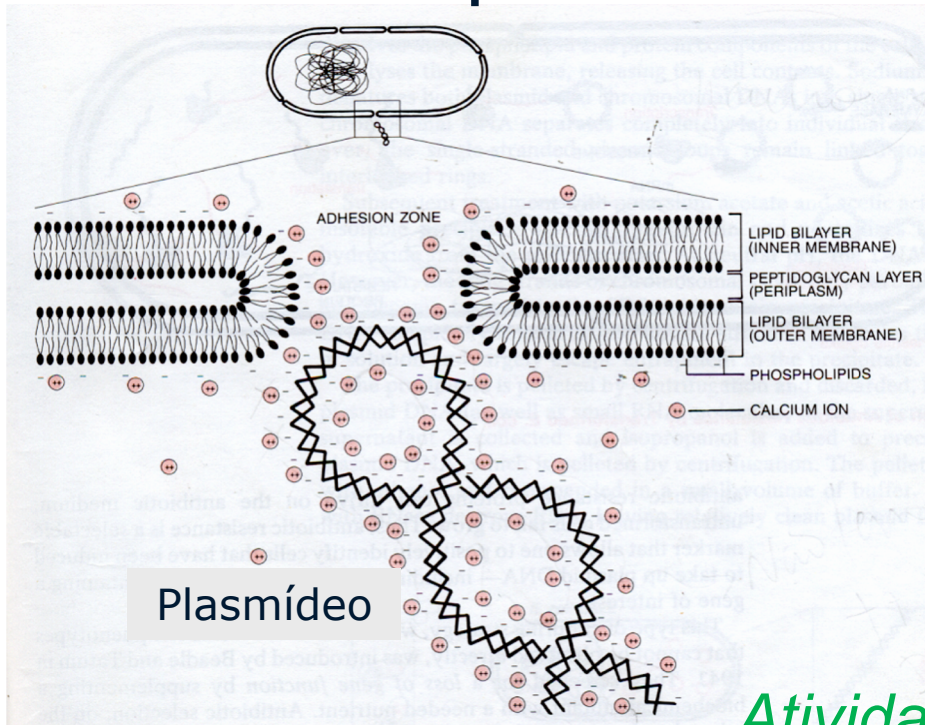
- Sítio de clonagem múltipla
- Alto número de cópias
- Gene para resistência a antibiótico (ampicilina)
 - seleção
- Sequências reconhecidas por primers “universais”
- α -complementação do *lacZ*: seleção colônias brancas/azuis

Transformação de *E. coli*

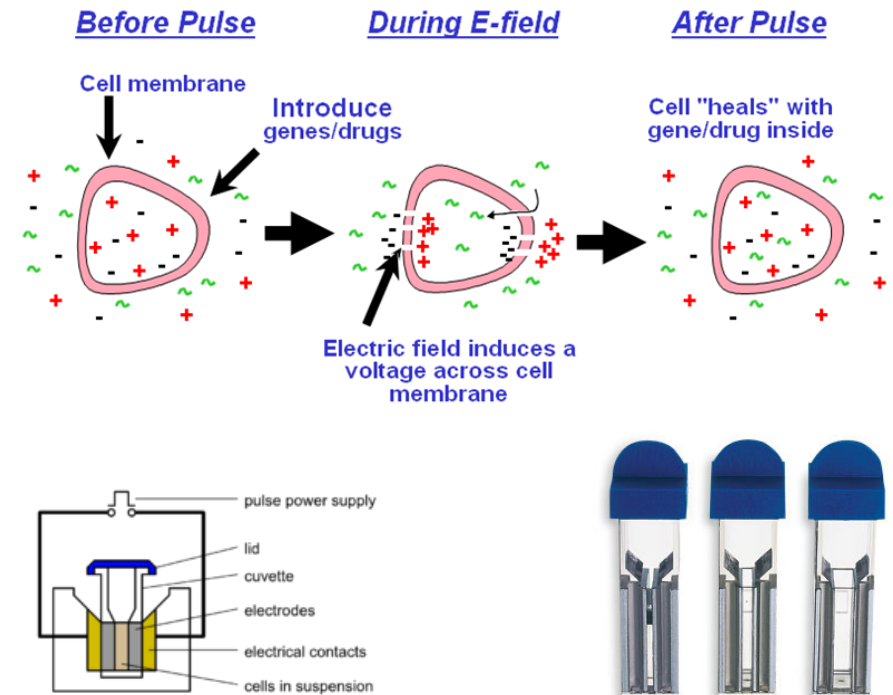
- *E. coli* não é naturalmente competente:

competência induzida por sais e choque térmico

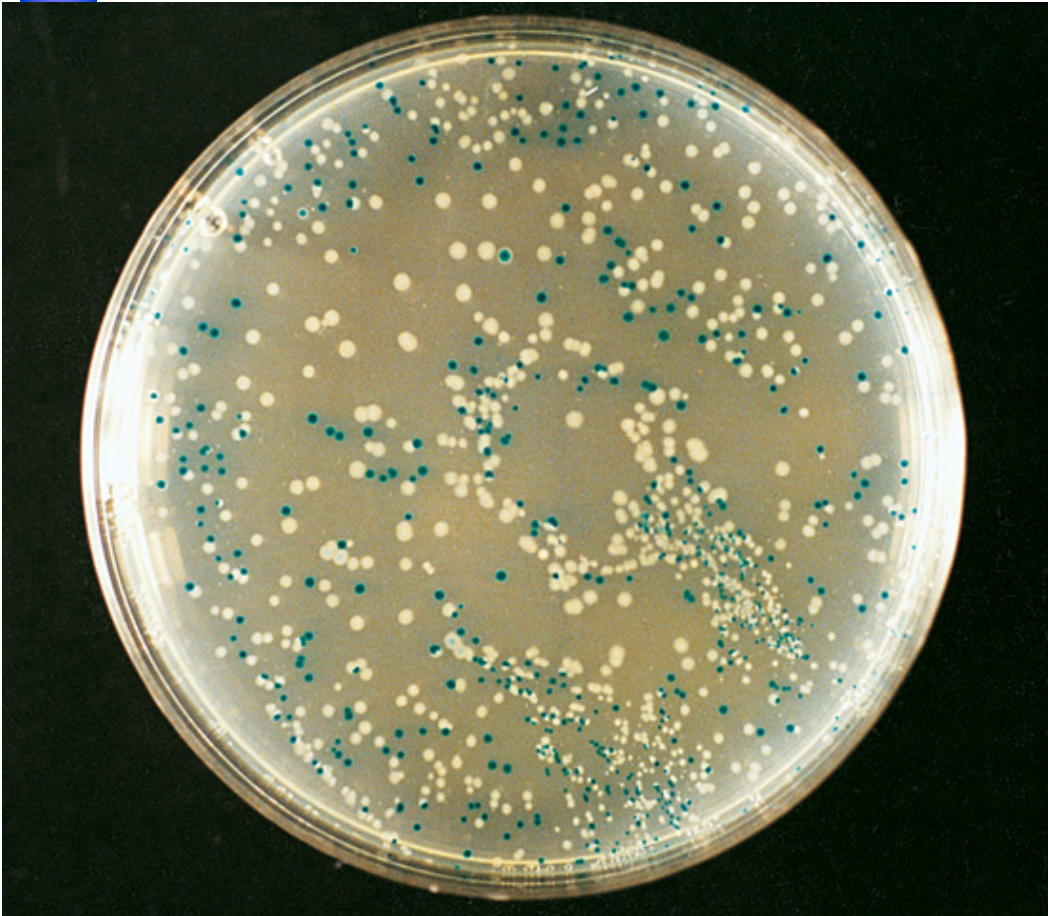
eletroporação



Atividade virtual



Após transformação, bactérias são inoculadas em meio com antibiótico apropriado

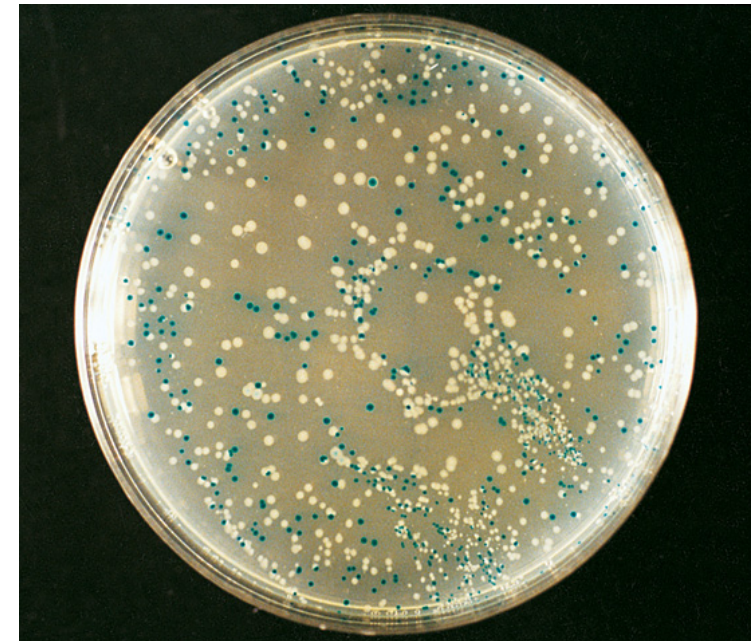
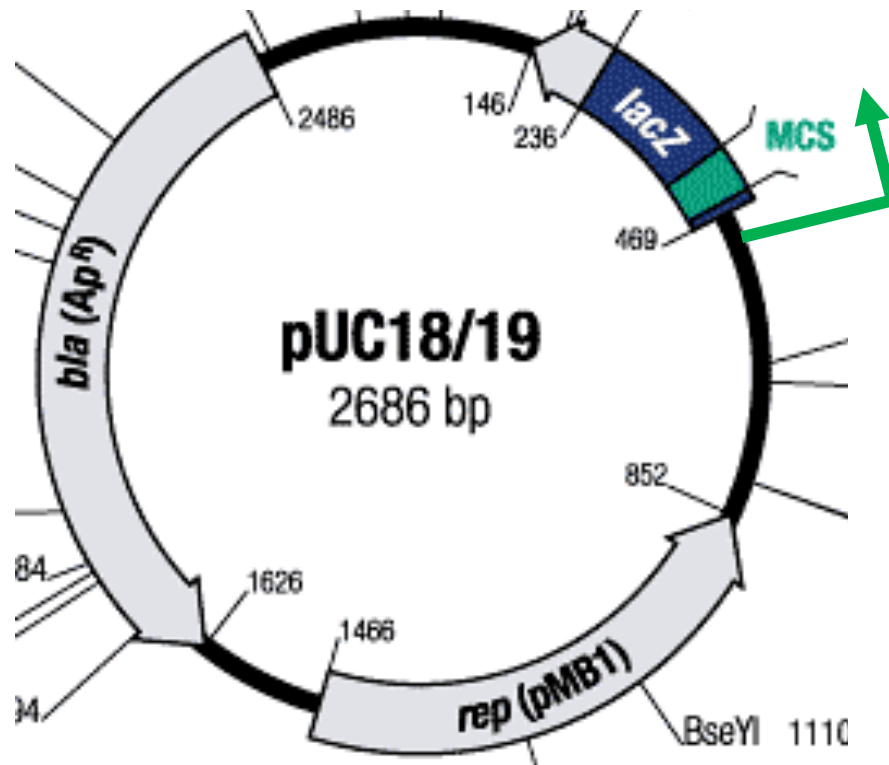
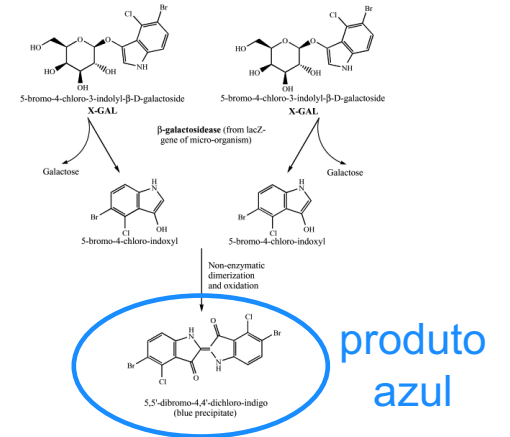


- Apenas as que receberam o plasmídeo crescem na presença de antibiótico
- Cada “ponto”(colônia) na placa representa um clone, ou seja, são idênticos ao indivíduo que recebeu o plasmídeo, e depois se dividiu muitas vezes
- Por que algumas colônias são azuis?

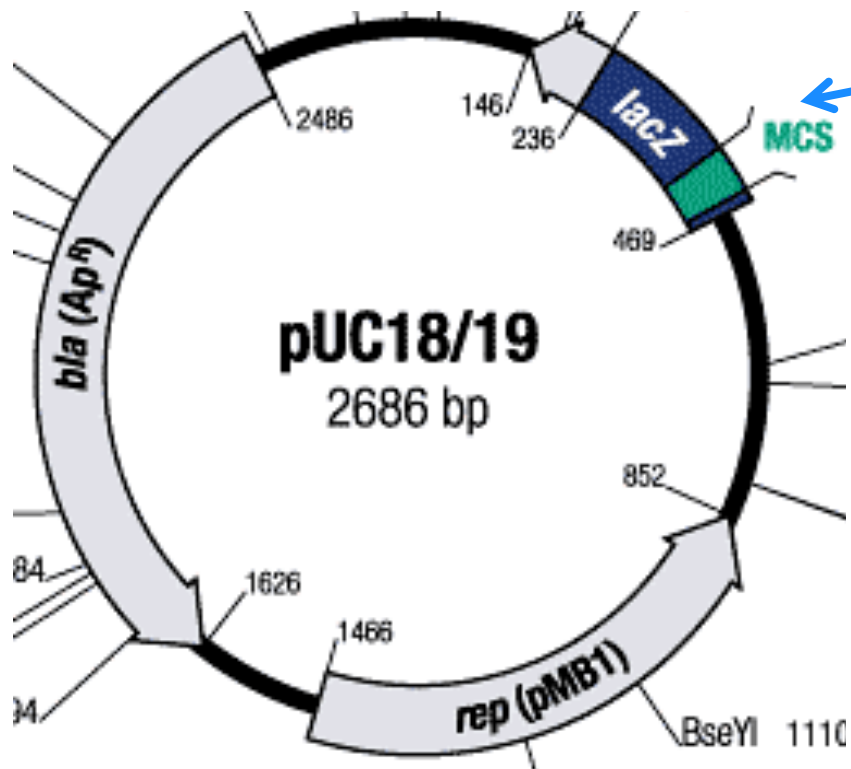
Colônias azuis expressam β -galactosidase

- β -galactosidase:

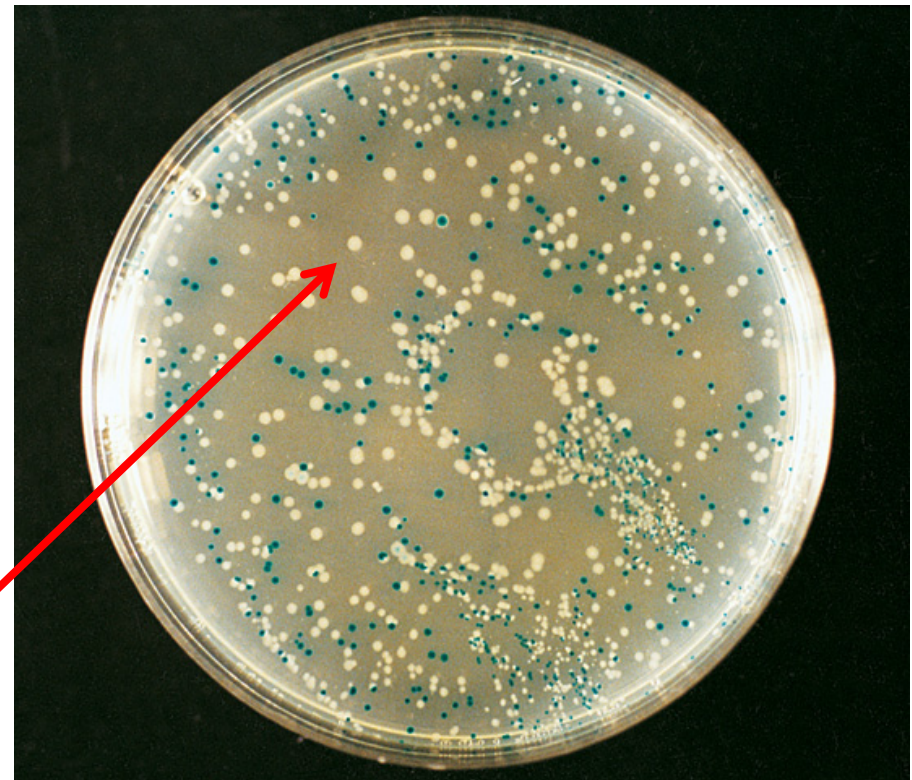
- codificada pelo gene *lacZ*
- quebra ligação glicosídica do substrato X-gal



Quais colônias têm o gene de interesse clonado?
Branças ou azuis?



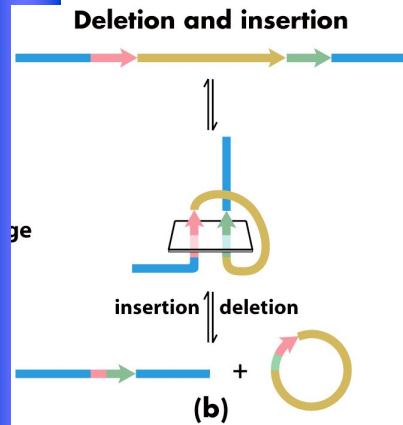
Fragmento clonado
interrompe *lacZ*



Métodos mais atuais de clonagem independem de enzimas de restrição e ligase

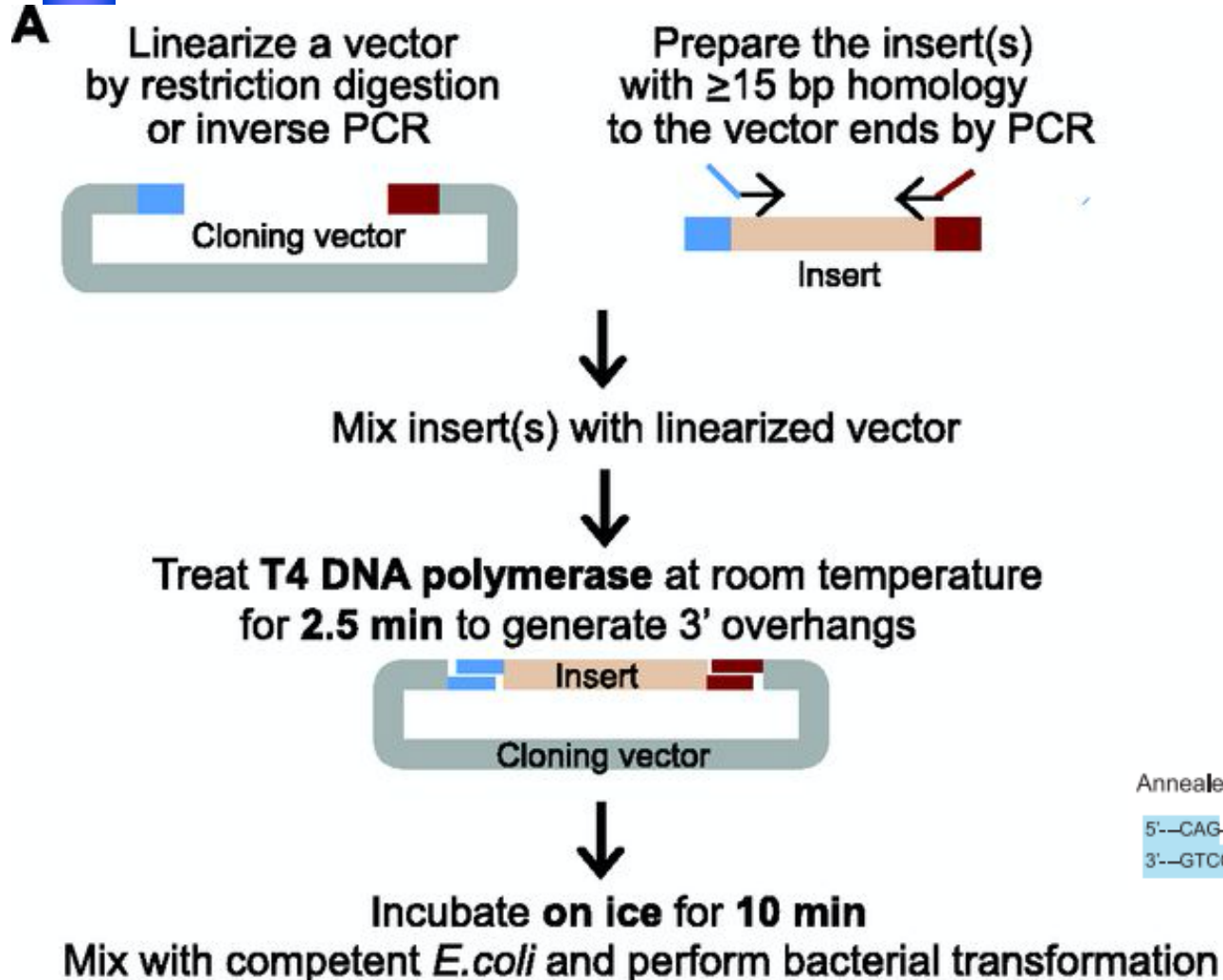
- Baseados em recombinação

- os sítios de recombinação estão presentes em vetor e fragmento de interesse
 - sequências-alvo inseridas nos primers
- a reação é feita por uma recombinase
- vetores e kits comerciais



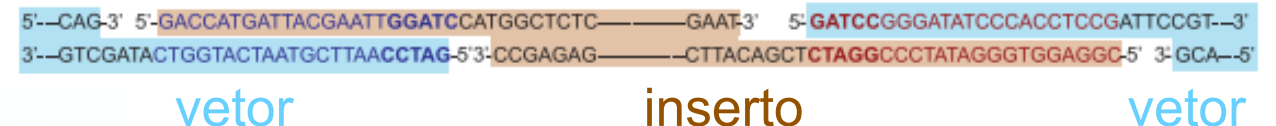
- Aproveitam os sistemas de reparo bacterianos

Exemplo: método SLIC



- T4 DNA polmerase tem atividade exonucleásica 3' \rightarrow 5'
 - Origina fitas simples nas extremidades dos fragmentos
- Fitas simples se pareiam
- Transformação
 - As bactérias se encarregam de reparar os gaps

Annealed complex



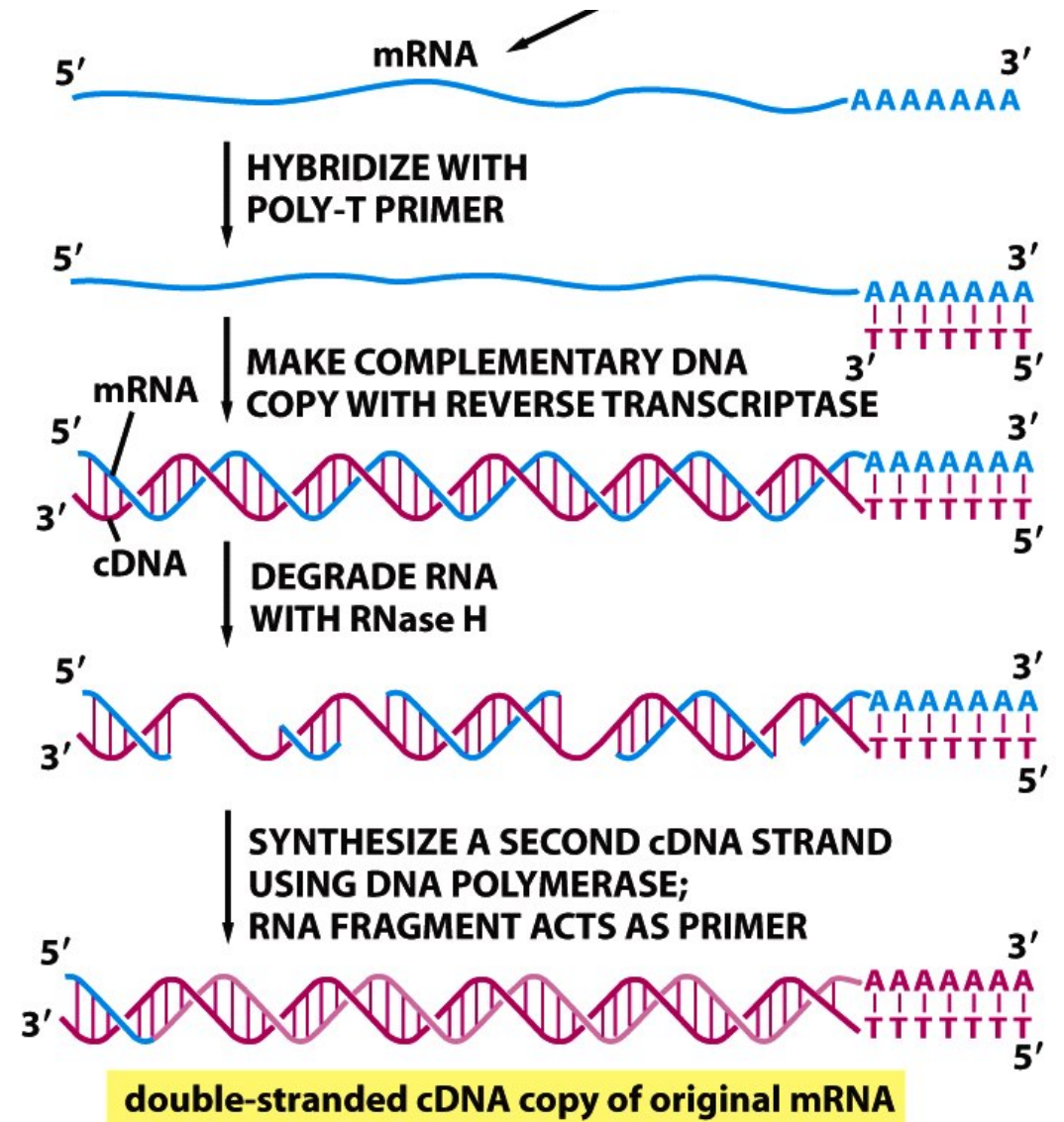
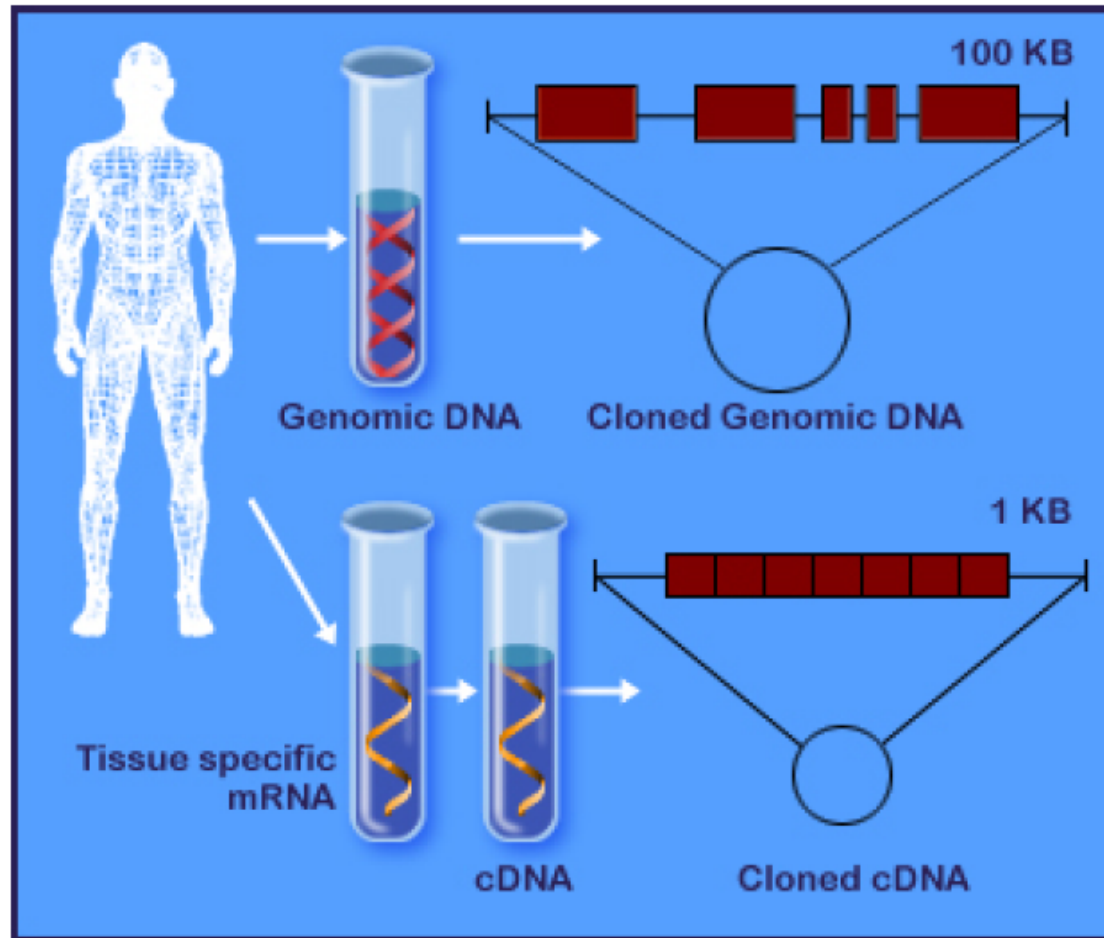
Produção de proteínas recombinantes

- Sistemas heterólogos
 - bactérias (ex: *E. coli*)
 - leveduras (ex: *S. cerevisiae*)
 - células de inseto em cultura
 - células de mamíferos em cultura (ex: células de ovário de hamster chinês, CHO)
 - plantas (ex: milho, tabaco, microalgas)
 - animais

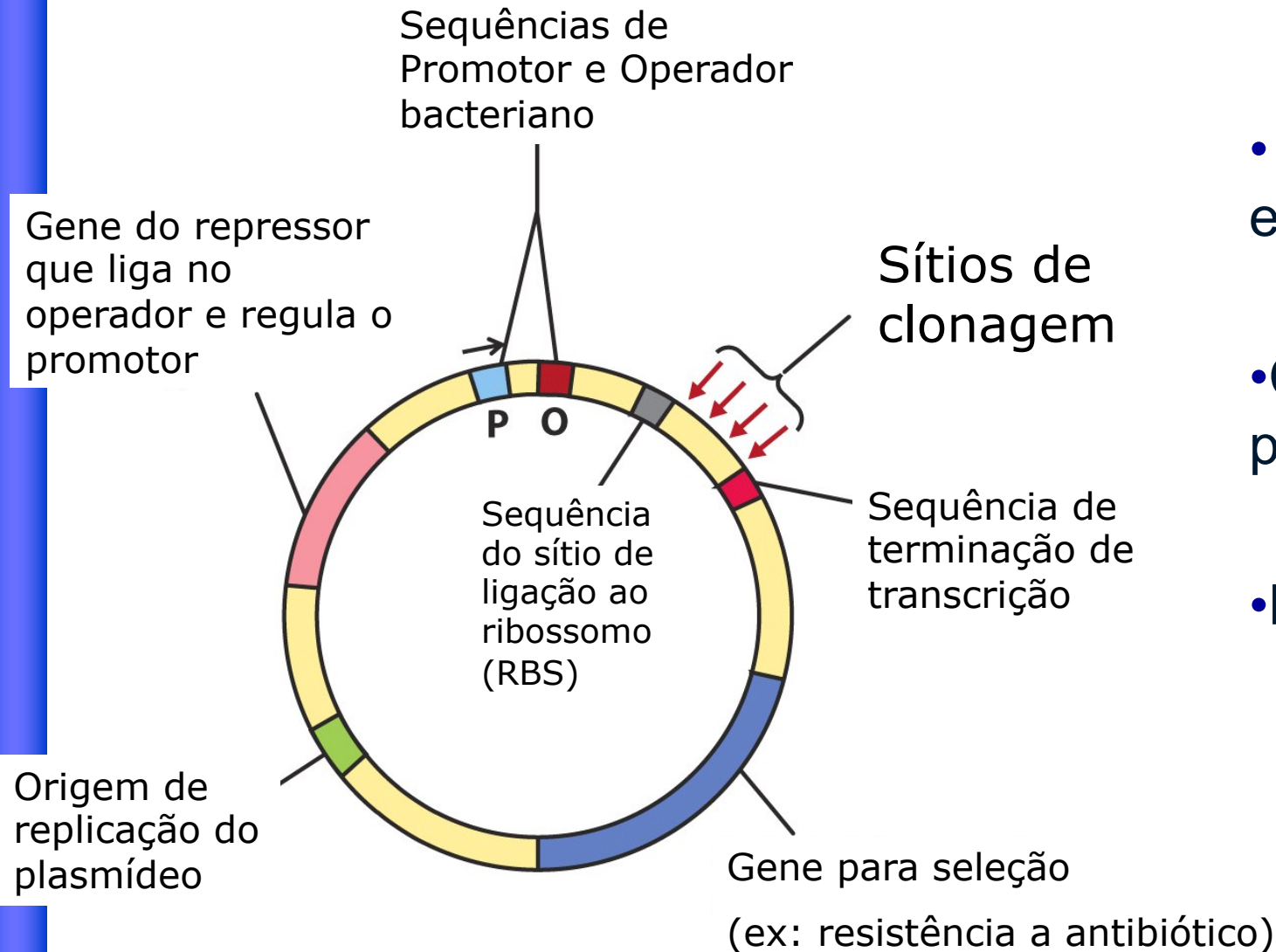


Organismos geneticamente modificados (OGM)

Para a expressão de uma proteína, a região codificadora sem os introns deve ser clonada



Vetor de expressão em bactérias



- características que permitam expressão controlada da proteína
- Crescimento da cultura e posterior indução da expressão
- Métodos de purificação
 - *Bq Experimental*

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes (além de *E.coli*)

- Leveduras, células de animais em cultura, plantas
- Quando usar?
 - proteína de interesse têm modificação pós-tradução que *E. coli* não faz (ex: glicosilação, dobramento por chaperonas)
 - proteína é tóxica para *E. coli*
 - proteína não é obtida de forma ativa em *E. coli*

Exemplos de fármacos produzidos por tecnologia do DNA recombinante

Table 4 Biosimilar products that had gained marketing authorization within the European Union and/or the United States by July 2018

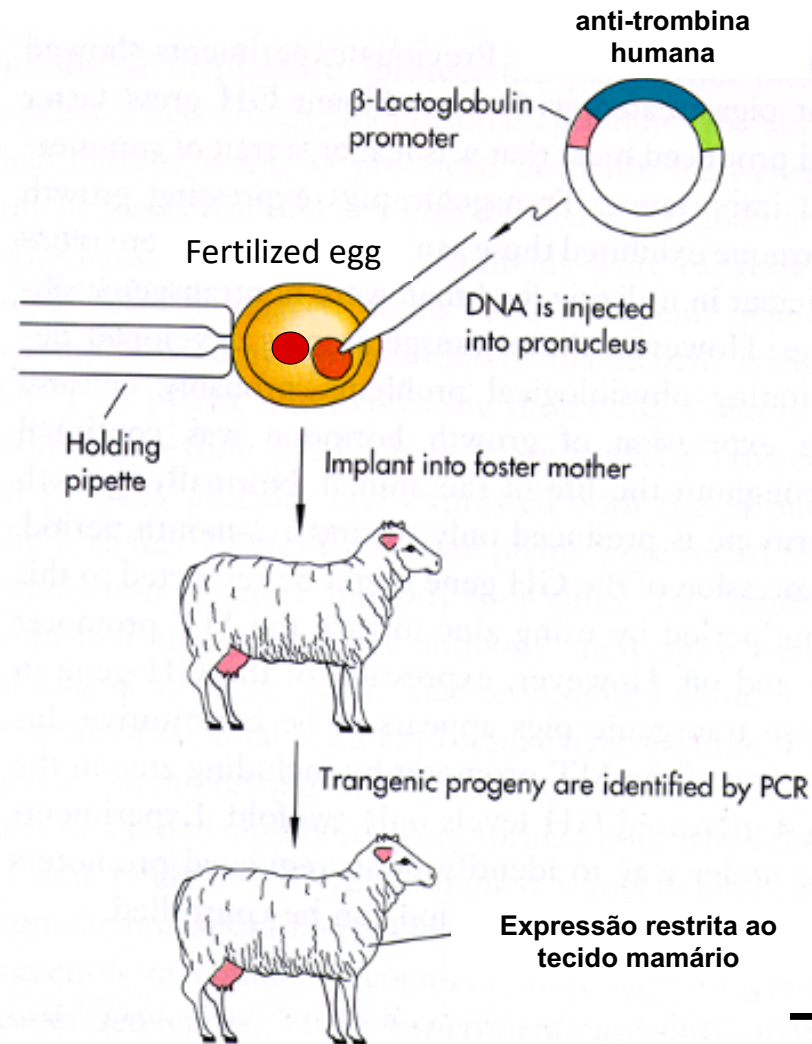
Product type	Biosimilar (trade name)	Year (and region) approved	Reference product	Drug (active ingredient) manufacturer
Somatropin-based				
Human growth hormone-based	Omnitrope	2006 (EU)	Genotropin	Sandoz (Kundl, Austria)
	Valtropin	2006 (EU) Withdrawn 2012	Humatrope	LG Life Sciences (Jeonbuk-do, Republic of Korea)
Epoetin-based				
Epoetin-based	Binocrit	2007 (EU)	Epex/Erypo	Rentschler (Laupheim, Germany) & Lek (Menges, Slovenia)
	Epoetin alfa hexal	2007 (EU)	Epex/Erypo	Rentschler & Lek
	Abseamed	2007 (EU)	Epex/Erypo	Rentschler & Lek
	Retacrit	2018 (US)	Epex/Erypo (EU)	Norbitec (Uetersen, Germany)
		2007 (EU)	Epogen/Procrit (US)	Norbitec (Uetersen, Germany)
Silapo	2007 (EU)	Epex/Erypo	Norbitec	
Filgrastim-based				
G-CSF-based	Ratiograstim	2008 (EU)	Neupogen	Sicor (Vilnius, Lithuania)
	Filgrastim ratiopharm	2008 (EU)	Neupogen	Sicor
		Withdrawn 2011		
	Biograstim	2008 (EU)	Neupogen	Sicor
		Withdrawn 2015		
	Tevagrastim	2008 (EU)	Neupogen	Sicor
	Zarxio (US)	2015 (US)	Neupogen	Sandoz (Kundl, Austria)
	Zarzio (EU)	2009 (EU)		
	Filgrastim hexal	2009 (EU)	Neupogen	Sandoz (Kundl, Austria)
	Nivestym (US)	2018 (US)	Neupogen	Hospira (Pfizer) (Zagreb, Croatia)
Nivestim (EU)	2010 (EU)			
Grastofil	2013 (EU)	Neupogen	Intas Biopharmaceuticals (Gujarat, India)	
Accofil	2014 (EU)	Neupogen	Intas Biopharmaceuticals	
Pegfilgrastim-based	Fulphila	2018 (US)	Neulasta	Mylan (Zurich)
Follicle-stimulating hormone-based				
Follicle-stimulating hormone-based	Ovaleap	2013 (EU)	Gonal F	Merckle Biotec (Ulm, Germany)
	Bemfola	2014 (EU)	Gonal F	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung (Klosterneuburg, Austria)
Insulin-based				
Insulin glargine-based	Abasaglar	2014 (EU)	Lantus	Lilly del Caribe (Carolina, Puerto Rico, USA) Eli Lilly (Indianapolis)
	Lusduna	2017 (EU)	Lantus	Merck Sharp & Dohme (Elkton, VA, USA)
		2017 (US), tentative		
Semglee	2018 (EU)	Lantus	Biocon Nusajaya (Johor, Malaysia)	
Insulin lispro-based	Insulin lispro Sanofi	2017 (EU)	Humalog	Sanofi-Aventis (Frankfurt)

Biopharmaceutical benchmarks 2018

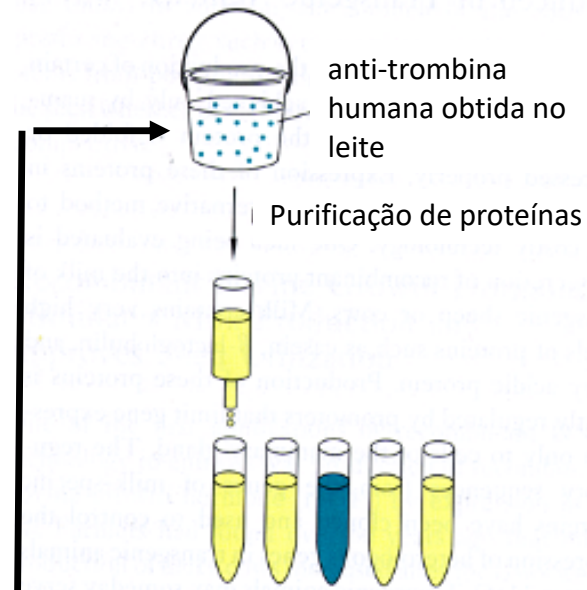
Gary Walsh

Monoclonal antibodies (mAbs) continue to reign supreme, although cellular and gene therapies are slowly starting to gather momentum. Burgeoning growth in biosimilars may threaten future brand monopolies for mAbs and other biologics.

Animais transgênicos também podem produzir fármacos



Ovelhas transgênicas:
Produção de proteínas
recombinantes no leite



Anti-trombina pura



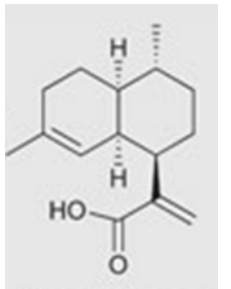
Do DNA Recombinante para:

- **Engenharia Metabólica**
- Otimização da produção de metabólitos de interesse
 - Inativação de rotas competidoras
- Super-expressão de rotas específicas
- Exemplos de metabólitos:
 - Antibióticos
 - Ácidos orgânicos
 - Aminoácidos
 - Etanol

- **Biologia Sintética**
- Reconstrução da rota de metabólitos de interesse e síntese em um hospedeiro heterólogo

- Exemplos

- Artemisina (anti-malárico)

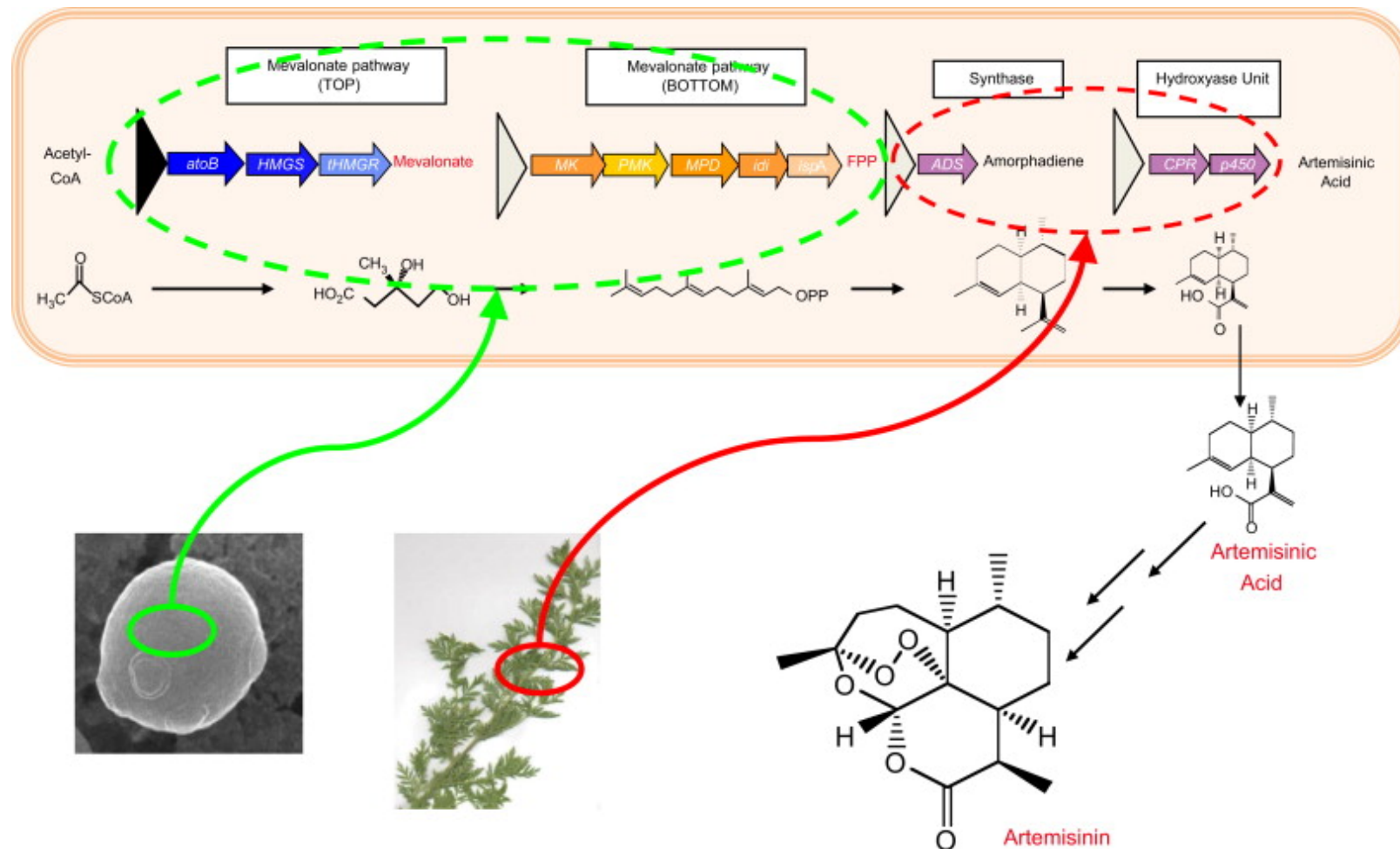


- Propano-1, 3-diol HOCCO

- farneseno 
Farnesene

Esquema da produção do ácido artemisínico em *E. coli*

Genes de *Saccharomyces cerevisiae* e da planta *Artemisia annua* são expressos na bactéria.

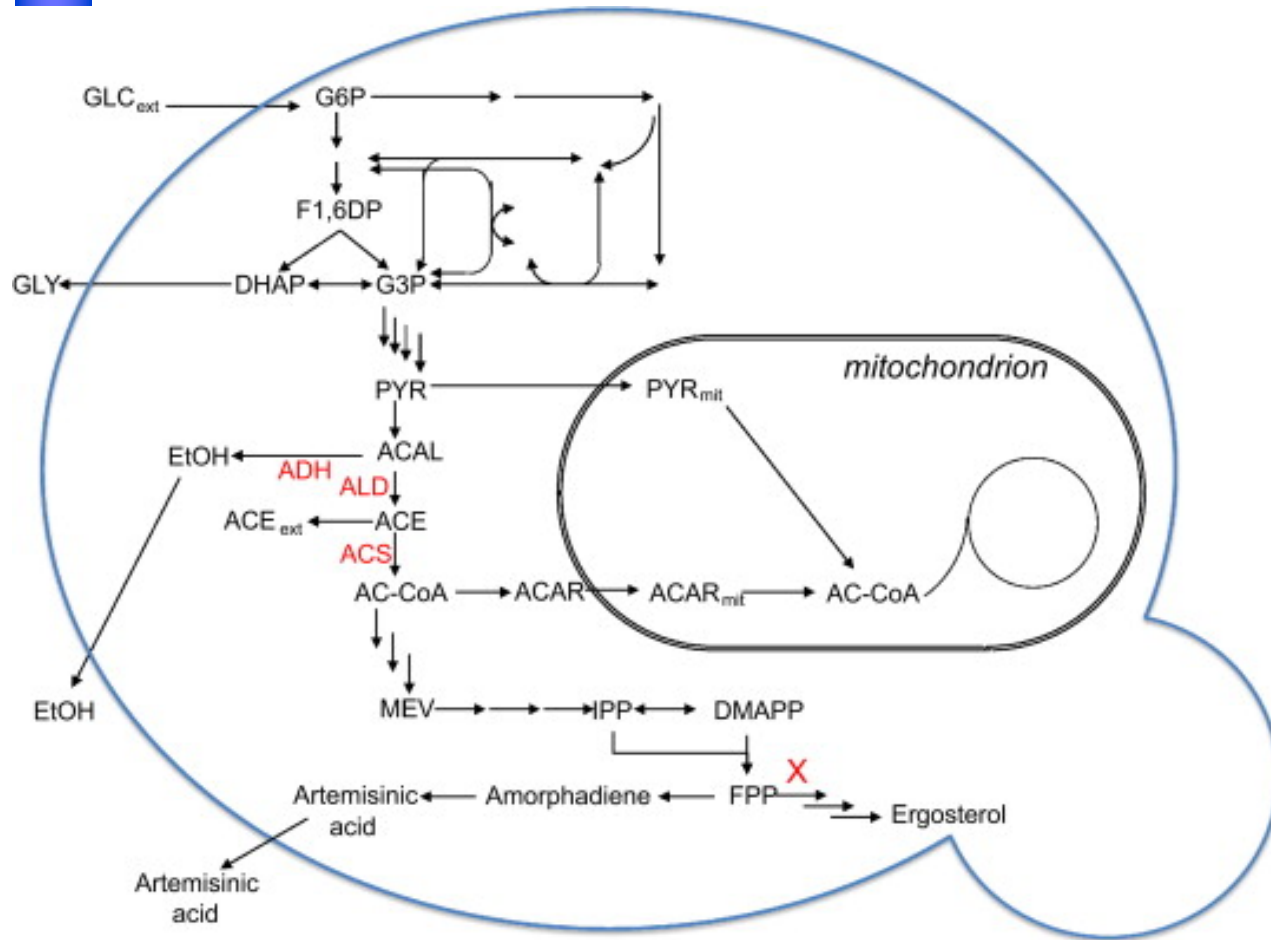


Jay D. Keasling

Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering

Metabolic Engineering, Volume 14, Issue 3, 2012, 189 - 195

Manipulação genética de levedura para produção do ácido artemisínico



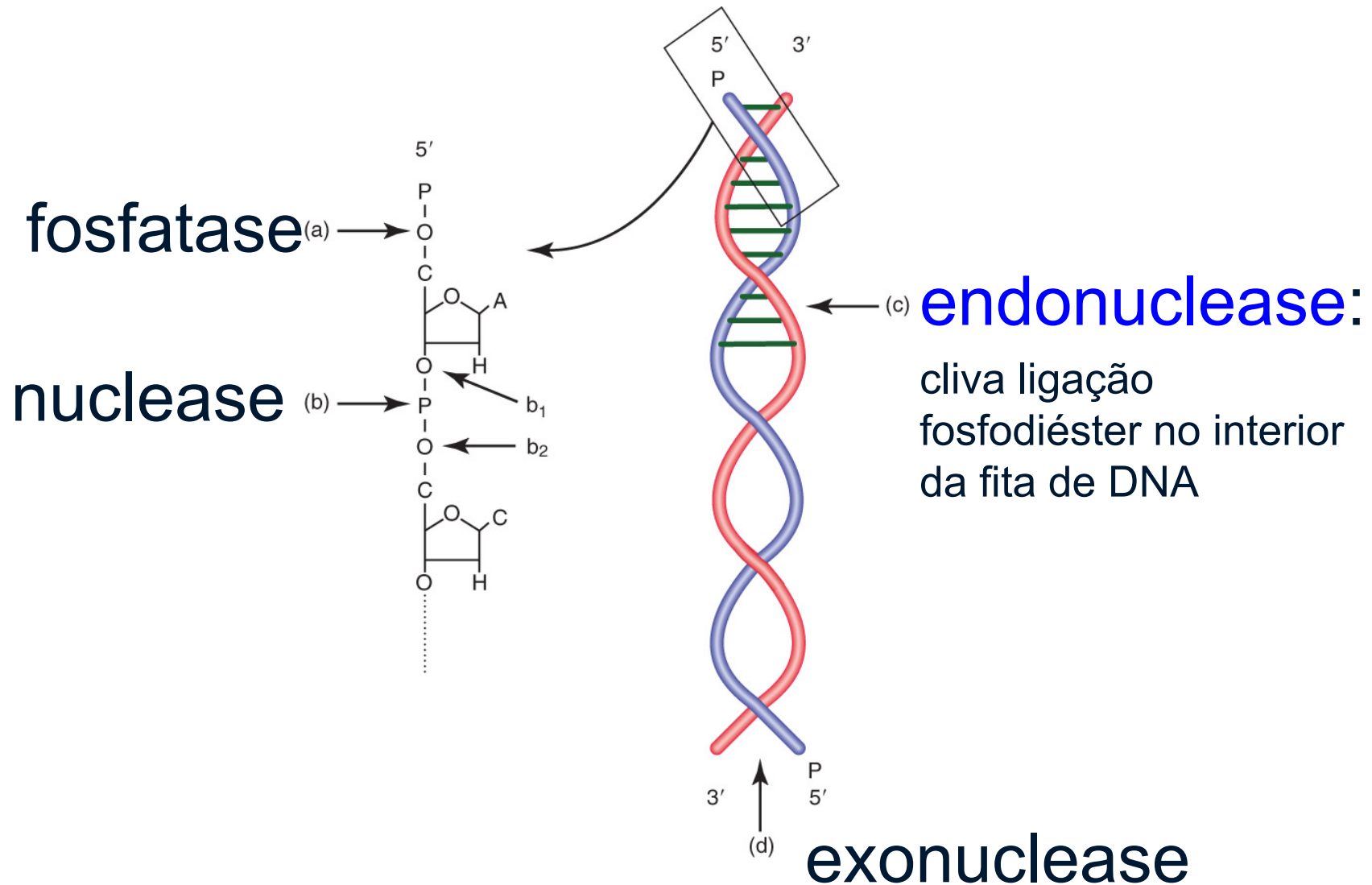
- Super-expressão de genes
- Substituição de genes por versões heterólogas mais eficientes
- Repressão de genes
- Otimização de códons
- Otimização da linhagem para produção industrial
- Otimização das condições de fermentação

- Vários anos
- Muitas pessoas
- Muito \$\$\$\$

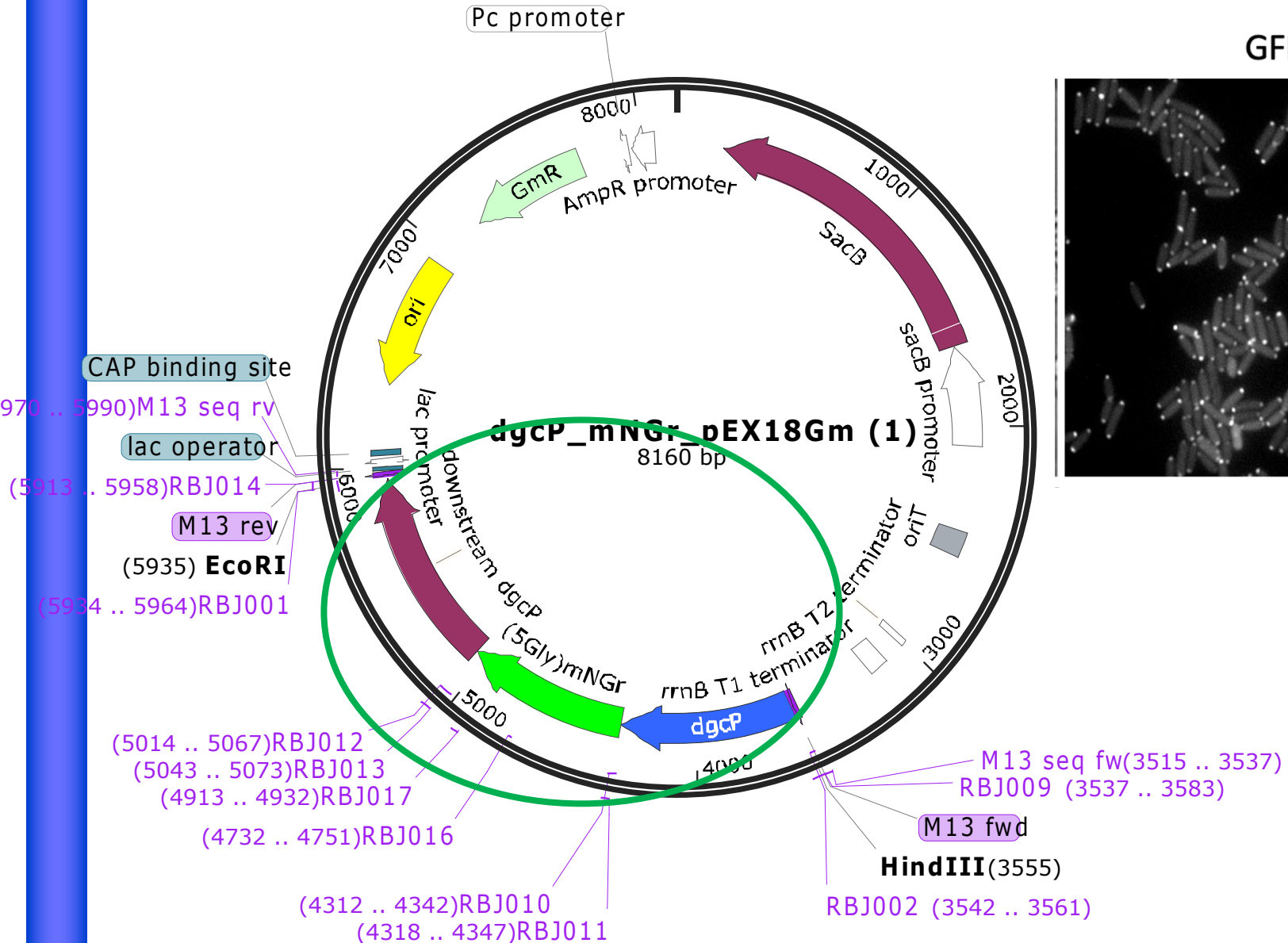
Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 2013;496(7446):528-532. doi:10.1038/nature12051

Slides Extras

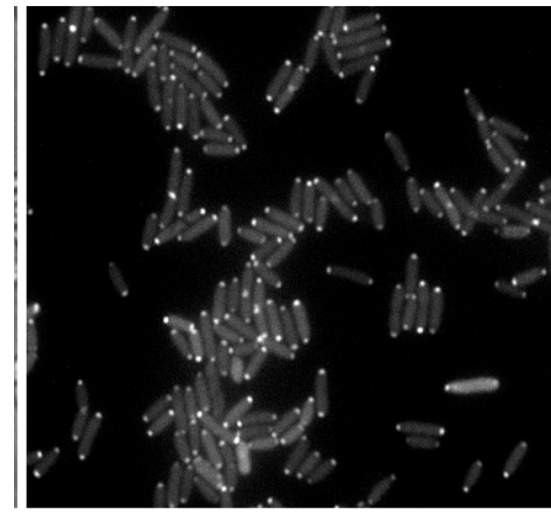
Enzimas de restrição são endonucleases que reconhecem sequências específicas



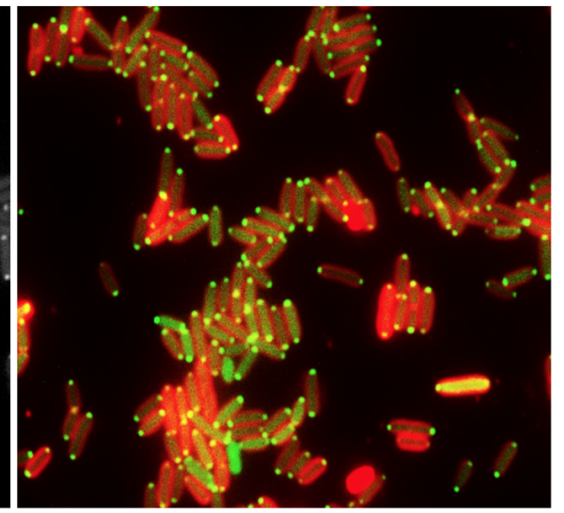
Exemplo: proteína de interesse fusionada com uma proteína verde fluorescente



GFP



Merge with FM4-64



No Brasil, o primeiro biossimilar aprovado foi o do princípio ativo do infliximabe, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em junho de 2015. O medicamento auxilia no tratamento de doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn, colite ulcerativa, espondilite anquilosante, artrite psoriática e psoríase.

No ramo oncológico brasileiro, o primeiro biossimilar foi aprovado pela Anvisa em dezembro de 2017. O medicamento, chamado comercialmente de Zedora[®], é indicado para o tratamento de câncer de mama inicial e metastático HER2 positivo e câncer gástrico HER2 positivo e está sendo comercializado pela Libbs.

Até 2020, dezenas de medicamentos biológicos terão suas patentes expiradas, possibilitando a produção de novos biossimilares.²⁻⁴

<https://www.biossimilaresbrasil.com.br/>

<https://youtu.be/y3YAqc39W8I>