

Plasmídeos e Enzimas de Restrição

Nícolas Hoch
QBQ2457 – 2023
Aula 1

O que é (e o que não é) **DNA recombinante**?

Molécula de DNA (nova – inexistente na natureza) gerada pela junção de duas ou mais moléculas de DNA de fontes (e geralmente organismos) diferentes

“Re-combinar” no sentido de combinar moléculas de uma maneira diferente

* Diferente de recombinação homóloga, que é uma via de reparo de DNA

O que é **Clonagem**?

Processo que gera cópias idênticas de algo:

- DNA (clonagem molecular – essa disciplina!)
- células (isolamento ou seleção de uma célula com dada característica)
- organismos (Dolly!)



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Paul Berg

Prize share: 1/2



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Walter Gilbert

Prize share: 1/4



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Frederick Sanger

Prize share: 1/4

The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg "for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA", the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger "for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"

Mas porque foi (e ainda é!) tão importante?

Pesquisa básica:

- Identificar genes (triagem)
- Estudar função de genes e/ ou do RNA
ou proteína que codificam
- Expressar proteínas para ensaios bioquímicos
- Determinar estrutura da proteína
- Sequenciamento
-

Biotecnologia:

- Insulina e hormônio do crescimento
- Transgênicos e engenharia genética
- Uso forense e teste de paternidade
-

Clínica:

- Diagnóstico de microrganismos
- Diagnóstico de doenças genéticas
- Terapia gênica
-

Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de cortar DNA para gerar um inserto
- Uma forma de ligar esse inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nove molécula gerada

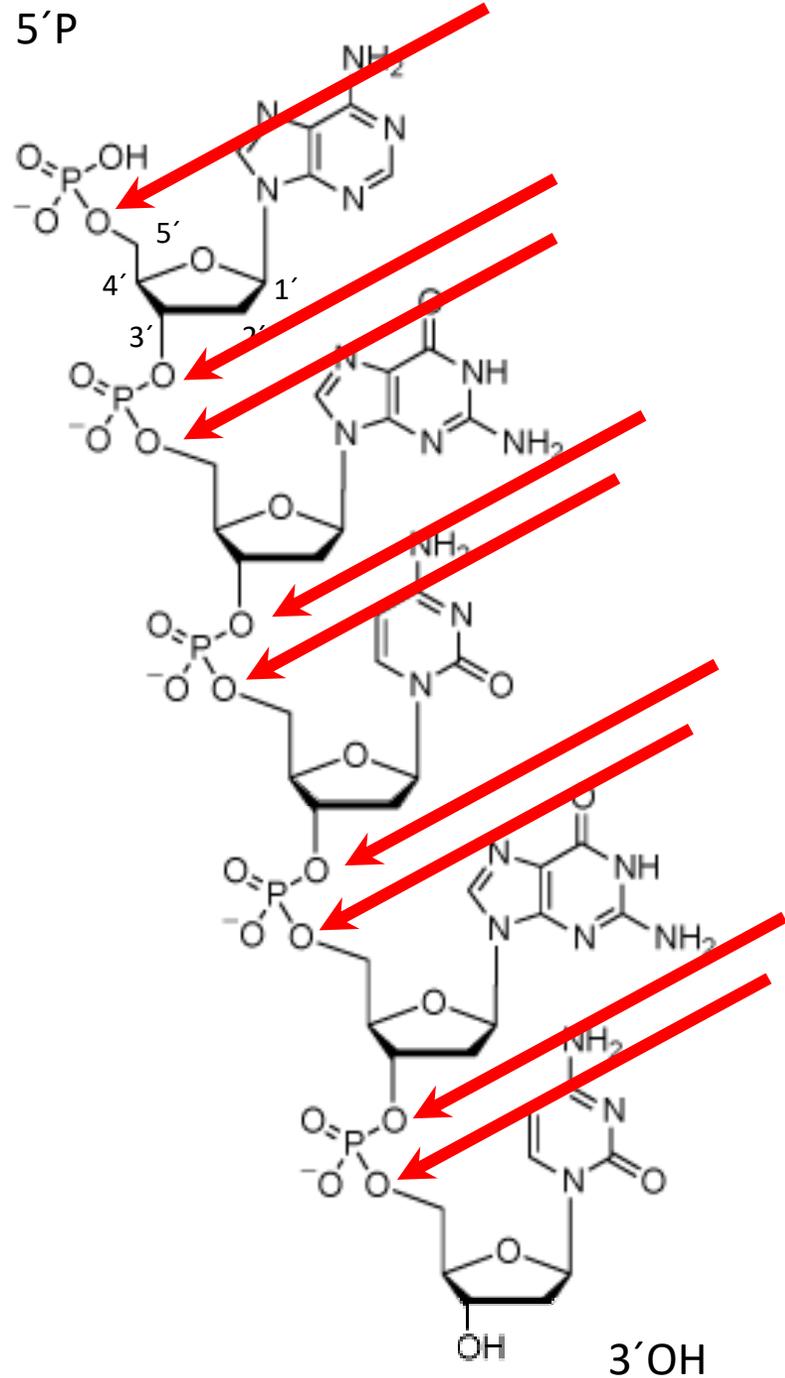
Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de cortar DNA para gerar um inserto
- Uma forma de ligar esse inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada

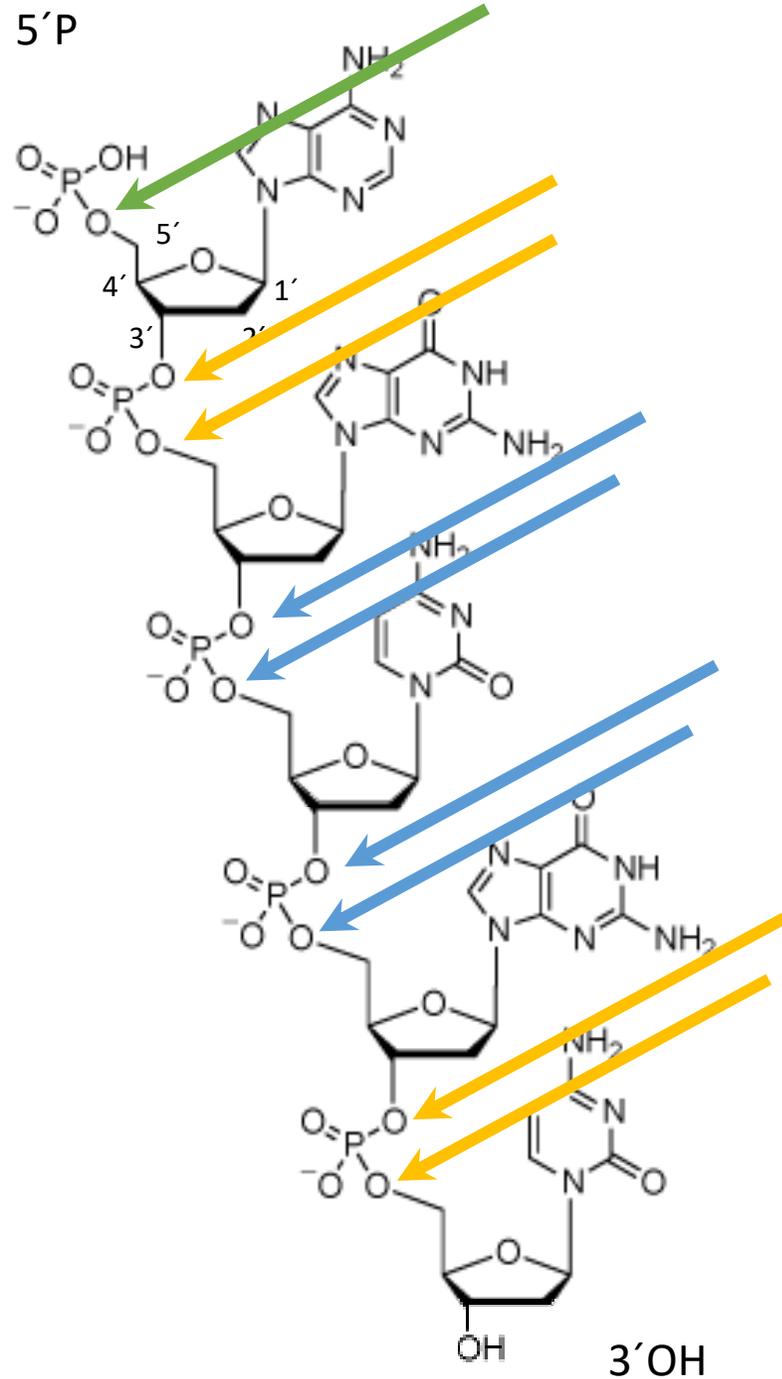
Como cortar?

- Reação química? Mas como faria para obter especificidade?
- Enzima! Mas que característica essa enzima precisa ter?
 - **Clivar DNA**
 - De maneira seletiva e específica para uma certa sequência

ENDOnuclease, EXOnuclease e fosfatase

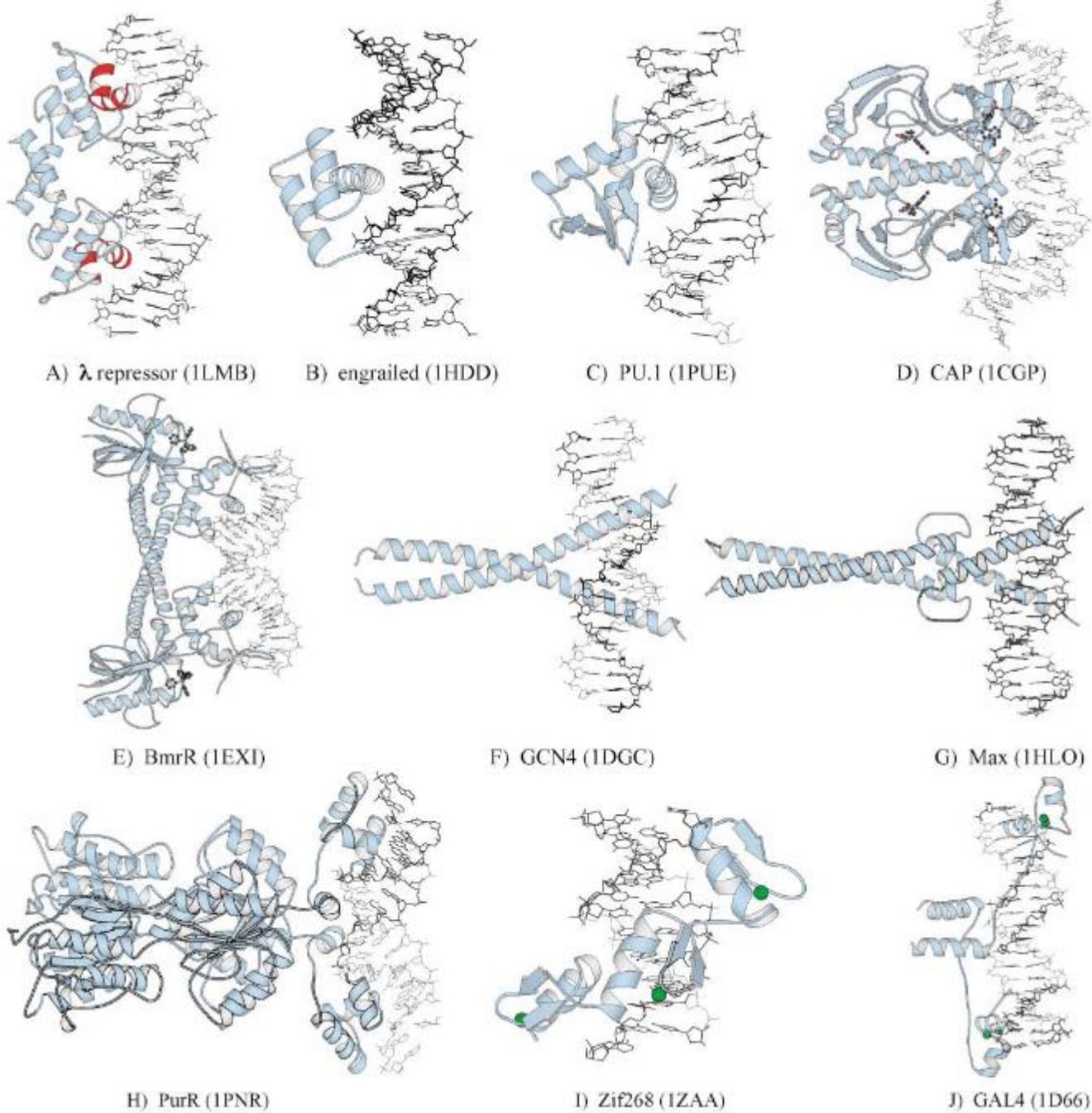


ENDOnuclease, EXOnuclease e Fosfatase



Como cortar?

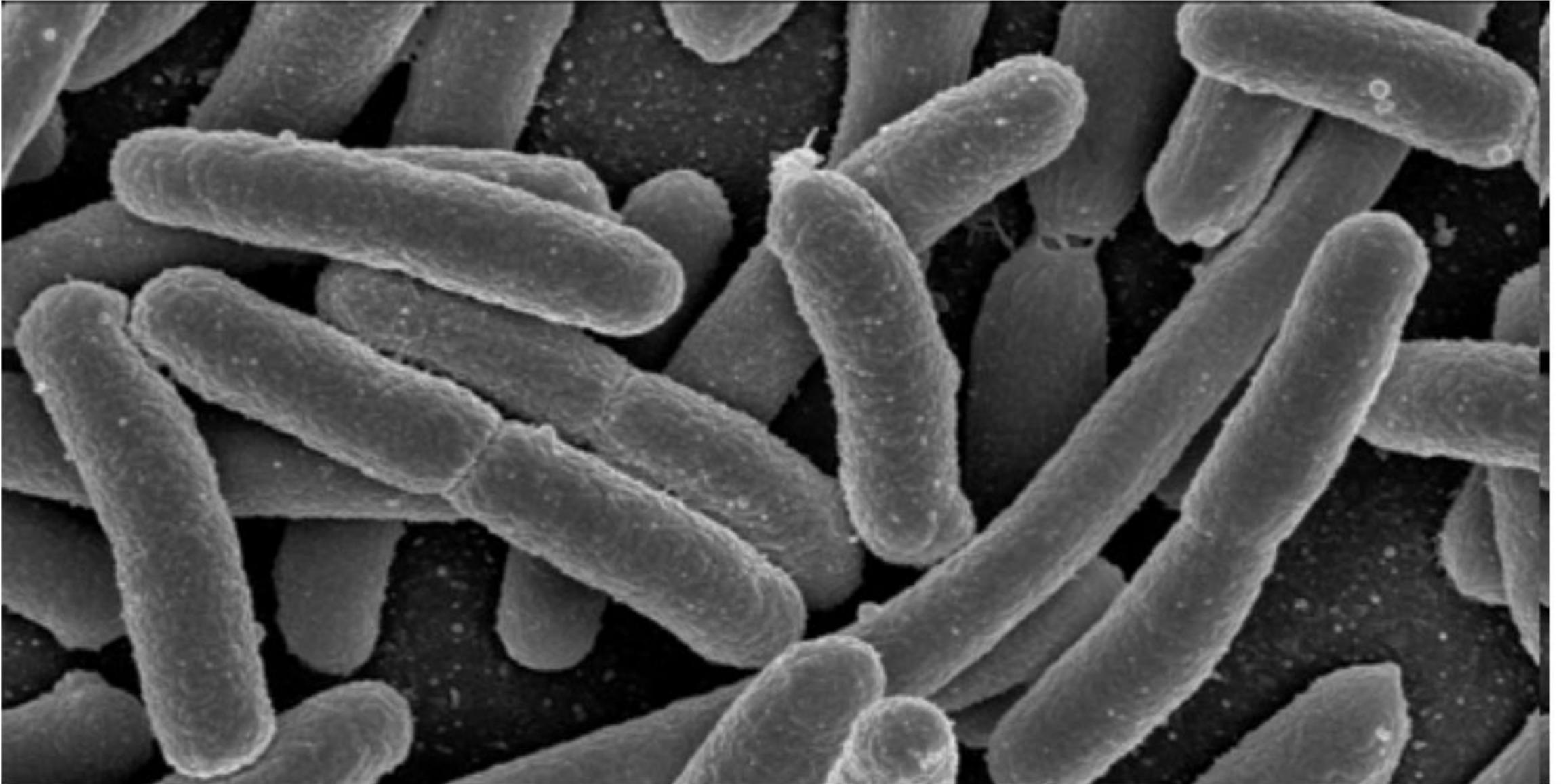
- Reação química? Mas como faria para obter especificidade?
- Enzima! Mas que característica essa enzima precisa ter?
 - Clivar DNA
 - De maneira seletiva e específica para uma certa sequência



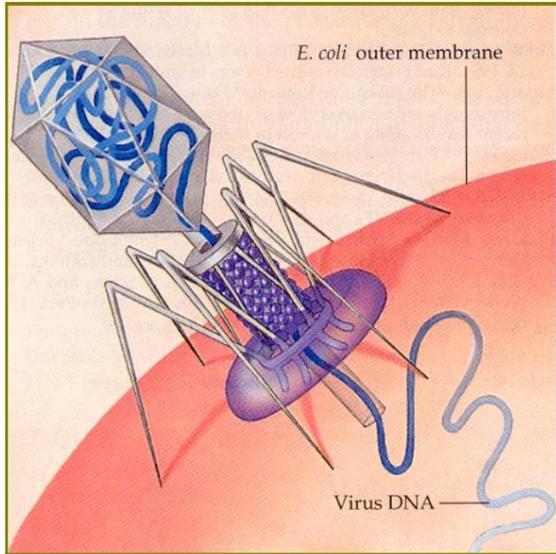
(exemplos de proteínas que ligam seqüências específicas de DNA, nenhuma dessas é uma enzima de restrição)

Garvie and Wohlberger, *Mol Cell* (2021)

Mas onde podemos encontrar uma enzima que faça isso?



Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias



As bactérias têm “sistemas imunes” primitivos para se defender desses vírus

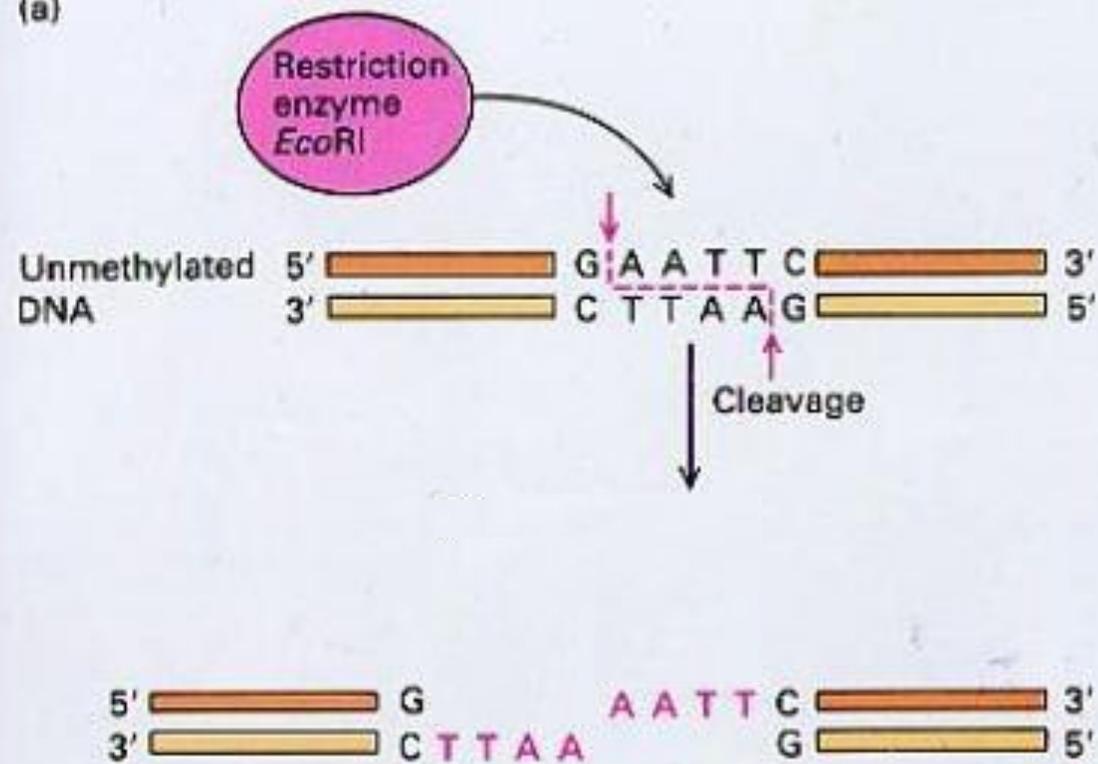
Um desses sistemas são metilases e endonucleases de RESTRIÇÃO (que restringem o vírus)

*Outro sistema desse tipo se chama CRISPR/Cas, mas essa história fica para outro dia

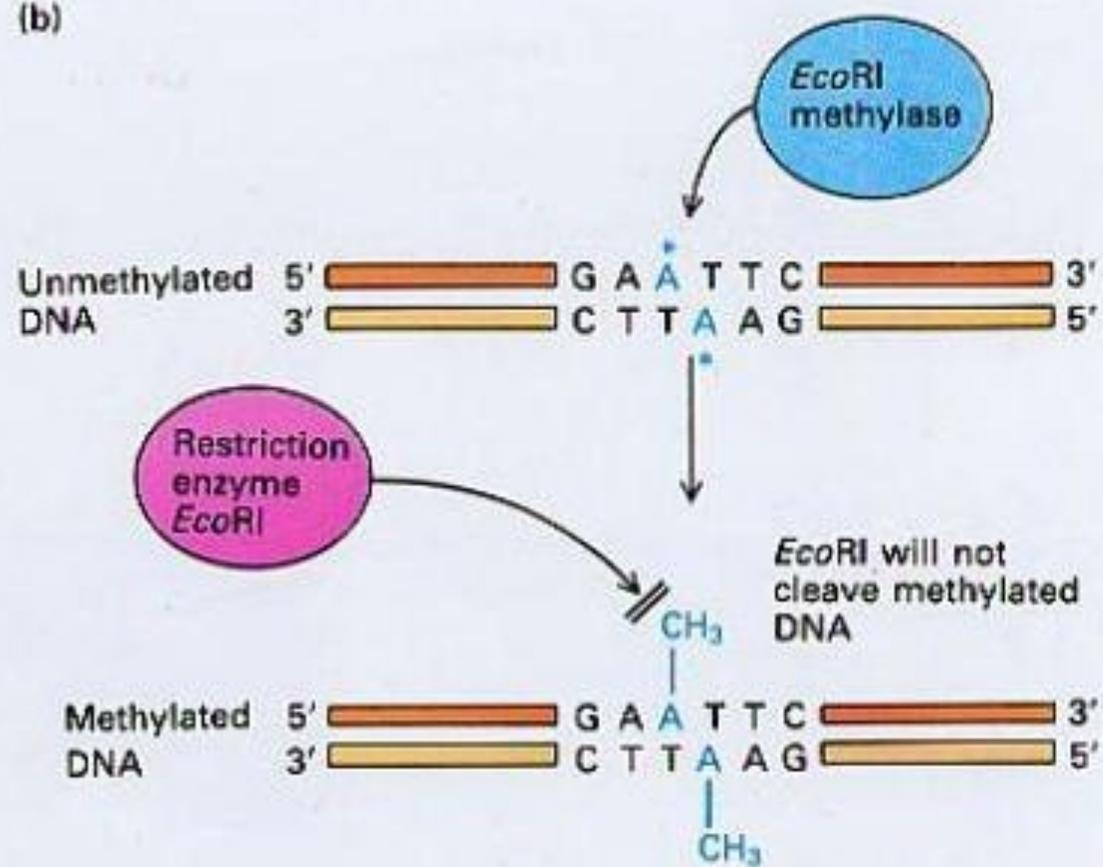
Em 1960, Stuart Linn and Werner Arber isolaram da cepa RY-13 de *Escherichia coli* o primeiro conjunto de metilase e endonuclease desse sistema de restrição.

- Metilase EcoRI reconhece e metila GAATTC do genoma da bactéria (metilação é na adenina sublinhada)
- Endonuclease EcoRI cliva GAATTC, mas só se não estiver metilado
- Resultado: cliva genoma do invasor, mas não da bactéria

(a)



(b)



PAUSA PARA APRECIAR A IMPORTÂNCIA DA CIÊNCIA BÁSICA

Características das Endonucleases de Restrição

1. O nome deriva da bactéria de origem

EcoRI = *Escherichia coli*, cepa RY13, enzima 1

EcoRV = *Escherichia coli*, cepa RY13, enzima 5

BamHI = *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H, enzima 1

HindIII = *Haemophilus influenzae*, cepa Rd, enzima 3

Características das Endonucleases de Restrição

1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb), mas diferentes para cada enzima

EcoRI → 5' GAATTC 3'

EcoRV → 5' GATATC 3'

BamHI → 5' GGATCC 3'

HindIII → 5' AAGCTT 3'

As enzimas mais comumente utilizadas reconhecem um sítio com 6pb

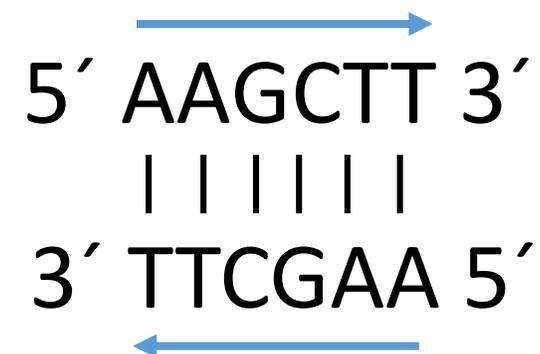
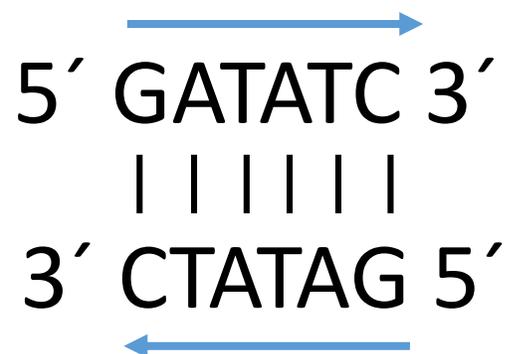
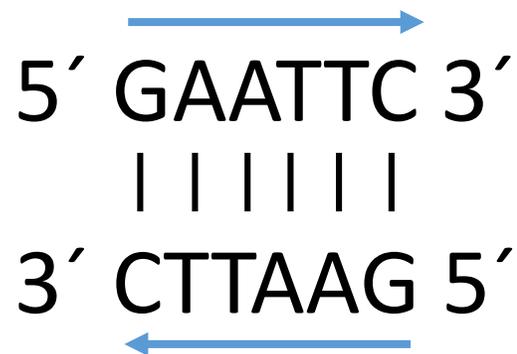
Características das Endonucleases de Restrição

1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb), mas diferentes para cada enzima
3. **Geralmente reconhecem sequências palindrômicas**

OVO

A BOLA DA LOBA

SOCORRAM-ME SUBI NO ONIBUS EM MARROCOS



Características das Endonucleases de Restrição

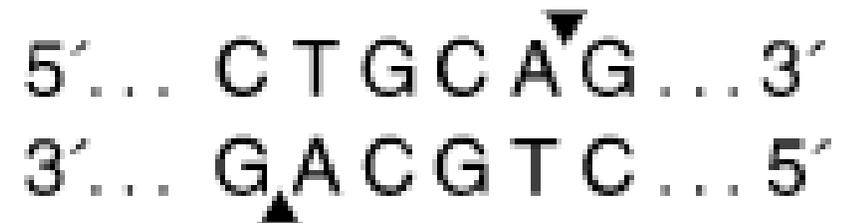
1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb), mas diferentes para cada enzima
3. Geralmente reconhecem sequências palindrômicas
4. Podem clivar em posições variadas (mas simétricas) da sequência alvo



EcoRI



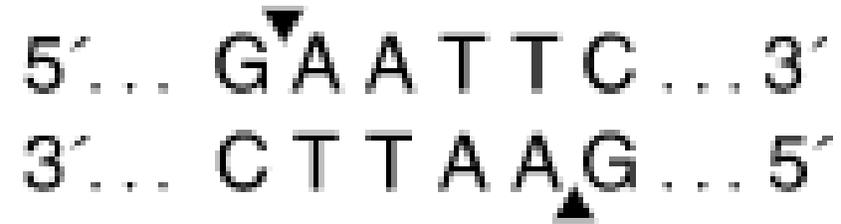
EcoRV



PstI

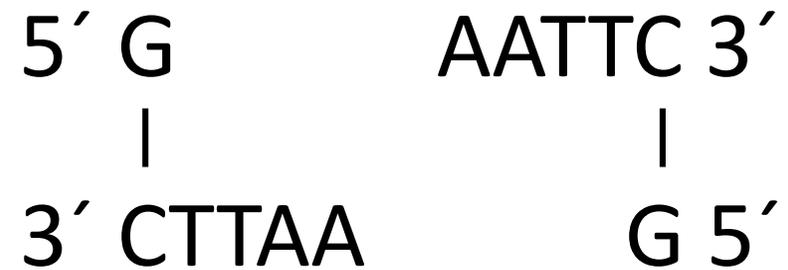
Características das Endonucleases de Restrição

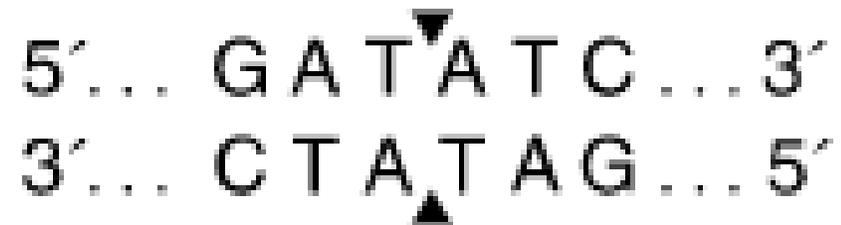
1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb) , mas diferentes para cada enzima
3. Geralmente reconhecem sequências palindrômicas
4. Podem clivar em posições variadas da sequência alvo
5. **Geram produtos com extremidades distintas (coesivas 3', coesivas 5' ou cegas)**



EcoRI

gera extremidade COESIVA 5'





EcoRV

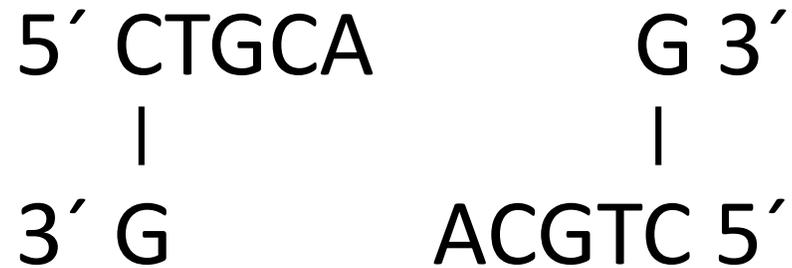
gera extremidade CEGA





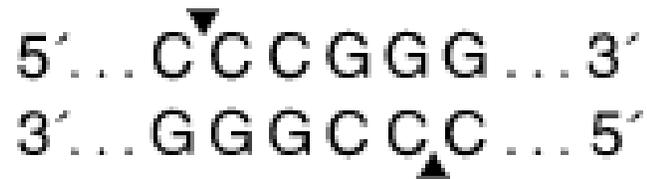
PstI

gera extremidade COESIVA 3'



Características das Endonucleases de Restrição

1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb), mas diferentes para cada enzima
3. Geralmente reconhecem sequências palindrômicas
4. Podem clivar em posições variadas da sequência alvo
5. Geram produtos com extremidades distintas (coesivas 3' ou 5' ou cegas)
6. Enzimas diferentes podem reconhecer a mesma sequência (isoesquisômeros)



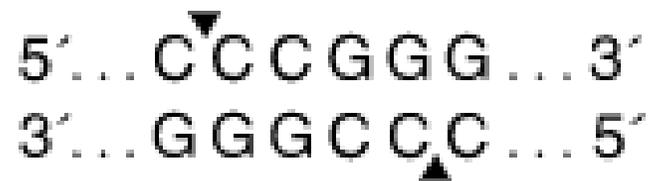
XmaI



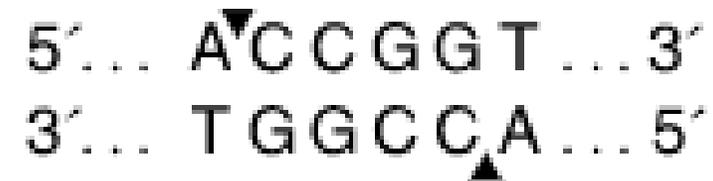
SmaI

Características das Endonucleases de Restrição

1. O nome deriva da bactéria de origem
2. Clivam as duas fitas de DNA em sequências específicas (4-20pb), mas diferentes para cada enzima
3. Geralmente reconhecem sequências palindrômicas
4. Podem clivar em posições variadas da sequência alvo
5. Geram produtos com extremidades distintas (coesivas 3' ou 5' ou cegas)
6. Enzimas diferentes podem reconhecer a mesma sequência (isoesquisômeros)
7. **Enzimas diferentes podem gerar a mesma extremidade coesiva (isocaudômeros)**



XmaI



AgeI

Em biologia SEMPRE há exceções

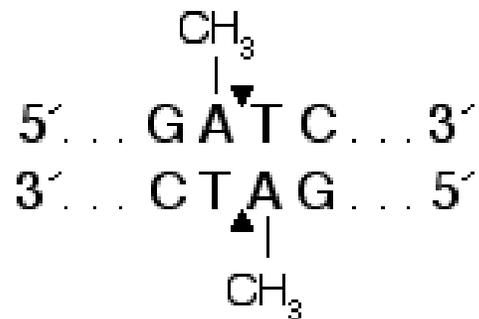


BbsI

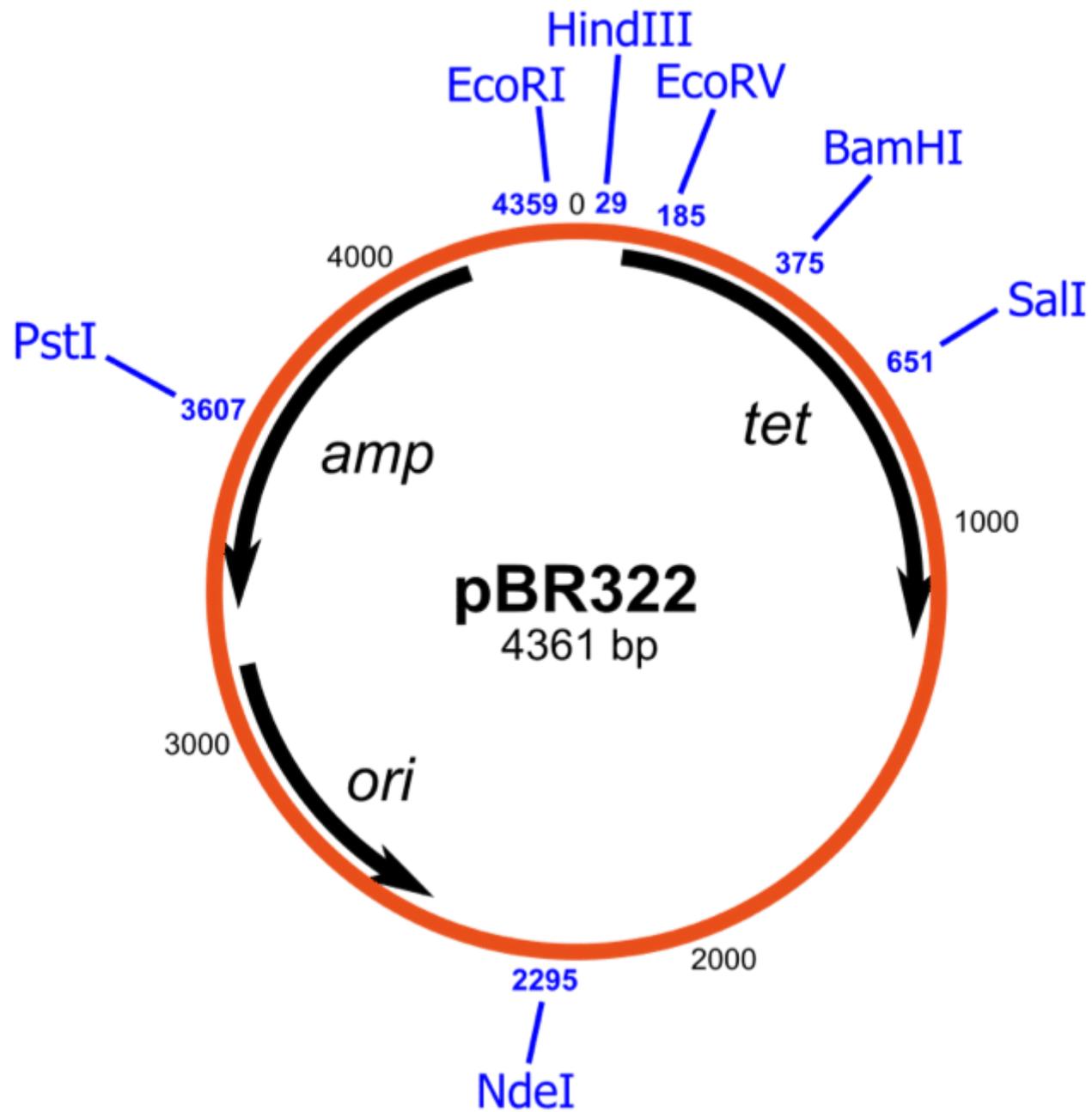


I-SceI

(da levedura *Saccharomyces cerevisiae*)



DpnI



Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de cortar DNA para gerar um inserto
- Uma forma de ligar esse inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada



Enzimas de
restrição

O que essa sequência de DNA receptora do nosso inserto precisa ter?

Ser transferível para dentro de uma célula

Ser estável dentro de uma célula

Ser copiada pela maquinaria celular

Possibilidade de selecionar as células que contêm o DNA de interesse

Outros elementos específicos do experimento que se deseja realizar

- promotor

- tags

- sequências para uso em outro organismo (shuttle vectors)

O que essa sequência de DNA receptora do nosso inserto precisa ter?

Ser transferível para dentro de uma célula

Ser estável dentro de uma célula

Ser copiada pela maquinaria celular

Possibilidade de selecionar as células que contêm o DNA de interesse

Outros elementos específicos do experimento que se deseja realizar

- promotor
- tags
- sequências para uso em outro organismo (shuttle vectors)

Tipos de vetores

Plasmídeos – DNA circular extracromossomal – diversas cópias por célula, geralmente até ~20kb, mas podem ser maiores

Fagos – vírus que infectam bactérias – muitas cópias por célula – limite ~50kb (~5kb de inserto)

Cosmídeos – vetores híbridos – plasmídeos com sítios para empacotamento pelo fago lambda (precisam ser empacotados em partículas de fago lambda para entrar na célula, mas não produzem fago) – limite ~50kb (~45kb de inserto!)

Cromossomos artificiais (BACs, YACs) – bacteriano é **circular**, de levedura é **linear** – carregam de 100kb a 1Mb

Vetores virais – plasmídeos contendo sequências necessárias para seu empacotamento em partículas de vírus que infectam células de eucariotos (podem ser lentivírus, adenovírus ou retrovírus)

O que essa sequência de DNA receptora do nosso inserto precisa ter?

Ser transferível para dentro de uma célula

Ser estável dentro de uma célula

Ser copiada pela maquinaria celular

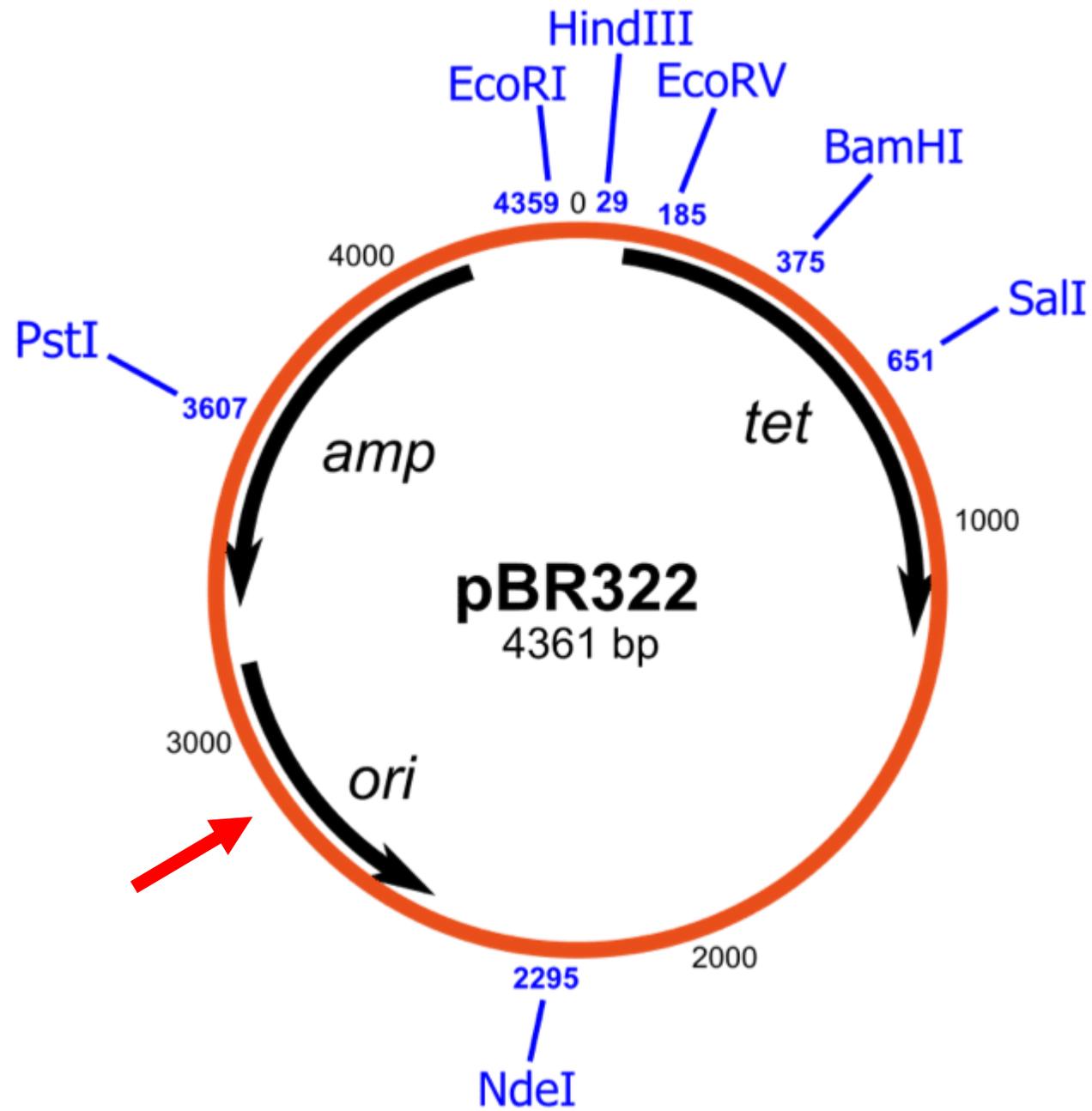
Possibilidade de selecionar as células que contêm o DNA de interesse

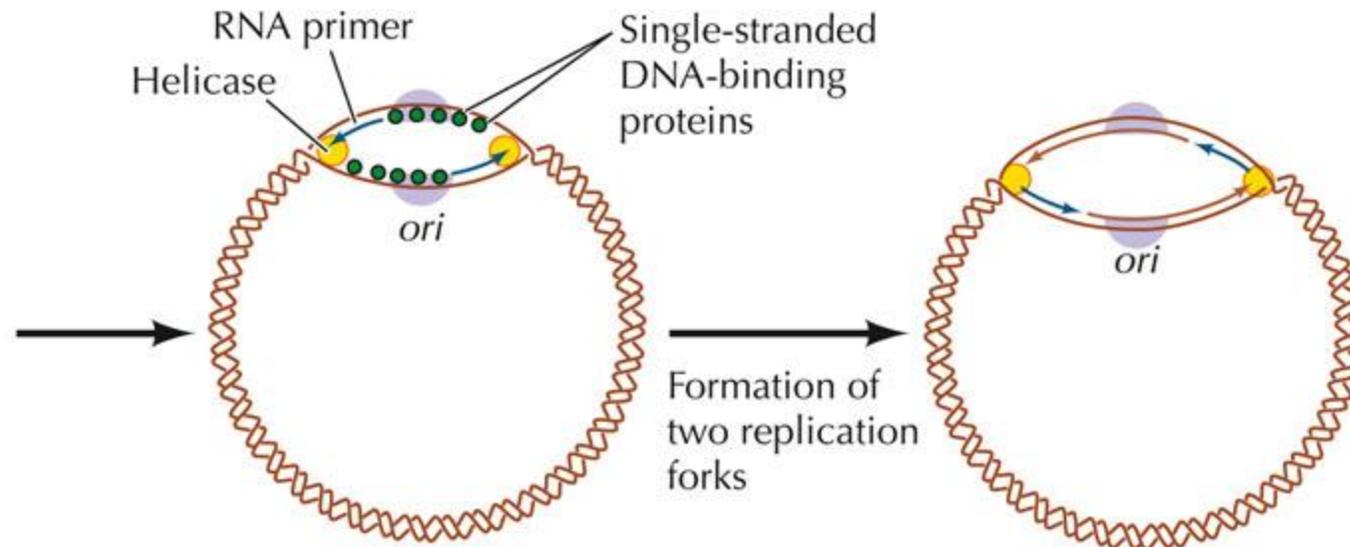
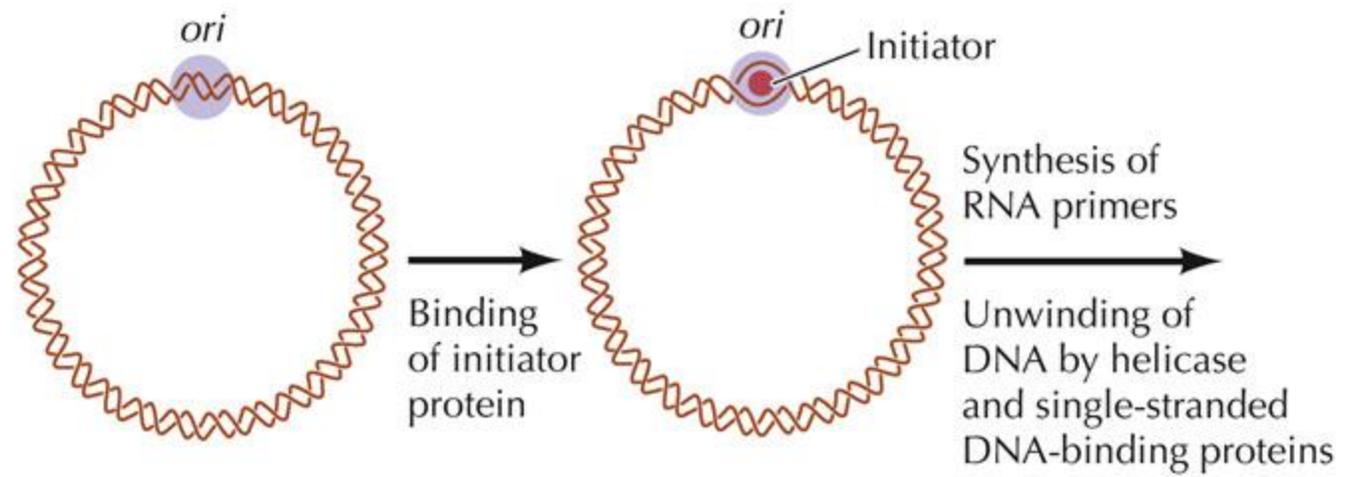
Outros elementos específicos do experimento que se deseja realizar

- promotor

- tags

- sequências para uso em outro organismo (shuttle vectors)





O que essa sequência de DNA receptora do nosso inserto precisa ter?

Ser transferível para dentro de uma célula

Ser estável dentro de uma célula

Ser copiada pela maquinaria celular

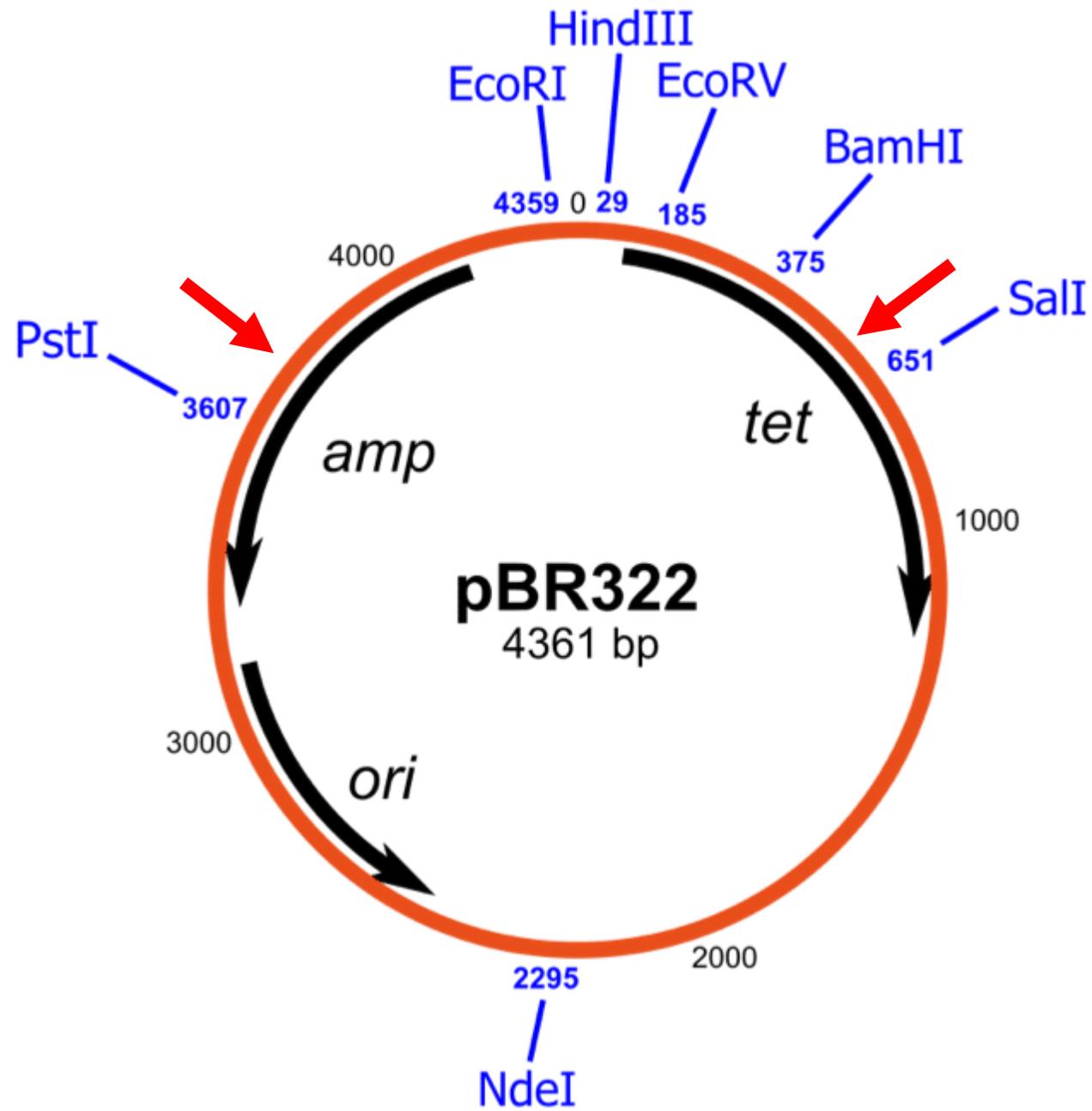
Possibilidade de selecionar as células que contêm o DNA de interesse

Outros elementos específicos do experimento que se deseja realizar

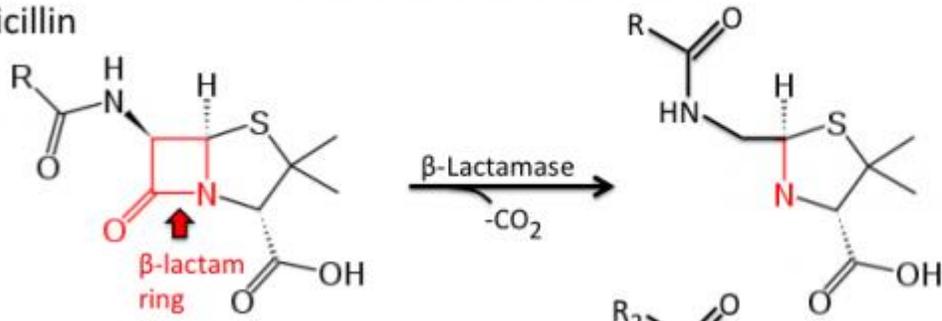
- promotor

- tags

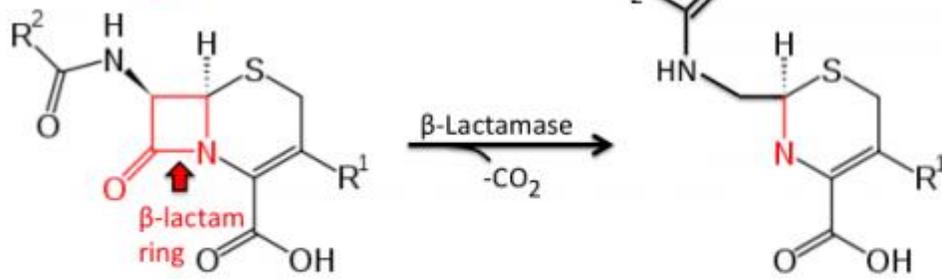
- sequências para uso em outro organismo (shuttle vectors)



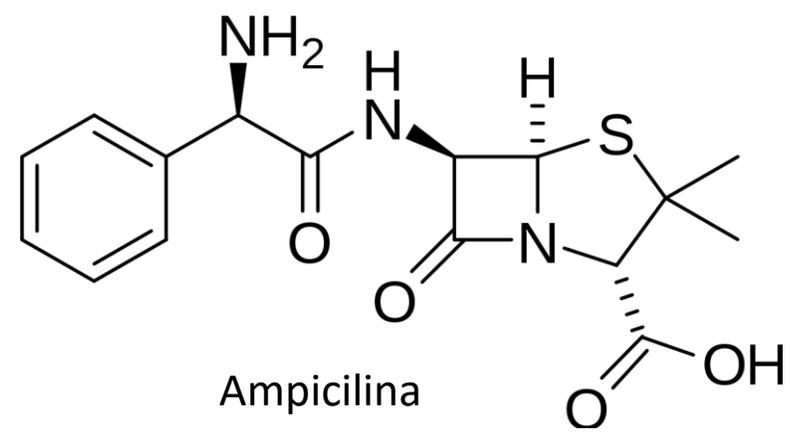
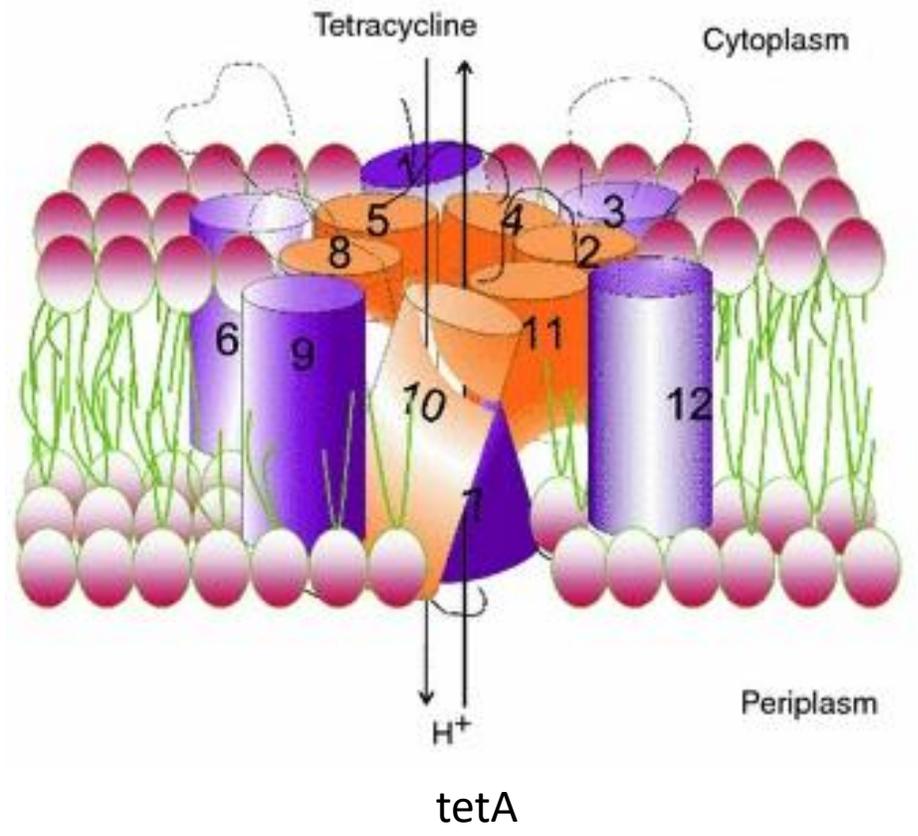
Penicillin



Cephalosporin



inactive metabolites



Ampicilina

O que essa sequência de DNA receptora do nosso inserto precisa ter?

Ser transferível para dentro de uma célula

Ser estável dentro de uma célula

Ser copiada pela maquinaria celular

Possibilidade de selecionar as células que contêm o DNA de interesse

Outros elementos específicos do experimento que se deseja realizar

- promotor

- tags

- sequências para uso em outro organismo (shuttle vectors)