

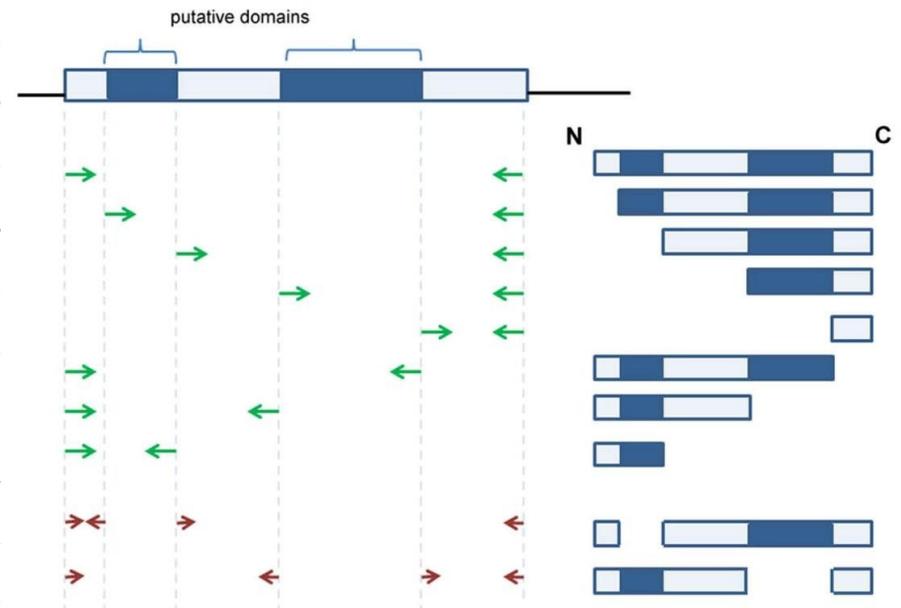
Mutagenesis

Mutagénesis basada en eliminación (aunque aquí usaremos un anglicismo: deleción). Los estudios de deleción, como su nombre lo indica, se basan en la eliminación de grandes "fragmentos" de la secuencia un gen a través de la manipulación genética. El método más simple para crear tales deleciones (que luego se puede usar con fines de clonado) es mediante PCR usando primers que definen los límites de la deleción. Esta técnica se emplea principalmente para definir la función de diferentes proteínas, parte de ellas (dominios), como secuencias de localización nuclear (NLS), dominios de unión a ADN (DBD), dominios de activación (AD), etc. Al eliminar diferentes regiones de la proteína y observar los cambios en su función, uno puede controlar qué región es responsable de esa función particular.

Figura 5.1.

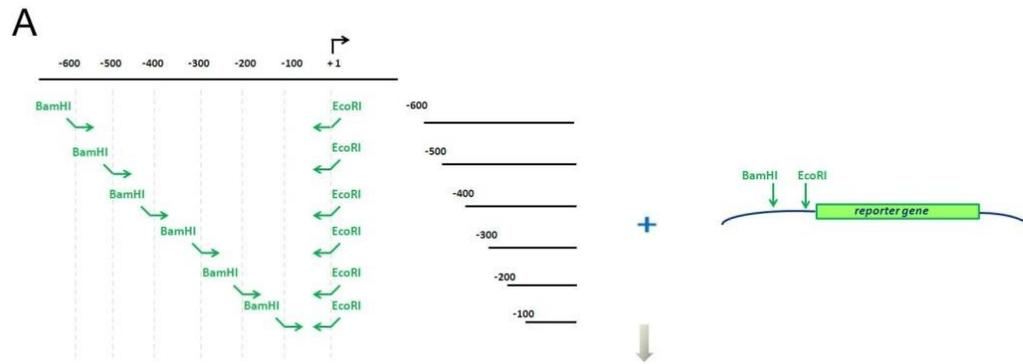
Es un ejemplo esquemático de una deleción típica. Análisis de secuencias codificantes de proteínas para el análisis de dominios putativos (sitio activo, motivo de unión, interacción región, dominio de activación, etc.). Si se sabe muy poco sobre los dominios predichos, luego una gran serie de deleciones se pueden utilizar para estudiar la función de estos dominios (las flechas verdes muestran los primers directos y reversos que podrían usarse para PCR de estas deleciones).

Adicionalmente, también se podría eliminar un segmento interno. En ese caso, se pueden usar dos conjuntos de primers, pero con un diseño bien calculado de primers que en el medio deben incluir sitios de restricción que se superpongan y que esten en marco de lectura con la secuencia codificante.



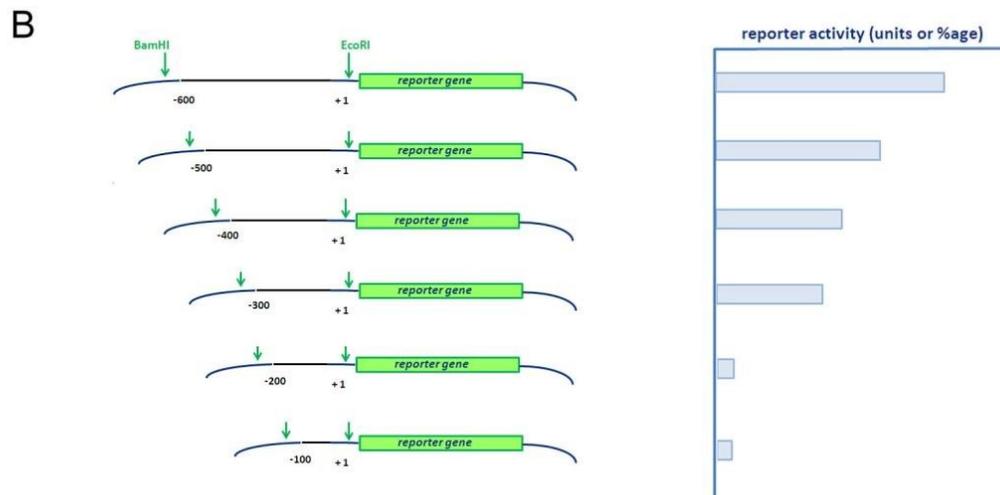
Experimentos de recorte de promotores y ensayos de gen reportero

Esta figura es un ejemplo esquemático de la estrategia de clonado para el análisis de función de promotor y ensayo de reportero.



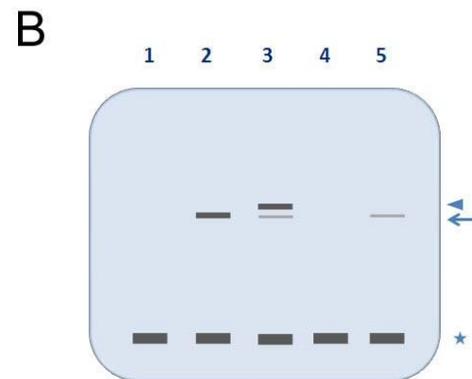
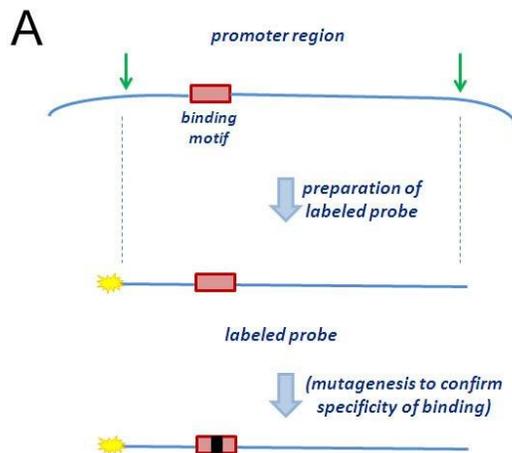
(a) Eliminaciones del final 5' del promotor se puede construir usando diferentes primers 5' y clonados en el plásmido reportero como se describe en el texto;

(b) el reportero (gen) construido de esta manera puede ser utilizado para analizar la actividad de estas eliminaciones a través del análisis de la actividad del gen reportero



Ensayos de interacción ADN - proteína: Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

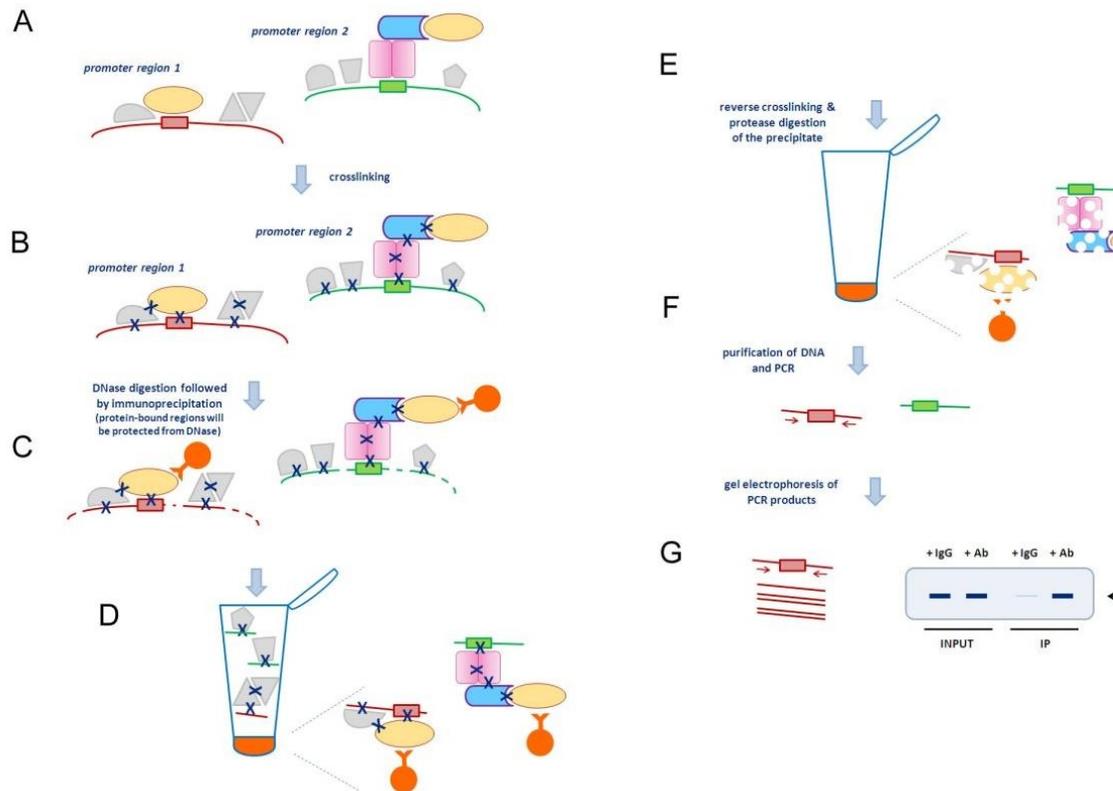
También conocido como Gel Mobility Assay, Gel Shift Assay, Bandshift Assay o Gel Retardation Assay, entre otros, el principio básico de este ensayo es que se utilizan geles no desnaturizantes, por lo que los complejos de proteína-ADN no se separan en sus componentes, y, por lo tanto, el tamaño como la estructura afectan la migración a través del gel. En la figura se observa una explicación esquemática del ensayo de cambio de movilidad (EMSA). (a) el fragmento de ADN de interés (generalmente una parte del promotor que contiene el motivo de unión) se utiliza para preparar un marcado (radiactivo o no radiactivo) (este fragmento de ADN podría también contener una mutación introducida para interrumpir el motivo de unión, al que el factor de transcripción ya no podrá unirse); (b) una caricatura de un ensayo de desplazamiento de banda hipotético, donde el marcado sonda o su homólogo mutado esquematizado en (a) son incubados junto con el factor de transcripción puro o con un extracto nuclear en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-factor de transcripción. Luego sometido a electroforesis en gel no desnaturizante; 1, sonda marcada sola; 2, etiquetado sonda incubada con proteína purificada o un extracto nuclear;



3, sonda marcada incubada con proteína purificada/extracto nuclear en presencia de un anticuerpo específico contra el factor de transcripción de interés; 4; sonda mutagenizada marcada sola; 5, sonda mutagenizada marcada con la proteína o extracto nuclear; la estrella muestra las sondas sin ninguna proteína, corriendo rápido en el gel; la flecha muestra el complejo de ADN/proteína de sonda retardada; la punta de flecha indica el complejo de ADN/proteína/anticuerpo de la sonda, retardado aún más en el campo electroforético. (El EMSA radiactivo podría usarse más para calcular las constantes de unión, si las bandas en el gel se cuantifican en experimentos diseñados para cálculos de afinidad de unión)

Ensayos de interacción ADN - proteína: inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

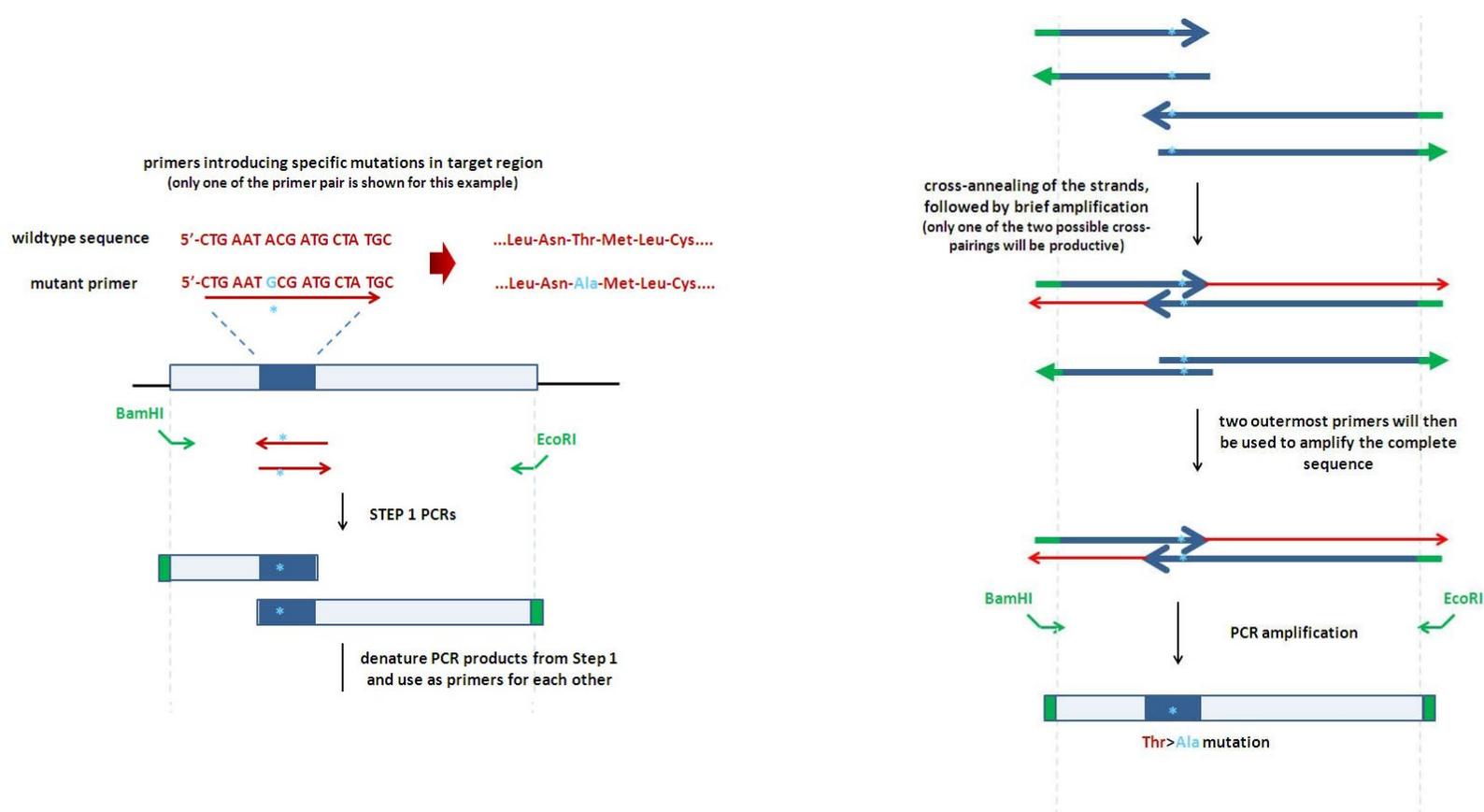
Una explicación esquemática de la inmunoprecipitación de cromatina. La pregunta en este caso es si una proteína está realmente unida a un supuesto sitio de unión en ADN in vivo. Para ese fin, las células se tratan con un reactivo de crosslinking. Esta mezcla luego se digiere con ADNasa (o bien se rompe por sonicación) generando fragmentos de 500pb aprox al azar, es decir que un cromosoma de una de las células en estudio se “rompe” en una posición pero en otra célula el mismo cromosoma se “rompe” en otra posición. Entonces se inmunoprecipita la proteína de interés con un anticuerpo específico, junto con cualquier “compañero” de interacción, ya sea proteína o ADN.



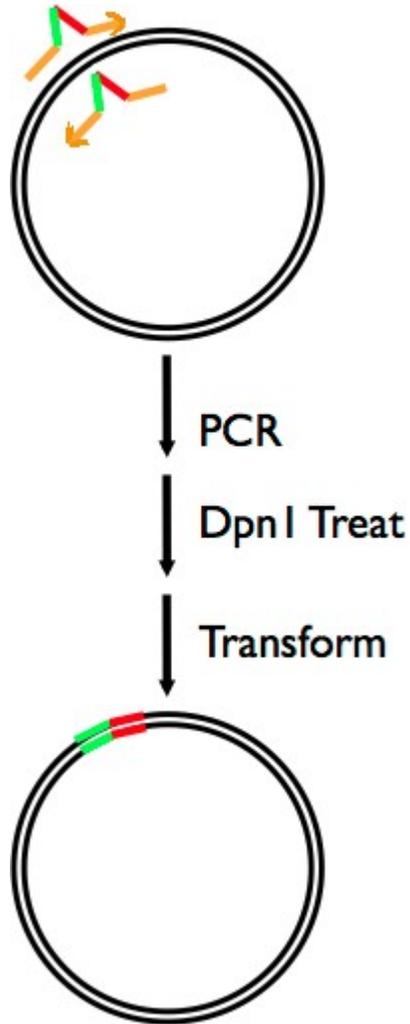
Después de revertir el crosslinking, las proteínas se digieren usando proteasas; el ADN que ha sido precipitado junto con complejos de proteína-anticuerpo son purificados y sometidos a amplificación por PCR usando primers específicos para la región de interés. Después de la electroforesis en gel tanto de la "entrada" (es decir, muestra antes de la inmunoprecipitación, en otras palabras, el lisado celular) y de los productos de amplificación "IP", la señal positiva con el anticuerpo-IP (junto con un control negativo hecho con la IgG pero sin crosslinking) confirma la unión específica de la proteína en cuestión a la región de ADN.

Mutagénesis sitio-dirigida

La mutagénesis sitio dirigida se refiere a la generación de mutaciones en regiones específicas del gen con el propósito específico de cambiar un sitio de fosforilación, un aminoácido esencial para la actividad catalítica de una enzima, propiedad de unión a ligando, etc.). Figura 5.3. Es un diagrama esquemático de la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida por PCR. La treonina fosforilable se debe mutar a una alanina (mutación T -> A). Se diseña un par de primers mutantes que contenga un nucleótido que cambie el codón de T a A, (se muestra en este ejemplo que contiene dos enzimas de restricción diferentes para fines de clonado).



Mutagénesis sitio-dirigida quickchange



Esta técnica de mutagénesis evita el clonado necesario de los fragmentos de PCR generados por la técnica anterior. Clonar fragmentos de PCR es algo difícil y laborioso de hacer ya que es sumamente ineficiente. Esta técnica utiliza el plásmido entero que contiene el gen de interés a estudiar. Se diseñan 2 primers 100% complementarios entre (una forward y otro reverse). Estos primers contienen la mutación deseada a insertar. Luego se realiza una PCR de cadenas largas, que basicamente utiliza una polimerasa diferente a la Taq (cual y por qué?).

Luego el producto de la PCR se digiere con una enzima de restricción que en su sitio de corte tiene un nucleotido metilado (DpnI “GATC” con la A metilada). De esta forma el plásmido original es digerido (porque viene de la bacteria y está metilado) pero no el que proviene de la PCR (reacción in vitro) luego se transforma y el 99% de las colonias que crezcan tendrán el plásmido conteniendo la mutación.

Mutagénesis aleatoria

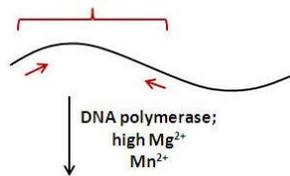
Originalmente, las mutaciones se introdujeron en los genes (o más bien en los organismos) por irradiación o mutagénesis química (por ejemplo, en los experimentos de Morgan *Drosophila*). Si bien estos métodos de mutagénesis química o física son bastante robustos para introducir mutaciones en los genes, son de naturaleza altamente peligrosa y, por lo tanto, no completamente deseables. Se pueden usar otros métodos no peligrosos para generar mutaciones aleatorias en genes, incluyendo PCR propensa a errores, primers degenerados o cepas bacterianas mutantes (como la cepa *E. coli* XL1red que es defectuosa en la reparación de su ADN). Proteínas para que la tasa de mutación sea alrededor de 5000 veces mayor que la WT) entre muchas otras.

La PCR propensa a errores simplemente se basa en el hecho de que la Taq pueden incorporar nucleótidos incorrectos en presencia de altos niveles de Mg^{+2} junto con Mn^{+2} .

A

error-prone PCR

target region for random mutagenesis

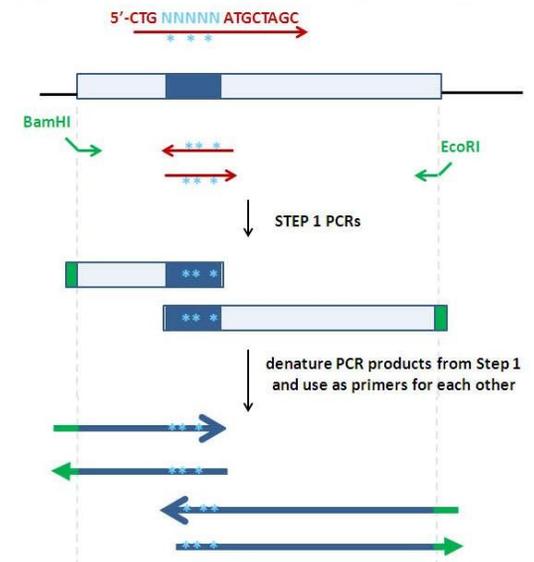


transform into bacteria to generate mutant library

Figura 5.4. (a) la PCR propensa a errores simplemente se basa en la pérdida de especificidad de la Taq en presencia de altas cantidades de iones de Mg^{+2} o Mn^{+2} . (b) la mutagénesis aleatoria sitio-dirigida se basa esencialmente en el mismo principio que la mutagénesis sitio-dirigida, con la única diferencia de usar primers degenerados en la región de destino. Se crea una secuencia degenerada en ciertos residuos (N, para cualquier nucleótido, en la figura 5.4b) para introducir mutaciones relativamente aleatorias en esos residuos. Se generan muchas mutantes por lo que luego son necesarios método de alto rendimiento para estudiar los efectos de la mutaciones introducidas.

B

degenerate primers introducing random mutations in target region
(only one of the degenerate mutant primer pair is shown for this example)



Evolución dirigida, ingeniería de proteínas e ingeniería enzimática.

El experimento de evolución dirigida tiene la intención breve de "evolucionar" artificialmente una proteína o una enzima, es decir, "optimizarla" para propiedades deseadas (o "dirigirlo" hacia un determinado objetivo). Existen diferentes medios para lograr este fin, aunque los más comunes incluyen mutagénesis aleatoria, y principalmente PCR propensa a errores, o el uso de una cepa altamente mutagénica. De este modo, el gen de interés se muta al azar, creando una gran biblioteca de mutantes para seleccionar el rasgo deseado bajo una presión de selección, como tolerancia a metales pesados, tolerancia a la sal, mayor afinidad al sustrato, etc. Una vez que se seleccionan los positivos, luego se amplifican los mutantes y se aísla su ADN para que la mutación resulte en rasgo deseado puede ser secuenciado e identificado.

Esto representa la primera "ronda" o "generación" de evolución dirigida: en muchos casos, múltiples rondas son necesarias para obtener un producto que sirva para el fin buscado.