

TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

- Principio 1970 → DNA molécula más difícil analizar
 - Enormemente larga
 - Químicamente monótona

- Actualmente → DNA molécula más fácil de estudiar
 - Es posible separar regiones determinadas del DNA
 - Obtenerlas en cantidades prácticamente ilimitadas
 - Determinar su secuencia de nucleótidos a una velocidad de varios cientos de nucleótidos al día.
 - Un gen puede ser alterado y transferido a células en cultivo o a la línea germinal de animales

- Impacto en la biología celular
 - Determinar las funciones de muchas proteínas
 - De sus dominios
 - Desenmarañar complejos mecanismos de regulación génica en eucariotas
 - Disponer de grandes cantidades de proteínas minoritarias

- A nivel comercial: producción a gran escala de hormonas peptídicas y vacunas a bajo coste y trabajo

Etapas principales del desarrollo de la tecnología del DNA Recombinante

1869	Miescher aisló por primera vez el DNA
1944	Avery demostró que el DNA y no la proteína contiene la información genética
1953	Watson y Crick propusieron el modelo de la doble hélice para la estructura del DNA, basados en los resultados de rayos X de Franklin y Wilkins .
1957	Kornberg descubrió la DNA polimerasa I, la enzima que ahora se utiliza para producir sondas de DNA marcadas
1961	Marmur y Doty descubrieron la renaturalización del DNA, estableciendo la especificidad y la posibilidad de las reacciones de hibridación de los ácidos nucleicos.
1962	Alber proporcionó la primera evidencia de la existencia de las nucleasas de restricción del DNA, que condujo a su posterior purificación y utilización en la caracterización de la secuencia del DNA por parte de Nathans y H. Smith
1966	Nirenberg, Ochoa y Khorana dilucidaron el código genético
1967	Geller descubrió la DNA ligasa, la enzima utilizada para unir fragmentos de DNA.
1972-1973	Se desarrollaron las técnicas de clonaje del DNA en los laboratorios de Boyer, Cohen, Berg y colaboradores, en la Universidad de Stanford y en la Universidad de California en San Francisco.
1975	Southern desarrollo la hibridación y transferencia sobre gel, para la detección de secuencias específicas de DNA
1975-1977	Sanger y Barrell y Maxam y Gilbert desarrollaron métodos rápidos de secuenciación del DNA
1981 1982	Palmiter y Brinster produjeron un ratón transgénico; Spradling y Rubin produjeron moscas del vinagre transgénicas.
1985	Mullis y colaboradores inventaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de Plomerase Chain Reaction)

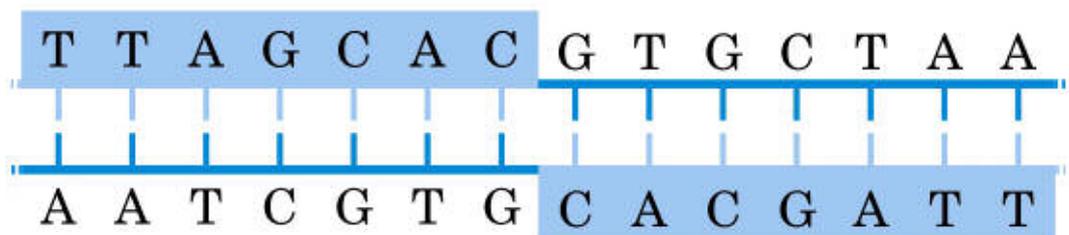
Tecnología del DNA Recombinante

Técnicas utilizadas

Utilización de nucleasas de restricción	Rotura específica del DNA, facilita enormemente el aislamiento y la manipulación de los genes individuales
Secuenciación	La secuenciación rápida de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de DNA, hace posible determinar los límites precisos de un gen y la secuencia de aminoácidos que codifica.
Hibridación de los ácidos nucleicos	Hace posible localizar secuencias determinadas de DNA o de RNA, con una gran exactitud y sensibilidad, utilizando la capacidad que tienen estas moléculas de unirse a secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos.
Clonación del DNA	Se puede conseguir que un fragmento de DNA se integre en un elemento génico autoreplicante (plásmidos, virus) que habita en una bacteria, de tal manera que de una molécula de DNA puede ser reproducida generando muchos miles de millones de copias idénticas.
Ingeniería génica	Se pueden alterar secuencias de DNA produciendo versiones modificadas de los genes, los cuales se pueden reinsertar en células u organismos.

Endonucleasas de restricción

- Los genes no son entidades independientes
 - Regiones de una molécula de DNA de gran tamaño
- Fragmentación mecánica al azar
 - Trozos pequeños
 - Un fragmento que contenga un gen aislado será uno entre cientos de miles
- Solución: **endonucleasas de restricción**
 - W. Arber, H. Smith y D. Nathans finales 60
 - Bisturíes de exquisita precisión
 - Reconocen secuencias específicas en el DNA de doble hélice
 - Cortan ambas hélices en lugares concretos
- Procedencia
 - Encontradas en gran variedad de procariotas
 - Función biológica → destruir moléculas de DNA extrañas
 - Los centros reconocibles propios están metilados
 - Reconocen secuencias específicas de 4-8 pares de bases
- Palíndromo
 - Palabra o frase que se lee igual de izquierda a derecha, que de derecha a izquierda: Radar, anilina, Dábale arroz a la zorra el abad



Enzimas utilizados en la tecnología del DNA recombinante

Enzima(s)	Función
Endonucleasa de restricción del tipo II	Romper DNA por secuencias específicas
DNA ligasa	Unir dos moléculas o fragmentos
DNA polimerasa I (<i>E. Coli</i>)	Rellenar los huecos de DNA dúplex mediante adición escalonada de nucleótidos en el extremo 3'
Transcriptasa inversa	Hacer una copia de DNA a partir de una molécula de RNA
Polinucleótido quinasa	Añadir un grupo fosfato al grupo OH del extremo 5' de un polinucleótido para marcarlo o para permitirle la ligación
Transferasa terminal	Añadir colas homopoliméricas al grupo OH del extremo 3' de un dúplex lineal
Exonucleasa III	Eliminar residuos nucleotídicos del extremo 3' de una hebra de DNA
Exonucleasa del bacteriófago λ	Eliminar nucleótidos del extremo 5' de un dúplex para exponer los extremos 3' monohebra
Fosfatasa alcalina	Eliminar fosfatos terminales de extremos 5' o 3', o de ambos

➤ Más de 90 enzimas de restricción purificadas y caracterizadas
➤ Nombre → abreviatura tres letras que se refiere al organismo, seguida de un número romano

➤ EcoRI → *Escherichia coli*

➤ HindIII → *Haemophilus influenzae*

➤ HaeIII → *Haemophilus aegyptius*

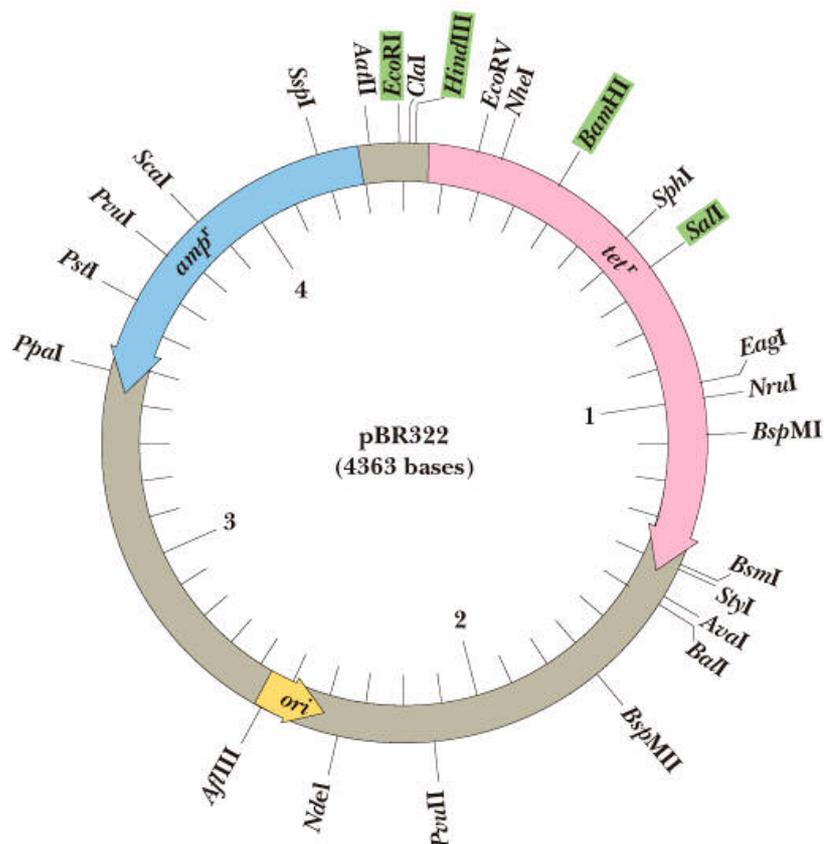
➤ Fragmentos de restricción → Fragmentos de DNA generados por una determinada enzima de restricción

➤ Mapa de restricción

➤ Tratamiento de una molécula de DNA con diferentes nucleasas de restricción

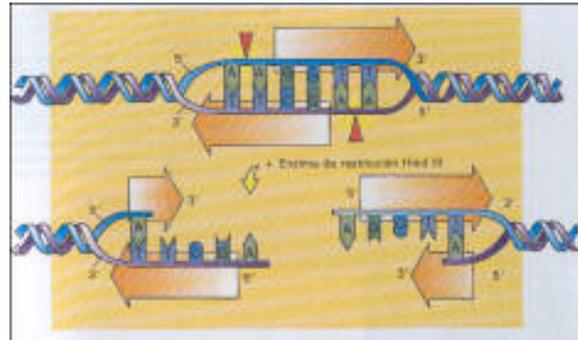
➤ Comparando los tamaños de los fragmentos de restricción de una región determinada

➤ Refleja la disposición de secuencias de nucleótidos específicas



Endonucleasas de restricción tipo II

Cortan el DNA en secuencias de bases palindrómicas

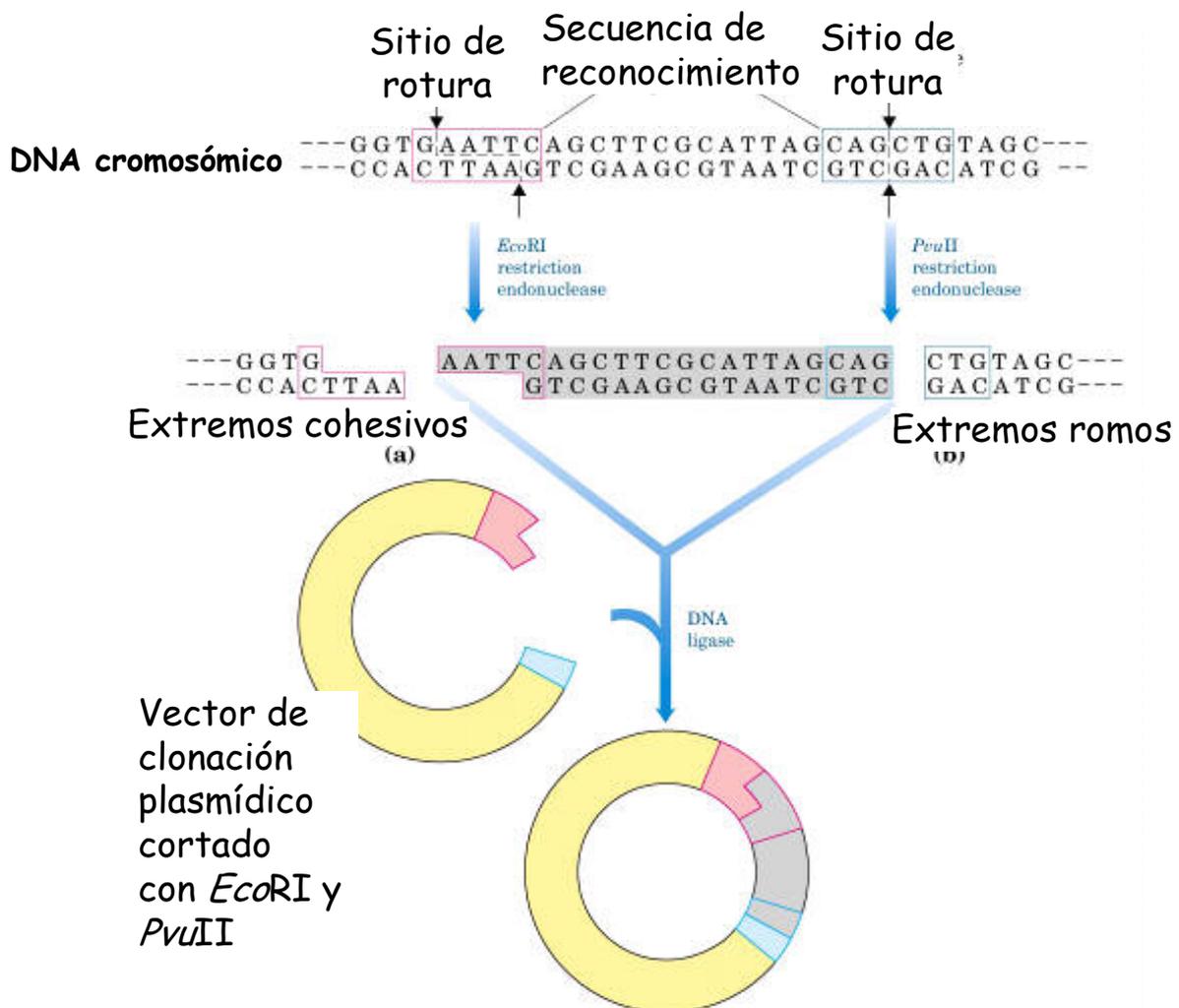


Secuencias de reconocimiento para algunas endonucleasas de restricción tipo II

<i>Bam</i> HI	<pre> ↓ (5') GGATCC (3') CCTAGG * ↑ </pre>	<i>Hind</i> III	<pre> (5') AAGCTT (3') TTCGAA ↑ </pre>
<i>Cla</i> I	<pre> ↓ (5') ATCGAT (3') TAGCTA * ↑ </pre>	<i>Not</i> I	<pre> ↓ (5') GCGGCCGC (3') CGCCGGCG ↑ </pre>
<i>Eco</i> RI	<pre> ↓ (5') GAATTC (3') CTTAAG * ↑ </pre>	<i>Pst</i> I	<pre> ↓ (5') CTGCAG (3') GACGTC ↑* </pre>
<i>Eco</i> RV	<pre> ↓ (5') GATATC (3') CTATAG ↑ </pre>	<i>Pvu</i> II	<pre> ↓ (5') CAGCTG (3') GTCGAC ↑ </pre>
<i>Hae</i> III	<pre> ↓* (5') GGCC (3') CCGG *↑ </pre>	<i>Tth</i> 111I	<pre> ↓ (5') GACNNGTC (3') CTGNNCAG ↑ </pre>

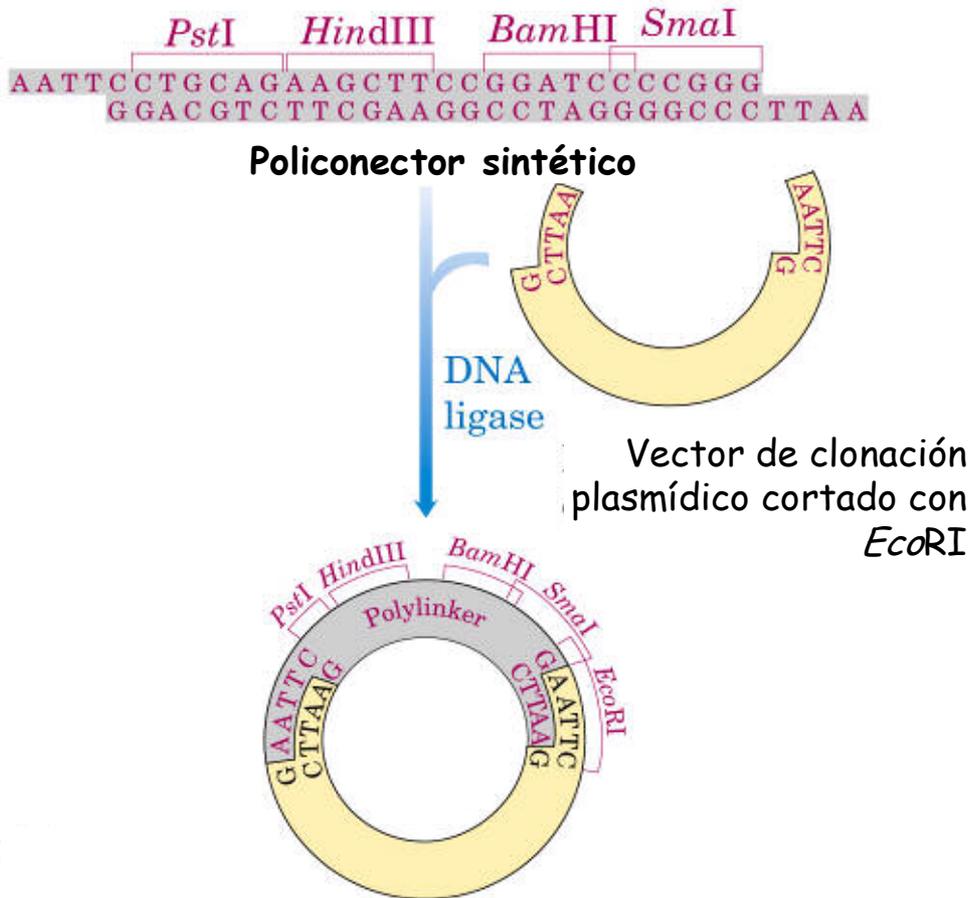
- Flechas: enlaces fosfodiéster hidrolizados por cada endonucleasa de restricción.
- Asteriscos: las bases que están metiladas por la correspondiente metilasa (si se conoce).
- N representa cualquier base.

Rotura de moléculas de DNA en fragmentos reproducibles mediante endonucleasas de restricción



- Los enzimas de restricción sólo reconocen y cortan secuencias específicas.
- Generan extremos cohesivos (con monocadenas) o extremos romos.
- La rotura del DNA produce una serie característica de fragmentos, y estos se pueden ligar a otros DNA, como el vector de clonación cortado (plásmido).
- La reacción de ligación está facilitada por el apareamiento de extremos cohesivos complementarios, y los fragmentos de DNA con extremos cohesivos diferentes (no complementarios) no suelen ligarse.

Policonector

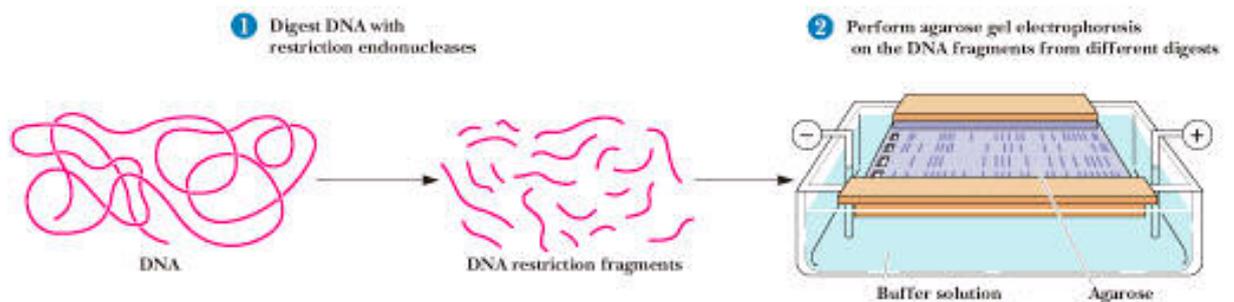


➤ **Conector** → Fragmento de DNA sintético que contiene la secuencia de reconocimiento para una endonucleasa de restricción.

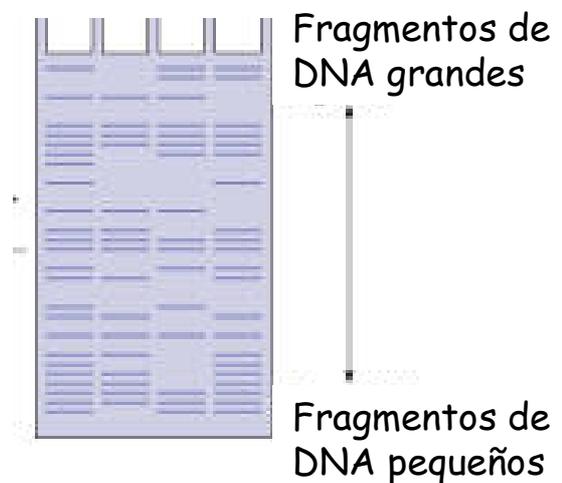
➤ **Policonector** → Fragmento sintético que contiene secuencias dianas para varias endonucleasas de restricción.

Separación de DNA de diferentes tamaños

- Electroforesis en gel
 - Poliacrilamida → fragmentos menores de 500 pb
 - Diluciones diluidas agarosa
 - Electroforesis en gel de campo pulsante
- Visualización
 - Colorante bromuro de etidio
 - Marcaje radiactivo (^{32}P) antes de electroforesis



Tinción con bromuro de etidio que emite fluorescencia cuando se ilumina con luz ultravioleta



Secuenciación del DNA

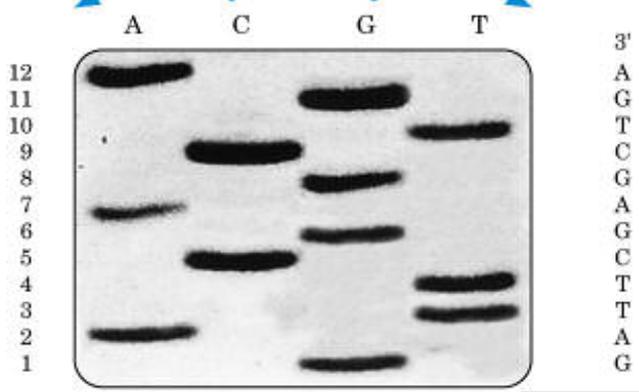
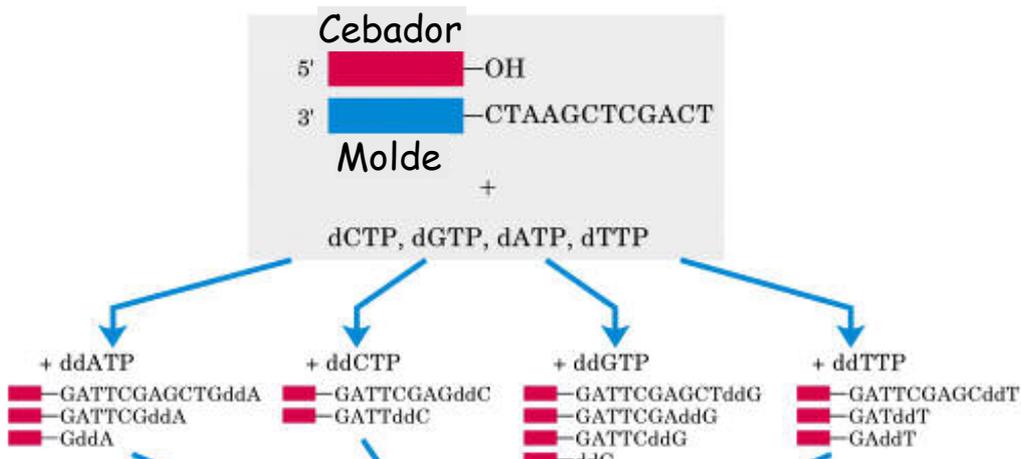
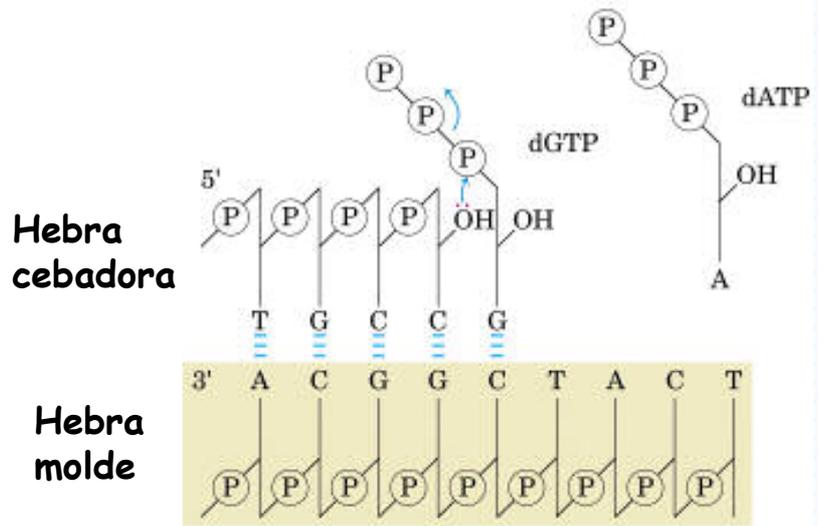
- Determinación de la secuencia exacta de un ácido nucleico
 - A. Maxam y W. Gilber → Por hidrólisis química específica
 - Hebra de DNA marcada en el extremo 5' con ^{32}P

5'- ^{32}P -GCTACGTA-3'

Ruptura en A:	^{32}P -GCT ^{32}P -GCTACGT
Ruptura en G:	^{32}P -GCTAC
Ruptura en C:	^{32}P -G ^{32}P -GCTA
Ruptura en T:	^{32}P -GC ^{32}P -GCTACG

- Autoradiograma → muestra un conjunto de bandas sobre el cual se puede leer directamente la secuencia
- Método del didesoxi de Sanger → Por interrupción controlada de la replicación
 - Se copia una secuencia de DNA de una hebra utilizando la DNA polimerasa I
 - Cebador complementario
 - Medio contiene
 - Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (marcados)
 - Los análogos 2',3'-didesoxi → carecen del grupo hidroxilo en 3' → no se forma enlace fosfodiéster
 - Fragmentos distinta longitud con análogos didesoxi extremo 3'

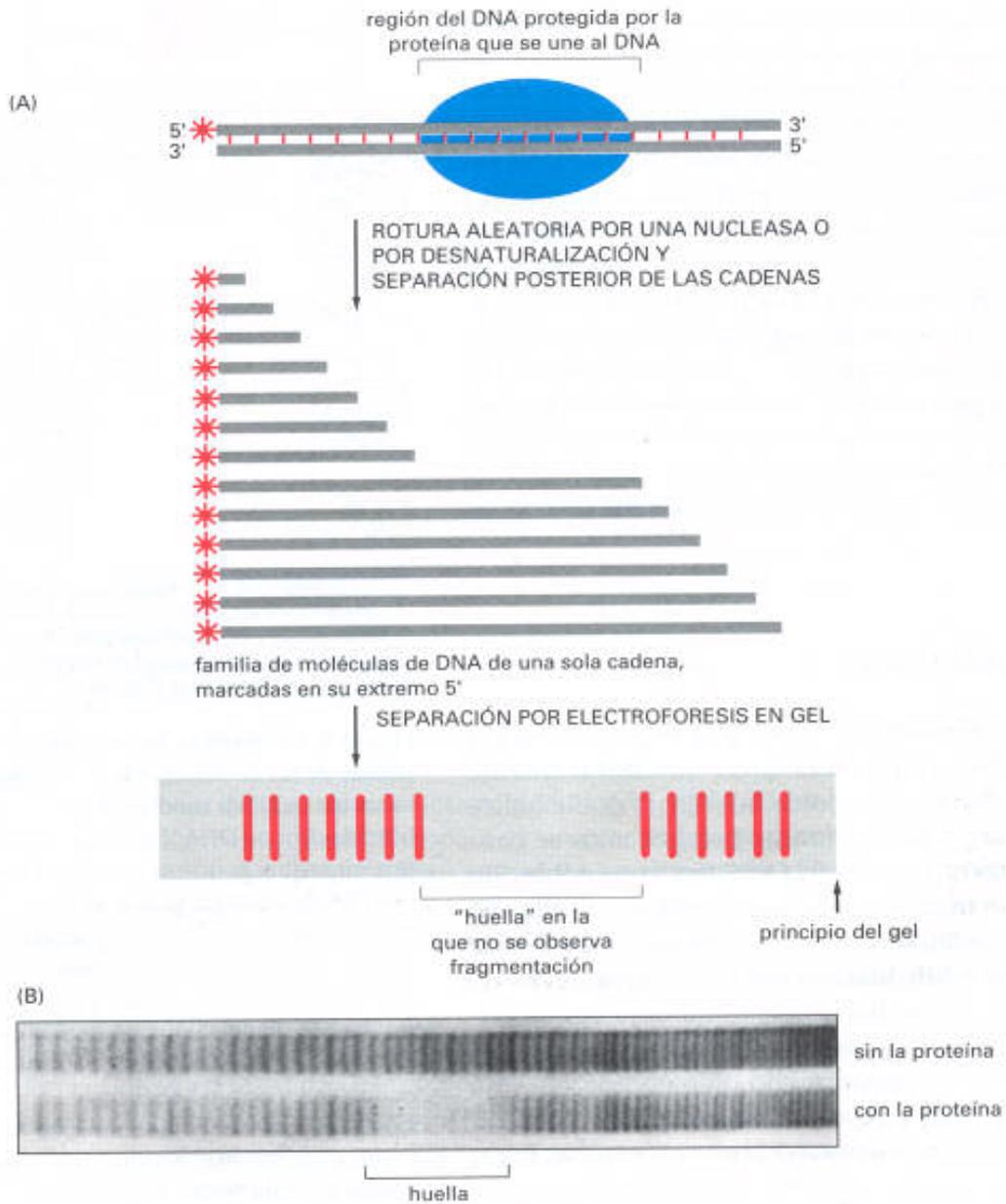
Secuenciación DNA método Sanger



Autoradiograma del gel de electroforesis

Secuencia de la hebra complementaria

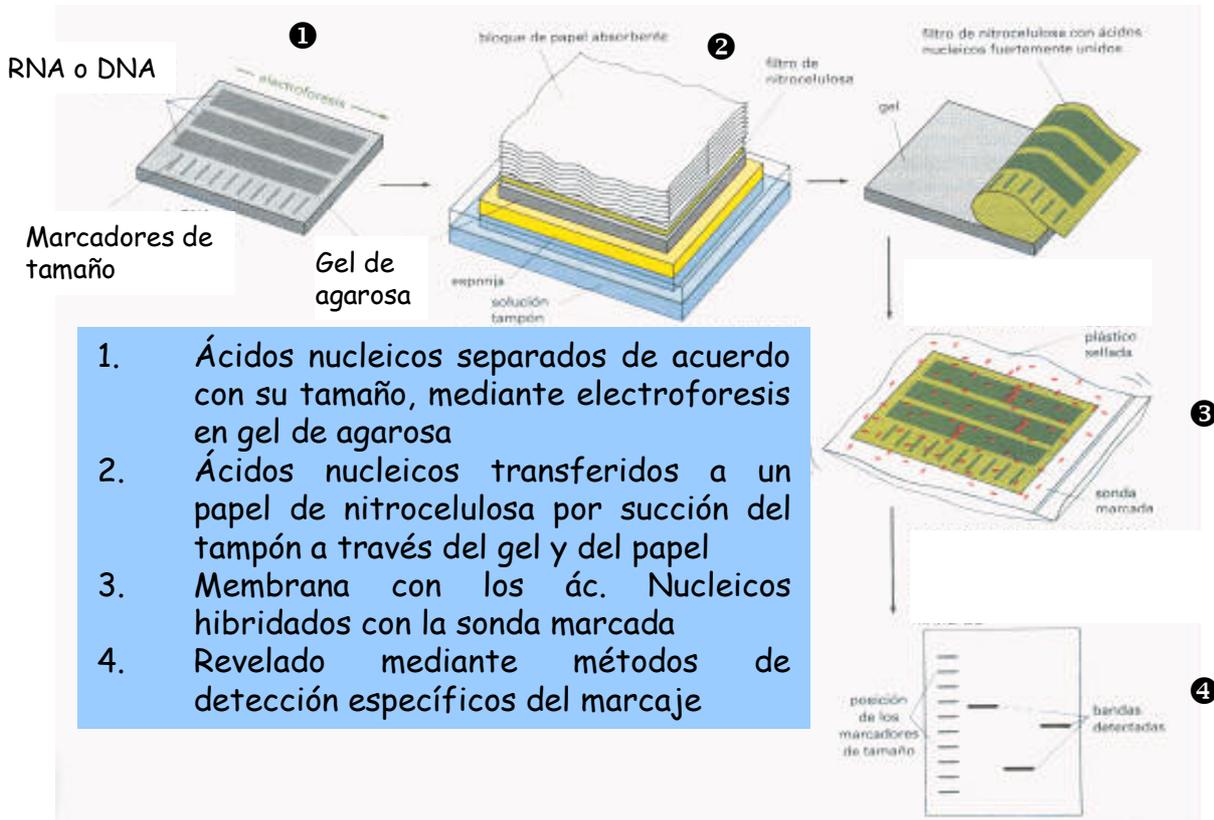
Técnicas de las huellas de DNA (DNA footprinting)



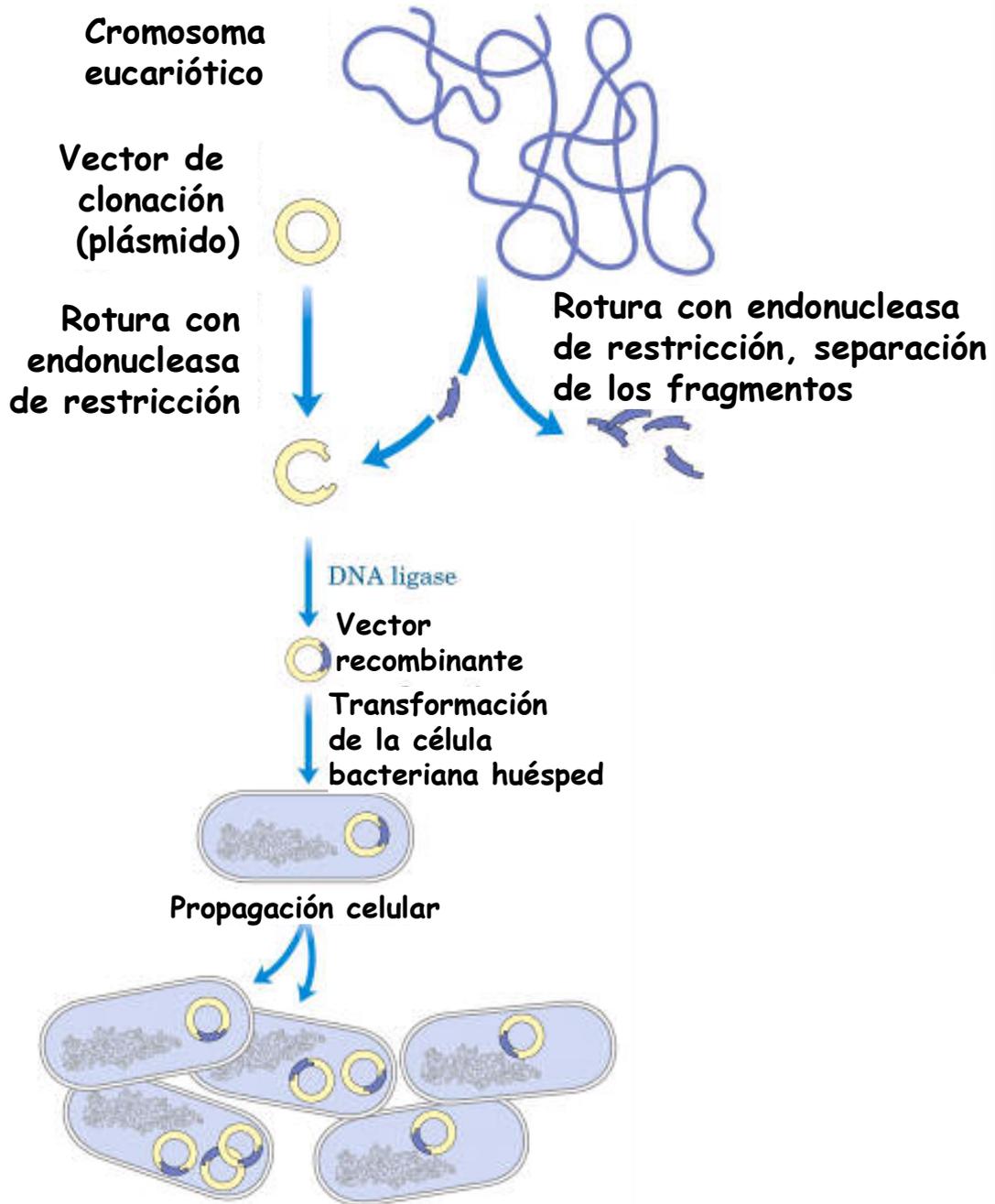
Hibridación de ácidos nucleicos



Northern y Southern



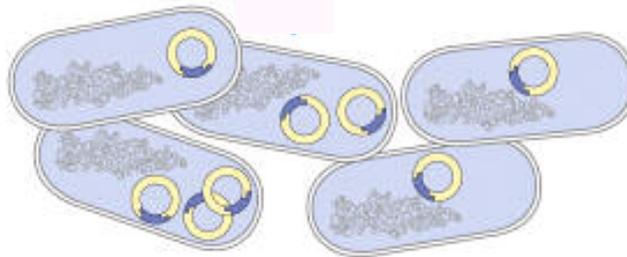
Clonación de DNA



Tipos de vectores de clonación utilizados en *E. coli*

Tipo de vector	Método de introducción en <i>E. coli</i>	Método de propagación	Tamaño del fragmento de DNA que se puede clonar
Plásmidos: modificados por técnicas de DNA recombinante	Transformación; las células se vuelven competentes para incorporar el plásmido recombinante; una vez transformadas, las células se seleccionan mediante un marcador seleccionable	Replicación del plásmido	Hasta 15.000 pb
Bacteriófago λ	Infección con fagos; posterior al empaquetamiento in vitro del vector recombinante en partículas de fago	Replicación del fago	Hasta 23.000 pb
Cósmidos, contruidos a partir de los plásmidos y de genes de λ	Cualquiera de los métodos anteriores, dependiendo del tamaño del fragmento del DNA insertado; los fragmentos largos necesitan el empaquetamiento en λ in vitro	Replicación a modo de plásmido	Hasta 45.000 pb

➤ **Plásmidos** → Moléculas de DNA circular que se replican aparte del cromosoma bacteriano



➤ Tamaño entre 5.000 y 400.000 pares de base

➤ **Transformación** → Proceso por el cual se introduce un plásmido en la célula bacteriana.

➤ Incubación células y plásmidos a 0°C en solución de $CaCl_2$.

➤ Choque térmico (37-45°C)

➤ **Plásmido seleccionable** → Plásmido que contenga un gen que la célula huésped necesite para crecer bajo ciertas condiciones.

➤ El gen es generalmente el de resistencia a un antibiótico → Sólo aquellas células que hayan sido transformadas por el plásmido serán resistentes al antibiótico y podrá crecer en presencia del mismo.

➤ **Características importantes de un vector de clonación plasmídico**

➤ Necesita un origen de replicación → propagar el plásmido y mantenerlo a nivel de 10 a 20 copias por célula.

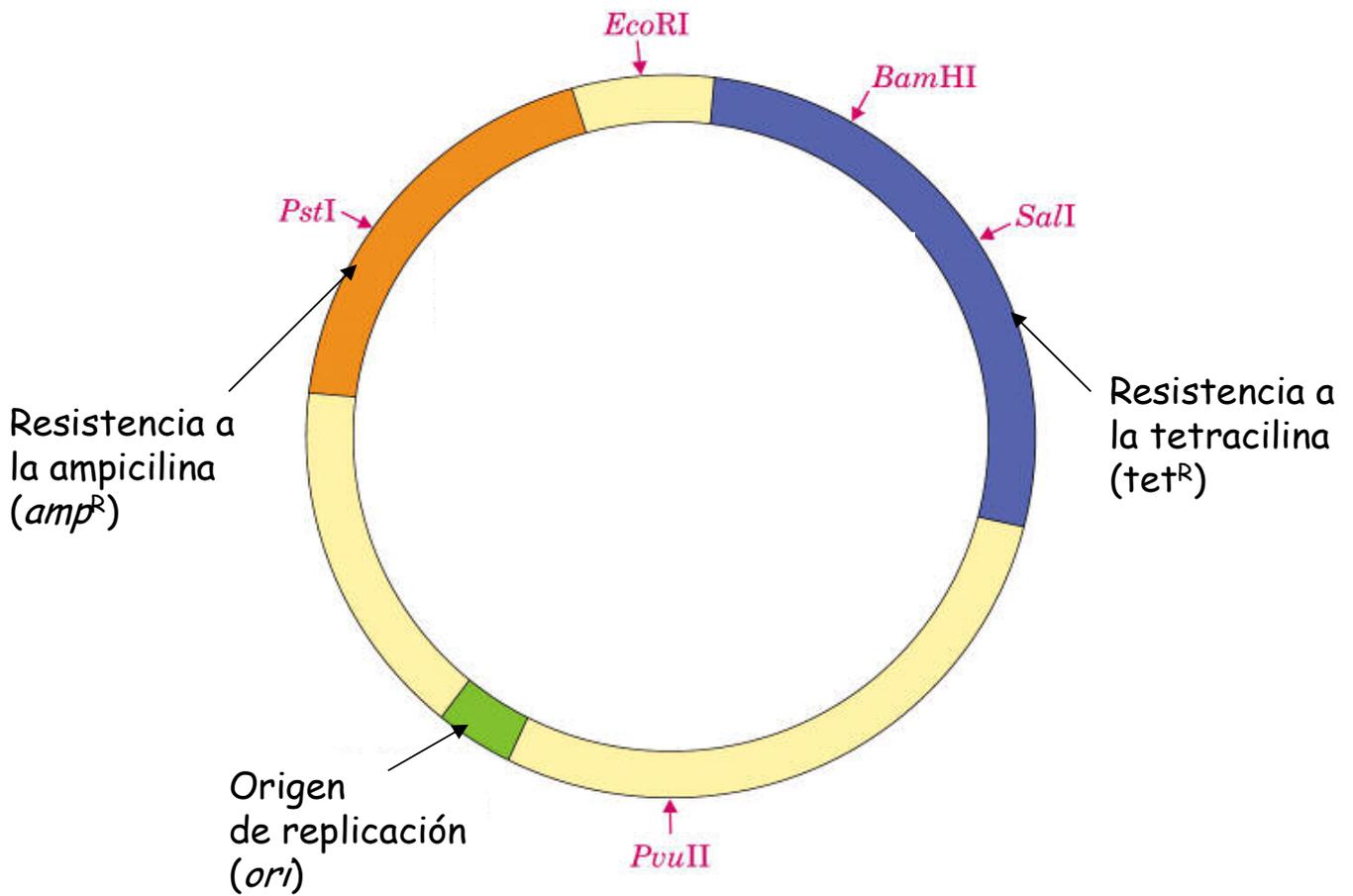
➤ Genes que confiere resistencia a antibióticos → permite la selección

➤ Varias secuencias únicas de reconocimientos para diferentes endonucleasas de restricción → generar sitios por donde se puede insertar las secuencias foráneas de DNA

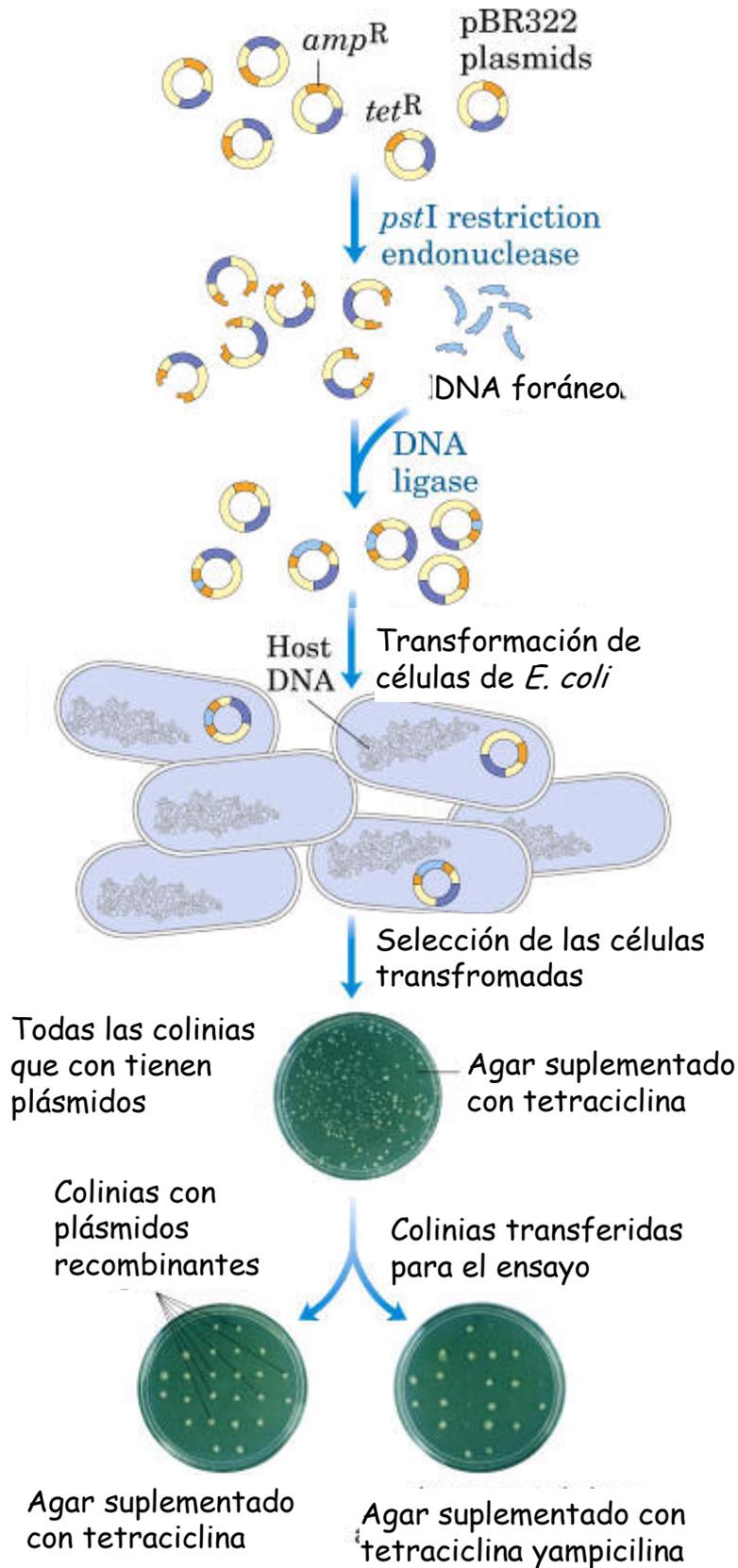
➤ Tamaño global pequeño → facilita la entrada del plásmido en la célula

Plásmido pBR322

- Algunos sitios de restricción importantes
- Genes de resistencia a antibióticos
- El origen de replicación (*ori*).



Clonación de un DNA foráneo en *E. coli* con pBR322



➤ **Bacteriófago λ**

- Permite clonar segmentos de DNA más largos
- Características del genoma del fago:
 - Alrededor de un tercio del genoma no es esencial → permite reemplazarlo por DNA foráneo.
 - El DNA se empaqueta en partículas de fago sólo cuando tenga un tamaño entre 40.000 y 50.000 pares de base.

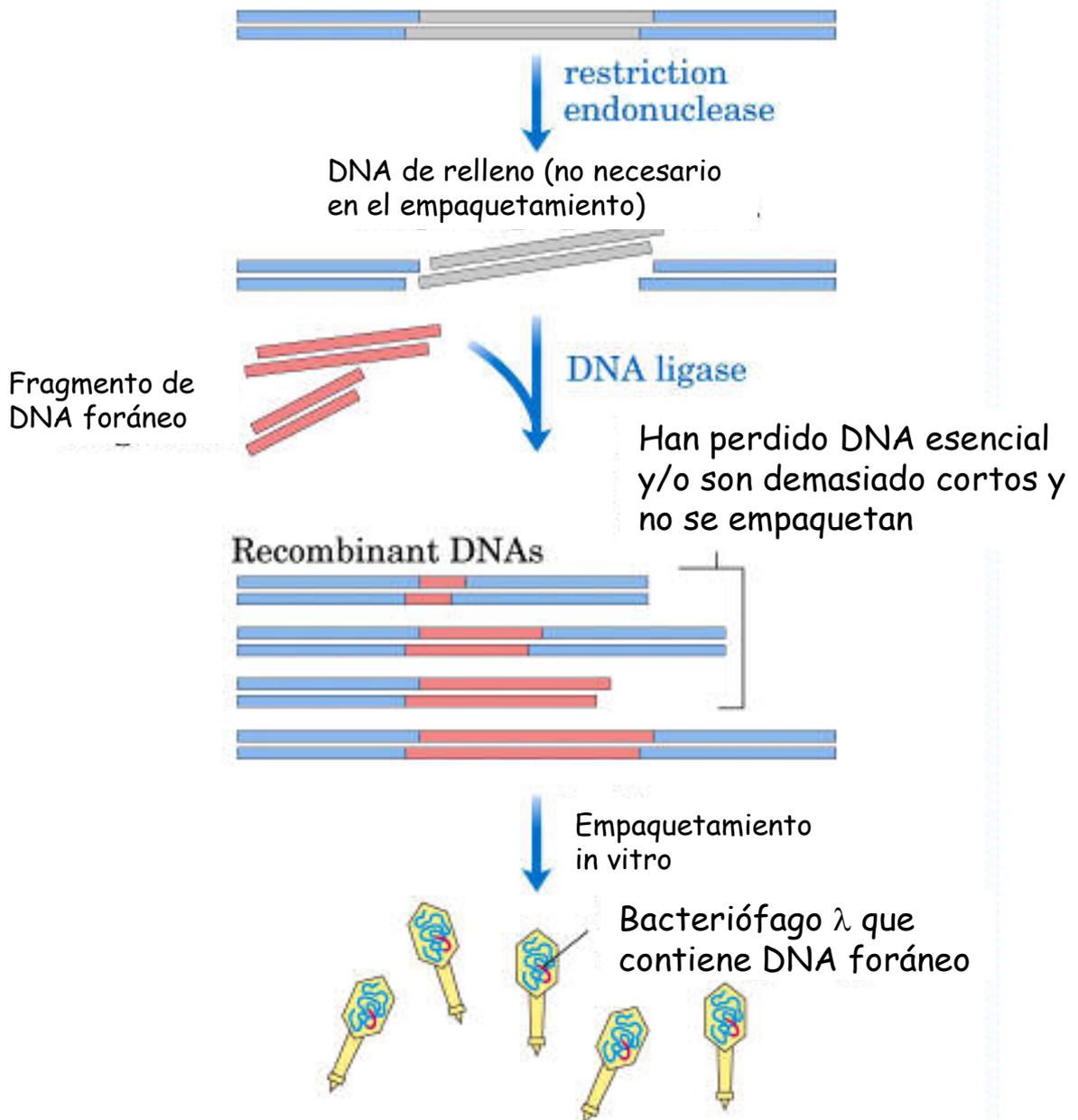
➤ **Empaquetamiento in vitro** → Cuando los fragmentos de DNA foráneo de tamaño adecuado se han ligado a los fragmentos del fago → DNA recombinante se empaqueta dentro de partícula de fago al añadir extracto crudo de células bacterianas (que contienen todas las proteínas necesarias para ensamblar un fago completo)

➤ **Cósmidos** → Plásmidos recombinantes que combinan características útiles de plásmidos y del bacteriófago λ .

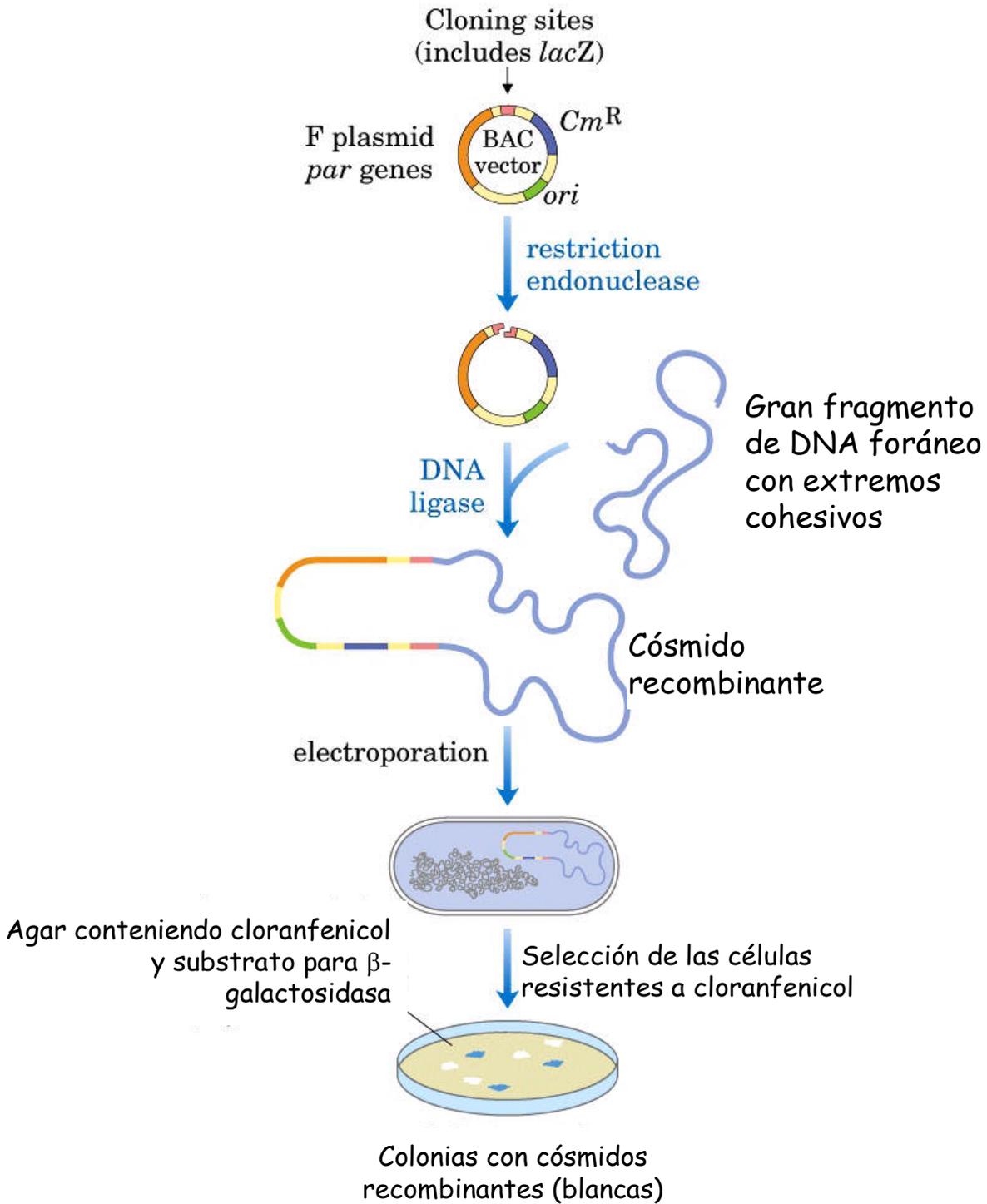
- Permite la clonación de fragmentos más largos
- Moléculas de DNA pequeñas (5.000 a 7.000 pb)
- Características:
 - Origen de replicación plasmídico
 - Uno o más marcadores seleccionables
 - Un número de sitios de restricción únicos donde se puede insertar el DNA foráneo
 - Un sitio *cos* → Una secuencia de DNA del bacteriófago λ que se necesita para el empaquetamiento.

- No contienen ningún gen más del bacteriófago
- Se propaga en *E. coli* como un plásmido

Vectores de clonación del bacteriófago λ



Clonación con cósmidos



➤ **Librería de DNA** → Una colección de los fragmentos derivados del genoma de un organismo determinado insertado, uno por uno, en un vector de clonación.

➤ Rotura del DNA purificado del vector con una enzima de restricción.

➤ DNA genómico a clonar se reduce a fragmentos de tamaño apropiado por una enzima de restricción (la misma que el vector).

➤ Separación de fragmentos (centrifugación isopícnica)

➤ Mezcla de fragmentos con el vector linearizado y ligación.

➤ Transformación de células bacterianas o empaquetamiento en partículas de fago.

➤ **Resultado** → gran población de bacteria o fagos, siendo cada uno de ellos portador de una molécula de DNA diferente.

➤ **Librería genómica** → Prácticamente todo el DNA genómico estará representado en la librería.

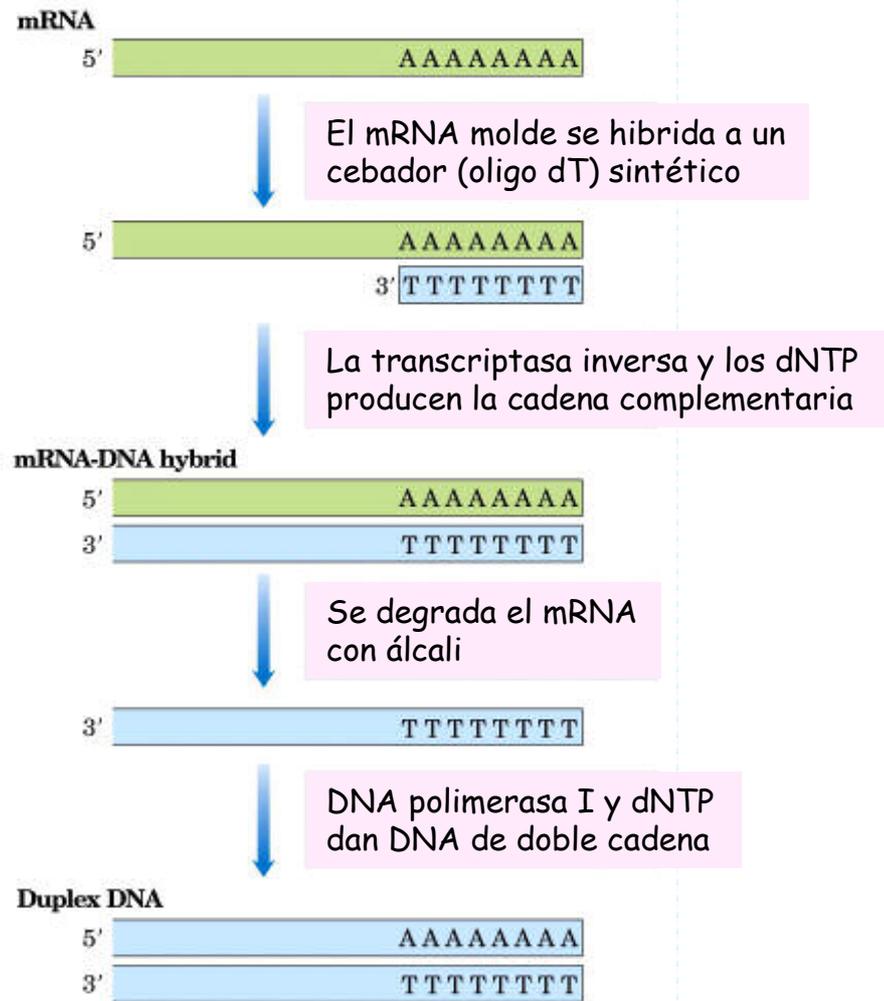
➤ **Librería de cDNA** → Librería de DNA más especializada, sólo incluye aquellos genes que están siendo *expresados* en un organismo determinado e incluso ciertos tejidos o células.

➤ Se extrae mRNA total del organismo

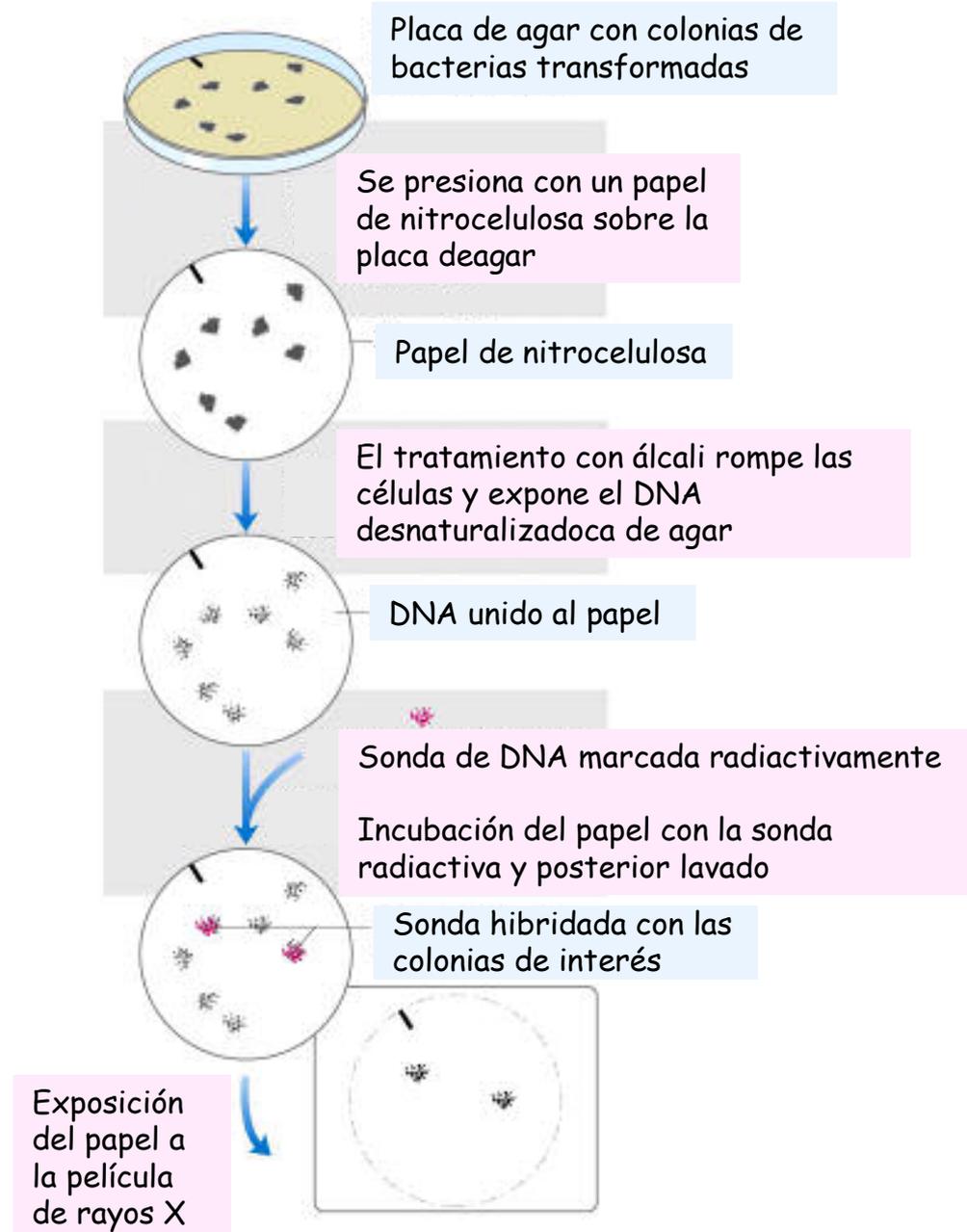
➤ Se produce **DNA complementario** (cDNA) mediante la transcriptasa inversa.

➤ Los fragmentos de doble hebra se insertan en un vector adecuado y se clonan.

Librería de cDNA



Identificación de un clon con el fragmento de DNA deseado



➤ **Amplificación de una secuencia de DNA específica**

➤ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

➤ **Cebadores:** Síntesis de dos oligonucleótidos complementarios a una una secuencia corta de una cadena del segmento de DNA deseado.

➤ Desnaturalización del segmento deseado → separación de las dos cadenas por calentamiento (95°C)

➤ Enfriar, añadir los cebadores → hibridan

➤ Añadir DNA polimerasa resistente al calor → *TaqI*

➤ Añadir los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos → replicación selectiva del segmento de DNA cebado.

➤ Repetición del proceso 25 o 30 ciclos → amplificación del segmento.

➤ Suficientemente sensible para detectar incluso una única molécula de DNA de casi cualquier muestra.

➤ Clonar fragmentos de DNA de momias

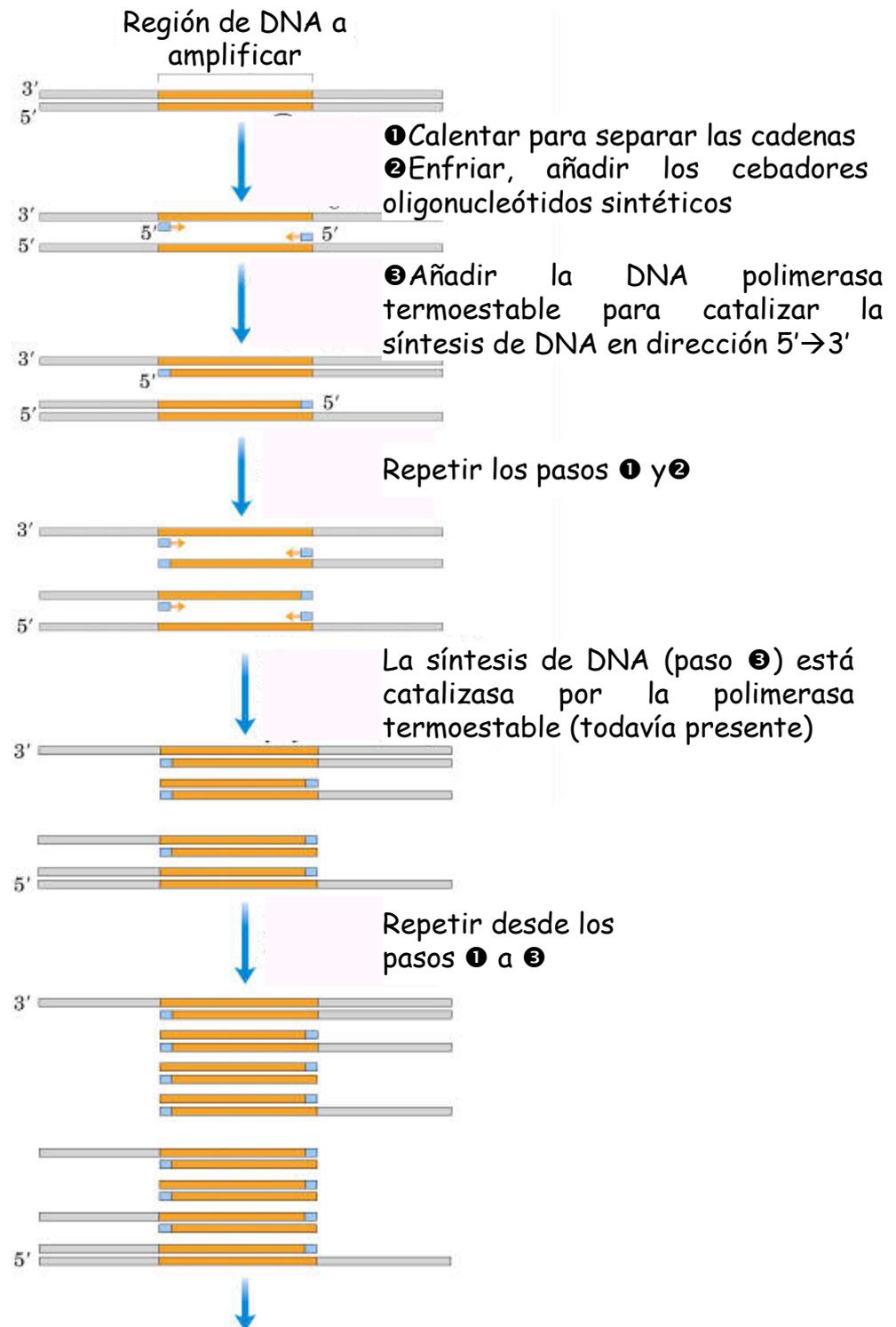
➤ Restos de animales extinguidos como el mamut lanudo

➤ Herramienta en la medicina forense

➤ Detección de infecciones víricas antes de que causen síntomas

➤ Diagnóstico prenatal de enfermedades genética

Amplificación de un fragmento de DNA mediante PCR



❶ Calentar para separar las cadenas
❷ Enfriar, añadir los cebadores oligonucleótidos sintéticos

❸ Añadir la DNA polimerasa termoestable para catalizar la síntesis de DNA en dirección 5'→3'

Repetir los pasos ❶ y ❷

La síntesis de DNA (paso ❸) está catalizada por la polimerasa termoestable (todavía presente)

Repetir desde los pasos ❶ a ❸

Después de 25 ciclos la secuencia diana se ha amplificado una 10^6 veces

➤ **Nueva arma para la medicina forense**

- Tradicionalmente → toma de huellas dactilares
- Ahora → Huella dactilar del DNA o registro o perfil del DNA

➤ **Polimorfismo de secuencias** → pequeñas diferencias secuenciales que se da entre individuos una vez cada pocos cientos de pares de bases de promedio.

➤ **Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción o RFLP** → Algunos cambios de secuencias afectan a dianas de restricción → originan diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos de DNA digeridos con un enzima de restricción, en individuos distintos.

➤ **Detección de RFLP por Southern blotting**

➤ Las secuencias de DNA genómico usadas en este test son regiones que contienen DNA repetitivo, comunes en los genomas de eucariotas.

➤ El número de unidades de repetición varía de un individuo a otro (excepto en gemelos idénticos)

➤ Usando una sonda apropiada → bandas distintas para cada individuo ensayado. Usando varias sondas → test selectivo, pudiendo indentificar un individuo entre toda una población.

➤ Necesita muestra fresca de DNA y mayor cantidad de DNA del que hay en la escena del crimen.

➤ **Aumentar la sensibilidad** → acoplado a la PCR.

➤ Huellas dactilares de DNA de:

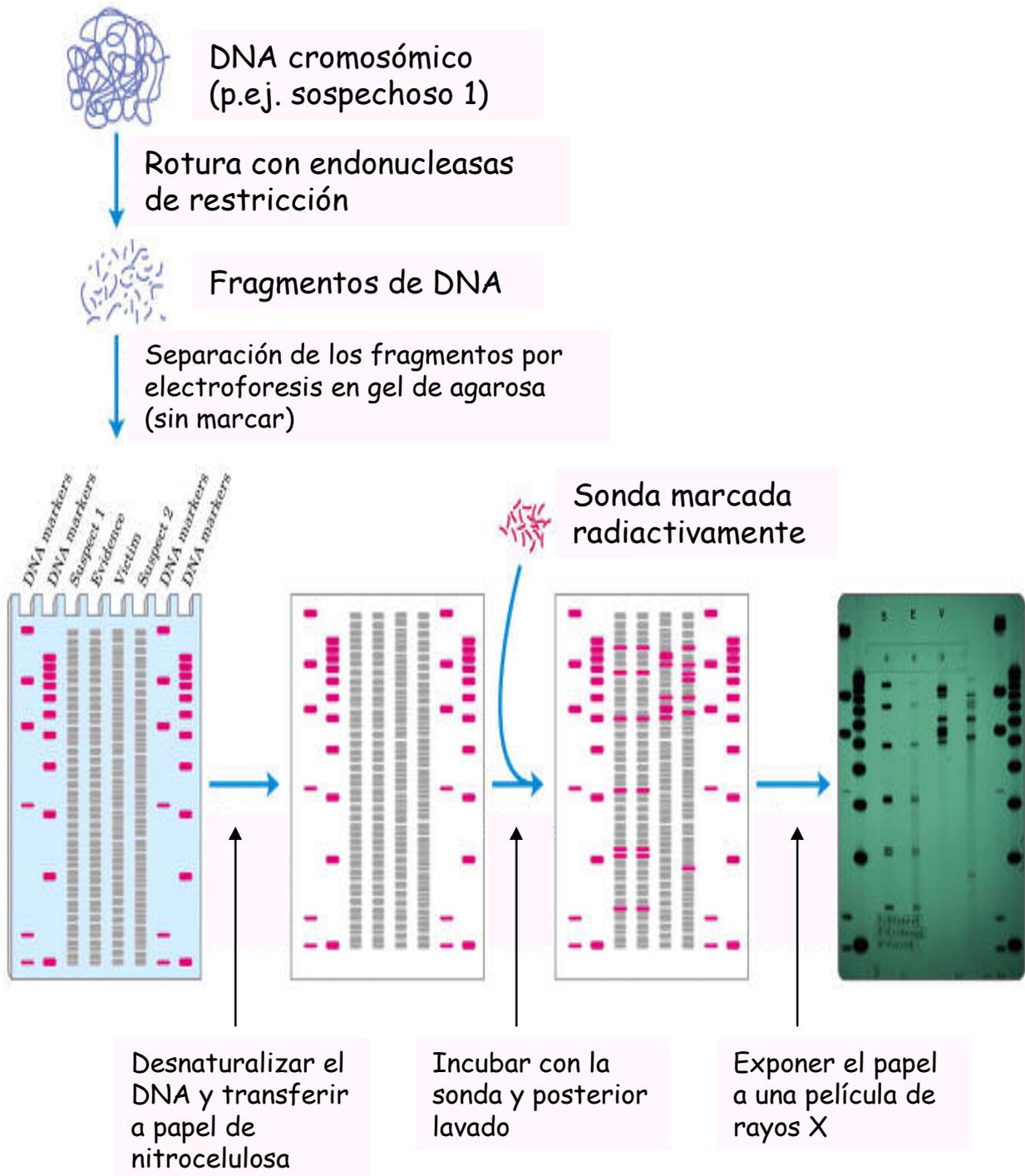
➤ Un pelo

➤ Pequeña muestra de semen

➤ Muestras de un mes e incluso años

➤ **Utilidad en construir pruebas decisivas en tribunales de todo el mundo**

Método de transferencia Southern aplicado a la determinación de la huella dactilar de DNA



Productos de la tecnología del DNA recombinante

- **Expresión de los genes clonados**
 - **Alteración de los genes clonados → Mutagénesis dirigida**
 - **Clonación en plantas mediadas por parásito bacteriano**
 - **Clonación en células animales → Terapia génica**
 - **Implicaciones de esta tecnología**
-
- **Expresión de los genes clonados:**
 - Fin de clonar un gen es obtener su producto.
 - Proteínas de gran interés para propósitos comerciales, terapéuticos e investigación.
 - **Vectores de expresión** → Vectores de clonación que contienen las señales de transcripción y transducción necesarias para regular la expresión de un gen clonado.
-
- **Mutagénesis dirigida:**
 - Alterando la secuencia de DNA de un gen clonado codificante para una proteína se puede cambiar la estructura de la misma.
 - Utilizado para investigación de estructura (plegamiento) y función de proteínas.
 - Uso comercial → fabricar proteínas con actividad incrementada o con funcionalidad en ambientes extremos de alta temperatura, disolventes orgánico o pH extremos.
-
- **Clonación en plantas mediada por parásitos bacterianos:**
 - Enorme potencial en agricultura → cosechas más productivas y abundantes, resistentes a plagas de insectos, enfermedades, frío y sequía.
 - Las plantas fértiles de algunas especies se generan a partir de una única célula transformada → el gen introducido se transfiere a generaciones sucesivas
 - Dificultad → No se ha encontrado un plásmido natural en plantas
 - *Agrobacterium tumefaciens* → bacteria que invade a la planta por las heridas

Productos de la tecnología del DNA recombinante

➤ Clonación en células animales → Terapia génica

➤ Transformación de células animales → importancia para el avance del conocimiento estructura y función genoma animales, generación de animales con caracteres nuevos.

➤ Necesita una fuente de células individuales → cultivo celular.

➤ Métodos para introducir DNA en una célula animal:

➤ **Asimilación espontánea** → Precipitación del DNA con cloruro de calcio o **electroporación** (convertir las células transitoriamente permeable al DNA por exposición a breves pulsos de voltaje).

➤ **Microinyección** → Inyección directa del DNA en el núcleo de la célula con ayuda de una aguja muy fina.

➤ **Vectores víricos** → Virus eucarióticos modificados integran a veces su DNA en el cromosoma de la célula huésped.

➤ Problemática:

➤ Inserción del DNA foráneo en el cromosoma en localizaciones al azar.

➤ Integración perjudiciales debido a que se producen en genes esenciales, rompiendo su mensaje.

➤ La expresión de un gen integrado depende de la posición de integración → La transcripción no es igual de efectiva en cualquier lugar del genoma.

➤ El tipo de célula a transformar:

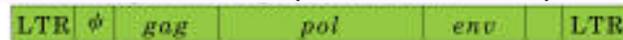
➤ **Líneas germinales** → La alteración se propaga sucesivas generaciones

➤ **Células somáticas** → La alteración afectará únicamente al animal tratado.

➤ **Animales transgénicos** → Cuando una transformación eficiente, con integración cromosómica, mediante microinyección de DNA se realiza en el núcleo de huevos de ratón fertilizados.

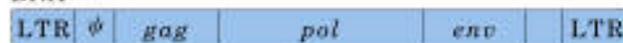
Clonación en células de mamífero con vectores retrovéricos

Genoma retroviral (RNA monohebra)



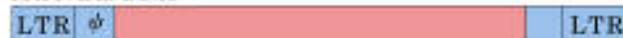
La transcriptasa inversa convierte el genoma de RNA en DNA de doble cadena

DNA

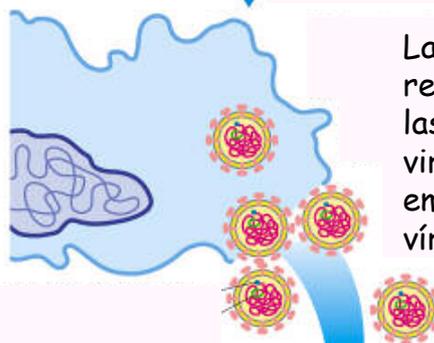


Los genes víricos se reemplazan por un gen foráneo

Recombinant defective retroviral DNA



El DNA recombinante se introduce en cultivos celulares



Las copias de RNA de virus recombinantes se producen en las células que contienen un virus coadyudante y se empaquetan en partículas víricas

Las partículas víricas recombinantes infectan una célula diana

El genoma retroviral con el gen foráneo se integra en el cromosoma de la célula diana



Productos de la tecnología del DNA recombinante



Planta de tabaco que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga

Plantas de tomate manipuladas genéticamente para ser resistentes a algunas larvas de insectos



Clonación en ratones. Ratón que se le ha introducido el gen de la hormona de crecimiento humana

Productos de la tecnología del DNA recombinante

Implicaciones de esta tecnología