

Tecnología del ADN recombinante o Ingeniería Genética

Conjunto de técnicas que permiten manipular y analizar el ADN

Aplicaciones de las técnicas del ADN recombinante

✓ **Biotecnología:**

- **Producción de proteínas recombinantes** para estudios de investigación básica y/o para su aplicación en diversos campos (producción de hormonas, anticuerpos, antivirales, vacunas, enzimas, polímeros)
 - **Obtención de organismos transgénicos** (modificados genéticamente) con propiedades útiles
 - **Aplicaciones en Medicina.** Diagnóstico de enfermedades infecciosas y genéticas. Terapia génica. Medicina forense.
- ## ✓ **Ecología microbiana.** Determinación de la biodiversidad (independiente de cultivo). Estudio de la composición y función de comunidades microbianas (**Metagenómica**)
- ## ✓ **Evolución.** Estudio de las relaciones filogenéticas entre organismos (comparación de secuencias de genes universalmente conservados. Ej. ARNr 16S y 18S)
- ## ✓ **Genómica.** Obtención y análisis de la sec. nt de genomas enteros.

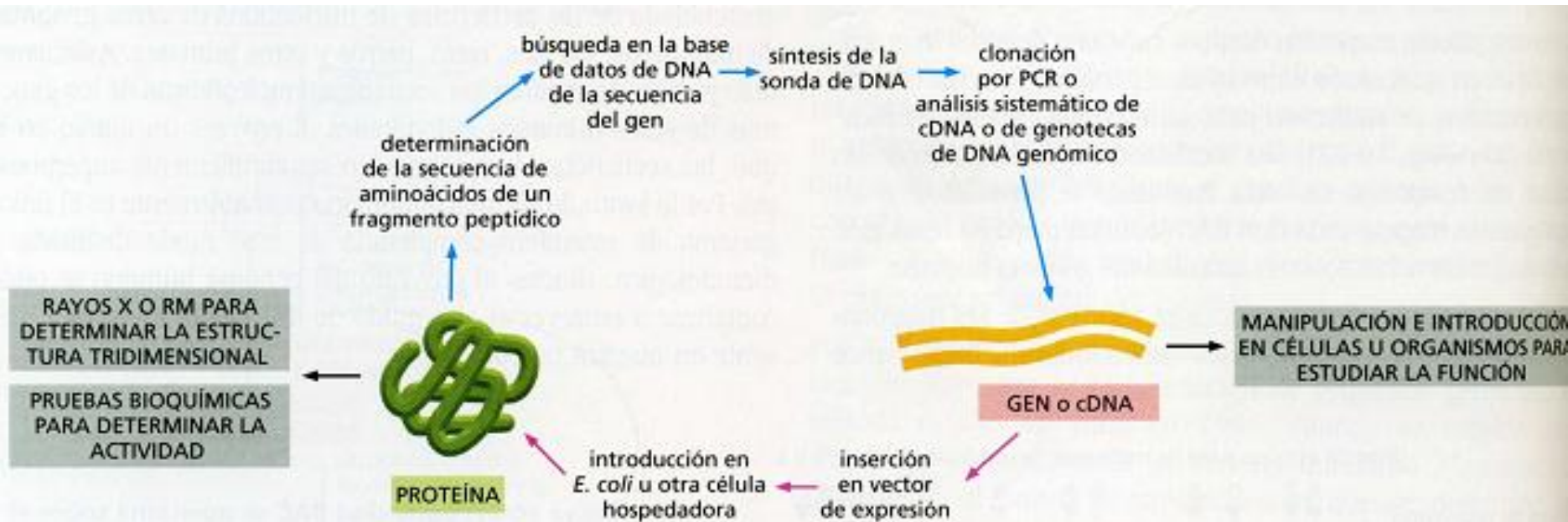
Biotecnología: producción industrial de bienes y servicios por procesos que usan organismos biológicos. Toma experiencia de la Microbiología, Bioquímica e Ingeniería Química.

Biotecnología molecular (Biot. M): manipulación de genes con el propósito de producir bienes y servicios útiles usando organismos vivos. Se basa en la aplicación de la tecnología del ADN recombinante.

Beneficios de la Biot. M :

- Diagnóstico
- Producción de organismo con propiedades útiles (plantas y animales)
- Microorganismos productores de enzimas, antibióticos, polímeros.
- Biorremediación de ambientes contaminados

Las técnicas del ADN recombinante permiten desplazarse experimentalmente desde el gen a la proteína y desde la proteína al gen



Producción de proteínas recombinantes

Pasos:

- ✓ Clonar del gen codificante de la proteína según método más apropiado
- ✓ Determinar secuencia nt
- ✓ Subclonar el gen de interés en un vector de expresión
- ✓ Transformar un organismo huésped apropiado e inducir la expresión del gen.
- ✓ Purificar la proteína y analizar sus propiedades biológicas

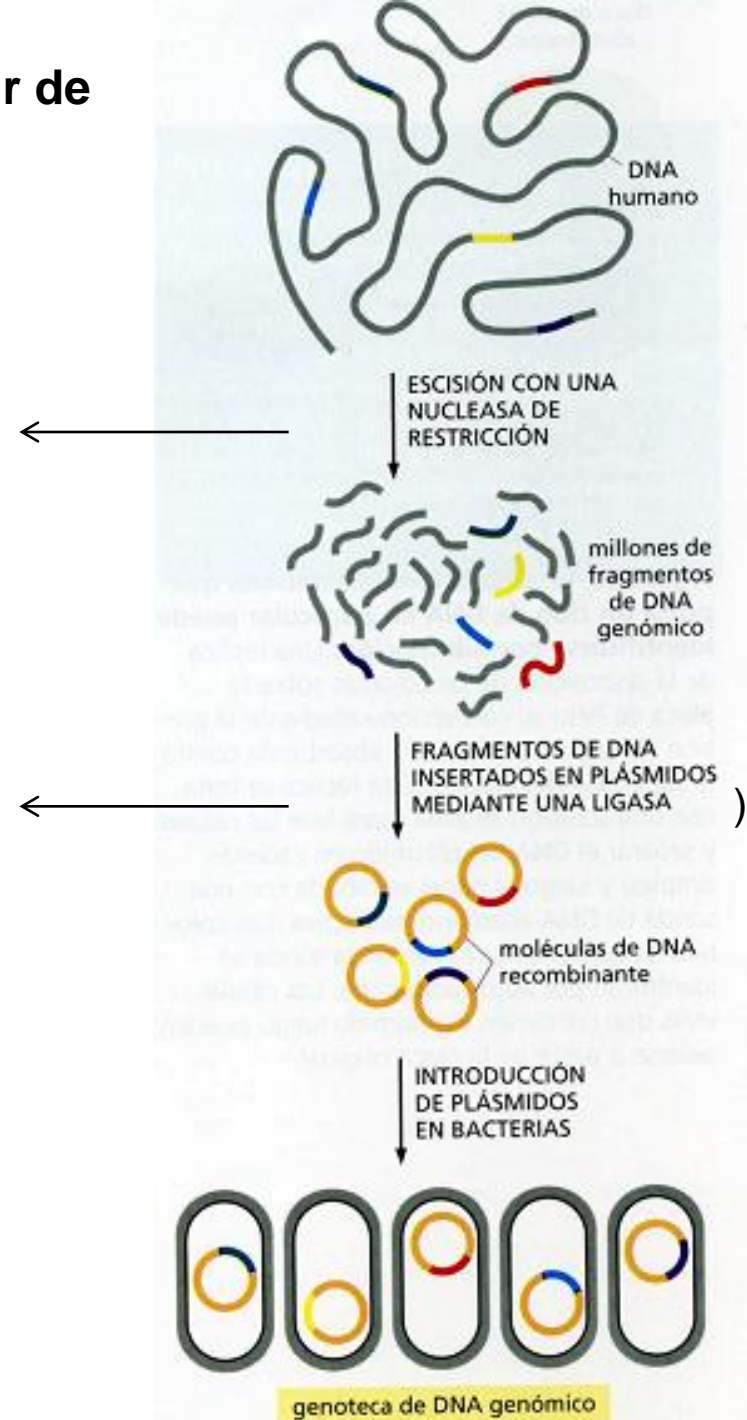
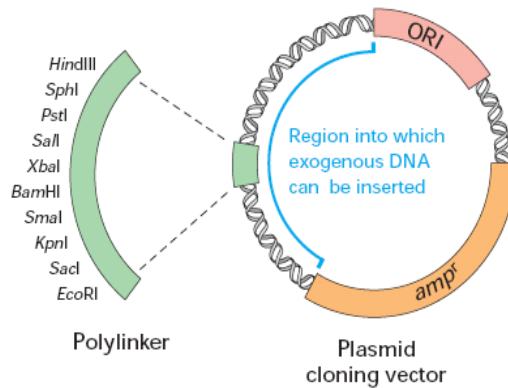
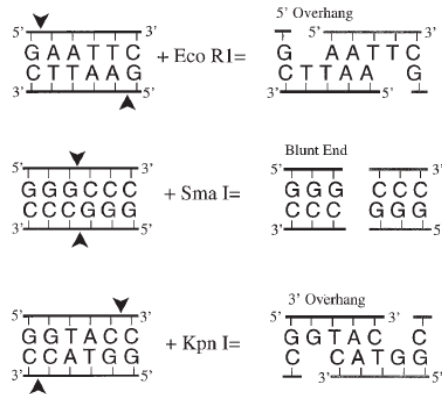
Cómo aislar un gen de un organismo?

Clonado de genes: Aislamiento y amplificación de un gen de interés para su posterior manipulación genética

Pasos:

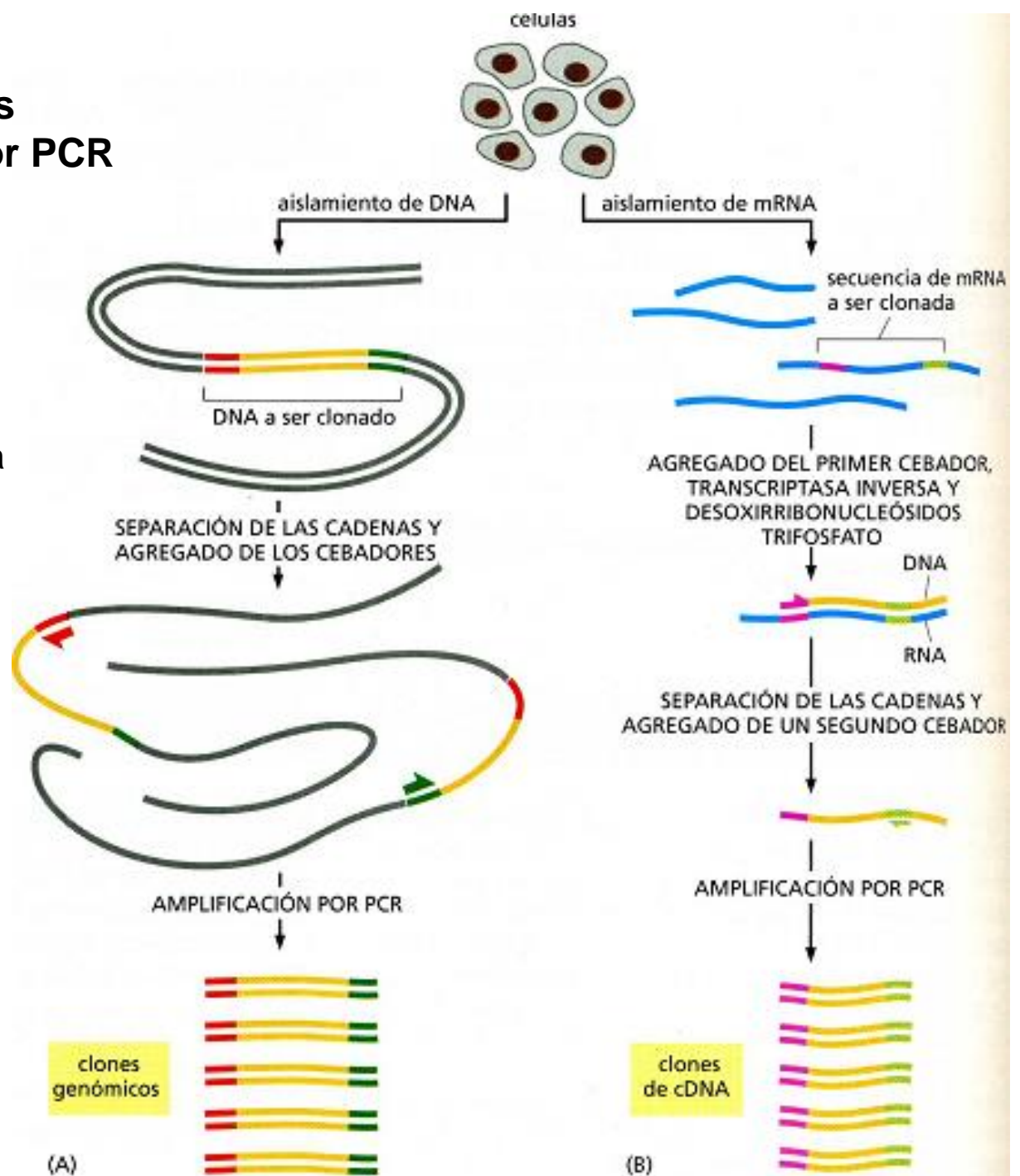
1. Aislamiento de la fuente de ADN: ADN genómico (fragmentación), ADNc o amplificación del gen por PCR.
2. Inserción en vector
3. Introducción y amplificación en organismo huésped
4. Identificación del gen de interés (hibridación con sonda de ADN, inmunodetección, análisis funcional, complementación)

Construcción de una genoteca a partir de ADN genómico



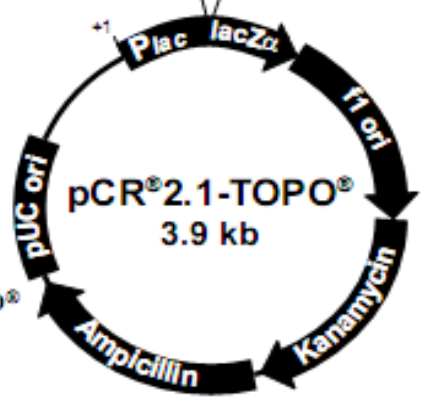
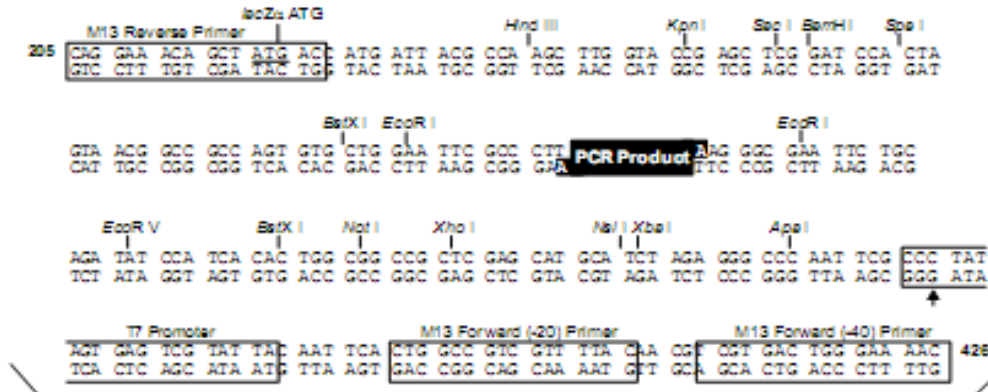
Obtención de clones genómicos o de ADNc por PCR

La técnica de PCR es útil para clonar fragmentos de ADN relativamente cortos (< 10 kbp) cuando se conoce la secuencia del gen.



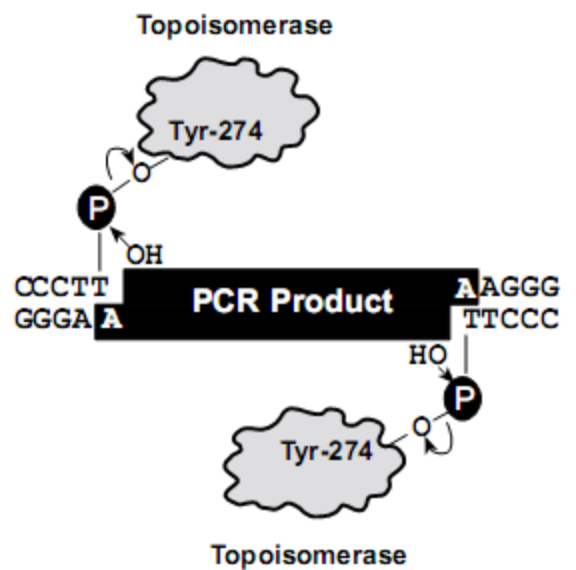
Clonado de productos de PCR: «TOPO-cloning»

Los productos de PCR generados por la *Taq* ADN polimerasa contienen deoxi-adenosina (A) simple cadena en extremo 3' debido a su actividad transferasa terminal independiente de templado. Estos se pueden ligar al vector TOPO, que contiene dT en sus extremos 3', en forma directa usando la reacción de la topoisomerasa.



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3908 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-571
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- M13 Forward (-40) priming site: bases 411-426
- f1 origin: bases 548-962
- Kanamycin resistance ORF: bases 1296-2090
- Ampicillin resistance ORF: bases 2108-2968
- pUC origin: bases 3113-3786



Capacidad de diferentes vectores de clonado

Tipo de vector	Inserto (kbp)
Plásmido	20
Fago lambda	25
Cósmido	45
P1	100
BAC	300
YAC	1000

Expresión heteróloga de proteínas recombinantes

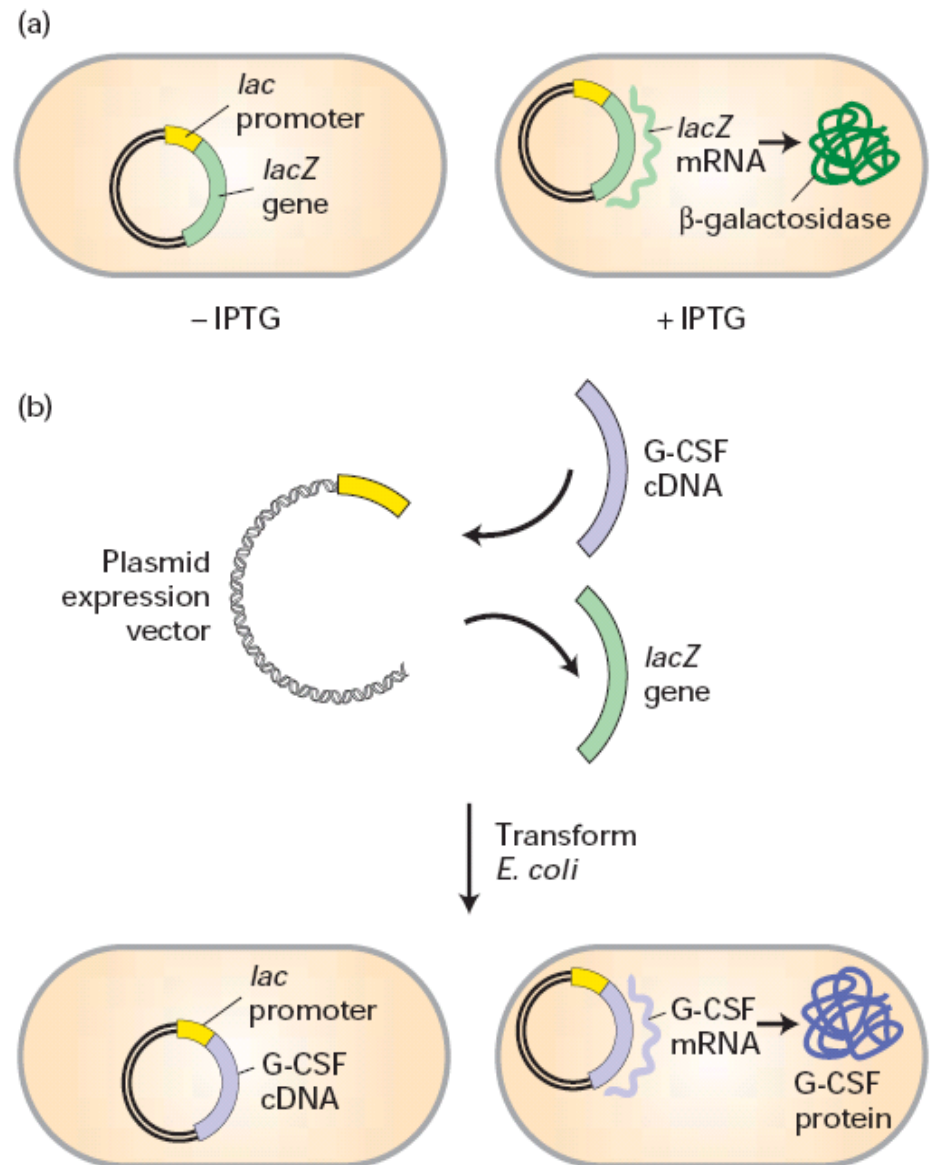
En bacterias *E. coli*

Ventajas:

- Fisiología y genética muy conocida
- Fácil manipulación en laboratorio
- Relativo bajo costo

Desventajas:

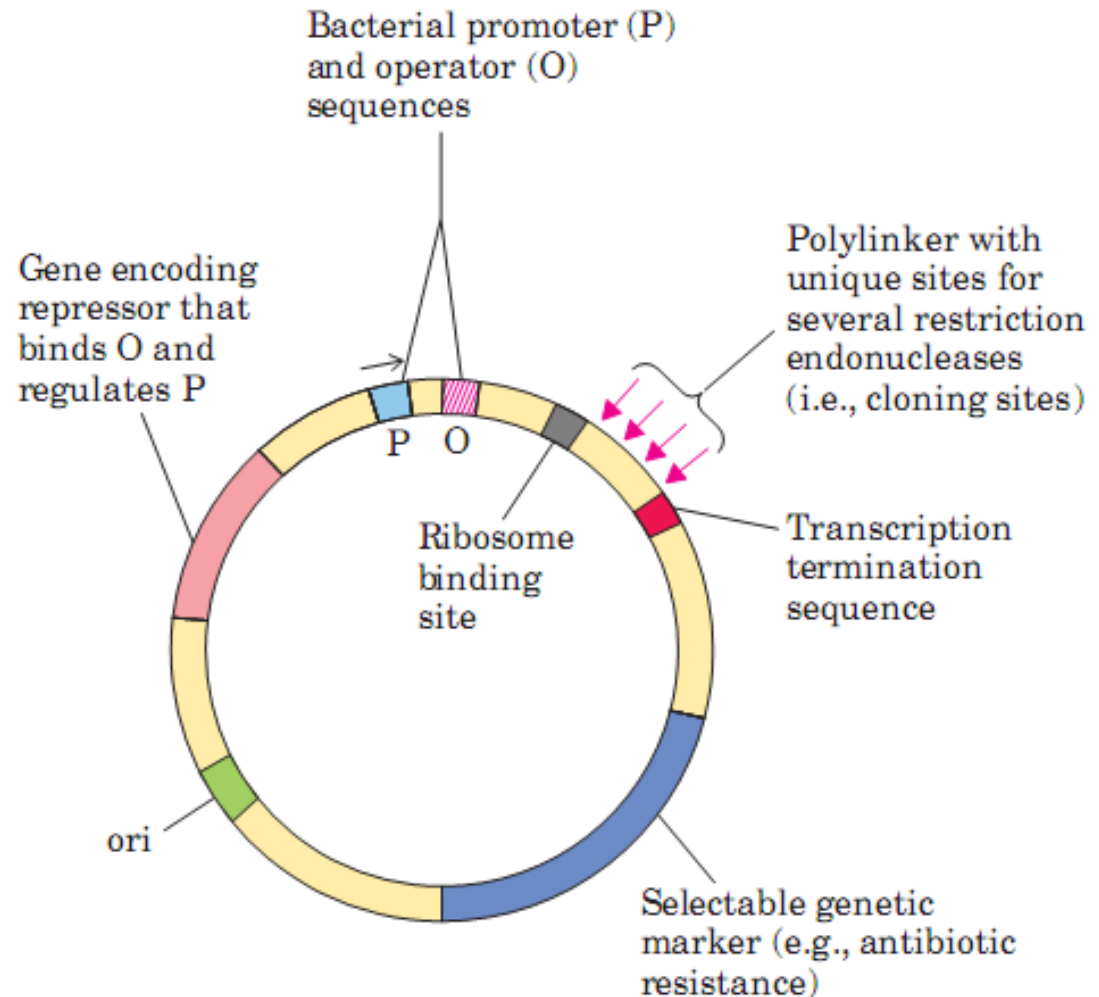
- No produce muchas de las modificaciones post-traduccionales requeridas para la expresión de proteínas de eucariotas.
- La proteína puede resultar tóxica
- La proteína mal plegada puede formar cuerpos de inclusión insolubles.



Elementos típicos de un vector de expresión bacteriano

Deben tener:

- Un **promotor fuerte** (alto nivel expresión del ARNm), generalmente **regulable** (la proteína expresada puede resultar tóxica para la bacteria)
- Un **terminador transcripcional**
- Un **sitio de unión al ribosoma** cercano al AUG iniciador



Vector de expresión en *E. coli*: pET system (Novagen)

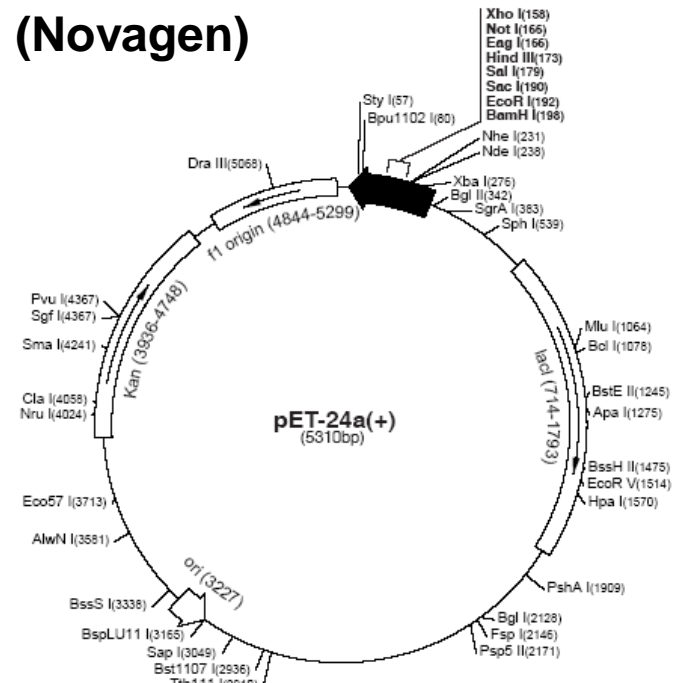
Promotor T7 y operador *lac* (región reguladora)

rbs: sitio de unión al ribosoma

Sitios múltiples de clonado dentro del gen *lacZ* (Ndel contiene codón inicio traducción **ATG**)

“His-tag”: codones para poli-histidina + codón stop (**TGA**) permite sintetizar la proteína de interés fusionada al epítipo His6, facilita purificación (x afinidad) e identificación con anticuerpos anti-His (Western blot)

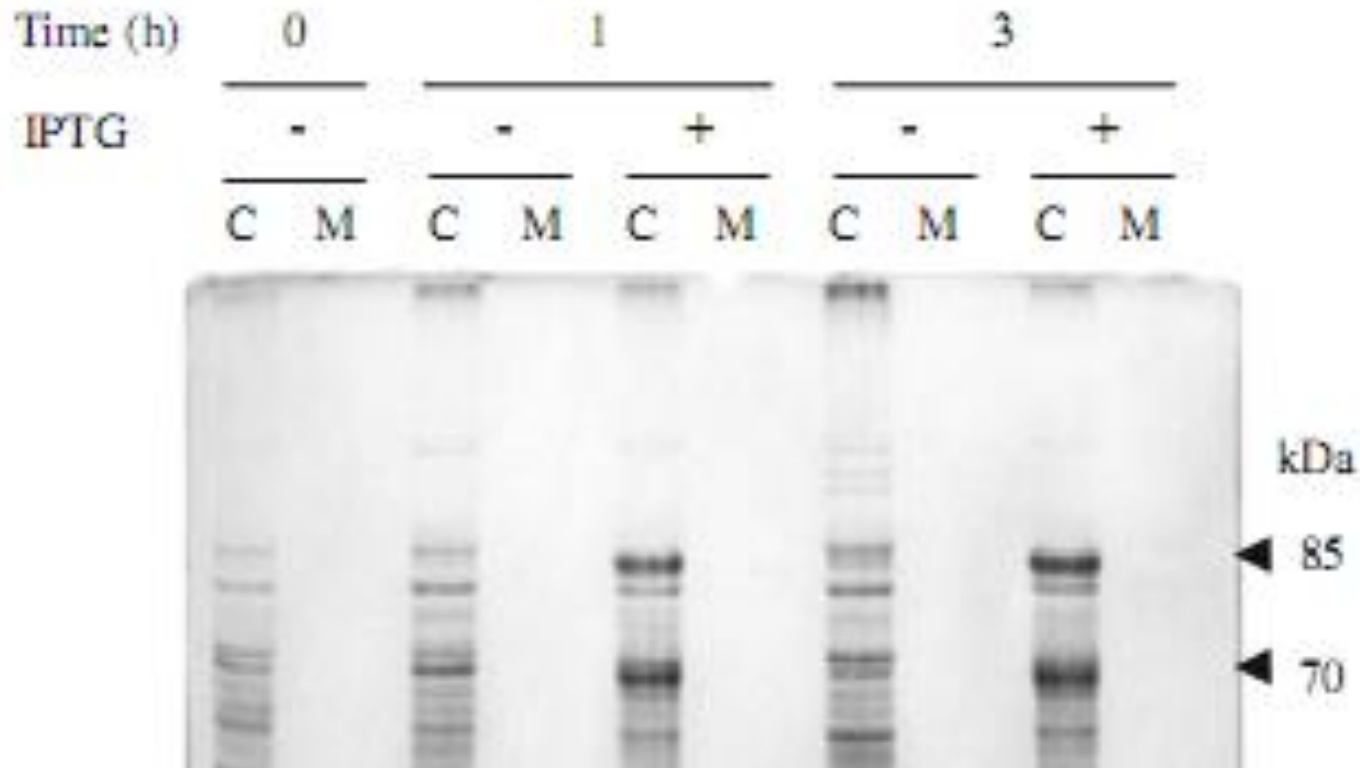
Terminador transcripcional T7



pET-24a-d(+) cloning/expression region

Análisis de la expresión de una proteína recombinante producida en *E. coli*

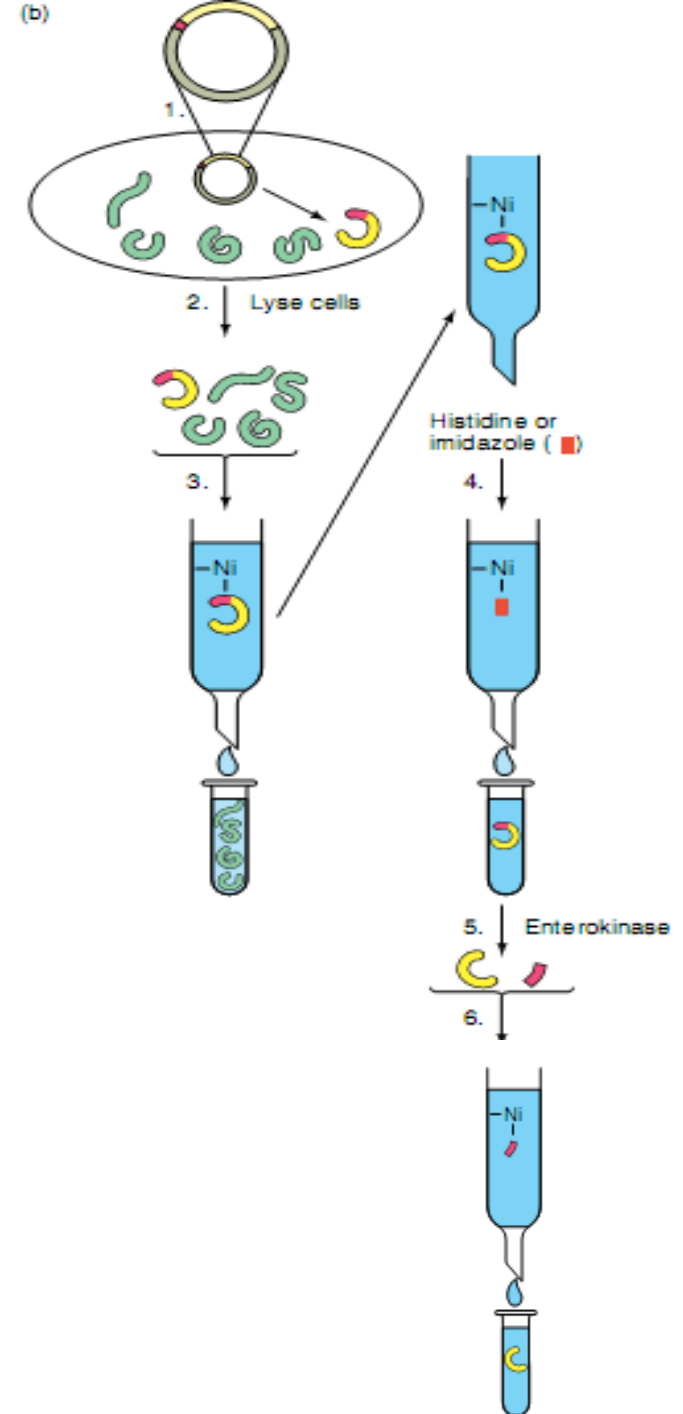
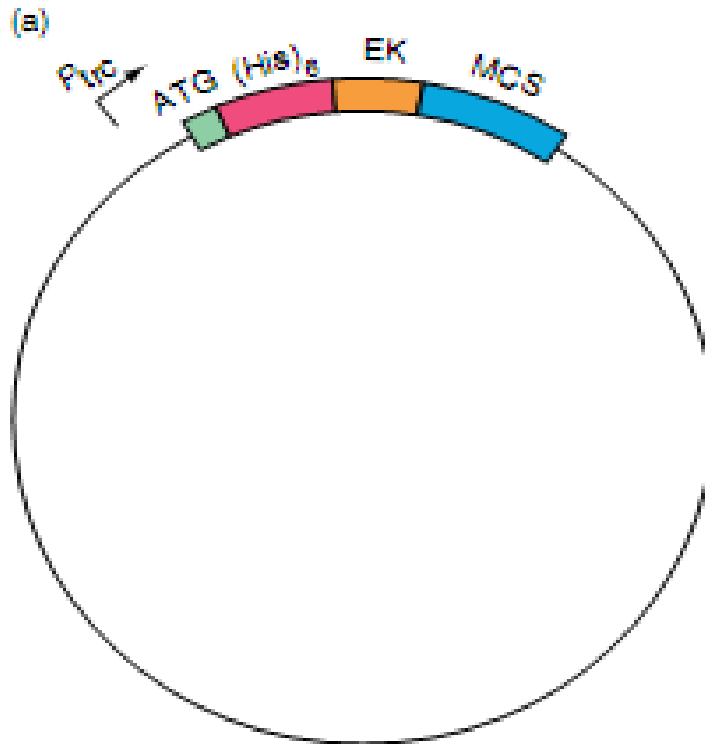
SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las proteínas celulares (C) y del medio de cultivo (M) de *E. coli* recombinante transformada con el plásmido pET-*nep*His6 que codifica para una proteasa (Nep) fusionada a cola poliHis (Nep-His6). El cultivo de la cepa bacteriana se incubó en presencia o ausencia del inductor (IPTG) diferentes tiempos



Vector de expresión que contiene 6 codones para His (poli His6) en el extremo 5' permite generar una **proteína de fusión (X-His6)** clonando el inserto en el mismo marco de lectura. Facilita la purificación e identificación de la proteína recombinante, ya que se puede purificar en columnas de afinidad con Ni^{2+} y detectar en Western blots con anticuerpos anti-His.

EK: sitio de clivaje para proteasa libera His6 de X-His6

MCS: sitio múltiple de clonado



Proteínas recombinantes aplicadas en Medicina

TABLE 9-3 Some Recombinant DNA Products in Medicine

<i>Product category</i>	<i>Examples/uses</i>
Anticoagulants	Tissue plasminogen activator (TPA); activates plasmin, an enzyme involved in dissolving clots; effective in treating heart attack patients.
Blood factors	Factor VIII; promotes clotting; it is deficient in hemophiliacs; treatment with factor VIII produced by recombinant DNA technology eliminates infection risks associated with blood transfusions.
Colony-stimulating factors	Immune system growth factors that stimulate leukocyte production; treatment of immune deficiencies and infections.
Erythropoietin	Stimulates erythrocyte production; treatment of anemia in patients with kidney disease.
Growth factors	Stimulate differentiation and growth of various cell types; promote wound healing.
Human growth hormone	Treatment of dwarfism.
Human insulin	Treatment of diabetes.
Interferons	Interfere with viral reproduction; used to treat some cancers.
Interleukins	Activate and stimulate different classes of leukocytes; possible uses in treatment of wounds, HIV infection, cancer, and immune deficiencies.
Monoclonal antibodies	Extraordinary binding specificity is used in: diagnostic tests; targeted transport of drugs, toxins, or radioactive compounds to tumors as a cancer therapy; many other applications.
Superoxide dismutase	Prevents tissue damage from reactive oxygen species when tissues briefly deprived of O ₂ during surgery suddenly have blood flow restored.
Vaccines	Proteins derived from viral coats are as effective in “priming” an immune system as is the killed virus more traditionally used for vaccines, and are safer; first developed was the vaccine for hepatitis B.

Expresión de proteínas heterólogas en células eucariotas

Pasos:

1. Clonar el gen de interés en *E. coli* usando vectores versátiles *-shuttle vectors-* (capaces de replicarse en dos huéspedes diferentes).
2. Transferir el plásmido a la célula eucariota de elección (levaduras, células animales, células de plantas)

Transfección. Amplificación de genes clonados en células animales

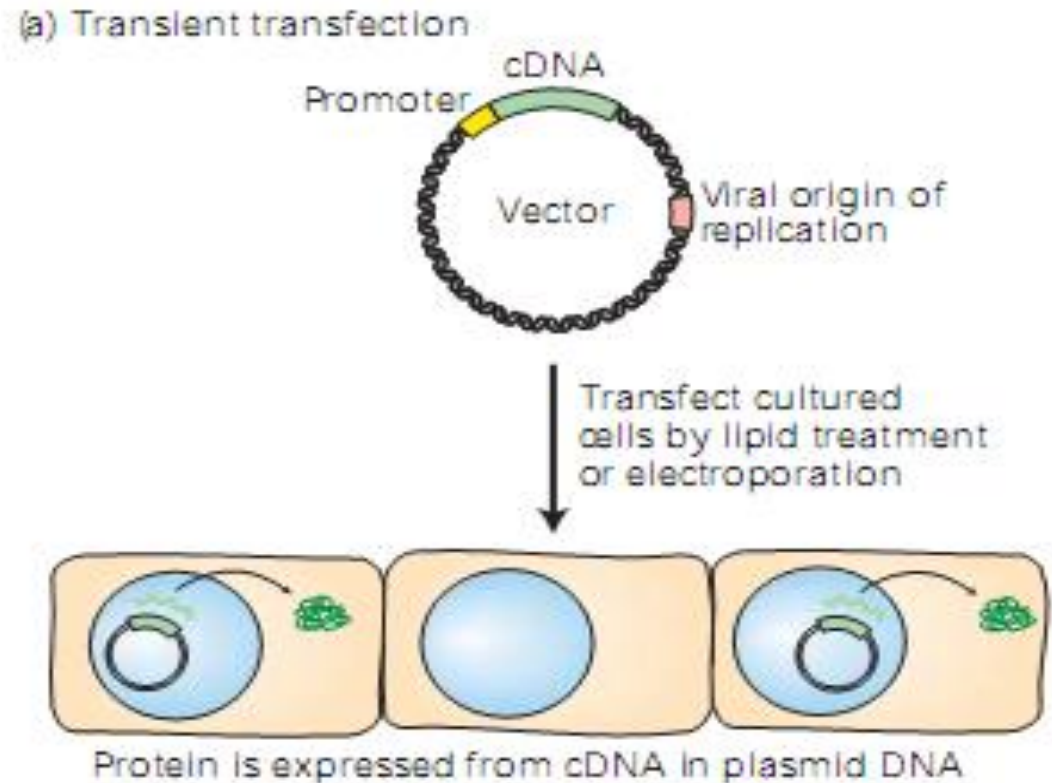
Vectores plasmídicos usados en células animales

Transfección transitoria

Durante la división celular los plásmidos no son segregados correctamente en las células hijas y con el tiempo algunas pierden el plásmido.

Para células de mamífero, el vector lleva:

- ori replicación viral
- Promotor fuerte
- ADNc clonado adyacente al promotor

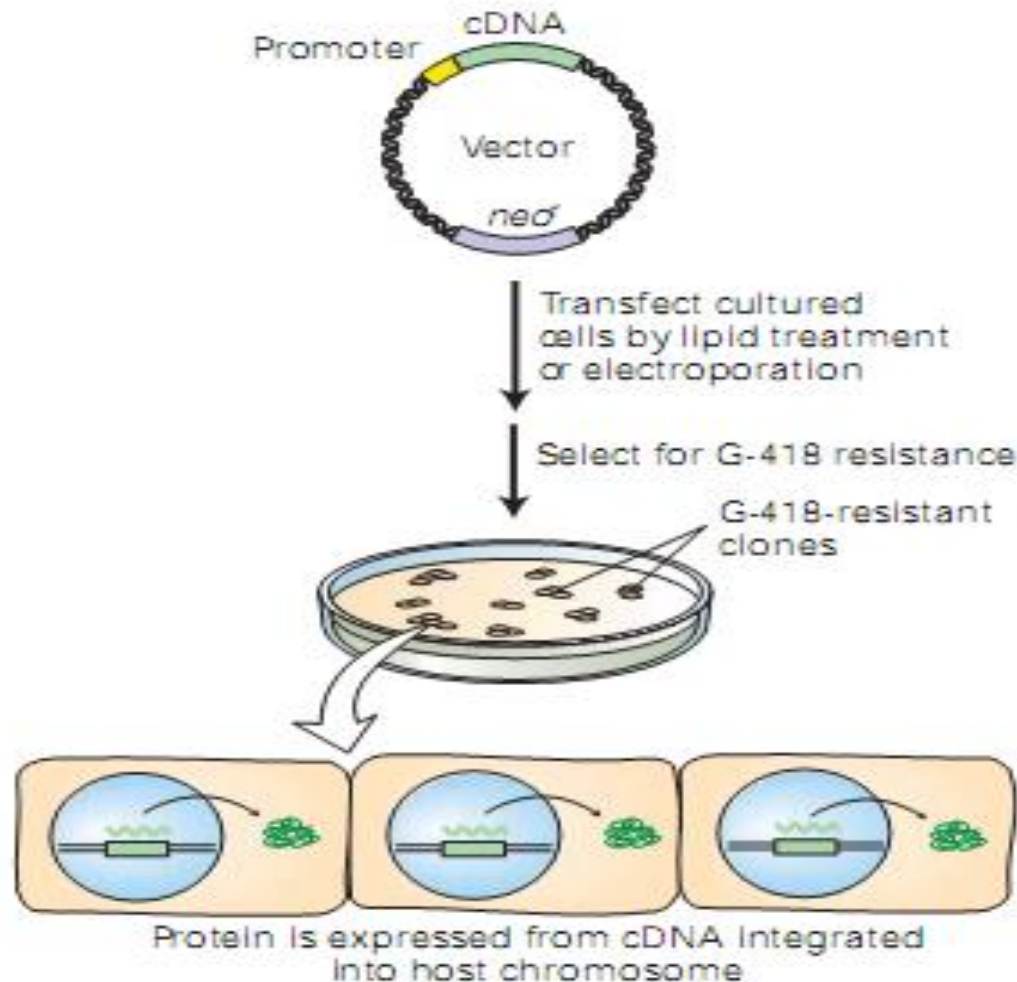


Transfección estable (transformación)

El vector se integra al genoma de la célula huésped en forma permanente, se dice que la célula está transformada.

El vector lleva gen marcador para diferenciar células que han integrado el vector (neo^r)

(b) Stable transfection (transformation)

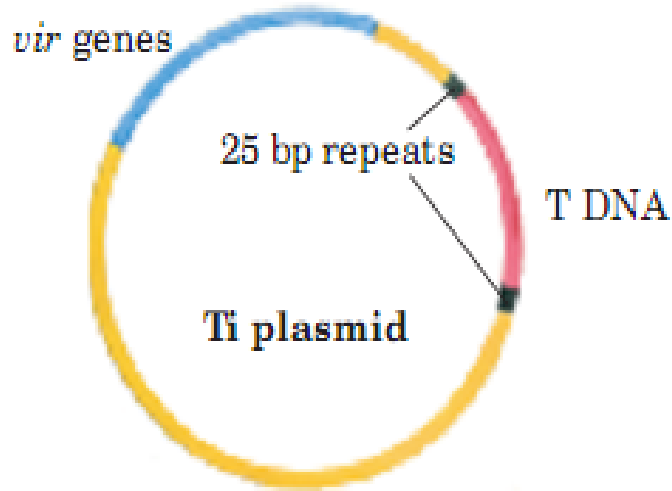


Obtención de organismos genéticamente modificados (transgénicos)

Introducción de genes en plantas mediante: Infección con *Agrobacterium tumefaciens*

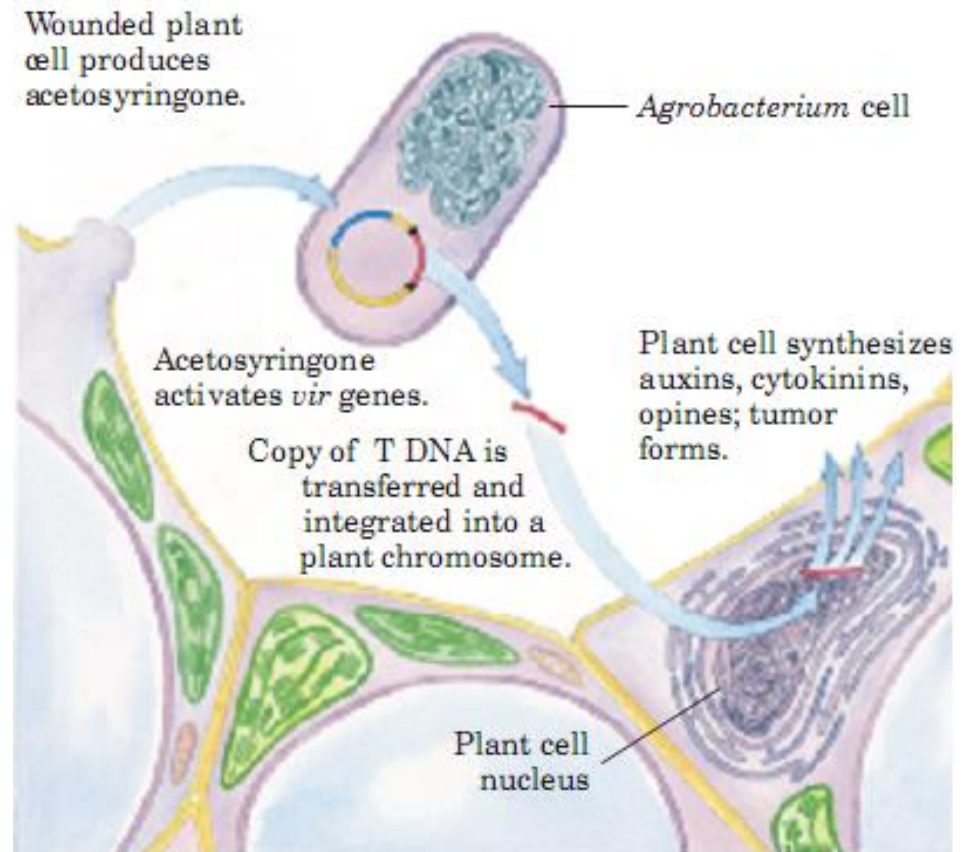
Hace posible alterar el perfil nutricional, rendimientos de la cosecha, resistencia a estreses ambientales

A. tumefaciens es una bacteria patógena de plantas dicotiledóneas que transfiere ADN (ADN-T) a partir del plásmido Ti (*tumor inducing*) a las plantas, causando la formación de tumores.



vir: genes de virulencia

25 bp repeats: necesarias para la integración de T-ADN

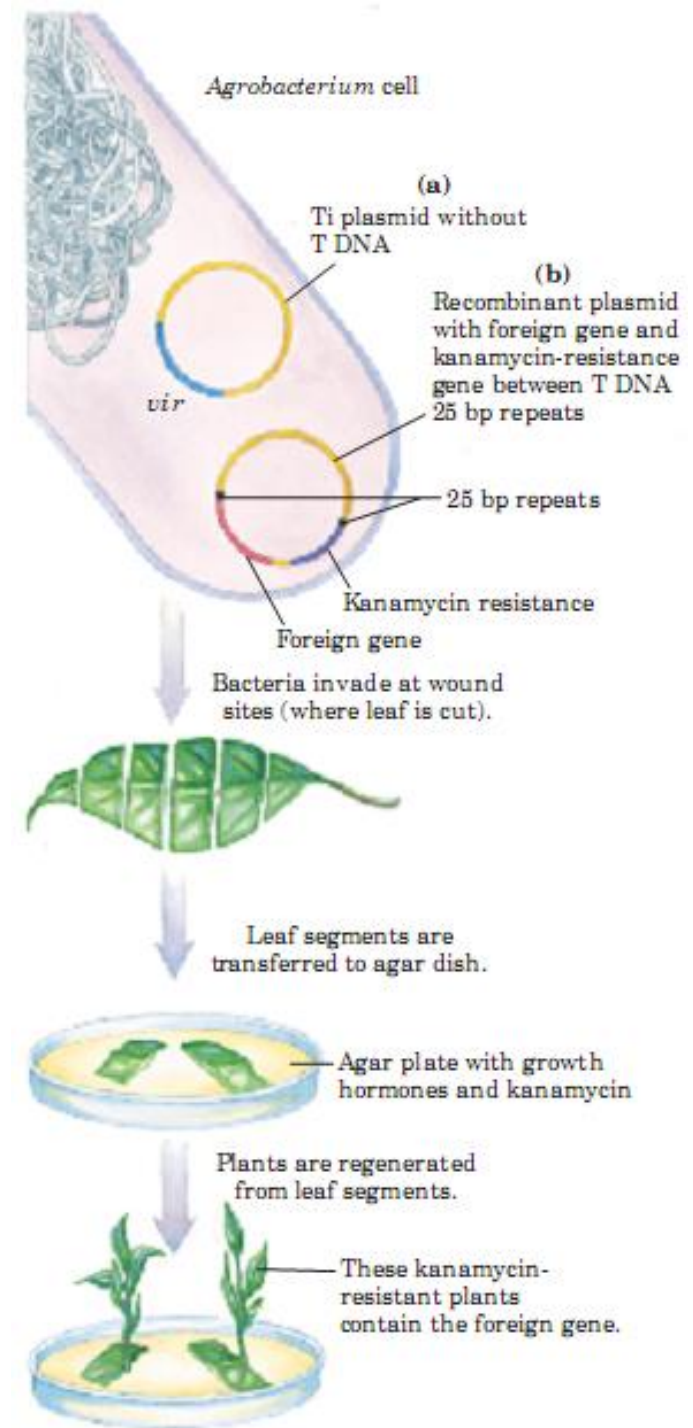


Estrategia con dos plásmidos para crear plantas recombinantes (transgénicas)

- a. Se saca el ADN-T del plásmido Ti, se dejan los genes *vir* necesarios para la transferencia de ADN desde la bacteria a la planta.
- b. En otro plásmido se clona el gen de interés *downstream* del promotor del T-DNA (promotor fuerte) y un gen de selección (Kanr), flanqueados por los 25 pb del ADN-T, importantes para la transferencia del ADN. Posee ori para replicación en la bacteria.



Plantas de tomate modificadas resistentes a larvas de insectos (expresan gen de toxina de *Bacillus turingensis*)



Transferencia de genes en animales

Se realiza sobre cultivos de células. La transformación generalmente requiere la integración del ADN en el cromosoma del huésped.

Métodos de transformación:

- Electroporación
- Microinyección. Inyección de ADN en el núcleo de células con una aguja fina
- Liposomas
- Vectores virales (retrovirus, adenovirus). Se integran en el cromosoma del huésped

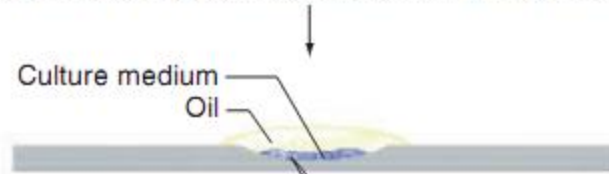


Se introdujo el gen de la hormona de crecimiento humana en el genoma del ratón bajo el control de un promotor regulable. Cuando se alimentó con dieta + inductor los ratones transgénicos crecieron a un tamaño inusual.

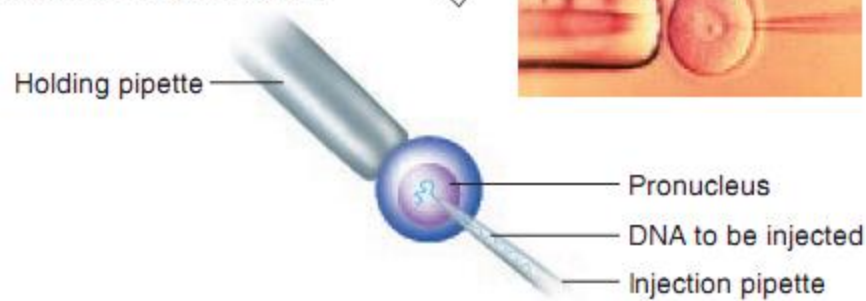
Several embryos recovered from sacrificed female



Embryos transferred to a depression slide containing culture medium



As embryo is held in place, DNA is injected into pronucleus.



Several injected embryos are placed into oviduct of receptive female.



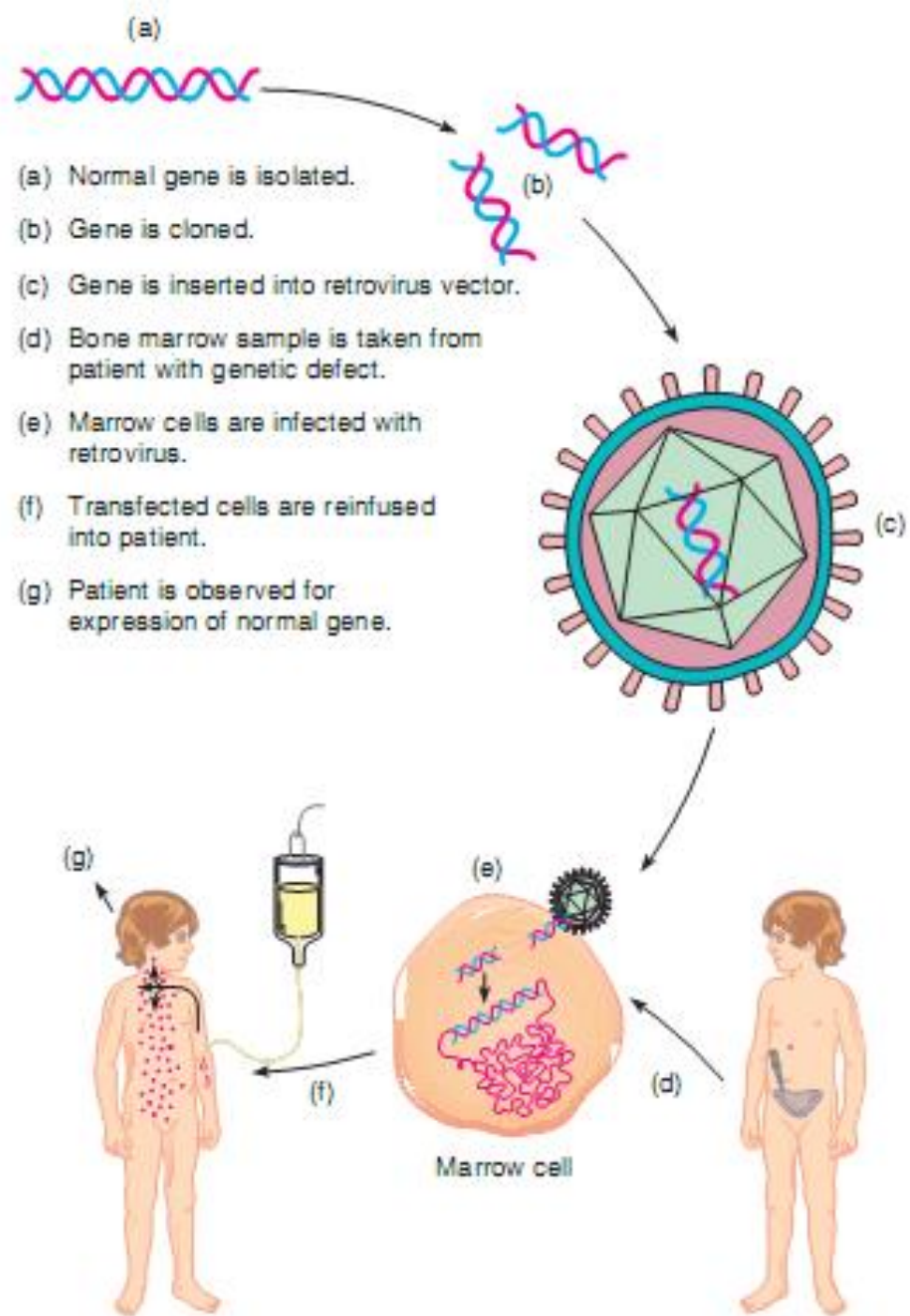
Creación de ratones transgénicos

Terapia génica

Es una técnica para reemplazar un gen deficiente por uno normal en individuos con enfermedades genéticas

Surge de la investigación con animales transgénicos.

Protocolo para TG *ex vivo* en humanos

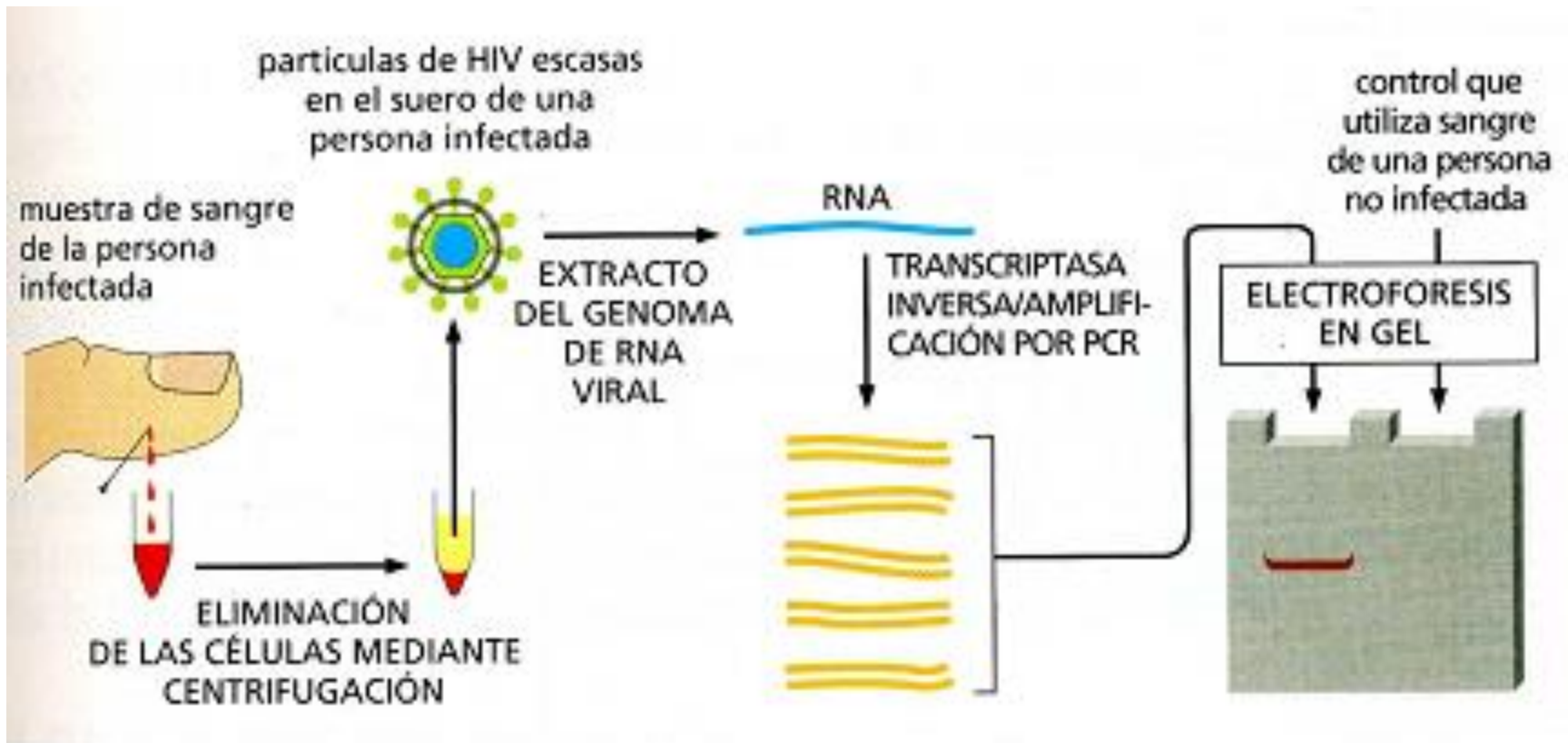


Sample of Human Genetic Defects Targeted for Gene Therapy

Disease	Nature of Defect	Gene Replacement Strategy
Adenosine deaminase (ADA) deficiency	Severe immunodeficiency due to destruction of lymphocytes by toxic metabolic product.	ADA gene inserted into bone marrow white blood cells using virus vector or liposomes.
X-1-linked SCID	Enzyme needed for maturing B and T cells is missing.	Bone marrow is modified by means of engineered virus.
Cystic fibrosis	Lack of necessary protein for conducting chloride ions across membranes causes buildup of mucus and secretions in lungs, pancreas, other organs.	CFTR gene placed in adenovirus or liposomes and inoculated into nasal cavity or lungs.
Sickle-cell anemia, beta-thalassemia	Lack of correct gene to make the normal B globin protein of hemoglobin.	Hemoglobin A (HbA) gene placed in bone marrow cells by vector.
Hemophilia B	Lack of gene to produce factor VIII, needed for blood clotting.	Normal gene for factor VIII incorporated into marrow cells.
Gaucher's disease	Deficiency in an enzyme that is needed to metabolize glucocerebroside leads to its buildup in lysosomes.	Insertion of normal glucocerebrosidase gene into marrow cells.
Muscular dystrophy	Lack of gene for producing dystrophin necessary for normal muscle development.	Dystrophin gene delivered into muscle tissue by one of several methods.
AIDS	Infection by HIV destroys important immune cells (T cells) and causes severe loss of immune function.	Fibroblasts are infected with gene that stimulates an immune response against HIV; other test uses ribozyme enzyme to block virus activity.
Malignant melanoma	Severest form of skin cancer that does not respond well to traditional therapy.	Insertion of B7 gene into tumor cells to boost the natural white blood cell response against the cancer.
Acute myelogenous leukemia	Blood disease caused by overexpression of a gene.	Genetic modification of cells by replacement of defective gene; also addition of antisense DNA to block the actions of cancer genes.

Diagnóstico de enfermedades

Detección de la presencia de un genoma viral en una muestra de sangre por PCR



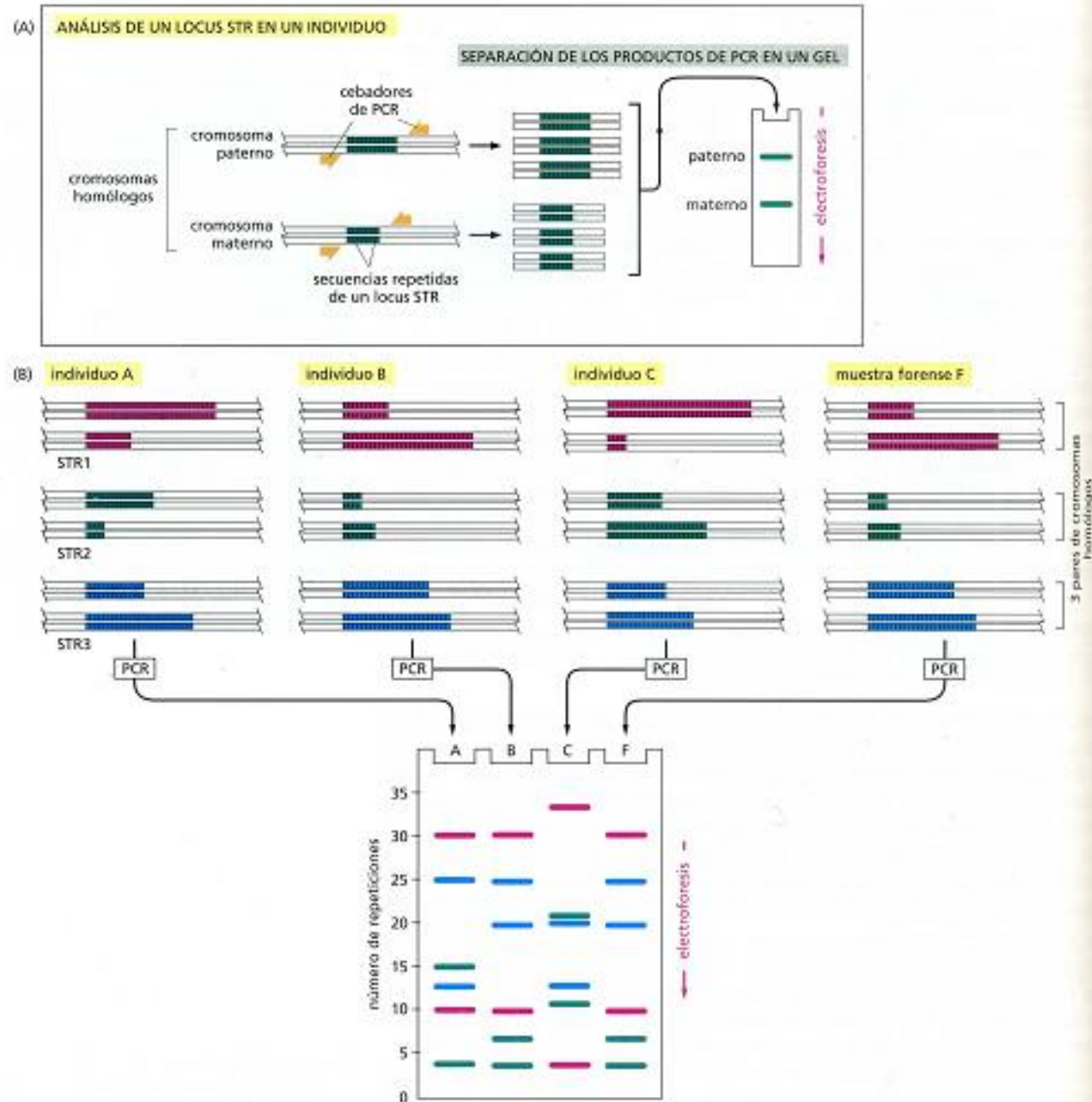
Ventaja frente a otros métodos de diagnóstico: **Muy alta sensibilidad** para detectar patógenos (virus, bacterias) en muestras humanas

La técnica de PCR en la ciencia forense: huella genética de ADN

El genoma de cada persona tiene una secuencia de ADN diferente: obtención de huella genética por PCR

A. Las secuencias de ADN usadas son repeticiones cortas en tandem (*short tandem repeats*, STR) ej. CACACA...o GTGTGT..., que están en varias posiciones (loci) en el genoma humano. El n de repeticiones en cada STR es variable en la población. Dos individuos no relacionados no suelen contener el mismo par de secuencias.

B. Obtención de «Huella genética» amplificando por PCR varios STR (a partir de muestra de sangre, pelo). Sirve para identificar individuos potencialmente sospechosos de cometer delito o de paternidad.



Problemas sociales y consecuencias de la Biotecnología Molecular :

- Impacto ambiental de organismos genéticamente modificados (OGM)
- Se deben modificar genéticamente los seres humanos?

Discusiones y debates gubernamentales y académicos



Formulación de Reglas y Leyes

Ética y Legislación

Reglamentación organismos genéticamente modificados (OGM) o transgénicos

Marco regulatorio en Argentina

Argentina fue el primer país de Latinoamérica que implementó un sistema organizado para evaluar la bioseguridad de los cultivos genéticamente modificados, a través de la creación de un marco regulatorio para la realización de actividades con **Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)**

La **Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGYP)**, dependiente del **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación**, es la institución responsable de otorgar la **autorización para comercializar cultivos GM**.

Evaluaciones:

- **Riesgo Ambiental** (Comisión Nacional Asesora en Biotecnología Agropecuaria, **CONABIA**)
- **Aptitud e Inocuidad Alimentaria** (Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria, **SENASA**)
- **Impacto en la producción y comercialización del cultivo GM** (Dirección de Mercados Agrícolas, **DMA**)

Para obtener la aprobación para la comercialización de un cultivo GM es necesario contar con tres dictámenes técnicos favorables.

Actividades de I y D en el campo. Se requieren **permisos** (CONABIA):

- **Evaluación de riesgo ambiental**
- **Condiciones de bioseguridad en que se desarrollará el ensayo**

Huella genética

Sociedad Argentina de Genética Forense (SAGF). <http://www.sagf.org.ar/>

Actividades científicas y de divulgación que contribuyan al progreso de la Genética Forense

Ley 23.511. Banco Nacional de Datos Genéticos (BNDG) (1987)

ARTICULO 1.- Créase el Banco Nacional de datos Genéticos (BNDG) a fin de **obtener y almacenar información genética** que facilite la **determinación y esclarecimiento de conflictos relativos a la filiación.**

Ley 26.548. Banco Nacional de Datos Genéticos (Nueva / Noviembre 2009)

ARTICULO 2º — Objeto. Constituye el objeto del Banco Nacional de Datos Genéticos garantizar la obtención, almacenamiento y análisis de la información genética que sea necesaria como prueba para el esclarecimiento de delitos de lesa humanidad cuya ejecución se haya iniciado en el ámbito del Estado nacional hasta el 10 de diciembre de 1983, y que permita: a) La búsqueda e identificación de hijos y/o hijas de personas desaparecidas, que hubiesen sido secuestrados junto a sus padres o hubiesen nacido durante el cautiverio de sus madres; b) Auxiliar a la justicia y/o a organizaciones gubernamentales y no gubernamentales especializadas en la materia objeto de esta ley en la **identificación genética de los restos de personas víctimas de desaparición forzada.**