

MANIPULACIONES GENÉTICAS. INGENIERÍA GENÉTICA.

PROCESOS NATURALES DE TRANSFERENCIA DE GENES DE UNA CÉLULA A OTRA.

Son procesos de recombinación genética que ocurren de forma espontánea en células procarióticas (sobre todo se estudian en bacterias). Ocurren de forma fragmentaria e incluso aleatoria y se producen fundamentalmente por tres mecanismos: transformación, transducción y conjugación.

1. Transformación. Es el proceso por el cual el DNA libre se inserta directamente en una célula receptora llamada célula competente. Sólo son transformables determinadas cepas de determinados **géneros de bacterias**. La primera bacteria en la que se descubrió el mecanismo de la transformación fue en *Diplococcus pneumonie*.

Como sabemos este proceso se da espontáneamente en la naturaleza. Si se inocula (introduce) a un ratón 2 cepas de bacterias, una resistente a la penicilina y otra resistente a la estreptomina, se pueden aislar más tarde cepas resistentes a ambos antibióticos. Se trata en este caso un proceso de herencia de genes de células muertas. Hemos visto también al principio de este capítulo como los **neumococos no encapsulados y no virulentos** se **transformaban** en **neumococos encapsulados y virulentos** cuando incorporaban el DNA procedente de neumococos encapsulados muertos, según demostraron **Avery, MacLeod y McCarty**.

Este proceso se usa actualmente, como ya sabemos y como veremos en este apartado, para insertar genes en una especie (procedentes de la misma especie o de otra). Se añade a células competentes DNA preparado en el laboratorio para que la célula produzca algunas sustancias deseadas por el hombre.

2. Transducción. El DNA se transfiere de una célula procariota a otra por medio de **virus**. Cuando un virus infecta a una célula en ciertas condiciones, puede integrarse en el genoma de la célula receptora a la que va a poder transferir a sus descendiente no solo sus propios genes sino también los del virus e incluso genes de la célula hospedera anterior a la que parasitó el virus.

En el caso de los fagos (virus bacterianos o bacteriófagos), si el virus se reproduce por **vía lítica**, formando miles de viriones en una sola célula que después morirá, puede ser que en el momento de la formación de los viriones, después de que el cromosoma bacteriano se haya fragmentado, **algunos de los genes de la bacteria sean encapsulados junto con el DNA vírico**. Cuando el virus infecta a una nueva célula bacteriana le **transfiere estos genes** procedentes de la anterior célula parasitada. En algunos casos pueden incluso **transferirse** todo el cromosoma bacteriano (**transducción general**).

Si el virus se reproduce **por vía lisogénica**, su ácido nucleico se incorpora al cromosoma bacteriano y se reproduce a la vez que la bacteria. Cuando **inicia la vía lítica de nuevo puede arrastrar genes** de la bacteria que pueden ser incorporados dentro de una cápsida y **transferirse** a una nueva célula bacteriana, generalmente la **transducción** es **restringida**.

En ambos casos, en las siguientes infecciones víricas, las bacterias pueden adquirir los genes no solo víricos, sino también de la bacteria anterior.

La transducción, como veremos a continuación, se utiliza también, al igual que la transformación, para transferir genes a una célula en los experimentos de ingeniería genética.

3. Conjugación. Es un proceso de recombinación genética que implica el contacto entre las dos células. Este proceso **se asemeja bastante al modo de recombinación sexual de los eucariotas**, pero difiere en que generalmente sólo se transmiten pequeños fragmentos de su genoma. A veces, solo a veces, se transfiere gran cantidad de su genoma. Existen unas cepas receptoras capaces de incorporar ese genoma y otras cepas donadoras.

Como sabemos, además del cromosoma bacteriano, casi todos los tipos de bacterias contienen pequeñas moléculas de DNA también circulares y capaces de autorreplicarse llamadas **plásmidos**. En ocasiones son capaces de integrarse en el cromosoma bacteriano. Se han descrito unos 12 plásmidos en *Escherichia coli*, de los cuales uno de los más estudiados es el **plásmido F**.

El **plásmido F** contiene unos **25 genes**, algunos de los cuales controlan la producción de pelos (*pili*). Solo las células **F+** presentan pelos en su superficie, mientras que las células **F-** carecen de ellos. Por conjugación y por medio de uno de esos pelos (pelos sexuales) se puede **transferir el plásmido F desde las células F+ (dadoras) a las células F-** (receptoras). Cuando esto ocurre, las células **F-** se transforman en células **F+** y desarrollan pelos. A veces el factor o **plásmido F se incorpora al cromosoma bacteriano** y se forman células **Hfr** (alta frecuencia de recombinación), que pueden transferir también genes a células **F-** por conjugación.

La conjugación bacteriana no se suele utilizar en ingeniería genética.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA METODOLOGÍA
DEL DNA RECOMBINANTE PARA ESTUDIAR
LA ESTRUCTURA DEL DNA O PARA OBTENER
UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

(En cualquier caso se puede transferir un gen de una especie a otra para clonarlo)

Introducción. Técnica general para obtener un DNA recombinante

En principio el término de **DNA recombinante** se empleaba para definir una molécula de DNA construida *in vitro* a partir de DNA proveniente de dos o más organismos. Hoy en día este término se aplica a todo material genético (también puede ser RNA) que es manipulado *in vitro*. La finalidad es **clonar un gen** (conseguir muchas copias) bien para su estudio o para conseguir la proteína que codifica ese gen. Clonar significa hacer copias idénticas. En este caso se hacen copias idénticas, pero en un organismo distinto al organismo original que poseía el gen.

La clonación del DNA comporta la **separación de un gen específico** o un fragmento de DNA de su cromosoma (que es mucho mayor) y **la unión a una pequeña molécula de DNA portador** para replicar este DNA modificado miles o millones de veces. El resultado es una amplificación de un gen o de un fragmento de DNA. Posteriormente este gen se expresará en forma de una proteína recombinante.

La clonación de un fragmento de DNA, procariótico o eucariótico se lleva a cabo mediante 5 procedimientos generales:

1. Un método para **cortar el DNA** en una región precisa. Esto se ha conseguido con el descubrimiento de endonucleasas específicas de secuencia (*endonucleasas o enzimas de restricción*), que son las tijeras moleculares necesarias. También se puede emplear la *transcriptasa inversa* de los retrovirus.

2. Un método para **unir covalentemente** dos fragmentos de DNA (el gen a estudiar y el vector). Las *DNA ligasas* son las encargadas de hacerlo.

3. **Selección** de una molécula de DNA portadora, capaz de autorreplicarse **para que actúe como DNA portador**. Suelen ser los **plásmidos bacterianos** (pequeños fragmentos de DNA bacterianos, distintos del cromosoma bacteriano) o **DNAs víricos**, ambos pasan a ser llamados **vectores de clonación**. En ellos se insertan las moléculas de DNA que se quieren clonar.

Las nuevas moléculas de DNA que contienen segmentos procedentes de otras fuentes reciben el nombre de **DNA recombinantes**.

4. Un método para trasladar el DNA desde el tubo de ensayo a una **célula hospedera** que ofrece la maquinaria enzimática necesaria para la replicación de ese DNA. Esta célula va a producir la proteína (proteína recombinante) que codifica el gen clonado (va a permitir la **expresión del gen**). Se suelen utilizar como células hospederas las **bacterias *Escherichia coli*** y ***Bacillus subtilis***, las **levaduras** (hongos unicelulares) y **células cultivadas de insectos y mamíferos**. Los sistemas bacterianos son los métodos más utilizados.

5. Métodos para **seleccionar o identificar aquellas células hospederas que contienen el DNA recombinante**.

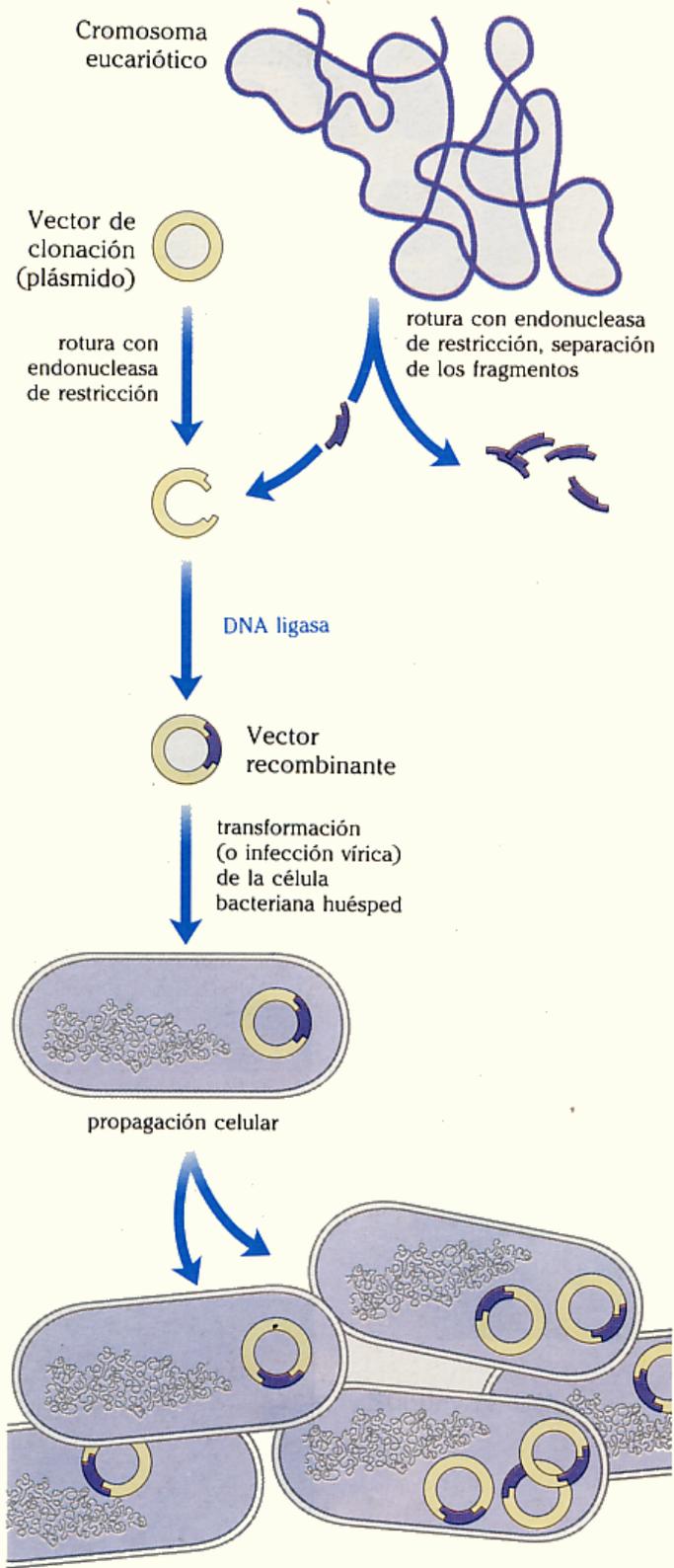


Figura 28-1 Representación esquemática de la clonación de DNA. Es posible obtener un fragmento de DNA de interés rompiendo cromosomas eucarióticos con endonucleasas de restricción. Después de aislar los fragmentos y ligarlos a un vector de clonación que ha sido igualmente cortado con una endonucleasa de restricción, el DNA recombinante que resulta es introducido en una célula huésped donde puede ser propagado (clonado). Es de remarcar que el tamaño del cromosoma de *E. coli* con respecto al de un vector de clonación típico, como un plásmido, es mucho mayor de lo que aquí se ilustra.

1. **Obtención y aislamiento del gen** (punto 1 de la técnica general).

Como acabamos de decir el gen a estudiar o expresar se obtiene mediante la utilización de *enzimas de restricción* o mediante el empleo de la *transcriptasa inversa*. El gen también podría ser un **polipéptido sintético**.

Los *enzimas de restricción* son enzimas capaces de unirse a una molécula de cadena doble y cortarla de manera específica. La primera *endonucleasa de restricción* fue aislada en 1970 por Hamilton Smith, a partir de extractos de una bacteria llamada *Haemophilus influenzae* (*HindIII*). Actualmente se conocen unas 150 *(hasta 800 según Lehninger) que cortan del DNA de una manera específica y reproducible. Suelen reconocer secuencias específicas de 4-8 nucleótidos, algunas reconocen secuencias muy frecuentes y cortan el DNA en muchos fragmentos pequeños, otras reconocen secuencias muy raras y cortan el DNA en pocos fragmentos muy grandes. Algunas realizan cortes rectos en las moléculas de DNA (**extremos romos**) mientras que otras mientras que otras cortan los nucleótidos dejando varios nucleótidos desapareados, es decir, dejan **extremos adhesivos o pegajosos**.

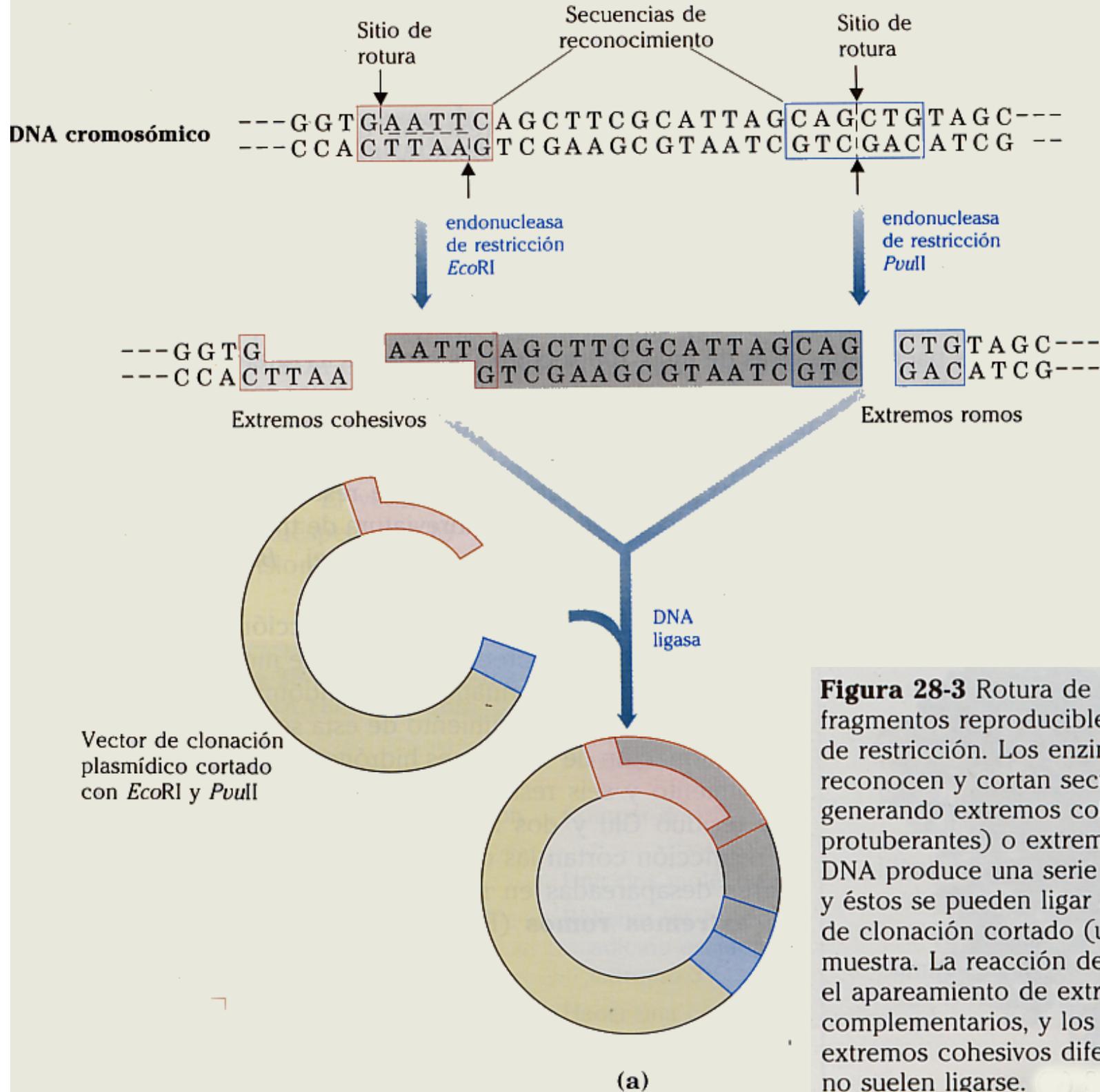


Figura 28-3 Rotura de moléculas de DNA en fragmentos reproducibles mediante endonucleasas de restricción. Los enzimas de restricción sólo reconocen y cortan secuencias específicas, generando extremos cohesivos (con monocadenas protuberantes) o extremos romos. **(a)** La rotura del DNA produce una serie característica de fragmentos, y éstos se pueden ligar a otros DNA, como el vector de clonación cortado (un plásmido) que aquí se muestra. 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.

Secuencias palindrómicas: se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izda:

Anilina.

Dábale arroz a la zorra el abad.

A mamá Roma le aviva el amor a papá y a papá Roma le aviva el amor a mamá

A cavar a Caravaca

Abusón, acá no suba

¿Acaso comeré mocos acá?

Adán no calla con nada

Allá, cada gorda drogada, calla

Ánimo Romina

Anita, la gorda lagartona, no traga la droga latina

Anula la luz azul a la Luna

Arde ya la yedra

Arena mala me da de mala manera
Ella te dara detalle
Isaac no ronca así
La ruta nos aportó otro paso natural
Ni nicotina ni tocinín
Odiosa, ¿has oído?
Oye, sí. Versos revisé yo
Roma le da té o pan a poeta del amor
Roza las alas al azor
Senil oí violines
Sé verle del revés
Sin anís o no, como taco. Coca tomo con o sin anís
Sonreí, Bogart no cede contra gobiernos
¿Subo tu auto o tu autobús?
Yo dono rosas, oro no doy
Yo hallé ropa, yo voy a por ella hoy

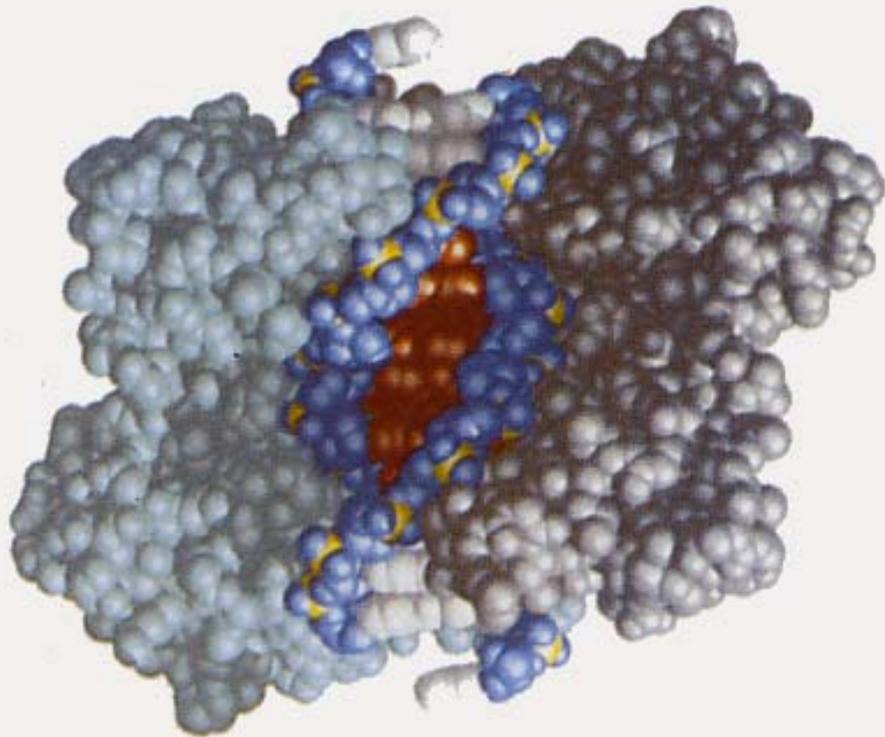
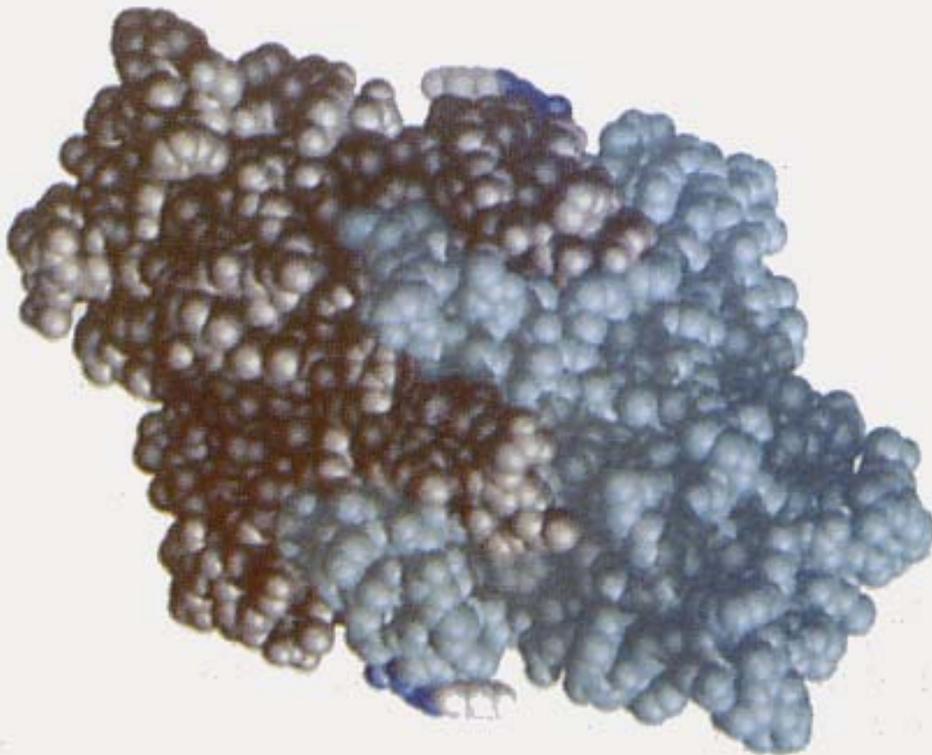


Figura 28-2 Interacción de la endonucleasa de restricción *EcoRI* con su secuencia diana. Se muestra este enzima dimérico (con sus subunidades en gris y en azul celeste) unido a DNA. En la figura superior, el sitio de unión al DNA está orientado hacia el observador. En la inferior, se muestra el lado opuesto. En la unión al DNA, las bases que son los sitios de reconocimiento para *EcoRI* están en rojo.



El enzima *EcoRI* fue descubierto en *Escherichia coli*. Se nombran con una abreviatura de tres letras que hace referencia a la especie bacteriana de la que deriva.

La utilización de la *transcriptasa inversa* permite obtener un gen **a partir** de una molécula de **RNAm maduro** (obtenido en el citoplasma). Se obtiene de esta manera una molécula de **DNA complementario (cDNA)** que tiene la ventaja de **carecer de intrones**. Esto es importante si se trata de un gen eucariótico con exones e intrones que se desea clonar intercalándolo en un plásmido bacteriano, ya que la bacteria, que no posee mecanismos de maduración del RNAm no podría expresar un gen que poseyera intrones y exones.

Por último, el gen podría ser un **polipéptido sintético** sintetizado en el laboratorio, con una secuencia de bases deducida a partir de la secuencia de a.a. conocida de una proteína.

2. Clonado mediante vectores e identificación de las células que contienen el DNA recombinante (puntos 2, 3, 4 y 5 de la técnica general).

Una vez obtenido el gen se inserta en un **vector adecuado**, es decir, en un **plásmido bacteriano** o en un **DNA vírico**, utilizando los mismos enzimas de restricción. El **DNA recombinante** así obtenido **se transfiere** a una **célula hospedera** mediante **transformación** si el vector es un plásmido o **transducción** si el vector es un DNA vírico.

Como sabemos, estas células suelen ser **bacterias (procariotas)** o **levaduras (eucariotas)**.

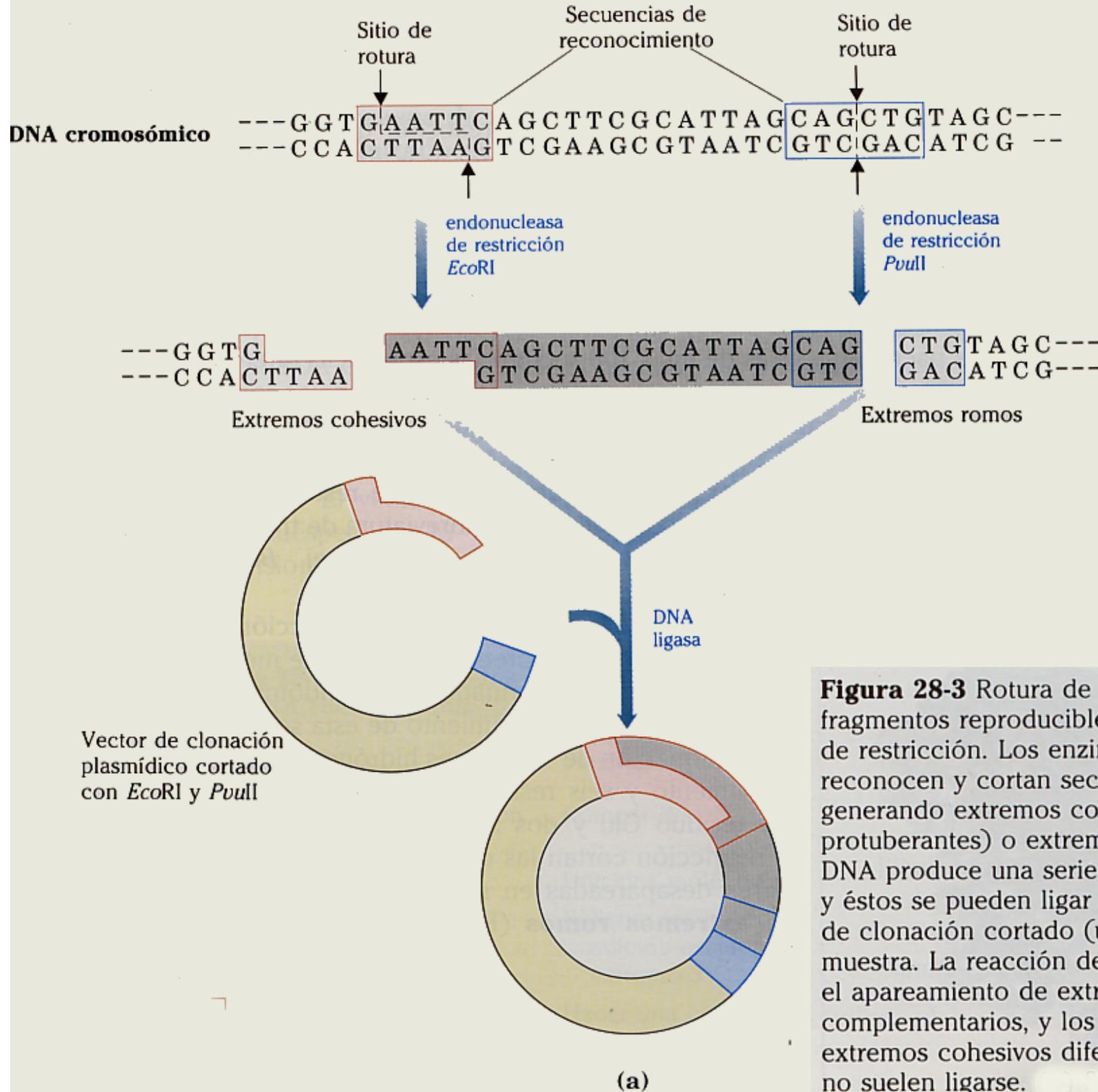


Figura 28-3 Rotura de moléculas de DNA en fragmentos reproducibles mediante endonucleasas de restricción. Los enzimas de restricción sólo reconocen y cortan secuencias específicas, generando extremos cohesivos (con monocadenas protuberantes) o extremos romos. **(a)** La rotura del DNA produce una serie característica de fragmentos, y éstos se pueden ligar a otros DNA, como el vector de clonación cortado (un plásmido) que aquí se muestra. 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.

Para ello, las moléculas de **DNA recombinante** se **mezclan** con las células en las que van a replicarse.

En el caso de los **plásmidos bacterianos**, mediante técnicas adecuadas las células se hacen competentes para incorporar el DNA recombinante. Debido a que solo unas pocas células captan el DNA plasmídico se necesita un **método para seleccionar las que lo han hecho**. La estrategia más común es construir un plásmido que contenga genes que permitan a la célula hospedera crecer en determinadas condiciones. Estos genes suelen ser **genes de resistencia a antibióticos**. Solo aquellas células que hayan sido transformadas por el plásmido recombinante serán **resistentes a un determinado antibiótico** y podrán crecer en presencia del mismo.

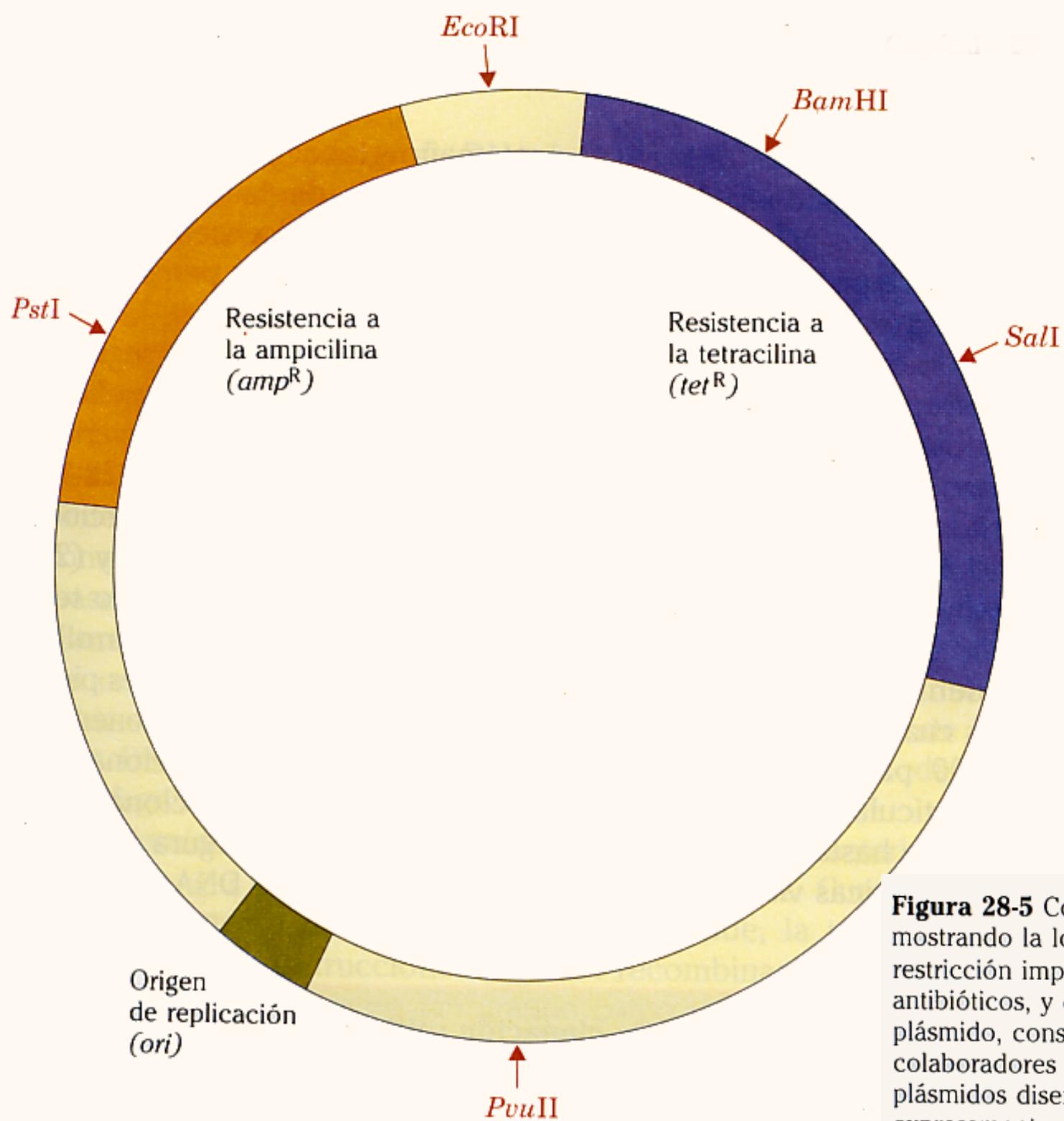


Figura 28-5 Construcción del plásmido pBR322, mostrando la localización de algunos sitios de restricción importantes, genes de resistencia a antibióticos, y el origen de replicación (*ori*). Este plásmido, construido por Herbert Boyer y colaboradores en 1977, fue uno de los primeros plásmidos diseñado para clonar en *E. coli* expresamente.

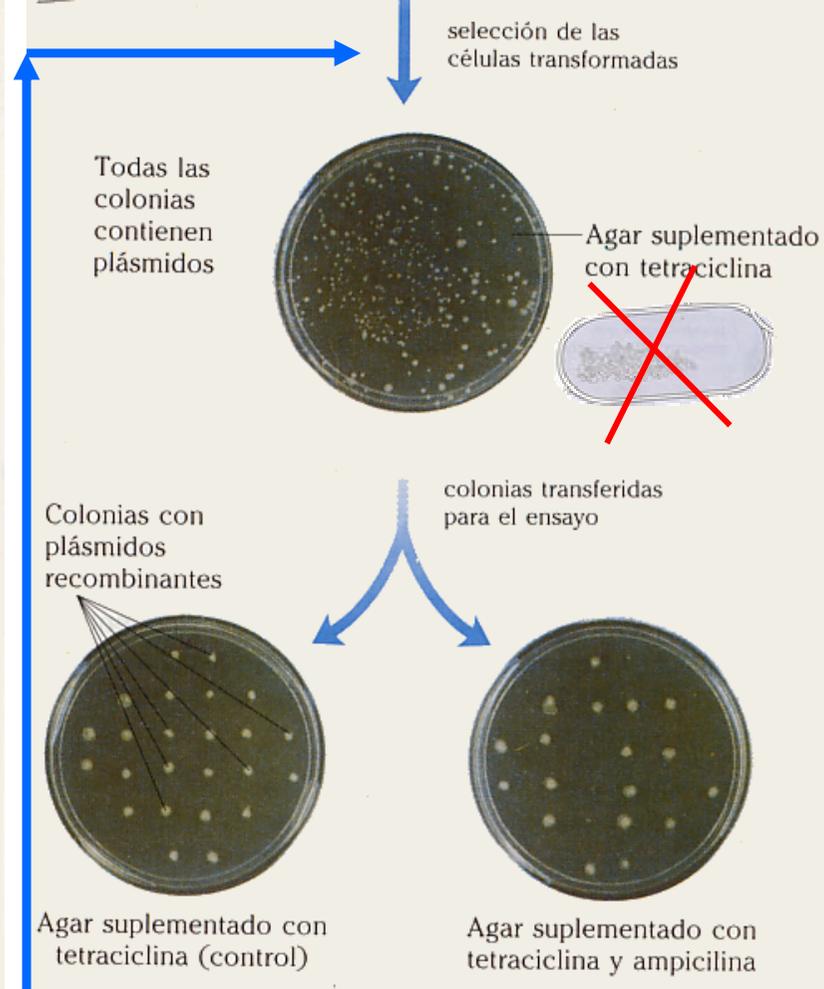
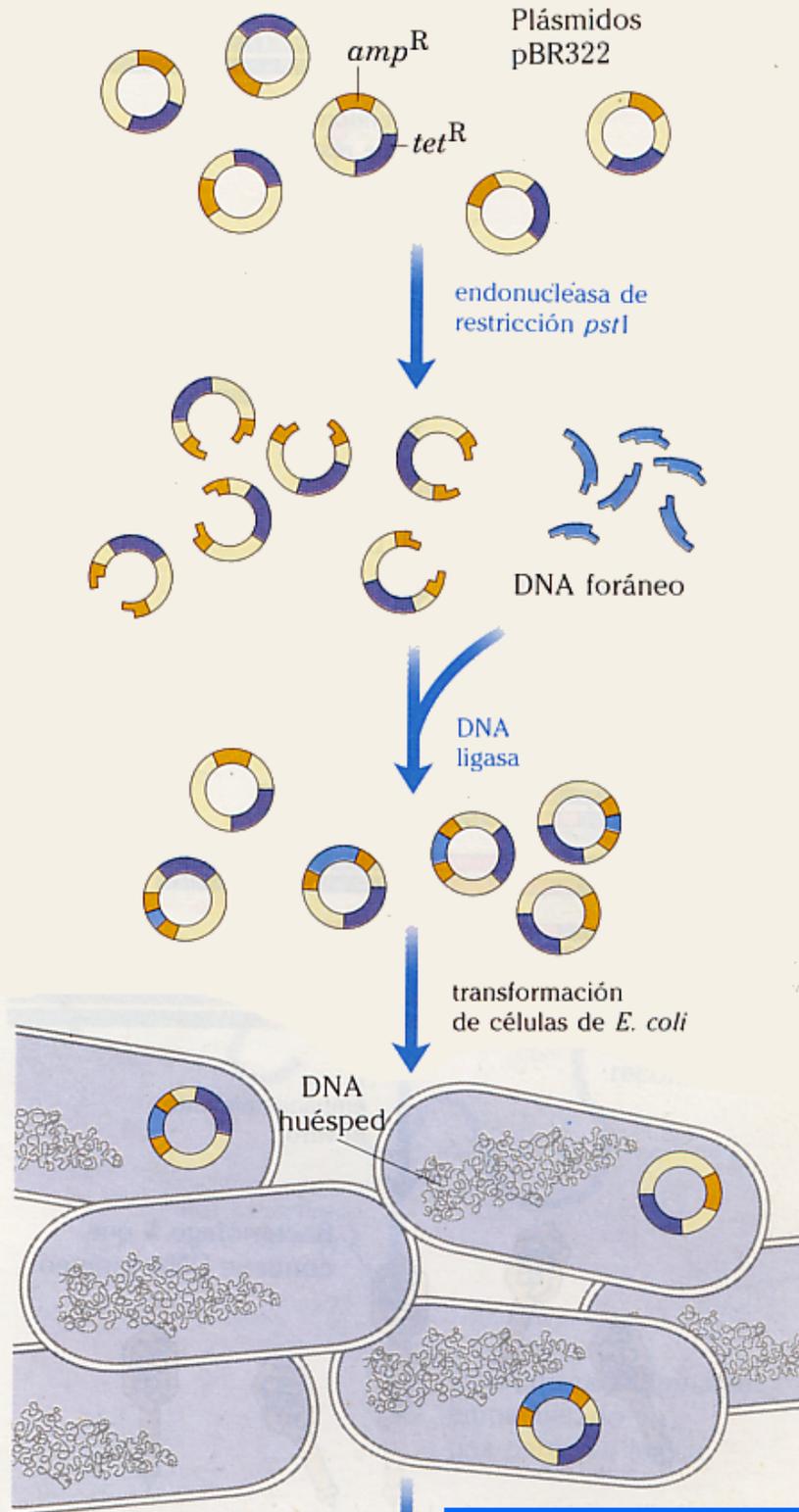


Figura 28-6 Clonación de un DNA foráneo en *E. coli* con pBR322. Si el DNA foráneo se inserta en el sitio de restricción *Pst*I, **se interrumpe e inactiva el elemento de resistencia a la ampicilina**. Después de la ligación del DNA y de la transformación de *E. coli*, se hacen crecer las células en placas de agar que contienen tetraciclina para seleccionar aquellas que han incorporado el plásmido.

Utilizando palillos estériles, se transfieren las colonias individuales a la misma posición de dos placas cuadradas; una contiene **tetraciclina** (como control) y la otra contiene **tetraciclina y ampicilina**. Las células que crecen en presencia de tetraciclina pero que **no forman colonias en la placa que contiene tetraciclina y ampicilina, son portadoras del plásmido recombinante** (el elemento de resistencia a la ampicilina no es funcional). Las células que contienen el pBR322 que se ligó **sin la inserción de DNA foráneo conservarán la resistencia a la ampicilina y crecerán en ambas placas**. Obsérvese que, en este y en otros experimentos que comportan la necesidad de hacer réplicas, es imprescindible poner una marca orientativa en la parte posterior de la placa, de tal modo que las colonias de diferentes placas se puedan superponer.

Una vez que tengamos seleccionada la población de bacterias que han incorporado el **plásmido recombinante**, en la que se ha clonado el gen por la división de las bacterias, podremos obtener la **proteína recombinante** o proceder al estudio del gen mediante secuenciación.

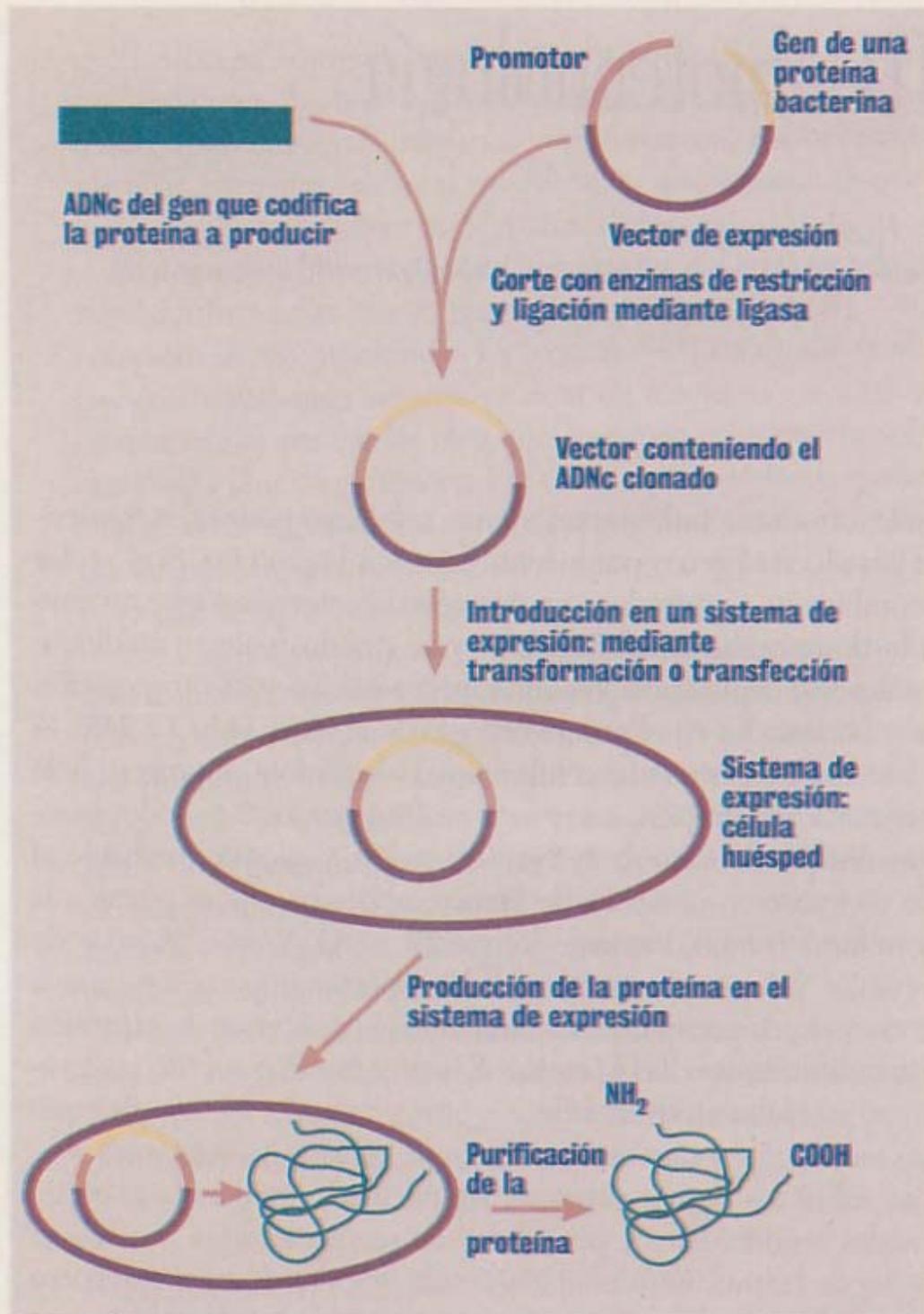


Figura 1 Procedimiento para la obtención de una proteína recombinante

3. Clonación del gen mediante amplificación por PCR.

Si se conoce la secuencia de al menos una parte de un segmento de DNA a clonar, se puede facilitar su clonación mediante la amplificación de ese segmento de DNA en un proceso denominado **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, desarrollado por **Kary Mullis en 1984**. Se sintetizan dos **oligonucleótidos**, cada uno de ellos complementarios a una secuencia corta de una cadena del segmento de DNA que interesa amplificar y clonar. Esos oligonucleótidos sintéticos se utilizan como **cebadores** de la replicación del segmento de DNA *in vitro*. El DNA **se calienta brevemente** para **desnaturalizarlo** (para abrir las dos cadenas), enfriándose en presencia de cantidades excesivas de oligonucleótidos sintéticos cebadores que inician la replicación. Entonces se añade una **DNA polimerasa resistente al calor** y los 4 desoxirribonucleótidos trifosfato (con las 4 bases, A, T, G y C) y se **produce la replicación del fragmento de DNA situado entre los cebadores**.

El proceso se repite durante **20 o 30 ciclos**, que pueden durar solo unas pocas horas cuando el proceso se automatiza, de modo que se amplifica el fragmento de DNA de modo que puede ser aislado para su estudio o clonado fácilmente.

Es un método muy sensible. Amplifica **incluso una única molécula de DNA de casi cualquier tipo de muestra**. Se usa para clonar fragmentos de DNA de **momias, animales o vegetales desaparecidos (Arqueología y Paleontología moleculares)**, en medicina forense, para la detección de **infecciones víricas** antes de que den sintomatología y para el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas. Ver fig 28-12.

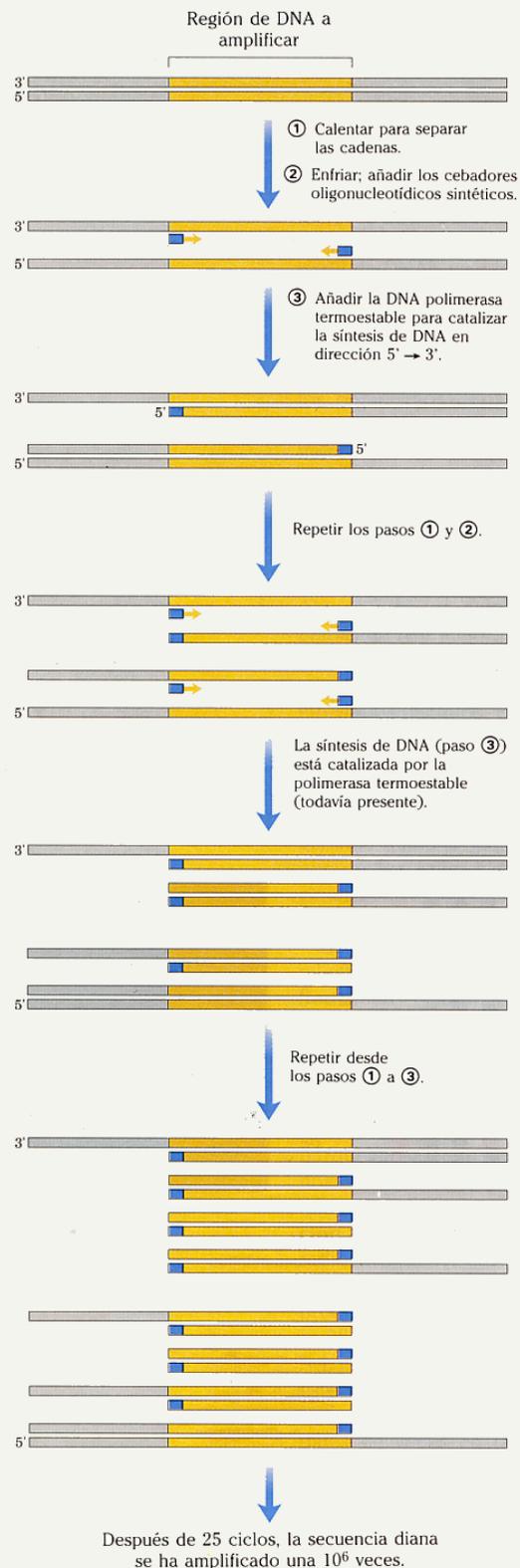


Figura 28-12 Amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se separan las cadenas de DNA por calentamiento, y se hibridan con un exceso de cebadores cortos de DNA sintético (azul) que flanquean la región a amplificar. Después de la polimerización, se repite el proceso durante unos 25 o 30 ciclos. La DNA polimerasa termoestable *TaqI* (de *Thermus thermophilus*, bacteria que vive en manantiales de agua caliente) no se desnaturaliza por estos tratamientos con calor.

Mullis, Kary (1944 -), biólogo molecular y premio Nobel estadounidense que desarrolló la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), una técnica que genera copias de ADN. Esta innovación tuvo una importancia decisiva en la gran expansión de la biología molecular a mediados de la década de 1980. Se ha aplicado de forma amplia en el campo de la biología, tanto para analizar el ADN de muy diversos organismos vivos como para detectar la presencia de pequeñas cantidades de ADN en los fluidos corporales con fines diagnósticos (por ejemplo, ADN vírico en muestras de sangre humana). *Véase Ácidos nucleicos.*

Mullis obtuvo el doctorado en bioquímica por la Universidad de California en 1973. En 1986, publicó un trabajo en el que explicaba cómo se pueden replicar rápida y repetidamente secuencias cortas y específicas de ADN. Para emplear la técnica PCR, la doble hélice del ADN objetivo, se desnaturaliza mediante temperaturas muy elevadas para obtener cadenas sencillas de ADN (el ADN plantilla). A continuación se unen dos secuencias muy cortas (oligonucleótidos) de ADN artificial de una sola hélice a la plantilla de ADN. La clave de la técnica es que estos oligonucleótidos están diseñados para unirse al extremo de cada una de las cadenas complementarias de ADN, que constituían en conjunto el ADN objetivo de cadena doble. Estas dos cadenas de ADN son replicadas entonces de forma independiente entre los oligonucleótidos por acción del enzima DNA polimerasa, duplicando el número de copias de cada secuencia plantilla disponible. El proceso de desnaturalización por el calor, unión de los oligonucleótidos y síntesis de ADN se repite una serie de veces, lo que da lugar a una multiplicación masiva del DNA objetivo. **En 1993 Mullis fue galardonado con el Premio Nobel de Química por este trabajo.**



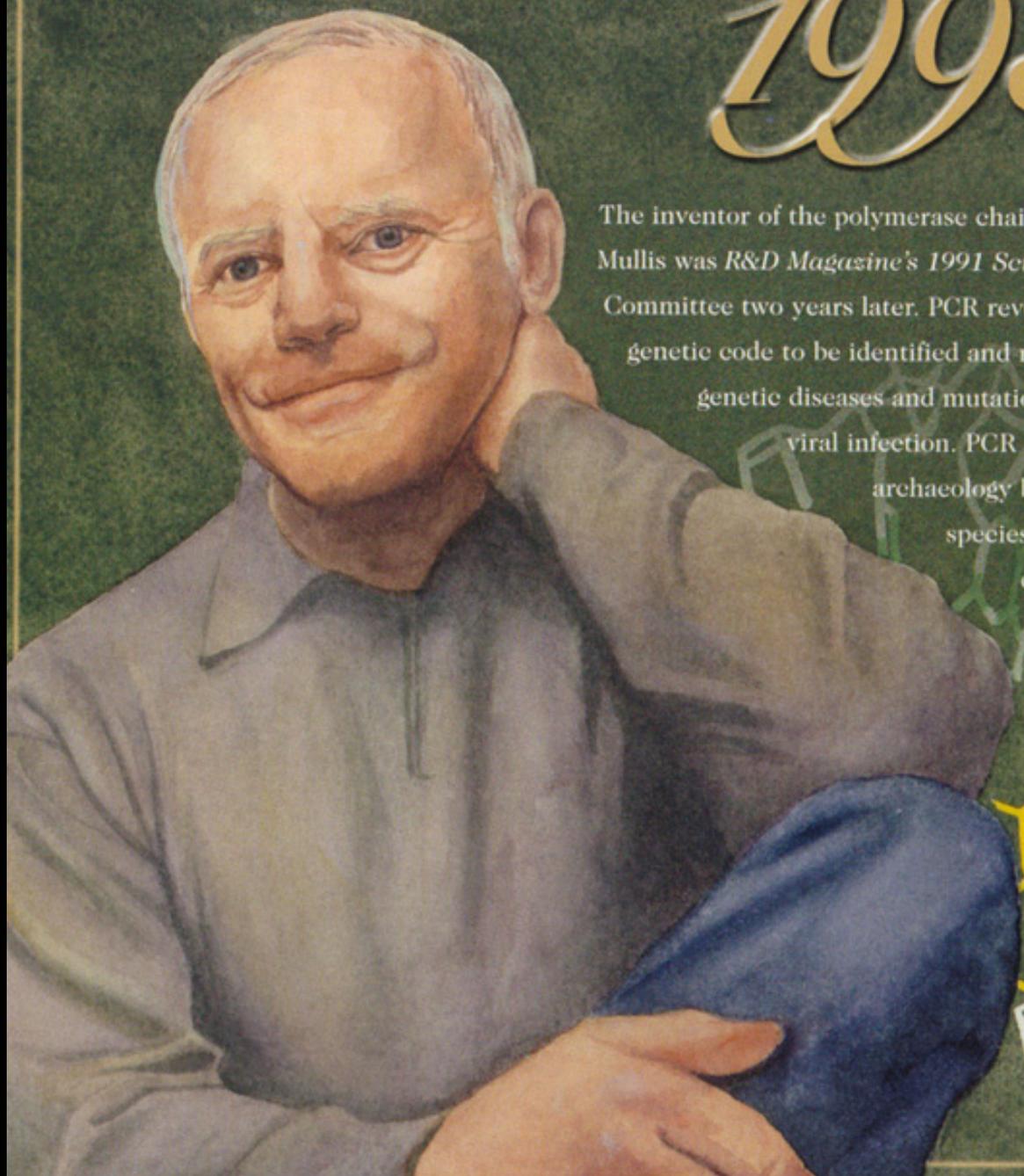
KARY BANKS MULLIS (b. Dec. 28, 1944, Lenoir, N.C., U.S.), American biochemist, cowinner (with [Michael Smith](#)) of the 1993 [Nobel Prize for Chemistry](#) for his invention of the [polymerase chain reaction](#) (PCR), a simple technique that allows a specific stretch of DNA to be copied billions of times in a few hours.



1993 Chemistry

Kary Mullis

The inventor of the polymerase chain reaction while at Chiron Corporation in the late 1980s, Mullis was *R&D Magazine's 1991 Scientist of the Year* and was honored by the Nobel Committee two years later. PCR revolutionized biotechnology by allowing a fragment of genetic code to be identified and reproduced indefinitely. Applications include tests for genetic diseases and mutations, forensic research, and identification and diagnosis of viral infection. PCR helped create the new research field of molecular archaeology by allowing the study of the genetic code of extinct species. New uses for the technique are being developed every day.



Una vez que tenemos el gen clonado, podemos proceder a su estudio mediante secuenciación o obtener la proteína recombinante:

Ejemplos de producción de proteínas recombinantes, de aplicación en Medicina:

Insulina: fue la primera proteína comercial creada de manera recombinante. Se produce en un sistema de expresión bacteriano. Se usa, como sabemos para tratar la diabetes.

Hormona del crecimiento: anteriormente era extraída de cadáveres para tratar a niños con déficit en esta hormona (enanismo hipofisario). A veces se producía muerte de los niños por contaminación con virus mortales. Su producción de forma recombinante en un sistema de expresión bacteriano produjo seguridad y abundancia del producto.

Vacunas contra enfermedades infecciosas: antes de la tecnología del DNA recombinante todas las vacunas estaban formadas por microorganismos inactivados (bacterias o virus muertos) o atenuados (bacterias o virus modificados para que no puedan multiplicarse en el organismo inoculado). Siempre había un peligro de infección. Actualmente se producen de forma recombinante únicamente proteínas de la superficie del agente infeccioso (por ejemplo, de la envoltura vírica) que son igual de eficaces para inducir la respuesta del sistema inmunitario, pero más seguras. La primera vacuna desarrollada de forma recombinante en levaduras fue contra el **virus de la Hepatitis B**. Actualmente hay muchas en estudio, sobre todo se está tratando de obtener proteínas recombinantes correspondientes a proteínas de la superficie del **virus del sida**.

Anticoagulantes y factores sanguíneos. Son producidos en cultivos de células de mamíferos. De momento es un proceso caro y lento. Se han obtenido de esta manera el **activador del plasminógeno de tejidos** (que activa la plasmina, un enzima implicado en la disolución de coágulos, se emplea en el tratamiento de víctimas de ataques de corazón), y el **factor VIII** (que promueve la coagulación y se emplea para el tratamiento de pacientes hemofílicos, eliminando el riesgo de las transfusiones).

Factores de estimulación del sistema inmunitario: estimulan la producción de leucocitos. Se emplean para tratar deficiencias del sistema inmunitario y combatir infecciones.

Eritropoyetina: estimula la producción de eritrocitos. Se utiliza para tratar anemia en pacientes con enfermedades del riñón.

Interferones: utilizados para combatir las infecciones víricas y el tratamiento de algunos cánceres.

Interleuquinas: activan y estimulan distintos tipos de leucocitos. Se emplean para curas de heridas, infecciones por VIH, cáncer e inmunodeficiencias.

Anticuerpos monoclonales: como sabemos, los anticuerpos son proteínas selectivas que pueden unirse a una determinada diana entre millones. Mediante la tecnología del DNA recombinante se ha conseguido clonar anticuerpos, generalmente en bacterias, que reconocen un determinado antígeno. Esta extraordinaria especificidad hace que sean usados en muchas pruebas de diagnóstico. Se utilizan anticuerpos monoclonales contra el FNT (factor de necrosis tumoral) para tratar enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea o enfermedad de Crohn.

Además, los investigadores intentan aprovechar esta especificidad de los anticuerpos para el transporte de fármacos selectivos, toxinas o compuestos radiactivos a los tumores, (así se conseguiría únicamente la muerte células tumorales) o bien a células infectadas por agentes infecciosos.

**CARTOGRAFÍA Y
SECUENCIAR GENES. EL
PROYECTO GENOMA
HUMANO**

TAMAÑO Y CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA HUMANO

En 1996-97 un comité de científicos propuso al Departamento de energía y al Instituto Nacional de la Salud de EEUU la realización de un proyecto científico que investigara y descifrara el genoma humano. Con este propósito se fundó en 1998 la Organización del Genoma Humano (**HUGO**) y en 1990 se inició el llamado **Proyecto Genoma Humano**, cuyo objetivo es secuenciar los nucleótidos del genoma humano, para luego poder descifrar los genes, situarlos en el mapa cromosómico e identificar las proteínas que codifican cada uno de ellos. La finalidad de este proyecto es la mejora del diagnóstico de las enfermedades para luego obtener medicamentos y tratamientos mediante terapia génica. El Congreso Norteamericano destinó 200 millones de dólares anuales y el proyecto fue dirigido en su primera etapa por James Watson. Recientemente (año 2001), se ha publicado la primera aproximación al genoma humano, tanto por la Organización Hugo como por una **empresa privada**, **Celera genomics** que ha completado también la secuencia del genoma humano en un alto porcentaje.

Como acabamos de decir, existen dos entidades que están estudiando el genoma humano. Hay un proyecto oficial llamado en principio Proyecto Genoma Humano para el que se creó más tarde la HUGO (Human Genome Organization) y el proyecto de la empresa privada Celera Genomics. Publicaron sus primeros resultados a principios del año 2001.

En el **Proyecto Genoma Humano**, de naturaleza pública y **cuyos resultados se facilitan gratuitamente a todo el mundo y a tiempo real**, colaboran fundamentalmente **EEUU (60%) y El Reino Unido (30 %)**. Otros países que intervienen son China, Japón, Francia, Alemania. La sangre es de **donantes anónimos**, se había recogido hacía varios años y se está utilizando ahora, nadie sabe a quien pertenece.

En el proyecto de **Celera Genomics** se utilizaron **5 personas sanas**, 2 hombres y 3 mujeres de varias razas: 1 afroamericano, un chino asiático, un mejicano hispano y dos caucasianos, cuyos datos permanecen en el anonimato.

Una vez que esté totalmente secuenciado tendremos un libro que ocupará un espacio equivalente a 200 guías telefónicas de 500 páginas, que está escrito solo con un abecedario de solo cuatro letras y del que se sabe que de todo lo escrito solo el 5% de las palabras tienen algún significado.

lññdfofoerekfgendfgunjghjhjfglugarkljklgkdesdgsgdfgd
gdgdfglahjghjghmanchaghsgjhdfgjdgdejkfgkfgghkjfglkgiw
ertncviopoggggnfjnfgiehkjcuyofgfgjfgjdjhghjnombrelkghj
kjhfgfgfgkjhkkhknocvbnbnquierofgghjfgghfghfghfurte
ryllkacordarmekvoeofjjgklklksjaljlkioiajsdjagsjdh

Datos a recordar:

Se estudia el genoma nuclear, porque el genoma mitocondrial se conoce ya hace tiempo.

Genoma mitocondrial: tiene 37 genes y 16600 pares de bases.

Genoma humano nuclear: 25000-30000 genes, 3164 millones pb. Genoma génico 30 %, extragénico 70 %. Dos seres humanos se diferencian en un **0,2 %**, **compartimos 99,8 % del genoma**. Con los chimpancés compartimos el 98 %.

Sólo el 5 % del genoma nuclear va a dar proteínas.

Se han secuenciado totalmente el **cromosoma 21**, el **22** y en diciembre de 2001 se ha publicado la secuenciación completa del cromosoma **20**. Se siguen publicando constantemente nuevos datos de diversas especies.

Se han secuenciado también los genomas de varios virus, algunas bacterias y en 1996 se secuenció el genoma completo de la primera célula eucariótica, la **levadura**. Además se conocen unos 4000 genes del genoma humano.

¿CÓMO SE CARTOGRAFÍA Y SECUENCIA EL GENOMA?

Cartografiar el genoma significa hacer un mapa cromosómico, es decir, determinar que genes y en que orden se sitúan los genes en los cromosomas.

Secuenciar el genoma es obtener la secuencia de nucleótidos de cada uno de los cromosomas.

Cartografía del genoma.

-De forma clásica se ha determinado la distancia entre dos o tres genes y su posición relativa dentro del cromosoma utilizando los experimentos de hibridación de la genética mendeliana. Para medir la distancia genética entre dos puntos se estudia la frecuencia de recombinación entre dos genes durante el proceso meiótico: se define como una **unidad de mapa o centimorgan** la distancia de separación entre dos genes entre los que existe una frecuencia de recombinación de un **1 %**.

Morgan y col. cartografiaron el mapa genético de *Drosophyla melanogaster*.

Con este procedimiento, en 1996, **J. Weissenbach** confeccionó un mapa genético con 2335 puntos que sirven de referencia para localizar los genes en los cromosomas. Uno de los cromosomas más completos es el 21, del que frecuentemente están apareciendo publicaciones.

- Hoy en día se puede determinar la localización de un gen en un cromosoma ordenando los fragmentos de DNA genómico que se obtienen mediante la utilización de enzimas de restricción y comparando las **huellas genéticas** de cada trozo de dos en dos. Se utilizan programas informáticos.

Secuenciación del genoma.

Para secuenciar el genoma es necesario tener trozos cortos de DNA, de unos 500 pares de bases, para ello se cortan repetidamente y se clonan hasta conseguir una **librería de DNA**, que es una colección de fragmentos derivados del genoma de un organismo determinado (en este caso de la especie humana). La librería es una gran población de bacterias o virus bacteriófagos, cada uno de ellos portador de una molécula de DNA recombinante diferente. Si se trata de una librería en la que está todo el genoma se habla de **librería genómica**. Si el DNA es el del hombre y como vector de clonación se usa un **cósmido** (plásmido con algunos genes virales, que permiten clonación de fragmentos de DNA más grandes y una mejor penetración en la célula bacteriana al poder ser empaquetados dentro de la cápsida de un fago*), se necesitan unos 350000 cósmidos recombinantes, cada uno de ellos con un DNA inserto de 35000 a 40000 pares de bases.

•Cuando se clona un fragmento de DNA muy grande, la transformación de una bacteria como *Escherichia coli* con este DNA recombinante es más complicada y difícil, por ello su inclusión en un fago facilita su incorporación a la célula bacteriana por transducción. Sin embargo, en el interior de la célula el cósmido se propaga como un plásmido, ya que a pesar de llevar algunos genes del fago le falta la información necesaria para construir nuevas partículas víricas en las células.

El desarrollo de dos técnicas en 1977, una a cargo de **Alan Maxam** y **Walter Gilbert** y otra a cargo de **Frederick Sanger** ha hecho posible la secuenciación de moléculas muy largas de DNA. Ambas técnicas se basan en métodos electroforéticos que permiten **la separación de hebras de DNA que difieren en un solo nucleótido**. En los dos casos el DNA a secuenciar se corta y se forman 4 conjuntos de fragmentos marcados. Cada uno de los juegos de fragmentos se obtiene cortando la molécula de DNA a nivel de una determinada base. Es decir, se utilizan **4 tipos de reacciones** en esta técnica: una dará siempre fragmentos que **terminen en A**, otra **en T**, otra **en C**, otra **en G**.

Por ejemplo, si tenemos un oligonucleótido de secuencia pAATCGACT, una reacción que de lugar a fragmentos que terminen en C originará fragmentos de 4 y 7 nucleótidos (pAATC y pAATCGAC), mientras que si la reacción da lugar a fragmentos terminados en G tan solo originará un fragmento de 5 nucleótidos (pAATCG).

Si se marca el extremo 5' con un fósforo radiactivo y los fragmentos resultantes después de cada reacción **los separamos por electroforesis** sobre cuatro geles de análisis, se produce un **escalonado en bandas** (que depende del tamaño de los oligonucleótidos obtenidos por cada una de las cuatro reacciones) a partir del cual puede **leerse directamente la secuencia de bases**.

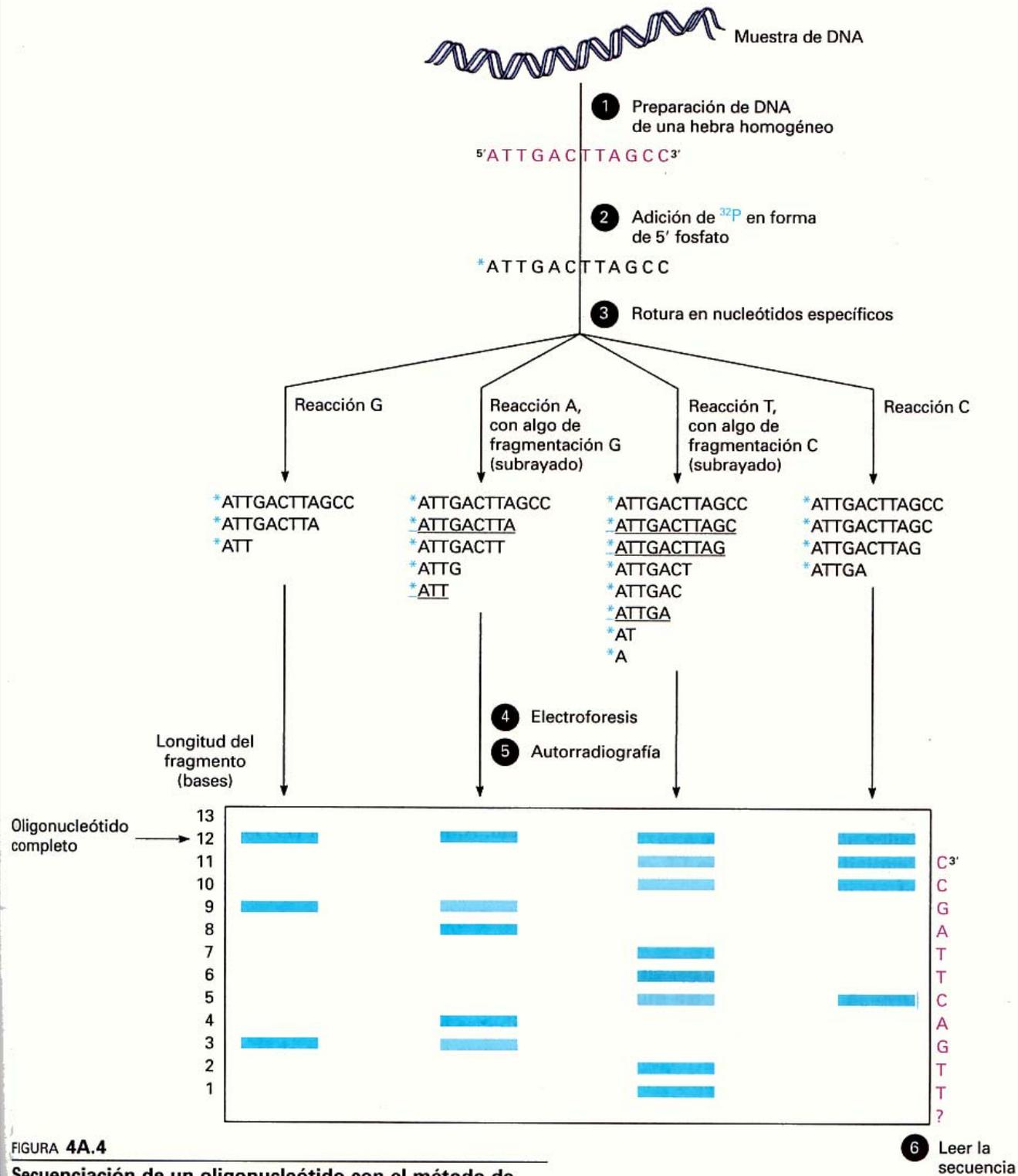
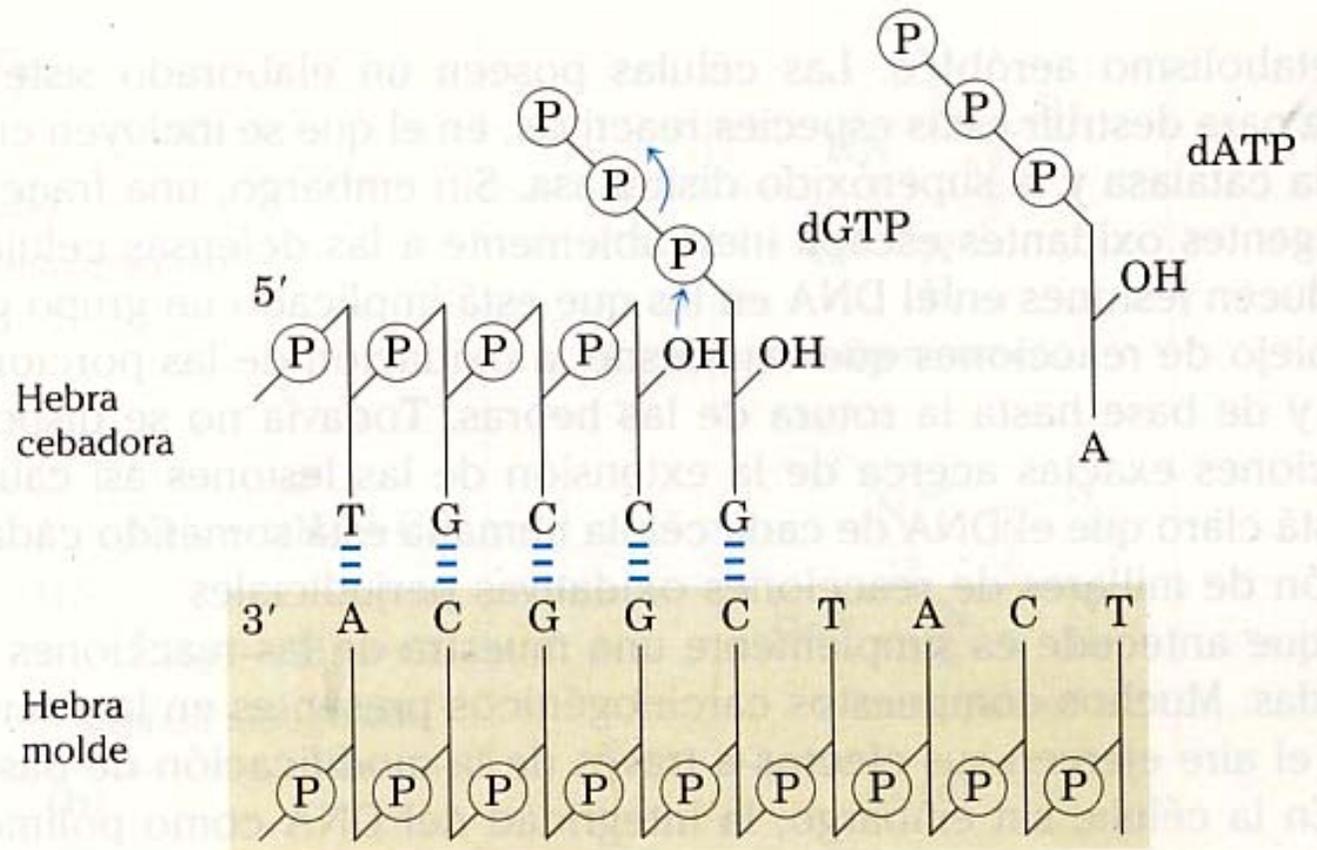


FIGURA 4A.4

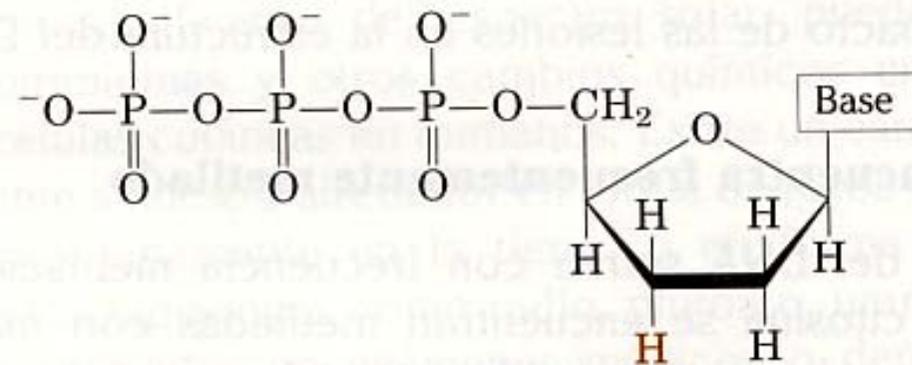
Secuenciación de un oligonucleótido con el método de Maxam-Gilbert.

Actualmente la secuenciación del DNA se hace de modo automático en base a una variación del método de Sanger en la que el cebador en cada reacción se marca con un tinte fluorescente. Así se obtienen miles de secuencias de nucleótidos en pocas horas. Por el método de Sanger los fragmentos se obtienen copiando la hebra molde utilizando análogos de nucleósidos alterados en el carbono 3, es decir se utilizan **didesoxinucleósidostrifosfato (ddNTP)**. Por lo tanto en el gel de electroforesis se obtiene la secuencia de la hebra complementaria a la que se está estudiando.

Figura 12-36 Secuenciación del DNA por el método de Sanger (didesoxi). Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA de la DNA polimerasa (Capítulo 24). La DNA polimerasa necesita, para expresar su actividad, un cebador al que se adicionan los nucleótidos y una hebra molde que dirige la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos que han de incorporarse a la secuencia **(a)**. El grupo hidroxilo en 3' del cebador reacciona con el desoxinucleósido entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) **(b)** para interrumpir la síntesis del DNA. Cuando el dNTP es reemplazado por el ddNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3' necesario para la siguiente reacción. El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto (a menudo marcado radiactivamente) **(c)**. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, a una reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán su crecimiento en las posiciones en las que normalmente se encuentre dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP con relación a ddCTP, existe tan sólo una pequeña posibilidad de que se incorpore el análogo en todos los casos en que deba incorporarse dC, pero, por otra parte, la cantidad empleada de ddCTP es suficientemente grande como para que exista una elevada probabilidad de que cada nueva hebra sintetizada incorpore un ddC en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene fragmentos que representan a cada uno de los de los residuos C en la secuencia. El tamaño de los fragmentos, separado por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite para cada uno de los cuatro ddNTP, y la secuencia puede leerse directamente a partir del autorradiograma del gel **(c)**. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, con lo que aquellos más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de nucleótidos más cercanas al cebador (extremo 5') y la secuencia se lee desde abajo hacia arriba. Obsérvese que la secuencia obtenida es la de la hebra *complementaria* a aquella que está siendo analizada. En la Fig. 12-35 se muestra un gel de secuenciación real.



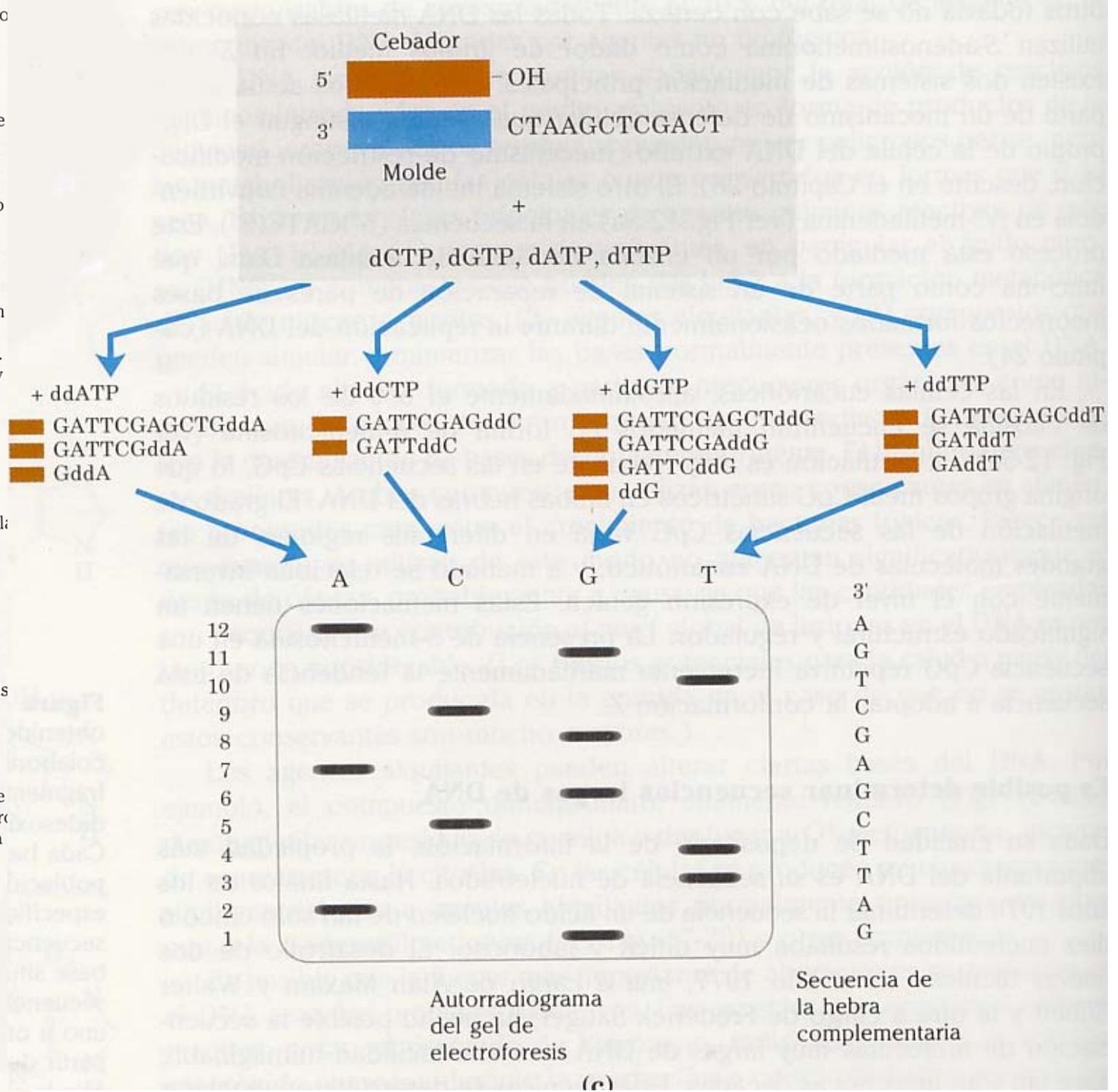
(a)



Análogo ddNTP

(b)

Figura 12-36 Secuenciación del DNA por el método de Sanger (didesoxi). Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA de la DNA polimerasa (Capítulo 24). La DNA polimerasa necesita, para expresar su actividad, un cebador al que se adicionan los nucleótidos y una hebra molde que dirige la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos que han de incorporarse a la secuencia **(a)**. El grupo hidroxilo en 3' del cebador reacciona con el desoxinucleósido entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) **(b)** para interrumpir la síntesis del DNA. Cuando el dNTP es reemplazado por el ddNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3' necesario para la siguiente reacción. El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto (a menudo marcado radiactivamente) **(c)**. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, a una reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán su crecimiento en las posiciones en las que normalmente se encuentre dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP con relación a ddCTP, existe tan sólo una pequeña posibilidad de que se incorpore el análogo en todos los casos en que deba incorporarse dC, pero, por otra parte, la cantidad empleada de ddCTP es suficientemente grande como para que exista una elevada probabilidad de que cada nueva hebra sintetizada incorpore un ddC en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene fragmentos que representan a cada uno de los de los residuos C en la secuencia. El tamaño de los fragmentos, separado por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite para cada uno de los cuatro ddNTP, y la secuencia puede leerse directamente a partir del autorradiograma del gel **(c)**. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, con lo que aquellos más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de nucleótidos más cercanas al cebador (extremo 5') y la secuencia se lee desde abajo hacia arriba. Obsérvese que la secuencia obtenida es la de la hebra complementaria a aquella que está siendo analizada. En la Fig. 12-35 se muestra un gel de secuenciación real.



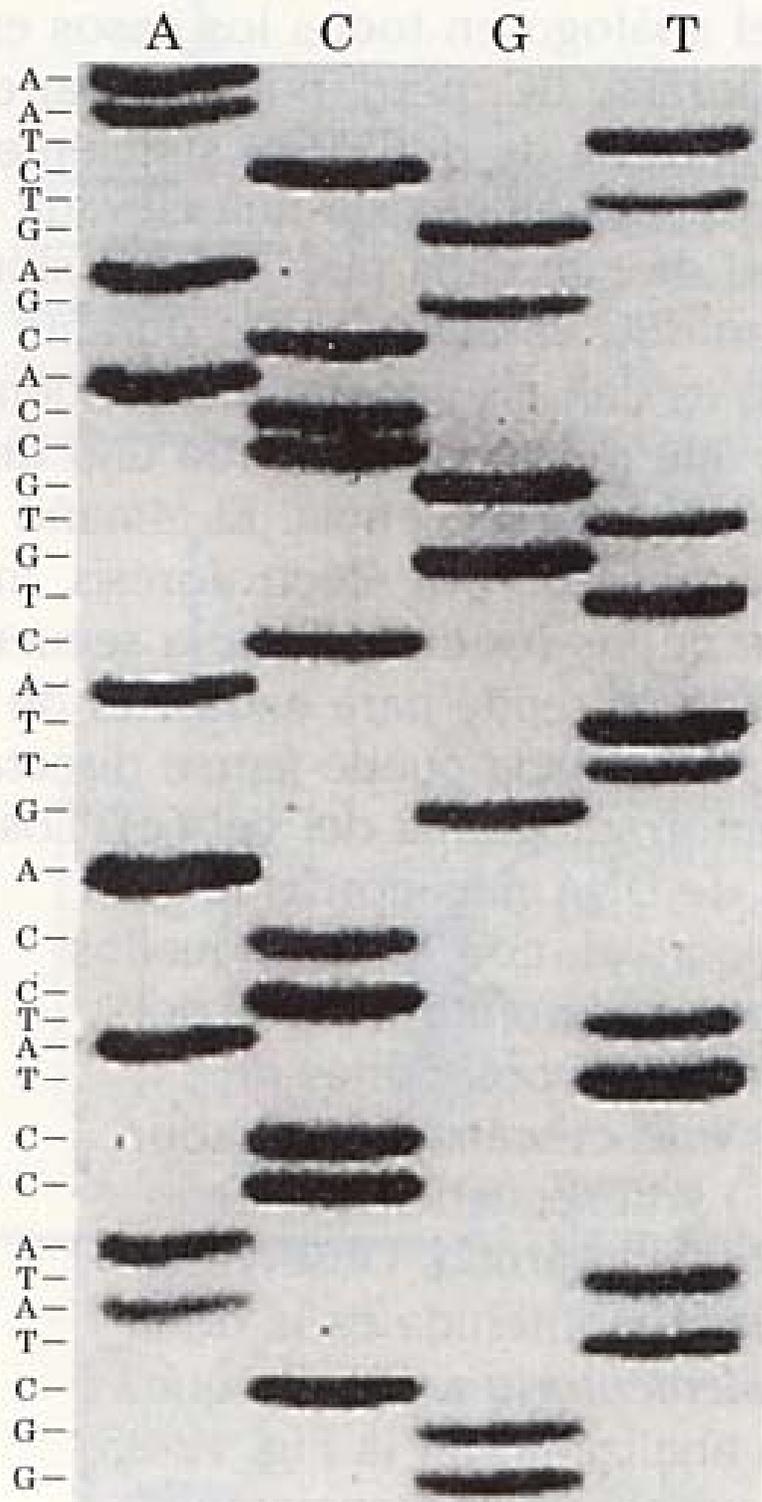


Figura 12-35 Sección de un autorradiograma obtenido con el método desarrollado por Sanger y colaboradores. El análisis electroforético de los fragmentos de DNA generados por cada uno de los didesoxinucleótidos genera una escalera de bandas. Cada banda de la película corresponde a una población de fragmentos de DNA de longitud específica producida durante las reacciones de secuenciación (ver Fig. 12-36). La identidad de la base situada en una posición determinada de la secuencia se deduce a partir de su localización en uno u otro carril; el orden de las bandas se lee a partir de la parte inferior del gel y se corresponde con la secuencia del DNA.

Una nueva arma para la medicina forense

Tradicionalmente, uno de los métodos más exactos para vincular un individuo a la escena de un crimen es la toma de huellas dactilares. Ahora se dispone de una nueva técnica de identificación gracias a las técnicas de DNA recombinante. Ésta se denomina a veces huella dactilar de DNA (o también registro o perfil de DNA), y en algunos aspectos es más poderosa que otros métodos de identificación.

La determinación de la huella dactilar de DNA se basa en el **polimorfismo de secuencias** que se da en el genoma humano (y en el genoma de todos los organismos). Los polimorfismos de secuencia son pequeñas diferencias secuenciales (generalmente cambios de pares de bases únicos) que se dan entre individuos una vez cada pocos cientos de pares de bases de promedio. Cada diferencia con respecto al genoma humano consenso se presenta normalmente en sólo una pequeña parte de la población, pero todos los individuos muestran alguna. Algunos de los cambios de secuencia afectan a dianas de restricción, originando diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos de DNA producidos por digestión con un enzima de restricción, en individuos distintos. Estas diferencias de tamaño se conocen como **polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción**, o RFLP (“restric-

tion fragment length polymorphisms”). Una sonda para una secuencia que se repite varias veces en el genoma humano generalmente identifica unos pocos de los miles de fragmentos de DNA que se generan cuando se digiere el genoma humano con una endonucleasa de restricción.

La detección de RFLP se basa en un procedimiento de hibridación llamado **“transferencia Southern”** (“Southern blotting”) (Fig.1). En primer lugar, los fragmentos de DNA procedentes de la digestión de DNA genómico con endonucleasas de restricción se separan en razón de su tamaño en un gel de agarosa. Los fragmentos se desnaturalizan por inmersión en álcali, y se transfieren a papel de nitrocelulosa de tal modo que en el papel se reproduzca la distribución de fragmentos del gel. A continuación se sumergen los papeles en una disolución que contenga la sonda de DNA marcada radiactivamente. Los fragmentos que hibridan con la sonda se revelan por autorradiografía, usando procedimientos similares a los descritos en la Figura 28-10.

Las secuencias de DNA genómico que se usan en este test son frecuentemente regiones que contienen DNA repetitivo (cortas secuencias repetidas miles de veces en tándem; ver p. 797), que son comunes en los genomas de eucariotas superiores.

El número de unidades de repetición varía de un individuo a otro (excepto en el caso de gemelos idénticos). Si se elige una sonda apropiada, la distribución de bandas en este tipo de experimento puede ser distinta para cada individuo ensayado. Si se usan varias sondas, el test puede ser tan selectivo que puede ser posible identificar a un individuo determinado de entre toda la población humana. Sin embargo, este procedimiento por transferencia Southern necesita muestras de DNA relativamente frescas y mayor cantidad de DNA del que hay normalmente presente en la escena del crimen. Para aumentar la sensibilidad, este método se ha acoplado con el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver Fig. 28-12), que permite la amplificación de pequeñas cantidades de DNA que de otro modo se perderían. Este test mejorado permite que se obtengan huellas dactilares de DNA de un único pelo, una pequeña muestra de semen de una víctima de violación, o de muestras que tienen meses e incluso años.

Desde su introducción en 1985, estos métodos se han desarrollado hasta el punto de constituir pruebas decisivas en los tribunales del mundo entero. En el ejemplo de la Figura 1, se analiza el DNA del semen tomado de una víctima de violación y asesinato, y se compara con el DNA de la víctima y de

dos sospechosos. Cada una de las muestras se digirió para dar fragmentos que se separaron por electroforesis en gel. Se utilizaron sondas de DNA radiactivas para detectar la pequeña fracción de estos fragmentos que contenía secuencias complementarias a las mismas. El tamaño de los fragmentos identificados varió de un individuo a otro, como se puede comprobar en este caso observando los tres perfiles mostrados por los tres individuos (la víctima y dos sospechosos). Uno de los sospechosos de violación mostró un perfil de bandas idéntico al de la muestra tomada de la víctima. En este caso se usó una única sonda, pero se pueden usar tres o cuatro para realizar una identificación positiva. Estos resultados han sido útiles tanto para condenar como para absolver a cada uno de los dos sospechosos. Esta técnica también se puede utilizar para establecer la paternidad con un alto grado de confianza. Los resultados de la toma de huellas dactilares de DNA han sido rebatidos con éxito en algunos juicios, debido a irregularidades y ausencias de controles en muchos ejemplos anteriores. El impacto a largo plazo de esta tecnología en los juicios continuará creciendo conforme se establezcan reglas generales y se introduzcan los métodos en la mayoría de los laboratorios forenses.

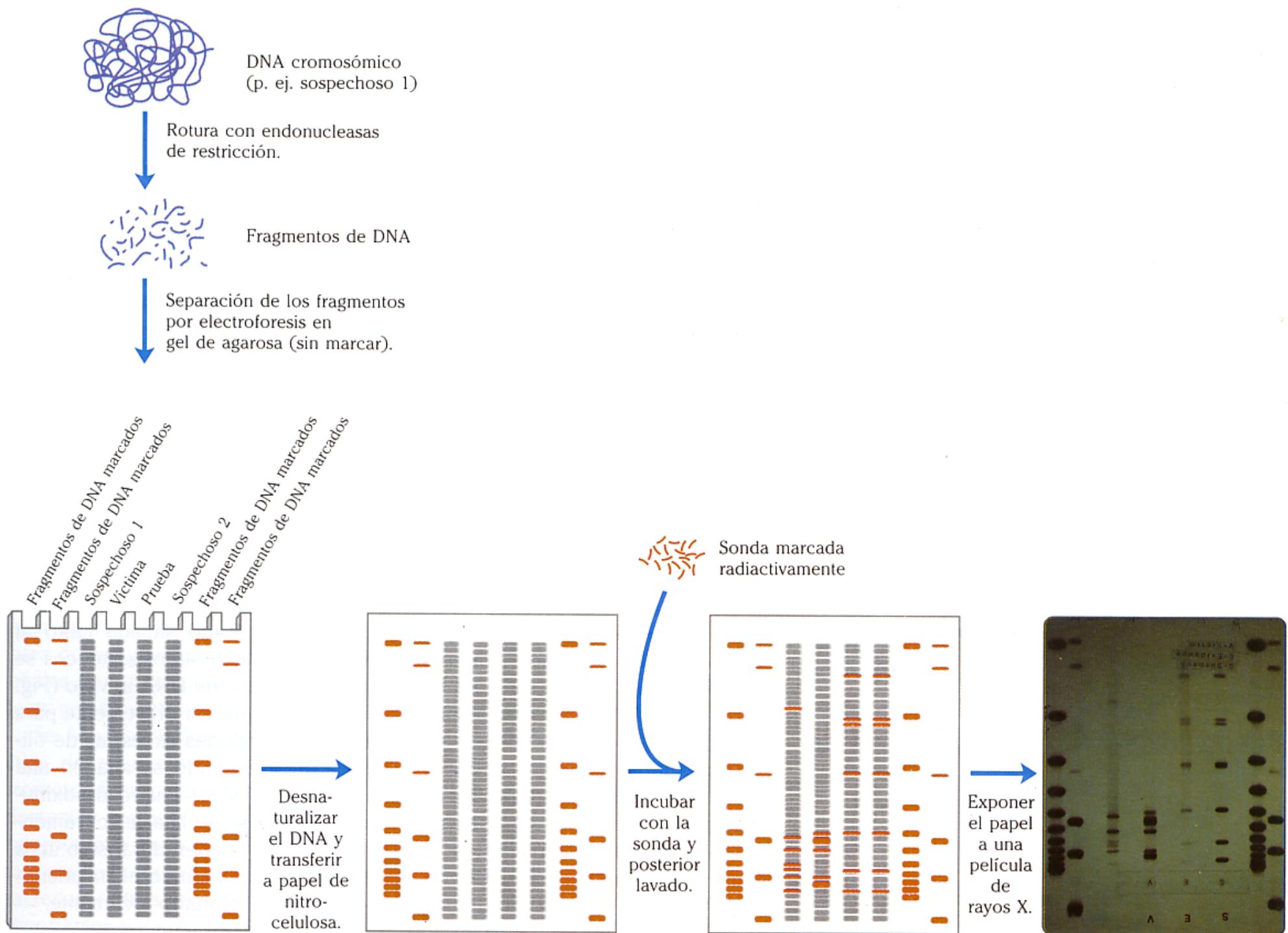


Figura 1 Método de transferencia Southern aplicado a la determinación de la huella dactilar de DNA.