**GUÍA DE ESTUDIO**

APLICACIONES DEL ADN RECOMBINANTE Y LIGAMIENTO Y RECOMBINACION.

En el siguiente material se ofrece la posibilidad de reflexionar sobre los fundamentos del estudio del ADN recombinante y su utilidad en caracterización molecular de una mutación, comprender la utilidad de los estudios de ligamiento en humanos. Se corresponde con los capítulos 12 y 13 del texto de estudio.

Hasta ahora se han estudiado características genéticas que han ido surgiendo con el avance alcanzado por la tecnología y la interpretación de sus resultados. Así se han incrementado el número de aberraciones cromosómicas estructurales, mecanismos biológicos nuevos, detectados por descubrimientos alcanzados por la aplicación de técnicas moleculares de estudio y manipulación del ADN.

Esta guía aborda un fenómeno genético cuyo estudio actual está dirigido a conocer la localización cromosómica de mutaciones que se expresan como enfermedades genéticas o caracteres diversos del organismo humano.

La mayoría de las personas que trabajan en biotecnología con frecuencia utilizan términos técnicos de uso común en biotecnología en Inglés. Ofrecemos la traducción de algunos de ellos al español.

cDNA: ADN complementario logrado a partir de la copia de un ARNm conocido. Se usa decir " Un clon de cDNA", "una "genoteca" (biblioteca) (library) de cDNA" o un "cDNA aislado". En español ADNc.

Hibridación (hibridization): La unión de dos hebras complementarias de ADN, formando una molécula híbrida.

Insertar (insert): Insertar un fragmento de ADN clonado, en un vector específico. "Ellos purificaron el "insert"..."

Genoteca "library": Colección de clones recombinantes de una fuente de genes conocidos, de ADNc o de otras secuencias de ADN de interés.

Ligar "ligation": Formar uniones fosfodiester de moléculas de doble cadenas de ADN, como un paso esencial para lograr un ADN recombinante, con el uso de la enzima ADN ligasa. "Los fragmentos fueron "ligated"..."

Hospedero "host": Se refiere al organismo utilizado para aislar y propagar una molécula de ADN recombinante.

ADN recombinante " recombinant DNA": La unión de fragmentos de ADN obtenidos por la acción de las enzimas de restricción.

Sonda "probe": Un ADN o ARN clonado y marcado con radioactividad u otros marcadores detectables que permitan identificar la hibridación por complementariedad de bases del fragmento que se estudia. Se suele decir "... el "probe" beta globina..."

Vector "vector" Molécula de ADN dentro de la cual el fragmento de ADN de interés es clonado. El vector tiene que ser capaz de replicarse en un hospedero particular.

Las primeras reflexiones para orientar su estudio se encuentran en las respuestas a:

¿Para qué es importante en la práctica de la Genética Médica , conocer en cuál cromosoma y en qué punto y sitio específico está un gen?

¿Cuáles son las técnicas moleculares se emplean?

¿Cuáles instrumentos permiten conocer las características de tamaño y estructura de un gen en número de bases, exones, intrones o dónde se encuentra ubicado un promotor?

¿Cómo se pueden obtener señales que permitan estudiar los segmentos de ADN y su relación con una mutación que expresa una enfermedad específica?

Las respuestas a estas preguntas requieren estudiar y comprender los fundamentos de la tecnología del ADN recombinante.

¿Cómo estudiar este aspecto de este tema?

En primer lugar ir por pasos, primero conocer las herramientas con las que se trabaja en biotecnología que como su nombre indica no se trata de herramientas comunes sino de herramientas de tipo biológico, pero como herramientas al fin con ellas pueden manipularse el material genético no solo del humano sino de todas las especies que contengan ADN.

¿Cómo obtener cantidades apreciables de segmentos específicos de ADN?

Podemos estudiar los pasos necesarios en tres momentos:

•  Obtención de un segmento específico de ADN del genoma humano.

•  Unión de este segmento de ADN humano que se estudia a una molécula de ADN de un microorganismo.

•  Obtención de múltiples copias del segmento de ADN humano que se estudia o sea clonación de ese segmento.

¿Cómo obtener un segmento de ADN humano para su estudio?

•  PRIMERA HERRAMIENTA.

Enzimas de restricción.

•  SEGUNDA HERRAMIENTA

Un vector.

•  TERCERA HERRAMIENTA

Sondas o probes y oligonucléotidos.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ¿Qué son?

Las bacterias producen un grupo de proteínas que tienen la propiedad de reconocer ADN extraño que penetre a ellas y de degradarlo o destruirlo. Uno de los mecanismos bioquímicos por el cual se destruye el ADN extraño para la bacteria se conoce con el nombre de restricción y a las enzimas que tienen esta función se les denomina enzimas de restricción.

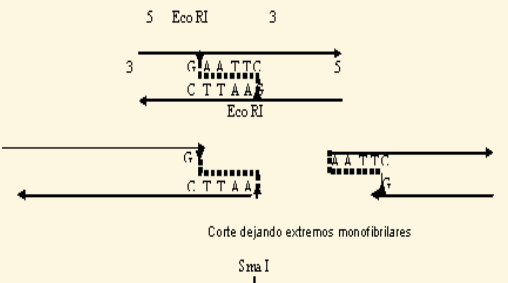
Cada bacteria tiene su propias proteínas con estos fines luego es de esperar que siendo un mecanismo común existan tantas enzimas de restricción como bacterias y subtipos de bacterias.

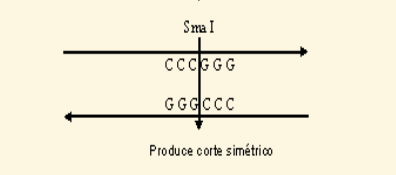
Estas herramientas que son muchas se les nombra de modo tal que puedan ser comercializadas, recordemos que su nombre viene de las letras iniciales del nombre de la bacteria de modo tal que la enzima de restricción de la E cherichia co li RYI se conoce con el nombre Eco RI , correspondiendo el I romano con el orden de descubrimiento.

Recordemos otras enzimas de restricción como Bam H I de la bacteria B acillus am yloloquefaciens H , la Hnd III del H aemophilus in fluenzae R d, la Sma I de la bacteria S errata ma rcescens.

¿Cómo reconocer la acción hidrolítica de cada tipo de enzima de restricción?

Por su sitio de corte del ADN que involucra el reconocimiento por la enzima de cuatro a 6 pares de base de la secuencia del ADN y que tienen la característica de ser simétricas en ambas cadenas en el sentido 5' a 3' y a lo que se le denomina con el término palindrómicas.

****

****

Un segmento de ADN puede entonces, cortarse en pedazos cada vez más pequeños, usando varias enzimas de restricción paso a paso.

Cada paso produce según el tipo de corte fragmentos de corte simétrico o de corte asimétrico con extremos monofibrilares.

¿Cómo insertar o pegar un segmento de ADN humano en el ADN de un microorganismo?

A este paso se le denomina recombinación in vitro y requiere además de la enzima de restricción urilizada para obtener el segmento que se quiere insertar, de un vector y de una enzima ADN ligasa (recordar que esta enzima sella brechas en la cadena de nucleótidos del ADN).

Con esto es suficiente si los extremos cortados son monofibrilares. ( Ver esquemas en el texto).

¿Qué es un vector?

Es una molécula de ADN que se emplea para introducir un segmento de ADN deseado en una célula.

La utilidad de un vector depende entonces de las siguientes propiedades

•  Que se replique.

•  Que se pueda detectar.

•  Que se pueda introducir en una célula.

Mencionemos al menos tres tipos de vectores:

•  Los plásmidos (moléculas de ADN circular encontradas en muchas bacterias).

•  Los virus que tienen su ADN protegido por una cubierta de proteínas y se fija a su vez a la cubuierta de proteínas de la bacteria inyectando su ADN y dejando fuera de la bacteria su estructura proteínica. Aprovecha el aparato metabólico de la bacteria para la replicación de su ADN.

•  Los denominados cromosoma artificiales de levadura, que tiene centrómero y telómeros para ambos brazos cromosómicos y que permite insertar ADN entre centrómero y telómeros y que por tal motivo reciben el nombre de YAC por Yeast Artificial Chromosome.

Las diferencias entre estos vectores está en el tamaño del ADN que permiten insertar.

Ya dentro de la célula el ADN del recombinante se replica y con segmento de ADN humano que se estudia y de esta forma se logra multiplicar el segmento y tener un número de copias muy grande del segmento de ADN deseado, a este fenómeno se le denomina clonación.

A partir del segmento de ADN humano clonado se pueden hacer múltiples investigaciones acerca de la estructura y función de ese segmento, entre ellas la obtención de sondas o probes. Recordemos que se les denomina así a una hebra de ADN obtenida del segmento clonado y a la cual se ha marcado añadiendo fosforo radioactivo. Esta sonda entonces tiene la propiedad de unirse por complementariedad de base con segmento complemetario y que se hará visible por la señal radioactiva que emite.

Procedemientos técnicos para el estudio de un gen o de un segmento de ADN que se investiga.

•  Para detectar ADN fundamentalemnete:

•  Southern blot.

•  PCR.

•  Secuenciación.+

•  Para el estudio de ARNm:

•  Northen blottig. PCR.

•  Secuenciación

•  PCR

•  Para el estudio de las proteínas:

•  Western blotting.

Recordar que los nombres Northern y Western blotting fueron asignadas a partir del Southern ¿Por qué Southern? Es algo que deben buscar en la literatura y tiene una historia interesante.

¿En qué consiste el Southern blot?

Es una electroforesis en gel de agarosa en el que se coloca una muestra de ADN por ejemplo de una perosna. El ADN se extrae de un tejido humano que genralmente es de leucocitos obtenidos de sangre periférica y que se ha sometido a la acción de una enzima de restrricción específica con la cual se obtiene el segmento de ADN que se desea estudiar. Por ejemplo la Eco RI. Al tratar una muestra del ADN extraido, con esta enzima se obtendrán múltiples fragmentos incluyendo el segmento de ADN que ya se ha clonado. Este ADN total sometido a la acción de la EcoRI se expone a la electroforesis y los múltiples fragmentos obtenidos se separan por su peso molecular. Los más ligeros migran o se separan más del origen donde se puso la muestra, mientras que los más pesados quedan más cercanos al origen. El siguiente paso es separar la doble helix de los fragmentos para lo que se utilizan alcalis. Sobre el gel se coloca en este momento de la técnica, un filtro de nitrocelulosa al cual se transfieren por capilaridad como ocurre con la tinta en un papel secante (de ahí la palabra blot).

¿Cómo ahora reconocer el segmento de ADN que nos interesa?

Pues bien si ese segmento ha sido clonado, se ha podido elaborar una hebra de ADN complementaria marcada con fósforo radioactivo o se se ha elaborado una sonda la cual se coloca (esto es una solución que la contiene) sobre el filtro de nitorcelulosa al cual ya se han transferido los segmentos de ADN que estaban en el gel. Entonces la molécula monofibrilar de la sonda se hibridiza con su hebra complementaria transferida al filtro. La señal se hace visible por el fosforo radioactivo y de esta forma podemos identificar el segmento de ADN que hemos querido estudiar.

¿Qué es el PCR?

Esta técnica permite amplificar selectivamente una simple cadena de ADN localizada entre dos oligonuclétidos que señalan los extremos del segmento que ha de amplificafse esto significa que primero se ha de conocer la estructura nucleotídica de los extremos 5' del segmento de ADN que se pretende amplificar y que sirven como iniciadores de la síntesis de ADN que comenzará con la acción de la polimeraza. Es una forma de clonación in vitro de un segmento de ADN.

Primero la muestra de ADN se trata con calor intenso para su desnaturalización, se añaden los oligonucleótidos que se hibridan en sus regiones específicas 5' a medida que ocurre el enfriamiento relativo se añade la polimeraza que se obtiiene de una bacteria denominada Thermophilos aquaticus por lo que se le llama Taq y que es resistente a cambios de temperatura. Existen equipos que realizan de forma automatizada esta técnica de PCR lo que facilita mucho el proceder obteniéndose muchas copias en pocos minutos. Su ventaja radica en que con muy poca cantidad de ADN es posible hacer un diagnóstico.

Por último la secuenciación cuyos fundamentos técnicos hizo posible conocer la secuencia de bases de cada uno de los cromosomas humanos, sus detalles aparecen en el texto, ahora se realiza de forma automatizada y en poco tiempo se puede conocer la secuencia de un fragmento de ADN que puede no ser un gen específico, pero identificar su secuencia de bases permie al propio tiempo encontrar mutaciones para el locus que se esté estudiando.

¿Qué aplicación tiene la tecnología del ADN recombinante en la que esté involucrada de algún modo la prártica de la Genética Médica ?

Utilizando estas técnicas y herramientas se ha podido conocer como está formado en secuencias de bases como ya hemos dicho, un cromosoma humano. Es algo así como conocer cada metro de una carretera o mejor cada Km. En Km hay un área de pastoreo de reses, en otro hay sembrados cítricos, en otro hay un caserio, en dos adyacentes hay varios caserios agrupados en un Consejo Popular, dos Km continuos hay edificios de escuelas en el campo, 10 Km hay un poblado y así se hace el mapa de una carretera específica. Lo mismo pasa con el ADN que tiene sus medidas en términos de pares de bases (bp) o en kilobases kb, (un kb = 1000 bp) o megabases (Mb = un millon de pares) de bases, 1 cM es equivalente a 1Mb. El genoma humano haploide tiene 3500 Mb 0 sea 3, 500 millones de pares de bases (3.5 X 10 9 bp) en las que se encuentran contenidos entre 30 000 y 50 000 genes.

¿En cuál cromosoma está cada uno? ¿Qué caracterististicas tienen en su estructura, como funcionan, cuantas mutaciones tienen en su estrutura?

La aplicación y el análisis de las técnicas mencionadas pueden dar respuestas a esas preguntas

Métodos de la aplicación de las técnicas PCR, Southern blot y secuenciación.

Los metódos pueden ser clasificados de acuerdo con las intenciones de su uso en directos e indirectos:

Métodos directos: pueden emplearse las técnicas de Southern blot, PCR o secuenciación cuando se ha logrado clonar un segmento de ADN que tiene un significado específico, ya sea para ser usado de referencia en una secuencia de pb de un cromosoma o porque es una cadena simple de ADN que contiene un gen cuyas mutaciones se expresan en una forma proteínica que tiene que ver con las funciones celulares o que se expresa como una enfermedad específica al impidir la función de alguna de esas proteínas. Utilizando estos métodos se pueden caracterisar mutaciones de la Fibrosisis Quistica , de las hemoglobinas alfa y beta, de las hemofilias, de la fibrilina, del síndrome frágil X, de la distrofia muscular Duchenne. La selección del método será una estrategia que corresponde al equipo de genetistas y técnicos involucrados en los objetivos del estudio.

Métodos indirectos: se emplean las mismas técnicas pero con objetivos de conocer la presencia de un locus y su relación de cercanía con el segmento de ADN conocido. Son métodos de estudio de ligamiento. Entonces las técnicas se aplican sobre el segmento conocido para de forma indirecta y utilizando métodos como el lod score para el caso de humanos, identificar la posibilidad de ligamiento entre ellos. O también conociendo que existe ligamiento inferir de forma indirecta si la persona tendrá o no la mutación que expresa la enfermedad en cuestion.

También cuando aún teniendo un locus clonado no es posible con las sondas construidas identificar todas las posibles mutaciones de un locus y se necesita conocer en un individuo el haplotipo que contiene la mutación problema.

Esto ocurre con locus que contienen muchas mutaciones que afectan la función normal de una proteína como la del gen de la proteína con función de canal de cloruro, que ya ha sido estudiada. Hay familias en las que a pesar de que la clínica diagnostica una fibrosis quistica no se identifican las mutaciones conocidas que se realizan en un laboratorio determinado (recoradar que hay cerca de mil mutaciones para este locus, que producen la FQ ) y entonces hay que acudir al estudio de métodos indirectos en el papá, la mamá y el niño afectado para con esa información poder predecir la posibilidad de esta enfermedad en un nuevo embarazo de la pareja, como se verá en el Tema 8.

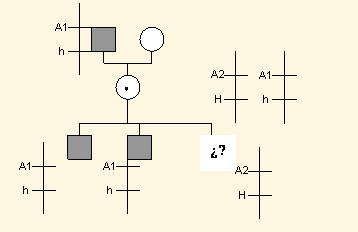
1. Genes ligados al cromosoma X.

H = alelo normal para factor de la coagulación

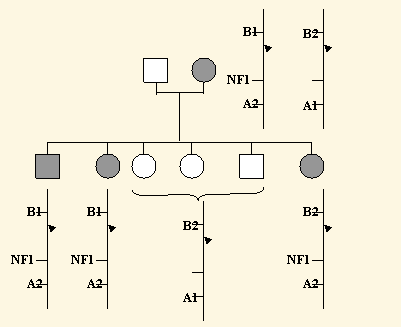
h = alelo mutado, defecto de la coagulación tipo de hemofilia A

Locus A del segmento de ADN recombinante estudiado (RFLP), tiene dos alelos denominados 1 y 2.

La mujer portadora está embarazada y el estudio del ADN fetal da el resultado expresado en el esquema. ¿Puede tener el hijo la enfermedad? Explique.

****

2. Ejemplo de la neurofibromatosis 1 (NF1). Se estudian dos loci de RFLP, uno B con dos alelos 1 y 2 por encima del centrómero, y uno A también con dos alelos 1 y 2 por debajo del locus del NF1. Explique la segregación de estos loci en la familia.

****

**ESTUDIAR EL CAPITULO 12 Aplicaciones del ADN recombimate**