

Técnicas de ADN recombinante: la manipulación genética

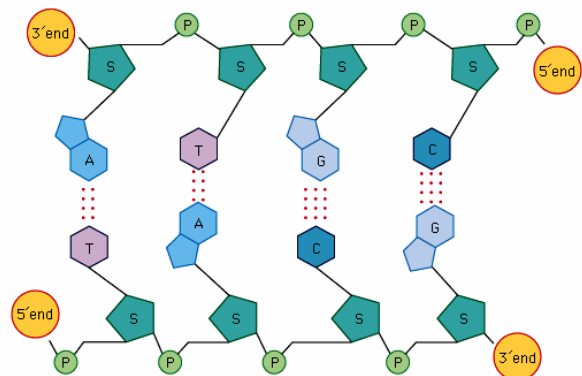
A partir de los años 70 se desarrollaron las herramientas de la biología molecular o la ingeniería genética o lo que se ha llamado técnicas del ADN recombinante. Y esto ocurrió, en comparación con lo que fue el resto de la historia de la ciencia, de forma muy rápida entre los años 70 y 80.

En estas primeras etapas se estaba trabajando sobre la posibilidad de manipular los genes, es decir:

- A) tenerlos aislados,
- B) amplificarlos, en el sentido de tener muchas copias de la misma secuencia,
- C) conocer la secuencia exacta, es decir el orden de las bases de esos genes
- D) una vez aislado poderlo expresar fuera de su localización natural, lo cual tendrá una enormidad de otras aplicaciones.

Toda esta manipulación genética está simplemente basada en unas pocas propiedades del ADN que han permitido avanzar muchísimo en las técnicas.

Recordemos: el hecho de que el ADN sea una doble cadena, y las cadenas sean complementarias y que la complementariedad de bases sea un requisito suficiente para que dos cadenas que estaban en simple hebra se encuentren y se vuelvan a reconstituir es la base de la mayor parte de la manipulación. Dos simples cadenas de ADN reconstituyen una doble cadena unida por puentes de hidrógeno basado



simplemente en la complementariedad de bases, en el hecho de que si en una de las hebras hay una serie de nucleótidos con las bases GCAT cualquier otra hebra que tenga CGTA, es decir complementaria, va a poder unirse y reconstituir una doble cadena en determinadas condiciones de temperatura y de pH dadas. Esta es una de las características básicas. A esto se agrega el hecho de que el ADN tiene la información en el orden de las bases y que el código por el cual esa información es transcrita y traducida a una proteína es prácticamente universal: ese tramo de ADN si es que codifica para algo puede producir esa proteína en diversas condiciones.

Las enzimas de restricción

Uno de los avances más importante en los inicios de la biología molecular, fue el descubrimiento de las **endonucleasas de restricción**, es decir de enzimas que pueden cortar el ADN y que tienen la ventaja de que lo cortan en sitios concretos. Fueron descubiertas en bacterias, y son enzimas que estas bacterias usan para destruir ADN que ingresa a ellas, por ejemplo ADN de virus bacteriófagos. Con las enzimas, la bacteria puede degradar este ADN foráneo sin degradar su propio ADN. Varias de ellas fueron identificadas en la década del 70 y siguieron descubriéndose otras posteriormente, aisladas de diferentes cepas bacterianas. La ventaja de estas enzimas es que reconocen un sitio para cortar, pueden ser un diseño de 4, 6, 8 bases, pero tienen que estar organizadas con una secuencia exacta y

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

1965 - Arber y col.

1978 - Smith y Nathan . Premio Nobel

Enzima de tipo II.

Ej: Eco RI (E.coli cepa RY13)

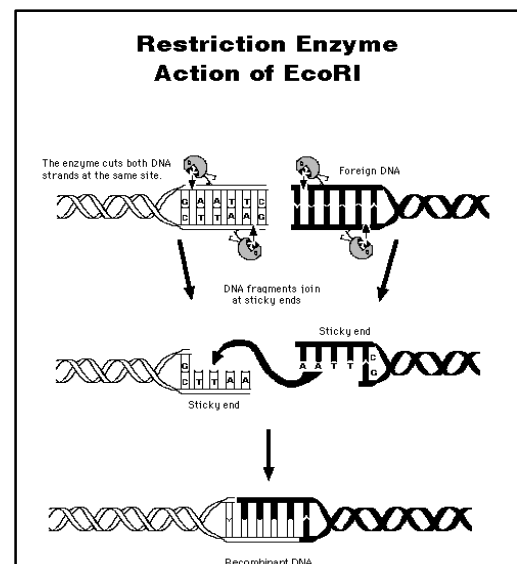
Reconocimiento y corte:



no otra. Por ejemplo, la enzima que se llama EcoR1 (porque se aisló de la bacteria *Escherichia coli*, que reside normalmente en el intestino), solo corta si encuentra la secuencia GAATTC. Si hay una base que está cambiada ya no corta.

Estas enzimas de restricción, entonces permiten cortar el ADN en sitios específicos. Algunas de ellas cortan dejando extremos cohesivos que se pueden pegar nada más que por complementariedad de bases. Esto quiere decir que un extremo que generó una enzima y otro que generó la misma enzima aunque provengan de moléculas de ADN diferentes, se pueden unir y generar lo que se llamó inicialmente un ADN recombinante. Este hito de los años 70 de poder recombinar, es decir hacer construcciones genéticas, hacer ingeniería en genética fue la base de una enormidad de otros avances.

En 1972 justamente se genera el primer ADN recombinante combinando el ADN de un plásmido, con un tramo de ADN de anfibio.



La clonación

Recordemos que los plásmidos son moléculas de ADN circulares, pequeñas, que se encuentran en las bacterias por fuera del ADN cromosómico. Dado que se adaptan a albergar otro pedazo de ADN, se abre la posibilidad de poner un gen determinado (o un tramo de ADN determinado) en un plásmido circular, generando un ADN recombinante. En estas circunstancias el plásmido está funcionando como un “**vector**”: es capaz de llevar el trozo de ADN (que denominamos **inserto**) mantenerlo, tenerlo



aislado, lo cual era uno de los propósitos de la manipulación genética.

El plásmido, que naturalmente está en las bacterias, puede volver a las bacterias y crecer con ellas. Se pueden **transformar** bacterias con plásmidos que llevan inserto. Una vez dentro de la bacteria, el plásmido se replica con ella. Así se consigue que el trozo de ADN además de estar aislado, sea amplificado y se obtienen rápidamente muchas copias idénticas.

Decimos que el trozo de ADN fue **clonado**. Teniendo una cantidad mayor de ADN del tramo de interés éste puede ser secuenciado, cortado con enzimas de restricción u otras manipulaciones.

Los vectores

Con el paso del tiempo surgió la necesidad de que los vectores albergaran pedazos más grandes. El tamaño medio del inserto de un plásmido es de 10000 bases. El objetivo de clonar genes eucariotas completos o de secuenciar un genoma exige poder incluir trozos de mayor tamaño. De esta manera, uno de los grandes polos de desarrollo que surgieron fue la obtención de mejores vectores, vectores que albergaran pedazos grandes en lo posible genes enteros. El primer paso fue pasar a utilizar como vectores los propios bacteriófagos (virus que infectan bacterias); y después se desarrollaron otros, que fueron construcciones, combinaciones, de trozos de plásmido, de bacteriófago, de cromosoma de levadura, etc. Siempre buscando vectores que llevaran mayores insertos y que fueran eficientes. Así surgen muchos, como por ejemplo los BACs (bacterial artificial chromosome) en los que están contenidos actualmente los trozos de ADN del genoma humano. Así se pudo por ejemplo clonar un gen que tiene alrededor de un millón de pares de bases que es el gen de la distrofia muscular, el gen se pudo tener entero para poderlo estudiar y eventualmente expresar.

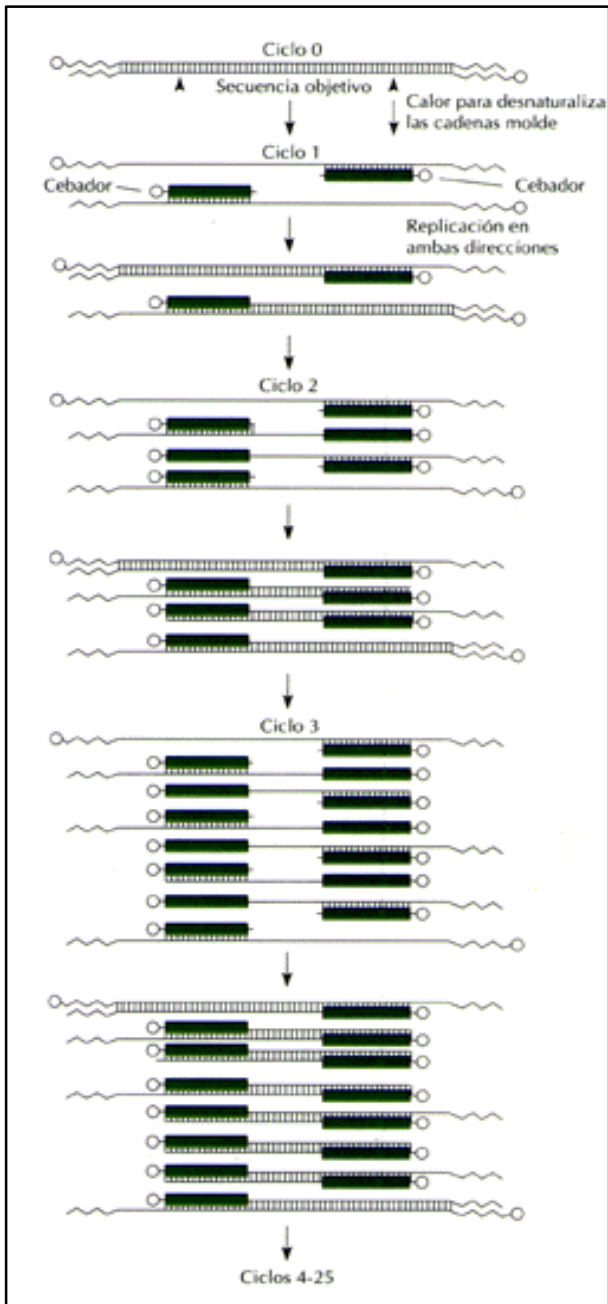
De esta forma se puede también tener todo el genoma cortado en pedazos y clonado (cada pedazo inserto en un vector) para posteriormente estudiarlo. Esto es justamente una genoteca: el clonado de un juego completo del genoma de una especie, **genoteca o biblioteca genómica**.

Este tipo de trabajo obviamente, no se realiza solamente con la especie humana, y el genoma de otras especies ha sido muy estudiado, y en algunos caso el Proyecto de descripción de su genoma está muy avanzado o terminado.

Para hacer una genoteca debemos extraer ADN de algún tejido del individuo. Luego, hacer uso de las enzimas de restricción que cortan en sitios concretos; esos sitios un poco al azar aparecen a lo largo de todo el genoma y entonces van a cortar el ADN en trozos, y se puede lograr que todos sean incluidos en vectores. Estos vectores pueden volver a su huésped (por ejemplo la bacteria) y así conservarse la genoteca en una heladera, en un freezer



La reacción en cadena de la polimerasa



También en los años 80 apareció otra técnica revolucionaria que permite tener mucha cantidad de un fragmento de ADN de interés: es la técnica de **PCR**, o "reacción en cadena de la polimerasa".

Es una técnica muy rápida, que por otra parte puede funcionar partiendo de trazas de ADN. Por ello se utiliza mucho en el área forense y de identificación humana, así como en genética de poblaciones, en casos en los que se tiene muy poquito ADN.

Esta técnica aprovecha las características de la replicación del ADN, es decir que a partir de un pequeño cebador la polimerasa puede proseguir una cadena. El requisito como se ve en la figura es poder diseñar dos cebadores adecuados. Por la posición de estos cebadores, al cabo de una serie de rondas de replicación, (hablamos de una reacción en cadena), tenemos grandes cantidades de un solo trozo, el tramo que va desde uno de los cebadores al otro. Esta técnica, en la que el ADN tiene que ser desnaturalizado por calor para iniciar cada nuevo ciclo se tornó muy fácil cuando hizo uso de una polimerasa que resiste el calor (aislada de una bacteria de aguas termales). Esta técnica se utiliza ya rutinariamente para muchos diagnósticos.