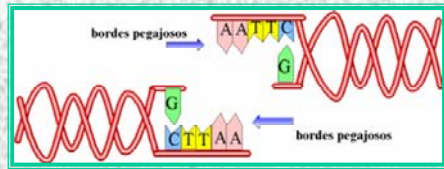
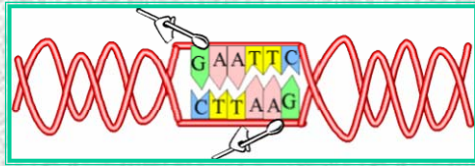


Ingeniería genética conjunto de técnicas, nacidas de la biología molecular, que permiten manipular el genoma de un ser vivo

1970s → Una década importante para la biología molecular y celular



descubrimientos CLAVES
Aislamiento DNA y RNA
enzimas de restricción
DNA ligasa
Secuenciación del DNA

Manipular el DNA

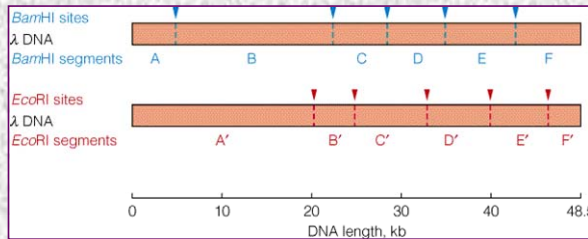
DNA RECOMBINANTE

Se introduce en bacterias, principalmente y se obtiene DNA concretos, rápidamente y en grandes cantidades

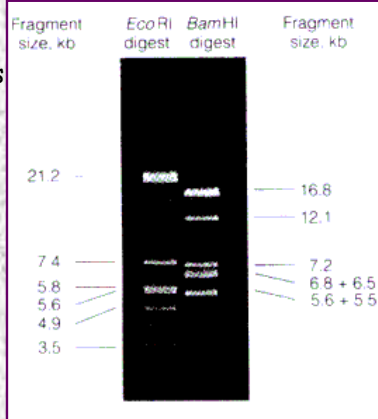
GEN

PROTEINA

Enzimas de restricción:
Hidrólisis selectiva del DNA



Separación de los fragmentos



Enzyme	Bacterial Source	Restriction and Modification Site ^a
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G ^m +GATCC
<i>Bgl</i> II	<i>B. globiggi</i>	A ^m +GATCT
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G ^m +AATTC
<i>Eco</i> RII	<i>E. coli</i> R245	CC ^m +GG
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG ^m +CC
<i>Hga</i> I	<i>H. gallinarum</i>	GACGCN ^m NNNN + CTGCGNNNNNNNNNN ^m
<i>Hha</i> I	<i>H. haemolyticus</i>	GC ^m G+C
<i>Hind</i> II	<i>H. influenzae</i> Rd	GT ^m Py+Pu ^m AC
<i>Hind</i> III	<i>H. influenzae</i> Rd	Ä ^m +AGCTT
<i>Hin</i> I	<i>H. influenzae</i> Rf	G ^m +ANTC
<i>Hpa</i> I	<i>H. parainfluenzae</i>	GTT ^m +AAC
<i>Hpa</i> II	<i>H. parainfluenzae</i>	C ^m +CGG
<i>Msp</i> I	<i>Moraxella</i> sp.	C ^m +CGG
<i>Nor</i> I	<i>Nocardia rubra</i>	GC ^m +GGCCGC
<i>Ple</i> I	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	GAGTCN ^m NNN + CTCAGNNNNN ^m †
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA ^m +G
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	G ^m +TOGAC
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> Sb	CC ^m C+GGG
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	T ^m +CTAGA

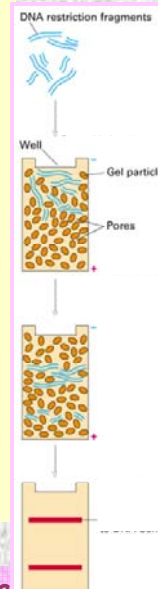
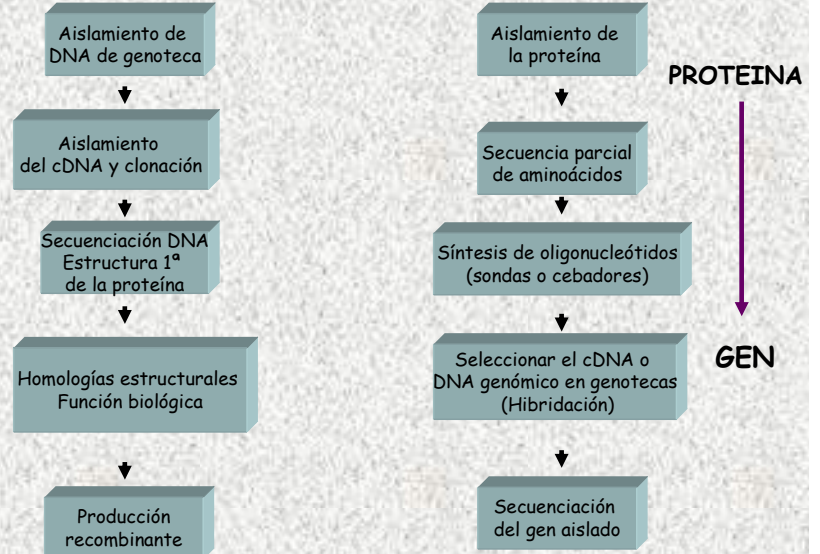
Mapas de restricción

Variabilidad interespecie: DNA mitocondria
Mutaciones

Genómica

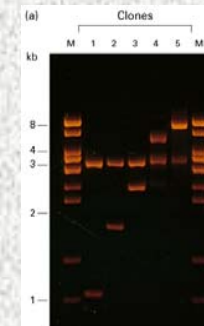
Alternativas

Proteómica



Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida

Separación por tamaño y conformación
Tinción con Bromuro de Etidio

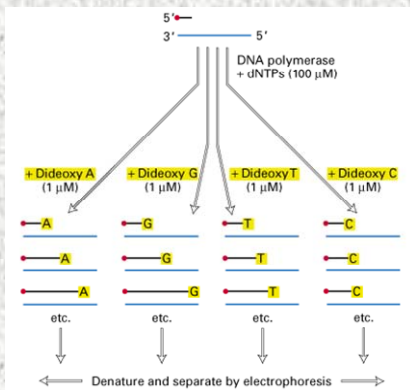
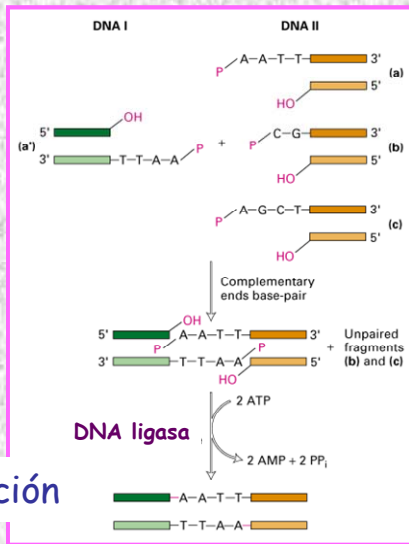


DNA ligasa: otra enzima esencial

Se puede ligar DNAs de distinta procedencia para formar una nueva especie de DNA : **DNA recombinante**

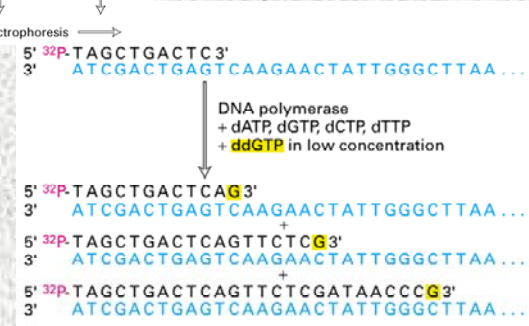
"Cohen y Boyer, 1973"

Ligación



Se secuenciación
Método de Sanger ("didesoxi")

Autorradiografía de rayos X



CAGTCGAT

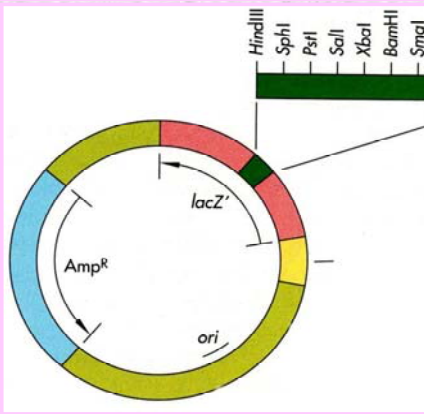
Clonar significa hacer copias idénticas: **CLON**

- Incorporación de DNA en vectores plasmídicos ("in vivo") a un sistema celular que permita su replicación

Vectores de clonación:

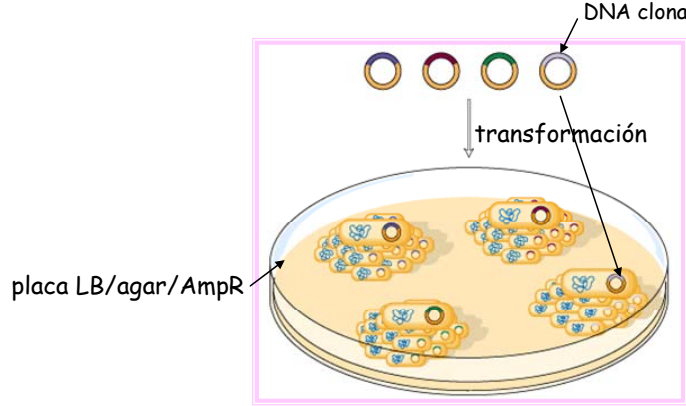
PLÁSMIDO

- Moléculas circulares de DNA bicatenario
- Extracromosómico
- Origen de replicación
- Marcador de selección: resistencia a antibiótico
- Sitio de clonaje múltiple
- Bacteria, levadura

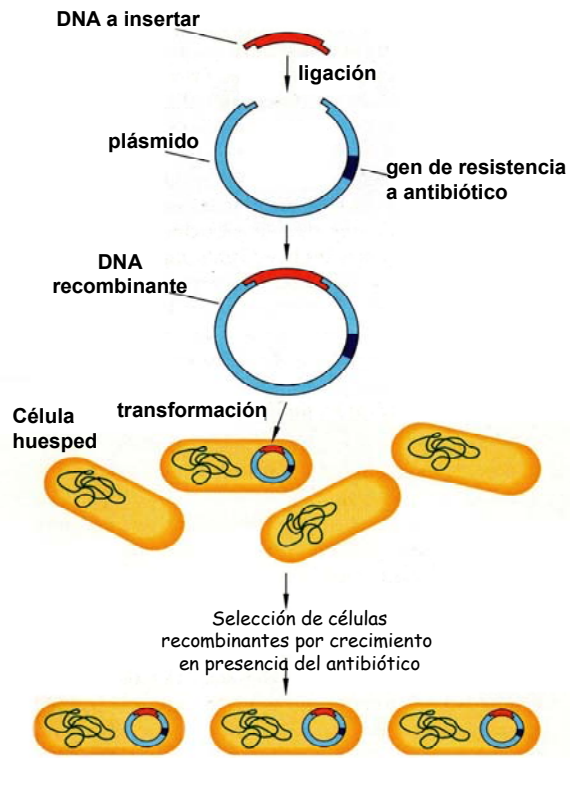


Las bacterias se pueden transformar con DNA recombinante : **Transformación**

Selección de colonias en la célula huésped: gen resistencia a antibiótico (Amp^R)



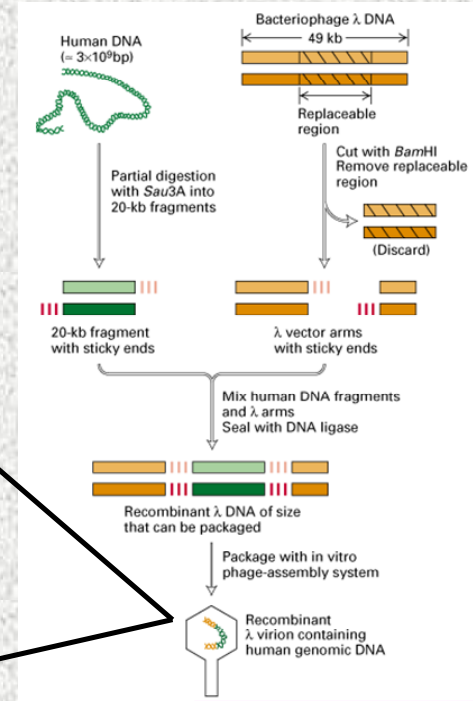
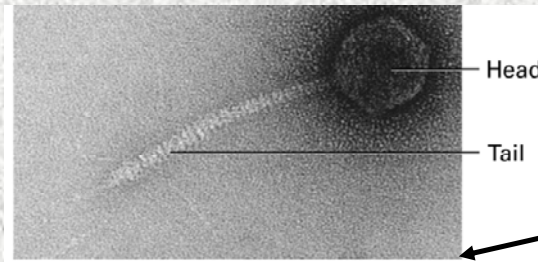
Grandes cantidades de DNA
Un mismo tipo de DNA



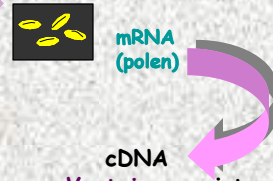
Elaboración de bibliotecas de DNA (genoteca) con fago y otros vectores

Ventajas
 Mayor eficiencia transformación
 Mayor nº clones analizados
 Fragmentos de gran tamaño

UN MUESTRARIO DE GENES MÁS COMPLETO



TIPOS DE GENOTECAS

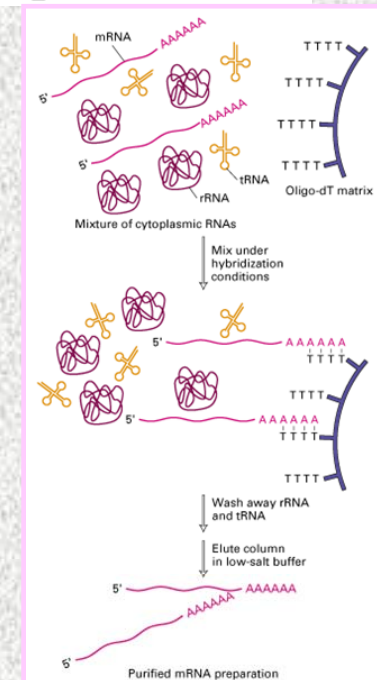


Ventajas: no intrones, proteínas específicas de tejido, secuencia deducida de aa

Aislamiento de mRNA
 Cromatografía de afinidad con oligo-dT sefarosa

transcriptasa inversa

mRNA → cDNA



tipo vector	DNA a clonar (kb)
Plásmido	20
Fago λ	25
Cósmido	45
Fago P1	100
BAC (cromosoma artificial bacteriano)	300
YAC (cromosoma artificial levadura)	1000

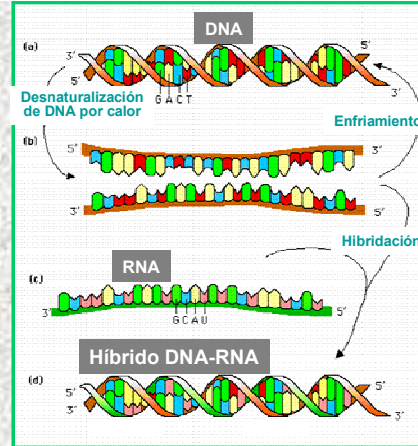
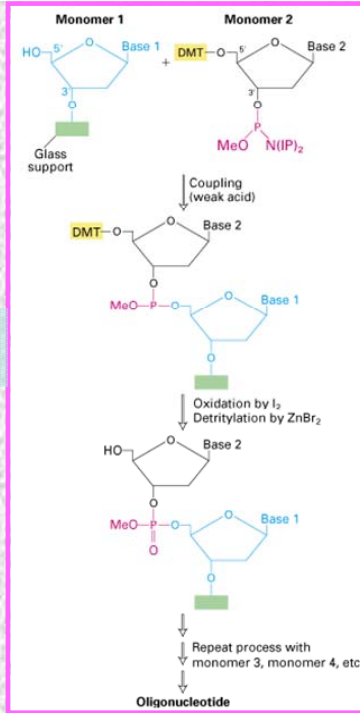
Longitud máxima de DNA que se pueden clonar en determinados vectores

Identificación del DNA clonado

Síntesis de oligonucleótidos

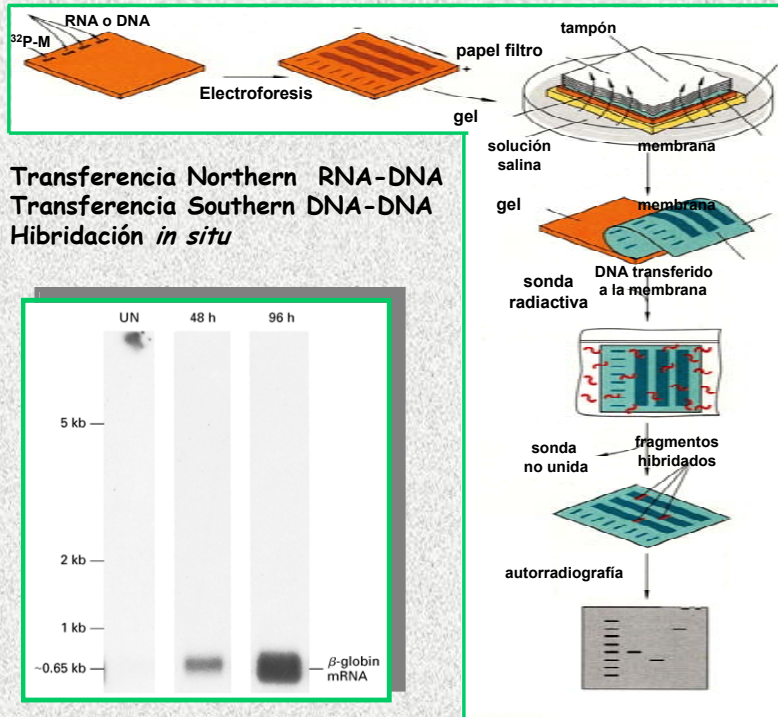
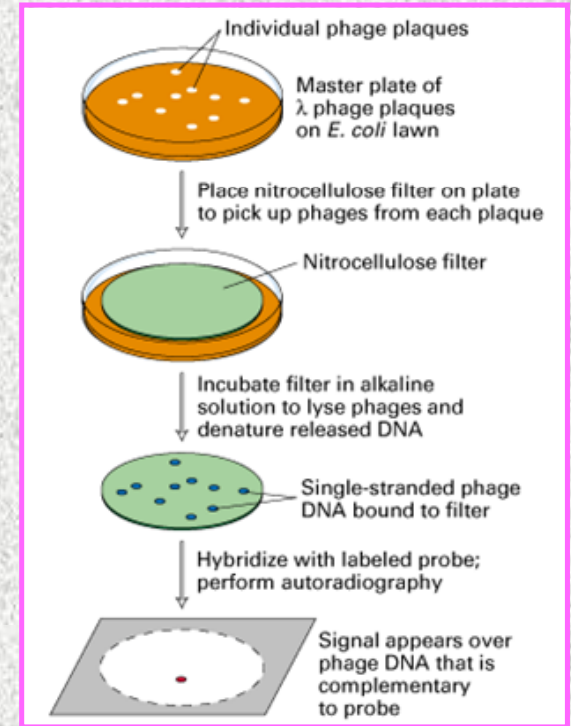
SONDAS (HIBRIDACIÓN)
CEBADORES (PCR)

"Beaucage y Caruthers, 1981"

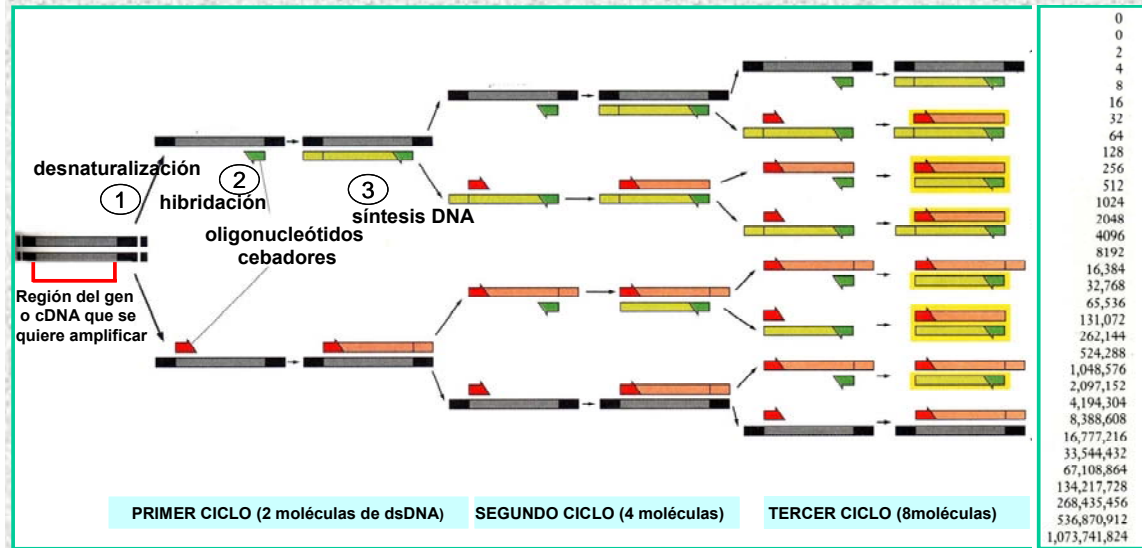
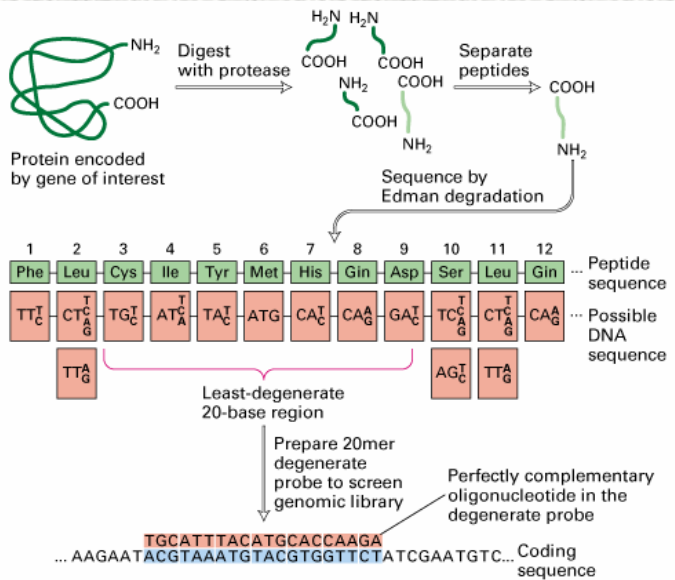


Seleccionar un DNA determinado

- Sonda radiactiva
- Expresión de la proteína y detección con Ab marcado



La PCR permite amplificar DNAs que codifican proteínas o péptidos específicos



moléculas/ciclo
(30 ciclos)

Producción de grandes cantidades de un segmento de DNA purificado

● Cuándo producir de las moléculas recombinantes

➔ PRODUCCIÓN ESCASA

- Niveles Bajos de síntesis (Interferón)
- Material biológico escaso (Inmunoglobulinas y citoquinas)
- Inestabilidad *in vivo*
- Alto polimorfismo (alergenos)

➔ PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS NO NATURALES

- Mutantes (quimeras, anticuerpos humanizados)
- Fragmentos peptídicos

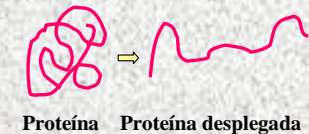
➔ ESTUDIOS FUNCIONALES *IN VIVO*

- Plantas y animales transgénicos

Tipos de células huésped

Bacterias, levaduras, cels insectos, plantas

Diferente calidad de la estructura de la proteína



Formas de expresión de la proteína

Intracelular o extracelular

Proteína libre o proteína de fusión

Facilidad de detección y aislamiento



Naturaleza del producto de expresión

Proteína completa, fragmentos, mutantes

Diferentes usos

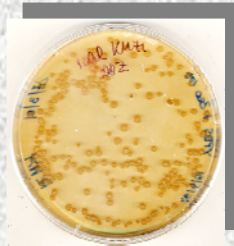
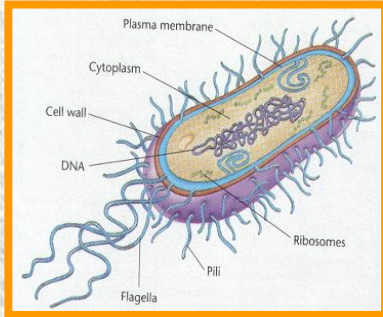


Sistemas de expresión

➔ Células bacterianas

Escherichia coli

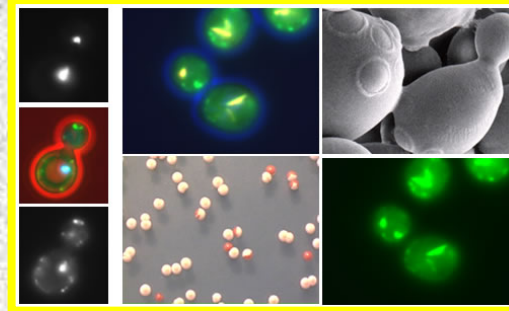
Bacillus subtilis



➔ Levaduras

Saccharomyces

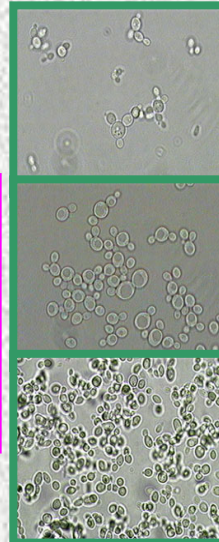
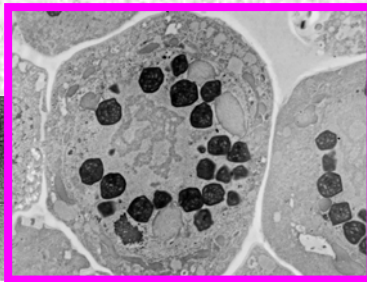
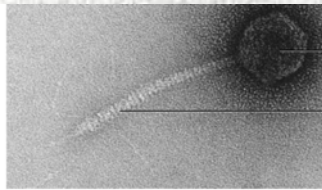
Pichia pastoris



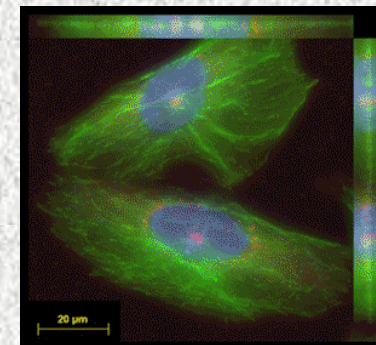
➔ Células de insecto

Sf9

Sf12



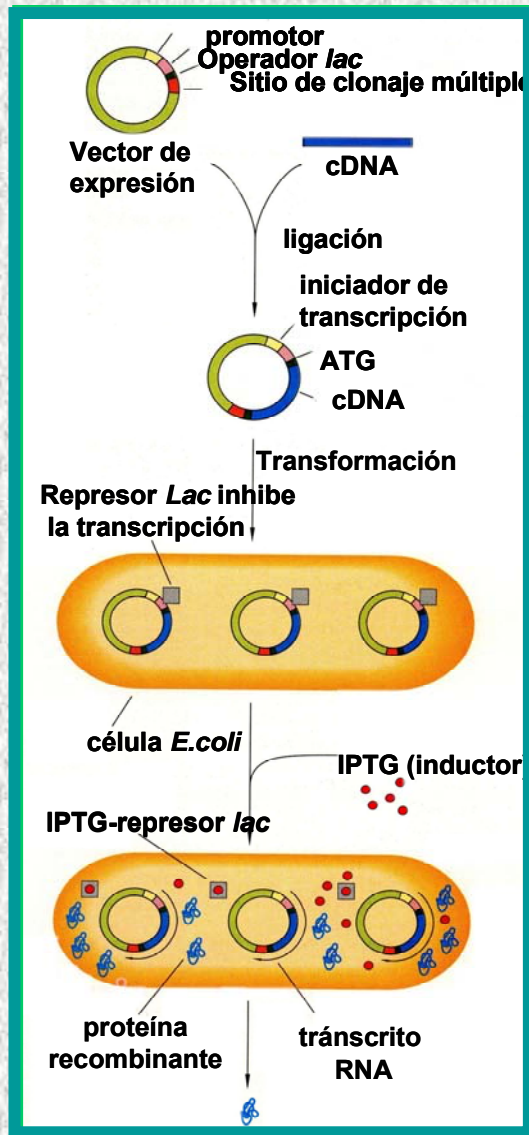
➔ Células de mamíferos



➔ Plantas mono y dicotiledóneas

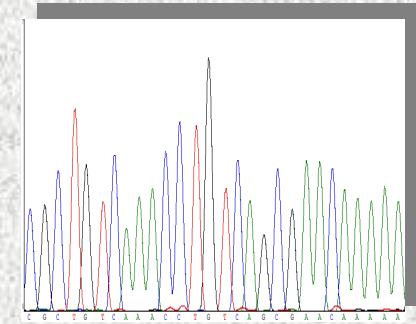
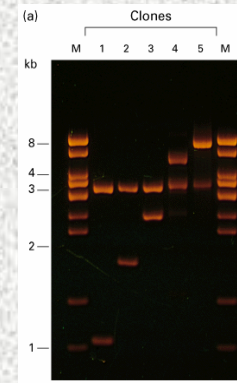


Etapas en la producción de proteínas recombinantes

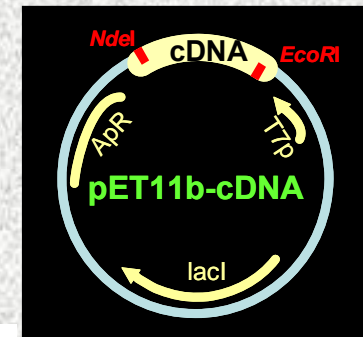


SOMATOSTATINA: Primera proteína humana producida en bacteria (1977)

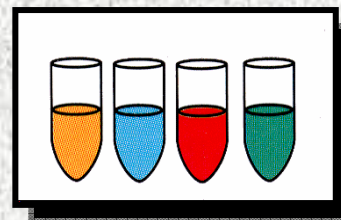
Secuenciación



2. Subclonación en vector de expresión



4. Detección y purificación



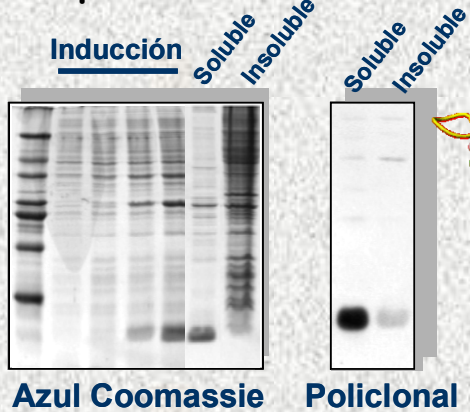
5. Producción a gran escala



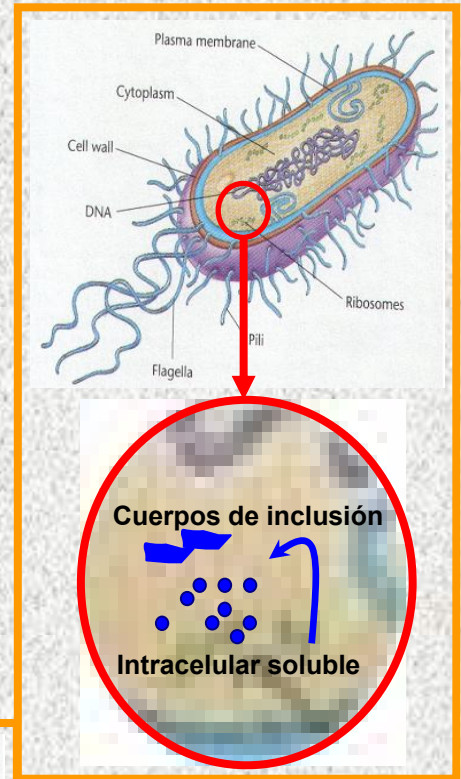
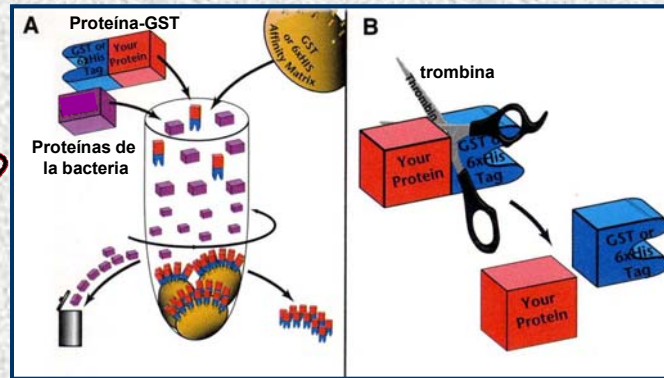
Modos de expresión

➔ Intracelular (grandes cantidades, insoluble)

Expresión directa



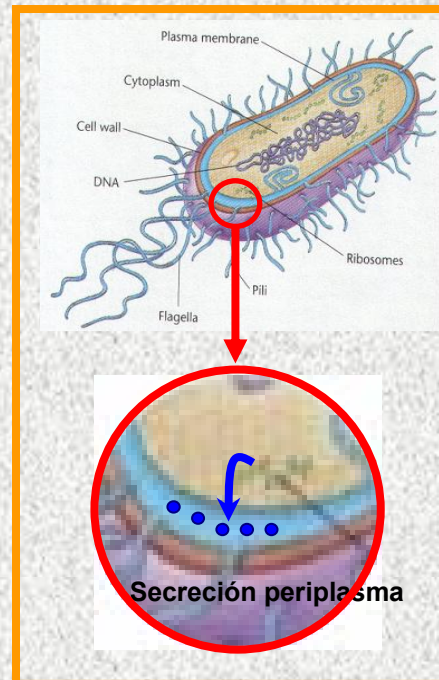
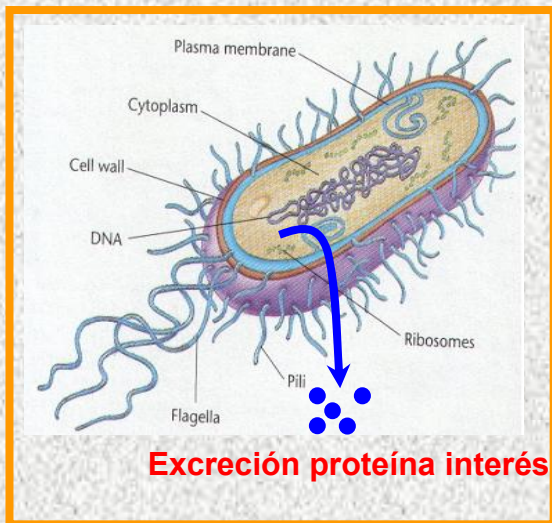
Proteína de fusión



➔ Extracelular (solubilidad, poca cantidad, previene proteolisis)

Secreción (periplasma)

Excreción (medio de cultivo)



Análisis del plegamiento de proteínas recombinantes

Equivalencia estructural

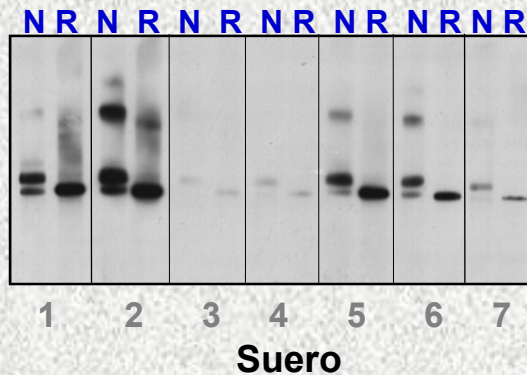


Natural

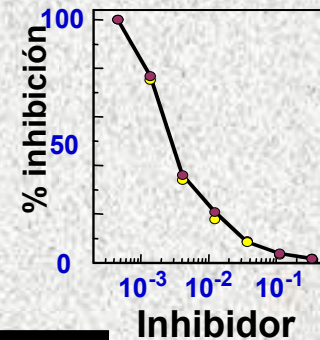
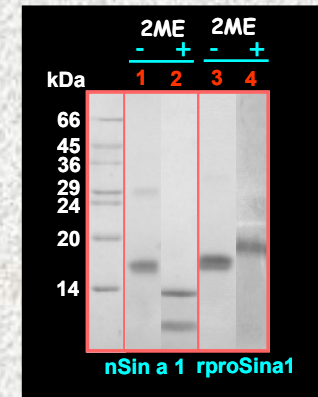


Recombinante

- ▶ SDS-PAGE en presencia y ausencia de 2-ME seguido por tinción
- ▶ SDS-PAGE seguido por westernblotting y análisis inmunológico



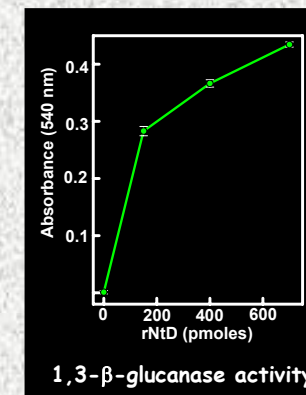
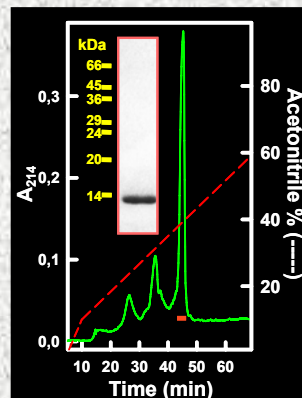
N, natural
R, recomb



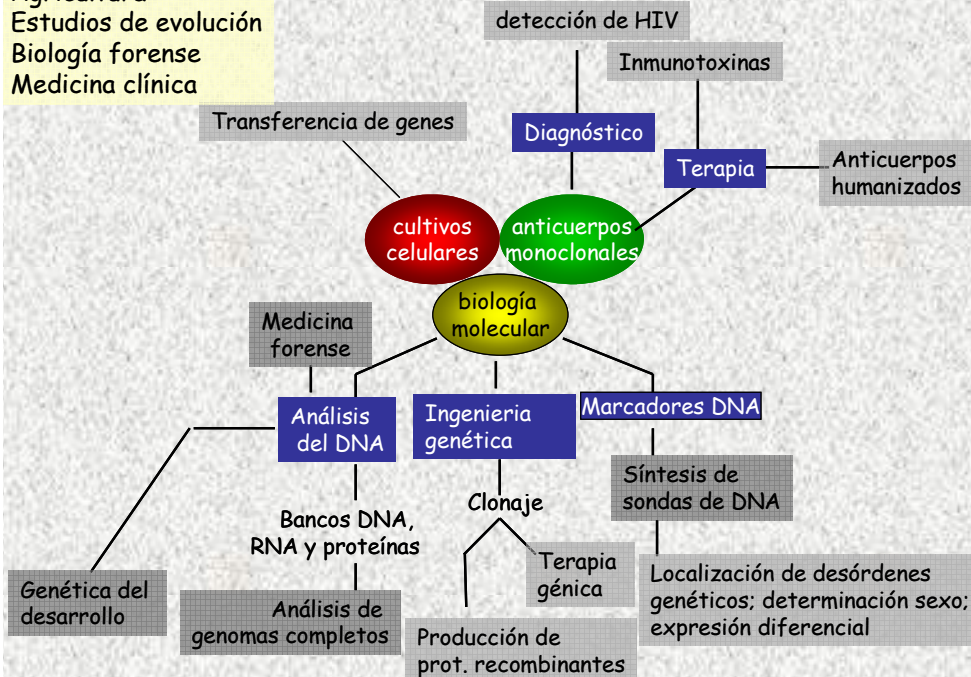
ELISA

- Proteína natural
- Proteína recombinante

- ▶ HPLC o FPLC analítica
- ▶ ensayo de actividad biológica



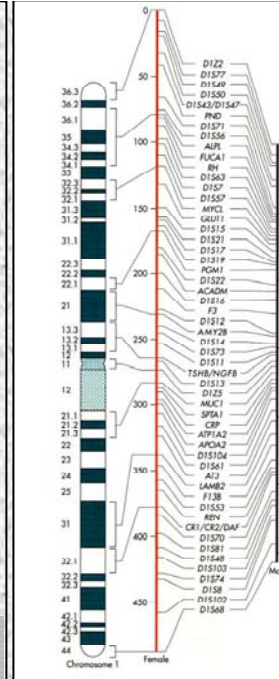
Investigación
Agricultura
Estudios de evolución
Biología forense
Medicina clínica



Análisis del DNA: proyecto "genoma"

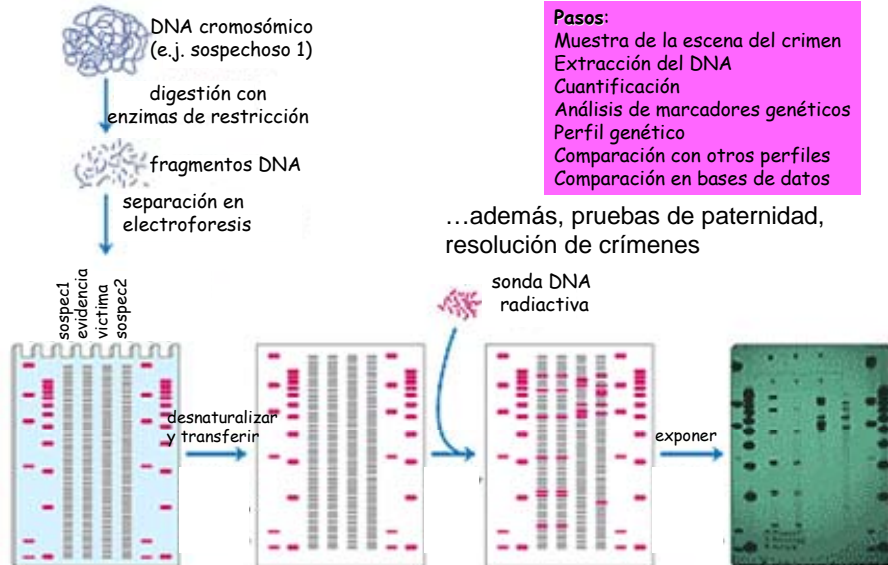
Desde 1980....Human Gene Mapping (HGM)

Mapa genético del cromosoma 1 humano,
el más largo
Posiciones de 58 marcadores
El cromosoma femenino es más largo



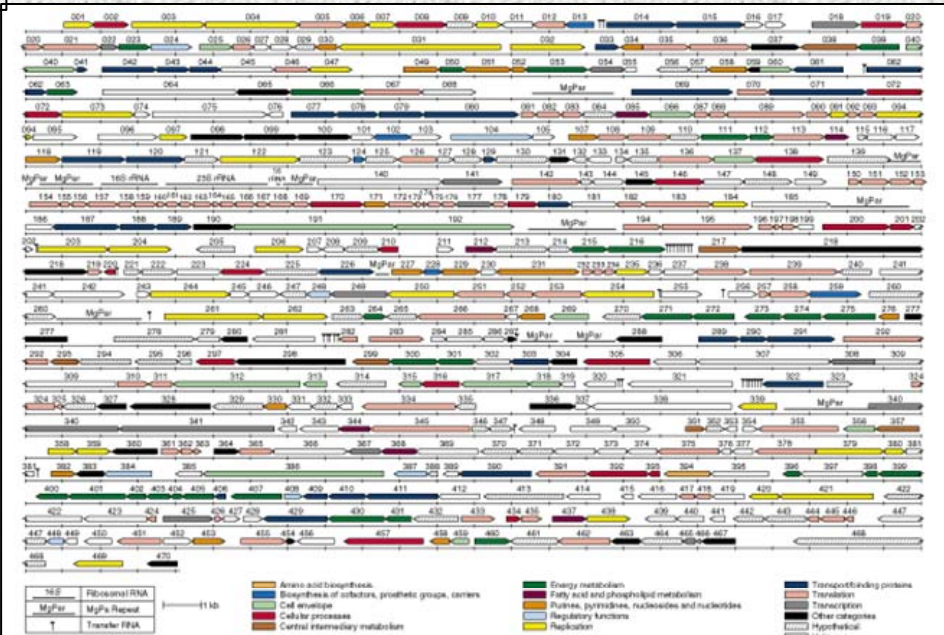
Ingeniería genética: medicina forense

Un caso de violación



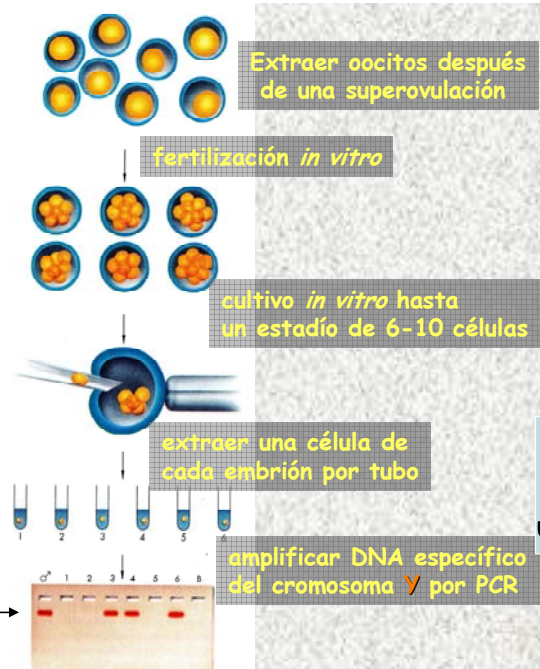
Pasos:
Muestra de la escena del crimen
Extracción del DNA
Cuantificación
Análisis de marcadores genéticos
Perfil genético
Comparación con otros perfiles
Comparación en bases de datos

...además, pruebas de paternidad,
resolución de crímenes

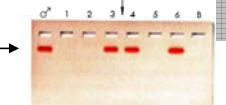


470 ORF
funciones al 87% Genoma del *Mycoplasma genitalium*

Técnica utilizada: PCR

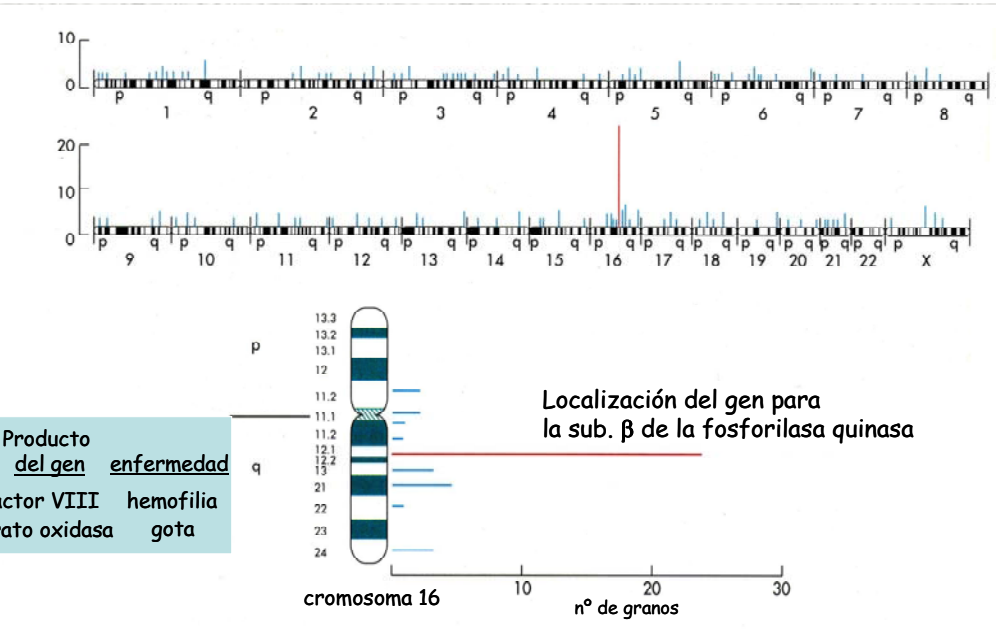


fragmento específico de sexo masculino

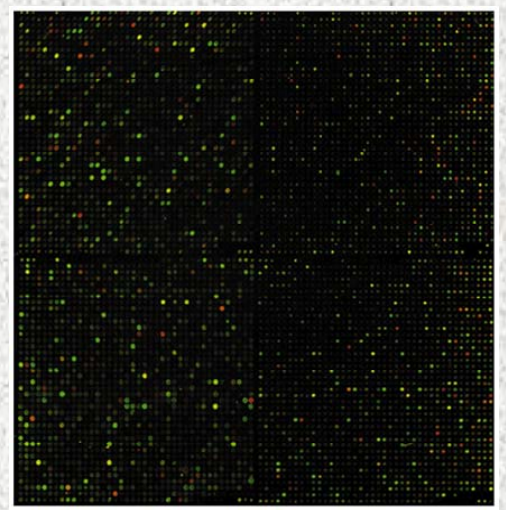


analizar los productos por PCR

Producto del gen	enfermedad
Factor VIII	hemofilia
Urato oxidasa	gota

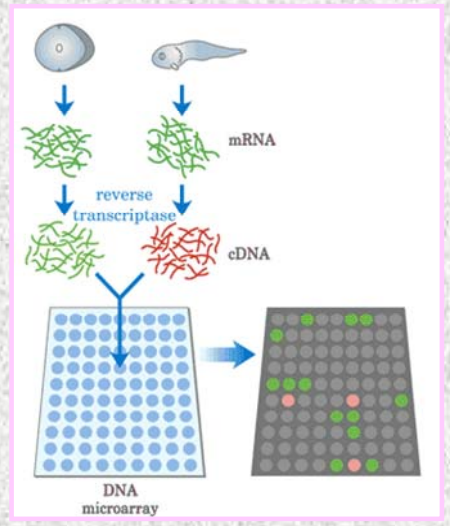


Análisis de hibridación con sondas de DNA y RNA fluorescente: PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES



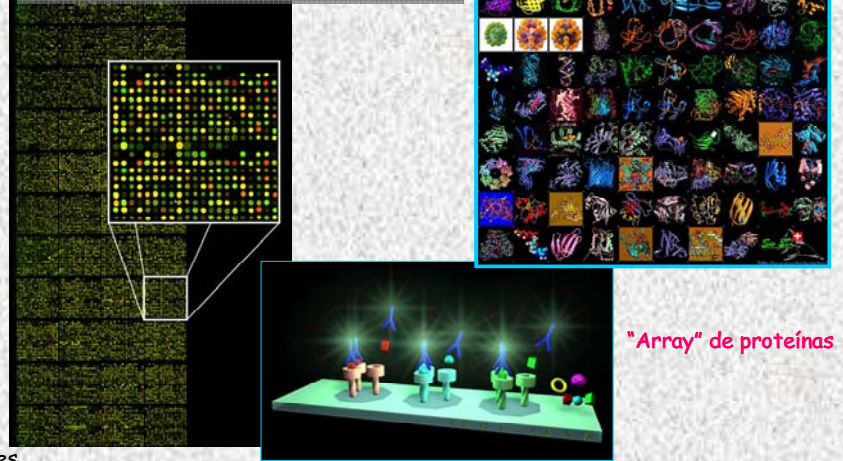
chip de silicio 18 x 18 mm
6400 puntos → 6400 genes de levadura

Hibridación con sonda verde → oocito
Hibridación con sonda roja → embrión
detección microscopio de barrido confocal



1. análisis de expresión génica de un genoma en determinadas condiciones
2. Detección de mutaciones
3. Mapeo genético

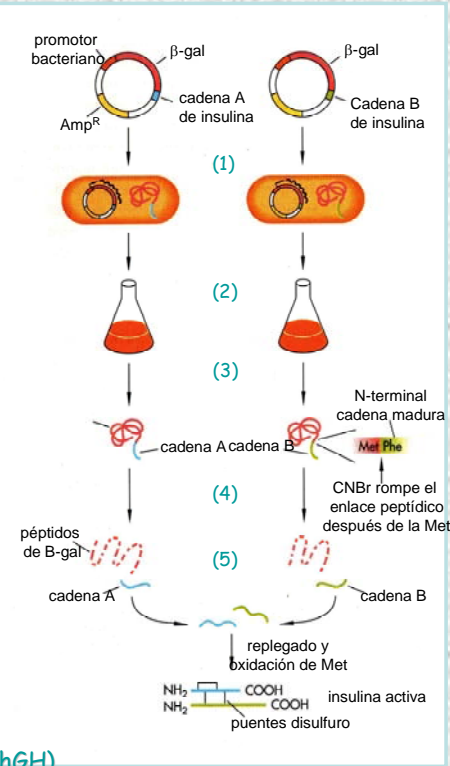
"Array" de DNA de Arabidopsis
Este array contiene 10.000 muestras diferentes de cDNA, aplicadas en duplicado, y en conjuntos de 20 x 21 muestras



"Array" de proteínas

Producción de nuevos productos recombinantes utilizados en medicina

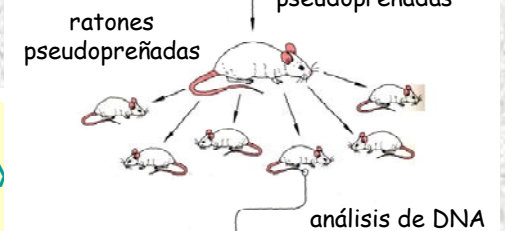
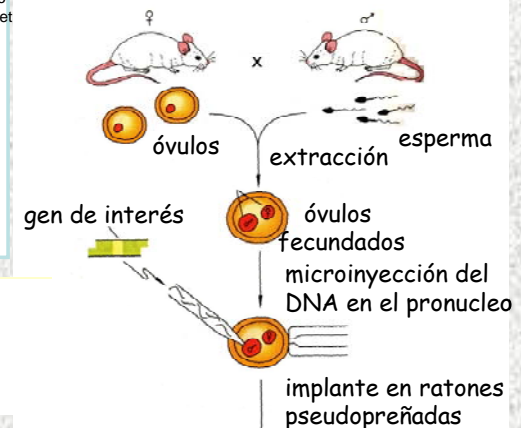
Product category	Examples/uses
Anticoagulants	Tissue plasminogen activator (TPA) activates plasmin, an enzyme involved in dissolving clots; effective in treating heart attack victims.
Blood factors	Factor VIII promotes clotting and is deficient in hemophiliacs; use of factor VIII produced by recombinant DNA technology eliminates infection risks associated with blood transfusions.
Colony stimulating factors	Immune system growth factors that stimulate leukocyte production; used to treat immune deficiencies and to fight infections.
Erythropoietin	Stimulates erythrocyte production; used to treat anemia in patients with kidney disease.
Growth factors	Stimulate differentiation and growth of various cell types; used to promote wound healing.
Human growth hormone	Used to treat dwarfism.
Human insulin	Used to treat diabetes.
Interferons	Interfere with viral reproduction; used to treat some cancers.
Interleukins	Activate and stimulate different classes of leukocytes; possible uses in treating 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 the killed virus more traditionally used for vaccines, but are safer; first developed was the vaccine for hepatitis B.



Fines terapéuticos

1. Obtención de insulina humana

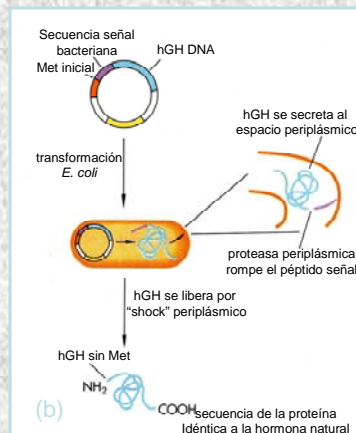
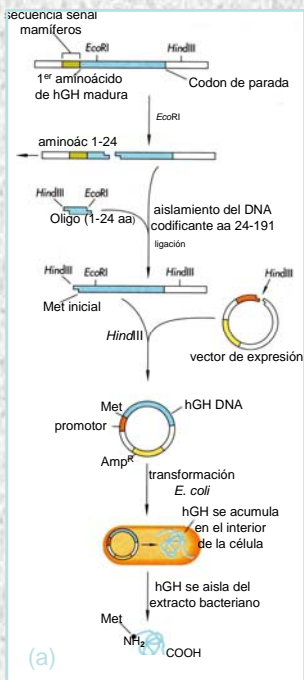
- (1) Transformación *E. coli*
- (2) Cultivo celular
- (3) Purificación proteínas de fusión β -gal – insulina
- (4) Tratamiento con CNBr
- (5) Purificación de cadenas A y B
- (6) Oxidación y formación de -S-S-



presencia del gen transgénico por PCR

2. Obtención de hormona del crecimiento humana (hGH)

- producción intracelular
- producción extracelular



Medicina: Terapia génica
Biotecnología: Producción de plantas y animales resistentes

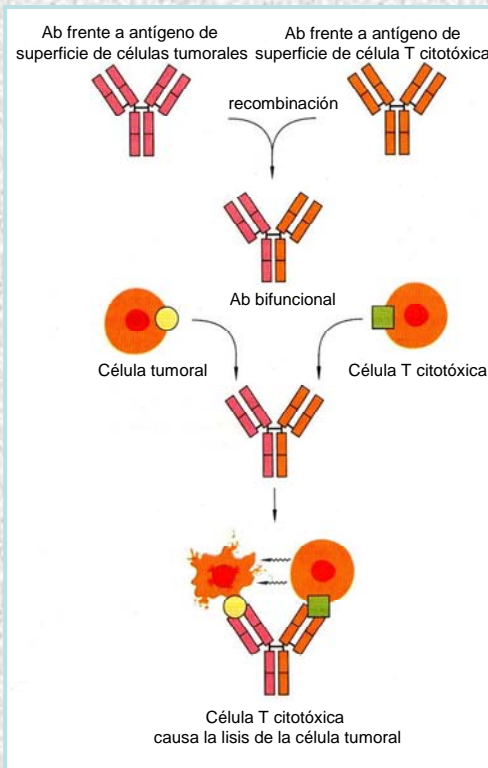
Transferencia de genes a animales: ANIMALES TRANSGÉNICOS

Utilización de estos modelos en TERAPIA GÉNICA

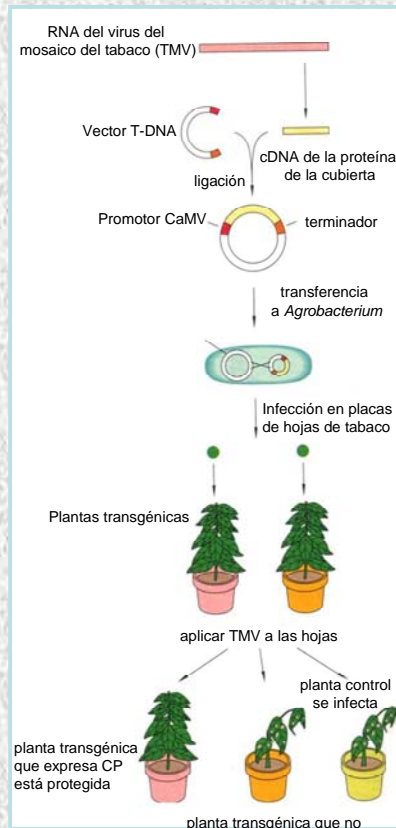


transferencia del gen que codifica la hormona de crecimiento (GH)

1. Producción de inmunotoxinas



Diseño de moléculas bifuncionales (inmunotoxinas): nuevas terapias utilizando mAb



Plantas como sistemas de producción de proteínas recombinantes

plantas transgénicas resistentes a plagas

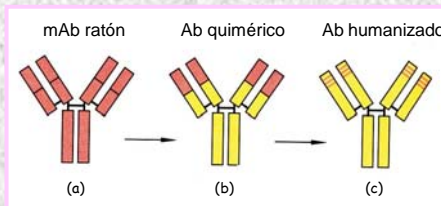


toxina *B. thuringiensis*

Inactiva hasta que es ingerida por las larvas del insecto

2. Anticuerpos "humanizados" retienen actividad pero pierden inmunogenicidad

Ingeniería de anticuerpos



- (a) Regiones constantes y variables de la Ig de ratón CDRs de ratón
- (b) Regiones constantes humanas, regiones variables Y CDRs de ratón
- (c) Regiones constantes y variables humanas, CDRs de ratón