

Tema 11. Plantas transgénicas (I): Métodos de transformación genética

• Cómo inducir variabilidad genética

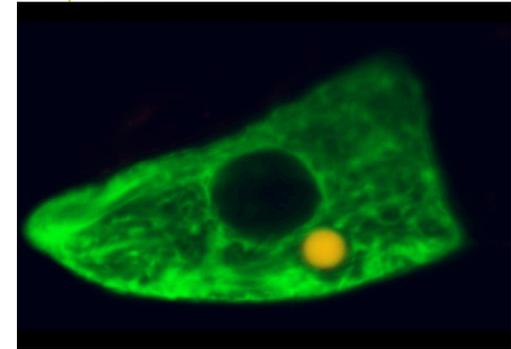
- Mejora genética clásica
 - Rescate de embriones
- Mutagénesis
- Hibridación somática
- Ingeniería genética (IG)

• Amplificación del ADN

- Plásmidos
- PCR
 - Electroforesis. Método de secuenciación de Sanger.

• Elementos necesarios para la transformación.

- Promotor, terminador, secuencias líder, genes marcadores



Aumentar la variabilidad genética

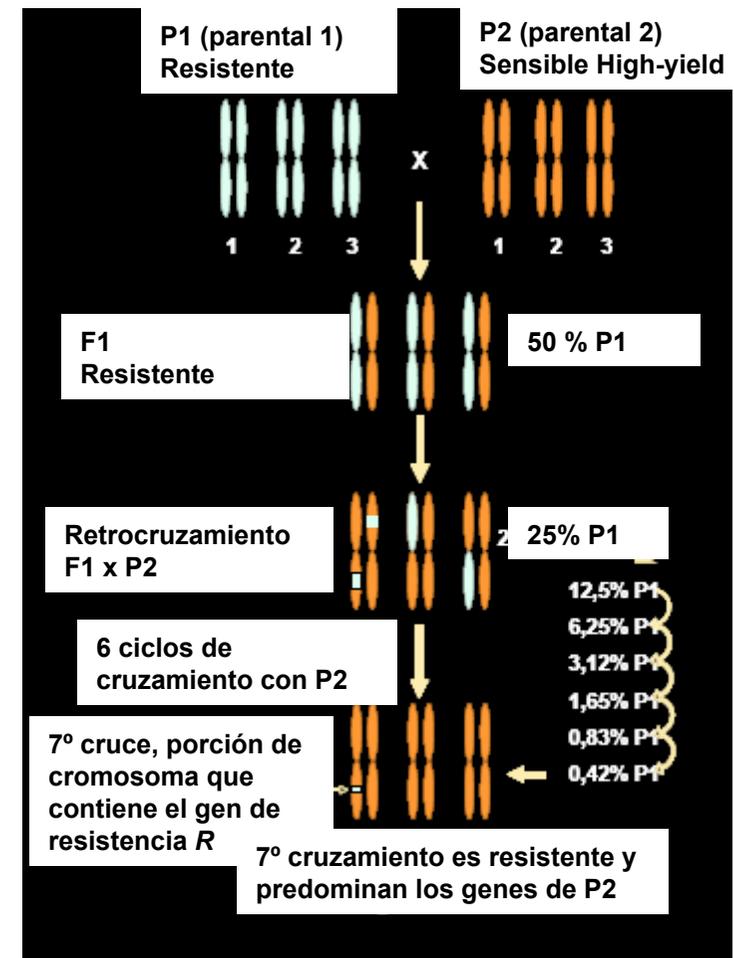
Aumentar la variabilidad genética de las plantas:

- **Mejora genética clásica**
- Rescate de embriones
- Mutagénesis
- Hibridación somática
- Ingeniería genética: Técnicas del ADN recombinante

Mejora Genética Clásica:

Hibridación de dos genotipos parentales, seleccionados por unos caracteres específicos, seguida de una selección de nuevos genotipos recombinantes

Cruzamientos entre un “high-yielding parent” y una variedad silvestre resistente. F1 recombinante y retrocruzamientos con el parental de alto rendimiento



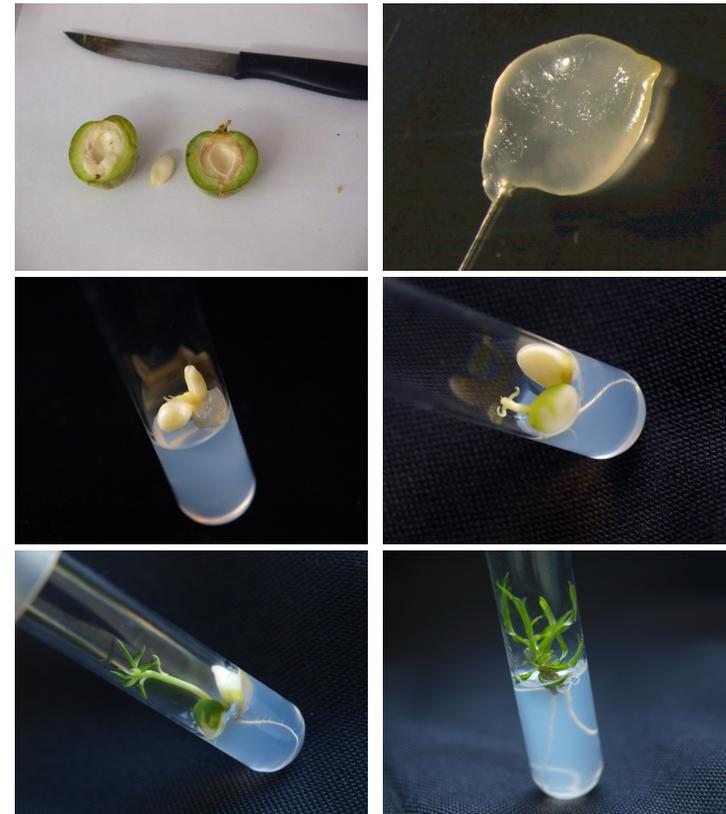
Aumentar la variabilidad genética

• Rescate de embriones

Rescate de embriones:

- Propósito: favorecer el desarrollo de un embrión débil e inmaduro en una planta viable.
- Usos. Producir híbridos:
 - interespecíficos
 - intergenéricos.
- Aborto del embrión: Falta de nutrientes (escaso desarrollo del endospermo).
- Procedimiento:
 - Aislar el embrión
 - Cultivar en un medio nutritivo adecuado para su desarrollo.

Prunus persica embryo rescue. Wojciech Dopierala



Aumentar la variabilidad genética

Mutagénesis:

- Mutaciones espontánea :Baja frecuencia.
- Inducción de mutaciones: Agentes químicos y físicos.
- Tipos de mutaciones:
 - “masivas” (deleciones a gran escala en el ADN)
 - mutaciones puntuales

Físicos:

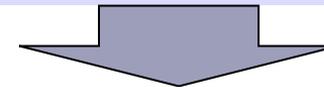
- Radiación no ionizante: UV
- Radiación ionizante: rayos X, gamma, alpha y beta.
- Neutrones rápidos y lentos



Deleciones a gran escala en ADN
Cambios en la estructura de los cromosomas

Dosis x tiempo

Químicos: ethylmethane sulphonate (EMS), methylmethane sulphonate (MMS), hydrogen fluoride (HF), sodium azide, *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), hydroxylamine.



Mutaciones que afectan a un único par de nucleótidos



Mutagénesis - bombas atómicas



Colección de maíz:

- gran número de **aberraciones cromosómicas**,
- Inducidas: de forma deliberada a exposición a distintos tipos de radiaciones 1940's.
 - semillas expuestas a **bombas atómicas**
 - atolón Bikini en 1946 y de Eniwetok en 1948.

- Efectos mutagénicos de la radiación en plantas se conocen desde 1920' s
- Todavía se usan para generar variación génica en cultivares



Aumentar la variabilidad genética

Mutagénesis:

Últimos 70 años. 2500 variedades procedentes de programas de mutagénesis.

Listado de variedades:

IAEA (International Atomic Energy Agency)/FAO <http://www-infocris.iaea.org/MVD>):

- 534 líneas de arroz, 205 trigo, 71 maíz
- Ornamentales: clavel, crisantemo



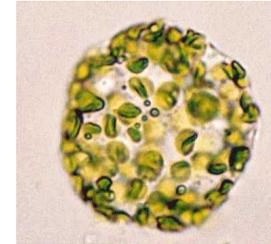
Ventajas:

- Cambios al azar en el genoma
- Amplia variedad de mutaciones en todos los genes
- Una única planta puede contener un gran número de mutaciones diferentes, por lo que el tamaño de la población es manejable

Desventajas:

- Difícil identificar los individuos con nuevas características en la población
- Debido a la duplicación y poliploidía, estas mutaciones no tiene un efecto fenotípico detectable

Aumentar la variabilidad genética

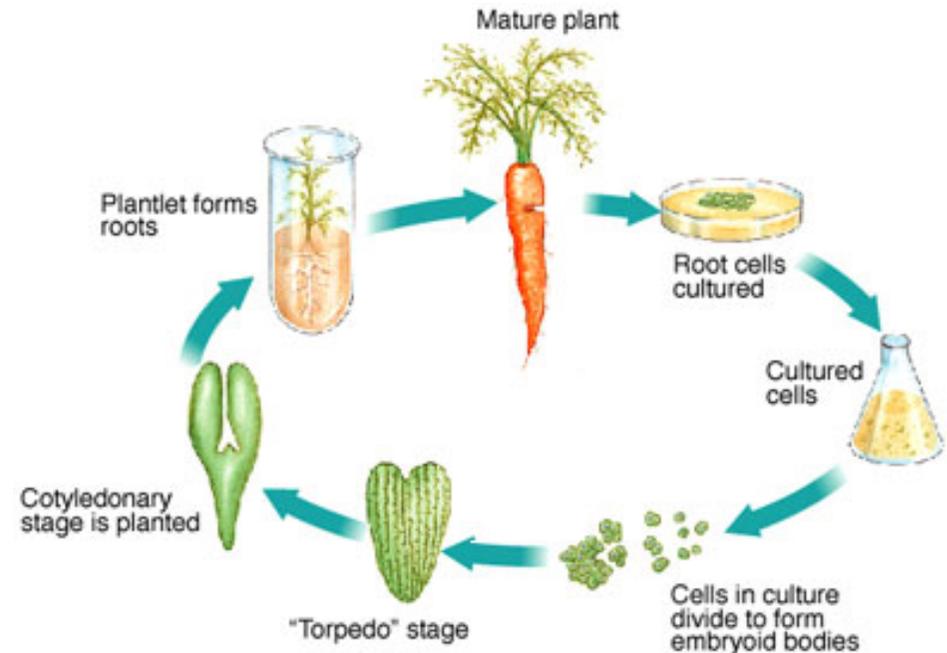


Hibridación somática

Unión de dos protoplastos aislados a partir de células somáticas

Célula vegetal sin pared celular

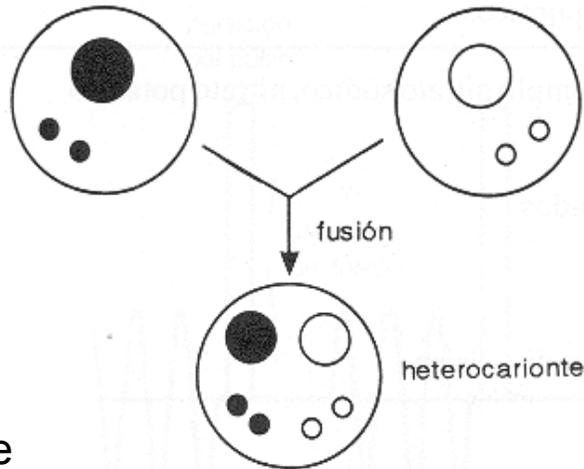
- ✓ Naturaleza totipotente célula vegetal
- ✓ Pérdida de rigidez y exposición del plasmalema al medio externo
 - ✓ Formación híbridos somáticos intra- o interespecíficos
 - ✓ Incorporación de orgánulos
 - ✓ Incorporación de macromoléculas



Fusión de protoplastos

Hibridación somática

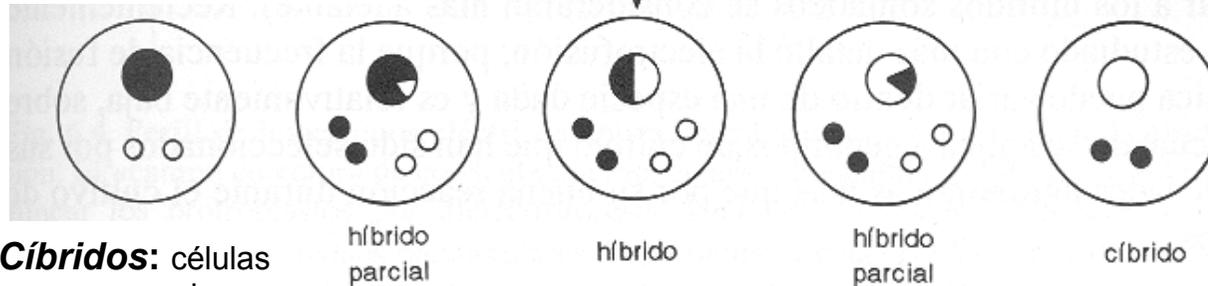
Heterocarionte:
Protoplastos proceden de diferentes tipos de células parentales



Híbrido: combinación de dos genomas completos. Se ha producido la fusión de núcleos

Híbrido parcial: transferencia parcial del genoma. Orgánulos de ambos protoplastos

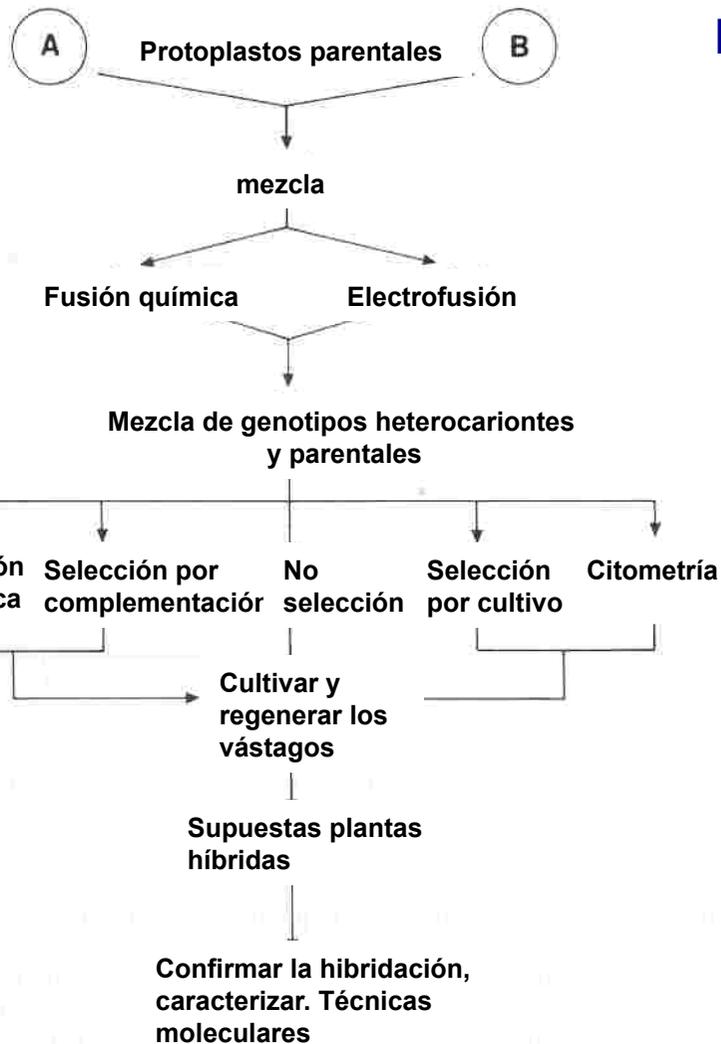
Cíbridos: transferencia de orgánulos



Cíbridos: células que poseen el núcleo de un tipo de protoplasto y los orgánulos de otro



Esquema general para la producción de híbridos somáticos



Pasos previos antes de la hibridación

Material vegetal

- Especie vegetal y genotipo
- Estado fisiológico y metabólico del tejido
 - Tejidos de reserva
 - Células del mesófilo
 - Células de cultivos en suspensión
- Edad
- Condiciones de cultivo

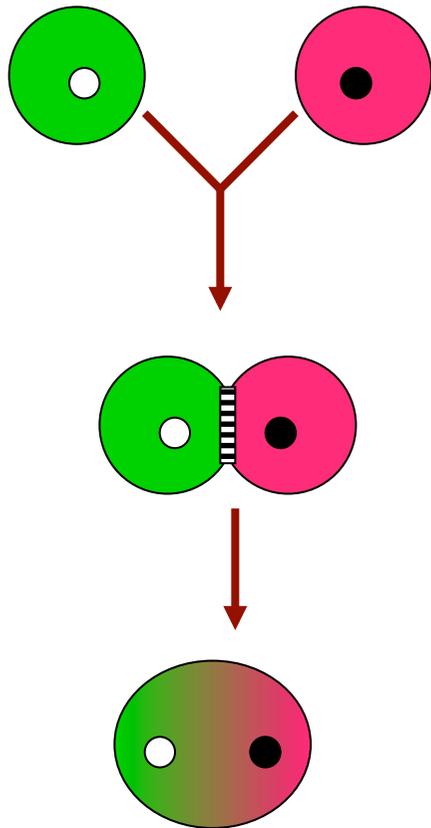
Rendimiento

Viabilidad

Calidad



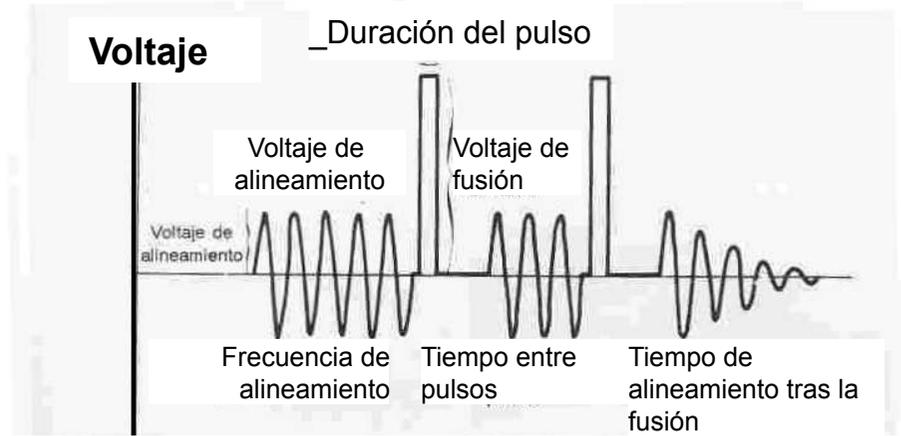
Fusión protoplastos: inducida por métodos químicos y electroporación



Carga negativa del plasmalema

Fusógenos químicos

- ✓ Soluciones salinas
- ✓ Policationes
- ✓ PEG (aglutinación)
- ✓ Ca^{2+} (10-50 mM)
- ✓ pH 9-11



Perfil de los campos eléctricos aplicados a los protoplastos durante la electroporación. El campo colector de corriente alterna (1 MHz) se aplica para alinear los protoplastos. Se induce la fusión aplicando uno o más pulsos rectangulares de corriente alterna (1-3 kV/cm, 10-100 μs).

Electroporation: Requires that cells be washed and suspended in water to decrease conductivity.



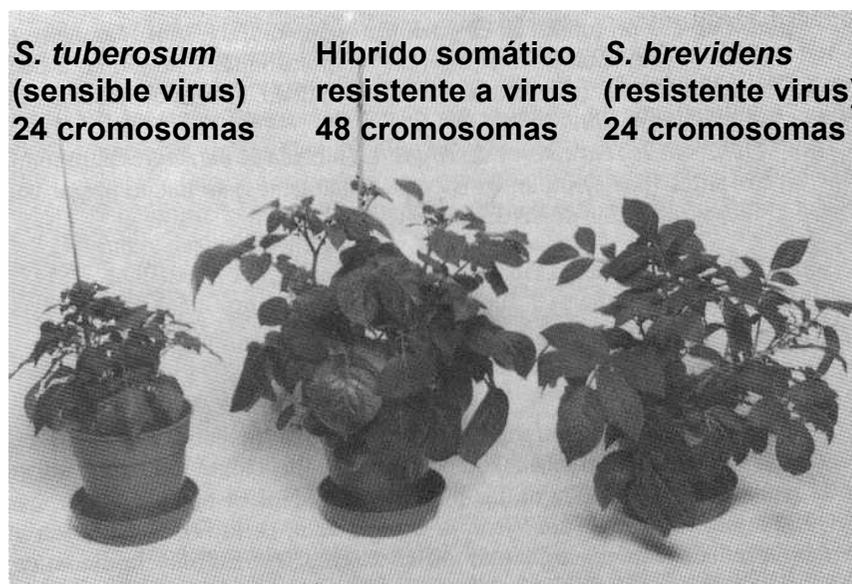
Aplicaciones de la fusión de protoplastos

Introducción en el germoplasma de cultivos agrícolas caracteres con utilidad agronómica presentes en especies silvestres

Fusión de patata y *Solanum brevidens*

Solanum brevidens resistente al virus del enrollado de la hoja y al virus Y.

S. brevidens no se puede cruzar sexualmente con *S. tuberosum*



<i>S. tuberosum</i> (sensible virus) 24 cromosomas	Híbrido somático resistente a virus 48 cromosomas	<i>S. brevidens</i> (resistente virus) 24 cromosomas
---	--	---

Tabla 6.3 Combinaciones genéticas y propiedades de los híbridos somáticos obtenidos entre *S. tuberosum* y *S. brevidens*

Método de fusión	Químico	Eléctrico
Número de híbridos	11	49
Porcentaje de los vástagos regenerados que eran híbridos	2,3%	12,6%
Citología		
Euploide		
tetraploide (48)	20%	
hexaploide (72)	14%	
Aneuploide		
tetraploide	23%	
hexaploide	34%	
octaploide	9%	
Origen del cloroplasto		
<i>Solanum tuberosum</i>	62%	
<i>Solanum brevidens</i>	38%	
Tipos de híbridos euploides:		

Productos fusión: 2 protoplastos: (48, tetraploides) y 3 protoplastos (78, hexaploides)

Híbridos. Test para comprobar la resistencia a los virus. Mismos niveles que el parental silvestre (*S. brevidens*).

	Dosis del genoma nuclear		Origen de los cloroplastos	
	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. brevidens</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. brevidens</i>
Tetraploides (48)	1	1	1	-
	1	1	-	1
Hexaploides (72)	1	2	1	-
	2	1	1	-
	1	2	-	1
	2	1	-	1

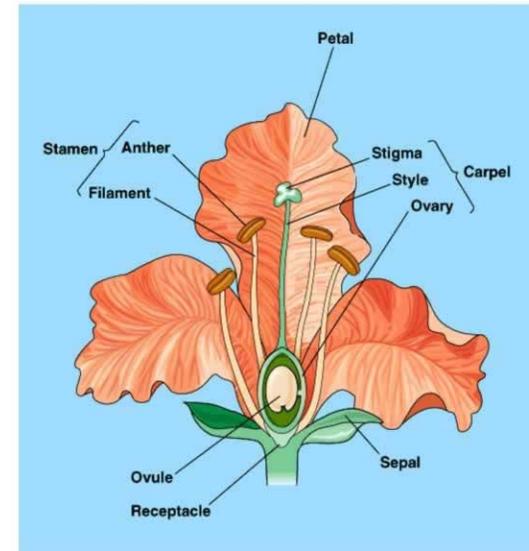
Formación de híbridos: esterilidad citoplásmica masculina (cms)

mitocondria cms
Núcleo rr

X

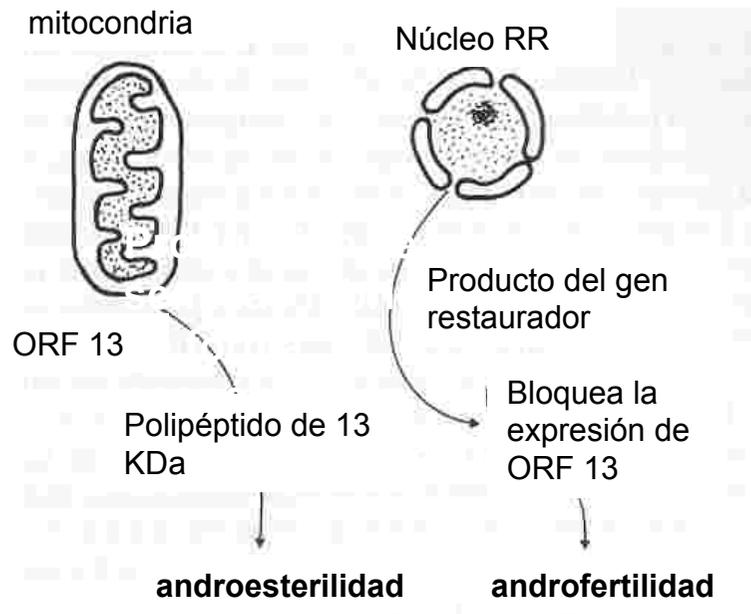
mitocondria normal
Núcleo RR

F1 mitocondrias cms
Núcleo Rr



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- **Producción de híbridos:**
 - planta/flor femenina no autofecundarse.
 - Emasculación. Proceso caro
- Semillas procedentes del cruce de una flor femenina cms serán 100% híbridas
- Gen cms presente condrioma
- Transferencia de este carácter: hibridación somática

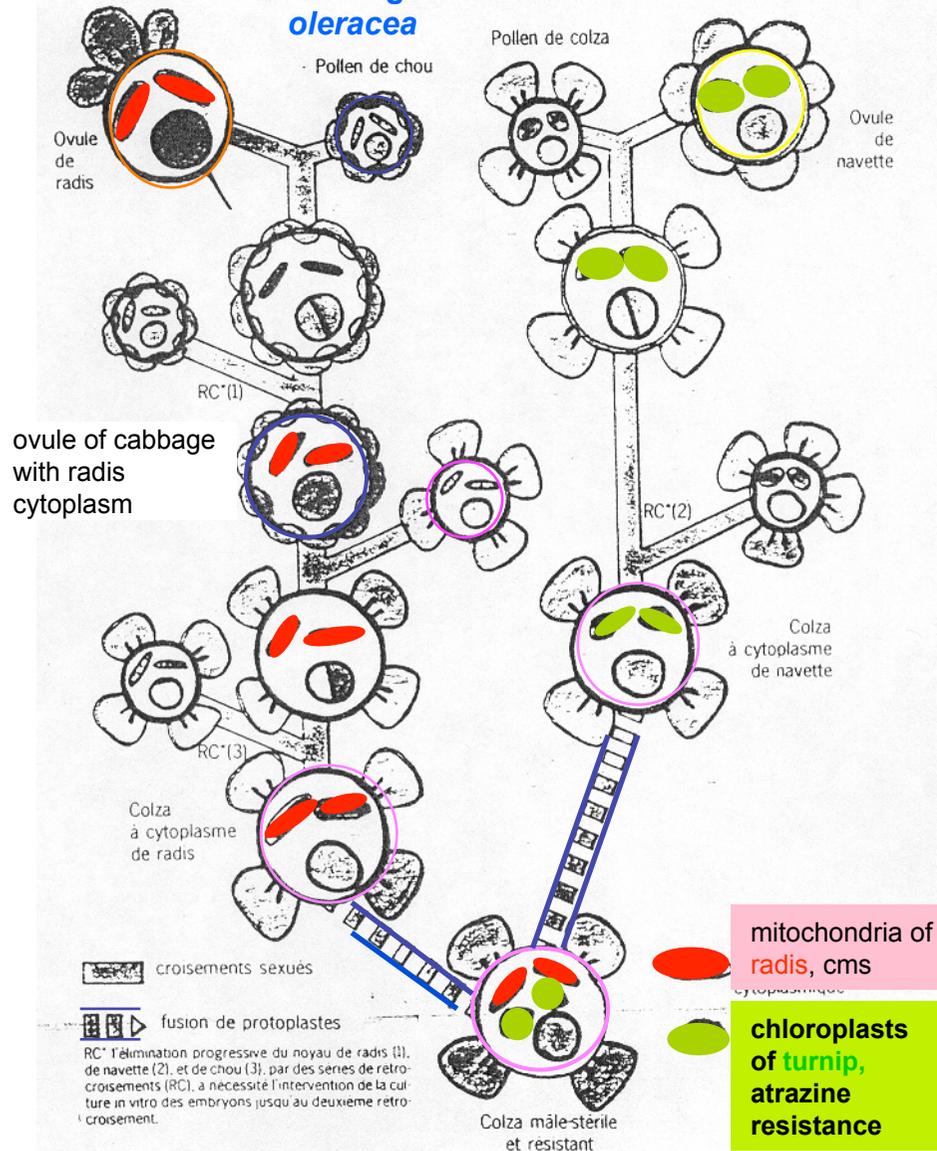


Raphanus sativus; rábano

Cabbage B. oleracea

B. napus, rape, colza

B. campestris, turnip nabo



FUSIÓN de protoplastos para combinar la esterilidad citoplásmica y la resistencia a atrazina en *Brassica napus* (INRA Versailles)

Colza: híbrido natural entre el nabo (turnip) y col (cabbage)

Cytoplasmic male sterility cms

- Genus Brassica: no cms
- Familia Brassicaceae **rábano (radis, *Raphanus sativus*)** presenta cms
- Cruzar **rábano** (óvulo) X (*Brassica oleracea*) (polen)
- Retrocruzamientos F1 X col (óvulo)
- Cruzar óvulo de col con citoplasma de rábano x **polen colza (*B. napus*)**
- Retrocruzamientos con polen de colza

Colza con cloroplastos de nabo (turnip, *B. campestris*): resistente a la atrazina

1. Fusión de protoplastos de colza con cloroplastos de nabo y colza con mitocondria **rábano**
2. Colza: cms y resistente a la atrazina

Rape obtained: several problems due to the poor coadaptation between genetic information. Pollen sterility. Yellowing leaves <12°C . Weak development of nectary



Hibridación somática

Ventajas

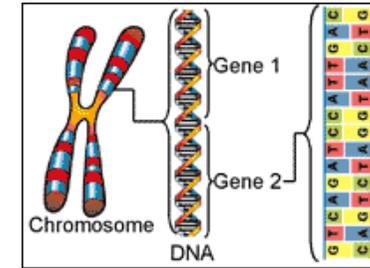
- **Permiten la transferencia de caracteres identificables sin necesidad de poseer una información molecular detallada**
- **Alternativa para la obtención de tetraploides**
- **Obtención de híbridos entre especies:**
 - **sexualmente incompatibles**
 - **estadio juvenil**
 - **estériles**

Inconvenientes

- **Ausencia de un método eficaz para seleccionar los híbridos**
- **Productos de la hibridación no viables**
- **Resultados impredecibles**
- **Escasa estabilidad génica de protoplastos, de células en cultivo: variación somaclonal:**
 - cambios en el número de cromosomas (poliploidía, aneuploidía)
 - Cambios en la estructura (translocaciones, deleciones, inserciones, duplicaciones)
 - Cambios en la secuencia del ADN (mutaciones de bases)
 - metilación del ADN.



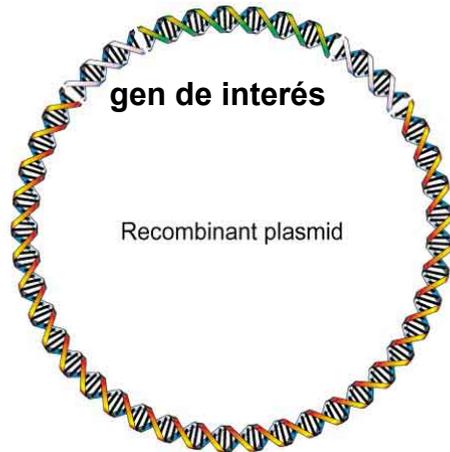
Ingeniería genética



Stanley Cohen y Herbert Boyer. *Congreso plásmidos bacterianos (Hawaii, 1972).*

Cohen (Univ. Stanford), especialista en el aislamiento de genes que confieren resistencia a antibióticos en plásmidos e introducirlos en *E. coli*.

Boyer (Univ. California) había descubierto una enzima de restricción (extremos cohesivos).



Plásmido recombinante:

“recombinación *in vitro* de un fragmento de ADN (organismo donante) con un vector de ADN con capacidad de replicación autónoma en una célula huésped”. La célula transformada se dividirá y dará lugar a una colonia de células portadoras del vector recombinante, clon de ADN



Clonación en un vector

1. Clonación del fragmento de ADN en el vector

1. Cortar ADN de interés y vector con la misma enzima de restricción
2. Unión del ADN de interés con el vector (ADN ligasa)

2. Transformación

1. Introducción del vector recombinante en célula hospedadora

3. Amplificación bacteriana en medio de selección

4. Extracción del plásmido

5. Aislamiento del gen de interés



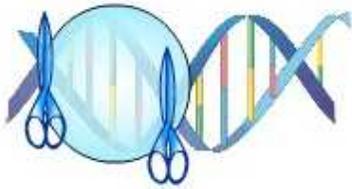
Plásmidos: Naturales

- **ADN circular y bicatenario**
 - **Tamaño: 1-200 kb**
 - **Bacterias, levaduras**
- **Transmiten de forma independiente:** (necesitan enzimas codificadas por el huésped para replicación y transcripción)
 - **Estrictos:** replicación acoplada al ADN cromosómico
 - **Relajados:** replicación independiente
- **Portan genes (no indispensables)**
 - Resistencia a antibióticos
 - Producción de antibióticos
 - Degradación de complejas moléculas orgánicas

Plásmidos: Clonación

- **Mínima cantidad de ADN no esencial (optimizar la clonación)**
 - Eficiencia transformación inversamente tamaño
 - Mapa de restricción del plásmido más difícil de caracterizar
 - Número de copias bajo
 - Mayor tamaño, mayor probabilidad rotura
 - Mayor probabilidad que el vector contenga una enzima de restricción del MCS
- **Capacidad de replicación autónoma (replicación relajada)**
- **Genes marcadores** (resistencia a antibióticos). Faciliten la selección de las células transformadas y su identificación
- **Presencia puntos corte únicos de enzimas de restricción (MCS, *multiple cloning site*)**
 - facilitar la inserción del gen





Fragmentación ADN. Enzimas restricción

Endonucleasas de restricción clase II:

➤ Reconocen secuencias específicas del ADN

- 4-7 pb
- Simetría palindrómica (dyad)

➤ Fragmentación del ADN con extremos terminales

- romos
- cohesivos

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		<p>5' overhang</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		<p>3' overhang</p>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<p>Blunt ends</p>
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		<p>Blunt ends</p>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		<p>5' overhang</p>

Digestión: Factores a tener en cuenta:

- Mg²⁺
- pH 7.2-7.8
- 37°C y NaCl



TABLE 2.1 Antibiotics and antibiotic-resistance genes are important tools in applied Molecular Genetics

Antibiotic	Mode of action	Resistance gene	Application
Ampicillin	Inhibits cell wall synthesis by disrupting peptidoglycan cross-linking	β -Lactamase (<i>amp^r</i>) gene product is secreted and hydrolyzes ampicillin	<i>amp^r</i> gene is included on plasmid vectors as a positive selection marker
Tetracycline	Inhibits binding of aminoacyl tRNA to the 30S ribosomal subunit	<i>tet^r</i> gene product is membrane bound and prevents tetracycline accumulation by an efflux mechanism	<i>tet^r</i> gene is a positive selection marker on some plasmids (e.g., pBR322, F' derivatives)
Kanamycin	Inactivates translation by interfering with ribosome function	Neomycin or aminoglycoside phosphotransferase (<i>neo^r</i>) gene product inactivates kanamycin by phosphorylation	<i>neo^r</i> gene is a positive selection marker on plasmids commonly used in eukaryotic molecular genetics
Bleomycin	Inhibits DNA and RNA synthesis by binding to DNA	The <i>bla^r</i> gene product binds to bleomycin and prevents it from binding to DNA	<i>bla^r</i> gene is a positive selection marker on plasmids and also used as a marker in eukaryotic cells (<i>zeo</i>)
Hygromycin B	Inhibits translation in prokaryotes and eukaryotes by interfering with ribosome translocation	Hygromycin-B-phosphotransferase (<i>hph</i> or <i>hyg^r</i>) gene product inactivates hygromycin B by phosphorylation	<i>hyg^r</i> gene is used as a positive selection marker in eukaryotic cells that are sensitive to hygromycin B
Chloramphenicol	Binds to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation	Chloramphenicol acetyl transferase (<i>CAT</i> or <i>CM^r</i>) gene product metabolizes chloramphenicol in the presence of acetyl CoA	<i>CAT/CM^r</i> gene is used as a selectable marker, and as transcriptional reporter gene of promoter activity in eukaryotic cells

Inhibe traducción

Inhibe traducción

Inhibe traducción

Inhibe traducción



Plásmidos serie pUC

Permiten selección directa de las células transformadas

Gen de resistencia a antibiótico

MCS situado en la secuencia *lacZα* que codifica la parte N-terminal de la β -galactosidasa de *E. coli* que complementa la delección M15 del operón *lac* de *E. coli*.

En un huésped de *E. coli* apropiado, la complementación dará lugar a una β -galactosidasa activa. Clonación de ADN en MCS origina una inactivación insercional de la secuencia *lacZα*. **No es 100% eficaz** (fasos positivos y negativos), pero reduce el número de colonias a analizar

X-Gal (incoloro)

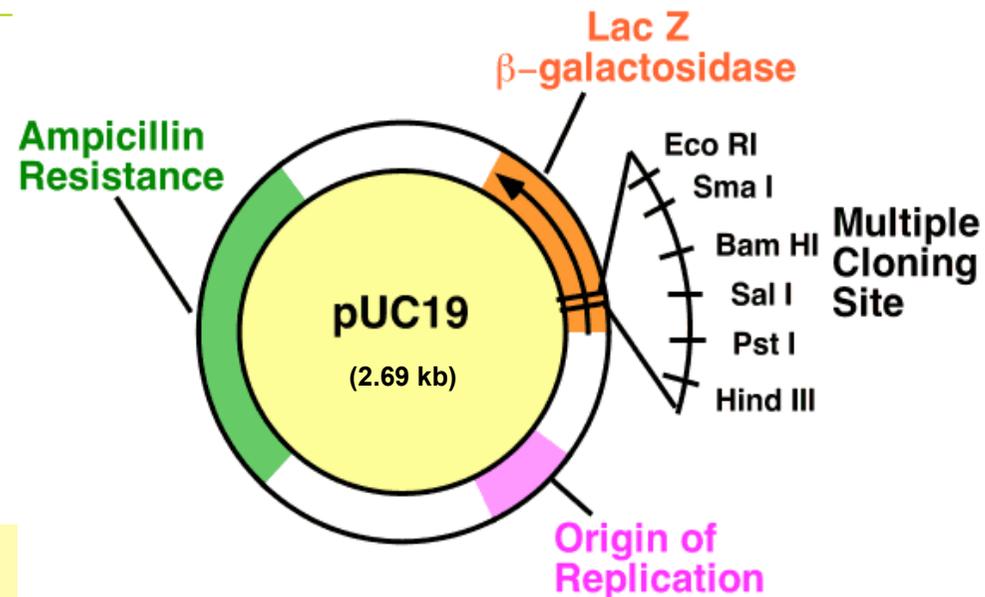
5Br-4Cl-3-indolil-3galactósido



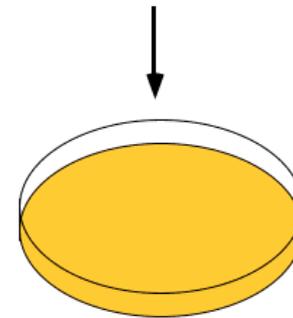
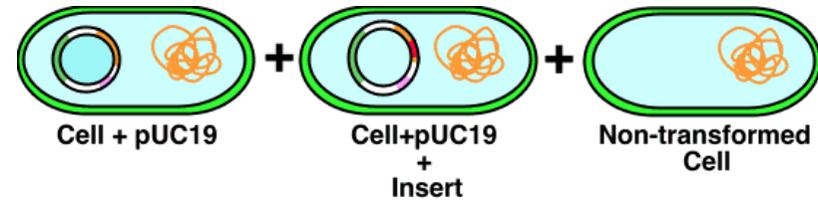
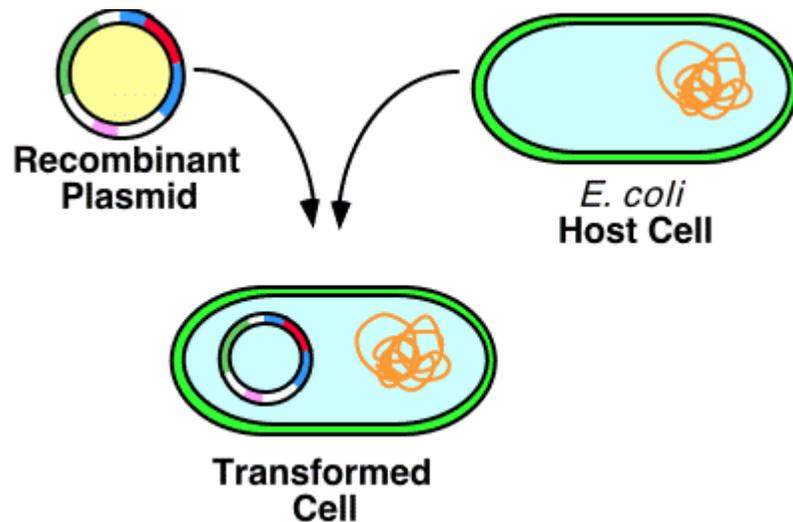
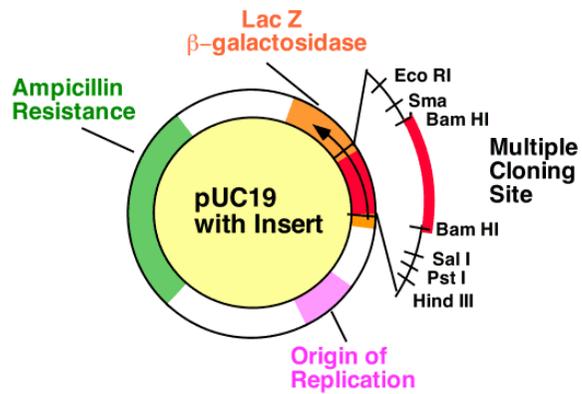
β -galactosidasa

Gal + 5Br-4Cl-3-indolil (azul)

IPTG (isopropil- β -D-galactósido) es un inductor de la síntesis de una β -galactosidasa



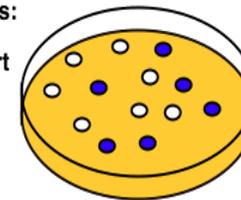
Plásmidos pUC: selección directa



IPTG
+
Nutrient medium
+
ampicillin
+
X-gal

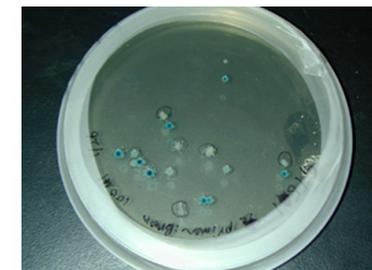
Overnight Growth

White colonies:
pUC19 + insert

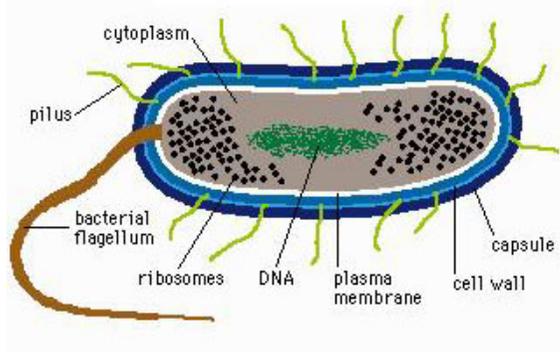
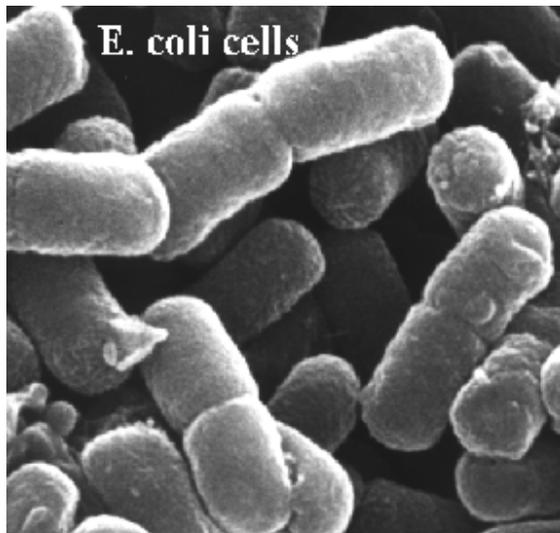


Ampicillin-resistant colonies

Blue colonies:
pUC19 only



Célula huésped: *E. coli*



Modificaciones genéticas introducidas para mejorar la clonación

Actividad endonucleasa.

No endonucleasa-I: **incrementa la replicación** del plásmido; endA-

Sistemas de recombinación del ADN.

Modificado: evitar **reagrupación, deleciones del inserto**; recA-

Sistemas de restricción.

Estas proteínas **degradan ADN foráneo** que **no está correctamente metilado** en la secuencia 5'-AAC-(N)5'-GTGC-3'; hsdR-



Introducción ADNr en *E. coli*

Transformación mediada por calcio

Tratamiento con $CaCl_2$ → células se vuelven competentes

- Incubar células competentes (captar ADN) con vector recombinante 0°C
 - ADN se adhiere a la pared celular
- Choque térmico 42°C 45''
 - Favorece la entrada del ADN
- Incubación medio completo 37°C 1h
 - Recuperación de las células
- Incubación medio selección (antibióticos)

Transformación electroporación

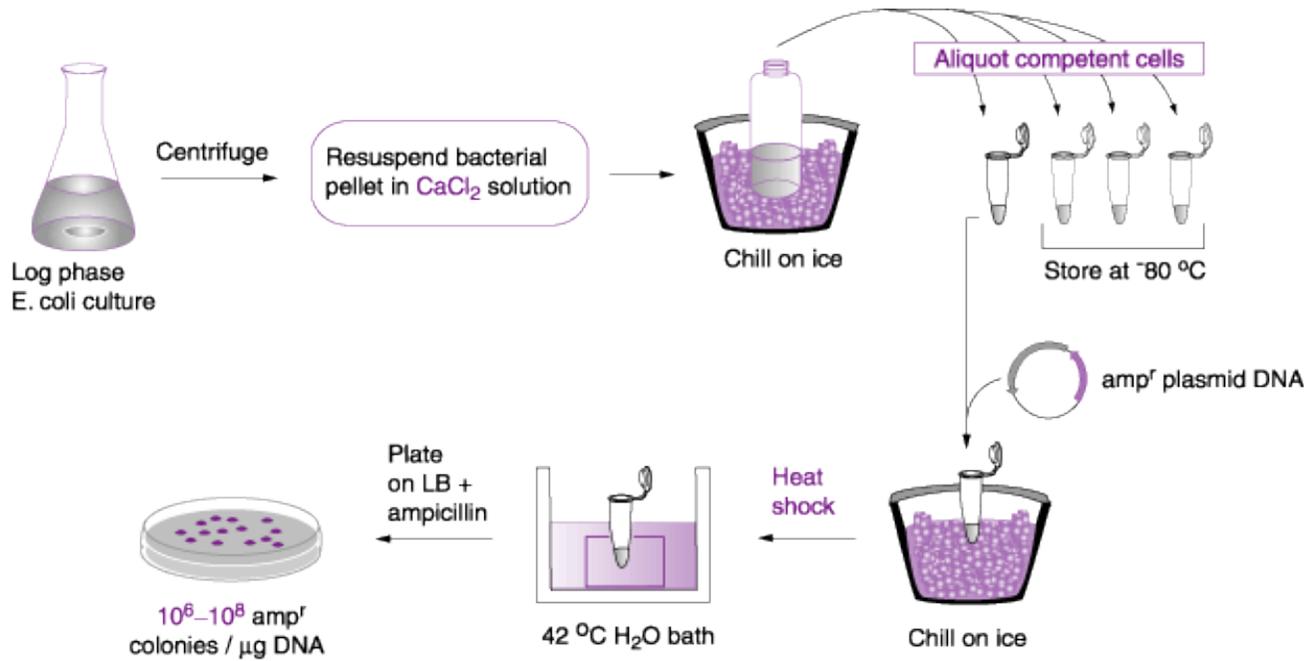
Breve pulso eléctrico: permeabiliza la membrana mediante un pulso eléctrico.

Parámetros esenciales: voltaje y duración del pulso

Formación de poros. Tras el cese del pulso eléctrico, los poros vuelven a cerrarse, más lentamente si las células se mantienen a 0°C

Transformación < 1 %

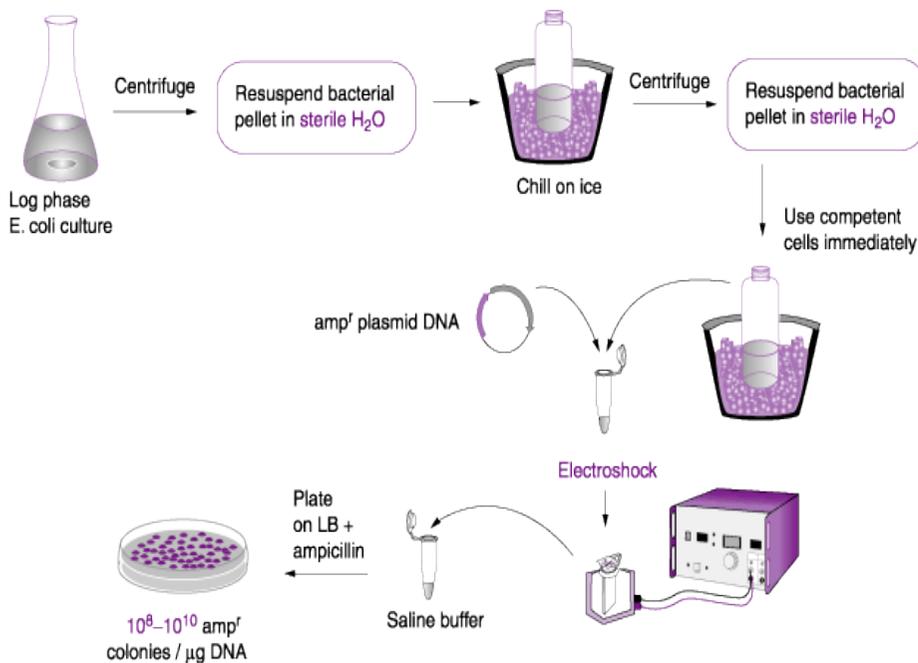




Introducción en las células el ADN recombinante: Transformación calcio

Descongelación de las células competentes en hielo

Añadir producto de la ligación. Incubar 30 min en hielo



Transformación mediante electroporación

Efectividad de la electroporación:

Tipo de célula: más pequeña más voltaje

Células en un medio baja sal

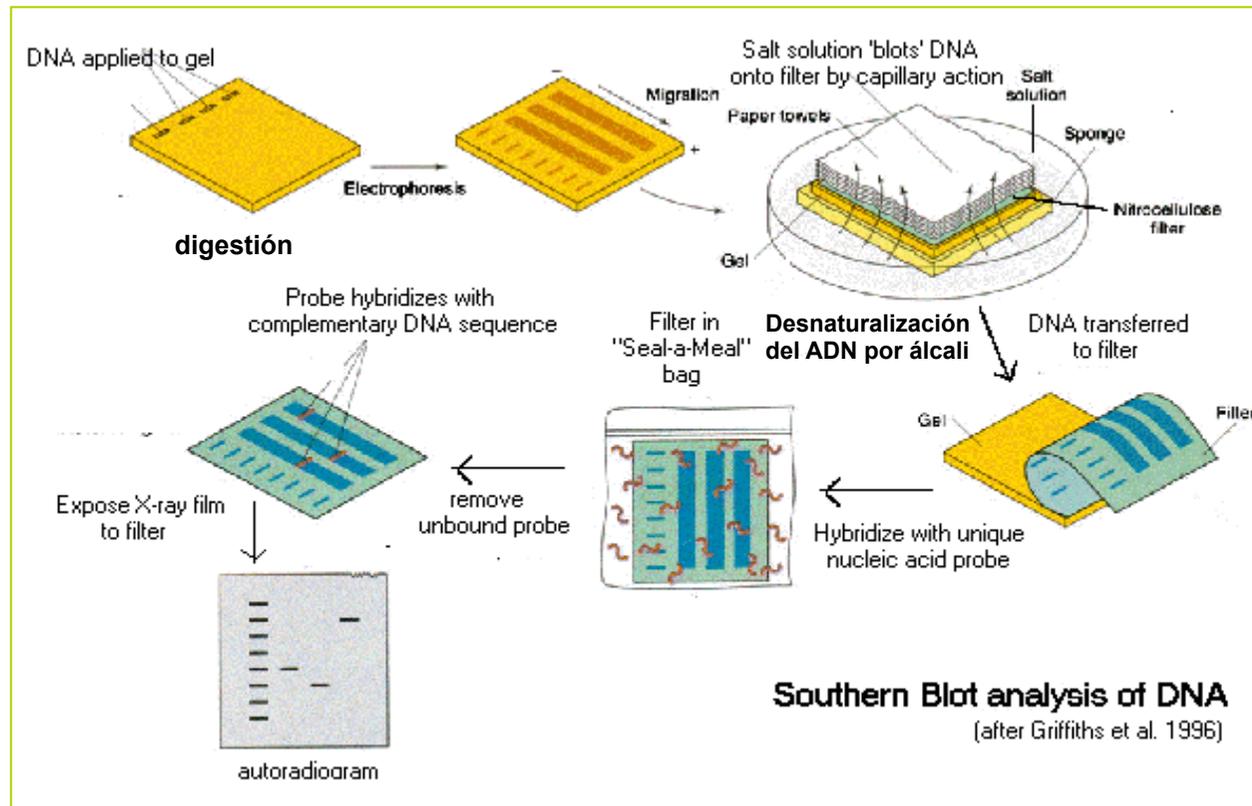
Voltaje (2.5 kV) y duración del pulso eléctrico (3 ms)



Selección de recombinantes: depende de la estrategia de clonación

- **Detección de genes marcadores**
 - **Plásmidos**
 - resistencia a antibióticos,
 - detección histoquímica (colonias blanca/azul)
 - **Bacteriófagos/Virus:**
 - Formación placas de lisis
- **Southern blot**
 - Comprobar el origen genómico del ADN clonado
- **Northern blot**
 - Comprobar el transcrito de ARNm





Para comprobar si el **ADN** se ha integrado en el genoma.
Southern blot.

- Extracción del ADN,
- Digestión endonucleasa de restricción,
- Separación de los fragmentos (electroforesis),
- Transferencia a un papel de nitrocelulosa,
- Desnaturation con álcali,
- Hibridación sonda marcada

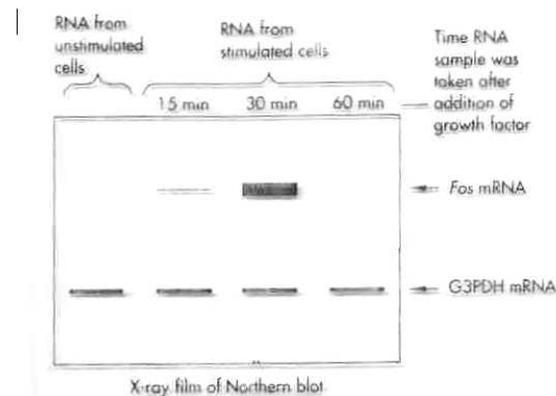
Northern blot

Extracción ARNm

Separación electroforesis en presencia de formaldehído para evitar apareamientos internos de bases en el ARN

Transferencia

Hibridación sonda



Amplificación del gen mediante PCR

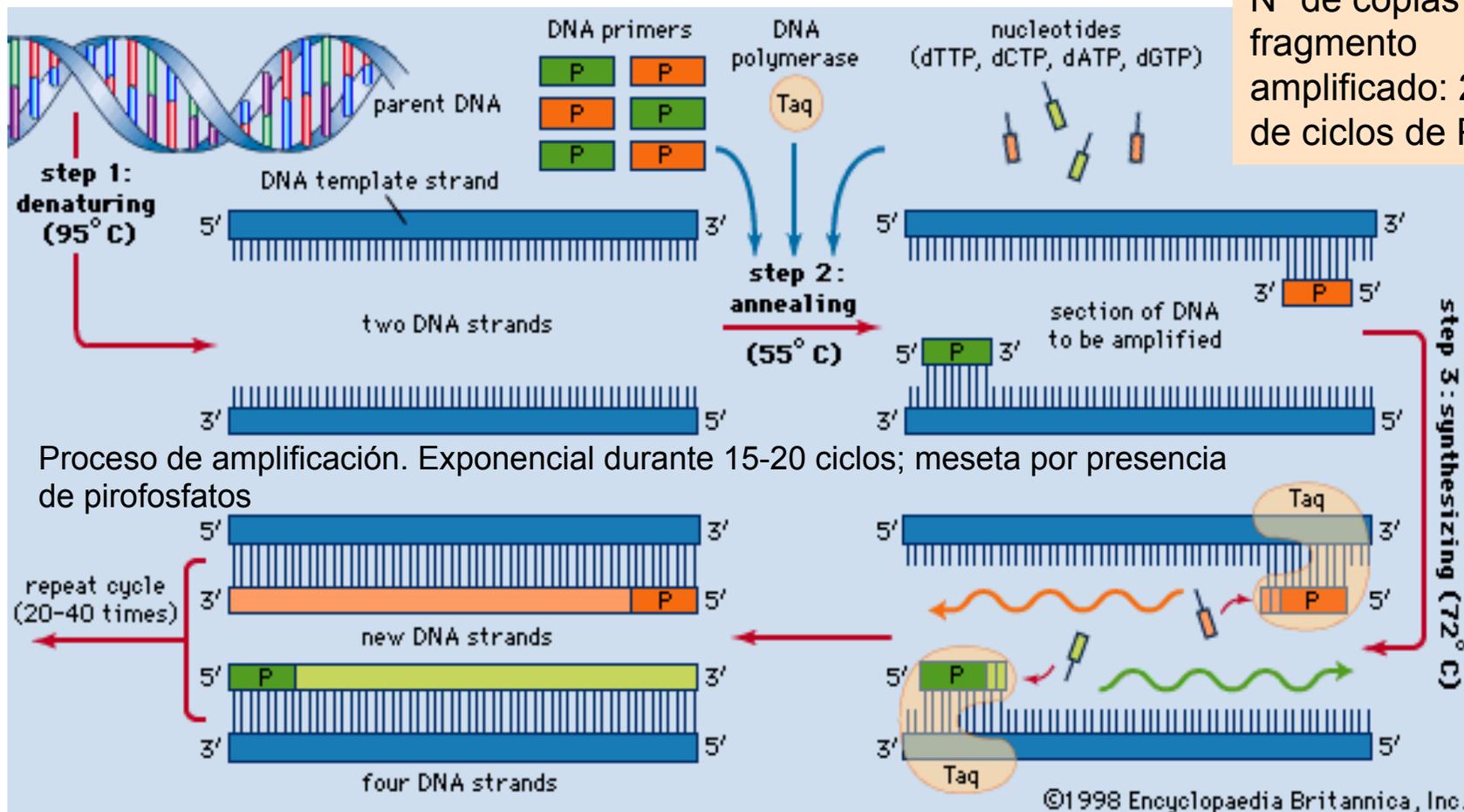


Kary Banks Mullis
Nobel Química
1993

*Obtener in vitro
múltiples copias de un
segmento de ADN*

- ADN molde
- 2 cebadores
- ADN polimerasa termoestable
- 4 desoxirribonucleósidos trifosfato

Nº de copias del
fragmento
amplificado: 2^n ; $n = \text{nº de ciclos de PCR}$



PCR: requisitos

➤ ADN:

- no purificado
- 200 ng

➤ ADN polimerasa:

- Taq (*Termus aquaticus*)
- Vent polimerasa: actividad exonucleasa
- Mg²⁺
- pH 7.0-7.5; 72°C

➤ Cebadores

- Tamaño (>17 nucleótidos)
- Alto contenido en G-C; Tm similar

	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón Taq 10X	5	
dNTPs 2 mM	5	200 µM
Cebador 5' 50 µM	1	1 µM
Cebador 3' 50 µM	1	1 µM
MgCl ₂	3,5	2 mM
ADN (0,1 µg)		
Taq DNA polimerasa	0,5	

Nº ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización
1	5 min		
30	30 s	1 min	1 min
1			15 min

Tasa de error depende no sólo de la enzima, también secuencia y condiciones de reacción. Disminuye al bajar la concentración de dNTPs y Mg. Tasa de mutación: 1% tras 30 ciclos



Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida

- **Método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos ADN**

- Técnica simple, rápida, eficaz

- **Detección ADN en gel**

- Directa, BET
- Detectar 1-10 ng
- Extracción del ADN del gel

Geles de poliacrilamida

- **Ventajas:**

- Separar fragmentos de ADN 5-50 bp
- Gran poder de resolución (1 bp)

- **Desventajas:**

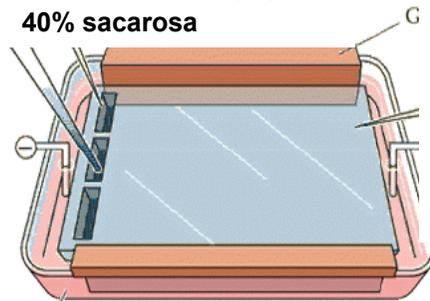
- Manipulación difícil

Geles de agarosa

- **Ventajas:**

- Mayor poder de separación (menor resolución)
- Fácil manipulación

Tampón de carga 6X
0.25 azul bromofenol
40% sacarosa



Función:
-Aumentar la densidad muestra
-Facilitar la carga
-Velocidad migración conocida
Azul bromofenol ~300 bp

Buffer solution

Tampones

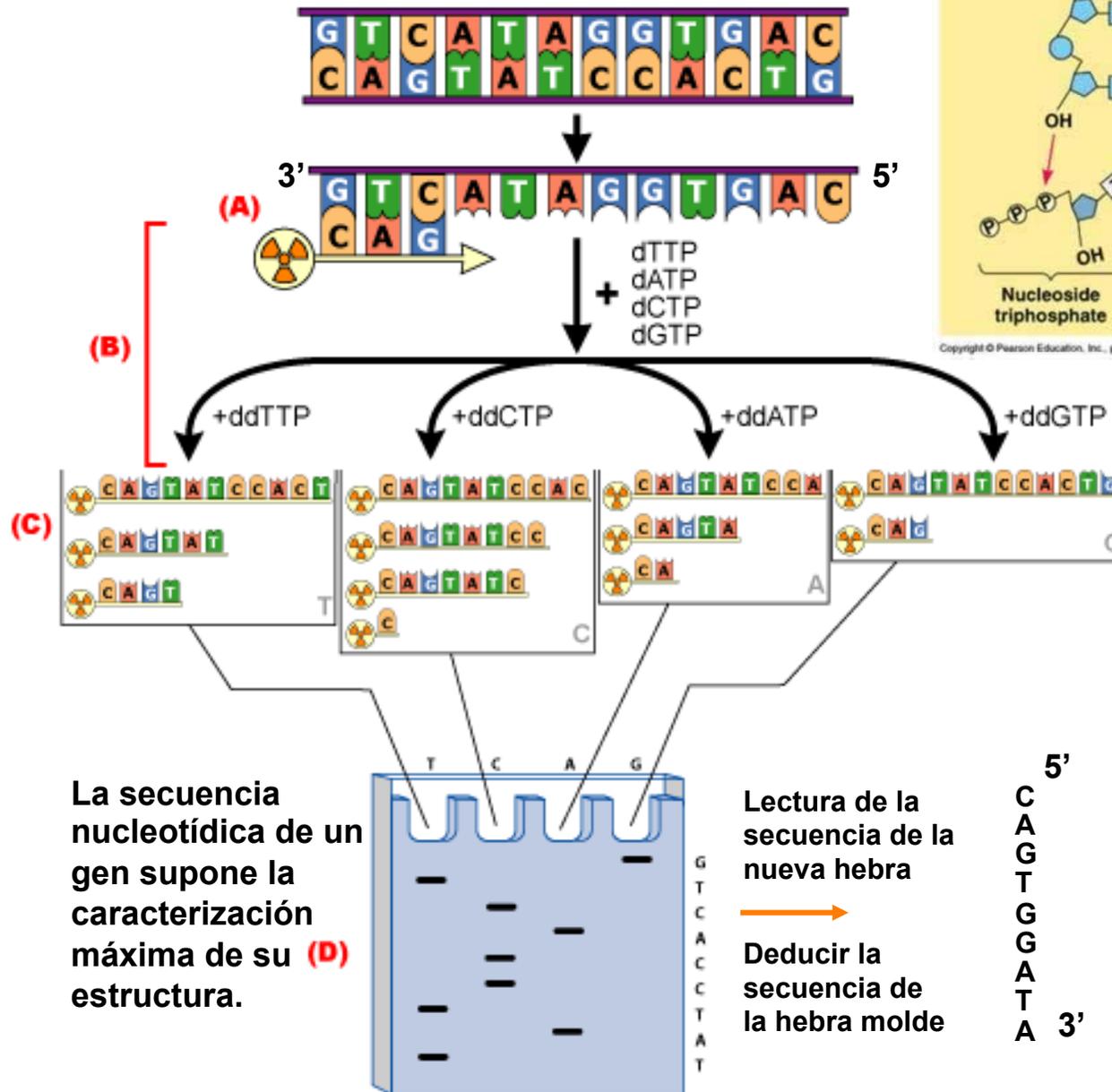
TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0

TBE: 45 mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8.0

Amount of agarose in gel (% [w/v])	Efficient range of separation of linear DNA molecules (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

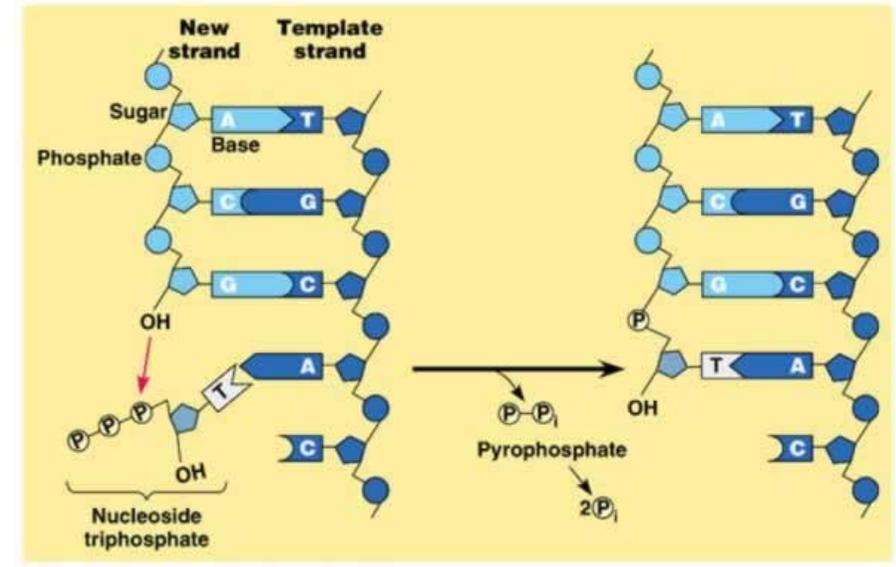


Método de Secuenciación de Sanger



La secuencia nucleotídica de un gen supone la caracterización máxima de su (D) estructura.

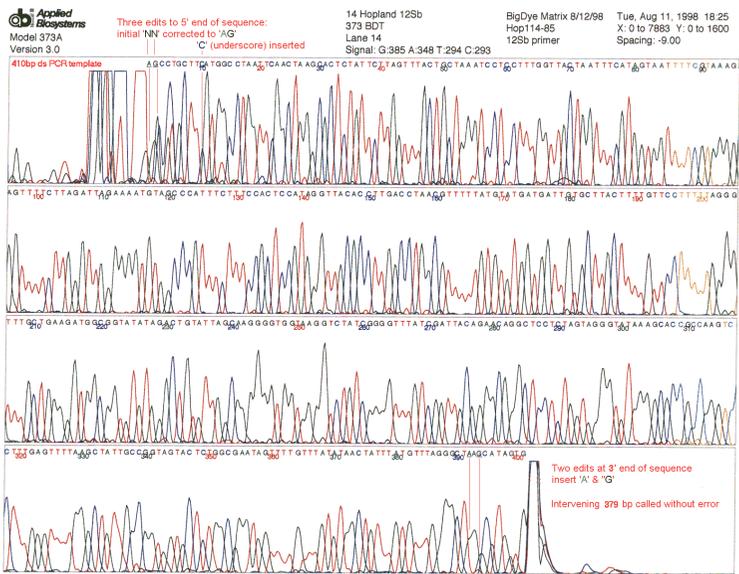
Lectura de la secuencia de la nueva hebra
 →
 Deducir la secuencia de la hebra molde



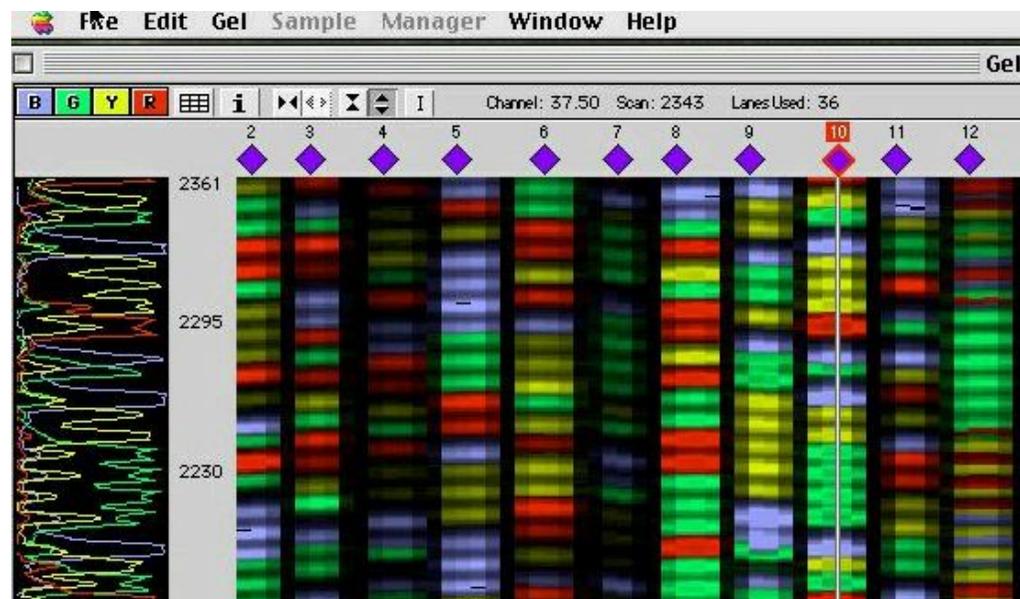
Reacción catalizada por la ADN polimerasa



Marcaje radiactivo



Copia impresa del cromatograma y de la secuencia obtenida con un secuenciador automático que utiliza compuestos fluorescentes



Marcaje con colorantes fluorescentes

Reacciones se depositan en el mismo carril. Secuenciación automática se basa en la detección inequívoca de la fluorescencia. Se separan en un tubo capilar de poliacrilamida

Los fluorocromos son excitados con un láser situado en la base del gel.

La señal es percibida por un fotomultiplicador. El color del fluorocromo indica el nucleótido

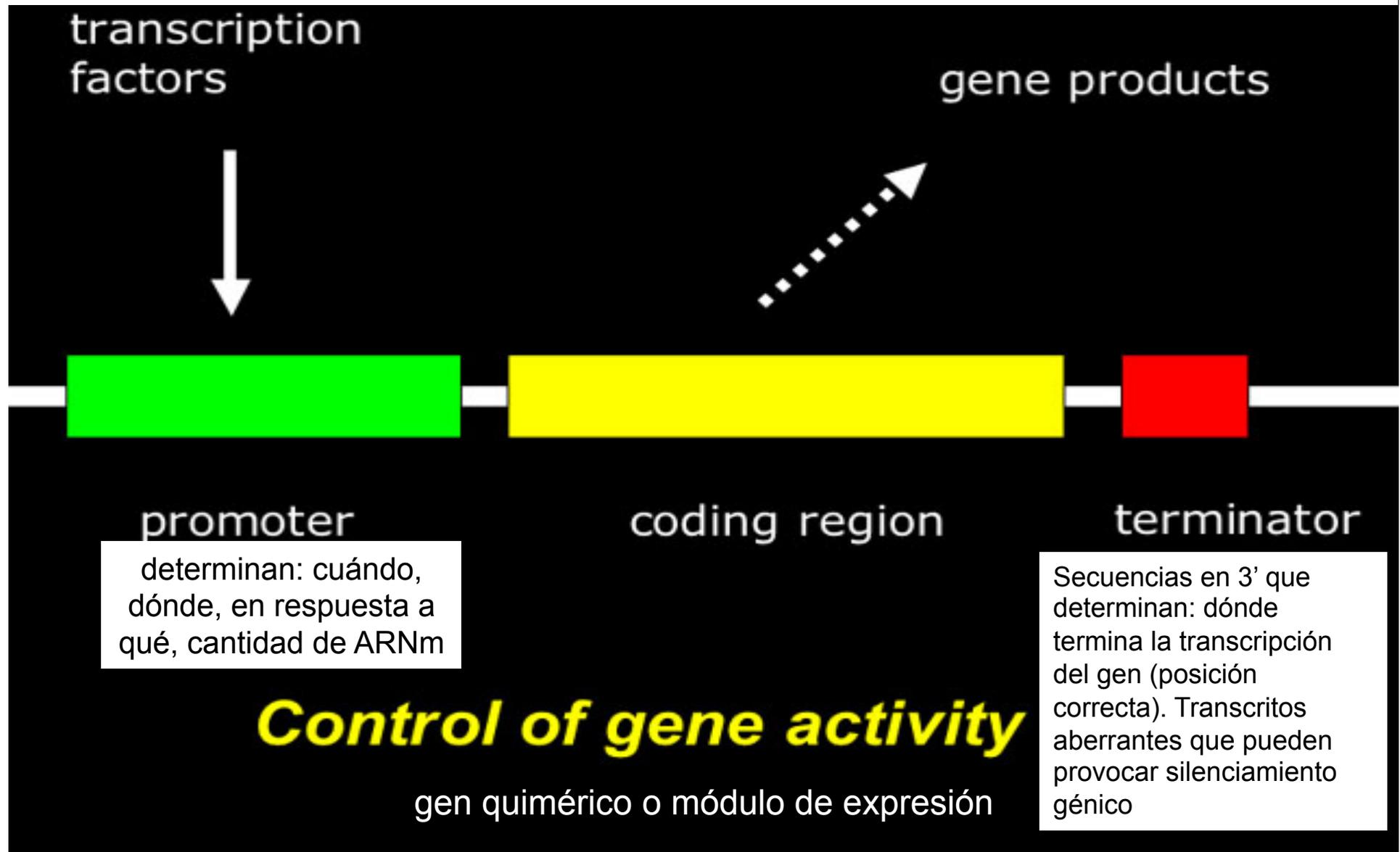


Ingeniería genética II

- **Elementos necesarios para la transformación.**
 - **Promotores:** Constitutivos, específicos e inducibles
 - **Terminadores**
 - **Secuencias líder**
 - **Genes informadores:** marcadores de selección y marcadores informadores
- **Diferentes sistemas de transferencia de genes en plantas**
 - Mediante vectores
 - De forma directa



Elementos necesarios para la transformación de plantas: expresión del transgén



Tipos de promotores

Promotores más utilizados:

➤ **Constitutivos**

- **CaMV 35S** (virus del mosaico de la coliflor) Dicotiledóneas
- **Promotor NOS** (gen nopalina sintasa del plásmido Ti de *Agrobacterium*). Dicot
- **Promotor ubiquitina (maíz)**. Monocotiledóneas.
- Promotor **actina** del arroz. Monocotiledóneas.

➤ **Específicos órgano/tejido**

- Promotores vicilina y glutenina: específicos expresión semillas
- Promotor α -amilasa: específico expresión en la aleurona de cereales
- Promotor rubisco: específico expresión en tejidos fotosintéticos

➤ **Promotores inducibles:** Promotor quimérico: 35S y regiones de unión factores de transcripción (FT). En ausencia del inductor: FT no activo

➤ **Inducibles por compuestos no derivados de plantas**

- Esteroides, Cu

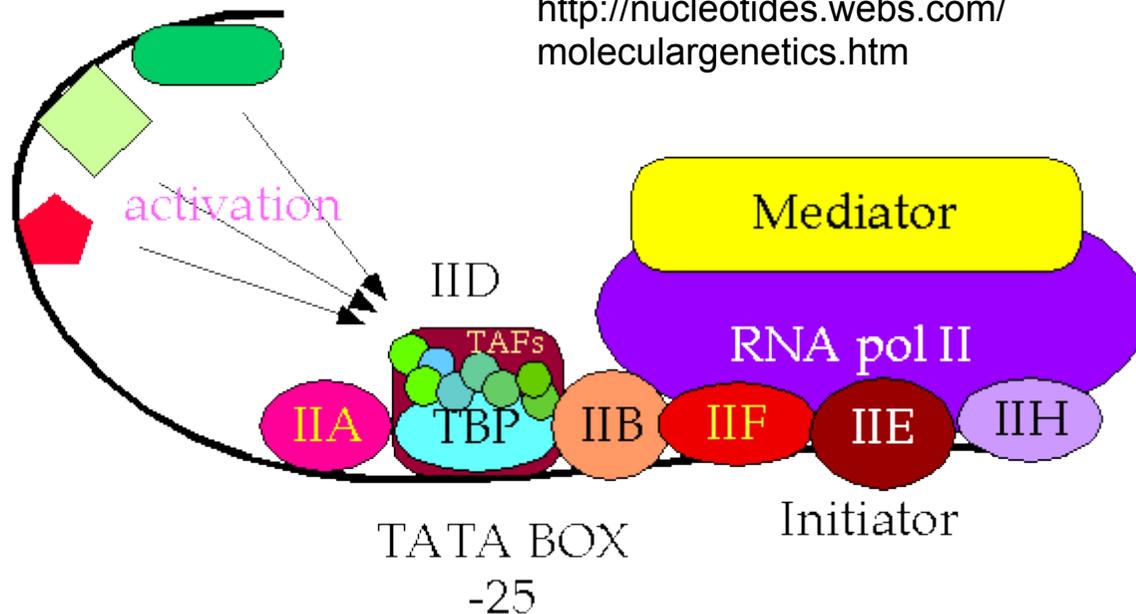
➤ **Inducibles por compuestos derivados de plantas**

- Inducibles por heridas (MJA), calor (heat-shocks elements)
- Inducibles por hormonas: ABA, auxinas (ABREs y AuxREs)



Promotor eucariota

Enhancer



Esquema resumido de la unión de la RNA polimerasa al promotor

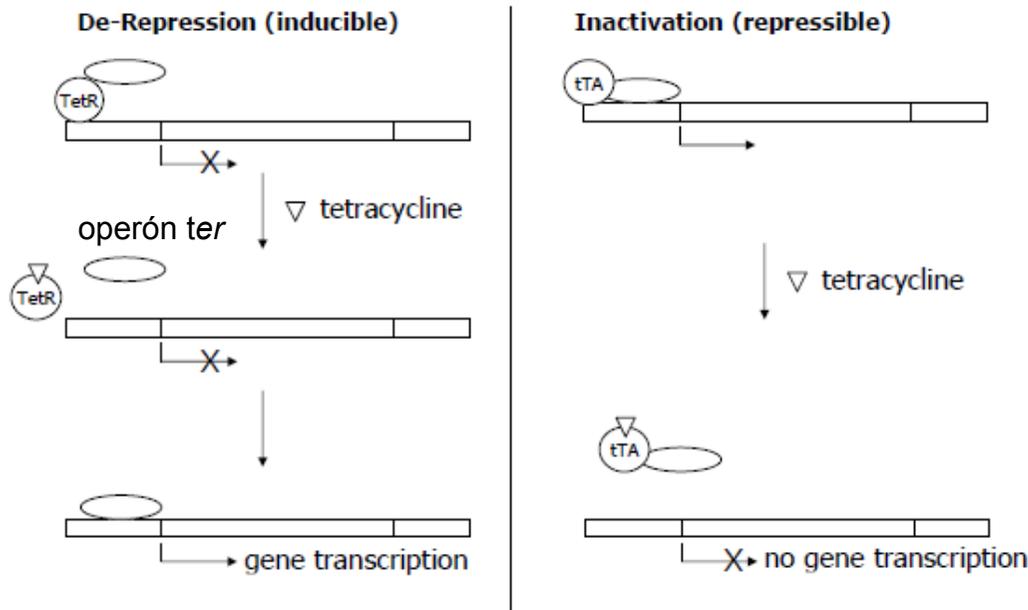
Los factores generales de transcripción se unen a la caja TATA del promotor. La primera proteína que se une a la subunidad “TATA-binding protein (TBP)” es la TFIID (factor de transcripción IID), el cual es un complejo multiproteico. Esta interacción requiere TBP-associated factor (TAFs) y está promovida por TFIIA. TFIIB se une al complejo y facilita la unión de TFIIF, que se une a la RNA polimerasa II. TFIIE y TFIIH se unen al complejo. Una helicasa dependiente de ATP se asocia con TFIIH y desenrolla el promotor. En este estado la RNA pol se dice que está en modo de iniciación. El dominio C-terminal de la RNA pol se fosforila, lo que provoca la transición al estado de elongación y la transcripción se inicia en + 1.



Promotores inducibles

Promotores inducibles no derivados de plantas: *Características*

- No debe haber expresión del transgén en ausencia del inductor
- El sistema debe responder sólo a un inductor o clase de inductores: especificidad
- La inducción de la expresión génica debe ser rápida tras la aplicación del inductor
- La expresión del gen debe cesar rápidamente tras la retirada del inductor
- El inductor debe ser no tóxico
- No debe causar cambios no específicos en la expresión génica



El antibiótico tetraciclina puede des-reprimir o inactivar la expresión génica.

El represor de la tetraciclina (TetR) se une al operón *ter*. En presencia de tetraciclina el represor TetR libera el operón *ter* y se inicia la transcripción.

TetR se puede modificar y convertirlo en un **activador tTA**. El tTA se une al operón e induce la expresión génica. En presencia de tetraciclina, se libera tTA del operón y la expresión génica cesa.



Otros elementos del módulo (cassette) de expresión

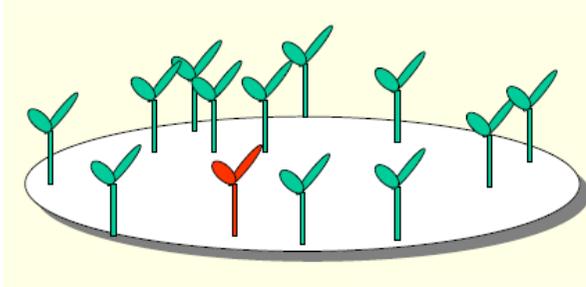
Terminadores

- **Terminador NOS** (gen nopalina sintasa de *Agrobacterium*)
 - La transcripción cesa en la posición correcta

Secuencias líder

- Secuencias situadas entre el promotor y la región codificante
- Proceden de virus de RNA
- **Incrementan la estabilidad del ARNm**





Elementos necesarios para la transformación de plantas: genes marcadores

El porcentaje de transformación es muy bajo

Métodos que permitan identificar las células transformadas

Genes marcadores

(confieren una nueva característica)

Marcadores selección (desarrollarse medio selectivo)

Confieren resistencia a un sustrato tóxico (antibiótico)

Promueven el crecimiento/diferenciación células transformadas (uso de otras fuentes de carbono: manosa, xilosa)

Marcadores informadores (característica física)

Permiten la detección visual de los tejidos transformados:

- β -Glucuronidasa (GUS)

-Luciferasa

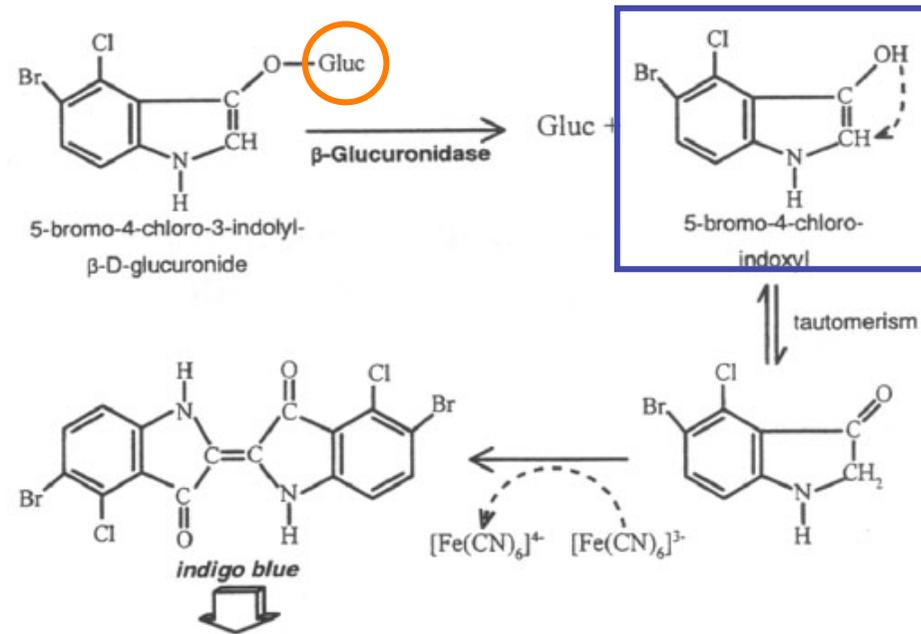
-Proteína de la fluorescencia verde (GFP)



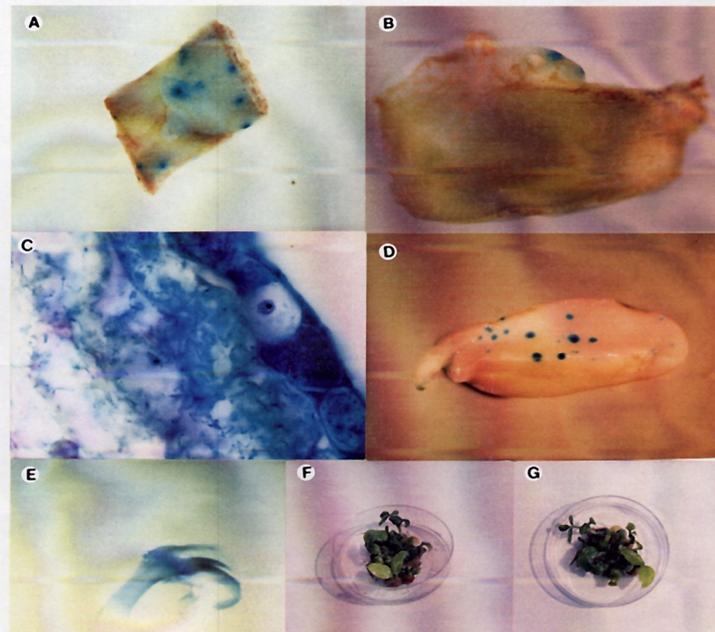
β-Glucuronidasa (GUS)

- GUS hidroliza β-glucurónidos (gen *uidA* aislado de *E. coli*)
- Requiere la adición de X-Glu (determinación histológica)
- Determinación actividad: 4-metil-umbeliferil-glucurónido (4-MUG)

Determinación de GUS: rápido, fácil. Puede ser cuantitativa y cualitativa. Sustrato fluorogénico: 4-MUG



Expresión de un promotor en respuesta a la infección por virus detectado con GUS



La enzima GUS es muy estable en plantas

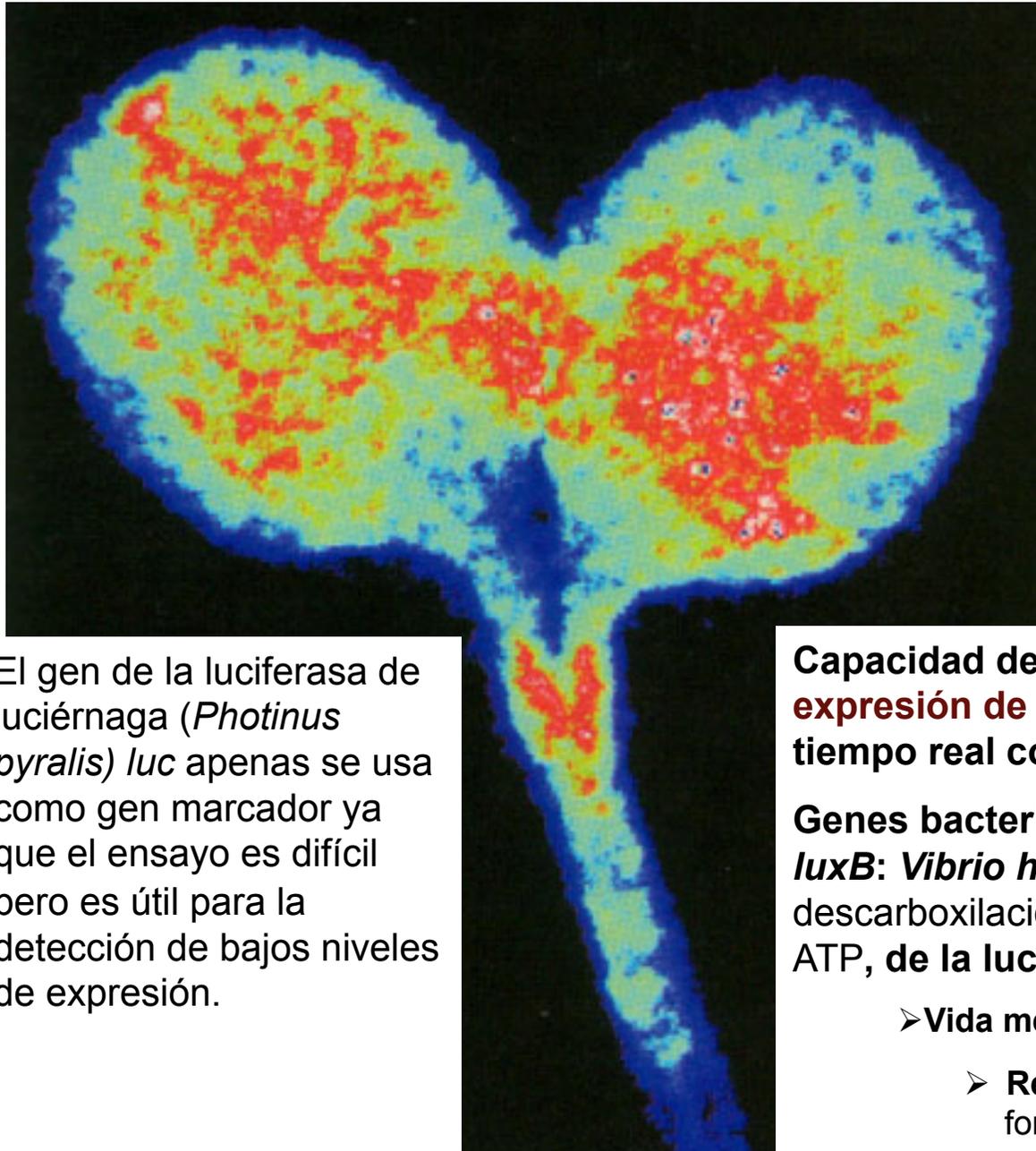
Localización histoquímica → detectable a nivel subcelular

Puede fusionarse con otras proteínas

Inconvenientes: Ensayo destructivo para la célula



Luciferasa



Plántula de Arabidopsis.

Luciferina se aplica con un pulverizador. Regiones amarillas y rojas corresponden a zonas de mayor intensidad. Los ensayos son muy sensibles (fotomultiplicadores, luminómetros o exposición de películas)

El gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) *luc* apenas se usa como gen marcador ya que el ensayo es difícil pero es útil para la detección de bajos niveles de expresión.

Capacidad de registrar el **patrón de expresión de forma no destructiva**, en tiempo real con gran intensidad,

Genes bacterianos de la luciferasa (*luxA* y *luxB*: *Vibrio harveyi*) cataliza la descarboxilación oxidativa, dependiente de ATP, **de la luciferina**

➤ **Vida media de LUC es corta**

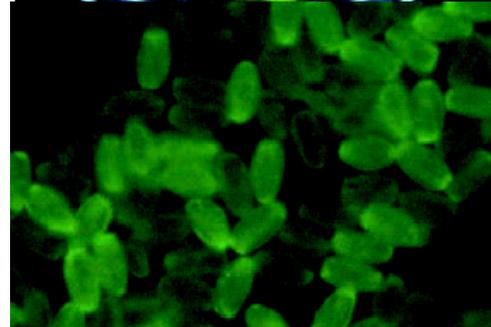
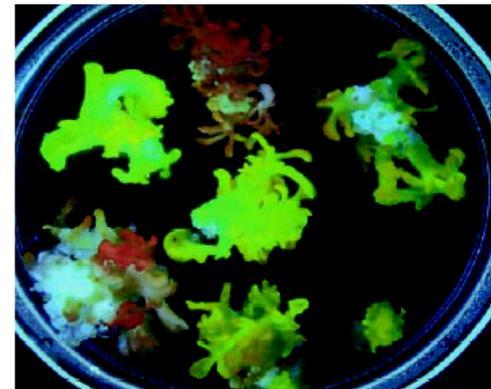
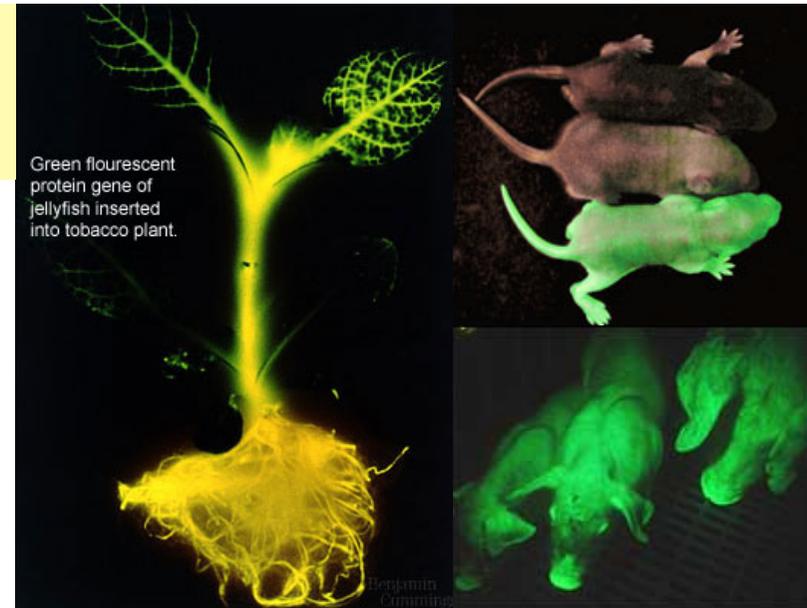
➤ **Reflejar la actividad transcripcional**
forma muy precisa

Proteína de la fluorescencia verde (GFP)

- **Emite fluorescencia de forma intrínseca (en presencia de oxígeno)**
- **Permite la identificación directa en células vivas**
 - **Potente gen marcador** usado para detectar las células transformadas
 - **No efectos citotóxicos**
 - **Permite la selección manual del material transformado antes de su cultivo en medio selectivo** (aumentar la frecuencia de transformación)

Otros usos de GFP

- **No muy utilizada en estudios de expresión génica**
- **Localización intracelular, transporte de sustancias** (fusión con proteína de interés)



Vástagos y callos transgénicos de tabaco con el gen GFP bajo el control del promotor 35S. Nótese la variación de la fluorescencia entre los distintos eventos y los escapes (rojo). GFP se visualiza bajo luz UV (365 nm).

Granos de polen. GFP bajo el control de un promotor específico.

Plant Cell Report
20(2001):376



Genes marcadores empleados en transformación

Gen marcador	Abreviatura	Fuente	Detección/Ensayo
β -glucuronidasa	<i>gus/uidA</i>	<i>E. coli</i>	Fluorimetría (cuantitativa) o histoquímica (<i>in situ</i>)
Gen de la fluorescencia verde	<i>gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	Fluorescencia, no destructivo
Luciferasa	<i>luc</i>	<i>Photinus pyralis</i>	Luminiscencia
Luciferasa	<i>luxA, luxB</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	Luminiscencia
Cloranfenicol acetiltransferasa	<i>cat</i>	<i>E. coli</i>	Ensayo radioactivo, sensible y semicuantitativo



Genes marcadores: eliminación

Función: seleccionar células transformadas

Normativa vigente: Directiva 2001/18/CE

(basada en el principio de la precaución)

Objetivo:

- **mínima cantidad de ADN foráneo**
- **no autorizados: genes resistencia a antibióticos**
- **incorporación locus preciso**

Only two GM crops approved: Monsanto's MON810 insect-resistant maize and, basf's industrial starch amflora potato

GM directive deficiencies in the European Union. The current framework for regulating GM crops in the EU weakens the precautionary principle as a policy tool.

Opinión

Webs de interés:

<http://www.gmo-compass.org/>

<http://www.gmoinfo.ie/>



Escisión mediante recombinación específica

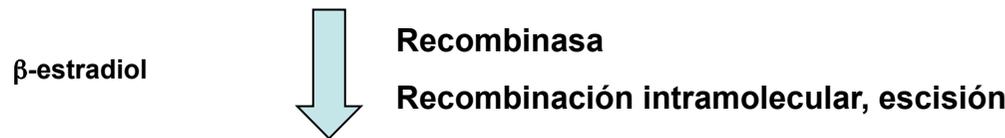
Cre/loxP y FLP/FRT

Cre/loxP (Cre: causes recombination; loxP: locus of crossing over in P1). Sistema más usado.

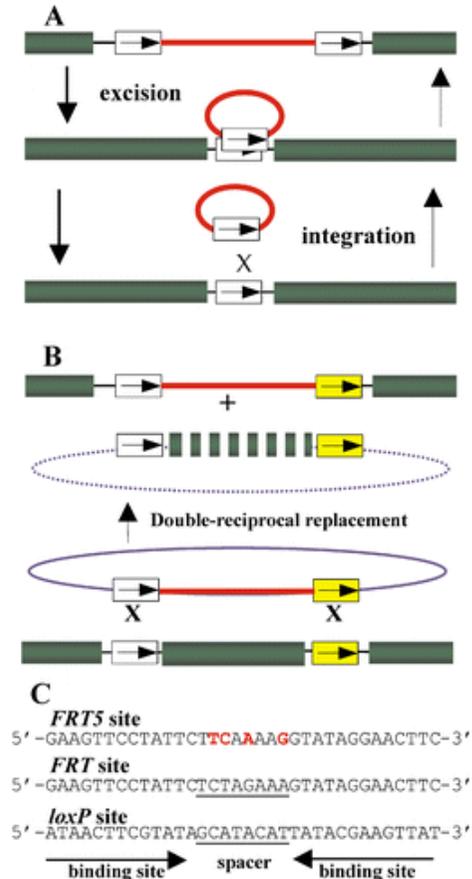
FLP/FRT (FLP: flipping DNA; FRT: FLP recombination target) levaduras

Sistema Cre-lox del bacteriófago P1

- Tirosina recombinasa (38.5 kDa)
- Región lox: 34 bp
 - Enzima reconoce secuencia de 13 bp del lox



Recombinasa Cre (38.5 kDa) y la región lox 34-bp. La enzima se une a una región repetida de 13 bp de la región lox. La reacción puede ser uni- o bimolecular. Integrar o escindir un fragmento de ADN



Reacciones son reversibles: escisión e integración

