

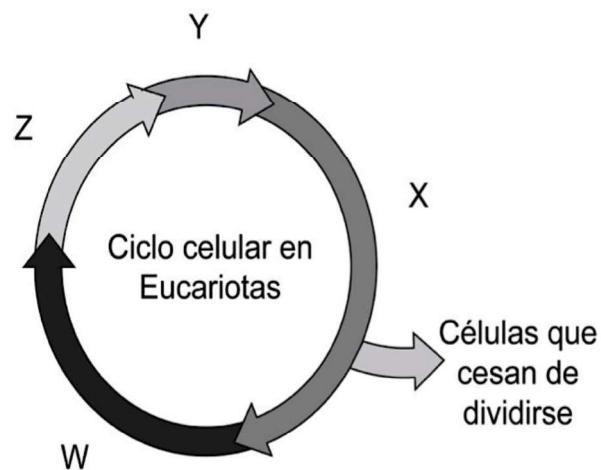
TEMA 14: MUTACIONES. APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA GENÉTICA



PRÁCTICA ESPACIADA

14.1. Recientemente investigadores de la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, en New Haven, Estados Unidos, han identificado un gran obstáculo para la reconversión de las células a su estado juvenil: la velocidad del ciclo celular o el tiempo que tarda una célula en dividirse.

- El siguiente diagrama representa un ciclo celular. Identifica las diferentes fases o etapas del ciclo indicadas como X, Y, Z y W.
- Señala y explica brevemente en qué fase del ciclo celular se duplica el ADN.
- Relaciona el ciclo celular con la apoptosis.
- ¿Qué relación presentan los mecanismos que regulan el ciclo celular y el cáncer?



APLICANDO LO QUE YA SABES

14.2. Asocia los siguientes términos dos a dos y explica las tres relaciones encontradas, utilizando todos los términos y sin repetir ninguno:

- Promotor
- Fragmento de Okazaki
- Codón
- Aminoacil-t-RNA
- DNA polimerasa
- RNA polimerasa



EVOCANDO LO YA APRENDIDO

14.3. La BrdU es una molécula similar a la timina y una célula la puede incorporar para la replicación del ADN en vez de este nucleótido. La BrdU se puede detectar fácilmente, por lo que se utiliza para estudiar las células que están en división. Si se añade BrdU a unas células en división, se observa que tras la mitosis todas las células hijas resultantes tienen BrdU. Justifica este resultado.



PRÁCTICA ESPACIADA

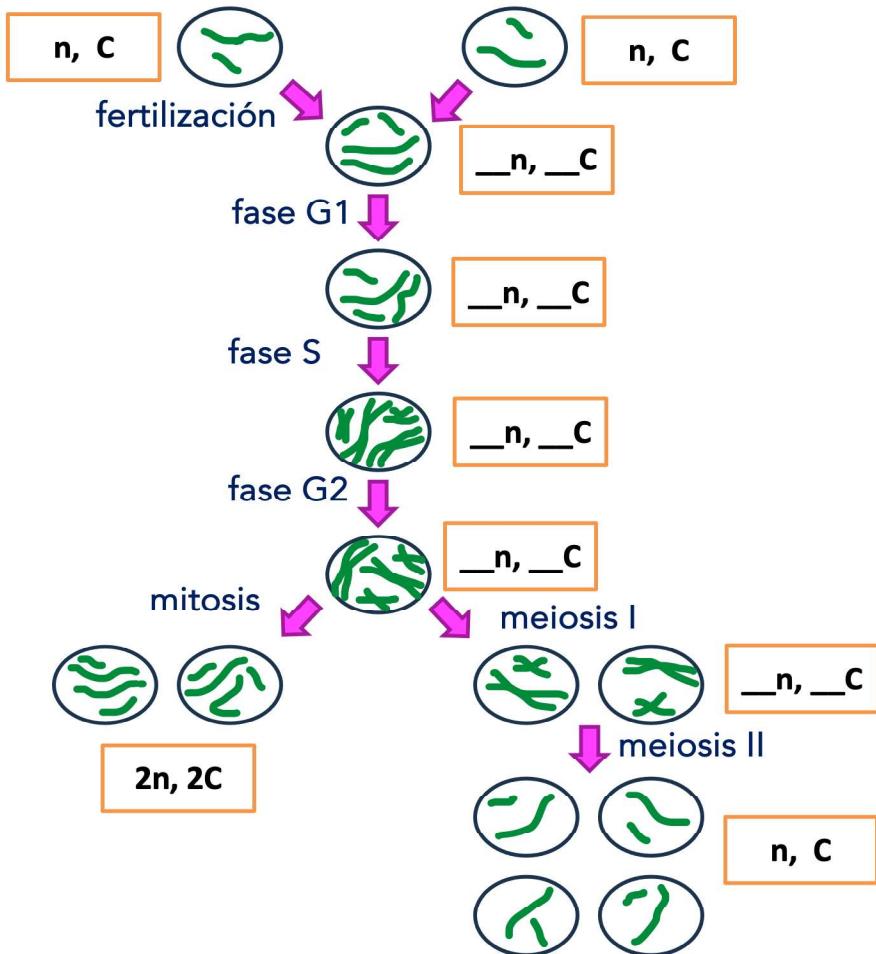
14.5. En relación con los procesos de división celular:

- Explica las diferencias en la cariocinesis y en la citocinesis entre las células animales y las células vegetales.
- Para un organismo diploide con $2n=10$ cromosomas, indica el número de cromosomas y cromátidas que habría en cada una de las siguientes fases:
 - fase G1
 - fase G2
 - telofase
 - telofase I
 - telofase II
 - metafase I



ENTRELAZANDO CONCEPTOS

14.6. Completa el siguiente diagrama con la dotación cromosómica o ploidía de las células (n , $2n$) y con la cantidad de ADN total (C , $2C$, $4C$) en las distintas etapas representadas:



- En el esquema se representa una célula con dotación cromosómica $2n=4$. Explica con tus palabras qué significa esta terminología.
- Calcula cuántos cromosomas y cuántas cromátidas tendría una célula humana en cada caso.
- Una célula humana puede tener $4C$ en cierto momento de su ciclo celular pero nunca puede ser $4n$. ¿Cuántos cromosomas y qué número total de cromátidas tendrá una célula humana cuando la cantidad de ADN es $4C$? ¿Cuántos de estos cromosomas serán autosomas y cuántos heterocromosomas?
- Si por algún motivo alguna célula humana llega a ser $4n$. ¿Cuántos sets o juegos de cromosomas tendría una célula somática? ¿Y cuántos heterocromosomas?
- Aunque en vegetales es frecuente encontrar células $4n$, en el caso del ser humano una célula $4n$ presenta una mutación. Explica qué tipo de mutación sería, especificando lo más posible.
- A pesar de que en el esquema los cromosomas, con fines didácticos, aparecen condensados y visibles en todas las fases del ciclo celular, esto no ocurre así en la realidad. ¿En qué grados de condensación o empaquetamiento está el ADN de las células en el núcleo interfásico? Relaciona el grado de empaquetamiento del ADN celular con la regulación de la expresión génica en eucariotas y la epigenética.

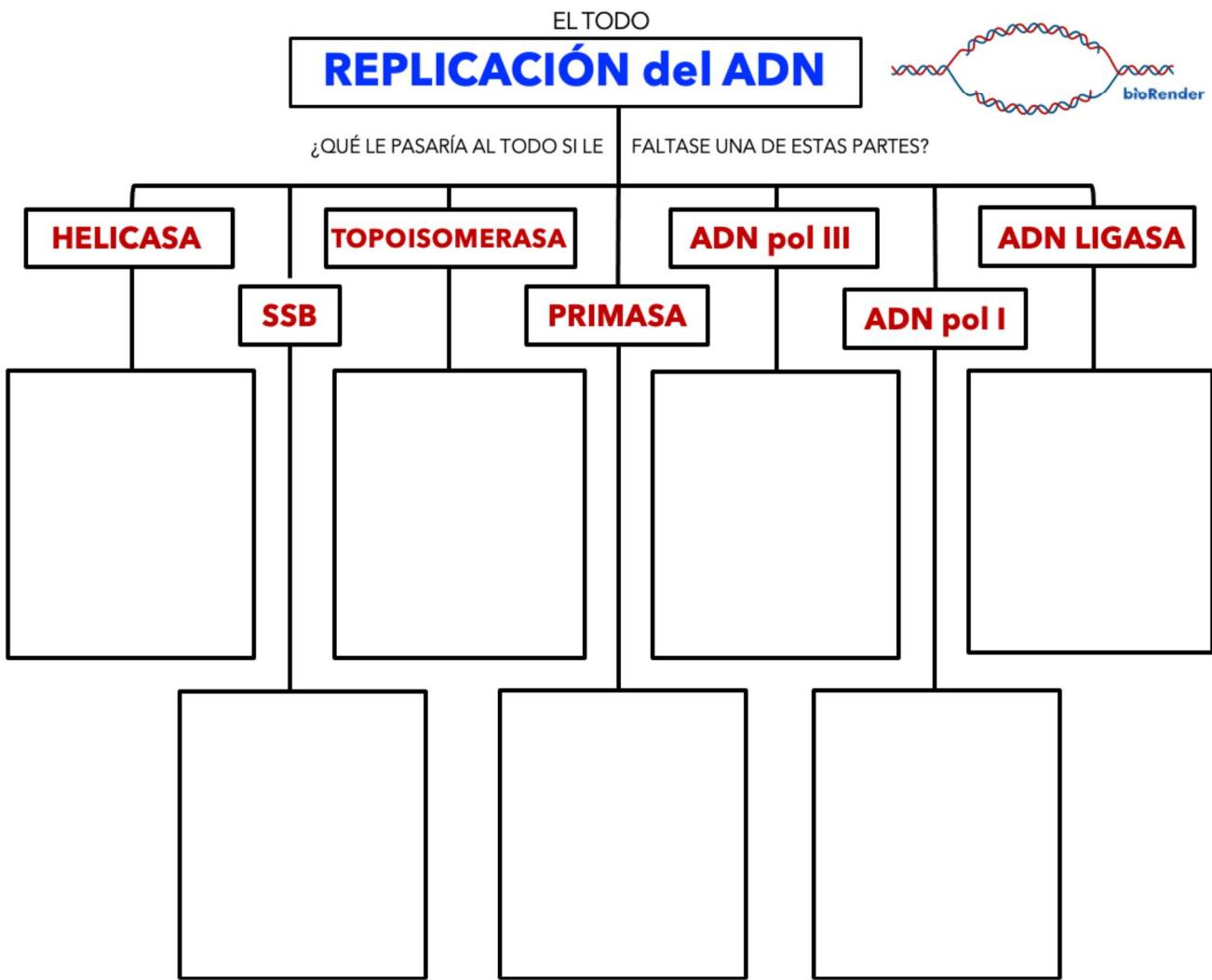


RUTINAS DE
PENSAMIENTO



EVOCANDO LO
YA APRENDIDO

14.7. Completa el siguiente esquema sobre el todo y sus partes explicando qué ocurriría en el proceso de replicación del ADN (el todo) si le faltara alguna de las moléculas implicadas (las partes):



CONCLUSIÓN:

14.8. Tras un accidente nuclear, se examinó a los habitantes de una población cercana, observándose que su genotipo había sufrido algunas alteraciones.

- a. ¿Heredarán sus descendientes dichas alteraciones?
- b. ¿Qué tipo de agente mutágeno ha provocado dichas alteraciones? ¿Es endógeno o exógeno? ¿Se considera físico, químico o biológico? ¿Cómo actúa? Razona la respuesta, poniendo ejemplos de cada tipo de agente mutagénico.
- c. ¿Cómo actúa este agente mutagénico? ¿Qué efectos puede causar sobre la secuencia de bases del DNA y, por tanto, sobre la célula?

14.9. Imagina que en un fragmento de ADN que codifica un polipéptido se produce una mutación que cambia un par de bases por otro. Debido a ello, cuando la célula sintetice de nuevo el polipéptido pueden ocurrir cualquiera de los cuatro hechos siguientes:

- Que se codifique el mismo aminoácido.
- Que se sustituya un aminoácido por otro distinto.
- Que el nuevo polipéptido sintetizado sea más corto.
- Que el nuevo polipéptido sintetizado sea más largo.

Basándote en lo que conoces del código genético, explica cómo se produciría cada resultado.



ENTRELAZANDO CONCEPTOS

14.10. A un óvulo de una hembra A se le elimina su núcleo, se le introduce el núcleo de una célula somática de un individuo B y posteriormente se implanta en el útero de una hembra C. Si los individuos A, B y C son de la misma especie, ¿a quién se le parecerá genéticamente el individuo resultante de su fertilización? Razona la respuesta.



EVOCANDO LO YA APRENDIDO

14.11. ¿Qué son los quiasmas y en qué fase de la profase I de la meiosis aparecen? ¿Y el complejo sinaptonémico? ¿Cuándo se distinguen tétradas?

14.12. Con ayuda de la tabla del código genético, indica una posible mutación puntual en el ADN que haya podido originar los mutantes 1, 2 y 3 de la figura. A continuación, detalla de qué tipo de mutación puntual o génica se trataría. ¿Hay alguna mutación sin sentido?



¿Serías capaz de adivinar la secuencia exacta de ADN que posee el organismo original? ¿Por qué?

14.13. ¿Podría evolucionar una población de organismos genotípicamente idénticos que se reproducen asexualmente si no se produjeran mutaciones? Razona la respuesta.



EVOCANDO LO YA APRENDIDO

14.14. Define con tus palabras recombinación y segregación cromosómica. ¿En qué fase se da cada una? ¿Cuál crees que es su relevancia biológica?

14.15. Empareja los términos relacionados de las dos columnas:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------|
| 1. Agente mutagénico físico | a. Mutación cromosómica |
| 2. Trisomía | b. Radiación |
| 3. Oncogén | c. ARNt |
| 4. Anticodón | d. Cáncer |
| 5. Codón | e. Mutación génica |
| 6. Transición | f. ARNm |
| 7. Monoploidía | g. No disyunción |
| 8. Translocación | h. Mutación genómica |

14.16. Uno de los procedimientos ofertados en los clínicas de fertilidad a la hora de una fecundación *in vitro* es realizar un Diagnóstico Genético Preimplantacional (D.G.P.) a los embriones de 3-5 días antes de implantarlos en el útero. Se suele aconsejar este estudio genético a parejas en las que alguno de los miembros padezca o sea portador/a de alguna enfermedad hereditaria como p.ej. la fibrosis quística y así poder seleccionar los embriones sanos. También se recomienda realizar D.G.P. a los embriones procedentes de parejas en las que la mujer es mayor de 40 años para descartar los embriones que no puedan desarrollar un embarazo evolutivo. La razón es que a medida que aumenta la edad de la mujer, crece casi exponencialmente la probabilidad de que sus óvulos posean alteraciones genéticas y terminen en aborto.

Clasifica lo más detalladamente qué tipo de mutación poseen estos embriones y por qué lo sabes:

- a. El embrión tiene un cromosoma X de menos ($45, X0 \rightarrow$ Síndrome de Turner).
- b. El embrión tiene 96 cromosomas ($4n$).
- c. El embrión tiene un cromosoma de más (tres cromosomas 18 \rightarrow Síndrome de Edwards).
- d. El embrión tiene uno de los cromosomas de la pareja 8 que ha intercambiado un brazo con otro de la pareja de homólogos 14.
- e. El embrión tiene una inserción de una timina (T) en el gen de la fibrilina (FBN1) del cromosoma 15, al igual que su padre (enfermedad autosómica dominante \rightarrow síndrome de Marfan).



**PRÁCTICA
ESPACIADA**

14.17. Lee las siguientes afirmaciones sobre la síntesis de la nueva cadena de DNA en la replicación y especifica si ocurre en la hebra conductora o líder, en la hebra retardada o en ambas hebras.

- a. En esta hebra la DNA polimerasa sólo puede sintetizar DNA en sentido $5' \rightarrow 3'$.
- b. En esta hebra se comienza a partir del origen de replicación.
- c. En esta hebra la DNA polimerasa lee la hebra en sentido $3' \rightarrow 5'$.
- d. Esta hebra se lee de manera continua.

- e. Para leer esta hebra se necesita que la helicasa abra más la hélice que en la otra hebra.
- f. La polimerasa en esta hebra replica el DNA en pequeños fragmentos (de Okazaki).
- g. En esta hebra, la primasa actúa una sola vez.
- h. En esta hebra, la primasa actúa al inicio de la síntesis de cada fragmento.
- i. En esta hebra, la ADN polimerasa I sustituye cada cebador o primer de ARN por ADN.
- j. En esta hebra, la ligasa actúa para unir los fragmentos de ADN.

14.18. ¿Son verdaderas o falsas las siguientes afirmaciones? Razona por qué lo sabes.

- a. Una mutación tiene las mismas consecuencias sin importar el tipo de célula afectada.
- b. En eucariotas, todas las proteínas recién sintetizadas poseen una metionina en su extremo N-terminal.
- c. Si la región codificadora de un gen en eucariotas está formada por cuatro exones de 99, 75, 66 y 90 nucleótidos respectivamente, y tres intrones, intercalados entre los exones, de 45, 63 y 42 nucleótidos, el ARNm precursor (ARNhn o transcripto primario) tendrá 480 nucleótidos pero, una vez el ARNm haya madurado, solo tendrá 150 nucleótidos.
- d. El péptido resultante de la región codificante del gen del apartado c) tendrá un total de 109 aminoácidos.
- e. En el ADN las dos hebras se sintetizan por mecanismos diferentes.
- f. Tanto en procariotas como en eucariotas, el mRNA puede ser traducido nada más sintetizarse.
- g. Si durante la transcripción de un gen estructural a ARNm se introduce un uracilo en la posición donde debería colocarse una citosina se produce una mutación puntual.
- h. Durante el proceso de transcripción de los genes, el mRNA crece en sentido 5'-3' y siempre utiliza como molde la misma hebra de DNA.

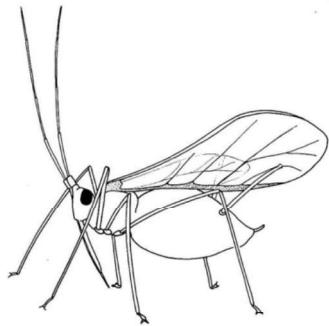
14.19. Se muestra la hebra de ADN codificante o sin sentido que contiene en su interior el fragmento que codifica para cierto oligopéptido de cinco aminoácidos. Completa el ADN con la hebra molde, indica los extremos 5' y 3' de cada cadena, cuál de ellas se transcribe y en qué dirección (dibuja una flecha), y cuáles son los codones de iniciación y terminación de la traducción.

...TACATGCTAGAAATTCCGTGAAATGATCATGTA...

- a. Propón una mutación puntual o génica que cause que el oligopéptido resultante tenga siete aminoácidos en vez de cinco. ¿De qué clase de mutación puntual se trataría?
- b. Si se cambia el tercer y último nucleótido del codón que codifica para el 2º aminoácido del oligopéptido por cualquier otro, la secuencia no se modifica. ¿A qué crees que es debido? ¿De qué tipo de mutación se trataría? ¿Qué característica del código genético lo posibilita?

- c. La temperatura cercana a 37°C que tenemos los seres humanos, puede ocasionar que una citosina se desamine transformándose en uracilo. ¿De qué tipo de mutación se trata?

14.20. Los áfidos son una de las plagas más devastadoras a nivel económico para los cultivos agrícolas y forestales, así como en jardinería. Los áfidos se caracterizan por su aparato bucal, en forma de estilete, que les permite llegar al floema de las plantas y succionar la savia elaborada. El áfido o pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, constituye un gran peligro, no solo por los daños directos que provoca sino por su capacidad para transmitir virus entre las plantas. Aunque hay cada vez más poblaciones resistentes, se suele utilizar el insecticida *pirimicarb* para eliminar la plaga, ya que actúa uniéndose a la enzima acetilcolinesterasa del áfido e inhibiéndola. Esta enzima contiene unos 500 aminoácidos y es necesaria para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Se ha secuenciado el gen que codifica para la acetilcolinesterasa en áfidos sensibles al insecticida y otros áfidos que muestran resistencia y sobreviven a la acción del *pirimicarb*. Compara las secuencias de aminoácidos de la acetilcolinesterasa de áfidos sensibles / resistentes y contesta a las preguntas:



FRAGMENTO DE ACETILCOLINESTERASA DE ÁFIDOS SENSIBLES AL PIRIMICARB	Glu - Glu - Gly - Tyr - Tyr - Ser - Ile - Phe - Tyr - Tyr - Leu
FRAGMENTO DE ACETILCOLINESTERASA DE ÁFIDOS RESISTENTES AL PIRIMICARB	Glu - Glu - Gly - Tyr - Tyr - Phe - Ile - Phe - Tyr - Tyr - Leu

- Con la ayuda de la tabla del código genético, explica qué tipo de mutación sufrieron las poblaciones resistentes al insecticida *pirimicarb*.
- Explica cómo crees que el cambio de un simple aminoácido en la estructura primaria de la proteína puede otorgar resistencia a un insecticida como el *pirimicarb*.
- Otras especies distintas de áfidos que muestran resistencia al *pirimicarb* también comparten el mismo cambio en la secuencia de la acetilcolinesterasa. ¿Cómo crees que esta mutación pudo originarse y por qué ha conseguido extenderse tan ampliamente?
- Debido a la aparición de resistencias y el impacto medioambiental del uso generalizado de insecticidas, se están estudiando otros métodos de control de plagas. En el caso de los mosquitos, por ejemplo, una estrategia es crear mosquitos modificados genéticamente en los que se elimina el cromosoma sexual X de los machos. El resultado es que a todos los óvulos de hembras fecundadas por estos machos modificados les llegan únicamente espermatozoides con cromosoma Y.
 - Razona cómo esta estrategia afectaría a la descendencia.
 - ¿Las hembras apareadas con los machos modificados genéticamente podrían tener machos y hembras?
 - ¿Los mosquitos descendientes podrían seguir reproduciéndose entre ellos.

**ENTRELAZANDO CONCEPTOS**

14.21. Un equipo de científicos de la Universidad de Illinois ha modificado genéticamente plantas de caña de azúcar para alterar su metabolismo y conseguir aumentar la proporción de triglicéridos hasta el 12 %.

- a. ¿Qué tipo de biomolécula orgánica son los triglicéridos? Explica sus componentes y mediante qué enlaces se unen entre ellos.
- b. La caña de azúcar, junto a la remolacha, es una fuente natural de otra biomolécula no reductora, ¿cuál es, por qué monómeros está formada, qué enlace se establece entre ellos y por qué dicha molécula no tiene carácter reductor?
- c. Para llevar a cabo la modificación genética se ha utilizado la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Investiga qué función tiene esta bacteria en la modificación genética.
- d. En la siguiente tabla aparecen los pasos que deben seguirse para obtener la caña de azúcar transgénica. Léelos con atención y ordénalos de forma coherente:

PASOS A SEGUIR PARA OBTENER CAÑA DE AZÚCAR MODIFICADA	ORDEN
Introducir la bacteria en un cultivo celular de caña de azúcar en el laboratorio.	
Cortar el plásmido de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con enzimas de restricción.	
Seleccionar las células que han incorporado el gen.	
Aislar el gen que se desea insertar y cortarlo con enzimas de restricción.	
Plantar en el campo las plántulas transgénicas.	
Introducir el plásmido dentro de la bacteria (transformación).	
Obtener plántulas modificadas a partir de las células que han incorporado el gen.	
Unir el gen al plásmido de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante la ADN-ligasa.	

14.22. Se utiliza la enzima de restricción EcoRI (enzima aislada de *Escherichia coli*) para realizar una digestión de distintos segmentos de ADN (llamados A, B, C y D). El ADN etiquetado como A tiene 5 dianas de restricción para EcoRI, el B tiene 7, el C posee 3 dianas y el ADN etiquetado como D no tiene ninguna diana de restricción para dicha enzima. Indica el número de fragmentos que se obtendrán de cada uno de ellos tras la incubación y digestión con EcoRI.

**ENTRELAZANDO CONCEPTOS**

14.23. Nettie Anne Rudloe fue una bióloga marina estadounidense cofundadora del Laboratorio de Especies Marinas de Florida que dedicó parte de su investigación al cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), un artrópodo clasificado con “fósil viviente” que tiene sangre o hemolinfa de color azul debido a un pigmento llamado hemocianina que contiene amebocitos que detectan la presencia de endotoxinas producidas por bacterias patógenas, por lo que es utilizada por la industria farmacéutica para la obtención de vacunas, medicamentos inyectables o prótesis. Contesta razonadamente las cuestiones:



- a. Si en el ADN del cangrejo cacerola, el 18% de las bases nitrogenadas son citosinas, ¿qué porcentaje de las otras bases posee?
 - b. ¿Cuándo en un ARNm se sustituye una Adenina por una Citosina, es eso una mutación? Justifica tu respuesta.
 - c. ¿Qué es una horquilla de replicación?
 - d. Es posible alterar la secuencia de bases de un gen sin que se altere la proteína?

14.24. La anemia falciforme es una enfermedad que afecta a los glóbulos rojos y es debida a una mutación génica. Un médico trata a un paciente de anemia de células falciformes con técnicas de terapia génica en células de médula ósea y los resultados son un éxito ya que no se observan eritrocitos anómalos en sangre. Si este paciente, tras la terapia, tuviera hijos ¿crees que podrían heredar el gen defectuoso o por el contrario la terapia aplicada lo habrá evitado? Justificalo.

14.25. Con la ayuda de la tabla del código genético, completa la tabla y contesta las cuestiones:

Describe en cada uno de los casos siguientes: cómo será el péptido resultante, de qué tipo de mutación puntual o génica se trata (sustitución-transición/ sustitución-transversión/ inserción/ delección), si es una mutación silenciosa, con o sin sentido, si se modifica el marco de lectura y, por último, ordénalas según la supuesta gravedad de sus consecuencias en el péptido sintetizado.

- a. El desoxirribonucleótido 4 intercambia su base por una citosina (C).

- b. El desoxirribonucleótido 15 intercambia su base por una quanina (G).

- c. El desoxirribonucleótido 10 intercambia su base por una adenina (A).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ADN	5'																				3'
ARNm																					
aa	H ₂ N-																				-COOH

- d. Desaparece el desoxirribonucleótido 5.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ADN	5'																			3'
ARNm																				
aa	H ₂ N-																		-COOH

- e. Se introduce una nueva timina (T) entre los desoxirribonucleótidos 12 y 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	↓	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ADN	5'																				3'	
ARNm																						
aa	H ₂ N-																		..		-COOH	

14.26. Se quiere amplificar por PCR un fragmento de ADN (obtener un gran número de copias) para introducirlo posteriormente en un plásmido. Para poder amplificar el fragmento se necesitan dos cebadores o *primers* que se unan a cada hebra en sentidos opuestos para que la ADN-polimerasa termorresistente tenga sitios por donde comenzar a añadir desoxirribonucleótidos en 3'. Teniendo en cuenta el sentido en el que las ADN-polimerasas fabrican siempre la nueva hebra y que los *primers* que se van a utilizar son los siguientes, híbrídalos donde corresponda en la cadena de ADN y señala con una flecha la dirección de elongación para cada nueva hebra:

5' - **TCCATGGAGTC** - 3'

3' - **TACCGGCGCGCT** - 5'

5' - TATCAGATCCATGGAGTCTACTTAGGCCAAATGTATGGCCGCGCGAGTACTAGTCCAGT - 3'

3' - ATAGTCTAGGTACCTCAGATGAATCCGGGTTACATACC GGCGCGCTCATGATCAGGTCA - 5'

Colorea debajo el fragmento del que finalmente se obtendrán millones de copias tras la PCR y analiza si posee alguna diana para el enzima de restricción *Hae III*:



5' - TATCAGATCCATGGAGTCTACTTAGGCCAAATGTATGGCCGCGCGAGTACTAGTCCAGT - 3'
 3' - ATAGTCTAGGTACCTCAGATGAATCCGGGTTACATACC GGCGCGCTCATGATCAGGTCA - 5'



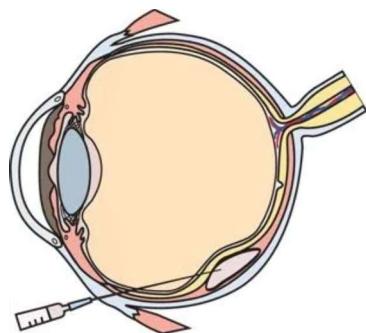
14.27. A partir de *Vinca major* (hierba doncella) se obtienen una serie de medicamentos conocidos como alcaloides de la vinca. Entre ellos se encuentra la vinblastina, medicamento que impide el ensamblaje de los microtúbulos que forman el huso mitótico. Razona por qué se utiliza para tratar distintos tipos de cáncer y si dicho medicamento afectará a la formación de los gametos de la persona que sufre el cáncer.

14.28. Se ha obtenido una planta tomatera, *Solanum lycopersicum*, que produce levodopa, también denominado L-DOPA, que se utiliza como fármaco para tratar la enfermedad de Parkinson, un trastorno neurodegenerativo que produce pérdida del control de los movimientos.

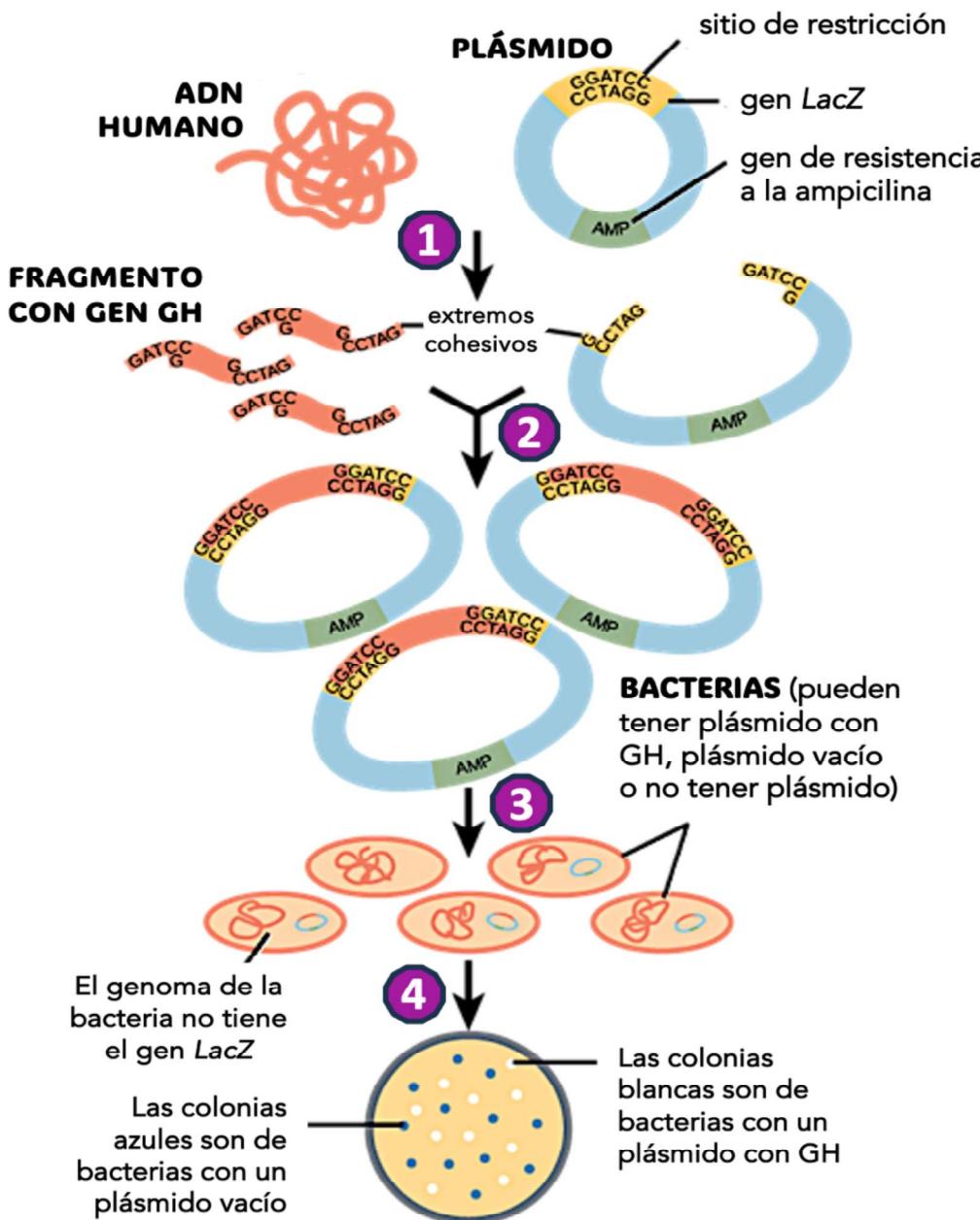
- ¿Qué hay que hacer para que una planta, como la tomatera que se nombra en el texto, pueda sintetizar una molécula que no está en su genoma?
- ¿Cómo se llama la técnica que permite obtener una molécula de ADN artificial con secuencias de ADN de dos organismos distintos?
- Indica dos aplicaciones de los organismos modificados genéticamente diferentes a la que se ha descrito en el enunciado.

14.29. En enero de 2022, el hospital público 12 de Octubre de Madrid administró la primera terapia génica aprobada en España. Se denomina *Luxturna®* y lleva utilizándose con bastante éxito en EE.UU desde 2018. Se trata de un tratamiento para un tipo concreto de enfermedad hereditaria de la retina producida por la mutación del gen *RPE65* y que afecta a niños y a jóvenes. Las mutaciones en el gen *RPE65* están asociadas a enfermedades como la retinitis pigmentosa y la amaurosis congénita de Leber, siendo esta última la causante de aproximadamente el 15% de los casos de ceguera infantil.

- ¿En qué consiste la terapia génica?
- Luxturna®* es un virus modificado genéticamente que introduce una copia funcional del gen *RPE65* en células de la retina de los pacientes. De esta forma, se puede expresar la proteína *RPE65* presente en los conos y bastones y fundamental para la visión. El fármaco debe inyectarse directamente en las células de la retina del paciente, ¿por qué crees que debe hacerse así?
- El virus utilizado como vector en *Luxturna®* es una adenovirus asociado, un tipo de virus muy prometedor en terapia génica por su nula patogenicidad. ¿Qué se entiende por vector en ingeniería genética? ¿Qué otros vectores conoces?
- La sanidad pública española cubre desde 2021 la terapia con *Luxturna®* que asciende exactamente a 221.357,76 euros (sin IVA) por cada tratamiento y paciente. El futuro pasa por la terapia génica y la medicina de precisión, pero el precio de este tipo de terapias es muchas veces desorbitado. Investiga qué es la medicina de precisión y explica con tus palabras en qué consiste y si la ves viable a corto plazo en España.



14.30. La hormona de crecimiento (GH del inglés Growth Hormone) se utiliza para tratar trastornos en los que hay un déficit de dicha hormona en el organismo. El déficit de GH se caracteriza por un retraso en el crecimiento, especialmente el longitudinal, y otras alteraciones neurológicas. Hasta 1985 se utilizaba hormona de crecimiento extraída de la hipófisis de cadáveres pero fue retirada del mercado tras aparecer varios casos de enfermedad de Creutzfeldt Jakob en los pacientes tratados (la GH estaba contaminada por los priones causantes de la enfermedad). Afortunadamente, en 2005 se aprobó la comercialización de GH recombinante obtenida en la bacteria *Escherichia coli*. En la imagen se esquematiza el proceso de obtención de GH recombinante:



Modificado de: CNX OpenStax (Wikimedia Commons)

a. Relaciona los números 1, 2 ,3 y 4 con los siguientes pasos:

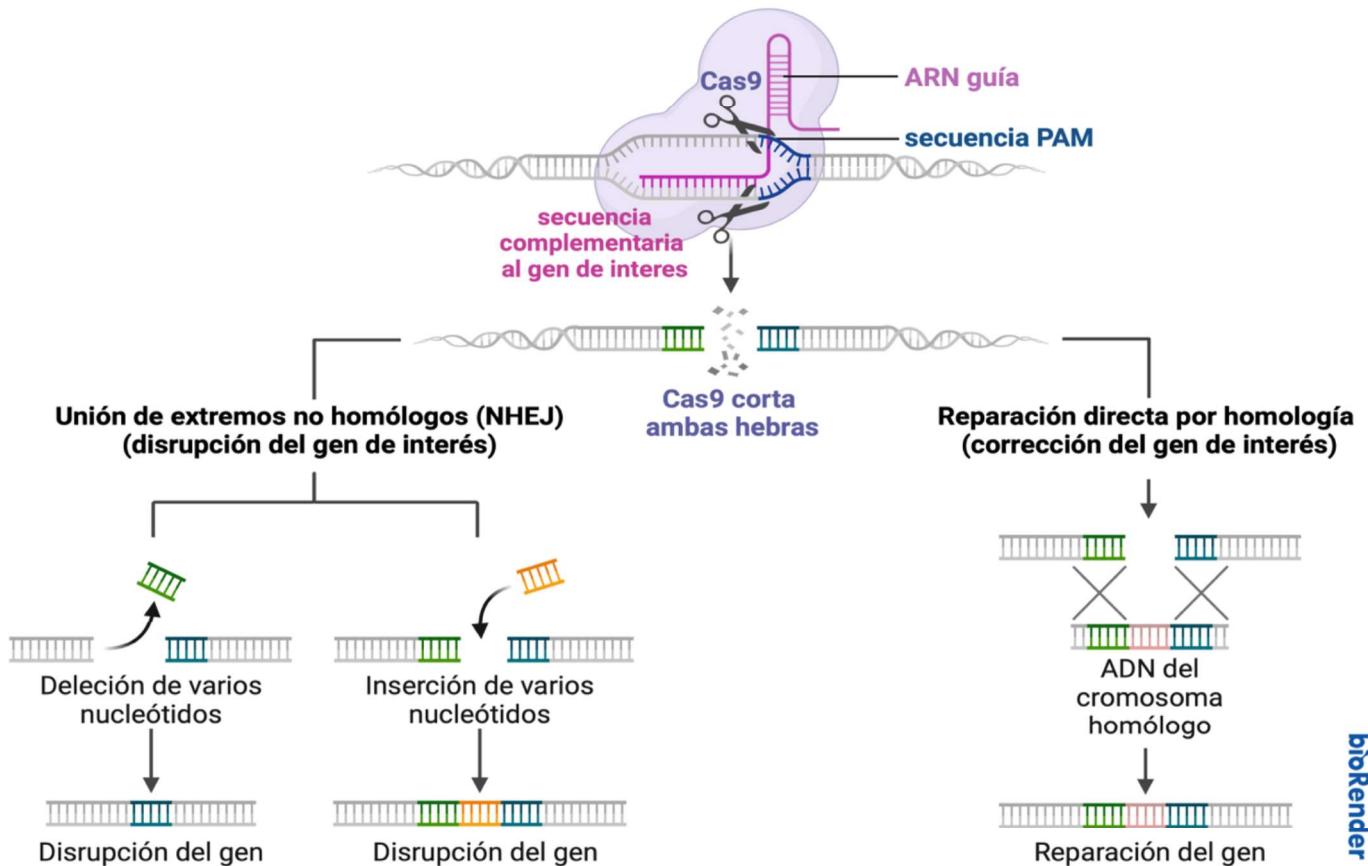
- Selección de bacterias transformadas en medio de cultivo específico.
- Transformación de las bacterias con el plásmido obtenido.
- Digestión con enzimas de restricción del gen amplificado y del plásmido usado como vector.
- Ligación y obtención de plásmidos con y sin inserto (de gen GH).

- b. El medio de cultivo utilizado en el paso 4 posee el antibiótico ampicilina y un reactivo llamado X-Gal. Sabiendo que el gen *LacZ* codifica para una enzima que, en presencia del sustrato X-Gal, colorea las bacterias de color azul. Explica de forma razonada por qué ocurre lo siguiente:
- Las bacterias que no han logrado transformarse y no poseen el plásmido en su citoplasma no son capaces de crecer en las placas Petri con el medio de cultivo utilizado.
 - Las bacterias que sí que llevan plásmido son capaces de crecer en el medio, pero solamente las que dan colonias blancas son aisladas y se utilizan para obtener GH recombinante para su posterior purificación.
- c. Las copias del gen de la hormona de crecimiento humana para realizar la digestión se obtienen mediante la técnica PCR a partir de un aislado de ADN humano. ¿Qué significan las siglas PCR? Resume brevemente en qué consiste la técnica y cita al menos otras dos aplicaciones para las que pueda utilizarse.
- d. ¿Por qué al producto obtenido se le denomina GH recombinante? ¿En qué consiste la tecnología del ADN recombinante?
- e. En este caso se utiliza un plásmido sintético como vector de expresión pero ¿qué más vectores conoces? Explícalos brevemente.
- f. Investiga qué diferencia existe entre un vector de clonación y un vector de expresión.

BONUS T.14. El sistema CRISPR-Cas está constituido por una cadena de ARN y una enzima endonucleasa, la proteína Cas. El ARN tiene una parte, denominada ARN guía, que marca a CRISPR-Cas el lugar donde se debe unir al ADN para cortarlo y que puede contener la secuencia de bases que se desee. El ARN guía también contiene una secuencia de ARN que es reconocida por la enzima Cas para unirse a él. En esencia, el sistema CRISPR-Cas funciona del siguiente modo:

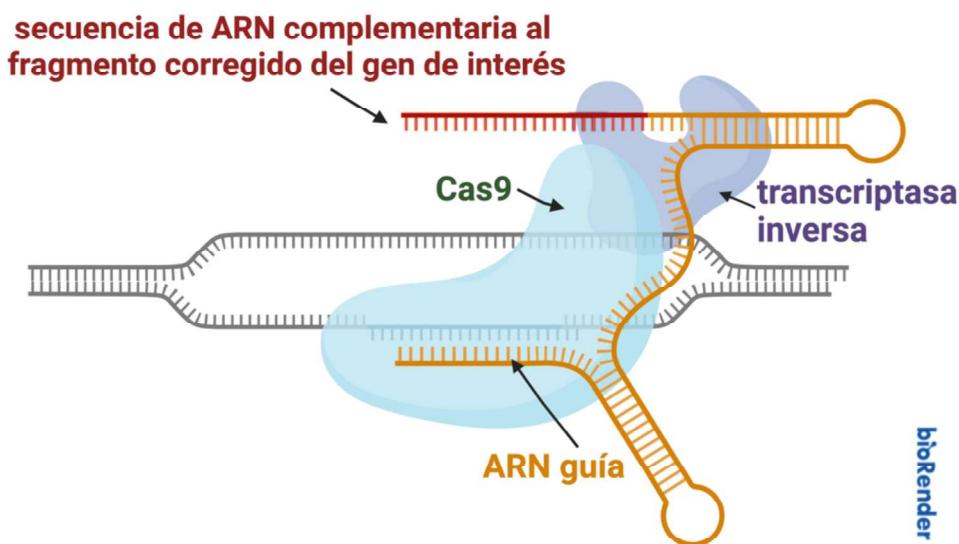
1. El sistema CRISPR-Cas se une a la región del ADN complementaria al ARN guía.
2. La proteína Cas reconoce el ARN guía, se une a él y corta el ADN per un sitio concreto de una de las hebras (justo detrás de una secuencia llamada PAM) y también corta la hebra complementaria justo por el mismo nucleótido.
3. A partir de ahí, tras una rotura de la doble cadena que parte un cromosoma en dos, se pueden dar dos mecanismos:
 - 3a. Unión de extremos no homólogos (NHEJ): en la mayoría de casos, los mecanismos de reparación del ADN intentan paliar el daño rápidamente para que la célula no muera uniendo los extremos como pueden. Este mecanismo tiende a provocar una mutación (se añade o se pierde algún nucleótido) que hace que el gen ya no funcione (disrupción del gen). Aun así, arriesgarse a perder ese único gen es mucho mejor para la célula que perder todos los genes que haya en el fragmento de cromosoma que se ha cortado y desprendido tras la rotura de la doble cadena.
 - 3b. Reparación directa por homología: los sistemas de reparación del ADN utilizan el gen del cromosoma homólogo para corregir y reparar el gen. Este mecanismo únicamente se da si la

célula está dividiéndose o preparándose para ello. No se da en otros momentos del ciclo celular porque los sistemas de reparación no cuentan con un ADN al que copiar para repararse. Es mucho más preciso que el anterior mecanismo y no suele producir mutaciones.



- ¿Por qué las dos clases de mutaciones que se dan en el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ) suele tener como consecuencia la disrupción del gen?
- El mecanismo de reparación directa por homología es muy eficiente y no suele generar mutaciones. De hecho, este mecanismo es parte del proceso de recombinación genética entre cromosomas durante la meiosis. ¿en qué fase de la meiosis se da la recombinación genética y en qué consiste? ¿Por qué este mecanismo sólo ocurre en células diploides?
- En diciembre del 2017, un equipo de investigadores realizó un experimento con el sistema CRISPR-Cas en ratones *Beethoven*. Los ratones *Beethoven* se denominan así porque sufren sordera como el famoso compositor alemán. Estos ratones tienen una mutación en el gen *TMC1*, localizado en el cromosoma 11 del ratón, que codifica una proteína que se expresa en las células auditivas. Los ratones *Beethoven* solamente tienen la mutación en uno de los cromosomas y en el otro cromosoma mantienen la forma correcta del gen *TMC1*. Aun siendo heterocigóticos los ratones *Beethoven* son sordos. Los investigadores fabricaron un sistema CRISPR-Cas con un ARN guía complementario a la secuencia de la forma mutada del gen *TMC1*. A continuación, los investigadores introdujeron este sistema en las células auditivas de ratones *Beethoven*.
 - ¿Cuál era el resultado esperado de este experimento? Razona la respuesta explicando cuál de los dos mecanismos que se dan en CRISPR-Cas, descritos en el enunciado, debe haber actuado y sus efectos con relación al papel de la proteína codificada por el gen *TMC1*.
 - Si los ratones tratados con CRISPR-Cas tienen descendencia, ¿serán las crías sordas?

d. En muchas ocasiones, para curar una enfermedad genética no basta con eliminar la secuencia incorrecta del gen mutado sino que, además, se debe sustituir por la secuencia correcta del gen. Si lo que se desea es modificar la secuencia génica con CRISPR, se debe proporcionar a la célula una plantilla para la reparación. Con este objetivo, en 2019, científicos del *Broad Institute* de Harvard y del MIT desarrollaron una potente herramienta de edición molecular, denominada *prime editing*, capaz de modificar el ADN con una precisión sin precedentes. La herramienta se basa en el perfeccionamiento del sistema CRISPR-Cas ya que añade al ARN guía (con su sitio de unión a la enzima Cas y la secuencia determinada de ARN por la que se quiere cortar) un ARN adicional que contiene la secuencia complementaria de la secuencia correcta del gen. Además, se añade una enzima más al sistema: la retrotranscriptasa.



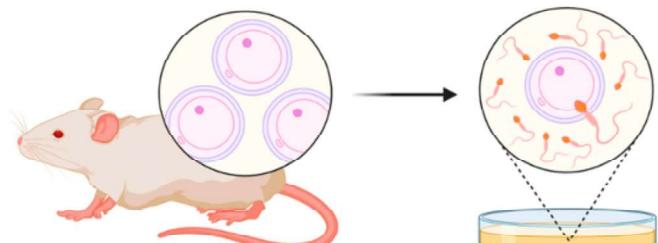
- ¿Qué es una retrotranscriptasa o transcriptasa inversa y qué acción lleva a cabo dentro del dogma de la biología molecular? ¿Qué entidades biológicas poseen retrotranscriptasa de forma natural?
- Explica qué hará la retrotranscriptasa una vez que la endonucleasa Cas9 haya cortado la secuencia mutada del ADN.

- e. Las posibilidades potenciales del sistema CRISPR-Cas en terapia génica son inmensas. De hecho, ya se están aprobando las primeras terapias que utilizan esta herramienta. ¿Qué es la terapia génica y cómo utilizarías CRISPR-Cas en este tipo de terapias?
- f. Otra aplicación de CRISPR-Cas es el bloqueo de genes (*gene knockout*) de un modo más sencillo de lo que se venía haciendo hasta ahora. Esta técnica consiste en suprimir la expresión de un gen específico en un organismo, generalmente un ratón. Así, comparando el ratón *knockout* con los ratones control se puede averiguar qué funciones tiene el gen bloqueado. En el esquema se resume cómo obtener un ratón *knockout* con CRISPR-Cas:

Posteriormente, se comprueba por PCR que la secuencia se ha alterado y el gen está bloqueado. Además, dado que los ratones son diploides, los ratones obtenidos suelen cruzarse unos con otros para asegurarse que se ha conseguido bloquear el gen en ambos cromosomas.

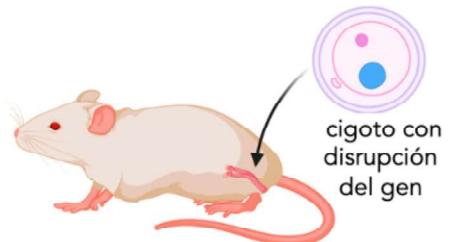
- ¿Cuántas hembras de ratón se utilizan como mínimo para obtener un ratón con un gen bloqueado por esta técnica? ¿Cuál es el papel de cada una?

① Recolección de óvulos y fecundación



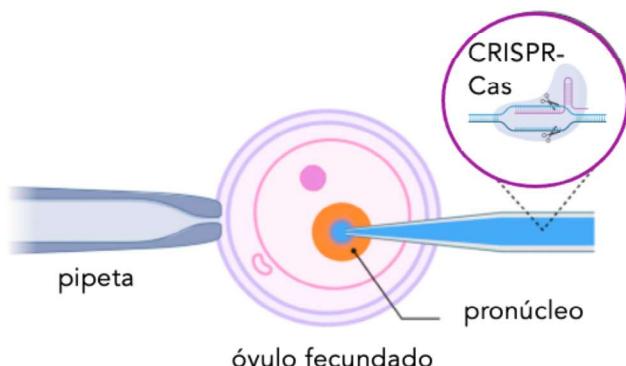
Se extraen ovocitos de una hembra estimulada hormonalmente y se fecundan con espermatozoides

③ Se transfiere el cigoto modificado en una hembra



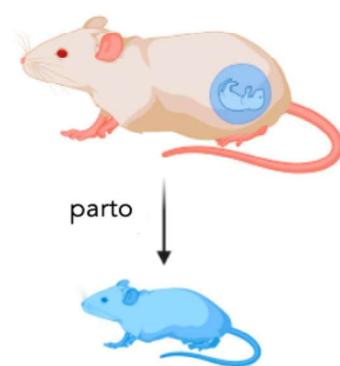
Se realiza una transferencia del cigoto modificado al útero de la hembra gestante

② Se provoca la disrupción del gen de interés con el sistema CRISPR-Cas



El ARN guía contiene una secuencia del gen que se quiere inactivar así que Cas lo corta y la maquinaria celular une los extremos provocando su disrupción.

④ La hembra embarazada da a luz a un ratón knockout



El ratón knockout para el gen de interés lo tiene inactivado así que sirve en investigación para conocer mejor las funciones de dicho gen

MODIFICADO DE: Nasrallah A et al. CRISPR-Cas9 Technology for the Creation of Biological Avatars Capable of Modeling and Treating Pathologies: From Discovery to the Latest Improvements. *Cells*. 2022; 11(22):3615.

Otra utilidad potencial de los ratones knockout es que, una vez inactivado o bloqueado un gen del genoma de ratón, se podría intentar sustituirlo, por ejemplo, con genes homólogos de otras especies. Por ejemplo, los ratones con el gen *PDX1* bloqueado son incapaces de generar el páncreas ya que *PDX1* es un factor de transcripción necesario para expresar múltiples genes que intervienen en la formación de este órgano. El equipo del investigador Hiromitsu Nakauchi consiguió que, tras inyectar unas pocas células embrionarias de rata sana en un blastocisto (embrión) de ratón con el gen *PDX1* bloqueado, los ratones resultantes eran capaces de desarrollar un páncreas de rata en el interior de su cuerpo de ratón. Estos ratones generados mezclando células embrionarias de dos especies distintas se denominan quimeras. El estudio de la obtención de quimeras es muy prometedor en el campo de la generación de órganos para trasplantes.

- En cuanto a los ratones quimera generados, ¿crees que son transgénicos? Razónalo.
- ¿Y los ratones knockout, son transgénicos? Razona tu respuesta.
- Siguiendo con esta línea, en 2017 el investigador español Juan Carlos Izpisúa, publicó en la prestigiosa revista científica "Cell" la creación de embriones químéricos humanos en cerdos por primera vez. En 2023, Investigadores chinos y el español Miguel Ángel Esteban generaron un esbozo de riñón humanizado en un embrión de cerdo, en un experimento en la frontera de la bioética. ¿Qué es la bioética y por qué crees que es necesaria en este caso?