



Las enzimas de restricción: las "tijeras moleculares" de los ingenieros genéticos

La clave de la transgénesis, la obtención de un organismo genéticamente modificado, está en extraer genes de interés de un organismo e introducirlos en otro, de modo de obtener un producto con características mejoradas. Pero ¿cómo se hace para "cortar" ADN de un organismo e insertarlo en otro? Los genetistas necesitaban herramientas para hacerlo, y así descubrieron las enzimas de restricción, las "tijeras moleculares" que cortan el ADN. De esta forma, es posible extraerlo del genoma de un organismo. También descubrieron las enzimas ligasas que "pegan" el fragmento de ADN aislado dentro del ADN del nuevo organismo. Ambos tipos de enzimas son esenciales en las técnicas de ingeniería genética (ver Cuadernos N° 2, 4, 5, 54 y 67).

Las enzimas son proteínas que cumplen una función esencial en el metabolismo celular: son catalizadores biológicos (aceleradores de reacciones químicas) que hacen posible que las reacciones se lleven a cabo en un tiempo adaptado a las necesidades vitales del organismo (ver Cuaderno N° 30). Entre sus características fundamentales se encuentra la de ser específicas, es decir que cada tipo de enzima actúa sobre un sustrato particular o una secuencia particular de una molécula, y no sobre otra. Esta especificidad enzimática resulta fundamental en la actividad de las enzimas de restricción que cortan secuencias particulares y determinadas del ADN.

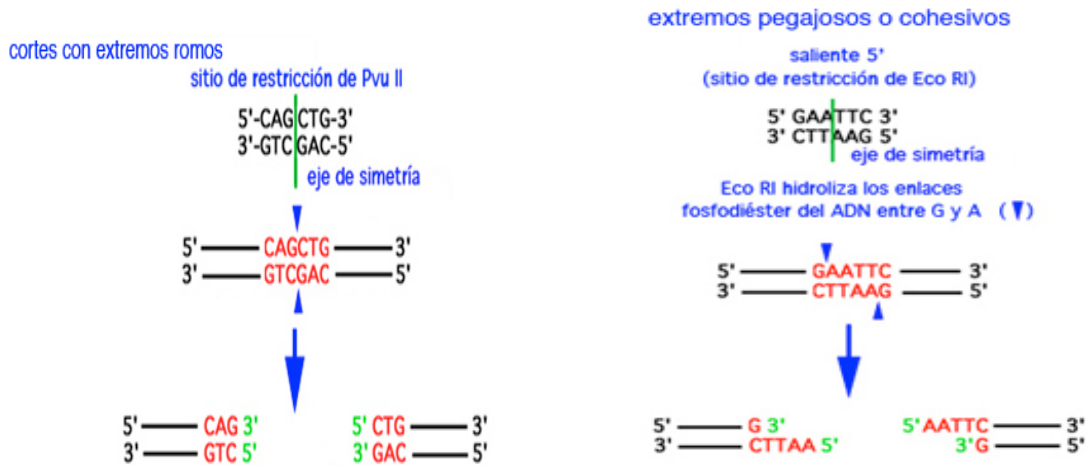
Las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas cuya función es cortar las hebras de ADN. Se podría decir que son "tijeras moleculares" que cortan ADN. Lo hacen en forma específica. Esto significa que cada enzima reconoce un sitio particular del ADN, es decir que reconoce una secuencia particular de nucleótidos. Esa secuencia específica para cada enzima se denomina "sitio de restricción". Una vez que la enzima reconoce estos sitios, se posiciona sobre la molécula de ADN y corta dentro o en torno de esa secuencia.

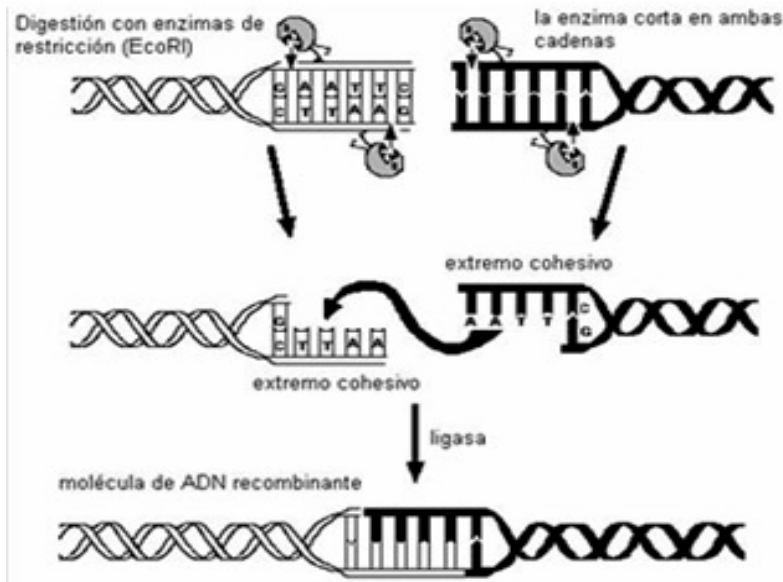
Acorde a como realizan el corte, las enzimas se pueden clasificar en:

- Enzimas que generan "extremos romos" (parejos)
- Enzimas que generan "extremos cohesivos" (desparejos). Estos extremos "colgantes" de simple cadena pueden pegarse con otros extremos de cadena simple que tengan la secuencia complementaria. Las enzimas encargadas de unir los extremos de ambas cadenas se denominan *ligasas*.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Las enzimas de restricción reconocen secuencias de 4, 6 o más bases y cortan generando *extremos romos* o *extremos cohesivos*. Fuente: <http://www.icampus.ucl.ac.be/>



"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo PorquéBiotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Los extremos, generados en diferentes moléculas de ADN, pueden sellarse con la enzima ADN ligasa y generar así una molécula de ADN nueva, denominada *recombinante* (ver Cuaderno N° 4).

El origen de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, conocidas también como *endonucleasas*, sólo cortan el ADN si reconocen en su interior una secuencia específica de nucleótidos. Estas enzimas fueron descubiertas en microorganismos. De hecho, se encuentran sólo en organismos procariontes (bacterias). Por esto, se les dio una nomenclatura asociada al organismo de donde provienen. Por ejemplo, las enzimas de restricción que se descubrieron en la bacteria *Escherichia coli* se denominan *Eco*. Existen diferentes tipos de enzimas *Eco* que se diferencian en la secuencia que reconocen y cortan. Para diferenciarlas se les agregan letras y números romanos, por ejemplo: *Eco RI* (*Eco* “erre” “uno”). Así, el sitio de restricción para *EcoRI* es la secuencia GAATTC, como muestra la ilustración anterior. Una vez que la enzima encontró ese sitio en el ADN, se acerca a la hebra de ADN y realiza el corte entre la G y la A. Al investigar otras especies de bacterias se descubrieron cientos de enzimas de restricción distintas y cada una reconoce una región específica.

Estas enzimas fueron descubiertas en la década del '70 y hasta la fecha existen más de 250 enzimas de restricción. Se cree que la función natural de estas enzimas en las bacterias es protegerlas contra ADN de virus que podrían ingresar en sus células. De esta manera, la bacteria utiliza estas “tijeras moleculares” para cortar en pedacitos el ADN viral que la infecta. El ADN propio de la bacteria no se corta, pues lo tiene “protegido” contra sus propias enzimas de restricción.

Usos de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción tienen diferentes aplicaciones que son de gran importancia en investigaciones en biología molecular y en las técnicas que emplea la biotecnología moderna:

1. Hacer mapa de restricción de un plásmido o bacteriófago. El ADN se corta con varias enzimas de restricción, solas y en parejas, para determinar el número de sitios de corte y sus posiciones relativas en la molécula, el orden y la distancia entre ellos.
2. Fragmentar ADN para separación por electroforesis. Los fragmentos obtenidos después de la actuación de las distintas enzimas de restricción, se pueden separar por tamaños mediante la técnica de electroforesis y así estudiar los distintos fragmentos. Por ejemplo: para la técnica de *Southern blotting* (ver

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



cuaderno N° 67) o en las usadas para identificar polimorfismos de ADN en distintos individuos (RFLP, ver cuaderno N° 69).

3. Generación de fragmentos para ser clonados en los vectores apropiados, y crear ADN recombinante. Se puede cortar una molécula de ADN con una enzima y, con el mismo tipo de enzima, cortar el fragmento de ADN de interés para clonar. Se unen con ligasas estas dos moléculas de ADN, generando así una molécula de ADN recombinante. Este vector recombinante puede usarse para transformar células que expresen el gen de interés clonado (si se usó un vector de expresión con el promotor adecuado) o puede usarse simplemente para tener clonado (“guardado”) ese fragmento de ADN de interés. Por ejemplo: para los proyectos de secuenciación de genomas (ver cuaderno N° 55)

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo PorquéBiotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



CONSIDERACIONES

METODOLÓGICAS

El tema que se trabaja en este cuaderno representa un caso específico del tema trabajado en el cuaderno N° 30, que se refiere a las enzimas en general, como aliadas de la biotecnología. Se sugiere trabajar previamente el cuaderno N° 30 donde se abordan las características y modo de acción de las enzimas en general que también vale para el caso particular de las enzimas de restricción. Esto permite comprender, luego, algunas de las condiciones que se requieren en un experimento con estas enzimas. De todas formas, es importante diferenciar que en este caso se habla de enzimas que emplea la biología molecular y que son herramientas de la biotecnología moderna, mientras que los ejemplos que se dan en el Cuaderno N° 30 son enzimas que son producto o aplicaciones de la biotecnología moderna. Es decir que las enzimas de restricción son necesarias como herramientas para que sea posible obtener las enzimas que se aplican en las diferentes industrias.

Para comprender el modo de acción de las enzimas de restricción es necesario previamente haber trabajado la estructura del ADN, para lo cual se sugiere trabajar los Cuadernos N° 3, 65 y 69. En el Cuaderno N° 3 se sugieren varias actividades interesantes para trabajar el tema ADN. También, es importante trabajar previamente la estructura y función de las enzimas en general. Por ejemplo, al trabajar el tema de las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) se sugiere incluir el tema de las enzimas como un tipo particular de proteínas, y trabajar sus características: la estructura química y las condiciones que llevan a la desnaturalización, el modo de acción (enzima-sustrato), la temperatura óptima, y la especificidad. La parte c) de la actividad 1, destinada al repaso de conceptos, incluye un esquema que se recomienda trabajar en grupos y hacer la puesta en común para aclarar los aspectos que puedan resultar más complejos de la representación gráfica. Las representaciones gráficas suelen presentar dificultades para su análisis y decodificación de los símbolos incluidos, que no siempre resultan claros.

CONCEPTOS RELACIONADOS

Biomoléculas. Proteínas. Enzimas. ADN.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



ACTIVIDADES

Actividad 1. Repaso de conceptos

El objetivo de las siguientes actividades es tratar el tema enzimas de restricción, a partir de los conceptos trabajados en el texto del cuaderno.

Actividades de aplicación

a. Responde verdadero o falso según corresponda. Justifica tus respuestas.

1. Las enzimas de restricción reconocen secuencias de nucleótidos en el ADN. **VERDADERO**
2. La única técnica empleada para originar fragmentos de ADN es la que se basa en la utilización de enzimas de restricción. **FALSO, pueden emplearse otras técnicas de rotura mecánica (por ejemplo la sonicación: disgregación de moléculas de ADN por ondas ultrasónicas).**
3. Las enzimas de restricción rompen la doble hélice del ADN en lugares específicos o cerca de ellos. **VERDADERO**
4. Los fragmentos de ADN pueden ser incorporados a plásmidos o virus que actúen como vectores. **VERDADERO**
5. Los plásmidos extracromosómicos no son vehículos corrientes utilizados para clonación. **FALSO. Son vehículos de clonación debido a su capacidad de mantenerse a sí mismo y replicarse en células huésped procariontas.**
6. Las enzimas de restricción ofrecen la posibilidad de segmentar el ADN en trozos y ordenarlos en forma secuencial. **VERDADERO**
7. *Escherichia coli* es la única bacteria que produce enzimas de restricción. **FALSO. La mayoría de las bacterias lo hacen.**
8. Las bacterias producen enzimas de restricción para degradar el material genético extraño que entre en la célula. **VERDADERO.**
9. Las enzimas de restricción actúan sobre cualquier tipo de molécula. **FALSO; como todas las enzimas, las de restricción son específicas, actúan sólo sobre sitios específicos de la molécula de ADN.**

b. Ordenar la secuencia de hechos que se emplean en ingeniería genética:

- § Transferencia del vector con el ADN de interés (vector recombinante) a una célula en donde se replique, proceso llamado “transformación” de la célula huésped.
- § Generación de un fragmento o fragmentos de ADN que han de utilizarse o manipularse.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



- § Selección de aquellas células que llevan las moléculas de ADN recombinante deseado, y su replicación como clones.
- § Empalme de los fragmentos de ADN formando una molécula compuesta, ADN recombinante, que puede actuar como vector, o ser incorporado en un vector para su posterior transmisión.

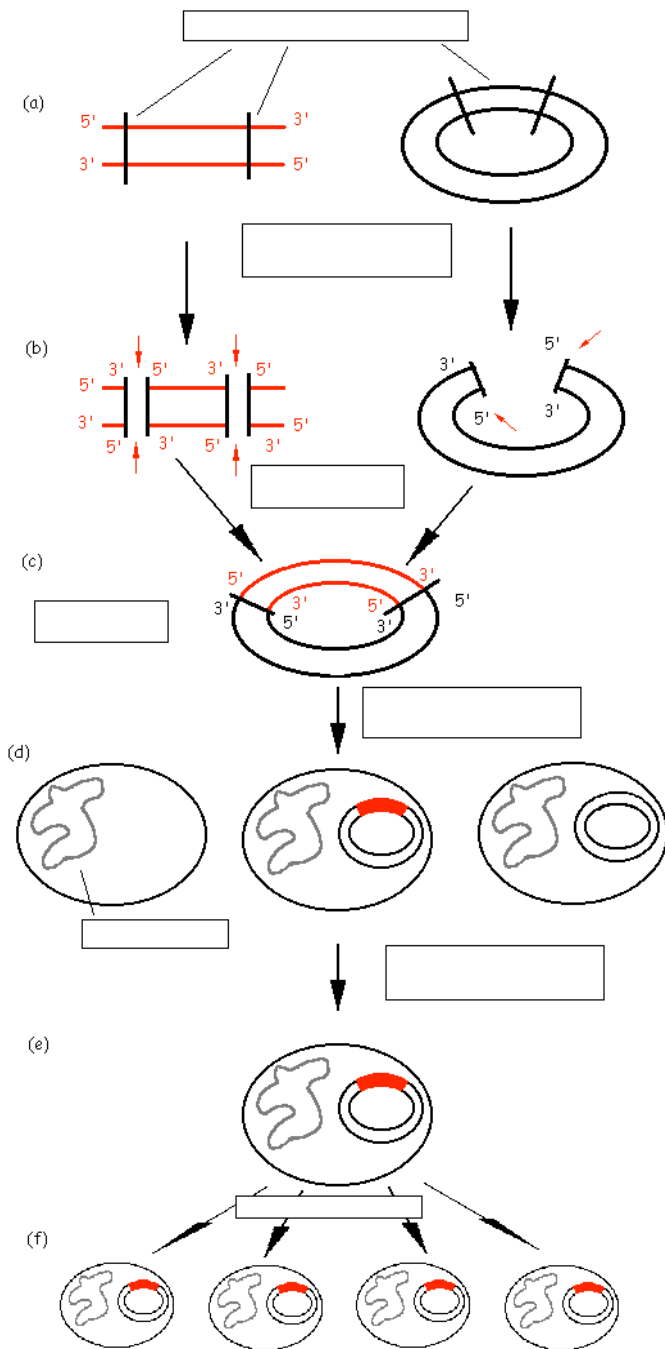
Respuesta:

- 1-Generación de un fragmento o fragmentos de ADN que han de utilizarse.
- 2-Empalme de los fragmentos de ADN formando una molécula compuesta, ADN recombinado, que puede actuar como vector, o ser incorporado en un vector para su posterior transmisión.
- 3-Transferencia del vector ADN a una célula en donde se replique, proceso llamado “transformación” de la célula huésped.
- 4-Selección de aquellas células que llevan las moléculas de ADN recombinante deseado, y su replicación como clones.

c. A continuación se presenta un esquema general para construir un clon de moléculas de ADN recombinante utilizando plásmidos y endonucleasas de restricción.

Observar y completar los recuadros del esquema utilizando las referencias que figuran al pie del mismo.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Referencias:

- Transferencia del vector a una célula huésped
- Selección de las células con ADN recombinante
- Clonación (replicación)

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo PorquéBiotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Cortes por la endonucleasa de restricción

Apareamiento y unión (ligasa)

Cromosoma huésped

Vector plasmídico

Lugares de reconocimiento por la enzima

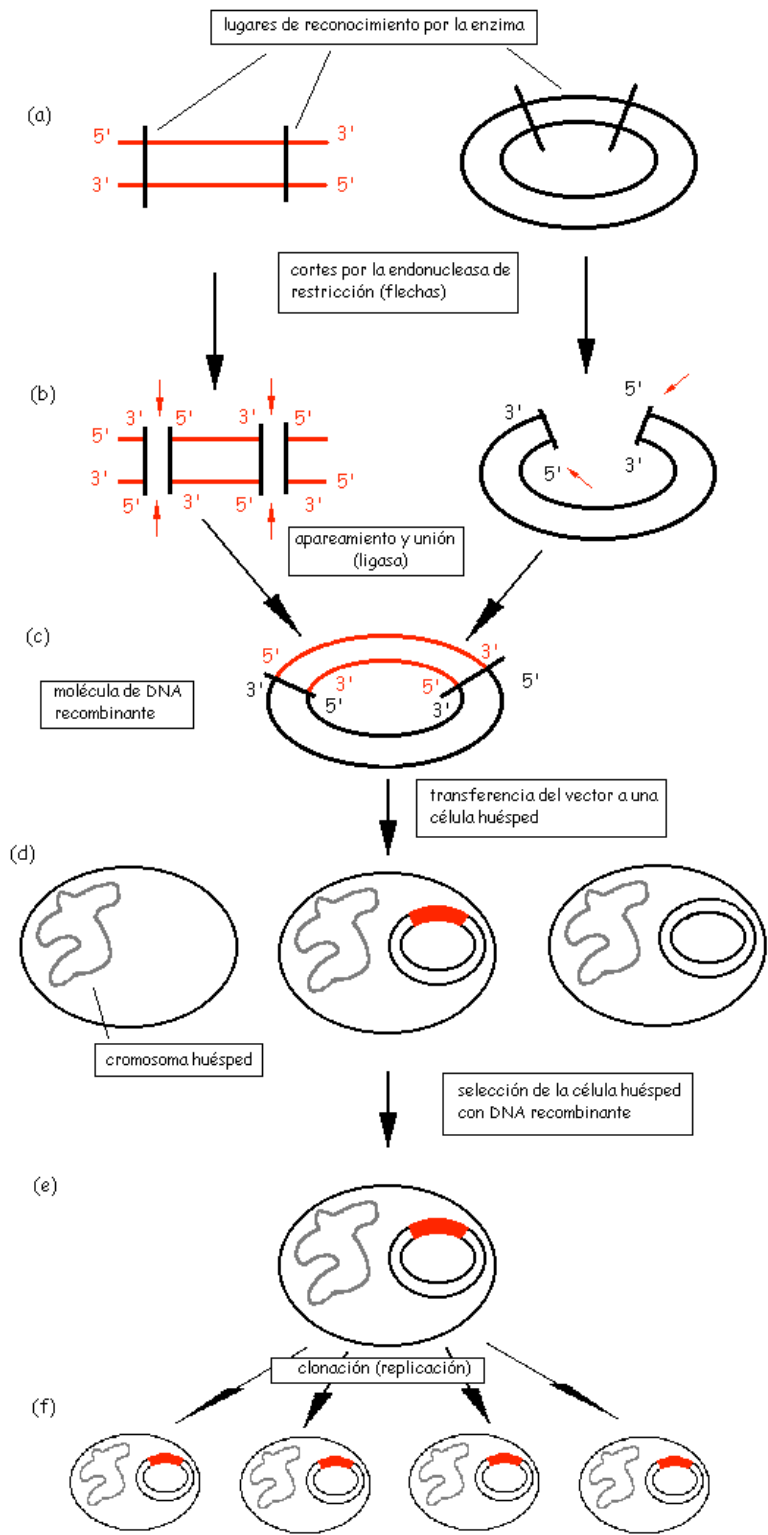
Molécula de ADN recombinante.

Fuente: Strickberger. Genética. Tercera edición. Ediciones Omega.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo PorquéBiotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Respuesta:



"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" desarrollada por el equipo de Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Actividad 2. Análisis de caso

Se puede fotocopiar las ilustraciones de la actividad y distribuirla entre los alumnos para que recorten el gen de la Fig. 1 y abran el vector de la Fig.2 e inserten allí el gen de interés.

Algunas consideraciones a tener en cuenta antes de hacer el ejercicio:

- 1) Cuando se realiza el protocolo de restricción (es decir se sigue la receta para el uso de las enzimas), se pueden combinar 2 o más enzimas en un mismo tubo de ensayo, siempre y cuando la solución en la cual deben estar disueltas sea la misma.
- 2) Cada enzima puede cortar en algunos o en todos los sitios que le corresponde, esto depende de la cantidad de moléculas enzimáticas que se utilicen, cuánto ADN haya en el tubo y cuánto tiempo se los deje actuar.
- 3) Antes de hacer la reacción en el tubo de ensayo se debe evaluar qué otra molécula de ADN se va a clonar y en base a eso elegir la mejor enzima para cortar el gen de interés. Por lo general, cuando se tiene un gen ya cortado y se quiere guardar, se usan *vectores de clonado*. Los vectores de clonado son moléculas de ADN circular del tipo plásmidos y que tienen un sitio en el cual se insertan las secuencias de corte de varias enzimas como para poder elegir la enzima que más convenga, ese sitio se denomina “sitio de múltiple clonado”.

Análisis del caso:

Un ingeniero agrónomo que trabaja en un laboratorio de Biotecnología Vegetal desea obtener trigo transgénico que sea resistente al ataque de un hongo que afecta ese cultivo en su país. Como no existe otra variedad de trigo que tenga genes antifúngicos, el ingeniero evaluó que no podría realizar cruzamientos convencionales y tendría que recurrir a técnicas de ingeniería genética. Al investigar en publicaciones científicas halló que la cebada tiene genes de resistencia, entonces decidió clonar esos genes de la cebada para luego utilizarlos en la obtención del trigo transgénico. Buscó en bases de datos la secuencia del gen de la cebada para analizar con qué enzimas de restricción podría cortar el gen que le interesa, una vez que haya hecho la extracción del ADN de la planta. El resultado de su análisis se encuentra en la figura 1.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Una vez cortado el gen de interés deberá insertarlo dentro del vector de clonado que se muestra en la figura 2, para lo cual deberá abrir el sitio de múltiple clonado cortando con alguna enzima de restricción. ¿Qué enzima/s habrá elegido? ¿Por qué?

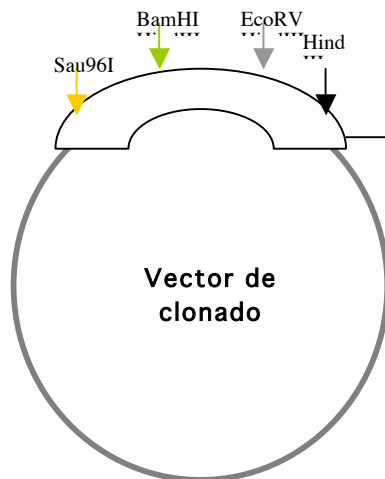


Fig.2: Sitio de múltiple clonado dentro del vector

Respuesta: Utilizar BamHI para cortar el gen de interés y también para abrir el sitio de múltiple clonado del vector. Así se asegura que el gen esté entero y que los extremos cohesivos que esta enzima genera sean compatibles con los que quedarán en el sitio de múltiple clonado. De esta forma se podrá luego “pegar” correctamente el gen (usando ligasas).

Material de consulta

<http://www.olimpiadadebiologia.com/cuadernillos/CuadenilloTeorico.pdf>

Cuadernillo teórico. Olimpíadas argentinas de Biología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencia Exactas Físico Químicas y naturales. 2005.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



<http://www.arrakis.es/~ibrabida/biologia.html> Las herramientas de la ingeniería genética. Sitio español.

<http://www.dnai.org> Animación del mecanismo de acción de una enzima de restricción, en la sección *Manipulation y Techniques*.

<http://www.dnai.org/index.htm> en la sección *Timelines* es posible elegir una década y escuchar a los actores del descubrimiento del ADN.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo PorquéBiotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.