

La ingeniería genética. Conceptos fundamentales. Aspectos médicos

Miguel Angel Calvo Benedí (*).

Daniel Ramón Vidal (**).

Sergio Ferrer Soler (**).

Juan Bautista Salom Sanvalero (***)

RESUMEN

En el transcurso de los últimos años hemos asistido a grandes avances en el campo de la biología molecular. Todos ellos han conducido al desarrollo de una serie de técnicas que permiten obtener, modificar e introducir en células receptoras fragmentos de DNA de individuos donadores. Con ello se han obviado todas las barreras que en la Naturaleza impiden el intercambio genético, lográndose construir verdaderas fábricas celulares para el desarrollo de productos con interés farmacológico o industrial. El potencial que se deduce del empleo de estas técnicas de ingeniería genética en campos como la medicina, la agricultura, la ganadería o la industria es inmenso y podemos afirmar, sin temor a equivocarnos, que estamos a las puertas de una auténtica revolución biotecnológica.

SUMMARY

Recent advances in the field of molecular biology have led to the development of techniques allowing the obtention of DNA fragments from donor cells and their modification and insertion in receptor cells. Thus, natural barriers to genetic interchange have been overcome so that actual cell-factories can be created for the development of substances of pharmacological or industrial interest. Obviously these techniques have a huge potential for medical, agricultural, cattle-rearing and industrial purpose, and can be considered as revolutionary.

GENERALIDADES SOBRE INGENIERIA GENETICA

Existen complicadas definiciones legales de lo que es ingeniería genética (4). Tal vez una definición sencilla y clara sea la que entiende por ingeniería genética la introducción de una planificación humana en la formación de nuevos genes y nuevas combinaciones de genes.

Supongamos que queremos clonar un gen de una célula donadora que llamaremos célula A en una célula receptora que denominaremos célula B. Para ello deberemos extraer el DNA total de la célula A y transformar con él la célula B seleccionando posteriormente aquellas células B que hayan tomado el gen que deseamos clonar. Esto sobre el papel es muy sencillo, pero en la práctica tropezaríamos con muchas dificultades. La principal de ellas radica en el hecho de que la simple introducción del DNA exógeno tal cual en la célula receptora se produce con una eficiencia muy baja, prácticamente no entra, y si lo hace es degradado en su mayor parte. Para proteger el DNA exógeno de la degradación se hace preciso introducirlo en el interior de otra molécula de DNA denominada vector. Este DNA recombinante

gen-vector ya puede penetrar con facilidad, conservándose de forma estable en el citoplasma de la célula receptora.

Vamos a profundizar un poco más en los vectores de clonación. Son plásmidos o virus en los que se inserta el gen que se desee clonar (3). Deben cumplir las siguientes propiedades:

a) Ser capaces de penetrar la membrana citoplasmática de la célula receptora.

b) Ser estables en el citoplasma de la célula receptora por poseer un origen de replicación que les permita independizar su proliferación de la división nuclear.

c) Estar relacionado con el DNA de la célula receptora para no ser degradado.

d) Contener algún gen que le confiera características fenotípicas que

* Capitán Médico. Servicio de Cirugía 2. Hospital Militar Central Generalísimo Franco. Isaac Peral, s/n. Madrid.

** Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. Doctor Moliner, s/n. Burjasot (Valencia).

*** Unidad de Circulación Cerebral. Centro de Investigación. Hospital La Fe. Avenida Campanar, 21. Valencia.

permitan seleccionar fácilmente las células receptoras que lo posean.

Un caso típico de vector es el plásmido pBR322 (fig. 1). Construido en el laboratorio de forma artificial (1) posee genes que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina. Al transformar con él células receptoras podremos distinguir claramente las que lo tomen de las que no lo hacen cultivándolas en medio adicionado de ambos antibióticos. Sólo las portadoras de pBR322 crecerán merced a su capacidad de inactivar los antibióticos.

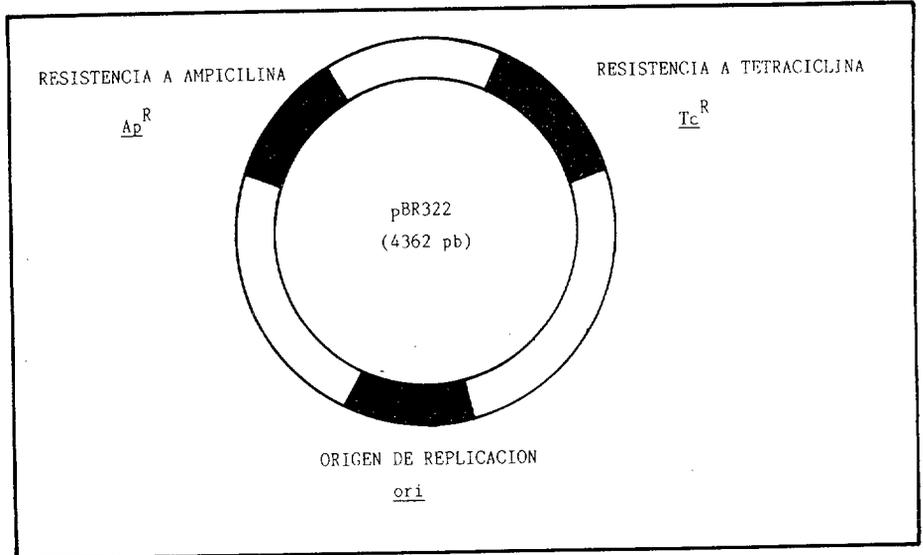


Fig. 1.—Mapa físico del plásmido pBR322, un clásico vector de clonación.

Para poder insertar el gen a clonar en el vector se precisa de una serie de enzimas implicados en el metabolismo del DNA. De todos ellos los más importantes son sin lugar a dudas las endonucleasas de restricción. Estos enzimas

reconocen secuencias palindrómicas de cuatro a seis pares de bases en el DNA cortándolas generalmente en un extremo (5). Si disponemos de dos DNAs de diferente origen digeridos con el mismo enzima podremos unirlos gracias a la complementariedad de bases adenina-timina y guanina-citosina que sus extremos presentan (fig. 2). Esta unión se verá favorecida por la presencia de otro enzima importante: la DNA ligasa, la cual cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 3'hidróxilo y 5'fosfato adyacentes en el DNA (2).

Con todo ello se logran DNAs recombinantes gen-vector con los que se transforman células receptoras. Estas pueden ser de cualquier tipo: bacterias, levaduras, hongos, células vegetales o células animales. Hay que destacar que el emplear un tipo u otro depende del experimento, si bien la inmensa mayoría de los mismos se diseñan para el trabajo con bacterias por la facilidad de su manipulación.

ESTRATEGIAS PARA LA CLONACION DE GENES

Cada experimento de ingeniería genética precisa de una estrategia de clonación propia, por lo que es muy difícil establecer generalidades. Ahora bien, se puede hablar de sistemas clásicos para la clonación de genes. En concreto hay tres de ellos de los cuales dos toman como material de partida para la obtención del gen DNA mientras que el otro toma RNA.

La primera estrategia (fig. 3) consiste en digerir tanto el DNA de la célula donadora como el vector con un enzima

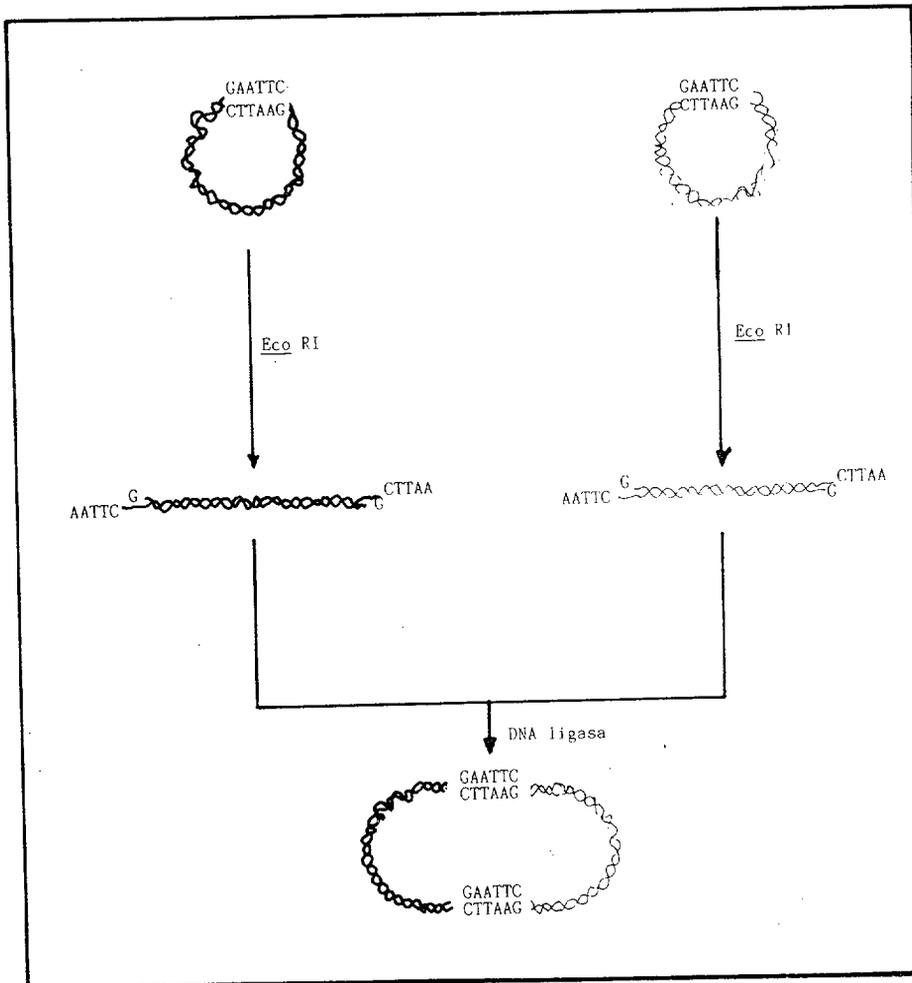


Fig. 2.—Utilización de los enzimas de restricción en la formación de DNAs recombinantes. La digestión de dos DNAs de diferentes orígenes con el enzima Eco RI genera en ambas moléculas extremos cohesivos de secuencia complementaria que pueden unirse por la actuación de la DNA ligasa.

de restricción que produzca un único punto de corte en este último. Ambas preparaciones se ponen en contacto en presencia de DNA ligasa, con lo que tal y como antes veíamos se forman los DNAs recombinantes. Con el conjunto de los mismos se transforma una célula receptora obteniéndose un número de clones de los cuales identificaremos aquel que porte el gen que se deseaba clonar.

La segunda estrategia parte de un DNA donador cuyos extremos son romos. Esto puede deberse a la actuación de determinados enzimas de restricción o al hecho de que el DNA se haya fragmentado por procedimientos mecánicos. Se puede resolver el problema por diversas vías. La primera de ellas consiste en intentar ligar gen y vector mediante DNA ligasa, a pesar de que los extremos no sean complementarios. Para ello se precisan altas concentraciones de gen, vector y DNA ligasa pudiendo deducirse que se trata de un procedimiento caro. Otra solución se basa en la adición de una cola de polinucleótidos al vector y de otra cola del polinucleótido complementario al gen a clonar (fig. 4). Ello se logra por la actuación del enzima terminal transferasa. De esta forma ambos DNAs presentan extremos complementarios y en presencia de DNA ligasa formarán DNAs recombinantes. Una última alternativa para el problema de los extremos romos toma como base el empleo de prendedores. Estos son secuencias de nucleótidos sintetizadas químicamente y que son diana para un enzima de restricción. Se unen a gen y vector, se digieren con el enzima para el cual son diana y de esta forma se dispone de dos DNAs complementarios en sus extremos (fig. 5).

La tercera y última estrategia toma como material de partida el RNA mensajero del gen a clonar. Es útil sobre todo a la hora de trabajar con genes de organismos eucariotas, pues permite obviar el problema de los intrones. Para llevar a cabo esta técnica es preciso acudir a buscar el RNA mensajero a su fuente biológica natural apropiada, es decir, si por ejemplo deseamos clonar el gen de la

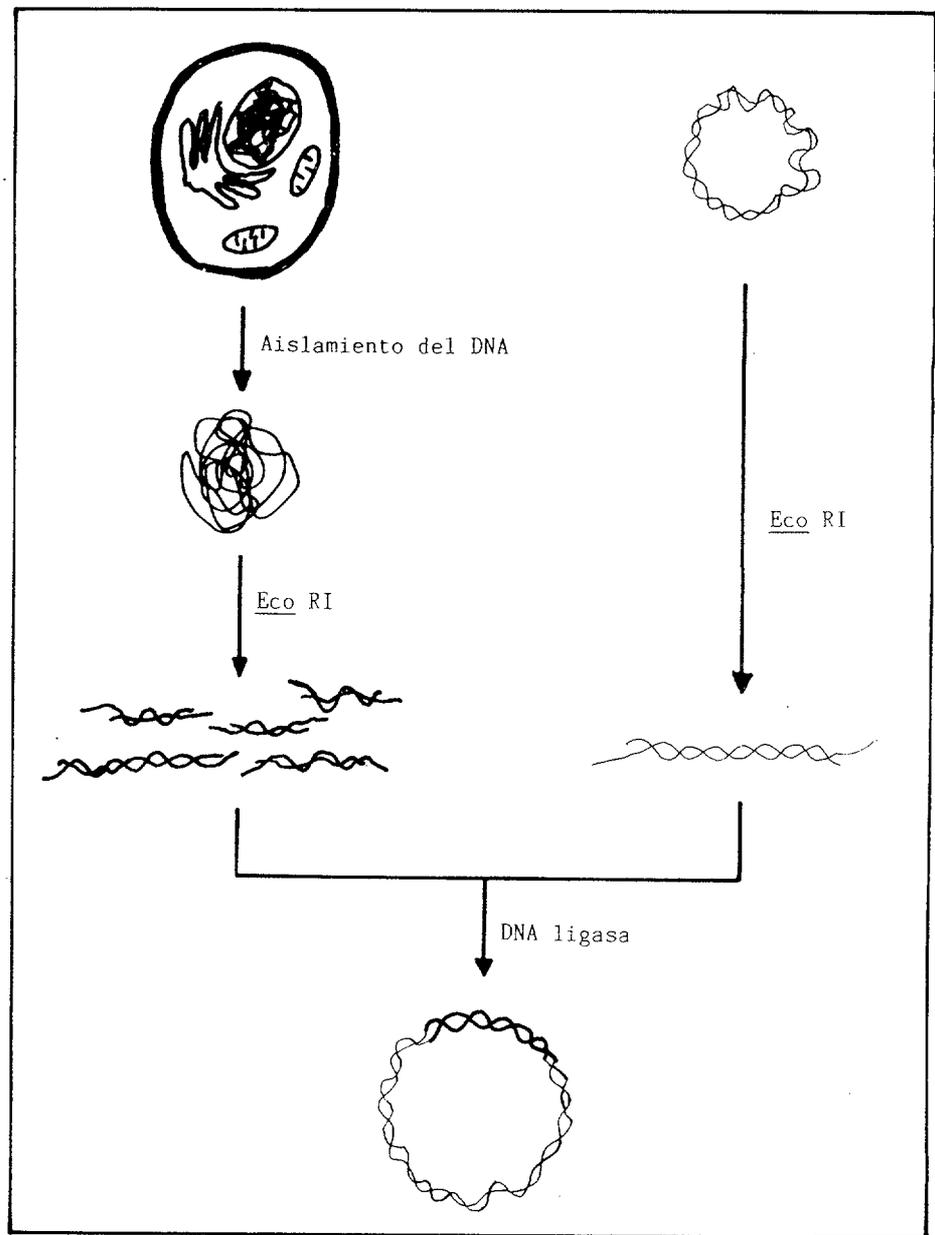


Fig. 3.—Método directo para la clonación de genes. Se aísla en DNA total de una célula y se digiere con un enzima de restricción. Por otra parte un plásmido vector se digiere con el mismo enzima. Ambas poblaciones moleculares se ponen en contacto en presencia de DNA ligasa lográndose una colección de DNAs recombinantes de los que habrá que aislar el que porte el gen deseado.

insulina buscaremos su RNA mensajero en el páncreas. El aislamiento del RNA mensajero se lleva a cabo por cromatografía de oligo deoxitimidina celulosa con lo cual los RNAs mensajeros quedan retenidos al poseer una cola de poliadenina. A continuación se añade a la suspensión de RNAs el enzima transcriptasa inversa el cual es capaz de sintetizar DNA tomando como molde RNA (Fig. 6). Se formará así un híbrido RNA-DNA. Mediante hidrólisis alcalina se elimina del mismo la hebra de RNA y con la ayuda de una DNA polimerasa se sintetiza un DNA complementario de la hebra de DNA preexistente. El único problema es la existencia de un codo de DNA de cadena sencilla que se digiere

por la actuación del enzima nucleasa S1. Con ello se logran DNAs de extremos romos correspondientes al gen del cual habíamos aislado sus mensajeros. La inserción de un vector se puede llevar a cabo por procedimientos similares a los citados anteriormente.

SELECCION DE LOS CLONES TRANSFORMADOS

La selección del clon que porte el gen que se desea clonar varía según el tipo de experiencia (6). Si el gen clonado es una resistencia a alguna droga bastará con plaquear en medio adicionado de la misma.

Si se trata de algún enzima implicado en una vía metabólica se buscan cepas receptoras mutantes en dicho gen con el objeto de poder complementar la mutación. Por ejemplo si deseamos clonar el gen para la orotidina-5' -fosfato descarboxilasa, un enzima implicado en la vía de síntesis de las uridina, buscaremos una cepa receptora mutante en este gen. Esta cepa no podrá crecer en un medio mínimo a menos que le añadamos uridina. La selección de los clones transformados con el gen mencionado se realizará en un medio mínimo sin uridina. Sólo aquellos clones que hayan tomado y expresado el gen de la orotidina-5' -fosfato descarboxilasa podrán crecer y dar colonias.

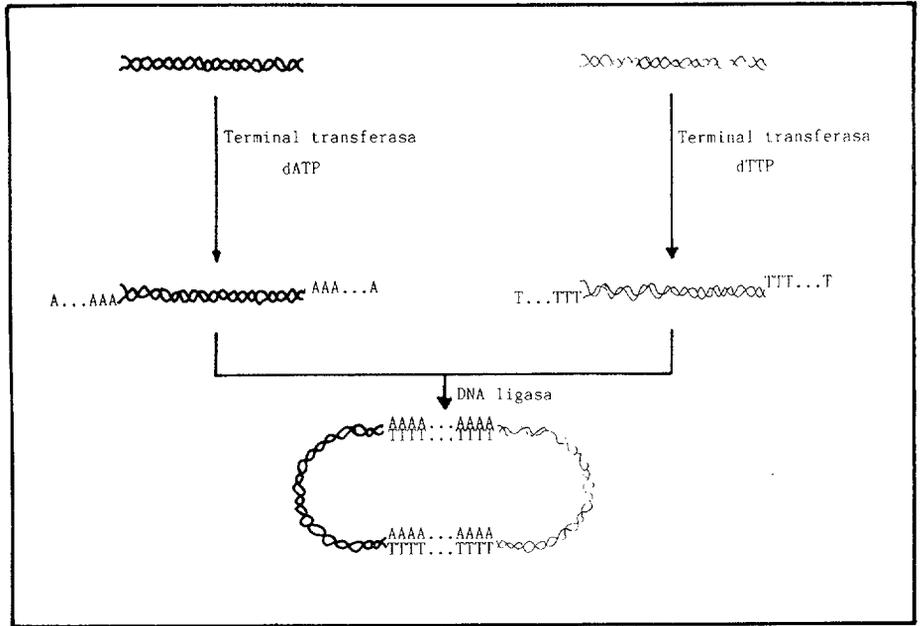


Fig. 4.—Método de la terminal transferasa para la clonación de genes incluidos en insertos de DNA de extremos romos. Gen y vector se tratan con la terminal transferasa pero a uno se le da como fuente de nucleótidos adenina y al otro timina. Se logran así colas complementarias que en presencia de DNA ligasa se unen.

Finalmente si el gen clonado corresponde a una proteína habrá que acudir a realizar una búsqueda del clon productor de la misma mediante la utiliza-

ción de anticuerpos marcados radioactivamente contra dicha proteína.

La aplicación de las técnicas de clonación molecular en medicina ofrece interesantes posibilidades tanto desde el punto de vista del diagnóstico de enfermedades como desde el de la producción de metabolitos secundarios con interés farmacológico (9, 12, 16).

PRUEBA DE HIBRIDACION

La mayoría de enfermedades hereditarias producidas por mutaciones recesivas tienen su explicación molecular en el simple cambio de una base del DNA por otra. Tal vez de todas ellas el ejemplo más conocido sea el de la anemia falciforme. Como sabemos en esta enfermedad se produce el cambio en el gen de la β globina de un triplete guanina-adenina-guanina por otro guanina-timidina-guanina. Esto lleva en la proteína al cambio de un resto de ácido glutámico por otro de valina con lo que no ejerce bien su función molecular y se produce la enfermedad.

Mediante técnicas de ingeniería genética se puede detectar este mínimo cambio molecular. El triplete implicado se encuentra dentro de la zona de reconocimiento del encima de restricción *Dde I*. Al pasar la adenina a timidina cambia la secuencia y esta ya no es reconocida por *Dde I*. El resultado es que un enzima que antes cortaba en el gen de la β globina ahora no lo hace.

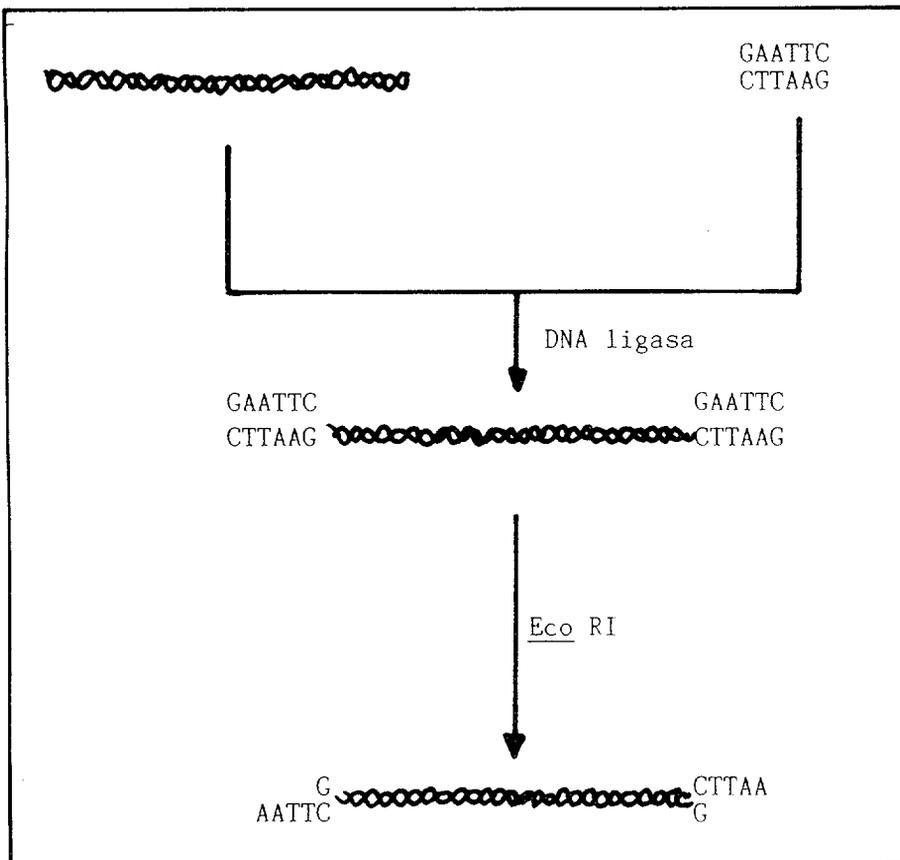


Fig. 5.—Empleo de prendedores para la clonación de genes en extremos romos de DNA. Altas concentraciones del gen y del prendedor se ponen en presencia de DNA ligasa. Se seleccionan los fragmentos que hayan tomado prendedores en ambos extremos y se digieren con el enzima *Eco RI* con lo que ya se dispone de un fragmento de DNA de extremos complementarios.

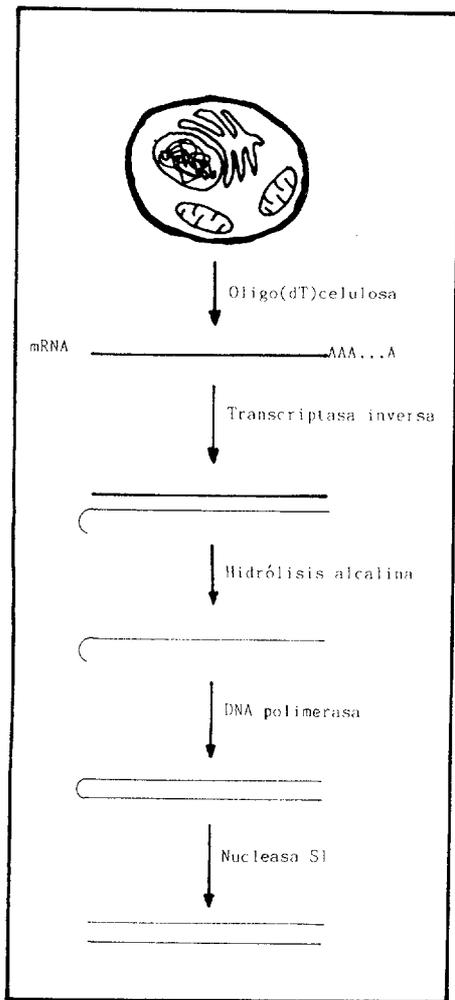


Fig. 6.— Método de la transcriptasa inversa. Se aíslan RNAs mensajeros y se someten a la acción de la tgranscriptasa inversa. Del híbrido DNA-RNA formado se separa el RNA por hidrólisis alcalina. Se sintetiza una hebra complementaria a la DNA por la acción de una polimerasa y finalmente se elimina el codo por la nucleasa S1.

Para poder detectar en ensayos clínicos estos cambios se ha puesto a punto la técnica denominada prueba *Dde*I (8). En ella se parte de la obtención de DNA de células de individuos presuntamente mutados que se digiere con *Dde*I. A continuación una muestra se somete a electroforesis en gel de agarosa para separar

los fragmentos. Se transfiere el gel a una membrana de nitrocelulosa y se hibrida con una sonda radioactiva del gen salvaje de la β globina. Si hay anemia falciforme aparecerá una única banda, de lo contrario aparecerán dos bandas debidas al corte por el enzima (Fig. 7).

Ultimamente la prueba *Dde*I para la detección de anemia falciforme se está

sustituyendo por la *Mst*II (11). Se trata de otro enzima de restricción que permite una mayor resolución de bandas con resultados más claros.

Este tipo de pruebas de hibridación se ha utilizado también para la detección de otras enfermedades. Por ejemplo en mutaciones HbOArab de β globinas (10) o en la fenilcetonuria (20). Este

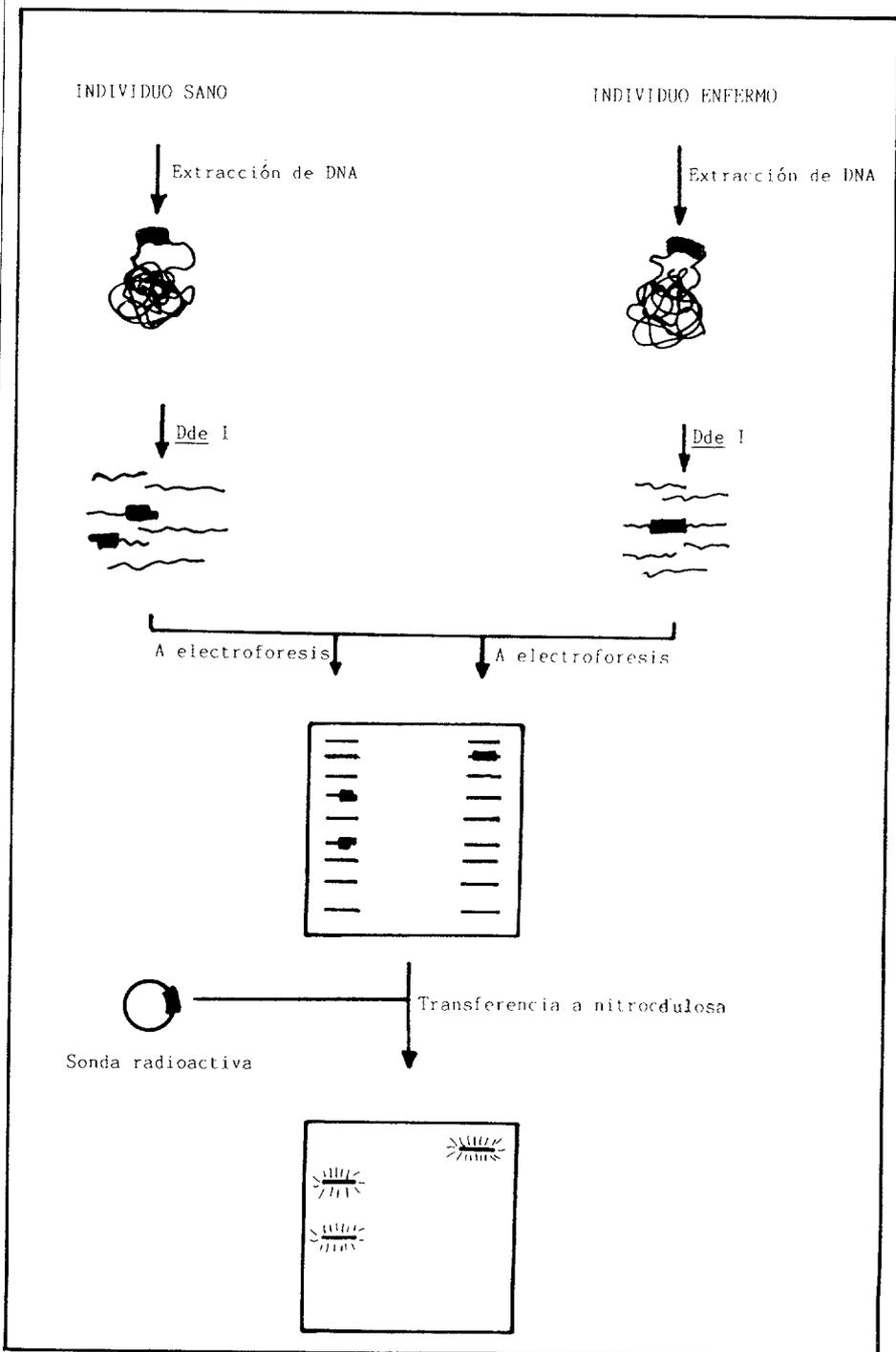


Fig. 7.— Prueba *Dde*I. De un individuo sano y otro enfermo de anemia falciforme se extrae el DNA y se digiere con *Dde*I. En el primer caso se produce un corte que rinde dos fragmentos cada uno con un trozo del gen. En el segundo no hay corte y por lo tanto sólo existe un único fragmento que contenga el gen. Al correr ambas poblaciones moleculares en electroforesis y posteriormente hibridar con una muestra radioactiva que contiene el gen salvaje aparecen dos bandas en el individuo sano y una única en el enfermo.

último caso es verdaderamente interesante pues permite establecer la condición de heterocigosis propia de individuos portadores. Con ello es posible hablar de diagnóstico genético preventivo por ingeniería genética.

Por el contrario en el caso de citrulinemia o en el síndrome de Lech-Nyhan, a pesar de tenerse clonado el alelo salvaje no se han logrado resultados positivos. Ello no significa que no haya mutación en el DNA de los pacientes sino tan sólo que no se puede detectar con los enzimas empleados ya que estos nos afectan al gen en cuestión.

ESTUDIOS MOLECULARES DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

La clonación de genes de la β globina en fagos recombinantes ha permitido llegar a la conclusión de que en el genoma humano estos genes se encuentran duplicados y ligados en un espacio de tan sólo 4000 pares de bases. Infectando con el lisado fágico una cepa de *Escherichia coli* se han podido reproducir en la bacteria procesos de selección similares a los descritos en poblaciones humanas (13). Merced a este tipo de trabajos básicos se podrán comprender mejor las bases moleculares de la enfermedad para de esta forma poderla sanar.

En el caso de las β talasemias se han podido incluso determinar el tamaño y localización de las deleciones del gen responsable. En concreto se pudo correlacionar un caso de talasemia con una deleción de 400 pares de bases en el extremo 3' hidroxilo del gen de la β globina. El procedimiento partió del clonaje del DNA de un paciente en un bacteriófago y su hibridación con el DNA de un individuo sano. Posteriormente se visualizaron al microscopio electrónico observándose los lazos correspondien-

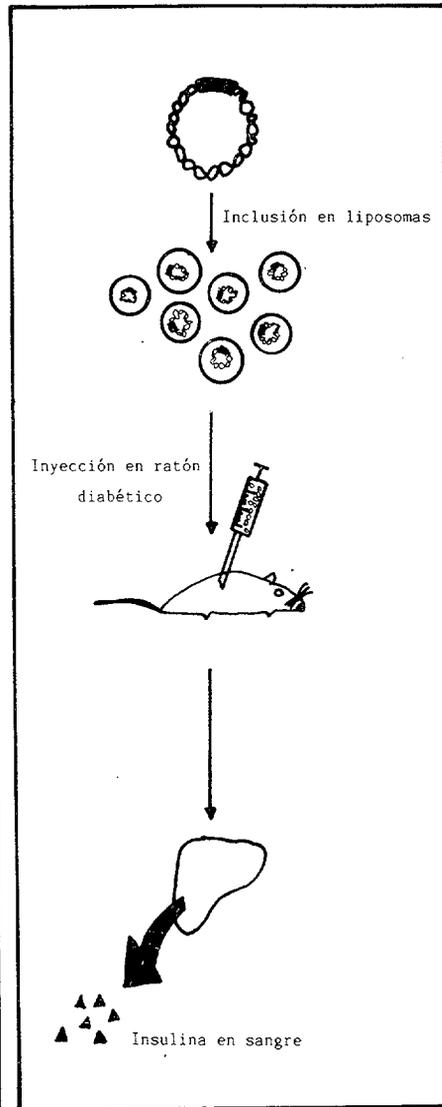


Fig. 8.— Experiencia de terapia con ratones diabéticos. Un plásmido que contenía un gen para la insulina murina se encapsuló en liposomas. Con una suspensión de los mismos se inyectaron ratones diabéticos. Los liposomas se fijaron sobre la superficie de células hepáticas y vertieron los plásmidos al citoplasma. Se sintetizó la insulina que por el torrente sanguíneo llegó a todo el cuerpo del animal.

tes a las deleciones así como su localización (17, 18).

DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Hay en este campo dos vertientes bien definidas. Por un lado el clonar el genoma o fragmentos de genoma de una bacteria o virus patógenos para su utilización como sonda. Por otro el aislamiento de productos proteicos de estos organismos y su utilización como antígenos purificados para inmunochag-nóstico o para la fabricación de vacunas.

En cuanto al diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante el empleo de sondas que contengan el genoma de bacterias o virus patógenos, hay que indicar que hay que buscar fragmentos de genoma con alta especificidad, de forma que sólo se encuentren en ese y no en otro organismo (15). Ultimamente se ha diseñado un método de marcaje de estas sondas con biotina y avidina (14) que permite disponer de resultados muy satisfactorios. Con ellos se pueden detectar patógenos en especies clínicas o patológicas e incluso visualizar la presencia de DNA o RNA microbiano en tejidos huéspedes.

El clonaje en bacterias de genes que codifican proteínas utilizables como antígenos permite disponer de una gran cantidad de los mismos. Un caso claro es el de la clonación en *Escherichia coli* del antígeno HBcAg del virus de la hepatitis B (19).

TERAPIA GENÉTICA

En animales de laboratorio se han puesto a punto una serie de técnicas de terapia genética (7). El caso citado partió de un cultivo de células de médula espinal de ratón las cuales se transformaron con genes clonados en el interior de retrovirus. Las células transformadas se implantaron en médula espinal con lo que el animal de experimentación recibió los genes clonados.

Muy recientemente el doctor Claude Nicolau del Centro de Biofísica Molecular de Orleans ha conseguido expresar en ratones diabéticos el gen de la insulina. Para ello integró millones de copias de un gen de la insulina murina en liposomas. Los liposomas son vesículas de lípidos en cuyo interior es posible encapsular sustancias, en este caso plásmidos. Inyectó estos liposomas a ratones diabéticos. Los liposomas pasaron al torrente sanguíneo y se fijaron sobre la pared de las células hepáticas liberando los plásmidos y por lo tanto el gen de la insulina. Esta se produjo y liberada en sangre sanó al animal (Fig. 8).

Como se puede deducir de lo visto estas técnicas son cada día más eficaces si bien no lo suficiente como para poderlas llevar a cabo en seres humanos. En un futuro no muy lejano los procedimientos podrán estar lo suficientemente desarrollados como para poder curar enfermos mediante este tipo de terapia. Ese es por ahora el objetivo a largo plazo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, E.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNECKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H. & FALKOW, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113, 1977.
- 2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Pág. 146. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1982.
- 3) MARTIN, J.F.: Plásmidos bacterianos y desarrollo de vectores de clonación. *En: "Temas de Microbiología. Vol. 1"*. Instituto de Ciencias de la Educación. Salamanca, 1983
- 4) OLD, R.W. & PRIMROSE, S.B.: Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Pág. 1. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1980.
- 5) ROBERTS, R.J.: RECOMBINANT DNA techniques. *In: "Methods in Enzymology. Volume 68. Recombinant DNA..."* (Wu, R. ed.). Academic Press. London, 1979.
- 6) WATSON, J.D., TOOZE, J. & KURTZ, D.T.: Recombinant DNA. A short course. Págs. 72-90. Scientific American Books. New York, 1983.
- 7) ANDERSON, W.F.: Prospects for human gene therapy. *Science* 226. Págs. 401-409, 1984.
- 8) CHANG, J.C. & KAN, Y.W.: Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by direct analysis of the sickle mutation. *Mut. Lancet* 2. Págs. 1127-1129, 1981.
- 9) ENGLEBERG, N.C. & EINSTEIN, B.I.: The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *New Engl. J. Med.* 311. Págs. 892-901, 1984.
- 10) FLAVELL, R.A., KOOTER, J.M., DE BOER, E., LITTLE, P.F.R. & WILLIAMSON, R.: Analysis of the B-5-globin gene loci in normal and Hb lepre DNA: direct determination of gene linkage and intergene distance. *Cell* 15. Págs. 25-41, 1978.
- 11) GEEVER, R.F., WILSON, L.R., NALLASETH, F.S., MILNER, P.F., BITTNER, M. & WILSON, J.T.: Direct identification of sickle cell anaemia by blot hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78. Págs. 5081-5085, 1981.
- 12) HADGKINSON, S. & SCAMBLER, P.: Recombinant DNA techniques in diagnostic and preventive medicine. *Bio Essays* 1. Págs. 12-15, 1984.
- 13) LAVER, J., SHEN, C.K. & MANIATIS, T.: The chromosomal arrangement of human c-like globin gene: sequence homology and c-globin gene deletions. *Cell* 20. Págs. 119-130, 1980.
- 14) LEARY, J.J., BRIGATI, D.J. & WARD, D.C.: Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized in nitrocellulose: bio blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80. Págs. 4045-4049, 1983.
- 15) MOSELEY, S.L., ECHEVARRIA, P. & SERIWATANA, J.: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probe. *J. Infect. Dis.* 145. Págs. 863-869, 1982.
- 16) MOTULSKY, A.G.: Genetic engineering, medicine and medical genetics. *Biomed. & Pharm.* 38. Págs. 185-186, 1984.
- 17) ORKIN, S.H., KOLODNER, R., MICHELSON, A. & HUSSOO, R.: Cloning and direct examination of a structurally abnormal human B-thalassemia globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. Págs. 3558-3562, 1980.
- 18) ORKIN, S.H., OLD, J.M., WETHERALL, D.J. & NATHAN, D.G.: Partial deletion of B-globin gene DNA in certain patients with B-thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76. Págs. 2400-2404, 1979.
- 19) PEUTHERER, J.F., MACKAY, P., ROSS, R., STAHL, S. & MURRAY, K.: Use of hepatitis B antigen produced in *Escherichia coli* in an assay for anti-HBc. *Med. Lab. Sci.* 38. Págs. 355-358, 1981.
- 20) WOO, S.L.C., LIDSKY, A.S., GUTTLER, F., CHANDRA, T. & ROBSON, K.J.H.: Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 306. Págs. 151-155, 1983.