

INGENIERIA GENETICA O MANIPULACION DE LOS GENES

El presente artículo trata sobre las técnicas para fraccionar el DNA y colocarlo en moléculas portadoras que luego son introducidas en células bacterianas. De esta manera es posible transferir información genética de un organismo a otro no relacionado, en donde el DNA transferido se duplica y expresa.

Stanley N. Cohen,
Scientific American
Vol. 233(1): 24-33, jul. 1975
Resumido y adaptado al Español por
Margarita Zuleta B.(1).

INTRODUCCION

El mundo está poblado de organismos que han surgido por evolución de especies que han retenido su identidad básica a través de generaciones sucesivas. Esto se debe a la existencia de barreras biológicas que impiden el intercambio de información genética entre organismos no relacionados. Por lo tanto, los organismos híbridos formados por la unión de organismos disímiles son poco frecuentes.

La unidad básica de la interrelación biológica es la especie. En organismos que se reproducen sexualmente, la especie se define por la habilidad de sus miembros de reproducirse entre sí; cruzarse sexualmente y compartir una dotación genética común. Las características que determinan cada especie dependen de los genes que posean, así que la individualidad de la especie se debe a la habilidad para impedir el intercambio biológico del material genético entre grupos de organismos no relacionados.

La conservación de la individualidad genética es aún más acentuada en organismos inferiores, tales como bacterias. Se observa por ejemplo que las diferentes especies bacterianas, por similares que sean, no intercambian información genética aunque ocupen el mismo habitat. Sin embargo, existen excepciones, gracias a los *plasmidios* que se encuentran en algunas bacterias.

Los plasmidios son partículas de DNA libres en el citoplasma, con capacidad de autoduplicarse. Algunos pueden contener hasta 30 genes. Un gran número de plasmidios que han sido estudiados intensamente en la última década, confieren a la bacteria portadora la habilidad de resistir a varios antibióticos. Por ejemplo, se ha encontrado que las bacterias *Escherichia coli* (bacilo de colon) resistentes a los anti-

bióticos, contienen plasmidios designados factor R, por conferir resistencia.

Dichos plasmidios llevan información genética para ciertas enzimas que de alguna manera pueden interferir la acción de antibióticos específicos. (Watanabe, 1967).

Algunas veces los plasmidios toman genes del cromosoma bacteriano y los transfieren a otras especies bacterianas relacionadas. Otras veces, pueden integrarse al DNA cromosomal de la célula receptora. Esta transferencia de genes entre especies diferentes, por medio de elementos extracromosómicos ha jugado un papel importante en la evolución de las bacterias, pero no es frecuente en la naturaleza. Si esto fuera frecuente, las bacterias comunes no hubieran conservado tan intactas sus características durante el gran número de generaciones bacterianas.

Utilizando el procedimiento llamado *Ingeniería de los plasmidios o ingeniería genética* se pueden transferir genes de una especie a otra en el laboratorio y propagar clones o líneas celulares genéticamente iguales, todas las cuales han recibido moléculas compuestas de diferentes DNA. Por medio de la ingeniería genética se puede crear una gran cantidad de combinaciones genéticas que luego son propagadas en los microorganismos. Desde 1973, A.C.Y. Chang y S.N. Cohen de la Universidad de Stanford y Herbert W. Boyer con Robert Helling en la Universidad de California en San Francisco, lograron construir en el tubo de ensayo moléculas de DNA biológicamente funcionales en las que se combina información genética de dos Plasmidios diferentes, encontrados en *E. coli*. Las moléculas resultantes fueron insertadas en células de *E. coli* donde se duplicaron y expresaron la información genética de ambos plasmidios parentales.

(1) Profesora, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

En la segunda etapa unieron genes de plasmidios de *Staphylococcus aureus* con segmentos de plasmidios de *E. coli*. Estas moléculas con DNA de dos especies no relacionadas se introdujeron en células de *E. coli* donde los genes extraños a *E. coli* expresaron sus propiedades biológicas originales.

Aplicando el mismo procedimiento, los investigadores J. F. Morrow de Stanford, H. M. Goodman de San Francisco y S. N. Cohen insertaron en células de *E. coli* algunos genes procedentes de la rana *Xenopus laevis*.

A las moléculas compuestas de segmentos de DNA de diferentes especies, se les llamó quimera de DNA por su similitud a las quimeras mitológicas (criaturas con cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente).

La ingeniería genética comprende técnicas bioquímicas y biológicas que han sido posibles, gracias a una serie de descubrimientos hechos en la década comprendida entre 1960 y 1970.

El procedimiento necesita cuatro elementos esenciales:

- 1) Un método para romper y unir diferentes moléculas de DNA procedentes de distintas especies.
- 2) Un portador de genes, que pueda duplicar su propio DNA y el DNA extraño que transfiera.
- 3) Una manera de introducir la molécula de DNA compuesta en una célula bacteriana funcional.
- 4) Un método para seleccionar, a partir de una gran población de células, un clon de células receptoras que hayan adquirido la quimera molecular.

Enzimas Utilizadas Para Unir Diferentes Segmentos de DNA.

El DNA, en la mayoría de los organismos, está conformado por dos cadenas de polinucleótidos complementarios. Cada nucleótido consta de un azúcar desoxirribosa, un fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina(A), timina(T), guanina(G) y citosina(C). Los azúcares y fosfatos forman el esqueleto del filamento. Dos nucleótidos adyacentes se conectan por medio de un enlace fosfodiéster entre el carbón 5 de un azúcar y el carbón 3 del azúcar siguiente (Fig. 1).

La DNA ligasa fue descubierta desde 1967 en cinco laboratorios diferentes. Esta enzima, bajo ciertas condiciones, puede unir extremos libres de las cadenas sencillas del DNA. Para ésto sintetiza el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes.

En 1970 el grupo de investigadores de Gobind Khorana en Wisconsin, encontró que la DNA ligasa producida por el bacteriófago T4 puede catalizar la formación del enlace fosfodiéster para unir los segmentos rotos de la doble cadena del DNA, para lo cual es necesario que los extremos de los

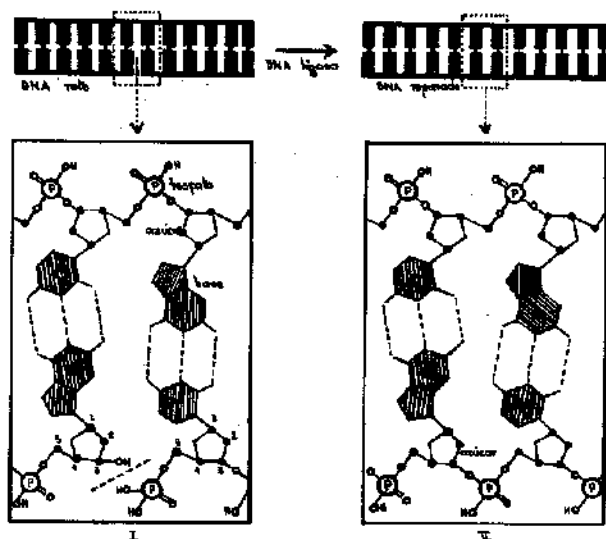


Figura 1. En la parte superior, la enzima DNA LIGASA repara la ruptura en una de las cadenas del DNA. En la parte inferior se representa la doble cadena de nucleótidos, cada nucleótido conformado por un azúcar, un grupo fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G), Citosina (C). En I se observa la ruptura entre el fosfato de un nucleótido y el azúcar del nucleótido adyacente. En II la ruptura ha sido reparada por la síntesis del enlace fosfodiéster entre el azúcar y el fosfato.

dos segmentos estén muy cerca. Se requiere, por lo tanto, un mecanismo que aproxime los dos extremos de las cadenas del DNA, para que la ligasa pueda actuar.

Peter Lobban, Dale Kaiser y otros en el laboratorio de Stanford desarrollaron una ingeniosa manera de acercar los extremos rotos del DNA. Se basaron en el conocimiento de que los extremos libres de las moléculas de DNA se pueden unir por apareamiento de bases, siempre que ambos extremos estén formados por secuencias sencillas de nucleótidos complementarios, de tal manera que las adeninas se unan por puentes de hidrógeno con las timinas y las guaninas con las citosinas.

Sabiendo que la enzima *terminal transferasa*, cataliza la adición secuencial de bases, especialmente en los extremos 3' de las cadenas sencillas del DNA, aprovecharon dicha enzima para agregar bases complementarias a los extremos de dos moléculas diferentes de DNA, de tal manera que, luego esos extremos se atraen y forman puentes de hidrógeno entre las bases complementarias. Quedan así, muy próximos los nucleótidos adyacentes de los extremos, por lo tanto pueden unirse utilizando la enzima DNA ligasa.

Métodos Para Unir Dos Moléculas de DNA Utilizando la Enzima Terminal Transferasa.

Berg, (1974) por medio de los siguientes pasos logró unir dos moléculas DNA:

- 1) Aislamiento del DNA del bacteriófago P.22 y del virus animal SV40. Ambos virus tienen DNA circular, por lo tanto, se deben romper las moléculas para

obtener DNA lineal con extremos libres que luego serán procesados (Fig.2). El rompimiento del DNA se hace con la enzima endonucleasa Eco RI que por sus propiedades especiales (que se explicarán más adelante), se utilizó posteriormente en un procedimiento diferente para elaborar el primer gen combinado funcional.

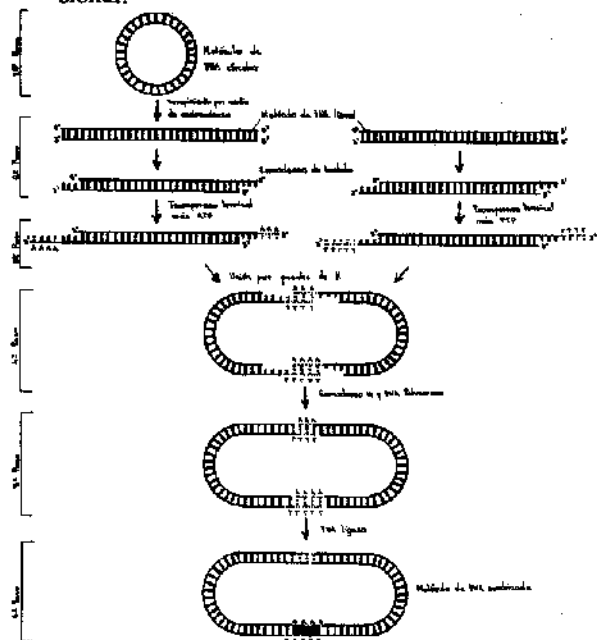


Figura 2. Procedimiento para unir dos moléculas de DNA utilizando la enzima TERMINAL TRANSFERASA. En el 1er. paso, la molécula circular de DNA es rota por medio de una endonucleasa. En el 2do. paso, las moléculas lineales de DNA son puestas bajo la acción de la exonucleasa de lambda que corta los nucleótidos en los extremos 5' de cada cadena (extremo en el que el grupo fosfato se une al carbono No.5). En el 3er. paso, la enzima terminal transferasa agrega nucleótidos del mismo tipo al extremo 3' de la cadena de DNA (extremo con un OH en el carbono No.3). A una especie de DNA se le agrega adenosín trifosfato (ATP); a la otra especie se le agrega timidina trifosfato (TTP). En el 4to. paso se mezclan las dos especies de DNA y las bases de los extremos complementarios de las dos moléculas, se unen por puentes de Hidrogeno. En el 5to. paso, la DNA polimerasa agrega nucleótidos para llenar los vacíos que han quedado en las cadenas sencillas. En el 6to. paso, la DNA ligasa sella los nucleótidos adyacentes de las dos moléculas que se combinaron.

- 2) Las moléculas lineales se tratan con una enzima exonucleasa, producidas por el bacteriófago lambda. Esta exonucleasa, corta los nucleótidos a partir de los extremos libres 5' de las moléculas de DNA, dejando así en cada extremo una cadena sencilla libre que termina en el carbón 3'; a éstos extremos libres se les puede agregar una serie de nucleótidos complementarios.
- 3) Con ayuda de la enzima terminal transferasa, se agrega una serie de nucleótidos "A." en los extremos 3' libres de una de las moléculas de DNA y se adiciona una serie de nucleótidos "T" en los extremos 3' libres del DNA de la otra especie.
- 4) Se mezcla las diferentes moléculas de DNA. Como los segmentos de las dos especies tienen extremos comple-

mentarios, se pueden aparear uno con el otro y unirse por puentes de hidrógeno, formando así moléculas de DNA combinadas. Para llenar los vacíos que hubieran quedado en los extremos 5' de los segmentos originales, los investigadores agregaron nucleótidos y dos enzimas: Exonucleasa III y DNA polimerasa.

- 5) Por último, se utilizó la DNA ligasa para sintetizar los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos adyacentes y así cerrar el círculo.

Método Simplificado Para Combinar Segmentos de DNA sin Usar la Enzima Terminal Transferasa.

Este método utiliza la enzima endonucleasa de restricción Eco RI para producir fragmentos de DNA con extremos libres complementarios que luego se combinan. No se requiere la adición de nucleótidos complementarios mediante la acción de la enzima terminal transferasa.

Durante los años 1970-1972 se descubrió que la endonucleasa Eco RI es una enzima de restricción, que sólo reconoce una secuencia específica de seis bases en el DNA que lee en la dirección 5' hacia 3' ($5' \text{GAATTC} \cdot 3'$ $3' \text{CTTAAG} \cdot 5'$) y en forma estricta sólo rompe el enlace entre las bases G A.

Esta endonucleasa Eco RI, aislada por Robert N. Tishimori en el laboratorio de Boyer en San Francisco, introduce rupturas en las dos cadenas de DNA. Debido al arreglo simétrico de las secuencia de nucleótidos que se complementan en las dos direcciones opuestas, las rupturas en las dos cadenas, sólo quedan separadas por la secuencia de cuatro nucleótidos, complementarios (Fig. 3). En esta forma la endonucleasa Eco RI produce en un solo paso moléculas lineales de DNA con extremos libres complementarios que pueden adherirse fácilmente. Estas moléculas son equivalentes a las que se obtienen con la enzima terminal transferasa, por medio de procedimientos más complicados.

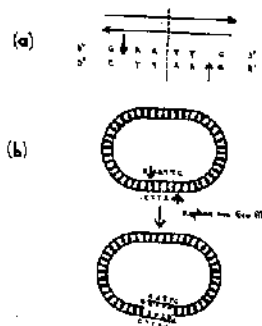


Figura 3. Acción de la endonucleasa de restricción Eco RI. (a) Secuencia de nucleótidos que conforman el sitio específico de acción de la endonucleasa. Las flechas de la endonucleasa. Las flechas verticales indican que la enzima rompe específicamente entre G y A. (b) Se observa que la enzima rompe las dos cadenas complementarias de DNA. Tales rupturas producen fragmentos de DNA con extremos de cadena sencilla, compuesto cada uno por cuatro bases complementarias. Por lo tanto, todos los fragmentos que produzca esta enzima se pueden unir entre sí.

Las moléculas circulares de DNA, rotas por medio de la enzima Eco RI, pueden luego unirse con otras por formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de los extremos libres y después pueden ligarse los nucleótidos adyacentes por medio de la enzima DNA ligasa.

En este primer paso de la ingeniería genética vemos que pueden combinarse diferentes fragmentos de DNA, utilizando un método simple que sólo requiere dos enzimas:

- La endonucleasa Eco RI para romper moléculas circulares de DNA en puntos específicos, dando como resultado fragmentos lineales con extremos complementarios.
- La DNA ligasa para unir, por medio de un enlace fosfodiéster, dos nucleótidos adyacentes pertenecientes a dos partículas diferentes de DNA.

MECANISMO PARA OBTENER EL PORTADOR DE GENES

Como la mayoría de los fragmentos libres de DNA no tienen capacidad de autoduplicarse, es necesario integrar los segmentos de DNA (genes que se están manipulando), en moléculas especiales de DNA que tengan la propiedad de autorreproducirse en un sistema biológico determinado (célula bacteriana).

En un principio se creyó que algunos bacteriófagos, como el virus lambda, serían las moléculas más apropiadas para servir como vehículo en la manipulación de genes; pues estos virus ocasionalmente toman por recombinación pequeños segmentos del DNA de *E. coli* y lo transfieren a otras células. Sin embargo, no fueron los virus, sino los plasmidios los que sirvieron como vehículos para introducir genes extraños en células bacterianas y los que han proporcionado un mecanismo para la duplicación y selección del DNA extraño.

Los plasmidios (factor R) se pueden aislar por centrifugación en gradientes de densidad y las moléculas se caracterizan por medio de técnicas bioquímicas y físicas (Clowes, 1973).

Utilizando la enzima Eco RI se rompe en varios sitios específicos el DNA circular de doble cadena de los plasmidios aislados. Los diferentes fragmentos son separados por centrifugación, para luego estudiar las propiedades genéticas y físicas de cada uno de los fragmentos aislados. De esta manera (Cohen, Chang y otros lograron aislar un segmento de DNA que conserva la información genética para autoduplicarse en la bacteria *E. coli* y para conferir resistencia a la tetraciclina. A este segmento lo llamaron plasmidio pSC 101 el cual equivale a la doceava parte del plasmidio parental. El plasmidio pSC 101, por unión de sus extremos cohesivos, mantiene la forma circular. Tiene la ventaja de que la enzima Eco RI lo rompe por un sólo punto específico sin afectar su habilidad para autoduplicarse, ni su resistencia a la tetraciclina.

Por estas propiedades, se escogió el plasmidio pSC 101 como vehículo para introducir en *E. coli*, un segmento diferente de DNA incapaz de autoduplicarse por sí solo.

MECANISMO PARA INTRODUCIR EL DNA EXTRAÑO EN CELULAS BACTERIANAS

Primero se mezclaron los plasmidios pSC 101 con el DNA de otros plasmidios de *E. coli* que confiere resistencia contra el antibiótico kanamicina. La mezcla de los dos tipos de DNA se sometió a la acción de la enzima Eco RI con el fin de romper las moléculas circulares. Luego, las moléculas lineales del plasmidio pSC 101 se unen por medio de puentes de hidrógeno con los extremos rotos complementarios del DNA del otro plasmidio diferente, (Fig. 4). A continuación se suturaron los nucleótidos adyacentes por medio de la enzima DNA ligasa.

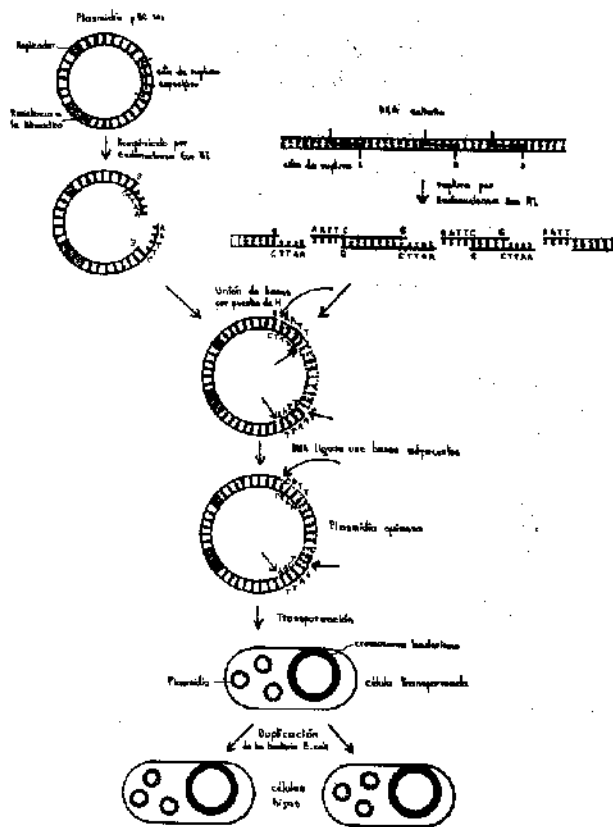


Figura 4. Proceso para unir un fragmento de DNA extraño al plasmidio pSC 101 e introducción en este plasmidio "quimero" en bacterias *E. coli*. En la parte superior izquierda, el plasmidio pSC 101 es roto por la endonucleasa Eco RI en un punto específico que no interfiere con los genes de replicación ni con los genes para la resistencia a la tetraciclina. En la parte superior derecha, el DNA extraño es roto en diferentes sitios específicos por la endonucleasa Eco RI. Los fragmentos resultantes pueden contener entre 4.000 a 16.000 pares de nucleótidos. En la parte media, un fragmento de DNA extraño se une al DNA del plasmidio por medio de puentes de Hidrógeno entre bases complementarias, y la enzima DNA ligasa sella los nucleótidos adyacentes. En la parte inferior, el plasmidio quimero es introducido en *E. coli* por medio de transformación, y el DNA extraño se duplica gracias a los genes replicadores del plasmidio.

El plasmidio "quimera" resultante, conformado por la unión del plasmidio pSC 101 con el DNA del plasmidio resistente a la kanamicina, se introdujo por medio de transformación a células de *E. coli* sensibles a los antibióticos, tetraciclina y kanamicina. Para lograr éxito en la transformación, las bacterias *E. coli* se trataron previamente con cloruro de calcio con el fin de permeabilizar sus membranas, de tal manera que dejaran pasar moléculas pequeñas de DNA. Se encontró, que una de cada millón de bacterias recibió el plasmidio quimera.

METODO PARA SELECCIONAR EL CLON DE CELULAS TRANSFORMADAS

Las bacterias que por transformación han recibido el plasmidio quiera se pueden identificar porque se vuelven resistentes a ambos antibióticos, tetraciclina y kanamicina. Estas son las únicas bacterias que pueden crecer en un medio selectivo que contenga tetraciclina y kanamicina. Cuando se aislaron los plasmidios del clon de bacterias transformadas, se comprobó que dichos plasmidios contenían todo el DNA del segmento pSC 101 con información para la resistencia a la tetraciclina y otro pequeño fragmento de DNA que llevaba la información para la resistencia a la kanamicina. Este plasmidio combinado pudo autoduplicarse gracias a que el segmento pSC 101 llevaba los genes del replicador. Los resultados confirman que el pSC 101 podría servir como vehículo para introducir en *E. coli*, un segmento diferente de DNA incapaz de duplicarse por sí solo.

A los pocos meses de haber realizado este experimento, se utilizó el mismo procedimiento en diferentes laboratorios con el fin de introducir en células bacteriana y animales, DNA procedente de diferentes especies. Por ejemplo, en un experimento que efectuaron Chang y Cohen, el DNA del plasmidio pSC 101 le unieron al DNA del plasmidio pl 258 que se encuentra en el *S. aureus*. Este plasmidio pl 258 confiere resistencia a la penicilina. Así que, la bacteria transformada expresó resistencia a la penicilina por la información del plasmidio pl 258 de *S. aureus* y resistencia a la tetraciclina, codificada por el plasmidio pSC 101 de *E. coli*. Luego se encontró que estas células bacterianas resistentes a los dos antibióticos, contenían DNA correspondiente al plasmidio pl 258 estafilococal y al plasmidio pSC 101 de *E. coli*.

La proliferación y expresión en *E. coli* de genes derivados de un organismo incapaz de intercambiar genes con esta bacteria, representaba un puente entre las dos especies. El hecho de que genes extraños se unieran a un plasmidio, ya era un indicio de que eran fáciles de aislar y purificar en grandes cantidades para estudios posteriores.

Haciendo uso del procedimiento descrito, potencialmente el plasmidio pSC 101 podría servir para introducir moléculas de DNA de organismos superiores en huéspedes bacterianos, facilitando así la aplicación de la genética bacteriana y las técnicas bioquímicas al estudio de los genes animales.

Con el fin de introducir genes de animales superiores en bacterias, varios investigadores (Morrow, et al, 1974), tomaron de la rana *Xenopus laevis*, ciertos genes que habían sido bien caracterizados y se podían aislar en cantidades apreciables. Estos genes codificaban un precursor de los ribosomas y se podían identificar en el caso de que lograran propagarse en las bacterias. Dichos genes se unieron al plasmidio pSC 101 resistente a la tetraciclina, (Fig. 5).

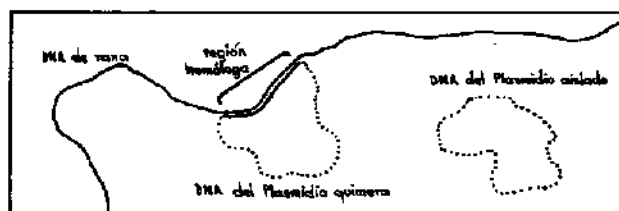


Figura 5. Plasmidio quimérico conformado por DNA de un plasmidio y DNA de rana.

El Plasmidio "quimera" se introdujo por transformación a las bacterias *E. coli* y cuando se analizaron las células transformadas, se encontró que los genes de las células animales se estaban autorreproduciendo generación tras generación en las bacterias a través de las funciones autoduplicadoras de los plasmidios. Además, se observó que en las células bacterianas, el DNA de las ranas transcribió su secuencia específica de nucleótidos a un RNA - m.

Fuera del plasmidio pSC 101 se han descubierto otros dos plasmidios con las mismas propiedades, o sea, que la enzima Eco RI las rompe por un solo sitio sin interferir con los genes esenciales.

Investigadores de las Universidades de Edinburg y Stanford han desarrollado mutaciones en el virus lambda con el fin de adecuarlo para que sirva de vehículo en la manipulación de genes.

También se han descubierto otras endonucleasas que producen extremos cohesivos en los segmentos de DNA, pero los rompen en sitios diferentes a los específicos para la enzima Eco RI.

La posibilidad de proliferar y estudiar genes de toda clase de animales en células bacterianas han aumentado intensamente. En la actualidad se está estudiando la organización de cromosomas complejos, tales como los de *Drosophila*, multiplicando genes de estos animales en bacterias.

La manipulación de genes abre las puertas para construir células bacterianas que puedan crecer fácilmente sin mayor costo y que lleguen a sintetizar una variedad de sustancias biológicas tales como anticuerpos, hormonas o enzimas que puedan convertir directamente la luz solar en sustancias alimenticias o energía utilizable.

BIBLIOGRAFIA

- Berg. P. "Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: Vol. 71(7):2595-2599, julio, 1974.
- Clowes, R. C. "The Molecule of Infectious Drug Resistance". *Scientific America*, abril 1973.
- Cohen S. N. Chang A. C. Y, Boyer H. W. and Helling R. B. "Functional Bacterial Plasmids in Vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 70,3240-3244; noviembre 1973.
- Morrow J. F. Cohen S. N. Chang A. C. Y. Boyer H. W. Goodman H. M. and Helling R.B. "Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*". Vol. 71(5):1743-1747; mayo, 1974.