

REVISION DE BIBLIOGRAFIA

UTILIZACION DE LAS CELULAS SOMATICAS EN LA LOCALIZACION

(MAPEO) DE LOS GENES HUMANOS

Por: M. Camargo(1)

Hasta hace cinco años la localización (mapeo) de los genes humanos en sus respectivos 23 pares de cromosomas, exceptuando el cromosoma X, era casi imposible. Pero con los recientes avances en las técnicas de hibridación de células somáticas, complementadas con las también nuevas técnicas de coloración diferencial de los cromosomas, se ha abierto un enorme campo de investigación en biología, especialmente en la genética de los mamíferos entre los cuales está el hombre.

Este tipo de estudios se utiliza en la actualidad no sólo para localizar los genes en los cromosomas, sino también para conocer como es regulada la expresión de los genes en la célula, e incluso, para dilucidar problemas básicos en biología como son la diferenciación celular, el desarrollo y la evolución.

En el presente trabajo se resumirán los logros más recientes que se han hecho en el campo de la hibridación de células somáticas como técnica para establecer grupos de ligamiento de genes en la especie humana.

La hibridación de células somáticas consiste en fusionar dos células de una misma especie o de especies diferentes. En esencia el procedimiento es sencillo. Para ello, por ejemplo, se co-cultivan en el laboratorio células de dos especies diferentes, digamos fibroblastos humanos y células de ratón.

Spontáneamente las células de las dos especies, pueden fusionarse, pero en la práctica esta fusión se puede incrementar adicionándole al medio en el cual están creciendo, agentes tales como lisolecitina o virus Sendai inactivados, los cuales inducen la formación de puentes intercelulares entre células adyacentes. La fusión produce un heterocarión binucleado (dos núcleos distintos en un mismo citoplasma)

el cual al sufrir la primera mitosis da lugar a células híbridas hijas mononucleadas, las cuales contienen los dos conjuntos de cromosomas de las células "parentales" originales (Handmaker, 1973; Klebe, 1970; Ricciuti, 1973; Ruddle, 1974). Las células híbridas resultantes de la fusión entre células somáticas humanas y de ratón, tienen tres importantes atributos que hacen de ellas un material apropiado para el análisis de grupos de ligamiento de genes en la especie humana. Estos atributos son:

(1) Los cromosomas de las dos especies son muy diferentes en tamaño, morfología y constitución biofísica. Los cromosomas de ratón son todos acrocéntricos, mientras que los cromosomas humanos son casi todos sub y metacéntricos. Además de utilizar la posición del centrómero, para identificar los cromosomas se cuenta en la actualidad con una serie de técnicas citológicas como son las de coloración diferencial (quinacrina, Giemsa, etc.), las cuales producen unos patrones de bandas en ellos únicos para cada especie (Chen, 1971; Ruddle, 1974). Por otra parte, los cromosomas de ratón poseen un tipo único de DNA (DNA satélite) el cual no se presenta en el genoma humano.

(2) Los aminoácidos de la gran mayoría de las proteínas homólogas entre el hombre y el ratón son diferentes. Esto es una consecuencia de la divergencia evolutiva entre las dos especies. En la práctica esto serviría para recolectar un gran número de marcadores genéticos (en el hombre y en el ratón), los cuales se podrían utilizar para el análisis aquí mencionado. Fenotípicamente estas diferencias bioquímicas se pueden detectar por medio de electroforesis (Ricciuti, 1973; Ruddle, 1970).

(3) En las células híbridas "hombre-ratón" los cromosomas humanos se van eliminando preferencial y paulatinamente, probablemente debido a la no disyunción o a otro

(1) Profesor, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, S.A.

mecanismo que todavía no está claro (Handmaker, 1973). Este proceso es análogo a la segregación genética que se produce en la meiosis. Una célula humana normal posee 46 cromosomas y una célula normal de ratón posee 40 cromosomas. Se espera que una célula híbrida entre las dos anteriores resulte con un número total de 86 cromosomas, pero en la práctica, después de varias generaciones de cultivo, los híbridos presentan entre 41 y 55 cromosomas, dentro de los cuales siempre están presentes los 40 del roedor. La eliminación de los cromosomas humanos es al azar lo que permite aislar clones híbridos que retienen uno o pocos cromosomas humanos determinados.

El análisis de grupos de ligamiento (mapeo) en la especie humana opera en base a los tres atributos anteriores utilizando la hibridación entre células somáticas como técnica principal.

¿Cómo saber cuando dos genes están localizados en el mismo cromosoma (ligados)? Partiendo de la base de que los cromosomas son eliminados como un todo y no en fragmentos, si dos genes están localizados en un mismo cromosoma, hay dos alternativas: ambos son eliminados o ambos permanecen en el clon híbrido. Estos genes son llamados *sinténicos*. Analizando la producción de enzimas humanas en varios clones, fácilmente se puede obtener información acerca de la sintenia de los genes correspondientes. El ligamiento y la localización de éstos se estudia, observando cuales productos genéticos (generalmente enzimas) aparecen consistentemente en un determinado clon y luego observando cual cromosoma aparece siempre asociado con determinado producto. A continuación se muestran unos resultados hipotéticos (Tabla 1).

TABLA 1. Organización de los resultados hipotéticos de 4 productos genéticos y tres cromosomas diferentes.

		CLONES HÍBRIDOS				
		A	B	C	D	E
ENZIMAS HUMANAS	I	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+
	IV	+	+	+	+	+
CROMOSOMAS HUMANOS	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+

Según estos resultados podemos decir que las enzimas I y III están ligadas a un mismo cromosoma debido a que presentan sintenia. Además, podemos decir que las anteriores enzimas están localizadas en el cromosoma número dos. Por otra parte la enzima II se le asignaría al cromosoma número 1. Cuando se trabaja con un gran número de marcas genéticas, las combinaciones matemáticas posibles son muy numerosas, lo cual hace a veces necesario el empleo de computadores para el análisis de los datos. Sin embargo, manufacturando un cuadro sencillo compuesto por la información de pocos clones híbridos, por ejemplo, tres (Tabla 2), cada uno de los cuales contiene diferentes combinaciones binarias de pares de cromosomas, las cuales se representan por "+" y "-", es posible saber casi con absoluta seguridad en que

cromosoma está localizado el gen responsable de la codificación de un determinado producto genético.

TABLA 2. Presencia (+) o ausencia (-) de algunos cromosomas humanos en 1786 clones diferentes.

		CROMOSOMAS HUMANOS							
		1	2	3	4	5	6	7	8
CLONES HÍBRIDOS	A	+	+	+	+	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	+	+	+	-
	C	+	-	+	-	+	-	+	-

Ejemplo: Si una enzima solo se detecta en el clon híbrido C, haciendo un análisis vertical del cuadro anterior, es lógico suponer que dicha enzima debe estar localizada en el cromosoma 7. En la misma forma, si una enzima solamente se detecta en el clon A es lógico suponer que el gen responsable de dicho producto está localizado en el cromosoma 4.

Mediante este método ha sido posible en los últimos años, mapear más de 50 genes distintos en 18 cromosomas humanos; muchos de estos están asociados a enfermedades hereditarias tales como la deficiencia en la enzima hexosaminidasa la cual está relacionada con la enfermedad de Tay-Sach. Este tipo de resultados aumentan la probabilidad de predecir el riesgo de que nazcan niños anormales mediante el examen prenatal del feto.

Después de conocer por el método anterior en qué cromosomas están determinados genes, la pregunta siguiente sería ¿en qué región de cada cromosoma están estos genes? Haciendo uso de reordenamientos cromosómicos tales como translocaciones y deficiencias, inducidas o espontáneas, combinándolas con las técnicas de coloración diferencial mencionadas anteriormente, se ha empezado a obtener los primeros resultados respecto a este interrogante. Por ejemplo, por análisis de árboles genealógicos se sabía que los genes responsables de la codificación de las enzimas fosfogliceratokinasa (PGK), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), e hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (HGPRT), estaban ligados al sexo, o sea, localizados en el cromosoma X. Ahora, utilizando la hibridación de células somáticas y algunos reordenamientos cromosómicos se sabe que estos tres genes están localizados en el brazo largo del mismo cromosoma en el siguiente orden: centrómero, PGK, HGPRT, G6PD (Ricciuti, 1973). Otro ejemplo es el caso del gen responsable de la codificación de la enzima timidina kinasa (TK); en un principio se localizó en el cromosoma 17; hoy se sabe que está en la parte media del brazo largo de dicho cromosoma.

Por lo reciente de estos estudios, todavía existen cromosomas a los cuales no se les ha podido asignar genes tales como el cromosoma 8, el 9 y el Y (McKusick, 1973; Perrod, 1974; Renwick, 1971; Ruddle, 1973; Ruddle, 1974).

Lo descrito anteriormente corresponde al mapeo de genes "constitutivos" o sea, genes que se expresan durante toda la vida de la célula, y en la mayoría de los diferentes tipos de células. Hay otras dos clases de genes: aquellos que se ex-

presan solamente cuando la célula es expuesta a un agente externo específico, y aquellos que se expresan continuamente pero sólo en células especializadas. El mapeo de estos genes requiere de técnicas diferentes y posiblemente proporcionará luces sobre los mecanismos de regulación genética (Handmaker, 1973).

El primer caso lo podemos ilustrar con el interferón que es una proteína producida por las células de los mamíferos, a las cuales confiere protección contra el ataque de virus. Aunque hasta el presente no se sabe como actúa, es un caso de intensa investigación porque potencialmente ofrece buenas perspectivas para el tratamiento de las enfermedades virales. Muchas de sus propiedades son específicas para cada especie. Se ha encontrado que dos cromosomas, el 2 y el 5, tienen que estar presentes simultáneamente, para que haya inducción de interferón. La interpretación que se tiene al respecto es que cada cromosoma mencionado, lleva un gen cuya actividad es necesaria para la producción del interferón humano.

En igual forma se ha visto que el sitio receptor para el virus de la poliomielitis depende de un gen localizado en el cromosoma 19.

Respecto a los genes que solo se expresan en células especializadas se han hecho recientemente interesantes hallazgos utilizando también células somáticas híbridas, pero con diferentes técnicas, motivo por el cual, no son mencionadas en este resumen.

En síntesis, los estudios mencionados abren nuevas y grandes posibilidades al análisis genético, especialmente en organismos tales como el hombre que por su período de generaciones tan largo, además de otros factores, son difíciles de abordar con las técnicas genéticas convencionales. Es fácil comprender que cada técnica científica nueva tiene problemas y perspectivas (Ruddle, 1970).

Entre las perspectivas en el campo de la biología básica figuran las posibles investigaciones con las especies más representativas del orden Primate. Por ejemplo, ya se han iniciado hibridaciones entre células de primates con células de roedores.

Los análisis de ligamiento que se hagan en estos grupos taxonómicos pueden revelar con más precisión las relaciones evolutivas existentes entre ellos así como un estimativo de la rata de divergencia evolutiva, especialmente cuando se combinen estos resultados con los que se tienen sobre constitución cromosómica y secuencia de aminoácidos en las proteínas de dichos especímenes (Ruddle 1973).

Es importante aclarar que mediante las técnicas actuales de hibridación celular aún no es posible confeccionar mapas de ligamiento tan precisos como los que se han elaborado en eucariotes inferiores e incluso en procariotes. Para ello será necesario desarrollar nuevas técnicas.

BIBLIOGRAFIA

- Chen, T. R. & Ruddle, F.H.: "Karyotype Analysis Utilizing Differentially Stained Constitutive Heterochromatin of Human and Murine Chromosomes". *Chromosoma* (Berl.), 34:51-72, 1971.
- , McMorris, F.A., Creagan, R., Ricciuti, R., Tischfiel, J., & Ruddle, F. H.: "Assignment of the Genes for Malate Oxidoreductase Decarboxylating to Chromosome 6, and Peptidase B and Lactate Dehydrogenase B to Chromosome 12 in Man". *Am. J. Hum. Genet.*, 25:200-207, 1973.
- Handmaker, S. D.: "Hybridization of Eukaryotic Cells". *Ann. Rev. Microb.*, 27:189-204, 1973.
- Klebe, R. J., Chen, T. R. & Ruddle, F. H.: "Controlled Production of Proliferating Somatic Cell Hybrids". *J. Cell Biol.*, 45:74-82, 1970
- McKusick, V. A., & Chase, G. A.: "Human Genetics". *Ann. Rev. Genet.*, 7:435-473, 1973.
- Pernod, J.: "La Carte Factorielle des Chromosomes Humains. L'état actuel des connaissances". *La Revue du Practicien*, Tome XXIV. 24:2323-2335, 1974.
- Renwick, J. H.: "The Mapping of Human Chromosomes". *Ann. Rev. Genet.*, 5:81-120, 1971.
- Ricciuti, F. C. & Ruddle, F. H.: "Assignment of Three Gene Loci (PGK, HGPRT, G6PD) to the Long Arm of the Human X Chromosome by Somatic Cell Genetics". *Genetics*, 74:661-678, 1973
- Ruddle, F. H.: "Utilization of Somatic Cells for Genetic Analysis. Possibilities and Problems". *Symposio of the International Society for Cell Biology*, 9:233-264, 1970.

- & Nichols, E. A.: "Starch Gel Electrophoretic Phenotypes of Mouse X Human Somatic Cell Hybrids and Mouse Isozyme Polymorphisms". *In Vitro*, 7:120-131, 1971.
- : "Linkage Analysis in Man by Somatic Cell Genetics". *Nature*, 242:165-169, 1973.
- & Kucherlapati, R. S.: "Hybrid Cell and Human Genes". *Sci. Am.*, 231:36-44, 1974.