

LOS CROMOSOMAS ARTIFICIALES Y SUS APLICACIONES

*DrS. Enrique Daniel Austin-Ward, Silvia Castillo
Servicio de Genética, Departamento de Medicina,
Hospital Clínico de la Universidad de Chile.*

RESUMEN

Los cromosomas artificiales son estructuras confeccionadas por ingeniería genética que facilitan el estudio del genoma y la comprensión del funcionamiento de los cromosomas; además, constituyen posibles vehículos de transferencia de genes en la terapia génica. Los primeros en desarrollarse fueron los cromosomas artificiales de levadura, los que se utilizan para la construcción de librerías de genes. Más recientemente se ha obtenido la primera generación de cromosomas artificiales humanos, los cuales han presentado una gran estabilidad, persistiendo en los cultivos celulares por varias generaciones.

Palabras claves: cromosomas, ingeniería genética, enzimas de restricción.

ABSTRACT

The artificial chromosomes are structures constructed by genetic engineering, which contribute to improve the genome studies and better knowledge of chromosome functioning; they are also good candidates for gene transfer methods in gene therapy. The first developed were the yeast artificial chromosomes (YAC), which have been used in genes libraries confection. More recently, the first generation of human artificial chromosomes have been obtained. They have a good nuclear stability through successive generations.

Keywords: chromosomes, genetic engineering, restriction enzymes.

INTRODUCCION

Los cromosomas (cr) son estructuras formadas principalmente por ADN y proteínas⁽¹⁾. Son visibles por técnicas de microscopía convencionales cuando sus elementos se encuentran ordenados en un estado de hipercondensación, el cual origina una estructura compacta que facilita la distribución equitativa del material genético a las células hijas durante la división celular.

Constan de dos brazos, p y q, unidos por un centrómetro. Este se puede situar en el medio del cromosoma, haciendo que p y q sean iguales (cr meta-céntrico), entre el primer tercio y los dos tercios restantes (cr sub-metacéntrico), o más cercano a uno de los extremos (cr acrocéntricos).

Durante la interfase del ciclo celular (el período en el cual la célula no se está dividiendo activamente, sino que se encuentra realizando procesos de funcionamiento básico y la duplicación del material genético para la próxima división celular) los cromosomas adquieren un estado decondensado que se denomina cromatina. Así pues, ambos términos, cromatina y cromosoma se refieren a una misma entidad (la unidad ADN-proteína), que se presenta en estados de condensación distinta durante el ciclo celular.

Para que un cromosoma pueda constituir una estructura que pueda autorreplicarse y transmitirse en forma estable de una generación a la siguiente, se ha determinado que es necesario que el ADN que lo constituye posea por lo menos 3 tipos de elementos o grupos de secuencias (nucleótidos o moléculas que forman el ADN⁽²⁾). Se requieren:

1. Un origen de replicación
2. Un centrómetro o secuencias centroméricas
3. Telómeros o secuencias teloméricas

El origen de replicación es el sitio o sitios donde une la maquinaria molecular, (factores de replicación, polimerasas), encargada de replicar el ADN, es decir, de reproducir una nueva copia del mismo.

El centrómetro es el punto en el cual se une el huso mitótico encargado de dirigir a los cromosomas hacia polos opuestos, cada uno de los cuales formará una célula hija.

Los telómeros son secuencias en tandem, una a cada extremo del cromosoma, las cuales ayudan a la estabilidad del mismo, evitando que sus extremos se peguen entre sí, o con otros cromosomas.

Un cromosoma artificial es una estructura construida con ayuda de técnicas de ingeniería genética con diversos propósitos, y que contiene estos 3 tipos de elementos básicos. Me referiré a dos tipos de ellos:

1. Los cromosomas artificiales de levadura o YAC (Yeast Artificial Chromosomes).
2. Los cromosomas artificiales humanos o HAC (Human Artificial Chromosomes).

La Ingeniería Genética y los Cromosomas Artificiales de Levadura

El proyecto Genoma Humano espera mapear y secuenciar aproximadamente unos 50.000 a 10.000 genes. Para la genética clínica, la importancia de esta intención radica en la posibilidad de determinar los genes involucrados en las enfermedades, y gracias a este conocimiento, incidir en la prevención de las mismas⁽³⁾. Es una labor ardua que se ha ido facilitando en la medida en que se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular y nuevas estrategias para abordar el problema. Este es uno de los aspectos donde han jugado un papel importante los YACs, los cuales se han utilizado para construir las llamadas bibliotecas de genes, que facilitan el proceso de identificación de nuevos genes.

De los 3 billones de pares de bases que forman el ADN del núcleo de los seres humanos, solamente un 5 a 10% tiene una función desconocida⁽⁴⁾, es

decir, codifica para una proteína, es elemento regulador o tiene una función estructural clara. De manera que encontrar cuándo y dónde una determinada secuencia de nucleótidos de ADN (los cuales se disponen de manera irregular, pero no al azar) se trata de un gen, no es fácil y éste constituye el objetivo último de los métodos de mapeamiento.

Para facilitar el análisis del ADN se ha recurrido a las enzimas de restricción, verdaderas microtijeras moleculares⁽⁵⁾ que pueden cortarlo en varias fracciones dependiendo de la existencia o no de los llamados sitios de restricción (secuencia que es reconocida por la enzima y donde realiza el corte), que son específicos para una enzima determinada. Hay cientos de estas enzimas que se pueden adquirir comercialmente. Fueron descubiertas por primera vez en las bacterias; éstas las utilizan para defenderse de los virus que las invaden, los cuales a su vez son secuencias de ADN o ARN.

El ADN de una bacteria que tiene una determinada enzima de restricción, se encuentra marcado de una forma especial, de manera que ésta no le causa daño, sino que más bien destruye a los virus invasores o fagos.

Una vez que se obtienen dichos fragmentos, se pueden fabricar constructos con el ADN de otros organismos, lo que se denomina ADN recombinante. El ADN al cual se ligan los fragmentos que interesa estudiar (por medio de otra enzima denominada ligasa), generalmente tiene la cualidad de autorreplicarse cuando se introducen en un huésped apropiado; estos constituyen los llamados vectores de clonación (VC)⁽⁶⁾. Se trata de plasmidios (elementos de ADN que se encuentran dentro de las bacterias), bacteriófagos (virus que infectan bacterias) o cósmidos (combinación de plásmidos y bacteriófagos) que al replicarse dentro de un huésped (generalmente una bacteria), multiplican el ADN que se ha insertado, originando así muchas copias o clones del mencionado fragmento. Si se divide el genoma entero de una especie dada, y cada una de esas fracciones se une a un vector de clona-

miento, y éstos a su vez se introducen en bacterias, se formarán colonias, cada una de las cuales tiene muchas copias de una fracción determinada; el conjunto de dichas colonias constituye la biblioteca de genes de dicha especie⁽⁷⁾. Junto con estos vectores se introducen marcadores que pueden ser detectados macroscópicamente por técnicas de hibridación por fluorescencia y se pueden utilizar como guía cuando se busca estudiar una porción del genoma que está cerca de este marcador (lo cual se puede determinar por estudios de ligamento).

El objetivo de tener clones identificables es el de tener suficiente material disponible para realizar todos los ensayos que sean necesarios cuando se busca un gen dado en una determinada región del genoma, ya que las técnicas que se utilizan requieren tener cierta cantidad material genético para realizar los análisis.

Los cromosomas artificiales de levadura son también vectores de clonación. El primer propósito por el cual fueron diseñados, provino de los genetistas que trabajan con levaduras, los cuales tenían el propósito de utilizarlos para estudiar mejor la estructura y el comportamiento cromosómico⁽⁸⁾. sin embargo, Olson y colaboradores en 1987, implementaron una nueva técnica con el propósito de poder clonar fragmentos más largos de ADN humano en *Saccaromyces cerevisiae* que los que se podía clonar en los cósmidos, lo cual facilitaría el mapeo de los genes humanos⁽³⁾. Dividir el genoma humano en fracciones lo suficientemente pequeñas como para poder introducirlo todo en cósmidos, requeriría más de 100.000 clones, en comparación de los 10.000 que requieren las bibliotecas genómicas hechas a partir de YACs⁽⁹⁾.

Los YACs poseen los elementos para propagar un cromosoma en las levaduras, es decir, un centrómetro, un origen de replicación y dos telómeros, así como marcadores que permiten la detección de los clones en cultivo⁽¹⁰⁾. Pueden permitir el aislamiento de un ADN de hasta unas 1.000 kilobases*, que es el tamaño parecido al de un

cromosoma de levadura, pero mucho más pequeño que el tamaño de un cromosoma humano⁽¹¹⁾.

* 1 kilobase= 1000 nucleótidos

CROMOSOMAS ARTIFICIALES HUMANOS ⁽¹²⁾

Diez años más tarde, en 1997, Harrington y colaboradores, del Departamento de Genética y de Centro de Genética Humana de Cleveland, Ohio, desarrollaron este otro tipo de cromosoma artificial.

Uno de sus principales propósitos era estudiar la estructura y comportamiento de los cromosomas en los mamíferos y en especial del ser humano, ya que estos tienen estructuras mucho más complejas que los cromosomas de las levaduras, cuyo funcionamiento ya se conoce bastante bien. Los cromosomas humanos tienen un tamaño 100 veces mayor que el de sus homólogos de la levadura y sus centrómetros tienen varias megabases de ADN satélite alfa y se unen a varias docenas de microtúbulos, durante la migración celular. Se llama ADN satélite, porque al examinar la densidad de flotación del ADN genómico completo en una columna de Cesio, este tipo ADN presenta una densidad de flotación menor que el resto del ADN, y por lo tanto se sitúa en una banda distinta en la columna. El ADN satélite alfa es un tipo de ADN extragenómico (o sea que es no codificante ni tiene relación con los genes) que tiene secuencias de nucleótidos altamente repetidas que se presentan en forma de acúmulos o grupos de entre 100 y 5.000 kilobases de longitud.

Otro de sus propósitos, era crear un prototipo que se pudiera convertir en un medio de transferencia de genes en la terapia génica. La terapia génica busca corregir los genes defectuosos que causan las enfermedades genéticas, introduciendo genes normales. Los métodos de transferencia de genes que están siendo mayormente utilizados en los ensayos preclínicos, incluyen a los vectores virales y no virales. En la terapia génica, el término vector, tiene una connotación ligeramente distinta a la de los vectores de clonación. En este caso se trata de un

término genérico que incluye a los diversos medios biológicos, químicos o físicos que se utilizan para transferir genes a las células ⁽¹³⁾. Los vectores virales y no virales han presentado dificultades en lo que concierne constancia en la expresión del gen introducido. Factores inmunológicos contra las células que tienen el nuevo gen introducido por virus modificados, y la poca estabilidad de los genes introducidos por los vectores no virales, son una de las principales dificultades observadas ⁽¹⁴⁾. Varios de estos problemas podrían ser superados una vez que los HAC sean perfeccionados.

La hipótesis de trabajo de estos investigadores al momento de intentar crear estos cromosomas artificiales consistió en que si se transfectaban constructos largos en tandem de ADN satélite alfa, junto con fragmentos de ADN genómico y constructos de ADN telomérico, se podrían conseguir una variedad de combinaciones únicas, algunas de las cuales tendrían todos los elementos (aque- llos elementos básicos mencionados anteriormente) para formar un micromosoma mitóticamente estable, substancialmente más pequeño que los cromosomas humanos endógenos.

Estos elementos fueron transfectados a la línea celular del fibrosarcoma humano HT1080 y se obtuvieron 3 tipos de nuevas estructuras cromosómicas que contenían ADN satélite alfa.

En el primer tipo, el ADN satélite alfa fue integrado en el brazo de un cromosoma humano endógeno.

En el segundo, este elemento se localizaba en el extremo de un cromosoma endógeno, el cual parecía haber sido truncado, si se le comparaba con los homólogos normales vistos en la línea HT1080.

El tercer tipo de estructura se trataba de un microcromosoma de novo, en el cual se localiza el ADN satélite alfa transfectado, así como ADN genómico conteniendo orígenes de replicación y ADN telomérico.

Luego de 6 meses de cultivo, se retuvieron los microcromosomas en todos los clones en un alto

porcentaje (29-100%), lo que da una eficiencia de segregación por generación de 99,5% a 99,9%.

Esta gran estabilidad, así como la falta de inmunogenicidad que se espera tengan estos microcromosomas, podría constituirlos en las herramientas ideales para la terapia génica. Aún se encuentran en una fase muy preliminar de experimentación. Falta conocer más sobre la arquitectura nuclear, y sobre su tolerancia a recibir material genético externo, así como posibles interferencias de este nuevo material en el funcionamiento del engranaje nuclear. Resta además saber cómo funcionan otros elementos de regulación de la estructura del comportamiento cromosómico que optimicen su futura utilización como vehículos terapéuticos.

Tanto los cromosomas artificiales humanos, como los de levadura, constituyen un buen ejemplo de como la ciencia está utilizando los elementos que encuentra en la naturaleza para fabricar nuevas estructuras que no son el resultado de una experiencia evolutiva de millones de años como la que posee todo el aparato biológico.

REFERENCIAS

1. *Mueller RF, Young ID: Chromosomes. En: Parkinson M (ed): Emery's Elements of Medical Genetics. Edinburgh: Churchill Livingstone 1995;24.*
2. *Rosenfeld M: Human artificial chromosomes get real. Nature Genetics 1997;15(4):333-35.*
3. *Thompson M, McInnes R, Willard H: The Human Gene Map: Gene Mapping Genetics in Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1991;176-78.*
4. *Brown TA: The Human Genome. En: Genetics, a molecular approach. London : Champman & Hall 1992; 290-95.*
5. *Grisolía S, Moreno-Palanques R: El proyecto Genoma Humano. En: Romeo Casabona CM (ed) Genética Humana. Monografías. Cátedra de Derecho y Genoman Humano. Fundación BBV. Bilbao:1995;35.*
6. *Singer M, Berg P: The Recombinant DNA Breakthrough. En: Stein S (ed) Genes & Genomes. University Science Books: Oxford 1991;233-41.*
7. *Griffiths A, Miller J, Suzuki D et al: Recombinant DNA. En: An Introduction to Genetic Analysis. W.H. Freeman*

-
- and Company. New York: 1993;423.*
8. Murray AW, Szostak JW. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 1983;305 (5931):189-93.
 9. Alberts B, Bray D, Lewis J et al: *Recombinant DNA Technology*. En: Robertson M (ed) *The molecular Biology of the Cell*. New York 1994;314-15
 10. Lewin B: *The Genome is packaged into chromosomes*. En: *Genes V*. Oxford University Press. Oxford 1994;794.
 11. Jorde L, Carey J, White R: *Gene Mapping*. En: Underdown E (ed) *Medical Genetics*. Mosby. St. Louis 1995;145-46.
 12. Harrington J, Van Bokkelen G, Mary R, Gustashaw K, Willard H: Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nature Genetics* 1997;15(4):345-55.
 13. Zhdanov RI, Kutsenko NG, Fedchenko VI. Nonviral methods of gene transfer in gene therapy. *Vopr Med Khim* 1997;43(1):3-12.
 14. Wagner JA, Gardner P. Toward cystic fibrosis gene therapy. *Annu Rev Med* 1997;48:203-16.