

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA EN RUMIANTES.

Por
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
Apartado Postal 3-4125
Monterrey, N.L., MEXICO 64460
Teléfono: (528)333 77 47
Fax: (528)333 77 47

I. INTRODUCCION

I. Ingeniería Genética

El método más reciente de ingeniería genética es la introducción de fragmentos específicos de ADN a vehículos recombinantes y su posterior integración en bacterias, método conocido como clonación molecular (ver la figura 1). Con la ayuda de estos vehículos moleculares es posible obtener grandes cantidades de clones recombinantes en bacterias. Como resultado de este proceso se pueden obtener grandes cantidades de clones recombinantes en el laboratorio.

La clonación molecular de genes recombinantes en bacterias es el primer paso a que muchos de los investigadores se dedican a finales de los sesenta. Liberman et al. (1968) fueron los primeros en obtener clones recombinantes de ADN. Al utilizar un vector bacteriano recombinante de ADN, el autor (por sus trabajos) obtuvo clones recombinantes de ADN. Posteriormente, el autor (por sus trabajos) obtuvo clones recombinantes de ADN del vector de bacterias. Este tipo de clones recombinantes se han utilizado para la clonación de genes recombinantes en la Universidad de California, San Diego en 1972 la primera muestra recombinante consistente en híbridos de plásmidos de virus SV40 que contienen genes de *Haemophilus coli* (Jackson y cols., 1973).

Por otro lado, en el primer año de trabajo de investigación en el laboratorio de bacterias, se realizó en 1973 por los Doctores Barrera Saldaña y colaboradores, también de la Universidad de California, se comenzó a trabajar en el área de ingeniería genética (Barrera Saldaña y cols., 1973).

El éxito de estas manipulaciones genéticas depende de la calidad de los clones recombinantes que se obtienen y de la eficiencia de la transformación de bacterias. Para la clonación de genes recombinantes en bacterias se debe utilizar un gen y algunas enzimas que permitan la transformación de bacterias recombinantes en la industria y la medicina.

Hay que tener en cuenta que el clon y el gen, por ejemplo del genoma bovino, se reproducen según:

- 1) Se debe tener un gen recombinante de bacterias.
- 2) Se debe tener un gen recombinante de bacterias.
- 3) Se debe tener un gen recombinante de bacterias.
- 4) Se debe tener un gen recombinante de bacterias.
- 5) Se debe tener un gen recombinante de bacterias.

I. INTRODUCCION

1. Ingeniería Genética.

El método más poderoso de la ingeniería genética es la introducción de fragmentos específicos de ADN a vehículos moleculares y su propagación en bacterias: método conocido como clonación molecular (ver la figura 1). Con la ayuda de estos vehículos moleculares es posible obtener grandes cantidades del gen eucariótico deseado o de su ARN mensajero (copiado a ADN por transcripción inversa), propagando en un medio bacteriano la molécula recombinante que lo contiene. Como vehículos moleculares se usan principalmente plásmidos bacterianos modificados en el laboratorio.

La creación de moléculas de ADN recombinante fué posible gracias a que muchas de las endonucleasas o enzimas de restricción descubiertas a finales de los sesentas, liberan extremos de cadena sencilla o "pegajosos" cuando hacen sus cortes altamente específicos en el ADN. Al volverse a aparear (por complementariedad de bases) fragmentos liberados del ADN de cualquier célula, con extremos "pegajosos" del mismo tipo (es decir liberados por la misma enzima de restricción) del ADN del vehículo, se producen moléculas híbridas o recombinantes. Estas requieren de ser tratadas con la enzima ADN ligasa para unir las covalentemente.

Usando estos procedimientos, el Dr. Paul Berg y sus colaboradores en la Universidad de California, construyeron en 1972 la primera molécula recombinante, consistente en híbridos "quimeras" del virus SV40 que contenían genes de *Escherichia coli* (Jackson y cols., 1972).

Por otro lado, en el primer experimento de clonación molecular con plásmidos bacterianos realizado en 1973 por los Doctores Herbert Boyer, Stanley Cohen y sus colaboradores, también de la Universidad de California, se construyeron híbridos de dos plásmidos diferentes (Cohen y cols., 1973).

El éxito de estas manipulaciones abrió las puertas a la realización de nuevos experimentos con ADN aislado ya sea de microorganismos, plantas o animales, para insertarlos en vehículos de clonación bacterianos. Estas construcciones permitirían investigar y manipular en detalle un gen y dejaba entrever posibles explotaciones comerciales, tales como la producción de proteínas recombinantes útiles en la medicina y la industria agropecuaria.

Muy brevemente, para clonar y aislar un gen, por ejemplo del genoma bovino, se siguen los siguientes pasos:

- 1) Se aísla ADN de alto peso molecular de linfocitos bovinos.
- 2) Se fracciona éste con enzimas de restricción.
- 3) Se introducen los fragmentos de ADN resultantes en vehículos moleculares, constituyéndose un banco de genes.
- 4) Se usa una sonda radiactiva de secuencia natural sintética, complementaria a una porción del gen que se pretende aislar, para identificar la clona que contiene dicho gen.
- 5) Se purifican cantidades suficientes del gen deseado.
- 6) Se caracteriza el gen en cuestión.

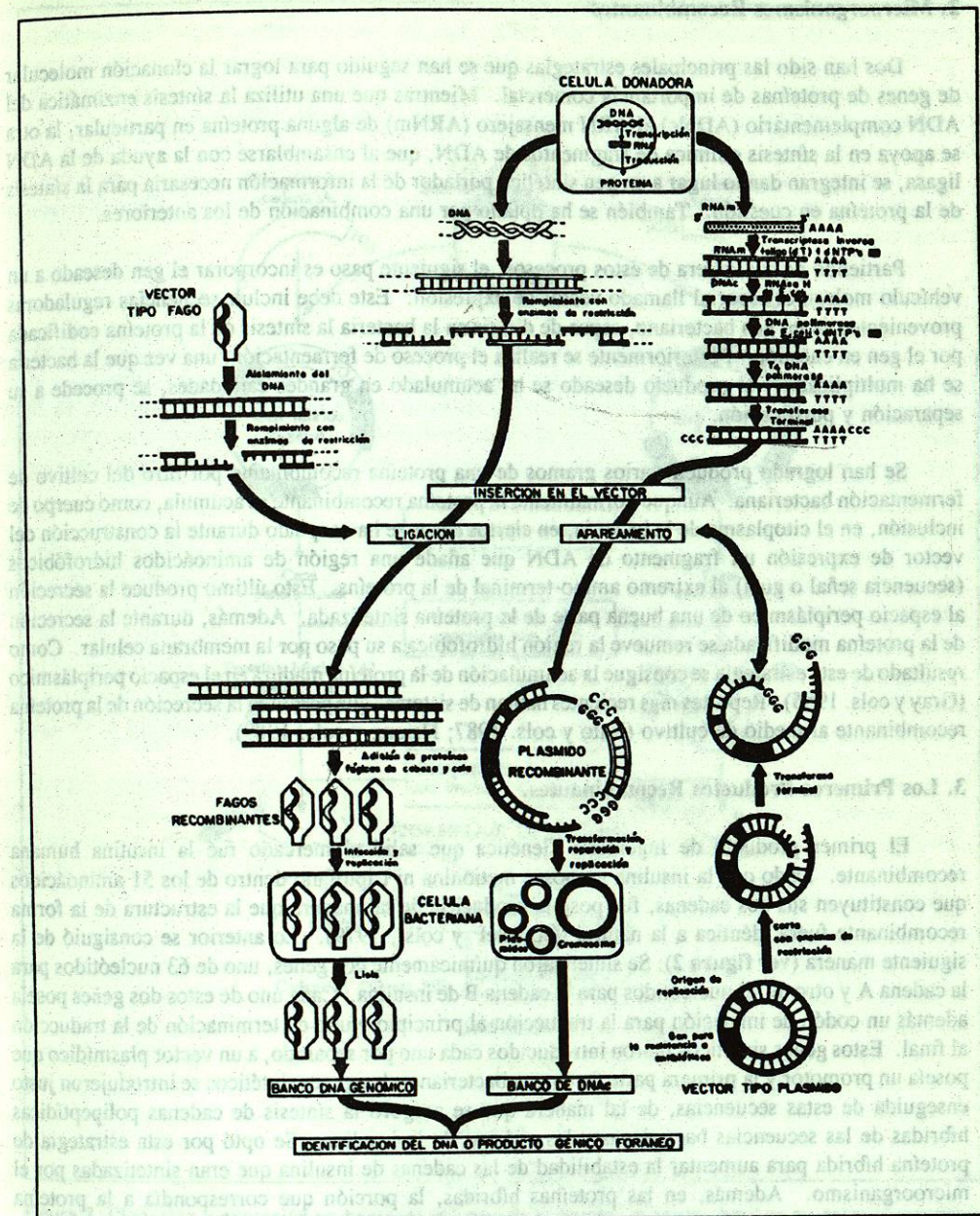


Figura 1. Principios básicos de clonación del genoma y del ADN complementario. Visión panorámica, a manera de resumen, de los principales métodos de clonación molecular.

2. Microorganismos Recombinantes

Dos han sido las principales estrategias que se han seguido para lograr la clonación molecular de genes de proteínas de importancia comercial. Mientras que una utiliza la síntesis enzimática de ADN complementario (ADNc) al ARN mensajero (ARNm) de alguna proteína en particular, la otra se apoya en la síntesis química de fragmentos de ADN, que al ensamblarse con la ayuda de la ADN ligasa, se integran dando lugar a un gen sintético portador de la información necesaria para la síntesis de la proteína en cuestión. También se ha optado por una combinación de los anteriores.

Partiendo de cualquiera de estos procesos, el siguiente paso es incorporar el gen deseado a un vehículo molecular especial llamado vector de expresión. Este debe incluir secuencias reguladoras provenientes de un gen bacteriano, capaz de dirigir en la bacteria la síntesis de la proteína codificada por el gen en cuestión. Posteriormente se realiza el proceso de fermentación; una vez que la bacteria se ha multiplicado y el producto deseado se ha acumulado en grandes cantidades, se procede a su separación y purificación.

Se han logrado producir varios gramos de una proteína recombinante por litro del cultivo de fermentación bacteriana. Aunque normalmente la proteína recombinante se acumula, como cuerpo de inclusión, en el citoplasma de la bacteria, en ciertos casos se ha acoplado durante la construcción del vector de expresión un fragmento de ADN que añade una región de aminoácidos hidrofóbicos (secuencia señal o guía) al extremo amino-terminal de la proteína. Esto último produce la secreción al espacio periplásmico de una buena parte de la proteína sintetizada. Además, durante la secreción de la proteína modificada se remueve la región hidrofóbica a su paso por la membrana celular. Como resultado de esta estrategia se consigue la acumulación de la proteína madura en el espacio periplásmico (Gray y cols. 1985). Reportes más recientes hablan de sistemas que permiten la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo (Kato y cols. 1987; Hsiung y cols. 1989).

3. Los Primeros Productos Recombinantes.

El primer producto de Ingeniería Genética que salió al mercado fue la insulina humana recombinante. Dado que la insulina no posee metionina ni triptófano dentro de los 51 aminoácidos que constituyen sus dos cadenas, fue posible producirla de tal manera que la estructura de la forma recombinante fuera idéntica a la natural (Goeddel y cols., 1979). Lo anterior se consiguió de la siguiente manera (ver figura 2): Se sintetizaron químicamente dos genes, uno de 63 nucleótidos para la cadena A y otro de 90 nucleótidos para la cadena B de insulina. Cada uno de estos dos genes poseía además un codón de iniciación para la traducción al principio y uno de terminación de la traducción al final. Estos genes sintéticos fueron introducidos cada uno por separado, a un vector plasmídico que poseía un promotor y la primera parte de un gen bacteriano. Los genes sintéticos se introdujeron justo enseguida de estas secuencias, de tal manera que se aseguró la síntesis de cadenas polipeptídicas híbridas de las secuencias bacterianas y las cadenas de la insulina. Se optó por esta estrategia de proteína híbrida para aumentar la estabilidad de las cadenas de insulina que eran sintetizadas por el microorganismo. Además, en las proteínas híbridas, la porción que correspondía a la proteína bacteriana estaba separada de la proteína humana por un residuo único de metionina. Al introducir estos plásmidos a *Escherichia coli*, se generaron las proteínas híbridas que contenían las cadenas A y

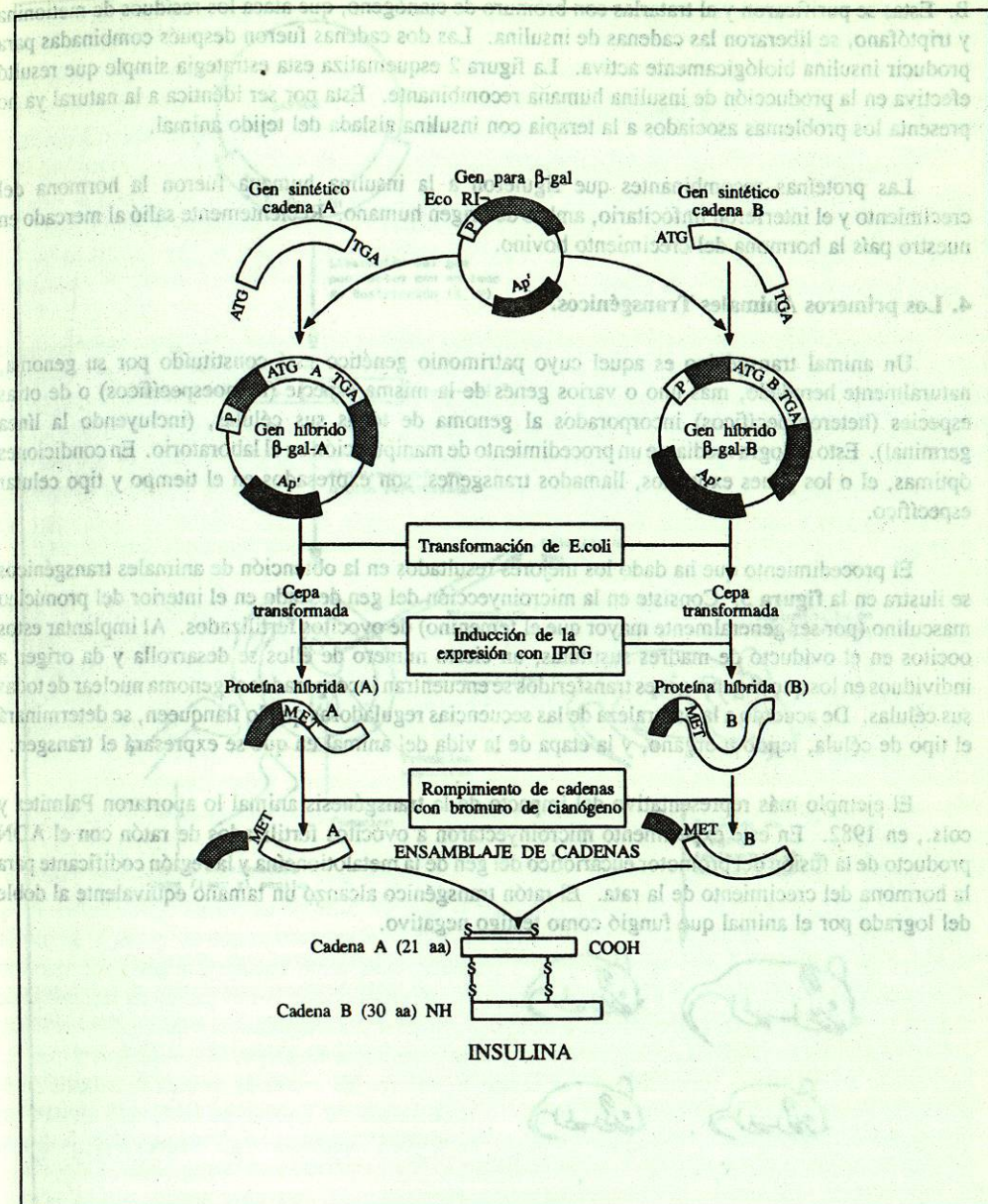


Figura 2. Clonación y expresión en bacterias del gen de la insulina humana. Aquí se muestra la estrategia que consiste en la síntesis por separado de las dos cadenas de la insulina. -gal = galactosidasa; P = promotor; ATG = codón de iniciación; TGA = codón de terminación; Ap^r = gen de resistencia a la ampicilina; A = cadena A de la insulina; B = cadena B de la insulina.

B. Estas se purificaron y al tratarlas con bromuro de cianógeno, que ataca los residuos de metionina y triptófano, se liberaron las cadenas de insulina. Las dos cadenas fueron después combinadas para producir insulina biológicamente activa. La figura 2 esquematiza esta estrategia simple que resultó efectiva en la producción de insulina humana recombinante. Esta por ser idéntica a la natural ya no presenta los problemas asociados a la terapia con insulina aislada del tejido animal.

Las proteínas recombinantes que siguieron a la insulina humana fueron la hormona del crecimiento y el interferón linfocitario, ambas de origen humano. Recientemente salió al mercado en nuestro país la hormona del crecimiento bovino.

4. Los primeros Animales Transgénicos.

Un animal transgénico es aquel cuyo patrimonio genético está constituido por su genoma naturalmente heredado, mas uno o varios genes de la misma especie (homoespecíficos) o de otra especie (heteroespecíficos) incorporados al genoma de todas sus células, (incluyendo la línea germinal). Esto se logra mediante un procedimiento de manipulación en el laboratorio. En condiciones óptimas, el o los genes exógenos, llamados transgenes, son expresados en el tiempo y tipo celular específico.

El procedimiento que ha dado los mejores resultados en la obtención de animales transgénicos se ilustra en la figura 3. Consiste en la microinyección del gen deseado en el interior del pronúcleo masculino (por ser generalmente mayor que el femenino) de ovocitos fertilizados. Al implantar estos ovocitos en el oviducto de madres sustitutas, un cierto número de ellos se desarrolla y da origen a individuos en los que el gen o genes transferidos se encuentran incorporados al genoma nuclear de todas sus células. De acuerdo a la naturaleza de las secuencias reguladoras que lo flanqueen, se determina el tipo de célula, tejido u órgano, y la etapa de la vida del animal en que se expresará el transgen.

El ejemplo más representativo del impacto de la transgénesis animal lo aportaron Palmiter cols., en 1982. En este experimento microinyectaron a ovocitos fertilizados de ratón con el ADN producto de la fusión del promotor eucariótico del gen de la metalotioneína y la región codificante para la hormona del crecimiento de la rata. El ratón transgénico alcanzó un tamaño equivalente al doble del logrado por el animal que fungió como testigo negativo.

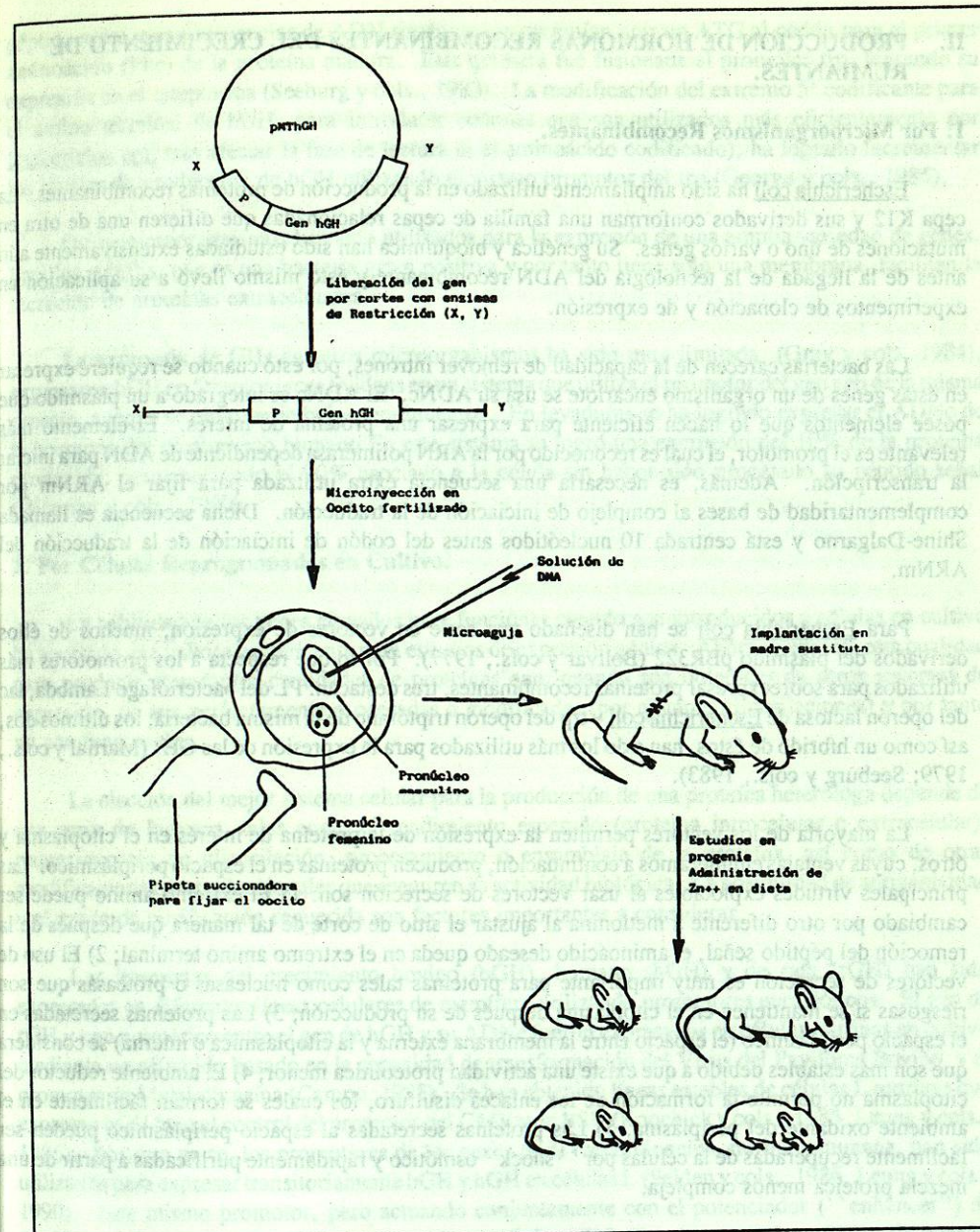


Figura 3. Producción de ratones transgénicos. Se resume como se obtuvieron ratones transgénicos gigantes producto de la sobreexpresión de la hormona del crecimiento humano, cuyo gen aunado a un promotor inducible se introdujo a embriones unicelulares por microinyección.

II. PRODUCCION DE HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO DE RUMIANTES.

1. Por Microorganismos Recombinantes.

Escherichia coli ha sido ampliamente utilizado en la producción de proteínas recombinantes. La cepa K12 y sus derivados conforman una familia de cepas relacionadas que difieren una de otra en mutaciones de uno o varios genes. Su genética y bioquímica han sido estudiadas extensivamente aún antes de la llegada de la tecnología del ADN recombinante y esto mismo llevó a su aplicación en experimentos de clonación y de expresión.

Las bacterias carecen de la capacidad de remover intrones, por esto cuando se requiere expresar en éstas genes de un organismo eucariote se usa su ADNc. El ADNc es integrado a un plásmido que posee elementos que lo hacen eficiente para expresar una proteína de interés. El elemento más relevante es el promotor, el cual es reconocido por la ARN polimerasa dependiente de ADN para iniciar la transcripción. Además, es necesaria una secuencia extra utilizada para fijar el ARNm por complementaridad de bases al complejo de iniciación de la traducción. Dicha secuencia es llamada Shine-Dalgarno y está centrada 10 nucleótidos antes del codón de iniciación de la traducción del ARNm.

Para Escherichia coli se han diseñado una serie de vectores de expresión, muchos de ellos derivados del plásmido pBR322 (Bolivar y cols., 1977). Por lo que respecta a los promotores más utilizados para sobreexpresar proteínas recombinantes, tres destacan: PL del bacteriófago Lambda, lac del operón lactosa de Escherichia coli y trp del operón triptófano de la misma bacteria; los últimos dos, así como un híbrido de éstos, han sido los más utilizados para la expresión de las GHs (Martial y cols., 1979; Seeburg y cols., 1983).

La mayoría de los vectores permiten la expresión de la proteína de interés en el citoplasma y otros, cuyas ventajas enumeramos a continuación, producen proteínas en el espacio periplásmico. Las principales virtudes explotables al usar vectores de secreción son: 1) El extremo amino puede ser cambiado por otro diferente a metionina al ajustar el sitio de corte de tal manera que después de la remoción del péptido señal, el aminoácido deseado queda en el extremo amino terminal; 2) El uso de vectores de secreción es muy importante para proteínas tales como nucleasas o proteasas que son riesgosas si se mantienen en el citoplasma después de su producción; 3) Las proteínas secretadas en el espacio periplásmico (el espacio entre la membrana externa y la citoplásmica o interna) se considera que son más estables debido a que existe una actividad proteolítica menor; 4) El ambiente reductor del citoplasma no permite la formación de los enlaces disulfuro, los cuales se forman fácilmente en el ambiente oxidante del periplasma; 5) Las proteínas secretadas al espacio periplásmico pueden ser fácilmente recuperadas de la células por "shock" osmótico y rápidamente purificadas a partir de una mezcla proteica menos compleja.

La hormona del crecimiento bovino (bGH) ha sido expresada en Escherichia coli siguiendo varias estrategias. En 1981, Keshet y cols. construyeron una fusión del gen de la β -lactamasa con el ADNc de bGH y detectaron la proteína de fusión principalmente en citoplasma. bGH fué expresada sin su

péptido señal y con secuencias de ADN sintético que permitan unir un ATG al codón para el primer aminoácido (Phe) de la proteína madura. Esta quimera fué fusionada al promotor trp, logrando su expresión en el citoplasma (Seeburg y cols., 1983). La modificación del extremo 5' codificante para el amino terminal de bGH, para introducir codones que son utilizados más eficientemente por Escherichia coli (sin afectar la fase de lectura ni el aminoácido codificado), ha logrado incrementar los niveles de producción de bGH utilizando el mismo promotor del trp (George y cols., 1985).

Otros microorganismos han sido utilizados para la expresión de una amplia variedad de genes. Bacillus subtilis, que es una bacteria gram positiva y por tanto tiene solo una membrana, facilitan la secreción de proteínas extracelulares.

La expresión de GHs en otros microorganismos ha sido muy limitada, (Gray y cols., 1984), expresaron bGH en Streptomyces lividans en un sistema que utiliza el promotor del gen aph de la misma especie, aunque se obtuvieron bajos rendimientos. En levaduras se ha logrado expresar el ADNc de la hormona del crecimiento humano. En este sistema se logró una excreción del 10% de la proteína producida, permaneciendo el 90% asociado a la célula sin haber sido procesado su péptido señal (Hitzman y cols., 1990).

2. Por Células Reprogramadas en Cultivo.

La habilidad de los genes clonados para funcionar cuando son introducidos a células en cultivo ha aportado una valiosa herramienta para estudios de expresión génica. Ahora se explota esta cualidad para producir abundantes cantidades de proteínas que, cuando son obtenidas de otros sistemas de expresión, no son perfectamente procesadas o modificadas (por ejemplo glicosilaciones) y por tanto no son funcionales.

La elección del mejor sistema celular para la producción de una proteína heteróloga depende de una serie de factores, tales como el rendimiento esperado (proteína intracelular o extracelular), requerimientos de glicosilación, procesamiento o ensamblaje de la proteína, así como de otras modificaciones postraduccionales que aseguren su actividad biológica. La posibilidad de antigenicidad y el grado de purificación requerida son factores importantes a considerar.

Las hormonas del crecimiento bovino (bGH), humano (hGH) y de rata (rGH) han sido expresadas en diferentes líneas celulares de mamífero utilizando promotores eucarióticos. El gen de rGH y uno quimérico entre el gen de hGH y su ADNc fueron expresados en células murinas en cultivo mediante un plásmido basado en la capacidad de transformación del Virus del Papiloma Bovino y el promotor de Metalotioneína (Campo, 1985). Se han obtenido líneas estables de células L murinas que expresan bGH bajo el control del promotor del CMV y de RSV (Kopchick y cols., 1985, Leung y cols., 1986). Por otra parte, los promotores de los genes de la metalotioneína murina y humana, han sido utilizados para expresar transitoriamente bGH y hGH en células L (Selden y cols., 1986, Leung y cols., 1990). Este mismo promotor, pero actuando conjuntamente con el potenciador ("enhancer") de SV40 condujo a niveles mayores de expresión en células CHO (Friedman y cols., 1989). En nuestro laboratorio hemos logrado la expresión tanto del gen como del ADNc de hGH y el ADNc de bGH bajo el control transcripcional del promotor del CMV en células COS-7 (Ramírez-Solís y cols., Alvidrez-Quihui, 1990).

3. En Animales Transgénicos.

La transgénesis o transferencia de genes en animales intactos puede ser llevada a cabo por diferentes métodos: transfección de embriones preimplantatorios mediante cocultivos con retrovirus, trasplante de células embrionarias pluripotenciales al blastocisto, microinyección de embriones unicelulares, y otras. La técnica más empleada ha sido la microinyección de embriones, la cual ha demostrado ser hasta ahora más confiable que las anteriores (Castro y de la Fuente. 1988). Ya que pueden ser introducidas mutaciones específicas a un animal vía transgénesis, se ha podido generar modelos animales para enfermedades genéticas del humano. Así mismo la transgénesis ha contribuido a avanzar nuestro entendimiento sobre muchos aspectos de la Biología moderna, desde el origen y mecanismo de la acción de oncogenes, hasta el desciframiento de las reglas del sistema inmune pasando por el esclarecimiento de varios enigmas del desarrollo.

La transgénesis tendrá su mayor impacto en la ingeniería genética de animales de interés pecuario al utilizar las hormonas del crecimiento recombinantes. Estudios en cerdos transgénicos utilizando bGH lograron niveles de expresión de la hormona que van desde 23 hasta 1600ng/ml en plasma. Siguiendo este estudio en generaciones sucesivas de cerdos, éstos mostraron mejorías en ganancia diaria de peso, eficiencia alimenticia y una reducción de la grasa subcutánea. Sin embargo, los niveles elevados de bGH también actúan en detrimento de la salud del animal transgénico, aunque esto es una consecuencia de la exposición prolongada a bGH y no a la naturaleza de la GH. Se ha observado una alta incidencia de úlceras gástricas, artritis y cardiomegalias entre otros efectos secundarios, además hay una alta mortalidad en cerdos juvenes (Pursel y cols., 1989).

III. RUMIANTES TRANSGENICOS COMO BIORREACTORES.

Una aplicación alternativa para la ganadería transgénica es utilizarla como un sistema de producción para proteínas de valor comercial, particularmente de aquellas proteínas que no pueden ser producidas satisfactoriamente a partir de micro-organismos recombinantes. Es posible dirigir la síntesis de una proteína particular hacia un tejido corporal específico del animal transgénico si se combinan los elementos genéticos reguladores de un gen específicamente expresado en el tejido deseado, con las secuencias codificantes del gen para la proteína deseada. Se considera a la glándula mamaria como el órgano más adecuado para estos propósitos.

Después de la demostración en 1987 de la producción de activador tisular del plasminógeno en la leche de ratonas lactantes (Gordon, K. y cols. 1987), la producción de proteínas de origen humano y de valor farmacéutico en rumiantes transgénicos surgió como una posibilidad atractiva. Esta llamada "ganadería o granja molecular" es una posibilidad que resulta atractiva en virtud de que ofrece el potencial de una producción volumétrica extremadamente alta (la leche de rumiantes contiene decenas de gramos de proteína por litro), bajos costos de operación, las modificaciones pos-traduccionales que algunas proteínas requieren para su actividad biológica, y una ilimitada reproducción del biorreactor.

Recientemente han aparecido informes comunicando significativos progresos en la ganadería molecular; en algunos casos se han logrado niveles de producción de hasta 35 g de la proteína de interés por litro de leche del animal biorreactor. A continuación se describen dos de éstos:

1. Factor IX humano producido en la leche de borregos transgénicos.

El factor IX (FIX), con peso molecular de 56,000 daltones, es el zimógeno de una serin-proteasa (Factor IXa), componente esencial de la vía intrínseca de la cascada de la coagulación sanguínea. Deficiencias en FIX están ligadas al cromosoma X y resultan en hemofilia B, la cual ocurre en uno de cada 30,000 varones. En la actualidad, pacientes que sufren de hemofilia B son tratados con plasma humano o con preparaciones parcialmente purificadas de FIX. Este tratamiento tiene riesgo de exponer a los pacientes a contaminantes tales como los virus que causan hepatitis o SIDA.

FIX es normalmente sintetizado en el hígado y sufre muchas modificaciones post-traduccionales previas a su secreción. El grado y complejidad de modificaciones post-traduccionales del FIX hacen probable que la producción de la proteína biológicamente activa sea alcanzable solo a través de la expresión de clones recombinantes introducidos a células de eucariotes superiores. En efecto, un buen número de líneas celulares de cultivo celular a las que se les introdujo el gen expresan FIX biológicamente activo, aunque a bajos niveles.

Se escogió al gen ovino de la β -lactoglobulina (oBLG) que codifica para una proteína de la leche, para derivar los elementos genéticos necesarios para expresión específica de glándula mamaria. Dado que se desconoce la organización precisa de los elementos genéticos que en el gen oBLG dictan la expresión específica de glándula mamaria, se optó por construir una fusión de este gen con el ADNc del FIX. Las secuencias nucleotídicas codificantes para la proteína FIX, fueron insertadas en la región 5' no-traducible (ver figura 4 para ubicar esta región en la anatomía de un gen típico) del primer exon