

Desarrollo de minicromosomas de eucariotas superiores

A. Villasante* y C. Tyler-Smith**

*Centro Nacional de Biotecnología. Madrid.

**Department of Biochemistry. University of Oxford.

Introducción

Actualmente se acepta que para el tratamiento definitivo de las enfermedades genéticas se tendrá que actuar directamente sobre el gen mutado. Este nuevo concepto de terapia se conoce como terapia génica y se puede conseguir completando la información genética defectiva mediante la introducción de genes normales, adición génica, o reemplazando las secuencias mutadas por las normales, corrección génica.

Durante los últimos 10 años se han desarrollado distintos métodos de transferencia génica en células de mamífero tales como la coprecipitación de ADN y fosfato cálcico, la encapsidación de ADN en liposomas, la electroporación, la microinyección directa en el núcleo y el uso de vectores virales. En todos estos métodos el ADN exógeno introducido se integra en el genoma predominantemente al azar (un caso de recombinación homóloga por cada 10^3 casos de integración no homóloga). La adición génica tiene dos inconvenientes: a) la integración de las secuencias exógenas puede producir mutagénesis por inserción, y b) la expresión del transgén muestra efecto de posición y alcanza niveles muy inferiores al del gen normal¹.

Idealmente, estos problemas no deberían existir si se realiza corrección génica mediante recombinación homóloga, pero, de forma inesperada, se está observando que durante la recombinación se producen nuevas mutaciones². De confirmarse la aparición de un elevado número de mutaciones durante la recombinación homóloga en células de mamífero, será imposible utilizar esta técnica para la terapia génica

Construcción de cromosomas artificiales

Los dos principales inconvenientes de la adición génica desaparecerán si se evita la integración en el genoma del ADN exógeno. Esto se conseguirá si se desarrolla un nuevo tipo de vector, el «minicromosoma de eucariotas superio-

res», que haría posible la construcción de cromosomas artificiales bien definidos, similares a los de levaduras. Igual que ocurrió en las levaduras, el paso previo para la consecución de este objetivo es clonar y caracterizar los centrómeros y telómeros de eucariotas superiores.

Los telómeros son estructuras especializadas presentes en los extremos del cromosoma. Estos permiten la replicación completa del cromosoma y le confieren estabilidad al protegerle de fusiones y degradaciones. En la actualidad se han aislado las secuencias de ADN teloméricas de varios organismos superiores, incluido el hombre^{3,4} y el mecanismo de su actuación se comienza ahora a entender⁵.

El centrómero es la región del cromosoma por la que éste se une a los microtúbulos del uso mitótico o meiótico. Este perfecto acoplamiento es uno de los requisitos para una segregación correcta durante la mitosis y meiosis. Aunque la base molecular de esta unión todavía es desconocida, se acepta que las proteínas que median la interacción con los microtúbulos están asociadas directa o indirectamente con secuencias de ADN centromérico^{6,7}.

En contraste con el conocimiento que se tiene sobre las secuencias teloméricas, todavía no se han aislado secuencias de ADN que funcionen como centrómero en organismos superiores. La causa principal de este fracaso se debe a que la región centromérica de los cromosomas es heterocromática, y la heterocromatina está compuesta por secuencias de ADN satélite que son difíciles de clonar en *E. coli*. La presencia de ADN satélite en las regiones centroméricas también dificulta la obtención de mapas físicos de estas zonas. Sólo recientemente está siendo posible realizar mapas de estas regiones al poder separar, mediante electroforesis en gel de campo pulsante, los grandes fragmentos de ADN que se generan tras la digestión con enzimas de restricción que no constan dentro de las secuencias repetidas⁸⁻¹⁰. Igualmente, la utilización hoy día de las levaduras (*S. cerevisiae*)

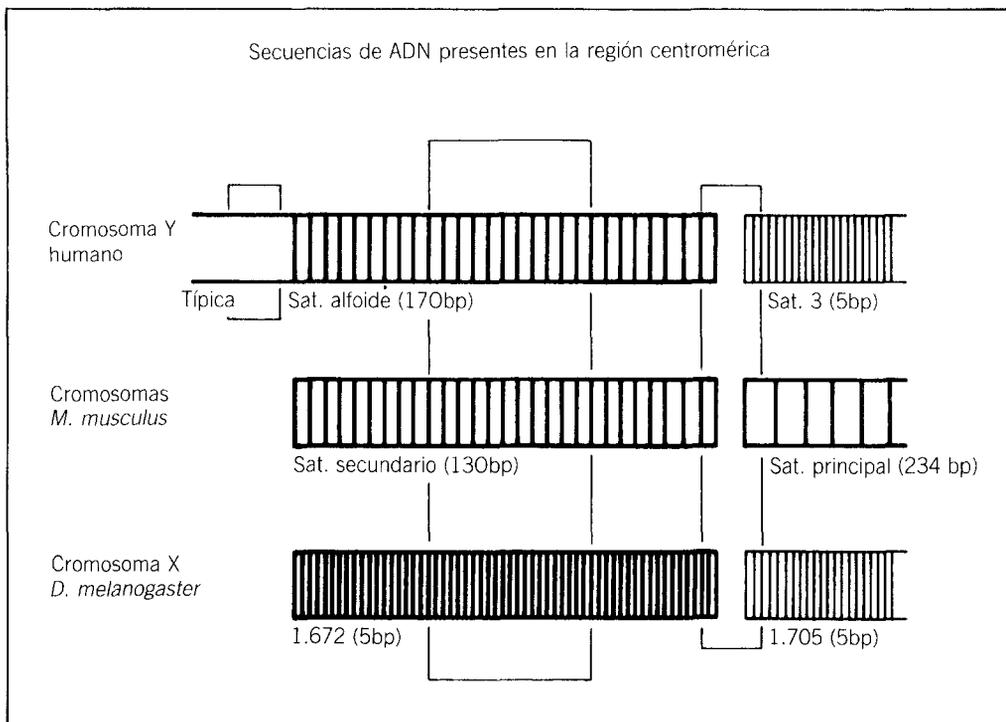


Fig. 1. Representación esquemática de la disposición de los bloques de ADN satélite en las regiones centroméricas.

como huéspedes de grandes fragmentos de ADN exógeno¹¹, plantea de nuevo la posibilidad de clonar en levaduras grandes fragmentos de secuencias repetidas. El sistema de clonaje se basa en la construcción *in vitro* de cromosomas artificiales de levaduras (YAC) que, una vez introducidos en éstas mediante transformación, se comportan como un cromosoma más. El clonaje en levaduras está siendo posible gracias al hecho, mencionado con anterioridad, de que las regiones funcionales de sus cromosomas (centrómeros, telómeros y secuencias de replicación autónoma) estaban clonadas y bien caracterizadas de antemano. Es importante destacar aquí que, si los cromosomas artificiales se comportan como cromosomas normales, la alta frecuencia de recombinación homóloga en levaduras hará posible el cambio de cualquier secuencia en dichos cromosomas artificiales, por otras que hayan sido manipuladas y mutadas en *E. coli*¹².

Basándose principalmente en la evidencia circunstancial de los experimentos de hibridación *in situ* se ha sugerido que los centrómeros de

eucariotas superiores están compuestos de grandes bloques de secuencias de ADN satélite. En la figura 1 se muestra un esquema de la disposición de los satélites en la región centromérica del cromosoma Y humano, de los cromosomas de ratón y del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*.

Análisis del ADN alfoide del cromosoma Y humano

El ADN satélite alfoide del genoma humano se compone de una familia de secuencias con una periodicidad de 170 bp que se encuentra en el centrómero de cada cromosoma^{13,14}. Utilizando ADN alfoide como sonda se ha construido recientemente el mapa de la región centromérica del cromosoma Y humano¹⁵. La distribución de los lugares de restricción sugiere que las secuencias a un lado del bloque alfoide podrían ser ADN eucromático típico, mientras que las secuencias del otro lado serían otro bloque de secuencia simple (fig. 2).

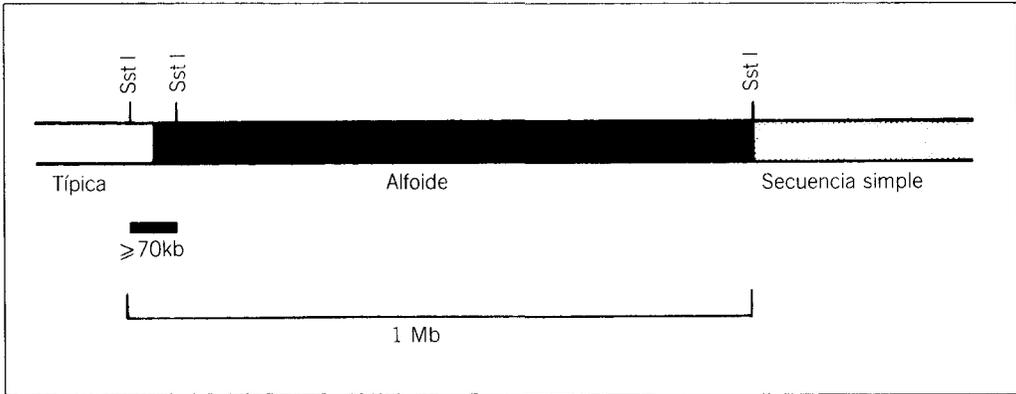


Fig. 2. Secuencias de ADN presentes en la región centromérica del cromosoma Y de la levadura OXEN.

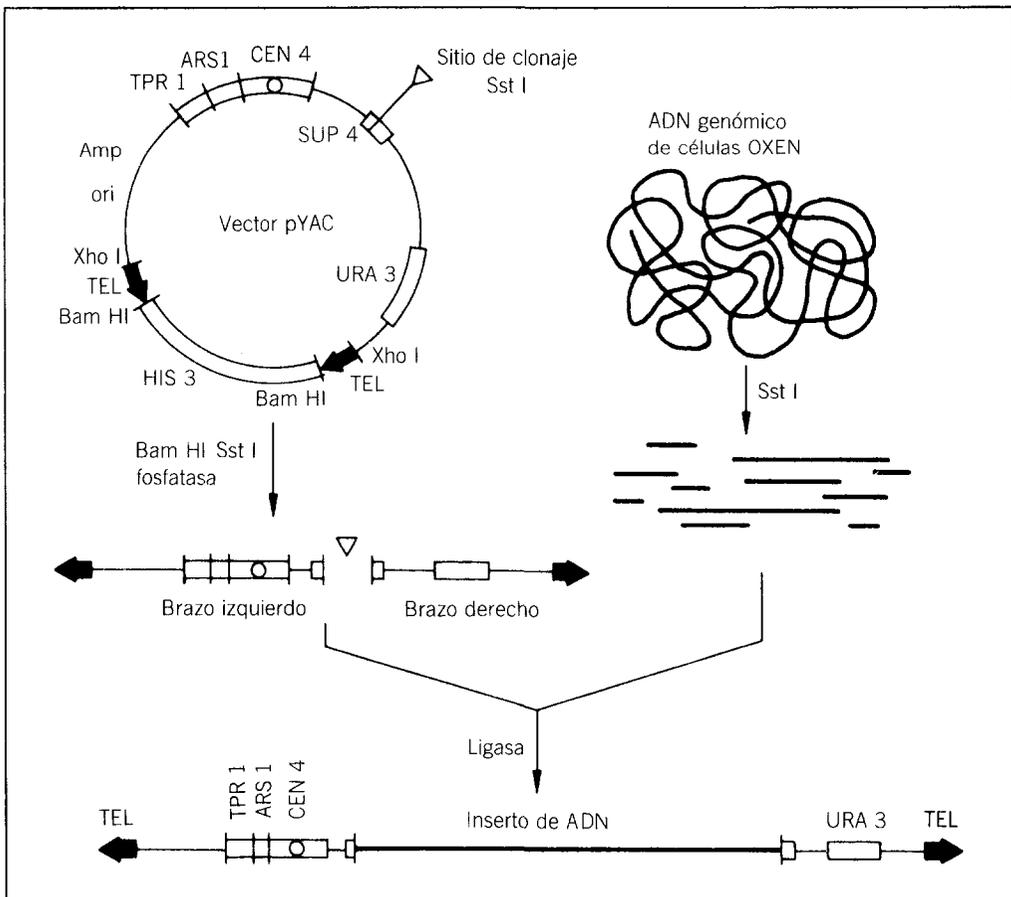


Fig. 3. Construcción de una genoteca en levaduras utilizando cromosomas artificiales de levaduras (YAC) como vector.

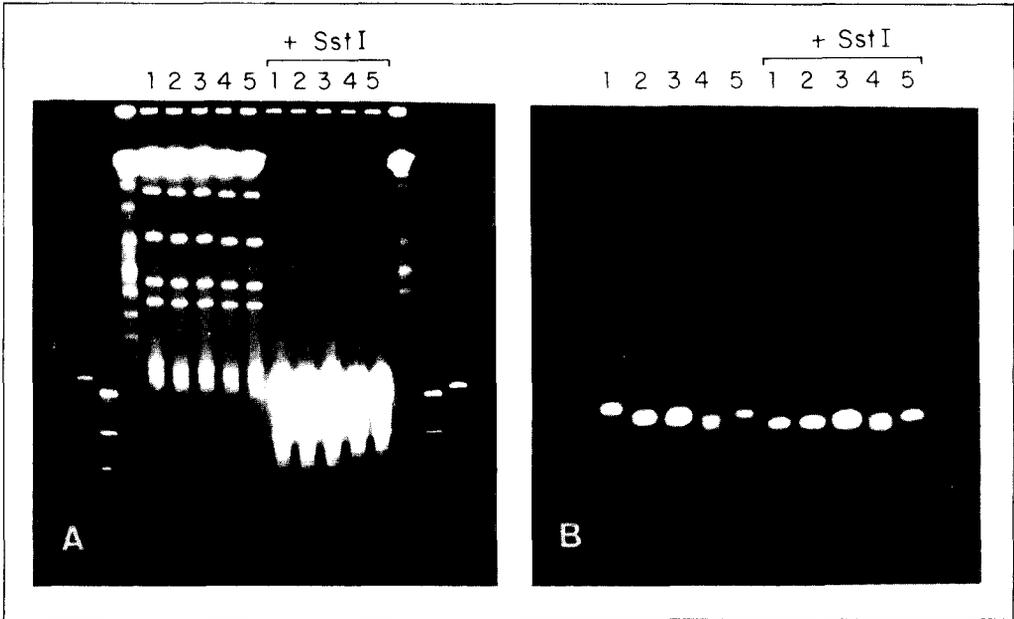


Fig. 1. Análisis de los YAC positivos mediante electroforesis en gel de campo pulsante. A: Gel mostrando la separación de los cromosomas normales y artificiales teñido con bromuro de etidio; B) autorradiograma que muestra la hibridación de los YAC (sin digerir y digeridos con *SstI*) con la sonda alfoide.

Conocido el mapa físico, el paso siguiente en el aislamiento de un centrómero funcional es clonar distintos fragmentos de esta región para, por una parte, realizar un análisis estructural más profundo, y por otra, investigar la presencia de secuencias centroméricas mediante algún ensayo funcional. Actualmente estos objetivos pueden ser alcanzados si, tras clonar distintos fragmentos en YAC, éstos son reintroducidos en células humanas para el estudio de su estabilidad mitótica.

Para comprobar que este tipo de estudios es realizable, se decidió comenzar clonando un fragmento *SstI*-*SstI* (≥ 70 kb) que en las células humanas OXEN (células con cuatro cromosomas Y) se encuentra en el borde del bloque alfoide con la secuencia típicamente eucromática (fig. 2). La construcción de la genoteca en levaduras se muestra en la figura 3; el ADN genómico de las células OXEN se dirigió totalmente con el enzima *SstI*, se ligó a los brazos del vector pYAC y los cromosomas sintéticos producidos se introdujeron en las levaduras mediante transformación.

Utilizando como sonda un ADN alfoide proveniente del cromosoma Y se analizaron unos 100.000 clones. Aunque inicialmente un número bastante alto de clones mostró hibridación

en condiciones normales (clones alfoides de distintos cromosomas), finalmente sólo 5 clones presentaron hibridación en condiciones muy restringidas. El análisis de estos 5 clones, mediante electroforesis en gel de campo pulsante (fig. 4), mostró que el tamaño de los minicromosomas es el esperado. La confirmación de que estos clones provienen del cromosoma Y se realizó dirigiéndolos con *EcoRI* y comprobando que presentaban el patrón de bandas típico de la secuencia alfoide de este cromosoma. Por último, para comprobar definitivamente que se había clonado el fragmento deseado, se realizaron digestiones dobles informativas del ADN de uno de los clones y del ADN genómico de las células OXEN. En la figura 5 se muestra que efectivamente el ADN del clon en cuestión y el ADN genómico tienen fragmentos comunes. Este resultado, además de confirmar la posibilidad de clonar en levaduras estas secuencias repetidas, muestra que su propagación en levaduras no las ha alterado.

Conclusión

Como conclusión se puede decir que la posibilidad de clonar completamente la región centromérica de los cromosomas permitirá en el fu-

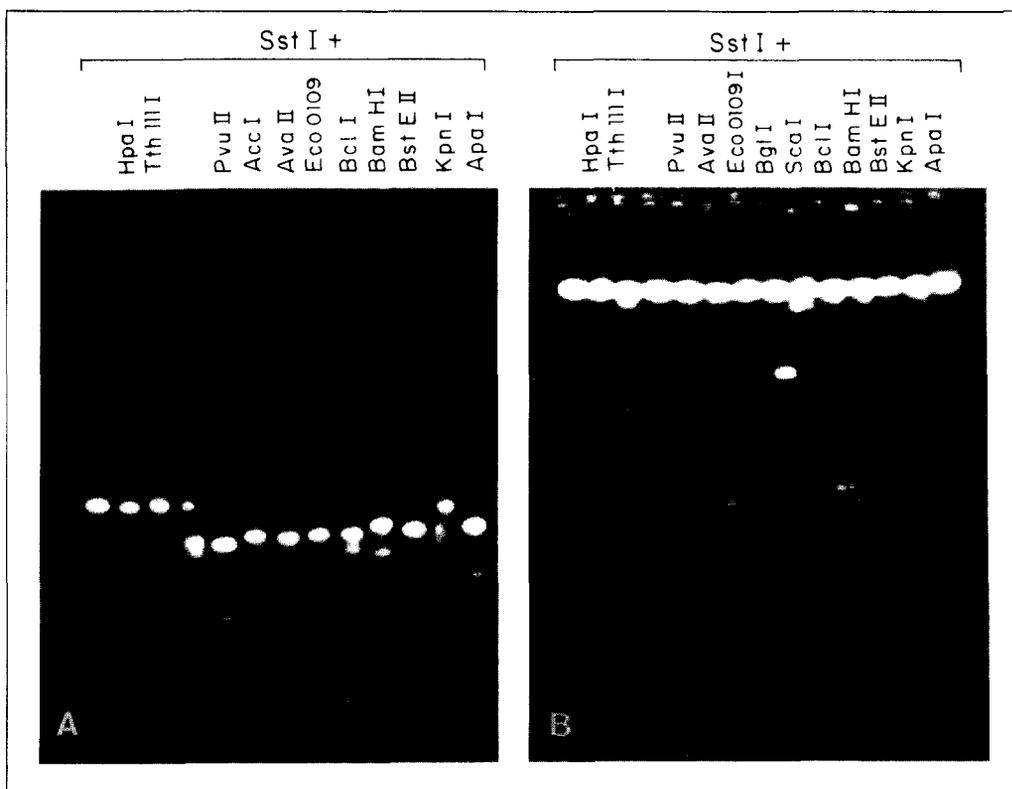


Fig. 5. Comparación de los distintos fragmentos de restricción presentes en el ADN de un YAC positivo y en el ADN genómico de células OXEN. A) Autorradiograma que muestra la hibridación de digestiones dobles del ADN de la levadura con la sonda alfoide; B) autorradiograma que muestra la hibridación de digestiones dobles del ADN humano con la sonda alfoide.

turo identificar la secuencia centromérica funcional necesaria para la construcción *in vitro* de minicromosomas de eucariotas superiores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grosveld F, Blom van Assendelft G, Greaves DR, Kollias G. Position-Independent, high-level expression of the human β -Globin Gene in Transgenic mice. *Cell* 1987; 52: 975-985.
2. Brinster RL, Braun RE, Lo D, Avarbock MR, Oram F, Palmiter R. Targeted correction of a major histocompatibility class II E α gene by DNA microinjected into mouse eggs *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7.087-7.091.
3. Moyzis RK, Buckingham JM, Scott Cram L et al. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG) $_n$, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6.622-6.626.
4. Brown WRA. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* 1989; 338: 774-776.
5. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987; 1: 887-898.
6. Villasante A, Corces VG, Manso-Martínez R, Avila J. Binding of microtubule protein to DNA chromatin: Possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic acids and assembly of the microtubule structure. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 895-908.
7. Avila J, Montejo de Garcini E, Wandosell F, Villasante A, Sogo JM, Villanueva N. Microtubule-associated protein MAP 2 preferentially binds to a dA/dT sequence present in mouse satellite DNA. *EMBO J* 1983; 2: 1.229-1.234.
8. Brown WRA, Bird AP. Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. *Nature* 1986; 322: 477-481.

9. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 65-75.
10. Sothorn EM, Anand R, Brown WRA, Fletcher DS. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5.925-5.943.
11. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; 236: 806-812.
12. Rothstein RJ. One-step gene disruption in yeast. *Meth Enzymol* 1983; 101: 202-211.
13. Manuelidis L. Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 1978; 66: 23-32.
14. Willard HF. Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 524-532.
15. Tyler-Smith C. Structure of repeated sequences in the centromeric region of the human Y chromosome. *Development* 1987; 101 (supl.): 93-100.

DISCUSIÓN

F. MURILLO: Mi pregunta es, ¿cómo realizar la prueba de funcionalidad del centrómero?

A. VILLASANTE: Actualmente, la única prueba de funcionalidad posible es una vez clonada la zona correspondiente reintroducirla en la célula adecuada. En el caso del centrómero humano las opciones posibles son introducir el microcromosoma mediante la fusión de leva-

das y células humanas, por ejemplo, o bien microinyectarlo directamente en el núcleo. Nosotros hemos probado la fusión levaduras-células humanas y ha fracasado, no sé si debido a carencia de funcionalidad o a fracaso de la fusión propiamente dicha. Ahora nos proponemos estudiar un modelo de *Drosophila*.