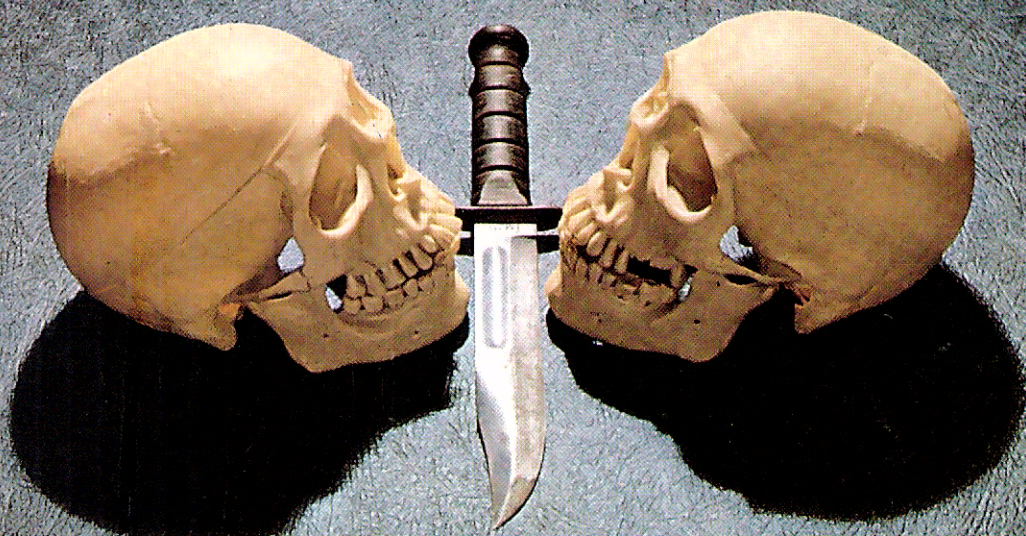


LA ESCANDALOSA
Y POLEMICA HISTORIA
DE LAS OLIMPIADAS

JULIO 1980 150 PESETAS

DOSSIER
ANALISIS
DEL
TERRORISMO



UN ARMA MOLECULAR UNA REVOLUCIONARIA HERRAMIENTA QUE NOS VIENE DE LAS BACTERIAS

por el Dr. Pedro Puigdoménech

SI LA historia del progreso científico se describe por sucesivas revoluciones, la presente, la que se está produciendo en este momento es la revolución de la biología. A principios de este siglo la física cambió totalmente la forma como vemos el mundo material. En los años cincuenta y sesenta la electrónica puso las bases de técnicas que están modificando incluso la vida cotidiana. Los actuales avances de la biología, de la biología molecular para ser concretos, están ya modificando a la vez la visión que tenemos del mundo de los seres vivos y comenzando a afectar aplicaciones de la medicina.

Conocer toda la información que lleva consigo un ser vivo y le permite alimentarse, reproducirse o atacar a otro organismo no es ya posible, se ha hecho. Hacer que una bacteria produzca una hormona humana o que un conejo produzca una proteína de un ratón son técnicas en muchos casos de rutina en muchos laboratorios. Y esto es sólo el comienzo, las casas comerciales se preocupan seriamente por patentes mientras las autoridades públicas se preguntan sobre las aplicaciones y peligros a que pueden dar lugar los nuevos descubrimientos.

Sin embargo en la base de toda revolución científica existe un progreso técnico acumulado durante años que da lugar a nuevas posibilidades, que permite ir más a fondo en los problemas, contrastar hipótesis. Una de las características más evidentes de la actual revolución de la biología es la utilización a fondo de los propios métodos que las células usan para sus funciones. Son las mismas funciones biológicas las que se están empleando para estudiar, modificar y aplicar las posibilidades casi ilimitadas del mundo biológico. Entre estas herramientas destaca el uso exhaustivo de los enzimas. Son éstas proteínas

que tienen propiedades específicas para realizar funciones necesarias a la célula. Entre estos enzimas en cuanto a su uso en los nuevos avances de la biología destacan los denominados enzimas de restricción.

Del interés de los enzimas de restricción nos podemos dar cuenta por dos datos indirectos. Por una parte el Premio Nobel de 1978 fue otorgado a los tres científicos que primero descubrieron, estudiaron y utilizaron tales sustancias. Por otra parte repasando los catálogos de las más importantes firmas comerciales suministradoras de productos biológicos observaremos que cada año incluyen un mayor número de tales enzimas y a precios comparables con los de las más preciadas sustancias para la joyería. En la actualidad un miligramo de un enzima de restricción puede sobrepasar el precio de los 2.000.000 de pesetas!

La base de este interés extraordinario por moléculas que nos son conocidas desde hace unos quince años reside en su actividad y en las aplicaciones a que dan lugar. Pero si pensamos que gracias a ellas podemos conocer a su nivel más profundo el material genético, lo que diferencia una especie de otra, un individuo de otro; si pensamos que gracias a ellas estamos conociendo como se expresa este material genético para dar lugar a las funciones, las formas que vemos en los organismos vivos; y sobre todo si pensamos que gracias a ellos es posible actuar sobre este material genético, rompiéndolo, recomponiéndolo, mezclándolo, abriendo las puertas a este mundo de aplicaciones insospechadas que es la ingeniería genética. Si pensamos todo esto no deberemos maravillarnos del interés que éstas hasta hace poco curiosidades de la naturaleza, los enzimas de restricción, están despertando y creando casi hasta una carrera del oro a su alrededor.

LAS BACTERIAS TAMBIEN SE DEFIENDEN

En el largo curso de la evolución biológica los microorganismos han ido adaptándose a las condiciones cambiantes del medio y de la presencia de otras especies. Así encontramos bacterias que, parasitando a organismos superiores, producen enfermedades y otras, como las de nuestro intestino, que han adoptado hábitos de simbiosis. Estas bacterias que en algunos casos pueden infectarnos pueden ser a su vez infectadas por otros organismos más primitivos que ellas, los virus.

Los virus son los organismos vivientes más sencillos que existen, tanto es así que no pueden reproducirse sin usar los mecanismos de otras células. De esta forma muchos virus son capaces de introducirse en el interior de las bacterias y allí transformarlas de forma que su principal actividad consista justamente en reproducir al virus. Cuando el virus ya se ha reproducido y está a punto para volver al medio exterior muchas veces destruye a la bacteria y se lanza al asalto de nuevas bacterias. A veces este mecanismo de destrucción de la célula no se da sino sólo su transformación, algo que está relacionado con la aparición de tumores provocados por virus. En cualquier caso los virus son terribles enemigos de las bacterias y por esta razón éstas han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse. Los enzimas de restricción forman parte de uno de tales mecanismos.

La forma como funciona este sistema de "inmunidad" bacteriana se comprende fácilmente considerando como son estos terribles atacantes que son los virus. Y en este funcionamiento encontraremos las razones del interés extraordinario por los enzimas de restricción. Los virus son en algunos casos organismos conocidos en sus más íntimos detalles y ello es debido en gran parte a que consisten en general únicamente de una molécula de ácido nucleico (DNA o RNA) en la cual lleva codificada toda la información necesaria para su actividad, y una envoltura de protección compuesta de proteínas y que puede ser más o menos compleja. Se conoce con detalle cómo el virus llega a infectar una bacteria y en este proceso suele haber una etapa en la que el virus hace un orificio en la pared de la bacteria por el que introduce su molécula de ácido nucleico, de esta forma la bacteria queda

transformada ya que posee su propia información genética y la del virus. De todo ello lo interesante es que en este momento de la infección el virus es muy vulnerable ya que ha perdido su protección de proteínas, por tanto la molécula de ácido nucleico está desnuda, y su destrucción implicaría la desaparición de la infección. De romper moléculas de ácidos nucleicos se encargan los enzimas de restricción.

Sin embargo, lo interesante de estos enzimas no es el hecho de que rompan ácidos nucleicos únicamente. En la naturaleza tenemos toda una gama de enzimas capaces de romper ácidos nucleicos, son lo que llamamos nucleasas. Algunas de éstas intervienen simplemente en la digestión y por eso las encontramos por ejemplo en el páncreas. Lo interesante, lo peculiar de los enzimas de restricción no es que sean capaces de romper ácidos nucleicos sino la forma en que lo hacen. Y para comprender esto hay que tener en cuenta también su función biológica. Porque, claro está, las bacterias no pueden tener en su interior unas moléculas que corten indiscriminadamente todos los ácidos nucleicos que encuentren ya que podrían destruir su propio material genético guardado en moléculas de ácido nucleico y ello equivaldría a la muerte del organismo. Por ello los enzimas de restricción van unidos a un sutil mecanismo de reconocimiento de los ácidos nucleicos que les permite distinguir los propios de los intrusos.

COMO DISTINGUIR A UN INTRUSO

Los ácidos nucleicos son largas moléculas lineales formadas por la unión de cuatro unidades fundamentales que denominamos nucleóticos. Existen principalmente dos clases de ácidos nucleicos que denominamos DNA y RNA; es en el primero de ellos donde se almacena la información genética y el que es atacado por los enzimas de restricción. Los cuatro elementos que forman al DNA los designamos por cuatro letras A, T, G y C. En este alfabeto de cuatro letras está escrita toda la información que requiere el organismo para su sobrevivencia. La lista de los nucleóticos ordenados es lo que denominamos la secuencia del DNA y es ésta la que nos informa acerca de las distintas actividades del organismo. Lo interesante en cuanto a los enzi-

mas de restricción es que romper el DNA no es en secuencias muy precisas una de nuestras bacterias *E. coli*, podemos de restricción denominar el DNA en los puntos de secuencia GAATTC rompan la G y la primera A.

El que sean capaces tan precisos es la bacteria pero es también fundamental ya que proporciona un mecanismo para distinguir el DNA propio que el DNA de cada organismo de las bacterias. En la bacteria se reproduce toda la molécula de DNA que de la propia molécula. En la bacteria existe un enzima que reconoce la misma secuencia de la enzima de restricción modifica los nucleótidos que lo forman. La enzima de restricción que la bacteria inmunidad contra los virus sin degradar el propio DNA.

Hay que decir sin embargo que los enzimas de restricción no indican el comportamiento de las bacterias. En realidad se usan en aplicaciones, al menos en biología molecular. Algunas de las propiedades, por ejemplo el hecho de que ciertos de estos enzimas cortan, tras unirse al DNA de él como si tiraran de una cuerda a una cierta distancia cortan. Es interesante que durante la acción de la enzima se toma la molestia de hacerlo en forma de hélice quedando en el bucle. Los enzimas necesitan de un mecanismo genético para realizar su acción ocurre en los enzimas de restricción que son utilizados. En cuanto a los que nos interesan tienen como su utilidad el que son capaces de cortar el DNA y no por cualquier

mas de restricción es que éstos son capaces de romper el DNA no en cualquier punto sino en secuencias muy precisas. Por ejemplo en una de nuestras bacterias intestinales, la *Escherichia Coli*, podemos encontrar un enzima de restricción denominado Eco R1 que corta el DNA en los puntos en los que hay la secuencia GAATTC rompiendo la cadena entre la G y la primera A.

El que sean capaces de romper en puntos tan precisos es la base de sus aplicaciones pero es también fundamental para su función, ya que proporciona un mecanismo para distinguir el DNA propio de los extraños. Y es que el DNA de cada organismo tiene modificaciones específicas. En efecto, cuando la bacteria se reproduce tiene que producir una molécula de DNA que es una réplica exacta de la propia molécula. Cuando esto se produce existe un enzima que es capaz de reconocer la misma secuencia que reconoce el enzima de restricción modificando alguno de los nucleótidos que lo forman. Y los enzimas de restricción tienen la propiedad de que no cortan el DNA si hay algún nucleótido específico modificado. El conjunto de estos dos procesos, modificación y restricción, es lo que da a la bacteria inmunidad contra infecciones exteriores sin degradar el propio material genético.

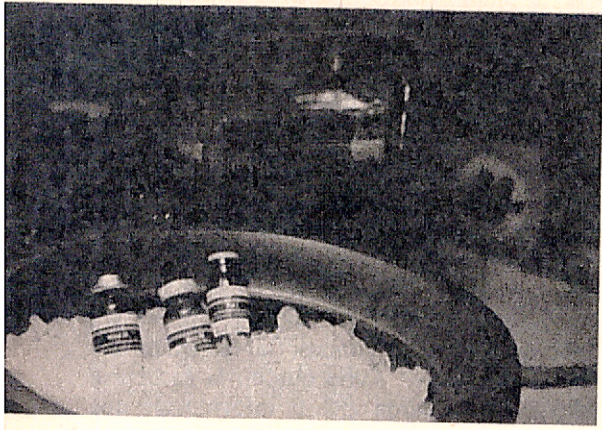
Hay que decir sin embargo que no todos los enzimas de restricción que se conocen siguen el comportamiento general que hemos indicado. En realidad se distinguen varias clases de enzimas de restricción y no todos tienen aplicaciones, al menos por ahora, en biología molecular. Algunos de ellos tienen curiosas propiedades, por ejemplo, se ha descubierto que ciertos de estos enzimas reconocen secuencias específicas del DNA pero no las cortan, tras unirse al ácido nucleico "tiran" de él como si tiraran de una cuerda y al llegar a una cierta distancia cortan el ácido nucleico. Es interesante que durante este proceso el enzima se toma la molestia de enrollar cuidadosamente en forma de hélice el DNA que va quedando en el bucle. Estos enzimas acostumbran a necesitar de un cierto aporte energético para realizar su actividad, cosa que no ocurre en los enzimas de restricción comúnmente utilizados. En cualquier caso los que nos interesan tienen como principal razón de su utilidad el que son capaces de romper el DNA y no por cualquier sitio sino cuando en

el ácido nucleico se da una secuencia determinada.

EN LO MAS INTIMO DE LOS SERES VIVOS

Las curiosidades de la actuación de los enzimas de restricción quizás hubieran merecido un estudio a fondo pero el interés actual por estas moléculas procede de sus aplicaciones. Y una de las aplicaciones más comunes de los enzimas de restricción es porque sin ellos es imposible conocer la secuencia del DNA. Ya hemos dicho que en la secuencia del DNA se guarda toda la información que hace a una especie o a un individuo genéticamente diferente de otro. Por esto el conocimiento más profundo de un ser vivo nos lo da el conocimiento de la secuencia de su DNA. Hoy conocemos ya la secuencia completa de algún organismo, en realidad de algún pequeño virus, y esto nos permitirá comprender los mecanismos de su actuación, de su infección y reproducción. Y también conocemos ya la secuencia de algún gen de organismos superiores incluyendo el del hombre y esto nos está permitiendo profundizar a una velocidad increíble en como funcionan las células de las que todos estamos compuestos.

En la actualidad conocer la secuencia de un fragmento de DNA si lo tenemos puro es algo muy sencillo que se hace en cuestión de pocos días aunque cuente con centenares de nucleótidos. Esta es una técnica que se ha desarrollado a extremos de facilidad tan grande que sólo con la ayuda de computadores podemos asimilar una cantidad tan grande de información. Sin embargo la secuenciación de DNA plantea un problema gravísimo y que viene derivado de la gran longitud de estas moléculas. En efecto, si en lugar de un virus que posee un DNA de "sólo" unos pocos miles nucleótidos, lo que queremos es secuenciar un fragmento de DNA que forma parte de una cadena cuyos nucleótidos se cuentan por millones nos encontraremos con problemas ya desde el momento de extraer las moléculas de DNA de las células. Pensemos que los DNA de organismos superiores son moléculas cuya longitud real la debemos medir en metros. Una molécula tan larga es imposible prepararla, manipularla, sin romperla. Tan solo trasvasándola de un recipiente a otro ya se observa que su viscosidad disminuye, signo inconfundible de que estamos rom-



Los enzimas de restricción llegan a valer precios altísimos pero al mismo tiempo son extremadamente delicados, por ello deben guardarse a bajas temperaturas y en presencia de sustancias estabilizadoras.

piendo la molécula. Por tanto en grandes moléculas de DNA, y esto vale incluso para el DNA de organismos tan sencillos como las bacterias, es prácticamente imposible no tener moléculas que no estén rotas. Pero el problema reside sobre todo en que estas roturas se habrán hecho al azar y por tanto tendremos una mezcla muy heterogénea de fragmentos que será imposible separar y por tanto no tiene ningún sentido tratar de secuenciarlos.

Para resolver el problema que hemos indicado es para lo que nos sirven los enzimas de restricción. Cuando tenemos un DNA cualquiera su gran longitud hace que incluso si sus cuatro nucleótidos están al azar, siempre hay presentes las secuencias que son reconocidas y rotas por cualquier enzima de restricción. Por tanto si tratamos un DNA que, desde luego, no sea demasiado heterogéneo y largo, obtendremos fragmentos que serán muy precisos y por tanto pueden ser separados y analizados y secuenciados. Si es necesario que los fragmentos no sean demasiado largos podemos tratar sucesivamente con varios enzimas de restricción de forma a obtener fragmentos que sean puros y de longitud adecuada para su secuenciación. Sin enzimas de restricción la secuenciación de DNA no hubiera podido darnos la cantidad de información al nivel más profundo de los seres vivos que en este momento está revolucionando nuestras concepciones de como funcionan las células.

MAPAS DE GENES

La secuenciación de todo el DNA de un organismo, incluso el de un pequeño virus, es un trabajo fundamental pero muy laborioso. Pensemos en el trabajo que representa secuenciar el DNA de un organismo superior lo que implica millones de nucleóticos. Hoy ya conocemos sin embargo fragmentos que contienen información valiosa sobre alguna proteína por ejemplo, incluso de la especie humana. Antes de llegar a este detalle último es interesante conocer en qué lugar se encuentra el gen para una actividad determinada. Por ejemplo, algo que ha sido muy estudiado es el de los genes en los que se guarda la información sobre las proteínas que transportan el oxígeno en la sangre, las hemoglobinas, o sobre ciertas hormonas. Y también es interesante conocer cuando se presentan ciertas variaciones de individuos a otros como en el caso de mutaciones o cuando un virus, por ejemplo, se introduce en el material genético de una bacteria. Para todo ello utilizamos también de forma necesaria a los enzimas de restricción.

Supongamos que tratamos con un enzima de restricción el DNA que contiene un gen determinado. Esto nos dará una colección de fragmentos determinada que podemos separar e identificar. Si por ejemplo en un sistema que estudiamos ocurre una mutación que podamos observar porque en él hay una función de la bacteria o del sistema estudiado podremos saber en que parte del gen se ha producido observando simplemente cambios en los fragmentos que se han producido al tratar éstos con enzimas de restricción. Con técnicas de este tipo es posible saber en cada parte del material genético donde se encuentran los diferentes genes y esto es fundamental para conocer los mecanismos de funcionamiento de la célula y probablemente para detectar donde se producen cambios en organismos que padecen enfermedades o malformaciones hereditarias. En todo ello ha sido muy importante el utilizar las técnicas de la ingeniería genética porque si queremos saber la estructura de una parte del material genético de un cierto organismo lo mejor es tomar el fragmento que interesa (utilizando enzimas de restricción, por supuesto) e introducirlo en una bacteria. A la velocidad a la que se reproducen estos microbios es posible obtener al cabo de un cierto tiempo una colonia, o un "clon" en el len-

guaje científico, que pueda ser suficiente para su estudio. Pueden aplicarse las técnicas de la ingeniería bacteriana para el estudio de organismos superiores.

LA INGENIERIA

Constituir bacterias con genes humanos, hacer que una bacteria tenga información de un organismo que ya se está haciendo, es algo que ya se está haciendo. Hacer que una bacteria produzca para la vacuna contra la rabia, es lo que llama cercano. Es lo que llama técnica y se trata solamente de aplicaciones casi ilimitadas. La ingeniería genética necesita de soldadores, éstos son los enzimas de restricción.

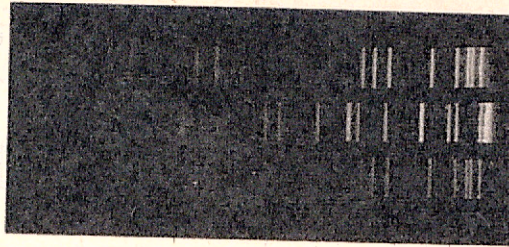
El caso más sencillo de ingeniería genética es lo que se denomina el clonaje en una bacteria. Esto significa constituir una colonia de bacterias que tengan en su interior material genético de otro organismo. Para hacer esto se necesita unir el DNA de un organismo a el de la bacteria. Una de las técnicas para seguir esto consiste en utilizar las diversas características de los enzimas de restricción. Por ejemplo, la razón de esto basta considerar las frecuencias que los enzimas de restricción rompen. Estas frecuencias dependen del tipo que se denomina el lenguaje escrito se llaman palabras, aquellas frases que se leen de la misma forma, el ejemplo es la palabra arroz a la zorra el abanico. El DNA que son reconocidos por los enzimas de restricción tienen esta misma característica. Ya hemos mencionado que una de las frecuencias es la GAATTC, es decir, considerar que el DNA está formado por dos cadenas complementarias que forman la doble hélice. En esta secuencia queda GAATTC en una cadena y CTTAAG en la otra, que como tiene la misma secuencia pero leídas en direcciones opuestas, es un típico palíndromo. En muchos mecanismos que se utilizan para que una proteína reconozca un palíndromo el DNA se sirven de palíndromo.

guaje científico, que posee este gen en cantidad suficiente para su estudio. De esta forma pueden aplicarse las técnicas de la microbiología bacteriana para el estudio de la genética de organismos superiores.

LA INGENIERIA GENETICA

Constituir bacterias que producen hormonas humanas, hacer que una célula de rata tenga información de un virus o de un conejo es algo que ya se está haciendo, es casi rutina. Hacer que una bacteria nos produzca la base para la vacuna contra la hepatitis está ya muy cercano. Es lo que llamamos ingeniería genética y se trata solamente del comienzo de unas aplicaciones casi ilimitadas. La ingeniería genética necesita de soldadores y de tijeras, y éstos son los enzimas de restricción.

El caso más sencillo de ingeniería genética es lo que se denomina el "clonaje" de un gen en una bacteria. Esto significa simplemente constituir una colonia de bacterias que contengan en su interior material genético procedente de otro organismo. Pero para hacer esto se necesita unir el DNA que nos interesa con el de la bacteria. Una de las maneras de conseguir esto consiste en utilizar simplemente las diversas características de la acción de los enzimas de restricción. Para comprender la razón de esto basta considerar el tipo de secuencias que los enzimas de restricción reconocen y rompen. Estas secuencias son siempre del tipo que se denomina palíndromes. En el lenguaje escrito se llaman palíndromes a aquellas frases que se leen en ambos sentidos de la misma forma, el ejemplo típico es: "Dá-bale arroz a la zorra el abad". Los puntos del DNA que son reconocidos por los enzimas de restricción tienen esta misma característica. Ya hemos mencionado que una de estas secuencias es la GAATTC, en ella hay que considerar que el DNA está formado por dos cadenas complementarias que forman la famosa doble hélice. En esta secuencia la doble hélice queda $\begin{matrix} \text{GAATTC} \\ \text{CTTAAG} \end{matrix}$ que como se puede observar tiene la misma secuencia en las dos cadenas pero leídas en direcciones contrarias, éste es un típico palíndromo. En realidad parece que muchos mecanismos que necesitan que una proteína reconozca un punto preciso del DNA se sirven de palíndromes.



Los fragmentos producidos por enzimas de restricción pueden separarse por la técnica conocida por electroforesis. En ésta los fragmentos son sometidos a un campo eléctrico en el interior de un gel. Los fragmentos corren a través del gel a velocidades que dependen de su peso molecular. En la fotografía un mismo DNA ha sido tratado con tres enzimas de restricción distintos dando, claro está, fragmentos distintos.

Lo que se ha descubierto que es característico de algunos enzimas de restricción es que no cortan por el centro de la estructura de reconocimiento sino por un punto lateral. El enzima Eco RI que hemos estado mencionando es un buen ejemplo de ello porque corta las dos cadenas complementarias entre los nucleótidos G y A. Por esta razón los dos fragmentos que quedan tienen en sus extre-

mos las secuencias siguientes: $\begin{matrix} \text{G} \\ \text{CTTAA} \\ \text{AATTC} \\ \text{G} \end{matrix}$ y $\begin{matrix} \text{G} \\ \text{CTTAA} \\ \text{AATTC} \\ \text{G} \end{matrix}$

De esta forma cuatro bases complementarias quedan formando un saliente por el extremo del fragmento. Esto es lo que se llama fragmentos pegajosos porque el hecho de tener estas bases complementarias por sus extremos hace que tiendan a volver a unirse con otros fragmentos que también las tengan. Si queremos unir dos fragmentos de DNA, lo que hacemos es romperlos con uno de estos enzimas y luego mezclamos los fragmentos y en condiciones adecuadas estos fragmentos se unen y con la ayuda de otro enzima, la ligasa, se realiza la "soldadura". Así habremos obtenido el híbrido de dos DNA, uno de ellos quizás era bacteriano y el otro humano, quizás uno era un virus y el otro procedía del conejo. Los enzimas de restricción han hecho fáciles avances que hasta hace poco eran simplemente impensables, por eso se han convertido en una de las más poderosas armas de la moderna biología molecular.

Dr. P. P.