

La localización de genes en los cromosomas de mamíferos

JEAN-LOUIS GUENET

Instituto Pasteur de París

28, Rue du Dr. Roux. 75015 París, Cedex, France

INTRODUCCION

En la actualidad todos los genetistas coinciden en que el mapeo genético exacto es esencial tanto para los estudios en el hombre como para los que se realizan en otros mamíferos a nivel de laboratorio (2, 4, 7). Por esta razón, en los últimos cincuenta años se han utilizado diversas técnicas para localizar los genes de los mamíferos en los cromosomas de una especie determinada. En este trabajo presentaremos todas estas técnicas, con énfasis especial en las más recientes, las cuales representan un verdadero descubrimiento en la genética formal.

LAS TECNICAS CLASICAS PARA EL MAPEO GENETICO Y SUS LIMITACIONES

Cuando dos genes se unen tienen la tendencia de cosegregar durante generaciones sucesivas; mientras más estrecho sea el "linkage", más absoluta será la cosegregación. Este es el principio fundamental del mapeo genético que durante muchos años se ha aplicado exitosamente a todas las especies, incluidas las plantas. En mamíferos como el hombre y el ratón, el descubrimiento continuo de genes marcadores dispersos en todo el genoma ha facilitado el mapeo de nuevos genes, de manera que en la actualidad poseemos mapas de linkage más detallados de estas dos especies (en particular del ratón), que los que existen para otros mamíferos.

En el ratón pueden establecerse apareamientos especiales, con las reservas apropiadas, para probar el posible linkage autosomal después de dos rondas reproductivas sucesivas: en general se utilizan los retrocruzamientos cruzados y se reservan los cruzamientos para estudios en los que está afectada la viabilidad o la fecundidad del mutante homocigótico de interés.

En el hombre, las investigaciones relacionadas con el linkage están basadas en los análisis del *pedigree*.

En otras palabras, para ambas especies es necesario definir como punto de partida la situación en la cual los dos genes son heterocigóticos, ya sea en la *repulsión* A+/B+ o en el acoplamiento AB/++, y buscar los cambios en esta configuración después de un ciclo reproductivo (formas de acoplamiento que dan lugar a formas de repulsión y viceversa). Por último, se realiza

el conteo del porcentaje o frecuencia de estos eventos de recombinación. A menor frecuencia, mayor linkage.

En el nivel poblacional se han ensayado otros enfoques para probar los linkages posibles.

Uno de estos métodos utilizados en poblaciones humanas es el *lod score*, donde se encuentran frecuencias de asociación anormalmente altas entre genes conocidos como no alélicos y se cuantifican dentro de muestras de poblaciones no relacionadas.

En el ratón el uso de *cepas congénicas*, y sobre todo de cepas consanguíneas recombinantes (R.I.S.), ha demostrado gran utilidad. El uso de esta última, la R.I.S., para detección del linkage ha sido revisado extensamente por TAYLOR B.A., que la ha considerado como un "F2 congelado" que segrega para muchos caracteres.

Aunque durante muchos años estas técnicas clásicas han demostrado ser muy útiles, también poseen algunos inconvenientes, así como dos grandes limitaciones intrínsecas:

Los inconvenientes mencionados están relacionados no sólo con el tiempo, como ocurre en el caso de los estudios con modelos humanos, sino también con los costos, ya que, por ejemplo, se necesita cruzar varios cientos de ratones para probar el linkage hipotético o para asegurar la precisión necesaria, ya que por definición deben efectuarse tantas "recombinaciones" como sea posible para poder detectar o establecer con precisión un linkage estrecho. También surgen inconvenientes adicionales cuando, por ejemplo, en el ratón muchos genes mutantes provocan reducciones en la viabilidad o estos no aparecen plenamente expresados en todos los portadores. En estos casos puede hacerse imposible la determinación de la verdadera proporción de segregación, y por tanto, la proporción de los recombinantes en los cruces del linkage.

Las dos limitaciones fundamentales surgen a causa de:

- La metodología del mapeo permite detectar exclusivamente el linkage de los genes marcadores ya conocidos. Por definición, el linkage no es detectable si el gen bajo estudio está "lejos" de todos los demás genes conocidos. Si se presenta esta situación, puede permanecer así por largo tiempo.
- Los genes que codifican para productos invariables que por definición no tienen forma alélica, no pueden mapearse con métodos clásicos.

Por estas razones, aunque no de forma exclusiva, los genetistas que trabajan con mamíferos han desarrollado en los últimos veinte años técnicas no sexuales basadas en el uso de células somáticas de diferentes especies que crecen *in vitro* y que son artificialmente hibridizadas. No obstante, debe tenerse en cuenta que estos métodos, aunque difieren en lo fundamental de los métodos clásicos, son complementarios y deben considerarse como adicionales y no como sustitutos de la metodología clásica de mapeo.

EL MAPEO GENETICO CON HIBRIDOS DE CELULAS SOMATICAS

En los últimos 15 ó 20 años han tenido lugar muchos descubrimientos importantes en la genética celular, que han permitido que el mapa genético de los mamíferos, en especial el del hombre haya devenido más sofisticado. Entre estos descubrimientos tenemos.

- El descubrimiento de la hibridación celular hombre-roedor y roedor-roedor, y el estudio de la segregación de diferentes cromosomas que tiene lugar en estos híbridos.
- El desarrollo de técnicas de coloración de cromosomas (la llamada técnica de bandas), que permite la identificación sin ambigüedad de cada cromosoma del hombre, el ratón y el hámster en la etapa de la metafase.

El descubrimiento de varios cientos de marcadores bioquímicos en diferentes especies que pueden identificarse y caracterizarse como variantes electroforéticas (los llamados electro-morfos o aloenzimas cuando la proteína específica es una enzima).

En la actualidad, cada cromosoma humano y cada cromosoma de ratón tiene al menos un marcador bioquímico, aunque por lo general tienen muchos más.

Estos avances técnicos han permitido alcanzar un gran progreso en el mapeo de los genes humanos (fundamentalmente) y los del ratón.

Para una rápida asignación cromosómica de los genes humanos puede utilizarse un panel que consta de una colección de híbridos de células hombre-roedor clonadas que contienen combinaciones específicas de los cromosomas humanos. Así, los genes que codifican para marcadores humanos específicos pueden mapearse en los cromosomas humanos individuales correspondientes según su patrón de presencia o ausencia en el panel híbrido. En algunos casos, solamente un cromosoma de una especie dada (el hombre en general) está presente además del complemento normal de la especie contraparte del híbrido, de manera que puede efectuarse una localización del gen casi inmediatamente y sin ambigüedad.

Para aumentar esta asignación de genes, se han realizado esfuerzos como son:

Una mayor caracterización de los productos de los genes en cuanto a sus características físicas, químicas e inmunológicas, con el objetivo de distinguir claramente los productos humanos de los de roedores. En este sentido han sido de importancia cardinal las técnicas de anticuerpos monoclonales, electroforesis y focalización isoelectrica, así como el estudio de la estabilidad térmica de las proteínas.

Métodos para inducir las actividades de genes que no aparecen normalmente expresadas en las células híbridas.

Construcción de paneles híbridos adicionales con nuevas combinaciones de cromosomas humanos de ratón o de hámster chino, ya sea como cromosomas intactos o que estén parcialmente reorganizados uno con otro.

Desarrollo de un conjunto de híbridos de deleción, cada uno con un solo cromosoma de una especie dada, que presenta deleciones terminales de forma más o menos extensa.

El uso de híbridos de células somáticas es muy popular en la actualidad particularmente en la genética humana y se han localizado más de 400 genes utilizando estas técnicas. El mapeo continúa su "velocidad de cruce" de 40 nuevos genes por "reunión científica anual". Pero aquí también existen limitaciones e inconvenientes tales como la imposibilidad de localizar los genes que codifican para los productos de genes monomórficos (aquellos que no exhiben variación entre los componentes de los híbridos celulares) y cierta falta de precisión en la localización del gen, en virtud de la limitación obvia del número de rupturas cromosómicas disponibles. Esto tiene como resultado que la mayoría de las asignaciones sean regionales, en lugar de las precisas que se obtienen cuando se usan las técnicas clásicas.

Finalmente debe señalarse que los genes cuyos productos no son expresados *in vitro*, no pueden mapearse mediante estas técnicas.

Con el gran desarrollo que recientemente ha alcanzado la tecnología molecular del ADN, se dispone de nuevas técnicas para el mapeo de los genes, las cuales, repetimos, son complementarias a las ya discutidas.

LA UTILIZACION DEL ADN RECOMBINANTE EN EL MAPEO DE GENES

Una sonda de ADN consiste en un pequeño segmento de ADN que contiene una secuencia específica del genoma que se utiliza para la hibridación en el nivel molecular con el ADN

genómico. Para mantenerlo y prepararlo con facilidad y en grandes cantidades para su posterior utilización en la hibridación, la secuencia de ADN de la sonda se incorpora dentro de una estructura autorreplicativa antes de la hibridación, bien sea con un bacteriófago o con un plásmido. Para facilitar su reconocimiento, que es la función principal de la sonda se marca la secuencia de ADN (por lo general) con un isótopo radiactivo.

Las sondas que contienen partes más o menos extensas de genes específicos son capaces de hibridizar con el segmento homólogo del cromosoma portador del gen particular, si se utiliza en condiciones técnicas apropiadas. Así, si se hibridiza una sonda radiactiva con una muestra de ADN preparado para híbridos de células interespecíficas que segregan para un conjunto dado de cromosomas, es posible localizar, al menos superficialmente, dónde se encuentra el *locus* que codifica para este gen, mediante el apareamiento del patrón de hibridaciones positivas con el patrón de presencia o ausencia cromosómica en el panel.

Estas técnicas representan un gran salto en la genética convencional, ya que permiten la detección del gen *sin necesidad de su expresión*. El mapeo de diversas secuencias de genes estructurales ha sido realizado mediante la utilización de sondas de ADN marcadas fuertemente o también ADN genómico de alto peso molecular o tratado con restrictasas (cortado en pequeños segmentos) provenientes de diferentes fuentes:

- Líneas de células híbridas hombre-ratón han permitido la localización del gen de la alfa globina en el cromosoma humano 16 y la asignación del complejo genético de la beta globina en el cromosoma humano 11.
- Líneas de células híbridas hombre-hámster chino han permitido la asignación del gen de la insulina al cromosoma humano 11.
- Línea de células híbridas ratón-hámster chino han permitido la asignación de la agrupación de genes que codifican para el interferón β en el cromosoma 4 del ratón.

La hibridación molecular *in situ* constituye otro acontecimiento promisorio en el mapeo de genes. Cuando las sondas de ADN se marcan con ^3H con una actividad específica alta (en vez de ^{32}P) y se hibridizan con preparaciones de cromosomas somáticos en metafase mitótica bien distribuidas, tiene lugar la unión de la sonda a las regiones homólogas en el cromosoma (5). Aquí puede encontrarse nuevamente el lugar donde se localiza una secuencia dada en el cromosoma de la especie en cuestión, después de la autorradiografía y la computación del conteo granular.

Estas técnicas de hibridación han demostrado ser muy útiles para los genetistas convencionales dedicados al estudio de los mamíferos, y merecen que se continúe su investigación. No obstante, presentan algunas desventajas:

- No se puede mapear un gen a menos que se disponga de una sonda radiactiva específica.
- Con frecuencia existen secuencias en el genoma de algunas especies que se aparean parcialmente con la sonda (seudogenes, codificación génica para isoformas, etcétera), que dificultan el reconocimiento de una secuencia dada.
- Como no se utiliza la reproducción sexual no tiene lugar el proceso de recombinación mitótica. Así, no es posible una asignación precisa para un gen dado.

Afortunadamente se está desarrollando un nuevo enfoque, que en nuestra opinión, tendrá una aplicación prácticamente universal.

EL "ARMA MODERNA": SONDAS ADN COMO MARCADORES GENÉTICOS

Con el número cada vez mayor de estudios que se efectúan sobre la estructura del ADN genómico, se ha establecido claramente que el polimorfismo a nivel del ADN es mucho más

intenso que en el nivel de productos de genes transcritos y traducidos. Esto puede explicarse fácilmente mediante lo que los genetistas llaman "mutaciones silentes" tales como los cambios a nivel del ADN que se producen por ejemplo, en la sustitución de un codón A.C.A. por uno A.C.G., en que ambos codifican para el aminoácido cisteína. Además, la mayoría de los polimorfismos del ADN no se detectan fácilmente porque la mayor parte del ADN no se traduce en proteínas. De acuerdo con un cálculo teórico reciente, en realidad solamente se traduce entre 5 y 10 por ciento del ADN genómico.

Si por otra parte se asume que las secuencias de codificación se encuentran dispersas al azar en todo el genoma (lo que en la práctica es cierto) es posible utilizar el polimorfismo a nivel del ADN como fuente de marcadores.

Esto se ha alcanzado con el uso de las llamadas endonucleasas de restricción. Estas enzimas específicas tienen la propiedad de cortar el ADN, de forma no azarosa. Hacen el corte cuando detectan una pequeña secuencia específica de nucleótidos (4-8) en la cadena de ADN y cada endonucleasa de restricción tiene una secuencia específica de nucleótidos que reconoce. Así es posible cortar en segmentos de varios tamaños todo un genoma con una enzima dada (unos pocos pares de kilobases en general) y esta disección del ADN genómico en pequeños pedazos puede realizarse sobre muestras diferentes con dos o más enzimas. Si dos individuos difieren uno del otro solamente en un par-base en el lugar de restricción (una mutación), el tamaño del fragmento de restricción será diferente. Si estos dos individuos pertenecen a dos especies diferentes, tales como el hombre y el ratón, la longitud del fragmento de restricción será muy diferente. Esto es lo que se denomina polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (oR.F.L.P.).

Cuando se ha efectuado la restricción del ADN, pueden separarse los fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño mediante la electroforesis en gel. Es posible reconocer un segmento particular del genoma hibridándolo con una sonda radiomarcada, ya sea de forma directa sobre electroforesis en gel, o más comúnmente, a una réplica de transferencia del mismo. El tándem, fragmento de restricción sonda, puede considerarse como un marcador y este marcador es por lo general único para el genoma, pues la probabilidad de encontrar dos secuencias que aporten un fragmento de restricción del mismo tamaño y que tenga afinidad similar para una sonda dada es muy reducida.

Con el llamado polimorfismo de restricción, es posible reconocer un individuo homocigótico mediante el polimorfismo de restricción de un heterocigótico. Después de la electroforesis del ADN restringido, la sonda radiomarcada se hibridará con fragmentos del mismo tamaño, siguiendo una sola línea si el ADN proviene de individuos homocigóticos. Si proviene de un animal heterocigótico, podrán reconocerse dos clases de fragmentos marcados que darán lugar a dos líneas.

Otra ventaja del polimorfismo es que la secuencia que se utiliza para el reconocimiento de un fragmento particular no necesariamente sirve de código para la formación de una proteína. Ni siquiera es obligatoria la expresión de la secuencia; cualquier segmento anónimo de ADN, siempre que esté presente en el genoma bajo la forma de copia simple será suficiente. Cerca del 1 por ciento de los fagos recombinantes en una librería genómica humana contienen una secuencia única. La localización cromosómica de tales secuencias únicas se hace posible mediante la utilización de la técnica anteriormente descrita (células híbridas, hibridación cromosómica *in situ*, etcétera). También es posible realizarla mediante marcadores convencionales en conjunción con reproducción sexual normal.

Conjuntamente con Benoit ROBERT y colaboradores hemos realizado el mapeo del código génico para las cadenas ligeras de miosina que están muy cercanas al *locus* Idh-1 del ratón

(cromosoma 1), utilizando la reproducción sexual (y por tanto la recombinación mitótica) y a dos especies diferentes de ratón: *Mus musculus domesticus* (el ratón normal de laboratorio) y *mus spretus* (una línea derivada de una población española de ratones salvajes). Estas dos líneas han estado separadas por millones de años, y por tanto, han perdido la atracción sexual mutua. Ya no se entrecruzan en condiciones naturales y se comportan como dos especies diferentes. Sin embargo, en el laboratorio es posible el entrecruzamiento y esto permite la aparición de una gran cantidad de polimorfismo, ya que la divergencia genética ha producido muchos cambios traducidos o no traducidos a nivel del ADN. Lo que hicimos originalmente utilizando una sonda de alfa miosina conocida, puede generalizarse ahora a cualquier fragmento, incluso hasta a uno "anónimo". Una vez que el fragmento de ADN contenido en la sonda haya sido mapeado a un cromosoma dado, la información es permanente. Puede utilizarse una y otra vez como marcador para otros fragmentos. La generación de información es acumulativa y la información fresca se acumula ahora con una velocidad exponencial. En nuestro Instituto, Philip AVNER y colaboradores han utilizado un enfoque similar para el estudio de una parte especial del genoma. Después de preparar una librería de ADN de una preparación casi pura de cromosomas-X de ratón clasificados por citometría de flujo (1) se localizaron sondas de ADN de cromosomas-X específicos, utilizando estas sondas en el nivel molecular en conjunción con estudios sobre el fenotipo animal, utilizando genes marcadores clásicos para el cromosoma-X *Tabby* (Ta) *jimpy* (jp) galactosidasa α (gal α), hipoxantina guanósina fosforribosil transferasa (H.G.P.R.T.), etcétera.

Después de ordenarlos linealmente uno con respecto al otro, pueden utilizarse todas estas sondas para mapear futuras secuencias, y repetir nuevamente la operación. Es obvio que el sistema es "autocatalítico". En la misma forma puede generalizarse a cualquier cromosoma de una especie dada, de manera que una vez que se tiene un marcador cada mili-Morgan, se convierte en una perspectiva razonable. Estos enfoques moleculares para el mapeo de los genes en mamíferos son universalmente aplicables. Por ejemplo, no es necesario conocer la naturaleza bioquímica de una enfermedad heredada para el mapeo de su determinante genético. Con esto se abren nuevas y promisorias perspectivas en términos de consejo genético, de manera que la mayoría de las enfermedades genéticas comunes serán probablemente detectables en los portadores y se identificarán los embarazos con riesgo. La técnica de mapeo convencional en el ratón, aunque aún se utiliza en los laboratorios más avanzados, se transformará irreversiblemente. Se termina un capítulo. . . pero otro comienza.

REFERENCIAS

- BARON, B. *et coll.* (1984). *Flow cytometry Isolation and Improved Visualization of sorted mouse chromosomes*. Exp. Cell. Res. 152: 220-230.
- COOPER, D. N. y J. SCHMIDTKE (1984). *DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome*. Hum. Genet. 66: 1-16.
- EVANS, H. J. (1984). *Structure and organisation of the human genome*. En: Mutations in Man (Gunther OBE Ed.), pp. 58-100. Springer Verlag Berlin.
- GREEN, M. C. (1981). *Gene mapping*. En: The Mouse in Biomedical Research, pp. 105-117. Academic Press New York.
- MALCOLM, S.; P. BARTON; C. MURPHY y M. A. FERGUSON-SMITH (1981). *Chromosomal localization of a single copy gene by hybridization -- human β globin genes on the short arm of chromosome 11*. Am. Hum. Genet. 45: 135-141.
- NAYLOR, S. L.; P. W. GRAY y P. A. LALLEY (1984). *Mouse immune interferon (IFN- γ) gene is on chromosome 10*. Somatic cell and Molecular Genetics 10 (5): 531-534.

- PUCK, T. T. y FA-TEN KAO (1982). *Somatic cell genetics and its application to medicine*. Ann. Rev. of Genet. 16: 225-271.
- ROBERT, B. *et coll.* (1985). *Genetic analysis using an interspecific mouse backcross demonstrates that myosin alkali light chains genes are dispersed*. Nature (in press).
- TAYLOR, B. A. (1978). *Recombinant inbred strains: Use in gene mapping*. En: *Origins of inbred mice* (Herbert C. Morse, III, Ed.), pp. 423-438. Academic Press New York.