

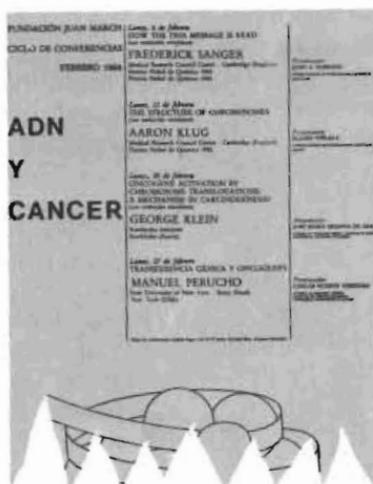
CICLO SOBRE «ADN Y CANCER»

Conferencias de los premios Nobel Sanger y Klug, y los científicos Klein y Perucho

El pasado mes de febrero se desarrolló un ciclo de conferencias que, bajo el título «ADN y Cáncer», acogió las intervenciones de los científicos **F. Sanger** (premio Nobel de química en 1958 y 1980), **Aaron Klug** (Nobel de química en 1982), **George Klein**, y el español **Manuel Perucho**, que fueron presentados, respectivamente, por los profesores **Juan Antonio Subirana**, **Eladio Viñuela**, **José María Segovia de Arana** y **Carlos Vicente Córdoba**.

Este ciclo estuvo precedido de unas breves palabras pronunciadas por el Presidente del Consejo de Patronato de esta institución, **Juan March Delgado**, quien explicó que había sido organizado en paralelo con la Convocatoria de Becas y Ayudas que tiene abierta la Fundación en materia de «Biología Molecular y sus Aplicaciones», a lo que añadió que con ello se trataba de «lograr una mayor divulgación de los estudios biológicos, de sus fronteras actuales y de algunas experimentaciones significativas que se están desarrollando fuera de España». Terminó recordando la obra científica y la figura humana del español **Arturo Duperier**, de cuyo fallecimiento se conmemoraba, en esos días, el 25 aniversario.

El primer conferenciante, que



intervino el día 6, fue el profesor **Frederick Sanger**, del Medical Research Council Centre, en la universidad de Cambridge (Inglaterra), quien habló sobre cómo leer el mensaje del ADN. Continuó el lunes 13 de febrero, el científico **Aaron Klug** también

del Medical Research Council Centre, que habló sobre la estructura de los cromosomas. Por su parte, el doctor **George Klein**, del Karolinska Institutet, de Estocolmo, en Suecia, disertó sobre carcinogénesis. El 20, cerró el ciclo el investigador español **Manuel Perucho**, de la State University de Nueva York, que habló sobre la transferencia génica y oncogenes.

A continuación ofrecemos un resumen de las distintas conferencias, así como de la presentación de las mismas.

Frederick Sanger:

«*COMO LEER EL MENSAJE DEL ADN*»



El ADN (ácido deoxirribonucleico) es una molécula en la cual se encuentra cifrada toda la información necesaria sobre la estructura y las características de un determinado ser vivo. Es una larga cadena formada por la sucesión de sólo cuatro compuestos químicos muy similares, los cuales se designan con las abreviaturas: A, C, G, y T. El orden en que se hallan dispuestos estos cuatro compuestos en la cadena de ADN es lo que determina esa información. Esta se transfiere después, a través de un intermediario semejante al ADN, el ARN (ácido ribonucleico), a las proteínas, que serán en definitiva las que expresen la información a través de sus diferentes funciones. En esta transferencia se pasa de un lenguaje formado por sólo cuatro letras, los cuatro nucleótidos que forman el ADN, a otro de veinte, que son los veinte aminoácidos diferentes cuya sucesión da lugar a la estructura primaria o lineal de las proteínas.

Conocemos el código genético, es decir, sabemos cómo se realiza la traducción entre ambos lenguajes. Cada grupo de tres nucleótidos en la secuencia de ADN da lugar a un «codón», que codifica por un aminoácido determinado de la secuencia de proteínas. Lógicamente, con cuatro nucleótidos se pueden formar 64 codones diferentes, por lo que habrá varios de ellos que codifiquen por el mismo aminoácido. Sucede ade-

más que tres de estos codones no codifican por ningún aminoácido, son señales de final de mensaje; es decir, indican donde termina la secuencia de la proteína que se venía codificando por delante de él. El código genético tiene también la característica de que es universal, el mismo para todos los organismos vivos.

Pero en la secuencia de nucleótidos del ADN hay otras muchas informaciones. Señales de iniciación que indican dónde comienza una secuencia proteica y en que fase han de leerse los nucleótidos para dar lugar a esta secuencia y no a las otras, también posibles, sobre el mismo fragmento de ADN. Y también información sobre el momento en que debe sintetizarse una proteína y la cantidad de la misma.

De lo expuesto anteriormente se deduce la importancia de poseer unas técnicas capaces de darnos a conocer la secuencia de un ADN. La base de todas las técnicas hoy disponibles para secuenciar ADN consiste en fragmentar éste en trozos más pequeños, secuenciar éstos, y luego, mediante el solapamiento de distintos trozos, deducir la secuencia completa. Nuestro método de secuenciación se basaba en la síntesis de ADN mediante el enzima ADN polimerasa.

El ADN es en realidad una doble cadena, ya que a una

secuencia de nucleótidos que corre en una dirección se opone de forma paralela otra secuencia complementaria que corre en la dirección contraria. La ADN polimerasa es un enzima que es capaz de sintetizar el ADN complementario al de una cadena «molde» preexistente.

Los cuatro nucleótidos se pueden suministrar marcados radiactivamente, de forma que el ADN obtenido tras la síntesis sería radiactivo. Esto es de capital importancia, ya que esta marca permite realizar los ensayos a pequeña escala y poder luego detectar los productos de la síntesis. Estos productos, fragmentos de ADN de diferen-

tes longitudes, se pueden separar unos de otros por la técnica de electroforesis en gel. Los fragmentos se disponen a lo largo del gel según su tamaño o longitud, dando lugar a bandas que se ponen de manifiesto mediante exposición del gel ante una placa radiográfica. Si fuésemos capaces de conseguir que todos los fragmentos sintetizados acabasen con el mismo nucleótido, tendríamos un patrón de bandas que se relacionaría con las posiciones que ese nucleótido ocupa en la secuencia de ADN. Y si hacemos lo mismo con los otros tres nucleótidos, tendremos resuelta la secuencia.



Juan Antonio Subirana:

«LOS METODOS QUIMICOS DE SANGER»



El doctor Sanger es uno de los pioneros de la Biología Molecular.

Fue capaz de diseñar los métodos químicos necesarios para analizar el lenguaje de la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Son una serie de técnicas laboriosas que supusieron un gran avance en la Biología y le valieron al doctor Sanger el Premio Nobel de Química en 1958. Pero los polímeros biológicos son una comunidad bilingüe, y el doctor Sanger se propuso después enseñarnos otro lenguaje, el de los genes, el del ADN. Un lenguaje con menos letras: a diferencia de los veinte aminoácidos que componen las proteínas, sólo cuatro nucleótidos diferentes son los que dan lugar a la secuencia de los ácidos nucleicos. Sin embargo, estas letras están muchas

veces más repetidas en este nuevo lenguaje, y su similitud hace que no sea posible usar las técnicas que se usaron para las proteínas.

El método que el doctor Sanger pone a punto está, en esta ocasión más simple, al alcance de todos los laboratorios. De hecho hoy día es más sencillo conocer la secuencia de una proteína a partir de la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica. Y estas nuevas técnicas le valieron al doctor Sanger un segundo Premio Nobel de Química en 1980.

El doctor Sanger es un científico unidimensional; ha puesto las bases para la dilucidación de las secuencias de proteínas y ADN. Hoy día se conoce la secuencia de aminoácidos de miles de proteínas.

Aaron Klug:

«LA ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS»



El ADN de las células eucariotas se encuentra encerrado dentro del núcleo de las mismas, formando una masa sin estructura aparente que se conoce con el nombre de cromatina. Cuando la célula se va a dividir, el ADN se pliega enormemente para formar unas estructuras individualizadas que se duplican y se reparten a partes iguales entre las dos células hijas; estas estructuras son los cromosomas. Una fibra de ADN, que estirada llegaría a medir varios centímetros queda convertida en un cromosoma de algunas micras de longitud. Así pues, sólo pueden observarse los cromosomas de una célula cuando ésta se está dividiendo. O en el caso excepcional de las glándulas salivares de la mosca *Drosophila*, en que por un fenómeno de politenización muchas copias del mismo ADN se alinean de forma paralela, siendo visibles al microscopio.

Cuando se extrae el ADN de los cromosomas en las condiciones adecuadas y se observa al microscopio electrónico, se puede ver un rosario de cuentas unidas por un filamento. Estas cuentas son zonas de plegamiento primario del ADN. Constituyen la unidad básica de todo el plegamiento, y se conocen con el nombre de nucleosomas. Por estudios de Kornberg en el año 1972, se sabe que en estos nucleosomas, además del ADN, existen una serie de proteínas a las que se ha llamado histonas, que son cinco diferentes.

Las cuentas del rosario se pueden separar unas de otras mediante tratamiento suave con una nucleasa (enzima que corta el ADN), y mediante electroforesis en gel de los fragmentos de ADN resultantes se puede comprobar que el tamaño de los mismos corresponde a 200 pares de bases o un múltiplo de esta cantidad. Si estos nucleosomas individualizados se tratan más intensivamente con la nucleasa, se obtienen fragmentos de ADN de 160 pares de bases. Y si el tratamiento continúa, la longitud se reduce a 140 pares de bases, además en este último paso se libera la histona H1. Lo que queda entonces se conoce con el nombre de núcleo o «core» del nucleosoma.

Sorprendentemente estos núcleos, procedentes en principio de un cromosoma, pudieron ser cristalizados. Y los cristales obtenidos se utilizaron para realizar estudios de difracción de rayos cuyos resultados llevaron al conocimiento de la estructura tridimensional de estos núcleos. Asimismo se pudieron realizar estudios de difracción de neutrones, con los que se conoció la aportación que a la estructura tridimensional daban por separado las histonas y el ADN. Por otra parte, el octámero básico de histonas del que hemos hablado antes también se cristalizó, y mediante microscopía electrónica, se hizo la reconstrucción tridimensional del mis-

mo. Esta técnica consiste en la observación al microscopio electrónico de estos cristales de octámeros desde distintas perspectivas, y la posterior integración de las imágenes.

Con los resultados de los estudios anteriores se ha confeccionado un modelo para explicar la formación del nucleosoma.

También se ha comprobado que la histona III es esencial para los posteriores niveles de plegamiento. Esto se ha podido comprobar «in vitro», donde se puede producir superplegamiento ADN aumentando la concen-

tración salina. Para que este nuevo plegamiento sea ordenado es imprescindible esta histona. Este segundo nivel de plegamiento da lugar a un solenoide, con seis o siete nucleosomas por vuelta de espira. Los siguientes plegamientos se conocen bastante menos, pero según parece se deben a uniones de zonas concretas del ADN que forman unas asas en torno al esqueleto central del cromosoma. Estas asas estarían más extendidas cuando esa zona del ADN se encontrara activa, por ejemplo, transcribiendo el ARN mensajero.



Eladio Viñuela:

«KLUG, DE FISICO A BIOLOGO»



El doctor Klug inició su carrera como físico. Incluso realizó su tesis doctoral sobre transiciones de fase en sólidos. Después, siguiendo el mismo camino que otros muchos físicos de Cambridge, entró en el campo de la Biología Molecular. Con Rosalyn Franklin tomó parte en el estudio estructural del virus del mosaico del tabaco; el primero que se conoció y se cristalizó.

Cuando una estructura se forma por la repetición de una unidad básica, esta estructura contendrá una simetría. En 1956, Watson y Crick descubrieron que la simetría de los virus regulares era cúbica. El doctor Klug dedujo que esta simetría sería la icosaédrica (el icosaedro es el poliedro formado por veinte caras, que son triángulos equiláteros). Y junto con el doctor Caspar sentaron los

principios de la construcción de los virus regulares en unos estudios que son clásicos. Asimismo se pudo comprobar lo que dichas teorías predecían con técnicas agrupadas bajo el nombre de microscopía electrónica, cristalografía o de Fourier.

Además de la estructura del virus del mosaico del tabaco, estudió un proceso muy importante en Biología; el autoensamblaje. Este virus está formado por una molécula de ARN y muchas copias de una única proteína. En el tubo de ensayo se puede conseguir la formación de la partícula vírica a partir de los componentes que la integran: ARN y proteína. Incluso la proteína sola tiene información suficiente para formar estructuras semejantes al virus.

George Klein:

«¿UN MECANISMO
DE LA CARCINOGENESIS?»



Los primeros oncogenes se pudieron detectar en una clase de virus llamados retrovirus. Estos contienen su información genética en ARN. Cuando infectan a una célula, se sintetiza un ADN correspondiente al genoma del virus. A partir de este ADN se expresa la maquinaria de replicación del virus, pero a la vez, este ADN puede recombinarse con el celular. Se comprobó que algunos de estos virus eran capaces de transformar células en cultivo, y hacerlas proliferar incontroladamente. Cuando se estudió detenidamente el genoma de estos virus, se observó que los genes responsables de la transformación de las células del cultivo no eran en absoluto necesarios para la autoreplicación del virus; y lo que es más, se averiguó que estos genes procedían de huéspedes celulares anteriores, de donde habían sido arrancados, y eran ahora transportados de esta manera.

Así se descubrió en primer lugar el oncogen «src» en el virus del sarcoma de ratón. Después el «myc», en diversas leucemias de aves. Y dado que estos genes se encontraban también en las células normales, surgía la pregunta de si el producto de estos genes en las células transformadas estaba modificado con respecto al de las células normales; o si la alteración se debía sólo a cuestión de cantidad de proteína o inoportunidad de la misma. Lo cierto es que hoy día se conocen ambos tipos de casos.

Los sistemas tumorales que estábamos estudiando nosotros eran el plasmocitoma del ratón y el linfoma de Burkitt en humanos. En ambos tipos de enfermedad se produce una proliferación de los linfocitos B (un tipo celular del sistema inmune). En 1979, cuando analizábamos los cromosomas de un plasmocitoma, pudimos observar que en el cromosoma 15 faltaba un fragmento distal del mismo que se había transferido al cromosoma 12. A esto le llamamos translocación típica. Sabíamos que en la región del cromosoma 12 al que se había transferido el fragmento del 15 se encontraba la información genética para la cadena pesada de las inmunoglobulinas (los anticuerpos producidos por los linfocitos B). En otras translocaciones variantes, el mismo material del cromosoma 15 se transfería al cromosoma 6, donde están los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. ¿Podrá suceder que en la región translocada del cromosoma se encuentre un oncogen que se active al ser translocado a una región cromosómica muy activa, como lo son los genes de las inmunoglobulinas en los linfocitos B?

Esta hipótesis tan aventurada empezó a tomar cuerpo cuando en el linfoma de Burkitt de humanos se observó un fenómeno similar.

A partir de toda una serie de trabajos genéticos se ha podido

identificar el oncogen «myc» como implicado en estos procesos. Se conoce también la estructura de este gen y el lugar aproximado de su inserción entre los genes que codifican las inmunoglobulinas. También se ha comprobado que la cantidad de proteína del gen «myc» no es necesariamente superior en la célula transformada. Ni siquiera ha de estar modificada.

En algunos casos, la translocación del gen «myc» tiene lugar tras un corte en este gen por una zona tal que después producirá un ARN mensajero más corto que el gen «myc» normal

En estas condiciones se puede estudiar la expresión de dicho gen en híbridos formados por la fusión de células diferentes: una de plasmocitoma con otra de linfoma de Burkitt; plasmocitoma con linfocito normal; etcétera. Los resultados de estos experimentos muestran que en estos híbridos sólo se expresa el gen «myc» translocado y queda bloqueada la expresión del gen en su posición normal. Efectivamente, en una célula normal este gen debería estar silenciado, pero el hecho de que cambie su posición le hace escapar del control de la célula.



José María Segovia de Arana:

«KLEIN, ANTE NUEVOS DESCUBRIMIENTOS»

Las diferencias entre una célula normal y una tumoral son múltiples. Pero todas estas diferencias observables derivan en realidad de pequeños fragmentos de ADN que por pleiotropía dan lugar a una gran cantidad de cambios funcionales. Estos fragmentos de ADN son los oncogenes, y, curiosamente, existen también en las células normales.

En 1979 Weinberg en Massachusetts consiguió transformar fibroblastos de ratón en un cultivo celular con fragmentos de ADN provenientes de otros fibroblastos transformados. En 1982, Mariano Barbacid y sus colaboradores consiguen aislar oncogenes capaces de producir transformación a partir de un cáncer de vejiga. Más tarde se pudo demostrar que la modificación de este gen se hallaba restringida a una zona de tan solo 350 nucleótidos.

A partir de estos oncogenes se

podieron crear sondas con las que se localizaron los mismos en el genoma de las células normales. Además, se encontraron en muchas especies animales diferentes. Así pues, estos agentes de la destrucción celular han permanecido conservados por la evolución a través de millones de años. Esto se debe a que son factores de crecimiento y diferenciación celular imprescindibles para la propia evolución.

Pero también se llegó al conocimiento de los oncogenes por otra vía: los retrovirus, que contienen un genoma de ARN. Algunos contienen también oncogenes capaces de producir tumores en animales.

El doctor Klein, a la cabeza de su departamento de Biología Tumoral, se encuentra en la cresta de esta ola de nuevos descubrimientos que abren una esperanza al problema del cáncer.



Manuel Perucho:

«TRANSFERENCIA GENICA Y ONCOGENES»



Las células cancerosas o tumorales se diferencian de las células normales en una gran cantidad de características fenotípicas, aunque la fundamental sea su crecimiento aberrante. Pero el proceso de conversión que lleva a una célula normal a hacerse cancerosa es complejo y atraviesa toda una serie de etapas. Lo que sí está claro es que la mayoría de los tumores son monoclonales, esto es, proceden de las alteraciones sufridas en principio por una única célula que luego da origen a todas las demás; por lo tanto se puede considerar el cáncer como enfermedad genética. De forma que una o varias etapas del proceso de transformación implica la alteración de determinados genes.

La primera demostración de estos oncogenes la hizo Bishop con el virus del sarcoma de ratón. En el genoma de este virus hay una zona que es responsable directa de la formación del sarcoma; además esta zona corresponde a un gen celular que el virus arrastró por recombinación. Más tarde se han descubierto más oncogenes de este tipo. Y, aunque no se conoce en la mayor parte de los casos la función fisiológica del proto-oncogén (esto es, el gen celular normal del que deriva un oncogén), ésta ha de ser muy importante, porque estos genes están muy conservados en la escala evolutiva.

Para demostrar la existencia de oncogenes humanos se tuvo que recurrir a otra técnica: «la

transferencia de genes a células animales en cultivo», o lo que es lo mismo, la transferencia de una serie de características desde una célula donante a otra receptora mediante ADN purificado. Esta técnica se pudo utilizar desde que en un experimento azaroso llevado a cabo en 1973, se comprobó que la transferencia de ADN a células en cultivo era muchísimo más eficiente si este ADN se suministraba coprecipitado con fosfato cálcico.

En 1977 un español, Angel Pellicer, consiguió un gran logro mediante el uso de esta técnica. Consiguió transformar una línea celular establecida de fibroblastos de ratón, carente del enzima timidina quinasa, con ADN procedente de células normales que sí poseían ese enzima. Se trataba entonces de dar el paso crucial de intentar transformar un cultivo de células normales con ADN procedentes de células cancerosas. Toda la evidencia de años en el estudio del cáncer parecía estar en contra, ya que si el proceso de transformación era complejo y con muchas etapas, difícilmente se podría obtener con un simple experimento de transferencia génica. Sin embargo, en 1979 Weinberg consiguió transformar un cultivo de fibroblastos de ratón, la cepa 3T3, con ADN de células cancerosas.

Más tarde se pudo conseguir lo mismo con oncogenes procedentes de humanos. En concreto



nosotros conseguimos la transformación de las mismas células de la cepa 3T3 con ADN de un carcinoma de pulmón humano. Se pudo comprobar que el fenotipo transformado de las células 3T3 era consecuencia directa del oncogén. Y también se consiguió la reversión de estas células transformadas en células normales cuando este oncogén se perdía. Con ello quedaba demostrado que la presencia del oncogén era necesaria no sólo para el comienzo de la transformación, sino también para su mantenimiento.

Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética y el uso de los vectores apropiados se

fue consiguiendo el aislamiento de estos genes. Con ello se pudo proceder al análisis de su estructura. Nosotros aislamos dos oncogenes procedentes de dos carcinomas de pulmón, y se comprobó que pertenecían a la familia de genes llamada «ras».

Quedaban por conocer las causas que producían estas alteraciones en los proto-oncogenes. Para ello, hubo que comparar la secuencia de los oncogenes con la de sus análogos de células normales. Y se pudo comprobar que en todos estos oncogenes de la familia «ras», la causa era debida al cambio de una sola base en la secuencia de ADN.

Carlos Vicente Córdoba:

«DESARROLLO DE LA TECNOLOGIA»



A lo largo de la Historia ha habido dos procedimientos diferentes de enfrentarse a las enfermedades. Uno de ellos ha consistido en el tratamiento del paciente con aquello que de alguna manera reportaba una mejoría para el hombre. Pero a finales del siglo pasado surge en Europa un grupo de heterodoxos, entre los que se encuentran Pasteur y Koch, que se plantean buscar el origen de la enfermedad. El método de estos hombres consiste en aislar de los organismos enfermos el germen causante, cultivar este germen, y demostrar que con él puede producirse la enfermedad en individuos sanos.

En 1928, Griffith realiza una serie de experimentos con el agente causante de la neumonía neumocócica. Existen unas cepas llamadas «R» de este agente que no causan la enfermedad,

mientras que otras, las «S», sí la producen. Sin embargo, cuando se infecta a un grupo de ratones con neumococos «R» junto con otros de la cepa «S», previamente muertos por calor, varios de los animales mueren. Además, de la sangre de estos animales se pueden aislar neumococos «S» capaces de producir la enfermedad. Algún factor de los «S» había sido capaz de modificar a la cepa R y hacerla virulenta. Este factor se descubrió que era ADN, y el experimento era la primera transformación genética que se había conseguido.

Sin embargo, conseguir una transformación genética en células superiores es problema difícil de resolver hasta que se desarrolla una técnica, la adición de ADN coprecipitado con fosfato cálcico a un cultivo de células.