

Introducción a la biología molecular

J. Díez * y J. M. López-Novoa * *

* Departamento de Medicina Interna. Centro de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. ** Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

RESUMEN

Los acontecimientos fisiológicos que acontecen en nuestro organismo están modulados por múltiples factores actuando a distintos niveles biológicos: molecular, subcelular, celular, de órgano o de tejido y de organismo completo. Hasta hace poco tiempo, el estudio de las enfermedades humanas consistía exclusivamente en el estudio de las anomalías que se producían a nivel del organismo completo o a nivel de determinados órganos o tejidos en particular. En los últimos *años*, *los procesos* patológicos se estudian también en los niveles celular, subcelular y molecular. Para ello, la medicina ha incorporado la lógica y la tecnología de la biología molecular. La *biología* molecular estudia fundamentalmente el proceso por el que la información contenida *en el* genoma es transmitido a los elementos de los *que se* valen las células para hacer operativa esa información: las proteínas. De tal incorporación están resultando avances que modifican sustancialmente *no sólo* la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades humanas, sino también su diagnóstico y, probablemente, su *profilaxis y su tratamiento*. *En esta breve revisión* sobre la biología molecular se considerarán brevemente sus bases bioquímicas y *fisiológicas*, *sus* principales instrumentos metodológicos y sus aplicaciones en nefrología.

Palabras clave: **Genes. Ácidos nucleicos. ADN. ARN. Proteínas. Células.**

SUMMARY

Physiological events are regulated by a number of factors acting at several levels, i.e., molecular, subcellular, cellular, organ-tissue, and whole organism. Classically, the study of human diseases was approached at the whole organism and/or organ-tissue level. Lastly, pathologic conditions are also studied at the molecular, subcellular, and cellular levels. This new approach comes from the development and application of molecular biology to medicine. Molecular biology studies the process by which genetic message is translated into final proteins synthesized by techniques to begin to unravel complex biological problems that have direct relevance to understanding, diagnosis, and treatment of medical problems. The objective of this article is to provide a comprehensive discussion of the biochemical and physiological foundations of molecular biology and its application to clinical medicine. In addition, this brief review is intended to provide a framework within which evaluate research articles in this field of growing importance to clinical nephrology.

Key words: **Genes. Nucleic acids. DNA. RNA. Proteins. Cells.**

Evolución histórica

El origen de la biología molecular data de principios de los años cuarenta. En aquel tiempo, los bioquímicos habían descubierto muchas reacciones químicas intracelulares fundamentales y habían comprendido la importancia de las reacciones específicas y de ciertas moléculas para definir numerosas propiedades de las células. Sin embargo, el desarrollo de la biología molecular tuvo que esperar a los adelantos que se llevaron a cabo estudiando células «sencillas» tales como bacterias y virus bacterianos (organismos procarióticos), los cuales proporcionan información acerca de los procesos biológicos básicos de una forma más rápida que las células animales (organismos eucarióticos). La creencia en la uniformidad básica de los procesos de la vida fue un factor importante en este rápido desarrollo¹. Es decir, se pensó que los principios biológicos fundamentales que gobiernan la actividad de los organismos procarióticos; podrían aplicarse también a los organismos eucarióticos, solamente variarían los detalles. Esta creencia ha sido posteriormente ratificada por los resultados experimentales.

Las bacterias y los virus permitieron a los científicos identificar un ácido nucleico, el ácido deoxirribonucleico o ADN, como la molécula que contiene la mayoría de la información genética de una célula y la que, a través de otro ácido nucleico -el ácido ribonucleico o ARN-, controla gran parte de las funciones celulares, regulando la síntesis de otras moléculas, las proteínas. Después de este descubrimiento, el nuevo campo de la genética molecular avanzó rápidamente durante las siguientes décadas (tabla I), proporcionando nuevos conceptos a una velocidad que sólo puede compararse con la del desarrollo de la mecánica cuántica en los años veinte. Los últimos años están conociendo la aplicación creciente de la metodología de la biología molecular -la denominada tecnología del ADN recombinante- a la investigación de aspectos muy diversos tanto de la biología general como de la medicina y de otras ciencias.

Concepto

Para definir la biología molecular hay que partir de la consideración de que una célula contiene entre 10.000 y 100.000 clases de moléculas diferentes. Aproximadamente la mitad de estas moléculas son pequeñas -iones inorgánicos y componentes orgánicos cuyos pesos moleculares generalmente no exceden de algunos cientos-. Las otras moléculas son grandes, peso molecular entre 10^4 y 10^{12} y se les llama macromoléculas. Existen cuatro tipos de macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, que están constituidos por polímeros de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y ácidos grasos, respectivamente. Las macromoléculas son esenciales para que acontezcan los distintos procesos que posibilitan la vida de las células. En este sentido, y dada la multiplicidad de

Tabla I. Hitos históricos en el desarrollo de la biología molecular

| | |
|---------|--|
| 1869 | Miescher aísla por vez primera el ADN. |
| 1944 | Avery demuestra que durante la transformación bacteriana es el ADN, y no las proteínas, el que contiene la información genética. |
| 1953 | A partir de los estudios con rayos X efectuados por Franklin y Williams, Watson y Crick proponen que la estructura del ADN se asemeja a la de una doble espiral. |
| 1957 | Kornberg descubre la ADN polimerasa (enzima que sintetiza ADN). |
| 1961 | Marmur y Doty desarrollan la técnica de hibridación del ADN. |
| 1962 | Arber descubre las nucleasas de restricción (enzimas que separan en fragmentos al ADN). Nathans y H. Smith usan esas enzimas para caracterizar la secuencia del ADN. |
| 1966 | Nirenberg, Ochoa y Khorana descubren el código genético. |
| 1967 | Geller descubre la ADN ligasa (que une fragmentos de ADN). |
| 1972-73 | Boyer, Cohen y Berg desarrollan las técnicas de clonación del ADN. |
| 1975-77 | Sanger y Barrell y Maxam y Gilbert desarrollan métodos de secuenciación rápida del ADN. |
| 1981-82 | Palmiter y Brinster desarrollan ratones transgénicos. |

las funciones desempeñadas por las proteínas² (tabla II), éstas son las macromoléculas más importantes de la célula. Pero, al fin y al cabo, las proteínas constituyen la expresión molecular de una información química contenida en y elaborada por los ácidos nucleicos ADN ARN. A tenor de todo ello, la biología molecular podría definirse como aquella rama de la biología que estudia los mecanismos que regulan la disponibilidad y la actividad de las proteínas en las células a partir de la información genética contenida en los ácidos nucleicos.

Tabla II. Principales funciones de las proteínas

| Tipo de proteínas | Función |
|--|--|
| Enzimas | Regular la transmisión de la información genética Regular el metabolismo de la célula |
| Proteínas estructurales | Mantener la configuración de la célula (citoesqueleto, membrana plasmática, matriz extracelular) |
| Mecanismos de transporte | Asegurar la constancia fisicoquímica del medio intracelular |
| Receptores, antígenos | Mediar la relación de la célula con el medio extracelular |
| Hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos | Transmitir señales entre las células |

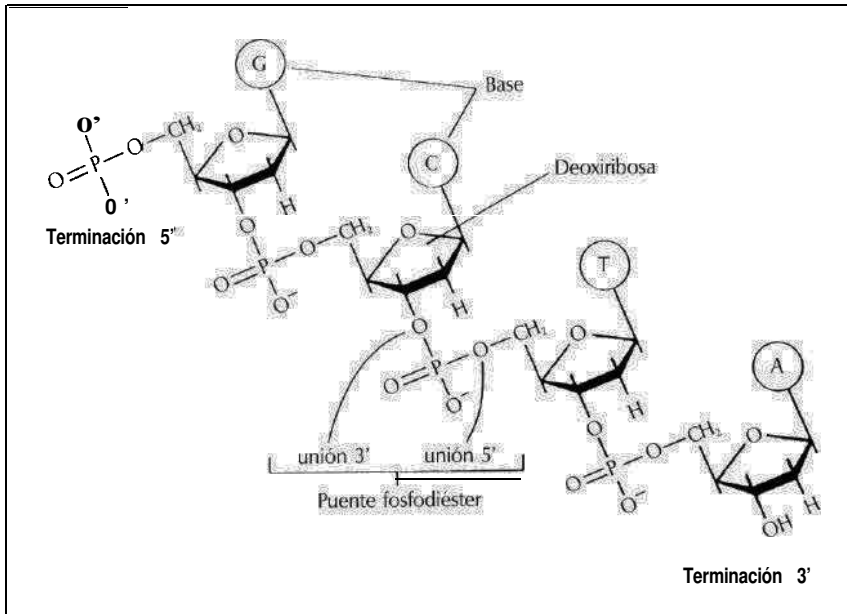


Fig. 1.-Cadena de nucleótidos constituyentes del ADN (G: guanina; C: citosina; T: timina; A: adenina).

El ADN y la síntesis de proteínas

Estructura del ADN

Cada molécula de ADN está constituida por dos polímeros lineales de nucleótidos en forma de cadena^{3,4}. Cada nucleótido consta de una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina) y un azúcar (deoxirribosa). Los nucleótidos están unidos entre sí por enlaces covalentes fosfodiéster que unen el carbono en posición 5' de una deoxirribosa con el carbono 3' de la deoxirribosa siguiente (fig. 1).

Watson y Crick⁵ avanzaron hace cuarenta años que las dos cadenas que constituyen cada molécula de ADN se enrollan entre sí adquiriendo una configuración final de doble hélice (fig. 2). Ello es posible porque entre las bases de cada polímero se forman parejas de bases complementarias. Cada pareja está constituida por la unión, a

través de puentes de hidrógeno, de la adenina de un polímero con la timina del otro y de la guanina de un polímero con la citosina del otro (fig. 2).

La distribución de las bases a lo largo de cada polímero también está sometida a unas determinadas normas⁶. Concretamente, en ciertas partes de la molécula, que constituyen las secuencias codificantes, ha bases ordenadas en grupos de tres o tripletes, de tal manera que cada uno de estos tripletes constituye una palabra clave o codón que codificará un aminoácido determinado. Los codones se hallan presentes sólo en ciertos segmentos del ADN, los llamados exones o regiones codificadoras, que constituyen alrededor del 10 % del total de ADN. En otros segmentos, las bases no están dispuestas formando codones. Entre estos segmentos se cuentan los denominados intrones o regiones intercalares. Los intrones se hallan intercalados entre los exones a lo largo de la molécula de ADN. También hay secuencias repetitivas de ba-

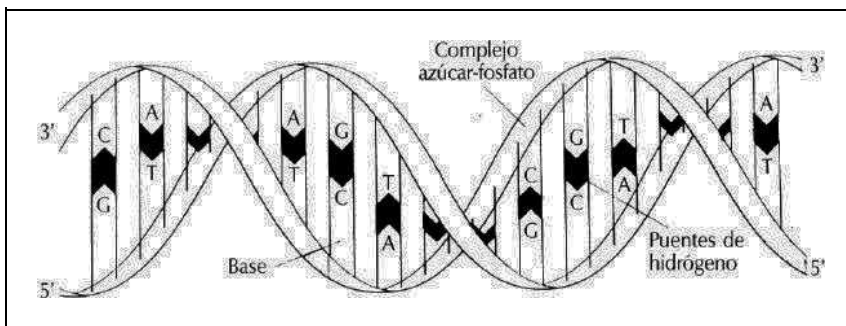


Fig. 2.—Estructura en doble hélice de una molécula de ADN (las iniciales corresponden a las bases).

ses y otros segmentos cuyas funciones se conocen en unos casos y se desconocen en otros. Un gen representa la secuencia completa de bases de ADN que especifica la secuencia de aminoácidos de una única cadena polipeptídica o de una molécula proteica. Ello significa que en el ADN un gen consiste en un número variable de exones y de los intrones entre ellos intercalados.

Se ha calculado que el genoma humano (constituido por el conjunto del ADN localizado en los 23 cromosomas de cada célula) consta de 3.000 millones de bases y que codifica entre 30.000 y 100.000 productos génicos.

Transmisión de la información genética: Expresión del ADN en las proteínas

Que la información genética contenida en el ADN se transmite quiere decir que los genes se expresan en forma de proteínas. Ello implica que una secuencia lineal de nucleótidos ha de ser convertida en una secuencia colineal de aminoácidos, lo que acontece a lo largo de una serie de pasos (fig. 3).

El primer paso consiste en que el ADN de los cromosomas se transcribe en el núcleo celular a una copia de ARN^{4,7}. El ARN es otro polímero lineal de nucleótidos que se distingue del ADN porque su azúcar es la ribosa (en lugar de la deoxirribosa) y porque la timina está sustituida por la uridina o uracilo (otra base capaz de formar una pareja de bases complementarias con la adenina).

Durante la transcripción, los nucleótidos del ARN se van alineando a lo largo de uno de los polímeros del ADN -que sirve como «molde» del ARN- siguiendo las reglas

del emparejamiento de las bases⁸. Así, la adenina del ADN se empareja con la uridina del ARN, la citosina se empareja con la guanina, la timina con la adenina y la guanina con la citosina. Los nucleótidos se unen entre sí por acción de una enzima con varios componentes: la ARN polimerasa de tipo II⁸. Un componente inicia la transcripción cuando reconoce en el ADN una secuencia específica de nucleótidos (denominada señal de iniciación), otro componente realiza la adición sucesiva de nucleótidos (elongación de la cadena de ARN) y otro componente finaliza la transcripción cuando reconoce otra secuencia específica en el ADN (denominada señal de terminación). Finalmente, el ARN transcrito y la ARN polimerasa se separan del ADN.

Hay que señalar que la transcripción del ADN da lugar a una copia fiel de toda la secuencia génica; así, en el ARN transcrito también alternan los exones y los intrones. Pero el ARN transcrito, antes de salir al citoplasma es sometido en el núcleo a un procesamiento que elimina los intrones y posibilita que los exones se agrupen para formar un solo gen continuo⁹. De esta manera, el ARN transcrito resultante constituye el molde necesario para la traducción en forma de secuencia de aminoácidos de una proteína. Este es el ARN denominado ARN mensajero.

El ARN mensajero abandona el núcleo y penetra en el citoplasma, donde se asocia a los ribosomas, que son grandes complejos de ARN (ARN ribosómico) y proteínas. Una vez en ellos, la síntesis tiene lugar mediante la participación de otro tipo de ARN (denominado ARN de transferencia o translación) unido específicamente a cada uno de los 20 aminoácidos existentes en las células. Cada ARN de transferencia contiene un triplete de bases complementarias de las existentes en un codón específico del ARN mensajero. Las moléculas del ARN de transferencia, con su aminoácido correspondiente, se alinean a lo largo de la molécula del ARN mensajero en el orden preciso dictado por la secuencia de codones de éste. Por la acción de ciertas enzimas citoplásmicas (aminoacil transferasas) se forman enlaces peptídicos entre los diversos aminoácidos, y la cadena polipeptídica o la proteína completa así formadas se desprenden del ribosoma¹⁰.

Regulación de la expresión génica

Los distintos tipos de células existentes en los organismos pluricelulares deben su diversidad al hecho de que expresan distintos genes. Ello es debido a que en cada célula la expresión de sus genes está regulada. La regulación de la expresión génica puede hacerse a tres niveles^{11,12}: 1) Nivel transcripcional, en el que se regula cómo es transcrito el ADN en el ARN de transcripción. 2) Nivel post-transcripcional, en el que se regulan el procesamiento del ARN transcrito hasta su conversión en ARN mensajero, el transporte del ARN mensajero desde el núcleo hasta el citoplasma y la o transferencia translación de los codones del ARN mensajero a los aminoácidos del ARN de trans-

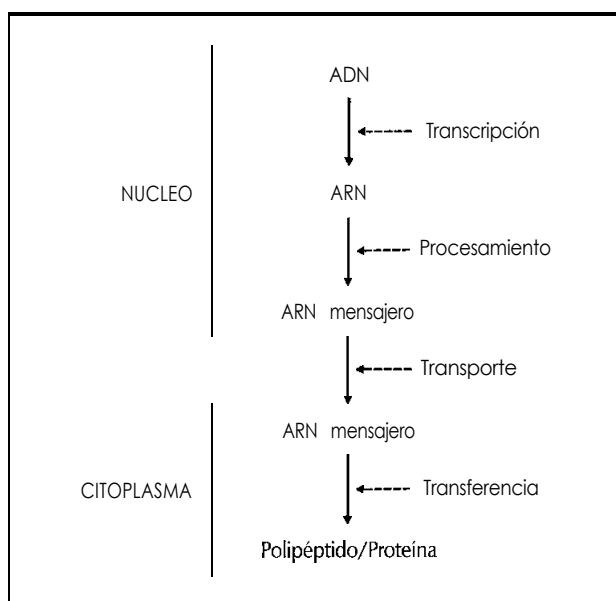


Fig. 3.-Proceso de transmisión de la información genética del ADN a las proteínas.

lación. 3) Nivel de proteína, en el que se regula la estructura y la actividad de las proteínas sintetizadas.

La regulación a nivel transcripcional es la más importante de las tres¹³. Esta regulación es ejercida por las llamadas proteínas reguladoras de genes o factores de transcripción. Se trata de unas proteínas existentes en el núcleo que reconocen en el ADN secuencias específicas de nucleótidos a las que se unen. Esta unión hace que en unos casos se facilite la transcripción de un gen adyacente o alejado y que en otros casos se inhiba. A las secuencias de ADN que facilitan la transcripción se las denomina promotoras o intensificadoras según que faciliten el inicio o la continuación de la transcripción, respectivamente. Se sabe actualmente que la transcripción de un gen está regulada por una combinación de proteínas reguladoras facilitadoras y de proteínas reguladoras inhibidoras. Asimismo, se sabe que existen proteínas reguladoras, llamadas maestras, cada una de las cuales regula la transcripción de grupos grandes de genes.

Hay genes que son transcritos siempre de una manera constante. La regulación de su expresión se efectúa entonces a nivel postranscripcional¹⁴. Este tipo de control es ejercido por proteínas reguladoras o por moléculas reguladoras de ARN que reconocen secuencias específicas del ARN a regular. Hay que señalar que uno de los puntos importantes de este tipo de control es el que afecta tanto a la formación como a la degradación del ARN mensajero.

Finalmente, la regulación del producto último del gen, la proteína, también forma parte del control de la expresión génica¹⁵. Ello supone que se regula la degradación de las mismas, su «localización» y funciones en la célula y las modificaciones que pueda experimentar su estructura.

Papel de la expresión génica en las interacciones celulares

Las células de un organismo multicelular se comunican entre sí con el triple fin de regular su desarrollo y organización en tejidos, controlar su crecimiento y división y coordinar sus funciones. Esa comunicación se puede establecer a través de tres mecanismos distintos¹⁶: 1) Secretando moléculas que actúan en células localizadas a distancia variable de la célula secretora (moléculas de señal). 2) Sirviéndose de moléculas unidas a la membrana plasmática y que contactan físicamente con la membrana de células adyacentes. 3) Intercambiando pequeñas moléculas a través de las uniones abiertas (gap junctions) que existen entre las membranas de células adyacentes ya través de las que se unen los citoplasmas de dichas células. Aunque los tres mecanismos son importantes para las interacciones celulares, el primero es el mejor conocido actualmente.

Las moléculas de señal secretadas por ciertas células pueden comunicar a éstas con células muy alejadas de ellas (comunicación endocrina mediada por hormonas transportadas por la sangre), con células de su entorno

próximo (comunicación paracrina mediada por mediadores químicos locales) y con células adyacentes (comunicación sináptica mediada por neurotransmisores). La norepinefrina y las encefalinas constituyen excepciones a esta clasificación, pues tratándose de neurotransmisores median un tipo de comunicación paracrina-autocrina.

Las moléculas de señal que median cualquiera de estos tres tipos de comunicación son de dos clases, según sea la solubilidad que presentan en el agua, el tiempo que permanecen intactas en el medio extracelular, el mecanismo por el que transmiten la información a las células diana y la respuesta que provocan en éstas¹⁷: 1) Moléculas hidrofóbicas (las hormonas esteroideas y las hormonas tiroideas) que persisten en el medio extracelular por largo tiempo y que, tras atravesar la membrana de la célula diana, activan receptores localizados en el citoplasma o en el núcleo, dando lugar a respuestas lentas y de larga duración. 2) Moléculas hidrofílicas (la gran mayoría de las hormonas, los mediadores químicos locales y los neurotransmisores) que, tras permanecer corto tiempo en el medio extracelular, interaccionan con receptores de la membrana de las células diana, originando respuestas rápidas y de corta duración. Una excepción a esta doble discriminación la constituyen las prostaglandinas y el factor activador de las plaquetas, moléculas hidrofóbicas que actúan como mediadores químicos locales uniéndose a receptores de la membrana celular y provocando una respuesta rápida y de corta duración.

La respuesta de las células diana a estas dos clases de moléculas implica siempre una modificación de la expresión génica, resultado fundamentalmente de cambios en la transcripción del ADN. Mientras que las moléculas hidrofóbicas de señal influyen la expresión génica directamente¹⁸, las moléculas hidrofílicas de señal lo hacen a través de mediadores intracelulares, los segundos mensajeros^{19,20}.

Así, la unión de las moléculas hidrofóbicas de señal a su receptor intracelular forma un complejo molécula-receptor que se une a secuencias del ADN que son secuencias intensificadoras de la transcripción de ciertos genes próximos (fig. 4). La respuesta primaria inmediata de la célula a esas moléculas consiste, pues, en facilitar la expresión de ciertos genes, conocidos como genes de respuesta inmediata. Pero, a su vez, el producto de algunos de estos genes puede facilitar la transcripción de otros genes (genes de respuesta tardía); es la llamada respuesta secundaria diferida, que sirve para amplificar la respuesta de la célula a las moléculas hidrofóbicas de señal.

Es interesante mencionar que los receptores para estas moléculas están constituidos por una familia de proteínas homólogas en la que cada proteína reconoce una sola molécula hidrofóbica de señal y secuencias intensificadoras de más de un gen, según el tipo de célula que se considere²¹. Ello da una idea de la multiplicidad de respuestas a las que puede dar lugar en distintas células una misma molécula hidrofóbica de señal.

Las moléculas hidrofílicas de señal inciden sobre el ge-

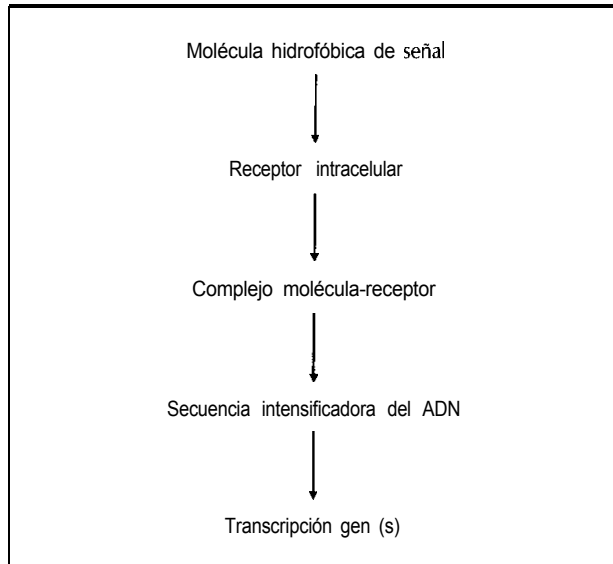


Fig. 4.-Eventos implicados en la modificación de la expresión génica por las moléculas hidrofóbicas de señal.

noma a través de una cascada de eventos (fig. 5). Esta cascada se inicia con la interacción de esas moléculas con sus receptores específicos de la membrana celular. Existen tres tipos de receptores: receptores ligados a canales iónicos, receptores ligados a tirosin cinasas específicas y receptores ligados a las proteínas G²². La unión de una molécula de señal con un receptor ligado a proteínas G da lugar a la modificación, mediada por el guanosintrifosfato o GTP, de la actividad de tres enzimas de la membrana: La adenilatociclase, la guanilatociclase y la fosfolipasa C. La adenilatociclase activada hidroliza e adenosintrifosfato o ATP y da lugar al AMP cíclico²³. La guanilatociclase activada hidroliza el fosfatidilinositol-bifosfato y da lugar al inositoltrifosfato y al diacilglicerol²⁴.

El AMP cíclico induce la activación de ciertas proteincinasas dependientes de AMP cíclico, que a su vez fosforilarán determinadas proteínas. El CMP cíclico también modifica la actividad de proteincinasas y de fosforilasas, y afecta por tanto a la fosforilación proteica, aunque puede ser en un sentido distinto a como lo hace el AMP cíclico. El inositoltrifosfato eleva la concentración citosólica de calcio, facilitando su salida desde sus reservorios citoplasmáticos. A partir de una cierta concentración, el calcio se une a la calmodulina y a otras proteínas citoplasmáticas, creando complejos que activan ciertas proteincinasas dependientes de calcio, capaces entonces de fosforilar proteínas. El diacilglicerol también induce la fosforilación de proteínas, previa activación de la proteincinasa C. Como se observa, el resultado final de la interacción entre la molécula hidrofílica de señal y su receptor es la fosforilación de numerosas proteínas celulares²⁵. Estas proteínas fosforiladas pueden influir sobre la transcripción del ADN, bien

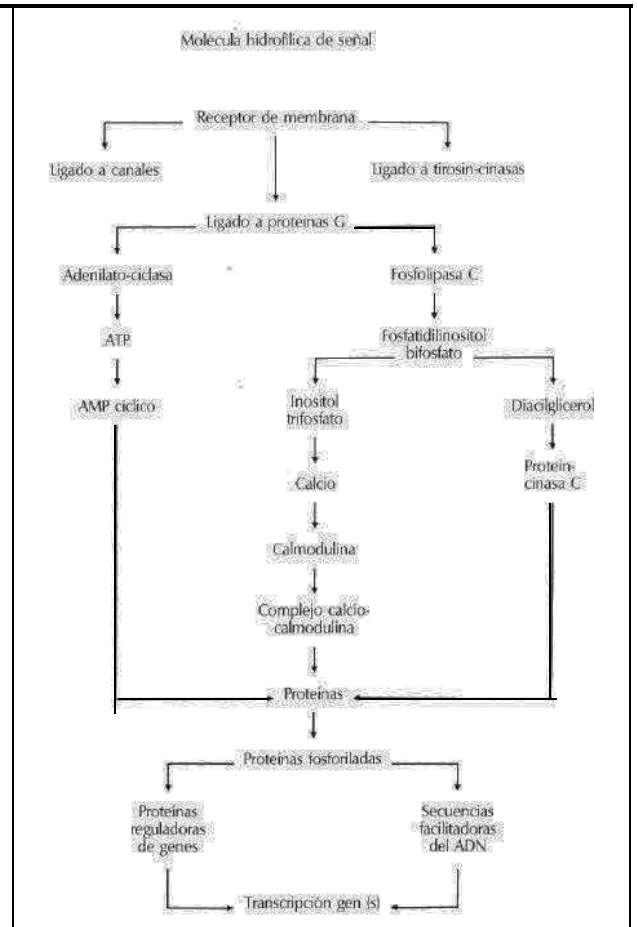


Fig. 5.-Eventos implicados en la modificación de la expresión génica por las moléculas hidrofílicas de señal.

a través de la activación de factores de transcripción (proteínas reguladoras de genes) o bien a través de la acción directa sobre las secuencias de ADN que promueven y que intensifican la transcripción.

Es de interés mencionar que ciertas proteínas fosforiladas pueden estimular la expresión de unos genes especiales, los protooncogenes, que son genes de respuesta rápida que dan lugar a tres tipos de proteínas fundamentalmente: proteínas G, proteincinasas y proteínas reguladoras de genes²⁶. Ello significa que a través de este mecanismo se puede amplificar la respuesta génica inicial de la célula a las moléculas hidrofílicas de señal.

Tecnología del ADN recombinante

Clásicamente, la única manera de estudiar la información contenida en el ADN consistía en deducir las funciones de los genes a partir del análisis de los fenotipos de

organismos mutantes y de su progenie. Aunque este enfoque metodológico propio de la genética clásica sigue siendo de utilidad, la biología molecular ha aportado otro enfoque sustentado por un grupo de técnicas que en su conjunto constituyen la denominada tecnología del ADN recombinante ²⁷⁻²⁹ (tabla III).

Esta tecnología ha revolucionado el estudio de la célula en general y de los genes en particular. Cualquier región del ADN de una célula puede ser escindida enzimáticamente (con nucleasas de restricción) e insertada en un elemento autorreplicativo (un plásmido bacteriano o un virus) para producir ADN por clonación; así se obtiene el llamado ADN genómico. Por otra parte, el ADN puede sintetizarse a partir de un ARN mensajero utilizando la enzima transcriptasa reversa, y así se obtiene el llamado ADN complementario (cADN). La cantidad de este ADN puede aumentarse también mediante el procedimiento de clonación anteriormente descrito. La secuencia de nucleótidos de un cADN purificado puede precisarse y a partir de ella puede delimitarse incluso la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.

Un fragmento de ADN obtenido por cualquier método puede marcarse (por ejemplo, con isótopos del tipo del ³²P) y puede ser usado como sonda. Con el ADN sonda y utilizando técnicas de blotting se puede determinar si un gen se expresa en un tejido (southern blotting), así como su localización en los cromosomas (hibridación in situ). Análogamente se puede proceder para detectar y lo-

calizar la presencia del ARN mensajero (northern blotting).

Una técnica de gran impacto en el campo de la biología molecular es la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en conocer la secuencia de una cierta región del ADN para poder reproducirla en gran cantidad -amplificarla- por un método enzimático. A tal fin se preparan oligonucleótidos complementarios de ciertas secuencias de un gen, cadenas opuestas de ADN (oligonucleótidos cebadores) que se incuban con el ADN cuya secuencia se quiere amplificar y con ADN polimerasa. La reacción, que tiene tres fases (desnaturalización para separar las cadenas con la secuencia problema, hibridación de la misma con los oligonucleótidos cebadores y polimerización con la enzima), se repite a lo largo de un número determinado de ciclos, tras los que se obtienen cientos de miles de copias de la secuencia original

El disponer de ADN aislado (intacto o mutado, previa su manipulación) permite su inserción ulterior en el cromosoma de una célula, tal que se convierta en parte permanente del genoma de ésta. Si la célula diana de este procedimiento de traslado del ADN es una célula germinal de un animal, entonces el gen insertado se transmitirá a su progenie. Así pueden estudiarse los efectos en la célula y en el organismo de un gen concreto, lo que permite eliminar sus funciones y su trascendencia para la biología de la célula y para la fisiología del organismo entero.

Las consecuencias de la aplicación de la tecnología del ADN recombinante en medicina empiezan a ser evidentes. Así, para entender mejor la etiopatogenia de ciertos procesos o para enfocar más adecuadamente su diagnóstico y su tratamiento, actualmente es preciso contar con las aportaciones de algunas de las técnicas mencionadas (tabla IV).

Tabla III. Técnicas utilizadas en biología molecular

| Fundamento | Método |
|---|--|
| Separar en fragmentos el ADN | Nucleasas de restricción |
| Analizar la secuencia del ADN | Método químico Método enzimático (ADN polimerasa I) |
| Producir ADN | |
| Por síntesis a partir de ARN mensajero | Transcriptasa reversa |
| Por reproducción de fragmentos de ADN | Clonación |
| Por duplicación de cadenas de ADN | Hibridación |
| Por amplificación de secuencias de ADN | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) |
| Detectar ADN específico | Southern blot |
| Detectar ARN mensajero específico | Northern blot Ensayo de protección con ARNasa Síntesis de cADN + PCR |
| Localizar ARN mensajero específico en un tejido | Hibridación in situ |
| Trasladar el ADN | |
| A células | Transfección |
| A animales | Modelos transgénicos |

Tabla IV. Aplicaciones de la metodología de la biología molecular a la investigación en medicina

| |
|--|
| Creación de modelos experimentales de enfermedad: Utilización de ratones transgénicos. Utilización de ratones mutantes. |
| Estudio genómico de enfermedades diversas (metabólicas, microbiológicas, oncológicas etc.): Estudios de clonación de ADN. Estudios de detección y localización de ácidos nucleicos. Estudios de transfección celular. |
| Diagnóstico de enfermedades genéticas: Identificación de marcadores (polimorfismo de los fragmentos de restricción). Análisis de ligamiento genético. |
| Tratamiento: Producción de proteínas con aplicación terapéutica a partir de células transfectadas. Terapia de reposición génica. |

Aplicaciones de la biología molecular a la nefrología

La biología molecular ha tenido cuatro efectos fundamentales sobre la nefrología³⁰ (tabla V): 1) La caracterización de la secuencia y la clonación de fragmentos de ADN codificadores de ciertas proteínas críticamente relacionadas con la función renal o con la interacción de las células renales con su entorno y con el resto del organismo. 2) la creación de modelos animales de enfermedades renales con trastornos genéticos aislados. 3) La obtención del mapa cromosómico y de los marcadores genéticos de algunas enfermedades hereditarias del riñón. 4) El conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo renal y en la respuesta del riñón ante las agresiones.

La tecnología del ADN recombinante ha permitido analizar la estructura y la expresión de los genes que codifican muchas de las proteínas directa o indirectamente relacionadas con la función renal. Algunas de estas proteínas están implicadas en los procesos de transporte transmembranario de iones y de otras sustancias, otras funcionan como moléculas de señal con actividad endocrina o paracrina y otras son importantes para la regulación del tono vascular. También se conocen ya los genes codificadores de proteínas relacionadas con la capacidad de las células renales para interactuar con el medio extracelular, tanto en condiciones normales (proteínas de la matriz extracelular, receptores para moléculas de señal) como en condiciones patológicas (antígenos). Junto al conocimiento de todos estos genes, la manipulación de su secuencia de nucleótidos y, consiguientemente, la modificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína final está

permitiendo establecer relaciones estructura-actividad que mejoran el conocimiento de los procesos moleculares que acontecen en el riñón.

La capacidad de introducir genes extraños en las líneas celulares germinales de los ratones ha hecho posible construir modelos animales de diversas nefropatías, principalmente glomerulopatías. La mayoría de las mismas traducen la expresión inadecuada del gen extraño que se insertó (es el caso de las glomerulopatías resultantes tras insertar el gen de la hormona del crecimiento, el gen viral T grande SV40, el gen de la proteína de superficie Thy-1 y el protooncogen c-myc). Pero otras glomerulopatías pueden ser el resultado de la interrupción de un gen endógeno por el gen extraño insertado (así se originaría la glomerulopatía resultante tras la inserción de los retrovirus). De todo ello se desprende que algunas enfermedades renales pueden ser el resultado de la expresión de genes anormales, mientras que otras pueden ser consecuencia de la represión de genes nativos.

La secuencia de nucleótidos del ADN varía entre los individuos de una población. Ello se puede detectar fácilmente midiendo la longitud (en miles de bases o kilobases) de los fragmentos de restricción resultantes tras tratar el ADN con nucleasas de restricción. Por lo tanto, en una población existirá polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. Si el ADN de estos fragmentos se relaciona con el ligamiento familiar que presenta una determinada enfermedad, se puede construir el mapa genético de dicha enfermedad en aquella familia. Así es como se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 16 el locus genético cuya mutación produce la enfermedad hereditaria renal más estudiada: la enfermedad poliquística autosómica dominante del adulto. Hay que señalar que en esta enfermedad renal, y en otras cuyo locus también se ha identificado ya, aún se desconoce cuál es el producto génico afectado y responsable último de la lesión renal.

Actualmente se empiezan a caracterizar los genes que regulan el momento y el lugar en que las células renales se desarrollan y se diferencian. Evidentemente, el conocimiento de estos genes puede ayudar a entender el desarrollo anormal del riñón en situaciones de hipoplasia-aplasia, hipertrofia y cáncer.

También es mucho lo que se investiga hoy en día con técnicas de ADN recombinante sobre el posible papel desempeñado por los factores de crecimiento, las citoquinas y los autocoides en la inducción y/o el mantenimiento de la respuesta renal a agresiones diversas. Menos investigado está todavía el papel de los protooncogenes y de las proteínas por ellos inducidas en la mediación de esas respuestas. Pero donde más trabajo queda aún por hacer es en el estudio de la participación de las llamadas proteínas de estrés en la respuesta renal a la agresión. Es probable que, como ha sucedido en otras áreas de la medicina -neurología, cardiología-, del estudio de estas proteínas tan singulares se derive un conocimiento más preciso de la patología de las enfermedades renales.

Tabla V. Efectos de la biología molecular sobre la nefrología

| |
|---|
| <p>Caracterización genético-funcional de proteínas relacionadas con las funciones y las interacciones de las células renales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteínas de transporte (ATPasas, intercambiador de aniones, intercambiador Na⁺/H⁺, canales de K⁺, otros transportadores). • Moléculas de señal (sistema renina-angiotensina-aldosterona, factor natriurético auricular, endotelina, vasopresina, eritropoyetina, vitamina D, hormona paratiroidea). • Proteínas de interacción (proteína del proteoglicano, fibronectina, laminina, receptores para hormonas, receptores para factores de crecimiento, receptores para linfoquinas, antígenos y autoantígenos diversos). <p>Creación de modelos transgénicos de enfermedad renal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulosclerosis (gen de la hormona del crecimiento, oncogen viral T grande SV40, gen de la proteína de superficie Thy-1). • Glomerulonefritis proliferativa (ADN de retrovirus). • Aplasia-hipoplasia renal (protooncogen c-myc). <p>Localización del mapa cromosómico y del ligamiento genético de enfermedades renales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad poliquística autosómica dominante del adulto. • Carcinoma renal. • Tumor de Wilms. • Enfermedad de Alport. • Diabetes insípida nefrogénica. • Acidosis tubular renal proximal. • otras. |
|---|

Bibliografía

- 1 Freifelder D: Sistemas y métodos en biología molecular. En Freifelder D (ed.). *Fundamentos de biología molecular*. Acribia, Zaragoza, pp. 1-14, 1988.
- 2 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD: Protein function. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 122-134, 1989.
- 3 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson ID: Nucleic acids. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 95-106, 1989.
- 4 Felsenfeld G: DNA. *Sci Am*, 253:58-66, 1985.
- 5 Watson JD y Crick FHC: Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737-738, 1953.
- 6 Sanger F: Sequences, sequences, and sequences. *Annu Rev Biochem*, 57:1-28, 1988.
- 7 Darnell JE Jr: RNA. *Sci Am*, 253:68-78, 1985.
- 8 Zamecnik P: The machinery of protein synthesis. *Trends Biochem Sci*, 9:464-466, 1984.
- 9 Chambon P: Split genes. *Sci Am*, 244:60-71, 1981.
- 10 Altman S, Baer M, Guerrier-Takada C y Viogre A: Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Trends Biochem Sci*, 11:515-518, 1986.
- 11 Darnell JE Jr: Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. *Nature*, 297:365-371, 1982.
- 12 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD: Strategies of gene control. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 551-556, 1989.
- 13 Latchman DS: Regulation at transcription. En Latchman DS (ed.). *Gene regulation: A eukaryotic perspective*. Unwin Hyman, London, pp. 46-66, 1990.
- 14 Latchman DS: Post-transcriptional regulation. En Latchman DS (ed.). *Gene regulation: A eukaryotic perspective*. Unwin Hyman, London, pp. 67-99, 1990.
- 15 Wold F: In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification). *Annu Rev Biochem*, 50:783-814, 1981.
- 16 Snyder SH: The molecular basis of communication between cells. *Sci Am* 253:132-140, 1985.
- 17 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD: Three strategies of chemical signalling: Endocrine, paracrine, and synaptic. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 682-690, 1989.
- 18 Beato M: Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56:335-349, 1989.
- 19 Casperson GF y Bourne HR: Biochemical and molecular genetic analysis of hormone-sensitive adenylate-cyclase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 27:371-384, 1987.
- 20 Carafoli E: Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, 56:395-433, 1987.
- 21 Yamamoto KR: Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet*, 19:209-252, 1985.
- 22 Miller RT: Transmembrane signalling through G proteins. *Kidney Int*, 39:421-429, 1991.
- 23 Schramm M y Seliger Z: Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system. *Science*, 225:1350-1356, 1984.
- 24 Berridge MJ: Inositol lipids and calcium signalling. *Pro R Soc Lond (Biol)*, 234:359-378, 1988.
- 25 Cohen P: Protein phosphorylation and hormone action. *Pro R Soc Lond (Biol)*, 234:115-144, 1988.
- 26 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD: The molecular genetics of cancer. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 1203-1216, 1989.
- 27 Garoff H: Using DNA recombinant techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. *Annu Rev Cell Biol*, 1:403-445, 1985.
- 28 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD: Recombinant DNA technology. En Alberts B y cols. (eds.). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, pp. 180-196, 1989.
- 29 Bader M, Kaling M, Metzger R, Peters J, Wagner J y Canten D: Basic methodology in the molecular characterisation of genes. *I Hypertens*, 10:9-16, 1992.
- 30 Alper SE y Lodish HF: Molecular biology of renal function. En Brenner BM y Rector FC (eds.). *The kidney*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 132-163, 1991.