

LA MANIPULACIÓ

per Antoni Prevosti


6 (606/octubre 1981

ciència 10)

Amb l'enginyeria genètica s'està albirant la possibilitat que l'home controli la seva pròpia naturalesa biològica. Aquest article, del professor Prevosti, ens introdueix en el camp de coneixements bàsics de la biologia molecular que ens ha d'ajudar a entendre la tècnica de les manipulacions genètiques, és a dir, el seu principi, les esperances i els interessos que plantegen i també els riscos derivats d'aquestes noves biotecnologies.

Antoni Prevosti i Pelegrín (Barcelona, 1919). Catedràtic de genètica a la facultat de ciències biològiques de la Universitat de Barcelona. Realitzà els seus estudis de llicenciatura (1942) i de doctorat a la Universitat de Barcelona. L'any 1949 amplia estudis a la Universitat de Roma i s'especialitza en genètica a la Universitat de Pàvia (Itàlia). Els anys 1953-54 treballa a l'Institut de Genètica Animal de la Universitat d'Edimburg (Escòcia). És professor d'investigació al CSIC, director de la revista "Genètica Ibèrica" i acadèmic a la Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona. Entre altres investigacions ha treballat en genètica de caràcters quantitius de *Drosophila* i en el polimorfisme cromosòmic de la *D. subobscura*.

LA INFORMACIÓ GENÈTICA

 Els gens, les unitats que determinen les propietats genètiques dels éssers vius, estan formats per àcid desoxiribonucleic (ADN).

Aquesta és una substància amb una estructura molecular idònia per a portar la informació genètica. Les molècules d'ADN són polímeres, és a dir, estan formades per una sèrie d'unitats semblants, que es diu nucleòtids, ordenades linealment en llargs filaments. Els nucleòtids de l'ADN són de quatre tipus diferents. Tots contenen àcid fosfòric, un sucre (la desoxiribosa) i una base nitrogenada, però només és aquesta última la que és diferent en els quatre tipus esmentats; pot ser timina, citosina, guanina i adenina. En la resta d'aquest article ens referirem a les quatre classes de nucleò-

tids de l'ADN amb la lletra (majúscula) inicial de les bases nitrogenades de l'ADN, és a dir, T, C, G i A, que simbolitzaran respectivament nucleòtids amb timina, citosina, guanina o adenina. Indiquem, a més, que les molècules completes d'ADN estan formades per dos filaments, cadascun dels quals és una seqüència de nucleòtids. Les dues cadenes són paral·leles i estan enrotllades en hèlix, per això diem que una molècula d'ADN és una doble hèlix (vegeu fig. 1). Els nucleòtids de les dues cadenes paral·leles es corresponen per parells, però no de qualsevol manera: sempre a un nucleòtid T d'una cadena correspon un d'A de l'altra i a un de C, un de G, és a dir, la doble hèlix d'ADN està formada per parells de nucleòtids que poden ser A-T, T-A, C-G o G-C.

L'ordenació dels nucleòtids a un filament d'ADN i, per tant, de parelles de nucleòtids a una doble hèlix, no està sotmesa a cap restricció ni condicionament físico-químic, és a dir, admet igualment qualsevol ordre de nucleòtids. És evident, per tant, que en les molècules d'ADN que porten informació genètica, que estan formades en els casos més senzills per milers i en general per molts milions de nucleòtids, el nombre d'ordenacions diferents que aquests poden presentar és il·limitat; aquesta possibilitat és la base que siguin idònies per a portar la informació genètica. D'una manera semblant a la utilització que fem de les lletres de l'alfabet, ordenades de formes diferents, com a vehicle de transmissió d'informació en el nostre llenguatge, en els sistemes vivents els quatre tipus de nucleòtids de l'ADN s'utilitzen per a transmetre la

informació genètica. Els gens, que són les unitats fonamentals de la informació genètica, són segments dels filaments d'ADN que, per tenir una seqüència de nucleòtids específica, porten una informació concreta per a la cèl·lula, de manera semblant a com ordenacions específiques de lletres en el nostre llenguatge porten la informació continguda en les paraules o en les frases.

Per a què serveix la informació genètica continguda en els gens? Principalment és informació per a la síntesi de proteïnes específiques. Aquestes també són molècules polímeres i les unitats que les formen són els aminoàcids, i en últim terme les propietats de cada proteïna depenen de l'ordenació dels aminoàcids que la formen. Als éssers vius s'ha desenvolupat un diccionari, la clau genètica, que estableix les equivalències entre triplets de nucleòtids (seqüències de tres nucleòtids) i cadascun dels vint aminoàcids que formen les proteïnes. Per un mecanisme complex, la seqüència de nucleòtids d'ADN de cada gen és transcrita en una seqüència de nucleòtids d'ARN, i aquesta, en els ribosomes de les cèl·lules, es tradueix, utilitzant el diccionari de la clau genètica, en una cadena d'aminoàcids, és a dir, en un polipèptid d'una proteïna.

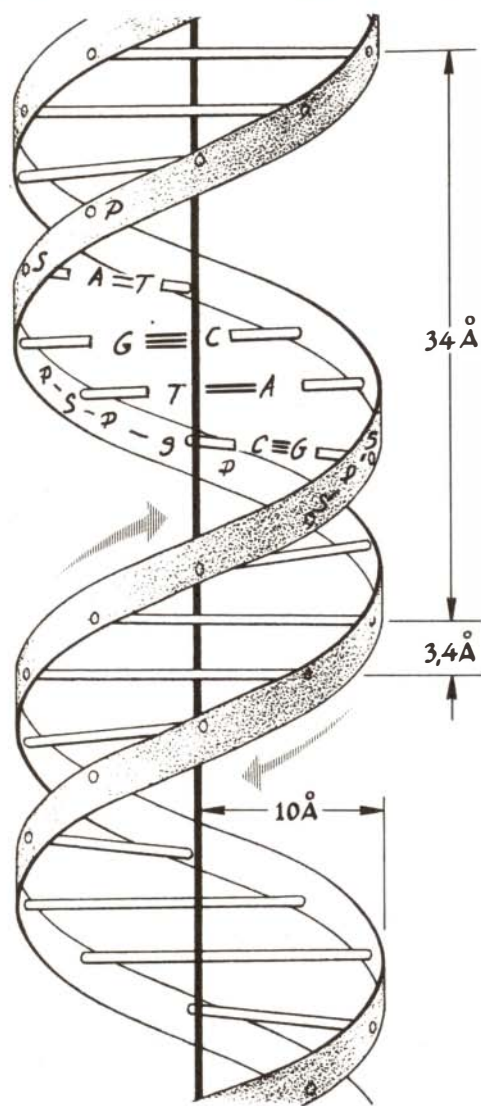
Per què aquests processos de transcripció i traducció es realitzin correctament, els gens, a més de les seqüències de nucleòtids que es tradueixen en els polipèptids, contenen seqüències que formen senyals indicadors d'on han de començar i acabar la transcripció i la traducció, d'on han de col·locar-se les molècules que intervenen en aquests processos, les que els regulen,

GENÈTICA

Estructura tridimensional en doble hèlice de la molècula d'ADN. Les cadenes laterals contenen àcid fosforic i sucre i els graons, bases nitrogenades.

ciència 10

octubre 1981/607 7



EL CROMOSOMA DELS BACTERIÒFAGS, BACTÈRIES I CÈL·LULES EUCARIONTS ELS PLÀSMIDS

La informació genètica bàsica de les bacteries està continguda en una gran molècula d'ADN d'estructura circular, és a dir, sense extrems lliures (vegeu fig. 2). Aquesta molècula és el cromosoma bacterià, encara que alguns autors no consideren adequat donar-li aquest nom, perquè té una estructura molt diferent de la dels cromosomes del nucli de les cèl·lules eucarionts i prefereixen utilitzar el terme de genòfor. Concretament, l'ADN de les bacteries no està associat a proteïnes bàsiques com en els eucarionts, on associat amb proteïnes d'aquest tipus, les histones, forma la cromatina.

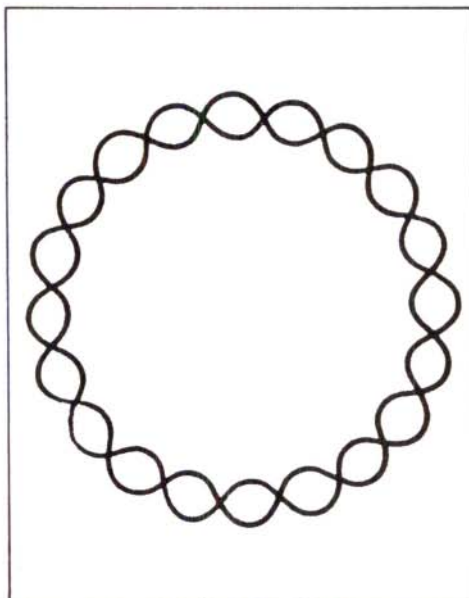
A més del genòfor que porta la informació genètica bàsica, és a dir, el conjunt de gens que conté sempre la bactèria normal, a les cèl·lules bacterianes pot haver-hi, circumstancialment, altres molècules d'ADN també circulars, però molt més petites i portadores d'una informació genètica que no és indispensable per al funcionament normal de la bactèria. Aquest ADN constitueix els plàsmids, els quals donen a les bacteries propietats peculiars. L'ADN dels plàsmids és autònom, pel que fa referència a la seva duplicació, del cromosoma bacterià. Pot ser, per tant, que els plàsmids es multipliquin amb major freqüència que el cromosoma bacterià, i que a conseqüència d'això a cada bactèria hi hagi diverses o fins moltes còpies de determinats tipus de plàsmids. Entre d'altres, una propietat de molts plàsmids és que tenen gens amb informació que els fa transferibles a altres bacteries, per mitjà d'un mecanisme que es diu conjugació.

La informació genètica dels bacteriòfags d'ADN de doble cadena, que són els que ens interessen en relació amb l'enginyeria

etc. Per tant, un gen és una unitat complexa que porta una informació per a la síntesi, en general, d'una cadena polipeptídica, però a més perquè aquesta es formi on i quan sigui necessària i en quantitat adequada.

Les proteïnes són les molècules bàsiques de l'estructura dels éssers vius, així com del seu funcionament. Els constituents de l'estructura cel·lular i dels teixits són proteïnes associades amb altres molècules, però aquestes es formen per l'acció d'altres proteïnes, principalment els en-

zims. A més, els processos fisiològics, com la respiració, la digestió, etc., depenen també d'enzims que són proteïnes. Per tant, els gens, a través de les proteïnes, porten informació de totes les característiques morfològiques, fisiològiques i fins de comportament dels organismes. Això no vol dir, però, que aquest control dels gens sigui rígid; de fet és més o menys flexible davant la influència de factors externs a l'organisme, l'ambient, que cada individu va trobant en el curs de la seva vida.



Esquema de l'ADN circular d'una bactèria

genètica, està continguda en una molècula d'ADN que, en general, és circular, però que en molts casos passa per fases en què és lineal. La mida d'aquestes molècules varia molt segons els tipus de bacteriòfags, però sol ser més gran que la dels plàsmids i sempre és molt més petita que el cromosoma bacterià.

En els eucariotes l'ADN portador de la informació genètica forma molècules molt més grans i, associat amb proteïnes, les histones, forma la cromatina. La fibra fonamental de cromatina molt enrotllada i replegada forma els cromosomes típics d'aquests organismes (vegeu fig. 3).

ELS ENZIMS DE RESTRICCIÓ

A les bactèries hi ha unes endonucleases, és a dir, uns enzims que s'anomenen enzims de restricció, que tenen per funció tallar l'ADN per llocs on hi ha seqüències específiques de nucleòtids. Aquests enzims actuen sobre l'ADN estrany a la bactèria que els conté i tenen especial importància en relació amb la resistència de les bactèries a la infecció per certs bacteriòfags, l'ADN dels quals és tallat per aquests enzims. Restringeixen, per tant, els tipus de bacteriòfags que poden desenvolupar-se en les bactèries, d'on prové el seu nom.

Els enzims de restricció van acompanyats a les bactèries que els contenen d'enzims de "modificació", que solen ser metilases, els quals actuen introduint un grup metílic en alguna de les bases dels nucleòtids que formen les seqüències específiques d'ADN reconegudes pels enzims de restricció. Així aquests enzims no poden tallar aquestes seqüències i la bactèria no autodestruïx el seu propi ADN.

Com a exemple d'enzim de restricció podem citar l'Eco RI, que reconeix i talla la seqüència



pels llocs indicats per una petita fletxa. Les dues A amb asterisc són les que el

sistema de modificació de la bactèria ha metilat en el seu propi ADN, perquè l'enzim de restricció no pugui tallar-lo. Un fet que cal senyalar és que l'enzim Eco RI, com altres enzims de restricció, encara que no tots, no talla les dues cadenes de l'ADN al mateix nivell. A conseqüència d'això els dos extrems que resulten a l'ADN tallat per l'enzim tenen una cadena més llarga que l'altra, és a dir, AATTC.....G

G...CTAA.

Com a exemple d'enzim de restricció que talla els dos filaments de l'ADN al mateix nivell podem citar l'AluI, que talla la seqüència



com s'indica amb les fletxetes.

LA TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Algunes espècies de bactèries permeten el pas de fragments d'ADN a través de les parets cel·lulars. Aquests fragments, una vegada dintre de la cèl·lula, per un mecanisme de recombinació poden substituir un fragment d'ADN homòleg, del cromosoma bacterià. Així, la bactèria pot adquirir les propietats genètiques corresponents a la informació portada per l'ADN que ha entrat i que poden ser alternatives a les que portava el que ha estat substituït. Perquè produeix aquest canvi de propietats genètiques, d'aquest fenomen se'n diu transformació. Hi ha bactèries, com *Escherichia coli*, que tenen una paret cel·lular que no permet el pas dels fragments d'ADN procedents de l'exterior. No obstant això, es pot aconseguir la transformació d'aquestes bactèries convertint-les en protoplasts, és a dir, en cèl·lules despallades, desproveïdes de la paret cel·lular.

Alguns plàsmids també poden entrar en les cèl·lules bacterianes pel mateix camí que els fragments d'ADN determinants de transformació. Aleshores, les bactèries receptors adquireixen propietats genèti-

ques noves, les corresponents als gens que porta el plàsmid. Per extensió, aquest fenomen també s'anomena transformació.

L'ENGINYERIA GENÈTICA

En termes generals consisteix en la introducció en cèl·lules, de procarionts o eucariotes, de gens procedents d'altres cèl·lules, aconseguint que la informació continguda en aquests gens sigui transcrita i traduïda, és a dir, que funcioni dins de la nova cèl·lula. Amb això la cèl·lula receptora pot produir una proteïna que es formava en les cèl·lules d'origen, però no dins ella. Aquesta cèl·lula ha adquirit una propietat genètica que no tenia.

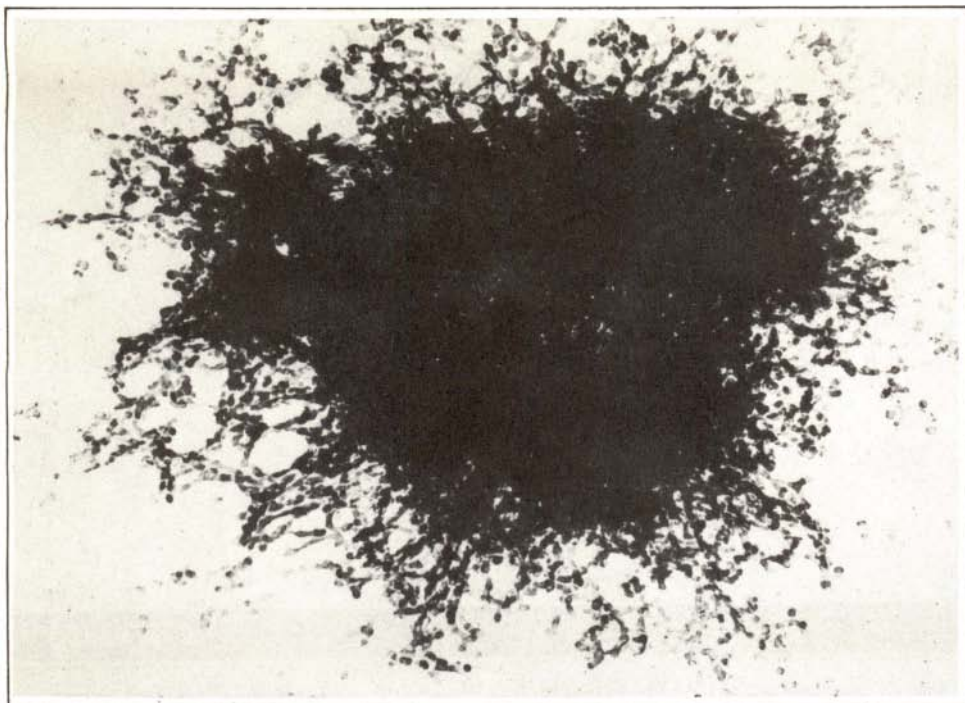
Les tècniques que s'utilitzen amb aquest objecte són variades; a continuació en descriurem les principals. El propòsit de totes és situar els gens que es volen transferir en un ADN que, per transformació, pugui entrar en les cèl·lules receptores i que una vegada dins d'elles es pugui anar reproduint per duplicació juntament amb el gen que s'hi ha inserit. A més, el gen s'ha de col·locar en un lloc adequat perquè pugui ser transcrit i traduït.

L'ADN en què s'ha col·locat el gen que es vol transferir rep el nom d'ADN recombinant.

ORIGEN DE L'ADN RECOMBINANT

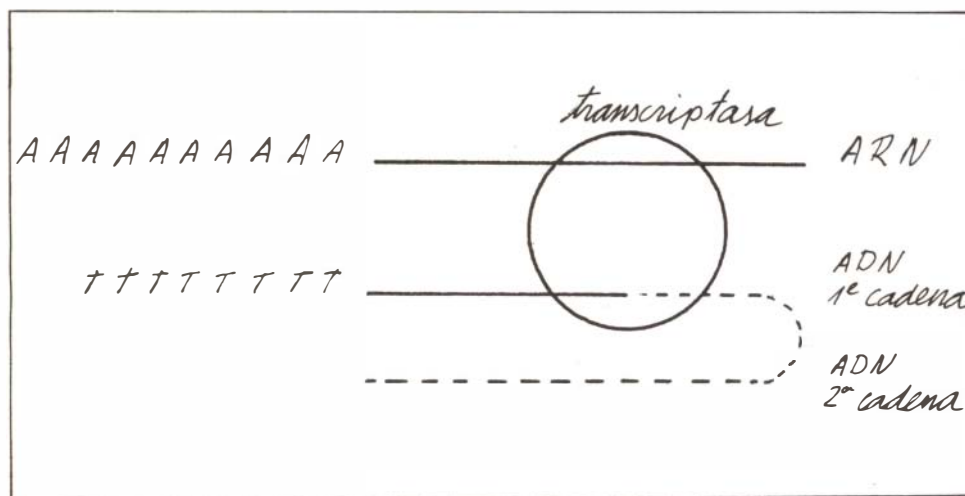
a) *Obtenció del gen o gens a transferir*
S'utilitzen dues alternatives.

1) Tallant l'ADN de les cèl·lules donants, amb enzims de restricció adequats, es poden obtenir fragments que continguin el gen que es vol transferir. Si un gen té a cada costat, més o menys a la vora dels seus extrems, una seqüència de nucleòtids reconeguda per un determinat enzim de restricció i aquesta seqüència no



Cromosoma eucariota, vist al microscopi electrònic (Foto: J. Navarro, Universitat Autònoma de Barcelona)

Esquema de l'actuació de la transcriptasa inversa



octubre 1981/609 9

vol introduir en una cèl·lula eucariot generalment s'utilitza un virus com a vehicle. Recentment, sembla que s'ha aconseguit la transformació de cèl·lules d'organismes superiors sense utilitzar ADN recombinant com a vehicle, directament amb el segment d'ADN que conté el gen que es vol transferir, que entra dins de la cèl·lula eucariot i s'integra en l'ADN dels cromosomes d'aquesta.

Tant els plàsmids com els virus es preparen prèviament fent-los deficients del màxim possible dels seus gens. Hi ha de quedar, això no obstant, la regió iniciadora de la replicació perquè puguin reproduir-se, i també un gen que doni resistència específica a algun antibiòtic, davant el qual no sigui resistent la soca bacteriana a la qual se'l vol introduir. El perquè d'això el veurem després. Per altra banda, ha de conservar una seqüència, però només una, que reconegui l'enzim de restricció utilitzat per a tallar el plàsmid i produir el lloc d'inserció del segment que conté el gen. En canvi, és especialment convenient que s'hagi eliminat els gens de transferència, en el cas dels plàsmids, i els que determinen la virulència de la infecció en el cas dels bacteriòfags i els virus d'eucariotes. Molts plàsmids tenen gens de transferència que porten informació perquè a les bacteries es desenvolupi un mecanisme de transferència dels plàsmids a d'altres bacteries que no els contenen. Com a mesura de seguretat interessa que això no es pugui produir i que l'ADN recombinant quedi limitat i controlat dins de la soca de bacteries en què s'ha introduït. El pas a altres tipus de bacteries podria produir situacions imprevisibles que originessin propietats incontrolades, perilloses en algun sentit, com es veurà en discutir els possibles perills biològics que comporta l'enginyeria genètica. En el cas dels bacteriòfags i els virus d'eucariotes és obvi que no interessa que siguin deficients en els gens que els donen aquest caràcter.

c) *Mecanisme d'obtenció de l'ADN recombinant*

és dins del gen, en tallar l'ADN amb aquest enzim de restricció (per exemple, l'Eco RI) quedarà un segment d'ADN que continuarà el gen.

Aquest mètode sol presentar un problema important. Juntament amb el segment d'ADN que conté el gen que es vol transferir, es produeixen molts altres fragments diferents que no el contenen. En general, resulta difícil i laboriós identificar el fragment que interessa. S'ha de recórrer a obtenir ADN recombinants a l'atzar, entre els nombrosos fragments d'ADN tallats i l'ADN que es vol utilitzar com a vector. Els ADN recombinants així formats s'introdueixen en bacteries que tenen diferents fragments de l'ADN de les cèl·lules donants. A partir d'aquestes bacteries es poden produir soques portadores d'un dels diferents fragments d'aquest ADN. Si l'experiment és suficientment ampli, pot ser que totes les seqüències de l'ADN de les cèl·lules donants siguin presents en alguna de les soques de bacteries que contenen l'ADN recombinant. D'aquesta manera s'obté el que se'n diu una biblioteca de l'ADN de l'espècie donant. Aleshores el problema és localitzar dins d'aquesta biblioteca la soca bacteriana que porta el gen que ens interessa. Això pot ser molt difícil i laboriós.

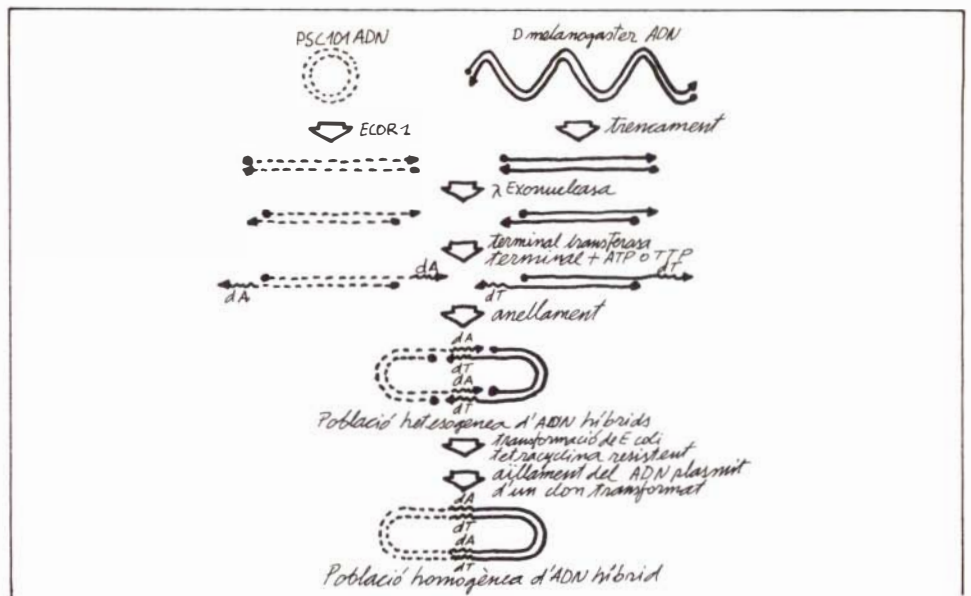
2) Quan és factible, actualment s'utilitza una alternativa a la tècnica anterior, que consisteix a sintetitzar l'ADN del gen que es vol transferir. Per a aquesta síntesi és necessari disposar de l'ARN missatger corresponent al gen, que es pot obtenir de cèl·lules en què el gen estigui en actiu.

Existeix un enzim, l'ADN polimerasa dependent d'ARN o transcriptasa inversa, fabricat amb la informació de gens d'alguns virus d'ARN productors de tumors, que té per funció transcriure una cadena d'ARN en la complementària d'ADN. Com que l'ARN missatger transcriu la seqüència de nucleòtids d'una de les dues cadenes de l'ADN, amb la transcriptasa inversa a partir del missatger es pot sintetitzar una altra vegada aquesta cadena de l'ADN. Després, a partir de l'ADN d'una cadena obtingut amb la transcriptasa inversa és possible sintetitzar un ADN de dues cadenes (fig. 4). S'ometen els detalls tècnics amb què això s'aconsegueix per no correspondre al nivell d'aquest treball.

b) *Elecció del vehicle que ha de portar el gen a transferir*

L'ADN en què s'insereix el gen que es vol transferir acostuma a ser l'ADN d'un plàsmid o d'un bacteriòfag, si el gen es vol introduir en una bactèria. Quan es

Esquema de la tècnica per a l'obtenció d'ADN recombinant



Hi ha tres mètodes principals.

1) Recordem que els enzims de restricció com l'Eco RI tallen l'ADN en fragments que tenen un sol filament en els seus extrems i que aquests extrems es diu que són cohesius, perquè són complementaris l'un de l'altre. Si tallem l'ADN d'un plàsmid o virus amb el mateix enzim de restricció utilitzat per a tallar el segment que conté el gen, es formaran en el lloc de tall uns extrems cohesis idèntics al que presenta aquest segment. Aleshores si barregem els fragments d'ADN de les cèl·lules donants, tallats per l'enzim, amb l'ADN del vehicle tallat pel mateix enzim, els extrems cohesius complementaris d'ambdós ADN poden aparellar-se per complementaritat de bases. Si a més, en el preparat on això es produeix hi ha molècules de lligasa (un enzim que uneix els nucleòtids dels extrems dels filaments d'ADN continguts, és a dir, que té una funció inversa a la dels enzims de restricció), aquesta podrà unir els extrems dels filaments de l'ADN que conté el gen que volem transferir amb els del vehicle. Així es formarà l'ADN recombinant, que serà una molècula circular. Amb aquesta explicació es veu la importància que l'ADN del vehicle tingui un sol lloc atacable per l'enzim de restricció (fig. 5).

2) Hi ha enzims de restricció com l'AluI que tallen l'ADN sense formar extrems cohesius. En aquest cas el mètode anterior no pot utilitzar-se per a formar l'ADN recombinant. El mateix succeeix quan l'ADN del gen que es vol transferir s'ha sintetitzat a partir d'un ARN missatger amb la transcriptasa inversa. En aquests casos el que es pot fer és sintetitzar extrems cohesius utilitzant l'enzim anomenat transferasa terminal. Aquest enzim té la propietat d'unir nucleòtids en els extrems 3' lliures de les molècules d'ADN. Si els fragments que contenen els gens que es volen transferir se sotmeten a l'acció de la transferasa terminal, en un preparat que tingui només nucleòtids d'un tipus, per exemple, nucleòtids d'adenina (A), en els extrems 3' dels segments d'ADN s'uniran una sèrie de nu-

cleòtids d'adenina. Si l'ADN del vehicle, després de tallar-lo pel lloc d'inserció, també el sotmetem a l'acció de la transferasa terminal, però utilitzant en aquest cas nucleòtids de timina (T) complementaris del d'adenina, en els extrems 3' del lloc on s'ha tallat s'uniran sèries d'aquests nucleòtids. Així tindrem en els extrems de les dues classes de molècules uns filaments senzills que seran complementaris entre si. Podrà produir-se un aparellament per complementaritat de bases entre l'ADN que conté el gen i el del vehicle, després per l'acció de la lligasa (com en el cas anterior) podrà quedar formada la molècula d'ADN recombinant (fig. 6).

3) Quan l'enzim de restricció utilitzat no forma extrems cohesius, com l'AluI, en lloc d'afegir-li aquests extrems com s'ha explicat a 2) pot fer-se una altra cosa. Pot utilitzar-se la lligasa del bacteriòfag T4, que uneix molècules d'ADN sense extrems cohesius.

ELECCIÓ DE L'ADN RECOMBINANT

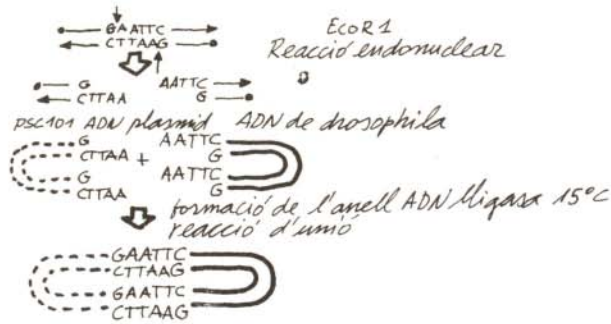
L'elecció d'aquest hoste depèn en primer lloc de l'objectiu que es vol assolir en l'experiment. Pot ser que aquest sigui la clonació, és a dir, l'obtenció de nombroses còpies de l'ADN transferit. Això sol tenir per finalitat tenir suficient quantitat d'aquest ADN per a poder-lo seqüenciar. En aquest cas solen utilitzar-se bacteries com a receptores de l'ADN recombinant. També pot interessar que l'ADN transferit pugui ser transcrit i traduït, en sintetitzar la proteïna per a la qual porta informació. Si aquesta proteïna es produeix en gran quantitat, perquè se sintetitzi en moltes cèl·lules, es pot extreure d'aquestes per utilitzar-la. Això és el que interessa fer, per exemple, en el cas en què l'ADN transferit sigui el del gen que regira la síntesi d'insulina en les cèl·lules humanes. Si es pot desenvolupar un mètode industrial per obtenir insulina humana per aquesta via, pot constituir la

base de l'obtenció d'aquesta hormona amb finalitat farmacològica. Fins ara, quan es persegueix un objectiu d'aquest tipus s'utilitzen bacteries com a cèl·lules receptores de l'ADN recombinant.

A vegades l'objectiu de l'experiment és aconseguir que algun tipus cel·lular adquireixi una propietat genètica que no tenia, però que porta l'ADN transferit. És possible que aquesta propietat sigui totalment estranya a la cèl·lula receptora, com en els casos en què s'intenta la transferència de gens nif de bacteries com *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Rhizobium*, que tenen informació per a la síntesi dels enzims necessaris per a la fixació del nitrogen atmosfèric, a cèl·lules de plantes com les dels cereals que mai no han tingut aquesta propietat. És evident l'interès pràctic que tindria aconseguir la transferència de gens nif als cereals, i que aquests gens hi funcionessin. Les varietats de blats o d'altres cereals que poguessin aprofitar directament el nitrogen atmosfèric no necessitarien adobs nitrogenats per al seu cultiu i la seva producció esdevindria molt econòmica.

Una altra alternativa és la introducció de gens normals en una cèl·lula deficient en alguna propietat genètica amb la intenció de corregir aquest defecte. Aquest pot ser el camí per a guarir malalties genètiques. Per exemple, en el cas de l'home, un objectiu pot ser introduir gens normals que determinen la síntesi de l'hemoglobina normal o A en individus malalts d'anèmia falciforme, els quals no elaboren aquesta hemoglobina. L'anèmia falciforme és una greu malaltia hereditària que per aquest camí pot arribar a guarir-se. En casos com aquest i l'indicat en el paràgraf anterior, és òbvia quina ha de ser l'elecció de la cèl·lula hoste: està determinada per quin és l'organisme al qual es vol introduir una propietat genètica o el qual es vol guarir.

Quan l'objectiu de l'experiment és clonar l'ADN, és molt convenient tenir en compte en l'elecció de la bactèria hoste que aquesta tingui propietats que minimitzin els possibles perills que pot tenir



Esquema d'un altre mètode d'obtenció d'ADN recombinant

l'experiment. En síntesi, aquests consisteixen en el fet que en la bactèria podrien aparèixer propietats imprevisibles que la fessin perillosa, ja sigui perquè es convertís en patògena per a l'home, per a algun animal domèstic o planta agrícola i fos difícil de controlar, o perquè es desenvolupés incontroladament a la natura produint desequilibris ecològics.

L'hoste més utilitzat en aquests casos és la bactèria *Escherichia coli*, però és molt convenient que les soques emprades tinguin mutants que facin molt difícil que puguin viure fora del medi de cultiu que s'utilitza al laboratori; en especial, convé que no puguin viure en l'intestí humà o del ratolí. Entre aquests mutants n'hi ha que per a poder viure necessiten la presència en el medi de cultiu de substàncies que no solen trobar-se en l'ambient en què normalment viuen les bactèries; d'altres fan deficientes les cèl·lules en la síntesi de la paret cel·lular, de manera que fora del medi de cultiu del laboratori són lisades (destruïdes) i resisteixen molt poc la dessecació.

En relació amb el problema del desenvolupament de soques perilloses, pot ser interessant no utilitzar *E. coli* i buscar una altra bactèria hoste que sigui menys perillosa per a l'home. En aquest sentit es recomana, per exemple, *Bacillus subtilis*. Finalment, en relació amb la tècnica de selecció de les bactèries transformades que s'explicarà en l'apartat següent, les bactèries hoste han de ser sensibles a un antibiòtic, precisament a aquell per al qual el plàsmid o bacteriòfag vector porti gens de resistència.

OBTENCIÓ I SELECCIÓ DE CÈL·LULES TRANSFORMADES

Quan ja s'ha obtingut l'ADN recombinant i es disposa d'una soca de bactèries adequada per a servir d'hoste, el proper pas és la introducció de l'ADN recombi-

nant en les bactèries. Això s'aconsegueix per la transformació. En afegir a un cultiu de bactèries ADN recombinant algunes bactèries són transformades, és a dir, hi penetra l'ADN del medi conferint-les noves propietats que aquest porta. Si l'ADN recombinant és prou petit i es compleixen altres condicions necessàries o convenients per a la reeixida de l'experiment, el nombre de cèl·lules transformades pot ser relativament gran. Això no obstant, l'aparició d'aquestes cèl·lules no és suficient per a utilitzar-les en els objectius abans esmentats. Per això cal poder-les separar de les que no s'han transformat, i obtenir-ne soques pures. Els mètodes de selecció de les cèl·lules transformades tenen aquest propòsit.

Per a fer possible la selecció, la soca de bactèries hoste ha de ser sensible a un antibiòtic. Així, quan s'ha produït la transformació, es poden seleccionar les bactèries transformades afegint l'antibiòtic al medi de cultiu. Les bactèries no transformades, sensibles, seran eliminades del cultiu, mentre que les transformades seran resistents perquè porten el gen de resistència de l'ADN recombinant i es conservaran vives en el cultiu. Aquestes cèl·lules, aïllades una a una, poden servir per a fundar soques de cèl·lules portadores d'ADN recombinant.

SELECCIÓ DE LES CÈL·LULES TRANSFORMADES PORTADORES D'UN ADN ESPECÍFIC

Un problema important és com aconseguir soques amb un ADN recombinant que porti precisament un gen o seqüència d'ADN específics, cosa que es necessita per a aconseguir l'objectiu de l'experiment.

En molts casos no és possible tallar de l'ADN de la cèl·lula portadora només la

seqüència que es vol transferir. L'enzim de restricció pot tallar, a més d'aquesta seqüència, altres moltes i la seva separació pot ser molt difícil o impossible. Per tant, s'han de realitzar experiments d'integració en vectors utilitzant el conjunt de les seqüències tallades. Com que els vectors que porten precisament les seqüències desitjades no es poden reconèixer, és necessari realitzar la transformació de les bactèries amb tots els vectors indiscriminadament. Aquest tipus d'experiment s'anomena "de perdigonada", perquè s'introdueixen a l'atzar els diferents ADNs, entre els quals hi ha el desitjat. El problema en aquest experiment és identificar i aïllar bactèries transformades que portin precisament el gen o segment d'ADN escollit.

Per a identificar entre les cèl·lules transformades les que porten un ADN determinat és necessari aïllar-les una a una i obtenir-ne clons. El conjunt d'aquests clons conté totes les seqüències d'ADN de l'espècie de la qual han estat extretes. S'obté així el que se'n diu "una biblioteca" de les seqüències d'ADN d'aquesta espècie. Ara el problema és identificar els clons portadors de l'ADN que es vol utilitzar. Són diverses les vies per a fer això. Es poden fer créixer bactèries dels diferents clons sobre un filtre de nitrocel·lulosa, col·locat sobre un medi de cultiu que travessa el filtre i permet el creixement de les bactèries. Quan amb aquest mètode s'han obtingut colònies, s'obtenen rèpliques d'aquestes i es provoca una lisi *in situ* de les bactèries, perquè quedi lliure l'ADN que contenen. Entre aquest ADN hi ha el que s'havia introduït amb el vector. Després els filtres s'incuben amb ARN missatger del gen que es vol identificar amb marcatge radioactiu. En els llocs on hi havia clons portadors de l'ADN d'aquest gen es produirà hibridització. Per autoradiografia es detecta la posició d'aquests clons. Una altra possibilitat és analitzar les propietats dels clons de bactèries transformades. Pot ser que els gens introduïts amb el vector funcionin i s'elabori per la bac-

tèria la proteïna corresponent a aquests gens. En aquest cas, la identificació d'aquestes proteïnes pot ser la via per a identificar els clons que les produeixen. El problema, a vegades molt difícil de solucionar, de la identificació dels clons que porten l'ADN desitjat, pot evitar-se preparant un ADN específic. A partir d'ARN missatger del gen que es vol manipular i utilitzant la transcriptasa inversa, com s'ha dit abans, és possible sintetitzar l'ADN del gen. Totes les molècules d'ADN recombinant obtingudes amb aquest ADN seran idèntiques i, emprant-les per a transformar una soca bacteriana, totes les cèl·lules transformades portaran l'ADN que desitgem. En aquest cas no serà necessària la selecció entre els clons transformats.

LA CLONACIÓ

Freqüentment, l'obtenció d'un ADN recombinant i la seva introducció en bacteries té per objecte aconseguir una gran quantitat d'aquest ADN.

Si el vector emprat per a introduir el gen és un plàsmid, per a aconseguir una gran quantitat de l'ADN del gen és favorable que el plàsmid sigui del que es presenta en gran nombre de rèpliques dins de cada bactèria. Aleshores aquestes portaran nombroses còpies del gen. En un cultiu de bacteries portadores d'aquest plàsmid, el nombre de còpies del gen serà elevadíssim. Aquest procés d'obtenció de moltes rèpliques d'un gen o ADN és la clonació.

LA MANIPULACIÓ DELS GENS EN ELS EUCARIONTS

Amb una sèrie d'objectius que s'exposaran després, té també interès la introducció de gens en cèl·lules eucariotes. És possible la introducció de petits fragments d'ADN en cèl·lules d'eucariotes i

que aquest ADN s'integri en algun dels cromosomes de la cèl·lula. Malgrat tot, això s'aconsegueix només amb una freqüència molt baixa.

Un altre camí per a introduir ADN en cèl·lules eucariotes consisteix a emprar com a vector un virus. Per exemple s'han utilitzat amb aquest objecte el virus SV40, el del polioma o el virus herpes. Amb aquest mètode s'aconsegueix una major freqüència d'introducció i si el gen inserit en el virus està col·locat en el lloc i amb l'orientació adequats pot funcionar, essent transcrit i traduït. Aquests virus han de ser deficientes per molts dels seus gens, com els bacteriòfags que s'utilitzen per a transformar bacteries, perquè no tinguin les seves propietats patògenes. Tot i això, alguns científics mostren considerable prudència en la utilització d'aquests vehicles, en especial si es volen introduir en organismes vius. S'han utilitzat també com a vectors plàsmids de bacteries. Fins i tot s'han obtingut vectors mixtos, per exemple, del virus SV40 i del bacteriòfag λ .

OBJECTIUS DE LA MANIPULACIÓ GENÈTICA

L'obtenció d'un gran nombre de rèpliques d'un segment d'ADN fa possible la seva seqüenciació ràpida, gràcies a les tècniques desenvolupades per Sanger. Són importantíssims els avenços que el coneixement d'aquestes seqüències està produint en el camp de la genètica molecular i de la genètica evolutiva. Els senyals que conté l'ADN relacionats amb els mecanismes de la transcripció i la traducció van essent ràpidament identificats amb la seqüenciació. Igualment, s'estan identificant senyals que serveixen en els mecanismes de regulació del funcionament dels gens, tan importants per a entendre els processos del desenvolupament en els organismes eucariotes, com les respostes adaptatives de les cèl·lules o

dels organismes a factors externs.

També el coneixement de les seqüències d'ADN ha demostrat que l'organització dels gens en els eucariotes no és igual que en els procarionts. Els gens dels primers són "partits", és a dir, presenten seqüències intercalades de nucleòtids que no es tradueixen (introns) entre les que són traduïdes (exons). Aquest ha estat un descobriment inesperat, que el coneixement dels gens de les bacteries no feia preveure. Igualment la seqüenciació de l'ADN de les mitocondries ha demostrat que la clau genètica no és completament universal, i la de bacteriòfags com el $\Phi X 174$, l'existència de gens imbricats que porten una informació superposada, però diferent perquè es lleixen amb un desplaçament de fase.

Des del punt de vista de la biologia evolutiva, la seqüenciació de l'ADN permet l'anàlisi de la variabilitat genètica a un nou nivell, el més bàsic possible. Encara que aquesta anàlisi està en les fases inicials, la seqüenciació i fins un pas inicial per a aquesta, l'obtenció dels mapes dits de restricció sembla que demostra l'existència d'una variabilitat molt més gran que la que semblava previsible. La seqüenciació de segments relativament llargs d'ADN, que contenen diversos gens, com s'ha fet en la regió dels gens de les globines en alguns mamífers, ha permès descobrir unes complexitats imprevisibles. S'ha trobat nombroses duplicacions de gens, entre els quals els pseudogens o gens duplicats que no funcionen, almenys normalment.

Una altra possibilitat de la investigació bàsica és la producció de mutacions dirigides en els gens aïllats *in vitro*. Amb els enzims de restricció es poden tallar d'un gen o d'una seqüència d'ADN segments determinats a voluntat de l'investigador. Aleshores, recombinant aquest ADN amb un vector i introduint-lo en cèl·lules, pot estudiar-se com funciona, el que permet deduir la funció del segment tallat.

Passant a les possibles aplicacions de la manipulació genètica podem citar la possibilitat que gens introduïts en bacteries

siguin traduïts dins d'elles, formant la proteïna per a la qual porten informació. Gràcies a la clonació, la formació d'aquesta proteïna es pot fer a gran escala i sembla que podrà arribar a produir-se a escala industrial. Si aquesta proteïna té una utilitat, posem per cas que tingui propietats terapèutiques, es comprèn fàcilment el seu interès pràctic. Quan interessa que el gen introduït es tradueixi, és indispensable que porti senyals necessaris per a la transcripció i la traducció o bé col·locar-lo a prop de senyals dels gens del vector que serveixin per a la seva traducció i transcripció.

Un altre objectiu pràctic important que sembla que pot assolir-se amb la manipulació genètica és la introducció de gens d'una espècie en una altra, amb el propòsit que aquesta adquireixi propietats de la primera que no tenia. Abans ja s'ha explicat l'interès que tindria la introducció de gens nif a plantes de cereals.

La curació de malalties hereditàries també és un dels últims objectius de la manipulació dels gens. Si a un individu diabètic se li pogués introduir gens normals per a la síntesi d'insulina, o bé a un pacient d'anèmia falciforme gens que portessin la informació per a la síntesi d'hemoglobina normal, tindríem una terapèutica genètica d'aquestes malalties. En ratolins ja s'ha fet alguns passos en aquest sentit. Per ara, en general, el que es fa primer és introduir gens en cèl·lules en cultiu (aquestes poden ser extreïdes de l'individu en què s'experimenta) i després introduir aquestes cèl·lules en l'hoste viu.

IMPACTE DE LA MANIPULACIÓ GENÈTICA A LA SOCIETAT

El desenvolupament de la ciència i de la seva aplicació, la tecnologia, té per conseqüència un control progressiu de la naturalesa per l'home. Amb l'enginyeria

genètica s'està albirant la possibilitat que l'home controli la seva pròpia naturalesa biològica. No és estrany que aquesta possibilitat hagi despertat temors i fins actituds de rebuig. Per una part, els mateixos científics que treballen en aquest camp varen plantejar-se la possibilitat que les tècniques de la manipulació genètica comportessin un risc biològic, que errors accidentals o per insuficiència de coneixements poguessin tenir per conseqüència la pèrdua del control dels organismes manipulats, principalment bacteries. Aquesta pèrdua de control s'ha pensat que podria tenir conseqüències desastroses des del punt de vista epidemiològic, ja sigui per a l'home, ja per a alguna de les seves espècies domèstiques. Igualment s'ha pensat que podria tenir conseqüències negatives sobre els equilibris ecològics naturals. És considerant aquests possibles perills que s'han desenvolupat tècniques adequades per a limitar-los. Les característiques de les soques de bacteries i dels vectors utilitzats que abans hem citat estan pensades amb aquest fi. Igualment en els laboratoris on es treballa en manipulació genètica s'han de complir unes condicions d'aïllament, d'higiene, etc. que redueixen la probabilitat que les cèl·lules manipulades surtin del laboratori. No obstant això, en aquest sentit, és a dir, com a perill biològic, l'experiència d'aquests anys de treball sembla indicar que la manipulació genètica no constitueix un risc més gran del que comporten altres avenços tecnològics que han despertat moltes menys suspicàcies. Per això sembla que en aquest aspecte l'última decisió ha de ser dels científics, ja que es tracta d'un problema tècnic i aquests són els qui millor el coneixen, per no dir els únics.

En canvi, un altre aspecte és la consideració de l'impacte que el control biològic de la nostra espècie pot tenir a la societat. Respecte a aquesta qüestió em limitaré a indicar els punts que em sembla que deuen tenir-se en compte.

1. Que les aplicacions possibles són moltes i molt positives per a millorar la vida

de l'home.

2. Que en problemes d'aquest tipus hi ha el perill de partir de prejudicis anticientífics i antiintel·lectuals.

3. Que si hi pot haver perills, aquests no depenen dels científics, sinó dels polítics, utilitzant aquest terme en sentit ampli.

4. Que en general, quan es vol passar un riu, s'ha d'afrontar el perill de mullar-se.

5. Que tota decisió negativa que no sigui resultat d'un acord universal i que es compleixi, no té sentit.

6. Que en últim terme és la societat, encara que amb la màxima informació que li puguin donar els científics, qui ha de decidir.

(Antoni Prevosti)

Materials de lectura

G.S. Stent: *Molecular Genetics*. San Francisco, 1971. (*Genètica molecular*, Barcelona, 1973).

J.D. Watson: *The Double Helix*. Londres, 1968 (*La doble hèlice*, Barcelona, 1970)

M. Ycas: *The Biological Code*. Nova York, 1970

F. Gros, F. Jacob, P. Royer: *Sciences de la vie et société*. París, La Documentation Française, 1979.