

Ingeniería genómica bacteriana a partir del genoma mínimo



Los estudios que buscan definir el genoma mínimo abren amplias perspectivas para el diseño de microorganismos adecuados a nuestras necesidades, sin dejar de lado la consideración de los riesgos asociados.

Gustavo Santoyo Pizano y David Romero Camarena

Cuando se publicó por primera vez en 1816 la novela *Frankenstein*, de Mary Shelley, el mundo se aterrorizó por la idea de crear vida de forma “no natural”. Sin embargo, se pensó que eso sólo podría pasar en la fantasía.

Hoy los científicos tienen interés en crear vida a partir de un genoma mínimo. En los siguientes párrafos, trataremos de explicar en qué consiste esta nueva idea, profundizando un poco en aspectos técnicos y esperando dejar la semilla del debate y la discusión de lo que será en el futuro una realidad.

Se dice que para entender la biología completa de un organismo se debe conocer la secuencia total de su genoma, que es el conjunto de todos sus genes. Por eso se ha dado una carrera por secuenciar la mayor cantidad de genomas posible, y en especial, los de interés humano. Esto entraña conocer el orden (la se-

cuencia) en la que aparecen las cuatro bases nucleotídicas (guanina, citosina, timina y adenina) que constituyen la molécula del ácido desoxirribonucleico, o ADN. Es este ordenamiento y su traducción a secuencias de proteínas el responsable de las características biológicas de un organismo.

El primer genoma secuenciado fue el del virus bacteriano fX174, por Fred Sanger (inventor de la técnica de secuenciación y ganador de dos premios Nobel) y sus colaboradores en 1977. Posteriormente, se secuenciaron otros genomas de organelos celulares que tienen sus propios genes, como mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, fue hasta 1995 que se secuenció por primera vez un organismo de vida libre, la bacteria *Haemophilus influenzae* Rd. Esta bacteria contiene 1 830 137 bases en su genoma. A partir de ese momento y hasta ahora se han secuenciado decenas de genomas, incluyendo la mayor parte del genoma humano, y la cifra sigue creciendo.

Los genomas de bacterias que se han secuenciado tienen diversos tamaños. El más grande conocido hasta ahora es el de la bacteria fijadora de nitrógeno *Mesorhizobium loti*, distribuidos en un cromosoma, que mide 7 millones de bases (7 mil kiloba-

ses) y dos plásmidos de 350 y 208 kilobases). Por el contrario, el más pequeño secuenciado es el de *Mycoplasma genitalium*, que contiene tan sólo 580 kilobases en su genoma, en las cuales encontramos 480 genes que codifican para proteínas y 37 genes que producen ácido ribonucleico (ARN). Esto convierte a *M. genitalium* en el organismo secuenciado autorreplicable con menos genes: el genoma de *M. loti* es quince veces más grande.

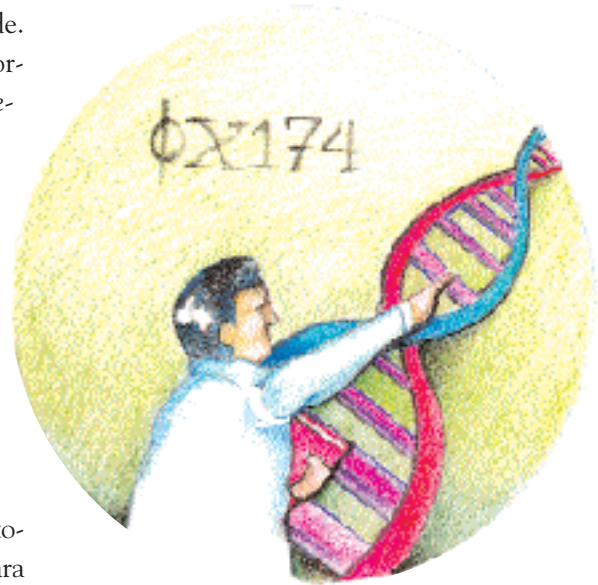
Sin duda el genoma tan compacto de *M. genitalium* es sorprendente, pero recientemente se publicó en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* un artículo donde se presenta un análisis de nueve genomas de *Buchnera* spp. Esta bacteria es un endosimbionte obligado de áfidos (pulgones); es decir, el pulgón requiere que las bacterias vivan dentro de sus células. Se encontró una gran diversidad en el tamaño de sus genomas: algunas cepas poseen un genoma de sólo 450 kilobases, aún más reducido que el de *M. genitalium*. Habrá que esperar para conocer la secuencia completa de su genoma, que traerá nuevos indicios sobre el conjunto de genes necesario para la vida de un endosimbionte.

Todo esto ha llevado a diversos científicos a preguntarse si todos los genes que contienen estas bacterias son esenciales para vivir y reproducirse. Si no todos son esenciales, ¿cuáles lo son?, ¿cuál es el conjunto mínimo de genes con el cual puede vivir una célula? En resumen, ¿cuál es el genoma mínimo?

EL GENOMA MÍNIMO

El genoma mínimo en general se define como el grupo más pequeño de genes que permiten a un organismo reproducirse en un determinado ambiente. La intención de encontrar el genoma mínimo ha llevado a varios investigadores a realizar diversos intentos, tanto teóricos como experimentales.

En 1996, Mushegian y Koonin publicaron un artículo en el que hacen un análisis comparativo de los genomas completos de *Mycoplasma genitalium* y *Haemophilus influenzae*. Como comentábamos anteriormente, *M. genitalium* tiene un genoma de 580 kilobases, lo que lo convierte en la forma de vida celular con menos genes cuyo genoma se ha secuenciado hasta ahora. Sin embargo, es necesario destacar que no significa que sea el genoma mínimo, ya que algunos de los genes que contiene podrían no ser indispensables para su supervivencia. La bacteria *Haemophilus influenzae* contiene un genoma de 1 830 kilobases, de las cuales se encontraron 1 700 genes que codifican para proteínas. Lo importante para conocer cuál es el genoma mínimo al comparar estas dos bacterias, radica en que el último



ancestro común entre *M. genitalium* y *H. influenzae* apareció hace 1 500 millones de años; desde entonces, cada bacteria siguió su camino evolutivo por separado. Por tanto, los genes que están conservados en ambas bacterias y que poseen un origen evolutivo común (genes ortólogos) son virtualmente esenciales para cumplir con las funciones celulares, y es muy probable que se acerquen al genoma mínimo. Basados en esta lógica, los investigadores encontraron que 240 genes de *M. genitalium* tienen genes ortólogos en el genoma de *H. influenzae*. A este grupo de genes se añadieron 22 genes más que se consideran indispensables en vías metabólicas, pero que no tienen un ortólogo. Adicionalmente, se eliminaron seis genes específicos de parásitos. Por tanto, se decidió que 256

genes son probablemente el grupo de genes mínimo indispensable y suficiente para que una célula “moderna” pueda vivir. Las funciones que cumple este conjunto de genes básicamente cubren las demandas fisiológicas esenciales de una célula.

Es interesante mencionar que, de este grupo de 256 genes, dieciocho no tienen una función conocida. Todos ellos son ortólogos y están altamente conservados en ambos genomas. Esto nos hace agudamente conscientes de que aún no entendemos del todo cómo funcionan algunas proteínas que podrían ser indispensables para la célula.

Por otra parte, se han realizado intentos en laboratorio por conocer el genoma mínimo. En 1999 Hutchison y colegas, del *Institute for Genomic Research* y *Celera Genomics*, utilizaron nuevamente la bacteria *Mycoplasma genitalium* y su pariente cercano *Mycoplasma pneumoniae* para realizar un experimento basado en la inactivación global de los genomas de ambas bacterias, que han sido completamente secuenciados.

Esto tuvo el objetivo de interrumpir la función de genes que no son esenciales para la vida de las bacterias en condiciones de crecimiento de laboratorio e identificar el verdadero genoma mínimo. Una vez que se realizó la inactivación al azar, se seleccionaron todas las cepas que podían continuar creciendo para localizar el sitio donde habían sido alteradas. Además, como ya se conocía la secuencia de sus genomas, fue relativamente fácil para los investigadores identificar el gen inactivado. De esta manera se identificaron de 265 a 350 genes (de los 480 que contiene el genoma de *M. genitalium*) que son indispensables para que la bacteria se divida en condiciones de laboratorio. Nuevamente, es muy interesante mencionar que dentro de este conjunto de genes indispensables se incluyen 111 genes que no tienen una función conocida, lo que nos indica que aún nos falta un largo camino para conocer mejor los mecanismos moleculares básicos de la vida celular.



CREACIÓN DE UN GENOMA MÍNIMO

Los intentos mencionados son grandes pasos que se han dado en la carrera por conocer cuál es el genoma mínimo.

En particular, el trabajo de Hutchison y colaboradores ha avanzado de forma importante en lo que será en un futuro la ingeniería genómica bacteriana. Entre la ingeniería genética y la ingeniería genómica bacteriana o microbiana existen grandes diferencias. La primera comenzó a principios de los setenta, con la clonación de genes en vectores o plásmidos, que son introducidos en células bacterianas y permiten su expresión y la

producción de alguna molécula de interés. Por otro lado, la ingeniería bacteriana consiste en la construcción de todo un cromosoma artificial a partir de un genoma mínimo. Para esto, los científicos están trabajando con dos técnicas. Una se conoce como *bottom-up* (“desde abajo”) y consiste en la síntesis completa de un cromosoma que contendría el genoma mínimo, y su inserción en un “ambiente” que permita la replicación y actividad metabólica. Podemos imaginar este “ambiente” como una célula bacteriana a la cual se le ha retirado por completo su material genético o ADN, dejando sólo la “cáscara” con un conjunto de proteínas que puedan iniciar la transcripción y traducción del nuevo cromosoma residente.

Por otro lado, se han dado algunos avances más concretos con técnicas novedosas de ingeniería, basados en la recombinación de ADN. Estas metodologías permiten la clonación de fragmentos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La célula utiliza la maquinaria de recombinación genética para integrar el fragmento de ADN en el cromosoma o la secuencia objetivo. Esta técnica se ha denominado como “recombinería” (*recombineering*) y presenta perspectivas importantes de aplicación, incluyendo la genómica funcional en eucariontes. Sin embargo, no dudamos que en el futuro se puedan realizar algunas modificaciones a la técnica inicial para permitir el ensamblaje o clonación de fragmentos de ADN más largos, para obtener un cromosoma artificial.

La segunda línea de investigación para construir un genoma mínimo se ha denominado como *top-down* (“desde arriba”). Consiste en tomar una bacteria de genoma pequeño, como *M. genitalium*, e inactivar o eliminar poco a poco genes que no sean esenciales, tal y como lo están haciendo Hutchison y colaboradores.

Recientemente, otro grupo de investigadores han propuesto una novedosa técnica, basada en la recombinería, para retirar segmentos grandes del genoma sin dejar rastro o huella del evento. Esto ha permitido disminuir el tamaño del genoma de la bacteria *Escherichia coli* en un 8.1 por ciento, reduciendo en un 9.3 por ciento la cantidad de genes.

Como podemos ver, sobre esta línea existe un mayor avance en la construcción del genoma mínimo. Sin embargo, como mencionábamos anteriormente, aún cuando estamos cerca de conocer cuál es el conjunto mínimo de genes, aún nos falta caracterizar y descubrir su función. Igualmente necesario es tener un conocimiento preciso sobre otros componentes celulares (lípidos, azúcares, etcétera) que son importantes para el metabolismo celular.

Es obvio que existe un gran puente por construir entre lo que conocemos ahora y el objetivo de tener un organismo ensamblado a partir de un genoma mínimo. Sin embargo, los cimientos que sienta este proyecto son muy fuertes; no sabemos en cuánto tiempo se logre la meta, pero podemos estar seguros de que se logrará.

APLICACIONES Y PERSPECTIVAS DE LA INGENIERÍA GENÓMICA BACTERIANA

El objetivo final de la ingeniería bacteriana es la construcción de nuevos organismos, y para tal fin debemos conocer a fondo cuál es el genoma mínimo y cómo funciona. De igual forma, la construcción de estos organismos con un genoma mínimo podría tener una diversidad de aplicaciones, tanto como la tienen ahora las bacterias y otros microorganismos en la industria alimenticia, farmacéutica, química o

El objetivo final de la ingeniería bacteriana es la construcción de nuevos organismos, y para tal fin debemos conocer a fondo cuál es el genoma mínimo y cómo funciona

en la agricultura, entre otras. Sabemos que desde la década de los setenta comenzó la ingeniería genética, introduciendo genes en bacterias para producir diversos compuestos, como por ejemplo la hormona insulina, de gran importancia médica para el tratamiento de la diabetes. En agricultura, se podrían producir cepas bacterianas como biocontrol de plagas. Estas bacterias podrían producir algún compuesto tóxico específico para combatir la plaga deseada sin dañar otros microorganismos benéficos para las plantas.

Otra aplicación de la ingeniería bacteriana sería el uso de bacterias como herramientas de trabajo en biología molecular. Quizás una bacteria con un genoma mínimo bien conocido nos ayude a caracterizar la función de un gen sin temor de que algún otro parámetro esté interfiriendo con nuestros análisis. Éstos son sólo algunos ejemplos que podemos mencionar. Sin

Conocer el genoma mínimo también puede traer importantes indicios sobre el origen de la vida y las primeras formas celulares que aparecieron hace miles de millones de años

embargo, podemos preguntarnos que, si con la ingeniería genética ya se ha hecho todo lo anteriormente mencionado, ¿qué ventajas podemos tener con un microorganismo construido a partir de un genoma mínimo? Una de las ventajas es que trabajaríamos con organismos bien caracterizados genómicamente, es decir, cualquier modificación o mutación que pudieran tener sería relativamente fácil de rastrear y corregir. Segundo, un organismo mínimo podría dirigir mayormente su energía a producir alguna sustancia deseada, ya que se evitaría el gasto de energía en alguna otra vía metabólica. Asimismo, el producto deseado estaría mucho más limpio de algún otro compuesto que pudiera contaminarlo, facilitando de esta forma su purificación final.

Como se ve, tener un organismo mínimo como un “diseño genómico básico” tiene varias ventajas, ya que a partir de este genoma mínimo se pueden introducir modificaciones con relativa facilidad, construyendo organismos que desempeñen las diferentes tareas que sean de nuestro interés.

Conocer el genoma mínimo también puede traer importantes indicios sobre el origen de la vida y las primeras formas celulares que aparecieron hace miles de millones de años. Aún cuando sabemos que las primeras formas de vida sobrevivieron en un ambiente extremo, con temperaturas cambiantes y una atmósfera con poco oxígeno, podemos descifrar quizás cuáles fueron los genes que pertenecieron a las primeras células, tal y como lo proponen Mushegian y Koonin: hacer un análisis comparativo de genes ortólogos entre organismos que pertenezcan a los tres principales reinos de la vida (eubacterias, arqueobacterias y eucariontes).

BREVES COMENTARIOS ÉTICOS

Craig Venter (uno de los principales investigadores en ciencias genómicas y responsable de la secuenciación de varios organismos, incluyendo el genoma humano) hace algunos años hablaba sobre la idea de contestar la pregunta: ¿qué es la vida? Él cree que cuando conozcamos cuál es el genoma mínimo y cómo funcionan todos esos genes en conjunto para crear vida, podremos contestar esa pregunta. Por supuesto, no todos comparten ese punto de vista reduccionista para definir lo que es la vida. Personas que tienen formación sociológica, filosófica o religiosa creen que la vida no es solamente un conjunto de genes. De igual forma, tener este tipo de enfoque sobre lo que es la vida puede limitar nuestro conocimiento científico de formas de vida más complejas. Por otra parte, el reduccionismo ha llevado

a hipótesis erróneas en biología, por ejemplo pensar que los virus fueron los precursores de la vida celular.

Definir la vida basados en los genes y su replicación es actualmente un tema a discutir. Sin embargo, ¿se debe dejar la definición de la vida solamente a los científicos, ignorando al público, a filósofos o a religiosos? Éste es un punto interesante que merece una discusión especial.

Cuando hablamos o escuchamos algún comentario sobre crear vida de forma “no natural”, surgen diversas cuestiones e interrogantes éticas. La primera y obligatoria es si se debe permitir la creación de nuevos organismos a partir de un genoma mínimo. Cuando el hombre comenzó a conocer con cierto detalle la biología de los organismos, el siguiente paso o pregunta que se hizo fue si se podría modificar ese orden biológico. Hasta ahora son muy diversos los ejemplos que tenemos sobre la modificación genética de organismos, desde bacterias hasta mamíferos. De igual forma surgieron temores sobre la liberación de estos organismos al ambiente, ya que podrían alterar el orden ecológico o, de igual forma, podrían contaminar y dañar a otras especies, incluyendo al hombre.

Con la construcción de nuevos organismos también surge el tema de la propiedad intelectual. ¿Se deben patentar estos nuevos genomas mínimos? ¿Cuáles serían las implicaciones sociales, económicas y científicas si los genomas mínimos son propiedad de alguna compañía?

Conforme avanza el conocimiento científico y se realizan descubrimientos importantes, se puede contribuir a mejorar la vida de la sociedad. Sin embargo, este conocimiento en ocasiones no es bien utilizado. Baste mencionar que se han utilizado bacterias patógenas de humanos como armas biológicas en las guerras.

El conocimiento mal empleado puede traer consecuencias graves a nuestro ambiente, a la sociedad o a nuestra salud. Todo es cuestión de tener información exacta y fiable que pueda abrir marcos de discusión entre los científicos, la sociedad y el poder legislativo de cada país. La información puede hacerse llegar al público de forma clara, de manera que forme opinión acerca de los avances científicos que se están dando, sus beneficios y también sus probables efectos negativos. Cuando apareció la oveja Dolly, el primer mamífero clonado a partir de la célula de un adulto, tomó por sorpresa a todo el mundo. En ese momento la sociedad se dio cuenta de la rapidez con que avanza la ciencia y se asombró con la posibilidad de usar esa tecnología en humanos. Como comenta Mildred K. Cho y el Grupo sobre Ética de la Genómica “... Dolly ilustra las consecuencias negativas de

dejar que los temas éticos vayan detrás de los avances científicos”.

Con el conocimiento de la secuencia de genomas completos se ha desarrollado la ciencia genómica, y nos hemos dado cuenta de lo mucho que sabemos, pero también de lo poco que entendemos. Aun cuando estamos seguros que las cuatro bases de la vida son guanina, citosina, adenina y timina (además de uracilo, que contiene el ARN) y conocemos en qué orden las encontramos en nuestros genes, debemos entender muchas cosas que aún no desciframos de este simple, y a la vez, complicado alfabeto de la vida.

¿Se debe dejar
la definición de la vida
solamente a los científicos,
ignorando al público,
a filósofos o a religiosos?
Éste es un punto interesante
que merece una
discusión especial

Bibliografía

- Gil, R., *et al.* (2002), "Extreme Genome Reduction en *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 4454-4458.
- Hutchinson III, C. A., *et al.* (1999), "Global Transposon Mutagenesis and a Minimal Mycoplasma Genome", *Science*, 286, 2165-2169.
- Cho, M. K., *et al.* (1999), "Ethical Considerations in Synthesizing a Minimal Genome" *Science*, 286, 2087-2090.
- Mushegian, A. R. y E. V. Koonin (1996), "A Minimal Gene Set for Cellular Life Derived by Comparison of Complete Bacterial Genomes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10268-10273.
- Maniloff, J. (1996), "The Minimal Cell Genome: On Being the Right Size", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10004-10006.
- Neal, G. C., *et al.* (2001), "Recombineering: A Powerful New Tool for Mouse Functional Genomics", *Nature Rev.*, 2, 769-779.
- Kolisnychenko, V., *et al.* (2002), "Engineering a Reduced *Escherichia coli* Genome", *Genome Res.*, 12, 640-647.

Agradecimientos

Agradecemos la amable revisión del escrito y los interesantes comentarios a Maricarmen Orozco Mosqueda.

Gustavo Santoyo Pizano es biólogo egresado de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Actualmente es estudiante del doctorado en Ciencias Biomédicas en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM. Realiza investigaciones *in silico* sobre eventos de conversión génica en familias multigénicas de genomas secuenciados completamente, además de tratar de explicar los mecanismos moleculares de recombinación genética entre genes reiterados en organismos procariontes. Es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
gsantoyo@cifn.unam.mx

David Romero Camarena obtuvo el doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Recibió el premio Weizmann de la Academia de la Investigación Científica en 1991. Se incorporó como investigador del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM en 1986; actualmente es investigador y secretario académico de ese instituto. Su área de investigación son los mecanismos de la recombinación genética y su papel en la formación de rearrreglos, empleando a *Rhizobium etli* como modelo. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores.
dromero@cifn.unam.mx