

Ingineria genică

Ingineria genică poate fi definită drept ansamblu de metode și tehnici prin care este posibilă manipularea materialului genetic la nivel celular și molecular pentru a obține pe căi netradiționale produși utili omului și genotipuri noi, având la bază tehnologia moleculelor recombinante (hibride) de ADN.

Ingineria genică se profilează ca direcție științifică și tehnologică în anii '70. Apariția ei a fost determinată, în primul rând, de aprofundarea cunoștințelor de genetică la nivel celular și molecular, de dezvoltarea cunoștințelor privind materialul genetic al organismelor vii, și anume:

- descoperirea mecanismelor principale de transmitere a informației ereditare: transformarea (**A. Avery, C. MacLeod, M. MacCarty**, 1944) – prin intermediul fragmentelor de ADN; sexducția (**J. Lederberg, E. Tatum**, 1946) – prin conjugarea bacteriilor și transducția (**J. Lederberg**, 1952) – cu ajutorul fagilor;
- descoperirea structurii moleculei de ADN (**J. Watson, F. Crick**, 1953);
- descoperirea și izolarea enzimelor de restricție și legare a fragmentelor de ADN (**H. Smith**, 1970);
- descoperirea fenomenului transcripției inverse a informației genetice de la ARN la ADN (**H. Temin, S. Mizutani, D. Baltimor**, 1970);
- descoperirea sintezei chimice a genelor (**A. Kornberg**, 1967; **H. Khorana**, 1970, 1976).

1. Bazele tehnico-materiale ale ingineriei genice

Datorită cercetărilor de genetică moleculară, a fost posibilă cunoașterea structurii de profunzime a unor gene și genomuri, fapt ce a condus la elaborarea tehnologiei ADN-ului recombinat și la transferul de gene peste barierele de specie.

Tehnica recombinării genetice *in vitro* include trei etape principale:

- 1) extragerea sau sinteza chimică a ADN-ului din diferite specii;
- 2) construirea unei molecule hibride (recombinante) de ADN;
- 3) reintroducerea moleculei recombinante de ADN într-o celulă vie pentru reproducerea și expresia ei (fig. 1).

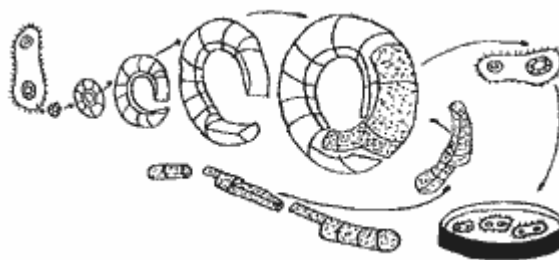


Fig 1. Etapele principale ale ingineriei genice.

Extragerea ADN-ului se produce utilizându-se o serie de enzime specifice, în primul rând, cele de restricție, capabile să rupă molecula de ADN în anumite locuri. Enzima de restricție extrasă din *Escherichia coli* Eco RI recunoaște următoarea secvență de nucleotide:

$$G\downarrow AATTC$$
$$CTTAA\uparrow G.$$

Restrictazele reprezintă instrumentul de bază al ingineriei genice, deoarece au capacitatea unică de a tăia molecula de ADN în anumite sectoare (loci). Prima restrictază a fost obținută din bacteriile *Haemophilus influenzae* serotipul α și se folosea pentru fragmentarea ADN-ului virusului SV-40 și cartarea lui (**Kelly, Smith**, 1970).

Nu toate restrictazele se utilizează în ingineria genică, ci doar acele care au următoarele proprietăți:

- pot tăia molecula de ADN în fragmente discrete;
- posedă o specificitate de acțiune înaltă (taie molecula de ADN într-o anumită succesiune – „site”-ul de recunoaștere);
- pot forma, în rezultatul restricției, „marginii lipicioase” la capetele fragmentului de ADN (această proprietate nu este caracteristică tuturor restrictazelor);
- pot fi izolate relativ ușor în stare pură din mediul incubațional.

La repartiția ADN-ului este implicată ADN-ligaza, care poate lega unele fragmente de restricție. Acestea și alte enzime stau la baza obținerii moleculelor recombinante de ADN (fig.2).

Pentru transferul genelor de la unele organisme la altele sunt utilizați vectorii (moleculele speciale de ADN ce transferă informația genetică dintr-o celulă în alta) reprezentați prin plasmide, virusuri, liposomi, ADN mitocondrial și ADN cloroplastic.

Sistemele vectoriale, utilizate pentru transferul informației străine în celulele (organismele) – gazdă, trebuie să corespundă următoarelor cerințe:

- inofensivitatea vectorului;
- multiplicarea rapidă în celula-gazdă și lipsa posibilităților de multiplicare în celulele altor organisme;
- prezența unui număr restrâns de situri de recunoaștere;
- prezența genelor marker pentru selectarea de clone după moleculele recombinante de ADN;
- izolarea relativ ușoară, clonarea și expresia în celulele (organismele) străine.

În calitate de vectori, plasmidele au căpătat o răspândire deosebită.

Plasmidele reprezintă niște molecule inelare de ADN specifice bacteriilor. Ele pot exista autonom și determină unele caractere ale bacteriilor, cum ar fi: capacitatea de conjugare, rezistența la antibiotice, agresivitatea.

Plasmidele necesare pentru transferul de gene trebuie să posedă un număr restrâns de regiuni sensibile la acțiunea enzimelor de restricție. În acest caz, se poate realiza ruperea și apoi inserția de ADN exogen în plasmid.

Primul plasmid bacterian, folosit ca vector pentru transferul de gene, a fost cel notat pSC 101, realizat de **S. Cohen** (1973).

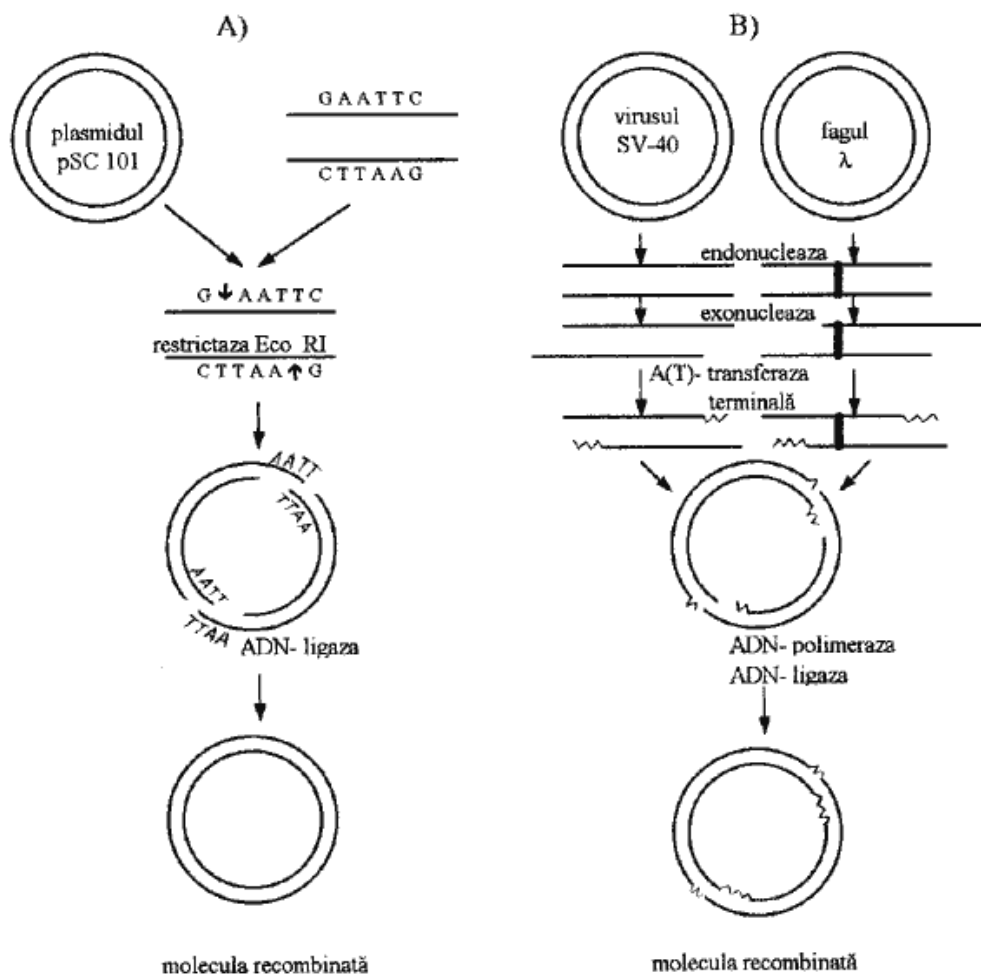


Fig.2. Obținerea moleculelor recombinante de ADN:

A) – metoda ligazică; B) – metoda terminală.

Ca vector plasmidic, la plante se folosește plasmidul Ti (Tumour inducing) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, care condiționează formarea tumorilor pe tulpinile a numeroase specii de plante dicotiledonate.

A doua tehnică de introducere a unei gene într-o bacterie folosește ca vector un bacteriofag (fagul leambda – λ), al cărui genom (10-50 gene) integrează gena străină. Ea se va sintetiza întocmai ca și celelalte gene ale virusului, dacă acesta din urmă se va replica în celula bacteriană.

Pentru celulele eucariote animale, vectorii virali care se folosesc sunt, de regulă, virusul tumoral SV-40 și virusul papiloma bovin (BPV). Se crede că vectorii virali vor putea fi utilizați și la plante.

Un tip particular de vectori reprezintă liposomii, picături foarte mici de lipide produse artificial, în care pot fi incluse gene, precum și diferite medicamente, enzime etc.

Genomul mitocondriilor și cloroplastelor este similar celui bacterian și, ca urmare, se crede că el va putea fi utilizat pentru transferul unor gene la organismele eucariote.

Celulelor utilizate în experimentele ingineriei genice le sunt înaintate o serie de cerințe care au menirea de a asigura securitatea investigațiilor științifice. Conform „Regulilor despre molecule recombinante de ADN” celulele-gazdă trebuie să satisfacă următoarele cerințe:

- capacitatea sporită de implicare în investigațiile științifice;

- incapacitatea de sinteză a anvelopei protectoare în afara laboratorului;
- capacitatea lizării ADN-ului său în afara laboratorului;
- imposibilitatea transferului informației ereditare altor organisme;
- imposibilitatea poluării mediului înconjurător în rezultatul transformării și/sau transfecției.

În prezent, de rând cu *E. coli*, în calitate de obiecte de studiu (celule gazdă), se utilizează bacilul fânului (*Bacillus subtilis*), celulele de drojdii, culturile de celule și țesuturi vegetale și animale, culturile de protoplaști.

După obținerea moleculelor recombinante de ADN, ele trebuie transferate în celulele (organismele) procariote sau eucariote pentru funcționarea lor ulterioară (replierea și transmiterea informației ereditare).

De menționat că, în cazul operării cu genele organismelor eucariote, genele eucariotelor superioare, de regulă, nu se manifestă în celulele procariote, iar genele eucariotelor inferioare se manifestă doar parțial. Iată de ce, în aceste experimente se acordă o deosebită atenție direcției transferului de informație ereditară a moleculelor recombinante, adică: de la celula procariotă în celulele pro- sau eucariote și invers, de la celula eucariotă în eu- sau procariote.

Moleculele recombinante ale procariotelor funcționează ușor în celulele procariote (în calitate de repliconi).

Sunt descrise și cazuri de funcționare a genelor procariotelor în celulele eucariotelor.

K. Merril și colab. (1971), **In. Hors** și colab. (1975) au demonstrat posibilitatea transferului genei β -galactozidazei din *E. coli* în fibroblastele umane ale unui bolnav de galactozimie cu ajutorul fagului λ (galactozimia este o boală autozomială recesivă ce provoacă dereglarea metabolismului ca rezultat al lipsei enzimei 1-D-galactozo-1-fosfaturidiltransferazei).

Expresia genelor eucariotelor în celulele procariote, de asemenea, este posibilă. **Devis** (1976) a transferat gena histidinei drojdiilor în *E. coli* cu ajutorul fagilor. Astăzi se obțin pe scară largă produse ale organismelor eucariote în baza bacteriilor (hormoni, interferoni etc.).

Informația ereditară străină (a moleculei recombinante), care pătrunde în celula (organismul) gazdă, este protejată pe diferite căi:

- metilarea ADN-ului (virusurile);
- transferul moleculei liniare de ADN în formă circulară (fagul λ);
- blocarea sistemului de restricții al celulei-gazdă (fagul T3);
- acțiunea restrictazelor.

În același timp, celula-gazdă își protejează informația ereditară prin diferite mecanisme:

- acțiunea restrictazelor specifice;
- metilarea ADN;
- acțiunea vecinătății epigenetice;
- acțiunea nespecifică a nucleazelor celulare;
- protecția mecanică prin membranele celulare;
- acțiunea proteinelor histonice și nehistonice;

- acțiunea interferonului.

2. Realizările ingineriei genice

Datorită cercetărilor în tehnologia ADN-ului recombinat, au fost elaborate metode de transfer de gene în celulele procariote, care pot sintetiza multe proteine utile. Astfel, a devenit posibilă producerea și chiar comercializarea pe scară largă a unor hormoni (insulina, somatostatina, somatotropina), a interferonului, a preparatelor de diagnosticare etc.

a) Obținerea insulinei umane și a altor hormoni.

Din 60 de milioane de diabetici, circa 4 milioane necesită un tratament cu insulină.

În 1916, **E. Sharpy-Schafer** a descoperit că insulina este secretată de celule care alcătuiesc insulele Langherhans din pancreas, ceea ce l-a determinat să numească hormonul insulină. În 1921, **F. Banting** și **H. Best**, la Toronto, au izolat din pancreasul de câine hormonul insulină, demonstrând acțiunea lui antidiabetică. În 1923, firma farmaceutică americană „Eli Lilly” pune deja în vânzare prima insulină animală (în prezent, pentru a obține circa 100 grame de insulină, este nevoie de 800 kg de pancreas de bou (greutatea medie a unui pancreas de bou este de 200-250 grame)).

Insulina umană este alcătuită din două catene polipeptidice A și B, compuse respectiv din 21 și 30 de aminoacizi, a căror secvență a fost stabilită în 1955 de **F. Sanger**.

În perioada 1963-1965, trei grupe de cercetători (americani, germani și chinezi) au reușit sinteza artificială a insulinei prin intermediul a 170 de reacții chimice, lucru ce făcea imposibilă producerea insulinei pe cale industrială.

Noile tehnologii industriale de obținere a insulinei umane au fost posibile odată cu extragerea genei insulinei (**W. Gilbert** și colaboratorii săi, 1980) și crearea moleculelor recombinante de ADN în baza plasmidelor (fig.3).

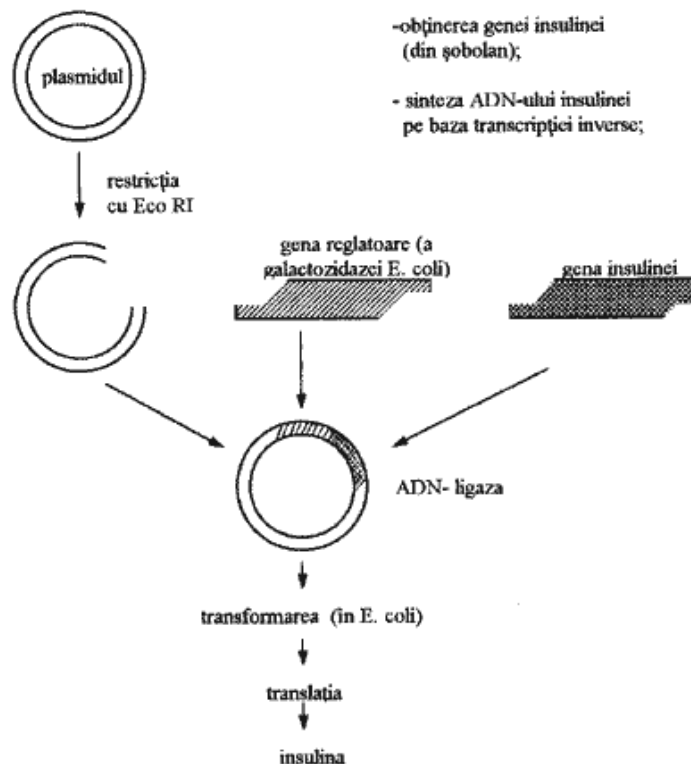


Fig.3. Schema obținerii insulinei umane.

Moleculile recombinante de ADN sunt transferate în colibacili (*Escherichia coli*), unde are loc realizarea informației genetice codificate în molecula de ADN. Paralel cu proteinele specifice bacteriei, se sintetizează și insulina. Pentru a proteja insulina umană (ea nu este proprie colibacililor și este distrusă de enzimele bacteriene), în molecula recombinată de ADN se încadrează, pe lângă gena insulinei, și o genă reglatoare care codifică o proteină specifică colibacililor (de exemplu galactozidaza). Ca rezultat al manifestării informației genetice a moleculei recombinante de ADN, se obține o catenă polipeptidică hibridă, din care mai apoi se separă insulina.

Datorită utilizării tehnologiei ADN-ului recombinat, se obțin aproximativ 200 grame de insulină de pe 1 m³ de mediu de cultură, adică tot atâta cât se poate extrage din aproape 1600 kg de pancreas de bou sau porc.

Probele clinice efectuate cu insulina umană, produsă prin tehnici de inginerie genică, au demonstrat că ea nu are efecte secundare și că poate fi comercializată, adică folosită la tratarea bolnavilor de diabet (din 1982 în SUA, din 1983 în Marea Britanie).

Un hormon de mare importanță biologică este hormonul de creștere sau somatotropina (HGH – Human Growth Hormone), secretat de lobul anterior al hipofizei. Molecula hormonului cuprinde 191 de aminoacizi. Absența lui provoacă nanismul hipofizar, ce are o frecvență de 7-100 per milion de persoane. Tratamentul cu acest hormon se realizează începând cu vârsta de 4-5 ani și până la pubertate, în doze de minimum 6 mg pe săptămână per persoană. Somatotropina este un hormon cu o specificație înaltă și nu poate fi utilizat de la animale. Din hipofiza unui cadavru se extrag doar 4-6 mg de hormon, heterogen și impurificat. Iată de ce, producerea acestui hormon prin tehnici de inginerie genică prezintă un interes deosebit.

Sinteza acestui hormon pe cale artificială s-a început cu producerea de ADNc (ADN-ul copie) cu ajutorul revers-transcriptazei, având ca matrice ARNm din hipofize (transcripție inversă). Acesta a fost clonat, apoi tăiat cu enzime de restricție pentru obținerea secvenței nucleotidice corespunzătoare somatotropinei, cu excepția fragmentului ce determină primii 23 de aminoacizi. Fragmentul în cauză era clonat separat, ca rezultat al unei sinteze chimice, apoi cele două segmente unite, la ele se adăugă segmente reglatoare și pe baza plasmidelor se obține plasmidiul recombinat cu gena HGH (a somatotropinei). Colibacilii, primind acest plasmid recombinat, sintetizau somatotropina (la 1 litru de mediu de cultură se obține 2,0-2,5 mg somatotropină).

În prezent, cu ajutorul bacteriilor recombinante sunt obținuți și alți hormoni, de exemplu, thimopietina ce conține 49 de aminoacizi și este secretată de timus.

În ce privește hormonii cu molecule mai mici (sub 20 de aminoacizi), este preferabilă sinteza lor pe cale chimică.

b) Obținerea interferonilor.

Interferonii sunt produși de celule specializate pentru lupta împotriva infecțiilor virale. Ei au fost descoperiți în 1957 de **F. Isaacs** și **I. Lindenmann** la Institutul Național de Cercetări Medicale de lângă Londra. Interferonii reprezintă niște substanțe proteice (din 146-166 de aminoacizi) și sunt produși în cantități infime de celula animală sau umană, când un virus pătrunde în organism.

Există mai multe tipuri de interferoni: interferonul leucocitar (α), interferonul fibroblastelor (β) și interferonul limfocitelor T sau interferonul imun (γ).

Ei pot fi obținuți prin tehnici clasice (din celulele sanguine și din fibroblaste) și prin tehnici de recombinare genică.

Pentru a obține interferon din celulele sanguine sau din fibroblastele cultivate, acestea sunt infectate cu un virus, iar după 24 de ore prin centrifugare și purificare se izolează din

mediul de cultură. Dintr-un litru de sânge se poate extrage până la 1 mkg (10^{-3} grame) de interferon.

În 1980, savanții americani **W. Gilbert** și **C. Weissmann** și japonezul **T. Taniguki** au produs interferonul uman cu ajutorul unor colibacili cu genomul modificat.

Celulele de *E. coli* nu pot transforma predecesorul interferonului în interferon activ, de aceea, inițial, complexul de ADN, format dintr-o regiune nucleotidică reglatoare și o regiune ce determină structura interferonului, este supus acțiunii enzimelor de restricție, care taie molecula de ADN aproximativ la frontiera acestor două catene (genei interferonului nu-i ajunge un triplet ATG). Codonul omis (ATG) este anexat prin sinteză chimică.

Gena interferonului se încadrează în continuare într-un plasmid, care se transferă în *E. coli*. Astfel, colibaciliile sintetizează interferonul uman. Dintr-un litru de suspensie de *E. coli* (circa 10^{11} celule) se pot extrage până la 5 mg de interferon (adică de 5000 de ori mai mult decât din 1 litru de sânge).

Tehnicile de inginerie genică permit obținerea preparatelor hibride de interferon cu un spectru larg de acțiune.

c) Transferul de gene în celulele vegetale și animale.

Tehnicile de recombinare genetică permit transferul genelor importante în celulele de plante și animale, iar în rezultat se obțin plante și animale transgenice. Pentru transferul de gene la plante sunt utilizate bacteriile *Agrobacterium tumefaciens* (descoperite în 1907 de **E. Smith** și **C. Townsend**), care provoacă formarea unor tumori cancerogene (crown gall) pe tulpinile unor plante (la speciile din 93 de familii de dicotiledonate).

Plasmidul Ti (tumor inducing) descoperit la *A. tumefaciens* cauzează tumori la plante prin transferul unui segment de ADN (ADN-T) din plasmid în celulele vegetale.

Strategia pentru transferul genelor cu ajutorul plasmidului Ti în celula vegetală include:

- introducerea segmentului de ADN-T într-un plasmid de *E. coli*;
- introducerea în plasmidul format a genei necesare și a genei marker (gena pentru rezistență la canamicină);
- introducerea plasmidului recombinat în *Agrobacterium tumefaciens*;
- infecția cu *A. tumefaciens* a plantelor respective;
- selectarea plantelor transformate (fig.4).

Pentru realizarea transferului de gene în celula vegetală este utilizată metoda culturilor de celule și țesuturi în *vitro*.

Firma americană „Monsanto” comercializează deja plante transgenice (transformate) de cartof, rezistente la gândacul de Colorado.

O realizare remarcabilă în domeniul transferului de gene în celula animală o constituie șoarecii transgenici. Gena hormonului de creștere de la șobolan a fost transferată prin microinjecții în cele două nuclee ale ovulului proaspăt fecundat de la șoarece (în fiecare nucleu câte circa 600 copii ale genei hormonului de creștere).

Ovulele fecundate (170) au fost implantate în oviductul unei femele-receptor. În consecință, s-au obținut 21 de șorice. La 6 dintre ei s-a constatat o cantitate mărită a hormonului de creștere (de 100-800 de ori). Acești șorice aveau o creștere mult mai rapidă și prezentau greutatea corporală superioare animalelor-martor.

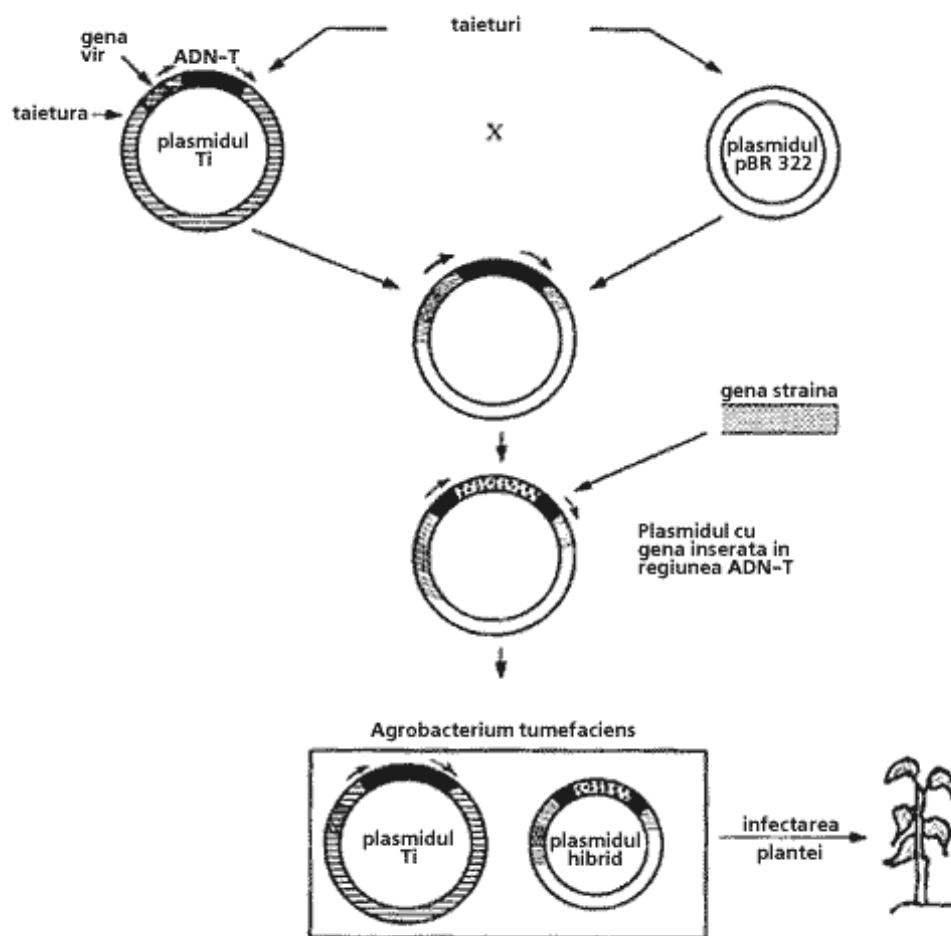


Fig.4. Transferul de gene cu ajutorul plasmidului Ti în celula vegetală.