

25 DE MARZO DE 2004

Nuevas bibliotecas de ARN pueden inactivar genes humanos de forma selectiva

Unos investigadores han producido extensas bibliotecas de segmentos cortos de ácido ribonucleico (ARN) que pueden ser utilizadas para inactivar genes individuales de ratón y de seres humanos para estudiar su función.

Las bibliotecas estarán a plena disposición de los laboratorios que estudian biología humana y enfermedades. Los investigadores esperan que las bibliotecas se conviertan en una herramienta de investigación poderosa para realizar análisis genéticos y descubrimientos.

"La biblioteca funciona eficientemente como herramienta de búsqueda de genes."

— Stephen J. Elledge

Dos grupos de investigación independientes publicaron sus respectivas bibliotecas de interferencia de ARN (iARN) en el número del 25 de marzo, de 2004, de la revista *Nature*. Gregory Hannon, del Laboratorio Cold Spring Harbor, y el investigador del Instituto Médico Howard Hughes, Stephen J. Elledge, quien se encuentra en la Facultad de Medicina de Harvard y en el Hospital Brigham and Women's lideraron el primer grupo. Los primeros coautores fueron Patrick Paddison, Jose Silva y Douglas Conklin, del laboratorio de Hannon. René Bernards, quien se encuentra en The Netherlands Cancer Institute condujo el segundo grupo.

Al comentar sobre la importancia de los estudios de la revista *Nature*, Andrew Fraser, del Instituto Wellcome Trust Sanger escribió: "Ya que ningún laboratorio puede especializarse en todos los aspectos de la función génica, la disponibilidad general de estas bibliotecas (ARN en forma de horquilla corta) como recurso común es un importante paso hacia adelante, ya que aprovecha la experiencia de análisis de toda la comunidad de investigación de células mamíferas".

La interferencia de ARN es una técnica utilizada con mucho éxito por los investigadores para desactivar genes en organismos inferiores, incluyendo la mosca de la fruta *Drosophila* y el gusano redondo *C. elegans*. Los investigadores se tropezaron con esta poderosa herramienta para realizar

análisis génico cuando descubrieron que cuando se introducían secuencias de ARN de doble cadena que son idénticas a un ARN mensajero diana, en realidad, activaban la degradación del ARN mensajero.

Las moléculas de ARN mensajero son planteados genéticos para la producción de proteínas. En la producción de proteínas, el plantado de ARNm se transcribe a partir de genes de ADN y se transporta a los ribosomas -“fábricas”de proteínas de la célula que son grandes complejos de proteína y de ARN-. La interferencia de ARN es una técnica que esencialmente detiene la actividad del gen que está siendo estudiado.

“Pero la iARN no funcionaba en la gran mayoría de las células de ratón y humanas porque hay respuestas antivirales adicionales que reconocen al ARN de doble cadena”, dijo Elledge. “A pesar de que la maquinaria para generar iARN se encuentran en células mamíferas, la maquinaria antiviral hace que el ARN introducido se vuelva tóxico y que las células mueran”.

Los investigadores descubrieron posteriormente que se podían introducir segmentos cortos de ARN interferente en células mamíferas y que permanecerían inadvertidos por la maquinaria antiviral, dijo Elledge. Además, descubrieron que la célula misma podría ser diseñada para producir ARN interferente al introducir el gen para las moléculas de ARN en forma de horquilla corta que se pliegan sobre sí mismas para crear un ARN pequeño.

Para construir una biblioteca de genes mamíferos para moléculas de ARN con forma de horquilla corta, Hannon y sus colegas primero tuvieron que decidirse por un diseño óptimo para una molécula de ARN de forma de horquilla corta. “Probamos muchas cosas distintas -por ejemplo, la longitud de la horquilla, la estructura del lazo, la estructura de transcripción y qué promotores utilizar-”, dijo Hannon. “Y llegamos a una estructura óptima para esta fase de la ciencia”.

Hannon enfatizó, sin embargo, “que ese conjunto de parámetros es algo que va a evolucionar continuamente. El año pasado hubo muchos avances en la comprensión de la bioquímica de la iARN. Por lo tanto, ahora estamos construyendo estructuras aún más eficaces y vehículos de entrega aún más eficaces que serán construidos en generaciones futuras de esta biblioteca”.

Una vez que se terminó un diseño básico optimizado de la molécula de ARN en forma de horquilla corta, los investigadores produjeron entonces una biblioteca de genes para ARNs en forma horquilla corta que podría tener como diana a 9.610 genes humanos y a 5.563 genes de ratón. Los genes elegidos fueron los que probablemente estaban involucrados en enfermedades humanas o que eran interruptores moleculares claves de la célula.

La biblioteca de genes fue integrada en un vector retroviral que era capaz de transportar los genes a otros tipos de células. Los investigadores también incorporaron un sistema de “código de barras” de ADN, mediante el cual se puede marcar cada molécula de ARN con una secuencia única de ADN.

Al determinar la secuencia de un código de barras determinado para un ARN en forma de horquilla corta, los investigadores que utilizan la biblioteca para buscar los genes que afectan un proceso celular específico pueden identificar qué molécula de ARN entre las miles que se encuentran en la biblioteca está inactivando la actividad de un gen particular.

Pero los vectores retrovirales utilizados para transportar los ARNs en forma de horquilla corta al interior de las células no fueron demasiado lejos. No resultaron eficientes para introducir los ARNs genéticos en forma de horquilla corta al interior de todos los tipos de células. Aquí es donde una técnica innovadora desarrollada por Elledge y sus colegas resultó ser útil. Esta técnica, llamada “clonación integrada genéticamente asistida por apareamiento” (MAGIC, por sus siglas en inglés), ayudó en gran medida a la transferencia de la biblioteca de ARN en forma de horquilla corta al interior de todos los tipos de células por medio de apareamiento bacteriano.

Para validar el funcionamiento de la biblioteca en células humanas, los investigadores la probaron en una búsqueda genética diseñada para distinguir defectos en la función del proteosoma humano. El proteosoma es un componente clave de la maquinaria mediante la cual la célula degrada las proteínas indeseadas. “Ésta fue una prueba exhaustiva del sistema dado que existe una gran cantidad de genes diferentes cuya pérdida podría interferir con la función del proteosoma”, dijo Elledge. “Encontramos una gran cantidad de genes, y concluimos que la biblioteca funcionaba muy eficientemente como herramienta de búsqueda de genes”.

Estudios actuales tienen el objetivo de aumentar el número de genes humanos que pueden ser investigados utilizando la biblioteca, dijeron los investigadores. Acentuaron que las bibliotecas actuales y futuras estarán a disposición de la comunidad científica a un costo nominal a través de Open Biosystems, Inc., en Huntsville, AL.

“Por primera vez, esto nos brinda la oportunidad de realizar una forma de investigación de genética directa en células mamíferas -donde podemos observar mutaciones hipomórficas, que van de leves a severas, y sus consecuencias fenotípicas, lo que eventualmente alcanzará una escala de todo el genoma”, dijo Hannon. “Por lo tanto, estas bibliotecas evolucionarán hasta convertirse en un recurso importante para la comunidad científica”.