

08 DE MARZO DE 2001

Método para atrapar genes impulsa el descubrimiento de nuevas señales que rigen el patrón de conexiones nerviosas cerebrales

Investigadores desarrollan un poderoso examen genético para identificar los genes que producen las proteínas que guían el patrón de los trillones de conexiones nerviosas presentes en el cerebro de los mamíferos. La técnica le permite a los científicos identificar genes nuevos y determinar qué genes son responsables de los defectos en el patrón de conexiones nerviosas cerebrales, que se observan durante el desarrollo. Los científicos piensan que esta técnica probablemente acelere el descubrimiento de nuevas moléculas involucradas en el direccionamiento del axón.

Las neuronas se conectan en redes extendiendo los axones, que actúan como cables que crecen hacia blancos específicos en el sistema nervioso. La trayectoria de los axones hacia una neurona diana es dirigida por los conos de crecimiento, presentes en el extremo del axón, que reciben señales sobre la mejor trayectoria a seguir, mediante químicos atrayentes y repelentes que son secretados por las células del sistema nervioso. Estos atrayentes y repelentes son las llamadas moléculas de direccionamiento del axón.

"Hasta ahora, hemos estado intentando identificar los mecanismos que realizan las conexiones cerebrales, a partir de un evento de direccionamiento por vez y a partir de una molécula por vez. Con el método para atrapar genes, podemos utilizar una red mucho más amplia, lo que nos permite estudiar simultáneamente una gran cantidad de genes, y luego determinar los efectos de las mutaciones en los mismos."

— Marc Tessier-Lavigne

En un artículo publicado en el número del 8 de marzo de 2001, de la revista *Nature*, los investigadores conducidos por el investigador del Instituto Médico Howard Hughes, Marc Tessier-Lavigne, de la Universidad de California, en San Francisco, y William C. Skarnes, de la Universidad de California, en Berkeley, revelan su nueva técnica y discuten algunas aplicaciones iniciales del método.

La nueva técnica para "atrapar genes" podría liberar a los científicos de los laboriosos exámenes genéticos y enfoques bioquímicos que se utilizan actualmente para identificar las moléculas nuevas involucradas en el direccionamiento del axón, dicen los investigadores. "Hasta ahora, hemos estado intentando identificar los mecanismos que realizan las conexiones cerebrales, a partir de un evento de direccionamiento por vez y a partir de una molécula por vez", dijo Tessier-Lavigne. "Por ejemplo, en trabajos anteriores en los que estudiamos el direccionamiento del axón en la médula espinal, desarrollamos un ensayo para estudiar el crecimiento de una clase particular de axón. Y ese estudio nos llevó, a través de un trabajo bioquímico extenso, a identificar una pequeña familia de moléculas de direccionamiento llamadas netrinas".

Al conectarse con los receptores presentes en la superficie del extremo del axón, las moléculas de direccionamiento ya sea atraen o rechazan a los axones en crecimiento de las neuronas. Típicamente, cada molécula de direccionamiento o receptor se identifica individualmente a través de largos exámenes genéticos de mutaciones aleatorias inducidas por métodos químicos, dijo Tessier-Lavigne. "Sin embargo, con el método para atrapar genes, podemos utilizar una red mucho más amplia, lo que nos permite estudiar simultáneamente una gran cantidad de genes, y luego determinar los efectos de las mutaciones en los mismos".

La técnica para atrapar genes se basó en un método desarrollado anteriormente por Skarnes, de la Universidad de California, en Berkeley. La técnica de Skarnes requería mutar genes en células troncales embrionarias de ratón, mediante la inserción aleatoria de un complejo marcador genético de dos componentes: el primero es un gen marcador que produce color azul en las células que lo llevan insertado y el segundo es un gen de resistencia a drogas. De esta manera, los científicos pueden identificar fácilmente a las células de interés, aplicando una droga para deshacerse de las células que no tomaron el gen de resistencia a drogas, y luego pueden utilizar el color azul para una mayor distinción.

El método de Skarnes refinó este método estándar de "vector para atrapar genes" al incluir un segmento génico que sólo activa al marcador azul si el ADN se fusiona con un gen para una proteína de membrana, tal como un receptor. Con este refinamiento, llamado "trampa secretora", los investigadores lograron reducir los genes atrapados a aquellos que codifican para los receptores que están involucrados en el direccionamiento del axón.

"El vector para la trampa secretora es muy útil porque nos permite centrarnos con exactitud en los tipos moléculas que estamos interesados principalmente

receptores y ligandos-, dijo Tessier-Lavigne. "Estos genes sólo representan una fracción pequeña del genoma, y esta trampa se centra únicamente en esa fracción".

Sin embargo, el método para atrapar genes todavía necesitaba un refinamiento mayor antes de que estuviera listo para ser utilizado para pescar las moléculas de direccionamiento del axón, dijo Tessier-Lavigne. "En estudios iniciales, encontramos que los ratones con genes neuronales 'atrapados' no presentaban una tinción axonal apropiada", dijo. De esta manera, los investigadores tuvieron dificultades para explorar los efectos que tenían las mutaciones específicas en genes que participan en la formación del patrón de conexiones nerviosas del cerebro.

Para tratar de solucionar el problema, Tessier-Lavigne y sus colegas insertaron un marcador adicional (PLAP) en el sistema para atrapar genes. La presencia de PLAP tiñe a los axones de color púrpura. "Esta estrategia para atrapar genes modificada nos permitió mutar al gen para un receptor de una molécula de direccionamiento, y al incluir el marcador PLAP, pudimos ver al patrón de conexiones nerviosas alterado gracias a la tinción púrpura y determinar rápidamente qué era lo que había fallado en la formación de las conexiones nerviosas", dijo Tessier-Lavigne.

Usando la técnica para atrapar genes modificada, los investigadores produjeron 46 líneas de ratones con defectos definidos en moléculas de direccionamiento del axón, dijo Tessier-Lavigne. "Con estos ratones, no sólo hemos probado que podemos atrapar los genes que se expresan específicamente en el sistema nervioso, sino que también podemos ver patrones discretos de marcado axonal, y podemos descubrir fenotipos mutantes", dijo.

Específicamente, estudios en genes llamados *Sema6A* y *EphA4*, demostraron que el método para atrapar podría identificar mutantes en el direccionamiento del axón.

"Con *EphA4*, demostramos que podíamos rederivar una mutante conocida, y con *Sema6A* demostramos que podíamos utilizar la técnica para descubrir una mutante nueva, que sólo afecte un subconjunto pequeño de axones en un sistema nervioso, que de otra manera sería normal", dijo Tessier-Lavigne.

Estos resultados sugieren que el nuevo método para atrapar genes permitirá un rápido aumento en la comprensión de la estrategia que utilizan las neuronas para establecer sus conexiones en el cerebro en desarrollo.

"Se ha demostrado que las neuronas que proyectan sus axones hacia un área particular siguen un código de activación de factores de transcripción, que probablemente active a los genes para los receptores superficiales que, a su vez, determinan lo que hace el axón", dijo Tessier-Lavigne. "Esperamos que el método pueda ayudar a identificar el código subyacente, lo que se lograría centrándose muy específicamente en los receptores implicados en el direccionamiento del axón y encontrando sus patrones de expresión, así como sus fenotipos mutantes".

Además, las líneas de ratones mutantes producidas por esta técnica también deberían ayudar a mapear el patrón de conexiones nerviosas normal del cerebro. "Estas líneas de ratones tienen poblaciones muy específicas de axones, marcadas con color púrpura", dijo Tessier-Lavigne. "En algunos casos esta es la primera vez que un marcador ha sido identificado para esos axones, y esos marcadores proporcionan un recurso valioso para las personas deseen estudiar el patrón de conexiones nerviosas normal del cerebro".