

30 DE NOVIEMBRE DE 2004

## Rápida evolución de una nueva proteína fluorescente

Fascinados con la forma eficiente en la que el sistema inmune humano genera una respuesta rápida para crear una variedad casi infinita de anticuerpos, unos investigadores “han secuestrado” esa maquinaria y la han utilizado para desarrollar un nuevo tipo de proteína fluorescente.

El proceso de mutación, llamado hipermutación somática (SHM, por sus siglas en inglés), actúa normalmente sobre los genes de inmunoglobulinas, produciendo una gran variedad de anticuerpos necesarios para atacar a los microbios y a otras sustancias extrañas que el sistema inmune podría no haber encontrado anteriormente.

---

"Lo que intentábamos hacer era tomar, digamos, una obra de Shakespeare y ver si podíamos mutarla para generar una obra completamente diferente. No sabíamos si podríamos hacerlo hasta que lo intentamos."

— Roger Y. Tsien

---

Los investigadores dijeron que su demostración de que la SHM se puede adaptar ampliamente para ser utilizada en investigación abre el camino para que una mutación mucho más rápida de genes produzca proteínas con propiedades nuevas y útiles, que se podrían utilizar como herramientas de investigación y en el tratamiento de enfermedades.

Por ejemplo, los investigadores utilizaron la SHM para desarrollar una proteína fluorescente roja -que se utiliza para rastrear moléculas dentro de las células- con propiedades mejoradas de estabilidad y emisión de color que iban más allá de lo que los investigadores podían crear ellos mismos. Las propiedades de la proteína fluorescente nueva, hecha por un gen mutado llamado *mPlum*, harán que sea un indicador útil de actividad génica o de tráfico proteico cuando *mPlum* sea unido a genes determinados en células vivas, dijeron.

El equipo de investigación conducido por Roger Y. Tsien, investigador del Instituto Médico Howard Hughes en la Universidad de California, en San

Diego, publicó su trabajo en el número del 30 de noviembre de 2004, de la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences*. En estudios relacionados pero separados, el grupo de Tsien ha utilizado una estrategia diferente para crear una variedad de colores nuevos de la proteína fluorescente. (Para leer sobre esos estudios, consulte por favor <http://www.hhmi.org/news/tsien2-esp.html>).

Según Tsien, el proceso de SHM, que tiene lugar en las células B productoras de anticuerpos del sistema inmune, ofrece ventajas considerables para los investigadores que intentan generar una gran variedad de genes mutados para producir proteínas con propiedades nuevas.

“La metodología tradicional utilizada para mutagenizar consiste en emplear un método bioquímico para realizar cambios en un gen en el tubo de ensayo y entonces insertar el gen en un organismo para determinar las propiedades de su proteína”, dijo. “Luego se tiene que hacer crecer el gen y extraerlo para hacer otros ciclos de mutaciones. Así que se introduce el gen constantemente para descubrir sus propiedades y se lo extrae para realizar más cambios. Es extremadamente tedioso y lleva mucho tiempo, y el tamaño de la biblioteca de genes mutados está limitado por la eficacia con la cual podemos introducir al menos una copia del gen mutado en cada célula. Si dos genes mutados distintos terminan en la misma célula, el efecto del mutante bueno se diluiría y se enmascararía por la versión no tan buena”.

Otra metodología de alteración genética, que Tsien dijo es igualmente problemática, consiste en tratar a las células con rayos X o con productos químicos que generan mutaciones. “El problema en ese caso es que si se induce demasiadas mutaciones, se elimina a los organismos porque se fríen todos los genes que éstos necesitan”, dijo.

“Lo que realmente queríamos era un organismo con células que pudieran producir mutaciones rápidamente y marcarlas con un gen específico”, dijo Tsien. “Para nuestra sorpresa, ese organismo resultó ser nosotros mismos”. La SHM produce genes mutados con un índice de mutación de aproximadamente un millón de veces el índice de mutación de otras partes del genoma, dijo Tsien. Y en estudios anteriores, otros investigadores habían demostrado que la SHM se podía inducir en las células B para reparar una única mutación en un gen que no codifica para anticuerpos.

“Este descubrimiento sugirió que el proceso podría ser útil para generar mutaciones múltiples”, dijo. “Pero es como tomar un manuscrito perfectamente mecanografiado, introducir un error y dárselo a un millón de malos mecanógrafos para ver si alguno de ellos puede arreglarlo accidentalmente. Podrían arreglarlo eventualmente, pero lo que intentábamos hacer era tomar, digamos, una obra de Shakespeare y ver si podíamos mutarla para generar una obra completamente diferente. No sabíamos si podríamos hacerlo hasta que lo intentamos”, dijo Tsien.

Para explorar si la SHM podría crear un amplio grupo de mutaciones, los investigadores introdujeron un gen para una proteína fluorescente roja en una línea cancerígena humana de células B, llamada Ramos, que muta a los genes

de inmunoglobulinas mediante la SHM. Al gen para la proteína fluorescente se le agregó un “interruptor de encendido” que se podía activar por medio del antibiótico doxiciclina, de modo que los investigadores podían controlar su actividad en las células. Dado que la SHM afecta solamente a los genes activos, esta técnica permitió que los investigadores también controlaran el índice de la mutación del gen introducido.

El objetivo de los científicos fue inducir la SHM para que desarrolle nuevas versiones de la proteína fluorescente roja que serían más útiles en el laboratorio. Específicamente, esperaban crear una molécula que despidiera luz fluorescente en longitudes de onda más largas que la proteína original cuando era estimulada por la luz láser. Una proteína tan fluorescente ayudaría a los investigadores a utilizar proteínas fluorescentes en mamíferos intactos, porque absorbería y emitiría la luz en longitudes de onda rojas más allá de las absorbidas por la sangre.

Una vez que permitieron que las células B realizaran la SHM en el gen para la proteína fluorescente roja, los investigadores utilizaron una técnica de clasificación de células basada en la fluorescencia para separar las células cuyos genes mutados al azar produjeran proteínas que despidieran luz fluorescente en longitudes de onda más largas. Los investigadores realizaron 23 ciclos en los cuales permitieron que la SHM mutara al gen. En cada ciclo aislaron células que despidieron luz fluorescente con longitudes de onda más largas. Entonces permitieron que esas células proliferaran y entonces mutaron al gen otra vez usando la SHM.

Al final de estos ciclos, el proceso había producido una mutante que los investigadores llamaron *mPlum* debido a su aspecto purpurino bajo la luz reflejada. Además de su mejor fluorescencia, la proteína nueva también era más resistente al blanqueo de la luz que la proteína fluorescente roja original.

Tsien dijo que resultó particularmente sorprendente que la SHM diseñaba una proteína que fluoresce con longitudes de onda más largas de forma más eficiente que los investigadores humanos, quienes utilizan para diseñar proteínas el conocimiento de la estructura de las mismas.

“Cuando las personas del laboratorio utilizaron la intuición química, no lograron tanto como la SHM. Y la SHM escogió una ruta muy diferente que llegó a una estructura distinta de la que hubiéramos llegado nosotros”, dijo Tsien. “No podríamos haber ideado a *mPlum* ; es algo que sólo la SHM podría haber encontrado. No somos lo suficientemente pacientes como para realizar 23 ciclos. Y nos habría llevado mucho más tiempo y esfuerzo”.

Y los investigadores encontraron que la SHM realizaba una amplia variedad de mutaciones durante la producción de nuevas secuencias genéticas -lo que significa que puede ser una metodología altamente “creativa” para producir mejores genes-.

El análisis del lugar en el que los genes para las proteínas fluorescentes terminaban insertándose cuando se los incorporaba al genoma de la célula B reveló que muchos genes estaban integrados inicialmente fuera de la región, o

locus, que contenía los blancos de ataque primarios de la SHM, que son los genes de inmunoglobulinas. Sin embargo, los investigadores encontraron que la mutación *mPlum* se produjo en un gen que se encuentra en un locus de inmunoglobulinas.

“Por eso pensamos que el locus de inmunoglobulina tiene algo especial que lo hace un poco mejor que otros sitios, y estudios adicionales tendrán como objetivo apuntar mejor a tales locus para introducir genes”, dijo Tsien.

En conclusión, dijo, la SHM debería ser extremadamente útil en la evolución dirigida de proteínas. “No estará limitada al tipo particular de proteínas que nosotros estudiamos”, dijo. “Requiere que se tenga una manera robusta de seleccionar las mejores células de cada generación sin destruirlas. Pero si se tiene tales medios, se debe poder seleccionar eligiendo prácticamente cualquier propiedad de la proteína que se desee. Eso significa que los genes del sistema inmune -que ha resultado ser más inteligente que nosotros- ahora se pueden utilizar para la producción de una amplia variedad de proteínas que no sean necesariamente anticuerpos”.