

## LA EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS *in vitro*: DESDE LA INVESTIGACIÓN SOBRE LOS ORÍGENES DE LA VIDA A LAS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

por CARLOS BRIONES

DEPARTAMENTO DE EVOLUCIÓN MOLECULAR. CENTRO DE ASTROBIOLOGÍA (CSIC-INTA), MADRID.

CBRIONES@CAB.INTA-CSIC.ES

*Palabras clave:* origen vida, química prebiótica, astrobiología, aptámeros, evolución *in vitro* Enviado: 11 de octubre de 2016

*Keywords:* origin of life, prebiotic chemistry, astrobiology, aptamers, *in vitro evolution* Aceptado: 7 de diciembre de 2016

Gracias al desarrollo de la selección *in vitro* de ácidos nucleicos se han descubierto nuevas capacidades funcionales del RNA, aumentando así la plausibilidad de la hipótesis del «Mundo RNA». Esta metodología también ha permitido obtener aptámeros de RNA y ssDNA, que se unen a diferentes moléculas diana con elevada afinidad y especificidad. Actualmente, los aptámeros tienen numerosas aplicaciones en biotecnología y biomedicina.

*Since the development of in vitro selection of nucleic acids new functional capabilities of RNA have been discovered, thereby increasing the plausibility of the «RNA World» hypothesis. This methodology has also allowed researchers to select RNA and ssDNA aptamers that bind to different target molecules with high affinity and specificity. Aptamers are currently used in a wide array of applications in biotechnology and biomedicine.*

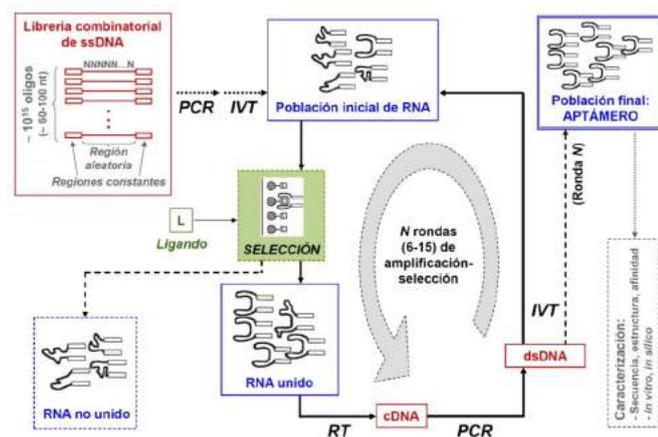
Con el comienzo de la era de la biología molecular a mediados del siglo XX, una de las preguntas que surgieron fue si los procesos evolutivos podrían producirse en sistemas muy simples, que no contuvieran células ni virus sino únicamente biomoléculas. La primera aproximación experimental relevante en este campo fue publicada por Sol Spiegelman en 1967. En sus experimentos utilizó la molécula de RNA de cadena sencilla y 4.217 nucleótidos de longitud que constituye el genoma del bacteriófago Q $\beta$ , un virus que infecta a *E. coli*. Al replicar dicho genoma utilizando la RNA polimerasa viral mediante pases seriados en tubos de ensayo, además de irse acumulando RNA de longitud completa aparecían moléculas de RNA subgenómico cada vez más cortas, que se replicaban a mayor velocidad. Así se llegó hasta una secuencia de sólo 220 nucleótidos que contenía la zona de unión de la polimerasa viral: un RNA obtenido en el laboratorio que comenzó a conocerse como «Monstruo de Spiegelman». Este resultado mostraba que los ácidos nucleicos pueden replicarse fuera del entorno celular y sugería que procesos similares tal vez ocurrieron antes de la aparición de las primeras células viables. Con ello se iniciaba una nueva disciplina experimental: la evolución de ácidos nucleicos *in vitro*.

Durante ese mismo año y el siguiente, Carl R. Woese, Leslie Orgel y Francis H.C. Crick publicaron independientemente tres artículos en los que planteaban que el RNA fue anterior a las proteínas y al DNA en el origen de la vida. Esta idea, ya su-

gerida por Alexander Rich en 1962, se basaba en evidencias extraídas de la biología, entre ellas que la biosíntesis de proteínas en los ribosomas no puede realizarse en ausencia de RNA, y que los ribonucleótidos son precursores de los desoxirribonucleótidos en las rutas metabólicas. A principios de la década de 1980, la pluripotencialidad del RNA se demostró gracias al descubrimiento de los primeros RNAs catalíticos (denominados «ribozimas» por analogía a las enzimas proteicas) por Thomas R. Cech (los intrones autocatalíticos del grupo I) y Sidney Altman (la RNasa P). En 1986, Walter Gilbert publicó un breve artículo que planteaba la hipótesis del «Mundo RNA», según la cual antes de la aparición de las primeras células con DNA-RNA-Proteínas (hace tal vez 3.700 millones de años) pudieron existir protocélulas en las que el RNA sería el único biopolímero funcionando como archivo de información genética y como catalizador de reacciones metabólicas (revisado en Ruiz-Mirazo y otros, 2014). Entonces, la pregunta clave pasó a ser: ¿qué capacidades funcionales pudo (y puede) tener el RNA?

Para intentar responderla se volvió al campo de la evolución en el tubo de ensayo, una vez que se habían optimizado sistemas *in vitro* para amplificar DNA (mediante PCR), transcribir DNA a RNA (IVT) y retrotranscribir RNA a DNA (RT), así como para sintetizar químicamente poblaciones de oligonucleótidos con regiones de secuencia aleatoria. Con ello, en 1990 se comunicó la puesta a punto de la tecnología de selección *in vitro* de RNA, mediante

un proceso iterativo de amplificación-selección que se denominó Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment o «SELEX» (Tuerkand Gold, 1990). Las moléculas de RNA así generadas se denominaron «aptámeros», por combinación del adjetivo latino aptus (que significa «encajado») y el sufijo griego meros («unidad» o «partícula») (Ellingtonand Szostak, 1990).



**Figura 1.** Esquema del proceso seguido para obtener aptámeros mediante selección *in vitro* de RNA (modificado de Ruiz-Mirazo y otros, 2014).

En la actualidad, los aptámeros se definen como ácidos nucleicos de cadena sencilla (RNA o ssDNA) obtenidos *in vitro* mediante procesos de selección o evolución (en estos últimos se introducen fuentes adicionales de variabilidad genética durante la amplificación, mediante mutación o recombinación), que tienen capacidad para unirse con elevada afinidad y especificidad al ligando deseado. Además de numerosos tipos de aptámeros, mediante SELEX se han generado diferentes ribozimas artificiales (que se suman a los ocho tipos de ribozimas naturales conocidas) y también enzimas de ssDNA o «DNAzimas» (que no existen en la naturaleza). Con ello se ha ampliado la posible versatilidad funcional de los ácidos nucleicos durante el origen y la evolución temprana de la vida, y en paralelo se han obtenido novedosas herramientas moleculares con aplicabilidad creciente en biomedicina y biotecnología (Sunand Zu, 2015).

Las dianas que pueden ser reconocidas por los aptámeros de RNA o ssDNA son muy variadas en cuanto a tamaño y complejidad, incluyendo moléculas de bajo peso molecular, proteínas, ácidos nucleicos, agregados macromoleculares, células o tejidos. La afinidad de un aptámero por su ligando puede igualar e incluso superar a la de un anticuerpo monoclonal por su antígeno. Además, se pueden generar aptámeros frente a moléculas tóxicas o poco inmunogénicas, y al ser obtenidos *in vitro* no se requie-

ren animales de experimentación y se evitan las diferencias entre lotes. Una vez producidos, se pueden optimizar *in vitro* e *in silico* para obtener el «aptámero mínimo» funcional (Gragoudas y otros, 2004; Sánchez-Luque y otros, 2014). Como son ácidos nucleicos, los aptámeros pueden amplificarse enzimáticamente y es posible modificarlos con grupos funcionales que incrementen su estabilidad y resistencia a nucleasas (un tema relevante en el caso de los aptámeros de RNA), o para incluir distintos tipos de marcaje.

Gracias a todo ello, desde hace dos décadas los aptámeros son cada vez más utilizados en investigación básica y aplicada. En concreto, se han mostrado muy útiles como sondas de bio-reconocimiento en biosensores (conocidos genéricamente como «aptasensores») y nano-biosensores de distintos tipos (Ku y otros, 2015). El salto de los aptámeros desde la ciencia básica a las aplicaciones biotecnológicas se produjo en 2004, cuando la FDA aprobó el pegaptanib como el primer aptámero de uso en terapia humana (comercializado con el nombre de «Macugen®»), para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (Gragoudas y otros, 2004). Actualmente, decenas de aptámeros se encuentran en distintas fases de investigación preclínica y clínica, por lo que es previsible que a corto o medio plazo constituyan alternativas terapéuticas útiles para el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. La evolución *in vitro* de ácidos nucleicos, una disciplina científica surgida para investigar sobre el pasado más remoto de la vida, tiene ante sí un prometedor futuro.

**Referencias**

<sup>1</sup>Ellington AD y Szostak JW (1990). *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.  
<sup>2</sup>Gragoudas ES y otros (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 351: 2805-2816.  
<sup>3</sup>Ku TH y otros (2015). Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors* 15: 16281-16313.  
<sup>4</sup>Ruiz-MirazoK y otros (2014). Prebiotic systems chemistry: New perspectives on the origins of life. *Chem Rev* 2014: 285-366.  
<sup>5</sup>Sánchez-Luque FJ y otros (2014). Efficient VIH-1 inhibition by a 16 nt-long RNA aptamer designed by combining *in vitro* selection and *in silico* optimisation strategies. *Sci Rep* 4: 6242 (1-10).  
<sup>6</sup>Sun H y Zu Y (2015). A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* 20: 11959-11980.  
<sup>7</sup>Tuerk C y Gold L (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.

*Reproducción con permiso del artículo original publicado en el apartado de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular «Acércate a nuestros científicos»*