

## **Los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química**

Mesa redonda celebrada en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 11 de enero de 2007

Coordinador:

**EXCMO. SR. D. JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO**

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia:*

*«La importancia del ARN en la Genética: un comentario a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química»*

Ponentes:

**EXCMO. SR. D. MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ**

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia:*

*«ARN interferente, del descubrimiento a sus aplicaciones»*

**DR. D. RAFAEL GIRALDO SUÁREZ**

*Científico Titular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid: «Roger Kornberg y la RNA pol: los misterios de la maquinaria macromolecular que sintetiza el ácido ribonucleico desvelados al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa»*

## PRESENTACIÓN:

### **La importancia del ARN en la genética: Un comentario a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química**

JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Ha transcurrido algo más de un siglo desde que la palabra «Genética» fuera usada por primera vez por William Bateson en una carta que escribió el 18 de abril de 1905 a Adam Sedgwick y propuesta al año siguiente por el propio Bateson en la «Conference on Hybridization and Plant Breeding», que tuvo lugar en Londres en 1906, para denominar oficialmente a la nueva ciencia que explica la «herencia y la variación en los seres vivos». De hecho, las actas de aquella reunión pasaron a denominarse «Report of the Third International Conference on Genetics». Desde entonces, la Genética ha crecido vertiginosamente, llegando a ser uno de los pivotes fundamentales de la ciencia de la vida. Buena prueba de ello es que en 33 ocasiones se han concedido los premios Nobel a 69 científicos para premiar sus investigaciones relacionadas con la Genética (25 de Fisiología o Medicina, 7 de Química, 1 de la Paz).

En mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia en diciembre de 1995, que versó sobre la «Historia “nobelada” de la Genética», hacía referencia a la transición prebiótica al «mundo del ARN», situando la evolución del ARN en el contexto de la química que le precedió y de la biología que le siguió. Decía entonces que, en términos de evolución del aparato genético, habría que gritar —parafraseando la antigua fórmula de proclamación de los reyes en la monarquía francesa: «el Rey ha muerto, ¡viva el Rey!»— que «el ADN ha muerto, ¡viva el ARN!» (1).

Algo parecido me sucede hoy al hacer un breve comentario de presentación a esta sesión científica de la Real Academia Nacional de Farmacia sobre los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química, puesto que ambos galardones han premiado investigaciones en torno al ARN. En efecto, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska concedía el premio Nobel en Fisiología o Medicina 2006 a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena» y, a su vez, la Real Academia Sueca de Ciencias otorgaba el Premio Nobel en Química 2006 a Roger D. Kornberg, «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica».

### 1. REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL: INTERFERENCIA POR ARN (ARNi)

En 2006, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska otorgaba el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: el silenciamiento de los genes por el ARN de cadena doble». Como señalaba Daneholt, Presidente de la Asamblea Nobel, en su comentario científico institucional («RNA interference») al galardón concedido a Fire y Mello, antes del descubrimiento de la *interferencia por ARN* se había descrito en plantas un fenómeno llamado silenciamiento génico mediatizado por ARN. Antes de seguir adelante me gustaría hacer una precisión terminológica respecto a cómo traducir al español los términos «RNA interference» y el acrónimo «iRNA». El primero puede ser castellanizado como «interferencia por ARN» o «interferencia mediatizada por el ARN», y el segundo como «ARNi», «ARN de interferencia» o «ARN interferente». Todos son válidos.

En la década de los noventa se observó que al introducir un transgén en el genoma de un organismo transgénico, su efecto podía consistir en la estimulación de la actividad génica o, por el contrario, en la inhibición de la expresión de secuencias homólogas, denominándose a este fenómeno como *silenciamiento génico dependiente de homología*. La inhibición de la actividad génica podía producirse a nivel de transcripción (*silenciamiento génico transcripcional*, TGS) o post-transcripcional (*silenciamiento génico post-transcripcional*,

PTGS). Sin embargo, aunque era evidente que el ARN jugaba un papel fundamental en estos procesos, no se supo dar explicaciones convincentes del PTGS hasta que Fire, Mello y colaboradores descubrieron el fenómeno de la *interferencia por ARN* (2).

El trabajo fundamental de Fire y Mello consistió en inyectar moléculas aisladas de ARN con sentido (*sense RNA*) y de ARN antisentido (*antisense RNA*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, comprobando que el efecto fenotípico por el silenciamiento de un gen específico (el gen *unc-22*, que codifica para una proteína muscular) era escaso, si alguno. En cambio, la inyección del gusano con ARN bicatenario (*double-stranded RNA*, ARNds) formado por las hélices de ARN con sentido y ARN antisentido de dicho gen producía el efecto fenotípico esperado («*twitcher*») correspondiente a la falta de expresión del gen en cuestión. Aunque en su trabajo de 1998 Fire y Mello no pudieron determinar si el ARNds actuaba a nivel transcripcional o post-transcripcional, en un trabajo posterior de Fire publicado el mismo año (3) se demostraba que el ARNds actuaba a nivel post-transcripcional de manera que el ARNm diana era degradado, impidiendo así el proceso de traducción y la síntesis de la proteína correspondiente. Además, los autores presentaban un modelo de cómo el ARNds podía actuar de una forma *catalítica* para degradar el ARNm homólogo. Es decir, el mecanismo de acción propuesto era diferente al «modelo del ARN antisentido», descrito previamente por otros autores. El nombre de «*interferencia mediatizada por el ARN* (ARNi)» con que se ha bautizado al nuevo mecanismo de silenciamiento de los genes había sido propuesto el año anterior por Mello (4).

Las principales conclusiones del trabajo de Fire y Mello fueron las siguientes: 1) el efecto silenciador del ARNds no lo igualan ni el ARN monocatenario con sentido ni el ARN antisentido; 2) el silenciamiento es específico para un ARNm homólogo al ARNds, de forma que ningún otro ARNm se ve afectado por la presencia del ARNds; 3) para que se produzca el silenciamiento el ARNds tiene que mostrar homología con el ARNm maduro; es decir, no reconoce secuencias de intrones ni de promotores, de donde se deduce que el proceso de silenciamiento ocurre en el citoplasma; 4) el ARNm afectado por el silenciamiento es degradado, desapareciendo del citoplasma; 5) puesto que bastan unas pocas moléculas de ARNds para lograr el silenciamiento génico de la célula, se infiere que debe haber

una amplificación del ARNds o bien que éste tiene una acción catalítica y no estequiométrica; 6) el efecto del ARNds podría extenderse de unos tejidos a otros o incluso a la descendencia.

El mecanismo molecular del proceso de interferencia por ARN (ARNi) fue descrito por otros investigadores utilizando un sistema *in vitro* de extractos embrionarios de *Drosophila* (5), demostrando que el ARNds es procesado a fragmentos pequeños de 21 a 23 nucleótidos (6). Posteriormente, Fire y Mello analizaron el proceso *in vivo*, demostrando que el ARNds es fragmentado en trozos de unos 25 nucleótidos y que el ARN antisentido dispara el proceso de degradación del ARNm por emparejamiento base a base al propio ARNm (7). El procesamiento del ARNds a fragmentos pequeños se produce por la acción de una ribonucleasa denominada *Dicer* («picadora») (8), mientras que en la degradación del ARNm interviene un gran complejo ribonucleoproteico denominado *Risc* (por *RNA-induced silencing complex*) que contiene al menos una proteína de la familia *argonauta* que actúa como una endonucleasa cortando y degradando el ARNm (9). Revisiones de los mecanismos moleculares del proceso de silenciamiento por ARN (ARNi) han sido realizadas por varios autores (10-13), además de las propias «Nobel Lectures 2006» de los galardonados Fire y Mello.

Como señala Daneholt (14), el significado biológico y genético del descubrimiento del fenómeno de la interferencia por ARN (ARNi) se extiende a la protección contra infecciones virales, a la estabilidad de los genomas silenciando los elementos genéticos móviles, la regulación post-transcripcional de la expresión génica en los procesos de desarrollo, la regulación transcripcional de la expresión génica por el mantenimiento de la condensación de la cromatina que impide la expresión de sus genes, la utilización como herramienta experimental para silenciar genes específicos, así como la posible utilización en la terapia génica.

De todo esto nos hablará en profundidad nuestro Académico de Número, el Doctor Mariano Esteban Rodríguez.

## 2. MECANISMO MOLECULAR DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

El proceso de *transcripción* es realizado por enzimas específicas: las ARN polimerasas-ADN dependientes o transcriptasas. Así como en las bacterias sólo existe un tipo de ARN polimerasa, en los eucariontes hay tres clases, denominadas ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III que se encargan, respectivamente, de la transcripción del ARN ribosomal (ARNr), del ARN transcrito por genes que codifican para proteínas (ARNm) y de los ARN de tamaño pequeño (ARNt, ARN5S, etc.).

En 2006 se otorgó el premio Nobel en Química a Roger D. Kornberg (hijo del también premio Nobel en 1959, Arthur Kornberg), «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica». Kornberg, que había iniciado su carrera científica como estudiante postdoctoral en el MRC de Cambridge, UK, trabajando con el laureado Nobel Aaron Klug en el estudio de la estructura de la cromatina, demostró en 1974 (15) que las histonas H3 y H4 forman un tetrámero del tipo  $(H3)_2(H4)_2$  y propuso, asimismo, que el nucleosoma es la unidad básica de la cromatina, estando formado por un octámero de histonas y 200 pb de ADN (16). En términos genéticos podríamos preguntarnos si «el sabio nace o se hace» y reflexionar cómo en este caso la «interacción genotipo-ambiente» ha dado como fenotipo a un Premio Nobel como lo fue su padre Arthur Kornberg.

Al regresar a Standford, USA, Kornberg decidió cambiar de línea de investigación adentrándose en el tema de transcripción en eucariontes. Aplicando a la perfección la regla de oro de la investigación—esto es, hacerse una pregunta importante, elegir el material biológico idóneo y aplicar la técnica experimental adecuada—, Kornberg eligió como organismo eucariótico modelo la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, siendo capaz de desarrollar un sistema de transcripción *in vitro* idóneo para llevar a cabo su propósito (17, 18). Mediante la técnica de análisis cristalográfico con rayos X, en el año 2001 Kornberg y colaboradores (19-20) estudiaron la estructura del complejo de transcripción (ARNpol II-ADN-ARN sintetizado) a un nivel de alta resolución (2,8 y 3,3 Å). Estudios posteriores de nuevas estructuras cristalizadas del complejo ARNpol II-ADN-ARN-nucleótidos-proteínas han permitido a Kornberg y colaboradores realizar una interpretación dinámica del proceso de transcripción.

De todo ello nos hablará el Doctor Rafael Giraldo Suárez, Científico Titular del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) LACADENA, J. R. (1995): Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España*. Madrid, 76 págs.
- (2) FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. and MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
- (3) MONTGOMERY, M. K.; XU, S. Q. and FIRE, A. (1998): RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 15502-15507.
- (4) ROCHELEAU, C. E.; DOWNS, W. D.; LIN, R.; WITTMAN, C.; BEI, Y.; CHA, Y. H.; ALI, M.; PRIESS, J. R. and MELLO, C. C. (1997): Wnt signalling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 90: 707-716.
- (5) TUSCHI, T.; ZAMORE, P. D.; LEHMAN, R.; BARTEL, D. P. and SHARP, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Devel.* 13: 3191-3197.
- (6) ZAMORE, P. D.; TUSCHI, T.; SHARP, P. A. and BARTEL, D. P. (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101: 25-33.
- (7) PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S. Q.; MELLO, C. C. and FIRE, A. (2000): Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirements for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*. 6: 1077-1087.
- (8) BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. and HANNON, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409: 363-366.
- (9) HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D. and HANNON, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404: 293-296.
- (10) HANNON, G. J. (2002): RNA interference. *Nature*, 418: 244-251.
- (11) MELLO, C. C. and CONTE, JR. D. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 431: 338-342.
- (12) MEISTER, G. and TUSCHI, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431: 343-349.
- (13) HAMMOND, S. M. (2005): Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letter*. 579: 5822-5829.
- (14) DANEHOLT, B. (2006): RNA interference. *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, Oficial website Nobel Foundation*.
- (15) KORNBERG, R. D. and THOMAS, J. O. (1974): Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*. 184: 865-868.

- (16) KORNBERG, R. D. (1974): Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. *Science*. 184: 868-871.
- (17) LUE, N. F. and KORNBERG, R. D. (1987): Accurate initiation at RNA polymerase II promoters in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 8839-8843.
- (18) SAYRE, M. H.; TESCHNOCHNER, H. and KORNBERG, R. D. (1992): Reconstitution of transcription with five purified protein factors and RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267: 23376-23382.
- (19) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science*. 292: 1863-1876.
- (20) GNATT, A. L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. 292: 1876-1882.