

Avances en la era ribonuclear

Oliver K.

Reyes Hernández

Jesús

Muñoz Rojas

Candelario

Vázquez Cruz

Rebeca D.

Martínez Contreras



© Luz María Genis.

El descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953 y la demostración de que esta molécula constituye la clave de la herencia en los organismos abrió la puerta a numerosas aplicaciones, todas ellas excitantes y prometedoras: desde controlar enfermedades de origen genético hasta modificar la constitución y características de los organismos vivos. Sin embargo, desde el origen de la vida, ha existido otro actor tanto o más importante e intrincado, a quien todavía no podemos acabar de descifrar: el ácido ribonucleico o ARN. Esta molécula participa en el proceso global de mantenimiento y decodificación de la información almacenada en el ADN, pero es capaz además de realizar complejos mecanismos que contribuyen a regular la expresión de dicha información. Los descubrimientos realizados en los últimos años han generado un cambio drástico de nuestra visión referente a las funciones del ARN en la célula, pues aunque primero se le reconoció como un intermediario para la transmisión de la información genética y un adaptador necesario para la síntesis de proteínas, ahora sabemos que es el reservorio del genoma en algunos virus y retrovirus, que puede catalizar ciertas reacciones químicas y que además tiene un papel importante y decisivo en la regulación de la expresión de genes.¹

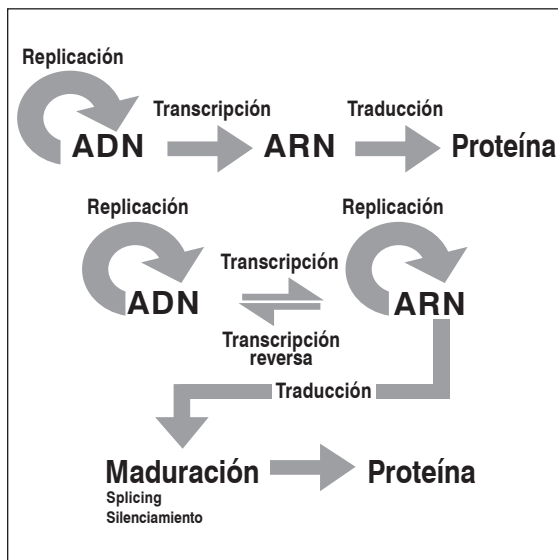


Figura 1. Antiguo dogma Central de la Biología Molecular. En la parte superior se muestra el planteamiento inicial en donde el ADN original es copiado en una nueva molécula de ADN, el cual serviría como plantilla para la síntesis de una molécula de ARN la cual a su vez dará origen a una proteína. Abajo se muestra que aunque las bases de este modelo se mantienen, recientemente se han descubierto eventos de maduración que involucran al ARN y que son clave para la diversidad y regulación genética.

Han pasado ya más de 50 años desde el inicio de la era genética y aún tenemos muchas cuestiones científicas, filosóficas y éticas por resolver. Aunque la era ribonuclear nos ayude a explicar parte de nuestras fascinantes dudas genómicas, lo más probable es que, como siempre, nos herede más preguntas que respuestas.

SEMEJANTES PERO DIFERENTES

Desde el inicio de la era genética se estableció la ruta por la que fluye la información, la cual se conoció como el dogma central de la biología molecular y es relativamente simple: en las células procariontes o eucariontes el ADN original de una célula es copiado en una nueva molécula de ADN (a este proceso se le llama replicación). Esta copia sirve de molde para generar moléculas de ARN (transcripción) a partir de las cuales se fabrican las proteínas (traducción). Dichos productos proteicos cumplen con funciones específicas para la célula (Fig. 1). La secuencia específica de cada gen corresponde a una pequeña porción del ADN total de un genoma y corresponde a la información necesaria para

producir una proteína en particular; así, un gen determinado codifica para cierta proteína correspondiente. El concepto de secuencia de un gen se refiere al arreglo lineal de cuatro moléculas (A, C, G, T) que se aparean en forma específica y universal conformando un polímero de ADN. A diferencia de éste, el ARN presenta U en vez de T, y mientras el azúcar que conforma al ADN es desoxirribosa, el ARN contiene una molécula del azúcar llamado ribosa, el cual presenta un ligero cambio en su estructura que le confiere mucha más reactividad. Finalmente, el ADN se arregla espacialmente en forma de doble cadena, mientras que el ARN está conformado por una sola hebra, lo cual le otorga una enorme versatilidad al permitirle interactuar con un sinnúmero de moléculas. Estas diferencias mínimas explican en parte por qué las funciones realizadas por ambas moléculas pueden ser tan distintas. A continuación se presentan las principales observaciones que convirtieron al ARN de simple mensajero en regulador clave de la expresión de la información genética.

EL ARN Y EL SECRETO DE LA DIVERSIDAD

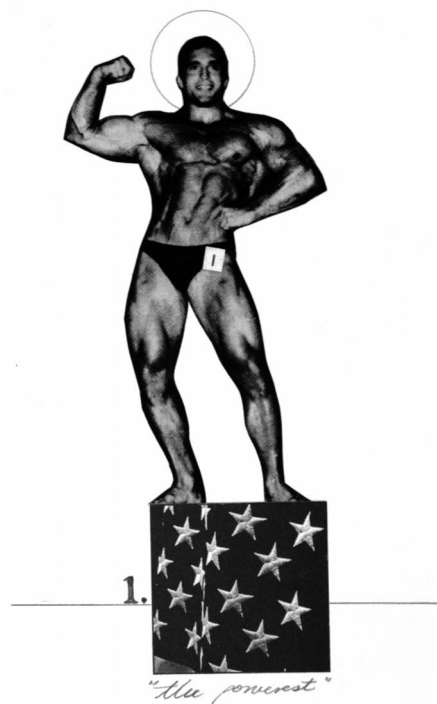
Cuando se publicaron los resultados del Proyecto del Genoma Humano, los datos producidos fueron sorprendentes. Con apenas 25 mil genes codificados no se podía explicar la inmensa variedad de proteínas celulares presentes en el ser humano, que supera a ese número. Resultaba evidente que la información genética debía ser más compleja y por tanto, lo que faltaba para descifrar el mensaje debería ser buscado en otra parte. Es un hecho que la porción de ADN con información para proteínas representa el dos por ciento del total en los cromosomas humanos. Entonces, ¿para qué conservamos en nuestras células el 98 por ciento restante? Inicialmente se pensó que esa porción mayoritaria de ADN para la que todavía no se había encontrado una función específica se podría considerar "chatarra" evolutiva debido a que la complejidad de los organismos no correlacionaba con el tamaño de su genoma. Por ejemplo, hay anfibios que contienen cinco veces más la cantidad de ADN que existe en los mamíferos; y aunque resulte increíble, algunas amibas cuentan con mil veces más. Durante décadas se pensó que semejante complejidad debería ser necesaria para contar con un mayor número de genes codifica-

dores de proteínas. Tras la secuenciación del genoma de diversas especies, sabemos ya que no existe tal correlación entre la complejidad del organismo y el número de genes. Prueba de ello lo constituye el gusano *Caenorhabditis elegans*, que consta sólo de unas mil células, contiene unos 19 mil genes codificadores de proteínas, aproximadamente 50 por ciento más que la mosca de la fruta (13 mil 500) y casi tantos como los humanos (alrededor de 25 mil). La conclusión lógica a partir de tales números es que puede existir una relación directa entre la complejidad del organismo y la cantidad de secuencias de ADN no codificantes. ¿Qué pensar entonces si la mayor parte del genoma humano se transcribe en ARN, pero sólo el 1.5 por ciento determina proteínas? Como ya mencionamos, originalmente se pensó que el genoma humano estaba repleto de transcripción inútil, aunque otra opción era que esos ARN no codificadores cumplieran con alguna función desconocida. Esta idea fue avalada por diferentes resultados experimentales, sugiriendo que, en los organismos complejos (como la mayoría de los mamíferos) muchos genes no generan proteínas, pero sí producen ARNs con funciones regu-

ladoras. Según esta hipótesis, tales secuencias de ARN contienen información de suma importancia para el desarrollo y la evolución.

LO QUE SE ESCONDE EN EL GENOMA

En 1977 se produjo un descubrimiento que dio la primera señal de que existían espacios por llenar en el "viejo dogma central de la biología molecular".² Phillip A. Sharp del Instituto de Tecnología de Massachusetts, y Richard J. Roberts de New England Biolabs, cada uno por su cuenta y con la ayuda de sus respectivos equipos de trabajo, demostraron que los genes de organismos complejos (eucariontes) presentaban bloques de secuencias de ADN codificantes para fragmentos de proteínas (a los que llamaron exones) interrumpidos por secuencias intermedias de ADN, a menudo extensas, que no codifican proteínas. A estas regiones no codificantes se les llamó intrones. Experimentos posteriores sirvieron para demostrar que estando en el núcleo de cada célula, los genes se transcriben en ARN; a continuación, el ARN intrónico se elimina del transcrito primario y el ARN exónico se



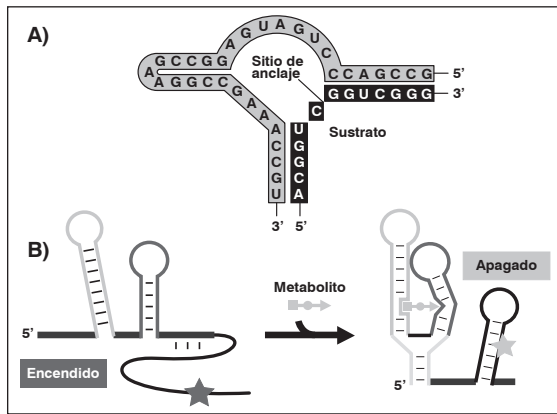


Figura 2. Algunas funciones del ARN. **A)** Esquema de una ribozima. Se indica el sitio de anclaje al sustrato, el cual es característico de cualquier enzima convencional. (Modificada de 7). **B)** Funcionamiento de un ribo-interruptor. En ausencia del metabolito, el interruptor mantiene activa la señal (estrella verde) para la síntesis de una proteína dada. Por el contrario, cuando este ARN no se encuentra unido al metabolito, cambia de conformación, con lo que se bloquea la síntesis de la proteína (estrella roja) y el interruptor se mantiene apagado. (Modificada de 8).

empalma para generar el ARN mensajero (ARNm). Una vez alineadas las secuencias codificantes, el ARNm puede salir del núcleo celular y traducirse a proteína.

Pero si los intrones no codifican proteínas, entonces ¿por qué abundan en los organismos complejos y escasean en los organismos simples? Aunque los intrones constituyen el 95 por ciento o más del genoma humano, habían sido considerados material redundante, restos ancestrales de un tiempo anterior a la evolución de la vida, cuando fragmentos codificadores de proteínas se ensamblaron de forma tosca para constituir los primeros genes. Se pensó que quizá los intrones sobrevivieron en los organismos complejos porque desempeñaban una función secundaria, mientras que la ausencia de intrones en los sistemas simples obedecía a las intensas presiones competitivas del entorno microbiano; por lo que la evolución habría eliminado a los intrones por inútiles. La evidencia experimental generada en los últimos años ha demostrado que las cosas no ocurrieron así. Cuando se comparan porciones de ADN entre distintas especies, se llega a la conclusión de que más de mil segmentos presentan cambios mínimos (llamados mutaciones), indicando que estas secuencias podrían contribuir a la adecuación evolutiva de las mismas. El 20 por ciento de dichos cambios se encuentra dentro de las porciones de ADN que codifican para proteínas,

el 66 por ciento se observa en intrones y el resto está disperso en el ADN no codificante que aparece entre los genes (regiones intergénicas). Estos datos, aunados a diferentes observaciones experimentales, indicaron que las alteraciones de la información genética no codificante tenían implicaciones relevantes y podían llevar a la generación de proteínas defectuosas. Así se explicó –por ejemplo– cómo diferentes mutaciones ubicadas en regiones no codificantes correlacionaban con la aparición de determinadas enfermedades humanas.

ROMPIENDO DOGMAS: MOLÉCULAS DE ARN CON ACTIVIDAD CATALÍTICA

Desde mediados del siglo XIX comenzó el estudio de catalizadores biológicos con los “fermentos” descritos por Louis Pasteur y que correspondían a agentes presentes en las levaduras que convertían azúcar en alcohol. Posteriormente, el estudio de estas y otras moléculas convertidoras llevó en 1926 a la purificación de la primera enzima, la ureasa, encontrando que estaba compuesta por material proteico. Los cientos de enzimas purificadas y analizadas desde entonces resultaron ser de naturaleza proteica, por lo que se concluyó que todas las enzimas eran proteínas.

Dicha conclusión pareció cambiar cuando en 1982, en el laboratorio de Thomas Cech, estudiando el procesamiento de ARN en un protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* se observó que la eliminación de un intrón era autocatalítica ¡El ARN se cortaba a sí mismo sin ayuda de un catalizador proteico! Paralelamente, en el laboratorio de Sidney Altman se investigaban las propiedades de la enzima ribonucleasa P, que se encuentra en todos los organismos, la cual consta de una proteína y una molécula de ARN. Sorprendentemente, la porción de ARN resultó suficiente para cortar otras cadenas de ARN, por lo cual a estas moléculas se les llamó ribozimas (Fig. 2A). En 1989 se les otorgó a Cech y a Altman el premio Nobel por el descubrimiento de estos catalizadores biológicos no proteicos. Actualmente se diseñan ribozimas para cortar determinado ARN con fines terapéuticos, copiando la estructura y características de las ribozimas naturales conocidas. Se ha pensado que la función que cumplen estas ribozimas puede ser aplicada en varios problemas médicos, como el cáncer y el sida, teniendo en cuenta que si la molécula de ARN

es cortada antes de ser traducida a proteína, nunca se obtendrá un producto defectuoso.

LOS RIBO-INTERRUPTORES

Otra manera en la que moléculas de ARN participan en procesos de regulación de la expresión genética lo constituyen los llamados “ribo-interruptores” (del inglés, riboswitches) que actúan como interruptores genéticos de precisión. En la mayoría de los ejemplos descritos hasta el momento, estos interruptores se encuentran en porciones de ADN no codificantes, que al ser transcritos generan una molécula de ARN capaz de acoplarse a una molécula específica. Generalmente, en ausencia de esta molécula reguladora, el ARN mensajero producirá el producto correspondiente de manera permanente. Sin embargo, la abundancia del regulador puede generar un cambio en el arreglo espacial que tome el interruptor, ocasionando que se “apague” la expresión del producto, contribuyendo a la regulación fina de dicha expresión (Fig. 2B). Diversas bacterias, hongos y plantas cuentan con ribo-interruptores que responden a ciertas vitaminas para regular la expresión de algunos genes. Un ejemplo lo constituye la vitamina B1 (tiamina), la cual es necesaria para muchas actividades importantes en el metabolismo celular y que mediante este mecanismo puede regular la expresión del dos por ciento de los genes de la bacteria *Bacillus subtilis*. Estos interruptores han sido encontrados en especies de todos los reinos vivientes y quizá deriven de un ancestro común muy antiguo. En años recientes se ha descrito además que esta actividad no se circunscribe únicamente a vitaminas, sino que se extiende a otras biomoléculas de diferentes clases.

EL ARN COMO NUEVO ACTOR PRINCIPAL EN LA ERA GENÓMICA

Los investigadores han comenzado a prestar más atención a las moléculas de ARN y les han encontrado cada vez más funciones. La posibilidad de diferentes interacciones vuelve a ser el centro de la escena: ARN-ARN, ARN-ADN, ARN-proteína, ARN-moléculas pequeñas. En general, las interacciones moleculares entre ácidos nucleicos ocurren cuando una molécula de ARN se

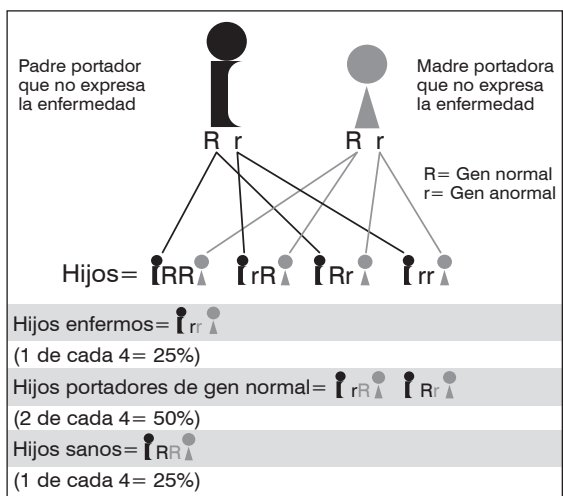


Figura 3. Esquema que representa los mecanismos de herencia en la hipoplasia del cartílago piloso. La mutación de una sola base en la molécula de ARN puede ocasionar una vida breve y con estatura corta cuando la mutación se recibe de ambos padres (rr). Cuando la mutación se recibe únicamente de uno de los progenitores, los hijos pueden llevar una vida sana y con estatura promedio (Rr).

encuentra con otra molécula de ADN o ARN que posea una secuencia de bases complementaria, lo que les permite interactuar para formar una estructura de cadena doble. En el caso de las proteínas, éstas pueden interactuar con una molécula de ARN por complementariedad de estructura, más que de secuencia, en forma semejante a como una llave se acopla a su cerradura. Todas las interacciones mencionadas han sido documentadas en diferentes organismos, con implicaciones funcionales relevantes; algunos ejemplos se consideran a continuación.

GENES NO CONVENCIONALES Y EL PODER DEL SILENCIO

El hecho de que el 98 por ciento del ADN contenido en el genoma no sea codificante, no lo convierte en inservible. En este sentido, cada vez aparecen más genes que no codifican para una proteína y, en su lugar, dan origen a ARNs activos, incluyendo variantes que pueden regular la abundancia o la función de los genes codificantes.

Un ejemplo de la importancia de ciertos tipos particulares de ARN, lo tenemos en la enfermedad conocida como hipoplasia del cartílago piloso (CHH, cartilage hair hypoplasia), una enfermedad recesiva identificada

por primera vez entre la población Amish. Uno de cada 19 individuos de esta comunidad lleva una copia defectuosa del gen, que causa un tipo inusual de enanismo, en el que las personas no solamente son de estatura corta, sino que presentan alta propensión a cáncer y desórdenes inmunológicos. En 2001 se identificó al culpable de esta enfermedad, un gen codificante solamente para ARN, llamado RMRP. El ARN transcrito por este gen es capaz de interactuar con proteínas para formar una enzima que altera la función mitocondrial. Un cambio en solamente una base de este ARN, puede significar la diferencia entre una vida sana, con estatura normal, o una vida breve (si es que se recibe la misma mutación de ambos padres) y con estatura corta³ (Fig. 3).

Otra proteína muy importante que tiene que interactuar con una molécula de ARN para poder cumplir con su función normal es la telomerasa. Esta enzima tiene un papel relevante por varios motivos científicos y prácticos; uno de ellos es que se encarga de copiar el ARN en ADN, acción opuesta a lo que ocurre para la mayoría de los genes convencionales. Particularmente, esta transcripción ocurre sobre los telómeros, que son secuencias específicas presentes en el extremo de cada cromosoma (unidades que albergan a los genes de cada organismo) para evitar que dos de ellos se peguen y empiecen a generar defectos en la información genética expresada (Fig. 4). Otro rasgo importante de la telomerasa es que se encuentra elevada en células cancerosas, por lo que se ha pensado usarla como blanco terapéutico para controlar o curar esta enfermedad. Finalmente, se le ha relacionado con la regulación del envejecimiento y muerte de la célula, por lo que se ha propuesto que su manipulación equivaldría a encontrar la “fuente de la eterna juventud”.

En sentido estrictamente necesario para la célula, un gen produce un ARN mensajero y a partir de éste puede elaborarse una proteína, sin embargo, en varias porciones del genoma se transcriben las dos cadenas del ADN de los genes. En este caso, junto con una molécula de ARNm que serviría de molde para obtener la proteína correspondiente, se obtendría una cadena de ARN que resultaría complementaria o “antisen-

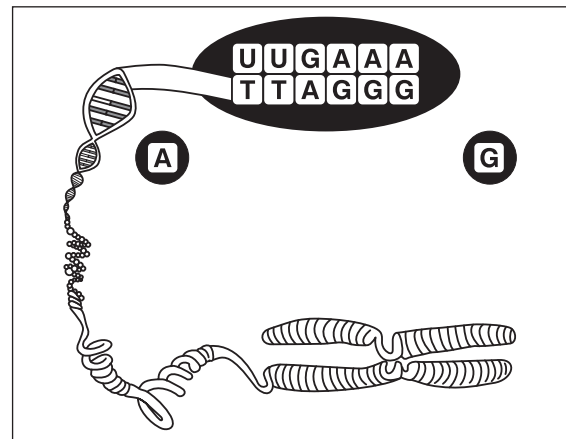


Figura 4. La telomerasa requiere de una molécula de ARN para realizar su función. Dicha enzima se encarga de mantener la integridad de los extremos cromosomales y salvaguardar el genoma en la célula. Su función particular consiste en agregar muchas veces la secuencia TTAGGG al extremo de cada cromosoma y es precisamente la molécula de ARN la que le sirve de plantilla para copiar dicha secuencia evitando que los cromosomas se peguen entre sí.

tido” para dicho ARNm. Muchos ARNs “antisentido” pueden “secuestrar” al ARNm transcrito a partir del gen original y de este modo, se impide que se traduzca en una proteína. Pequeñas porciones de ciertos intrones pueden comportarse de la manera anteriormente descrita y son utilizados por la maquinaria celular para bloquear algún ARNm de manera específica. La molécula de ARN capaz de controlar a otros genes se llama “ARN de interferencia” (ARNi). Puesto que la producción de la proteína disminuye mediante la acción de este ARN, a este mecanismo de regulación se le llama silenciamiento.⁴ El sistema de ARNi es un mecanismo de defensa, evolutivamente muy antiguo, contra ARN de doble cadena que la célula reconoce como extraño. Las primeras observaciones relacionadas con este mecanismo al que entonces se llamó “co-supresión” se realizaron en plantas en 1990, pero la evidencia contundente se mostró en 1997, cuando se publicaron por separado los trabajos de Craig C. Mello y Andrew Fire, documentando el silenciamiento mediado por ARN en el gusano *Caenorhabditis elegans*. Casi diez años después, en 2006, dichos descubrimientos les valieron a Mello y Fire la obtención del Premio Nobel en Fisiología y Medicina⁵ ¡Nuevamente, el ARN se colocaba en el centro de atención para la comunidad científica internacional!

Dado que la interferencia por ARN ocurre gracias a la interacción específica entre secuencias del ARNi y del ARNm, se pueden diseñar pequeñas moléculas de

ARN para silenciar prácticamente cualquier gen y la relativa facilidad con que los genes pueden ser silenciados mediante esta técnica, ha causado una revolución en la biología molecular. El potencial terapéutico que representa la utilización del ARNi es enorme, ya que es posible tomar la secuencia de ADN de un gen relacionado con una enfermedad particular y diseñar un ARN que se administre al paciente para silenciar dicho gen en forma específica y efectiva.⁶ Sin embargo, aún es necesario resolver el problema que presenta la degradación de la molécula de ARN por diferentes mecanismos, incluyendo la respuesta inmune del paciente a tratar. Es necesario profundizar todavía en los detalles que regulan el sistema de interferencia por ARN, pero algo es seguro, que estos ARNi han revolucionado la forma en que los científicos piensan acerca del ARN y su relación con el ADN y las proteínas. El trabajo futuro indicará el tipo y la utilidad que se le dará al ARNi dentro de las compañías farmacéuticas, así como en la investigación científica aplicada.

DE VUELTA AL MUNDO DEL ARN

La teoría del "mundo del ARN" se ha desarrollado para intentar develar el misterio del origen de la vida. Esta teoría propone que la evolución basada en la replicación del ARN precedió a la aparición de la síntesis de proteínas. En algún momento de la evolución de la vida, la continuidad genética fue asegurada por la replicación del ARN, sin involucrar como catalizadores a las proteínas codificadas genéticamente. Las evidencias que sustentan esta teoría están basadas en las múltiples funciones que puede cumplir el ARN, algunas de las cuales han sido descritas a lo largo de este artículo: 1) el ARN es capaz de almacenar información genética, 2) puede servir de molde para la síntesis de cadenas complementarias de ADN o de ARN, 3) puede actuar como catalizador, 4) muchas moléculas de ARN se acoplan a diferentes proteínas para catalizar un sinfín de reacciones biológicas, 5) la presencia de pequeñas proteínas unidas al ARN son indispensables para la regulación de la expresión genética y el mantenimiento del genoma y 6) numerosos virus llevan como único material genético ARN de cadena sencilla o doble. Si aplicamos la teoría del mundo del ARN, podemos suponer que durante la evolución, a medida que el metabolismo

celular se volvió más versátil y sofisticado, el requerimiento de moléculas con distinta especificidad hizo que las proteínas (capaces de combinar 20 aminoácidos en comparación con cuatro bases del ARN) asumieran el papel de biocatalizadores. Por su parte, el ADN adquirió la función de guardar y transmitir la información genética, presumiblemente debido a su mayor estabilidad. Los descendientes de la era dominada por el ARN habitan hoy en el mundo en forma de ribozimas presentes en todo tipo de organismos: desde las bacterias hasta el hombre. James Watson y Francis Crick fueron de los primeros en darse cuenta del apasionante mundo encriptado en la molécula de ARN, ya que al poco tiempo de publicar la estructura del ADN, empezaron a estudiar diferentes aspectos de la maraña ribonuclear. Los últimos 50 años han indicado que Watson y Crick tenían razón y a pesar de que las limitaciones técnicas actuales no nos permiten aún demostrar plenamente ni descartar esta teoría, resulta atractivo pensar que: "En un principio, existió el ARN..."

B I B L I O G R A F Í A

- ¹ Gesteland RF y Atkins JF. *The RNA world*. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1993).
- ² Nilsen TW. "RNA 1997-2007: a remarkable decade of discovery" en *Molecular Cell* (2007) Vol. 28: 715-720.
- ³ Calvo JC. Una nueva visión del ARN: los ARN de interferencia. ¿Un nuevo genoma? *Revista Química Viva* (2003) núm 3, año 2. ISSN 1666-7948
- ⁴ Narry KV. "microRNA Biogenesis: coordinated cropping and dicing", en: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (2005) Vol. 6: 376-385.
- ⁵ Return to the RNAi World: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture). Discurso de Craig C. Mello durante la ceremonia de recepción del Premio Nobel en Fisiología y Medicina, 2006.
- ⁶ McManus MT y Sharp PA. "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs" en: *Nature Reviews in Genetics*. (2002) Vol 3: 737-747.
- ⁷ Sancho J. Estructura de Macromoléculas Virtual. <http://bifi.unizar.es/jsancho>
- ⁸ Alexander Serganov. Brookhaven National Laboratory web site. <http://www.nsls.bnl.gov/newsroom/science/2006/08-Serganov.htm>
- ⁹ Howard Hughes Medical Institute. "Antidepressant Found To Extend Lifespan In C. Elegans." *ScienceDaily* 22 November 2007. <<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/11/071121144946.htm>>

**Oliver K. Reyes Hernández,
Jesús Muñoz Rojas,
Candelario Vázquez Cruz,
Rebeca D. Martínez Contreras.
Centro de Investigaciones Microbiológicas.
Instituto de Ciencias, BUAP.
e-mail: acgt26@hotmail.com**