

Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006: Descubrimiento del RNA de interferencia

Marcelo López L.^{1,2}, Pablo Ramdohr L.¹

Los premios Nobel, fundados por el industrial sueco Alfred Bernhard Nobel, el inventor de la dinamita, fueron entregados por primera vez en 1901. Desde entonces, la ceremonia formal de premiación tiene lugar cada año en Estocolmo el 10 de diciembre, fecha aniversario de la muerte de Nobel [<http://nobelprize.org/>]. Nobel estableció los premios en cinco categorías específicas: literatura, paz, fisiología o medicina, física y química. Posteriormente, un sexto premio, creado por el Banco Nacional de Suecia, se instauró en 1968 destinado a la mejor obra de investigación en el campo de la Economía.

Este año, el Premio Nobel de Fisiología o Medicina fue otorgado a los científicos estadounidenses Andrew Fire y Craig Mello, por el descubrimiento de un mecanismo fundamental para controlar el flujo de información genética, el ácido ribonucleico de interferencia (RNAi). El éxito de estos científicos insta a reflexionar sobre la relevancia de algunos modelos biológicos aparentemente tan lejanos a la medicina como son las plantas (petunias) y el gusano de tierra (*Caenorhabditis Elegans*), así como del temple de algunos hombres con espíritu inquisidor que son capaces de ver más allá de un evidente fracaso.

La historia comienza a fines de la década de los ochenta cuando un grupo de científicos liderados por el Dr. Jorgensen diseñó una novedosa estrategia para obtener petunias con una mayor coloración púrpura. La estrategia propuesta era simple e implicaba la introducción en la planta de una copia adicional del gen que codifica para una de las enzimas principales de la vía de

producción de los pigmentos responsables de proporcionar el color púrpura a las petunias. Inesperadamente, y contrario a las expectativas, todas las plantas transgénicas exhibían flores blancas, indicando la falta de pigmento¹. Experiencias similares se repetían en otras especies. Por ejemplo, el intento de incrementar la expresión del pigmento naranja sintetizado por el hongo *Neurospora crassa* utilizando una aproximación similar a la de Jorgensen dio origen a hongos de color blanquecino². Este conjunto de resultados aparentemente "negativos" motivó a una serie de investigadores a estudiar este fenómeno de "supresión génica". Es así como estudios posteriores permitieron establecer que la supresión génica ocurría a nivel post-transcripcional y representaba un proceso general en eucariontes. El fenómeno se denominó "silenciamiento de genes post-transcripcional" o PTGS (*Post Transcriptional Gene Silencing*).

Diversos modelos biológicos se utilizaron para estudiar el fenómeno de PTGS, siendo el modelo del gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) el que permitió los mayores logros. En 1996, se describió que la introducción de un oligonucleótido sentido junto a un oligonucleótido antisentido en *C. Elegans* potenciaban el efecto de supresión del gen³. Esta observación quedaría, sin embargo, sin explicación hasta que el grupo del Dr. Craig Mello de la Universidad de Carnegie trabajando también con *C. Elegans* demostró que el fenómeno de PTGS era producido por la formación de RNA de doble cadena (dsRNA)⁴. El Dr. Andrew Fire, quien realizaba estudios posdoctorales

1. Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Médicas.

2. Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

con Mello denominó a este fenómeno "interferencia por RNA o RNAi". En su artículo, publicado en 1998 en la revista *Nature*⁴, Fire y Mello demuestran que es posible el silenciamiento específico de un gen mediante la introducción en la célula de dsRNA que contiene la secuencia homóloga. Proponen además, que este fenómeno es mediado por un mecanismo endógeno que es usado por la célula para controlar la expresión génica. Finalmente, sugieren una conexión entre este mecanismo y el fenómeno descrito por el grupo de Jorgensen en plantas⁴. Tal impacto causó este hallazgo que en el año 2002 la revista *Science* determinó que el RNAi era el descubrimiento más relevante del año, reposicionando así al RNA como una molécula mucho más versátil de lo que inicialmente se pensó⁵. Mas aún, el descubrimiento del RNAi ha sido el pilar estructural para el desarrollo de nuevas herramientas genéticas con la capacidad de silenciar cualquier gen del genoma de manera específica mediante el empleo de pequeñas moléculas de dsRNA denominados RNA interferentes pequeños (siRNA)⁶. La tecnología desarrollada en torno al conocimiento del RNAi ha revolucionado diversos ámbitos de la ciencia fundamental y aplicada. Como consecuencia, tan sólo ocho años después de la publicación del hallazgo, el Instituto Karolinska decidió conceder el Premio Nobel de Fisiología o Medicina del año 2006 a los Drs. Andrew Fire y Craig C. Mello por el descubrimiento del RNAi.

Flujo de información génica y el silenciamiento de genes

En células eucariontes, el ácido desoxirribonucleico (DNA), molécula portadora de la información genética, está confinado al núcleo celular. Esto implica que la transmisión de la información genética desde el DNA hasta las proteínas, cuya maquinaria de síntesis se encuentra en el citoplasma celular, requiere de un intermediario o mensajero molecular. El ácido ribonucleico (RNA) denominado RNA mensajero (mRNA) cumple ésta función transportando la información codificada desde el núcleo al citoplasma celular. La síntesis del mRNA a partir del DNA, proceso denominado transcripción, ocurre en el núcleo celular y consiste en realizar una copia exacta de una de las hebras de DNA, excepto por la presencia de uracilo (U) en vez de timina (T). El mRNA

es luego transportado al citoplasma celular para ser *traducido*. La traducción, implica la interpretación de la información contenida en el mRNA haciendo uso del código genético, que identifica aminoácidos específicos a partir de un conjunto de tres bases, para así sintetizar la proteína codificada en su secuencia.

El fenómeno de silenciamiento de genes por RNAi interfiere en forma específica con el flujo de información génica. Es así como la introducción de un RNA de doble hebra (dsRNA) en una célula u organismo inicia una cascada de eventos (figura 1 A), los cuales culminan con la degradación del mRNA de secuencia homóloga al dsRNA originalmente introducido⁶. En consecuencia, el dsRNA es capaz de interrumpir de manera específica el flujo de información genética desde el DNA hasta las proteínas. En la naturaleza el dsRNA puede provenir de una fuente exógena, como por ejemplo los virus, o endógena, como son los transposones movilizados, secuencias transcrita incorrectamente, o micro-RNAs no codificantes⁶. La primera fase del proceso de silenciamiento está a cargo de una ribonucleasa denominada Dicer (figura 1 B). Esta ribonucleasa reconoce y fragmenta el dsRNA en porciones de 21-25 nucleótidos de longitud, los denominados RNA interferentes pequeños (siRNA) (figura 1 C). Estos siRNAs inducen la formación de un complejo de proteínas denominado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) (figura 1d). El RISC contiene una helicasa (aún no identificada molecularmente), la cual separa las dos hebras del siRNA permitiendo al complejo seleccionar sólo una de ellas⁷. De seleccionar la hebra antisentido, una nucleasa homóloga a Dicer (Dicer2) se encarga de degradar el mRNA complementario a la secuencia del siRNA (figura 1 E y 1 F). Por tanto, el dsRNA puede inducir un silenciamiento genético de manera secuencia-específica en eucariontes. El fenómeno de RNAi es altamente conservado a lo largo de la evolución, presentándose en organismos tan variados y distantes como levaduras, diversas plantas unicelulares y pluricelulares, hongos, insectos, nematodos y mamíferos⁶.

La revolución de la tecnología del RNAi

En los últimos años la comunidad científica ha sido testigos de una revolución en el área de la Genómica, Biología Celular y

Molecular. De hecho y después de grandes esfuerzos que involucraron grupos multidisciplinarios alrededor del mundo, se ha podido finalizar la secuenciación de diversos genomas, entre los cuales destaca el genoma humano. Este hito expone, sin embargo, un reto aun mayor, el de identificar la función

de cada uno de los miles de genes identificados. En este contexto, el RNAi brinda una posibilidad insuperable, la capacidad de silenciar uno o bien muchos genes de forma simultánea y rápida⁸. Dado que la interferencia por RNA se basa en la interacción específica entre secuencias del siRNA y del mRNA, los siRNA pueden ser diseñados para silenciar, en principio, cualquier gen. Es factible, por tanto, especular que un trabajo sistemático de silenciamiento de genes podría permitir establecer la función de la mayoría de los genes que forman un genoma complejo.

El campo de RNAi se ha desarrollado de forma exponencial permitiendo que la tecnología asociada a este descubrimiento se proyecte como una potente herramienta con fines terapéuticos^{6,9-11}. La potencialidad de esta nueva tecnología ha impulsado a diversas empresas a iniciar el desarrollo de instrumentos bioinformáticos que permiten el diseño y la obtención de siRNA con potencial farmacológico a través de una búsqueda optimizada de las secuencias más adecuadas para el silenciamiento de genes específicos, reduciendo así los tiempos de investigación y maximizando los resultados. Es así como diversos grupos de investigación desarrollan en la actualidad la tecnología del RNAi con el fin de silenciar específicamente mRNAs responsables de la síntesis de proteínas nocivas dentro de la célula, inhibiendo así sus efectos. En consecuencia, el uso de la tecnología del RNAi para el desarrollo de nuevas terapias moleculares contra patologías tan diversas como son las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer se hace cada vez más evidente⁹⁻¹⁵. Por ejemplo, la inhibición del mRNA que codifica para la proteína Lyn utilizando RNAi permitió la inducción de apoptosis en células de pacientes con leucemia mieloide crónica en crisis blástica¹². Se ha demostrado también el uso de la tecnología del RNAi para silenciar genes importantes para la replicación y morfogénesis de varios virus de importancia

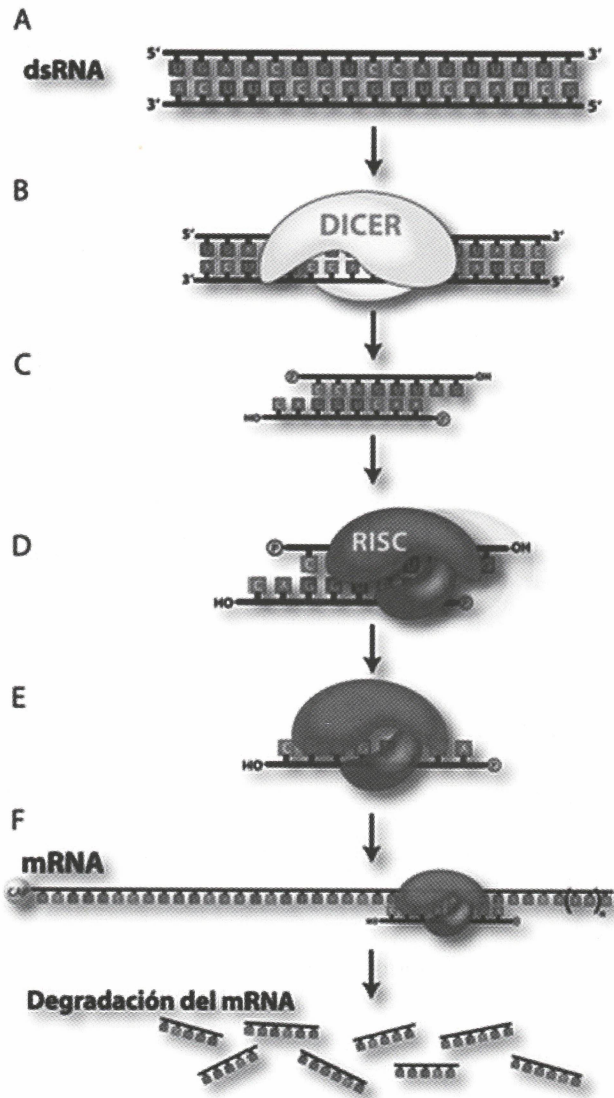


Figura 1. Mecanismo de acción del RNA de interferencia. Representación esquemática de la cascada de eventos iniciados por la introducción de un RNA de doble hebra (dsRNA) a una célula. La nucleasa Dicer corta el dsRNA en fragmentos pequeños de 21-25 nucleótidos (siRNA) (B-C). Estos últimos inician el ensamblaje del complejo RISC (D), el cual media la degradación del RNA mensajero (mRNA) con secuencia homologa al dsRNA (E-F).

médica¹⁴. La introducción de dsRNA homólogos a regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)¹⁶, del virus de la polio¹⁷, rotavirus¹⁸, el virus de la hepatitis B (HBV) y el de la hepatitis C (HCV)^{19,20}, entre otros, en células humanas confiere resistencia a la infección por estos virus. Estos hallazgos han permitido especular sobre el posible uso de fragmentos de dsRNA como vacunas antivirales, o aún más en el tratamiento de infecciones virales ya establecidas^{21,22}. Sin embargo, aun cuando los resultados obtenidos son extremadamente prometedores es importante considerar que aún resta mucho que aprender sobre el mecanismo de acción del RNAi²³. Por tanto, los resultados deben ser tratados con cautela y crítica^{23,24}.

En resumen, a pesar de que el fin inicial de lograr petunias con un color intenso fracasó rotundamente, la comprensión de este fenómeno por los Drs. Fire y Mello, utilizando como modelo de estudio el gusano de tierra, abrió nuevas y excitantes expectativas no sólo para las ciencias fundamentales sino que también para las ciencias médicas, otorgando nuevas herramientas para el desarrollo de prometedoras terapias moleculares para un número importante de patologías.

REFERENCIAS

- 1.- *Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R*: Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279-89.
- 2.- *Romano N, Macino G*: Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 1992; 6: 3343-53.
- 3.- *Guo S, Kemphues KJ*: Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 408-15.
- 4.- *Fire A*: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.
- 5.- *Couzin J*: Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002; 298: 2296-7.
- 6.- *Agrawal N*: RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 657-85.
- 7.- *Schwarz DS*: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.
- 8.- *Hannon GJ, Rossi JJ*: Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-8.
- 9.- *Boudreau RL, Davidson BL*: RNAi therapy for neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 2006; 75: 73-92.
- 10.- *Soutschek J*: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-8.
- 11.- *Dykxhoorn DM, Lieberman J*: Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; 126: 231-5.
- 12.- *Ptasznik A*: Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 2004; 10: 1187-9.
- 13.- *Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ*: RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3857-65.
- 14.- *Carmichael GG*: Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature* 2002; 418: 379-80.
- 15.- *Sah DW*: Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders. *Life Sci* 2006; 79: 1773-80.
- 16.- *Jacque JM, Triques K, Stevenson M*: Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-8.
- 17.- *Saleh MC, Van Rij RP, Andino R*: RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Res* 2004; 102: 11-7.
- 18.- *Dector MA*: Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2002; 3: 1175-80.
- 19.- *Shlomai A, Shaul Y*: Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-70.
- 20.- *Randall G, Rice CM*: Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 2004; 102: 19-25.
- 21.- *Lawrence D*: RNAi could hold promise in the treatment of HIV. *Lancet* 2002; 359: 2007.
- 22.- *Saulnier A*: Complete cure of persistent virus infections by antiviral siRNAs. *Mol Ther* 2006; 13: 142-50.
- 23.- *Li LC*: Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006.
- 24.- *Couzin J*: Molecular biology. RNAi shows cracks in its armor. *Science* 2004; 306: 1124-5.