

Artículos Originales

UNA BREVE HISTORIA DEL FENÓMENO DEL SILENCIAMIENTO DEL RNA. CONTRIBUCIONES DE LA VIROLOGÍA A SU DESCUBRIMIENTO

Vicente Pallás

vpallas@ibmcp.upv.es

Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP)

Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Avda. de los Naranjos s/n - 46022 Valencia

Resumen

El descubrimiento del fenómeno de silenciamiento o interferencia del RNA por moléculas de RNAs de doble cadena (dsRNAs) ha supuesto un cambio de paradigma en la Biología Molecular. Hasta el momento de su descubrimiento, los dsRNAs solo eran familiares a los virólogos como señales de alarma de una infección viral, mientras que, para el resto de los biólogos, eran considerados moléculas inertes. Los experimentos de los grupos de A. Fire y C. Mello permitieron poner de manifiesto que los muy energéticamente estables dsRNAs eran los principales inductores, no solo de mecanismos de defensa evolutivamente conservados en la célula eucariota, sino de mecanismos celulares relacionados con procesos de desarrollo en animales, plantas y hongos, dando una mayor solidez, si cabe, a la hipótesis del mundo de RNA primigenio. Esta revisión relata brevemente los hitos de este descubrimiento, así como las principales contribuciones, no siempre suficientemente reconocidas, que la Virología, y, en especial la Virología de plantas, han aportado para la consolidación de este nuevo paradigma.



Figura 1. Andrew Fire (izquierda) y Craig Mello (derecha) en la ceremonia de concesión de los Premios Nobel 2006. Reproducido de *The Nobel Foundation*, con permiso.

ANTECEDENTES

El premio Nobel de Medicina de 2006 reconoció la labor de los profesores Andrew Z. Fire, de la Universidad de Stanford, y Craig C. Mello [Figura 1], de la Universidad de Massachussets, por descifrar un nuevo mecanismo de regulación génica basado en unas pequeñas moléculas tan curiosas como insospechadas: los RNAs de interferencia. En los últimos años, se ha demostrado que este mecanismo silenciador de la expresión de los genes, opera tanto en animales como en plantas y en hongos, y está implicado en procesos tan fundamentales como son el desarrollo y defensa de los organismos; en otras palabras, en su vida y en su mantenimiento. Fire y Mello demostraron elegantemente que la molécula inductora del denominado fenómeno de interferencia del RNA (RNAi) era el RNA de doble cadena (dsRNA)^[7].

Hasta entonces, las moléculas de dsRNA eran consideradas, o bien especies inertes para la mayoría de los biólogos, o bien la señal de una

infección viral para los virólogos. Se habían descubierto en los primeros años de la década de los 60, estando vigente el dogma según el cual la mayoría de las células utilizan DNA de cadena doble y RNA de cadena simple como formas de almacenamiento de la información genética a largo y corto plazo, respectivamente. Sin embargo, las raras formas de doble cadena del RNA les eran bastante familiares a los virólogos por ser indicativas de la presencia de virus; por tanto, es razonable asumir que los antecedentes y premisas que facilitaron la elucidación del mecanismo del silenciamiento del RNA haya que buscarlos, al menos en parte, en la Virología. Entre los hitos históricos que permitieron o facilitaron una inusualmente rápida aceptación del fenómeno del silenciamiento o interferencia del RNA, cabría destacar tres, que se describen a continuación: la protección cruzada; la inmunidad innata y el interferón; y el descubrimiento de los dsRNAs.

Inmunidad o protección cruzada

El 22 de diciembre de 1927, la expedición Allison V. Armour llegaba al puerto de Santa Cruz de Tenerife con el propósito de recolectar semillas y plantas vivas de las Islas Canarias, Gibraltar y el oeste de África, para introducir las en los EE.UU. Uno de los responsables científicos de la expedición era el patólogo H. H. McKinney, del Departamento de Agricultura de los EE.UU., cuya misión consistía en la búsqueda de virus de plantas apropiados para estudios experimentales y así acumular información relativa a las enfermedades virales de las plantas de las regiones visitadas.

En muchas localidades se crecían patatas y tomates, y varias especies de cucurbitáceas se hallaban en jardines y a ambos lados de los caminos. Muchas de las plantaciones de patata se encontraban en estrechas terrazas, algunas de ellas, muy lejos de los caminos, muy inaccesibles. En una de estas terrazas, desde la que se divisaba el mar del puerto de la Orotava (Tenerife), pude observar un mosaico verde en la mayoría de las patatas cultivadas y en una planta parecida al ajo que crecía como una mala hierba entre las patatas^[17].

En aquella época, la palabra «mosaico» se utilizaba, en el mundo vegetal, como sinónimo de la palabra «virus», y se creía que todos los síntomas del mosaico observados en plantas cultivadas estaban ocasionados por el mismo agente, por el mismo virus. El mosaico consistía en deco-

Las raras formas de doble cadena del RNA les eran bastante familiares a los virólogos por ser indicativas de la presencia de virus

loraciones alternadas del aspecto verde de las hojas con zonas amarillentas o de color verde claro. McKinney utilizó la plataforma del barco de la expedición para realizar una serie de cuidadosos experimentos que le permitieron observar diferencias en la intensidad de los síntomas del mosaico, esencialmente clasificados como mosaico *verde* y mosaico *amarillo*. Pudo demostrar que, cuando separaba las regiones de

la hoja con diferentes mosaicos y obtenía los jugos correspondientes, estos se comportaban de manera diferente al inocularlos en plantas de tabaco. McKinney sostuvo que estos resultados solo podrían explicarse por la existencia de formas mutadas del virus localmente presentes en la planta. El uso del término «mutante» fue duramente criticado por sus superiores del Departamento de Agricultura, porque admitía implícitamente que los virus eran organismos vivos. En esa misma serie de experimentos, pudo demostrar que la presencia en una planta de las formas mutadas que daban lugar a un mosaico más suave, protegía de la infección de las formas mutantes que daban un mosaico más fuerte. Este fenómeno, al que denominó «protección cruzada», posteriormente se aplicaría como un método de control directo de las infecciones provocadas por los aislados más perjudiciales de un mismo virus. En los años siguientes apareció un número considerable de artículos en los que se describía la existencia de cepas de virus que daban una sintomatología suave y que protegían frente a la posterior infección con aquellas cepas de virus que ocasionaban la sintomatología más nociva^[31].

mismo

Inmunidad innata e interferón

Años después, una serie de experimentos encaminados a estudiar las respuestas celulares a la infección viral, esta vez en mamíferos, revelaron unos interesantes resultados sobre los efectos de la interferencia viral. Trabajando esencialmente con el virus de la fiebre amarilla, diversos grupos pusieron de manifiesto que una infección previa con un virus considerado «benigno» podía proporcionar resistencia frente a una infección posterior con un virus patógeno. Aunque la capacidad de inducir respuesta inmune se conocía desde hacía mucho tiempo, estos resultados fueron inesperados dada la ausencia de relación entre los dos virus empleados en los experimentos y, por tanto, hacían sospechar la existencia de mecanismos generales de alarma frente a las infecciones virales. Esta hipótesis inicial se confirmó cuando Isaacs y Linderman^[11] pudieron purificar en 1957 un componente proteico de los animales «retados» con el virus benigno y observaron que, tras inyectarlo en animales control, estos desarrollaban una resistencia viral general. A este componente proteico lo llamaron «interferón».

Paralelamente a este interesante descubrimiento, Richard Shope^[25] estaba interesado en encontrar tratamientos que indujeran una inmunidad generalizada frente a las infecciones virales. A finales de la II Guerra Mundial, decidió iniciar una serie de viajes por todo el mundo buscando materiales biológicos que pudiera cultivar y usar como materiales de partida. A pesar de esta vasta serie de viajes, el material más valioso lo encontró en el moho de una foto de su mujer, Helen. A los extractos de este hongo (*Penicillium funiculosum*) Shope los denominó «Helenina» y encontró que podían inducir una respuesta de tipo interferón en animales.

El dsRNA entra en escena

El grupo de Maurice Hilleman, que trabajaba en Merck, usó el hongo de R. Shope como punto de partida para purificar el componente que confería la resistencia viral. En los extractos de este hongo, Hilleman determinó la presencia de RNAs de doble cadena como la responsable de la inducción de la resistencia^[13]. Dada la falta de similitud entre los dsRNAs del hongo y del RNA diana, decidieron comprobar si dsRNAs naturales y sintéticos muy distantes filogenéticamente inducían el mismo efecto y, para su sorpresa, en ambos casos observaron una respuesta de tipo interferón. Quedaba sin responder cuál era el origen de los dsRNAs inductores, aunque la hipótesis más probable era que derivaran de una infección viral fortuita presente en el hongo. En cualquier caso, Hilleman y colaboradores habían puesto de manifiesto la existencia de un sistema ancestral mediante el cual las células podían percibir a una molécula como delatora de una infección viral (dsRNA) y responder produciendo una señal que las «obligara» a dedicar todos sus esfuerzos y energías a combatir al patógeno^[8].

espacio →

Todos estos antecedentes, aunque por separado no fueron claves para el descubrimiento del fenómeno del silenciamiento por RNA, en su conjunto, sentaron las bases de una línea de pensamiento según la cual las moléculas de dsRNAs desempeñaban un papel relevante en determinados procesos biológicos.

El silenciamiento del RNA

Como en otros muchos aspectos de la ciencia, los antecedentes de este nuevo mecanismo de regulación génica hay que buscarlos en el mundo vegetal. A principios de la década de los 90, Richard A. Jorgensen, de la Universidad de Arizona, y Joseph Mol, de la de Ámsterdam, estaban interesados en intensificar el color violeta de las petunias. Habían razonado que, modificándolas para que expresaran más copias del gen responsable de su pigmentación nativa, la sobreexpresión de la enzima que este co-

▶▶ Como en otros muchos aspectos de la ciencia, los antecedentes de este nuevo mecanismo de regulación génica hay que buscarlos en el mundo vegetal.

dificaría daría mayor tonalidad violeta a los pétalos. Sin embargo, el resultado fue justo el contrario al esperado: las flores no solo no tenían más intensidad de color violeta, sino que gran parte de sus pétalos se tornaron blancos [Figura 2]. La expresión de copias extra del gen responsable del color había inactivado al propio gen endógeno de la planta^[19,29]. A este fenómeno lo denominaron «cosupresión».

Mientras tanto, y de manera simultánea, en Oregón, William G. Dougherty y su equipo trataban de demostrar experimentalmente una antigua hipótesis según la cual la expresión en plantas de genes derivados de un patógeno conferiría a la planta resistencia frente al mismo (resistencia derivada del patógeno o PDR, por sus siglas en inglés). Según esta hipótesis, formulada por Sanford y Johnson^[23], los patógenos generarían moléculas críticas y únicas para su propio proceso específico de patogénesis. Propusieron, por tanto, que si se expresaran moléculas específicas del patógeno en una forma modificada (disfuncional) en el genoma de la célula huésped, estas podrían actuar para inhibir al patógeno mismo. Dougherty y colaboradores expresaron la proteína de cubierta de un virus RNA que afecta al tabaco para ver qué efectos tenía sobre la infección del mismo. Como controles de su experimento, diseñaron secuencias completas del gen de la mencionada proteína que no se podían traducir, es decir, que no expresaban la proteína. De nuevo, otro resultado inesperado: se consiguió protección con las secuencias del gen no traducible. Dedujeron que la planta había puesto en marcha un mecanismo que inactivaba tanto el gen insertado (transgén), como la secuencia homóloga del virus, y esta actividad degradadora del RNA era activada por el RNA y no por la proteína^[15]. Observaron, además, que esta inactivación era muy específica de secuencia, dado que otros virus estrechamente relacionados, pero de secuencia de RNA ligeramente distinta, no resultaban inactivados por este mecanismo. Todavía más desconcertantes fueron los resultados que mostraban



Figura 2. Secciones blancas en flores de petunia representando áreas donde la expresión del gen de la chalcona sintasa, enzima implicada en la coloración de la flor, había sido silenciada por RNAi. Todas las imágenes pertenecen a R. Jorgensen, Universidad de Arizona (Tucson). Reproducido de *Plant Cell* 2: 279–289 (1990)^[19] con permiso de la *American Society of Plant Biologists*.

claramente que las plantas que manifestaban una mayor resistencia al virus eran, precisamente, aquellas en las que el RNA transgén estaba presente en menor concentración, mientras que otras que expresaban el mismo gen a mayor nivel eran completamente susceptibles. Llamaron a este fenómeno «silenciamiento génico mediado por RNA» y pronto se comprobó que respondía a las mismas pautas que el de co-supresión previamente descrito. Desafortunadamente, W. G. Dougherty decidió abandonar la ciencia en este punto, quizá sin ser muy consciente de que estaba ante una de las principales revoluciones de la era de la Biología Molecular.

En un principio, muchos de los fenómenos relacionados con el silenciamiento en plantas fueron denominados genéricamente como *silenciamiento génico*. Mientras el Dr. David Baulcombe utilizaba repetidamente este término en un seminario que impartía en Suiza, fue interrumpido por el Dr. Ingo Potrykus, el inventor del «arroz dorado», quien le manifestó que no estaba realmente hablando de silenciamiento génico, sino de «silenciamiento del RNA». Desde entonces, el Dr. Baulcombe y otros promovieron esta última denominación como un término genérico que abarca a una familia de mecanismos que implican fenómenos de silenciamiento y al RNA.

Durante esos años, A. Z. Fire y C. C. Mello estaban interesados en una línea de investigación encaminada a anular la expresión de un determinado gen mediante la tecnología del RNA antisentido. Esta aproximación se basaba en incorporar secuencias inversas –en sentido estricto, complementarias– a un determinado gen para tratar de desactivarlo. Su sistema experimental era el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el mal llamado «gusano», propuesto por Sidney Brenner como sistema modelo de experimentación animal. Hasta entonces, los resultados de esta estrategia habían sido dispares y, en la mayoría de los casos, modestos. Sin embargo, la gran sorpresa vendría, de nuevo, precisamente de los controles que se utilizaron en el experimento definitivo. Inocularon a los nematodos tanto RNA antisentido, como RNA del mismo sentido de un gen que desempeña un papel clave en la función muscular; e incluyeron una preparación de dsRNA y, por tanto, las secuencias en las dos orientaciones. El resultado fue espectacular, y los nematodos inoculados con dsRNA presentaron síntomas claros de que ese gen había sido inactivado. Habían interferido en la expresión de un determinado gen mediante la aplicación de pequeñas secuencias de dsRNA. Su artículo en la prestigiosa revista *Nature* en 1998 es ya un clásico de la Bio-

El Dr. David Baulcombe fue interrumpido por el Dr. Ingo Potrykus, el inventor del «arroz dorado», quien le manifestó que no estaba realmente hablando de silenciamiento génico, sino de «silenciamiento del RNA».

logía Molecular^[7]. En él sugirieron que este mecanismo de interferencia se utilizaría, de manera endógena, por la célula animal o vegetal para inactivar determinados RNAs mensajeros (mRNA). Además, pusieron de manifiesto la estrecha relación del fenómeno observado por ellos con el silenciamiento génico previamente descrito en plantas. Cuando los grupos de Fire y Mello ya habían obtenido las evidencias definitivas de que el dsRNA era el inductor del fenómeno de interferencia del RNA, llegó a sus manos un artículo que el grupo

de Baulcombe acababa de publicar^[5]. En dicho artículo, se proponía que las características únicas de los intermediarios de la replicación viral podrían mejorar la inducción del silenciamiento génico basada en la presencia del transgén:

Podría incrementarse la incidencia del silenciamiento génico asegurándose de que los transcritos del transgén tuvieran propiedades que se asemejaran a las formas replicativas del RNA viral, tales como su naturaleza de doble cadena.

El trabajo de los grupos de Fire y Mello no solo demostró que las moléculas de dsRNAs tenían una gran capacidad de silenciamiento por interferencia sobre su mRNA diana, sino que puso de manifiesto –en este caso, *serendípicamente*– que este fenómeno tenía un efecto sistémico y, además, podía transmitirse a la descendencia [Figura 3].

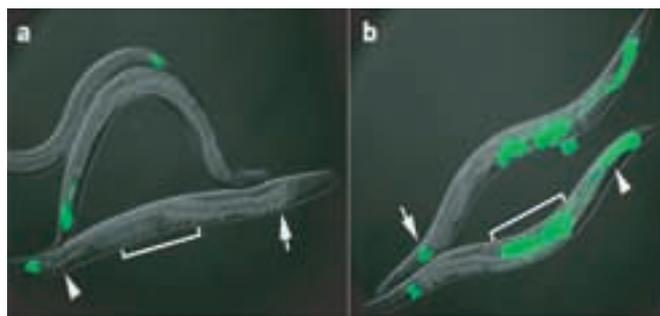


Figura 3. RNAi en *C. elegans*. El silenciamiento del gen delator de la proteína verde fluorescente (GFP) en *C. elegans* ocurre (a) cuando los animales se alimentan de bacterias que expresan moléculas dsRNAs de GFP; pero no ocurre (b) en animales que son defectivos para el RNAi. El silenciamiento tiene lugar a través de todo el cuerpo del animal, con la excepción de unas pocas células en la cola que expresan GFP residual. La señal se pierde en células intestinales cerca de la cola (cabezas de flecha), así como cerca de la cabeza (flechas). La ausencia de embriones positivos a GFP en (a) (región entre corchetes) demuestra el efecto sistémico y heredable del silenciamiento. Reproducido de Mello y Conte (2004), *Nature* 431: 338-342; con permiso de Nature Publishing Group.

En 1996, un estudiante recién graduado en el laboratorio de Craig Mello, Sam Driver, estaba empezando unos experimentos de microinyección de dsRNAs en *C. elegans*; y, muchas veces, acertar con la aguja en el tejido correcto le resultaba más que problemático. Sam y Craig se percataron de que, a pesar de que los pinchazos de Sam no estaban en el sitio adecuado, las inyecciones producían todavía un efecto de interferencia muy acusado. Cuando inyectaron los dsRNAs, deliberadamente esta vez, en el sitio inadecuado, seguían observando un fuerte efecto biológico. Sam y Craig extendieron esta serie de experimentos a otros tejidos del cuerpo del nematodo y comprobaron, de forma concluyente, que la inyección de dsRNAs producía un marcado efecto sistémico. Muy poco tiempo después, el grupo de Hervé Vaucheret en París demostraba en plantas este mismo efecto sistémico del silenciamiento del RNA, al verificar que el silenciamiento se transmitía mediante injerto desde los patrones silenciados hasta los injertos no silenciados^[20].

APARECEN LOS PEQUEÑOS RNAs INTERFERENTES

En el último párrafo de su artículo seminal, Fire y Mello postulan:

(...) sea cual sea la diana de los dsRNAs, los mecanismos subyacentes a la interferencia del RNA, probablemente, tengan una finalidad biológica^[7].

Sin duda, una afirmación premonitoria. En cualquier caso, aunque el fenómeno de la interferencia había sido descrito y contrastado de forma contundente, los mecanismos a través de los cuales operaba eran, en esos momentos, una caja negra. La capacidad del mecanismo de silenciamiento por RNA para actuar de manera específica sobre secuencias nucleotídicas constituía un auténtico misterio. La explicación más sencilla requería la presencia de moléculas de RNA antisentido que guiaran la maquinaria de silenciamiento o interferencia a su RNA diana.

Andrew Hamilton, quien había trabajado de manera exitosa en la estrategia del RNA antisentido en tomates transgénicos durante su tesis doctoral, se incorporó al laboratorio del Dr. D. Baulcombe para abordar la búsqueda de pequeños RNAs antisentido que pudieran explicar el fenómeno de cosupresión en plantas, anteriormente descrito. Hamilton y Baulcombe^[9] pusieron de manifiesto que, en aquellas plantas en las que un gen específico había sido silenciado, siempre se acumulaban RNAs an-

tisentido de aproximadamente 25 nucleótidos (nt) y que eran complementarios al gen silenciado. El posterior refinamiento de la metodología empleada les permitió concluir que estos pequeños RNAs tenían un tamaño comprendido entre 21 y 24 nt.

▶▶ La explicación más sencilla requería la presencia de moléculas de RNA antisentido que guiaran la maquinaria de silenciamiento o interferencia a su RNA diana

Sin duda, la presencia de estos pequeños RNAs en plantas silenciadas establecía necesariamente una conexión con los trabajos anteriores de Victor Ambros, primero, y Gary Ruvkun, después, quienes habían demostrado el papel esencial de pequeños RNAs provenientes de los genes *lin-4* y *let-7*, respectivamente, en el control del desarrollo temporal en *C. elegans*^[1,22]. Esta conexión biológica, aunque obvia desde una perspectiva

actual, al principio pasó desapercibida a D. Baulcombe. Tal como él mismo reconoció, su «fracaso» en establecer esa conexión fue debido, muy probablemente, a que los mecanismos de regulación en *C. elegans* implicaban la inhibición de la traducción; mientras que, en plantas, la perfecta complementariedad de bases entre el RNAi y el mRNA diana conllevaba una disminución de la estabilidad y la consiguiente destrucción de este último^[2].

En este escenario, parecía obvio plantearse la posible universalidad de este mecanismo regulador basado en el RNA. Ruvkun y colaboradores habían demostrado que el RNA del gen *let-7* estaba perfectamente conservado en una amplia gama de *phyla* animales^[21]. Esto llevó a pensar a V. Ambros en la existencia de otros RNAs como miembros de una clase ancestral, todavía por identificar, que participaran en un mecanismo general de regulación de la expresión génica. Su equipo empezó a preparar genotecas de RNAs para identificar nuevos RNAi, llamados por entonces microRNAs, a partir de preparaciones enriquecidas de RNAs de 22 nt. Pensaba que esta línea de investigación no la podrían afrontar muchos otros investigadores. De hecho, en julio de 2001, en un reunión científica sobre *C. elegans* le había llegado el rumor de que David Bartel estaba intentando clonar pequeños RNAs del gusano, pero él mismo pensó: «¿Bartel...? Él no es una persona *gusano*»^[1]. Cuando ya habían identificado más de una docena de RNAi pequeños en *C. elegans*, que estaban conservados en humanos, recibió un correo electrónico de los editores de *Science*, conteniendo el resumen de un manuscrito firmado por Tom Tuschl, y en el que le pedían ser revisor del mismo. Para su sorpresa, en el resumen se describía la existencia de un gran número de pequeños RNAi conservados desde las moscas hasta los humanos. Tuvo que rechazar su revisión por un conflicto de intereses, si bien aprovechó para negociar con los editores la publicación de sus resultados en la

misma revista. Los editores aceptaron la propuesta un martes, pero le exigieron que el manuscrito estuviera listo el viernes de esa misma semana. Además, un editor añadió: «hay un tercer manuscrito de D. Bartel». ¡V. Ambros no lo podía creer! Tras dos días y medio sin dormir, pudo enviar el manuscrito el día pactado y, finalmente, los tres artículos aparecieron en el mismo número de *Science* [12,14,16].

LA MAQUINARIA ENZIMÁTICA

El silenciamiento o interferencia por RNA era, en esos momentos, un potente mecanismo de regulación génica del que se conocían las moléculas inductoras y las efectoras, pero apenas se sabía nada de los componentes proteicos necesarios para llevar a cabo dicho proceso. Hiroaki Tabara, del grupo de C. Mello, había perfeccionado el sistema para hacer llegar las moléculas de dsRNAs a *C. elegans*: en lugar de inyectar las moléculas de dsRNAs directamente al nematodo, crecía este en presencia de una cepa de *Escherichia coli* modificada para producir dsRNAs. Esta vez, los dsRNAs no estaban dirigidos a un gen implicado en el movimiento del nematodo, sino a un gen esencial del mismo. De esta forma, si los animales tenían un sistema de RNAi intacto –como sería en la mayoría de los casos–, estos morirían; pero aquellos mutantes que carecieran del sistema de RNAi serían viables. Este poderoso sistema de selección genética permitiría identificar mutantes defectivos en RNAi. Algunos de esos mutantes no presentaron ninguna alteración en su fenotipo, como fue el caso de los mutantes *rde-1* y *rde-4* (de RNAi-deficiens genes), pero eran extremadamente deficientes en la respuesta RNAi al dsRNA [26]. La clonación del gen *rde-1* puso de manifiesto que codificaba una proteína, la RDE-1, con dominios altamente conservados entre los genes de organismos tan diversos como plantas y humanos.

De manera muy relevante, poco tiempo antes se había puesto de manifiesto que miembros de esta familia de proteínas, denominada Argonauta, estaban implicadas en el desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana* [4] y en la ruta de silenciamiento epigenético de *Drosophila melanogaster* [24]. Una serie de aproximaciones bioquímicas había evidenciado la implicación de una nucleasa, parte de un componente multiproteico, en el silenciamiento por RNA [10,27,30]. La especificidad de este complejo hacia los RNAs diana vendría dada por los RNA de 21 a 24 nt, pero la enzima generadora de estos últimos todavía no había sido identificada. El grupo de G. J. Hannon del Cold Spring Harbor Laboratory consiguió purificar e identificar, a partir de extractos proteicos de células S2 de *Drosophila*, la enzima que producía los putativos RNAi guía [3], a la

Tras dos días y medio sin dormir, V. Ambros pudo enviar el manuscrito el día pactado y, finalmente, los tres artículos aparecieron en el mismo número de *Science*.

que denominaron Dicer. Miembro de la familia de nucleasas RNAsa III, Dicer corta dsRNAs de manera específica y está conservada evolutivamente en nematodos, moscas, plantas, hongos y mamíferos. La enzima tiene una estructura distintiva que incluye un dominio helicasa, dos motivos RNasa III [Figura 4] y una región de homología a la familia Argonauta, cuya conexión al fenómeno de RNAi se había establecido recientemente.

Pronto varios grupos pusieron de manifiesto que, cuando la nucleasa Dicer se inactiva experimentalmente, la producción de los pequeños RNAi quedaba suprimida.

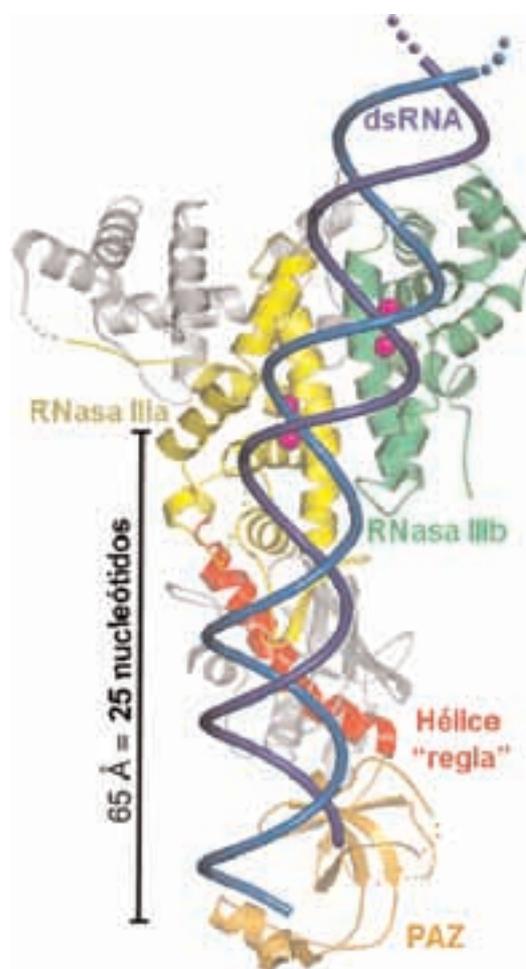


Figura 4. Esquema de la estructura cristalográfica de la proteína Dicer del protozoo *Giardia intestinalis* [18]. La actividad enzimática se localiza en la parte superior (dominios adyacentes RNasa IIIa y IIIb, en amarillo y verde, respectivamente) y el dominio PAZ de anclaje, al que se fija el extremo del dsRNA, está en la parte inferior de la molécula. El ángulo y la distancia que marca el conector helicoidal entre ambas regiones, constituye una verdadera «regla» molecular que determina la longitud idéntica de los fragmentos en que resultará cortado el dsRNA (en azul) por la endonucleasa. El core de esta enzima es idéntico al de la enzima en eucariotas superiores. Reproducido con permiso de *Nature Publishing Group*.

LAS APLICACIONES

No es muy corriente que la generación de conocimiento básico conlleve una inmediata aplicación social o científica. Sin duda, hay casos, como el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han revolucionado la Biología moderna y cuyas aplicaciones influyen decisivamente en la sociedad del bienestar. Este es el caso del descubrimiento del silenciamiento de RNA, mecanismo altamente conservado hasta en células de mamíferos, como constató Thomas Tuschl, de la Universidad Rockefeller, siendo el primero en demostrar que los pequeños RNAi también podían silenciar la expresión génica^[6] en este tipo de células. No es extraño que A. Z. Fire y C. C. Mello recibieran el Premio Nobel de Medicina y no el de Química. Las aplicaciones terapéuticas que se han derivado de este descubrimiento han sido espectaculares, y hoy disponemos de una herramienta muy precisa y eficiente para inactivar determinados genes.

El reto lo tienen ahora los clínicos y es encontrar la manera de hacer llegar los RNAi a sus moléculas diana dado que, a diferencia de lo que ocurre en plantas y nematodos, en mamíferos no tienen un efecto sistémico; este es el principal inconveniente de la metodología, todavía no resuelto de manera satisfactoria. Hay más de 20 compañías biotecnológicas desarrollando el RNAi terapéutico. Este se puede administrar como droga o mediante el uso de la terapia génica. En el primer caso se ha obtenido un relativo éxito mediante inyección directa vía ocular, o mediante administración intranasal para que tenga efecto pulmonar.



La tecnología del RNAi está todavía en una fase inmadura que debe mejorar en eficacia y seguridad pero, sin duda, esta etapa preclínica es extremadamente prometedora

La terapia génica está basada esencialmente en el uso de vectores virales, con las limitaciones que estos presentan. El RNAi se está aplicando ya a diferentes campos de la Medicina. La gran especificidad del mecanismo por el que opera es un inconveniente para tratar enfermedades de etiología viral, dada la alta mutabilidad de estos patógenos. Para combatir al virus de la hepatitis B o al HIV, las moléculas diana elegidas han sido los genes de proteínas receptoras del virión, más que el propio genoma viral. Sin embargo, esta alta especificidad se convierte en una ventaja

valiosísima para tratar enfermedades derivadas de mutaciones puntuales alélicas, como son una gran parte de enfermedades neurológicas (Parkinson y la enfermedad de Huntington) y enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide. También, se está mostrando muy útil para la inactivación de ciertos oncogenes o de genes que facilitan la metástasis de células cancerosas. La tecnología del RNAi está todavía en una fase inmadura que debe mejorar en eficacia y seguridad pero, sin duda, esta etapa preclínica es extremadamente prometedora^[28].

El descubrimiento del silenciamiento de RNA ha sido fruto del esfuerzo de muy diversos grupos entre los que hay que necesariamente destacar a los de A. Fire y C. Mello. No obstante, sin duda, la Virología y, en especial, la Virología de plantas, ha tenido una contribución muy meritoria en la elucidación de un apasionante mecanismo de regulación génica que la evolución ha ido moldeando en todos los seres vivos.



REFERENCIAS

- [1] Ambros, V. (2008). «The evolution of our thinking about microRNAs». *Nature Medicine* **14**: 10-14.
- [2] Baulcombe, D. (2008). «Of maize and men, or peas and people: case histories to justify plants and other model systems». *Nature Medicine* **14**: 20-23.
- [3] Bernstein, E. *et ál.*, (2001). «Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference». *Nature* **409**: 363-369.
- [4] Bohmert, K. *et ál.* (1998) «AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development». *EMBO J.* **17**:170-180.
- [5] Brigneti, G. *et ál.* (1998) «Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*». *EMBO J.* **17**:6739-6746.
- [6] Elbashir, S. M. *et ál.* (2001). «Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells». *Nature* **411**: 494-498.
- [7] Fire, A. Z. *et ál.*, (1998). «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*». *Nature* **391**: 806-811.
- [8] Fire, A. Z. (2006). «Gene silencing by double stranded RNA». *Nobel lecture* 198-233.
- [9] Hamilton, A. y Baulcombe, D. (1999). «A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants». *Science* **286**: 950-952.
- [10] Hammond, S. *et ál.* (2000). «An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells». *Nature* **404**:293-296.
- [11] Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957) «Virus Interference. I. The Interferon». *Proc. Royal Soc. B* **147**: 268-273.
- [12] Lagos-Quintana, M. *et ál.* (2001). «Identification of novel genes coding for small expressed RNAs». *Science* **294**: 853-858.
- [13] Lampson, G. P. *et ál.* (1967). «Inducers of interferon and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*». *PNAS* **58**: 782-789.
- [14] Lau, N. C. *et ál.* (2001). «An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*». *Science* **294**: 858-862.
- [15] Lindbo, J. A. *et ál.* (1993). «Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance». *Plant Cell* **5**: 1749-1759.
- [16] Lee, R. C. y Ambros, V. (2001). «An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*». *Science* **294**: 862-864.
- [17] McKinney, H. H. (1929). «Mosaic diseases in the Canary islands, West Africa and Gibraltar». *J. Agric. Res.* **39** (8): 557-578.
- [18] MacRae, I. J., Zhou, K. y Doudna, J. A. (2007). «Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer». *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 934-940.
- [19] Napoli, C., Lemiexu, C. y Jorgensen, R. A. (1990). «Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*». *Plant Cell* **2**: 279-289.
- [20] Palauqui, J. *et ál.* (1997). «Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions». *EMBO J.* **16**: 4738-4745.
- [21] Pasquinelli, A. E. *et ál.* (2000). «Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA». *Nature* **408**: 86-89.
- [22] Ruvkun, G. (2008). «The perfect storm of tiny RNAs». *Nature Medicine* **14**: 15-19.
- [23] Sanford, J. C. y Johnson, S. A. (1985). «The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome». *J. Theor. Biol.* **113**: 395-405.
- [24] Schmidt, A. *et ál.* (1999). «Genetic and molecular characterization of sting, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*». *Genetics* **151**: 749-760.
- [25] Shope, R. (1953) «An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*». *J. Exp. Med.* **97**:601-650.
- [26] Tabara, H. *et ál.* (1999) «The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*». *Cell* **99**:123-132.
- [27] Tuschl, T. *et ál.* (1999) «Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*». *Genes Dev.* **13**:3191-3197.
- [28] Uprichard, S. L. (2005). «The therapeutical potential of RNA interference». *FEBS Lett.* **579**: 5996-6007.
- [29] Van der Krol, A. *et ál.* (1990). «Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression». *Plant Cell* **2**: 291-299.
- [30] Zamore, P. *et ál.* (2000). «RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals». *Cell* **101**: 25-33.
- [31] Ziebell, H y Carr, J. P. (2010). «Cross-Protection: A Century of Mystery». *Adv. Virus Res.* **76**: 211-264.

