

RNAi:

UN PONT ENTRE LA BIOLOGIA DEL DESENVOLUPAMENT I LA VIROLOGIA

Escrit per:

Samuel Ojosnegros i Jordi Solana

Estudiants de Biologia
Universitat de Barcelona
Club de la Ciència
clubdelaciencia@hotmail.com

El 1990 un grup d'investigadors va provar d'exaltar el color púrpura d'unes petúnies introduint transgènicament còpies extres d'un dels gens responsables de la fabricació del pigment (1). En lloc d'aconseguir el seu objectiu, les petúnies creades van resultar blanques.

Sense saber-ho, aquests investigadors van activar una via molt antiga i evolutivament conservada de silenciament gènic. El fenomen es va anomenar co-supressió: un transgen inhibia el seu homòleg i s'inhibia a ell mateix. Es va obrir llavors la porta de la investigació del que es va acabar anomenant *post transcriptional gene silencing* (PTGS). Uns anys més tard es va trobar un fenomen similar en animals i en aquest cas es parlà d'interferència d'RNA (RNAi). Avui sabem que el mecanisme bàsic d'aquests processos és essencialment el mateix. Per simplificar parlarem doncs d'aquest fenomen com a RNAi.

L'auge de l'RNAi arribà en adonar-se la comunitat científica de la seva potència com a eina per inhibir gens. En plantes es van inhibir tota classe de virus de RNA i en animals es va utilitzar per l'estudi de la funció gènica. La inhibició es produeix introduint RNA de cadena doble (*dsRNA*) amb homologia de seqüència amb el gen del qual volem apaivagar l'expressió. Aquest *dsRNA* dispara una resposta que degrada els missatgers del gen en qüestió

d'una manera molt forta i específica. Ara sabem que el significat fisiològic d'aquesta resposta és protegir-se de paràsits moleculars tals com virus o transposons, i netejar la cèl·lula de RNAs aberrants.

El mecanisme

Aquest mecanisme es dispara en presència de *dsRNA* (fig. 1a). L'enzim *DICER* talla aquest *dsRNA* en trossos petits d'aproximadament 21-23 nucleòtids, els anomenats *siRNAs* (*short interfering RNAs*) primaris. Aquests *siRNAs* primaris poden seguir bàsicament 2 vies, depenent de l'espècie. En *Drosophila melanogaster* i altres organismes (fig. 1b) aquests *siRNAs* entren a formar part d'un complex multienzimàtic anomenat *RISC* (*RNA induced silencing complex*), mitjançant el qual i utilitzant com a guia la cadena antisentit (*antisense*) de *siRNA* es produeix el tall de l'*mRNA* al bell mig de la zona de complementarietat. En altres organismes com el nematode *Caenorhabditis elegans* es produeix un pas previ d'amplificació (fig. 2c) mediat per una RNA polimerasa RNA dependent (*RdRP*); d'aquesta manera i gràcies a l'actuació per segona vegada de l'enzim *DICER* s'aconsegueix la producció de *siRNAs* secundaris en quantitats majors. Aquests *siRNAs* secundaris s'introdueixen al *RISC* per degradar els *mRNAs* diana.

Els microRNAs

Reflexionant sobre el mecanisme de l'RNAi hom podria pensar en una petita qüestió: donat que tenim un mecanisme de silenciament gènic efectiu i senzill que funciona amb RNAs exògens, per què no utilitzar-lo per silenciar gens d'una manera normal, fisiològica? Tenint en compte que en biologia res no té sentit si no és des del punt de vista evolutiu, la pregunta esdevé hipòtesi: donat que el sistema produeix un silenciament ràpid i simple en els gens, és probable que l'evolució hagi adoptat el mecanisme per silenciar gens propis quan convingui a l'organisme.

Perquè això passés hauria de ser l'organisme mateix qui sintetitzés un RNA de doble cadena capaç de disparar la resposta de silenciament. Aquest RNA hauria de ser homòleg a la seqüència del gen que convé silenciar endògenament. Ens podem aventurar, doncs, a dir que aquest RNA hauria de ser codificat al genoma i transcrit reguladament en el moment que interressi.

La manera que hem considerat com a ortodoxa en el control de l'expressió gènica fins ara ha estat aquella en què el control es produeix sempre a través de proteïnes, bé siguin activadores o repressores. Un control mitjançant RNAs ens resultaria molt més senzill a primera vista, ja que ens estalviaria el pas a proteïnes, tot i que parlar en aquests termes sense un estudi acurat és frivoltzar. Tot i així la pregunta queda a l'aire: per què no?

El descobriment

A principis dels anys 90 es va caracteritzar el mutant *lin-4* de *C. elegans*, més tard es va descobrir *let-7*. Tots dos causaven heterocronies al desenvolupament (2): tipus cel·lulars larvals romaniens presents a l'adult. El més curiós de l'afer era que aquestes mutacions, clonades per genètica clàssica, van resultar correspondre a zones del genoma que es transcrivien però no donaven proteïna. Al llarg dels anys 90 es va veure que aquests RNAs prenen conformació de branca, formant un RNA de doble cadena, i que aquest RNA era processat per DICER d'igual manera que els siRNAs. La nostra qüestió inicial començava a quedar resolta, la hipòtesi a confirmar-se.

A l'entrada del nou mil·lenni diversos grups es van llançar a la recerca i clonatge de més d'aquests RNAs, que es van anomenar *microRNAs* o *miRNAs* (3-5). Es tractava de RNAs de 60-70 nucleòtids que es plegaven i donaven branques de doble cadena (fig. 2). Aquesta doble cadena era susceptible de ser processada per l'enzim DICER, donant lloc en aquest cas a RNAs petits, de cadena senzilla i també de 21-25 nucleòtids. Aquests RNAs són els que es recuperaven amb el procés de clonatge. La seqüència d'aquests 21-25 nt és la que correspon al gen diana, tot i que en aquest cas no és cent per cent homòloga: hi ha malaparellaments (*mismatches*), i això els diferencia dels siRNAs.

El mecanisme dels miRNAs

Recentment s'ha vist que el mecanisme de silenciament que duen a terme no és igual que el que els siRNAs fan: en *Drosophila* i *C. elegans* no hi ha un tall de l'mRNA sinó que es produeix una repressió traduccional. S'ha demostrat que si artificialment fem que la complementarietat entre miRNA i diana sigui completa, llavors es produeix una resposta de tall del mRNA en comptes de la repressió de la traducció (6). Aquesta homologia és, doncs, el tret que diferencia els dos mecanismes.

Tot i així els experiments dels quals

hem parlat es van fer en animals i és allà on són vàlids. Els miRNAs també s'han trobat a plantes, però en aquests casos, els que s'han trobat utilitzen un mecanisme més propi de l'RNAi: l'homologia de seqüència és perfecta i es destrueix l'mRNA del gen diana. Això ens obre la qüestió de si els mecanismes pels quals operen aquests miRNAs són diferents en plantes i animals o la poca realitat experimental que es té ens condueix a pensar-ho tot i que sigui fals. Existeixen miRNAs en animals que d'una manera natural entrin a la via de l'RNAi i degradin, tallin l'RNA diana? Hi ha miRNAs repressors traduccionals en plantes? Encara és d'hora per saber-ho.

Quan hem parlat d'RNAi hem definit molt clarament com la resposta de tall de l'mRNA diana es produïa, almenys en els organismes més estudiats, mitjançant un complex multienzimàtic que hem anomenat RISC. És el moment ara de preguntar-nos quin és l'artífex material de la resposta dels miRNA que veiem en els animals, és a dir, la repressió traduccional. L'any 2002 va veure la llum un descobriment al qual potser no s'ha donat la importància que es mereix: diversos miRNAs es van trobar formant part d'un complex ribonucleoproteic, que es va anomenar miRNP (7).

En un primer moment un pensaria que és aquest complex el que fa de mitjancer

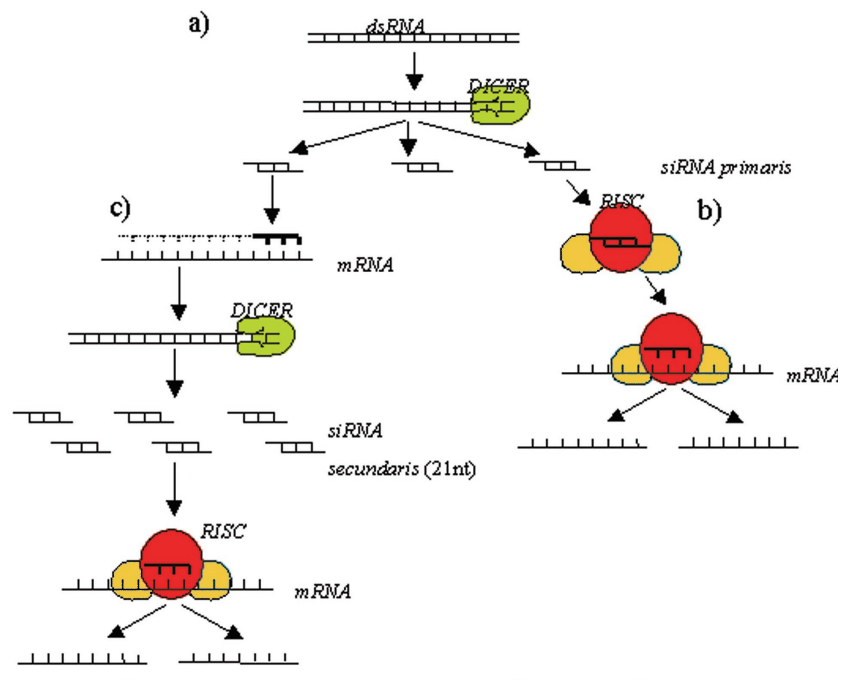


Figura 1: Mecanisme bàsic de l'RNAi

de la repressió traduccional. El que va resultar curiós va ser la semblança entre aquest complex i la mateixa *RISC*, caracteritzada en *Drosophila* però no en humans. Altres experiments van oferir més suport encara a aquest paral·lelisme.

Si admetem que aquesta *miRNP* és la *RISC* humana –seria el mateix que admetre que la *RISC* descrita en *Drosophila* seria la mediadora del silenciament per repressió traduccional que porten a terme els *miRNAs* propis de la mosca– un es pot preguntar la següent qüestió: com és que aquesta *RISC* conté *RNAs* que es classifiquen com a *miRNAs* –provenen del genoma codificats en un segment que es plega, etc.– i no en trobem cap *siRNA*? Si la *miRNP* també s'encarrega de la resposta *RNAi* en defensa de virus, silenciament de transposons, etc. llavors deuriem poder aïllar-los juntament amb la *miRNP*. La resposta a aquesta pregunta no es coneix encara i només en podem donar una d'especulativa: potser els *siRNAs* no són tan freqüents com els *miRNAs* o almenys no al model concret en què es descriu la *miRNP*, que són les cèl·lules *HeLa* i altres línies cel·lulars humanes. No hem de pensar que un cultiu de cèl·lules *HeLa* hagi de respondre a una infecció vírica via *RNAi*, per exemple. De fet en els clonats massius de *miRNAs* tampoc es van trobar *siRNAs*, exceptuant algun cas puntual.

Incògnites

El punt de misteri del cas el posen uns components moleculars ben especials. Tant la *miRNP* com la *RISC* de *Drosophila* tenen entre els seus components una proteïna *PPD*. D'aquestes proteïnes –que deuen el seu nom al fet que tenen els dominis *PAZ* i *PIWI*, dels quals encara es desconeix la funció– se n'estan trobant cada vegada més i implicades en diferents processos (per a una revisió vegeu 8). Són els actors misteriosos de la comèdia de la nova biologia de l'*RNAi*, pel que se sap, quan es reveli el seu paper poden passar a tenir una importància extrema.

Fins ara se sap poc de les funcions d'aquests *miRNAs*, és a dir, de les funcions dels gens diana, aquells als quals regulen (per a una revisió vegeu

9). Només tenim 4 *miRNAs* que s'hagin trobat per genètica clàssica, a partir de la funció. De la resta, la deducció de la funció no és tan simple per culpa de l'homologia parcial de les seqüències reguladores i regulades. L'aproximació computacional té encara molt camí per recórrer.

Tot i així el que sí que s'ha vist és que les funcions deuen estar conservades entre organismes. El que almenys es comprova és que molts *miRNAs* estan molt conservats en seqüència entre diferents organismes. Aquesta conservació tan important (la seqüència de *let-7*, de *C. elegans* i *Homo sapiens* és idèntica, per exemple) constitueix també un misteri. O bé un indicatiu de la gran importància que aquests petits *RNAs* han de tenir evolutivament parlant en diversos processos del desenvolupament i de la biologia en general.

L'*RNAi* com a mecanisme de defensa antiviral

Una de les accions més importants que realitza l'*RNAi* de manera natural és silenciar transposons i virus. Perquè, què és un virus si no un grapat de gens ordenats i coordinats? És una diana perfecta per aquest mecanisme (cal recordar però que els experiments que demostren que l'*RNAi* està involucrat en el silenciament de virus només estan ben desenvolupats en plantes, mentre que en altres organismes com a *C. elegans* o *Drosophila* només se'n tenen evidències indirectes, 10). A més a més, conceptualment l'*RNAi* comparteix unes característiques molt marcades amb el sistema immunitari (SI) dels vertebrats. Tot seguit destaquem alguns punts necessaris per poder comparar el *RNAi* amb el SI.

Reconèixer un cos com a agent estrany

Així com el SI reconeix epítops estranys mercès a la presentació d'antigen, el complement, etc., l'*RNAi* haurà de reconèixer algun senyal indicador de la presència d'un agent aliè a l'organisme. Però per què la molècula inductora d'aquest procés és el *dsRNA*? En principi en una cèl·lula sana gairebé no existeix

RNA en la seva forma bicatenària, per tant la cèl·lula, en detectar la seva presència, “interpreta” que ha estat infectada per un virus i provarà de destruir els seus missatgers via *RNAi*. Molts virus d'*RNA* presenten una fase de *dsRNA* durant la seva replicació (en vegetals es calcula que són el 90 per cent dels virus), per tant ja tenim un bon marcador de l'existència d'un cos estrany. Recordem però que en vertebrats la presència de *dsRNA* activa la resposta de l'interferó ja que també s'interpreta com una infecció viral. Val a dir que hi ha altres formes de l'*RNAi* però no estan involucrades directament amb la infecció vírica (11). Aquest *dsRNA* serà reconegut i processat per *DICER* (fig. 1a).

Generar una resposta específica contra l'agent aliè.

La majoria dels processos de reconeixement d'elements estranys al SI són altament específics (receptor de cel·lules T, anticossos,...), l'*RNAi* presenta també una elevada especificitat d'acció. El *RISC* (fig. 1) carregat amb el *siRNA* separa les dues cadenes d'aquest per buscar homologia de seqüència amb algun missatger i un cop en troba un amb el qual faci una unió **perfecta** per complementaritat de bases, l'hidrolitza. Un malaparellament (*mismatch*) d'un nucleòtid no genera resposta, d'aquí la especificitat.

Ara la pregunta és: per què 21 nucleòtids? S'ha calculat que 21 nucleòtids (dues voltes d'hèlix) són homologia (12) i redundància suficient com per distingir amb precisió d'una base qualsevol *mRNA* de 1Kb., amb 1 probabilitat d'error entre 10¹⁰.

Sensibilitat i amplificació del senyal

Sensibilitat: per induir una resposta inflamatòria en un organisme immunocompetent, només cal injectar unes poques molècules exògenes (p.ex.: les càpsides d'un virus) a la sang de l'individu.

Amplificació: se sap que els promotors de les immunoglobulines són dels més potents que existeixen, ja que han de fer front a organismes com virus o bacteries amb elevadíssimes capacitats de replicació.

Per tant, caldrà que l'*RNAi* generi un resposta molt potent i ho fa amplificant el senyal donat per un *dsRNA* de tres maneres bàsiques (13):

I) Tallar el *dsRNA* inicial (llarg) en *siRNAs*, cadascun amb activitat pròpia. Això amplifica el senyal de 10 a 20 vegades (fig. 1a).

II) Un mateix *siRNA* insertat al *RISC* pot ser utilitzat múltiples vegades de manera catalítica per hidrolitzar diferents *mRNAs* (fig. 1b).

III) El *siRNA* pot actuar com a *encebador* del que seria sorprenentment una mena de *PCR* endògena, guiant la

RdRp cap als *mRNAs*; aquests es transformarien en *dsRNAs* i altre cop per l'acció de *DICER* es generarien nous *siRNAs* (fig. 1c).

A les plantes la primera opció més la tercera són les que semblen actuar de manera més generalitzada.

Un últim i sorprenent pas d'amplificació és l'acció sistèmica que manifesta l'*RNAi* (en plantes o en *C. elegans*). El senyal de silenciament que es genera en una cèl·lula s'expandeix a llargues distàncies en un teixit, i arriba a passar al floema de les plantes o a tot l'organisme en *C. elegans*. Així, quan una cèl·lula és infectada per un virus, encara que aquesta no el controli, les veïnes tindran la maquinària de silenciament a punt per quan el virus provi d'atacar-les. En aquest punt se'ns fa inevitable comparar els *siRNAs* amb les immunoglobulines, ja que aquests s'uneixen específicament als *mRNAs* invasors, els "opsonitzen" i guien el *RISC* perquè els talli. Finalment els *siRNA* es dispersen sistèmicament, com també poden fer-ho els anticossos.

Memòria

Se sap que plantes que hagin patit un contacte previ amb un virus al qual aconsegueixen silenciar, en produir-se una segona infecció ja tenen la maquinària de silenciament preparada per generar una resposta més ràpida i efectiva. Les analogies amb el sistema immunològic i les vacunes són evidents.

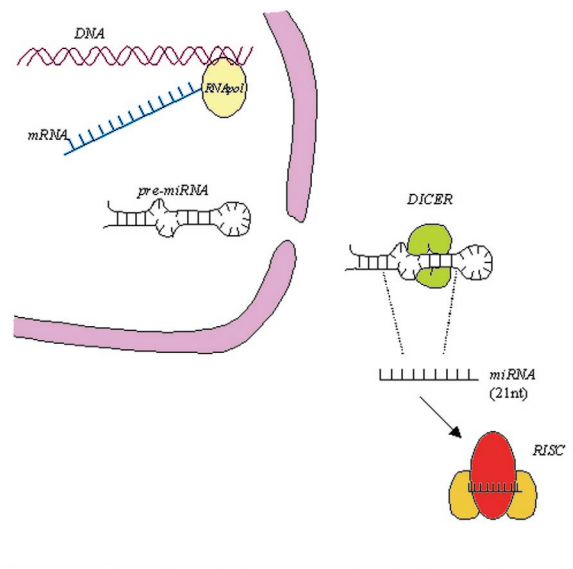


Figura 2: Mecanisme bàsic dels miRNAs

Finalment, i com a culminació del procés, les plantes (i potser altres organismes) utilitzen alguna molècula, segurament els *siRNAs*, per dirigir per homologia de seqüència l'addició de grups metil al gen que s'està silenciant. Malgrat que la metilació té més importància com un fenomen per silenciar transposons, virus amb fases d'integració al *DNA* també en patien les conseqüències, ja que si la metilació es produeix en una zona reguladora d'un gen impedeix que els factors de transcripció s'hi puguin unir, reprimint per tant la transcripció. Òbviament hi ha virus que han evolucionat per tal de superar les barreres que imposa aquesta defensa: es coneixen actualment diferents proteïnes codificades per virus que bloquegen aquest procés en diversos punts (per exemple la proteïna *Hc-Pro* del *Potyvirus*, 14). Sorprenentment s'ha trobat recentment a *Drosophila* un virus que codifica una d'aquestes proteïnes (15), fet que fa que ens preguntem: serveix l'*RNAi* a *Drosophila* com a defensa antiviral?; i en organismes superiors, es pot activar la via de l'*RNAi* en presència d'un virus d'*RNA*, o potser aquesta via ha estat suplantada per la de l'interferó?, i si és així, per què?

Variabilitat

Potser el problema més gran amb el qual el SI es troba per fer front a una infecció de virus *RNA* és la seva elevada capacitat

de variabilitat, a causa de les altes taxes de mutació i recombinació que posseeixen. De fet, es creu que els virus de *RNA* són els que han exercit una pressió de selecció sobre el sistema immunològic fent que hagi augmentat progressivament la seva variabilitat fins a assolir els nivells actuals, equiparable a la d'aquests virus. Les plantes van solucionar aquest problema utilitzant el cos estrany (*dsRNA* víric) com a motllo per fabricar els seus anticossos (*siRNAs*); així, independentment del nombre de mutacions que pugui generar el virus, la resposta serà específica. Aparentment sembla més eficient que generar immunoglobulines a l'atzar com

fa el sistema immunològic, ja que la gran majoria no s'uniran a cap patògen i a més petites mutacions en l'epítip diana les fan gairebé inserbibles. Per tant, el perquè l'*RNAi* no continua jugant un paper primordial a la immunologia dels vertebrats segueix sent un misteri.

Referències

- 1 - Gura T. A silence that speaks volumes. *Nature*. 2000 Apr 20;404(6780):804-8.
- 2 - Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- 3 - Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
- 4 - Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
- 5 - Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862-4.
- 6 - Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover *RNAi* enzyme complex. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2056-60. Epub 2002 Aug 01.
- 7 - Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*. 2002 Mar 15;16(6):720-8.
- 8 - Schwarz DS, Zamore PD. Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev*. 2002 May 1;16(9):1025-31.
- 9 - Ambros V. MicroRNA Pathways in Flies and Worms. *Growth, Death, Fat, Stress, and Timing*. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):269.
- 10 - Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*. 2001 Jun 14;411(6839):834-42.
- 11 - Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1263-9.
- 12 - van Dam RM, Quake SR. Gene expression analysis with universal n-mer arrays. *Genome Res*. 2002 Jan;12(1):145-52.
- 13 - Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1263-5.
- 14 - Lindenbach BD, Rice CM. RNAi targeting an animal virus: news from the front. *Mol Cell*. 2002 May;9(5):925-7.
- 15 - Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1319-21.