



El ARN

Para comprender los procesos que ocurren en las células vivas actuales, se debe considerar la forma en que éstos surgieron durante la evolución. Uno de estos procesos vitales es la expresión de la información hereditaria, que hoy requiere de maquinaria extraordinariamente compleja para producir un flujo unidireccional que va del ADN a las proteínas a través de un intermediario de ARN. Pero, ¿cómo surge esta maquinaria?

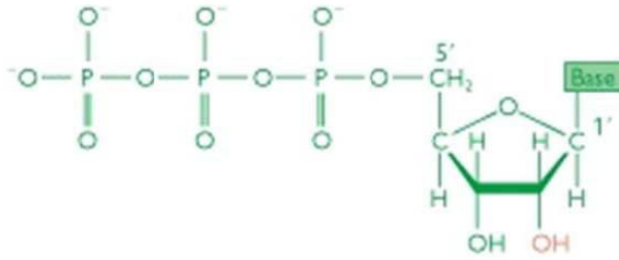
Un mundo de ARN en el origen de la vida

Existe una hipótesis que indica que un mundo de ARN existía en la Tierra antes de que las células modernas surgieran. Según esta hipótesis, el ARN almacenaba la información genética y las reacciones químicas catalizadas en las células primitivas. Sólo más tarde en el tiempo evolutivo surgió el ADN como el material genético y las proteínas llegaron a ser los mayores catalizadores y componentes estructurales de las células. Si esta hipótesis es correcta, entonces se podría decir que la transición del mundo de ARN a ADN no llegó a completarse ya que, como se verá en este Cuaderno, el ARN aún cataliza varias reacciones fundamentales en las células.

Estructura del ARN

En las células existen dos tipos diferentes de macromoléculas llamadas ácidos nucleicos, y que difieren en el tipo de azúcar en su esqueleto de azúcar-fosfato. Aquellas que contienen el azúcar desoxirribosa se conocen como ácido desoxirribonucleico, o ADN, y contienen las bases A, G, C y T. Por otro lado, el azúcar presente en el ARN es la ribosa. Esto indica que en la posición 2' del anillo del azúcar hay un grupo hidroxilo (OH) libre (ver cuadernos N° 3, 32). Por este motivo, el ARN es químicamente inestable, de forma que en una disolución acuosa se hidroliza fácilmente. En el ARN, las bases unidas a la molécula de ribosa pueden ser A, G, C y U (donde U es químicamente similar a la T en el ADN, sólo difieren en la presencia de un grupo metilo en el anillo de pirimidina).

(A) ribonucleótido



(B) uracilo

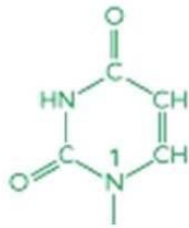


Figura 1: Diferencias químicas entre el ADN y el ARN

(A) Al ARN contiene ribonucleótidos, en el que el azúcar es la ribosa en lugar de 2'-desoxirribosa. La diferencia es que un grupo hidroxilo en lugar de un átomo de hidrógeno se une al carbono 2. (B) el ARN contiene la base uracilo en lugar de timina fuente: *Genomes*, 2°Ed. Capítulo 1. Disponible en

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=genomes&part=A5218>

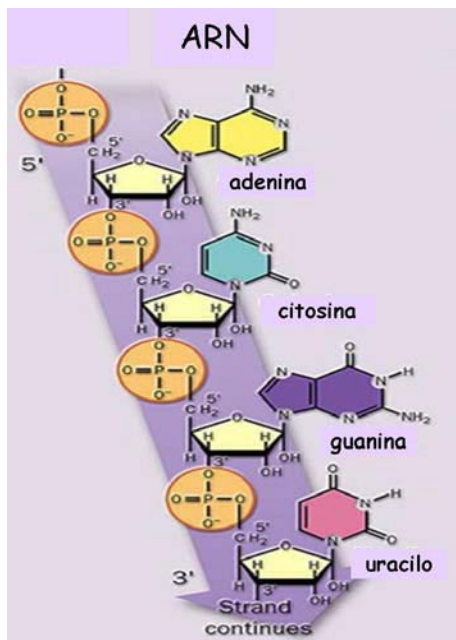


Figura 2: Estructura del ARN

Fuente:

http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=introduccion&idap=30

El ARN está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). Es el ácido nucleico más abundante, encontrándose en las células en una proporción 10 veces mayor que el ADN. A diferencia del ADN, en la mayor parte de los casos, el ARN es un polímero monocatenario (de una sola cadena), aunque en ciertos casos puede presentar zonas en su secuencia con apareamientos intracatenarios (segmentos de la misma cadena que se unen). El filamento de ARN se puede enrollar sobre sí mismo mediante la formación de pares de bases en algunas secciones de la molécula, formando las denominadas estructuras secundarias del ARN. Esta estructura secundaria, a su vez, en algunos tipos de ARNs, puede plegarse sobre sí misma formando la denominada estructura terciaria de ARN.

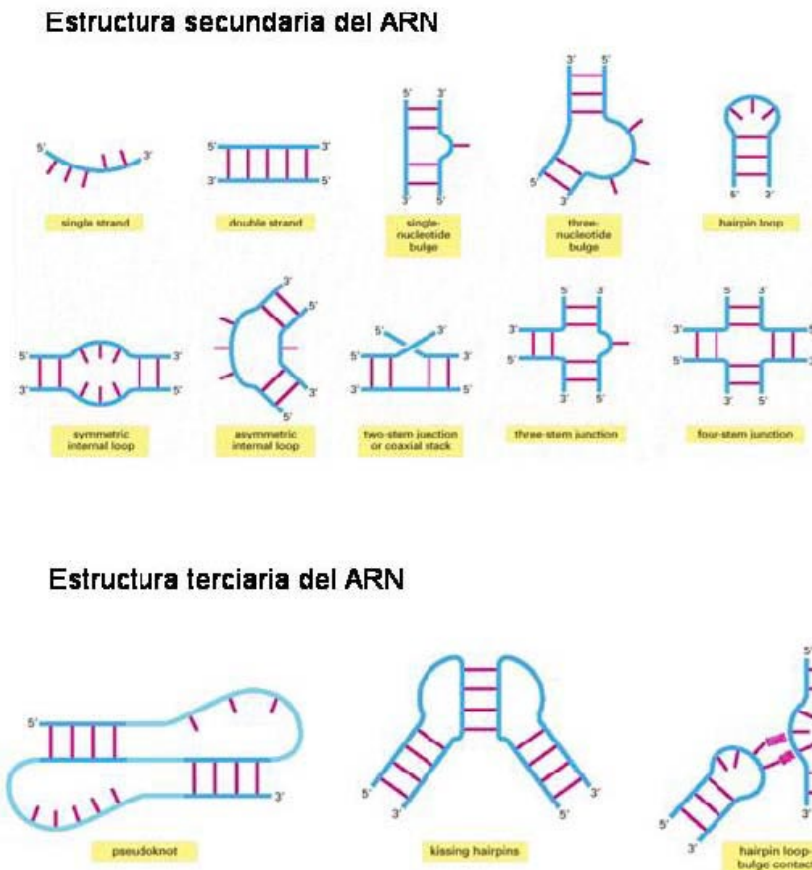


Figura 3: Estructura secundaria y terciaria del ARN Fuente: The Cell, 4ta edición. Capítulo 6 Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A1119#A1126>



Existen diferentes tipos de ARN

La molécula de ARN desempeña diversas funciones en las células: dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica (ver cuaderno n° 123), regulan la expresión génica, mientras que otros tienen actividad catalítica. Debido a esto, se dice que el ARN es mucho más versátil que el ADN.

1. ARN implicados en la síntesis de proteínas

- **ARN mensajero.** El ARN mensajero (ARNm o RNAm), como su nombre lo indica, lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína, desde el ADN (ubicado en el núcleo en las células eucariotas) hasta los ribosomas (ubicados en el citoplasma), lugar en que se sintetizan las proteínas de la célula. En eucariotas, el ARNm sufre algunos cambios durante este proceso el cual es, generalmente, breve. Se sintetiza en el núcleo celular, mediante el proceso llamado transcripción del ADN. Inicialmente el ARN se conoce como transcrito primario o ARN inmaduro (pre-ARN), el cual sufre modificaciones antes de ejercer su función (procesamiento o maduración del ARN). Entre esas modificaciones se encuentran la eliminación de fragmentos (en un proceso denominado "corte y empalme" o "splicing"), la adición de otros no codificados en el ADN, y la modificación covalente de ciertas bases nitrogenadas (Ver cuaderno n° 123).

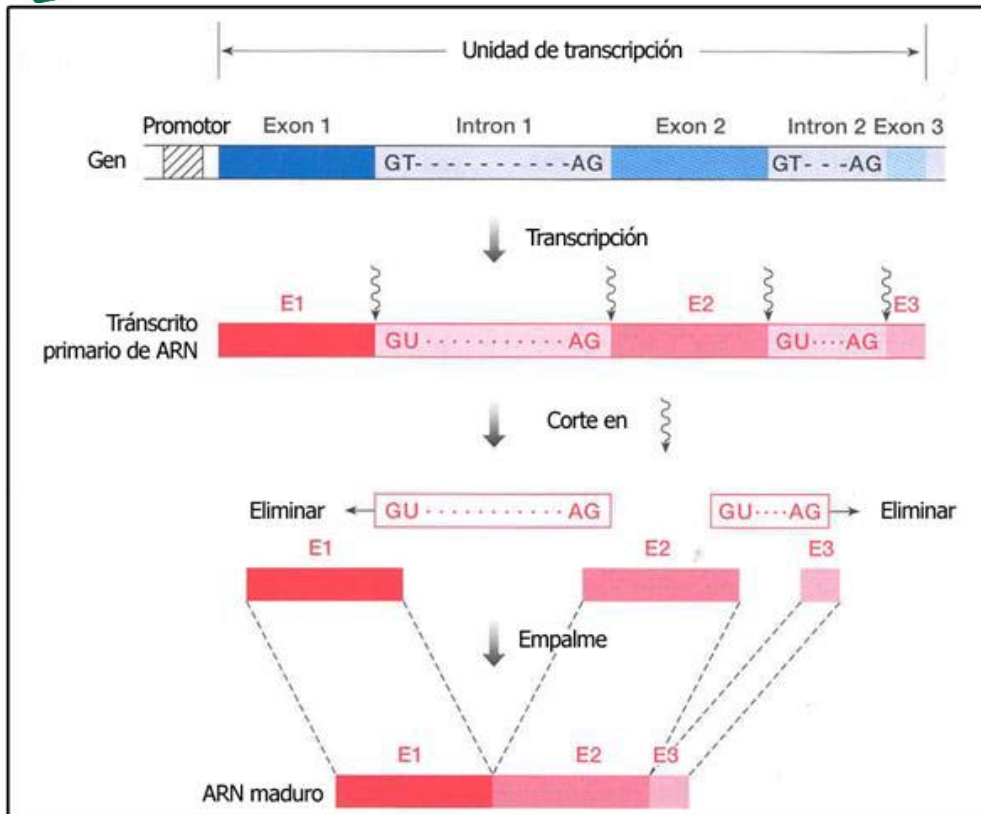


Figura 4: Proceso de corte y empalme (splicing) de ARN Mediante este proceso, el ARN inmaduro transcrito del gen origina el ARN maduro. El gen (en azul) contiene 3 exones (regiones codificantes) y 2 intrones (no codificantes). El transcrito primario de ARN (en rojo) posee todas las secuencias complementarias del ADN. Posteriormente se cortan y eliminan las secuencias intrónicas (GU...AG) y se empalman las exónicas (E1, E2, E3) para originar el ARN maduro. (Figura tomada de: Stracham T, Read AP. Human Molecular Genetics, 3ª ed., New York, Garland Publishing 2004, disponible en http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm)

- **ARN de transferencia (ARNt o tRNA).** Es el ácido ribonucleico más pequeño (entre 70 y 90 nucleótidos) dentro de la célula. Pueden presentar nucleótidos poco usuales como ácido pseudouridílico, ácido inosílico e incluso bases características del ADN como la timina. Cada ARNt transfiere un aminoácido específico al polipéptido en crecimiento. Los ARNt se unen a lugares específicos del ribosoma durante la traducción. Poseen un sitio específico para la fijación del aminoácido (extremo 3') y un anticodón formado por un triplete de nucleótidos que se une al codón complementario del ARNm mediante puentes de hidrógeno (ver cuaderno nº 123).
- **ARN ribosómico (ARNr o rRNA).** Es el más abundante de la célula, representando el 80% del ARN hallado en el citoplasma de las células eucariotas. Está formado por una sola cadena de nucleótidos, aunque presenta

zonas de doble hélice debido a su conformación tridimensional. El ARNr se halla unido a proteínas para formar los ribosomas. En procariotas, la subunidad mayor del ribosoma contiene dos moléculas de ARNr (ARNr 23S y ARNr 5S) y la subunidad menor, una (ARNr 16S). En los eucariotas, la subunidad mayor contiene tres moléculas de ARNr (ARNr 5S, ARNr 5'8S y ARNr 28S) y la menor, una (ARNr 18S). En ambos casos, sobre el armazón constituido por los ARNr se asocian proteínas específicas. Los ARNr ribosómicos son el componente catalítico de los ribosomas, ya que crean los enlaces peptídicos entre los aminoácidos del polipéptido en formación durante la síntesis de proteínas.

2. ARN con actividad catalítica Algunos tipos de ARN pueden actuar como biocatalizadores, es decir, que pueden acelerar reacciones de forma específica. Las **Ribozimas** son moléculas de ARN que, al igual que las enzimas, poseen un centro activo que se une a un sustrato facilitando su conversión en un producto, aumentando sustancialmente la velocidad de reacción. Se conocen cinco tipos de ribozimas: tres producen reacciones de automodificación (es decir, modifican a otras moléculas de ARN), como sucede en el proceso de eliminación de intrones del ARN inmaduro; las otras dos (ribonucleasa P y ARN ribosómico) actúan sobre otros tipos de sustratos.

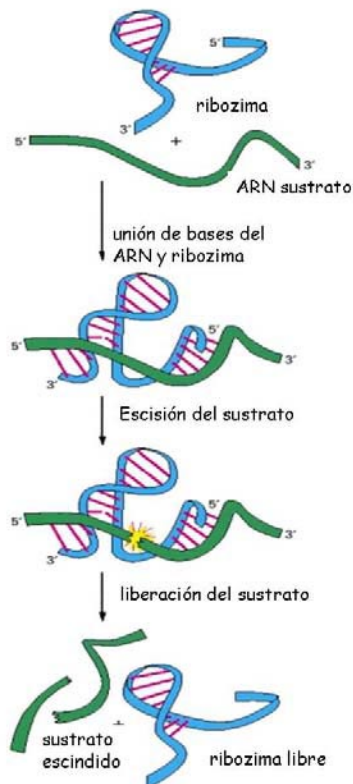


Figura 5: Acción catalítica de las ribozimas: Una simple molécula de ARN (ribozima) cataliza el corte de una segunda molécula de ARN en un sitio específico. Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A1119>



La asociación de la ribozima a su sustrato específico, permite el diseño de ribozimas artificiales dirigidas a cortar una molécula de ARNm en particular. Los resultados del Proyecto Genómico Humano prometen la identificación de genes o proteínas que son importantes en el cáncer, dándoles a los diseñadores de ribozimas otras opciones para el tratamiento de esta enfermedad. Así, las ribozimas diseñadas podrían combatir etapas específicas del crecimiento canceroso, incluyendo la proliferación celular, la resistencia a los medicamentos, y la metástasis. La **ribonucleasa P** corta moléculas precursoras de ARNt inactivo que son transformadas en ARNt funcionales. Es un verdadero catalizador, ya que cada ribozima cataliza el corte de múltiples sustratos. Tiene 300 a 400 nucleótidos de largo, forma dos dominios uno de los cuales tiene el sitio de reconocimiento del sustrato y el otro el sitio activo. El **espliceosoma** es un complejo formado por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, del inglés small nuclear ribonucleoproteins), denominados U1, U2, U4, U5 y U6 y es el encargado de eliminar los intrones (secuencias no codificantes) de los precursores del ARNm en el proceso llamado "splicing" del ARN. Cada una de las snRNP son complejos formados por proteínas y moléculas pequeñas nucleares de ARN (ARNpn o snRNA), que reconocen la secuencia consenso GU (Guanina-Uracilo) del extremo 5' y AG (Adenina-Guanina) del extremo 3' del intron que será removido. Otro tipo son los **ARN pequeños nucleolares** (ARNpno o snoRNA), hallados en el nucleolo, que dirigen la modificación de nucleótidos de otros ARN (como los ARNr y los ARNt que contienen muchos nucleótidos modificados). El proceso consiste en transformar alguna de las cuatro bases nitrogenadas (A, C, U, G) en otras. Los ARNpno se asocian con enzimas y se unen a secuencias específicas del ARN al que modificarán.

3. ARN reguladores Hasta hace unos pocos años, se sabía que los genes son aquellas porciones de ADN que codifican para proteínas funcionales. En la actualidad se sabe que estas secuencias constituyen sólo el 2% del genoma humano. El resto del genoma está formado por ADN que es "no codificante", lo cual no significa que no cumple ninguna función. Cada vez se conocen más genes no codificantes que dan origen a ARNs activos, incluyendo algunos que pueden silenciar o regular a los genes convencionales en el proceso conocido como silenciamiento génico post transcripcional. Algunos de estos tipos de ARN reguladores son:

- **ARN antisentido.** Un ARN antisentido es la hebra complementaria (no codificadora) de un hebra ARNm (codificadora). Si en una célula se transcribiese, además de la hebra "codificante" de ADN que sirve como molde en un gen, una cadena de ARN que resultara complementaria o "antisentido" del



- ARNm correspondiente, éstos podrían interceptar al ARNm transcripto (formando un ARN de doble cadena). El apareamiento de las dos hebras de ARN, forma una molécula de doble cadena que no puede traducirse y es degradada enzimáticamente. En los laboratorios de biología molecular y biotecnología, se utiliza esta propiedad del ARN para bloquear la expresión de un gen de interés mediante la introducción de un transgén que produce un ARNm antisentido. **ARN de interferencia**. Los ARN interferentes (ARNi o iRNA) son moléculas de ARN que suprimen la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos globalmente como interferencia por ARN. Los ARN interferentes son moléculas pequeñas de 20 a 25 nucleótidos que se generan por fragmentación de precursores más largos. Se pueden clasificar en tres grandes grupos, entre los que se encuentran los **microARN** (miARN o RNAmi) y los **ARN interferentes pequeños** (ARNip o siARN). Los ARN de interferencia se encuentran implicados en el proceso de silenciamiento génico post transcripcional. Éste es un mecanismo que regula la expresión de genes endógenos, pero además es empleado por los organismos para protegerse de virus. Actualmente, se cree que el silenciamiento génico es una forma de defensa ancestral que utilizan los organismos para defenderse de la invasión de ácidos nucleicos infecciosos. Este tipo de silenciamiento génico es desencadenado por una molécula de ARN de doble cadena (dsARN), proveniente de virus o transgenes. El proceso central involucra el corte del dsARN en pequeños trozos mediante una enzima llamada "Dicer". Esta enzima corta al dsARN en dos clases de ARNs pequeños: microARN (miARNs) y ARN interferentes pequeños (siARN), con una longitud aproximada de 21-23 nucleótidos. De estos dos tipos, se cree que los siARNs son los principales involucrados en la interferencia por ARN. Luego, la enzima "Dicer" entrega estos siARN o miARN a un complejo con actividad de nucleasa (enzimas que degradan ácidos nucleicos) para formar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). La actividad de RISC separa las dos hebras del siRNA, y sólo una de ellas permanece unida al complejo. El complejo RISC utiliza esta simple cadena antisentido del siARN para unirse al ARNm y degradarlo, resultando en el silenciamiento del gen. El sistema de interferencia por ARN es considerablemente eficiente, ya que RISC es una enzima que cataliza cientos o miles de vueltas de interferencia.

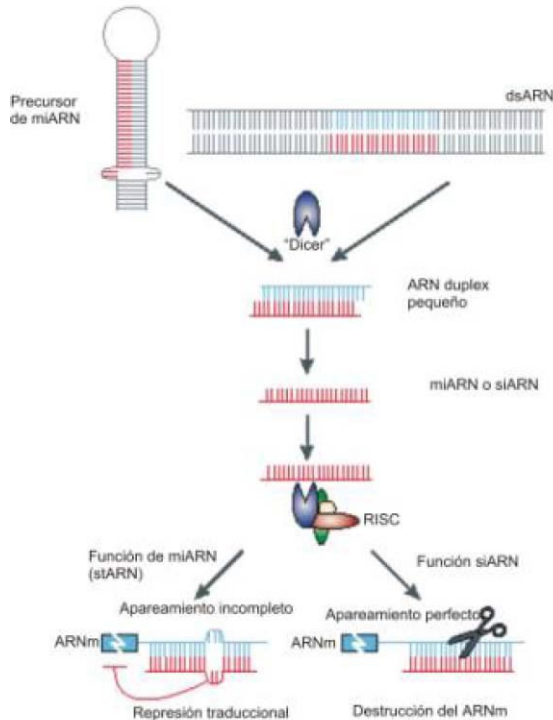


Figura 6: mecanismo de silenciamiento génico post transcripcional. El sistema de ARNi (interferencia por ARN) es un mecanismo de defensa, aparentemente muy antiguo, contra ARN de solamente 22 nucleótidos en longitud, llamados ARN de interferencia pequeños (siARNs), son cortados a partir de dsARN más largos por una enzima llamada "dicer". La hebra antisentido del siARN es utilizada por un complejo (RISC) para guiar el clivaje de ARNm, promoviendo de esta forma la degradación del ARNm. Las abreviaturas utilizadas son: miARN, microARN, stARN, ARN pequeño temporario. Extraído de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Nuevos%20enfoces/arn/arn.htm>

Aplicaciones biotecnológicas

El descubrimiento de la función catalítica de las ribozimas ha llevado a una revolución en el área de la biología molecular. Las ribozimas podrían ser sintetizadas y modificadas, y serían una potente herramienta biotecnológica para degradar ARN específicos. Por ejemplo se podría utilizar para proteger organismos contra virus, bacterias u hongos patógenos eliminando específicamente sus ARN. En la actualidad, se está estudiando las ribozimas para ser utilizadas frente al virus del HIV, virus del herpes y virus del mosaico del tabaco. Por otro lado, se están utilizando los nuevos conocimientos en el mecanismo de silenciamiento génico post transcripcional para silenciar genes. Este fenómeno puede ser utilizado como herramienta para identificar genes "blanco" para el desarrollo de nuevas drogas, eliminar la función de un gen en particular y hasta eliminar, potencialmente, la expresión de genes responsables de ciertas enfermedades.



Dado que la interferencia por ARN se da por la interacción específica entre secuencias del siARN y del ARNm, los siARNs pueden ser diseñados para silenciar casi a cualquier gen. Tomar la secuencia de ADN de un gen y diseñar dsARN que puedan silenciar en forma específica y efectiva un gen relacionado con una enfermedad es actualmente un gran desafío para los científicos. También es posible utilizar el silenciamiento génico como una herramienta para generar mejores cultivos y alimentos: plantas resistentes a virus, mejor calidad de los aceites, y mejoras nutricionales en granos y tubérculos. Desde hace unos años, estos pequeños ARN de interferencia han revolucionado la forma en que los científicos piensan acerca de las funciones del ARN y cómo el ADN, el ARN y las proteínas son controlados. En los próximos años se verá la utilidad que se le darán a estos conocimientos.



Uno de los aspectos relevantes del tema trabajado en este Cuaderno es, justamente, el hecho de ser un tema que suele trabajarse poco en las escuelas. Si bien no se pretende que todos los niveles de la escuela lleguen a tratar el tema con la profundidad que lo hace este Cuaderno, sí se muestra su importancia y las numerosas funciones que cumple la moléculas de ARN (en sus diferentes tipos) dentro de las células. A continuación se sugieren algunas instancias del trabajo escolar en las cuales es posible incorporar los conceptos trabajados en este Cuaderno:

- Habitualmente en la escuela, y en el lenguaje corriente, se ha incorporado con mayor fuerza el término ADN. Sin embargo, el ARN es un tipo de molécula que tiene fuerte presencia en la teoría del origen de la vida. Este es un contenido escolar en el cual se sugiere incorporar la idea del ARN como precursor de las moléculas y células primitivas.
- En ocasiones, la enseñanza de la biología suele estar fragmentada y no se integran los diferentes contenidos de manera explícita con los alumnos. Por ejemplo, se estudian las características de los seres vivos y, por separado, contenidos vinculados con la genética. La idea que se propone es hacer referencia, en ambos casos, a la relación que existe entre los genes y las características. Esto es, al camino que lleva desde el ADN a la característica visible. Al estudiar acerca de las características se pueden mencionar la función del ADN y el ARN, y al estudiar el ADN detallar el proceso que lleva a la característica (al fenotipo). Esto implica el estudio del proceso de síntesis de proteínas (explicado en el Cuaderno n° 123). Al obviar, o mencionar superficialmente, estos temas (ARN y síntesis de proteínas) queda un vacío conceptual: ¿cómo se llega del ADN a la característica visible? Por ejemplo, ¿cómo se llega desde el ADN en el núcleo celular al color de los ojos? ¿Cómo es posible que los ojos sean marrones? Se sugiere formular estas preguntas a los alumnos para recoger las ideas previas, y luego poner en común y avanzar en estos contenidos. En el caso particular mencionado, la idea es trabajar el hecho de que ni el ADN ni las proteínas son marrones. Es decir, que existe un proceso que lleva del ADN a la síntesis de ARN, a la síntesis de proteínas, a la fabricación de un pigmento marrón, y de allí a la manifestación del fenotipo "marrón". En este proceso la función del ARN es esencial.
- Si se trabajan conceptos de biotecnología, es posible incorporar conceptos más profundos trabajados en este Cuaderno, a través de los cuales se puede comprender la aplicación actual y futura que tienen estas moléculas.

Se sugiere trabajar en conjunto con docentes de química o físico-química la estructura química del ARN, los enlaces que mantienen unidos a los nucleótidos (enlaces fosfodiéster) y los enlaces más débiles que mantienen la estructura secundaria o terciaria de estas moléculas. Esta estructura química es fundamental para la función de las moléculas, al igual que la estructura tridimensional de las proteínas lo es para sus múltiples funciones.



ACTIVIDADES

Actividad N° 1: los distintos tipos de ARN

En esta actividad se propone indicar el tipo de ARN al que hace referencia cada oración. Dentro de las opciones se encuentran: ARNm, ARNr, ARNt, ribozimas, siARN, dsARN, espliceosoma. Se indican las respuestas, en azul.

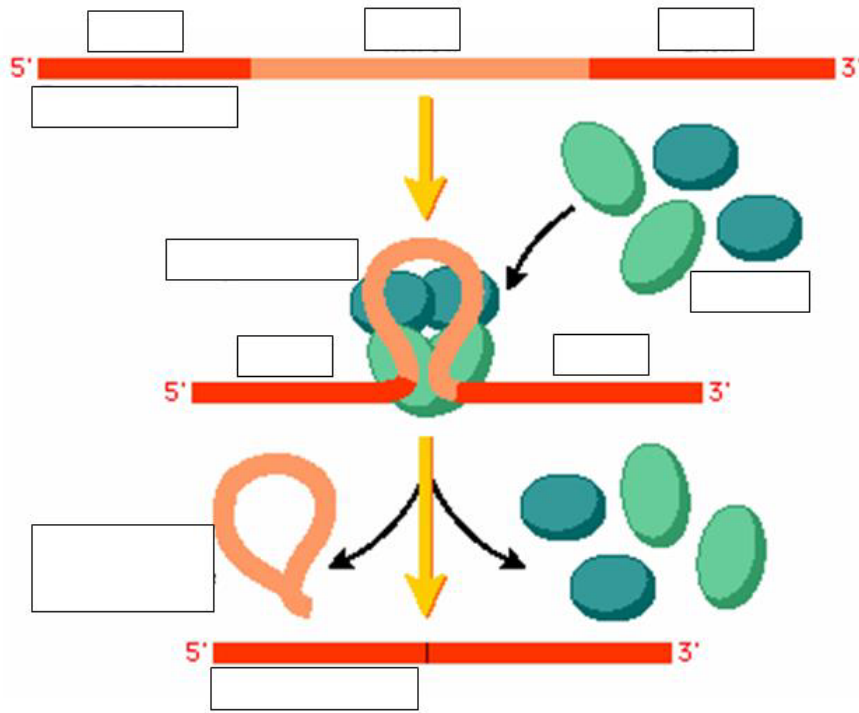
- Presenta estructura lineal..... ARNm
- Se asocian con proteínas para formar los ribosomas..... ARNr
- Tiene un triplete de bases denominado anticodón..... ARNt
- Hasta un 10% de sus bases nitrogenadas puede ser distinta de las normales (A, C, U, G)ARNt
- ARN cortos de doble cadena que se unen al RISC en el proceso de silenciamiento génico..... siARN
- Transportan los aminoácidos hasta los ribosomas..... ARNt
- Complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas encargadas de eliminar intrones en el proceso de corte y empalme.....espliceosoma
- Su función es copiar la información genética del ADN..... ARNm
- Tiene estructura en forma de hoja de trébol..... ARNt
- Su vida media es muy cortaARNm
- Constituye hasta el 80% del ARN total de la célula.....ARNr
- Agrupar ARN de muy diferentes masas moleculares..... ARNr
- Su masa molecular es pequeña en comparación con otros ARN.....ARNt
- ARN de doble cadena que desencadena el silenciamiento génico..... dsARN
- Tienen función catalítica..... ribozimas
- Hay más de 50 tipos distintos.....ARNt

Actividad N° 2: Del ARN inmaduro al ARN maduro

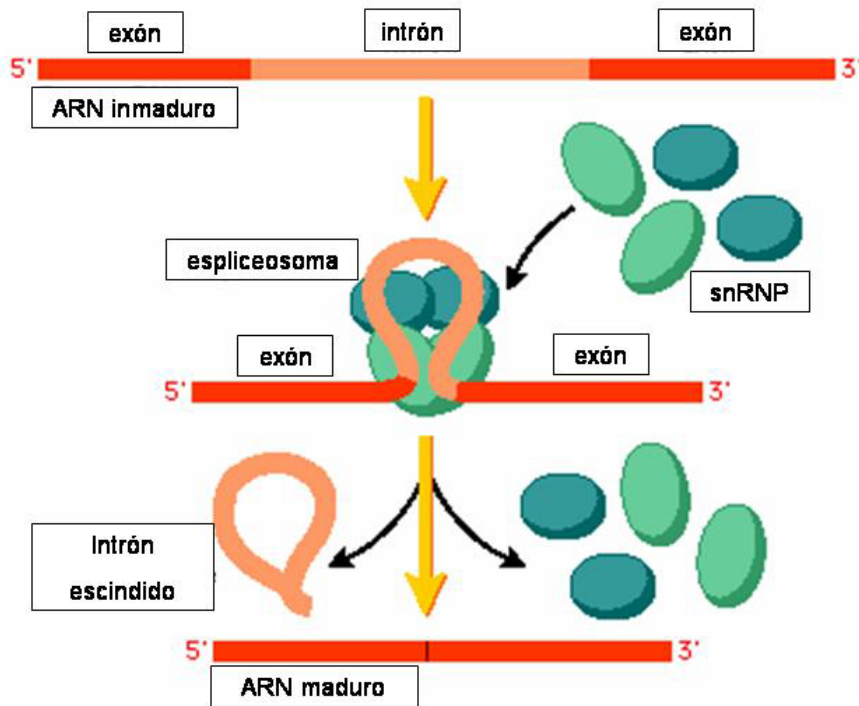
En el siguiente esquema, se muestra el mecanismo de corte y empalme (splicing) del ARN. Se propone completar el mismo, utilizando los siguientes términos: exón, intron, ARN inmaduro, ARN maduro, intrón escindido, espliceosoma, snRNP



El Cuaderno de PorquéBiotecnología



Respuesta



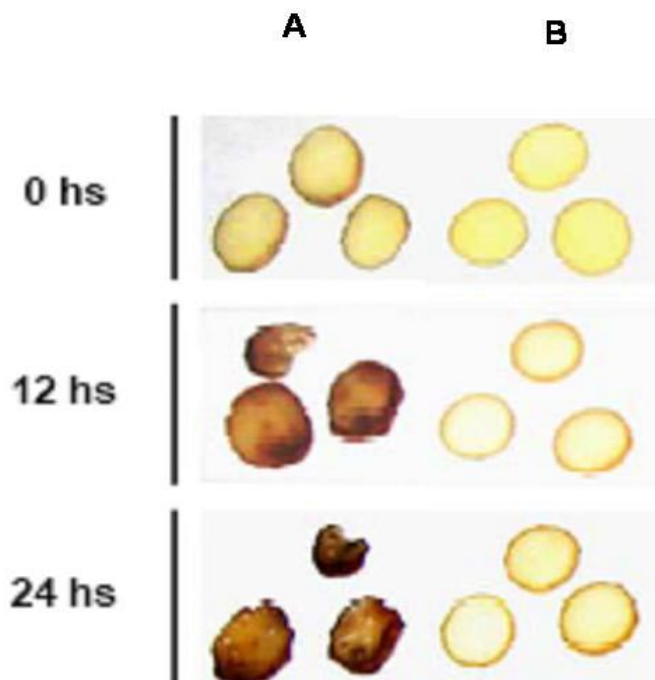
Actividad N°3 Analizar un trabajo de investigación

Extraído y modificado del artículo "Silenciamiento génico" de Paula Bey, 2007. Disponible en la biblioteca de ArgenBio.

http://www.argenbio.org/h/biblioteca/pdf/Silenciamiento_genico_Argenbio.pdf

En el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI - CONICET), de Argentina, un grupo de investigadores, desarrolló plantas de papa que expresan un ARN de interferencia (ARNi) destinado a silenciar el gen de una enzima llamada polifenol oxidasa (PPO), responsable del fenómeno de oxidación o pardeamiento. Los tubérculos provenientes de las plantas genéticamente modificadas no sufren el "pardeamiento" debido a la oxidación al ser cortados o golpeados. Gracias a dicha modificación estas papas se pueden exponer al aire durante tiempos prolongados y en comparación con una papa común, también resultan resistentes al proceso de oxidación enzimática.

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos por este grupo de científicos. Observa las fotografías y responde:



1. ¿Por qué se exponen dos grupos diferentes de muestras (A y B)? Rta: en los trabajos científicos siempre se comparan los resultados de los tratamientos con plantas transgénicas versus no transgénicas, es por eso que hay dos grupos de muestras.
2. ¿Qué observaciones se realizan a estos grupos de papas? Rta: se observa el fenómeno de pardeamiento u oxidación (color marrón en el tubérculo)



3. ¿Cuántas observaciones se realizaron? ¿Cada cuántas horas?. Rta: Se realizaron 3 observaciones cada 12 horas. Luego de 12 hs se observa oxidación en las rodajas de papa provenientes de plantas no transgénicas, mientras que las rodajas de papas transgénicas resisten más de 24 hs sin sufrir pardeamiento.
4. Teniendo en cuenta los resultados, ¿Cuál de estos grupos corresponde a las plantas transgénicas? Rta: grupo B.
5. ¿A qué se deben las diferencias ante la oxidación de las dos muestras? Rta: se debe a que las papas transgénicas expresan un ARN de interferencia (ARNi) destinado a silenciar el gen de una enzima llamada polifenol oxidasa (PPO), responsable del fenómeno de oxidación o pardeamiento. Así, las papas transgénicas no se ven oxidadas al cabo de 24 horas, contrario a lo que sucede con las papas no transgénicas.

MATERIAL DE CONSULTA

- Ribozimas: resabios del mundo primitivo. Silvia Billi. Revista Química viva. Volumen 1, número 1, 2002
<http://www.quimicaviva.gb.fcen.uba.ar/Nuevos%20enfoques/ribozimas.html>
- Una nueva visión del ARN: los ARN de interferencia. ¿Un nuevo genoma? Juan Carlos Calvo. Revista Química viva. Volumen 2, número 3, 2003
<http://www.quimicaviva.gb.fcen.uba.ar/Nuevos%20enfoques/arn/arn.htm>
 - Animación de la asociación de una ribozima al ARNm y el corte del mismo en dos fragmentos
<http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=387>
- Animación del mecanismo de ARN de interferencia de la revista Nature
<http://www.nature.com/focus/rnai/animations/index.html>
 - Silenciamiento génico. Paula Bey, 2007. Disponible en la biblioteca de ArgenBio.
http://www.argenbio.org/h/biblioteca/pdf/Silenciamiento_genico_Argenbio.pdf