

LOS microRNA: PEQUEÑAS MOLÉCULAS, GRANDES REGULADORES

“Aunque las posibilidades sean todavía fruto de una terapia experimental y pocos estudios estén en fase clínica, el descubrimiento de dianas, el desarrollo de nuevas tecnologías y el avance experimental en este campo apuntan a los miRNA como una herramienta terapéutica que en último término pueden tener una gran relevancia clínica.”

POR M^a ANTONIA LIZARBE

Los microRNA: pequeñas moléculas, grandes reguladores

El ácido ribonucleico (RNA) es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos que desempeña diversas funciones. La primera función que se asignó al RNA, alrededor de 1939, fue su participación en la biosíntesis de proteínas o traducción, proceso en el que participan tres tipos de RNA, el mensajero (mRNA), el de transferencia y el ribosómico. En las células, el flujo de información desde el DNA a la proteína no transcurre directamente por la lectura de la información codificada en el DNA. El DNA se utiliza como molde en el proceso de transcripción para sintetizar una molécula informativa, el mRNA que, por tanto, porta la información del DNA para la síntesis de las proteínas y es denominado RNA codificante. La secuencia de nucleótidos del mRNA determina la secuencia de aminoácidos que tendrá la proteína. Los RNA de transferencia, moléculas adaptadoras, leen los tripletes codificadores del mensajero y aportan los aminoácidos que se incorporan a la cadena polipeptídica en crecimiento. El RNA ribosómico junto con proteínas, forma los ribosomas, que se consideran como la fábrica migratoria donde se biosintetizan las proteínas.

Estos RNA, los de transferencia y los ribosomales, aunque son fundamentales en el proceso de la traducción, no codifican proteínas por lo que se clasifican como RNA no codificantes.

Los RNA no son solo las moléculas fundamentales en la biosíntesis de proteínas, los genomas de eucariotas codifican una amplia variedad de especies de RNA. De hecho, en los últimos años se han descrito un gran número de diferentes RNA no codificantes, entre los que se encuentran los denominados RNA pequeños, que desempeñan diversas y variadas funciones dando cuenta de la versatilidad de las moléculas de RNA. Así, entre otros papeles, algunos RNA tienen actividad catalítica (ribozimas), otros participan en el procesamiento o maduración del mRNA y otros desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica. De las investigaciones realizadas en los últimos años, se podría resaltar el descubrimiento de los RNA de interferencia (siRNA) y de los microRNA (miRNA) por las puertas que han abierto al conocimiento sobre la regulación de la expresión génica y las posibilidades que ello conlleva en el desarrollo de nuevas terapias.

ALGUNOS ANTECEDENTES

Como primer antecedente, cabe reseñar un mecanismo que se describió inicialmente en bacterias hace alrededor de 50 años, que se basa en una de las actividades del RNA, la inhibición por RNA antisentido. Los RNA antisentido son RNA de una sola cadena que tienen una secuencia complementaria a algún mRNA específico y que producen un bloqueo de la traducción de dicho mRNA. Así, la introducción experimental de un RNA exógeno en las células puede ser utilizada en ciertos sistemas biológicos para interferir con la función de un gen endógeno. Este descubrimiento abrió la puerta a una potencial terapia basada en el uso de oligonucleótidos. De hecho, un oligonucleótido sintético de 21 nucleótidos (fomivirsen), diseñado para que sea resistente a la degradación por nucleasas, se utiliza como una droga antiviral para tratar la reinitis por citomegalovirus.

Sin duda, una revolución en el mundo del RNA fue el descubrimiento del proceso denominado silenciamiento por RNA, o mecanismo de RNA de interferencia, que inicialmente recibió otros nombres como cosupresión o silenciamiento génico post-transcripcional. En este proceso, dos tipos de RNA pequeños, los RNA pequeños de interferencia y los microRNA, son clave en la regulación de la expresión génica. Nos debemos remontar tan solo a la década de los años 90, cuando se describió la existencia de mecanismos de silenciamiento génico introduciendo en petunias genes implicados en la pigmentación (gen de la enzima chalcona sintasa) con el fin de incrementar la

expresión de dichos genes y obtener petunias con un colorido más atractivo (Napoli et al., 1990). Sorprendentemente, los resultados obtenidos fueron contrarios a lo esperado: se obtenían petunias menos pigmentadas, jaspeadas o blancas. Se había conseguido anular la expresión del producto génico en vez de incrementarla. La reducción de la actividad de la chalcona sintasa se asoció con una degradación específica del mRNA de dicha enzima. Así quedó patente que los genes introducidos podían silenciar genes similares de la misma planta. También fue clave la contribución de los virólogos, que investigaban para mejorar la resistencia de plantas a infecciones virales, que describieron el mismo fenómeno al que denominaron "silenciamiento génico inducido por virus". La resistencia a infecciones virales se producía no solo en plantas que expresaban proteínas virales específicas sino también en plantas que portaban RNA pequeños no codificantes virales.

Investigaciones posteriores pusieron de manifiesto que procesos similares, al descrito inicialmente en plantas, también operan en organismos eucariotas. En este sentido, un trabajo trascendente sobre el RNA de interferencia fue el publicado en 1998 por Andrew Fire y Craig Mello utilizando el nemátodo *Caenorhabditis*



Petunias y silenciamiento génico

*<http://en.wikipedia.org>

El nemátodo *Caenorhabditiselegans*

*<http://en.wikipedia.org>



Los microRNA: pequeñas moléculas, grandes reguladores

elegans para manipular la expresión génica (Fire et al., 1998). Seleccionaron el gen *unc-22*, que codifica una proteína abundante pero no esencial de los miofilamentos, y de la que hay varios miles de copias del mRNA en cada célula de músculo estriado. La alteración o pérdida de la función del gen se analiza por los cambios producidos en el fenotipo de *C. elegans*. Observaron un silenciamiento génico mediado por los RNA de doble cadena (dsRNA), que es sustancialmente más efectivo para reducir la expresión de genes que el RNA antisentido monocatenario cuyo efecto es moderado. El mecanismo se inicia por un dsRNA que contiene alguna secuencia semejante a la del mRNA endógeno del gen diana cuya actividad va a ser reprimida. Propusieron que el proceso consistía en una interferencia a nivel post-transcripcional, es decir, afectaba al mRNA procesado o maduro, ya que los dsRNA correspondientes a varios intrones o a secuencias del promotor no producen una interferencia detectable. Así, la expresión de una proteína diana se suprime estimulando la degradación específica de su mRNA, hecho que depende del RNA de doble cadena.

El alcance de este descubrimiento fue tal que, en el año 2006, Andrew Fire y Craig C. Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por "su descubrimiento del RNA de interferencia - silenciamiento génico por RNA de doble cadena". El silenciamiento génico mediado por dsRNA desempeña un papel esencial en numerosos procesos, entre otros, en el desarrollo, diferenciación celular, proliferación celular, muerte celular, estructura de los cromosomas o la resistencia a virus.

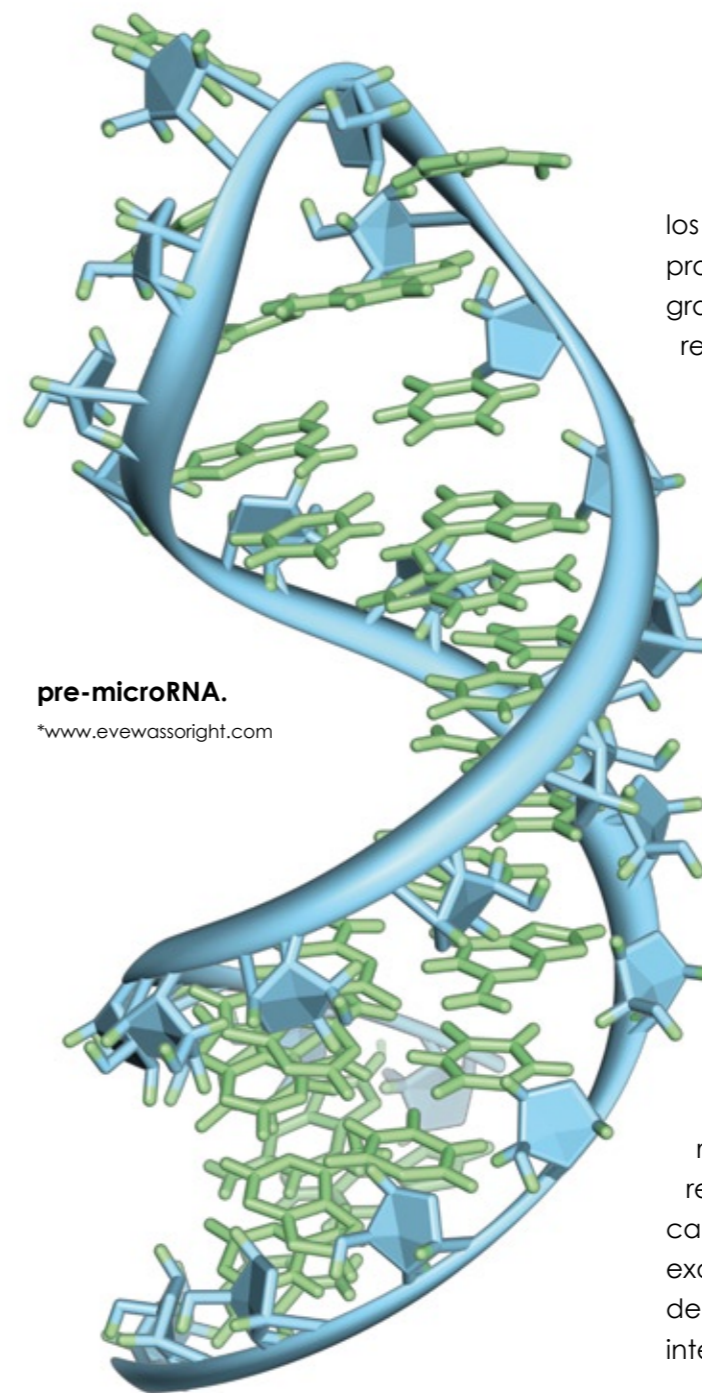
EL DESCUBRIMIENTO DE LOS microRNA

En 1993, se describen por primera vez los denominados miRNA, como resultado de los estudios genéticos, realizados en *C. elegans*, sobre

el defecto de genes en el desarrollo de la larva. Los dos primeros genes de miRNA descubiertos fueron identificados como RNA pequeños no codificantes: en 1993 el miembro fundador de esta familia de miRNA, *lin-4* (Lee et al., 1993), y siete años después, el *lin-7* (de 22 y 21 nucleótidos, respectivamente). Éstos poseen actividad represora de la traducción del mRNA y son un ejemplo de cómo se produce una expresión coordinada de dos miRNA, dictando las pautas a través de las diferentes fases larvares. Así, al final del primer estado larvario el miRNA *lin-4* bloquea la traducción de los mRNA de las proteínas LIN-14 y LIN-28, posibilitando el desarrollo de las siguientes etapas larvales. En la cuarta etapa larval se inicia la producción del miRNA *let-7*, que forma también híbridos con el mRNA de la proteína LIN-41 (un inhibidor de la proteína LIN-29), por lo que esta última proteína, necesaria para la generación de linajes celulares adultos, se sintetizará.

Desde entonces, el número de publicaciones sobre los miRNA se ha ido incrementando, de forma sorprendente, de unos 250 artículos anuales en el año 2002 a más de cuatro mil en el año 2010. Este aumento da cuenta no solo de la presencia de miRNA en una variedad de animales, plantas y virus, sino también de su papel en la regulación de procesos tan diversos que van desde el desarrollo a diferentes procesos fisiológicos en el organismo adulto, tales como diferenciación, proliferación y muerte celular. Además, estudios realizados en los últimos años han demostrado que su expresión se altera en una serie de patologías humanas.

“El silenciamiento génico mediado por dsRNA desempeña un papel esencial en numerosos procesos.”



¿QUÉ SABEMOS DE LOS microRNA?

Los miRNA son pequeños RNA de interferencia, de 19 a 25 nucleótidos, que contienen secuencias complementarias a las de diversos mRNA y, dependiendo del grado de complementariedad, pueden promover la degradación del mRNA diana o inhibir su traducción. Su función se define como reguladores negativos de la expresión génica en organismos eucariotas. Los miRNA se agrupan en familias según la homología de su secuencia, aunque no está claro si

los miembros de una misma familia controlan procesos biológicos similares. Los miRNA, ¿son grandes reguladores? Se han identificado alrededor de unos 1000 miRNA en el genoma humano, pero se estima que pueden existir más. Ello puede suponer hasta alrededor de un 4% de todos los genes expresados y, además, los datos bioinformáticos estiman que alrededor de un 30% de los genes que codifican proteínas están regulados por estas moléculas, por lo que se consideran el tipo fundamental de reguladores génicos (Wang, 2010). El panorama es complejo ya que un único miRNA puede regular a varios mRNA, por lo que el efecto de estos reguladores puede ser muy extenso, y un mRNA puede estar, a su vez, regulado por varios miRNA. Además, los genes de miRNA se pueden organizar en agrupamientos, por lo que los productos de la expresión de dichos agrupamientos se pueden sincronizar para regular un conjunto de mRNA diana, lo que repercutirá en el control de la expresión génica. Sin embargo, es alentador que los miRNA exógenos puedan integrarse en la maquinaria de regulación y, por ello, pueden ser de gran interés terapéutico.

¿CÓMO SE BIOSINTETIZAN LOS microRNA?

No es fácil presentar la biogénesis de los miRNA de forma simple pero es importante para entender posteriormente cómo una desregulación de este proceso puede conducir a un proceso patológico. Los precursores de miRNA proceden de la expresión de genes que se transcriben por la RNA polimerasa II, y dicha expresión está condicionada por los elementos reguladores propios de su gen. Sus secuencias también pueden provenir de intrones de genes que codifican proteínas. En este caso la expresión de los miRNA estaría correlacionada con

Los microRNA: pequeñas moléculas, grandes reguladores

La regulación transcripcional de los genes de dichas proteínas, y ello daría cuenta de una expresión dependiente de tejido y de tipo celular. En cualquier caso, se obtiene una molécula precursora de un tamaño alrededor de 1000 nucleótidos a la que se denomina pri-miRNA. Éstos son largos precursores a partir de los cuales se obtendrán las moléculas funcionalmente activas. Estos transcritos primarios se pliegan estableciendo interacciones intramoleculares entre regiones con complementariedad que les permite adoptar estructuras en forma de horquilla (tallo-asa), que serán reconocidas por los sistemas de maduración. En mamíferos, las formas precursoras se cortan en el núcleo por la endonucleasa RNasa III conocida como Drosha, que está asociada con la proteína DGCR8, rindiendo un producto de unos 60-70 nucleótidos (pre-miRNA). Éste es exportado al citoplasma a través del complejo dependiente de RAM-GTP, exportina-5. En el citoplasma, la molécula es cortada por Dicer, otra endonucleasa RNasa III, asociada a las proteínas TRBP y PACT, proporcionando una molécula de doble cadena (miRNA dúplex) de alrededor de 22 nucleótidos. Una cadena, el miRNA maduro (la hebra del miRNA cuya secuencia es complementaria al mRNA diana) se asocia con el complejo RISC (RNA-induced silencing complex o complejo silenciador inducido por RNA), que también participa en la represión por siRNA en el mecanismo de interferencia. A RISC se le considera la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana o de la inhibición de la traducción. En células animales el complejo RISC-miRNA se une a múltiples sitios en la región del extremo 3' terminal (3'UTR) del mRNA diana, con una complementariedad miRNA-mRNA imperfecta, bloqueándose la biosíntesis de proteínas. Algunos miRNA, por ejemplo en plantas, pueden formar un dúplex perfecto con su mRNA diana, de forma similar

a como lo hacen los siRNA, conduciendo a su degradación. En ambos casos el resultado es la disminución del nivel de la proteína codificada por el mRNA.

Varias evidencias experimentales apuntan a que los miRNA también pueden estar implicados en la regulación de la estructura de la cromatina, lo que conlleva un proceso de silenciamiento génico. Entre los genes diana de los miRNA hay enzimas de la maquinaria epigenética, como las DNA metiltransferasas, histona desacetilasas e histona metiltransferasas. A su vez, eventos epigenéticos, como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, pueden estar implicados en el control de la expresión de los miRNA.

microRNA Y CÁNCER

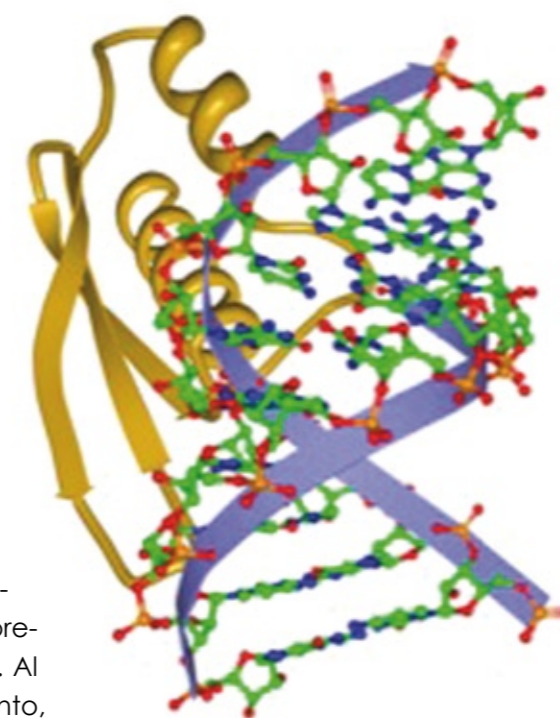
Se han apuntado diversas posibilidades para explicar la pérdida de la regulación de la expresión de un determinado miRNA, como el fallo en la regulación post-transcripcional de los miRNA, la silenciación transcripcional asociada a una hipermetilación de promotores en isletas CpG, la represión transcripcional de miRNA por factores oncogénicos o mutaciones que deterioran el procesamiento de genes miRNA. A modo de ejemplo, las enzimas o componentes de los complejos implicados en la ruta del procesamiento de miRNA pueden ser ellos mismos dianas de una disfunción génica, lo que contribuye a incrementar la transformación celular. En este sentido, en carcinomas esporádicos y hereditarios con inestabilidad en microsatélites, se han identificado mutaciones en el gen *TARBP2* (*TAR RNA-binding protein 2*) que codifica un componente integral que contiene el complejo DICER1. Por tanto, la disfunción de TRBP está asociada a una desestabilización de la proteína DICER1 y a un defecto en el procesamiento

de los miRNA. La reintroducción del gen *TRBP2* en células deficientes restaura la producción efectiva de los miRNA e inhibe el crecimiento tumoral (Melo et al., 2009).

También, el transporte de los pre-miRNA del núcleo al citoplasma es clave y está regulado. En varias líneas tumorales se ha descrito que defectos en la exportina-5 por mutaciones de su gen (*XPO5*) hacen que los pre-miRNA queden retenidos en el núcleo. Al reducirse la eficiencia del procesamiento, el nivel de los miRNA maduros disminuye en el citoplasma y, por tanto, no inhiben a sus dianas (Melo et al., 2010).

El impacto de los miRNA en cáncer, tumorigénesis y metastasis ya es patente, como ha quedado demostrado por el abrumador número de artículos centrados en este tema y en su papel como biomarcadores en cáncer (Macfarlane y Murphy, 2010). Más de la mitad los miRNA humanos están localizados en regiones cromosómicas específicas, que incluyen sitios frágiles y regiones que frecuentemente pueden ser amplificadas, delecionadas, reordenadas, o en las que se puede integrar DNA plasmídico o el de virus asociados a tumores. Todo ello conduce a una expresión aberrante de los miRNA en carcinogénesis. De hecho, la primera conexión entre los miRNA y el cáncer se describe en 2002 (Calin et al., 2002); se observó que los miR-15 y miR-16 están localizados en el cromosoma 13q14, región que se delecciona en la mitad de los casos de leucemia linfocítica crónica. A los miRNA que desempeñan un papel en cáncer (desarrollo, progresión, diagnóstico, prognosis) se les designa como miRNA oncogénicos u oncomiR.

La implicación de los miRNA en procesos carcinogénicos indica que pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores, según la acción del gen que estén regulando, lo que explicaría por qué un mismo miRNA



Complejo/
interacción
proteína TRBP2-
miRNA.

puede funcionar como oncogén o como supresor tumoral en diferentes tejidos. La amplificación o sobreexpresión de un miRNA que actúa como un oncogén, reduce la expresión de un gen supresor de tumores o los implicados en diferenciación, contribuyendo a la formación del tumor, como por ejemplo en cáncer de páncreas los miR-125b, miR-103 y miR107. Por el contrario, otros miRNA pueden reducir la expresión de genes oncogénicos y se comportarían como supresores de tumores; un ejemplo sería el miR-34a, que está silenciado en varios tipos de cáncer. Otros miRNA se han relacionado con el proceso de metástasis. En este sentido, se ha descrito que un grupo de miRNA cuya expresión se pierde en cáncer de mama está relacionado con la capacidad metastásica de dichas células (Tavazoie et al., 2008). Al restaurar la expresión de los miR-126 y miR-335 mediante vectores retrovirales, se consigue disminuir la colonización del pulmón y del hueso, por lo que estos miRNA se definen como supresores de metástasis.

Además, la expresión de los miRNA se correlaciona con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Por ejemplo, a la familia miRNA let-7a se le ha asignado un papel en la patogénesis del cáncer de pulmón. Let-7 actúa como un gen supresor de tumores ya que inhibe la expresión del oncogén *ras* y su expresión se reduce en cáncer de pulmón de célula pequeña. Por otro

Los microRNA: pequeñas moléculas, grandes reguladores

lado, miR-21 se sobreexpresa en glioblastoma y cáncer de mama y pancreático ya que provoca una señal de supervivencia y las células son menos susceptibles a entrar en apoptosis. Además, el control de la traducción ejercido por los miRNA juega un papel importante en el mecanismo molecular de resistencia a quimioterapias basadas en el empleo de antifolatos y fluoropirimidinas, como se ha descrito para el miR-215 en células de osteosarcoma y de cáncer de colon.

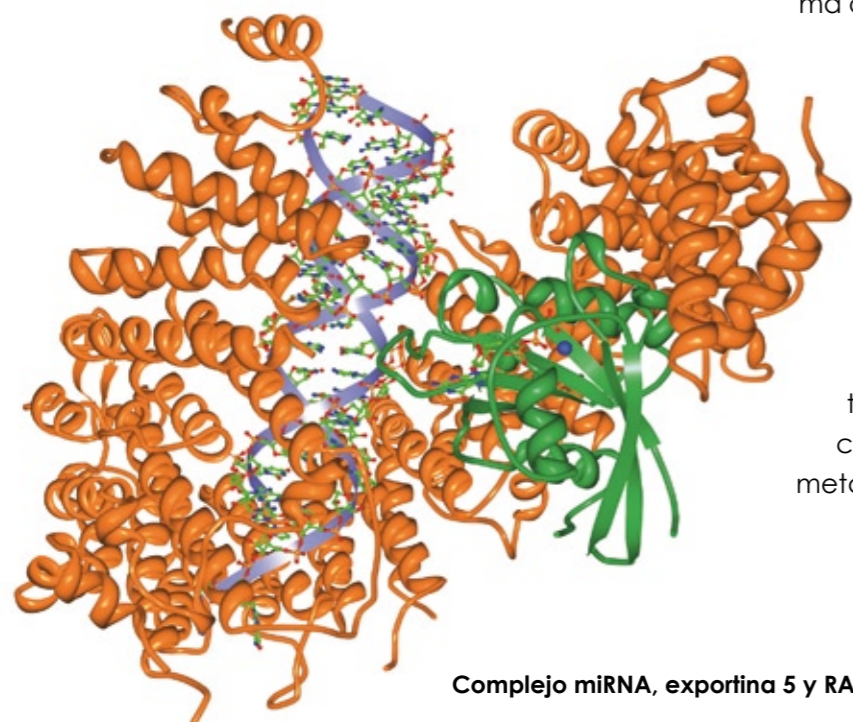
Algunos ejemplos de los miRNA implicados en cáncer de colon cuya expresión disminuye (se consideran supresores de tumores) son let-7 (implicado en la inhibición del crecimiento celular y que tiene como RNA diana a H-, N- y K-ras, y c-Myc) y el miR-34a (controla la inducción de apoptosis mediada por p53 y tiene como genes diana *CDK4*, *E2F3* y *Bcl-2*). Alteraciones en los miRNA también se han asociado a una desregulación de la proteína p53, cuya actividad supresora de tumores se pierde durante la carcinogénesis colorrectal. También cabe destacar la regulación del proceso de apoptosis

por los miRNA. En este sentido, la expresión de los miRNA esta inversamente correlacionada con la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (regulan negativamente la expresión de Bcl-2 a nivel post-transcripcional) induciendo apoptosis.

microRNA Y TERAPIA

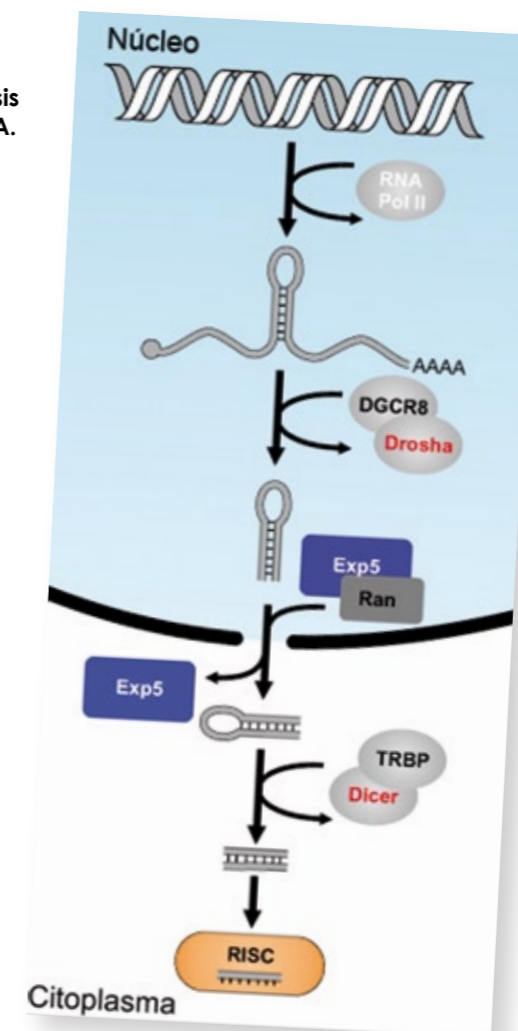
El descubrimiento de los miRNA, y todo el conocimiento que ya hoy en día se tiene sobre estas pequeñas moléculas, apunta a su potencial utilización en terapia molecular. Las perspectivas son prometedoras en cuanto al desarrollo de nuevas terapias frente al cáncer, infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas, desordenes oculares, etc. Así, si el defecto primario en una patología está en los miRNA, se podría corregir la expresión de los miRNA de tal forma que se recupere el fenotipo celular normal o, por el contrario, que se induzca la muerte celular por apoptosis. Si hay una desregulación de miRNA, se podrían utilizar miRNA naturales o sintéticos para corregir dichos defectos. Es un reto para los investigadores y para las empresas farmacéuticas el tratar de elucidar la forma adecuada de administrar los miRNA

exógenos restauradores de las actividades celulares. Además, los denominados perfiles genómicos de expresión de miRNA, o firmas genéticas, pueden ser de gran utilidad para la clasificación, el diagnóstico, el pronóstico y el análisis de la respuesta al tratamiento de diferentes tipos de tumores, o para establecer una correlación con el potencial metastásico de las células de un tumor



Complejo miRNA, exportina 5 y RAN-GTP.

La biosíntesis de miRNA.



y tratar de frenar dicho proceso. Aunque las posibilidades sean todavía fruto de una terapia experimental y pocos estudios estén en fase clínica, el descubrimiento de dianas, el desarrollo de nuevas tecnologías y el avance experimental en este campo apuntan a los miRNA como una herramienta terapéutica que, en último término, puede tener una gran relevancia clínica.

M^a Antonia Lizarbe

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense

BIBLIOGRAFÍA

- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15524-15529.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Macfarlane L.A., Murphy P.R. (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11:537-561.
- Melo S.A., Ropero S., Moutinho C., Aaltonen L.A., Yamamoto H., Calin G.A., Rossi S., Fernandez A.F., Carneiro F., Oliveira C., Ferreira B., Liu C.G., Villanueva A., Capella G., Schwartz S. Jr., Shiekhatter R., Esteller M. (2009) A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet.* 41:365-370
- Melo S.A., Moutinho C., Ropero S., Calin G.A., Rossi S., Spizzo R., Fernandez A.F., Davalos V., Villanueva A., Montoya G., Yamamoto H., Schwartz S. Jr., Esteller M. (2010) A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18:303-315
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (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
- Tavazoie S.F., Alarcón C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P.D., Gerald W.L., Massagué J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147-152.
- Wang Z. (2010) MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem* 1:41-54.