

DE LA QUÍMICA DE LOS PRODUCTOS NATURALES A LA MEDICINA MOLECULAR: ¿UN TRAYECTO ATÍPICO?

Francisco E. Baralle

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). Padriciano 99,
(34012) Trieste, Italy. Tel. +39-040-3757337, Fax: +39-040-3757361, E-mail: baralle@icgeb.trieste.it.

Resumen

En este trabajo, luego de una breve tentativa de justificar cambios abruptos de temas de investigación, se describen los recientes progresos en el estudio de las alteraciones del procesamiento del pre-mRNA del Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) y los fenotipos patológicos producidos por dichas alteraciones.

En las formas monosintomáticas de fibrosis quística (CF) variaciones de secuencias polimórficas $(TG)_m/T_n$ adyacentes al exon 9 en el "3' splice site" producen una mayor exclusión de este exon resultando en altas proporciones de proteína CFTR no funcional. La acción combinada de factores de *splicing* y una nueva proteína, TDP43, induce exclusión del exon 9. Nuestros estudios han identificado la secuencia $(UG)_m$ como el objetivo de TDP43 en el CFTR pre-mRNA y los elementos denominados Exon Splicing Enhancer (ESE), Exon Splicing Silencer (ESS) e Intron Splicing Silencer (ISS) como los responsables de la exclusión del exon 9 inducida por los factores de *splicing*. La variabilidad de individuo a individuo y en distintos tejidos, de las concentraciones de TDP43 y de los factores de *splicing* determina la penetración parcial del locus $(TG)_m/T_n$ en la fibrosis quística. La importancia clínica y biológica de esta observación es demostrada claramente por el fenotipo severo visto en pacientes con variaciones extremas de este genotipo y por la posibilidad de revertir el efecto deletéreo inhibiendo la síntesis celular de TDP43 mediante oligonucleótidos antisentido.

Palabras clave: Fibrosis quística; RNA splicing; complejos RNA-proteína.

Abstract

This work, after a short attempt to justify abrupt changes in research interests, describes recent progress in the study of alterations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) pre-mRNA processing and the pathological alterations derived from this phenomena.

In monosymptomatic forms of cystic fibrosis, variations in the $(TG)_m/T_n$ polymorphic repeats at the 3' end of intron 8 of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene are associated with the exclusion by the splicing machinery of exon 9. This results in

Conferencia pronunciada en su incorporación como Académico Correspondiente en Trieste, Italia, el 29 de octubre de 1999.

high proportions of a non-functional CFTR protein. The combined action of splicing factors and a new protein, TDP43, induces exclusion of exon 9. Our studies have shown that the sequence (UG)_m is the target for TDP43 binding in the CFTR pre-mRNA. Furthermore, additional cis-acting elements were identified such as an Exon Splicing Enhancer (ESE), an Exon Splicing Silencer (ESS) and an Intronic Splicing Silencer (ISS). These sequences are responsible of the negative effect of the splicing factors on exon 9 inclusion. Tissue levels and individual variability of splicing factors would determine the penetrance of the (TG)_mT_n locus in monosymptomatic forms of cystic fibrosis. The clinical and biological relevance of this finding *in vivo* is clearly demonstrated by the severe phenotype of CF patients carrying extreme variations of the genotype and by the possibility of preventing the deleterious exon 9 skipping by inhibiting the synthesis of TDP43 using antisense oligonucleotides.

Key words: Cystic fibrosis; RNA splicing; RNA-protein interactions.

Introducción

En la primera parte de mi presentación deseo describir brevemente una carrera académica no exactamente típica: el trayecto de un químico en productos naturales hacia la biología molecular y las bases moleculares de las patologías humanas. Este camino metodológico se inició poco antes del nacimiento de la ingeniería genética -unos 25 años atrás- y se desarrolló en la aplicación de esta tecnología de investigación al estudio de los procesos patológicos humanos. Particular atención dedicaremos a algunas enfermedades hereditarias, como la fibrosis quística, que nos proveerá un ejemplo de modelo científico que, partiendo de observaciones clínicas particulares, nos lleva al análisis de los mecanismos moleculares de la expresión génica a la definición de las alteraciones presentes en los pacientes, y una vez comprendidas éstas, a la intervención terapéutica específica con fármacos sintéticos.

Completé mi licenciatura en química con un fuerte interés en los problemas biológicos y en la medicina. Sin embargo, mis primeros pasos en la investigación fueron en un campo relativamente alejado de estos temas, en cuanto decidí aprovechar la oportunidad de hacer un doctorado en biosíntesis de productos naturales (alcaloides en plantas y esteroides en anfibios) que me ofreció el Dr. Eduardo Gros, recién llegado de su actividad posdoctoral en Estados Unidos y uno de los más jóvenes y activos investigadores del De-

partamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Su grupo, al final de los años 60 (Figura 1), fue el ambiente ideal para reafirmar en forma definitiva mi vocación para la investigación. El aprendizaje del método científico y la satisfacción estética y científica de mi trabajo de tesis sobre la biosíntesis de cuscohigrina e hyosciamina en *Atropa belladonna* fue el motor y la base sobre la cual desarrollé mi carrera académica hasta el presente.

Los pasos sucesivos fueron a través de la bioquímica a la biología molecular y a la asistencia a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, culminando mi prolongada vida estudiantil con la convalidación de mi título de médico en la Universidad de Nápoles. En los párrafos siguientes describiré brevemente estas etapas.

Química de los productos naturales: Biosíntesis de cuscohigrina

La Figura 2, tomada de mi tesis doctoral, muestra esquemáticamente el camino desde la unidad básica de AcetylCoA al alcaloide cuscohigrina. Nuestro trabajo [Baralle F.E. y E.G. Gros, 1969 a y b] demostró que el C1 y C2 de acetyl CoA daban origen a los átomos de carbono de la cadena central del alcaloide. En una segunda etapa se demostró que el anillo heterocíclico se origina a través de la ciclación del amino ácido ornitina y pudimos demostrar conclusivamente que el



Fig. 1. El grupo de estudio de la biosíntesis de productos naturales dirigido por el Dr. Eduardo Gros alrededor de 1968. De izquierda a derecha: F.E. Baralle, E. Gruñeiro, I. Mastronardi, E. G. Gros, A. M. Porto y A. I. Colonna.

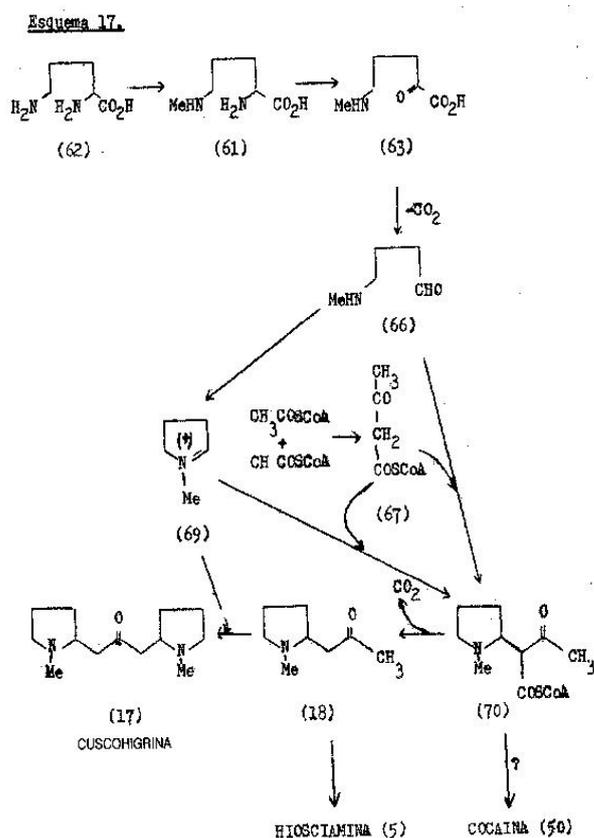


Fig. 2. El camino metabólico sintético de ornitina y acetyl CoA a cuscohigrina, hiosciamina y cocaína.

átomo de N contenido en el heterociclo derivado del N δ de la ornitina y no del N α [Baralle F.E. y E.G. Gros, 1969 c].

Bioquímica y el paso a la biología molecular

Por un período, mi obsesión con la biología y la bioquímica tuvo un fugaz desahogo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Fundación Campomar, donde me ocupé del mecanismo de traducción de proteínas en el laboratorio del Dr. Israel D. Algranti, iniciándome en las técnicas de biología molecular bajo la valiosa guía de Nélica González. Le siguieron breves aventuras en la farmacología y luego en la bioquímica. En el laboratorio del Dr. Luis F. Leloir usé un poco de mi experiencia en química orgánica para preparar extractos de lípidos hepáticos, material de partida para la purificación del dolichol, de gran fama posterior. Esta limitada experiencia fue de gran utilidad para eventualmente, con la ayuda de César Milstein, llegar al MRC Laboratory of Molecular Biology, de Cambridge, donde inicié mi carrera en biología molecular a través de la química orgánica, sintetizando oligonucleótidos que luego usé para determinar la primera secuencia completa de un RNA mensajero celular eucariote: el mRNA de la β globina (Figura 3) [Baralle F.E., 1977 a]. Este trabajo fue seguido de la determinación de la estructura primaria de los mRNA de β globina en distintas especies y su papel en la regulación de la traducción del mRNA [Baralle F.E., 1977 b y c; Baralle F.E. y G.G. Brownlee, 1978] y por la determinación de la secuencia completa de todos los componentes del gen de la β globina humana [Proudfoot N.J. y F.E. Baralle, 1979; Baralle F.E., 1980, Lawn R.M., 1980; Slightom J.L., 1980; Spritz R.A., 1980; Efstratiadis, A., 1980].

En 1980 obtuve los puestos de Profesor de Patología en la Sir William Dunn School of Pathology y de Medical Tutor en el Magdalen College, ambos institutos de la Universidad de Oxford. En esos años había completado la convalidación de mis estudios médicos y estaba fuertemente motivado a trabajar en las aplicaciones de la biología molecular a la patología humana. En 1981 iniciamos

nuestros estudios sobre las bases genéticas de las enfermedades cardiovasculares, en particular las dislipidemias, y fuimos los primeros en describir polimorfismos genéticos asociados a hiperlipidemia, en particular en los genes codificantes por las apolipoproteínas AI, CIII e AIV (Figura 4) [Rees A., 1983].

El funcionamiento correcto de los genes Apo AI y Apo AIV permite mantener niveles plasmáticos satisfactorios de la lipoproteína de alta densidad (HDL), una partícula lipoproteica involucrada en el transporte inverso del colesterol y por tanto asociado a una protección contra las enfermedades cardiovasculares. Se observó que una variación de la secuencia nucleotídica creaba un nuevo sitio de corte de la enzima de restricción Sst1 o Sac (S*) produciendo variantes polimórficas (indicados como 3.2 y 4.2 en la Figura 4) de la dimensión del fragmento Sst derivado de la región 3' del gen de Apo AI. Esta diferencia se visualiza usando la técnica de Southern blot (Figura 4B), con la que se estudió la distribución de este polimorfismo en poblaciones de individuos normales y en pacientes hiperlipémicos y se demostró una asociación del polimorfismo Sst 3.2 con hipertrigliceridemia [Rees A., 1983].

En esa época se unió a nuestro grupo, en Oxford, un brillante posdoc, el Dr. Alberto Kornblihtt, quien desarrolló un proyecto explorando los aspectos moleculares de la síntesis de la matriz extracelular y que además fue uno de los primeros estudios que demostró el procesamiento diferencial del pre-mRNA (alternative splicing) [Kornblihtt A.R., 1983; Kornblihtt A.R., 1984 a y b; Kornblihtt A.R., 1985 y Vibe-Pedersen K., 1984].

En la Figura 5 puede verse que de una compleja fase de procesamiento del pre-mRNA resulta una molécula de fibronectina, que si bien es codificada por un solo gen, puede tener 20 secuencias distintas. Las funciones de adhesión celular, complejamiento con el colágeno, interacción con la fibrina, etc., pueden ser modificadas o moduladas según el procesamiento diferencial del pre-mRNA. El caso más claro es la ausencia en una de las isoformas generadas por un *splicing* alternativo de un sitio de unión a las células (LVD) en la región III CS.

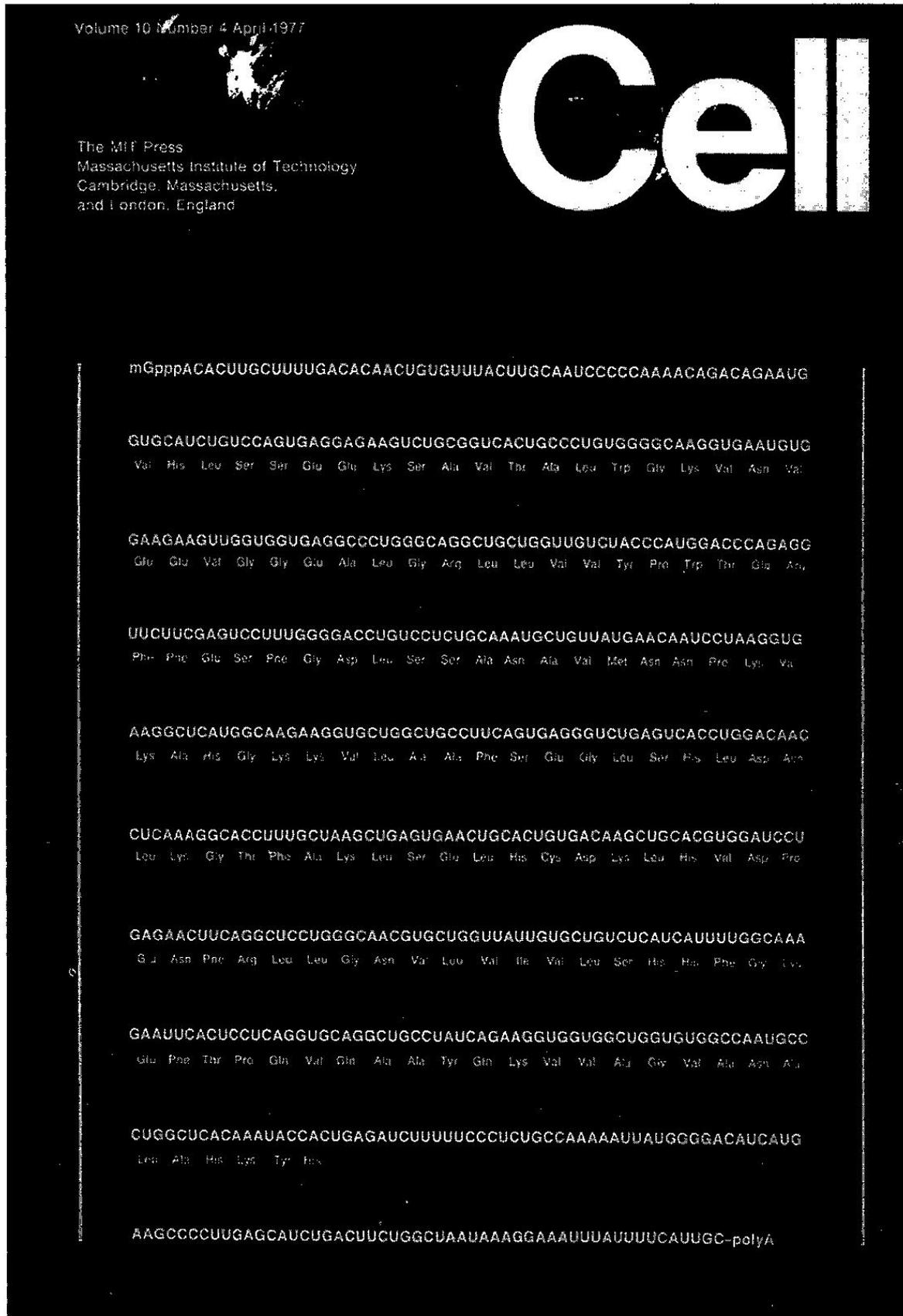


Fig. 3. La secuencia completa del mRNA de la β -globina de conejo, la primera estructura primaria de un RNA mensajero celular eucariote.

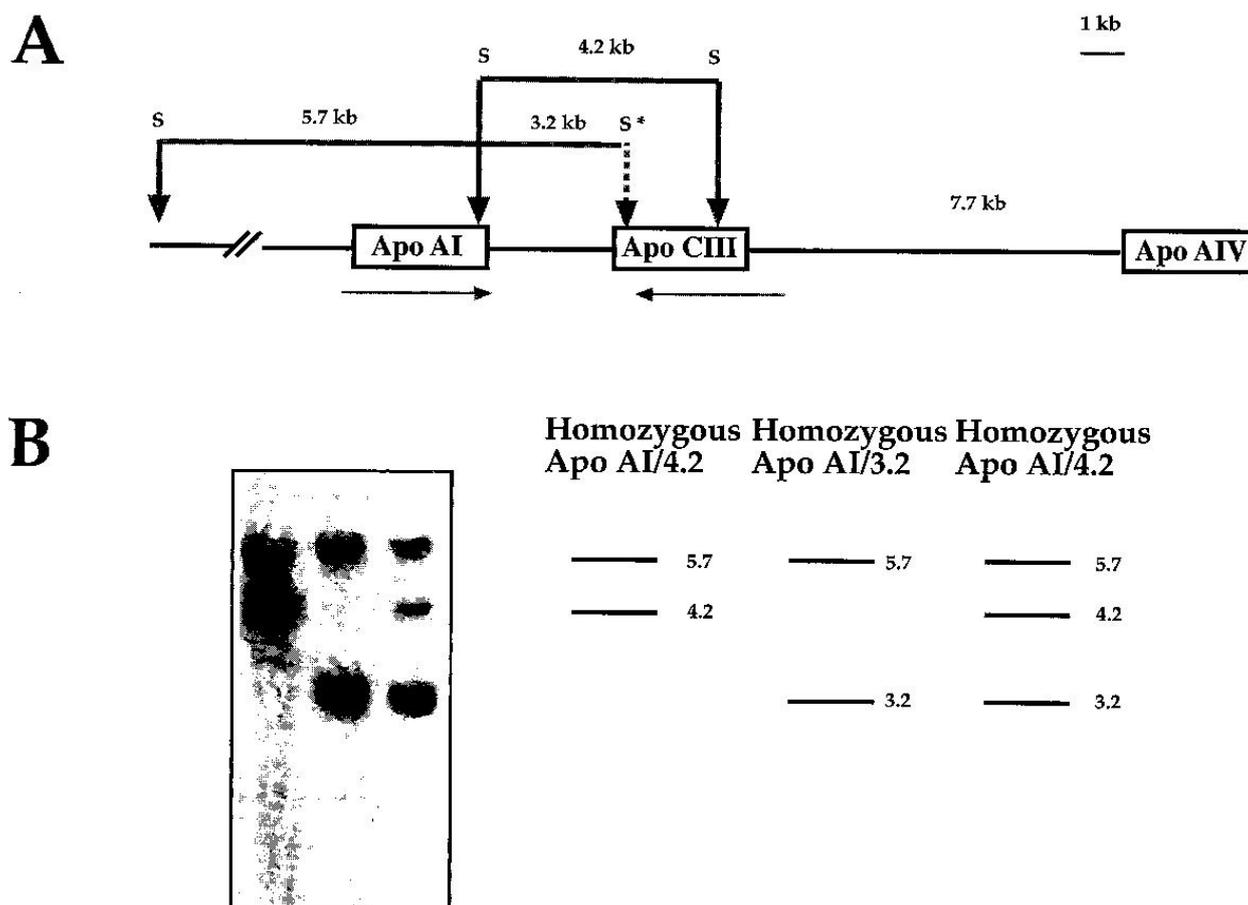


Fig. 4. A) Esquema de la región del cromosoma 11 humano donde se encuentra el cluster de los genes codificantes por las apolipoproteínas AI, CIII y AIV. B) La secuencia 3' del gen de ApoAI presenta variaciones individuales que resultan en dos posibles fragmentos de restricción que se evidencian por la técnica de Southern blot, el fragmento de 4.2 Kb (calle 1) o de 3.2 Kb (calle 2) o el respectivo heterocigota (calle 3).

Medicina molecular

El paso de Oxford a Trieste fue concomitante con grandes desarrollos en las aplicaciones de la biología molecular a la medicina (nacimiento de la medicina molecular), y deseo dedicar la última sección de esta presentación a nuestros estudios actuales que combinando la química, la biología molecular, la patología y la medicina nos han permitido hacer grandes progresos en la comprensión de ciertos aspectos patogenéticos de las enfermedades hereditarias, y en particular de la fibrosis quística (CF) y enfermedades relacionadas.

El gen que codifica por el Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) fue identificado en 1989 como la causa de la fi-

brosis quística, la enfermedad hereditaria más frecuente en la población caucásica [Rommens J.M., 1989; Riordan J.R., 1989 y Kerem B., 1989]. Nuestro interés se centra en un aspecto particular de la función de este gen, que es el procesamiento anómalo del exón 9 del CFTR pre-mRNA. Este fenómeno es peculiar del gen humano, ya que otros mamíferos no presentan un *splicing* diferenciado del exón 9 [Rozmahel R., 1997 y Niksic M., 1999].

Las Figuras 6A y 6B muestran esquemáticamente la estructura de la proteína CFTR y su respectivo mRNA. El *splicing* del exón 9 del CFTR produce un mRNA que codifica por una proteína CFTR no funcional. La regulación de este *splicing* alternativo no conservado evolucionariamente es muy compleja e involucra varios segmentos regulatorios

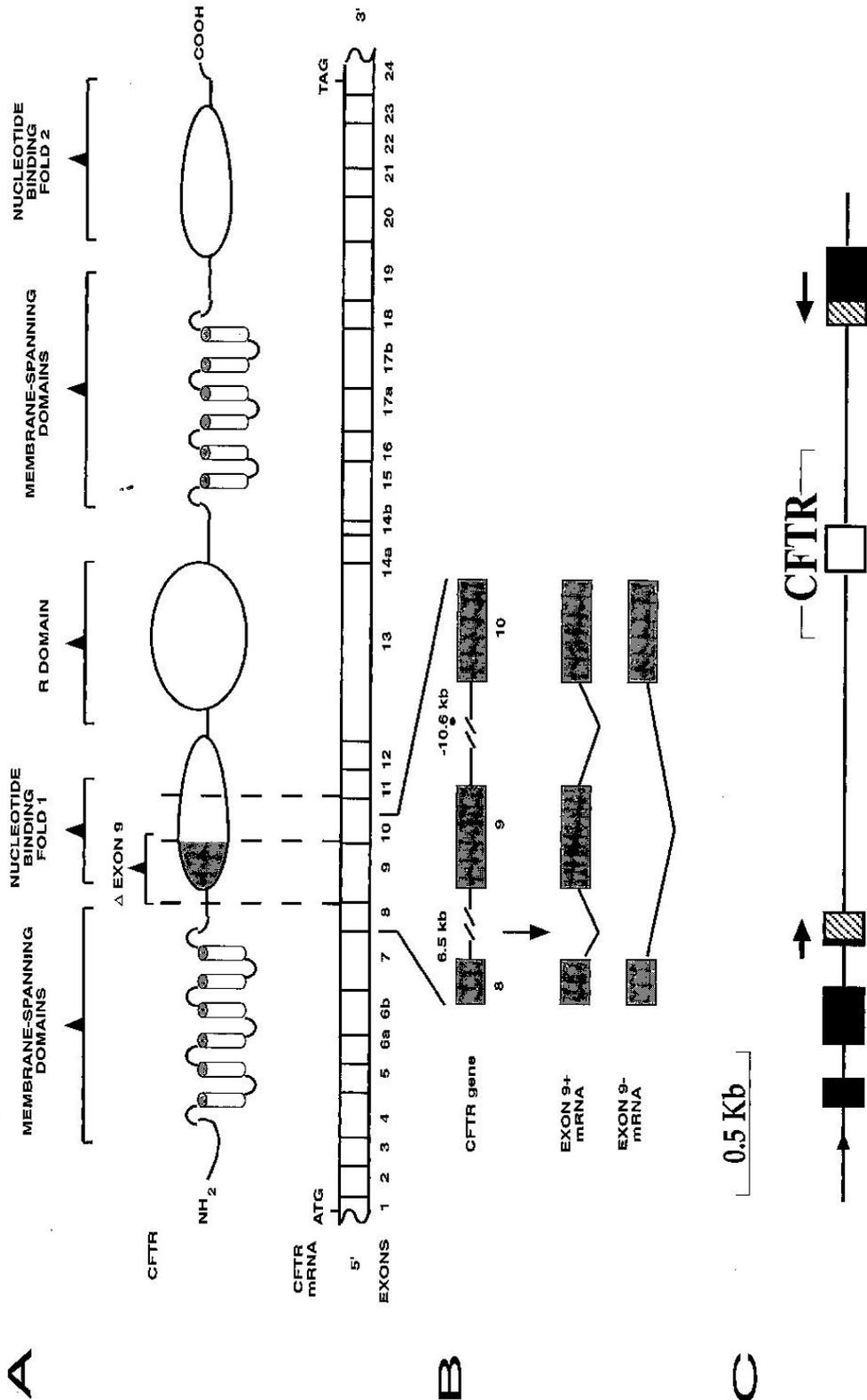


Fig. 6. A) Esquema de la proteína Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR). La función de las distintas regiones de la molécula está indicada en la parte superior de la figura. B) Esquema del procesamiento alternativo del exón 9 humano que cuando no es incluido codifica por una proteína no funcional. C) Minigen CFTR: ■ secuencias del gen de α globina □ secuencias del gen CFTR.

e interacciones RNA-proteína. La falta de proporciones variables del exón 9 en el CFTR mRNA ha sido asociado con las formas llamadas fibrosis quística monosintomáticas, entre las cuales se encuentran la ausencia congénita del *vas deferens* (CBAVD), pancreatitis, poliposis nasal, bronquiectasia y alergia broncopulmonar aspergilósica. La Figura 6C muestra esquemáticamente el minigen utilizado como modelo en todos nuestros experimentos. Como el gen completo de CFTR es de un tamaño que lo hace poco manejable, hemos introducido la región de interés en un gen de α -globina que es mucho más pequeño y nos permite manipularlo con facilidad. El minigen CFTR tiene una pauta de *splicing* idéntica al gen endógeno cuando se lo introduce en células en cultivo por transfección.

El gen de CFTR presenta, en la región del exón 9, una serie de características estructurales particulares de la especie humana (Figura 7A). Entre ellas, nuestra investigación ha identificado el polimorfismo $(TG)_m/T_n$, un *intronic splicing silencer* (ISS) y secuencias exónicas, *enhancer* (ESE) y *silencers* (ESS) del *splicing*. Las regiones polimórficas $(TG)_m/T_n$, donde "m" varía de 9 a 13 y "n" de 3 a 9, están asociadas a un mayor número de moléculas de mRNA procesadas aberrantemente (9-). Efectivamente, la cantidad de mRNA sin el exón 9 es directamente proporcional a "m" e inversamente proporcional a "n". La Figura 7B muestra la relación del porcentaje de CFTR mRNA 9- con fenotipos patológicos. Es evidente un aumento de pacientes con CBAVD o pancreatitis en aquellos individuos con un valor menor o igual a 5. Cabe destacar, asimismo, que no todos los portadores de genotipo T5 presentan características patológicas. Esta variabilidad de la penetración fenotípica del polimorfismo T5 y de las otras mutaciones indicadas en la Figura 7, pueden ser explicados a través de las interacciones de estas secuencias con proteínas nucleares involucradas en el procesamiento del pre-mRNA. Efectivamente, la secuencia UG/U (la versión RNA de T/TG) es el objetivo de una interacción con una nueva llegada al mundo del RNA *processing*, la proteína TDP43, identificada en nuestro laboratorio como el componente celular que se une espe-

cíficamente a la secuencia $(UG)_m$, cuando $m \geq 6$, inhibiendo el *splicing*, sobre todo en presencia de U5.

En la Figura 8 se muestra un experimento diseñado para estudiar la interacción RNA-proteína usando la técnica de estabilización covalente por UV. Es clara la diferencia entre el comportamiento de las moléculas de RNA: aquellas que no poseen la secuencia $(ug)_11$ no son capaces de ligar la proteína indicada por la flecha en la Figura 8B. Esta proteína fue identificada como TDP43 [Buratti E., 2001], un factor nuclear cuya propiedad de interactuar con RNA no había sido descrita previamente. Experimentos funcionales también demostraron que esta proteína tiene un efecto inhibitorio sobre el *splicing* normal. Efectivamente, altas concentraciones de TDP43 aumentan la cantidad de CFTR mRNA 9- [Buratti E., 2001].

La identificación funcional de los elementos regulatorios de *splicing* ubicados en el exón y en el intrón del minigen CFTR exón 9 fue llevada a cabo utilizando la técnica de delección o mutagénesis selectiva [Buratti E., 2001 y Pagani F., 2000] y probando la funcionalidad de los mutantes por transfección de los minigenes en células en cultivo acompañados, como indica la Figura 9, con un plásmido que expresa altas cantidades del factor de *splicing* SF2/ASF. El CFTR mRNA fue extraído de estas células y su composición respecto al exón 9 fue analizada por RT-PCR [Buratti E., 2001 y Pagani F., 2000]. La banda superior contiene el exón 9; es evidente que la sensibilidad a la inhibición de *splicing* por ASF/SF2 depende de la presencia combinada de secuencias exónicas e intrónicas. De este modo se identificaron un *exonic splicing enhancer* (ESE), un *exonic splicing silencer* (ESS) y un *intronic splicing silencer* (ISS). De particular interés es la secuencia ISS, que es el compañero anómalo del factor de *splicing* ASF/SF2. En el caso del exón 9 de CFTR, el factor SF2 tiene paradójicamente un efecto inhibitorio (Figura 9), mientras que su función habitual es la de estimular la inclusión de los exones donde su secuencia de reconocimiento está presente.

Finalmente todavía está en estudio el efecto de las mutaciones dentro del exón 9

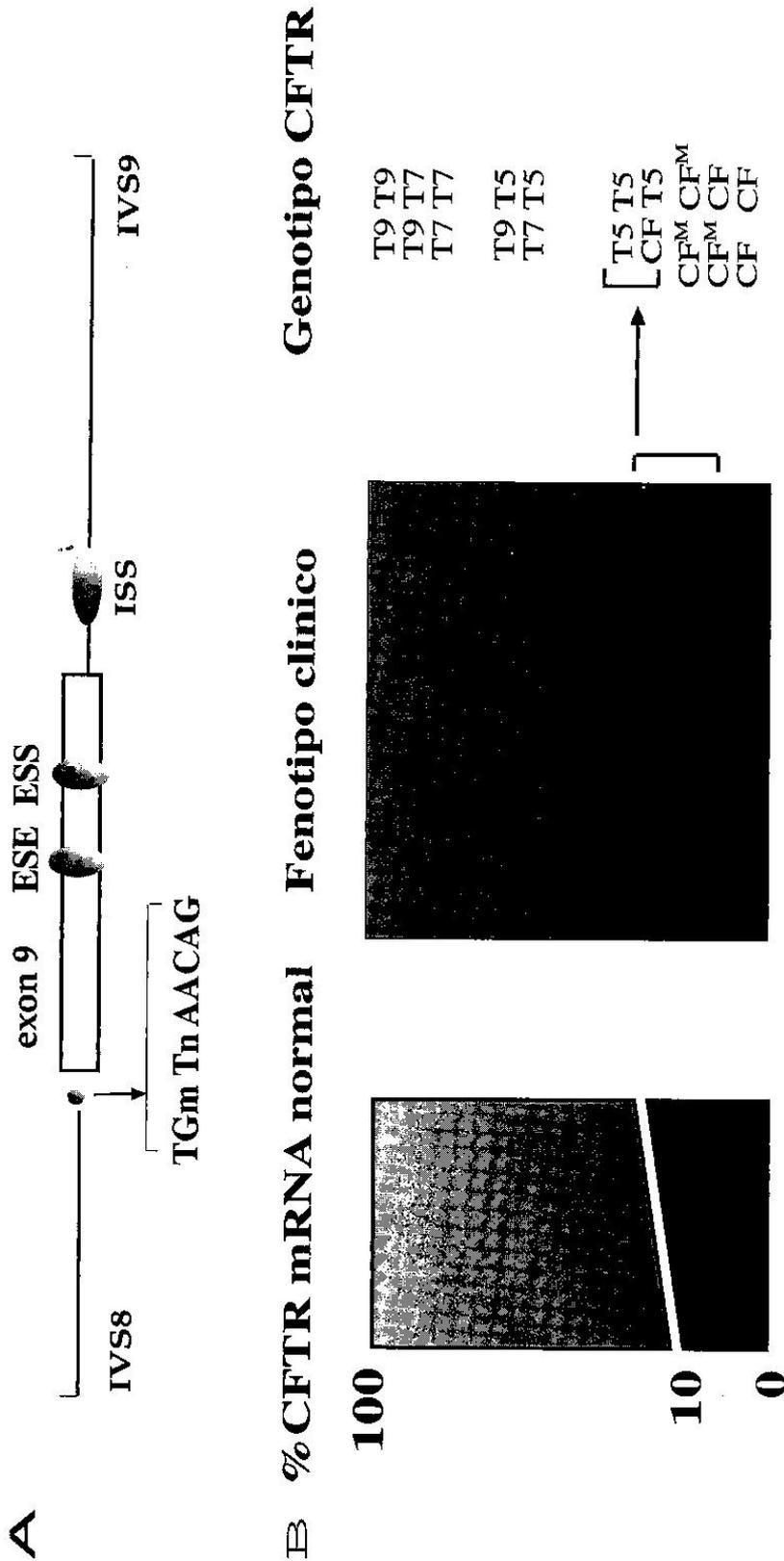


Fig. 7. A) Estructura detallada de la región del exón 9 y secuencias intrónicas adyacentes. ESE: Exonic splicing silencer, ISS: Intronic splicing silencer. B) Relación del porcentaje de CFTR mRNA 9' y el fenotipo clínico. PS: Suficiencia pancreática. PI: Insuficiencia pancreática.

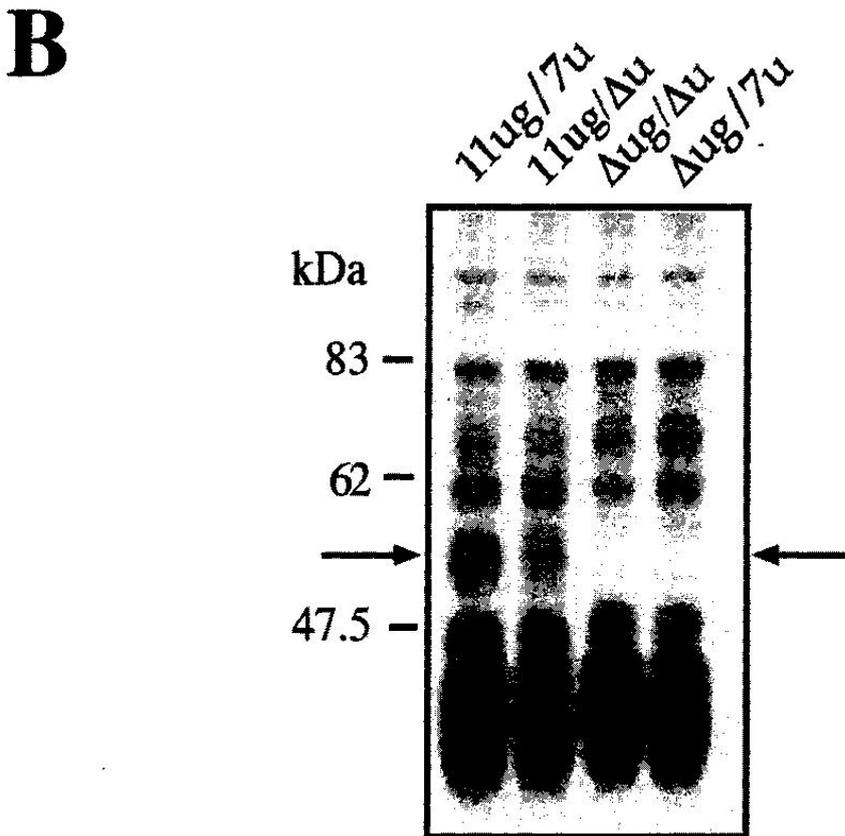
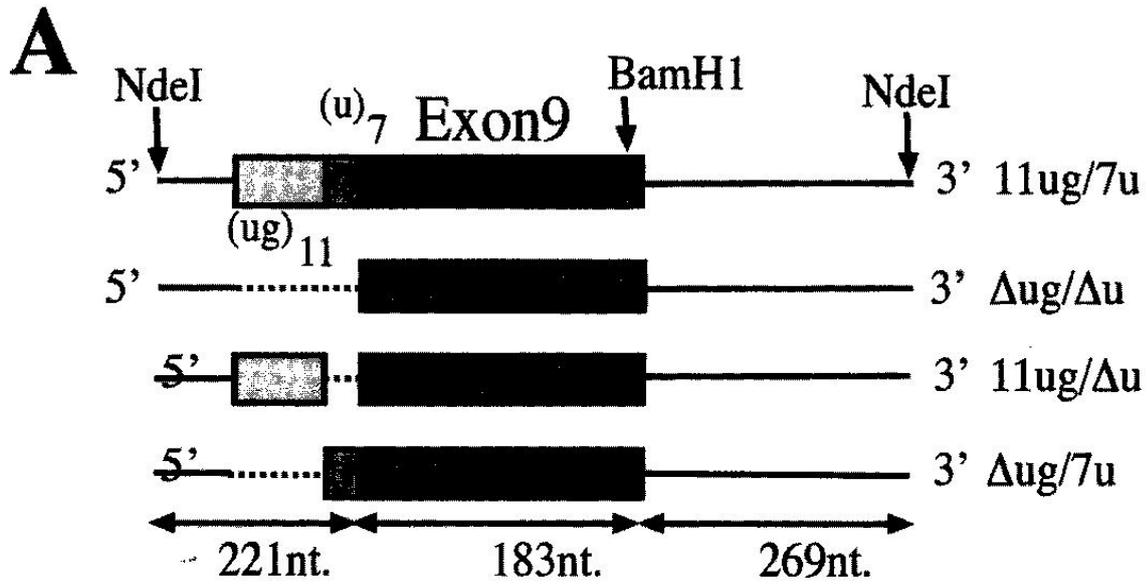
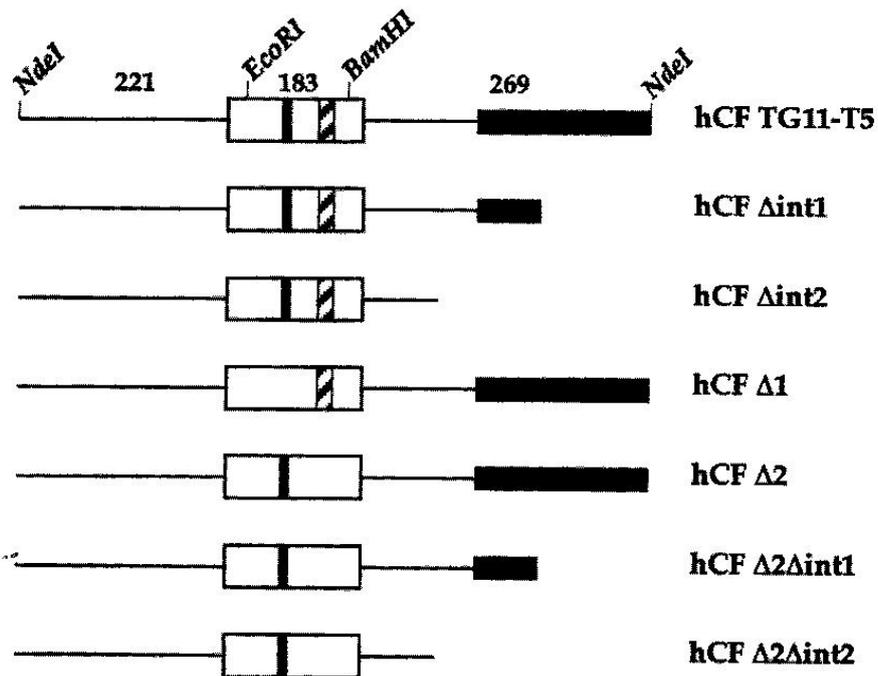


Fig. 8. Análisis de las interacciones RNA-proteína: Minigenes artificiales que contienen la región del CFTR exón 9 y secuencias intrónicas adyacentes fueron mutagenizados selectivamente en el polimorfismo (TG)_m/T_n del 3' splice site y luego transcritos *in vitro*. Los RNA resultantes están representados esquemáticamente en el panel A, el *wild type* (11ug/7u), la doble delección de (u)_n y (ug)_m (Δug/Δu), la delección de u_n (11ug/Δu) y la delección de ug_m. Estos RNAs fueron utilizados en experimentos de UV *cross linking* con extractos nucleares (Δug/7u) para detalles de la técnica ver ref. 25). Un análisis de los complejos RNA-proteína resultantes se muestra en el panel B.

A



B

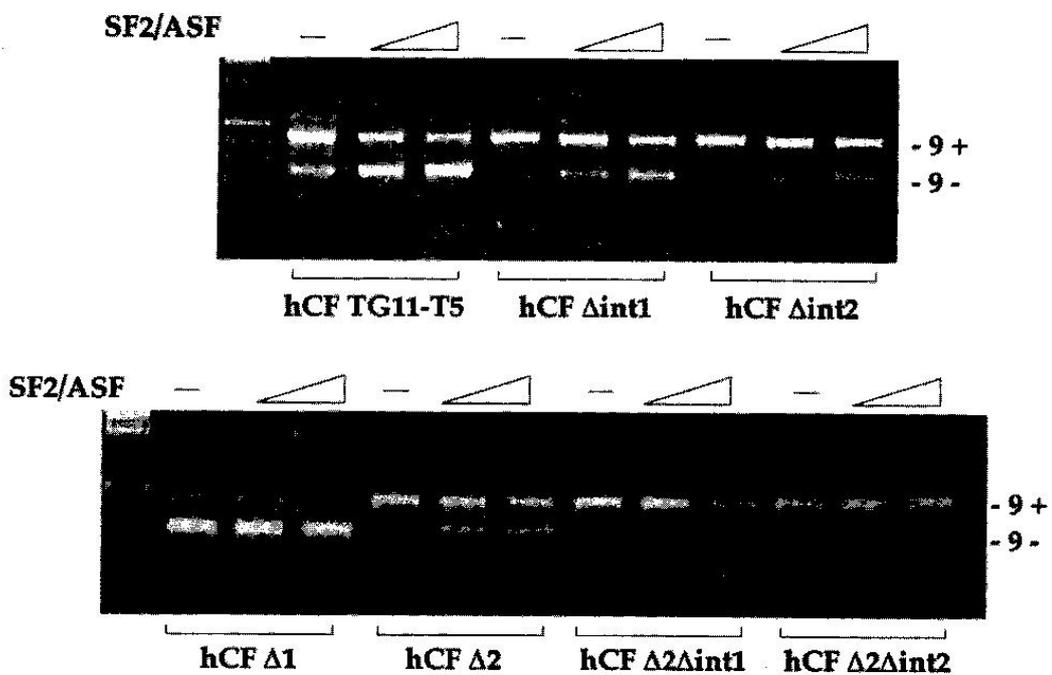


Fig. 9. Elementos regulatorios involucrados en el *splicing* alternativo del exón 9 del CFTR pre-mRNA: A) Esquema de los minigenes utilizados en el experimento indicando el *exonic splicing enhancer* (ESE) ■, *exon splicing silencer* (ESS) ▨ e *intronic splicing silencer* (ISS) □. B) Experimentos de funcionalidad *in vivo*: Los minigenes fueron introducidos en células en cultivo y luego de 28 horas el RNA fue extraído y analizado por RT-PCR. Los fragmentos resultantes fueron analizados por separación electroforética que permite diferenciar la banda 9+ de la banda 9- y en base a ellas cuantificar las cantidades relativas de ambos mRNAs.

sobre el *splicing*. Este fenómeno es extremadamente interesante porque es natural sospechar que mutaciones que cambian el aminoácido van a ser la causa del problema funcional de la proteína, pero no es tan obvio considerar que mutaciones en la secuencia codificante pueden también causar el efecto patológico a través de un aumento del *splicing out* del exón 9. En la Figura 10 se muestran las mutaciones en la secuencia codificante que han sido descritas en el exón 9 y cual de ellas afecta el *RNA processing*. La mutación A455E es particularmente interesante porque se presenta en pacientes con síntomas clínicos serios a edad muy temprana, pero también se la ha encontrado en sujetos de más de 60 años sin problemas clínicos significativos. La proteína mutada ha sido estudiada y presenta un grado de funcionalidad aceptable. Nuestra interpretación es que la mutación causa un *splicing out* del exón 9 que cambia de tejido a tejido y de individuo a individuo, dependiendo de las concentraciones de *splicing factors* y TDP43 que son sujetas a variaciones considerables en la población. Las mutaciones G424S, I444S y A455E se encuentran en secuencias exónicas que representan *enhancers* y *silencers* de *splicing* y nos dan una nueva óptica para ver las mutaciones, donde el cambio de la secuencia aminoacídica es banal, pero el cambio de la secuencia nucleotídica causa un problema radical para el *RNA splicing* que resulta en una delección de un exón completo.

¿Qué tiene de medicina esta biología molecular? El conocimiento preciso del mecanismo patológico molecular nos permite identificar cuál es el objetivo para una eventual intervención terapéutica. Efectivamente, el hecho que TDP43 inhibe el *splicing* nos da la pista a seguir. La inhibición de la síntesis de esta proteína con consecuente disminución de su concentración en el núcleo celular debería resultar en una mayor inclusión de exón 9 y por lo tanto en una mayor cantidad de CFTR mRNA 9+ que se traduce en una proteína funcional.

Un método ampliamente usado para la inhibición de la síntesis de proteínas específicas es el antisentido RNA o DNA. Efectivamente, la introducción en la célula de se-

cuencias complementarias a las codificantes que se encuentran en el mRNA resulta en el bloqueo de las funciones de esta molécula y, en consecuencia, en la inhibición de la síntesis de proteínas [Agrawals S., 2000].

Una vez más, la experiencia del inicio de mi carrera en la síntesis orgánica fue de gran valor en este tipo de experimentos, ya que el antisentido es simplemente un oligonucleótido sintético de tamaño variable, en promedio alrededor de 30 nucleótidos, que es modificado mediante el reemplazo del grupo O=P por S=P para extender su vida media intracelular (Figura 11).

Estos oligonucleótidos pueden ser agregados al medio de cultivo, y las células los internalizan o son introducidos en los tejidos *in vivo*. Una vez dentro de las células se aparean específicamente con el objetivo mRNA complementario. Esta hibridización obstruye físicamente el funcionamiento del ribosoma y/o activa la RNAasaH endógena, una enzima que degrada específicamente el mRNA en regiones doble hélice. La destrucción del mRNA y la obstrucción de la función del ribosoma resultan en la inhibición de la síntesis de la proteína codificada por el mRNA. En nuestro caso hemos visto que la interacción de la proteína TDP43 con la secuencia (GU)_m en el 3' *splice site* del exón 9 del CFTR pre-mRNA resulta en la exclusión de este exón y una mayor proporción de proteína CFTR no funcional, y por lo tanto, síntomas clínicos de CF. Al menos en células en cultivo, este problema puede ser resuelto con el sistema antisentido [Buratti E., 2001]. En la Figura 12A se indica el sitio de complementariedad en el CFTR mRNA de 4 oligonucleótidos fosfotiolatos antisentido que fueron usados en experimentos *in vitro* en células de derivación hepática transfectadas con el minigen CFTR que utilizamos para estudiar el *splicing* alternativo del exón 9 (Figura 6C). Después de 28 horas de tratamiento, las células fueron cosechadas, extraídos el mRNA y proteína y analizados, respectivamente, por RT-PCR (Figura 12B) y *western blot* (Figura 12C). Es evidente el aumento de CFTR mRNA exón 9+ que codifica por la proteína CFTR funcional (Figura 12B). El efecto del antisentido es confirmado por la disminución de la cantidad de

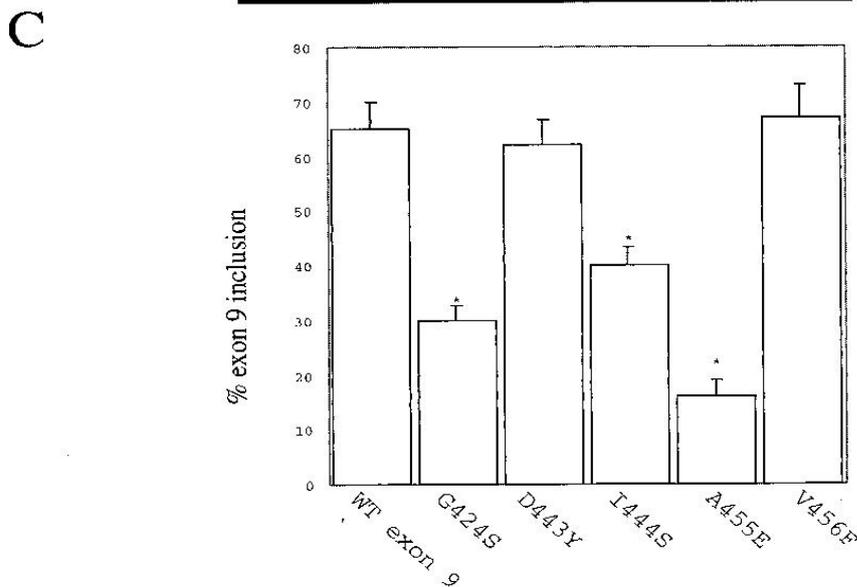
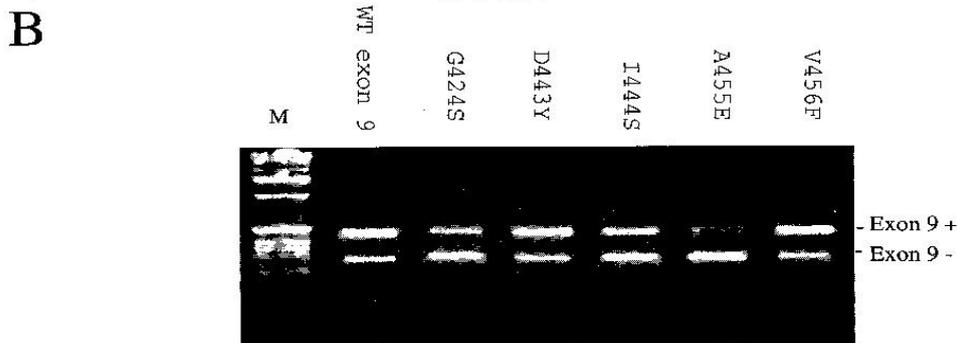
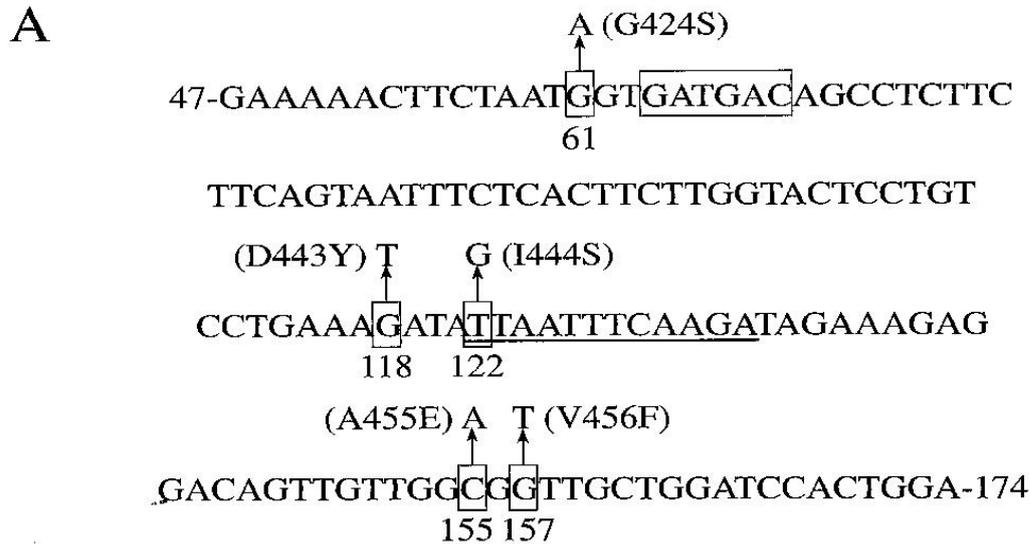


Fig. 10. A) Secuencia del ex3n 9 indicando mutaciones descriptas en individuos con fibrosis quística de características clínicas variables. B) Análisis *in vivo* del pre-mRNA *splicing*. Es evidente el efecto diferenciado de las mutaciones ex3nicas. En particular mientras que el minigen *wild type* produce 80-85% de mRNA ex3n 9+, el minigen portador de la mutación A455E, que se diferencia en una sola base, produce sólo 10% de mRNA ex3n 9+. C) Representación esquemática del porcentaje de ex3n 9+ CFTR mRNA estimado, cuantificando las bandas 9+ y 9- del gel en el panel B.

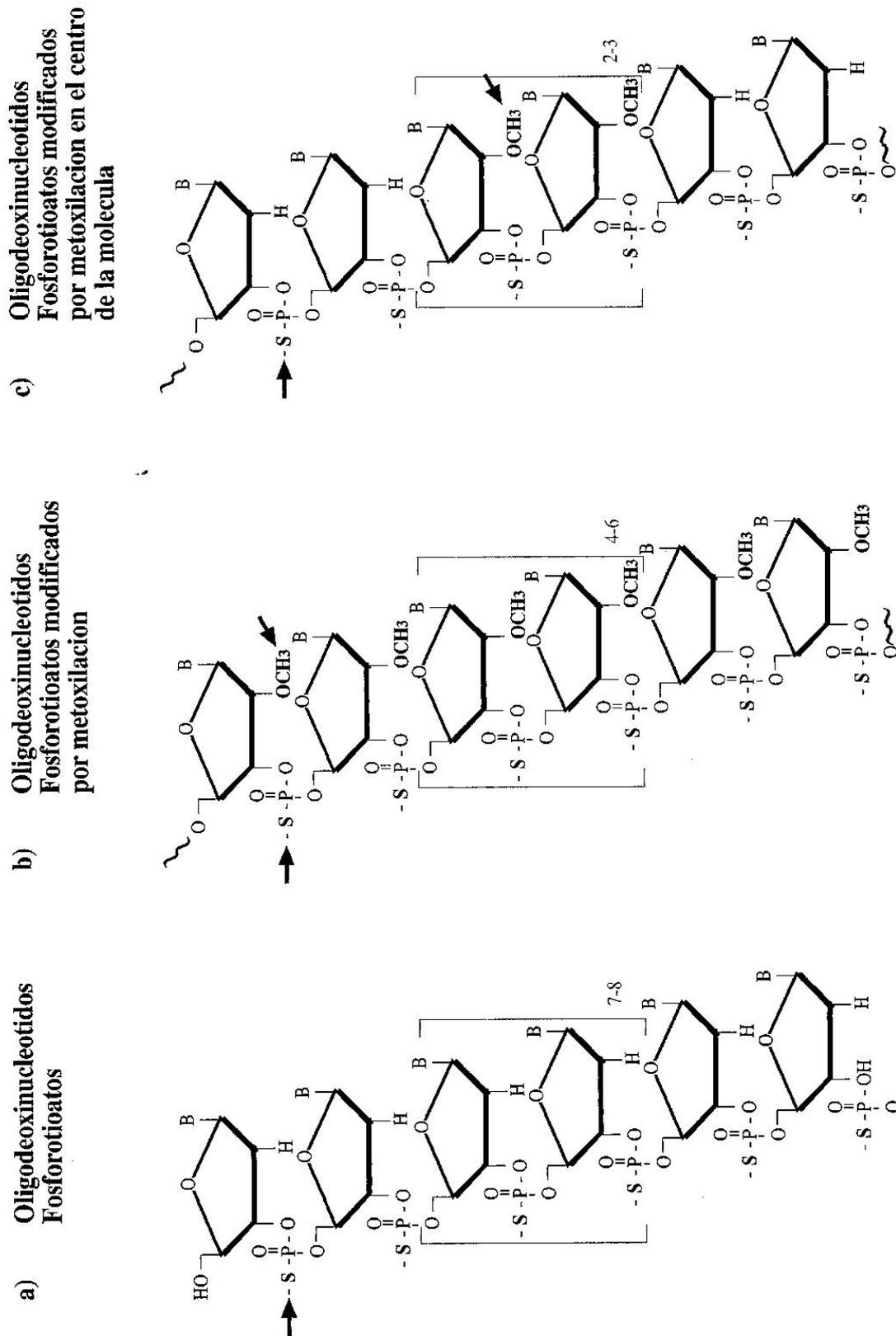
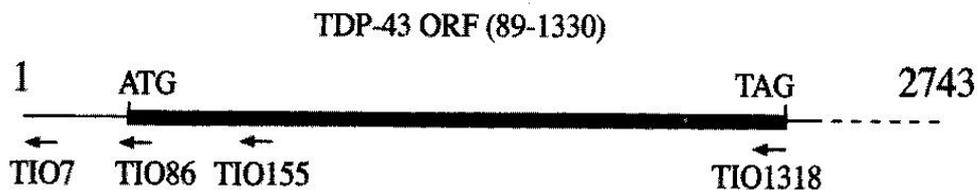
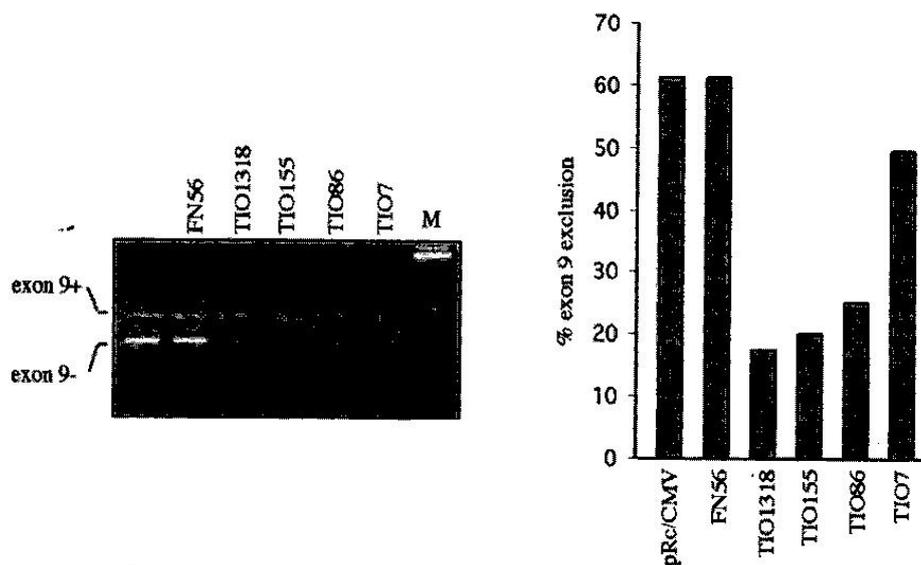


Fig. 11. Estructura de los oligodeoxinucleótidos fosforitoatos. Modificaciones químicas adicionales pueden ser introducidas como la metilación del anillo ribosa para aumentar la especificidad del antisense y su vida media intracelular.

A



B



C

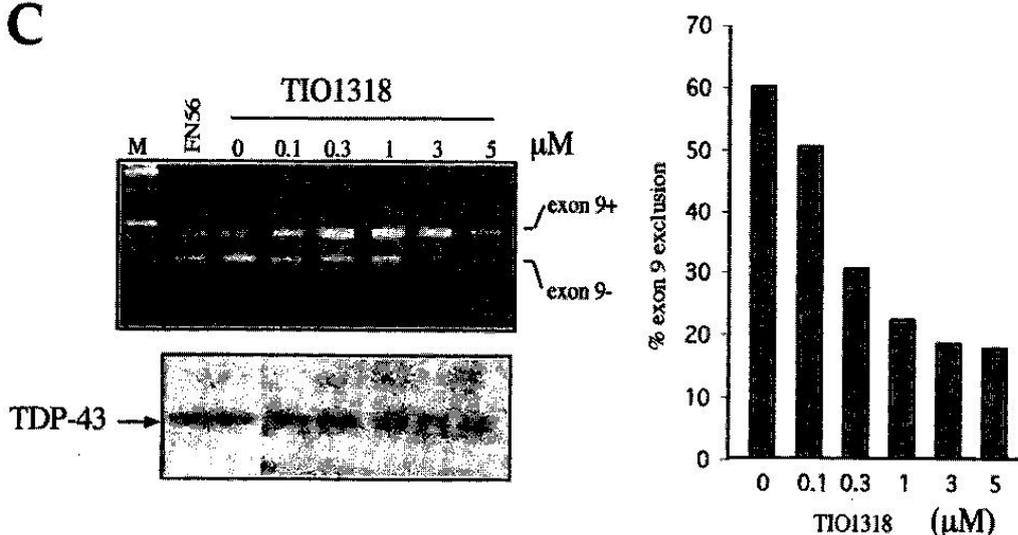


Fig. 12. Efecto de la inhibición de la síntesis de TDP43 en el *splicing* de CFTR exón 9. A) La posición de los 4 oligodeoxinucleótidos fosfotiolatos antisentido (TIO7, TIO86, TIO155 y TIO1318) usados en los experimentos, es indicada esquemáticamente por las flechas. B) Análisis RT-PCR del CFTR mRNA producido en las células tratadas con oligodeoxinucleótidos fosforotiolatos. Es evidente el aumento de CFTR mRNA exón 9+ cuando las células (Hep3B) son tratadas con TIO1318, TIO155 y TIO86. C) Efecto del dosaje de TIO1318 en la proporción de CFTR exón 9+ y la consecuente disminución de la cantidad de TDP43 estimada por *western blot*.

proteína TDP43 vista por *western blot*, que es paralela al aumento de CFTR mRNA 9+ (Figura 12C). Podemos decir que si encontráramos el modo de introducir el antisentido o una molécula orgánica con propiedades similares en los tejidos de un individuo con CF derivada del problema de *splicing* del exón 9 [Buratti E., 2001], tendríamos un tratamiento efectivo y específico para este tipo de fibrosis quística. Este último experimento nos lleva a completar el círculo donde la química, la biología molecular y la medicina se encuentran y nos indican un posible camino terapéutico para aliviar los efectos de una enfermedad hereditaria.

Quisiera terminar con una reflexión sobre el valor de la ciencia pura que en este período parece siempre más en peligro de perder apoyo a favor de proyectos de transferencia inmediata. Los experimentos descriptos precedentemente fueron iniciados porque nos interesaba el conocimiento de la estructura del mRNA y de los mecanismos de procesamiento del pre-mRNA. No obstante este inicio poco auspicioso, desde el punto de vista de su aplicabilidad inmediata, podemos sin duda decir que se ha contribuido a comprender el mecanismo patogénico de una enfermedad, a racionalizar el tratamiento y a proyectar nuevas herramientas farmacológicas para un tratamiento más eficiente. Este es un caso simple e inconcluso, pero si observamos la producción científica encontraremos abundantes ejemplos mucho más claros e importantes, que indican, sin lugar a duda, que el valor social de la ciencia no es principalmente su valor práctico. La investigación de base vale mucho más que su retorno económico hipotético directo. Su valor fundamental es la creación de una competencia técnica colectiva que permite adquirir y difundir innovación en el tejido social. En otras palabras, los contenidos específicos y los temas concretos de la investigación científica son de importancia secundaria. La práctica de la investigación científica de base garantiza a sus actores el mantenimiento de un alto nivel de calificación técnico-científica que, aunque dispar en las instituciones de enseñanza y formación, permiten finalmente el funcionamiento de un sistema industrial productivo, innovativo y en evo-

lución dinámica. La financiación nacional continua de la investigación científica es como la obtención de un boleto de entrada permanente al stock mundial de los conocimientos acumulados y no una inversión a corto plazo. Obviamente, hay que estimar correctamente el esfuerzo financiero que es razonable requerir a la comunidad en favor de la investigación científica de base.

Agradecimientos

Mi más profundo reconocimiento a mis maestros directos y a aquellos de los que he tratado de seguir el ejemplo: E. G. Gros, I. D. Algranati, M. J. Vernengo, H. N. Torres, L. F. Leloir, G. G. Brownlee, F. Sanger, y a todos mis amigos, colaboradores y personal de los institutos en los que he trabajado.

Referencias

- Agrawal S. and E.R. Kandimalla, "Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition?". *Mol. Med. Today* 6, 72-81 (2000).
- Baralle F.E. and E.G. Gros, "Biosynthesis of cuscohygrine in *Atropa belladonna* from sodium acetate-1-¹⁴C". *Phytochemistry* 8, 849 (1969).
- Baralle F.E. and E.G. Gros, "Biosynthesis of cuscohygrine in *Atropa belladonna* from sodium acetate-2-¹⁴C". *Phytochemistry* 8, 853 (1969).
- Baralle F.E. and E.G. Gros, "Biosynthesis of cuscohygrine and hyosciamine in *Atropa belladonna* from DL- α -methyl-³H-ornithine and DL-d-N-methyl-³H-ornithine". *J. Chem. Soc. (D)* 721 (1969).
- Baralle F.E., "Complete nucleotide sequence of the 5' non-coding region of rabbit B-globin mRNA". *Cell* 10, 549-558 (1977).
- Baralle F.E., "Structure-function relationship of 5' non-coding sequence of rabbit α - and B-globin mRNA". *Nature* 267, 279-281 (1977).
- Baralle F.E., "Complete nucleotide sequence of the 5' non-coding region of human α - and B-globin mRNA". *Cell* 12, 1085-1095 (1977).
- Baralle F.E. and G.G. Brownlee, "AUG is the only recognisable signal sequence in the 5' non-coding regions of eukaryotic mRNA". *Nature* 274, 84-87 (1978).
- Baralle F.E., C.C. Shoulders and N.J. Proudfoot,

- "The primary structure of the human ϵ -globin gene". *Cell* 21, 621-626 (1980).
- Buratti E., T. Dörk, E. Zuccato, F. Pagani, M. Romano and F.E. Baralle, "Nuclear Factor TDP-43 and SR proteins promote *in vitro* and *in vivo* CFTR exon 9 skipping". *EMBO J.*, in press (2001).
- Efstratiadis A., J.W. Posakony, T. Maniatis, R.M. Lawn, C. O'Connell, R.A. Spritz, J.K. Dieriel, B.G. Forget, S.M. Weissman, J.L. Slightom, A.E. Blechl, O. Smithies, F.E. Baralle, C.C. Shoulders and N.J. Proudfoot, "The structure and evolution of the human β -globin gene family". *Cell* 21, 653-668 (1980).
- Kerem B., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald and L.C. Tsui, "Identification of the Cystic Fibrosis gene: genetic analysis". *Science* 245: 1073-1080 (1989).
- Kornblihtt A.R., K. Vibe-Pedersen and F.E. Baralle, "Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3218-3222 (1983).
- Kornblihtt A.R., K. Vibe-Pedersen and F.E. Baralle, "Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain". *EMBO J.* 3, 221-226 (1984).
- Kornblihtt A.R., K. Vibe-Pedersen and F.E. Baralle, "Human fibronectin: cell specific alternative mRNA splicing generates polypeptide chains differing in the number of internal repeats". *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 (1984).
- Kornblihtt A.R., K. Umezawa, K. Vibe-Pedersen and F.E. Baralle, "Primary structure of human fibronectin: Differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene". *EMBO J.* 4, 1755-1759 (1985).
- Lawn R.M., A. Efstratiadis, C. O'Connell and T. Maniatis, "The nucleotide sequence of the human β -globin gene". *Cell* 21, 647-651 (1980).
- Niksic M., M. Romano, E. Buratti, F. Pagani and F.E. Baralle, "Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9". *Hum. Mol. Gen.* 8: 2339-2349 (1999).
- Pagani F., E. Buratti, C. Stuani, M. Romano, E. Zuccato, M. Niksic, L. Giglio, D. Faraguna and F.E. Baralle, "Splicing factors induce Cystic Fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element". *J. Biol. Chem.* 275: 2141-21047 (2000).
- Proudfoot N.J. and F.E. Baralle, "Molecular cloning of human ϵ -globin gene". *PNAS* 76: 5435-5439 (1979).
- Rees A., C.C. Shoulders, J. Stocks, D.J. Galton and F.E. Baralle, "DNA polymorphism adjacent to the human apoprotein AI gene: relationship to hypertriglyceridaemia". *Lancet* (1), 444-446 (1983).
- Riordan J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Cou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins and L.C. Tsui, "Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA". *Science* 245: 1066-1073 (1989).
- Rommens J.M., M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui and F.S. Collins, "Identification of the Cystic Fibrosis gene: chromosome walking and jumping". *Science* 245: 1059-1065 (1989).
- Rozmahel R., H.H. Heng, A.M. Duncan, X.M. Shi, J.M. Rommens and L.C. Tsui, "Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome". *Genomics* 45, 554-561 (1997).
- Slightom J.L., A.E. Blechl and O. Smithies, "Human fetal $\zeta\gamma$ - and $\psi\gamma$ -globin genes: complete nucleotide sequences suggested that DNA can be exchanged between these duplicated genes". *Cell* 21, 627-638 (1980).
- Spritz R.A., J.K. De Riel, B.G. Forget and S.M. Weissman, "Complete nucleotide sequence of the δ -globin gene". *Cell* 21, 639-646 (1980).
- Vibe-Pedersen K., A.R. Kornblihtt and F.E. Baralle, "Expression of a human α -globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing". *EMBO J.* 3, 2511-2516 (1984).

Manuscrito recibido y aceptado en abril de 2001.

II

ENTREGA DE LOS PREMIOS "ACADEMIA NACIONAL DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES" y "ERNESTO E. GALLONI"

- AÑO 1999 -

Premio "MANUEL BALANZAT" en Matemática
al DR. JORGE E. SOLOMÍN

Premio "WOLFGANG MECKBACH" en Física Experimental
al DR. OSCAR E. MARTÍNEZ

Premio "JUAN MANUEL BARCALA" en Ingeniería Electrónica
al ING. ANTONIO A. QUIJANO

Premio "ORESTE MORETTO" en Ingeniería Geotécnica
al ING. JORGE A. SUÁREZ

Premio "RANWEL CAPUTTO" en Neuroquímica
al DR. ALEJANDRO F. DE NICOLA

Premio "VENANCIO DEULOFEU" en Química de Productos Naturales
al DR. OSCAR S. GIORDANO

Premio "HORACIO J. HARRINGTON" en Geología Estructural
al DR. EDUARDO A. ROSSELLO

Premio "ERNESTO E. GALLONI"
-instituido por la Sra. Nélida Pedretti de Galloni e hijos-
en Ingeniería Nuclear
al DR. DARÍO F. DELMASTRO

APERTURA DEL ACTO DE ENTREGA DE PREMIOS

Eduardo G. Gros

Presidente de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
hasta su fallecimiento, el 12 de junio de 2001.

La presente es la séptima oportunidad en que nuestra entrega de premios, uno de los actos anuales más importantes que realizamos, se lleva a cabo en este magnífico auditorio amablemente cedido por la Academia Nacional de Medicina, a la que deseo expresar mi profundo agradecimiento por su generosidad.

Nuestra Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales fue creada en 1874 por un decreto de Mariano Acosta, quien era gobernador de la provincia de Buenos Aires. Mediante ese decreto del 26 marzo 1874 se establecía la reglamentación de la Instrucción Secundaria y Superior por la cual se determinaba la constitución y el funcionamiento de los cuerpos que formarían la Universidad de Buenos Aires, siendo la Academia parte de ella.

Años más tarde, en 1926, por decreto del presidente de la Nación Marcelo T. de Alvear, la Academia se separó de la Universidad, adquiriendo autonomía como institución civil con sus propios estatutos y reglamentos.

Por la ley 14007/50 y su reglamentación por el decreto 7500/52, esta Academia, como todas las existentes en aquellos momentos, dejó prácticamente de funcionar, ya que una de las reglamentaciones limitaba a 60 años la edad que debían tener los académicos.

Por esa razón, esta Academia quedó con sólo 9 miembros, impidiéndole funcionar.

Su actividad fue retomada posteriormente a la emisión del decreto 4362/55, que restableció su autonomía.

La nuestra, tal como las restantes academias nacionales, tiene como finalidad el estudio y profundización de las ciencias para contribuir a su adelanto y perfeccionamiento con miras al bien común. Para ese propósito debe congregarse a personas conspicuas y representativas en el cultivo de las ciencias, con la finalidad de intensificar el estudio o el ejercicio de las mismas; promover el progreso de sus diferentes disciplinas; estimular la plenitud de las vocaciones intelectuales; difundir el fruto de sus trabajos; y enaltecer, en el país y en el extranjero, el prestigio de la cultura nacional.

Es evidente que para cumplir con muchos de esos propósitos es necesario contar con los recursos apropiados. Este hecho no siempre fue plenamente satisfecho, de tal manera que en ciertas etapas de su existencia la Academia tuvo un desarrollo muy modesto, haciendo imposible, en términos generales, llevar a la práctica diversos programas iniciados en los deseos y aspiraciones de sus miembros.

Es fácil comprender entonces que los esfuerzos de los miembros de la Academia para cumplir con algunos de los mandatos que le fueron encomendados, resultaron infructuosos por no contar con los medios materiales

Acto realizado el 12 de noviembre de 1999.

para llevarlos a cabo.

Sin embargo, varios de los propósitos que justifican su existencia han podido cumplimentarse, como contribuir, con modestia, al funcionamiento del internacionalmente renombrado Instituto de Botánica Darwinion; mantener nuestra propia Biblioteca; y editar publicaciones periódicas, como los "Anales", las "Monografías" y los boletines "Noticias", además de contar con nuestra propia página en la red internacional accesible por Internet.

Por otro lado, si recordamos que uno de nuestros deberes es estimular la plenitud de las vocaciones intelectuales y difundir el fruto de sus trabajos para enaltecer el prestigio de la cultura nacional, estamos ahora cumpliendo parte de ese mandato, ya que el acto de premiar tareas científicas significa otorgar el reconocimiento que merecen aquellos que, inadvertidamente para la mayoría de nuestra sociedad, empeñan su esfuerzo en el desarrollo de las ciencias y consecuentemente enaltecen el prestigio de nuestra cultura.

En esta acción de reconocer las labores de nuestros hombres y mujeres de ciencia, nuestra Academia tiene un antiguo historial: desde hace décadas instituyó y otorgó premios a destacados cultores de las ciencias que nos competen.

En 1927, el Consejo Deliberante de Buenos Aires instituyó el premio "Eduardo L. Holmberg" y encomendó a nuestra Academia su organización y discernimiento. Holmberg fue un naturalista de excelencia, fundador y director del Jardín Zoológico de Buenos Aires y miembro de esta corporación durante 47 años, desde 1890 hasta 1937.

En 1956 se estableció el premio "Cristóbal M. Hicken" en homenaje a otro distinguido botánico y fundador del ya mencionado Instituto de Botánica Darwinion, cedido por él a esta Academia en 1936.

En 1966 se crearon los premios "Angel Gallardo" y "Enrique Herrero Ducloux", en 1968 el premio "Teófilo Isnardi", en 1972 el premio "Enrique P. Villarreal" y en 1982 el último premio de este tipo, denominado "Alberto González Domínguez".

Y digo el último premio de este tipo, porque a partir de 1992 la Academia estable-

ció otra norma para sus premios. Se programó y adoptó que cada una de las tres Secciones que la forman -Matemática, Física y Astronomía; Ingeniería; y Ciencias Químicas, de la Tierra y Biológicas- puedan proponer hasta tres distinciones con la denominación y la orientación definida anualmente por cada una de ellas.

Como norma general se adoptó que esos premios, que llevan el nombre genérico de "Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales", conlleven, año a año, el nombre de algún académico, científico o tecnólogo de reconocido prestigio, físicamente desaparecido.

En la presente ocasión el premio en Matemática se denomina "Manuel Balanzat", en homenaje a quien fuera miembro titular de la Academia durante el período 1980 a 1994. Balanzat fue un destacado matemático y un hombre ejemplar con una vida austera consagrada al servicio de la ciencia y la sociedad.

El premio en Física Experimental tiene el nombre de "Wolfgang Meckbach", recordando a quien fuera académico correspondiente nacional entre 1982 y 1998. Conjuntamente con Balseiro y otros destacados científicos, Meckbach participó en la creación de un instituto de investigación y enseñanza en Bariloche. Tenía las dotes del maestro que es capaz de generar vocaciones y demostró su capacidad para adaptarse a los cambios generacionales.

El premio en Ingeniería Electrónica de denomina "Juan Manuel Barcala", recordando al brillante ingeniero mecánico electricista y a sus valiosos aportes a la investigación y al desarrollo tecnológico. Fue profesor emérito de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata y miembro de la Academia de Ingeniería de la Provincia de Buenos Aires.

El premio en Ingeniería Geotécnica lleva el nombre de "Oreste Moretto", por quien fuera miembro de esta Academia desde 1967 hasta 1997 y su presidente entre 1988 y 1992. El Dr. Ing. Moretto supo desarrollar conocimientos de vanguardia en tres disciplinas muy importantes dentro de la ingeniería: la mecánica de suelos, la ingeniería de fundaciones y

las teorías y aplicaciones del hormigón armado.

El premio en Neuroquímica se denomina "Ranwel Caputto" en honor del distinguido bioquímico que fuera académico correspondiente en Córdoba desde 1971 a 1994. Fue uno de los más íntimos colaboradores de Luis Federico Leloir en sus primeros años. Establecido en esa ciudad, se destacó por sus contribuciones a la química biológica, la biofísica, la genética molecular y la biotecnología.

El premio en Química de Productos Naturales recibe el nombre de "Venancio Deulofeu". El Dr. Deulofeu fue miembro titular de nuestra Academia entre 1946 y 1984, y presidente de la misma entre 1972 y 1976. Es considerado como uno de los pioneros en nuestro medio en realizar investigaciones en química orgánica y, en particular, en estudiar metabolitos secundarios presentes en vegetales del país. Sus resultados trascendieron nuestras fronteras.

El premio en Geología Estructural recibe el nombre de "Horacio J. Harrington" en homenaje a quien fuera miembro titular de esta corporación entre 1950 y 1973. Incursionó en casi todos los campos de la geología, evidenciando una profundidad y erudición poco común. En paleontología fue sin dudas una autoridad mundial.

En esta oportunidad, y como lo venimos haciendo desde 1994, se entregará además el premio "Ernesto E. Galloni", homenajeando a quien fuera miembro titular durante 37 años y presidente entre 1968 y 1972. Su labor docente, de investigación, de organización y divulgador de la ciencia, le brindó en su momento un destacadísimo lugar en el quehacer académico-universitario nacional. Este año el tema elegido para el premio fue la Ingeniería Nuclear, y deseo aclarar que el premio consiste en un diploma y la suma de u\$s 1.000 sobre la base de una donación de la Sra. Nélida Pedretti de Galloni e hijos, realizada para ese propósito y destinada a investigadores de hasta 35 años de edad.

Por otro lado, nos sentimos muy complacidos en informar que por primera vez haremos entrega de certificados de becas para estudiantes de la Universidad de Buenos Aires en Matemática y en Ciencias Biológicas.

Dichas becas reciben el nombre genérico de "In libris carpe rosam" y los fondos para las mismas provienen de la donación de Marcelo G. y Paulo D. Barroso Mastronardi. Como mencioné, las becas serán en Matemática y en Ciencias Biológicas y son asignadas a los mejores estudiantes en esas especialidades, menores de 22 años al momento de iniciarla. Se otorgan por períodos no menores de 1 año y con una retribución anual de \$ 7.200.

Esperamos poder continuar en esta senda brindando mayores posibilidades para que jóvenes virtuosos puedan dedicarse exclusivamente a sus estudios.

En este momento deseo agradecer la labor de los jurados constituidos para discernir cada uno de los premios como las becas que acabo de indicar. Para todos ellos nuestro agradecimiento por la desinteresada tarea que avala el prestigio de estos resultados presentados.

Todos sabemos que la inteligencia, para ser fecunda, necesita moverse con libertad dentro del orden que ella misma crea y sustenta; necesita del diálogo; necesita de la comunicación para dar testimonio de su contribución al desarrollo de las ciencias en general. Pero sólo con esta libertad no basta. Ella es una condición necesaria pero no suficiente. Es imprescindible tener los medios necesarios para desarrollar las ideas que puedan surgir en el ambiente de libertad.

Un investigador debe tener además una profunda vocación para sobrellevar los inconvenientes que la falta de apoyo puede ocasionar. Eso lo sabemos por haberlo vivido durante décadas de actividad en este quehacer.

Hacer investigación científica en nuestro medio es, por lo común, una tarea difícil, y no lo es sólo por los inconvenientes propios de abrir caminos vírgenes o recorrer otros poco explorados. Esos inconvenientes son propios de toda actividad de investigación científica y comunes en todas las latitudes del globo. Sin embargo, en ciertos países, las posibilidades de poder trabajar desahogadamente se ven facilitadas por las condiciones económicas que los rodean.

A ese respecto, en nuestro medio siempre han habido inconvenientes -de regular a

marcada importancia-, pero estamos observando que en estos últimos años los mismos tienden a mejorar gracias a la acción de entidades públicas, que entendiendo el problema, están haciendo grandes esfuerzos para paliarlos. Esperemos que ese accionar siga progresando, independientemente del organismo responsable que actúe.

Al margen de esos problemas, nuestros premiados de hoy, y afortunadamente muchos otros investigadores, trabajaron y trabajan arduamente y continuarán haciendo ciencia para constituirse en modelos de los jóvenes que siguen sus pasos.

Para todos ellos, mis calurosas felicitaciones.